

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE TRÊS ESPÉCIES DE
ANIBA (LAURACEAE)

Bolsista: Yasmin Cunha da Silva, CNPq

MANAUS

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO À PESQUISA
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

RELATÓRIO FINAL

PIB - E - 0071/2013

FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE TRÊS ESPÉCIES DE
ANIBA (LAURACEAE)

Bolsista: Yasmin Cunha da Silva, CNPq.

Orientador: Prof Dr Valdir Florêncio da Veiga Júnior

MANAUS

2014

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao grupo de pesquisa Q-BiomA e a seus autores. Parte desse relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos

Esta pesquisa, financiada pelo Conselho Nacional de Pesquisa - CNPq, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, foi desenvolvida pelo grupo de pesquisa Q-BiomA e se caracteriza como subprojeto do projeto de pesquisa Estudos Fitoquímicos de Fabaceae, Lauraceae e Burseraceae

RESUMO

A família botânica Lauraceae destaca-se por ter uma rica composição química de substâncias bioativas. Esta família apresenta uma distribuição pantropical, possuindo um total de 50 gêneros e 2500 espécies, sendo que no Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros. As espécies do gênero *Aniba* caracterizam-se por serem grandes fornecedoras de óleos voláteis, utilizados na indústria farmacêutica de perfumes, sendo este um gênero muito abundante na região Amazônica. Algumas atividades importantes já foram descritas para esse gênero, como, por exemplo, atividade anticâncer, antimicrobiana e antidepressiva. Neste contexto, considerando que o gênero *Aniba* é um dos mais comuns da família Lauraceae e que possui espécies sem relatos da composição química e nem de atividades biológicas, propõe-se o estudo fitoquímico de três espécies de *Aniba* e a avaliação das atividades biológicas de extratos das folhas, galhos e óleos essenciais. Para atingir tais objetivos, foi realizada inicialmente a análise cromatográfica de todos os extratos e frações, por cromatografia em camada delgada (CCD), seguida de uma análise qualitativa de fenólicos, flavonoides, alcaloides e da atividade antioxidante usando o radical estável 2,2-defenil-1-picrilhidrazila (DPPH•). A partir desses resultados selecionou-se os extratos para os ensaios quantitativos. Nos ensaios quantitativos da atividade antioxidante frente aos radicais de DPPH e ABTS, obteve-se o melhor resultado de CE_{50} para extrato proveniente dos galhos de *A. ferrea*, com valores de $CE_{50} = 12,18 \mu\text{g/mL}$ e $CE_{50} = 14,14 \mu\text{g/mL}$ respectivamente, sendo obtido também a maior porcentagem de fenóis para esta espécie (37,02%). Nos ensaios enzimáticos, para inibição da enzima tirosinase não apresentaram extratos ativos, porém para o ensaio de inibição da enzima lipase, obteve-se porcentagem de aproximadamente 94% de inibição para extrato das folhas de *A. parviflora*. A partir de análises dos perfis espectrométricos das frações alcaloídicas, observou-se na maioria das frações a presença de massas que correspondem a reticulina e N-metilcoclaurina, substâncias já isoladas no gênero *Aniba*. Para as frações flavonoídicas, não foram identificados flavonoides com massas semelhantes aos já isolados no gênero. O fracionamento em coluna cromatográfica (CC) do extrato dos galhos de *A. panurensis* resultou na obtenção de dois alcaloides, que estão em processo de elucidação estrutural. Já o fracionamento dos galhos de *A. ferrea* obteve-se duas frações puras, com massas correspondentes à isoboldina e a reticulina, alcaloides já isolados em *Aniba*. Estudos posteriores utilizando ressonância magnética nuclear serão realizados para a confirmação destas moléculas. No estudo dos óleos essenciais foram obtidos os rendimentos

mais altos para as folhas, tendo valores acima de 0,06% e para os galhos foram observados rendimentos menores.

Palavras-chave: *Aniba*; alcaloides; atividades biológicas

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	07
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	08
3.	METODOLOGIA.....	10
3.1	Análise da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH.....	10
3.2	Análise da atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS.....	10
3.3	Teste quantitativo de Fenóis Totais.....	10
3.4	Teste quantitativo de Flavonoides Totais.....	10
3.5	Atividade antimicrobiana.....	10
3.6	Atividade de inibição da enzima lipase.....	10
3.7	Atividade de inibição da enzima tirosinase.....	10
3.8	Ensaio de citotoxicidade.....	10
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	11
4.1	Ensaio químico / biológico com os extratos.....	11
4.2	Perfil espectrométrico.....	12
4.3	Fracionamento e isolamento <i>Aniba panurensis</i> (galhos).....	14
4.4	Fracionamento e isolamento <i>Aniba ferrea</i> (galhos).....	15
4.5	Óleos essenciais.....	15
5.	CONCLUSÃO.....	16

6.	REFERÊNCIAS	
	BIBLIOGRÁFICAS.....	17
7.	CRONOGRAMA DE ATIVIDADES.....	25

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se mundialmente por apresentar uma imensa biodiversidade, que ainda não foi estudada. Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são considerados fontes com potencial para a descoberta substâncias ativas de interesse farmacológico (Barreiro *et al.*, 2009; Braz-Filho, 2010; Pinto *et al.*, 2002). Dentre essa riqueza, temos a família botânica Lauraceae, que apresenta relatos de uma rica composição química de substâncias bioativas.

A família botânica Lauraceae apresenta uma distribuição pantropical, possuindo um total de 50 gêneros e 2500 espécies, onde 29 gêneros e 900 espécies estão localizados nas Américas e no Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros. A família é frequente em florestas tropicais, mas a grande diversidade ocorre em terras baixas da Amazônia e da América Central (Barroso *et al.*, 2002; Rohwer, 1993).

