

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

ISOLAMENTO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALCALOIDES DE
Ocotea leucoxilum E *Aniba panurensis*.

Bolsista: Alanne Soares de Oliveira, CNPq.

MANAUS

2015

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

RELATÓRIO PARCIAL

PIB-E/0182/2014

ISOLAMENTO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ALCALOIDES DE
OCOTEA LEUCOXILUM E ANIBA PANURENSIS.

Bolsista: Alanne Soares de Oliveira, CNPq.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Coorientadoras Klenicy Kazumy de Lima Yamaguchi e Nilma de Souza
Fernandes

MANAUS

2015

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Grupo de Pesquisa Q-Bioma (Química de Biomoléculas da Amazônia) aos seus autores. Parte deste 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 (Química de Biomoléculas da Amazônia) tendo como subprojeto o projeto Química de Lauraceae, Fabaceae, Buseraceae e Leguminosa.

Resumo

A família botânica Lauraceae fica concentrada na Ásia e América. No Brasil existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros. Algumas espécies são vastamente utilizadas na culinária, como remédios e na extração madeireira pela população. Os gêneros *Ocotea* e *Aniba* destacam-se por apresentarem estudos que comprovam uma gama de princípios ativos em suas identidades químicas. Para esses gêneros já foram identificadas atividades anticâncer, antimicrobiana e antidepressiva, características de metabólitos secundários, como os alcaloides. Esses gêneros foram pouco explorados no campo de pesquisa, portanto, propôs-se a realização desta pesquisa visando à caracterização do perfil químico, isolamento de alcaloides e a avaliação da atividade biológica de extratos de folhas e galhos das espécies *Aniba panurensis* e *Ocotea leucoxilum*. Contribuindo, assim, para o aprofundamento na pesquisa da família Lauraceae e para isolamento de substâncias de média e baixa polaridade com princípios ativos que permitam futura produção de fármacos contra doenças, como depressão, câncer e mal de chagas. Os extratos etanólicos foram obtidos de folhas e galhos coletados na Reserva Florestal Ducke. Os extratos foram submetidos a metodologias de extração de alcaloides, propostas por Giordani *et al.* (2008), Wolter Filho *et al.* (1985) e Djilani *et al.* (2006). A partir das frações obtidas por partição ácido-base das três metodologias foram realizados testes cromatográficos para avaliar/comparar a eficiência entre as três metodologias e determinar a que melhor extraiu substâncias de média e baixa polaridade. A metodologia proposta por Giordani *et al.*, (2008) obteve os melhores rendimentos e a melhor extração de alcaloide. Essa, portanto, será utilizada em extrações contínuas visando a obtenção de maior quantidade de fração alcaloídica para a realização de coluna de isolamento, no mês de fevereiro de 2015. O objetivo de proceder com esse método cromatográfico é o isolamento de alcaloides das espécies estudadas nesta pesquisa, *O. leucoxilum* e *A. panurensis*.

SUMÁRIO

1.0	INTRODUÇÃO.....	06
2.0	OBJETIVOS.....	07
3.0	JUSTIFICATIVA.....	08
4.0	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	09
5.0	METODOLOGIA.....	11
5.1	Análise qualitativa de alcaloides.....	11
5.2	Análise de potencial antibacteriano.....	11
5.3	Metodologias de extração de alcaloides.....	11
6.0	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
6.1	Análises das frações alcaloídicas da espécie <i>A. panurensis</i> por E.M.....	13
6.2	Análises das frações alcaloídicas da espécie <i>O. leucoxilum</i> por E.M.....	14
6.3	Ensaio Biológico.....	14
6.4	Fracionamento e isolamento a partir do extrato etanólico de galhos de <i>A. panurensis</i>	15
6.5	Análise dos isolados de <i>A. panurensis</i> por Espectrometria de Massas.....	17
6.6	Análise do cristal obtido do extrato etanólico de galhos de <i>O. leucoxilum</i> por CCD.....	17
7.0	CONCLUSÃO.....	18
8.0	AGRADECIMENTOS.....	19
9.0	REFERÊNCIAS.....	20
10.0	CRONOGRAMA.....	22

1.0 Introdução

A família Lauraceae possui distribuição pantropical, principalmente nas terras baixas da Amazônia e América Central, com cerca de 50 gêneros e 2.500 espécies (Ribeiro *et al.*, 1999). No Brasil, existem cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros (Quinet, 2005). Apesar disso, muitas espécies encontradas na Amazônia ainda não foram investigadas fitoquimicamente.

Dentre os gêneros mais expressivos das Lauraceae no Brasil, tem-se o gênero *Ocotea*. Este gênero tem despertado o interesse dos fitoquímicos brasileiros devido a sua ampla distribuição no território nacional, e ao fato de suas espécies serem muito apreciadas no comércio madeireiro (Carvalho, 2003). Sendo também, o gênero que apresenta o maior número de espécies medicinais (Marques, 2001) já estudada.

