

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas pelo homem é uma prática antiga que visa o controle e cura de diversos males que afetam a saúde humana e registros históricos revelam que em todos os povos em todas as épocas houve o uso de plantas para aliviar o sofrimento humano provocado por doenças. Ervas medicinais são utilizadas como um recurso terapêutico, devido ao baixo custo, maior acessibilidade, sendo ainda utilizada por aproximadamente 80% da população mundial. (TIWARI, 2008)

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. (FILHO & YUNES, 1998; CORDELL, 2000)

Os vegetais respondem a estímulos ambientais bastante variáveis como, fertilidade e tipo de solo, umidade, temperatura, ataque de insetos ou animais, que podem influenciar e alterar a produção de metabólitos secundários. (ALVES, 2001)

A origem dos metabólitos secundários em espécies vegetais se deve a existência de rotas biossintéticas. A via do ácido chiquímico gera alguns aminoácidos aromáticos (triptofano, fenilalanina e tirosina), precursores de alcalóides indólicos e isoquinolínicos, fenilpropanóides e alilpropenilfenóis, onde esses últimos geram por acoplamento oxidativo dímeros C_6C_3 (lignanas e neolignanas) e terpenos são formados por unidades de isopentenilpirofosfato (IPP), oriundos da via do ácido mevalônico ou mevalonato. (MANN, 1995)

Uma das linhas de pesquisa desenvolvidas no laboratório LP-1 do Departamento de Química da UFMS trata do estudo químico de espécies vegetais no Cerrado e Pantanal de Mato Grosso do Sul e avaliação de diversas atividades biológicas de metabólitos secundários obtidos destas plantas.

1.1 Família Lauraceae – Gênero *Nectandra*

As plantas da família Lauraceae apresentam-se amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do planeta, principalmente em regiões florestais Centro e Sul-americanas. Esta família compreende 49 gêneros, possuindo de 2.500-3.000 espécies (WERFF& RICHTER, 1996).

Os gêneros de maior importância econômica são *Ocotea*, *Aniba* e *Nectandra*, empregados para diversos fins, como utilização da madeira na construção civil, indústria química, perfumaria e culinária, porém o uso de algumas espécies na medicina popular é restrito a comunidades tradicionais que possuem o conhecimento empírico. (RAGGI, 2008; MARQUES, 2001)

No Brasil ocorrem aproximadamente 20 gêneros, sendo *Nectandra* um dos principais gêneros da família Lauraceae, com cerca de 114 espécies reconhecidas e destas 43 são brasileiras (GOTTLIEB, 1972; ROYAL BOTANIC, 2007; KUBITZKI & ROHWER, 1993; PIO CORREA, 1984).

Do ponto de vista fitoquímico, as plantas da família Lauraceae são conhecidas pela ocorrência de lignanas e neolignanas, alcalóides aporfinicos e benzilquinolínicos, flavonóides, pironas e sesquiterpenos. Lignanas e neolignanas são os constituintes comumente encontrados em plantas desta família (BARBOSA FILHO, 2000; GOTTLIEB & YOSHIDA, 1989). Lignanas são compostos formados a partir de duas unidades de fenilpropanóide, unidos pela ligação C-8 da cadeia lateral, já neolignanas são derivados do acoplamento oxidativo de alil/propenilfenóis, ambas as classes podendo variar de acordo com o nível de oxidação, padrão de substituição e estrutura básica do esqueleto carbônico (UMEZAWA, 2003) e de acordo com Aveniente e colaboradores (2007) análogos de neolignanas obtidas por meios de síntese como, ceto-neolignanas (β -cetoésteres β -cetossulfetos) possuem alto potencial de atividade antileishmaniose.

A literatura relata diversas atividades biológicas para lignanas e neolignanas de origem vegetal (Quadro 1, pág. 3).

Quadro 1. Atividades biológicas descritas para lignanas e/ou neolignanas de origem vegetal

Atividade Biológica	Referência
Efeitos neuroprotetores	ZHAI <i>et al.</i> 2005; MA <i>et al.</i> , 2005; JANG <i>et al.</i> , 2001
Atividade antioxidante	YAMAUCHI <i>et al.</i> , 2005; JIN <i>et al.</i> , 2005; REZENDE <i>et al.</i> , 2005; EKLUND <i>et al.</i> , 2005, ABOUGAZAR <i>et al.</i> , 2004; YU <i>et al.</i> , 2000
Utilizadas para uso farmacêutico, dermatológico ou cosmético com o propósito de modulação de níveis de testosterona no tratamento ou prevenção de doenças resultantes de variações anormais desse hormônio – “modulating testosterone levels”	PHILIPPE & DIDIER, 2008
Antiinflamatória e analgésica (neolignanas e/ou seus derivados sintéticos)	SILVA <i>et al.</i> , 2006
Antitumoral	McRAE & TOWERS, 1984
Antimitótica	AYRES & LOIKE, 1990
Antiviral	UMEZAWA, 1996
Antiinflamatória	CHEN <i>et al.</i> , 2008; LIN <i>et al.</i> , 2006, DA SILVA FILHO <i>et al.</i> , 2004
Antialérgica	KOYAMA <i>et al.</i> , 2006
Antimalárica	MA <i>et al.</i> , 2006; DA SILVA FILHO <i>et al.</i> , 2008; KRAFT <i>et al.</i> , 2002
Antifúngica	KOROISHI <i>et al.</i> , 2008
Atividade antileishmaniose e antimalárica.	DA SILVA FILHO <i>et al.</i> , 2008; AVENIENTE <i>et al.</i> , 2007.
PAF-antagonista	BARRERA & SUAREZ, 2009

A família Lauraceae possui também várias espécies produtoras de óleos essenciais (RAGGI, 2008; GOTTLIEB *et. al.*, 1981), sendo muitos com atividade biológica comprovada em laboratório como: *Origanum syriacum* - atividade antioxidante e antimicrobiana (ALMA *et. al.*, 2003), *Ocotea quixos* – antiplaquetária e antitrombótica (BALLABENI *et. al.*, 2007), *Cinnamomum zeylanicum* – antioxidante e antifúngica (DONGMO *et. al.*, 2007). Alguns óleos essenciais de espécies do gênero *Nectandra* já foram estudadas como *N. angustifolia* (FESTER *et. al.*, 1960), *N. coriaceae* (PINO *et. al.*, 2005), *N. elaiophora* (NAVES, 1951), *N. rígida* (ALPANDE DE MORAIS *et. al.*, 1972) e alguns com atividade biológica como *Nectandra megapotamica* – atividade anti-tumoral, antiinflamatória e antimicrobiana (APEL, *et al.*, 2006) e *N. membranacea* – inibição da enzima cisteína protease (SETZER *et. al.*, 2007).

Algumas espécies de *Nectandra* são utilizadas na medicina popular por apresentar propriedades como: digestiva, antireumática, diurética (CORREA, 1984), no tratamento de reumatismo, artrite e dor (BERTUCCI *et. al.*, 2008) no qual o autor relata a presença de constituintes químicos como triterpenos, esteróides, glicosídeos e flavonóides. Foi comprovada atividade antimalárica *in vitro* de extratos de plantas da espécie *Nectandra*, utilizadas por tribos indígenas Chacobo da Amazônia boliviana (MUNOZ *et. al.*, 2000) e indígenas Tacana que sobrevivem na Cordilheira dos Andes (DEHARO *et. al.*, 2001).

Com relação às classes de metabólitos secundários encontradas em plantas do gênero *Nectandra*, foram previamente isolados terpenos (mono-, sesqui- e diterpenos), lignanas e neolignanas, alcalóides, além de glicosídeos cianogênicos, fenilpropanóides e flavonóides (Quadro 2, página 5 e 6).

Quadro 2. Constituintes químicos isolados do gênero *Nectandra*

Espécie	Parte da planta	Constituinte(s)	Referência
<i>N. membranacea</i>	casca	ácido ilíaco; ácido cístico e ácido 3-isocístico	WU <i>et. al.</i> , 2006
<i>N. amazonum</i>	folhas	licarina A	CABRAL <i>et. al.</i> , 2007
<i>N. amazonum</i>	folhas	nectomazina A; nectomazina B; nectomazina C; (+)-licarina A; (+)-acuminatina; denudatina B; liliflól B; macrophyllina B; denudanolídeo D e kadsurenina C.	BARRERA & SUAREZ, 2009
<i>N. rodiei</i>	casca do caule	rodiasina	GRUNDON & MACGARVEY, 1966
<i>N. falcifolia</i>	folhas	caempferol 3-O-ramnopiranosídeo	TRUITI <i>et. al.</i> , 2003
<i>N. grandiflora</i>	folhas	ácido protocatecuico e flavonóides afzelina e quercetrina; (7 <i>S</i> , 8 <i>R</i> , 1' <i>R</i> , 3' <i>R</i>)-3,4,5'-trimetóxi-3,7'-ciclo-8,1'-neolig-8'-ene-2,4'(3' <i>H</i>)-diona, piperol B; burchelina.	RIBEIRO <i>et. al.</i> , 2005
<i>N. rígida</i>	folhas e caule	desidrodisoeugenol, galgravina, nectandrina A, nectandrina B, laureliptina e β-sitosterol	LE QUESNE <i>et. al.</i> , 1980
<i>N. salicifolia</i>	casca do tronco	(+)-costaricina; (+)-boldina; (+)-isoboldina; (+)-isocoridina; (+)-laurolicina; (+)-laurotetanina; (+)- <i>N</i> -metilaurotetanina; (+)-norisocordina; (+)-norpurpureina; (1 <i>R</i>)-coclaurina; (1 <i>S</i>)- <i>N</i> -metilcoclaurina; (1 <i>S</i>)-Nor-juzifina; (1 <i>S</i>)-reticulina; (9 <i>S</i>)-sebiferina; (6 <i>aS</i>)-glaziovina.	BOHLKE <i>et. al.</i> , 2006
<i>N. saligna</i>	folhas	espatulenol; alismol; elemicina; asarona; veraguensina; calopectina; liriolutipiferina	DE MELO <i>et. al.</i> , 2004
<i>N. rubra</i>	cerne	rubrenolídeo e rubrinolídeo	FRANCA <i>et. al.</i> , 1972
<i>N. amazonum</i>	casca	taninos	HERNES & HEDGES, 2004
<i>N. microcarpa</i>	folhas	taninos	HAASE & WANTSEN, 2008
<i>N. lineata</i>	folhas	3'-metóxi-3,4-metilenodióxi-4',7-epóxi-9-nor-8,5-neolignan-9'-acetoxinorlignana; 3'-metóxi-3,4-metilenodióxi-4'-7-epóxi-9-nor-8,5'-neolignana-7,8'-diene	CHERIGO <i>et. al.</i> , 2005
<i>N. sinuata</i>	casca	nordomesticina; norlirioferina; 1,2,3-trimetóxi-9,10-metilenodioxidiidroaporfina	CASTRO <i>et. al.</i> , 2001
<i>N. amazonum</i>	fruto	sesamina e <i>O</i> -metilpiperitol	BARBOSA FILHO <i>et. al.</i> , 1991
<i>N. glabrescens</i>	fruto	licarina-A e licarina-E	BARBOSA FILHO <i>et. al.</i> , 1991
<i>N. turbacensis</i>	casca e cerne	(+)-sesamina; (+)-dimetoxiexcelsina; (+)-piperitol e	DE CARVALHO <i>et. al.</i> ,

		(1R, 2S, 5R)-2-(3'-metóxi-4',5'-metilenodioxifenil)3,7-dioxa-6-oxobicyclo[3.3.0]octano	1986
<i>N. puberula</i>	cerne	veraguensina; ácido geranilgeranodióico; (7R, 8S, 8'R)-7-hidróxi-3,4,3',4'-tetrametóxi-8.8'-neolignana; (8S, 8'R)-4'-hidróxi-3'-metóxi-3,4-metilenodióxi-7-oxo-8.8'-neolignana; (8S, 8'R)-3',4'-dimetóxi-3,4-metilenodióxi-7-oxo-8.8'-neolignana; (8S,8'R)-3,4,3',4'-dimetilenodióxi-7-oxo-8.8'-neolignana	MORO <i>et. al.</i> , 1987
<i>N. polita</i>	cerne	sitosterol; <i>O</i> -metileugenol; desidrodieugenol; <i>O</i> -metildesidrodieugenol e di- <i>O</i> -metil-desidrodieugenol	SUAREZ <i>et. al.</i> , 1983
<i>N. miranda</i>	cerne	(2S, 3S, 3aS)-5-alil-3a-metoxi-2-(3',4',5'-trimetoxifenil)-3-metil-2,3,3a,6-tetraidro-6-oxobenzofurano (mirandina A); (2S, 3S, 3aR)- 5-alil-3a-metoxi-2-(3',4',5'-trimetoxifenil)-3-metil-2,3,3a, 6-tetraidro-6-oxobenzofurano (mirandina B); 7-alil-6-hidróxi-5-metoxi-2-(3', 4', 5'-trimetoxifenil)-3-metilbenzofurano e (2R, 3R)-7-metoxi-2-(3',4',5'-trimetoxifenil)-3-metil-5-(E)-propenil-2,3-dihidrobenzofurano (licarina C)	AIBA <i>et. al.</i> , 1977
<i>N. cissiflora</i>	Cascas do tronco	ác. cóstico; 12-carboxieudesman-3,11(13)-dieno; eudesm-13-eno-12,4β-olídeo; ác. víscico; ác. 3-oxo-γ-cóstico; ác. 5β-hidróxi-4-oxo-11(13)-desidroifionan-12-óico; ác. 3α-hidroxiisofion-11(13)-en-12-óico; costoato de 10- <i>nor</i> -fenchoila; eudesma-3,11(13)-dien-12-oato de <i>nor</i> -fenchoila e (-)-epicatequina	MIRANDA & GARCEZ, 2008
<i>N. gardneri</i>	frutos e folhas	frutos: isolancifolide; fraxidin e fraxidin 8- <i>O</i> -β-D-glucopiranosídeo.	GARCEZ <i>et. al.</i> , 1999

Algumas atividades farmacológicas comprovadas em extratos e frações de extrato de espécies de *Nectandra* são relatadas no Quadro 3, enquanto que as estruturas de algumas substâncias isoladas deste gênero e relacionadas no Quadro 2 são apresentadas na figuras 1-13, pág 8-15.

