

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES DO
GÊNERO *ANIBA* E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

NA UFAM

Bolsista: Virlane Reis Cunha, FAPEAM

MANAUS

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRO REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
DEPERATAMENTO DE APOIO A PESQUISA

RELATÓRIO FINAL

PIB-E /02111/ 2015

OTIMIZAÇÃO DE METODOLOGIAS PARA EXTRAÇÃO DE ALCALOIDES DO
GÊNERO *ANIBA* E SUAS ATIVIDADES BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

NA UFAM

Bolsista: Virlane Reis Cunha, FAPEAM

Orientadora: Prof^a Dr^a Larissa Silveira Moreira Wiedemann

Co-orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

Co-orientador: MSc. Nilma de Souza Fernandes

MANAUS

2015

Todos os direitos deste relatório são reservados á 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 pela Fundação de Amparo de Pesquisa-FAPEAM, 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 “Estudos Químicos de Leguminoseae, Lauraceae e Burseraceae”.

RESUMO

A família Lauraceae é uma das mais importantes na floresta amazônica. Diversas de suas espécies apresentam em sua composição substâncias com pronunciadas atividades biológicas, com cerca de 2.500 espécies e 50 gêneros distribuídos nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. O gênero *Aniba* é muito abundante na região amazônica com espécies empregadas na medicina popular, na indústria cosmética e alimentícia. O gênero *Aniba* destaca-se também pela presença de alcaloides de estrutura diferenciada, e bioativas. O interesse nesses metabolitos secundários justifica-se diante do potencial biológico descrito para esse gênero como, por exemplo, atividade anticâncer, antimicrobiana e antidepressiva. Em continuidade aos estudos realizados por nosso grupo de pesquisas (Q-BiomA), com objetivo de otimizar metodologias para extração de alcaloides, analisou-se a seletividade e os rendimentos das metodologias, para obtenção de frações ricas em alcaloides de *Aniba ferrea*, *Aniba panurensis* e *Aniba parviflora*. Obteve-se os extratos brutos, por maceração em etanol, e realizou-se as partições alcaloídicas de acordo com as metodologias aprimoradas, a melhor seletividade foi observada na metodologia de Giordani, através de análise em CCD, assim como os melhores rendimentos obtidos pela mesma metodologia. A otimização ocorreu na substituição de um ácido forte por um ácido fraco, evitando assim a degradação de alcaloides, a validação da otimização foi comprovada por espectrometria de infravermelho. Nas frações alcaloídicas otimizadas de folhas e galhos de *Aniba ferrea* e *Aniba parviflora* realizou-se coluna de fase normal a fim de promover o isolamento dos alcaloides, as frações que foram positivas em meio ao revelador seletivo draguendorff foram unidas, e fracionadas novamente em meio ao aparelho de MPLC, resultando em cristais que se encontram em processo de purificação por recristalização e identificação.

Palavras-chave: Alcaloides, desenvolvimento de metodologias analíticas, otimização.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	6
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2 MÉTODOS UTILIZADOS	8
Metodologia 1	8
Metodologia 2	8
Metodologia 3	8
2.2 Análises Cromatográficas	9
2.3 Otimização das extrações	9
2.4 Validação de otimização	9
2.5 Fracionamento e Isolamento	9
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	10
3.1 Comparação das Metodologias	10
Metodologia 1	10
Metodologia 2	10
Metodologia 3	11
3.2 Análise dos rendimentos	11
3.3 Análise cromatográfica das Metodologias	11
3.4 Otimização de Metodologia	13
3.5 Validação de Otimização	14
3.6 Fracionamento e Isolamento	14
CONCLUSÃO	15
4 AGRADECIMENTOS	16
5 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO	17
6 CRONOGRAMA	19
APÊNDICE A -Análise dos Rendimentos	20
APÊNDICE B- Validação de Otimização	22
APÊNDICE C- Fracionamento e Isolamento	25

INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se mundialmente por apresentar uma imensa biodiversidade, que permanece pouco 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* 2009). Dentre essa riqueza, temos a família botânica Lauraceae, que apresenta relatos de uma rica composição química de substâncias bioativas.

A família Lauraceae tem grande destaque na região amazônica. Além das atividades biológicas de seus metabolitos especiais, as espécies são exploradas economicamente pelos seus óleos essenciais, na marcenaria, na construção, na culinária e na medicina popular (Marques, 2001). Segundo relatos da literatura, o gênero *Aniba* apresenta atividades farmacológicas (Almeida *et al.*, 2009). Estudos preliminares das frações alcaloídicas de *Aniba ferrea*, *Aniba parviflora*, *Aniba panurensis* apresentaram expressivos resultados em testes microbiológicos salientando relatos de isolamentos de alcaloides inéditos na literatura. No entanto os baixos rendimentos na obtenção destes metabolitos secundários impedem uma melhor bioprospecção desses estudos, desestimulando a integração: princípio ativo- indústria (Silva, 2014).

Neste contexto contribuindo para o conhecimento sobre o isolamento de produtos naturais, propõem-se a realizar a bioprospecção de alcaloides obtido de três espécies de Lauraceae da Amazônia, pertencentes ao gênero *Aniba*. Com objetivo de isolar e purificar os metabolitos especiais, através de técnicas cromatográficas, a otimização de metodologias para extração de frações alcaloídicas valida à maneira de obtenção, assim com os isolados a identificação destes metabolitos especiais ocorrerá por meio da combinação de técnicas espectroscópicas e espectrométricas, quanto às atividades biológicas será submetidas à bioensaios.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Estudos botânicos classificam a família Lauraceae, entre as famílias mais importantes do mundo. No Brasil, a maioria das espécies das famílias são encontradas em florestas pluviais e em restingas e nos cerrados (SHPHERD, 2000;QUINET,2002).