Lauraceae caracteriza-se quimicamente por apresentar terpenos, flavonoides, lignoides, alcaloides e pironas em sua composição (Barbosa Filho *et al.* 1999; Giang *et al.* 2006; Garcez *et al.* 2005; Garcez *et al.* 1995; Garcez *et al.* 2011; Gottlieb & Yoshida, 1978). As espécies do gênero *Aniba* caracterizam-se por serem grandes fornecedoras de óleos voláteis, utilizados nas indústrias farmacêuticas de perfumes, como o obtido a partir de *Aniba rosaeodora*, que tem como constituinte majoritário o álcool terpênico linalol, amplamente utilizado em fragrâncias de perfumes (Rizzini & Mors, 1995; Marques, 2001; Fidelis *et al.*, 2012).

Algumas atividades importantes já foram descritas para esse gênero, demonstrando o potencial para atividade anticâncer dos óleos de *A. roseadora* (Soeur *et al.*, 2010), atividade antimicrobiana e antidepressiva para alcaloides de *A. riparia* (Barbosa *et al.*, 1988; Teixeira *et al.*, 2011), atividade contra o câncer de ovário de um alcaloide isolado de *A. panurensis* (Zhang *et al.*, 2012), entre outras.

Neste contexto, considerando que o gênero *Aniba* é um das mais comuns da família Lauraceae, que apresenta grande endemismo na periferia de Manaus e que possui espécies sem relatos da composição química e nem de atividades biológicas, propõe-se o estudo fitoquímico de três espécies de *Aniba*, quanto a composição dos óleos essenciais, perfis alcaloídicos e fenólicos, como também avaliação das bioatividades dos extratos e frações, em ensaios de citotoxicidade a linhagens tumorais, atividade antimicrobiana e atividade antioxidante.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

A família botânica Lauraceae é considerada uma das mais representativas, tanto em número de indivíduos quanto em riqueza de táxons, relatadas nos inventários florísticos e fitossociológicos (Vattimo-Gil, 1959). Esta família destaca-se por apresentar um grande número de espécies economicamente importantes, apresentando diversificados usos, como por exemplo, na culinária, em marcenaria, na construção civil, na fabrica de papel, na indústria de perfumaria, na indústria química e na medicina popular (Marques, 2001).

O gênero *Aniba* foi estabelecido por Aublet (1775), a partir de *A. guianensis*. Esse gênero possui cerca de 41 espécies com distribuição restrita aos neotrópicos e predominância no território brasileiro. No Brasil é possível encontrar cerca de 40 espécies, sendo abundante em toda a região amazônica e muitas de suas espécies são utilizadas nas indústrias madeireiras (Richter, 1981).

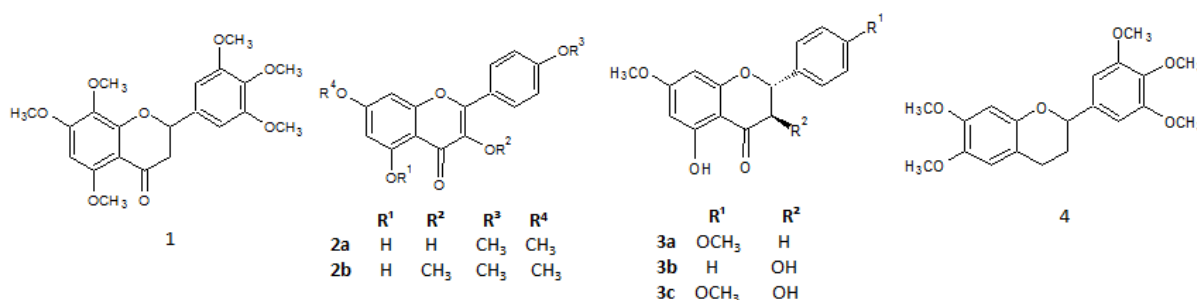
Segundo relatos da literatura, as espécies do gênero *Aniba* apresentam atividades farmacológicas, tais como o efeito sedativo de *A. rosaeodora* (Almeida *et al.*, 2009), atividade contra nematóides observada em *A. canelilla*, *A. duckei* e *A. hastmanniana* (Goulart, *et al.*, 1975), efeito ansiolítico em *A. riparia* (Melo *et al.*, 2006), antiespasmódico de *A. canelilla* (Maia *et al.*, 2003), larvicida de *A. duckei* (Souza *et al.*, 2007), antimicrobiano de *A. riparia* (Barbosa *et al.*, 1988) e atividade antifúngica de *A. rosaeodora* (Simic *et al.*, 2004).

Diversos constituintes químicos podem ser encontrados nas espécies pertencentes ao gênero *Aniba* como: alcaloides, flavonoides, pironas, lignanas, monoterpenos e sesquiterpenos

(Oger *et al.*, 1992; Adrianaivoravelona *et al.*, 1999; Cavalcante *et al.*, 1982; Sampaio *et al.*, 2012; Fidelis *et al.*, 2012).

Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários, apresentando uma estrutura compostas por 15 átomos de carbono, reunidos em um núcleo tricíclico, ou seja, consistem de um esqueleto de difenil propano, com dois anéis benzênicos ligados a um anel pirânico. Podem ser classificados em antocianidinas, flavanóis, flavonona, flavonas, flavonóis e isoflavonas (Ahlenstiel, 2003; Rice-Evans *et al.*, 1996).

No gênero, já foram relatados alguns flavonoides que podem ser visto na **figura 1**, como: as flavonas 5,7,8,3',4',5'-hexametoxiflavona (**1**), 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**2a**), 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (**2b**), 2,3-dihidroxi-5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**3a**), 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona (**3b**), 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (**3c**) e

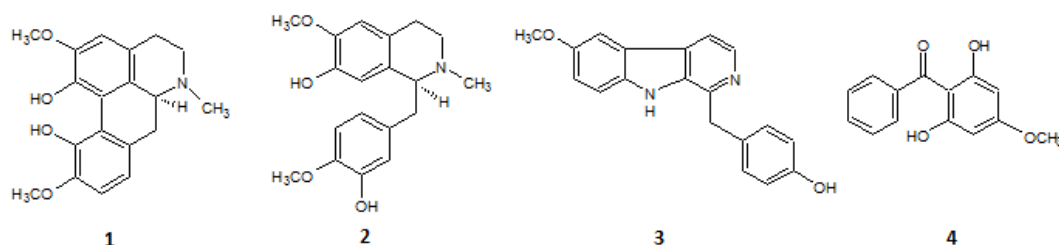


uma flavana 6,7,3',4',5'-pentametoxiflavona (**4**) (Cavalcante *et al.*, 1982; Rossi *et al.*, 1996).

