

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DE MARCADORES EM ESPÉCIES DE ANIBA
(LAURACEAE) BIOATIVAS DA AMAZÔNIA**



YASMIN CUNHA DA SILVA

MANAUS

2018

YASMIN CUNHA DA SILVA

**ESTUDO DE MARCADORES EM ESPÉCIES DE *ANIBA*
(*LAURACEAE*) BIOATIVAS DA AMAZÔNIA**

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química, na linha de Pesquisa de Produtos Naturais e Biomoléculas.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Coorientador: Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa

MANAUS

2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S586e	Silva, Yasmin Cunha da Estudo de marcadores em espécies de Aniba (Lauraceae) bioativas da Amazônia / Yasmin Cunha da Silva. 2018 198 f.: il. color; 31 cm. Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Júnior Coorientador: Emmanoel Vilaça Costa Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Aniba. 2. pironas. 3. alcaloides. 4. antimicrobiano. I. Veiga Júnior, Valdir Florêncio da II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	---

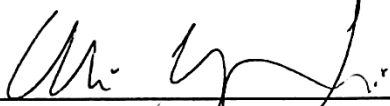
“ESTUDO DE MARCADORES EM ESPÉCIES DE ANIBA (LAURACEAE) BIOATIVAS DA AMAZÔNIA”

Yasmin Cunha da Silva

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovado, em 23 de abril de 2018.

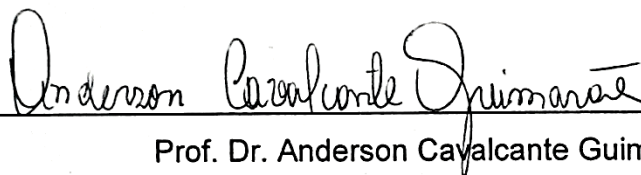
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Júnior

Universidade Federal do Amazonas

Orientador



Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães
Membro UFAM



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro
Membro UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 23 de abril de 2018.

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial aos meus pais, Maria Silvane Cunha da Silva e José Adauto da Silva por todo amor, apoio e esforço. Tudo o que sou e todas minhas conquistas devo a eles, que me ensinaram a lutar pelos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Nesse pequeno espaço tentarei demonstrar um pouco da minha gratidão por esses dois anos, repletos de ensinamentos, força, ajuda, contribuição, companheirismos e parcerias. É muito difícil agradecer a todos sem esquecer de alguém. **Agradeço:**

À Deus, por toda luz concedida nessa jornada, pela saúde e força de chegar ao fim de mais uma etapa.

À minha família, em especial aos meus pais José Adauto e Maria Silvane, por todo amor, apoio, incentivo, educação e por me aguentarem nos dias mais difíceis dessa jornada. À minha irmã Francisca Duvânia e aos meus sobrinhos por todo carinho e torcida. Amo muito vocês.

À família que Pitinga me deu, em especial às minhas irmãs Raíza, Greice, Letícia, Mirtene e Thaís, pela amizade, por todo apoio, por sempre estarem comigo nos momentos bons e ruins, e por me compreenderem naqueles momentos que estava ocupada realizando este trabalho.

Ao meu orientador de pibic, pibiti, monografia e dissertação, prof. Dr. Valdir Veiga, por ser o meu “pai científico” durante esses quase sete anos. Obrigada pelos desafios, que não foram poucos; pela confiança, ensinamentos e por acreditar no meu potencial. Obrigada por toda orientação e apoio nessa jornada.

Ao meu coorientador, prof. Dr. Emmanoel Costa, por ter aceitado o desafio de orientação, por todos ensinamentos desde a graduação até aqui.

À minha “mãe científica”, prof. Dra. Klenicy Yamaguchi por ter me auxiliado na escolha do projeto, que foi fundamental para o meu crescimento. Obrigada por todo ensinamento, carinho, companheirismo e por sempre estar por perto.

Ao melhor grupo do mundo, o Q-BiomA como um todo, a todos os membros. Aos membros atuais, que permaneceram unidos em meio a grandes mudanças e adversidades, Isadora minha “irmã científica”, Larissa, Glaucia, Emily, Ananda, Milena, Simone, Davi, Nathália, Karen Cristine, Karen Alves, Karen Marciel, Renata, Maurício, Rodrigo, Steve. Aos antigos membros do Q-BiomA, Isabely, Marcos, Leandro, Virlane e Alanne. Obrigada por todos os momentos de alegria e desespero.

Aos amigos de graduação, Isadora, Ingridy, Lídia, George e Renê, que estiveram presentes, apoiando e sempre dando força nessa fase. Obrigada pelo companheirismo e pela amizade.

Aos companheiros de mestrado, que de alguma forma contribuíram nesse caminho desde as disciplinas até a finalização desse projeto.

À Central Analítica da UFAM pela contribuição com experimentos espectroscópicos e espectrométricos.

À FIOCRUZ-AM por contribuir com os ensaios biológicos, em especial a Dra. Patrícia Puccinelli, a MSc. Ivanildes Bastos e a doutoranda Emily Soares.

Aos professores, que são verdadeiros heróis e que de alguma forma contribuíram para meu desenvolvimento intelectual. Muito obrigada pela dedicação e por todos ensinamentos.

À CAPES pela bolsa concedida, e as outras agências (CNPq e FAPPEAM) de fomento, que contribuíram para manutenção dos laboratórios de pesquisa.

RESUMO

A região Amazônica destaca-se por sua imensa biodiversidade, que é considerada como fonte para descoberta de novas moléculas de interesse farmacológico. Nesse campo de pesquisa, o gênero *Aniba* (*Lauraceae*) possui ampla variabilidade e abundância. As espécies de *Aniba* são descritas quimicamente com a presença de alcaloides, flavonoides, terpenoides, pironas e lignanas. Nesse contexto, propõe-se o isolamento e identificação dos biomarcadores dos extratos das espécies *A. panurensis*, *A. parviflora*, *A. ferrea* e *A. roseadora*, visando desenvolver um método para rápida caracterização dos extratos de espécies de *Aniba* (*Lauraceae*), além de descrever suas atividades biológicas. Para atingir tais objetivos, foram preparados os extratos etanólicos (galhos e folhas) por maceração, e esses foram particionados. Por meio de métodos cromatográficos clássicos (CCD) e por técnicas espectrométricas (EM), realizou-se a caracterização química das frações hexânicas e metanólicas. Dessa forma, foram detectados como principais íons de m/z 300, 328 e 330, que por comparação dos dados de fragmentação com a literatura, são características dos alcaloides: *N*-metilcoclaurina, isoboldina, laurotetanina e reticulina; além desses íons, foram detectadas no modo negativo por ionização ESI, os íons de m/z 283, 311 e 863, que foram associados aos flavonoides: izalpinina, 3, 5, 7 – tri-*O*-metilgalangina e a procianidina trimer. O fracionamento para obtenção dos componentes majoritários foi desenvolvido pelo uso de técnicas cromatográficas clássicas, como a CC e a CCDP, assim resultando na obtenção de 6 substâncias, que foram elucidadas pela união de técnicas espectrométricas e espectroscópicas, tais como: EM e RMN (^1H e ^{13}C uni e bidimensional). Assim, foram identificadas as estirilpironas: 5,6-dehidrokawaína, 4-metoxi-11,12-metilenodioxo-6-trans-estiril-piran-2-ona e rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona (*A. panurensis*); o alcaloide piridínicos: anibina (*A. roseadora*) e as kawalactonas: tetrahidroyangonina e dihidrometisticina (*A. parviflora*). Visando a análise do potencial antimicrobiano dos extratos, frações e das substâncias isoladas, realizou-se os ensaios antibacterianos e antiparasitário. Obtendo bons resultados para os extratos e frações de *A. panurensis* com CIM de 7,8 e 15,62 $\mu\text{g/mL}$ frente a três bactérias gram-positivas (*Staphylococcus simulans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à metilina (MRSA)). No teste antiplasmódico frente *Plasmodium falciparum*, obtiveram-se bons resultados para as extratos etanólicos de *A. parviflora* e *A. panurensis*, com melhor resultado de CI_{50} = 29,03 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato das folhas de *A. parviflora*; e resultados positivos para duas substâncias isoladas, com CI_{50} = 36,16 $\mu\text{g/mL}$ para 4-metoxi-11,12-metilenodioxo-6-trans-estiril-piran-2-ona e CI_{50} = 24,10 $\mu\text{g/mL}$ para rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona. Os resultados confirmam a presença de alcaloides, flavonoides e pironas nas espécies de *Aniba*, além de descrever um método por CCDAE para rápida detecção desses padrões isolados e relatar o potencial antimicrobiano dos extratos, frações e substâncias isoladas.

Palavras-chave: *Aniba*; pironas; alcaloides; antimicrobiano.

ABSTRACT

The Amazon region stands out for its immense biodiversity, which is considered as a source for the discovery of new molecules of pharmacological interest. In this field of research, the genus *Aniba* (*Lauraceae*) has wide variability and abundance. *Aniba* species are chemically described with the presence of alkaloids, flavonoids, terpenoids, pyrans and lignans. In this context, it is proposed the isolation and identification of the biomarkers of extracts of the species *A. panurensis*, *A. parviflora*, *A. ferrea* and *A. roseadora*, aiming to develop a method for the rapid characterization of the extracts of species of *Aniba* (*Lauraceae*), besides describing its biological activities. To achieve these objectives, ethanolic extracts (branches and leaves) were prepared by maceration, and these were partitioned. By means of classical chromatographic methods (TLC) and by spectrometric techniques (MS), the chemical characterization of hexane and methanolic fractions was carried out. Thus, the major ions of m/z 300, 328 and 330 were detected, which, by comparing the fragmentation data with the literature, correspond to the alkaloids: *N*-methylcocclaurine, isoboldine, laurotetanine and reticuline; in addition to these ions, the ions of m/z 283, 311 and 863, which may be associated with flavonoids: izalpinine, 3, 5, 7-tri-*O*-methylgalangine and procyanidin trimer were detected in the negative mode by ESI ionization. The fractionation to obtain the major components was developed by the use of classical chromatographic techniques, such as CC and TLCP, thus resulting in the obtaining of 6 substances, which were elucidated by the union of spectroscopic and spectrometric techniques such as: MS and NMR (^1H and ^{13}C uni and bidimensional). Thus, styrylpyrones were identified: 5,6-dehydrokawaine, 4-methoxy-11,12-methylenedioxy-6-*trans*-styryl-pyran-2-one and rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-methoxy-8-(11,12-dimethoxyphenyl)-7-[6-(4-methoxy-2-pyranyl)-6-(*E*)-styryl-1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en -2'-one (*A. panurensis*), the pyridine alkaloid: anibine (*A. roseadora*) and the kawalactones: tetrahydroyangonine and dihydrometisticina (*A. parviflora*). Aiming to analyze the antimicrobial potential of extracts, fractions and isolated substances, the antibacterial and antiparasitic tests were carried out. Good results for extracts and fractions of *A. panurensis* with MICs of 7.8 and 15.62 $\mu\text{g/mL}$ were compared to three gram-positive bacteria (*Staphylococcus simulans*, *S. aureus* and methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA)). In the antiplasmodic test against *Plasmodium falciparum*, good results were obtained for the ethanolic extracts of *A. parviflora* and *A. panurensis*, with a better result of $\text{IC}_{50} = 29.03 \mu\text{g/mL}$ for the leaves extract of *A. parviflora*; and positive results for two isolated substances, with $\text{IC}_{50} = 36.16 \mu\text{g/mL}$ for 4-methoxy-11,12-methylenedioxy-6-*trans*-styryl-pyran-2-one and $\text{IC}_{50} = 24.10 \mu\text{g/mL}$ for rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-methoxy-8-(11,12-dimethoxyphenyl)-7-[6-(4-methoxy-2-pyranyl)-6-(*E*)-styryl-1'-oxabicyclo[4,2,0]octa-4'-en-2'-one. The results confirm the presence of alkaloids, flavonoids and pyrans in the species of *Aniba*, in addition to describing a HPTLC method for rapid detection of these isolated standards and reporting the antimicrobial potential of extracts, fractions and isolated substances.

Keywords: *Aniba*; pyrans; alkaloids; antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica da família <i>Lauraceae</i> . FONTE: Missouri Botanical Garden.	4
Figura 2 - Estrutura química do linalol.	6
Figura 3 - Classes de alcaloides de <i>Lauraceae</i>	10
Figura 4 - Alcaloides descritos para o gênero <i>Aniba</i>	12
Figura 5 - Alguns antioxidantes conhecidos.	14
Figura 6 - Estruturas básicas dos diferentes esqueletos de flavonoides.	15
Figura 7 - Flavonoides descritos para o gênero <i>Aniba</i>	17
Figura 8 - Lignoides descritos para o gênero <i>Aniba</i>	19
Figura 9 - Estirilpironas descritos para o gênero <i>Aniba</i>	22
Figura 10 - Exemplos de antibacterianos derivados de produtos naturais.	23
Figura 11 - Exemplos de antibacterianos derivados de diferentes classes químicas.....	25
Figura 12 - Fluxograma da parte I do projeto visando a caracterização química.....	34
Figura 13 - Fluxograma da parte II do projeto visando o isolamento dos padrões.	37
Figura 14 - Fluxograma correspondente ao fracionamento da fração DCM dos galhos de <i>A. panurensis</i>	40
Figura 15 - Placas das frações hexânicas da partição em microescala.	55
Figura 16 - Placas das frações metanólicas da partição em microescala.	58
Figura 17 - Proposta de fragmentação do íon m/z 330. Fonte: Schimidt et al., 2005.....	68
Figura 18 - Moléculas com m/z 300: a) a <i>N</i> -metilcocclaurina, b) (R)-(+)-noranicanina e c) (+)-canellilina.....	68
Figura 19 - Proposta de fragmentação do íon de m/z 300. Fonte: Schimidt et al., 2005.....	69
Figura 20 - Estruturas químicas da isoboldina (a) e da laurotetanina (b).....	70
Figura 21 - Proposta de fragmentação do íon de m/z 328. Fonte: Stévigny et al., 2003.	70
Figura 22 - Estruturas correlacionadas com os íons de m/z 283 e 311.....	78
Figura 23 - Proposta de fragmentação do íon 283.....	79

Figura 24 - Análise cromatográfica das frações de <i>A. panurensis</i> e <i>A. roseadora</i> das partições em larga escala.....	85
Figura 25 - Análise cromatográfica das frações de <i>A. ferrea</i> e <i>A. parviflora</i> das partições em larga escala	86
Figura 26 - Placas da coluna em fase normal de galhos de <i>A. panurensis</i>	87
Figura 27 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da substância 1.	88
Figura 28 - Espectros de RMN de ^1H da substância 1 e as ampliações das áreas.	90
Figura 29 - Mapa de contornos de COSY com ampliações da área de acoplamento dos hidrogênios da substância 1.....	90
Figura 30 - Espectros de RMN de ^{13}C da substância 1.	91
Figura 31 - Espectros de DEPT da substância 1.....	91
Figura 32 - Ampliações de três regiões do mapa de contornos de HMBC da substância 1....	92
Figura 33 - Estrutura da substância 1 com as correlações de HMBC.	93
Figura 34 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da substância 2.	96
Figura 35 - Espectros de RMN de ^1H da substância 2 e as ampliações das áreas.	97
Figura 36 - Mapa de contornos de COSY com ampliações da área de acoplamento dos hidrogênios da substância 2.....	97
Figura 37 - Espectros de RMN de ^{13}C da substância 2.	98
Figura 38 - Espectros de DEPT da substância 2.....	98
Figura 39 - Ampliações de duas regiões do mapa de contornos de HMBC da substância 2. .	99
Figura 40 - Estrutura da substância 2 com as correlações de HMBC.	100
Figura 41 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da substância 3.	102
Figura 42 - Perfil espectrométrico das frações metanólicas da espécie <i>A. panurensis</i> por meio de ionização APCI (a) folhas e b) galhos) e ESI (c) folhas e d) galhos) no modo positivo de ionização.....	103
Figura 43 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da substância 1 (vermelho) com a substância 3 (azul).	104
Figura 44 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da substância 3.....	105
Figura 45 - Mapa de contornos de COSY com ampliação da substância 3.	105

Figura 46 - Estrutura química da substância 3.	106
Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3.	107
Figura 48 - Estrutura da substância 3 com as correlações de HMBC.	109
Figura 49 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da substância 4.	111
Figura 50 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da substância 4.	113
Figura 51 - Mapa de contornos de COSY com ampliações da área de acoplamento dos hidrogênios da substância 4.	113
Figura 52 - Espectros de RMN de ^{13}C da substância 4.	114
Figura 53 - Espectros de DEPT da substância 4.	114
Figura 54 - Estrutura da substância 4 com as correlações de HMBC.	115
Figura 55 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da mistura das substâncias 5 e 6.	118
Figura 56 - Cromatograma da mistura das substâncias 5 e 6.	119
Figura 57 - Espectros de absorção de ultravioleta da mistura das substâncias 5 e 6. a) tempo de retenção 9,5 min e b) tempo de retenção 9,9 min.	119
Figura 58 - Perfil espectrométrico das frações metanólicas da espécie <i>A. parviflora</i> por meio de ionização APCI (a) folhas e b) galhos) e ESI (c) folhas e d) galhos) no modo positivo de ionização.	120
Figura 59 - Perfil cromatográfico em placa de HPTLC das frações em hexano de folhas e galhos de <i>A. parviflora</i>	121
Figura 60 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da mistura das substâncias 5 e 6.	122
Figura 61 - Mapa de contornos de COSY com ampliação da mistura das substâncias 5 e 6.	123
Figura 62 - Espectros de RMN de ^{13}C da mistura das substâncias 5 e 6.	124
Figura 63 - Espectros de DEPT da mistura das substâncias 5 e 6.	125
Figura 64 - Estruturas das substâncias 5 (a) tetraidroyangonina) e 6 (b) dihidrometisticina) com as correlações de HMBC.	125
Figura 65 - Placa correspondente ao método para detecção das substâncias isoladas nas frações em DCM.	133

Figura 66 - Placa correspondente ao método para detecção das substâncias isoladas nos extratos em EtOH.	134
Figura 67 - Representação esquemática do perfil cromatográfico por faixa de r_f 's.	137
Figura 68 - Análise cromatográfica das frações em diclorometano das espécies de <i>Aniba</i> ..	138
Figura 69 - Análise cromatográfica das frações em diclorometano das espécies de <i>Aniba</i> ..	139
Figura 70 -Antibiogramas das amostras de <i>A. panurensis</i> bioativas contra bactérias gram-positivas. Amostras: 1) extrato em etanol de folhas; 2) extrato em etanol de galhos; 3) fração em hexano de folhas; 4) fração em diclorometano de folhas; 5) fração em hexano de galhos e 6) fração em diclorometano de folhas.	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividades biológicas para diferentes espécies de <i>Aniba</i>	7
Tabela 2 - Atividades farmacológicas relatadas em estudos do grupo Q-BiomA para espécies de <i>Aniba</i>	9
Tabela 3 - Metabólitos de <i>Lauraceae</i> com atividade antimicrobiana.....	27
Tabela 4 - Dados das espécies coletadas.	35
Tabela 5 - Massas de material vegetal utilizadas nas extrações.	35
Tabela 6 - Lista das cepas bacterianas gram-positivas.	44
Tabela 7 - Lista das cepas bacterianas gram-negativas.	44
Tabela 8 - Rendimento dos extratos.	51
Tabela 9 - Rendimento em massa e porcentagem das frações da partição em microescala com 500 mg de extrato.	51
Tabela 10 - Dados espectrométricos obtidos das espécies de <i>Aniba</i> em comparação com dados de alcaloides da literatura.	65
Tabela 11 - Dados espectrométricos de fragmentação (m/z e m/z^2) dos principais íons detectados nas espécies de <i>Aniba</i>	66
Tabela 12 - Dados espectrométricos obtidos das espécies de <i>Aniba</i> em comparação com dados dos flavonoides da literatura.....	76
Tabela 13 - Dados espectrométricos de fragmentação (m/z) dos principais íons detectados nas espécies de <i>Aniba</i>	77
Tabela 14 - Rendimento das frações da partição com massa de 6 g de extrato.....	81
Tabela 15 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Itokawa et al., 1981) de RMN de ^1H , ^{13}C e HMBC da substância 1.	94
Tabela 16 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (^a McCracken et al., 2012 e ^b Adam et al., 1994) de RMN de ^1H , ^{13}C e de HMBC da substância 2.	101
Tabela 17 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Rossi et al.,1997) de RMN de ^1H , ^{13}C e de HMBC da substância 3.	110
Tabela 18 – Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Dhavale et al., 1989) de RMN de ^1H , ^{13}C e de HMBC da substância 4.....	116
Tabela 19 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Dharmaratne et al., 2002) de RMN de ^1H , ^{13}C e de HMBC da substância 5.	127

Tabela 20 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Dharmaratne et al., 2002) de RMN de ^1H , ^{13}C e de HMBC da substância 6.	128
Tabela 21 - Média dos halos de inibição (mm) de amostras de folhas de <i>A. panurensis</i> frente às bactérias <i>B. subtilis</i> , <i>S. simulans</i> , <i>S. aureus</i> e MRSA. Legenda: 10 a 15 mm (pouca atividade); 15 a 20 mm (moderada atividade) e acima de 20 mm (boa atividade). NR- Não realizado ..	142
Tabela 22 - Concentração Inibitória Mínima dos extratos e frações de <i>A. panurensis</i> frente às bactérias <i>S. simulans</i> , <i>S. aureus</i> e MRSA. Legenda: Acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (inativo); 500-1000 $\mu\text{g/mL}$ (fraca atividade), 100-500 $\mu\text{g/mL}$ (moderada atividade) e abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$ (boa atividade).	144
Tabela 23 - Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos de <i>A. panurensis</i> , <i>A. parviflora</i> e das substâncias isoladas, frente a <i>Plasmodium falciparum</i>	147

LISTA DE UNIDADES, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

µg - Micrograma

µm - Micrometro

mL - Mililitro

µL - Microlitro

µM - Micromolar

mg - Miligramas

g - Gramas

Kg - Quilogramas

°C - Grau Celsius

min - Minutos

h - Horas

% - Porcentagem

rf - Fator de Retenção

Da - Dalton

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

ABTS - 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)

HEX - Hexano

DCM - Diclorometano

CHCl₃ - Clorofórmio

AcOEt - Acetato de Etila

MeOH - Metanol

EtOH - Etanol

DMSO - Dimetilsulfóxido

FIOCRUZ – AM - Fundação Oswaldo Cruz do Amazonas

Q-BiomA - Química de Biomoléculas da Amazônia

INPA - Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas

CC - Cromatografia em Coluna

CG - Cromatografia a Gás

CCF - Cromatografia em Coluna Flash

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CCFN - Cromatografia em Coluna de Fase Normal

CLMP - Cromatografia Líquida de Média Pressão

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

CCCAE - Cromatografia Contracorrente de Alta Eficiência

CCDP - Cromatografia em Camada Delgada Preparativa

CCDAE - Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

UV-VIS - Ultravioleta Visível

DAD - Detector de Arranjo Diodos

EM - Espectrometria de Massas

m/z - Razão massa e carga

ESI – *Eletrospray Ionization*

APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

ddp - diferença de potencial

RMN ^1H - Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN ^{13}C - Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

DEPT - *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

COSY - *Homonuclear Correlation Spectroscopy*

HMQC - *Heteronuclear Multiple Quantum Coherence*

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Coherence*

Hz - Hertz

δ - deslocamento químico

s - singleto

d - dubleto

ddd - duplo duplo dubleto

m - multiplete

J – constante de acoplamento

NP-PEG – difenilboriloxietilamina - polietilenoglicol

CIM - Concentração Inibitória Mínima

CI_{50%} - Concentração Inibitória de 50 %

KOH – Hidróxido de potássio

SiO₂ - Dióxido de silício

Al₂O₃ - Óxido de alumínio

PTFE - Politetrafluoretileno

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo geral.....	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	4
3.1 A Família <i>Lauraceae</i> Jussieu.....	4
3.2 Gênero <i>Aniba</i> Aublet	6
3.3 Alcaloides de <i>Aniba</i>	9
3.4 Flavonoides de <i>Aniba</i>	13
3.5 Lignoides de <i>Aniba</i>	18
3.5 Estirilpironas de <i>Aniba</i>	20
3.6 Atividades Biológicas	23
3.6.1 Atividade antimicrobiana	23
3.6.1.1 Atividade antimicrobiana em metabólitos de <i>Lauraceae</i>	26
3.7 Técnicas cromatográficas clássicas e modernas	28
3.8.1 Técnicas espectroscópicas	30
3.8.1.1 Espectroscopia no Ultravioleta Visível	30
3.8.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	31
3.8.2 Técnicas espectrométricas	32
3.8.2.1 Espectrometria de Massas	32
4 METODOLOGIA.....	34
4.1 PARTE I – Caracterização química.....	34
4.1.1 Material vegetal.....	34
4.1.2 Preparação dos extratos.....	35
4.1.3 Partição líquido-líquido em microescala.....	36
4.1.4 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência	36
4.1.5 Espectrometria de Massas	36
4.2 PARTE II e III - Obtenção e identificação dos padrões	37
4.2.1 Partição líquido-líquido em larga escala	38
4.2.2 Fracionamento e isolamento dos padrões.....	38
4.2.2.1 Fracionamento e isolamento dos metabolitos de <i>A. panurensis</i> (galhos)	39

4.2.2.2 Fracionamento e isolamento dos metabolitos de <i>A. roseadora</i> (galhos).....	40
4.2.2.3 Fracionamento e isolamento dos metabolitos de <i>A. parviflora</i> (galhos).....	41
4.2.3 Identificação dos Padrões	41
4.2.3.1 Espectrometria de Massas	41
4.2.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	42
4.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	42
4.3 PARTE IV – Desenvolvimento do método cromatográfico	43
4.4 PARTE V – Ensaios antimicrobianos	43
4.4.1 Ensaio antibacteriano - Teste de difusão em ágar.....	43
4.4.2 Ensaio antibacteriano - Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	45
4.4.3 Ensaio antiparasitário - Teste antiplasmodico	47
4.4.3.1 Cultura de <i>Plasmodium falciparum</i>	47
4.4.3.2 Análise de inibição de crescimento	47
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1 PARTE I – Caracterização química	50
5.1.1 Rendimentos Extratos	50
5.1.2 Partição líquido-líquido em microescala.....	51
5.1.3 Caracterização do perfil cromatográfico das espécies de <i>Aniba</i>	52
5.1.3.1 Análise das frações hexânicas	52
5.1.3.2 Análise das frações metanólicas.....	56
5.1.4 Caracterização do perfil espectrométrico das espécies de <i>Aniba</i>	59
5.1.4.1 Perfil alcaloídico	59
5.1.4.1.1 Proposta de fragmentação dos principais alcaloides detectados	66
5.1.4.2 Perfil flavonoídico.....	71
5.1.4.2.1 Proposta de fragmentação dos principais flavonoides detectados	77
5.2 PARTE II E III – Obtenção e identificação dos padrões	80
5.2.1 Partição líquido-líquido larga escala	80
5.2.2 Fracionamento e isolamento de <i>Aniba panurensis</i> (galhos).....	87
5.2.2.1 Substância 1.....	88
5.2.2.2 Substância 2.....	95
5.2.2.3 Substância 3.....	102
5.2.3 Fracionamento e isolamento de <i>Aniba roseadora</i> (galhos).....	111
5.2.3.1 Substância 4.....	111

5.2.4 Fracionamento e isolamento de <i>Aniba parviflora</i> (folhas).....	117
5.2.4.1 Substâncias 5 e 6	117
5.3 PARTE IV - Desenvolvimento dos métodos cromatográficos	129
5.3.1 Placas comparativas das frações em DCM	135
5.5 PARTE V - Atividades antimicrobianas.....	140
5.5.1 Ensaio antibacteriano - Teste de difusão em ágar	140
5.5.2 Ensaio antibacteriano - Teste de concentração inibitória mínima (CIM)	144
5.5.3 Ensaio antiparasitário - Teste antiplasmódico.....	146
6 CONCLUSÃO	149
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	152
ANEXOS	163

1. INTRODUÇÃO

O Brasil destaca-se mundialmente por apresentar uma imensa biodiversidade. Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são considerados fontes com potencial para a descoberta de substâncias ativas de interesse farmacológico (BARREIRO et al., 2009). Dentre essa riqueza, têm-se a família *Lauraceae*, que apresenta relatos de uma rica composição química de moléculas bioativas. *Lauraceae* dispõe de uma distribuição pantropical, possuindo cerca de 400 espécies distribuídas em 25 gêneros no Brasil. (BARROSO et al., 2002). É uma família que possui grande importância econômica, apresentando diversificados usos, como por exemplo, na culinária, em marcenaria, na construção civil, na fábrica de papel, na indústria de perfumaria, na indústria química e na medicina popular (MARQUES, 2001).

O gênero *Aniba* possui predominância no território brasileiro contendo cerca de 40 espécies, sendo que esse gênero apresenta um total de 41 espécies com distribuição restrita aos neotrópicos. No Brasil, as espécies de *Aniba* são abundantes na Região Amazônica (RICHTER, 1981). Essas espécies caracterizam-se por serem grandes fornecedoras de óleos voláteis, utilizados nas indústrias farmacêuticas de perfumes, como por exemplo, o óleo obtido a partir de *A. roseadora*, que tem como constituinte majoritário o álcool terpênico linalol, amplamente utilizado em fragrâncias de perfumes (RIZZINI e MORS, 1995; MARQUES, 2001; FIDELIS et al., 2012). Diversos constituintes químicos podem ser encontrados nas espécies pertencentes a *Aniba*, tais como: alcaloides, flavonoides, pironas, lignanas e terpenos.

Algumas atividades importantes já foram descritas para esse gênero, demonstrando o potencial para atividade anticâncer de pele do óleo essencial de *A. roseadora* (SOEUR et al., 2011), atividade antimicrobiana e antidepressiva para os alcaloides de *A. riparia* (BARBOSA et al., 1988; TEXEIRA et al., 2013), atividade anticâncer de ovário de um alcaloide isolado de

A. panurensis (ZHANG et al., 2012), atividade vasodilatadora de uma pirona isolada de *A. panurensis* (REZENDE et al., 2015), entre outras.

O grupo de pesquisa Q-BiomA (Química de Biomoléculas da Amazônia) da UFAM (Universidade Federal do Amazonas) há mais de seis anos vem desenvolvendo pesquisas com espécies de *Lauraceae*, na qual foram realizados estudos da caracterização de perfil químico e varredura de atividades químicas/biológicas de extratos e frações. A partir desses estudos foram observados potenciais para as espécies do gênero *Aniba* (*A. panurensis*, *A. parviflora*, *A. ferrea* e *A. roseadora*), que estão associadas as atividades: antioxidante, citotóxica, antimicrobiana e antiprotozoaria.

Estudos sobre os marcadores químicos desses extratos bioativos de *Aniba* apresentam importância para identificação das substâncias que estão relacionadas a essas atividades. Apesar dos extratos de *Aniba* possuírem uma composição rica em alcaloides, a partir dos resultados de trabalhos anteriores foi observado que as frações alcaloídicas foram menos ativas do que os extratos em ensaios de citotoxicidade e contra tripanosomatídeos. Assim, evidenciando a necessidade de isolamento e caracterização química dos extratos, para proporcionar a continuidade da investigação das atividades biológicas com isolados e testar o efeito sinérgico.

Considerando a abundância das espécies do gênero *Aniba*, e os excelentes resultados de caracterização do perfil químico e atividades química/biológicas pronunciadas em trabalhos anteriores do grupo Q-BiomA, propõe-se o isolamento e a identificação dos biomarcadores dos extratos farmacologicamente ativos das espécies *A. panurensis*, *A. parviflora*, *A. ferrea* e *A. roseadora* (*Lauraceae*), visando obter um banco de padrões para caracterização química das espécies, além de descrever suas atividades antimicrobianas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método para rápida caracterização dos extratos farmacologicamente ativos de espécies de *Aniba* (*Lauraceae*), além de descrever suas atividades biológicas.

2.2 Objetivos específicos

- i. Caracterizar o perfil químico dos extratos etanólicos de quatro espécies de *Aniba* por métodos espectrométricos e cromatográficos.
- ii. Isolar os marcadores químicos por métodos cromatográficos clássicos e modernos, como CC, CLMP, CLAE e CCCAE.
- iii. Identificar as estruturas químicas das substâncias majoritárias dos extratos por meio de técnicas espectrométricas e espectroscópicas, como EM e RMN de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional.
- iv. Desenvolver um método cromatográfico utilizando padrões isolados das espécies de *Aniba*.
- v. Descrever as atividades antimicrobianas dos extratos, frações e das substâncias purificadas.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 A Família *Lauraceae* Jussieu

A família botânica *Lauraceae* possui uma distribuição pantropical sendo bem representada na América, Ásia Tropical, Austrália, Madagascar e África sub-saariana, como pode ser observado na figura 1. Esta família apresenta cerca de 50 gêneros e 2.500 espécies, contendo cerca de 29 gêneros e 900 espécies nas Américas. No Brasil podem ser encontradas cerca de 400 espécies (corresponde a 16% do total de espécies), distribuídas em 25 gêneros. (ROHWER, 1993; BARROSO et al., 2002).



Figura 1 - Mapa da distribuição geográfica da família *Lauraceae*. FONTE: Missouri Botanical Garden.

Os 25 gêneros de *Lauraceae* relatados como nativos do Brasil são: *Aiouea*, *Anaueria*, *Aniba*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Cryptocaria*, *Dicypellium*, *Endlicheria*, *Kubitzkia*, *Licaria*, *Mezilaurus*, *Misanteca*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Paraia*, *Persea*, *Phoebe*, *Phyllostemonodaphne*, *Pleurothyrium*, *Rhodostemonodaphne*, *Sextonia*, *Systemonodaphne*, *Urbanodendron* e *Williamdendron*. Os gêneros *Laurus* e *Litsea*, que não são nativos, foram cultivados no Brasil devido à sua importância econômica (SOUZA e LORENZI, 2005).

Na Reserva Florestal Ducke, que está localizada a 25 km de Manaus-AM, foram encontradas 99 espécies, pertencentes a 13 gêneros, como: *Ocotea* (41 espécies), *Licaria* (15 espécies), *Aniba* (13 espécies), *Endlicheria* (11 espécies), *Rhodostemonodaphne* (8 espécies), *Aiouea* (3 espécies) e *Mezilaurus* (3 espécies). Os demais gêneros são representados por apenas uma espécie. (RIBEIRO et al., 1999).

Lauraceae é considerada uma das famílias botânicas mais representativas, que tem se destacado por sua importância econômica, quando comparada com as outras famílias. Algumas espécies possuem uso industrial, porém, a maior parte da sua utilização está restrita ao conhecimento popular. As espécies de *Lauraceae* apresentam grandes diversidade de usos, como por exemplo, na culinária, em marcenaria, na construção civil, na fábrica de papel, nas indústrias de perfumaria e química, e na medicina popular, assim destacando as espécies correspondentes aos gêneros: *Ocotea*, *Aniba* e *Nectandra*, que possuem as maiores quantidades de espécies utilizadas (MARQUES, 2001).

Segundo a revisão de Marques (2001), as espécies que desempenham importante função na culinária são: o abacate (*Persea gratissima* L.), as canelas (*Cinnamomum seylanicum* Breyne e *C. cassia* (Nees)) e o louro (*Laurus nobilis* L.). O gênero *Ocotea* Aubl. tem destaque no fornecimento de madeiras para as mais diversas finalidades, como, por exemplo, na produção de papel (*O. puberula* Nees), na carpintaria (*O. diospyrifolia* (Mez)), na construção civil (*O. acutifolia* Mez, *O. aciphylla* (Nees) Mez, *O. catharinensis* Mez), marcenaria (*O. canaliculata* (Rich.)), entre outros. As espécies aromáticas diferenciam-se economicamente por estarem relacionadas aos maiores valores de mercado, sendo importante destacar as espécies do gênero *Aniba* usadas na perfumaria, como: *A. roseadora* Ducke, *A. canellila* (H.B.K.) Mez e *A. parviflora* (Meissn) Mez. Outras espécies dessa família que são importantes produtoras de óleos são: *Cinnamomum camphora* (L.) Presl., usada na medicina popular, e *Sassafras albidum* Nutt., muito utilizada na indústria farmacêutica, em perfumaria e também na indústria química.

O potencial econômico das espécies da família *Lauraceae* é descrito há muito tempo, e pode ser evidenciado pela exploração da espécie *Aniba roseadora* Ducke, conhecida por ser produtora de um óleo essencial com componente majoritário correspondente ao álcool terpênico linalol (figura 2), que é utilizado na indústria de perfumes. O óleo essencial de pau-rosa já foi relatado em terceiro lugar na pauta de exportação da Região Amazônica, com a borracha em primeiro e a castanha-do-Brasil em segundo lugar. Esta exploração demasiada para produção de óleo essencial fez com que essa espécie fosse levada próxima a extinção (MARQUES, 2001).

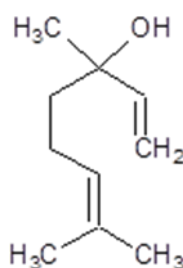


Figura 2 - Estrutura química do linalol.

Lauraceae caracteriza-se quimicamente por apresentar terpenos, flavonoides, lignoides e neolignanais, alcaloides e pironas, além de sesquiterpenos e monoterpenos em seus óleos essenciais (BARBOSA FILHO et al., 1999; GIANG et al., 2006; GARCEZ et al., 2005; GARCEZ et al., 1995; GARCEZ et al., 2011; GOTTLIEB e YOSHIDA, 1978). Na revisão de Custódio e Veiga Junior (2014) sobre alcaloides de *Lauraceae* foi relatada uma ampla variedade desses compostos já descritos na literatura, com mais de 300 estruturas de 21 gêneros de *Lauraceae*, em que se destacam os alcaloides isoquinolínicos.

3.2 Gênero *Aniba* Aublet

Segundo Richter (1981), o gênero *Aniba* foi determinado por Aublet (1775), com base em uma única espécie *A. guianensis*. Esse gênero possui distribuição limitada aos neotrópicos e compreende cerca de 41 espécies de árvores de pequeno à grande porte. A distribuição dessas espécies ocorre na Amazônia Central e regiões da Guiana, com espécies individuais difundidas para os Andes, norte da Venezuela, Pequenas Antilhas e do leste ao sul do Brasil. No Brasil, é

possível encontrar cerca de 40 espécies, sendo abundante em toda a Região Amazônica, muitas dessas são utilizadas na indústria madeireira.

Segundo relatos da literatura, as espécies do gênero *Aniba* apresentam atividades farmacológicas (tabela 1), tais como o efeito sedativo, atividade contra nematóides, efeito ansiolítico, antiespasmódico, larvicida, antimicrobiano e atividade antifúngica.

Espécies	Atividades biológicas	Referência
<i>A. canelila</i> , <i>A. duckei</i> e <i>A. hastmanniana</i>	Contra nematóides	Goulart (1975)
<i>A. riparia</i>	Antimicrobiana Efeito ansiolítico	Barbosa (1988) Melo (2006)
<i>A. canellila</i>	Antiespasmódica	Maia (2003)
<i>A. roseadora</i>	Antifúngica Efeito sedativo	Simic (2004) Almeida (2009)
<i>A. duckei</i>	Larvicida	Souza (2007)

Tabela 1 - Atividades biológicas para diferentes espécies de *Aniba*.

Na dissertação de mestrado de Alcântara (2009) os extratos de *A. panurensis* foram relatados com atividades: antioxidante, inibição de acetilcolinesterase e antiparasitária. Nesse contexto, os extratos de folhas e galhos da espécie *A. panurensis* foram ativos para atividade antioxidante frente ao radical de DPPH quando comparadas com o padrão quercetina (2,85 µg/mL) nas concentrações de 14,37 e 27,59 µg/mL, respectivamente. Ambos os extratos de folhas e galhos de *A. panurensis* geraram resultados de atividade inibidora de acetilcolinesterase, com valores superiores a 50%, quando comparados com o padrão eserina. Outro resultado significativo obtido para o extrato das folhas de *A. panurensis* foram atividades contra *Leishmania amazonensis* (67 µg/mL) e *Trypanosoma cruzi* (79 µg/mL).

A dissertação de Souza (2014) relata o potencial antioxidante e citotóxico para extratos de *Aniba*. Nos ensaios de atividade antioxidante, os extratos mais ativos foram os dos galhos de *A. ferrea* (12,18 µg/mL) e *A. parviflora* (14,09 µg/mL) frente ao radical de DPPH comparado com o padrão quercetina (6,66 µg/mL) e os extratos de galhos de *A. panurensis* (11,05 µg/mL) e *A. ferrea* (14,14 µg/mL) frente ao radical de ABTS utilizando o padrão ácido gálico (8,95

µg/mL). Nesse estudo, destacou-se o elevado potencial citotóxico dos extratos dos galhos de *A. panurensis*, apresentando alta atividade para células tumorais de cólon-humano (89,98%), mama-humano (91,28%), fibroblastos de pulmão humano (94,65%) e adenocarcinoma gástrico (86,61%).

O estudo de Bastos (2015) realizado na FIOCRUZ-AM em parceria com o grupo Q-BiomA, descreve as atividades antimicrobianas dos extratos e frações de *A. panurensis*, *A. ferrea*, *A. parviflora* e *A. guianensis* frente a 13 bactérias gram-positivas e 22 gram-negativas. Essa dissertação aponta excelentes atividades para todas as espécies, destacando-se a espécie *A. panurensis*. Os extratos etanólicos de galhos e folhas de *A. panurensis* foram ativos nas mesmas concentrações para cinco bactérias gram-positivas: *Bacillus subtilis* (65,5 µg/mL), *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (62,5 µg/mL), *Staphylococcus sumulans* (62,5 µg/mL), *Staphylococcus aureus* (250,0 µg/mL) e *Streptococcus agalactiae* (125,0 µg/mL) e uma bactéria gram-negativa: *Acinetobacter baumannii* (250,0 µg/mL).

O estudo de tese de Fernandes (2017) desenvolvidos na UFAM e na UEM (Universidade Estadual de Maringá) relatam atividades de extratos, frações e alcaloides de algumas espécies de *Lauraceae* contra tripanosomatídeos (*Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*), dentre as espécies estudadas as *Aniba*, foram as mais ativas. As espécies de *Aniba* consideradas ativas (valores de $CE_{50} < 50$ µg/mL) frente a tripomastigotas de *T. cruzi* foram correspondentes aos extratos de folhas de *A. ferrea* (15,5 µg/mL), extrato das folhas (11,3 µg/mL) e dos galhos (21,1 µg/mL) de *A. panurensis*. Nos ensaios com promastigotas de *L. amazonensis* foram relatadas boas atividades para os extratos de folhas de *A. parviflora* (15,2 µg/mL), e para os extratos de galhos de *A. panurensis* (13,2 µg/mL) e *A. roseadora* (14,6 µg/mL).

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

(OGER et al., 1992; ADRIANAIVORAVELONA et al., 1999; CAVALCANTE et al., 1982; SAMPAIO et al., 2012; FIDELIS et al., 2012).

Espécies de <i>Aniba</i>	Atividades	Referência
<i>A. panurensis</i>	Antioxidante	Alcântara (2009)
	Inibidora de acetilcolinesterase	
	Antiparasitária (<i>Leishmania amazonensis</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>)	
<i>A. panurensis</i> , <i>A. ferrea</i> e <i>A. parviflora</i>	Antioxidante	Souza (2014)
	Citotóxica	
<i>A. panurensis</i> , <i>A. ferrea</i> e <i>A. parviflora</i>	Antibacteriana	Bastos (2015)
<i>A. panurensis</i> e <i>A. ferrea</i>	Antiparasitária (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	Fernandes (2017)
<i>A. panurensis</i> , <i>A. ferrea</i> , <i>A. parviflora</i> e <i>A. roseadora</i>	Antiparasitária (<i>Leishmania amazonensis</i>)	

Tabela 2 - Atividades farmacológicas relatadas em estudos do grupo Q-BiomA para espécies de *Aniba*.

3.3 Alcaloides de *Aniba*

Os alcaloides são compostos nitrogenados, que podem ser encontrados principalmente em plantas, mas também, em menor quantidade em micro-organismos e animais. Esses compostos contêm um ou mais átomos de nitrogênio, normalmente como aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que lhes proporciona a basicidade. O grau de basicidade dessas moléculas varia de acordo a presença de outros grupos adjacentes ao nitrogênio. Quando o nitrogênio pertence a uma amida, por exemplo, a estabilização da carbonila torna o alcaloide praticamente neutro (DEWICK, 2009).

Os alcaloides podem ser classificados de acordo com sua origem biossintética, ou seja, de acordo com a natureza da estrutura que possui o nitrogênio. Os átomos de nitrogênio dos alcaloides geralmente são derivados de alguns aminoácidos, sendo os principais: *L*-ornitina, *L*-

lisina, ácido *L*-nicotínico, *L*-tirosina, *L*-triptofano, ácido *L*-antranílico e a *L*-histidina. Dessa forma, essas substâncias são classificadas como tendo o núcleo baseado nas estruturas da pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, do indol, entre outras (figura 3) (DEWICK, 2009).

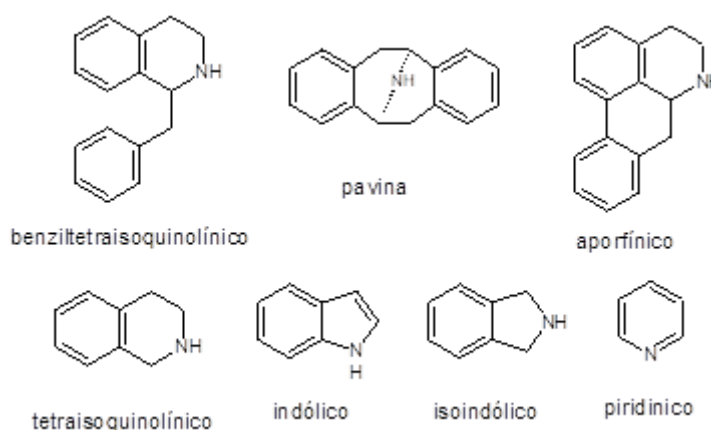


Figura 3- Classes de alcaloides de *Lauraceae*.

Segundo dados da literatura, há relatos de 22 alcaloides (figura 4) pertencentes a 6 classes diferentes (indólicos, piridínicos, indolizidínicos, aporfínicos, benziltetraisoquinolínicos e *N*-benziltiraminas), obtidos a partir de 7 espécies diferentes de *Aniba*. Os alcaloides piridínicos isolados foram: anibina (*A. roseadora*) (1) (MORS et al., 1957) e duckeina (*A. fragrans*) (2) (CORRÊA e GOTTLIEB, 1975). Os compostos representantes dos *N*-benziltiraminas são: riparina I (3), riparina II (4) e riparina III (5) isolados de *A. riparia* (BARBOSA-FILHO et al., 1987). Outros alcaloides descritos foram: anibamina (*A. panurensis*) (6), que é pertencente à subclasse indolizidínico (KLAUSMEYER et al., 2004) e a cecilina (*A. santalodora*) (7), que é um alcaloide do tipo indólico (AGUIAR et al., 1980). Os alcaloides isoquinolínicos relatados para esse gênero corresponderam aos esqueletos: isoboldina (*A. muca*) (8), reticulina (*A. muca* e *A. roseadora*) (9), *N*-metilcocclaurina (*A. muca*) (10) (BRAVO et al., 1996), (*R*)-(+)-noranicanina (11), (-)-norcanelillina (12), (+)-canelillina (13), anicanina (14), canelillinoxina (15), (-) anibacanina (16), (+)-manibacanina (17), (-)-pseudoanibacanina (18), (+)-pseudoanibacanina (19), (-)- α -8-metilpseudoanibacanina (20), (-)- β -8-

metilpseudoanibacarina (21) e (-)- α -8-metilanibacarina (22), isolados de *A. canellila* (OGER et al., 1992; OGER et al., 1993).

Os alcaloides isolados que foram reportados com atividade biológicas correspondem às estruturas da anibina, com atividade analéptica (GONÇALVES et al., 1958); riparina I, riparina II e riparina III, apresentaram atividades antimicrobianas (CATÃO et al., 2005); riparina I, com atividade antinoceceptiva (ARAUJO et al., 2009); riparina II e III, com atividade ansiolítica; riparina III, com atividade antidepressiva (SOUSA et al., 2004; SOUSA et al., 2007; MELO et al., 2006; MELO et al., 2013); e anibamina, com atividade antifúngica (KLAUSMEYER et al., 2004).

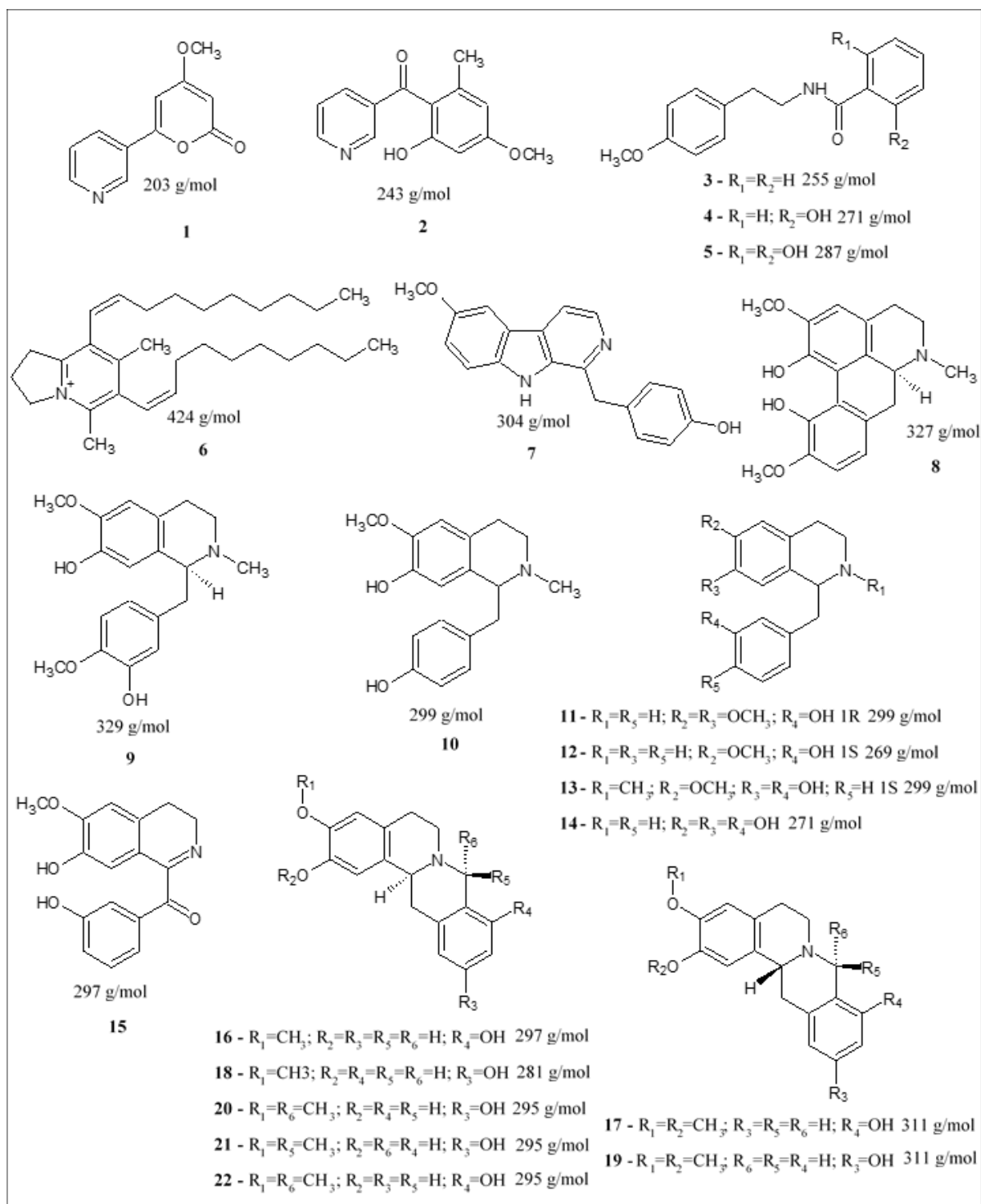


Figura 4 - Alcaloides descritos para o gênero *Aniba*.

3.4 Flavonoides de *Aniba*

Nos últimos anos, os fenólicos tais como os flavonoides têm-se destacado devido ao seu potencial antioxidante, associada à interrupção do processo de formação de radicais livres. Os radicais livres são correlacionados a patologias como, câncer, envelhecimento precoce, e as doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas. Tal potencial deriva da estrutura química do fenol, que tem capacidade de doar um elétron e tornar-se um radical, que é estabilizado pela ressonância do anel aromático (ANGELO e JORGE, 2007; ALVES et al., 2010).

Os radicais livres são definidos como estruturas químicas que possuem um ou mais elétrons não-pareados na última camada eletrônica. Essa configuração eletrônica confere a molécula uma alta instabilidade, reatividade e um tempo de meia-vida muito curto. Os agentes patogênicos reativos não são apenas radicais ($O_2^{\bullet-}$, $\bullet OH$, $NO^{\bullet}$), mas também podem ser neutros ou carregados (H_2O_2 , $ROOH$ e $ONOO^-$) (HALLIWELL, 1994; POMPELLA, 1997).

Os radicais livres estão associados a diferentes funções no organismo, como por exemplo, atuam na produção de energia, fagocitose, regulam o crescimento celular e participam de síntese biológicas essenciais. Essas espécies reativas são fundamentais, porém, quando em excesso no organismo geram sérias patologias, como: câncer, envelhecimento precoce, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas, choque hemorrágico, catarata, disfunções cognitivas, entre outras (ALVES et al., 2010).

Uma estratégia eficaz de defesa contra os radicais livres é a utilização de um antioxidante. O antioxidante é uma substância que em baixas concentrações, em comparação com o substrato oxidável, exerce a função de atrasar ou inibir a oxidação. Alguns exemplos bem conhecidos de antioxidantes são: vitaminas C (20) e E, quercetina (21), rutina, ácido gálico (22), entre outros (ALVES et al., 2010).

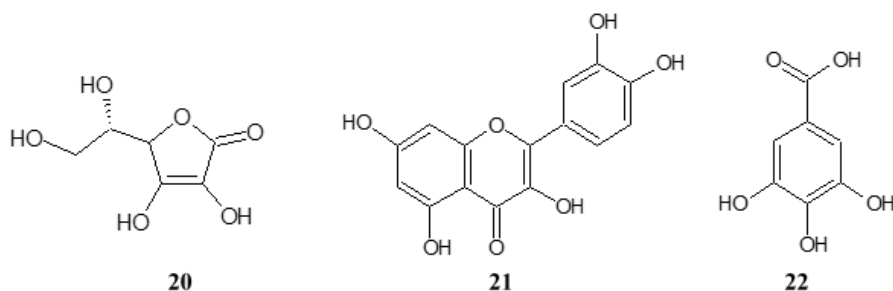


Figura 5 - Alguns antioxidantes conhecidos.

Os antioxidantes desempenham funções de proteção no organismo, que podem ser divididas em níveis de proteção. O primeiro mecanismo impede a formação dos radicais a partir de reações com metais (ferro e cobre), o segundo evita a formação de lesões celulares ao interceptar os radicais, o terceiro mecanismo é através do reparo das lesões causadas por essas moléculas reativas, e o último corresponde a um processo de adaptação do organismo gerando o aumento da produção de enzimas antioxidantes (BIANCHI e ANTUNES, 1999).

Os flavonoides são considerados um dos maiores grupos de metabólitos secundários, apresentando uma estrutura básica composta por 15 átomos de carbono, reunidos em um núcleo tricíclico (C6-C3-C6) ou seja, consistem de um esqueleto de difenil propano, com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirânico (C), como mostra a figura 6. Estas moléculas são subdivididas em: flavonas, flavonóis, chalconas, auronas, flavanonas, flavanas, antocianidinas, leucoantocianidinas, proantocianidinas, isoflavonas e neoflavonoides (DORNAS et al., 2007; DEWICK, 2009; RICE-EVANS et al., 1996).

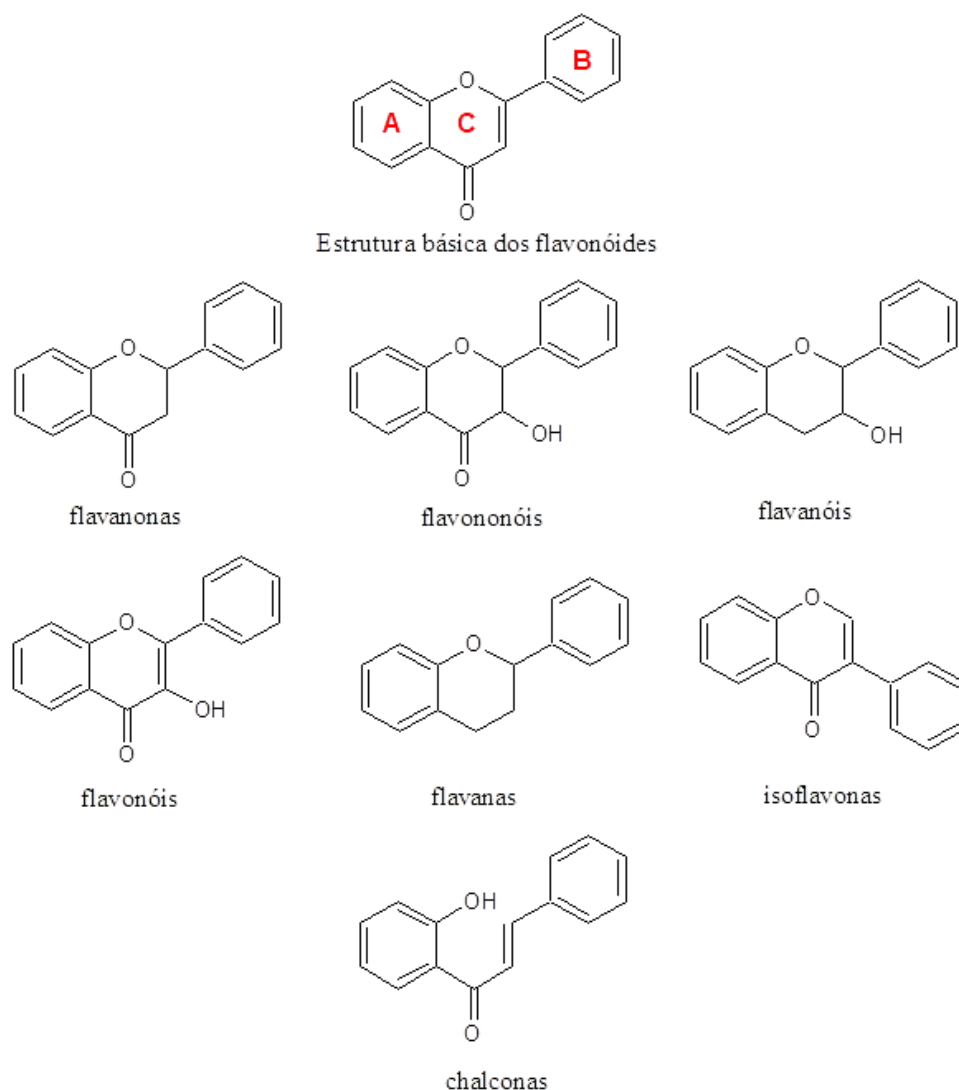


Figura 6 - Estruturas básicas dos diferentes esqueletos de flavonoides.

O anel aromático A da estrutura básica dos flavonoides deriva do ciclo do acetato/malonato, e o anel B é derivado da fenilalanina. As diferentes formas de substituição do anel C proporcionam a divisão dos flavonoides em classes e quando há, substituições de oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação ou sulfação nos anéis A e B, ocorre a formação de diferentes compostos em cada classe (ANGELO e JORGE, 2007).

Os compostos flavonoídicos já descritos para espécies de *Aniba*, correspondem às subclasses: flavanonol, flavana, flavanol, flavanonol, flavanol e chalcona. Dessa forma, pode-se observar as estruturas desse flavonoides na figura 7, que é composta por: (2R, 3R)-2,3-

dihidro-5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (23); (2*R*, 3*R*)-2,3-dihidro-3,5-hidroxi-7-metoxiflavona (24); (2*R*, 3*R*)-2,3-dihidro-3,5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (25); 6,7,3',4',5'-pentametoxiflavona (26); 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona (27); 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (28); 3,5,4'-trihidroxi-7-metoxiflavona (29) (CAVALCANTE et al., 1982; FERNANDES et al., 1978; BARBOSA FILHO et al., 1987); catequina (30); pinocembrina (31); kaempferol-*O*-rutinosídeo (32); kaempferol-*O*-deoxihexose-*O*-deodihexoseshexosídeo (33); procianidina trímero (34); rubranina (35); rhap-(1 → 2)-[Rhap-(1 → 6)]-Galp-(1 → 3)-*O*-Quercetina (36) (COMBES et al., 1970; GALAVERNA et al., 2015).

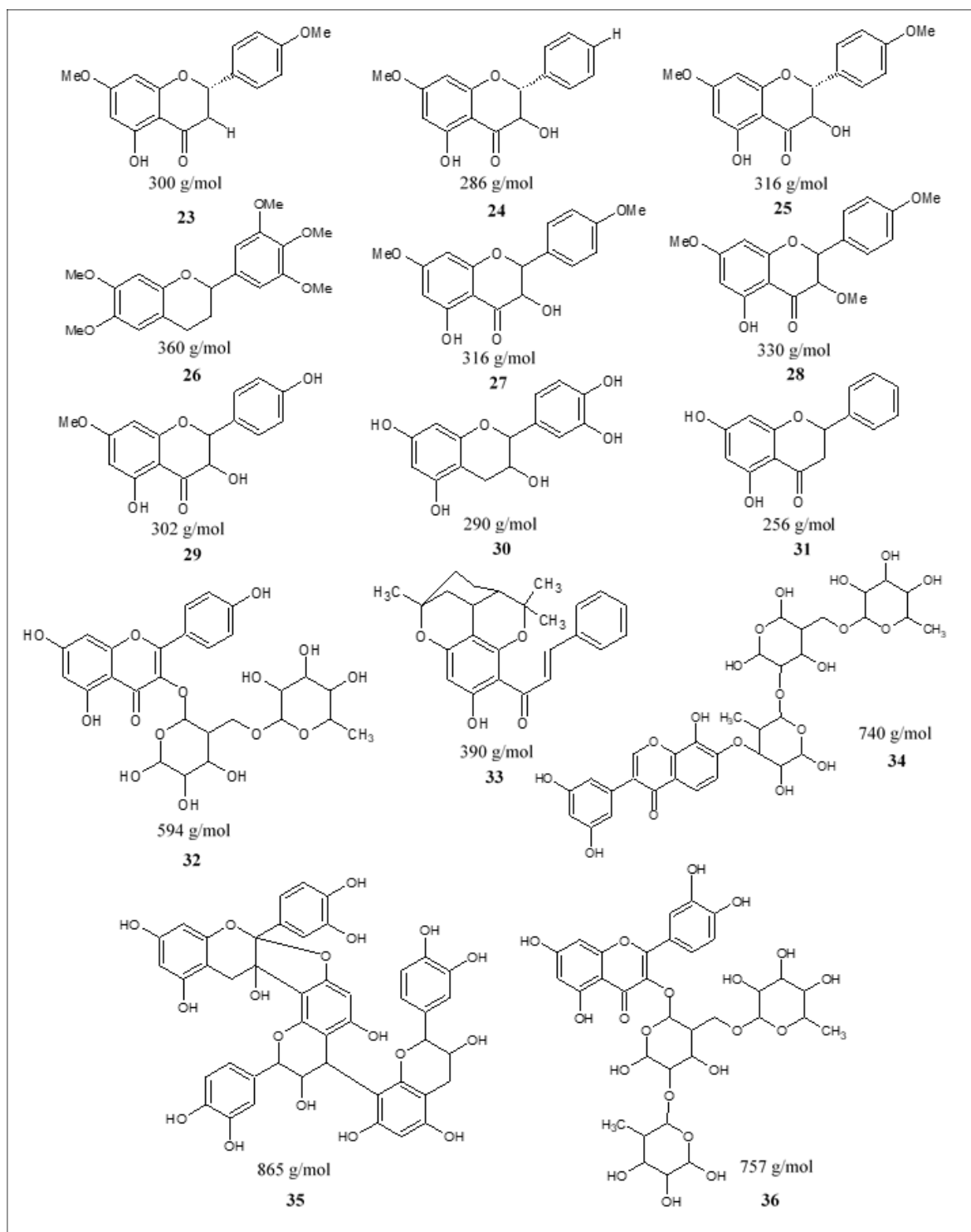


Figura 7 - Flavonoides descritos para o gênero *Aniba*.

3.5 Lignoides de *Aniba*

Os lignoides podem ser encontrados na natureza nas plantas vasculares, que possuem tecido enriquecido por ligninas. As ligninas são macromoléculas formadas por unidades de $(C_6.C_3)_n$, onde n varia de 2 até 500. Lignóide é uma designação para micromoléculas cujo esqueleto é formado exclusivamente, ou adicionalmente a outros grupos, por $(C_6-C_3)_n$, sendo n restrito a poucas unidades, 1, 2, 3, etc. A biossíntese desses compostos envolve metabólitos primários da via metabólica do chiquimato. Subdividem-se em seis grupos: lignanas, neolignanas, alolignanas, norlignanas, oligolignoides e heterolignoides (GOTTLIEB e YOSHIDA, 1984).