Quimicamente é rica em alcaloides, principalmente os isoquinolínicos, indólicos e triptofânicos (Ribeiro *et al*, 1999). Cordell e colaboradores (2001) registraram em seu trabalho o isolamento de 425 alcaloides, em 25 gêneros e em 189 espécies da família Lauraceae. Segundo a revisão de Custódio e Veiga (2014), é relatada na literatura uma grande variedade de alcaloides em Lauraceae, com mais de 300 estruturas em 21 gêneros, sendo os alcaloides isoquinolínicos a maior classe, com cerca de 287 compostos e este estão presentes nos gêneros de Lauraceae.

O gênero *Aniba* foi estabelecido por Aublet (1775), a partir de *A.guianenses*, esse gênero possui cerca de 40 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).

Recentemente (Silva, 2014), relata o isolamento de alcaloides, da espécie *Aniba panurensis* (folhas) correspondente alcaloide indólico. Da espécie *Aniba ferrea*(folhas) isobaldina que corresponde a reticulina, já isolados em *Anibamuca*(Bravo *et al.*, 1996).

Devido ao interesse nesses metabolitos secundários, é fundamental o desenvolvimento de métodos analíticos que possam monitorar a melhor obtenção dos mesmos. Muitos produtos naturais que contêm átomos de hidrogênio básicos exemplo alcaloides como morfina e a quinina têm o potencial para tratar uma ampla gama de doenças humanas. No entanto a presença de hidrogênio numa molécula alvo pode complicar sua síntese química devido a basicidade dos átomos de hidrogênio, ocorrendo suscetibilidade á oxidação (MARIN *et al.*,2014).

2. MÉTODOS UTILIZADOS

O material botânico de *Aniba ferrea*, *Aniba panurensis* e *Aniba parviflora*, (folhas e galhos) coletados, na reserva florestal Ducke, foram limpos, separados e triturados. Realizou-se os extratos brutos a partir do material botânico em extração sólido líquido a frio por 72 horas em etanol destilado. Em seguida, filtrou-se e o etanol foi eliminado com auxílio do evaporador rotatório.

Metodologia 1

Iniciaram-se as análises das metodologias a partir da metodologia aprimorada por (Giordani *et al.*, 2008), utilizada por este grupo para obtenção de fração alcaloídica. Utilizou-se 1 g de extrato bruto das folhas e galhos das respectivas espécies, que foram solubilizados em 10 mL de solução de HCl 3%, para a retirada de substâncias lipofílicas adicionou-se 40 mL de hexano. Para a retirada de substâncias de média polaridade adicionou-se 40 mL de diclorometano, a alcalinização ocorreu ao adicionar-se \approx 4-6 gotas de NH_4OH . Em seguida extraiu-se a fração alcaloídica com 40 mL de diclorometano. Devido o gênero *Aniba* apresentar muitas substâncias lipofílicas principalmente em suas folhas utilizou-se em média em cada partição 640 mL de hexano na retirada destas substâncias, e 280 mL de diclorometano na retirada de substâncias de média polaridade, seguindo de 200 mL de diclorometano após a alcalinização obtendo a fração alcaloídica.

Metodologia 2

De acordo com a metodologia de (Costa *et al.*, 2006), solubilizou-se 1 g de extrato bruto das folhas e galhos das respectivas espécies, em 10 mL de diclorometano, em seguida acidificou-se com 10 mL de solução de HCl 3%, Posteriormente adicionou-se 40 mL de diclorometano para a retirada de substância de média e baixa polaridade. A fração aquosa gerada após a retirada do diclorometano foi alcalinizada com \approx 4-6 gotas de NH_4OH , ajustando-se o pH entre 9-10, assim na extração da fração alcaloídica adicionou-se 40 mL de diclorometano. Nesta metodologia utilizou-se em média 420 mL de diclorometano, para a retirada de substâncias de média e baixa polaridade, seguida de 320 mL de diclorometano, obtendo assim a fração rica em alcaloides.

Metodologia 3

De acordo com a metodologia aprimorada por (Silva, 2007), Utilizou-se 500 mg de material vegetal das folhas e galhos das respectivas espécies, sobre o material vegetal adicionou-se 5 mL de solução de hidróxido de amônio a 10%, ocasionando a mudança

dos alcaloides encontrados em sais na natureza, para a fórmula molecular. Em seguida adicionou-se 5 mL de diclorometano para extração dos alcaloides. Desprezando a mistura formada pelo o material vegetal, em meio a solução 10% de NH₄OH e diclorometano, observou-se a formação de duas fases, fase densa e aquosa, que foram separadas com auxílio de uma pipeta, a fase densa resultante da extração dos alcaloides foi acidificada com 5 mL de solução de HCl 3%. Observou-se novamente a formação duas fases, aquosa e densa, no entanto desprezou-se a fase densa. E a fase aquosa foi alcalinizada com ≈4 a 6 gotas de NH₄OH ajustando-se o pH para 9-10, em seguida adicionou-se 5mL de diclorometano obtendo a fração alcaloídica. As análises predominaram-se em: avaliação dos rendimentos e comparação das metodologias, que implicou na aplicação destas metodologias em repetidas vezes.

