



Serviço Público Federal - Ministério da Educação

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Universidade Federal de Goiás

Universidade Federal de Uberlândia

Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E ANTIFÚNGICA DE
Ocotea acutifolia (NEES) MEZ. (LAURACEAE)

ANA FRANCISCA GOMES DA SILVA

TESE DE DOUTORADO

PROFa. Dra. FERNANDA RODRIGUES GARCEZ

Orientadora

CAMPO GRANDE - MS
MARÇO/2010

Serviço Público Federal - Ministério da Educação

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Universidade Federal de Goiás

Universidade Federal de Uberlândia

Programa Multiinstitucional de Doutorado em Química

ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES
CITOTÓXICA, GENOTÓXICA E ANTIFÚNGICA DE
Ocotea acutifolia (NEES) MEZ. (LAURACEAE)

Ana Francisca Gomes da Silva

Banca examinadora:

Profa. Dra. Fernanda Rodrigues Garcez – DQI/UFMS

Prof. Dr. Dênis Pires de Lima – DQI/UFMS

Profa. Dra. Cecilia Maria Alves de Oliveira – IQ/UFG

Profa. Dra. Lucia Maria Conserva – IQB/UFAL

Prof. Frederico Guará Cruz – IQ/UFBA

Dedico este trabalho

aos meus pais Francisco e Guilhermina,

aos meus amores Sebastião e Guilherme e

aos meus irmãos Antônio e Andréa

AGRADECIMENTOS

A DEUS.

À professora Dra. Fernanda Rodrigues Garcez, pela orientação, confiança e liberdade na condução do trabalho.

Ao professor Dr. Walmir Silva Garcez, pela dedicação, ensinamentos e colaboração constante para a realização deste trabalho.

À professora Dra. Zaira da Rosa Guterres e Felipe Rodrigues Garcez pelos ensinamentos e execução do ensaio biológico de genotoxicidade.

À Dra. Lidilhone Hamesk pela orientação e auxílio no CLAE.

À professora Dra. Maria de Fátima Cepa Matos, professora MSc. Ivana Maria Póvoa Violante e MSc. Ana Lúcia Batista pela execução dos ensaios biológicos.

Ao professor Dr. Joaquim Corsino e MSc. Luciana Marçal Ravaglia pelos espectros de RMN uni- e bidimensionais e ao Luis Leonardo pelos espectros de IV e obtenção dos dados de rotação óptica.

A Gabriela Link pela valiosa colaboração no desenvolvimento deste trabalho e a minha ex-aluna Fernanda Orlando Boscarioli pelas coletas do material vegetal.

Ao Dr. Norberto Peporim Lopes e a Dra. Denise Bretan da Silva pelos espectros de massas.

Ao Fábio de Lima do laboratório LP 5 pelos espectros UV.

Ao Dr. João Baitello e MSc. Flávio Macedo Alves pela identificação da espécie.

A minha amiga Maria José de Camargo por tudo.

A Luzinátia Ramos Soares pela convivência e amizade e aos meus colegas de laboratório pela agradável convivência.

A Maria Otávia Vasco e Celestino Gonçalves pela competência no desempenho de suas funções.

Aos funcionários do Departamento de Química pela colaboração.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a execução deste trabalho.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE TABELAS	v
ÍNDICE DE ESPECTROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xvi
ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxii
1- INTRODUÇÃO	1
2- REVISÃO DA LITERATURA	2
2.1- FAMÍLIA LAURACEAE - GÊNERO <i>Ocotea</i>	2
2.2- <i>Ocotea acutifolia</i>	3
2.2- ALCALÓIDES de <i>Ocotea</i>	4
3- OBJETIVOS	16
4- MATERIAL E MÉTODOS	17
4.1- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	17
4.2- OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DAS FOLHAS DE <i>O. acutifolia</i>	17
4.2.1- FRACIONAMENTO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DAS FOLHAS DE <i>O. acutifolia</i>	17
4.2.2- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OAF-ALC 1, OAF-ALC 2, OAF-ALC 3, OAF-ALC 4, OAF-ALC 5, OAF-ALC 6, OAF-ALC 7, OAF-ALC 9, OAF-ALC 10 e OAF-ALC 16	19
4.2.2.1- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 1	19
4.2.2.2- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 2	19
4.2.2.3- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 3	20
4.2.2.4- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 4	20
4.2.2.5- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 5	20
4.2.2.6- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 6	23
4.2.2.7- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 7	23
4.2.2.8- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 9	23
4.2.2.9- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 10	24

4.2.2.10- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 16	24
4.3- OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>O. acutifolia</i>	26
4.3.1- FRACIONAMENTO DA FASE HEXÂNICA PROVENIENTE DA PARTIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>O. acutifolia</i>	26
4.3.2- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OAF-A 1, OAF-A 3, OAF-A 6 e OAF-A 8	27
4.3.2.1- Frações OAF-A 1	27
4.3.2.2- Separação dos componentes da fração OAF-A 3	28
4.3.2.3- Separação dos componentes da fração OAF-A 6	28
4.3.2.4- Fração OAF-A 8	28
4.3.3- FRACIONAMENTO DA FASE ACETATO DE ETILA PROVENIENTE DA PARTIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE <i>O. acutifolia</i>	30
4.3.4- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OAF-Ac 4, OAF-Ac 5, OAF-Ac 6 e OAF-Ac 8	31
4.3.4.1- Estudo da fração OAF-Ac 4	31
4.3.4.1.1- Separação dos componentes da fração OAF-Ac B.5	31
4.3.4.1.2- Separação dos componentes da fração OAF-Ac B.12	31
4.3.4.1.3- Separação dos componentes da fração OAF-Ac B.13	32
4.3.4.2- Estudo da fração OAF-Ac 5	34
4.3.4.2.1- Separação dos componentes da fração OAF-Ac E.4	34
4.3.4.2.2- Separação dos componentes da fração OAF-Ac E.11	34
4.3.4.2.3- Separação dos componentes da fração OAF-Ac E.12	35
4.3.4.2.4- Separação dos componentes da fração OAF-Ac E.13	35
4.3.4.3- Estudo da fração OAF-Ac 6	37
4.3.4.3.1- Separação dos componentes da fração OAF-Ac J.5	37
4.3.4.3.2- Separação dos componentes da fração OAF-Ac J.14	37
4.3.4.4- Estudo da fração OAF-Ac 8	38
4.4- OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DAS CASCAS DO CAULE DE <i>O. acutifolia</i>	40
4.4.1- FRACIONAMENTO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DAS CASCAS DO CAULE DE <i>O. acutifolia</i>	40
4.4.2- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OAC-A 5, OAC-A 6 e OAC-A 7	41

4.4.2.1- Estudo da fração OAC-A 5	41
4.4.2.2- Estudo da fração OAC-A 6	42
4.4.2.3- Estudo da fração OAC-A 7	42
4.5- ENSAIOS BIOLÓGICOS	44
4.5.1- Ensaios de atividades citotóxica	44
4.5.1.1- Teste de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> (TAS)	44
4.5.1.2- Ensaio de atividade citotóxica in vitro em linhagens de células cancerígenas	44
4.5.2- Ensaio de atividade genotóxica	47
4.5.3- Ensaio de atividade antifúngica in vitro	48
4.6- ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	50
4.7- DADOS ESPECTROSCÓPICOS E PROPRIEDADES FÍSICAS DOS CONSTITUINTES ISOLADOS OU EM MISTURA DE <i>O. acutifolia</i>	52
5- RESULTADOS E DISCUSSÃO	59
5.1- Alcaloides aporfínicos	60
5.1.1- Identificação de (+)-dicentrina (1)	62
5.1.2- Identificação de (+)-ocoteína (2)	69
5.1.3- Identificação de (+)-nordicentrina (3) e (+)-O-metilcassifilina (4)	78
5.1.4- Identificação de (+)-6S-N-óxido dicentrina (5)	92
5.1.5- Elucidação estrutural de (+)-6R-N-óxido dicentrina (6)	102
5.1.6- Elucidação estrutural de (+)-6S-N-óxido ocoteína (7)	112
5.1.7- Elucidação estrutural de (+)-6R-N-óxido ocoteína (8)	121
5.1.8- Identificação de (+)-leucoxina (9)	129
5.1.9- Identificação de (+)-ocoxilonina (10)	137
5.1.10- Elucidação estrutural de (+)-norocoxilonina (11)	146
5.1.11- Identificação de (+)-neolitsina (12)	153
5.1.12- Identificação de (+)-isodomesticina (13)	160
5.1.13- Identificação de (+)-talicsimidina (14)	168
5.1.14- Identificação de (+)-N-metillaurotetanina (15) e (+)-predicentrina (16)	177
5.1.15- Identificação de talicminina (17)	192
5.2- Alcaloide morfinano	200
5.2.1- Identificação de (+)-palidina (18)	200

5.3- Flavonoide	210
5.3.1- Identificação de kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo (19)	210
5.4- Poliprenol	216
5.4.1- Identificação de ficaprenol-12 (20)	216
5.5- Esteróide	221
5.5.1- Identificação de 3-(6'- <i>O</i> -acil- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil)-sitosterol (21)	221
5.6- PROPOSTA BIOSINTÉTICA PARA OS ALCALOIDES OBTIDOS DE <i>Ocotea acutifolia</i>	226
5.7- ENSAIOS BIOLÓGICOS	227
5.7.1- Ensaio de atividade citotóxica	227
5.7.1.1- Teste de toxicidade sobre <i>Artemia salina</i> (TAS)	227
5.7.1.2- Ensaio de atividade citotóxica <i>in vitro</i> em linhagens de células cancerígenas	228
5.7.2- Ensaio de atividade genotóxica	231
5.7.2.1- Atividade genotóxica de EE	231
5.7.2.2- Atividade genotóxica de EA	233
5.7.2.3- Atividade genotóxica de DO	234
5.7.2.4- Atividade genotóxica de (+)-dicentrina (1)	236
5.7.2.5- Atividade genotóxica de (+)-ocoteína (2)	237
5.7.2.6- Atividade genotóxica de talicminina (17)	239
5.7.2.7- Atividades genotóxicas de (+)-6 <i>S</i> - <i>N</i> -óxido ocoteína (7) e de (+)-leucoxina (9)	240
5.6.3- Ensaio de atividade antifúngica <i>in vitro</i>	244
6- CONSIDERAÇÕES FINAIS	248
7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	250

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- Alcaloides aporfinoides obtidos de espécies de <i>Ocotea</i> (Lauraceae)	9
Tabela 2- Fracionamento do extrato alcaloídico das folhas de <i>O. acutifolia</i> (Coluna ALC)	18
Tabela 3- Fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>O. acutifolia</i> (Coluna A)	27
Tabela 4- Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>O. acutifolia</i> (Coluna A)	30
Tabela 5- Fracionamento do extrato alcaloídico das cascas do caule de <i>O. acutifolia</i> (Coluna A)	41
Tabela 6- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de 1 e do alcaloide (+)-dicentrina citado na literatura (MA et al., 2000) [500/125 MHz, CDCl_3]	64
Tabela 7- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 1 (300/75 MHz, CDCl_3)	65
Tabela 8- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, acetona- d_6) de 2 e do alcaloide (+)-ocoteína citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl_3], (GUINAUDEAU et al., 1979) [15 MHz, CDCl_3]	71
Tabela 9- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)	72
Tabela 10- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de 3 e do alcaloide (+)-nordicentrina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1979) [60MHz, CF_3COOH], (GUINAUDEAU et al., 1994) [15 MHz, CDCl_3]	80
Tabela 11- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 3 (300/75 MHz, CD_3OD)	81
Tabela 12- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de 4 e dados de RMN ^1H do alcaloide (+)- <i>O</i> -metilcassifilina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl_3]	82
Tabela 13- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 4 (300/75 MHz, CD_3OD)	83

Tabela 14- Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 5 obtido de <i>O. acutifolia</i> e do (-)- <i>N</i> -óxido dicentrina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1994) [60 MHz, CDCl_3]	94
Tabela 15- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 5 obtido de <i>O. acutifolia</i> e do <i>N</i> -óxido dicentrina citado na literatura (ZANIN & LORDELLO, 2007) [75 MHz, CDCl_3]	95
Tabela 16- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 5 (300/75 MHz, CDCl_3)	96
Tabela 17- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de 6 e dados de RMN ^{13}C de 5 (75 MHz, CDCl_3)	104
Tabela 18- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 6 (300/75 MHz, CDCl_3)	105
Tabela 19- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de 7 e dados de RMN ^{13}C de 2 (75 MHz, acetona- d_6)	114
Tabela 20- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 7 (300/75 MHz, CDCl_3)	115
Tabela 21- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de 8 e dados de RMN ^{13}C de 7 (75 MHz, CDCl_3)	123
Tabela 22- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 8 (300/75 MHz, CD_3OD)	124
Tabela 23- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de 9 e do alcaloide (+)-leucoxina citado na literatura (VECCHIETTI et al., 1977) [60 MHz, CDCl_3], (GUINAUDEAU et al., 1979) [15 MHz, DMSO]	131
Tabela 24- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 9 (300/75 MHz, CD_3OD)	132
Tabela 25- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de 10 e dados de RMN ^1H do alcaloide (+)-ocoxilonina citado na literatura (AHMAD & CAVA, 1977) [60 MHz, CDCl_3]	139
Tabela 26- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 10 (300/75 MHz, CD_3OD)	140
Tabela 27- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de 11 e dados de RMN ^{13}C de 10 (75 MHz, CD_3OD)	147

Tabela 28- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 11 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	148
Tabela 29- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CD ₃ OD) de 12 e dados de RMN ¹ H do alcaloide (+)-neolitsina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl ₃]	155
Tabela 30- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 12 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	156
Tabela 31- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CD ₃ OD) de 13 e do alcaloide (+)-isodomeesticina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl ₃], (ZANIN & LORDELLO, 2007) [75 MHz, CDCl ₃]	162
Tabela 32- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 13 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	163
Tabela 33- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CD ₃ OD) de 14 e dados de RMN ¹ H do alcaloide (+)-talicsimidina citado na literatura (DOSKOTCH et al., 1971) [60 MHz, CDCl ₃]	170
Tabela 34- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 14 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	171
Tabela 35- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CD ₃ OD) de 15 e do alcaloide (+)- <i>N</i> -metillaurotetanina citado na literatura (LEBOEUF et al., 1982) [60 MHz, CDCl ₃], (ZANIN & LORDELLO, 2007) [75 MHz, CDCl ₃]	180
Tabela 36- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 15 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	181
Tabela 37- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CD ₃ OD) de 16 e do alcaloide (+)-predicentrina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl ₃], (GUINAUDEAU et al., 1979) [15 MHz, CDCl ₃]	182
Tabela 38- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 16 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	183
Tabela 39- Dados de RMN ¹ H e ¹³ C (300/75 MHz, CDCl ₃) de 17 e dados de RMN ¹ H do alcaloide talicminina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1979) [60 MHz, CF ₃ COOH]	194
Tabela 40- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 17 (300/75 MHz, CDCl ₃)	195

Tabela 41- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de 18 e do alcaloide (-)-palidina citado na literatura (ROBLOT et al., 1984) [400/25 MHz, CDCl_3]	202
Tabela 42- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 18 (300/75 MHz, CD_3OD)	203
Tabela 43- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) do flavonoide 19 obtido de <i>O. acutifolia</i> e do flavonoide kaempferol-3- <i>O</i> - α -L-ramnopiranosídeo citado na literatura (GARCEZ, 1991) [50 MHz, acetona- d_6]	212
Tabela 44- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de 20 e do poliprenol ficaprenol-12 citado na literatura (REYNOLDS et al., 1999) [500/125 MHz, respectivamente, C_6D_6]	218
Tabela 45- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 21 e do 3-(6'- <i>O</i> -acil- <i>O</i> - β -D-glucopiranosil)-sitosterol) citado na literatura (SILVA et al., 2005) [75 MHz, CDCl_3]	223
Tabela 46- Toxicidade sobre <i>A. Salina</i> dos extratos alcalóidico das folhas e etanólicos das folhas e cascas do caule de <i>O. acutifolia</i>	227
Tabela 47- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para os compostos 1 , 2 , 5 , 7 , 8 , 9 , 11 , 12 , 13 e 17 frente às linhagens de células Hep-2, MCF-7, B16-F10 e 786-0 (Método SRB - SKEHAN et al., 1990)	230
Tabela 48- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para os compostos 1 e 2 frente às linhagens de células MDA-MB435, SF-295, HL-60 e HCT-8 (Método MTT - SKEHAN et al., 1990)	230
Tabela 49- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de EE obtido das folhas da <i>O. acutifolia</i>	232
Tabela 50- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de EA obtido das folhas da <i>O. acutifolia</i>	233
Tabela 51- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de DO obtido das folhas da <i>O. acutifolia</i>	235
Tabela 52- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de 1 obtido das folhas da <i>O. acutifolia</i>	236

Tabela 53- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de 2 obtido das folhas da <i>O. acutifolia</i>	238
Tabela 54- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de 17 obtido das folhas da <i>O. acutifolia</i>	239
Tabela 55- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de 7 obtido das folhas da <i>O. acutifolia</i>	241
Tabela 56- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de 9 obtido das folhas da <i>O. acutifolia</i>	242
Tabela 57- Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos alcaloídico e etanólicos das folhas e das cascas do caule de <i>O. acutifolia</i> frente às cepas <i>C. albicans</i> , <i>C. glabrata</i> , <i>C. krusei</i> , <i>C. parapslosis</i> , <i>C. tropicalis</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	246
Tabela 58- Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) das substâncias 1 , 2 , 5 , 7 , 8 , 9 , 11 , 17 e 18 obtidas de <i>O. acutifolia</i> frente às cepas <i>C. albicans</i> , <i>C. krusei</i> e <i>Cryptococcus neoformans</i>	247

ÍNDICE DE ESPECTROS

Espectro 1- RMN ^1H de 1 (300 MHz, CDCl_3)	66
Espectro 2- RMN ^{13}C de 1 (75 MHz, CDCl_3)	66
Espectro 3- Espectro HSQC de 1 (300/75 MHz, CDCl_3)	67
Espectro 4- Espectro HMBC de 1 (300/75 MHz, CDCl_3)	67
Espectro 5- Expansão de espectro HMBC de 1 (300/75 MHz, CDCl_3)	68
Espectro 6- Expansão de espectro HMBC de 1 (300/75 MHz, CDCl_3)	68
Espectro 7- RMN ^1H de 2 (300 MHz, acetona- d_6)	73
Espectro 8- RMN ^{13}C de 2 (75 MHz, acetona- d_6)	73
Espectro 9- DEPT 135° de 2 (75 MHz, acetona- d_6)	74
Espectro 10- Espectro HSQC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)	74
Espectro 11- Espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)	75
Espectro 12- Expansão do espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)	75
Espectro 13- Expansão do espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)	76
Espectro 14- Expansão do espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)	76
Espectro 15- Expansão do espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)	77
Espectro 16- RMN ^1H da mistura de 3 e 4 (300 MHz, CD_3OD)	84
Espectro 17- Expansão do espectro de RMN ^1H da mistura de 3 e 4	84
Espectro 18- RMN ^{13}C da mistura de 3 e 4 (75 MHz, CD_3OD)	85
Espectro 19- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de 3 e 4 (75 MHz, CD_3OD)	85
Espectro 20- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de 3 e 4 (75 MHz, CD_3OD)	86
Espectro 21- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de 3 e 4 (75 MHz, CD_3OD)	86
Espectro 22- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de 3 e 4 (75 MHz, CD_3OD)	87
Espectro 23- DEPT 135° da mistura de 3 e 4 (75 MHz, CD_3OD)	87
Espectro 24- Espectro HSQC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD_3OD)	88
Espectro 25- Expansão do espectro HSQC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD_3OD)	88

Espectro 26- Expansão do espectro HSQC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	89
Espectro 27- Espectro HMBC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	89
Espectro 28- Expansão do espectro HMBC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	90
Espectro 29- Expansão do espectro HMBC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	90
Espectro 30- Expansão do espectro HMBC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	91
Espectro 31- RMN ¹ H de 5 (300 MHz, CDCl ₃)	97
Espectro 32- RMN ¹³ C de 5 (75 MHz, CDCl ₃)	97
Espectro 33- DEPT 135° de 5 (75 MHz, CDCl ₃)	98
Espectro 34 – Espectro HSQC de 5 (300/75 MHz, CDCl ₃)	98
Espectro 35- Espectro HMBC de 5 (300/75 MHz, CDCl ₃)	99
Espectro 36- Expansão do espectro HMBC de 5 (300/75 MHz, CDCl ₃)	99
Espectro 37- NOESY de 5 (300 MHz, CDCl ₃)	100
Espectro 38- Expansão do espectro NOESY de 5 (300 MHz, CDCl ₃)	100
Espectro 39- Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) de 5 obtido no modo positivo	101
Espectro 40- RMN ¹ H da mistura de 6 e 5 (300 MHz, CDCl ₃)	106
Espectro 41- RMN ¹³ C da mistura de 6 e 5 (75 MHz, CDCl ₃)	106
Espectro 42- Expansão do espectro RMN ¹³ C da mistura de 6 e 5 (75 MHz, CDCl ₃)	107
Espectro 43- Expansão do espectro RMN ¹³ C da mistura de 6 e 5 (75 MHz, CDCl ₃)	107
Espectro 44- Espectro HSQC da mistura de 6 e 5 (300/75 MHz, CDCl ₃)	108
Espectro 45- Expansão do espectro HSQC da mistura de 6 e 5 (300/75 MHz, CDCl ₃)	108
Espectro 46- Espectro HMBC da mistura de 6 e 5 (300/75 MHz, CDCl ₃)	109
Espectro 47- Expansão do espectro HMBC da mistura de 6 e 5 (300/75 MHz, CDCl ₃)	109
Espectro 48- Expansão do espectro HMBC da mistura de 6 e 5 (300/75 MHz, CDCl ₃)	110

Espectro 49- NOESY da mistura de 6 e 5 (75 MHz, CDCl ₃)	110
Espectro 50- Expansão do espectro NOESY da mistura de 6 e 5 (75 MHz, CDCl ₃)	111
Espectro 51- RMN ¹ H de 7 (300 MHz, CDCl ₃)	116
Espectro 52- RMN ¹³ C de 7 (75 MHz, CDCl ₃)	116
Espectro 53- DEPT 135° de 7 (75 MHz, CDCl ₃)	117
Espectro 54- Espectro HSQC de 7 (300/75 MHz, CDCl ₃)	117
Espectro 55- Espectro HMBC de 7 (300/75 MHz, CDCl ₃)	118
Espectro 56- Expansão do espectro HMBC de 7 (300/75 MHz, CDCl ₃)	118
Espectro 57- Expansão do espectro HMBC de 7 (300/75 MHz, CDCl ₃)	119
Espectro 58- NOESY de 7	119
Espectro 59- Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) de 7 obtido no modo negativo	120
Espectro 60- RMN ¹ H de 8 (300 MHz, CD ₃ OD)	125
Espectro 61- RMN ¹³ C de 8 (75 MHz, CD ₃ OD)	125
Espectro 62- Espectro HSQC de 8 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	126
Espectro 63- Espectro HMBC de 8 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	126
Espectro 64- Expansão do espectro HMBC de 8 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	127
Espectro 65- Expansão do espectro HMBC de 8 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	127
Espectro 66- NOESY de 8	128
Espectro 67- Expansão do espectro NOESY de 8	128
Espectro 68- RMN ¹ H de 9 (300 MHz, CD ₃ OD)	133
Espectro 69- RMN ¹³ C de 9 (75 MHz, CD ₃ OD)	133
Espectro 70- DEPT 135° de 9 (75 MHz, CD ₃ OD)	134
Espectro 71- Espectro HSQC de 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	134
Espectro 72- Espectro HMBC de 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	135
Espectro 73- Expansão do Espectro HMBC de 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	135
Espectro 74- Expansão do Espectro HMBC de 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	136
Espectro 75- RMN ¹ H de 10 em mistura com 9 (300 MHz, CD ₃ OD)	141
Espectro 76- Expansão do espectro de RMN ¹ H de 10 em mistura com 9 (300 MHz, CD ₃ OD)	141
Espectro 77- RMN ¹³ C de 10 em mistura com 9 (75 MHz, CD ₃ OD)	142
Espectro 78- Expansão do espectro de RMN ¹³ C de 10 em mistura com 9 (75 MHz, CD ₃ OD)	142

Espectro 79- DEPT 135° de 10 em mistura com 9 (75 MHz, CD ₃ OD)	143
Espectro 80- Espectro HSQC de 10 em mistura com 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	143
Espectro 81- Expansão do espectro HSQC de 10 em mistura com 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	144
Espectro 82- Espectro HMBC de 10 em mistura com 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	144
Espectro 83- Expansão do espectro HMBC de 10 em mistura com 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	145
Espectro 84- Expansão do espectro HMBC de 10 em mistura com 9 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	145
Espectro 85- RMN ¹ H de 11 (300 MHz, CD ₃ OD)	149
Espectro 86- RMN ¹³ C de 11 (75 MHz, CD ₃ OD)	149
Espectro 87- Espectro de HSQC de 11 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	150
Espectro 88- Espectro HMBC de 11 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	150
Espectro 89- Expansão do espectro HMBC de 11 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	151
Espectro 90- Expansão do espectro HMBC de 11 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	151
Espectro 91- Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) de 11 obtido no modo positivo	152
Espectro 92- RMN ¹ H de 12 (300 MHz, CD ₃ OD)	157
Espectro 93- RMN ¹³ C de 12 (75 MHz, CD ₃ OD)	157
Espectro 94- Espectro HSQC de 12 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	158
Espectro 95- Expansão do espectro HSQC de 12 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	158
Espectro 96- Espectro HMBC de 12 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	159
Espectro 97- Expansão do espectro HMBC de 12 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	159
Espectro 98- RMN ¹ H de 13 (300 MHz, CD ₃ OD)	164
Espectro 99- RMN ¹³ C de 13 (75 MHz, CD ₃ OD)	164
Espectro 100- Espectro HSQC de 13 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	165
Espectro 101- Expansão do espectro HSQC de 13 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	165
Espectro 102- Espectro HMBC de 13 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	166
Espectro 103- Expansão do espectro HMBC de 13 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	166
Espectro 104- Expansão do espectro HMBC de 13 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	167
Espectro 105- Expansão do espectro HMBC de 13 (300/75 MHz, CD ₃ OD)	167
Espectro 106- RMN ¹ H de 14 (300 MHz, CD ₃ OD)	172
Espectro 107- RMN ¹³ C de 14 (75 MHz, CD ₃ OD)	172

Espectro 108- Expansão do espectro de RMN ^{13}C de 14 (75 MHz, CD_3OD)	173
Espectro 109- Espectro HSQC de 14 (300/75 MHz, CD_3OD)	173
Espectro 110- Expansão do espectro HSQC de 14 (300/75 MHz, CD_3OD)	174
Espectro 111- Espectro HMBC de 14 (300/75 MHz, CD_3OD)	174
Espectro 112- Expansão do espectro HMBC de 14 (300/75 MHz, CD_3OD)	175
Espectro 113- Expansão do espectro HMBC de 14 (300/75 MHz, CD_3OD)	175
Espectro 114- Expansão do espectro HMBC de 14 (300/75 MHz, CD_3OD)	176
Espectro 115- RMN ^1H da mistura de 15 e 16 (300 MHz, CD_3OD)	184
Espectro 116- Expansão do espectro de RMN ^1H da mistura de 15 e 16 (300 MHz, CD_3OD)	184
Espectro 117- RMN ^{13}C da mistura de 15 e 16 (75 MHz, CD_3OD)	185
Espectro 118- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de 15 e 16 (75 MHz, CD_3OD)	185
Espectro 119- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de 15 e 16 (75 MHz, CD_3OD)	186
Espectro 120- DEPT 135° da mistura de 15 e 16 (75 MHz, CD_3OD)	186
Espectro 121- Espectro HSQC da mistura de 15 e 16 (300/75 MHz, CD_3OD)	187
Espectro 122- Expansão do espectro HSQC da mistura de 15 e 16 (300/75 MHz, CD_3OD)	187
Espectro 123- Expansão do espectro HSQC da mistura de 15 e 16 (300/75 MHz, CD_3OD)	188
Espectro 124- Espectro HMBC da mistura de 15 e 16 (300/75 MHz, CD_3OD)	188
Espectro 125- Expansão do espectro HMBC da mistura de 15 e 16 (300/75 MHz, CD_3OD)	189
Espectro 126- Expansão do espectro HMBC da mistura de 15 e 16 (300/75 MHz, CD_3OD)	189
Espectro 127- Expansão do espectro HMBC da mistura de 15 e 16 (300/75 MHz, CD_3OD)	190
Espectro 128- Expansão do espectro HMBC da mistura de 15 e 16 (300/75 MHz, CD_3OD)	190
Espectro 129- NOESY da mistura de 15 e 16	191
Espectro 130- Expansão do espectro NOESY da mistura de 15 e 16	191
Espectro 131- RMN ^1H de 17 (300 MHz, CDCl_3)	196

Espectro 132- RMN ^{13}C de 17 (75 MHz, CDCl_3)	196
Espectro 133- ^1H - ^1H COSY de 17 (300/75 MHz, CDCl_3)	197
Espectro 134- Espectro HSQC de 17 (300/75 MHz, CDCl_3)	197
Espectro 135- Expansão do espectro HSQC de 17 (300/75 MHz, CDCl_3)	198
Espectro 136- Espectro HMBC de 17 (300/75 MHz, CDCl_3)	198
Espectro 137- Expansão do espectro HMBC de 17 (300/75 MHz, CDCl_3)	199
Espectro 138- Expansão do espectro HMBC de 17 (300/75 MHz, CDCl_3)	199
Espectro 139- RMN ^1H de 18 (300 MHz, CD_3OD)	204
Espectro 140- RMN ^{13}C de 18 (75 MHz, CD_3OD)	204
Espectro 141- DEPT 135° de 18 (75 MHz, CD_3OD)	205
Espectro 142- Espectro HSQC de 18 (300/75 MHz, CDCl_3)	205
Espectro 143- Expansão do espectro HSQC de 18 (300/75 MHz, CDCl_3)	206
Espectro 144- Expansão do espectro HSQC de 18 (300/75 MHz, CDCl_3)	206
Espectro 145- Espectro HMBC de 18 (300/75 MHz, CDCl_3)	207
Espectro 146- Expansão do espectro HMBC de 18 (300/75 MHz, CDCl_3)	207
Espectro 147- Expansão do espectro HMBC de 18 (300/75 MHz, CDCl_3)	208
Espectro 148- Expansão do espectro HMBC de 18 (300/75 MHz, CDCl_3)	208
Espectro 149- NOESY de 18	209
Espectro 150- RMN ^1H de 19 (300 MHz, CD_3OD)	213
Espectro 151- RMN ^{13}C de 19 (75 MHz, CD_3OD)	213
Espectro 152- Expansão do espectro RMN ^{13}C de 19 (75 MHz, CD_3OD)	214
Espectro 153- Espectro HSQC de 19 (300/75 MHz, CD_3OD)	214
Espectro 154- Espectro HMBC de 19 (300/75 MHz, CD_3OD)	215
Espectro 155- Expansão do espectro HMBC de 19 (300/75 MHz, CD_3OD)	215
Espectro 156- RMN ^1H de 20 (300 MHz, CDCl_3)	219
Espectro 157- RMN ^{13}C de 20 (75 MHz, CDCl_3)	219
Espectro 158- Expansão do espectro de RMN ^{13}C de 20 (75 MHz, CDCl_3)	220
Espectro 159- DEPT 135° de 20 (75 MHz, CDCl_3)	220
Espectro 160- RMN ^1H de 21 (300 MHz, CDCl_3)	225
Espectro 161- RMN ^{13}C de 21 (75 MHz, CDCl_3)	225

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- <i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez.	4
Figura 2- Esqueletos carbônicos das principais classes de alcaloides isoquinolínicos	5
Figura 3- Sequência biossintética atualmente aceita evidenciando a sequência comum de alcaloides aporfínicos e morfinanos	6
Figura 4- Estruturas dos alcaloides aporfinoides obtidos de espécies de <i>Ocotea</i>	13
Figura 5- Cromatograma analítico da fração OAF-ALC 5. Coluna Phenomenex-Luna C-8, 5 µm, 4,6Ø x 250 mm; eluente MeOH/H ₂ O (60:40); fluxo de 0,7 mL/min; detector UV, 280 nm	21
Figura 6- Cromatograma analítico da fração OAF-Ac B.13. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 µm, 4,6Ø x 250 mm; eluente MeOH/H ₂ O (52:48); fluxo de 0,7 mL/min; detector UV, 280 nm	32
Figura 7- Proposta biossintética para os alcaloides isolados de <i>O. acutifolia</i>	226
Figura 8- Frequências totais de manchas (<i>mwh</i>) observadas em células de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com EE	232
Figura 9- Frequências totais de manchas (<i>mwh</i>) observadas em células de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com EA	234
Figura 10- Frequências totais de manchas (<i>mwh</i>) observadas em células de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com DO	235
Figura 11- Frequências totais de manchas (<i>mwh</i>) observadas em células de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com 1	237
Figura 12- Frequências totais de manchas (<i>mwh</i>) observadas em células de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com 2	238

Figura 13- Frequências totais de manchas (<i>mwh</i>) observadas em células de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com 17	240
Figura 14- Frequências totais de manchas (<i>mwh</i>) observadas em células de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com 7	241
Figura 15- Frequências totais de manchas (<i>mwh</i>) observadas em células de asas de <i>D. melanogaster</i> de descendentes MH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com 9	242

ÍNDICE DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μm	micrômetro
$\nu_{\text{máx}}$	frequência máxima
$\lambda_{\text{máx}}$	comprimento de onda máximo
AcOEt	acetato de etila
ax	axial
c	concentração
CC	cromatografia em coluna (à pressão atmosférica)
CCDA	cromatografia em camada delgada analítica
CD ₃ OD	metanol deuterado
CDCl ₃	clorofórmio deuterato
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
COSY	homonuclear correlated spectroscopy
d	dubleto
dd	duplo dubleto
ddl	duplo dubleto largo
DEPT	distortionless enhancement by polarization transfer
dl	dubleto largo
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DMSO	dimetilsulfóxido
EM	espectrometria de massas
eq	equatorial
EtOH	etanol
Hex	hexano
HMBC	heteronuclear multiple bond connectivity
HRESI-MS	high resolution electron spray ionization mass spectra
HSQC	heteronuclear single quantum coherence
Hz	hertz
IV	infravermelho
J	constante de acoplamento

Lit.	literatura
m	multiplete
m	multiplicidade
m/z	relação massa/carga
Me	metila
MeOH	metanol
MHz	megahertz
nm	nanômetro
NOESY	nuclear Overhauser and exchange spectroscopy
Ø	diâmetro interno
Ref.	Referência
RMN de ^{13}C	ressonância magnética nuclear de carbono-13
RMN de ^1H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
s	singleto
sl	singleto largo
tl	triplete largo
UV	ultravioleta
δ	deslocamento químico

RESUMO

Ocotea acutifolia, espécie pertencente à família Lauraceae e ainda não estudada quimicamente, foi coletada na região sul de Mato Grosso do Sul. O estudo químico dos extratos alcaloídicos das folhas e cascas do caule e das fases hexânica e em acetato de etila obtidas das partições do extrato etanólico das folhas resultou no isolamento e identificação e/ou elucidação estrutural de vinte e uma substâncias, compreendendo dezoito alcaloides, um flavonoide, um poliprenol e um esteroide. Das folhas foram obtidos dezessete alcaloides aporfinoides, (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**), (+)-nordicentrina (**3**), (+)-*O*-metilcassifilina (**4**), (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina (**5**), (+)-6*R*-*N*-óxido dicentrina (**6**), (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**), (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**), (+)-leucoxina (**9**), (+)-ocoxilonina (**10**), (+)-norocoxilonina (**11**), (+)-neolitsina (**12**), (+)-isodomesticina (**13**), (+)-talicsimidina (**14**), (+)-predicentrina (**15**), (+)-*N*-metillaurotetanina (**16**) e talicminina (**17**) e um alcaloide morfinano (+)-palidina (**18**), além de kaempferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo, ficaprenol-12 e 3-(6'-*O*-acil-*O*- β -D-glucopiranosil)-sitosterol, dos quais **1**, **2**, **4** e **17** também foram isolados das cascas do caule. Os alcaloides **7**, **8** e **11** são inéditos, enquanto **12** e **14** estão sendo descritos pela primeira vez no gênero. As determinações estruturais foram efetuadas com base em dados espectroscópicos de IV, UV, RMN ^1H e ^{13}C uni- e bidimensionais, dados de EM e valores de rotação óptica. Neste trabalho foram também avaliadas a toxicidade para *Artemia salina* e atividades citotóxica frente a diferentes linhagens de células tumorais, genotóxica em células de asas de *Drosophila melanogaster* por meio do ensaio SMART e antifúngica frente a seis cepas padrão de *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* dos extratos das folhas e das cascas do caule e de alguns dos alcaloides obtidos de *O. acutifolia*. Dentre os resultados obtidos, pode-se destacar no ensaio de atividade citotóxica realizado com dez dos alcaloides isolados (**1**, **2**, **5**, **7-9**, **11-13** e **17**), os compostos **1** (CI_{50} = 11,2 $\mu\text{g/mL}$ frente a células B16-F10), **2** (CI_{50} = 8,1 $\mu\text{g/mL}$ frente a células Hep-2), **12** (CI_{50} = 10,2 $\mu\text{g/mL}$ frente as células MCF-7 e B16-F10) e **17** (CI_{50} = 10,7 $\mu\text{g/mL}$ frente a células 786-0). No ensaio de atividade genotóxica realizado com cinco dos alcaloides obtidos (**1**, **2**, **7**, **9** e **17**), três (**1**, **2** e **17**) apresentaram atividade genotóxica, destacando-se **1** e **17** os quais apresentaram genotoxicidade superior à do agente anticâncer cloridrato de doxorrubicina (controle positivo). Estes alcaloides podem

interagir com o DNA como agentes intercalantes, causando eventos de mutação e recombinação e assim os seus efeitos genotóxicos podem ser um dos principais fatores que explica a citotoxicidade apresentada por estes compostos. Quanto ao ensaio de atividade antifúngica, o extrato alcaloídico das folhas demonstrou potencial fungitóxico, assim como os nove alcaloides submetidos a este ensaio (**1**, **2**, **5**, **7**, **8**, **9**, **11**, **17** e **18**), os quais apresentaram fungitoxicidade frente à maioria das cepas testadas.

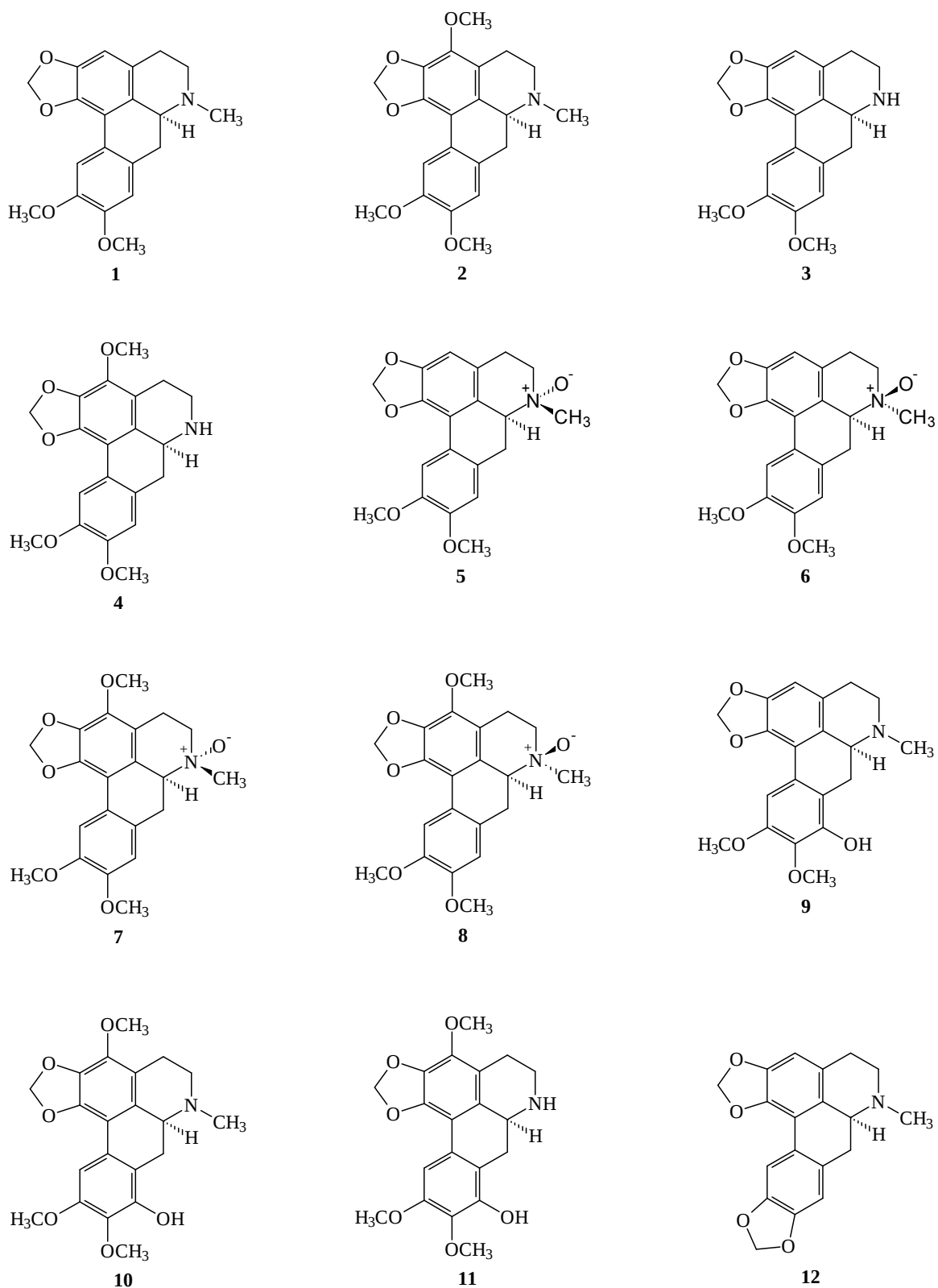
Palavras-Chave: Lauraceae, *Ocotea acutifolia*, alcaloides, citotoxicidade, genotoxicidade e atividade antifúngica.

ABSTRACT

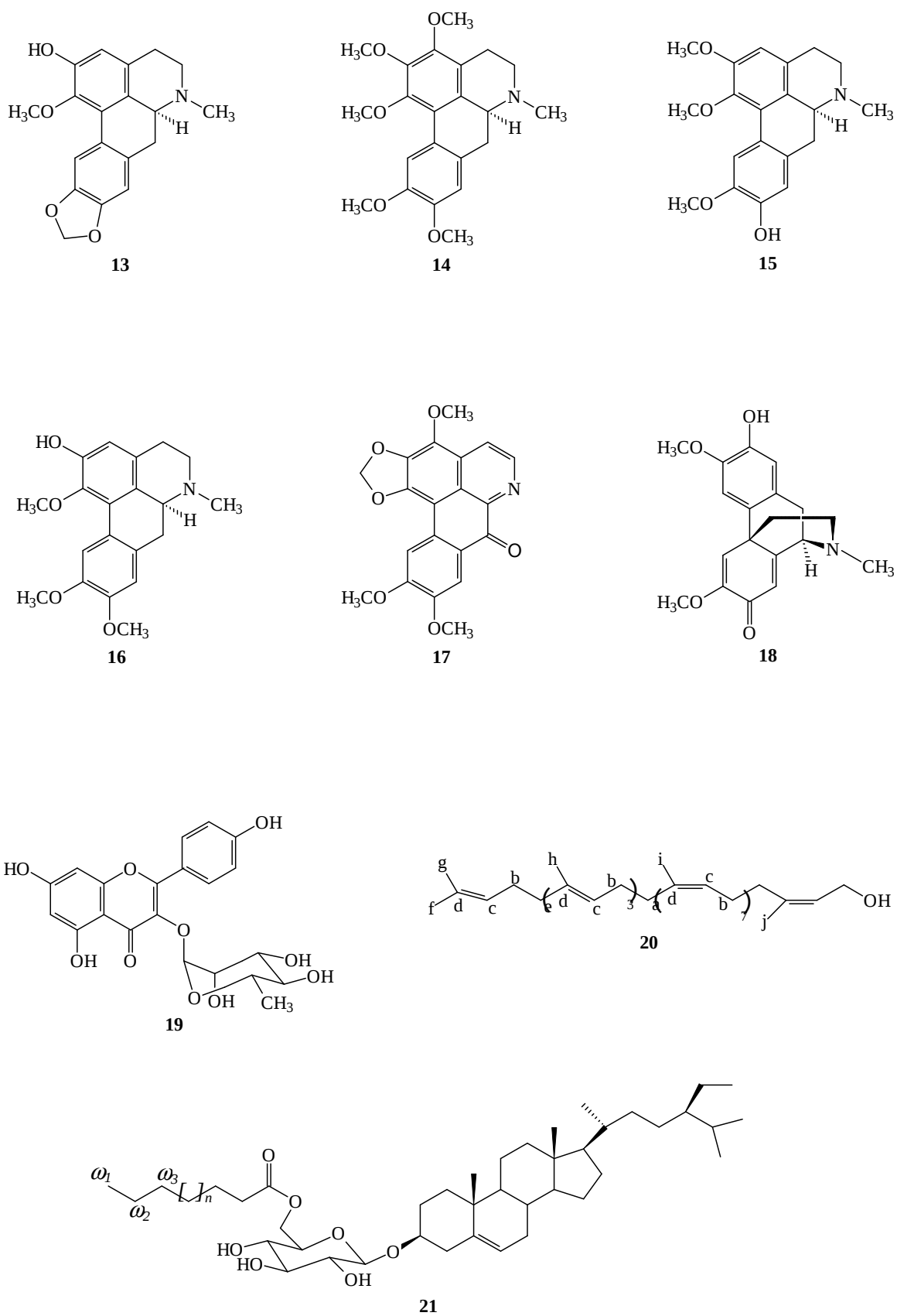
Ocotea acutifolia (Nees) Mez., a Lauraceous species which had not been chemically investigated previously, was collected in the southern region of Mato Grosso do Sul. The chemical study of the alkaloid extract of the leaves and the trunk bark and of the hexane and ethyl acetate phases obtained from partition of the ethanol extract of the leaves resulted in the isolation and identification and/or structural elucidation of eighteen alkaloids, one flavonoid, one polyprenol and one steroid. From the leaves were obtained seventeen aporphinoid alkaloids, (+)-dicentrine (**1**), (+)-ocoteine (**2**), (+)-nordicentrine (**3**), (+)-*O*-methylecassipiline (**4**), (+)-6*S*-dicentrine *N*-oxide (**5**), (+)-6*R*-dicentrine *N*-oxide (**6**), (+)-6*S*-ocoteine *N*-oxide (**7**), (+)-6*R*-ocoteine *N*-oxide (**8**), (+)-leucoxine (**9**), (+)-oxocoxylonine (**10**), (+)-norocoxylonine (**11**), (+)-neolitsine (**12**), (+)-isodomecine (**13**), (+)-thalicimidine (**14**), (+)-predicentrine (**15**), (+)-*N*-methyllaurotethanine (**16**) and thalicminine (**17**) and one morphinan alkaloid (+)-pallidine (**18**), in addition to 3-*O*- α -L-rhamnopyranosylkaempferol, ficaprenol-12 and 3-(6'-*O*-acyl-*O*- β -D-glucopyranosyl)-sitosterol, from which **1**, **2**, **4** and **17** were also isolated from the trunk bark. Alkaloids **7**, **8** and **11** are new, while **12** and **14** are being reported for the first time in the genus *Ocotea*. The structures of the known and new compounds were established on the basis of 1D- and 2D-NMR spectroscopic techniques, optical rotation and/or mass spectrometry data. The crude extracts from the leaves and trunk bark as well as some of the isolated alkaloids were assessed for their toxicity against *Artemia salina* larvae, cytotoxic activity against four human cancer cell lines, genotoxicity using the somatic mutation and recombination test (SMART) in the wing cells of *Drosophila melanogaster* and antifungal properties against six standard fungal strains, *Candida albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Cryptococcus neoformans*. Among the results obtained in the evaluation of the cytotoxic activity of ten aporphine alkaloids (**1**, **2**, **5**, **7-9**, **11-13** and **17**), it is worthy of mention the cytotoxic activities of **1** (IC₅₀ = 11.2 μ g/mL against B16-F10 cells), **2** (IC₅₀ = 8.1 μ g/mL against Hep-2 cells), **12** (IC₅₀ = 10.2 μ g/mL against MCF-7 and B16-F10 cells) and **17** (IC₅₀ = 10.7 μ g/mL against 786-0 cells). Among the five aporphine alkaloids evaluated for their genotoxic potential in the SMART assay (**1**, **2**, **7**, **9** and **17**), three of them (**1**, **2** and **17**) showed genotoxicity at the concentrations tested, from which **1** and **17** were more genotoxic than the anticancer agent doxorubicin hydrochloride, used as positive

control. These alkaloids might interact with DNA as intercalating agents, causing mutational and recombinational events, and so their genotoxic effects might one of the main factors that account for their cytotoxicity. All the alkaloids assayed for their antifungal properties, namely (1, 2, 5, 7, 8, 9, 11, 17 and 18), showed fungitoxic activities against most fungal strains tested.

Key Words: Lauraceae, *Ocotea acutifolia*, alkaloids, cytotoxicity, genotoxicity and antifungal activity.



Estruturas das substâncias isoladas das folhas e cascas do caule de *Ocotea acutifolia*



Estruturas das substâncias isoladas das folhas e cascas do caule de *Ocotea acutifolia*

1- INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas, uma vez que as substâncias de origem vegetal ainda desempenham papéis importantes na medicina moderna, constituindo-se na principal fonte de medicamentos ou de substâncias, que podem servir de modelos para preparação de análogos mais eficazes usando metodologia química como síntese total ou combinatória (CRAGG & NEWMAN, 2009; NEWMAN et al., 2003; HOSTETTMANN et al., 2003; YUNES & CALIXTO, 2001; NEWMAN et al., 2000; CORDELL, 2000; SIMÕES et al., 2000; HOSTETTMANN et al., 1998; CECHINEL FILHO & YUNES, 1998).

Dentro deste contexto, diversos tipos de pesquisa são desenvolvidos no Laboratório LP-1 do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, incluindo-se a que consiste em estudar plantas com potencialidades farmacológicas e terapêuticas, visando isolar e caracterizar os metabólitos secundários bioativos. Os extratos brutos e/ou substâncias isoladas são submetidos a bioensaios de toxicidade para *Artemia salina*, atividade fungitóxica, atividade citotóxica *in vitro* frente a linhagens de células tumorais e atividade genotóxica *in vitro* e a testes de atividade antioxidante.

Estes estudos são realizados com espécies pertencentes a famílias selecionadas, particularmente, Lauraceae, Meliaceae, Combretaceae e Bignoniaceae, devido ao fato de que muitas das plantas pertencentes a estas famílias são ricas em metabólitos secundários, muitos deles bioativos.

Estas diferentes abordagens têm originado bons resultados, sendo obtidos e caracterizados metabólitos secundários de interesse, alguns dos quais bioativos quanto à toxicidade para *A. salina* (GARCEZ, 2006; GARCEZ et al., 2005a; GARCEZ et al., 2005b; GARCEZ et al., 2004; GUERBAS NETO, 2003; GARCEZ et al., 2003a; GARCEZ et al., 2003b; BATISTA, 2001; GARCEZ et al., 2000; RAMOS, 1999; GARCEZ et al., 1999; GARCEZ et al., 1998; GARCEZ et al., 1997a; GARCEZ et al., 1997b; GARCEZ et al., 1996; GARCEZ et al., 1995).

Com base nas informações acima relatadas, o presente trabalho visa contribuir para o conhecimento da composição química e das atividades biológicas de plantas da família Lauraceae, realizando o estudo de um espécime de *Ocotea acutifolia*.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- FAMÍLIA LAURACEAE - GÊNERO *Ocotea*

A família Lauraceae compreende 54 gêneros e cerca de 2500 espécies, as quais são predominantemente arbóreas, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta, estendendo-se a regiões de clima temperado. No Brasil, esta família é representada por 19 gêneros e aproximadamente 390 espécies (CHRISTOPHEL & ROWETT, 1996; JOLY, 1991; GOTTLIEB, 1972).

Muitas das espécies pertencentes à família Lauraceae são consideradas medicinais e de utilização variada, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças. Algumas espécies são amplamente utilizadas pela sociedade, podendo-se destacar entre elas a cânfora (*Cinnamomum camphora*), utilizada como cardiotônico, anestésico e cicatrizante e o louro (*Laurus nobilis*) freqüentemente utilizado como estimulante nas afecções gástricas e reumáticas, além de apresentar atividade antiespasmódica (MARQUES, 2001).

Como já mencionado anteriormente, trata-se de uma família rica em metabólitos secundários, destacando-se os pertencentes às seguintes classes: neolignanais e lignanas, alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, flavonoides, sesquiterpenos, e pironas (GARCEZ et al, 2005a; GARCEZ et al., 2005b; HENRIQUES et al., 2000; BARBOSA FILHO, 2000; GARCEZ et al., 1999; GARCEZ et al., 1995; SAKAI et al., 1989; GOTTLIEB & YOSHIDA, 1989; GOTTLIEB, 1972), sendo ainda algumas espécies ricas em óleo essencial (BRUNI et al., 2004; SCORA & SCORA, 2001; DIAZ et al., 1980).

Inserido na família Lauraceae, *Ocotea* é um gênero que inclui mais de 300 espécies de árvores e arbustos, distribuídas principalmente pelas regiões tropicais e subtropicais da América Central e América do Sul, com poucas espécies na África em Madagascar (ROHWER, 1993).

Este gênero apresenta o maior número de espécies empregadas na medicina popular, as quais são usadas como anti-reumáticas, depurativas, tônicas, estomáquicas, sudorífica e contra abscessos (MARQUES, 2001; RIZZINI & MORS, 1976). Estudos etnobotânicos mencionam o uso de *Ocotea aciphylla* por índios do Xingu, onde a folha é

utilizada para enrolar cigarro usado pelo pajé em rituais de cura. Esta folha, quando queimada, pode apresentar um efeito narcótico (EMMERICH & SENNA, 1985).

Diversas plantas pertencentes a este gênero produzem óleos essenciais, que em alguns casos têm importância econômica. Pode-se citar, por exemplo, *O. cymbarum*, *O. caudata*, *O. pretiosa* e *O. usambarensis*, que são exploradas comercialmente. Algumas espécies são também importantes na produção de madeira, entre estas destacando-se *O. porosa*, *O. odorífera*, *O. puberula* e *O. bullata* (LORENZI, 2002).

Quanto à composição química de representantes de *Ocotea*, destacam-se os alcaloides aporfinoides e benziltetraidroisoquinolínicos, benzopiranos e principalmente, neolignananas (ZANIN & LORDELLO, 2007; TELES et al., 2005; SILVA et al., 2002; LORDELLO & MASSAYOSHI, 1997; GARCEZ et al., 1995; GUINAUDEAU et al., 1994; BOTEAGA et al., 1993; SILVA et al., 1989; DODSON et al., 1987; KHAN et al., 1987; VECCHIETTI et al., 1979).

Com relação à *O. acutifolia*, não foi encontrado na literatura nenhum relato sobre a composição química desta espécie.

2.2- *Ocotea acutifolia*

Ocotea acutifolia (Nees) Mez., conhecida popularmente como canela bosta, canela-massapé, louro-branco-do-paraná ou louro-do-paraná, é uma árvore de grande porte portando folhas persistentes, verde-escuro brilhante, simples, lanceoladas e de 6 a 11 centímetros de comprimento. A árvore floresce na primavera e no verão. As flores são brancas, minúsculas, em panículas axilares ou subterminal. Seu fruto é uma baga elipsóide, cúpula hemisférica, coriácea com margem simples (NEES, 1833).

O. acutifolia possui madeira adequada para o uso em marcenaria e construções (MARQUES, 2001). Esta espécie está dispersa na América do Sul, com ocorrência no nordeste da Argentina e no norte do Uruguai, no Brasil ocorre principalmente na região sul do país (ROHWER, 1986).

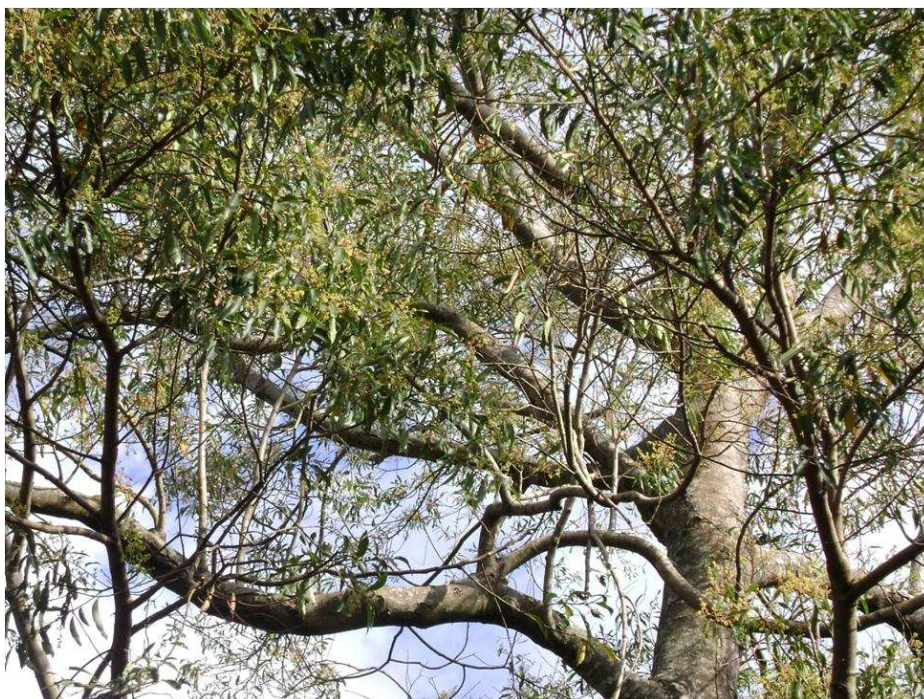


Figura 1- *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez.

2.2- ALCALOIDES de *Ocotea*

Os alcaloides isoquinolínicos constituem o maior grupo de alcaloides vegetais, ocorrendo em diversas famílias de plantas (ROBBERS et al., 1996; SILVA et al., 2002). Trata-se de um grupo extenso de alcaloides relacionados biogenética e estruturalmente, sendo as principais classes destes compostos os tetraidroisoquinolínicos, benziltetraidroisoquinolínicos, aporfínicos, proaporfínicos, bisbenziltetraidroisoquinolínicos, dibenzopirrocólínicos, protoberberínicos e benzofenantridínicos (Figura 2) [SHAMA, 1972].

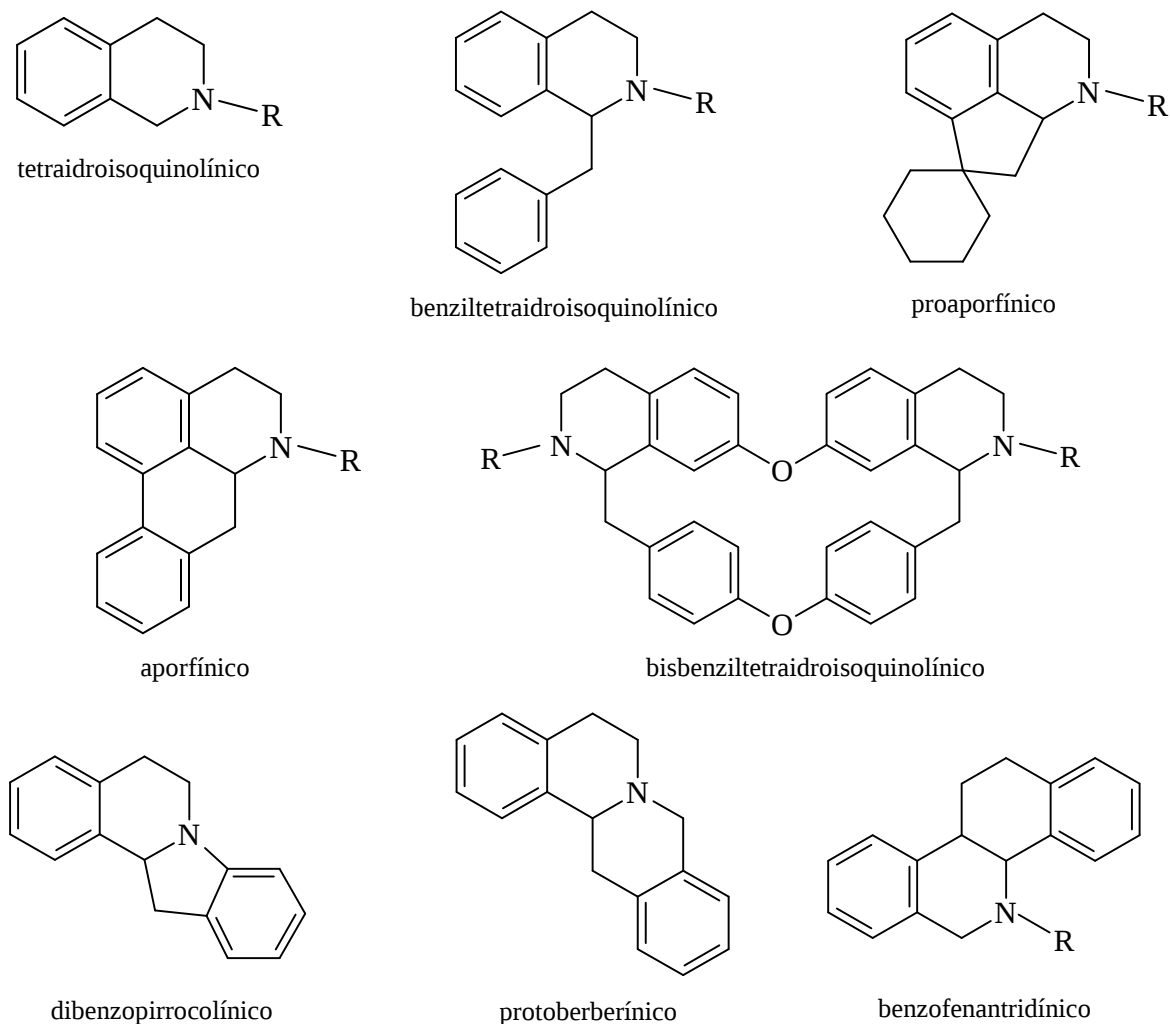


Figura 2- Esqueletos carbônicos das principais classes de alcaloides isoquinolínicos

Os alcaloides benzilisoquinolínicos são estruturalmente os precursores destas classes e a partir desta estrutura base, através de uma série de oxidações e ciclizações são originados os outros esqueletos (SHAMA, 1972). A figura 3 ilustra a relação biossintética entre o precursor, um alcaloide do tipo benziltetraidroisoquinolínico, o qual é formado pela condensação de duas unidades derivadas de tirosina, e os alcaloides com esqueleto do tipo aporfínico e morfinano.

Em espécies de *Ocotea*, os alcaloides isoquinolínicos são substâncias bastante freqüentes. Dos mais de 200 representantes deste gênero sessenta e cinco tiveram seus estudos químicos e/ou farmacológicos realizados e das espécies que foram estudadas

quimicamente, em vinte e cinco foi constatada a presença de cerca de oitenta alcaloides isoquinolínicos, sendo os aporfínicos, alcaloides estruturalmente relacionados aos isoquinolínicos, os de maior ocorrência nas espécies (Tabela 1, figura 4). No entanto, a literatura também relata a ocorrência de outros tipos de esqueletos de alcaloides no gênero, tais como os morfínicos (ALAIN et al., 2007; VECHIETTI et al., 1981; VECHIETTI et al., 1977; VECHIETTI et al., 1976), embora presentes em quantidades pouco expressivas.

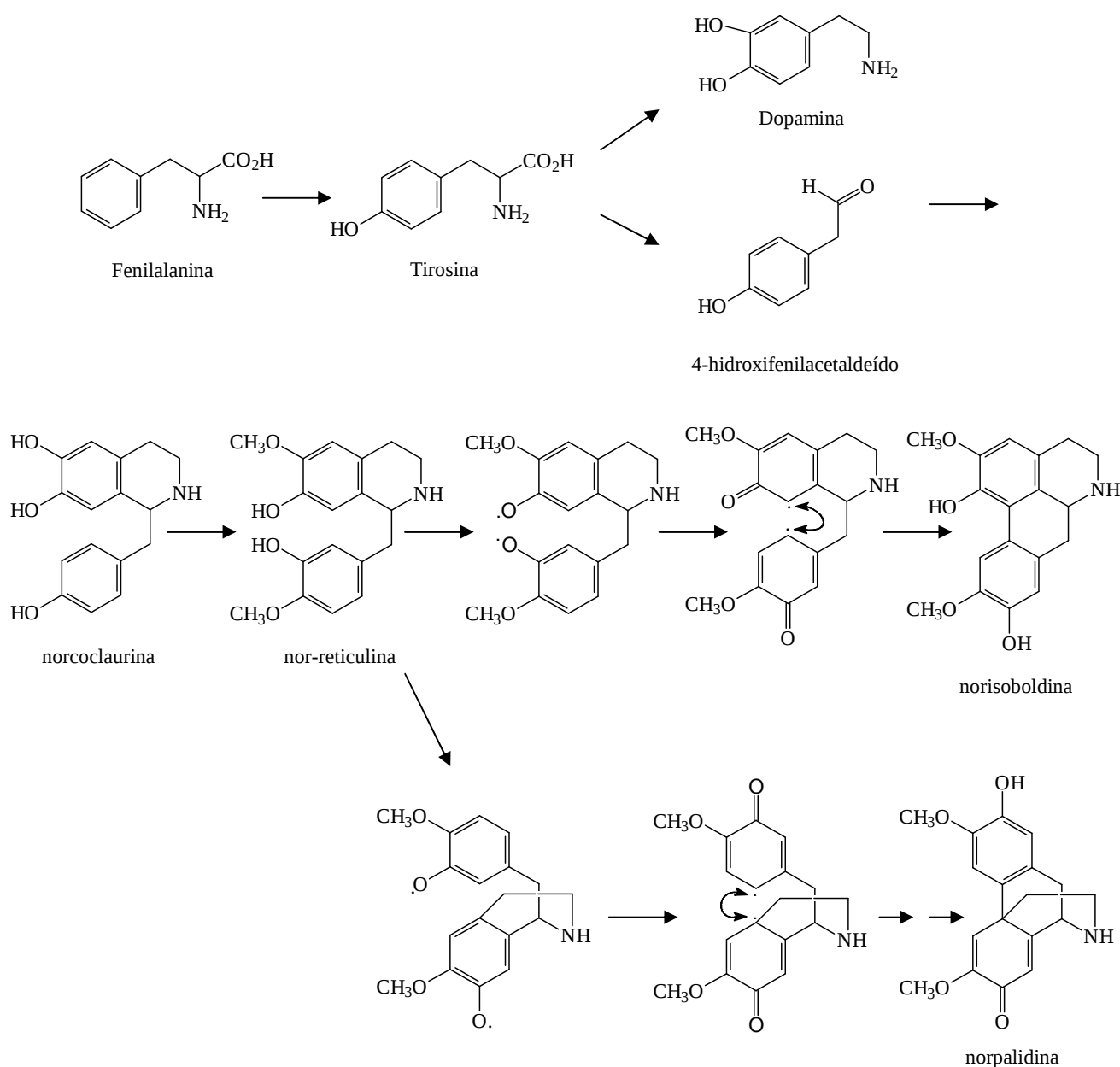


Figura 3- Sequência biossintética atualmente aceita evidenciando a sequência comum de alcaloides aporfínicos e morfínicos

Vários alcaloides aporfinoides comumente encontrados em plantas do gênero *Ocotea* apresentam pronunciada bioatividade. O alcaloide (+)-dicentrina (**VIII**), por exemplo, é um agente intercalante do DNA com diferentes bioatividades, destacando-se citotoxicidade frente a inúmeras linhagens de células humanas tumorais (HOET et al., 2004; MORTEZA-SEMNANI et al., 2003; STÉVIGNY et al., 2002; SHEN et al., 2000; HUANG et al., 1998; KONDO et al., 1990; LIOU et al., 1979). O alcaloide (+)-Glaucina (**XVI**) também exibe atividade antineoplásica (HOET et al., 2004; KONDO et al., 1990; LIOU et al., 1979). É descrito ainda atividade antitumoral frente à linhagem celular HepG2 para os alcaloides (+)-nordomesticina (**XXX**), (+)-domesticina (**XXIX**) e (-)-caaverina (FOURNET et al., 2007).

(+) Dicentrina (**VIII**) apresenta atividade anti-topoisomerase I e II (HOET et al., 2004; WOO et al., 1999) sendo também considerado antagonista α 1-adrenoceptor, assim como o alcaloide (+) ocoteína (**XXXVI**) [CHANG et al., 1997; YU et al., 1994].

Dicentrinona (**XXXVI**), além de exibir significativa ação vasorelaxante (CHEN et al., 1997), inibe a ação catalítica da enzima topoisomerase I (ZHOU et al., 2000) e (+)-nantenina (**XLII**) atua como bloqueador de contração muscular e translocação de Ca^{2+} (RIBEIRO et al., 2003).

A literatura registra a ação tóxica contra diferentes fungos demonstrada pelos alcaloides (+) glaucina (**XVI**) e (+) dicentrina (**VIII**) [MORTEZA-SEMNANI et al., 2003; HSU et al., 1991, MA et al., 2000]. (+)-Nordicentrina (**XL**) é considerado um potente antifúngico frente a *Cladosporium cladosporioides* (PUVANENDRAN et al., 2008).

Atividade antiagregante plaquetária é relatada para (+)-dicentrina (**VIII**), (+)-ocoteína (**XXXVI**), (+)-hernovina (**LX**), (+)-predicentrina (**IX**) e (+)-*N*-metillaurotetanina (**LII**) [WU et al., 1998; CHANG et al., 1998; CHEN et al., 1997; CHEN et al., 1996]. Para glaziovina (**XIII**), isolado de *O. glaziovii*, é relatado efeito anti-úlceras em camundongos (CHAUMONTET et al., 1978).

Atividade tripanocida foi relatada para os alcaloides (+) glaucina (**XLI**) e (+)-predicentrina (**IX**), os quais inibiram o crescimento de *Trypanosoma cruzi* (MORELLO et al., 1994). Relata-se também para (+)-dicentrina (**VIII**) atividade antitripanosomal contra *Trypanosoma brucei brucei* (HOET et al., 2004).

Os alcaloides (+)-nordomesticina (**XXX**), (+)-domesticina (**XXIX**) e (-)-caaverina isolado de *O. lancifolia* apresentaram resultados interessantes frente aos parasitas *Leishmania brasiliensis*, *L. amazonensis*, *L. donavani* e *Trypanosoma cruzi*.

(FOURNET et al., 2007). (+)-Isodomeesticina (**LIII**), (+)-*N*-metillaurotetanina (**LII**) e (+)-nantenina (**XLII**) também apresentaram atividade antileishmania, inibindo o crescimento do parasita *Leishmania mexicana* (CORREA et al., 2006).

Para (+)-*N*-metillaurotetanina (**LII**), (+)-isoboldina (**XV**) e (+)-glaucina (**XLI**) existem registros de atividades antipoliiovirus (STIGLIANI et al., 1998; BOUSTIE et al., 1998) e para o oxaporfínico talicminina (**LI**) há relatos na literatura de atividade antiplasmodial frente à *Plasmodium falciparum* (WRIGHT et al., 2000).

Tabela 1- Alcaloides aporfinoides obtidos de espécies de *Ocotea* (Lauraceae)

Espécies	Alcaloides	#	Parte estudada	Ref.
<i>O. holdridgeana</i>	(+)-isocoridina	<u>I</u>	Cascas	VARGAS et al., 1996
	(+)-norisocoridina	<u>II</u>		
	(+)-corituberina	<u>III</u>		
	(+)- <i>O,O</i> dimetilcorituberina	<u>IV</u>	Folhas	CASTRO & RUIZ, 1994
	(-)-3-metoxinuciferina	<u>V</u>		
	(-)-3-hidroxinuciferina	<u>VI</u>		
	(+)-isocoridina	<u>I</u>		
<i>O. bucherii</i>	(+)-3-hidroxi-glaucina	<u>VII</u>	Folhas/galhos	ROENSCH et al., 1983
<i>O. brachybotra</i>	(+)-dicentrina	<u>VIII</u>	Folhas	VECCHIETTI et al., 1977
	(+)-predicentrina	<u>IX</u>		
	(+)-cassiticina	<u>X</u>		
	(+)-ocopodina	<u>XI</u>		
	(+)-leucoxina	<u>XII</u>		
	(+/-)-glaziovina	<u>XIII</u>		
<i>O. brenesii</i>	3-hidroxi-6a, 7-dehidronuciferina	<u>XIV</u>	Folhas	LOPEZ et al., 1996
	(+)-isocoridina	<u>I</u>		
	(-)-3-hidroxinuciferina	<u>VI</u>		
<i>O. caesia</i>	(+)-isolbodina	<u>XV</u>	Madeira do tronco	VILEGAS et al., 1989
	(+)-norisolbodina	<u>XVI</u>		
	(-)-pulcina	<u>XVII</u>		
	(-)-zenquerina	<u>XVIII</u>		
	(+)-nororientina	<u>XIX</u>		
<i>O. glaziovii</i>	(+/-)-apoglaziovina	<u>XX</u>	Folhas	GILBERT et al., 1964; CASAGRANDE & FERRARI, 1975
	(+/-)-glaziovina	<u>XIII</u>		
	(-)-pronuciferina	<u>XXI</u>	Folhas	CASAGRANDE & FERRARI, 1975
	(+)-crotsparina	<u>XXII</u>		
	(-)-caaverina	<u>XXIII</u>		
	(-)-asimilobina	<u>XXIV</u>		
	(+/-)-lirinidina	<u>XXV</u>		
	(+)-isolbodina	<u>XV</u>		
<i>O. gomesii</i>	(+)-preocoteina	<u>XXVI</u>	Cascas	LOPEZ et al., 1995
<i>O. insularis</i>	talictuberina	<u>XXVII</u>	Folhas	HASBUN & CASTRO, 1993
	3- <i>O</i> -dimetiltalictuberina	<u>XXVIII</u>		

Tabela 1 (continuação)- Alcaloides aporfinoides obtidos de espécies de *Ocotea*

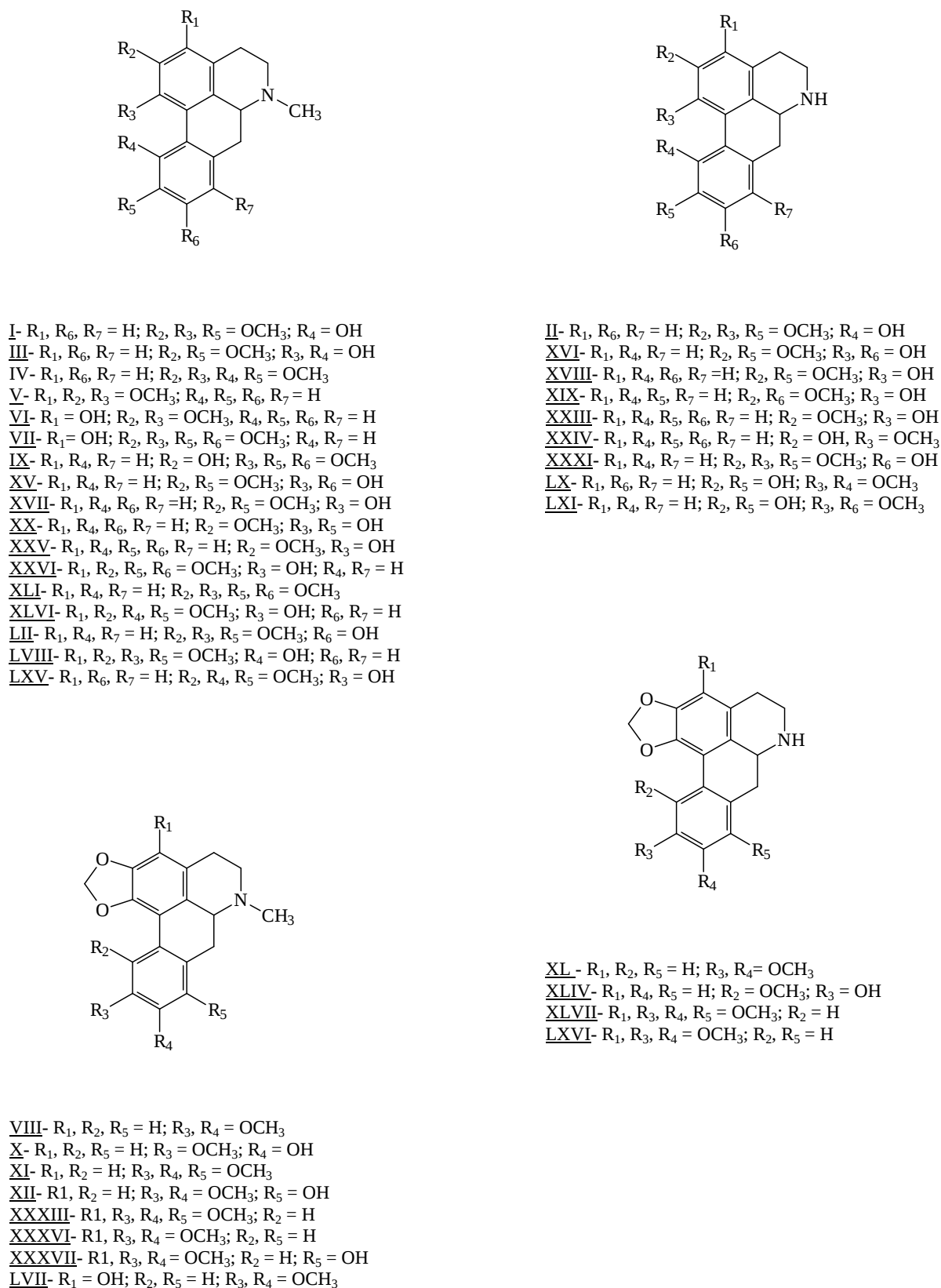
Espécies	Alcaloides	#	Parte estudada	Ref.
<i>O. lancifolia</i>	(+)-domesticina	<u>XXIX</u>	Cascas do	FOURNET et al., 2007
	(+)-nordomesticina	<u>XXX</u>	caule	
	(+)-laurotetanina	<u>XXXI</u>		
	(+)-nornantenina	<u>XXXII</u>		
	(+)-corituberina	<u>III</u>		
	glaziovina	<u>XIII</u>		
	(+)-isoboldina	<u>XV</u>		
	(+)-norisoboldina	<u>XVI</u>		
	crostparina	<u>XXII</u>		
	(-)-caaverina	<u>XXXIII</u>		
<i>O. leucoxylon</i>	(+)-dicentrina	<u>VIII</u>	Folhas	GOODWIN, et al., 1960
	(+)-leucoxina	<u>XII</u>		
	(+)-leucoxilonina	<u>XXXIII</u>		
	(+)-dicentrina	<u>VIII</u>	Folhas	ZHOU et al., 2000
	dicentrinona	<u>XXXIV</u>		
	lequesnamina	<u>XXXV</u>	Madeira	IMLER et al., 2003
	(+)-ocoteína	<u>XXXVI</u>	-	
	(+)-ocoxilonina	<u>XXXVII</u>		
<i>O. macropoda</i>	(+)-dicentrina	<u>VIII</u>	-	CAVA et al, 1968
	deidrodicentrina	<u>XXXVIII</u>		
	(+)-ocopodina	<u>XI</u>		
	dicentrinona	<u>XXXIV</u>	-	CAVA & VENKATESWARLU 1971
	deidroocopodina	<u>XXXIX</u>		
	(+)-nordicentrina	<u>XL</u>		
	(+)-predicentrina	<u>IX</u>		
<i>O. macrophylla</i>	(+)-glaucina	<u>XXI</u>	Madeira do	FRANCA et al., 1975
	(+)-nantenina	<u>XXII</u>	tronco	
	(+)-isocoridina	<u>I</u>		
	deidronantenina	<u>XXIII</u>		
	(+)-nantenina	<u>XXII</u>	-	RIBEIRO et al., 2003
<i>O. meiziana</i>	(+)-nandigerina	<u>XXIV</u>	Cascas	LOPEZ et al., 1995
<i>O. minarum</i>	(+)-dicentrina	<u>VIII</u>	Folhas	VECCHIETTI et al., 1979
	(+)-predicentrina	<u>IX</u>		
	(+)-ocopodina	<u>XI</u>		
	(+)-leucoxina	<u>XII</u>		

Tabela 1 (continuação)- Alcaloides aporfinoides obtidos de espécies de *Ocotea*

Espécies	Alcaloides	#	Parte estudada	Ref.
<i>O. minarum</i>	(+)-leucoxilonina	<u>XXXIII</u>	Folhas	VECCHIETTI et al., 1979
	dicentrinona	<u>XXXIV</u>		
	(+)-ocoteína	<u>XXXVI</u>		
	(+)-hidroxidicentrina	<u>XLV</u>		
	(+)-iso-oconovina	<u>XLVI</u>		
	(+)-norleucoxilonina	<u>XLVII</u>		
	(+)-ocominarina	<u>XLVIII</u>		
	(+)-ocotominarina	<u>XLIX</u>		
	ocominarona	<u>L</u>		
	talicminina	<u>LI</u>		
<i>O. puberula</i>	dicentrina	<u>VIII</u>	-	ZANIN & LORDELLO, 2007
	predicentrina	<u>IX</u>		
	leucoxina	<u>XII</u>		
	N-metillaurotetanina	<u>LII</u>		
	isodomeesticina	<u>LIII</u>		
	N-óxido dicentrina	<u>LIV</u>		
	talicminina	<u>LI</u>	-	BARALLE et al., 1973
	(+)-ocoteína	<u>XXXVI</u>	Cascas	
			-	ZANIN & LORDELLO, 2007
	deidroocoteína	<u>LV</u>	Cascas	
	dideidroocoteína	<u>LVI</u>		BARALLE et al., 1972
	3-hidroxidicentrina	<u>LVII</u>	-	
				ZANIN & LORDELLO, 2007
<i>O. sinuata</i>	nordomeesticina	<u>XXX</u>	-	ZANIN & LORDELLO, 2007
<i>Ocotea</i> sp.	(+)-isocoridina	<u>I</u>	-	CAVA et al, 1968
	(+)-oconovina	<u>LVIII</u>		
	(+)-ococriptina	<u>LIX</u>		
<i>O. teleiandra</i>	(+)-hernovina	<u>LX</u>	Madeira do tronco	VILEGAS & GOTTLIEB , 1992
	(+)-laetanina	<u>LXI</u>		
	(-)-laetina	<u>LXII</u>		
	(+)-ovigerina	<u>LXIII</u>		

Tabela 1 (continuação)- Alcaloides aporfinoides obtidos de espécies de *Ocotea*

Espécies	Alcaloides	#	Parte estudada	Ref.
<i>O. teleiandra</i>	(+)-nandigerina	<u>XLIV</u>	Madeira do tronco	VILEGAS & GOTTLIEB, 1992
<i>O. variabilis</i>	variabilina	<u>LXIV</u>	-	CAVA et al., 1972
	(+)-glaziovina	<u>XIII</u>		
	(+)-apoglaziovina	<u>XX</u>		
	(+)-nantenina	<u>XLII</u>		
<i>O. vellosiana</i>	coridina	<u>LXV</u>	Frutos	GARCEZ et al., 1995
	O-metilcassifilina	<u>LXVI</u>		
	(+)-isocoridina	<u>I</u>		
	(+)-dicentrina	<u>VIII</u>		
	predecentrina	<u>IX</u>		
	ocopodina	<u>XI</u>		
	leucoxilonina	<u>XXXIII</u>		
	ocoteína	<u>XXXVI</u>		
	nordicentrina	<u>XL</u>		
	glaucina	<u>XLI</u>		
	ocominarina	<u>XLVIII</u>		
	ocotominarina	<u>XLIX</u>		

Figura 4- Estruturas dos alcaloides aporfinoides obtidos de espécies de *Ocotea*

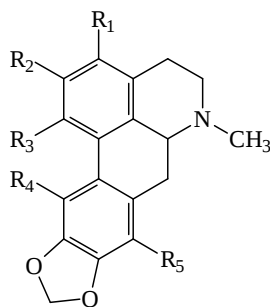
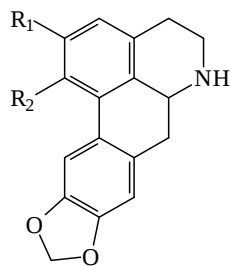
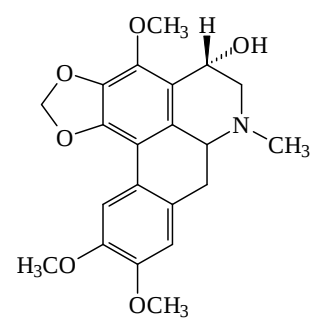
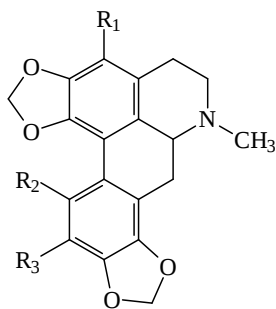
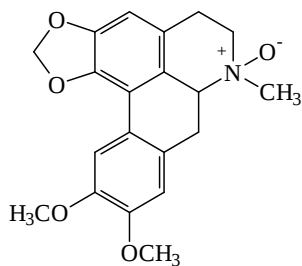
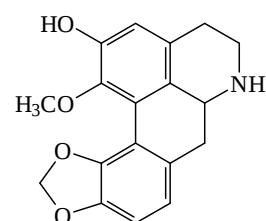
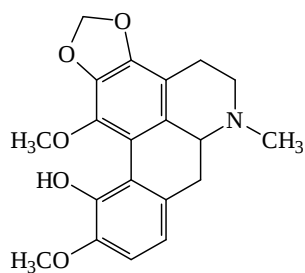
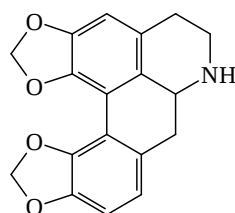
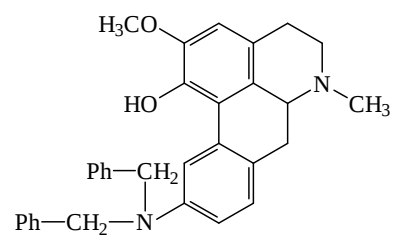
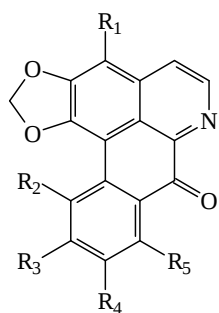
XXIX- R₁, R₄, R₅ = H; R₂ = OCH₃; R₃ = OHXLII- R₁, R₄, R₅ = H; R₂, R₃ = OCH₃LIII- R₁, R₄, R₅ = H; R₂ = OH; R₃ = OCH₃XXX- R₁ = OCH₃; R₂ = OHXXXII- R₁, R₂ = OCH₃XLVXLVIII- R₁, R₂ = H; R₃ = OCH₃XLIX- R₁, R₃ = OCH₃; R₂ = HLIVLXIILIXLXIIILXIV

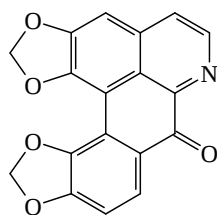
Figura 4 (continuação)- Estruturas dos alcaloides aporfinoides obtidos de espécies de *Ocotea*



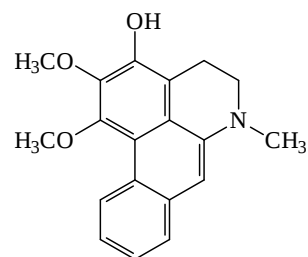
XXXIV- R₁, R₂, R₅ = H; R₃, R₄ = OCH₃

L- R₁, R₃, R₄, R₅ = OCH₃; R₂ = H

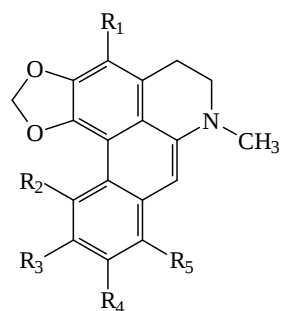
LI- R₁, R₃, R₄ = OCH₃; R₂, R₅ = H



LX



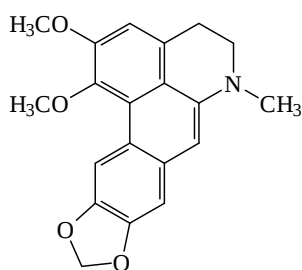
XIV



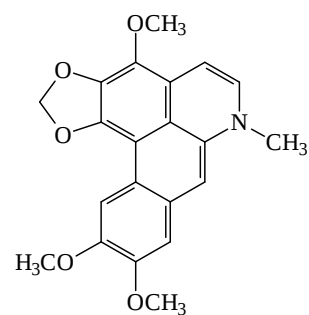
XXXVIII- R₁, R₂, R₅ = H; R₃, R₄ = OCH₃

LV- R₁, R₃, R₄ = OCH₃; R₂, R₅ = H

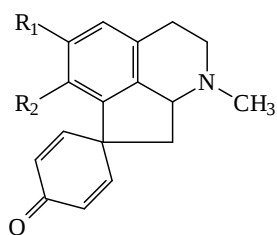
XXXIX- R₁, R₂ = H; R₃, R₄, R₅ = OCH₃



XLIII

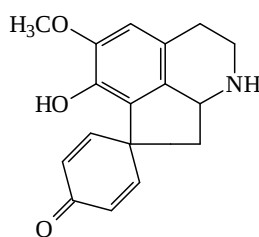


LVI

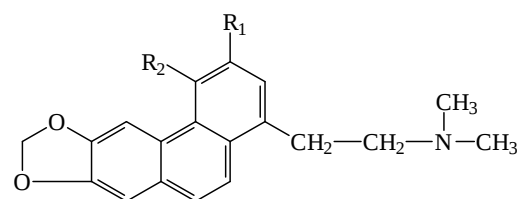


XIII- R₁ = OCH₃; R₂ = OH

XXI- R₁, R₂ = OCH₃



XXII



XXVII- R₁, R₂ = OCH₃

XXVIII- R₁ = OH; R₂ = OCH₃

Figura 4 (continuação)- Estruturas dos alcaloides aporfinoídeos obtidos de espécies de *Ocotea*

3- OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos:

- realizar o estudo químico das folhas e cascas do caule de um espécime de *Ocotea acutifolia*, visando ao isolamento e caracterização dos metabólitos secundários,
- Submeter os extratos e metabólitos secundários obtidos puros e/ou em misturas a ensaios de atividades biológicas, particularmente os de toxicidade para *Artemia salina* e atividades citotóxica frente a linhagens de células cancerígenas, genotóxica em asas de *Drosophila melanogaster* e antifúngica frente a cepas padrão de leveduras.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1- COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado em março de 2006, no município de Japorã, região sul de Mato Grosso do Sul. A identificação da planta foi realizada por Dr. João Baitello (Instituto Florestal de São Paulo, SP) e MSc. Flávio Macedo Alves (DBI/UFMS), sendo uma excisata depositada no herbário da UFMS (CGMS) sob o número 15441.

4.2- OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DAS FOLHAS DE *O. acutifolia*

As folhas (500 g) de *O. acutifolia* foram submetidas à secagem ao ar, moídas e posteriormente extraídas exaustivamente com etanol, a frio. O extrato resultante foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até consistência xaroposa. Ao extrato etanólico obtido foram adicionados 200 ml de ácido acético 10% e 50 ml de acetato de etila. Este sistema foi mantido sob agitação intensa por 2 horas e então transferido para um funil de separação com auxílio de 300 ml de acetato de etila e 50 ml de água. O funil foi agitado várias vezes por cerca de 30 minutos e deixado em repouso até completa separação das fases.

A fase acetato de etila foi retirada e a aquosa alcalinizada a pH 8 com NH_4OH concentrado, sendo em seguida submetida à extração com acetato de etila (200 ml, 3 vezes). A fase acetato de etila assim obtida foi lavada com 100 ml de água e o solvente evaporado sob pressão reduzida, resultando 3,0 g de extrato alcaloídico.

4.2.1- FRACIONAMENTO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DAS FOLHAS DE *O. acutifolia*

O extrato alcaloídico (3,0 g) foi inicialmente submetido à cromatografia em coluna de sílica gel 40-63 μm (150 g), eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 162 frações, sendo a primeira de 50 ml, a segunda e a terceira de 25 ml e as demais de 10 ml. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas

que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 18 frações (OAF-ALC 1 a 18) [Tabela 2].

Tabela 2- Fracionamento do extrato alcaloídico das folhas de *O. acutifolia* (Coluna ALC)

Eluente	Fração	Massa (mg)
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 1	285,5
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 2	312,3
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 3	428,9
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 4	122,9
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 5	47,0
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 6	60,2
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 7	132,2
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 8	20,2
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 9	50,3
CHCl ₃ /MeOH 5%	OAF-ALC 10	55,8
CHCl ₃ /MeOH 6%	OAF-ALC 11	25,7
CHCl ₃ /MeOH 6%	OAF-ALC 12	34,5
CHCl ₃ /MeOH 7%	OAF-ALC 13	18,1
CHCl ₃ /MeOH 8%	OAF-ALC 14	21,3
CHCl ₃ /MeOH 10%	OAF-ALC 15	41,4
CHCl ₃ /MeOH 20%	OAF-ALC 16	40,4
CHCl ₃ /MeOH 20%	OAF-ALC 17	52,7
CHCl ₃ /MeOH 30%	OAF-ALC 18	48,5

Foram selecionadas para estudo, após análise por CCDA visando ao isolamento e caracterização dos metabólitos secundários as frações OAF-ALC 1, OAF-ALC 2, OAF-ALC 3, OAF-ALC 4, OAF-ALC 5, OAF-ALC 6, OAF-ALC 7, OAF-ALC 9, OAF-ALC 10 e OAF-ALC 16.

4.2.2- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OAF-ALC 1, OAF-ALC 2, OAF-ALC 3, OAF-ALC 4, OAF-ALC 5, OAF-ALC 6, OAF-ALC 7, OAF-ALC 9, OAF-ALC 10 e OAF-ALC 16

4.2.2.1- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 1

A fração OAF-ALC 1 (285,5 mg) foi inicialmente dividida em 2 porções, sendo cada uma delas submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram aplicados cerca de 140 mg de material de cada vez e coletadas, em média, 36 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 8 frações (OAF-ALC A 1 a 8) [Esquema 1a].

Da fração OAF-ALC A 2 obteve-se o composto (+)-talicsimidina (**14**) [4,0 mg] e da fração OAF-ALC A 4 (15,0 mg) os compostos (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**) e talicminina (**17**).

4.2.2.2- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 2

A fração OAF-ALC 2 (312,0 mg) foi inicialmente dividida em 3 porções, sendo cada uma delas submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram aplicados cerca de 100 mg de material de cada vez e coletadas, em média, 33 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 9 frações (OAF-ALC B 1 a 9) [Esquema 1a].

Da fração OAF-ALC B 1 (21,0 mg) obteve-se (+)-ocoteína (**2**), de OAF-ALC B 2 (10,0 mg) obteve-se (+)-dicentrina (**1**) e da fração OAF-ALC B 6 (5,3 mg) obteve-se o composto (+)-neolitsina (**12**).

4.2.2.3- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 3

O perfil cromatográfico, após análise por CCDA, da fração OAF-ALC 3 (428,5 mg) mostrou ser bastante semelhante ao da fração anterior OAF-ALC 2. Sendo assim, parte da fração OAF-ALC 3 (80,0 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram coletadas 38 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. Desse processo resultaram 8 frações (OAF-ALC C 1 a 8), após análise das mesmas por CCDA [Esquema 1a].

Das frações OAF-ALC C 4 a 6 (60,2 mg) foram também obtidos os compostos (+)-dicentrina (**1**) e (+)-ocoteína (**2**) em mistura.

4.2.2.4- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 4

OAF-ALC 4 (122,9 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram coletadas 34 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. Desse processo resultaram 9 frações (OAF-ALC D 1 a 9), após análise de seus respectivos perfis cromatográficos em CCDA [Esquema 1a].

A fração OAF-ALC D 3 (11,4 mg) forneceu mistura de (+)-dicentrina (**1**) e (+)-leucoxina (**9**).

4.2.2.5- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 5

A fração OAF-ALC 5 (47,0 mg) foi analisada por CLAE em sílica de fase reversa. Foram estabelecidas as condições de separação em coluna analítica (Figura 5) e as substâncias purificadas através de coluna semipreparativa (Esquema 1a). Desse processo foram obtidos mistura (5,2 mg) de (+)-*N*-metillaurotetanina (**15**) e (+)-predicentrina (**16**), os compostos (+)-isodomesticina (**13**; 6,4 mg) e (+)-leucoxina (**9**; 14,2 mg) e ainda mistura (7,0 mg) de **9** e (+)-ocoxilonina (**10**).

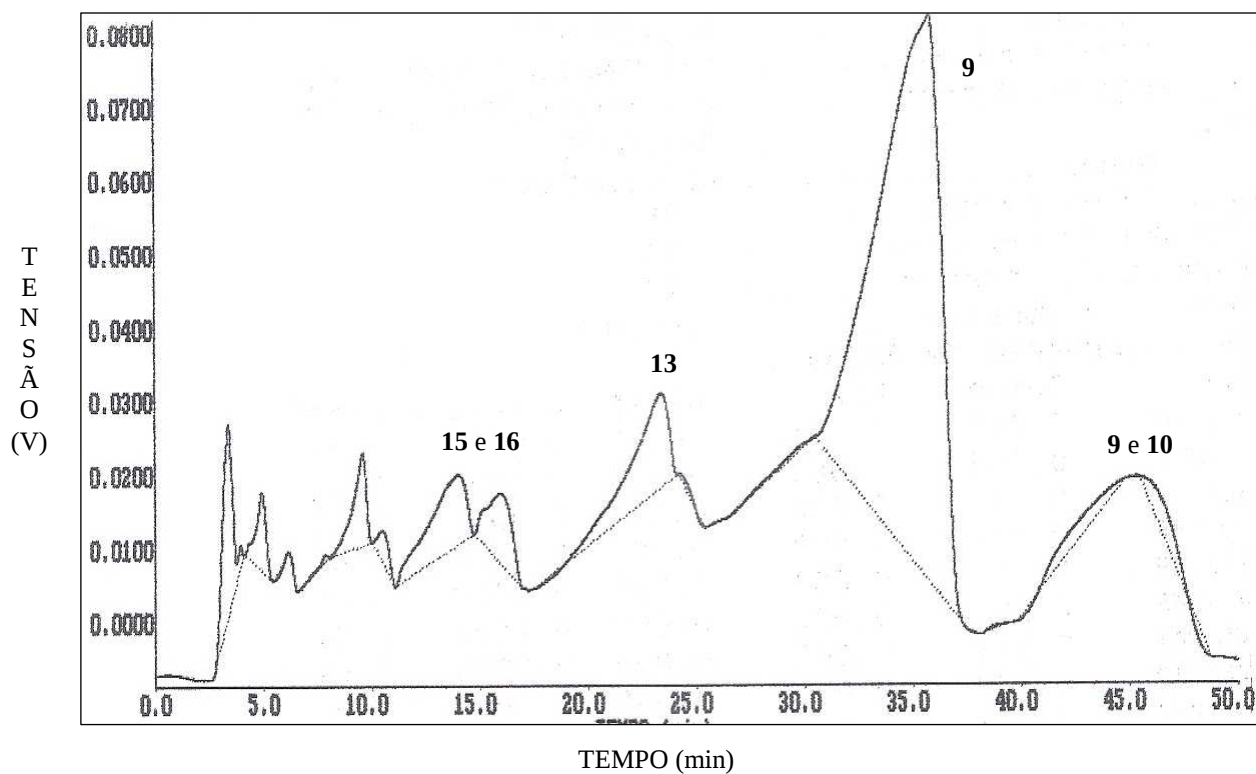
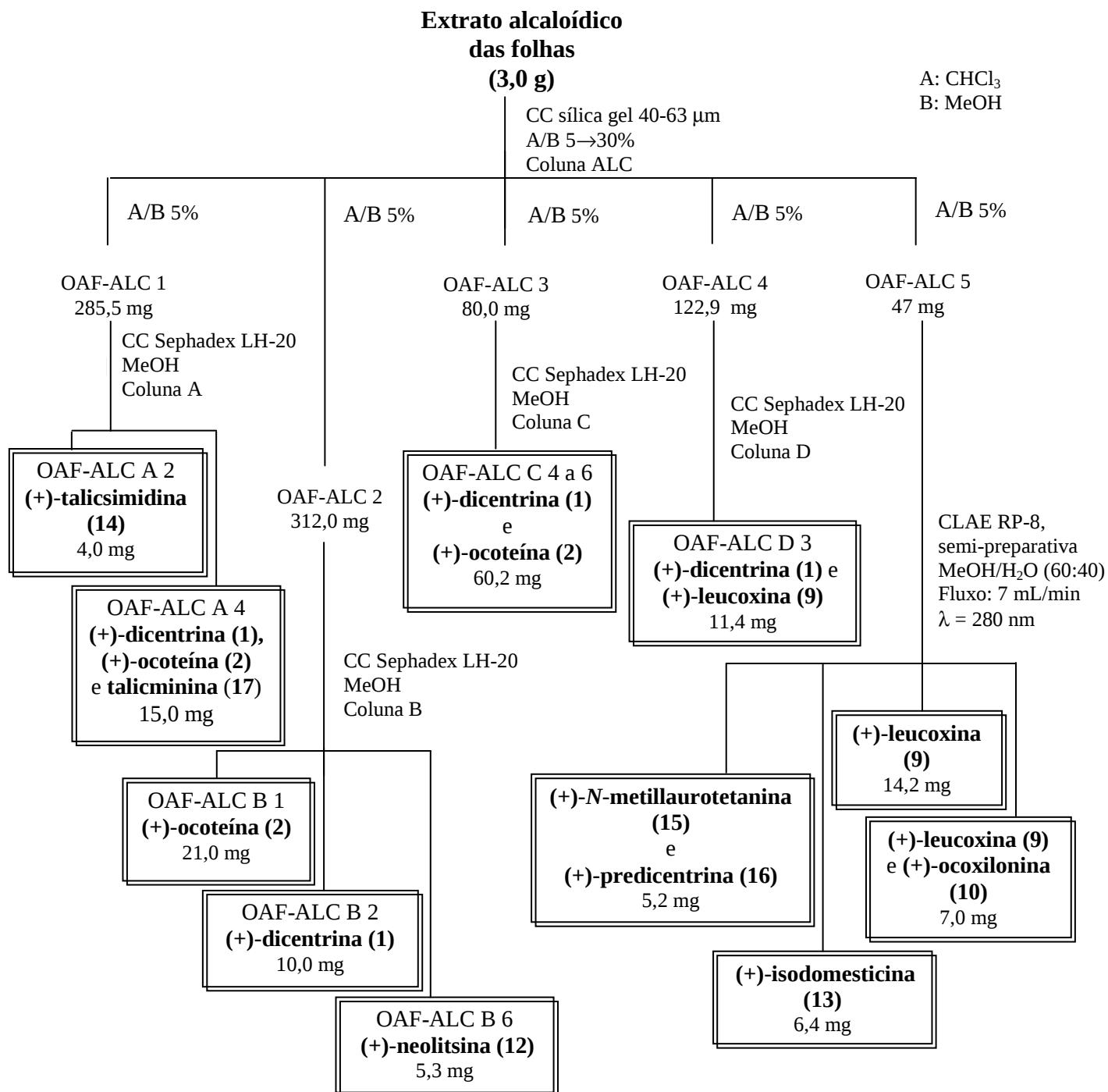


Figura 5- Cromatograma analítico da fração OAF-ALC 5. Coluna Phenomenex-Luna C-8, 5 μ m, 4,6 $\varnothing$ x 250 mm; eluente MeOH/H₂O (60:40); fluxo de 0,7 mL/min; detector UV, 280 nm

Esquema 1a- Fracionamento de OAF-ALC 1, OAF-ALC 2, OAF-ALC 3, OAF-ALC 4, OAF-ALC 5, OAF-ALC 6, OAF-ALC 7, OAF-ALC 9, OAF-ALC 10 e OAF-ALC 16 originadas do extrato alcaloídico das folhas de *O. acutifolia*



4.2.2.6- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 6

OAF-ALC 6 (60,2 mg) foi inicialmente submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram coletadas 30 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 6 frações (OAF-ALC E 1 a 6) [Esquema 1b].

Da fração OAF-ALC E 1 (4,7 mg) obteve-se o composto (+)-palidina (**18**).

4.2.2.7- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 7

OAF-ALC 7 (132,2 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram coletadas 48 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. Desse processo resultaram 8 frações (OAF-ALC F 1 a 8), após análise das mesmas por CCDA [Esquema 1b].

Da fração OAF-ALC F 6 (14,0 mg) foi obtida a mistura dos compostos (+)-nordicentrina (**3**) e (+)-*O*-metilcassifilina (**4**).

4.2.2.8- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 9

A fração OAF-ALC 9 (50,3 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram coletadas 38 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. Desse processo resultaram 8 frações (OAF-ALC G 1 a 8), após análise de seus respectivos perfis cromatográficos e CCDA [Esquema 1b].

As frações OAF-ALC G 2 e 3 originaram o composto (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) [25,2 mg] e a fração OAF-ALC G 6 originou o composto (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina (**5**) [5,0 mg].

4.2.2.9- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 10

A fração OAF-ALC 10 (55,8 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram coletadas 32 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. Após análise por CCDA das frações foram reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 9 frações (OAF-ALC H 1 a 9) [Esquema 1b].

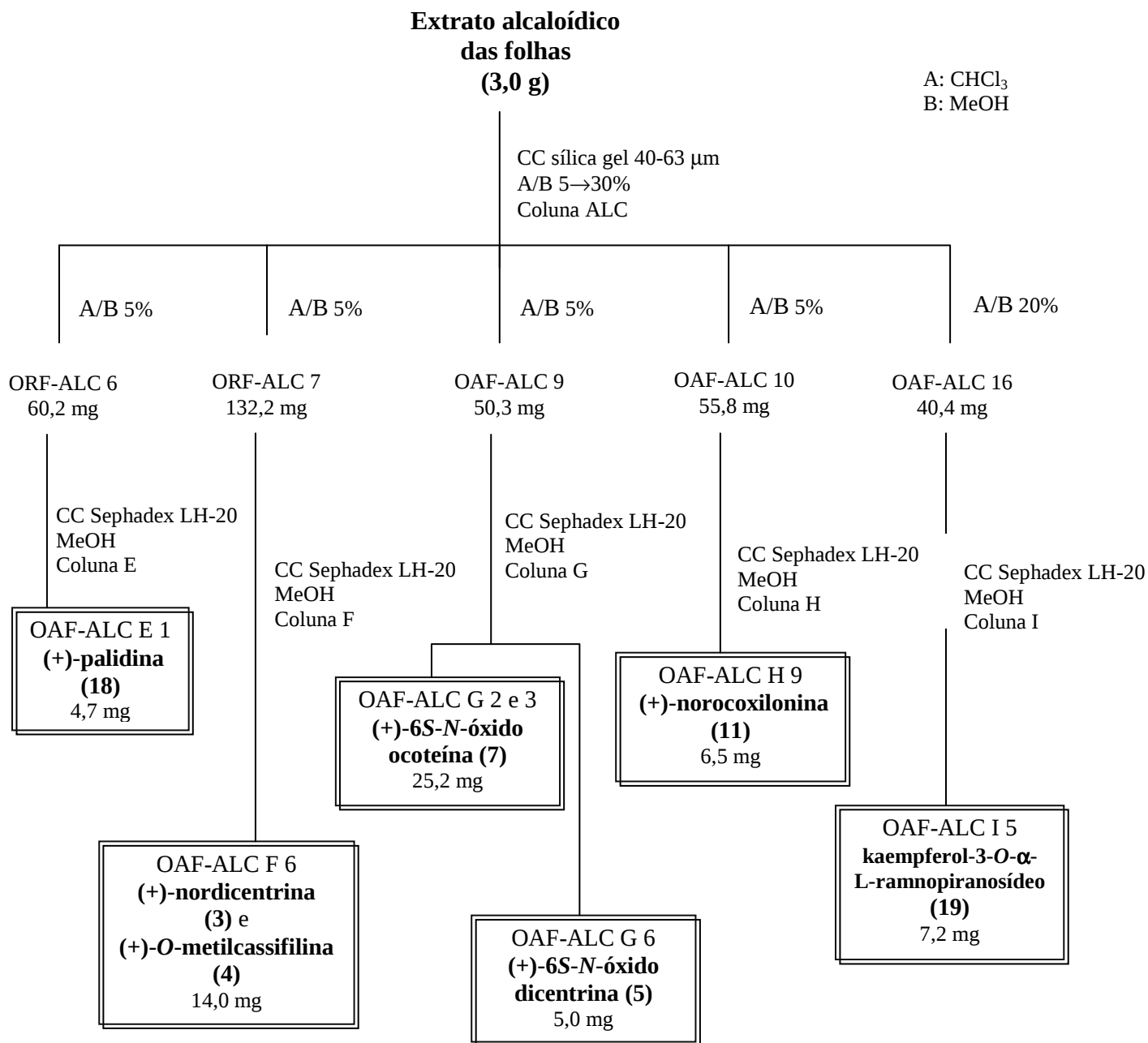
A fração OAF-ALC H 9 (6,5 mg) forneceu o composto (+)-norocoxilonina (11).

4.2.2.10- Separação dos componentes da fração OAF-ALC 16

OAF-ALC 15 (40,4 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram coletadas 60 frações, sendo a primeira de 35 ml, a segunda de 15 ml e as demais de 5 ml. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, resultando 9 frações (OAF-ALC I 1 a 9) [Esquema 1b].

A fração OAF-ALC I 5 (7,2 mg) forneceu o composto kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (19).

Esquema 1b- Seqüência de fracionamento de OAF-ALC 1, OAF-ALC 2, OAF-ALC 3, OAF-ALC 4, OAF-ALC 5, OAF-ALC 6, OAF-ALC 7, OAF-ALC 9, OAF-ALC 10 e OAF-ALC 16 originadas do extrato alcaloídico das folhas de *O. acutifolia*



4.3- OBTENÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *O. acutifolia*

As folhas (2880 g) de *O. acutifolia* foram submetidas à secagem ao ar, moídas e posteriormente extraídas exaustivamente com etanol, a frio.

O extrato resultante foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até consistência xaroposa, fornecendo o extrato etanólico bruto. Após adição de 1700 mL de metanol/água (9:1), o extrato foi submetido à partição com hexano. A fase hidrometanólica foi concentrada sob pressão reduzida até eliminação do metanol e em seguida, particionada com acetato de etila. Desta forma foram obtidos 73,4 g da fase hexânica e 54,0 g da fase acetato de etila.

4.3.1- FRACIONAMENTO DA FASE HEXÂNICA PROVENIENTE DA PARTIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *O. acutifolia*

O material presente na fase hexânica (73,4 g) foi submetido inicialmente a uma cromatografia em coluna (Coluna A), utilizando-se para tal 150 g de sílica gel 63-200 µm. O sistema foi eluído com CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/AcOEt, AcOEt e AcOEt/MeOH em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 39 frações de aproximadamente 250 ml cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida, sendo reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 13 frações (OAF-A 1 a 13) [Tabela 3].

Tabela 3- Fracionamento da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de *O. acutifolia* (Coluna A)

Eluente	Fração	Massa (g)
CH ₂ Cl ₂	OAF-A 1	7,16
CH ₂ Cl ₂	OAF-A 2	31,6
CH ₂ Cl ₂	OAF-A 3	12,2
CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (9:1)	OAF-A 4	8,57
CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (7:3)	OAF-A 5	3,36
CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (7:3)	OAF-A 6	0,82
CH ₂ Cl ₂ / AcOEt (1:1)	OAF-A 7	1,48
AcOEt	OAF-A 8	2,98
AcOEt	OAF-A 9	1,05
AcOEt / MeOH (9:1)	OAF-A 10	0,10
AcOEt / MeOH (7:3)	OAF-A 11	0,16
AcOEt / MeOH (7:3)	OAF-A 12	1,19
AcOEt / MeOH (1:1)	OAF-A 13	0,42

Foram selecionadas para estudo, após análise por CCDA visando o isolamento e caracterização dos metabólitos secundários as frações OAF-A 1, OAF-A 3, OAF-A 6, OAF-A 8.

4.3.2- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OAF-A 1, OAF-A 3, OAF-A 6 e OAF-A 8

4.3.2.1- Frações OAF-A 1

A fração OAF-A 1 (7,16 g) forneceu o composto ficaprenol-12 (**20**) contendo pequena proporção de impurezas (Esquema 2).

4.3.2.2- Separação dos componentes da fração OAF-A 3

Parte da fração OAF-A 3 (0,3 g) foi inicialmente submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 40-63 μm (40 g), eluída em Hex/AcOEt em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 170 frações, sendo a primeira de 50 ml, a segunda e a terceira de 25 ml e as demais de 10 ml. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 10 frações (OAF-B 1 a 10) [Esquema 2].

Da fração OAF-B 1, eluída em Hex/AcOEt 2 e 3% (21,0 mg) obteve-se o composto ficaprenol-12 (**20**) com pequena quantidade de impurezas e e da fração OAF-B 6, eluída em Hex/AcOEt 15 e 17% (14,0 mg) obteve-se o composto 3-(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol (**21**).