No Brasil, o grupo de pesquisa liderado pelo Prof. Gottlieb contribuiu significativamente para o conhecimento da química das neolignanas. A família *Lauraceae* foi a mais estudada principalmente os gêneros *Aniba*, *Licaria*, *Nectandra* e *Ocotea*, com quase duas centenas de substâncias inéditas registradas na literatura. Numa avaliação aproximada, já foram isolados por volta de 700 lignoides, dos quais 390 eram lignanas e 270 neolignanas (BARBOSA FILHO, 2004), que exibem grande diversidade de estruturas químicas.

Algumas moléculas da classe de lignoides (figura 8) que já foram descritas para espécies de *Aniba* foram: burchellina (*A. burchellii*) (37) (LIMA et al., 1972), guianina (*A. guianensis*, *A. affinis*, *A. species* e *A. burchellii*) (38) (BULOW et al., 1973; FERNANDES et al., 1976, ALVARENGA et al., 1977), megafona (*A. megaphylla* Mez.) (39) (KUPCHAN et al., 1978), armenina-C (40), canelina-D (41), canelina-E (*Aniba species*) (42) (TRAVISAN et al., 1984), lancifolina-A (43), lancifolina-C (44), lancifolina-E (45), lancifolina-B (46), lancifolina-D (47), lancifolina-F (48), lancilina (*A. lancifolia*) (49) (DIAZ et al., 1980), eusiderina (50), metoxicanellina-A (*A. species*) (51) (DIAS et al., 1982), rel-(1S,5S,6S,7R,8R)-8-acetoxi-l-alil-

3-hidroxi-5-metoxi-7-metil-4-oxo-6-piperonilbiciclo[3.2.1]oct-2-ano (A. species) (52)

(FERNANDES et al.,1976).

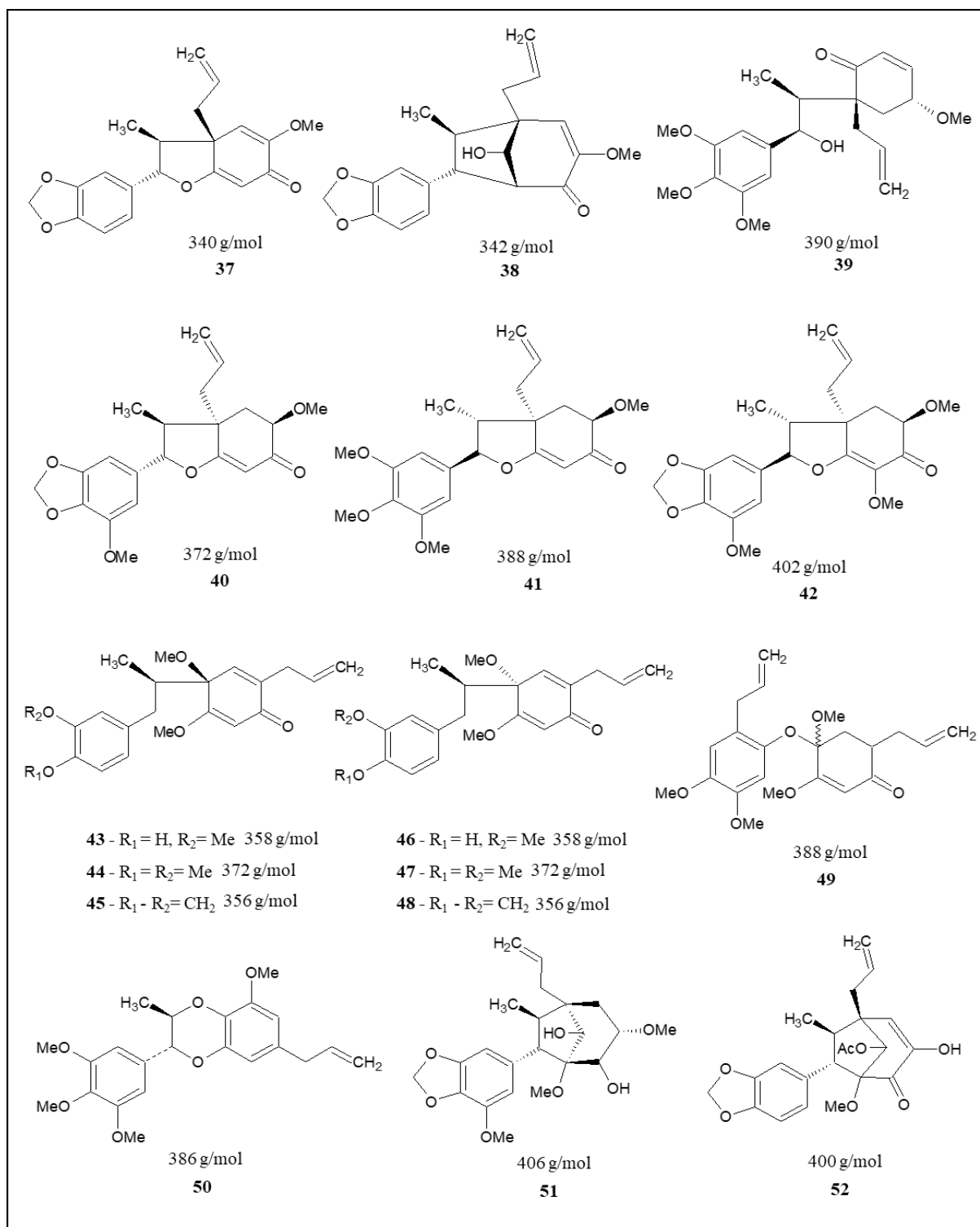


Figura 8 - Lignoides descritos para o gênero *Aniba*.

3.5 Estirilpironas de *Aniba*

As estirilpironas são policetídeos aromáticos, resultantes da combinação entre as rotas biosintéticas do chiquimato com a do acetato. As estirilpironas são formados a partir de uma unidade de cinamoil-CoA com adição de duas unidades extensoras de malonil-CoA. Essas cadeias curtas de poli- β -ceto, são consideradas raras e geralmente ocorre a ciclização dessas cadeias para formar lactonas (DEWICK, 2009).

Segundo alguns estudos quimiotaxonômicos desenvolvidos com espécies de *Aniba*, há uma divisão nesse gênero, devido as características biosintéticas, assim as espécies são divididas em dois grupos, um que produz esterilpironas e outro lignanas (FERREIRA et al., 1980). Além disso, estudos relacionados aos mesmos assuntos, descrevem que as neolignanas em *Aniba* são metabólitos considerados primitivos, enquanto as pironas são consideradas produtos relacionados a evolução das espécies (GOTTLIEB e KUBITZKI, 1981). Outros dados abordados nesses trabalhos, correspondem a forte semelhança química entre as espécies de *Piper* com as de *Aniba*, como por exemplo, na produção algumas moléculas de flavonoides, lignanas e pironas (FERNANDES et al., 1978).

Algumas moléculas da classe de estirilpironas (figura 9) que já foram descritas para espécies de *Aniba* foram: anibina (*A. duckei*, *A. roseadora*, *A. gigantifolia*, *A. coto*) (53) (FRANÇA et al., 1973), 4-metoxiparacotoína (54) (*A. duckei*, *A. roseadora*, *A. firmula*) (GOTTLIEB e MORS et al., 1959), 6-esteril-piran-2-ona (*A. parviflora*, *A. panurensis*) (55) (BITTENCOURT et al., 1971; REZENDE et al., 2015), 6-[4'-(hidroxi)estiril] – piran-2-ona (56) (*A. parviflora*) 6-[3',4'-(dihidroxi)estiril] – piran-2-ona (57) (REZENDE et al., 1971), 6-[4'-(hidroxi)-3'-(metoxi) estiril]–piran-2-ona (*A. parviflora*) (58) (BITTENCOURT et al., 1971), 6-[3',4'-(dimetoxi) estiril] – piran-2-ona (*A. cylindriflora*) (59) (DIAZ et al., 1977), 6-[3',4'-(metilenodioxi)estiril] – piran-2-ona (*A. cylindriflora* e *A. parviflora*) (60) (DIAZ et al.,

1977; BITTENCOURT et al., 1971), 6-estiril-4-metoxi-piran-2-ona (*A. mas*, *A. permollis*) (61) (DIAZ et al., 1977), 3'-metoxi-iangonina (62), 4-metoxi-6-[3',4'-(metilenodioxi)estiril]piran-2-ona (*A. spescies*) (63) (ROSSI et al., 1997), 6-*cis*-estiril-2-pirona (*A. parviflora*) (64), Aniba-dímero-B (65), Aniba-dímero-A (*A. gardneri*) (66) (REZENDE et al., 1971), rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-Metoxi-8-(11,12-dimetoxifenil-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril-1'-oxabicciclo [4,2,0]octa-4'-en-2'-ono (67), *r*-8, *c*-7', *t*-8', *t*-7-8,8'-11,12 -dimetoxifenil -7,7'-di-[6-(4-metoxi-2-pironil)]-ciclobutano (*A. species*) (68) (ROSSI et al., 1997).

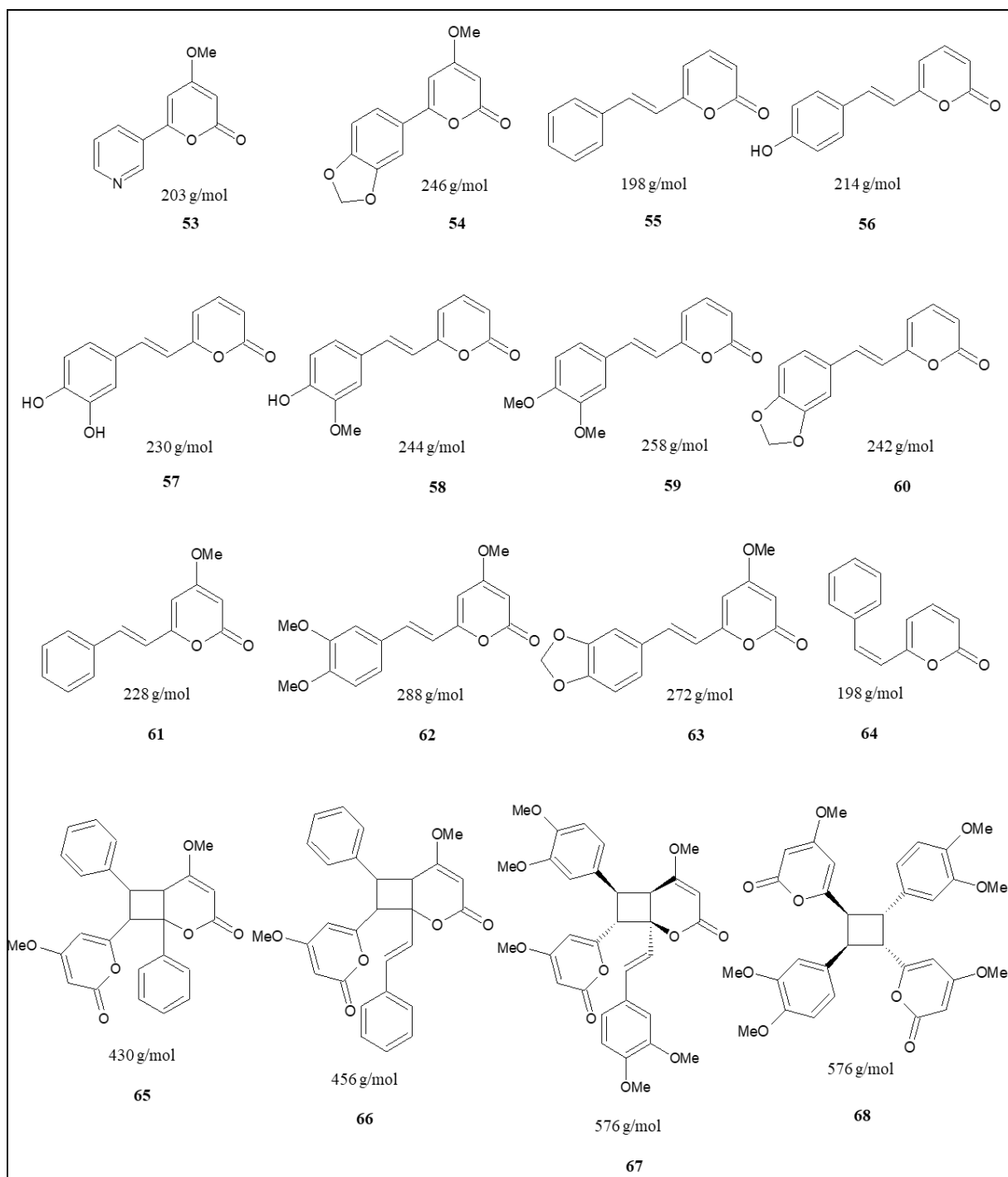


Figura 9 - Estirilpironas descritos para o gênero *Aniba*.

3.6 Atividades Biológicas

3.6.1 Atividade antimicrobiana

Os antimicrobianos são medicamentos utilizados no tratamento de patologias causadas por micro-organismos. Esses agentes terapêuticos podem ser classificados como antibacterianos, antifúngicos, antivirais e antiparasitários. Os antimicrobianos podem ser naturais ou sintéticos e são substâncias capazes de inibir o crescimento de micro-organismos. Esses agentes terapêuticos podem ser microbiocidas, quando atuam provocando diretamente a morte dos micro-organismos, ou microbiostáticos, quando atuam impedindo a sua replicação (COWAN, 1999; WALSH, 2003).

O estudo de agentes antimicrobianos provenientes de produtos naturais apresenta suma importância, devido a problemática do aumento da resistência de bactérias, fungos e parasitas aos antimicrobianos tradicionais. Essa resistência pode ser considerada um fenômeno ecológico, que acontece como uma forma de resposta do micro-organismo frente ao amplo uso de antimicrobianos e sua presença no meio ambiente (GUIMARÃES et al., 2010).

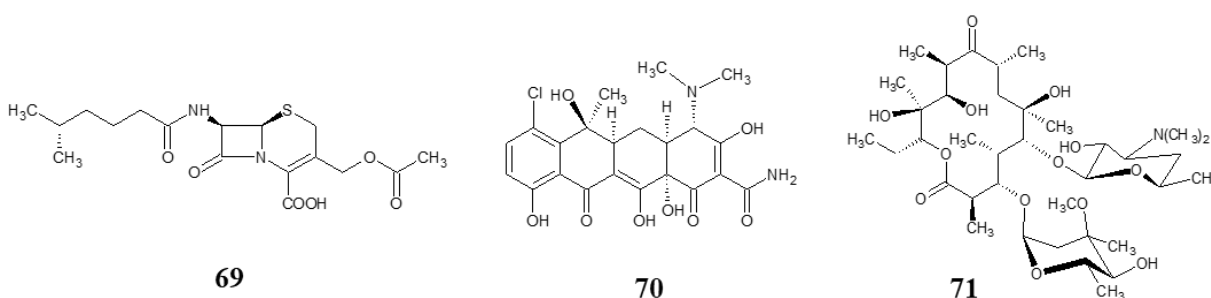


Figura 10 - Exemplos de antibacterianos derivados de produtos naturais.

A partir de triagens de produtos naturais microbianos no período de 1940-1960 foram realizadas várias descobertas de antibióticos, em sua maioria eficazes para o tratamento de bactérias gram-positivas. Esses antibióticos correspondiam às classes: β -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina (69)), tetraciclina (clortetraciclina (70)),

macrolídeos (eritromicina (71)), peptídeos (vancomicina), entre outros. Neste período, apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida®, trimetropim® e metronidazol®. No período de 1960-1980 foram desenvolvidos novos agentes antibacterianos utilizados tanto para o tratamento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, que foram semi-sintetizados de modo a formar produtos análogos aos produtos naturais já existentes (FERNANDES, 2006).

Segundo Cowan (1999), as principais substâncias químicas que possuem atividade antimicrobiana (figura 11), são: fenólicos e polifenólicos, terpenoides, alcaloides, lectinas e polipeptídios. Alguns exemplos são: ácido cafeico (72), catecol (73), eugenol (74) (fenóis simples), hypericina (75) (quinona), catequina (76) e crisina (77) (flavonoides), pentagaloilglucose e procianidina B-2 (78) (taninos); warfarina (79) e 7-hidroxycumarina (80) (cumarinas); mentol (81) e capsaicina (82) (terpenoides); barberina (83) e harmano (84) (alcaloides).

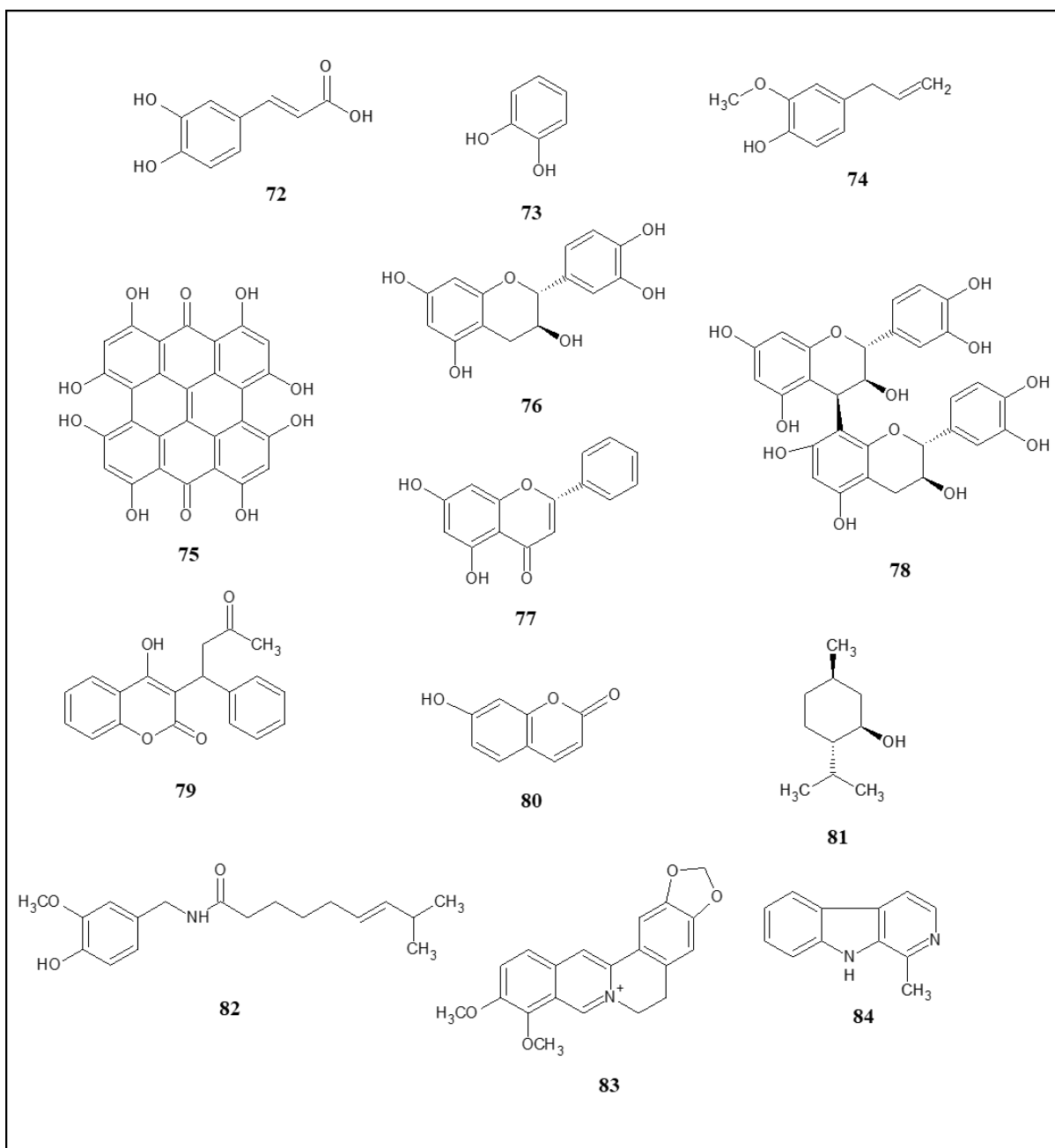


Figura 11 - Exemplos de antibacterianos derivados de diferentes classes químicas.

3.6.1.1 Atividade antimicrobiana em metabólitos de *Lauraceae*

A família *Lauraceae* apresenta uma grande diversidade de estudos de atividade antimicrobiana. Os gêneros que possuem estudos quanto a atividade antimicrobiana, são: *Aniba*, *Cinnamomum*, *Cryptocaria*, *Litsea*, *Lauros*, *Persea*, *Lindera*, *Nectandra*, *Machilus*, *Ocotea*, *Beilschmiedia*, entre outros gêneros. Esses estudos relatam atividades de extratos, óleos essenciais, frações e de substâncias isoladas dessas espécies.

Segundo dados da literatura, as espécies descritas com atividade antimicrobiana dos óleos essenciais são: *Cinnamomum zeylanicum* Blume com atividade bacteriana e antifúngica (UNLU et al., 2010), *Cinnamomum osmophloeum* com atividade antimicrobiana (CHANG et al., 2001), *Lindera strychnifolia* com atividade antibacteriana (YAN et al., 2009), *Ocotea bofo* Kunth com atividade antibacteriana e antifúngica (GUERRINI et al., 2006).

Os extratos que são relatados com atividade antimicrobiana para as espécies de *Lauraceae*, são: *Machilus Macrantha* Nees com atividade para os extratos das cascas em concentrações de 5-10 mg/mL para atividade antibacteriana e antifúngica (TATIYA et al. 2014); *Litsea elliptica* Blume e *Litsea resinosa* Blume com atividade antibacteriana e antifúngica, com atividade mais forte para a espécie *Litsea resinosa* (WONG et al., 2014); *Nectandra falcifolia* (Nees) Castiglioni com resultados positivos para atividade antibacteriana (TRUITI et al., 2006).

Os metabolitos de *Lauraceae*, que foram isolados e avaliados em relação a atividade antimicrobiana, estão relatados na tabela 3. Nessa tabela pode-se observar classes de alcaloides, flavonoides, lignoides e terpenos, que tem sido associado a diferentes atividades antimicrobianas, tais como: antibacteriana, antifúngica e antiparasitária. As estruturas que correspondentes a esses compostos bioativos podem ser observados nas figuras: 4 e 8.

Espécie	Classe	Substância	Atividade Antimicrobiana	Referência
<i>Aniba riparia</i>	Alcaloide	riparina I (3), riparina II (4) e riparina III (5)	Atividade antibacteriana: <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> de origem humana	Catão (2005)
<i>Aniba panurensis</i>	Alcaloide	anibamina (6)	Atividade antifúngica: <i>Candida albicans</i> , <i>Candida lusitaniae</i> , <i>Candida glabrata</i> , <i>Candida krusei</i> , <i>Candida</i> <i>parapsilosis</i> , <i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i>	Klausmeyer (2004)
<i>Nectandra glabrescens</i>	Lignoide	licarina A	Atividade antiparasitária: <i>Trypanosoma cruzi</i>	Cabral (2010)
<i>Ocotea cymbarum</i> Kunth	Lignoide	burchelina (37)	Atividade antiparasitária: <i>Trypanosoma cruzi</i>	Cabral (2010)
<i>Cryptocaria concinna</i>	Flavonoide	criptocariona, kurzichalcolactoa A, kurzichalcolactona B	Atividade antibacteriana (<i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i> , <i>Xanthomonas</i> <i>oryzae</i> pv. <i>oryzicola</i> , <i>Acidovorax avenae</i> subsp. <i>citrulli</i> , e <i>Erwinia amylovora</i>) e atividade antifúngica (<i>Phytophthora capsici</i> , <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Alternaria solani</i> , e <i>Botrytis cinerea</i>)	Huang (2014)
<i>Cinnamomum cebuense</i> Kosterm	Terpenos	terpineol, eugenol, humuleno	Atividade antibacteriana (<i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Bacillus subtilis</i>) e Atividade antifúngica: <i>Candida albicans</i> ,	Espineli (2014)

Tabela 3 - Metabólitos de *Lauraceae* com atividade antimicrobiana.

3.7 Técnicas cromatográficas clássicas e modernas

O nome cromatografia deriva dos termos *chrom* e *graphie*, que significam cor e escrita respectivamente. Esta técnica é definida como um método físico-químico de separação, sendo um processo baseado na migração diferencial dos componentes de uma amostra, que ocorre em função das interações entre duas fases, a fase móvel e a fase estacionária. As técnicas cromatográficas destacam-se por sua ampla aplicação e grande versatilidade gerada por sua grande variedade de combinações entre fases móveis e fases estacionárias (VIEIRA et al., 1996).

As diferentes formas de cromatografia podem ser classificadas considerando-se diversos critérios, tais como: forma física do sistema, fase móvel, fase estacionária e pelo método de separação. Em relação à forma física do sistema, a cromatografia pode ser subdividida em coluna e planar. Quando se trata da fase móvel, são três os tipos de cromatografia: a gasosa, líquida e supercrítica. Quanto à fase estacionária, distingue-se entre fases estacionárias sólidas, líquidas e quimicamente ligadas. Já a classificação por separações cromatográficas se deve à adsorção, partição, troca iônica, exclusão ou misturas desses mecanismos. (VIEIRA et al., 1996; COLLINS et al., 1997).

As técnicas cromatográficas podem ser classificadas em técnicas clássicas e modernas. As técnicas clássicas são: Cromatografia em Coluna de Fase Normal (CCFN), Cromatografia em Coluna Flash (CCF), Cromatografia em Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP). As técnicas modernas são: Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência (CCDAE), Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), Cromatografia por Contracorrente de Alta Eficiência (CCCAE) e a Cromatografia a Gás (CG).

A CCD e a CCDAE são técnicas que têm como base a separação dos componentes de uma amostra pelo processo de migração diferencial sobre uma camada delgada de adsorvente

retido sobre uma superfície plana, fundamentando-se no fenômeno de adsorção. Quando são utilizadas fases estacionárias modificadas, pode ocorrer também processos de partição e troca iônica, desta forma permitindo a separação de substâncias hidrofóbicas e hidrofílicas. As principais diferenças entre CCD e a CCDAE, envolve a placa cromatográfica que possui diferentes tamanhos de partículas da camada de separação, modo de aplicação e eluição. A CCDAE (5 μm) possui partículas menores que a placa normal de CCD (20 μm), o que gera uma melhor separação em uma placa de CCDAE. A aplicação e eluição na CCDAE é mecânica, proporcionando o controle do volume aplicado e mantém o controle do processo eluição (VIEIRA et al., 1996; COLLINS et al., 1997).

A CCFN, CLMP e CLAE são técnicas baseadas em no processo de separação por adsorção. Essas técnicas são utilizadas em processos de fracionamento e isolamento de metabólitos secundários provenientes das plantas. Na CCFN utiliza-se fase estacionária sólida, que levam a uma separação por adsorção, como é o caso da sílica (SiO_2) e da alumina (Al_2O_3), que são os adsorventes (polares) mais empregados em processos de separação. A CLMP é uma técnica que se diferencia da CCFN por ser um método que pode utilizar fase estacionária normal e reversa, utiliza bomba de média pressão, detector de UV-VIS e um sistema automatizado de coleta de amostra. A CLMP permite a purificação de maiores quantidades de amostra e, ao contrário de cromatografia em coluna aberta e da cromatografia flash, separações mais rápidas e melhores são obtidas. A cromatografia por CLAE diferencia-se por ser uma técnica aplicada geralmente para estudo de compostos polares, apresentando uma coluna de C-18 (apolar) com partículas de 2 μm , e utiliza misturas de solventes de média e alta polaridade (acetonitrila, metanol ou água), além de ser uma cromatografia que pode ser acoplado a detectores de arranjo de diodos (DAD) ou espectrometria de massas (EM). A CLAE é uma técnica amplamente usada em processos de quantificação e detecção de substâncias em um dado analito (VIEIRA et al., 1996; COLLINS et al., 1997).

A CCCAE diferencia-se de todas as outras, pois é um tipo de cromatografia de partição líquido-líquido, na qual a fase líquida estacionária é retida no equipamento sem o uso de suporte sólidos. Na maioria dos tipos de CCCAE, uma das fases de um sistema de solventes bifásico permanece estacionária, enquanto a outra é passada através dela. O princípio da separação envolve a partição de um soluto entre as duas fases imiscíveis e a proporção de soluto que passa para cada uma das fases é uma função do seu coeficiente de partição. É um método útil principalmente na separação preparativa, na escala de miligramas a gramas de material, sendo uma excelente técnica para substâncias polares e lábeis. As vantagens da técnica são: (i) versatilidade de sistemas dos solventes; (ii) rapidez e eficiência do método; (iii) boa resolução e reprodutibilidade; (iv) economia, pois não requer solventes com grau muito elevado de pureza; (v) durabilidade das colunas; (vi) recuperação total da amostra; (vii) é uma excelente ferramenta para obtenção de padrões de origem vegetal (LEITÃO, 2005).

3.8 Elucidação estrutural por técnicas espectroscópicas e espectrométricas

A união das técnicas espectroscópicas e espectrométricas constituem a base para elucidação estrutural de moléculas de produtos naturais, pois são técnicas complementares. As técnicas espectroscópicas, são baseadas em processos de absorção ou emissão de radiações eletromagnéticas, como as Espectroscopias de Ultravioleta Visível (UV-Vis), Infravermelho (IV) e Ressonância Magnética Nuclear (RMN); e as técnicas espectrométricas, que baseia-se no processo de medição, como por exemplo a Espectrometria de Massas (EM).

3.8.1 Técnicas espectroscópicas

3.8.1.1 Espectroscopia no Ultravioleta Visível

A absorção molecular na região do ultravioleta visível depende da estrutura eletrônica de cada molécula. As características das moléculas variam conforme as transições eletrônicas

que podem ocorrer e também com os efeitos do ambiente em que estão os átomos sobre as transições. A absorção de energia é quantizada e conduz à passagem dos elétrons de orbitais do estado fundamental para orbitais de maior energia, em um estado excitado. Na prática, a espectrometria de UV-VIS é limitada, na maior parte, aos sistemas conjugados (SILVERSTEIN et al., 1994).

Compostos que possuem apenas elétrons σ , como é o caso dos hidrocarbonetos saturados, possuem apenas energias de transição no ultravioleta distante. Desta forma, os hidrocarbonetos são transparentes nas regiões do ultravioleta próximo e do visível, com isso podem ser usados como solvente. Os compostos saturados que contêm heteroátomos como o oxigênio, nitrogênio, enxofre ou halogênios possuem elétrons não ligantes e elétrons σ não absorvem no ultravioleta próximo. Os álcoois e ésteres absorvem em comprimentos de onda menores que 185 nm, sendo, por isso, muito usados para o trabalho na região do ultravioleta próximo (SILVERSTEIN et al., 1994).

A utilização da técnica de ultravioleta proporciona informação da presença de grupos cromóforos ($C=C$, $C=O$, ou NO_2) e dos grupos saturados chamados de auxocromo, que podem estar ligados (OH , NH_2 e Cl) aos cromóforos. Essas informações correspondem às alterações no comprimento de onda e na intensidade de absorção. (SILVERSTEIN et al., 1994).

3.8.1.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

A técnica de Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear é mais uma técnica que está baseada no processo de absorção, sendo equivalente à espectroscopia de infravermelho ou de ultravioleta. Sob condições apropriadas de campo magnético, uma amostra tem a capacidade de absorver radiação eletromagnética na região de radiofrequência em uma frequência governada pelas características de sua estrutura química da amostra. O processo de absorção é uma função de determinados núcleos da molécula. Os espectros gerados dessa técnica

correspondem a gráficos das frequências dos picos de absorção por suas intensidades. (SILVERSTEIN et al., 1994)

Essa espectroscopia pode gerar dados de hidrogênio, carbono, e das interações entre hidrogênio-hidrogênio, carbono-carbono e carbono-hidrogênio, a partir das técnicas unidimensionais (RMN de ^1H , RMN de ^{13}C) e bidimensionais (DEPT, COSY, HMBC e HSQC). Os tipos de ressonância de RMN ^1H e RMN ^{13}C assemelham-se por fornecerem informações de deslocamento químico, assim geram informações de quantos átomos de cada elemento tem a molécula analisada. A RMN de ^1H e RMN de ^{13}C diferenciam-se pela abundância isotópica, onde a abundância do ^{13}C é muito menor do que a do ^1H . O espectro de DEPT gera resultados dos grupos: CH, CH₂ e CH₃ que estão presentes na molécula. O espectro de COSY fornece informações sobre as interações entre ^1H - ^1H do átomo. O espectro de HSQC e HMBC geram informações sobre as interações de ^{13}C - ^1H (SILVERSTEIN et al., 1994)

3.8.2 Técnicas espectrométricas

3.8.2.1 Espectrometria de Massas

A espectrometria de massas destaca-se por ser uma técnica de alta sensibilidade, que há muito tempo é utilizada para determinação de estruturas orgânicas e para a medida de isótopos. A EM é usada para estudo de átomos, moléculas ou fragmentos de moléculas, a partir da formação de íons em fase gasosa e sua caracterização de acordo com a razão entre sua massa e carga (m/z), estrutura ou propriedades físico-químicas (HARRIS, 2012; HAM, 2008).

Os componentes principais de um espectrômetro de massa são: a fonte de íons, o analisador de massa e o detector. Na fonte de íons, a amostra que é injetada e convertida em íons, os íons positivos ou negativos são acelerados por um campo elétrico em direção ao analisador de massa. O analisador de massas desempenha a função de separar os íons de acordo com a razão entre suas massas e suas cargas (usualmente igual a 1) (m/z). Após a passagem

pelo analisador, os íons separados passam pelo detector, que transforma a corrente dos íons em sinais elétricos que são processados e armazenados (HARRIS, 2012).

A ionização por electrospray (ESI) é a mais utilizada dentre as fontes de ionização. É uma técnica em que ocorre a formação de pequenas gotas carregadas, que são fragmentadas com a aplicação de uma diferença de potencial (ddp) entre um capilar e um contra eletrodo, sob pressão atmosférica, formando os íons de interesse. Dessa forma, o processo pode ser simplificado pelas seguintes etapas: nebulização da amostra, formação de íons pelas pequenas gotas e o transporte dos íons da fonte para o analisador (HAM, 2008).

A ionização química à pressão atmosférica (IQPA) usa o processo de aquecimento e um fluxo de N_2 para produzir um aerossol fino com a fase eleuída. Esse tipo de ionização dá origem a novos íons pela reação em fase gasosa entre íons e moléculas. O diferencial desta técnica é utilização de uma alta diferença de potencial aplicada a uma agulha de metal, que fica posicionada no percurso do aerossol. Desta forma, produz-se um plasma com partículas ionizadas em torno da agulha, injetando elétrons no aerossol e formando os íons (HARRIS, 2012).

4 METODOLOGIA

4.1 PARTE I – Caracterização química

A visão geral da metodologia desenvolvida para a caracterização química das espécies de *Aniba*, pode ser visualizada a partir do fluxograma da figura 12.

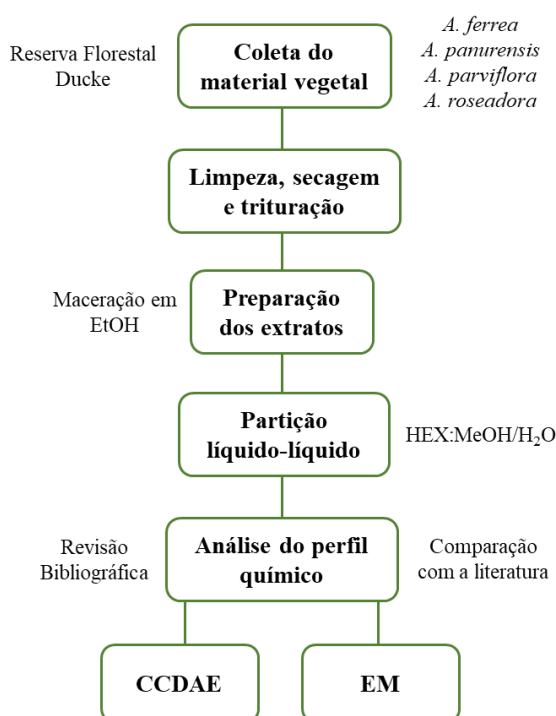


Figura 12 - Fluxograma da parte I do projeto visando a caracterização química.

4.1.1 Material vegetal

As quatro espécies do gênero *Aniba* (*Lauraceae*) foram coletadas no dia 12 de março de 2016 na Reserva Florestal Ducke, localizada em Manaus, no Amazonas. Os dados das espécies coletadas estão na tabela 4 e suas exsiccatas encontram-se depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas (INPA) no projeto Flora da Reserva Ducke.

Após a coleta, as diferentes partes da planta (folhas e galhos) foram separadas, limpas e analisadas quanto a presença de fungos, galhas e insetos. O material foi seco à temperatura ambiente (40°C) em estufa de circulação de ar. Em seguida, o material seco foi triturado em

moinho de quatro facas da marca SPLABOR® do modelo SP-32 e armazenados em freezer para posterior obtenção dos extratos.

Marco	Nº da planta	Nome científico	Parte da planta
113	1259	<i>Aniba ferrea</i>	Folhas e galhos
534	1734	<i>Aniba panurensis</i>	Folhas e galhos
0,15 Km	4453	<i>Aniba parviflora</i>	Folhas e galhos
114	1267	<i>Aniba roseadora</i>	Folhas e galhos

Tabela 4 - Dados das espécies coletadas.

4.1.2 Preparação dos extratos

As quatro espécies estudadas foram submetidas a um procedimento de extração padronizado. Cada parte da planta (folhas e galhos) passou por um processo de maceração em etanol da marca Química Credie previamente destilado, na proporção de massa/solvente de 10%, por 24 h, 48 h e 72 h utilizando um agitador da marca BIOMIXER. Após a maceração e filtração, o solvente de cada amostra foi eliminado em evaporador rotatório a pressão reduzida, resultando nos extratos brutos, que foram armazenados na geladeira. Em cada processo de extração foi utilizado massas diferentes, devido a quantidade de cada material, esses valores podem ser observados na tabela 5.

Espécie	Massa (g)	
	Folhas	Galhos
<i>Aniba panurensis</i>	517,59	611,75
<i>Aniba roseadora</i>	100,00	200,00
<i>Aniba férrea</i>	600,91	367,40
<i>Aniba parviflora</i>	400,00	400,00

Tabela 5 - Massas de material vegetal utilizadas nas extrações.

4.1.3 Partição líquido-líquido em microescala

As partições em microescala foram realizadas com a finalidade de desengraxe dos extratos e a partir do uso das frações obtidas fosse desenvolvido o estudo da caracterização química por meio das técnicas cromatográficas e espectrométricas. Os extratos etanólicos (500 mg) das folhas e galhos de cada espécie de *Aniba* foram solubilizados em 4 mL de MeOH/H₂O (8:2) e particionados sequencialmente com 6 mL hexano (HEX), solventes da marca TEDIA previamente destilados. Após a partição, o solvente de cada amostra foi eliminado em um evaporador rotatório a pressão reduzida, liofilizadas (ALPHA 1-4 LD plus da marca CHRIST) para a retirada de água, pesada e armazenado na geladeira.

4.1.4 Cromatografia em Camada Delgada de Alta Eficiência

As análises de cromatografia foram desenvolvidas em Sílica gel 60 F₂₅₄ placa de HPTLC (placas de 20 x 20 cm, partículas de 4-8µm, espessura de 0,15-0,2 mm; Merck, Darmstadt, Alemanha). As amostras foram pulverizadas na placa em forma de bandas utilizando gás nitrogênio, a partir de um aplicador automático Linomat 5 da CAMAG, sendo feita apenas a troca da seringa (enchimento, inserção e enxaguamento) de 100 µL. No processo de documentação das placas de TLC usou-se o equipamento TLC VISUALIZER da CAMAG nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm. A aplicação pelo Linomat 5, visualização pela TLC VISUALIZER e todo o tratamento foi realizado utilizando o software winCATS Planar Chromatography Manager. As concentrações, os volumes aplicação e os eluentes da amostra foram definidos de acordo com suas características.

4.1.5 Espectrometria de Massas

As análises das frações foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas na Central Analítica da UFAM. No desenvolvimento das análises foi utilizado um

espectrômetro de massas LQC *Fleet* (Thermo Scientific®), usando fonte de ionização eletrospray (ESI) no modo positivo e negativo, com faixa de detecção de 100-1000 Da. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau CLAE da marca TÉDIA) e 20 µL foram retirados e diluídos em 980 µL de metanol. Os dados obtidos das injeções foram processados através do programa *Xcalibur* 2.0.7. e comparados com o banco de dados obtido da literatura.

4.2 PARTE II e III - Obtenção e identificação dos padrões

Visando a obtenção dos padrões de *Aniba*, foram realizadas partições líquido-líquido em larga escala, que foram analisadas por CCD e fracionadas em CCFN. Os padrões obtidos foram cristalizados e recristalizados, e analisados por técnicas cromatográficas, espectrométricas e espectroscópicas, para posterior identificação. A metodologia desenvolvida pode ser visualizada a partir do fluxograma da figura 13.

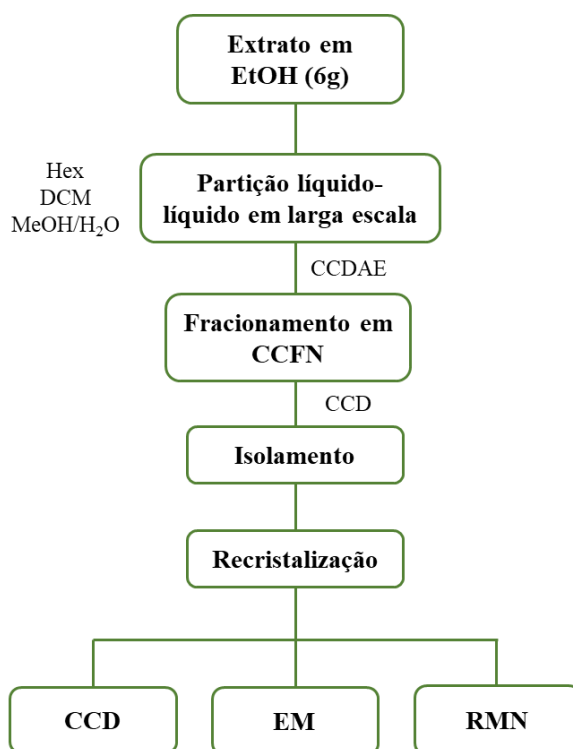


Figura 13 - Fluxograma da parte II do projeto visando o isolamento dos padrões.

4.2.1 Partição líquido-líquido em larga escala

As partições foram realizadas para obtenção das frações em diferentes polaridades (baixa, média e alta), com a finalidade de uso para o fracionamento e purificação de padrões. Os extratos etanólicos (6 g ou 7g) das folhas e galhos de cada espécie de *Aniba* foram solubilizados 60 mL de MeOH/H₂O (8:2) e particionando sequencialmente com 100 mL de hexano (HEX) e diclorometano (DCM), solventes da marca TEDIA previamente destilados. Após a partição, o solvente de cada amostra foi eliminado em um evaporador rotatório a pressão reduzida, liofilizadas (ALPHA 1-4 LD plus da marca CHRIST) para a retirada de água, pesada e armazenado na geladeira.

4.2.2 Fracionamento e isolamento dos padrões

Visando a obtenção dos padrões realizou-se o fracionamento a partir da cromatografia em coluna de fase normal e em coluna flash. Nesse processo foi utilizando sílica 70-230 e 230-400 mesh (SilicaFlash® G60 e F60 da marca SILICYCLE), colunas de vidro com diâmetro interno (Øint.) variando de 1,8-3,5 cm e solventes previamente destilados da marca TEDIA. O gradiente de eluição para cada amostra foi determinado de acordo com o perfil cromatográfico por CCD.

Além da cromatografia em coluna, também foi utilizada a técnica de cromatografia em camada delgada preparativa para obtenção dos padrões. As placas foram preparadas com gel de sílica gel para TLC (20 g para 60 mL de água destilada), com gesso e F₂₅₄ de 400 mesh da marca SORBENT TECHNOLOGIES utilizando como suporte placas de vidro. As amostras foram aplicadas a 1 cm da base, sendo desenvolvida em cuba com os eluentes determinados em testes por CCD. Após a eluição a amostra, e com o uso da câmera de UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, as placas foram reveladas e a partir dos dados de *r_f*'s as substâncias foram

raspadas junto com o gel de sílica, posteriormente foram realizados processos de extração com a mistura de solventes na proporção de 80%:20% de CHCl₃: MeOH, em seguida foram filtradas.

Seguem os procedimentos metodológicos realizados para o isolamento das substâncias de cada espécie estudada.

4.2.2.1 Fracionamento e isolamento dos metabolitos de *A. panurensis* (galhos)

Após a avaliação dos eluentes por CCD para a fração em diclorometano dos galhos de *A. panurensis*, foi realizado o fracionamento em coluna. Nesse processo, utilizou-se 1,68 g de amostra em coluna (3,5 cm de diâmetro) aberta de fase normal com 120 g sílica de 70-230 mesh, tendo como fase móvel a mistura de CHCl₃:AcOEt (100:0, 97:3, 95:5, 93:7, 90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) e AcOEt:MeOH (100:0, 95:5, 85:15, 0:100 (3x)) em ordem crescente de polaridade.

As frações coletadas foram concentradas a partir da utilização de um evaporador rotatório, posteriormente as mesmas foram transferidas para frascos de 10 mL, pesadas e analisadas por CCD para visualização da separação, utilizando como reveladores: luz UV 254 nm e 366 nm, vanilina sulfúrica e Dragendorff. A partir do perfil cromatográfico observado, reuniu-se as frações que eram semelhantes. Dessas amostras, as frações 3a+4 e 4a+5+5a foram refractionadas em placa preparativa e as substâncias purificadas foram cristalizadas e recristalizadas. Dessa forma, obtiveram-se as substâncias 1, 2 e 3.

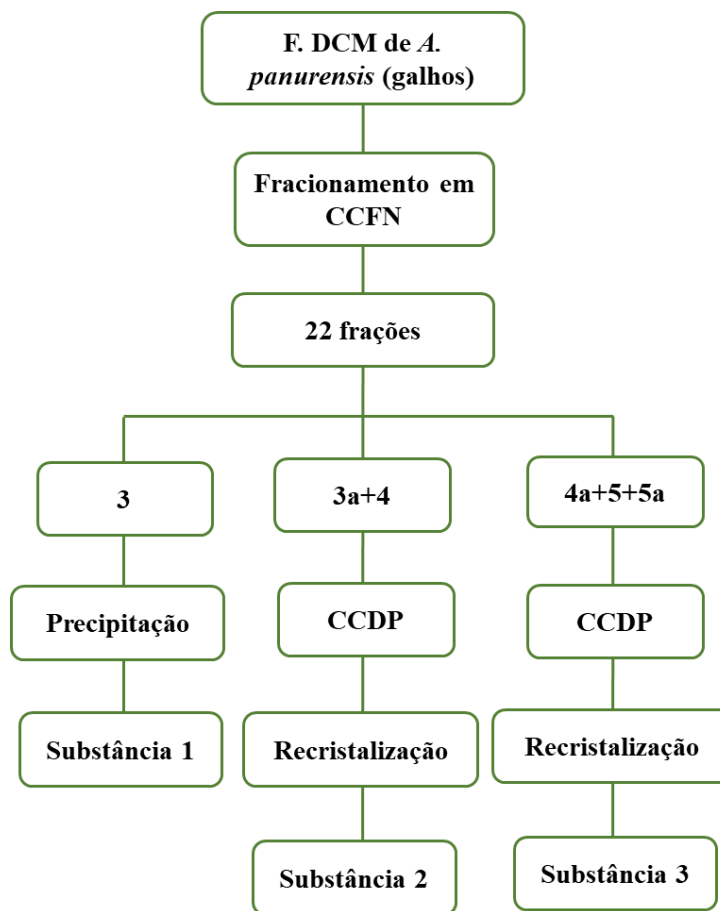


Figura 14 - Fluxograma correspondente ao fracionamento da fração DCM dos galhos de *A. panurensis*.

4.2.2.2 Fracionamento e isolamento dos metabolitos de *A. roseadora* (galhos)

A fração diclorometano dos galhos de *A. roseadora* foi fracionada em coluna de fase normal. Nesse processo foi utilizado 200 mg de amostra, 20 g de sílica normal G60, uma coluna de 2 centímetros de diâmetro, com gradiente que variou de CHCl_3 :MeOH (100:0, 95:5, 90:10, 85:15, 80: 20, 75:25 e 0:100 (2x)). Foram obtidas sete frações, as quais foram analisadas em cromatografia em camada delgada (CCD), sendo observada na terceira fração a presença de uma substância, a qual mostrou resultado positivo para alcaloides quando revelada com Dragendorff. Esta fração foi submetida à cristalização e recristalização com etanol, resultando na substância 4.

4.2.2.3 Fracionamento e isolamento dos metabolitos de *A. parviflora* (galhos)

O fracionamento da amostra em hexano da espécie *A. parviflora*, foi realizado em coluna de fase normal, utilizando 30 g de sílica normal G60, uma coluna de 2 centímetros de diâmetro, 410,3 mg de amostra, volume morto de 80 mL e tendo como fase móvel a mistura de HEX:AcOEt (100:0, 100:0, 80:20, 60:40, 50:50, 47,5:52,5, 45:55, 42,5:57,5, 40:60, 37:63, 35:65, 32,5:67,5, 30:70, 20:80, 10:90, 0:100) e MeOH 100% (2x), em ordem crescente de polaridade. Após o fracionamento e análise, foi feita uma coluna filtrante com a fração 5, utilizando 4,72 g de Sílica Normal G60 impregnada com KOH, 214,3 mg de carvão ativado, em uma coluna de 1 centímetro de diâmetro, 50,5 mg de amostra, volume morto de 9 mL e um gradiente de 100% de HEX (3x), 100% de DCM (3x) e 100% de MeOH (1x). Dessa forma, obteve-se a mistura das substâncias 5 e 6, nas frações coletadas em hexano e diclorometano.

4.2.3 Identificação dos Padrões

Objetivando a identificação das substâncias isoladas utilizou-se a união das técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

4.2.3.1 Espectrometria de Massas

As análises dos isolados foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas na central analítica da UFAM. O experimento foi realizado em um espectrômetro de massas LQC *Fleet* (Thermo Scientific®), usando fonte de ionização química (APCI). A faixa de detecção foi de 100-1000 Da. As amostras foram preparadas na concentração de 1 mg/mL em metanol (grau CLAE da marca TÊDIA) e 20 µL foram retirados e diluídos em 980 µL de metanol. Os dados obtidos das injeções foram processados através do programa *Xcalibur* 2.0.7. e comparados com os dados da literatura.

4.2.3.2 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

As substâncias isoladas foram identificadas por RMN ^1H , ^{13}C , DEPT 135, COSY, HSQC e HMBC. As análises foram realizadas na Central Analítica no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da UFAM em equipamento Bruker advance III HD MhZ MRI, 500 MHz (campo magnético de 11,7 Tesla). As substâncias isoladas foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) em relação ao padrão interno TMS ($\delta = 0,00$) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (singlete), d (dublete), dd (duplo dublete), t (triplete) e m (multiplete). Os dados obtidos foram processados através de um programa TopSpin 3.5 e comparados com os dados da literatura para elucidação estrutural das substâncias.

4.2.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD) foi utilizada em forma analítica (Dionex - Ultimate 3000 automático da Thermo Scientific) com injetor automático. As amostras injetadas foram filtradas em uma membrana de $0,45\ \mu\text{m}$ de PTFE w/GMF da marca WHATMAN. Foi utilizado coluna em fase reversa, da marca VARIAN (250 x 4,6 mm) do modelo Microsorb – MV 100 – 5. O gradiente utilizado foi de 50%:50% a 35%: 65% (A:B) (água acidificada com ácido acético a 0,1%: acetonitrila) por 11 min e 35%: 65% (A:B) por 1 min. Amostras foi injetada na concentração de $1\ \mu\text{g/mL}$, com volume de injeção de $7\ \mu\text{L}$, taxa de fluxo de $0,5\ \text{mL/minuto}$, temperatura de forno de 30°C e temperatura do amostrador de 25°C .

4.3 PARTE IV – Desenvolvimento do método cromatográfico

O método foi desenvolvido a partir da cromatografia em camada delgada de alta eficiência, utilizando os padrões obtidos, padrões comerciais de flavonoides (quercetina (Tédia Brazil), kaemferol (Sigma-Aldrich), apigenina (Sigma-Aldrich) (-)-epigalatocatequina (Sigma-Aldrich), isoquercitrina (HWI Analytik GMBH) e (+)-catequina (Sigma-Aldrich)) e os extratos (EtOH) e frações (HEX, DCM e MeOH). As análises de cromatografia foram desenvolvidas em Sílica gel 60 F₂₅₄ placa de HPTLC (placas de 20 x 20 cm, partículas de 4-8µm, espessura de 0,15-0,2 mm; Merck, Darmstadt, Alemanha). As placas de sílica foram limpas, eluindo a placa com metanol e depois ativadas em estufa a 100 °C. Os eluentes foram preparados conforme a natureza da amostra visando a melhor separação cromatográfica. As concentrações, os volumes aplicação e os eluentes da amostra foram definidas de acordo com suas características. As amostras foram pulverizadas na placa em forma de bandas utilizando gás nitrogênio, a partir de um aplicador automático Linomat 5 da CAMAG, sendo feita apenas a troca da seringa (enchimento, inserção e enxaguamento) de 100 µL. No processo de documentação das placas de TLC usou-se o equipamento TLC VISUALIZER da CAMAG nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm. A aplicação pelo Linomat 5, visualização pela TLC VISUALIZER e todo o tratamento foi realizado utilizando o software winCATS Planar Chromatography Manager. Como reveladores, serão utilizados: luz ultravioleta (254 e 365 nm), vanilina sulfúrica, cloreto férrico, Dragedorff e NP-PEG (WAGNER e BLADT, 1996).

4.4 PARTE V – Ensaios antimicrobianos

4.4.1 Ensaio antibacteriano - Teste de difusão em ágar

Os ensaios antibacterianos foram realizados em colaboração com a plataforma de Bioensaios do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia, sob a coordenação da

Profa. Dra. Patrícia Puccinelli Orlandi Nogueira. Foram submetidas à avaliação de atividade antibacteriana cepas padrões de 31 bactérias gram-positivas e gram-negativas (Tabela 6 e 7).

Bactérias Gram-Positivas	Cepas
<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> (CT)	ATCC 6051
<i>Enterococcus faecalis</i> (<i>Streptococcus faecalis</i>)	ATCC 4083
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 15313
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 80958
<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina	(MRSA)
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC 27851

Tabela 6 - Lista das cepas bacterianas gram-positivas.

Bactérias Gram-negativas	Cepas
<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC 19606-143
<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 43864-576
<i>Escherichia coli</i> de aderência difusa (DAEC)	BUTANTÃ F1845
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	CDC EDL- O42
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	CDC EDL-933-171
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST (ETEC)	ST8
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica ST (ETEC)	BUTANTÃ LT 2871
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica típica (EPEC)	ATCC E234869
<i>Escherichia coli</i> -INV-enteroinvasiva (EIEC)	ATCC 1381
<i>Escherichia coli</i> não diarreicogênica	ATCC 10536
<i>Hafnia alvei</i>	ATCC 11601-120
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 4352-083
<i>Proteus mirabilis</i>	ATCC 15290-095
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CDC EDL-1284
<i>Pseudomonas putida</i> (oralis)	ATCC 15175-113
<i>Salmonella arizonae</i>	UFAM
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ATCC 10708
<i>Salmonella typhimurium</i>	ATCC 13311
<i>Salmonella typhi</i>	ATCC 6539
<i>Serratia marcescens</i>	ATCC 14756-131
<i>Shigella dysenteriae</i>	ATCC 13313
<i>Shigella flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ATCC 9610

Tabela 7 - Lista das cepas bacterianas gram-negativas.

Para o teste de antagonismo, as amostras testadas foram solubilizadas em DMSO a 10% na concentração de 5 mg/mL quando extratos ou frações, e 1 mg/mL quando substâncias isoladas.

As bactérias foram cultivadas previamente em caldo Brain Heart Infusion (BHI) pelo período de 24 horas. A cultura bacteriana crescida foi diluída em meio de cultura, conforme padronização com o tubo 0,5 da escala de McFarland, que equivale a 1×10^8 Unidades Formadoras de Colônias/mL (UFC/mL).

A determinação da atividade antibacteriana foi realizada pelo método de difusão em ágar, pela técnica do poço, segundo Grove e Randall (1955), a qual consiste na utilização de placas com camada dupla (camada base e camada *seed*), utilizando o meio de cultura Ágar Müeller Hinton (MHA). Primeiramente, foi vertido o meio nas placas de Petri em duas camadas. Após a solidificação do meio de cultura, o inóculo bacteriano padronizado foi semeado com swab estéril por toda a sua superfície da placa. Em seguida, com o auxílio de ponteiros de 200 µL, foram perfurados orifícios de aproximadamente 6 mm de diâmetro na camada superior, os quais receberam 80 µL das amostras. O controle negativo compreendeu poços contendo DMSO a 10% e a droga controle utilizada foi o TIENAM (imipenem + cilastatina sódica) na concentração de 500 µg/mL. Os ensaios foram feitos em triplicata.

Após a difusão dos metabólitos no meio de cultura, as placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas e em seguida foi realizada a leitura do diâmetro dos halos de inibição, com o auxílio de uma régua milimetrada.

4.4.2 Ensaio antibacteriano - Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As amostras que apresentaram halos de inibição nos antibiogramas foram avaliadas para determinação da Concentração Inibitoria Mínima (CIM) de acordo com o manual Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012), com modificações, em placas de 96 poços. As cepas que se apresentarem sensíveis às amostras foram cultivadas em 3 mL de caldo nutritivo BHI e incubadas a 37 °C por 24 horas. Para o preparo do inóculo bacteriano, foi transferido, com o auxílio de uma micropipeta, uma alíquota de 50 a 100 µL da cultura para um tubo com

3 mL de meio BHI estéril, suficiente para atingir a turvação padrão de 0,5 na escala de McFarland (1×10^8 UFC/mL). Após a turvação, o inóculo padronizado foi diluído em 1:20, de maneira que a concentração final nos poços-teste fosse de aproximadamente 5×10^5 UFC/mL.

Foram acrescidos 50 μ L do meio BHI em todos os poços. Na linha A foram adicionados 50 μ L das amostras (extratos, frações ou isolados) nos poços correspondentes. O conteúdo dos poços da linha A foram homogeneizados e se procedeu uma diluição seriada (1:2) nos poços subsequentes de cada amostra, realizada até a linha H, descartando-se 50 μ L no final. Em seguida, foram acrescidos em cada poço, 10 μ L de inóculo bacteriano e 40 μ L de caldo BHI, totalizando um volume final de 100 μ L por poço. As concentrações das amostras avaliadas foram em um espectro de 1000 a 7,8 μ g/mL.

Como controle de esterilidade foi utilizado DMSO a 10% em meio de cultura estéril, os quais foram utilizados para solubilizar a amostra, e como controle da droga foi utilizado o TIENAM, avaliado nas mesmas concentrações que as amostras vegetais. Como controle de crescimento, foi acrescido 90 μ L de DMSO 10% em meio de cultura estéril e 10 μ L de inóculo.

Logo após a micropipetagem as placas foram tampadas e incubadas a 37 °C pelo período de 20 a 24 h, sem agitação. Terminado o período de incubação, foram adicionados em cada orifício das placas 15 μ L de resazurina em solução aquosa esterilizada, a uma concentração de 0,01% no poço. Após 4 h de reincubação, a leitura foi realizada.

A resazurina facilita verificar a presença de crescimento microbiano, pois a permanência da coloração azul indica ausência de crescimento microbiano. Será considerado o crescimento bacteriano positivo quando houver a conversão do corante azul para rosa (ou incolor). A concentração inibitória mínima é definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento de bactérias, como indicado pela coloração azul da resazurina.

4.4.3 Ensaio antiparasitário - Teste antiplamódico

Para a avaliação da atividade antiplasmódica foram utilizadas cepas FRC3 de *Plasmodium falciparum* em colaboração com a Plataforma de Bioensaios e com a Plataforma de Citometria de Fluxo, ambas do Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ Amazônia.

4.4.3.1 Cultura de *Plasmodium falciparum*

As cepas FCR3 de *P. falciparum* foram mantidas em cultivo no meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) incompleto com 10 % de soro humano AB+ e alimentadas com eritrócitos humanos normais, incubadas a 37 °C em atmosfera de baixa concentração de oxigênio e gás carbônico, seguindo a técnica de micro-aerofilia tradicional da queima de vela em dessecador. O meio de cultura RPMI 1640 incompleto será constituído de 10,4 g de RPMI, 5,94 g de hepes, 40 mg de gentamicina, 2 g de glicose e 50 mg de hipoxantina a pH 6,8. O meio completo é suplementado com 5 mL soro humano AB+ previamente tratado em banho-maria a 56 °C durante 30 minutos, 1 mL de NaHCO₃ 10 % e 44 mL de meio RPMI incompleto (LJUNGSTRÖM et al., 2004).

4.4.3.2 Análise de inibição de crescimento

As soluções estoques dos extratos, frações e isolados foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio completo até que atinja a concentração final de DMSO de 0,5% nos poços, concentração em que o DMSO não inibe o crescimento parasitário. As amostras são solubilizadas em DMSO 100% resultando em um estoque inicial de 10 mg/mL. Deste estoque inicial, 4 µL são retirados para diluição em 196 µL de meio completo, resultando em um segundo estoque (1:50).

Os testes foram realizados em placas de 96 poços em triplicata, com volume final de 100 µL/poço. Foram adicionados 50 µL de meio completo em todos os poços. Após isso, 50

μL do segundo estoque de cada amostra serão adicionados aos poços correspondentes da fileira A da placa. Diluições seriadas das amostras (1:2) serão realizadas nas fileiras subsequentes, resultando em um espectro de análise das amostras nas concentrações de 50 a 0,39 μg/mL.

O parasita foi preparado para o teste utilizando uma solução com 100 μL de hemácias parasitadas, 100 μL de hemácias sadias, 10 μL de gentamicina e avolumado para 10 mL de meio completo, obtendo uma suspensão de parasita a 2% de hematócrito e parasitemia de 3 a 5%. Desta solução foram distribuídos 50 μL em cada um dos poços tratados com as amostras, em uma triplicata para o controle positivo (meio de cultura + parasita), em uma triplicata para o controle do reagente (meio de cultura + DMSO a 0,5% + parasita), e nos poços correspondentes à droga controle. A droga controle utilizada foi o Quinino e foi avaliada nas mesmas concentrações das amostras testadas. No controle negativo utilizou-se apenas hemácias sadias (eritrócitos não parasitados) com hematócrito a 2 %. As placas foram incubadas a 37 °C em atmosfera de baixa concentração de oxigênio e gás carbônico seguindo a técnica de micro-aerofilia tradicional da queima de vela em dessecador, mesmas condições do cultivo do parasita.

Após 72 horas de incubação, as amostras foram lavadas com 200μl de tampão PBS 1x à 800 rpm por 5 minutos. Este procedimento foi repetido três vezes. Ao final, as amostras foram ressuspensas em 200μl de PBS 1x para a análise em citômetro de fluxo. A verificação da inibição de crescimento por citometria de fluxo foi realizada na Subunidade Citometria de Fluxo (RPT08J) - FIOCRUZ – Amazônia (ILMD), utilizando citômetro de fluxo, FACSCanto II (BD) no canal FL-1 com software Getting Started with BD FACSDiva™ e FlowJo™ versão 10.

A porcentagem de inibição das amostras foi calculada de acordo com a fórmula: % Inibição = $100 - \frac{(\% \text{Fluorescência amostra} - \% \text{Fluorescência Eritrócitos sadios})}{(\% \text{Fluorescência Controle} - \% \text{Fluorescência Eritrócitos sadios})} \times 100$. A concentração inibitória em 50 % da parasitemia total (CI₅₀) foi determinada pelo software Graphpad Prism 7

através de um gráfico do Log da dose *versus* inibição (expresso em porcentagem em relação ao controle) por análise de regressão não linear.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PARTE I – Caracterização química

Visando a caracterização química dos extratos das espécies de *Aniba* (*A. panurensis*, *A. roseadora*, *A. ferrea* e *A. parviflora*), realizou-se a preparação dos extratos etanólicos, partições em microescala e com essas amostras, fez-se as análises cromatográficas (CCDAE) e espectrométricas (EM e fragmentação).

5.1.1 Rendimentos Extratos

A partir do processo de maceração exaustiva a temperatura ambiente foram obtidos oito extratos, com rendimentos que variaram de 2,49 - 14,04%, valores que estão localizados na tabela 8. Os melhores rendimentos obtidos corresponderam a parte das folhas das espécies, com valores que variaram de 6,79 - 14,04%, na qual a melhor porcentagem foi de *A. roseadora*. Os rendimentos dos galhos oscilaram entre 2,49-6,56%, com o melhor rendimento para *A. ferrea*.

O rendimento do extrato das folhas de *A. roseadora* foi bem próximo do valor obtido no trabalho de tese de Custódio (2013), que apresentou valor de 13,09% para o método de maceração. Na dissertação de Alcântara (2009) foram obtidos rendimento mais baixos (8,04%) para os extratos das folhas de *A. panurensis* e valores maiores (6,09%) para os galhos; e a porcentagem para o extrato de galhos de *A. roseadora* (4,70%) foi mais próximo quando comparado com os resultados desse trabalho, utilizando o mesmo método.

No estudo de Custódio (2013) foram utilizados dois métodos diferentes de extração, com isso foi observado que os melhores rendimentos foram obtidos para o método de Soxhlet, apresentando porcentagens de 21,65% (folhas) e 13,21% (galhos) para os extratos de *A. roseadora*. O estudo de tese de Fernandes (2017) demonstrou melhor rendimento para o extrato dos galhos de *A. panurensis*, a partir da extração por Soxhlet, com rendimento de 6,0%. Esses

melhores rendimentos devem estar associados a utilização de temperatura do método de extração por Soxhlet, que se diferencia do método de maceração por ser realizado a temperatura ambiente, na qual utilizou-se apenas a agitação mecânica para melhor extração das substâncias.