2.2 Análises Cromatográficas

A análise utilizada para avaliar o critério de seletividade foi realizada por CCD, através da fase estacionária (placa cromatográfica) e fase móvel (eluente). Durante a passagem da fase móvel os componentes foram separados de acordo com a seletividade no eluente: diclorometano:clorofórmio:metanol (2/7/3).

2.3 Otimização das extrações

A otimização ocorreu na substituição do ácido forte por um fraco no caso o ácido clorídrico por ácido acético, a fim de evitar possíveis degradações aos alcaloides.

2.4 Validação de otimização

A validação de otimização, ocorreu comparando as frações alcaloídicas de folhas e galhos de *Aniba ferrea*, *Aniba panurensis* e *Aniba parviflora* resultantes da metodologia aprimorada por (Giordani., 2008), e as frações otimizadas, em meio análise de espectrometria de infravermelho onde retirou-se das respectivas frações 5 mg, que foram solubilizadas em metanol para análise de infravermelho. As partilhas originaram-se partir de 500 mg do sal de Brometo de potássio, viabilizando a análise.

2.5 Fracionamento e Isolamento

Com objetivo de promover o isolamento dos alcaloides das folhas e galhos das respectivas espécies do gênero *Aniba*, repetiu-se em média 14 vezes a metodologia otimizada a fim de se obter uma quantidade estimada de 350 mg de frações alcaloídicas, para iniciar-se os estudos de fracionamento e isolamento. Com auxílio de colunas de fase normal, com diâmetro de 2 e 3 cm, e do aparelho de MPLC.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dentre as espécies propostas para este estudo, priorizou-se a *Aniba ferrea*, em virtude da disponibilidade para os propósitos deste trabalho: comparação metodológica e otimização do método mais seletivo.

O quadro 1 demonstra o resultado dos cálculos realizados para obtenção dos rendimentos a partir da extração sólido líquido de 7,500 kg de *Aniba ferrea* folhas e galhos, 485 g das folhas de *Aniba panurensis* e 700 g dos seus galhos, 500 g das folhas de *Aniba parviflora* e 300 g dos seus galhos.

Quadro1- Rendimento dos extratos das respectivas espécies do gênero *Aniba*

Espécies	Rendimento em folhas %	Rendimentos em galhos %
<i>Aniba ferrea</i>	42,4	27,0
<i>Aniba panurensis</i>	19,2	19,2
<i>Aniba parviflora</i>	26,1	15,4

Iniciou-se as análises metodológicas, e padronização com 1g de extrato bruto da espécie *Aniba ferrea*, para aplicação das metodologias aprimoradas por (Giordani.,2008) metodologia 1, (Costa., 2006) metodologia 2 e (Silva, 2007) metodologia 3, realizou-se o mesmo com as respectivas espécies *Aniba panurensis* e *Aniba parviflora*.

3.1 Comparação das Metodologias

Metodologia 1

Esta metodologia é seletiva por realizar-se as extrações de acordo com a seletividade das substâncias acidifica-se promovendo a protonação dos alcaloides, seguida da retirada das frações apolares, como nas folhas das respectivas espécies de *Aniba* estão presentes substâncias lipofílicas emprega-se elevadas solubilizações em hexano, as substâncias de média polaridade são extraídas em diclorometano, após alcalinização os alcaloides desprotonam-se sendo extraídos novamente em diclorometano.

Metodologia 2

A ausência da solubilização das frações lipofílicas resultantes nas folhas das respectivas espécie do gênero *Aniba* faz desta metodologia pouco seletiva, seguida da alcalinização os alcaloides são protonados e as frações apolares são extraídas na solubilização em diclorometano. Posteriormente basicifica-se desprotonando, e a fração alcaloídica é obtida na solubilização em diclorometano.

Metodologia 3

Nesta metodologia a extração ocorreu sobre o material vegetal das respectivas espécies do gênero *Aniba* (folhas e galhos). A Adição de solução de hidróxido de amônio, ocasiona a mudança dos alcaloides encontrados em sais na natureza, para a fórmula molecular. Em seguida adiciona-se diclorometano para extração dos alcaloides. Desprezando a mistura formada pelo o material vegetal, em meio a solução 10% de NH_4OH e diclorometano, observou-se a formação de duas fases, fase densa e aquosa, que foram separadas com auxílio de uma pipeta, a fase densa resultante da extração dos alcaloides foi acidificada ocasionando a protonação dos alcaloides com solução de HCl 3%. Observou-se novamente a formação duas fases, aquosa e densa, no entanto desprezou-se a fase densa. E a fase aquosa foi alcalinizada com NH_4OH desprotonando os alcaloides, por fim adicionou-se diclorometano obtendo-se a fração alcaloídica.

3.2 Análise dos rendimentos

O quadro de avaliação dos rendimentos encontra-se como apêndice A, a avaliação foi realizada a partir dos cálculos de variação de massa, nas metodologias analisadas: metodologia 1 (Giordani, 2008), metodologia 2 (Costa *et al.*, 2006) e metodologia 3 (Silva, 2007). A partir de 1g de extrato bruto das folhas e galhos das respectivas espécies do gênero *Aniba*.

Onde a metodologia 1 aprimorada por Giordani, resultou nos rendimentos mais expressivos, deste modo conclui-se que a melhor metodologia observada, através da avaliação dos cálculos de rendimentos foi a metodologia 1 aprimorada por Giordani, e a segunda melhor foi a metodologia 3 aprimorada por Silva.