Quadro 3. Espécies de *Nectandra* e atividades biológicas relacionadas

Espécie	Parte da planta	Atividade biológica	Referência
<i>N. rubra</i>	cerne	efeito tóxico frente a <i>Limnoria quadripunctata</i> e <i>Pinus sylvestris</i>	BORGES <i>et. al.</i> , 2008
<i>N. membranacea</i>	extrato EtOH do caule e folhas	antifúngica	AGRIPINO <i>et. al.</i> , 2004
<i>N. membranacea</i>	óleo essencial das folhas	inibição de protease cisteína (tripanocida)	SETZER <i>et. al.</i> , 2007
<i>N. membranacea</i>	óleo essencial das folhas	antimicrobiana, antibacteriano e citotóxica	WERKA <i>et. al.</i> , 2007
<i>N. cuspidata</i>	extrato EtOH da casca do caule	atividade antimalárica	MUÑOZ <i>et. al.</i> , 2000
<i>N. falcifolia</i>	extrato EtOH das folhas	atividade anti-inflamatória	DE MELO <i>et. al.</i> , 2006
<i>N. falcifolia</i>	extrato EtOH das folhas	atividade tripanocida	TRUITI <i>et. al.</i> , 2005
<i>N. falcifolia</i>	extrato EtOH das folhas	antiinflamatória e antimicrobial	TRUITI <i>et. al.</i> , 2006
<i>N. hihua</i>	extrato EtOH da casca do caule	atividade antimalárica	DEHARO <i>et. al.</i> , 2001
<i>N. salicifolia</i>	extrato EtOH das folhas	vasoativa (relaxante muscular)	SLISH <i>et. al.</i> , 1999
<i>N. salicina</i>	óleo essencial das folhas e casca do caule	citotóxico	CICCIÓ <i>et. al.</i> , 2009

Figura 1. Estruturas de sesquiterpenos de espécies de *Nectandra*

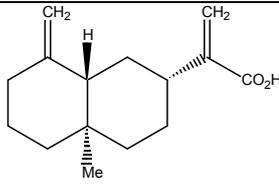
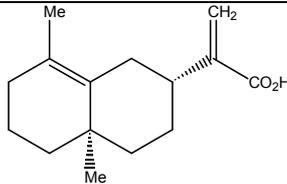
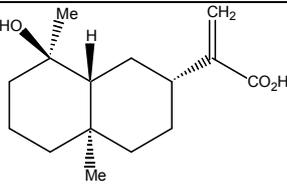
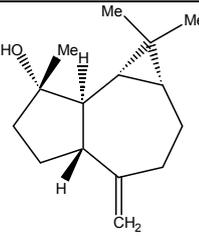
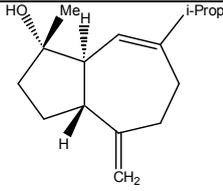
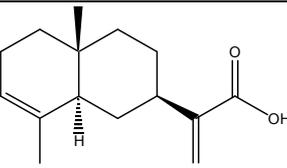
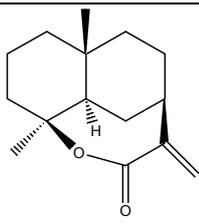
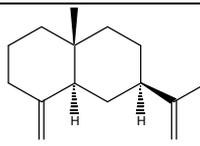
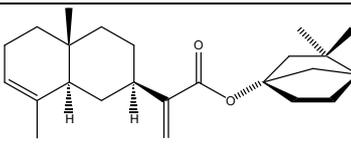
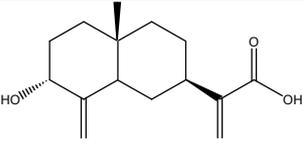
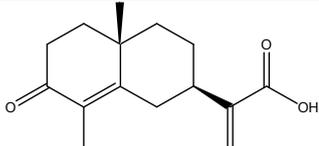
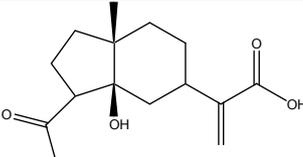
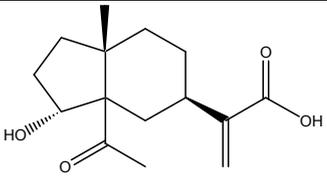
 <p>ácido cóstico (WU <i>et. al.</i>, 2006; MIRANDA <i>et. al.</i>, 2008)</p>	 <p>ácido isocóstico (WU <i>et. al.</i>, 2006)</p>	 <p>ácido ilíaco (WU <i>et. al.</i>, 2006)</p>
 <p>espathulenol (DE MELO <i>et. al.</i>, 2004)</p>	 <p>alismol (DE MELO <i>et. al.</i>, 2004)</p>	 <p>12-carboxieudesman-3,11(13)-dieno (MIRANDA <i>et. al.</i>, 2008)</p>
 <p>eudsm-11(13)-eno-12,4β-olídeo (MIRANDA <i>et. al.</i>, 2008)</p>	 <p>costoatode</p>	 <p>10-nor-fenchoíla (MIRANDA <i>et. al.</i>, 2008)</p>
 <p>ácido víscico (MIRANDA <i>et. al.</i>, 2008)</p>	 <p>ácido 3-oxo-γ-cóstico (MIRANDA <i>et. al.</i>, 2008)</p>	 <p>ácido 5β-hidróxi-4-oxo-11(13)- desiddroifionan-12-óico (MIRANDA <i>et. al.</i>, 2008)</p>
 <p>ac. 3α-hidroxiisoifion-11(13)-3n-12-óico</p>		

Figura 2. Estruturas de alcalóides de espécies de *Nectandra*

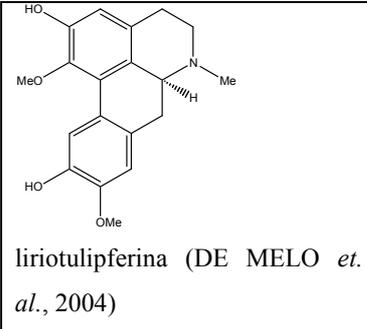
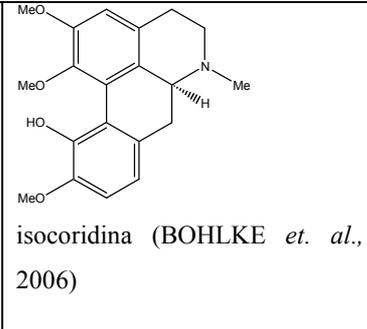
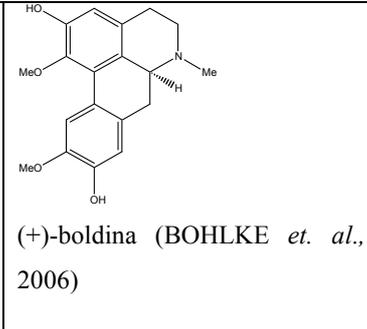
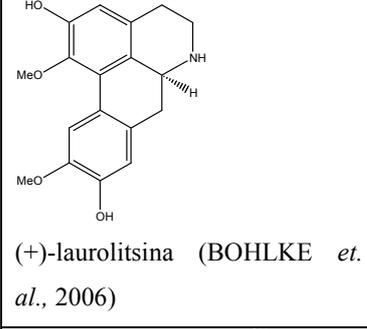
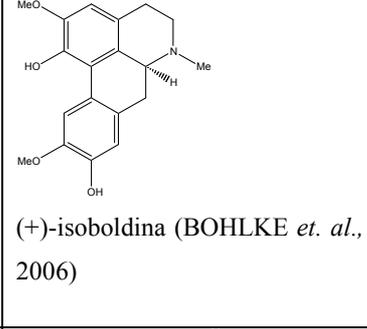
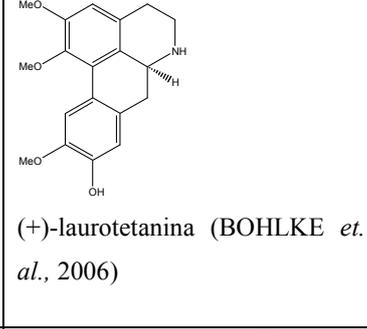
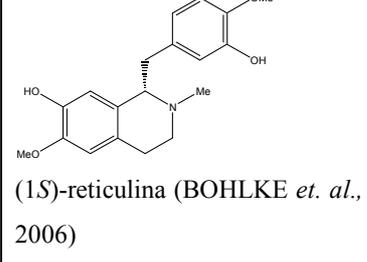
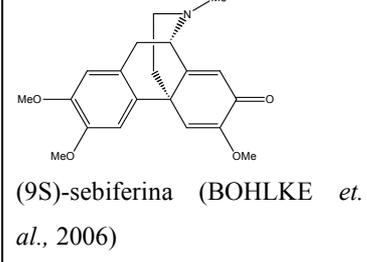
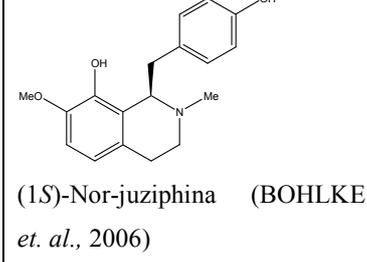
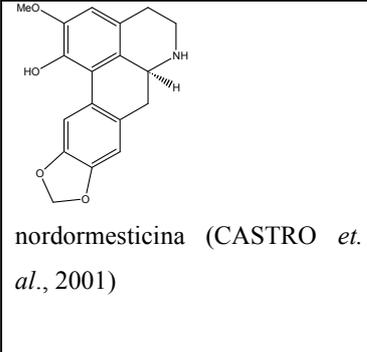
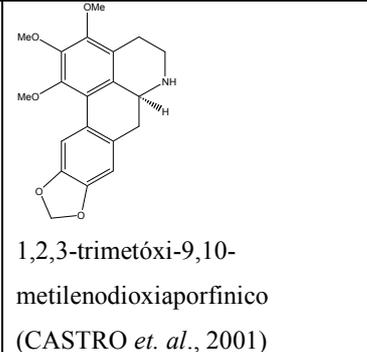
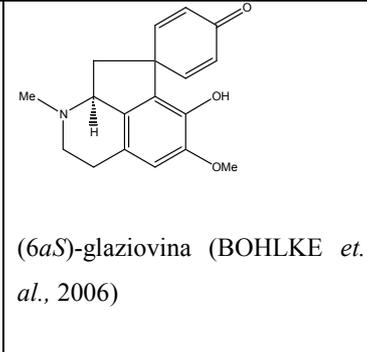
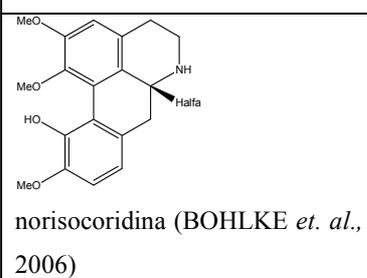
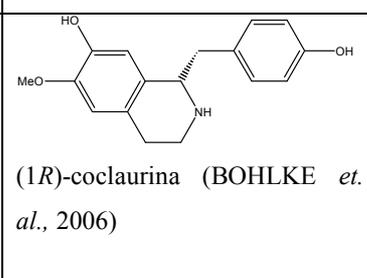
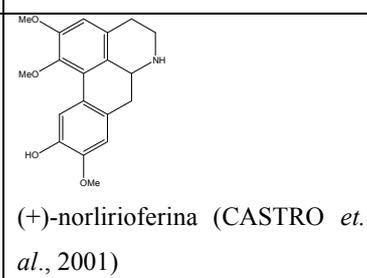
 <p>liritulipferina (DE MELO <i>et al.</i>, 2004)</p>	 <p>isocoridina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>(+)-boldina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>
 <p>(+)-laulolitsina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>(+)-isoboldina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>(+)-lauretana (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>
 <p>(1<i>S</i>)-reticulina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>(9<i>S</i>)-sebiferina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>(1<i>S</i>)-Nor-juziphina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>
 <p>nordormesticina (CASTRO <i>et al.</i>, 2001)</p>	 <p>1,2,3-trimetóxi-9,10-metilenodioxiaporfínico (CASTRO <i>et al.</i>, 2001)</p>	 <p>(6<i>aS</i>)-glaziovina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>
 <p>norisocoridina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>(1<i>R</i>)-coclaurina (BOHLKE <i>et al.</i>, 2006)</p>	 <p>(+)-norlirioferina (CASTRO <i>et al.</i>, 2001)</p>

Figura 3. Estruturas de alcalóides de espécies de *Nectandra* (Continuação)

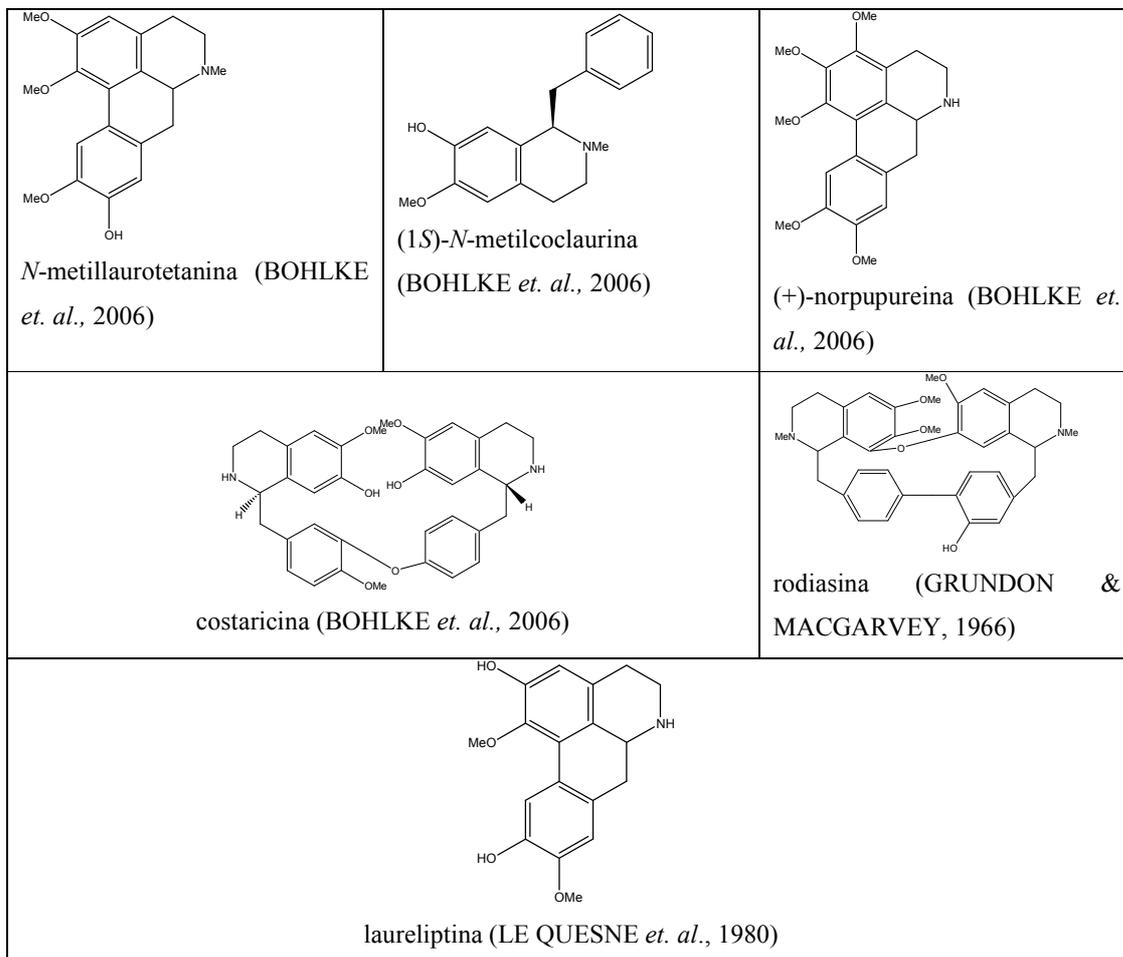
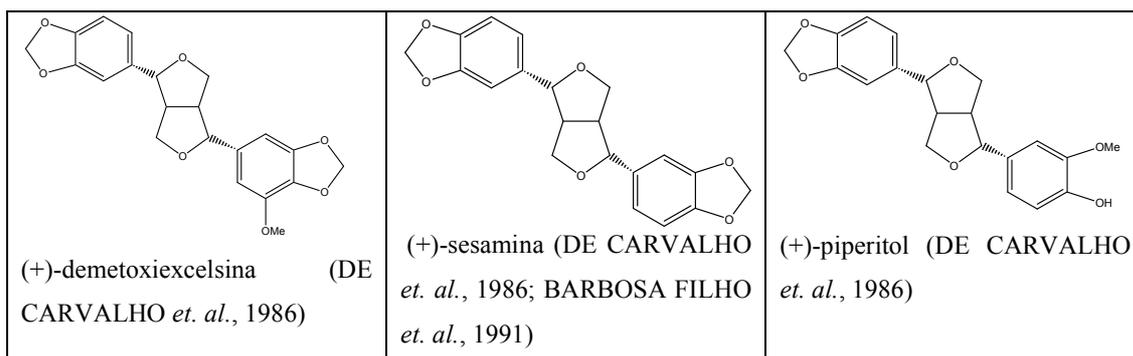


