

SANDRA MARIA WARUMBY ZANIN

**ALCALÓIDES APORFINÓIDES EM MUDAS DE *Ocotea puberula*
(Reich.) Nees (LAURACEAE)**

Tese apresentada como requisito parcial à
obtenção do grau de Doutor em Química,
Programa de Pós-Graduação em Química,
Setor de Ciências Exatas, Universidade
Federal do Paraná.

Orientadora: Prof. Dra. Ana Luisa L. Lordello

**CURITIBA
2006**

“A SABEDORIA E A LOUCURA”

Melhor é a boa fama do que o unguento precioso, e o dia da morte melhor do que o dia do nascimento.

Melhor é ir à casa onde há luto do que ir à casa onde há banquete, pois naquela se vê o fim de todos os homens e os vivos que o tomem em consideração.

Melhor é a mágoa que o riso, porque com a tristeza do rosto se faz melhor o coração.

O coração dos sábios está na casa do luto, mas o dos insensatos, na casa da alegria.

Melhor é ouvir a repreensão do sábio do que ouvir a canção do insensato.

Melhor é o fim das coisas do que o seu princípio; melhor é o paciente do que o arrogante.

Lança o teu pão sobre as águas, porque depois de muitos dias o acharás.

Quem somente observa o vento nunca semeará, e o que olha para as nuvens nunca segará.

Semeia pela manhã a tua semente e à tarde não repouses a mão, porque não sabes qual prosperará; se esta, se aquela ou se ambas igualmente serão boas.

Demais, filho meu, atenta: não há limite para fazer livros, e o muito estudar é enfado da carne.

De tudo o que se tem ouvido, a suma é: teme a Deus e guarda os seus mandamentos; porque isto é o dever de todo homem.

Porque Deus há de trazer a juízo todas as obras, até as que estão escondidas, quer sejam boas, quer sejam más.

Eclesiastes
Bíblia Sagrada

AGRADECIMENTOS

Dedico este trabalho aos meus queridos

Pedro, Rafael e Daniel Zanin

Teresa Cristina Warumby Lins e Clóvis Lins Sobrinho

Marilis Dallarmi Miguel e Obdúlio Gomes Miguel

Ana Luísa Lacava Lordello, Beatriz Helena L. Noronha Sales Maia e

Jaísa Fernandes Soares

Carlos Eduardo Delay, Audrey Cercal e Jessé Lagos

Neuza Lopes Constanti

Agradeço

À Universidade Federal do Paraná, em especial à Coordenação e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Química, pelo esforço e dedicação sempre presentes.

Laboratório Catarinense

Osmael Portela

Andersson Barison

João Luiz de Souza Carvalho

Denis Jeison Gulin

Marcelino Câmara

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	xi
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	xiii
RESUMO	xvi
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	01
1.1 Considerações sobre a família Lauraceae	02
1.2 Considerações sobre o gênero <i>Ocotea</i>	02
1.2.1 Alcalóides aporfinóides identificados em espécies do gênero <i>Ocotea</i>	02
1.2.2 Rota biossintética dos alcalóides aporfinóides	07
1.3 Considerações sobre <i>Ocotea puberula</i>	09
1.3.1 Ocorrência natural	09
1.3.2 Nomes populares	10
1.3.3 Características morfológicas e utilidade	10
1.3.4 Usos na medicina popular	12
1.3.5 Usos comprovados por testes clínicos	12
1.3.6 Principais pragas, doenças e espécies afins	12
1.3.7 Constituintes alcaloídicos presentes em <i>Ocotea puberula</i>	13
2 OBJETIVOS	14
2.1 OBJETIVO GERAL	14
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3 MATERIAL	14
3.1 Material vegetal	14
3.2 Produtos químicos e equipamentos	14
4 MÉTODOS	15
4.1 MÉTODOS EXTRATIVOS	15
4.1.1 Escolha de métodos extrativos	15
4.1.1.1 Maceração com MeOH à frio	15
4.1.1.2 Maceração com EtOH à frio	16

4.1.1.3	Extração a quente em aparelho de Soxhlet convencional com solventes EP, DCM e MeOH	17
4.1.1.4	Extração a quente em aparelho de Soxhlet convencional com MeOH	17
4.1.2	OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PADRÕES DE ALCALÓIDES APORFINÓIDES EM FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS	18
4.1.2.1	Método de obtenção do extrato bruto por maceração de folhas de espécimens adultos de <i>Ocotea puberula</i>	18
4.1.2.2	Método de obtenção de extrato alcaloídico bruto de folhas de espécimens adultos de <i>Ocotea puberula</i>	18
4.1.3	Fracionamento cromatográfico do extrato alcaloídico bruto de folhas adultas de <i>Ocotea puberula</i> e isolamento de padrões de alcalóides	18
4.1.4	Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para análise de padrões de alcalóides isolados	23
4.1.4.1	Curva de Calibração	24
4.1.4.2	Quantificação dos padrões por CLAE	25
4.2	OBTENÇÃO DE MUDAS DE <i>Ocotea puberula</i> DE SEMENTES DO MUNICÍPIO DE IRATI / PR	26
4.2.1	Obtenção de mudas de <i>Ocotea puberula</i>	26
4.2.2	Coleta e triagem de frutos de <i>Ocotea puberula</i>	26
4.2.3	Tratamento de sementes e germinação	27
4.2.4	Substrato e recipiente no viveiro	28
4.2.5	Coleta e beneficiamento de mudas de <i>Ocotea puberula</i>	30
4.3	MONITORAMENTO DE ALCALÓIDES APORFINÓIDES EM MUDAS DE <i>O. puberula</i> ATÉ 1 ANO DE IDADE	30
4.3.1	Método de obtenção dos extratos brutos e alcaloídicos de folhas, caules e raízes de mudas de <i>Ocotea puberula</i>	30
4.3.1.1	Material vegetal	31
4.3.1.2	Métodos extrativos	31
4.3.1.3	Diluições dos extratos alcaloídicos de folhas, caules e raízes de mudas para análise por CLAE	31

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 MÉTODOS EXTRATIVOS	32
5.1.1 Escolha dos métodos extrativos	33
5.1.1.1 Método de cálculo de boldina em µg/g de folhas secas	34
5.1.1.2 Resultados dos métodos de extração avaliados por CLAE	34
5.1.2 PROCESSO EXTRATIVO PARA OBTENÇÃO DE PADRÕES DE FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS DE <i>Ocotea puberula</i>	36
5.1.2.1 Processo extrativo por maceração de folhas para obtenção de extrato bruto	36
5.1.2.2 Processo extrativo à quente para obtenção do extrato alcaloídico bruto em extrator de Soxhlet modificado	37
5.1.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES APORFINÓIDES ISOLADOS DE FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS DE <i>Ocotea puberula</i>	37
5.1.3.1 Fracionamento e isolamento de alcalóides	37
5.1.3.2 Identificação da fração FA3	37
5.1.3.3 Identificação da fração FB	41
5.1.3.4 Identificação da fração FC	45
5.2 AVALIAÇÃO DAS MUDAS DE <i>Ocotea puberula</i> OBTIDAS EM VIVEIRO	49
5.2.1 Características de lote e germinação de sementes	49
5.2.2 Desenvolvimento de mudas em viveiro	49
5.3 MÉTODOS EXTRATIVOS PARA FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE MUDAS DE <i>Ocotea puberula</i>	52
5.3.1 Processo extrativo a quente em extrator de Soxhlet convencional para obtenção de extratos brutos	52
5.3.2 Processo extrativo a quente em extrator de Soxhlet modificado para obtenção de extratos alcaloídicos brutos	55
5.4 AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA POR CLAE PARA MONITORAMENTO DE ALCALÓIDES	55
5.4.1 Análise dos padrões de alcalóides por CLAE	57

5.5 MONITORAMENTO DOS PADRÕES POR CLAE NAS FRAÇÕES DE FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE MUDAS DE <i>Ocotea puberula</i> de 3, 6, 9 e 12 MESES DE IDADE	59
6 CONCLUSÃO	63
7 REFERÊNCIAS	65
ANEXO 1 AVALIAÇÃO DE MÉTODO E RENDIMENTOS EXTRATIVOS EM MUDAS DE <i>Ocotea puberula</i> DE SEMENTES DE ANTONINA / PR	70
ANEXO 2 DESENVOLVIMENTO E RENDIMENTO DE MATÉRIA SECA EM MUDAS DE <i>Ocotea puberula</i> DE SEMENTES DE ANTONINA/PR	74
ANEXO 3 FIGURAS DOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES FA3, FB e FC	76

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – POSIÇÕES DOS SUBSTITUINTES NAS ESTRUTURAS DOS ALCALÓIDES APORFINÓIDES IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Ocotea</i>	07
FIGURA 2 – ESQUEMA SUSCINTO DA BIOSÍNTESE DE ALCALÓIDES APORFINÓIDES	08
FIGURA 3 – VISTA DO CAPÃO ONDE FORAM SELECIONADAS MATRIZES DE <i>Ocotea puberula</i>	10
FIGURA 4 – ÁRVORE ADULTA DE <i>Ocotea puberula</i>	11
FIGURA 5 – FLORAÇÃO DE <i>Ocotea puberula</i>	11
FIGURA 6 – FRUTOS E SEMENTES DE <i>Ocotea puberula</i>	11
FIGURA 7 – MADEIRA DE <i>Ocotea puberula</i>	11
FIGURA 8 – FRUTOS DE <i>Ocotea puberula</i> ATACADOS POR FUNGOS	13
FIGURA 9 – SOXHLET MODIFICADO	16
FIGURA 10 – DETALHE DO SOXHLET MODIFICADO	16
FIGURA 11 – FLUXOGRAMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS DE <i>Ocotea puberula</i>	19
FIGURA 12 – FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA (F2) FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS DE <i>Ocotea puberula</i>	20
FIGURA 13 – INTERAÇÕES DE VAN DER WAALS ENTRE HEPTANOSULFONATO DE SÓDIO E COLUNA RP 18	23
FIGURA 14 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BOLDINA DE 3 PONTOS	25
FIGURA 15 – CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BOLDINA DE 7 PONTOS	25
FIGURA 16 – FRUTOS MADUROS DE <i>Ocotea puberula</i>	27
FIGURA 17 – SEMENTES EM GERBOX	28
FIGURA 18 – GERMINADOR	28
FIGURA 19 – CÂMARA DE GERMINAÇÃO	28
FIGURA 20 – SEMENTES GERMINADAS	28
FIGURA 21 – VISTA DO CANTEIRO DE MUDAS DE <i>Ocotea puberula</i>	29

FIGURA 22 –	VISTA DO CANTEIRO PROTEGIDO COM SOMBRITE .	29
FIGURA 23 –	MUDA DE <i>Ocotea puberula</i> COM 1 ANO DE IDADE	30
FIGURA 24 –	MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR MACERAÇÃO A FRIO COM MeOH	34
FIGURA 25 –	MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR MACERAÇÃO A FRIO COM MeOH E ALCALOÍDICO POR FUNIL DE SEPARAÇÃO	35
FIGURA 26 –	MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR MACERAÇÃO A FRIO COM EtOH E ALCALOÍDICO POR SOXHLET MODIFICADO	35
FIGURA 27 –	MÉTODO:EXTRATO BRUTO POR SOXHLET COM MeOH E ALCALOÍDICO POR SOXHLET MODIFICADO	35
FIGURA 28 –	MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR SOXHLET COM EP/ DCM / MeOH E ALCALOÍDICO POR SOXHLET MODIFICADO	36
FIGURA 29 –	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (400Mz, CDCl ₃) DE FA3 ..	77
FIGURA 30 –	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (100Mz, CDCl ₃) DE FA3 ..	78
FIGURA 31 –	AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HSQC DE FA3	79
FIGURA 32 –	AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FA3	80
FIGURA 33 –	AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FA3	81
FIGURA 34 –	AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FA3	82
FIGURA 35 –	AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FA3	83
FIGURA 36 –	AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (400Mz, CDCl ₃) DE FA3	84
FIGURA 37 –	AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FA3	85
FIGURA 38 –	AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (400Mz, CDCl ₃) DE FA3	86

FIGURA 39 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HSQC DE FA3	87
FIGURA 40 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FA3	88
FIGURA 41 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FA3	89
FIGURA 42 – AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400Mz, CDCl_3) DE FA3	90
FIGURA 43 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FA3	91
FIGURA 44 – AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400Mz, CDCl_3) DE FA3	92
FIGURA 45 – AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400Mz, CDCl_3) DE FA3	93
FIGURA 46 – ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400Mz, CDCl_3) DE FB	94
FIGURA 47 – ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C (100Mz, CDCl_3) DE FB ...	95
FIGURA 48 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HSQC DE FB	96
FIGURA 49 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FB	97
FIGURA 50 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FB	98
FIGURA 51 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FB	99
FIGURA 52 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FB	100
FIGURA 53 – AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400Mz, CDCl_3) DE FB	101
FIGURA 54 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FB	102
FIGURA 55 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HSQC DE FB	103
FIGURA 56 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FB	104
FIGURA 57 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FB	105
FIGURA 58 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FB	106
FIGURA 59 – AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400Mz, CDCl_3) DE FB	107
FIGURA 60 – AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ^1H (400Mz, CDCl_3) DE FB	108

FIGURA 61 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DE FB	109
FIGURA 62 – ESPECTRO DE RMN DE ¹ H (400Mz, CDCl ₃) DE FC	110
FIGURA 63 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HSQC DE FC	111
FIGURA 64 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HSQC DE FC	112
FIGURA 65 – AMPLIAÇÃO DE ESPECTRO DE RMN DE ¹ H DE FC	113
FIGURA 66 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HSQC DE FC	114
FIGURA 67 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HMBC DE FC	115
FIGURA 68 – AMPLIAÇÃO DO MAPA DE CONTORNO HSQC DE FC	116
FIGURA 69 – ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C (100Mz, CDCl ₃) DE FC	117
FIGURA 70 – ESPECTRO NO INFRAVERMELHO DA FRAÇÃO FC	118
FIGURA 71 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES UTILIZADOS POR CLAE	57
FIGURA 72 – PUREZA OBTIDA E TEMPO DE RETENÇÃO DO ALCALÓIDE FB	58
FIGURA 73 – PUREZA OBTIDA E TEMPO DE RETENÇÃO DO ALCALÓIDE FA3	58
FIGURA 74 – PUREZA OBTIDA E TEMPO DE RETENÇÃO DO ALCALÓIDE FC	59
FIGURA 75 – PADRÕES DE ALCALÓIDES EM FOLHAS DE MUDAS ATÉ 12 MESES DE IDADE	60
FIGURA 76 – PADRÕES DE ALCALÓIDES EM CAULES DE MUDAS ATÉ 12 MESES DE IDADE	61
FIGURA 77 – PADRÕES DE ALCALÓIDES EM RAÍZES DE MUDAS ATÉ 12 MESES DE IDADE	61
FIGURA 78 – DISTRIBUIÇÃO DOS ALCALÓIDES ACUMULADOS EM FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE MUDAS DE 03, 06, 09 E 12 MESES	62

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ALCALÓIDES APORFINÓIDES IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO <i>Ocotea</i> , FAMÍLIA LAURACEAE	4
TABELA 2 – FASES MÓVEIS UTILIZADAS NO FRACIONAMENTO PRELIMINAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE <i>Ocotea puberula</i>	19
TABELA 3 – GRADIENTE DE ELUIÇÃO DAS FASES MÓVEIS UTILIZADAS	24
TABELA 4 – RESULTADOS DOS PROCESSOS EXTRATIVOS EM FOLHAS DE PLANTAS ADULTAS ANALISADOS POR CLAE	33
TABELA 5 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DA FRAÇÃO FA3 COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A DICENTRINA E CORRELAÇÕES $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA	40
TABELA 6 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DA FRAÇÃO FB COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A ISODOMESTICINA E CORRELAÇÕES $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA	44
TABELA 7 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DA FRAÇÃO FC COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A LEUCOXINA E CORRELAÇÕES $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA	48
TABELA 8 – RESULTADO DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE IRATI / PR	50
TABELA 9 – RESULTADO DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ANTONINA / PR	50

TABELA 10 –	DESENVOLVIMENTO, QUANTIDADE UTILIZADA, COLETA E RENDIMENTO EM MATÉRIA SECA DE MUDAS DE <i>Ocotea puberula</i>	52
TABELA 11 –	RENDIMENTOS DE EXTRATOS BRUTOS DE MUDAS DE 3, 6, 9 E 12 MESES, DE SEMENTES PROVENIENTES DE IRATI/PR	54
TABELA 12 –	RENDIMENTOS DE EXTRATOS ALCALOÍDICOS BRUTOS DE FOLHAS, CAULES E RAÍZES DAS MUDAS EM PERCENTAGEM (%)	55
TABELA 13 –	AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE ALCALÓIDES USADOS COMO MARCADORES	57
TABELA 14 –	RENDIMENTOS DE PADRÕES OBTIDOS POR CLAE EM FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE MUDAS DE 3, 6, 9 E 12 MESES DE IDADE	60
TABELA 15 –	RENDIMENTO PERCENTUAL DE EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS COM EP, DCM E MEOH DE PARTES DE MUDAS	72
TABELA 16 –	RENDIMENTO DE EXTRATO ALCALOÍDICO BRUTO PROVENIENTE DOS EXTRATOS BRUTOS UNIFICADOS DE FOLHAS DE MUDAS DE 6 E 12 MESES DE IDADE	72
TABELA 17 –	DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE 6 E 12 MESES DE SEMENTES PROVENIENTES DE ANTONINA/PR ..	75
TABELA 18 –	RENDIMENTO DE MATÉRIA SECA DE PARTES DAS MUDAS DE 6 E 2 MESES DE SEMENTES DE ANTONINA/PR	75

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AcoEt	acetato de etila
HCl	ácido clorídrico
RP	coluna de fase reversa
C	carbono
C12	caules de mudas de 12 meses
C3	caules de mudas de 3 meses
C6	caules de mudas de 6 meses
C9	caules de mudas de 9 meses
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CHCl ₃	clorofórmio
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
<i>J</i>	constante de acoplamento
δ	deslocamento químico
d	dubleto
DAD	detecção por arranjo de diodos
DCM	diclorometano
dd	duplo dubleto
- CO ₂	descarboxilação – em esquemas
EM	espectrometria de massa
EP	éter de petróleo
<i>et al.</i>	e colaboradores
EtOH	etanol
F1...Fn	frações alcaloídicas
F12	folhas de mudas de 12 meses
F3	folhas de mudas de 3 meses
F6	folhas de mudas de 6 meses
F9	folhas de mudas de 9 meses
FA	folhas adultas

FA3	fração identificada como dicentrina
FB	fração alcaloídica identificada como isodomecicina
FC	fração alcaloídica identificada como leucoxina
FDCM1	fração diclorometano não alcaloídica
FDCM2	fração diclorometano alcaloídica
g	grama
°C	grau centígrado
°GL	graus Gay-Lussac
H	hidrogênio
NH ₄ OH	hidróxido de amônio
Hz	hertz
IV	infravermelho
IVG	índice de velocidade de germinação
kg	kg
®	marca registrada
µL	microlitro
µm	micrômetro
HMBC	mapa de contorno nuclear de longa distância
HSQC	mapa de contorno nuclear de curta distância
m	multipeto
mcg/mL	micrograma/mL
MeOH	metanol
min.	minuto
mL	mililitro
mM	milimol
N	normal
nm	nanômetro
[O]	oxidação - em esquemas
%	percentagem
pH	potencial hidrogeniônico
PLP	piridoxal 5' - fosfato
ppm	partes por milhão
R12	raízes de mudas de 12 meses

R3	raízes de mudas de 3 meses
R6	raízes de mudas de 6 meses
R9	raízes de mudas de 9 meses
RMN de ¹³ C	ressonância magnética nuclear de carbono
RMN de ¹ H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN	ressonância magnética nuclear
s	singleto
SAM	S – adenosil metionina
Si	sílica
t	triplete
TMS	tetrametilsilano
v/v	volume/volume

RESUMO

Este trabalho relata a presença de alcalóides aporfinóides em mudas de *Ocotea puberula* de 3, 6, 9 e 12 meses de idade. Os alcalóides aporfinícos *stricto sensu* dicentrina, isodomeesticina e leucoxina foram isolados da fração alcaloídica do extrato etanólico de folhas adultas de *Ocotea puberula* por técnicas cromatográficas usuais. Os alcalóides foram identificados por métodos espectroscópicos de IV e RMN em uma e duas dimensões. Os padrões de alcalóides foram analisados por CLAE, utilizando extratos alcaloídicos de folhas, caules e raízes de mudas e de folhas adultas. O método desenvolvido utilizou o pareamento iônico e heptanosulfonato de sódio em meio ácido na fase móvel. Os alcalóides foram quantificados utilizando o alcalóide boldina como padrão externo. Constatou-se que as mudas de *Ocotea puberula* de até 12 meses de idade acumulam os alcalóides estudados da mesma forma que as plantas adultas. No entanto, a concentração desses alcalóides é bastante diferente nos vários órgãos analisados. As folhas apresentaram a tendência de aumento do teor com a idade dentro do período analisado, porém esta tendência não se manteve contínua até a fase adulta pois o teor de alcalóides aporfinóides acumulados em folhas é significativamente maior em mudas que em espécimens adultos. As raízes apresentaram um pequeno aumento de concentração de alcalóides seguido de redução significativa, sugerindo uma possível translocação desses metabólitos para outros órgãos. Também está descrito neste trabalho todas as atividades necessárias para obtenção de mudas de *Ocotea puberula*, uma espécie nativa, em viveiro.

Palavras-chave: *Ocotea puberula*, mudas, Lauraceae, alcalóides aporfinícos, aporfinóides, CLAE, dicentrina, isodomeesticina, leucoxina, boldina.

ABSTRACT

This work describes the occurrence of aporphinoids alkaloids in seedlings of *Ocotea puberula* with 3, 6, 9 and 12 months old. The aporphinoids alkaloids *stricto sensu* dicentrine, leucoxine and isodomeesticine were isolated by chromatographic techniques from alkaloid fraction of the ethanolic extract of *Ocotea puberula* leaves. The isolated alkaloids were identified by IR and one and two – dimensional NMR techniques. These standards alkaloids were determined by HPLC using alkaloid extracts of leaves, stems and roots of seedlings and adult leaves. The method was developed by ion pair chromatography with sodium heptanosulphonate in acidic mobile phase. The alkaloids were quantified using boldine as external standard. It was observed that *Ocotea puberula* seedlings, up to 12 months old, accumulated the studied alkaloids in the same way as the adult plants. The concentration levels, however, are far different in each organ analyzed. The leaves presented a tendency to increase this accumulation over the experimental time, but this tendency was not continuous until the adult phase since aporphinoids alkaloids levels were significantly higher in seedlings than in adult ones. The roots showed a slight increase in the alkaloids concentrations followed by a significant decrease, suggesting a possible translocation of these metabolites to other organs. It is also described in this work all the activities needed to cultivate *Ocotea puberula*, a native specie in a seedling-nursery.

Key-words: *Ocotea puberula*, seedlings, Lauraceae, aporphine alkaloids, aporphinoids, HPLC technique, dicentrine, isodomeesticine, leucoxine, boldine.

1. INTRODUÇÃO

Os organismos variam largamente na sua capacidade de produzir e transformar substâncias essenciais ao seu desenvolvimento e sobrevivência. Estes processos considerados essenciais à vida são descritos de maneira geral como metabolismo primário e os componentes envolvidos de metabólitos primários. Polissacarídeos, açúcares, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos fazem parte do metabolismo primário dos mesmos (DEWICK, 2002; VERPOORTE e MEMELINK, 2002; SANTOS *in* SIMÕES, 1999).

Por sua vez, as plantas produzem e armazenam uma grande variedade de substâncias em suas folhas, caules, raízes, flores e sementes, chamados de metabólitos secundários. Estes produtos, embora não necessariamente essenciais para o organismo produtor, tem um papel importante na sobrevivência destas plantas em seu ecossistema. Uma característica bastante importante de muitos metabólitos secundários é a sua distribuição relativamente restrita na natureza, que em alguns casos se limita a espécies ou subespécies únicas e são uma expressão de sua individualidade. Como resultado, uma população de plantas naturais exibe uma quantidade grande de variações fenotípicas em seus metabólitos secundários (BRENES-ARGUEDAS e COLEY, 2005; DEWICK, 2002; MALHEIROS e PERES, 2001; SANTOS *in* SIMÕES, 1999).

Os metabólitos secundários por serem fatores de interação entre organismos, frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes. Algumas são facilmente percebidas, tais como defesa contra predadores, resistência contra pragas e doenças, atração de polinizadores, interação com microorganismos simbióticos, atrativos voláteis relacionados com a mesma ou outras espécies (DEWICK, 2002; VERPOORTE *et al.*, 2002; SANTOS *in* SIMÕES, 1999). Muitos são de importância comercial tanto na área farmacêutica quanto nas áreas alimentar, agrônômica e perfumaria, entre outras (SANTOS *in* SIMÕES 1999).

Dentre os metabólitos secundários, os alcalóides, geralmente definidos como moléculas naturais contendo nitrogênio, independentemente do seu caráter básico, são abundantes nas plantas e representam uma das classes mais difundidas de compostos dotados com propriedades farmacológicas múltiplas e variadas. Entre os alcalóides, os aporfinóides constituem um grande subgrupo de compostos benzilisoquinólicos, com mais de 500 alcalóides isolados até o momento. Eles são

amplamente distribuídos em um grande número de famílias de plantas incluindo Annonaceae, Lauraceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Hernandiaceae, Ranunculaceae, apenas para citar algumas (STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN - LECLERCQ, 2005; JIA *et al.*, 2000).

1.1 Considerações sobre a família Lauraceae

A família Lauraceae consiste de 30 a 50 gêneros, dependendo do autor, e cerca de 2000 ou mais espécies distribuídas em regiões tropicais e sub-tropicais ao redor do mundo. Os dois maiores centros para o grupo estão a sudeste da Ásia e no Brasil. Cerca de dois terços das espécies pertencem a somente 6 gêneros: *Ocotea* (400+), *Litsea* (250+), *Persea* (200), *Cinnamomum* (200), *Cryptocaria* (200), e *Beilschmiedia* (150), (CRONQUIST, 1981). Das cerca de 2000 espécies, 390 são encontradas no Brasil, contribuindo assim com cerca de 20% do total mundial dessas espécies (SHEPHERD, 2000).

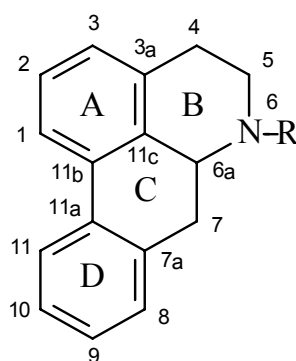
1.2 Considerações sobre o gênero *Ocotea*

O gênero *Ocotea* tem despertado o interesse dos fitoquímicos brasileiros devido a sua ampla distribuição no território nacional e ao fato de algumas de suas espécies serem muito apreciadas no comércio madeireiro devido ao alto valor de sua madeira (RIZZINI e MORS, 1995; INOUE, RODERJAN e KUNIYOSHI, 1984). Através de um levantamento preliminar nas várias reservas florestais no Estado do Paraná foi possível constatar a existência de várias espécies do gênero *Ocotea*, dentre elas a canela-preta, *Ocotea catharinensis* Mez. (CARVALHO, 2003; INOUE RODERJAN e KUNIYOSHI, 1984), a canela-sassafrás, *Ocotea odorifera* (Vellozo) também chamada *Ocotea pretiosa* (Nees) Mez (CARVALHO, 2003), a canela lageana, *Ocotea pulchella* Martius, a imbuia, *Ocotea porosa* (Nees) Liberato Barroso e a canela-guaicá, *Ocotea puberula* (INOUE, RODERJAN e KUNIYOSHI, 1984).

1.2.1 Alcalóides aporfinóides identificados em espécies do gênero *Ocotea*.

Desde 1975, poucas revisões sobre as estruturas químicas, dados espectrais, fontes botânicas e atividades farmacológicas foram publicadas sobre os aporfinóides. Os autores GUINAUDEAU, LEBOUF e CAVÉ nos anos de 1975, 1979, 1983, 1988 e 1994 merecem destaque pela compilação de informações e

acompanhamento dos progressos nos estudos destes alcalóides. Os alcalóides aporfínóides incluem os aporfínicos (*stricto sensu*) e os alcalóides biogeneticamente relacionados ou aporfínicos *lato sensu*, como os proaporfínicos e os derivados do catabolismo, os oxoaporfínicos e também os fenantrenos que são os produtos de degradação mais comuns para estes compostos. As formas diméricas e os desidroaporfínicos, caracterizados por uma insaturação adicional no carbono 6a, estão incluídos neste grupo (STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN - LECLERCQ, 2005). Quimicamente falando, os aporfínicos (*stricto sensu*) são bases tetracíclicas formadas por ligação direta dos anéis aromáticos A e D dos núcleos benzilisoquinolínicos típicos (1). O átomo de nitrogênio na posição 6 é normalmente terciário na forma básica mas, pode também ser quaternário, menos frequentemente acetilado ou formilado. Compostos N-óxidos também foram descritos. O alcalóide é chamado noraporfínico quando o nitrogênio é secundário. Nos aporfínicos naturais, as posições 1 e 2 são normalmente substituídas por grupos hidroxila, metoxila ou metilenodioxílico. O núcleo tetracíclico pode ser substituído em diferentes locais, nas posições 9, 10 e 11 e menos frequentemente nas posições 3 e 8, e em uns poucos casos, a posição 7 (ou 4) é oxigenada. Os aporfínicos são opticamente ativos, possuindo tanto a configuração absoluta R(-) ou S(+), dependendo da estereoquímica do carbono 6a (STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN - LECLERCQ, 2005).



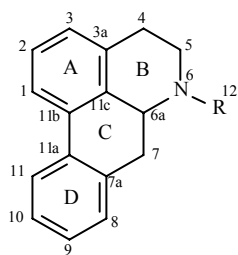
(1)

A Tabela 1 e a Figura 1 apresentam um levantamento bibliográfico de alcalóides aporfínóides isolados e identificados em diversas espécies do gênero *Ocotea* (ZANIN e LORDELLO, 2007).

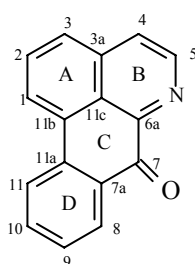
TABELA 1 – ALCALÓIDES APORFINÓIDES IDENTIFICADOS EM ESPÉCIES DO GÊNERO *Ocotea*, FAMÍLIA LAURACEAE

ALCALÓIDE	NUMERAÇÃO	ESPÉCIE ISOLADA	REFERÊNCIA GÊNERO/ESPÉCIE
Alcalóide aporfínico <i>stricto sensu</i> (estruturas 01 a 39)			
caaverina	1	<i>O. glaziovii</i>	Gilbert <i>et al</i> 1964
asimilobina	2	<i>O. glaziovii</i>	Gilbert <i>et al</i> 1964
laureliptina	3	<i>O. caesia</i>	Vilegas <i>et al.</i> 1989
nordomesticina	4	<i>O. sinuata</i>	Castro 1993
zenquerina	5	<i>O. caesia</i>	Vilegas <i>et al.</i> 1989
lirinidina	6	<i>O. glaziovii</i>	Gilbert <i>et al</i> 1964
apoglaziovina	7	<i>O. variabilis</i>	Cava , Behrforous e Mitchell, 1972
variabilina	8	<i>O. variabilis</i>	Cava , Behrforous e Mitchell, 1972
taliporfina	9	<i>Ocotea sp</i>	Guinadeau <i>et al.</i> 1983
predicentrina	10	<i>O. brachybotra</i>	Vecchietti, Casagrande e Ferrari, 1977
		<i>O. macropoda</i>	Cava e Venkateswarlu, 1971
		<i>O. minarum</i>	Vecchietti <i>et al.</i> 1979
		<i>O. vellosiana</i>	Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
		<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000
glaucina	11	<i>O. macrophylla</i>	Franca <i>et al.</i> 1975
		<i>O. vellosiana</i>	Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
nantenina	12	<i>O. macrophylla</i>	Franca <i>et al.</i> 1975
		<i>O. variabilis</i>	Cava , Behrforous e Mitchell, 1972
cassiticina	13	<i>O. brachybotra</i>	Vecchietti, Casagrande e Ferrari, 1977
dicentrina	14	<i>O. macropoda</i>	Cava <i>et al.</i> 1968
		<i>O. minarum</i>	Vecchietti <i>et al.</i> 1979
		<i>O. leucoxydon</i>	Zhou <i>et al.</i> 2000
		<i>O. brachybotra</i>	Vecchietti, Casagrande e Ferrari, 1977
		<i>O. vellosiana</i>	Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
		<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000
N-metillaurotetanina	15	<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000
isodomesticina	16	<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000
N-óxido dicentrina	17	<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000
coridina	18	<i>O. vellosiana</i>	Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
isocoridina	19	<i>Ocotea sp</i>	Cava <i>et al.</i> 1968
		<i>O. macrophylla</i>	Franca <i>et al.</i> 1975
		<i>O. vellosiana</i>	Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
		<i>O. boldridgeiana</i>	Guinaudeau, Leboeuf e Cavé 1994
		<i>O. brenesii</i>	Lopes <i>et al.</i> 1996
O,O-dimetil corituberina	20	<i>O. boldridgeiana</i>	Castro, 1993
oconovina	21	<i>Ocotea sp</i>	Cava <i>et al.</i> 1968
ococriptina	22	<i>Ocotea sp</i>	Cava <i>et al.</i> 1968
3-hidroxinuciferina	23	<i>O. boldridgeiana</i>	Guinaudeau, Leboeuf e Cavé 1994
		<i>O. brenesii</i>	Lopes <i>et al.</i> 1996
3-methoxy nuciferina	24	<i>O. boldridgeiana</i>	Guinaudeau, Leboeuf e Cavé 1994
isooconovina	25	<i>O. minarum</i>	Vecchietti <i>et al.</i> 1979
pulcina	26	<i>O. caesia</i>	Vilegas <i>et al.</i> 1989
ocoteina	27	<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000; Cava <i>et al.</i> 1968 , Baralle <i>et al.</i> 1973
		<i>O. minarum</i>	Vecchietti <i>et al.</i> 1979
		<i>O. vellosiana</i>	Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
ocopodina	28	<i>O. macropoda</i>	Cava e Venkateswarlu, 1971;, Cava <i>et al.</i> 1968
		<i>O. brachybotra</i>	Vecchietti, Casagrande e Ferrari, 1977
		<i>O. minarum</i>	Vecchietti <i>et al.</i> 1979
		<i>O. vellosiana</i>	Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
leucoxina	29	<i>O. brachybotra</i>	Vecchietti, Casagrande e Ferrari, 1977
		<i>O. minarum</i>	Vecchietti <i>et al.</i> 1979
		<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000
ocoxilonina	30	<i>Ocotea sp</i>	Guinadeau, Leboeuf e Cavé, 1979

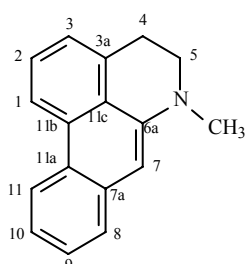
leucoxilonina	31	<i>O. minarum</i> <i>O. vellosiana</i> <i>O. leucoxylon</i>	Vecchiatti <i>et al.</i> 1979 Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995 Zhou, 2000
ocominarina	32	<i>O. minarum</i> <i>O. vellosiana</i>	Vecchiatti <i>et al.</i> 1979 Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
ocotominarina	33	<i>O. minarum</i> <i>O. vellosiana</i>	Vecchiatti <i>et al.</i> 1979 Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
talbaicalidina	34	<i>O. bucherii</i>	Guinaudeau, Leboeuf e Cavé 1988
isoboldina	35	<i>O. caesia</i>	Vilegas <i>et al.</i> 1989
norleucoxilonina	36	<i>O. minarum</i>	Vecchiatti <i>et al.</i> 1979
nororientina	37	<i>O. caesia</i>	Vilegas <i>et al.</i> 1989
nordicentrina	38	<i>O. macropoda</i>	Cava e Venkateswarlu, 1971
O-metilcassifilina	39	<i>O. vellosiana</i>	Garcez, Yoshida e Gottlieb, 1995
Alcalóide oxoaporfínico (estruturas 40 a 43)			
dicentrinona	40	<i>O. minarum</i> <i>O. leucoxylon</i> <i>O. macropoda</i>	Vecchiatti <i>et al.</i> 1979 Zhou, 2000 Cava e Venkateswarlu, 1971
hernandonina	41	<i>Ocotea sp</i>	Guinaudeau, Leboeuf e Cavé, 1975
talicminina	42	<i>O. puberula</i> <i>O. minarum</i>	Baralle <i>et al.</i> 1973 Vecchiatti <i>et al.</i> 1979
ocominarona	43	<i>O. minarum</i>	Vecchiatti <i>et al.</i> 1979
Alcalóide desidroaporfínico (6a , 7-diidroaporfínico) (estruturas 44 a 48)			
deidronantenina	44	<i>O. macrophylla</i>	Franca <i>et al.</i> 1975
deidrodicentrina	45	<i>O. macropoda</i>	Cava e Venkateswarlu, 1971; Cava <i>et al.</i> 1968
deidroocoteína	46	<i>O. puberula</i>	Baralle <i>et al.</i> 1973; Baralle <i>et al.</i> 1972
deidroocopodina	47	<i>O. macropoda</i>	Cava e Venkateswarlu, 1971
3-hidroxi-6a,7- diidronuciferina	48	<i>O. brenesii</i>	Lopes <i>et al.</i> 1996
Alcalóide didesidroaporfínico (estrutura 49)			
dideidroocoteína	49	<i>O. puberula</i>	Baralle <i>et al.</i> 1973; Baralle <i>et al.</i> 1972
Alcalóide C-3-O-aporfínico (estrutura 50)			
3-hidroxidicentrina	50	<i>O. puberula</i>	Araujo, 2000
Alcalóide C-4-O-aporfínico (estrutura 51)			
4- hidroxidicentrina	51	<i>O. minarum</i>	Vecchiatti <i>et al.</i> 1979
Alcalóide fenantreno (estruturas 52 a 53)			
talictuberina	52	<i>O. insularis</i>	Guinaudeau, Leboeuf e Cavé 1994
3-O-dimetil talictuberina	53	<i>O. insularis</i>	Guinaudeau, Leboeuf e Cavé 1994
Alcalóide proaporfínico (estrutura 54)			
glaziovina	54	<i>O. glaziovii</i> <i>O. variabilis</i> <i>O. brachybotra</i>	Cava <i>et al.</i> 1968 Cava, Behforouz e Mitchell, 1972 Vecchiatti, Casagrande e Ferrari, 1977



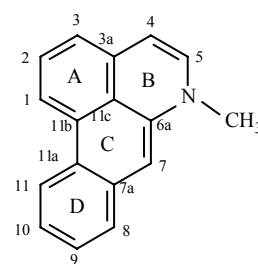
Aporfino stricto sensu
01 – 39



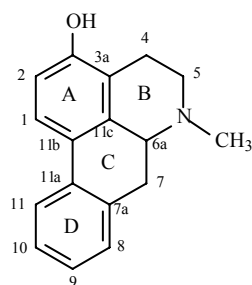
Oxoaporfino
40 - 43



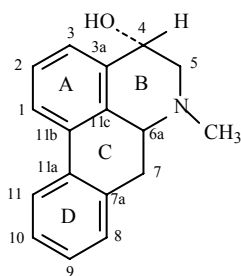
Desidroaporfino
44 - 48



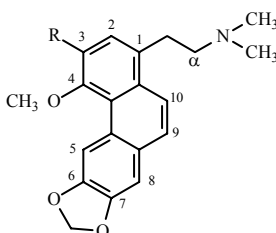
Didesidroaporfino
49



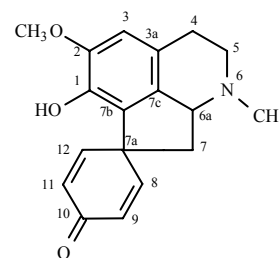
C-3-O-aporfino
50



C-4-O-aporfino
51



Fenantreno
52 - R = OCH₃
53 - R = OH



Proaporfino
54

Posição/ Alcalóide	1	2	3	8	9	10	11	12
1	OH	OCH ₃	H	H	H	H	H	H
2	OCH ₃	OH	H	H	H	H	H	H
3	OH	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H	H
4	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₂ O	H	H
5	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	H
6	OH	OCH ₃	H	H	H	H	H	CH ₃
7	OH	OCH ₃	H	H	H	OH	H	CH ₃
8	OH	OCH ₃	H	H	H	H	H	CH ₃
9	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
10	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
11	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
12	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₂ O	H	CH ₃
13		OCH ₂ O	H	H	OH	OCH ₃	H	CH ₃
14		OCH ₂ O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
15	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H	CH ₃
16	OCH ₃	OH	H	H	H	OCH ₂ O	H	CH ₃
17		OCH ₂ O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	NOCH ₃
18	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃
19	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OH	CH ₃
20	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃
21	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OH	CH ₃
22	OCH ₃	OCH ₂ O	H	H	H	OCH ₃	OH	CH ₃
23	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	H	H	CH ₃
24	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H	CH ₃
25	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	CH ₃
26	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	H	CH ₃
27		OCH ₂ O	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
28		OCH ₂ O	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
29		OCH ₂ O	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
30		OCH ₂ O	OCH ₃	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
31		OCH ₂ O	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
32		OCH ₂ O	H	OCH ₂ O	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
33		OCH ₂ O	OCH ₃	OCH ₂ O	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
34	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
35	OH	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H	CH ₃
36		OCH ₂ O	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H
37	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	H	H	H

38	OCH ₂ O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
39	OCH ₂ O	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H
40	OCH ₂ O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	-
41	OCH ₂ O	H	H	H	OCH ₂ O	-	-
42	OCH ₂ O	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	-
43	OCH ₂ O	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	-
44	OCH ₃ OCH ₃	H	H	OCH ₂ O	-	H	CH ₃
45	OCH ₂ O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
46	OCH ₂ O	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
47	OCH ₂ O	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
48	OCH ₃ OCH ₃	OH	H	H	H	H	CH ₃
49	OCH ₂ O	OCH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
50	OCH ₂ O	OH	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃
51	OCH ₂ O	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	CH ₃

FIGURA 1 – POSIÇÕES DOS SUBSTITUINTES NAS ESTRUTURAS DOS ALCALÓIDES APORFINÓIDES IDENTIFICADOS NO GÊNERO *Ocotea*

1.2.2 Rota biossintética dos alcalóides aporfinóides

As moléculas dos produtos naturais são biossintetizadas por uma sequência de reações, as quais, com muito poucas exceções são catalisadas por enzimas. Em muitos casos, um co-fator apropriado pode também participar na transformação. Algumas destas reações são estereoespecíficas. Entre as reações importantes freqüentemente encontradas nestes processos estão as reações de alquilação, transaminação, descarboxilação, oxidação e redução. A rota biossintética, a partir do aminoácido L-tirosina para os alcalóides aporfinóides está mostrado na Figura 2 (DEWICK, 2002).