Espécie	Rendimento (%)	
	Folhas	Galhos
<i>Aniba panurensis</i>	12,67	2,49
<i>Aniba roseadora</i>	14,04	3,62
<i>Aniba ferrea</i>	6,79	6,56
<i>Aniba parviflora</i>	11,72	4,46

Tabela 8 - Rendimento dos extratos.

5.1.2 Partição líquido-líquido em microescala

Após o desenvolvimento das partições e com as amostras secas, foi realizado a pesagem e assim calculados os respectivos rendimentos (tabela 9). Com base nos dados tabelados, pode-se constatar que as frações metanólicas dos galhos apresentaram os maiores rendimentos (57-87%), quando comparados com as amostras das folhas, que apresentaram valores próximos para as duas frações. Essa diferença de porcentagens pode estar associada a maior composição lipofílica dos extratos de folhas quando comparadas com os galhos, que resultam nas porcentagens mais altas das frações hexânicas das folhas.

Amostra		Massa (g)		Rendimento %	
		Hex	MeOH	Hex	MeOH
<i>A. panurensis</i>	Folhas	0,1758	0,1525	35,16	30,50
	Galhos	0,0935	0,3049	18,70	60,98
<i>A. roseadora</i>	Folhas	0,1945	0,2212	38,90	44,24
	Galhos	0,1620	0,2848	32,40	56,96
<i>A. férrea</i>	Folhas	0,0994	0,2527	19,88	50,54
	Galhos	0,0176	0,4350	3,52	87,00
<i>A. parviflora</i>	Folhas	0,1702	0,2182	34,04	43,64
	Galhos	0,0415	0,3736	8,3	74,72

Tabela 9 - Rendimento em massa e porcentagem das frações da partição em microescala com 500 mg de extrato.

Os extratos dos galhos de *A. ferrea* e *A. parviflora* caracterizaram-se pelas maiores porcentagens das frações metanólicas, com valores de 87 e 74%, respectivamente. As amostras de folhas de *A. roseadora* e *A. ferrea*, quando compradas com as frações metanólicas de folhas, apresentaram porcentagens mais alta com valores de 44 e 50%.

5.1.3 Caracterização do perfil cromatográfico das espécies de *Aniba*

A caracterização do perfil cromatográfico foi realizada utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada de alta eficiência (CCDAE), na qual foram analisadas as frações em hexano e em metanol da partição em microescala, para um estudo preliminar dessas amostras.

5.1.3.1 Análise das frações hexânicas

As amostras em hexano da partição em microescala foram analisadas por CCDAE. Essas amostras foram preparadas na concentração de 4 mg/mL, sendo borrifados na placa 5 µL das amostras de folhas e 10 µL das amostras de galhos. Utilizaram-se placas cromatográficas cortadas de 5 cm de altura por 16 cm de comprimento e com a adição da amostra a partir da aplicação automática foram produzidas bandas de 1 cm, com distâncias entre amostras de 0,86 cm. As frações hexânicas foram analisadas a partir da revelação na luz branca, nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, vanilina sulfúrica e Dragendorff (figura 15).

Após a placa ser eluída, foram evidenciadas na luz branca a formação de manchas apenas para as amostras de folhas de todas as espécies, sendo assim observados sete rf's semelhantes (0,15; 0,23; 0,32; 0,35; 0,42; 0,47 e 0,56), com colorações que variaram entre amarelo e verde. A amostra de folhas de *Aniba ferrea* (número 5 na placa) foi a única que apresentou diferença, correspondente a uma mancha amarela no rf: 0,84.

Na placa revelada no UV no comprimento de onda de 254 nm, as substâncias foram reveladas com coloração preta. Nessa placa foi notável a semelhança das amostras de folhas, como pode ser constatado na placa pelos valores de rfs: 0,12; 0,24; 0,32; 0,44; 0,56 e 0,58. As amostras correspondentes a parte dos galhos possuíram diferenciados rfs (0,13; 0,15; 0,18; 0,67; 0,68). As amostras que se destacaram foram pertencentes a espécie *A. parviflora* (folhas e galhos), na qual observa-se perfis diferenciados, além da presença de três substâncias majoritárias (0,13; 0,15; 0,18) (figura 15).

Na terceira placa revelada no UV no comprimento de onda de 366 nm pode-se observar mais substâncias do que na placa em revelada em 254 nm. Nessa placa foi verificada a semelhança das amostras das folhas de diferentes espécies, com substâncias de coloração vermelha dada pelos rfs: 0,03; 0,25; 0,34; 0,38; 0,43; 0,48; 0,56 e 0,72. A substância correspondente ao rf 0,34 (vermelha) destaca-se por estar presente em todas as espécies e pode ser um dos marcadores desse gênero. As amostras de *A. panurensis* (folhas e galhos) assemelham-se pelos rfs: 0,13; 0,17 e 0,34; e diferenciam-se pela presença dos rf's :0,38; 0,43; 0,48; 0,56 e 0,72 para a fração de folhas; e por uma mancha azul no rf 0,59 para a amostra de galhos. As amostras de *A. roseadora* apresentaram perfis diferentes, como poder ser observado pelos rfs: 0,26; 0,55 e 0,59; que possuem coloração azul e vermelha, na qual as substâncias de coloração azul não são visualizadas nas frações hexânicas das folhas. As amostras de *A. ferrea* diferiram pela substância localizada no rf 0,55 dos galhos. As amostras de *A. parviflora* assemelham-se pelos rf's 0,34 e 0,38; e diferenciaram pelos rf: 0,14; 0,43; 0,48; 0,56 e 0,72, presente nas folhas; e para os galhos em relação aos rf: 0,13; 0,18 e 0,60.

A placa cromatográfica revelada em vanilina sulfúrica apresentou uma substância de cor roxa que pode ser um marcador químico das espécies de *Aniba*, pois encontra-se presente em todas as frações no rf: 0,47, com a mesma coloração roxa. As frações das folhas de *A. parviflora* diferenciaram-se muito das outras espécies (*A. panurensis*, *A. roseadora* e *A. ferrea*)

que tiveram perfil mais parecido. A semelhança entre as três espécies (spots: 1, 3 e 5) são relacionadas aos rfs: 0,41 (amarelo); 0,47 (roxo); 0,55 (verde); 0,70 (rosa); 0,81 (roxo); 0,85 (roxo). Para as folhas da espécie *A. parviflora* foi observada a presença de duas substâncias (rfs: 0,47 e 0,55) semelhantes as outras espécies (spots: 1, 2 e 3). A espécie *A. panurensis* distinguiu-se das outras espécies pelas substâncias que estão ambas as partes da planta, que possuem rfs: 0,11 (amarelo queimado) e 0,26 (verde). A espécies *A. roseadora* são bem semelhantes e caracterizando-se pelos rfs: 0,09 (cinza) e 0,23 (cinza). As amostras de *A. ferrea* não possuíram muitas semelhanças, diferenciando-se pelas substâncias que estão no intervalo de rf de 0,40-0,20. A principal diferença observada entre as amostras de folhas e galhos de *A. parviflora* corresponde aos majoritários observados nessas frações, na qual observa-se a presença de uma substância em ambas as amostras com rf de 0,14 de coloração preta e os galhos revelaram outra substância em 0,18 com coloração (verde musgo).

Como pode ser observado na figura 15, na placa revelada em dragendorff, confirma-se a presença de alcaloides nas folhas e galhos de *A. parviflora*, que se diferenciam pois para as folhas há apenas um rf (0,15) e, para os galhos, dois rfs (0,13 e 0,18).

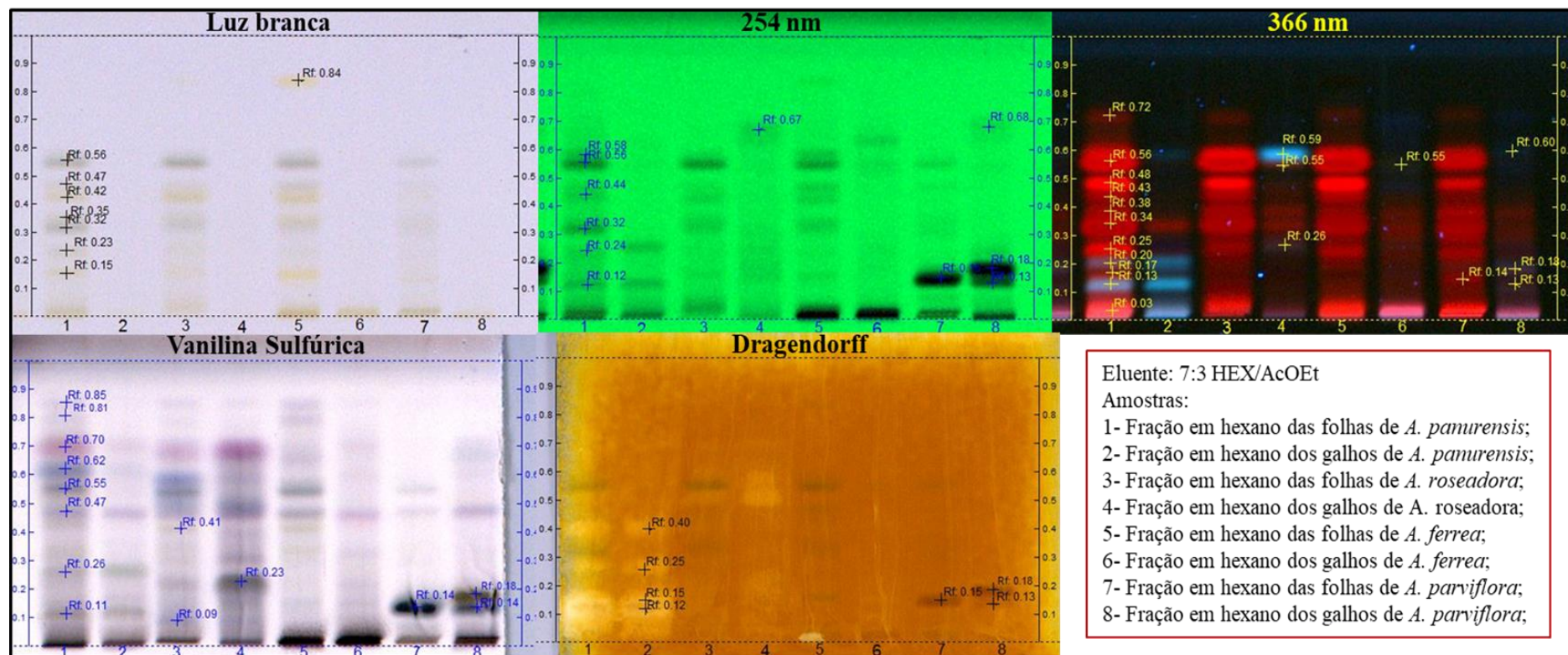


Figura 15 - Placas das frações hexânicas da partição em microescala.

5.1.3.2 Análise das frações metanólicas

As amostras correspondentes às frações metanólicas da partição em microescala foram analisadas por HPTLC. Essas amostras foram preparadas na concentração de 4 mg/mL, sendo borrifados 10 µL das amostras de galhos e folhas. Utilizou-se placas cromatográficas cortadas 5 cm de altura por 16 cm de comprimento e com a adição da amostra a partir da aplicação automática, sendo produzidas bandas de 1 cm com distância entre amostras de 0,86 cm.

Na placa revelada no UV no comprimento de onda de 254 nm (figura 16) foram observadas apenas semelhanças entre as frações metanólicas dos galhos e folhas de cada espécie. Os rfs 0,81 e 0,90 são comuns para folhas e galhos de *A. panurensis*. Outros rfs, como: 0,09; 0,35; 0,58 podem ser observados nas folhas e não são observados na amostra dos galhos. Os rfs: 0,23; 0,42; 0,68; 0,72 e 0,80 são comuns para folhas e galhos de *A. roseadora*; para a parte das folhas há uma substância (rf 0,60) que não é observada nos extratos de galhos. Em relação às amostras de *A. ferrea*, não pode ser obtida muita informação, pois só são evidenciadas algumas substâncias para as folhas dessa amostra, que contém rfs: 0,09; 0,13; 0,60 e 0,81. As amostras de *A. parviflora* apresentaram o rf 0,89 em comum, diferenciando-se apenas pelas manchas em 0,60 e 0,75.

A partir da placa revelada no UV no comprimento de onda 366 nm podem ser visualizadas as manchas nos rf's 0,06; 0,15 e 0,77 que são comuns em todas as frações metanólicas. As amostras de *A. panurensis* (1 e 2) assemelham-se pela substância majoritária que está localizada no rf 0,89. A amostra de folhas de *A. panurensis* diferenciou-se pela presença de um maior número de substâncias e com diferentes cores nos rf: 0,53; 0,58; 0,62; 0,67; 0,71; 0,81 e 0,97. As amostras de *A. roseadora* de folhas e galhos (3 e 4) se diferenciam pelas manchas no rfs 0,60 e 0,81 para as folhas e o rf 0,57 para os galhos; nos rfs 0,66; 0,72 e 0,81 observa-se manchas que não absorvem bem nesse comprimento de onda. As amostras de

A. ferrea se diferenciam pelas manchas nos rfs: 0,10; 0,67; 0,71 e 0,81. As amostras de *A. parviflora* distinguiram-se pelas manchas nos rfs 0,61; 0,67; 0,71 e 0,84; assemelhando-se pelos rf: 0,33; 0,53; 0,91; 0,97 (figura 16).

Na terceira placa, revelada em vanilina sulfúrica, as amostras de *A. panurensis* demonstraram ter substâncias com os mesmos rfs e coloração, tais como: 0,10; 0,52; 0,75 e 0,90. As amostras de *A. roseadora* assemelham-se pelos rfs 0,23; 0,66 e 0,72; diferenciaram-se pelas substâncias em 0,81 (frações das folhas) e 0,60 (frações dos galhos). As amostras de *A. parviflora* se assemelharam pelas manchas 0,23 e 0,89 e diferenciaram pelas manchas em 0,34 e 0,60 que estão presentes nas folhas.

A última placa revelada em Dragendorff confirma a presença de alcaloides para todas as espécies. Observa-se a presença de alcaloides entre os rfs 0,8-0,9, entre outros que ficaram retidos na base por serem mais polares. Para as folhas e galhos de *A. panurensis* foi observada a presença de um alcaloide em 0,83 que está presente em ambas as partes. E em 0,87 também foi revelado outro alcaloide, que só foi observado para as folhas dessa espécie. Além disso, foi detectado um alcaloide em ambas as partes das amostras de *A. parviflora*, no rf 0,88.

Esse estudo do perfil cromatográfico é essencial para compor a descrição da composição química dos extratos de *Aniba*, que será complementado com o isolamento dos padrões mais importantes, por meio da observação das substâncias principais, caracterizados pelos rf mais comuns nos extratos, direciona-se o processo de isolamento apresentado a seguir.

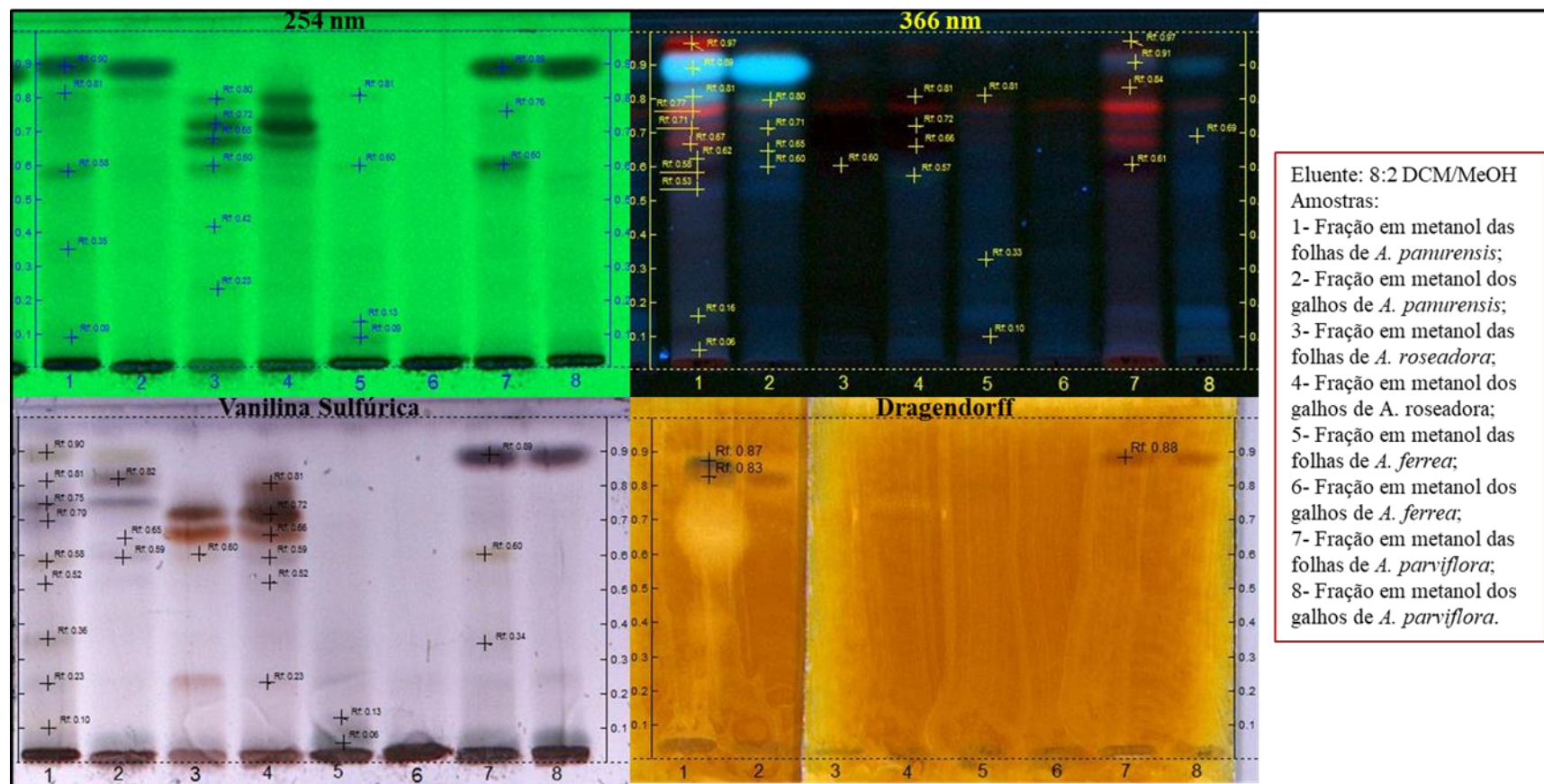


Figura 16 - Placas das frações metanólicas da partição em microescala.

5.1.4 Caracterização do perfil espectrométrico das espécies de *Aniba*

A caracterização do perfil espectrométrico foi desenvolvida a partir da análise das frações metanólicas das espécies de *Aniba* no modo positivo e negativo, utilizando fonte de ionização ESI. Essa análise foi dividida na caracterização do perfil alcaloídico e do perfil flavonoídico, assim comparando os dados obtidos com o que já foi relatado para o gênero.

5.1.4.1 Perfil alcaloídico

A caracterização espectrométrica do perfil alcaloídico foi desenvolvido por meio da análise das frações metanólicas no modo positivo pela fonte ESI. O uso da fonte no modo positivo pode ser justificado pelas características da classe da substância que se deseja detectar, como é o caso dos alcaloides, que são moléculas com característica básica, devido a presença do nitrogênio.

Após as análises de EM-ESI no modo positivo os dados foram tabelados e comparados com o que já foi descrito para o gênero de *Aniba*. A faixa de detecção dos alcaloides de *Aniba* foi de 200-450 Da, dado obtido após a construção da tabela com as substâncias já relatadas na literatura para o gênero. As frações metanólicas analisadas por espectrometria de massas foram resultantes das partições em microescala, na qual foram obtidas frações desengraxadas.

Na tabela 10, que foi gerada com os dados espectrométricos (anexo 1), podem ser observados os dados relacionados a intensidade (%), a razão massa carga m/z ($M+H$), o nome das possíveis estruturas e as espécies que já foram relatadas com a presença dessa substância, além da sua respectiva referência.

Os primeiros dados observados na tabela 10 são dos íons detectados para os extratos desengraxados de folhas e galhos de *A. panurensis*. Comparando os dados, observa-se a presença dos íons de m/z 424, 330, 328, 312 e 300 em ambas as partes da planta, sendo

importante destacar que eles foram mais intensos na fração que corresponde aos galhos e o íon mais intenso de ambas as amostras foi o m/z 330. Essas amostras diferenciaram-se pelos íons menos intensos detectados na fração de galhos na faixa de m/z 204-298 e o pelo íon m/z 305. O íon de m/z 424 pode corresponder a anibamina, que já foi isolada do tronco de *A. panurensis* e já foi descrita com atividade antimicrobiana (KLAUSMEYER et al., 2004). No trabalho de dissertação de Souza (2014) foi detectado apenas o íon de m/z 330 para a fração alcaloídica das folhas de *A. panurensis*.

Comparando os dados espectrométricos de *A. roseadora*, que encontram-se descritos na tabela 10, observa-se a presença dos íons de m/z 204, 256, 270, 288, 298, 300, 312, 328, 330 e 424 em ambas as partes da planta, na qual os íons mais intensos são de m/z 204 e 330. Os íons 204, 244 e 330 já foram descritos anteriormente para o tronco dessa espécie em outros trabalhos (MORS et al., 1957; CORREA et al., 1975; FERREIRA et al., 1980). A amostra correspondente as folhas diferenciou-se pela presença dos íons m/z 272 e o 296, já a amostra de galhos pela presença do íon m/z 282.

Na tese de Custódio (2013) foi desenvolvido um estudo com frações alcaloídicas dos galhos da espécie *A. roseadora*, nesse trabalho foram detectados os íons m/z 204 (anibina), 286 (coclorina), 300 (*N*-metilcoclorina), 314 (norboldina), 328 (boldina), 330 (reticulina); além disso, esses íons foram confirmados por comparação do perfil de fragmentação. Dessas estruturas, a da anibina (m/z 204) foi a única isolada da fração alcaloídica e confirmada pelos dados de RMN de ^{13}C e ^1H .

Na mesma tabela pode-se verificar o perfil da espécie *A. ferrea*, em que pode-se destacar a presença dos íons m/z 330, 300 e 328 em ambas as partes da planta, onde o íon mais intenso é o m/z 330. Essas amostras diferenciaram-se pelos íons na faixa de m/z 204-298, 305 e 312 detectado para os galhos. Os íons 330, 300 e 328 já tinham sido detectados nas frações

alcaloídicas dos galhos de *A. ferrea* no estudo de dissertação Souza (2014), além de serem isolados os íons 330 e 328, que foram identificados por meio de dados de RMN de ^1H como reticulina e laurotetanina, respectivamente.

A última espécie analisada foi de *A. parviflora*, nessas amostras constatou-se a presença dos mesmos íons m/z 330, 328 e 300 em ambas as partes da planta, onde o íon mais intenso foi o de m/z 330. A diferença observada entre as amostras de *A. parviflora*, correspondeu aos íons presentes nos galhos da espécie, tais como: m/z 256 e 424. As massas correspondentes aos íons m/z 330 e 300 já foram detectadas em trabalhos anteriores, como na dissertação de Souza (2014), que foi estudada apenas a fração dos galhos de *A. parviflora*.

Com base nos dados espectrométricos obtidos para as quatro espécies de *Aniba*, os íons que foram observados mais vezes nesses extratos foram: 330, 300 e 328. O íon de maior intensidade que está presente em todas as amostras correspondeu ao íon m/z 330, que pode ser relacionado a reticulina. O segundo íon de maior intensidade mais abundante nas espécies é o íon m/z 300, que pode corresponder a três moléculas: *N*- metilcocclaurina, *R*-(+)-noranicanina e a (+)-canelillina. O terceiro íon mais comum nas espécies foi o m/z 328 pode estar associado ao alcaloide isoboldina.

Comparando as diferentes partes das espécies, observa-se que os galhos apresentaram as maiores intensidades de 80-100% para o íon 330, 13-35% para o íon 328 e 20-40% para o íon 300, quando comparado com a parte das folhas que tiveram as menores intensidade para íons de m/z 330 (17-76%), 328 (7-11%) e 300 (5-22%).

Espécie	Parte da planta	Intensidade (%)	m/z (M+H)	Estrutura	Espécie	Referência
<i>Aniba panurensis</i>	Folhas	7,72	300, 22	<i>N</i> -metilcoclaurina (<i>R</i>)-(+)-noranicanina (+)-canelillina	<i>A. muca</i> <i>A. canelilla</i>	Bravo (1996) Oger (1992) Oger (1993)
		5,53	312,38	(+)-manibacarina (+)-pseudoanibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		5,14	328,24	Isoboldina	<i>A. muca</i>	Bravo (1996)
		44,70	330,24	Reticulina	<i>A. muca</i> <i>A. roseadora</i>	Bravo (1996) Ferreira (1980)
		5,52	424,45	Anibamina	<i>A. panurensis</i>	Klausmeyer (2004)
	Galhos	5,16	204,05	Anibina	<i>A. roseadora</i> <i>A. fragrans</i>	Mors (1957)
		8,4	244,41	Duckeina	<i>A. roseadora</i>	Correa (1975)
		8,75	256,26	Riparina I	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		7,34	270,16	(-)-norcanelillina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		8,07	272,18	Riparina II	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		11,51	282,04	Anicanina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		16,22	288,22	Riparina III	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		8,85	296,15	(-)- α -8-metilpseudoanibacarina (-)- β -8-metilpseudoanibacarina (-)- α -8-methylanibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		10,2	298,19	canelillinoxina (-)-anibacarina	<i>A. canellila</i>	Oger (1993)
		40,84	300,20	<i>N</i> -metilcoclaurina (<i>R</i>)-(+)-noranicanina (+)-canelillina	<i>A. muca</i> <i>A. canelilla</i>	Bravo (1996) Oger (1992) Oger (1993)
		7,52	305,25	Cecilina	<i>A. santalodora Ducke</i>	Aguiar (1980)
		22,34	312,17	(+)-manibacarina (+)-pseudoanibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)

<i>Aniba roseadora</i>	Folhas	35,26	328,22	Isoboldina	<i>A. muca</i>	Bravo (1996)
		82,95	330,18	Reticulina	<i>A. muca</i> <i>A. roseadora</i>	Bravo (1996) Ferreira (1980)
		6,08	424,34	Anibamina	<i>A. panurensis</i>	Klausmeyer (2004)
		56,86	204,09	Anibina	<i>A. roseadora</i> <i>A. fragrans</i>	Mors (1957)
		8,39	244,16	Duckeina	<i>A. roseadora</i>	Correa (1975)
		8,07	256,07	Riparina I	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		10,81	270,17	(-)-norcanelillina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		8,87	272,02	Riparina II	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		5,39	288,21	Riparina III	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		8,44	296,04	(-)- α -8-metilpseudoanibacarina (-)- β -8-metilpseudoanibacarina (-)- α -8-methylanibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		10,56	298,22	Canelillinoxina (-)-anibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		7,14	300,35	<i>N</i> -metilcoclorina (<i>R</i>)-(+)-noranicanina (+)-canelillina	<i>A. muca</i> <i>A. canelilla</i>	Bravo (1996) Oger (1992) Oger (1993)
		5,39	312,24	(+)-manibacarina (+)-pseudoanibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		9,61	328,09	Isoboldina	<i>A. muca</i>	Bravo (1996)
		76,79	330,22	Reticulina	<i>A. muca</i> <i>A. roseadora</i>	Bravo (1996) Ferreira (1980)
		16,39	424,20	Anibamina	<i>A. panurensis</i>	Klausmeyer (2004)
	Galhos	51,36	204,09	Anibina	<i>A. roseadora</i> <i>A. fragrans</i>	Mors (1957)
		7,41	256,25	Riparina I	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		6,71	270,29	(-)-norcanelillina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)

<i>Aniba ferrea</i>		6,18	282,16	Anicanina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		8,44	288,31	Riparina III	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		6,47	298,27	Canelillinoxina (-)-anibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		20,99	300,26	<i>N</i> -metilcoclorina (<i>R</i>)-(+)-noranicanina (+)-canelillina	<i>A. muca</i> <i>A. canelilla</i>	Bravo (1996) Oger (1992) Oger (1993)
		6,33	312,33	(+)-manibacarina (+)-pseudoanibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		30,34	328,18	Isoboldina	<i>A. muca</i>	Bravo (1996)
		93,07	330,22	Reticulina	<i>A. muca</i> <i>A. roseadora</i>	Bravo (1996) Ferreira (1980)
		11,07	424,23	Anibamina	<i>A. panurensis</i>	Klausmeyer (2004)
	Folhas	22,97	300,19	<i>N</i> -metilcoclorina (<i>R</i>)-(+)-noranicanina (+)-canelillina	<i>A. muca</i> <i>A. canelilla</i>	Bravo (1996) Oger (1992) Oger (1993)
		10,96	328,20	Isoboldina	<i>A. muca</i>	Bravo (1996)
		47,76	330,22	Reticulina	<i>A. muca</i> <i>A. roseadora</i>	Bravo (1996) Ferreira (1980)
		6,56	204,14	Anibina	<i>A. roseadora</i> <i>A. fragrans</i>	Mors (1957)
	Galhos	5,47	244,23	Duckeina	<i>A. roseadora</i>	Correa (1975)
		6,69	256,23	Riparina I	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		9,77	270,35	(-)-norcanelillina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		5,84	272,30	Riparina II	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		6,86	288,26	Riparina III	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
		5,26	296,23	(-)- α -8-metilpseudoanibacarina (-)- β -8-metilpseudoanibacarina (-)- α -8-methylanibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		11,63	298,26	Canelillinoxina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)

		(-)-anibacarina				
		40,42	300,22	<i>N</i> -metilcoclaurina (<i>R</i>)-(+)-noranicanina (+)-canelillina	<i>A. muca</i> <i>A. canelilla</i>	Bravo (1996) Oger (1992) Oger (1993)
		6,32	305,25	Cecilina	<i>A. santalodora Ducke</i>	Aguiar (1980)
		8,43	312,33	(+)-manibacarina (+)-pseudoanibacarina	<i>A. canelilla</i>	Oger (1993)
		15,32	328,21	Isoboldina	<i>A. muca</i>	Bravo (1996)
		100,00	330,22	Reticulina	<i>A. muca</i> <i>A. roseadora</i>	Bravo (1996) Ferreira (1980)
		Folhas		11,78	300,15	<i>N</i> -metilcoclaurina (<i>R</i>)-(+)-noranicanina (+)-canelillina
2,96	328,17			Isoboldina	<i>A. muca</i>	Bravo (1996)
17,77	330,21			Reticulina	<i>A. muca</i> <i>A. roseadora</i>	Bravo (1996) Ferreira (1980)
9,74	256,16			Riparina I	<i>A. riparia</i>	Barbosa-Filho (1987)
22,86	300,2			<i>N</i> -metilcoclaurina (<i>R</i>)-(+)-noranicanina (+)-canelillina	<i>A. muca</i> <i>A. canelilla</i>	Bravo (1996) Oger (1992) Oger (1993)
Galhos		13,26	328,17	Isoboldina	<i>A. muca</i>	Bravo (1996)
		100	330,19	Reticulina	<i>A. muca</i> <i>A. roseadora</i>	Bravo (1996) Ferreira (1980)
		5,82	424,31	Anibamina	<i>A. panurensis</i>	Klausmeyer (2004)

Tabela 10 - Dados espectrométricos obtidos das espécies de *Aniba* em comparação com dados de alcaloides da literatura.

5.1.4.1.1 Proposta de fragmentação dos principais alcaloides detectados

A partir dos dados espectrométricos obtidos (anexo 2), selecionou-se os principais íons para a fragmentação e dessa forma realizar a confirmação de suas estruturas por meio de comparação com dados da literatura. Os fragmentos principais podem ser observados na tabela 11.

Espécies	Parte da planta	Íon $[M+H]^+$	Fragmentação	
			ms^2	ms^3
<i>A. panurensis</i>	Folhas	330	192	177
		300	269	175
		328	297	265
	Galhos	330	192	177
		300	269	175
		328	297	265
<i>A. roseadora</i>	Folhas	330	192	177
		300	269	
		328	297	265
	Galhos	330	192	177
		300	269	175
		328	311	296
<i>A. ferrea</i>	Folhas	330	192	177
		300	269	175
		328	311	296
	Galhos	330	192	177
		300	269	175
		328	313	298
<i>A. parviflora</i>	Folhas	330	192	177
		300	269	143
		328	311	
	Galhos	330	192	177
		300	269	175
		328	311	296

Tabela 11 - Dados espectrométricos de fragmentação (ms^2 e ms^3) dos principais íons detectados nas espécies de *Aniba*.

O íon m/z 330, que foi a principal massa detectada em todas as frações metanólicas, foi compatível com alcaloide reticulina, substância que já foi descrita em outras espécies como: *A. muca*, *A. roseadora* e *A. ferrea* (BRAVO et al., 1996; FERREIRA et al., 1980; SOUZA, 2015). Os íons ao serem fragmentados geraram os fragmentos observados na tabela 11, tais com m/z

192 e 177, que são semelhantes aos descritos na literatura (SCHIMIDT et al., 2005; WU et al., 2010).

Na figura 17 podem ser observadas as propostas de fragmentação do íon m/z 330. A formação do fragmento m/z 299 deve-se a perda de 31 Da correspondente a metilamina (NH_2CH_3). O íon m/z 192 (grupo benzilisoquinolina) é gerado pela perda de 138 Da (m/z 137 de $\text{C}_8\text{H}_9\text{O}_2 + m/z$ 1 de H), que é obtido a partir de uma reação de McLafferty, que envolve o próton do nitrogênio do tetrahydroisoquinolina e o grupo substituinte benzila. Os fragmentos m/z 137, 175 e 143, que são característicos da reticulina podem ser gerados a partir do íon m/z 299 (SCHIMIDT et al., 2005).

A reticulina é um alcaloide verdadeiro derivado do aminoácido *L*-tirosina, pertencente a subclasse dos benziltetrahydroisoquinolinos, que são formados a partir da reação de dopamina com o 4-hidroxifenilacetaldeído por meio de uma reação de Mannich, com reações de *N* e *O*-metilação; e oxidação. A (*S*)-reticulina é precursor dos alcaloides aporfínicos, protoberberínicos e benzofenantridinas, já a (*R*)-reticulina possui uma distribuição restrita e é responsável pela formação dos alcaloides da subclasse dos morfinanos (DEWICK, 2009)

Segundo o estudo quimiotaxonômico de Otto Gottlieb publicado em 1981, que tem como título “*Chemosystematics of Aniba*”, os alcaloides benziltetrahydroisoquinolinos foram ditos como possíveis constituintes gerais do gênero, como é o caso da reticulina. Esse estudo também destaca que o gênero tem uma simplicidade biossintética na produção dos metabólitos, quando comparado com outros gêneros de *Lauraceae*.

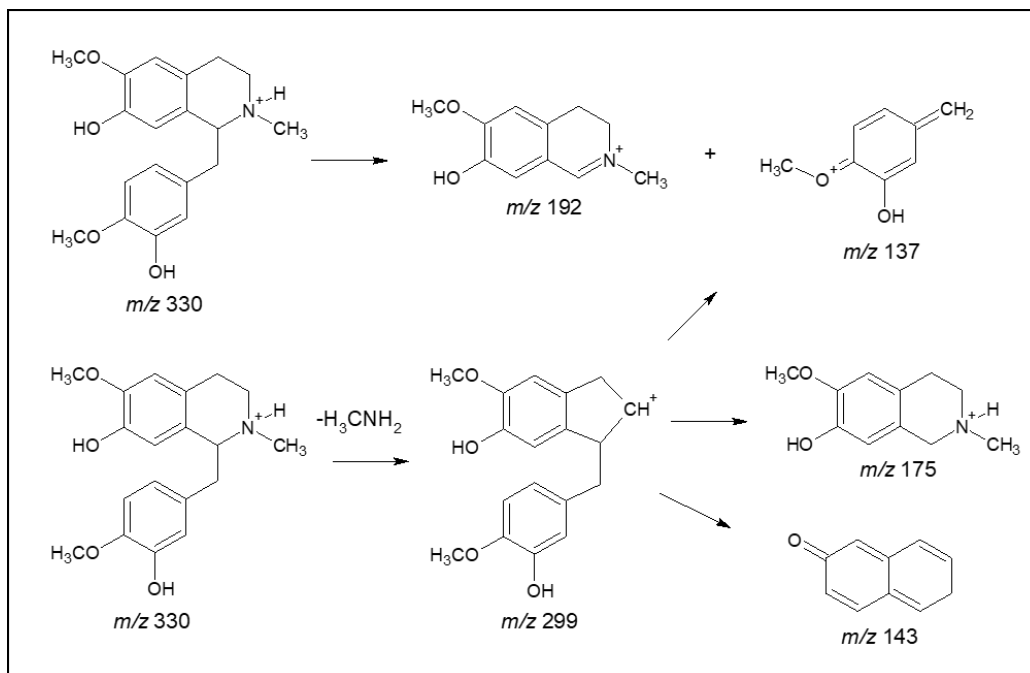


Figura 17 - Proposta de fragmentação do íon m/z 330. Fonte: Schimdt et al., 2005.

O segundo íon mais detectado nas frações metanólicas foi de m/z 300, que apresentou massa semelhante a *N*-metilcocclaurina, alcaloide que já foi descrito em *A. muca* (BRAVO et al., 1996), a (R)-(+)-noranicanina e (+)-canellilina, que já foram relatados para espécies *A. canellila* (OGER et al., 1993). As diferenças das estruturas estão relacionadas as posições de oxidação e metilação, como pode ser observado nas estruturas da figura 18, consequentemente geram diferentes fragmentos. As diferenças consistem nas metilas ligadas ao nitrogênio e nas *O*-metilações do núcleo tetraidroisoquinoliníco, além de diferentes posições de hidroxilação dos anéis benzílicos contendo substituições em *meta* e *para*.

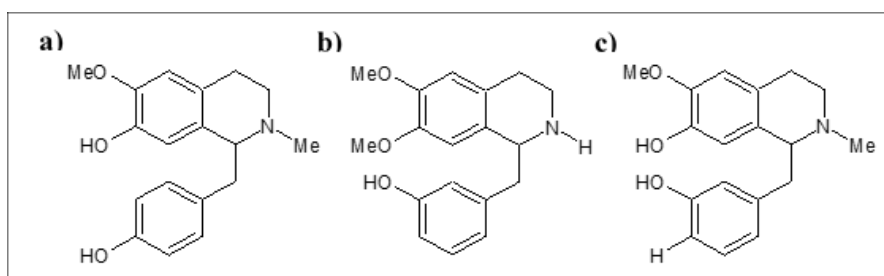


Figura 18 - Moléculas com m/z 300: a) *N*-metilcocclaurina, b) (R)-(+)-noranicanina e c) (+)-canellilina.

O íon m/z 300 ao ser fragmentado, gerou íons de m/z : 269, 175 e 143 que são característicos do alcaloide *N*-metilcocclaurina (SCHIMIDT et al., 2005). A formação do

fragmento m/z 269 deve-se a perda de 31 Da correspondente a metilamina (NH_2CH_3), esse fragmento exclui a possibilidade de ser a (R)-(+)-noranicanina, restando duas possibilidades. O íon m/z 192 (grupo benzilisoquinolina) é gerado pela perda de 108 Da (m/z 107 de $\text{C}_7\text{H}_7\text{O}$ + m/z 1 de H), que é obtido a partir de uma reação de McLafferty, que envolve o próton do nitrogênio do tetrahydroisoquinolina e o grupo substituinte benzila. Os fragmentos m/z 107, 175 e 143, que são característicos da *N*-metilcoclaurina podem ser gerados a partir do íon m/z 269 (figura 19) (SCHIMIDT et al., 2005).

A *N*-metilcoclaurina pertence ao grupo dos alcaloides verdadeiros derivado do aminoácido *L*-tirosina, pertencente a subclasse dos benziltetrahydroisoquinolinos, que são formados a partir da reação de dopamina com o 4-hidroxifenilacetaldeído por meio de uma reação de Mannich, com reações de *N* e *O*-metilação; e oxidação (DEWICK, 2009). A presença da *N*-metilcoclaurina está associada a biossíntese da reticulina, sendo assim um precursor. A menor abundância dessa substância deve estar associada a utilização da *N*-metilcoclaurina para produção da reticulina.

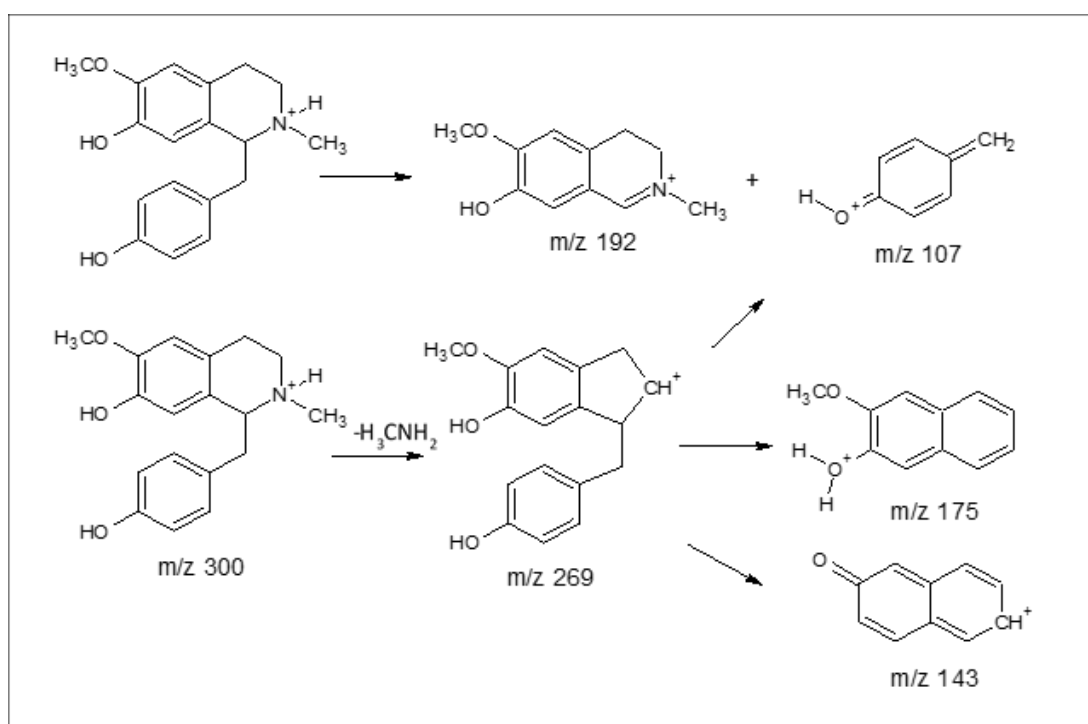


Figura 19 - Proposta de fragmentação do íon de m/z 300. Fonte: Schimidt et al., 2005.

O terceiro íon mais abundante foi o m/z 328, possui massa compatível com a isoboldina, alcaloides que já foi identificado na espécie *A. muca* (BRAVO et al., 1996). O íon de m/z 328 quando fragmentado, produziu os íons de m/z : 313, 311, 297, 298, 296 e 265, que a partir da compação com a literatura foi associado aos alcaloides isoboldina e laurotetanina (figura 20).

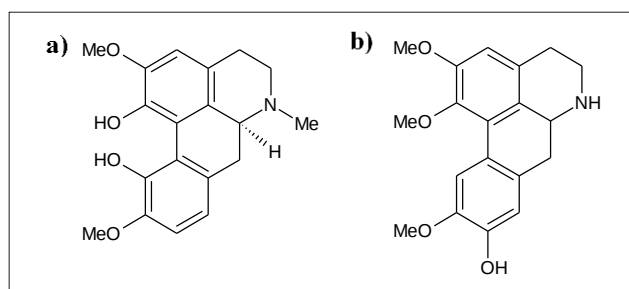


Figura 20 - Estruturas químicas da isoboldina (a) e da laurotetanina (b).

A fragmentação do alcaloide isoboldina gera os íons de m/z : 297 e 265 (WU et al., 2010), que foram fragmentos observados nas folhas de *A. panurensis* e *A. roseadora*, e nos galhos de *A. panurensis*. O segundo perfil de fragmentação que gerou o íon m/z 311 com perda de 17 Da (NH₃), foi relacionado ao alcaloide aporfínicos laurotetanina (SOARES et al., 2015), fragmento que foi observado nos galhos das espécies *A. roseadora*, *A. ferrea* e *A. parviflora*, e nas folhas de *A. ferrea* e *A. parviflora*. A laurotetanina já foi isolado nos galhos de *A. ferrea* no trabalho de dissertação de mestrado de Souza (2014). As propostas de fragmentação para ambas substâncias podem ser observadas na figura 21.

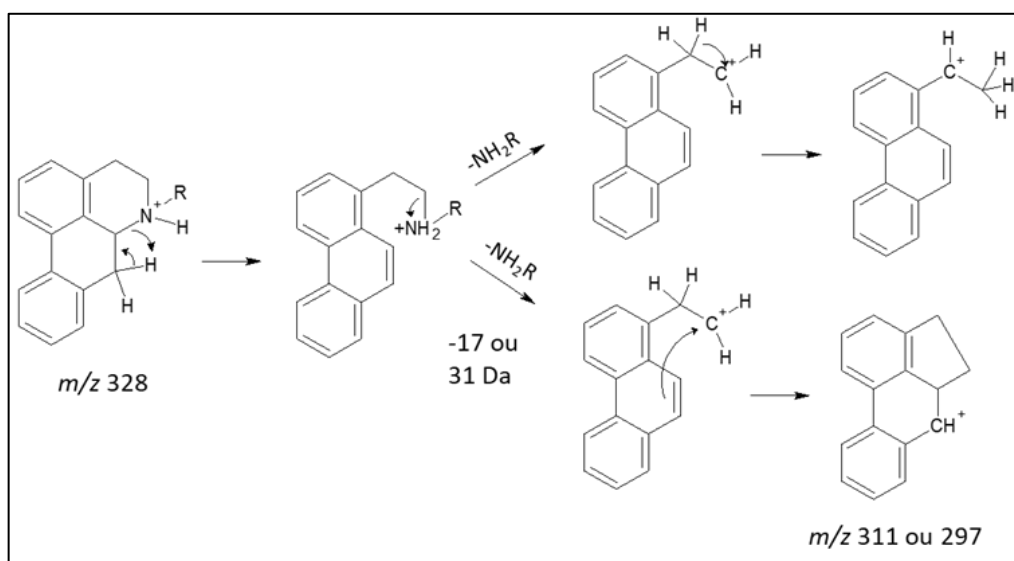


Figura 21 - Proposta de fragmentação do íon de m/z 328. Fonte: Stévigny et al., 2003.

5.1.4.2 Perfil flavonoídico

O estudo espectrométrico das frações metanólicas com finalidade de detecção dos flavonoides, constituiu a análise das amostras metanólicas ionizadas no modo negativo pela fonte ESI, devido a capacidade de melhor estabilização por deslocamento eletrônico pela perda do próton.

Após realizadas as análises de EM-ESI no modo negativo os dados foram tabelados e comparados com o que já foi descrito para o gênero de *Aniba*. A faixa de detecção dos flavonoides de *Aniba* foi de 250-870 Da, dado obtido após a construção da tabela com as substâncias já relatadas na literatura do gênero. As frações metanólicas analisadas por EM são resultantes das partições em microescala, na qual foram obtidas frações desengraxadas.

Na tabela 12, que foi gerada com os dados espectrométricos (anexo 3) podem ser observados os dados relacionados a intensidade (%), a razão massa carga m/z (M-H), o nome das possíveis estruturas e as espécies que já foram relatadas com a presença dessa substância, além da sua respectiva referência.

Analisando os dados tabelados verifica-se que para a espécie *A. panurensis* foram detectados seis íons semelhantes para as duas partes estudadas, esses íons são de m/z : 283, 311, 315, 329, 359 e 863. Os íons mais abundantes correspondem as massas de m/z 329 (64%) para as folhas e a m/z 311 (100%) para os galhos, que são os mais intensos e podem corresponder a 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona e 3, 5, 7 – tri-*O*-metilgalangina, respectivamente. A substância de m/z 329 já foi isolada em *A. species* (ROSSI et al., 1997) e a de m/z 311 foi isolada em *A. riparia* (FERNANDES et al., 1978).

O perfil espectrométrico de *A. roseadora* foi o mais simples, foram detectados poucos íons. O íon de m/z 739 foi único íon comum e também foi o mais abundante para as folhas e

para os galhos, com intensidades de 100% e 40%, respectivamente. Esse íon pode corresponder ao flavonoide kaempferol-O-deoxihexose-O-deoxihexosehexoside, detectado na espécie *A. parviflora* (GALAVERNA et al., 2015). Outro íon que foi semelhante em ambas as partes da amostra foi a m/z 259, corresponde a um fenólico cotoína hidróxido (benzofenona $C_6-C_1-C_6$) que já foi detectado nas folhas de *A. roseadora* (GALAVERNA et al., 2015).

A espécie *A. ferrea* apresentou um perfil semelhante para as amostras de folhas e galhos, pois apresentou os mesmos íons em intensidades próximas, tais como: 255, 283, 311, 593, 739 e 863. Entre esses íons o de m/z 863 foi o mais abundante em ambas as partes da planta com 100% de intensidade, esse íon pode corresponder a procianidina trimer que já foi detectada nas folhas da espécie *A. parviflora* (GALAVERNA et al., 2015).

O estudo do perfil flavonoídico de *A. parviflora* demonstrou a presença de seis íons semelhantes para as folhas e galhos, esses íons são: 255, 283, 289, 311, 593 e 863. Dentre esses íons, o mais intenso com valores de 67% e 55% correspondeu a m/z de 863, substância que já foi detectada nas folhas dessa espécie, que é nomeada de procianidina trimer. Sete substâncias detectadas para a parte das folhas de *A. parviflora* já haviam sido descritas para as folhas dessa espécie, esses íons são: 255 (pinocembrina), 289 (catequina), 593 (Kaempferol-O-rutinoside), 609 (hesperidina-7-rhamnoglucoside), 739 (kaempferol-O-deoxihexose-O-deoxihexosehexoside), 755 (Rhap-(1/2)-[Rhap-(1/6)]-Galp-(1/3)-O-quercetina) e 863 (GALAVERNA et al., 2015). As folhas e galhos diferenciaram-se pelos íons m/z 315, 401, 609, 739 e 755.

Comparando todas as espécies de *Aniba*, verifica-se que *A. roseadora* foi a mais diferente das outras, distinguindo-se também pela intensidade do íon m/z 739. As espécies *A. panurensis*, *A. ferrea* e *A. parviflora* assemelharam-se pela presença de três íons comuns de m/z 283 (Flavokawaina-B e Izalpinina), 311 (3, 5, 7 – tri-O-metilgalangina) e 863 (procianidina trimer).

Espécies	Parte da planta	Intensidade (%)	m/z (M-H)	Estrutura	Espécie	Referência
<i>Aniba panurensis</i>	Folhas	18,97	255,50	Pinocembrina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		8,32	269,48	Pinoestrombina (2S) – 5, 7 – di-O-metilpinocembrina	<i>A. riparia</i>	(Fernandes, 1978)
		69,04	283,40	flavokawaina-B izalpinina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		9,42	285,36	(2R, 3R)-2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-7-metoxiflavona	<i>A. sp</i> <i>A. riparia</i>	Rossi (1997)
		8,21	289,36	Catequina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		12,69	299,34	(2R, 3R) – 5, 7 – di-O-metil pinobanksina (2R, 3 R)-2,3-Dihidro-5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavona	<i>A. riparia</i> <i>A. sp</i>	Fernandes (1978) Rossi (1997)
		18,38	301,42	Trihidroxi- metoxiflavona	<i>A. sp</i>	Rossi (1997)
		74,69	311,43	3, 5, 7 – tri-O-metilgalangina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		19,43	315,44	(2R, 3R)-2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-7,4'- dimetoxiflavona 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.	<i>A. sp</i>	Rossi (1997)
		63,87	329,39	5-Hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	<i>A. sp</i>	Rossi (1997)
		29,72	359,42	6,7,3',4',5'-Pentametoxiflavona	<i>A. sp</i>	Rossi (1997)
		10,27	389,36	Rubranina	<i>A. roseadora</i>	Combes, 1970
		10,63	401,36	5,7,8,3',4',5' – hexametoxiflavona	<i>A. species</i>	Cavalcante (1982)
		25,99	593,22	Kaempferol-O-rutinoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		18,19	609,39	Hesperidina-7-rhamnoglucoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		26,73	739,37	kaempferol-O-deoxihexose-O-deoxihexosehexoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)

	Galhos	11,39	755,38	Rhap-(1 /2)-[Rhap-(1 /6)]-Galp-(1/3)-O-quercetina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		12,19	863,54	Procianidina trimer	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		43,37	283,41	Flavokawaina-B Izalpinina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		100,00	311,41	3, 5, 7 – tri-O-metilgalangina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		5,69	315,43	(2R, 3R)-2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-7,4'- dimetoxiflavona 3,5-dihidroxi-7,4'-dimetoxiflavona.	<i>A. sp</i>	Rossi (1997)
		21,47	329,40	5-Hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona	<i>A. sp</i>	Yoshida (1997)
		13,18	359,40	6,7,3',4',5'-Pentametoxiflavona	<i>A. sp</i>	Rossi (1997)
		9,83	863,26	Procianidina trimer	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		100,00	739,10	kaempferol-O-deoxihexose-O-deoxihexosehexoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		18,95	755,04	Rhap-(1 /2)-[Rhap-(1 /6)]-Galp-(1/3)-O-quercetina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
Aniba roseadora	Galhos	13,16	259,31	Cotoina hidróxido	<i>A. roseadora</i>	Galaverna (2015)
		40,21	739,11	Kaempferol-O-deoxihexose-O-deoxihexosehexoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
Aniba ferrea	Folhas	9,16	255,46	Pinocembrina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		7,20	283,52	Flavokawaina-B Izalpinina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		8,59	311,46	3, 5, 7 – tri-O-metilgalangina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		14,68	593,30	Kaempferol-O-rutinoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		6,00	739,35	Kaempferol-O-deoxihexose-O-deoxihexosehexoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)

<i>Aniba parviflora</i>	Galhos	100,00	863,25	Procianidina trimer	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		7,72	255,44	Pinocembrina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		5,42	283,48	Flavokawaina-B Izalpinina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		5,95	311,41	3, 5, 7 – tri- <i>O</i> -metilgalangina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		9,53	593,25	Kaempferol- <i>O</i> -rutinoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		5,59	739,08	Kaempferol- <i>O</i> -deoxihexose- <i>O</i> -deoxihexosehexoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		100,00	863,25	Procianidina trimer	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		12,26	255,48	Pinocembrina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
	Folhas	10,89	283,52	Flavokawaina-B Izalpinina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		6,77	289,31	Catequina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		13,91	311,44	3, 5, 7 – tri- <i>O</i> -metilgalangina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
		11,26	401,39	5,7,8,3',4',5' – hexametoxiflavona	<i>A. species</i>	Cavalcante (1982)
		9,83	593,40	kaempferol- <i>O</i> -rutinoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		5,75	609,32	hesperidina-7-rhamnoglucoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		24,44	739,31	kaempferol- <i>O</i> -deoxihexose- <i>O</i> -deoxihexosehexoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		6,77	755,37	Rhap-(1 /2)-[Rhap-(1 /6)]-Galp-(1/3)- <i>O</i> -quercetina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
		67,00	863,22	Procianidina trimer	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)

Galhos	5,46	255,49	Pinocembrina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
	7,55	283,51	Flavokawaina-B Izalpinina	<i>A. riparia</i>	Fernandes (1978)
	8,31	289,31	Catequina	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
	24,46	311,40	5,7,8,3',4',5' – hexametoxiflavona	<i>A. species</i>	Cavalcante (1982)
	5,47	315,33	(2R, 3R)-2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-7,4'- dimetoxiflavona 3,5-dihidroxi-7,4'-dimethoxiflavona.	<i>A. sp</i>	Rossi (1997)
	5,17	593,30	Kaempferol-O-rutinoside	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)
	54,83	863,25	Procianidina trimer	<i>A. parviflora</i>	Galaverna (2015)

Tabela 12 - Dados espectrométricos obtidos das espécies de *Aniba* em comparação com dados dos flavonoides da literatura.

5.1.4.2.1 Proposta de fragmentação dos principais flavonoides detectados

A partir dos dados espectrométricos (anexo 4) obtidos, selecionou-se os principais íons para a fragmentação e com isso realizar a confirmação de suas estruturas por meio de comparação com dados da literatura. Os íons selecionados para fragmentação foram: 283, 311, 739 e 863, porém os íons m/z 739 e 863 não fragmentaram. A fragmentação dos íons pode ser observada na tabela 13.

Espécies	Parte da planta	Íon [M-H] ⁻	Fragmentação
			ms ²
<i>A. panurensis</i>	Folhas	283	239
		311	183
	Galhos	283	239
		311	183
<i>A. ferrea</i>	Folhas	283	239
		311	183
	Galhos	283	169
		311	183
<i>A. parviflora</i>	Folhas	283	103
		311	183
	Galhos	283	239
		311	183

Tabela 13 - Dados espectrométricos de fragmentação (ms²) dos principais íons detectados nas espécies de *Aniba*.

Os íons que m/z 283 e 311, que foram fragmentados podem corresponder aos flavonoides: flavokawina-B, izalpinina e 3,5,7-tri-*O*-metilgalangina. A flavokawina possui estrutura classificada, como chalcona; e a izalpinina e a 3,5,7-tri-*O*-metilgalangina, possuem esqueletos característicos da classe de flavonóis. Como pode-se observar na figura 22, as estruturas izalpinina e a 3,5,7-tri-*O*-metilgalangina diferenciam-se nas substituições das posições dos carbonos C-3 e C-5, na qual há uma diferença das *O*-metilações, partindo da estrutura da izalpinina para a 3,5,7-tri-*O*-metilgalangina, sendo assim um indicio biossintético da produção desses esqueletos nas espécies. No artigo de Fernandes (1978), que apresenta como título “*Chemosystematic Implications of Flavonoids in Aniba riparia*”, o autor faz uma correlação dos flavonoides: flavokawina-B, izalpinina, 3,5,7-tri-*O*-metilgalangina, (2*S*)-5,7-di-

O-metilpinocembrina e (2R, 3R) – 5, 7 – di-O-metil pinobanksina; como sendo provenientes da mesma rota biossintética.

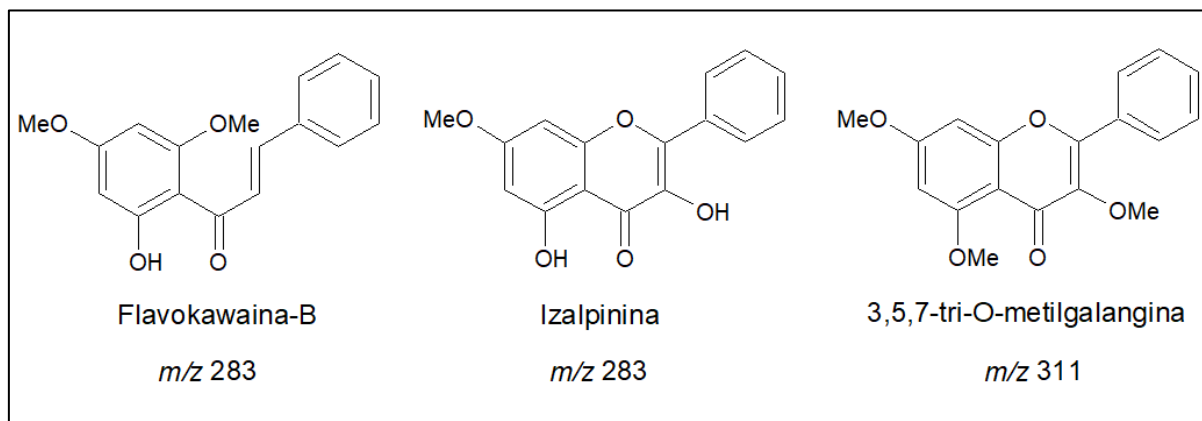


Figura 22 - Estruturas correlacionadas com os íons de *m/z* 283 e 311.

Com os dados de fragmentação, observa-se os mesmos fragmentos para o íon *m/z* 311 nas três espécies (*A. panurensis*, *A. ferrea* e *A. parviflora*), que por apresentar o mesmo perfil de fragmentação pode corresponder a mesma molécula; a 3,5,7-tri-O-metilgalangina, que já foi isolada em *A. riparia* e possui a mesma massa molecular (FERNANDES et al., 1978). A espécie *A. roseadora* não apresentou nenhum dos dois íons (311 e 283) que foram fragmentados.

O segundo íon fragmentado *m/z* 283 apresentou o mesmo fragmento (*m/z* 239) para todas as amostras correspondentes a parte de folhas e apenas para parte de galhos de *A. panurensis*; já em relação as outras amostras, observou-se fragmentos diferentes, de *m/z* 169 para os galhos de *A. ferrea* e o *m/z* 103 para os galhos de *A. parviflora*. O principal fragmento observado (*m/z* 239) pode ser associado a perda de CO₂ (44 Da) do anel C do flavonol, podendo estar relacionando a izalpinina (figura 23). Esse tipo de fragmentação relacionando ao anel C de flavonóis, foi observado no trabalho de Fabre (2001), que faz um estudo de fragmentação de agliconas de flavona, flavonol e flavanona.

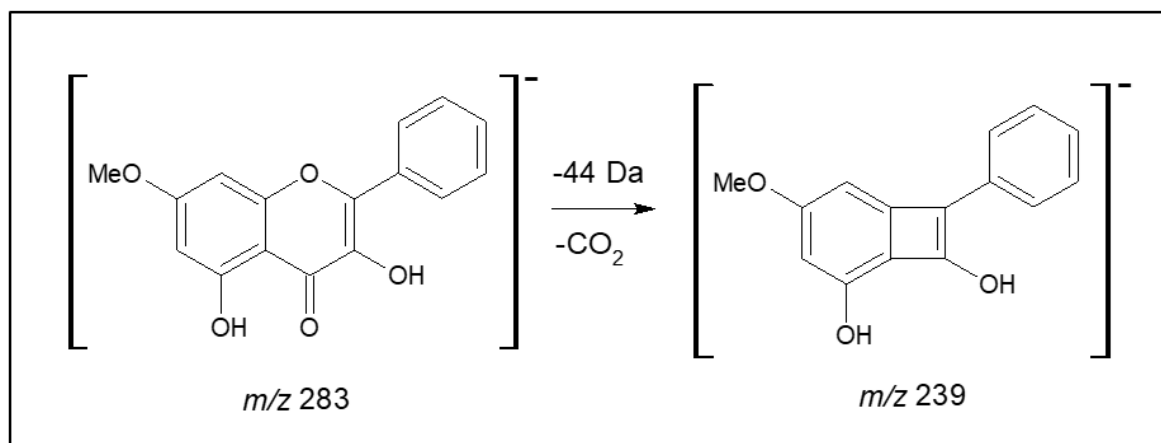


Figura 23 - Proposta de fragmentação do íon 283.

5.2 PARTE II E III – Obtenção e identificação dos padrões

No processo de obtenção dos padrões de *Aniba*, foram realizadas partições líquido-líquido com maior quantidade dos extratos etanólicos, assim resultando em frações de baixa, média e alta polaridade, que foram analisadas por CCD para seleção das amostras a serem fracionadas. A partir dessas amostras, foram realizados os fracionamentos em coluna de fase normal, assim obtendo os padrões, que foram caracterizados por técnicas cromatográficas, e elucidados pela união das técnicas espectroscópicas e espectrométricas.

5.2.1 Partição líquido-líquido larga escala

Os rendimentos das partições em larga escala estão localizados na tabela 14. A partir desses valores, verifica-se que os maiores rendimentos foram obtidos nas frações metanólicas com porcentagens de 48-89%, exceto para as amostras de folhas de *A. panurensis* e *A. parviflora*, que tiveram as maiores porcentagens para a fração hexânica. Os rendimentos correspondentes às frações em diclorometano foram medianos, com porcentagens de 20-37%, diferenciando apenas para as frações de media polaridade de *A. ferrea*, em que foram obtidas porcentagens mais baixas, de 5-10%.

Os perfis cromatográficos das frações em CCD podem ser observados nas figuras 24 e 25. Os extratos foram preparados nas concentrações de 20 mg/mL e as frações em 10 mg/mL, sendo aplicado 5 µL em cada spot. Foram utilizadas placas cromatográficas cortadas com 5 cm de altura por 4 cm de comprimento e para aplicação utilizou-se uma seringa de 20 µL Hamilton®. As frações foram analisadas a partir da revelação nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, vanilina sulfúrica, Dragendorff (revelador de compostos alcaloídicos), cloreto férrico (revelador de compostos fenólicos) e NP-PEG (revelador de compostos flavonoídicos).

Amostra		Rendimento	
		Massa (g)	Porcentagem (%)
<i>Aniba panurensis</i>	Folhas	HEX	2,63
		DCM	43,82
		MeOH	28,01
	Galhos	HEX	0,93
		DCM	15,45
		MeOH	21,42
<i>Aniba roseadora</i>	Folhas	HEX	1,29
		DCM	27,83
		MeOH	48,91
	Galhos	HEX	1,08
		DCM	25,35
		MeOH	55,66
<i>Aniba ferrea</i>	Folhas	HEX	0,91
		DCM	12,99
		MeOH	37,40
	Galhos	HEX	3,35
		DCM	47,92
		MeOH	25,23
<i>Aniba parviflora</i>	Folhas	HEX	1,51
		DCM	0,59
		MeOH	9,88
	Galhos	HEX	3,06
		DCM	51,06
		MeOH	2,76
<i>Aniba parviflora</i>	Folhas	HEX	0,36
		DCM	5,98
		MeOH	89,61
	Galhos	HEX	5,38
		DCM	33,26
		MeOH	20,82
<i>Aniba parviflora</i>	Folhas	HEX	2,10
		DCM	30,00
		MeOH	11,12
	Galhos	HEX	0,67
		DCM	26,64
		MeOH	49,71

Tabela 14 - Rendimento das frações da partição com massa de 6 g de extrato.