Figura 4. Estruturas de lignanas de espécies de *Nectandra*



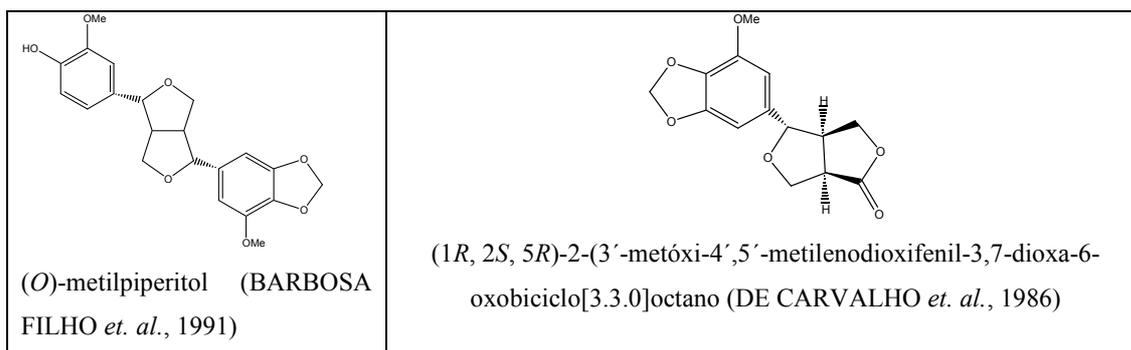


Figura 5: Estruturas de neolignanas de espécies de *Nectandra*

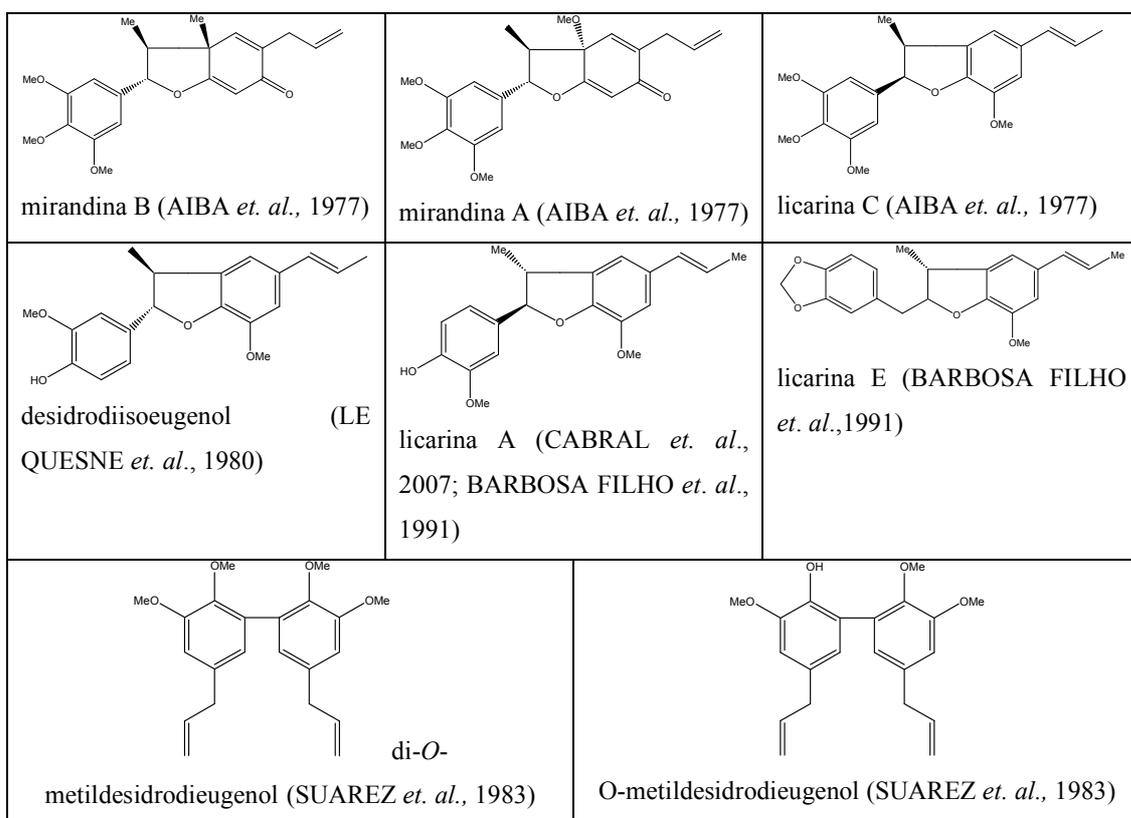
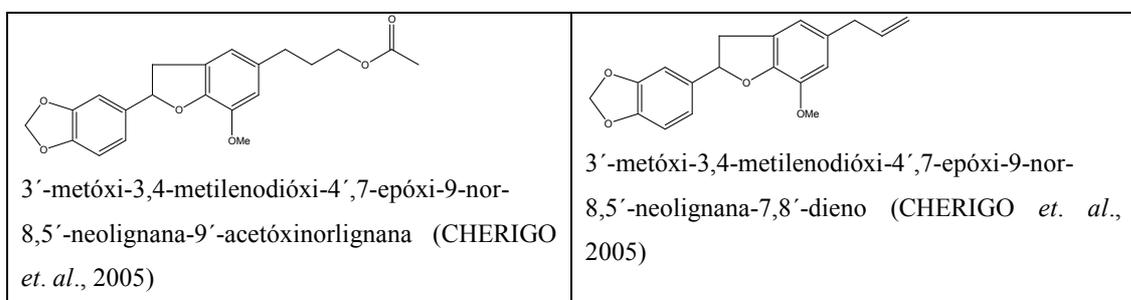


Figura 6: Estruturas de neolignanas de espécies de *Nectandra*



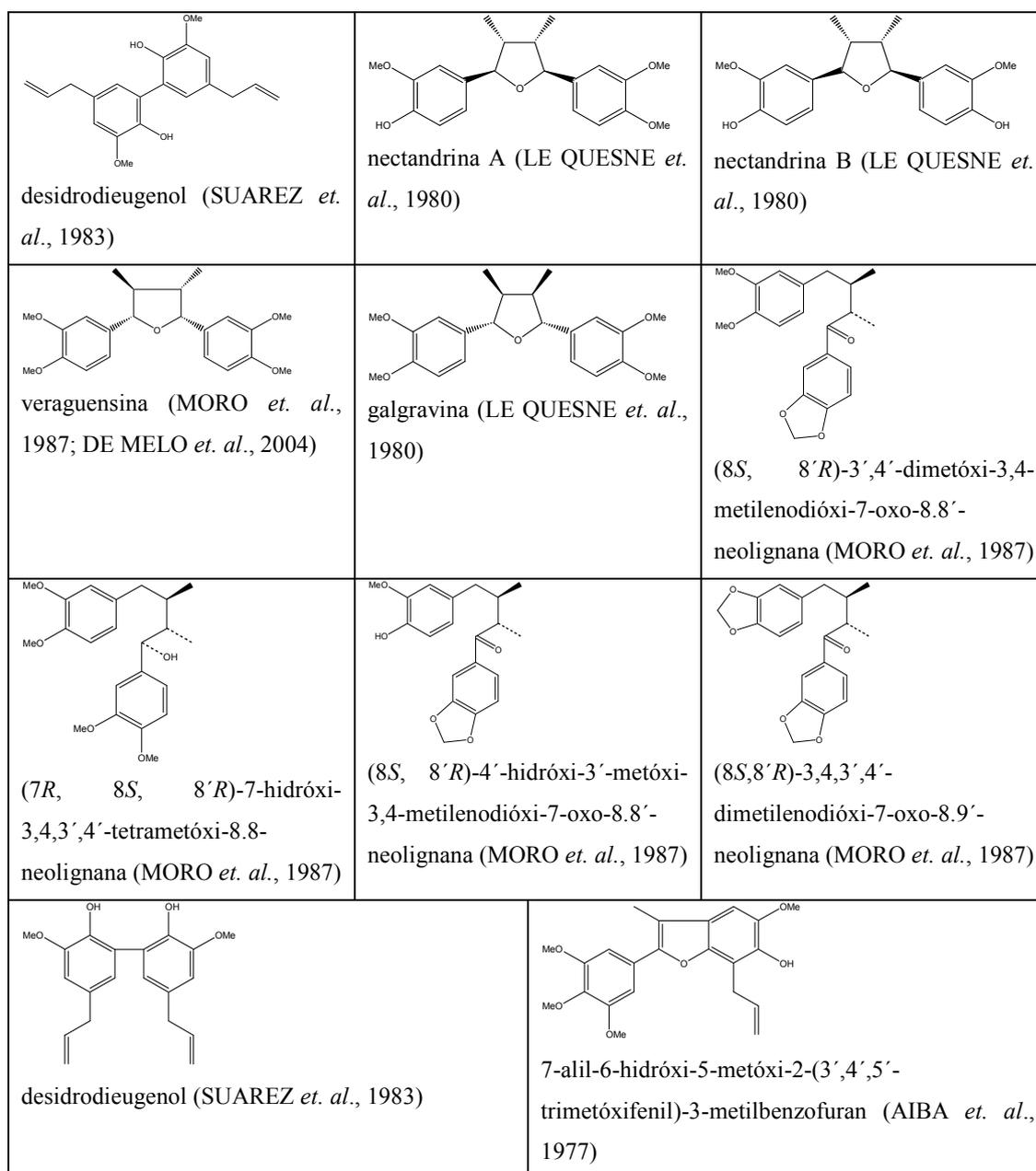
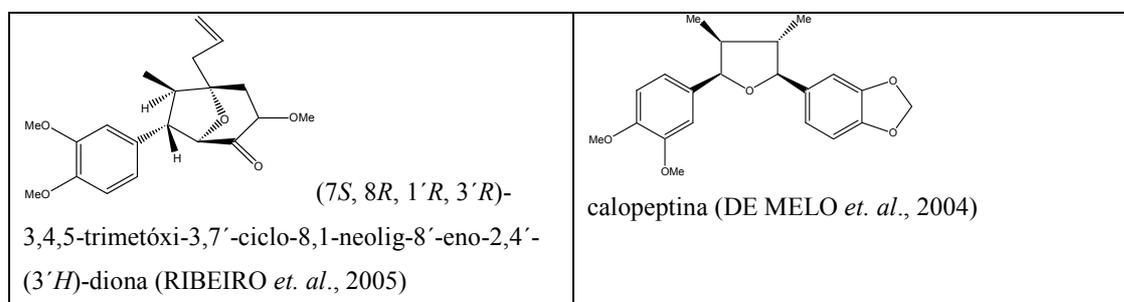


Figura 7: Estruturas de neolignanas de espécies de *Nectandra*



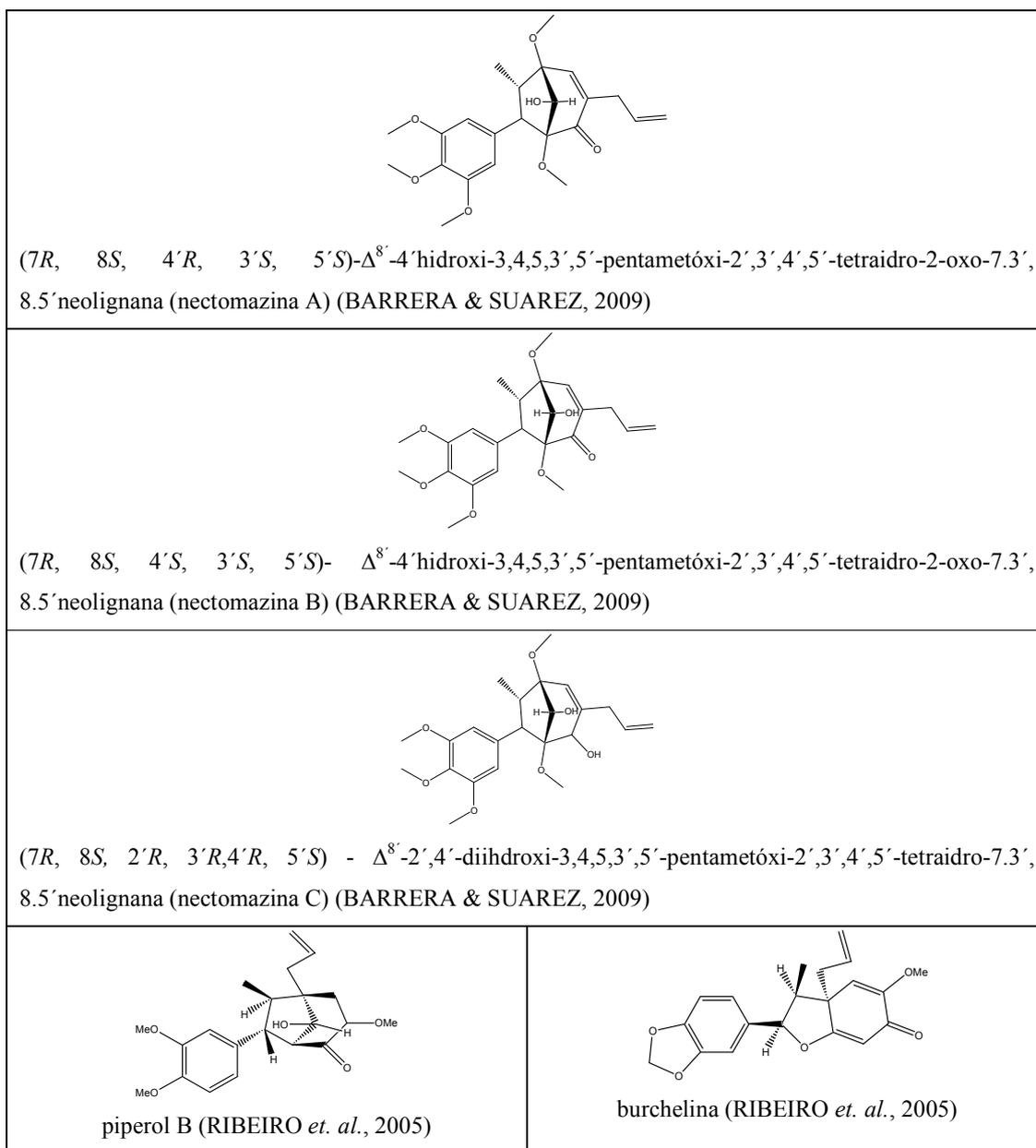


Figura 7: Estruturas de neolignanas de espécies de *Nectandra* (continuação)