Outro gênero que merece destaque na família Lauraceae é o gênero *Aniba*. Está distribuído principalmente na Amazônia e na região das Guianas e compreende 41 espécies da família Lauraceae (Silveira *et al.* 2010). As espécies do gênero caracterizam-se por serem grandes fornecedoras de óleos voláteis, de grande valor comercial, utilizados vastamente nas indústrias farmacêuticas e de perfumes (Rizzini & Mors, 1995; Marques, 2001; Fidelis *et al.*, 2012).

Com relação ao Brasil, o panorama da importância dos produtos naturais para indústria farmacêutica brasileira é ainda muito tímido quando avaliada nossa biodiversidade assim como 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 são praticamente inexistentes (ANVISA Brasil 2008, *apud* Queiroz, 2009).

Visando a descoberta de novos fármacos, o objetivo deste projeto é estudar a composição química e as atividades biológicas de alcaloides das espécies *Ocotea leucoxylum* e *Aniba panurensis*. A expectativa é isolar substâncias em cujos extratos já se observaram bioatividade, para propor novos fármacos para doenças negligenciadas e avaliar a atividade citotóxica em três linhagens de células tumorais e a atividades antimicrobianas.

2.0 Objetivos

Objetivo Geral:

- Isolar por técnicas cromatográficas e identificar por técnicas espectroscópicas e espectrométricas alcaloides das espécies *Ocotea leucoxilum* e *Aniba panurensis*.

Objetivos Específicos:

- Isolar e purificar os metabólitos especiais de extratos das espécies *O. leucoxilum* e *A. panurensis* por meio de técnicas cromatográficas;

- Identificar a estrutura química dos metabólitos especiais isolados por meio da combinação de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, conforme as características estruturais;

- Realizar ensaios antioxidantes frente ao radical livre DPPH de frações e substâncias obtidas;

- Realizar testes farmacológicos *in vitro*, com frações e substâncias obtidas, visando à avaliação da atividade citotóxica em três linhagens de células tumorais e a atividade antimicrobiana;

- Analisar, na Universidade Estadual de Maringá, as atividades antiparasitárias das substâncias isoladas.

3.0 Justificativa

A química de alcaloides apresenta um interesse farmacológico crescente, devido à sua gama de atividades biológicas. Espécies da família Lauraceae vêm sendo testadas contra protozoários parasitas, tais como: *Licaria canella* que se mostrou ativa contra as cepas de *Leishmania amazonensis* (Silva et al., 2009), *Nectandra lineata* em que foram isoladas duas neolignananas (3'- metoxi- 3, 4- metilenodioxi- 4', 7- epoxi- 9- nor- 8, 5'- neolignana- 9'- acetoxi e 3- metoxi- 3, 4- metilenodioxi- 4', 7- epoxi- 9- nor- 8, 5'- neolignana- 7, 8'- dieno) que apresentaram inibição do crescimento de *T. cruzi* na forma epimastigota (Chérigo et al., 2005).

Em estudos anteriores, realizados no Grupo de Pesquisas (Q-BiomA), nas dissertações de mestrado de Alcantara (2009), Yamaguchi (2011) e Souza (2013) foram realizadas caracterizações dos perfis alcaloídicos de extratos de várias partes das árvores de espécies da Lauraceae na Amazônia Central, indicando espécies com potencial atividade antioxidante, bactericida, antifúngica, cicatrizante, antineoplásica e anticolinesterásica.

Os extratos em etanol dos gêneros: *Ocotea*, *Licaria* e *Aniba* foram os que apresentaram melhores atividades antimicrobianas e atividade citotóxica SF- 295, HCT- 8 e MDAMB- 435. Assim, o fracionamento de extratos e isolamento de substâncias em espécies desses gêneros e avaliações biológicas dos constituintes isolados contribui tanto para o desenvolvimento de novos fármacos para doenças que atualmente são tratadas de maneira ineficiente quanto para o perfil químico e caracterização de substâncias bioativas de espécies dessa família.

A expectativa, no decorrer deste projeto, é de isolar essas substâncias em cujos extratos já houve relato de bioatividade, para propor novos fármacos para doenças negligenciadas.

4.0 Revisão Bibliográfica

Economicamente, a família Lauraceae é considerada uma das mais importantes dentre as espécies encontradas 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 (Quinet; Andreato, 2002).

Na região amazônica, a família Lauraceae destaca-se pela sua composição de metabólitos incluindo alcaloides, neolignanas, sesquiterpenos, fenilpropanoides, flavonoides e taninos, os quais demonstram uma grande variedade de atividades biológicas (Quinet; Andreato, 2002).

No Brasil é possível encontrar cerca de 40 espécies do gênero *Aniba*, sendo abundante em toda a região amazônica. Muitas de suas espécies são utilizadas nas indústrias madeireiras (Richter, 1981). As espécies de *Aniba* destacam-se entre as outras da família Lauraceae por serem fornecedoras de óleos essenciais, são muito utilizados 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).