4.3.2.3- Separação dos componentes da fração OAF-A 6

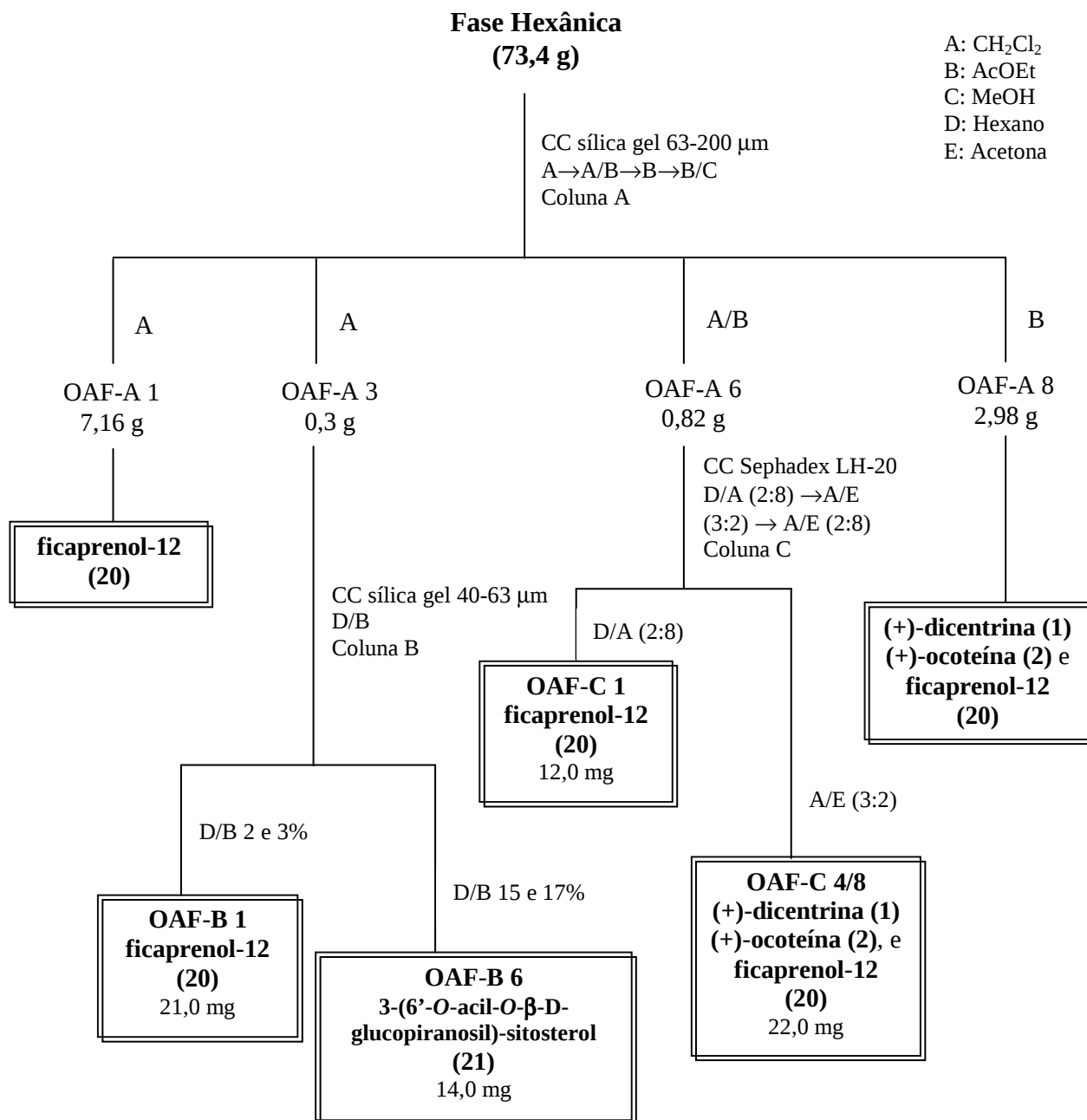
A fração OAF-A 6 (0,82 g) foi inicialmente dividida em duas porções, sendo cada uma delas submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em Hex/ CH_2Cl_2 (2:8), CH_2Cl_2 /Acetona (3:2) e CH_2Cl_2 /Acetona (2:8). Foram aplicados cerca de 400,0 mg de material de cada vez e coletadas, em média, 160 frações, sendo a primeira de 35 mL, a segunda de 15 mL e as demais de 5 mL. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, resultando 13 frações (OAF-C 1 a 13) [Esquema 2].

A fração OAF-C 1 (12,0 mg), eluída em Hex/ CH_2Cl_2 (2:8), forneceu o ficaprenol (**20**) como composto majoritário, enquanto as frações OAF-C 4 a C 8 (22,0 mg), eluídas em CH_2Cl_2 /Acetona (3:2), originaram a mistura dos compostos (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**) e **20**.

4.3.2.4- Fração OAF-A 8

A fração OAF-A 8 (2,98 g) forneceu a mistura de (+)-dicentrina (**1**) e (+)-ocoteína (**2**) e ainda o composto ficaprenol-12 (**20**) [Esquema 2].

Esquema 2- Fracionamento de OAF-A 1, OAF-A 3, OAF-A 6 e OAF-A 8 originadas da fase hexânica do extrato etanólico das folhas de *O. acutifolia*



4.3.3- FRACIONAMENTO DA FASE ACETATO DE ETILA PROVENIENTE DA PARTIÇÃO DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS DE *O. acutifolia*

O material presente na fase acetato de etila (54,0 g) foi submetido inicialmente a uma cromatografia em coluna de sílica gel de fase reversa RP-18 (Coluna A), utilizando-se para tal 500 g de sílica. O sistema foi eluído com H₂O/MeOH (8:2); H₂O/MeOH (6:4), H₂O/MeOH (4:6), H₂O/MeOH (2:8), MeOH, AcOEt, CHCl₃ e MeOH. Foram coletadas 8 frações (OAF-Ac) de aproximadamente 500 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida (Tabela 4).

Tabela 4- Fracionamento da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *O. acutifolia* (Coluna A)

Eluente	Fração	Massa (g)
H ₂ O/MeOH (8:2)	OAF-Ac 1	-
H ₂ O/MeOH (6:4)	OAF-Ac 2	-
H ₂ O/MeOH (4:6)	OAF-Ac 3	1,0
H ₂ O/MeOH (2:8)	OAF-Ac 4	10,0
MeOH	OAF-Ac 5	17,0
AcOEt	OAF-Ac 6	8,0
CHCl ₃	OAF-Ac 7	0,9
MeOH	OAF-Ac 8	1,1

A seguir foram selecionadas para estudo, após análise por CCDA visando ao isolamento e caracterização dos metabólitos secundários as frações OAF-Ac 4, OAF-Ac 5, OAF-Ac 6 e OAF-Ac 8

4.3.4- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OAF-Ac 4, OAF-Ac 5, OAF-Ac 6 e OAF-Ac 8

4.3.4.1- Estudo da fração OAF-Ac 4

A fração OAF-Ac 4 (10,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 63-200 μm (120 g) eluída em Hex, Hex/ CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 16 frações de aproximadamente 300 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida, sendo reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 13 frações (OAF-Ac B.1 a 13) [Esquema 3a].

Da fração OAF-Ac B.3 (1,8 g), eluída em CH_2Cl_2 , obteve-se a mistura dos compostos (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**), (+)-leucoxina (**9**) e (+)-ocoxilonina (**10**).

4.3.4.1.1- Separação dos componentes da fração OAF-Ac B.5

A fração OAF-Ac B.5 (430,0 mg), eluída em AcOEt/MeOH 5%, foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/37 cm) eluída em MeOH. Foram coletadas 32 frações, sendo a primeira de 35 mL e as demais de 10 mL e após análise por CCDA de cada fração foram reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 7 frações (OAF-Ac C.1 a 7) [Esquema 3a], tendo sido obtido como componente majoritário da fração OAF-Ac C.3 (12,0 mg) o composto (kaempferol-3-O- α -L-ramnospiranosídeo (**19**)).

4.3.4.1.2- Separação dos componentes da fração OAF-Ac B.12

A fração OAF-Ac B.12 (MeOH, 180 mg) foi submetida também à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/37 cm) no eluente MeOH. Foram coletadas 30 frações, sendo a primeira de 35 mL e as demais de 10 mL. As frações obtidas

foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, resultando 9 frações (OAF-Ac D.1 a 9) [Esquema 3a].

O composto (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**) foi obtido da fração OAF-Ac D.2 (14,5 mg), enquanto que OAF-Ac D.3 (14,0 mg) forneceu a mistura de (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) e **8**.

4.3.4.1.3- Separação dos componentes da fração OAF-Ac B.13

A fração OAF-Ac B.13 (MeOH, 17,0 mg), foi analisada por CLAE em sílica de fase reversa, após análise dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C , que revelou a presença dos compostos **5** e **6**. Foram estabelecidas as condições de separação em coluna analítica (Figura 6) e as substâncias purificadas através de coluna semipreparativa (Esquema 3a). Desse processo obteve-se os compostos (+)-6*R*-*N*-óxido dicentrina (**6**) [1,0 mg] e (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina (**5**) [3,1 mg].

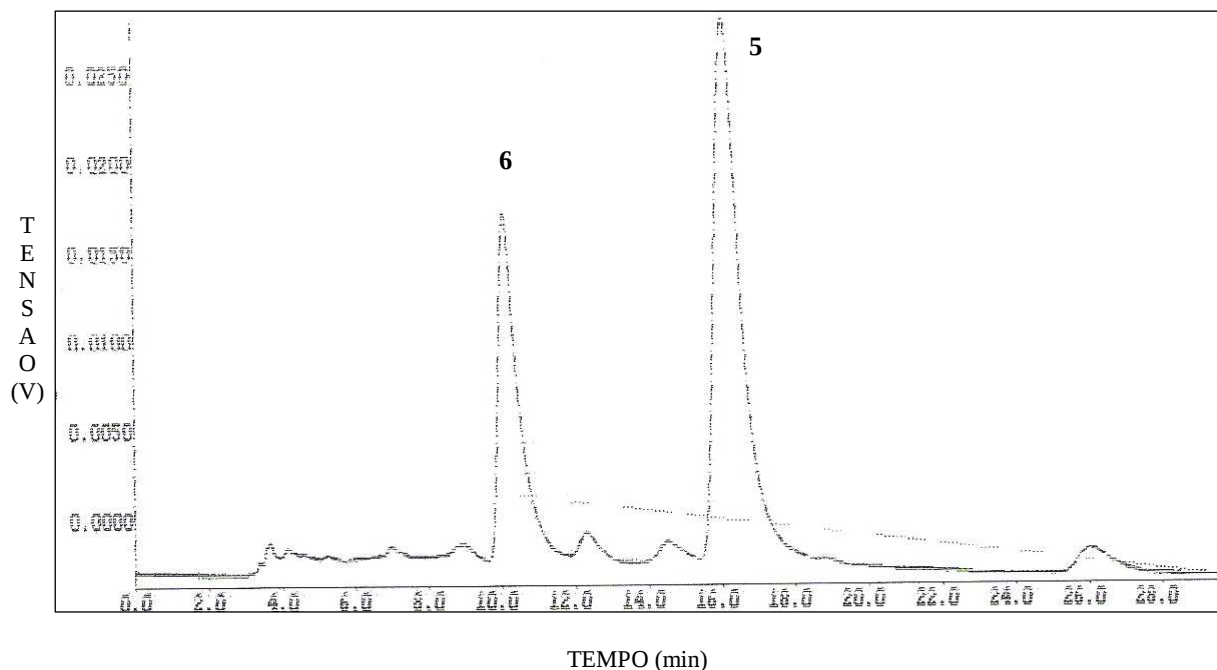
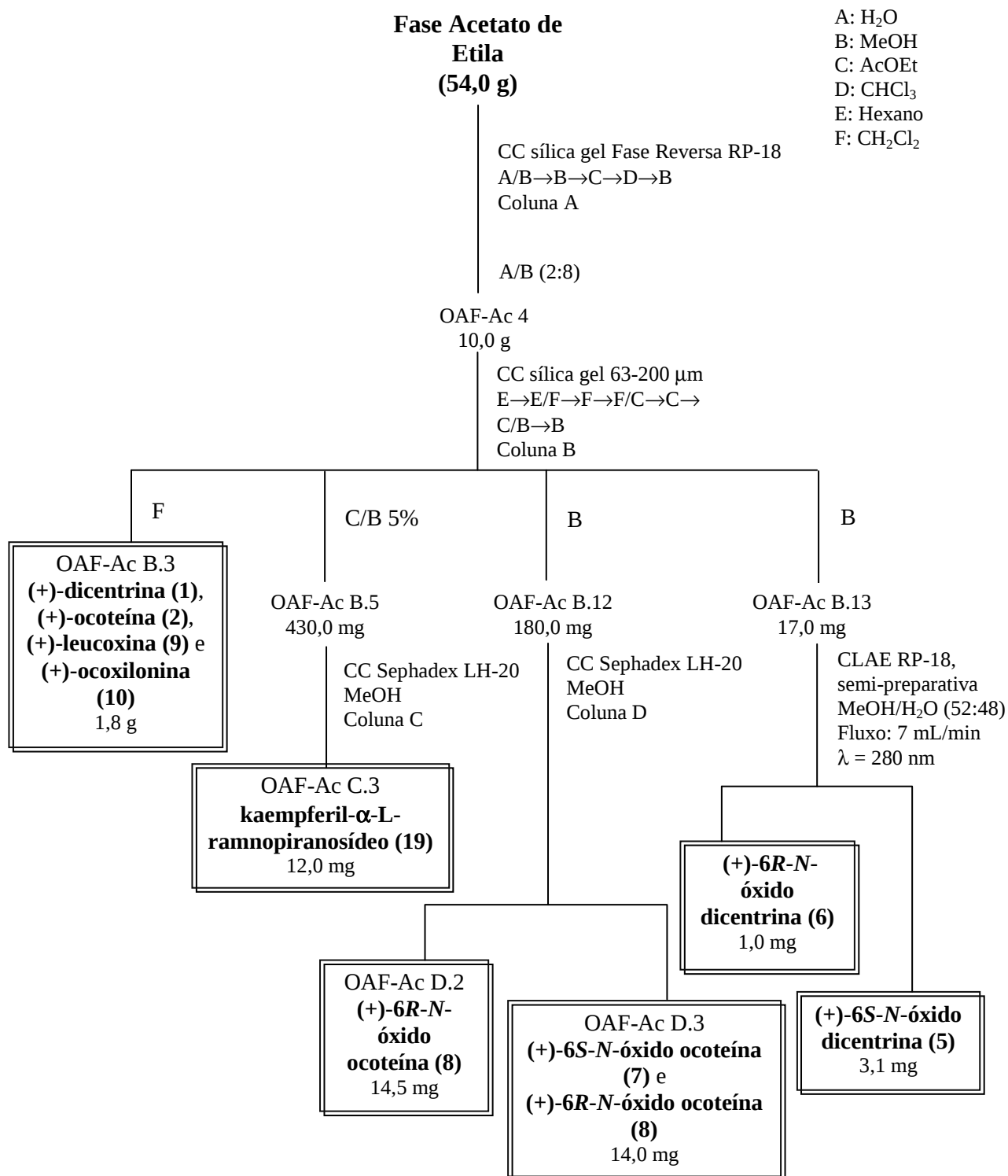


Figura 6- Cromatograma analítico da fração OAF-Ac B.13. Coluna Phenomenex-Luna C-18, 5 μm , 4,6 $\varnothing$ x 250 mm; eluente MeOH/H₂O (52:48); fluxo de 0,7 mL/min; detector UV, 280 nm

Esquema 3a- Fracionamento de OAF-Ac 4, OAF-Ac 5, OAF-Ac 6 e OAF-Ac 8 originadas da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *O. acutifolia*



4.3.4.2- Estudo da fração OAF-Ac 5

A fração OAF-Ac 5 (17,0 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 63-200 μm (120 g) eluída em Hex, Hex/ CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 16 frações de aproximadamente 300 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida, sendo reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 14 frações (OAF-Ac E.1 a 14) [Esquema 3b].

A fração OAF-Ac E.3 (3,0 g), eluída em CH_2Cl_2 , originou o composto (+)-ocoteína (2) com pequena proporção de impurezas.

4.3.4.2.1- Separação dos componentes da fração OAF-Ac E.4

A fração OAF-Ac E.4 (405,0 mg), obtida em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$ 1:1, foi inicialmente dividida em 2 porções, sendo cada uma delas submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm) eluída em MeOH. Foram aplicados cerca de 200 mg de cada vez e coletadas, em média 48 frações, sendo a primeira de 35 mL e as demais de 10 mL. As frações obtidas foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, resultando 12 frações (OAF-Ac F.1 a 12) [Esquema 3b].

Os compostos (+)-dicentrina (1) e (+)-ocoteína (2) foram isolados em mistura (9,2 mg) das frações OAF-Ac F.7 e OAF-Ac F.8, enquanto que a fração OAF-Ac F.9 forneceu os compostos 1, 2, (+)-leucoxina (9) e (+)-ocoxilonina (10) também em mistura (59,0 mg).

4.3.4.2.2- Separação dos componentes da fração OAF-Ac E.11

A fração OAF-Ac E.11 (MeOH, 110,0 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (2/30 cm) no eluente MeOH. Foram coletadas 36 frações, sendo a primeira de 35 mL e as demais de 10 mL. As frações obtidas foram analisadas por

CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 8 frações (OAF-Ac G.1 a 8) [Esquema 3b].

A fração OAF-Ac G.5 forneceu o composto (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**) [4,0 mg], a fração OAF-Ac G.6 (10,0 mg) mistura dos compostos (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) e **8** e a fração OAF-Ac G.8 revelou que era constituída apenas pelo composto **7** (13,4 mg).

4.3.4.2.3- Separação dos componentes da fração OAF-Ac E.12

OAF-Ac E.12 (MeOH, 210,0 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (2/30 cm) eluída em MeOH. Foram coletadas 42 frações, sendo a primeira de 35 mL e as demais de 10 mL. Após análise por CCDA de cada fração obtida, foram reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 8 frações (OAF-Ac H.1 a 8) [Esquema 3b].

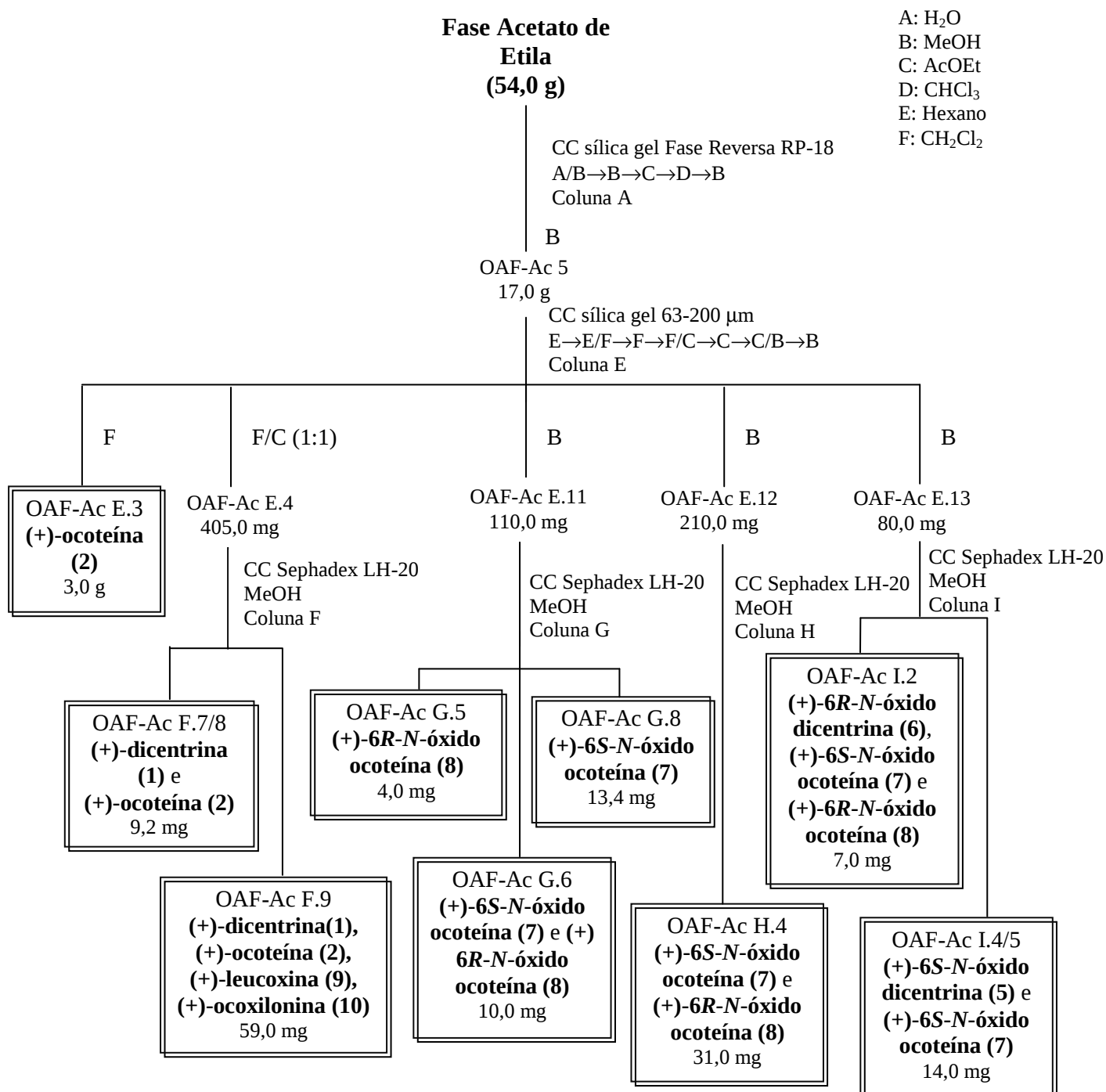
Da fração OAF-Ac H.4 (31,0 mg) foram obtidos em mistura os compostos (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) e (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**).

4.3.4.2.4- Separação dos componentes da fração OAF-Ac E.13

A fração OAF-Ac E.13 (MeOH, 80,0 mg) foi submetida também à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (2/30 cm) eluída em MeOH. Foram coletadas 46 frações, sendo a primeira de 35 mL e as demais de 5 mL. Desse processo resultaram 10 frações (OAF-Ac I.1 a 10), após análise de seus respectivos perfis cromatográficos em CCDA (Esquema 3b).

Da fração OAF-Ac I.2 (7,0 mg) obteve-se a mistura dos compostos (+)-6*R*-*N*-óxido dicentrina (**6**), (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) e (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**) e das frações OAF-Ac I.4/I.5 foram isolados em mistura os compostos (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina (**5**) e **7** (14,0 mg), sendo **5** o composto majoritário.

Esquema 3b- Sequência de fracionamento de OAF-Ac 4, OAF-Ac 5, OAF-Ac 6 e OAF-Ac 8 originadas da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *O. acutifolia*



4.3.4.3- Estudo da fração OAF-Ac 6

A fração OAF-Ac 6 (8,0 g) foi inicialmente submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 63-200 μm (80 g) eluída em Hex, Hex/ CH_2Cl_2 , CH_2Cl_2 , $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{AcOEt}$, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 19 frações de aproximadamente 100 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida, sendo reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 14 frações (OAF-Ac J.1 a 14) [Esquema 3c].

4.3.4.3.1- Separação dos componentes da fração OAF-Ac J.5

A fração OAF-Ac J.5 (128,0 mg), obtida em CH_2Cl_2 , foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 40-63 μm (40 g), eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 48 frações, sendo a primeira de 50 ml, a segunda e a terceira de 25 ml e as demais de 10 ml. Desse processo resultaram 8 frações (OAF-Ac K.1 a 8) [Esquema 3c], após análise de seus respectivos perfis cromatográficos em CCDA.

Da fração OAF-Ac K.7 (5,3 mg), eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 5%, foram obtidos os compostos (+)-dicentrina (**1**) e (+)-ocoteína (**2**).

4.3.4.3.2- Separação dos componentes da fração OAF-Ac J.14

OAF-Ac J.14 (110 mg), eluída em AcOEt/MeOH 1:1, também foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 40-63 μm (30 g), eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 124 frações, sendo a primeira de 50 ml, a segunda e a terceira de 25 ml e as demais de 10 ml. As frações foram analisadas por CCDA e reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 32 frações (OAF-Ac L.1 a 32) [Esquema 3c].

Os compostos talicminina (**17**) [2,9 mg] e (+)-ocoteína (**2**) [3,9 mg] foram obtidos, respectivamente, das frações OAF-Ac L.19, eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 2% e OAF-Ac L.22 eluída em $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ 3%.

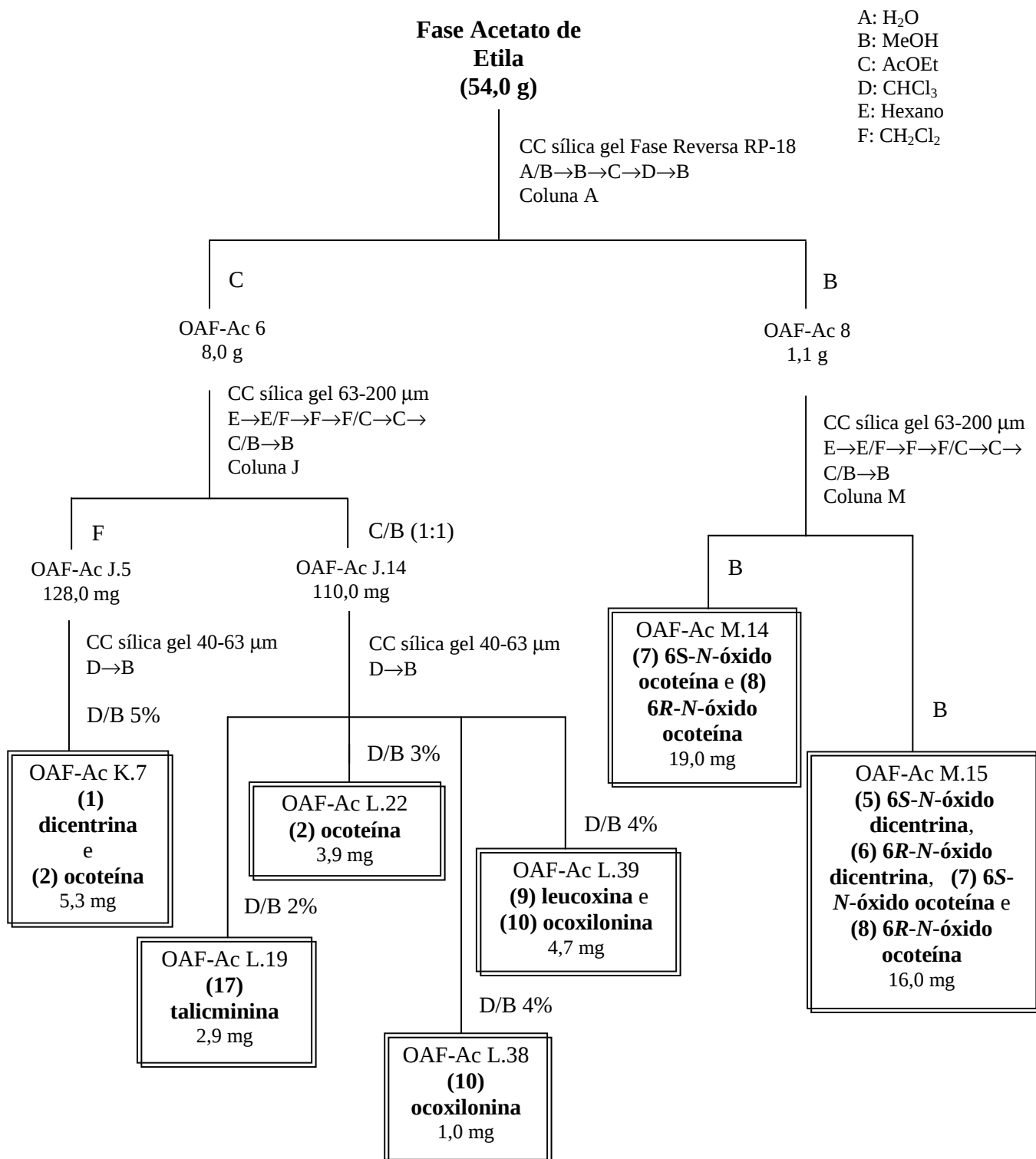
As frações OAF-Ac L.38 e OAF-Ac L.39 obtidas em CHCl₃/MeOH 4%, originaram o composto (+)-ocoxilonina (**10**) [1,0 mg] e a mistura (4,7 mg) dos compostos (+)-leucoxina (**9**) e **10**, respectivamente.

4.3.4.4- Estudo da fração OAF-Ac 8

A fração OAF-Ac 8 (1,1 g) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 63-200 µm (80 g), eluída em Hexano, Hex/CH₂Cl₂, CH₂Cl₂, CH₂Cl₂/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 36 frações de aproximadamente 300 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida, sendo reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 19 frações (OAF-Ac M.1 a 19) [Esquema 3c].

Da fração OAF-Ac M.14 (19,0 mg), eluída em MeOH, foram obtidos em mistura (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) e (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**) e da fração OAF-Ac M.15 (16,0 mg), também eluída em MeOH, foram obtidos os compostos **7**, **8**, (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina (**5**) e (+)-6*R*-*N*-óxido dicentrina (**6**).

Esquema 3c- Sequência de fracionamento de OAF-Ac 4, OAF-Ac 5, OAF-Ac 6 e OAF-Ac 8 originadas da fase acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *O. acutifolia*



4.4- OBTENÇÃO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DAS CASCAS DO CAULE DE *O. acutifolia*

As cascas do caule (1570 g) de *O. acutifolia* foram submetidas à secagem ao ar, moídas e posteriormente extraídas exaustivamente com etanol, a frio. O extrato resultante foi filtrado e concentrado sob pressão reduzida até consistência xaroposa. Ao extrato etanólico obtido foram adicionados 300 ml de ácido acético 10% e 50 ml de acetato de etila. Este sistema foi mantido sob agitação intensa por aproximadamente 2 horas e então transferido para um funil de separação com auxílio de 500 ml de acetato de etila e 100 ml de água. O funil foi agitado várias vezes por cerca de 1 hora e deixado em repouso até completa separação das fases.

A fase acetato de etila foi retirada e a aquosa alcalinizada a pH 8 com NH_4OH concentrado, sendo em seguida submetida à extração com acetato de etila (300 ml, 3 vezes). A fase acetato de etila assim obtida foi lavada com água e o solvente evaporado sob pressão reduzida, resultando 3,45 g da fase acetato de etila contendo alcaloides.

4.4.1- FRACIONAMENTO DO EXTRATO ALCALOÍDICO DAS CASCAS DO CAULE DE *O. acutifolia*

O material presente no extrato alcaloídico (3,45 g) foi submetido a cromatografia em coluna de sílica gel de fase reversa RP-18 (80 g) [Coluna A], eluída em $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (8:2), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (6:4), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (4:6), $\text{H}_2\text{O}/\text{MeOH}$ (2:8), MeOH, AcOEt e CHCl_3 . Foram coletadas 7 frações (OAC-A) de aproximadamente 300 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida (Tabela 5).

Tabela 5- Fracionamento do extrato alcaloídico das cascas do caule de *O. acutifolia* (Coluna A)

Eluente	Fração	Massa (mg)
H ₂ O/MeOH (8:2)	OAC-A 1	310,0
H ₂ O/MeOH (6:4)	OAC-A 2	138,9
H ₂ O/MeOH (4:6)	OAC-A 3	26,7
H ₂ O/MeOH (2:8)	OAC-A 4	627,8
MeOH	OAC-A 5	967,3
AcOEt	OAC-A 6	42,0
CHCl ₃	OAC-A 7	229,0

Foram selecionadas para estudo, após análise por CCDA visando ao isolamento e caracterização dos metabólitos secundários as frações OAC-A 5, OAC-A 6 e OAC-A 7.

4.4.2- FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE OAC-A 5, OAC-A 6 e OAC-A 7

4.4.2.1- Estudo da fração OAC-A 5

A fração OAC-A 5 (967,3 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de sílica gel 63-200 µm (50,7 g) eluída em Hex, Hex/AcOEt, AcOEt, AcOEt/MeOH e MeOH em gradiente de polaridade crescente. Foram coletadas 47 frações de aproximadamente 50 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida, sendo reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 9 frações (OAC-A-B.1 a 9) [Esquema 4].

Das frações OAC-A-B.3 (33,1 mg) e OAC-A-B.5 (40,2 mg) ambas eluídas em Hex/AcOEt 50%, foram obtidos como componentes majoritários, os compostos (+)-ocoteína (2) e (+)-dicentrina (1), respectivamente.

A fração OAC-A-B.7 (46,0 mg) eluída em AcOEt revelou mistura de **1**, **2** e (+)-*O*-metilcassifilina (**4**).

4.4.2.2- Estudo da fração OAC-A 6

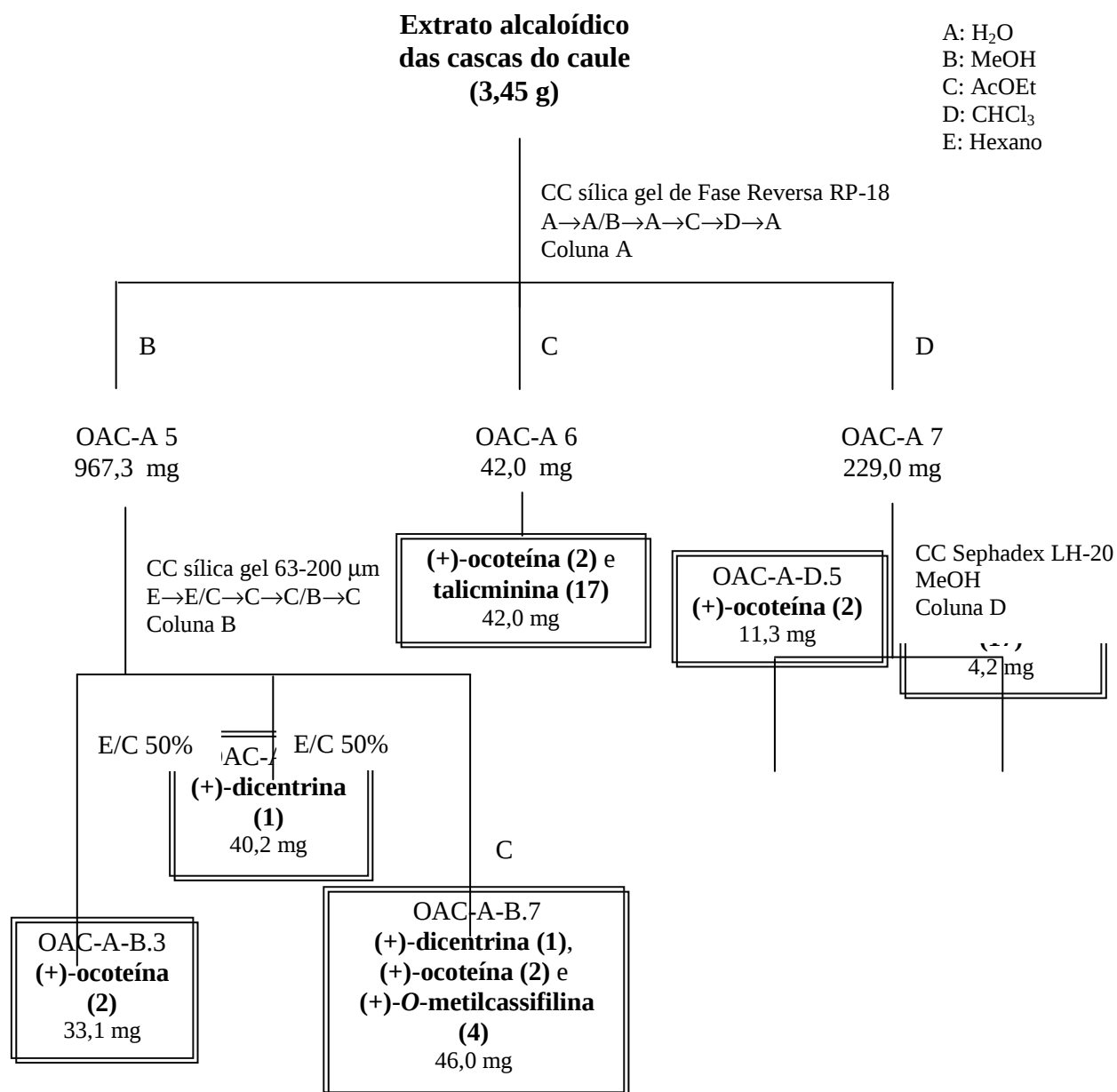
A análise por CCDA da fração OAC-A 6 (42,0 mg) revelou a presença de (+)-ocoteína (**2**) e talicminina (**17**) como constituinte majoritário (Esquema 4).

4.4.2.3- Estudo da fração OAC-A 7

A fração OAC-A 7 (229,0 mg) foi submetida à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 (3/26 cm), eluída em MeOH. Foram coletadas 48 frações, sendo a primeira de 50 mL e as demais de 10 mL cada e feita análise por CCDA de cada fração obtida, foram reunidas aquelas que apresentaram perfil cromatográfico semelhante. Desse processo resultaram 8 frações (OAC-A-D.1 a 8) [Esquema 4].

A fração OAC-A-D.5 (11,3 mg) revelou que era composta principalmente por (+)-ocoteína (**2**), enquanto que a fração OAC-A-D.7 (4,2 mg) forneceu o composto talicminina (**17**) com pequena proporção de impurezas.

Esquema 4- Fracionamento de OAC-A 5, OAC-A 6 e OAC-A 7 originadas do extrato alcaloídico das cascas do caule de *O. acutifolia*



4.5- ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os extratos brutos, misturas e/ou substâncias puras obtidas de *O. acutifolia* foram submetidos aos seguintes bioensaios: toxicidade para *Artemia salina*, atividade citotóxica em linhagens de células cancerígenas, atividades genotóxica (teste SMART) e antifúngica.

4.5.1- Ensaios de atividades citotóxica

4.5.1.1- Teste de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS)

O ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* foi realizado no laboratório de pesquisa LP-1 do Departamento de Química da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, de acordo com a metodologia descrita na literatura (MEYER et al., 1982).

As amostras foram preparadas nas concentrações de 1000, 100 e 10 µg/mL, todas em triplicata. A cada amostra adicionou-se 5 mL de solução salina (3,8 g/L) contendo 10 microcrustáceos (*A. salina*). Após 24 horas registrou-se o número de sobreviventes. Os dados obtidos foram analisados no programa Probitos e são demonstrados por DL₅₀ (dose necessária para provocar a morte de 50% dos indivíduos submetidos à análise).

Foram testados os extratos alcaloídico das folhas e etanólicos das folhas e cascas do caule.

4.5.1.2- Ensaio de atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células cancerígenas

- Atividade citotóxica em linhagens de células cancerígenas, por avaliação fotolorimétrica pelo método SRB

Este ensaio foi realizado no Departamento de Farmácia-Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a responsabilidade da Dra. Maria de Fátima Cepa Matos.

Para a avaliação da atividade citotóxica das substâncias isoladas de *O. acutifolia* frente às linhagens de células Hep-2, MCF-7, B16-F10 e 786-0 foi utilizado o método da SRB (sulforodamina B) descrito por SKEHAN et al., 1990.

O princípio do método baseia-se na coloração das proteínas, pelo corante sulforodamina B (SRB). Este corante possui dois grupos sulfônicos, ligando-se às proteínas das células fixadas na placa, as quais são precipitadas pelo ácido tricloro acético (TCA).

As células Hep-2, MCF-7, B16-F10 e 786-0 foram semeadas em placas de 96 cavidades (100 000 células/mL) e mantidas em meio de cultura DMEM a 37 °C em incubadora com atmosfera úmida contendo CO₂ (5%). Após 20 horas o meio foi aspirado para a adição dos compostos-teste e do controle positivo - Cisplatina [cis-diclorodiamino-platinum (II)]. Foram utilizadas quatro concentrações de cada composto (entre 5 e 50 µg/mL), sendo que cada concentração foi adicionada em 3 cavidades.

Em 48 horas, o meio foi removido e substituído por 100 µL de TCA 20%. As placas foram incubadas por meia hora, a 4 °C em geladeira, e posteriormente, a solução TCA foi removida. Adicionou-se 50 µL de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) e o material foi novamente incubado por meia hora em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, foi adicionado Tris Base 10mM. Em seguida as placas foram submetidas a uma agitação de 10 minutos para a dissolução das proteínas coradas e a absorbância foi medida a 540 nm em leitor de microplacas.

Foram testadas as substâncias (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**), (+)-6S-N-óxido dicentrina (**5**), (+)-6S-N-óxido ocoteína (**7**), (+)-6R-N-óxido ocoteína (**8**), (+)-leucoxina (**9**), (+)-norocoxilonina (**11**), (+)-neolitisina (**12**), (+)-isodomesticina (**13**) e talicminina (**17**).

- Atividade citotóxica em linhagens de células cancerígenas, por avaliação fotocolorimétrica pelo método MTT

Este ensaio foi realizado no Laboratório de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará, sob a responsabilidade da Dra. Cláudia do Ó Pessoa.

A análise de citotoxicidade de substâncias isoladas de *O. acutifolia* também foi realizada frente às linhagens de células MDA-MB435, SF-295, HL-60 e HCT-8,

utilizando-se o método MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] de acordo com protocolos estabelecidos (MOSMANN, 1983). Este é um sal solúvel de tetrazólio, e somente células vivas são capazes de reduzi-lo a um produto colorido insolúvel, o formazan, que pode ser medido após sua dissolução com DMSO.

As células MDA-MB435, SF-295, HL-60 e HCT-8 foram plaqueadas em placas de 96 poços nas seguintes concentrações: ($0,1 \times 10^6$ cel/mL), ($0,1 \times 10^6$ cel/mL), ($0,3 \times 10^6$ cel/mL) e ($0,7 \times 10^6$ cel/mL). Os compostos foram diluídos seriadamente em meio RPMI para obtenção das concentrações finais (0,09-50 μ g/mL) e adicionadas em placa de 96 poços (100 μ L/poço). Após 72 h, as placas foram resfriadas e centrifugadas a 1500 rpm/15 minutos. O sobrenadante foi aspirado e foi adicionado 150 μ L de solução MTT 10% RPMI a 5% de CO₂ por 3 h. Em seguida as placas foram novamente centrifugadas a 3000 rpm/10 minutos, tendo o sobrenadante aspirado e seu precipitado ressuspensionado em 150 μ L de DMSO e agitado por 10 minutos, até completa dissolução dos cristais de formazan. O controle positivo utilizado foi a Doxorubicina. As placas foram lidas em espectrofotômetro a 595 nm.

Foram testadas as substâncias (+)-dicentrina (1) e (+)-ocoteína (2).

- Determinação da CI₅₀

Como parâmetro para a citotoxicidade, utilizou-se o valor da CI₅₀, que representa a atividade antineoplásica das substâncias testadas. A CI₅₀ consiste na concentração (microgramas/mL) que inibe 50% do crescimento celular e foi determinada a partir das diferenças de absorbância a 540 nm (método SRB) e 595 nm (método MTT), entre o controle negativo e as células tratadas com o composto-teste ou controle positivo.

No método SRB, CI₅₀ foi calculada utilizando-se o programa PROBITOS (FINNEY, 1971) e no MTT foi calculada com base no programa Prism versão 3.0 (GraphPad Software).

4.5.2- Ensaio de atividade genotóxica

O ensaio de atividade genotóxica foi realizado no laboratório de pesquisa LP-1 do Departamento de Química da UFMS, sob a responsabilidade da Dra. Zaira da Rosa Guterres.

O Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática em células somáticas de *Drosophila melanogaster* (“Somatic Mutation And Recombination Test – SMART”) foi executado de acordo com a metodologia descrita na literatura (GRAF et al., 1984) e baseia-se em mutações encontradas nos tricomas que revestem as asas de *D. Melanogaster*. Durante as sucessivas mitoses das células que originarão as asas, podem ocorrer alterações genéticas, levando ao aparecimento de manchas mutantes. Estas regiões são detectadas ao se analisar a diferente forma dos pêlos ou tricomas que expressam fenotipicamente os genes *mwh* ou *flr*³.

Na análise das lesões induzidas, pode-se contabilizar o número total de manchas ou o tipo de mancha encontrada, sendo que o primeiro aspecto fornece dados quantitativos, enquanto que o segundo elucida o tipo de lesão ocorrida. Dois tipos de manchas são possíveis, simples e gêmeas que permitem detectar agentes causadores de mutações pontuais, alterações cromossômicas, recombinações, deleções, rearranjos, aneuploidias, entre outros (GRAF et al., 1984).

O seqüenciamento do genoma da *D. melanogaster* revelou uma alta conservação evolutiva quando comparado ao genoma humano, não apenas em nível de seqüência de DNA, mas principalmente em relação às funções gênicas, demonstrando alta homologia genética (TINCKOO & RUSSEL, 2002).

Neste ensaio foi utilizado o Cruzamento padrão (ST) [fêmeas + *flr*³/+ TM3, *Bd*^s cruzadas com machos + *mwh*/+ *mwh*], portando os marcadores para a forma dos pêlos das asas. Os indivíduos foram previamente reproduzidos e as larvas no terceiro estágio de desenvolvimento foram transferidas para frascos de vidros contendo meio alternativo (purê instantâneo de batata Yoki®) e tratadas com diferentes concentrações dos extratos, misturas e/ou substâncias obtidas de *O. acutifolia*. Como controle positivo foi utilizado o cloridrato de doxorrubicina (DXR) nas concentrações 0,125 e 0,2 mg/mL e como controle negativo – solvente (água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol).

Os adultos emergentes [*mwh* + / + *flr*³ (MH) e *mwh* + / + TM3, *Bd*^s (BH)] foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram montadas entre lâminas e

lamínulas com solução de Faure e analisadas, quanto à ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400x. A análise dos indivíduos MH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto, pequenas aberrações cromossômicas e recombinações mitóticas e dos indivíduos BH permite detectar a ocorrência de mutações de ponto e pequenas aberrações cromossômicas.

Os dados obtidos foram analisados estatisticamente através do teste de KASTENBAUM & BOWMAN, 1970 e as frequências de cada tipo de mancha mutante por mosca foram comparadas com as frequências dos respectivos controles negativos.

Foram testados os extratos alcaloídico e etanólico das folhas, mistura de (+)-dicentrina (1) e (+)-ocoteína (2) e as substâncias puras (+)-dicentrina (1), (+)-ocoteína (2), (+)-6S-N-óxido ocoteína (7), (+)-leucoxina (9) e talicminina (17).

4.5.3- Ensaio de atividade antifúngica *in vitro*

Este ensaio foi realizado no Departamento de Farmácia-Bioquímica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, sob a responsabilidade da MSc. Ivana Maria Póvoa Violante e MSc. Ana Lúcia Batista.

Foram utilizadas cepas padronizadas da American Type Culture Collection (ATCC) de *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida glabrata* (ATCC 9030), *Candida krusei*, (ATCC 6258), *Candida parapslosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 760) e *Cryptococcus neoformans* (ATCC 32045), disponíveis no Núcleo do Hospital Universitário, Divisão de Farmácia-Bioquímica, Seção de Análises Clínicas - UFMS.

Para a detecção de atividade antifúngica dos extratos e compostos isolados de *O. acutifolia* utilizou-se a técnica da microdiluição, de acordo com metodologia descrita na literatura (CLSI, 2002; MITSCHER, 1972).

As soluções-estoque das amostras foram solubilizadas, no caso de extratos, em meio de cultura Sabouraud e no caso de substâncias puras, em meio RPMI-1640 líquido (com glutamina, sem bicarbonato de sódio e com indicador de vermelho de fenol). O meio RPMI-1640 foi tamponado a pH $7,0 \pm 0,1$, em temperatura de 25 °C, com uma solução tampão de MOPS [ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico], numa concentração final de 0,165 mol/L, pH 7,0. A padronização do inóculo foi realizada de acordo com o Método de

Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica (CLSI, 2002).

Os testes (diluições) foram realizados em triplicata, sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) estabelecida como a menor concentração capaz de inibir o crescimento fúngico. Como controle padrão utilizou-se o antimicrobiano anfotericina B.

Foram testados os extratos alcalóidico das folhas e etanólicos das folhas e cascas do caule e também as substâncias (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**), (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina (**5**), (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**), (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**), (+)-leucoxina (**9**), (+)-norocoxilonina (**11**), talicminina (**17**) e (+)-palidina (**18**).

4.6- ESPECIFICAÇÃO DOS MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

As folhas e cascas do caule de *O. acutifolia* foram moídas em moinho de facas tipo Wiley.

Foram utilizados para extração, partição por solventes e técnicas cromatográficas (com exceção CLAE) solventes de grau P. A. (Vetec, QM, Synth). No caso de CLAE foram empregados solventes de grau cromatográfico (Tedia).

Nas separações cromatográficas foram utilizados:

- gel de sílica do tipo 60, partículas de 63-200 μm e 40-63 μm (Merck ou Aldrich) e Sephadex LH-20, partículas de 25-100 μm (Sigma), para cromatografia em coluna.

- gel de sílica do tipo 60 G (5-40 μm , Merck ou Vetec) em camadas de 0,25 mm de espessura para cromatografia em camada delgada analítica.

Nas separações por CLAE foram utilizadas:

- bomba ternária Shimadzu LC 6AD, com detector UV/Visível variável Shimadzu SPD 6AV, para condições analíticas e semi-preparativas.

- coluna de fase reversa C-8 (base sílica derivatizada com octilsilano), com partículas de 100 Å de poro e diâmetro médio de 5 μm , dimensões de 4,6Ø x 250 mm (analítica) e 20Ø x 250 mm (semi-preparativa) [Phenomenex Luna].

- coluna de fase reversa C-18 (base sílica derivatizada com octadecilsilano), com partículas de 100 Å de poro e diâmetro médio de 5 μm , dimensões de 4,6Ø x 250 mm (analítica) e 14Ø x 250 mm (semi-preparativa) [Phenomenex Luna].

A revelação dos cromatogramas foi feita através de inspeção à luz UV (monitor UV de mão, modelo UVGL-25, UVP inc. com lâmpadas Blackray de 254 e 366 nm) em câmara escura e empregando-se solução a 2% de sulfato cérico em H_2SO_4 2N ou reagente de Dragendorff com ácido tartárico (WAGNER et al., 1984).

As medidas de rotação óptica foram feitas em polarímetro Perkin-Elmer 341EM, filtro de sódio (589 nm) e cela de 1 dm.

Os espectros de RMN ^1H e ^{13}C (uni- e bidimensionais) foram registrados em espectrômetro Bruker DPX-300 (300 e 75 MHz). Como referência interna foram utilizados os sinais relativos ao hidrogênio residual do solvente para RMN ^1H e do solvente e/ou tetrametilsilano (TMS) para RMN ^{13}C . Os solventes deuterados empregados foram CDCl_3 , CD_3OD e acetona- d_6 das marcas Merck e CIL (Cambridge Isotope Laboratories).

Os espectros na região do infravermelho foram obtidos em espectrofotômetro Bomem-Hartmann & Braum, modelo Michelson MB Series, FT-IR, utilizando-se pastilha de KBr, em janelas de NaCl.

Os espectros de massas de alta resolução (HRESIMS-MS) foram obtidos na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP-SP em aparelho Ultro TOF-Q, com ionização por eletrospray e condições ESI (+) e (-).

Os espectros de absorção na região do Ultravioleta foram obtidos em espectrofotômetro, modelo U-3000 da marca Hitachi, utilizando-se etanol como solvente.

4.7- DADOS ESPECTROSCÓPICOS E PROPRIEDADES FÍSICAS DOS CONSTITUINTES ISOLADOS OU EM MISTURA DE *O. acutifolia*

* (+)-dicentrina (**1**) $C_{20}H_{21}O_4N$

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 44,0$ ($CHCl_3$, c 0,0007)

Lit: $[\alpha]_D = + 57,0$ (EtOH, c 1,0) [LU et al., 1972]

RMN de 1H : Espectro 1, tabela 6

RMN de ^{13}C : Espectro 2, tabela 6

HSQC: Espectro 3, tabela 7

HMBC: Espectros 4-6, tabela 7

* (+)-ocoteína (**2**) $C_{21}H_{23}O_5N$

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 28,0$ ($CHCl_3$, c 0,00045)

Lit: $[\alpha]_D = + 36,2$ (EtOH, c 0.92) [BARALLE et al., 1972]

RMN de 1H : Espectro 7, tabela 8

RMN de ^{13}C : Espectro 8, tabela 8

DEPT 135°: Espectro 9

HSQC: Espectro 10, tabela 9

HMBC: Espectros 11-15, tabela 9

* (+)-nordicentrina (**3**) $C_{19}H_{19}O_4N$

Sólido amorfo amarelo (Mistura)

$[\alpha]_D = + 14,0$ ($CHCl_3$, c 0,0003)

Lit: $[\alpha]_D = + 31,0$ (MeOH, c 0,65) [CHEN et al., 1977]

RMN de 1H : Espectros 16 e 17, tabela 10

RMN de ^{13}C : Espectros 18-22, tabela 10

DEPT 135°: Espectro 23

HSQC: Espectros 24-26, tabela 11

HMBC: Espectros 27-30, tabela 11

* (+)-*O*-metilcassifilina (**4**) C₂₀H₂₁O₅N

Sólido amorfo amarelo (Mistura)

$[\alpha]_D = + 14,0$ (CHCl₃, *c* 0,0003)

Lit: $[\alpha]_D = + 16,4$ (CHCl₃, *c* 1,0) [TOMITA et al., 1965]

RMN de ¹H: Espectros 16 e 17, tabela 12

RMN de ¹³C: Espectros 18-22, tabela 12

DEPT 135°: Espectro 23

HSQC: Espectros 24-26, tabela 13

HMBC: Espectros 27-30, tabela 13

* (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina (**5**) C₂₀H₂₁O₅N

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 32,5$ (MeOH, *c* 0,0008)

RMN de ¹H: Espectro 31, tabela 14

RMN de ¹³C: Espectro 32, tabela 15

DEPT 135°: Espectro 33

HSQC: Espectro 34, tabela 16

HMBC: Espectros 35 e 36, tabela 16

NOESY: Espectros 37 e 38

UV (EtOH) $\lambda_{\max}$ (log ϵ): 226 (4,84), 269 (4,70), 308 (4,50) nm

IV ($\nu_{\max}$ cm⁻¹): 3417, 2921, 1643, 1517, 1455, 1430, 1110, 1060

HRESIMS *m/z*: 356,1492 [M+H]⁺ (calculado para C₂₀H₂₂O₅N *m/z*: 356,1498)

* (+)-6*R*-*N*-óxido dicentrina (**6**) C₂₀H₂₁O₅N

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 16,9$ (MeOH, *c* 0,00045)

RMN de ¹H: Espectro 40, tabela 17

RMN de ¹³C: Espectros 41-43, tabela 17

HSQC: Espectros 44 e 45, tabela 18

HMBC: Espectros 46-48, tabela 18

NOESY: Espectros 49 e 50

* (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) C₂₁H₂₃O₆N

Sólido amorfo amarelo

[α]_D = + 35,0 (MeOH, *c* 0,001)

RMN de ¹H: Espectro 51, tabela 19

RMN de ¹³C: Espectro 52, tabela 19

DEPT 135°: Espectro 53

HSQC: Espectro 54, tabela 20

HMBC: Espectros 55-57, tabela 20

NOESY: Espectro 58

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 226 (4,30), 273 (4,18), 316 (3,82) nm

IV (ν_{max} cm⁻¹): 3404, 2941, 1626, 1510, 1458, 1434, 1339, 1203, 1120

HRESI-MS *m/z*: 420,1249 [M+Cl]⁻ (calculado para C₂₁H₂₃O₆NCl *m/z*: 420,1215)

* (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**) C₂₁H₂₃O₆N

Sólido amorfo amarelo

[α]_D = + 13,0 (MeOH, *c* 0,00023)

RMN de ¹H: Espectro 60, tabela 21

RMN de ¹³C: Espectro 61, tabela 21

HSQC: Espectro 62, tabela 22

HMBC: Espectros 63-65, tabela 22

NOESY: Espectros 66 e 67

IV (ν_{max} cm⁻¹): 3411, 2933, 1635, 1517, 1458, 1407, 1340, 1251, 1118.

* (+)-leucoxina (**9**) C₂₁H₂₃O₅N

Sólido amorfo amarelo

[α]_D = + 38,5 (MeOH, *c* 0,0004)

Lit: [α]_D = + 83° (EtOH, *c* 0,5) [VECCHIETTI et al., 1977]

RMN de ¹H: Espectro 68, tabela 23

RMN de ¹³C: Espectro 69, tabela 23

DEPT 135°: Espectro 70

HSQC: Espectro 71, tabela 24

HMBC: Espectros 72-74, tabela 24

* (+)-ocoxilonina (**10**) $C_{21}H_{23}O_6N$

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 22,0$ (MeOH, c 0,0005)

Lit: $[\alpha]_D = + 45,0$ (CHCl₃) [AHMAD & CAVA, 1977]

RMN de 1H : Espectros 75 e 76, tabela 25

RMN de ^{13}C : Espectro 77 e 78, tabela 25

DEPT 135°: Espectro 79

HSQC: Espectros 80 e 81, tabela 26

HMBC: Espectros 82-84, tabela 26

* (+)-norocoxilonina (**11**) $C_{20}H_{21}O_6N$

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 64,6$ (MeOH, c 0,0013)

RMN de 1H : Espectro 85, tabela 27

RMN de ^{13}C : Espectro 86, tabela 27

HSQC: Espectro 87, tabela 28

HMBC: Espectros 88-90, tabela 28

UV (EtOH) λ_{max} (log ϵ): 226 (4,12), 267 (3,95), 289 (3,80) nm

IV (ν_{max} cm⁻¹): 3410, 2924, 2854, 1636, 1458, 1362, 1090

HRESI-MS m/z : 372,1424 [M+H]⁺ (calculado para $C_{20}H_{22}O_6N$ m/z : 372,1446)

* (+)-neolitsina (**12**) $C_{19}H_{17}O_4N$

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 27,0$ (MeOH, c 0,0005)

Lit: $[\alpha]_D = + 56,5$ (CHCl₃, c 1,57) [HUI et al., 1965]

RMN de 1H : Espectro 92, tabela 29

RMN de ^{13}C : Espectro 93, tabela 29

HSQC: Espectros 94 e 95, tabela 30

HMBC: Espectros 96 e 97, tabela 30

* (+)-isodomesticina (**13**) $C_{19}H_{19}O_4N$

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 37,5$ (MeOH, c 0,00064)

RMN de ^1H : Espectro 98, tabela 31

RMN de ^{13}C : Espectro 99, tabela 31

HSQC: Espectros 100 e 101, tabela 32

HMBC: Espectros 102 e 105, tabela 32

* (+)-talicsimidina (**14**) $\text{C}_{22}\text{H}_{27}\text{O}_5\text{N}$

Sólido amorfo amarelo

$[\alpha]_D = + 66,0$ (MeOH, c 0,0006)

Lit: $[\alpha]_D = + 66,9$ (EtOH, c 1,42) [UMAROV et al., 1970]

RMN de ^1H : Espectro 106, tabela 33

RMN de ^{13}C : Espectros 107 e 108, tabela 33

HSQC: Espectros 109 e 110, tabela 34

HMBC: Espectros 111-114, tabela 34

* (+)-*N*-metillaurotetanina (**15**) $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}$

Sólido amorfo amarelo (Mistura)

$[\alpha]_D = + 44,2$ (MeOH, c 0,0005)

Lit: $[\alpha]_D = + 88,0$ (CHCl_3 , c 0,64) [JOHNS et al., 1967]

RMN de ^1H : Espectros 115 e 116, tabela 35

RMN de ^{13}C : Espectros 117-119, tabela 35

DEPT 135°: Espectro 120

HSQC: Espectros 121-123, tabela 36

HMBC: Espectros 124-128, tabela 36

NOESY: Espectros 129 e 130

* (+)-predicentrina (**16**) $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{O}_4\text{N}$

Sólido amorfo amarelo (Mistura)

$[\alpha]_D = + 44,2$ (MeOH, c 0,0005)

Lit: $[\alpha]_D = + 97,0$ (EtOH, c 0,2) [JOHNS et al., 1969]

RMN de ^1H : Espectros 115 e 116, tabela 37

RMN de ^{13}C : Espectros 117-119, tabela 37

DEPT 135°: Espectro 120

HSQC: Espectros 121-123, tabela 38

HMBC: Espectros 124-128, tabela 38

NOESY: Espectros 129 e 130

* talicminina (**17**) $C_{20}H_{15}O_6N$

Sólido amorfo amarelo

RMN de 1H : Espectro 131, tabela 39

RMN de ^{13}C : Espectro 132, tabela 39

1H - 1H COSY: Espectro 133

HSQC: Espectros 134 e 135, tabela 40

HMBC: Espectros 136-138, tabela 40

* (+)-palidina (**18**) $C_{19}H_{21}O_4N$

Sólido amorfo verde

$[\alpha]_D = + 35,8$ (MeOH, c 0,00053)

Lit: $[\alpha]_D = - 32,0$ [KAMETANI et al., 1969]

RMN de 1H : Espectro 139, tabela 41

RMN de ^{13}C : Espectro 140, tabela 41

DEPT 135°: Espectro 141

HSQC: Espectros 142-144, tabela 42

HMBC: Espectros 145-148, tabela 42

NOESY: Espectros 149

* kaempferol-3-O- α -L-ramnopyranosídeo (**19**)

Sólido amorfo amarelo

RMN de 1H : Espectro 150, tabela 43

RMN de ^{13}C : Espectros 151 e 152, tabela 43

HSQC: Espectro 153

HMBC: Espectros 154 e 155

* ficaprenol-12 (**20**)

Óleo levemente amarelo

RMN de 1H : Espectro 156, tabela 44

RMN de ^{13}C : Espectro 157, tabela 44

DEPT 135°: Espectro 158

* 3-(6'-*O*-acil-*O*- β -D-glucopiranosil)-sitosterol (**21**)

Sólido amorfo incolor

RMN de ^1H : Espectro 159, tabela 45

RMN de ^{13}C : Espectro 160, tabela 45

5- RESULTADOS E DISCUSSÃO

As substâncias isoladas neste trabalho foram obtidas do extrato alcaloídico das folhas e das cascas do caule e das fases hexânica e em acetato de etila, resultantes da partição do extrato etanólico das folhas de *O. acutifolia*, através da utilização de técnicas cromatográficas descritas na parte experimental (capítulo 4).

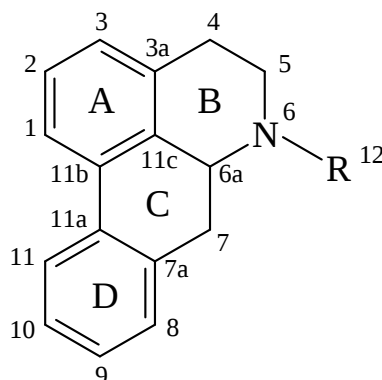
A determinação estrutural das substâncias foi efetuada com base em dados espectroscópicos de IV, UV, RMN ^1H e ^{13}C (DEPT 135°), incluindo técnicas bidimensionais homo e heteronucleares (COSY ^1H - ^1H , NOESY, HSQC e HMBC), dados de EM e valores de rotação óptica; no caso das substâncias conhecidas a identificação também foi realizada por comparação dos dados espectrais obtidos com os disponíveis na literatura.

A discussão relativa à determinação estrutural das substâncias obtidas será conduzida independente da ordem de obtenção das mesmas, a partir do fracionamento dos extratos das folhas e cascas do caule.

Neste capítulo também serão apresentados os resultados obtidos das avaliações das atividades citotóxica, genotóxica e antifúngica realizadas com os extratos, misturas e/ou substâncias puras.

5.1- Alcaloides aporfínicos

Através do estudo químico de *O. acutifolia* foram isolados dezessete alcaloides isoquinolínicos com esqueleto aporfínico. Desta forma, alguns aspectos gerais dessa classe serão apresentados, a fim de esclarecer dados relevantes para a elucidação estrutural destes compostos.



Esqueleto básico de alcaloides aporfínicos

Os alcaloides aporfínicos são invariavelmente substituídos no anel A, em C-1 e C-2 podendo ocorrer também substituição em C-3. No anel D, as substituições mais comuns ocorrem em C-9, C-10 e também em C-11, sendo que não é comum a substituição em C-8. Em geral, esses substituintes são oxigenados (presença de hidroxilas ou metoxilas), uma vez que esses compostos são biossintetizados a partir de alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos via acoplamentos oxidativos vide item 2.2 (SHAMA, 1972; CAVÉ et al., 1987).

Com relação às características espectroscópicas dos alcaloides aporfínicos, a análise espectral de RMN ^1H , principalmente nas regiões referentes a hidrogênios de anel aromático (δ 6,50 a 8,50) e metoxilas aromáticas (δ 3,50 a 4,00), pode fornecer informações que permitem definir o padrão de substituição do alcaloide.

Assim, o sinal de H-3 se apresenta, em geral, como um singlete entre δ 6,40 e 6,70 e o de H-11 entre δ 7,50 e 8,20, sendo que este último é influenciado pela presença de substituintes em C-10 e C-1. Os hidrogênios H-8, H-9 e H-10 normalmente ocorrem entre δ 6,70 e 7,40 e os alifáticos apresentam-se, comumente, como multipletos entre δ 2,00 e 4,00.

As metoxilas presentes nos anéis A e D ocorrem entre δ 3,80 e 4,00, com exceção das localizadas em C-11 (δ 3,60 e 3,80) e em C-1 (mais protegida, ocorrendo entre δ 3,40 e 3,70).

Os hidrogênios não equivalentes do grupo dioxidometileno, quando este encontra-se posicionado no anel A (C-1/C-2 e C-2/C-3) e no anel D (C-10/C-11), geralmente originam dois dubletos (diferença de deslocamento químico de aproximadamente δ 0,15 e constante de acoplamento de 1,5 Hz) em δ 5,90 e 6,10. No caso de estar localizado em C-9/C-10 (anel D), os sinais dos hidrogênios apresentam-se como um singlete ou dubletos com deslocamentos químicos muito próximos (diferença de deslocamento químico de aproximadamente 0,05 ppm) em torno de δ 5,95.

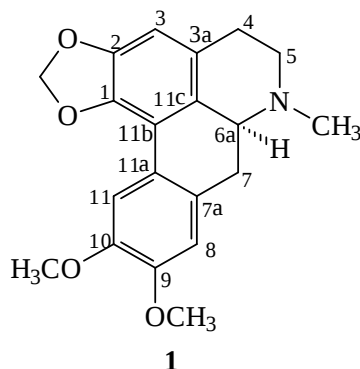
O grupo N-CH₃, quando presente, apresenta-se como um singlete entre δ 2,40 e 2,50, entretanto em alcaloides *N*-óxidos o deslocamento é em torno de δ 3,20 (GUINAUDEAU et al., 1988; GUINAUDEAU et al., 1983; GUINAUDEAU et al., 1979; GUINAUDEAU et al., 1975; SHAMA, 1972).

Nos espectros de RMN ¹³C destes compostos, o sinal referente a C-4 é observado entre δ 28,0 e 30,0, já os de C-5, C-6a e C-7 apresentam deslocamentos em torno de δ 43,0; 53,0 e 37,0, respectivamente. Porém, quando há a ocorrência de metila ligada ao nitrogênio, os carbonos C-5 e C-6a sofrem desproteção (efeito β), sendo os sinais observados em δ 53,0 (C-5) e 62,0 (C-6a), enquanto que C-7 sofre efeito γ de proteção originando um sinal em torno de δ 34,0.

Os carbonos dos anéis aromáticos A e D adjacentes aos carbonos com substituintes oxigenados apresentam valores de deslocamento químico entre δ 105,0 e 115,0, enquanto que os valores observados na região de δ 155,0 e 130,0 são referentes aos carbonos com substituintes oxigenados.

O sinal do carbono do grupo dioxidometileno (presente no anel A e/ou D) é observado em torno de δ 100,0 e do grupo CH₃-N entre δ 40,0-43,0, porém em *N*-óxidos é observado entre δ 48,0 e 58,0. Os sinais dos carbonos dos grupos metoxílicos podem ser observados entre δ 59,0 e 61,0 ou δ 55,0 e 56,0 (GUINAUDEAU et al., 1988; CASSELS et al., 1987; GUINAUDEAU et al., 1983; MARSAIOLI et al., 1979; GUINAUDEAU et al., 1979; GUINAUDEAU et al., 1975).

5.1.1- Identificação de (+)-dicentrina (1)



Das frações OAF-ALC (A 4, B 2, C 4/6, D 3) e OAC (A-B.7, B.5) provenientes dos fracionamentos cromatográficos dos extratos alcaloídicos das folhas e das cascas do caule e das frações OAF (C 4/8, A 8) e OAF-Ac (B 3, F.7/8, K.7, L.22), obtidas dos fracionamentos cromatográficos das fases hexânica e acetato de etila das folhas foi isolado o alcaloide **1** (itens 4.2.2; 4.3.2; 4.3.4 e 4.4.2).

O espectro de RMN ^1H (Espectro 1, tabela 6) apresentou três singletos na região de hidrogênios de anel aromático em δ 6,76 e 7,64, atribuíveis a H-8 e H-11, respectivamente e em δ 6,50 referente a H-3, além de dois singletos largos em δ 5,91 e 6,06 indicativos de hidrogênios de um grupo dioxidometileno presente no anel A.

Apresentou ainda, um singlete em δ 2,53, atribuído a uma metila ligada a nitrogênio e mais um singlete largo em δ 3,90, referentes a duas metoxilas ligadas a anel aromático. Estes dados sugeriram que **1** possuía um esqueleto do tipo aporfínico com a ausência de um grupo metoxila em C-3, uma vez que foi observado o singlete na região de δ 6,50 correspondente a H-3.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 2, tabela 6) evidenciou sinais para vinte carbonos. Com base nas correlações presentes no espectro HSQC (Espectro 3, tabela 7), foi feita a correspondência entre os hidrogênios e os seus respectivos carbonos e aquelas absorções foram então atribuídas a nove carbonos tetrassubstituídos, sendo quatro indicativa de carbonos de anel aromático oxigenados (δ 141,8; 146,6; 147,7 e 148,3), quatro carbonos metilênicos em δ 29,2; 34,2; 53,6 e 100,6, sendo esta última relativa ao grupo dioxidometileno (OCH_2O), quatro carbonos metínicos, sendo três de anel aromático

em δ 106,8, 110,6 e 111,3, uma metila ligada a nitrogênio em δ 43,9 e metoxilas, observadas em δ 55,9 e 56,2.

No experimento HMBC (Espectros 4-6, tabela 7), foi possível observar correlações do tipo 3J entre H-3 e C-4 (δ 29,2), H-8 e C-7 (δ 34,2) e H-11 e C-11b (δ 116,6), como também correlações dos hidrogênios das metoxilas sobrepostas em δ 3,90 (δ_C 55,9 e 56,1) com os respectivos carbonos em δ 147,7 (C-9) e 148,3 (C-10) evidenciando assim a presença de metoxilas em C-9 e C-10 e do grupo dioxidometileno em C-1/C-2.

Em alcaloides aporfínicos, a rotação óptica específica na raia D do sódio determina a configuração absoluta do centro estereogênico do C-6a, pois os compostos dextrógiros têm configuração (*S*) e os levógiros (*R*) [CAVÉ et al., 1987] o valor de $[\alpha]_D = +44,0$ (CHCl₃, *c* 0,0007) encontrado para **1** determinou, portanto, a configuração do C-6a como sendo *S*.

A comparação dos dados espectrais de RMN 1H e ^{13}C de **1** com os descritos na literatura (MA et al., 2000) para o alcaloide aporfínico (+)-dicentrina indicou a identidade entre as substâncias.

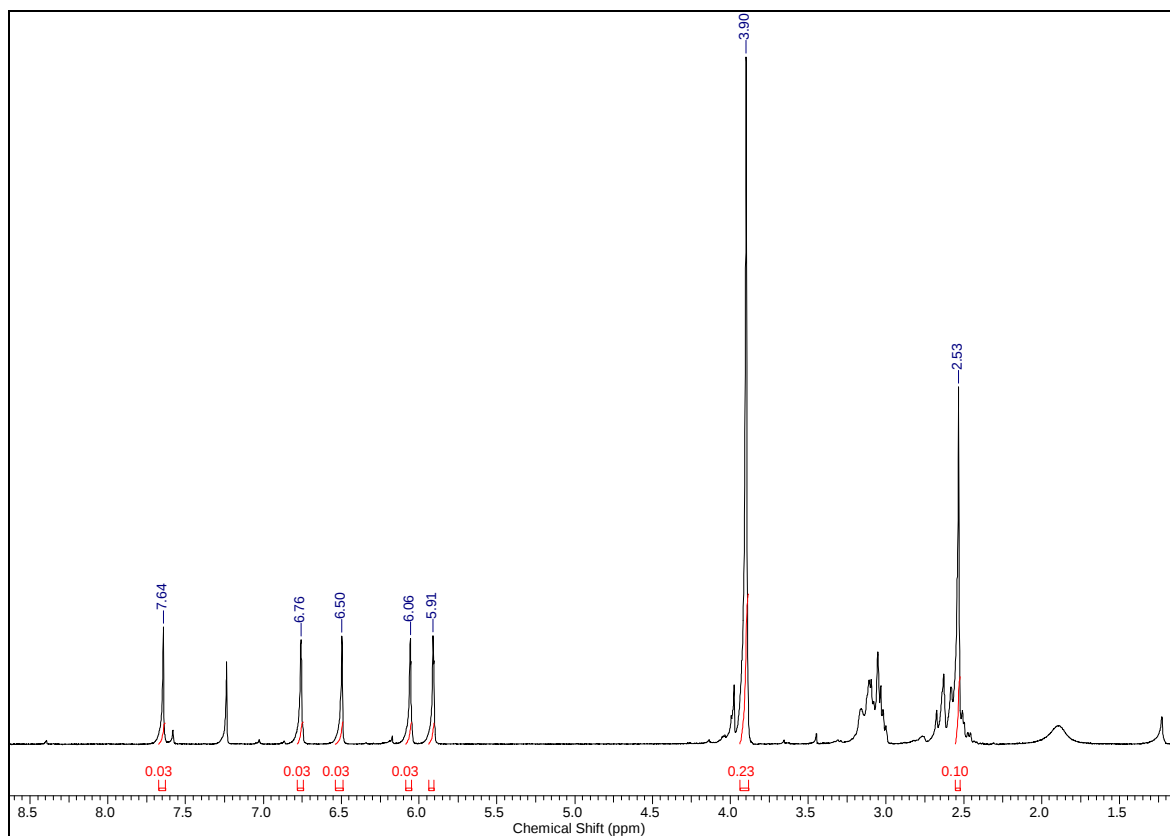
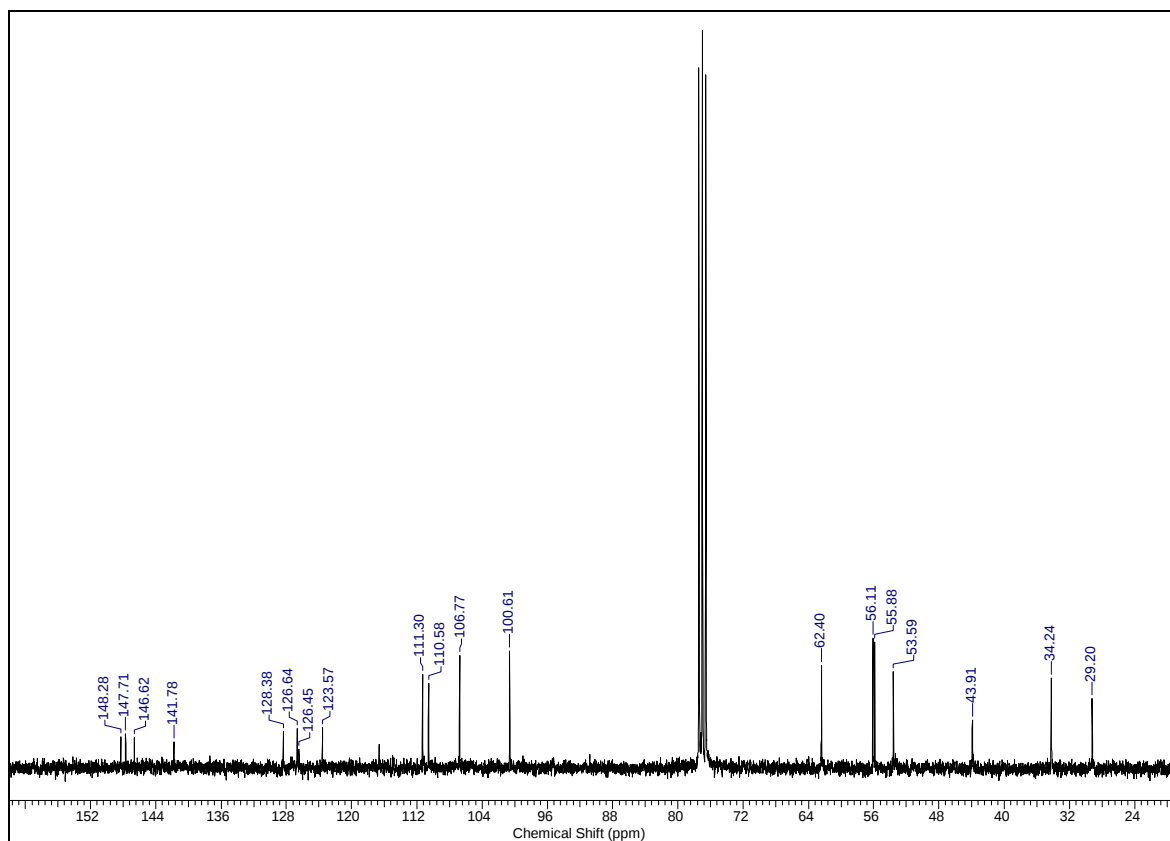
Esta substância foi isolada anteriormente de outras espécies do gênero *Ocotea* (ZANIN & LORDELLO, 2007; GARCEZ et al., 1995; VECCHIETTI et al., 1979; VECCHIETTI et al., 1977; CAVA et al., 1968; GOODWIN et al., 1960), havendo na literatura inúmeros relatos sobre atividades biológicas deste alcaloide, tais como citotóxica frente a diferentes linhagens de células humanas tumorais, antifúngica e anti-topoisomerase I e II (HOET et al., 2004; MORTEZA-SEMNANI, 2003; STÉVIGNY, 2002; WOO et al, 1999; HUANG et al., 1998; KONDO et al., 1990; LIOU et al., 1979).

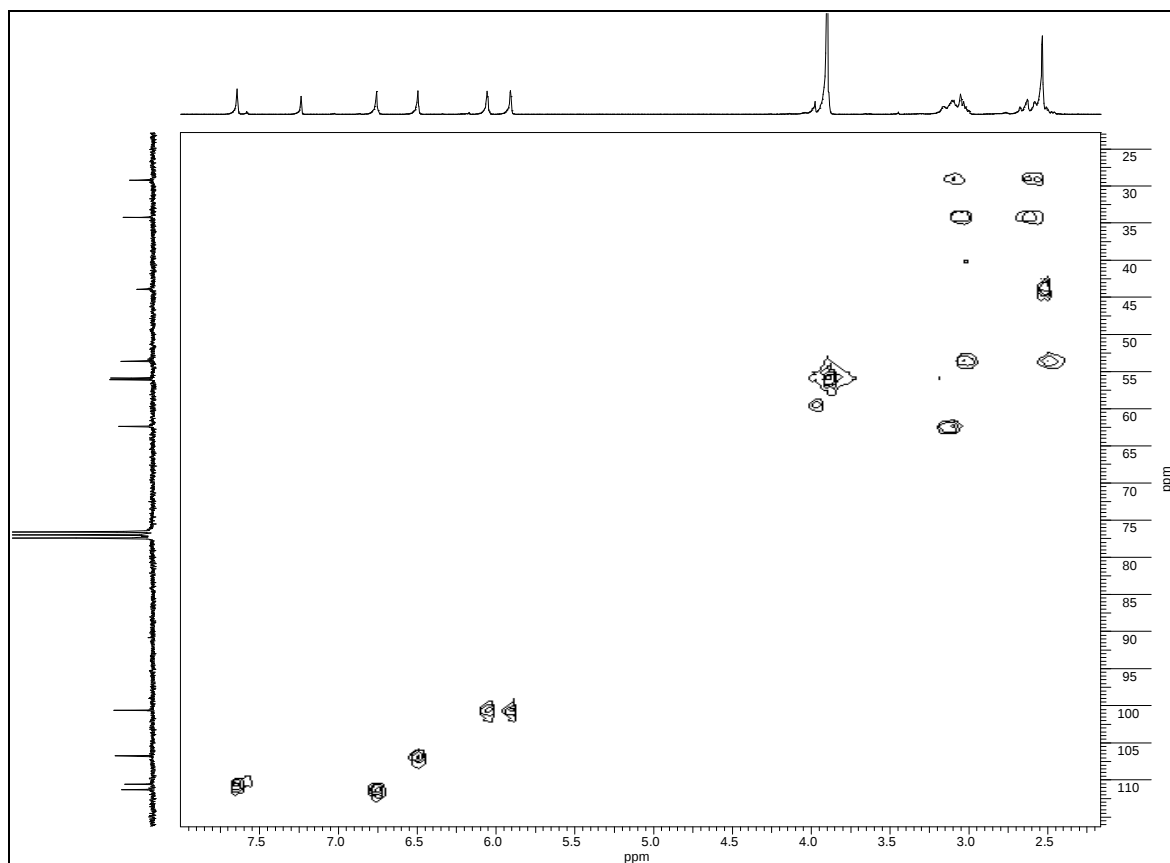
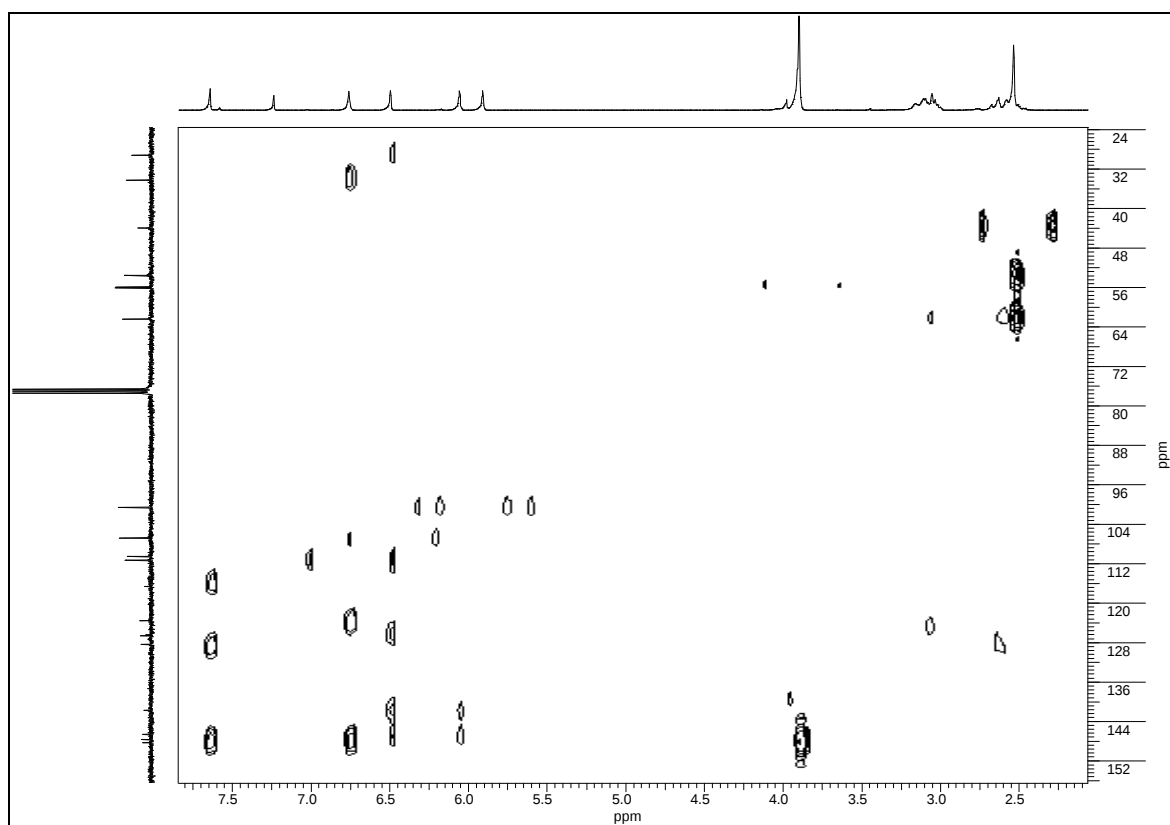
Tabela 6- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **1** e do alcaloide (+)-dicentrina citado na literatura (MA et al., 2000) [500/125 MHz, CDCl_3]

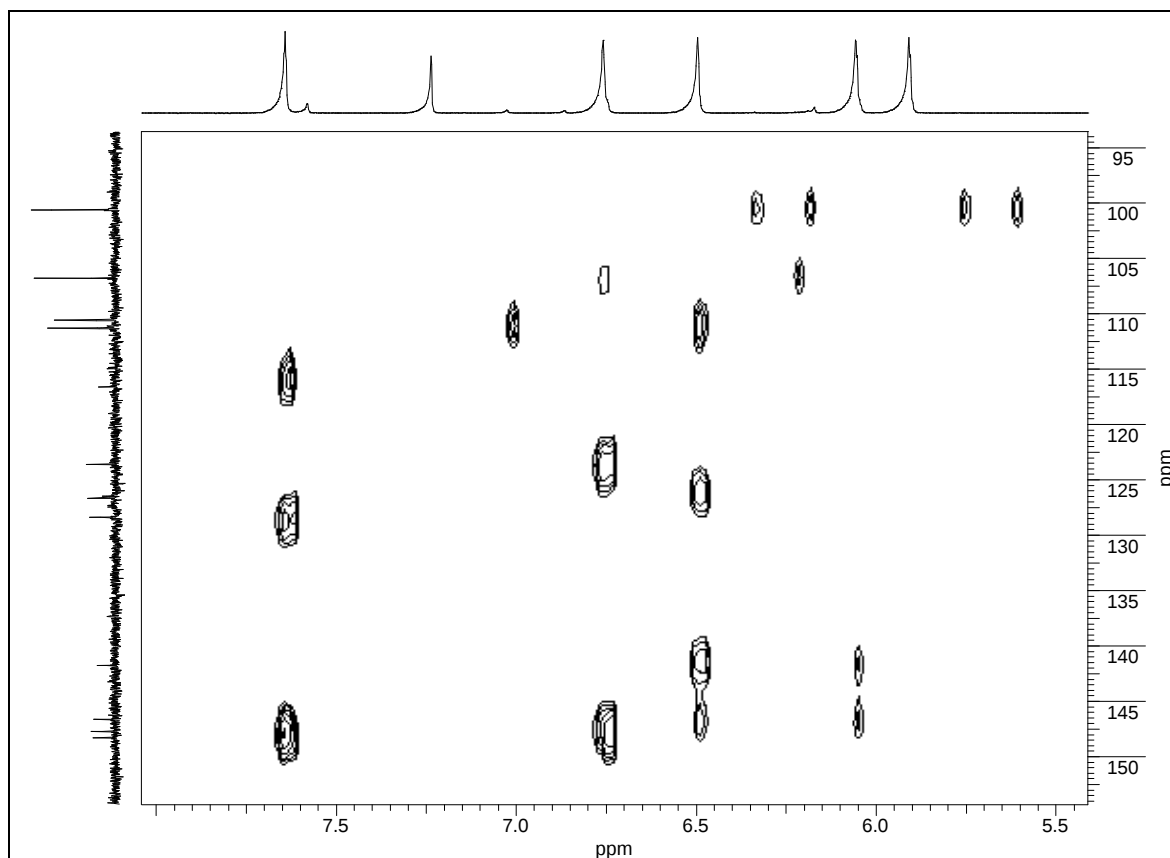
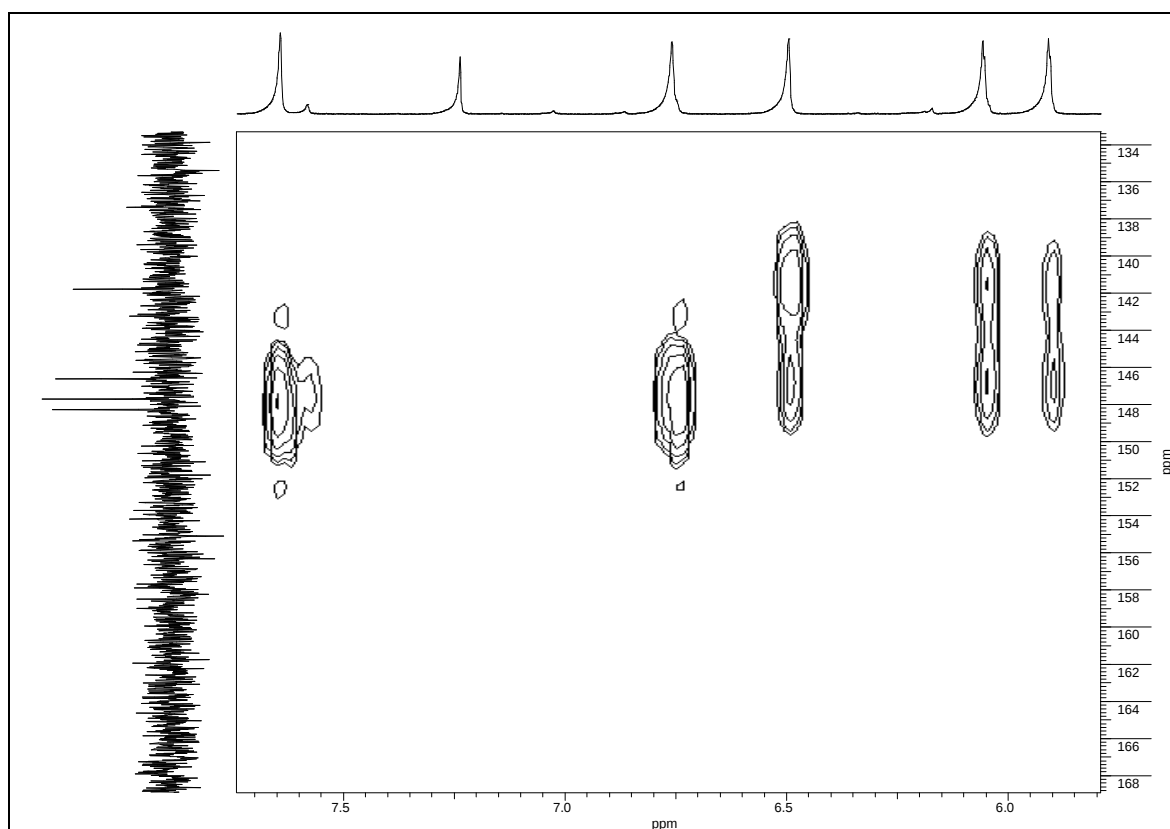
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(1)	(1) Literatura	
		$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	146,6	-	146,2	-
2	141,8	-	141,4	-
3	106,8	6,50 s	106,2	6,51 s
3a	126,6	-	126,6	-
4	29,2	3,11 m (Ha) 2,58 m (Hb)	28,9	3,16 m 2,64 dl (14,0)
5	53,6	3,03m (Ha) 2,50 m (Hb)	53,2	3,07 m 2,56 m
6a	62,4	3,16 m	62,1	3,23 dl (10,0)
7	34,2	3,05 m (Heq) 2,63 tl (15,0 Hax)	33,8	3,07 dd (15,0; 4,5) 2,67 dd (15,0; 10,0)
7a	128,4	-	128,2	-
8	111,3	6,76 s	111,2	6,79 s
9	147,7	-	147,5	-
10	148,3	-	148,2	-
11	110,6	7,64 s	110,4	7,63 s
11a	123,6	-	123,1	-
11b	116,6	-	116,2	-
11c	126,5	-	126,3	-
N-CH ₃	43,9	2,53 s	43,3	2,58 s
9-OCH ₃	55,9	3,90 s	55,4	3,93 s
10-OCH ₃	56,1	3,90 s	55,6	3,93 s
OCH ₂ O	100,6	5,91 sl; 6,06 sl	100,4	5,93 s; 6,05 s

Tabela 7- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **1** (300/75 MHz, CDCl₃)

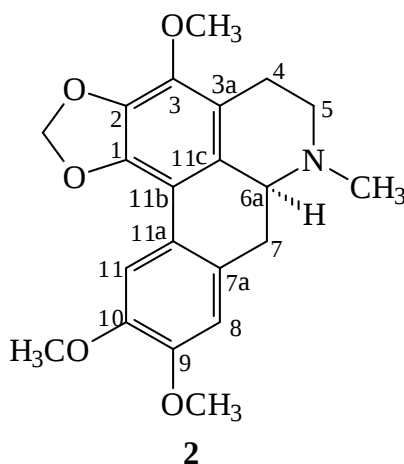
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (1)	HMBC (1)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	106,8	6,50 s	C-1, C-2, C-3a, C-4
4	29,2	3,11 m (Ha)	-
		2,58 m (Hb)	-
5	53,6	3,03m (Ha)	C-4
		2,50 m (Hb)	-
6a	62,4	3,16 m	-
7	34,2	3,05 m (Heq)	C-11a, C-11c
		2,63 tl (15,0 Hax)	C-7a
8	111,3	6,76 s	C-7, C-9, C-10, C-11a
11	110,6	7,64 s	C-7a, C-9, C-C-10, C-11b
N-CH ₃	43,9	2,53 s	C-5, C-6a
9-OCH ₃	55,9	3,90 s	C-9
10-OCH ₃	56,1	3,90 s	C-10
OCH ₂ O	100,6	5,91 sl; 6,06 sl	C-1, C-2

Espectro 1- RMN ^1H de **1** (300 MHz, CDCl_3)Espectro 2- RMN ^{13}C de **1** (75 MHz, CDCl_3)

Espectro 3- Espectro HSQC de **1** (300/75 MHz, CDCl₃)Espectro 4- Espectro HMBC de **1** (300/75 MHz, CDCl₃)

Espectro 5- Expansão de espectro HMBC de **1** (300/75 MHz, CDCl_3)Espectro 6- Expansão de espectro HMBC de **1** (300/75 MHz, CDCl_3)

5.1.2- Identificação de (+)-ocoteína (2)



O alcaloide **2** foi obtido das frações OAF-ALC (A 4, B 1, C 4/6) e OAC-A (6, B.3, B.7, D.5) a partir dos fracionamentos cromatográficos dos extratos alcaloídicos das folhas e cascas do caule e das frações OAF (C 4/8, A 8), OAF-Ac (B.3, E.3, F.7/8, K.7, e L.22), provenientes dos fracionamentos cromatográficos das fases hexânica e acetato de etila das folhas (itens 4.2.1; 4.3.1; 4.3.3 e 4.4.1).

No espectro de RMN ^1H de **2** (Espectro 7, tabela 8), sinais relativos a hidrogênios de anel aromático foram observados como dois singletos largos em δ 6,87 e 7,59. Este espectro apresentou também dois singletos em δ 5,94 e 6,08 referentes aos hidrogênios do grupo dioximetileno presente no anel A e ainda mais três singletos em δ 3,77, 3,80 e 3,95 referentes à metoxilas em anel aromático. Além desses, foram observados sinais correspondentes a hidrogênios alifáticos, destacando-se um singleto em δ 2,43 atribuído à metila ligada a N.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 8, tabela 8) mostrou sinais para vinte carbonos. Com auxílio das informações presentes no espectro DEPT 135° (Espectro 9) estes sinais foram atribuídos: - a dez carbonos tetrassubstituídos, dos quais cinco apresentaram valores de deslocamento químico compatíveis com carbonos de anel aromático oxigenado (δ 135,0; 139,3; 143,5; 148,1 e 148,5) - quatro carbonos metilênicos em δ 23,6; 53,2; 33,8 e 100,8, este último referente ao carbono do grupo dioximetileno - três carbonos metínicos, sendo dois de anel aromático em δ 111,2 e 112,2, três metoxilas

em δ 55,3; 55,6 e 58,8, este último sugestivo de metoxila estericamente impedida e uma metila ligada a N em δ 43,3.

Estes dados, ao serem comparados com os do alcaloide **1**, indicaram que a diferença estrutural entre os dois compostos residia unicamente na presença da metoxila em C-3 no alcaloide **2**. Esta proposta pôde ser confirmada pela ausência do singlete a δ 6,50 atribuível a H-3 e pela ausência do sinal em δ 106,8 atribuído a C-3 em **1**. Foram observados ainda efeitos de proteção de C-2, C-3a e C-11b, assim como de C-4 em **2**, compatíveis com a presença da metoxila em C-3. No espectro HSQC (Espectro 10, tabela 9), o sinal relativo aos hidrogênios desta metoxila (δ 3,95) apresentou correlação com o sinal à δ 58,8.

No espectro HMBC (Espectros 11-15, tabela 9) também foi possível constatar a presença da metoxila em C-3, através da observação de uma correlação intensa entre o sinal em δ 3,95 e o de C-3 a δ 139,3, cuja atribuição foi confirmada pela correlação com H-4 (tipo 3J).

A atribuição inequívoca dos valores de deslocamento químico para os demais carbonos de **2**, principalmente os valores relativos às metoxilas, foi realizada com auxílio das informações fornecidas pelos espectros HSQC e/ou HMBC.

Os dados espectrais de RMN 1H e ^{13}C , aliados aos valores positivos de rotação óptica +28,0 ($CHCl_3$, c 0,00045) encontrados para **2**, foram compatíveis com os descritos na literatura para o alcaloide aporfínico (+)-ocoteína (GUINAUDEAU et al., 1975; GUINAUDEAU et al., 1979).

O isolamento deste alcaloide já foi relatado em várias espécies de plantas, incluindo três pertencentes ao gênero *Ocotea* (ZANIN & LORDELLO, 2007; GARCEZ et al., 1995; VECCHIETTI et al., 1979; AHMAD & CAVA, 1977; VERNENGO et al., 1957; JACOBUCCI et al., 1954).

A literatura relata também atividades antineoplásica contra células KB (WRIGHT et al., 2000) e anti-agregante plaquetária para este alcaloide (CHANG et al., 1968).