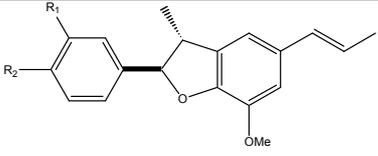
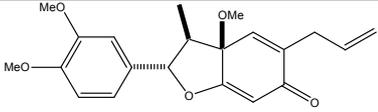
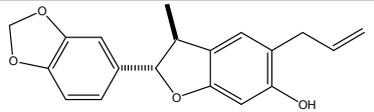
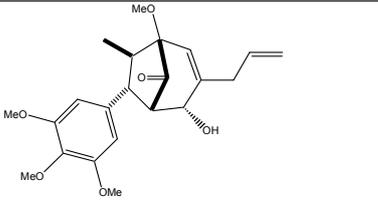
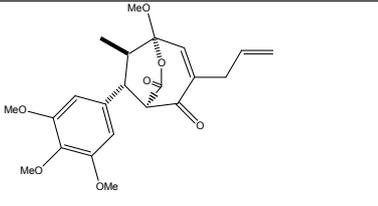
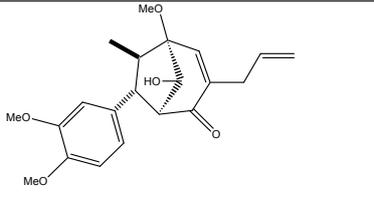
 <p>R₁=OMe; R₂=OH,(+)-licarina A. R₁=R₂=OMe,(+)-acuminatina. (BARRERA & SUAREZ, 2009)</p>	 <p>denudatina B (BARRERA & SUAREZ, 2009)</p>	 <p>liliflol B (BARRERA & SUAREZ, 2009)</p>
 <p>macrophyllina B (BARRERA & SUAREZ, 2009)</p>	 <p>denudanólido D (BARRERA & SUAREZ, 2009)</p>	 <p>kadsurenina C (BARRERA & SUAREZ, 2009)</p>

Figura 8: Estrutura de dois butanolídeos isolados de um espécime do gênero *Nectandra*

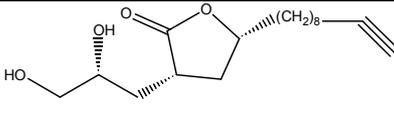
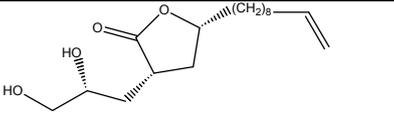
 <p>rubrinólido (FRANCA <i>et. al.</i>, 1972)</p>	 <p>rubrenólido (FRANCA <i>et. al.</i>, 1972)</p>
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Figura 9: Estrutura de flavonóides isolados do gênero *Nectandra*

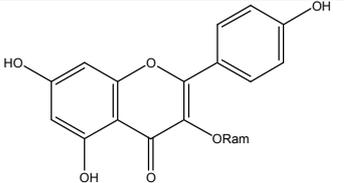
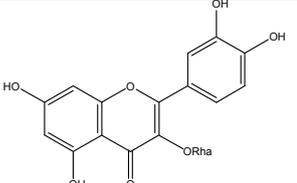
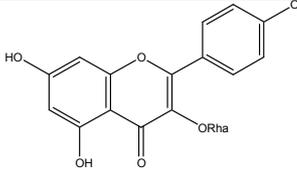
 <p>canferol-3-O-α-rhamnopyranoside (TRUITI <i>et. al.</i>, 2006)</p>	 <p>quercetrina (RIBEIRO <i>et. al.</i>, 2005)</p>	 <p>afzelina (RIBEIRO <i>et. al.</i>, 2005)</p>
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Figura 10: Estrutura de fenilpropanóides isolados do gênero *Nectandra*

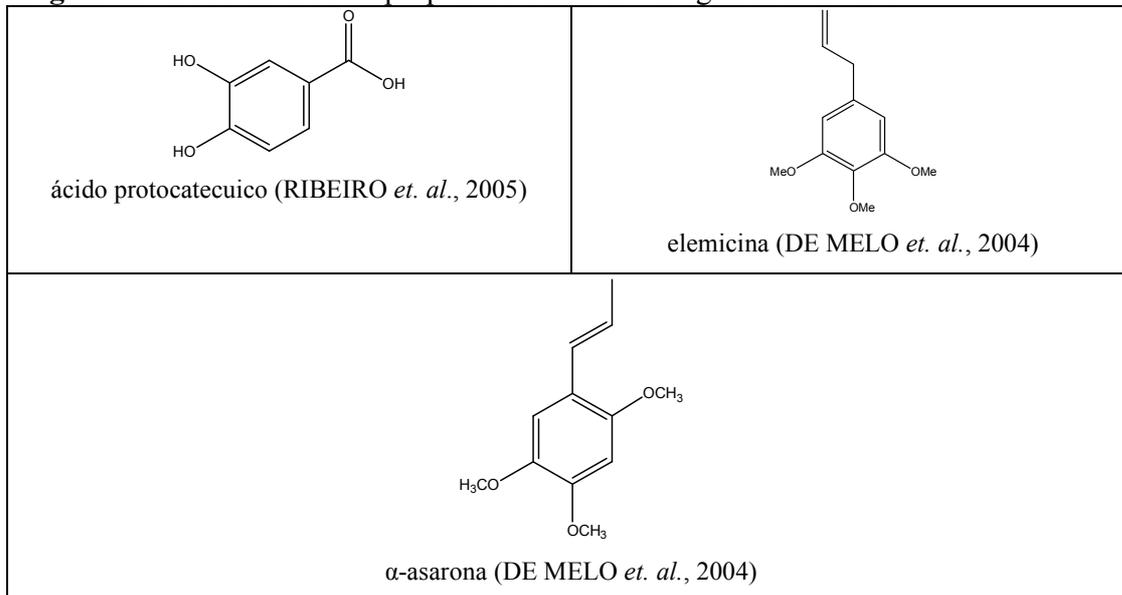


Figura 11: Estrutura de cumarinas isoladas de um espécime do gênero *Nectandra*:

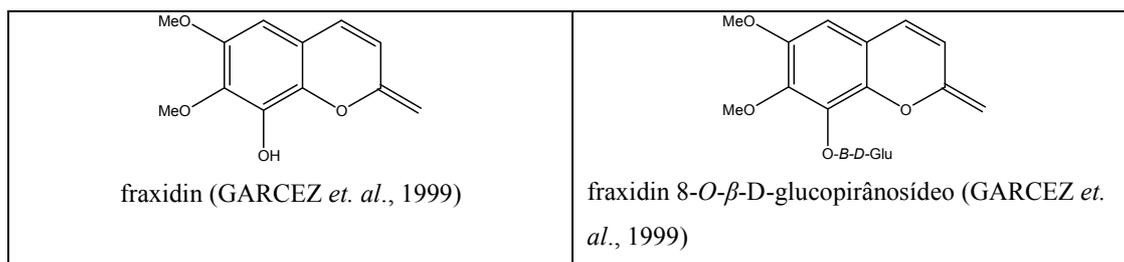


Figura 12: Estrutura de uma lactona isolada em um espécime do Gênero *Nectandra*

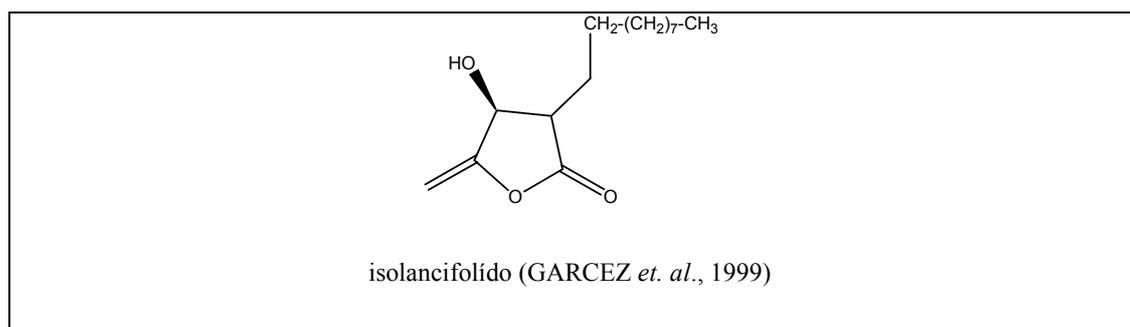
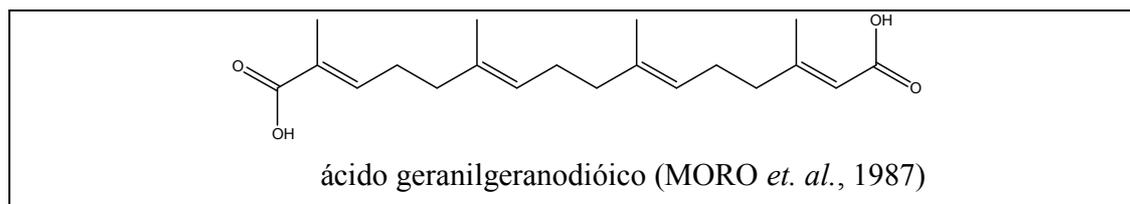


Figura 13: Estrutura de um diterpeno isolado em um espécime do Gênero *Nectandra*



1.2. *Nectandra megapotamica*

Nectandra megapotamica (figura 14) pertencente á família Lauraceae é uma espécie arbórea, conhecida popularmente por “canelinha, canela-preta, canela-ferrugem, canela-louro, canela-cheirosa (SP), canela-fedorenta, canela-de-cheiro, canela-merda, canela-loura e canela-imbuia (SC)”, é encontrada do estado de São Paulo até estado do Rio Grande do Sul e também na região Centro-Oeste, em praticamente todas as formações florestais. (BARBOSA FILHO, 2000; GOTTLIEB & YOSHIDA, 1989)

A árvore dessa espécie possui altura entre 15-25 m, tronco de 40-60 cm de diâmetro, com folhas possuindo de 8-14 cm de comprimento por 2-4 cm de largura e a madeira de alta resistência e cheiro característico. O período de florescência é do mês de Junho prolongando-se até Setembro e os frutos amadurecem de Novembro-Janeiro, sendo alimento de pássaros. (LORENZI, 2002)

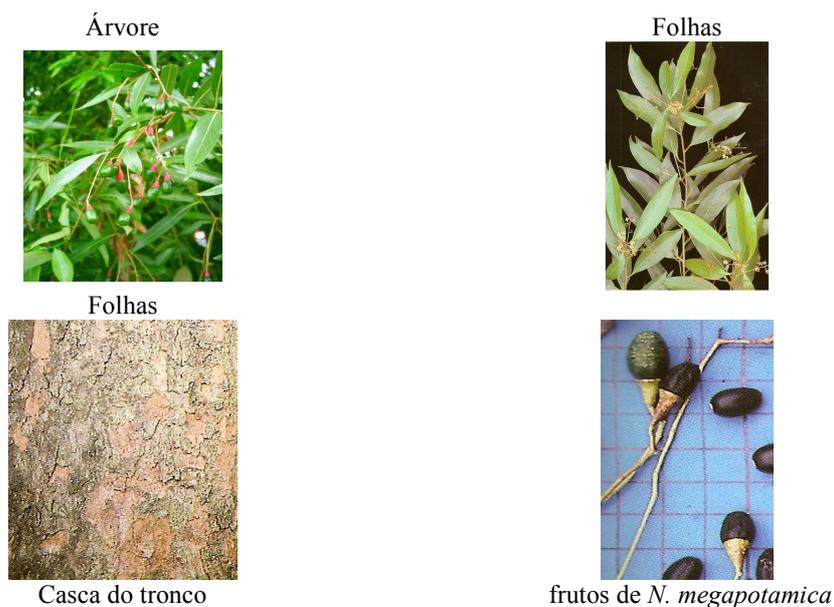


Figura 14: fotos de *N. megapotamica* (LORENZI, 2002).

A literatura relata treze trabalhos realizados com esta espécie, seis dos quais relacionados a atividades biológicas de alguns de seus constituintes químicos. Da casca do caule foram obtidos dois alcalóides indólicos inibidores do crescimento *in vitro* de *Crithidia fasciculata* e *Trypanosoma cruzi* (DOS SANTOS FILHO & SARTI, 1980; DOS SANTOS FILHO & GILBERT, 1975). O estudo do extrato hidroalcoólico de um espécime coletado em Ribeirão Preto-SP forneceu como componente principal um fenilpropanóide

(α -asarona) que apresentou atividade analgésica, além de duas neolignanas tetraidrofurânicas galgravina e veraguensina com atividade antiinflamatória em ratos e camundongos (DA SILVA FILHO *et. al.*, 2004b.), da casca do caule também foram isoladas onze neolignanas, sendo sete com atividade antileishmaniíose e antimalárica *in vitro*, duas denominadas galgravina e veraguensina possuindo alta atividade antileishmaniíose, outra chamada calopeptina com atividade antimalárica (DA SILVA FILHO *et. al.*, 2008), enquanto que das folhas foram obtidas onze neolignanas tetraidrofurânicas, destacando machilina G e outras cinco denominadas galgravina, nectandrina B, calopeptina, aristolignina e ganschinsandrina com atividade anti-chagácica (DA SILVA FILHO *et. al.*, 2004a.). Do extrato etanólico das cascas do caule de um espécime coletado em Campo Grande-MS foram obtidos, um flavonoide chamado (+)-epicatequina e um fenilpropanóide chamado ác. 3,4,5-trimetóxi-benzóico com atividade antioxidante, enquanto os diastereoisômeros *eritro* e *treo* 1-(3,4,5-trimetoxifenil)-1,2-propanodiol apresentaram capacidade de acelerar a oxidação do β -caroteno e os seis compostos aromáticos relatados, foram também testados e demonstraram fraca atividade frente as cepas de *Candida* e *Cryptococcus* (GARCEZ *et. al.*, 2009).