Figura 1 - Flavonoides isolados no gênero *Aniba*.

Os alcaloides são compostos nitrogenados que apresentam em sua estrutura, além de carbono e hidrogênio, usualmente também oxigênio. Sua basicidade é típica, no entanto, muito variável, pois depende dos grupos ligados ao nitrogênio. Os alcaloides podem ser classificados de acordo com sua origem biossintética, ou seja, de acordo com a estrutura que contém nitrogênio em pirrolidínico, piperidínico, quinolínico, indólico, entre outros. (Dewick, 2002; Henriques *et al.*, 2004).

No gênero *Aniba* há relatos de alcaloides isolados, alguns deles são: anibamina (Hiranthi *et al.*, 2004) isolado de *Aniba* sp; isoboldina (**1**), reticulina (**2**) e N-metilcoclaurina de *A. muca* (Bravo *et al.*, 1996); cecilim (**3**) de *A. santalodora* (Aguiar, 1980); ducleim (**4**) de *A. duckei*; 6,



8-dideca-(1Z)-enil-5,7-dimetil-2,3-diidro-1H-indolizinium de *A. panurensis* (Klausmeyer, 2004). Algumas estruturas podem ser observadas na **figura 2**.

Figura 2- Alcaloides isolados no gênero *Aniba*

As espécies de *Aniba* destacam-se entre as outras espécies da família Lauraceae por serem fornecedoras de óleos essenciais, que são muito usados nas indústrias químicas. Diversos estudos descrevem a composição dos óleos de *Aniba*, demonstrando a predominância de monoterpenos e sesquiterpenos, como: o linalol em *A. roseadora* e *A. duckei*, α -pineno *A. burchelli* e *A. parviflora*. Relatando a presença de fenilpropanóides como: safrol em *Aniba sp.* (Gottlieb *et al.*, 1965).

3. MÉTODOS UTILIZADOS

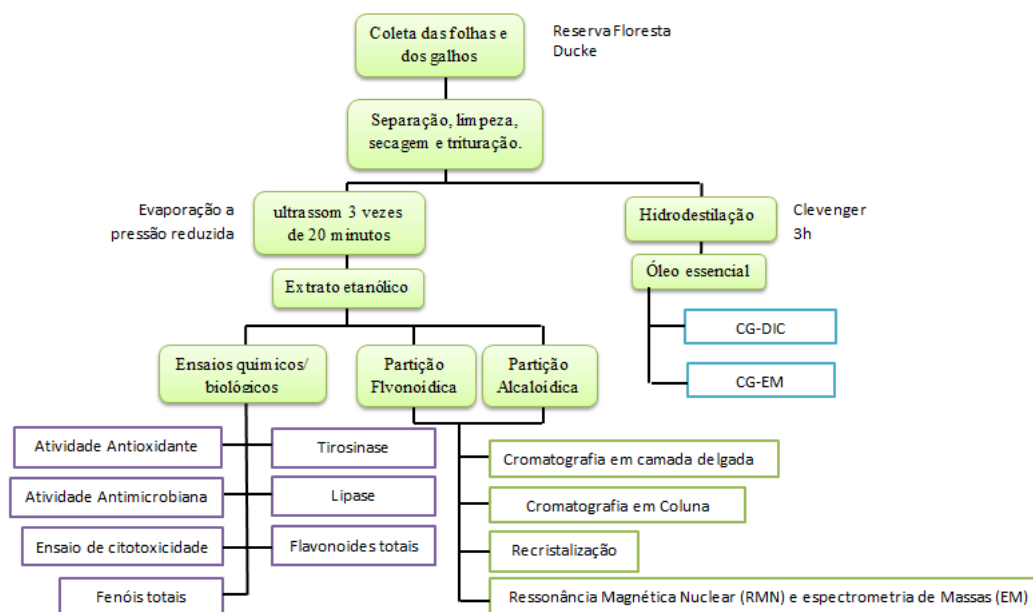


Figura 3 – Esquema geral da metodologia do projeto

3.1 Análise da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH

Análise qualitativa foi realizada segundo a metodologia de Montenegro *et al.*(2006) e a análise quantitativa foi realizada segundo a metodologia de Mensor *et al.* (2001).

3.2 Análise da atividade antioxidante frente ao radical livre ABTS.+

A análise quantitativa foi realizada segundo a metodologia de Re *et al.* (1999).

3.3 Teste quantitativo de Fenóis Totais

O teste foi realizado segundo a metodologia de Singleton *et al.* (1999).

3.4 Teste quantitativo de Flavonoides Totais

O teste foi realizado segundo a metodologia de Chang *et al.* (2002).

3.5 Atividade antimicrobiana

A análise foi realizada na FIOCRUZ-AM, utilizando a metodologia de Pieri *et al.* (2012).

3.6 Atividade de inibição da enzima lipase

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Pereira *et al.* (2011).

3.7 Atividade de inibição da enzima tirosinase

Espécie	Rendimento das folhas (%)	Rendimento dos galhos (%)
<i>Aniba panurensis</i>	6,58	1,42
<i>Aniba ferrea</i>	2,13	2,97
<i>Aniba parviflora</i>	2,60	2,75

O ensaio foi realizado segundo a metodologia de Hearing (1987).