Tabela 8- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, acetona- d_6) de **2** e do alcaloide (+)-ocoteína citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl_3], (GUINAUDEAU et al., 1979) [15 MHz, CDCl_3]

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(2)	$\delta^{13}\text{C}$	(2) Literatura
		$\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]		$\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]
1	143,5	-	143,2	-
2	135,0	-	134,8	-
3	139,3	-	139,1	-
3a	119,3	-	119,1	-
4	23,6	2,66 m (Ha; Hb)	23,6	nc
5	53,2	3,01m (Ha)	53,2	nc
		2,30 m (Hb)		-
6a	62,6	2,92 m	62,3	nc
7	33,8	3,11 dd (15,0; 3,0 Heq)	34,1	nc
		2,43 m (Hax)		-
7a	128,1	-	127,4	-
8	112,2	6,87 s	111,1	6,74 s
9	148,5	-	147,5	-
10	148,1	-	147,5	-
11	111,2	7,59 s	110,0	7,57 s
11a	123,6	-	123,5	-
11b	111,2	-	110,4	-
11c	127,9	-	127,4	-
N-CH ₃	43,3	2,43 s	41,9	2,52 s
3-OCH ₃	58,8	3,95 s	59,3	3,97 s
9-OCH ₃	55,6 ^a	3,80 s	56,0	3,80 s
10-OCH ₃	55,3 ^a	3,77 s	55,8	3,80 s
OCH ₂ O	100,8	5,94 sl; 6,08 sl	100,4	5,92 d (1,5); 6,02 d (1,5)

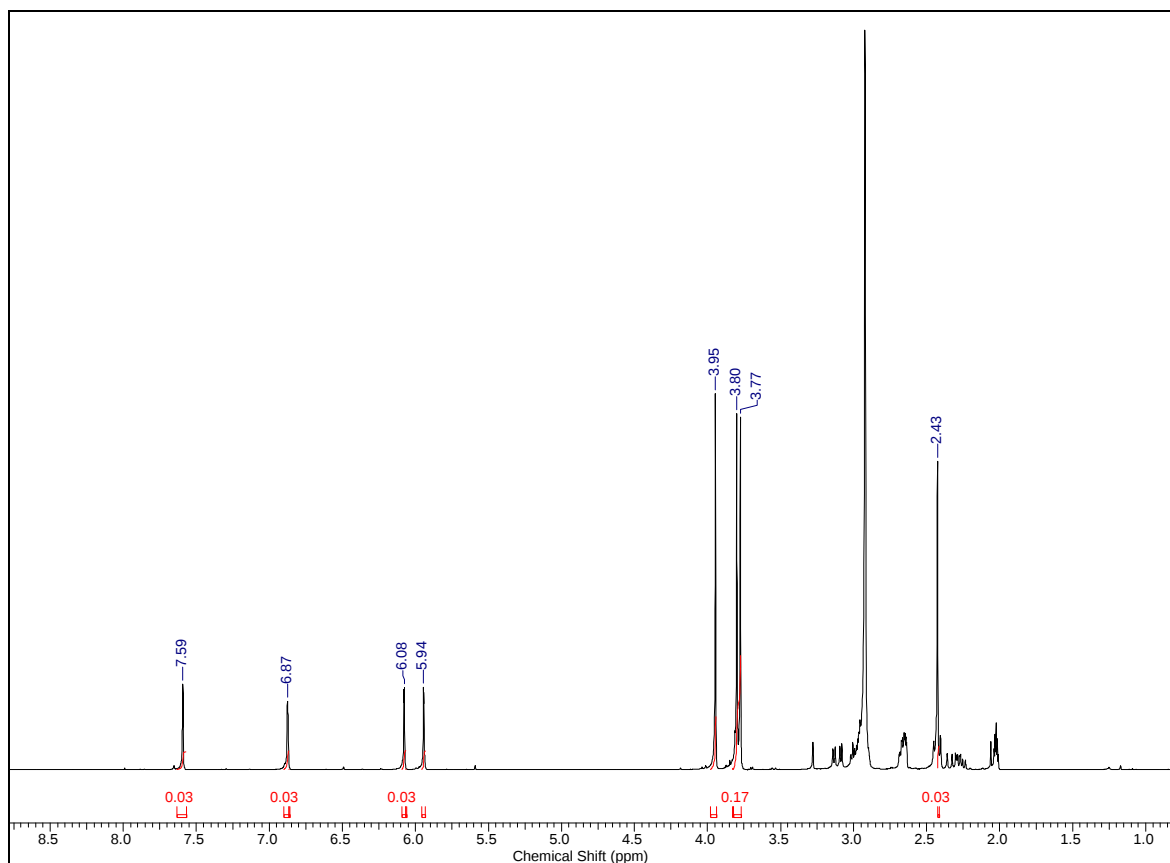
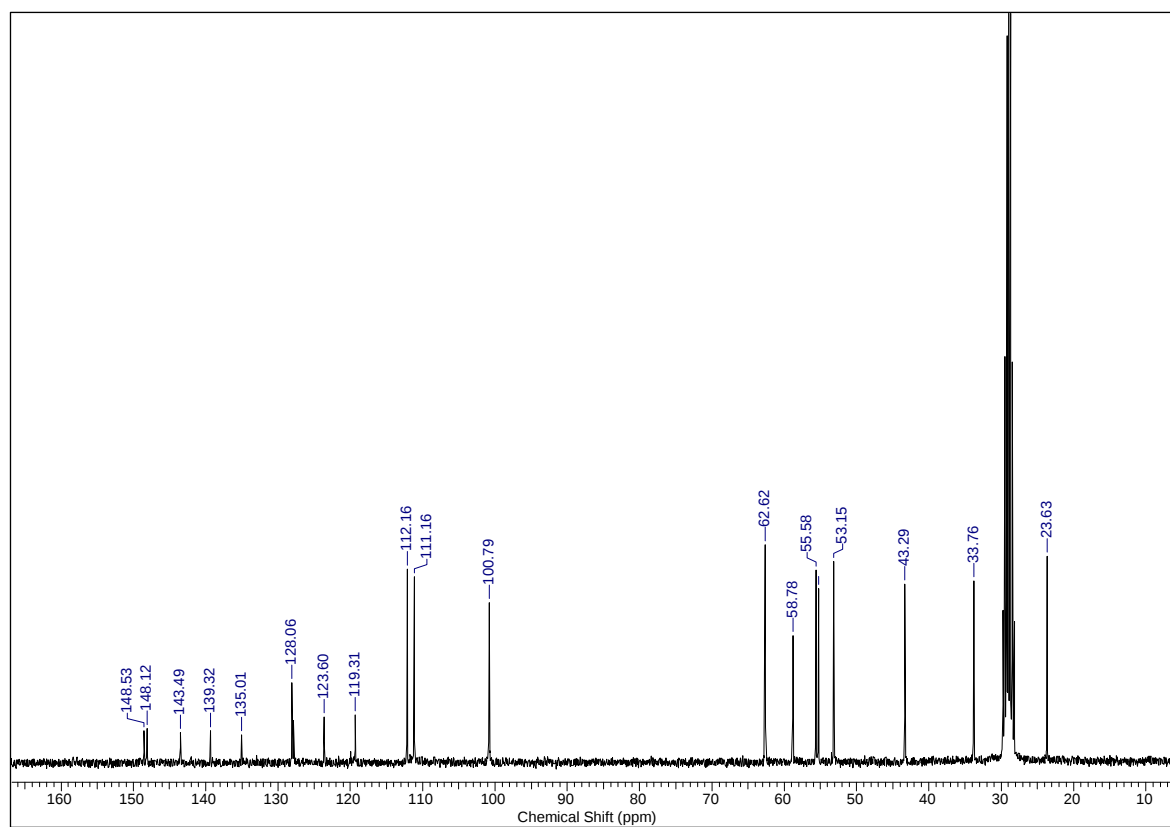
nc: não citado na referência

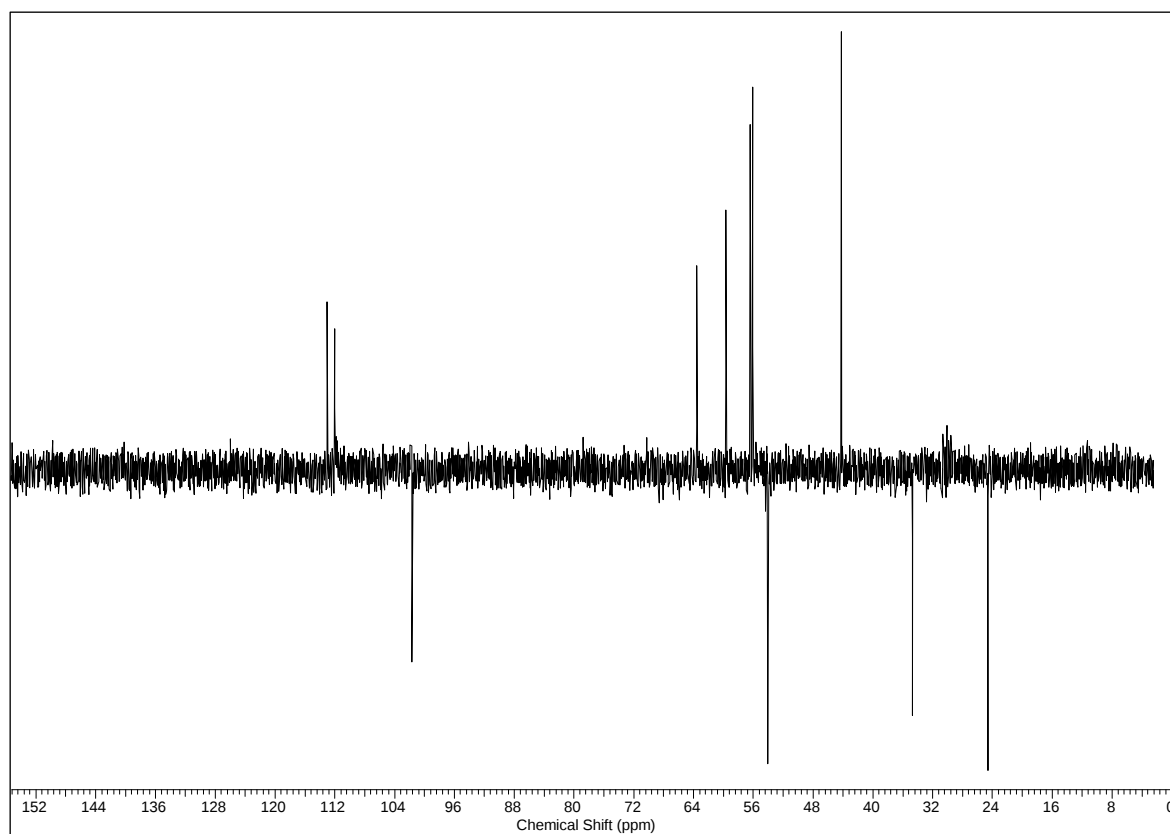
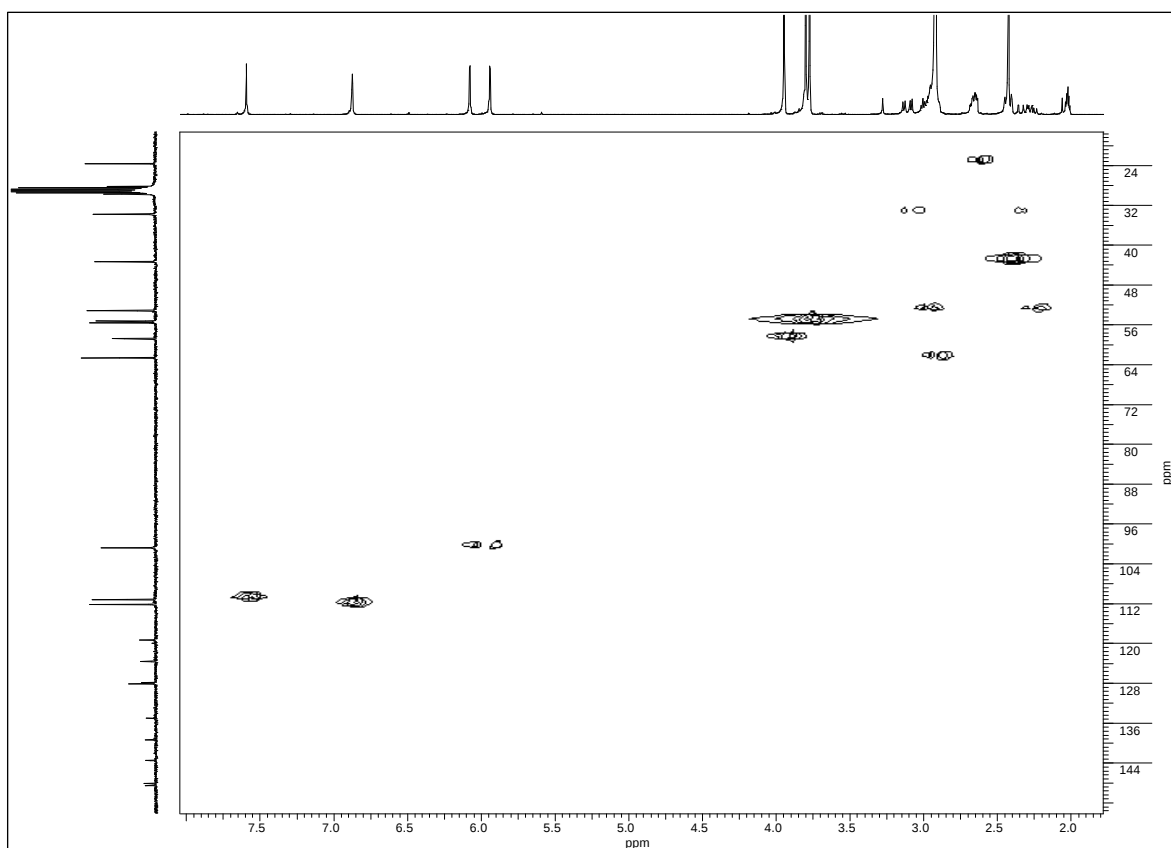
^a valores que podem estar trocados

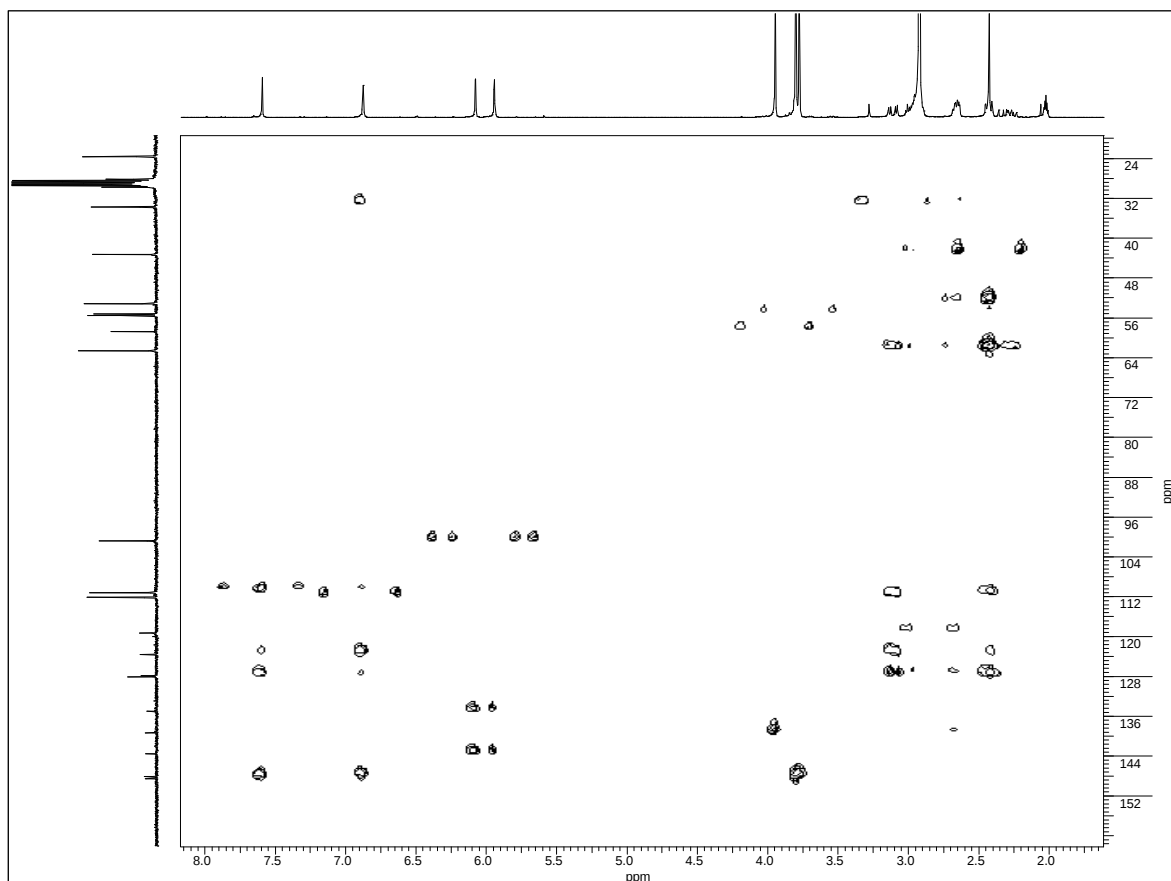
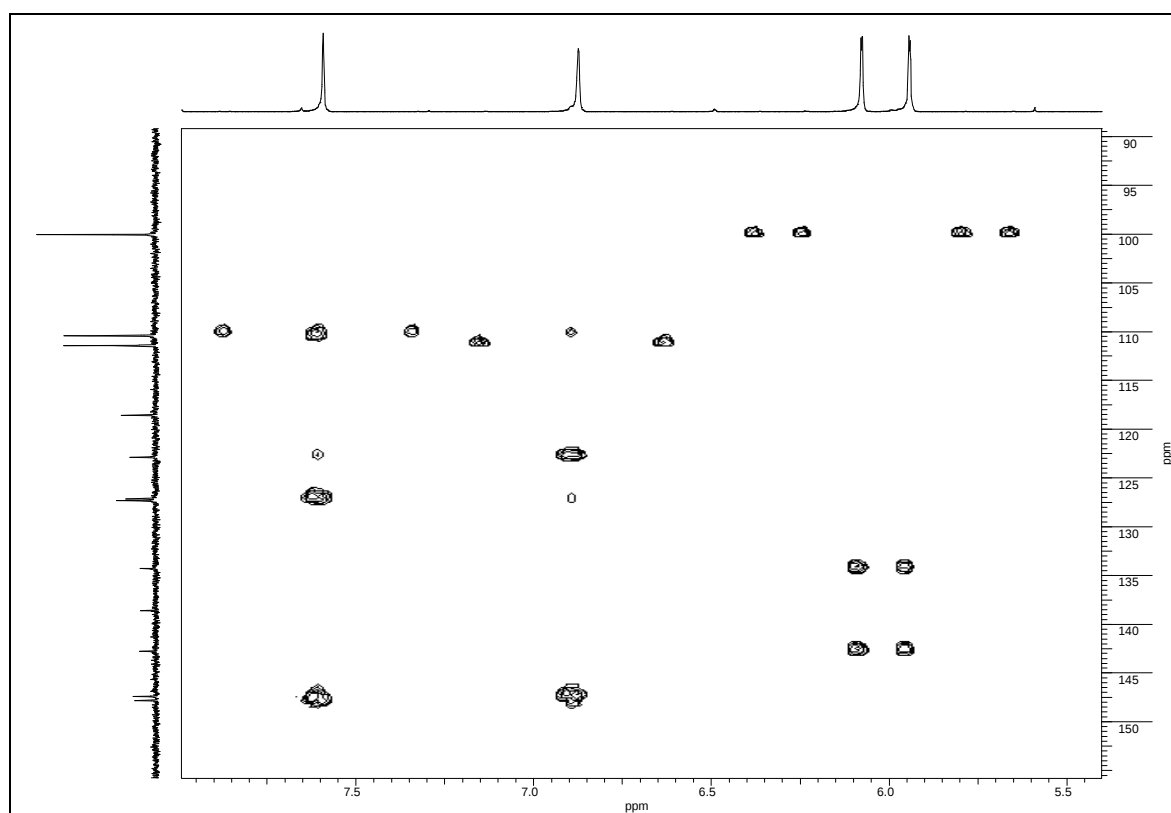
Tabela 9- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **2** (300/75 MHz, acetona-*d*₆)

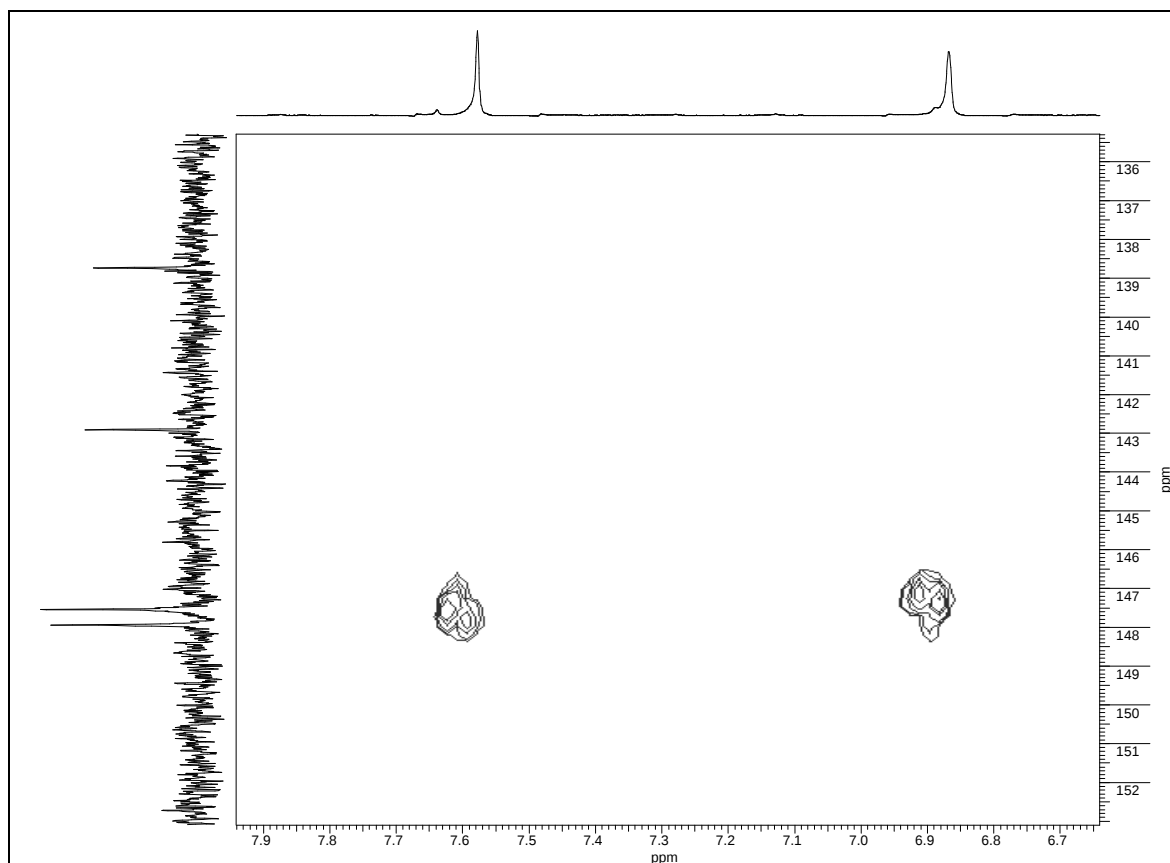
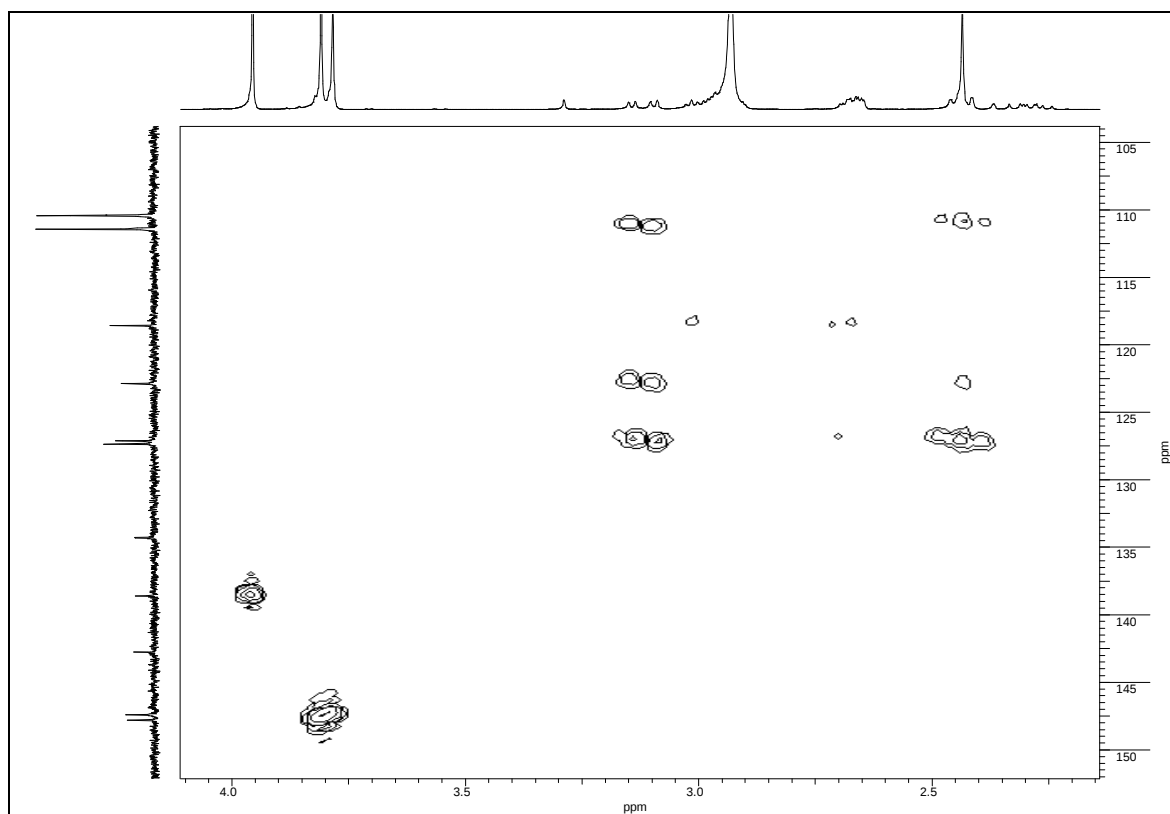
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (2)	HMBC (2)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
4	23,6	2,66 m (Ha; Hb)	C-3, C-3a, C-5, C-11c
5	53,2	3,01m (Ha)	-
		2,30 m (Hb)	C-6a
6a	62,6	2,92 m	-
7	33,8	3,11 dd (15,0; 3,0 Heq)	C-6a, C-8, C-11a, C-11c
		2,43 m (Hax)	C-8, C-11c
8	112,2	6,87 s	C-7, C-7a, C-9, C-10, C-11a,
11	111,2	7,59 s	C-7a, C-9, C-10, C-11a, C-11b
N-CH ₃	43,3	2,43 s	C-5, C-6a
3-OCH ₃	58,8	3,95 s	C-3
9-OCH ₃	55,6 ^a	3,80 s	C-9
10-OCH ₃	55,3 ^a	3,77 s	C-10
OCH ₂ O	100,8	5,94 sl; 6,08 sl	C-1, C-2

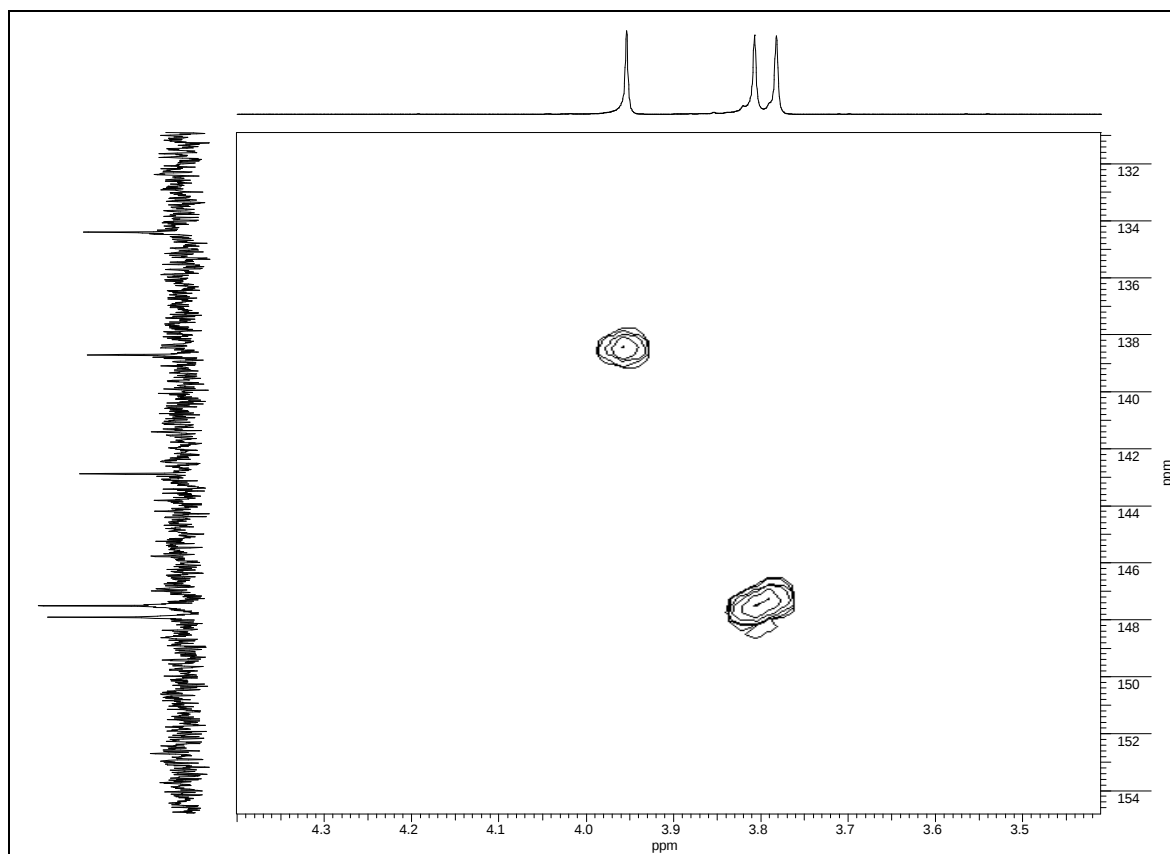
^a valores que podem estar trocados

Espectro 7- RMN ^1H de 2 (300 MHz, acetona- d_6)Espectro 8- RMN ^{13}C de 2 (75 MHz, acetona- d_6)

Espectro 9- DEPT 135° de 2 (75 MHz, acetona- d_6)10- Espectro HSQC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)

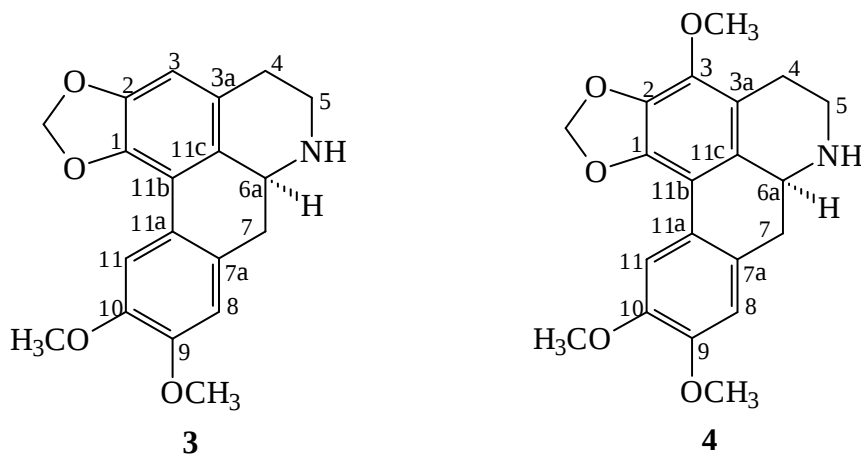
Espectro 11- Espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona-*d*₆)Espectro 12- Expansão do espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona-*d*₆)

Espectro 13- Expansão do espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona-*d*₆)Espectro 14- Expansão do espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona-*d*₆)



Espectro 15- Expansão do espectro HMBC de 2 (300/75 MHz, acetona- d_6)

5.1.3- Identificação de (+)-nordicentrina (3) e (+)-O-metilcassifilina (4)



Da Fração OAF-ALC F 6 originada a partir dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas foram obtidos **3** e **4** em mistura numa proporção de aproximadamente 1:1 (item 4.2.2.7). O alcaloide **4** foi obtido ainda em mistura com **1** e **2** da fração OAC-A-B.7 proveniente dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das cascas do caule (item 4.4.2.1).

Os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de **3** e **4** mostraram-se semelhantes aos de **1** e **2**, respectivamente, indicando que estas substâncias também eram alcaloides do tipo aporfínico, onde **3** diferia de **1** e **4** diferia de **2** apenas pela ausência do grupo metila ligado no nitrogênio.

Assim, o espectro de RMN ^1H (Espectros 13 e 14, tabelas 16 e 17) apresentou três singletos em δ 6,59; 6,89 e 7,69, atribuídos respectivamente a H-3, H-8 e H-11 de **3**, como também dois singletos em δ 6,87 e 7,62 atribuídos a H-8 e H-11 de **4**, respectivamente. Também foram observados neste espectro dois singletos largos em δ 5,96 e 6,09 referentes aos hidrogênios do grupo dioxidometileno presente no anel A das duas substâncias, além de singletos em δ 3,84 e 3,87 atribuídos às metoxilas de **3** e em δ 3,84; 3,85 e 4,03 atribuídos às de **4**. A não observação de singletos na região de δ 2,40 indicou, portanto, a ausência do grupo N-CH₃ na estrutura dos dois compostos.

Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Espectros 18-23, tabelas 10 e 12), foram observados sinais dos carbonos metilênicos dos anéis B e C entre δ 22,9 e 35,4, sinais de carbonos metínicos na região entre δ 112,0 e 113,0 relativos a C-8 e C-11 dos

anéis D, como também sinais relativos às metoxilas entre δ 56,7 e 60,0 para os dois compostos. Não foram observados sinais referentes a metilas em torno de δ 43,0, evidenciando então, a ausência de metilas ligadas a nitrogênio em ambos os compostos.

Os dados espectrais de RMN ^1H obtidos para **3** mostraram-se bastante semelhantes com aos descritos na literatura para o alcaloide aporfínico (+)-nordicentrina (GUINAUDEAU et al., 1979). Na literatura há relatos dos valores de RMN ^{13}C para o (-)-nordicentrina (GUINAUDEAU et al., 1994) os quais apresentaram uma boa correlação com os de **3**.

Já para o alcaloide **4**, os dados de RMN ^1H apresentaram uma boa correlação com os relatados na literatura para o alcaloide (+)-O-metilcassifilina (GUINAUDEAU et al., 1975), enquanto que os de RMN ^{13}C estão sendo relatados pela primeira vez. Os sinais relativos aos carbonos de **4** foram definidos após eliminação no espectro de RMN ^{13}C dos sinais referentes aos do alcaloide **3**.

As atribuições dos valores de deslocamento químico para os carbonos de **3** e **4**, foram também confirmadas pelas correlações presentes nos espectros de HSQC (Espectros 24-26, tabelas 11 e 13) e/ou HMBC (Espectros 27-30, tabelas 11 e 13). No espectro HMBC foi possível observar para **4**, correlações entre H-8 (δ 6,87) ligado ao carbono correspondente ao sinal em δ 112,9 e os carbonos C-7a (δ 127,3) e C-11a (δ 124,8) e entre H-11 (δ 7,62) ligado ao carbono referente ao sinal em δ 112,1 e os carbonos C-7a (δ 127,3) e C-11b (δ 111,9), além de constatar a presença da metoxila em C-3, através da observação de uma correlação intensa entre o sinal em δ 4,03 e o de C-3 a δ 141,0.

O sinal da rotação óptica da mistura de **3** e **4** $[\alpha]_{\text{D}} = + 14,0$ (CHCl_3 , c 0,0003), indicou que estes alcaloides são dextrorrotatórios, sendo indentificados como (+)-nordicentrina e (+)-O-metilcassifilina.

Estes alcaloides já foram isolados previamente de outras espécies vegetais, inclusive de plantas do gênero *Ocotea* (GARCEZ et al, 1995; CAVA & VENKATESWARLU, 1971).

Tabela 10- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **3** e do alcaloide (+)-nordicentrina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1979) [60MHz, CF_3COOH], (GUINAUDEAU et al., 1994) [15 MHz, CDCl_3]

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(3)	$\delta^{13}\text{C}$	(3) Literatura
		$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]		$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	143,7	-	141,6	-
2	149,1	-	146,6	-
3	108,0	6,59 s	107,1	6,50 s
3a	126,6	-	126,5	-
4	28,0	3,11 m (Ha) 2,85-2,75 m (Hb)	29,1	nc
5	43,4	3,60-3,48 m (Ha) 3,22-3,02 m (Hb)	43,1	nc
6a	54,6	4,12-4,06 m	53,5	nc
7	35,4	3,02-2,94 m (Ha) 2,89-2,71 m (Hb)	36,4	nc
7a	128,1	-	127,9	-
8	112,9	6,89 s	111,0	6,72 s
9	150,2	-	148,1	-
10	149,4	-	147,5	-
11	112,5	7,69 s	110,5	7,65 s
11a	124,6 ^a	-	123,5	-
11b	117,4	-	116,2	-
11c	124,7 ^a	-	127,0	-
9-OCH ₃	56,5	3,87 s	55,8	3,88 s
10-OCH ₃	56,5	3,84 s	56,0	3,90 s
OCH ₂ O	102,4	5,96 sl; 6,09 sl	100,5	5,90 d (1,3); 6,04 d (1,3)

nc: não citado na referência

^a valores que podem estar trocados

Tabela 11- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **3** (300/75 MHz, CD₃OD)

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (3)	HMBC (3)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	108,0	6,59 s	C-1, C-2, C-11c
4	28,0	3,11 m (Ha)	-
		2,85-2,75 m (Hb)	-
5	43,4	3,60-3,48 m (Ha)	-
		3,22-3,02 m (Hb)	-
6a	54,6	4,12-4,06 m	-
7	35,4	3,02-2,94 m (Ha)	-
		2,89-2,71 m (Hb)	-
8	112,9	6,89 s	C-9, C-10, C-11a
11	112,5	7,69 s	C-7a, C-9, C-10, C-11b
9-OCH ₃	56,5	3,87 s	C-9
10-OCH ₃	56,5	3,84 s	C-10
OCH ₂ O	102,4	5,96 sl; 6,09 sl	C-1, C-2

Tabela 12- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **4**, dados de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) de **2** e do alcaloide (+)-*O*-metilcassifilina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl_3]

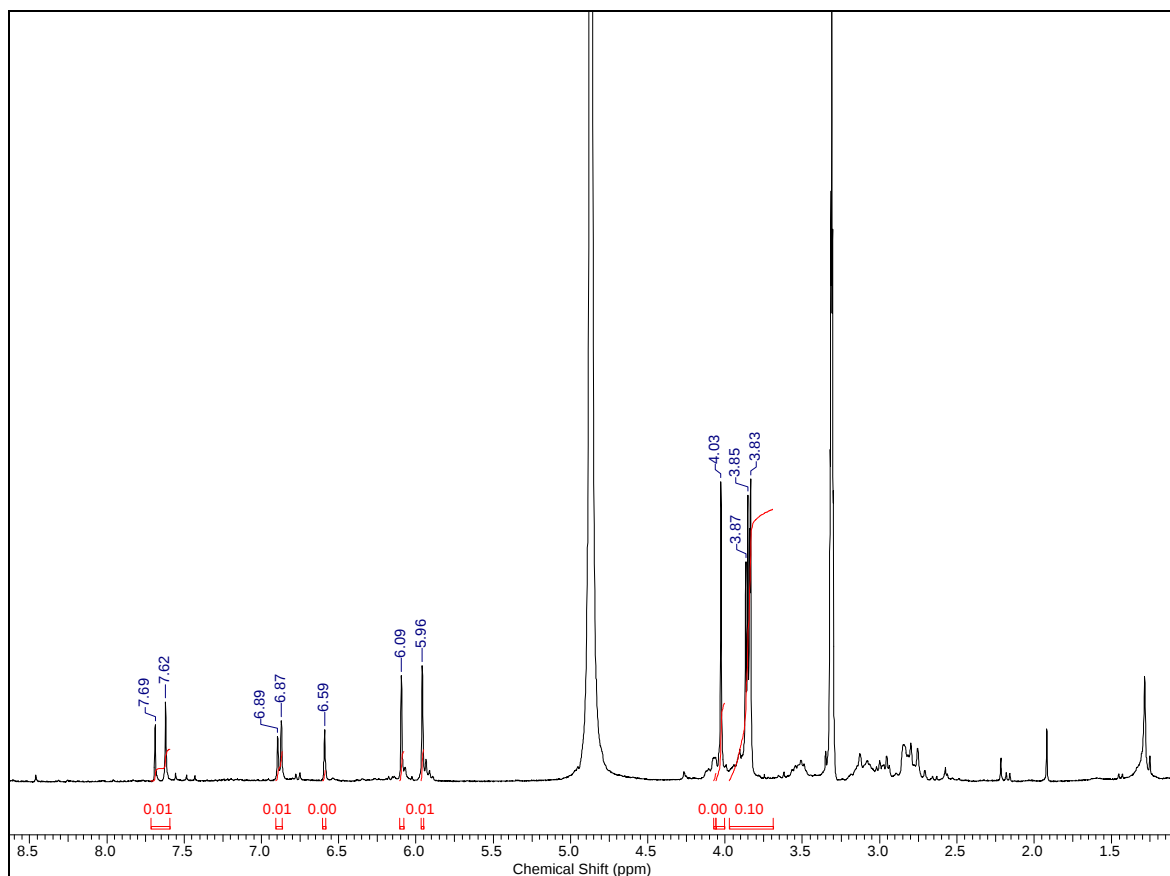
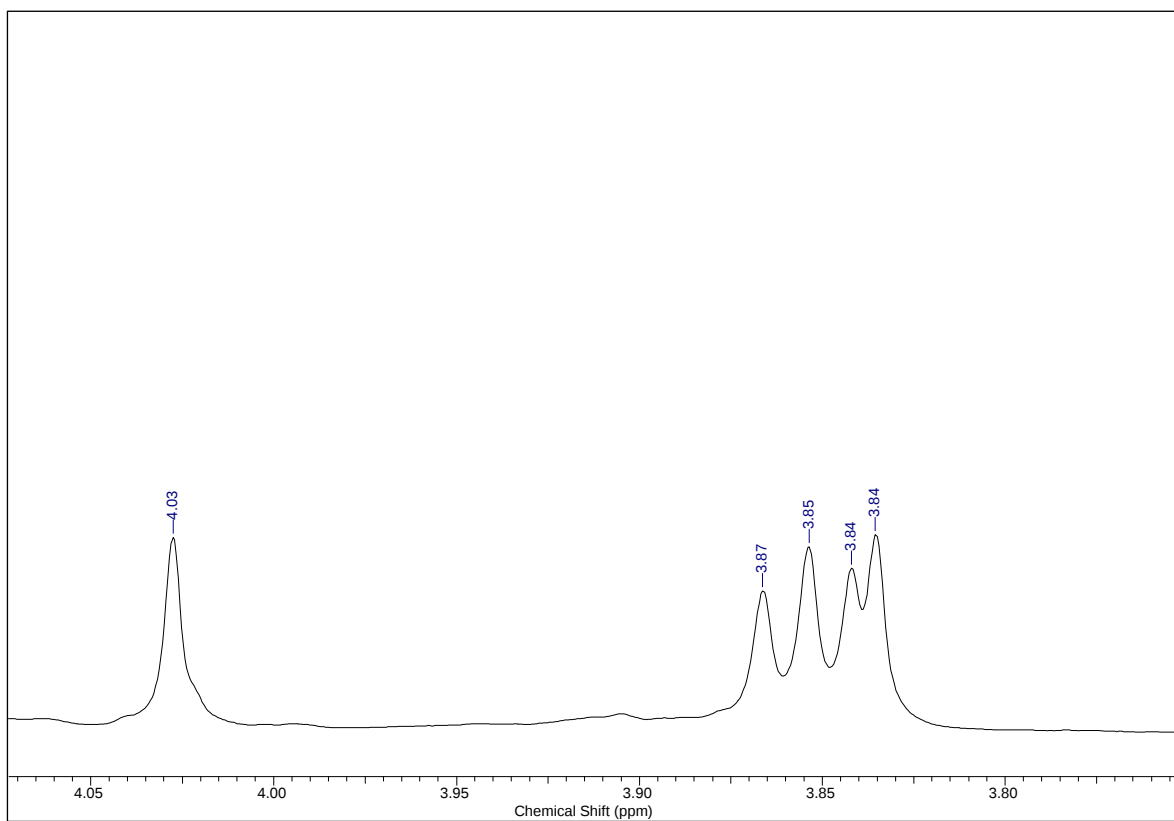
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(4) $\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	(2) $\delta^{13}\text{C}$	(4) Literatura $\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]
1	145,4	-	143,5	-
2	137,0	-	135,0	-
3	141,0	-	139,3	-
3a	118,9	-	119,3	-
4	22,9	2,84 m (Ha, Hb)	23,6	nc
5	43,1	3,60-3,48 m (Ha) 3,22-3,02 m (Hb)	53,2	nc
6a	54,6	4,12-4,06 m	62,6	nc
7	35,3	3,02-2,94 m (Ha) 2,89-2,71 m (Hb)	33,8	nc -
7a	127,3	-	128,1	-
8	112,9	6,87 s	112,2	6,73 s
9	149,7	-	148,5	-
10	149,4	-	148,1	-
11	112,1	7,62 s	111,2	7,61 s
11a	124,8	-	123,6	-
11b	111,9	-	111,2	-
11c	125,7	-	127,9	-
N-CH ₃	-	-	43,3	-
3-OCH ₃	60,0	4,03 s	58,8	3,99 s
9-OCH ₃	56,7	3,85 s	55,6 ^a	3,89 s
10-OCH ₃	56,7	3,84 s	55,3 ^a	3,89 s
OCH ₂ O	102,4	5,96 sl; 6,09 sl	100,8	5,92 s; 6,02 s

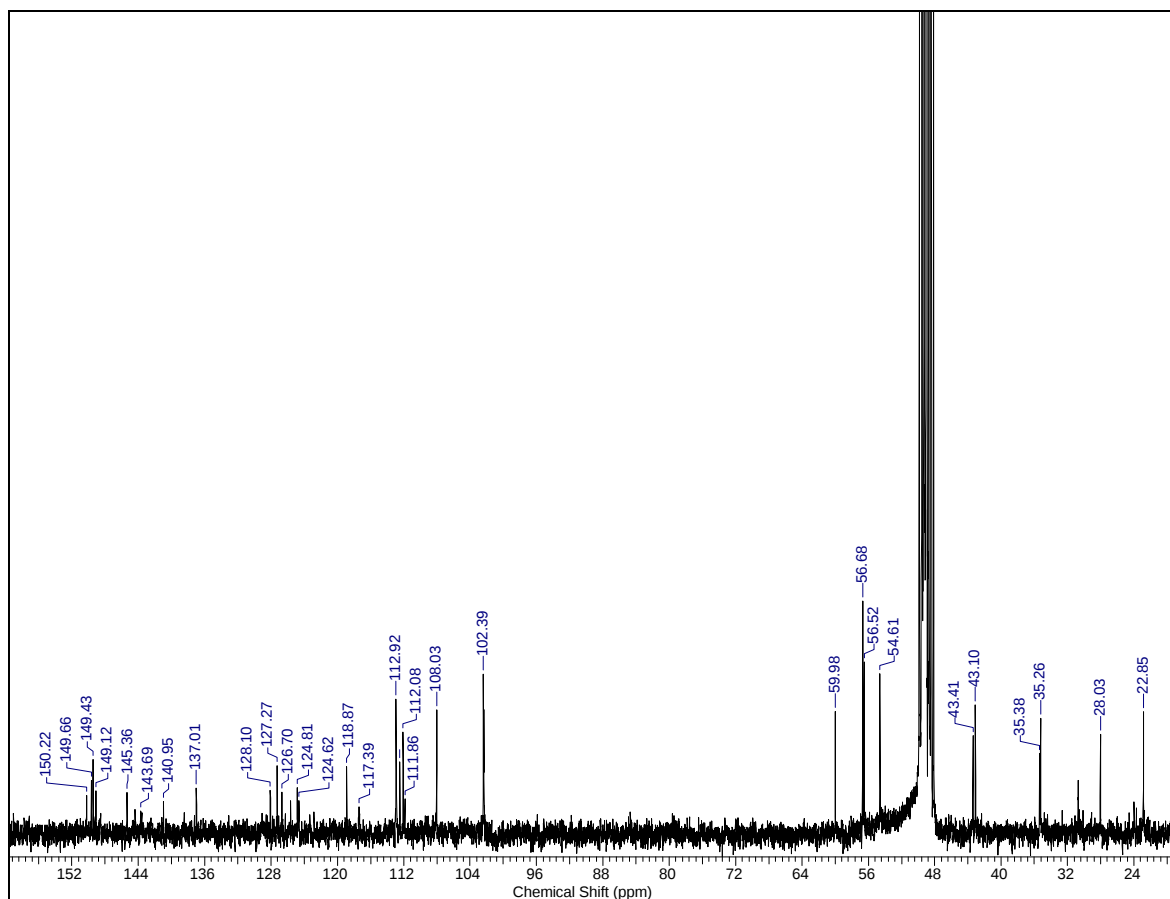
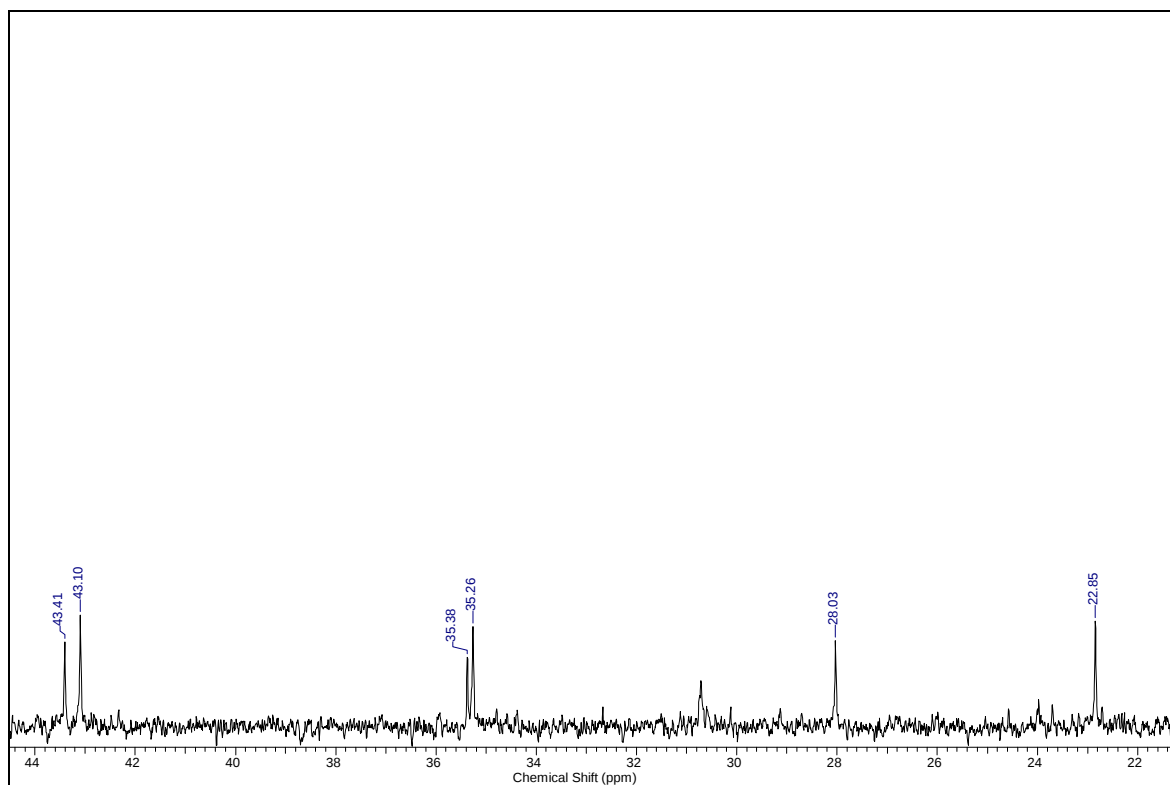
nc: não citado na referência

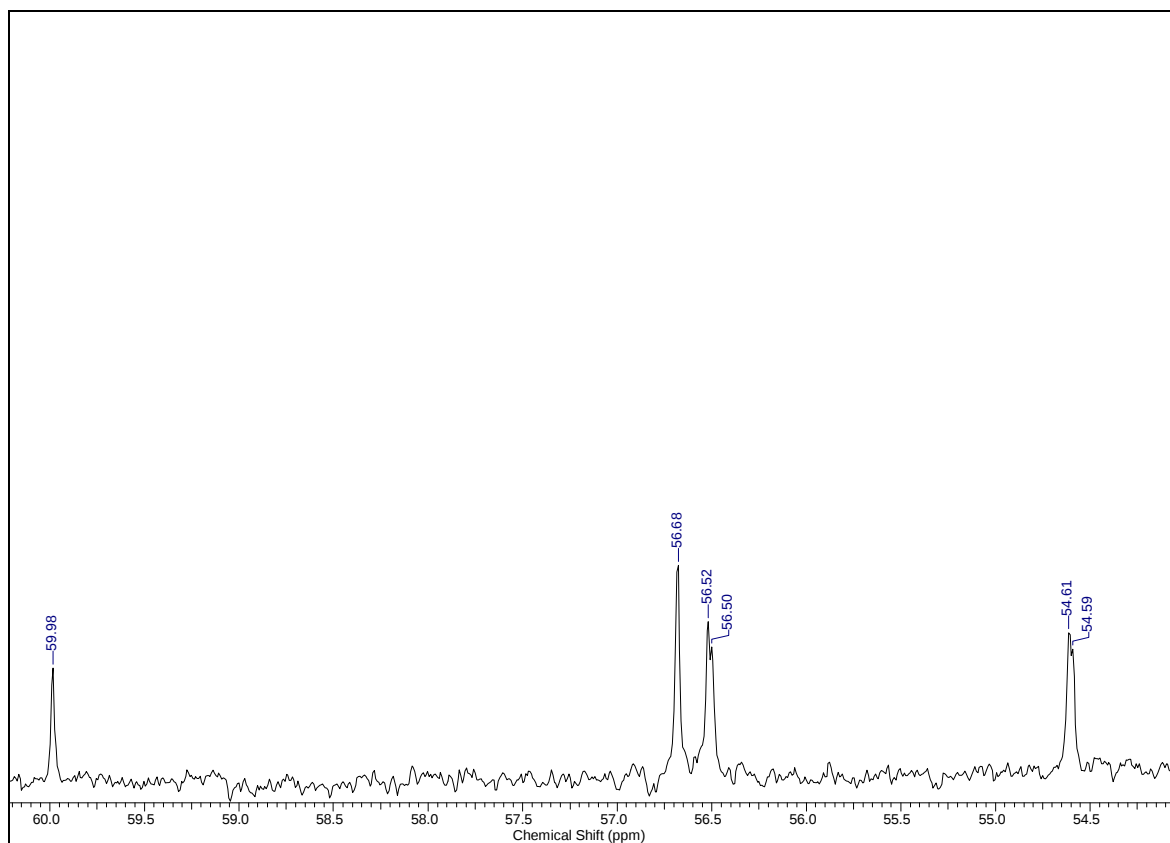
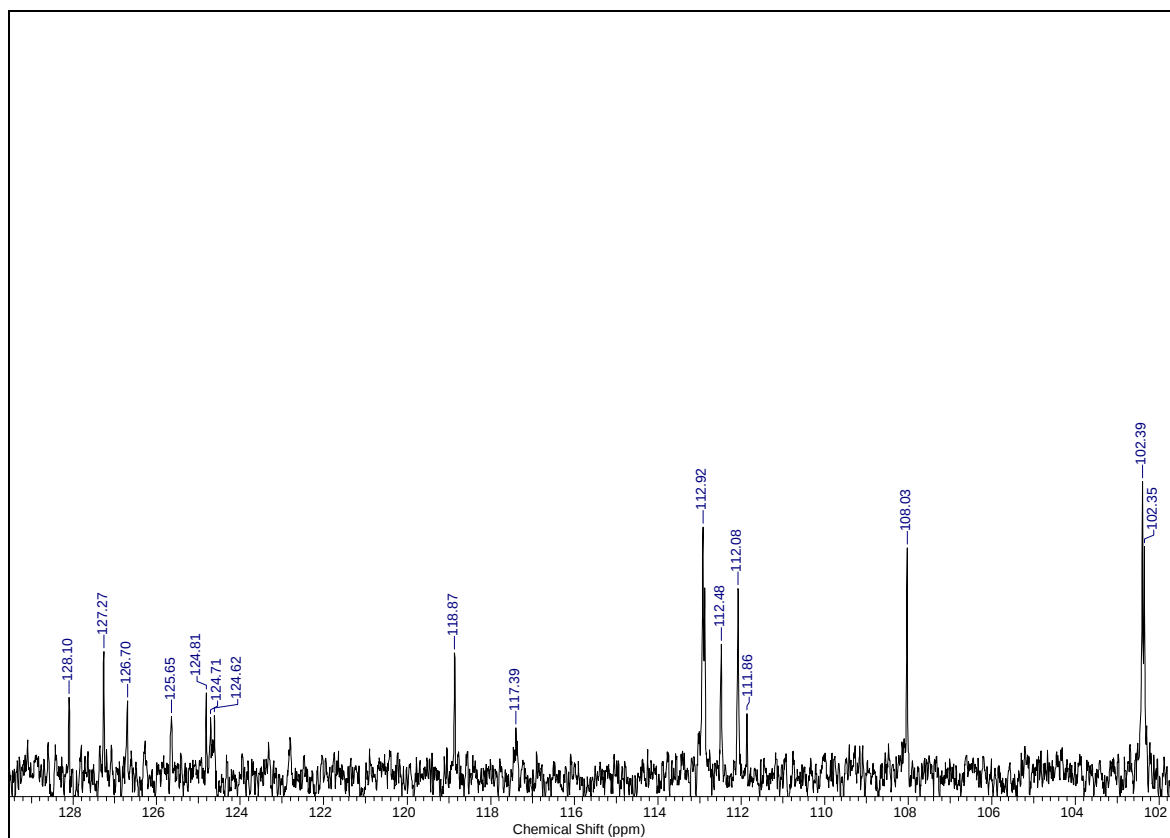
^a valores que podem estar trocados

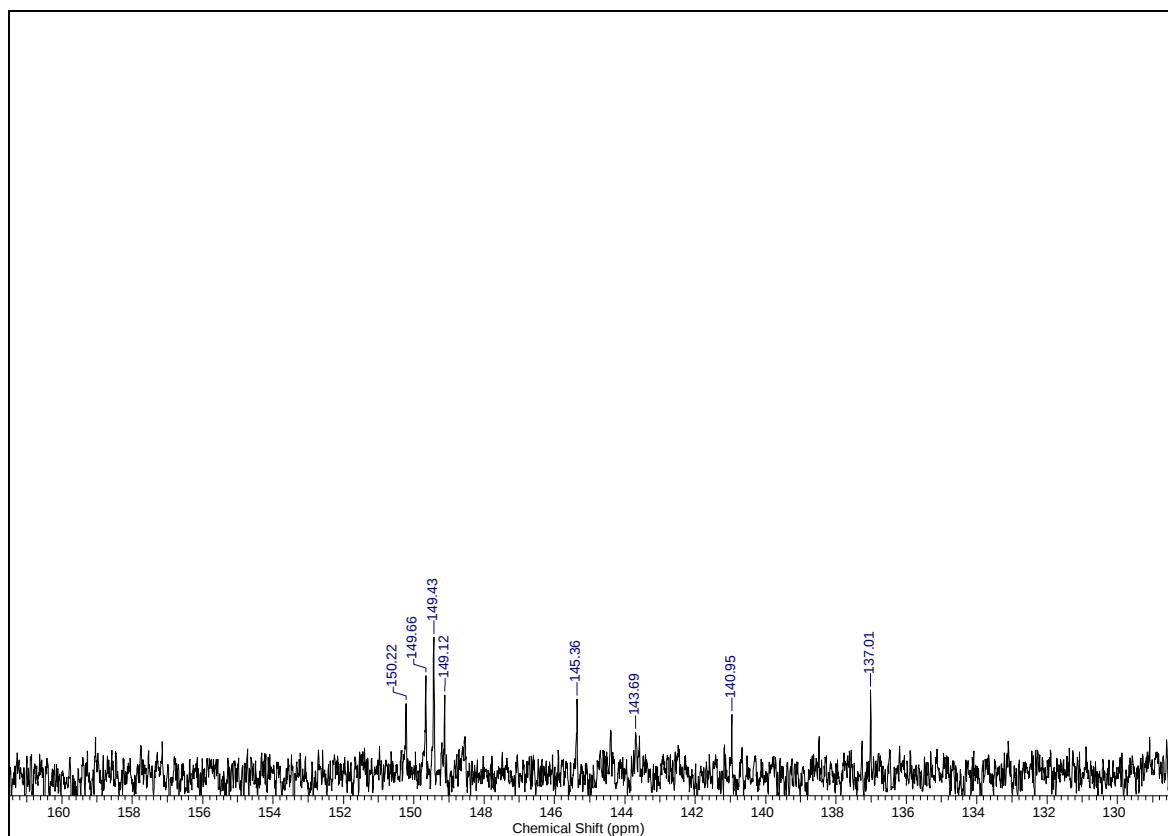
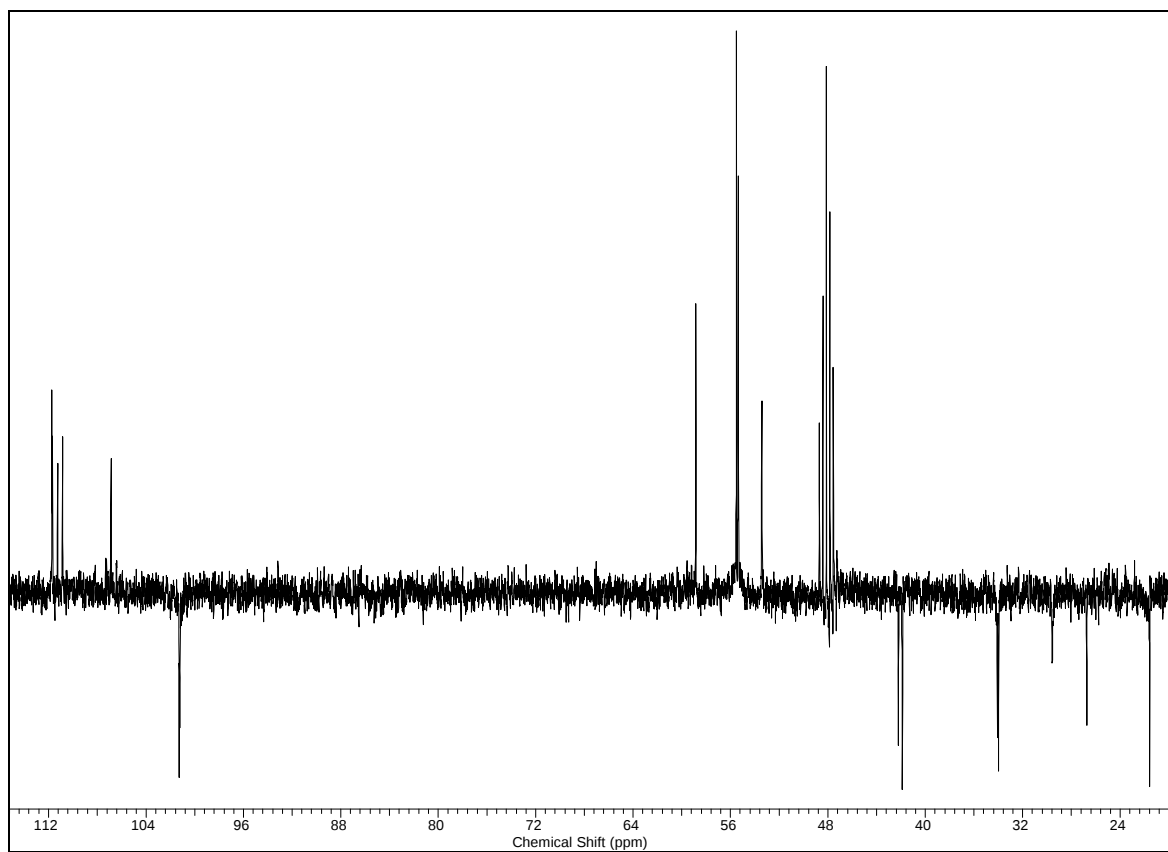
Tabela 13- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **4** (300/75 MHz, CD₃OD)

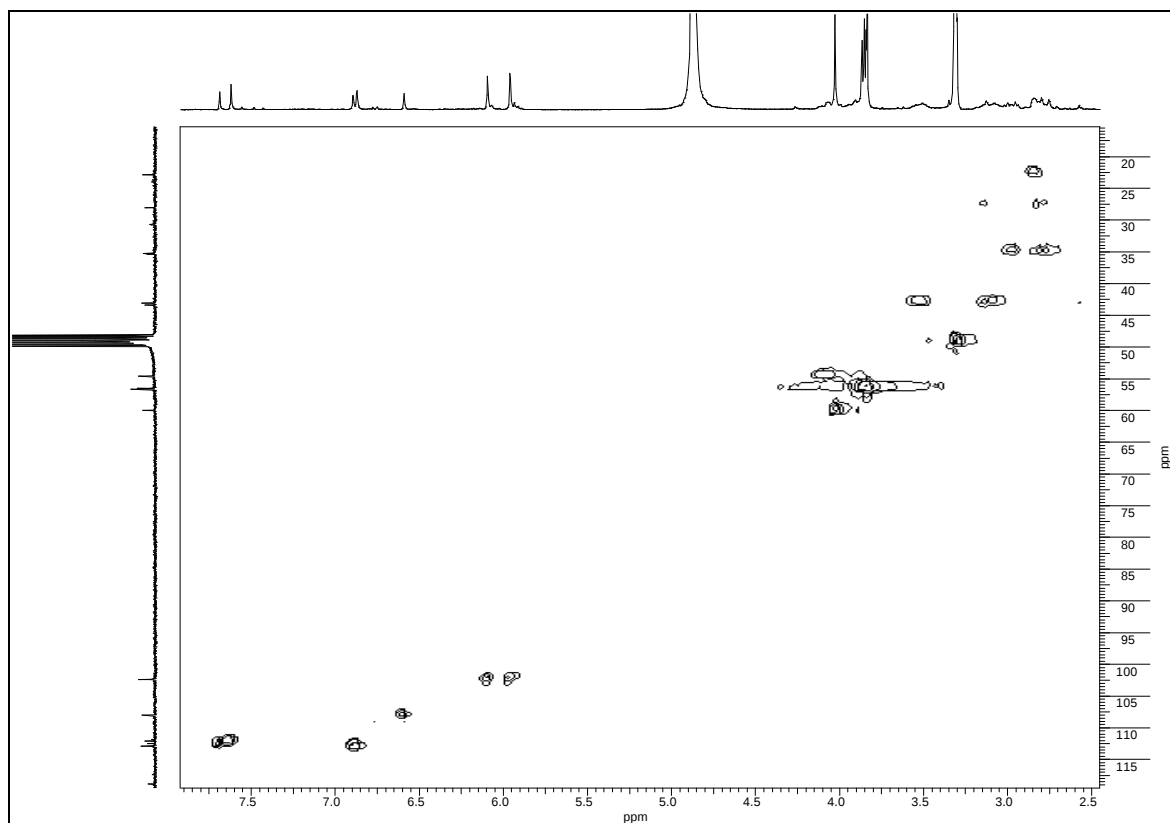
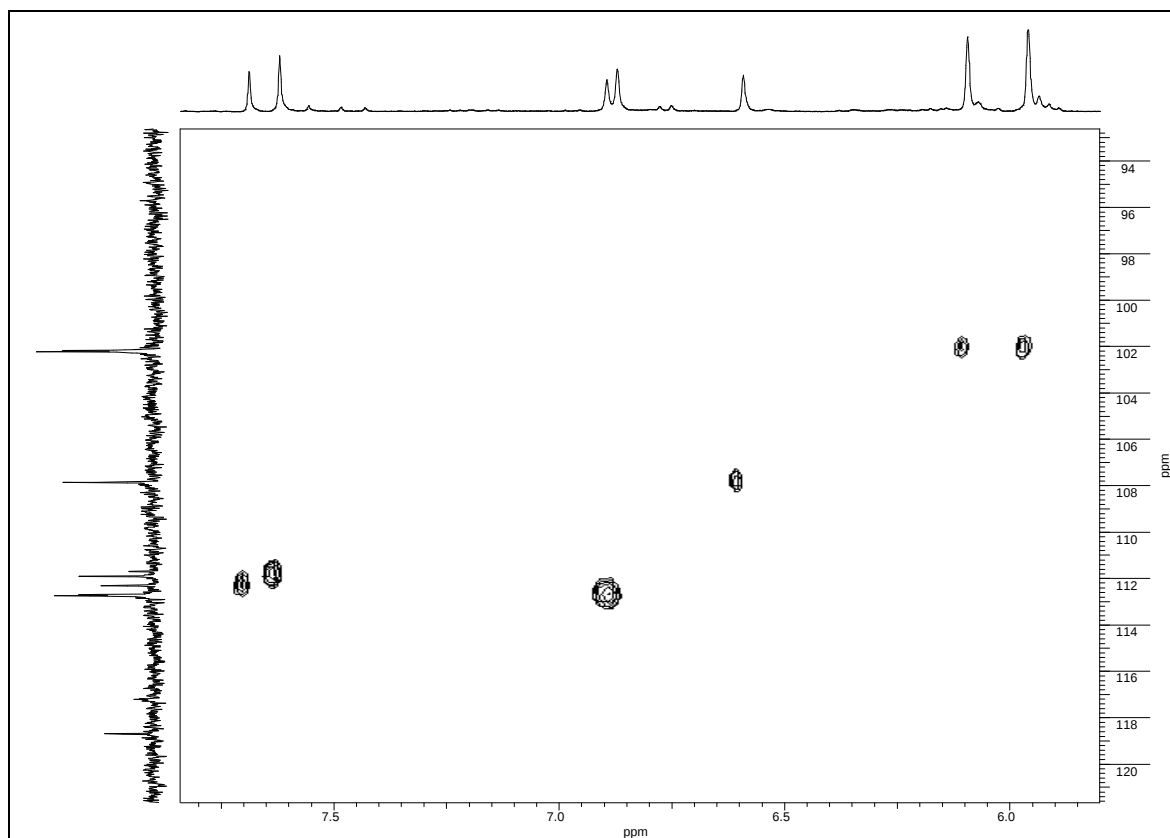
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (4)	HMBC (4)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
4	22,9	2,84 m (Ha, Hb)	-
5	43,1	3,60-3,48 m (Ha)	-
		3,22-3,02 m (Hb)	-
6a	54,6	4,12-4,06 m	-
7	35,3	3,02-2,94 m (Ha)	C-6a
		2,89-2,71 m (Hb)	C-6a
8	112,9	6,87 s	C-7a, C-9, C-10, C-11a
11	112,1	7,62 s	C-7a, C-9, C-10, C-11a, C-11b
3-OCH ₃	60,0	4,03 s	C-3
9-OCH ₃	56,7	3,85 s	C-9
10-OCH ₃	56,7	3,84 s	C-10
OCH ₂ O	102,4	5,96 sl; 6,09 sl	C-1, C-2

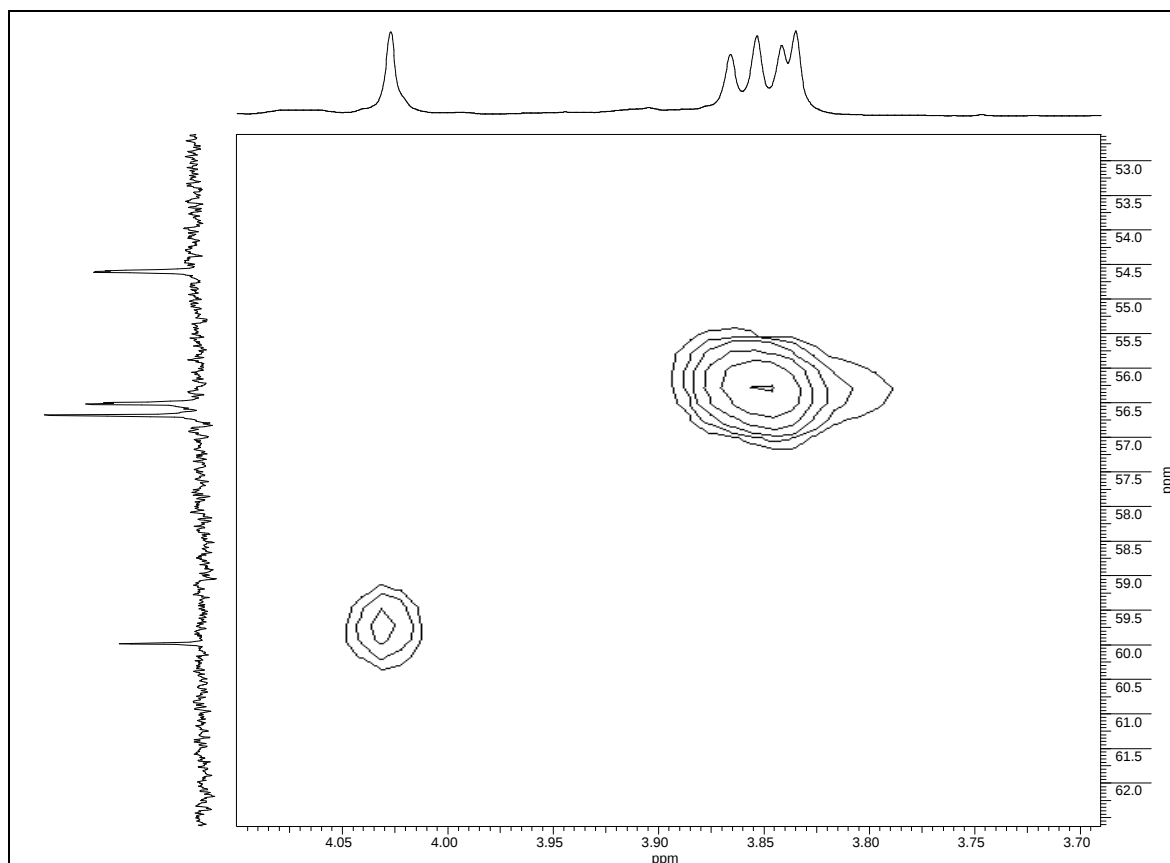
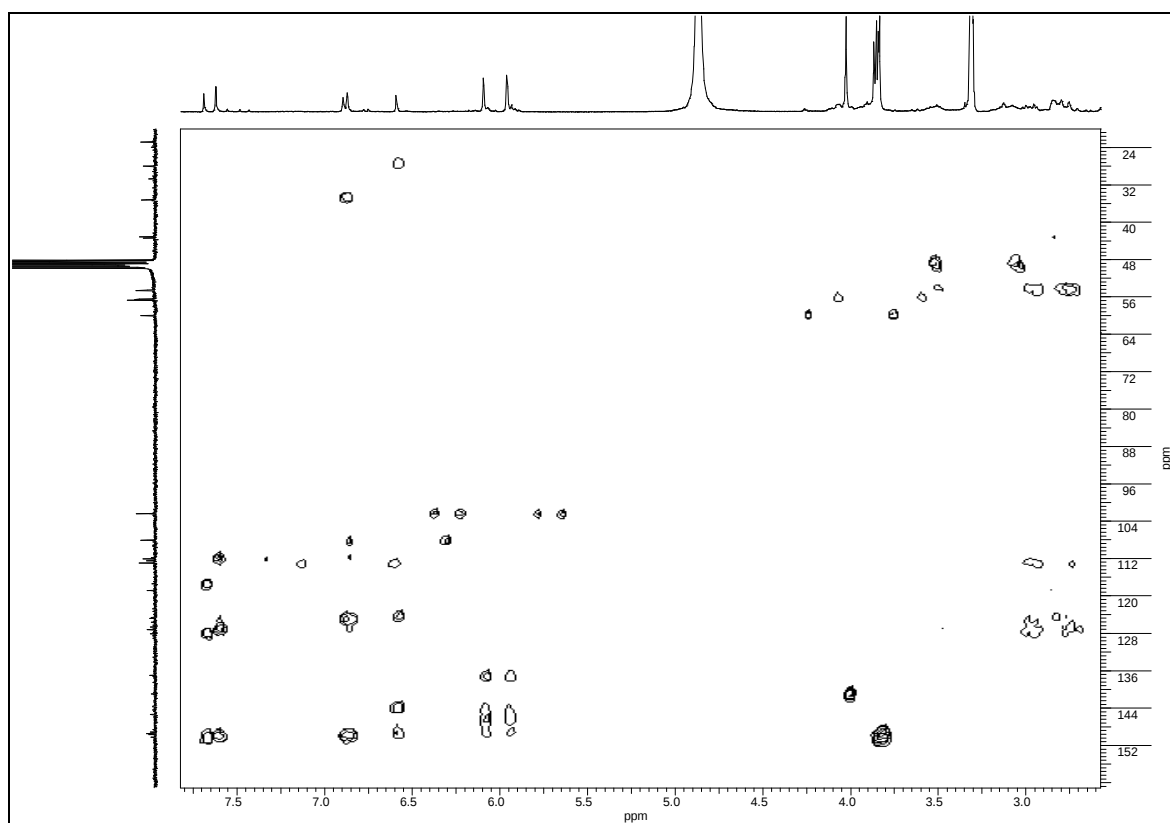
Espectro 16- RMN ^1H da mistura de **3** e **4** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 17- Expansão do espectro de RMN ^1H da mistura de **3** e **4**

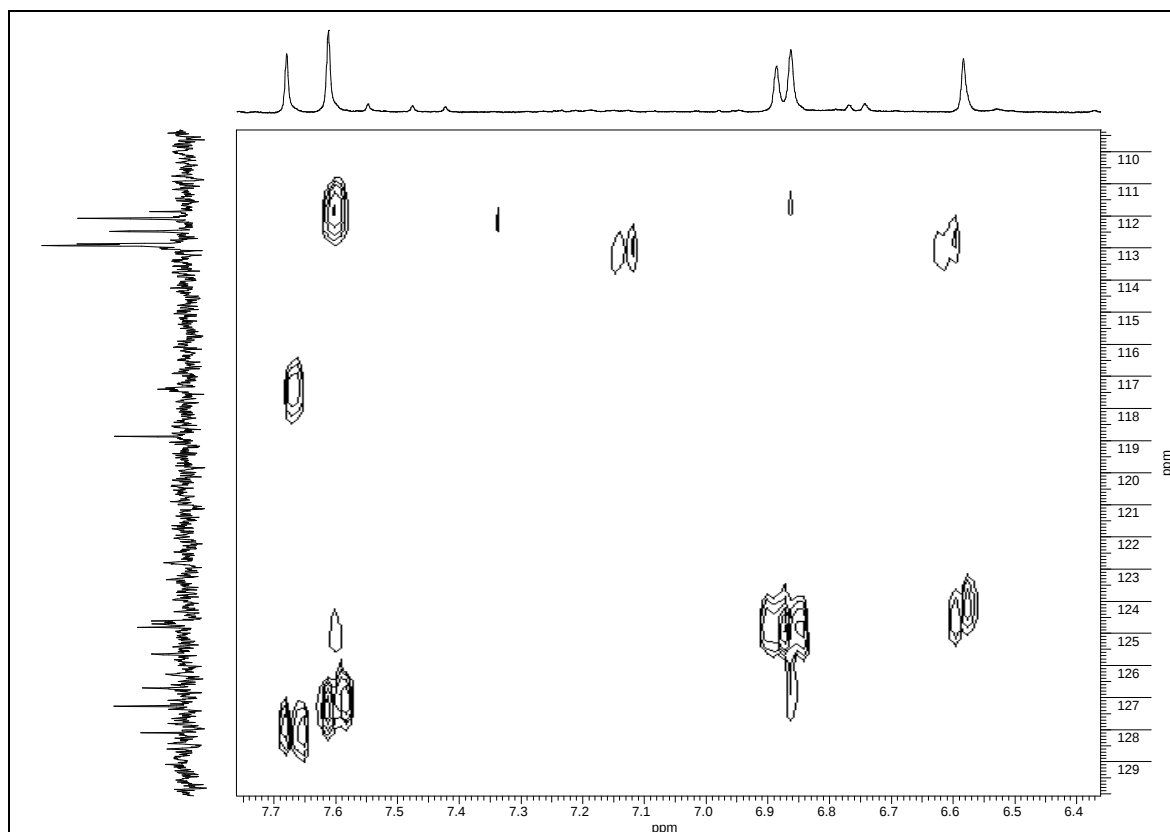
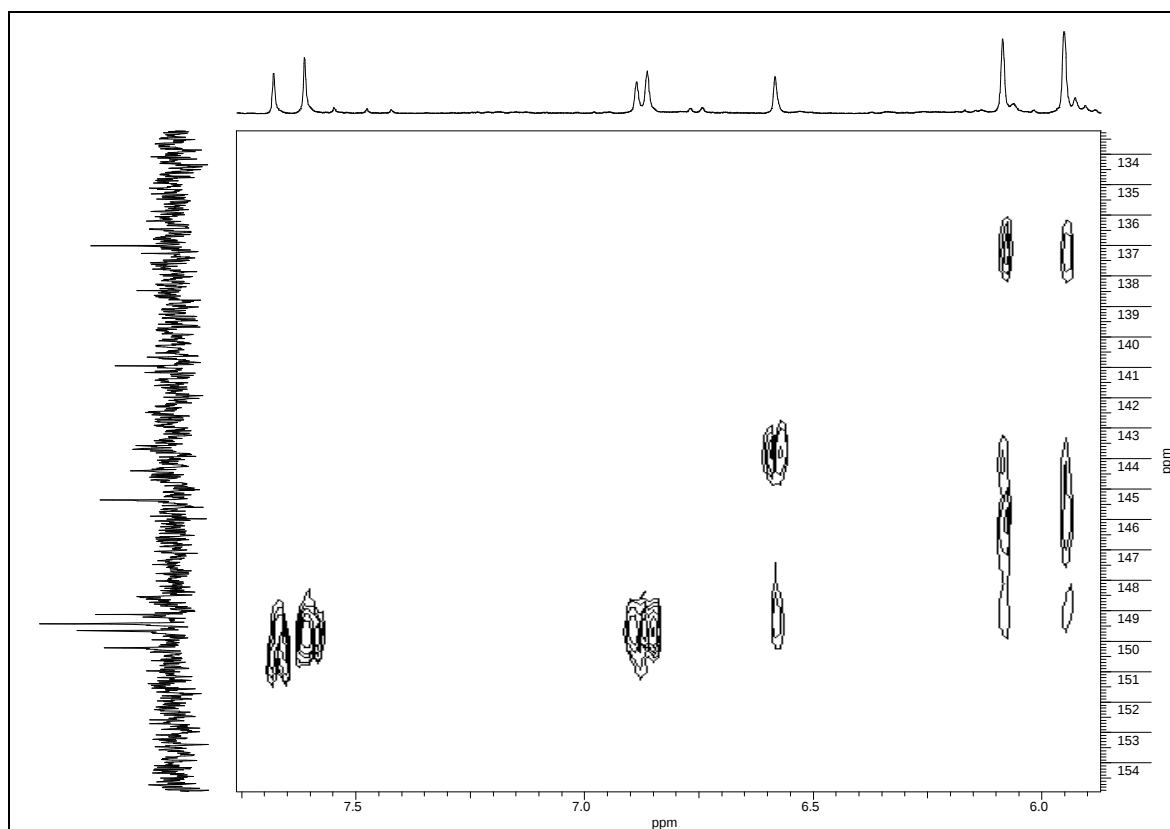
Espectro 18- RMN ^{13}C da mistura de **3** e **4** (75 MHz, CD_3OD)Espectro 19- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de **3** e **4** (75 MHz, CD_3OD)

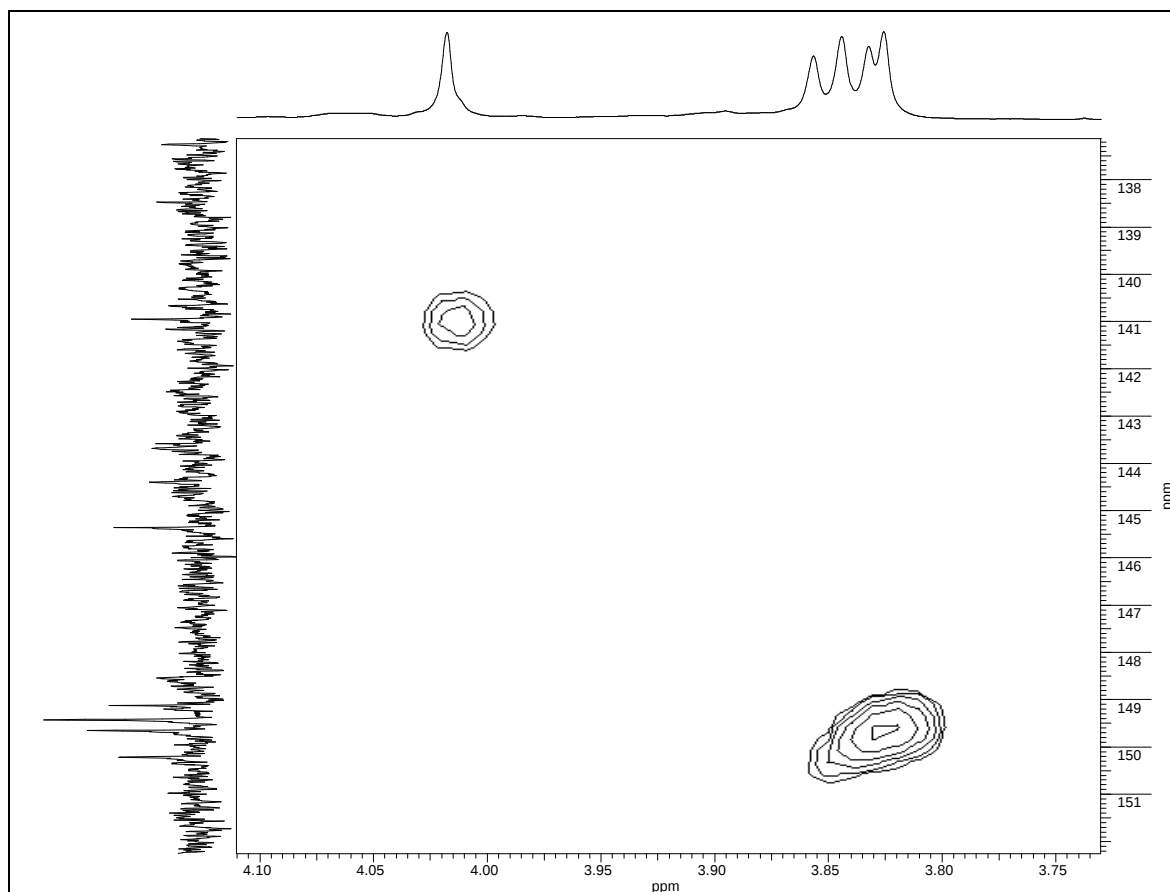
Espectro 20- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de **3** e **4** (75 MHz, CD_3OD)Espectro 21- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de **3** e **4** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 22- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de **3** e **4** (75 MHz, CD_3OD)Espectro 23- DEPT 135° da mistura de **3** e **4** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 24- Espectro HSQC da mistura de **3** e **4** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 25- Expansão do espectro HSQC da mistura de **3** e **4** (300/75 MHz, CD₃OD)

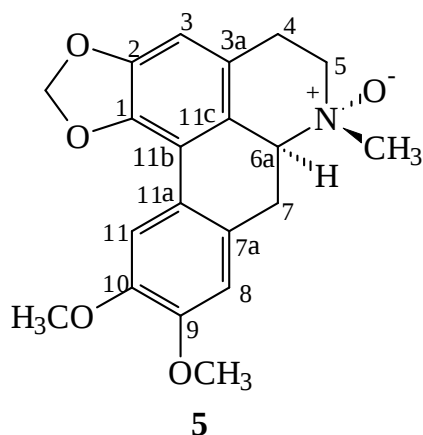
Espectro 26- Expansão do espectro HSQC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 27- Espectro HMBC da mistura de 3 e 4 (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 28- Expansão do espectro HMBC da mistura de **3** e **4** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 29- Expansão do espectro HMBC da mistura de **3** e **4** (300/75 MHz, CD₃OD)



Espectro 30- Expansão do espectro HMBC da mistura de **3** e **4** (300/75 MHz, CD₃OD)

5.1.4- Identificação de (+)-6S-N-óxido dicentrina (5)



O alcaloide **5** foi obtido da fração OAF-ALC G 6 originada a partir dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas e das frações OAF-Ac (B.13, I.4/I.5 e M.15) provenientes dos fracionamentos cromatográficos da fase acetato de etila das folhas (itens 4.2.2.8; 4.3.4.1.3; 4.3.4.2.4 e 4.3.4.4).

O espectro de massas de alta resolução de **5** (Espectro 39) apresentou um íon $[M + H]^+$ a m/z 356,1492, compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{21}O_5N$.

O espectro de RMN 1H de **5** (Espectro 31, tabela 14) apresentou sinais bastante semelhantes aos observados no espectro de **1**, indicando que **5** possuía um esqueleto aporfínico com os mesmos substituintes presentes no de **1**. A principal diferença residia no valor de deslocamento químico do sinal relativo a CH_3-N de **5** (δ 3,19), enquanto que no espectro de **1** este foi observado em δ 2,53.

Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Espectros 32 e 33, tabela 15) de **5** e **1** as principais diferenças foram observadas nos valores de deslocamento químico dos carbonos dos anéis B e C (particularmente os relativos aos carbonos C-5 e C-6a, os quais apresentaram uma desproteção superior a 10 ppm) e do sinal em δ 48,3, este referente à metila ligada ao nitrogênio, cuja correlação com o sinal a δ 3,19 foi observada no espectro HSQC (Espectro 34, tabela 16). No espectro de RMN ^{13}C de **1** este sinal se apresentou em δ 43,9.

Estas alterações nos deslocamentos químicos dos carbonos dos anéis B e C, particularmente, as desproteções de C-5 (+12,8 ppm) e C-6a (+11,9 ppm) e as proteções de C-4 (-2,0 ppm) e C-7 (-6 ppm) quando comparados com os de **1** e ainda a desproteção em

torno de 5,0 ppm da metila ligada ao nitrogênio mostraram-se compatíveis com a quaternização do nitrogênio (MARSAIOLI et al., 1979).

Desta maneira, a diferença estrutural entre os alcaloides **5** e **1** seria a presença de uma função *N*-óxido no esqueleto de **5**. O valor do deslocamento químico dos hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio (δ 3,19) corroborou com esta proposta.

Estas informações indicaram que o alcaloide **5** tratava-se de um *N*-óxido dicentrina.

No espectro HMBC (Espectro 35 e 36, tabela 16) foram observadas correlações intensas do tipo 3J entre os hidrogênios daquela metila ($\text{CH}_3\text{-N}$) e os carbonos 5 (δ 66,4) e 6a (δ 74,3) e também entre H-3 (δ 6,51) e os carbonos C-11c (δ 121,3) e C-4 (δ 27,3), H-8 (δ 6,80) e os carbonos em δ 28,3 (C-7) e em δ 122,4 (C-11a) e entre H-11 (δ 7,60) e os carbonos em δ 125,3 (C-7a) e em δ 117,1 (C-11b).

O sinal positivo da rotação específica de **5** $[\alpha]_D = +32,5$ (MeOH, *c* 0,0008), determinou a configuração absoluta de C-6a como sendo *S* (CAVÉ et al., 1987). Esta informação, aliada às correlações espaciais evidenciadas no espectro NOESY de **5** (Espectros 37 e 38), tais como: entre o hidrogênio pseudo-axial δ 4,54 (H-6a) e os hidrogênios δ 3,69 (H-7eq) e δ 3,68 (H-5b), indicando uma relação *syn* entre eles e entre os hidrogênios da metila (pseudo-axial) ligada ao nitrogênio e o hidrogênio em δ 3,88 (H-5a), indicando que ambos estão do mesmo lado (*syn*), porém anti ao H-6a, definiram a orientação β do grupo metila ligado ao nitrogênio e consequentemente uma orientação α para o oxigênio da função *N*-óxido.

Assim, a estrutura do composto **5** foi definida como sendo (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C desta substância apresentaram uma boa correlação com os descritos na literatura para o *N*-óxido dicentrina obtido como produto de síntese (GUINAUDEAU et al., 1994) e de *Ocotea puberula* (ZANIN & LORDELLO, 2007). No entanto, é importante mencionar que para o isômero levógiro previamente sintetizado (GUINAUDEAU et al., 1994) a configuração do centro *N*-óxido não foi determinado e para *N*-óxido dicentrina obtido a partir de *Ocotea puberula* (ZANIN & LORDELLO, 2007), nenhuma informação foi fornecida sobre a sua rotação específica e orientação do grupo *N*-metila.

Portanto, o isolamento de (+)-*N*-óxido dicentrina apresentando a configuração 6*S* para o *N* está sendo descrita pela primeira vez.

Embora ocorra em espécies de Annonaceae e de outras famílias vegetais GUINAUDEAU et al., 1975; GUINAUDEAU et al., 1979; GUINAUDEAU et al., 1983; GUINAUDEAU et al., 1988), alcaloides *N*-óxidos são incomuns em espécies pertencentes ao gênero *Ocotea*.

Na literatura existem relatos sobre atividades biológicas para o (-)-*N*-óxido dicentrina, tais como: citotóxica *in vitro* contra linhagem de células humanas KB (WU et al., 1989).

Tabela 14- Dados de RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **5** obtido de *O. acutifolia* e do (-)-*N*-óxido dicentrina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1994) [60 MHz, CDCl_3]

H	$\delta ^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	
	(5)	[(-)- <i>N</i> -óxido dicentrina] Lit.
3	6,51 s	6,52 s
4	3,22 m (Ha) 2,94-2,98 m (Hb)	nc
5	3,88 m (Ha) 3,68 m (Hb)	nc
6a	4,54 dd (13,5; 4,5)	nc
7	3,69 dd (13,5; 4,5 Heq) 2,88 tl (13,5 Hax)	nc
8	6,80 s	6,84 s
11	7,60 s	7,60 s
N-CH ₃	3,19 s	3,02 s
9-OCH ₃	3,88 s	3,92 s
10-OCH ₃	3,88 s	3,92 s
OCH ₂ O	5,97 sl; 6,14 sl	5,94 d (2,0); 6,12 d (2,0)

nc: não citado na referência

Tabela 15- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **5** e **1** e do *N*-óxido dicentrina citado na literatura (ZANIN & LORDELLO, 2007) [75 MHz, CDCl_3]

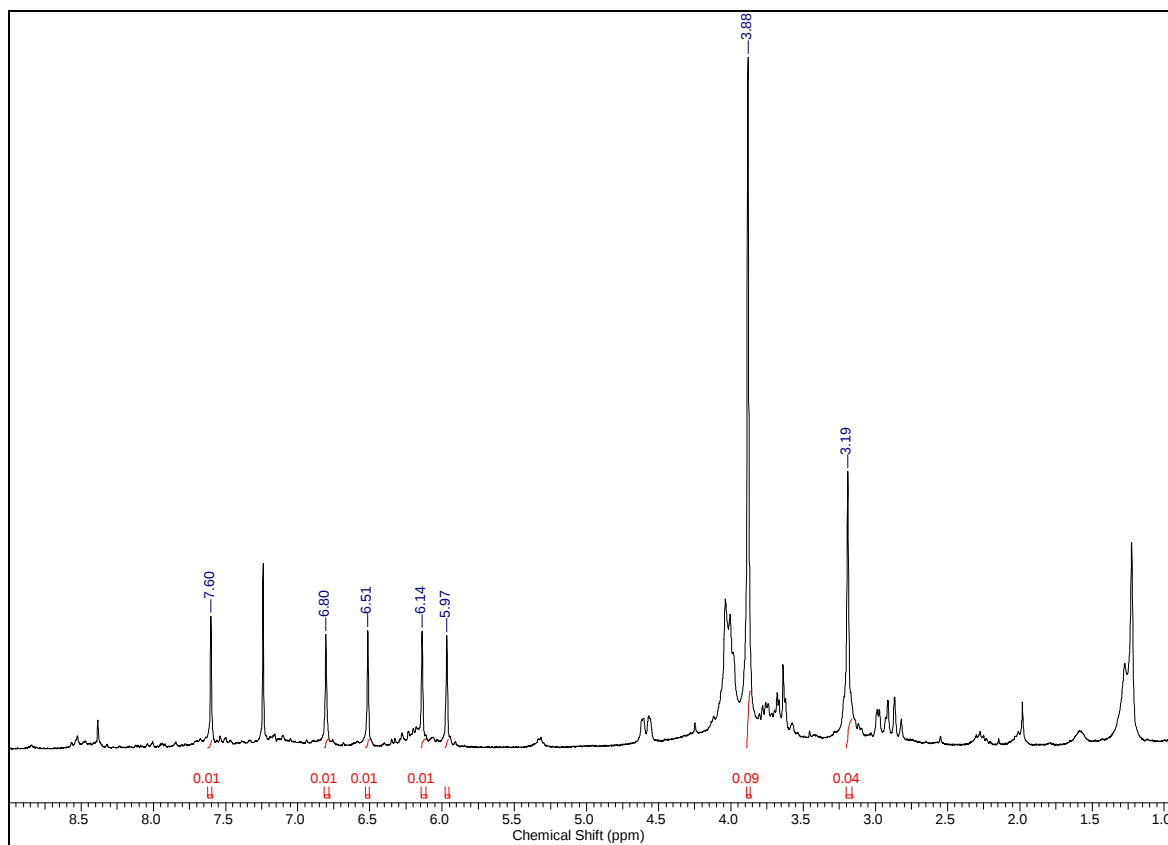
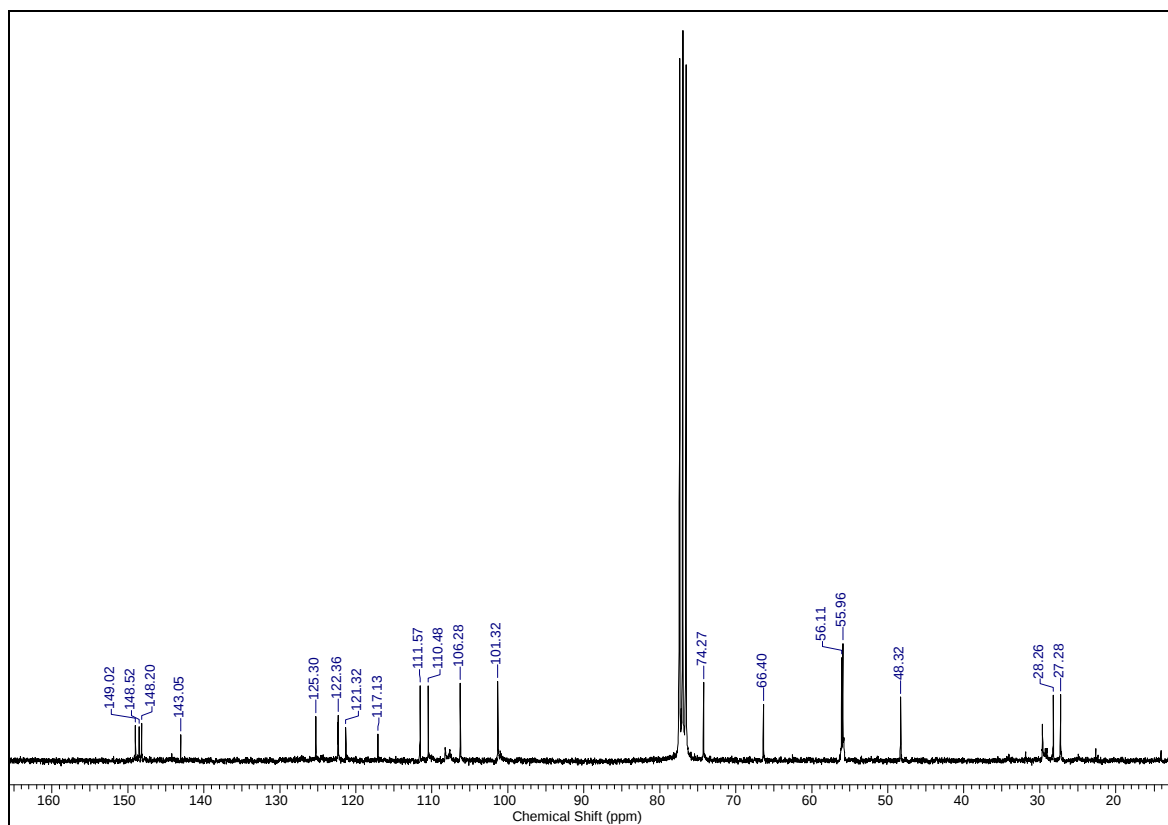
C	(5) $\delta^{13}\text{C}$	(1) $\delta^{13}\text{C}$	(<i>N</i> -óxido dicentrina) $\delta^{13}\text{C}$ Lit.
1	143,1	146,6	143,5
2	148,5	141,8	148,7
3	106,3	106,8	106,5
3a	122,3 ^a	126,6	122,4
4	27,3	29,2	28,5
5	66,4	53,6	65,6
6a	74,3	62,4	73,8
7	28,3	34,2	27,1
7a	125,3	128,4	124,4
8	111,6	111,3	110,8
9	149,0	147,7	149,4
10	148,2	148,3	149,1
11	110,5	110,6	111,8
11a	122,4 ^a	123,6	120,1
11b	117,1	116,6	117,4
11c	121,3	126,5	122,1
N-CH ₃	48,3	43,9	47,6
9-OCH ₃	56,0 ^b	55,9	56,3
10-OCH ₃	56,1 ^b	56,1	56,2
OCH ₂ O	101,3	100,6	100,6

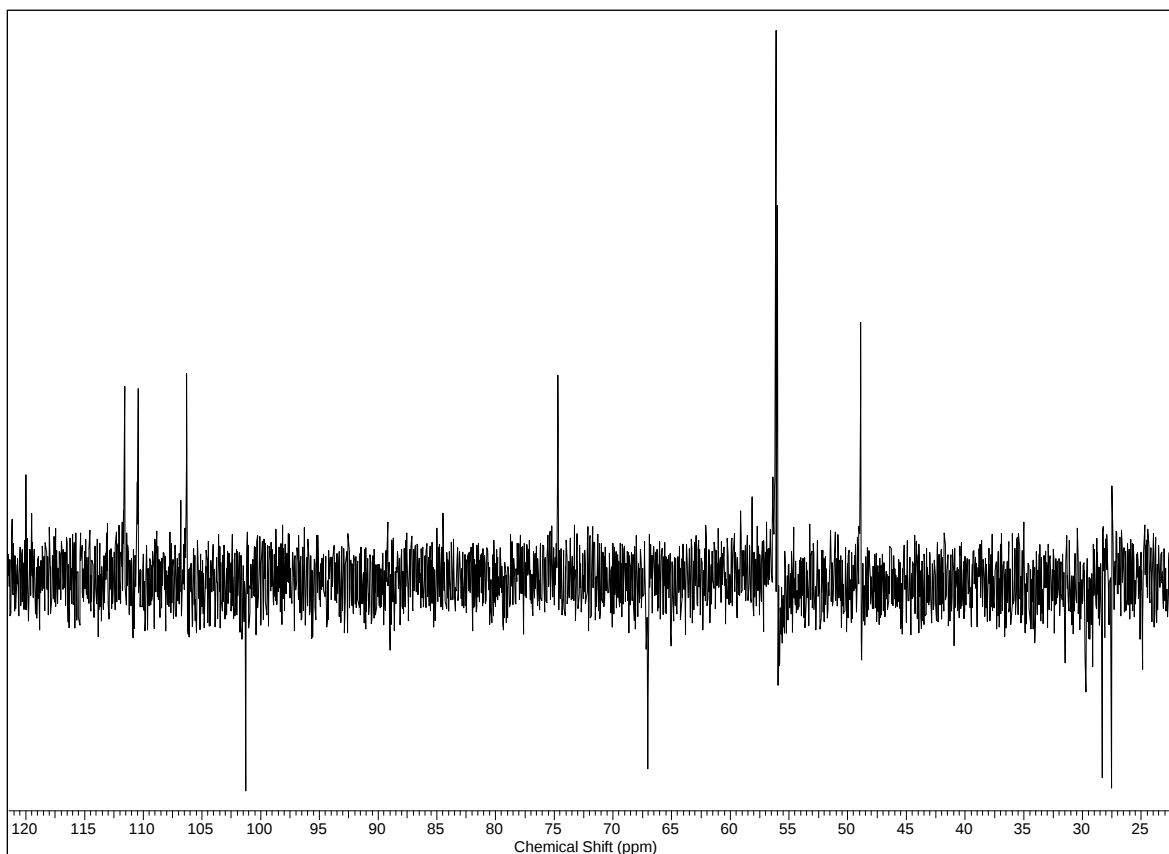
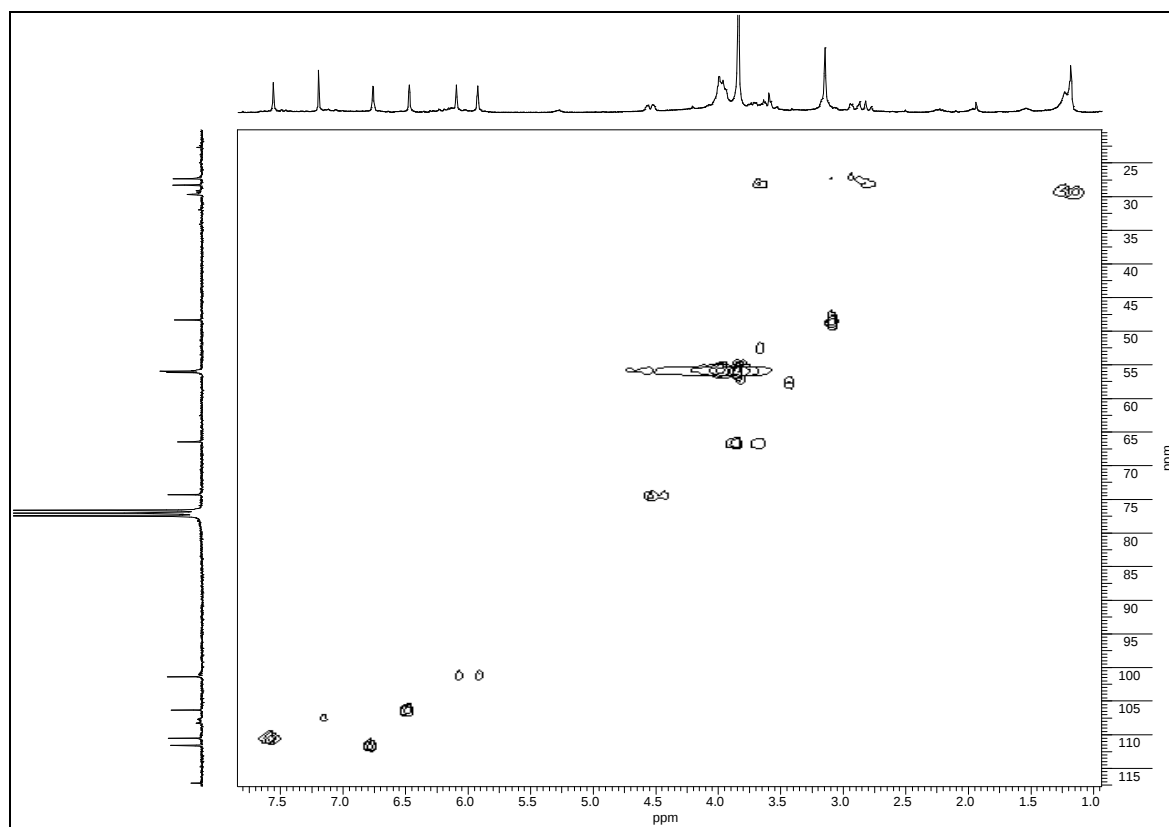
^{a,b} valores que podem estar trocados

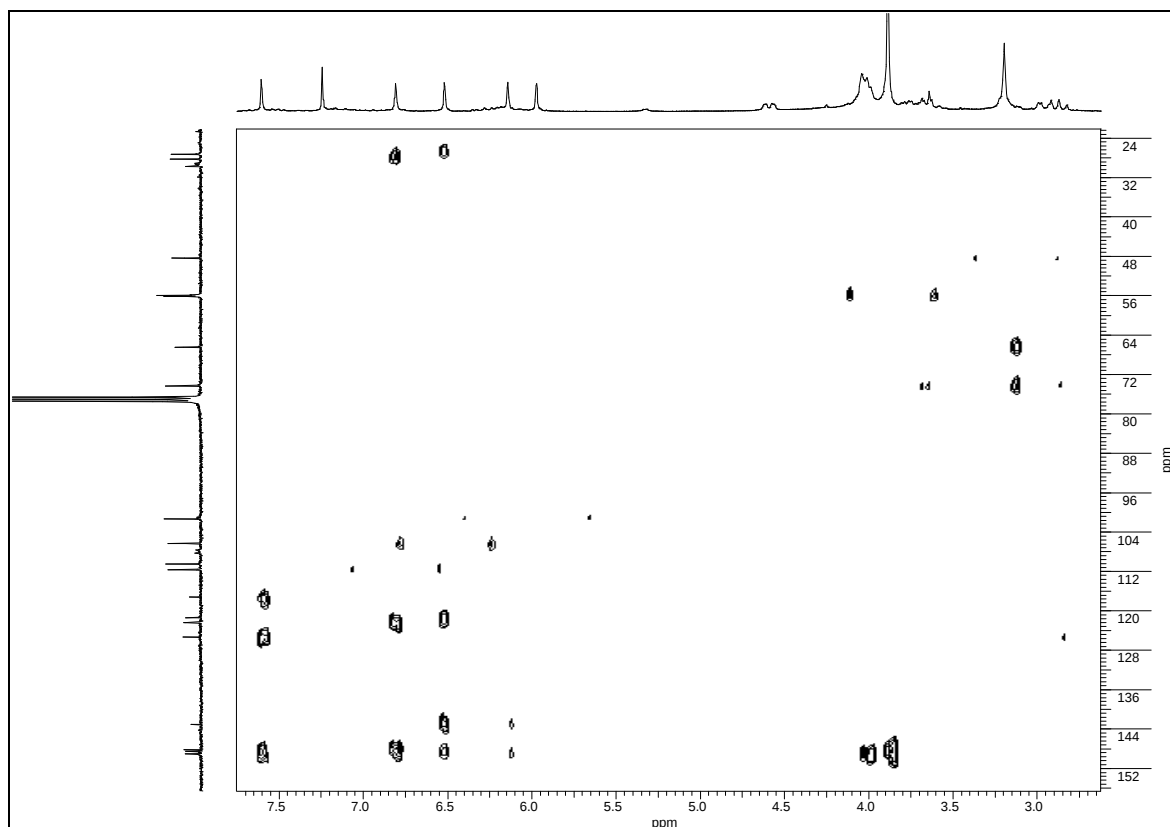
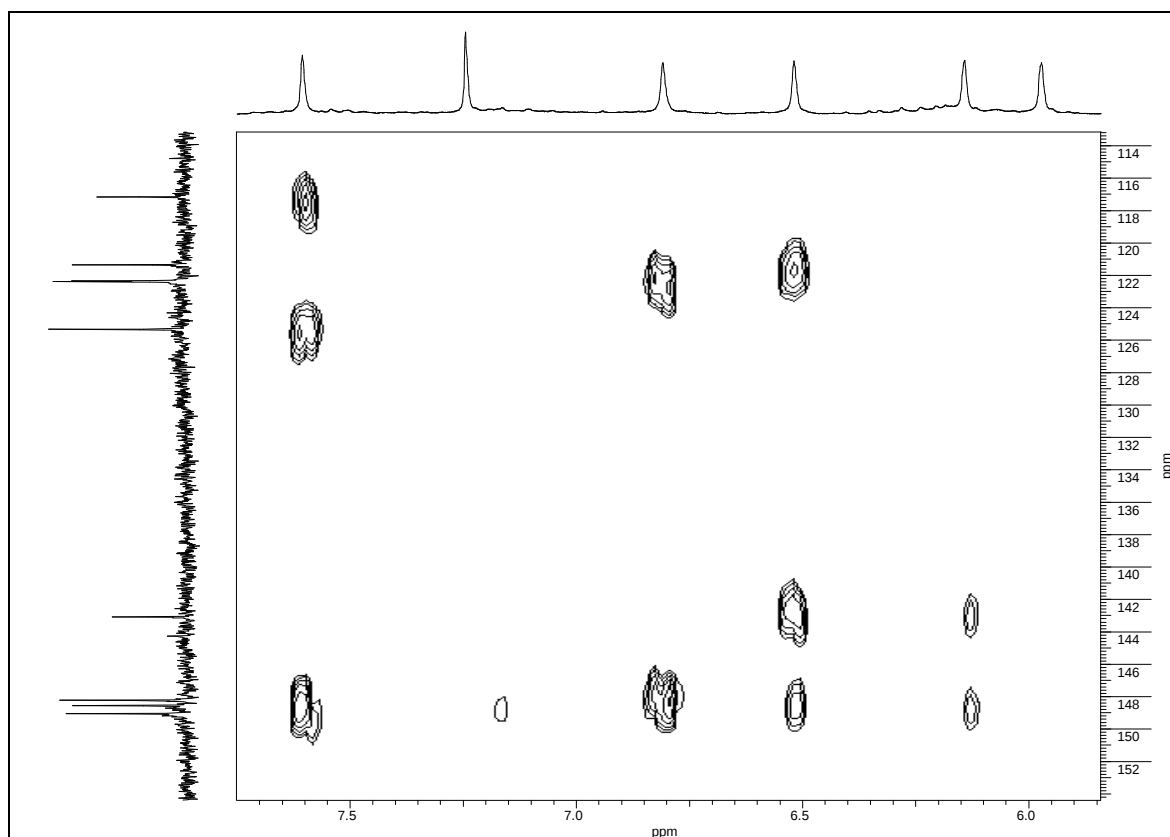
Tabela 16- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de 5 (300/75 MHz, CDCl₃)

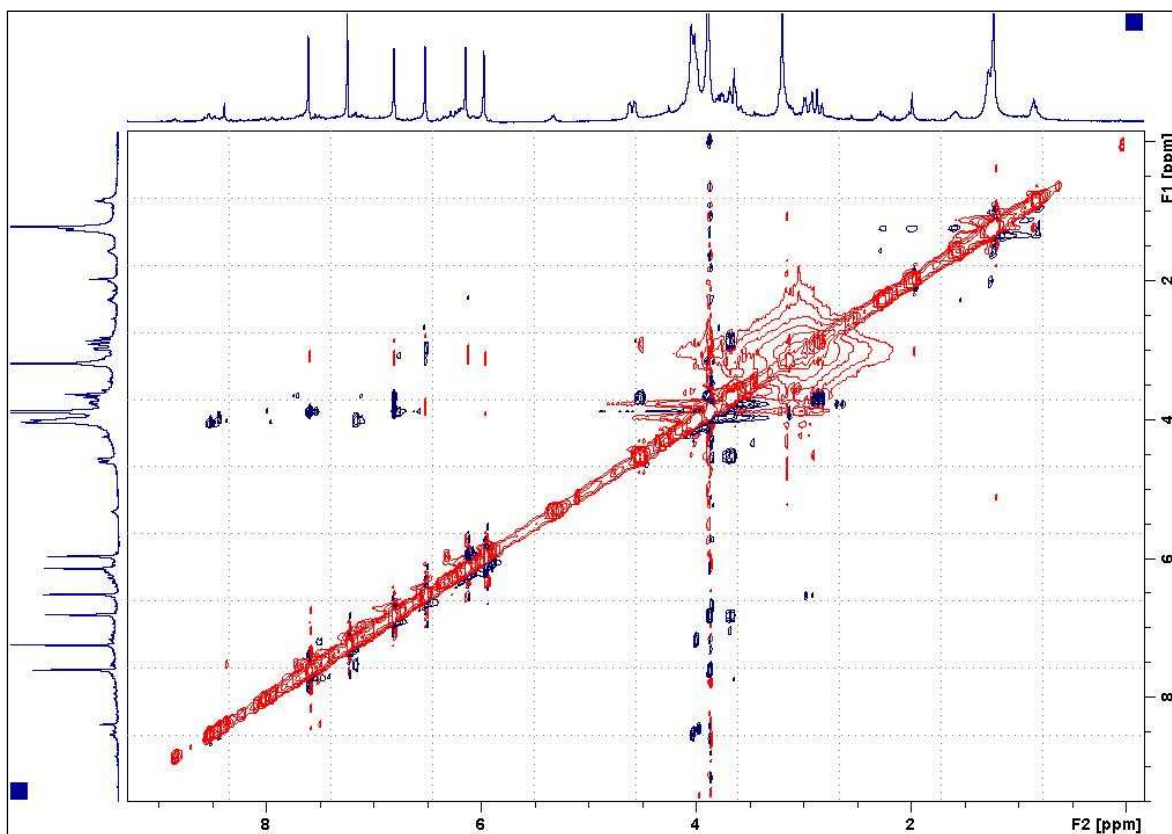
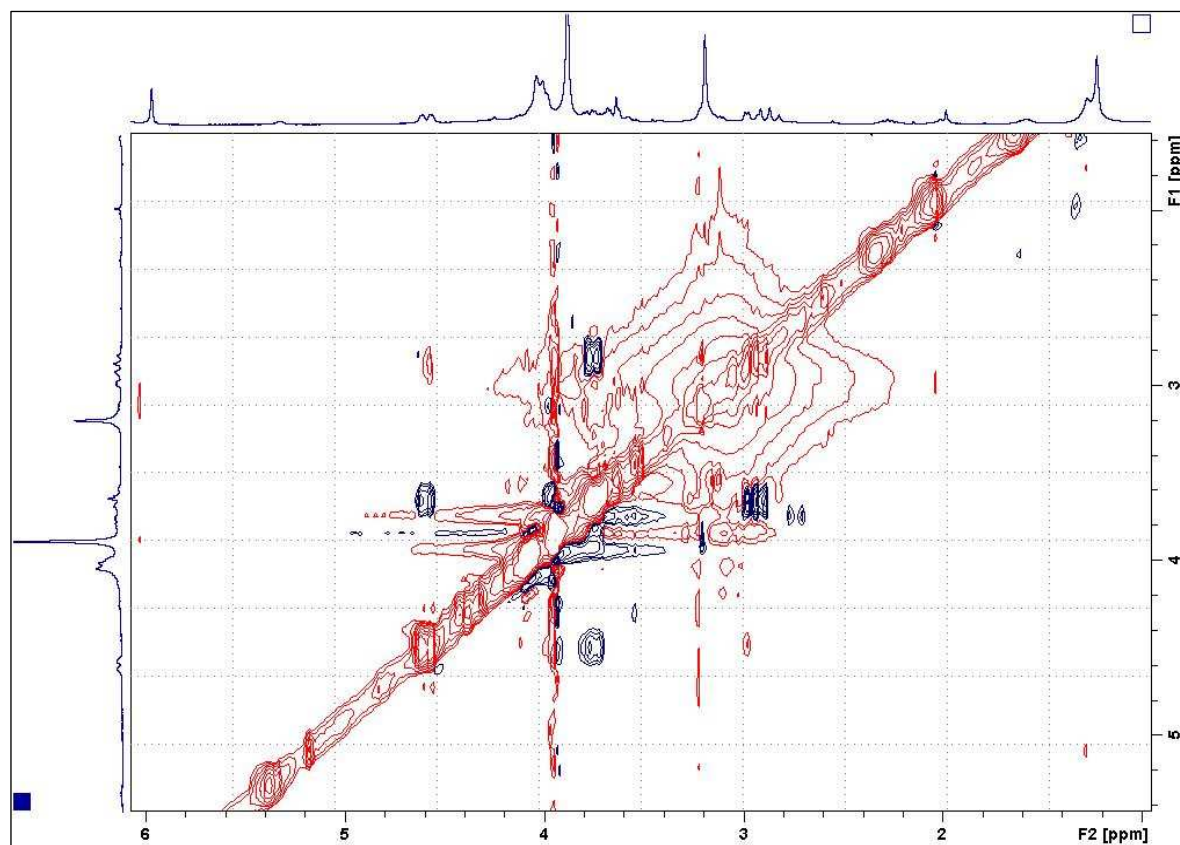
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (5)	HMBC (5)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	106,3	6,51 s	C-1, C-2, C-4, C-11c
4	27,3	3,22 m (Ha)	-
		2,96 m (Hb)	-
5	66,4	3,88 m (Ha)	-
		3,68 m (Hb)	-
6a	74,3	4,54 dd	-
7	28,3	3,69 dd (Heq)	C-6a
		2,88 tl (Hax)	C-6a
8	111,6	6,80 s	C-7, C-9, C-10, C-11a
11	110,5	7,60 s	C-9, C-10, C-11b
N-CH ₃	48,3	3,19 s	C-5, C-6a
9-OCH ₃	56,0 ^a	3,88 s	C-9
10-OCH ₃	56,1 ^a	3,88 s	C-10
OCH ₂ O	101,3	5,97 sl; 6,14 sl	C-1, C-2

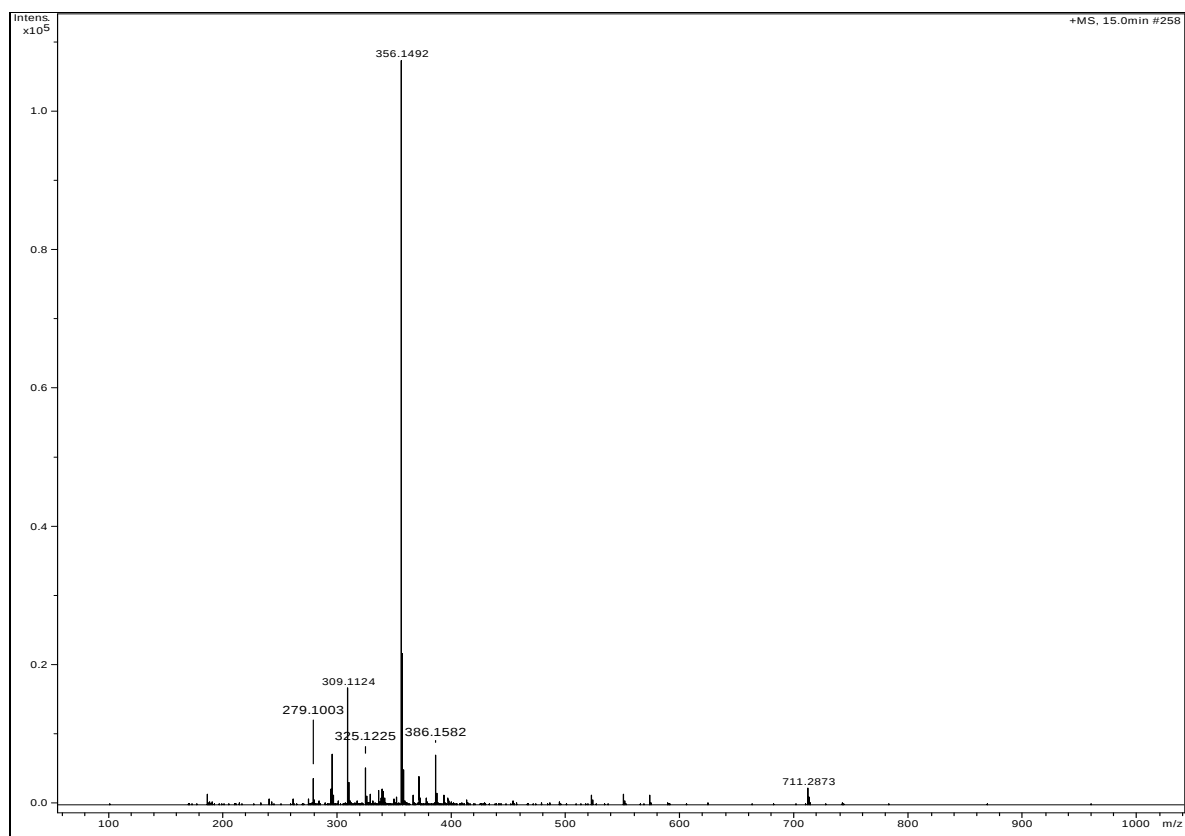
^a valores que podem estar trocados

Espectro 31- RMN ^1H de **5** (300 MHz, CDCl_3)Espectro 32- RMN ^{13}C de **5** (75 MHz, CDCl_3)

Espectro 33- DEPT 135° de 5 (75 MHz, CDCl₃)Espectro 34- Espectro HSQC de 5 (300/75 MHz, CDCl₃)

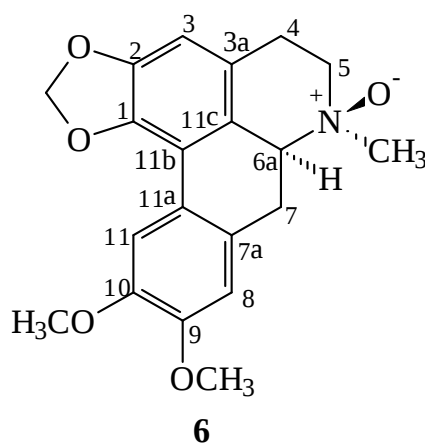
Espectro 35- Espectro HMBC de 5 (300/75 MHz, CDCl_3)Espectro 36- Expansão do espectro HMBC de 5 (300/75 MHz, CDCl_3)

Espectro 37- NOESY de 5 (300 MHz, CDCl₃)Espectro 38- Expansão do espectro NOESY de 5 (300 MHz, CDCl₃)



Espectro 39- Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) de **5** obtido no modo positivo

5.1.5- Elucidação estrutural de (+)-6*R*-*N*-óxido dicentrina (6)



Das frações OAF-Ac (B.13, I.2 e M.15) originadas dos fracionamentos cromatográficos da fase acetato de etila das folhas foi obtido o alcaloide **6** em mistura (capítulo 4, itens 4.3.4.1.3; 4.3.4.2.4 e 4.3.4.4).

Nos espectros da fração OAF-Ac B.13 foi detectada a presença dos compostos **5** e **6**, onde **6** era o componente minoritário. No entanto, após ter sido submetida à técnica de purificação que resultou no isolamento de **5**, obteve-se de **6** na forma pura em quantidade suficiente para a determinação de seu valor de rotação óptica. Sendo assim, a estrutura deste alcaloide foi elucidada com base nos valores de deslocamento químico e multiplicidades dos sinais presentes nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura contendo **5** e **6**.

Os sinais no espectro de RMN ^1H (Espectro 40, tabela 17) atribuídos a **6** mostraram-se bastante semelhantes aos de **5**, indicando que o alcaloide **6** também era do tipo aporfínico com os mesmos substituintes presentes no esqueleto de **5**. A única diferença residia no valor de deslocamento químico do sinal relativo aos hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio ($\text{CH}_3\text{-N}$), que para **6** foi observado em δ 3,44 e para **5** δ 3,19.

No espectro de RMN ^{13}C (Espectros 41-43, tabela 17), auxiliado pelos dados presentes no experimento HSQC (Espectros 44 e 45, tabela 18), os sinais relativos a **6** mostraram boa correlação com os observados no espectro de **5** com alteração significativa apenas no valor referente a $\text{CH}_3\text{-N}$ em δ 58,1 (δ 3,44) que no espectro de **5** foi observado em δ 48,3, compatível com uma inversão na configuração do nitrogênio.

No espectro HMBC (Espectros 46-48, tabela 18) foram observadas correspondências intensas entre os hidrogênios CH₃-N (δ 3,44) e os sinais em δ 65,0 (referente a C-5) e em δ 71,5 (C-6a).

Uma vez que **6** apresentou, da mesma forma que **5**, um valor positivo de rotação óptica $[\alpha]_D = +16,9$ (MeOH, *c* 0,00045) no entanto, no experimento NOESY (Espectros 49 e 50) apresentou uma correlação entre os hidrogênios da metila pseudo-equatorial ligada ao nitrogênio (δ 3,44) e o hidrogênio pseudo-axial H-6a (δ 4,34), chegou-se a conclusão que a diferença estrutural entre ambos residia unicamente na configuração do nitrogênio.