3.3 Análise cromatográfica das Metodologias

O eluente das análises empregado como fase móvel foi: Diclorometano:Clorofórmio:Metanol(2:7:3), e revelou-se as placas cromatográficas em sequência, no revelador universal: Vanilina sulfúrica, e no revelador específico Dragendorff. Nas figuras 1, 2 e 3 pode-se visualizar e comparar as frações alcaloídicas obtidas: metodologia 1 (Giordani, 2008), metodologia 2 (Costa *et al.*, 2006), metodologia 3 (Silva, 2007).

As frações alcaloídicas do gênero *Aniba* espécie folhas, foram espotadas nas cromatoplasmas A e B. As frações alcaloídicas do gênero *Aniba* espécie galhos, Foram espotados nas cromatoplasmas C e D.

Figura 1- Comparação entre as metodologias 1, 2 e 3 das folhas e galhos *Aniba ferra*:

Frações alcaloídicas *A. ferra* folhas

Frações alcaloídicas *A. ferra* galhos

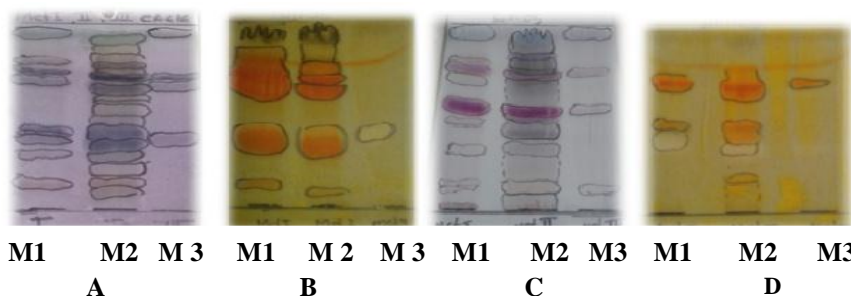


Figura 2- Comparação entre as metodologias 1, 2 e 3 das folhas e galhos *Aniba panurensis*:

Frações alcaloídicas *A. panurensis* folhas

Frações alcaloídicas *A. panurensis* galhos

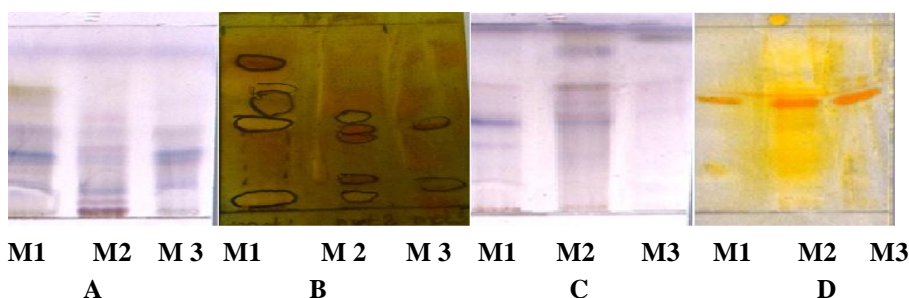
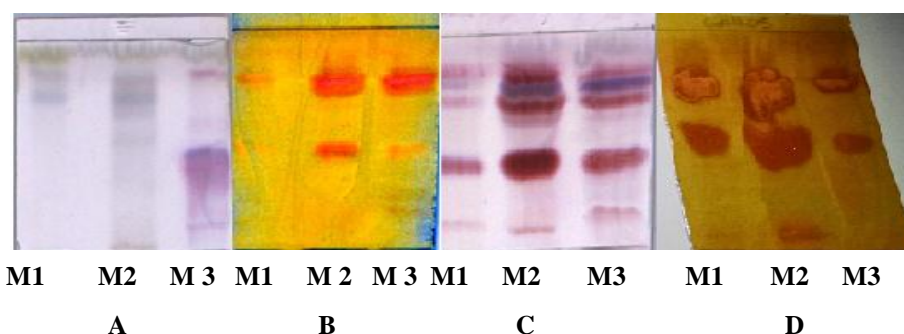


Figura 3- Comparação entre as metodologias 1, 2 e 3 das folhas e galhos *Aniba parviflora*:

Frações alcaloídicas *A. parviflora* folhas

Frações alcaloídicas *A. parviflora* galhos



Metodologia 1 (M1) Metodologia 2 (M2) Metodologia 3 (M3)

observou-se características semelhantes o que foi favorável para a validação de metodologia onde:

A metodologia 1 (M1) expostas nas cromatoplasmas A e C, correspondendo as folhas e galhos das respectivas espécies, revelaram em meio ao revelador universal vanilina sulfúrica, melhor seletividade diante das outras metodologias aplicadas e com a mesma validade observadas diante das três espécies. As manchas características de alcaloides foram confirmadas diante da revelação em draguendorff, revelador seletivo que podem ser visualizados nas cromatoplasmas B e D folhas e galhos das respectivas espécies do gênero *Aniba*.

Na metodologia 2 (M2) não foi possível observar o mesmo, diante das revelações em vanilina sulfúrica, observou-se varias manchas que correspondem a compostos lipofílicos resultantes, da não solubilização em um solvente apolar, nesta metodologia inicia-se as solubilizações em diclorometano, logo as frações resultantes, demonstram ser mais extrativas, e não seletivas, diante das cromatoplasas **B** e **D** reveladas em draguendorff é possível observar notoriamente manchas positivas para alcaloides, todavia a separação dos outros constituintes dificulta o isolamento, e por não apresentar um expressivo rendimento, é mais eficaz trabalhar com extrato, a trabalhar com esta fração.