A partir das placas, verifica-se que foi obtida uma boa separação para cada extrato particionado, fato que pode ser evidenciado pelos diferentes R_f 's das frações. Nessas placas também podem ser visualizadas semelhanças entre os perfis de folhas e galhos das diferentes espécies, como também a semelhança entre as espécies.

Nas placas reveladas no UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm, e em vanilina sulfúrica correspondentes as amostras de folhas e galhos de *A. panurensis*, observa-se a presença de substâncias majoritárias nas frações em diclorometano no intervalo de R_f de 0,65-0,80, que podem ser visualizadas pelas colorações preta, azul e amarela, respectivamente. As placas reveladas com Dragendorff, cloreto férrico e NP-PEG, evidenciam a presença de alcaloide, fenólicos e flavonoides nas frações em diclorometano e metanol. A fração em diclorometano das folhas de *A. panurensis* distinguiu-se pela presença de maior concentração

de fenólicos e flavonoides, fato observado pelos R_f 's 0,06; 0,13; 0,34; 0,42 de coloração marrom na placa revelada com cloreto férrico e pelo R_f 0,13, que teve a coloração amarela ressaltada no comprimento de onda de 366 nm ao revelar com NP-PEG; já a fração em diclorometano dos galhos de *A. panurensis* apresentou quatro manchas laranjas (R_f 's: 0,10; 0,40; 0,56; 0,67) correspondentes a alcaloides.

As placas das análises das partições de folhas e galhos de *A. roseadora*, demonstram a presença substâncias majoritárias no intervalo de R_f de 0,17-0,62, que podem ser observadas nas placas reveladas no comprimento de onda 254 nm, 366 nm e em vanilina sulfúrica. As frações em diclorometano se assemelharam quanto as substâncias majoritárias, diferenciando-se pela substância no R_f 0,17 de coloração amarela presente nas frações de folhas, que é observada na placa revelada com vanilina sulfúrica. As placas reveladas com dragendorff, cloreto férrico e NP-PEG, evidenciam a presença de alcaloide, fenólicos e flavonoides em R_f 's semelhantes nas frações em diclorometano e metanol. As frações de ambas as partes de *A. roseadora* em diclorometano apresentaram uma forte presença de compostos fenólicos no intervalo de R_f de 0,12-0,38 e flavonoídicos no intervalo de R_f de 0,14-0,80. Nas placas reveladas com Dragendorff, observa-se nas frações em diclorometanos de *A. roseadora* a presença de um alcaloide no mesmo R_f , de 0,57 em ambas as partes da planta.

A espécie *A. ferrea* apresentou um perfil mais complexo, quando comparada com as outras espécies, porém pode-se observar semelhanças nas placas reveladas no UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, sendo de difícil visualização da separação quando reveladas em vanilina sulfúrica. As placas reveladas com os reveladores específicos Dragendorff, cloreto férrico e NP-PEG, também evidenciam a presença de alcaloide, fenólicos e flavonoides nas frações em diclorometano e metanol. Confirma-se a presença de alcaloides nas frações em diclorometano das folhas e galhos de *A. ferrea*, através da visualização dos R_f 's 0,07 e 0,49 para fração de folhas e R_f 0,19 para a fração de galhos. Ambas as partes analisadas

de *A. ferrea* apresentaram fenólicos, tais resultados são verificados nas frações em diclorometano das folhas com manchas de colorações marrom nos R_f 's 0,18; 0,32 e 0,40 e para os galhos nos R_f 0,11; 0,35 e 0,46. A amostra em diclorometano das folhas apresentou uma maior fluorescência para flavonoides quando comparada com a parte dos galhos das espécies, este fato pode ser observado a partir dos R_f 's 0,18 e 0,24, com cor laranja e amarela.

Na análise cromatográfica das frações da partição de folhas e galhos de *A. parviflora* é possível destacar a presença de uma substância majoritária em ambas as partes analisadas, essa substância apresentou R_f no intervalo de 0,80-0,90 nas frações em hexano e diclorometano; observou-se diferentes colorações dessa substância nas placas reveladas no comprimento de onda de 366 nm (cor vermelha e azul) e em vanilina sulfúrica (cor preta e marrom), quando comparada folhas e galhos. As placas reveladas com Dragendorff, cloreto férrico e NP-PEG, evidenciam a presença de alcaloide, fenólicos e flavonoides nas frações três frações. As placas de ambas as partes quando reveladas com Dragendorff, revelaram com coloração laranja as substâncias majoritárias observadas nos R_f 's 0,80-0,90, assim caracterizando-se como alcaloides. A fração em diclorometano das folhas de *A. parviflora* distinguiu-se pela presença de maior concentração de fenólicos e flavonoides, fato observado pelos R_f 's 0,23 e 0,32 de coloração marrom na placa revelada com cloreto férrico e pelo R_f 0,16 e 0,26, que apresentou as colorações laranja e amarela ressaltadas no comprimento de onda de 366 nm ao revelar com NP-PEG.

Comparando todas a espécies analisadas pode-se confirma a presença de compostos alcaloídicos, fenólicos e flavonoídicos. As espécies *A. panurensis*, *A. roseadora* e *A. parviflora* demonstraram ter perfis menos complexos do que a espécie *A. ferrea*. A espécie *A. roseadora* distinguiu-se das outras devido a evidente concentração de compostos fenólicos, como é o caso dos flavonoides em ambas as partes da planta. Outro fator importante evidenciado nessa análise, é relativo a maior concentração de flavonoides nas folhas de todas as espécies quando

comparadas com a parte dos galhos, essas substâncias observadas nas folhas das espécies analisadas possuem r_f s próximos (0,13-0,26), que contém colorações (laranja e amarelo) semelhantes quando reveladas em NP-PEG, podendo corresponder as mesmas substâncias.

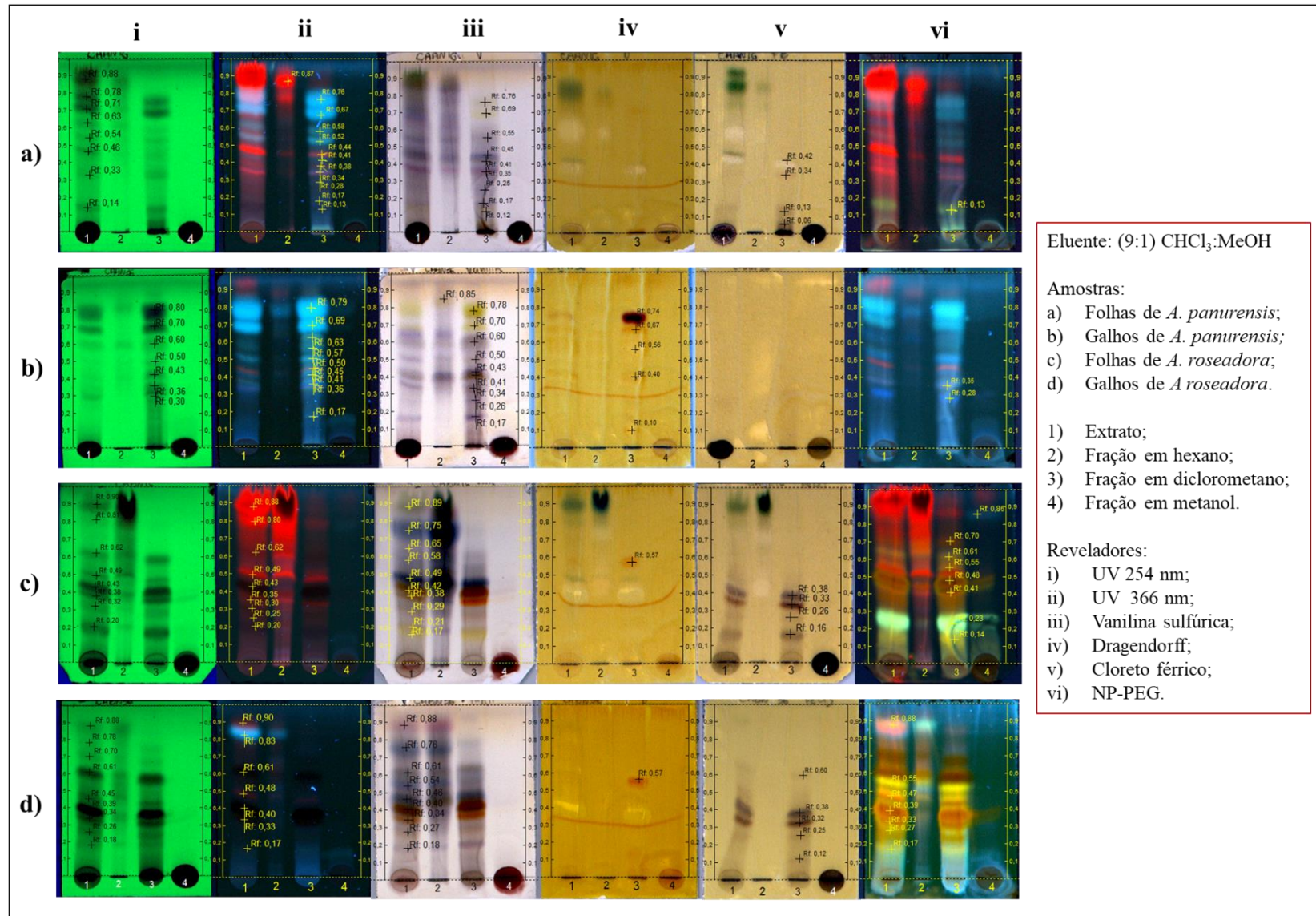


Figura 24 - Análise cromatográfica das frações de *A. panurensis* e *A. roseadora* das partições em larga escala.

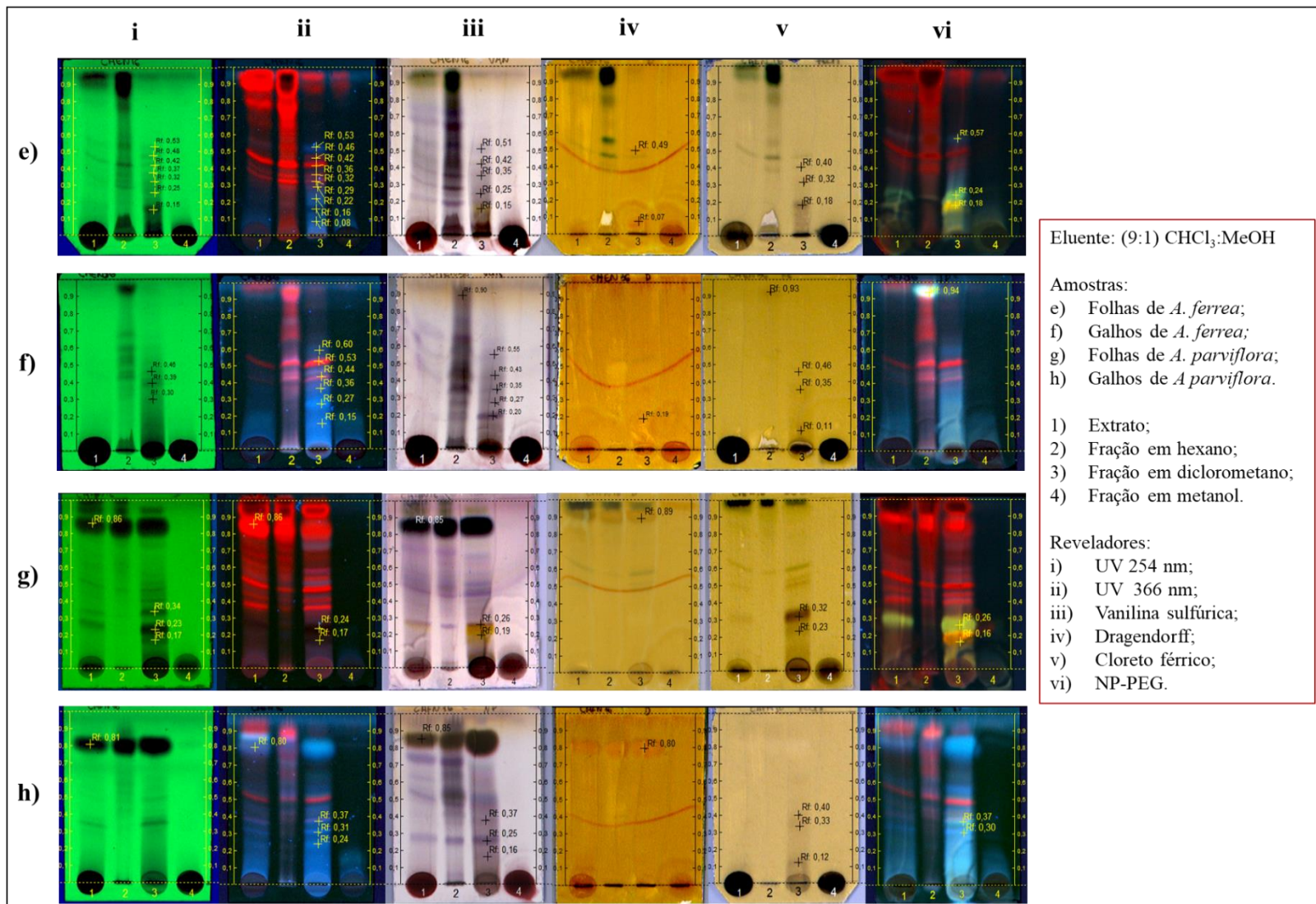


Figura 25 - Análise cromatográfica das frações de *A. ferrea* e *A. parviflora* das partições em larga escala

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

O fracionamento em coluna da fração em diclorometano de galhos de *A. panurensis* resultou em 22 frações, que foram analisadas por CCD e podem ser observadas na figura 26. Após análise por CCD, reuniu-se as frações semelhantes: 3a+4, 4a+5+5a, 6+6a+7, 11+12+13+14, 15+16+17.

A primeira substância foi obtida da fração 3 da coluna, a qual passou por processo de purificação por precipitação em MeOH. A segunda substância foi resultante da união das frações 3a+4, amostra que foi refracionada em placa preparativa e recristalizada em acetona. A terceira substância originou-se da união das frações 4a+5+5a, que também foi refracionada em placa preparativa e recristalizada em metanol.

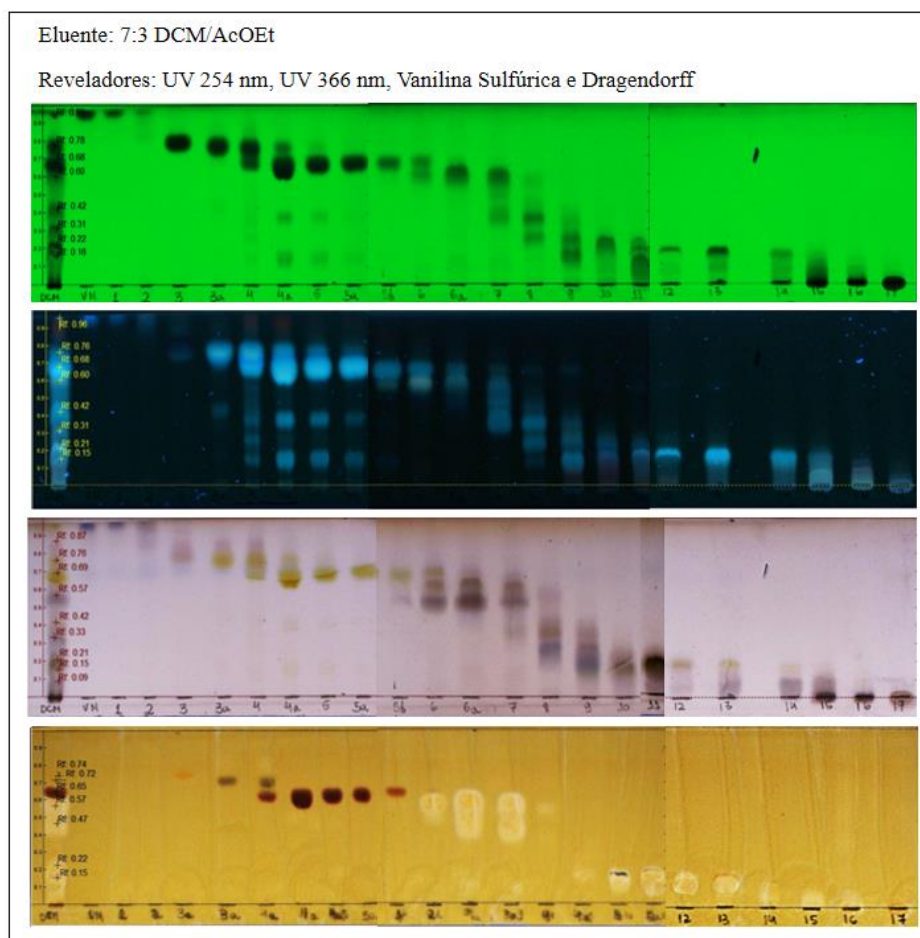


Figura 26 - Placas da coluna em fase normal de galhos de *A. panurensis*.

5.2.2.1 Substância 1

A substância 1 foi obtida da fração 3 da CCFN realizada com a fração em diclorometano dos galhos de *A. panurensis*. Essa substância foi purificada por meio de precipitação em metanol, dessa forma obteve-se 3,7 mg de um sólido branco. A substância 1, foi analisada por meio de métodos cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos, como: CCD, EM e RMN uni e bidimensional.

O perfil cromatográfico e espectrométrico da substância pode ser observado na figura 27. A substância 1 apresentou R_f 0,57 no sistema de eluição da placa, com uma coloração mais forte no comprimento de onda de UV 254 nm do que no UV 366 nm. Quando revelada com vanilina sulfúrica, exibiu uma coloração lilaz bem fraca e no Dragendorff apresentou coloração preta, que não é indicativo de alcaloide. Essa molécula, quando analisada por espectrometria de massas no modo positivo utilizando fonte de ionização APCI, produziu o íon m/z 229, dado que quando comparado com a literatura foi associada a uma estirilpirona já isolada em outras espécies de *Aniba*, como: *A. firma* (QUEIROZ, 2009), 5,6-dehidrokawaína ou 4-metoxi-6-[(E)-2-feniletanil]piran-2-ona (4-metoxi-6-*trans*-estiril-piran-2-ona).

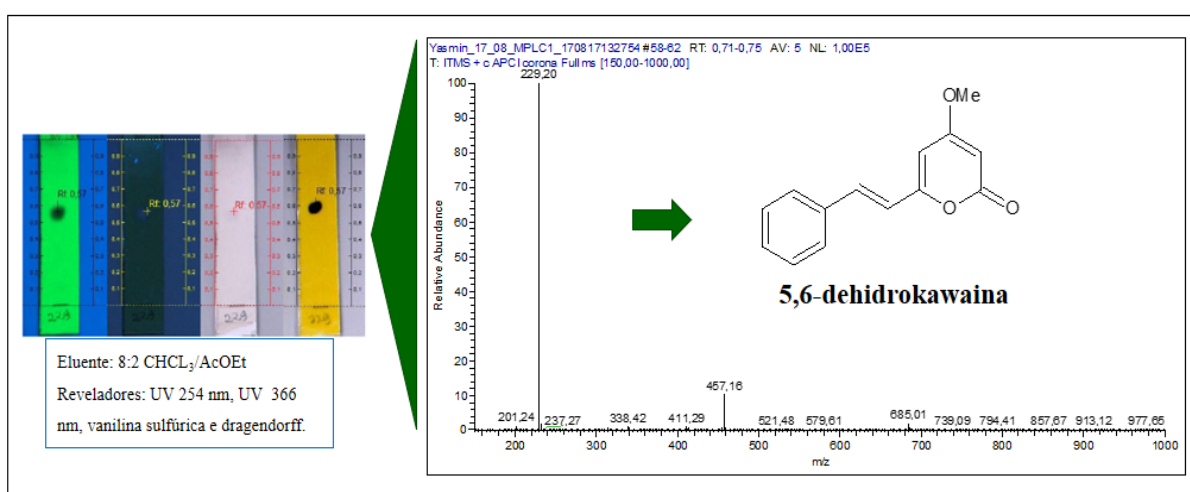


Figura 27 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da substância 1.

O espectro de RMN de ^1H da substância 1 (figura 28) apresentou informações da dupla ligação dos carbonos C7-C8, na qual observa-se o hidrogênio H-7 em δ 6,59 (1H, *d*, $J = 16,0$ Hz), que se caracteriza por uma configuração *trans*, gerando um sinal de um dubleto com constante de acoplamento de 16 Hz, valor que se diferencia de uma ligação *cis*, que possui valor da constante de aproximadamente 10 Hz. A partir dos dados obtidos pelo mapa de contornos de COSY (figura 29), pode-se confirmar o acoplamento vicinal dos hidrogênios da ligação *trans*, H-7 (δ 6,59) e H-8 (δ 7,50). Outros sinais que podem ser observados nesse espectro correspondem aos hidrogênios H-3 e H-5, pertencentes ao anel pirânico e esses sinais caracterizam-se pela formação de dubletos com deslocamentos em campos mais altos, sendo eles: H-3 com δ 5,50 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz) e H-5 com δ 5,95 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz). Além desses sinais, verifica-se a presença de um singlete intenso de hidrogênios de metoxíla em δ 3,83 (3H, *s*) e sinais de aromáticos correspondentes aos hidrogênios H-10, H-11, H-12, H-13 e H-14, que foram associados aos multipletos em δ 7,36 e δ 7,50.

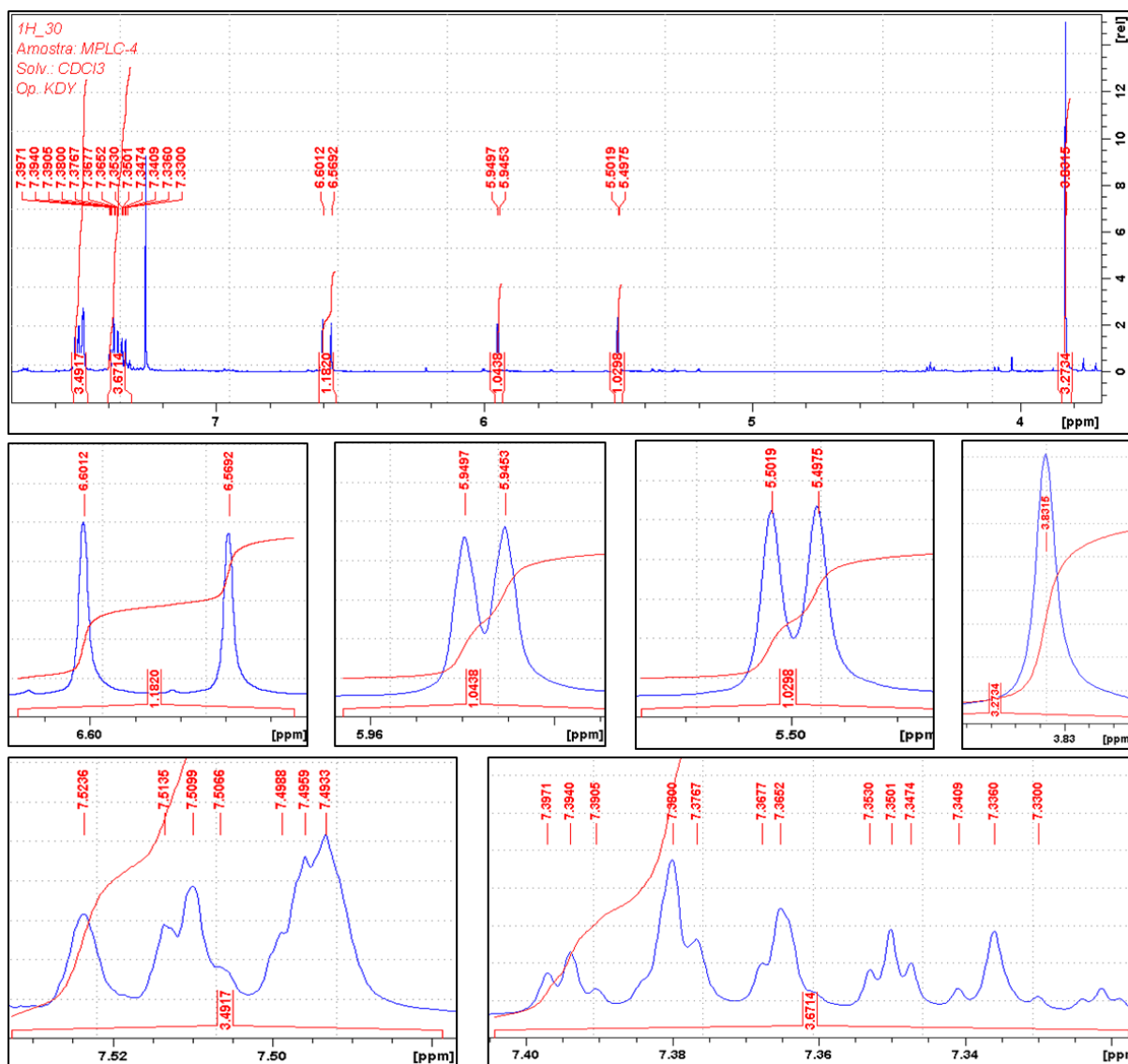


Figura 28 - Espectros de RMN de ^1H da substância 1 e as ampliações das áreas.

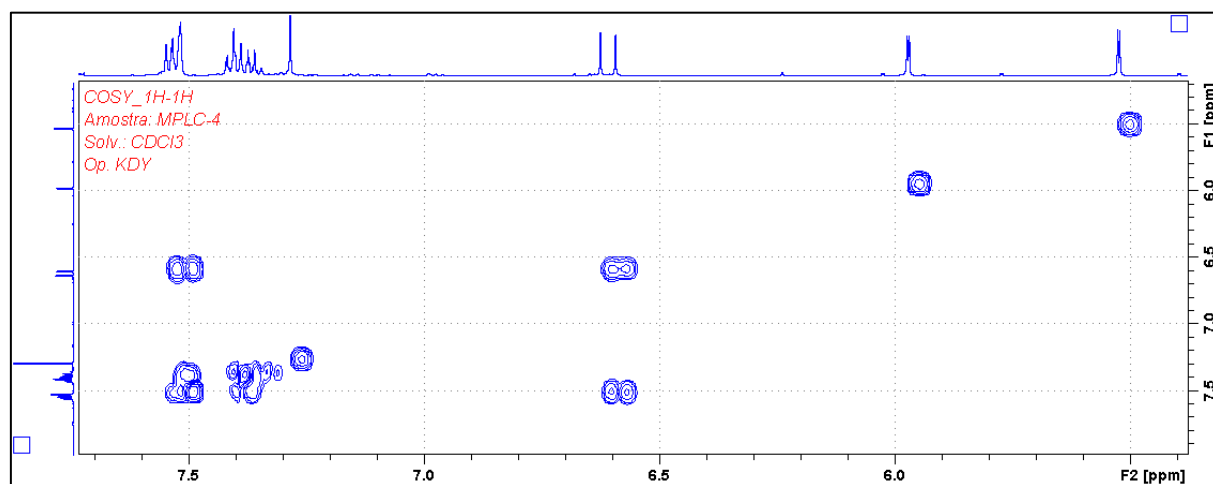


Figura 29 – Mapa de contornos de COSY com ampliações da área de acoplamento dos hidrogênios da substância 1.

Os dados de RMN de ^{13}C dessa substância podem ser observados na tabela 15 e figura 30. Analisando os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e comparando com o espectro de DEPT 135 (figura 31), observa-se a ausência de dois carbonos, um com δ 158,6, do anel pirânico (C-6), e outro com δ 135,2 (C-9), do anel aromático. Além desses deslocamentos, observa-se a presença de carbonos em campos mais baixos (desblindados), que também não são observados no espectro de DEPT 135 e pertencem ao anel pirânico, tais como: δ 163,9, pertencente à carbonila (C-2), e o δ 171,0, correspondente ao C-4 ligado a metoxila. Outros deslocamentos observados, são: δ 55,9, que é característico da região de carbono de metoxila, os δ 127,4-129,4 que estão localizados em região de carbonos de aromáticos e os sinais referentes aos sistemas de carbonos secundários do anel pirânico (δ 88,8 e 101,3) e da ligação *trans* (δ 118,6 e 135,8).

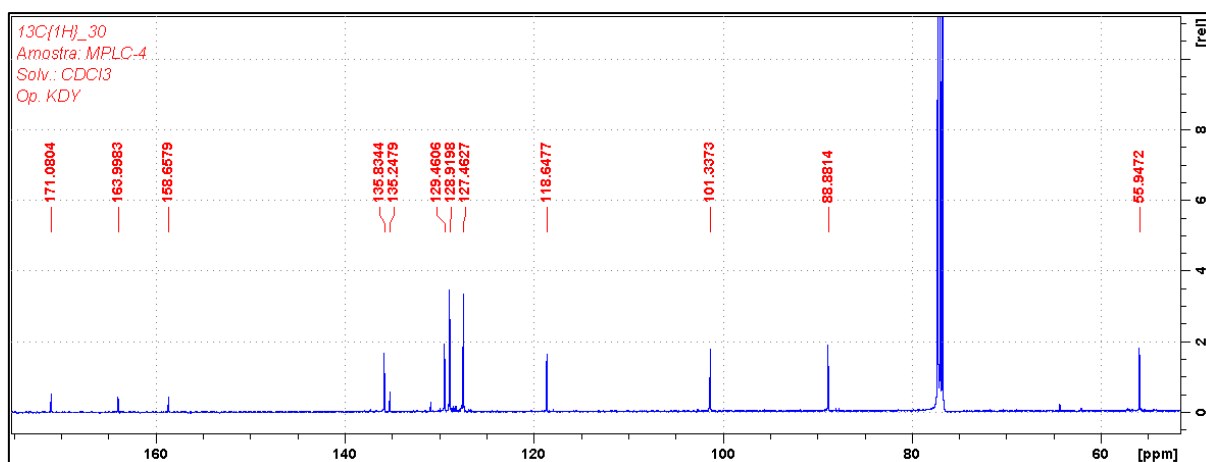


Figura 30 - Espectros de RMN de ^{13}C da substância 1.

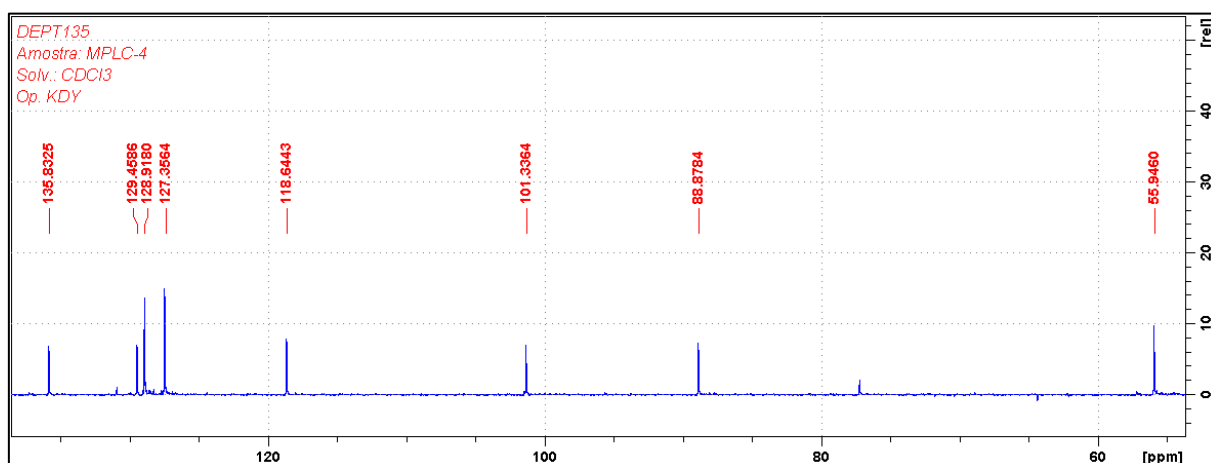


Figura 31 - Espectros de DEPT da substância 1.

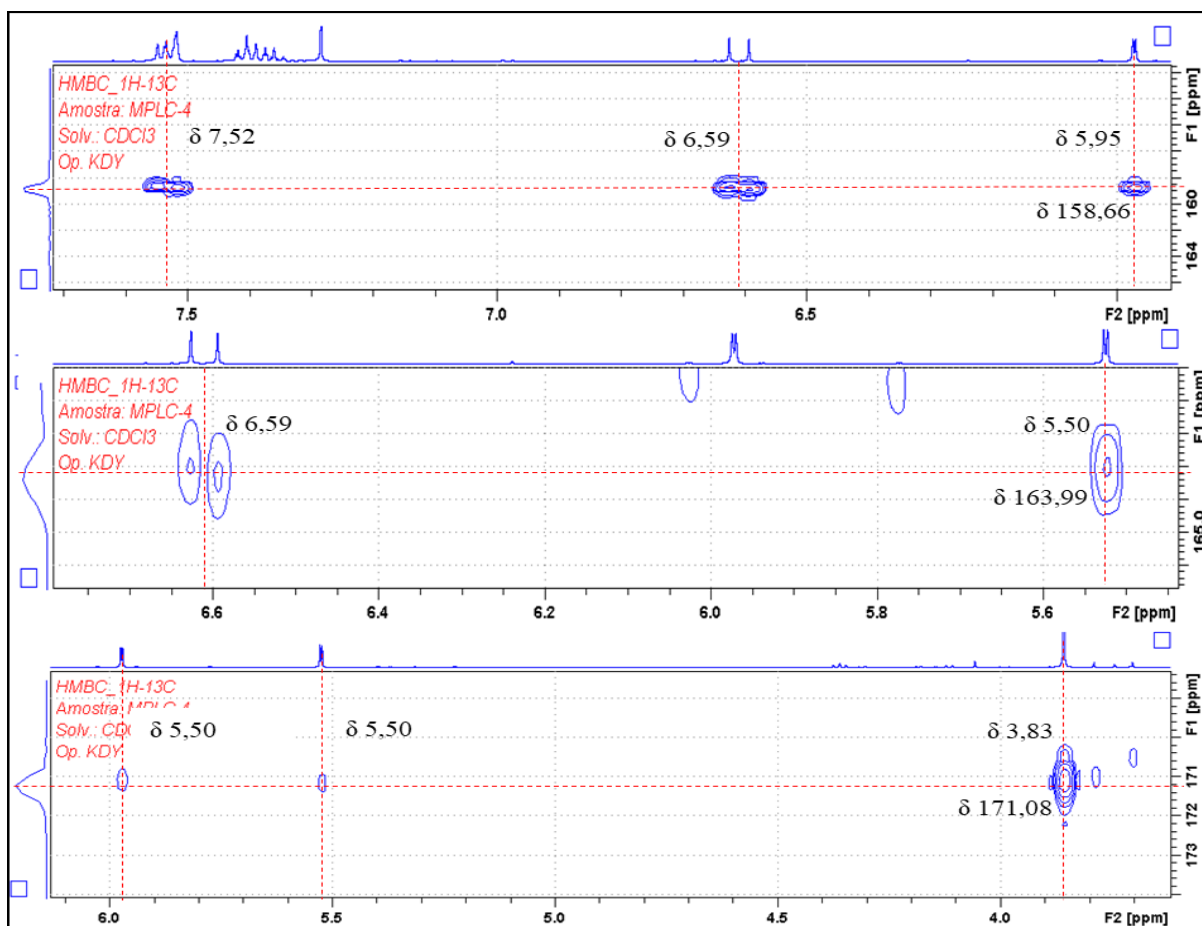


Figura 32 - Ampliações de três regiões do mapa de contornos de HMBC da substância 1.

Os dados obtidos por meio do mapa de contornos de HMBC (figura 32) confirmam as posições dos deslocamentos dos carbonos (C-2 em 164,11, C-4 em 171,08 e C-6 em 158,66) do anel pirânico da molécula, pois os dados da literatura demonstram divergências nas reais posições dos carbonos com δ 158, 164 e 171. Dessa forma, foram observados trabalhos relacionando os carbonos: C-2 com δ 158 ou 171; C-4 com δ 164 ou 171 e C-6 com δ 158 ou 164 (ITOKAWA et al., 1981; QUEIROZ, 2009). As correlações de HMBC podem ser observadas na figura 33 e na tabela 15.

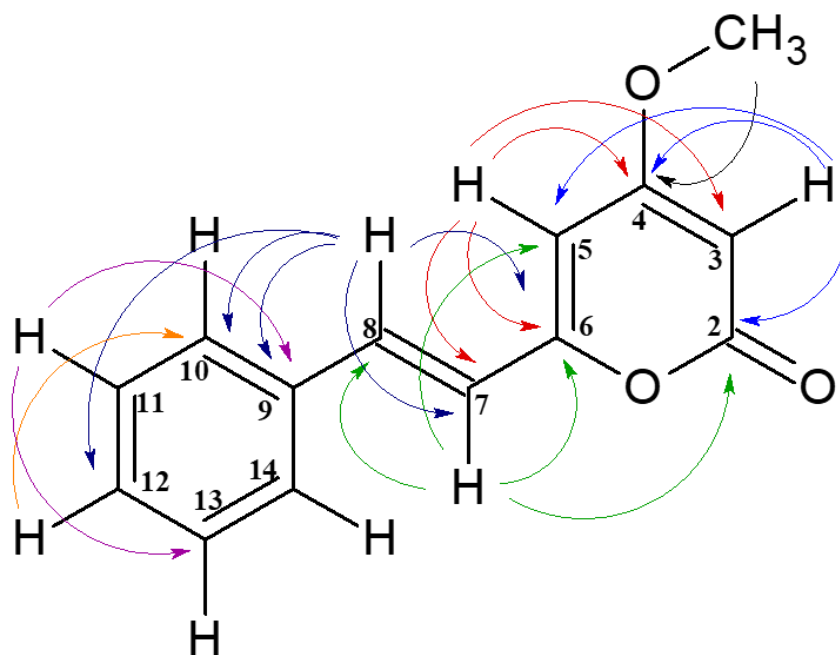


Figura 33 - Estrutura da substância 1 com as correlações de HMBC.

A partir desses dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC (anexo 5) a substância isolada dos galhos de *A. panurensis* foi confirmada como 4-metoxi-6-[(E)-2-feniletanil]piran-2-ona (4-metoxi-6-*trans*-estiril-piran-2-ona), mais conhecida como 5,6-dehidrokawaina. Essa estirilpirona já foi relatada anteriormente no gênero *Aniba*, nas espécies: *A. firmula*, (GOTTLIEB et al., 1959), *A. gardneri*, *A. permollis* (REZENDE et al., 1971).

Além de ser isolada na família *Lauraceae*, essa substância já foi obtida de outras famílias botânicas, como é o caso da família *Piperaceae*, especificamente na espécie *Piper methysticum*, conhecida como Kawa-Kawa. *P. methysticum* é uma importante planta medicinal, com atividades: ansiolítica, sedativa, anticonvulsivante, anestésica local, espasmolítica e analgésica. Essas atividades são correlacionadas as cavactonas ou cavapironas, tais como: iangonina, metisticina, cavaína, desmetoxiangonina, dihidrocavaína e dihidrometisticina (DEWICK, 2002).

Na espécie *A. panurensis* já foram relatadas moléculas da mesma classe, como, por exemplo 6-(E)-(3',4'-metilenodioxestiril)-2-pirona, 6-(E)-3',4'-dimetóxiestiril)-2-pirona

(MOTIDOME, 1982) e 6-estiril-2-pirona (REZENDE et al., 2015). A 5,6-dehidrokawaína isolada nesse trabalho, segundo relatos da literatura, possui vários estudos quanto suas atividades biológicas, tais como: efeito contra inflamação (CHOU et al., 2013), capacidade de induzir CYP3A23 (MA et al., 2004), atividade antimalárica moderada (MCCRAKEN et al., 2012), atividade antifúngica (TRAM et al., 2007) e atividade contra HIV (UPADHYAY et al., 2011).

Posição do C	Dados experimentais (500 MHz, CDCl ₃)			Dados da Literatura (CDCl ₃)	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); multiplicidade; J (Hz)	HMBC δ_H (ppm)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); multiplicidade; J (Hz)
2	163,9	-	5,50; 6,59	158,5	-
3	88,8	5,50; d; 2,2	5,95	88,8	5,46; d; 2,0
4	171,0	-	3,83; 5,50; 5,95	171,0	-
5	101,3	5,95; d; 2,2	5,50; 6,59	101,3	5,94; d; 2,0
6	158,6	-	5,95; 6,59; 7,50	163,9	-
7	118,6	6,59; d; 16,0	7,51; 5,95	118,5	6,48; d; 16,0
8	135,8	7,50; m	6,59; 7,39; 7,50	135,6	7,46; d; 16,0
9	135,2	-	7,39	135,1	-
10 e 14	127,4	7,50; m	7,50; 7,36	127,4	7,30; m
12	129,4	7,36; m	7,50	129,3	7,30; m
11 e 13	128,9	7,36; m	7,39	128,8	7,30; m
OMe	55,9	3,83; s	-	55,9	3,78; s

Tabela 15 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Itokawa et al., 1981) de RMN de ¹H, ¹³C e HMBC da substância 1.

5.2.2.2 Substância 2

A substância 2 foi obtida da fração 3a+4 da CCFN realizada com a amostra obtida em diclorometano dos galhos de *A. panurensis*. Essa amostra foi fracionada em placa preparativa utilizando o sistema de eluição 9,5:0,5 CHCl₃/AcOEt (eluída por 2x) e revelada em UV 254 nm e 366 nm para visualização e separação das substâncias presentes na placa. No processo de purificação da substância 2 foi realizado a cristalização e recristalização em acetona, dessa forma foram obtidos 7 mg de cristal amarelo. Essa substância foi analisada por meio de métodos cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos, como: CCD, EM e RMN uni e bidimensional.

O perfil cromatográfico e espectrométrico da substância pode ser observado na figura 34. A substância 2 apresentou *r_f* 0,51 no sistema de eluição da placa, com uma intensa coloração nos dois comprimentos de onda de UV (254 nm e UV 366 nm). Quando revelada com vanilina sulfúrica, exibiu uma cor amarela e no Dragendorff apresentou coloração preta, que não é indicativo de alcaloide. Essa molécula, quando analisada por espectrometria de massas no modo positivo utilizando fonte de ionização APCI, produziu o íon *m/z* 273, dado que quando comparado com a literatura foi associada a uma estirilpirona já isolada em *Aniba* sp. (ROSSI, et al., 1997), nomeada como, 4-metoxi-11,12-metilenodioxi-6-trans-estiril-piran-2-ona. No espectro de fragmentação do íon *m/z* 273, observa-se os fragmentos correspondentes a perda de 28 Da (*m/z* 245), 32 Da (*m/z* 241) e 46 Da (*m/z* 227), valores que equivalem a perda de CO (carbonila), OCH₃ (metoxila) e OCH₂O (metilenodioxi).

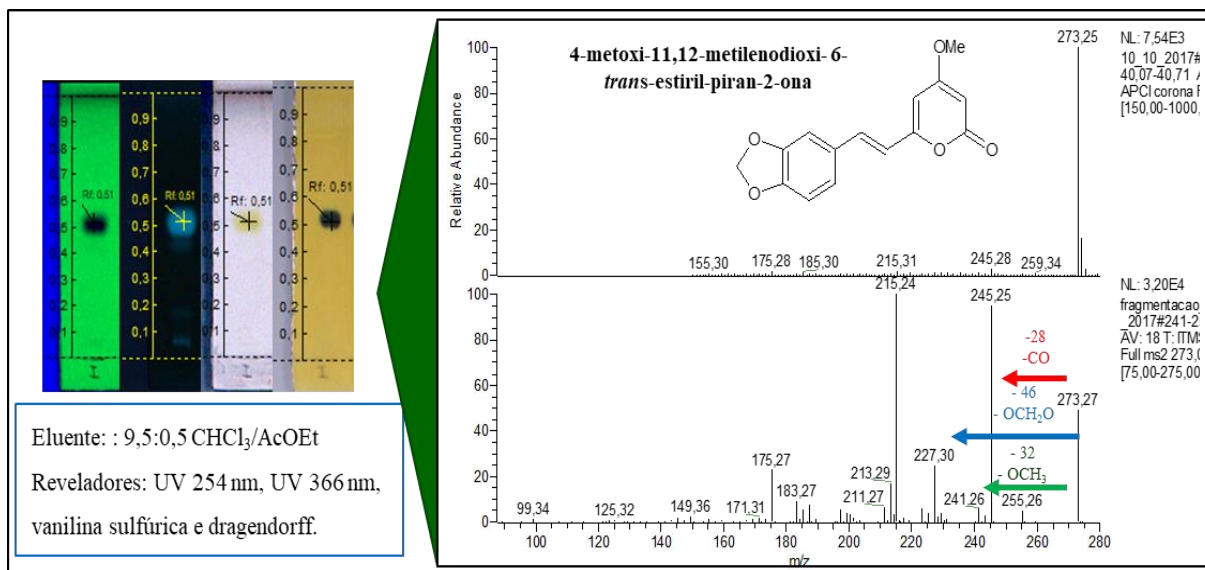


Figura 34 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da substância 2.

O espectro de RMN de ¹H da substância 2 (figura 35) apresentou semelhanças com a substância 1 (5,6-dehidrokawaína). Nesse espectro, observa-se a presença dos hidrogênios da dupla ligação dos carbonos C7-C8, na qual observa-se o hidrogênio H-7 com δ 6,40 (1H, *d*, *J* = 15,9 Hz) e o hidrogênio H-8 com δ 7,41 (1H, *d*, *J* = 15,9 Hz), que caracterizam-se por uma configuração *trans*, gerando um sinal de um dubleto com constante iguais de acoplamento de aproximadamente 16 Hz. Outros sinais que podem ser observados nesse espectro correspondem aos hidrogênios H-3 e H-5, pertencentes ao anel pirânico e esses sinais caracterizam-se pela formação de dubletos em deslocamentos em campos mais altos, sendo eles: H-3 com δ 5,47 (1H, *d*, *J* = 2,2 Hz) e H-5 com δ 5,89 (1H, *d*, *J* = 2,2 Hz). Pode ser também observado o sinal característico de metoxila com δ 3,82 (3H, *s*). Essa molécula distinguiu-se pelos sinais dos hidrogênios do metilenodioxo, com δ 5,99 (2H, *s*); e pelos deslocamentos do anel benzênico, que apresentou sinais bem definidos para os hidrogênios H-10, H-13 e H-14, possuindo os seguintes deslocamentos: δ 7,01 (1H, *d*, *J* = 1,6 Hz), δ 6,81 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz) e δ 6,97 (1H, *d*, *J* = 8,0; 1,6 Hz). A comparação desses dados com a literatura pode ser observado na tabela 16.

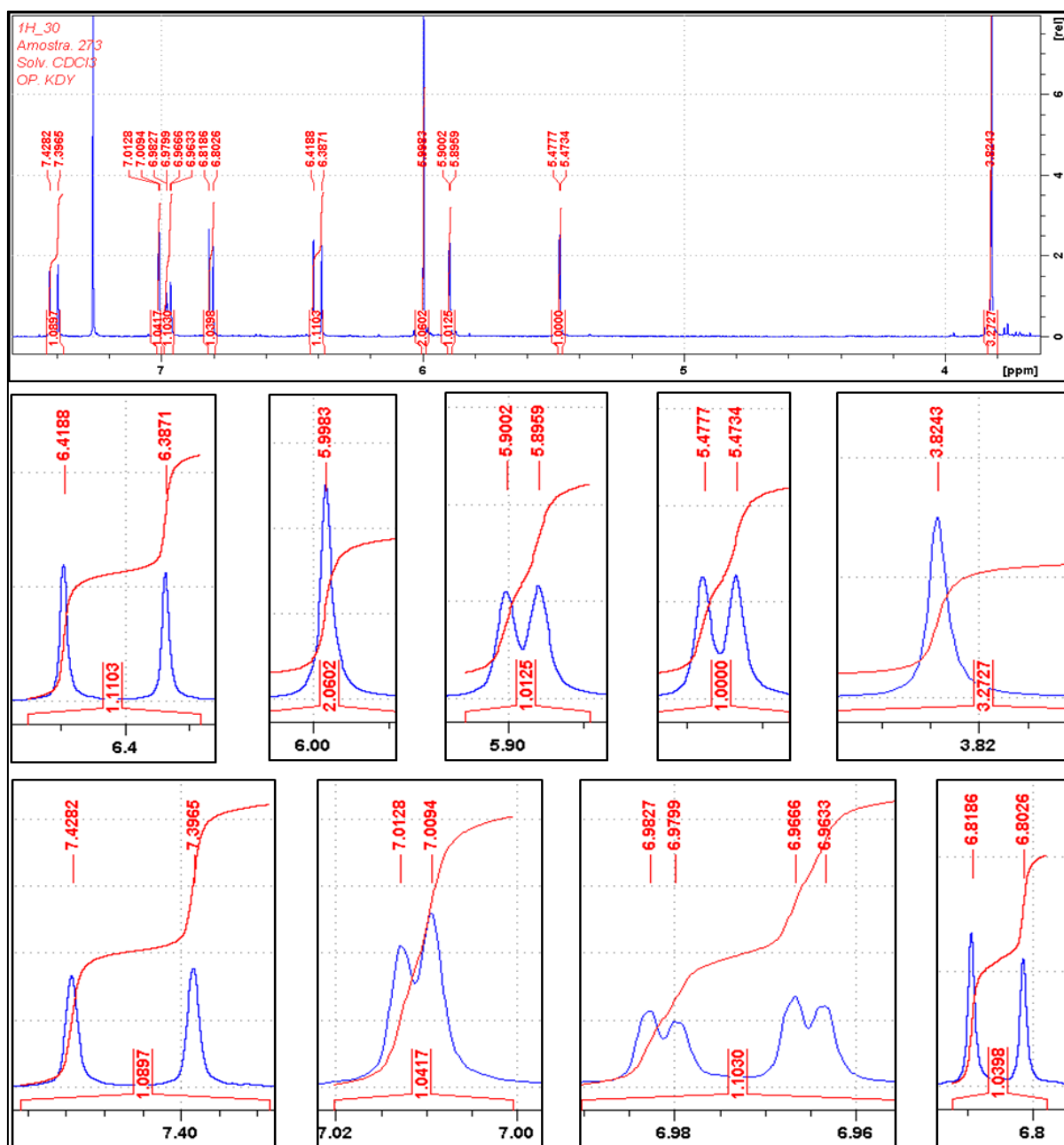


Figura 35 - Espectros de RMN de ¹H da substância 2 e as ampliações das áreas.

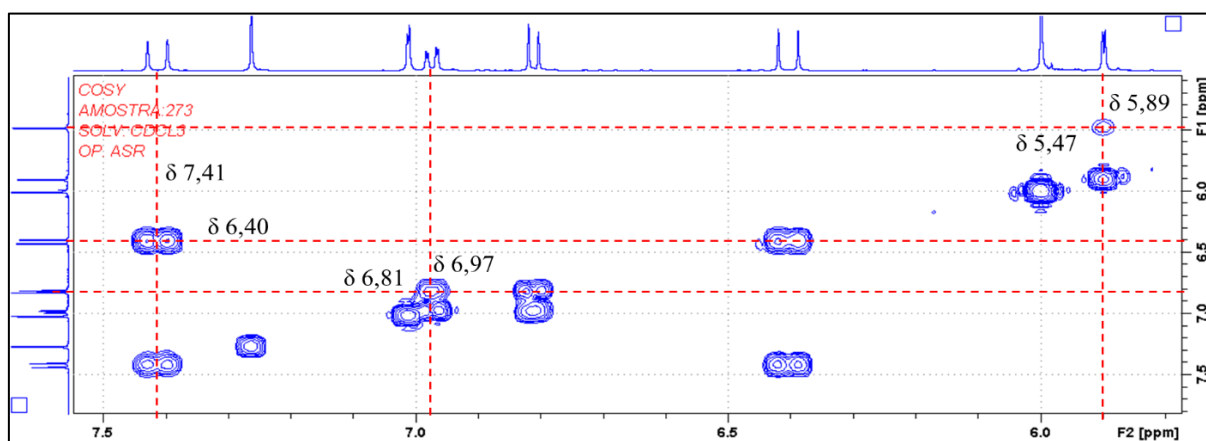


Figura 36 - Mapa de contornos de COSY com ampliações da área de acoplamento dos hidrogênios da substância 2.

A partir do mapa de contornos de COSY (figura 36) da substância 3 pode-se observar três acoplamentos, um relacionado aos hidrogênios H-7 (δ 6,40) e H-8 (δ 7,41) da ligação *trans*, outro correspondente aos hidrogênios H-3 (δ 5,47) e H-5 (δ 5,89) pertencentes ao anel pirânico e o acoplamento dos hidrogênios H-13 (δ 6,81) e H-14 (δ 6,97), confirmando as posições desses hidrogênios.

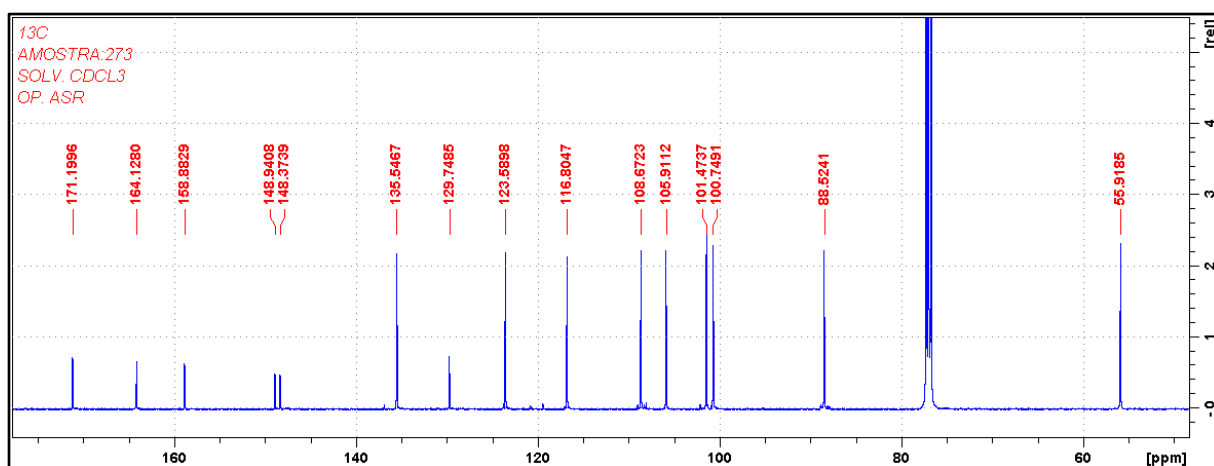


Figura 37 - Espectros de RMN de ^{13}C da substância 2.

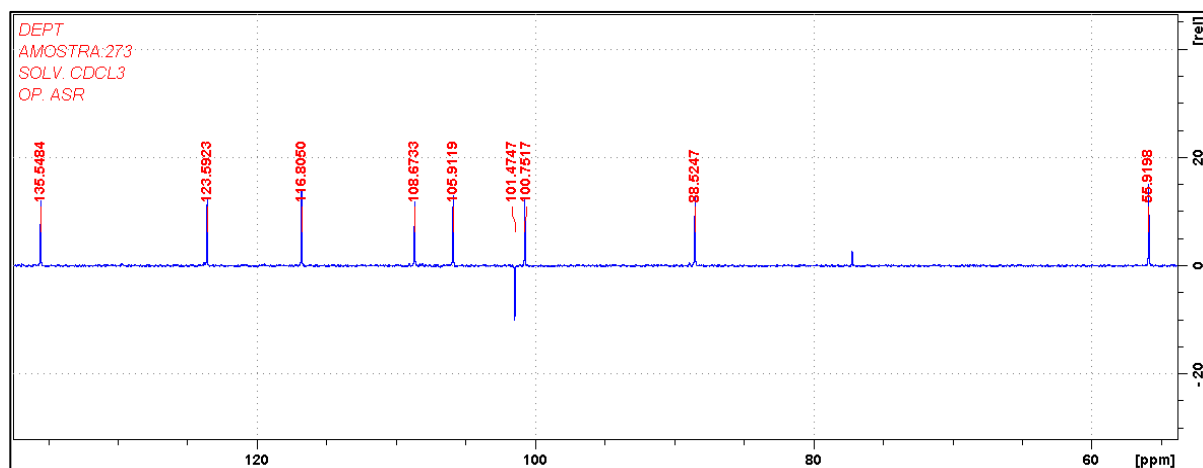


Figura 38 - Espectros de DEPT da substância 2

Os dados de RMN de ^{13}C (figura 37) dessa substância podem ser observados na tabela 16. Analisando os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e comparando com o espectro de DEPT 135 (figura 38), observa-se a presença de carbonos quaternários, carbonílicos, metínicos (CH), metilênicos (CH_2) e metílicos (CH_3). Em campos mais baixos do espectro de carbono,

observa-se os sinais dos carbonos do anel pirânico, de δ 171,1 (C-4), δ 164,1 (C-2) e δ 158,8 (C-6); além desses sinais nesse mesmo anel, têm-se os carbonos metínicos C-3 (δ 88,5) e C-5 (δ 100,7). Outros deslocamentos observados, são: δ 55,9, que é característico da região de carbono de metoxilas; os δ 129,7 (C-9), 105,9 (C-10), 148,9 (C-11), 148,3 (C-12), 108,6 (C-13) e 123,5 (C-14) foram associados aos carbonos do anel aromático, na qual os carbonos C-11 e C-14 apresentam valores mais deslocados devido a ligação com o grupo metilenodioxí; além desses deslocamentos, observa-se a presença dos carbonos da ligação *trans*, com δ 116,8 (C-7) e δ 135,5 (C-8), e o carbono do metilenodioxí, com δ 101,4.

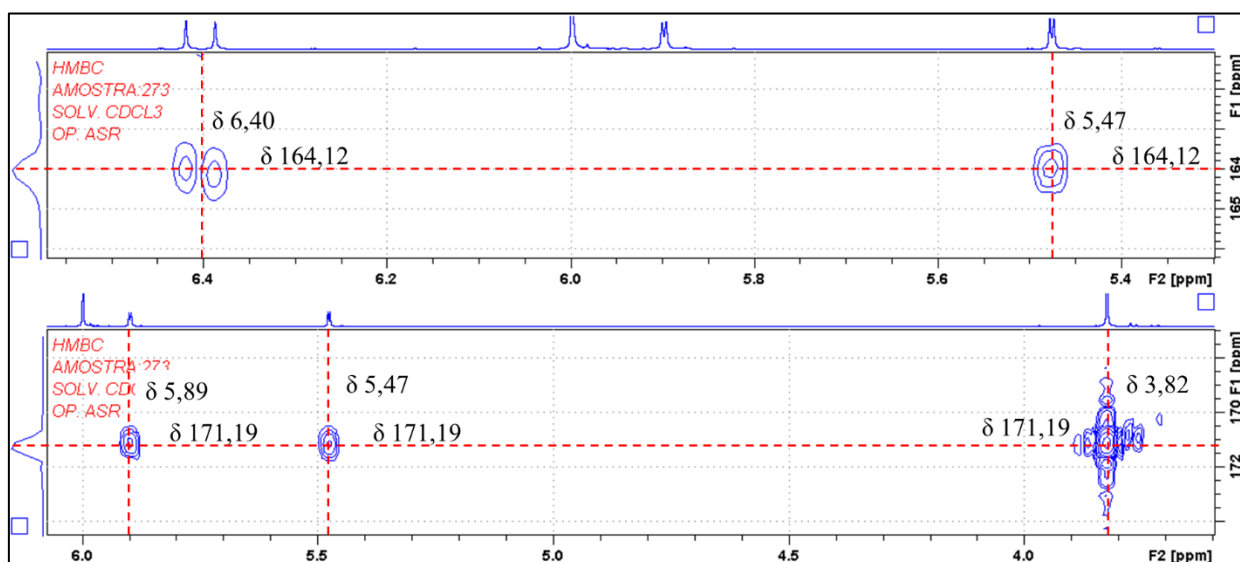


Figura 39 - Ampliações das duas regiões do mapa de contornos de HMBC da substância 2.

Os dados obtidos por meio do mapa de contornos de HMBC (figura 39) confirmam as posições dos deslocamentos dos carbonos (C-2 em 164,12, C-4 em 171,18 e C-6 em 158,88) do anel pirânico da molécula, pois os dados da literatura divergem quanto as posições dos carbonos C-2 e C-4, como por exemplo no artigo de Rossi (1997), associou o C-2 com δ 171,1 e C-4 com δ 163,0; e o artigo de McCracken (2012), relacionou o C-2 com δ 164,0 e C-4 com δ 171,1. As correlações de HMBC podem ser observadas na tabela 16.

A partir desses dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMQC (anexo 5) a substância isolada dos galhos de *A. panurensis* foi confirmada como 4-metoxi-11,12-metilenodioxo-6-*trans*-estiril-piran-2-ona. Essa substância já foi isolada em *Aniba* sp. (ROSSI et al., 1997) e também já foi descrita com atividade antimalárica contra o parasita *Plasmodium falciparum*, com IC_{50} 5,6 μM (MCCRACKEN et al., 2012).

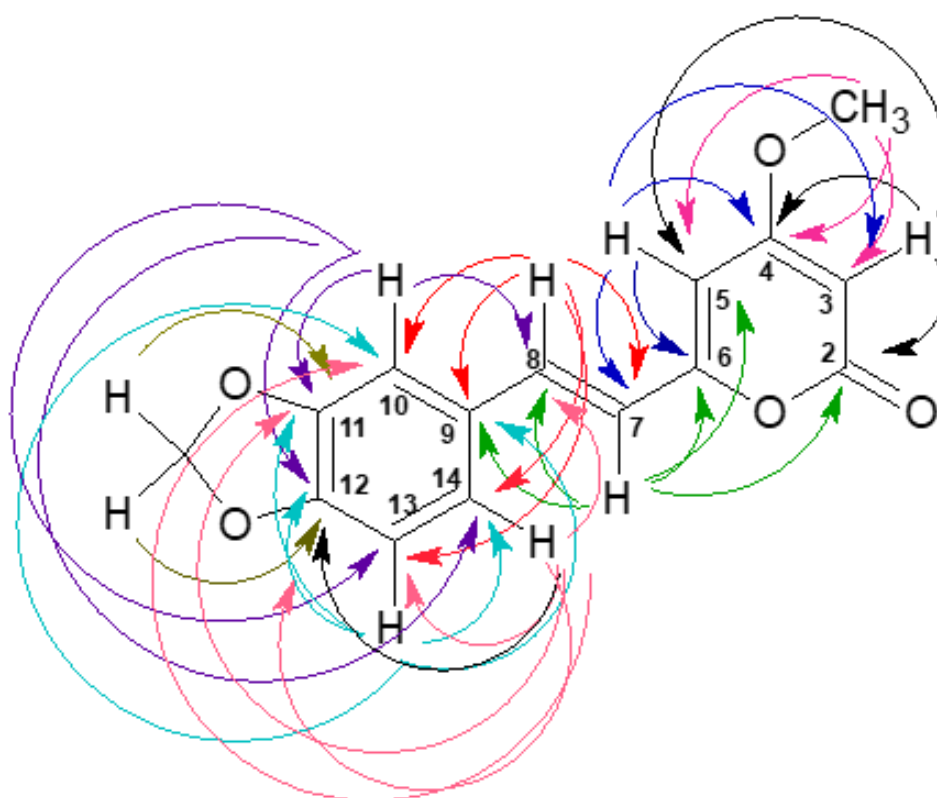


Figura 40 - Estrutura da substância 2 com as correlações de HMBC.

Posição do C	Dados experimentais (500 MHz, CDCl ₃)			Dados da Literatura (100 e 250 MHz, CDCl ₃)	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)	HMBC δ_H (ppm)	δ_c (ppm) ^a	δ_H (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz) ^b
2	164,1	-	5,47; 6,40	164,0	-
3	88,5	5,47; d; 2,2	3,82; 5,89	88,5	5,47; d; 2,2
4	171,1	-	3,82; 5,47; 5,89	171,1	-
5	100,7	5,89; d; 2,2	3,82; 5,47; 6,40;	100,7	5,89; d; 2,2
6	158,8	-	5,89; 6,40; 7,41;	158,8	-
7	116,8	6,40; d; 15,9	5,89; 7,41	116,8	6,40; d; 15,9
8	135,5	7,41; d; 15,9	6,40; 6,97; 7,01	135,5	7,41; d; 15,9
9	129,7	-	6,40; 6,81; 7,41	129,7	-
10	105,9	7,01; d; 1,6	6,81; 6,97; 7,41;	108,6	7,00; d; 1,5
11	148,9	-	5,99; 6,81; 6,97; 7,01	148,3	-
12	148,3	-	5,99; 6,81; 6,97; 7,01	148,9	-
13	108,6	6,81; d; 8,0	6,97; 7,01	105,9	6,80; d; 8,0
14	123,5	6,97; dd; 8,0; 1,6	6,81; 7,01; 7,41	123,5	
OMe	55,9	3,82; s	-	55,9	3,82; s
OCH ₂ O	101,4	5,99; s	-	101,4	5,99; s

Tabela 16 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (^aMcCracken et al., 2012 e ^bAdam et al., 1994) de RMN de ¹H, ¹³C e de HMBC da substância 2.