Embora duas moléculas de tirosina sejam usadas na rota biossintética, somente o fragmento feniletilamina do sistema anelar tetraidroisoquinolínico é formado via DOPA (diidroxifenilalanina), os carbonos remanescentes provém da tirosina via ácido 4 - hidroxifenilpirúvico e 4 - hidroxifenilacetaldeído. O produto da reação do tipo Mannich é então o alcalóide triidroxilado norcoclaurina, formado estereoespecificamente como o enantiômero – (S). O passo da O – metilação da (S) – norcoclaurina fornece a (S) – coclaurina que, posteriormente por N – metilação, fornece a (S) - N – metilcoclaurina. Após estas etapas, o anel benzílico é hidroxilado formando o modelo de substituição tetraidroxílico (DEWICK, 2002).

Em artigo de STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN – LECLERCQ (2005), sobre a biossíntese dos alcalóides aporfínicos, a (S) – reticulina também é citada como precursora da maioria dos alcalóides isoquinolínicos. Este derivado tetraidroisoquinolínico se forma a partir de duas unidades de tirosina. A condensação destas duas unidades, catalizada pela (S) – norcoclaurina sintetase, origina a (S) – (+) – norcoclaurina. Os aporfínicos são formados nas plantas por

acoplamento oxidativo intramolecular direto da (*S*) – reticulina, *orto* ao grupo fenólico no tetraidroisoquinolínico e *para* ao fenol do substituinte benzílico ou através de acoplamento oxidativo intramolecular *orto* – *orto*, a partir da forma radical bisdienona.

DEWICK (2002) cita que a mudança na configuração é alcançada posteriormente à formação do isômero - (*S*) por um processo de oxidação – redução e do íon intermediário desidroreticulíno.

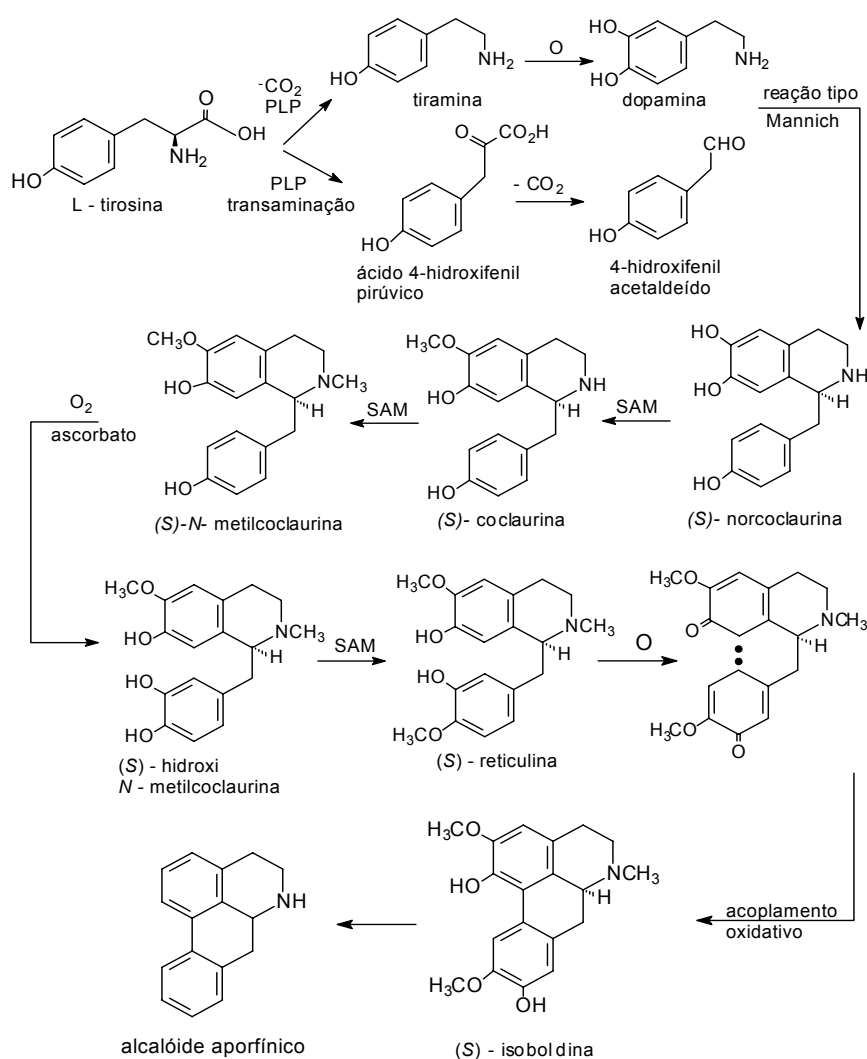


FIGURA 2 – ESQUEMA SUSCITADO DA BIOSÍNTESE DE ALCALÓIDES APORFÍNICOS (DEWICK, 2002)

1.3 Considerações sobre *Ocotea puberula*

Das 37 espécies selecionadas como prioritárias para reflorestamento no Paraná, cinco são pertencentes ao gênero *Ocotea*, sendo a *Ocotea puberula* uma delas. Devido a seu rápido crescimento, tronco reto e vitalidade, torna-se uma das poucas espécies nativas com amplas possibilidades de reflorestamento (INOUE, RODERJAN e KUNIYOSHI, 1984).

De acordo com o Sistema de Classificação de CRONQUIST (1981), a taxonomia de *Ocotea puberula* obedece à seguinte hierarquia: divisão Magnoliophyta (Angiospermae), classe Magnoliopsida (Dicotyledonae), sub-classe Magnoliidae, ordem Laurales, família Lauraceae, gênero e espécie *Ocotea puberula* (Nees et Martius) Nees, Syst. Laurin. 472, 1836. A sinonímia botânica é *Laurus puberula* Rich., *Oreodaphne martiniana* Nees, *Ocotea martiniana* (Nees) Mez, *Ocotea pyramidata* S.F. Blake ex Bradegee e *Strychnodaphne puberula* (Rich.) Nees & Mart (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2002).

1.3.1 Ocorrência natural

Planta heliófita, indiferente às condições físicas do solo, e uma das plantas pioneiras mais comuns do Planalto Meridional ou Planalto Sul-Brasileiro. Invade capoeiras e capoeirões (Figura 3), chegando a dominar um determinado estágio da sucessão secundária. Ocorre também em clareiras de matas e matas abertas. É rara no interior da floresta primária densa, inalterada (LORENZI, 2002). Ocorre de forma natural no norte e no nordeste da Argentina, no sul da Bolívia e no leste do Paraguai. No Brasil esta espécie ocorre nos estados da Bahia, Espírito Santo, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal. Esta espécie invade clareiras na floresta primária, ou em matas exploradas. Chega a dominar em determinadas formações secundárias. Em Misiones, Argentina, a *Ocotea puberula* é uma das poucas espécies que regeneram naturalmente em pastos abandonados. A canela-guaicá é encontrada principalmente na Floresta Ombrófila Mista ou Floresta de Araucária (CARVALHO, 2003; KOCH e CORRÊA, 2002; VELOZO, 1992).



FIGURA 3 – VISTA DO CAPÃO ONDE FORAM SELECIONADAS AS MATRIZES DE *Ocotea puberula* – IRATI / PR

FONTE: ZANIN, 2003

1.3.2 Nomes populares

Alguns de seus nomes vulgares no Brasil são amansa-besta, louro-pimenta, louro-vermelho na Bahia; canela, no Rio Grande do Sul; canela-amarela, no Paraná e no Estado de São Paulo; canela-babosa, canela-branca, canela-de-corvo, canela-pinho, canelão, guaicazeiro e gaitaveiro, no Paraná; canela-guaicá, canela-guaica, em Santa Catarina; canela-parda, no Paraná, em Santa Catarina e no Estado de São Paulo; canela-pimenta e canelinha, no Estado de São Paulo; canela-preta, na Bahia e no Estado de São Paulo; canela-sebo, no Paraná, em Santa Catarina e no Estado de São Paulo; guaiacá; guaicá; louro-abacate. Seus nomes vulgares no exterior são aju'y guasu, no Paraguai, e laurel guaycá e guaica blanca, na Argentina. *Ocotea* é nome popular na Guiana; o termo *puberula* significa folhas sem pêlo (CARVALHO, 2003).

1.3.3 Características morfológicas e utilidade

A canela-guaicá é árvore perenifolia, com 10 a 15 m de altura e 20 a 60 cm de diâmetro, podendo atingir até 25 m de altura e 90 cm de diâmetro, na idade adulta (CARVALHO, 2003). O tronco é cilíndrico a irregular, reto a inclinado suave, fuste com até 12 m de comprimento. A ramificação é simpódica, dicotômica ou tricotômica. As folhas são subcoriáceas, de 10-12 cm de comprimento por 3-4 cm de largura e os frutos drupas elipsóides (LORENZI, 2002). Copa ampla, umbeliforme ou irregular, densifoliada e sempre verde (Figura 4). A floração (Figura 5) ocorre de maio a outubro e os frutos amadurecem de dezembro a fevereiro, no Paraná (Figura 6). A dispersão de frutos e sementes é zoocórica, principalmente por aves

(CARVALHO, 2003; CALDATO, VERA e DONAGH, 2003). A madeira da canela-guaicá (Figura 7) é leve, mole, baixa resistência mecânica, moderadamente resistente ao apodrecimento e ao ataque de organismos xilófagos. É indicada principalmente para construções internas e construção civil leve; também é usada em marcenaria e carpintaria, estrutura de móveis, caixas, móveis populares, portas, painéis, uso doméstico em geral, forro, tabuado, embalagem em geral, laminação, compensado de base para lâminas nobres e revestimento de interiores, celulose e papel, alimentação animal. A árvore pode ser empregada na arborização de ruas. Como espécie pioneira e produtora de grande quantidade de frutos muito apreciados por pássaros, não deve faltar nos plantios mistos de áreas degradadas de preservação permanente (CARVALHO, 2003; LORENZI, 2002; INOUE, RODERJAN e KUNIYOSHI, 1984).



FIGURA 4 – ÁRVORE ADULTA DE *Ocotea puberula*
FONTE: ZANIN, 2003



FIGURA 5 – FLORAÇÃO DE *Ocotea puberula*
FONTE: LORENZI, 2002

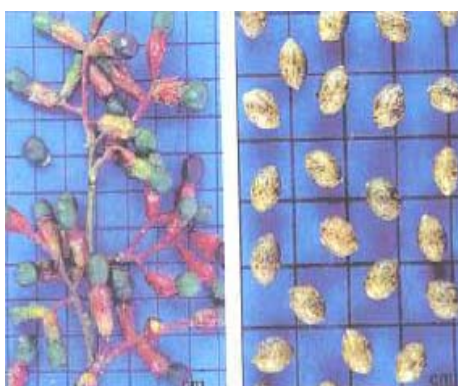


FIGURA 6 – FRUTOS E SEMENTES
DE *Ocotea puberula*
FONTE: LORENZI 2002



FIGURA 7 – MADEIRA DE *Ocotea puberula*
FONTE: LORENZI, 2002

1.3.4 Usos na medicina popular

Os usos medicinais relatados pelos índios de várias etnias do Paraná e de Santa Catarina usam a parte interna do caule (quanto mais velha melhor) e a casca do caule no tratamento de furúnculo (puxa, fura e acaba com a secreção). A seiva da casca dá um emplastro para puxar espinhos ou estrepes; o chá é usado no combate às diarreias e desinterias (CARVALHO, 2003; STEFANELLO, 1993).

1.3.5 Usos comprovados por testes clínicos

Vários alcalóides aporfinóides comumente encontrados no gênero *Ocotea* apresentam pronunciada bioatividade, como a nantenina, bloqueador de contração muscular, translocação de Ca^{+2} (RIBEIRO *et al.*, 2003); glaucina, citotóxica (HOET *et al.*, 2004); derivados halogenados da predicentrina, aumento da afinidade aos receptores dopaminérgicos D_1 (ASENCIO *et al.*, 2005); dicentrina, inibição da topoisomerase II (WOO *et al.*, 1999) e atividade citotóxica (*in vitro*) e antineoplásica (*in vivo*) foram avaliadas com células tumorais humanas. Este composto significativamente inibe o crescimento da linha celular de hepatoma humano HuH-7, como também a biossíntese de DNA e RNA (STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN-LECLERCQ, 2005; HUANG *et al.*, 1998); dicentrinona, inibição da topoisomerase I (ZHOU *et al.*, 2000); inclusive vários deles tendo sido alvo de patentes (JIA *et al.*, 2000).

1.3.6 Principais pragas, doenças e espécies afins

As principais pragas que atingem a espécie são o coleóptero cerambicídio *Oncideres* spp., serrador, com danos em plantas com até 10 cm de diâmetro e besouros da família Scolytidae. Entre as doenças que atacam a espécie destacam-se o fungo *Botryconis pallida*, onde os frutos são freqüentemente atacados na árvore (Figura 8), reduzindo consideravelmente a produção de sementes férteis. Em 1996, no viveiro da Embrapa Florestas, constatou-se forte ataque de podridão causado por fungo em mudas com apenas 9 meses de idade (CARVALHO, 2003).

Entre as espécies afins ocorrem cerca de 60 espécies do gênero *Ocotea* no Brasil, distribuídas principalmente no Sul e no Sudeste. Entre essas, podem ser destacadas *Ocotea porosa* ou imbuia e *Ocotea odorifera* ou canela-sassafrás com

ocorrência na mesma área de *Ocotea puberula* ou canela-guaicá (CARVALHO, 2003).



FIGURA 8 – FRUTOS DE *Ocotea puberula*
ATACADOS POR FUNGOS

FONTE: ZANIN, 2003

1.3.7 Constituintes alcaloídicos presentes em *Ocotea puberula*

Em trabalho de CAVA *et al.* (1968) é mencionado a presença da ocoteína, um alcalóide aporfínico *stricto sensu*, presente em *Ocotea puberula*. Os primeiros estudos fitoquímicos conduzidos em *Ocotea puberula* por BARALLE *et al.* (1972) descrevem a ocorrência de um alcalóide diidroaporfínico, a deidroocoteína e de um alcalóide dideidroaporfínico, a dideidroocoteína. Em trabalho posterior de BARALLE, SCHVARZBERG e VERNENGO (1973) foi isolado e identificado o alcalóide oxoaporfínico talicminina.

Em trabalho de ARAÚJO (2000) foi descrito o isolamento de alcalóides a partir do extrato alcaloídico de folhas de *Ocotea puberula* coletadas em Curitiba, Estado do Paraná, conduzindo ao isolamento dos alcalóides aporfínicos *stricto sensu* ocoteína, dicentrina, predicentrina, N-metil laurotetanina, isodomecicina e leucoxina, além de dois novos alcalóides aporfínoides, o alcalóide C-3-O-aporfínico 3-hidroxicentrina e o aporfínico *stricto sensu* N-óxido dicentrina, previamente obtido por síntese (GUINAUDEAU, LEBOEUF e CAVÉ, 1994).

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

. Monitorar alcalóides aporfinóides em mudas de *Ocotea puberula* em diferentes estágios de desenvolvimento até um 01 ano de idade.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

. Isolar e caracterizar quimicamente alcalóides aporfinóides como padrões de referência em folhas de espécimens adultos de *Ocotea puberula*.

. Desenvolver metodologia analítica em CLAE para monitoramento de alcalóides aporfinóides em extratos vegetais.

. Obter mudas de *Ocotea puberula* em viveiro até 01 ano de idade.

. Monitorar trimestralmente os alcalóides aporfinóides de folhas, caules e raízes de mudas de *Ocotea puberula* até 01 ano de idade.

3 MATERIAL

3.1 Material vegetal

Coletou-se, no mês de janeiro de 2003, folhas de espécimens adultas de *Ocotea puberula* de cinco matrizes identificadas e localizadas no Município de Irati – PR. As exsiccatas destas matrizes estão registradas no Museu Botânico de Curitiba sob números 301144, 301145, 301146, 301147 e 301148. As mudas de *Ocotea puberula* foram obtidas de sementes coletadas das mesmas matrizes identificadas.

3.2 Produtos químicos e equipamentos

Os sais e solventes utilizados são pró-análise e a água foi purificada em sistema Milli-Q[®]. A sílica gel 60 (0,063-0,210 mm) para coluna filtrante, sílica gel 60 para placas preparativas e placas analíticas foram usadas da Merck[®]. Como padrão externo para CLAE foi utilizada boldina Fluka[®] lote 438298/1. Os solventes para CLAE, grau espectroscópico Tedia ou Merck e fases móveis, conforme item 4.1.4, feitas no momento de uso, foram filtrados em filtro 0,45 µm de celulose modificada. Os demais produtos e solventes utilizados foram de grau analítico. A germinação das sementes foi conduzida em germinador Marconi em câmara de germinação. Os resultados cromatográficos foram obtidos em Cromatógrafo Merck-Hitachi Lachrom

Elite acoplado com detector DAD e coluna analítica de fase reversa RP-18 Waters X-Terra. Os espectros de IV foram obtidos em Espectrofotômetro de IV Bommem MB-100 / Hartmann & Braun. Os espectros de RMN foram obtidos em Espectrômetro de RMN modelo Bruker Avance 400, solvente CDCl_3 e TMS como referência. Os extratos foram obtidos em extrator de Soxhlet e os extratos alcaloídicos em extrator de Soxhlet modificado.

4. MÉTODOS

4.1 MÉTODOS EXTRATIVOS

4.1.1 Escolha de métodos extrativos

O material vegetal utilizado para os métodos testados foram folhas de espécimens adultos. Para a obtenção dos extratos brutos, os métodos extrativos avaliados foram a maceração e a extração por Soxhlet com diferentes solventes extratores e para a obtenção do extrato alcaloídico bruto foram utilizados funil de separação e Soxhlet modificado. A avaliação dos processos extrativos foi feita por CLAE com o alcalóide aporfínico *stricto sensu* boldina. A triagem das folhas foi feita à mão e a secagem efetuada em estufa a 40 - 45°C (PRISTA, ALVES e MORGADO, 2003). Após secas, as folhas foram diretamente moídas em moinho laboratorial de facas (SONAGLIO *et al.* in SIMÕES, 1999). A determinação da granulometria do pó obtido foi conduzida de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1991).

4.1.1.1 Maceração com MeOH à frio.

No método de extração por maceração com MeOH a frio, macerou-se 5,0 g de folhas adultas, secas e moídas em 50 mL de MeOH por 48 horas. O material foi filtrado em algodão, lavado com MeOH e completado novamente o volume para 50 mL em balão volumétrico. O extrato bruto foi obtido evaporando-se à secura 10 mL de extrato metanólico do balão volumétrico em rotaevaporador a 40 °C. O resíduo foi dissolvido em 1,5 mL de MeOH. Deste, foi retirado 170 μL , diluído em 330 μL de fase aquosa ácida (A) para análise por CLAE.

Para a obtenção do extrato alcaloídico bruto adicionou-se em um funil de separação 15 mL de extrato metanólico, 10 mL de HCl 0,1 N e extraiu-se duas vezes com DCM, desprezando-se a fase orgânica. Adicionou-se à fase aquosa restante 3 mL de NH_4OH a 25% e extraiu-se com 4 porções de 20 mL com DCM. As fases

orgânicas foram evaporadas à secura em rotaevaporador a 40°C e dissolveu-se o resíduo em 1,5 mL de MeOH. Deste, diluiu-se 170 µL com 330 µL de fase aquosa ácida (A) para análise em CLAE.

4.1.1.2 Maceração com EtOH à frio

No método de maceração com EtOH à frio macerou-se 5,0 g de folhas adultas, secas e moídas em EtOH. O processo de extração foi estabelecido em 5 repetições sucessivas em intervalos de 5 dias cada. O extrato etanólico bruto, em cada etapa, foi filtrado e concentrado em rotaevaporador a 40°C. Ao final, os extratos de cada etapa foram reunidos.

Para a obtenção do extrato alcaloídico bruto, o extrato bruto foi acidificado até pH 2 com HCl a 2 %, filtrado novamente, e colocado em extrator de Soxhlet modificado conforme Figuras 9 e 10. A modificação do extrator de Soxhlet refere-se ao alargamento do sifão lateral do extrator a partir da curva superior, impedindo o refluxo do solvente através do mesmo (DAVET, 2005; CARVALHO, 2001). A primeira extração foi feita com DCM, desprezando-se a fase orgânica. A seguir, foi basificada a fase aquosa ácida com NH₄OH a 25% até pH 10 e feita a extração alcaloídica com DCM. A fase orgânica foi evaporada em rotaevaporador a 40°C e preparada uma amostra com 6 mg/mL em MeOH, da qual retirou-se 80 µL que foi diluído com 920 µL de fase aquosa ácida (A) para análise em CLAE.



FIGURA 9 – SOXHLET MODIFICADO
FONTE: MIGUEL, 2005



FIGURA 10 – DETALHE DO SOXHLET
MODIFICADO
FONTE: MIGUEL, 2005

4.1.1.3 Extração a quente em aparelho de Soxhlet convencional com solventes os EP, DCM e MeOH.

Para o método extrativo a quente em aparelho de Soxhlet convencional utilizou-se 5,0g de folhas adultas, secas e moídas que sofreram um processo de extração a quente em extrações consecutivas com os solventes EP, DCM e MeOH, utilizados em ordem crescente de polaridade, obtendo-se os extratos brutos. Em cada etapa do processo foi utilizado 125 mL de solvente com a duração de 30 horas de extração (ARAÚJO, 2000; JIA *et al.*, 2000; FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES *in* SIMÕES, 1999). Após cada extração os solventes foram evaporados em rotaevaporador a temperatura de 40°C.

O processo extrativo foi conduzido colocando-se o material em cartucho de papel filtro o qual foi posto no extrator, conectado a um condensador e balão. O solvente, no balão aquecido em manta, foi evaporado e após condensação, gotejado dentro do extrator sobre o cartucho com o material até ser sifonado, arrastando consigo o material extraído para o balão, repetindo o ciclo até o tempo que foi definido.

O extrato alcaloídico bruto foi obtido da mesma forma descrita para maceração etanólica a frio no item 4.1.1.2 com a mesma diluição para análise em CLAE.

4.1.1.4 Extração a quente em aparelho de Soxhlet convencional com MeOH.

O processo de extração a quente em extrator de Soxhlet convencional com MeOH, foi conduzido utilizando-se 5,0g de folhas adultas, secas e moídas, submetidas a processo de extração em extrator de Soxhlet com 125 mL de MeOH por um período de 30 horas. O extrato alcaloídico bruto foi obtido da mesma maneira descrita para maceração etanólica a frio conforme item 4.1.1.2 com a mesma diluição para análise em CLAE.

4.1.2 OBTENÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE PADRÕES DE ALCALÓIDES APORFINÓIDES EM FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS.

4.1.2.1 – Método de obtenção do extrato bruto por maceração de folhas de espécimens adultos de *Ocotea puberula*.

Macerou-se 2.500 g de folhas adultas, secas e moídas, em EtOH à frio. O processo de extração foi estabelecido em 5 repetições sucessivas em intervalos de 5 dias cada. O extrato etanólico bruto, em cada etapa, foi filtrado e concentrado em rotaevaporador a 40°C. Ao final os extratos obtidos foram reunidos.

4.1.2.2 - Método de obtenção de extrato alcaloídico bruto de folhas de espécimens adultos de *Ocotea puberula*.

O processo de obtenção do extrato alcaloídico bruto está descrito no item 4.1.1.2 e ilustrado nas Figuras 9 e 10.

4.1.3 Fracionamento cromatográfico do extrato alcaloídico bruto de folhas adultas de *Ocotea puberula* e isolamento de padrões de alcalóides.

O extrato alcaloídico bruto FDCM2 de 8,55 g, obtido conforme método descrito no item 4.1.1.2, foi fracionado em coluna filtrante com 56 g de sílica gel 60 e eluído em misturas de CHCl₃/MeOH com polaridades crescentes conforme Tabela 2, como fracionamento preliminar, obtendo-se 9 frações, apresentadas na Figura 11.

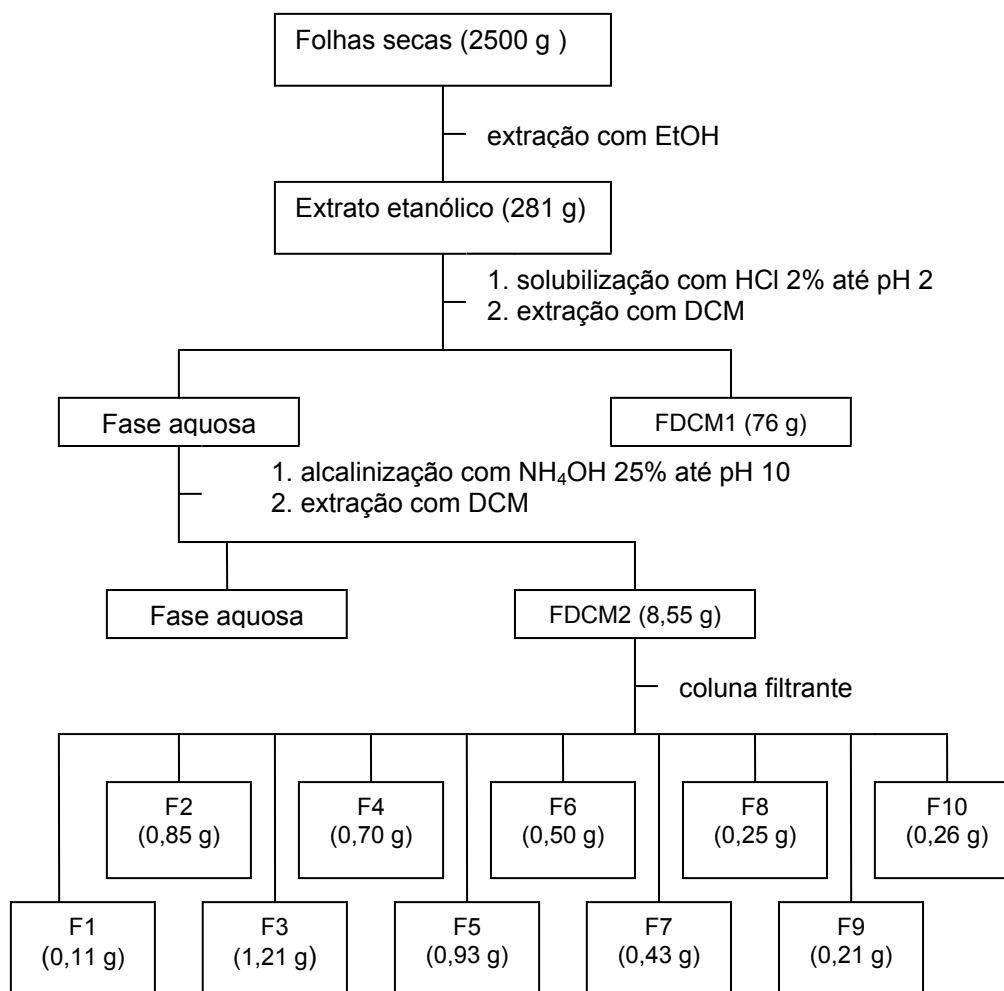


FIGURA 11 - FLUXOGRAMA DE FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS DE *Ocotea puberula*

TABELA 2 – FASES MÓVEIS UTILIZADAS NO FRACIONAMENTO PRELIMINAR DO EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS DE *Ocotea puberula*

Fração	Solvente (% em volume)		Volume eluido (mL)
	CHCl ₃	MeOH	Mistura
F1	100	-	300
F2	98	2	300
F3	95	5	300
F4	92	8	300
F5	88	12	300
F6	85	15	300
F7	80	20	300
F8	70	30	300
F9	50	50	300
F10	-	100	300

A fração F2 foi trabalhada segundo o fluxograma apresentado na Figura 12.

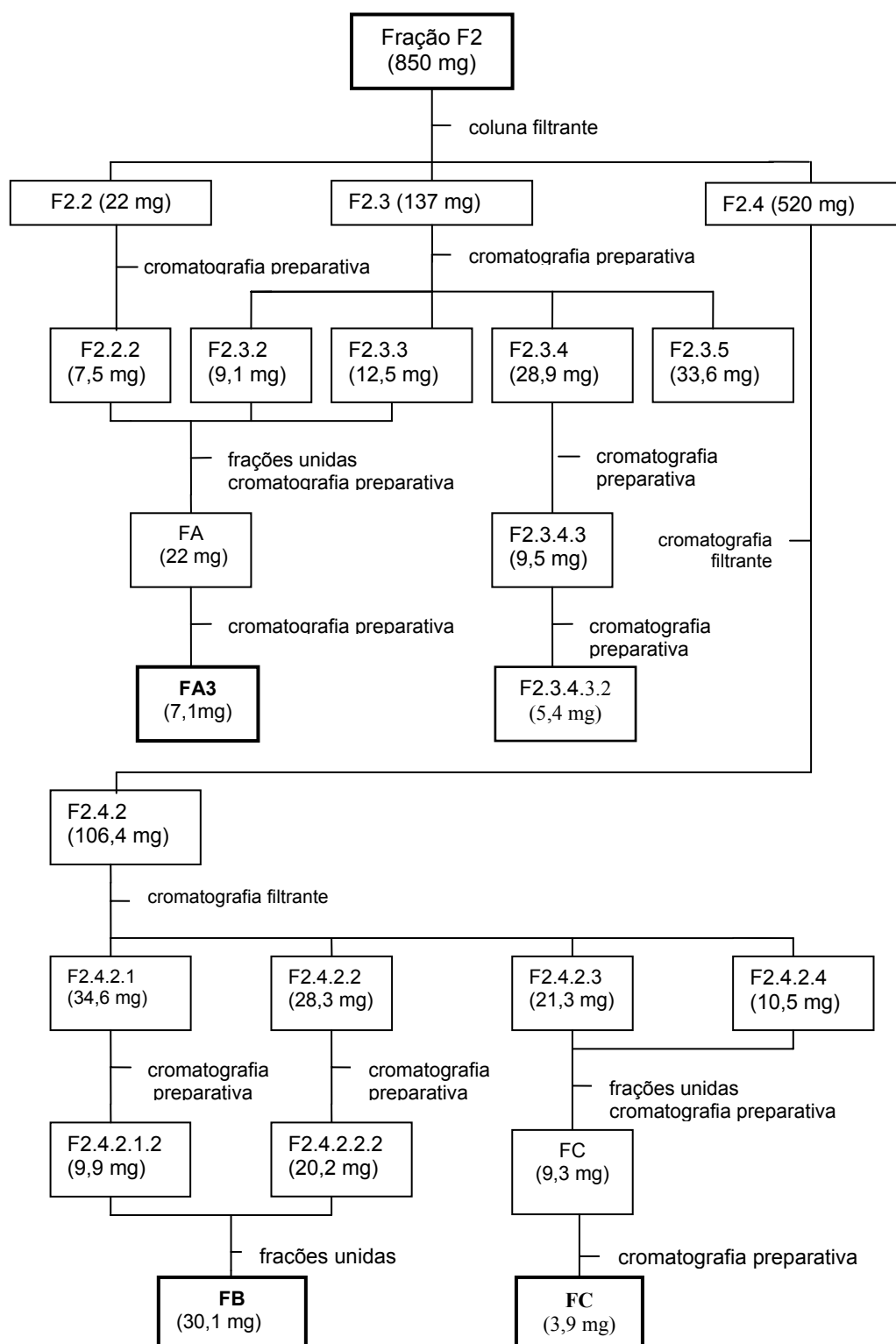


FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DO FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA (F2) DE FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS DE *Ocotea puberula*.

Fração F2

A fração alcaloídica F2 (850 mg) foi submetida a cromatografia em coluna com 36 g de sílica gel 60, eluída com gradiente de CHCl_3 / MeOH. Foram recolhidas 185 frações de 5 mL cada, que foram agrupadas em 10 frações. As frações de 12 a 20 identificadas como F2.2 (22 mg), de 21 a 30 identificadas como F2.3 (137 mg) e de 31 a 59 como F2.4 (520 mg). Estas três frações foram obtidas com eluição de CHCl_3 / MeOH (9,8:0,2 v/v) e em seguida foram trabalhadas.

Fração F2.2

A fração F2.2 (22 mg) foi submetida a cromatografia preparativa em placa de sílica gel, usando como eluente CHCl_3 / NH_4OH (25:0,1 v/v), fornecendo a fração majoritária F2.2.2 (7,5 mg).

Fração F2.3

A fração F2.3 (137 mg) foi submetida ao mesmo processo da fração F2.2, fornecendo as frações F2.3.2 (9,1 mg), F2.3.3 (12,5 mg), F2.3.4 (28,9 mg), F2.3.5 (33,6 mg).

As frações F2.2.2, F2.3.2 e F2.3.3 foram unidas e submetidas a cromatografia preparativa em placa de sílica gel, usando como solvente CHCl_3 / NH_4OH (25:0,2 v/v) em ambiente amoniacal, obtendo-se a fração majoritária FA (22 mg).

A fração FA foi submetida a cromatografia preparativa em placa de sílica gel com eluente hexano/ CHCl_3 / dietilamina (3:1:0,3 v/v/v) em ambiente amoniacal, fornecendo a fração **FA3**, submetida a espectroscopia de RMN de ^1H , ^{13}C , HSQC, HMBC e CLAE.

Fração F2.3.4

A fração F2.3.4 (28,9 mg) foi submetida a cromatografia preparativa em placa de sílica gel, usando como eluente CHCl_3 / NH_4OH (25:0,2 v/v) em ambiente amoniacal, fornecendo a fração F2.3.4.3 (9,5 mg).

A fração F2.3.4.3 foi submetida a cromatografia preparativa em placa de sílica gel com eluente hexano/ CHCl_3 / dietilamina (1:3:0,2 v/v/v) em ambiente amoniacal, fornecendo a fração F2.3.4.3.2 (5,4 mg).

Fração F 2.4

A fração F2.4 (520 mg) foi submetida a cromatografia em coluna com 26,0 g de sílica gel 60 eluindo com gradiente de polaridade crescente com EP/AcoEt/MeOH/dietilamina, fornecendo 60 frações de 5 mL cada, que após analisadas por CCDP foram agrupadas em 8 frações. A fração identificada como F2.4.2 (106,4 mg), que corresponde às frações 3 a 5 agrupadas, eluiu com EP/AcoEt/dietilamina (1:2,5:0,5 v/v/v) que em seguida foi trabalhada.

Fração F 2.4.2

A fração 2.4.2 (106,4 mg) foi submetida a cromatografia em coluna com 16,0 g de sílica gel 60 eluindo com DCM / CHCl₃ / MeOH / dietilamina, em proporções crescentes de polaridade. Foram recolhidas 16 frações de 10 mL cada que após analisadas por CCDP foram agrupadas em 4 frações. As frações recolhidas de 1 a 5 foram identificadas como F2.4.2.1 (34,6 mg), de 6 a 9 como F2.4.2.2 (28,3 mg), de 10 a 13 como F2.4.2.3 (21,3 mg) e de 14 a 16 como F2.4.2.4 (10,5 mg).

Fração F2.4.2.1

A fração F2.4.2.1 foi submetida a cromatografia preparativa em placa de sílica com fase móvel DCM / CHCl₃ / dietilamina (1,5:2,5:0,2 v/v/v) em ambiente amoniacal, fornecendo a fração majoritária F2.4.2.1.2 (9,9 mg).

Fração F2.4.2.2

A fração F2.4.2.2 foi submetida ao mesmo processo da F2.4.2.1 fornecendo a fração majoritária F2.4.2.2.2 (30,2 mg).

As frações F2.4.2.1.2 e F2.4.2.2.2 foram unidas resultando a fração **FB** (30,1 mg) que foi submetida a espectroscopia de RMN de ¹H e ¹³C, HSQC, HMBC, IV e CLAE.

Frações F2.4.2.3 e F2.4.2.4

As frações F2.4.2.3 (21,3 mg) e F2.4.2.4 (10,5 mg) foram unidas e submetidas a cromatografia preparativa em placa de sílica gel com fase móvel DCM / CHCl₃ / dietilamina (1,5:2,5:0,2 v/v/v) em ambiente amoniacal, obtendo-se a fração majoritária FC (9,3 mg). A fração FC foi novamente submetida a cromatografia preparativa em placa de sílica gel com eluente hexano/ CHCl₃ / dietilamina (1:3:0,2

v/v/v) em ambiente amoniacal, fornecendo a fração majoritária **FC** (3,9 mg) que foi submetida à espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , HSQC, HMBC, IV e CLAE.

4.1.4 Método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) para análise de padrões de alcalóides isolados

As análises por CLAE foram desenvolvidas no Cromatógrafo Lachrom Elite da Merck-Hitashi, equipado com detector de arranjo de diodos DAD L2450, bomba quaternária L2130, forno de coluna L-2300 e amostrador automático L-2200. O programa de aquisição de dados foi o EZchrom Elite.

As separações foram realizadas em coluna Waters X-Terra[®] de fase reversa octadecílica RP-18 de 250 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno, preenchida com partículas esféricas de 5 μm e associada a uma pré-coluna. O volume de amostra injetado para todas as análises foi de 20 μL . O forno operou a uma temperatura de 25°C.

As fases móveis utilizadas foram a fase ácida (A) 250 mg/L de heptanosulfonato de sódio em água com 0,2% de ácido fosfórico e 0,01 M de ácido sulfúrico; (B) metanol; (C) acetonitrila 90% em água. O heptanosulfonato de sódio foi usado na fase móvel (A) como contra-íon, interagindo com as cadeias carbônicas da fase estacionária e a extremidade polar da amostra, fazendo pareamento iônico com a mesma (Figura 13). A amostra comporta-se então como se fosse uma molécula neutra, sendo separada pelas técnicas normais de partição cromatográfica com coluna de fase reversa. Estas soluções foram filtradas em filtro 0,45 μm de celulose modificada.

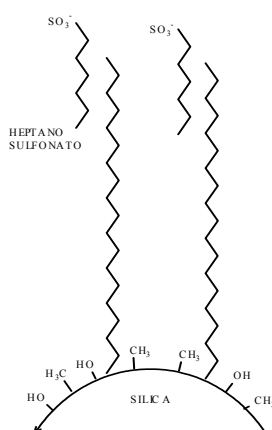


FIGURA 13 – INTERAÇÕES DE VAN DER WAALS ENTRE HEPTANOSULFONATO DE SÓDIO E COLUNA RP 18.

O gradiente de eluição da fase móvel está especificado conforme Tabela 3

TABELA 3 - GRADIENTE DE ELUIÇÃO DAS FASES MÓVEIS UTILIZADAS

Tempo (min)	A (%)	B (%)	C (%)	Fluxo (mL/min)
0	82	13	5	0,7
77	53	42	5	0,7
78	5	90	5	0,7
82	5	90	5	0,7
83	82	13	5	0,8

O detector de arranjo de diodos (DAD) foi configurado para realizar a varredura de 200 a 350 nm e integrar o cromatograma a 280 nm (MERCK, 2005; DAVET, 2005; GUIMARÃES, 1998; CIOLA, 1998).

4.1.4.1 Curva de Calibração

O alcalóide aporfínico *stricto sensu* boldina foi utilizado como padrão de referência para a curva de calibração. Os sistemas por CLAE são calibrados comparando-se as respostas dos picos obtidos com as respectivas concentrações do padrão de referência.

Preparou-se uma solução de boldina com 500 µg/mL em MeOH, diluindo-se nas concentrações de 62,5; 125 e 250 µg/mL. Estas amostras foram injetadas em triplicata para a construção de uma curva de calibração com 3 pontos. O resultado mostrou linearidade e reprodutibilidade com (r^2) maior que 0,9999 (Figura 14). Outra curva de calibração com 7 pontos foi construída partindo-se de uma nova solução de boldina com 500 µg/mL em MeOH nas diluições de 75, 100, 125, 150, 175, 200 e 250 µg/mL e injetadas em triplicata por ponto. O resultado mostrou linearidade e reprodutibilidade com (r^2) maior que 0,999 (Figura 15). O resultado comparativo de área de pico de boldina com 125 µg/mL em ambas as curvas, mostrou variação de 1,4%. Os cálculos de quantificação foram feitos com base na curva de calibração de 3 pontos.

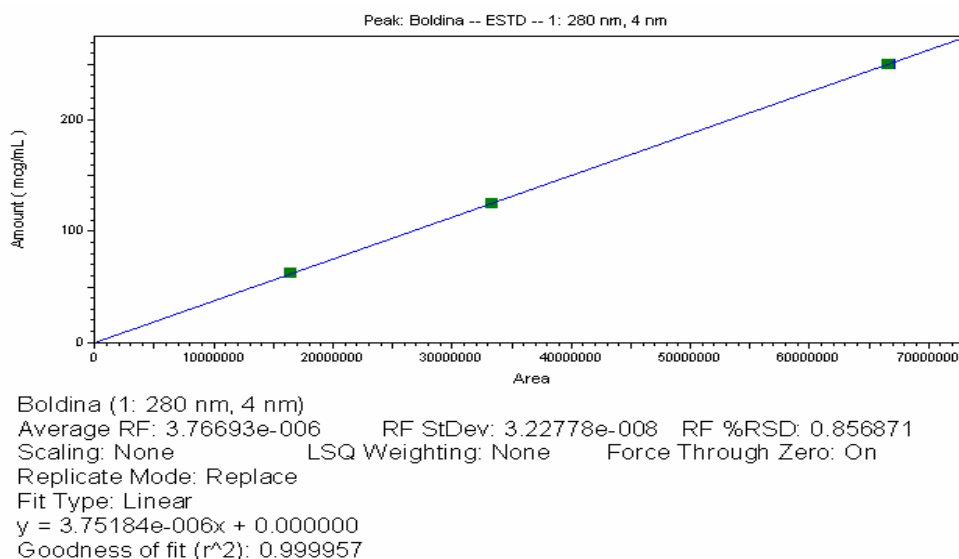


FIGURA 14 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BOLDINA COM 3 PONTOS

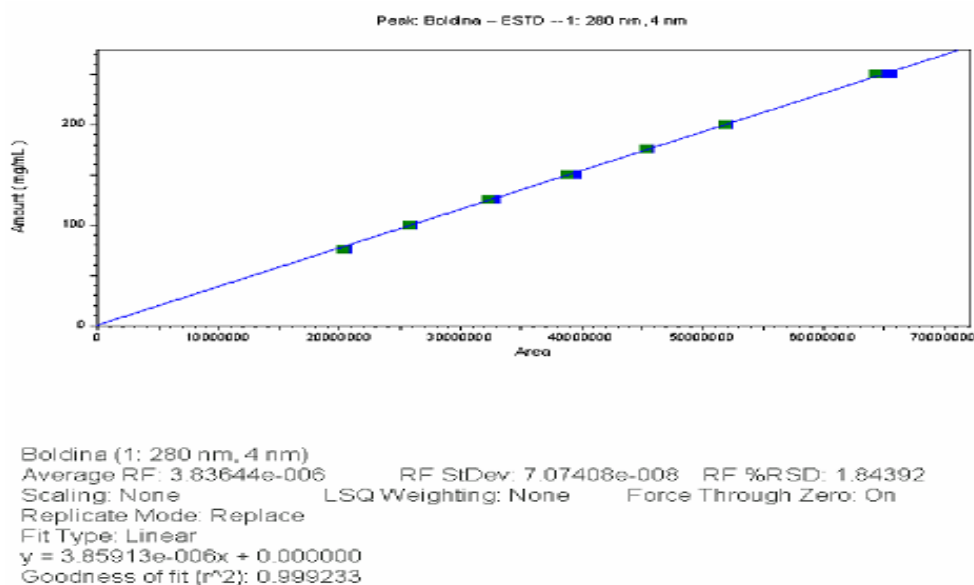


FIGURA 15 - CURVA DE CALIBRAÇÃO DA BOLDINA COM 7 PONTOS

4.1.4.2 Quantificação dos padrões por CLAE

Os padrões boldina, FB, FC e FA3 foram solubilizados em fase aquosa ácida: MeOH (2:1), misturados na concentração de 125 µg/mL para boldina, 157 µg/mL para FB, 165 µg/mL para FC e 145 µg/mL para FA3 e utilizados para quantificação dos mesmos nas frações analisadas. Os picos correspondentes aos padrões podem ser identificados no cromatograma pelos tempos de retenção de cada um deles e os

seus respectivos espectros de absorção. A quantificação dos padrões nas frações foi feita tomando como base o cálculo demonstrado no item 5.1.1.1.