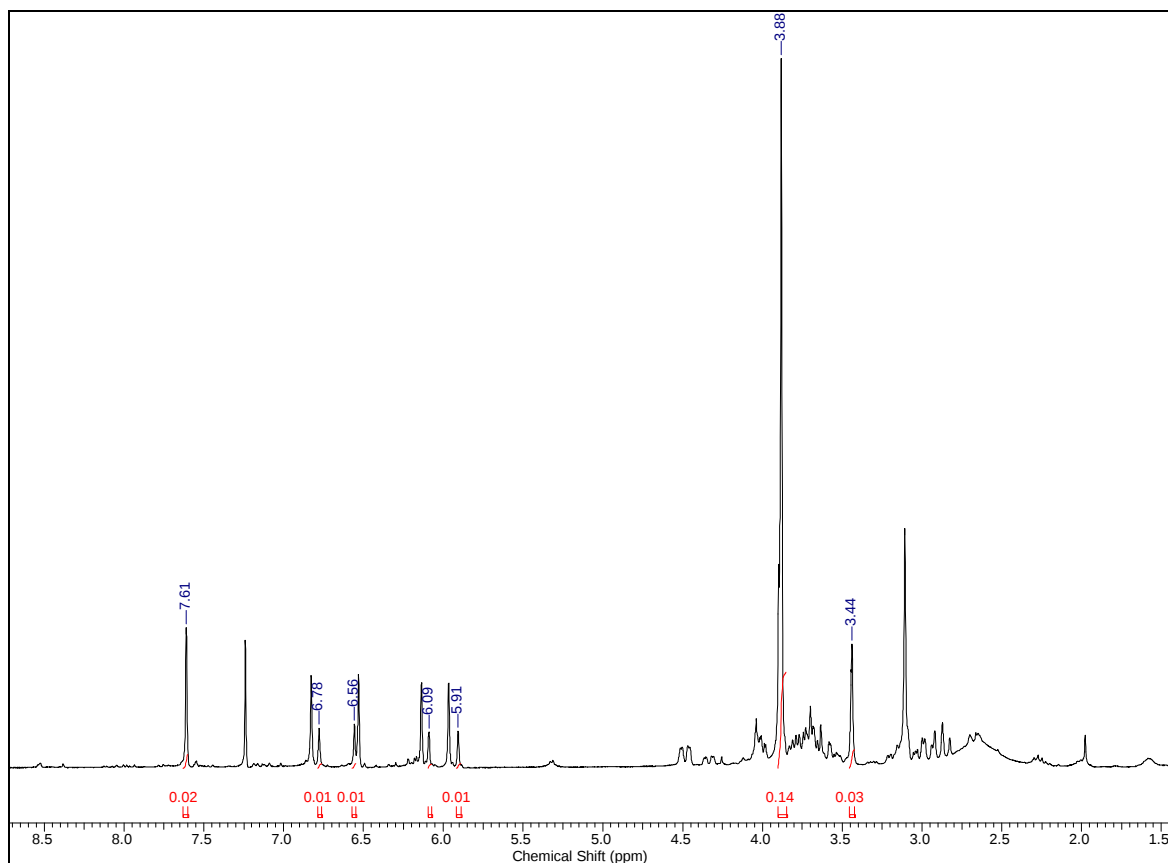
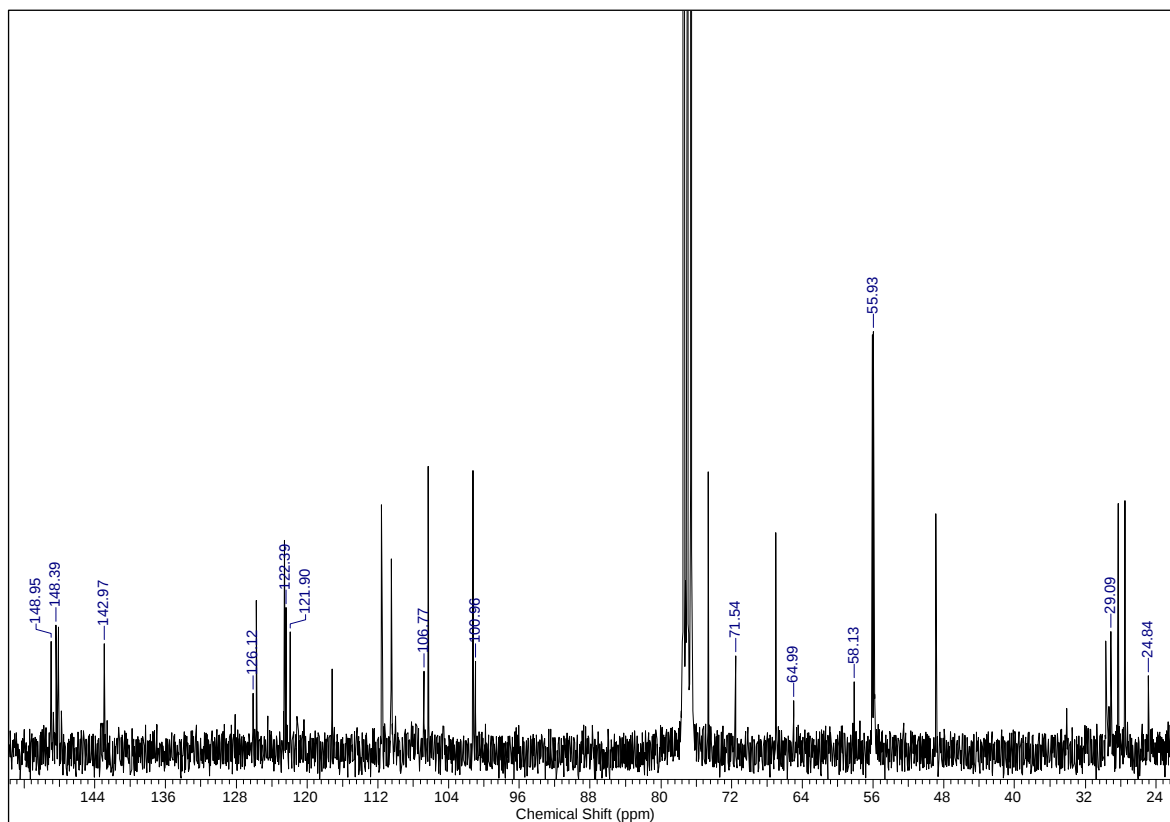
Desta forma, o alcaloide **6** foi caracterizado como (+)-6*R*-*N*-óxido dicentrina. Na literatura existem relatos para o isômero levógiro, porém para **6** não há informações sobre os seus dados de RMN ¹³C e nenhuma informação com relação a orientação do grupo *N*-metila (LU & WU, 1985). Portanto os dados de RMN ¹³C de **6** são apresentados pela primeira vez no presente trabalho, assim como a configuração 6*R* para o nitrogênio.

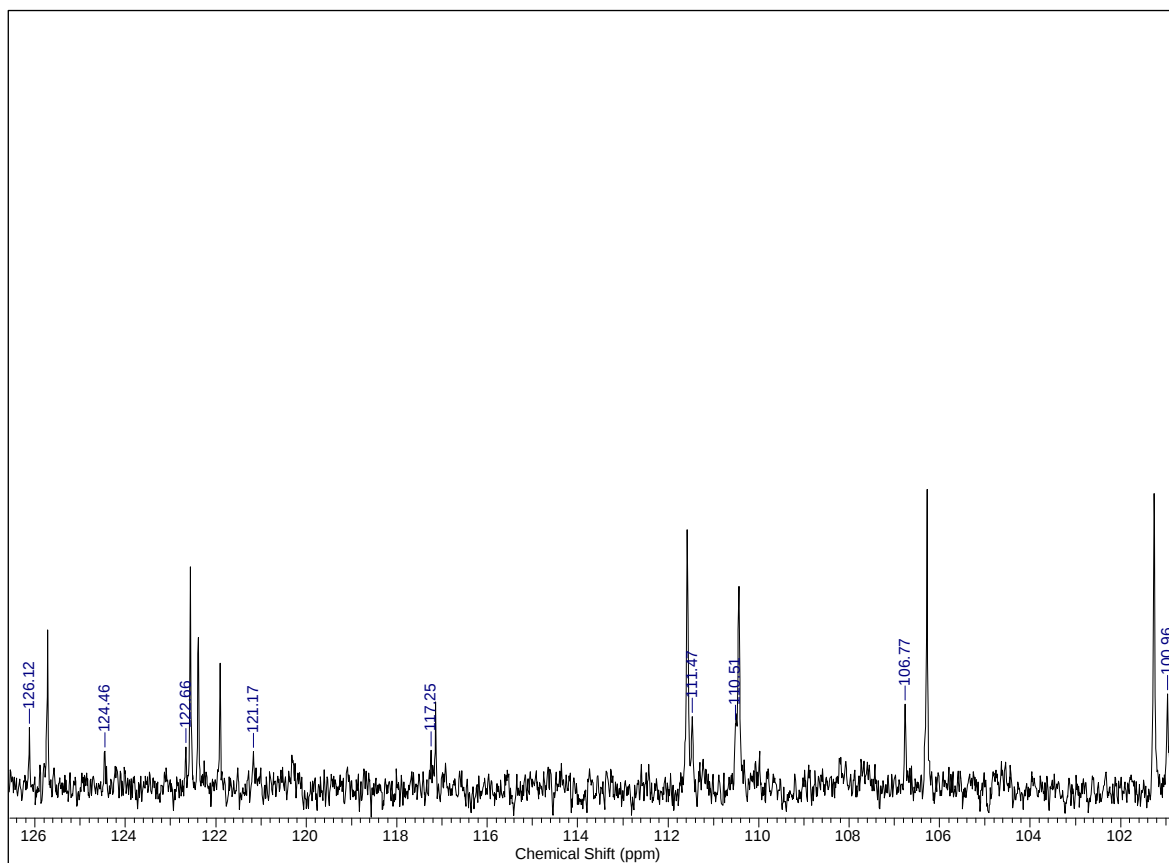
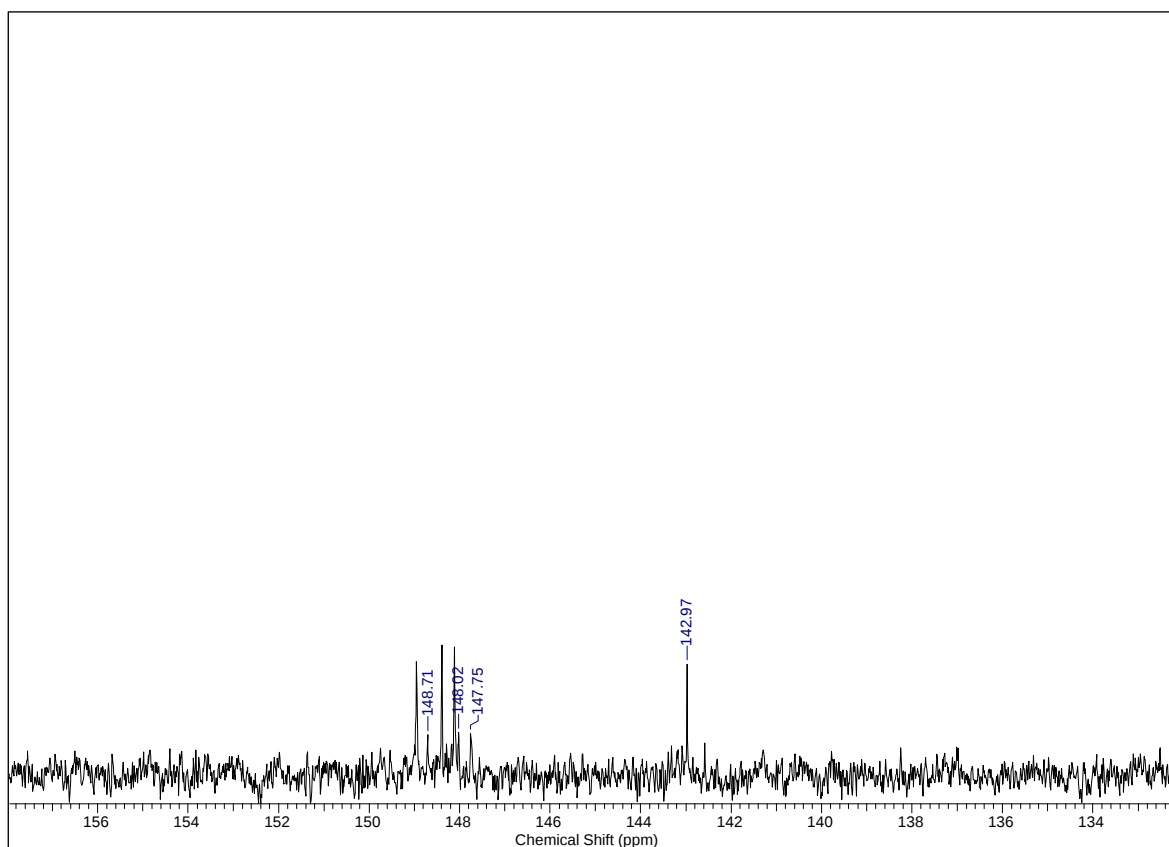
Tabela 17- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **6** e dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **5**

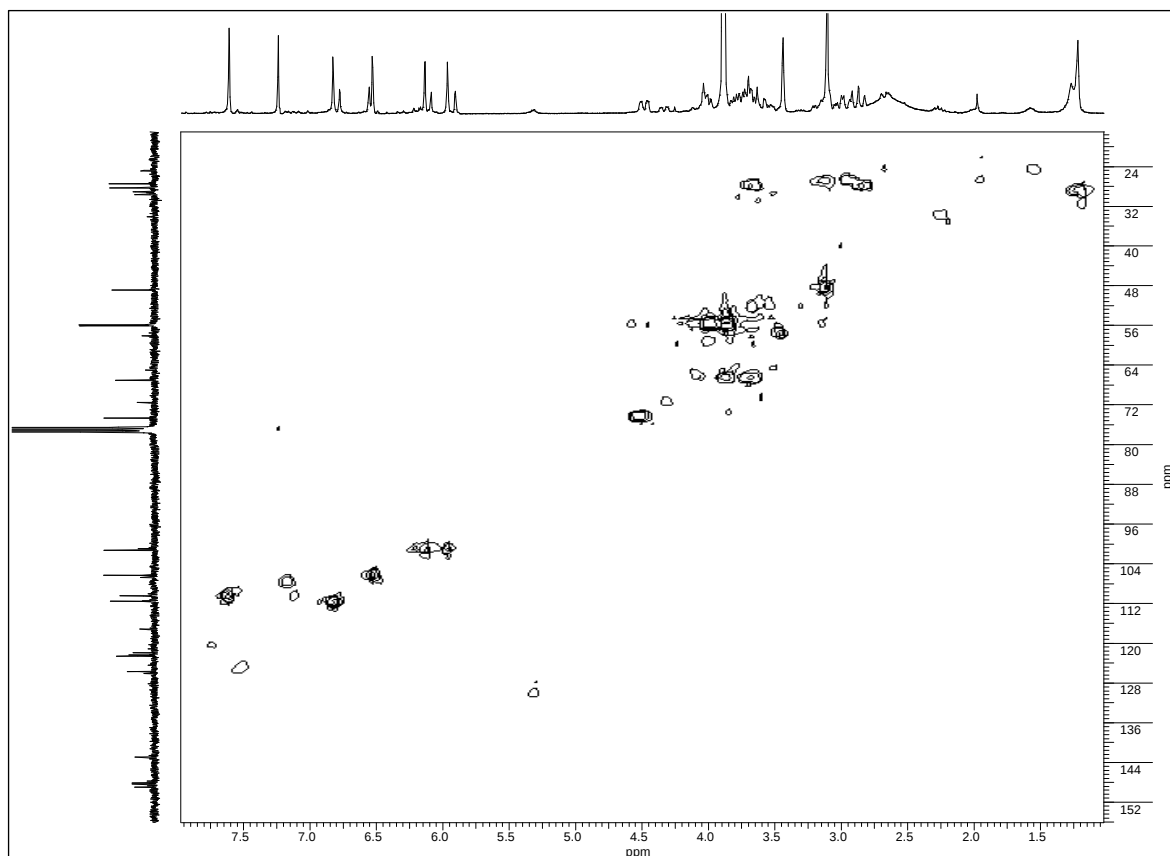
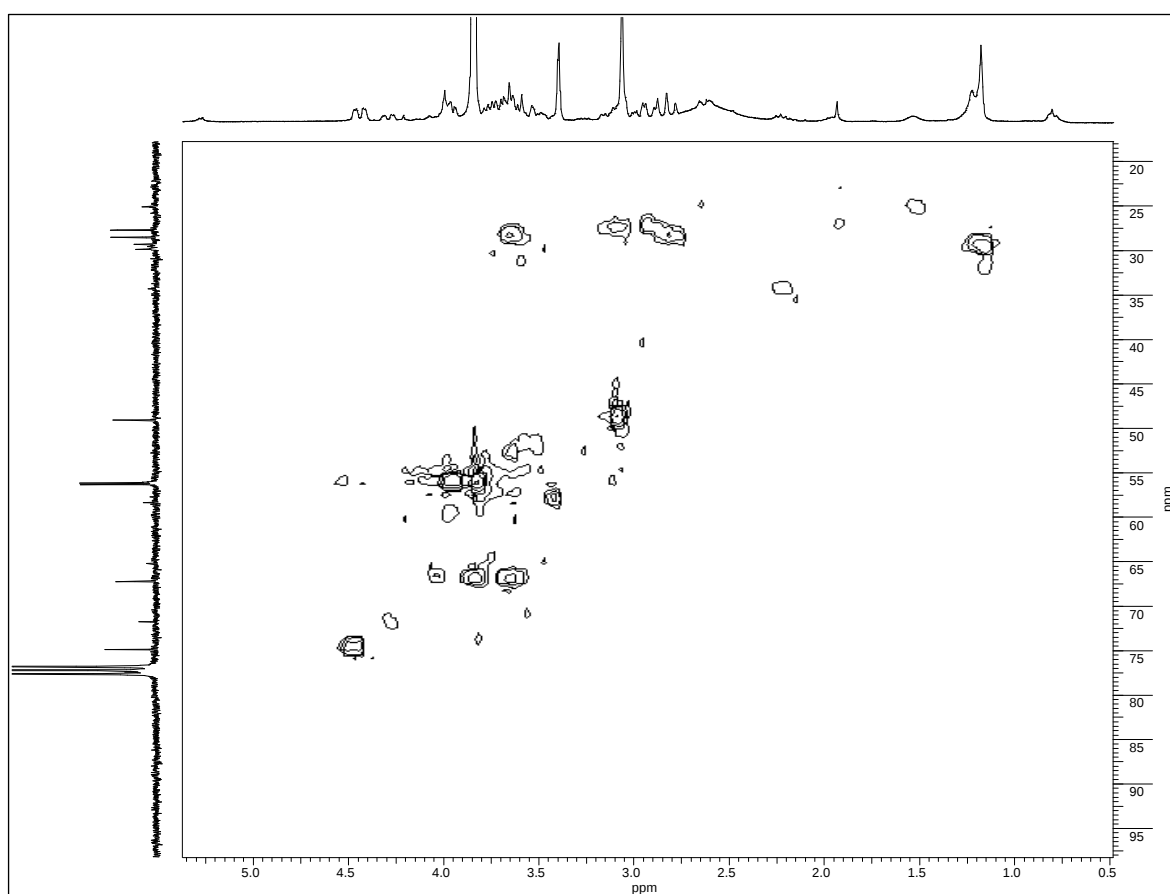
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(6)	(5)
		$\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$
1	142,6	-	143,1
2	148,0	-	148,5
3	106,8	6,56 s	106,3
3a	122,7	-	122,3
4	24,8	2,72-2,82 m (Ha, Hb)	27,3
5	65,0	3,83-3,77 m (Ha) 3,17 m (Hb)	66,4
6a	71,5	4,34 dd (12,0; 3,0)	74,3
7	29,1	3,61-3,51 m (Ha, Hb)	28,3
7a	126,1	-	125,3
8	111,5	6,78 s	111,6
9	148,7	-	149,0
10	147,8	-	148,2
11	110,5	7,61 s	110,5
11a	124,5	-	122,4
11b	117,3	-	117,3
11c	121,2	-	121,3
N-CH ₃	58,1	3,44 s	48,3
9-OCH ₃	56,0	3,88 s	56,0
10-OCH ₃	56,0	3,88 s	56,1
OCH ₂ O	101,0	5,91 sl; 6,09 sl	101,3

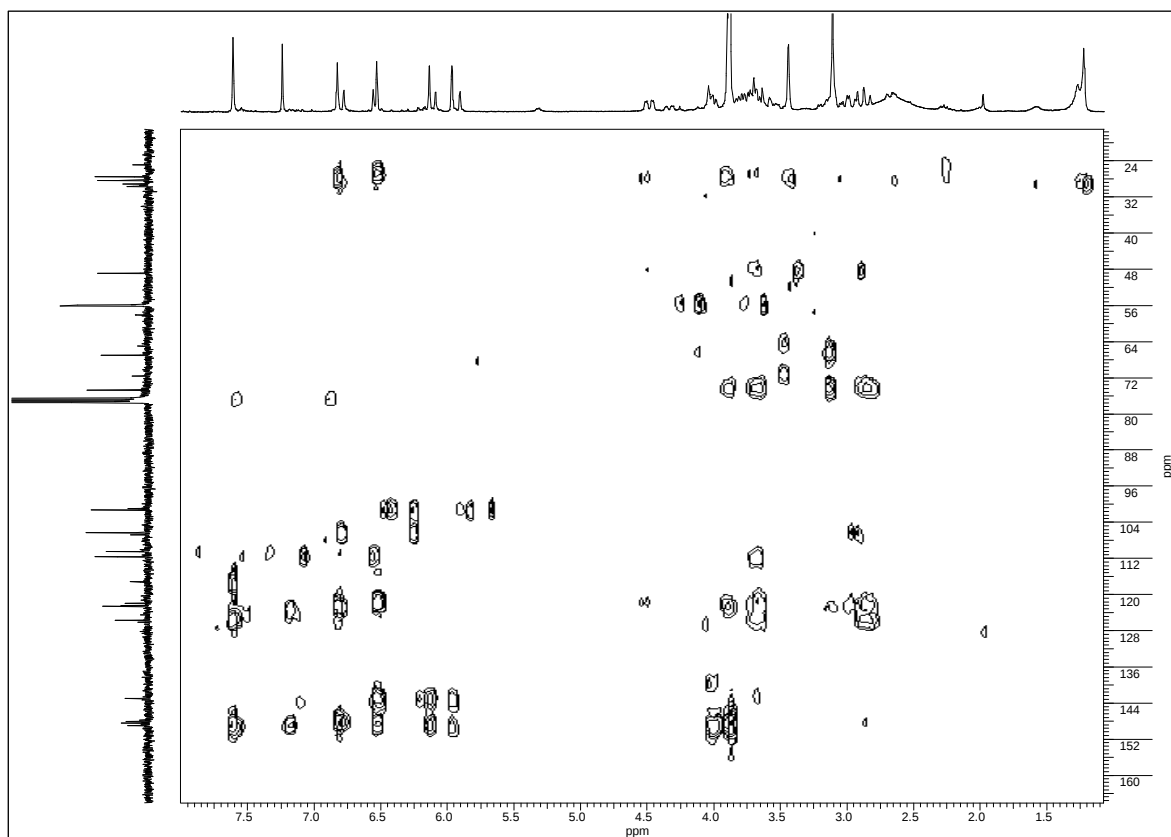
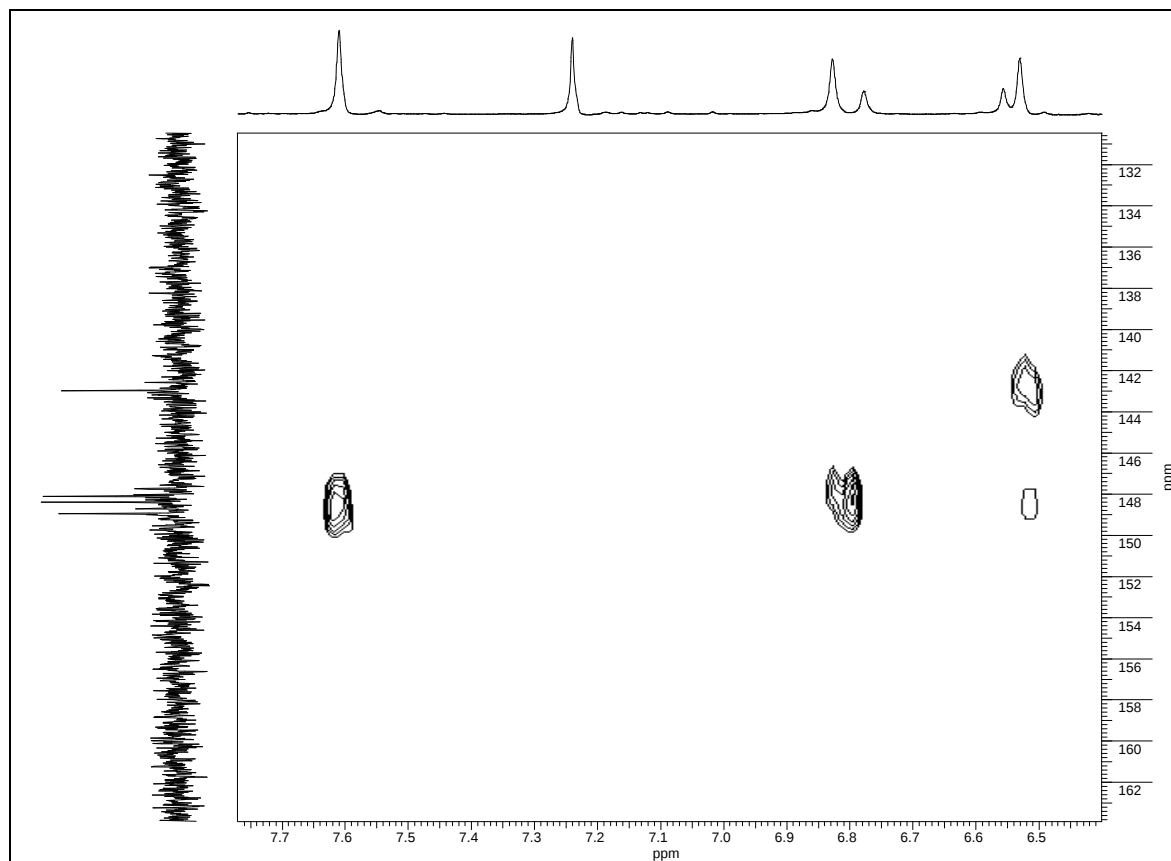
Tabela 18- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **6** (300/75 MHz, CDCl₃)

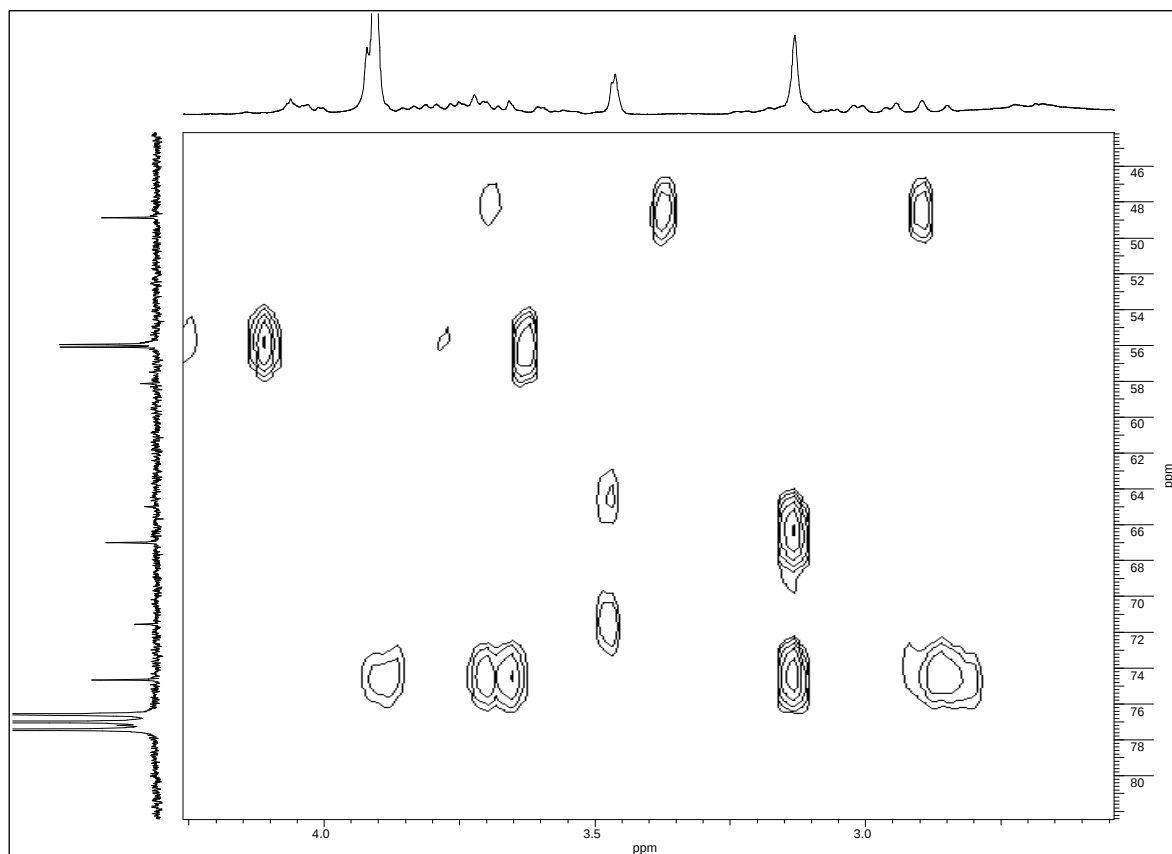
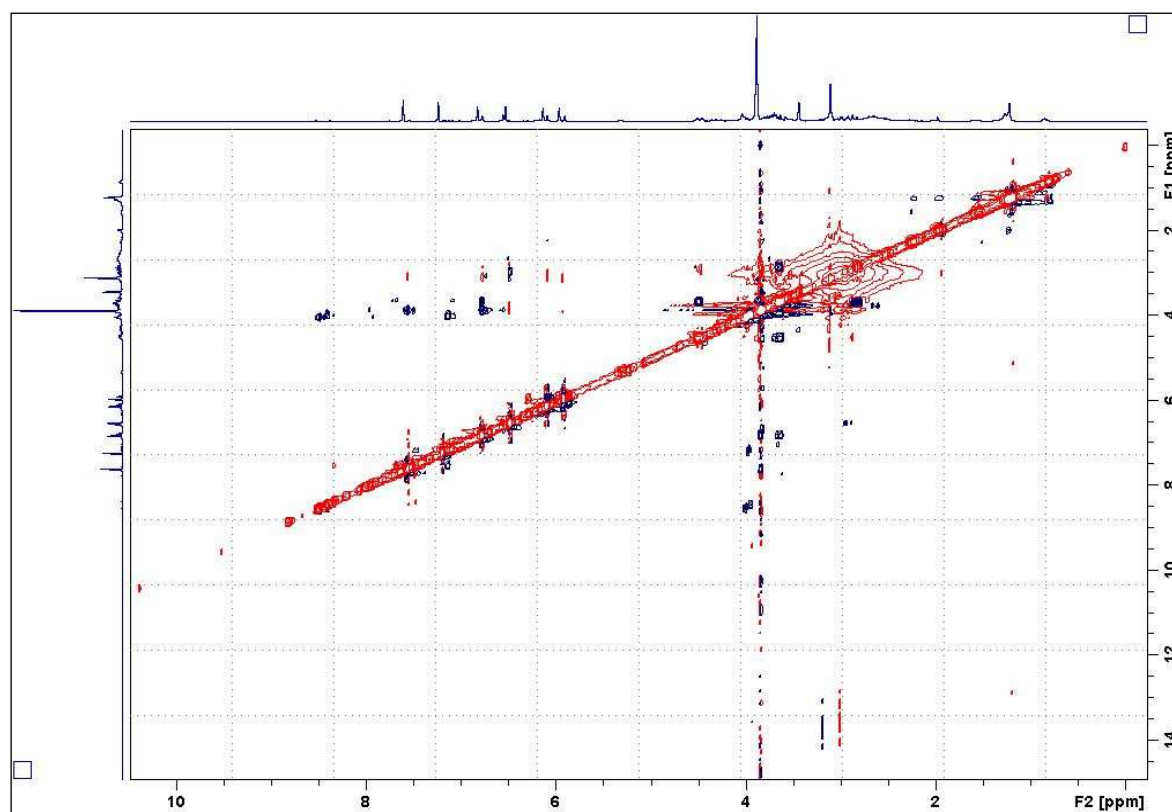
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (6)	HMBC (6)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	106,8	6,56 s	-
4	24,8	2,72-2,82 m (Ha, Hb)	-
5	65,0	3,83-3,77 m (Ha)	-
		3,17 m (Hb)	-
6a	71,5	4,34 dd (12,0; 3,0)	-
7	29,1	3,61-3,51 m (Ha, Hb)	C-11a, C-11c
8	111,5	6,78 s	C-7, C-9, C-10, C-11 ^a
11	110,5	7,61 s	C-9, C-10
N-CH ₃	58,1	3,44 s	C-5, C-6 ^a
9-OCH ₃	56,0	3,88 s	C-9
10-OCH ₃	56,0	3,88 s	C-10
OCH ₂ O	101,0	5,91 sl; 6,09 sl	C-1, C-2

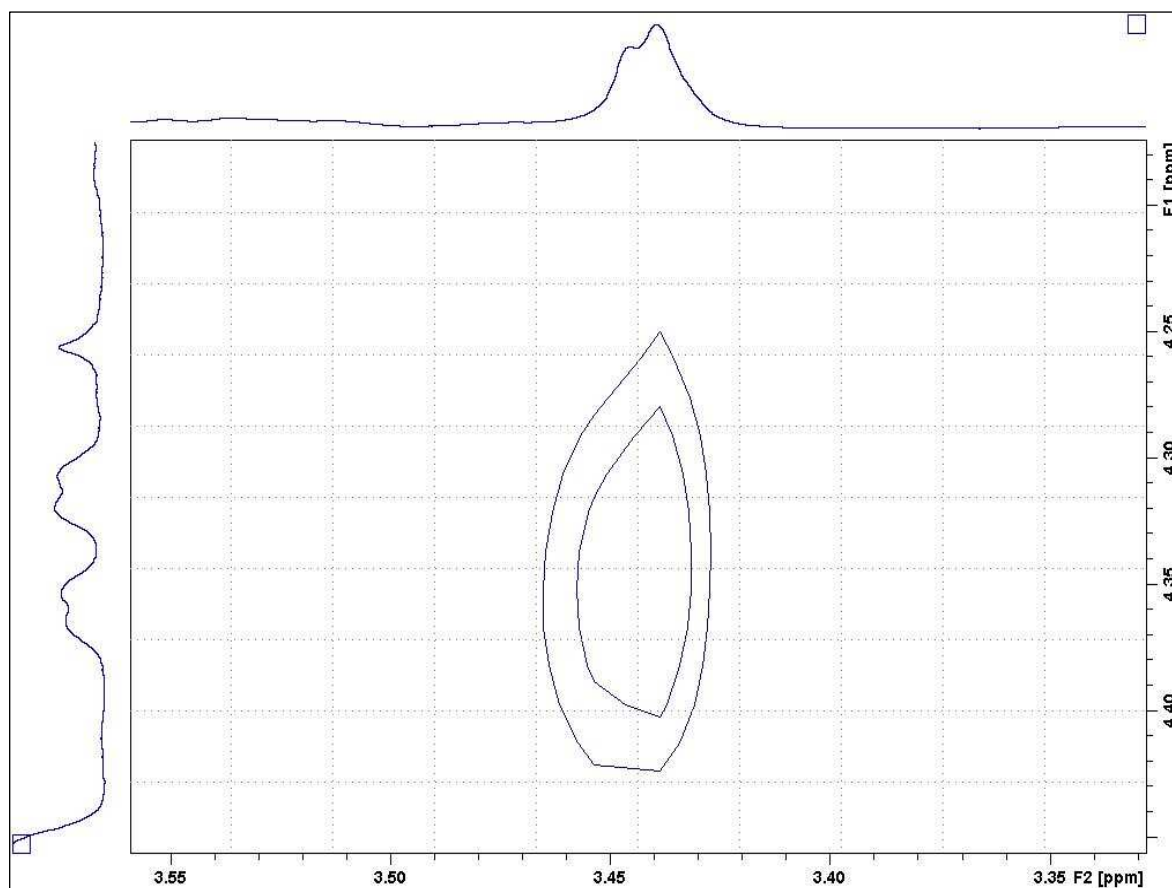
Espectro 40- RMN ^1H da mistura de **6** e **5** (300 MHz, CDCl_3)Espectro 41- RMN ^{13}C da mistura de **6** e **5** (75 MHz, CDCl_3)

Espectro 42- Expansão do espectro RMN ^{13}C da mistura de **6** e **5** (75 MHz, CDCl_3)Espectro 43- Expansão do espectro RMN ^{13}C da mistura de **6** e **5** (75 MHz, CDCl_3)

Espectro 44- Espectro HSQC da mistura de **6** e **5** (300/75 MHz, CDCl₃)Espectro 45- Expansão do espectro HSQC da mistura de **6** e **5** (300/75 MHz, CDCl₃)

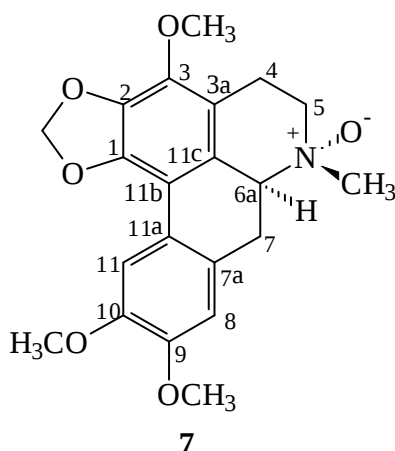
Espectro 46- Espectro HMBC da mistura de **6** e **5** (300/75 MHz, CDCl₃)Espectro 47- Expansão do espectro HMBC da mistura de **6** e **5** (300/75 MHz, CDCl₃)

Espectro 48- Expansão do espectro HMBC da mistura de **6** e **5** (300/75 MHz, CDCl₃)Espectro 49- NOESY da mistura de **6** e **5** (75 MHz, CDCl₃)



Espectro 50- Expansão do espectro NOESY da mistura de **6** e **5** (75 MHz, CDCl₃)

5.1.6- Elucidação estrutural de (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (7)



Das frações OAF-ALC G 2 e 3 provenientes dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas e das frações OAF-Ac (D.3, G.5, G.8, H.4, I.2, M.14 e M.15) obtidas a partir dos fracionamentos cromatográficos da fase acetato de etila das folhas, foi isolado o composto 7 (itens 4.2.2.8; 4.3.4.1.2; 4.3.4.2.2; 4.3.4.2.3; 4.3.4.2.4 e 4.3.4.4).

O espectro de RMN ^1H de 7 (Espectro 51, tabela 19) apresentou sinais praticamente idênticos aos presentes no espectro de 2, entretanto, o valor de deslocamento químico do sinal relativo a Me-N para 7 foi observado em δ 3,34, e para 2 em δ 2,43.

Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Espectros 52 e 53, tabela 19) de 7 as principais diferenças com relação aos de 2 foram observadas nos valores de deslocamento químico dos carbonos dos anéis B/C, particularmente C-5 e C-6a, os quais apresentaram uma desproteção superior a 10 ppm e do sinal atribuído a metila ligada ao nitrogênio (δ 48,2), cuja correlação com o sinal a δ 3,34 foi observada no espectro HSQC (Espectro 54, tabela 20). No espectro de RMN ^{13}C de 2 este sinal se apresentou em δ 43,3.

No espectro HMBC (Espectros 55-57, tabela 20) foi possível observar as correlações entre os hidrogênios daquela metila e os carbonos referentes aos sinais em δ 66,3 (C-5) e δ 74,1 (C-6a).

Estas alterações nos deslocamentos químicos dos carbonos dos anéis B e C, ou seja, as desproteções de C-5 (+13,1 ppm) e C-6a (+11,5 ppm) quando comparados com os de 2 e ainda a desproteção de 4,9 ppm da metila ligada ao nitrogênio, foram compatíveis com a presença de um oxigênio ligado ao nitrogênio no alcaloide 7 (MARSIAOLI et al.,

1979). Da mesma maneira, um efeito γ significativo sobre a ressonância de C-7 (δ 28,3), causado pela presença da função *N*-óxido, reforçou esta proposta. Esta, portanto seria a única diferença estrutural entre os alcaloides 7 e 2, tal como a existente entre os alcaloides 5 e 1.

O espectro de massas de alta resolução de 6 (Espectro 59) obtido por ionização por eletrospray em modo negativo apresentou um íon a m/z 420,1249 $[(M+Cl)^-]$ compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{23}O_6N$, confirmando a presença de mais um oxigênio na estrutura de 7 em relação ao alcaloide 2.

Com base nestas informações e ainda, com o valor positivo de rotação óptica obtido para 7 ($[\alpha]_D + 35,0$, MeOH, c 0,001), a estrutura deste alcaloide foi definida como (+)-*N*-óxido ocoteína.

No experimento NOESY (Espectro 58) de 7 foram observadas correlações entre o hidrogênio pseudo-axial δ 4,81 (H-6a) e os hidrogênios δ 3,61 (H-7eq) e δ 3,96 (H-5ax), indicando que estes estão em posição *syn*. Da mesma forma observaram-se correlações entre os hidrogênios Me-N (δ 3,34) e os hidrogênios δ 2,91 (H-7ax) e δ 4,32 (H-5eq), indicando a relação *syn* entre eles. Portanto, a metila ligada ao nitrogênio estaria localizada espacialmente do lado oposto (*anti*) a H-6a, definindo a configuração do nitrogênio com sendo *S*.

Assim, o composto 7 foi identificado como (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína. Até o momento, não foi encontrado na literatura nenhum relato sobre esta substância, tratando-se, portanto, de um alcaloide inédito.

A atribuição inequívoca dos valores de deslocamento químico dos carbonos de 7 foi realizada em função das informações fornecidas pelos espectros de HSQC e/ou HMBC sendo relacionada na tabela 20.

Tabela 19- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de 7 e dados de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) de 2

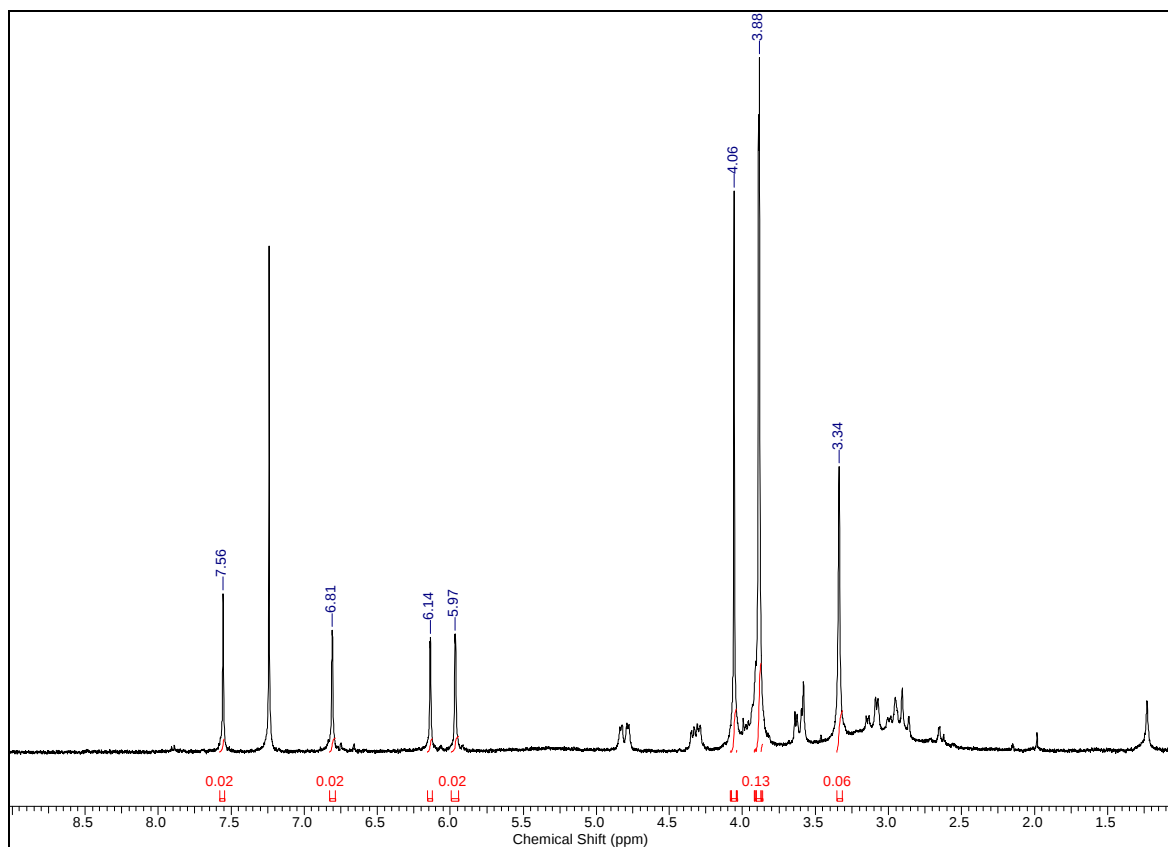
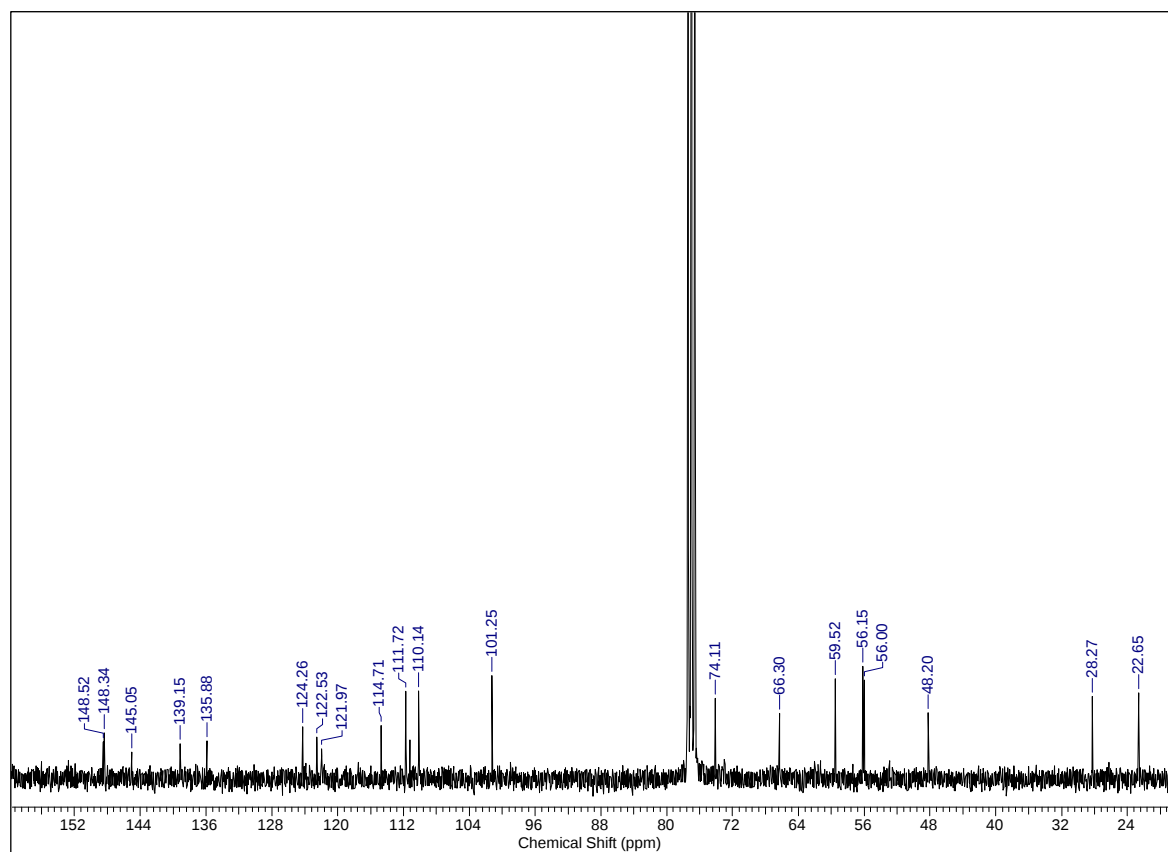
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(7)	(2)
		$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$
1	145,1	-	143,5
2	136,0	-	135,0
3	139,2	-	139,3
3a	114,7	-	119,3
4	22,7	3,11 ddl (18,0; 6,0 Ha) 2,95 m (Hb)	23,6
5	66,3	4,32 ddl (13,5; 4,5 Heq) 3,96 m (Hax)	53,2
6a	74,1	4,81 dd (16,0; 4,5)	62,6
7	28,3	3,61 dd (16,0; 4,5 Heq) 2,91 tl (16,0; 16,0 Hax)	33,8
7a	124,3	-	128,1
8	111,7	6,81 s	112,2
9	148,5	-	148,5
10	148,3	-	148,1
11	110,1	7,56 s	111,2
11a	122,5	-	123,6
11b	111,3	-	111,2
11c	122,0	-	127,9
N-CH ₃	48,2	3,34 s	43,3
3-OCH ₃	59,6	4,06 s	58,8
9-OCH ₃	56,2 ^a	3,88 s	55,6 ^b
10-OCH ₃	56,0 ^a	3,88 s	55,3 ^b
OCH ₂ O	101,3	5,97 sl; 6,14 sl	100,8

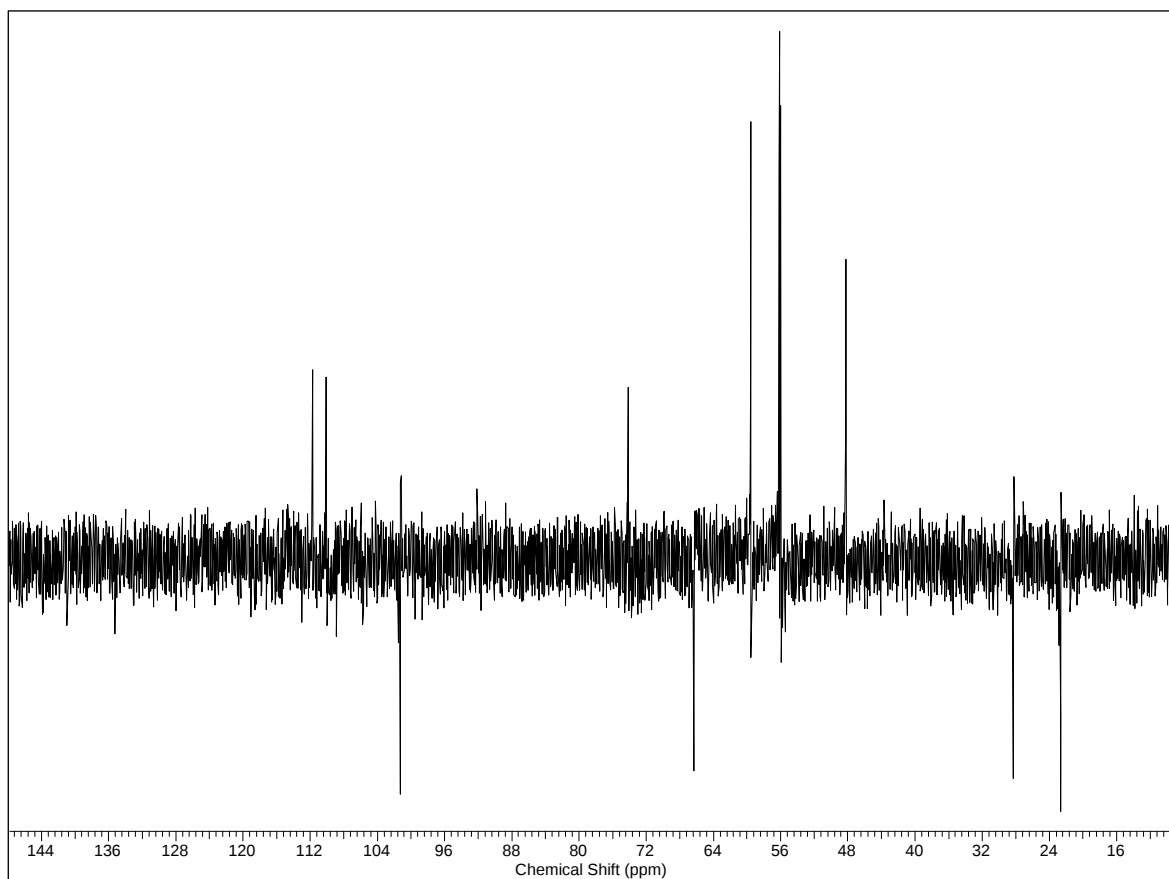
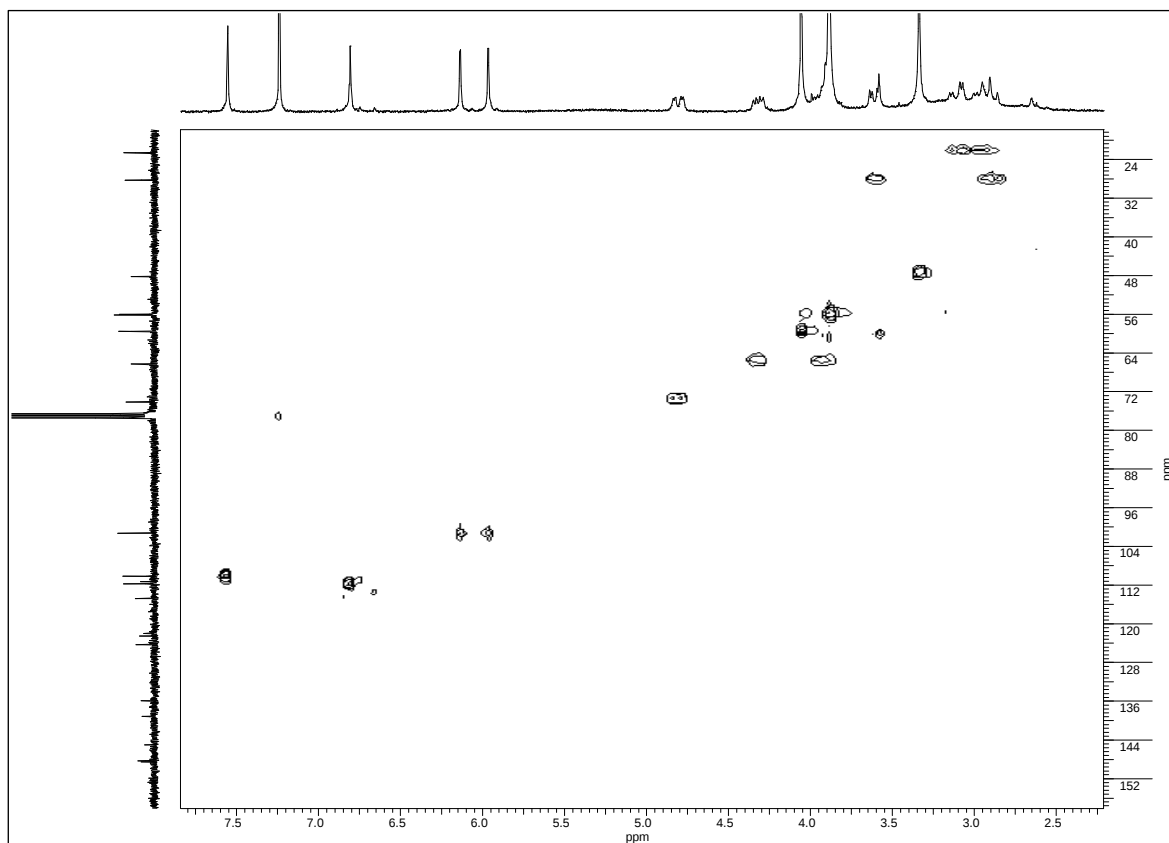
^{a,b} valores que podem estar trocados

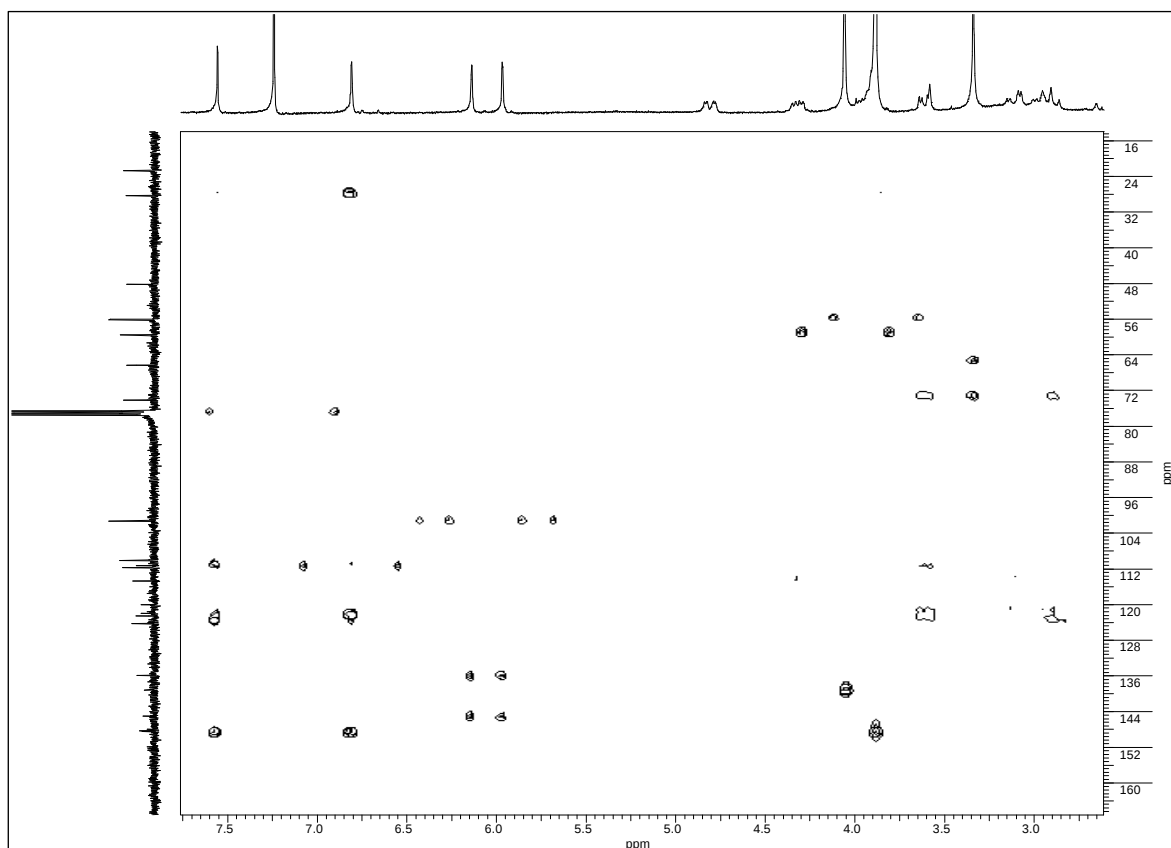
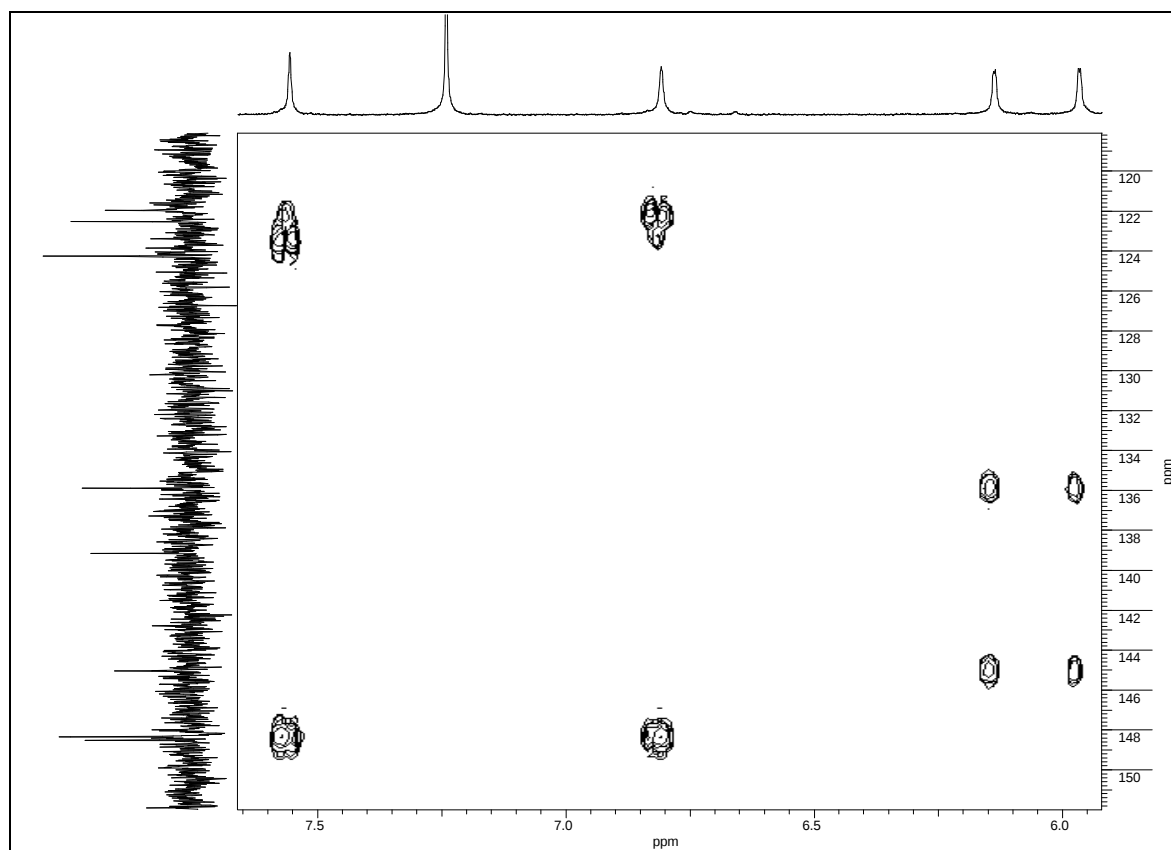
Tabela 20- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **7** (300/75 MHz, CDCl₃)

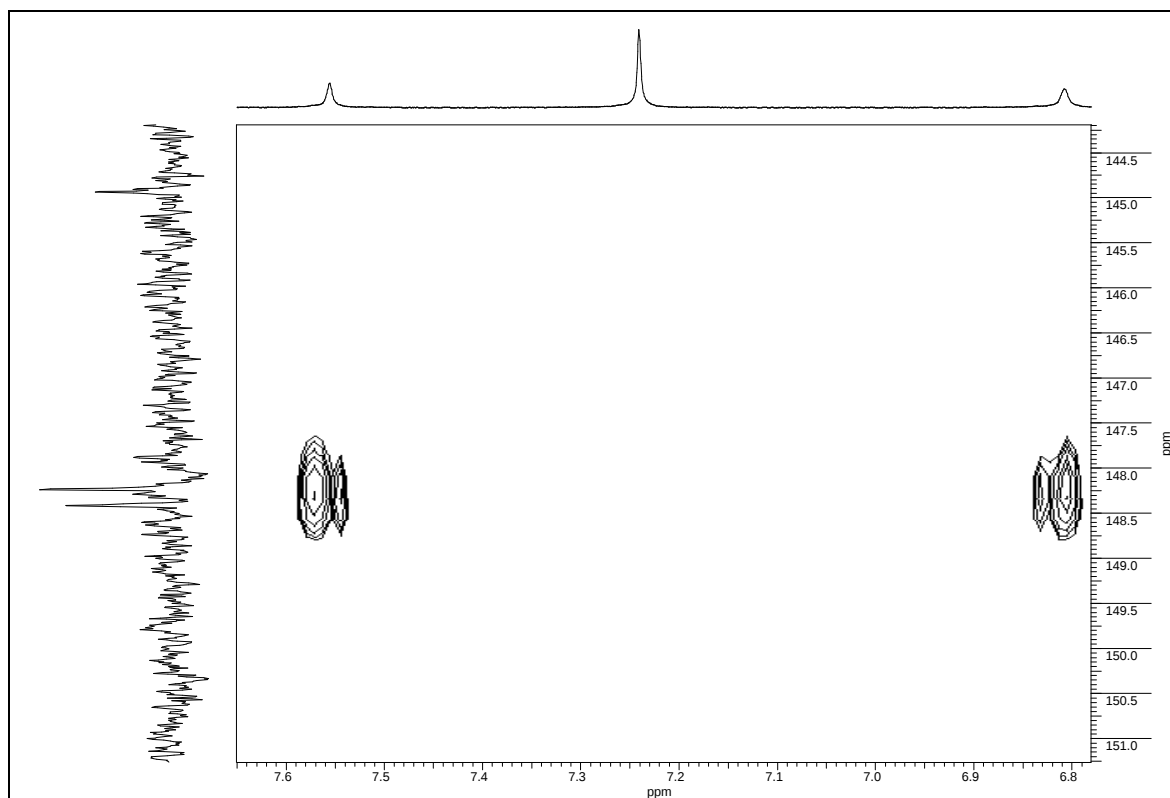
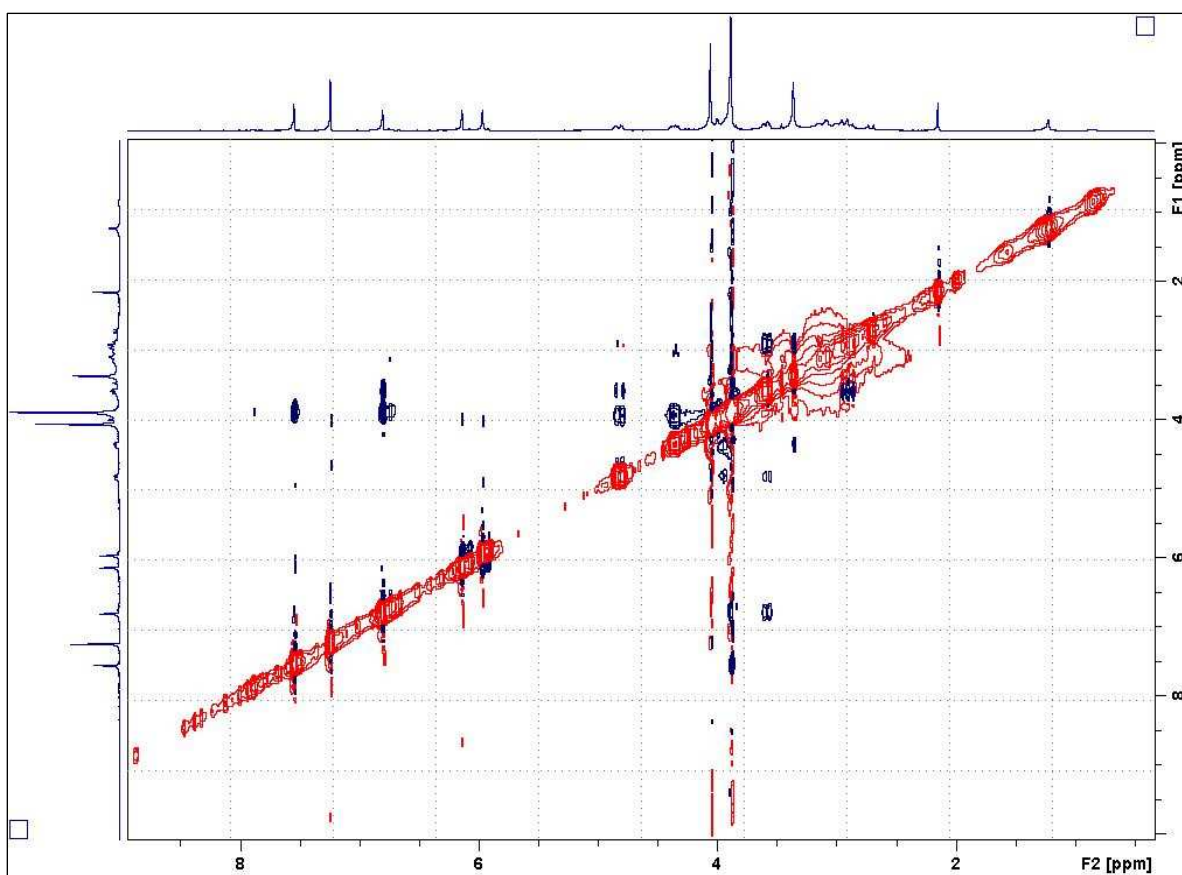
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (7)	HMBC (7)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
4	22,7	3,11 ddl (18,0; 6,0 Ha)	C-3 ^a
		2,95 m (Hb)	C-3 ^a
5	66,3	4,32 ddl (13,5; 4,5 Heq)	C-3 ^a
		3,96 m (Hax)	-
6a	74,1	4,81 dd (16,0; 4,5)	-
7	28,3	3,61 dd (16,0; 4,5 Heq)	C-6a, C-7a, C-8, C-11a, C-11c
		2,91 tl (16,0 Hax)	C-6a, C-7a, C-11a, C-11c
8	111,7	6,81 s	C-7, C-7a, C-9, C-10, C-11 ^a
11	110,1	7,56 s	C-7a, C-9, C-10, C-11a, C-11b
N-CH ₃	48,2	3,34 s	C-5, C-6 ^a
3-OCH ₃	59,6	4,06 s	C-3
9-OCH ₃	56,2 ^a	3,88 s	C-9
10-OCH ₃	56,0 ^a	3,88 s	C-10
OCH ₂ O	101,3	5,97 sl; 6,14 sl	C-1, C-2

^a, valores que podem estar trocados

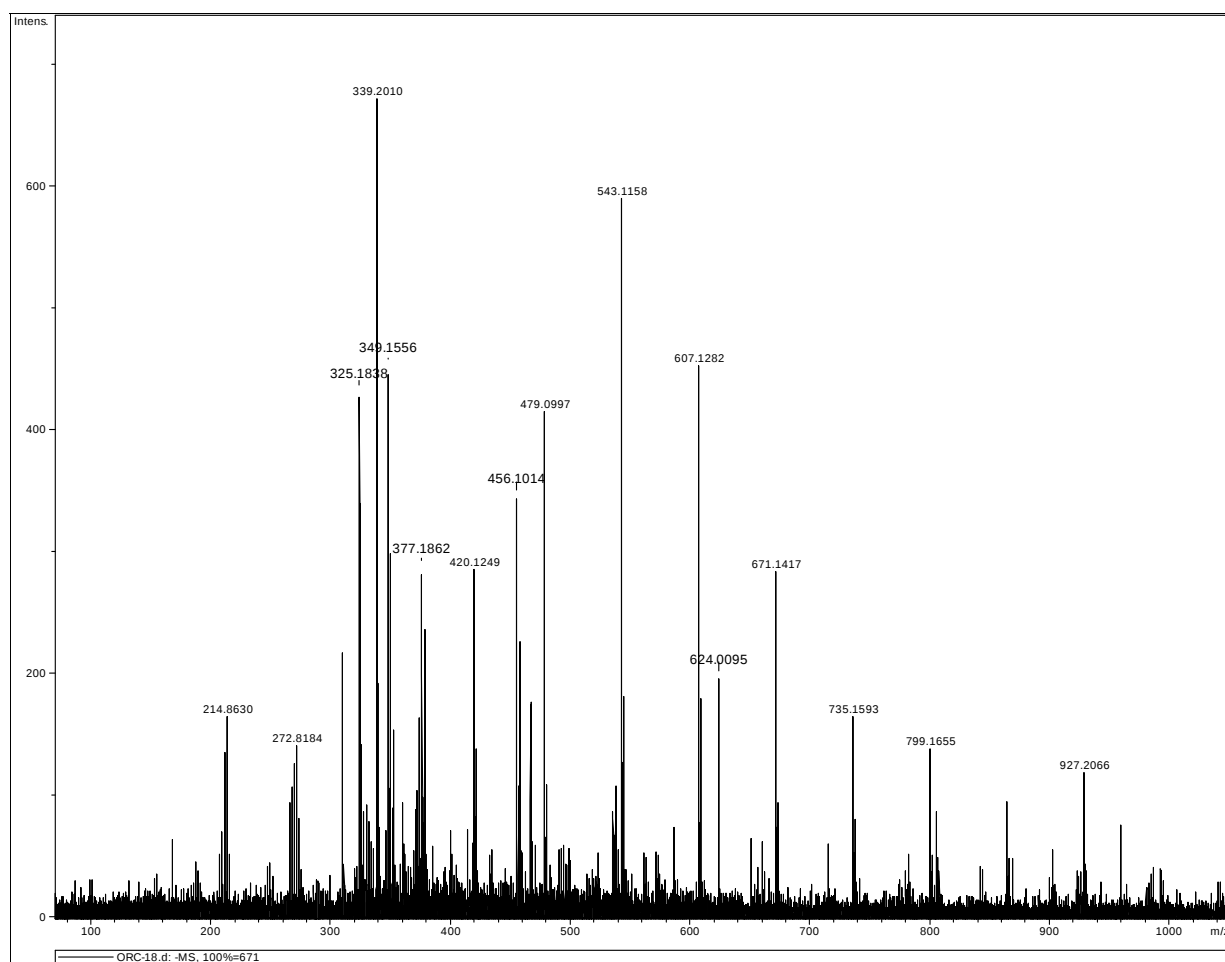
Espectro 51- RMN ^1H de 7 (300 MHz, CDCl_3)Espectro 52- RMN ^{13}C de 7 (75 MHz, CDCl_3)

Espectro 53- DEPT 135° de **7** (75 MHz, CDCl₃)Espectro 54- Espectro HSQC de **7** (300/75 MHz, CDCl₃)

Espectro 55- Espectro HMBC de 7 (300/75 MHz, CDCl_3)Espectro 56- Expansão do espectro HMBC de 7 (300/75 MHz, CDCl_3)

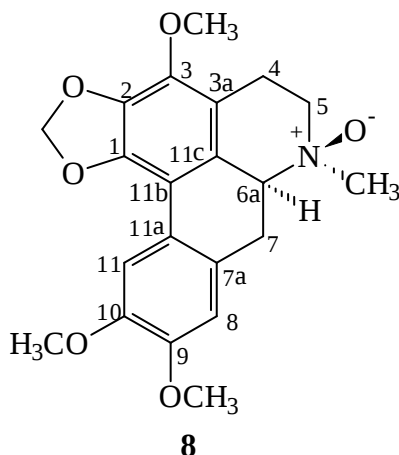
Espectro 57- Expansão do espectro HMBC de 7 (300/75 MHz, CDCl₃)

Espectro 58- NOESY de 7



Espectro 59- Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) de **7** obtido no modo negativo

5.1.7- Elucidação estrutural de (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**)



O composto **8** foi isolado das frações OAF-Ac (D.2, D.3, G.5, G.6, H.4, I.2, M.14 e M.15) provenientes dos fracionamentos cromatográficos da fase acetato de etila das folhas (itens 4.3.4.1.2; 4.3.4.2.2; 4.3.4.2.3; 4.3.4.2.4 e 4.3.4.4).

Este composto apresentou espectros de RMN ^1H (Espectro 60, tabela 21) e ^{13}C (Espectro 61, tabela 21) semelhantes aos de **7**, indicando que ambos possuíam o mesmo esqueleto aporfínico. Com relação ao espectro de RMN ^1H , pequenas diferenças consistiam nos valores de deslocamentos químicos relativos aos hidrogênios dos anéis B e C e da metila ligada ao nitrogênio.

Nos espectros de RMN ^{13}C de **7** e **8** uma diferença significativa foi observada no valor de deslocamento químico do carbono da Me-N, que para **8** foi observado em δ 58,0 e para **7** em δ 48,2, compatível com a inversão na configuração do nitrogênio (MARSAIOLI et al., 1979).

Considerando-se que o alcaloide **8** apresentou, da mesma forma que **7**, um valor positivo de rotação óptica ($[\alpha]_{\text{D}} + 13,0$ MeOH, c 0,00023), chegou-se a conclusão que ambos diferiam apenas na inversão na configuração do nitrogênio, assim como o descrito para a relação entre os compostos **6** e **5**.

Esta informação foi confirmada pela correlação espacial entre H-6a pseudo-axial (δ 4,56) e os hidrogênios de Me-N (δ 3,39) observada no experimento NOESY (Espectros 66 e 67).

Com o auxílio das informações presentes nos espectros HSQC (Espectro 62, tabela 22) e/ou HMBC (Espectros 63-65, tabela 22) foi feita a atribuição dos valores de deslocamento químico de todos os carbonos de **7**.

Assim, a substância **8** foi caracterizada como (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína, a qual esta sendo relatada pela primeira vez neste trabalho, porém a comparação dos dados espectrais indicou que **8** é idêntica a um composto isolado no LP-1, do extrato metanólico da fase butanólica das sementes de *Mimosa flocculosa* (SOARES, 2008), “resultados não publicados”.

Tabela 21- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **8** e dados de RMN ^{13}C de **7** (75 MHz, CDCl_3)

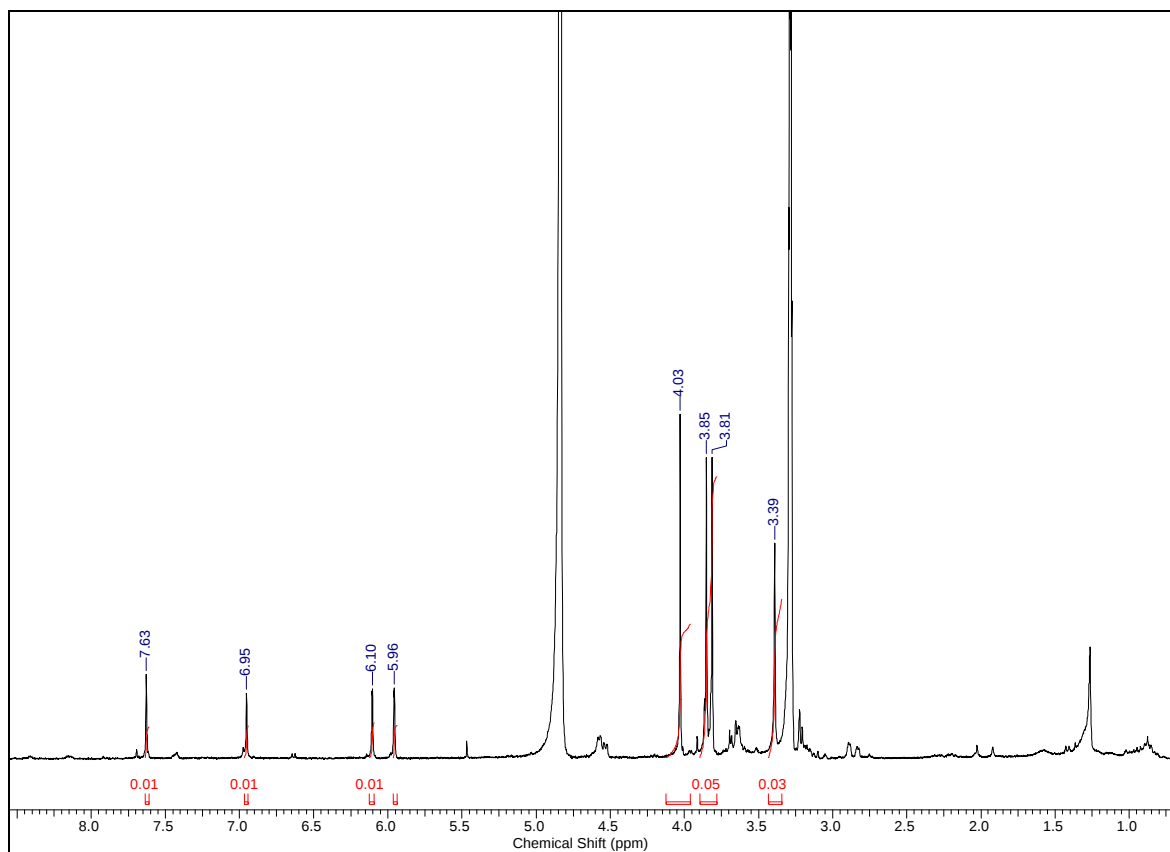
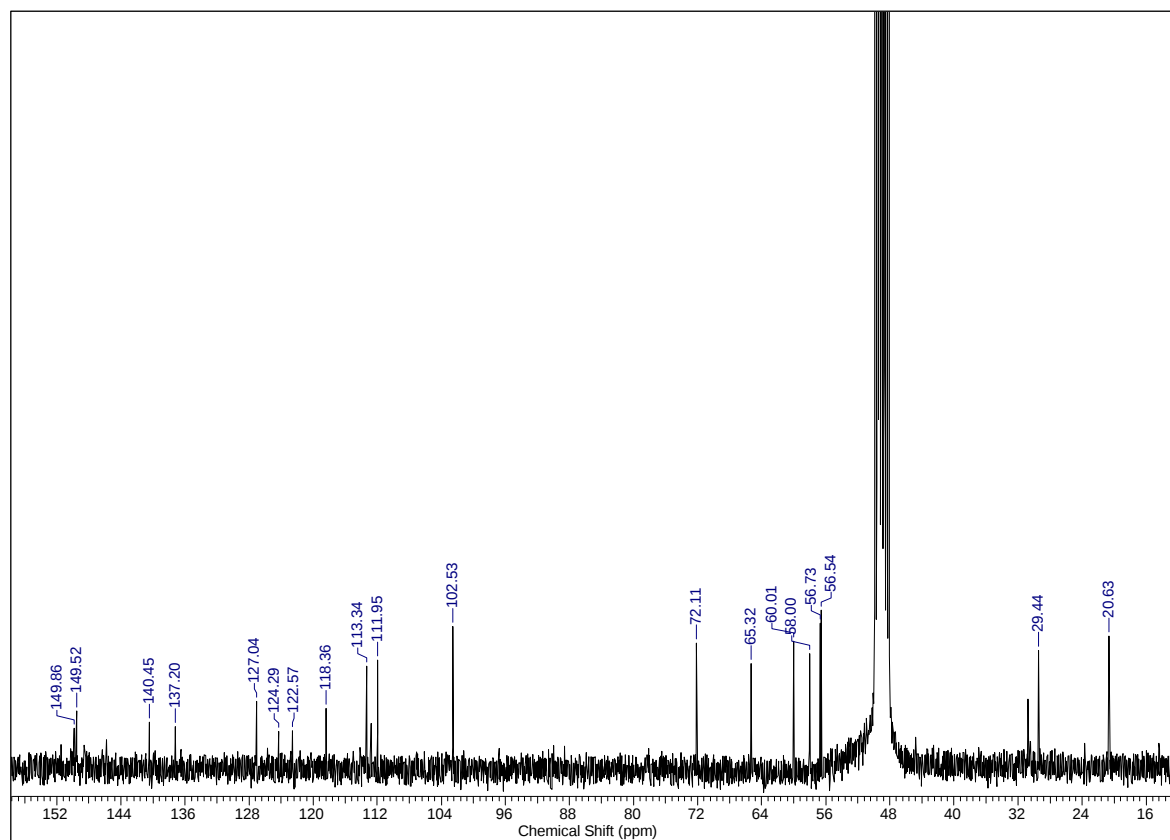
C/H	(8)		(7)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$
1	145,8	-	145,1
2	137,2	-	136,0
3	140,5	-	139,2
3a	118,4	-	114,7
4	20,6	3,22 m (Ha) 2,86 ddl (16,5; 4,5 Hb)	22,7
5	65,3	3,69 m (Ha) 3,64 m (Hb)	66,3
6a	72,1	4,56 dd (13,5; 4,5)	74,1
7	29,4	3,25 m (Ha, Hb)	28,3
7a	127,0	-	124,3
8	113,3	6,95 s	111,7
9	149,9	-	148,5
10	149,5	-	148,3
11	112,0	7,63 s	110,1
11a	124,3	-	122,5
11b	112,8	-	111,3
11c	122,6	-	122,0
N-CH ₃	58,0	3,39 s	48,2
3-OCH ₃	60,0	4,03 s	59,6
9-OCH ₃	56,5 ^a	3,85 s	56,2 ^b
10-OCH ₃	56,7 ^a	3,81 s	56,0 ^b
OCH ₂ O	102,5	5,96 sl; 6,10 sl	101,3

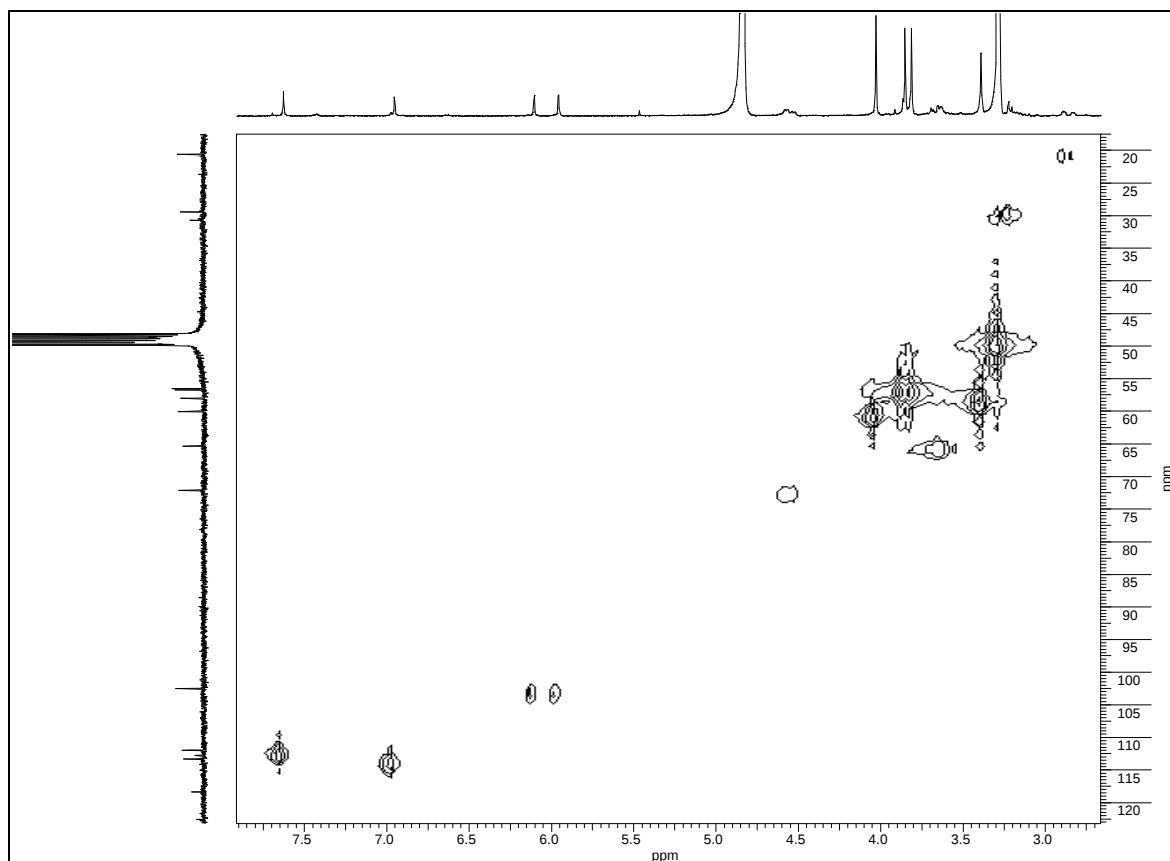
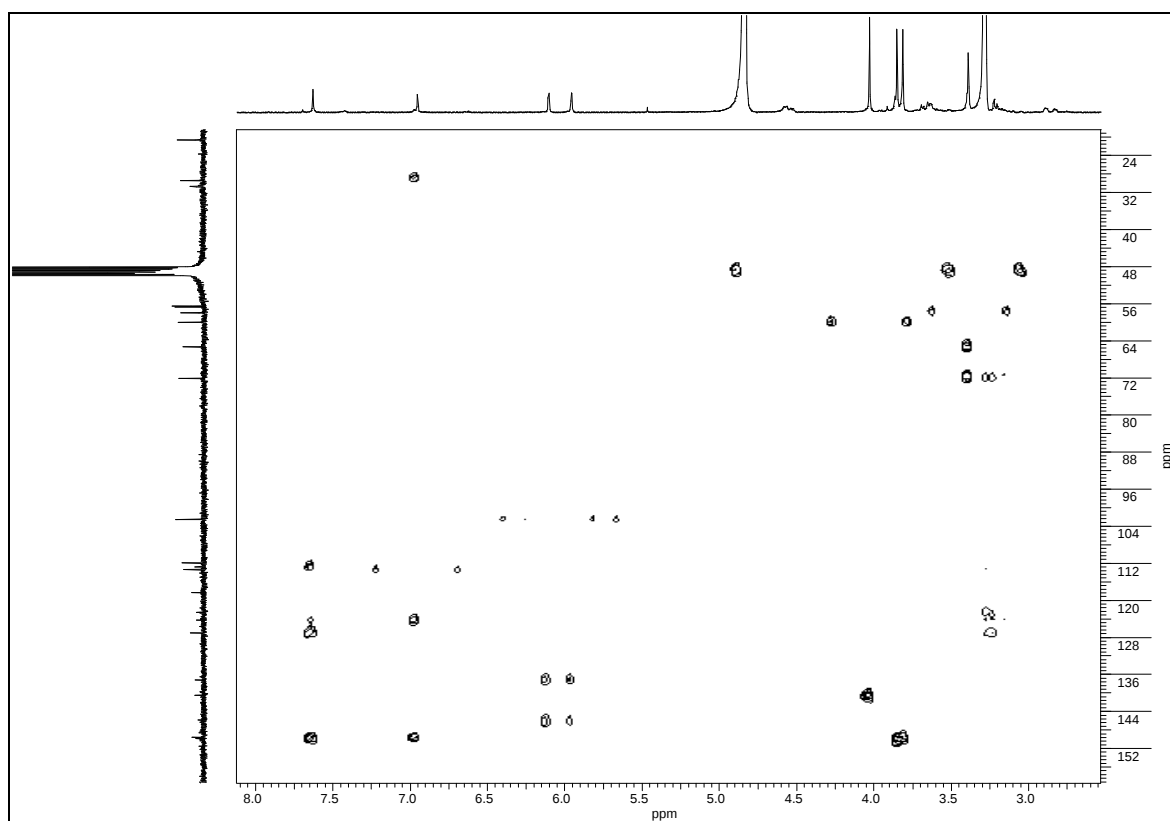
^{a,b} valores que podem estar trocados

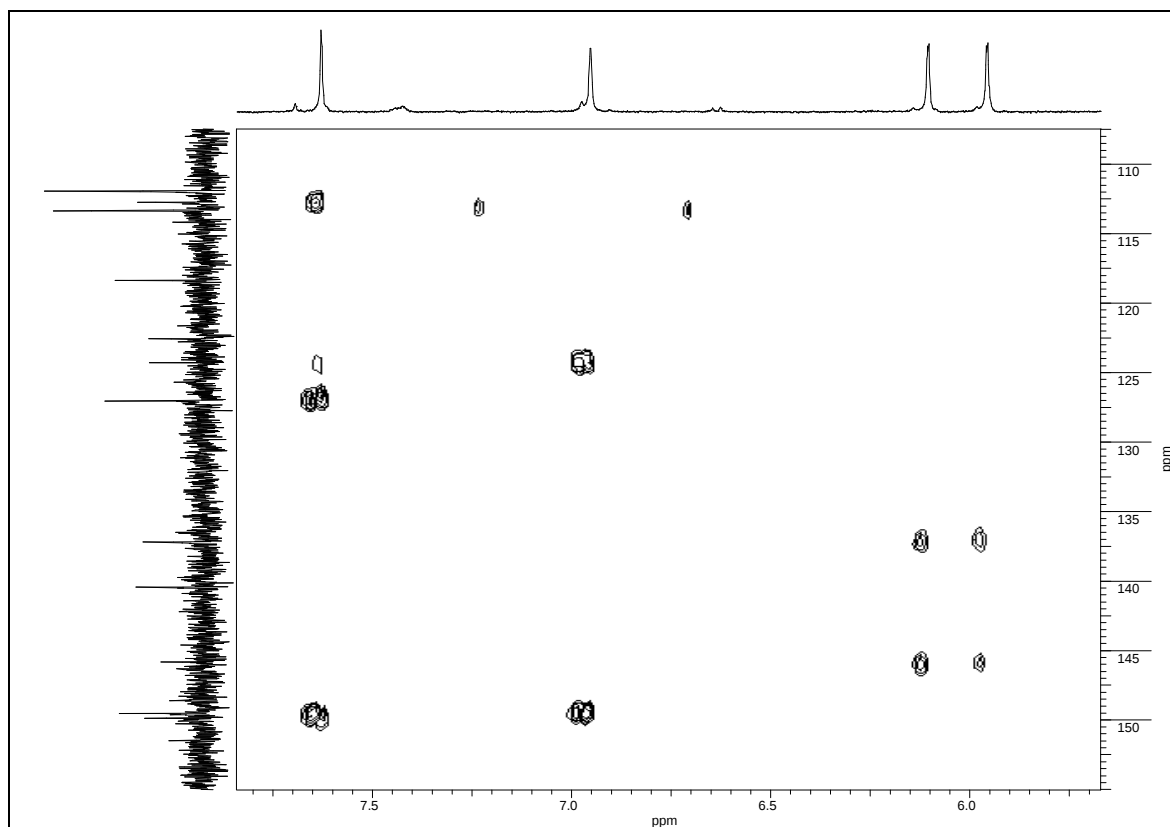
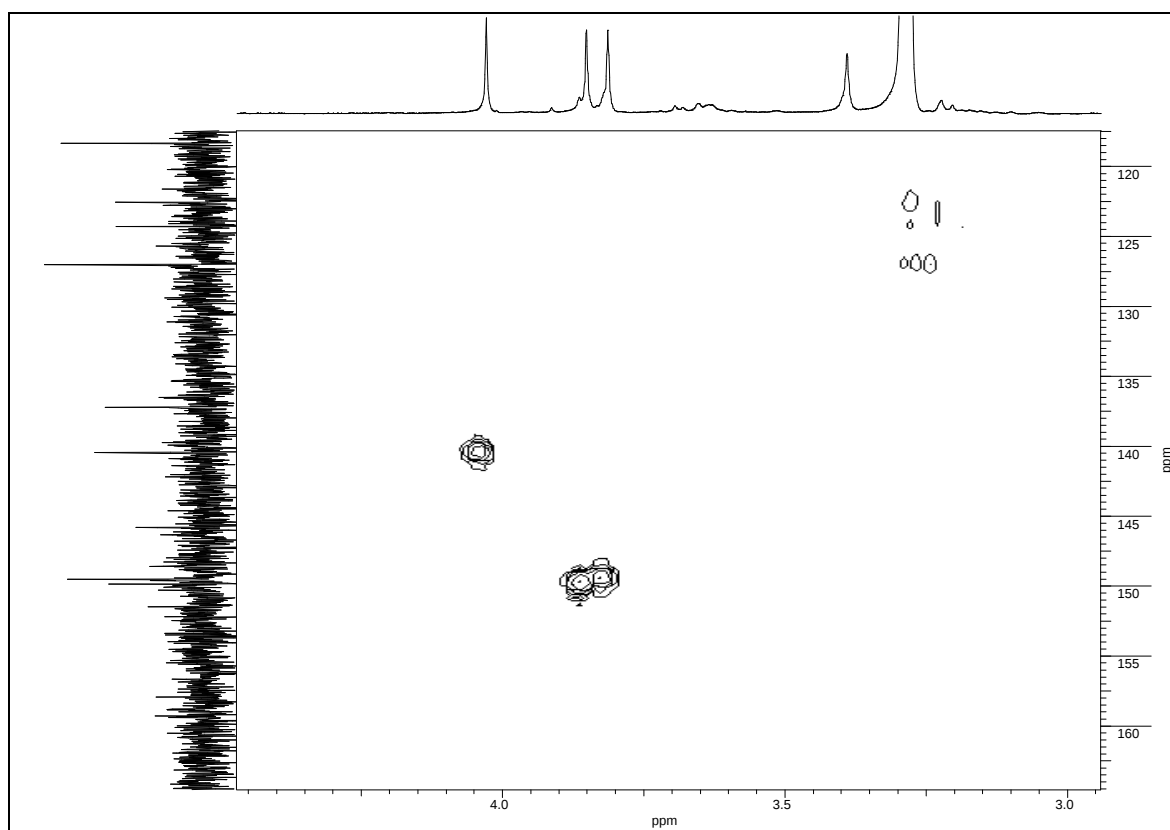
Tabela 22- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **8** (300/75 MHz, CD₃OD)

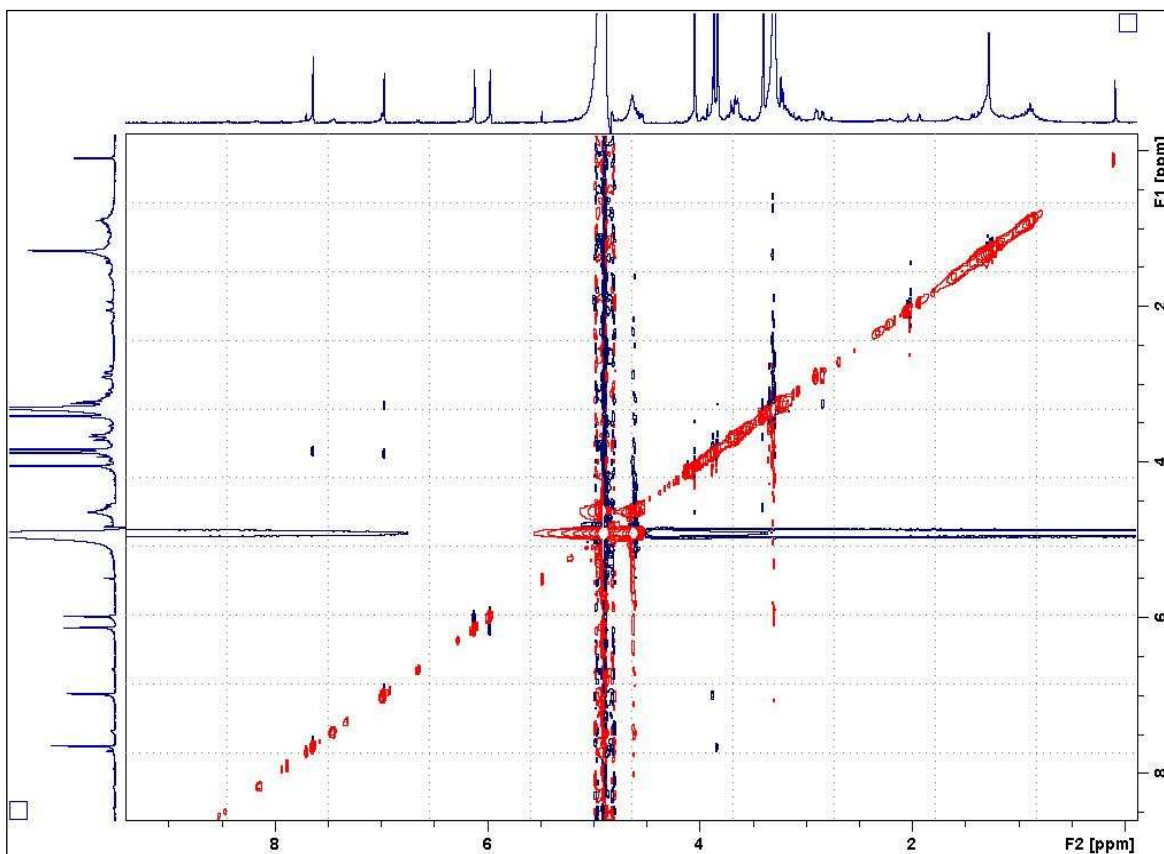
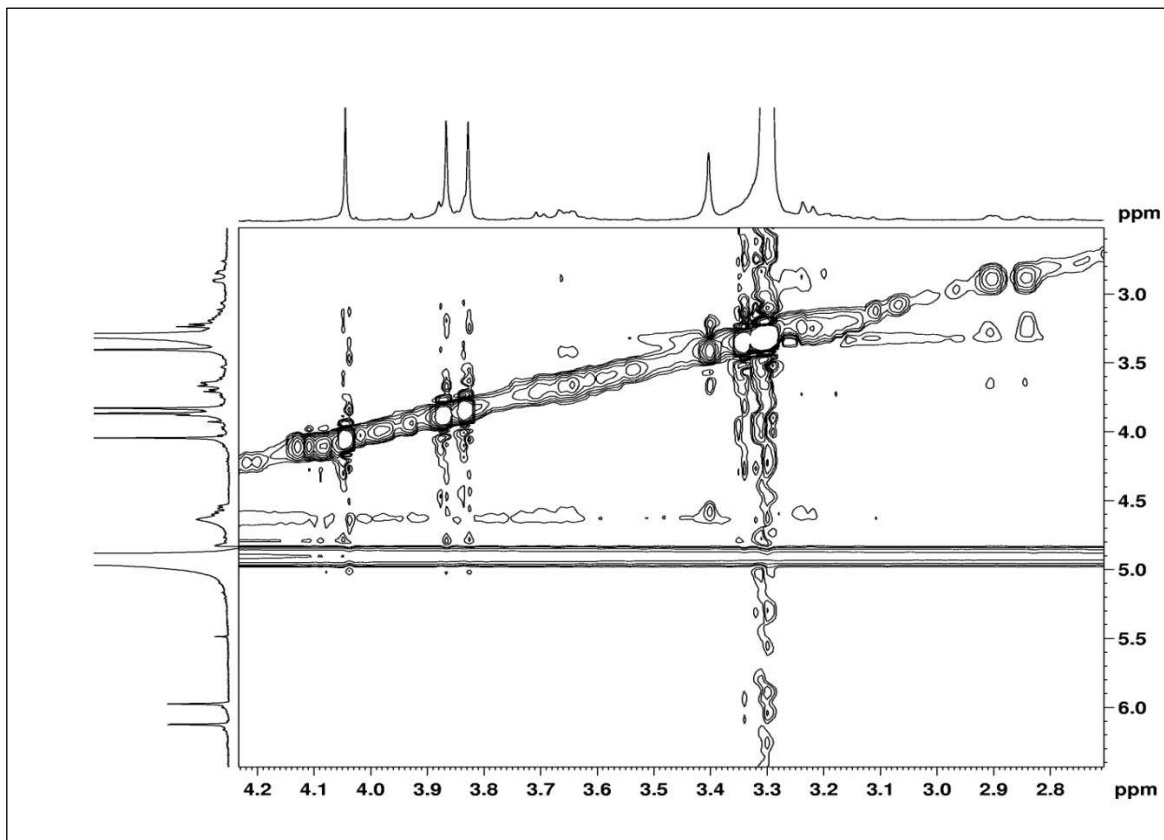
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (8)	HMBC (8)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
4	20,6	3,22 m (Ha)	-
		2,86 ddl (16,5; 4,5 Hb)	-
5	65,3	3,69 m (Ha)	-
		3,64 m (Hb)	-
6a	72,1	4,56 dd (13,5; 4,5)	-
7	29,4	3,25 m	C-7a, C-8, C-11c
8	113,3	6,95 s	C-7, C-7a, C-9, C-10, C-11 ^a
11	112,0	7,63 s	C-7a, C-9, C-10, C-11a, C-11b
N-CH ₃	58,0	3,39 s	C-5, C-6 ^a
3-OCH ₃	60,0	4,03 s	C-3
9-OCH ₃	56,5 ^a	3,85 s	C-9
10-OCH ₃	56,7 ^a	3,81 s	C-10
OCH ₂ O	102,5	5,96 sl; 6,10 sl	C-1, C-2

^a valores que podem estar trocados

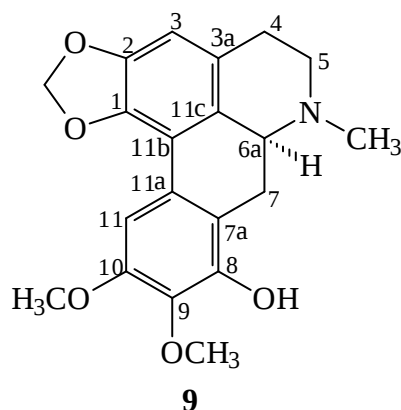
Espectro 60- RMN ^1H de **8** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 61- RMN ^{13}C de **8** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 62- Espectro HSQC de **8** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 63- Espectro HMBC de **8** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 64- Expansão do espectro HMBC de **8** (300/75 MHz, CD_3OD)Espectro 65- Expansão do espectro HMBC de **8** (300/75 MHz, CD_3OD)

Espectro 66- NOESY de **8**Espectro 67- Expansão do espectro NOESY de **8**

5.1.8- Identificação de (+)-leucoxina (9)



Das frações OAC-ALC (D 3 e 5) originadas a partir dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas e das frações OAF-Ac (B.3 e F.9) provenientes dos fracionamentos cromatográficos da fase acetato de etila das folhas foi isolado o alcaloide **9** (itens 4.2.2.4; 4.2.2.5; 4.3.4.1 e 4.3.4.2.1).

O espectro de RMN ^1H de **9** (Espectro 68, tabela 23) apresentou semelhança com o de **1**. Foram observados dois singletos em δ 3,82 e 3,85, referentes a metoxilas presentes no anel D, dois singletos em δ 5,91 e 6,06, referentes aos hidrogênios do grupo dioxidometileno presente no anel A e um singleto atribuído à metila ligada ao nitrogênio em δ 2,56. Apresentou ainda na região de hidrogênios aromáticos, dois singletos em δ 6,54 e 7,29 atribuíveis aos hidrogênios H-3 e H-11, respectivamente. A diferença residia, portanto, na ausência do singleto entre δ 6,70-6,90, observado no espectro de **1** em δ 6,76 e atribuído a H-8.

Da mesma forma, ao serem comparados espectros RMN ^{13}C e DEPT 135° de **9** (Espectros 69 e 70, tabela 23), e de **1** as principais diferenças foram observadas nos valores de deslocamento químico dos carbonos do anel D, compatíveis com a presença de um substituinte oxigenado em C-8 no alcaloide **9**. Uma vez que foram observados vinte sinais no espectro de RMN ^{13}C de **9** e duas metoxilas, sendo uma impedida (δ 61,2), o substituinte presente em C-8 foi caracterizado como sendo uma hidroxila.

Os valores de deslocamento químico de C-7a (δ 116,3), C-9 (δ 137,3) e C-11 (δ 104,1), assim como a proteção de +7,3 ppm ocorrida em C-7, mostraram-se também compatíveis com a localização do grupo hidroxila na posição 8 deste alcaloide.

Com auxílio das informações obtidas nos experimentos HSQC e/ou HMBC (Espectros 71-74, tabela 24) foram realizadas as atribuições dos valores de deslocamento químico dos carbonos de **9**.

Assim, com base no valor de $[\alpha]_D = +38,5$ (MeOH, c 0,0004) e através da comparação dos dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C deste alcaloide com os descritos na literatura (GUINAUDEAU et al., 1979; VECCHIETTI et al., 1977) para o alcaloide aporfínico (+)-leucoxina, isolado também de outras espécies de plantas do gênero *Ocotea* (ZANIN & LORDELLO, 2007; VECCHIETTI et al., 1979; VECCHIETTI et al., 1977; GOODWIN, et al., 1960), foi possível estabelecer a identidade entre os dois compostos.