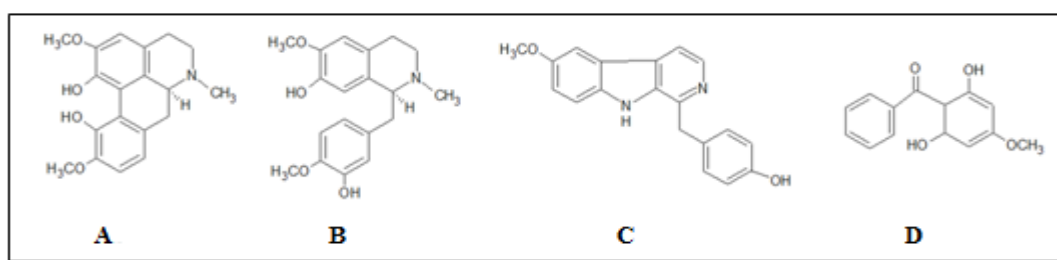


Figura 1- Alcaloides isolados no gênero *Aniba*.

Em estudos fitoquímicos realizados com *A. panurensis*, foram isolados alguns alcaloides como: isoboldina (**A**), reticulina (**B**) e N-metilcoclorina de *A. muca* (Bravo *et al.*, 1996), cecilim (**C**) de *A. santalodora* (Aguiar, 1980), ducleim (**D**) 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 1**.

Dentre os gêneros mais expressivos das Lauraceae brasileiras, tem-se o gênero *Ocotea*. Este gênero tem despertado o interesse dos fitoquímicos brasileiros devido a sua ampla distribuição no território nacional, e ao fato de suas espécies serem muito apreciadas no comércio madeireiro, como a *Ocotea porosa*, popular imbuia e *Ocotea odorífera*, popular sassafrás (Lorenzi, 2002 *apud* Zanin, 2007).

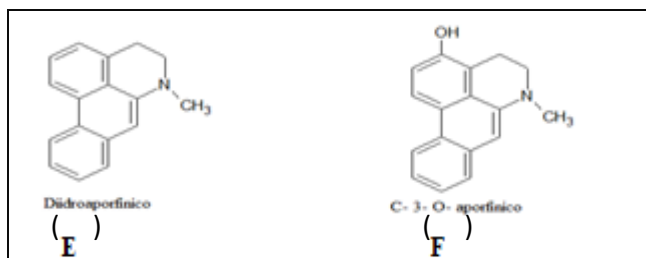


Figura 2. Alcaloides do gênero *Ocotea*. E e F - Isolados da espécie *O. puberula*, 7- Isolado da espécie *O. minarum*.

O gênero *Ocotea* desperta interesse científico e tecnológico devido às inúmeras atividades farmacológicas atribuídas as lignanas e alcaloides já relatados em espécies do gênero, distribuídas no território nacional. Dentre as atividades farmacológicas já encontradas, destacam-se, antibacteriana, antifúngica (Souza *et al.*, 2004), anti-inflamatória (Zschocke, *et al.*, 2000 *apud* Queiroz, 2009), antialérgica (Serra *et al.*, 1997 *apud* Queiroz, 2009) entre outras. No gênero *Ocotea* os alcaloides aporfínicos e os aporfínicos *sensu stricto* são os mais comumente encontrados (Zanin *et al.* 2007). Alguns desses alcaloides podem ser observados na **figura 2**.

5.0 METODOLOGIA

Para o isolamento e identificação de alcaloides das espécies *A. panurensis* e *O. leucoxilum*, das partes galhos e folhas, foram utilizadas as seguintes metodologias:

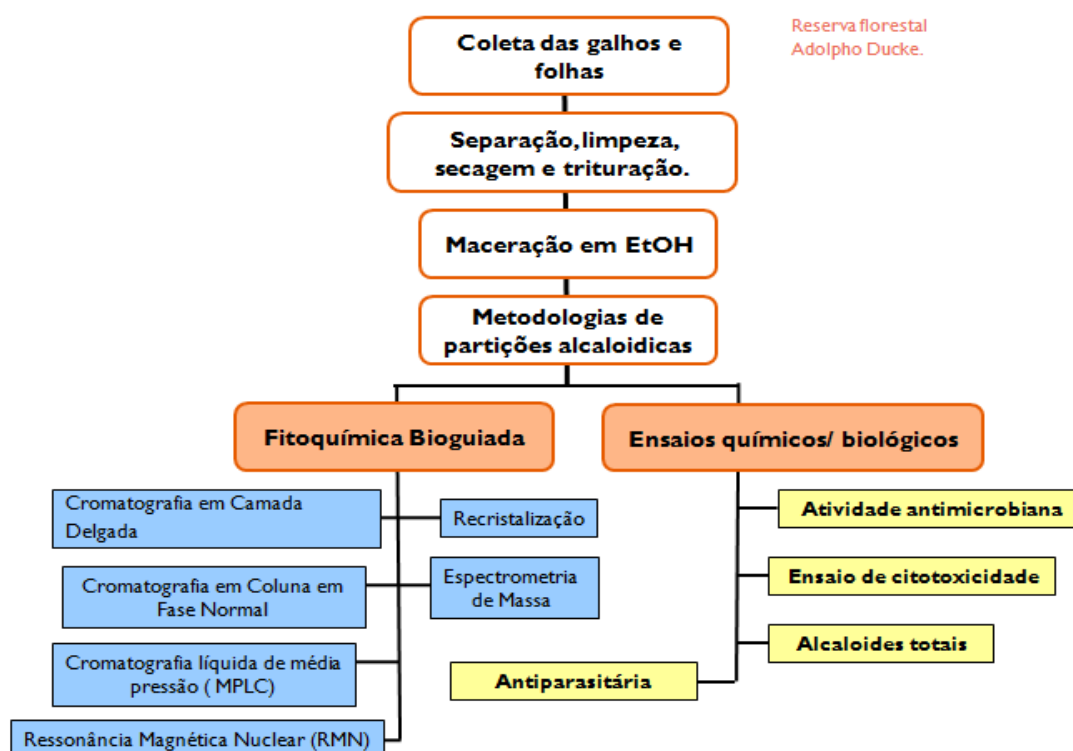


Figura 3 – Fluxograma da metodologia do projeto

5.1 Análise qualitativa de alcaloides

A placa cromatográfica eluída revelou-se com Dragendorff

5.2 Análise de potencial antibacteriano

Atividade das frações por teste de difusão em poço, contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas

5.3 Metodologias de extração:

Metodologias para a obtenção das frações alcaloídicas visando eleger o método mais eficiente de extração de alcaloides.

Metodologia W: Foi realizada a proposta de Djilani *et al.* (2006), com algumas modificações:

1 g dos extratos etanólicos de (galhos e folhas) foram solubilizados com solução de 100 mL ácido sulfúrico 2% e 5 mL de metanol. Foi realizada uma partição com

hexano (5 x 50 mL) para separar as substâncias lipofílicas, parte apolar do extrato solubilizado. A fração aquosa, que restou no funil de partição, foi alcalinizada com hidróxido de amônio até um pH 9-10. Adicionou-se clorofórmio (5 x 20 mL), obtendo uma fração rica em substâncias de média e baixa polaridade. As frações foram secas e tiveram suas massas medidas para cálculo do rendimento.

Metodologia X: Foi realizada a proposta de Giordani *et al.* (2008), com algumas modificações:

1 g dos extratos etanólicos de (galhos e folhas) foram solubilizados com solução de 5 mL ácido clorídrico 3% e 5 mL de metanol. Foi realizada uma partição com hexano (5 x 15 mL) para separar as substâncias lipofílicas, parte apolar do extrato solubilizado. Para separar as substâncias de média e baixa polaridade, adicionou-se diclorometano (4 x 15 mL), obtendo-se a 1ª fração alcaloídica. A fração aquosa que restou no funil de partição foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e, por conseguinte, extraída a 2ª fração alcaloídica com diclorometano. As frações foram secas na capela e tiveram suas massas medidas para cálculo do rendimento.

Metodologia Z: Foi realizada a proposta de Wolter Filho *et al.* (1985), com algumas modificações:

1 g dos extratos etanólicos de (galhos e folhas) foram solubilizados com solução de 40 mL de ácido tartárico 8% e 5 mL de metanol em aquecimento a 50 °C por 15 minutos. Depois foi deixado em banho no ultrassom por 60 minutos. Realizou-se uma partição com hexano (10 x 10 mL, para o extrato de galhos e 14 x 20 mL, para os extratos de folhas) para separar as substâncias lipofílicas. A fração aquosa que restou no funil de partição, foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 11. Foi adicionado hexano (8 x 10 mL, para extratos de folhas e 5 x 10 mL para extrato de galhos), obtendo primeira fração alcaloídica. Em seguida foi extraída a 2ª fração alcaloídica com clorofórmio (5 x 10 mL). As frações foram secas e tiveram suas massas medidas para cálculo do rendimento.

6.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos de galhos e folhas das espécies de *Ocotea leucoxilum* e *Aniba panurensis* foram particionados segundo as três metodologias escolhidas para comparação. Dessas extrações foram obtidas 32 frações, sendo 20 frações alcaloídicas. Foi calculado os rendimentos, como observado na **Tabela 1**. Os processos foram realizados em duplicata para a confirmação de resultados.

Tabela 1 – Rendimento das frações alcaloídicas. **W**- Dijilani *et al.* (2006), **B**- Giordani *et al.*(2008), **C**- Wolter Filho *et al.* (1985)

Metodologia	Espécie e parte da planta			
	<i>Aniba panurensis</i> galhos (%)	<i>Aniba panurensis</i> folhas (%)	<i>Ocotea leucoxilum</i> galhos (%)	<i>Ocotea leucoxilum</i> folhas (%)
W	15,9%	2,2%	9,9%	8,9%
X	9,3%	11,8%	19,3%	15,3%
Y	4,3%	16,7%	8,2%	13,9%

A metodologia **W** apresentou menor rendimento para frações alcaloidicas, exceto para os galhos de *A. panurensis* (15,9%). A metodologia **Y** obteve baixo rendimento de frações alcaloidicas com 4,3% para galhos de *A. panurensis* e 8,2% para galhos de *O. leucoxilum*. A metodologia **X** obteve alto rendimento de frações alcaloídicas de ambas as partes das plantas 9,3% de galhos e 11,8% folhas de *A. panurensis* e 15,3% para folhas e 19,3% para galhos de *O. leucoxilum*.