4.2 OBTENÇÃO DE MUDAS DE *Ocotea puberula* DE SEMENTES PROVENIENTES DO MUNICÍPIO DE IRATI / PR

4.2.1 Obtenção de mudas de *Ocotea puberula*

Para viabilizar o monitoramento de alcalóides em mudas até 01 ano de idade com coletas trimestrais, foi necessário obtê-las em viveiro, tendo em vista a quantidade e idade das mesmas em cada coleta. Como não se podia prever a quantidade de mudas necessárias para o desenvolvimento deste trabalho, foi realizado inicialmente um trabalho preliminar com a coleta de mudas de 6 e 12 meses de idade de sementes provenientes de Antonina/PR no viveiro da Faculdade de Floresta da UFPR, Bairro Juvevê, Curitiba/PR, com a finalidade de monitorar a variável quantidade de mudas através dos rendimentos de extratos brutos e alcaloídicos, conforme Anexo 1, e posterior desenvolvimento das mudas coletadas conforme Anexo 2.

As mudas necessárias para o presente trabalho foram obtidas através de coleta de frutos, germinação de sementes, plantio, crescimento em viveiro e coleta das mudas de 3, 6, 9 e 12 meses. As sementes utilizadas foram obtidas dos frutos dos mesmos 5 espécimens adultos identificados em Irati/PR que também ofereceram as folhas para a obtenção de padrões de alcalóides.

4.2.2 Coleta e triagem de frutos de *Ocotea puberula*

Os frutos foram coletados manualmente (CARVALHO, 2003), misturados aleatoriamente e acondicionados em bolsas térmicas, com temperatura baixa, para o transporte até Curitiba / PR.

A triagem dos frutos foi feita sobre mesa, separando-se manualmente os frutos maduros (Figura 16), de coloração negra, lisa e lustrosa e/ou escuro a púrpura acastanhado (KUBITZKI *et al. in* KUBITZKI, 1993) eliminando-se os frutos verdes, estragados e partes inertes ou produtos estranhos (PRISTA, ALVES e MORGADO, 2003). Os frutos maduros separados foram colocados em um recipiente plástico com água fria suficiente para umedecê-los e deixá-los flácidos e, então, premidos entre as mãos com força moderada para não danificar as sementes, removeu-se

tegumento e polpa (PRISTA, ALVES e MORGADO, 2003). A seguir, adicionou-se água fria em abundância no recipiente para lavar as sementes, eliminando-se os resíduos em peneira de malha grossa sob água corrente, repetindo-se este procedimento até que as sementes estivessem limpas e todo o resíduo eliminado. Após este tratamento, as sementes foram deixadas em peneira em ambiente ventilado para secagem.

A semente é elíptica, marrom-escura e com estrias pretas, medindo 4 a 10 mm de comprimento e 2 a 5 mm de diâmetro (CARVALHO, 2003).



FIGURA 16 - FRUTOS MADUROS DE *Ocotea puberula*.

FONTE: ZANIN, 2003

4.2.3 Tratamento de sementes e germinação

O tratamento para superação da dormência das sementes foi feito por escarificação ácida por 5 min. em ácido sulfúrico (LORENZI, 2002; CARVALHO, 2003). Para o processo de germinação foram utilizados recipientes do tipo gerbox, previamente lavados com água corrente e em seguida sanitizados com álcool etílico 77°GL (BRASIL, Regras para Análises de Sementes, 1976). O substrato utilizado foi a argila expandida, chamada de vermiculita, na proporção de 30g do produto para 45 mL de água destilada (NOGUEIRA, PORTELA e NAZÁRIO, 2002). Foram colocadas 50 sementes em cada gerbox distanciadas umas das outras 2,5 a 3 vezes o seu diâmetro (Figura 17), colocados em germinador com iluminação direta de luz fria (Figura 18). Para o processo de germinação foi utilizado germinador Marconi a 25°C, ambientado em câmara fria com temperatura de 5°C (Figura 19). As

sementes germinadas (Figura 20) foram coletadas semanalmente (BRASIL, Regras para Análises de Sementes, 1976) e transferidas para o substrato no viveiro.



FIGURA 17 – SEMENTES NO GERBOX
FONTE: ZANIN, 2003



FIGURA 18 – GERMINADOR
FONTE: ZANIN, 2003



FIGURA 19 – CÂMARA DE GERMINAÇÃO
FONTE: ZANIN, 2003



FIGURA 20 – SEMENTES GERMINADAS
FONTE: ZANIN, 2003

4.2.4 Substrato e recipiente no viveiro

O substrato foi terra comum peneirada em peneira de malha grossa para retirada de torrões e colocada em sacos de polietileno com dimensões de 20 cm de altura por 10 cm de diâmetro (CARVALHO, 2003). As sementes germinadas foram transplantadas individualmente para os recipientes, que foram colocados em canteiros no viveiro da Faculdade de Florestas da UFPR no Bairro Juvevê -

Curitiba/PR. Os recipientes foram colocados sobre a superfície do solo, próximos uns aos outros, em canteiro a céu aberto com proteção lateral de madeira de altura inferior a dos recipientes (Figura 21) e estrutura superior para suporte de tela de poliolefina (sombrite) com objetivo de proteção contra intempéries e excesso de sol (Figura 22). Foi utilizado sombrite 30, tela que confere 30% de sombreamento, colocada a 1 m de altura do canteiro (INOUE, RODERJAN e KUNIYOSHI, 1984; CARNEIRO, 1995; LORENZI, 2002). As dimensões do canteiro são de aproximadamente 1,2 m de largura por 10 m de comprimento, ladeados por mais canteiros com espaçamento de 0,8m entre eles (CARNEIRO, 1995). As mudas no viveiro foram regadas em dias alternados ou diariamente conforme necessidade (CARNEIRO, 1995).



FIGURA 21 – VISTA DO CANTEIRO DE MUDAS DE *Ocotea puberula*
FONTE: ZANIN, 2004



FIGURA 22 – VISTA DO CANTEIRO PROTEGIDO COM TELA SOMBRITE
FONTE: ZANIN, 2004

4.2.5 Coleta e beneficiamento de mudas de *Ocotea puberula*

As mudas com idade de 3, 6, 9, 12 meses (Figura 23) foram coletadas no viveiro em 07/07/2003, 07/10/2003, 07/02/2004 e 07/05/2004, respectivamente.



FIGURA 23 – MUDA DE *Ocotea puberula* COM 1 ANO DE IDADE.

FONTE: ZANIN, 2004

A triagem das mudas, separando-se folhas, caules e raízes, foi feita à mão e a secagem efetuada em estufa a 40 – 45°C (PRISTA, ALVES e MORGADO, 2003). Após secas, foram diretamente moídas em moinho laboratorial de facas (SONAGLIO *et al. in* SIMÕES, 1999). A determinação da granulometria do pó obtido foi conduzida de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1991).

4.3 MONITORAMENTO DE ALCALÓIDES APORFINÓIDES EM MUDAS DE *Ocotea puberula* ATÉ 01 ANO DE IDADE.

4.3.1 Método de obtenção dos extratos brutos e alcaloídicos brutos de folhas, caules e raízes de mudas de *Ocotea puberula*

O método definido de obtenção de extratos brutos, utilizando folhas, caules e raízes de mudas foi o de extração por extrator de Soxhlet com EP, DCM e MeOH e o de extratos alcaloídicos brutos por extrator de Soxhlet modificado.

4.3.1.1 Material vegetal

A triagem das mudas foi feita conforme descrito no item 4.1.1 para folhas adultas, separando-se em folhas, caules e raízes.

4.3.1.2 Métodos extrativos

Folhas, caules e raízes, secos e moídos, sofreram um processo de extração a quente em extrator de Soxhlet convencional para obtenção dos extratos brutos, conforme item 4.1.1.3. O método de obtenção dos extratos alcaloídicos brutos por extrator de Soxhlet modificado (DAVET, 2005; CARVALHO, 2001) está descrito no item 4.1.1.2. As quantidades de material seco, extratos brutos e extratos alcaloídicos brutos utilizados constam da Tabela 4 e Tabela 5.

4.3.1.3 Diluições dos extratos alcaloídicos de folhas, caules e raízes de mudas para análise por CLAE

Foram analisados por CLAE os extratos alcaloídicos brutos de folhas adultas, folhas, caules e raízes de mudas respectivamente de 3, 6, 9 e 12 meses conforme método descrito no item 4.1.4.

Os extratos alcaloídicos brutos de folhas F₃, F₆, F₉ e F₁₂ foram utilizados na concentração de 3,0 mg/mL de MeOH e diluição de 170 µL da fração alcaloídica em 330 µL de fase aquosa ácida (A).

O extrato alcaloídico bruto de folha adulta (FA) foi utilizado na concentração de 6,0 mg/mL de MeOH e diluição de 80 µL em 920 µL de fase aquosa ácida (A).

Os extratos alcaloídicos brutos de caules C₃, C₆, C₉ e C₁₂ foram utilizados na concentração de 3,0 mg/mL de MeOH e diluição de 80 µL em 420 µL de fase aquosa ácida (A).

Os extratos alcaloídicos brutos de raízes R₃, R₆, R₉ e R₁₂ foram utilizados na concentração de 3,0 mg/mL de MeOH e diluição de 80 µL em 420 µL de fase aquosa ácida (A).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 - MÉTODOS EXTRATIVOS

As folhas foram coletadas das cinco matrizes identificadas no período da manhã porque, em geral, as espécies apresentam épocas específicas em que contêm maior quantidade de princípio ativo no seu tecido, podendo esta variação ocorrer tanto no período de um dia como em épocas do ano. De acordo com as substâncias ativas da planta, existem horários em que a concentração desses princípios é maior. No período da manhã é recomendada a colheita de plantas com óleos essenciais e alcalóides (REIS e MARIOT *in* SIMÕES, 1999). A triagem teve a finalidade de separar das folhas materiais aderidos estranhos ou inertes. A secagem foi conduzida até peso constante do material. As folhas perderam em média 56% de umidade.

Para fins de extração são recomendados diferentes níveis de redução de tamanho de partículas, os quais dependem da natureza da droga vegetal. Para a extração de alcalóides, (SONAGLIO *et al.* *in* SIMÕES, 1999) recomendam corte fino, com diâmetro médio de partícula entre 50-500 μm . Seguindo esta recomendação, as folhas foram moídas até obtenção de pó semi – fino, com diâmetro médio de partículas entre 180–355 μm de acordo com as normas estabelecidas pela Farmacopéia Brasileira IV (1991). Quanto à escolha dos solventes extratores são poucos os utilizados na extração de produtos vegetais. Essa limitação de uso é devida às propriedades extrativas ou parâmetros de solubilidade do solvente e do soluto, adequação tecnológica e inocuidade fisiológica. Os solventes extratores mais utilizados são os hidrocarbonetos alifáticos, éter de petróleo e n-hexano; hidrocarbonetos halogenados, clorofórmio e diclorometano; álcoois, etanol e metanol; cetonas; éter etílico; ácido acético; acetato de etila e água. Os solventes selecionados para as extrações neste trabalho foram o éter de petróleo, utilizado para a extração de substâncias altamente lipofílicas. O diclorometano para extração de alcalóides na forma de base livre, entre outros produtos (SONAGLIO *et al.* *in* SIMÕES, 1999) e o metanol e etanol, empregados com freqüência, porque praticamente todos os constituintes de interesse para a análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade neles (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES *in* SIMÕES, 1999).

5.1.1 Escolha dos métodos extrativos

Os métodos extrativos foram avaliados por CLAE. O alcalóide aporfínico *stricto sensu* boldina foi utilizado como padrão para monitoramento por ter sido o único alcalóide aporfínico a ser conseguido comercialmente e posteriormente identificado nas folhas de *Ocotea puberula*. Observou-se na Tabela 4 que os melhores rendimentos de boldina apresentados foram dos métodos de obtenção de extrato bruto por Soxhlet com MeOH (item 4) e por Soxhlet com EP, DCM e MeOH (item 5) e o extrato alcaloídico bruto de ambos obtidos por Soxhlet modificado. A presença do alcalóide boldina foi constatada em todos os métodos testados. A quantidade limitada de material vegetal de mudas e a necessidade de um método de extração intensivo reforçaram a decisão para o método de extração por Soxhlet com solvente em ordem crescente de polaridade com EP / DCM / MeOH e de extração alcaloídica por partição líquido-líquido através de Soxhlet modificado conforme item 5 da Tabela 4, que apresentou o melhor desempenho entre os métodos testados.

TABELA 4 - RESULTADOS DOS PROCESSOS EXTRATIVOS EM FOLHAS DE PLANTAS ADULTAS ANALISADOS POR CLAE

Métodos de extração de extrato bruto / extrato alcaloídico bruto	boldina ($\mu\text{g/g}$ de folha seca)
1. Extrato bruto por maceração a frio com MeOH	200,14
2. Extrato bruto por maceração a frio com MeOH e extrato alcaloídico por funil de separação	194,06
3. Extrato bruto por maceração a frio com EtOH e extrato alcaloídico por Soxhlet modificado	517,66
4. Extrato bruto por Soxhlet com MeOH e extrato alcaloídico por Soxhlet modificado	932,75
5. Extrato bruto por Soxhlet com EP/DCM/MeOH e extrato alcaloídico por Soxhlet modificado	1055,94

A metodologia de cálculo utilizada em CLAE da concentração de boldina nos extratos é exemplificada no item 5.1.1.1 e os valores obtidos do padrão boldina nos processos extrativos constam dos cromatogramas das Figuras 24 a 28 conforme item 5.1.1.2.

5.1.1.1 Cálculo de boldina em $\mu\text{g/g}$ de folhas secas e moídas

Equivalência folhas – extrato alcaloídico bruto
 5,0 g de folhas - equivale a 0,035 g de extrato alcaloídico bruto
 X g - 0,006 g (solução 6,0 mg/mL)

X = 0,857 g de folhas

Preparo da amostra para injeção no equipamento

Diluiu-se 80 μL com 920 μL da fase aquosa ácida (A)

Fator de diluição \rightarrow Fd = $1000/80 = 12,5$

Cálculo da concentração de boldina:

$$\mu\text{g de boldina/ g de folhas} = \frac{Aa \text{ (área da amostra)} \cdot Mp \text{ (massa do padrão } \mu\text{g)} \cdot Fd}{Ap \text{ (área padrão)} \cdot Ma \text{ (massa da amostra em g)}}$$

$$\mu\text{g de boldina/ g de folhas} = \frac{19290925 \cdot 125 \cdot 12,5}{33308329 \cdot 0,857}$$

$\mu\text{g de boldina/g de folhas} = 1055,94$

5.1.1.2 Resultados dos métodos de extração avaliados por CLAE

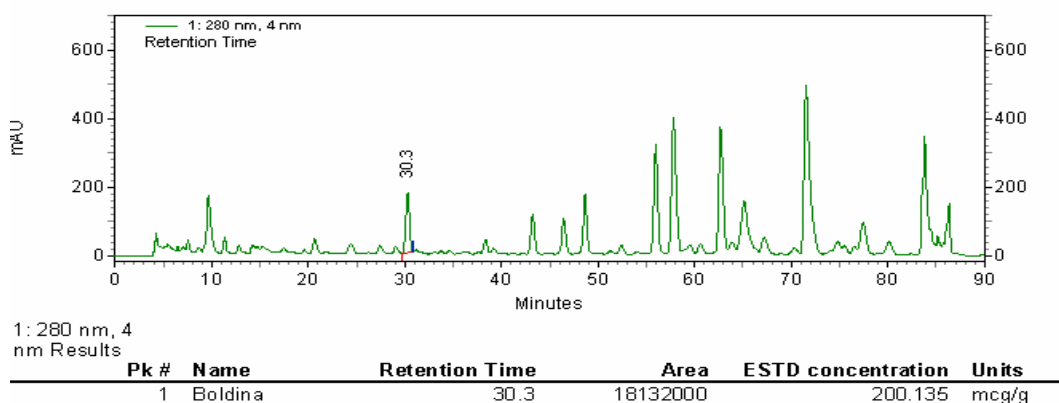
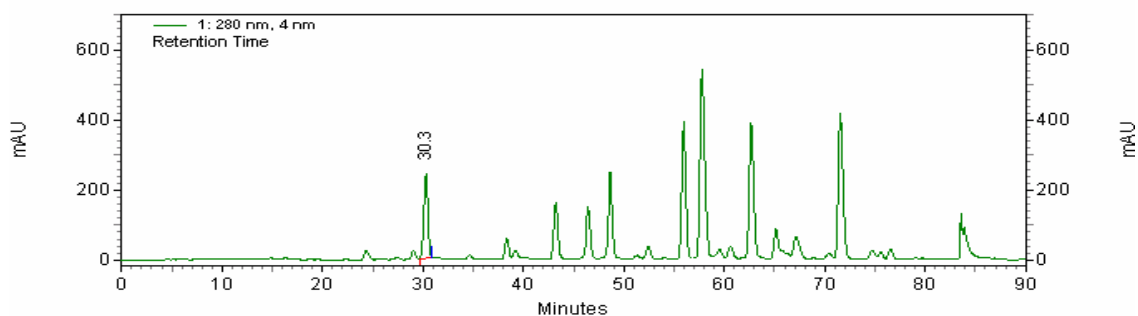


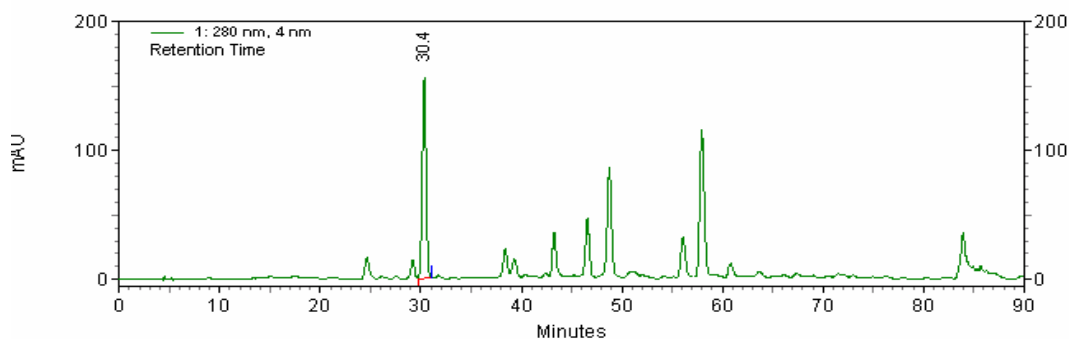
FIGURA 24 - MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR MACERAÇÃO A FRIO COM MeOH



1: 280 nm, 4
nm Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
1	Boldina	30.3	26372370	194.060	mcg/g

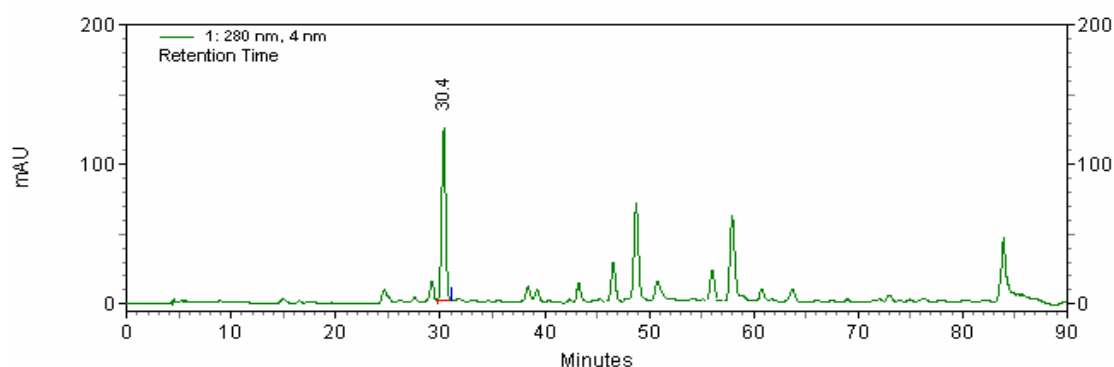
FIGURA 25 – MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR MACERAÇÃO A FRIO COM MeOH E ALCALOÍDICO POR FUNIL DE SEPARAÇÃO



1: 280 nm, 4
nm Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
1	Boldina	30.4	16056232	517.662	mcg/g

FIGURA 26 – MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR MACERAÇÃO A FRIO COM EtOH E ALCALOÍDICO POR SOXHLET MODIFICADO.



1: 280 nm, 4
nm Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
1	Boldina	30.4	12685910	932.756	mcg/g

FIGURA 27 – MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR SOXHLET COM MeOH E ALCALOÍDICO POR SOXHLET MODIFICADO.

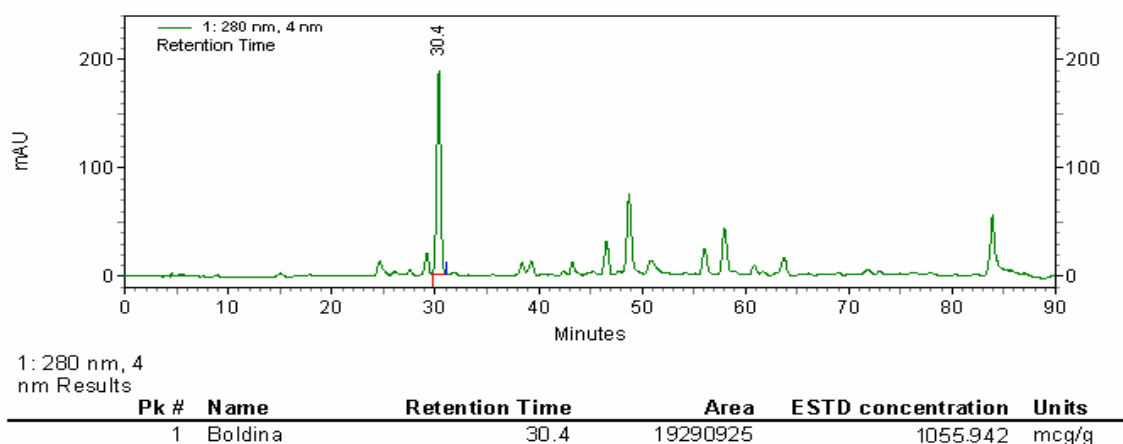


FIGURA 28 – MÉTODO: EXTRATO BRUTO POR SOXHLET COM EP/DCM/MeOH E ALCALOÍDICO POR SOXHLET MODIFICADO.

5.1.2 PROCESSO EXTRATIVO PARA OBTENÇÃO DE PADRÕES DE FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS DE *Ocotea puberula*

5.1.2.1 Processo extrativo por maceração de folhas para obtenção de extrato bruto.

A maceração designa a operação na qual a extração da matéria-prima vegetal é realizada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante um período prolongado de horas ou dias, sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Pela sua natureza, não conduz ao esgotamento da matéria-prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Diversas variações conhecidas desta operação objetivam, essencialmente, o aumento da eficiência de extração, entre elas a remaceração, quando a operação é repetida utilizando o mesmo material vegetal, renovando-se apenas o líquido extrator. Como os principais fatores que influenciam a eficiência da maceração estão vinculados ao material vegetal, ao líquido ou misturas de líquidos extratores e às condições do sistema (SONAGLIO *et al. in* SIMÕES, 1999), atentou-se para repetidas remacerações, freqüente agitação manual do sistema, quantidade adequada de líquido extrator e tempo de extração prolongado. O método está descrito no item 4.1.1.2 e o rendimento do processo de maceração de 2.500 g de folhas foi de 281,0 g de extrato bruto.

5.1.2.2 Processo extrativo à quente para obtenção do extrato alcaloídico bruto em extrator de Soxhlet modificado

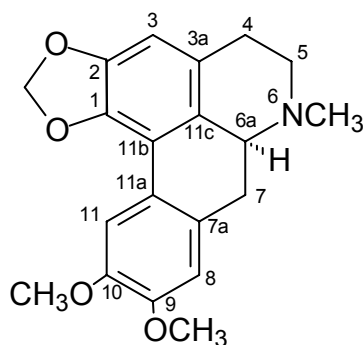
Neste tipo de extração, conforme item 4.1.1.2, a quantidade de solvente é constante no sistema, tanto no balão como no extrator e o solvente DCM mais denso que a fase aquosa permanece na parte inferior do extrator, transferindo para o balão por gotejamento, através do sifão, o extrato alcaloídico solubilizado no DCM. O tempo de extração foi mantido até que o DCM no extrator estivesse límpido. O rendimento do processo extrativo de extrato bruto alcaloídico foi de 8,55 g.

5.1.3 IDENTIFICAÇÃO DOS ALCALÓIDES APORFINÓIDES ISOLADOS DE FOLHAS DE ESPÉCIMENS ADULTOS DE *Ocotea puberula*

5.1.3.1 Fracionamento e isolamento de alcalóides

O fracionamento da fração F2 do extrato alcaloídico bruto de folhas de espécimens adultos levou ao isolamento de 3 alcalóides aporfínicos *stricto sensu* identificados como FA3, FB e FC.

5.1.3.2 Identificação da fração FA3



Dicentrina

A Fração FA3 (20 mg) foi assim denominada após a unificação das frações F2.2.2 (7,5 mg) com a F2.3.2 (9,1mg) e F2.3.3 (12,5 mg) e posterior purificação em CCDP. A Tabela 5 mostra a comparação dos valores de deslocamento químico de RMN de ^1H (Figura 29) e ^{13}C (Figura 30) para o alcalóide FA3 com aqueles encontrados na literatura e as correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC. Todas as figuras do item 5.1.3.2 constam do Anexo 3.

No espectro de RMN de ^1H da fração FA3 foram observados os três singletos em δ 6,78 (1H), δ 7,65 (1H) e δ 6,53 (1H) que foram atribuídos ao H-8, H-11 e H-3, respectivamente. O hidrogênio H-8 em δ 6,78 (Figura 29) mostrou correlação direta com um carbono em δ 111,3 no experimento HSQC (Figura 31) e a longa distância (Figuras 32, 33 e 34) com os carbonos 7, 9, 11, 11a e 11b. O hidrogênio H-11 em δ 7,65 (Figura 29) mostrou correlação com carbono em δ 110,5 no experimento HSQC (Figura 31) e a longa distância (Figuras 33 e 35) com os carbonos 7a, 8, 10 e 11b. Estes dados permitiram inverter a atribuição dos C-8 e C-11 em relação aos valores de literatura.

O hidrogênio H-3 em δ 6,53 (Figura 29) mostrou correlação direta com o carbono em δ 106,7 (Figura 31) no experimento HSQC e também a longa distância (Figuras 32 e 33) com os carbonos 1, 2 e 4. A pouca quantidade de sinais na região aromática deste espectro de RMN de ^1H foi um indicativo de que a estrutura é altamente substituída.

Os dois dubletos, no espectro de RMN de ^1H em δ 5,95 e δ 6,10, ambos com constante de acoplamento de 1,4 Hz (Figuras 29 e 36) são características de hidrogênios do grupo metileno-dioxílico (OCH_2O), o que pode ser confirmado pela presença do carbono metilênico cetálico em δ 100,8 no experimento HSQC (Figura 31). Estes hidrogênios apresentaram correlação no experimento HSQC com um carbono em δ 100,8 e a longa distância (Figuras 33 e 37) com os carbonos 1 e 2, o que permitiu localizar o grupo metileno-dioxílico nesta posição.

Observou-se ainda no espectro de RMN de ^1H dois singletos em δ 3,921 e δ 3,924 (Figuras 29 e 38) ambos de integração três, os quais foram atribuídos a presença de dois grupos metoxílicos (OCH_3) na estrutura. Os hidrogênios dos grupos metoxílicos no experimento HSQC mostraram correlação direta com os sinais relativos aos carbonos em δ 55,9 e 56,1 (Figura 39) e em longa distância o sinal em δ 3,921 mostrou correlação com C-8 e C-9 e o sinal em δ 3,924 mostrou correlação com C-10 e C-11 (Figuras 40 e 41). No espectro de RMN de ^1H foi observado um singlete de integração para três hidrogênios em δ 2,68 (Figura 29 e 42) atribuído ao grupo metílico ligado ao nitrogênio (NCH_3). Apesar de não ser possível observar com intensidade apreciável o sinal em δ 42,5 no espectro de RMN de ^{13}C atribuído ao carbono metílico ligado ao nitrogênio, a correlação entre o sinal em δ 2,68 com δ

42,5 foi observado no experimento HSQC (Figura 39). Os hidrogênios mostraram correlação a longa distância (Figura 43) com os carbonos 5 e 6a, localizando o grupo metílico entre os carbonos 5 e 6a.

Os hidrogênios diastereotópicos H-4 apresentaram no espectro de RMN de ^1H multipletos em δ 2,72 e δ 3,23 - 3,25, os hidrogênios diastereotópicos H-5 como multipletos em δ 2,77 e δ 3,23 - 3,25 e o hidrogênio H-6a como multiplete em 3,51. A correta multiplicidade bem como as constantes de acoplamento destes hidrogênios não puderam ser obtidos devido estarem em uma região de alta sobreposição de sinais. Entretanto, os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-4 e dos H-5 puderam ser atribuídos através do experimento de HSQC, uma vez que os sinais em 2,72 e 3,23-3,25 mostraram correlações com um único sinal de carbono em δ 27,7 o que permitiu atribuí-los como sendo os hidrogênios de H-4. O mesmo foi observado para os deslocamentos em δ 2,77 e 3,23-3,25, ou seja uma única correlação de sinal de carbono em δ 53,0 possibilitando assim atribuí-los com H-5. Os hidrogênios H-7 apresentaram sinais em 2,83 (t, $J=14,0;14,0$ Hz) e 3,15 (dd, $J=14,0; 4,2$ Hz) (Figuras 39, 44 e 45). Assim, foi possível estabelecer a identidade de FA3 como sendo o alcalóide aporfínico *stricto sensu* dicentrina (ZHOU *et al.*, 2000; GUINAUDEAU, LEBOEUF e CAVÉ, 1979; GUINAUDEAU, LEBOEUF e CAVÉ, 1975)

TABELA 5 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DA FRAÇÃO FA3 COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A DICENTRINA E CORRELAÇÕES $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ A LONGA DISTÂNCIA.

Posições carbonos	$^{13}\text{C}^a$ dicentrina	$^{13}\text{C}^b$ dicentrina	$^{13}\text{C}^c$ FA3	$^1\text{H}^e$ dicentrina	$^1\text{H}^g$ FA3	HMBC h $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$
1	141,80	141,7	142,1			
2	146,66	146,6	147,2			
3	106,75	106,1	106,7	6,51 (1H, s, H -3)	6,53 (1H, s, H - 3)	1; 2; 4; 11b
3a	126,49	126,6	125,5			
4	28,98	29,2	27,7		2,72 m; 3,25-3,23 m	
5	53,47	53,6	53,0		2,77 m; 3,25 -3,23 m	
6a	62,31	62,4	61,9		3,51 m	
7	34,06	34,3	33,2	2,66 (1H, dd, $J = 14,3; 14,3$) 3,19 (1H, dd, $J = 14,3; 4,42$)	2,83 (1H, t, $J = 14,0; 14,0$) 3,15 (1H, dd, $J = 14,0; 4,2$)	6a; 7a; 8; 11a
7a	128,19	128,3	127,2			
8	110,45	110,5	111,3	6,77 (1H, s, H - 8) ^f	6,78 (1H, s, H - 8)	7;7a;10;11;11a;11b
9	148,23	148,2	148,4			
10	147,66	147,6	147,9			
11	111,21	111,2	110,5	7,66 (1H, s, H -11)	7,65; (1H, s, H - 11)	7a; 8;9;11a; 11b
11a	123,47	123,4	123,1			
11b	116,59	116,6	116,7			
11c	126,30	126,4	124,8			
N-CH ₃	43,67	44,0	42,5 ^d	2,56 (3H, s)	2,68 (3H, s)	5; 6a
9-OCH ₃	55,86	55,9 ^a	55,9	3,91 (3H, s)	3,921 (3H, s)	8; 9
10-OCH ₃	56,08	56,1 ^a	56,1	3,92 (3H, s)	3,924 (3H, s)	10; 11
1-2 O-CH ₂ -O	100,63	100,2	100,8	5,92 e 6,07(1H cada, d, $J = 1,5$)	5,95 e 6,10(1H cada, d, $J = 1,4$)	1; 2

Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C são expressos em ppm em relação ao sinal do TMS como referência em δ 0,00 ppm.

As constantes de acoplamento J são expressas em Hz.

^{a, e} ZHOU, B.N. *et al.* **J.Nat. Prod.** v.63, 2000.

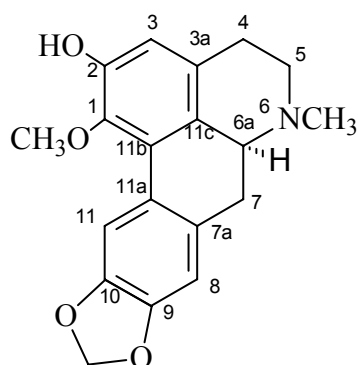
^f GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. **Lloydia**, v.38, n.4, 1975. p.292

^b GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. **J. Nat. Prod.**, v.42, n.4, 1979. p.330

^{c, g, h} Todas as medidas foram feitas observando-se o núcleo de hidrogênio a 400 MHz e ^{13}C a 100 MHz, CDCl_3 .

^d Correlação observada no mapa de contorno HSQC.

5.1.3.3 Identificação da fração FB



Isodomeesticina

A fração FB (40 mg) resultou da unificação das frações F2.4.2.1.2 (9,9 mg) e F2.4.2.2.2 (30 mg). A tabela 6 mostra a comparação dos valores de deslocamento químico de RMN de ^1H (Figura 46) e ^{13}C (Figura 47) para o alcalóide FB com aqueles encontrados na literatura e as correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC. Todas as figuras do item 5.1.3.3 constam do Anexo 3.

No espectro de RMN de ^1H da fração FB (Figura 46) foram observados os três singletos em δ 7,81 (1H), δ 6,75 (1H) e δ 6,66 (1H) que foram atribuídos ao H -11, H-8 e H-3, respectivamente.

O hidrogênio H-11 em δ 7,81 (Figura 46) mostrou correlação direta com o carbono em δ 107,8 no experimento HSQC (Figura 48) e correlação de longa distância (Figuras 49, 50 e 51) com os carbonos 7, 7a, 8, 9, 10 e 11b.

O hidrogênio H-8 como singlete em δ 6,75 (Figura 46) mostrou correlação com carbono em δ 108,5 no experimento HSQC (Figura 48) e correlação a longa distância (Figuras 49, 50 e 52) com os carbonos 7, 9, 10, 11, 11a e 11b.

O hidrogênio H-3 em δ 6,66 (Figura 46) mostrou correlação direta com um carbono em δ 113,6 no experimento HSQC (Figura 48) e também correlação em longa distância (Figuras 49 e 50) com os carbonos 1, 2, 4, 6a, 11b, 11c.

Os dois dubletos no espectro de RMN de ^1H (Figuras 46 e 53) em δ 5,98 e δ 5,99 ambos com constante de acoplamento de 1,4 Hz são características de hidrogênios do grupo metilenodioxílico (OCH_2O), o que pode ser confirmado pela presença do carbono metilênico cetálico em δ 101,0 no experimento HSQC (Figura

48) e correlação a longa distância (Figuras 50 e 54) com os carbonos 9 e 10, o que permitiu localizar o grupo metilenodioxílico em C-9 e C-10.

Observou-se ainda no espectro de RMN de ^1H um singlete em δ 3,57 (Figura 46), de integração três, o qual foi atribuído à presença de um grupo metoxila (OCH_3) na estrutura. Os hidrogênios do grupo metoxílico apresentaram correlação no experimento HSQC com um carbono em δ 60,3 (Figura 55) e em longa distância (Figura 56) mostra correlação com C-1, localizando o grupo metoxílico no C-1.

No espectro de RMN de ^1H foi observado um singlete de integração para três hidrogênios com absorção em δ 2,68 (Figura 46) atribuído ao grupo metílico ligado ao nitrogênio (NCH_3). Os hidrogênios mostraram correlação direta no experimento HSQC com um carbono em δ 42,4 (Figura 55) e a longa distância (Figuras 57 e 58) com os carbonos 5 e 6a, localizando o grupo N-metílico entre os carbonos 5 e 6a.

Os hidrogênios diastereotópicos H-4 apresentaram no espectro de RMN de ^1H multipletos em δ 2,71 e δ 3,23 a 3,25, os hidrogênios diastereotópicos H-5 como multipletos em δ 2,74 e δ 3,23 a 3,25 e o hidrogênio H-6a como multiplete em δ 3,33. A correta multiplicidade bem como as constantes de acoplamento destes hidrogênios não puderam ser obtidos devido estarem em uma região de alta sobreposição de sinais. Entretanto, os deslocamentos químicos dos hidrogênios H-4 e dos H-5 puderam ser atribuídos através do experimento de HSQC (Figura 55), uma vez que os sinais em 2,71 e 3,23-3,25 mostraram correlações com um único sinal de carbono em δ 27,37 o que permitiu atribuí-los como sendo os hidrogênios de H-4. O mesmo foi observado para os deslocamentos em δ 2,74 e 3,23-3,25, ou seja, uma única correlação em um carbono de δ 52,8, possibilitando assim atribuí-los com H-5. Os hidrogênios H-7 apresentaram sinais em 2,77 (t, $J=13,9$; 13,9 Hz) e 3,02 (dd, $J=13,9$; 3,8 Hz) (Figuras 59 e 60).

A pouca quantidade de sinais na região aromática deste espectro de RMN de ^1H é um indicativo de que a estrutura é altamente substituída. A presença de 4 carbonos quaternários sp^2 em δ em torno de 140 -150 ppm no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 47), característicos de carbono aromático oxigenado, foi atribuído aos carbonos que sustentam o grupo metilenodioxílico em C-9 e C-10, o grupo metoxílico em C-1 e de um grupo hidroxílico (OH) em C-2, o que foi comprovado no espectro de IV (Figura 61), pela banda de deformação axial em 3438 cm^{-1} . O

posicionamento do grupo metoxílico em C-1 e conseqüentemente do grupo hidroxílico em C-2 e do grupo metilenodioxílico em C-9 e C-10 só foi possível através das correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC (Tabela 6). Assim, foi possível estabelecer a identidade de FB como sendo o alcalóide aporfínico *stricto sensu* isodomesticina (ARAÚJO, 2000; GUINAUDEAU, LEBOEUF e CAVÉ, 1975).

TABELA 6 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DA FRAÇÃO FB COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A ISODOMESTICINA E CORRELAÇÕES ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA.

Posições carbonos	$^{13}\text{C}^a$	$^{13}\text{C}^b$ FB	$^1\text{H}^c$	$^1\text{H}^d$ FB	HMBC e ^1H - ^{13}C
1	142,8	142,7			
2	148,9	148,8			
3	113,6	113,6	6,62 (s)	6,66 (1H, s)	1; 2; 4; 6a; 11b; 11c
3a	128,5	128,3			
4	27,3	27,3		2,71 m; 3,25-3,23 m	
5	52,8	52,8		2,74 m; 3,25 -3,23 m	
6a	62,1	62,1		3,33 m	3
7	33,8	33,9		2,77 (1H, t, $J = 13,9; 13,9$) 3,02 (1H, dd, $J = 13,9; 3,8$)	8; 11
7a	129,7	129,4			
8	108,6	108,5	6,76(s)	6,75 (1H, s)	7; 9; 11; 11a;
9	147,2	147,0			
10	146,9	146,7			
11	107,8	107,8	7,83(s)	7,81; (1H, s)	7; 7a; 8; 10; 11b
11a	125,0	124,9			
11b	126,1	126,0			
11c	125,0	124,0			
N-CH ₃	42,3	42,4	2,50(s)	2,68 (3H, s)	3a; 4; 5; 6a; 7; 11c
1-OCH ₃	60,4	60,3	3,57(s)	3,57 (3H, s)	1
O-CH ₂ -O	101,1	101,0	5,95(s)	5,98 e 5,99(1H cada, d, $J = 1,4$)	9; 10

Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C são expressos em ppm em relação ao sinal do TMS como referência em δ 0,00 ppm.

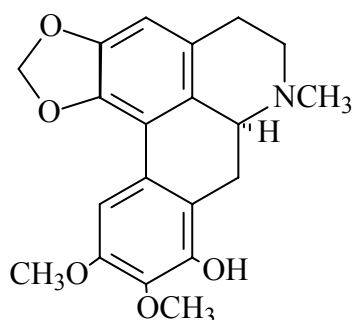
As constantes de acoplamento J são expressas em Hz

^a ARAÚJO, A.J. Curitiba, 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Química) – Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

^c GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids. *Lloydia*, v.38, n.4, 1975. p.289

^{b, d, e} Todas as medidas foram feitas observando-se o núcleo de hidrogênio a 400 MHz e ^{13}C a 100 MHz, CDCl₃.

5.1.3.4 Identificação da fração FC



Leucocoxina

A fração FC foi obtida da unificação das frações F2.4.2.3 (21,3 mg) e da fração F2.4.2.4 (10,5 mg) que após purificado em CCDP, resultou em 9,3 mg de amostra. A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C apresentou impurezas, sendo novamente repurificado por CCDP resultando em 3,9 mg de amostra. Todas as figuras do item 5.1.3.4 constam do Anexo 3.

No espectro de RMN de ^1H da fração FC (Figura 62) foram observados somente 2 singletos em δ 6,58 (1H) e δ 7,26 (1H) que foram atribuídos aos H-3 e H-11, respectivamente.

O hidrogênio H-3 em δ 6,58 (Figura 63) mostra correlação direta com o carbono em δ 106,8 no experimento HSQC e também a longa distância no experimento HMBC (Figura 64) com os carbonos 1, 2, 11b.