Tabela 23- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **9** e do alcaloide (+)-leucoxina citado na literatura (VECCHIETTI et al., 1977) [60 MHz, CDCl_3], (GUINAUDEAU et al., 1979) [15 MHz, DMSO]

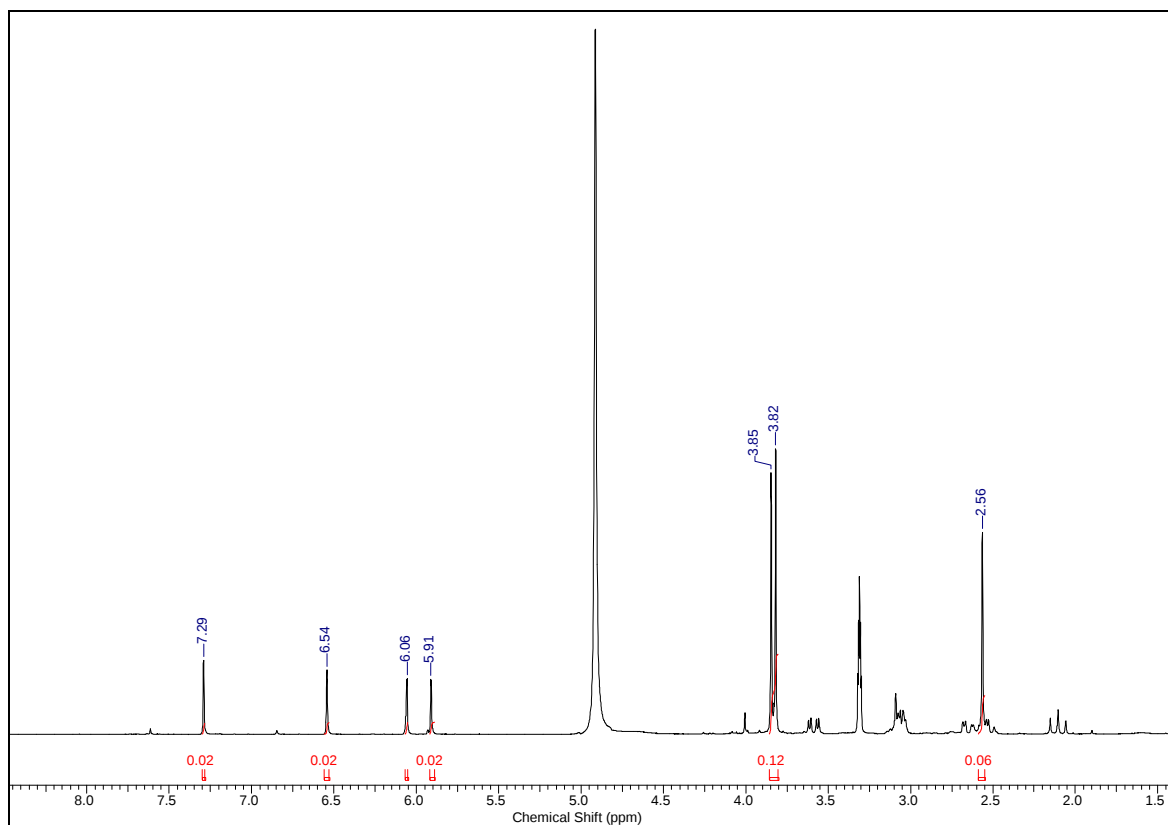
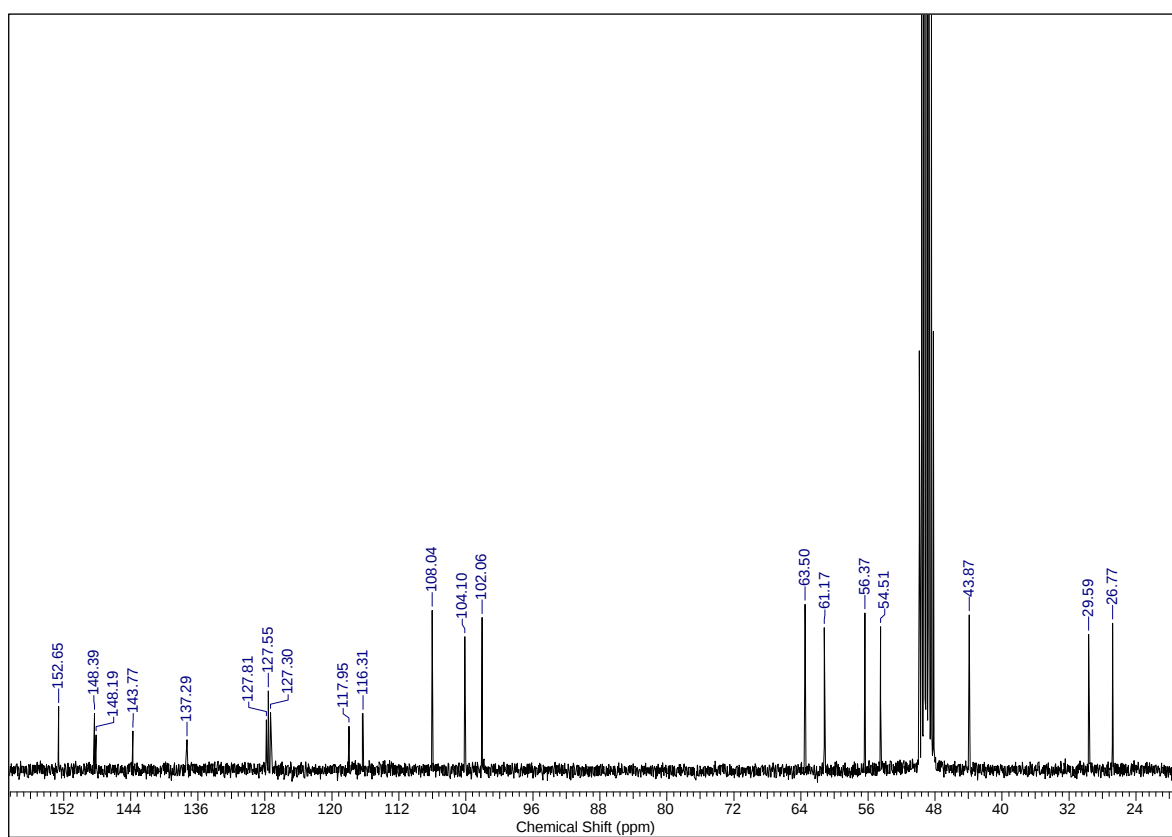
C/H	(9)			(9) Literatura
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	143,8	-	141,6	-
2	148,2	-	146,0	-
3	108,0	6,54 s	106,8	6,52 s
3a	127,8	-	126,7 ^a	-
4	29,6	3,05 m (Ha)	28,7	Nc
		2,65 ddl (15,0; 3,0 Hb)		-
5	54,5	3,08 m (Ha)	52,9	Nc
		2,49 m (Hb)		-
6a	63,5	3,06 m	61,7	Nc
7	26,8	3,59 dd (15,0; 3,0 Heq)	25,8	Nc
		2,11 tl (15,0 Hax)		-
7a	116,3	-	115,6	-
8	148,4	-	146,8	-
9	137,3	-	135,9	-
10	152,7	-	150,8	-
11	104,1	7,29 s	102,4	7,32 s
11a	127,6	-	125,8	-
11b	118,0	-	116,0	-
11c	127,3	-	126,4 ^a	-
N-CH ₃	43,9	2,56 s	43,5	2,55 s
9-OCH ₃	61,2	3,82 s	60,2	3,87 s
10-OCH ₃	56,4	3,85 s	55,6	3,92 s
OCH ₂ O	102,1	5,91 sl; 6,06 sl	100,4	5,88 d (1,0); 6,04 d (1,0)

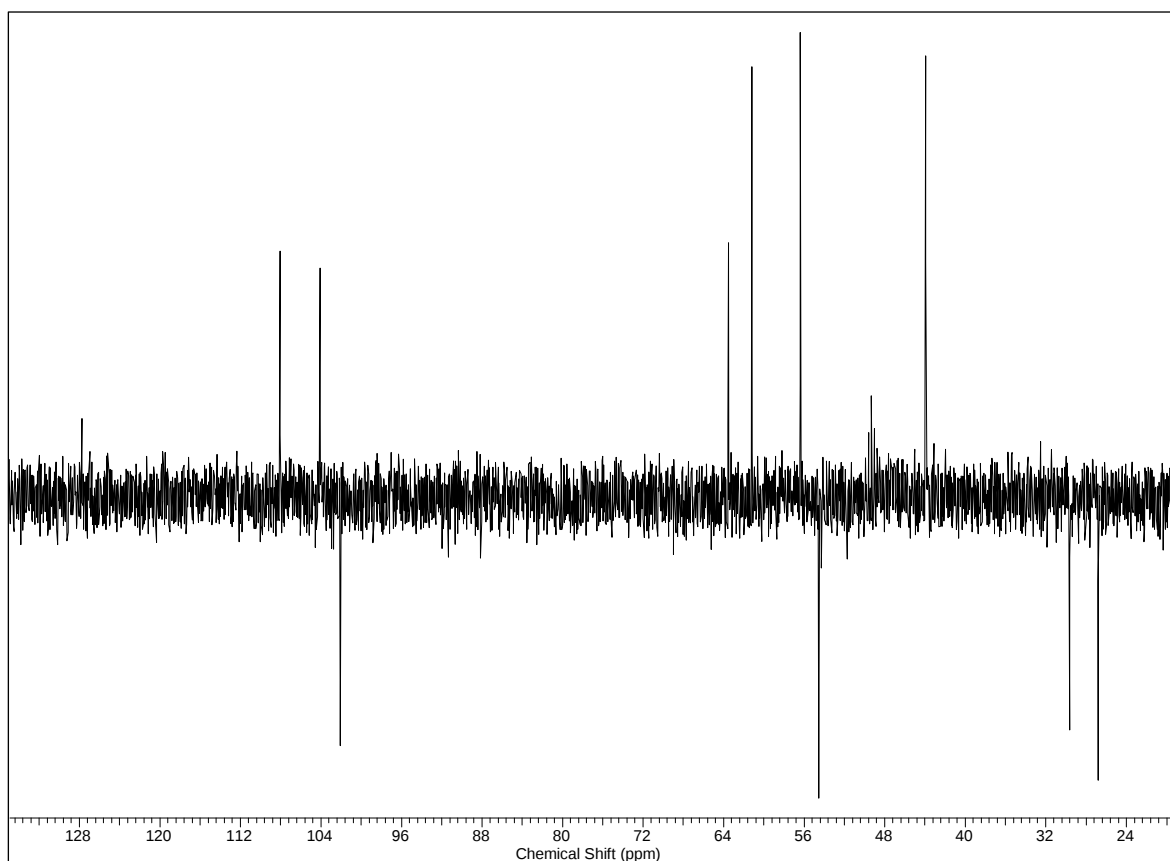
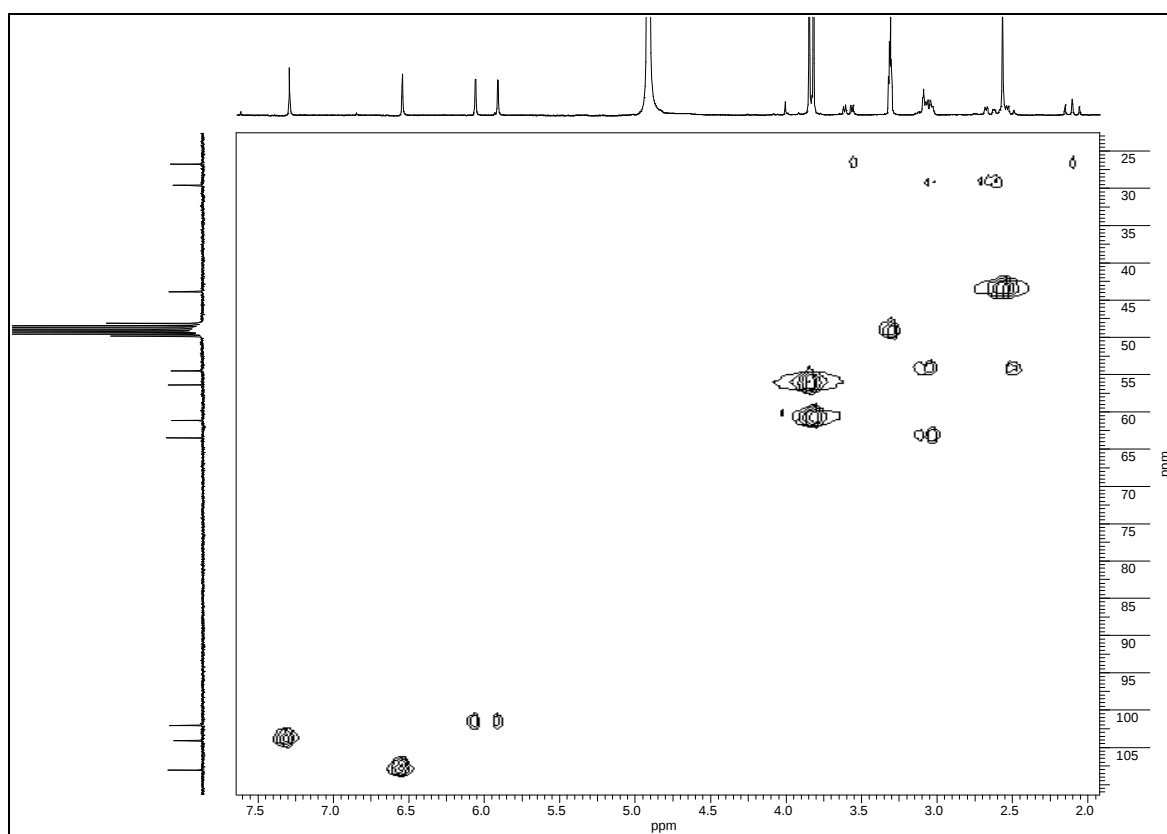
nc: não citado na referência

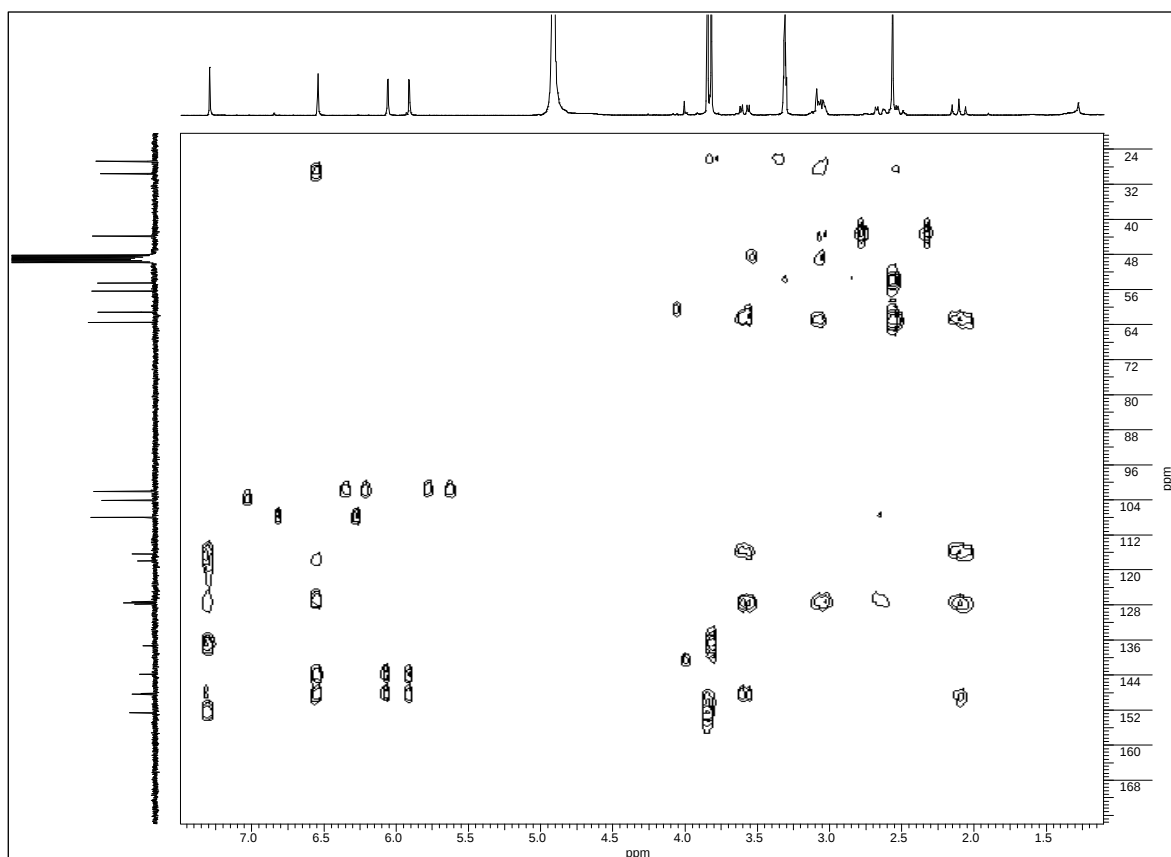
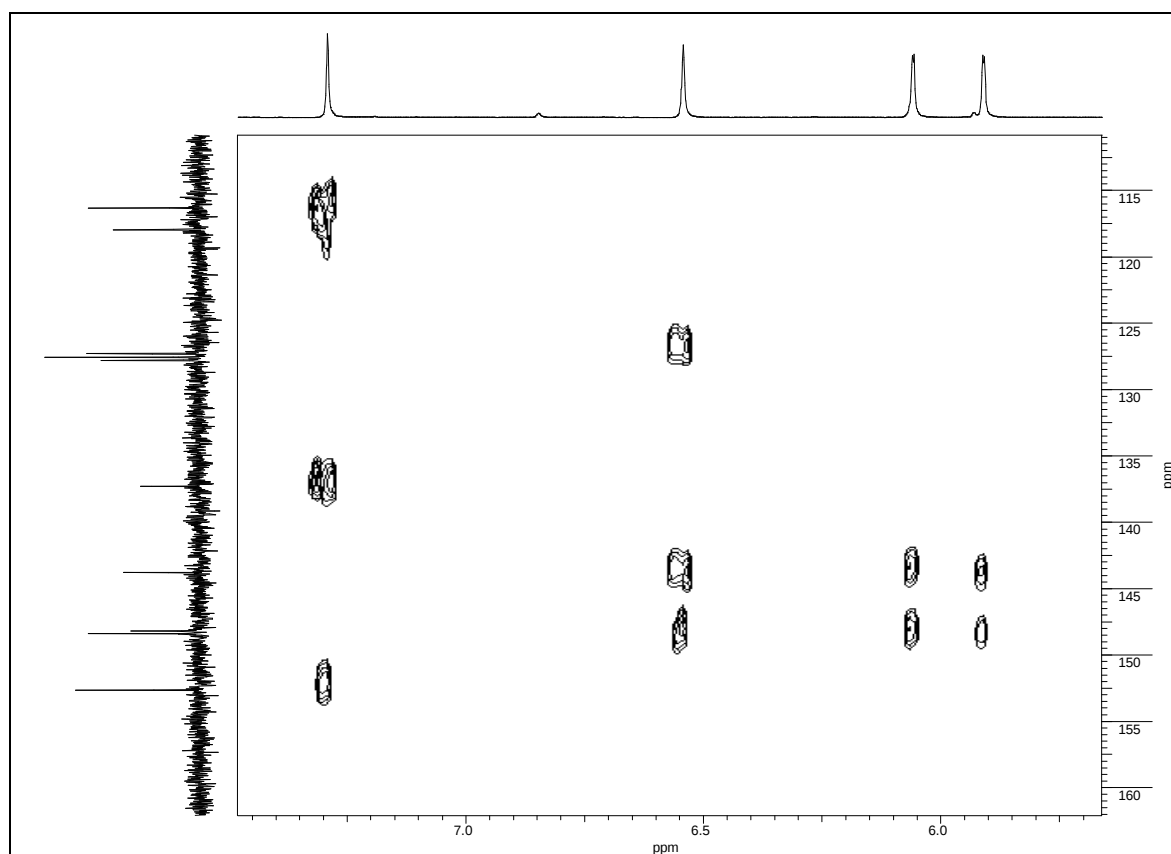
^a valores que podem estar trocados

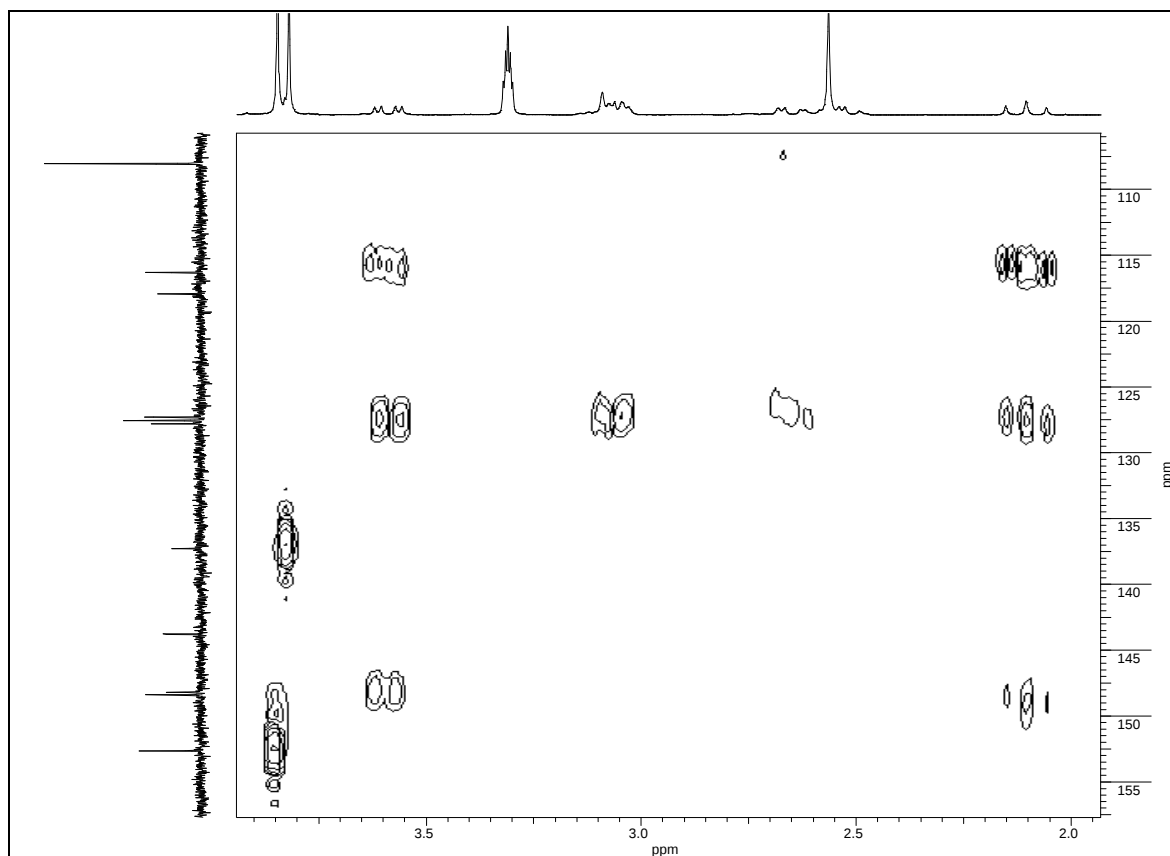
Tabela 24- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **9** (300/75 MHz, CD₃OD)

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (9)	HMBC (9)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	108,0	6,54 s	C-1, C-2, C-4
4	29,6	3,05 m (Ha)	C-11c
		2,65 ddl (15,0; 3,0 Hb)	C-11c
5	54,5	3,08 m (Ha)	C-4
		2,49 m (Hb)	C-4
6a	63,5	3,06 m	-
7	26,8	3,59 dd (15,0; 3,0 Heq)	C-6a, C-7a, C-8, C-11c
		2,11 tl (15,0 Hax)	C-6a, C-7a, C-8, C-11c
11	104,1	7,29 s	C-7a, C-9, C-10, C-11b
N-CH ₃	43,9	2,56 s	C-5, C-6 ^a
9-OCH ₃	61,2	3,82 s	C-9
10-OCH ₃	56,4	3,85 s	C-10
OCH ₂ O	102,1	5,91 sl; 6,06 sl	C-1, C-2

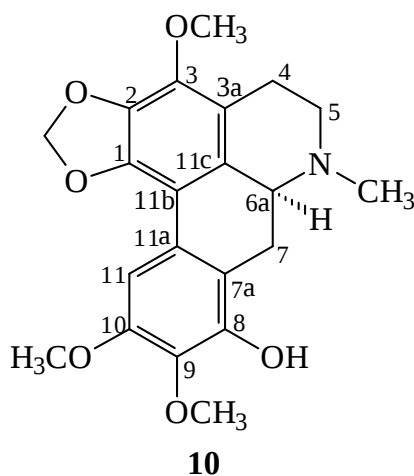
Espectro 68- RMN ^1H de **9** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 69- RMN ^{13}C de **9** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 70- DEPT 135° de **9** (75 MHz, CD₃OD)Espectro 71- Espectro HSQC de **9** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 72- Espectro HMBC de **9** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 73- Expansão do Espectro HMBC de **9** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro74- Expansão do Espectro HMBC de **9** (300/75 MHz, CD₃OD)

5.1.9- Identificação de (+)-ocoxilonina (**10**)



Da fração OAF-ALC 5 proveniente dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas e das frações OAF-Ac (B.3, F.9 e L.39) resultantes dos fracionamentos cromatográficos da fase acetato de etila das folhas foi obtido o composto **10** em mistura com **1**, **2** e **9**. Da fração OAF-Ac L.38 foi isolado o composto **10** na forma pura, porém em quantidade suficiente apenas para obtenção de seus valores de rotação óptica (itens 4.2.2.5; 4.3.4.1; 4.3.4.2.1 e 4.3.4.3.2).

Da fração OAF-ALC 5 foram obtidos os compostos **9** e **10** em mistura, onde os sinais majoritários nos espectros de ^1H e ^{13}C (DEPT 135°) [Espectros 75-79, tabela 25] foram atribuídos aos de **10**.

Os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de **10** mostraram-se semelhantes aos de **2**, indicando que esta substância também possuía um esqueleto aporfínico, entretanto não foi observado um singlete em δ 6,88, atribuído a H-8 no espectro de **2**.

Assim, o composto **10** apresentou no espectro de RMN ^1H um singlete em δ 7,21 atribuído a H-11, três singletos em δ 3,98; 3,82 e 3,79 referentes a três metoxilas, dois singletos em δ 5,90 e 6,04 atribuídos aos hidrogênios do grupo dioxidometileno, e ainda um singlete em δ 2,54 referente ao grupo $\text{CH}_3\text{-N}$.

No espectro de RMN ^{13}C de **10**, o sinal em δ 148,4 (C) atribuído a C-8, juntamente com as alterações ocorridas, notadamente a proteção de C-7 (7,5 ppm), C-7a (11,9 ppm), C-9 (10,1 ppm) e C-11 (6,4 ppm), quando comparados com os dados espectrais de **2**, indicaram a presença de um grupo hidroxila em C-8, da mesma forma como o observado para o alcaloide **9**, que também possui em C-8 o mesmo substituinte.

No espectro HMBC (Espectros 82-84, tabela 26) foi possível observar a correlação entre H-7 e C-8 (δ 148,4).

O valor de rotação óptica observado para **10** ($[\alpha]_D = +22,0$; MeOH, c 0,0005) indicou que o mesmo também pertencia a série 6a-(S).

Os dados de RMN ^1H de **10** apresentaram uma boa correlação com os descritos na literatura para o alcaloide isolado anteriormente de *Ocotea leucoxydon*, (+)-ocoxilonina (AHMAD & CAVA, 1977), enquanto que os de RMN ^{13}C estão sendo descritos pela primeira vez. As atribuições dos valores de deslocamento químico dos carbonos de **10** foram realizadas com auxílio das informações fornecidas pelos espectros HSQC e/ou HMBC (Espectros 80-84, tabela 26).

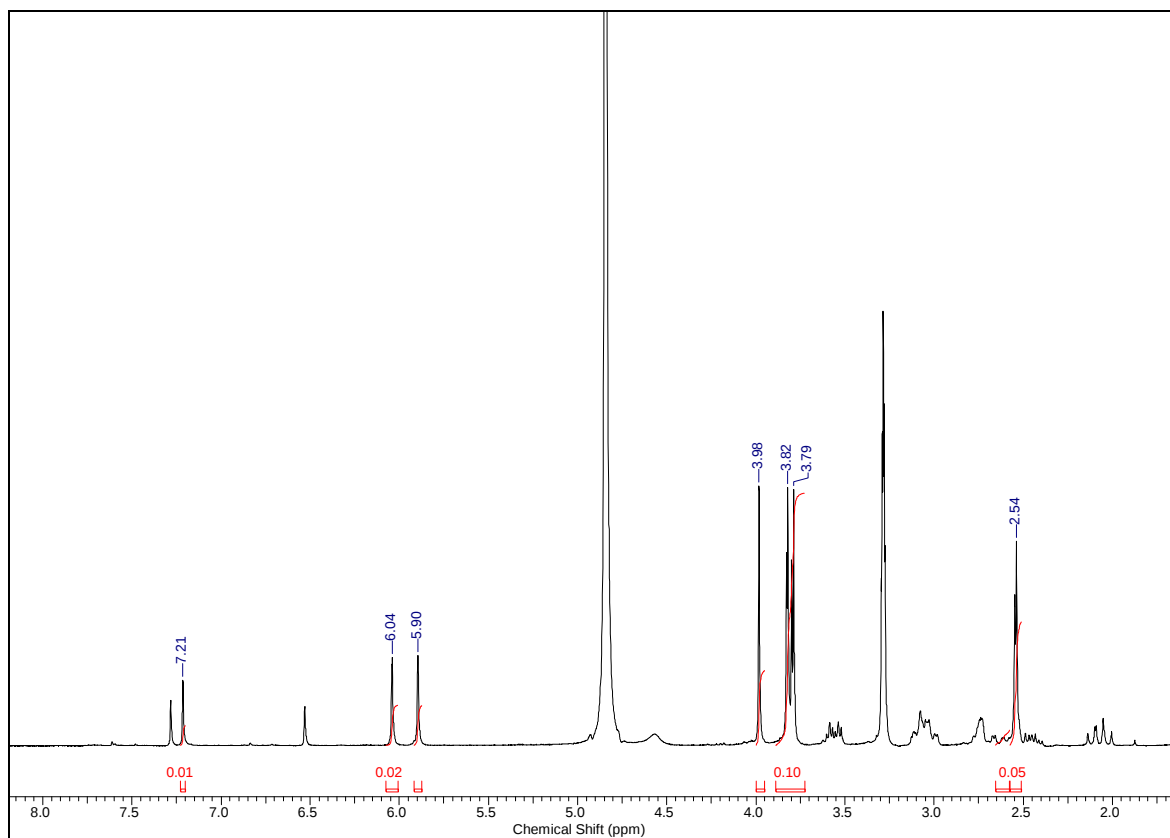
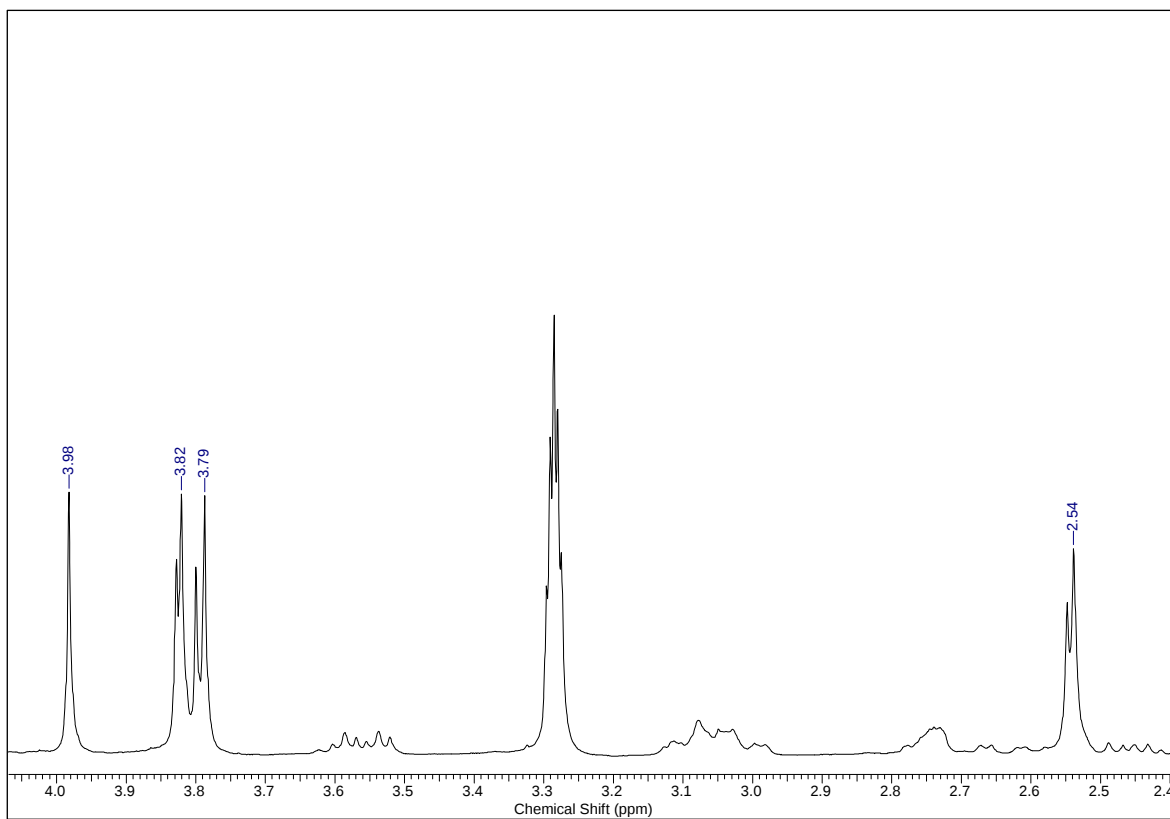
Tabela 25- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **10**, dados de RMN ^{13}C (75 MHz, acetona- d_6) de **2** e do alcaloide (+)-ocoxilonina citado na literatura (AHMAD & CAVA, 1977) [60 MHz, CDCl_3]

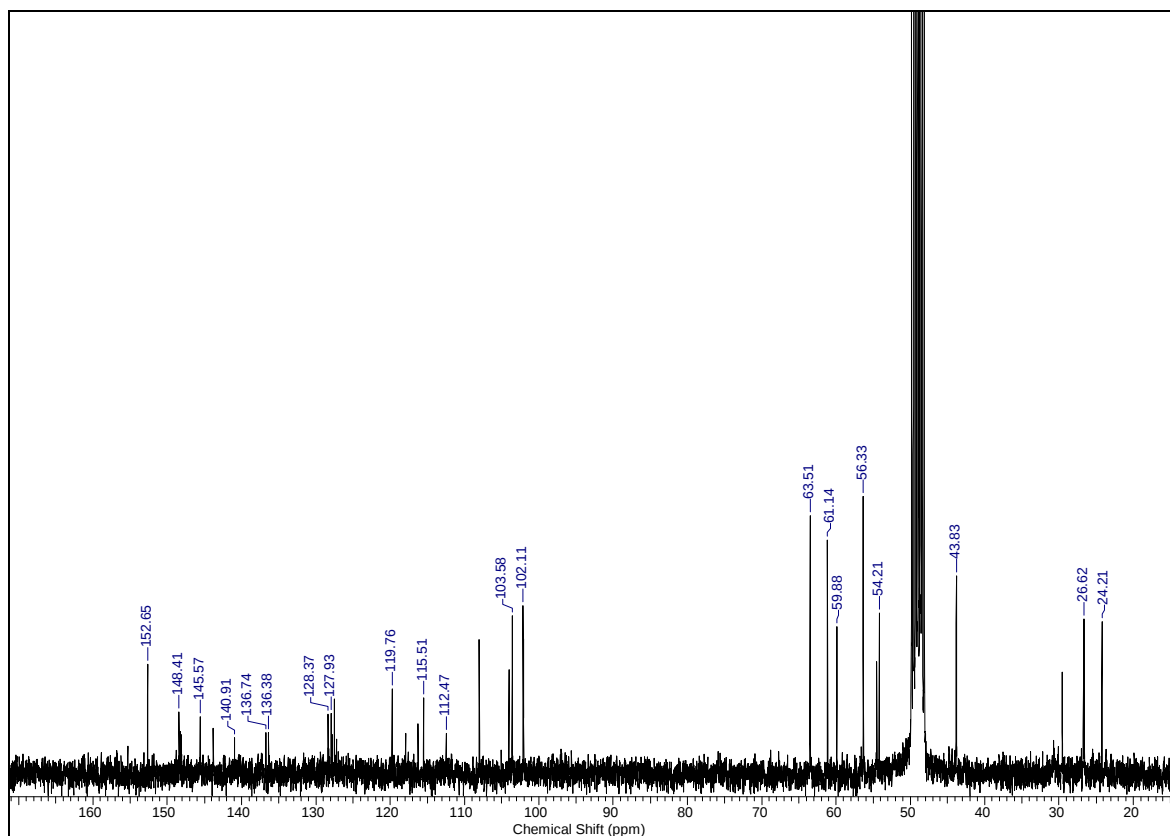
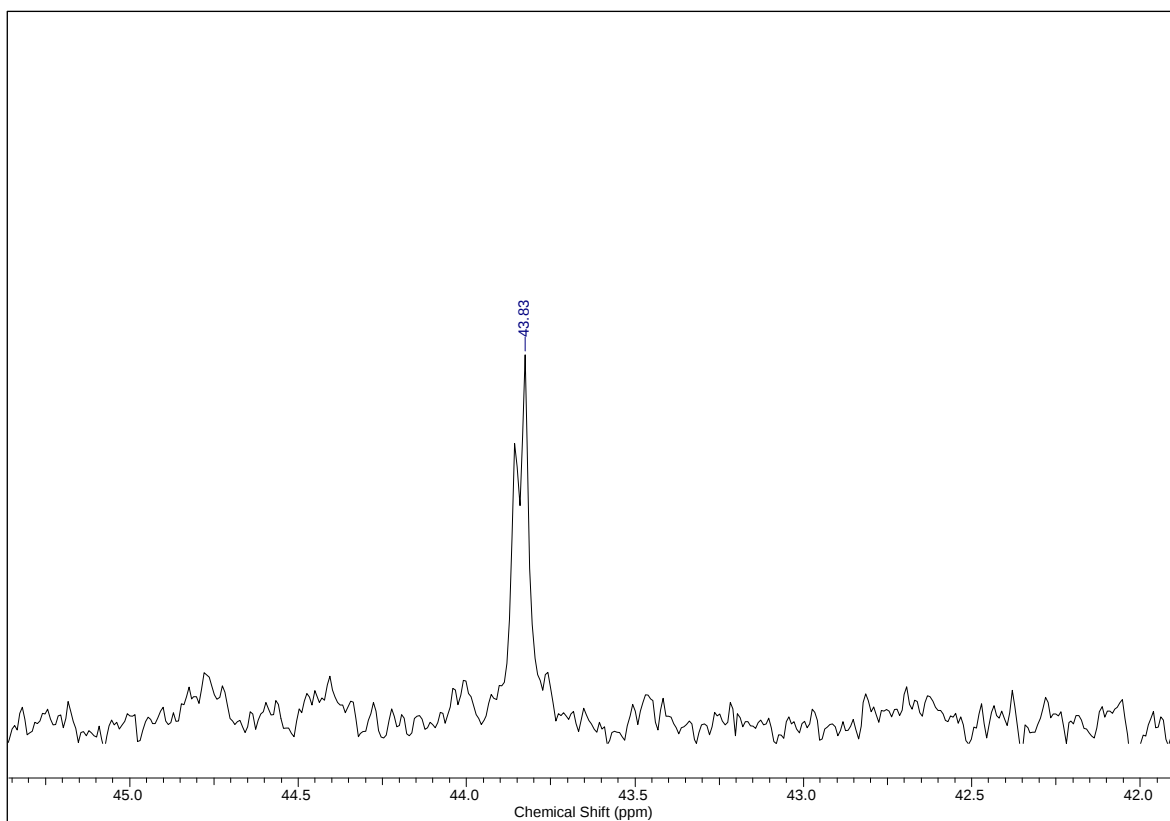
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(10) $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	(2) $\delta^{13}\text{C}$	(10) Literatura $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	145,6	-	143,5	-
2	136,4	-	135,0	-
3	140,9	-	139,3	-
3a	119,8	-	119,3	-
4	24,2	2,74 m	23,6	Nc
5	54,2	3,08 m (Ha) 2,45 m (Hb)	53,2	Nc -
6a	63,5	3,00 m	62,6	Nc
7	26,6	3,54 m (Heq) 2,05 tl (12,0 Hax)	33,8	Nc -
7a	115,5	-	128,1	-
8	148,4	-	112,2	-
9	136,7	-	148,5	-
10	152,7	-	148,1	-
11	103,6	7,21s	111,2	7,30 s
11a	127,9	-	123,6	-
11b	112,5	-	111,2	-
11c	128,4	-	127,9	-
N-CH ₃	43,9	2,54 s	43,3	2,58 s
3-OCH ₃	59,9	3,98 s	58,8	4,01 s
9-OCH ₃	61,2	3,79 s	55,6 ^a	3,90 s
10-OCH ₃	56,3	3,82 s	55,3 ^a	3,93 s
OCH ₂ O	102,1	5,90 sl; 6,04 sl	100,8	5,96 s; 5,98 s

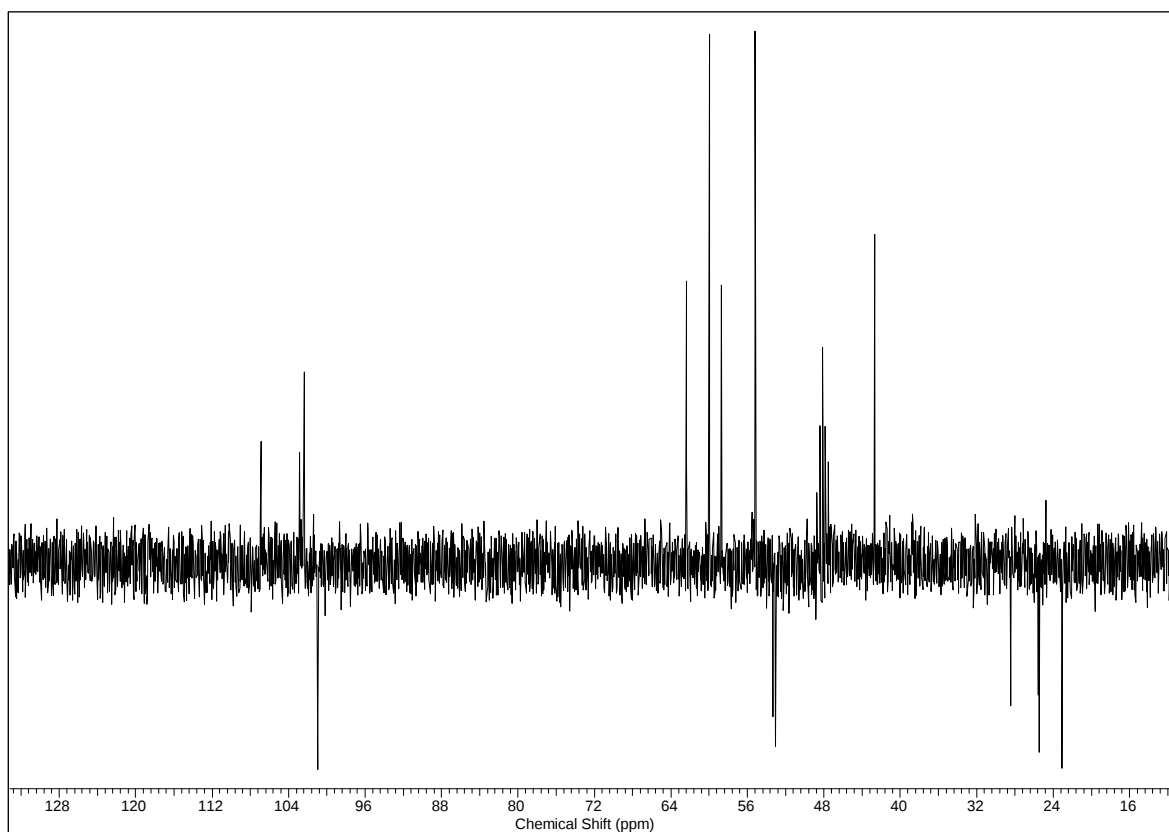
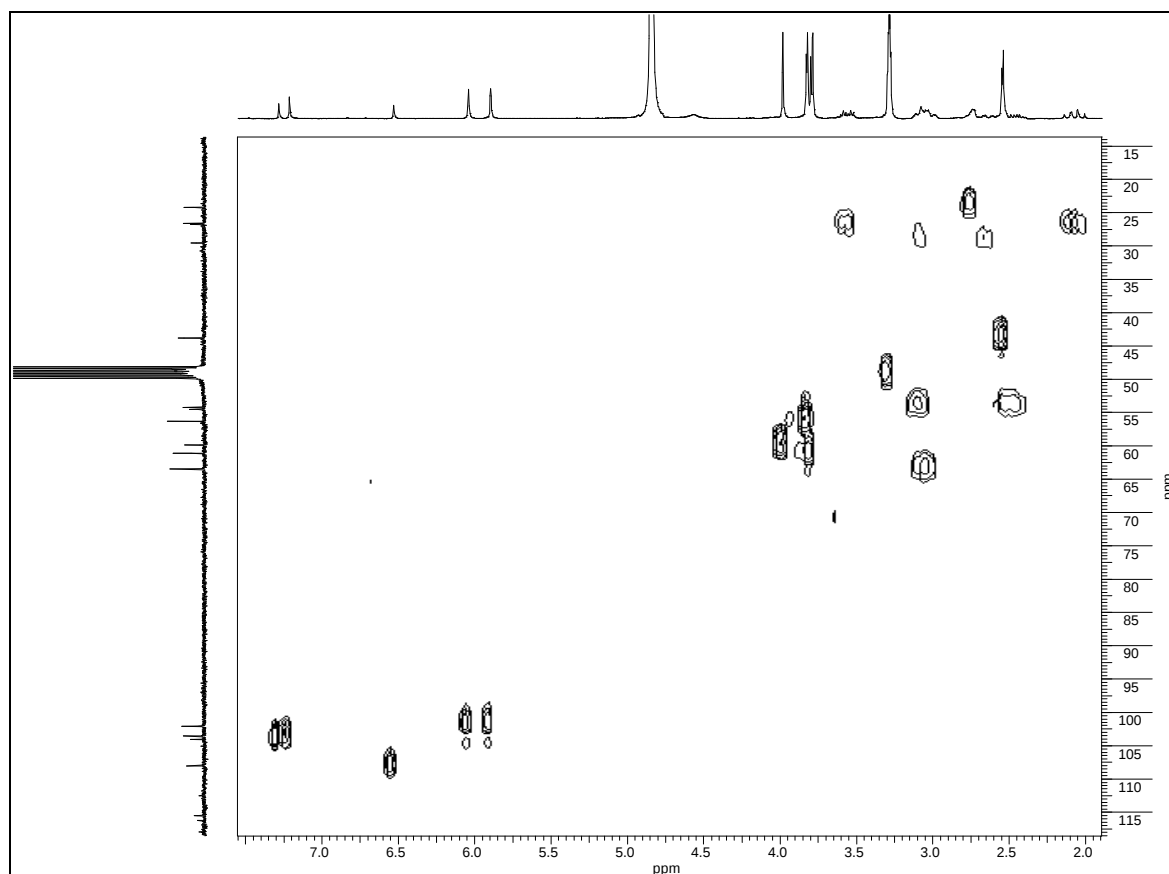
^a valores que podem estar trocados

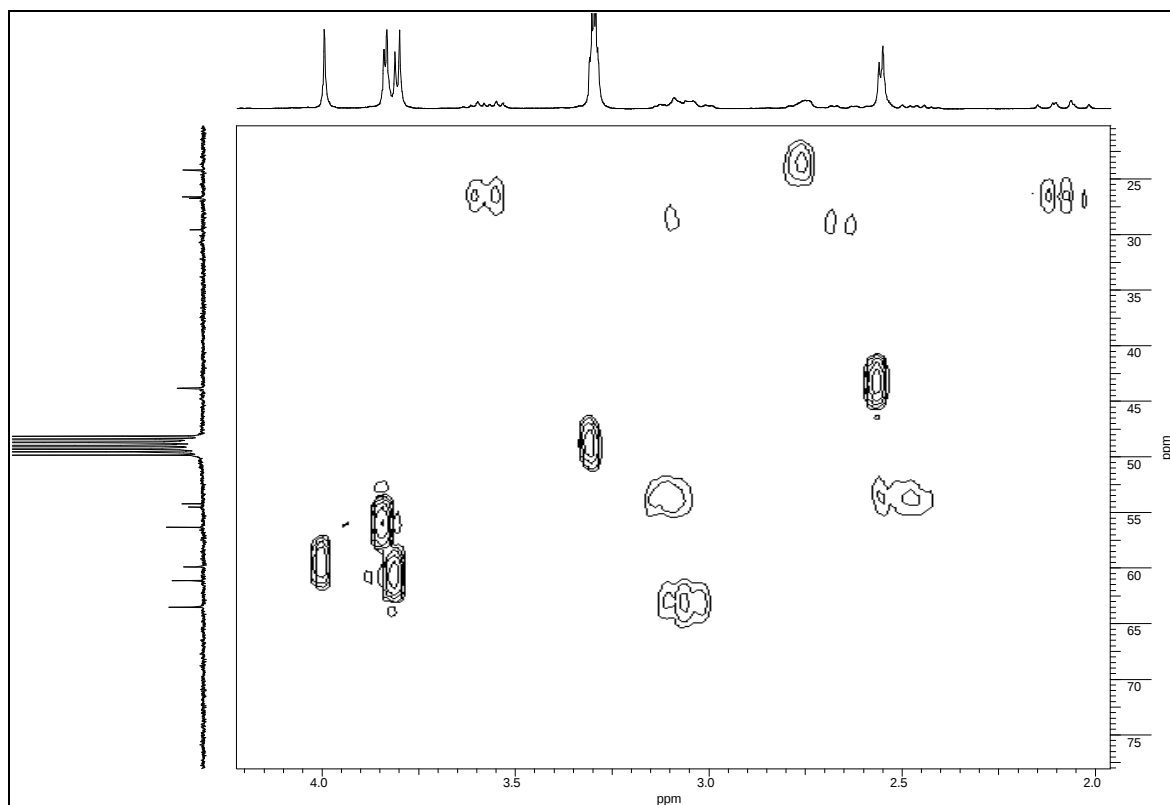
Tabela 26- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **10** (300/75 MHz, CD₃OD)

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (10)	HMBC (10)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
4	24,2	2,74 m	-
5	54,2	3,08 m (Ha)	-
		2,45 m (Hb)	-
6a	63,5	3,00 m	-
7	26,6	3,54 m (Heq)	C-6a, C-7a, C-8, C-11c
		2,05 tl (12,0 Hax)	C-6a, C-7a, C-8, C-11c
11	103,6	7,21s	C-7a, C-9, C-10, C-11b
N-CH ₃	43,9	2,54 s	C-5, C-6 ^a
3-OCH ₃	59,9	3,98 s	C-3
9-OCH ₃	61,2	3,79 s	C-9
10-OCH ₃	56,3	3,82 s	C-10
OCH ₂ O	102,1	5,90 sl; 6,04 sl	C-1, C-2

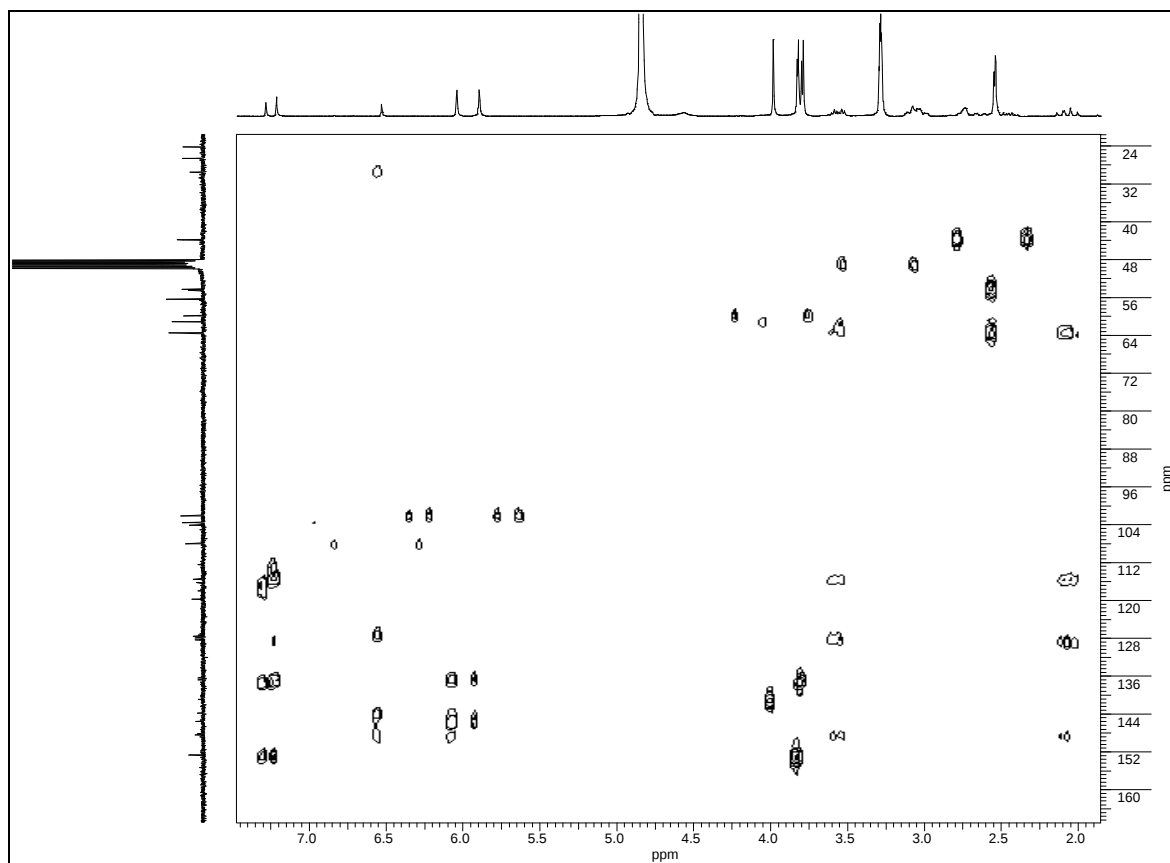
Espectro 75- RMN ^1H de **10** em mistura com **9** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 76- Expansão do espectro de RMN ^1H de **10** em mistura com **9** (300 MHz, CD_3OD)

Espectro 77- RMN ^{13}C de **10** em mistura com **9** (75 MHz, CD_3OD)Espectro 78- Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **10** em mistura com **9** (75 MHz, CD_3OD)

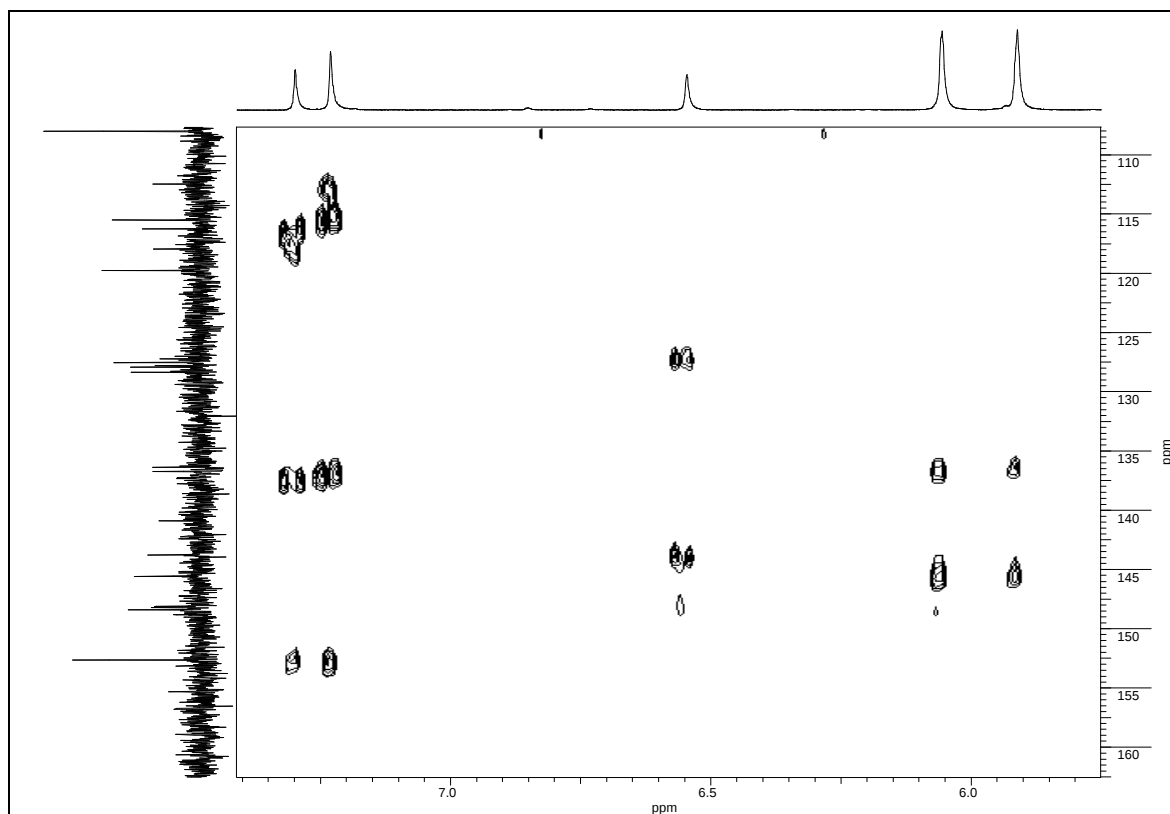
Espectro 79- DEPT 135° de **10** em mistura com **9** (75 MHz, CD₃OD)Espectro 80- Espectro HSQC de **10** em mistura com **9** (300/75 MHz, CD₃OD)



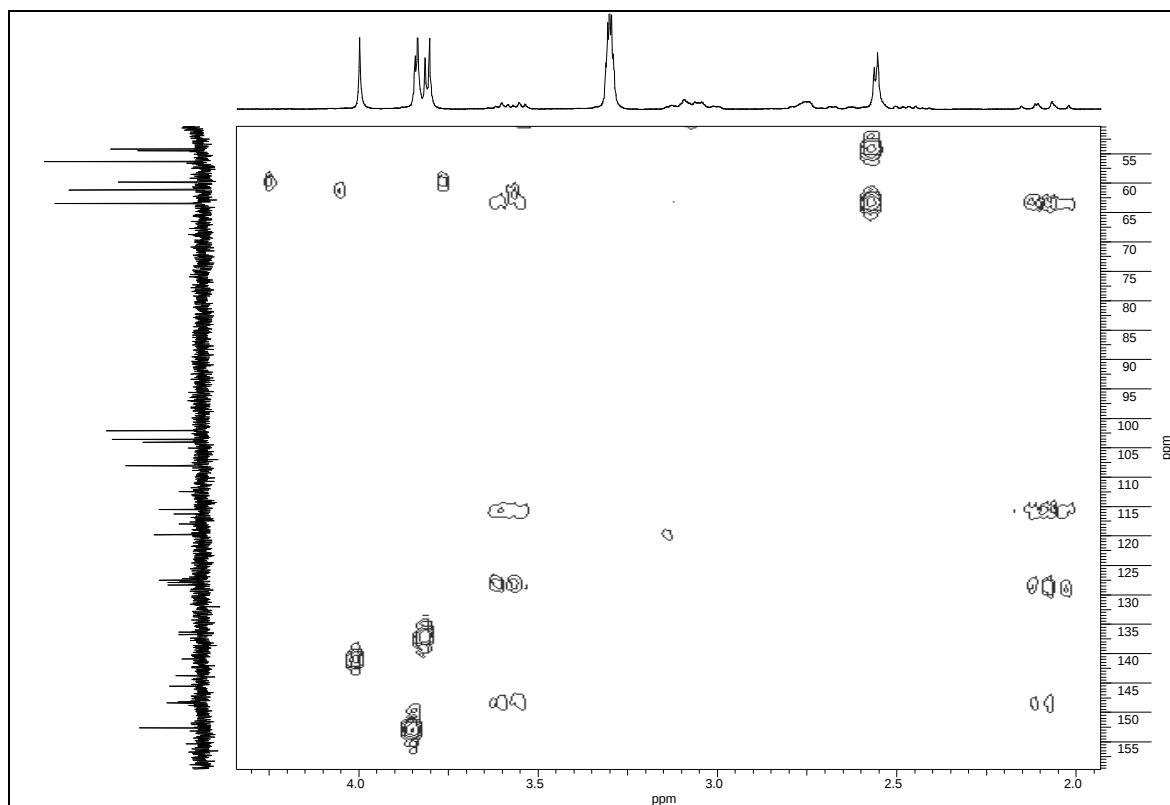
Espectro 81- Expansão do espectro HSQC de **10** em mistura com **9** (300/75 MHz, CD₃OD)



Espectro 82- Espectro HMBC de **10** em mistura com **9** (300/75 MHz, CD₃OD)

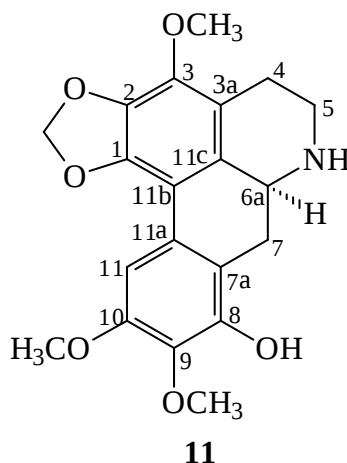


Espectro 83- Expansão do espectro HMBC de **10** em mistura com **9** (300/75 MHz, CD₃OD)



Espectro 84- Expansão do espectro HMBC de **10** em mistura com **9** (300/75 MHz, CD₃OD)

5.1.10- Elucidação estrutural de (+)-norocoxilonina (**11**)



Da fração OAF-ALC H 9 obtida dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas foi isolado o alcaloide **11** (item 4.2.2.9).

Os dados espectrais de RMN ^1H e ^{13}C de **11** mostraram-se bastante semelhantes aos de (+)-ocoxilonina (**10**), indicando que esta substância possuía um esqueleto aporfínico com os mesmos substituintes de **10**, com exceção da metila ligada ao nitrogênio, ausente em **11**.

Esta informação foi baseada na ausência de sinais na região de δ 2,50 e em torno de δ 43,0 nos espectros de RMN ^1H (Espectro 85, tabela 27) e RMN ^{13}C (Espectro 86, tabela 27), respectivamente. A proteção de 11,7 ppm de C-5 e de 9,2 ppm de C-6a no composto **11** em relação aos carbonos C-5 e C-6a de **10**, confirma a ausência de metila ligada ao nitrogênio naquele alcaloide. No espectro infravermelho de **11** foi observada uma banda larga em 3410 cm^{-1} relativa ao estiramento N-H.

O espectro de massas de alta resolução de **11** (Espectro 91) obtido por ionização por “eletrospray” em modo positivo apresentou um íon a m/z 372,1424 $[(\text{M}+\text{H})^+]$ relativo à fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{O}_6\text{N}$, compatível com a proposta supracitada.

Desta forma, considerando-se o valor positivo de rotação óptica ($[\alpha]_{\text{D}} = +64,6$; MeOH, c 0,0013) apresentado por **11**, este foi caracterizado como (+)-norocoxilonina.

As atribuições dos valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos de **11** foram confirmadas através das correlações presentes nos espectros HSQC e/ou HMBC (Espectros 87-90) e estão relacionadas na tabela 28.

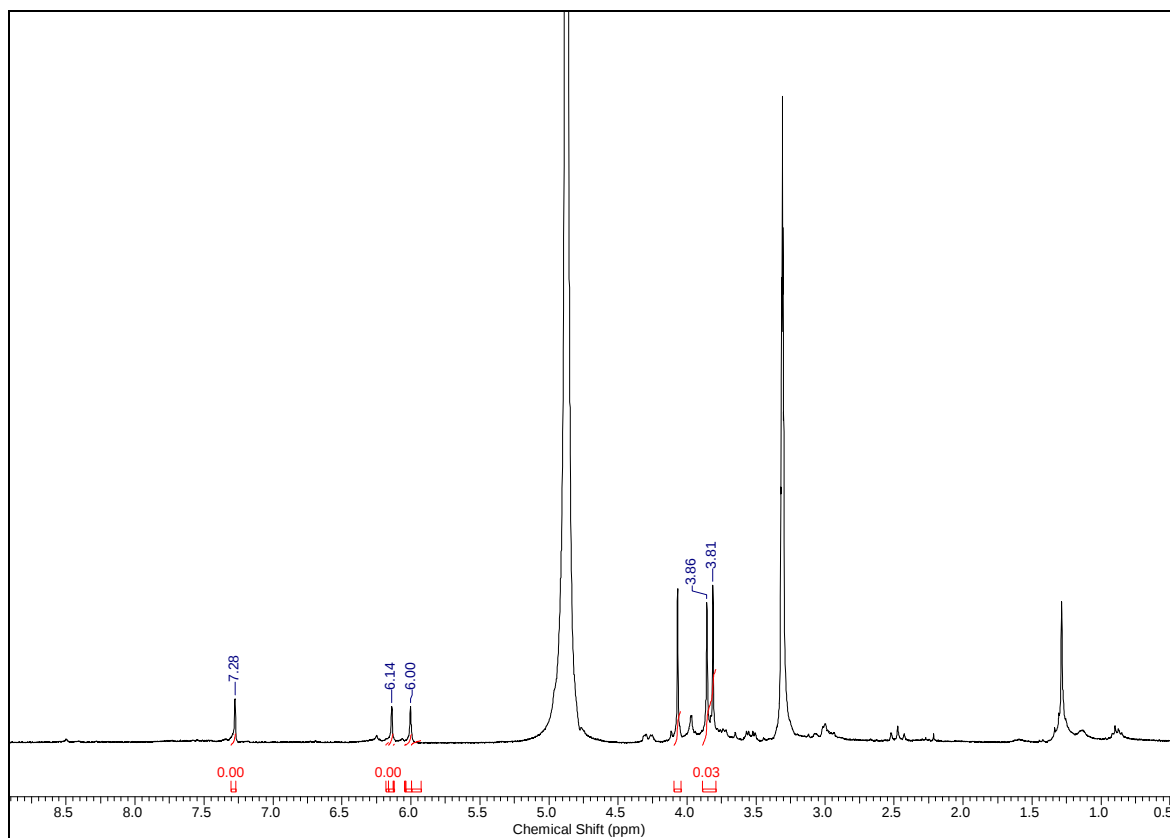
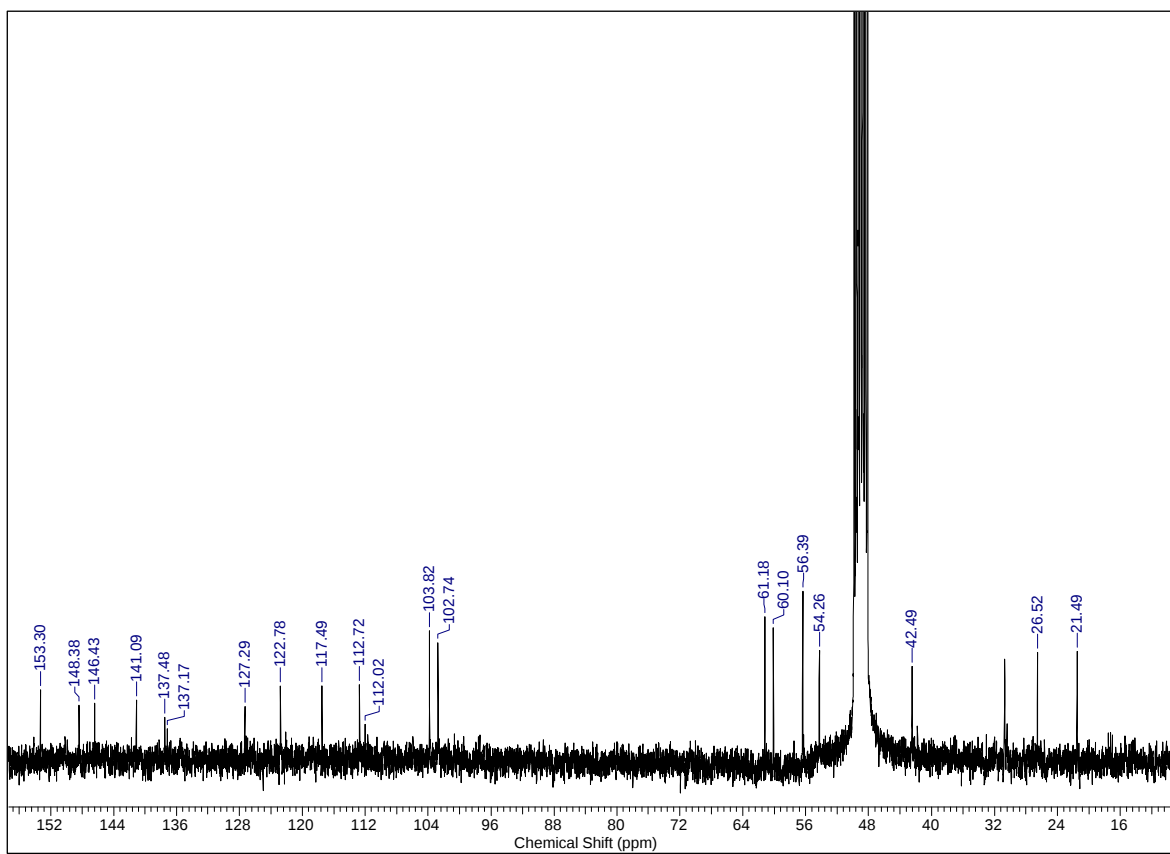
Na literatura não foram encontrados relatos sobre este alcaloide, tratando-se, portanto de uma substância inédita.

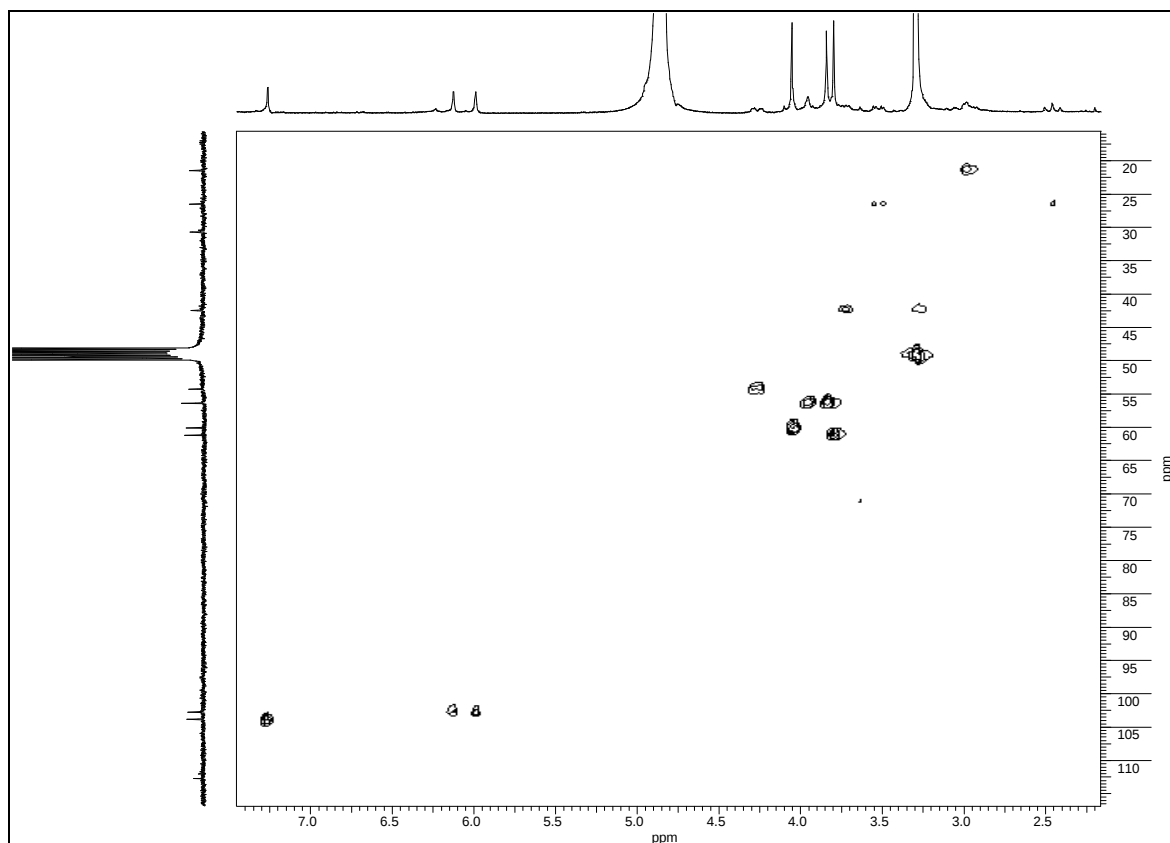
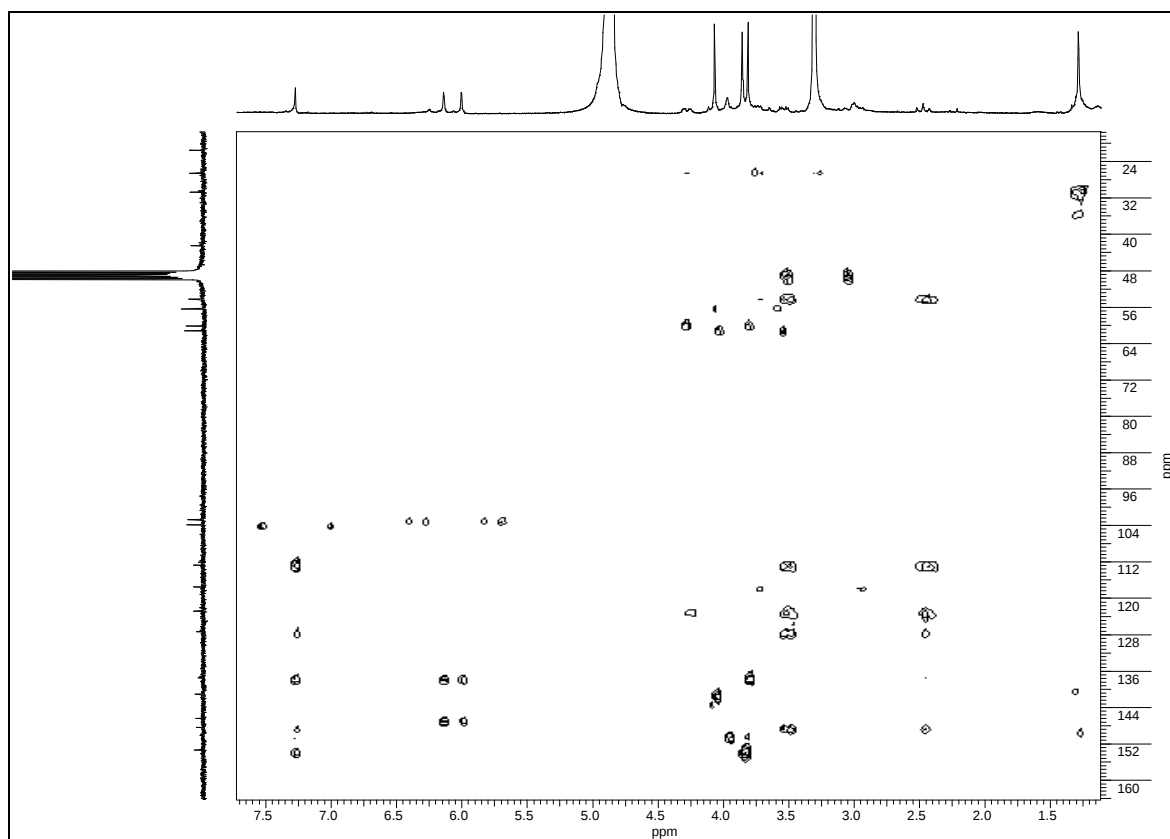
Tabela 27- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **11** e dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de **10**

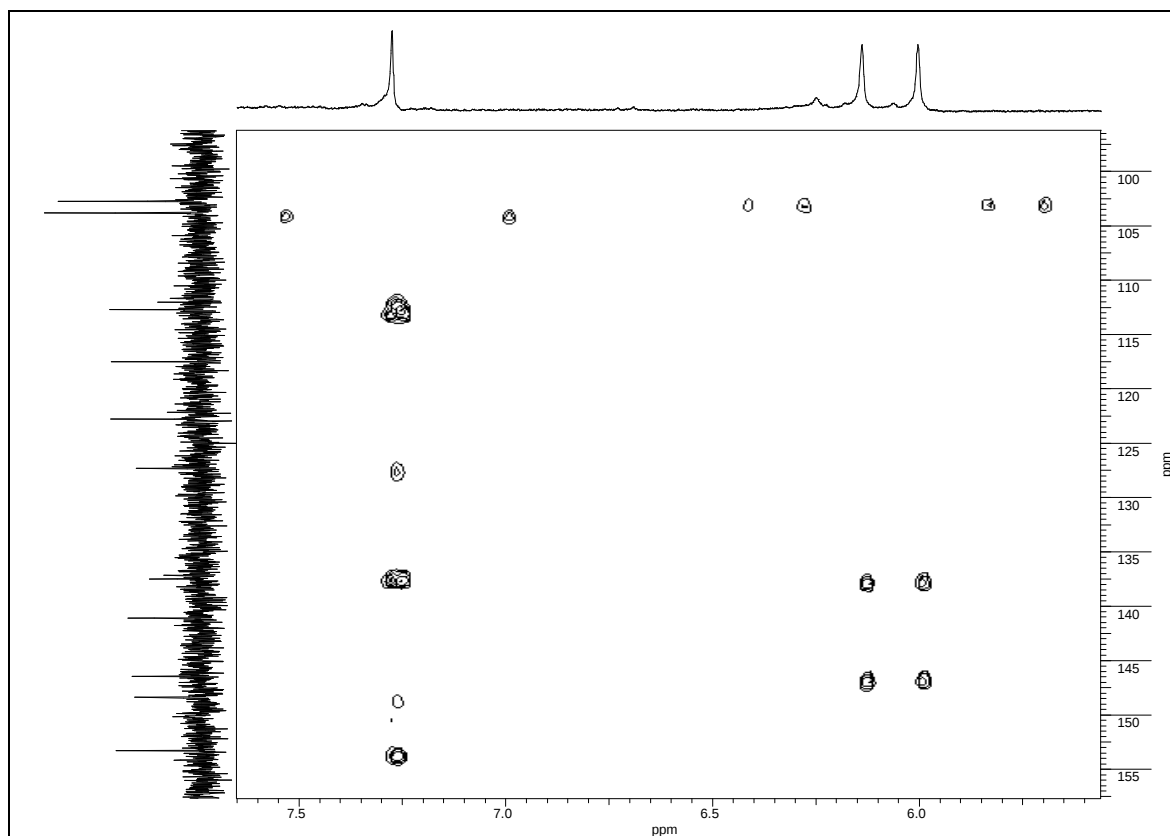
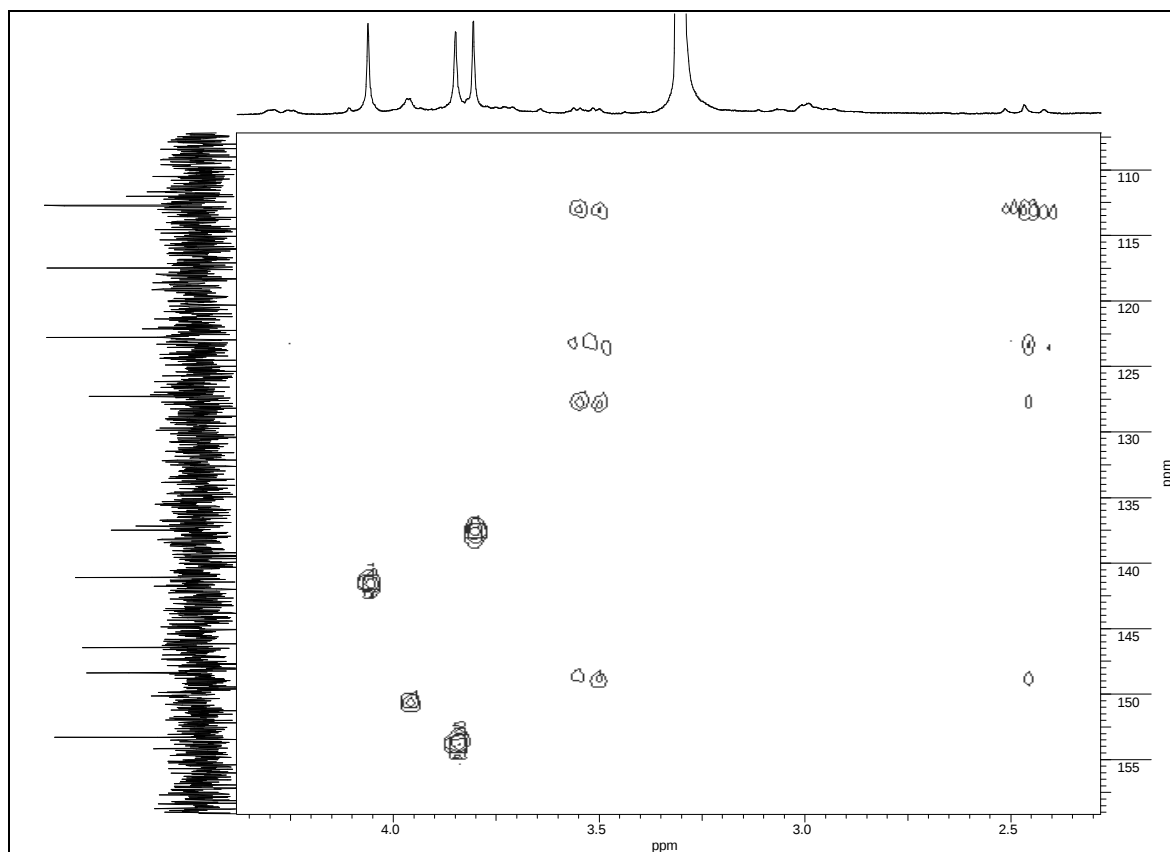
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(11)	(10)
		$\delta^1\text{H}$ [<i>m</i> , J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$
1	146,4	-	145,6
2	137,5	-	136,4
3	141,1	-	140,9
3a	117,5	-	119,8
4	21,5	2,85 - 3,12 m	24,2
5	42,5	3,74 ddl (12,0; 6,0 Heq) 3,34 m (Hax)	54,2
6a	54,3	4,29 dd (15,0; 6,0)	63,5
7	26,5	3,56 dd (15,0, 6,0 Heq) 2,47 tl (15,0 Hax)	26,6
7a	112,0	-	115,5
8	148,4	-	148,4
9	137,2	-	136,7
10	153,3	-	152,7
11	103,8	7,28 s	103,6
11a	127,3	-	127,9
11b	112,8	-	112,5
11c	122,8	-	128,4
N-CH ₃	-	-	43,9
3-OCH ₃	60,1	4,07 s	59,9
9-OCH ₃	61,2	3,81 s	61,2
10-OCH ₃	56,4	3,86 s	56,3
OCH ₂ O	102,7	6,00 sl; 6,14 sl	102,1

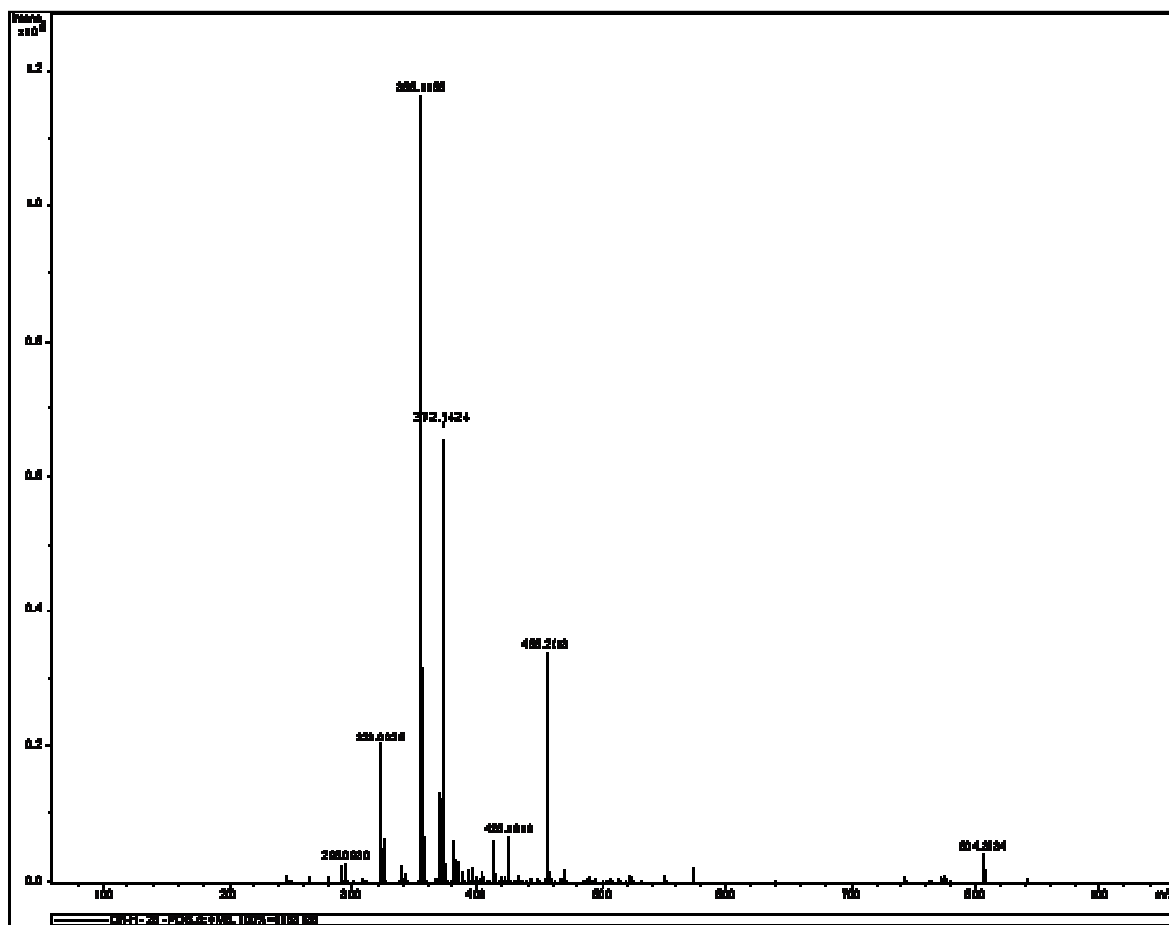
Tabela 28- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **11** (300/75 MHz, CD₃OD)

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (11)	HMBC (11)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
4	21,5	2,85 - 3,12 m	-
5	42,5	3,74 ddl (12,0; 6,0 Heq)	-
		3,34 m (Hax)	-
6a	54,3	4,29 dd (15,0; 6,0)	C-11c
7	26,5	3,56 dd (15,0, 6,0 Heq)	C-6a, C-7a, C-8, C-11a, C-11c
		2,47 tl (15,0 Hax)	C-6a, C-7a, C-8, C-11a, C-11c
11	103,8	7,28 s	C-9, C-10, C-11a, C-11b
3-OCH ₃	60,1	4,07 s	C-3
9-OCH ₃	61,2	3,81 s	C-9
10-OCH ₃	56,4	3,86 s	C-10
OCH ₂ O	102,7	6,00 sl; 6,14 sl	C-1, C-2

Espectro 85- RMN ^1H de **11** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 86- RMN ^{13}C de **11** (75 MHz, CD_3OD)

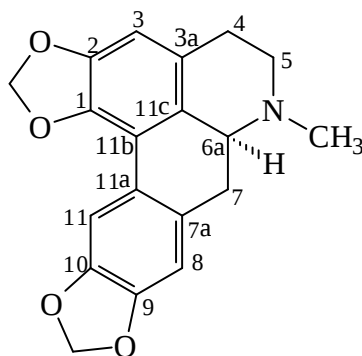
Espectro 87- Espectro de HSQC de **11** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 88- Espectro HMBC de **11** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 89- Expansão do espectro HMBC de **11** (300/75 MHz, CD_3OD)Espectro 90- Expansão do espectro HMBC de **11** (300/75 MHz, CD_3OD)



Espectro 91- Espectro de massas de alta resolução (HRESIMS) de **11** obtido no modo positivo

5.1.11- Identificação de (+)-neolitsina (**12**)



12

Da fração OAF-ALC B 6 proveniente dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas, foi obtido o composto **12** contendo ainda impurezas em pequena proporção (item 4.2.2.2).

O espectro de RMN ^1H de **12** (Espectro 92, tabela 29) apresentou três singletos em δ 6,56; 6,81 e 7,56 atribuídos, de maneira semelhante aos alcaloides **1**, **4**, **5** e **6**, a H-3, H-8 e H-11, respectivamente, como também dois singletos em δ 5,93 e 6,07, referentes aos hidrogênios do grupo dioxidometileno presente no anel A e um singlete em δ 2,56 relativo à metila ligada ao nitrogênio. Apresentou ainda um singlete em δ 5,95, sugestivo de hidrogênios de outro grupo dioxidometileno, que estaria, portanto, presente no anel D, na posição C- 9/C-10.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 93, tabela 29) mostrou dezenove absorções mais intensas, atribuíveis aos carbonos de **12**, assim como uma em δ 29,7 correspondente a material graxo.

Com base nas correlações presentes no espectro HSQC (Espectros 94 e 95, tabela 30) foi feita a correspondência entre os hidrogênios e os seus respectivos carbonos e aquelas absorções foram referentes a: - quatro carbonos metínicos; - cinco carbonos metilênicos, sendo que os sinais em δ 102,2 e 102,5 foram atribuídos aos carbonos dos grupos OCH_2O , confirmando, então, a presença de um segundo grupo dioxidometileno na estrutura de **12**; - nove carbonos quaternários, sendo quatro deles referentes aos carbonos oxigenados C-1 (δ 143,5) e C-2 (δ 148,3) no anel A e em δ 148,2 e δ 148,3 no anel D; - um carbono metílico (ligado a N) em δ 43,6.

No espectro HMBC (Espectros 96 e 97, tabela 30) de **12** foram observadas correlações (tipo 3J) entre os hidrogênios da metila ligada a N e os carbonos em δ 54,4 (C-5) e 63,6 (C-6a), além das correlações entre H-3 (δ 6,56) e os carbonos C-1 e C-2 e entre H-8 e H-11 e C-9 e C-10.

De acordo com tais informações, juntamente com o valor de rotação óptica $[\alpha]_D = +27,0$ (MeOH, c 0,0005) encontrado e também com base no levantamento bibliográfico realizado, chegou-se a conclusão que **12** tratava-se do alcaloide (+)-neolitsina, cujos dados espectrais de RMN 1H (GUINAUDEAU et al., 1975) apresentaram uma boa correlação com os de **12**. No entanto não foram encontrados os dados de RMN ^{13}C para este alcaloide, os quais são apresentados pela primeira vez no presente trabalho.

Embora já tenha sido relatado em outras espécies de Lauraceae, (STEVIGNY et al., 2002; PECH & BRUNETON, 1982; CAVA et al., 1968), o isolamento deste composto no gênero *Ocotea* está sendo descrito pela primeira vez.

Com relação às atividades biológicas relatadas para o composto, destaca-se a sua ação inibitória frente ao parasita *Leishmania mexicana* e atividade citotóxica *in vitro* contra linhagens de células HEla e 3T3 (STEVIGNY et al., 2002).

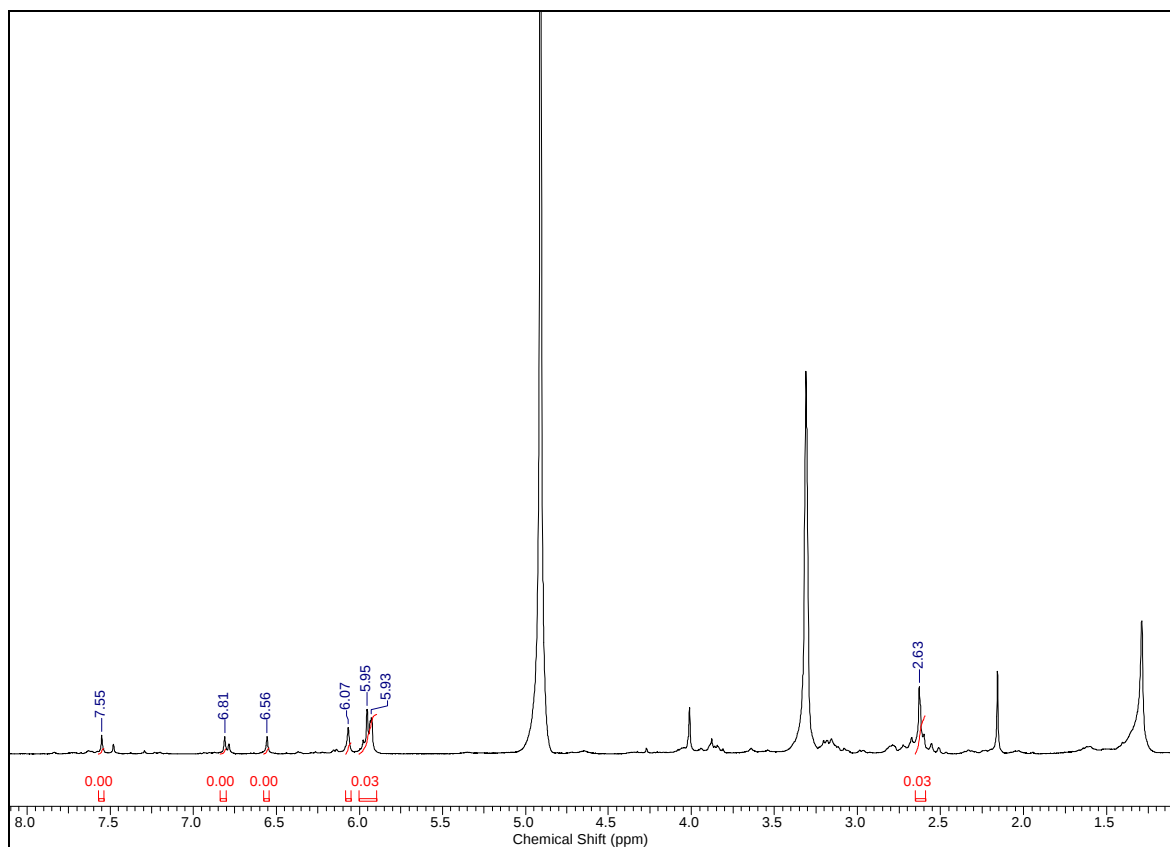
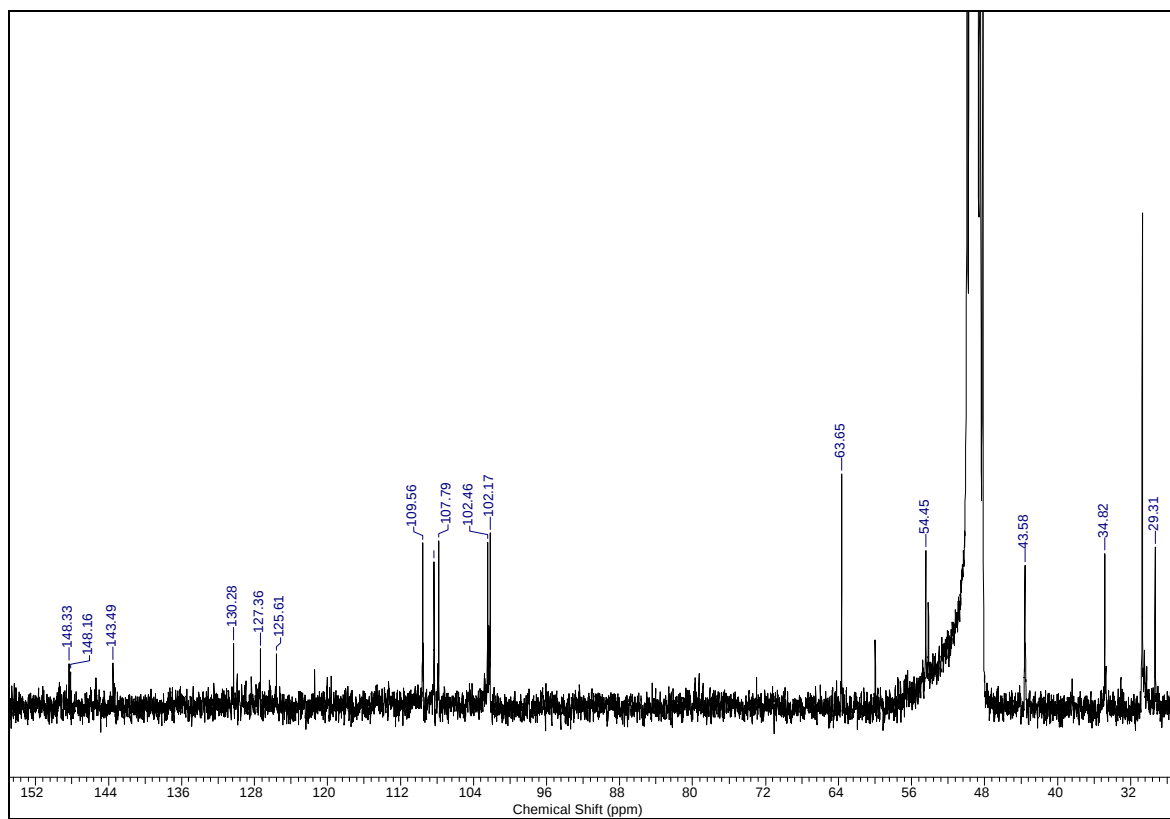
Tabela 29- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **12** e dados de RMN ^1H do alcaloide (+)-neolitsina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl_3]

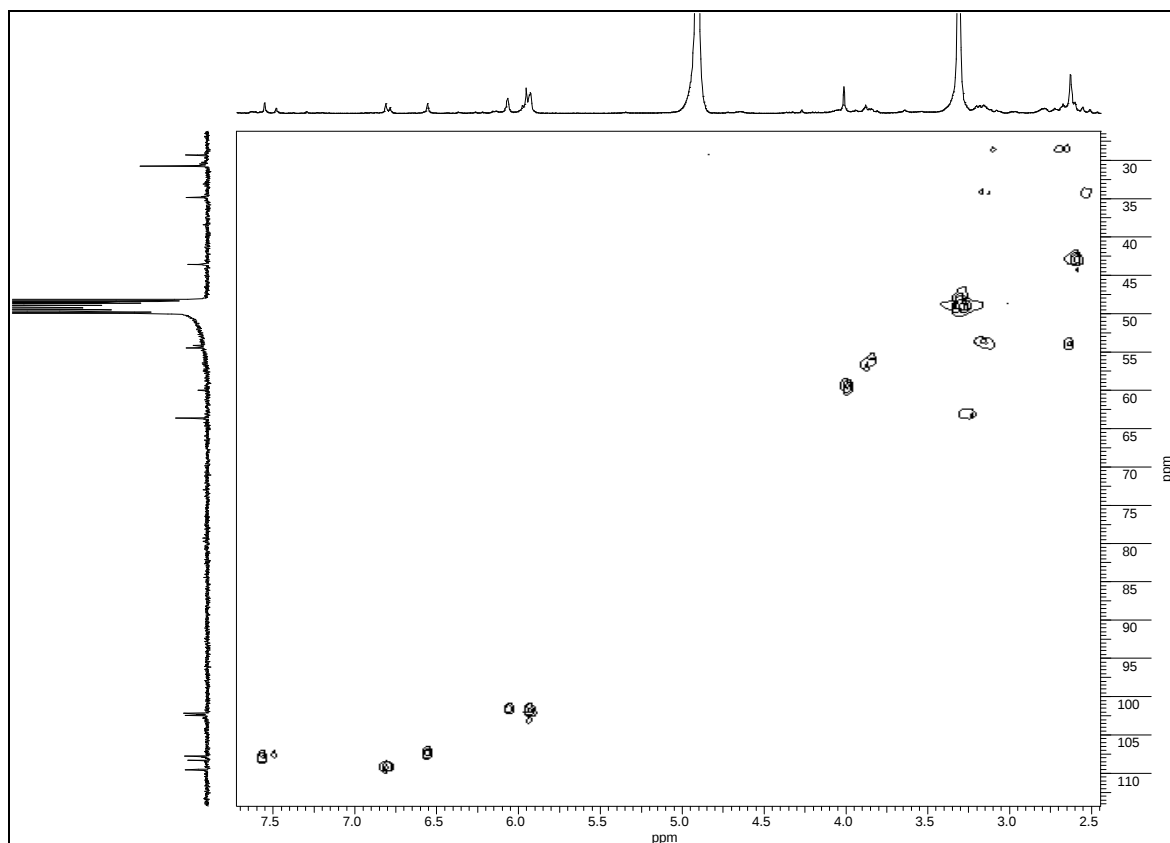
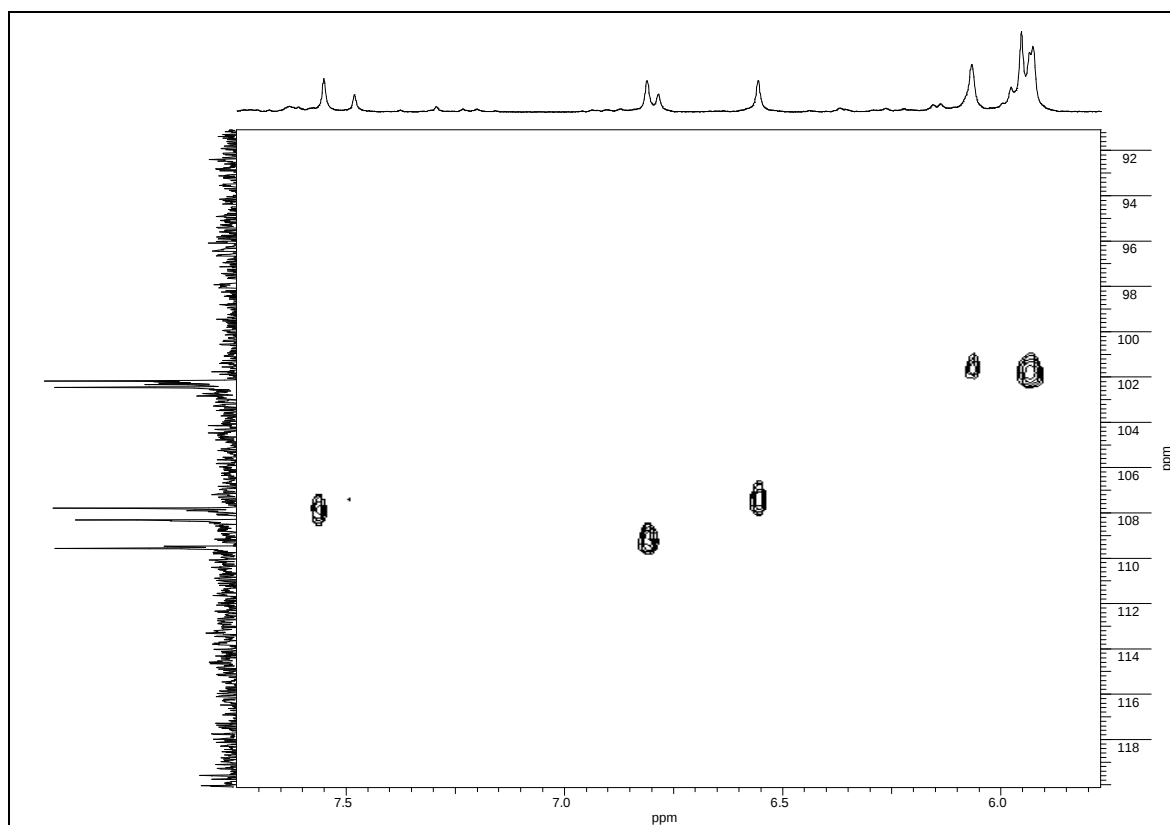
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(12) $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	(12) Literatura $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	143,5	-	-
2	148,3	-	-
3	107,8	6,56 s	6,43 s
3a	127,6	-	-
4	29,3	3,13 m (Ha) 2,72 m (Hb)	Nc
5	54,4	3,16 m (Ha) 2,72 m (Hb)	Nc
6a	63,6	3,27 m	Nc
7	34,8	3,14 m (Ha) 2,55 m (Hb)	Nc
7a	130,3	-	-
8	109,6	6,81 s	6,95 s
9	148,3 ^a	-	-
10	148,2 ^a	-	-
11	108,3	7,56 s	7,57 s
11a	125,6	-	-
11b	117,2	-	-
11c	126,4	-	-
N-CH ₃	43,6	2,60 s	2,47
OCH ₂ O-1, 2	102,2	5,93 sl; 6,07 sl	5,83 s; 5,92 s
OCH ₂ O-9, 10	102,5	5,95 s	5,95 s

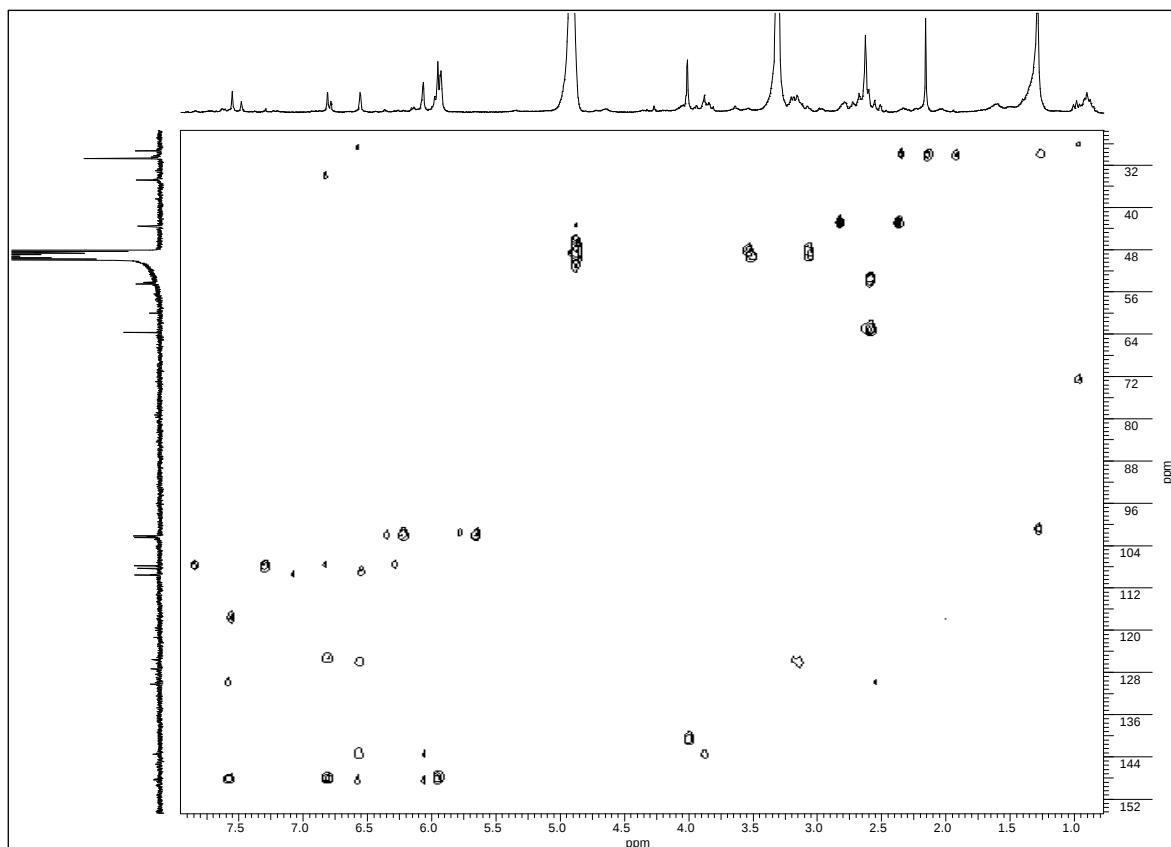
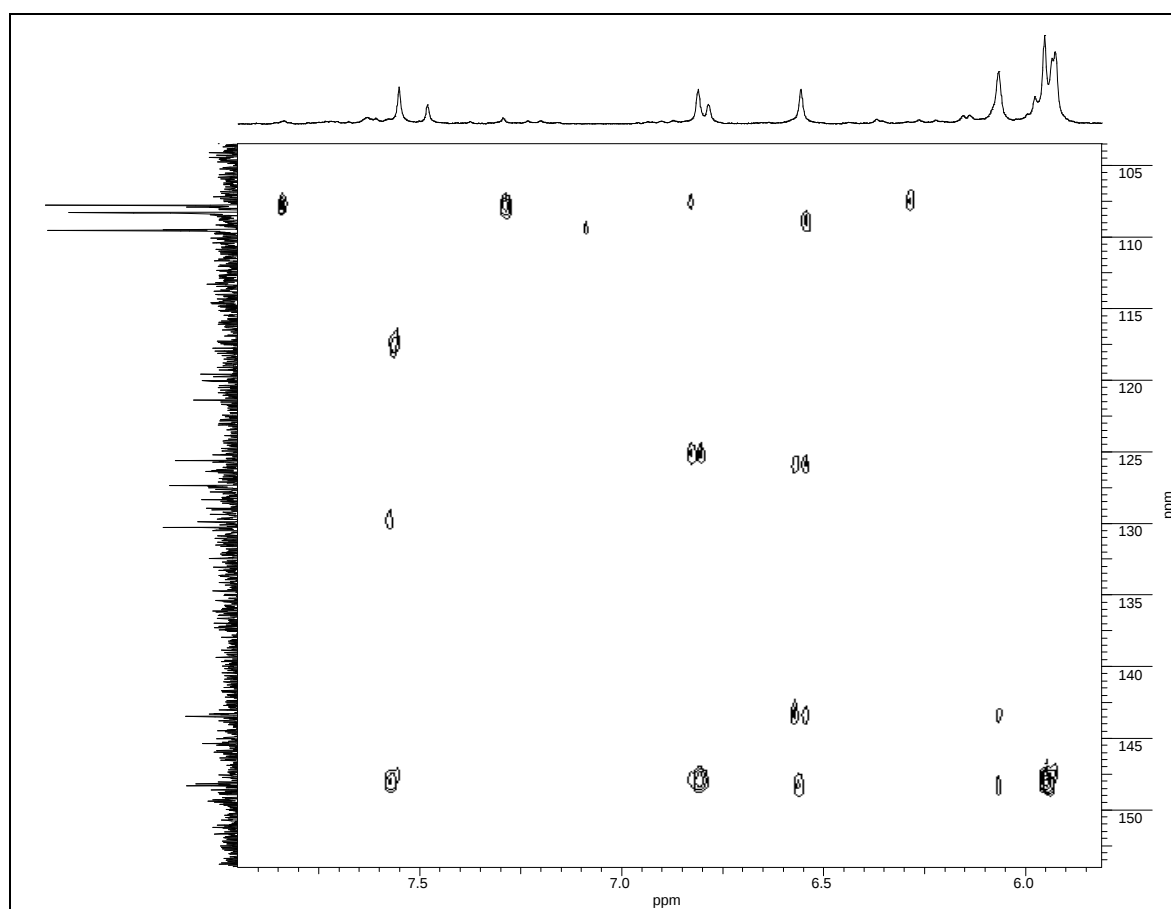
^a valores que podem estar trocados

Tabela 30- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **12** (300/75 MHz, CD₃OD)

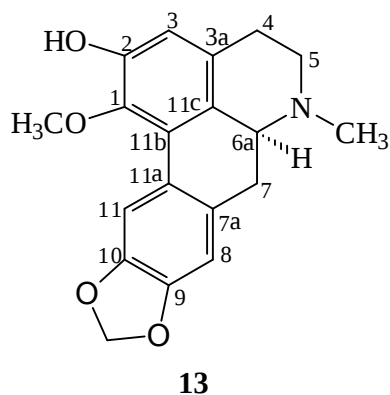
C/H	HSQC (12)		HMBC (12)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	107,8	6,56 s	C-1, C-2, C-3a, C-4
4	29,3	3,13 m (Ha)	-
		2,72 m (Hb)	-
5	54,4	3,16 m (Ha)	-
		2,72 m (Hb)	-
6a	63,6	3,27 m	-
7	34,8	3,14 m (Ha)	C-7a, C-11 ^a
		2,55 m (Hb)	C-7a, C-11 ^a
8	109,6	6,81 s	C-7, C-9, C-10, C-11 ^a
11	108,3	7,56 s	C-7a, C-9, C-10, C-11b
N-CH ₃	43,6	2,60 s	C-5, C-6 ^a
OCH ₂ O-1, 2	102,2	5,93 sl; 6,07 sl	C-1, C-2
OCH ₂ O-9, 10	102,5	5,95 s	C-9, C-10

Espectro 92- RMN ^1H de **12** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 93- RMN ^{13}C de **12** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 94- Espectro HSQC de **12** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 95- Expansão do espectro HSQC de **12** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 96- Espectro HMBC de **12** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 97- Expansão do espectro HMBC de **12** (300/75 MHz, CD₃OD)

5.1.12- Identificação de (+)-isodomesticina (13)



Da fração OAC-ALC 5, obtida a partir dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico, foi isolado o composto **13** (item 4.2.2.5).

O espectro de RMN ^1H de **13** (Espectro 98, tabela 31) apresentou três singletos em δ 6,57; 6,80 e 7,81 atribuídos a H-3, H-8 e H-11, respectivamente, um singlete em δ 3,54 sugestivo de metoxila aromática em C-1 (SHAMA, 1972) e ainda um singlete em δ 2,52 relativo à metila ligada a nitrogênio. Apresentou também um singlete em δ 5,95, já evidenciado no espectro do alcaloide **12**, relativo aos hidrogênios do grupo dioximetileno no anel D (C- 9/C-10). Entretanto não foram observados os sinais entre δ 5,90 e 6,10 relativos ao grupo OCH_2O do anel A, como nos alcaloides anteriores **1-12**, indicando a ausência deste grupo neste anel.

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 99, tabela 31), auxiliado pelos dados obtidos do experimento HSQC (Espectros 100 e 101, tabela 32), foram observados nove carbonos tetrassubstituídos, sendo quatro carbonos oxigenados em δ 148,0 e 148,2 (correspondentes a C-9 e C-10, respectivamente) e em δ 144,7 e 150,7 (atribuídos aos carbonos presentes no anel A), três carbonos metilênicos, um deles a δ 102,3 relativo ao grupo dioximetileno, quatro carbonos metínicos, sendo três de anel aromático (C-3, C-8 e C-11) e dois carbonos metílicos a δ 43,9 ($\text{CH}_3\text{-N}$) e δ 60,4 (OCH_3).

O valor do deslocamento químico da metoxila (δ 60,4) foi indicativo de sua localização em C-1, definindo, portanto, a presença de um grupo hidroxila em C-2. A localização daquela metoxila em C-1 também foi evidenciada pelas correlações existentes

no espectro HMBC (Espectro 102-105, tabela 32) entre C-1 (δ 144,7) e os hidrogênios da metoxila (δ 3,54) e o hidrogênio H-3 (correlações tipo 3J).

Estas informações, juntamente com o valor da rotação óptica $[\alpha]_D = + 37,5$ (MeOH, c 0,00064), permitiram identificar o composto **13** como sendo (+)-isodosmeticina, alcaloide isolado anteriormente de outra espécie do gênero, *Ocotea puberula* (ZANIN & LORDELLO, 2007), cujos dados espectrais apresentaram uma boa correlação com os de **13** (ZANIN & LORDELLO, 2007; GUINAUDEAU et al., 1975).