6.1 Análises das frações alcaloídicas da espécie *A. panurensis* por Espectrometria de massas.

As três metodologias apresentaram perfis espectrométricos com íon alcaloídico semelhante tanto para folhas quanto para galhos, apresentando poucos íons em destaque. Nas três observou-se a incidência do íon de massa m/z 330 reticulina Schmidt *et al.*, (2005), relatado na espécie *Endlicheria verticillata* Dias *et al.*,(2003). A metodologia **W** apresentou uma absorbância de 20% e as metodologias **X** e **Y**

apresentaram de 100% de absorvência para esse íon. A única metodologia que apresentou o íon m/z 300 N-metilcoclaurina foi a Y, alcaloide já relatado na espécie *Aniba ferrea* Schmidt et al., 2005, somente as frações alcaloidicas de galhos.

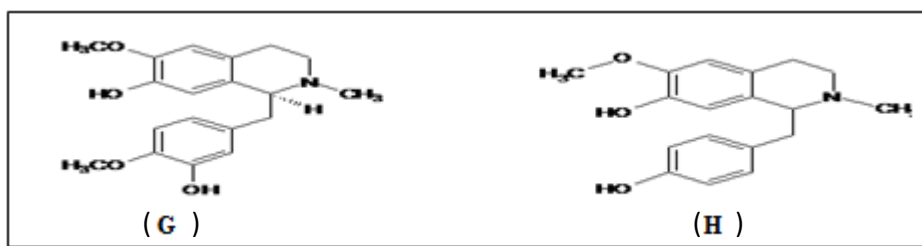


Figura 4 – Alcaloides isolados do gênero *Aniba*. **G-** m/z 330 reticulina, **H-** m/z 300 N-metilcoclaurina.

6.2 Análises das frações alcaloídicas da espécie *O. leucoxilum* por Espectrometria de massas.

O modo de ionização utilizado para todas as amostras foi o positivo. Os espectros correspondentes ao perfil alcaloídico das três metodologias apresentaram poucos íons em destaque, sendo eles, tanto para folhas quanto para galhos, os íons de m/z 356 de maior intensidade, alcaloide sugerido 6-N-óxido dicentrina, ocokriptina ou leucoxina (Garcez *et al.* 2011; Zanin *et al.*, 2011; Cava et al., 1968), isolados das folhas e cascas de *Ocotea acutifolia*, *Ocotea perula* e *Ocotea macropoda* (Lauraceae) e o m/z 342, alcaloide sugerido metilarmepavina metiodida [C₂₁H₂₈NO₃]⁺ (Wu & Huang (2006)).

Das três metodologias em relação a rendimentos a mais significativa foi a de Giordani *et al* (2008)., tanto para galhos quanto para folhas. Porém para a caracterização, quantificação e obtenção de melhores rendimentos dos alcaloides obtidos a partir da realização dessas três metodologias, foram realizadas colunas em fase normal filtrante e de isolamento a partir do extrato bruto desengraxado.

6.3 Ensaio Biológico

Foi observada a atividade das amostras de frações pelo teste de difusão em poço, contra as bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A fração alcaloídica testadas foram as da metodologia X. A fração de folhas de *O.leucoxilum* não deu resultado positivo em cepas de bactérias, já a de galhos deu resultado positivo contra *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* em dimensão de halo de 15mm. As frações de *A. panurensis* galhos e folhas deram resultados positivos para *Bacillus subtilis* com halo de 15mm para folhas e 17mm para galhos, *Staphylococcus aureus* com 21mm para folhas e com 13mm para galhos, *Streptococcus parasanguinis* com 13mm para folhas e galhos.

Para a bactéria *Streptococcus galoltyicus* só obteve resultado positivo a fração alcaloídica de folhas. As substâncias isoladas serão enviadas para a realização dos ensaios biológicos, atividade antimicrobiana, ensaio de citotoxicidade e atividade antiparasitária e estes resultados serão adicionados na apresentação final.

6.4 Fracionamento e isolamento a partir do extrato etanólico de galhos de *Aniba panurensis*

Foi feito o fracionamento do extrato etanólico bruto desengraxado dos galhos utilizando 3g de amostra, em uma mistura de solventes de polaridade crescente de hexano, acetato, metanol. Obteve-se 19 frações, e sendo analisado o perfil cromatográfico obtido em cromatografia de camada delgada, foram reunidas as frações f5, f5a, f5b e f5c (222,4 mg). A partir dessas amostras reunidas foi realizado um refracionamento, gerando uma segunda coluna com 14 frações. As frações f2 e f3 formaram um precipitado de coloração amarelada, a análise por CCD apresentou que elas eram a mistura de várias substâncias de interesse com Rf's diferentes. Visando o isolamento dessas substâncias, reveladas em dragendorff dando resultado positivo para alcaloides, foi feita uma terceira coluna de isolamento a partir dessas amostras reunidas (137 mg), obteve-se 20 frações.

Essa coluna apresentou vários precipitados que foram analisados em CCD. A fração f4 apresentou um perfil cromatográfico bem limpo, o que sugere uma substância pura. Essa amostra foi revelada em revelador específico para alcaloides dragendorff apresentando resultado positivo para alcaloides, portanto, foi feita a análise em espectrometria de massas obtendo-se um espectro com apenas um pico majoritário de m/z 273, esse alcaloide já foi isolado na espécie e sua estrutura elucidada na trabalho de Souza, a. d. (2014). É um alcaloide indólico de fórmula molecular C₁₄H₁₂N₂O₄ como pode ser observado na figura 5.