O hidrogênio H-11 em δ 7,26 mostra correlação direta com o carbono em δ 102,7 no experimento HSQC (Figura 63) e correlação em longa distância HMBC (Figura 64) com os carbonos 7a, 8, 9, 10, 11a e 11b.

Os dois dubletos no espectro de RMN de ^1H com absorção em δ 5,96 e δ 6,14, ambos com constante de acoplamento de 1,18 Hz (Figura 65) são característicos de hidrogênios do grupo metilenodioxílico (OCH_2O), o que pode ser confirmado pela presença do carbono metilênico cetálico em δ 101,2 no experimento HSQC (Figura 63) e correlação a longa distância (Figura 64) no experimento HMBC com os carbonos 1 e 2 que nos permite localizar o grupo metilenodioxílico nesta posição.

Observou-se ainda no espectro de RMN de ^1H dois singletos em δ 3,90 e δ 3,94 (Figura 62), ambos de integração três, os quais foram atribuídos a presença de dois grupos metoxilas (OCH_3) na estrutura. Os hidrogênios dos grupos metoxílicos no experimento HSQC (Figura 66) mostram correlação direta com os carbonos em δ 55,6 e δ 60,5. Em longa distância, no experimento HMBC (Figuras 67) o sinal em δ 3,90 mostra correlação com o carbono em δ 151,6 e o sinal em δ 3,94 mostra correlação com o carbono em δ 135,5.

No espectro de RMN de ^1H foi observado ainda um singlete de integração para três hidrogênios em δ 3,01 atribuído ao grupo metila ligado ao nitrogênio. A correlação entre o sinal em δ 3,01 com δ 41,5 é observado no experimento HSQC (Figura 68).

Os hidrogênios diastereotópicos H-4 apresentaram sinais no espectro de RMN de ^1H como multipletos em δ 3,33 – 3,39, os hidrogênios diastereotópicos H-5 como multipletos em δ 3,59 – 3,72. A correta multiplicidade bem como as constantes de acoplamento destes hidrogênios não puderam ser obtidas devido estarem em uma região de alta sobreposição de sinais. Os sinais em δ 3,33 – 3,39 mostram no experimento HSQC uma correlação direta com um sinal de carbono em δ 29,3 atribuído ao C-4 e os sinais em δ 3,59 – 3,72 mostram uma correlação direta com um sinal de carbono em δ 52,9 atribuído ao C-5. Os sinais no espectro de RMN de ^1H em δ 3,64 – 3,72 como multipletos foram atribuídos aos hidrogênios de H-7 e mostram correlação direta no experimento HSQC com um sinal de carbono em δ 23,4. (Figura 68). A ausência do sinal referente ao H-8 no espectro de RMN de ^1H sugere um grau de substituição maior no anel D que, associado à presença de 5 carbonos quaternários sp^2 oxigenados em torno de δ 135 – 150 ppm no espectro de RMN de ^{13}C (Figura 69), característicos de carbono aromático oxigenado, sustentam o grupo metilenodioxílico em C-1 e C-2, os grupos metoxílicos em C-9 e C-10 e um grupo hidroxila atribuído ao C-8 caracterizado pela banda de deformação axial em 3368 cm^{-1} na análise da amostra no espectro de IV (Figura 70). A Tabela 7 mostra a comparação dos valores de deslocamento químico de RMN de ^1H para o alcalóide FC com aqueles encontrados em literatura e as correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC. Os deslocamentos químicos do espectro de RMN de ^{13}C de δ 126,2 do carbono 11c foi obtido antes da repurificação da amostra FC. A

pouca quantidade final da amostra FC não evidenciou o deslocamento químico deste carbono.

Os posicionamentos dos grupos metilenodioxílico, metoxílicos e hidroxílico foi possível através das correlações observadas nos mapas de contorno HSQC e HMBC. Assim, a identidade de FC foi caracterizada como sendo o alcalóide aporfínico *stricto sensu* leucoxina (ARAÚJO, 2000; GUINAUDEAU, LEBOEUF e CAVÉ, 1979).

TABELA 7 – COMPARAÇÃO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DE RMN DE ^1H E DE ^{13}C DA FRAÇÃO FC COM OS ENCONTRADOS NA LITERATURA PARA A LEUCOXINA E CORRELAÇÕES ^1H - ^{13}C A LONGA DISTÂNCIA.

Posições carbonos	$^{13}\text{C}^a$ Leucoxina	$^{13}\text{C}^b$ Leucoxina	$^{13}\text{C}^c$ FC	$^1\text{H}^e$ Leucoxina	$^1\text{H}^f$ FC	HSQC ^g ^1H - ^{13}C	HMBC ^h ^1H - ^{13}C
1	141,6	142,6	143,2				
2	146,0	146,2	148,3				
3	106,8	107,4	106,8	6,55 (1H, s, H -3)	6,58 (1H, s, H - 3)	106,8 (C-3)	1; 2; 11b;
3a	126,7	126,7	125,4				
4	28,7	28,2	29,3		3,33-3,39 m	29,3	
5	52,9	53,2	52,9		3,59 -3,72 m	52,9	5
6a	61,7	61,8	62,5				
7	25,8	25,3	23,4		3,64-3,72 m	23,4	
7a	115,6	-	111,6		3,32 - 3,39 m		7a
8	146,8	147,1	146,2				
9	135,9	135,1	135,5				
10	150,8	150,8	151,6				
11	102,3	103,2	102,7	7,30 (1H, s, H -11)	7,26; (1H, s, H - 11)	102,7 (C-11)	7a; 8; 9; 10; 11(J1); 11a; 11b
11a	125,8	-	123,3				
11b	116,0	116,7	116,3				
11c	126,4	126,1	126,2 ^d				
N-CH ₃	43,5	43,0	41,5	2,69 (3H, s)	3,01 (3H, s)	41,5	
9-OCH ₃	60,2	61,0	60,5	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)	55,6	55,6 (J1); 10
10-OCH ₃	55,6	55,9	55,6	3,94 (3H, s)	3,94 (3H, s)	60,5	60,5 (J1); 9
1-2 O-CH ₂ -O	100,4	100,8	101,2	5,93 e 6,10 (1H cada, d, J =1,4)	5,96 e 6,14 (1H cada, d, J =1,18)	101,2	101,2(J1); 1; 2

Os deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C são expressos em ppm em relação ao sinal do TMS como referência em δ 0,00 ppm.

As constantes de acoplamento J são expressas em Hz.

^a GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. **J. Nat. Prod.**, v.42, n.4, 1979.

^{b, e} ARAÚJO A.J. Curitiba, 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Química)- Setor de Ciências Exatas, UFPR

^d Medida feita observando-se o núcleo de ^{13}C a 50 MHz

^{c, f, g, h} Medidas foram feitas observando-se o núcleo de hidrogênio a 400 MHz e ^{13}C a 100 MHz, CDCl_3 .

5.2 AVALIAÇÃO DAS MUDAS DE *Ocotea puberula* OBTIDAS EM VIVEIRO

5.2.1 Características de lote e germinação de sementes

As características do lote de sementes coletado são de 170,7 g/1.000 sementes, 5.856 sementes/kg e umidade de 35,3%. No Brasil a variação é de 3.000 a 7.861 sementes/kg e na Argentina este valor é de 16.234 sementes/kg (CARVALHO, 2003). Em trabalho de NOGUEIRA, PORTELA e NAZÁRIO (2002) os dados de sementes coletadas em Antonina/PR são de 411,0 g/1000 sementes, 2.427 sementes/kg e umidade de 41,1% e para sementes coletadas em Irati/PR são de 166,5 g/1.000 sementes, 6.007 sementes/kg e umidade de 34,9%.

Foram submetidas ao processo de germinação 12.058 sementes provenientes das 5 matrizes identificadas, distribuídas em 241 recipientes gerbox.

A razão de se trabalhar com 5 espécimens baseou-se que entre indivíduos de uma mesma espécie os metabólitos secundários diferem total ou parcialmente na concentração de cada composto (BRENES-ARGUEDAS e COLEY, 2005).

5.2.2 Desenvolvimento de mudas em viveiro

A semeadura foi realizada no dia 8 de janeiro de 2003. Para o período inicial de germinação de 50 dias até 28.02.2003, observou-se resultado de germinação muito baixo com 29 sementes germinadas, correspondendo a 0,24% das mesmas. Durante este período de baixa germinação ou dormência, as plântulas que germinaram não foram utilizadas por serem de quantidade insignificante. Observamos na Tabela 8 os resultados do processo germinativo e um período alongado de germinação (INOUE, RODERJAN e KUNIYOSHI, 1984), sendo que a contagem foi interrompida em 20.06.2003 com 5 meses de germinação. A percentagem de sementes germinadas foi de 38,58%, sendo considerado baixo em relação ao percentual de até 75% (CARVALHO, 2003) e 70,9% (NOGUEIRA, PORTELA e NAZÁRIO, 2002).

TABELA 8 – RESULTADO DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE IRATI/ PR

RESUMO GERMINAÇÃO / IRATI / PR				
Data/ dias acumulados	Sementes germinadas	% Sementes germinadas	% do total de sementes germinadas	IVG
08.01	-			
28.02 / 50	61	1,31	0,51	0,0101
17.03 / 67	106	2,28	0,88	0,0131
24.03 / 74	143	3,07	1,19	0,0160
01.04 / 81	263	5,66	2,18	0,0269
07.04 / 87	319	6,86	2,64	0,0304
14.04 / 94	418	8,99	3,47	0,0368
22.04 / 102	471	10,13	3,91	0,0383
28.04 / 108	176	3,78	1,46	0,0135
05.05 / 115	341	7,34	2,83	0,0246
12.05 / 122	324	6,96	2,68	0,0220
22.05 / 132	311	6,69	2,58	0,0195
30.05 / 140	459	9,86	3,81	0,0272
06.06 / 146	462	9,93	3,83	0,0262
13.06 / 151	380	8,17	3,15	0,0209
20.06 / 159	417	8,97	3,46	0,0217
Total	4651	100,00	38,58	0,3472

Exemplo de cálculo de IVG = $61 \times 100/12058 = 0,5059/50 = 0,0101$

Nota: - Sementes de Irati/PR com semeadura em 08.01.2003 e término de germinação em 20.06.2003. Lote de 12058 sementes.

TABELA 9 – RESULTADO DO PROCESSO DE GERMINAÇÃO DE SEMENTES DE ANTONINA/PR

RESUMO DE GERMINAÇÃO / ANTONINA / PR				
Data/ dias acumulados	Sementes germinadas	% sementes germinadas	% do total de sementes germinadas	IVG
03.01 / 40	54	8,1	3,37	0,0843
10.01 / 47	55	8,2	3,44	0,0731
15.01 / 52	37	5,5	2,31	0,0445
22.01 / 59	75	11,2	4,69	0,0794
29.01 / 63	37	5,5	2,31	0,0367
01.02 / 71	43	6,5	2,69	0,0378
06.02 / 76	88	13,2	5,50	0,0723
13.02 / 95	20	3,0	1,25	0,0132
19.02 / 101	68	10,2	4,25	0,0421
26.02 / 108	58	8,7	3,63	0,0335
05.03 / 117	36	5,4	2,25	0,0192
12.03 / 124	12	1,8	0,75	0,0060
19.03 / 131	19	2,9	1,19	0,0091
26.03 / 138	47	7,1	2,94	0,0212
03.04 / 145	18	2,7	1,12	0,0077
Total	667	100,0	41,69	0,5800

Exemplo de cálculo de IVG = $54 \times 100/ 1600 = 3,375/40 = 0,0843$

Nota: Semeadura em 23.11.2001 e término de germinação em 03.04.2002 (NOGUEIRA, PORTELA, NAZÁRIO e CERCAL, 2002, dados não publicados). Lote de 1600 sementes.

As mudas originárias de sementes provenientes do Município de Irati, Estado do Paraná, apresentaram crescimento menor quando comparado com as mudas de sementes provenientes de Antonina/PR. Vários são os aspectos indicativos para este comportamento de crescimento. Os resultados do número de sementes/kg mostram que as sementes provenientes de Antonina/PR são maiores que as de Irati/PR (NOGUEIRA, PORTELA e NAZÁRIO, 2002). A origem das sementes de biomas diferentes pode ter muita influência sobre o seu comportamento, pelo menos na fase de germinação. Usualmente sementes maiores fornecem mudas mais vigorosas. O tamanho da semente tem efeito pronunciado sobre o crescimento inicial das plântulas (KRZYZANOWSKI, VIEIRA e FRANÇA NETO, 1999; CARVALHO, 1988). O nível de vigor das sementes também influi decisivamente sobre o processo de germinação, quer retardando-o, quer provocando o aparecimento de plântulas anormais, quer impedindo a germinação. Sementes de menor vigor germinam mais lentamente (CARVALHO, 1988). A velocidade de germinação (IVG) baseia-se no princípio de que as sementes que apresentam maior velocidade de germinação são mais vigorosas, ou seja, que há relação direta entre velocidade de germinação e vigor das sementes (KRZYZANOWSKI, VIEIRA e FRANÇA NETO, 1999; POPINIGIS 1977). Menor vigor das sementes mostra menor desenvolvimento inicial das mudas e maior possibilidade de “dumping-off” ou tombamento (CARVALHO, 1988). Os resultados de germinação das sementes provenientes de Antonina/PR, conforme Tabela 9, sob mesmas condições, mostraram Índice de Velocidade de Germinação (IVG) de 0,58 comparado com o índice de 0,35 para as sementes de Irati/PR, conforme Tabela 8, indicando que as sementes de Antonina/PR possuem maior vigor e portanto maior desenvolvimento das mudas. Para obter o IVG multiplica-se o número de plântulas retiradas de cada coleta, pelo inverso do número de dias de germinação após o início do teste, somando-se os valores obtidos. Para os primeiros 60 dias de germinação as sementes de Irati resultaram em 0,65% de sementes germinadas e 14,00% de sementes de Antonina/PR e para 90 dias de germinação mostraram 5,9% de sementes germinadas de Irati/PR e 33,6% de Antonina/PR (NOGUEIRA, PORTELA, NAZÁRIO e CERCAL, 2002; dados não publicados referentes a Antonina/PR).

Segundo KRZYZANOWSKI, VIEIRA e FRANÇA NETO (1999), CARVALHO (1988) e POPINIGIS(1977), há relação direta entre vigor de sementes, velocidade de

germinação e desenvolvimento inicial de mudas em viveiro. Dentro desta perspectiva, em função de quantidade, homogeneidade de mudas necessárias para o presente trabalho foi definido um período máximo de germinação de 30 dias, iniciado a partir de 24.03 até 22.04.2003, sendo transferidas 1470 plântulas para o viveiro.

As mudas no viveiro, com 3 meses de idade, sofreram uma tempestade forte com chuva de granizo, causando injúrias na parte aérea e tombamento de aproximadamente 20% das mesmas.

Os dados obtidos de desenvolvimento, quantidade utilizada, rendimento e coleta das mudas utilizadas constam da Tabela 10.

TABELA 10 – DESENVOLVIMENTO, QUANTIDADE UTILIZADA, COLETA E RENDIMENTO EM MATÉRIA SECA DE MUDAS DE *Ocotea puberula*

Idade meses	Data de coleta	Mudas utilizadas	Altura média das mudas (cm)	Comp.médio das raízes (cm)	Peso médio das mudas (g)	Rend. médio de matéria seca das mudas (%)
3	7.07.03	240	3,63	10,76	0,34	26,10
6	7.10.03	239	3,83	15,22	0,40	31,85
9	7.01.04	248	6,06	22,62	1,08	29,10
12	7.04.04	232	7,30	25,48	2,31	33,40

5.3 MÉTODOS EXTRATIVOS PARA FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE MUDAS DE *Ocotea puberula*

5.3.1 Processo extrativo a quente em extrator de Soxhlet convencional para obtenção de extratos brutos

O extrator de Soxhlet é utilizado sobretudo para extrair sólidos com solventes voláteis. Em cada ciclo da operação o material vegetal entra em contato com solvente renovado e assim, o processamento possibilita uma extração altamente eficiente empregando uma quantidade reduzida de solvente, em comparação com as quantidades necessárias nos outros processos extrativos para se obter os mesmos resultados qualitativos e quantitativos (FALKEMBERG, SANTOS e SIMÕES *in* SIMÕES 1999).

Neste método de extração o material a extrair sofre influência da temperatura, que provoca um aumento da solubilidade de qualquer substância e rapidez de processo. Entretanto, o calor nem sempre pode ser empregado, já que muitas substâncias são instáveis em temperaturas mais elevadas. O tempo de extração varia em função da rigidez dos tecidos do material vegetal, do seu estado de divisão, da natureza das substâncias a extrair, do solvente utilizado e do emprego ou não de agitação, que poderia agilizar o processo (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES *in* SIMÕES, 1999; CASTRO e GARCIA-AYUSO, 1998). Em trabalho de ARAÚJO (2000) foi utilizado este método para extrair alcalóides de folhas adultas de *Ocotea puberula*, utilizando apenas EtOH como líquido extrator por um período de 28 horas. O método utilizado para obtenção de extratos brutos de folhas, caules e raízes de mudas está descrito no item 4.1.1.3. Os rendimentos das extrações apresentados na Tabela 11 mostram que a extração metanólica foi a mais expressiva quando comparadas com as de EP e DCM.

TABELA 11 - RENDIMENTOS DE EXTRATOS BRUTOS DE MUDAS DE 3, 6, 9 e 12 MESES DE SEMENTES PROVENIENTES DE IRATI/PR.

Idade das mudas	03 meses			06 meses			09 meses			12 meses		
	raiz	caule	folha	raiz	caule	folhas	raiz	caule	folha	raiz	caule	folha
Data da coleta no viveiro	15.07.2003			15.10.2003			15.01.2004			15.04.2004		
Parte da muda												
Material seco (g)	7,49	4,51	9,34	4,04	5,21	9,99	37,27	12,25	24,42	46,45	30,64	57,00
Solvente de extração	EP											
Massa de extrato bruto (g)	0,08	0,08	0,22	0,14	0,05	0,19	0,77	0,14	0,70	1,04	0,34	1,88
Rendimento (%relativo) ao material seco	1,07	1,77	2,36	1,00	0,96	1,90	2,07	1,14	2,87	2,24	1,11	3,30
Solvente de extração	DCM											
Material seco após extração EP (g)	7,41	4,43	9,12	13,90	5,16	9,80	36,50	12,11	23,72	45,41	30,30	55,12
Massa de extrato bruto (g)	0,09	0,05	0,19	0,17	0,05	0,18	0,58	0,11	0,50	0,64	0,24	0,70
Rendimento em percentagem (%)	1,21	1,13	2,08	1,22	0,97	1,84	1,59	0,91	2,11	1,41	0,79	1,27
Solvente de extração	MeOH											
Material seco após extração DCM(g)	7,32	4,38	8,93	13,73	5,11	9,62	35,92	12,00	23,22	44,77	30,06	54,42
Massa de extrato bruto (g)	1,43	1,06	3,23	1,78	1,15	3,35	3,32	2,34	9,48	4,88	5,15	15,99
Rendimento em percentagem (%)	19,53	24,20	36,17	12,96	22,50	34,82	9,24	19,50	40,83	10,90	17,13	29,38

5.3.2 Processo extrativo à quente em extrator de Soxhlet modificado para obtenção de extratos alcaloídicos brutos.

A extração é feita através de partição líquido-líquido, a quantidade de solvente é constante no sistema, tanto no balão como no extrator e o solvente DCM mais denso que a fase aquosa permanece na parte inferior do extrator, transferindo para o balão por gotejamento, através do sifão, o extrato alcaloídico solubilizado no DCM. O método está descrito no item 4.1.1.2. Para a obtenção dos extratos alcaloídicos, os extratos brutos de EP, DCM e MeOH das partes das mudas em suas respectivas idades foram unificados e submetidos à extração alcaloídica. A Tabela 12 mostra os rendimentos obtidos. As folhas forneceram o maior rendimento de extrato bruto alcaloídico comparado com caules e raízes, a partir do terceiro mês de idade.

TABELA 12 - RENDIMENTOS DE EXTRATOS ALCALOÍDICOS BRUTOS DE FOLHAS, CAULES E RAÍZES DAS MUDAS EM PERCENTAGEM (%).

idade (meses)	folhas			caule			raiz		
	peso seco (g)	extrato (g)	rendimento (%)	peso seco (g)	extrato (g)	rendimento (%)	peso seco (g)	extrato (g)	rendimento (%)
3	9,34	0,04	0,43	4,51	0,02	0,44	7,49	0,03	0,40
6	9,99	0,12	1,20	5,21	0,02	0,38	14,04	0,06	0,43
9	24,42	0,27	1,10	12,25	0,04	0,33	37,27	0,12	0,32
12	57,00	0,66	1,16	30,64	0,12	0,39	46,45	0,16	0,34

5.4 AVALIAÇÃO DE METODOLOGIA POR CLAE PARA MONITORAMENTO DE ALCALÓIDES

Nas plantas e em seus extratos existem grandes quantidades de compostos desconhecidos, muitos deles em pequenas quantidades e, a vantagem da CLAE está na versatilidade de análise dos mesmos. CLAE é uma ferramenta necessária para análise de compostos de plantas, não está limitada pela volatilidade ou estabilidade dos componentes da amostra e, em geral, pode ser utilizada para

analisar praticamente a maioria deles. As colunas de fase reversa RP são muito usadas na separação analítica de compostos de plantas. CLAE-DAD tem se tornado uma técnica bastante difundida atualmente e com os dados adicionais do espectro de UV, a análise de amostras complexas de plantas tornaram-se mais fáceis. Pode-se observar a pureza de pico e comparar o espectro do padrão conhecido com o da amostra analisada. Processos hifenados, combinando CLAE-DAD-EM, tem a vantagem da separação na cromatografia e a identificação dos compostos com DAD – MS. Recentemente CLAE-RMN tem sido também utilizado na separação e elucidação estrutural de diversos compostos (LIANG, XIE e CHAN, 2004). Em trabalho de TSENG (2000) foi utilizado o acoplamento do CLAE-RMN com resultados de separação e identificação de nove alcalóides aporfinóides, entre os quais está incluída a boldina.

Em trabalho de SUN, LEE e HUANG (1996) foi desenvolvido método analítico para determinação de oito alcalóides aporfinóides, utilizando boldina (Sigma) e isodomeesticina entre outros, obtidos de Lauraceas, que são uma fonte abundante deste tipo de alcalóides. Por eluição isocrática em coluna de fase reversa RP- 18 utilizou-se as fases móveis (A) água com 0,02 M de ácido fosfórico a 85% ajustado pH em 3,7 com hidróxido de amônio a 25% (B) acetonitrila e (C) metanol (45:12:1 v/v/v), vazão de 1 mL/min e detector a 280 nm.

Em trabalho desenvolvido por JÁCOME e OLIVEIRA (2004) com casca de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. foi obtido perfil cromatográfico de alcalóides em coluna de fase reversa RP 18, eluição de gradiente linear e fase móvel de acetonitrila e água com 0,05% de ácido hexanosulfônico, 10:90 – 90:10 em 50 min. Detecção no UV a 210 nm.

O desenvolvimento e validação de metodologia para determinação quantitativa de alcalóides aporfinóides de amostras de *Cassytha filiformis* por CLAE-UV-MS foi realizado por (STÉVIGNY *et al.*, 2004) usando como fase móvel (A) água com 10mM de acetato de amônio ajustado para pH 3,0 com ácido acético-acetonitrila (90:10 v/v) e (B) acetonitrila em coluna RP select B[®], eluição por gradiente, vazão de 0,7 mL/min e detector a 307 nm.

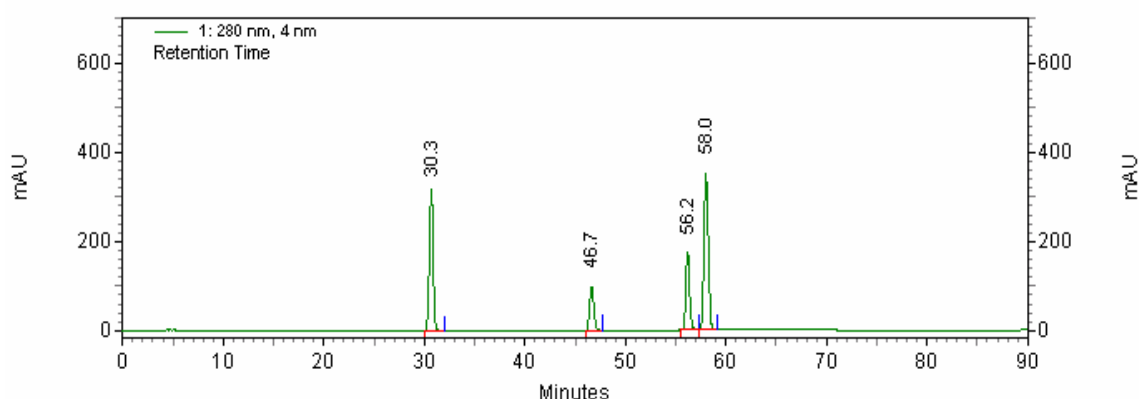
A metodologia desenvolvida por CLAE considerou aspectos dos métodos citados, porém foi específica para o presente trabalho.

5.4.1 Análise dos padrões de alcalóides por CLAE

Os padrões usados como marcadores foram avaliados por CLAE com a mesma metodologia descrita no item 4.1.4. O pico majoritário, pureza e seus tempos de retenção respectivos estão mostrados na Tabela 13 e o cromatograma dos padrões encontram-se na figura 71.

TABELA 13 - AVALIAÇÃO DOS PADRÕES DE ALCALÓIDES USADOS COMO MARCADORES.

Padrão	Pureza (%)	Tempo de Retenção (min)	UV Pico (lambda máximo)		
1. Boldina	99,8	30,3	282	302	
2. FB	94,0	46,7	284	308	
3. FA3	98,8	56,2	225	281	306
4. FC	86,7	58,0	222	281	

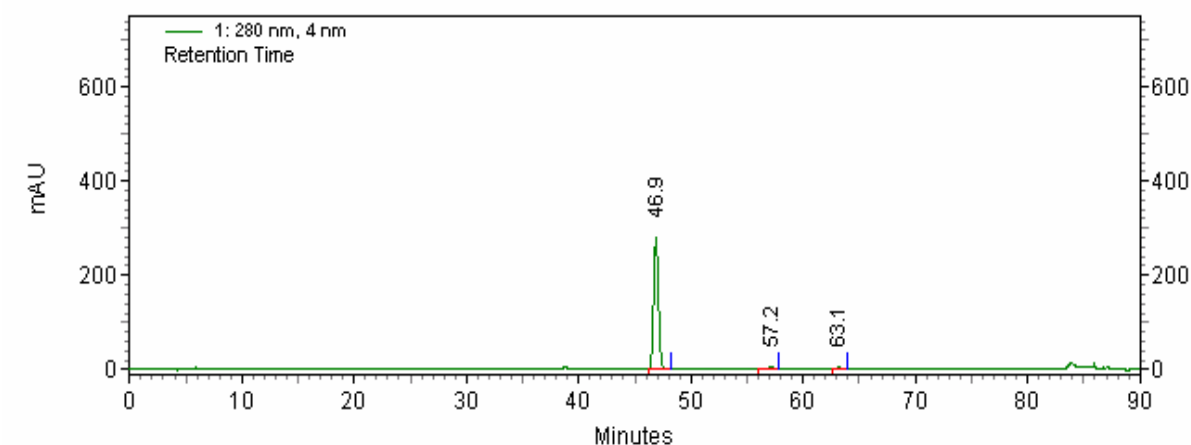


1: 280 nm, 4 nm Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
1	Boldina	30.3	33308329	125.000 CAL	mcg/mL
2	FB	46.7	10888332	157.000 CAL	mcg/mL
3	FA3	56.2	19471500	145.000 CAL	mcg/mL
4	FC	58.0	41168728	165.000 CAL	mcg/mL

FIGURA 71 – CROMATOGRAMA DOS PADRÕES UTILIZADOS POR CLAE

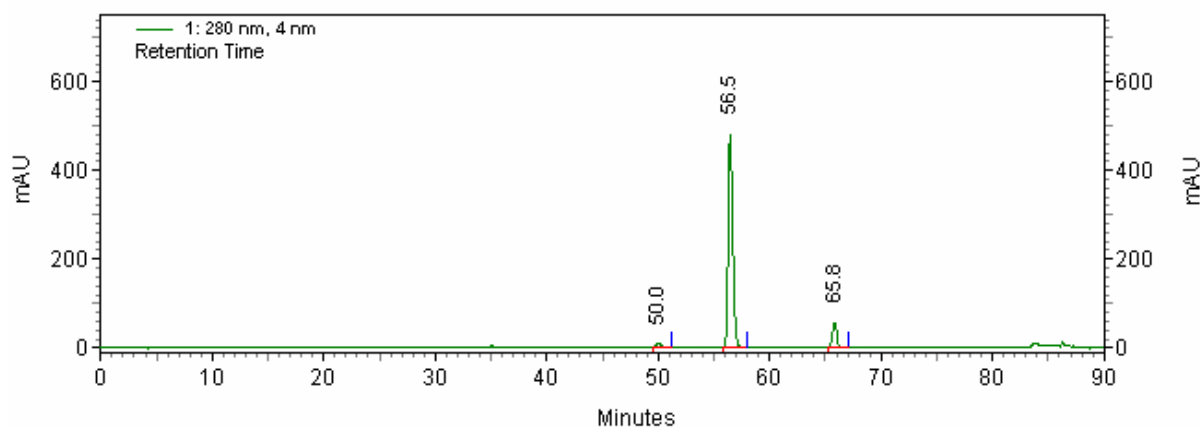
Cada padrão obtido foi avaliado por CLAE com a mesma metodologia descrita no item 4.1.4. O pico majoritário, pureza e seus tempos de retenção respectivos estão mostrados nas Figuras 72 a 74.



1: 280 nm, 4
nm Results

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
1	FB	46.9	32073594	94 %	
2	Impureza	57.2	779137		
3	Impureza	63.1	534913		

FIGURA 72 – PUREZA OBTIDA E TEMPO DE RETENÇÃO DO ALCALÓIDE ISODOMESTICINA



1: 280 nm, 4
nm Results

6 Impureza

Pk #	Name	Retention Time	Area	ESTD concentration	Units
1	Impureza	50.0	1084863		
2	FA3	56.5	56412846	86,7 %	
3	Impureza	65.8	6513728		

FIGURA 73 – PUREZA OBTIDA E TEMPO DE RETENÇÃO DO ALCALÓIDE DICENTRINA

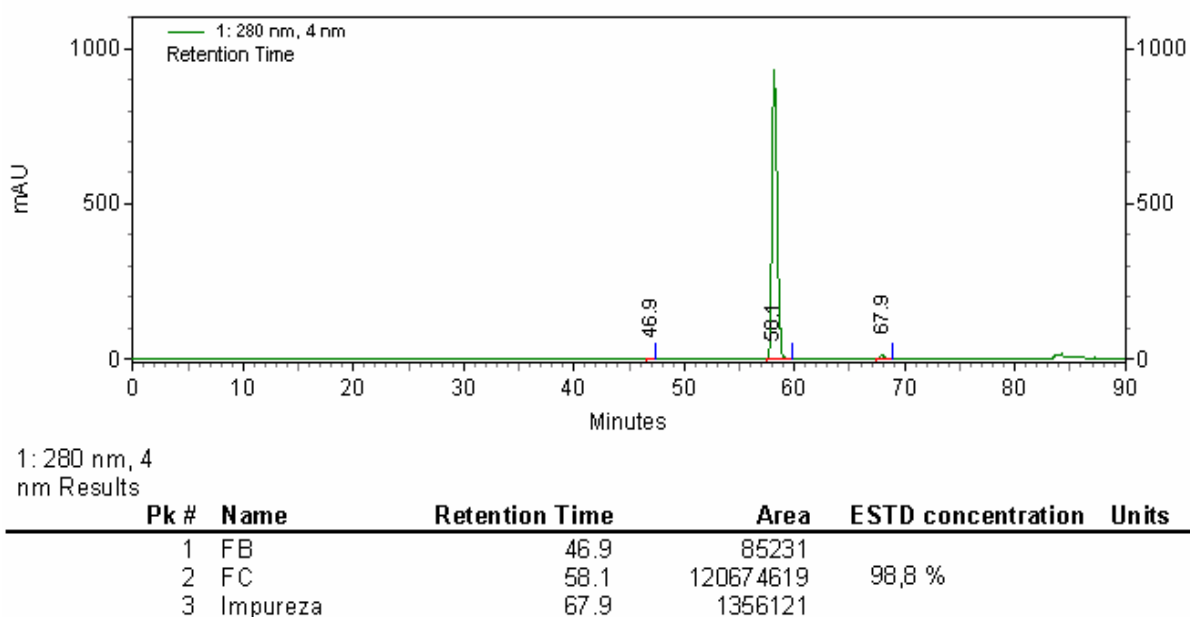


FIGURA 74 – PUREZA OBTIDA E TEMPO DE RETENÇÃO DO ALCALÓIDE LEUCOXINA

5.5 MONITORAMENTO DOS PADRÕES POR CLAE NAS FRAÇÕES DE FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE MUDAS DE *Ocotea puberula* DE 3, 6, 9 e 12 MESES DE IDADE.

O trabalho de monitoramento por CLAE dos alcalóides foi realizado para analisar comparativamente o acúmulo desses metabólitos nas diferentes frações de folhas, caules e raízes de mudas de *Ocotea puberula* ao longo do período de 12 meses com amostragem trimestral.

O método envolve a comparação direta das respostas obtidas com os picos, analisados separadamente, de padrões e amostras, sendo o método de cálculo exemplificado no item 5.1.1.1. Resultados quantitativos foram obtidos por meio de calibração com padrão boldina, utilizando amostradores automáticos. Os resultados estão na Tabela 14.

TABELA 14 - RENDIMENTOS DE PADRÕES OBTIDOS POR CLAE EM FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE MUDAS DE 3, 6, 9 E 12 MESES DE IDADE.

FOLHAS	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses	Folhas adultas (FA)
Boldina ($\mu\text{g/g}$)	23,12	33,15	76,60	29,86	404,20
Isodomeesticina ($\mu\text{g/g}$)	316,20	689,27	1098,17	1061,34	505,03
Dicentrina ($\mu\text{g/g}$)	859,68	2887,17	2067,35	2906,37	196,91
Leucoxina ($\mu\text{g/g}$)	645,73	1584,40	3120,81	2582,36	366,35
Total em folhas ($\mu\text{g/g}$)	1844,73	5193,95	6362,93	9536,07	1472,49

CAULES	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Boldina ($\mu\text{g/g}$)	37,63	46,00	29,55	19,25
Isodomeesticina ($\mu\text{g/g}$)	154,21	138,92	231,73	229,71
Dicentrina ($\mu\text{g/g}$)	91,20	62,18	71,24	212,67
Leucoxina ($\mu\text{g/g}$)	49,75	30,32	25,96	88,57
Total em caules ($\mu\text{g/g}$)	332,79	277,42	358,48	550,22

RAÍZES	3 meses	6 meses	9 meses	12 meses
Boldina ($\mu\text{g/g}$)	41,76	25,06	10,77	-
Isodomeesticina ($\mu\text{g/g}$)	95,21	91,06	51,04	15,48
Dicentrina ($\mu\text{g/g}$)	35,08	68,60	47,02	25,98
Leucoxina ($\mu\text{g/g}$)	53,37	49,23	45,02	37,12
Total em raízes ($\mu\text{g/g}$)	225,42	233,95	153,85	78,59

Total em mudas ($\mu\text{g/g}$)	2402,94	5705,32	6875,26	10164,88
--	----------------	----------------	----------------	-----------------

Os resultados por CLAE para folhas, conforme Figura 75, mostraram aumento da concentração dos alcalóides boldina, isodomeesticina e leucoxina até a faixa de 9 meses de idade com pequena redução deste acúmulo na faixa de 12 meses. A dicentrina, apresentando maior variação, aumentou de concentração até 6 meses, apresentando redução em 9 meses e aumentando novamente em 12 meses.

Outra constatação é que no período analisado, conforme Tabela 14, o acúmulo de alcalóides nas folhas das mudas é significativamente maior, já com 3 meses de idade, do que nas folhas de espécimens adultos.

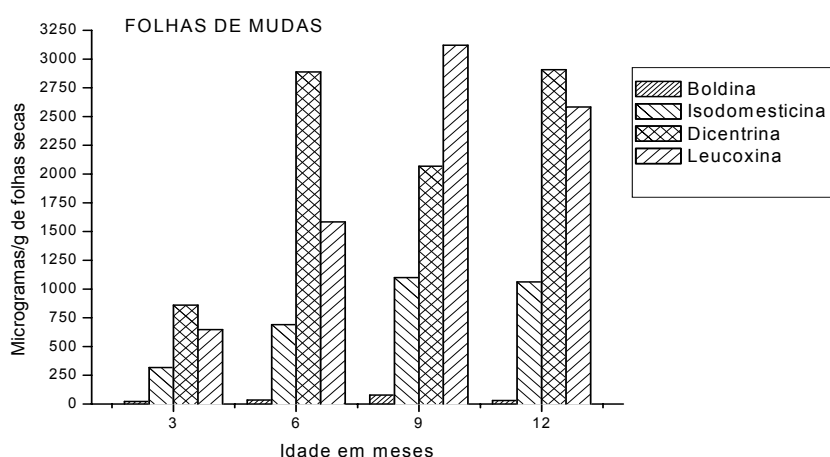


FIGURA 75 – PADRÕES DE ALCALÓIDES EM FOLHAS DE MUDAS ATÉ 12 MESES DE IDADE

Os resultados por CLAE para caules das mudas, conforme figura 76, mostraram redução da concentração dos alcalóides leucoxina, isodomeesticina, dicentrina de 3 para 6 meses, aumentando progressivamente para 9 e 12 meses com exceção da boldina que apresentou pequeno acréscimo de concentração de 3 para 6 meses, decrescendo progressivamente para 9 e 12 meses.

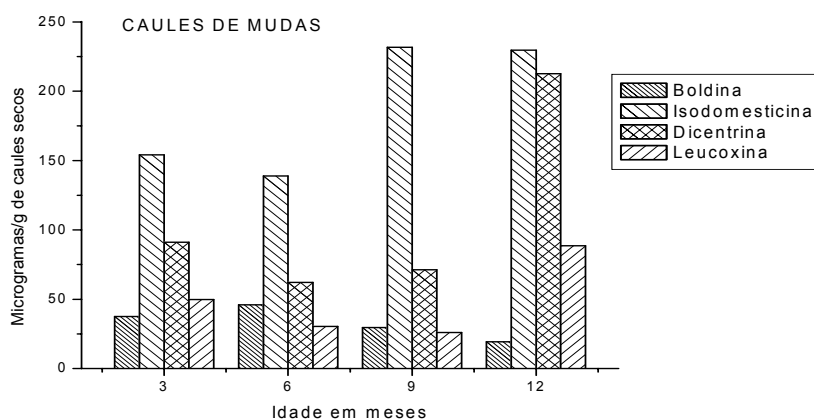


FIGURA 76 – PADRÕES DE ALCALÓIDES EM CAULES DE MUDAS ATÉ 12 MESES DE IDADE.

A análise dos resultados por CLAE para raízes, conforme Figura 77, mostrou redução de concentração de boldina, isodomeesticina e leucoxina, sendo que a boldina não é mais detectada com 12 meses de idade. A dicentrina aumenta a concentração de 3 para 6 meses, reduzindo progressivamente para 9 e 12 meses. O perfil da tendência é de redução destes alcalóides no período analisado.

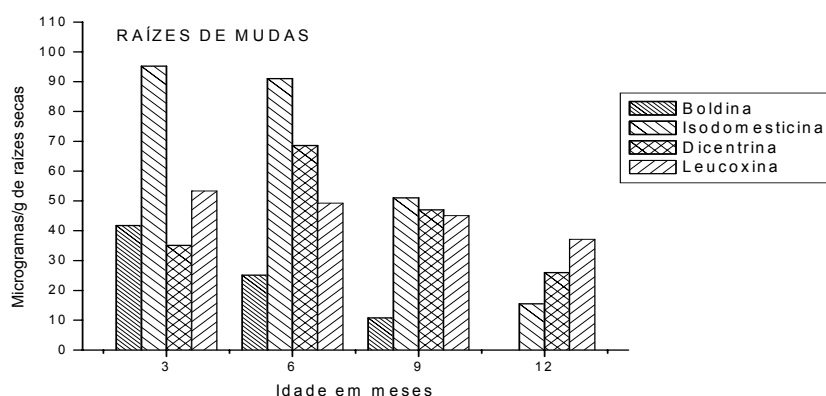


FIGURA 77 – PADRÕES DE ALCALÓIDES EM RAÍZES DE MUDAS ATÉ 12 MESES DE IDADE.

A análise dos alcalóides boldina, dientrina, isodomecicina e leucoxina quando somados separadamente para folhas, caules e raízes das mudas (Figura 78) mostrou que a concentração destes alcalóides nas folhas é significativamente maior que em caules e raízes e crescente no período analisado de 12 meses.

A concentração dos alcalóides somados nos caules apresenta um leve crescimento e a concentração de alcalóides somados nas raízes tem decréscimo no mesmo período analisado.

Este comportamento sugere que os alcalóides estejam sendo produzidos nas raízes e translocados para caules e folhas, no período analisado.

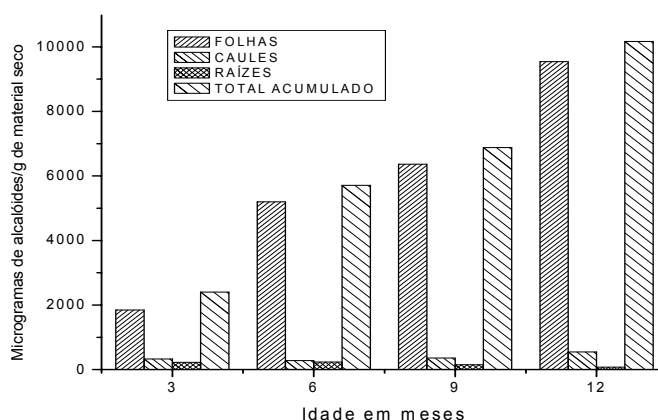


FIGURA 78 – DISTRIBUIÇÃO DOS ALCALÓIDES ACUMULADOS EM FOLHAS, CAULES E RAÍZES DE MUDAS DE 03, 06, 09 e 12 MESES

6. CONCLUSÃO

O presente trabalho com *Ocotea puberula* abrangeu a coleta de frutos, germinação das sementes, semeadura e desenvolvimento em viveiro, coleta de mudas, seleção de processos extrativos, desenvolvimento de método por CLAE, obtenção de padrões de alcalóides aporfínicos em folhas de espécimens adultos e monitoramento desses padrões nas amostras de folhas, caules e raízes de mudas de 3, 6, 9 e 12 meses de idade. Assim, observamos o menor desenvolvimento das mudas com sementes provenientes de Irati/PR, comparadas com as mudas de sementes provenientes de Antonina/PR. A seleção do método de extração por Soxhlet foi definida em função do melhor resultado de boldina obtido nos métodos de extração testados. O método de extração alcaloídica por Soxhlet modificado mostrou-se adequado. A extração por Soxhlet convencional tem sido a técnica de extração mundialmente mais usada por décadas, ultrapassando a performance de outras alternativas de extração mais recentes tais como extração por fluido supercrítico, microondas, sonicação, entre outros e sendo usada como referência eficiente para comparação de resultados com estes novos métodos extrativos. Modificações no extrator, como a que foi utilizada neste trabalho, tem sido acrescentadas visando usos específicos.