Tabela 31- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **13** e do alcaloide (+)-isodomeesticina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl_3], (ZANIN & LORDELLO, 2007) [75 MHz, CDCl_3]

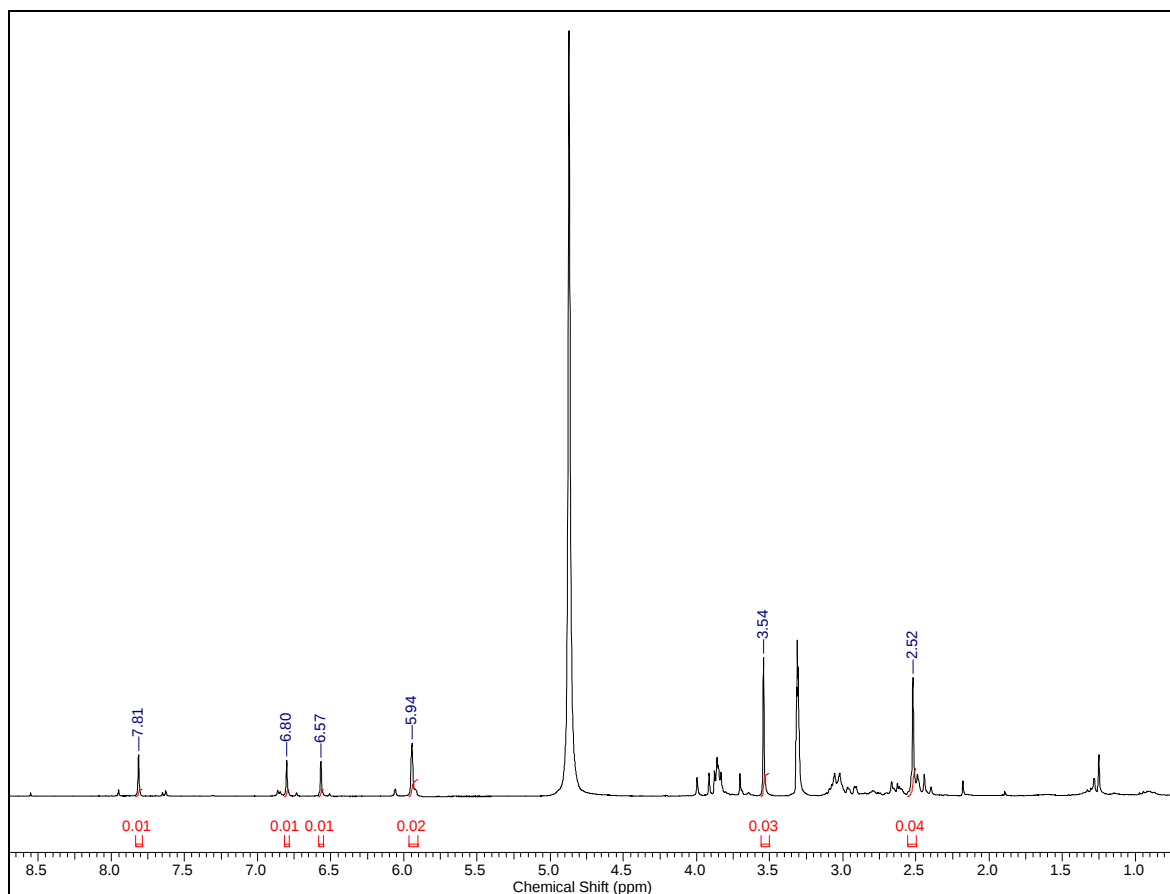
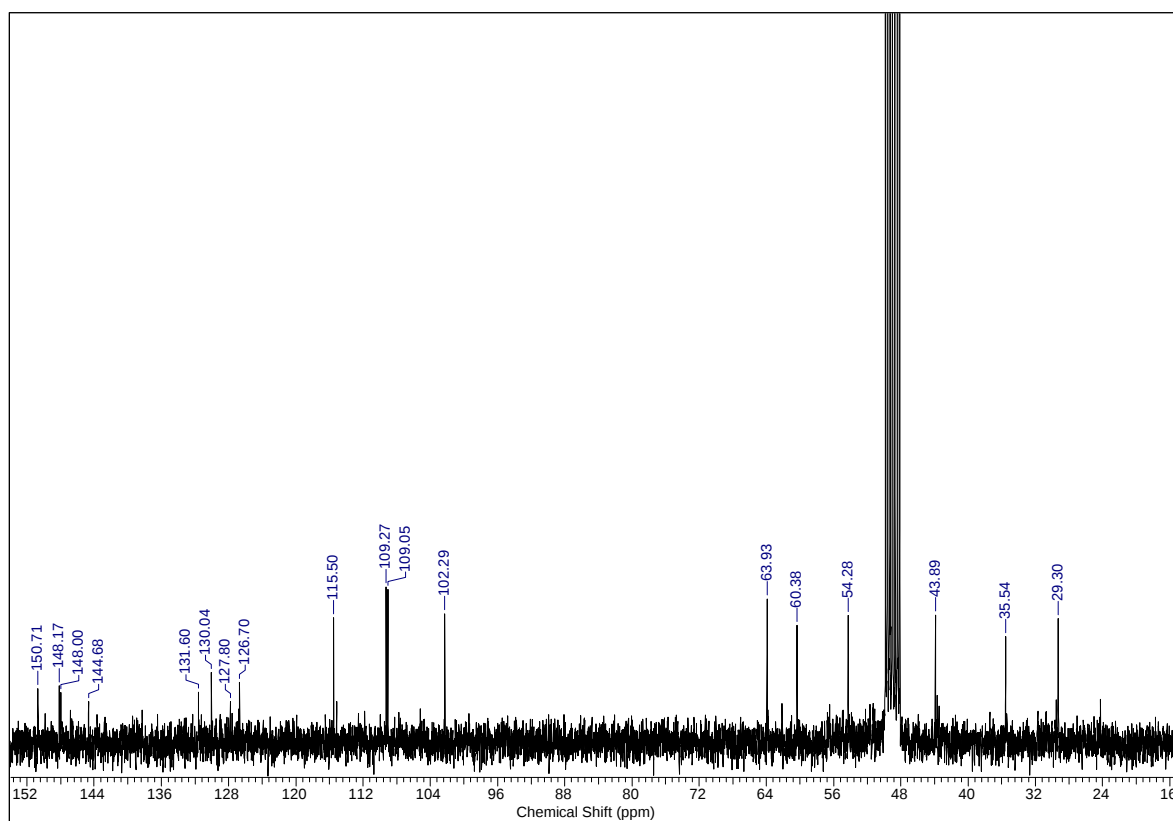
C/H	(13)			(13) Literatura	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	
1	144,7	-	142,8	-	
2	150,7	-	148,9	-	
3	115,5	6,57 s	113,6	6,52 s	
3a	130,0	-	128,5	-	
4	29,3	3,02 m (Ha) 2,64m (Hb)	27,3	Nc	
5	54,3	2,97 m (Ha) 2,49 m (Hb)	52,8	Nc	
6a	63,9	2,95 ddl (15,0; 3,0)	62,1	Nc	
7	35,5	3,02 m (Heq) 2,44 tl (15,0 Hax)	33,8	Nc	
7a	131,6	-	129,7	-	
8	109,3	6,80 s	108,6	6,76 s	
9	148,0 ^a	-	147,2	-	
10	148,2 ^a	-	146,9	-	
11	109,1	7,81 s	107,8	7,83 s	
11a	126,7	-	125,0	-	
11b	127,8	-	126,1	-	
11c	126,7	-	125,0	-	
N-CH ₃	43,9	2,52 s	42,3	2,50 s	
1-OCH ₃	60,4	3,54 s	60,4	3,57 s	
OCH ₂ O	102,3	5,95 s	101,1	5,95 s	

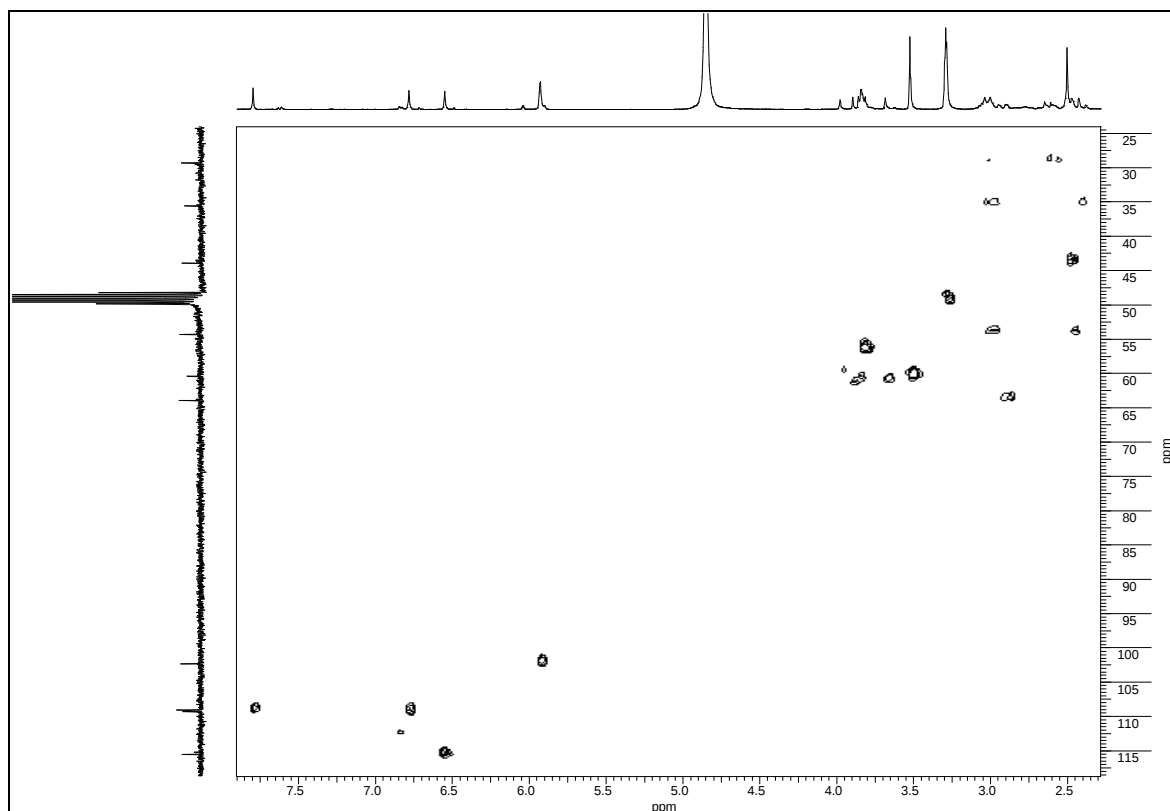
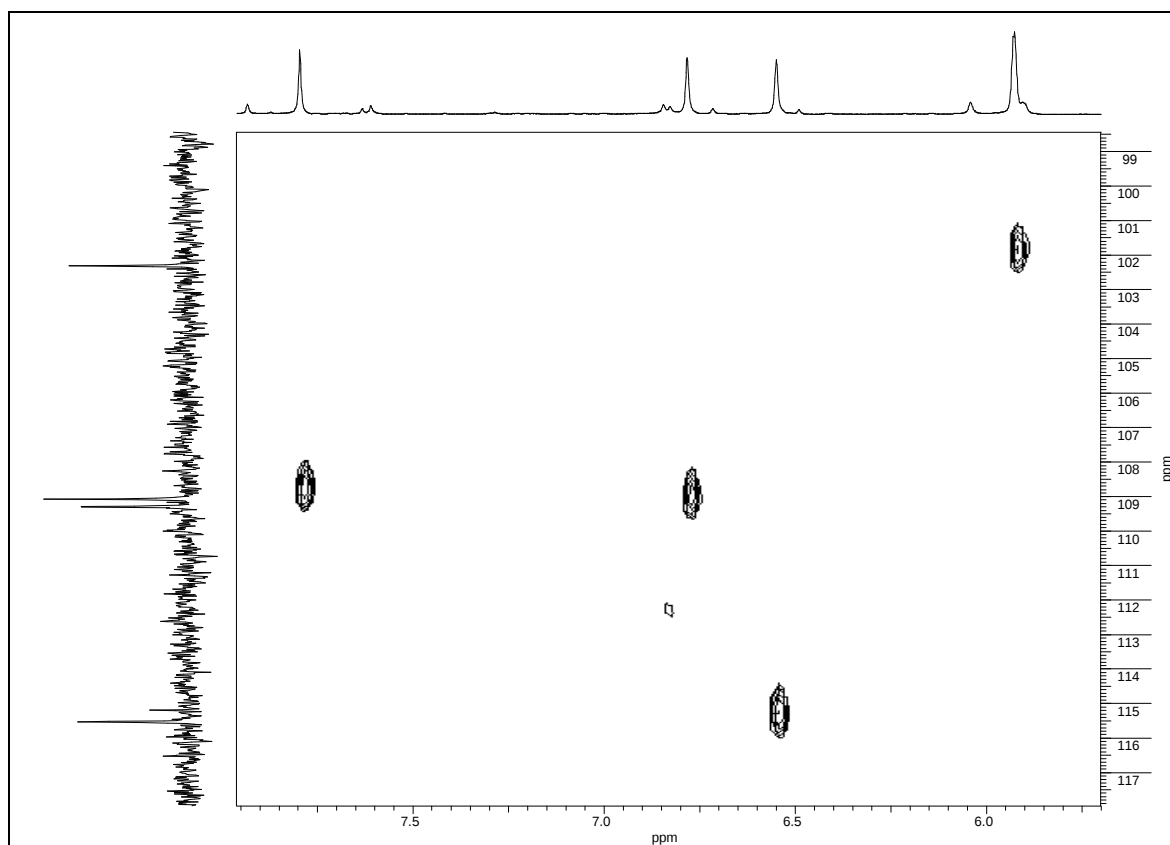
nc: não citado na referência

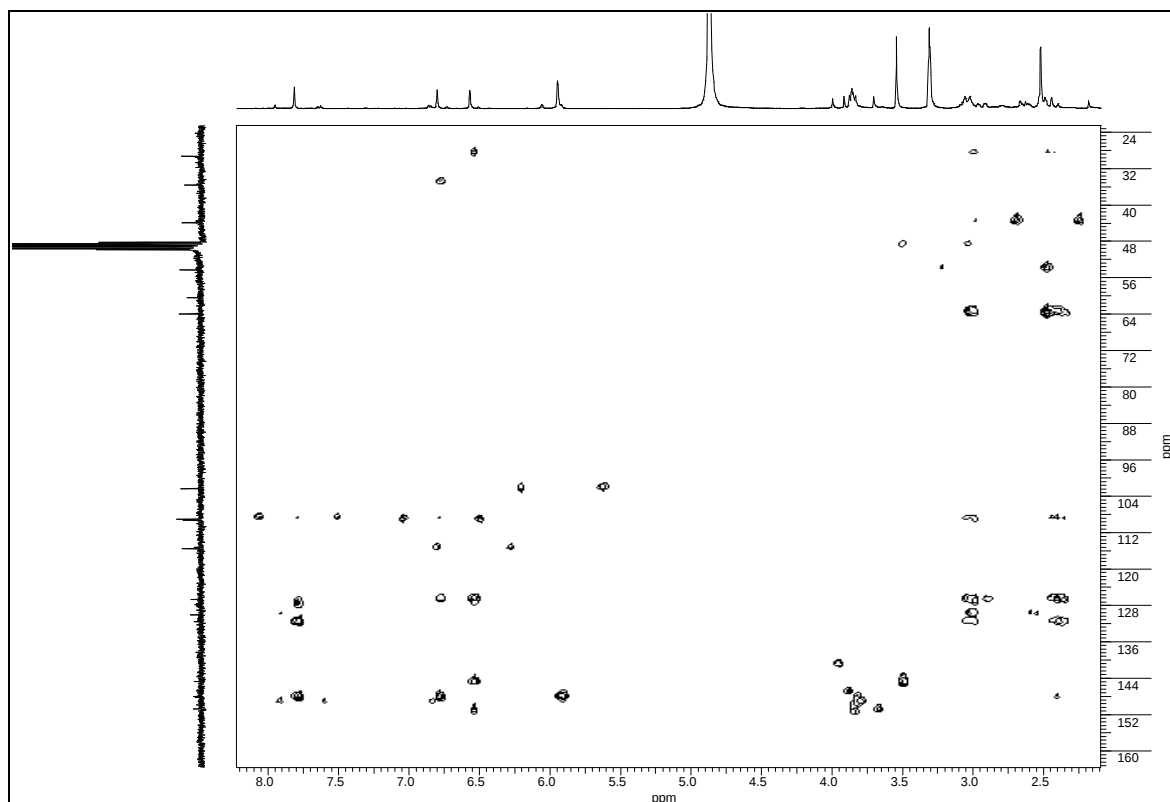
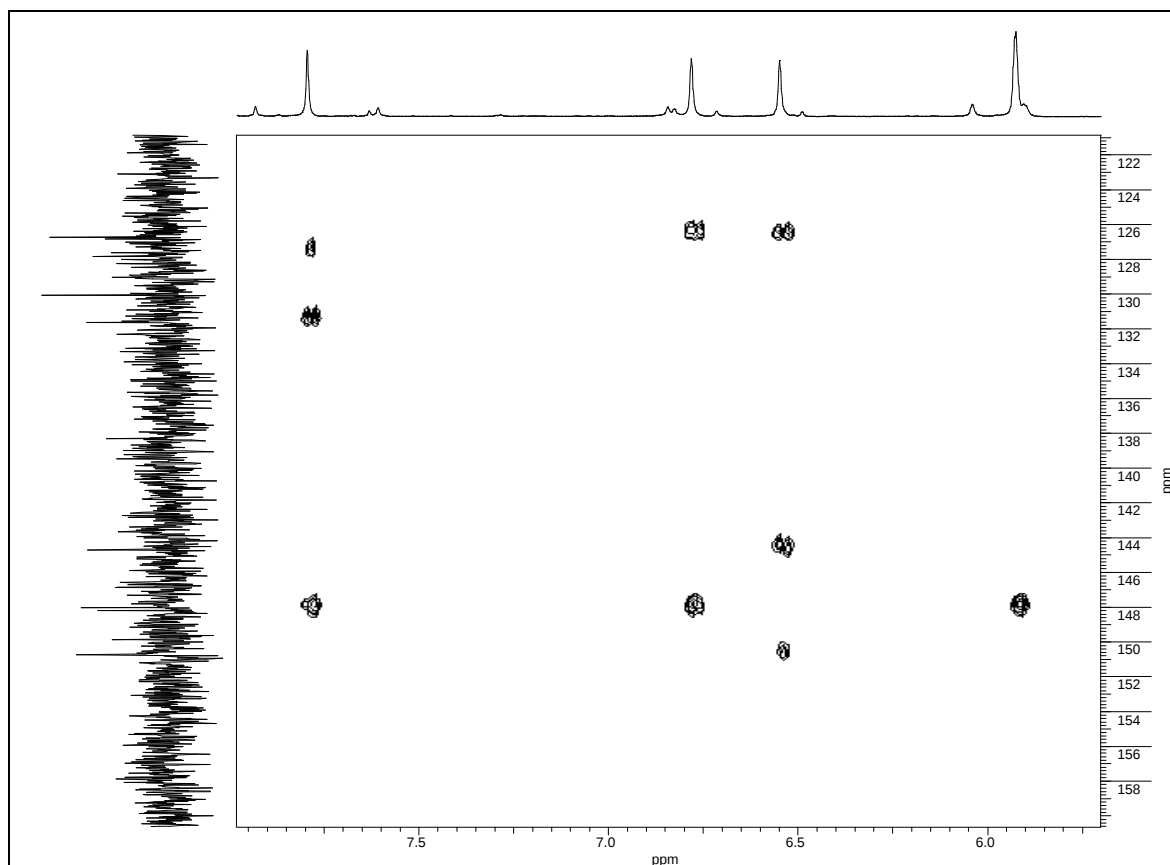
^a valores que podem estar trocados

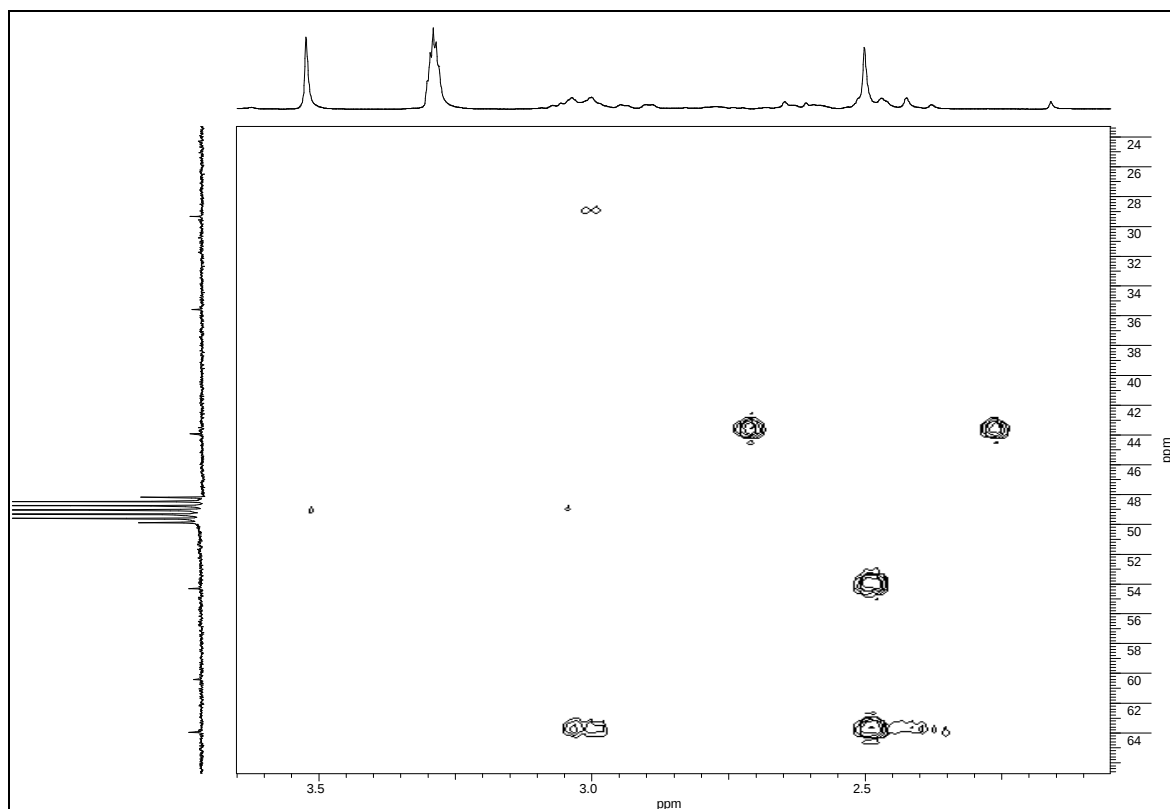
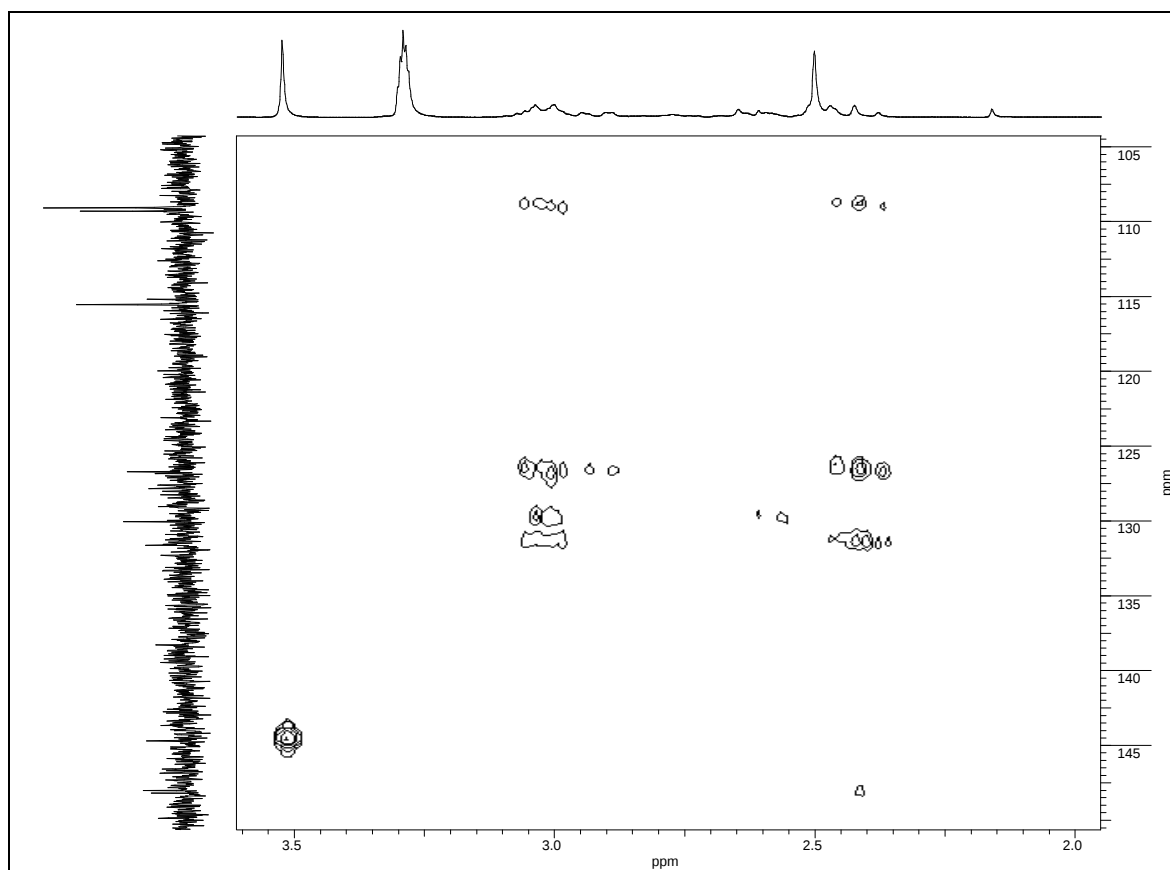
Tabela 32- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **13** (300/75 MHz, CD₃OD)

C/H	HSQC (13)		HMBC (13)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	115,5	6,57 s	C-1, C-2, C-4, C-11 ^a
4	29,3	3,02 m (Ha)	-
		2,64m (Hb)	-
5	54,3	2,97 m (Ha)	-
		2,49 m (Hb)	-
6a	63,9	2,95 ddl (15,0; 3,0)	-
7	35,5	3,02 m (Heq)	C-6a, C-7a, C-8, C-11a, C-11c
		2,44 tl (15,0 Hax)	C-6a, C-7a, C-8, C-11a, C-11c
8	109,3	6,80 s	C-7, C-9, C-10, C-11a
11	109,1	7,81 s	C-7a, C-9, C-10, C-11b
N-CH ₃	43,9	2,52 s	C-5, C-6 ^a
1-OCH ₃	60,4	3,54 s	C-1
OCH ₂ O-9, 10	102,3	5,95 s	C-9, C-10

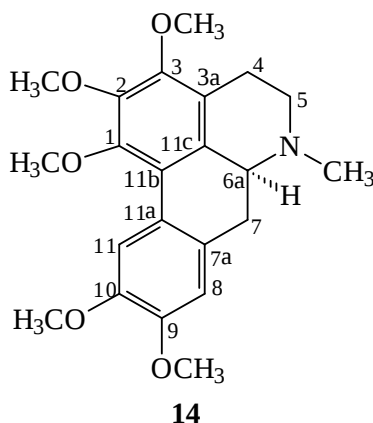
Espectro 98- RMN ^1H de **13** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 99- RMN ^{13}C de **13** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 100- Espectro HSQC de **13** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 101- Expansão do espectro HSQC de **13** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 102- Espectro HMBC de **13** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 103- Expansão do espectro HMBC de **13** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 104- Expansão do espectro HMBC de **13** (300/75 MHz, CD_3OD)Espectro 105- Expansão do espectro HMBC de **13** (300/75 MHz, CD_3OD)

5.1.13- Identificação de (+)-talicsimidina (**14**)



Da fração OAF-ALC A 2 proveniente dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas (item 4.2.2.1) foi obtido o alcaloide **14**, com pequena proporção de impurezas.

No espectro de RMN ^1H (Espectros 106, tabela 33) de **14** foram observados dois singletos em δ 6,92 e 7,92 referentes a H-8 e H-11, respectivamente, um singlete em δ 2,69 atribuído à metila ligada a N e ainda sinais atribuídos a cinco metoxilas em δ 3,92, 3,89, 3,88, 3,86 e 3,70. No espectro de **14** não foram observados sinais na região de δ 6,00 indicando a ausência do grupo OCH_2O nos anéis A e/ou D.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 107 e 108, tabela 33) mostrou sinais para vinte e dois carbonos. Com auxílio das informações presentes no espectro HSQC (Espectros 109 e 110, tabela 34) estes sinais foram atribuídos: - a dez carbonos tetrassubstituídos, dos quais cinco deles relativos a carbonos oxigenados em δ 151,1; 151,0; 147,1, 149,7 e 149,2, sendo os dois últimos correspondentes a C-9 e C-10, respectivamente, três carbonos metilênicos em δ 23,7 (C-4); 53,7 (C-5) e 34,0 (C-7), não tendo sido observado o sinal na região de δ 100,0, confirmando assim, a ausência do grupo OCH_2O - três carbonos metínicos em δ 64,0 (C-6a), 112,7 (C-8) e 113,1 (C-11) e cinco metoxilas em δ 61,4; 61,0; 60,9; 56,8 e 56,5, sendo as três primeiras estericamente impedidas e portanto, localizadas no anel A. Foi observado ainda um sinal em δ 43,3 referente ao carbono metílico ligado ao N.

O singlete relativo a uma metoxila presente no anel A observado em δ 3,89 apresentou correlação com o sinal em δ 60,9 no espectro HSQC (Espectros 109 e 110,

tabela 34). No espectro HMBC (Espectros 111-114, tabela 34), os hidrogênios desta metoxila correlacionaram com o carbono a δ 151,0. Uma vez que este carbono apresentou conectividade neste mesmo experimento com H-4, ficou definida a localização do grupo metoxila em δ_H 3,89/ δ_C 60,9 no carbono 3.

Os singletos relativos às duas outras metoxilas presentes no anel A em δ 3,70 e 3,92 apresentaram picos cruzados no espectro HSQC com os sinais dos respectivos carbonos em δ 61,0 e 61,4, enquanto que no espectro HMBC apresentaram correlações à longa distância com os sinais dos carbonos em δ 151,1 e 147,1, respectivamente. Assim, uma vez que, no alcaloide **13** foram atribuídos os valores de δ 144,7 para C-1 e δ 150,7 para C-2 e considerando o efeito de proteção em C-2 causado pela presença da metoxila em C-3 no composto **14**, ficaram definidos os valores de δ 147,1 para C-2 e, consequentemente, δ 151,1 para C-1.

Estas e as demais correlações presentes nos espectros bidimensionais de **14**, permitiram a atribuição completa dos valores de deslocamento químico de RMN ^{13}C deste composto.

Os dados espectrais de RMN 1H , aliados aos valores positivos de rotação óptica ($[\alpha]_D = +66,0$; MeOH, c 0,0006) obtidos para **14** foram compatíveis com os descritos na literatura para o alcaloide aporfínico (+)-talicsimidina (DOSKOTCH et al., 1971), entretanto, seus dados de ^{13}C estão sendo fornecidos pela primeira vez no presente trabalho.

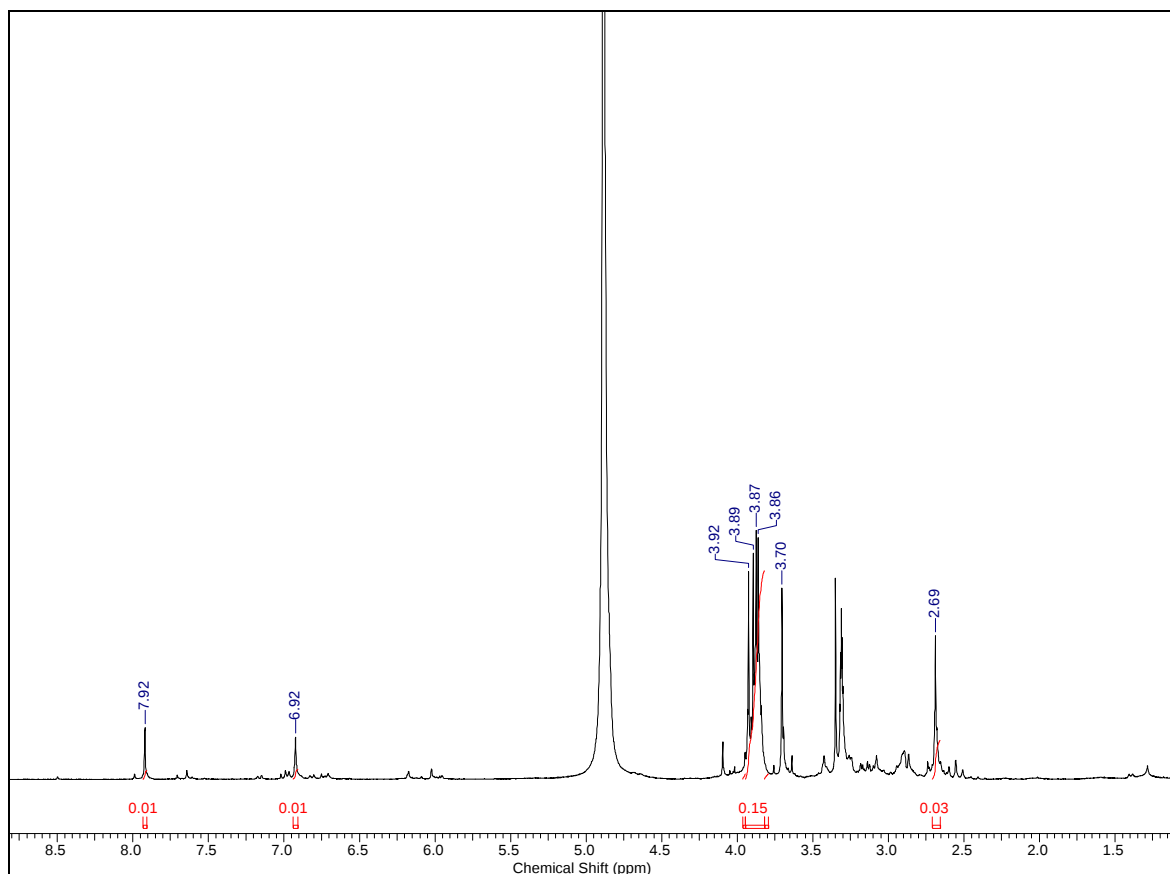
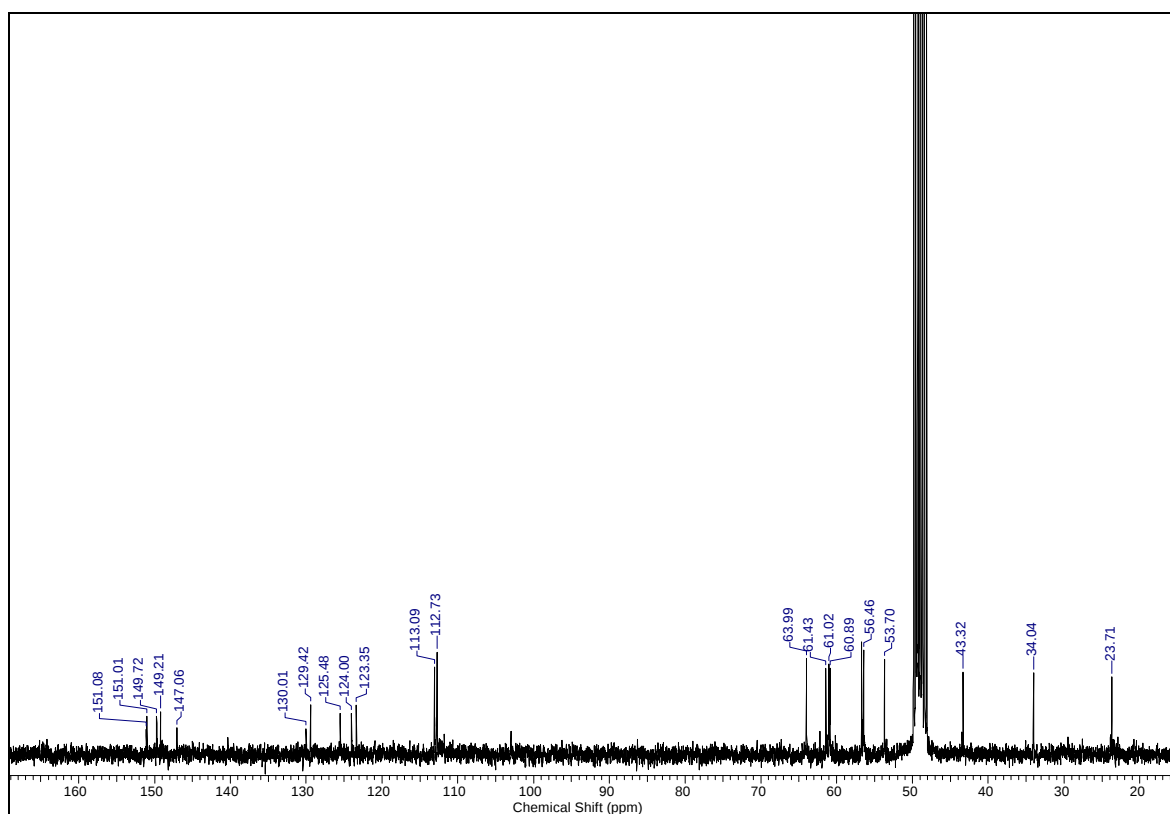
O isolamento deste alcaloide já havia sido relatado em espécies de plantas da família Lauraceae (CHANG, et al., 2002), porém trata-se do primeiro relato em um representante do gênero *Ocotea*.

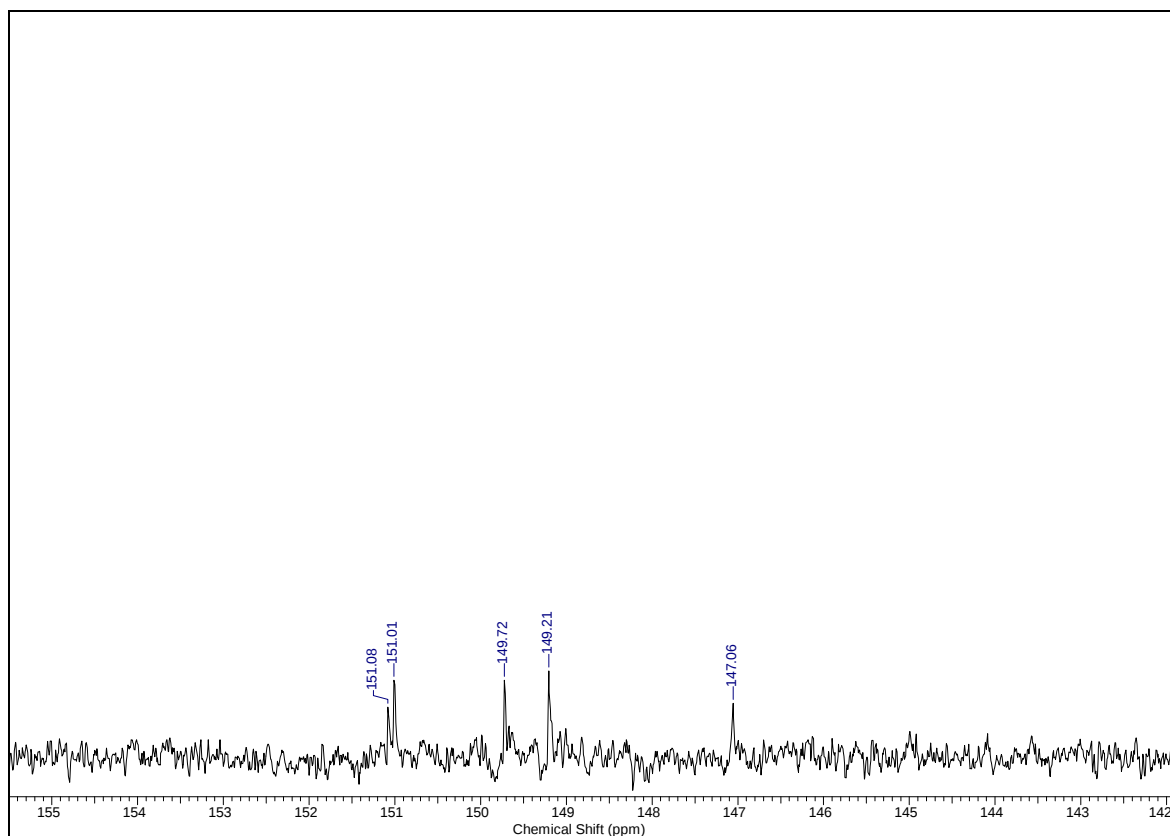
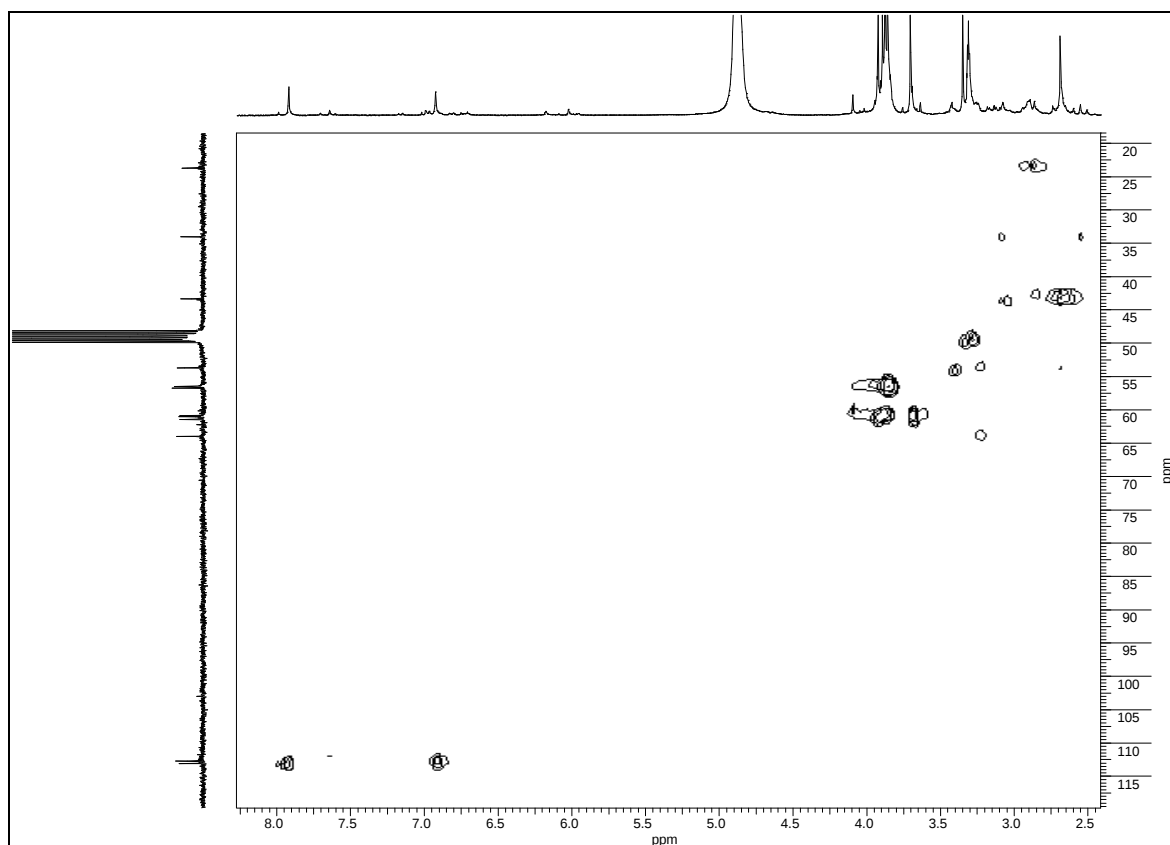
Tabela 33- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **14** e dados de RMN ^1H do alcaloide (+)-talicsimidina citado na literatura (DOSKOTCH et al., 1971) [60 MHz, CDCl_3]

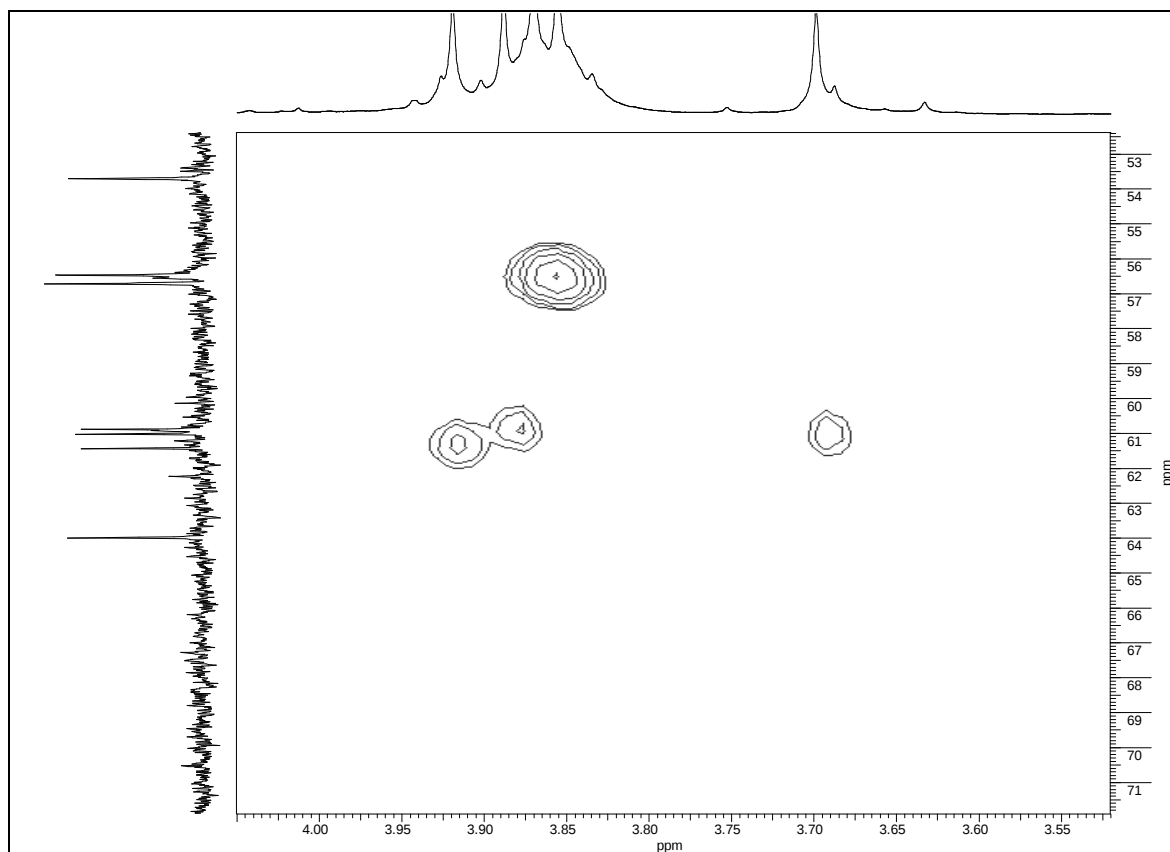
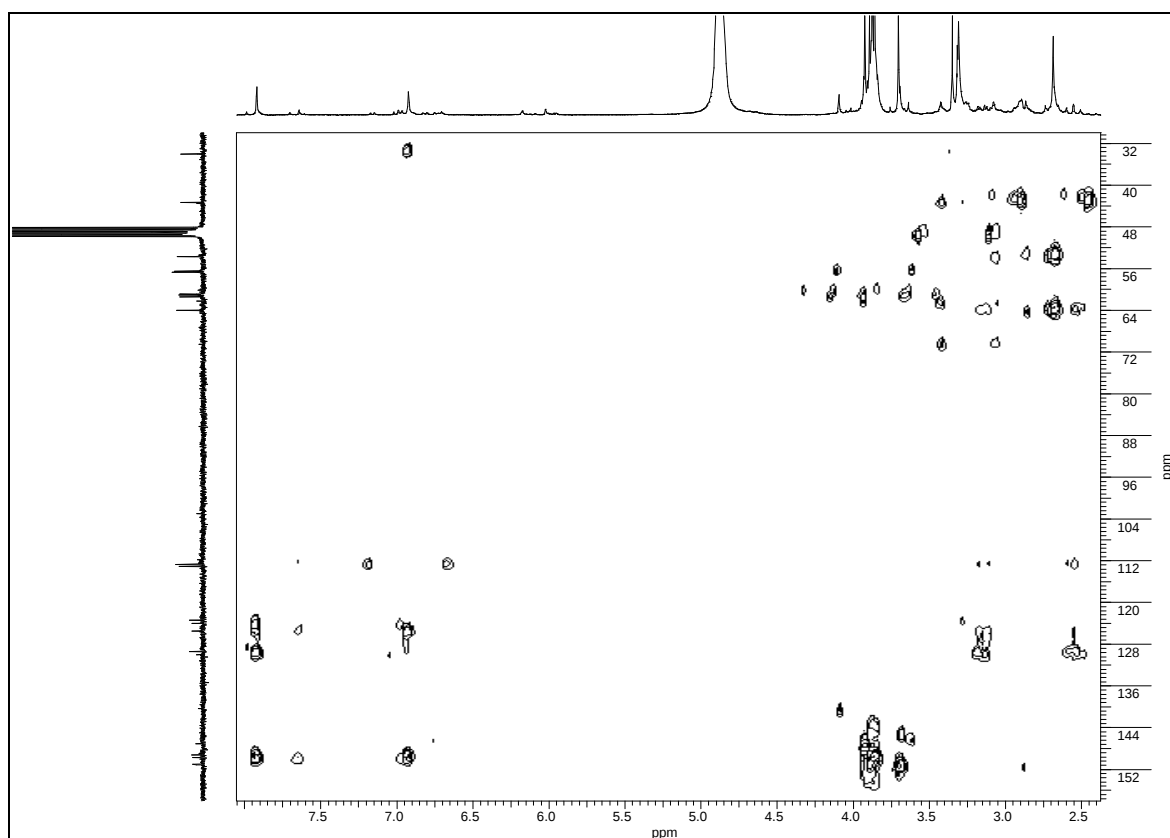
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(14)	(14) Literatura
		$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	151,1	-	-
2	147,1	-	-
3	151,0	-	-
3a	123,4	-	-
4	23,7	2,98-2,87 m (Ha, Hb)	Nc
5	53,7	3,26 m (Ha)	Nc
		2,73 m (Hb)	-
6a	64,0	3,25 m	Nc
7	34,0	3,16 dd (15,0; 4,5 Heq)	Nc
		2,55 tl (15,0 Hax)	-
7a	129,4	-	-
8	112,7	6,92 s	6,81 s
9	149,7	-	-
10	149,2	-	-
11	113,1	7,92 s	8,00 s
11a	125,5	-	-
11b	124,0	-	-
11c	130,0	-	-
N-CH ₃	43,3	2,69 s	2,55 s
1-OCH ₃	61,0	3,70 s	3,75 s
2-OCH ₃	61,4	3,92 s	3,91 s
3-OCH ₃	60,9	3,89 s	3,94 s
9-OCH ₃	56,5	3,88 s	3,94 s
10-OCH ₃	56,8	3,86 s	3,98 s

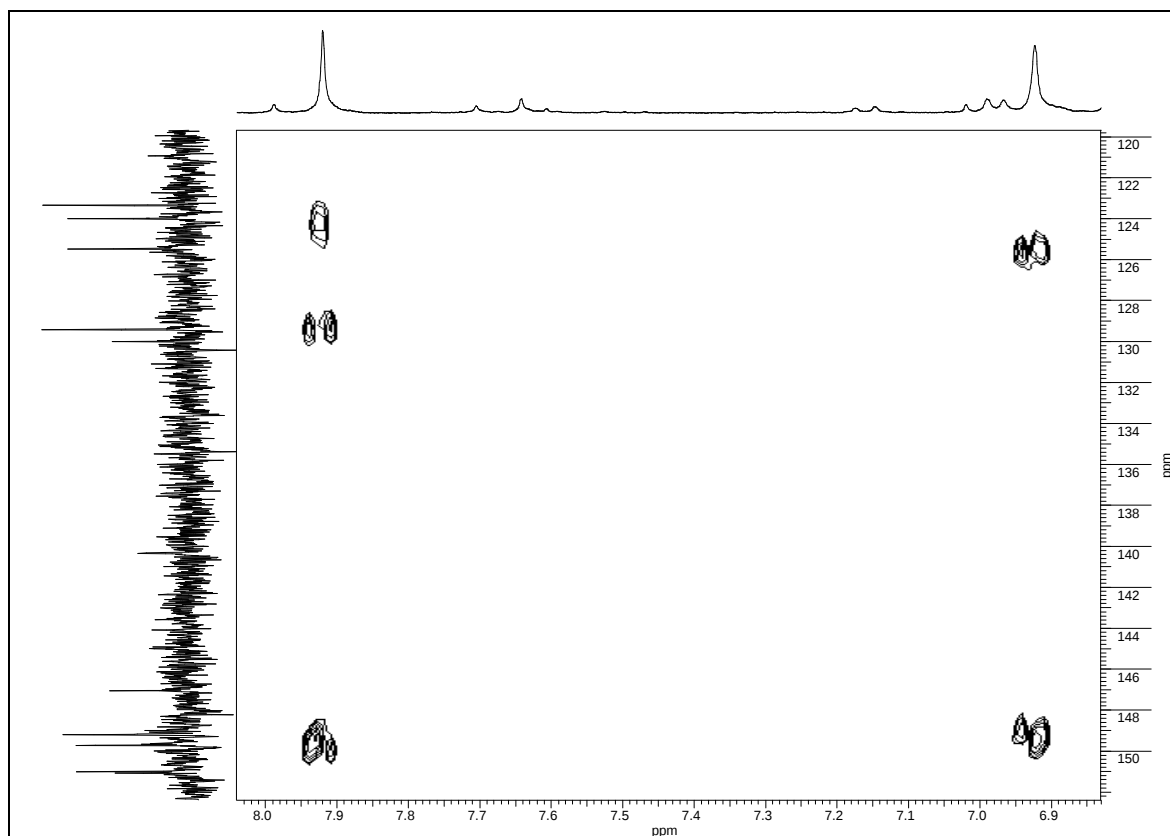
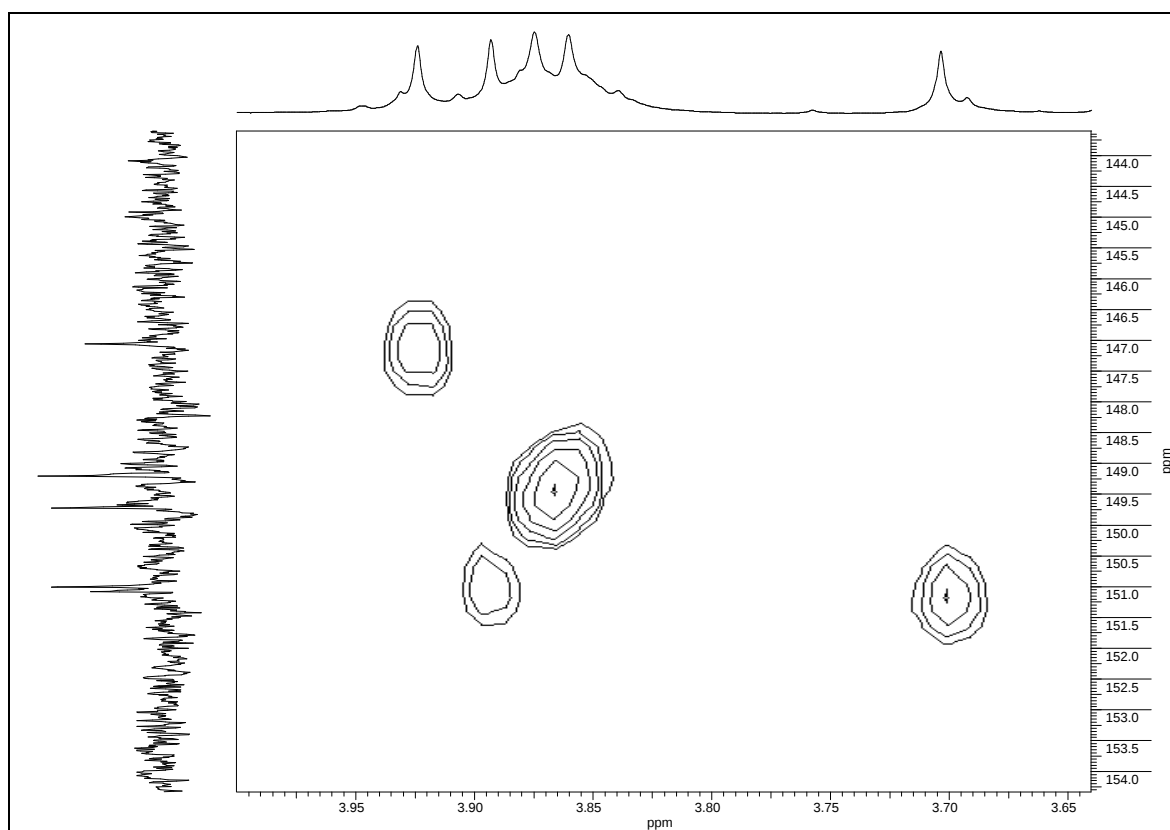
Tabela 34- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **14** (300/75 MHz, CD₃OD)

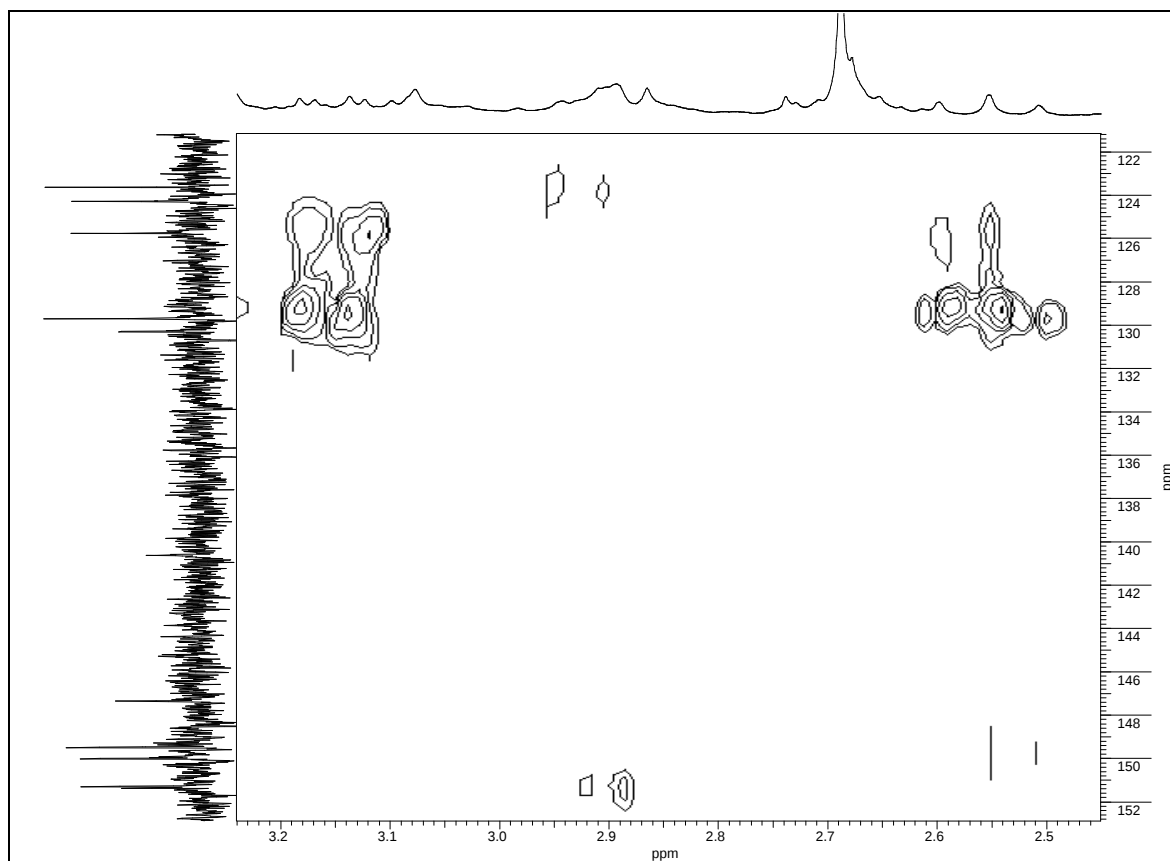
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (14)	HMBC (14)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
4	23,7	2,98-2,87 m (Ha, Hb)	C-3, C-5
5	53,7	3,26 m (Ha) 2,73 m (Hb)	-
6a	64,0	3,25 m	-
7	34,0	3,16 dd (15,0; 4,5 Heq) 2,55 tl (15,0 Hax)	C-6a, C-7a, C-8, C-11a, C-11c C-6a, C-7a, C-8, C-11a, C-11c
8	112,7	6,92 s	C-7, C-9, C-10, C-11 ^a
11	113,1	7,92 s	C-7a, C-9, C-10, C-11b
N-CH ₃	43,3	2,69 s	C-5, C-6 ^a
1-OCH ₃	61,0	3,70 s	C-1
2-OCH ₃	61,4	3,92 s	C-2
3-OCH ₃	60,9	3,89 s	C-3
9-OCH ₃	56,5	3,88 s	C-9
10-OCH ₃	56,8	3,86 s	C-10

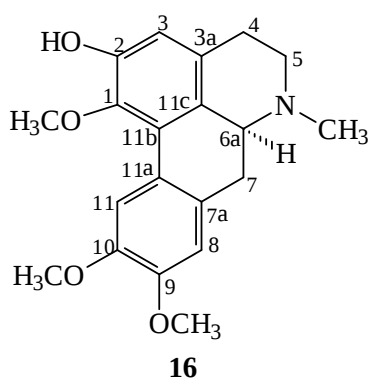
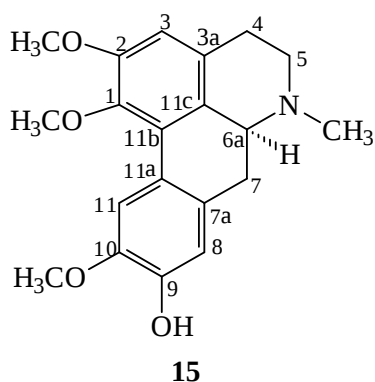
Espectro 106- RMN ^1H de **14** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 107- RMN ^{13}C de **14** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 108- Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **14** (75 MHz, CD_3OD)Espectro 109- Espectro HSQC de **14** (300/75 MHz, CD_3OD)

Espectro 110- Expansão do espectro HSQC de **14** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 111- Espectro HMBC de **14** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 112- Expansão do espectro HMBC de **14** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 113- Expansão do espectro HMBC de **14** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 114- Expansão do espectro HMBC de **14** (300/75 MHz, CD₃OD)

5.1.14- Identificação de (+)-*N*-metillaurotetanina (**15**) e (+)-predicentrina (**16**)

Da Fração OAF-ALC 5 originada a partir dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas, foram obtidos **15** e **16** em mistura (item 4.2.2.5).

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da mistura apresentou sinais duplicados, indicando que a mesma era constituída de dois alcaloides do tipo aporfínico. Esta mistura mostrou ser de difícil separação, porém os dados espectrais obtidos permitiram que se chegasse às estruturas dos seus componentes, em virtude do composto **15** estar em maior proporção.

Assim, o espectro de RMN ^1H (Espectros 115 e 116, tabelas 35 e 37) apresentou três singletos em δ 6,67, 6,72 e 7,94 atribuídos respectivamente a H-3, H-8 e H-11 de **15**, como também três singletos em δ 6,55, 6,89 e 7,98 atribuídos a H-3, H-8 e H-11 de **16**, respectivamente. Também foram observados neste espectro três singletos em δ 3,85; 3,83 e 3,60 atribuídos às metoxilas em anel aromático de **15** e em δ 3,86, 3,83 e 3,55 atribuídos às de **16**. Assim como já observado nos alcaloides **13** e **14** os sinais a δ 3,60 e 3,55 foram sugestivos de metoxilas liagadas ao anel A em C-1.

Da mesma forma como verificado no espectro de **14**, não foram observados sinais na região de δ 6,00 no espectro da mistura de **15** e **16**, indicando a ausência do grupo OCH_2O nos dois compostos. Ainda neste espectro foram observados dois singletos em δ 2,51 e 2,52 referentes aos grupos $\text{CH}_3\text{-N}$ presentes em **15** e **16**, respectivamente.

Nos espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° (Espectros 117-120, tabelas 35 e 37) foram observados sinais dos carbonos metilênicos dos anéis B e C entre δ 29,2 e 34,9, sinais de carbonos metínicos na região entre δ 111,6 e 115,8 relativos à C-3, C-8 e C-11

dos anéis A e D, como também sinais relativos às metoxilas entre δ 56,3 e 60,4 e dois sinais sobrepostos em δ 43,8, referentes $\text{CH}_3\text{-N}$. No primeiro espectro também foram observados quatro sinais de carbonos aromáticos oxigenados para cada alcaloide. Desta forma, chegou-se à conclusão que cada alcaloide continha um grupo hidroxila como substituinte, uma vez que, para cada um deles foram observadas três metoxilas.

No espectro HSQC (Espectros 121-123, tabelas 36 e 38) foram estabelecidas as conectividades entre H-3, H-8 e H-11 de **15** e **16** e os respectivos carbonos metínicos. A partir das demais informações presentes neste espectro, em conjunto com as correlações à longa distância no espectro HMBC (Espectros 124-128, tabelas 36 e 38) foi possível definir a localização dos grupos metoxilas e do grupo hidroxila nos anéis A e D de **15** e **16**.

Assim, para o composto **15**, a correlação ^3J dos hidrogênios da metoxila a δ 3,60 com o carbono a δ 145,5, o qual apresentou correlação também do tipo ^3J com H-3, confirmou a localização de uma das metoxilas em C-1. As correlações ^1J entre os hidrogênios das metoxilas em δ 3,83 e 3,85 e os respectivos carbonos em δ 153,6 e 147,7 estabeleceram as ligações dos grupos metoxilas a estes carbonos e uma vez que o carbono em δ 153,6 apresentou conectividade com H-3 (correlação tipo ^2J) e o carbono em δ 147,7 com H-11 (correlação do tipo ^2J) e H-8 (correlação do tipo ^3J) ficaram definidas as posições das outras duas metoxilas restantes em C-2 (δ_{H} 3,83/ δ_{C} 153,6) e em C-10 (δ_{H} 3,85/ δ_{C} 147,7) e, portanto restando a C-9 (δ 147,2) a ligação com o grupo hidroxila.

Da mesma maneira, para **16**, a confirmação da localização da metoxila δ 3,55 em C-1 foi possível em função da correlação observada entre os hidrogênios da metoxila e o carbono em 144,6 δ , que por sua vez apresentou conectividade com H-3. Os hidrogênios das duas metoxilas restantes em δ 3,83 e 3,86 apresentaram correlação do tipo ^1J com os carbonos em δ 56,7 e 56,4 e correlações à longa distância (^3J) com os respectivos carbonos em δ 149,1 e 149,7. Este último apresentou correlações do tipo ^2J com H-8 e ^3J com H-11, enquanto que o carbono em 149,1 δ apresentou correlações com os H-11 (^2J) e H-8 (^3J), definindo, portanto, a localização das metoxilas e em C-10 δ_{H} 3,83/ δ_{C} 56,7 e C-9 δ_{H} 3,86/ δ_{C} 56,4, e conseqüentemente, a localização da hidroxila em C-2 (δ 150,7).

Os dados resultantes do experimento NOESY (Espectros 129 e 130) corroboraram com a localização das metoxilas em C-1, C-2 e C-10 para **15**, em função das correlações espaciais entre os hidrogênios H-3 e $\text{CH}_3\text{O-2}$ (δ 3,83) e H-11 e $\text{CH}_3\text{O-10}$ (δ

3,85), e em C-1, C-9 e C-10 para **16**, pelas correlações observadas entre H-8 e CH₃O-9 (δ 3,86) e H-11 e CH₃O-10 (δ 3,83).

Com base nos dados acima relatados e no sinal positivo obtido para a rotação óptica da mistura ($[\alpha]_D = + 44,2$; MeOH, c 0,0005) verificou-se que **15** tratava-se do alcaloide (+)-*N*-metillaurotetanina e **16** do alcaloide (+)-predicentrina ambos já isolados anteriormente de outras espécies de Lauraceae, inclusive do gênero *Ocotea* (ZANIN & LORDELLO, 2007; GARCEZ et al., 1995; VECCHIETTI et al., 1979; VECCHIETTI et al., 1977; CAVA & VENKATESWARLU, 1971). Os dados espectrais de RMN ¹H e ¹³C de **15** e **16** apresentaram uma boa correlação com os relatados na literatura para estes alcaloides (LEBOEUF et al., 1982; ZANIN & LORDELLO, 2007; GUINAUDEAU et al., 1975; GUINAUDEAU et al., 1979).

Tabela 35- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **15** e do alcaloide (+)-*N*-metillaurotetanina citado na literatura (LEBOEUF et al., 1982) [60 MHz, CDCl_3], (ZANIN & LORDELLO, 2007) [75 MHz, CDCl_3]

C/H	(15)		(15) Literatura	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	145,5	-	144,1	-
2	153,6	-	151,9	-
3	111,6	6,67 s	110,1	6,57 s
3a	129,9	-	128,6	-
4	29,5	3,10-3,05 m (Ha) 2,72-2,60 m (Hb)	28,8	Nc -
5	54,1	3,10-2,95 m (Ha) 2,55-2,45 m (Hb)	53,1	Nc -
6a	63,9	3,03 m	61,4	Nc
7	34,7	3,10-2,95 m (Ha) 2,48-2,42 m (Hb)	33,9	Nc -
7a	130,7	-	129,8	-
8	115,8	6,72 s	111,2	6,80 s
9	147,2	-	145,3	-
10	147,7	-	144,9	-
11	113,2	7,94 s	114,0	8,06 s
11a	124,5	-	123,7	-
11b	128,2	-	126,7	-
11c	127,5	-	127,0	-
N-CH ₃	43,8	2,51 s	43,6	2,53 s
1-OCH ₃	60,4	3,60 s	60,0	3,65 s
2-OCH ₃	56,3 ^a	3,83 s	55,7	3,89 s
10-OCH ₃	56,6 ^a	3,85 s	55,9	3,89 s

nc: não citado na referência

^a valores que podem estar trocados

Tabela 36- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **15** (300/75 MHz, CD₃OD)

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (15)	HMBC (15)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	111,6	6,67 s	C-1, C-2, C-4, C-11c
4	29,5	3,10-3,05 m (Ha)	-
		2,72-2,60 m (Hb)	-
5	54,1	3,10-2,95 m (Ha)	-
		2,55-2,45 m (Hb)	-
6a	63,9	3,03 m	-
7	34,7	3,10-2,95 m (Ha)	-
		2,48-2,42 m (Hb)	-
8	115,8	6,72 s	C-7, C-9, C-10, C-11 ^a
11	113,2	7,94 s	C-7a, C-9, C-10, C-11b
N-CH ₃	43,8	2,51 s	C-5, C-6
1-OCH ₃	60,4	3,60 s	C-1
2-OCH ₃	56,3 ^a	3,83 s	C-2
10-OCH ₃	56,6 ^a	3,85 s	C-10

^a valores que podem estar trocados

Tabela 37- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **16** e do alcaloide (+)-predicentrina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1975) [60 MHz, CDCl_3], (GUINAUDEAU et al., 1979) [15 MHz, CDCl_3]

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(16)	$\delta^{13}\text{C}$	(16)
		$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]		$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	144,6	-	142,3	-
2	150,7	-	148,2	-
3	115,4	6,55 s	113,5	6,53 s
3a	130,1	-	129,6	-
4	29,2	3,10-3,05 m (Ha) 2,72-2,60 m (Hb)	28,7	Nc -
5	54,2	3,10-2,95 m (Ha) 2,55-2,45 m (Hb)	53,3	Nc -
6a	63,9	3,03 m	62,5	Nc
7	34,9	3,10-2,95 m (Ha) 2,48-2,42 m (Hb)	34,2	Nc -
7a	130,5	-	129,2	-
8	112,7	6,89 s	110,7	6,78 s
9	149,7	-	148,1	-
10	149,1	-	147,6	-
11	113,0	7,98 s	110,0	7,98 s
11a	125,8	-	124,1	-
11b	127,7	-	126,3	-
11c	126,5	-	125,9	-
N-CH ₃	43,8	2,52 s	43,4	2,48 s
1-OCH ₃	60,4	3,55 s	60,3	3,52 s
9-OCH ₃	56,4 ^a	3,86 s	56,0	3,87 s
10-OCH ₃	56,7 ^a	3,83 s	55,8	3,83 s

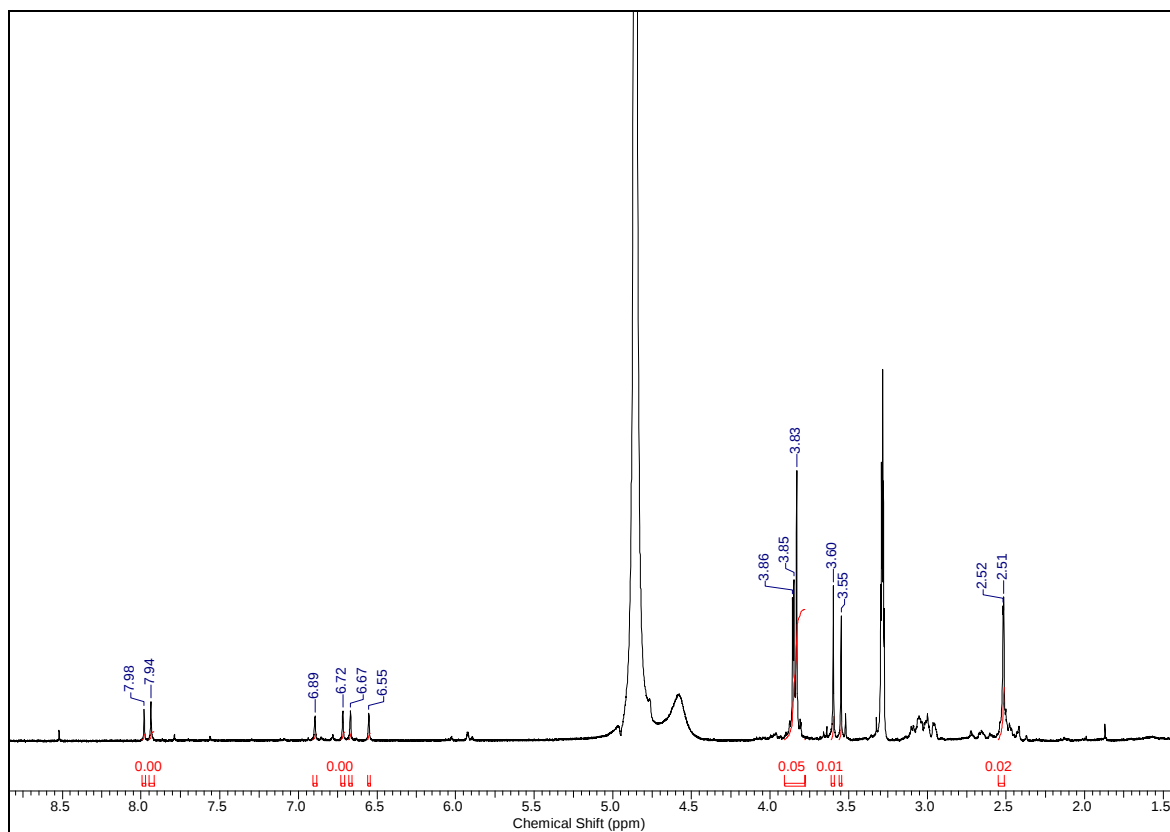
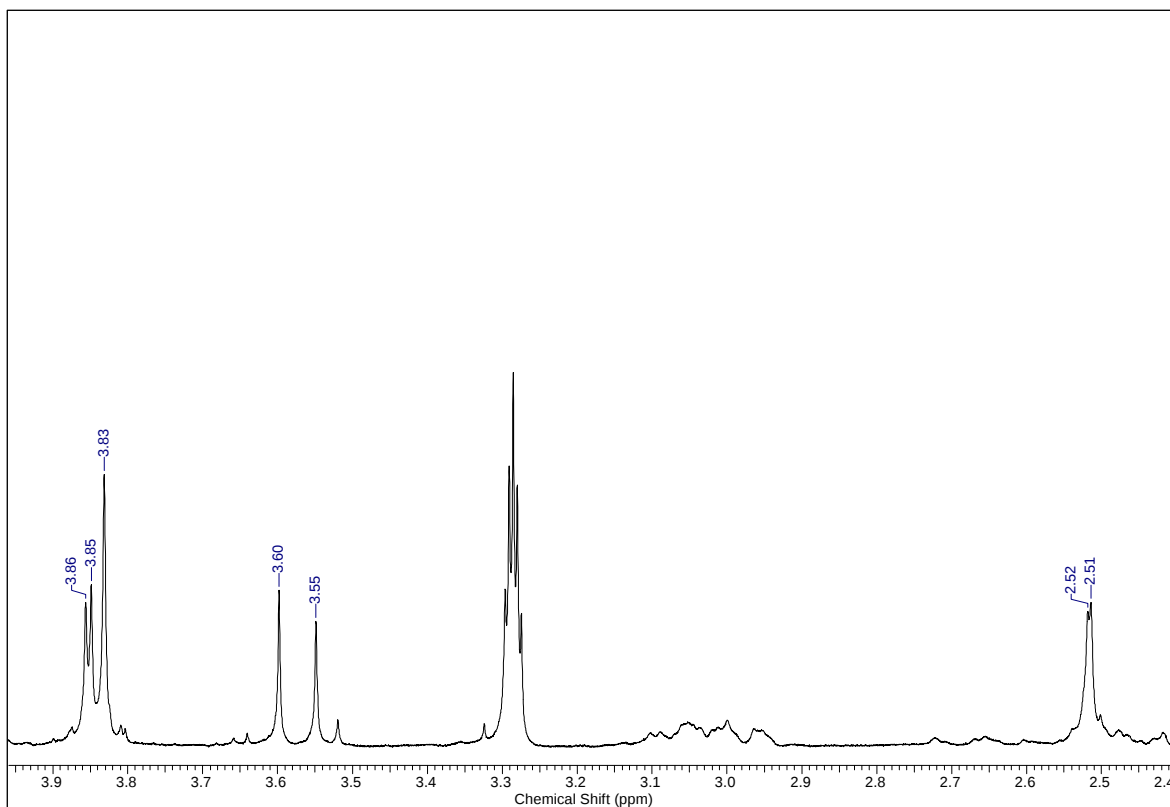
nc: não citado na referência

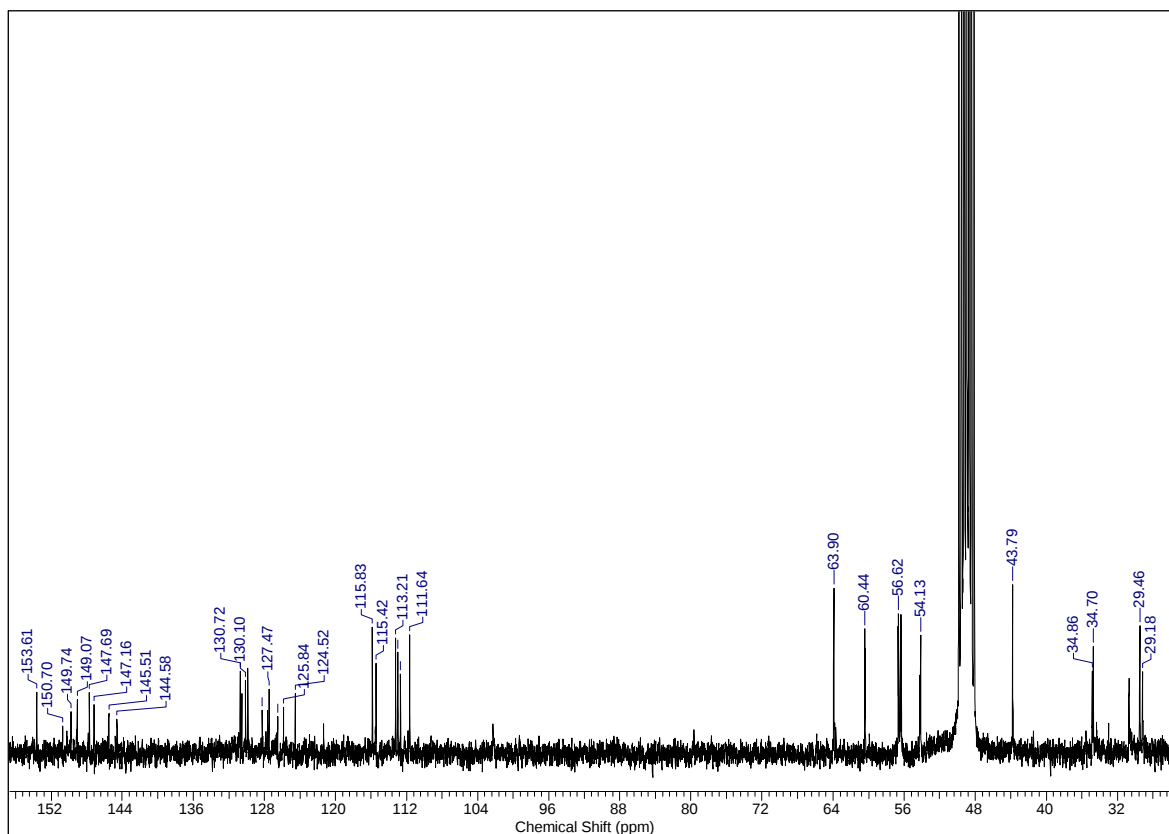
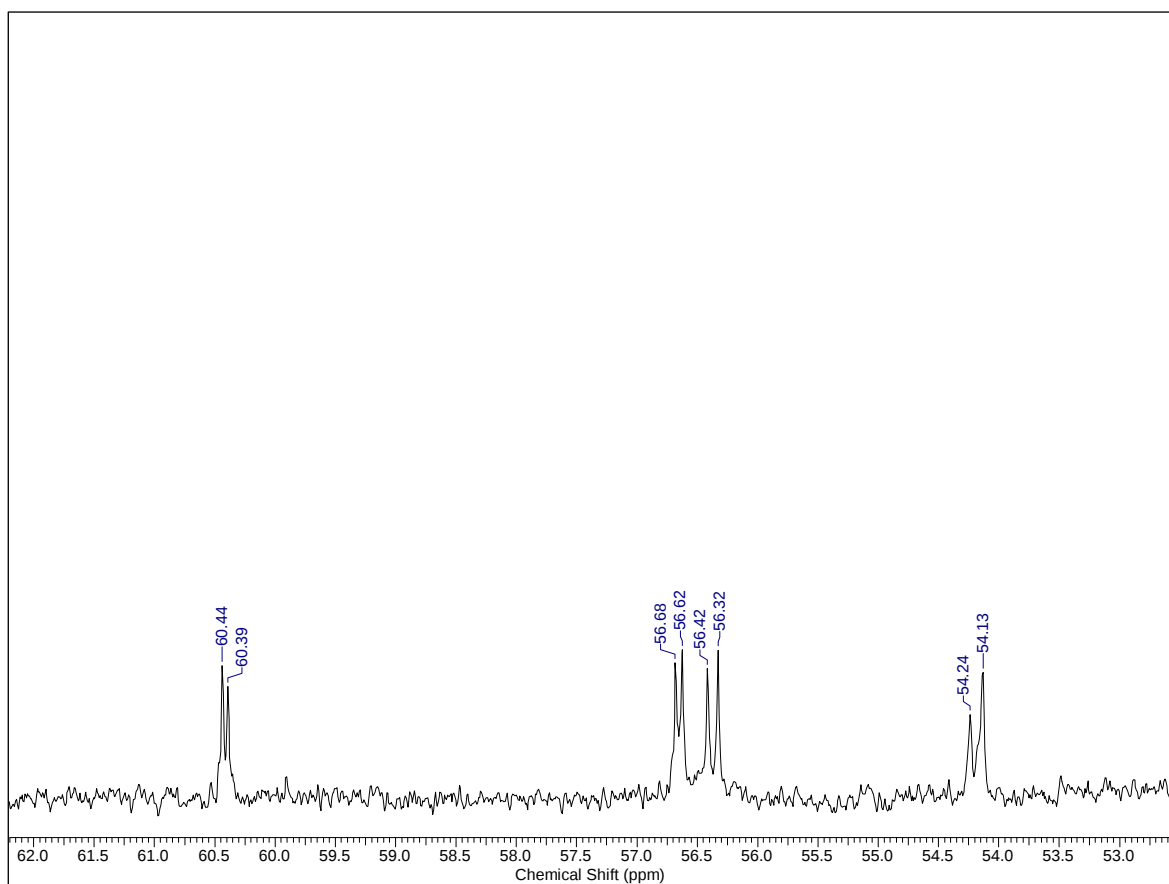
^a valores que podem estar trocados

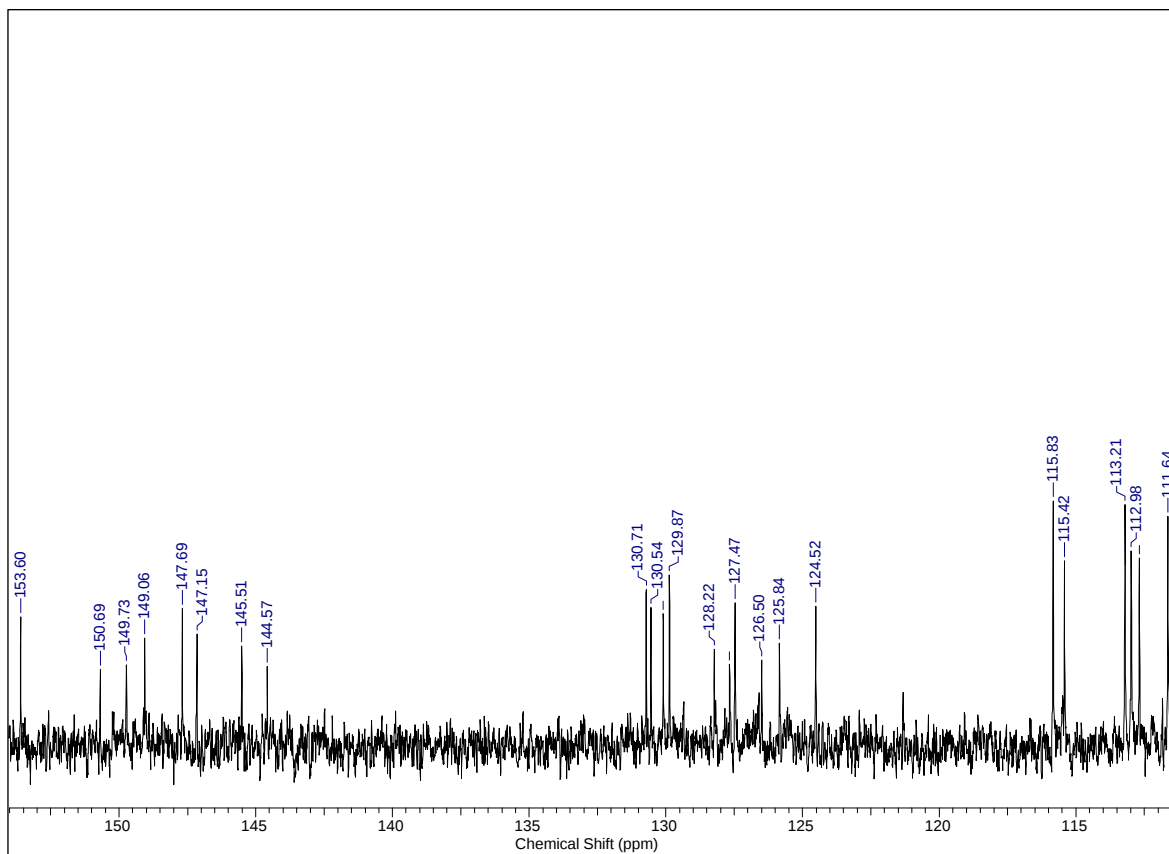
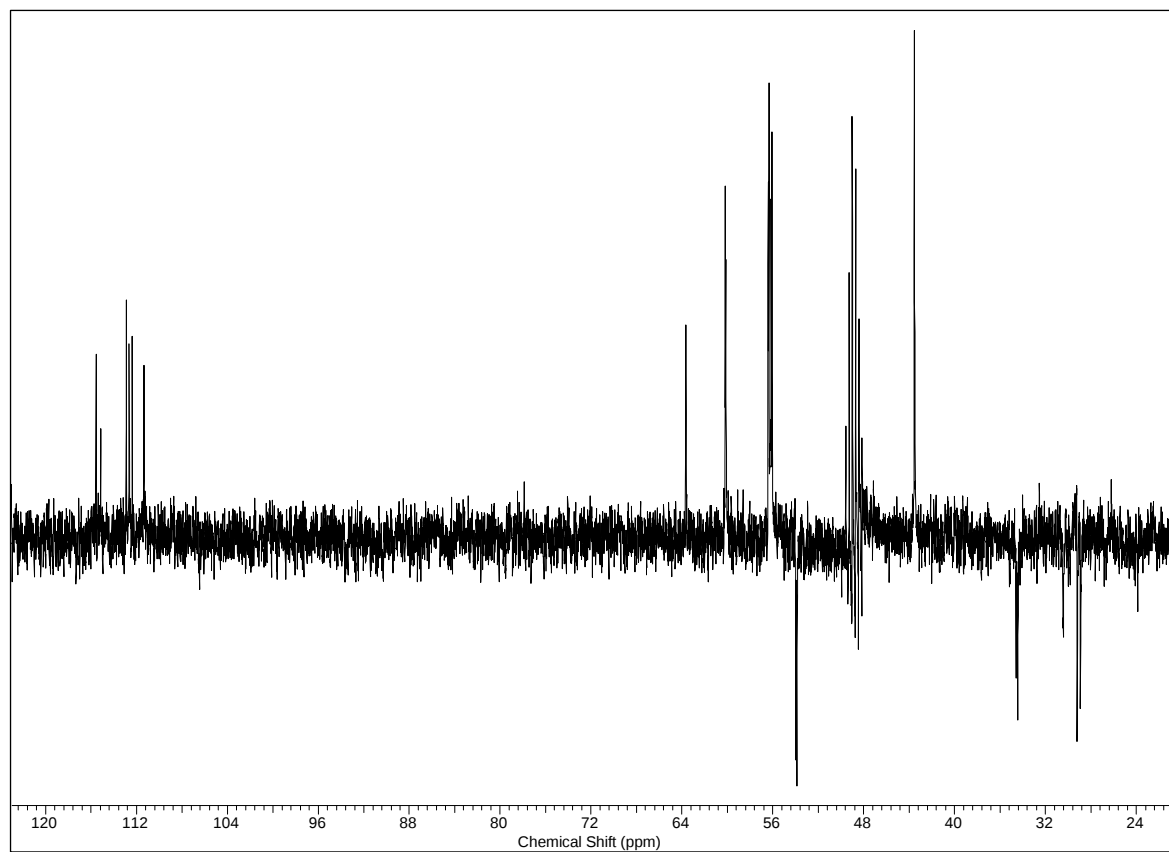
Tabela 38- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **16** (300/75 MHz, CD₃OD)

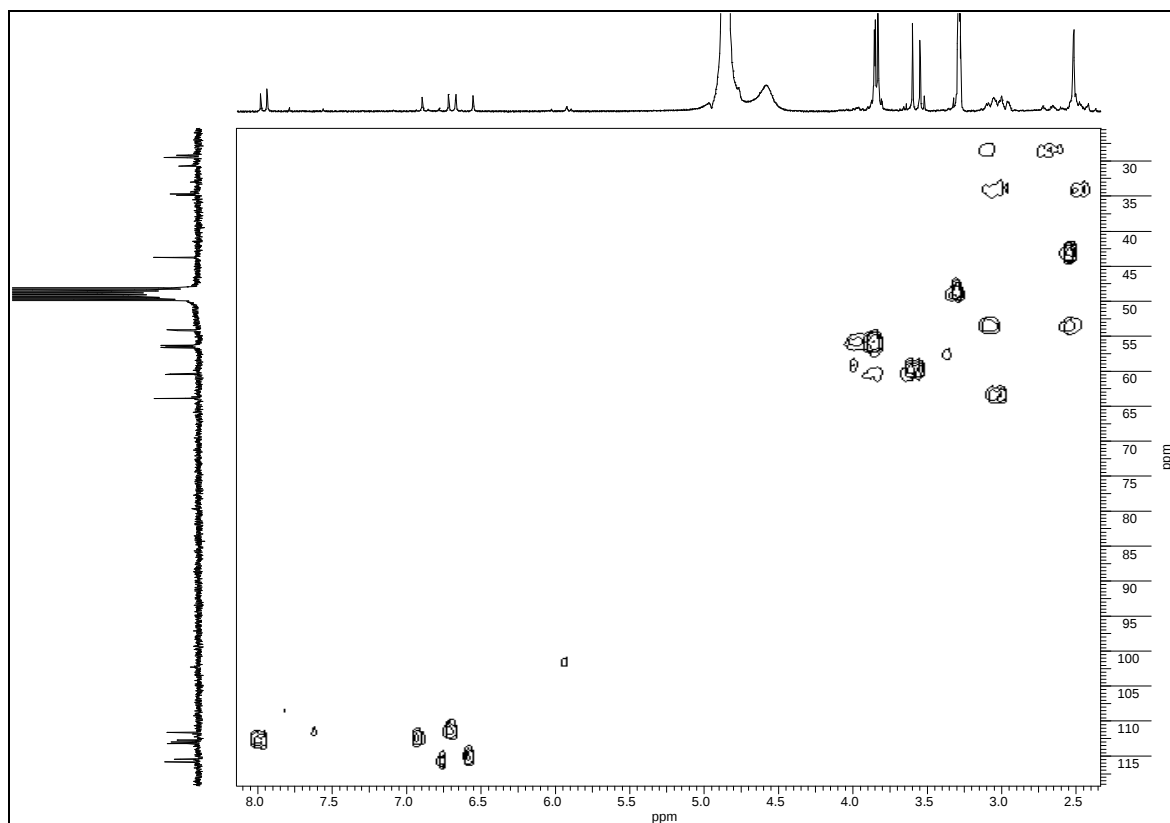
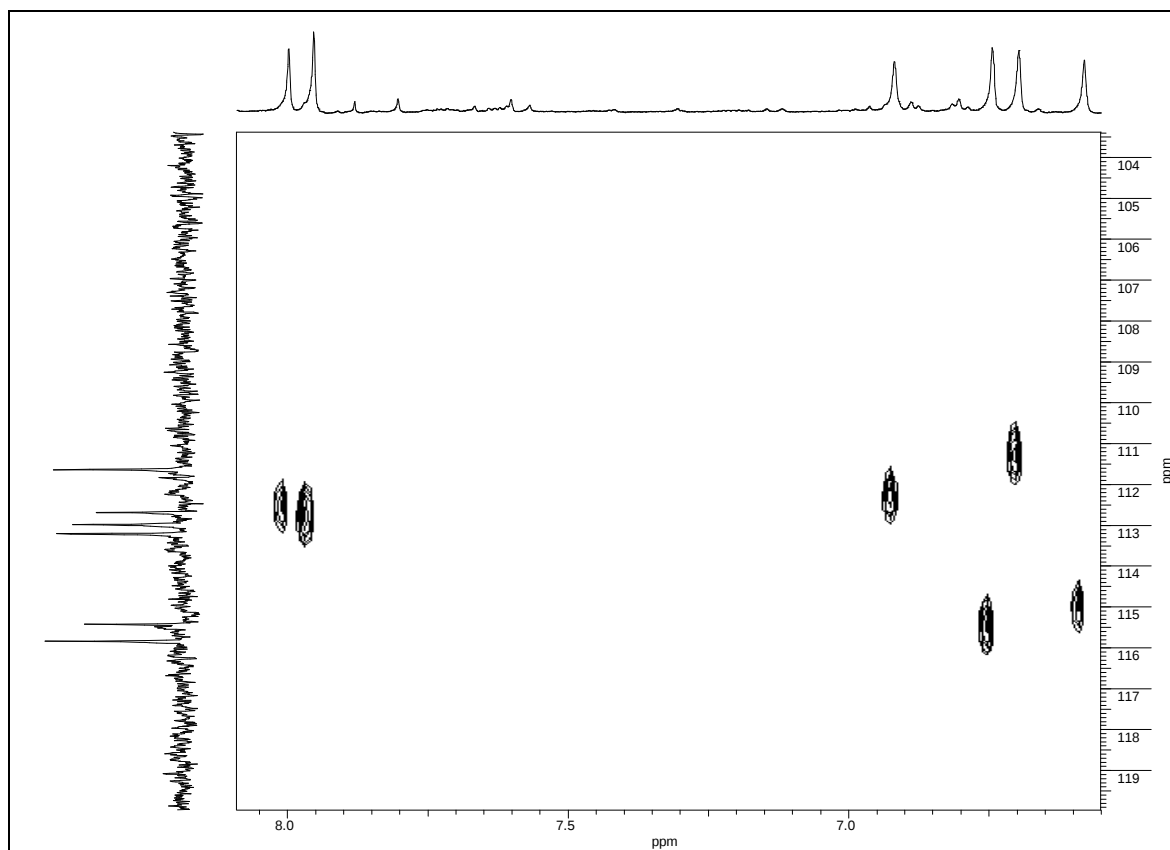
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (16)	HMBC (16)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
3	115,4	6,55 s	C-1, C-2, C-4, C-11c
4	29,2	3,10-3,05 m (Ha)	-
		2,72-2,60 m (Hb)	-
5	54,2	3,10-2,95 m (Ha)	-
		2,55-2,45 m (Hb)	-
6a	63,9	3,03 m	-
7	34,9	3,10-2,95 m (Ha)	-
		2,48-2,42 m (Hb)	-
8	112,7	6,89 s	C-7, C-9, C-10, C-11a
11	113,0	7,98 s	C-7a, C-9, C-10, C-11b
N-CH ₃	43,8	2,52 s	C-5, C-6
1-OCH ₃	60,4	3,55 s	C-1
9-OCH ₃	56,4 ^a	3,86 s	C-9
10-OCH ₃	56,7 ^a	3,83 s	C-10

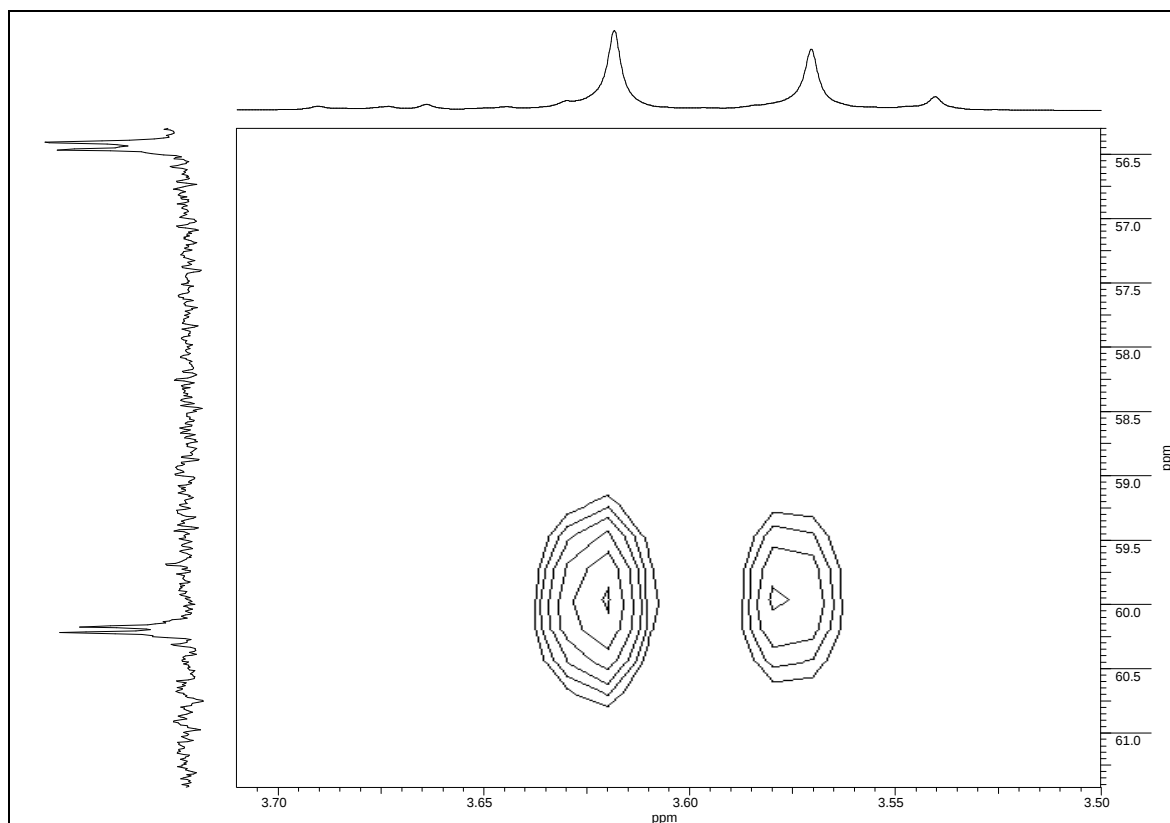
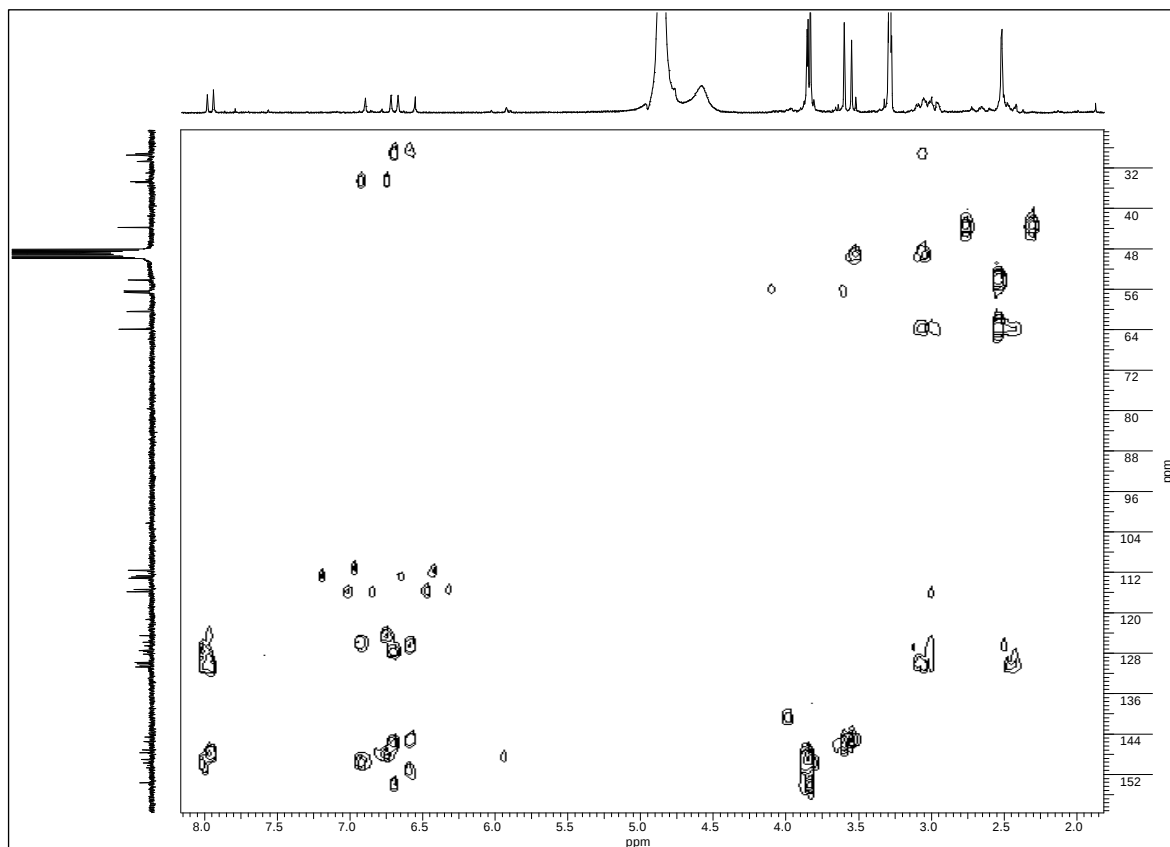
^a valores que podem estar trocados

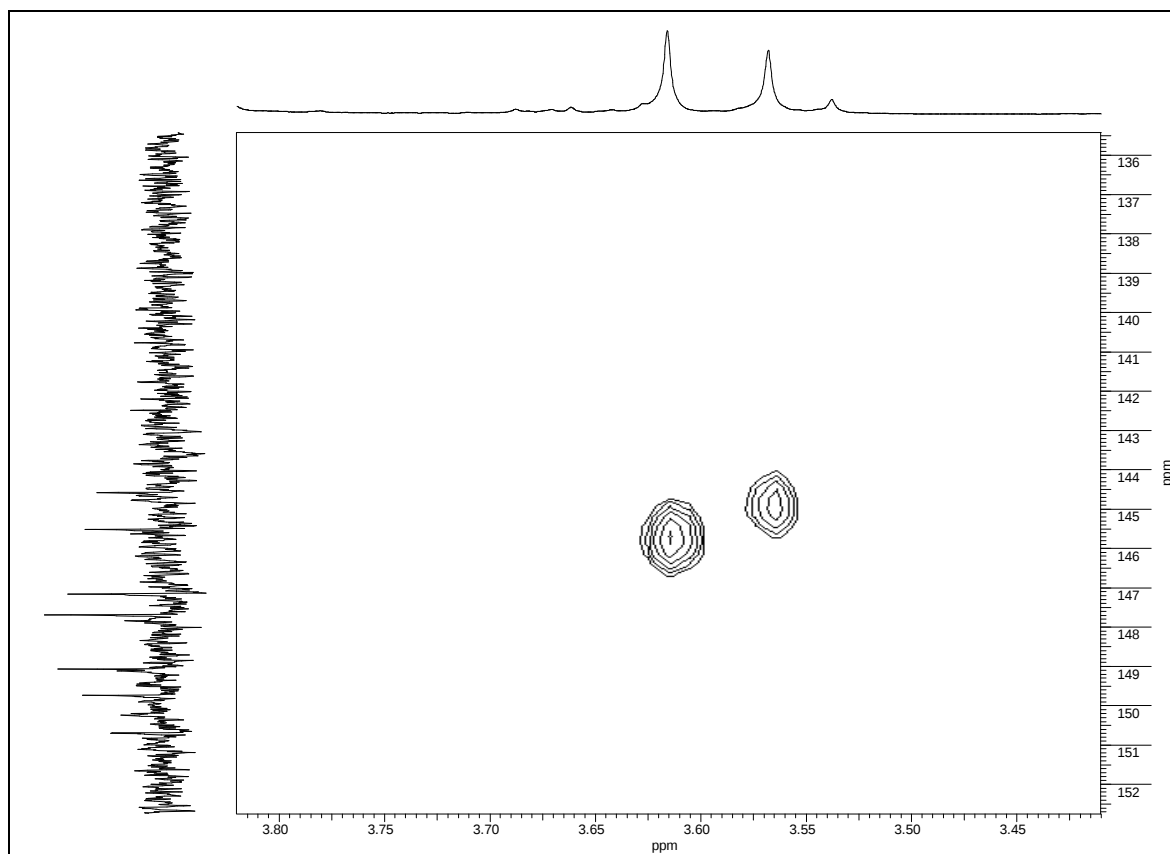
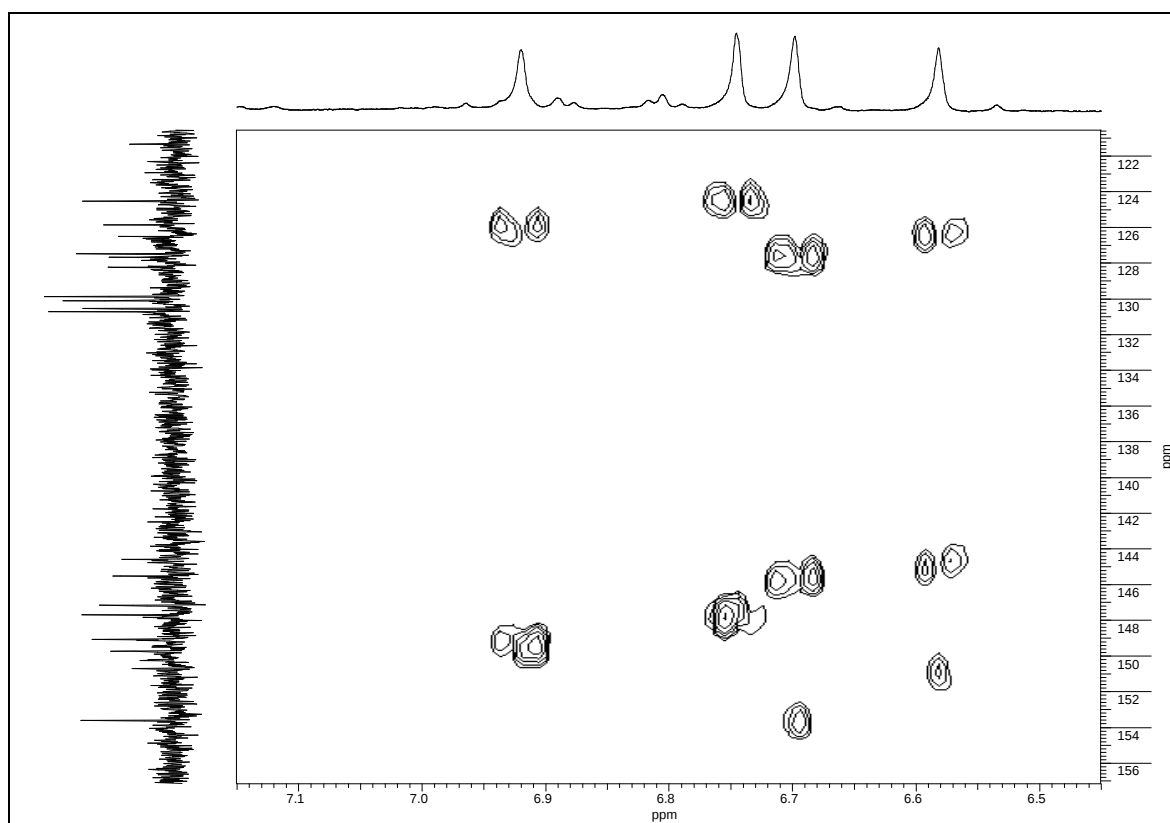
Espectro 115- RMN ^1H da mistura de **15** e **16** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 116- Expansão do espectro de RMN ^1H da mistura de **15** e **16** (300 MHz, CD_3OD)

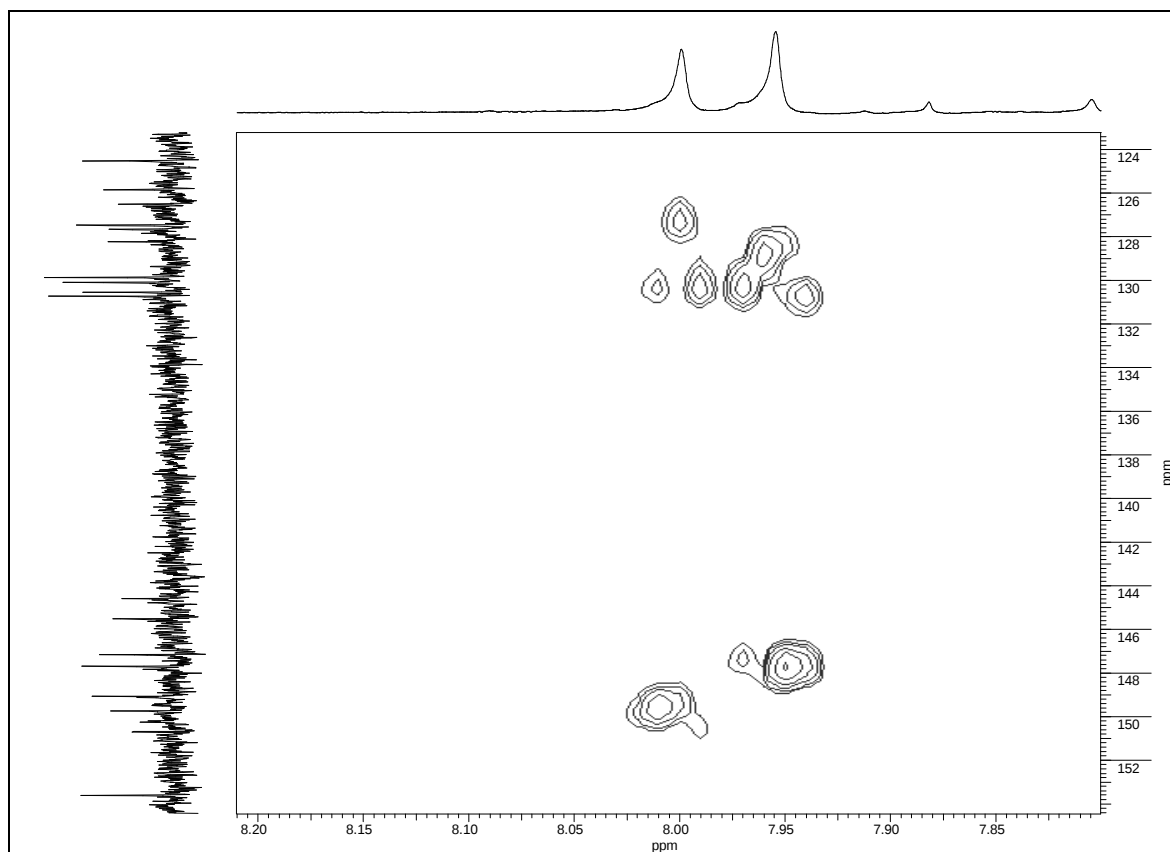
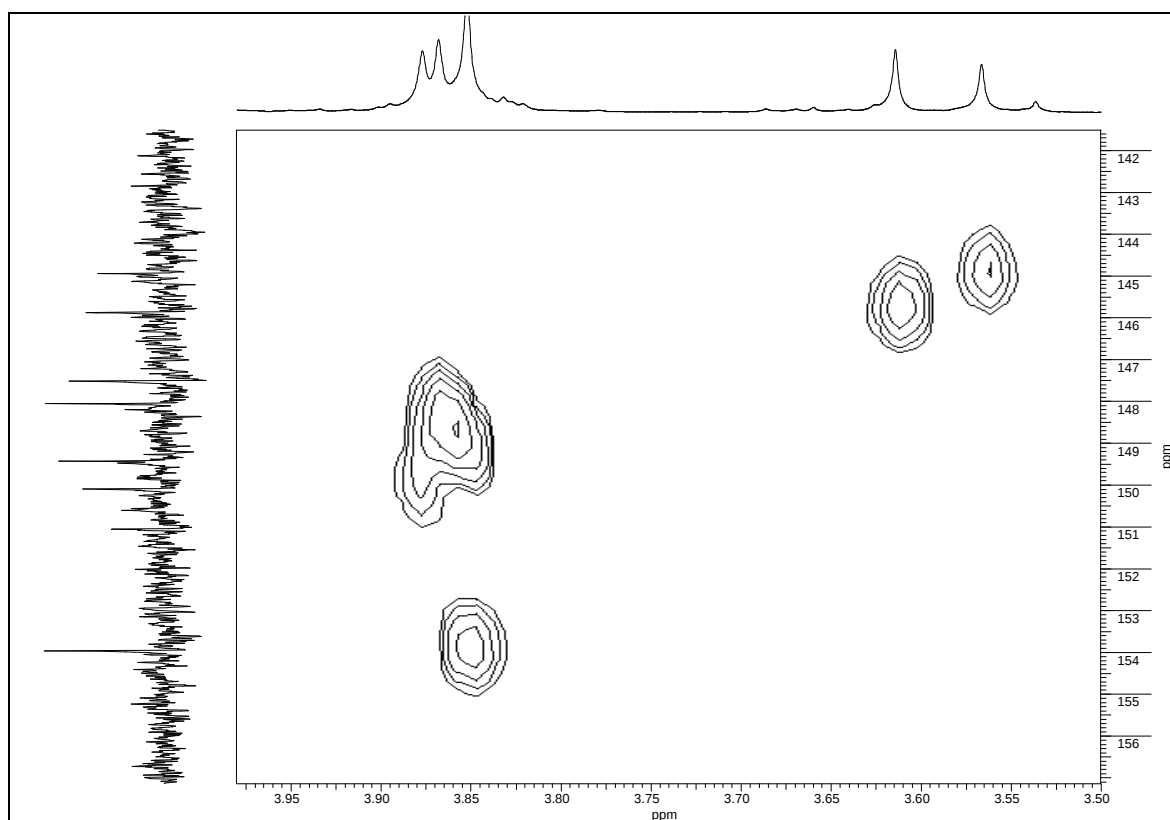
Espectro 117- RMN ^{13}C da mistura de **15** e **16** (75 MHz, CD_3OD)Espectro 118- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de **15** e **16** (75 MHz, CD_3OD)

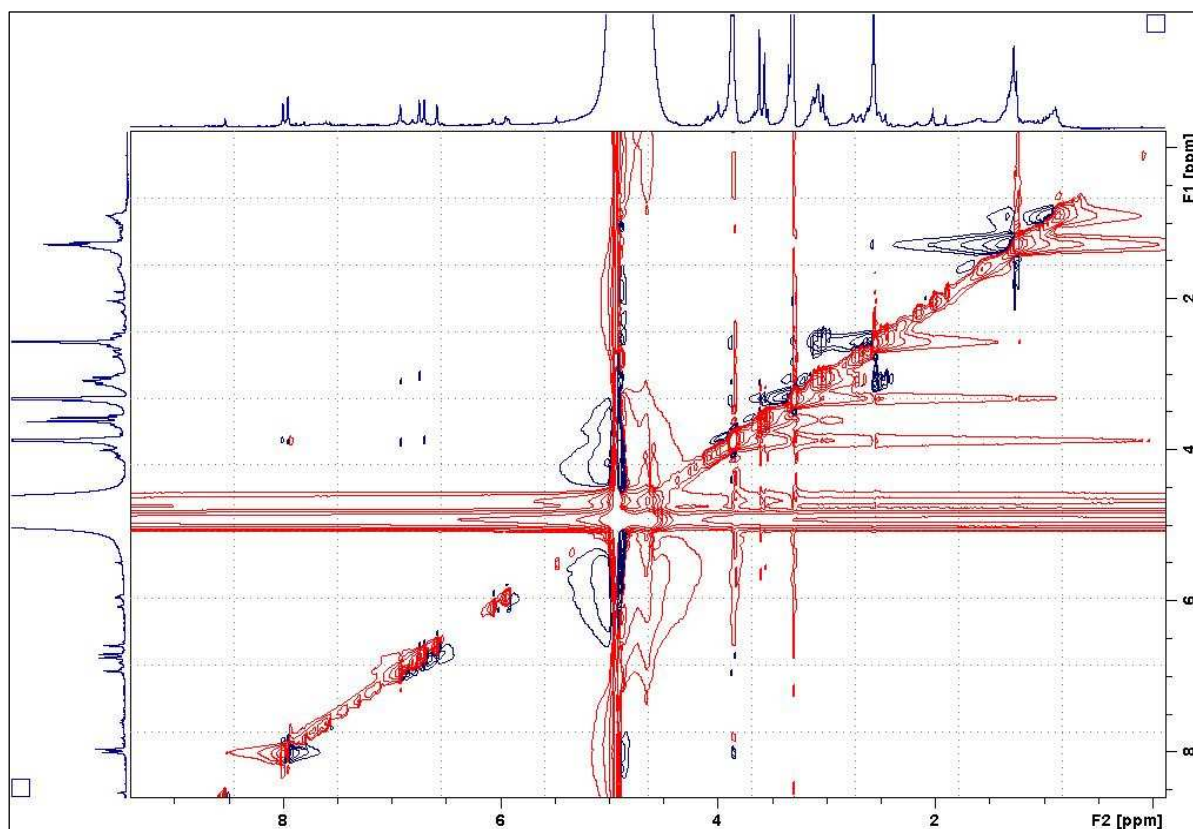
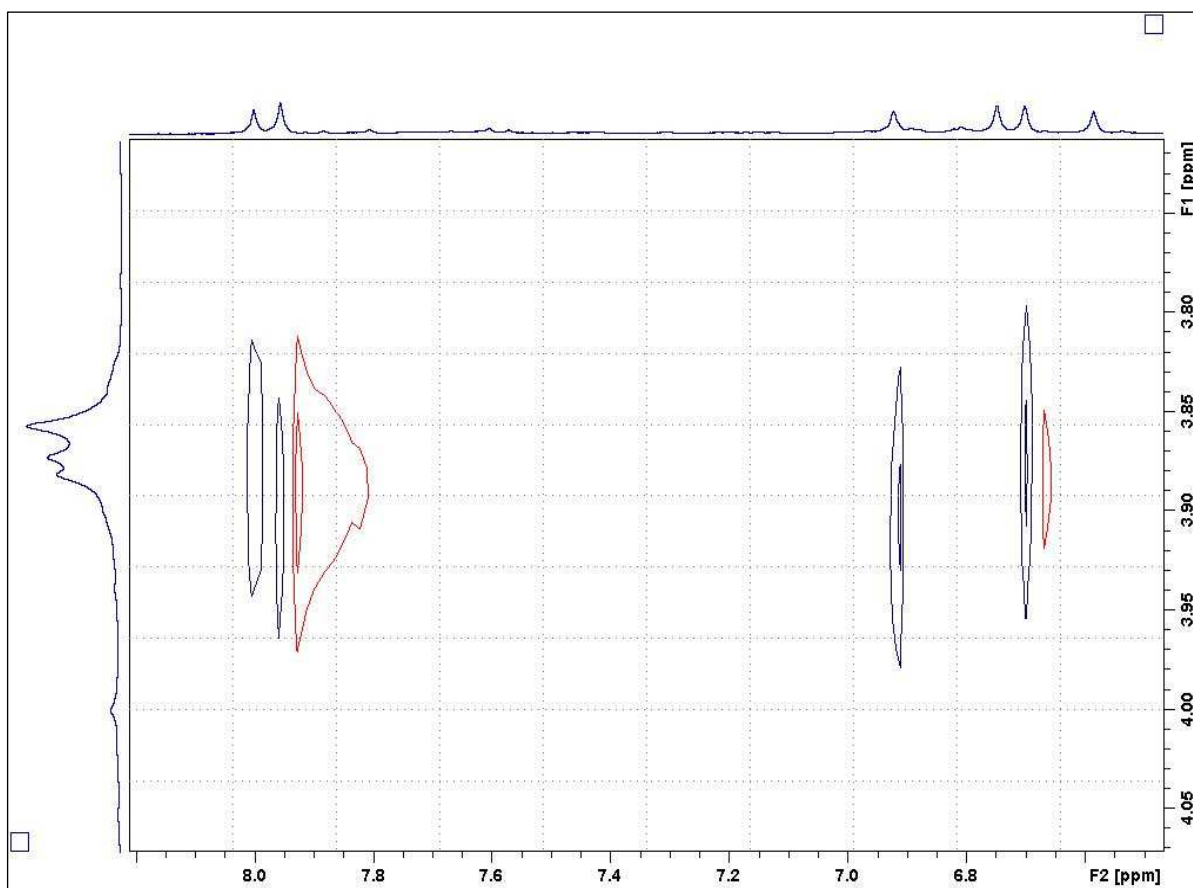
Espectro 119- Expansão do espectro de RMN ^{13}C da mistura de **15** e **16** (75 MHz, CD_3OD)Espectro 120- DEPT 135° da mistura de **15** e **16** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 121- Espectro HSQC da mistura de **15** e **16** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 122- Expansão do espectro HSQC da mistura de **15** e **16** (300/75 MHz, CD₃OD)

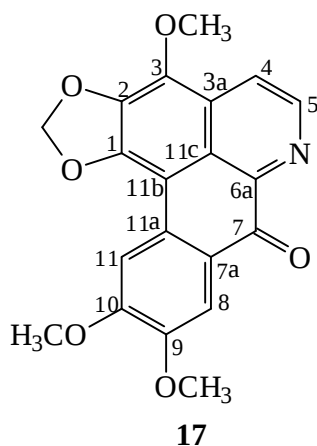
Espectro 123- Expansão do espectro HSQC da mistura de **15** e **16** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 124- Espectro HMBC da mistura de **15** e **16** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 125- Expansão do espectro HMBC da mistura de **15** e **16** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 126- Expansão do espectro HMBC da mistura de **15** e **16** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 127- Expansão do espectro HMBC da mistura de **15** e **16** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 128- Expansão do espectro HMBC da mistura de **15** e **16** (300/75 MHz, CD₃OD)

Espectro 129- NOESY da mistura de **15** e **16**Espectro 130- Expansão do espectro NOESY da mistura de **15** e **16**

5.1.15- Identificação de talicminina (17)



O alcaloide **17** foi isolado das frações OAF-ALC A 4 e OAC-A (6, D.7) proveniente dos fracionamentos cromatográficos dos extratos alcaloídicos das folhas e cascas do caule e da fração OAF-Ac L.19 originada dos fracionamentos cromatográficos da fase acetato de etila das folhas (itens 4.2.2.1; 4.4.2.2; 4.4.2.3 e 4.3.4.3.2).