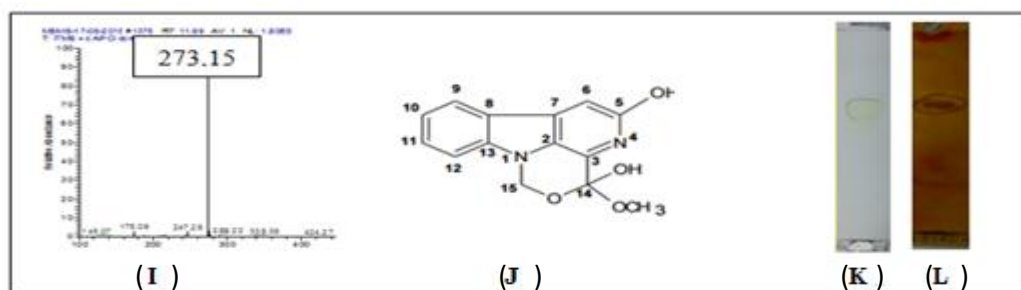


Figura 5. I- Isolado m/z 273 do extrato etanólico de galhos da espécie *A. panurensis* Espectro de massas. J-Estrutura molecular. CCD's : K- Revelado vanilina sulfúrica e L- Revelado em dragendorff. Eluente 5:5 hexano: acetona

As frações da coluna 3ª f2, f3 e f4, foram reunidas (98mg) e analisadas em CCD em um eluente de 5:5 Hexano: Acetona. Essa CCD apresentou 5 manchas com Rf's bem separados. Esse eluente proporcionou uma excelente separação dos componentes da amostra, o que possibilitou submetê-la a cromatografia líquida de média pressão (MPLC), equipamento para isolamento de substâncias que já foram fracionadas e que possuem polaridades semelhantes e de difícil separação.

A coluna em MPLC obteve 112 frações, muitas frações apresentaram precipitados brancos e amarelos. As frações f10, f12, f13, e f15 foram submetidas à recristalização em etanol, acetona e hexano, respectivamente. Da fração f10 foi obtido o alcaloide, identificado por espectrômetro de massas em modo de ionização positiva, m/z 297,19, precipitado de cor branca. Da fração f12 foi obtido o alcaloide de m/z 229,19, precipitado branco transparente com aspecto gelatinoso. Esses dois íons alcaloídicos não tem sugestão de nome na literatura, mas há incidência em frações alcaloidicas obtidas em partição ácido- base da *A. panurensis* no trabalho de Souza, a. d. (2014). Da f13 foi obtido, mais uma vez isolado, o alcaloide m/z 273,15 e da f15 o m/z 289,20. Esses dois alcaloides indólicos já tiveram suas estruturas elucidadas no trabalho de Souza, a. d. (2014), porém ainda não possuem sugestão de nome.

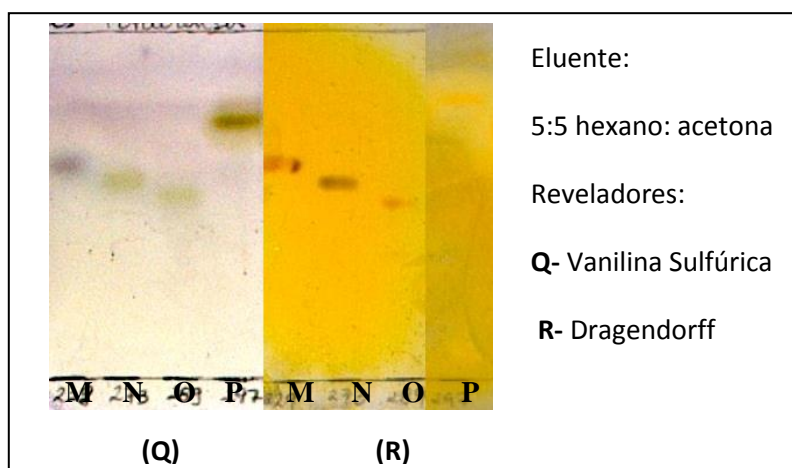


Figura 6. Isolados obtidos das recristalizações das frações do MPLC: **M**- m/z 229,19, **N**- m/z 273,15, **O**- m/z 289,20, **P**- m/z 297,19.

Obtidos os cristais por recristalização, processo no qual são retiradas as impurezas da sua amostra até a cristalização da fração, as amostras foram submetidas à espectrometria de massas.