O método desenvolvido por CLAE apresentou boa separação cromatográfica para os alcalóides, apesar da similaridade dos alcalóides isolados. As análises foram efetuadas em tempo razoável, com boa simetria de picos, utilizando a técnica de eluição por gradiente. A cromatografia por pareamento iônico, utilizando heptanosulfonato de sódio na fase móvel foi adequado. A boldina, utilizada como padrão por CLAE, permitiu identificá-la pela primeira vez nos extratos alcaloídicos de folhas de espécimens adultos de *Ocotea puberula*.

Os padrões isolados de folhas de espécimens adultos e identificados como alcalóides aporfínicos *stricto sensu* isodomeesticina (FB), dicentrina (FA3) e leucoxina (FC) foram monitorados nas folhas, caules e raízes de mudas e de folhas adultas.

Para estes alcalóides monitorados nas amostras de folhas, caules e raízes pode-se concluir que as mudas de *Ocotea puberula* até 12 meses de idade, da mesma forma que as plantas adultas, contém basicamente os mesmos

alcalóides. A concentração desses alcalóides para folhas, caules e raízes de 3, 6, 9 e 12 meses de idade são distintos. Estes alcalóides estão acumulados em maior quantidade nas folhas das mudas, seguido de caules e raízes em ordem decrescente.

Não foi evidenciado em literatura estudo fitoquímico em mudas de *Ocotea puberula*, apenas de plantas adultas, bem como não foram encontrados dados sobre mudas desta espécie para serem comparados com os obtidos neste trabalho, razão pela qual buscamos monitorar os padrões obtidos em folhas de plantas adultas. A detecção de metabólitos secundários em mudas, presentes ou não em espécimens adultas, abre a perspectiva de utilização das mesmas ao invés de exploração de árvores adultas com implicações ambientais e econômicas. Este trabalho evidencia oportunidades no desenvolvimento de mudas como fonte de produção de fármacos. No caso específico de plantas nativas como fonte de medicamentos, fica evidente o uso sustentável, e a preservação da espécie sem destruição ambiental. Uma outra alternativa é o desenvolvimento da cultura de células vegetais para que esta se torne um método viável de produção de metabólitos secundários de interesse comercial.

7. REFERÊNCIAS

ARAUJO, A. J. **Estudo fitoquímico das folhas de *Ocotea puberula* (Reich.) Nees (LAURACEAE)**. Curitiba, 2000. 110f. Dissertação (Mestrado em Química) - Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná.

ASENCIO, M.; GUZMÁN, C.H.; LÓPEZ, J.J.; CASSELS, B.K.; PROTAIS, P.; CHAGRAOUI, A. Structure-affinity relationships of halogenated predicine and glaucine derivatives at D₁ and D₂ dopaminergic receptors: halogenation and D₁ receptor selectivity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** 13, p.3699-3704. 2005

BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M.J. Thalimine from *Ocotea puberula*. **Phytochemistry**, v.12, p.948-949, 1973.

BARALLE, F.; SCHVARZBERG, N.; VERNENGO, M.; COMIN J. Dehydroocoteine and dihydroocoteine from *Ocotea puberula*. **Experientia**, v.28(8), p.875-876. 1972.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Departamento Nacional de Produção Vegetal (DNPM). Divisão de Sementes e Mudas (DISEM). **Regras para Análise de Sementes**. Brasília, 1976. p.01-91.

BRENES-ARGUEDAS, T.; COLEY P. D. Phenotypic variation and spatial structure of secondary chemistry in a natural population of a tropical tree species. **Oikos**, v.108, p. 410-420. 2005.

CALDATO, S.L., VERA, N., DONAGH, P.M. Estructura poblacional de *Ocotea puberula* em um bosque secundário y primário de la selva mixta misionera. **Ciência Florestal**, v.13, n.1. Santa Maria, 2002. p. 25-32.

CARNEIRO, J. G. de A. **Produção e controle de qualidade de mudas florestais**. Curitiba: UFPR/FUPEF; Campos: UENF, 1995. p. 12-29, 186-195.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. 1.ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica; Colombo, PR: Embrapa Florestas, 2003. v.1. p. 301-323.

CARVALHO, N. M. (Coord.) **Sementes: ciência, tecnologia e produção**. 3. ed. rev. Campinas: Fundação Cargill, 1988. p.231-241.

CARVALHO, J.L.S. **Contribuição ao estudo fitoquímico e analítico do *Nasturium officinale* R., Brassicaceae**. Curitiba:2001. 105 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CREWS, P.; RODRIGUEZ, J.; JASPARS, M. Organic Structure Analysis. In: HOUK, K.N.; LOUDON G.M. (Ed.). **Topics in organic chemistry: a series of advanced textbooks**. New York/Oxford: Oxford University Press. 1998,

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p. 1-79.

CASTRO, O.C. **Phytochemical potencial of tropical plants**: recent advances in phytochemistry. In: DOWNUM, K.R.; ROMEO, J.T.; STAFFORD, H.A. (Ed.). New York: Plenum Press, 1993. v.27, p.65-87.

CASTRO, L.; AYUSO, G. Soxhlet extraction of solid material: an outdated technique with a promising innovative future. **Analytica Chimica Acta**, 369, p.1-10. 1998.

CAVA, M.P.; BEHFOROZ, M.; MITCHELL, M.J. Ocotea alkaloids: variabilina, a novel aminoaporphine. **Tetrahedron Letters**, 46, p.4647-4649. 1972.

CAVA, M.P.; WENKATESWARLU, A. Dehydroocopodine, dicentrinone and other alkaloids from *Ocotea macropoda* and *Hernandia jamaicensis*. **Tetrahedron Letters**, v. 27, p.2639-2643. 1971.

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

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho**. S. Paulo: Edgard Blücher, 1998. p. 42-80;120-152.

DAVET, A. **Estudo fitoquímico e biológico do cacto-*Cereus jamacaru* De Candolle, Cactaceae**. Curitiba: 2005. 103 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná.

DEWICK, P.M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach**, 2 ed. UK: Wiley & Sons, 2002. p.322-340.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS e Ed. da UFSC, 1999. p.166-168.

Farmacopéia Brasileira IV. 4 ed., parte I, p. V.2.11, São Paulo, 1991.

FRANCA, N.C.; GIESBRECHT, A.M.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, A.F.; MAGALHÃES, E.G.; MAIA, J.G.S. Benzylisoquinolines from *Ocotea* species. **Phytochemistry**, v.14, p.1761-1672. 1975.

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

GILBERT, B.; GILBERT, M.E.A.; DE OLIVEIRA, M.M.; RIBEIRO, O.; WENKERT, E.; WICKBERG, B.; HOLLSTEIN, U.; RAPORT, H. The aporphine and isoquinoliedienone alkaloids of *Ocotea glaziovii*. **Journal of American Chemical Society**, v.86, p. 694-696. 1964.

GUIMARÃES, L.F.L. Cromatografia líquida de alta eficiência. In COLLINS C.H. (Coord.). **Introdução a métodos cromatográficos**. 7. ed. São Paulo: Editora Unicamp. 1998. p. 183-229.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids, **Lloydia**, v.38, n.4, p.275 – 337, july-aug.1975.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids II, **Journal of Natural Products**, v.42, n.4, p.325-360, july - aug. 1979.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids III, **Journal of Natural Products**, v.46, n.6, p.761-835, nov – dec. 1983.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids IV, **Journal of Natural Products**, v.51, n.3, p.389-474, may – jun. 1988.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids V, **Journal of Natural Product**, v.57, n.8, p.1033 - 1133, aug. 1994.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS e Ed. da UFSC, 1999. p.641-653.

HOET,S.; STEVIGNY, S.; BLOCK, S.; OPPERDOES, F.; COLSON, P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; QUETIN - LECLERCQ, J. Alkaloids from *Cassythia filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. **Planta Medica** 70 (5), p.407-413. 2004.

HUANG, R.L.; CHEN, C.C.; HUANG, Y.L.; OU, J.C.; PO HU, C.; CHEN, C.C.; CHUNGMING, C. Anti-tumor effects of d-dicentrine from the root of *Lindera megaphylla*. **Planta Medica** 64, p.212-215. 1998.

INOUE, M. T., RODERJAN, C.V., KUNIYOSHI, Y.S. **Projeto madeira do Paraná**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná, 1984. p. 15, 55-69.

JACOME, R.L.R.; OLIVEIRA, A.B. Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“Pau-pereira”). **Química Nova**, v.27, n.6, p.897-900. 2004.

JIA, Q.; QIU, Z.; NISSANKA, A.; FARROW, T.M.; **Method for the prevention and treatment of chronic venous insufficiency**. US Patent Application , Kind Code, serial nº 741215, Séries Code 09. december 19, 2000.

KOCH, Z.; CORRÊA, M.C. **Araucária**: a floresta do Brasil meridional. Curitiba: Olhar Brasileiro, 2002, p.43-49.

KRZYŻANOWSKI, F. C.; VIEIRA, R. D.; FRANÇA NETO, J. B. **Vigor das sementes**: conceitos e testes. Londrina: Abrates, 1999. p.1-1/2-8.

KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. Flowering plants Dicotyledons, magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families. In KUBITZKI, K. (Ed.) **The families and genera of vascular plants**. Berlin:Springer Verlag, 1993. p. 372.

LIANG, Y.Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **Journal of Chromatography B**, 812, p.53-70. 2004.

LOPEZ J.A.; BARILLAS, W.; GOMEZ LAURITO, L.; LIN, F.T.; ALREHAILY, A.J.; SHARAF, M.H.M.; SCHIFF, P.L. Aporphine alkaloids of *Ocotea Brenesii*. **International Journal of Pharmacognosy**, 34(2), p.145-147. 1996.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4.ed. São Paulo: Nova Odessa, Instituto Plantarum, 2002. v.1. p. 11-16,145.

MALHEIROS, A.; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: Interações químicas entre espécies. In YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. (Ed.). **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p.505.

MERCK. **Introdução à técnica de HPLC**. 2005. p. 1-31.

NOGUEIRA, A.C.; PORTELA, O.; NAZÁRIO, P. Análise quantitativa e germinação de sementes de *O. puberula* (Reich) Nees. In CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA, 53/ REUNIÃO NORDESTINA DE BOTÂNICA,25. 2002, Recife. **Resumos**. Recife: Universitária, 2002. p.29.

POPINIGIS, F. **Fisiologia de sementes**. Brasília: Ministério da Agricultura, AGIPLAN, 1977. p. 277

PRISTA, L.N.; ALVES, A.C.; MORGADO, R.; LOBO J.S. **Tecnologia farmacêutica**. 6. ed. Lisboa:Fundação Calouste Gulbenkian, 2003. p.204-208

REIS, M.S.; MARIOT, A. Diversidade natural e aspectos agrônômicos de plantas medicinais. In SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 1.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 1999. p.51.

RIBEIRO, R.A.; CARMO, L.G.; VLADIMIROVA, J.; JURKIEWICZ, N.H.; JURKIEWICZ, A. Nantenine blocks muscle contraction and Ca²⁺ transient induced by noradrenaline and K⁺ in rat vas deferens. **European Journal of Pharmacology** 470, p.37-43. 2003.

RIZZINI, C. T.; MORS, W. B. **Botânica econômica brasileira**. 2.ed. revista e atualizada. Rio de Janeiro: Âmbito Cultural, 1995. p. 141-142.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre e Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS e Ed. da UFSC, 1999. p. 324-325, 331-339.

SHAMMA, M.; GUINAUDEAU, H. Biogenetic pathways for the aporphinoid alkaloids. Great Britain: Pergamon Press. Tetrahedron report number 175. **Tetrahedron**. v.40, n.23, p. 4795-4822, 1984.

SHEPHERD, G. J. Brasil. Ministério do Meio Ambiente - MMA. Secretaria de Biodiversidade e Florestas – SBF. **Conhecimento de diversidade de plantas terrestres do Brasil**, São Paulo: Unicamp, 2000. p.13-14, 46.

SONAGLIO, D.; ORTEGA, G.G.; PETROVICK, P.R.; BASSANI, V.L. Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 1.ed. Porto Alegre/ e Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS e Ed. da UFSC, 1999. p. 244-248.

STAHL, E. **Thin-Layer Chromatography: a Laboratory Handbook**. 2.ed. Berlin:Springer-Verlag, 1969. p.873.

STEFANELLO, M.E.A. **Avaliação estatística de plantas medicinais:química, farmacologia e sistemática**. São Paulo: 1993. Tese (Doutorado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, p. 8, 11.

STEVIGNY, C.; WAUTIER, M.C.;JIWAN, J.L.H.; CHIAP, P.; HUBERT, P.; LECLERCQ, J.Q. Development and validation of a high performance liquid chromatographic method for quantitative determination of aporphine alkaloids from different samples of *Cassythia filiformis*. **Planta Medica**, 70, p.764-770. 2004.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents**. 5(2), p. 173-182. 2005.

SUN, S.W.; LEE, S.S.; HUANG, H.M. Determination of lauraceous aporphine alkaloids by high-performance liquid chromatography. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, 14, p.1383-1387.

TSENG, L.H.; BRAUMANN, U.; GODEJOHANN, M.; LEE, S.S.; ALBERT, K. Structure identification of aporphine alkaloids by on-line coupling of HPLC-NMR with loop storage. **Journal of the Chinese Chemical Society**, 47, p.1231-1236. 2000.

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Alkaloids of *Ocotea brachybotra*. **Farmaco [Sci]** 32(11), p.767-769. 1977

VECCHIETTI, V.; CASAGRANDE, C.; FERRARI, G.; SEVERINI RICCA, G. New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. **Farmaco [Sci]**, 34(10), p.829-840. 1979.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolite in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13. 2002. p. 181-187.

VERPOORTE, R.; COLLIN, A.; MEMELINK, J. Biotechnology for the production of plant secondary metabolites. **Biochemical Review**, v.1. 2002. p. 13-25.

VELOSO, H.P., OLIVEIRA FILHO L.C., VAZ, A.M.S.F., LIMA, M.P.M., MARQUETE, R., BRAZÃO, J.E.M. (Org.). **Manual técnico da vegetação brasileira**. Rio de Janeiro:IBGE, 1992. p.20.

VILEGAS, J.H.Y.; GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; GOTTLIEB, H.E. The chemistry of brasilian lauraceae. 93. Aporphine alkaloids from *Ocotea caesia*. **Phytochemistry**, v.28, n.12, p.3577-3578. 1989.

WOO, S.H.; SUN, N.J.; CASSIDY, J.M.; SNAPKA, R.M. Topoisomerase II by aporphine alkaloids. **Biochemical Pharmacology**. v.57, p.1141-1145. 1999.

ZHOU, B.N.; JOHNSON, R.K.; MATTERN, M.R.; WANG, X.; HECHT, S.M.; BECK, H.T.; ORTIZ, A. KINGSTON, D.G.J. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucosylon*. **Journal of Natural Products**, v.63, p.217-221. 2000.

ZANIN, S.M.W.; LORDELLO, A.L.L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v.30, n.1, p. 92-98. 2007.

ANEXO 1

AVALIAÇÃO DE MÉTODO E RENDIMENTOS EXTRATIVOS EM MUDAS DE
Ocotea puberula DE SEMENTES DE ANTONINA / PR

ANEXO 1

1 AVALIAÇÃO DE MÉTODO E RENDIMENTOS EXTRATIVOS EM MUDAS DE *Ocotea puberula* DE SEMENTES DE ANTONINA / PR

Mudas de *Ocotea puberula* de sementes provenientes de Antonina/PR foram coletadas no viveiro do Departamento de Silvicultura e Manejo Florestal / UFPR, sendo 31 mudas no mês de agosto de 2002 com idade de 6 meses e 44 mudas com idade de 12 meses no mês de janeiro de 2003 com o objetivo de avaliar o método extrativo por Soxhlet convencional com EP, DCM e MeOH para extrato bruto e por Soxhlet modificado para extrato alcaloídico bruto e avaliar simultaneamente rendimentos de extração, presença de alcalóides como metabólitos secundários e o desenvolvimento das mudas coletadas.

1.1 PROCESSO EXTRATIVO

A triagem das mudas foi feita à mão, separando-se em folhas, caules e raízes e a secagem efetuada em estufa a 40-45°C (PRISTA *et al.*, 2003). Após secas, folhas, caules e raízes foram diretamente moídas separadamente em moinho laboratorial de facas (SONAGLIO *et al. in* SIMÕES, 1999). A determinação da granulometria do pó obtido foi conduzida de acordo com a Farmacopéia Brasileira IV (1991).

Os extratos brutos foram obtidos em aparelho de Soxhlet convencional, utilizando-se solventes extratores EP, DCM e MeOH com 300 mL de solvente e tempo de extração de 30 horas em cada etapa, conforme método em 4.1.1.3 e realizado separadamente para cada parte das mudas de 6 e 12 meses de idade.

A extração alcaloídica foi feita com as folhas das mudas em extrator de Soxhlet modificado conforme método em 4.1.1.2.

1.2 RENDIMENTO PERCENTUAL DO EXTRATO BRUTO EM EXTRATOR DE SOXHLET COM EP, DCM e MeOH.

O extrato metanólico, comparativamente com extratos de EP e DCM, foi o que apresentou os maiores rendimentos percentuais para todas as partes das mudas e em ordem crescente para raízes, caules e folhas. Os dados de rendimento obtidos encontram-se na Tabela 15.

TABELA 15 – RENDIMENTO PERCENTUAL DE EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS COM EP, DCM E MeOH DE PARTES DE MUDAS.

Parte da muda utilizada	Solvente utilizado	Peso de materia seca moída e tamisada (g)		Peso do extrato bruto obtido (g)		Rendimento do processo extrativo (%)	
		6 meses	12 meses	6 meses	12 meses	6 meses	12 meses
Folha	EP	20,20	42,51	0,51	1,20	2,52	2,81
Folha	DCM			0,36	0,76	1,82	1,79
Folha	MeOH			4,72	13,52	23,36	31,80
Caule	EP	17,37	41,41	0,07	0,22	0,38	5,26
Caule	DCM			0,07	0,18	0,43	0,44
Caule	MeOH			2,04	4,67	11,72	11,28
Raízes	EP	21,69	55,40	1,06	1,35	4,88	2,44
Raízes	DCM			0,27	0,52	1,25	0,94
Raízes	MeOH			1,91	5,24	8,82	9,46

1.3 RENDIMENTO DE EXTRATO ALCALOÍDICO BRUTO DE FOLHAS DE MUDAS DE 6 e 12 MESES DE SEMENTES PROVENIENTES DE ANTONINA/PR

Para a obtenção do extrato alcaloídico de folhas, os extratos brutos das frações EP, DCM e MeOH foram unificados devido à pequena quantidade dos extratos brutos obtidos com EP e DCM em relação ao metanólico para as folhas de 6 e 12 meses de idade e obter a totalidade da fração alcaloídica presente nas folhas.

Observamos na Tabela 16 que 62,71g de folhas secas moídas e tamisadas forneceram 0,25g de extrato alcaloídico bruto, correspondente a 0,40% sobre a matéria seca utilizada. Estes dados preliminares mostraram pequena quantidade de alcalóides presentes e que, para o desenvolvimento do presente trabalho, serão necessárias uma quantidade expressiva de mudas.

TABELA 16 – RENDIMENTO DE EXTRATO ALCALOÍDICO BRUTO PROVENIENTE DOS EXTRATOS BRUTOS UNIFICADOS DE FOLHAS DE PLÂNTULAS DE 6 E 12 MESES DE IDADE.

Especificações	Peso (g)	Rendimento (%)
Folhas secas moídas	62,71	
Extrato bruto unificado	21,07	33,60
Extrato alcaloídico bruto	0,25	0,40

1.4 DETECÇÃO DE ALCALÓIDES

A caracterização preliminar dessas substâncias foi realizada através de cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando como adsorvente Si 60 F₂₅₄ Merck[®]. O sistema eluente que apresentou melhor resolução foi DCM / MeOH / Dietilamina (8:2:0,2 v/v/v) em meio amoniacal. Para as revelações dos cromatogramas utilizou-se o reagente cromogênico de Dragendorff segundo Munier, (HENRIQUES, KERBER e MORENO *in* SIMÕES, 1999; STAHL, 1969).

A razão para a caracterização direta de alcalóides baseou-se em ARAÚJO (2000) que trabalhou com a mesma espécie do gênero *Ocotea*, encontrando alcalóides aporfinóides em folhas de matrizes adultas.

ANEXO 2

DESENVOLVIMENTO E RENDIMENTO DE MATÉRIA SECA EM MUDAS
DE *Ocotea puberula* DE SEMENTES DE ANTONINA/PR

ANEXO 2

1 DESENVOLVIMENTO E RENDIMENTO DE MATÉRIA SECA EM MUDAS DE *Ocotea puberula* DE SEMENTES DE ANTONINA/PR

O desenvolvimento das mudas coletadas são apresentados na Tabela 17.

TABELA 17 – DESENVOLVIMENTO DE MUDAS DE 6 E 12 MESES DE SEMENTES PROVENIENTES DE ANTONINA/PR

Idade (meses)	Coleta	Amostragem de mudas	Desenvolvimento médio (cm)		Peso médio das mudas (g)	
			Parte aérea	Raízes	Verde	Seco
06	28.08.02	31	22,50	17,50	5,63	2,01
12	28.01.03	44	34,34	29,00	7,57	3,90

O rendimento de matéria seca de folhas, caules e raízes das mesmas são apresentados na Tabela 18.

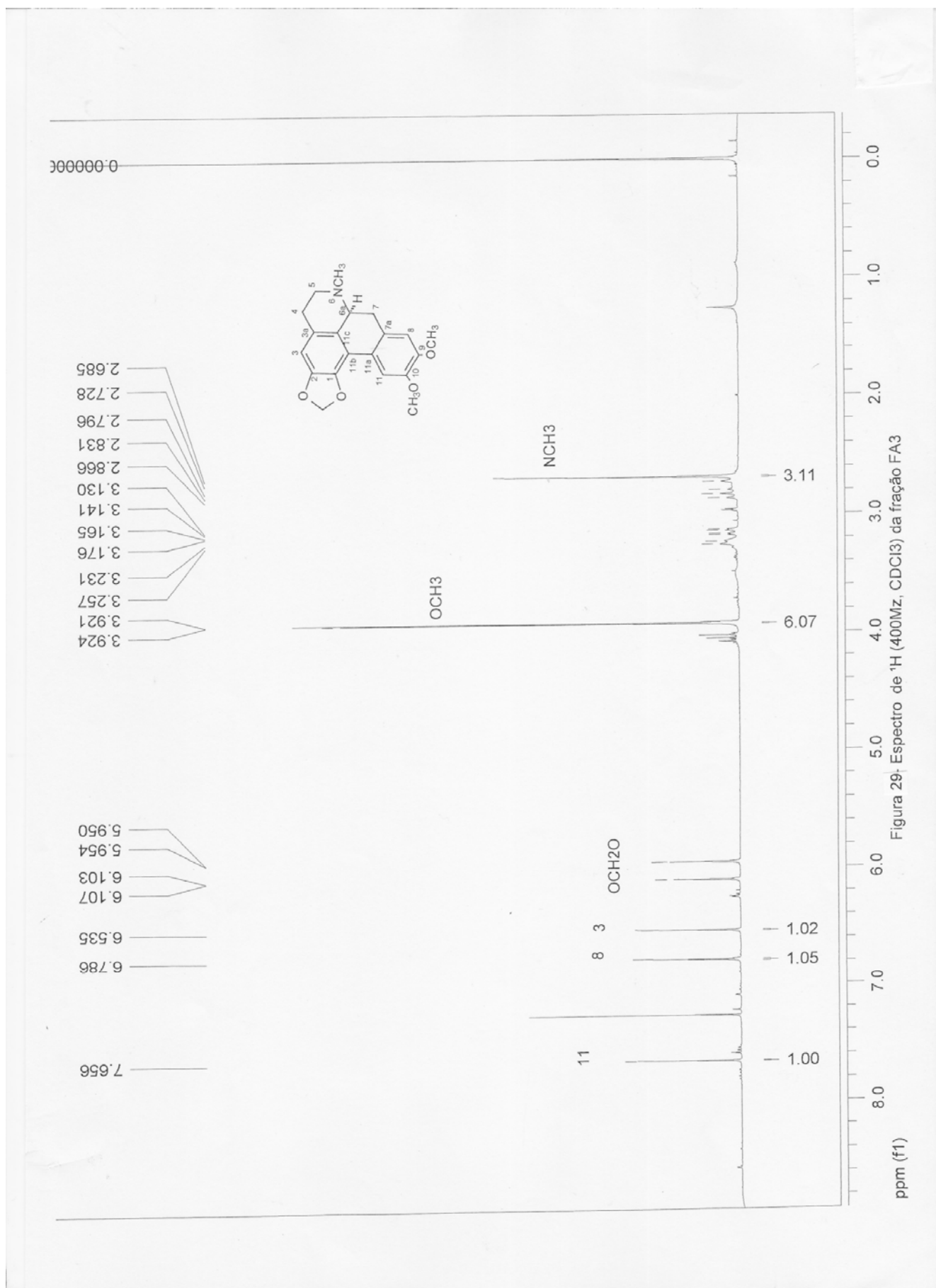
TABELA 18 – RENDIMENTO DE MATÉRIA SECA DE PARTES DAS MUDAS DE 6 E 12 MESES DE SEMENTES DE ANTONINA/PR

Idade	6 meses			12 meses		
	Peso verde (g)	Peso seco (g)	Peso seco (%)	Peso verde (g)	Peso seco (g)	Peso seco (%)
Folhas	64,18	20,50	31,94	111,50	55,84	50,08
Caules	51,13	19,19	37,54	125,50	58,90	46,93
Raízes	59,20	22,53	38,05	96,10	56,91	59,22
Total	174,51	62,22	35,65	333,10	171,65	51,53

Para uma avaliação de desenvolvimento destas mudas deve ser considerado todos os fatores pertinentes, tais como tratar-se de espécie nativa, origem das sementes, local de germinação, plantio no viveiro, características de solo, entre outros, que afetam o crescimento das mesmas e obter dados comparativos de outros experimentos realizados com a mesma espécie.

ANEXO 3

FIGURAS DOS ESPECTROS DE RMN DAS FRAÇÕES FA3, FB e FC



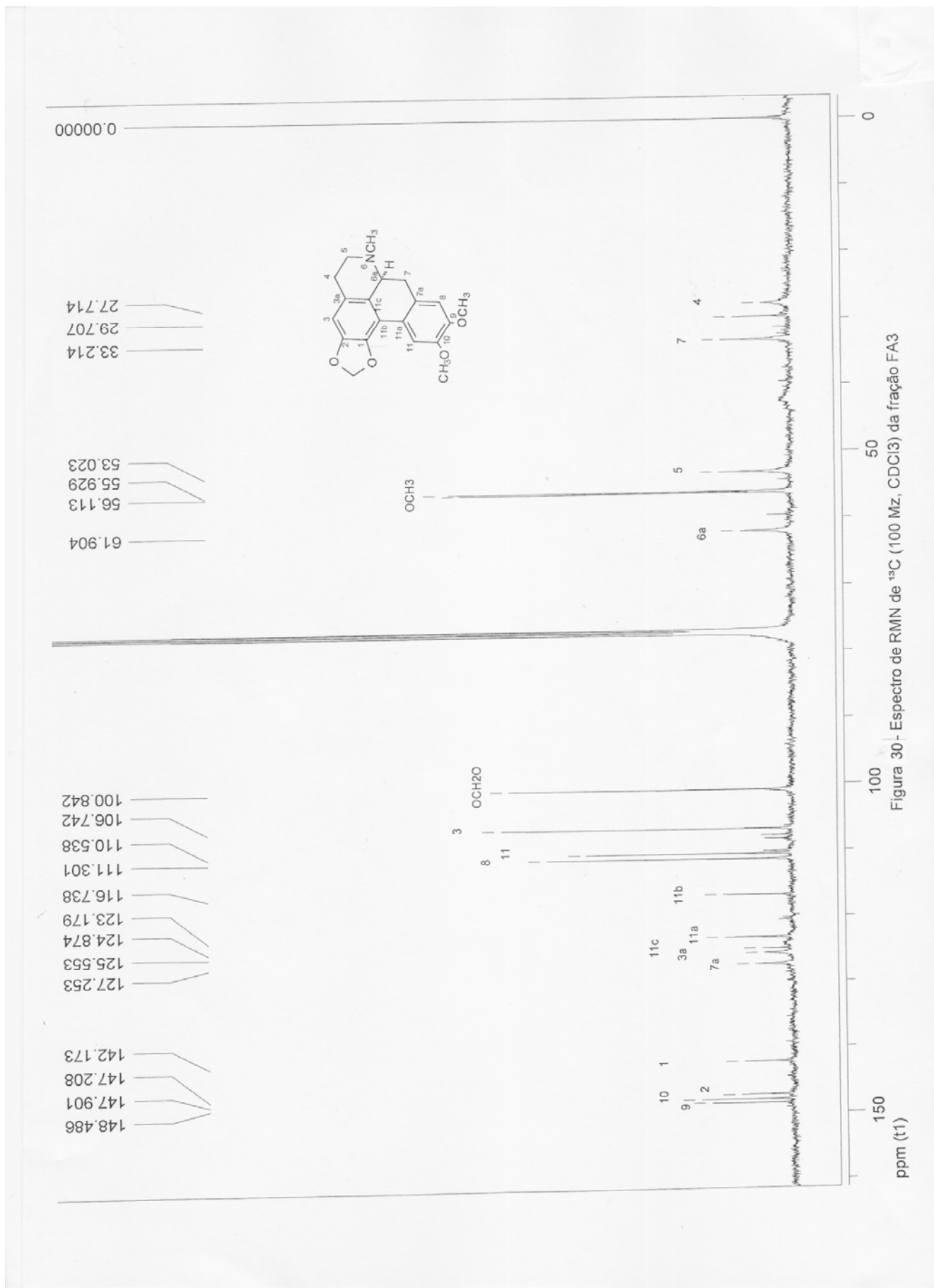


Figura 30 - Espectro de RMN de ¹³C (100 Mz, CDC₃) da fração FA3



Figura 31 - Ampliação do Mapa de Contorno HSQC da fração FA3

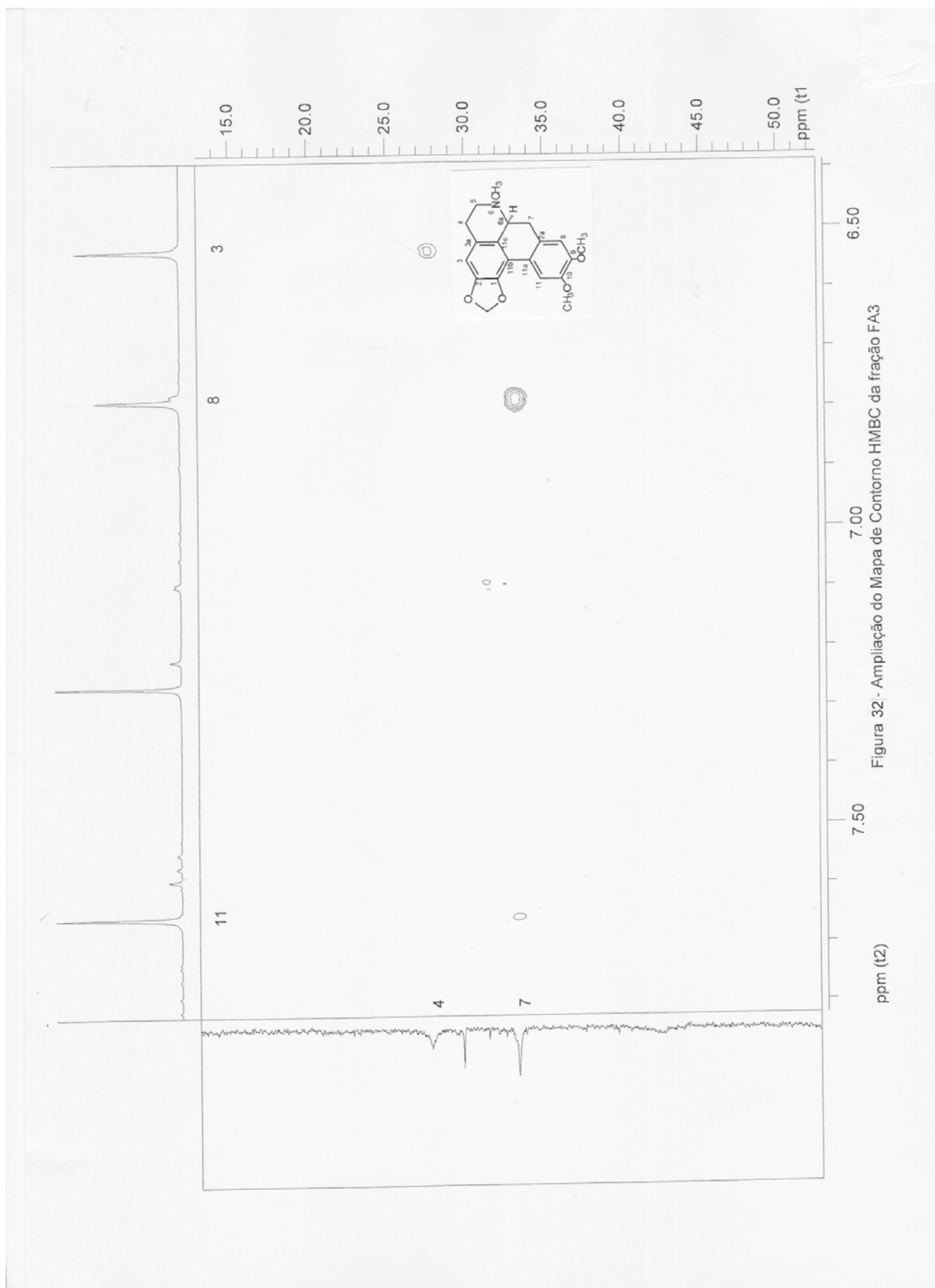


Figura 32 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FA3

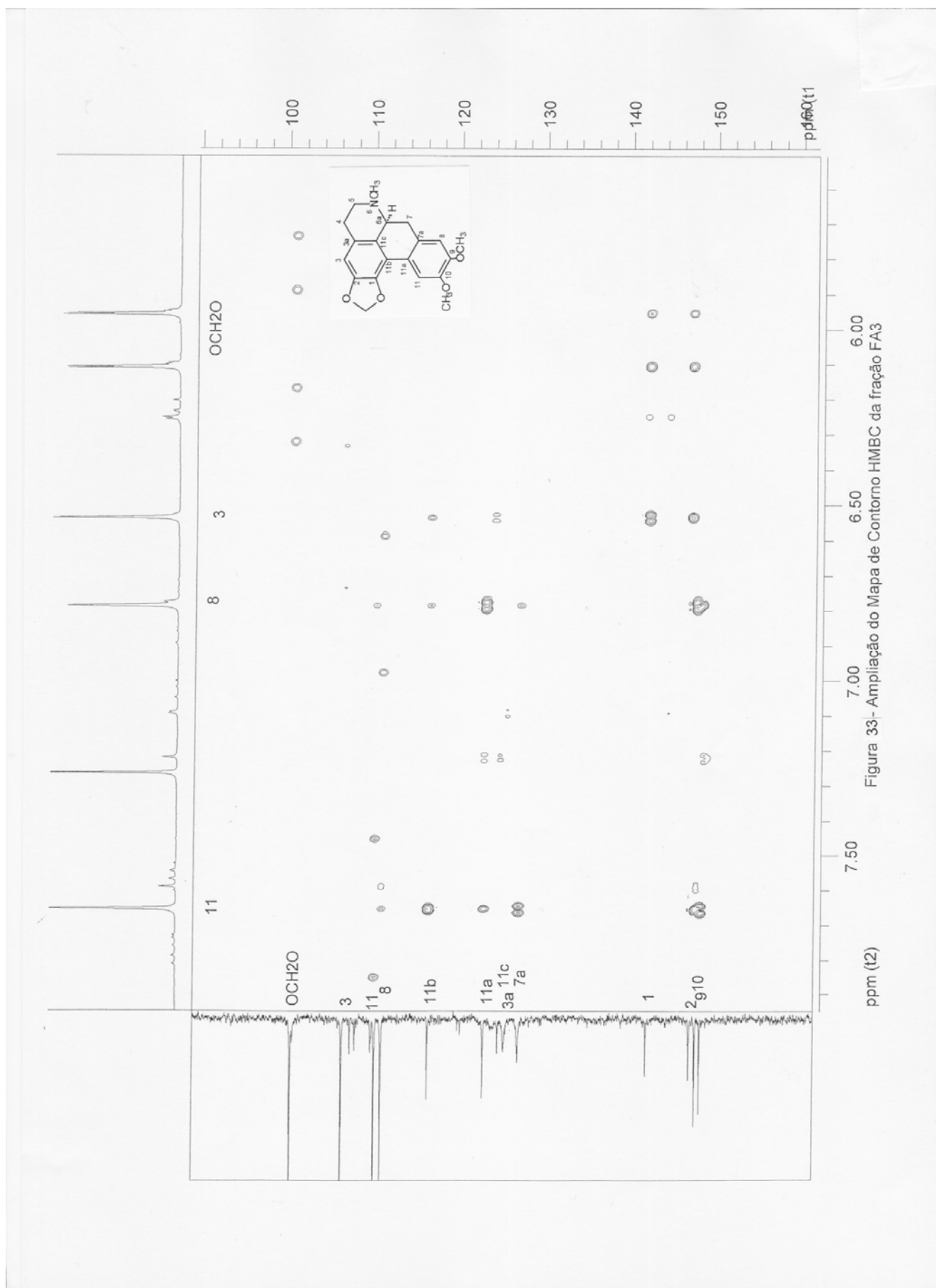


Figura 33- Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FA3

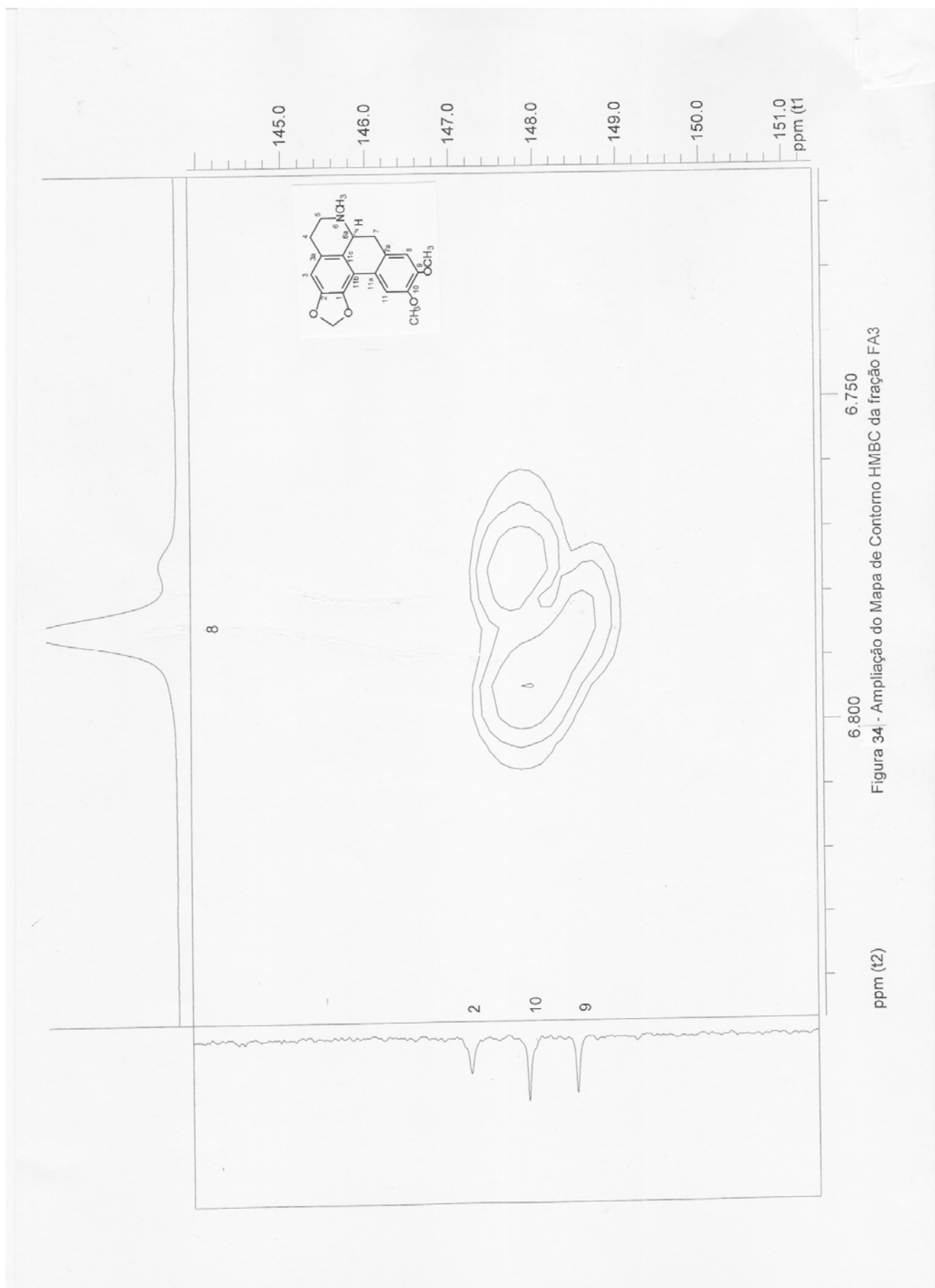


Figura 34 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FA3

ppm (t2)