5.2.2.3 Substância 3

A substância 3 foi obtida da fração 4a+5+5a da CCFN realizada com a amostra obtida em diclorometano dos galhos de *A. panurensis*. Essa amostra foi fracionada em placa preparativa utilizando o sistema de eluição (0,5:8,5:1,0) HEX/CHCl₃/AcOEt (eluída por 3x) e revelada em UV 254 nm e 366 nm para visualização e separação das substâncias presentes na placa. No processo de purificação da substância 3 foi realizada a cristalização e recristalização em metanol, dessa forma foram obtidos 20 mg de cristal branco. Esse composto foi analisado por meio de métodos cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos, como: CCD, EM e RMN uni e bidimensional. O composto apresentou *rf* 0,57 no sistema de eluição da placa, com uma coloração intensa nos comprimentos de onda de UV 254 nm e 366 nm, revelando uma cor mais fraca de amarelo queimado em vanilina sulfúrica e no dragendorff ficou com uma coloração laranja.

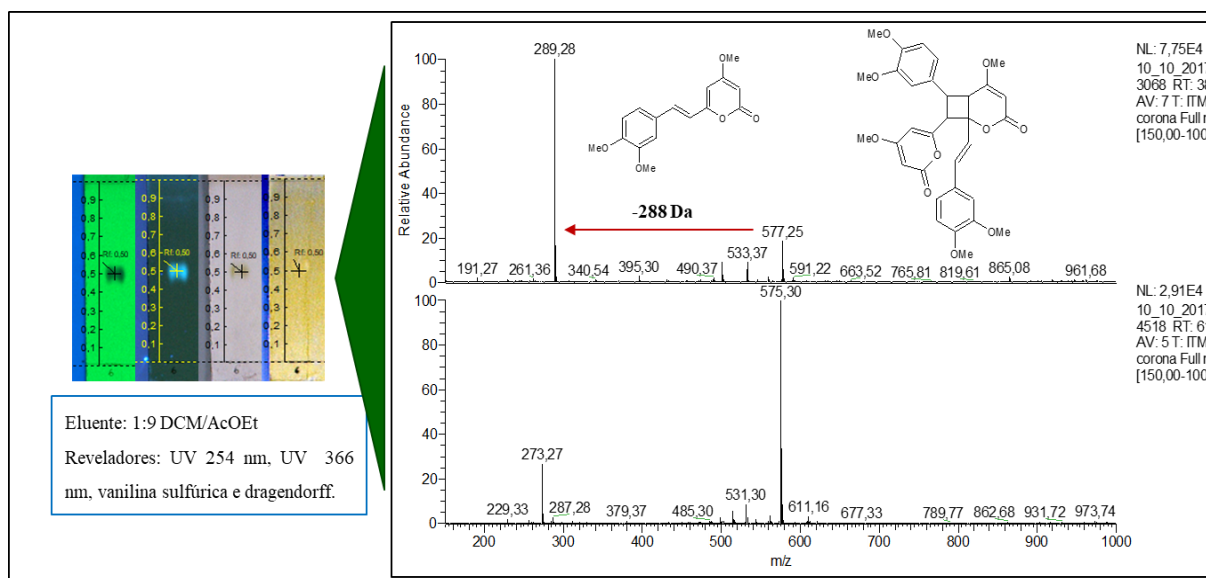


Figura 41 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da substância 3.

O perfil cromatográfico e espectrométrico da substância pode ser observado na figura 41. Essa molécula quando analisada por espectrometria de massas no modo positivo utilizando fonte de ionização APCI produziu o íon *m/z* 289 e 577, que quando comparado com a literatura foi associada a um dímero de uma estilipirona já isolada em outras espécies de *Aniba* sp.

(ROSSI et al., 1997). Dessa forma, a substância é um dímero que possui massa molecular 576 g/mol, sendo importante destacar que o íon de m/z 289 corresponde ao monômero da molécula.

A substância 3 foi o principal íon observado nos espectros das frações metanólicas de folhas e galhos da espécie *A. panurensis* da partição em microescala, como pode ser observado na figura 42. Os espectros no modo positivo por ionização ESI diferenciam-se pela presença do íon m/z 599 quando comparados com a fonte APCI com íon m/z 577. Esse fato pode ser justificado pela formação do aduto de sódio $[M+23]$ gerando o íon m/z 599. Dessa forma, as duas fontes evidenciaram a massa molecular de 576 g/mol como sendo a principal, podendo este íon ser um dos marcadores da espécie.

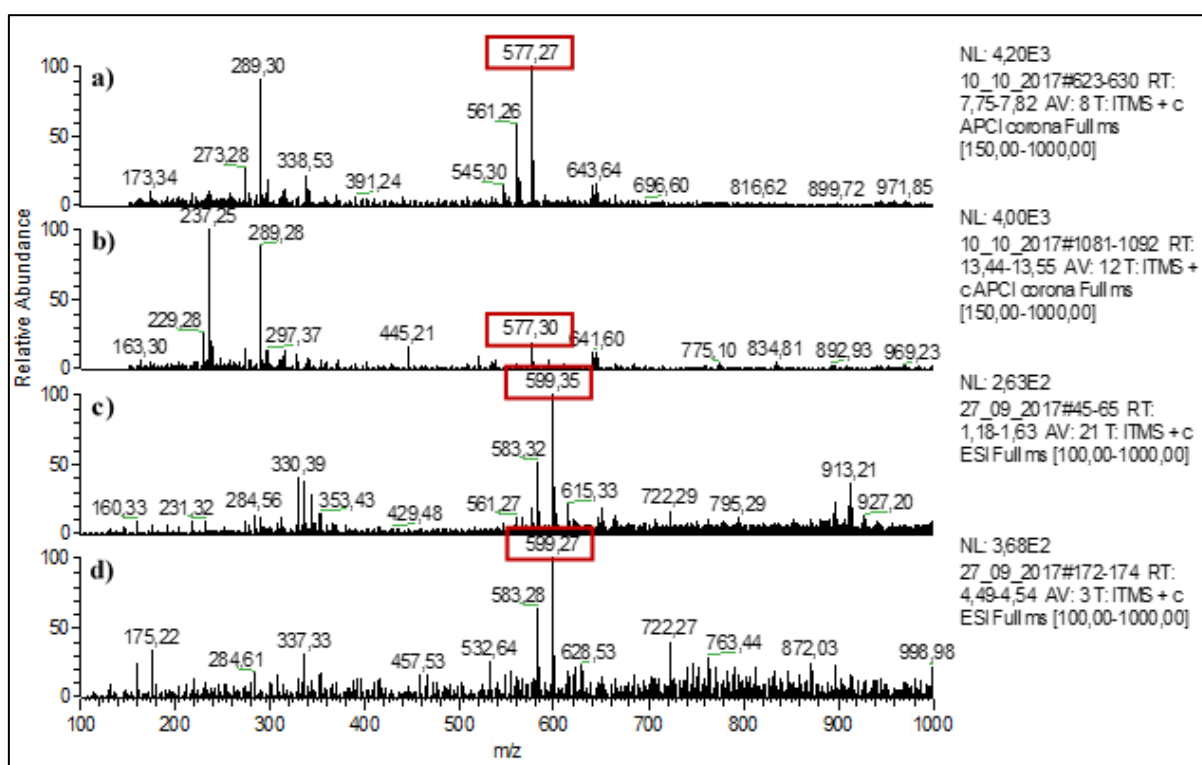


Figura 42 - Perfil espectrométrico das frações metanólicas da espécie *A. panurensis* por meio de ionização APCI (a) folhas e (b) galhos) e ESI (c) folhas e (d) galhos) no modo positivo de ionização.

O espectro de RMN de ^1H da substância 3 caracterizou-se pela presença de alguns sinais semelhantes com a substância 1, porém observou-se alguns sinais a mais (figura 43).

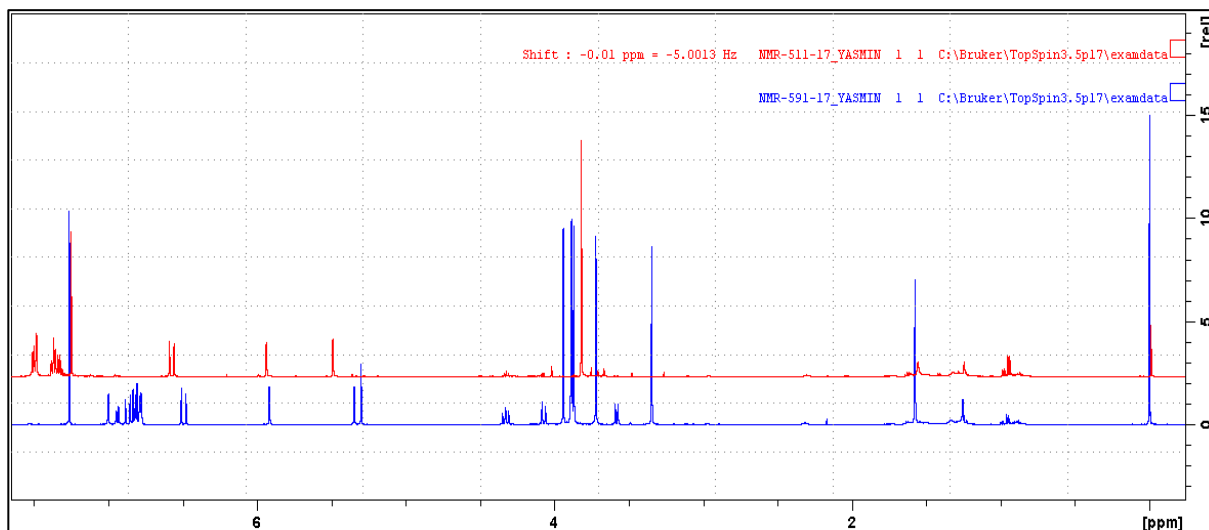


Figura 43 - Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H da substância 1 (vermelho) com a substância 3 (azul).

Nesse espectro (figura 44), verifica-se a presença de hidrogênio de dupla com configuração *trans*, observados pelos sinais dos hidrogênios H-7' e H-8', com valores de δ 6,49 (1H, *d*, $J = 15,8$ Hz) e δ 6,86 (1H, *d*, $J = 15,8$ Hz), respectivamente. Outros sinais observados correspondem aos hidrogênios H-3, H-5 e H-3' pertencentes aos dois anéis pirânicos, assim caracterizando-se pela formação de sinais em regiões de campos mais altos, tais como: H-3 com δ 5,34 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz), H-5 com δ 5,91 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz) e H-3' com δ 5,30 (1H, *s*). Além desses sinais, verifica-se a presença de sinais de aromáticos em regiões de campo mais baixos, em δ 7-8 ppm. Os deslocamentos de δ 3,34 (3H, *s*), δ 3,72 (3H, *s*), δ 3,87 (3H, *s*), δ 3,88 (3H, *s*), δ 3,89 (3H, *s*) e δ 3,94 (3H, *s*), foram atribuídos as metoxilas dos anéis pirânicos (δ 3,34 e δ 3,72) e dos sistemas aromáticos (δ 3,87-3,94). Os sinais referêntes aos hidrogênios H-5', H-8 e H-7 do anel do ciclobutano foram relacionados aos deslocamentos δ 3,58 (1H, *d*, $J = 10,1$ Hz), δ 4,31 (1H, *t*, $J = 10,2$ Hz) e δ 4,07 (1H, *d*, $J = 10,9$ Hz).

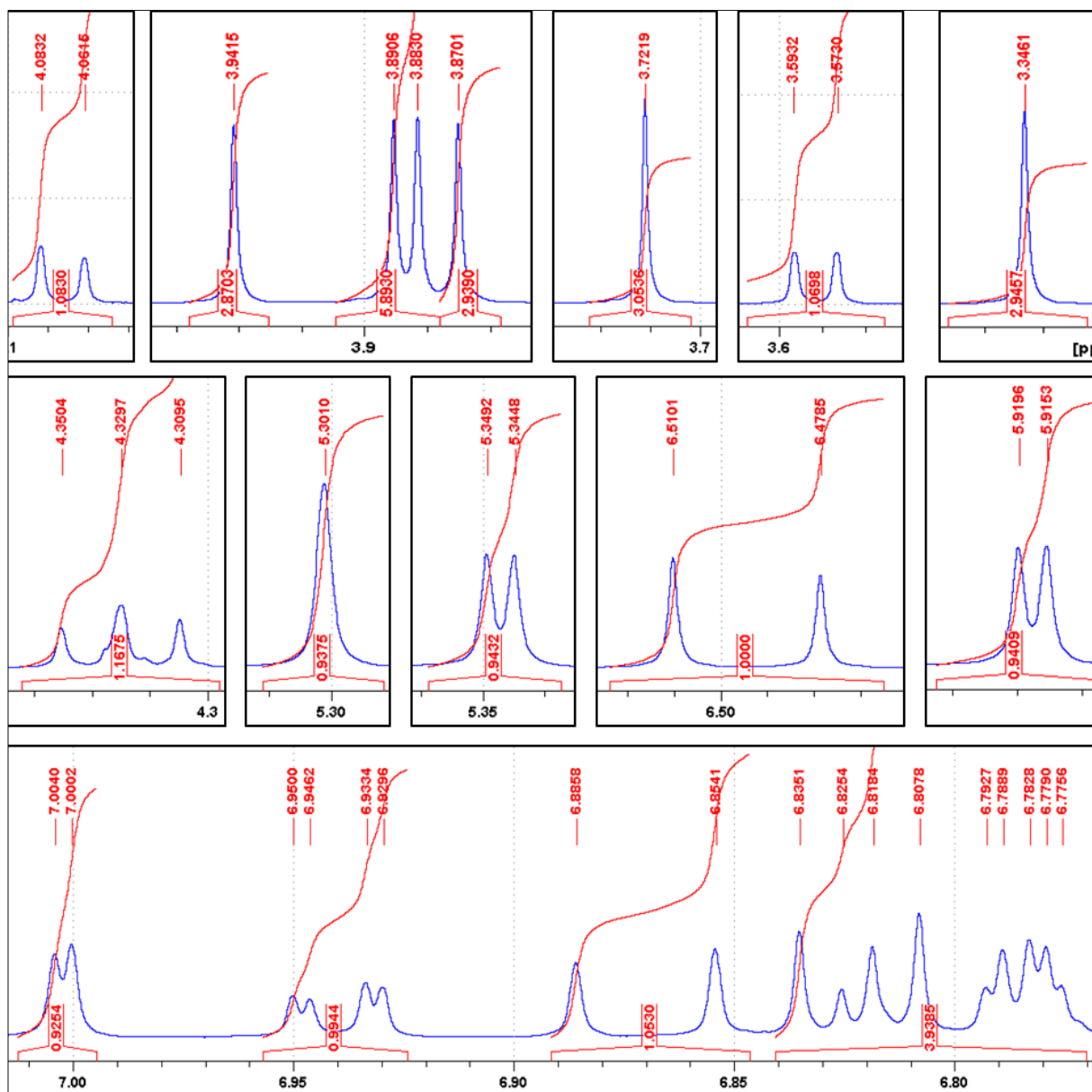


Figura 44 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da substância 3.

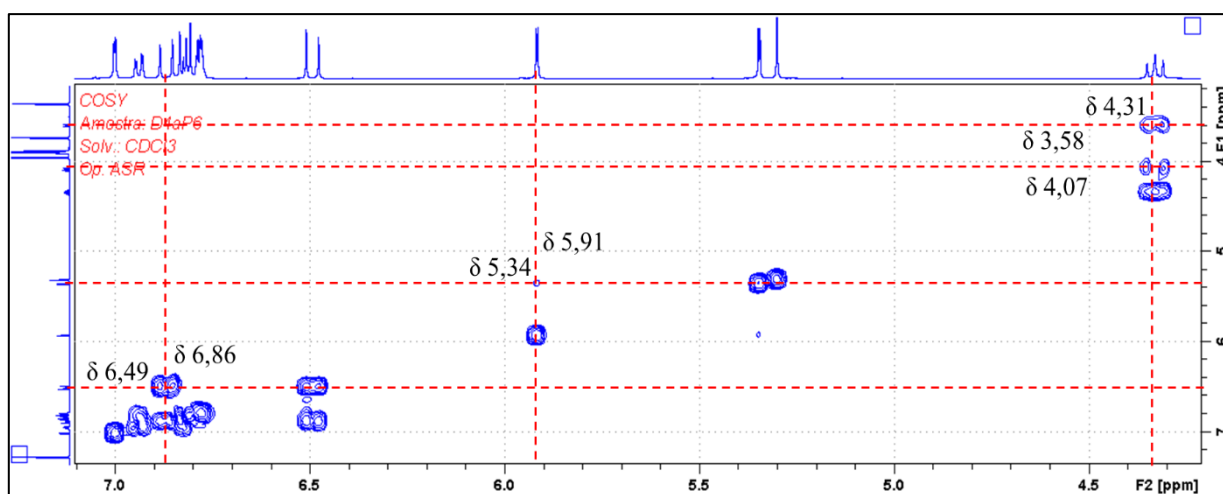


Figura 45 - Mapa de contornos de COSY com ampliação da substância 3.

O mapa de contornos de COSY (figura 45) da substância 3 mostra o acoplamento dos hidrogênios, H-8 (δ 4,31) com H-5' (δ 3,58) e H-7 (δ 4,07), assim confirmando que esses hidrogênios fazem parte do ciclobutano. Nesse mapa, observa-se também a correlação fraca dos hidrogênios H-3 (δ 5,34) com H-5 (δ 5,91), que fazem parte do anel pirânico; e outra correlação observada é relacionada aos hidrogênios H-7' (δ 6,49) com H-8' (δ 6,86), que pertencem a ligação *trans* da molécula.

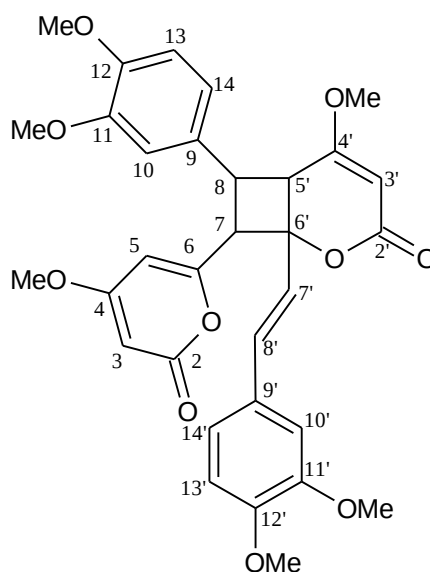


Figura 46 - Estrutura química da substância 3.

O espectro de RMN de ^{13}C da substância 3 caracterizou-se pela presença de alguns sinais semelhantes com a substância 1, como, por exemplo, os sinais localizados em campos mais baixos dos grupos carbonílicos e de carbonos ligados a grupo metoxílicos, sinais em região de aromáticos, e também em regiões de carbonos de metoxilas. Porém observou-se alguns sinais há mais no espectro da substância 3 (figura 47).

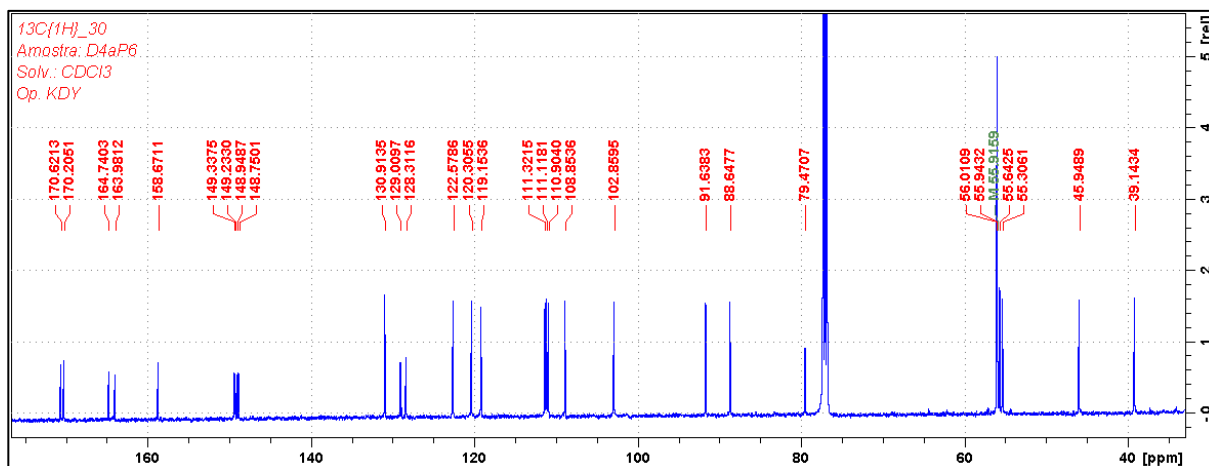


Figura 47 - Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3.

Os dados de RMN de ^{13}C da substância 3 podem ser observados na tabela 17. Os sinais de carbonos localizados em campos mais baixos foram atribuídos aos carbonos dos anéis pirânicos C-2, C-2', C-4 e C-4', com os δ 163,6; δ 164,7; δ 170,6 e δ 170,2; respectivamente. Além desses sinais dos anéis pirânicos, também são observados os sinais dos carbonos olefínicos C-3, C-3' e C-5 em δ 88,6; δ 91,6; δ 102,8. Os carbonos pertencentes aos anéis aromáticos das estirilpironas são: δ 128,3 (C-9), δ 110,9 (C-10), δ 148,7 (C-11), δ 149,2 (C-12), δ 111,3 (C-13); δ 119,1 (C-14), δ 129,0 (C-9'), δ 108,9 (C-10'), δ 148,9 (C-11'), δ 149,3 (C-12'), δ 111,1 (C-13'); δ 120,3 (C-14'); desses carbonos os que possuem deslocamentos entre 148-150 ppm, que são mais desblindados devido sua ligação com o oxigênio das metoxilas. Os sinais que confirmam o anel do ciclobutano, correspondem aos sinais mais protegidos em δ 55,3 (C-7), δ 39,1 (C-8), δ 45,9 (C-5') e δ 79,4 (C-6').

No espectro de DEPT 135 verifica-se a presença só de sinais positivos correspondentes a CH (carbonos metínicos) e CH_3 (carbonos metílicos); e confirma a ausência de sinais negativos relacionados a CH_2 (carbonos metilênicos). Verifica-se também a inexistência de sinais no intervalo de δ 157-171, assim caracterizando-os como, carbonos quaternários, carbonílicos e ligados aos grupos metoxílicos.

A partir desses dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC (anexo 5) e a substância isolada dos galhos de *A. panurensis* foi confirmada como: rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil-7-[6-(4 metoxi-2-piranyl)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona ou 6,6'-(2,4-Bis(3,4-dimethoxyphenyl)cyclobutane-1,3-diyl)bis(4-methoxy-2*H*-pyran-2-one). Esse dímero foi isolado pela primeira vez no gênero *Aniba* no trabalho com *Aniba* sp. (ROSSI et al.,1997).

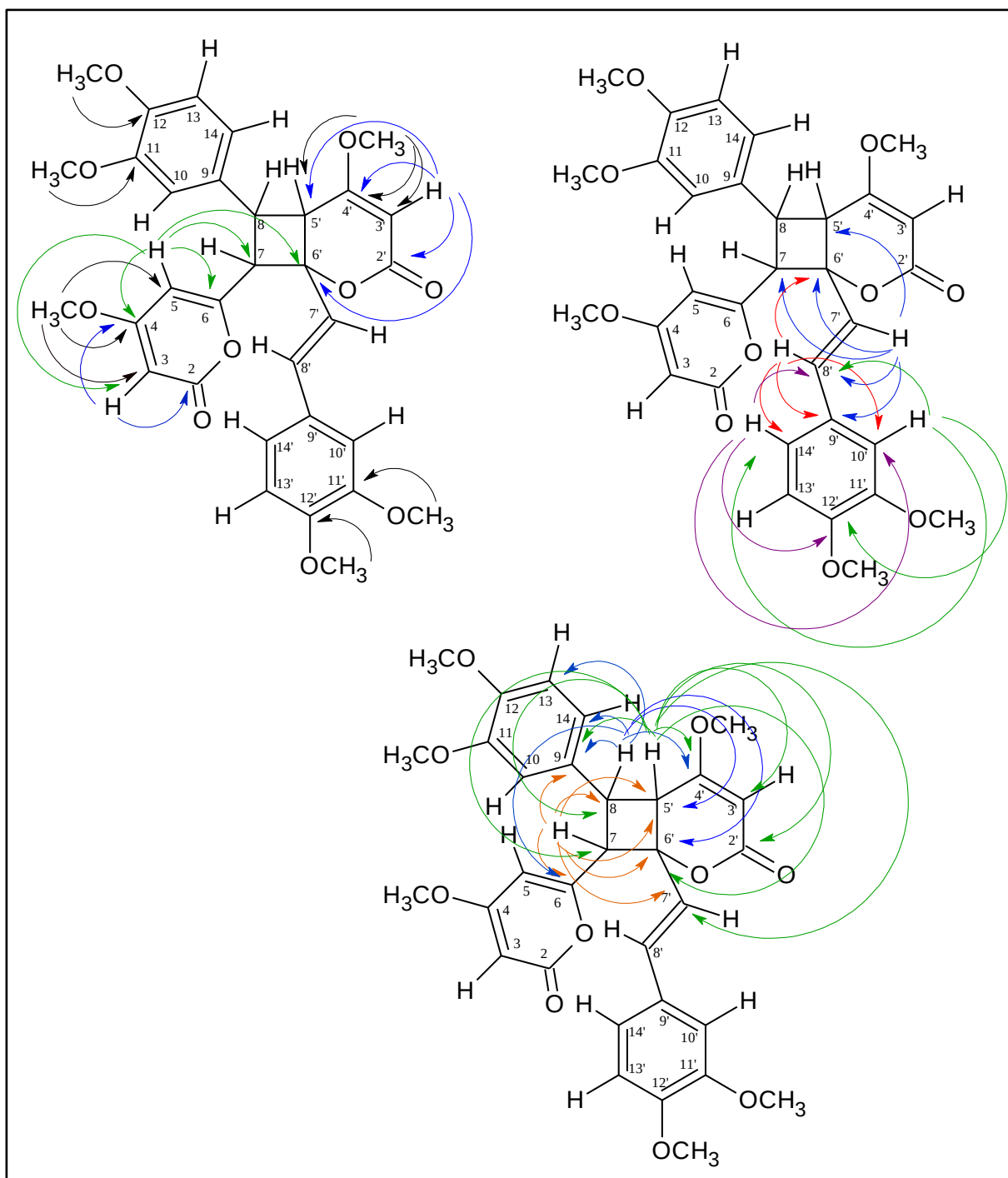


Figura 48 - Estrutura da substância 3 com as correlações de HMBC.

Posição do C	Dados Experimentais (500 MHz, CDCl ₃)			Dados da Literatura (200 MHz, CDCl ₃)	
	δ _c (ppm)	δ _H (ppm); multiplicidade; J (Hz)	HMBC δ _H (ppm)	δ _c (ppm)	δ _H (ppm); multiplicidade; J (Hz)
2	163,6	-	5,34	170,6	-
3	88,6	5,34; d; 2,2	3,72; 5,91	88,6	5,32; d; 2,1
4	170,6	-	3,72; 5,34; 5,91;	164,0	-
5	102,8	5,91; d; 2,2	3,72; 5,34	102,8	5,92; d; 2,1
6	158,6	-	5,91, 4,07; 4,31; 3,58	158,6	-
7	55,3	4,07; d; 10,8	4,31; 3,58; 5,91; 6,49	45,9	4,05; d; 11,0
8	39,1	4,31; t; 10,2	4,07; 3,58; 5,30	39,1	4,28; d; 9,8
9	128,3	-	4,31; 3,58; 4,07;	128,9	-
10	110,9	6,8; m	-	110,7	6,76-6,98; m
11	148,7	-	3,87	148,7	-
12	149,2	-	3,94	149,2	-
13	111,3	6,8; m	4,31	111,1	6,76-6,98; m
14	119,1	6,8; m	4,31	123,3	6,76-6,98; m
2'	164,7	-	5,30; 3,58	170,2	-
3'	91,6	5,30 s	3,34; 3,58;	91,6	5,28; s
4'	170,2	-	3,34; 5,30; 3,58; 4,31	164,8	-
5'	45,9	3,58; d; 10,1	5,30; 3,34; 4,31; 4,07; 6,49	30,9	3,56; d; 9,7
6'	79,4	-	3,58; 4,31; 4,07; 5,30; 5,91; 6,49; 6,86;	79,5	-
7'	122,5	6,49; d; 15,8	4,07	119,1	6,47; d; 16,0
8'	130,9	6,86; d; 15,8	6,49; 7,00; 6,93	130,9	6,93; d; 16,0
9'	129,0	-	6,49; 6,86	128,3	-
10'	108,8	7,00; d; 1,9	6,83; 6,93	108,7	6,76-6,98; m
11'	148,9	-	-	148,9	-
12'	149,3	-	6,93; 7,00	149,3	-
13'	111,1	6,8; m	-	111,3	6,76-6,98; m
14'	120,3	6,93; dd; 8,3; 1,9	6,86; 7,00	122,5	6,76-6,98; m
OMe	56,0 (C-12'); 55,94 (C-11', C-11 e C-12); 55,91 (C4); 55,6 (C4')	3,88 (C-12'); 3,98 (C-11'); 3,94 (C-12); 3,87 (C-11); 3,72 (C-4); 3,34 (C-4')	-	55,3; 55,6; 55,9; 56,0	3,32 (C4'); 3,70 (C4); 3,85; 3,86; 3,87 (C11, C11', C12); 3,92 (C12')

Tabela 17 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Rossi et al.,1997) de RMN de ¹H, ¹³C e de HMBC da substância 3.

5.2.3 Fracionamento e isolamento de *Aniba roseadora* (galhos)

A substância 4 foi obtida a partir do extrato etanólico dos galhos de *A. roseadora*. Realizou-se o fracionamento em CCFN com a fração em diclorometano de *A. roseadora*, foram obtidas 7 frações. A fração 2 foi cristalizada e recristalizada com etanol, dessa forma foi obtido um cristal branco.

5.2.3.1 Substância 4

A substância 4 foi obtida da CCFN realizada com a amostra obtida em diclorometano dos galhos de *A. roseadora*. Esse composto foi analisado por meio de métodos cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos, como: CCD, EM e RMN uni e bidimensional. Na figura 49, pode-se observar a análise cromatográfica e espectrométrica da substância 4.

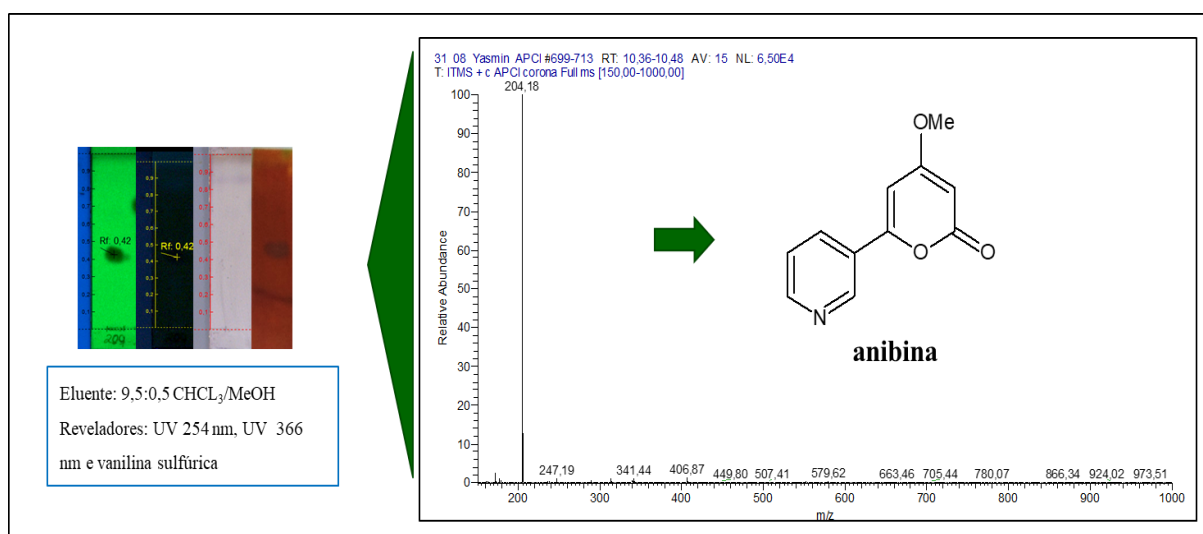


Figura 49 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da substância 4.

O composto apresentou r_f 0,42 no sistema de eluição da placa, com uma coloração intensa nos comprimentos de onda de UV 254 nm (preta) e no Dragendorff (laranja); no entanto em outros reveladores, como: UV 366 nm e vanilina sulfúrica, não são observadas colorações. Essa substância, quando analisada por espectrometria de massas no modo positivo utilizando fonte de ionização APCI, gerou o íon m/z 204, que quando comparado com a literatura foi

associada ao alcaloide anibina, já isolada em espécies do gênero de *Aniba*, como: *A. roaeadora* e *A. fragrans* (MORS et al., 1957).

O espectro de RMN de ^1H da substância 4 (figura 50) apresentou semelhanças quando comparados com os outros espectros das moléculas isoladas de *A. panurensis*, devido a presença de um anel pirânico; diferenciando-se pela presença de sinais mais deslocados do anel piridínico, que contém a presença de um átomo de nitrogênio. Os sinais dos hidrogênios H-3 e H-5 correspondentes ao anel pirânico, produziram sinais de dubletos em deslocamentos de campos mais altos, tais como: H-3 com δ 5,58 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz) e H-5 com δ 6,48 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz). Outro sinal característico observado nesse espectro, é associado a hidrogênios de grupos metoxílicos, com δ 3,83 (3H, *s*). Além desses sinais, foram evidenciados outros em deslocamentos de campos mais baixos do anel piridínico adjacente, apresentando deslocamentos em: H-2' com δ 9,00 (1H, *d*, $J = 2,2$ Hz), H-6' com δ 8,69 (1H, *dd*, $J = 4,8; 1,5$ Hz), H-4' com δ 8,12 (1H, *ddd*, $J = 8,0; 2,2; 1,5$ Hz) e H-5' com δ 7,40 (1H, *ddd*, $J = 8,0; 4,8; 0,7$ Hz).

No mapa de contornos de COSY (figura 51) da substância 4 pode-se observar quatro acoplamentos, um relacionado aos hidrogênios H-5 (δ 6,48) e H-3 (δ 5,58) pertencentes ao anel pirânico e o acoplamento dos hidrogênios do anel piridínico, sendo eles: H-4' com H-5', H-6' com H-5' e H-2' com H-4'. Dessa forma, confirmando a proximidade desses hidrogênios.

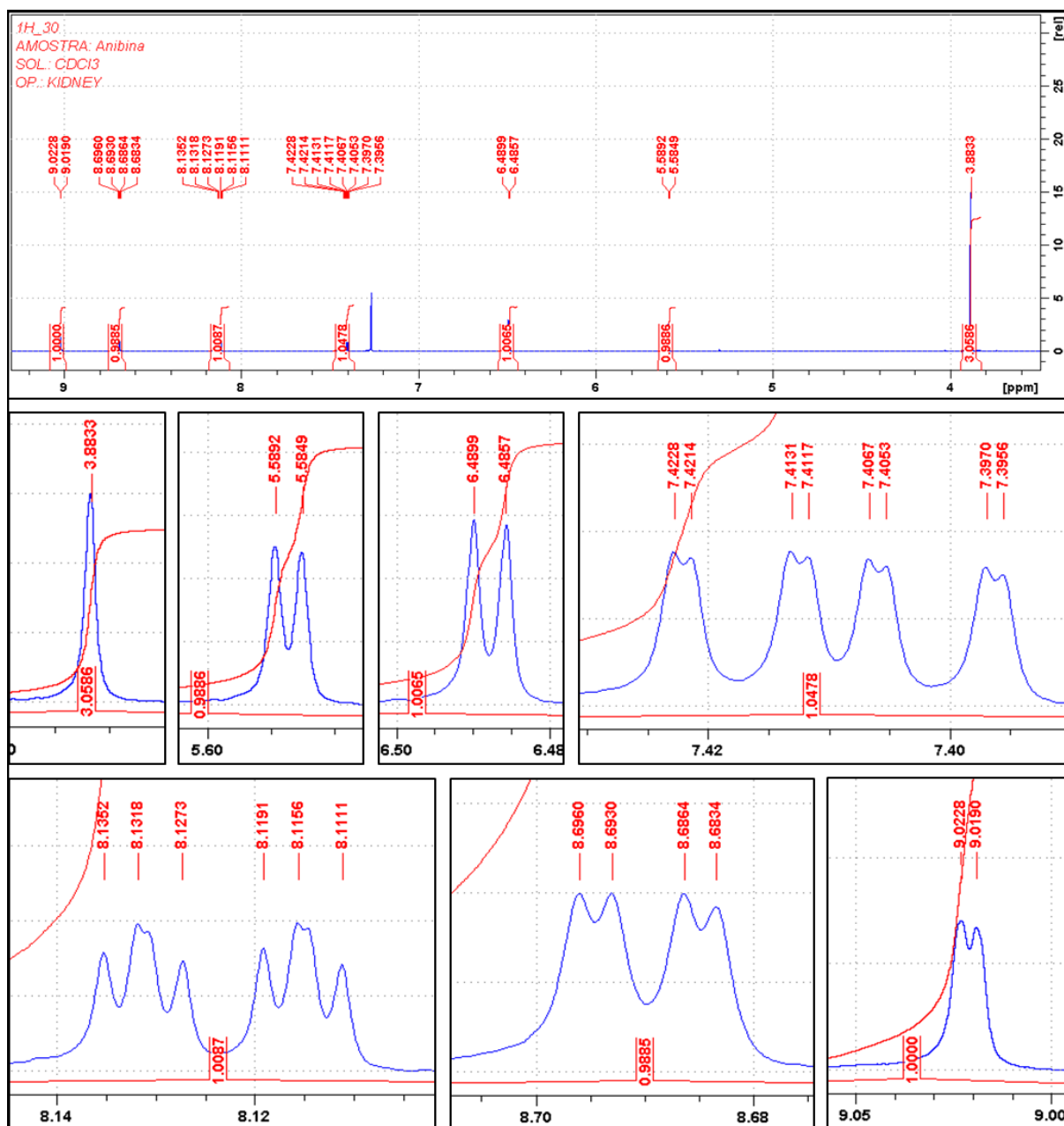


Figura 50 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da substância 4.

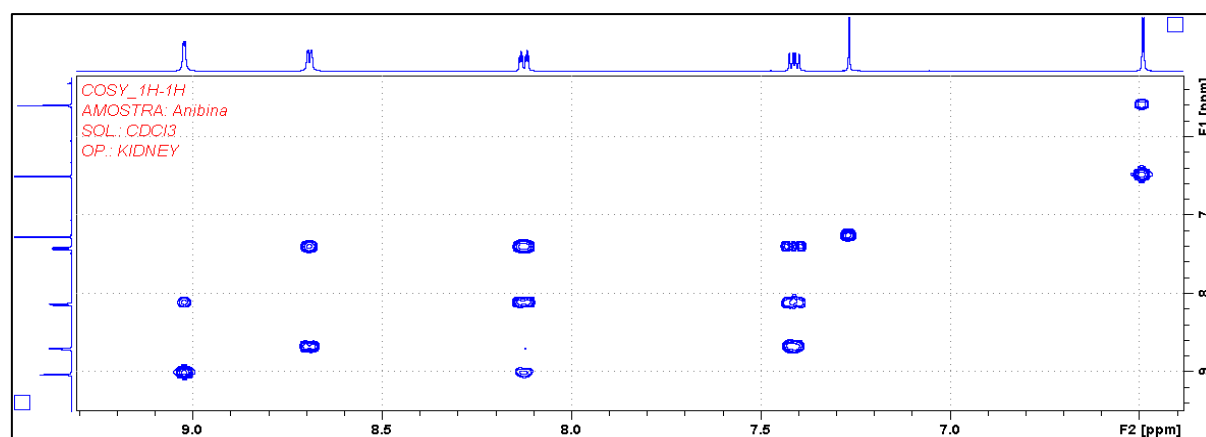


Figura 51 - Mapa de contornos de COSY com ampliações da área de acoplamento dos hidrogênios da substância 4.

Os dados de RMN de ^{13}C (figura 52) dessa substância podem ser observados na tabela 18. Analisando os deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C e comparando com o espectro de DEPT 135 (figura 53), observa-se a presença de sete sinais (metínicos (CH) e metílicos (CH_3)) e a ausência de quatro sinais, que podem ser associados a carbonos sem átomos de hidrogênio. Em campos mais baixos do espectro de carbono, observa-se os sinais dos carbonos do anel pirânico, de δ 170,8 (C-4), δ 163,5 (C-2) e δ 157,6 (C-6); além desses sinais nesse mesmo anel, têm-se os carbonos metínicos C-3 (δ 89,2) e C-5 (δ 99,0). Outros deslocamentos observados, são: δ 56,1, que é característico da região de carbono de metoxilas; os δ 146,9 (C-2'), 127,2 (C-3'), 133,1 (C-4'), 123,6 (C-5') e 151,5 (C-6'), que foram associados aos carbonos do anel piridínico.

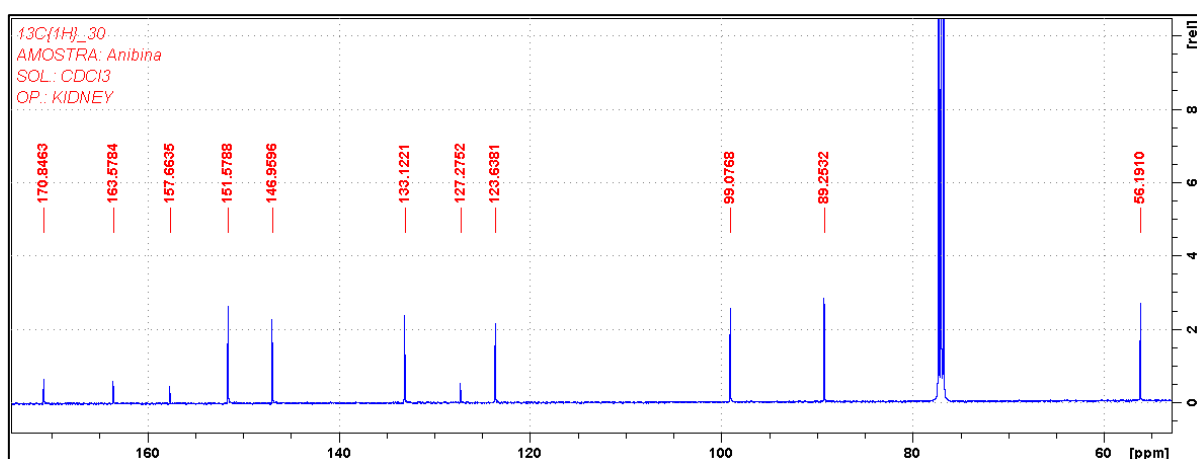


Figura 52 - Espectros de RMN de ^{13}C da substância 4.

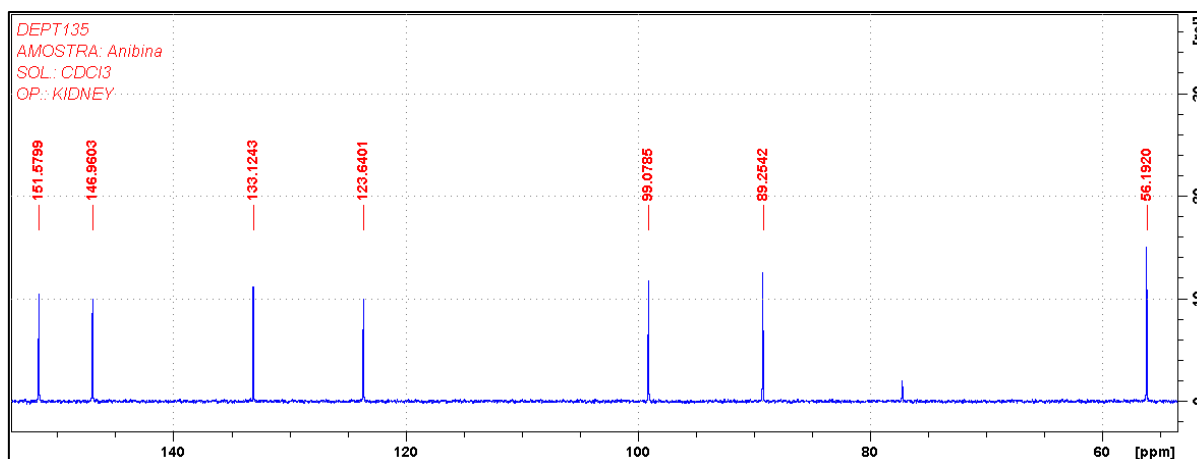


Figura 53- Espectros de DEPT da substância 4.

Os dados obtidos por meio do mapa de contornos de HMBC podem ser observados na tabela 18 e na figura 54. A partir desses dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC (anexo 5) a substância isolada dos galhos de *A. roseadora* foi confirmada como anibina. Essa substância já foi isolada em espécies do gênero de *Aniba*, como: *A. roaeadora* e *A. fragrans* (MORS et al., 1957); e também já foi descrita com analéptica (GONÇALVES et al., 1958), atividade antibacteriana frente *Bacillus subtilis* com CIM de 1 $\mu\text{g/mL}$ (CUSTÓDIO, 2013).

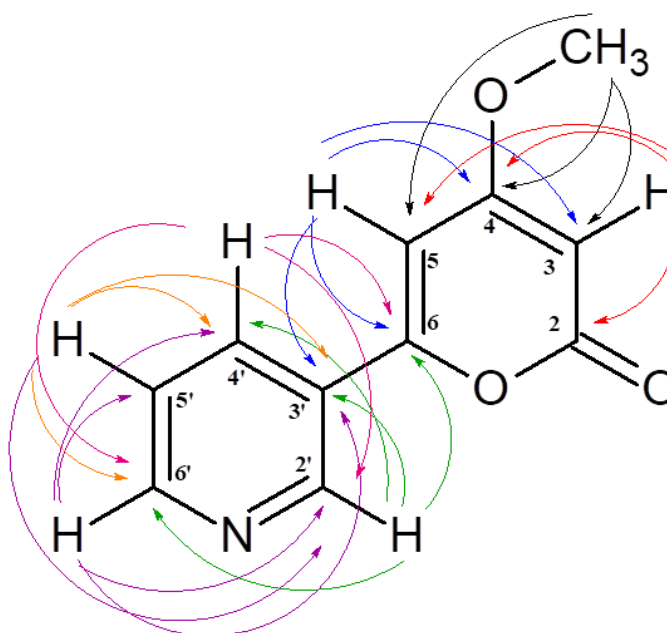


Figura 54 - Estrutura da substância 4 com as correlações de HMBC.

Posição do C	Dados experimentais (500 MHz, CDCl ₃)			Dados da Literatura (90 MHz, CDCl ₃)
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)	HMBC δ_H (ppm)	δ_H (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)
2	163,5	-	5,58	-
3	89,2	5,58; d; 2,2	3,88; 6,48	5,50; d; 2,5
4	170,8	-	3,88; 5,58; 6,48	-
5	99,0	6,48; d; 2,2	3,88; 5,58	6,50; d; 2,5
6	157,6	-	6,48; 8,12; 9,00	-
2'	146,9	9,00; d; 2,2	7,40; 8,12; 8,69	9,00; d; 2,5
3'	127,2	-	6,48; 7,40; 8,69; 9,00	-
4'	133,1	8,12; ddd; 8,0; 2,2; 1,5	7,40; 8,69; 9,00	8,10; m
5'	123,6	7,40; ddd; 8,0; 4,8; 0,7	8,69; 9,00	7,35; dd; 8,0; 5,0
6'	151,5	8,69; dd; 4,8; 1,5	7,40; 8,12; 9,00	8,67; dd; 5,0; 1,5
OMe	56,1	3,88; s	-	4,00; s

Tabela 18 – Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Dhavale et al., 1989) de RMN de ¹H, ¹³C e de HMBC da substância 4.

5.2.4 Fracionamento e isolamento de *Aniba parviflora* (folhas)

A mistura composta pelas substâncias 5 e 6 foi obtida do extrato etanólico de folhas de *A. parviflora*. Esse extrato destacou-se pela formação de cristais logo após a eliminação do solvente, provavelmente pela presença de moléculas majoritárias, que também foram observadas na análise do perfil cromatográfico do extrato; e das frações em hexano e diclorometano. Realizou-se o fracionamento em CCFN com a fração em hexano de *A. parviflora*, foram obtidas 19 frações, que foram reunidas em 8 frações. A fração 5 apresentou um cristal, que foi fracionada em coluna com sílica impregnada com KOH e carvão ativado, utilizando como gradiente: hexano, diclorometano e metanol, visando purificar a amostra de outras substâncias, como: clorofila ou ácidos graxos. A partir desse fracionamento nas frações 1 e 2, obteve-se o mesmo perfil em CCD; a fração 1 foi cristalizada gerando assim 25 mg.

5.2.4.1 Substâncias 5 e 6

A mistura das substâncias 5 e 6, foi analisada por meio de métodos cromatográficos, espectrométricos e espectroscópicos, como: CCD, EM, CLAE-DAD e RMN uni e bidimensional. O perfil cromatográfico e espectrométrico mistura pode ser observado na figura 55. A mistura substâncias 5 e 6 em CCD apresentou apenas uma macha na placa, com R_f 0,60 no sistema de eluição da placa, com uma coloração forte em todos os reveladores, exceto no comprimento de onda de UV 366 nm. Quando revelada com vanilina sulfúrica e no comprimento de onda de UV 254 nm, exibiu coloração preta; e em Dragendorff apresentou coloração laranja, resultando em um falso positivo para classe de alcaloides. Essa amostra, quando analisada por espectrometria de massas no modo positivo utilizando fonte de ionização APCI, produziu dois íons m/z 263 e 277, dado que quando comparado com a literatura foi associada a uma estirilpirona já isolada em outras espécies de *Aniba*, como: *A. species*, *A.*

gigantifolia (FRANÇA et al., 1973), tetrahidroyangonina e dihidrometisticina, respectivamente.

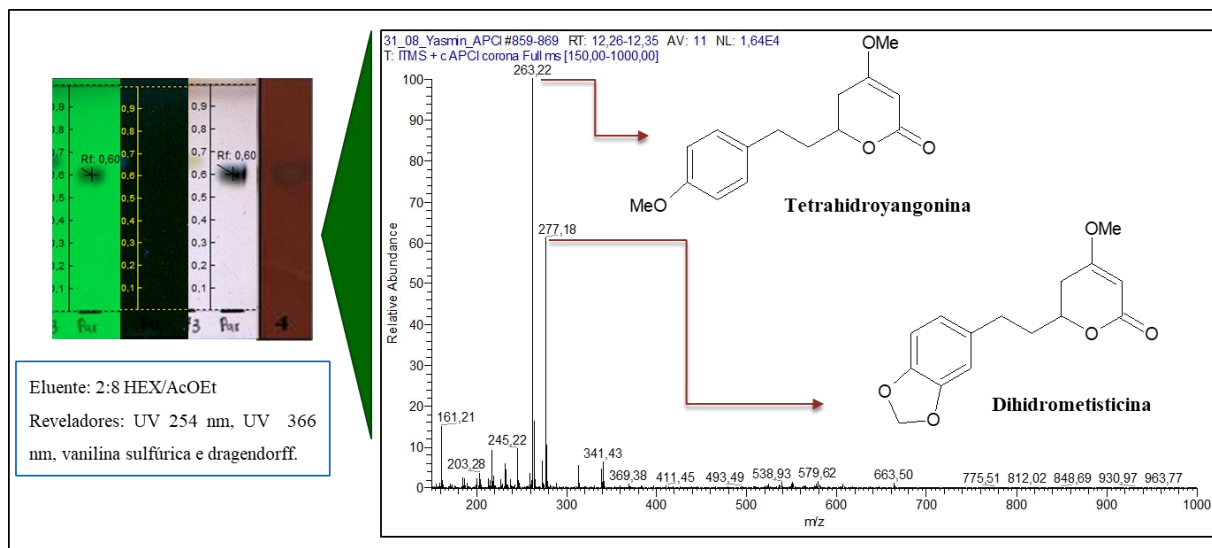


Figura 55 - Perfil cromatográfico e espectrométrico da mistura das substâncias 5 e 6.

O cromatograma dessa amostra pode ser visualizado na figura 56, com essa análise pode-se confirmar a presença de duas substâncias, que coeluem na placa cromatográfica. O melhor método obtido para a separação dessa mistura foi de 12 min, na qual os tempos de retenção observados das estirilpironas correspondeu a 9,5 e 9,9 min. Os espectros de absorção no ultravioleta podem ser visualizados na figura 57, em que verifica-se que ambos os picos apresentaram bandas de absorção máximas ($\lambda_{\max}$) de aproximadamente 240 nm (240,14 nm e 238,75). Segundo a literatura (SHAO et al., 1998) as kawalactonas, como por exemplo, kawaina, dihidrometisticina e dihidrokawaina, possuem espectro de $\lambda_{\max}$ em 240 nm; e metisticina, yangonina e demetoxiyangonina, possuem $\lambda_{\max}$ em 220 nm. Conforme o livro de espectroscopia de Silverstein (1994) o espectro de UV das lactonas insaturadas simples apresentam absorções em 200-240 nm. Dessa forma, confirmando assim as estruturas das estirilpironas ou kavalactonas.

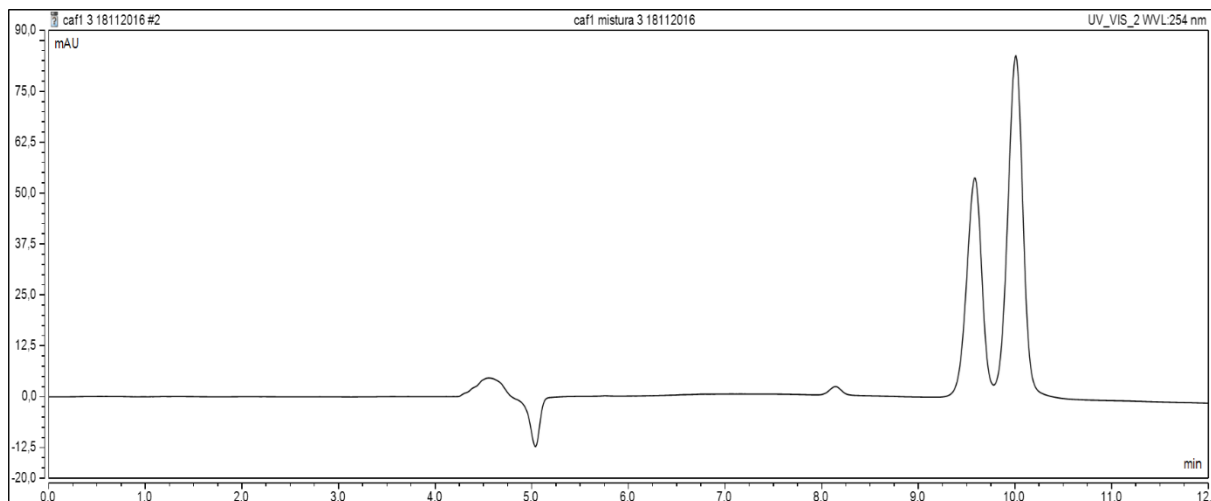


Figura 56 - Cromatograma da mistura das substâncias 5 e 6.

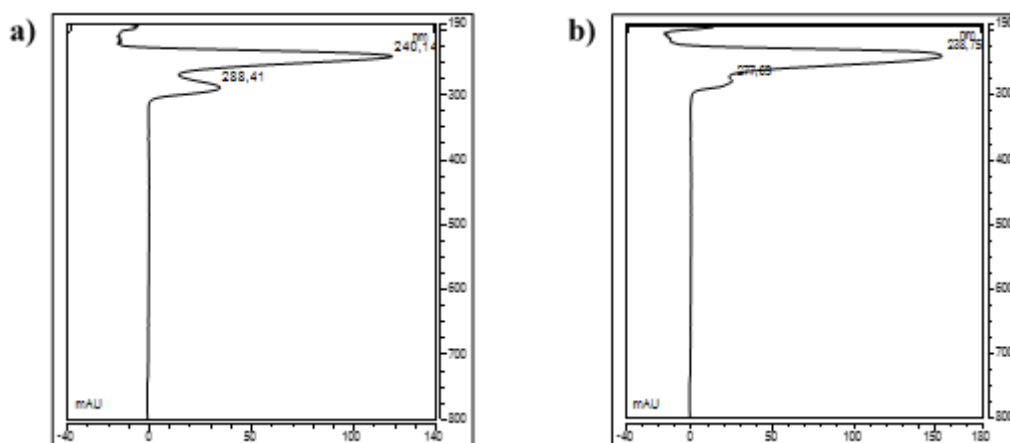


Figura 57 - Espectros de absorção de ultravioleta da mistura das substâncias 5 e 6. a) tempo de retenção 9,5 min e b) tempo de retenção 9,9 min.

Na figura 58, são observados os espectros de ambas as partes das frações metanólicas de *A. parviflora* da partição em microescala, nas fontes APCI e ESI no modo positivo. Na fonte de ionização APCI os íons evidenciados são de m/z : 233, 263, 277 e 293, os quais encontra-se protonados; já na fonte de ionização ESI os íons evidenciados são de m/z : 255, 285, 299 e 315, correspondem aos mesmos íons da fonte APCI, porém no modo ESI encontram-se na forma de adutos de sódio $[M+23]$. As substâncias 5 e 6 foram os principais íons (m/z 263 e 277) observados na fração metanólicas de folhas da espécie *A. parviflora*, mas também são presentes nos espectros de galhos da mesma espécie. Além desses íons, são observados outros íons que também estão presentes em ambas as partes da planta, sendo eles: m/z 233 e 293; o íon 233 foi o principal observado para os galhos e o 293 foi mais abundante para as folhas, podem corresponder as substâncias dihidrokawaina e metoxitetrahidroyangonina, que apresentam

estruturas semelhantes e diferenciam-se pela presença ou ausência de grupos de metoxilas no anel benzênico. As substâncias dihidrokawaina e metoxitetrahydroyangonina já foram relatadas em espécies de *Aniba*, como: *A. species*, *A. gigantifolia* (FRANÇA et al., 1972).

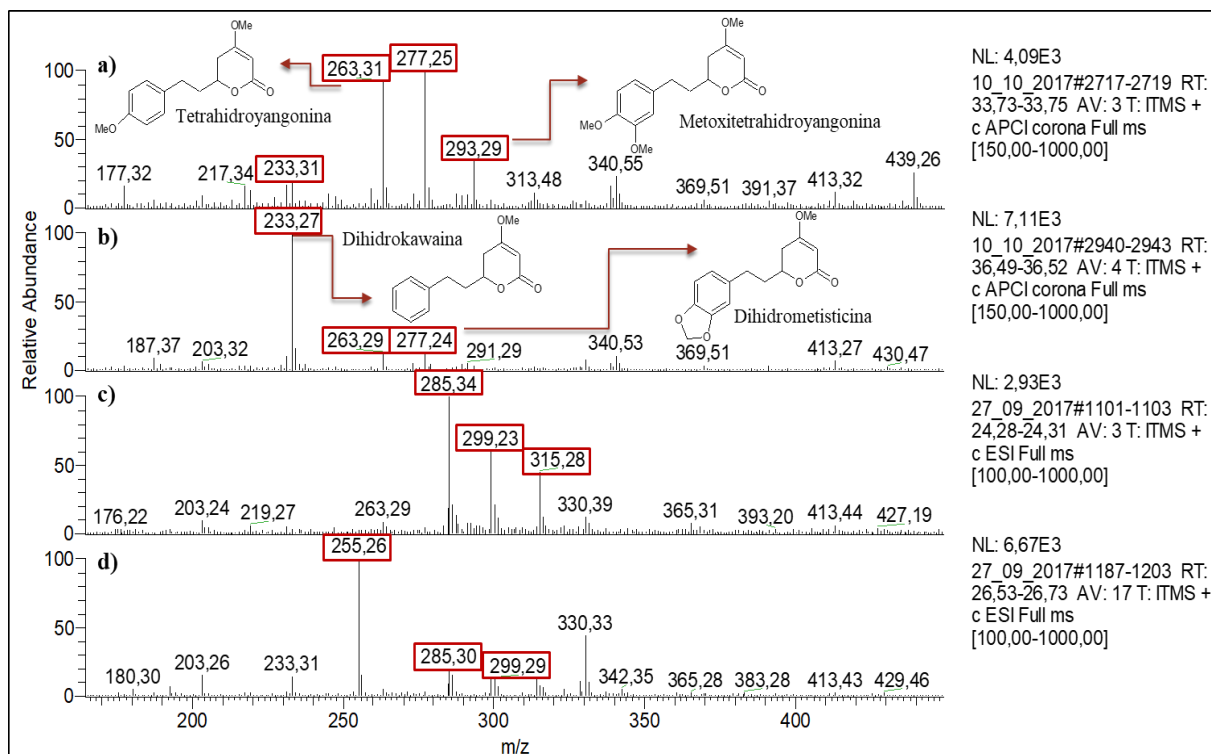


Figura 58 - Perfil espectrométrico das frações metanólicas da espécie *A. parviflora* por meio de ionização APCI (a) folhas e b) galhos) e ESI (c) folhas e d) galhos) no modo positivo de ionização.

Comparando os dados espectrométricos com resultado obtidos de análise do perfil cromatográficos (figura 59) de ambas as partições em micro e em larga escala, verificou-se que a mistura das substâncias que foi obtida pode ser encontrada nas frações hexânica e metanólica da partição em microescala; e também na fração em diclorometano da partição em larga escala. A placa da figura 57 foi selecionada para ilustrar, nessa placa observa-se no rf 0,14 do spot 7 a mistura das substâncias 5 e 6 (263 e 273), com coloração preta em vanilina sulfúrica; e no spot adjacente observa-se a mesma mancha preta no revelador vanilina sulfúrica, porém verifica-se a presença de outra substância bem majoritária e de coloração verde musgo no rf 0,18, que pode estar relacionado ao íon 233, que foi o mais intenso no espectro de galhos de *A. parviflora* e pode estar associado a substância dihidrokawaina.

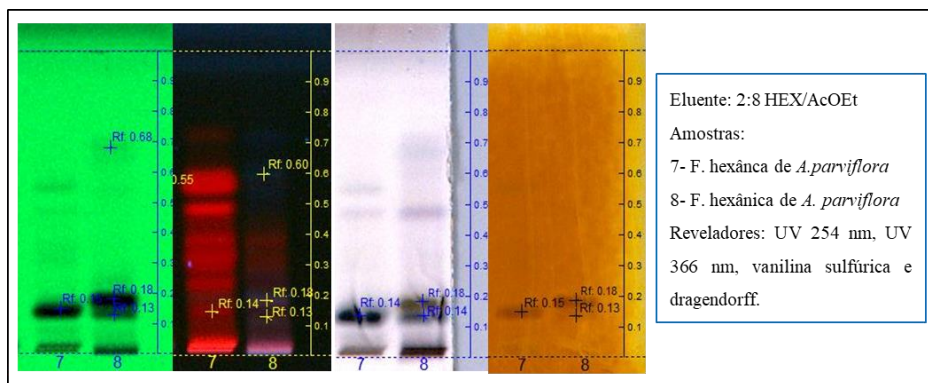


Figura 59 - Perfil cromatográfico em placa de HPTLC das frações em hexano de folhas e galhos de *A. parviflora*.

O espectro de RMN de ^1H da mistura das substâncias 5 e 6 (figura 60), diferenciou-se dos espectros das substância 1, 2 e 3. Nesse espectro, os deslocamentos característicos da molécula 5 corresponderam aos deslocamentos dos hidrogênios H-10 e H-14, H-11 e H-12; que possuem os respectivos valores: δ 7,11 (2H, *d*, J = 8,7) e δ 6,83 (2H, *d*, J = 8,7). Além desses deslocamentos, há evidências do deslocamento dos hidrogênios da metoxila em δ 3,78 (3H, *s*), que encontra-se ligada no C-12 do anel benzênico na posição *para*. Os dados de hidrogenios característicos da molécula 6, também estão ligados no anel benzênico, H-10 com δ 6,68 (1H, *d*, J = 1,7 Hz), H-13 com δ 6,72 (1H, *d*, J = 7,9 Hz) e H-14 com δ 6,65 (1H, *dd*, J = 7,9; 1,7 Hz). Além disso, há evidências do deslocamento dos hidrogênios do grupo metilenodioxi em δ 5,92 (2H, *s*), que encontra-se ligada no anel benzênico da molécula 6. Devido a semelhança estruturais de ambas as moléculas, os sinais correspondentes a lactona e a cadeia lateral de hidrocarbônicos apresentam os mesmos deslocamentos, fato que foi confirmado pelos valores das integrais. Esses deslocamentos são dos hidrogênios nos δ 1,88 (*m*), δ 2,09 (*m*), δ 2,29 (*dd*, J = 17,0; 3,7 Hz), δ 2,49 (*ddd*, J = 17,0; 3,7; 1,2 Hz), 2,70 (*m*), 2,79 (*m*). Outros sinais observado são da lactona em δ 3,72 (3H, *s*), δ 3,73 (3H, *s*) e 5,13 (2H, *d*; J = 1,2 Hz), que foram atribuídos com base na comparação com a literatura (DHARMARATNE et al., 2002), tais dados encontram-se nas tabelas 19 e 20.