A metodologia 3 (M3) apresentou melhor seletividade, comparando-as com a metodologia 1 (M1) e metodologia 2 (M2), seus rendimentos foram o segundo mais expressivos, o que faz desta metodologia eficaz para um trabalho de caracterização, como um dos objetivos deste projeto de pesquisa é o isolamento não foi viável a extensão fatorial para o mesmo, outro fator negativo observado foi a possível degradação de alcaloides minoritários.

A otimização, transcorreu de acordo com as análises de rendimentos mais expressivos, e de melhor seletividade observadas por cromatografia em camada delgada, das 3 respectivas espécies de *Aniba*, Intitulado como objetivo geral deste projeto, priorizou-se ao menos 6 meses de vigência de bolsa, para comparação de metodologias por CCD, validação e reaplicabilidade nas devidas espécies propostas para este projeto: *A. ferrea* *A.panurensis* e *A.parviflora*, de acordo com os resultados acima validou-se a metodologia 1 aprimorada por Giordani, para uma proposta de otimização.

3.4 Otimização de Metodologia

A otimização ocorreu na substituição do ácido forte por um fraco no caso o ácido clorídrico por ácido acético, a fim de evitar possíveis degradações nos alcaloides. A eficiência da extração foi avaliada por CCD a semelhança das plaquinhas espotadas com frações alcaloídicas realizadas com ácido clorídrico e ácido acético, onde foi possível visualizar a semelhança, e a maior intensidade na visualização na revelação. A confirmação final será por meio de análise de espectrometria de absorção infravermelho.

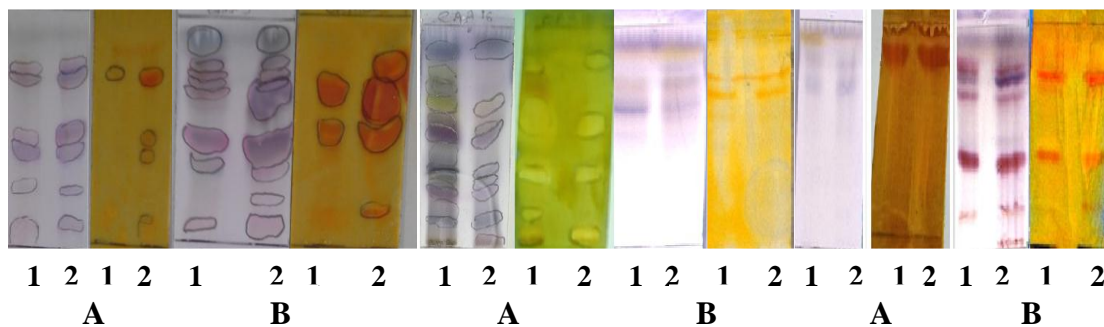
A figura 4 representa as frações alcaloídicas obtidas através da metodologia 1.(Giordani, 2008) otimizada,ao substituir ácido clorídrico por ácido acético

Figura 4- Comparação da fração alcaloídica, **1** obtida por solubilização em HCl e **2** por solubilização em ácido acético.

A. ferrea folhas e galhos

A. Panurensis folhas e galhos

A. Parviflora folhas e galhos



A= cromatoplaça A espotadas as frações alcaloídicas folhas das respectivas espécies de *Aniba*
B= cromatoplaça B espotadas as frações alcaloídicas galhos das respectivas espécies de *Aniba*

É possível observar uma maior intensidade na visualização da metodologia 2 aprimorada, ao substituir HCl por ácido acético, espotados na cromatoplaça A. O mesmo confirma-se diante das frações alcaloidicas obtidas dos galhos do gênero *Aniba* espotadas na cromatoplaça B.

3.5 Validação de Otimização

Os espectros resultantes da análise de infravermelho, estão anexado como apêndice B, foi possível observar um pico minoritário que aproxima-se com com estiramento de olefinas que corresponde em estiramentos de 690 e 980 cm^{-1} que é viável devido os compostos lipofílicos bastantes comuns nas espécies de *Aniba*.

Sugere-se para o segundo estiramento que varia de 1200 e 1360 cm^{-1} que seja um composto de aril-aquil-amina. Pequenas bandas de compostos nitrogenados foram observados nos estiramentos que variam ou compostos de carbono de 1500 e 1650 cm^{-1} , isso pode acontecer devido à vibração de estiramento do composto de carbono (C = O) ou deformação N-H, conhecidas também como banda de amidas I e II. Foi possível observar bandas características de alcinos e nitrila em estiramentos que variam de 2100 a 2260 e majoritariamente um estiramento que varia de 3000 a 3900 que neste estiramento caracteriza um composto de ácido carboxílico, a grupo de amida primária.

3.6 Fracionamento e Isolamento

O fracionamento das frações alcaloídicas das folhas e galhos de aniba ferrea e aniba parviflora, resultaram em quatro cristais que serão elucidados por espectrometria de massas e ressonância magnética, a marcha alcaloídica do fracionamento e isolamento estão anexados como apêndice C.

CONCLUSÃO

A escolha por otimizar a metodologia aprimorada por Giordani se deu por observar bons rendimentos e boa seletividade. A otimização ocorreu na substituição do ácido clorídrico por ácido acético. Em análise por CCD, a substituição demonstrou semelhança e validade nas extrações alcaloídicas.