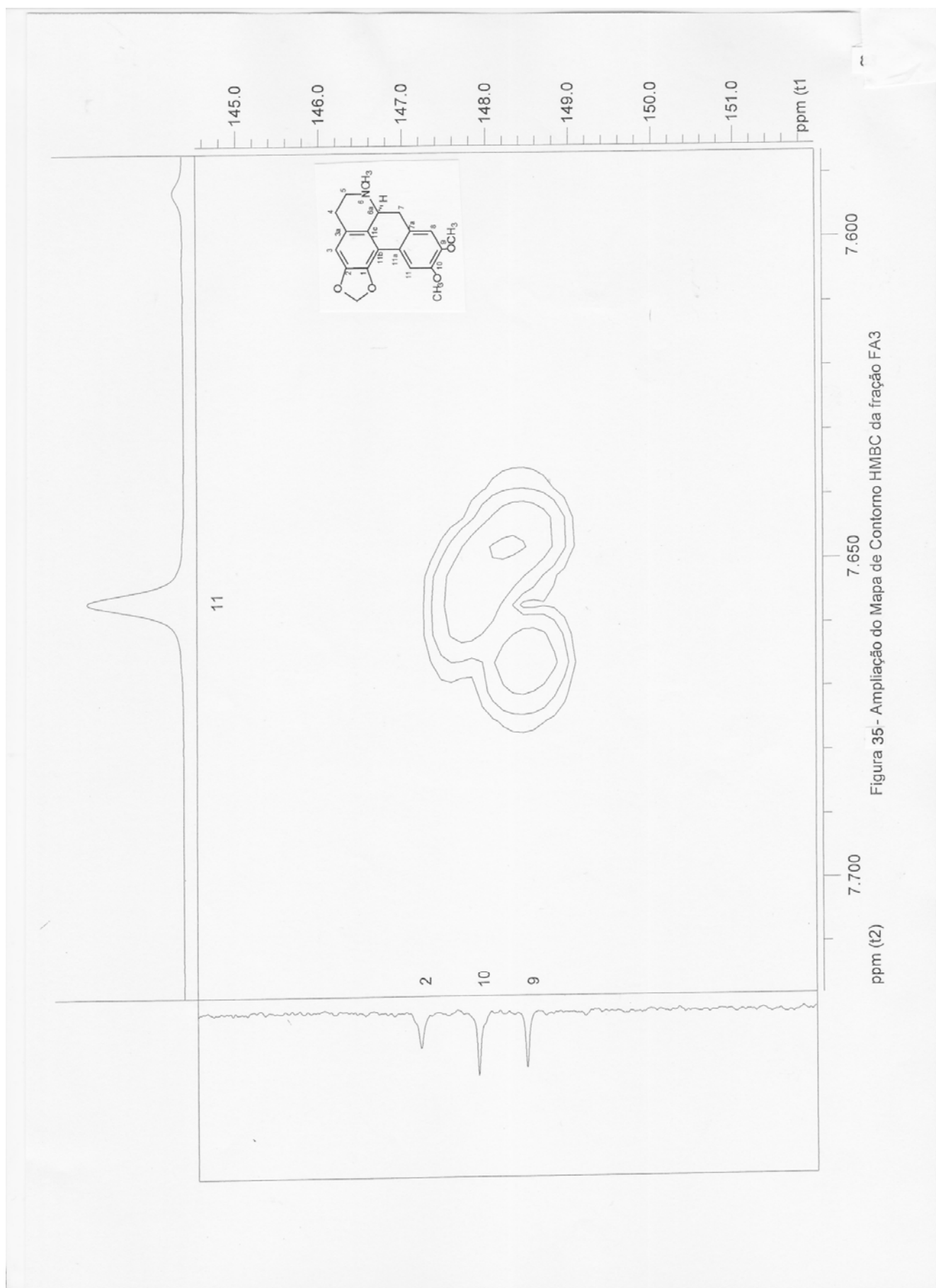
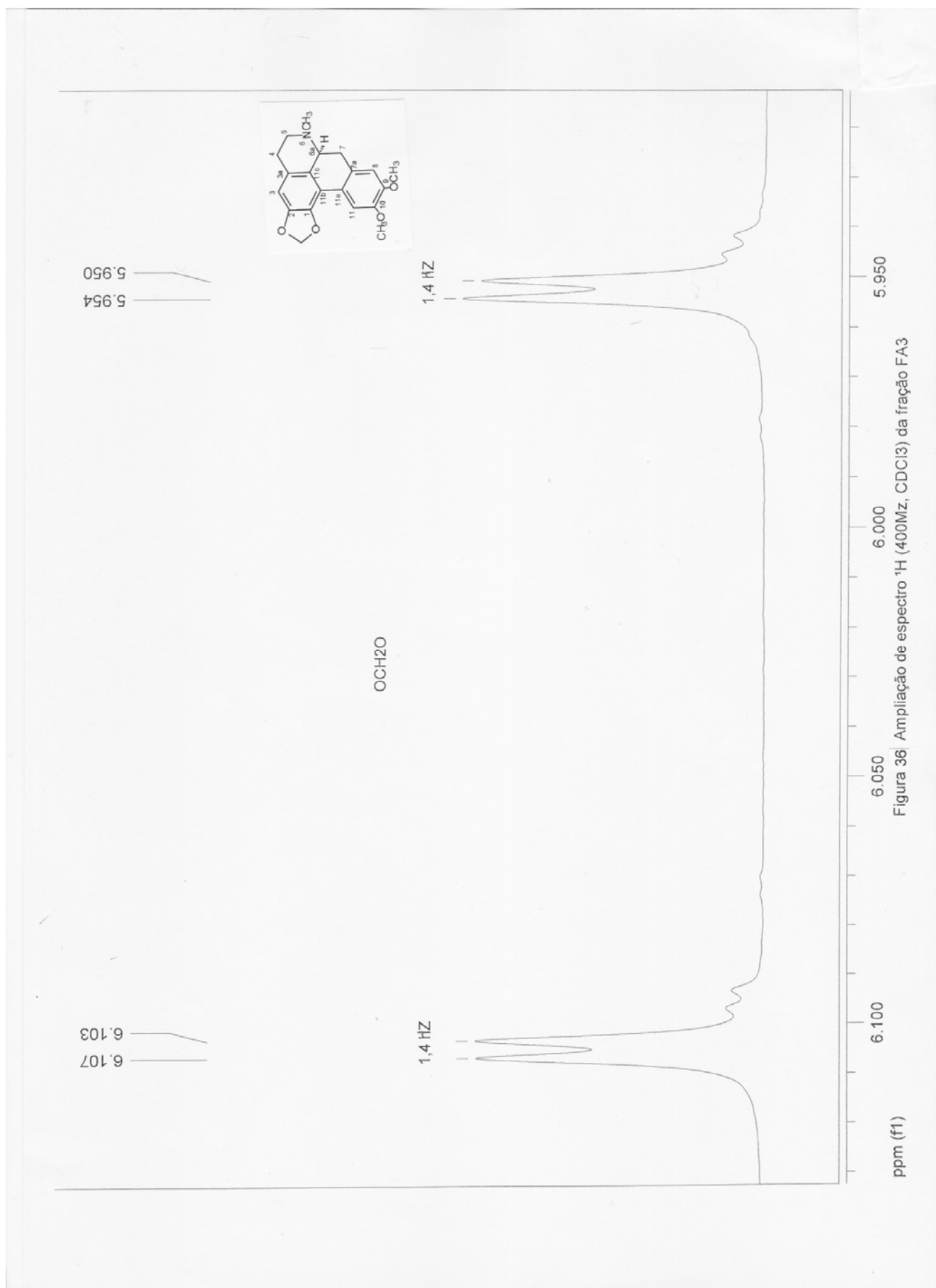


Figura 35- Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FA3

Figura 36. Ampliação de espectro ^1H (400Mz, CDCl_3) da fração FA3

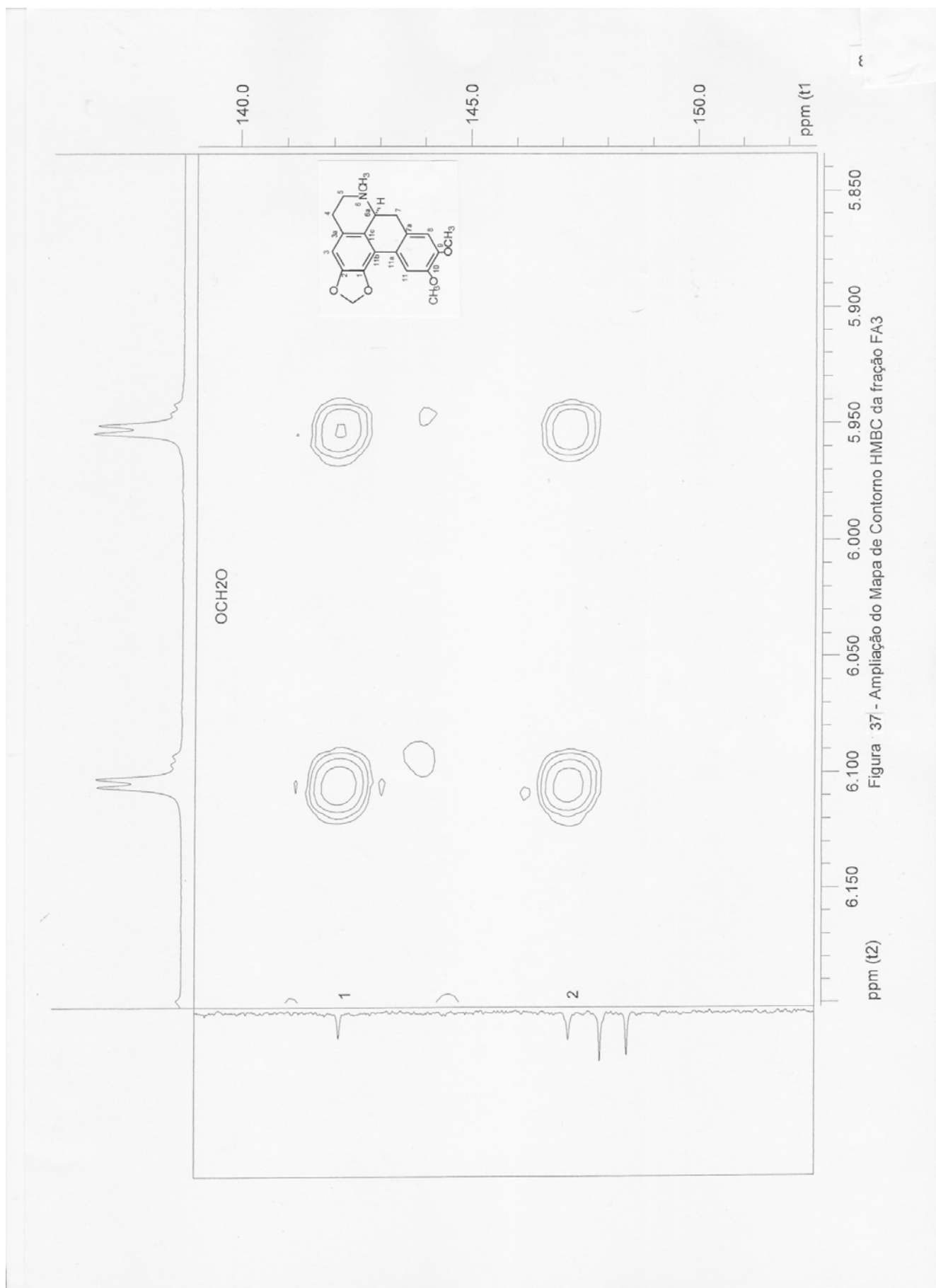
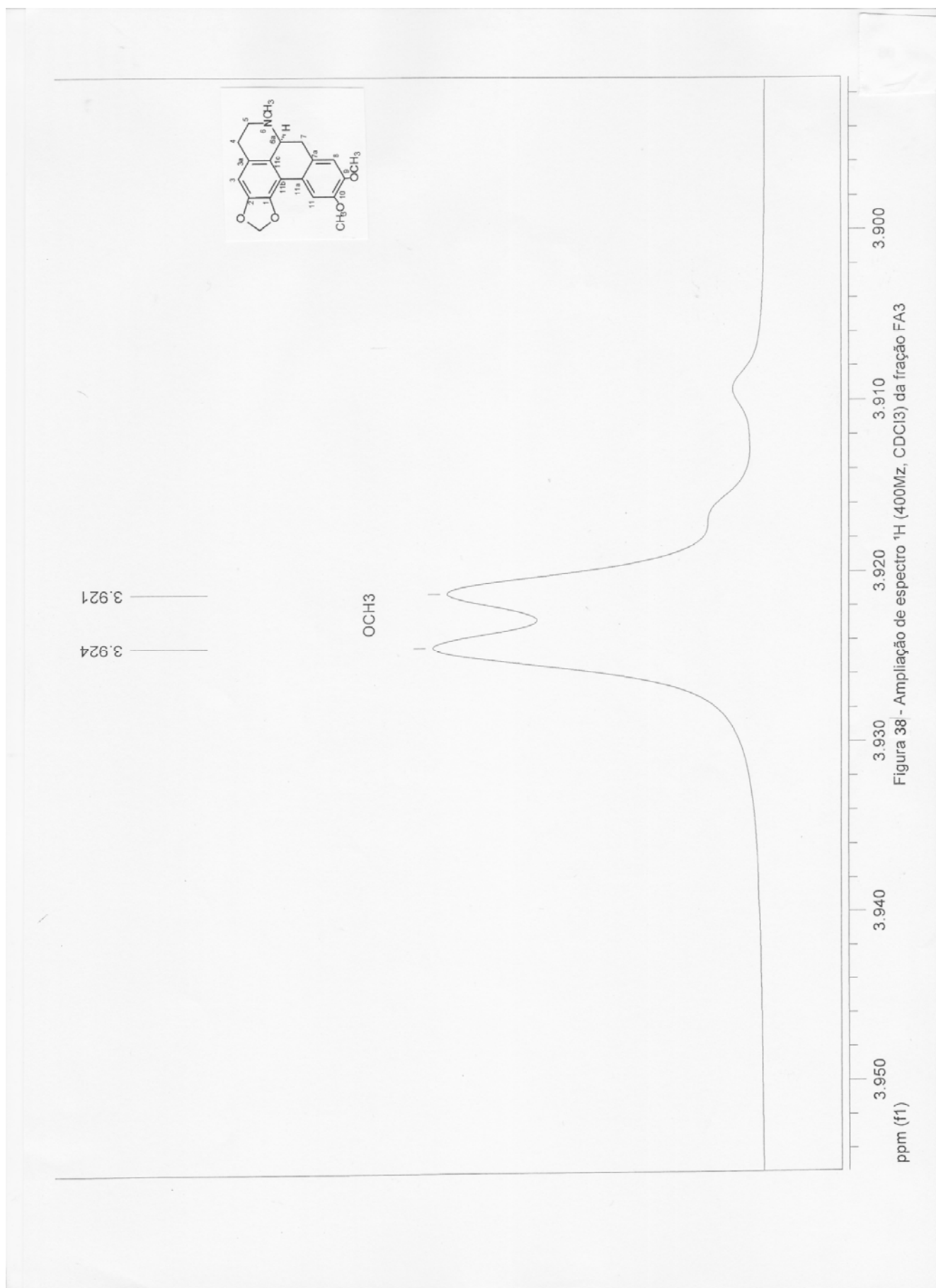
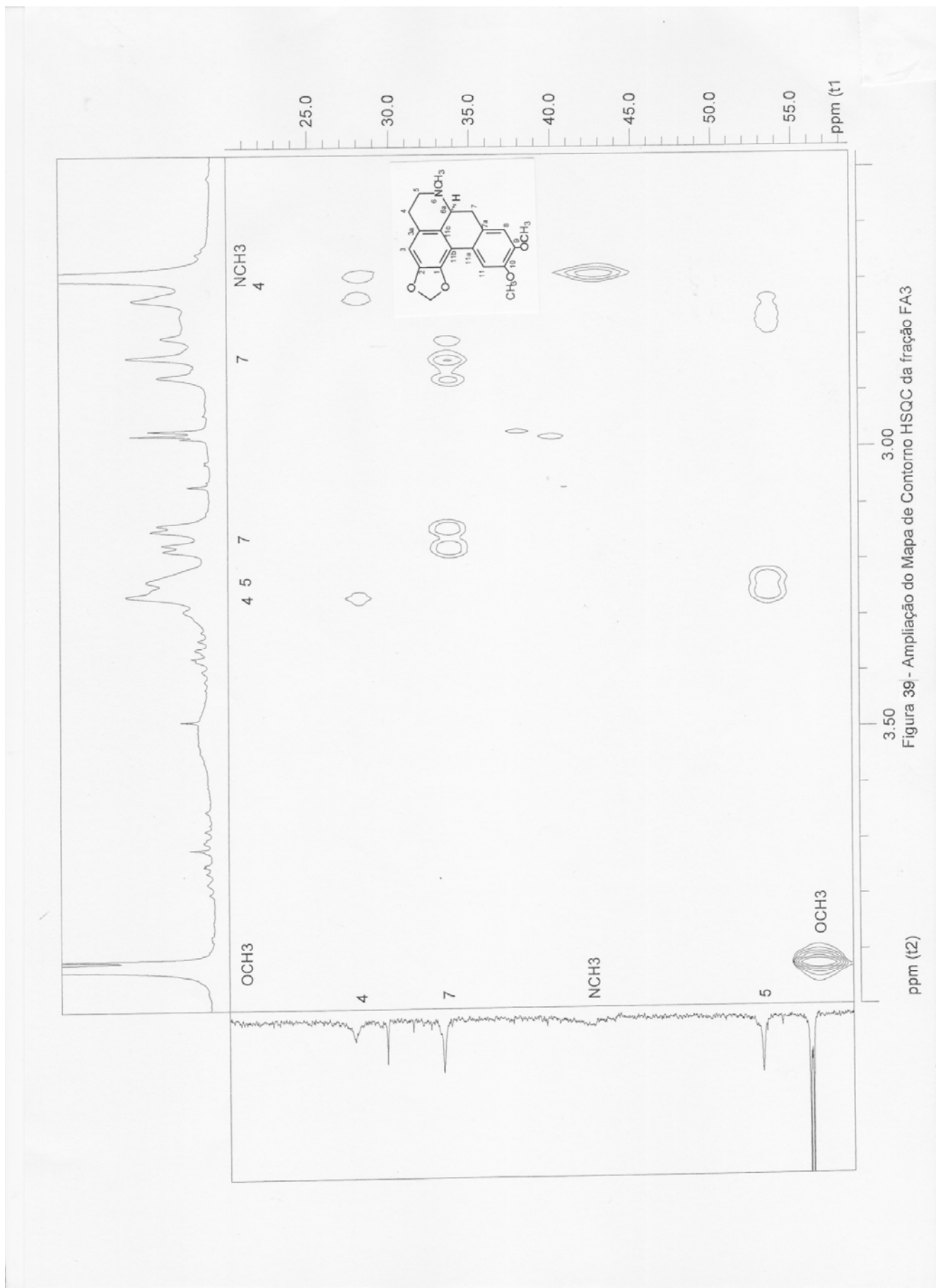


Figura 37 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FA3

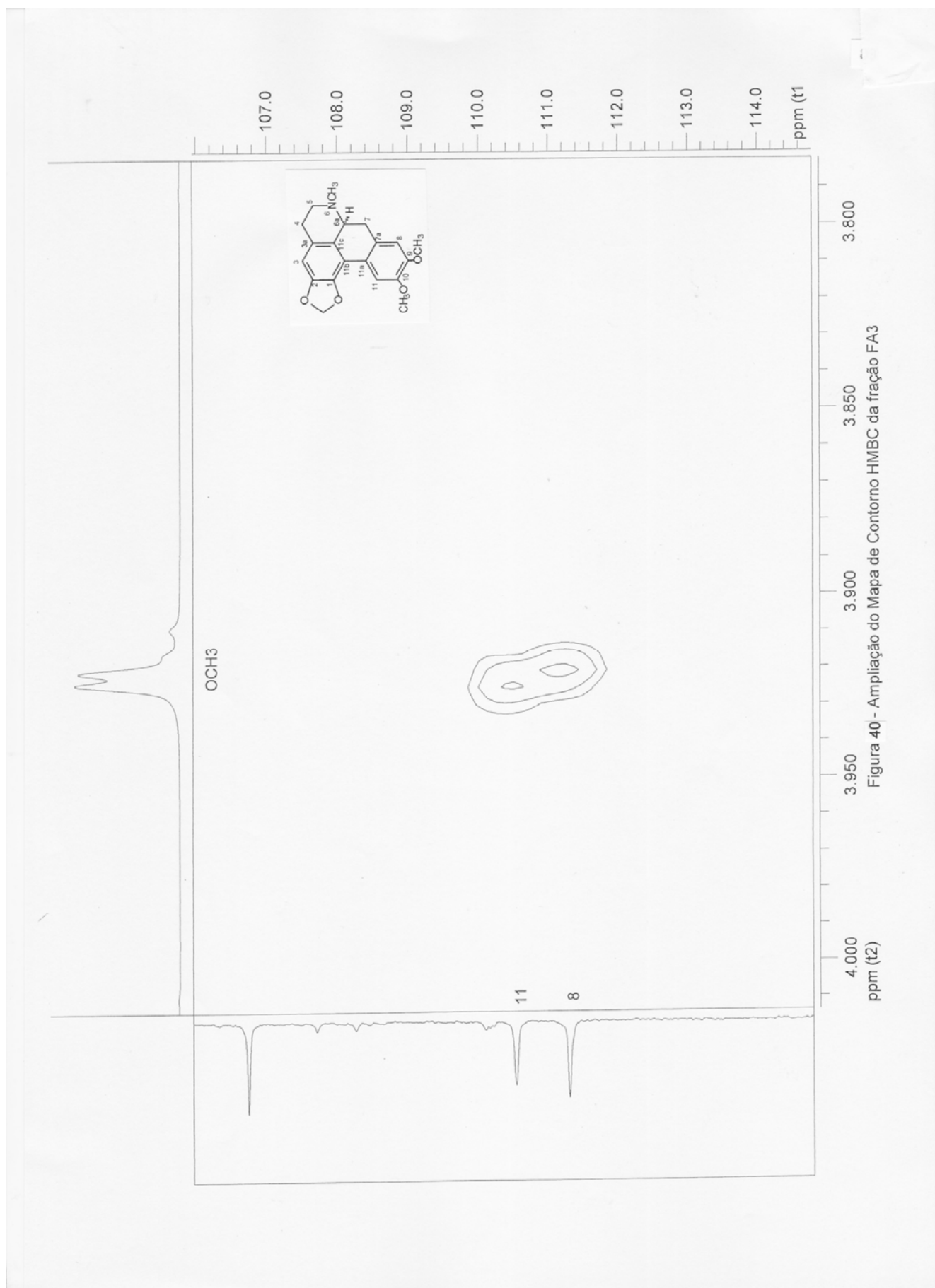




3.50 3.00
Figura 39 - Ampliação do Mapa de Contorno HSQC da fração FA3

ppm (t2)

ppm (t1)



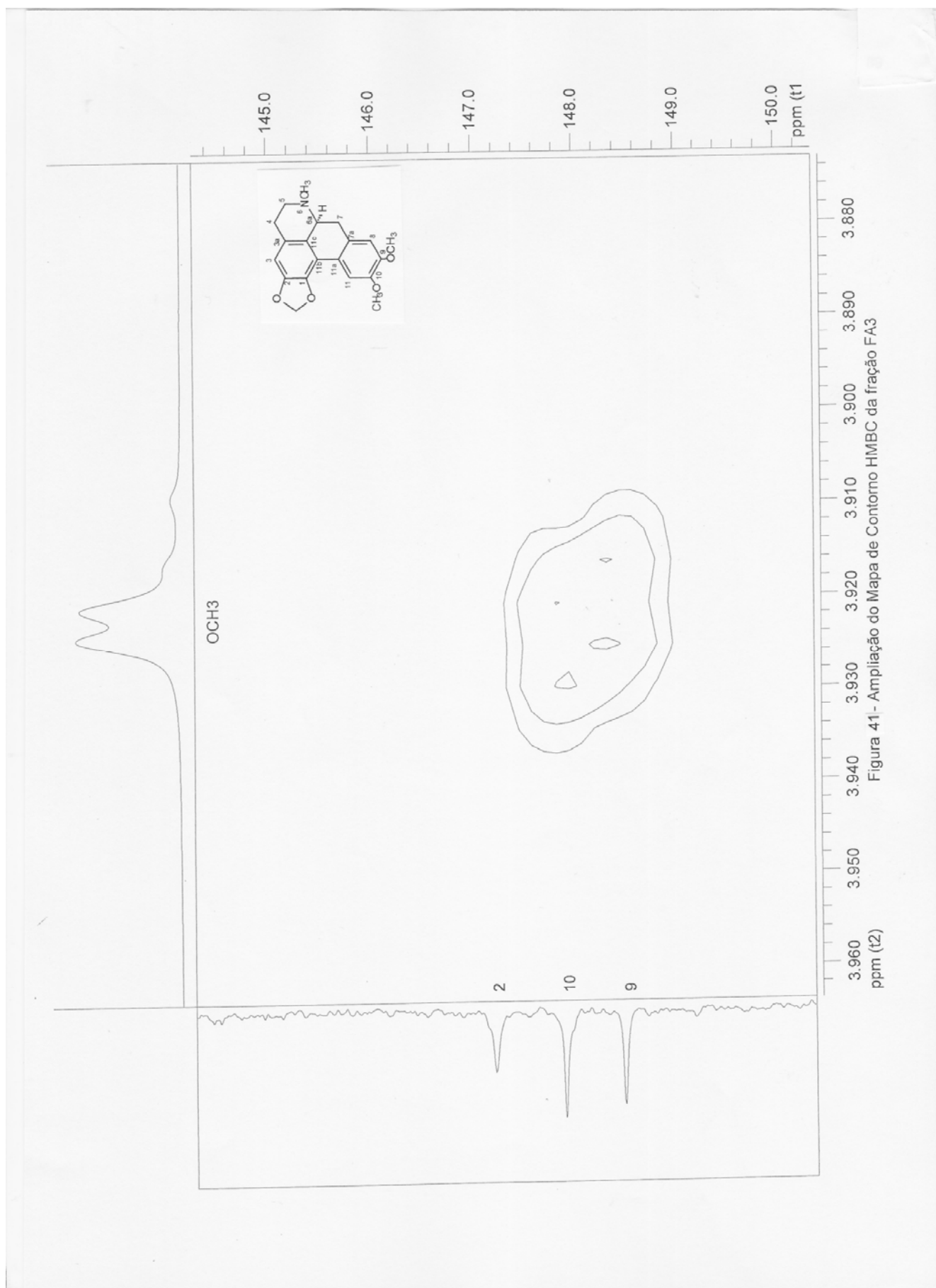
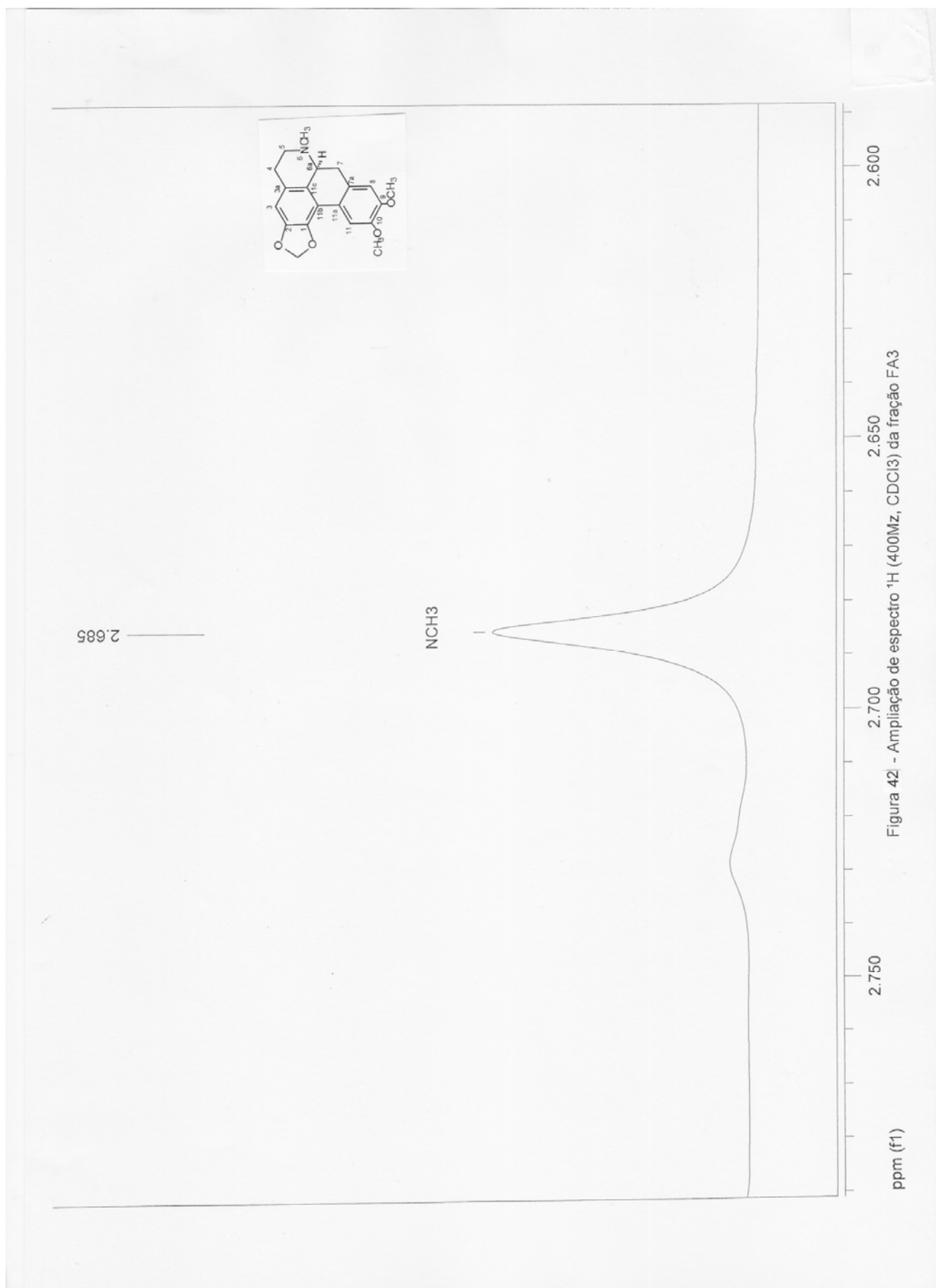


Figura 41 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FA3



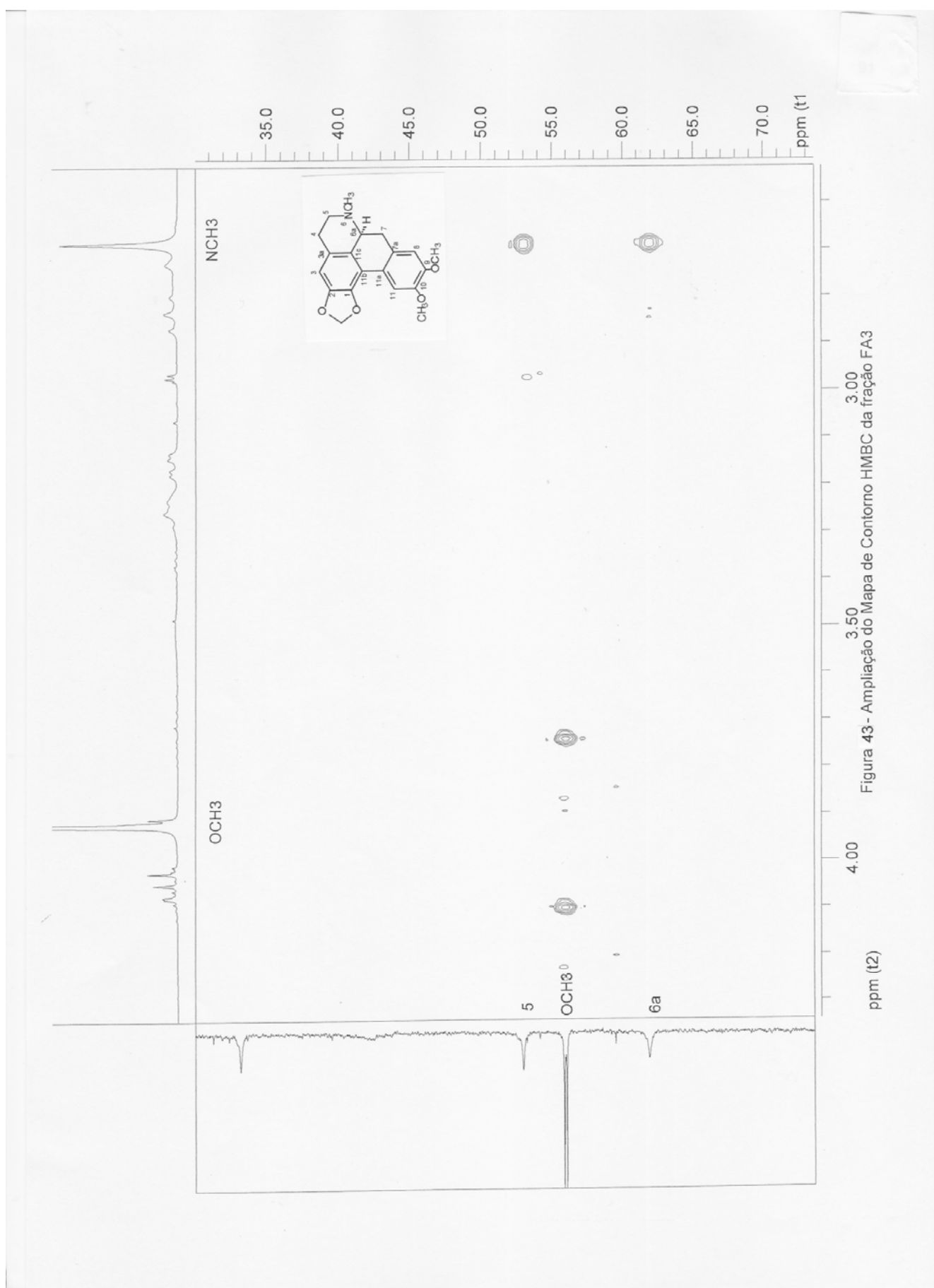
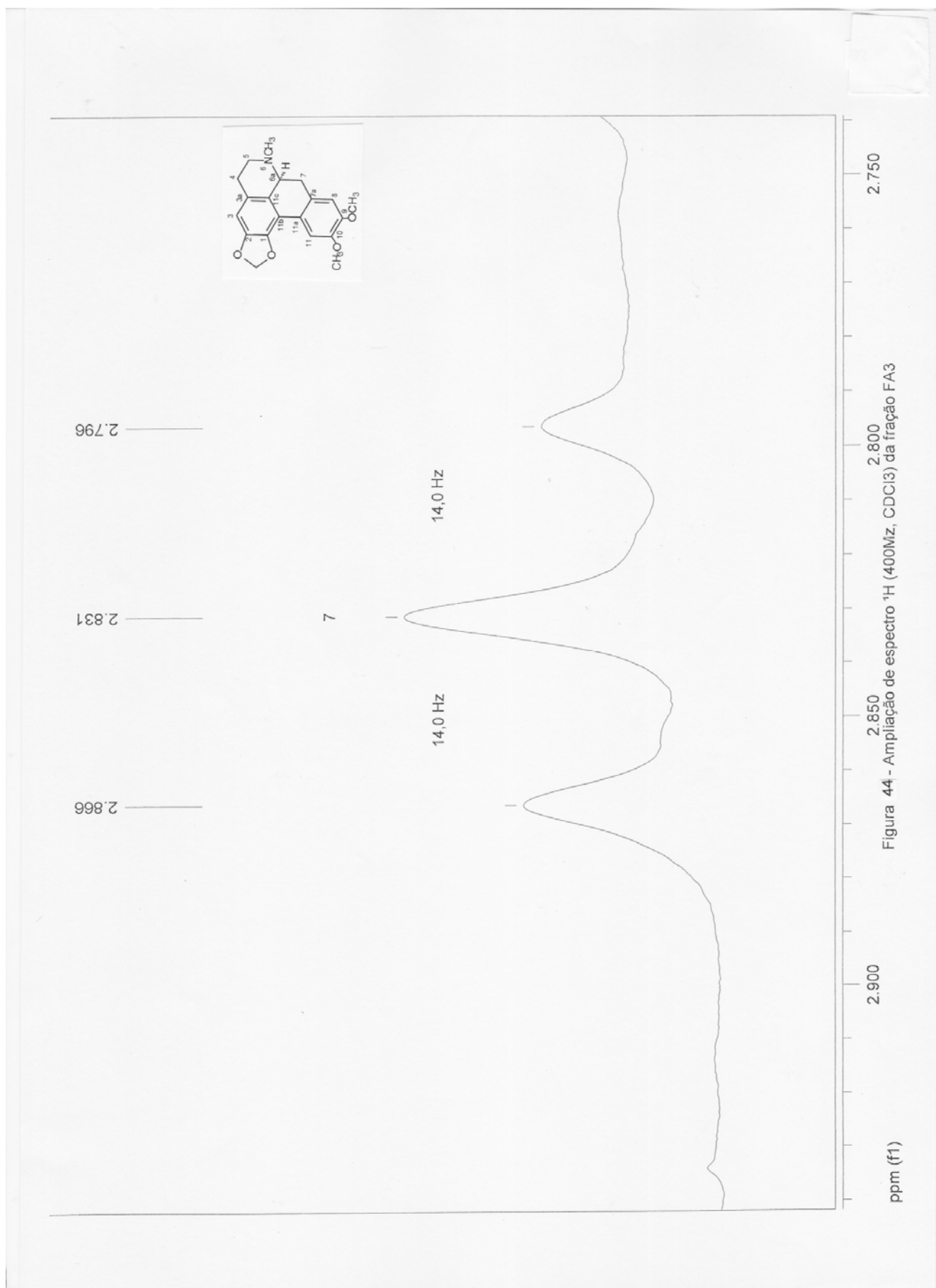
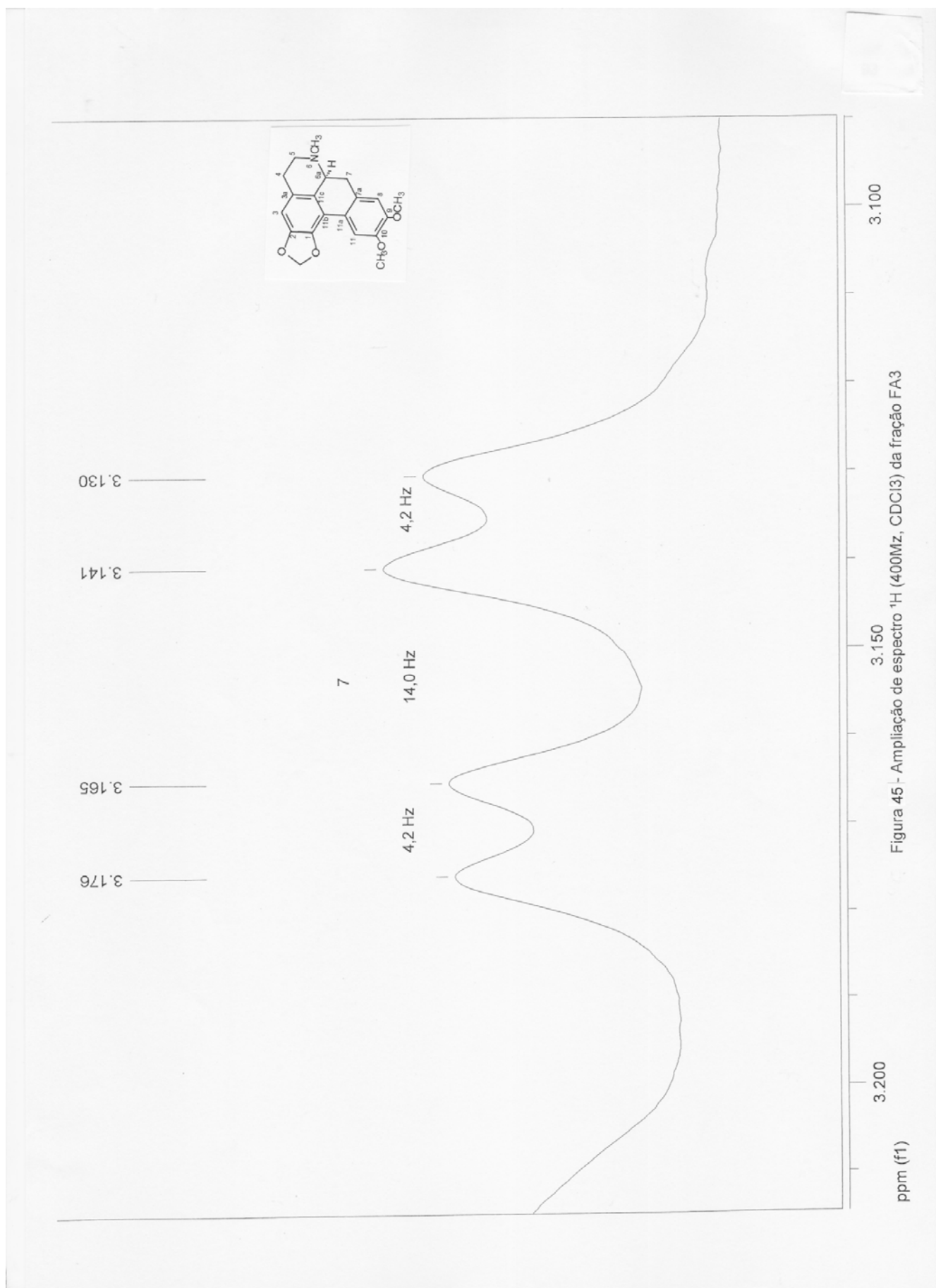


Figura 43 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FA3

Figura 44 - Ampliação de espectro ^1H (400Mz, CDCl_3) da fração FA3

ppm (f1)