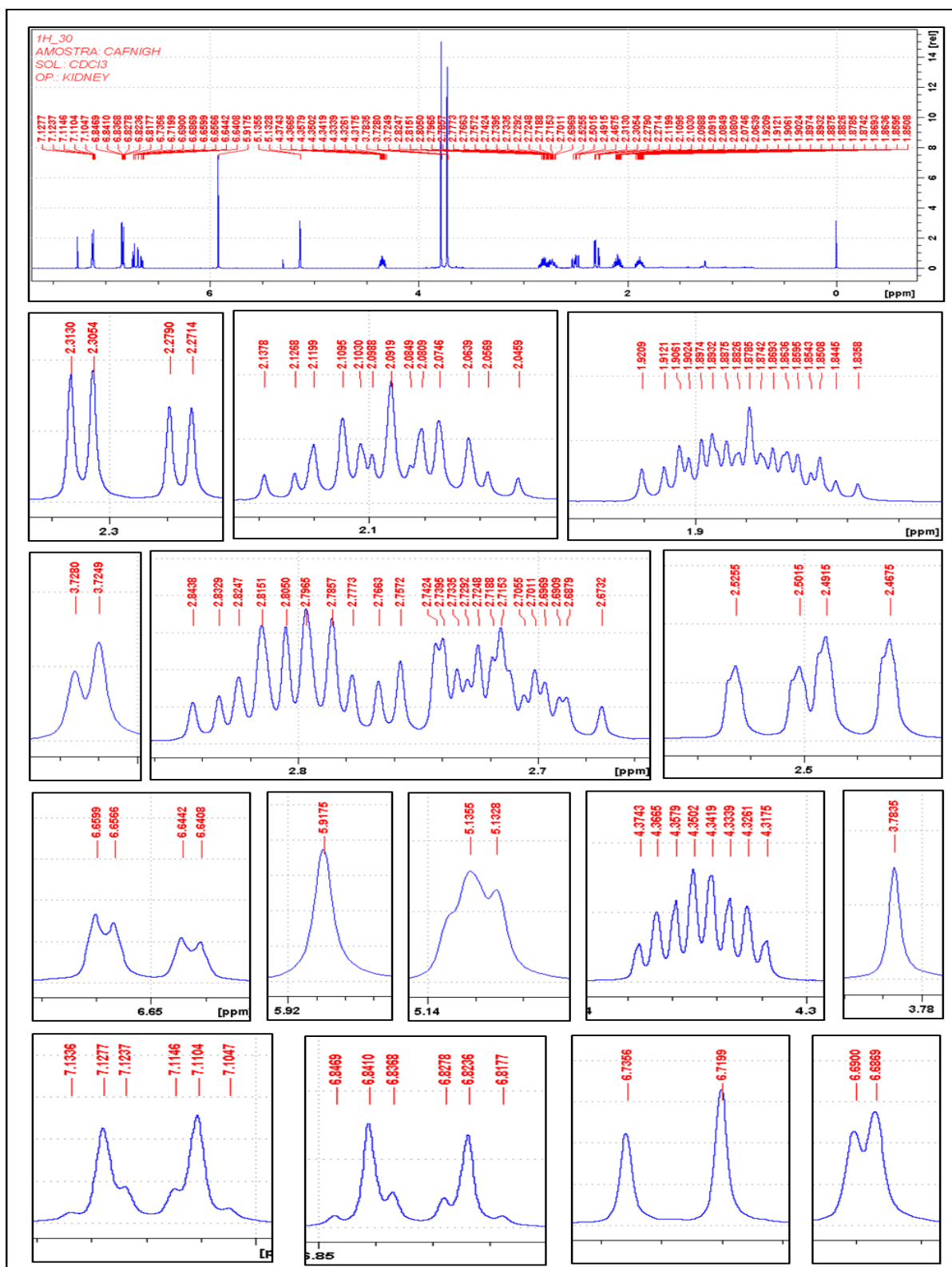


Figura 60 - Ampliação dos sinais do espectro de RMN de ^1H da mistura das substâncias 5 e 6.

Os dados de mapa de contornos de COSY (figura 61) confirmam os acoplamentos dos hidrogênios H-10 e H-11 ou H-13 e H-14 (δ 7,11 com δ 6,83), correspondente a substância 5; outro acoplamento verificado dos hidrogênios H-13 e H-14 (δ 6,72 com δ 6,65), dados

pertencentes a substância 6. Além desses, outros acoplamentos de ambas as moléculas são evidenciados, sendo eles dos hidrogênios: H-3 com H-5 (δ 5,13 com δ 2,49); H-6 com H-5, H-5', H-7 e H-7' (δ 4,35 com δ 1,88; δ 2,09; δ 2,29 e δ 2,49); H-5 e H-5' com H-7 e H-7' (δ 2,79 e δ 2,70 com δ 1,88 e δ 2,09); H-8 e H-8' com H-7 e H-7' (δ 2,79 e 2,70 com δ 1,88 e δ 2,09); H-5 com H-5' (δ 2,49 com δ 2,29); e H-7 com H-7' (δ 2,09 com δ 1,88).

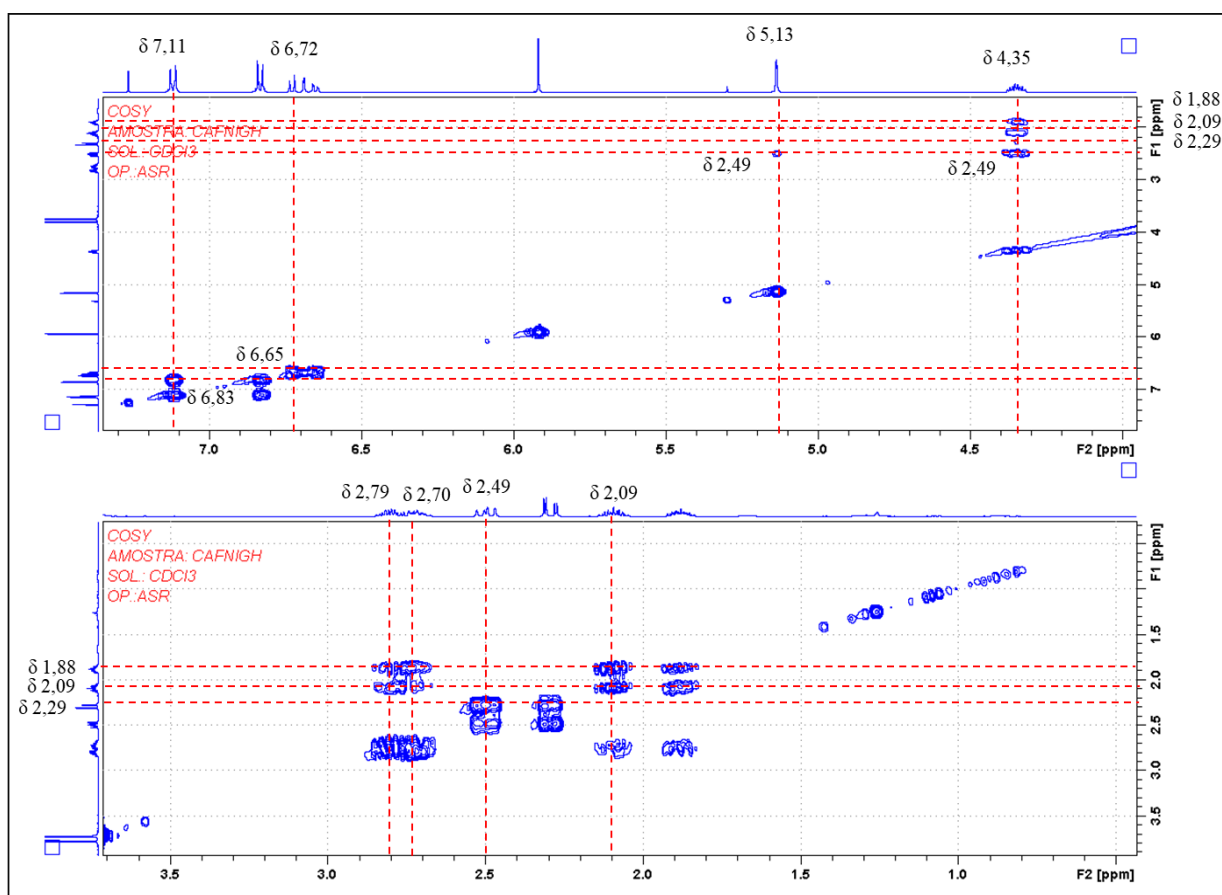


Figura 61 - Mapa de contornos de COSY com ampliação da mistura das substâncias 5 e 6.

Os dados de RMN de ^{13}C (figura 62) dessa mistura das substância 5 e 6, podem ser observados nas tabelas 19 e 20, nesse espectro foram obtidos 25 sinais, em que 5 desses sinais encontram-se dobrados. Os principais deslocamentos observados foram: δ 129,39 (C-10 e C-14), 113,95 (C-11 e C-13), 158,00 (C-12), que pertencem ao anel benzênico a substância 5; e os δ 108,85 (C-10), δ 147,70 (C-11), δ 145,87 (C-12), δ 108,28 (C-13), 121,27 (C-14) e 100,83 (OCH₂O), que pertencem ao anel benzênico a substância 6. Os outros sinais, foram atribuídos por comparação com os dados literatura (DHARMARATNE et al., 2002), pois com a

proximidades dos valores dos deslocamentos por conta da similaridade de parte de ambas as estruturas. Dessa forma, são observados os deslocamentos correspondentes a lactona: δ 167,30; δ 167,23; δ 90,36; δ 33,03; δ 74,76; δ 74,65; δ 36,57; δ 36,54; δ 30,04 e δ 30,70. Os deslocamentos dos carbonos C-5, C-6, C-7 e C-8, diferenciaram dos deslocamentos das estilpironas isoladas de *A. panurensis* (substância 1 e 2), apresentando deslocamentos em campos mais altos, diferenciando-se pela ausência de insaturações nas posições nesses carbonos.

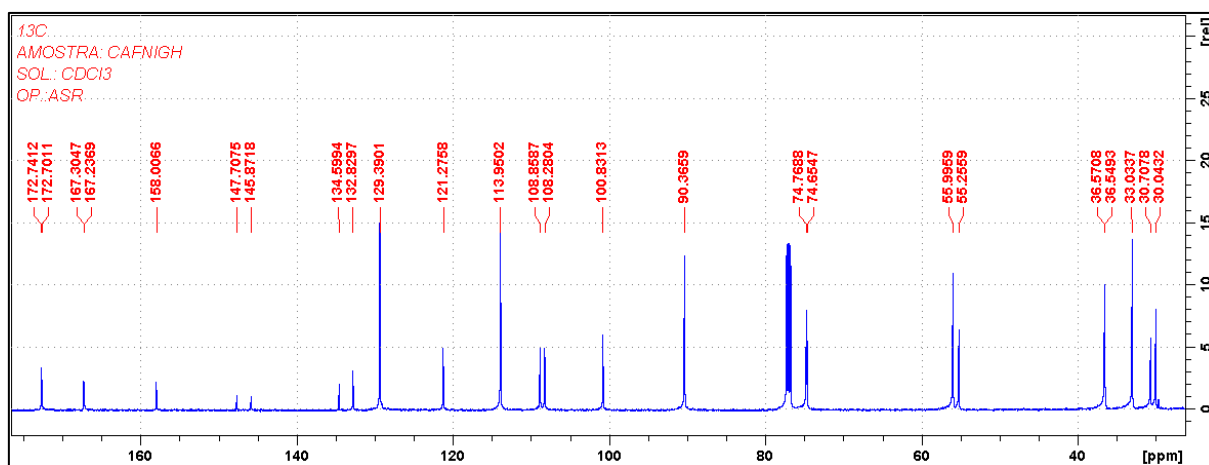


Figura 62 - Espectros de RMN de ^{13}C da mistura das substâncias 5 e 6.

O espectro de DEPT 135 (figura 63) evidencia 16 sinais de carbonos ligados a hidrogênios, em que 5 deles encontram-se dobrados. Nesse espectro, observa-se a presença carbonos metínicos (CH), metilênicos (CH_2) e metílicos (CH_3), na qual 8 sinais são de grupos de CH, 5 são de CH_2 e 2 são de CH_3 . Verifica-se também a inexistência de sinais no intervalo de δ 157-171, assim caracterizando-os como, carbonos quaternários, carbonílicos e ligados aos grupos metoxílicos.

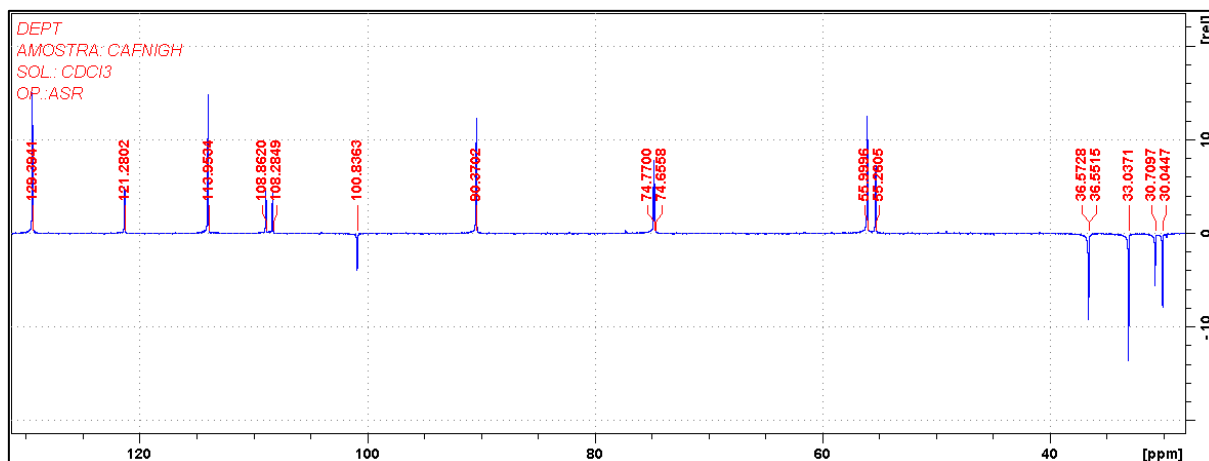


Figura 63 - Espectros de DEPT da mistura das substâncias 5 e 6.

A partir desses dados de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, COSY, HSQC e HMBC (anexo 5), a mistura das substâncias 5 e 6 obtidas das folhas de *A. parviflora* foram confirmadas como: tetrahidroyangonina e dihidrometisticina, respectivamente. Essas estruturas já foram relatadas em espécies do gênero *Aniba*, tais como: *A. species*, *A. gigantifolia* (FRANÇA et al., 1972). Essas moléculas também já foram relatadas em espécies pertencentes a família *Piperaceae*, como é o caso da espécie *Piper methysticum* (DHARMARATNE et al., 2002).

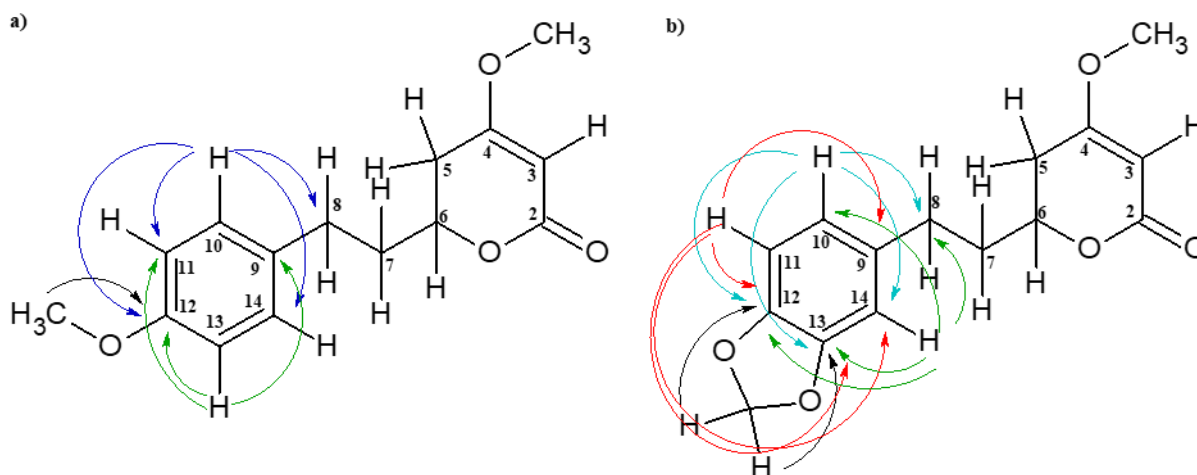


Figura 64 - Estruturas das substâncias 5 (a) tetrahidroyangonina e 6 (b) dihidrometisticina com as correlações de HMBC.

No projeto de iniciação científica desenvolvidos no período de 2013-2014, em um ensaio com enzima lipase o extrato das folhas de *A. parviflora* foi o único que apresentou inibição, com porcentagem de $93,89\% \pm 4,96$, valor considerado alto em comparação com o

padrão xenical (orlistat) que é 100%. Esse potencial detectado pode estar associado a essa mistura das moléculas tetrahidroyangonina e dihidrometisticina, que são majoritárias no extrato de *A. parviflora*. A molécula dihidrometisticina é descrita na literatura como um agente quimiopreventivo promissor para o câncer de pulmão, na qual estudos correlacionam essa atividade com a presença do grupo metilenodioxí na molécula (PUPPALA et al., 2017).

Posição do C	Dados experimentais (500 MHz, CDCl ₃)			Dados da Literatura (300 e 500 MHz, CDCl ₃)	
	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)	HMBC δ_H (ppm)	δ_c (ppm)	δ_H (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)
2	167,30	-	2,29; 4,35; 5,14	167,7	-
3	90,36	5,13; t; 1,2	2,29; 2,49; 3,73	90,7	5,14; s
4	172,74	-	2,29; 2,49; 3,73; 4,35; 5,14	173,2	-
5	33,03	2,29; dd; 17,0; 3,7 2,49; ddd; 17,0; 12,0; 1,2	1,88; 2,09; 3,73; 5,14	33,4	2,29; dd; 17,0; 3,7 2,50; dd; 17,0; 3,7
6	74,76	4,35; m	1,88; 2,09; 2,29; 2,49; 2,70; 2,79; 5,14	75,2	4,35; m
7	36,57	1,88; m 2,09; m	2,29; 2,49; 2,70; 2,79; 4,35	36,9	1,89; m 2,09; m
8	30,04	2,70; m 2,79; m	1,88; 2,09; 4,35; 7,11	30,4	2,72; m 2,81; m
9	132,82	-	1,88; 2,09; 2,70; 2,79; 6,83	133,2	-
10 e 14	129,39	7,11; d; 8,7	2,70; 2,79; 7,11	129,8	7,11; d; 8,5
11 e 13	113,95	6,83; d; 8,7	6,83; 7,11	114,3	6,83; d; 8,4
12	158,00	-	3,78	158,4	-
OMe	55,25	3,73; s	-	55,6	3,72; s
OMe	55,99	3,78; s	-	56,4	3,78; s

Tabela 19 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Dharmaratne et al., 2002) de RMN de ¹H, ¹³C e de HMBC da substância 5.

Posição do C	Dados experimentais (500 MHz, CDCl ₃)			Dados da Literatura (300 e 500 MHz, CDCl ₃)	
	δ _c (ppm)	δ _H (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)	HMBC δ _H (ppm)	δ _c (ppm)	δ _H (ppm); multiplicidade; <i>J</i> (Hz)
2	167,23	-	2,29; 4,35; 5,13	167,5	-
3	90,36	5,13; t; 1,2	2,29; 2,49; 3,72	90,5	5,13; d; 1,2
4	172,70	-	2,29; 2,49; 3,72; 4,35; 5,13	172,9	-
5	33,03	2,29; dd; 17,0; 3,7 2,49; ddd; 17,0; 12,0; 1,2	1,88; 2,09; 3,72; 5,13	33,2	2,28; dd; 17,0; 3,8 2,40; ddd; 17,0; 12,0; 1,2
6	74,65	4,35; m	1,88; 2,09; 2,29; 2,49; 2,70; 2,79; 5,13	74,8	4,33; m
7	36,54	1,88; m 2,09; m	2,29; 2,49; 2,70; 2,79; 4,35	36,7	1,85; m 2,04; m
8	30,70	2,70; m 2,79; m	1,88; 2,09; 4,35; 6,65; 6,68	30,9	2,67; m 2,77; m
9	134,59	-	1,88; 2,09; 2,70; 2,79; 6,72	134,8	-
10	108,85	6,68; d; 1,7	2,70; 2,79; 6,65; 6,72	109,0	6,66; d; 1,2
11	147,70	-	5,92	147,9	-
12	145,87	-	5,92	146,1	-
13	108,28	6,72; d; 7,9	-	108,5	6,70; d; 7,9
14	121,27	6,65; dd; 7,9; 1,7	2,70; 2,79; 6,68	121,5	6,63; dd; 7,9; 1,2
OMe	55,99	3,72; s	-	56,2	3,70; s
OCH₂O	100,83	5,92; s	-	101,0	5,89; s

Tabela 20 - Dados de deslocamentos químicos experimentais e da literatura (Dharmaratne et al., 2002) de RMN de ¹H, ¹³C e de HMBC da substância 6.

5.3 PARTE IV – Desenvolvimento dos métodos cromatográficos

Visando o desenvolvimento do método cromatográfico, realizou-se testes de separação por CCD dos padrões. Após a obtenção do melhor sistema de eluição, realizou-se testes com os padrões, frações em hexano, frações em diclorometano e extratos etanólicos das espécies de *Aniba*. O melhor método foi obtido para as frações em diclorometano e para os extratos etanólicos.

As placas correspondentes ao melhor método podem ser visualizadas na figura 65 e 66. Essas amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL para as frações, 15 mg/mL para os extratos e 1 mg/mL para os padrões, sendo aplicados 5 µL das amostras das frações em DCM, 5 µL das amostras dos extratos em EtOH e 2,5 µL dos padrões. Utilizou-se placas de CCDAE cortadas 5 cm de altura por 15 cm de comprimento, com spot de 0,5-0,6 cm e adição da amostra a 0,5 cm da base. As placas foram eluídas e reveladas no UV (254 e 366 nm), vanilina sulfúrica e Dragendorff.

A partir das placas das figuras 65 e 66, observa-se que foi possível detectar os padrões nas frações e nos extratos. O melhor revelador obtido para a detecção dos padrões correspondeu ao comprimento onda de UV 254 nm, na qual todos os padrões podem ser observados; nos outros reveladores obteve-se uma limitação na detecção de alguns dos padrões, porém os que são visualizados apresentam colorações características que auxiliam na caracterização dessas substâncias. Na placa dos extratos (figura 66) foi adicionado um extrato a mais, além dos extratos de galhos e folhas das espécies de *Aniba*; essa outra amostra correspondeu ao extrato etanólico de flores de *A. panurensis*, que foi preparado no projeto de iniciação científica de 2014 e não havia sido estudado.

Os dados de R_f 's dos padrões obtidos foram: 0,61-0,64 da substância 1 (5,6-dehidrokawaína); 0,59-0,62 da substância 2 (4-metoxi-11,12-metilenodioxo-6-*trans*-estiril-

piran-2-ona); 0,53-0,58 da mistura das substâncias 5 e 6 (tetrahidroyangonina e dihidrometisticina); 0,29-0,33 da substância 3 (rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranyl)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona); e 0,23-0,24 da substância 4 (anibina).

Nas placas reveladas no comprimento de onda de UV 254 nm, pode-se observar a presença da substância 3 (rf 0,33) nas frações em diclorometano de folhas e galhos de *A. panurensis*; além disso, foi possível detectar essa substância com rf 0,31 nos extratos de folhas, galhos e flores de *A. panurensis*. As substâncias 1 e 2 foram visualizadas na fração em diclorometano galhos, com rf de 0,61; e nos extratos etanólicos de galhos e flores de *A. panurensis* foi detectado apenas a substância 2; fato que pode estar relacionando a baixa concentração do extrato. A substância 4 (rf 0,23-0,24), pode ser visualizada nas frações e nos extratos de folhas e galhos de *A. roseadora*. O rf 0,56-0,57 correspondente a mistura das substâncias 5 e 6, podem ser observadas nas frações e nos extratos de folhas e galhos de *A. parviflora*.

A análise utilizando a luz de UV 366 nm, gerou dados apenas para as substâncias: 1 (rf 0,64), 2 (rf 0,62), 3 (rf 0,31-0,32) e 4 (rf 0,23-0,24). Nesse comprimento de onda as substâncias 2 e 3 apresentam coloração azul, já as substâncias 1 e 4 possuíram fraca absorção. As substâncias 2 e 3 foram detectadas pelos rf's, e também por suas colorações características, assim sendo confirmadas em todas as frações e extratos de *A. panurensis*. Além disso, constata-se a presença de outros rf's na faixa de 0,2-0,7 com colorações similares aos das substâncias 2 e 3, que podem estar associados a outras estruturas de pironas presentes nas folhas, galhos e flores de *A. panurensis*. Apesar da fraca absorção da substância 4, foi possível detectá-la apenas nas frações em diclorometano de folhas e galhos de *A. roseadora*. A mistura das substâncias 5 e 6 (rf 0,60), não evidenciaram nenhum tipo de absorção nesse comprimento de onda.

As placas reveladas com vanilina sulfúrica, forneceram dados para as substâncias: 1 com rf de 0,64 (cor lilás); 2 com rf de 0,62 (cor amarela); 5 e 6 com rf de 0,56-0,58 (cor preta); 3 com rf de 0,31-0,33 (cor amarelo queimado); e a 4 não apresentou nenhuma cor. A partir dessa placa, foram evidenciados os rf's pertencentes a substância 2 e 3 em ambas as frações em diclorometano de *A. panurensis*; e os extratos de folhas, galhos e flores de *A. panurensis* foram detectados o rf da substância 3, porém o da substância 2 foi detectado apenas nos extratos de galhos e flores de *A. panurensis*. Outro rf evidenciado nessa análise correspondeu da mistura das substâncias 5 e 6, que foram observadas bem concentradas nas frações e nos extratos de *A. parviflora*; o extrato de galhos de *A. parviflora* apresentou uma coloração de amarelo queimado nessa análise, de acordo com o que foi observado em análises anteriores, a mancha das misturas das substâncias 5 e 6 esta coelundo com outra mancha, que também é muito majoritária no extrato e gerou essa coloração diferente.

As ultimas placas reveladas com o Dragendorff, que é um revelador específico de substâncias alcaloídicas, foi utilizado apesar de que entre os padrões só havia um alcaloide (anibina – substância 4). A utilização desse revelador pode ser justificada, a partir do que foi observado, que as pironas obtidas em meio ao Dragendorff revelavam, assim gerando falso positivo para alcaloides. Esse falso positivo observado foi confirmado, como foi relatado em outros estudos, que descrevem testes realizados com pironas e outras classe de substâncias não alcaloídicas, utilizando o Dragendorff; entre esses testes foram utilizadas as substâncias: dihidrokawaina e dihidrometisticina, que foram obtidas nesse trabalho. Esse falso positivo, segundo estudos é associado ao anel pirânico, que proporciona a complexação com reagentes de alcaloides (FURGIUELE et al., 1962; HABIB, 1980).

A utilização do Dragendorff mostrou-se eficiente para detecção dessas substâncias, por revelar essas moléculas com forte coloração. As cores observadas das substâncias foram: 1 com rf de 0,61-0,64 (cor preta); 2 com rf de 0,59-0,62 (cor preta); 5 e 6 com rf de 0,53-0,57 (cor

laranja); 3 com rf de 0,29-0,31 (cor laranja); e 4 com rf de 0,23-0,24 (cor laranja). A substância 3 foi detectada em ambas as frações e também nos extratos de folhas e flores de *A. panurensis*; a substância 2 foi detectada em todos os extratos etanólicos de *A. panurensis* a partir do rf 0,62; o rf correspondente a substância 1 pode ser observado na fração em diclorometano de galhos de *A. panurensis*, com rf 0,61. A mistura das substâncias 5 e 6 foram detectadas nas frações e nos extratos de *A. parviflora*, exibindo forte coloração laranja. A substância 4 foi observada apenas nas frações em diclorometano de *A. roseadora*, fato que deve estar associado a concentração dessa molécula nas frações serem maiores do que nos extratos.

Nesse contexto, a partir desse método foi possível observar que a placa revelada no UV 254 nm apresentou a melhor detecção de todas as substâncias, porém a utilização desses 4 reveladores foram complementares, assim proporcionando informações de rf e colorações, que as distinguem. Dessa forma, pode-se confirmar a presença de substância 2 (4-metoxi-11,12-metilenodioxo-6-trans-estiril-piran-2-ona) e 3 (rel-(6R, 7S, 8S, 5'S)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranyl)]-6-(E)-estiril- 1'-oxabícclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona) nas folhas, galhos e flores de *A. panurensis*. A substâncias 1 pode ser observada na fração em diclorometanos dos galhos de *A. panurensis*. A substância 4 (anibina) foi confirmada nas folhas e galhos de *A. roseadora*. E a mistura das substâncias 5 e 6 (tetraidroyangonina e dihidrometisticina) foram observadas nas folhas e galhos de *A. parviflora*.

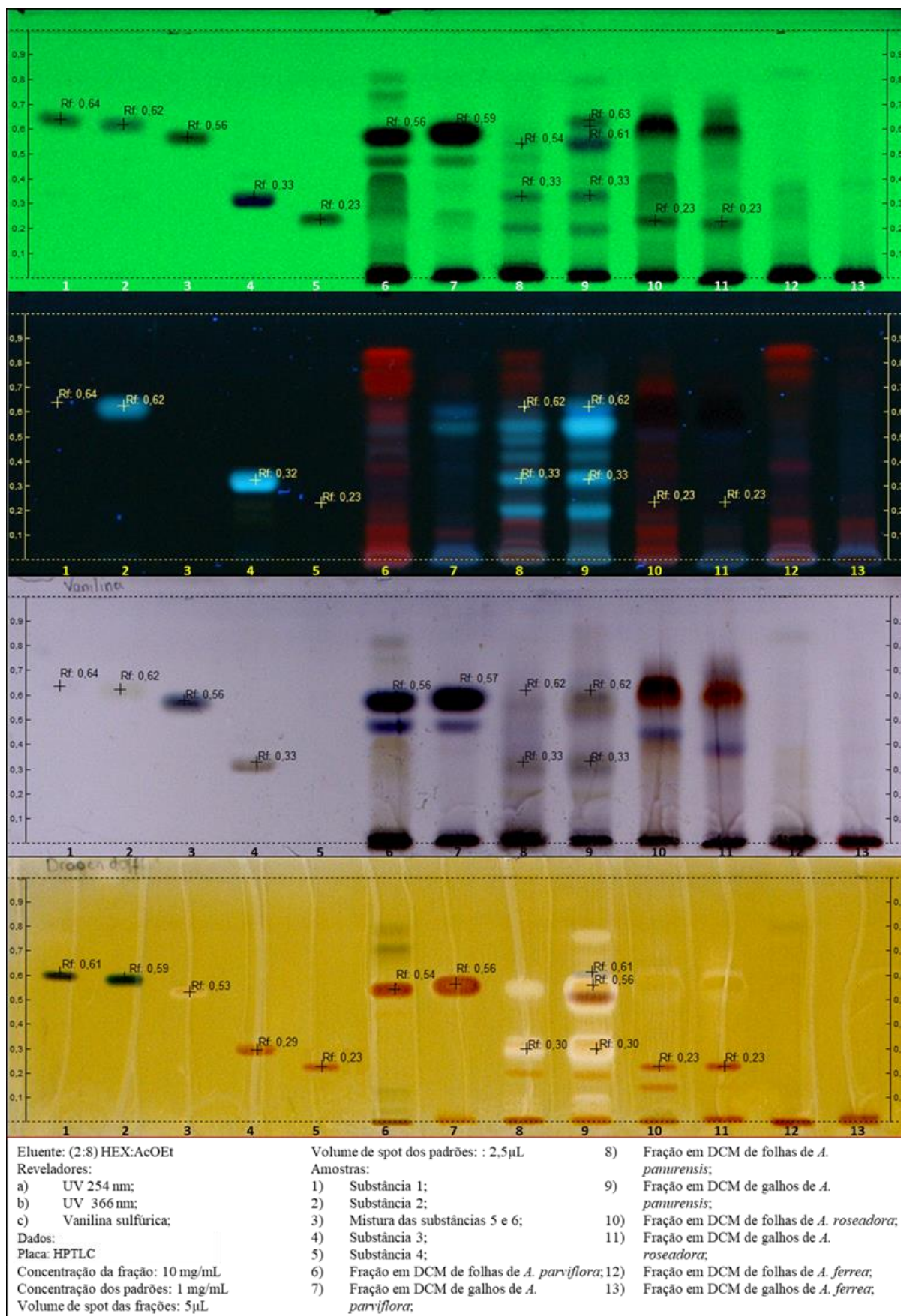


Figura 65 - Placa correspondente ao método para detecção das substâncias isoladas nas frações em DCM.

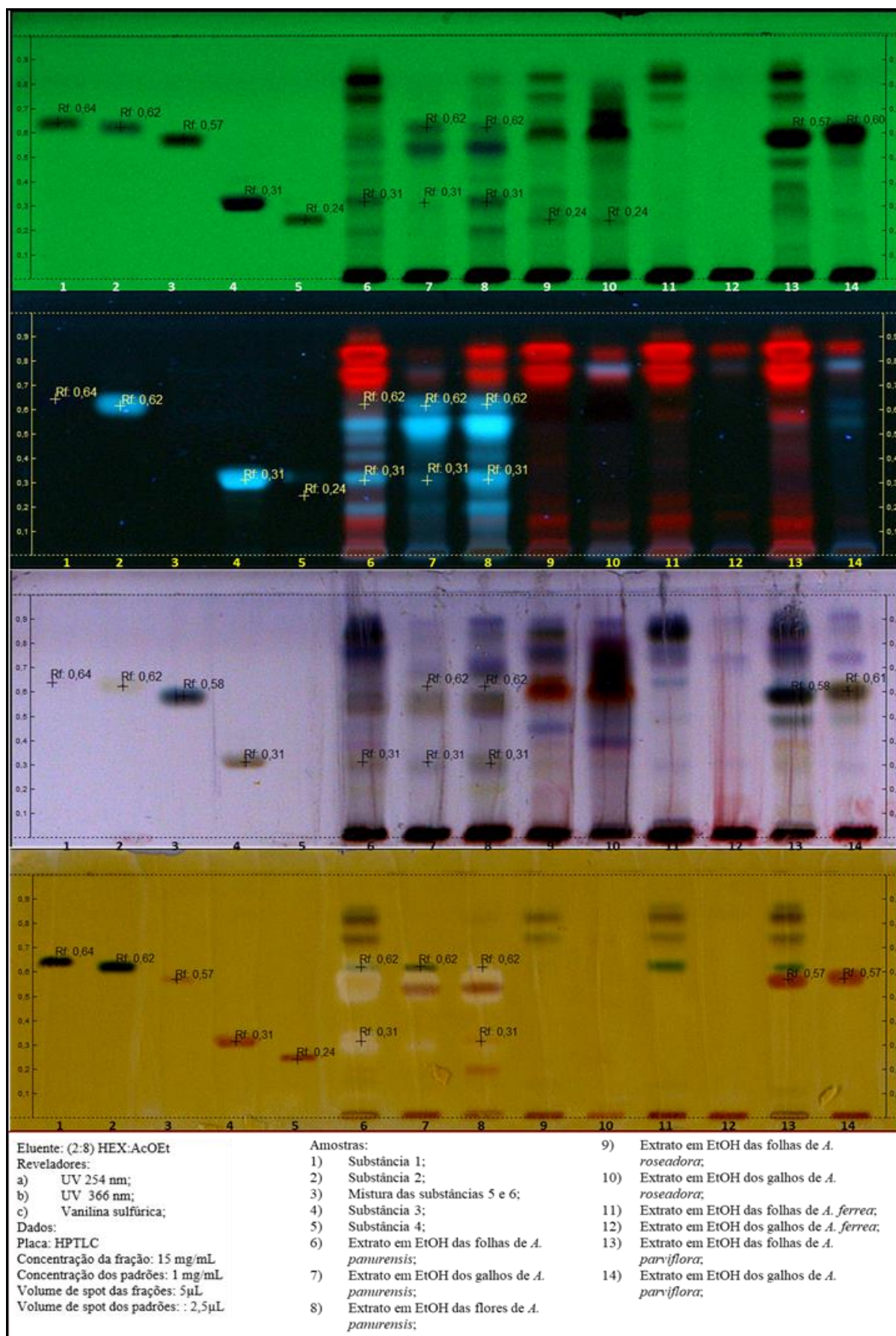


Figura 66 - Placa correspondente ao método para detecção das substâncias isoladas nos extratos em EtOH.

5.3.1 Placas comparativas das frações em DCM

As amostras correspondentes às frações em diclorometano das partições em larga escala foram analisadas por HPTLC. A partir da utilização dos padrões de pironas e flavonoides, além da utilização de diferentes reveladores, foi desenvolvido um método para caracterização dessas frações. Essas amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL para as frações e 1 mg/mL para os padrões, sendo aplicados 5 µL das amostras das frações em DCM e 2,5 µL dos padrões. Utilizou-se placas de CCDAE cortadas 5 cm de altura por 20 cm de comprimento, com spot de 0,6 cm e adição da amostra a 0,5 cm da base. As placas foram eluídas e reveladas no UV (254 e 366 nm), vanilina sulfúrica, dragendorff, cloreto férrico e NP-PEG. A partir da figura 68 e 69, pode-se observar as semelhanças e diferenças entre as espécies e as partes (galhos e folhas).

A placa revelada com Dragendorff (figura 69 (b)), revelaram manchas com coloração laranja, que podem ser observadas nas amostras das frações pelos r_f s: 0,11; 0,23; 0,37; 0,42; 0,47; 0,62; 0,71; 0,72; 0,76; 0,86 e 0,87. O r_f 0,23 que foi observado em todas as espécies, exceto na fração de folhas de *A. roseadora*, fato que pode estar correlacionado a concentração da amostra na placa; esse r_f pode ser relacionado ao alcaloide reticulina, que ao ser comparado com dados obtidos da caracterização química foi o mais abundante nas espécies de *Aniba*. O r_f 0,72 presente em ambas as partes (folhas e galhos) de *A. roseadora* pode ser associado a anibina, que é alcaloide/pirona e possui o mesmo r_f ; é uma substância que revela bem no UV no comprimento de onda de 254 nm, mas não revela bem no comprimento de onda de 366 nm e nem na vanilina. As substâncias nos r_f s 0,86 e 0,87 reveladas nas espécies *A. panurensis* e *A. parviflora*, não são alcalóides, pois elas estão nos mesmos r_f s correspondentes aos padrões de pironas obtidas nesse trabalho e geram um falso positivo para alcaloides quando reveladas em Dragendorff. Outros r_f s revelados em Dragendorff observados na espécie *A. panurensis*, que também podem estar associados a classe de pironas são: 0,62; 0,63 e 0,76; devido as colorações

observadas nas placas de reveladas no comprimento de onda de 366 nm, na vanilina sulfúrica e no Dragendorff.

As placas reveladas com cloreto férrico (figura 69 (a)), evidenciaram as manchas com colorações marrom e preta nos *rf*'s: 0,11; 0,14; 0,16; 0,21; 0,23; 0,25; 0,30; 0,37; 0,39; 0,40; 0,43; 0,44; 0,47; 0,54; 0,55 e 0,61. Os padrões utilizados de flavonoides foram: apigenina (*rf* 0,58 – cor marrom), kaempferol (*rf* 0,57 – cor marrom), quercetina (*rf* 0,42- cor preta), (+)-catequina (*rf* 0,16 – cor marrom), isoquercetrina (*rf* 0,06 - cor preta) e (-)-epigalatocatequina (*rf* 0,09 – cor cinza); nessa análise foi detectado apenas um *rf* similar ao da catequina, nos folhas de *A. parviflora*. Na análise do perfil espectrométrico a massa da catequina foi detectada nas folhas de *A. panurensis*, e nas folhas e galhos de *A. parviflora*, com baixa intensidade. As maiores concentrações de fenólico foram obtidas para as frações de *A. roseadora*, observadas principalmente na faixa de *rf*'s 0,54-0,61. Além disso, pode-se destacar que as folhas das espécies de *Aniba* produzem mais fenólicos do que a parte dos galhos.

A análise do perfil flavonoídico vem complementar a análise de fenólicos, já que é uma subclasse dos fenólicos. Observa-se semelhanças entre os *rf*'s revelados em cloreto férrico com o NP-PEG (figura 69 (a e c)). Os padrões utilizados de flavonoides foram: apigenina (*rf* 0,60 – cor amarelo), kaempferol (*rf* 0,57 – cor amarelo), quercetina (*rf* 0,42- cor laranja), (+)-catequina (*rf* 0,16 – sem cor), isoquercetrina (*rf* 0,06 - cor laranja) e (-)-epigalatocatequina (*rf* 0,09 – cor laranja); nessa análise não foram observados *rf*'s correspondentes aos padrões. Apesar de não terem sido observados *rf*'s similares aos dos padrões, foram evidenciados outros *rf*'s (0,16; 0,17; 0,30; 0,31; 0,39; 0,40; 0,54; 0,55; 0,61 e 0,69), que foram realçadas no comprimento de onda 366 nm. Além disso, constatou-se que as folhas possuem a maior quantidade de flavonóides do que os galhos, fato que pode ser evidenciado pelos *rf*'s 0,39-0,40 (cor amarela), 0,30-0,31 (cor laranja) e 0,16-0,17 (cor amarela). Nessa placa é importante destacar que esses três *rf*'s (0,39-0,40; 0,30-0,31 e 0,16-0,17) são constantes nas frações em diclorometano de

folhas; além disso, há semelhança de suas colorações em NP-PEG, vanilina sulfúrica e no UV (254 nm e 366 nm), que podem estar associados a marcadores dessas espécies de *Aniba*. A maior abundância de flavonoides nas folhas deve estar associado a maior exposição das folhas a radiação solar e a consequente capacidade de fotoproteção dos compostos fenólicos, devido a estabilização por ressonância existente nessas estruturas.

Dessa forma, pode-se constatar que nesse sistema de eluição, os alcaloides encontram-se distribuídos majoritariamente nos intervalos de *rf*: 0,00-0,25; já os flavonoides majoritariamente na faixa de 0,25-0,70; e as pironas majoritariamente no intervalo de 0,70-1,00 (figura 67).

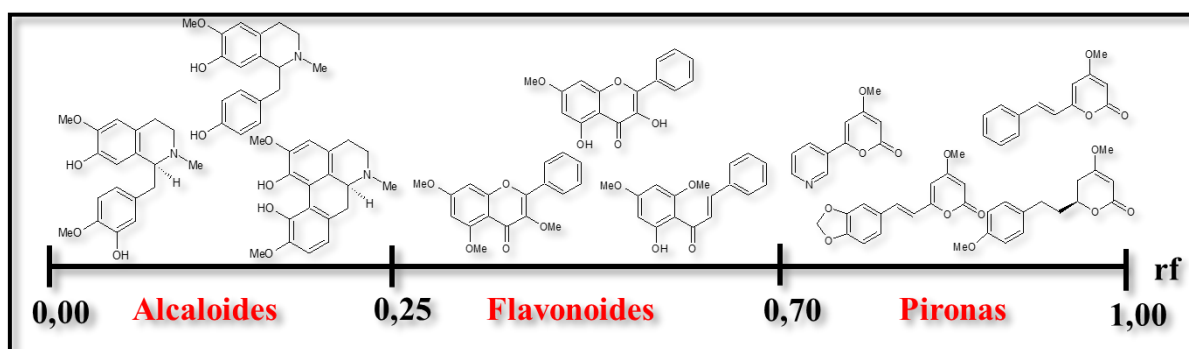


Figura 67 - Representação esquemática do perfil cromatográfico por faixa de *R_f* s.

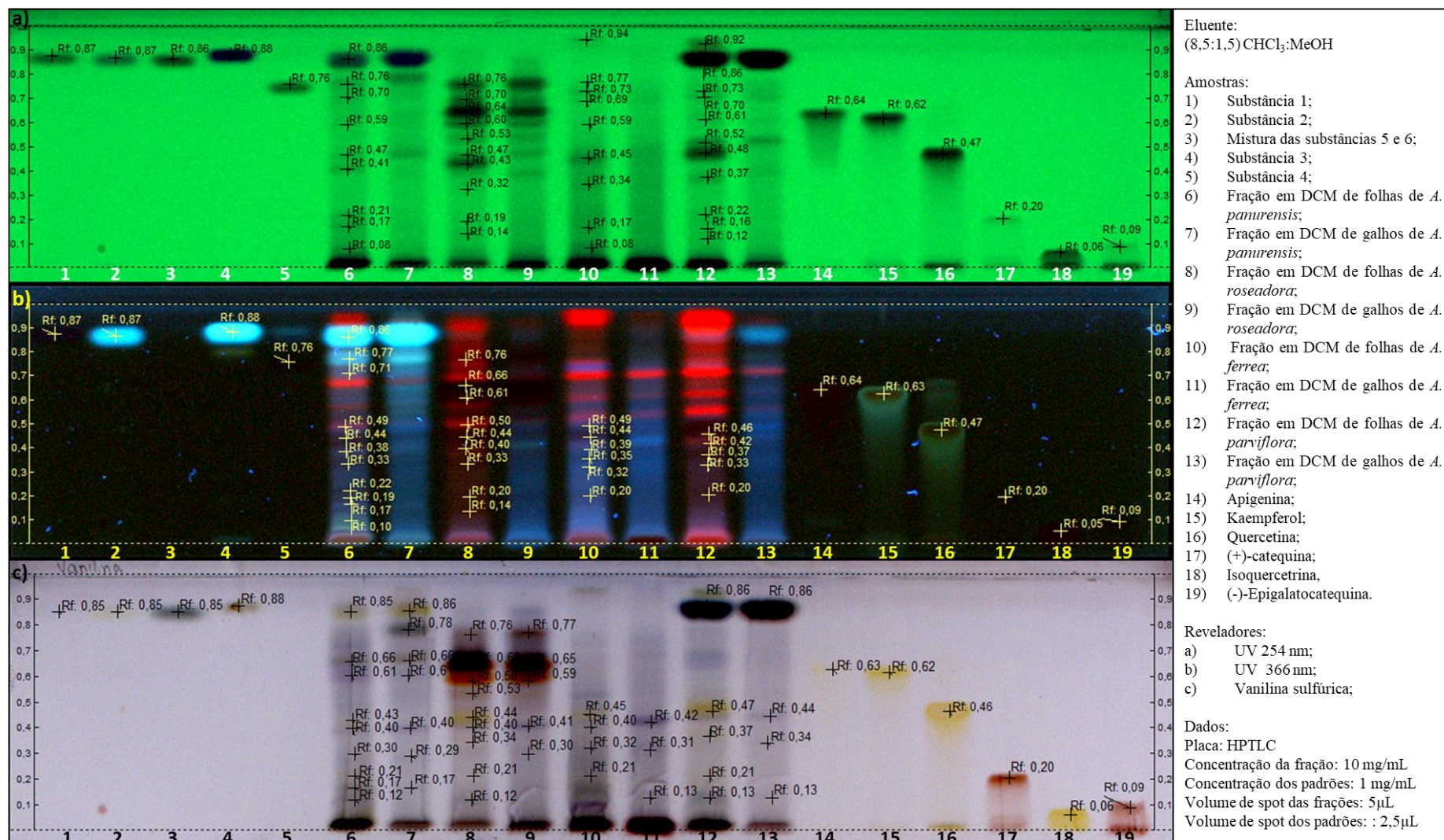


Figura 68- Análise cromatográfica das frações em diclorometano das espécies de *Aniba*.

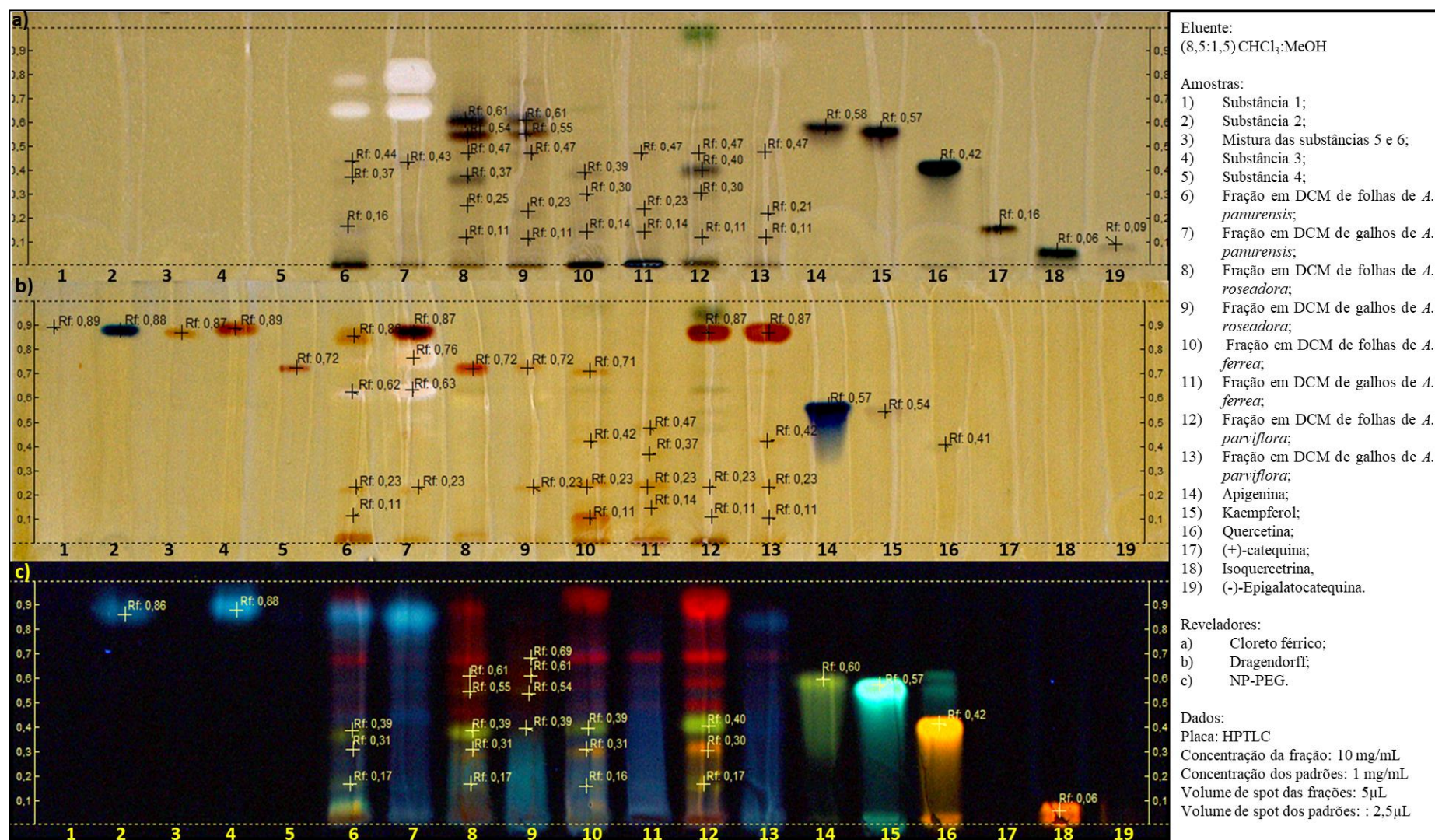


Figura 69 - Análise cromatográfica das frações em diclorometano das espécies de *Aniba*.

5.5 PARTE V - Atividades antimicrobianas

A análise do potencial antimicrobiano dos extratos, frações e das substâncias isoladas, foi realizado na FIOCRUZ-AM em paralelo ao trabalho de doutorado da discente Emily Soares sob supervisão da Dr. Patrícia Puccinelli. Sendo desenvolvido o estudo antimicrobiano, a partir dos ensaios antibacterianos frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas, e através do ensaio antiparasitário, frente a *Plasmodium falciparum*.

5.5.1 Ensaio antibacteriano - Teste de difusão em ágar

O ensaio antimicrobiano foi realizado com os extratos e frações das partições das espécies de *Aniba*, na qual foi desenvolvido por meio do teste de difusão em ágar realizado frente a bactérias gram-negativas e gram-positivas. Nesse teste a espécie *A. panurensis* destacou-se por ser a única que foi ativa, apresentando atividade para os extratos e frações (hexano e diclorometano) de ambas as partes analisadas. Os extratos e frações apresentaram atividade contra quatro bactérias gram-positivas: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus simulans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). Na figura 70, pode-se observar os antibiogramas das amostras ativas, onde observa-se a presença de halos, que é um indicativo da atividade.

Na tabela 21, observa-se os dados correspondentes aos halos de inibição das amostras de *A. panurensis*. O extrato de folhas apresentou o melhor resultado para *S. simulans* (22 mm) com uma boa atividade e para as outras bactérias observou-se atividade moderada; já para o extrato de galhos observou-se uma boa atividade para duas bactérias *S. simulans* (22 mm) e *S. aureus* (22 mm), e para as outras bactérias verificou-se uma atividade moderada. A partir dos dados das frações de folhas de *A. panurensis*, constatou-se um aumento de atividade da fração hexânica com halo de 27 mm para *S. simulans*. Os dados de inibição das frações de galhos de

A. panurensis destacou-se pelos melhores resultados, apresentando aumento de inibição para as frações em hexano e diclorometano, com formação de halos de 31 mm contra *S. simulans*; o segundo melhor resultado correspondeu a fração em diclorometano dos galhos, com halo de 23 mm contra *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA), apresentando boa atividade.

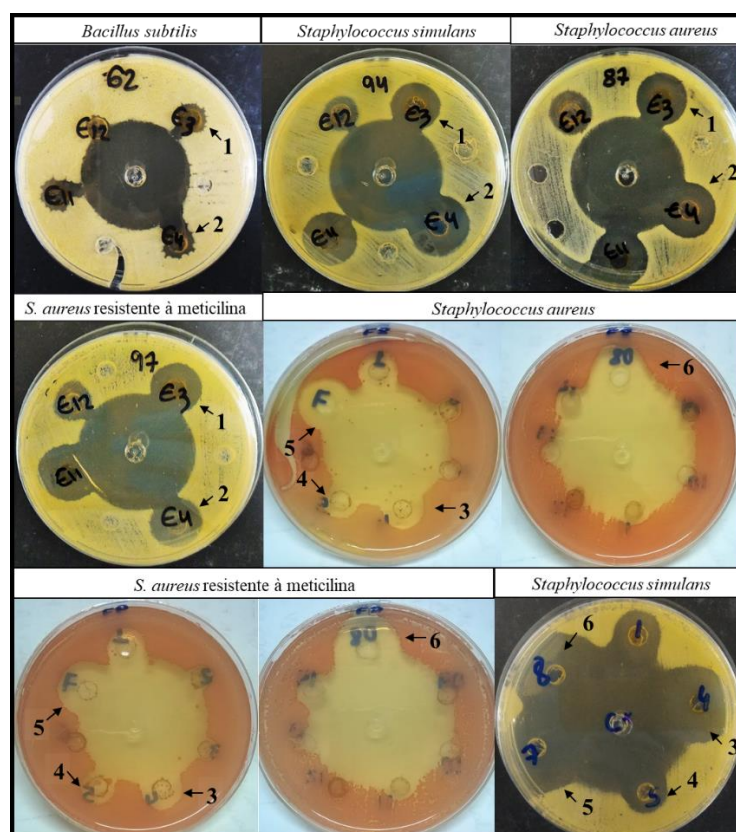


Figura 70 -Antibiogramas das amostras de *A. panurensis* bioativas contra bactérias gram-positivas. Amostras: 1) extrato em etanol de folhas; 2) extrato em etanol de galhos; 3) fração em hexano de folhas; 4) fração em diclorometano de folhas; 5) fração em hexano de galhos e 6) fração em diclorometano de folhas.

Amostra		Halos de inibição (mm)			
		<i>B. subtilis</i>	<i>S. simulans</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA
Folhas	Extrato em EtOH	17	22	20	19
	Fração em HEX	NR	27	16	11
	Fração em DCM	NR	16	14	13
Galhos	Extrato em EtOH	16	22	22	19
	Fração em HEX	NR	31	20	20
	Fração em DCM	NR	31	20	23
Controle positivo	TIENAM	49	49	45	45

Tabela 21 - Média dos halos de inibição (mm) de amostras de folhas de *A. panurensis* frente às bactérias *B. subtilis*, *S. simulans*, *S. aureus* e MRSA. Legenda: 10 a 15 mm (pouca atividade); 15 a 20 mm (moderada atividade) e acima de 20 mm (boa atividade). NR- Não realizado

Os relatos de atividade antibacteriana dos óleos essenciais de espécies de *Lauraceae*, correspondem as espécies: óleos das cascas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume com halos de 40 mm contra *S. aureus*, que possui como principal componente (69%) o (*E*)-cinamaldeído (UNLU et al., 2010); os óleos de galhos, folhas, caules e raízes de *Litsea elliptica* Blume e *Litsea resinosa* Blume, apresentaram halos no intervalo de 9-14 mm contra *B. subtilis* e halos de 8-16 mm contra *S. aureus* (WONG et al., 2014); óleos das folhas e raízes de *Lindera strychnifolia* apresentou halos de 35-36 mm contra *S. aureus* e 13-15 mm contra *B. subtilis* (YAN et al., 2009). Além de relatos, há estudos da atividade de substâncias provenientes de óleos, como é o caso, do α -terpineol, 4-alil-2-metoxifenol e humuleno (*Cinnamomum cebuense*), que apresentaram halos de 16-19 mm contra *S. aureus* e halos de 14-55 mm contra *B. subtilis* (ESPINELI et al., 2014). Dados relacionados a atividade de extratos são poucos, quando comparadas com óleos essenciais; um estudo dos extratos de diferentes polaridades (HEX, DCM, CHCl_3 e MeOH), observou-se que os extratos de *Litsea elliptica* Blume foram ativos contra *B. subtilis*, com halos de 9-14 mm; e para *Litsea resinosa* Blume, com atividade contra *S. aureus* (9-14 mm) e *B. subtilis* (9-15 mm) (WONG et al., 2014). Esses dados demonstram que o potencial observado para a espécie *A. panurensis* é relevante, em face aos valores observados na literatura da família.

Segundo o estudo de Barbosa (1988) as frações hexânicas e clorofórmicas dos cálices das espécies *A. riparia* e *A. sp.*, e dos frutos de *A. sp.* apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, na qual o autor destaca que a principal composição química de *A. sp.* corresponde a arilpironas e estilipironas. Desta forma, pode-se correlacionar a atividade observada nos extratos e frações da espécie *A. panurensis* com as estilipironas isoladas, como: 5,6-dehidrokawaina, 4-metoxi-11,12-metilenodioxi-6-trans-estiril-piran-2-ona

e rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ono; ou podem estar associadas a outras estirilpironas, pois estas são moléculas abundantes nessa espécie.

O estudo de dissertação de Souza (2014) relata resultados similares para os extratos de folhas e galhos de *A. panurensis*, em que foram realizados testes frente a 35 bactérias (13 gram-positivas e 22 gram-negativas) com espécies de três gêneros de *Lauraceae*, dentre essas espécies testadas apenas *A. panurensis* foi ativa contra 5 bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus simulans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)) e 1 bactérias gram-negativa (*Acinetobacter baumannii*). Comparando os resultados, verificou-se que os extratos foram ativos para as mesmas bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus simulans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)), considerando as outras duas bactérias (*Streptococcus agalactiae* e *Acinetobacter baumannii*) ativas no trabalho de Souza (2015) não foram testadas no trabalho atual. No trabalho de Souza (2015) foram obtidos halos com valores menores ambas as partes analisadas com valores: 14,0 mm para o extrato de folhas e 14,5 mm para o extrato de galhos contra *Bacillus subtilis*; 21,5 mm para o extrato de galhos contra *Staphylococcus simulans*; 16,5 mm para o extrato de galhos e 18,5 mm para o extrato de folhas contra *S. aureus* e 18,5 mm para ambos os extratos contra *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA).

Nesse mesmo estudo de Souza (2014), também foi testada a substância 2 (4-metoxi-11,12-metilenodioxi-6-*trans*-estiril-piran-2-ona), que apresentou fraca halo de inibição de 20 mm contra 4 bactérias gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus simulans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)). No atual estudo, as substância 2 e 3 (rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona) foram testadas no mesmo método, porém não apresentaram halos de inibição.

Segundo o estudo de tese de Custódio (2013), os extratos etanólicos, hidrolatos e frações alcaloídicas de *A. roseadora* foram testadas frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, assim resultando em fraca atividade contra *Bacillus subtilis* apenas para as frações alcaloídicas, com a formação de halos de 10 mm.

5.5.2 Ensaio antibacteriano - Teste de concentração inibitória mínima (CIM)

A partir dos resultados do ensaio antimicrobiano de difusão em ágar, selecionou-se os extratos e frações que seriam realizados os testes de concentração inibitória mínima; o qual foram testados apenas amostras da espécie *A. panurensis*. A concentração inibitória mínima é um teste de sensibilidade do microorganismos para cada antimicrobiano, dessa forma o CIM corresponde a menor concentração que o antimicrobiano é capaz de inibir o desenvolvimento do microorganismo.

Amostra		Concentração Inibitória Mínima (µg/mL)		
		<i>S. simulans</i>	<i>S. aureus</i>	MRSA
Folhas	Extrato em EtOH	15,62	15,62	15,62
	Fração em HEX	15,62	15,62	15,62
	Fração em DCM	125	125	250
Galhos	Extrato em EtOH	7,8	7,8	15,62
	Fração em HEX	7,8	7,8	7,8
	Fração em DCM	7,8	7,8	15,62
Controle positivo	TIENAM	7,8	7,8	7,8

Tabela 22 - Concentração Inibitória Mínima dos extratos e frações de *A. panurensis* frente às bactérias *S. simulans*, *S. aureus* e MRSA. Legenda: Acima de 1000 µg/mL (inativo); 500-1000 µg/mL (fraca atividade), 100-500 µg/mL (moderada atividade) e abaixo de 100 µg/mL (boa atividade).

Os dados de concentração inibitória mínima estão localizados na tabela 22. Nesse ensaio, todas as amostras analisadas possuíam boa atividade, exceto a fração em diclorometano das folhas de *A. panurensis*, exibindo atividade moderada (125-250 µg/mL) frente a *Staphylococcus simulans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA). As amostras de galhos destacaram-se pelas menores concentrações, quando comparadas com as folhas; esses

dados condizem com o que foi obtido no teste difusão em ágar. O melhor resultado foi para a fração em hexano de galhos de *A. panurensis*, com CIM de 7,8 µg/mL contra as três bactérias com valores equivalentes ao controle Tienam; o segundo melhor resultado foi para o extrato e fração de diclorometano dos galhos de *A. panurensis*, com CIM de 7,8 µg/mL contra *S. simulans* e *S. aureus*; e 15,62 µg/mL contra *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA). Os melhores resultados de CIM das amostras de folhas de *A. panurensis*, foram para o extrato e fração hexânica, com CIM de 15,62 µg/mL contra *S. simulans*, *S. aureus*, *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA).

A família *Lauraceae* apresenta uma grande diversidade de estudos de atividade antimicrobiana. Esses estudos relatam atividades de extratos, óleos essenciais, frações e de substâncias isoladas dessas espécies. Os dados observados na literatura sobre o ensaio de concentração inibitória mínima de espécies da família, são relacionados, aos óleos das cascas de *Cinnamomum zeylanicum* Blume com CIM de 560 µg/mL contra *S. aureus* (UNLU et al., 2010); aos óleos de *Cinnamomum osmophloeum* com CIM de 250 µg/mL contra *S. aureus* e *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA), sendo que o principal componente desse óleo é o cinamaldeído (CHANG et al., 2001); os óleos das folhas e raízes de *Lindera strychnifolia* apresentaram valores de CIM 10 µg/mL contra *S. aureus* (YAN et al., 2009); os extratos das sementes e do epicarpo de 3 variações de *Persea americana* resultaram na atividade contra *S. aureus*, na faixa de 208-500 µg/mL e 291-416 µg/mL; além desse estudos 3 flavonóides isolados de *Cryptocarya concinna* foram descritos com atividade antibacteriana com CIM de 20 µg/mL (cryptocayanona), 10 µg/mL (kurzichalcolactona A e kurzichalcolactona B) (HUANG et al., 2014).

No trabalho de dissertação de Souza (2014) os extratos de ambas as partes de *A. panurensis* exibiram fraca atividade com valores de CIM de 600 µg/mL contra *S. simulans*, *S. aureus* resistente à metilicina (MRSA) e *Bacillus subtilis*; valores mais elevados do que foram

obtidos nesse estudo. No mesmo estudo de dissertação, também foi testada a substância 2 (4-metoxi-11,12-metilenodioxo-6-*trans*-estiril-piran-2-ona), que apresentou fraca atividade com CIM de 600 µg/mL contra 6 bactérias, 5 gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus simulans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)) e uma gram-negativa (*Acinetobacter baumannii*). No atual estudo, as substâncias 2 e 3 (rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranyl)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ono) foram testadas, porém não foram ativas.

Segundo o estudo de tese de Custódio (2013), os extratos etanólicos, hidrolatos e frações alcaloídicas e o alcaloide anibina de *A. roseadora* foram testadas frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas, resultando na atividade apenas do alcaloide anibina, com CIM de 1 µg/mL contra *Bacillus subtilis*.

Esse potencial observado nos dois ensaios antibacterianos dos extrato e frações de *A. panurensis*, podem estar associados com as pironas, flavonoides e alcaloides, que foram detectados nesse estudo. As duas estruturas de pironas testadas não foram ativas, porém essa espécie possui como característica a presença majoritária de pironas, que vão além do que foi obtido. Alguns íons detectados de alcaloides (reticulina, *N*-metilcocclaurina, isoboldina e laurotetanina) e flavonoides (Flavokawaina-B, Izalpinina, 3, 5, 7 – tri-*O*-metilgalangina), podem estar correlacionados com esse potencial, como já foi relato na literatura, que essas são classes que exibem atividade antimicrobiana.