A validação de otimização, foi confirmada por espectrometria de absorção em infravermelho, onde pode-se sugerir as mesmas semelhanças observadas em cromatografia em camada delgada, o que demonstra a eficiência desta técnica barata e de fácil domínio, e a eficiência seletiva da metodologia otimizada.

Embora empregue uma grande quantidade de solventes, a validade desta metodologia está na retirada das frações lipofílicas, solubilização em diclorometano, assim como acidificação e alcalinização. Esses critérios não são administrados nas outras metodologias com exceção da acidificação e alcalinização. Em decorrência disto, observa-se que na metodologia empregada por Costa, a ausência de adição de um solvente para a solubilização das frações lipofílicas resulta em uma metodologia pouco seletiva.

Em critério de seletividade a melhor metodologia observada foi aprimorada por Silva, embora seu rendimento seja considerado o segundo melhor entre as metodologias, não é factível para realização de marchas de isolamento e seu planejamento fatorial não é viável devido o restrito uso de solventes específicos e de elevado custo.

As atividades de fracionamento e isolamentos de alcaloides irá permanecer para o fechamento deste projeto, cursando assim todas atividades propostas nos objetivos, exaurindo assim o isolamento e purificação de metabolitos secundários (Alcaloides) e a respectivas identificação dos seus compostos, atribui essas atividades as espécies de *A. ferrea* e *A. panurensis*, assim como a elucidação de cristais de folhas e galhos de *Aniba parviflora*.

4 AGRADECIMENTOS



UFAM



FAPEAM



5 REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

ALCÂNTARA, J. M. Bioprospecção de espécies amazônicas da família Lauraceae com potencial aromático e medicinal. Manaus, AM: UFAM, 139p, 2009.

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 *Anibasantalodora*. *Phytochemistry*, v. 19, n. 8, p. 1859-1860, 1980.

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.

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

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

BRAVO, J. A.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L.; MORETTI, C.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Alkaloids from *Anibamuca*. *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.

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

KLAUSMEYER, P.; CHMURNY, G. N.; MCCLOUD, T. G.; TUCKER, K. D.; SHOEMAKER, R. H. A novel antimicrobial indolizinium alkaloid from *Anibapanurensis*. *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.

MOITA, I. S.; Alcaloides e citotoxicidade de *Licaria canella angustata* e *L. martiniana* (Lauraceae). *Iniciação científica* 2013-2014.

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.

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.

SILVA, Y.C.; Fitoquímica e atividades biológicas de três espécies de Aniba
(Lauracea). Iniciação científica 2013-2014.

6 CRONOGRAMA

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



Realizado



Não Realizado

APÊNDICE A -Análise dos Rendimentos

O Quadro 1 demonstra os cálculos de variação de massa para análise de critério de rendimentos, nas metodologias analisadas: metodologia 1 (Giordani, 2008), metodologia 2 (Costa *et al.*, 2006) e metodologia 3 (Silva, 2007). A partir de 1g de extrato bruto das folhas e galhos das respectivas espécies do gênero *Aniba*.

Quadro 1- Rendimento das frações alcalóidicas

<i>Aniba ferrea</i>	Varição de massa	Rendimento em %
Metodologia 1 folhas	ΔM	Rendimento em %
Fração hexanica	0,1642 mg	16,4%
Fração Dcm1	0,1666 mg	16,6%
Fração Dcm2	0,0721 mg	7,21%
Metodologia 1 galhos	ΔM	Rendimento em %
Fração hexanica	0,0178 mg	1,72%
Fração Dcm1	0,0352 mg	3,52%
Fração Dcm2	0,0314 mg	3,14%
Metodologia 2 Folhas	ΔM	Rendimento em %
F. média polaridade	0,0117 mg	1,17%
F. alcalóidica	0,0209 mg	2,09%
Metodologia 2 Galhos	ΔM	Rendimento em %
F. média polaridade	0,0336 mg	3,36%
F. alcalóidica	0,0207 mg	2,07%
Metodologia 3 Folhas	ΔM	Rendimento em %
F.alcalóidica	0,0003 mg	0,06 %
Metodologia 3 Galhos	ΔM	Rendimento em %
F. alcalóidica	0,0009 mg	0,12%

<i>Aniba panurensis</i>	Varição de massa	Rendimento em %
Metodologia 1 folhas	ΔM	Rendimento em %
Fração hexanica	0,0868 mg	8,68%
Fração Dcm1	0,2019 mg	2,01%
Fração Dcm2	0,0396 mg	3,96%
Metodologia 1 galhos	ΔM	Rendimento em %
Fração hexanica	0,2355 mg	2,35%
Fração Dcm1	0,7758 mg	7,75%
Fração Dcm2	0,0218 mg	2,18%
Metodologia 2 Folhas	ΔM	Rendimento em %
F. média polaridade	0,8753 mg	8,75%
F. alcaloídica	0,0134 mg	1,34%
Metodologia 2 Galhos	ΔM	Rendimento em %
F. média polaridade	0,875 mg	8,57%
F. alcaloídica	0,0173 mg	1,73%
Metodologia 3 Folhas	ΔM	Rendimento em %
F.alcaloídica	0,0135 mg	1,35 %
Metodologia 3 Galhos	ΔM	Rendimento em %
F. alcaloídica	0,0144 mg	1,44%