3.8 Ensaios de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados na Faculdade de Farmácia da UFAM, sob acompanhamento do Dr. Emerson Lima.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, selecionou-se as espécies que seriam estudadas a partir dos resultados de estudos anteriores do laboratório. Posteriormente, realizou-se a coleta na Reserva Florestal Ducke, coletando galhos e folhas de *Aniba panurensis*, *A. ferrea* e *A. parviflora*. Após o preparo das amostras obteve-se os extratos por sonicação. Os rendimentos dos extratos podem ser observados na **tabela 1**. A partir desses dados observou-se o melhor rendimento para as folhas *A. panurensis*.

Tabela 1 – Rendimento dos extratos das espécies de *Aniba*

A espécie *A. guianensis* também foi estudada, pois tinha extrato de folhas e galhos já preparado pela mesma metodologia, resultante de outro projeto do grupo de pesquisa Q-biomA.

4.1 Ensaios químicos / biológicos com os extratos

Após a preparação dos extratos e a obtenção das frações flavonoídicas e alcaloídicas, observou-se rendimentos altos, de no mínimo 30% para as frações flavonoídicas. As frações alcaloidicas tiveram rendimentos de aproximadamente 1%, considerados muito inferiores.

Foram feitas análises qualitativas de fenóis, flavonoides, alcaloides e da atividade antioxidante, obtendo resultados positivos nas quatro análises. Posteriormente, fez-se a quantificação para os extratos com resultados positivos nos ensaios preliminares.

Nos ensaios quantitativos de fenóis totais, flavonoides totais e de atividade antioxidante frente aos radicais DPPH e ABTS, obteve-se os resultados que estão expressos na **tabela 2**. O melhor resultado dos ensaios de antioxidante DPPH e ABTS foi para o extrato de *A. ferrea* dos galhos, tendo também a maior porcentagem de fenólicos de aproximadamente 40%. O segundo melhor resultado para os mesmos testes foi obtido de *A. parviflora* dos galhos.

Esses resultados positivos para os extratos etanólicos de *A. ferrea* e *A. parviflora*, podem estar relacionada à presença de uma maior porcentagem de fenóis. Essas substâncias apresentam como características a capacidade de neutralizar radicais livres que podem ser evidenciadas a partir dos ensaios de atividade antioxidante.

Tabela 2 – Resultados das análises qualitativas de DPPH, quantitativa de fenóis totais e da atividade antioxidante de DPPH e ABTS.

Extrato		DPPH qualitativo	DDPH ($\mu\text{g/mL} \pm \text{dp}$)	ABTS ($\mu\text{g/mL} \pm \text{dp}$)	Fenóis (% \pm dp)
<i>Aniba panurensis</i>	Folhas	+	68,47 \pm 0,82	43,62 \pm 0,62	10,22 \pm 0,41
	Galhos	+	62,87 \pm 2,84	11,05 \pm 0,63	20,48 \pm 1,91
	Flores	+	41,75 \pm 0,71	36,23 \pm 4,99	12,35 \pm 1,36
<i>Aniba guianensis</i>	Folhas	+	-	61,38 \pm 2,61	9,65 \pm 0,41
	Galhos	+	20,56 \pm 2,25	17,07 \pm 0,90	23,95 \pm 0,43
<i>Aniba ferrea</i>	Folhas	+	24,97 \pm 7,62	53,67 \pm 4,73	28,81 \pm 1,88
	Galhos	+	12,18 \pm 0,64	14,14 \pm 2,00	37,02 \pm 2,12
<i>Aniba parviflora</i>	Folhas	+	89,48 \pm 1,32	52,45 \pm 0,48	9,29 \pm 0,80
	Galhos	+	14,09 \pm 0,14	39,00 \pm 1,41	29,38 \pm 1,54
Padrão		+	6,66 \pm 0,14	8,95 \pm 0,07	100
		Quercetina	Quercetina	Ácido gálico	Ácido gálico

A enzima tirosinase é a responsável pela síntese da melanina e no sistema nervoso participa da síntese de dopamina, sendo implicada em doenças neurodegenerativas como Parkinson. Hoje, as indústrias farmacêuticas visam compostos que inibam essa enzima (Shimizu *et al*, 2003; Karioti *et al*, 2007). No ensaio enzimático de inibição da atividade da enzima tirosinase com os extratos brutos não foram obtidos resultados positivos.

No ensaio com a enzima lipase, que visa promover novas possibilidades de tratamento de doenças como obesidade e diabetes, ocorrendo à inibição da enzima há redução na taxa glicêmica por não haver a absorção de glicose (Pereira *et al*, 2011). Nesse ensaio, o extrato das folhas de *A. parviflora* apresentou inibição de 93,89% ± 4,96, valor considerado alto em comparação com o padrão xenical (orlistat) que é 100%. Os ensaios de atividade antimicrobiana e citotoxicidade com os extratos e frações das espécies estão em análise.

4.2 Perfil espectrométrico

Após a realização das partições para obtenção de frações ricas em alcaloides, analisou-se o perfil cromatográfico, confirmando composição rica em compostos nitrogenados e posteriormente para análise do perfil químico, fez-se espectrometria de massas. Com este perfil e em comparação com dados da literatura, foi possível identificar massas correspondentes às substâncias que estão descritas na **tabela 3**.

A partir dos dados de massas, observou-se que os picos m/z 330 e m/z 300 estão presentes na maioria das frações analisadas. Os alcaloides relatados na tabela, já foram isolados em outras espécies do gênero *Aniba*, como: a reticulina e a N-metilcoclaurina em *A. muca* (Bravo *et al.*;1996). O alcaloide coclaurina foi isolado em *Ocotea duckei* e a papraline em *Cryptocarya rugulosa* (Custódio & Veiga Jr., 2014).

Tabela 3 - Substâncias correspondentes aos picos obtidos no espectro de massas das frações alcaloídicas.