O espectro de RMN ^1H de **17** (Espectro 131, tabela 39) apresentou dois dubletos em δ 8,87 (1H, $J = 6,0$ Hz) e 8,08 (1H, $J = 6,0$ Hz), dois singletos em δ 7,90 e 7,82, um singlete em δ 6,27 atribuído a um grupo dioxidometileno e ainda três singletos em δ 4,25, 4,04 e 3,98 referentes a metoxilas ligadas a anel aromático. Estes dados sugeriram para **17** um esqueleto aporfínico totalmente aromatizado, porém possuindo os mesmos substituintes nos anéis A e D que (+)-ocoteína (**2**).

No espectro de RMN ^{13}C (Espectro 132, tabela 39) os sinais observados em δ 118,9 e 144,2, os quais apresentaram correlação no espectro HSQC (Espectros 134 e 135, tabela 40) com os hidrogênios a δ 8,08 e 8,87, respectivamente, juntamente com o sinal a δ 181,2 atribuído a um grupo carbonila corroboraram com a proposta, e sugeriram que **17** tratava-se de um alcaloide oxaporfínico. Estes alcaloides são estruturalmente caracterizados por possuírem um esqueleto aporfínico totalmente aromatizado e uma carbonila em C-7 (GUINAUDEAU et al., 1975; SILVA et al., 2007).

No espectro ^1H - ^1H COSY (Espectro 133) foi possível confirmar o acoplamento vicinal entre os hidrogênios em δ 8,08 e 8,87 e atribuídos a C-4 e C-5, respectivamente.

A presença dos dois singletos a δ 7,82 e 7,90, além da correlação observada no espectro HMBC (Espectros 136-138, tabela 40) entre este último sinal e o sinal do carbono

carbonílico a δ 181,2 mostraram-se coerentes com a proposta de um alcaloide oxaaporfínico contendo metoxilas em C-9 e C-10. A correlação presente no espectro HMBC entre H-4 (δ 8,08) e C-3 (δ 135,9), o qual por sua vez correlacionou-se com os hidrogênios da metoxila em δ 4,25, permitiu confirmar a localização deste grupo em C-3. A confirmação da localização das demais metoxilas em C-9 e C-10 foi feita com base nas correlações entre seus respectivos hidrogênios a δ 4,04 e 3,98 com os carbonos a δ 148,9 e 153,9 os quais apresentaram correlações do tipo 2J com H-8 (δ 7,90) e H-11 (δ 7,82), respectivamente. O grupo dioxidometileno estaria, portanto, localizado nos carbonos C-1 e C-2.

De acordo com o levantamento bibliográfico realizado, os dados espectrais de RMN 1H mostraram-se compatíveis com os citados para o alcaloide talicminina (GUINAUDEAU et al., 1979), entretanto não foram encontrados os valores de RMN ^{13}C , os quais são apresentados na tabela 39.

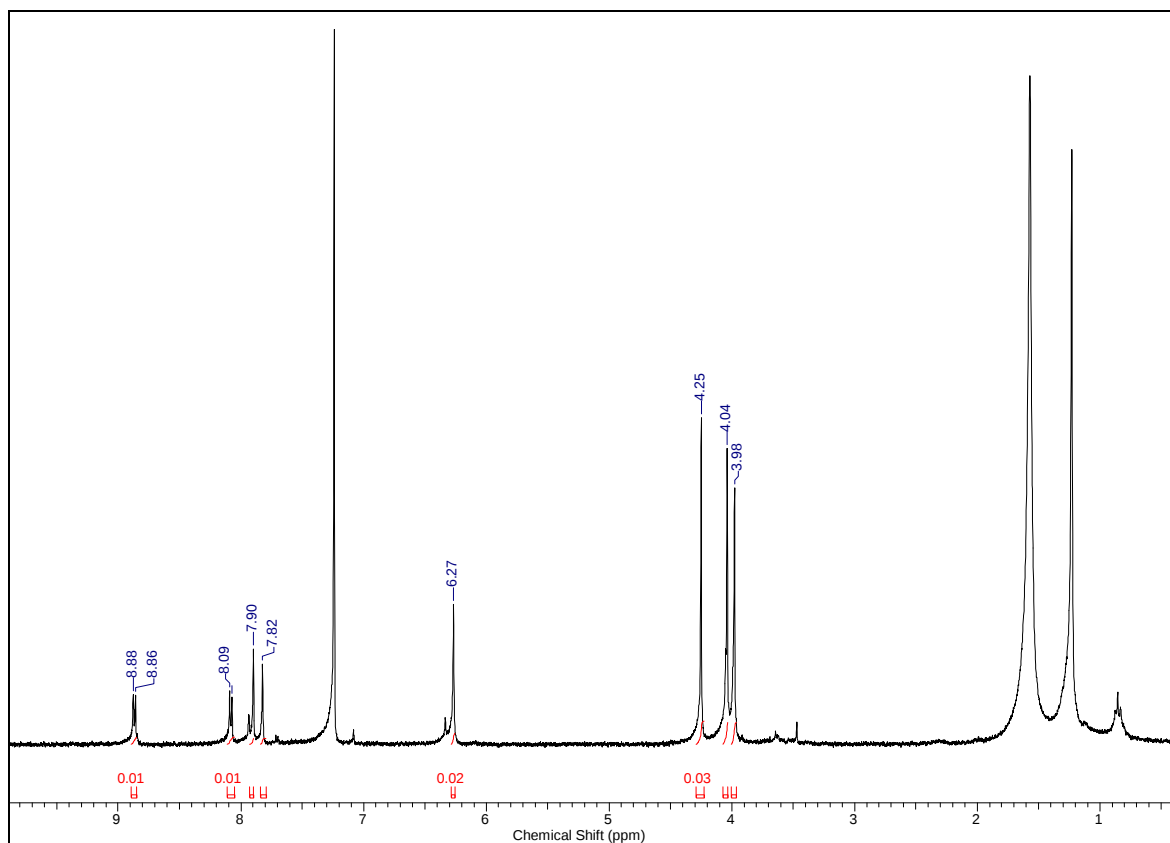
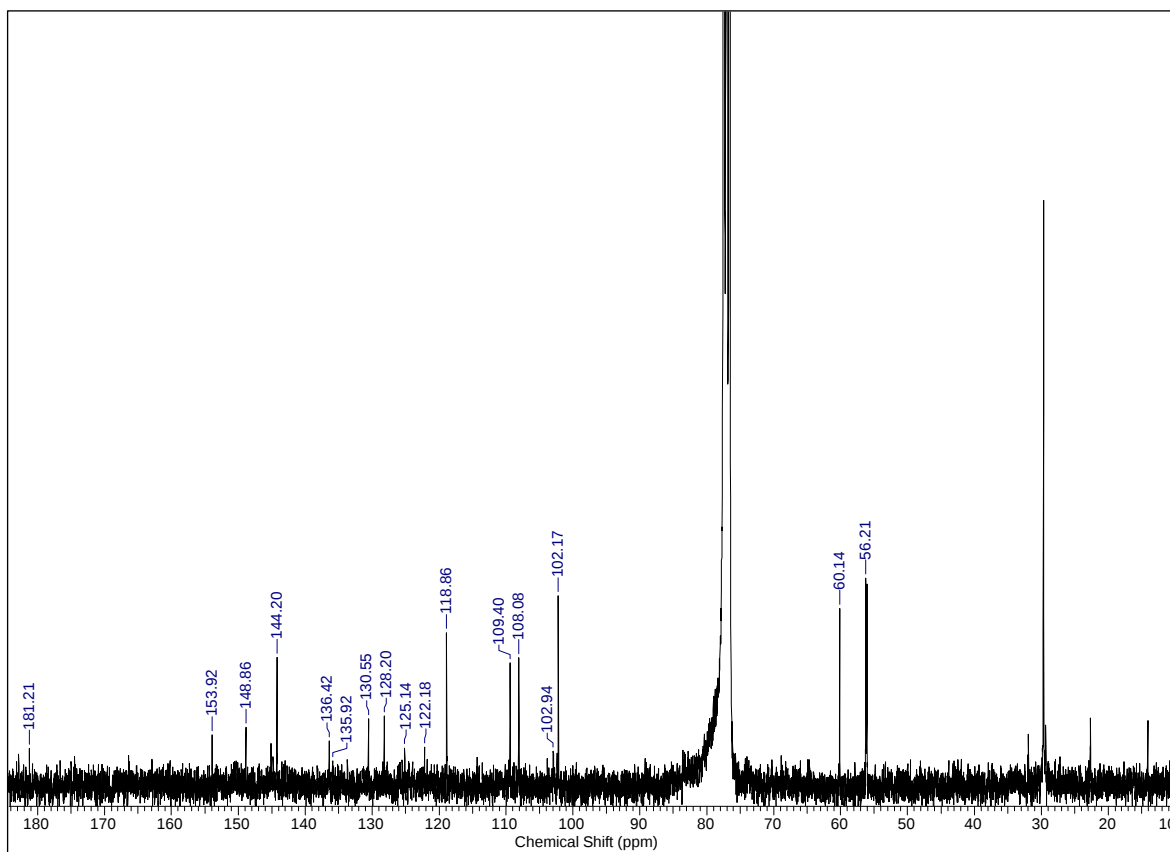
O isolamento deste alcaloide já havia sido descrito nas espécies *O. puberula* e *O. minarum* (VECCHIETTI et al., 1979; BARALLE et al., 1973) e com relação a sua atividade biológica há relatos de atividade citotóxica contra linhagens de células KB (WRIGHT et al., 2000).

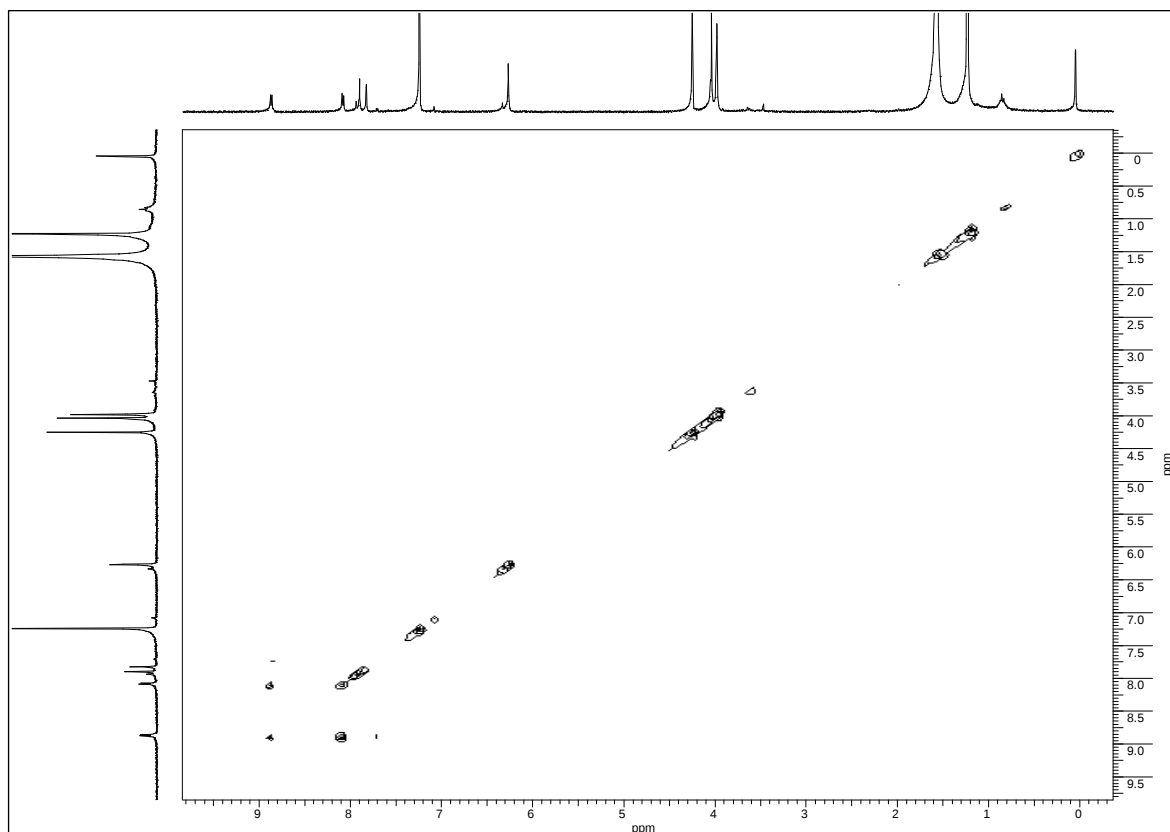
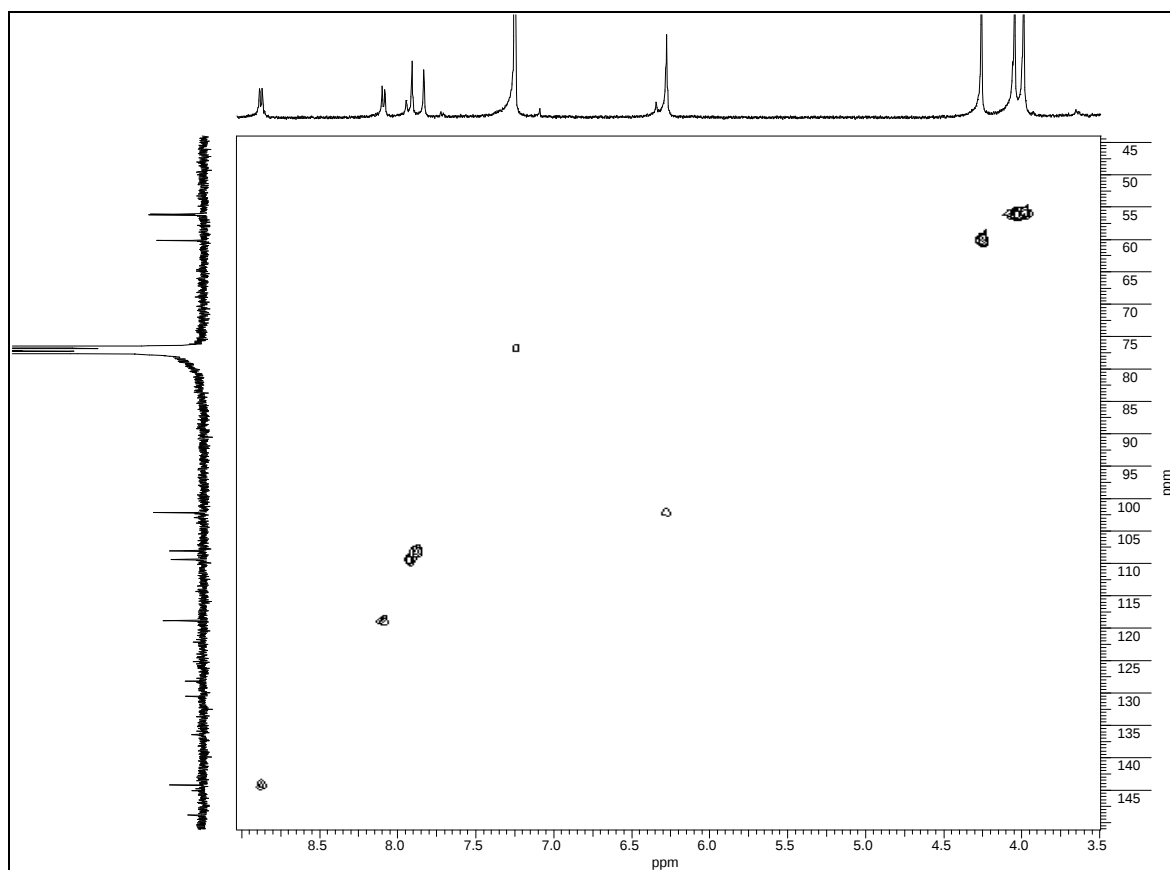
Tabela 39- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **17** e dados de RMN ^1H do alcaloide talicminina citado na literatura (GUINAUDEAU et al., 1979) [60 MHz, CF_3COOH]

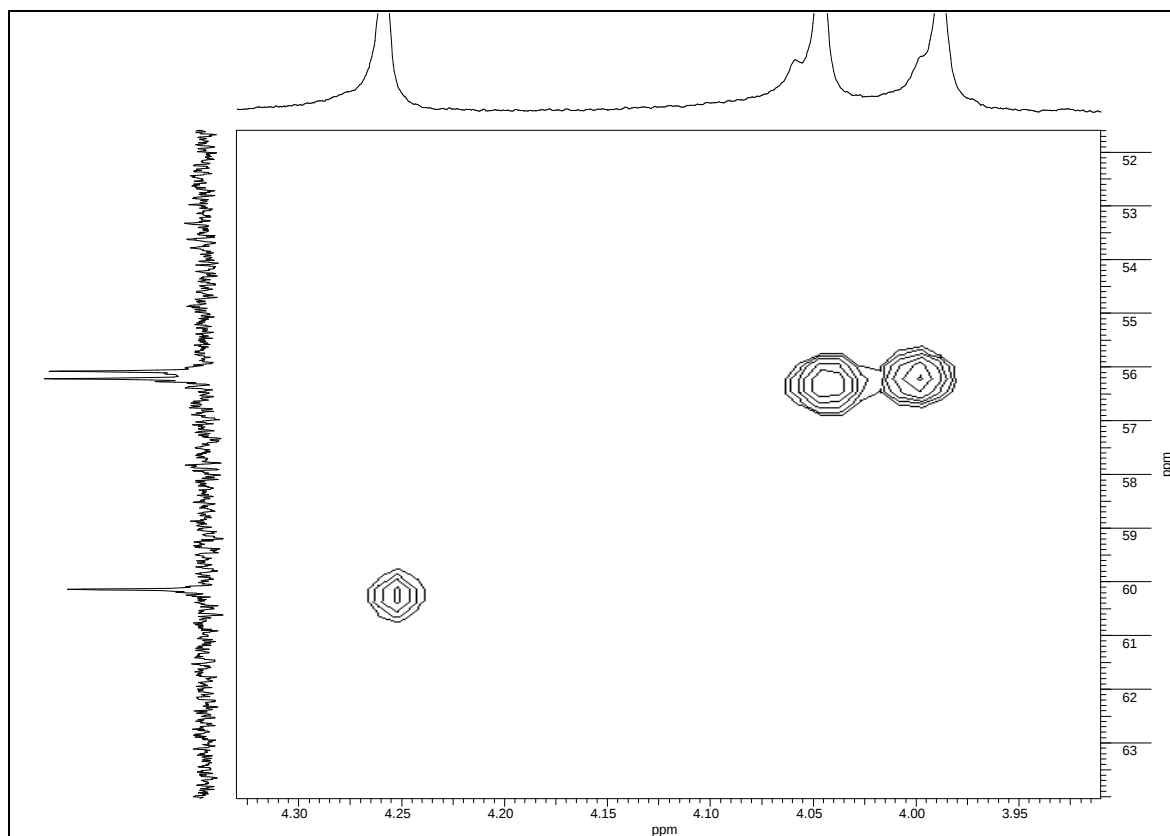
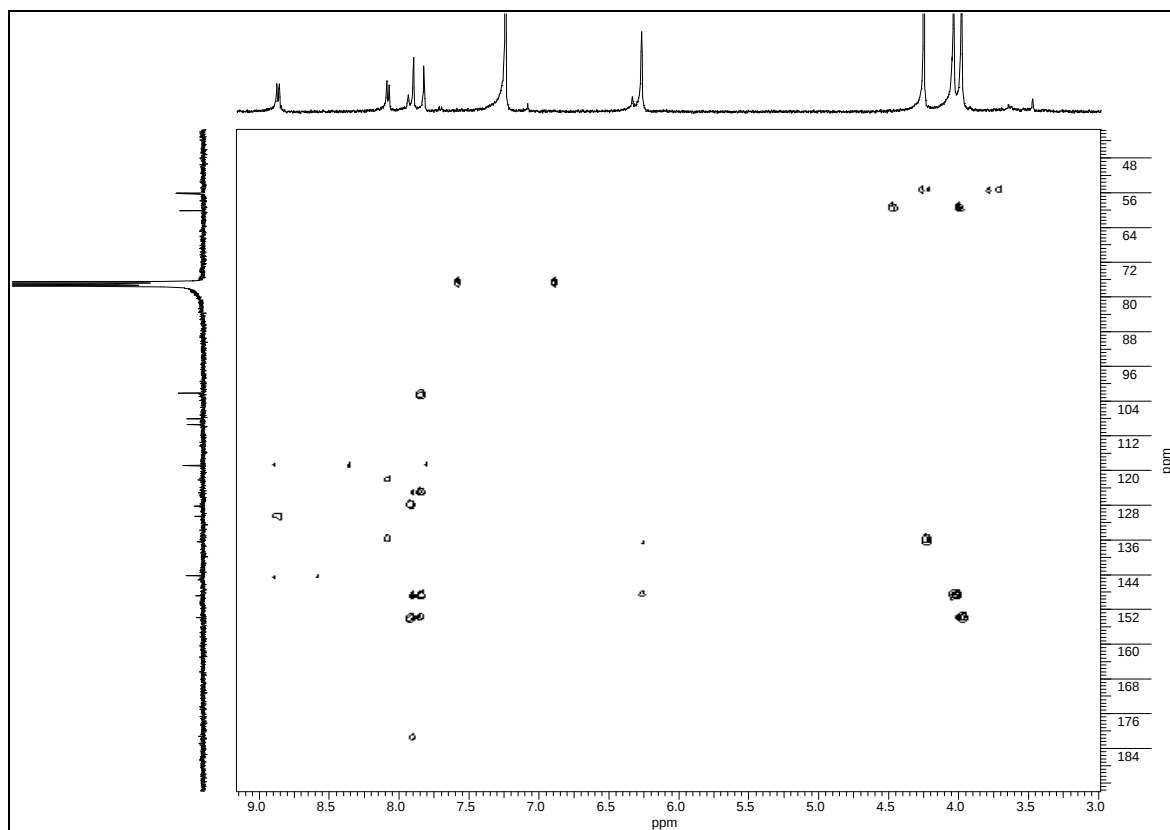
C/H	$\delta^{13}\text{C}$	(17) $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	(17) Literatura $\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	148,6	-	-
2	136,4	-	-
3	135,9	-	-
3a	130,6	-	-
4	118,9	8,08 d (6,0)	8,10 s
5	144,2	8,87 d (6,0)	8,88 s
6a	145,1	-	-
7	181,2	-	-
7a	125,1	-	-
8	109,4	7,90 s	8,35 s
9	148,9	-	-
10	153,9	-	-
11	108,1	7,82 s	8,74 s
11a	128,2	-	-
11b	102,9	-	-
11c	122,2	-	-
3-OCH ₃	60,1	4,25 s	4,55 s
9-OCH ₃	56,2	4,04 s	4,25 s
10-OCH ₃	56,1	3,98 s	4,20 s
OCH ₂ O	102,2	6,27 s	6,65 s

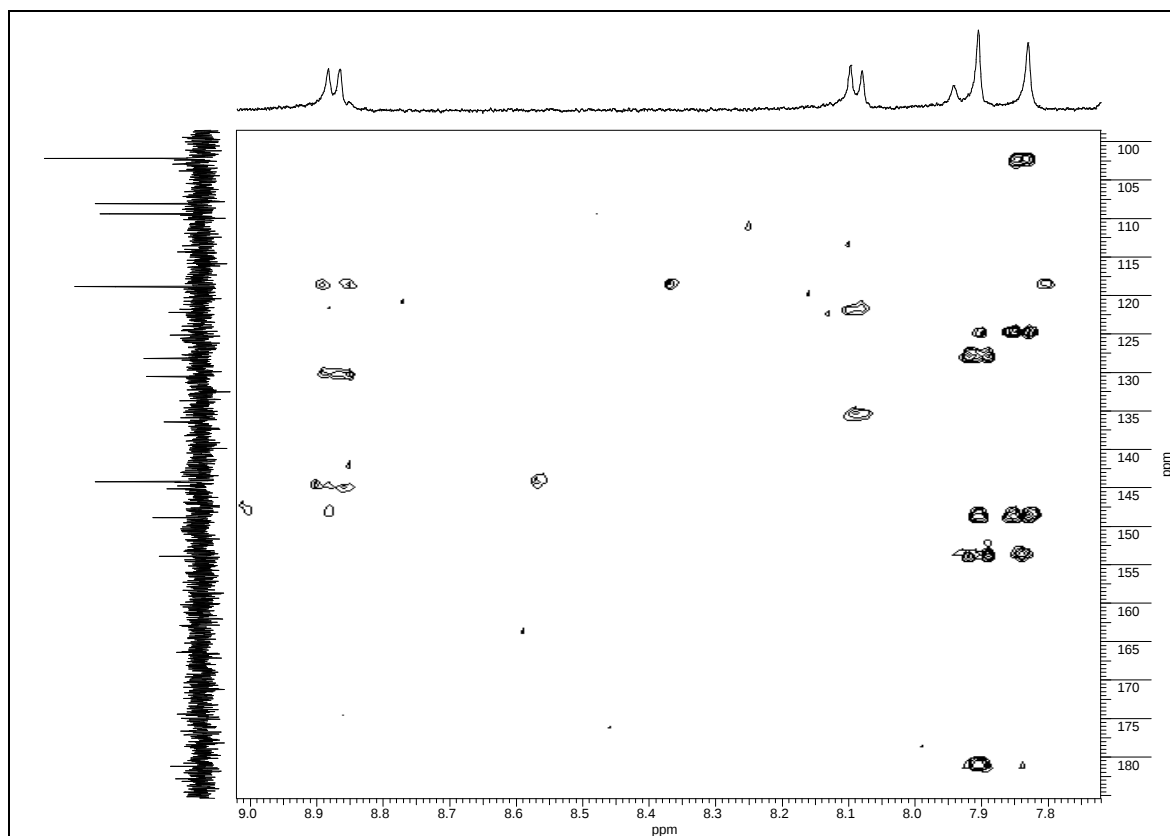
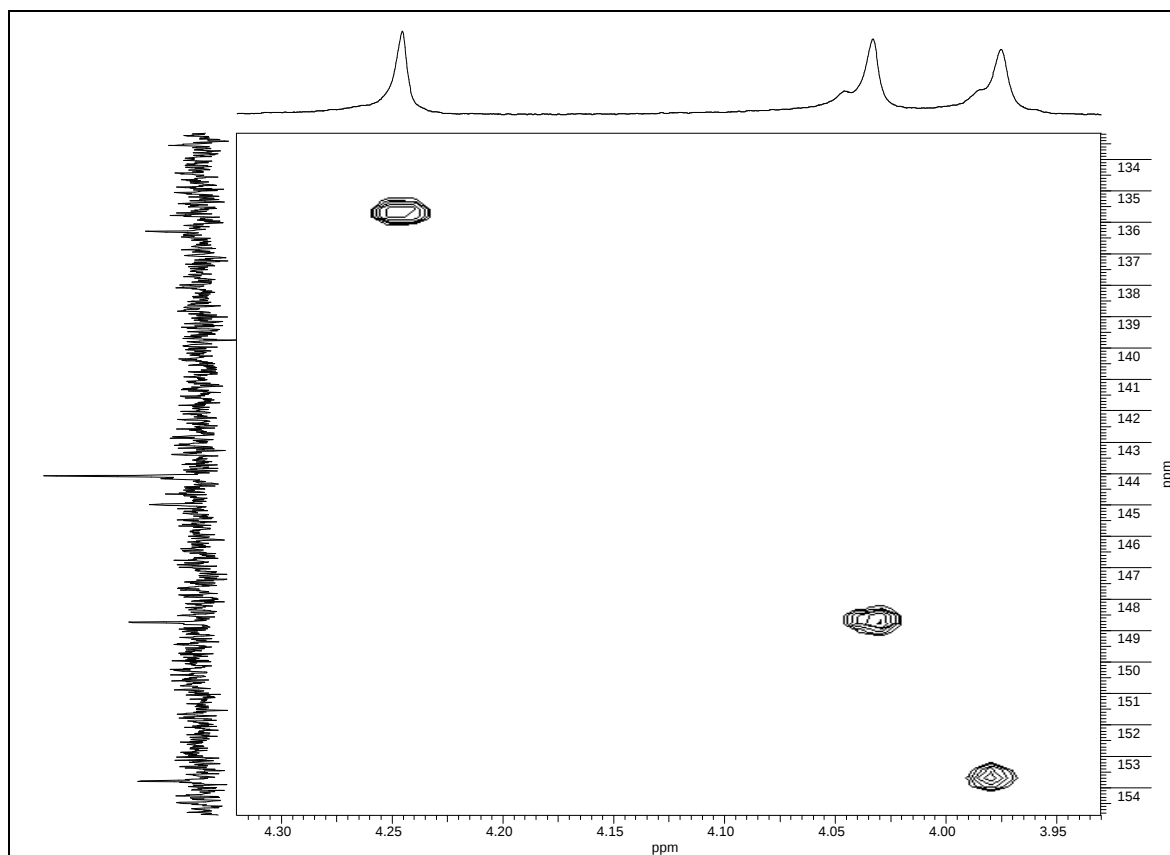
Tabela 40- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **17** (300/75 MHz, CDCl₃)

C/H	$\delta^{13}\text{C}$	HSQC (17)	HMBC (17)
		$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
4	118,9	8,08 d (6,0)	C-3, C-11c
5	144,2	8,87 d (6,0)	C-3a, C-4
8	109,4	7,90 s	C-7, C-7a, C-9, C-10, C-11 ^a
11	108,1	7,82 s	C-7, C-7a, C-9, C-10, C-11b
3-OCH ₃	60,1	4,25 s	C-3
9-OCH ₃	56,2	4,04 s	C-9
10-OCH ₃	56,1	3,98 s	C-10
OCH ₂ O	102,2	6,27 s	C-1, C-2

Espectro 131- RMN ^1H de **17** (300 MHz, CDCl_3)Espectro 132- RMN ^{13}C de **17** (75 MHz, CDCl_3)

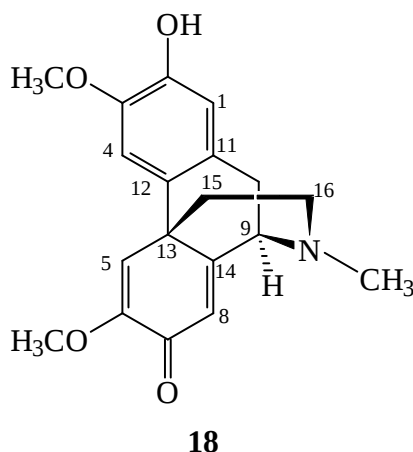
Espectro 133- ^1H - ^1H COSY de 17 (300/75 MHz, CDCl_3)Espectro 134- Espectro HSQC de 17 (300/75 MHz, CDCl_3)

Espectro 135- Expansão do espectro HSQC de **17** (300/75 MHz, CDCl₃)Espectro 136- Espectro HMBC de **17** (300/75 MHz, CDCl₃)

Espectro 137- Expansão do espectro HMBC de **17** (300/75 MHz, CDCl_3)Espectro 138- Expansão do espectro HMBC de **17** (300/75 MHz, CDCl_3)

5.2- Alcaloide morfinano

5.2.1- Identificação de (+)-palidina (**18**)



Da fração OAF-ALC E 1, originada dos fracionamentos cromatográficos do extrato alcaloídico das folhas, foi isolado o alcaloide **18** (item 4.2.2.6).

O espectro de RMN ^1H (Espectro 139, tabela 41) apresentou quatro singletos em δ 7,05, 6,89, 6,62 e 6,34 proporcionais a um hidrogênio cada e dois singletos em δ 3,88 e 3,80 referentes a dois grupos metoxila. Apresentou ainda, um singlete em δ 2,47 atribuído à metila ligada a nitrogênio e sinais de dois grupos de hidrogênios alifáticos nas regiões entre 3,81-3,35 δ e 2,61-1,97 δ .

No espectro de RMN ^{13}C (Espectros 140, tabela 41) foram observados sinais para dezenove carbonos, os quais foram atribuídos com auxílio do DEPT 135° (Espectro 141) a três metilas, cinco carbonos metínicos, três metilênicos, sete tetrassubstituídos, sendo três oxigenados e um grupo carbonila (δ 183,0). Tais informações, aliadas à presença de um sinal de carbono quaternário em δ 43,5 e ainda do sinal em δ 41,7 atribuído a Me-N, sugeriram para o alcaloide **18** um esqueleto do tipo morfinano (ROBLOT et al., 1984). O sinal do carbono tetrassubstituído C-13 na região de δ 40,0 é considerado característico de alcaloides com esse tipo de esqueleto (ROBLOT et al., 1984).

No espectro de RMN ^{13}C também foram observados sinais em δ 56,8 e 55,8, os quais com auxílio das correlações presentes no experimento HSQC (Espectros 142-144,

tabela 42) foram relacionados aos hidrogênios observados no espectro RMN ^1H a δ 3,88 e 3,80, respectivamente.

Com base nas correlações presentes nos experimentos HSQC e/ou HMBC (Espectros 142-148, tabela 42) foi possível propor a localização do grupo carbonila, das metoxila, e ainda de uma hidroxila que estaria ligada a um dos carbonos tetrassubstituídos, uma vez que foram observados três carbonos oxigenados.

Assim, no espectro HSQC foram estabelecidas as correlações entre os hidrogênios e os respectivos carbonos em δ_{H} 7,05/ δ_{C} 110,5, δ_{H} 6,89/ δ_{C} 122,6, δ_{H} 6,62/ δ_{C} 115,1 e δ_{H} 6,34/ δ_{C} 123,2 os quais foram atribuídos, respectivamente a H-4, H-5, H-1 e H-8, com base nas correlações presentes no espectro HMBC.

As correlações do tipo ^3J entre o carbono em 148,5 δ e os hidrogênios da metoxila a δ 3,88 estabeleceu a ligação da metoxila a este carbono e uma vez que este apresentou conectividades com os hidrogênios a δ 6,62/H-1 (^3J) e δ 7,05/H-4 (^2J), ficou definida a localização de um dos grupos metoxila em C-3 e da hidroxila em C-2 (147,1 δ), já que este apresentou correlações com os hidrogênios a δ 6,62/H-1 (^2J) e 7,05/H-4 (^3J).

A correlação dos hidrogênios da metoxila a δ 3,80 com o carbono a 152,2 δ , o qual apresentou acoplamento tipo ^3J com os hidrogênios a δ 6,34 e ^2J com δ 6,89, hidrogênio este que, por sua vez, apresentou conectividade com a carbonila (δ 183,0), definiu a localização da metoxila restante em C-6, e, conseqüentemente, da carbonila em C-7. As demais correlações observadas no espectro HMBC permitiram a atribuição completa dos valores de deslocamento químico de RMN ^{13}C de **18**.

As correlações espaciais obtidas no experimento NOESY (Espectro 149), tais como de H-5 (δ 6,89) com CH_3O -6 (δ 3,80) e H-4 (δ 7,05) com CH_3O -3 (δ 3,88), também confirmaram as atribuições efetuadas para o composto **18**.

Estas informações, em conjunto com o valor positivo de rotação óptica de **18** ($[\alpha]_{\text{D}} = +35,8$; MeOH, c 0,00053) indicaram que **18** tratava-se do alcaloide (+)-palidina, isolado anteriormente de *Ocotea acutangula*, *O. brachybotra* e *O. lancifolia* (FOURNET et al., 2007; VECCHIETTI et al., 1981; VECCHETTI et al., 1977).

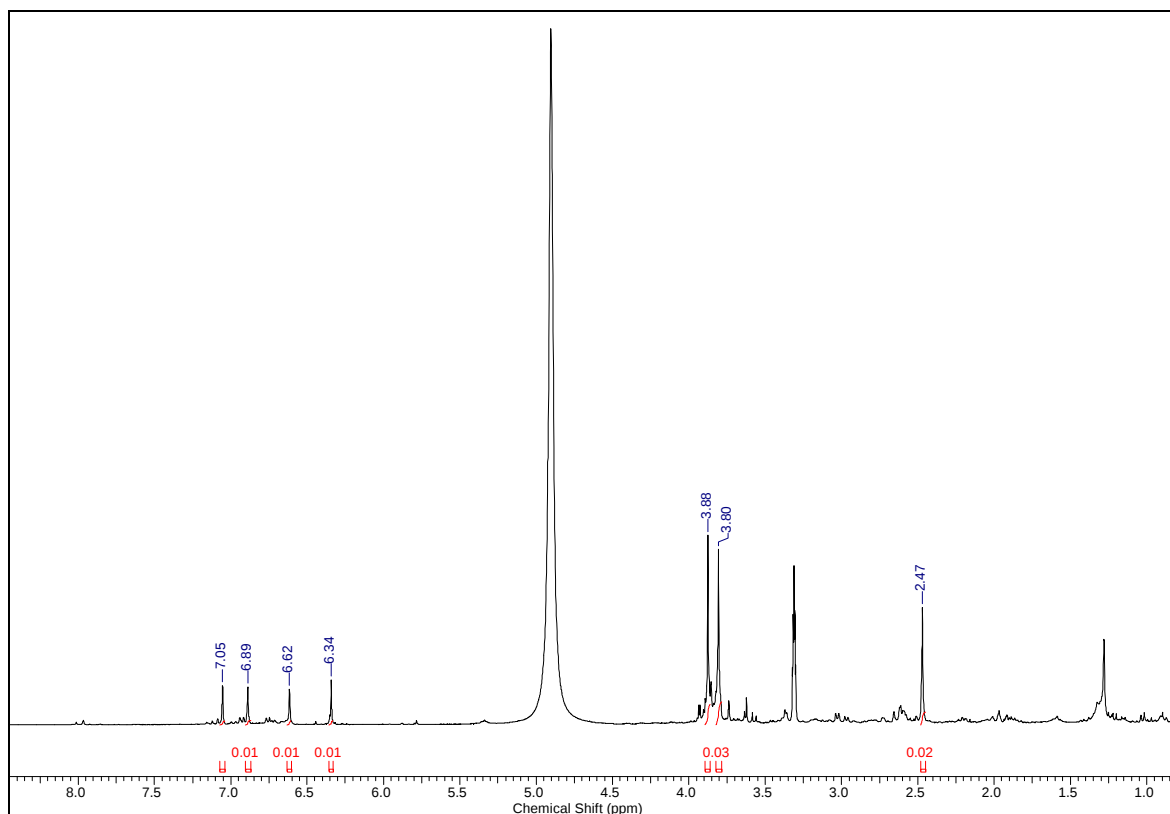
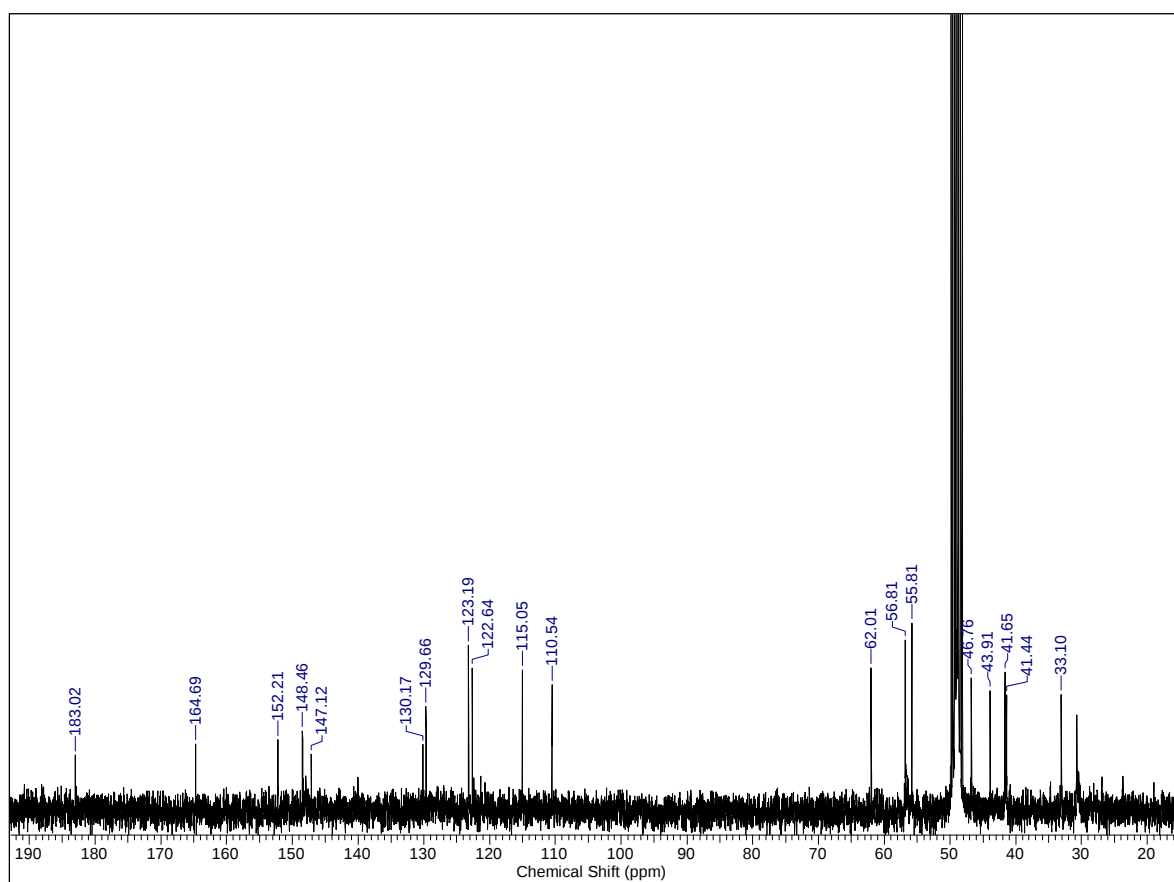
Os valores de RMN ^1H e ^{13}C mostraram-se compatíveis com os citados na literatura para (-)-palidina (ROBLOT et al., 1984).

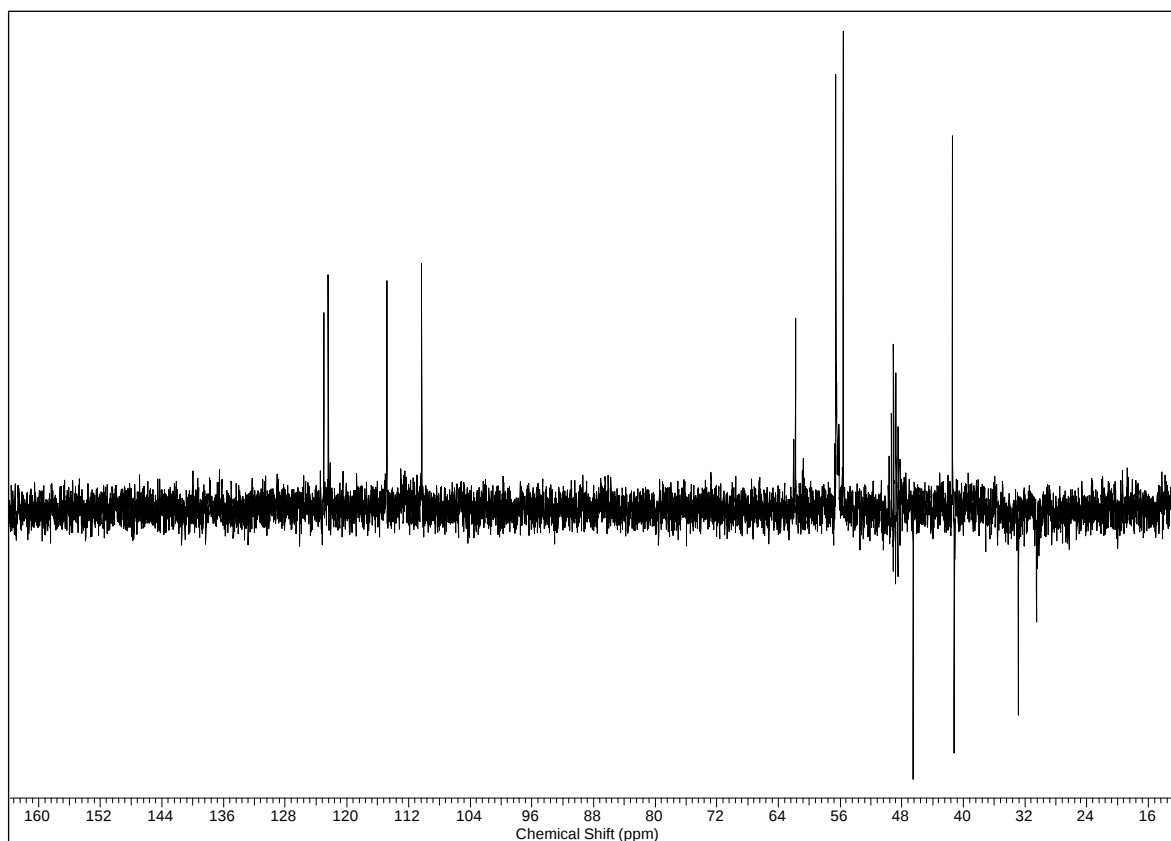
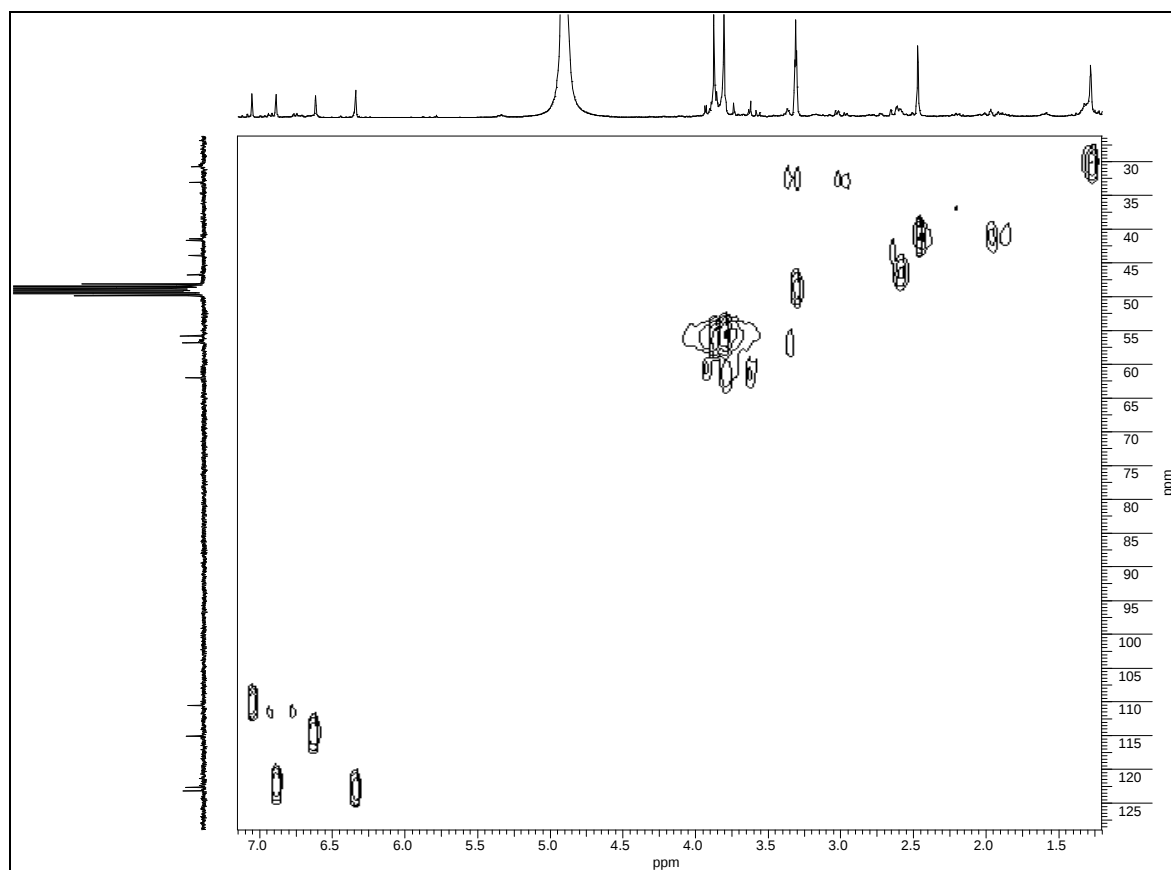
Tabela 41- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) de **18** e do alcaloide (-)-palidina citado na literatura (ROBLOT et al., 1984) [400/25 MHz, CDCl_3]

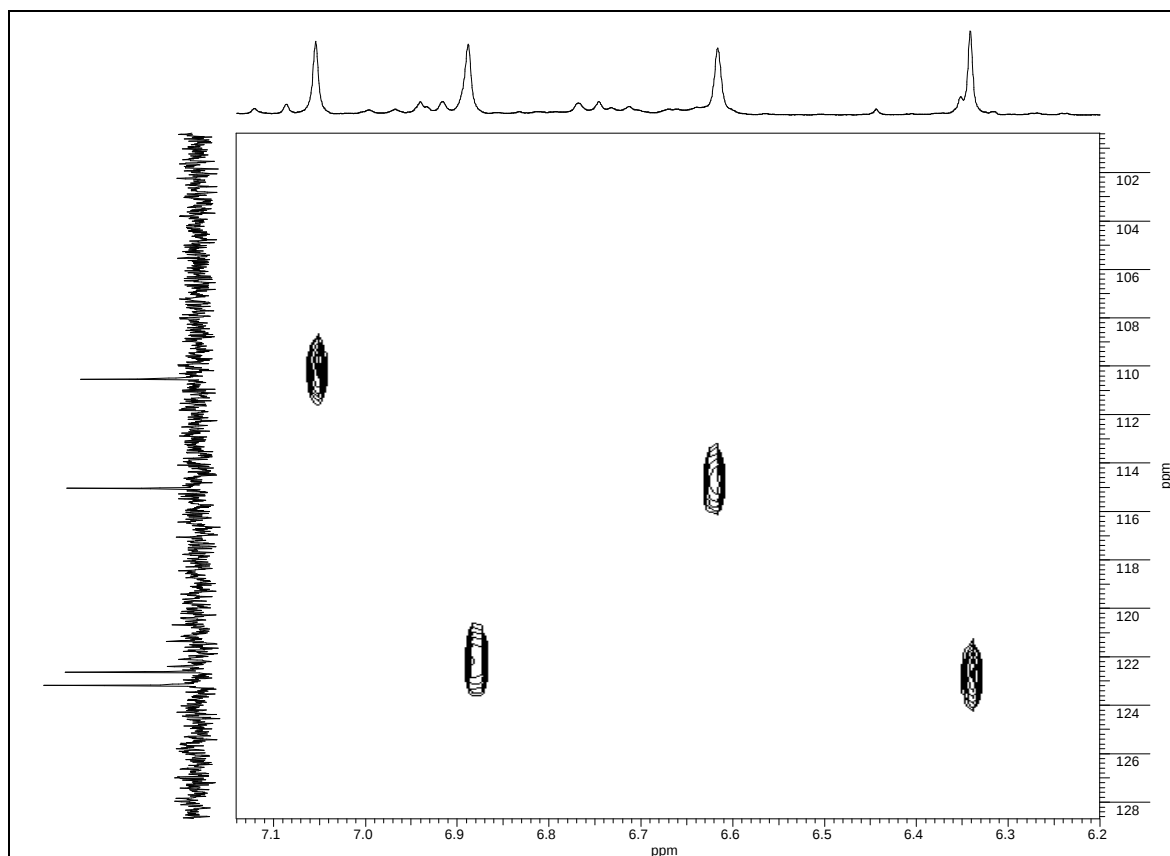
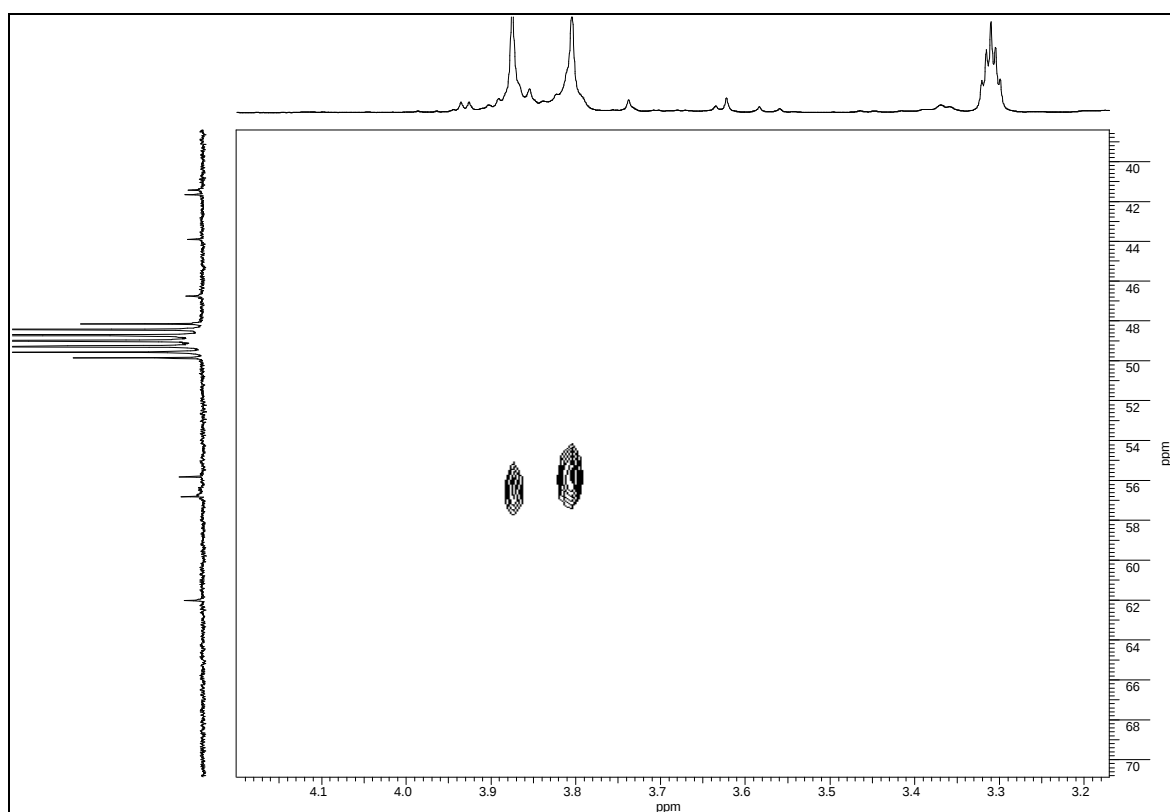
C/H	(18)		[(-)-palidina] Literatura	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
1	115,1	6,62 s	113,7	6,68 s
2	147,1	-	145,0	-
3	148,5	-	145,9	-
4	110,5	7,05 s	107,6	6,75 s
5	122,6	6,89 s	119,0	6,32 s
6	152,2	-	151,4	-
7	183,0	-	180,9	-
8	123,2	6,34 s	122,2	6,30 s
9	62,0	3,81 m	60,8	3,67 d (6,0)
10	33,1	3,35 m ($\text{H}\alpha$)	32,4	3,31 dd (17,5 $\text{H}\alpha$)
		3,00 ddl (18,0; 6,0 $\text{H}\beta$)		2,99 dd (17,5; 6,0 $\text{H}\beta$)
11	130,2	-	129,3	-
12	129,7	-	129,5	-
13	43,9	-	42,3	-
14	164,7	-	161,8	-
15	41,5	1,97 m ($\text{H}\alpha$)	41,3	1,94 ddd (13,0; 10,0; 7,0 $\text{H}\alpha$)
		1,86 m ($\text{H}\epsilon$)		1,82 ddd (13,0; 3,0; 2,5 $\text{H}\epsilon$)
16	46,8	2,61 m ($\text{H}\alpha$)	45,7	2,58 m ($\text{H}\alpha$)
		2,61 m ($\text{H}\epsilon$)		2,58 m ($\text{H}\epsilon$)
N- CH_3	41,7	2,47 s	41,7	2,37 s
3- OCH_3	56,8	3,88 s	56,2	3,89 s
6- OCH_3	55,8	3,80 s	55,1	3,79 s

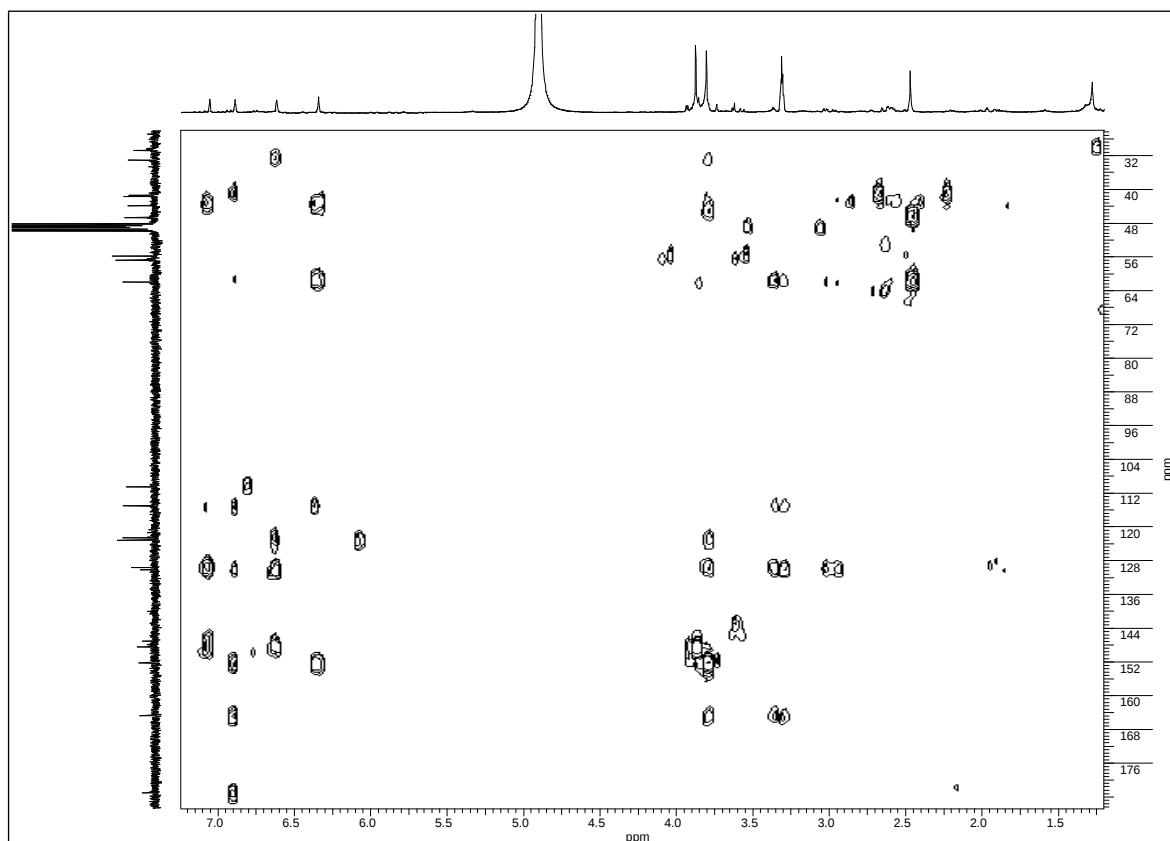
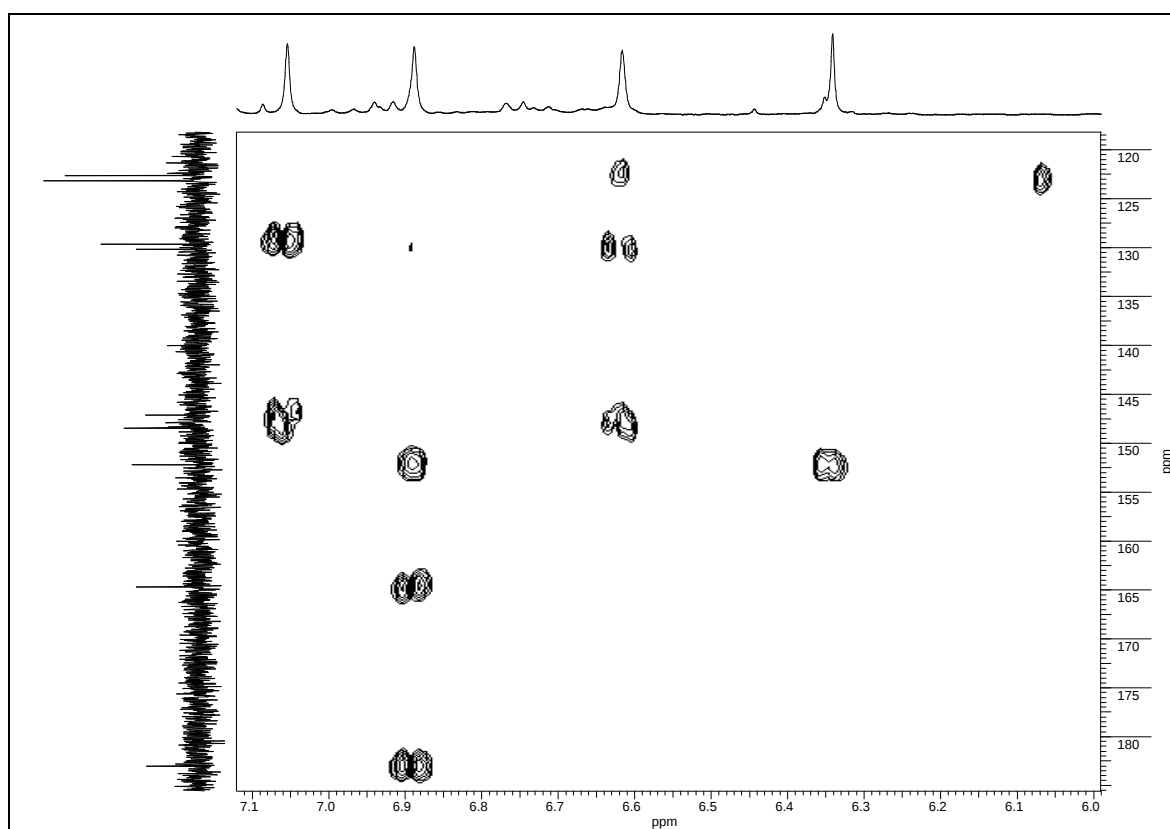
Tabela 42- Correlações observadas nos espectros HSQC e HMBC de **18** (300/75 MHz, CD₃OD)

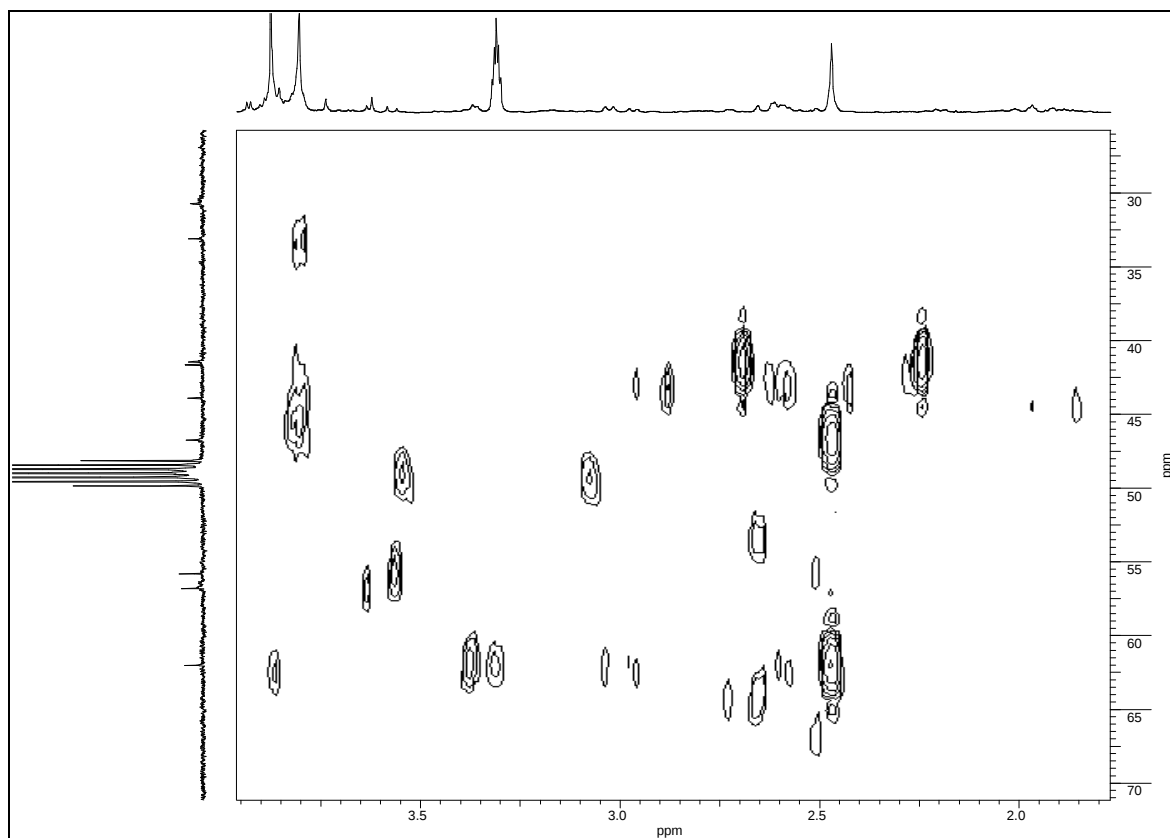
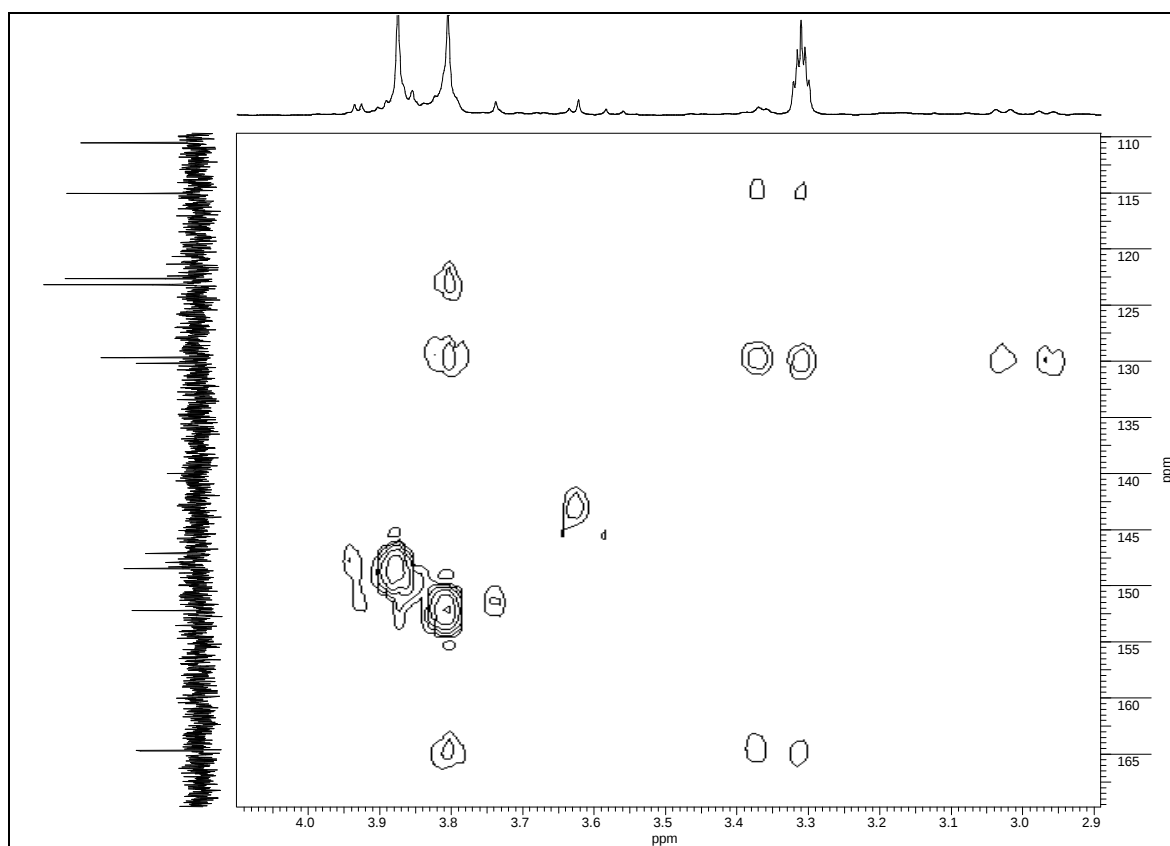
C/H	HSQC (18)		HMBC (18)
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ (m)	(H→C)
1	115,1	6,62 s	C-2, C-3, C-10, C-12
4	110,5	7,05 s	C-2, C-3, C-13
5	122,6	6,89 s	C-6, C-7, C-12, C-14, C-15
8	123,2	6,34 s	C-6, C-9, C-13
9	62,0	3,81 m	C-10, C-13, C-14
10 H α	33,1	3,35 m	C-1, C-9, C-12, C-14
10 H β		3,00 ddl	C-1, C-9, C-12
15 H α	41,5	1,97 m	-
15 H ϵ		1,86 m	-
16 H α	46,8	2,61 m	C-13
16 H ϵ		2,61 m	C-13
N-CH ₃	41,7	2,47 m	C-9, C-16
3-OCH ₃	56,8	3,88 s	C-3
6-OCH ₃	55,8	3,80 s	C-6

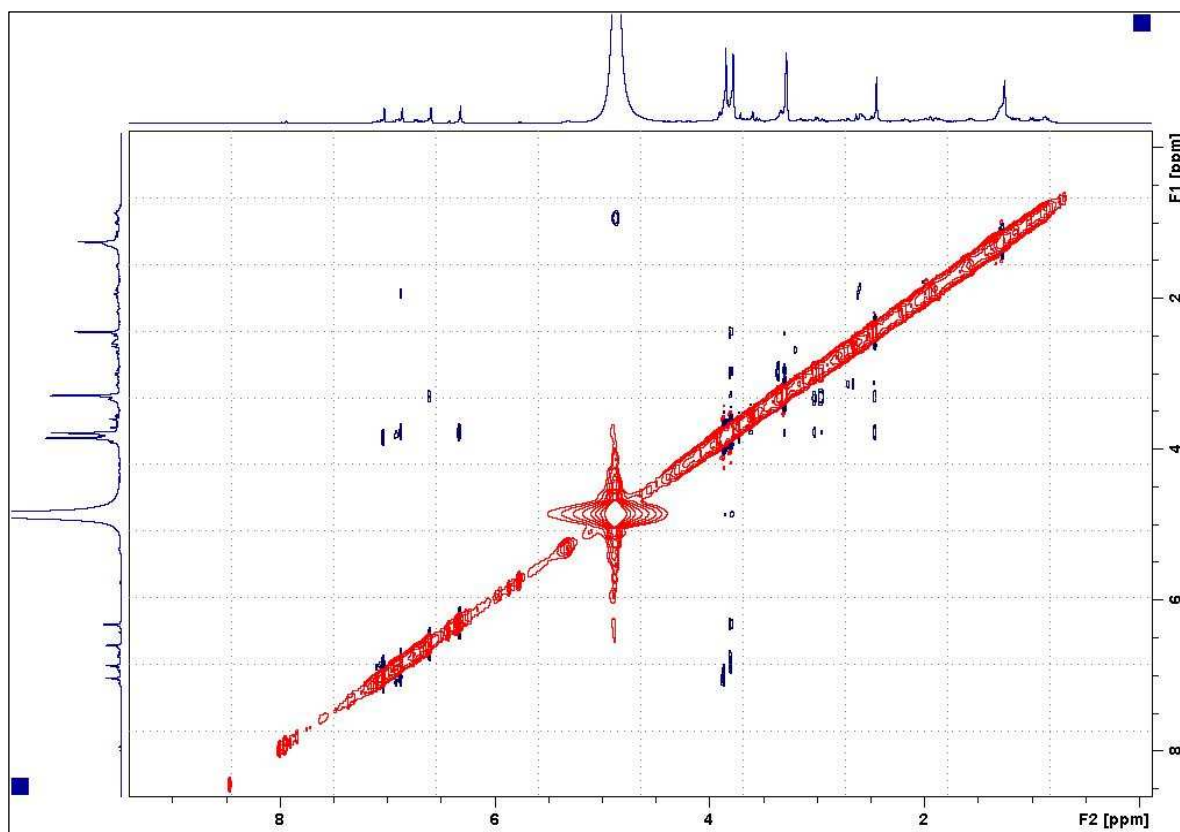
Espectro 139- RMN ^1H de **18** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 140- RMN ^{13}C de **18** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 141- DEPT 135° de **18** (75 MHz, CD₃OD)Espectro 142- Espectro HSQC de **18** (300/75 MHz, CDCl₃)

Espectro 143- Expansão do espectro HSQC de **18** (300/75 MHz, CDCl₃)Espectro 144- Expansão do espectro HSQC de **18** (300/75 MHz, CDCl₃)

Espectro 145- Espectro HMBC de **18** (300/75 MHz, CDCl_3)Espectro 146- Expansão do espectro HMBC de **18** (300/75 MHz, CDCl_3)

Espectro 147- Expansão do espectro HMBC de **18** (300/75 MHz, CDCl₃)Espectro 148- Expansão do espectro HMBC de **18** (300/75 MHz, CDCl₃)

Espectro 149- NOESY de **18**

flavona, indicaram que **19** seria um derivado de flavonol (MABRY et al., 1970; AGRAWAL, 1989).

No espectro de RMN ^1H foram observados ainda dois dubletos em 5,37 δ ($J = 1,5$ Hz) e 0,92 δ ($J = 6,0$ Hz), este último relativo a um grupo metila e sinais de multipletos na região de 4,23 a 3,77 δ sugerindo que o substituinte em C-3 era uma unidade de α -ramnose (GARCEZ, 1991). Os sinais observados no espectro RMN ^{13}C em 103,5 δ atribuído ao carbono anomérico e em 17,6 δ referente à metila observada em 0,92 δ no espectro de RMN ^1H , e entre 73,2 e 71,9 δ , confirmaram a presença deste açúcar em **19** (GARCEZ, 1991).

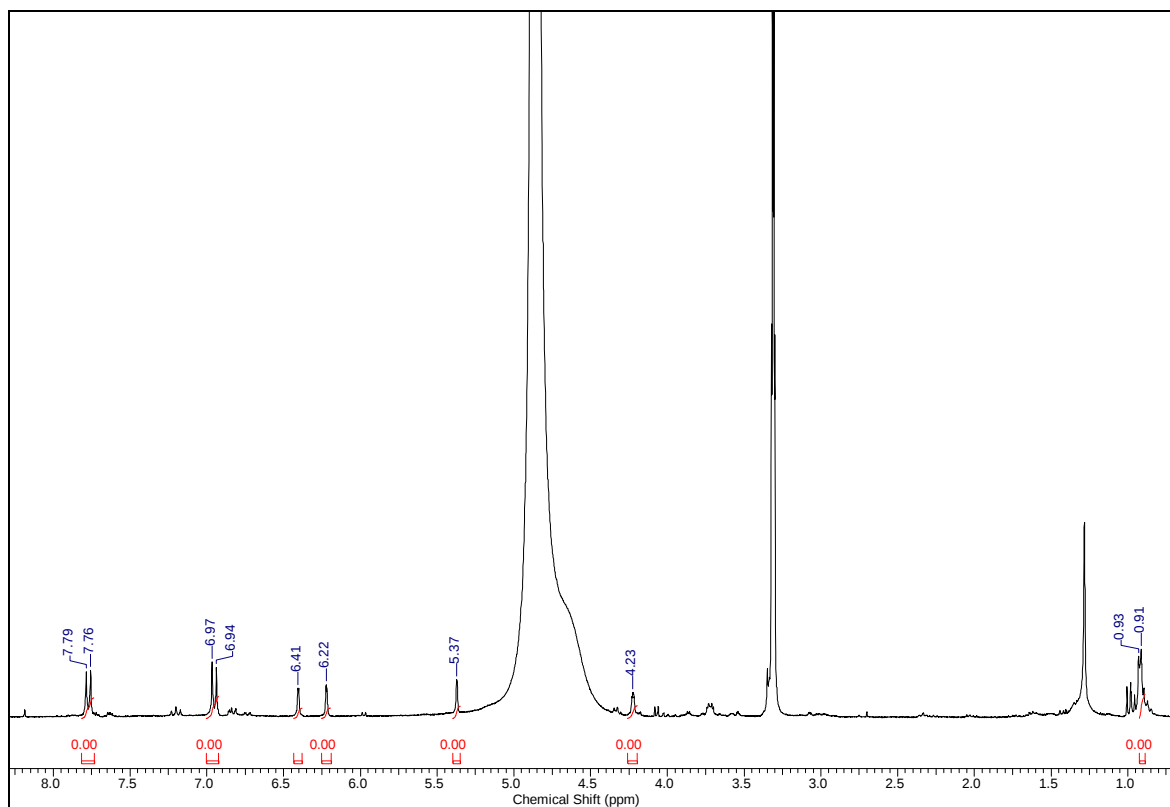
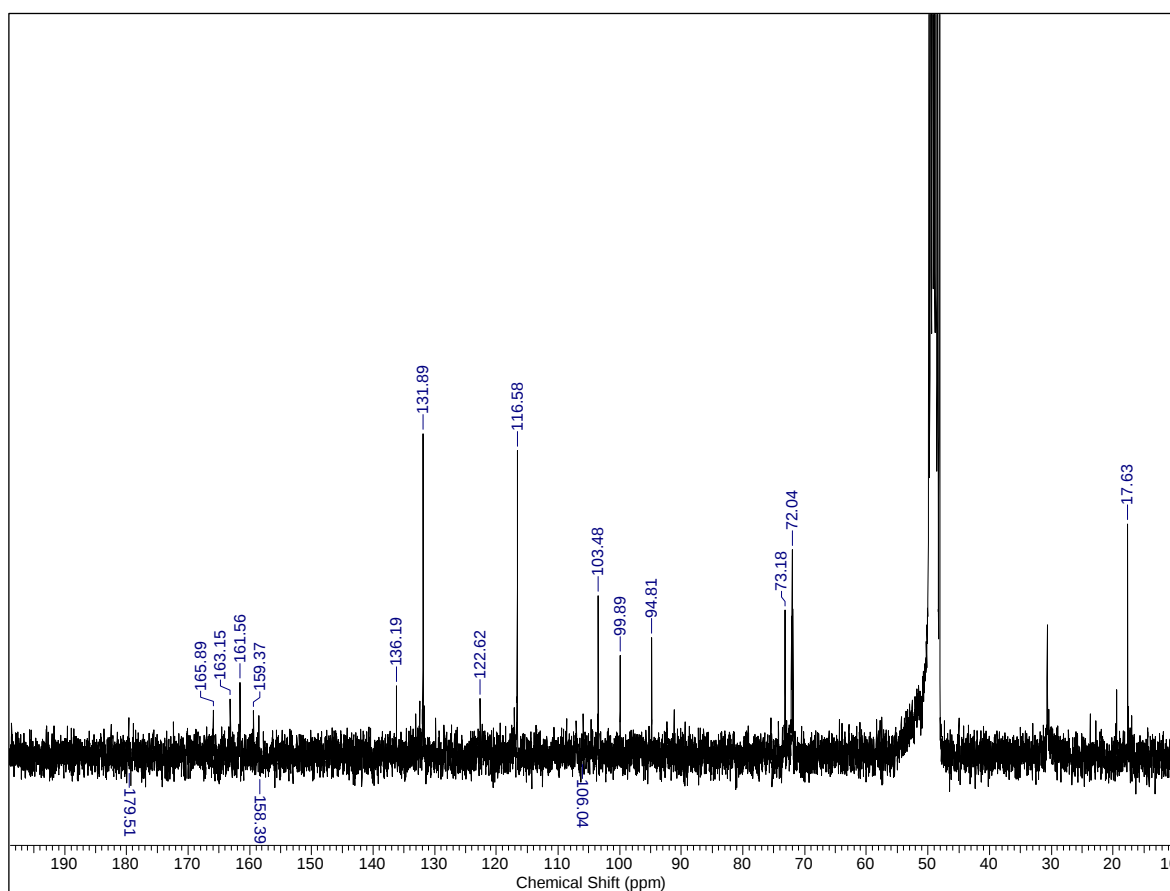
Através das correlações observadas nos espectros HSQC (Espectro 153) e HMBC (Espectros 154 e 155) foi possível realizar todas as atribuições dos carbonos de **19** e a correlação observada no espectro HMBC entre H-1'' e C-3 evidenciou a presença do resíduo de ramnose em C-3.

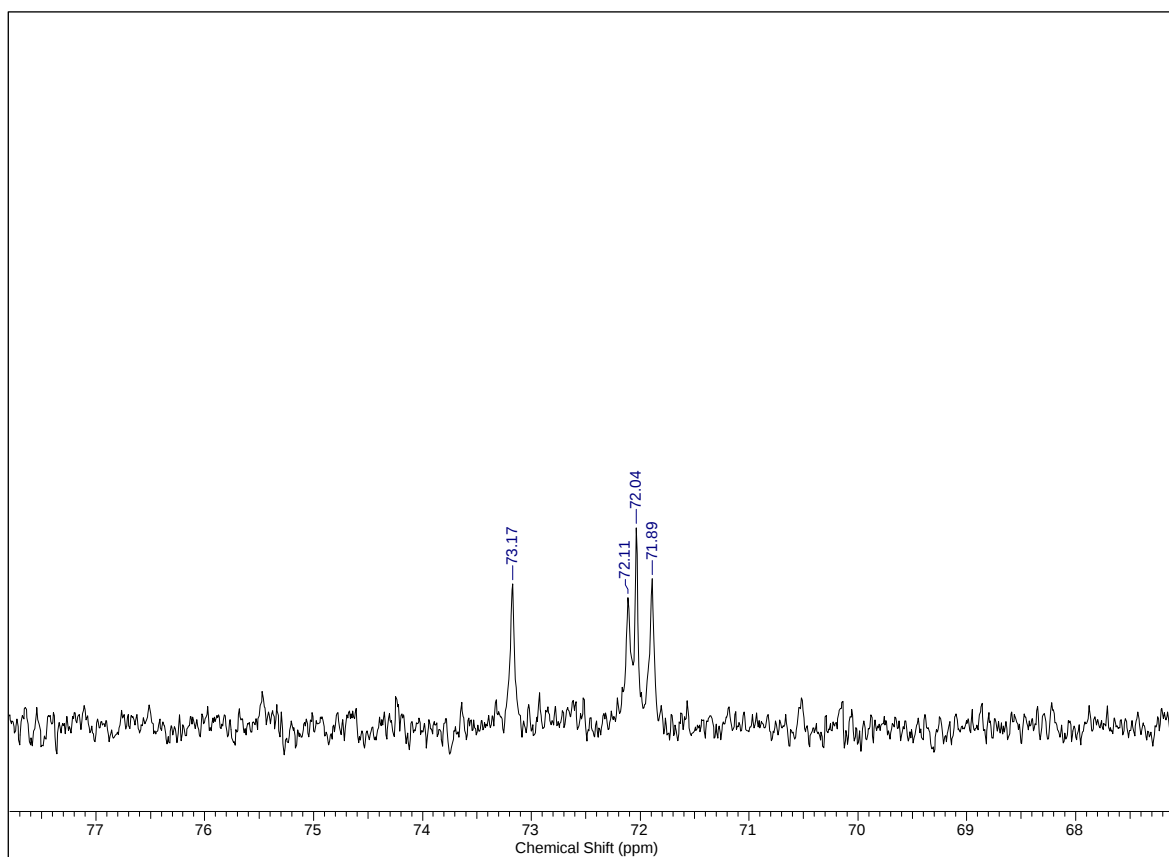
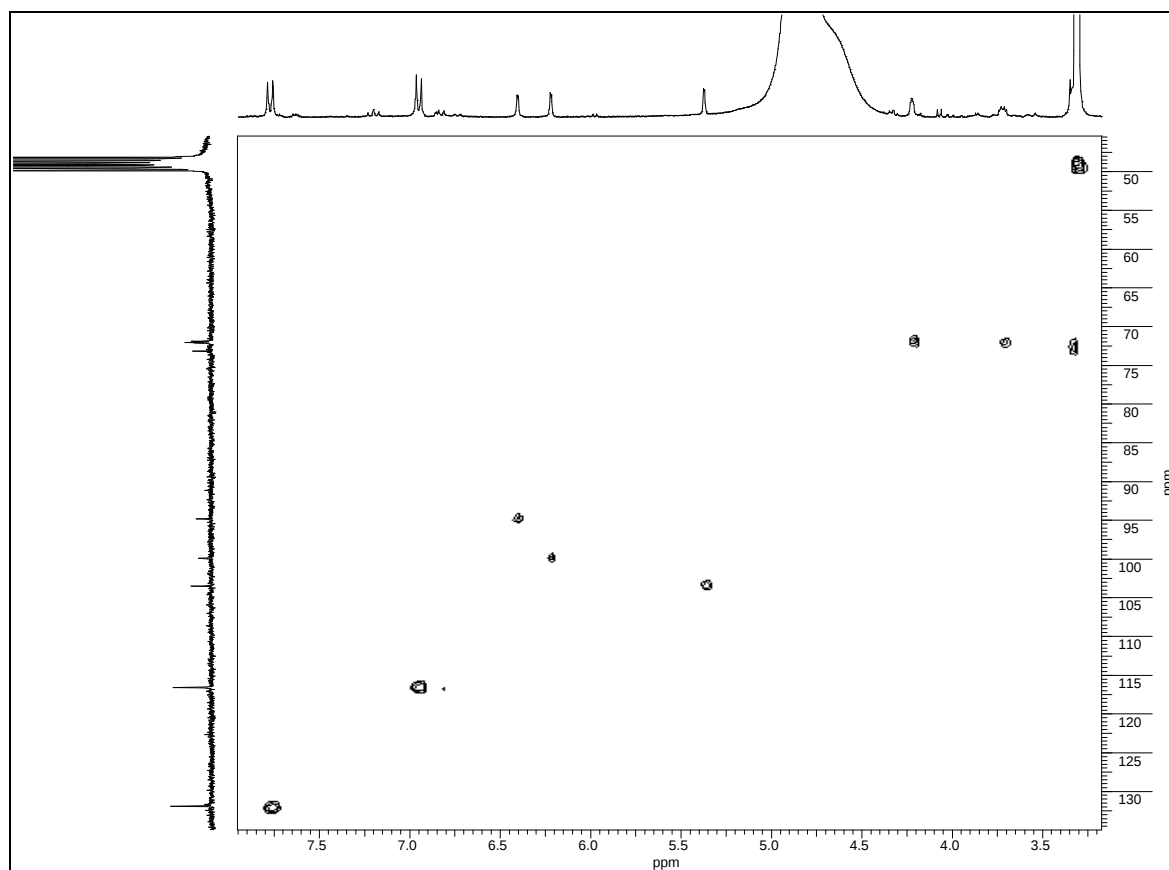
O valor da constante de acoplamento 1,5 Hz para os sinais relativos a H-1'' e H-2'' definiu a orientação trans-diequatorial de ambos, indicando a orientação α para o hidrogênio anomérico (H-1'').

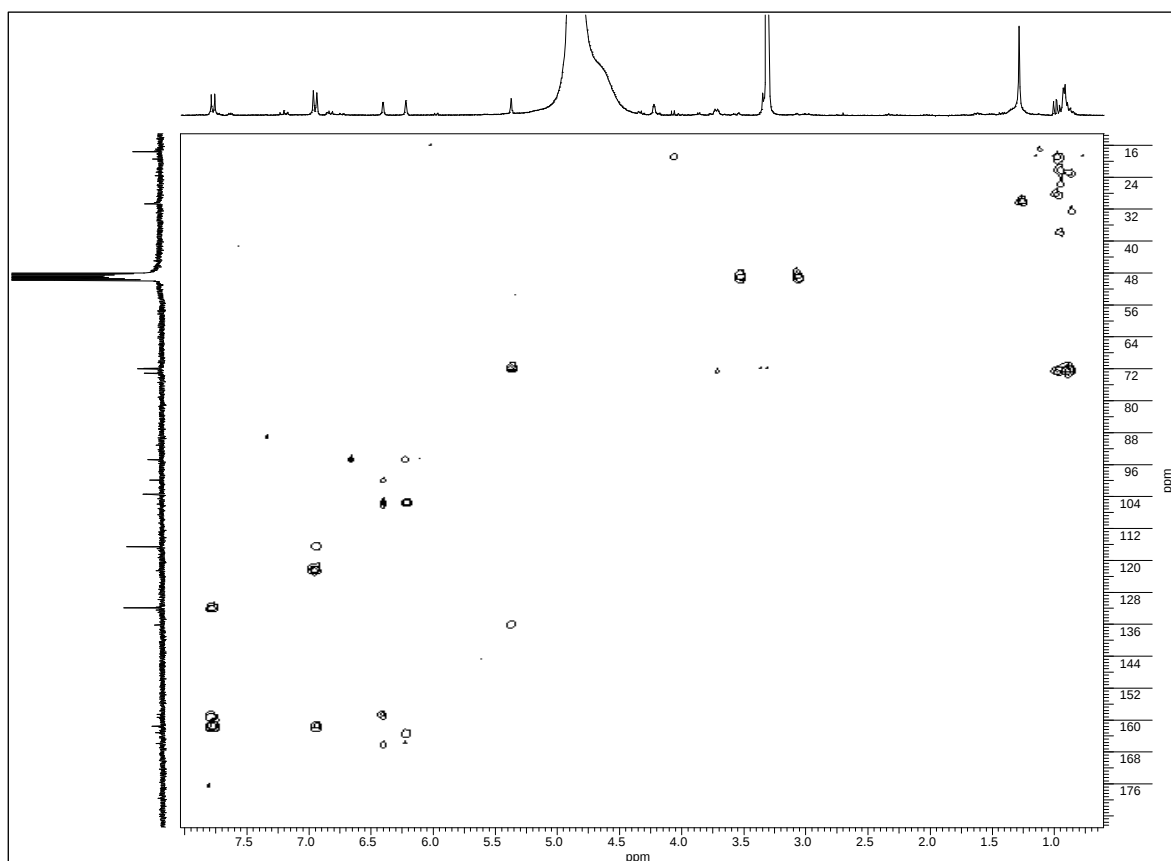
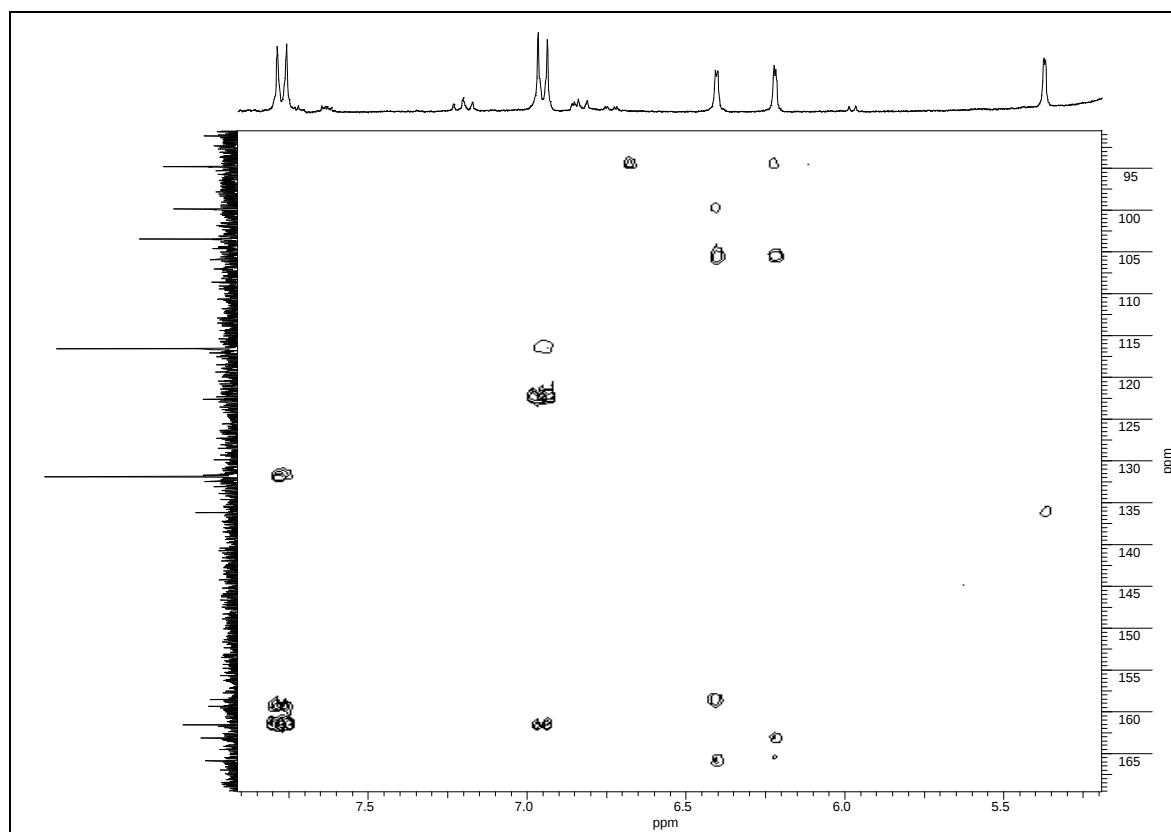
Com base nas informações acima citadas, verificou-se que **19** tratava-se do kaempferol-3-*O*- α -L-ramnopiranosídeo, já isolado anteriormente de *Ocotea vellosiana* (GARCEZ, 1991), cujos dados de RMN ^1H e ^{13}C apresentaram uma boa correlação com os de **19** (Tabela 27).

Tabela 43- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CD_3OD) do flavonoide **19** obtido de *O. acutifolia* e do flavonoide kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosídeo citado na literatura (GARCEZ, 1991) [50 MHz, acetona- d_6]

C/H	(19)		(19) literatura	
	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]
2	159,4	-	158,4	-
3	136,2	-	135,8	-
4	179,5	-	179,3	-
5	163,2	-	163,1	-
6	99,9	6,22 d (1,5)	94,6	6,24 d (2,0)
7	165,9	-	165,0	-
8	94,8	6,41 d (1,5)	98,6	6,44 d (2,0)
9	158,4	-	158,0	-
10	106,0	-	105,8	-
1'	122,6		122,5	-
2'	131,9	7,78 d (9,0)	131,8	7,80 d (8,7)
3'	116,6	6,96 d (9,0)	116,3	6,99 d (8,7)
4'	161,6	-	160,9	
5'	116,6	6,96 d (9,0)	116,3	6,99 d (8,5)
6'	131,9	7,78 d (9,0)	131,8	7,80 d (8,5)
Ramnose 1''	103,5	5,37 d (1,5)	102,8	5,47 d (1,4)
2''	71,9	4,23 m	71,5	4,21 m
3''	72,0	3,72 m	72,2	3,20-3,80 m
4''	72,1	3,31 m	73,0	3,20-3,80 m
5''	73,2	3,31 m	71,3	3,20-3,80 m
6''	17,6	0,92 d (6,0)	17,7	0,86 d (6,0)

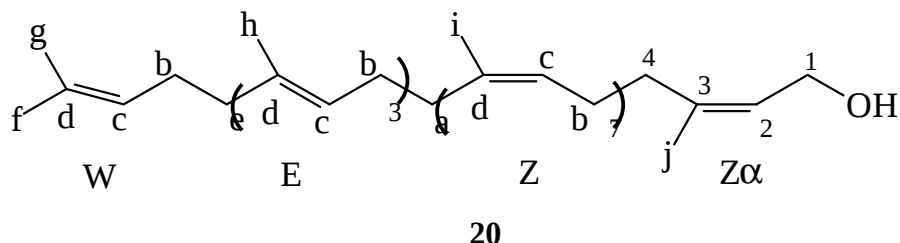
Espectro 150- RMN ^1H de **19** (300 MHz, CD_3OD)Espectro 151- RMN ^{13}C de **19** (75 MHz, CD_3OD)

Espectro 152- Expansão do espectro RMN ^{13}C de **19** (75 MHz, CD_3OD)Espectro 153- Espectro HSQC de **19** (300/75 MHz, CD_3OD)

Espectro 154- Espectro HMBC de **19** (300/75 MHz, CD₃OD)Espectro 155- Expansão do espectro HMBC de **19** (300/75 MHz, CD₃OD)

5.4- Poliprenol

5.4.1- Identificação de ficaprenol-12 (**20**)



A substância **20** foi obtida com pequena quantidade de impurezas, das frações OAF- (A 1, B 1, C 1, C 4/8 e A 8) provenientes das fases hexânicas das folhas (4.3.2.1; 4.3.2.2; 4.3.2.3; 4.3.2.4).

O espectro de RMN ^1H de **20** (Espectro 156, tabela 44) apresentou três singletos em 1,76; 1,69 e 1,61 δ , sugestivos de grupos metila ligados a carbonos olefínicos e dois singletos largos em 2,05 e 5,13 δ . Apresentou também um duplo dubleto em 4,12 δ (6,0; 3,0 Hz) e um multiplete em 5,37 δ .

Os espectros de RMN ^{13}C de **20** (DEPT 135°) [Espectros 157 e 159, tabela 44] apresentaram, além de dois conjuntos de sinais relativos a carbonos olefínicos [um na região de 124,9 a 125,8 δ (CH) e outro na região de 132,7 a 136,1 δ (C)], um sinal em 61,6 δ correspondente a um grupo metilênico carbinólico (compatível com o sinal em 4,12 δ no espectro de RMN ^1H) e sinais referentes a grupos metila ligados a carbonos olefínicos entre 16,8 e 26,4 δ e a carbonos metilênicos entre 27,2 e 40,5 δ .

Estas informações sugeriram para **20** uma estrutura isoprenoide acíclica e pela comparação dos dados espectrais deste composto com os existentes na literatura, verificou-se que **20** pertencia a classe dos poliprenóis, os quais podem ser obtidos de plantas superiores e também de animais e microorganismos (SWIEZEWSKA et al., 1994; AOKI et al., 1997; TANAKA et al., 1998).

Poliprenóis de origem vegetal apresentam uma grande diversidade quanto ao tamanho da cadeia isoprenoide. Em geral, poliprenóis encontrados em folhas de angiospermas possuem cadeias com 8 a 15 ou até mais unidades isoprênicas, sendo os mais comuns os que contêm resíduos de 10 a 12 destas unidades (SWIEZEWSKA et al., 1994).

Existem dois tipos principais de poliprenóis vegetais: os tri-*trans* poli-*cis* prenóis (Figura 4, $n = 3$) e os di-*trans* poli-*cis* prenóis (Figura 4, $n = 2$) [SWIEZEWSKA et al., 1994; AOKI et al., 1997] originados a partir da incorporação de unidades isoprênicas (através do pirofosfato de isopentenila) a unidades de pirofosfato de tri-*trans* geranil-geranila e di-*trans* farnesila, respectivamente, pela ação de uma *cis*-preniltransferase (SWIEZEWSKA et al., 1994; TANAKA & TANGPAKDEE, 1998).

Com relação a estereoquímica destas unidades isoprênicas, verificou-se que tanto ligações duplas trissubstituídas Z como E ocorriam na estrutura de **20**, uma vez que foram observados sinais para carbonos metílicos na região de 23 δ e para carbonos metilênicos alílicos vizinhos ao carbono metilado na região de 32 δ (indicativos de ligação dupla Z), como também metilas na região de 16 δ e carbonos metilênicos entorno de 39 δ (indicativos de ligação dupla E), conforme exemplificado pelos valores de deslocamento químico dos carbonos nos monoterpênicos abaixo (WEHRLI & NISHIDA, 1979).



Com base, principalmente, no número de sinais de carbonos olefínicos, como também na integração dos sinais no espectro de RMN ^1H de **20**, concluiu-se que este composto possuía em sua estrutura vários resíduos isoprênicos contendo ligações duplas (Z) e (E) e um grupo hidroximetilênico terminal.

No espectro de RMN ^1H de **20** observa-se que há uma predominância de resíduos isoprênicos com geometria Z em relação aos de geometria E, conforme demonstrado pela integração dos sinais em 1,61 e 1,69-1,76 δ , referentes às metilas dos resíduos isoprênicos internos E e Z, respectivamente. Estes sinais também representam as metilas do resíduo isoprênico terminal W com orientação *cis* e *trans*, respectivamente, em relação à cadeia principal e à metila do resíduo isoprênico terminal α (1,69 δ).

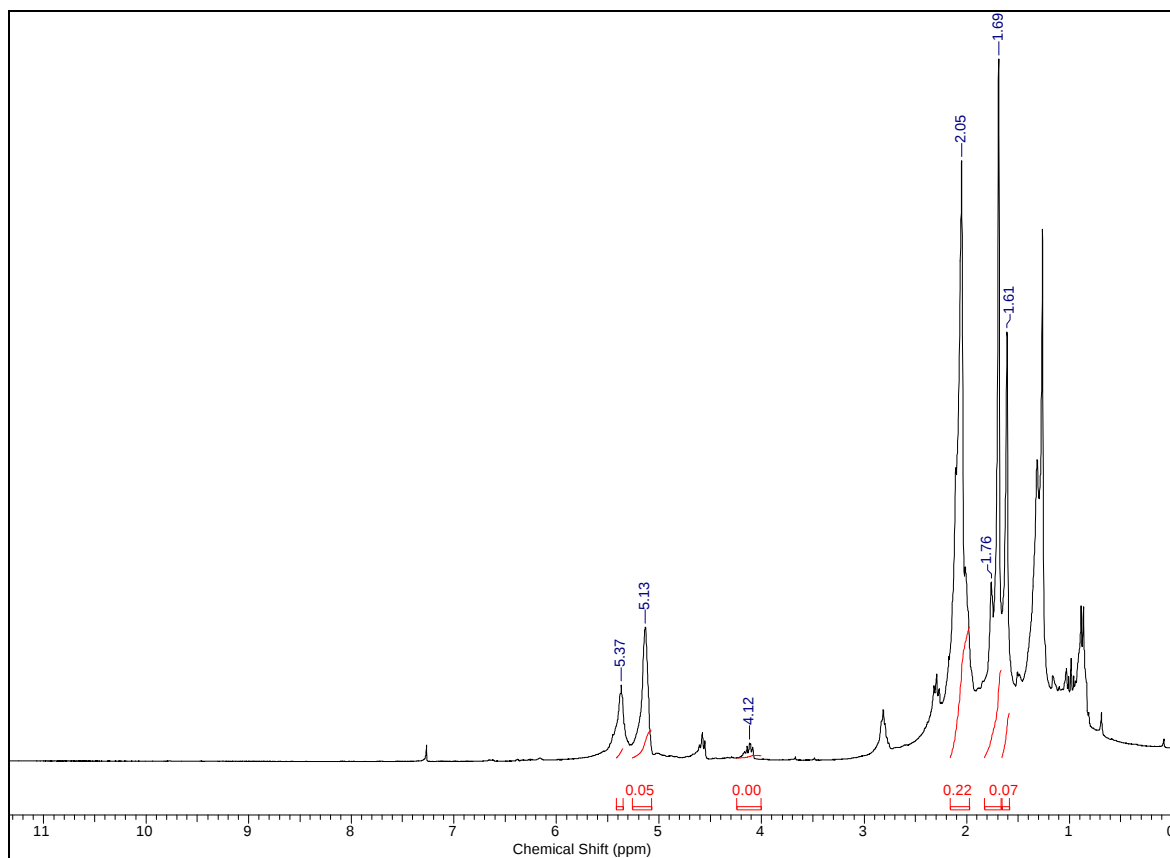
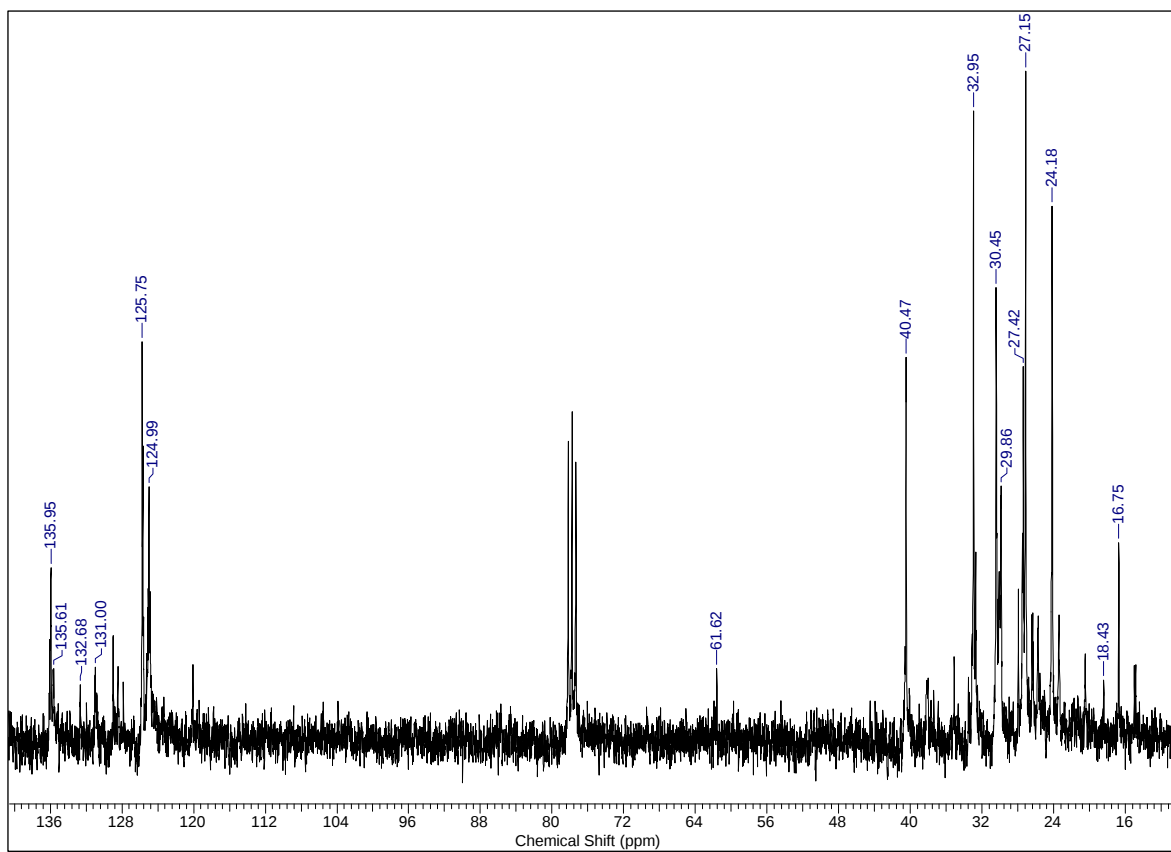
As informações fornecidas pela integração destes sinais presentes no espectro de RMN ^1H sugeriram a presença de 12 unidades isoprênicas na estrutura de **20**,

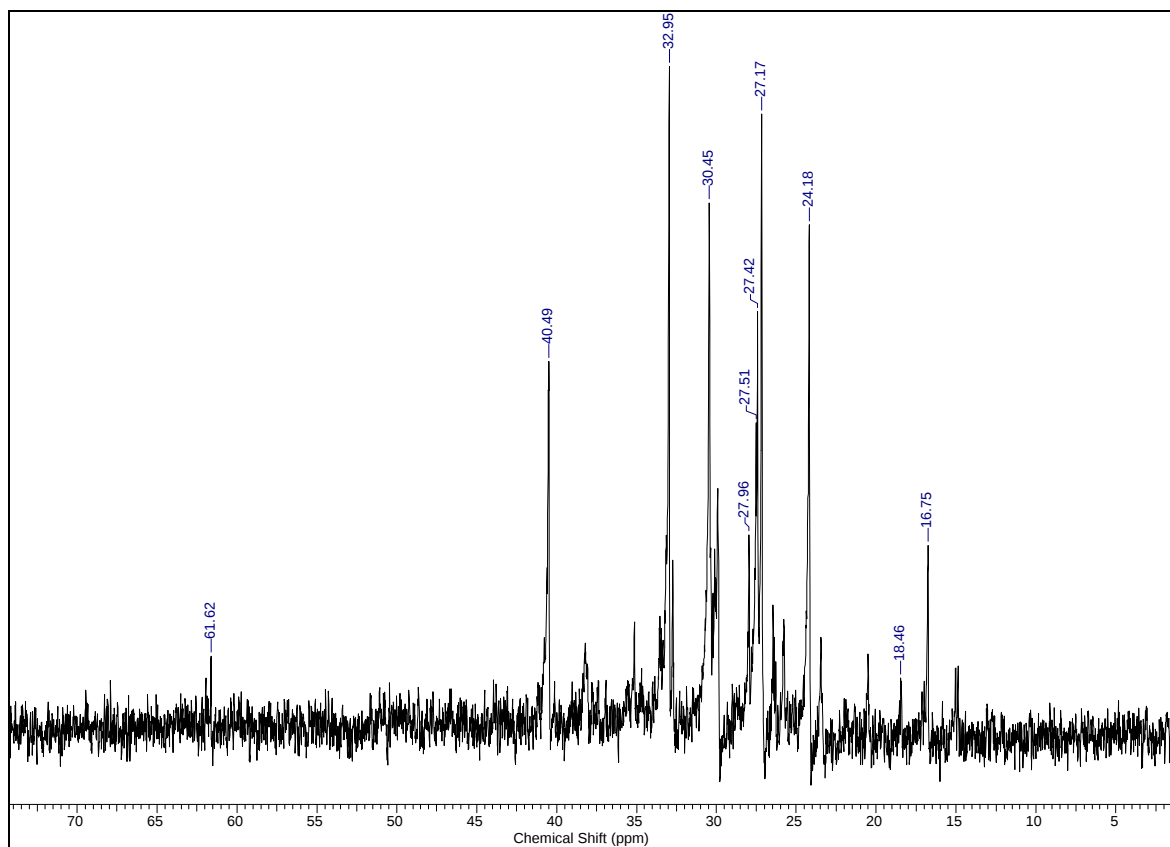
compreendendo: sete resíduos isoprênicos Z e três E, além de um resíduo terminal W e um terminal α (Z), contendo o grupo hidroximetilênico.