<i>Aniba parviflora</i>	Varição de massa	Rendimento em %
Metodologia 1 folhas	ΔM	Rendimento em %
Fração hexanica	0,2233 mg	2,23%
Fração Dcm1	0,3881 mg	3,88%
Fração Dcm2	0,0186 mg	1,86%
Metodologia 1 galhos	ΔM	Rendimento em %
Fração hexanica	0,0222 mg	2,22%
Fração Dcm1	0,3433 mg	3,43%
Fração Dcm2	0,0129 mg	1,29%
Metodologia 2 Folhas	ΔM	Rendimento em %
F. média polaridade	0,0733 mg	7,33%
F. alcaloídica	0,0007 mg	0,07%
Metodologia 2 Galhos	ΔM	Rendimento em %
F. média polaridade	0,0472 mg	4,72%
F. alcaloídica	0,0105 mg	1,05%
Metodologia 3 Folhas	ΔM	Rendimento em %
F.alcaloídica	NÃO REALIZOU-SE	NÃO REALIZOU-SE
Metodologia 3 Galhos	ΔM	Rendimento em %
F. alcaloídica	0,0122 mg	1,22%

A metodologia 1 destaca-se ao ser comparada entre as outras metodologias testadas, de acordo com o quadro 1 podemos observar que a metodologia aprimorada por Giordani resultou nos melhores rendimentos observados nas três espécies. Onde nas folhas de *Aniba ferrea* destaca-se 7,21% de fração alcaloídica, e 3,14% de fração alcaloídica referente aos seus galhos.

Resultando nos melhores rendimentos, neste processo ocorre transferência dos constituintes das espécies de acordo com afinidade em meio aos sistemas de polaridades através da solubilização em hexano que gerando-se fração hexânica, fração de média polaridade extraída em diclorometano e fração alcaloídica obtida após a quimisorção onde ocorre o ajuste de pH e novamente solubilização e extração em diclorometano.

A não solubilização em hexano, na metodologia 2, ou seja a não retirada das frações apolares neste caso lipofílicas, resulta em uma metodologia pouco seletiva e de rendimentos inferior a metodologia 1 ao se observar no quadro 2.

Para a espécie *Aniba ferrea* a metodologia 3 apresentou o rendimento mais inferior, 0,06% para as folhas de e 0,12% para os galhos de *Aniba ferrea*.

Para validação da melhor metodologia repetiu-se as três metodologias nas espécies de *Aniba panurensis* e *Aniba parviflora*.

O mesmo foi observado na espécie *Aniba panurensis* onde a metodologia 1 apresentou os melhores rendimentos resultando nas folhas 3,96 % de fração alcaloídica, e nos galhos 2,18% de fração alcaloídica, a metodologia 2 resultou em 1,34% de fração alcaloídica nas folhas e 1,73% de fração alcaloídica nos galhos, a metodologia 3 resultou em 1,35% de fração alcaloídica nas folhas de *Aniba panurensis* e 1,44% nos seus respectivos galhos.

A espécie *Aniba parviflora*, resultou-nos mais baixos rendimentos comparando com as outras espécies, no entanto a metodologia 1 novamente destacou-se resultando em 1,22 % de fração alcaloídica resultante das folhas e 1,29 % resultante dos galhos, a metodologia 3 correspondeu ao segundo melhor rendimento resultando em 1,22% referente aos seus galhos, esta metodologia não foi administrada para as folhas de *Aniba parviflora*, por não disponibilizar de material vegetal. A metodologia 2 resultou em 0,7 % de rendimento de fração alcaloídica das folhas e 1,05% de fração alcaloídica dos galhos.

Deste modo conclui-se que a melhor metodologia observada, através da avaliação dos cálculos de rendimentos foi a metodologia 1 aprimorada por Giordani, e a segunda melhor foi a metodologia 3 aprimorada por Silva.

APÊNDICE B- Validação de Otimização

Para validação da otimização, retirou-se 5 mg resultantes das frações alcaloídicas solubilizadas em ácido clorídrico, e ácido acético, substituído na otimização em seguida solubilizou-se em 1 mL de metanol para análise de infravermelho, preparou-se a partilha a partir de 600 mg do sal de brometo de potássio que foi prensado durante 15 minutos com auxílio de uma prensa, resultando na pastilha e sobre a mesma foi adicionado de 3 a 4 gotas das amostras que foram analisados no aparelho de infravermelho. Durante a análise a amostra sofre a excitação em meio à variação de energia da ordem de 80 a 40 kJ/mol que corresponde à faixa que engloba frequências vibracionais de estiramentos e dobramentos naturais das moléculas a serem investigadas como é possível visualizar nas figuras 1 e 2 que correspondem as frações alcaloídicas de folhas de *Aniba ferrea*. E as figuras 3 e 4 correspondem as frações alcaloídicas dos galhos de *Aniba ferrea*

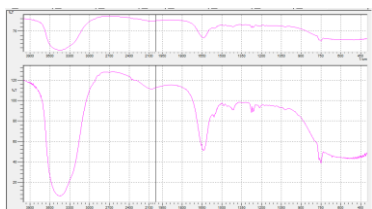


Figura 1- Espectro de fração alcaloídica solubilizada em ácido acético (otimização).

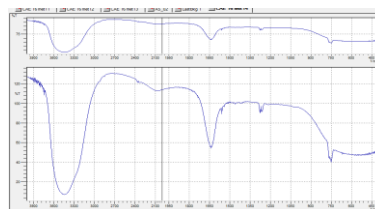


Figura 2- Espectro de fração alcaloídica Solubilizada em ácido clorídrico.