Espécie		Massa (m/z)	Modo	Intensidade	Nome da substância	Referência
<i>A.panurensis</i>	folhas	330,63	Positivo	15%	reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
<i>A.guianensis</i>	galhos	300,32	Positivo	100%	N-metilcoclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		330,41	Positivo	40%	reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
<i>A.ferrea</i>	folhas	174,21	Positivo	100%	papraline (C.rugulosa)	Custódio & Veiga Jr., 2014
		330,35	Positivo	24%	reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003
		300,35	Positivo	18%	N-metilcoclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
	galhos	330,38	Positivo	75%	reticulina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005;

						Dias <i>et al.</i> , 2003
		300,33	Positivo	51%	N-metilcoclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005
		286,23	Positivo	29%	coclaurina	Schmidt <i>et al.</i> , 2005; Dias <i>et al.</i> , 2003

As frações flavonoídicas obtidas, foram analisadas por cromatografia em camada delgada onde observou-se a presença de flavonoides nas frações. Testou-se em CCD as frações com padrões glicosilados e não glicosilados revelando com NP-PEG. Os padrões usados foram a quercetina, quercetina-3- glicosídeo, (+) – catequina e com kaempferol, na qual não foi possível observar substâncias com RF semelhante ao dos padrões.

Com o perfil espectrométrico das frações flavonoídicas e em comparação com dados da literatura não foi possível identificar flavonoides com massas semelhantes aos já isolados no gênero, pois são poucos flavonoides descritos na literatura para esse gênero. Porém foi possível sugerir algumas substâncias isoladas em outros gêneros de Lauraceae como a quercetina e até mesmo de outras famílias. O íon de m/z 285 foi comum para todas as espécies (*A. panurensis*, *A. ferrea* e *A. guianensis*), como mostrado na **tabela 4**.

Tabela 4 - Substâncias correspondentes aos picos obtidos no espectro de massas das frações flavonoídicas.

Espécie		Massa (m/z)	Modo	Intensidade	Nome da substância	Referência
<i>A.panurensis</i>	Folhas	315,77	Positivo	14%	Kumatakenina (3,7-di-O-metilkanferol)	Silva <i>et al.</i> , 2009
<i>A.guianensis</i>	Folhas	285,15	Positivo	41%	7,4-diidroxi-5'-metilisoflavona	Ameira <i>et al.</i> , 2009
		329,04	Positivo	16%	7,4'-diidroxi-5'-carboximetóxiisoflavona	Ameira <i>et al.</i> , 2009
	Galhos	285,56	Positivo	33%	7,4-diidroxi-5'-metilisoflavona	Ameira <i>et al.</i> , 2009
<i>A.ferrea</i>	Folhas	285,45	Positivo	100%	7,4-diidroxi-5'-metilisoflavona	Ameira <i>et al.</i> , 2009
	galhos	303,33	Positivo	18%	Quercetina	Garrett <i>et al.</i> , 2012

4.3 Fracionamento e isolamento de *Aniba panurensis* (galhos)

A fração DCM 1 (rica em compostos que tem afinidade com a media polaridade do solvente) da partição alcaloídica apresentou um precipitado amarelo. Fez-se análise cromatográfica da fração, observou-se que esta possuía um composto muito majoritário, vários reveladores foram testados e observou-se um resultado positivo para alcaloides. Analisou-se a

fração DCM 2 (fração alcaloídica) e comparando as duas amostras, verificou-se que elas apresentavam perfil semelhante em CCD.

Comparando os espectros de massas das duas frações, observou-se o mesmo perfil com picos de m/z 289, m/z 273 e m/z 229, no modo positivo. Devido ao baixo rendimento das frações alcaloídicas, resolveu-se fazer fracionamento em coluna cromatográfica com o extrato desengraxado. Nesse fracionamento foram obtidas 21 frações, sendo que as frações 6a e 6b se apresentaram puras em CCD e com resultado positivo para alcalóides.

O espectro de massas da amostra 6a no modo positivo evidenciou apenas um pico de m/z 273,28 e para a amostra 6b obteve-se um pico majoritário de m/z 289,31 (**figura 4**). Esses alcaloides podem ser indólicos, pois as massas desses compostos são pares, provavelmente pela presença de dois nitrogênios na estrutura. Essas amostras já foram enviadas para análise em RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional e já estão em processo para sua elucidação estrutural.

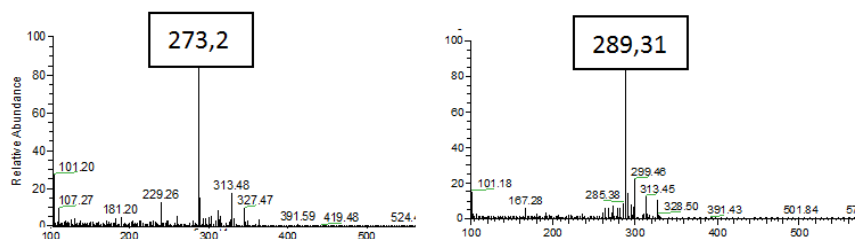


Figura 4– Espectros de massas das amostras 6a e 6b, no modo positivo.

4.4 Fracionamento e isolamento de *Aniba ferrea* (galhos)

As frações alcaloídicas de *Aniba ferrea* apresentaram um perfil muito rico de alcaloides, então fez-se duas colunas cromatográficas para tentar obter estas substâncias. No segundo fracionamento obteve-se 13 frações, resultando em duas frações puras, frações 3 e 5, como pode ser confirmado pelos espectros de massas da **figura 5**. O pico resultante da fração 3 foi de m/z 328, que corresponde a isoboldina e da fração 5 foi m/z 330, que corresponde reticulina, alcaloides já isolados em *Aniba muca*. (Bravo *et al.*, 1996).

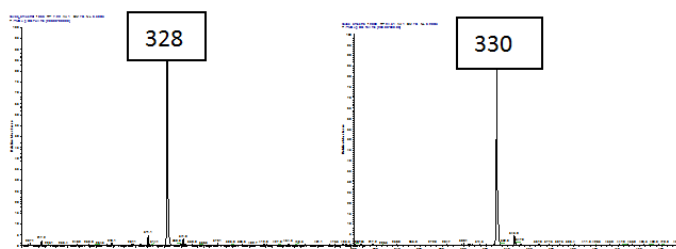


Figura 5– Espectros de massas das frações 3 e 5 respectivamente, no modo positivo.