5.5.3 Ensaio antiparasitário - Teste antiplasmódico

O ensaio antiparasitário frente a *Plasmodium falciparum*, que é a forma mais grave de malária, foi realizado com os extratos e substâncias isoladas (tabela 23). Resultou na atividade para os extratos etanólicos de galhos e folhas de *A. panurensis* e para o extrato de folhas de *A. parviflora*, obteve-se o melhor resultado para o extrato de folhas de *A. parviflora* com CI_{50} =

29,03 µg/mL. Além disso, as duas substâncias obtidas do extrato de galhos de *A. panurensis* foram testadas e geraram bons resultados, com $CI_{50} = 36,16$ µg/mL para a substância 2 (4-metoxi-11,12-metilenodioxi-6-trans-estiril-piran-2-ona) e $CI_{50} = 24,10$ µg/mL para a substância 3 (rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona); observando a melhor atividade antimalárica para a substância 3.

Amostra		CI_{50} (µg/mL)
<i>Aniba panurensis</i>	Extrato etanólico de folhas	35,21
	Extrato etanólico de galhos	34,50
	Substância 2	36,16
	Substância 3	24,10
<i>Aniba parviflora</i>	Extrato etanólico de folhas	29,03
Droga controle	Quinino	0,14

Tabela 23 - Concentração Inibitória 50% (CI_{50}) dos extratos de *A. panurensis*, *A. parviflora* e das substâncias isoladas, frente a *Plasmodium falciparum*.

Segundo a literatura, os principais relatos da família encontrados de atividade antiplasmódica correspondem a estudos de espécies de *Lauraceae* encontradas na Bolívia, Perú e África. Algumas espécies testadas contra *P. falciparum* são: os galhos de *Licaria canella* e *Nectandra* aff. *Hihua*, com CI_{50} de aproximadamente 4 µg/mL (muito ativa) (DEHARO et al., 2001); os extratos alcaloídicos de folhas de *Dehaasia longipedicellata* (MUKHTAR et al., 2004); e os extratos de galhos de *Persea americana*, com $CI_{50} > 10$ µg/mL (RUIZ et al., 2011). Outros dados estão relacionados a testes *in vivo* frente a *P. berghei*, que possui características parecidas *P. falciparum*, como é o caso dos estudos dos extratos frescos de raízes de *Nectandra membranacea*, com $CI_{50} = 20$ mg/kg; os extratos frescos de folhas de *Persea povedae*, com $CI_{50} = 19$ mg/kg (CHINCHILLA et al., 2011); e os extratos do tronco de *Nectandra cuspidata*, com 61% de inibição e $CI_{50} = 250$ mg/kg (MUÑOZ et al., 2000). Além desses desse relatos há

dados de testes *in vivo* frente a *P. vinckei* para os extratos do tronco de *Nectandra cuspidata*, com 83% de inibição e $CI_{50} = 250$ mg/kg (MUÑOZ et al., 2000).

De acordo com a literatura, alguns alcaloides obtidos de espécies são descritos com atividade antiplasmodica frente a *P. falciparum*, algumas dessas espécies com relatos são: *Nectandra salicifolia*, *Actinodaphne macrophylla*, *Alseodaphne corneri* Kosterm, *Cryptocarya nigra* e *Dehaasia longipedicellata*. Alguns dos alcaloides ativos foram detectados nas espécies de *Aniba*, que foram estudadas, como: isoboldina, com $CI_{50} = 0,67$ µg/mL contra cepas sensíveis a cloroquina e $CI_{50} = 0,90$ µg/mL contra cepas resistentes a cloroquina; boldina, com $CI_{50} = 0,67$ µg/mL contra cepas sensíveis a cloroquina, $CI_{50} = 0,90$ µg/mL contra cepas resistentes a cloroquina e $CI_{50} = 2,60$ µM; reticulina, com $CI_{50} = 5,80$ µg/mL contra cepas sensíveis a cloroquina, $CI_{50} = 3,65$ µg/mL contra cepas resistentes a cloroquina e $CI_{50} = 1,18$ µM; *N*-metilcoclarina, com $CI_{50} = 2,73$ µg/mL contra cepas sensíveis a cloroquina e $CI_{50} = 3,81$ µg/mL contra cepas resistentes a cloroquina; laurotetanina, com $CI_{50} = 3,90$ µg/mL contra cepas sensíveis a cloroquina e $CI_{50} = 2,53$ µg/mL contra cepas resistentes a cloroquina e $CI_{50} = 3,11$ µM contra cepas sensíveis a cloroquina (BOHLKE et al., 1996; FADAEINASAB et al., 2015; NAFIAH et al., 2013; NASRULLAH et al., 2013; ZAHARI et al., 2014; ZAHARI et al., 2016).

A atividade observada para os extratos pode estar associada aos alcaloides, que são moléculas já descritas com atividade antiparasitária, como a reticulina, isoboldina e *N*-metilcoclarina, que foram os principais íons detectados; podendo também estar associadas as estirilpironas, substâncias 2 e 3, que apresentaram atividade e são moléculas majoritárias dos extratos, como é o caso das espécies, *A. panurensis* e *A. parviflora*.

6 CONCLUSÃO

- ✓ O processo de caracterização do perfil químico das espécies de *Aniba*, a partir do uso de técnicas cromatográficas e espectrométricas, confirmou-se a presença de alcaloides e flavonoides nas frações metanólicas de folhas e galhos das espécies. Assim, foram detectados como principais íons de m/z 300, 328 e 330, que por comparação dos dados literatura, foram associados aos alcaloides: *N*-metilcoclaurina, isoboldina, laurotetanina e reticulina; além desses íons, foram detectadas no modo negativo por ionização ESI, os íons de m/z 283, 311 e 863, que foram associados aos flavonoides: izalpinina, 3, 5, 7 – tri-*O*-metilgalangina e a procianidina trimer.
- ✓ O fracionamento das espécies de *Aniba* visando a obtenção dos componentes majoritários foi desenvolvido pelo uso de técnicas cromatográficas clássicas, como a CCFN e a CCDP, assim resultando na identificação de 6 substâncias, que foram elucidadas pela união de técnicas espectrométricas e espectroscópicas, tais como: UV, EM e RMN (^1H e ^{13}C uni e bidimensional). Assim, foram identificadas as estirilpironas: 5,6-dehidrokawaína, 4-metoxi-11,12-metilenodioxi-6-*trans*-estiril-piran-2-ona e rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabíciclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona (*A. panurensis*); o alcaloide piridínico: anibina (*A. roseadora*) e as kawalactonas: tetrahidroyangonina e dihidrometisticina (*A. parviflora*).
- ✓ Com a identificação das as estirilpironas (5,6-dehidrokawaína, 4-metoxi-11,12-metilenodioxi-6-*trans*-estiril-piran-2-ona e rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabíciclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona), obtidas dos extratos de galhos de *A. panurensis*, foi possível detectar a presença de outras estruturas nas frações metanólicas de folhas e galhos, que também são

abundantes. Dessa forma, foram detectados em ambas as partes o íon de m/z 289, que pode ser associada ao monômero (3'-metoxi-yangonina); e o íon de m/z 545, que pode ser relacionado ao dímero do íon de m/z (4-metoxi-11,12-metilenodioxo-6-trans-estiril-piran-2-ona).

- ✓ A partir da identificação das kawalactonas (tetrahidroyangonina e dihidrometisticina) majoritárias nos extratos de folhas de *A. parviflora*, foi possível detectar a presença de outras estruturas nos extratos de folhas e galhos, que também são abundantes. Dessa forma, foram detectados como principais íons de folhas e galhos de *A. parviflora* m/z 233, 263, 277 e o 295; na qual o íon m/z 233 foi mais abundante nos galhos e foi associado a dihidrokawaina; e os íons de m/z 263, 277 e o 295, foram abundantes nas folhas, sendo associados tetrahidroyangonina, dihidrometisticina e metoxitetrahidroyangonina.
- ✓ Por meio do método cromatográfico desenvolvido por CCDAE, foi possível detectar a presença das estilipironas, 4-metoxi-11,12-metilenodioxo-6-trans-estiril-piran-2-ona e rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil)-7-[6-(4 metoxi-2-piranil)]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ona, nas frações e nos extratos de folhas, galhos e flores de *A. panurensis*; e a 5,6-dehidrokawaína, foi detectada apenas na fração em diclorometano dos galhos de *A. panurensis*. Além disso, foi possível detectar a anibina em ambas as partes das frações analisadas de *A. roseadora*; e a mistura da tetrahidroyangonina e dihidrometisticina, nas frações de folhas e galhos de *A. parviflora*.
- ✓ Visando a análise do potencial antimicrobiano dos extratos, frações e das substâncias isoladas, realizou-se os ensaios antibacterianos e antiparasitário. Assim, obtendo-se bons resultados para os extratos e frações de *A. panurensis* com CIM de 7,8 e 15,62

$\mu\text{g/mL}$ frente a três bactérias gram-positivas (*Staphylococcus simulans*, *S. aureus* e *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA)). No teste antiplasmódico frente *Plasmodium falciparum*, obteve-se bons resultados para as extratos etanólicos de *A. parviflora* e *A. panurensis*, com melhor resultados de $\text{CI}_{50} = 29,03$ para o extrato das folhas de *A. parviflora*; e resultados positivos para duas das substâncias isoladas, com $\text{CI}_{50} = 36,16$ $\mu\text{g/mL}$ para 4-metoxi-11,12-metilenodioxi-6-trans-estiril-piran-2-ona e $\text{CI}_{50} = 24,10$ $\mu\text{g/mL}$ para rel-(6*R*, 7*S*, 8*S*, 5'*S*)-4'-metoxi-8-(11, 12-dimetoxifenil-7-[6-(4 metoxi-2-piranil]-6-(*E*)-estiril- 1'-oxabicyclo [4,2,0] octa-4'-en-2'-ono.

- ✓ A partir desse estudo foi possível confirmar que os alcaloides benziltetrahidroisoquinolínicos (reticulina) são os principais constituintes das espécies de *Aniba*, o que condiz com o estudo “*Chemosystematics of Aniba*” de Otto Gottlieb publicado em 1981. Além disso, foi possível observar que a espécies *A. panurensis*, *A. parviflora* e *A. roseadora*, caracterizam-se pela presença de pironas, como seus marcadores químicos. Dessa forma, confirma-se a divisão do gênero *Aniba*, em espécies que produzem pironas e outro lignanas, já que a espécie *A. ferrea* é descrita na literatura com a presença de lignanas em sua composição química.
- ✓ Os resultados confirmam a presença de alcaloides, flavonoides e pironas nas espécies de *Aniba*, além de descrever o potencial antimicrobiano dos extratos, frações e substâncias isoladas. Esse estudo das atividades antimicrobianas, são essenciais para descoberta de novos ativos, tendo em vista a resistividade de bactérias e parasitas aos antibióticos, que são utilizados.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRIANAIVORAVELONA, J. O.; TERREAUX, C.; SAHPAZ, S.; RASOLONDRAMANITRA, J; HOSTETTMANN, K.; A phenolic glycoside and N-(p-coumaroyl)-tryptamine from *Ravensara anisata*. *Phytochemistry*, v. 52, p. 1145 -1148, 1999.
- ADAM, W.; SAHA-MOELLER, C. R.; VEIT, M.; WELKE, B. A Convenient Synthesis of Hispidin from Piperonal. *Synthesis*, v. 2, n. 18, p. 1133-1134, 1994.
- AGUIAR, L. M. G.; BRAZ-FILHO, R.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S.; PINHO, S. L. V.; SOUZA, J. R. The chemistry of Brazilian *Lauraceae*. Part LX. Cecilin, a 1-benzyl- β -carboline from *Aniba santalodora*. *Phytochemistry*, v. 19, n. 8, p. 1859-1860, 1980.
- ALCÂNTARA, J. M. Bioprospecção de espécies amazônicas da família *Lauraceae* com potencial aromático e medicinal. Dissertação (Mestrado em Química). Manaus-AM: Universidade Federal do Amazonas, 2009.
- ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. P.; PINTO, A. C.; Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 942-952, 2009.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ANGELO, P. M; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revistas Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n.1, p.1-9, 2007.
- ARAUJO, F. L.; MELO, C. T.; ROCHA, N. F.; MOURA, B. A.; LEITE, C. P.; AMARAL, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J.; VASCONCELOS, S.M.; VIANA G. S.; SOUSA, F. C.; SCHMIED, N. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in mice. *Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, v. 380, n. 4, p. 337-344, 2009.
- ALVARENGA, M. A.; BROCKSOM, U.; CASTRO C. O., GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Neolignans from *Aniba burchellii*. *Phytochemistry*, v. 16, p. 1797-1799, 1977.
- BARBOSA-FILHO J. M, YOSHIDA M., GOTTLIEB O. R., R. BARBOSA C.S.B.C., GIESBRECHT A. M.; CLAUDIA M.; YOUNG, M. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 2615-2617, 1987.
- BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M; BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Avaliação da atividade antibiótica de extratos de *Lauraceae*. *Acta Amazonica*, v. 18, n. 1-2, p. 91-94, 1988.
- BARBOSA FILHO, J. M; VARGAS, M. R. W.; SILVA, I. G, FRANCA; MORAIS, L. C. S. L; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S. ; SOUZA, M. F.V; CHAVES, M.C.O.; ALMEIDA, R. N;

AGRA, M. F. *Ocotea duckei* excepcional fonte de iangambina e outras lignanas furofuran. Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 71, n. 2, p. 231-238, 1999.

BARBOSA-FILHO, J. M.; Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: C.M.O. Simões et al. (eds.). Farmacognosia da planta ao medicamento. Universidade UFRGS/ Ed. da UFSC, Porto Alegre, capítulo 22, Florianópolis, 2004.

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

BARROSO, G. M.; GUIMARÃES, E. F.; ICHASO, C. L. F.; COSTA, C. G.; PEIXOTO, A. L.; Sistemática de Angiosperma do Brasil. V. 1, 2ª Edição, EDUSP, p. 255, São Paulo, 2002.

BASTOS, I. S. Avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica e antimalárico de extratos, frações e composto obtidos de plantas da região amazônica. Dissertação (Mestrado em Saúde) Manaus-AM: Universidade Federal do Amazonas, 2015.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição, v. 12. N. 02, p. 123-130, 1999

BITTENCOURT, A.M.; GOTTLIEB, O.R.; MAGESWARAN, S.; MORS, W.B.; OLLIS, W.D.; SUTHERLAND, I.O.; MAGALHÃES, M.T. The natural occurrence of 6-styryl-2-pyrones and their synthesis. Tetrahedron, v. 27, p. 1043-1048; 1971.

BÖHLKE, M.; GUINAUDEAU, H.; ANGERHOFER, C.K.; WONGPANICH, V.; SOEJARTO, D.D.; FARNSWORTH, N.R.; MORA, G.A.; POVEDA, L.J. Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. Journal of Natural Products, v 59, p. 576-580, 1996.

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

BULOW, M. V. V.; FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; SUAREZ, A. M. P. Guianin: a neolignan from *Aniba guianensis*. Phytochemistry, v. 12, n.5, p. 1805-1808, 1973.

CABRAL, M.M.O.; BARBOSA-FILHO J.M.; MAIA, G.L.A.; CHAVES, M.C.O.; BRAGA, M.V.; DE SOUZA, W.; SOARES R.O.A. Neolignans from plants in northeastern Brazil (*Lauraceae*) with activity against *Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology, v. 124, p. 319-324, 2010.

CATÃO, R. M. R.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZ, S. J. C., LIMA, E. O. L.; PEREIRA, M. S. V.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes. Revista brasileira de Análises clínicas, v. 37, n. 4, p. 247-249, 2005.

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

CHANG, S.T.; CHEN, P.F.; CHANG, S.C. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, n. 1, p. 123–127, 2001.

CHINCHILLA, M.; VALERIO I., SÁNCHEZ, R.; MORA V.; BAGNARELLO, V.; MARTÍNEZ, L.; GONZÁLEZ, A.; VANEGAS, J.C. Evaluación in vivo de la actividad antimalárica de 25 plantas provenientes de una Reserva de Conservación Biológica de Costa Rica. *Revista Chilena de Historia Natural*, v. 84, p. 115-123, 2011.

CHOU, T. W.; FENG, J. H.; HUANG, C. C.; CHENG, Y. W.; CHIEN, S. C.; WANG, S. Y.; Shyur, L. F. A Plant Kavalactone Desmethoxyyangonin Prevents Inflammation and Fulminant Hepatitis in Mice. *Plos one*, v. 8, p. 1-15, 2013.

COLLINS, H. C.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Introdução a métodos cromatográficos. Editora da Unicamp, 7ª edição, 1997.

COMBES, G.; VASSORT, PH.; WINTERNITZ, F. Structure de la rubranine, chalcone isolee de l'*Aniba rosaeodora* Ducke. *Tetrahedron*, v. 26, p. 5981–5992, 1970.

CORRÊA, D. B.; GOTTLIEB, O. R. Duckein, an alkaloid from *Aniba duckei*. *Phytochemistry*, v. 14, n. 1, p. 271-272, 1975.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CUSTÓDIO, D. L. Aproveitamento dos subprodutos da extração do óleo do pau-rosa (*Aniba rosaeodora* Ducke) para a obtenção de bioprodutos. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Manaus-AM: Universidade Federal do Amazonas, 2013.

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

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEDO, C.; MUÑOZ, V.; SAUVIN, M.A. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 91-98, 2001.

DEWICK, P. M. Medicinal natural product: a biosynthetic approach. 3ª edição, John Wiley & Sons, 2009.

DHARMARATNE, H. R.; NANAYAKKARA, N. P.; KHAN, I. A. Kavalactones from *Piper methysticum*, and their ¹³C NMR spectroscopic analyses. *Phytochemistry*, v 59, p. 429–433, 2002.

DHAVALÉ, D. D.; AIDHEN, I. S.; SHAFIQUE, M. Acyl anion equivalents in the synthesis of 2H-pyran-2-ones: an efficient synthesis of anibine. *The Journal of Organic Chemistry*, v. 54, n. 16, p. 3985-3987, 1989.

DIAZ, A. M. P.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; MAIA, J. G. S.; SANTOS, C. C. The chemistry of Brazilian *Lauraceae* XLVI. Note on *Aniba* species. *Acta Amazonica*, v. 7, n. 1, p. 41-43, 1977.

DIAZ, P.S.P.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O.R. Neolignans from *Aniba lancifolia*. *Phytochemistry*, v. 19, p. 285-288, 1980.

DIAS, S. M. C.; FERNANDES, J. B.; MAIA, O. R.; GOTTLIEB, H. E. Neolignans from an *Aniba* species. *Phytochemistry*, v. 21, n. 7, p. 1737-1740, 1982.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v. 28, n.3, p. 241- 249, 2007.

ESPINELI, D. L.; AGOO, E. M. G.; FIERRO, R. S.; SHEN, C.; RAGASA, C. Y. Cytotoxic and antimicrobial compounds from *Cinnamomum cebuense* Kosterm. (*Lauraceae*). *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v. 48, nº. 9, 2014.

FABRE, N.; RUSTAN, I.; HOFFMANN, E.; QUETIN-LECLERCQ, J. Determination of flavone, flavonol, and flavanone aglycones by negative ion liquid chromatography electrospray ion trap mass spectrometry. *American Society for Mass Spectrometry*, v. 12, p. 707–715, 2001.

FADAEINASAB, M.; TAHA, H.; FAUZI, P.N.; ALI, H.M.; WIDYAWARUYANTI, A. Anti-malarial activity of isoquinoline alkaloids from the stem bark of *Actinodaphne macrophylla*. *Natural Product Communications*, v. 10, n. 0, p.1541–1542, 2015.

FERNANDES, J. B.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, J. G. S. Neolignans from an *Aniba* species. *Phytochemistry*, v. 15, p. 1033-1036, 1976.

FERNANDES, J.B.; GOTTLIEB, O.R.; XAVIER, L.M. Chemosystematic implications of flavonoids in *Aniba riparia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 6, p. 55–58, 1978.

FERNANDES, N. S. Investigação de alcalóides de *Lauraceae* da Amazônia como tratamento para tripanosomíase e leishmaniose: Avaliação fenotípica e busca de alvos moleculares. Tese (Doutorado em Biotecnologia). Manaus-AM: Universidade Federal do Amazonas, 2017.

FERNANDES, P. Antibacterial discovery and development: the failure of success? *Nature Biotechnology*, v. 24, n.12, p. 1497-1503, 2006.

FERREIRA, Z. S.; GOTTLIEB, O. R.; ROQUE, N. F. Chemosystematic implications of benzyltetrahydroisoquinolines in *Aniba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 8, n. 1, p. 51-54, 1980.

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

FRANÇA, N. C.; GOTTLIEB, O. R.; SUAREZ, A. M. P. 6-phenylethyl-5,6-dihydro-2-pyrones from *Aniba gigantifolia*. *Phytochemistry*, v. 12, n. 5, p. 1182-1184, 1973.

FURGIUELE, A. R.; FARNSWORTH, N. R.; BUCKLEY, J. P. False-positive alkaloid reactions obtained with extracts of *Piper methysticum*. *Journal of Pharmacezitical Sciences*, v. 51, n. 12, p. 1156-1162, 1962.

GALAVERNA, R. S.; SAMPAIO, P. T. B.; BARATA, L. E. S.; EBERLINA, M. N.; FIDELIS C. H. V. Differentiation of two morphologically similar Amazonian *Aniba* species by mass spectrometry leaf fingerprinting. *Royal Society of Chemitry, Analytical Methods*, v. 7, p. 1984-1990, 2015.

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

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

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

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

GONCALVES, N. B.; CORREA FO, J. C.; GOTTLIEB, O. R. Analeptic Action of Anibine. *Nature*, v. 182, n. 4640, p. 938-939, 1958.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Isolamento de 4-Metoxi-paracotoina e 5,6-Dehidrocavaina da *Aniba firmula*. *Anais Acad. Brasil*; v. 24, p. 17-18, 1959.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the lauraceae. *Phytochemistry*, v. 11, n. 5, p. 1537-1570, 1972.

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

GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI, K. Chemosystematics of *Aniba*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 9, n. 1, p. 6-12, 1981.

GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignóides, com atenção especial à química das neolignanas. *Quimica Nova*, v.7, p. 250-273, 1984.

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

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; MUZZOLI, M; RUEDA, G. M.; MEDICI, A.; BESCO, E.; BRUNI, B. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 7778-7788, 2006.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, Mônica, T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Quim. Nova*, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

HABIB, A. M. False-positive alkaloid reactions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 69, n. 1, p. 37-43, 1980.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. *Nutrition Reviews*, Vol.52, n.8, pp.253-265, 1994.

HAM, B. M. *Even Electron Mass Spectrometry with Biomolecule Applications*. New Jersey – USA. John Wiley & Sons, 2008.

HARRIS, D. C. Análise química quantitativa. Editora LTC, v. 8, p. 539-574, cap. 21: Espectrometria de massa, Rio de Janeiro, 2012.

HUANG, W.; ZHANG, W.; CHENG, Y.; JIANG, R.; WEI, W.; CHEN, C.; WANG, G.; JIAO R.; TAN, R.; GE, H. Cytotoxic and Antimicrobial Flavonoids from *Cryptocarya concinna*. *Planta Medica*, 80, 925-930, 2014.

ITOKAWA, H.; MORITA, M.; MIHASHI, S. Phenolic compounds from the rhizomes of *Alpinia speciosa*. *Phytochemistry*, v. 20, n. 11, p. 2503–2506, 1981.

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

KUPCHAN, S.M.; STEVENS, K.L.; ROHLFING, E.A.; SICKLES, B.R.; SNEDEN, A.T.; MILLER, R.W.; BRYAN, R.F. New cytotoxic neolignans from *Aniba megaphylla* Mez. *Journal of Organic Chemistry*, v. 43, p. 586–590, 1978.

LIMA, O. A.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Burchellin, a neolignan from *Aniba burchellii*. *Phytochemistry*, v. 11, p. 0–6, 1972.

LEITÃO, G.G. Uso da cromatografia contracorrente na obtenção de padrões de origem vegetal. *Revista Fitos*, v.1, n.2, p.48-52, 2005.

MA, Y.; SACHDEVA, K.; LIU, J.; FORD, M.; YANG, D.; KHAN, I. A.; CHICHESTER, C. O.; YAN, B. Desmethoxyyangonin and dihydromethysticin are two major pharmacological kavalactones with marked activity on the induction of CYP3A23. *Drug Metab Dispos*, v. 32, n. 11, p. 1317-1324, 2004.

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

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

MCCRACKEN, S.T.; KAISER, M.; BOSHOFF, H.I.; BOYD, P.D.W.; COPP, B.R. Synthesis and antimalarial and antituberculosis activities of a series of natural and unnatural 4-methoxy-6-styryl-pyran-2-ones, dihydro analogues and photo-dimers. *Bioorg Med Chem*, v. 20, n. 4, p. 1482–1493, 2012.

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

MELO, C. T.; MONTEIRO, C. P; LEITE, F. L.; LIMA, V. T.; BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M. F.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA, G. S. B.; SOUSA, F. C. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-2,6-dihydroxybenzoyltyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in mice. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v.29, p.451-454, 2006.

MELO C. T. V.; CARVALHO A. M. R.; MOURA B. A.; TEIXEIRA C. P. L.; VASCONCELOS L. F.; FEITOSA M. L.; OLIVEIRA G. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CHAVEZ, S. J.; GUTIERREZ S. J. C.; FONTELES M. M. F.; VASCONCELOS S. M. M.; SOUSA F. C. F. Evidence for the involvement of the serotonergic, noradrenergic, and dopaminergic systems in the antidepressant-like action of riparin III obtained from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in mice. *Fundamental and Clinical Pharmacology*, v. 27, p. 104-112, 2013.

MORS, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; DJERASSI, C. The chemistry of rosewood. isolation and structure of anibine and 4-methoxyparacotoin. *Journal of the American Chemical Society*, v. 79, n. 16, p. 4507-4511, 1957.

MORS, W. B.; GOTTLIEB, O. R. Anibine, the alkaloid of Coto bark. *Anais da Associação Brasileira de Química*, v. 18, p. 185-187, 1959.

MOTIDOME, M.; GOTTLIEB, O. R.; KUBITZKI, K. The chemistry of Brazilian *Lauraceae*. LXXI. Styrylpyrones of *Aniba panurensis* and *A. permollis*. *Acta Amazonica*, v. 12, n. 3, p. 667-668, 1982.

MUKHTAR, M. R.; HADI, A. H. A.; LITAUDON, M.; AWANG, K. Morphinandienone alkaloids from *Dehaasia longipedicellata*, Fitoterapia, v. 75, 792 – 794, 2004.

NAFIAH, M. A.; CHEN, J. K. H.; MOHAMMAD, S. N. F.; AWANG, K.; HADI, A. H. A.; AHMAD, K. Extraction and isolation of alkaloids from the leaves of *Alseodaphne corneri* Kosterm. Malaysian Journal of Chemistry, v. 15, n. 1, pp. 27-32, 2013.

NASRULLAH A. A., ZAHARI A., MOHAMAD J., AWANG K. Antiplasmodial alkaloids from the bark of *Cryptocarya nigra* (Lauraceae). Molecules, v. 18, p. 8009-8017, 2013.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. Journal of Ethnopharmacology, v. 69, p. 127-137, 2000.

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

OGER, J. M.; FARDEAU, A.; RICHOMME, P.; GUINAUDEAU, H.; FOURNET, A. Novel isoquinoline alkaloids from Bolivian Lauraceae: *Aniba canelilla* H.B.K. Canadian Journal of Chemistry, v. 71, n. 8, p.1128-1135, 1993.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. International Journal of Vitamin and Nutrition Research, Bern, v.67, n.5, p.289-297, 1997.

PUPPALA, M.; NARAYANAPILLAI, S. C.; LEITZMAN, P.; SUN, H.; UPADHYAYA, P.; O'SULLIVAN, M. G.; HECHT, S.S.; XING, C. Pilot in Vivo Structure–Activity Relationship of Dihydromethysticin in Blocking 4-(Methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone-Induced O6-Methylguanine and Lung Tumor in A/J Mice. Journal of Medicinal Chemistry, v. 60, p. 7935–7940, 2017.

QUEIROZ, M.M.F. Utilização da técnica hifenada CLAE-DAD-IES-EM na detecção e caracterização de substâncias em *Ocotea paranapiacabensis* e *Aniba firmula* (Lauraceae). Dissertação (Universidade Estadual Paulista) Araraquara, 2009.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. DA S.; BRITO, J. M.; MARTINS, L. H., P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PRÓSCÓPIO, L. C.; Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. P. 151, Manaus, INPA, 1999.

REZENDE, C. M. A. M.; BULOW, M.V. The 2-pyrones of *Aniba* species. Phytochemistry, v. 10, p. 3167-3172, 1971.

REZENDE, B. A.; SIVA, G. C.; CORRADI, R. G.; TELES, M. M. R. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIRGINIA, LEMOS, V. S.; CORTES, S. F. Dihydrogoniiothalamine, an Endothelium and NO-Dependent Vasodilator Drug Isolated from *Aniba panurensis*. *Planta Medica*, v.81, n°15, p. 1375-1381, 2015.

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

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

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

ROHWER, J.G.; LAURACEAE. IN: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. (Eds.). The families and genera of vascular plants. Springer-Verlag, Berlin, Vol. 2, Pp. 366-391, 1993.

RUIZ, L.; RUIZ, L.; MACO, M.; COBOS, M.; GUTIERREZCHOQUEVILCA, A.L.; ROUMV, V. Plants used by native Amazonian groups from the Nanay River (Peru) for the treatment of malaria. *Journal of Ethnopharmacology*, 133, p. 917–921, 2011.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology Medicine*, Amsterdam, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

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

SILVERSTEIN, R. M., BASSLER, G. C., MORRILL, T. C., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos 5ª ed., LTC: Rio de Janeiro, 1994.

SCHMIDT, J. et al. Analysis of benzyloisoquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. *European Journal of Mass Spectrometry*, v. 11, n. 3, p. 325-33, 2005.

SHAO, Y.; HE, K.; ZHENG, B.; ZHENG, Q. Reversed phase high performance liquid chromatographic method for quantitative analysis of the six major kavalactones in *Piper methysticum*. *Journal of Chromatography A*, 825, p. 1–18, 1998.

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

SOARES, E. R., SILVA F.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R.; SILVA-FILHO, F-A; BARISON, A.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L. Direct infusion ESI-IT-MSⁿ

alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* maas (*Annonaceae*). *Phytochemical Analysis*, v. 26, n.5, p. 339-345, 2015.

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

SOUSA, F. C.; MELO, C. T.; MONTEIRO, A. P.; LIMA, V.T. GUTIERREZ S.J.; PEREIRA, B. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VASCONCELOS, S. M.; FONTELES, M. F.; VIANA, G. S. Antianxiety and antidepressant effects of riparin III from *Aniba riparia* (Nees) Mez (*Lauraceae*) in mice. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, v.78, n. 1, p.27-33, 2004.

SOUSA, F. C., LEITE C. P., MELO C. T., ARAUJO F. L., GUTIERREZ S. J., BARBOSA-FILHO, J. M.; FONTELES, M. M.; VASCONCELOS, S. M.; VIANA G. S. B. Biological and Pharmaceutical Bulletin, v. 30, p. 1212-1216, 2007.

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

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, A. D. Isolamento de alcaloides e atividades biológicas de espécies de *Lauraceae* da Amazônia. Dissertação (Mestrado em Química). Manaus-AM: Universidade Federal do Amazonas, 2014.

TATIYA, A. U.; SURANA, S. S.; SALUJA, A. K.; SURANA, S. J. Antimicrobial activity of *Machilus macranta* Nees. (*Lauraceae*). *Int. J. Res. Ayuveda Pharm*, v.5, n. 1, 105-107, 2014.

TRAM, L. H; GIANG, P. M.; SON, P. T. Biologically active phenolic constituents from *Alpinia gagnepainii* K. Schum. (*Zingiberaceae*). *Journal of Chemistry*, v. 45, n. 1, p. 126 - 130, 2007.

TRUITI, M. C. T; SERSANI-AMADO, C. A.; DIAS-FILHO, B. P.; SARAGIOTTO, M. A., SOUZA, M. C. Screening of Five Brazilian Plants for Anti-inflammatory and Antimicrobial Activities. *Pharmaceutical Biology*, v. 44, N°. 7, p. 516–521, 2006

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

TRAVISANT, L. M. V.; YOSHIDA, M., GOTTLIEB, O. R. Hexahydrobensofuranoid neolignans from na *Aniba* species. *Phytochemistry*, v.23, n.3, p. 661-665, 1984.

VIEIRA, P. C.; CASS, Q. B.; DEGANI, A. L. G. Cromatografia Um Breve Ensaio. *Química Nova Na Escola*, Nº 7, 21-26, 1998.

UNLU, M., ERGENE, E.; UNLU, G. V.; ZEYTINOGLU, H. S.; VURAL, N. Composition, antimicrobial activity and in vitro cytotoxicity of essential oil from *Cinnamomum zeylanicum* Blume (*Lauraceae*). *Food and Chemical Toxicology*, 48, 3274–3280, 2010.

UPADHYAY, A.; CHOMPOO, J.; KISHIMOTO, W.; MAKISE, T.; TAWATA, S. HIV-1 integrase and neuraminidase inhibitors from *Alpinia zerumbet*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 7, p. 2857–2862, 2011

WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant Drug Analysis – A Thin Layer Chromatography Atlas*. Springer. Second Edition, 1996.

WALSH, C. *Antibiotics: Actions, Origins, Resistenc.* ASM Press, Washington, 2003.

WONG, M.; LIM, L.; AHMAD, F.; ASSIM, Z. Antioxidant and antimicrobial properties of *Litsea elliptica* Blume and *Litsea resinosa* Blume (*Lauraceae*). *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, v.4, nº5, p. 386-392, 2014.

WU, Y. J.; ZHENG, Y. L.; LUAN, L. J.; LIU, X. S.; HAN, Z.; REN, Y. P.; GAN, L. S.; ZHOU, C. X. Development of the fingerprint for the quality of *Radix Linderae* through ultra-pressure liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, v. 33, n. 17-18, p. 2734-2742, 2010.

YAN, R.; YANG, Y.; ZENG, Y.; ZOU, G. Cytotoxicity and antibacterial activity of *Lindera strychnifolia* essential oils and extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 121, 451–455, 2009.

ZAHARI, A.; CHEAH, F. K.; MOHAMAD, J.; SULAIMAN, S. N.; LITAUDON, M.; LEONG, K. H. AND. AWANG, K. Antiplasmodial and antioxidant isoquinoline alkaloids from *Dehaasia longipedicellata*. *Planta Med.*, v. 80, n. 7, p. 599-603, 2014.

ZAHARI, A.; ABLAT, A.; SIVASOTHY, Y.; MOHAMAD, J.; CHOUDHARY, M. I.; AWANG, K. In vitro antiplasmodial and antioxidant activities of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Alseodaphne corneri* Kosterm. *Asian Pacific. Journal of Tropical Medicine*, v. 9, n. 4, 328–332, 2016.

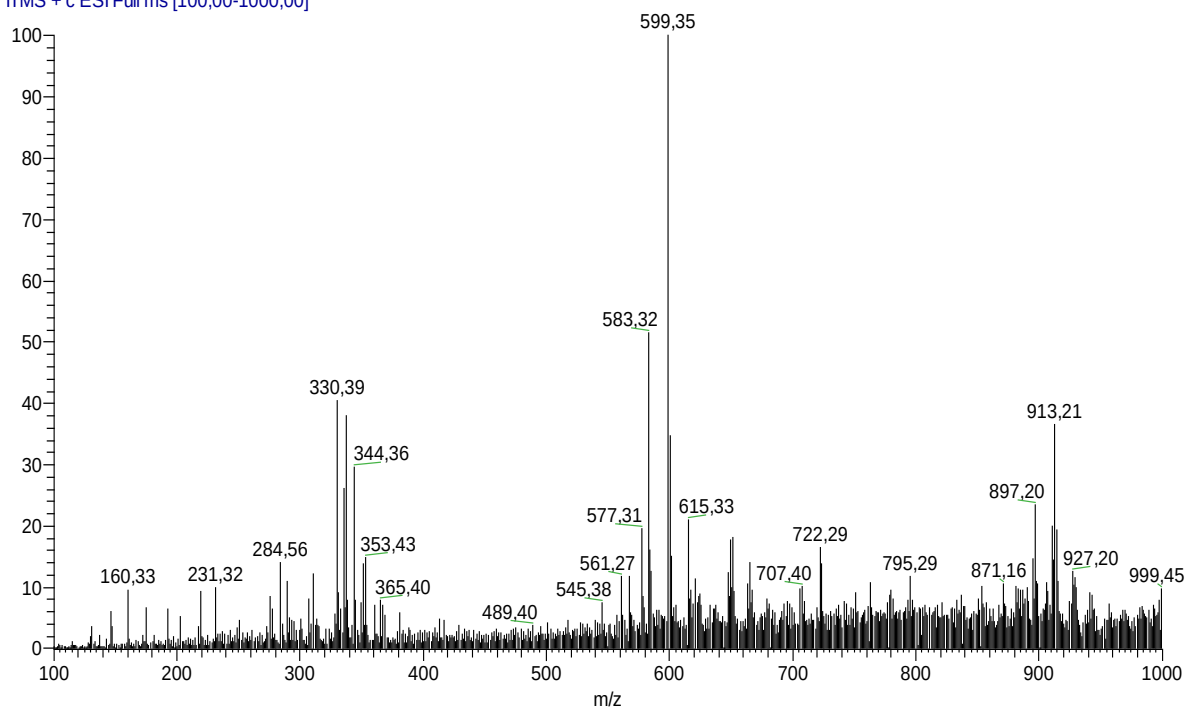
ZHANG, F.; ARNATT, C. K.; HANEY, K. M.; FANG, H. C.; BAJACAN, J. E.; RICHARDSON, A.C.; WARE, J. L.; ZHANG, Y. Structure activity relationship studies of natural product chemokine receptor CCR5 antagonist anibamine toward the development of novel anti prostate cancer agents. *European Journal of Medicinal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

ANEXOS

1. Espectros de massas das amostras metanólicas das espécies de *Aniba* por meio de fonte ESI no modo positivo.

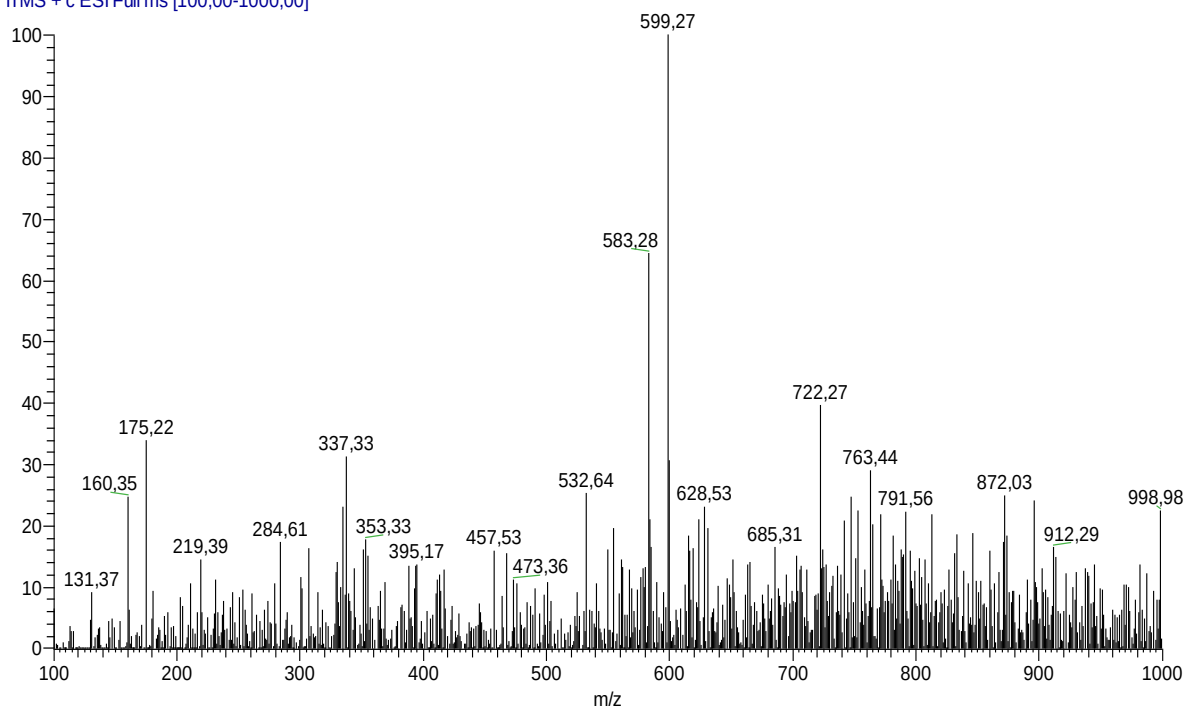
i. Amostra das folhas de *A. panurensis*.

27_09_2017 #46-65 RT: 1,21-1,63 AV: 20 NL: 2,75E2
T: TMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



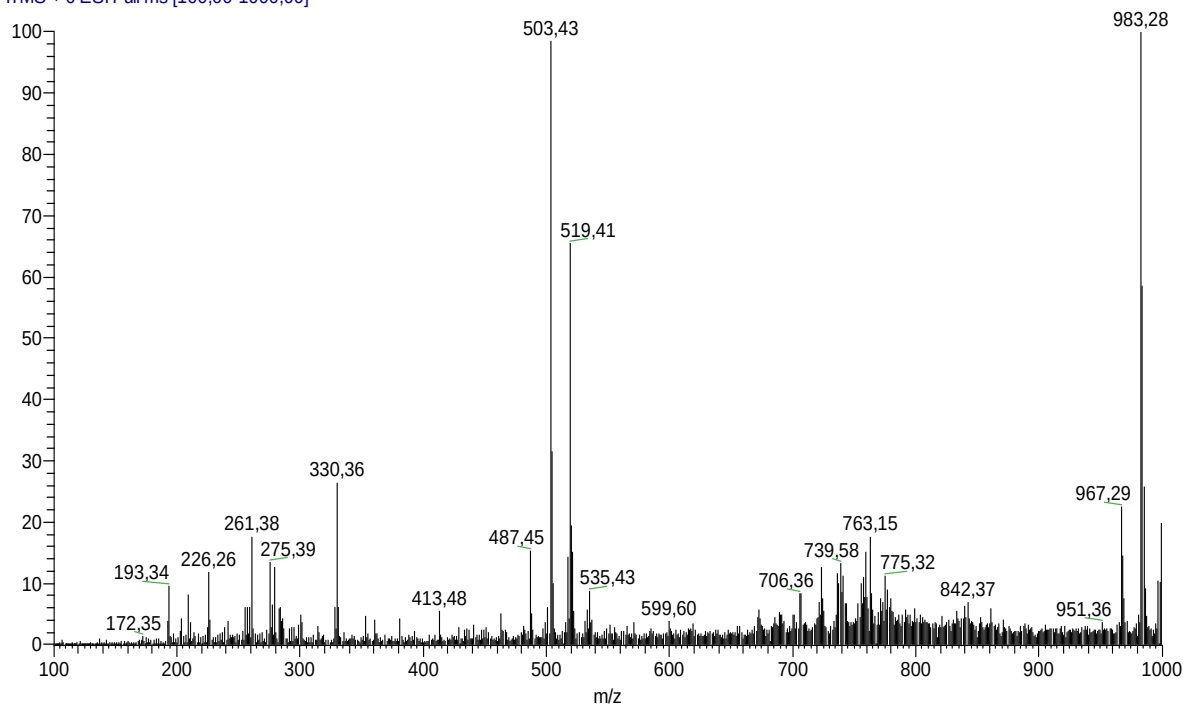
ii. Amostra dos galhos de *A. panurensis*.

27_09_2017 #172-174 RT: 4,49-4,54 AV: 3 NL: 3,68E2
T: TMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

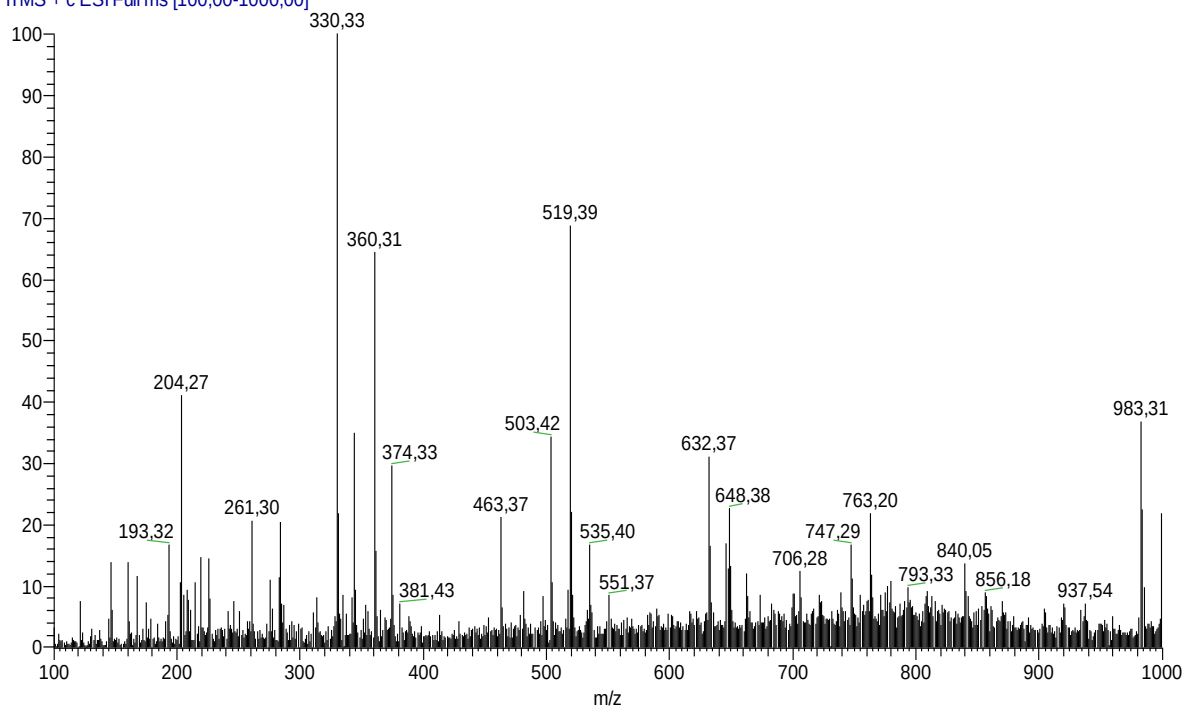


iii. Amostra das folhas de *A. roseadora*.

27_09_2017 #722-755 RT: 15,39-15,85 AV: 34 NL: 1,47E3
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

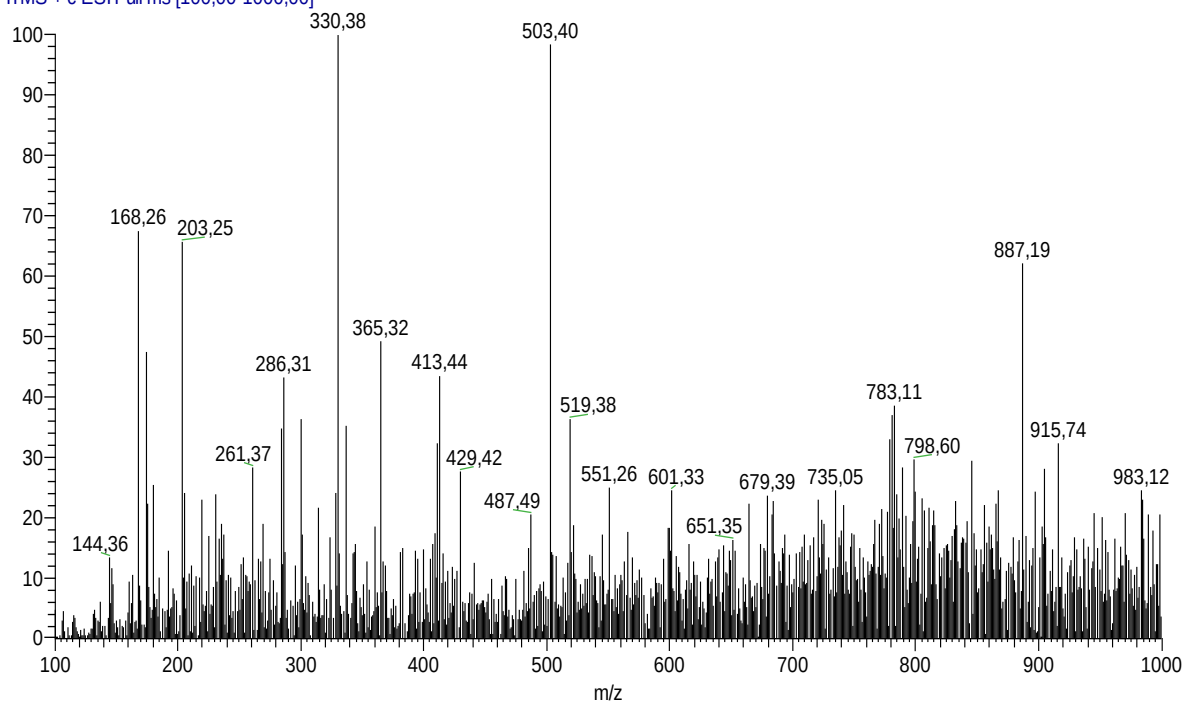
iv. Amostra dos galhos de *A. roseadora*.

27_09_2017 #334-356 RT: 8,78-9,14 AV: 23 NL: 7,78E2
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

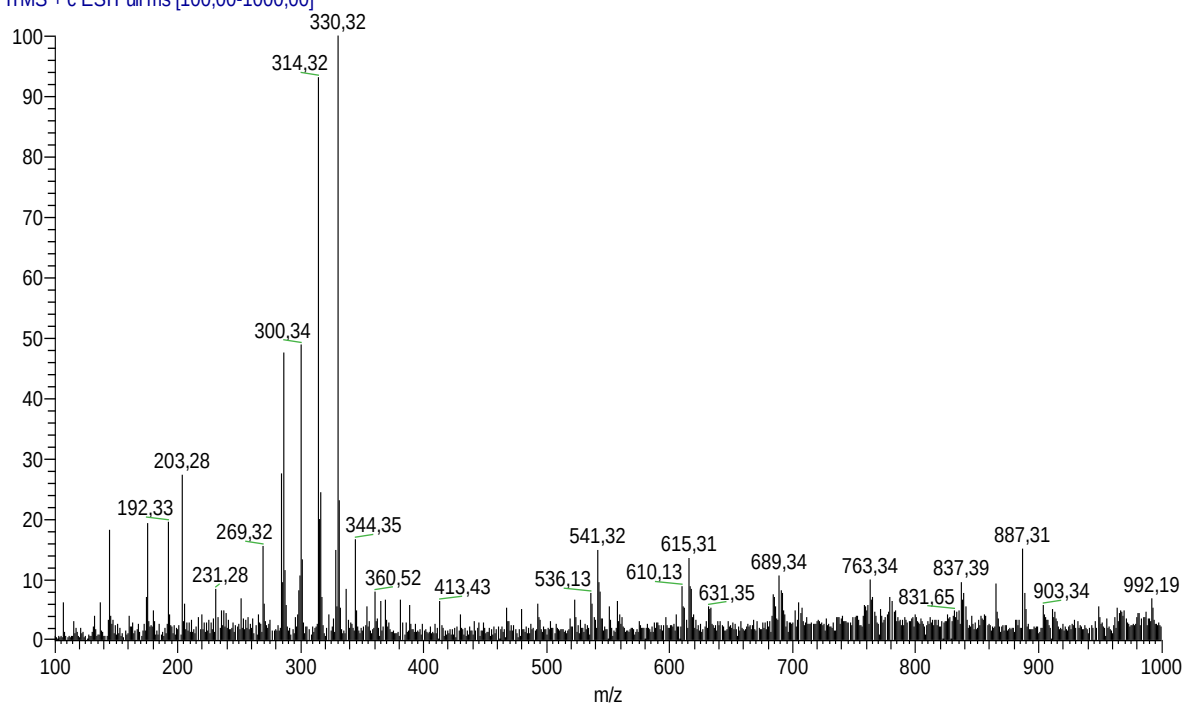


v. Amostra das folhas de *A. ferrea*.

27_09_2017 #860-862 RT: 18,20-18,24 AV: 3 NL: 4,04E2
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

vi. Amostra dos galhos de *A. ferrea*.

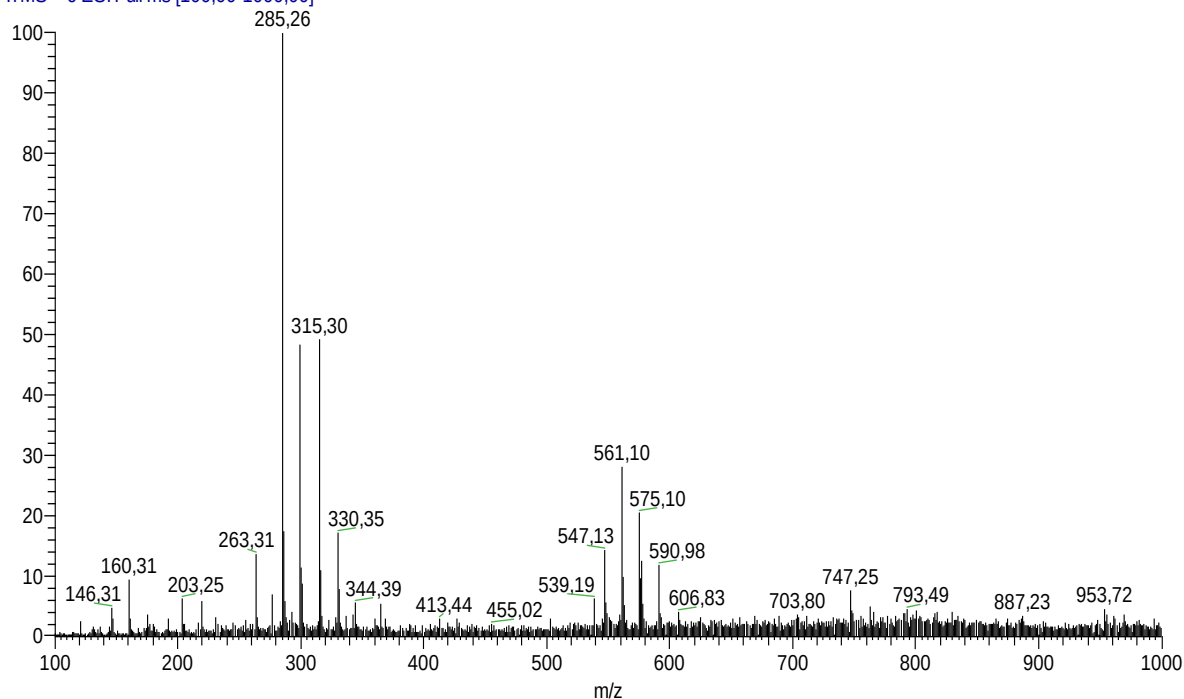
27_09_2017 #956-974 RT: 20,66-21,06 AV: 19 NL: 3,17E2
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



vii. Amostra das folhas de *A. parviflora*.

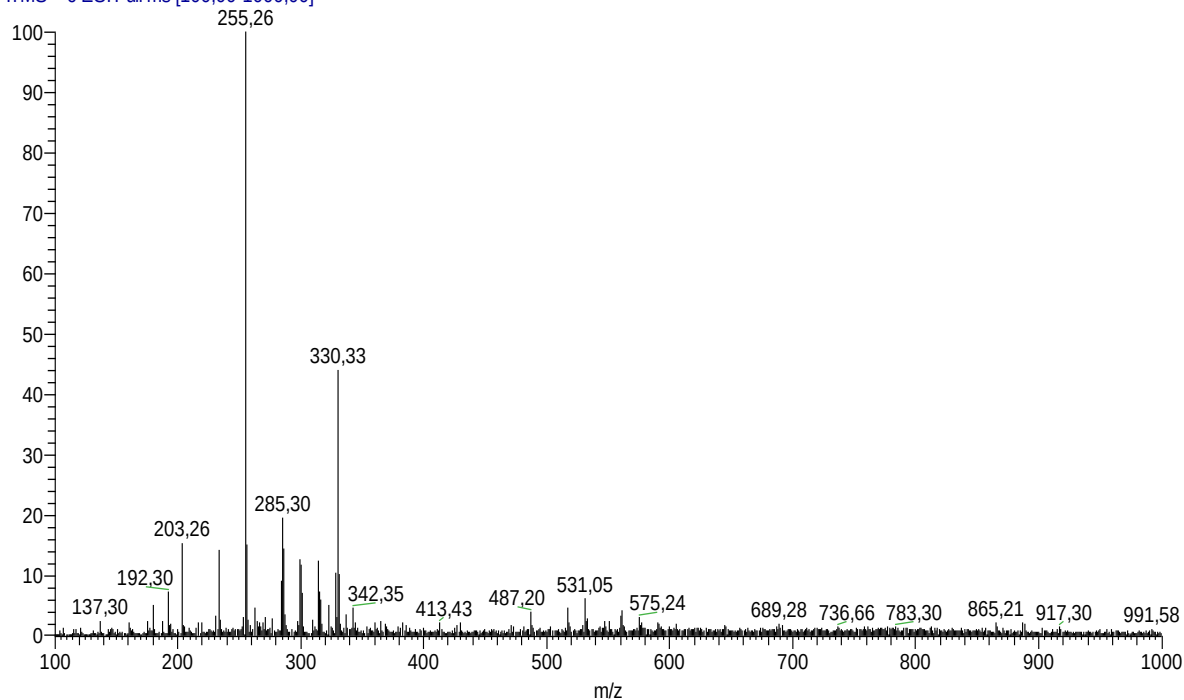
27_09_2017 #1083-1104 RT: 23,97-24,33 AV: 22 NL: 1,73E3

T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

viii. Amostra dos galhos de *A. parviflora*.

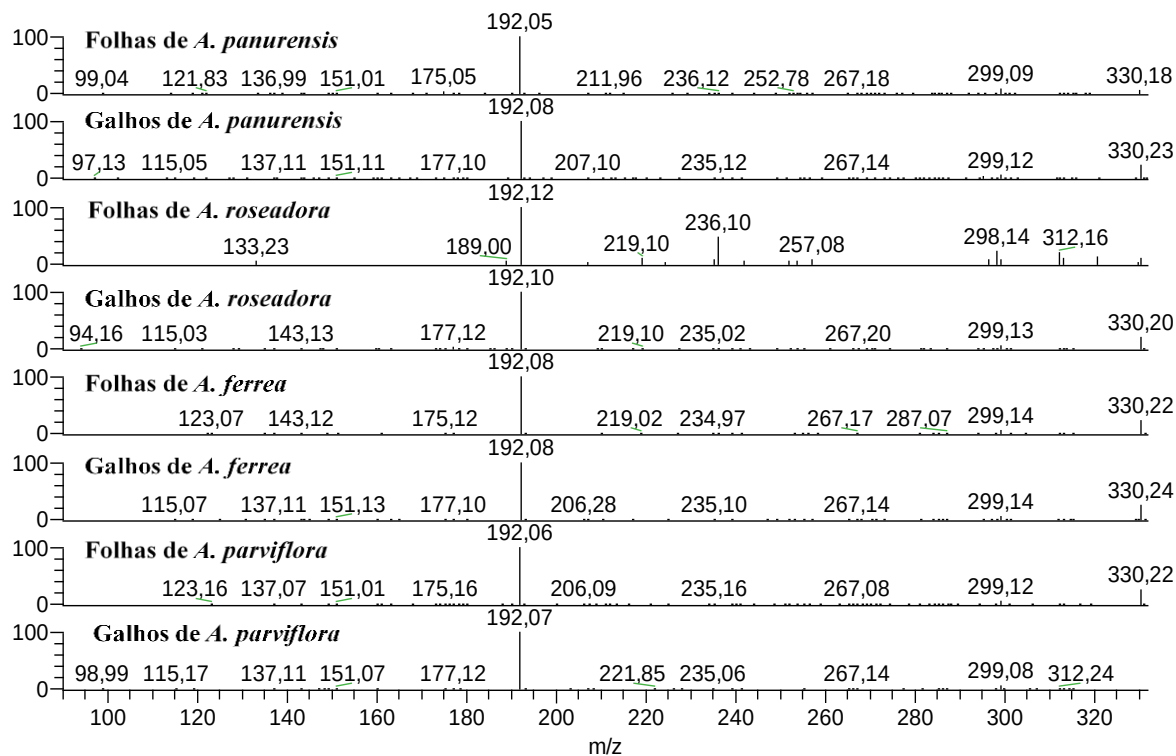
27_09_2017 #1184-1204 RT: 26,45-26,74 AV: 21 NL: 5,58E3

T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

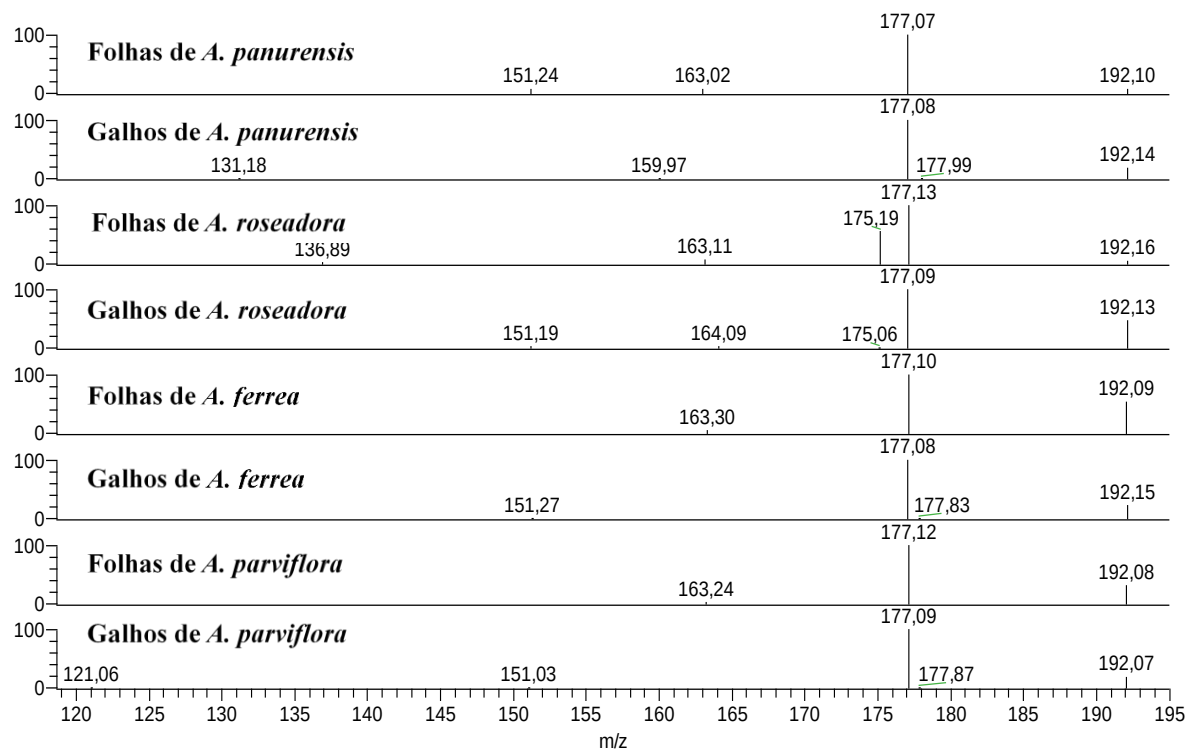


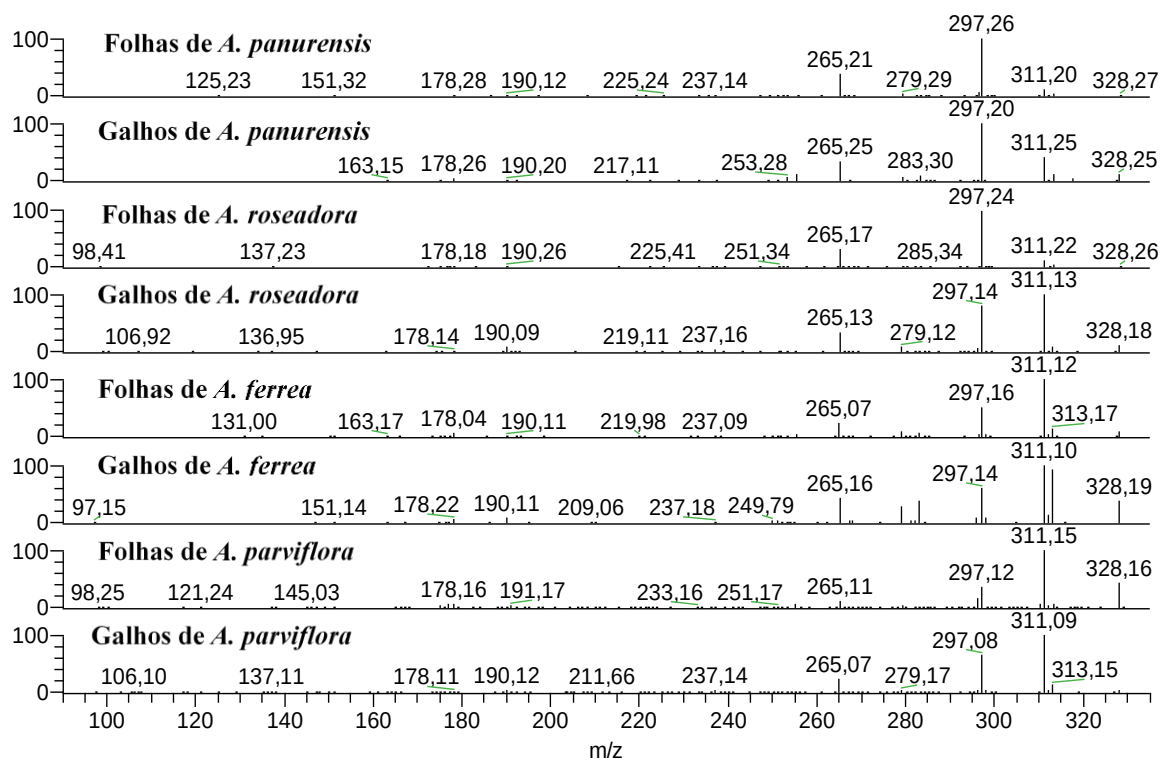
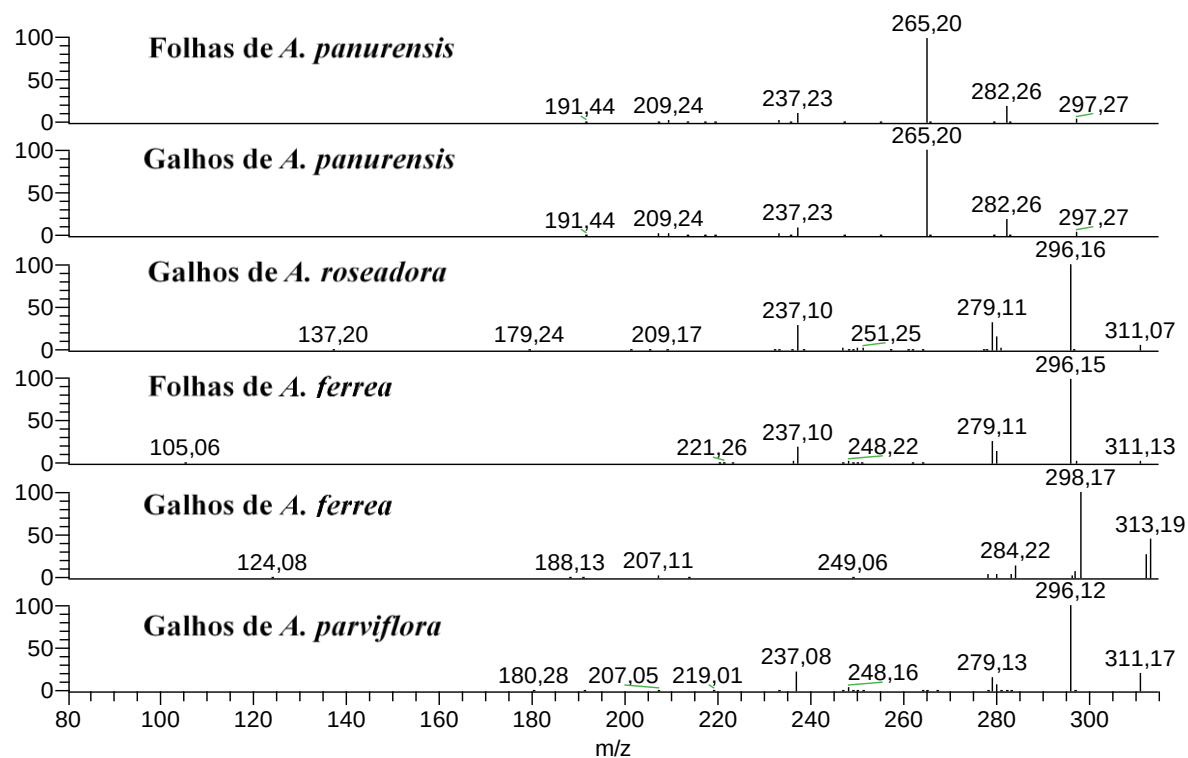
2. Espectros de fragmentação (m/z e m/z^3) dos principais íons detectados nas amostras metanólicas das espécies de *Aniba* por meio de fonte ESI no modo positivo.