O óleo essencial de *Nectandra megapotamica* extraído das folhas de um espécime coletado em Ilha do Cardoso, Cananéia-SP, apresentou potencial antimicrobiano, antiinflamatório e antitumoral (APEL *et. al.*, 2006), sendo que não existe relato sobre estudo dos constituintes voláteis dessa espécie em CG-EM e fracionamento em coluna cromatográfica.

O estudo do extrato etanólico da casca do caule e das folhas de um espécime de *N. megapotamica* que ocorre na região do Cerrado de Mato Grosso do Sul, realizado em nosso laboratório, resultou no isolamento e caracterização de fenilpropanóides, sesqui- e diterpenos e flavonóides (GARCEZ *et. al.*, 2007; GARCEZ *et. al.*, 2009).

O quadro 4 (página 18), mostra os constituintes e algumas atividades biológicas relacionadas de compostos isolados de *N. megapotamica* e as estruturas mostradas na figuras 15-19, páginas 19-21.

Quadro 4: Alguns constituintes isolados de *N. megapotamica* e atividades biológicas relacionadas

Fonte	Constituintes/Atividade biológica	Referência
Oleo essencial das folhas	antiinflamatório e antitumoral	(APEL <i>et. al.</i> , 2006)
Casca do caule	<p><i>ativ. antifúngica</i> (<i>Candida</i> e <i>Cryptococcus</i>) - <i>trans</i>-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno; 1,2,3-trimetóxi-5-(2-propenilbenzeno (elemicina); 1,2,3-trimetóxi-5-[(1E)-1-propenil]benzeno (isoelemicina); <i>eritro</i>-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol; <i>treo</i>-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol; 3',4',5'-trimetóxicinamaldeído e (-)-epicatequina.</p> <p><i>ativ. antioxidante:</i> (-)-epicatequina e 3',4',5'-trimetóxicinamaldeído</p> <p><i>ativ. pró-oxidante:</i> <i>eritro</i>-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol e <i>treo</i>-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol.</p>	(GARCEZ <i>et. al.</i> , 2009)
Folhas	2,6-dimetóxi-4[prop-2-enil]fenil- <i>O</i> - α -L-rhamnopiranosil-(1-6)- β -D-glucopiranosídeo; isovitexina; quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo e quercetina-3- <i>O</i> -rhamnopiranosídeo e <i>ent</i> -caur-16-eno.	(MARQUES <i>et. al.</i> , 2006)
Folhas	<p>machilina G; galgravina; nectandrina A; nectandrina B; calopeptina; veraguensina; aristolignina; ganschidrina; nectandrina C; nectandrina D; nectandrina E</p> <p>^b<i>ativ. analgésica</i> (α-asarona) e <i>antiinflamatório</i> (galgravina e veraguensina)</p> <p>^a<i>ativ. tripanocida</i> (machilina G, galagravina, nectandrina B, calopiptina, aristolignina e ganschinsandrina)</p> <p><i>ativ. antileishmaniôse</i> (<i>Leishmania donovani</i>) – machilina G e veraguensina.</p> <p><i>ativ. antimalárica</i> (<i>Plasmodium falciparum</i>)- calopiptina.</p>	(DA SILVA FILHO, <i>et. al.</i> , 2004a.; DA SILVA FILHO, <i>et. al.</i> , 2004b.; DA SILVA FILHO <i>et. al.</i> , 2008)
Folhas	glicosídeos cianogênicos	(FRANCISCO & PINOTTI, 2000)
Casca do caule	Inibidores do crescimento <i>in vitro</i> de <i>Crithidia fasciculata</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i> : <i>N</i> -metiltriptamina e 6-metóxi- <i>N</i> _b -1,2,3,4- β -carbolina.	(DOS SANTOS FILHO & SARTI, 1980; DOS SANTOS FILHO & GILBERT, 1975)

Figura 15: Sesquiterpeno e diterpeno de *Nectandra megapotamica*

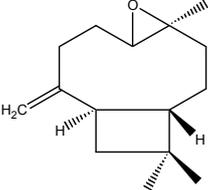
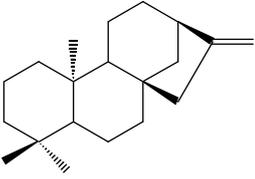
Sesquiterpeno	Diterpeno
 <p><i>trans</i>-4(15)-epóxi-cariofileno (GARCEZ <i>et. al.</i>, 2009)</p>	 <p><i>ent</i>-caur-16-eno (MARQUES <i>et. al.</i>, 2006)</p>

Figura 16: Fenilpropanóides de *Nectandra megapotamica*

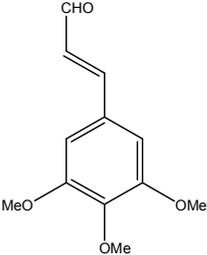
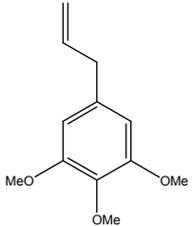
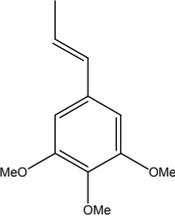
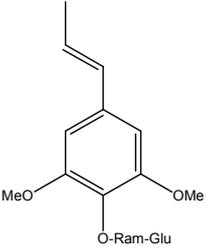
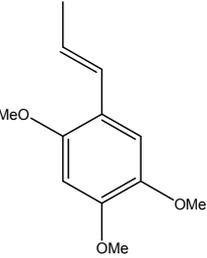
 <p>3',4',5'-trimetoxicinamaldeído (GARCEZ <i>et. al.</i>, 2009)</p>	 <p>elemicina (GARCEZ <i>et. al.</i>, 2009)</p>
 <p>isoelemicina (GARCEZ <i>et. al.</i>, 2009)</p>	 <p>2,6-dimetóxi-4[prop-1-enil]-O-α-ramnopiranosil-(1-6)-β D-glucopiranosídeo (MARQUES <i>et. al.</i>, 2006)</p>
 <p>α-asarona (DA SILVA FILHO <i>et. al.</i>, 2004)</p>	

Figura 17: Flavonóides de *Nectandra megapotamica*

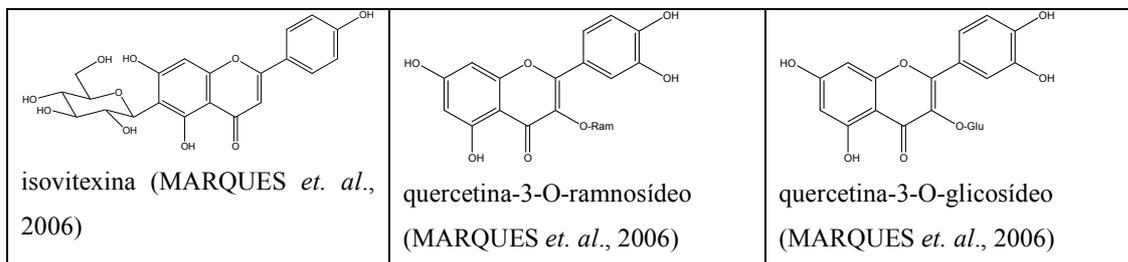
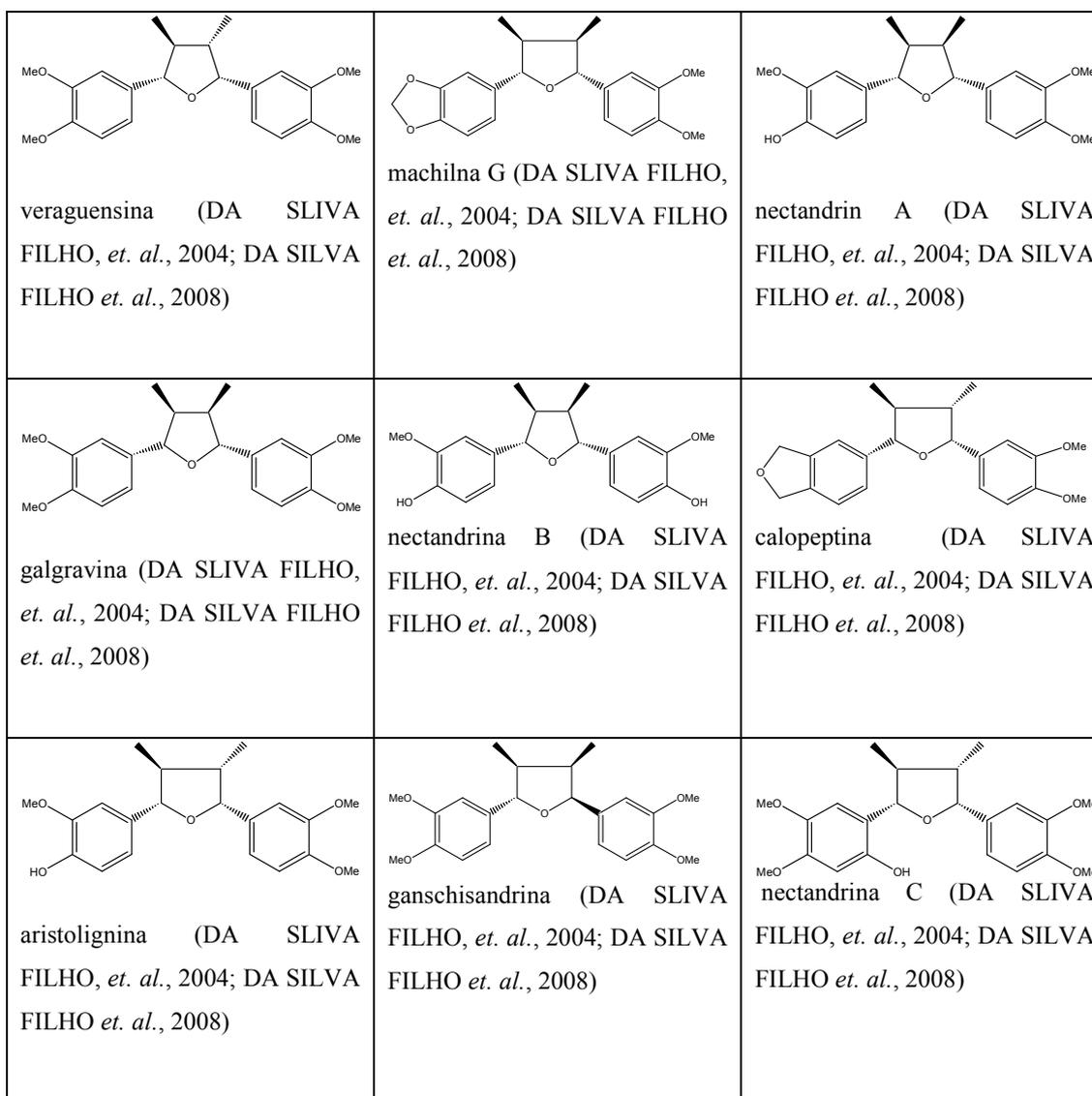


Figura 18: Neolignanais de *Nectandra megapotamica*



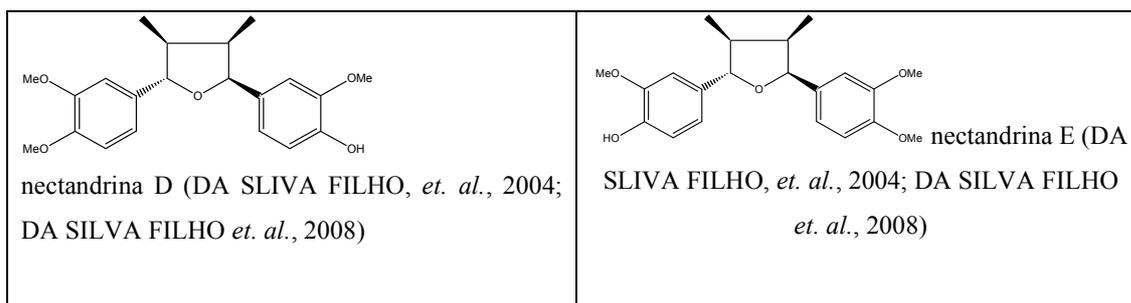
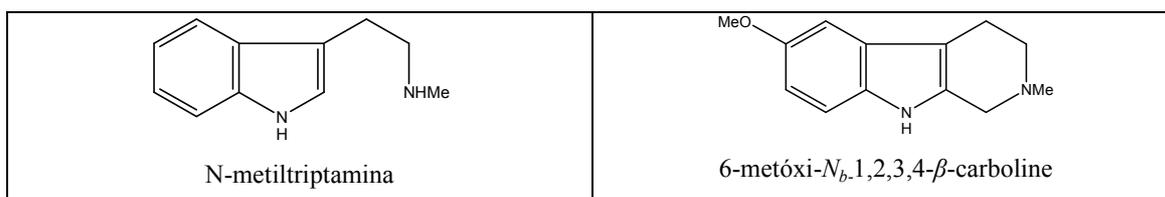


Figura 19: Alcalóides de *Nectandra megapotamica*



No presente trabalho foi dada continuidade do estudo químico do espécime de *N. megapotamica* ocorrente em Mato Grosso do Sul, através da avaliação da composição química da madeira e do óleo essencial das folhas, bem como atividades biológicas do óleo essencial e/ou de algumas substâncias isoladas.

2. OBJETIVOS

2.1 Gerais

Este trabalho teve como objetivo a busca de substâncias bioativas existentes em plantas de Mato Grosso do Sul, através do estudo químico de um espécime de *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Mez (Lauraceae).

2.2 Específicos

Realizar o estudo químico da madeira de *N. megapotamica*, visando ao isolamento e caracterização de metabólitos secundários e analisar a composição química do óleo essencial presente nas folhas desta espécie.

Avaliar o potencial antifúngico frente a cepas de *Cryptococcus neoformans* e *Candida krusei*, antibacteriano contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pseudomonas aeruginosa* e/ou larvicida frente à *Aedes aegypti* do óleo essencial das folhas e de algumas das substâncias isoladas da madeira e do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*.

3. METODOLOGIA

3.1. Relação de equipamentos e materiais utilizados

A madeira de *Nectandra megapotamica* seca foi moída em um moinho de facas MANESCO & RANIERI, tipo Willey.

Os solventes e reagentes utilizados foram analiticamente puros (P.A.) das marcas Synth, VETEC, Carlo Erba, Quimex.

A concentração dos extratos e frações contendo grande volume de solvente orgânico foi efetuada em evaporadores rotatórios da Tecnal modelo TE-210 e Fisatom modelo 802, sob pressão reduzida, com auxílio de bombas de água WEG e FAMAC modelo XKM60.