Essas amostras já foram enviadas para análise em RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional, para sua elucidação estrutural.

4.5 Óleos essenciais

Após a extração dos óleos, calculou-se os rendimentos mostrados na **tabela 5**, observou-se os melhores rendimentos para as folhas. O óleo dos galhos de *Aniba ferrea* cristalizou e as amostras foram enviadas para análise de CG-DIC e CG-EM.

Tabela 5 – Rendimento dos óleos essenciais

5. CONCLUSÃO

A análise quantitativa da atividade antioxidante foi realizada com os extratos etanólicos das folhas e galhos de *A. ferrea*, *A. guianensis*, *A. panurensis* e *A. parviflora*, devido ao resultado positivo no ensaio qualitativo. Nessa análise, tanto para o radical DPPH quanto para ABTS, obteve-se o melhor resultado para extrato dos galhos de *A. ferrea*, seguido do extrato dos galhos de *A. parviflora*. Esse resultado pode ter relação com os maiores porcentagens de compostos fenólicos para ambos os extratos, com valores acima de 30%.

Nos ensaio enzimáticos, para inibição da enzima tirosinase não foram obtidos extratos ativos, porém para o ensaio de inibição da enzima lipase, foi obtido um extrato com porcentagem de inibição de aproximadamente 94% em comparação com o padrão xenical (orlistat). O extrato que apresentou essa porcentagem foi das folhas de *A. parviflora*.

A partir de análises dos perfis espectrométricos das frações alcaloídicas e em comparação com dados da literatura, observou-se a presença dos picos de m/z 330 e de m/z 300 na maioria das frações, massas que correspondem respectivamente à reticulina e N-metilcoclaurina, substâncias já isoladas no gênero *Aniba*. Para as frações flavonoídicas, não foram identificados flavonoides com massas semelhantes aos já isolados no gênero, porém foi possível sugerir substâncias já isoladas em outros gêneros e famílias.

O fracionamento do extrato dos galhos de *A. panurensis* resultou na obtenção de dois alcaloides que apresentaram picos de m/z 273,28 para fração 6a, e para a amostra 6b pico de m/z 289,31. Esses alcaloides podem ser indólicos, pois a massa molecular desses compostos é par.

Espécie	Rendimento das folhas (%)	Rendimento dos galhos (%)
<i>Aniba panurensis</i>	0,15	0,02
<i>Aniba ferrea</i>	0,07	0,01
<i>Aniba parviflora</i>	0,06	0,06

Com o fracionamento dos galhos de *Aniba ferrea* obteve-se duas frações puras. A fração 3, que apresentou pico de m/z 328 corresponde a isoboldina, e a fração 5, com m/z 330, que corresponde à reticulina, ambos já isolados em *Aniba*.

No estudo dos óleos essenciais foram obtidos os rendimentos mais altos para as folhas, tendo valores acima de 0,06% e para os galhos foram observados valores inferiores.

Portanto, o estudo fitoquímico de espécies de *Aniba* (Lauraceae), que são muito abundantes em toda a região amazônica, apresenta importância por existirem poucos estudos que relatam a composição química e descrevem as atividades biológicas das espécies estudadas. Sendo este o estudo que leva a confirmação da composição rica em alcaloides, confirma a presença de flavonoides e relata algumas atividades química/biológicas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRIANAIVORAVELONA, J. O.; TERREAUX, C.; SAHPAZ, S.; RASOLONDRAMANITRA, J; HOSTETTMANN K.; A phenolic glycoside and N-(p-coumaroyl)-tryptamine from *Ravensara anisata*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 1145 -1148, 1999.

AGUIAR, L. M. G.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S.; PINHO, S. L. V.; SOUZA, J. R. The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part LX. Cecilin, a 1-benzyl- β -carboline from *Aniba santalodora*. *Phytochemistry*, v. 19, n. 8, p. 1859-1860, 1980.

AHLENSTIEL, T.; BURKHARDT, G.; KOHLER, H.; KYHLMANN, M. K. Bioflavonóides attenuate renal proximal tubular cell injury during cold preservation in Euro-Collins and University of Wisconsin solutions. *Kidney Int.*, v. 63, p. 554-563, 2003.

ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.; Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 942-952, 2009.

AMEIRA, O.A.; PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonóides em *Cordia verbenacea* DC. Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.11, n.1, p.7-11, 2009.

AUBLET, J. B. C. F. Histoire des Plantes de la Guiane Française. London, 1: 327, pl. 124, 1775.

BARBOSA FILHO, J. M; VARGAS, M. R. W. ; SILVA, I. G, FRANCA; MORAIS, L. C. S. L; CUNHA, E. V. L. da; SILVA, M. S. da; SOUZA, M. F.V Chaves MCO; ALMEIDA, R. N; AGRA, M. F. *Ocotea duckei* excepcional fonte de iangambina e outras lignanas furofuran. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 71, n. 2, p. 231-238, 1999.

BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M; BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de Lauraceae. Acta Amazonica, v. 18, n. 1-2, p. 91-94, 1988.

BARREIRO, E.J. Biodiversidade: Fonte potencial para descoberta de novos fármacos. Química Nova v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

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

BRAVO, J. A.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L.; MORETTI, C.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Alkaloids from Aniba muca. Revista Boliviana de Química, v. 13, n. 1, p. 19-22, 1996.

BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. Química Nova, v.33, n.1, p. 229-239, 2010.

CAVALCANTE, S. H.; GIESBRECHT, A. M.; GOTTLIEB, O. R, MOURÃO, J.C.;YOSHIDA, M.; Lanthanide shift reagents in neolignan analysis: revision of structure of canellin-b*. *Phytochemistry*, v. 17, p.983-985, 1978.