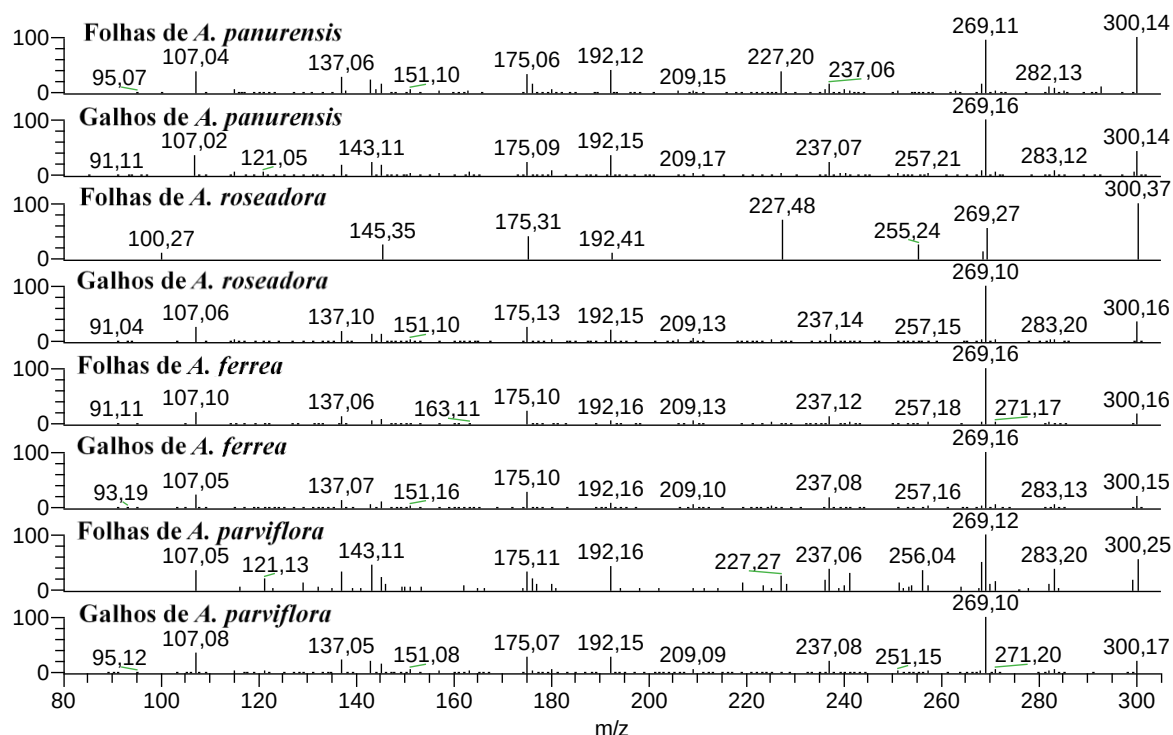
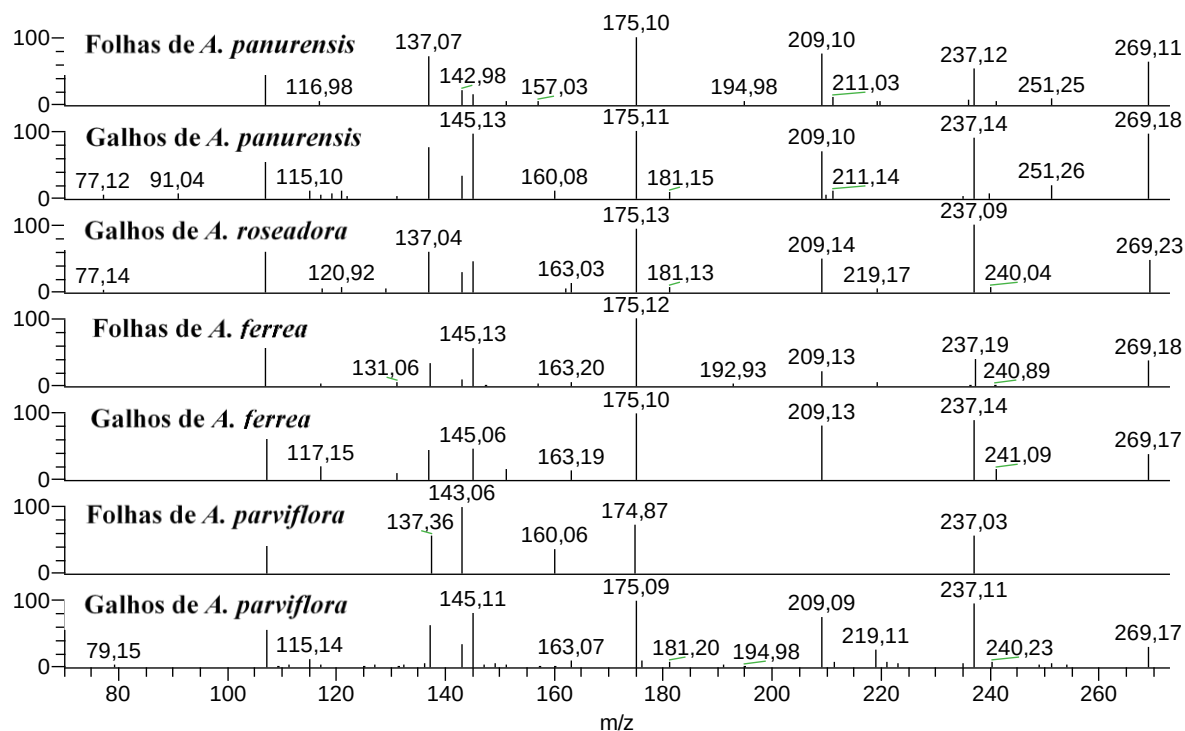
i. Espectros de m/z^2 do íon m/z 330.



ii. Espectros de m/z^3 do íon m/z 192.



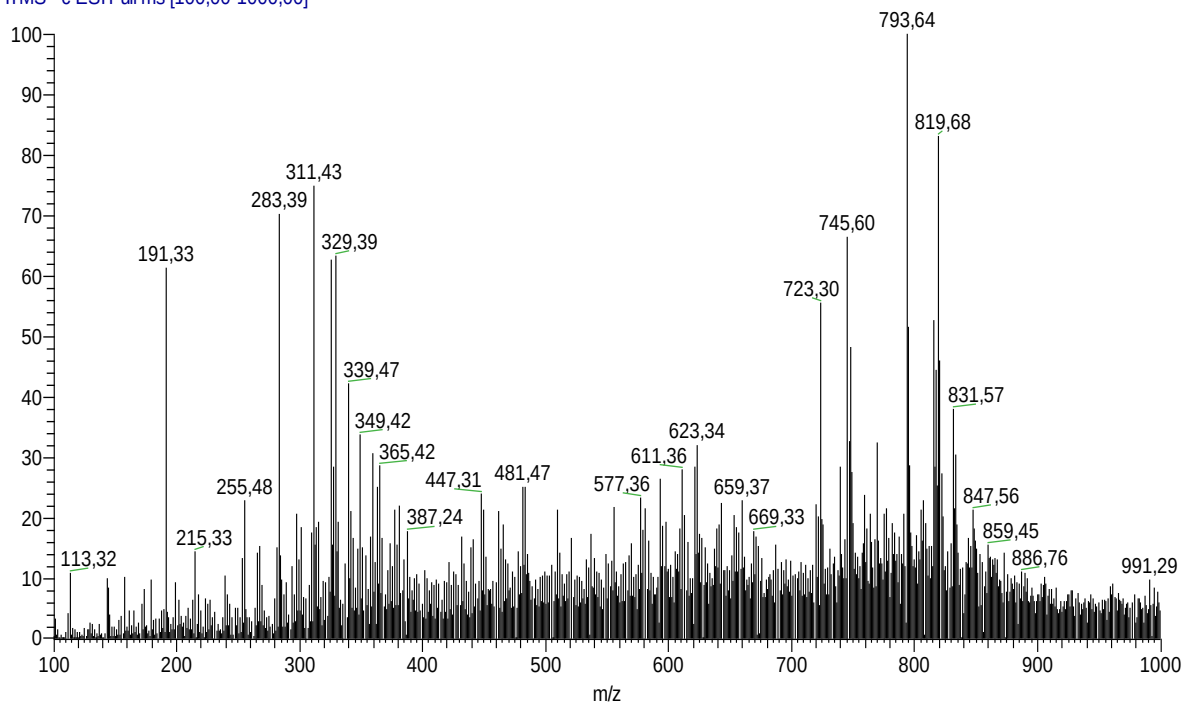
iii. Espectros de ms^2 do íon m/z 328iv. Espectros de ms^3 dos íons m/z 297, 311 e 313.

v. Espectros de ms^2 do íon m/z 300.vi. Espectro de ms^3 do íon m/z 269.

3. Espectros de massas das amostras metanólicas das espécies de *Aniba* por meio de fonte ESI no modo negativo.

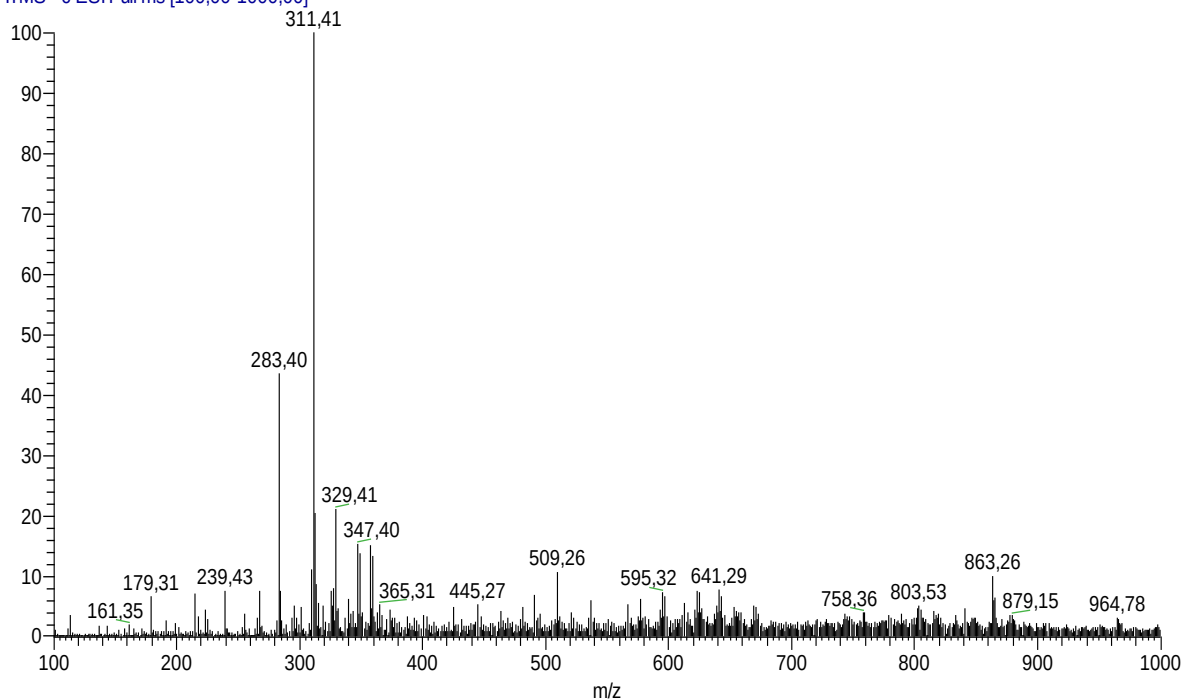
i. Amostra das folhas de *A. panurensis*.

27_09_2017 neg #51-71 RT: 1,34-1,82 AV: 21 NL: 1,24E2
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]



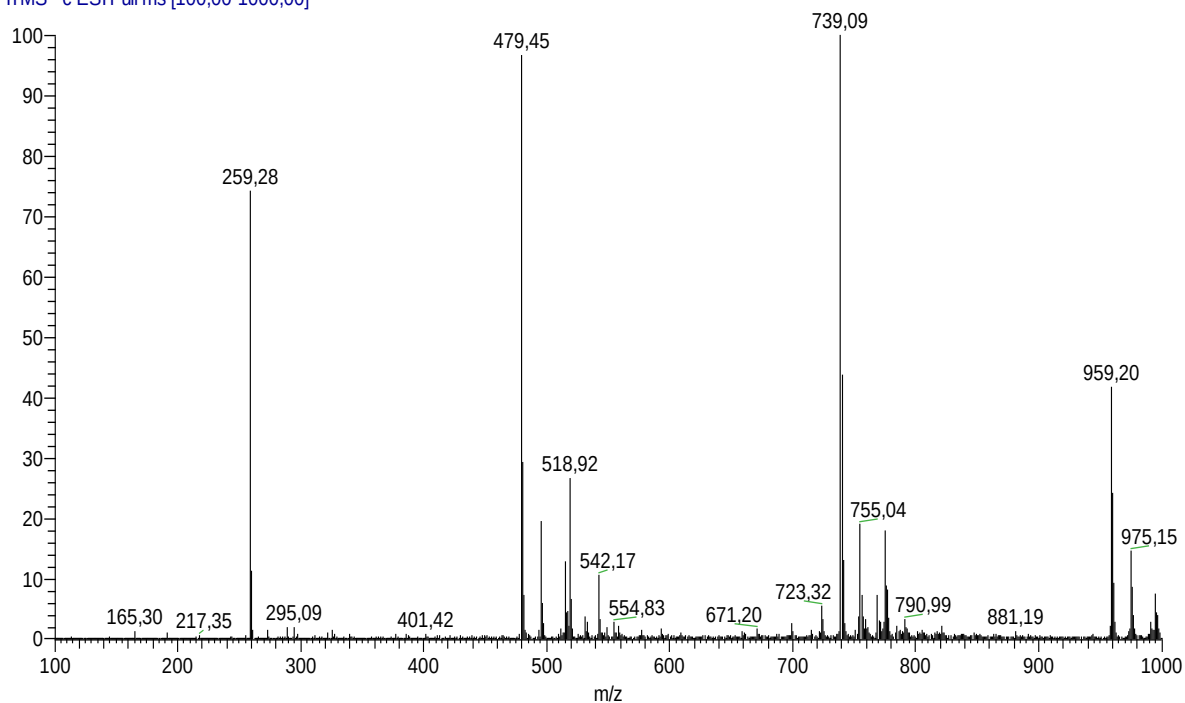
ii. Amostra dos galhos de *A. panurensis*.

27_09_2017 neg #150-165 RT: 3,95-4,28 AV: 16 NL: 8,65E2
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

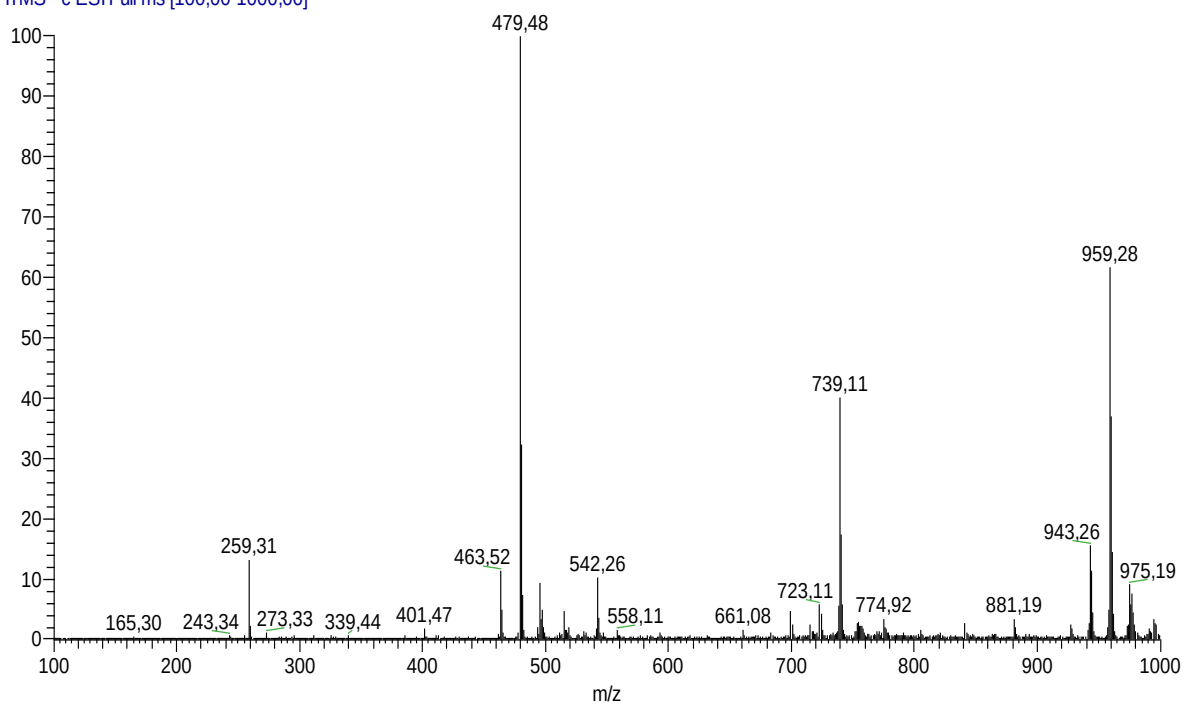


iii. Amostra das folhas de *A. roseadora*.

27_09_2017_neg #265-298 RT: 6,96-7,53 AV: 34 NL: 4,32E3
T: TMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

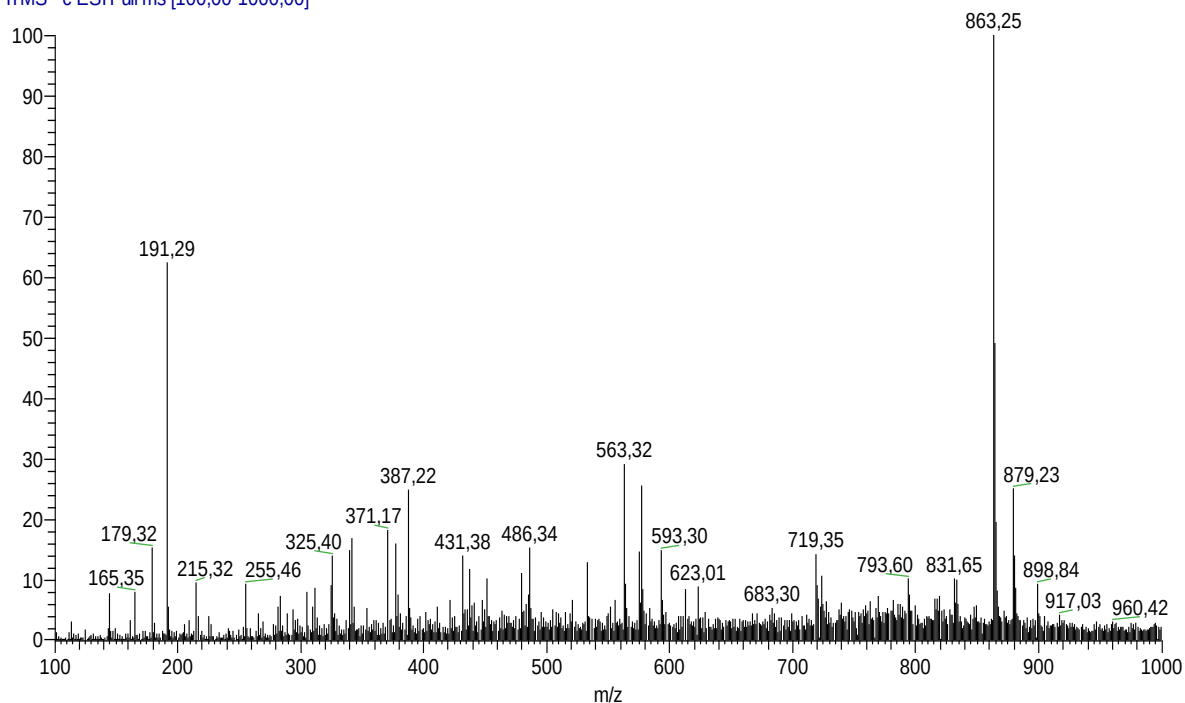
iv. Amostra dos galhos de *A. roseadora*.

27_09_2017_neg #458-485 RT: 11,82-12,26 AV: 28 NL: 6,22E3
T: TMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

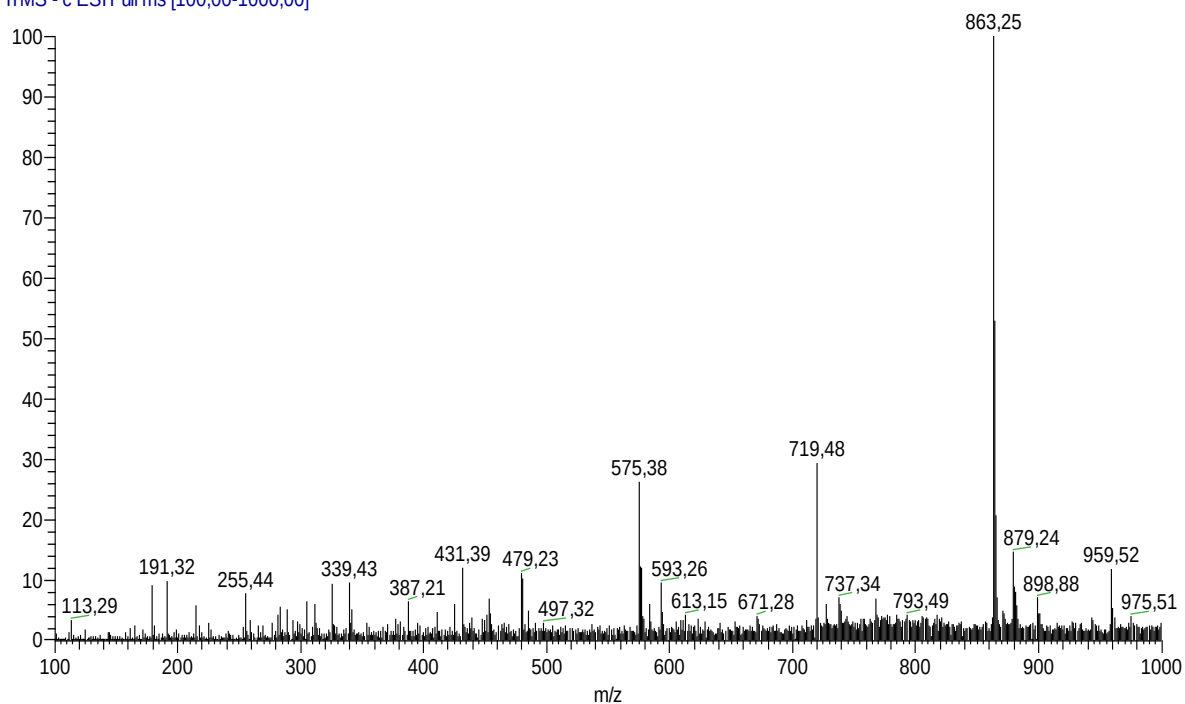


v. Amostra das folhas de *A. ferrea*.

27_09_2017_neg #592-612 RT: 15,12-15,52 AV: 21 NL: 6,76E2
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

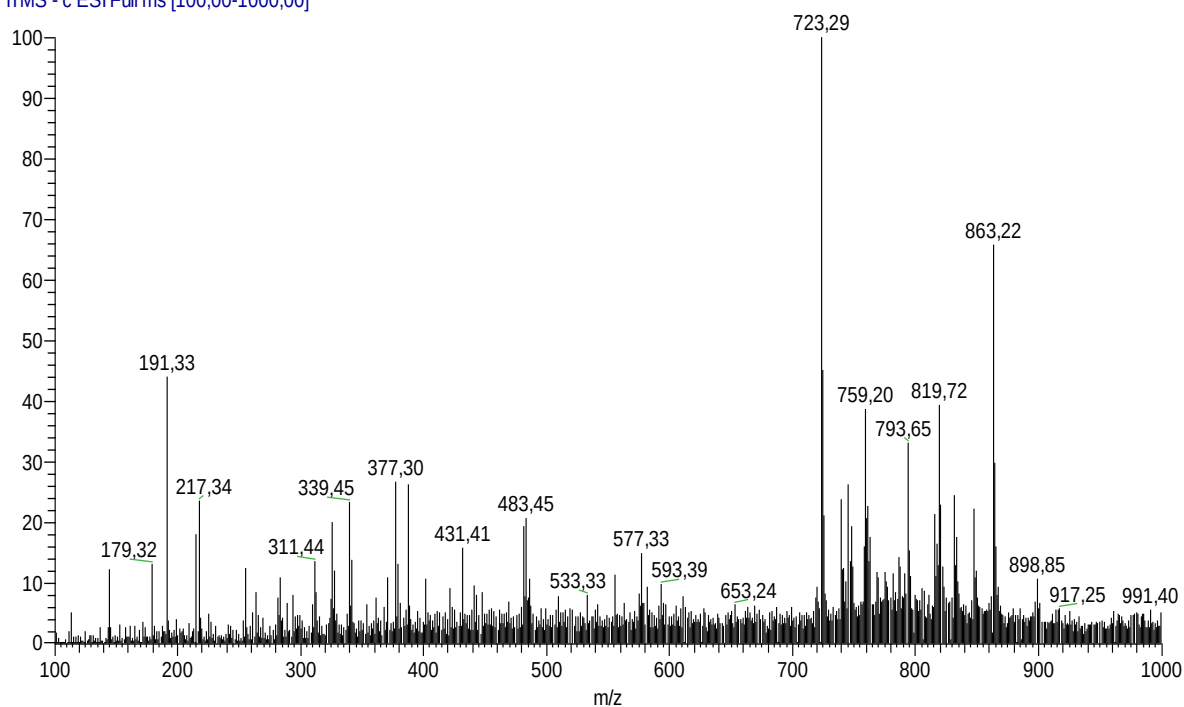
vi. Amostra dos galhos de *A. ferrea*.

27_09_2017_neg #700-720 RT: 17,85-18,30 AV: 21 NL: 6,57E2
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

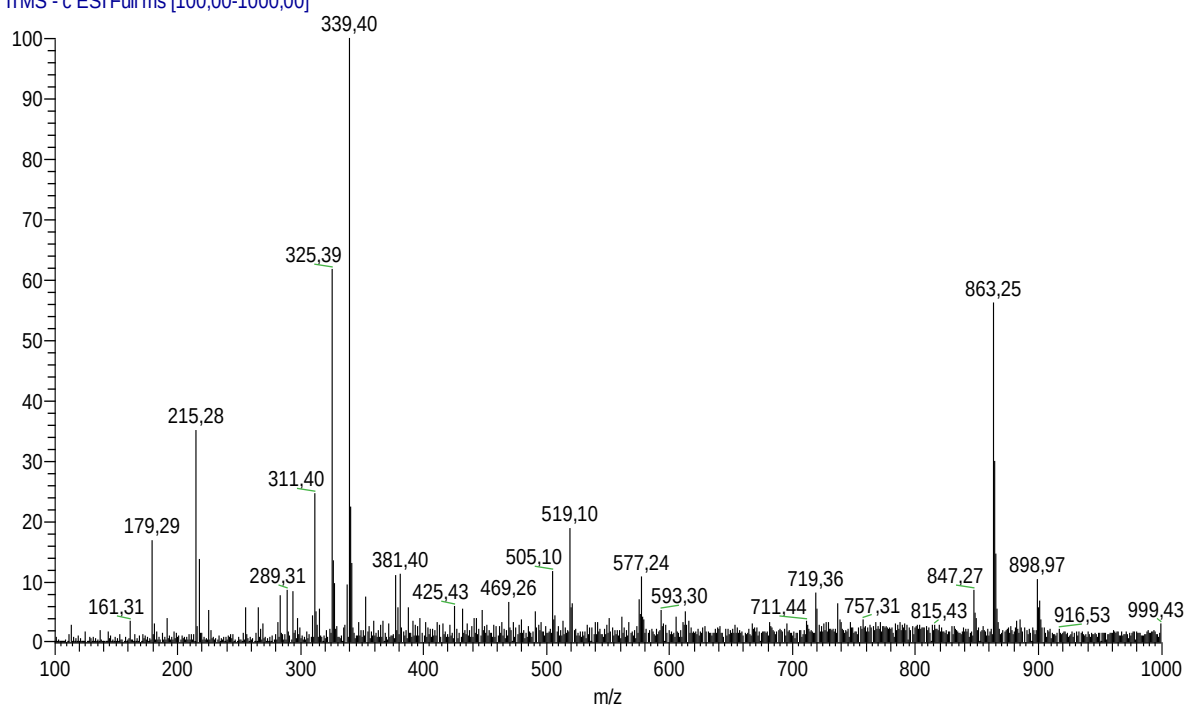


vii. Amostra das folhas de *A. parviflora*.

27_09_2017_neg #793-814 RT: 20,23-20,67 AV: 22 NL: 3,77E2
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

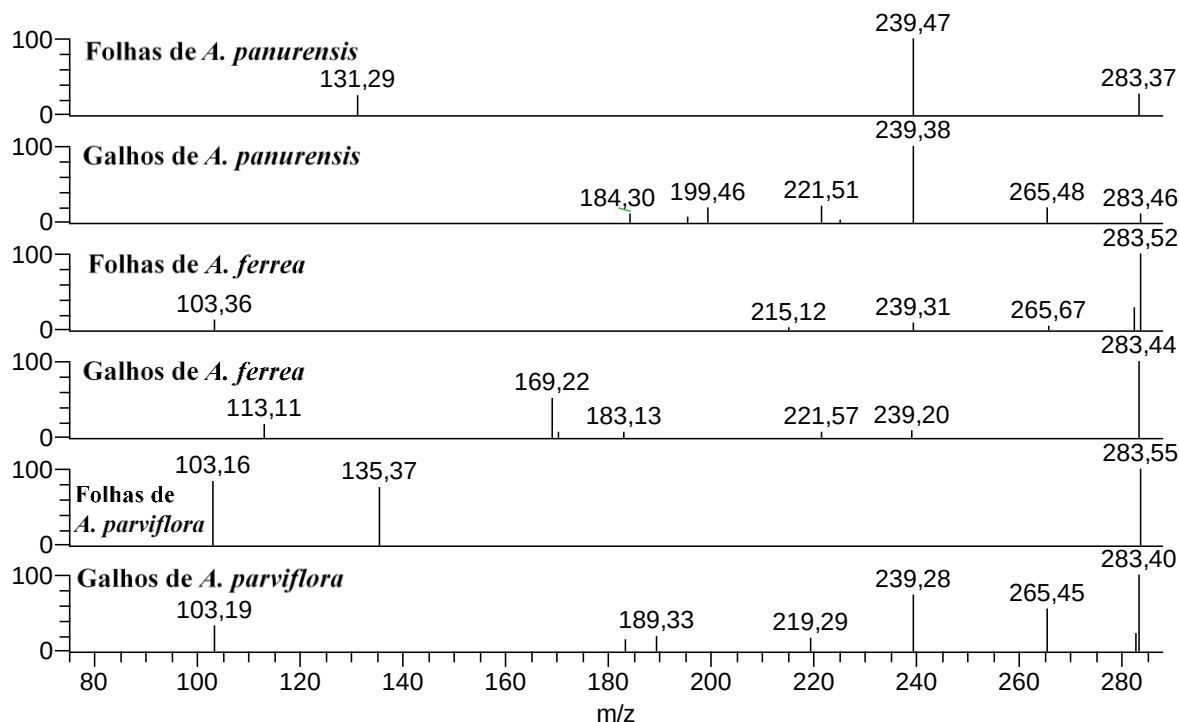
viii. Amostra dos galhos de *A. parviflora*.

27_09_2017_neg #860-877 RT: 21,90-22,26 AV: 18 NL: 7,72E2
T: ITMS - c ESI Full ms [100,00-1000,00]

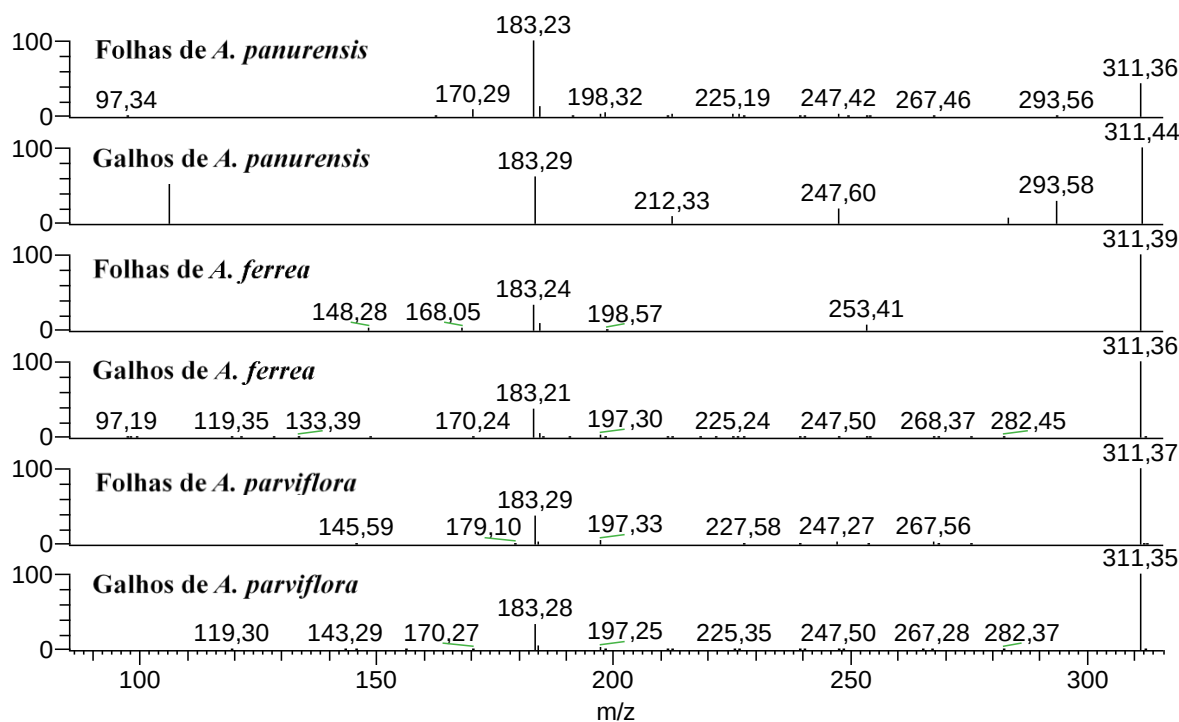


4. Espectro de fragmentação (m/z) dos principais íons detectados nas amostras metanólicas das espécies de *Aniba* por meio de fonte ESI no modo negativo.

i. Espectros de m/z do íon m/z 283.

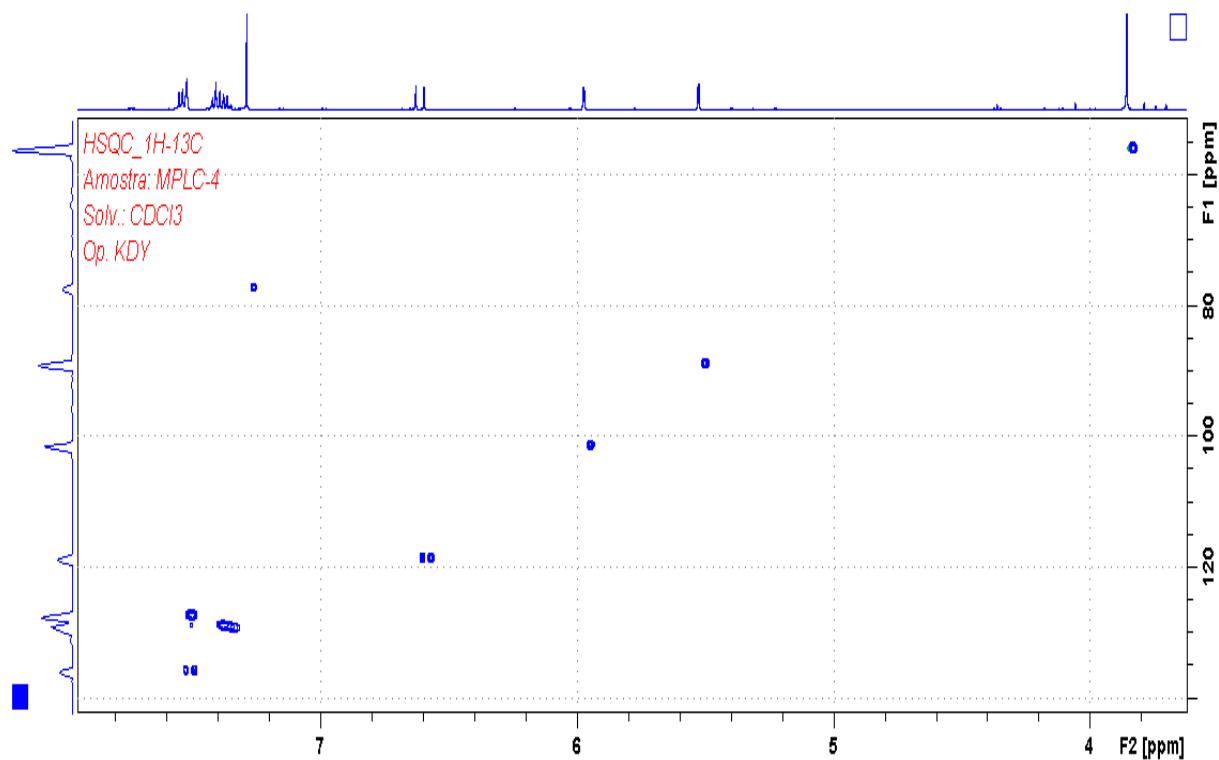


ii. Espectros de m/z do íon m/z 311.

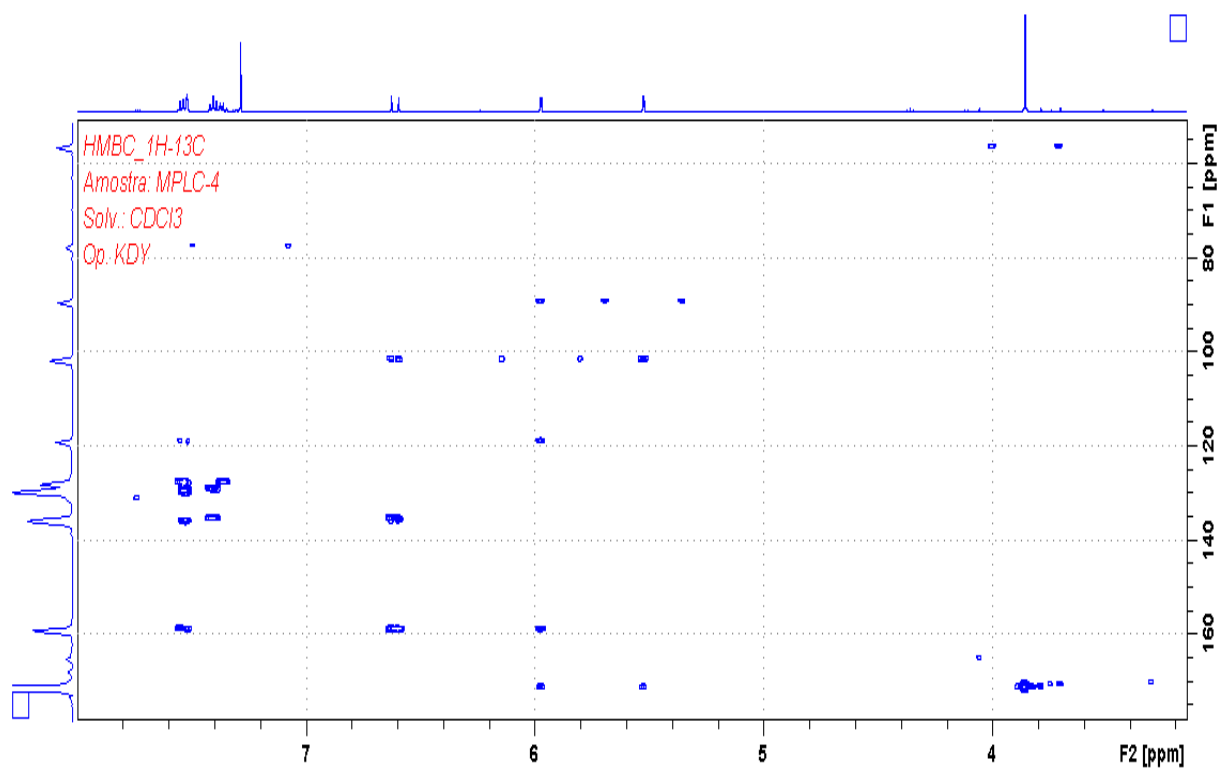


5. Espectros de RMN (HSQC e HMBC) das substâncias obtidas.

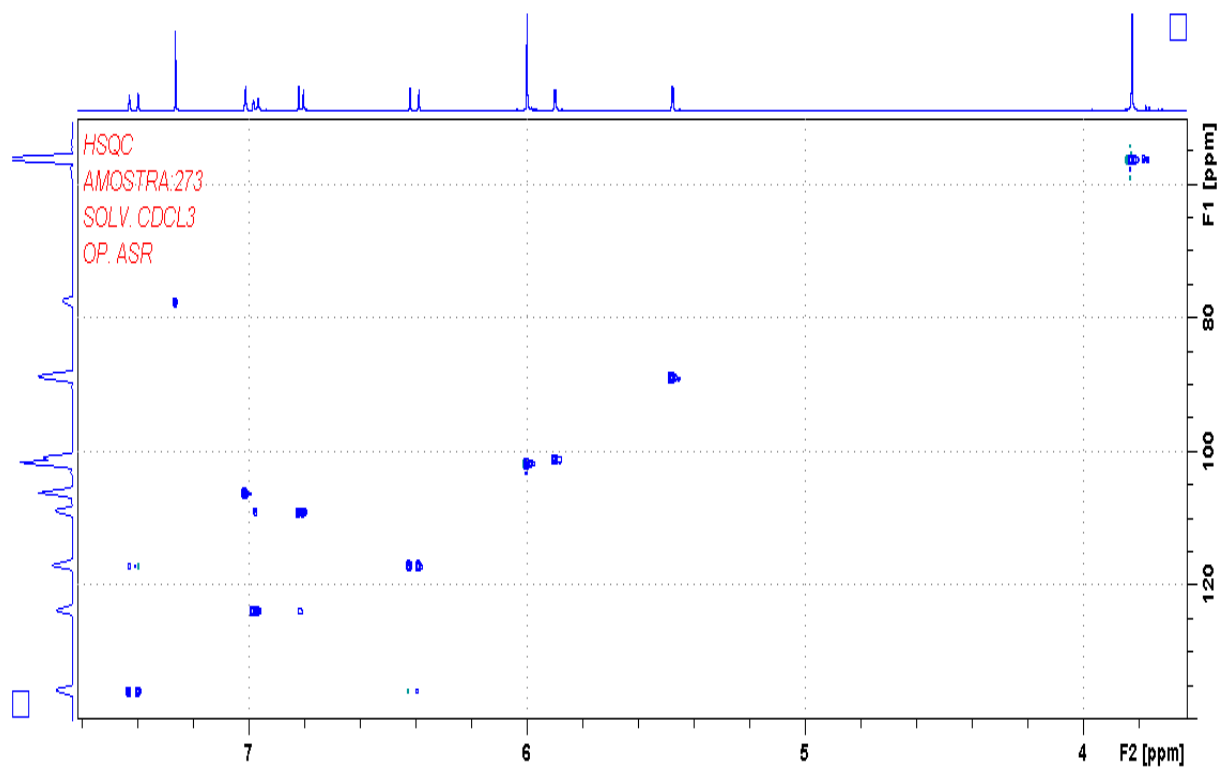
i. Mapa de contornos de HSQC da substância 1.



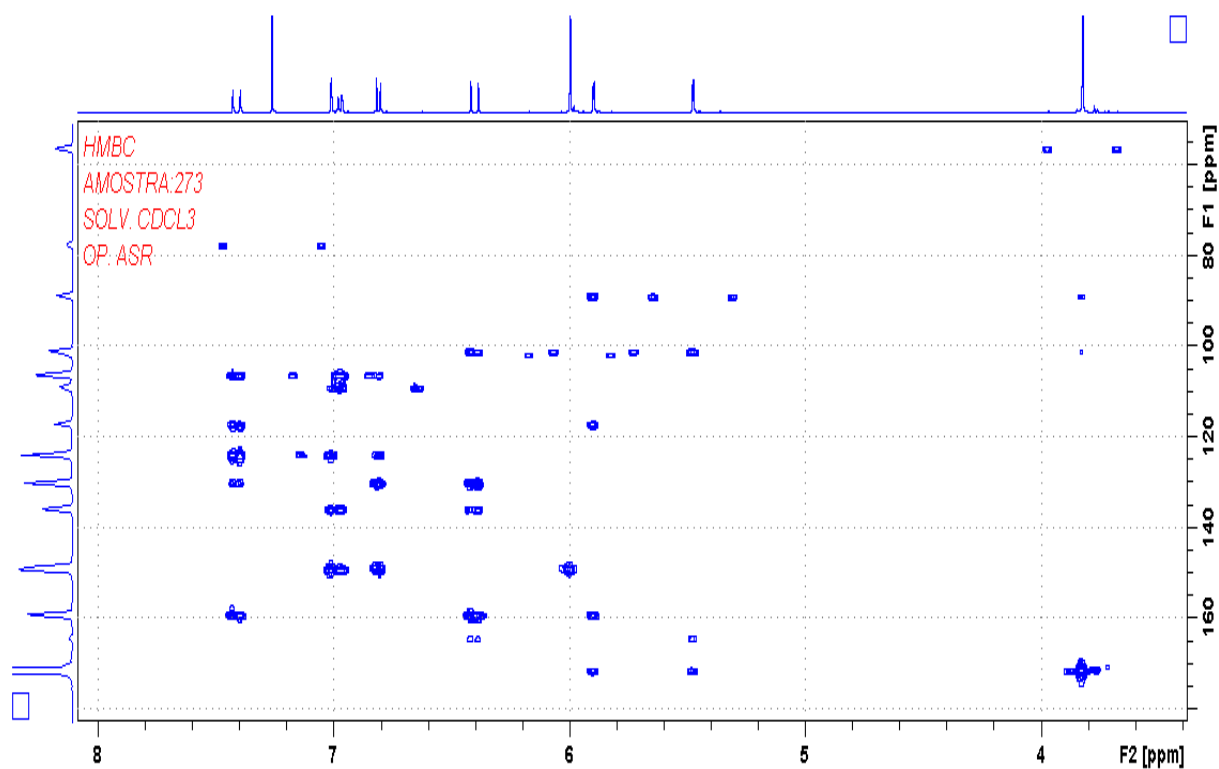
ii. Mapa de contornos de HMBC da substância 1.



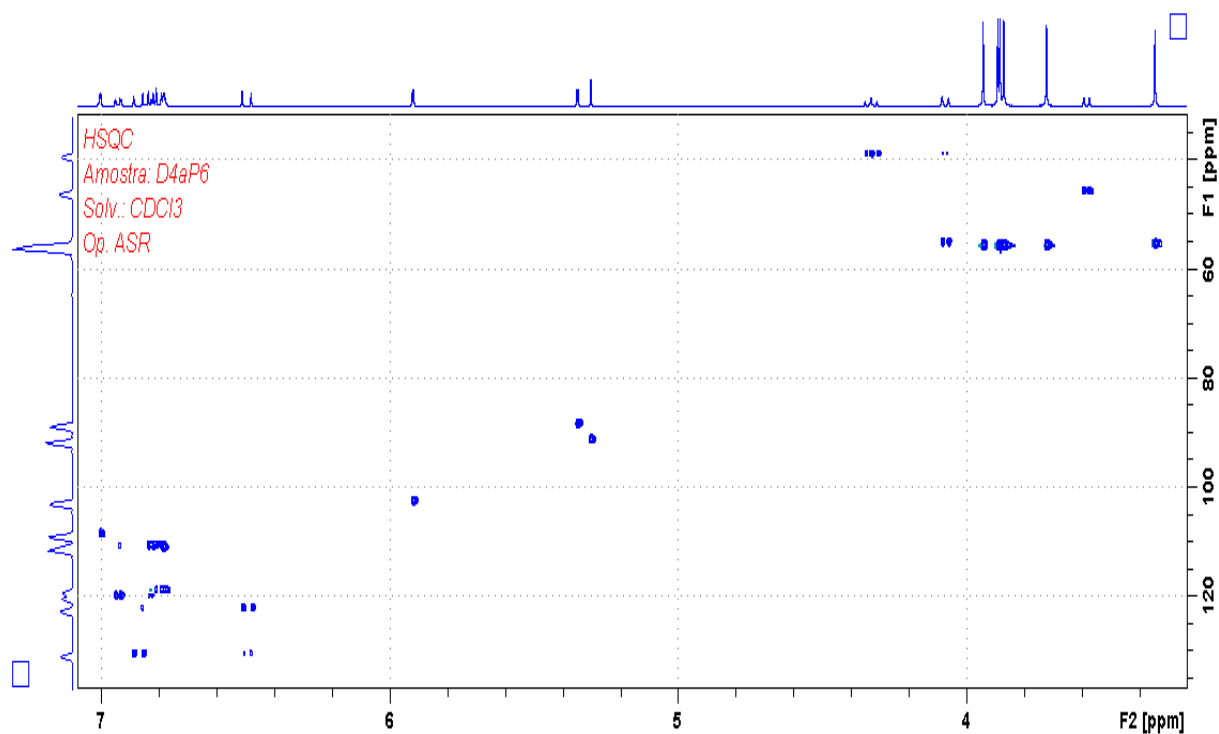
iii. Mapa de contornos de HSQC da substância 2.



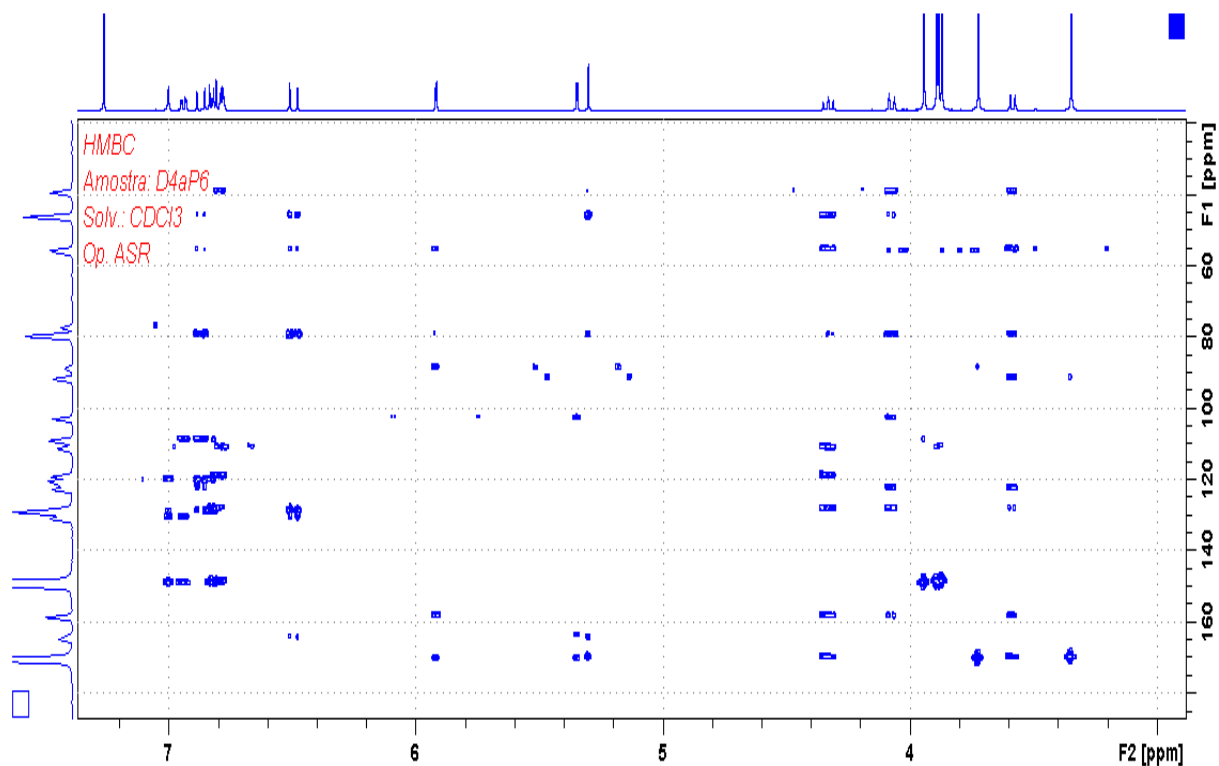
iv. Mapa de contornos de HMBC da substância 2.



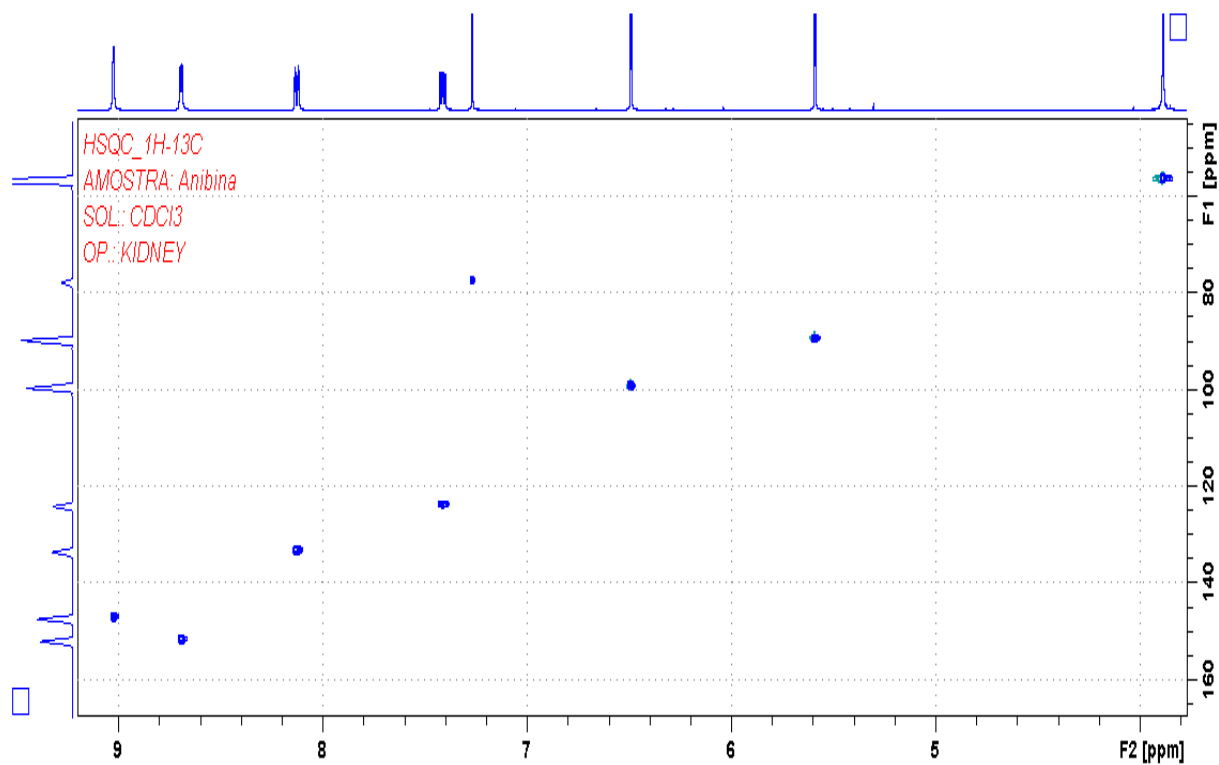
v. Mapa de contornos de HSQC da substância 3.



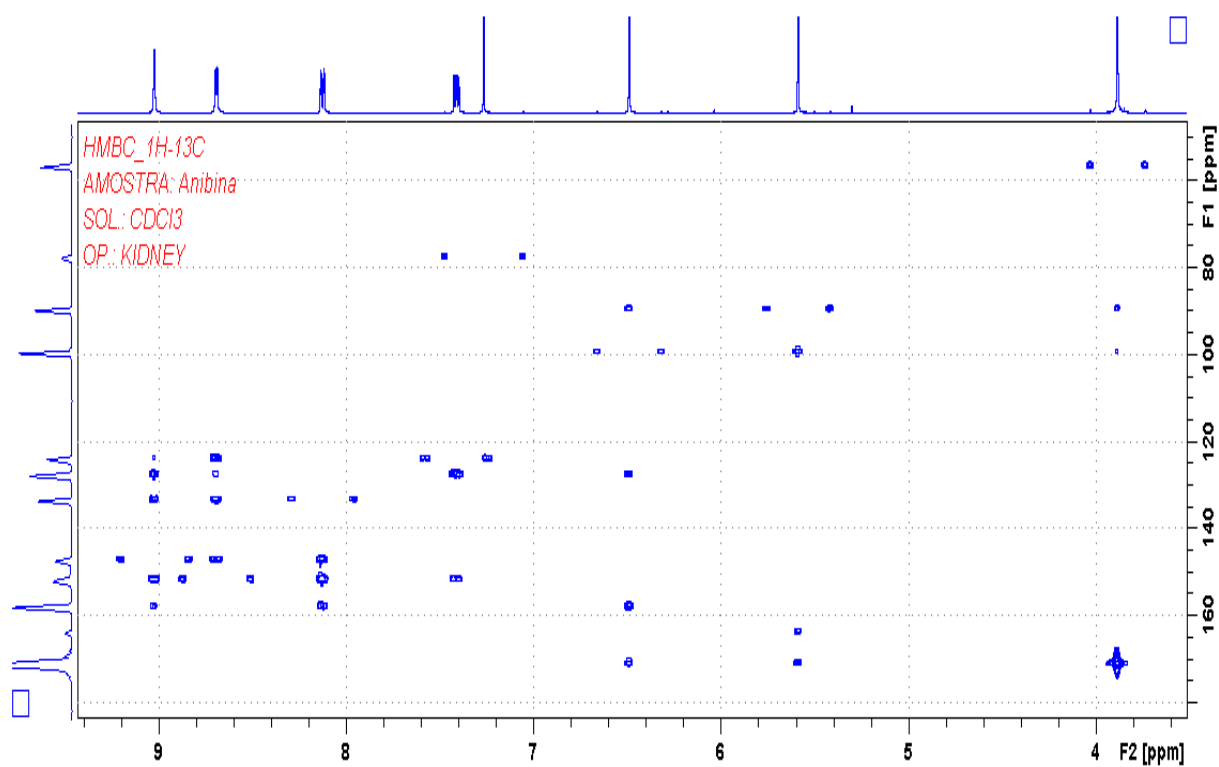
vi. Mapa de contornos de HMBC da substância 3.



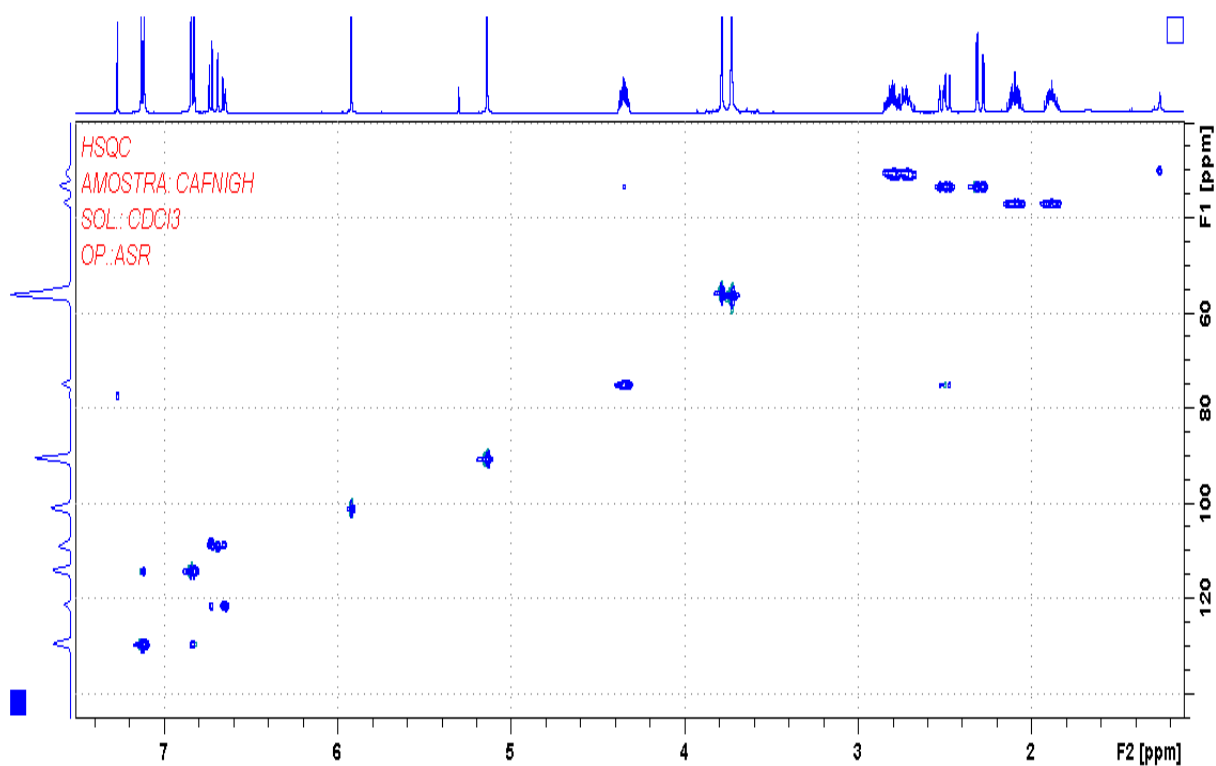
vii. Mapa de contornos de HSQC da substância 4.



viii. Mapa de contornos de HMBC da substância 4.



ix. Mapa de contornos de HSQC da mistura das substâncias 5 e 6.



x. Mapa de contornos de HMBC da mistura das substâncias 5 e 6.