As placas de cromatografia em camada delgada (CCD) foram preparadas utilizando uma mistura de gel de sílica 60G VETEC na proporção 1:1, espalhando-se manualmente a suspensão de sílica em água destilada em placas de vidro de dimensão 7,5 cm x 2,5 cm e 7,5 cm x 5,0 cm e ativadas em estufa FANEM modelo 315SE.

Na revelação das substâncias, as cromatoplasmas foram borrifadas com solução de vanilina a 1% a partir de solução de água/metanol/ácido sulfúrico (45: 45: 10), seguido de aquecimento em placa de aquecimento.

Nas separações em colunas cromatográficas foram utilizadas sílica gel 60 (70-230 mesh) da marca VETEC, sílica gel 60 200-400 mesh da marca Ultra Chem e sílica gel LiChroprep (40-60 μ m, em coluna LOBAR[®]) da marca MERCK.

Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em espectrômetro Bruker modelo DPX-300 operando a 75 MHz para Carbono-13 e 300 MHz para Hidrogênio-1. As amostras foram preparadas em tubos de 5 mm de diâmetro interno utilizando-se CDCl₃ ou CD₃OD da marca Aldrich como solvente.

As separações cromatográficas em CLAE foram realizadas em um equipamento Shimadzu modelo LC - 6 AD, bomba ternária, detector UV-visível variável Shimadzu SPD 6 AV, injetor manual com alça de amostragem de 0,5 mL (analítico) e 5 mL (semi-preparativo). As colunas cromatográficas (analítica e semi-preparativa) foram as da marca Phenomenex C-18, partículas de 100 Å de poro, diâmetro médio de 5 μ m e dimensões de 5,0 Φ x 250 mm (analítica) e 21,20 Φ x 250 mm (semi-preparativa). Nas separações cromatográficas foram empregados sistemas isocráticos de misturas binárias de

CH₃CN/H₂O. A acetonitrila usada foi de grau cromatográfico e a água do sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

A determinação de rotação óptica [α_D] foi realizada em um polarímetro Perkin Elmer, modelo 341, lâmpada de Na_D operando a 589 nm. A leitura foi realizada em uma cela (Standart cell) de vidro com caminho ótico de 100 mm e volume interno de 6,2 mL.

Os espectros de I.V. foram realizados em um espectrofotômetro da marca Bonem modelo SMH-3100 G, empregando-se pastilhas de KBr.

As análises por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em um cromatógrafo a gás GC 3900, acoplado a espectrômetro de massas Saturn 2100 T (Varian), com processador de dados Class 5000 e banco de dados da NIST v.2 e Saturn. A coluna utilizada no forno foi uma DB-5 da Phenomenex com as seguintes dimensões: 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e espessura do filme 0,25 μ m.

3.2. Estudo químico da madeira de *N. megapotamica*

N. megapotamica foi coletada no município de Campo Grande, na região do córrego Guariroba, MS, em agosto de 2005. A identificação botânica foi realizada por Msc. Flávio Macedo Alves (Departamento de Biologia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul) e uma excisicata (n° 15433) encontra-se depositada no Herbário CGMS da UFMS.

3.2.1 Coleta da planta, obtenção e fracionamento do extrato bruto

A parte da planta coletada (madeira - 3,3 kg) foi seca, moída e extraída com etanol, à temperatura ambiente, sendo obtido o extrato etanólico correspondente (97,0 g), após evaporação do solvente sob pressão reduzida.

Uma parte do extrato etanólico (79,8 g) foi solubilizada em 1L de metanol/água (9:1) e particionada com 500 mL de hexano. Em seguida, a fase MeOH-água foi diluída para a proporção 1:1 e particionada com 500 mL de acetato de etila e por último com 500 mL de n-butanol, obtendo-se assim as fases: hexânica (6,5 g), AcOEt (12,8 g) e *n*-BuOH (21,5 g) [Figura 20, pág. 24].

No presente trabalho foram selecionadas para estudo químico as fases hexânica e em acetato de etila.

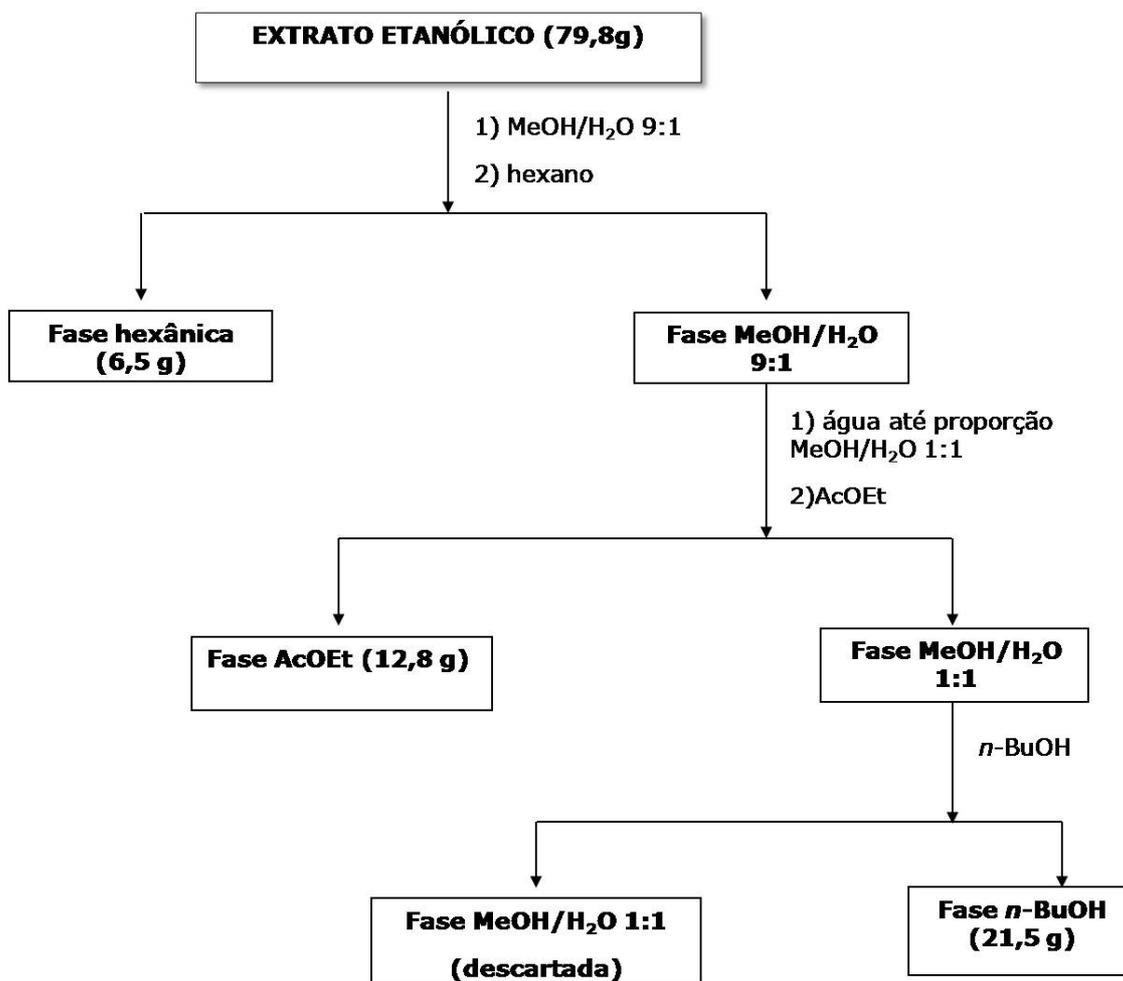


Figura 20. Fluxograma da obtenção e partição do extrato etanólico da madeira de *Nectandra megapotamica*.

3.2.2 Estudo químico da fase hexânica

A fase hexânica (6,5 g) obtida da partição do extrato etanólico foi submetida a uma coluna de sílica gel 70-230 mesh (Coluna C1, Figura 21, pág 26). O sistema foi eluído, seguindo um gradiente de polaridade crescente, com hexano, hexano→acetato de etila, acetato de etila e acetato de etila→metanol. Foram coletadas 33 frações de 250 mL, as quais, após eliminação do solvente em evaporador rotativo, foram analisadas por meio de CCD, sendo reunidas as que apresentaram perfis cromatográficos semelhantes. Este processo resultou em 15 frações de código NMCrH-C1-1 a 33 (Tabela 1, pág. 25), tendo sido selecionadas para estudo as frações NMCrH-C1-3/5, NMCrH-C1-8/9, NMCrH-C1-10 e NMCrH-C1-12 e NMCrH-C1-15. As demais frações, com base na análise por cromatografia em camada delgada e por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , demonstraram ser somente constituídas de material graxo e/ou compostos já isolados em frações da fase hexânica.

Tabela 1: Frações obtidas da coluna C1 da fase hexânica, obtida da partição do extrato etanólico da madeira de *Nectandra megapotamica*.

Frações NMCrH-C1	Eluente	Massa (mg)
1-2	Hexano	157,5
3-5	Hexano	135,1
6-7	Hex./AcOEt 5%	73,8
8-9	Hex./AcOEt 10%	498,3
10	Hex./AcOEt 30%	801,9
11	Hex./AcOEt 30%	1.946,2
12	Hex./AcOEt 30%	52,5
13	Hex./AcOEt 1 : 1	83,1
14	Hex./AcOEt 1 : 1	127,8
15	Hex./AcOEt 2 : 8	151,0
16	Hex./AcOEt 2 : 8	117,7
17-19	AcOEt	102,3
20-23	AcOEt./MeOH 2%	137,1
24-26	AcOEt./MeOH 5%	168,0
27-33	AcOEt./MeOH 10%	104,7

As frações selecionadas para estudo foram submetidas a processos cromatográficos de separação, os quais são descritos nos itens 3.2.2.1 a 3.2.2.5 e resumidos no fluxograma da figura 21, pág. 26.

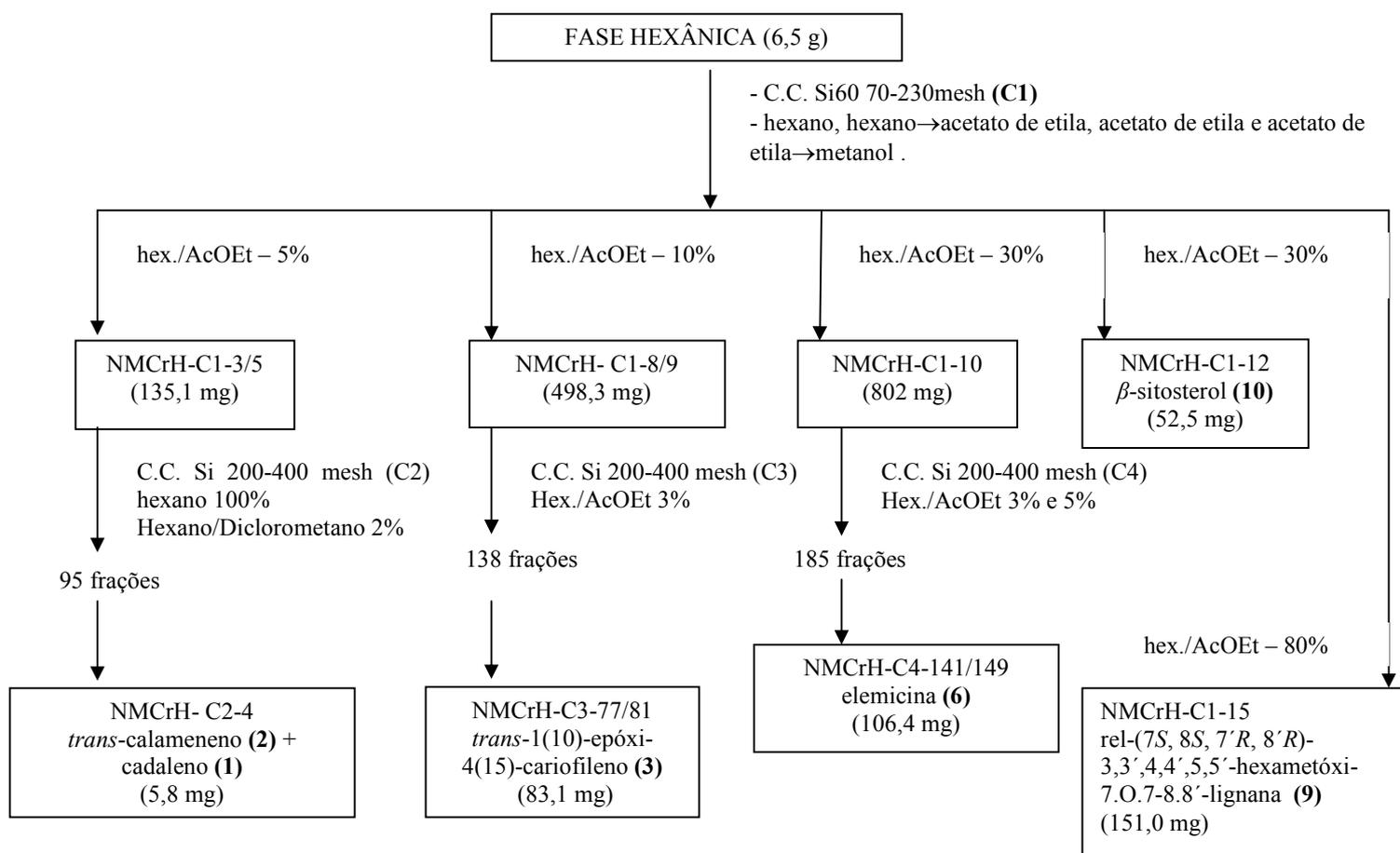


Figura 21. Fluxograma relativo ao fracionamento cromatográfico da fase hexânica, proveniente da partição do extrato etanólico da madeira de *Nectandra megapotamica*.

3.2.2.1 Estudo químico da fração NMCrH-C1-3/5: obtenção da mistura de cadaleno (1) + *trans*-calameneno (2)

Com a fração NMCrH-C1-3/5 (0,135 g) foi realizada uma coluna de sílica gel LOBAR[®] (40-63 μm), denominada coluna C2, eluída em sistema de hexano 100% a hexano/diclorometano 2%, resultando em 95 frações.

Da fração 4 (NMCrH-C2-4) foi obtida uma mistura dos sesquiterpenos *trans*-calameneno (2) e cadaleno (1) de massa 5,8 mg.

3.2.2.2 Estudo químico da fração NMCrH-C1-8/9: obtenção de *trans*-epóxi-cariofileno (3)

A fração NMCrH-C1-8/9 (0,4983 g) obtida da coluna C1 foi submetida à coluna de sílicagel (200-400 mesh - 56,7 g), eluída no sistema hexano / acetato de etila 3% , resultando em 138 frações. Das frações 77 a 81 foi obtido o *trans*-epóxi-cariofileno (83,1 mg) (composto 3).