Assim os dados de RMN ^1H e ^{13}C de **20** apresentaram-se bastante semelhantes aos do ficaprenol-12 relatados na literatura (REYNOLDS et al., 1999) e também com os de uma amostra autêntica, obtida de *Guarea kunthiana* (GARCEZ et al., 2004). Esta substância tem sido isolada de folhas de várias espécies de angiospermas (SWIEZEWSKA et al., 1994), incluindo representantes da família Lauraceae, como por exemplo, *Nectandra cuspidata*, *Persea gratissima* e algumas pertencentes ao gênero *Cinnamomum* (GARCEZ et al., 1999; SWIEZEWSKA et al., 1994).

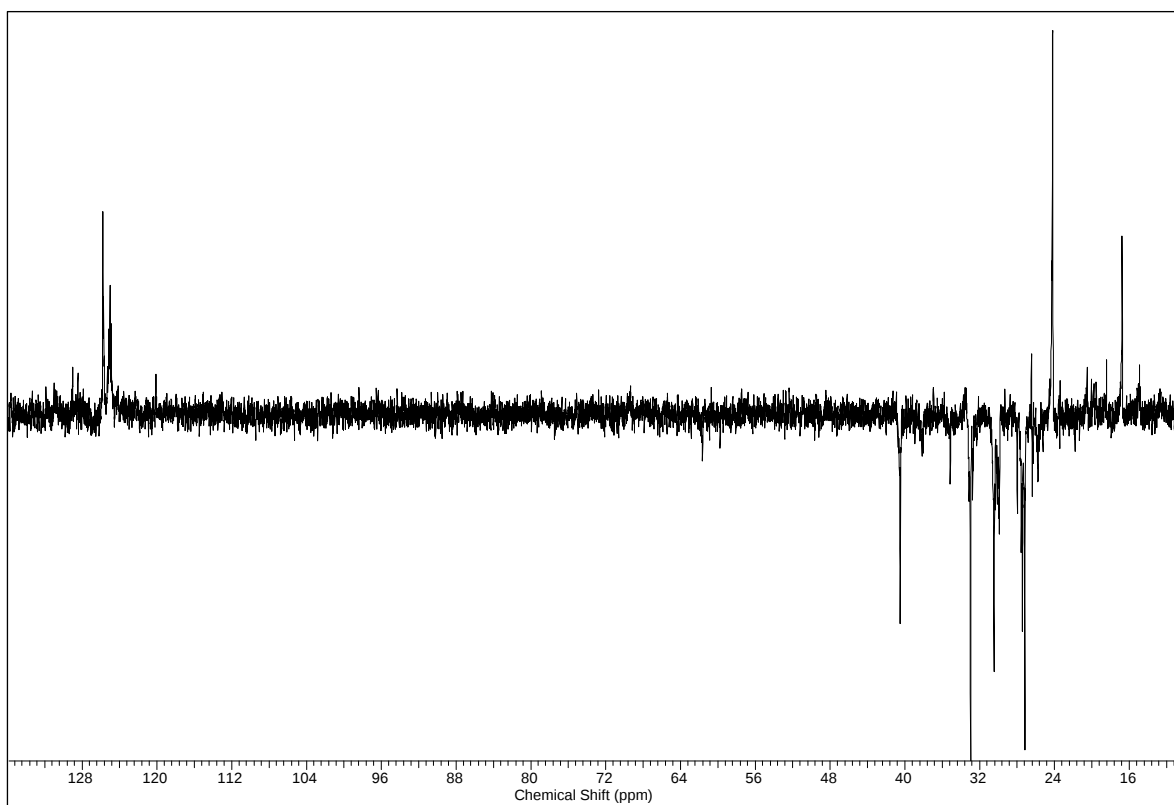
Tabela 44- Dados de RMN ^1H e ^{13}C (300/75 MHz, CDCl_3) de **20** e do poliprenol ficaprenol-12 citado na literatura (REYNOLDS et al., 1999) [500/125 MHz, respectivamente, C_6D_6]

Posição	$\delta^1\text{H}$ [m, J (Hz)]	$\delta^1\text{H}$	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{13}\text{C}$
	(20)	Literatura	(20)	Literatura
1	4,12 dd (6,0; 3,0)	4,02	61,6	59,0
2	5,37 m	5,41	125,8	126,0
3	-	-	136,1	138,4
4	2,05 sl	2,03	32,7	32,5
a	2,05 sl	2,11-2,18	33,0	32,4-32,6
b	2,05 sl	2,10-2,20	27,2-28,0	26,9-27,2
c	5,13 sl	5,16-5,31	124,9-125,8	124,7-125,6
d	-	-	132,7-136,1	131,1-135,8
e	2,05 sl	2,10-2,12	40,5	40,2
f	1,69 s	1,68	26,4	25,9
g	1,61 s	1,57	18,5	17,8
h	1,61 s	1,61-1,63	16,8	16,1
i	1,76 s	1,72-1,75	24,2	23,6-23,7
j	1,69 s	1,65	26,4	23,5

Espectro 156- RMN ^1H de **20** (300 MHz, CDCl_3)Espectro 157- RMN ^{13}C de **20** (75 MHz, CDCl_3)



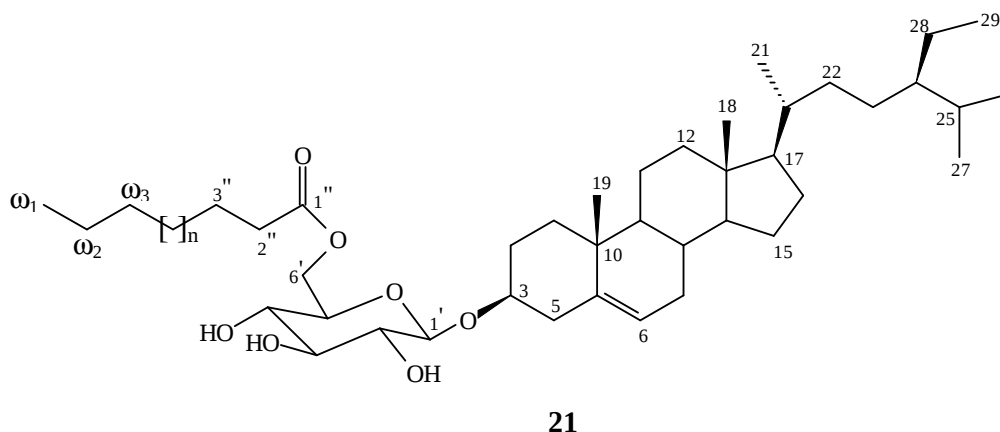
Espectro 158- Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **20** (75 MHz, CDCl_3)



Espectro 159- DEPT 135° de **20** (75 MHz, CDCl₃)

5.5- Esteróide

5.5.1- Identificação de 3-(6'-O-acil-O-β-D-glucopiranosil)-sitosterol (21)



O composto **21** foi isolado da fração OAF-B-6 originada dos fracionamentos cromatográficos da fase hexânica das folhas (item 4.3.2.2).

O espectro de RMN ^1H (Espectro 160) de **21** mostrou vários sinais na região de δ 0,65 a 2,75, um sinal múltiplo na região de δ 3,54 relativo a um hidrogênio e um dubleto largo a δ 5,34 (9,0 Hz) que indicou a presença de hidrogênio olefínico.

O espectro de RMN ^{13}C (Espectro 161, tabela 45) apresentaram sinais mais intensos relativos a seis metilas (duas delas a 11,8 e 12,0 δ), um carbono oxigenado a δ 79,6 e dois carbonos olefínicos a 140,3 δ (C tetrassubstituído) e 122,1 δ (CH), sugestivos de um esqueleto esteroidal (GARCEZ et al., 1997a; POUCHERT & BEHNKE, 1983). Além destes sinais relacionados no espectro de ^{13}C foram observados sinais adicionais na região de 14,1-34,2 δ e 128,1-130,2 δ e de um observado a δ 174,6.

Nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C foram observados ainda, sinais na região entre δ 4,18 e 4,47 δ no espectro de RMN ^1H e seis sinais na região de 63,2-101,2 δ , os quais foram sugestivos de um resíduo de açúcar. Foi determinado que tal resíduo era de β-glucopiranosila em função dos valores de deslocamento químico no espectro de RMN ^{13}C (COLLINS & FERRIER, 1980).

Estes dados sugeriram para **21** a estrutura de um β-sitosterol glicosilado em C-3 contendo um resíduo de ácido graxo. No espectro de RMN ^{13}C de **21** a diferença significativa observada no valor de deslocamento do sinal correspondente ao carbono δ

79,5 em relação ao mesmo carbono no sitosterol (δ 71,7) [WRIGHT et al., 1978] foi compatível com a presença do açúcar em C-3. Da mesma forma, a desproteção do carbono C-6' da glucose, assim como a proteção de C-5' (SOARES, 2006), foram compatíveis com a localização do resíduo de ácido graxo naquele carbono.

O valor de 101,2 δ para o C-1' da unidade de glucose pôde ainda evidenciar a ligação do tipo de *O*-glucosídeo em C-3 entre a aglicona e o açúcar, uma vez que carbonos anoméricos de *O*-glucosídeos são observados na região de 100,0 δ , independentemente da natureza do resíduo de açúcar (BOYD & TURVEY, 1978).

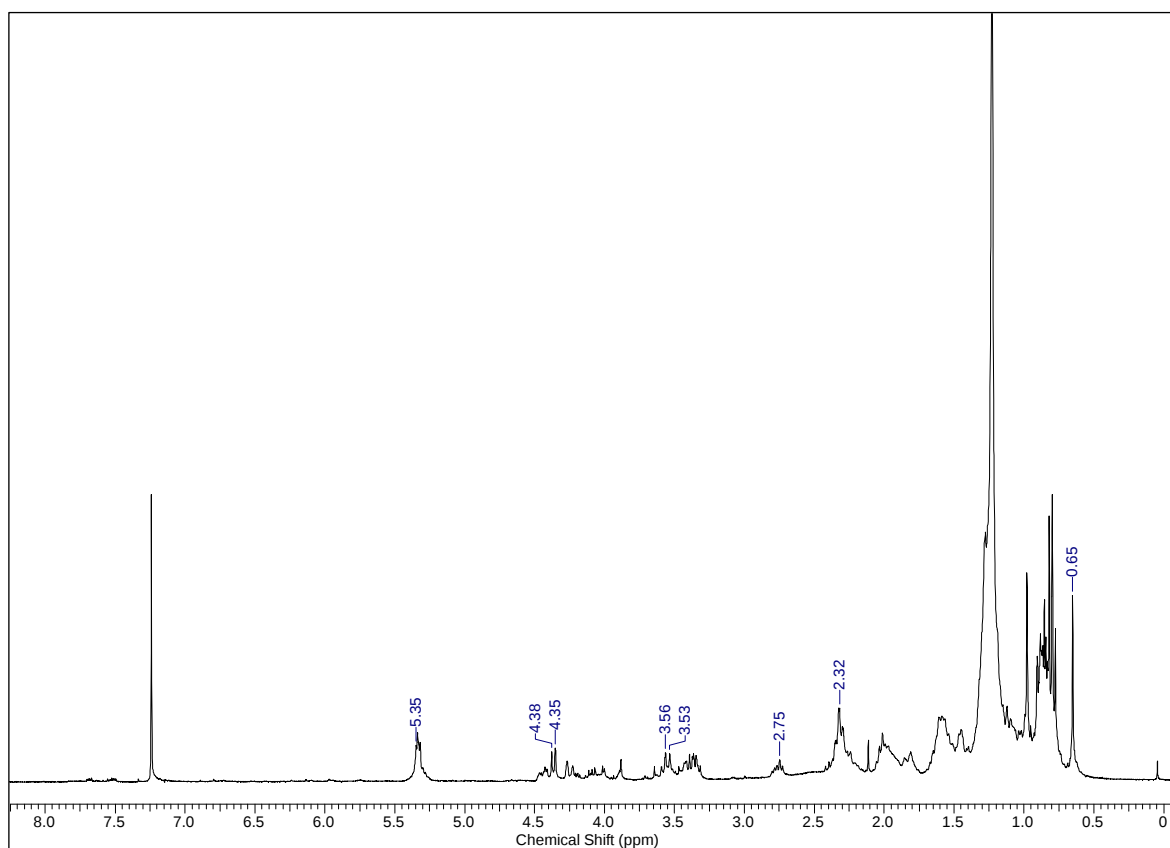
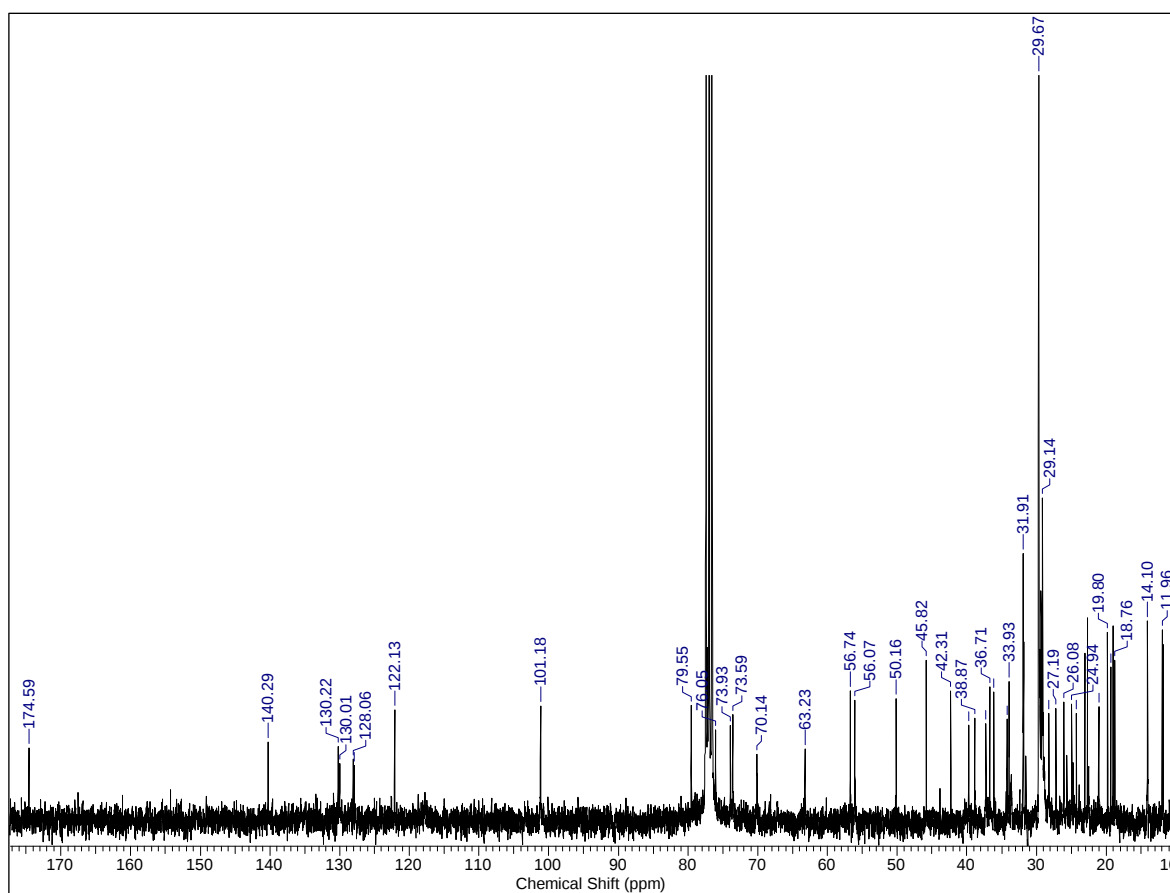
Com base nos dados espectroscópicos obtidos e através do levantamento bibliográfico sobre outros esteroides (SILVA et al., 2005), pôde-se concluir que **21** tratava-se do 3(6'-*O*-acil-*O*- β -D-glucopiranosil)-sitosterol. Para estes tipos de compostos são atribuídos importantes atividades biológicas, tais como antitumoral (KIRIAKIDIS et al., 1997) e piscicida (HASHIMOTO et al., 1991).

Tabela 45- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **21** e do 3-(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol) citado na literatura (SILVA et al., 2005) [75 MHz, CDCl_3]

C	(21) $\delta^{13}\text{C}$	(21) $\delta^{13}\text{C}$ Literatura
1	37,3	38,9
2	31,5	30,9
3	79,6	79,5
4	38,9	38,9
5	140,3	140,3
6	122,1	122,1
7	31,9	31,8
8	31,9	31,9
9	50,2	50,2
10	36,7	36,1
11	21,1	21,1
12	39,7	39,8
13	42,3	42,3
14	56,7	56,8
15	24,3	24,3
16	28,2	28,2
17	56,1	56,1
18	11,8	11,8
19	19,3	19,3
20	36,1	37,3
21	18,8	18,8
22	33,9	33,9
23	26,1	26,1
24	45,8	45,8
25	29,1	29,2
26	19,8	19,8
27	19,0	19,0
28	23,1	23,1
29	12,0	11,9

Tabela 45 (Continuação)- Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **21** e do 3-(6'-O-acil-O- β -D-glucopiranosil)-sitosterol) citado na literatura (SILVA et al., 2005) [75 MHz, CDCl_3]

C	(21) $\delta^{13}\text{C}$	(21) $\delta^{13}\text{C}$ Literatura
Glicose 1'	101,2	101,2
2'	73,9	73,9
3'	76,1	76,6
4'	70,1	70,5
5'	73,6	73,6
6'	63,2	63,3
3-O-Acil CO 1''	174,6	174,1
2''	34,2	34,2
3''	24,9	25,0
ω_1	14,1	14,1
ω_2	22,7	22,5
ω_3	34,2	31,9

Espectro 160- RMN ^1H de **21** (300 MHz, CDCl_3)Espectro 161- RMN ^{13}C de **21** (75 MHz, CDCl_3)

5.6- PROPOSTA BIOGENÉTICA PARA OS ALCALOIDES OBTIDOS DE *Ocotea acutifolia*

O precursor da maioria dos alcaloides aporfínicos é o alcaloide benziltetraidroisoquinolínico, *S*-reticulina, originado do esqueleto formado pela condensação duas unidades de tirosina. A partir deste precursor são gerados os diversos esqueletos aporfínicos, após ciclizações através de acoplamento oxidativo intramolecular, seguidas de uma série de oxidações, metilações e hidroxilações (STÉVIGNY et al., 2005). A figura 7 ilustra uma possível sequência biogenética para os alcaloides aporfínicos e morfinano presentes em *O. acutifolia*.

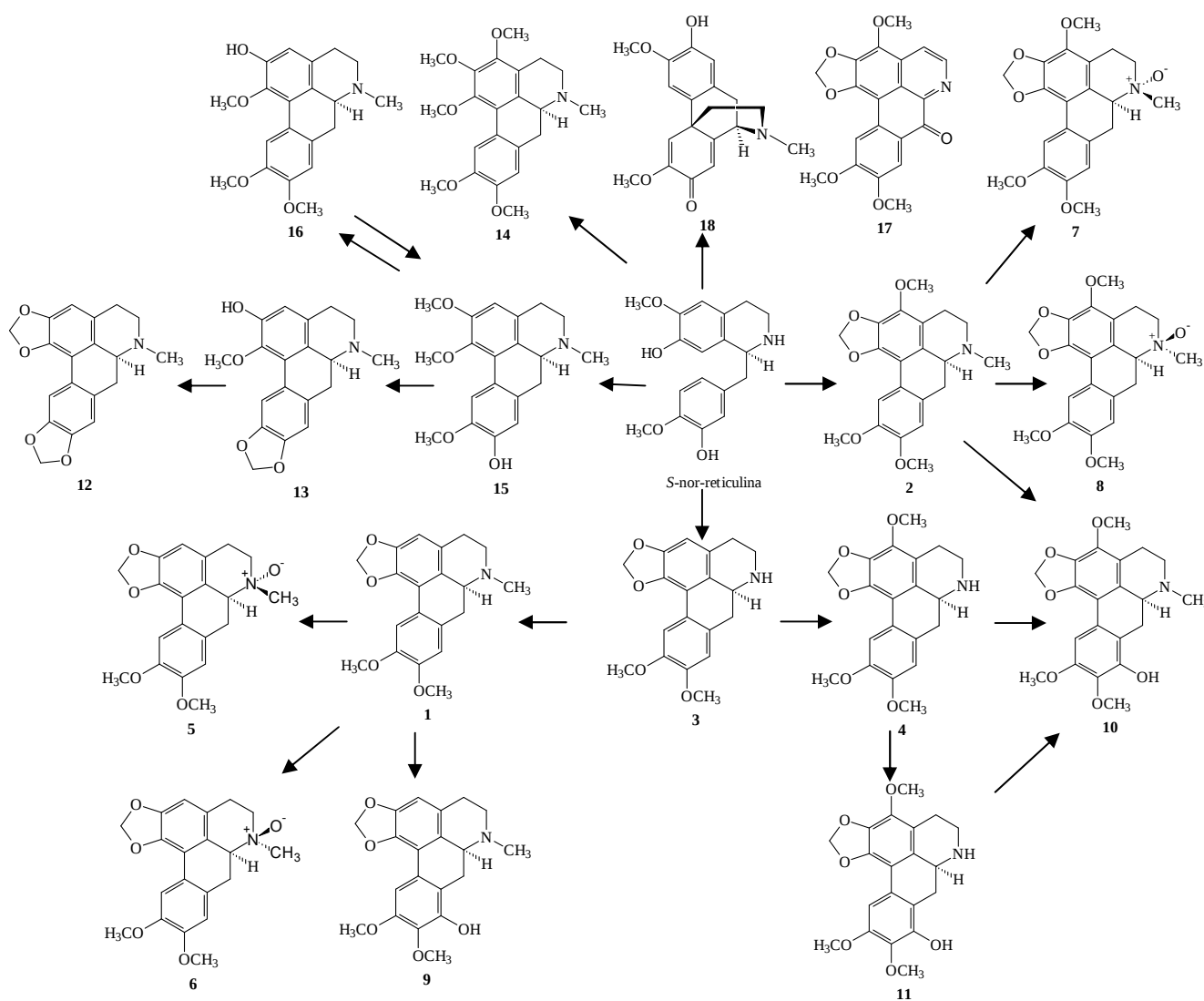


Figura 7- Proposta biogenética para os alcaloides isolados de *O. acutifolia*

5.7- ENSAIOS BIOLÓGICOS

Em função das atividades biológicas apresentadas por várias substâncias isoladas de plantas do gênero *Ocotea* e dentro do programa de busca de compostos bioativos em plantas de Mato Grosso do Sul desenvolvido no LP 1, foram realizados testes de atividades citotóxica, genotóxica e antifúngica com extratos, misturas e substâncias puras obtidas de *O. acutifolia*. No caso de substâncias isoladas, foram selecionadas para serem submetidas aos bioensaios aquelas obtidas num grau de pureza satisfatório e em quantidade suficiente para a realização dos mesmos.

5.7.1- Ensaios de atividade citotóxica

5.7.1.1- Teste de toxicidade sobre *Artemia salina* (TAS)

Os extratos alcaloídico das folhas e etanólicos das folhas e cascas do caule de *O. acutifolia* apresentaram toxicidade para *A. Salina*, uma vez que extratos brutos vegetais são considerados bioativos quando apresentam um valor de DL_{50} abaixo de 1000 $\mu\text{g/ml}$ (MEYER et al., 1982). Os resultados obtidos indicaram que os extratos são potencialmente citotóxicos, destacando-se o valor de $DL_{50} = 2,90 \mu\text{g/ml}$ obtido para o extrato alcaloídico das folhas, sugerindo a presença de substâncias com potencial atividade antitumoral, pois o teste de toxicidade sobre *A. Salina* possui uma boa correlação com o comportamento de células cancerígenas (MCLAUGHLIN, 2008; MEYER et al., 1982).

Tabela 46- Toxicidade sobre *A. Salina* dos extratos alcaloídico das folhas e etanólicos das folhas e cascas do caule de *O. acutifolia*

Extrato	$DL_{50} \mu\text{g/ml}$
Alcaloídico das folhas	2,9
Etanólico das folhas	243,9
Etanólico das cascas do caule	499,9

5.7.1.2- Ensaio de atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células cancerígenas

Dos dezoito alcaloides obtidos no presente trabalho, dez foram avaliados quanto à atividade citotóxica *in vitro* frente a diferentes linhagens de células humanas tumorais (item 4.5.1.2).

Os alcaloides (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**), (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina (**5**), (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**), (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**), (+)-leucoxina (**9**), (+)-norocoxilonina (**11**), (+)-neolitisina (**12**), (+)-isodomestica (**13**), talicminina (**17**) foram avaliados quanto sua atividade citotóxica frente à quatro linhagens de células cancerígenas de Hep-2 (laringe), MCF-7 (mama), B16-F10 (melanoma) e 786-0 (rim) utilizando-se o método SRB (Tabela 47).

Os alcaloides **1** e **2** também foram testados frente a mais quatro linhagens de células cancerígenas MDA-MB435 (melanoma), SF-295 (glioblastoma), HL-60 (leucemia) e HCT-8 (cólon) pelo Método MTT (Tabela 48).

Segundo CALDERON et al., 2003, compostos com forte atividade citotóxica apresentam valores de CI_{50} menores que 25 $\mu\text{g/mL}$ e com fraca atividade valores maiores que 25 $\mu\text{g/mL}$. Para compostos inativos são observados valores acima de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Desta forma, de acordo com os resultados descritos na Tabela 47, (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**), (+)-neolitsina (**12**) e talicminina (**17**) foram significativamente mais ativos contra as linhagens de células testadas. (+)-Ocoteína (**2**) mostrou o efeito mais potente contra células Hep-2, pois inibiu o crescimento celular em 50% em uma concentração de 8,14 $\mu\text{g/mL}$, apresentando ainda atividade significativa frente as células B 16-F10 ($CI_{50} = 11,4 \mu\text{g/ml}$) e 786-0 ($CI_{50} = 12,9 \mu\text{g/ml}$). (+)-Neolitsina (**12**) foi o alcaloide mais citotóxico contra as linhagens MCF-7 ($CI_{50} = 10,2 \mu\text{g/mL}$) e B16-F10 ($CI_{50} = 10,2 \mu\text{g/mL}$) e talicminina (**17**), por outro lado, mostrou ser o composto mais ativo contra células 786-0 ($CI_{50} = 10,7 \mu\text{g/ml}$), mas apenas inibiu moderadamente o crescimento de células Hep-2 e foi inativo para as células MCF-7 e B16-F10 ($CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$).

(+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) apresentou apenas fraca atividade contra Hep-2 e B16-F10 ($CI_{50} = 32,7$ e $30,7 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) e foi inativo contra células MCF-7 e 786-0, como demonstrado pelo seu valor de $CI_{50} > 50 \mu\text{g/mL}$ em ambos os casos, assim como o alcaloide (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína (**8**), o qual foi inativo frente às células testadas (MCF-7 e B-16-F10). O alcaloide (+)-6*R*-*N*-óxido dicentrina (**5**) foi inativo frente as

células 786-0, MCF-7 e B-16-F10 demonstrando atividade apenas contra Hep-2 ($CI_{50} = 16,2 \mu\text{g/mL}$).

Estes resultados indicam que, comparado a **2**, a funcionalidade *N*-óxido em **7** reduz significativamente a sua atividade citotóxica e em **8** o torna inativo, o que também pôde ser observado na comparação entre **1** e **5**, no entanto para **5** efeito citotóxico é observado frente células MCF-7. Da mesma forma, a presença de um substituinte hidroxila em C-8 foi o responsável pela baixa citotoxicidade de (+)-leucoxina (**9**) contra todas as quatro linhagens testadas em comparação com a de **1**. Por outro lado, os resultados obtidos para (+)-isodomeesticina (**13**) e **12** sugerem que a presença de um substituinte dioxidometileno no anel A de **12** em vez de grupos orto hidroxila e metoxila em posições 1 e 2, como em **13**, pode explicar o aumento da atividade mostrado por **12** contra as células testadas. Assim, quanto aos efeitos citotóxicos de **1** e **2** contra células Hep-2, MCF-7 e 786-0, a introdução de um grupo metoxila em C-3 parece tornar este último mais ativo, entretanto um efeito significativo não é observado contra células B16-F10.

Dentre os resultados obtidos para os alcaloides **1** e **2** frente as outras linhagens celulares MDA-MB43, SF-295, HL-60 e HCT-8 utilizando-se o método MTT (Tabela 48) pode-se destacar o efeito mais potente apresentado pelo composto **2** contra células HCT-8, entretanto, **1** foi inativo frente a esta linhagem. **1** e **2** demonstraram atividade citotóxica significativa para as demais linhagens (MDA-MB43, SF-295, HL-60) com valores de CI_{50} entre 5,5 e 10,7 $\mu\text{g/mL}$.

Para os alcaloides (+)-leucoxina e (+)-isodomeesticina não existem trabalhos descritos sobre suas atividades citotóxica *in vitro*. O potencial citotóxico de (+)-ocoteina e talicminina, foi previamente avaliado apenas sobre células KB, onde este último mostrou-se inativo (WRIGHT et al., 2000), enquanto (+)-neolitsina foi testado contra linhagens de células tumorais HeLa, Mel-5 e HL-60 (STÉVIGNY et al., 2002). Apesar de existirem atividades mencionadas para as duas formas enantioméricas de dicentrina contra várias linhagens de células cancerígenas (STÉVIGNY et al., 2005; STÉVIGNY et al., 2002; HUANG et al., 1998; LIKHITWITAYAWUID et al., 1993), esta é a primeira vez que a citotoxicidade da (+)-dicentrina foi avaliada contra células MCF-7, B16-F10 e 786-0.

Tabela 47- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para os compostos **1**, **2**, **5**, **7**, **8**, **9**, **11**, **12**, **13** e **17** frente às linhagens de células Hep-2, MCF-7, B16-F10 e 786-0 (Método SRB - SKEHAN et al., 1990)

Composto	Linhagem			
	Hep-2 (laringe)	MCF-7 (mama)	B16-F10 (melanoma)	786-0 (rim)
1	21,8	25,2	11,2	16,3
2	8,1	20,8	11,4	12,9
5	>50	16,2	>50	>50
7	32,7	>50	30,7	>50
8	NT	>50	>50	NT
9	37,2	28,5	23,8	19,2
11	>50	>50	>50	>50
12	10,3	10,2	10,2	26,6
13	41,5	>50	23,3	41,6
17	26,5	>50	>50	10,7
Cisplatina (controle positivo)	1,6	6,1	7,7	1,3

NT-não testado

Tabela 48- Valores de CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) obtidos para os compostos **1** e **2** frente às linhagens de células MDA-MB435, SF-295, HL-60 e HCT-8 (Método MTT - MOSMANN, 1983)

Composto	Linhagem			
	MDA-MB43 (melanoma)	SF-295 (glioblastoma)	HL-60 (leucemia)	HCT-8 (cólon)
1	10,7	5,8	5,5	>50
2	10,7	9,1	5,9	3,2
Doxorrubicina (controle positivo)	0,48	0,23	0,02	0,01

5.7.2- Ensaio de atividade genotóxica

No presente trabalho foi também avaliada a atividade genotóxica: a) do extrato etanólico (EE) das folhas; b) do extrato alcaloídico (EA) das folhas; c) e da mistura de dicentrina e ocoteína (DO); d)- das substâncias puras (+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**), (+)-6S-N-óxido ocoteína (**7**), (+)-leucoxina (**9**), e talicminina (**17**) utilizando-se como modelo biológico o teste SMART, em asas de *Drosophila melanogaster*. Foram realizados experimentos independentes, utilizando-se cruzamento padrão (ST) para todas as amostras.

O cruzamentos ST permite a obtenção de descendentes MH (genótipo *mwh/flr³*) identificados fenotipicamente pela borda lisa das asas e os descendentes BH (genótipo *mwh/TM3*) identificados pela borda de asa recortada. A diferença entre as frequências de manchas mutantes detectadas nos indivíduos MH e BH representa a frequência de recombinação mitótica.

5.7.2.1- Atividade genotóxica de EE

A tabela 49 apresenta os resultados obtidos para o extrato etanólico das folhas (EE). A frequência total de manchas por indivíduo MH no controle negativo foi de 0,58 enquanto que os tratados com o EE a frequência variou de 0,65 (menor concentração) a 1,05 (maior concentração).

Analisando os resultados obtidos com os indivíduos BH, verificou-se que a frequência total de manchas do controle negativo foi de 0,30, enquanto que a do EE não passou de 0,28. Com base nestes dados, pode-se inferir que grande parte das manchas dos indivíduos MH provém de eventos recombinogênicos (75,7% para a concentração intermediária e 72,5% para a maior concentração).

Assim, os resultados obtidos após tratamento com o extrato etanólico das folhas diferem estatisticamente do controle negativo (Figura 8) e, portanto, nessas condições experimentais, o EE apresenta efeito genotóxico.

De acordo com MARQUES et al., 2003, extratos hidroalcoólicos de *Ocotea duckei* foram mutagênicos, quando avaliados pelo Teste de Ames, sendo esta atividade atribuída aos componentes presentes no extrato, tais como lignanas, monoterpenos e alcaloides (SILVA et al., 2002).

Tabela 49- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de EE obtido das folhas da *O. acutifolia*

Amostra (EE) (mg.mL ⁻¹)	Nº de indivíduos	FTM <i>mwh</i>	TM <i>mwh</i>	FTM <i>mwh</i>	TM <i>mwh</i>	Recombinação %
		<i>mwh/flr</i> ³		<i>mwh/TM3</i>		
0,6	40	0,65	26	0,28	11	57,7
1,25	40	0,93	37	0,23	09	75,7
2,5	40	1,05	42	0,28	11	72,5
DXR (0,125)	40	8,03	321	1,08	43	86,1
Controle negativo	40	0,58	23	0,30	12	-

FTM- Frequência total de manchas

TM- Total de manchas

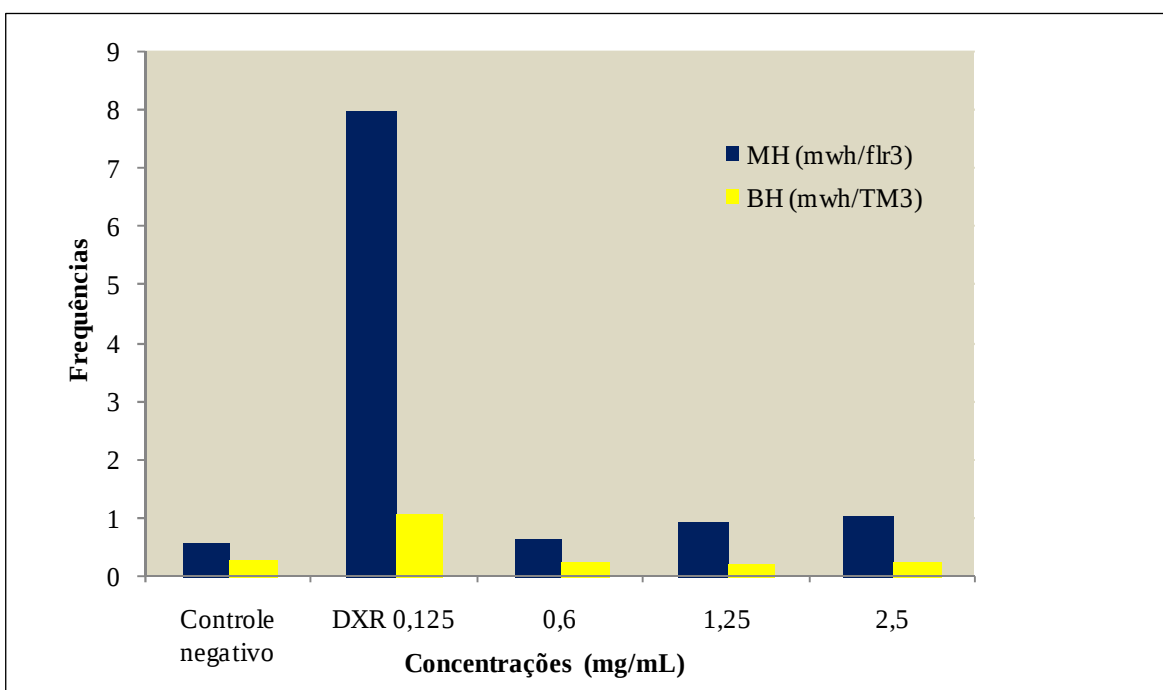


Figura 8- Frequências totais de manchas (*mwh*) observadas em células de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com EE

5.7.2.2- Atividade genotóxica de EA

Na análise dos descendentes de genótipo *mwh/flr*³ tratados com diferentes concentrações do extrato alcaloídico (EA), constatou-se um aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes, 1,40 para a menor concentração e 2,20 para a concentração intermediária em relação ao controle negativo (Tabela 50, figura 9). No entanto, a maior concentração (0,8 mg/mL) foi citotóxica, impedindo o desenvolvimento das moscas e posterior análise das asas. Este fato provavelmente se dá pelo grande número de alcaloides presente nas folhas de *O. acutifolia*, que, em conjunto, podem apresentar um forte efeito citotóxico.

Já o genótipo *mwh/TM3* não apresentou resultados positivos, o que determinou para o EA taxas de recombinações de 68% e 71,4% para as concentrações 0,4 mg/mL e 0,6 mg/mL, respectivamente. A partir destas informações conclui-se que EA exibe efeito genotóxico superior ao apresentado pelo EE.

Tabela 50- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de EA obtido das folhas da *O. acutifolia*

Amostra (EA) (mg.mL ⁻¹)	Nº de indivíduos	FTM	TM <i>mwh</i>	FTM	TM <i>mwh</i>	Recombinação %
		<i>mwh/flr</i> ³		<i>mwh/TM3</i>		
0,4	20	1,40	28	0,45	09	68,0
0,6	20	2,20	44	0,60	12	71,4
0,8*	-	-	-	-	-	-
DXR (0,125)	40	8,03	321	1,08	43	86,1
Controle negativo	40	0,58	23	0,30	12	-

FTM- Frequência total de manchas

TM- Total de manchas

*citotóxica

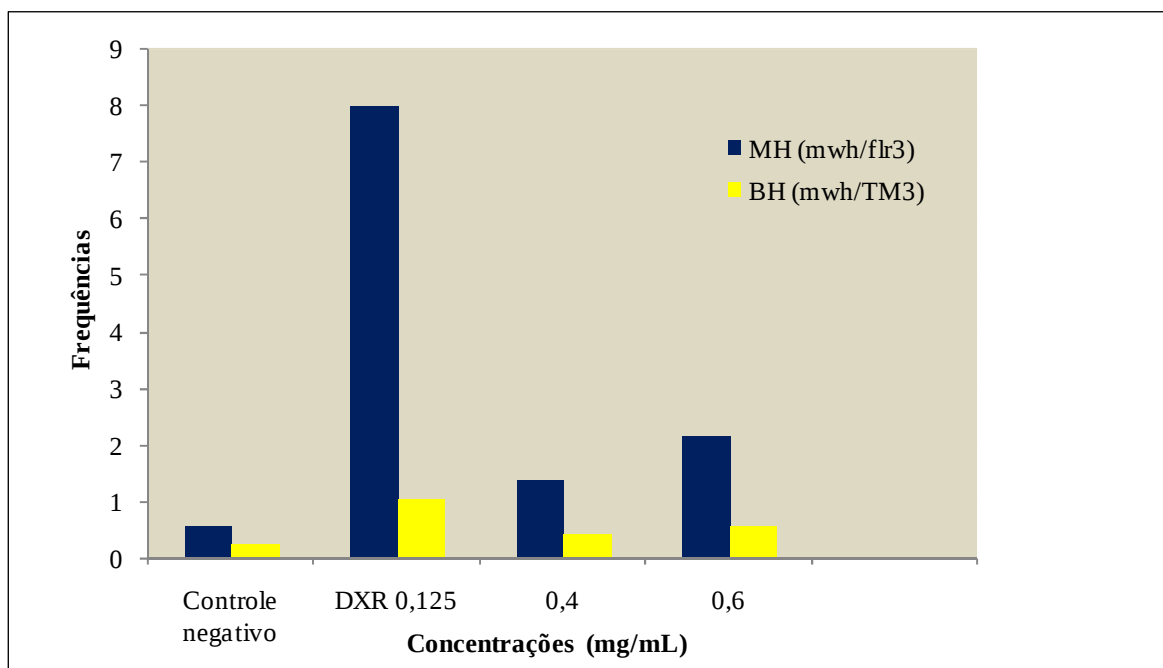


Figura 9- Frequências totais de manchas (*mwh*) observadas em células de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com EA

5.7.2.3- Atividade genotóxica de DO

Para a mistura de ocoteína e dicentrina (DO) a frequência total de manchas por indivíduo (*mwh/flr³*) no controle negativo foi de 0,58 enquanto que nos tratados a frequência variou de 2,15 para a menor concentração a 5,35 para a maior. Constatou-se um aumento estatisticamente significativo, quando comparado com a frequência de manchas mutantes observada no controle negativo, assim como foi observado na análise dos indivíduos de genótipo *mwh/TM3* para as concentrações 0,8 e 1,6 mg/mL (Tabela 51, figura 10).

A frequência de recombinação variou de 75% (menor concentração) a 79,2 % (maior concentração). Com base nestes resultados observou-se um aumento na frequência de mutações da mistura em relação à observada nos ensaios com EE e EA. Desta forma os alcaloides ocoteína e dicentrina, em maior concentração, apresentam maior atividade genotóxica.

Tabela 51- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de DO obtido das folhas da *O. acutifolia*

Amostra (DO) (mg.mL ⁻¹)	Nº de indivíduos	FTM	TM	FTM	TM	Recombinação %
		<i>mwh</i>		<i>mwh</i>		
		<i>mwh/flr³</i>		<i>mwh/TM3</i>		
0,4	20	2,15	43	0,50	10	75,0
0,8	20	3,55	71	0,75	15	79,5
1,6	20	5,35	107	1,05	21	79,2
DXR (0,125)	40	8,03	321	1,08	43	86,1
Controle negativo	40	0,58	23	0,30	12	-

FTM- Frequência total de manchas

TM- Total de manchas

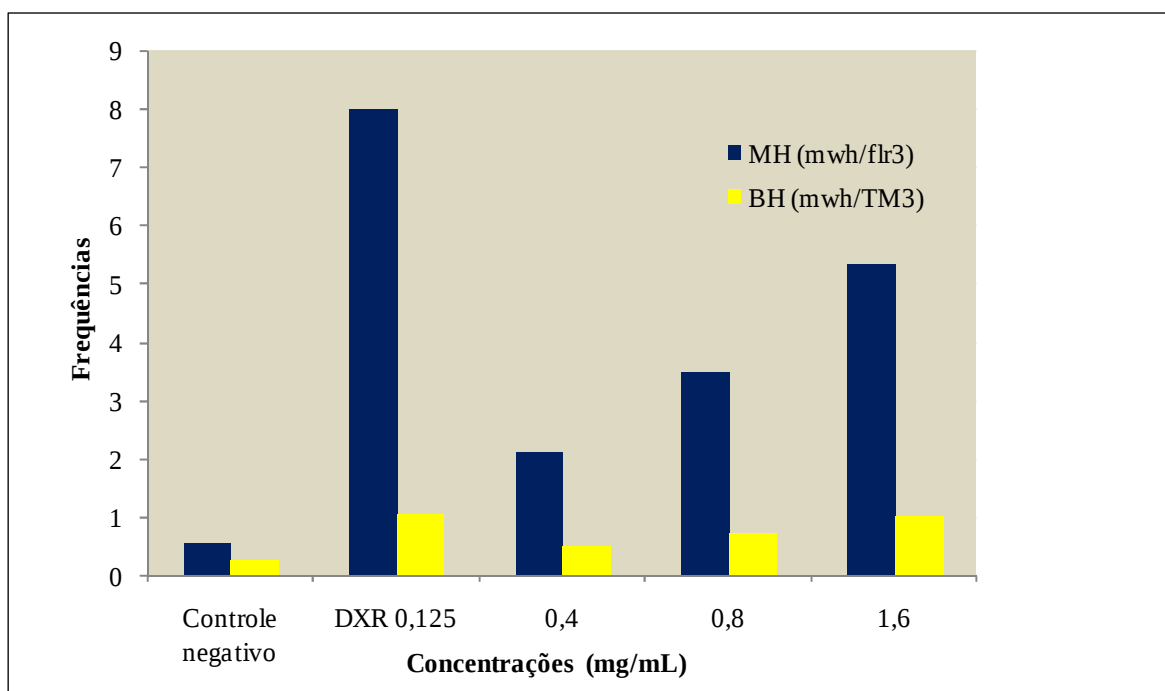


Figura 10- Frequências totais de manchas (*mwh*) observadas em células de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com DO

5.7.2.4- Atividade genotóxica de (+)-dicentrina (1)

Para o alcaloide **1** a frequência de manchas mutantes nos indivíduos de genótipo *mwh/flr*³ variou de 5,80 a 14,35 e para o genótipo *mwh/TM3* de 0,90 a 1,60 (Tabela 52). Estes resultados quando comparados as frequências obtidas para o controle negativo indicaram um aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes proporcionais as concentrações testadas para os dois indivíduos (Figura 11), entretanto a taxa de recombinação mitótica foi superior a 80%, demonstrando que grande parte das manchas dos indivíduos MH provém de eventos recombinogênicos. Nessas condições experimentais **1** apresenta pronunciado efeito genotóxico e superior ao efeito obtido com a mistura de **1** e (+)-ocoteína (**2**).

Tabela 52- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de **1** obtido das folhas da *O. acutifolia*

Amostra (1) (mg.mL ⁻¹)	Nº de indivíduos	FTM	TM <i>mwh</i>	FTM	TM <i>mwh</i>	Recombinação %
		<i>mwh/flr</i> ³		<i>mwh/TM3</i>		
0,1	20	5,80	116	0,90	18	86,3
0,2	20	7,15	143	1,40	28	81,3
0,4	20	14,35	287	1,60	32	88,7
DXR (0,2)	40	8,03	321	1,08	43	86,1
Controle negativo	30	0,53	16	0,20	06	-

FTM- Frequência total de manchas

TM- Total de manchas

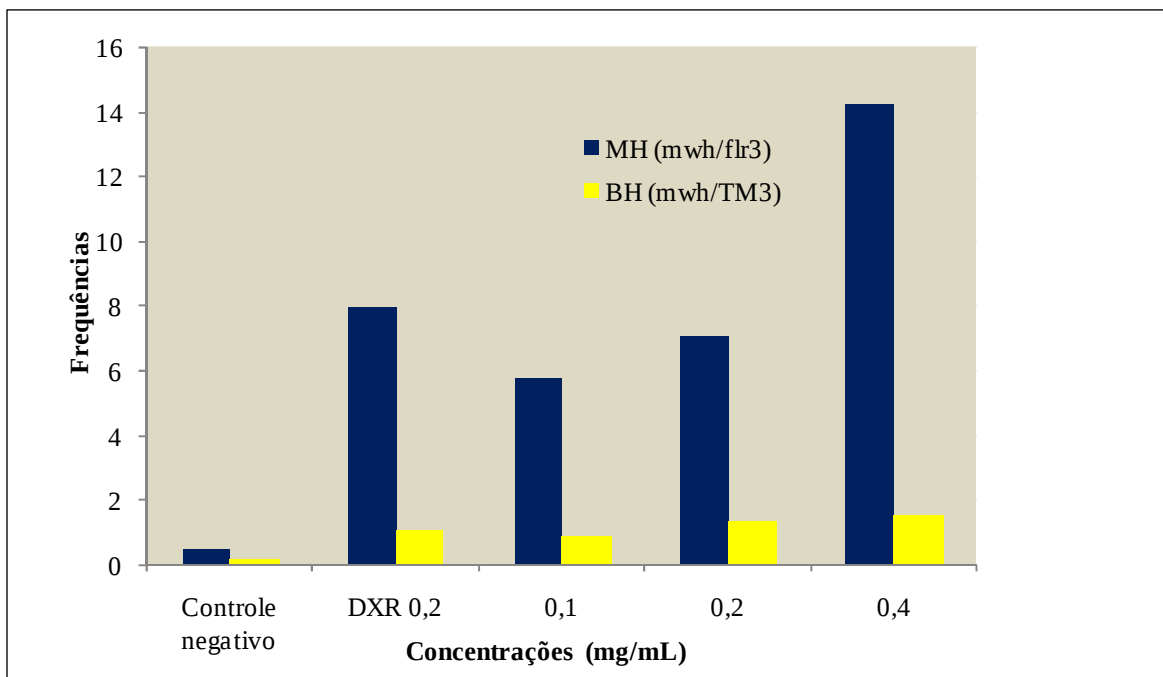


Figura 11- Frequências totais de manchas (*mwh*) observadas em células de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com **1**

5.7.2.5- Atividade genotóxica de (+)-ocoteína (**2**)

Os resultados obtidos (Tabela 53, figura 12) com o alcaloide **2** demonstraram um aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes no genótipo *mwh/flr³*, exceto para a concentração de 0,4 mg/mL. A frequência de manchas mutantes foi de 1,7 para a concentração 0,8 mg/mL e de 2,65 para a concentração 1,6 mg/mL. Entretanto, no genótipo *mwh/TM3* os resultados não foram positivos, indicando que grande parte das manchas dos indivíduos MH estão ligadas a eventos recombinogênicos (68,8 a 82,4%).

A análise destes dados indica que **2** é uma substância genotóxica, porém com uma genotoxicidade menor que a conferida por (+)-dicentrina (**1**).

Tabela 53- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de 2 obtido das folhas da *O. acutifolia*

Amostra (2) (mg.mL ⁻¹)	N° de indivíduos	FTM	TM	FTM	TM	Recombinação %
			<i>mwh</i>		<i>mwh</i>	
		<i>mwh/flr</i> ³		<i>mwh/TM</i> ³		
0,4	20	0,80	16	0,25	5	68,8
0,8	20	1,70	34	0,30	6	82,4
1,6	20	2,65	53	0,55	11	79,2
DXR (0,125)	40	8,03	321	1,08	43	86,1
Controle negativo	40	0,58	23	0,15	6	-

FTM- Frequência total de manchas

TM- Total de manchas

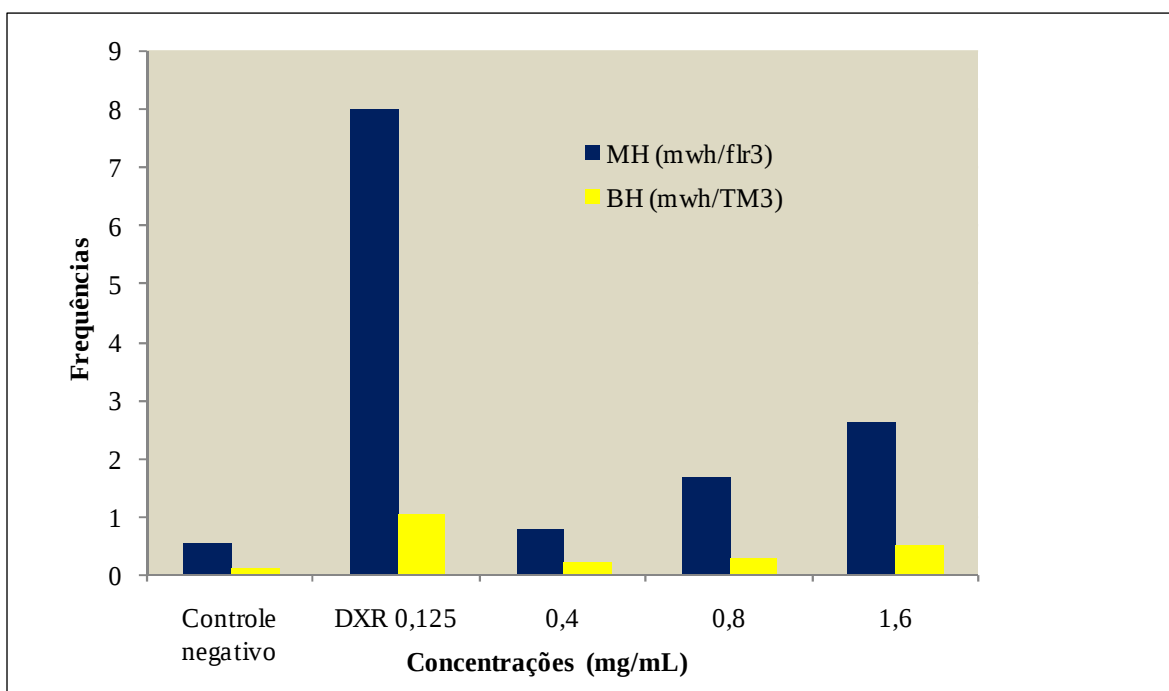


Figura 12- Frequências totais de manchas (*mwh*) observadas em células de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com 2

5.7.2.6- Atividade genotóxica de talicminina (17)

Para a **17**, a frequência total de manchas por indivíduo (mwh/flr^3) variou de 3,35 para a menor concentração a 18,10 para a maior (Tabela 54, figura 13). Constatou-se um aumento estatisticamente significativo na frequência de manchas mutantes proporcional às concentrações de **17**, sendo inclusive citotóxico na concentração de 1,6 mg/mL. Entretanto, este aumento não foi observado para indivíduos de genótipo *mwh/TM3*. Com base nestes resultados pode-se afirmar que o alcaloide oxaporfínico **17** apresenta um potente efeito genotóxico ligado à recombinação mitótica, já que foi observado uma taxa de recombinação próxima de 100% nas três concentrações testadas.

Tabela 54- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de **17** obtido das folhas da *O. acutifolia*

Amostra (17) (mg.mL ⁻¹)	Nº de indivíduos	FTM	TM <i>mwh</i>	FTM	TM <i>mwh</i>	Recombinação %
		<i>mwh/flr³</i>		<i>mwh/TM3</i>		
0,4	20	3,35	67	0,10	2	97,0
0,8	20	6,75	135	0,45	9	93,0
1,2	20	18,10	361	1,20	24	93,0
1,6*	-	-	-	-	-	-
DXR (0,125)	40	8,03	321	1,08	43	86,1
Controle negativo	20	0,55	11	0,30	06	-

FTM- Frequência total de manchas

TM- Total de manchas

*citotóxica

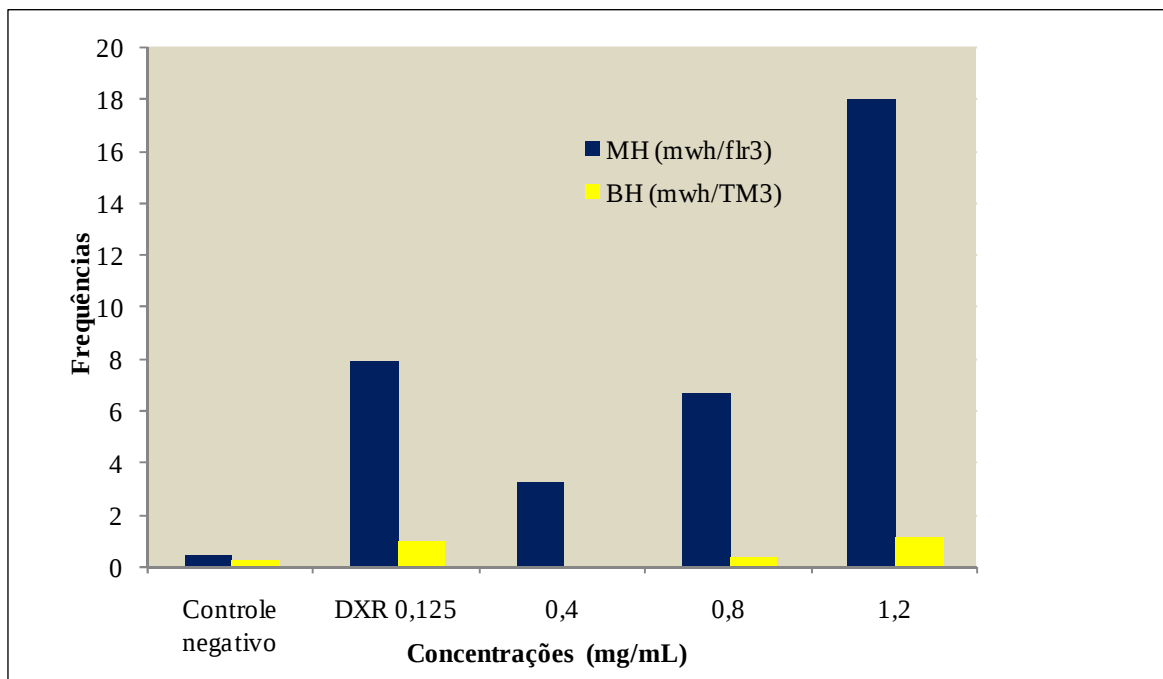


Figura 13- Frequências totais de manchas (*mwh*) observadas em células de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH e BH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com **17**

5.7.2.7- Atividades genotóxicas de (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína (**7**) e de (+)-leucoxina (**9**)

Os resultados obtidos (Tabela 55, figura 14) para **7** foram positivos, entretanto, quando comparados com os obtidos para (+)-ocoteína (**2**), não foi observado para as concentrações testadas um aumento estatisticamente significativo nas frequências de manchas mutantes para os indivíduos de genótipo *mwh/flr*³ em relação ao controle negativo. Para os de genótipo *mwh/TM3* os resultados foram negativos. Estes dados demonstram que **7** apresenta efeito genotóxico, porém menos pronunciado que o observado para o alcaloide, estruturalmente relacionado, **2**.

Para **9** os resultados obtidos, expressos na tabelas 66 e figura 15, foram negativos, pois não foi observado nas concentrações testadas, aumento nas frequências de manchas mutantes para os indivíduos de genótipo *mwh/flr*³ em relação ao controle negativo, indicando que **9** não apresenta, nestas condições experimentais, atividade genotóxica.

Tabela 55- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de 7 obtido das folhas da *O. acutifolia*

Amostra (7) (mg.mL ⁻¹)	Nº de indivíduos	FTM	TM	FTM	TM	Recombinação %
		<i>mwh</i>		<i>mwh</i>		
		<i>mwh/flr³</i>		<i>mwh/TM3</i>		
0,4	40	0,60	24	0,20	08	66,0
0,8	40	0,93	37	0,25	10	69,7
1,6	40	1,05	42	0,25	10	74,0
DXR (0,2)	40	8,03	321	1,08	43	86,1
Controle negativo	40	0,33	13	0,20	08	

FTM- Frequência total de manchas

TM- Total de manchas

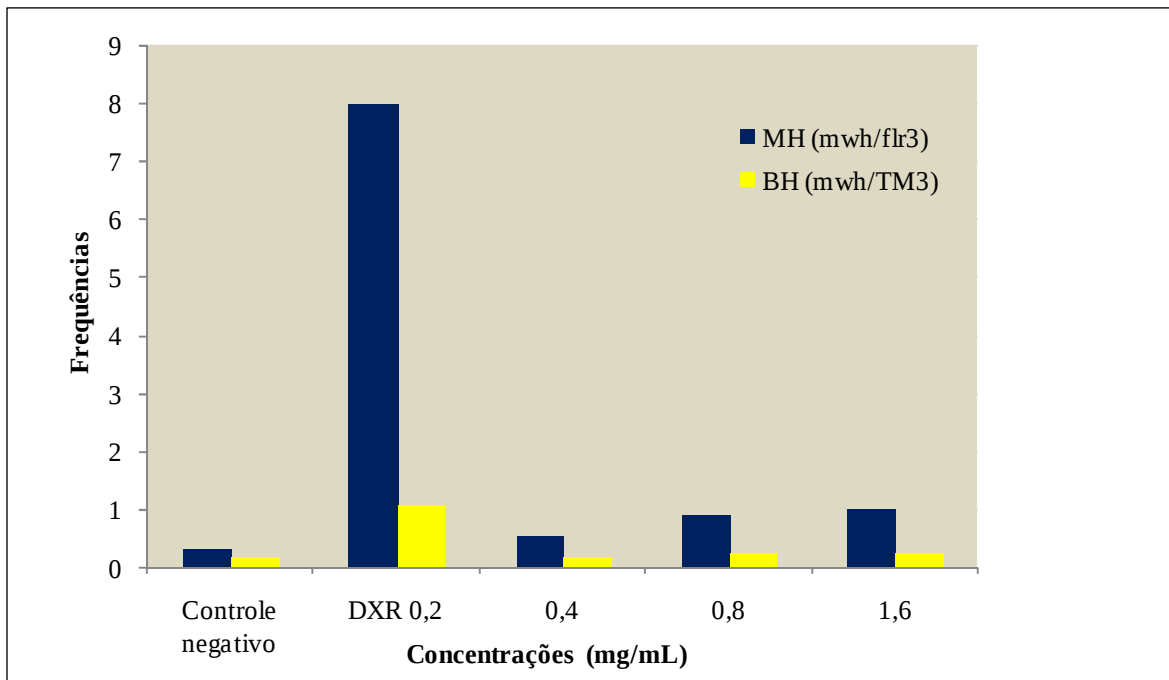


Figura 14- Frequências totais de manchas (*mwh*) observadas em células de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com 7

Tabela 56- Resultados obtidos no teste de mancha de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH do cruzamento ST, após tratamento crônico com diferentes concentrações de **9** obtido das folhas da *O. acutifolia*

Amostra (9) (mg.mL ⁻¹)	Nº de indivíduos	FTM	TM <i>Mwh</i>
		<i>mwh/flr</i> ³	
0,4	40	0,40	16
0,8	40	0,48	19
1,6	40	0,50	20
DXR (0,125)	40	8,03	321
Controle negativo	40	0,33	13

FTM- Frequência total de manchas

TM- Total de manchas

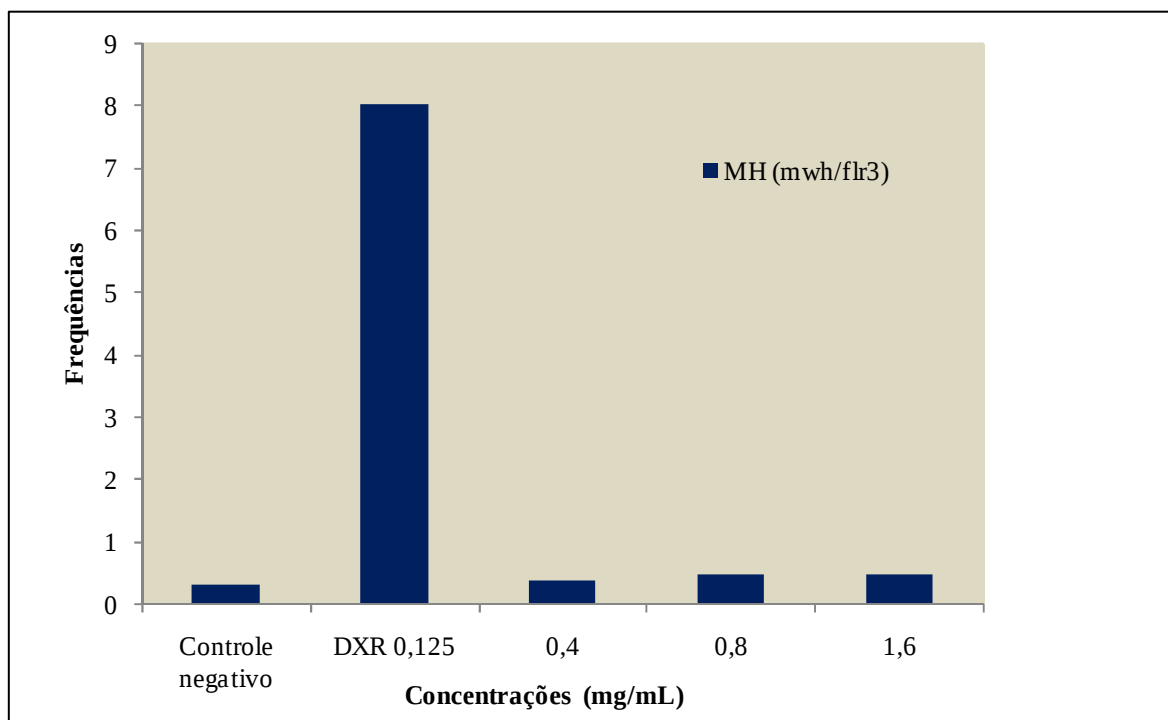


Figura 15- Frequências totais de manchas (*mwh*) observadas em células de asas de *D. melanogaster* de descendentes MH, do cruzamento ST, após o tratamento crônico com **9**

A atividade genotóxica para os extratos e compostos (**1**, **2**, **7**, **9** e **17**) obtidos de *O. acutifolia*, avaliada através do ensaio SMART, está sendo descrita pela primeira vez neste trabalho.

O forte efeito genotóxico observado para **1**, **2** e **17**, neste ensaio, pode estar relacionado com a conformação planar adotada pelas moléculas, já que pronunciado efeito genotóxico foi relatado anteriormente para os alcaloides **1** e o oxaporfínico liriodenina empregando-se o Teste de Ames (TADAKI et al., 1992; NOZAKA et al., 1990), os quais apresentam uma conformação planar ideal para se ligarem entre as fitas de DNA, atuando como agentes intercalantes, causando eventos de mutação e recombinação (WOO et al., 1997; WOO et al., 1999). Para **1** há também o fato de que interfere com a atividade catalítica das topoisomerasas I e II (HOET et al., 2004), favorecendo, principalmente, a ocorrência de recombinação mitótica.

Os resultados observados para **1** e **17** nas maiores concentrações foram inclusive superiores aos obtidos para o controle positivo utilizado, o antibiótico anticâncer Cloridrato de Doxorrubicina (DXR) muito usado como quimioterápico no tratamento de leucemia e outros tumores e que, por ser uma molécula que apresenta na sua estrutura um núcleo também planar, atua como agente intercalante, se situando entre as fitas de DNA, alterando a conformação da dupla-hélice, podendo levar à apoptose e à fragmentação do DNA (SKLADANOWSKI & KONOPA, 1993; ZHANG & LI, 2000; KUMAR et al., 2004). A fragmentação do DNA se dá por ação conjunta da enzima topoisomerase II que, ao entrar em contato com a doxorrubicina, efetua quebras em uma ou em duas fitas (TEWEY et al., 1984).

Quanto aos efeitos genotóxicos observados para os alcaloides estruturalmente relacionados **1** e **2**, **9** e **1** e **7** e **2**, os resultados obtidos neste ensaio indicam que, comparado a (+)-dicentrina (**1**), a introdução de um grupo metoxila em C-3 na estrutura de (+)-ocoteína (**2**), reduz a sua genotoxicidade. Da mesma forma, a presença de um substituinte hidroxila em C-8 pode ser o responsável por tornar (+)-leucoxina (**9**) inativa neste ensaio. Os resultados obtidos para (+)-6S-*N*-óxido ocoteína (**7**) e **2** sugerem que a presença de uma função *N*-óxido na estrutura de **7** reduz significativamente a sua atividade genotóxica.

Com relação à citotoxicidade, substâncias que apresentam potencial genotóxico podem ser consideradas agentes quimioterápicos, já que os efeitos de mutações e recombinações podem ser citotóxicos, levando as células tumorais à morte (KINGMA &

OSHEROFF, 1998). Portanto, a atividade genotóxica com alto valor de recombinação observada para **1**, **2** e **17**, pode estar relacionada com a citotoxicidade apresentada por estas substâncias, frente a determinadas linhagens de células tumorais, uma vez que no ensaio de atividade citotóxica realizado no presente trabalho, estas substâncias exibiram de moderada a forte atividade frente à maioria das células tumorais testadas.

5.6.3- Ensaio de atividade antifúngica *in vitro*

Os resultados dos testes para determinação do potencial antifúngico dos extratos alcaloídico das folhas e etanólicos das folhas e das cascas do caule de *O. acutifolia* estão descritos na tabela 57. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato alcaloídico para as cepas de *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* apresentou um valor de 7,8 µg/mL, sendo este o melhor resultado para os extratos testados. Os demais resultados obtidos para o extrato alcaloídico frentes as outras cepas, também foram significativos, visto que se trata de um extrato bruto.

Para os extratos etanólicos das folhas e cascas do caule os melhores resultados foram 62,5 µg/mL frente a *C. neoformans* e 15,6 µg/mL frente a *C. tropicalis*, respectivamente.

Um dado importante que deve ser ressaltado, de acordo com os resultados do teste, é a especificidade do extrato frente às cepas testadas, como é o caso do extrato etanólico das folhas, pois o extrato inibiu o crescimento das cepas de *Candida parapslosis* e *Cryptococcus neoformans* e não inibiu significativamente o crescimento das outras cepas testadas, sendo inclusive inativo para algumas cepas. No caso do extrato etanólico das cascas do caule, esta especificidade não foi tão pronunciada, pois o extrato demonstrou atividade antifúngica frente às cepas de *Candida krusei*, *C. parapslosis*, *C. tropicalis* e *C. neoformans*, sendo inativo frente às outras duas (*Candida albicans* e *C. glabrata*).

Em relação às substâncias obtidas de *O. acutifolia* nove delas [(+)-dicentrina (**1**), (+)-ocoteína (**2**), (+)-6S-N-óxido dicentrina (**5**), (+)-6S-N-óxido ocoteína (**7**), (+)-6R-N-óxido ocoteína (**8**), (+)-leucoxina (**9**), (+)-norocoxilonina (**11**), talicminina (**17**) e (+)-palidina (**18**)] foram avaliadas para a detecção de atividade antifúngica frente às cepas de *C. albicans*, *C. krusei* e *C. neoformans*.

As amostras apresentaram atividade antifúngica frente à maioria das cepas testadas (Tabela 58). Frente a *C. neoformans*, o alcaloide **8** foi o mais ativo, pois exibiu uma inibição de crescimento fúngico a uma concentração de 25 µg/mL. Todos os alcaloides testados contra *C. albicans* demonstraram atividade significativa, sendo que **18** apresentou uma atividade antifúngica mais acentuada (CIM = 50 µg/mL). Os alcaloides **5** e **8** foram inativos frente *C. krusei*, porém os demais apresentaram moderada atividade antifúngica frente a esta cepa (CIM = 50 µg/mL ou 100 µg/mL).

Apenas alguns trabalhos relatam atividade antifúngica de alcaloides aporfínicos. Os alcaloides (+)-dicentrina e (+)-glaucina foram identificados como os responsáveis pela ação antifúngica de *Glaucium oxylobum* contra os fungos *Microsporum gypseum*, *M. canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Epidermophyton floccosum* (MORTEZA-SEMNANI et al., 2003) sendo que (+)-glaucina inibiu ainda o crescimento dos fungos *Ceratocystis coerulescens*, *Fusarium oxysporum*, *Phialophora melinii*, *Pleurotus ostreatus* e *Polyporus sulphureus* (HSU et al., 1991).

Das cascas de *Xylopia championii* foram isolados cinco alcaloides, sendo o alcaloide aporfínico (+)-nordicentrina o que apresentou maior atividade contra o fungo fitopatogênico *Cladosporium cladosporioides* (PUVANENDRAN et al., 2008).

Das folhas de *Nelumbo mucifera* foi isolado (-)-roemerina, o qual apresentou atividade antifúngica frente a *Candida albicans* (AGNIHOTRI et al., 2008). (+)-anonaína demonstrou potente ação antifúngica frente a *Cryptococcus neoformans* e diferentes espécies de *Candida* (TSAI et al., 1989). Relata-se também que o alcaloide oxaporfínico liriodenina demonstrou atividade antifúngica, *in vivo*, contra *Candida albicans* (CLARK et al., 1987). É descrito ainda para liriodenina, além de (-)-asimibolina e (-)-norushinsunina atividade frente aos fungos *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerosporum* (LAGO et al., 2007).

Recentemente, um novo alcaloide aporfínico β-magnoflorina e o conhecido α-magnoflorina foram isolados das partes aéreas de *Clematis parviloba* e ambos exibiram potente atividade antifúngica frente à *Penicillium avellaneum* (CHEN et al., 2009).

Desta forma, este é o primeiro relato de atividade antifúngica para os extratos de *O. acutifolia*, assim como para os alcaloides (**2**, **5**, **7**, **8**, **9**, **11**, **17** e **18**). No caso de **1**, sua atividade frente às cepas testadas no presente trabalho está sendo também descrita pela primeira vez.

Tabela 57- Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) dos extratos alcaloídico e etanólicos das folhas e das cascas do caule de *O. acutifolia* frente às cepas *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapslosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*

	Cepas (CIM $\mu\text{g/mL}$)					
	<i>C. albicans</i>	<i>C. glabrata</i>	<i>C. krusei</i>	<i>C. parapslosis</i>	<i>C. tropicalis</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>
	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC	ATCC 32045
	90028	9030	6258	22019	760	ATCC 32045
Extrato alcaloídico das folhas	15,6	7,8	62,5	62,5	7,8	7,8
Extrato etanólico das folhas	Inativo	Inativo	1000	125,0	1000	62,5
Extrato etanólico das cascas do caule	Inativo	Inativo	500	250	15,6	31,2
Anfotericina B (controle positivo)	2,0	4,0	4,0	2,0	4,0	2,0

Tabela 58- Valores da CIM ($\mu\text{g/mL}$) das substâncias **1, 2, 5, 7, 8, 9, 11, 17 e 18** obtidas de *O. acutifolia* frente às cepas *C. albicans*, *C. krusei* e *Cryptococcus neoformans*

Cepas (CIM $\mu\text{g/mL}$)			
	<i>C. albicans</i> ATCC 90028	<i>C. krusei</i> ATCC 6258	<i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i> ATCC 32045
1	100,0	50,0	50,0
2	100,0	50,0	50,0
5	100,0	Inativo	50,0
7	100,0	50,0	50,0
8	200,0	Inativo	25,0
9	100,0	50,0	100,0
11	100,0	100,0	100,0
17	100,0	100,0	200,0
18	50,0	50,0	100,0
Anfotericina B (Controle positivo)	0,5	0,5	0,25

6- CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo químico dos extratos alcalóidicos das folhas e das cascas do caule e das fases hexânica e em acetato de etila provenientes da partição do extrato etanólico das folhas de *Ocotea acutifolia* coletadas na região sul de Mato Grosso do Sul resultou no isolamento e identificação de dezoito alcaloides, compreendendo dezessete com esqueleto aporfínico e um com esqueleto morfinano, além de um flavonoide, um poliprenol e um esteroide.

Com relação aos alcaloides, constituintes principais do material vegetal estudado, merecem destaque os alcaloides inéditos e pertencentes a um grupo não usual de alcaloides aporfínicos: (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína, (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína e o alcaloide (+)-norocoxilonina também descrito pela primeira vez, além de (+)-neolitsina e (+)-talicsimidina cuja ocorrência está sendo relatada pela primeira vez no gênero.

A exemplo de outras espécies de *Ocotea*, observou-se no espécime estudado a predominância de alcaloides aporfínoides com esqueleto aporfínico, como também a presença de alcaloides bioativos.

Os resultados obtidos nos bioensaios realizados com os extratos e com alguns alcaloides isolados, particularmente os de citotoxicidade em linhagens de células cancerígenas e genotoxicidade foram considerados bastante promissores em função de serem comparáveis aos obtidos com compostos pertencentes à mesma classe descritos na literatura.

Nos ensaios de atividade citotóxica realizados com dez dos dezoito alcaloides isolados foram obtidos valores de CI_{50} significativos para (+)-ocoteína ($IC_{50} = 8,1 \mu\text{g/mL}$ frente a células Hep-2), (+)-neolitsina ($CI_{50} = 10,2 \mu\text{g/mL}$ frente às células MCF-7 e B16-F10) e (+)-dicentrina ($CI_{50} = 11,2 \mu\text{g/mL}$ frente a células B16-F10) e talicminina ($CI_{50} = 10,7 \mu\text{g/mL}$ frente a célula 786-0) o que lhes confere uma potencial capacidade de inibição do crescimento de células cancerígenas.

Já no ensaio de atividade genotóxica os resultados foram ainda mais significativos. Dos cinco alcaloides testados, três (talicminina, (+)-dicentrina e (+)-ocoteína) apresentaram atividade genotóxica em células somáticas de asas de *Drosophila melanogaster*, destacando-se talicminina e (+)-dicentrina os quais apresentaram genotoxicidade superior à do anticâncer cloridrato de doxorrubicina (controle positivo).

Dentre os extratos testados no ensaio de atividade antifúngica, deve-se ressaltar o potencial fungitóxico observado para o extrato alcaloídico das folhas e ainda dos nove alcaloides submetidos a este ensaio (+)-dicentrina, (+)-ocoteína, (+)-6*S*-*N*-óxido dicentrina, (+)-6*S*-*N*-óxido ocoteína, (+)-6*R*-*N*-óxido ocoteína, (+)-leucoxina, (+)-norocoxilonina, talicminina e (+)-palidina os quais apresentaram fungitoxicidade frente à maioria das cepas testadas.

Além da relevância dos resultados acima citados, pode-se destacar ainda neste trabalho a contribuição dada para o conhecimento da composição química de espécies de *Ocotea* que ocorrem em Mato Grosso do Sul, bem como o fornecimento de informações que poderão facilitar posteriormente a execução de novos trabalhos relativos ao isolamento, caracterização e avaliação de atividade biológica de compostos afins.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNIHOTRI, V. K.; EL SOHLY, H. N.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; JOSHI, V. C.; SMILLIE, T.; KHAN, I. A.; WALKER, L. A. Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity. *Phytochemistry Letters*, v. 1, p. 89, 2008.
- AGRAWAL, P. K. Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier, New York, 1989.
- AHMAD, R.; CAVA, M. P. Leucoxyloxyline and ocoxyloxyline - hexaoxygenated aporphines from *Ocotea leucoxyloxyline*. *Heterocycles*, v. 7, p. 927, 1977.
- ALAIN, F.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; GUY, I.; GUINAUDEAU, H.; HEINZEN, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*, v. 78, p. 382, 2007.
- AOKI, T.; MATSUO, K.; SUGA, T.; OHTA, S. Arachisprenols: polyprenols possessing a geranyl residue from *Arachis hypogaea*. *Phytochemistry*, v. 46, p. 715, 1997.
- BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M. J.; MOLTRASIO, G. Y.; GIACOPELLO, D. Thalictminine from *Ocotea puberula*. *Phytochemistry*, v. 12, p. 948, 1973.
- BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M.; COMIN, J. Dehydroocoteine and didehydroocoteine from *Ocotea puberula*. *Experientia*, v. 28, p. 875, 1972.
- BARBOSA FILHO, J. M. Lignanas, neo-lignanas e seu análogos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. 2 ed. EDUFRGS, Porto Alegre, p. 471, 2000.
- BATISTA, A. L. Estudo fitoquímico das folhas e casca de *Nectandra cuspidata* Nees. (Lauraceae). Campo Grande, 2001. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.
- BOTEGA, C.; PAGLIOSA, F. M.; BOLZANI, V. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline alkaloids and eudesmane sesquiterpenes from *Ocotea pulchella*. *Phytochemistry*, v. 32, p. 1331, 1993.

- BOUSTIE, J.; STIGLIANI, J.; MONTANHA, J.; AMOROS, M.; PAYARD, M.; GIRRE, L. Antipoliovirus structure-activity relationships of some aporphine alkaloids. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 480, 1998.
- BOYD, J.; TURVEY, J. R. Identification by N.M.R.-C-13 spectroscopy of oligosaccharides derived from alginic acid. *Carbohydrate Research*, v. 61, p. 223, 1978.
- BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MARIAVITTORIA, M.; MARCO, D.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, v. 85, p. 415, 2004.
- CALDERON, A. I.; TERREAUX, C.; GUPTA, M. P. *In vitro* cytotoxicity of 11 Panamanian plants. *Fitoterapia*, v. 74, p. 378, 2003.
- CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Proaporphine and aporphine alkaloids. IV. Minor alkaloids of *Ocotea glaziovii*. *Farmaco, Edizione Scientifica*, v. 30, p. 479, 1975.
- CASSELS, B. K.; CAVÉ A.; LEBOEUF, M. The carbon-13 NMR spectra of 1, 2, 10-trioxygenated aporphines. *Journal of Natural Products*, v. 50, p. 297, 1987.
- CASTRO, O.; RUIZ, I. Aporphine alkaloids and flavonoids from *Ocotea holdridgeana* leaves. *International Journal of Pharmacognosy*, v. 32, p. 406, 1994.
- CAVA, M. P.; BEHFOROUZ, M.; MITCHELL, M. J. *Ocotea* alkaloids. Variabiline, a novel aminoaporphine. *Tetrahedron Letters*, v. 46, p. 4647, 1972.
- CAVA, M. P.; VENKATESWARLU, A. Dehydroocopodine, dicentrinone, and other alkaloids from *Ocotea macropoda* and *Hernandia jamaicensis*. *Tetrahedron*, v. 27, p. 2639, 1971.
- CAVA, M. P.; WATANABE, Y.; BESSHO, K.; MITCHELL, M. J.; DaROCHA, A. I. *Ocotea* alkaloids: the characterization and structures of four new aporphine bases. *Tetrahedron Letters*, v. 20, p. 2437, 1968.
- CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; WATERMAN, P. G. The aporphinoid alkaloids of the Annonaceae. In: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. Ed. S. Willian Pelleiter (John Wiley & Sons) New York, v. 5, p. 133, 1987.

CLARK, A. M.; WATSON, E. S.; ASHFAQ, M. K.; HUFFORD, C. D. *In vivo* efficacy of antifungal oxoaporphine alkaloids in experimental disseminated candidiasis. *Pharmaceutical Research*, v. 4, p. 495, 1987.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, v. 21, 99, 1998.

CHANG, C. W.; KO, F. N.; SU, M. J.; WU, Y. C.; TENG, C. M. Pharmacological evaluation of ocoteine, isolated from *Cassytha filiformis*, as an α -1-adrenoceptor antagonist in rat thoracic aorta. *Japanese Journal of Pharmacology*, v. 73, p. 207, 1997.

CHANG, F.; HSIEH, T. J.; HUANG, T. L.; CHEN, C. Y.; KUO, R. Y.; YUH-CHWEN CHANG, Y. C.; CHIU, H. F.; WU, Y. C. Cytotoxic constituents of the stem bark of *Neolitsea acuminatissima*. *Journal of Natural Products*, v. 65, p. 255, 2002.

CHANG, F.; WEI, J. L.; TENG, C. M.; WU, Y. C. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, v. 61, p. 1457, 1998.

CHAUMONTET M.; CAPT M.; GOLD-AUBERT P. Comparative study of two anti-ulcerogenic drugs-glaziovine and sulpiride. *Arzneimittel-Forschung*, v. 28, p. 2119, 1978.

CHEN, I. S. Studies on the alkaloids of Formosan lauraceous plants. XIX. Alkaloids of *Lindera oldhamii* Hemsl. (2). *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 24, p. 41, 1977.

CHEN, J. H.; DU, Z. Z.; SHEN, Y. M.; YANG, Y. P. Aporphine alkaloids from *Clematis parviloba* and their antifungal activity. *Archives of Pharmacol*, v. 32, p. 3, 2009.

CHEN, K. S. ; KO, F. N.; TENG, C. M.; WU, Y. C. Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Medica*, v. 62, p. 133, 1996.

CHRISTOPHEL, D. C.; ROWETT, A. I. The use of cuticular featura in the taxonomy of the Lauraceae. *Annals Missouri Botanical Garden*, v. 83, p. 419, 1996.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Método de referência para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade a terapia antifúngica das leveduras; Norma Aprovada. 2 ed. Norma M27-A2 do NCCLS, Pennsylvania, Estados Unidos, v. 22, 2002.

COLLINS, P. M.; FERRIER, R. J. Monosacharides their chemistry and their roles in natural products. John Wiley & Sons, Chichester, 1980.

CORDELL, G. A. Biodiversity and drug discovery - a symbiotic relationship. *Phytochemistry*, v. 55, p. 463, 2000.

CORREA, J. E.; RIOS, CARLOS H.; CASTILLO, A.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A.; HELLER, M. V.; GERWICK, W. H.; RIOS, L. C. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. *Planta Medica*, v. 72, p. 270, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Nature: a vital source of leads for anticancer drug development. *Phytochemistry*, v. 8, p. 313, 2009.

DIAZ, A. M. P.; GOTTLIEB, H. E.; GOTTLIEB, O. R. Dehydrodieugenols from *Ocotea cymbarum*. *Phytochemistry Reviews*, v. 19, p. 681, 1980.

DODSON, C. D.; STERMITZ, F. R.; CASTRO C. O.; JANZEN, D. H. . Neolignans from fruits of *Ocotea veraguensis*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2037, 1987.

DOSKOTCH, R. W.; PHILLIPSON, J. D.; RAY, A. B.; BEAL, J. L. The Synthesis of the thalictrum alkaloids, adiantifoline and thalicsimidine. *Journal of Organic Chemistry*, v. 136, p. 2409, 1971.

EMMERICH, M.; SENNA, L. M. Estudos de etnobotânica no Parque indígena do Xingu II. Dois componentes do ritual de pajelância: o cigarro e a semente do pajé. *Bradea*, v. 4, p. 170, 1985.

FINNEY, D.J. Probit analysis. 3 ed. Cambridge University Press, Cambridge, 1971.

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

FRANCA, N. C.; GIESBRECHT, A. M.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, A. F.; MAGALHAES, E. G.; MAIA, J. G. S. Chemistry of Brazilian Lauraceae. 32. Benzylisoquinolines from *Ocotea* species. *Phytochemistry*, v. 14, p. 1671, 1975.

GARCEZ, F. R., GARCEZ, W. S., SILVA, A. F. G.; BAZZO, R. C.; RESENDE, U. M. Terpenoid constituents from leaves of *Guarea kunthiana*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 15, p. 767, 2004.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; CRUZ, A. C. A bioactive lactone from *Nectandra gardneri*. *Planta Medica*, v. 65, p. 775, 1999.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MARTINS, M.; LOPES, F. A. Triterpenoids, lignan and flavans from *Terminalia argentea*. *Biochemical Systematics Ecology*, v. 31, p. 229, 2003a.

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 Medica*, v. 71, p. 923, 2005a.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; RODRIGUES, E. D.; POTT, V. J.; ROQUE, N. F. Seco-protolimonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, v. 42, p. 1399, 1996.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; ROQUE, N. F.; CASTELLANO, E. E.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J. 7b-Oxygenated limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, v. 55, p. 733, 2000.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; TSUTSUMI, M. T.; ROQUE, N. F. Limonoids from *Trichilia elegans* ssp. *elegans*. *Phytochemistry*, v. 45, p. 141, 1997a.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SANTANA, A. L. B. D.; ALVES, M. M.; MATOS, M. F.; SCALIENTE, A. M. Bioactive flavonoids and triterpenes from *Terminalia fagifolia*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 17, p. 1223, 2006.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; MIGUEL, D. L. S.; SEREA, A. A. T.; PRADO, F. C. Chemical constituents from *Terminalia glabrescens*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 14, p. 461, 2003b.

GARCEZ, F. R.; NUNEZ, C. V.; GARCEZ, W. S.; ALMEIDA, R. M.; ROQUE, N. F. Sesquiterpenes, limonoid and coumarin from the wood bark of *Guarea guidonia*. *Planta Medica*, v. 64, p. 79, 1998.

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

GARCEZ, W. S. Constituintes químicos de *Ocotea Velloziana* (Meissn.) Mez. Lauraceae. São Paulo, 1991. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo.

GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R.; RAMOS, L.; CAMARGO, M. J.; DAMASCENO JR., G. A. Sesquiterpenes from *Trichilia catigua*. *Fitoterapia* v. 68, p. 87, 1997b.

GARCEZ, W. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzyliisoguinoline alkaloids and flavonol from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry*, v. 39, p. 815, 1995.

GILBERT, B.; GILBERT, M. E. A.; DE OLIVEIRA, M. M.; RIBEIRO, O.; WENKERT, E.; WICKBERG, B.; HOLLSTEIN, U.; RAPOPORT, H. Aporphine and isoquinolinedienone alkaloids of *Ocotea glaziovii*. *Journal of the American Chemical Society*, v. 86, p. 694, 1964.

GOODWIN, S.; SMITH, A. F.; HORNING, E. C. Leucoxine and leucoxytonine. *Chemistry & Industry*, p. 691, 1960.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignans. In: Natural Products of Woody Plants: Chemical extraneous to the lignocellulosic cell wall. ROWE, J. W. Springer-Verlag, Berlin p. 439, 1989.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry*, v. 11, p. 1537, 1972.

GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATS, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B.; KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environmental Mutagenesis* v. 6, p. 153, 1984.

GUERBAS NETO, P. Estudo químico da casca, folhas e cerne de um espécime de *Tabebuia aurea* (Bignoniaceae) coletado no Pantanal. Campo Grande, 2003. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids I, *Lloydia*, v. 38, p. 275, 1975.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids III, *Journal of natural products*, v. 57, p. 1033, 1994.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids III, *Journal of natural products*, v. 46, p. 389, 1988.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids IV, *Journal of natural products*, v. 51, p. 761, 1983.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids II, *Journal of natural products*, v. 42, p. 325, 1979.

HASBUN, C.; CASTRO, O. A novel phenanthrene alkaloid from *Ocotea insularis*. *Fitoterapia*, v. 64, p. 440, 1993.

HASHIMOTO, T.; TORI, M.; ASAKAWA, Y. Piscidal sterol acylglucosides from *edgeworthia-chrysantha*. *Phytochemistry*, v. 30, p. 2927, 1991.

HENRIQUES, A. M.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. SIMÕES, C. M. O. 2 ed. UFRGS, Porto Alegre, p. 641, 2000.

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

HOSTETTMANN, K.; POTTERAT, O.; WOLFENDER, J. L. The potential of higher plants as a source of new drugs. *Chimia*, v. 52, p. 10, 1998.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. EDUFSCAR, São Carlos, 2003.

HSU, C. Y. H.; CHEN, C. L. Antimicrobial activities of aporphine alkaloids isolated from heartwood and discolored sapwood of *Liriodendron tulipifera*. *Holzforschung*, v. 45, p. 325, 1991.

HUANG, R. L.; CHEN, C.C.; HUANG, Y. L.; OU, J. C.; HU, C. P.; CHEN, C. F.; CHANG, C. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. *Planta Medica*, v. 64, p. 212, 1998.

HUI, W. H.; LOO, S. N.; ARTHUR, H. R. New aporphine alkaloids from *Neolitsina pulchella*. *Journal of the Chemical Society*, p. 2285, 1965.

IMLER, M. J.; MENACHERY, M. D.; RAJARAMAN, R.; CAVA, M. P.; FREYER, A. J.; SHI, S. D. Lequesnamine: A new oxoaporphine alkaloid from *Ocotea leucoxylon*. *American Chemical Society*, v. 225, p. 23, 2003.

JACOBUCCI, G. A. Ocoteine, the alkaloid separated from the bark of *Ocotea puberula*. *Anales de la Asociacion Quimica Argentina*, v. 42, p. 18, 1954.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A.; SIOUMIS, A. A. Cassytha alkaloids. IV. The alkaloids of *Cassytha racemosa* Nees. *Australian Journal of Chemistry*, v. 20, p. 1457, 1967.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A.; SIOUMIS, A. A.; TWEEDDALE, H. J. New aporphine alkaloids from *Beilschmiedia podagrica* (Lauraceae). *Australian Journal of Chemistry*, v. 22, p. 1277, 1969.

JOLY, A. B. Introdução à taxonomia vegetal. 11 ed. Nacional, São Paulo, p. 777, 1991.

KAMETANI, T.; IHARA, M.; HONDA, T. Two new alkaloids; kikernanine and the morphinandienone- type alkaloid, pallidine, from *Corydalis* species. *Chemical Communication*, p. 1301, 1969.

KASTENBAUM, M. A.; BOWMAN K. O. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutation Research*, v. 9, p. 527, 1970.

KHAN, M. R.; GRAY, A. I.; WATERMAN, P. G. Neolignans from stem bark of *Ocotea veraguensis*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 1155, 1987.

KINGMA, P. S.; OSHEROFF, N. The response of eukaryotic topoisomerases to DNA damage. *Biochemical Biophysical Acta*, v. 1400, p. 223, 1998.

KIRIAKIDIS, S.; STATHI, S.; JHA, H.C.; HARTMANN, R.; EGGE, H.; Fatty acid esters of sitosterol 3 β -glucoside from soybeans and tempe (fermented soybeans) as antiproliferative substances. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, v. 22, p. 139, 1997.

KONDO, Y.; IMAI, Y.; HOJO, H.; ENDO, T.; NOZOE, S. Suppression of tumor cell growth and mitogen response by aporphine alkaloids, dicentrine, glaucine, corydine, and apomorphine. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, v. 13, p. 426, 1990.

KUMAR, A.; BROWN, D. T.; LENO, G. H. DNA intercalators differentially affect chromatin structure and DNA replication in *Xenopus* egg extract. *Anti-cancer Drugs*, v. 15, p. 633, 2004.

LAGO J. H. G.; CHAVES M. H.; AYRES M. C. C.; AGRIPINO D. G.; YOUNG M. C. M. Evaluation of antifungal and DNA-damaging activities of alkaloids from branches of *Porcelia macrocarpa*. *Planta Medica*, v. 73, p. 292, 2007.

- LEBOEUF M.; CAVÉ, A.; TOHAMI, M. Alkaloids of annonaceae. XXXV. alkaloids of *Desmos tiebaghiensis*. *Journal of Natural Products*, v. 45, p. 617, 1982.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Traditional medicinal plants of Thailand. XXIII. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 1468, 1993.
- LIU, Y. F.; LIN, K. H.; LU, S. T. Screening for antimicrobial and antitumor alkaloids. *Taiwan Yaxue Zazhi*, v. 31, p. 28, 1979.
- LOPEZ, J. A.; BARILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J.; LIN, F.; AL-REHAILY, A. J.; SHARAF, M. H. M.; SCHIFF, P. L. Aporphine alkaloids of selected species of *Nectandra* and *Ocotea*. *Planta Medica*, v. 61, p. 589, 1995.
- LOPEZ, J. A.; BARILLAS, W.; GOMEZ-LAURITO, J.; LIN, F.; AL-REHAILY, A. J.; SHARAF, M. H. M.; SCHIFF, P. Jr. Aporphine alkaloids of *Ocotea brenesii*. *International Journal of Pharmacognosy*, v. 34, p. 145, 1996.
- LORDELLO, A. L. L.; MASSAYOSHI Y. Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry*, v. 46, p. 741, 1997.
- LORENZI, H. Árvores Brasileiras - Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, 4 ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa SP, v. 1, p. 143, 2002.
- LU, S.T.; WANG, S. J.; LAI, P. H.; LING, C. M.; LIN, L. C. Alkaloids of Formosan Lauraceous plants XV: alkaloids of *Lindera oldhamii* Heinsl. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, v. 92, p. 910, 1972.
- LU, S. T.; WU, Y. C. Studies on the alkaloids of Formosan Lauraceous plants. XXIX. Transformation from aporphine N-oxides to 1-(N-methyl-Nhydroxylaminoethyl) phenanthrene derivatives. *Heterocycles*, v. 23, p. 3085, 1985.
- MA, W. G.; FUKUSHI, Y.; TAHARA, S.; OSAWA, T. Fungitoxic alkaloids from Hokkaido Papaveraceae. *Fitoterapia*, v. 71, p. 527, 2000.
- MABRY, T. J.; MARKITAM, K. R.; THOMAS, M.B. The Systematic identification of flavonoids. Springer-Verlag, Berlin, 1970.
- MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e Ambiente*, v. 8, p. 195, 2001.

- MARQUES, R.C.; MEDEIROS, S.R.B.; DA SILVA DIAS, C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGNES-LIMA, L.F. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames test. *Mutation Research*, v. 536, p. 117, 2003.
- MARSAIOLI, A. J.; REIS, F. A. M.; MAGALHÃES, A. F.; RUVEDA, E.; KUCK, A. M. Carbon-13 NMR analysis of aporphine alkaloids. *Phytochemistry*, v. 18, p. 165, 1979.
- MCLAUGHLIN J. L. Paw paw and cancer: Annonaceous acetogenins from discovery to commercial products. *Journal of Natural Products*, v. 71, p. 1311, 2008.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp - a convenient general bioassay for active-plant constituents. *Planta Medica*, v. 45, p. 31, 1982.
- MITSCHER, L. A.; BEAL, J. L.; BATHALA, M. S. Antimicrobial agents from higher plantas. 1. Introduction, rationale and methodology. *Lloydia*, v. 35, p. 157, 1972.
- MORELLO, A.; LIPCHENCA, I.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Pharmacology, toxicology and endocrinology*, v. 107, p. 367, 1994.
- MORTEZA-SEMNANI, K.; AMIN, GH.; SHIDFAR, M. R.; HADIZADEH, H.; SHAFIEE, A. Antifungal activity of the methanolic extract and alkaloids of *Glaucium oxylobum*. *Fitoterapia*, v. 74, p. 493, 2003.
- MOSMANN T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, v. 65, p. 55, 1983.
- NEES, V. E. C. G. Revisio Laurinearum a claro sellowio in Brasilia collectarum. *Linnaea*, v. 8, p. 42, 1833.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1022, 2003.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K.M. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports*, v. 17, p. 215, 2000.
- NOZAKA, T.; WATANABE, F.; TADAKI, S.; ISHINO, M.; MORIMOTO, I.; KUNITOMO, J.; ISHII, H.; NATORI, S. Mutagenicity of isoquinoline alkaloids,

especially of the aporphine type. *Mutation Research - Genetic Toxicology Testing*, v. 240, p. 267, 1990.

PECH, B.; BRUNETON, J. Alcaloides du laurier noble, la urus nobilis. *Journal of Natural Products*, v. 45, p. 560, 1982.

POUCHERT, C. J.; BEHNKE, J. The Aldrich library of ^{13}C and FT NMR spectra. Aldrich Chemical Company, Inc: Milwaukee, 1983.

PUVANENDRAN, S.; WICKRAMASINGHE, A.; KARUNARATNE, D. N.; CARR, G.; WIJESUNDARA, D. S. A.; ANDERSEN, R.; KARUNARATNE, V. Antioxidant constituents from *Xylopia championii*. *Pharmaceutical Biology*, v. 46, p. 352, 2008.

RAMOS, L. Contribuição ao estudo químico da casca do caule de *Guarea guidonia* Meliaceae. Campo Grande, 1999. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S.; JACOBS, H.; HARDING, W. W. Assignment of ^1H and ^{13}C spectra for polyprenol-12, a molecule with severe ^1H and ^{13}C spectral crowding with the aid of high-resolution, ^{13}C -detected, ^{13}C , ^{13}C - ^1H shift correlation spectra. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 77, p. 1922, 1999.

RIBEIRO, R. A.; CARMO, L. G.; VLADIMIROVA, J.; JURKIEWICZ, N. H.; JURKIEWICZ, A. Nantenine blocks muscle contraction and Ca^{2+} transient induced by noradrenaline and K^+ in rat vas deferens. *European Journal Pharmacology*, v. 37, p. 470, 2003.

RIZZINI, C. T.; W. B. MORS. Botânica econômica brasileira. EPU/EDUSP, São Paulo, 1976.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1996.

ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Study of morphinandienones: carbon-13 and proton NMR of sebiferine and related alkaloids. *Bulletin de la Societe Chimique de France*, v. 3-4, p. 139, 1984.

ROENSCH, H.; PREISS, A.; SCHREIBER, K.; FERNANDEZ DE CORDOBA, H. Structure elucidation and carbon-13 NMR of the new aporphine alkaloid 3-hydroxyglaucine. *Liebigs Annalen der Chemie* v. 5, p. 744, 1983.

ROHWER, J. G. Lauraceae. In: The families and genera of vascular plants. KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G.; BITTRICH, V. Springer-Verlag, Berlin, v.2, 1993.

ROHWER, J. S. Prodrum einer monographie der gattung *Ocotea* Aublet (Lauraceae) sensu lato. Mitteilungen aus dem Institut für allgemeine Botanik in Hamburg, v. 20, p. 164, 1986.

SAKAI, S. I.; AIMI, N.; YAMANAKA, E.; YAMAGUCHI, K. The alkaloids. In: Natural Products of Woody Plants. ROWE, J. W. Springer-Verlag, Berlin, p. 200, 1989.

SCORA, R. W.; SCORA, P. E. Essential leaf oil of *Persea* subgenus *Eriodaphne* and closely related *Perseoid* genera. *Journal Essential Oil Research*, v. 13, p. 37, 2001.

SHAMA, M. The Isoquinoline alkaloids: chemistry and pharmacology. Academic Press, Nova York, 1972.

SHEN, C. C.; HUANG, R. L.; LIN, H. F.; LIAO, J. F.; CHEN, C. C. Synthesis and cytotoxic activity of dicentrine analogues. *Chinese Pharmaceutical Journal*, v. 52, p. 353, 2000.

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

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

SILVA, L. M. G. E. Estudo Químico dos frutos, cascas do caule e cerne de um espécime de *Ocotea Minarum* (Meissn.) Mez. (Lauraceae). Campo Grande, 2005. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

SILVA, W. D.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R. Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea costulatum*. *Phytochemistry*, v. 28, p. 661, 1989.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia - da planta ao medicamento. 2 ed. UFRGS/UFSC, Porto Alegre/Florianópolis, 2000.

SKEHAN, P.; STORENG, R.; SCUDIERO, D.; MONKS, A.; McMAHON, J.; VISTICA, D.; WARREN, J. T.; BOKESCH, H.; KENNEY, S.; BOYD, M. R. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 82, p. 1107, 1990.

SKLADANOWSKI, A.; J. KONOPA. Adriamycin and daunomycin induce programmed cell death (apoptosis) in tumour cells. *Biochemical Pharmacology*, v. 46, p. 375, 1993.

SOARES, A. O. Estudo fitoquímico das flores e casca do caule de um espécime de *Tabebuia caraíba* (Bignoniaceae) coletado na região do cerrado de Mato Grosso do Sul. Campo Grande, 2006. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

SOARES, L. R. Substâncias indutoras de nodulação de raízes de feijoeiro presentes no exsudato de *Mimosa flocculosa*. Campo Grande, 2008. Qualificação (Doutorado em Química) - Departamento de Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, v. 5, p. 173, 2005.

STÉVIGNY, C.; BLOCK, S.; PAUW-GILLET, M. C.; HOFFMANN, E.; LLABRÈS, G.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Planta Medica*, v. 68, p. 1042, 2002.

STIGLIANI, J. L.; BOUSTIE, J.; AMOROS, M.; MONTANHA, J.; PAYARD, M.; GIRRE, L. Molecular modeling and antipoliiovirus activity of some isoquinoline alkaloids. *Pharmacy and Pharmacology Communications*, v. 4, p. 65, 1998.

SWIEZEWSKA, E.; SAZAK, W.; MARIKOWSKI, T.; JANKOWSKI, T. V.; KRAJEWSKA, I.; HERTEL, J.; SKOCZLAS, E. The search for polyprenol. *Acta Biochimica Polonica*, v. 41, p. 221, 1994.

TADAKI, S.; NOZAKA, T.; YAMADA, S.; ISHINO, M.; MORIMOTO, I.; TANAKA, A.; KUNITOMO, J. Clastogenicity of aporphine alkaloids *in vitro*. *Journal of Pharmacobio-Dynamics*, v. 15, p. 501, 1992.

TANAKA, Y.; TANGPAKDEE, J. Log-chain polyprenols and rubber un young leaves of *Hevea brasiliensis*. *Phytochemistry*, v. 48, p. 447, 1998.

TELES, H. L.; SILVA, G. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S.; PEREIRA, J. O.; COSTA NETO, C. M.; HADDAD, R.; EBERLIN, N.; YOUNG, M. C.; ARAÚJO, A. R. Benzopyrans from *Curvularia* sp. Na endophytic fungus associated with *Ocotea corymbosa* (Lauraceae). *Phytochemistry*, v. 66, p. 2363, 2005.

TEWEY, K. M.; ROWE, T. C.; YANG, L.; HALLIGAN, B. D.; LIU, L. F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. *Science*, v. 226, p. 466, 1984.

TINCKOO, S.; RUSSEL, S. *Drosophila melanogaster* as a model system for drug discovery and pathway screening. *Current Opinion in Pharmacology*, v.2, p. 555, 2002.

TOMITA, M.; LU, S. T.; WANG, S. J. Studies on the alkaloids of Formosan Lauraceous plants: *Cassytha filiformis* Structure of a new aporphine type alkaloids cassyfiline. *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan*, v. 85, p. 827, 1965.

TSAI, I. L.; LIOU, Y. F.; LU, S. T. Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities. *Gaoxiong Yixue Kexue Zazhi*, v. 5, p. 132, 1989.

UMAROV, K. S., TELEZHENETSKAYA, M. V.; ISMAILOV, Z. F., YUNUSOV, S. Y. Alkaloids of *thalictrum simplex*. *Khim. Prir. Soedin*, v. 6, p. 224, 1970.

VARGAS, L.; BARRIOS, M.; CABEZAS, J. M.; CASTRO, O. Aporphine alkaloids from *Ocotea holdridgeana* bark. *Fitoterapia*, v. 67, p. 184, 1996.

VECCHIETTI, V., CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Ocobotrine and 1,4-episinomenine. New trans-morphinane alkaloids of *Ocotea brachybrotia*. *Tetrahedron Letters*, v. 19, p. 1631, 1976.

VECCHIETTI, V., CASAGRANDE, C.; FERRARI, G.; DANIELI, B.; PALMISANO, G. Alkaloids of *Ocotea acutangula*. *Journal of Chemical Society*, v. 2, p. 578, 1981.

VECCHIETTI, V., CASAGRANDE, C.; FERRARI, G.; SEVERINI RICCA, G. Alkaloids of *Ocotea brachybotra*. *Farmaco, Edizione Scientifica*, v. 32, p. 767, 1977.

VECCHIETTI, V., CASAGRANDE, C.; FERRARI, G.; SEVERINI RICCA, G. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. *Farmaco, Edizione Scientifica*, v. 34, p. 829, 1979.

VERNENGO, M. J.; CEREZO, A. S.; IACOBUCCHI, G. A.; DEULOFEU, V. Argentine plants. XVI. Structure of ocoteine. *Ann.*, v. 610, p. 173, 1957.

VILEGAS, J. H. Y.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline alkaloids from *Ocotea teleiandra*. *Revista Latinoamericana de Quimica*, v. 23, p. 18, 1992.

VILEGAS, JANETE H. YARIWAKE; GOTTLIEB, OTTO R.; KAPLAN, MARIA AUXILIADORA C.; GOTTLIEB, HUGO E. The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part 93. Aporphine alkaloids from *Ocotea caesia*. *Phytochemistry*, v. 28, p. 3577, 1989.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. Plant drug analysis. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New Tokyo, 1984.

WEHRLI, F. W.; NISHIDA, T. The use of carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy in natural products chemistry. In: Fortschritte der chemie organischer naturstoffe/progress in the chemistry of organic natural products. HERZ, W.; GRISEBACH, H.; KIRBY, G. W. Springer-Verlag, New York p. 36, 1979.

WOO, S. H.; CASSADY, J. M.; SNAPKA, R. M. Topoisomerase II inhibition by aporphine alkaloids. *Biochemical Pharmacology*, v. 57, p. 1141, 1999.

WOO, S. H.; REYNOLDS, M. C.; SUN, N. J.; CASSADY, J. M.; SNAPKA, R. M. of inhibition of topoisomerase II by liriodenine. *Biochemical Pharmacology*, v. 54, p. 467, 1997.

WRIGHT, C. W.; MARSHALL, S. J.; RUSSELL, P. F.; ANDERSON, M. M.; PHILLIPSON, J. D.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SCHIFF, P. L. JR. *In vitro* antiplasmodial, antiamoebic, and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1638, 2000.

WRIGHT, J. L. C.; McINNES, A. G.; SHIMIZU, S.; SMITH, D. G.; WALTER, J. A.; IDLER, D.; KHALIL, W. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry*, v. 56, p. 1898, 1978.

WU, Y.C.; CHANG, F. R.; CHAO, Y. C.; TENG, C. M. Antiplatelet and vasorelaxing actions of aporphinoids from *Cassytha filiformis*. *Phytotherapy Research*, v. 12, p. 39, 1998.

WU, Y. C.; LIOU, Y. F.; LU, S. T.; CHEN, C. H.; CHANG, J. J.; LEE, K. H. Antitumor agents. CIII. Cytotoxicity of isoquinoline alkaloids and their N- oxides. *Planta Medica*, v. 55, p. 163, 1989).

YU, S. M.; KO, F. N.; CHUEH, S. C.; CHEN, J. CHEN, S. C.; CHEN, C. C.; TENG, C. M. Effects of dicentrine, a novel α -1-adrenoceptor antagonist, on human hyperplastic prostates. *European Journal of Pharmacology*, v. 252, p. 29, 1994.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. 1 ed. Argos, Chapecó, 2001.

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

ZHANG, H. J.; NAKAMURA, N.; TEWTRAKUL, S.; HATTORI, M.; SUN, Q. S.; WANG, Z. T.; FUJIWARA, T. Sesquiterpenes and alkaloids from *Lindera chunii* and their inhibitory activities against HIV-1 integrase. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, v. 50, p. 1195, 2002.

ZHANG, H.; N. LI. Eletrochemical studies of the interaction of adriamycin to DNA. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 22, p. 67, 2000.

ZHOU, B. N.; JOHNSON, R. K.; MATTERN, M. R.; WANG, X.; HECHT, S. M.; BECK, H. T.; ORTIZ, A.; KINGSTON, D. G. I. Isolation and Biochemical Characterization of a New Topoisomerase I Inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. *Journal of Natural Product*, v. 63, p. 217, 2000.