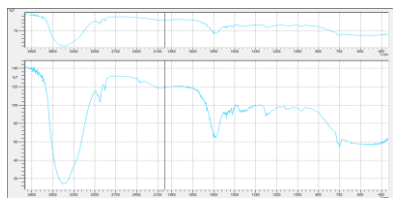


Figura 3- Espectro de fração alcaloídica solubilizada em ácido acético (otimização).

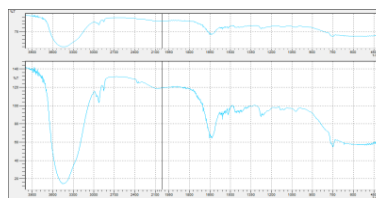


Figura 4- Espectro de fração alcaloídica Solubilizada em ácido clorídrico.

As figuras 5 e 6 correspondem aos espectros resultantes da validação de metodologia otimizada para as folhas da espécie *Aniba panurensis*. As figuras 7 e 8 correspondem como os espectros resultantes da validação de metodologia para os galhos de *Aniba panurensis*.

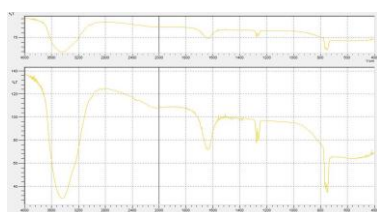


Figura 5- Espectro de fração alcaloídica solubilizada em ácido acético (otimização).

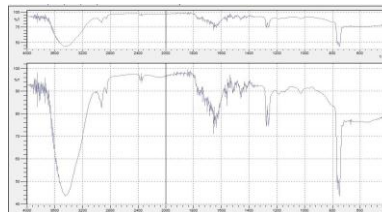


Figura 6- Espectro de fração alcaloídica Solubilizada em ácido clorídrico.

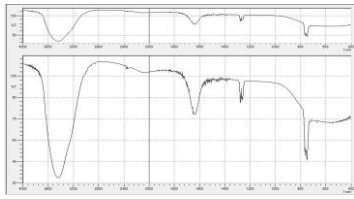


Figura 7- Espectro de fração alcaloídica solubilizada em ácido acético (otimização).

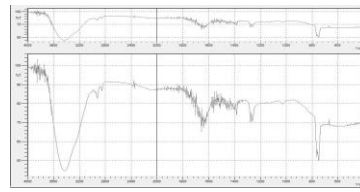


Figura 8- Espectro de fração alcaloídica Solubilização em ácido clorídrico.

As frações alcaloídicas pertencentes a espécie *Aniba parviflora* apresentou comportamentos diferentes como pode-se observar diante dos espectros resultantes da validação de metodologia onde as figuras 9 e 10 correspondem as frações alcaloídicas das folhas, a figuras 11 corresponde a frações alcaloídica dos galhos de *Aniba parviflora*.

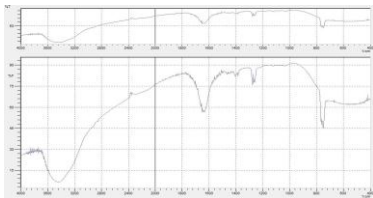


Figura 9- Espectro de fração alcaloídica solubilizada em ácido acético (otimização)

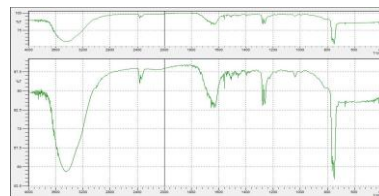


Figura 10- Espectro de fração alcaloídica solubilizada em ácido clorídrico.

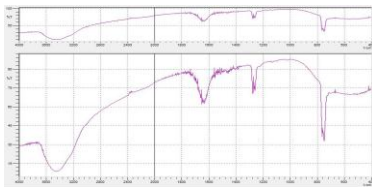


Figura 11- Espectro de fração alcaloídica solubilizada em ácido acético (otimização)

APÊNDICE C- Fracionamento e Isolamento

Nas frações alcaloídicas otimizadas de folhas e galhos de *Aniba ferrea* e *Aniba parviflora* realizou-se coluna de fase normal a fim de promover o isolamento dos alcaloides, as frações que foram positivas em meio ao revelador seletivo draguendorff foram unidas, e fracionadas novamente em meio ao aparelho de MPLC.

As figuras 12 e 13 correspondem a melhor visualização observada diante das corridas realizada no MPLC em meio a análise por CCD.

Figura12- frações promissoras para alcaloides de *Aniba ferrea* folhas:

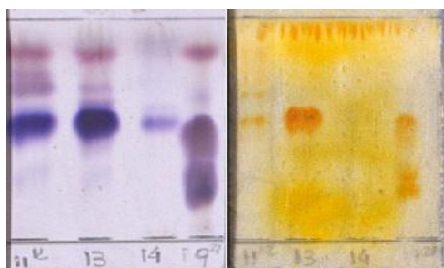


Figura13- frações promissoras para alcaloides de *Aniba ferrea* galhos:



As frações foram novamente unidas para um novo fracionamento.

Nas frações promissoras de *Aniba ferrea* galhos (figura 13), promoveu-se recristalizações para a tentativa de isolamento.

As frações alcaloídicas de folhas e galhos de *Aniba parviflora*, foram submetidas à coluna de isolamento em marcha crescente de polaridade em meio aos eluentes: clorofórmio:metanol, nas frações resultantes da coluna observou-se a formação de cristais e precipitados, os mesmos encontram em processo de purificação por recristalização