Figura 45 - Ampliação de espectro ^1H (400Mz, CDCl_3) da fração FA3

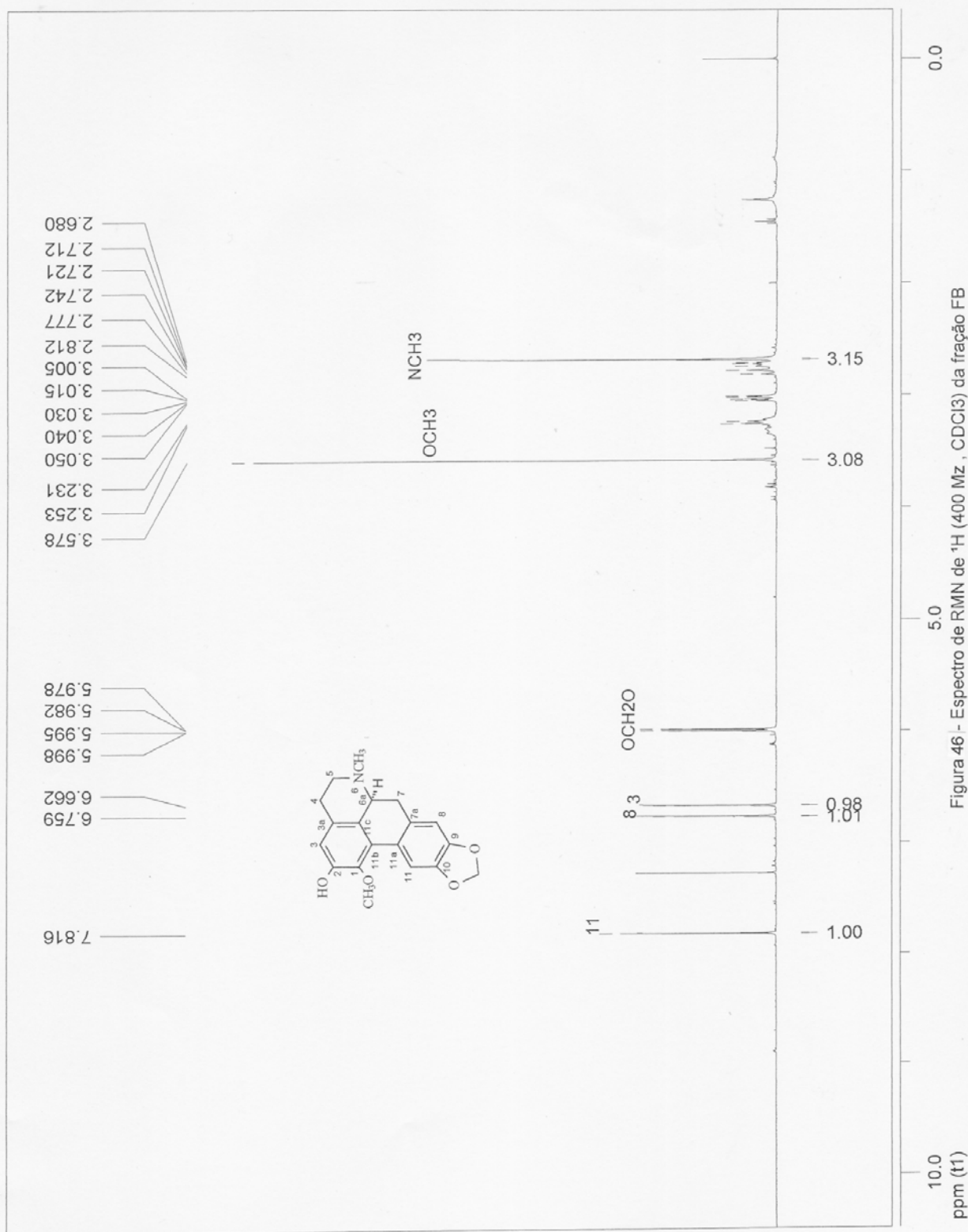


Figura 46 - Espectro de RMN de ¹H (400 Mz , CDCl₃) da fração FB

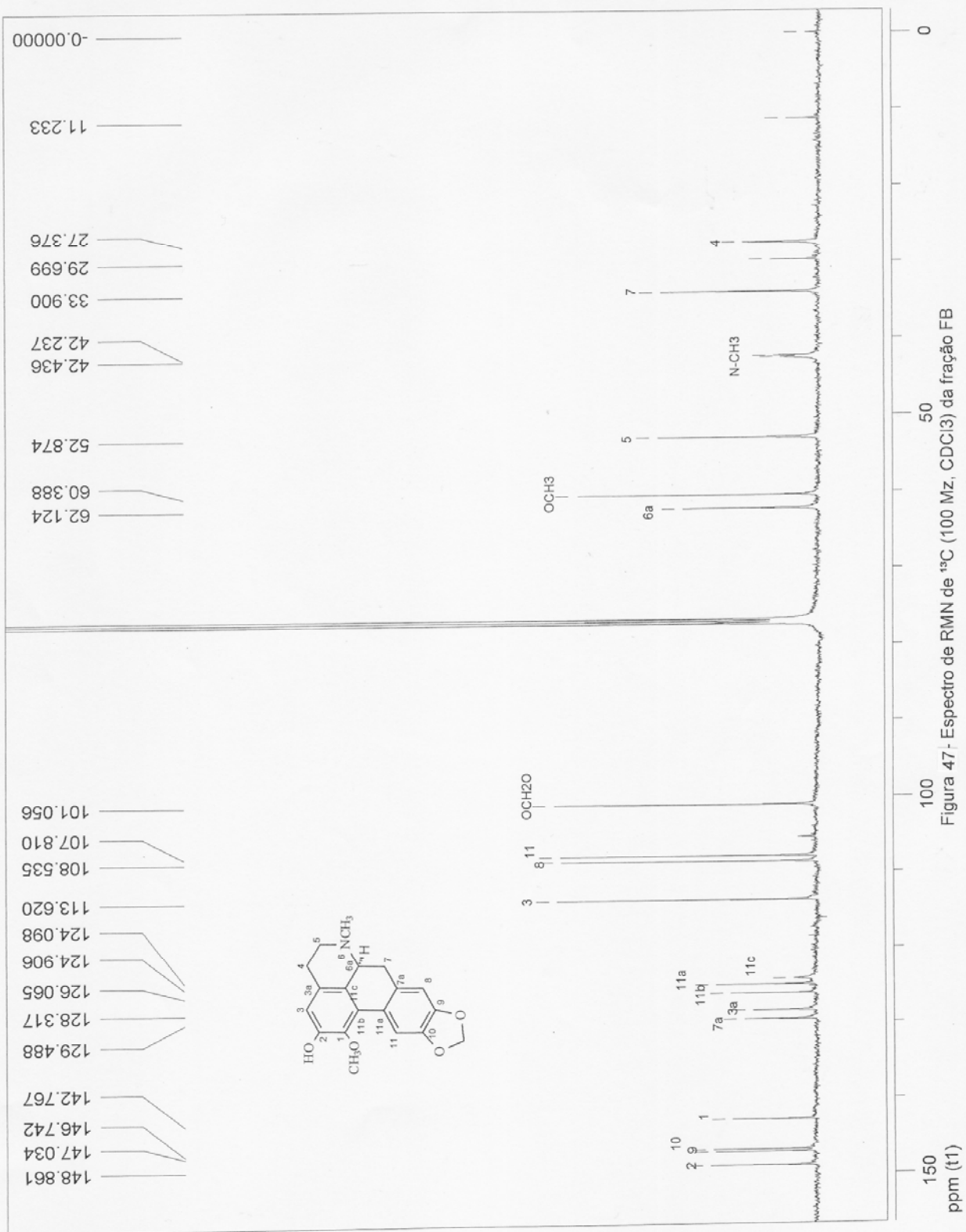
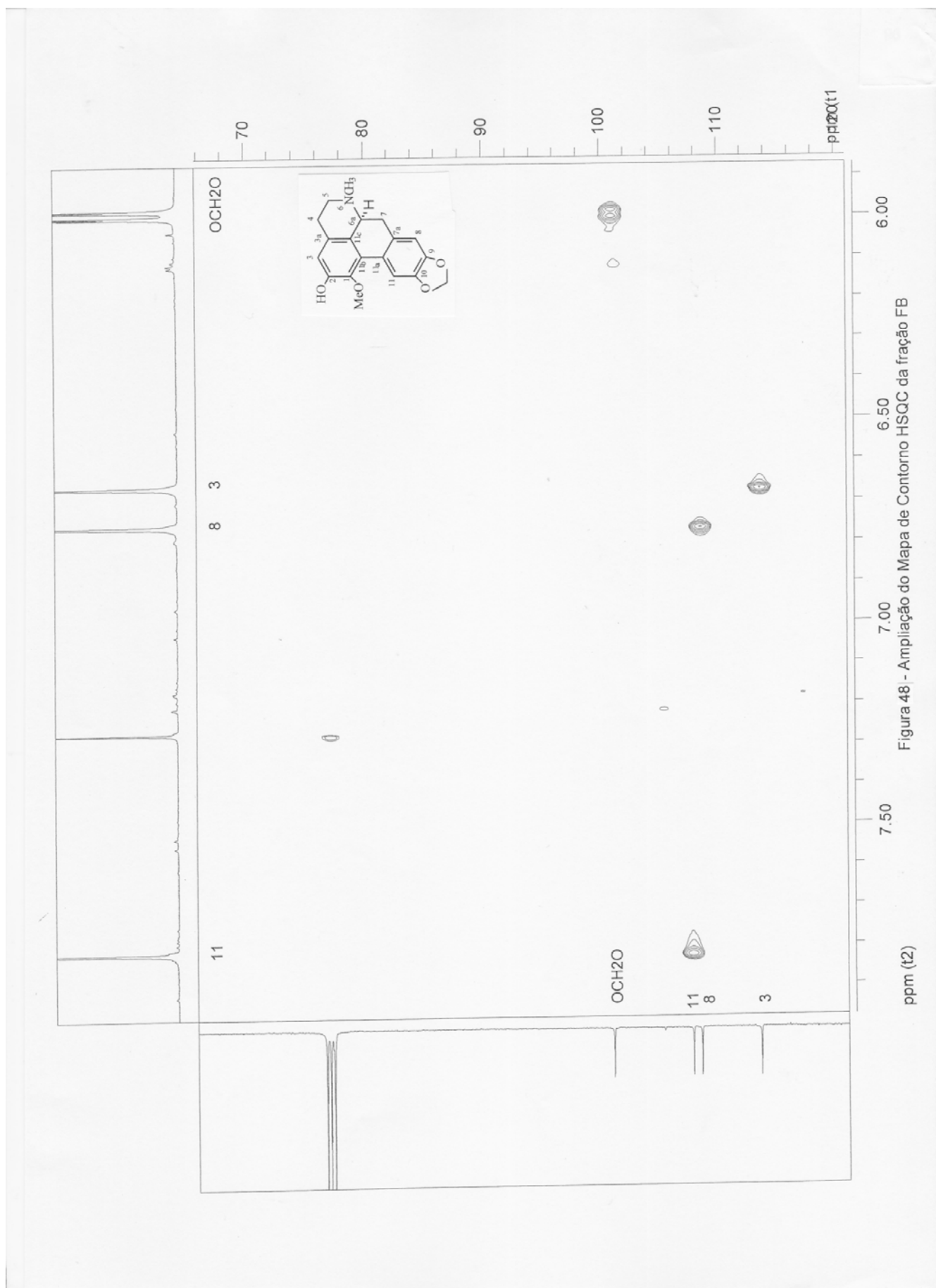


Figura 47- Espectro de RMN de ¹³C (100 Mz, CDCI₃) da fração FB



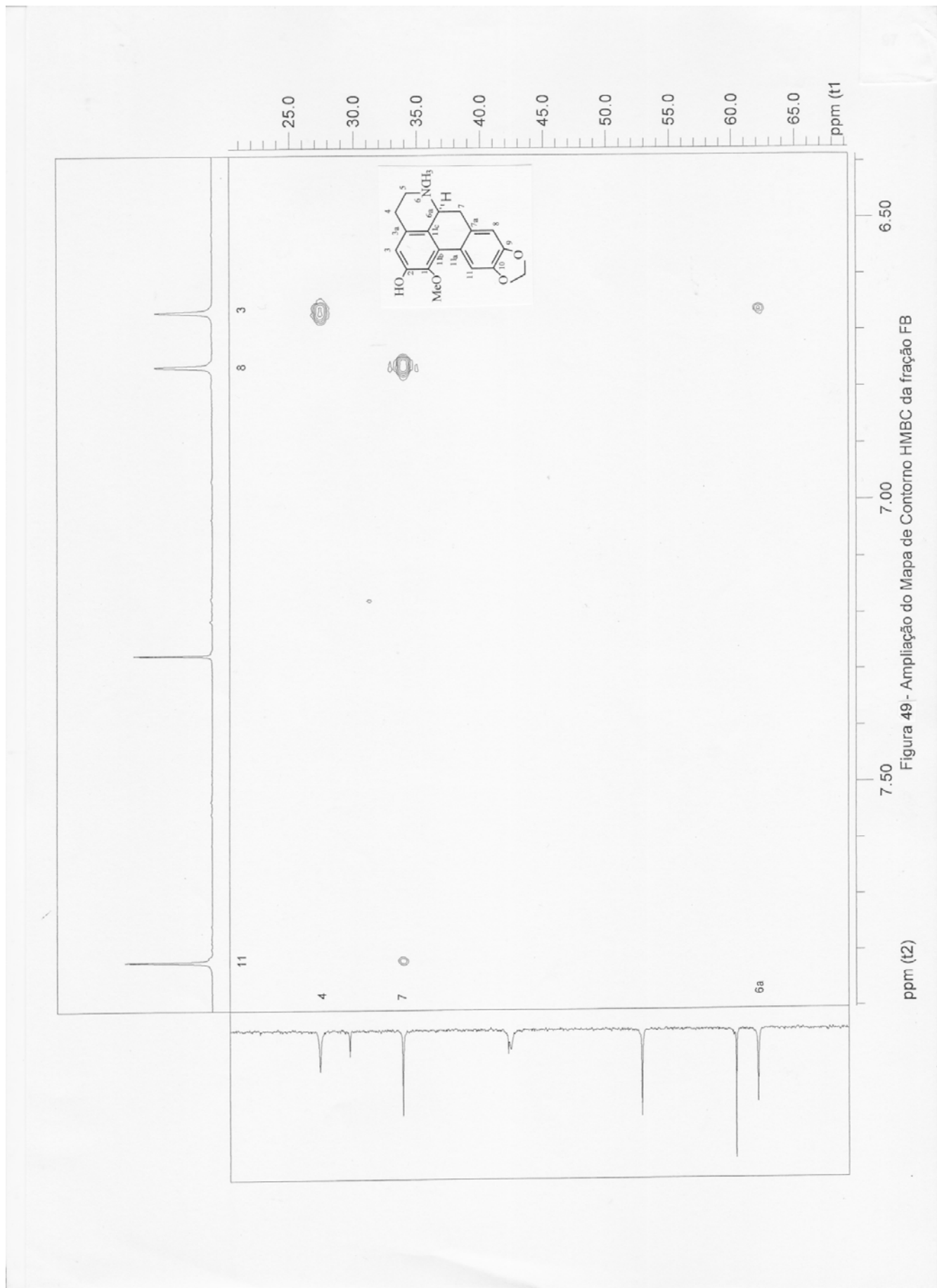


Figura 49 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FB

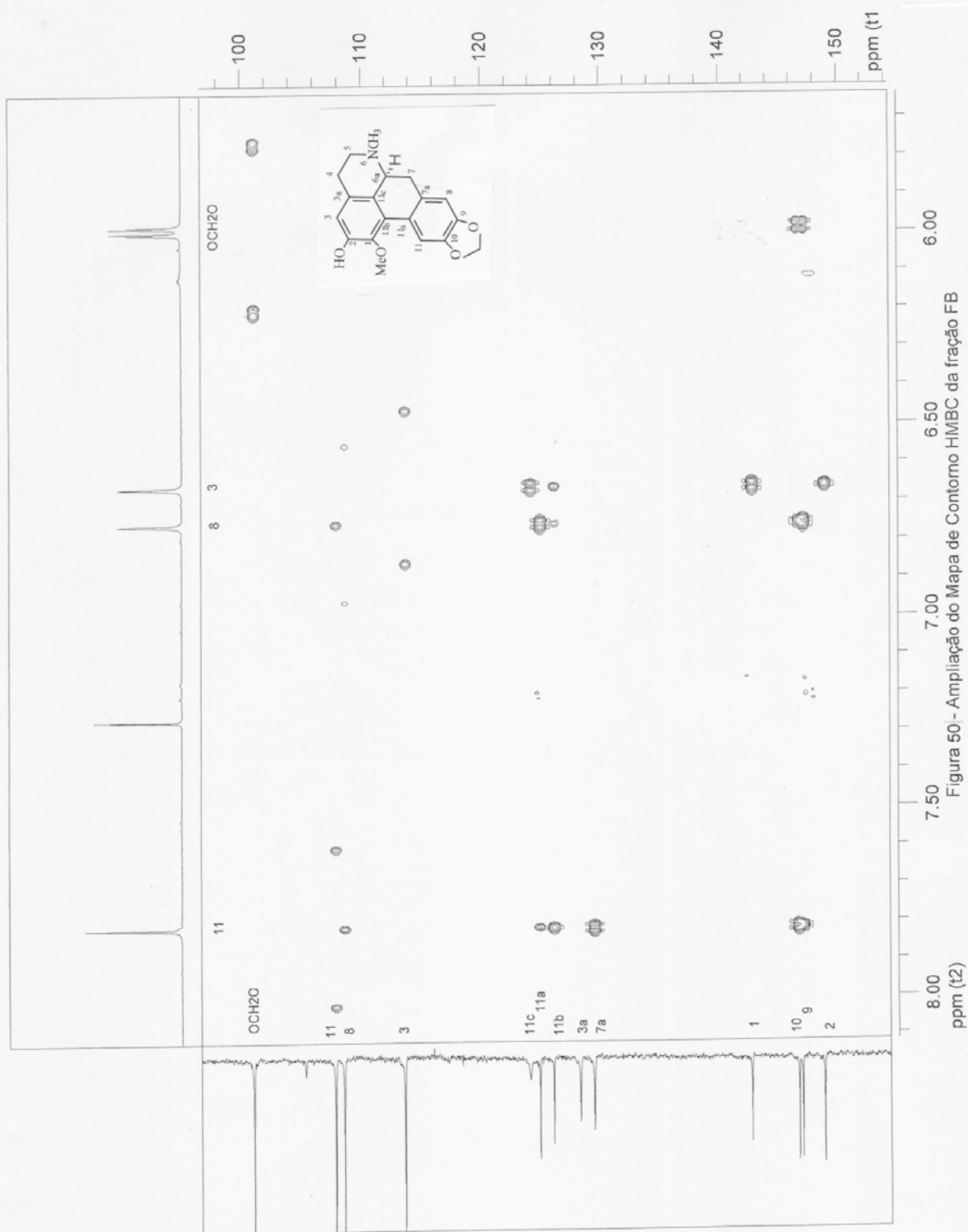
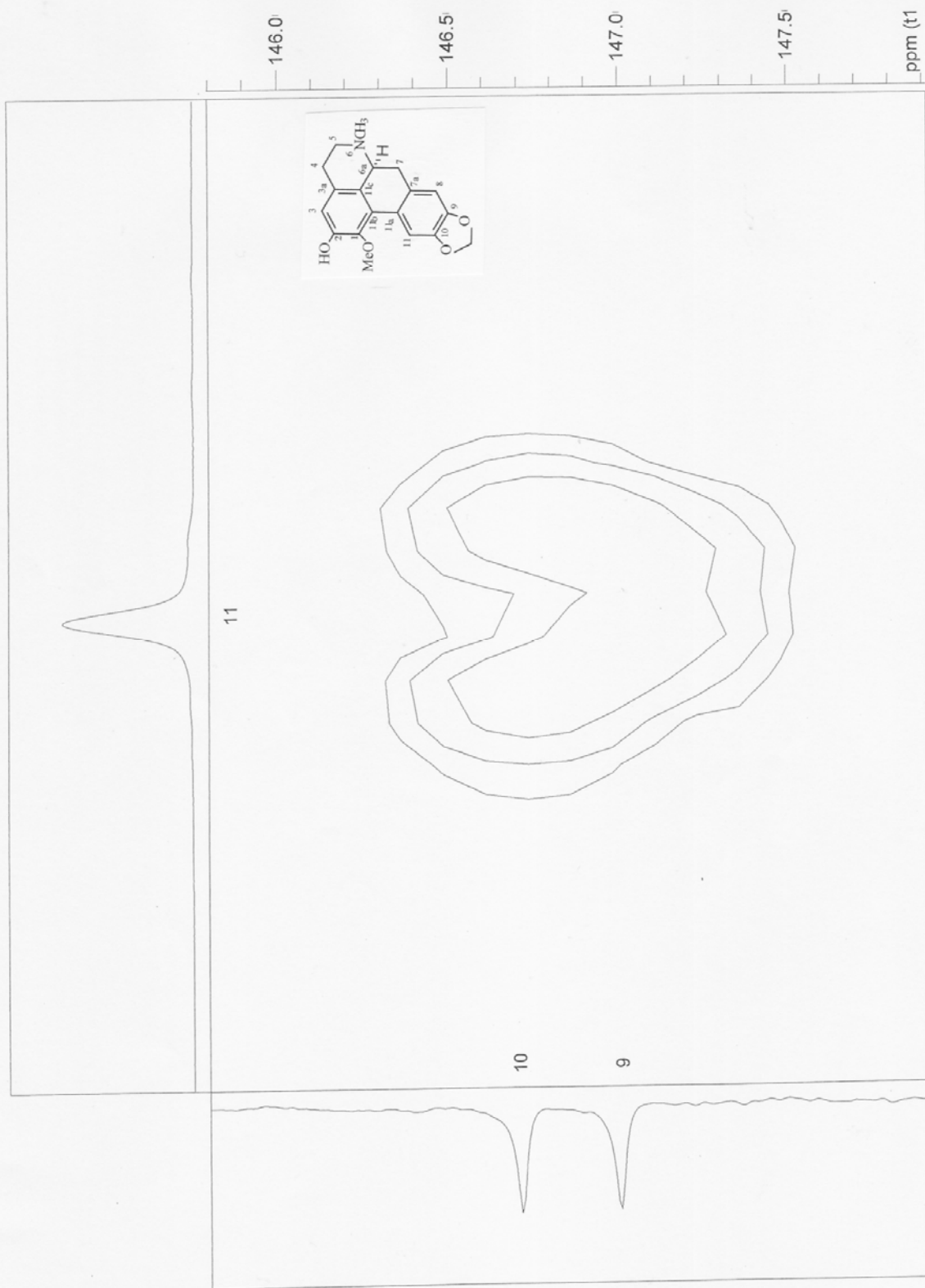
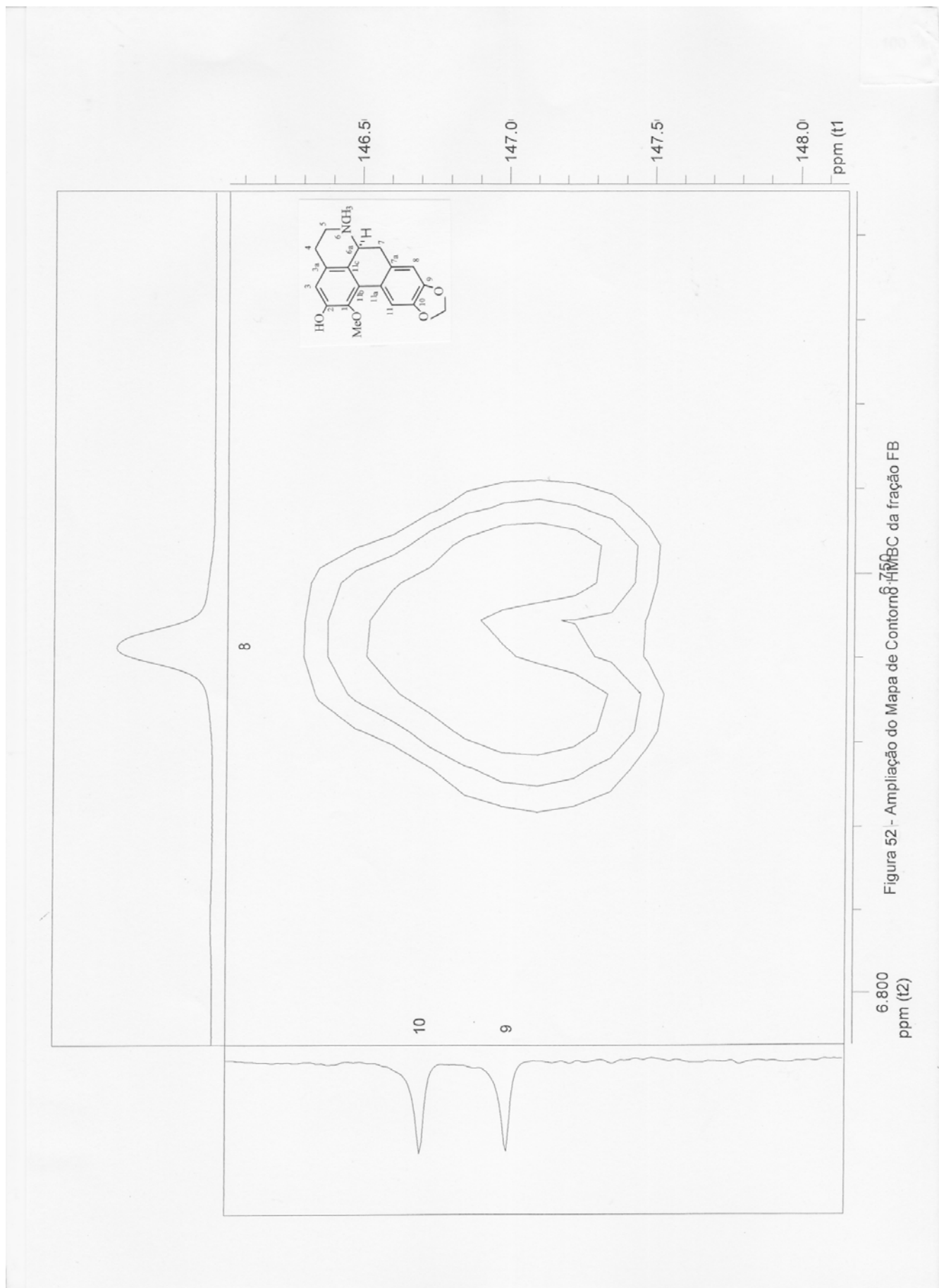


Figura 50 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FB



7.850 Figura 51 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FB

ppm (t2)



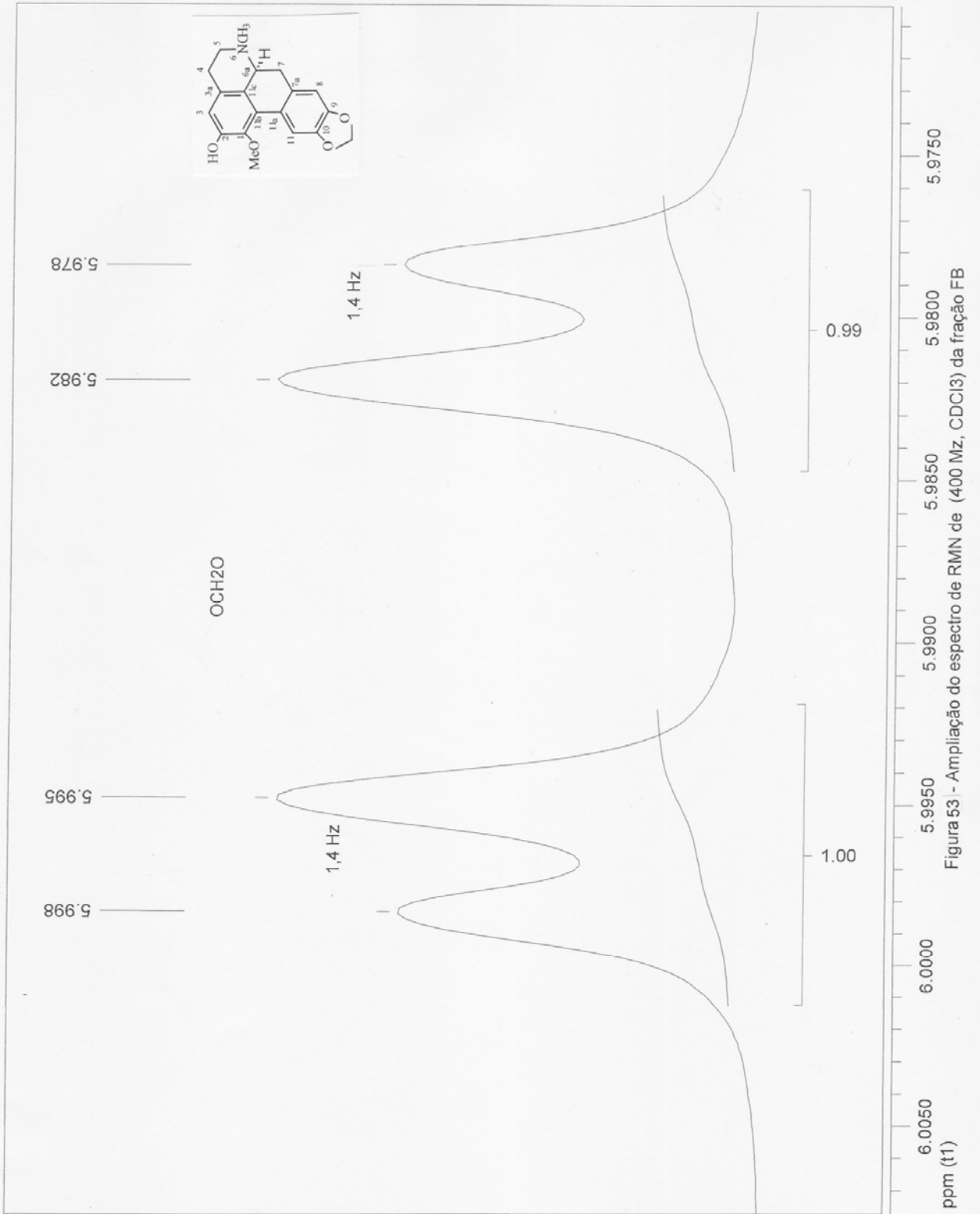
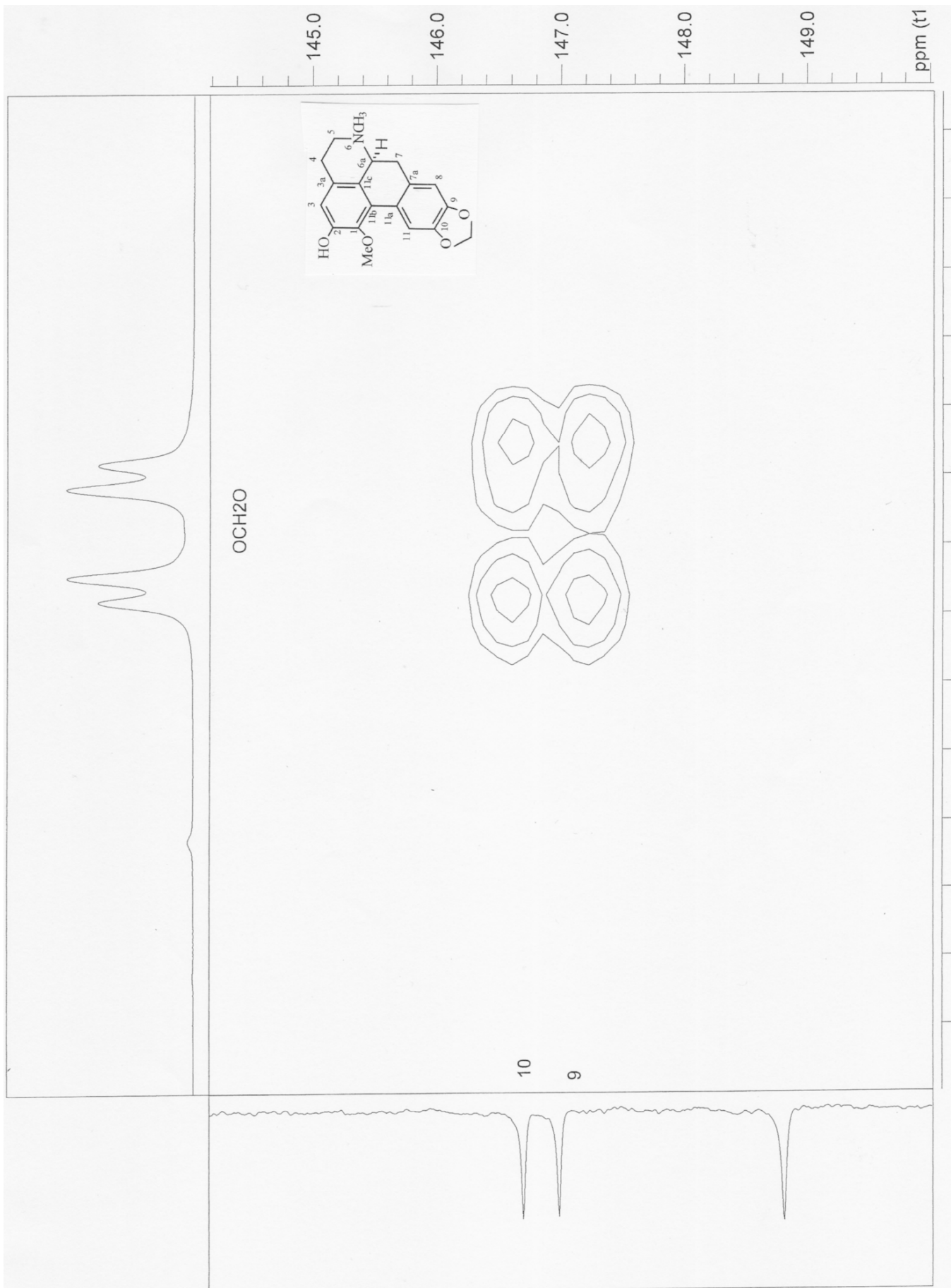


Figura 53 - Ampliação do espectro de RMN de (400 Mz, CDCl₃) da fração FB



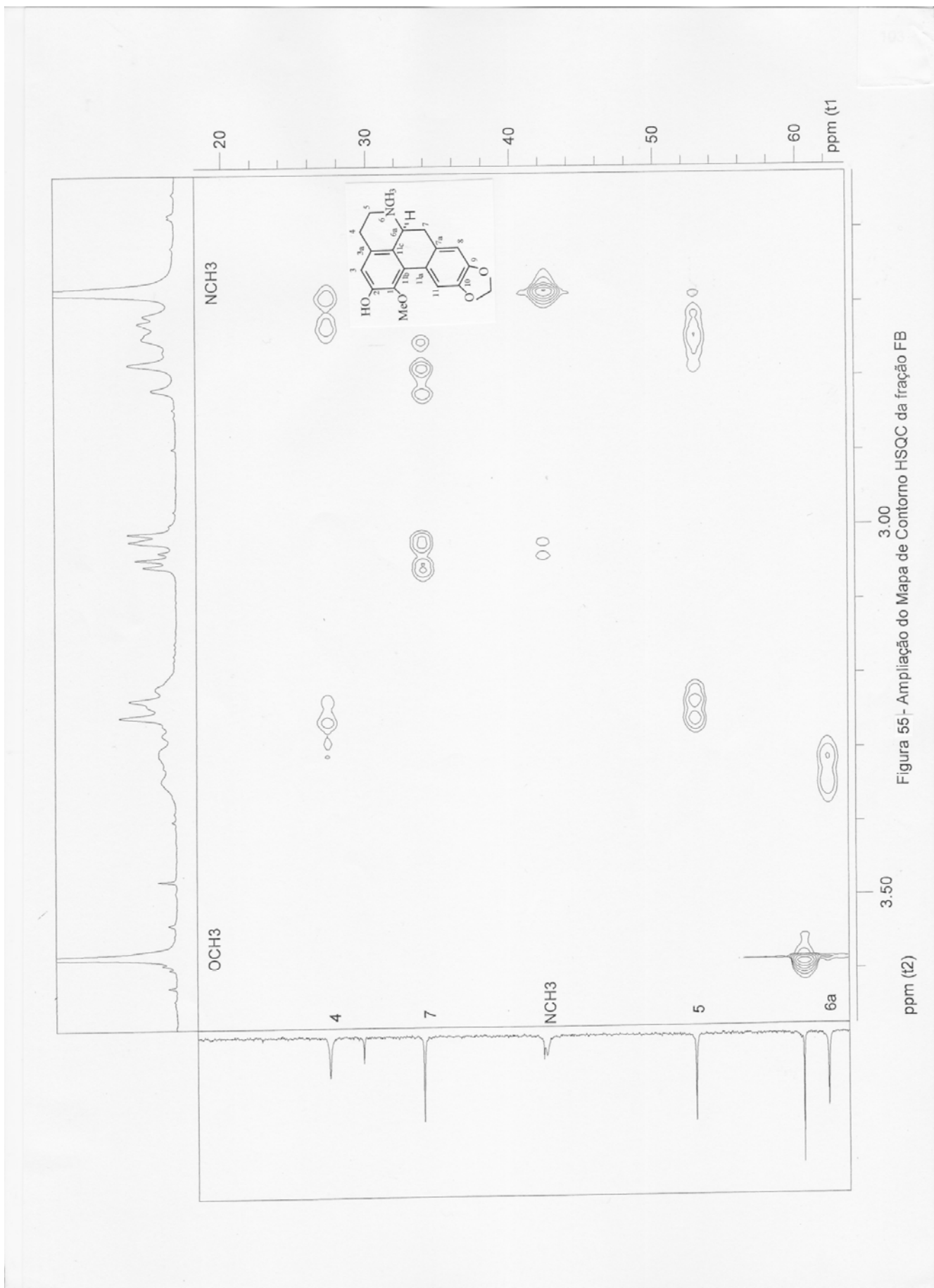


Figura 55 - Ampliação do Mapa de Contorno HSQC da fração FB

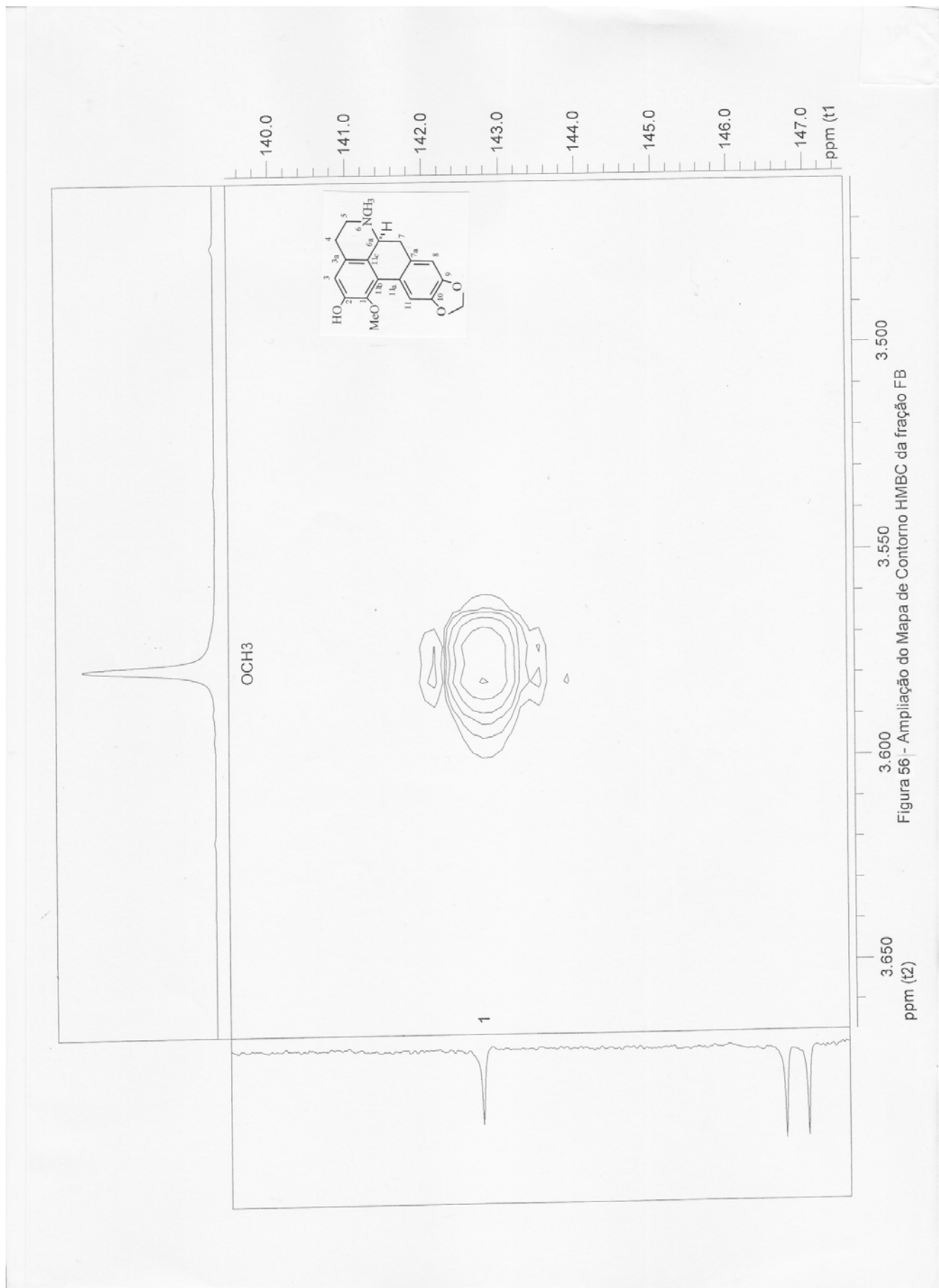


Figura 56 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FB

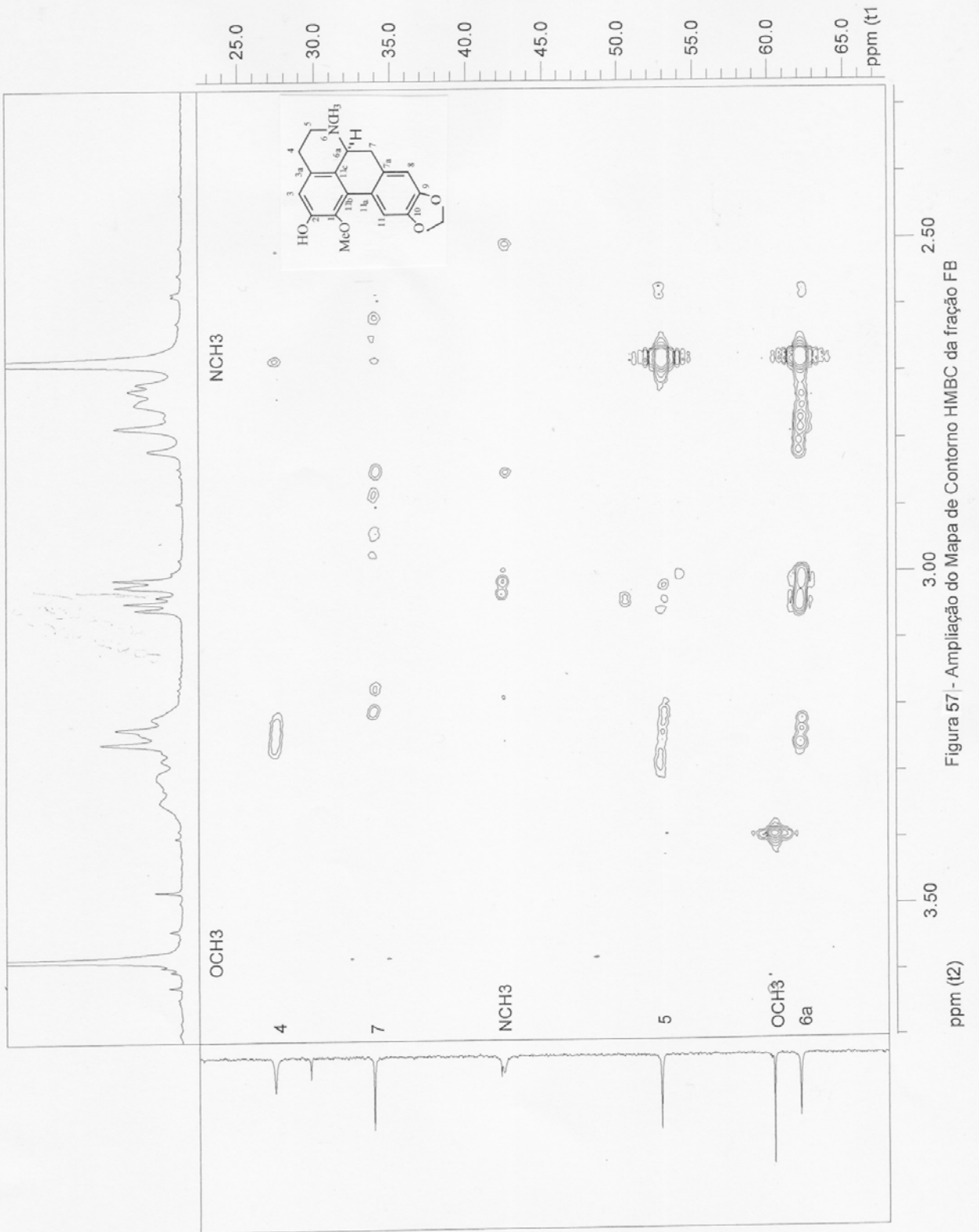
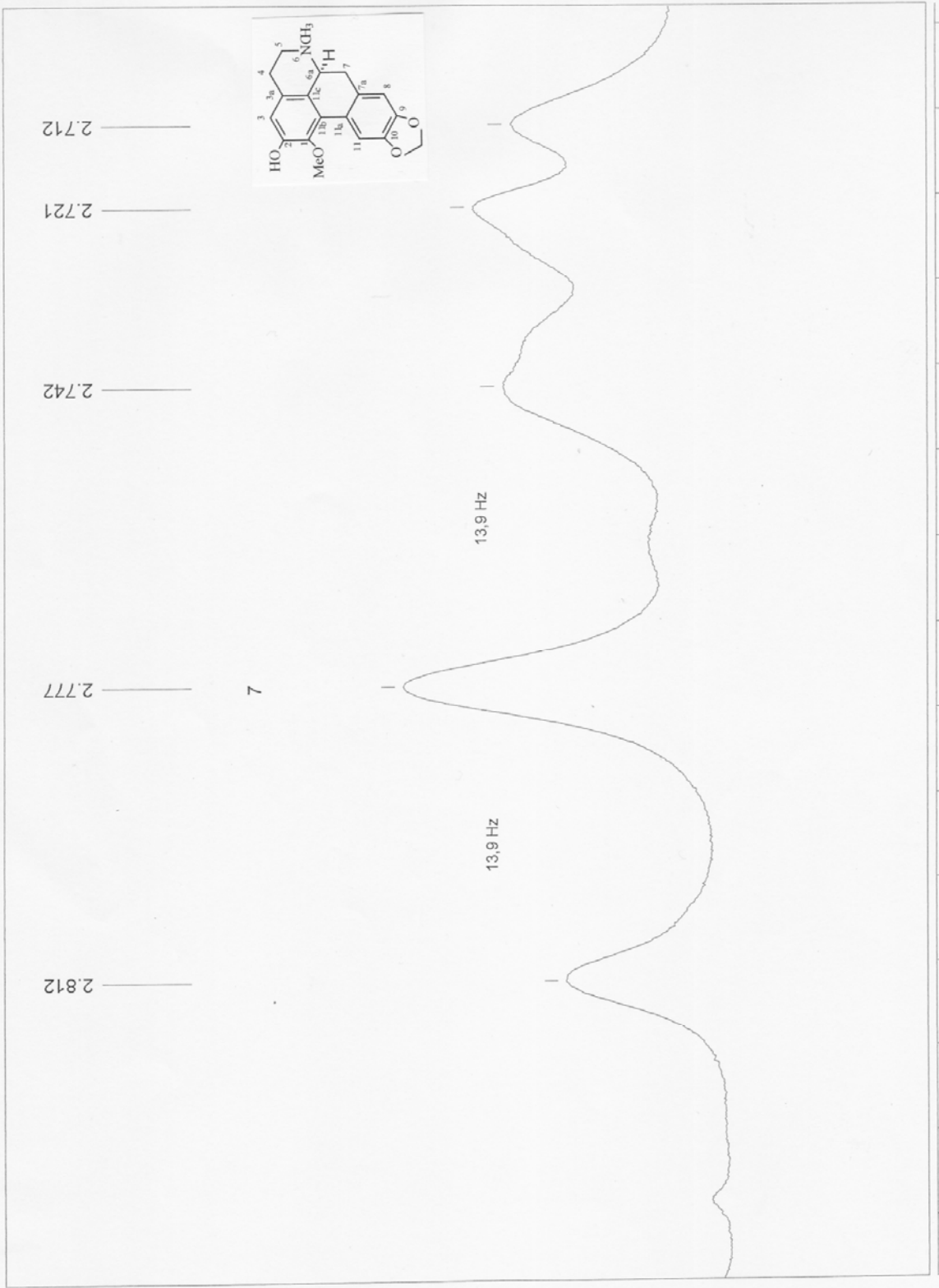