CAVALCANTE, S. H.; ROCHA, A.I.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. The chemistry of brazilian Lauraceae.LXV. 5,7, 8,3',4',5' – hexamethoxyflavone from an Aniba species. *Acta amazonico*, v.12, n. 2, p 377-380, 1982.

CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J.Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and drug Analysis*, v.10, n.3, p. 178-182, 2002.

CUSTÓDIO, D. L.; VEIGA JUNIOR, V. F.; Lauraceae alkaloids. *Royal Society of chemistry. RSC Advances*, review, 4, p. 21864-21890, 2014.

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

DEWICK, P. M. *Medicinal natural product: a biosynthetic approach*. 2º edição, John Wiley & Sons, 2002.

FIDELIS, C.H.V.; SAMPAIO, P.T.B.; KRAINOVIC, P. M.; AUGUSTO, F.; BARATA, L.E.S.; Correlation between maturity of tree and GC % GC–qMS chemical profiles of essential oil from leaves of *Aniba rosaeodora Ducke*. *Microchemical Journal*, 2012.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; MATOS, M. F. C; GUTERRES, Z. R.; MANTOVANI. M. S.; MISU, C. K.; NAKASHITA, S.T. Cytotoxic and genotoxic butanolides and lignans from *Aiouea trinervis*. *Planta Médica*, v. 71, p. 923, 2005.

GARCEZ, F. R.; SILVA, ANA FRANCISCA G. DA; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; MATOS, MARIA DE FATIMA C.; SANTOS, EVELYN C. S.; QUEIROZ, LYARA M. M. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Médica*, vol. 77, p. 383-387, 2011.

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellsiana*. *Phytochemistry*, v. 39, n. 4, p. 815-816, 1995.

GARRETT, R.; ROMANOS M.T.V.; BORGES, R.M.;SANTOS, M.G.; ROCHA,L.; SILVA, A.J.R.; Antiherpetic activity of a flavonoid fraction from *Ocotea notata* leaves. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 22, n.2, p. 306-313, 2012.

GIANG, P. M.; SON, P. T.; MATSUNAMI, K.; OTSUKA, H. New neolignans and lignans from vietnamese medicinal plant *Machilus odoratissima* NEES. *Chem. Pharm. Bull*, v. 54, n. 3, p. 380-383, 2006.

GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M. MAGALHÃES, M. T.; MAIA, J. G. S.; MENDES, P. H.; ROCHA, A. I.; SILVA, M. L.; WILBERG, V. C. Óleos essenciais da Amazônia VII. *Acta Amazonica*, v. 11, n. 1, p. 143-148, 1981

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Neolignanas antitumorais. *Ciência e Cultura*, v. 32, p. 93-100, 1978.

GOULART, E. G; JOURDAN, M.C; BRAZIL, B. G; GILBERT, B.; LOPES, J. N. C.; SARTI, S. J.; VICHNEWSKY, W.; THAMES, A. W. Atividade bloqueadora de produtos naturais na evolução externa de *Strongyloides stercoralis* e ancilostomídeos. *Rev Bras Farm.* v. 56, n. 9-12, p. 123-137, 1975.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: Generalidades e aspectos básicos. In: C.M.O. Simões et al. (eds.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 29, Florianópolis, 2004.

HIRANTHI, Jayasuriya; KITHSIRI, Herath B; Ondeyka John G; POLISHOOK, Jon D; BILLS, Gerald F; DOMBROWSKI, Anne W; SPRINGER, Marty S; SICILIANO, Sal; MALKOWITZ, Lorraine; SANCHEZ, Manuel. Isolation and structure of antagonists of chemokine receptor (CCR5). *Journal of natural products*, v. 67, n. 6, p. 1036-1038, 2004.

HEARING, V. J..Mammalian monophenol monooxygenase (tyrosinase): purification properties, and reactions catalyzed. *Meth. Enzymol.*, 142, p. 154-65,1987.

KARIOTI, A.; PROTOPAPPA, A.; MEGOULAS, N.; SKAL TSA, H. Identification of tyrosinase inhibitors from *Marrubium velutinum* and *Marrubium cylleneum*. *Bioorg. Med. Chem.*, v. 15, n.7, p. 2708-2714, 2007.

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G. N.; MCCLOUD, T. G.; TUCKER, K. D.; SHOEMAKER, R. H. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Aniba panurensis*. *Journal of natural products*, v. 67, p. 1732-1735, 2004.

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae. *Floresta e Ambiente*, Universidade Federal de Viçosa, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MAIA, J. G. S.; SOUSA, P. J. C.; FONTES JUNIOR, E. A.; SANTOS, A. M. S. Volatile Compounds and Antispasmodic Activity of the Stem Bark Oil of *Aniba canelilla*. XII Congresso Ítalo-Latino-Americano de Etnomedicina. Rio de Janeiro, 2003.

MARIA HELENAR ROSSI, YOSHIDA, M.; MAIA, J.G.S. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from aniba species. *Phytochemistry*, v. 45, n. 6, p.1263-1269, 1997.

MELO, C.T.V.; Estudo dos efeitos farmacológicos de (o-metil)-n-2,6-dihidrodi-benzoil tiramina (riparina III) de *Aniba riparia* (NEES) Mez (Lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos. Dissertação de mestrado. UFC. Fortaleza-CE, 2006.

MENSOR, L.L.; FABIO, S.M.; GILDOR, G.L.; ALEXANDER, S.R.; TEREZA, C.D.; CINTIA, S.C.; SUZANE, G.L. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Res.*, v. 15, p. 127-130, 2001.

MONTENEGRO, L.H.M.; OLIVEIRA, P.E.S.; CONSERVA, L.M.; ROCHA, E.M.M.; BRITO, A.C.; ARAÚJO, R.M.; TREVISAN, M.T.S.; LEMOS, R.P.L. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 611-617, 2006.