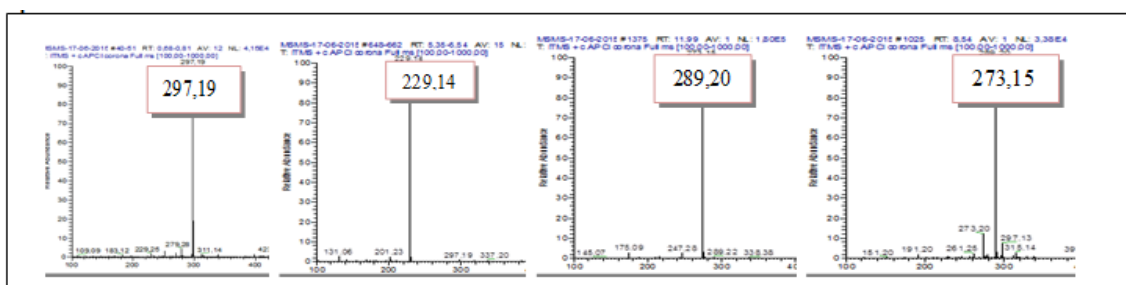


Figura 7. Espectros de massas, modo de ionização positiva, das amostras indicando os quatro alcaloides isolados.

6.3 Fracionamento e isolamento do extrato etanólico de galhos *O. leucoxilum*

Para o extrato de *O. leucoxilum* foi realizada uma coluna a partir extrato bruto de galhos desengraxado utilizando 3 g em uma coluna com 3,5 cm de diâmetro e 20 cm de altura de sílica, obtendo-se 36 frações. A fase móvel foi composta por uma mistura de solventes em polaridade crescente de hexano, acetato, metanol.

A partir das CCD's feitas das frações da coluna, foram reunidas as f 9, f 10 e f 10A. Essas frações foram submetidas à lavagem com etanol para retirar parte das impurezas, obtendo-se assim um precipitado de coloração esbranquiçada. Esse foi recristalizado com hexano, obtendo-se um cristal e uma plaquinha com um único Rf, o que sugere uma substância isolada. Essa amostra foi revelada em dragendorff dando resultado positivo para alcaloide. O espectrômetro de massas da central analítica da Universidade Federal do Amazonas quebrou, impossibilitando a análise do cristal antes da submissão do relatório final, porém a análise será feita e o resultado será adicionado na apresentação final.

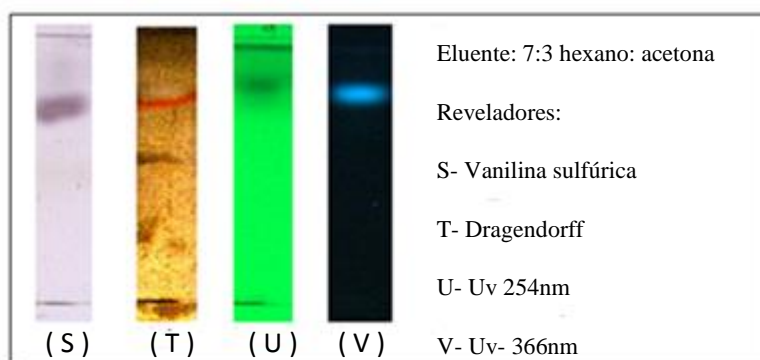


Figura 8. CCD da fração do cristal obtido de *Ocotea leucoxilum*.

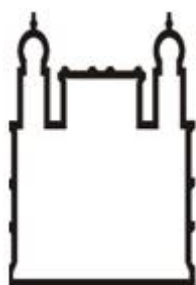
7.0 CONCLUSÃO

Analisando as três metodologias de extração alcaloidicas, pode-se observar que a metodologia de Giordani *et al* (2008) apresentou os melhores rendimentos tanto para *A. panurensis*, com 9,3% para galhos e 11,8% para folhas, quanto para *O. leucoxilum* com 19,3% para galhos e 15,3% para folhas. Através das análises feitas em Espectrometria de massas, pode-se observar que para o perfil de *O. leucoxilum*, o íon de maior incidência em praticamente todos os espectros foi o de m/z 546, alcaloide sugerido 6-N-óxido dicentrina, ocokriptina ou leucoxina (Garcez *et al.* 2011; Zanin *et al.*, 2011; Cava *et al.*, 1968). Já para a *A. panurensis* o íon de m/z 330, alcaloide sugerido reticulina Schmidt *et al.*, (2005), foi o de maior intensidade para todas as partes da planta estudada, tendo incidência nas três metodologias e que só houve incidência do íon m/z 300, alcaloide sugerido N-metilcoclaurina, na fração alcaloidica extraída em diclorometano da metodologia de Giordani *et al* (2008), confirmando que essa foi a melhor metodologia de extração dentre as três realizadas.

Visando a caracterização do perfil alcaloídico das espécies, foram feitos fracionamentos em colunas em fase normal e de alta pressão MPLC, análise em cromatografia em camada delgada e recristalização das frações obtidas. A partir do extrato de galhos de *A. panurensis* foi possível isolar os alcaloides de íons m/z 229,19, m/z 297, 19, que estão em processo de análise em RMN e Espectrometria de Massas para a elucidação de suas estruturas moleculares, e os íons m/z 273,15, m/z 289,20, alcaloides indólicos de fórmulas moleculares (C₁₄H₁₂N₂O₄) e (C₁₄H₁₂N₂O₅), como sugerido no trabalho de Souza, a. d. (2014). A partir dos galhos de *O. leucoxilum* obteve-se um cristal que deu resultado positivo para alcaloides, quando revelado em revelador específico dragendorff, que está em processo de análise em Espectrometria de Massas.