Figura 57 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FB

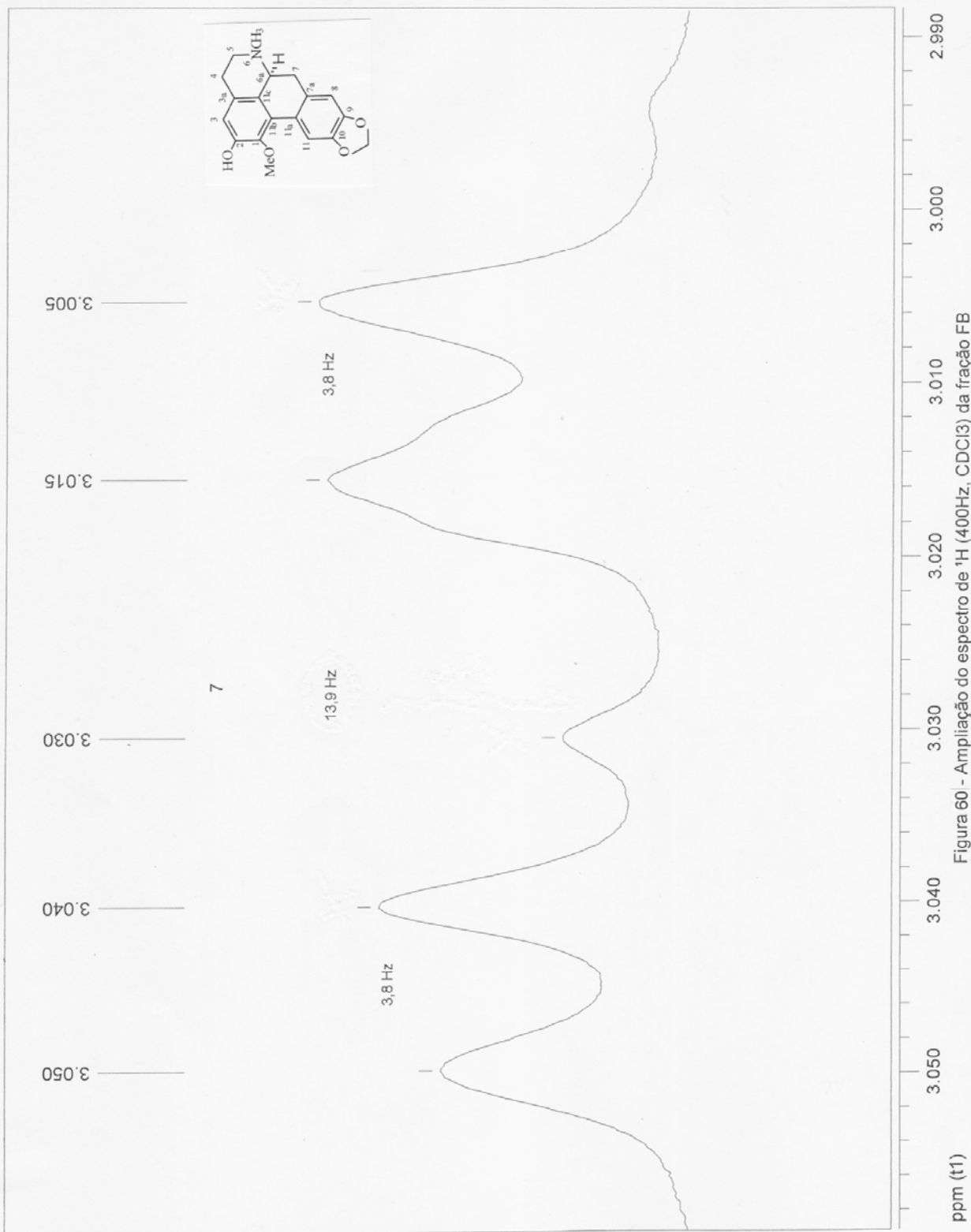


Figura 58 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FB



2.800
2.750
Figura 59 - Ampliação do espectro de ¹H (400 Mz, CDCl₃) da fração FB

ppm (t1)



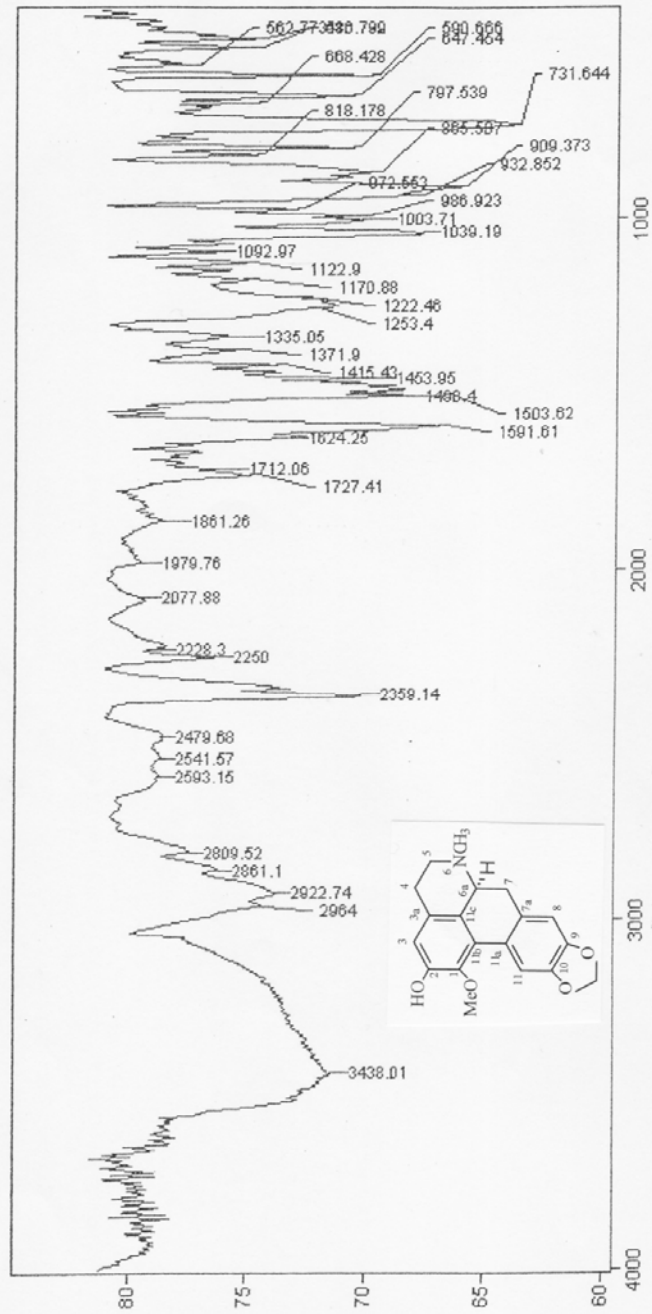


Figura 61 – Espectro no I.V. da fração FB

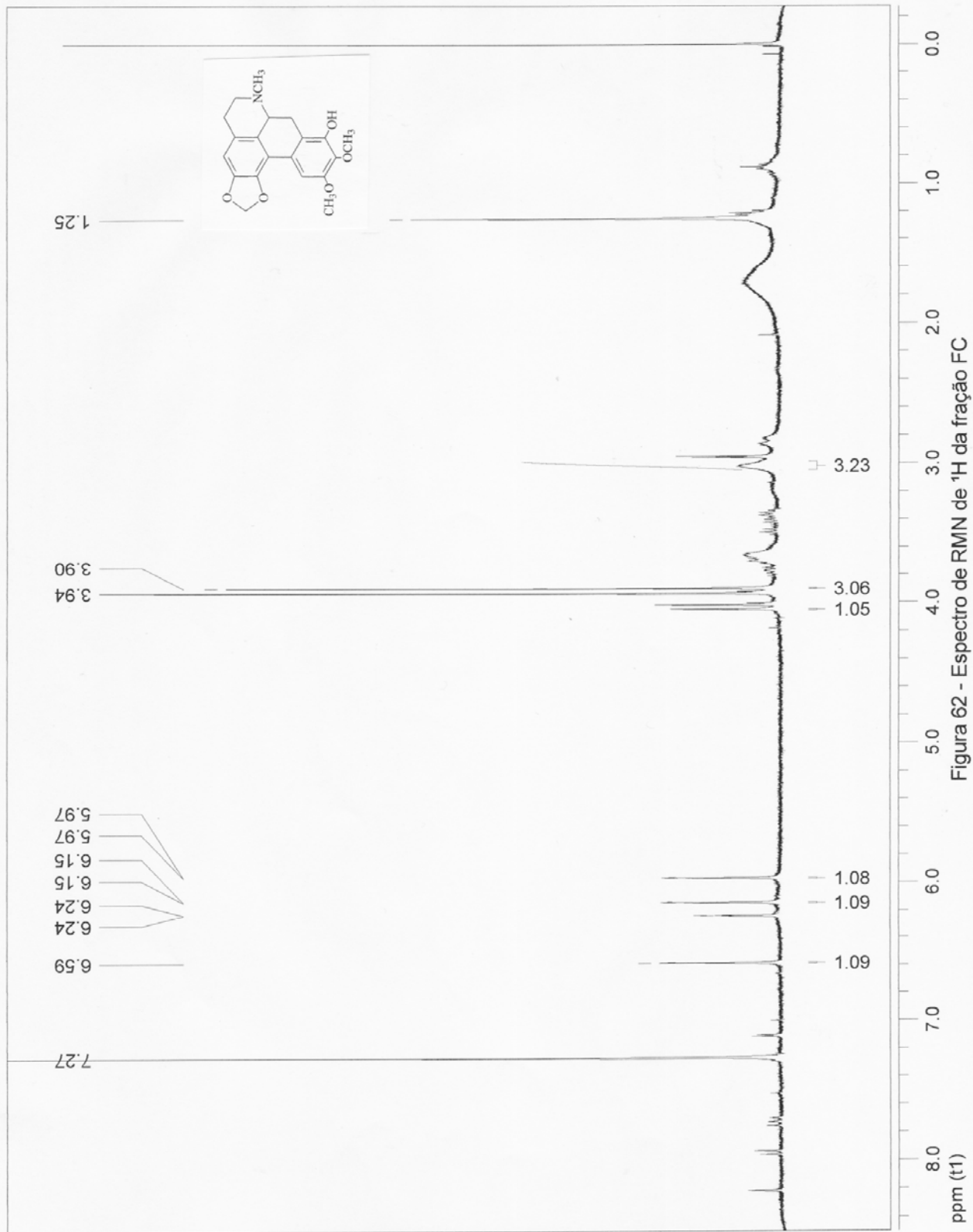




Figura 63 - Ampliação do Mapa de Contorno HSQC da fração FC

ppm (f2)

7.00

6.50

6.00

ppm (f1)

7,26

6,58

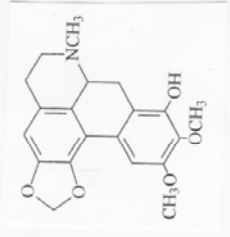
6,14

5,96

102,7

106,8

101,2



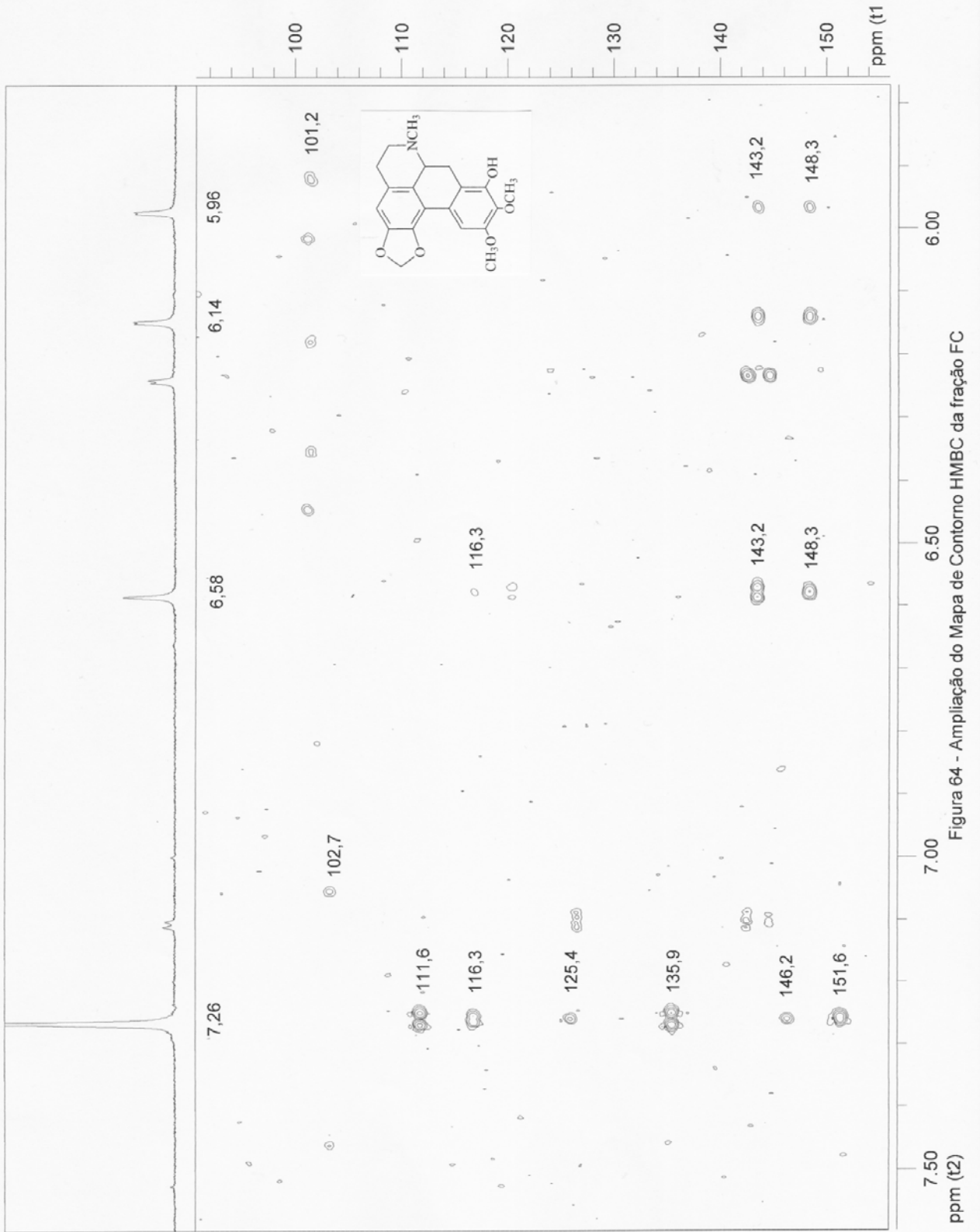
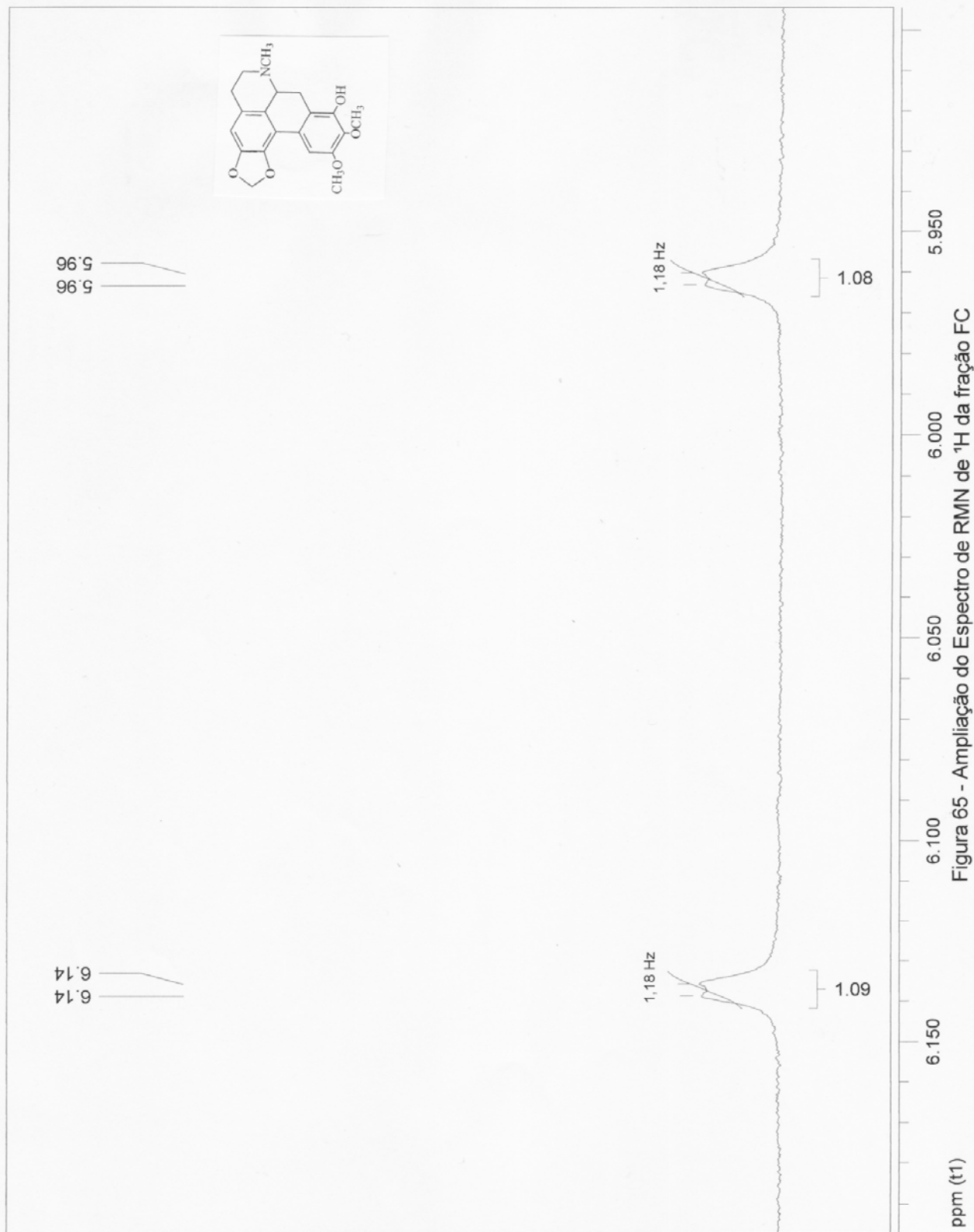


Figura 64 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FC

Figura 65 - Ampliação do Espectro de RMN de ^1H da fração FC

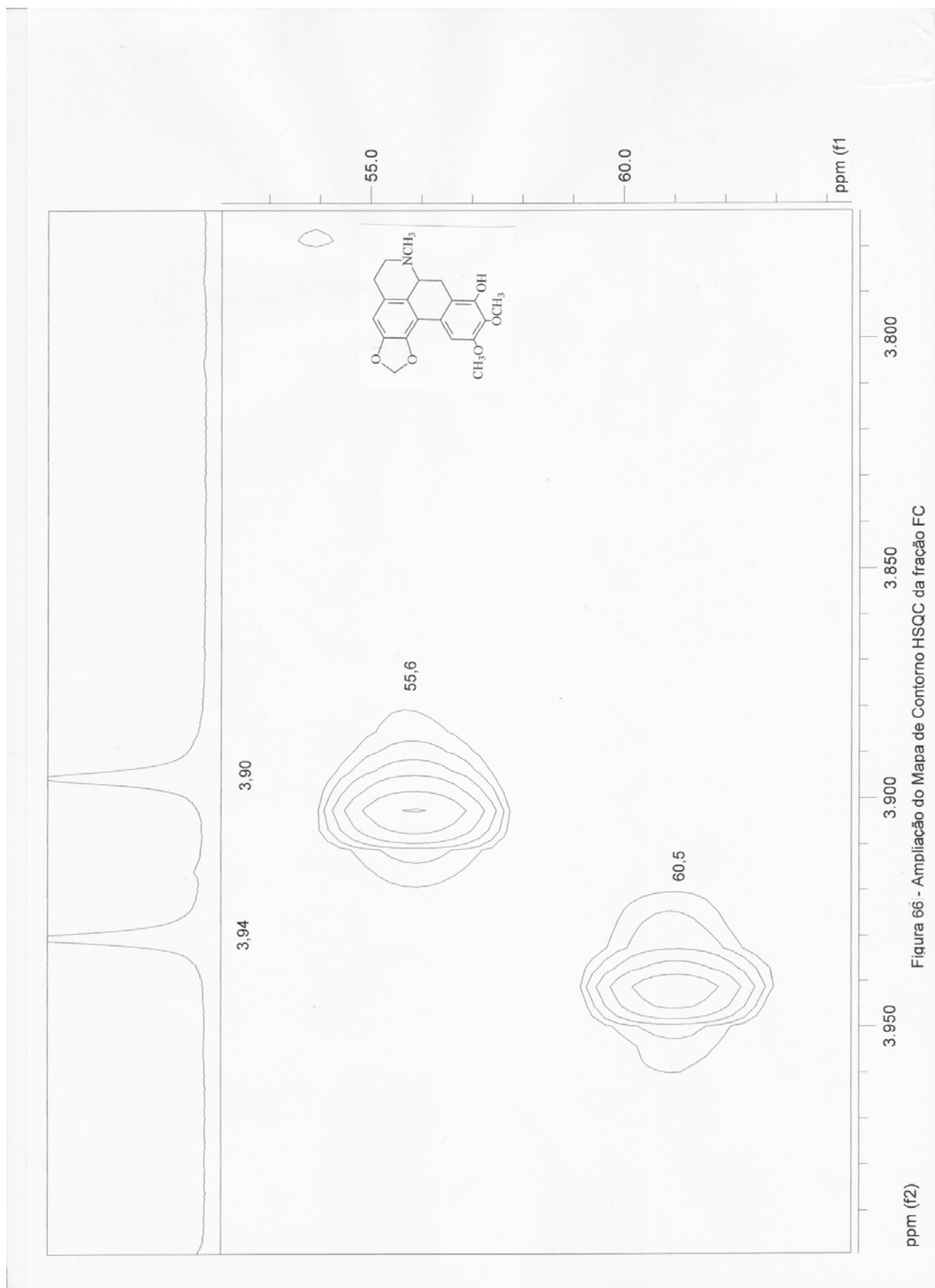


Figura 66 - Ampliação do Mapa de Contorno HSQC da fração FC

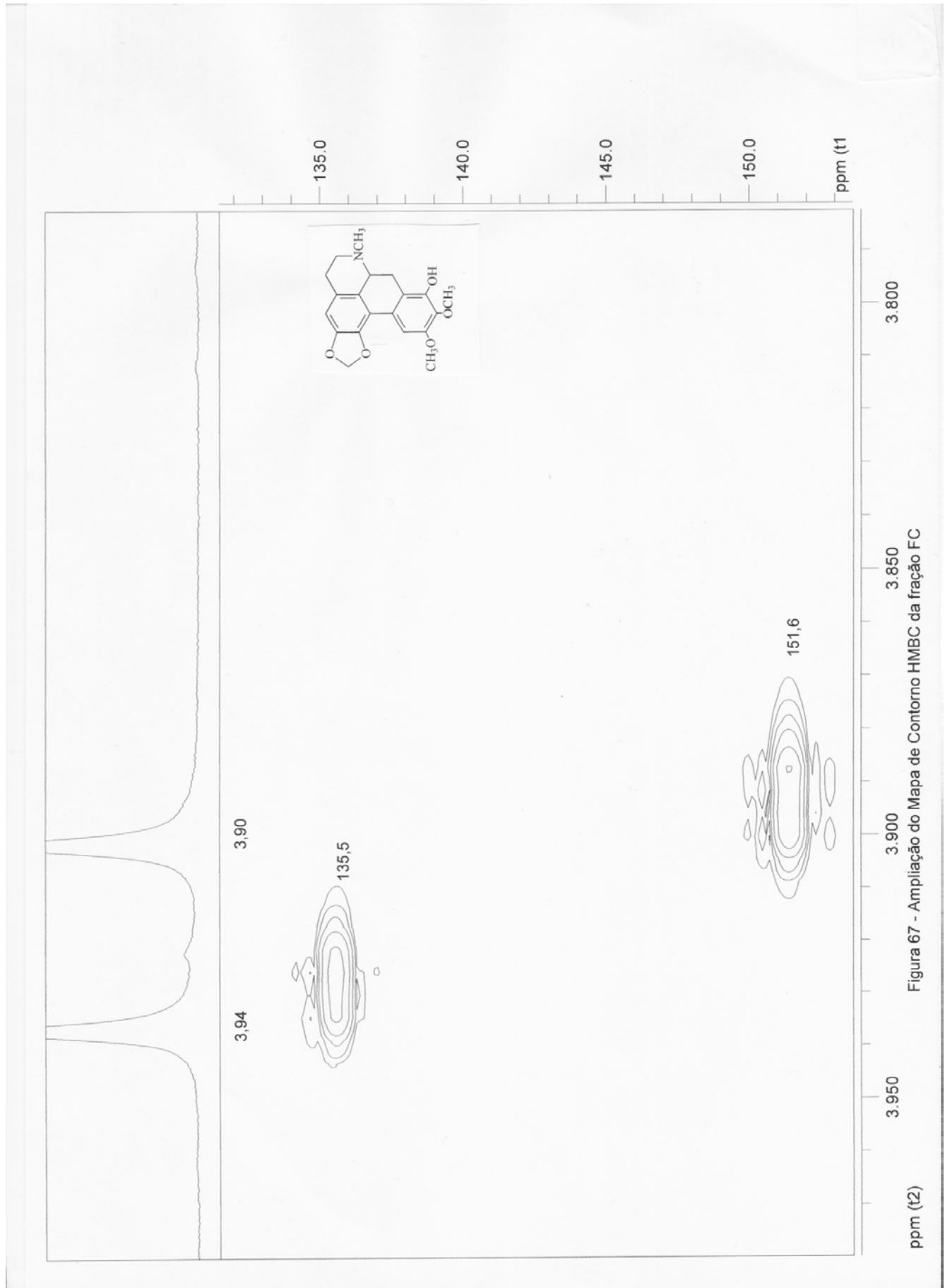


Figura 67 - Ampliação do Mapa de Contorno HMBC da fração FC

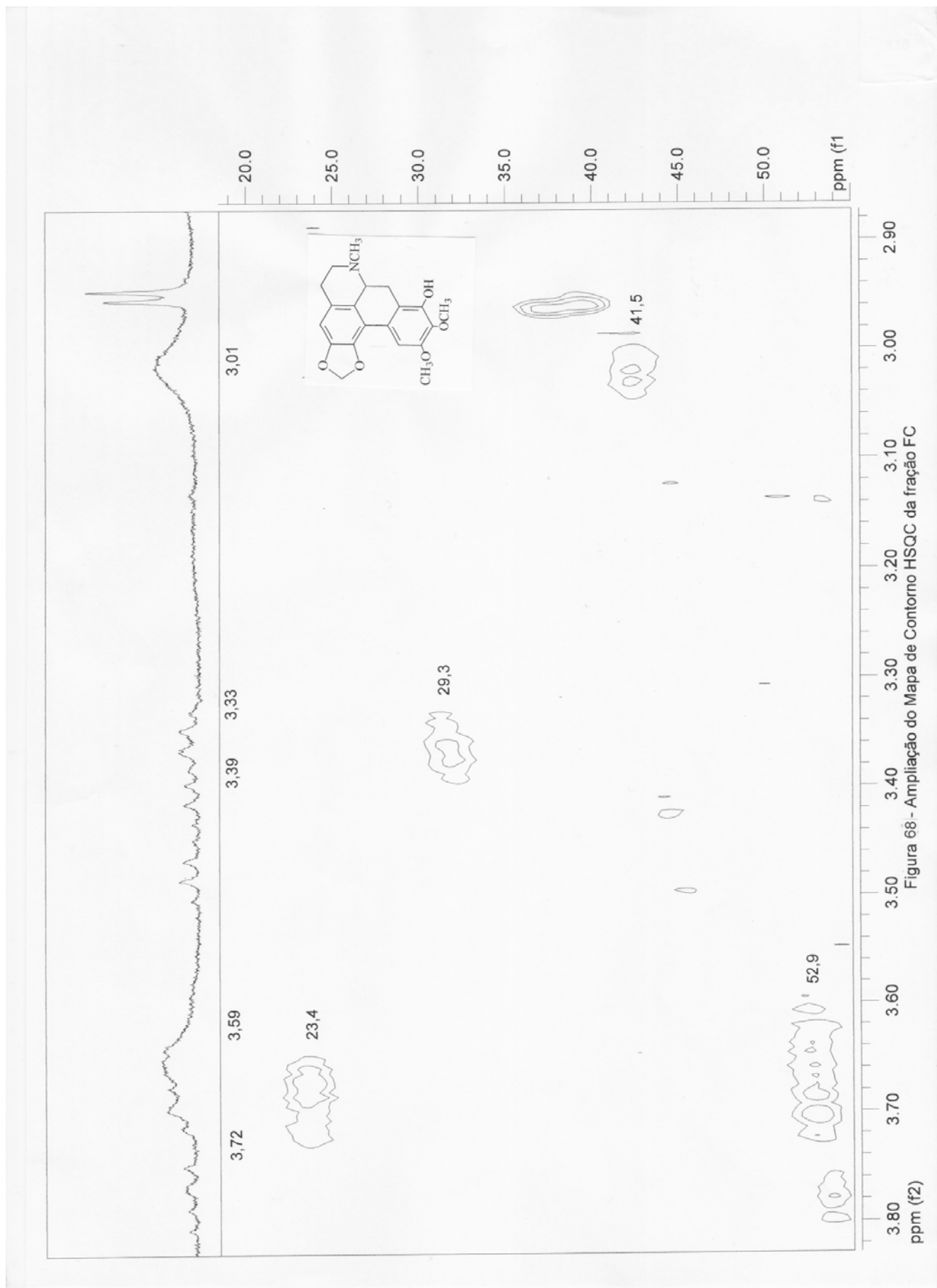


Figura 68 - Ampliação do Mapa de Contorno HSQC da fração FC

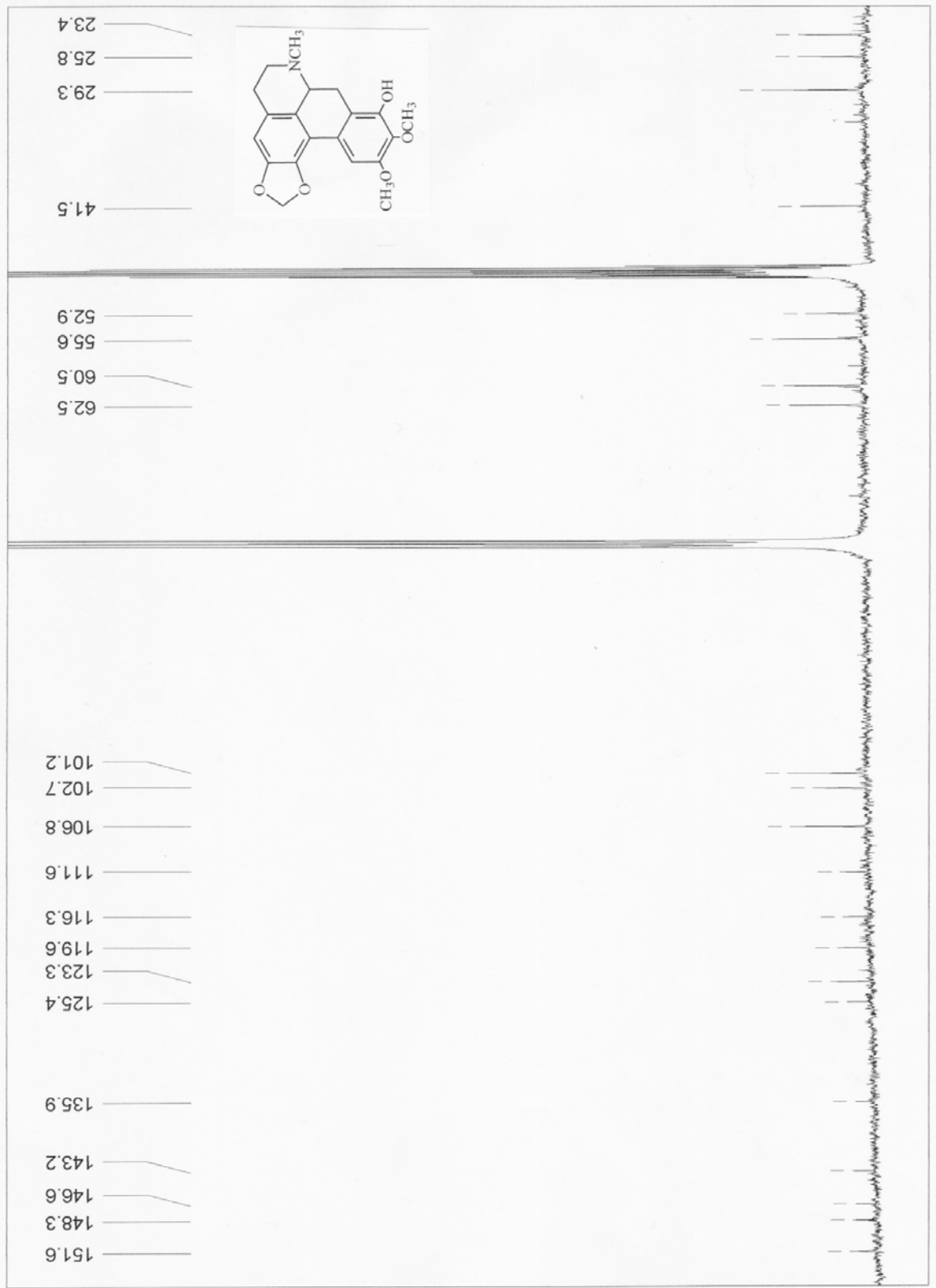


Figura 69 - Espectro de RMN de ¹³C da fração FC

150
ppm (t1)

Win-Bomem Easy

File Edit View Collect Peaks Report Arithmetic Options Help

File # 1 : FC

Mode = 2 (Mid-IR)

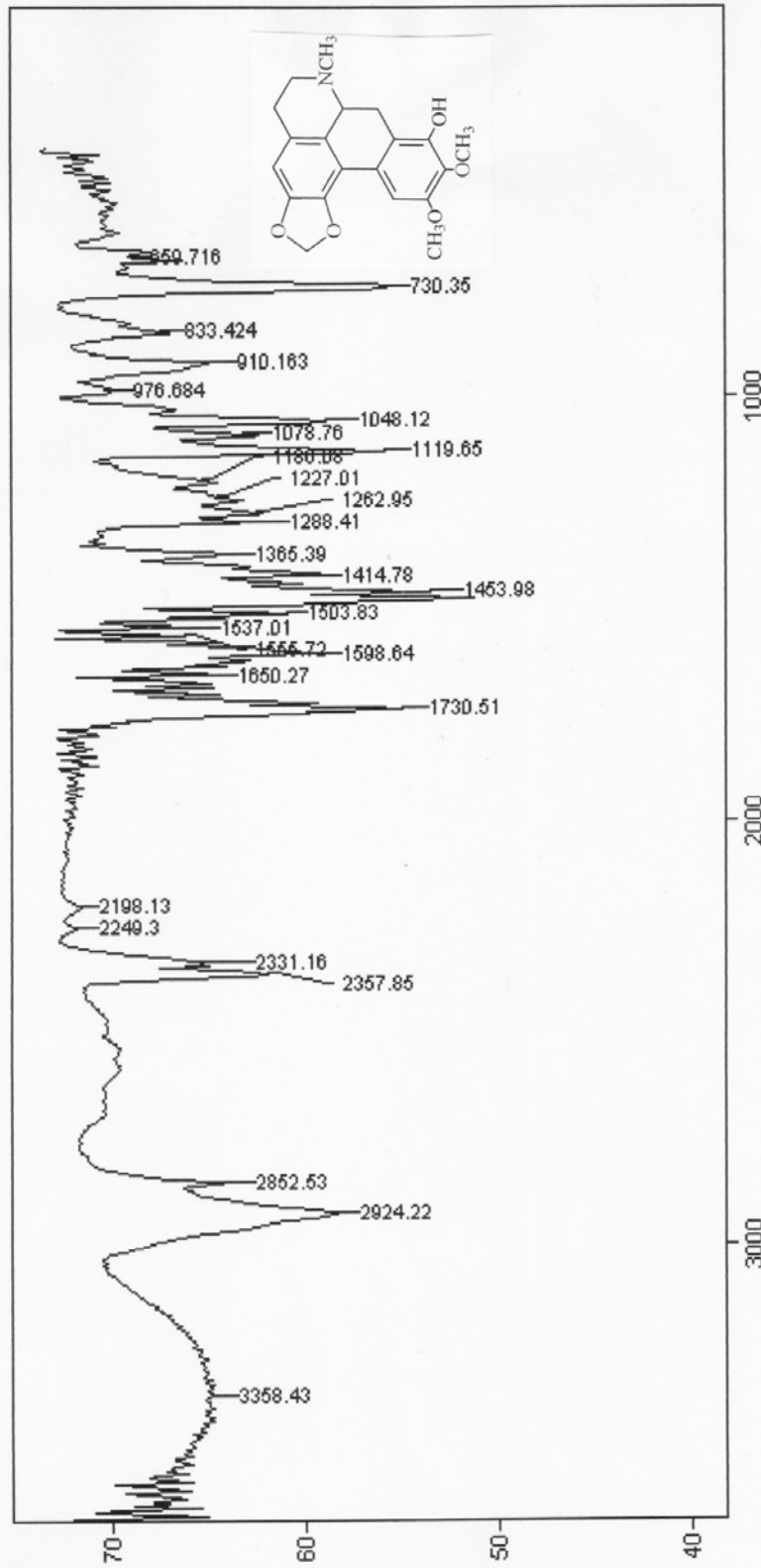
12/01/06 15:13

Sample Description:

Scans = 32

Res = 4 cm⁻¹ 19 scans/min

Apod = Cosine



Transmittance /Wavenumber (cm⁻¹)

FC Overlay CURSOR Y-Zoom Description:

Figura 70 – Espectro no IV da fração FC