3.2.2.3 Estudo químico da fração NMCrH-C1-10: obtenção da elemicina (6)

Com a fração 10 da coluna C1 (NMCrH-C1-10) de massa 0,802 g, foi feita uma coluna cromatográfica de sílicagel (200-400 mesh – 54,4 g), eluída em hexano / acetato 3% e 5%, a qual resultou em 185 frações. Das frações 141 a 149 foi obtido o fenilpropanóide elemicina (106,4 mg) (composto 6).

3.2.2.4 Estudo químico da fração NMCrH-C1-12: obtenção do β -sitosterol (10)

A fração NMCrH-C1-12 eluída da coluna C1 (Hex./AcOEt 30%), mostrou ser constituída pelo β -sitosterol (52,5 mg) (composto 10).

3.2.2.5 Estudo químico da fração NMCrH-C1-15: obtenção da neolignana tetraidrofurânica *rel*-(7*S*, 8*S*, 7'*R*, 8'*R*) – 3, 3', 4, 4',5, 5'-hexametóxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana (9)

A fração NMCrH-C1-15 eluída da coluna C1 (Hex./AcOEt 2:8), após análise por espectroscopia de RMN de ^1H e de ^{13}C , mostrou ser constituída pela neolignana tetraidrofurânica *rel*-(7*S*, 8*S*, 7'*R*, 8'*R*) – 3, 3', 4, 4',5, 5'-hexametóxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana (151,0 mg) (composto 9).

3.2.3 Estudo químico da fase em acetato de etila

Parte da fase em acetato de etila (6,0 g) obtida da partição do extrato etanólico (figura 20, pág. 25), foi submetida a uma coluna de sílica gel de fase reversa C-18 (figura 22, pág. 30). O sistema foi eluído seguindo um gradiente de polaridade decrescente com MeOH/H₂O – 80%, MeOH/H₂O – 60%, MeOH/H₂O – 50%, MeOH/H₂O – 30%, MeOH/H₂O – 10%, MeOH 100% e acetato de etila 100%. Foram coletadas 7 frações de 250 mL cada (Tabela 2) e selecionadas para estudo as frações NMCrA-C1-1, NMCrA-C1-2, NMCrA-C1-4. As frações NMCrA-C1-6 e NMCrA-C1-7, após análise em CCD e espectroscopia de RMN de ¹H e de RMN de ¹³C, demonstraram ser constituídas de material de natureza graxa.

Tabela 2. Frações resultantes do fracionamento da fase em acetato de etila proveniente da partição do extrato etanólico da madeira de *Nectandra megapotamica*.

Fração	Eluente	Massa obtida (mg)
1	MeOH/H ₂ O – 80%	143,4
2	MeOH/H ₂ O – 60%	286,2
3	MeOH/H ₂ O – 50%	649,7
4	MeOH/H ₂ O – 30%	2.500
5	MeOH/H ₂ O – 10%	1.050
6	MeOH -100%	576,7
7	Acetato de etila 100%	55,0

As frações selecionadas para estudo foram submetidas a processos cromatográficos de separação, os quais são descritos nos itens 3.2.3.1 a 3.2.3.3 e resumidos no fluxograma da figura 22, pág. 29.

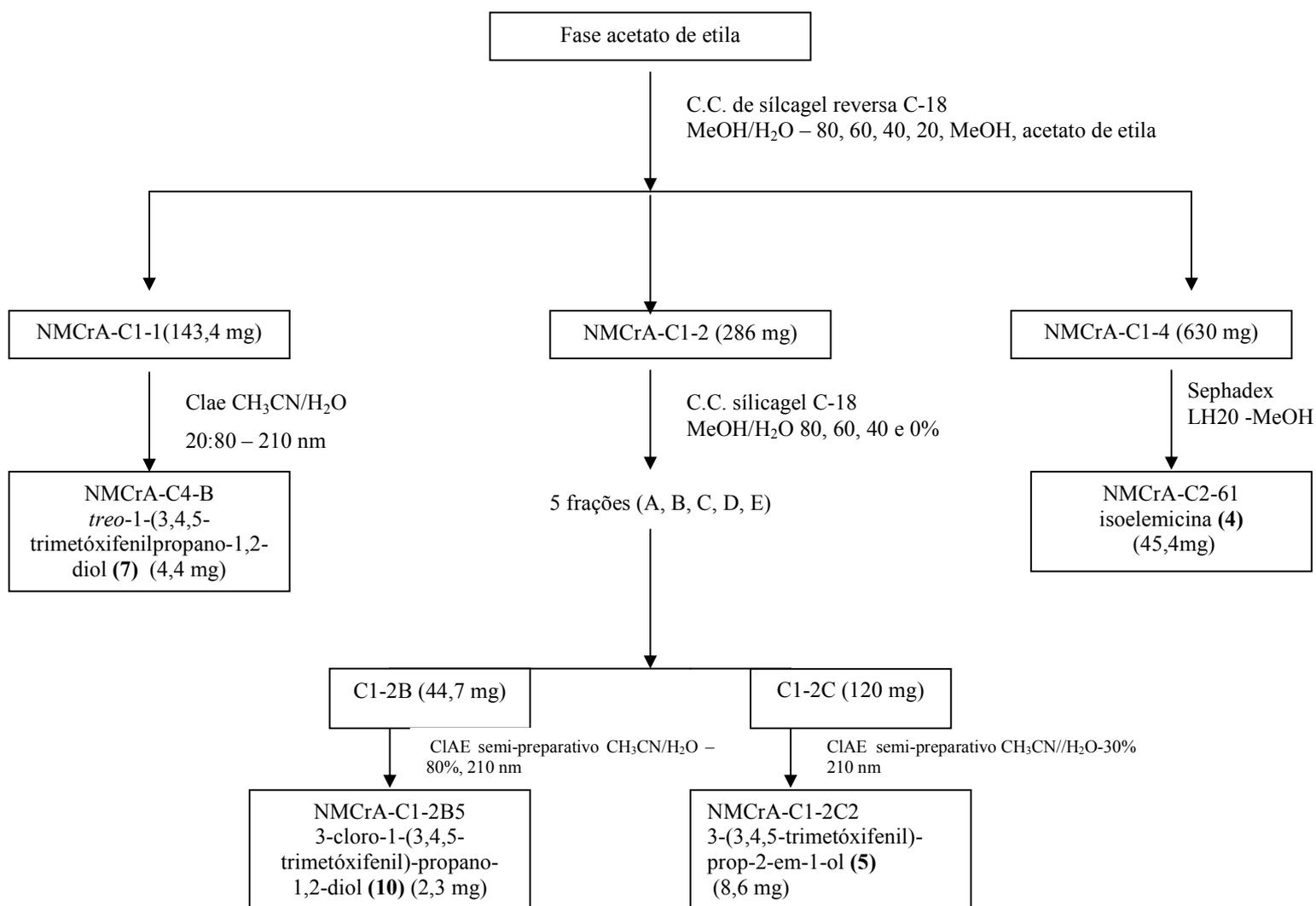


Figura 22. Fracionamento cromatográfico da fase em acetato de etila proveniente da partição do extrato etanólico da madeira de *Nectandra megapotamica*.

3.2.3.1. Estudo químico da fração NMCrA-C1-1: obtenção do *treo*-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol (7)

A fração NMCrA-C1-1 (143,4 mg), eluída da coluna C1 (MeOH/H₂O – 60%) (figura 22, pág. 29) foi submetida a uma cromatografia semi-preparativa em Clae em fase reversa C-18. O sistema foi eluído com CH₃CN/H₂O – 80%, detecção em 210 nm, fluxo de 12 mL/min. Foram coletadas 5 subfrações (A, B, C, D, E). A subfração B (4,4 mg),

mostrou ser constituída pelo fenilpropanoide *treo*- 1-(3,4,5-trimetóxifenil)-propano-1,2-diol (composto 7).

3.2.3.2. Estudo químico da fração NMCrA-C1-2: obtenção de (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol (5) e 3-cloro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propan-1,2-diol (8)

A fração NMCrA-C1-2 (286,2 mg), eluída da coluna C1 (MeOH/H₂O – 60%), foi recromatografada em coluna de sílicagel C-18 (figura 22, pág. 29). O sistema foi eluído seguindo um gradiente de polaridade decrescente MeOH/H₂O - 80%, MeOH/H₂O – 60%, MeOH/H₂O - 40% e MeOH – 100%. Foram coletadas 5 subfrações com volume de 100 mL de cada eluente, as quais resultaram nas frações C1-2A, C1-2B, C1-2C, C1-2D, C1-2E, após evaporação do solvente.

A fração C1-2C (120,0 mg) foi submetida à CLAE semi-preparativa em fase reversa C-18 no sistema CH₃CN/H₂O – 30%, detecção em 210 nm e fluxo de 12 mL/min. A fração 2 (8,6 mg) foi analisada por espectroscopia RMN ¹H e RMN ¹³C e mostrou ser constituída pelo fenilpropanoide (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol (composto 5).

A fração C1-2B (44,7 mg) foi submetida à CLAE semi-preparativa em fase reversa C-18, no sistema CH₃CN/H₂O – 80%, com detecção em 210 nm, fluxo de 12 mL/min. Foram coletadas 5 subfrações. A subfração 5 (2,3 mg) mostrou ser constituída pelo fenilpropanoide 3-cloro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol (composto 8).

O composto 8 foi submetido à acetilação com anidrido acético e piridina (1:1) de acordo com o procedimento usual. O produto acetilado 8a (2,3 mg) foi isolado após eliminação dos reagentes sob ar frio.

3.2.3.3 Estudo químico da fração NMCrA-C1-4: obtenção de isoelemicina (4)

Parte da fração NMCrA-C1-4 (630,0 mg), eluída de coluna C1 (MeOH/H₂O – 30%) (figura 22, pág. 29), foi cromatografada em coluna de Sephadex LH-20, resultando em 100 frações. A análise dos perfis cromatográficos resultou na reunião das frações 61/77 (45,4 mg) cujo principal componente foi identificado como sendo o fenilpropanoide isoelemicina (composto 4).

3.3 Obtenção, análise e fracionamento do óleo essencial das folhas de *Nectandra megapotamica*

As folhas de *N. megapotamica* (485,5 g) foram coletadas em dezembro de 2008 no mesmo local de coleta da madeira.

O óleo essencial das folhas frescas foi obtido pela técnica de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, extraído com diclorometano e seco com sulfato de sódio, obtendo-se 3,45 g de óleo.

3.3.1 Análise do óleo essencial por CG-EM

A condição cromatográfica empregada na análise em CG-EM foi a seguinte: volume de injeção 1 μL , razão de *split* 1:20, com temperatura inicial do forno de 50°C e aquecimento de 50 °C à 250 °C a uma taxa de 3 °C/min., a temperatura do injetor e do *trap* foram 240 °C e 200 °C, respectivamente, *manifold* a 70 °C e linha de transferência de 240 °C. O índice de retenção do analito foi gerado pela equação de Van Den Dool e Kratzs (SCHOMBURG, 1990), utilizando os n-alcenos ($\text{C}_8\text{-C}_{21}$) como padrões de referência da marca Aldrich. As condições do espectrômetro de massas foram as seguintes: voltagem de ionização de 70 eV, varredura de massas de 41-380 mz^{-1} e intervalo de *scan* de 0.5 s. Os componentes foram identificados comparando-se o índice de retenção e o espectro de massas do analito com os índices de retenção, espectros de massas da literatura especializada (ADAMS, 1995) e espectros de massas do banco de dados NIST e Saturn.

3.3.2 Fracionamento do óleo essencial de *N. megapotamica*

Parte do óleo essencial obtido (500,0 mg) foi submetido a uma cromatografia em coluna de Sílicagel 200-400 mesh (65,4 g) em um sistema de eluentes formado por hexano 100% e misturas de hex/AcOEt -1%; 3%; 5% e 7% sendo coletadas 170 frações de 5 mL cada.

Este processo resultou no isolamento dos seguintes compostos: *ent-caur-16-eno* (11; 7,3 mg) das frações 28-31; *cariofileno* (12; 3,3 mg) das frações 32-35; *biciclogermacreno* (13; 3,3 mg) das frações 37-45; *elemicina* (6; 55,7 mg) e *espatulenol* (14) e *elemicina* (3,2 mg) das frações 136-138.

3.4 Ensaios de atividade biológica

3.4.1 Ensaio de atividade antibacteriana

O ensaio de atividade antibacteriana foi realizado com as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); *Enterococcus faecalis* (ATCC 29218) e a Gram-negativa *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) empregando-se a técnica de microdiluição. O inóculo foi realizado em placas de Petri com agar Muller-Hinton incubadas por 20 horas em estufa a 35 °C, sob a responsabilidade da aluna de Doutorado do LP-1 da UFMS Ana Lúcia Batista do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da UFMS e a aluna de IC do curso de Farmácia e Bioquímica Ulana Chavez.

3.4.2 Ensaio de atividade antifúngica

Os ensaios de atividade antifúngica foram realizados com os fungos *Cryptococcus neoformans* (ATCC 27853), *Candida krusei* (ATCC 6258), empregando-se a técnica de microdiluição sob a responsabilidade da aluna de Doutorado do LP-1 da UFMS Ana Lúcia Batista do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da UFMS e a aluna de IC do curso de Farmácia e Bioquímica Ulana Chavez.

. O antifúngico usado para referência foi a Anfotericina B. O meio utilizado para o ensaio foi RPMI 640 com MIOPS, sendo os microorganismos foi incubados por 24 horas. Posteriormente a este período foi realizado o ensaio em 96 poços e o tempo para a leitura foi de 72 horas.

3.4.3 Ensaio larvicida frente à *Aedes aegypti*

Este ensaio foi realizado no nosso laboratório pela aluna de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na região Centro-Oeste Lilliam May Grespan de acordo com a metodologia descrita na literatura [World Health Organization - WHO, 1981], com modificações. No bioensaio, os ovos de *Aedes aegypti* foram eclodidos em uma bandeja com 2 litros de água isenta de cloro, sob condições controladas de temperatura ($T = 27 \pm 2$ °C), umidade relativa ($UR = 70 \pm 5\%$). Em condições controladas,

os ovos maduros eclodem quando submersos em meio líquido, dando origem às larvas do mosquito, essas foram alimentadas com ração de peixe (1 grama por litro) até atingirem o 3º estágio de desenvolvimento [Gadelha, 1985] para serem utilizadas no presente estudo.

O óleo essencial e as substâncias isoladas foram testados em diferentes concentrações (100, 75, 55, 35 e 10 µg/mL), sendo solubilizados em 0,5% mL de dimetilsulfóxido (DMSO) e a cada concentração foram adicionadas 10 larvas de estágio 3.