A família Lauraceae possui espécies que contém substâncias de altos potenciais fitoterápicos e o estudo das espécies *A. panurensis* e *O. leucoxilum* é de suma importância para a caracterização desses metabólitos pertencentes à família. Os testes biológicos que serão realizados, garantido pela pureza das substâncias isoladas nesse trabalho, serão de grande importância para o possível desenvolvimento de novos fármacos com atividades antibacteriana, citotóxica e antioxidante.

8.0 AGRADECIMENTOS



Ministério da Saúde
FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz



UFAM

9.0 Referência Bibliográfica

AGUIAR, L. M. G, *et al.*, [The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part LX. Cecilin, a 1-benzyl- \$\beta\$ -carboline from *Aniba santalodora*](#). *Phytochemistry*, v. 19, n. 8, p. 1859-1860, 1980.

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

CARVALHO, P. E. R. Espécies arbóreas brasileiras. *Embrapa Informação Tecnológica*, v. 1, p. 318, 2003.

CAVA, M.P.; Rao, K.V.; Douglas, B.; Weisbach, J.A. Alkaloids of *Cassytha americana*. *J. Org. Chem.* V. 33, p. 2443-2446, 1968.

CAVA, M. P.; WATANABE, Y.; BESSHO, K.; MITCHELL, M.J.; ROCHA, A. I. *Ocotea* alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases. *Tetrahedron Letters*, v. 20, p. 2437-2442, 1968

CHÉRIGO, L, *et al.*, Antitrypanosomal activity of a novel norlignan purified from *Nectandra lineata*. *Natural Product Research*, v. 19, n. 4, p. 373-377, 2005.

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

DJILANI, A, *et al.*, New Extraction Technique for Alkaloids. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 17, No. 3, 518-520, 2006.

FIDELIS, C.H.V, *et al.*, Correlation between maturity of tree and GC % GC-qMS chemical profiles of essential oil from leaves of *Aniba rosaeodora* Ducke. *Microchemical Journal*, 2012. 63.

GARCEZ, Fernanda R.; SILVA, Ana Francisca G. da; GARCEZ, Walmir S.; LINCK, Gabriela; MATOS, Maria de Fatima C.; SANTOS, Evelyn C. S.; QUEIROZ, Lyara M. M. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Médica*, vol. 77, p. 383- 387, 2011.

GIORDANI, R. B, *et al.*, Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de *Hippeastrum* (Amaryllidaceae). *Química Nova*, Vol. 31, No. 8, Pp 2042-2046, 2008.

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

MORAIS, L.C.S.L, *et al.*, (+)-4'-O-Demethylepimagnoli A from *Ocotea duckei*. *Fitoterapia*. v. 69,p.91-92, 1998.

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

RIBEIRO, J. E. L. S. *et al.*, Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. Manaus: INPA, p. 816, 1999.

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

SANTOS-FILHO, D.; SARTIS, S. J. Alcalóides de *Nectandra megapotamica* (Spring) Chodat Et Hassler: Atividade inibidora do desenvolvimento de *Crithidia fasciculata* e *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto*, v. 17, n. 1, p. 21-24, 1980.

SCHMIDT, J.; RATH, Klaus; BOETTCHER, Chotima; ZENK, Meinhart 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

SILVA, J. R. D. A. *et al.*, Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from Lauraceae species. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

SOUZA, A. D. Isolamento de alcaloides e atividades biológicas de espécies de lauraceae da Amazônia, (2014)

AICANTRA, J. M. *et al.*, Composição química de óleos essenciais de espécies de *Aniba* e *Licaria* e suas atividades antioxidante e antiagregante plaquetária. *Quim. Nova*, Vol. 33, No. 1, 141-145, 2010

WOLTER FILHO, W. *et al.*, *Acta Amazônica* **1985**, 15, 193

WU, W.; HUANG, C.; Sctructural Elucidation of Isoquinoline, Isoquinolone, Benzyloquinoline, Aporphine, and Phenanthrene Alkaloids using API-ionspray Tandem Mass Spectrometry. *The Chinese Pharmaceutical Journal*, v. 58, p. 51-55, 2006.

YAMAGUCHI, K. K. L. Estudos biológicos dos extratos e composição química dos óleos essenciais de espécies da família Lauraceae. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais). Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus. 2011.144p.

ZANIN, S. M. W. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (LAURACEAE). *Quim. Nova*, vol. 30, n. 1, p. 92-98, 2007.

1.0 CRONOGRAMA

Nº	Descrição	Ago 2014	Set	Out	Nov	Dez	Jan 2015	Fev	Mar	Abr	Mai	Jun	Jul
1	Pesquisa bibliográfica	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
2	Obtenção dos extratos		S	S									
3	Análises cromatográficas		S	S	S	S	S	S	S	S	S		
4	Análises espectrométricas					S	S						
5	Análises espectroscópicas						S	S	S				
6	Fracionamentos e isolamento			S	S	S	S	S	S	S	S		
7	Identificação dos constituintes								S	S	S	S	
8	Apresentação de relatório Parcial												
9	Elaboração do Resumo e Relatório Final												S
10	Preparação da Apresentação Final para o Congresso							S	S		S		