OGER, J. M.; DUVAL, O.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J.; GUINAUDEAU, H.; FOURNET, A. (R)-(+)-Noranicanine a new type of trioxxygenated benzylisoquinoline isolation and synthesis. *Heterocycles*, v. 34, n. 1, p. 17-20, 1992.

PEREIRA, C. A.; CORRÊA, A. D. ; PEREIRA, L. L. S.; CHAGAS, P. M. B.; SANTOS, C. D.; DE SOUZA, S. P.. Inibição de enzimas digestivas por extratos de pó comercial de *Hoodia gordonii* utilizado no tratamento da obesidade. *R. Bras. Bioci.*, v. 9, n.3, p. 265-269, 2011.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C. M.; FIORINI, J. E.; MOREIRA, M. A. S.; SCHNEEDORF, J. M. Bacteriostatic effect of copaiba oil (*Copaifera officinalis*) against *Streptococcus mutans*. *Brazilian dental journal*, v.23, n. 1, p. 36 – 8, 2012

PINTO, A. C.; SILVA, S. H. D; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*. v. 25, n. 01, p. 45-61, 2002.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorizing assay. *Free Radic Biol Med.*, v. 26 , n. 9-10, p. 1231-1237, 1999

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationship of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biol. Med.*, v. 20, p. 933-956, 1996.

RICHTER, H. G. Wood and bark anatomy of Lauraceae I. *Aniba Aublet. IAWA Bulletin n. s.*, v. 2, n. 2-3, p. 79-87, 1981.

RIZZINI, C.T. e MORS, W.B.; *Botânica econômica brasileira*, 2.ed., Âmbito cultural, Rio de Janeiro, p. 56,1995.

ROHWER, J.G.; LAURACEAE. IN: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G. & BITTRICH, V. (Eds.). *The families and genera of vascular plants. Springer-Verlag, Berlim*,v. 2, p. 366-391, 1993.

ROSSI, M. H.; YOSHIDA M.; MAIA, J. G. S. Neolignans, styrylpyrones and flavonoids from an *Aniba* species. *Phytochemistry*, v. 45, n. 6, p. 1263-1269, 1997.

SAMPAIO, L. F. S.; MAIA, J. G. S.; PARIJÓS, A. M.; SOUZA, R. Z.; BARATA, L. E. S. Linalool from Rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) Oil Inhibits Adenylate Cyclase in the Retina, Contributing to Understanding its Biological Activity. *Phytotherapy Research*, v.26, p. 73-77, 2012

SCHMIDT, J.; RAITH, K.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. H. Analyses of benzyloquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. *Eur. J. Mass Spectrom*, v. 11, p. 325-333, 2005.

SHIMIZU, K.; YASUTAKE, S.; KONDO, R. A new stilbene with tyrosinase inhibitory activity from *Chlorophora excelsa*. *Chem. Pharm. Bull*, v. 51, n.3, p. 318-319, 2003.

SILVA, T. M. S.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO R.; Estudo espectroscópico em elucidação estrutural de flavonoides de *Solanum jabrense* agra & nee e *s. paludosum* moric. Química nova, v.32, n. 5, p. 1119-1128, 2009.

SIMIC, A.; SOKOVIC, M. D.; RISTIS, M.; GRUJIC-JOVANOVIC, S.; VUKOJEVIC, J.; MARIN, P. D.; The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. Phytotherapy Research, v. 18, p. 713–717, September 2004.

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. Methods Enzymol. v.299, p. 152-178,1999.

SOEUR, J.; MARROT, L.; PEREZ, P.; IRAQUI, I.; KIENDA, G.; DARDALHON, M.; MEUNIER, J.R.; AVERBECK, D.; HUANG, M.E. Selective cytotoxicity of *Aniba rosaeodora* essential oil towards epidermoid cancer cells through induction of apoptosis. Mutation Research, 718, p. 24-32, 2011.

SOLER-RIVAR-RIVAS, C.; ESPÍN, J.C.; WISHERS, H.J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. Phytochem Analysis, v.11, n. 1-9; 2000.

SOUZA, C. M. M.; ROCHA E SILVA, H.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H.; Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, v. 30, n. 02, p.351-355, 2007.

TEXEIRA, C. P. L.; MELO, C. T. V.; ARAUJO, F. L. O.; CARVALHO, A. M. R.; SILVA, M. I. G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MACÊDO, D. S.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. F.; Antidepressant-like effect of riparin II from *Aniba riparia* in mice: evidence for the involvement of the monoaminergic system. Fundamental & Clinical Pharmacology, v. 27, p. 129–137, 2013.

VATTIMO-GIL, I. A.; O gênero *Ocotea* Aubl. no sul do Brasil I. Espécies de Santa Catarina e do Paraná, p. 265-350, 1956.

ZHANG, F.; ARNATT, C. K.; HANEY, K. M.; FANG, H. C.; BAJACAN, J. E.; RICHARDSON, A.C.; WARE, J. L.; ZHANG, Y.; Structure activity relationship studies of natural product chemokine receptor CCR5 antagonist anibamine toward the development of novel anti prostate cancer agents. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v. 55, p. 395-408, 2012.

7. CRONOGRAMA DE ATIVIDADES

Nº	Descrição	Ago 2013	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2014	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Pesquisa bibliográfica	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
2	Coleta do material vegetal	x											
3	Limpeza, secagem e trituração		x	x									
4	Obtenção dos óleos essenciais		x	x	x								
5	Identificação dos constituintes			x	x	x	x	x					
6	Atividade antimicrobiana						x	x	x	x			
7	Preparação dos extratos			x	x	x							
8	Análise do perfil espectrométrico					x	x	x	x	x			
9	Atividade hemolítica								x	x			
10	Ensaio de citotoxicidade em linhagem de células tumorais									x	x	x	
11	Atividade antioxidante						x	x					
12	Apresentação de relatório Parcial					x							
13	Elaboração do Resumo e Relatório Final												x
14	Preparação da Apresentação Final para o Congresso							x			x		
15	Elaboração do artigo científico										x	x	