Após 24h de exposição das larvas aos tratamentos, sob temperatura de 27 ± 2 °C, o número de larvas mortas foi registrado, sendo consideradas mortas aquelas que não apresentavam movimento ou não respondiam aos estímulos com a pipeta Pasteur. Os testes foram feitos em quadruplicata. As concentrações das amostras ensaiadas foram repetidas no mínimo 2 a 3 vezes.

Paralelamente todos os experimentos foram acompanhados de uma série controle negativo em DMSO e água isenta de cloro e controle positivo com Temefós e BTI, contendo o mesmo número de larvas. Os dados obtidos foram lançados no programa de Probitos da mortalidade x concentrações (ppm), para calcular a CL_{50} .

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Sesquiterpenos da madeira de *Nectandra megapotamica*

4.1.1 Identificação da mistura de cadaleno (1) e *trans*-calameneno (2)

A mistura desses dois compostos foi obtida da fração NMCrH-C2-4 de acordo com metodologia descrita no item 3.2.2.1, pág 28.

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , incluindo DEPT 135° e também CG-EM da fração demonstrou que era constituída por uma mistura de aproximadamente 1:1 de 1 e 2. A análise inicial do espectro de RMN de ^1H (espectro 1, pág. 39) revelou a presença sinais na região de 0,70 δ a 3,7 δ bem como um grupo de sinais entre 6,92 δ e 7,93 δ de um anel aromático.

No espectro de RMN de ^{13}C da mistura (espectro 6, pág. 42), foram observados 16 sinais na região de carbonos de anel aromático, sendo oito relativos a carbonos metínicos, de acordo com dados do espectro DEPT 135° (espectros 4 e 5, pág. 41). Na região de carbonos sp^3 foram observados 13 sinais entre 17 e 44 δ , sendo um deles (23,6 δ) relativo a

dois carbonos, os quais corresponderam a quatro carbonos metínicos (28,2; 31,9; 32,5; 43,8 δ), dois metilênicos (21,5 e 30,8 δ) e oito carbonos metínicos (estes na região de 17 a 24 δ).

No espectro de RMN de ^1H (espectro 1, pág. 39) os sinais de hidrogênios metílicos foram observados como dubletos a 0,70 δ ($J= 6,8$ Hz); 0,99 δ ($J= 6,8$ Hz); 1,25 δ ($J= 6,9$ Hz) e 1,37 δ (6,8 Hz), este último atribuído aos hidrogênios de duas metilas equivalentes e com três singletos indicativos de metilas ligadas a anel aromático a 2,29; 2,54 e 2,63 δ .

Com base nestes dados e nas correlações presentes nos espectros COSY (espectros 9 a 12, págs. 44 a 47) e HSQC (espectros 13 e 14, págs. 48 e 49), foi possível separar os sistemas de spins dos dois componentes da mistura e dessa forma, identificar os sinais pertencentes a cada um dos dois componentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C .

Assim no espectro COSY para o composto 1 foram observadas correlações entre os sinais característicos de um grupo isopropila ligado a anel aromático [1,37 δ (d; $J= 6,8$ Hz) e 3,60-3,80 δ (m; 1H)], no espectro HMBC foram observadas correlações entre as duas metilas ligadas a anel aromático a 2,54 e 2,63 δ com carbonos metínicos na região de carbonos sp^2 . No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 7, pág 43) os carbonos do grupo isopropila foram observados a 28,2 δ (CH) e 23,6 δ (2 x CH_3) enquanto que os das metilas ligadas a anel aromático a 19,4 e 21,1 δ . Cinco sinais relativos a hidrogênios em anel aromático (espectro 12, pág. 47) foram atribuídos ao composto 1, constituindo dois sistemas de spins: um singleto largo, um dubleto e um dubleto a 7,90 δ ; 7,33 δ ($J= 8,6$ Hz) e 7,91 δ ($J= 8,5$ Hz) e dois dubletos a 7,20 e 7,27 δ ($J= 7,4$ Hz).

Estas informações, aliadas às correlações presentes no espectro HMBC (espectros 15 a 18, págs. 50 a 53 e tabela 3, pág. 37) permitiram propor para o composto 1 a estrutura correspondente a do sesquiterpeno aromático cadaleno (figura 23)

Este sesquiterpeno, constituinte de alguns óleos essenciais, já foi obtido de espécies de Lauraceae, como *Podadaphne quadriporata* (CICCIO & CHAVERRI, 2008), porém está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Nectandra*.

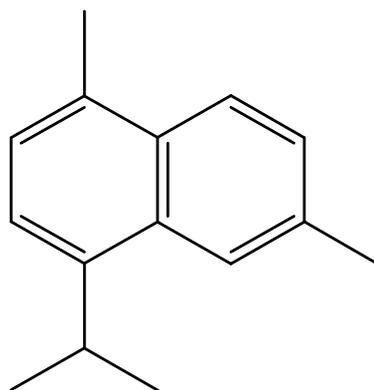


Figura 23: Sesquiterpeno cadaleno (1).

A análise dos sinais remanescentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da mistura, em conjunto com os dados obtidos do espectro DEPT 135° , revelaram que o segundo componente (composto 2) também se tratava de um sesquiterpeno, porém possuindo fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{22}$.

No espectro de RMN de ^1H (espectro 3, pág. 40) um singlete largo a $7,01 \delta$, um dubleto largo a $6,93 \delta$ ($J= 7,8 \text{ Hz}$) e um dubleto a $7,10 \delta$ ($J= 7,8 \text{ Hz}$), os quais apresentaram correlações no espectro HSQC (espectro 14, pág. 49) com os sinais a $128,7$; $126,1$; $126,8 \delta$, respectivamente, indicaram a presença de um anel aromático 1,2,4-trissubstituído. Com base na fórmula molecular proposta para 2, este sesquiterpeno seria portanto, bicíclico, com apenas um dos anéis aromáticos.

A presença de um grupo isopropila em 2 foi evidenciada pela observação da correlação no espectro COSY (espectro 10, pág. 45) entre dubletos a $0,70$ e $0,99 \delta$ ($J= 6,8 \text{ Hz}$) e pelo multiplete na região de $2,15$ a $2,25 \delta$ e também associados no espectro HSQC (espectro 13, pág.48) aos sinais a $17,3$; $22,3$; $31,9 \delta$, respectivamente.

O dubleto observado nos espectros HMBC em $1,25 \delta$ ($J= 6,9 \text{ Hz}$) e o singlete a $2,29 \delta$ foram atribuídos a duas metilas, a primeira (espectro 15, pág. 50) revelou três correlações com carbonos na região de carbonos sp^3 ($32,5$ e $30,8 \delta$), ligada à parte alicíclica da estrutura de 2 e para a segunda foram observadas correlações com três sinais de carbonos sp^2 sendo um tetrasubstituído ($128,7$; $134,4$ e $126,1$) (espectro 17, pág. 52) ligada ao anel aromático.

Estes dados foram compatíveis com um esqueleto do tipo calameneno para 2. Esta proposta foi confirmada pelas correlações presentes no espectro HMBC (espectros 15 a 18, págs. 50 a 53 e tabela 4, pág. 38).

A definição da estereoquímica *cis* ou *trans* para a metila-14 e o grupo isopropila em C-4 foi possível através da comparação, principalmente, entre valores de deslocamento químico dos hidrogênios H-1 e H-4, e no deslocamento químico dos carbonos, C-1, C-4, C-14, C-11 e relatos na literatura para os isômeros *cis*-calameneno ($[\alpha]_D^{20} = + 42,6^\circ$, *c.* 1, CHCl₃) e *trans*-calameneno ($[\alpha]_D^{20} = - 75,2^\circ$, *c.* 1, CHCl₃) (SERRA & FUGANTI, 2005). Os valores observados para o composto 2 apresentaram uma boa correlação com os do *trans*-calameneno, embora no trabalho da literatura estes valores tenham sido apenas listados e não atribuídos aos carbonos correspondentes. Assim a estrutura do sesquiterpeno 2 foi definida como sendo a do *trans*-calameneno (figura 24).

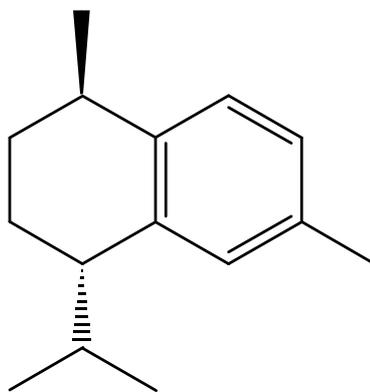


Figura 24: Sesquiterpeno *trans*-calameneno (**2**).

Este sesquiterpeno, da mesma forma que 1, está sendo relatado pela primeira vez em uma espécie do gênero *Nectandra*.

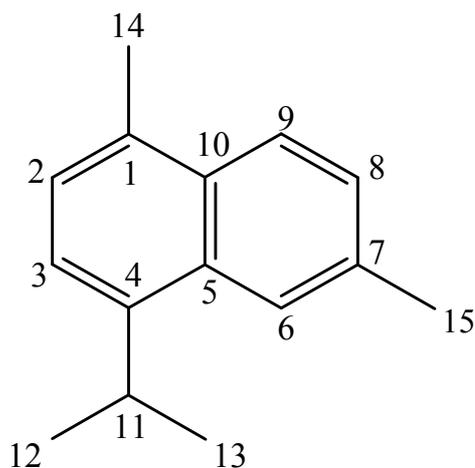


Tabela 3: Dados de RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) e de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do sesquiterpeno do sesquiterpeno cadaleno (1)

C/H	δ_{C}^*	δ_{H}^*	HMBC (H \rightarrow C)
1	131,1	-	-
2	125,6	7,20 d (7,4 Hz)	C-14
3	121,4	7,27 d (7,4 Hz)	C-1, C-5, C-11
4	142,1	-	-
5	131,8	-	-
6	122,9	7,90 sl	C-5, C-7, C-8, C-10, C-15
7	134,7	-	-
8	127,2	7,33 dl (8,6 Hz)	C-15
9	124,8	7,91 d (8,6 Hz)	C-5, C-7, C-10
10	131,5	-	-
11	28,2	3,60-3,80 m	C-3, C-4, C-12, C-13
12	23,6	1,37 d (6,8 Hz)	C-4
13	23,6	1,37 d (6,8 Hz)	C-4
14	19,4	2,63 s	C-1, C-2, C-10
15	22,1	2,54 s	C-6, C-7, C-8

*75 MHz, CDCl_3

*300 MHz, CDCl_3

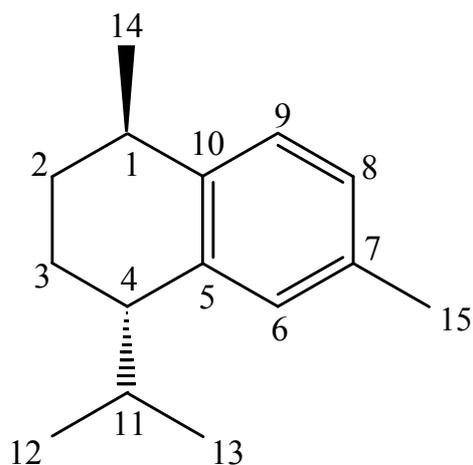
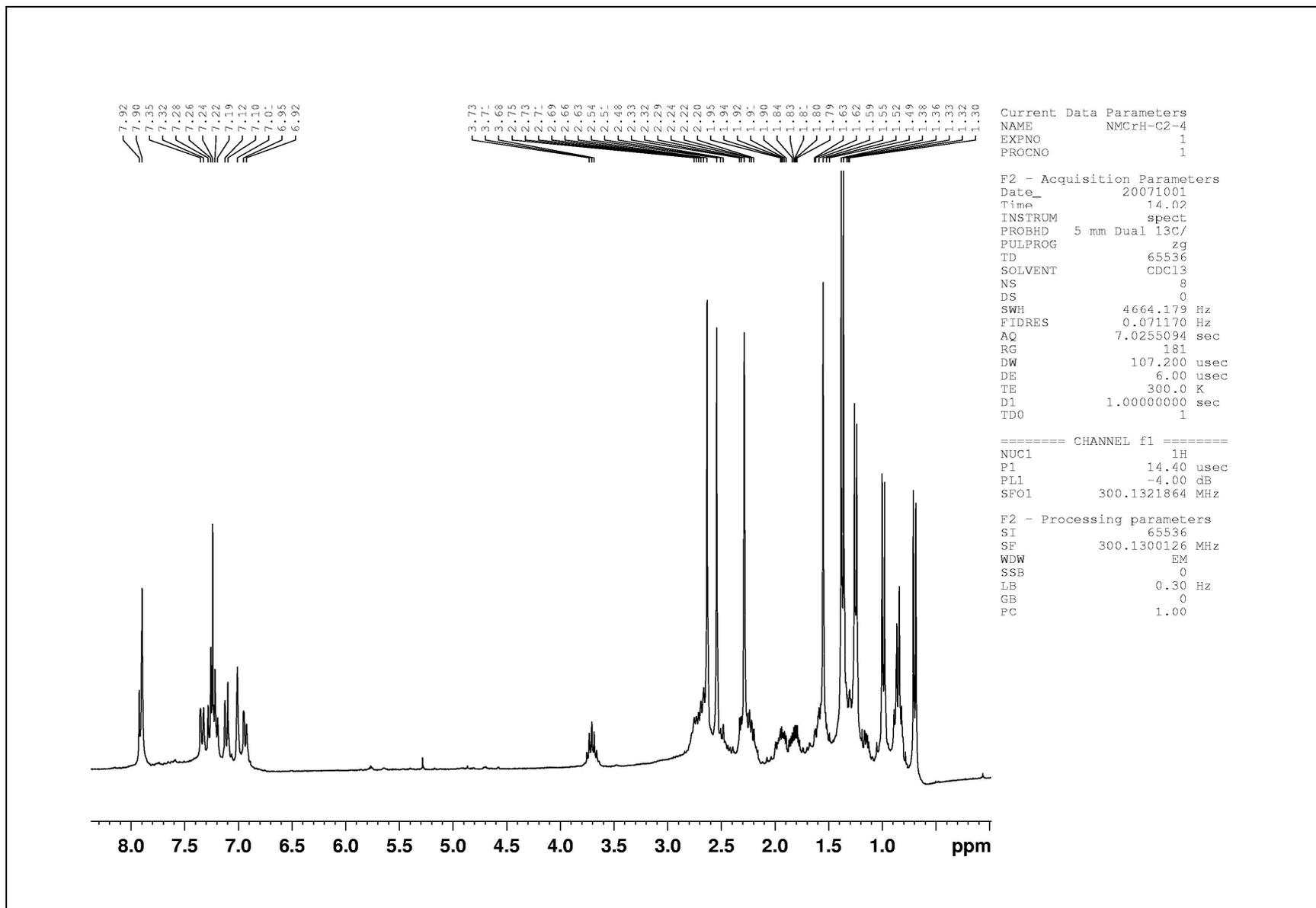
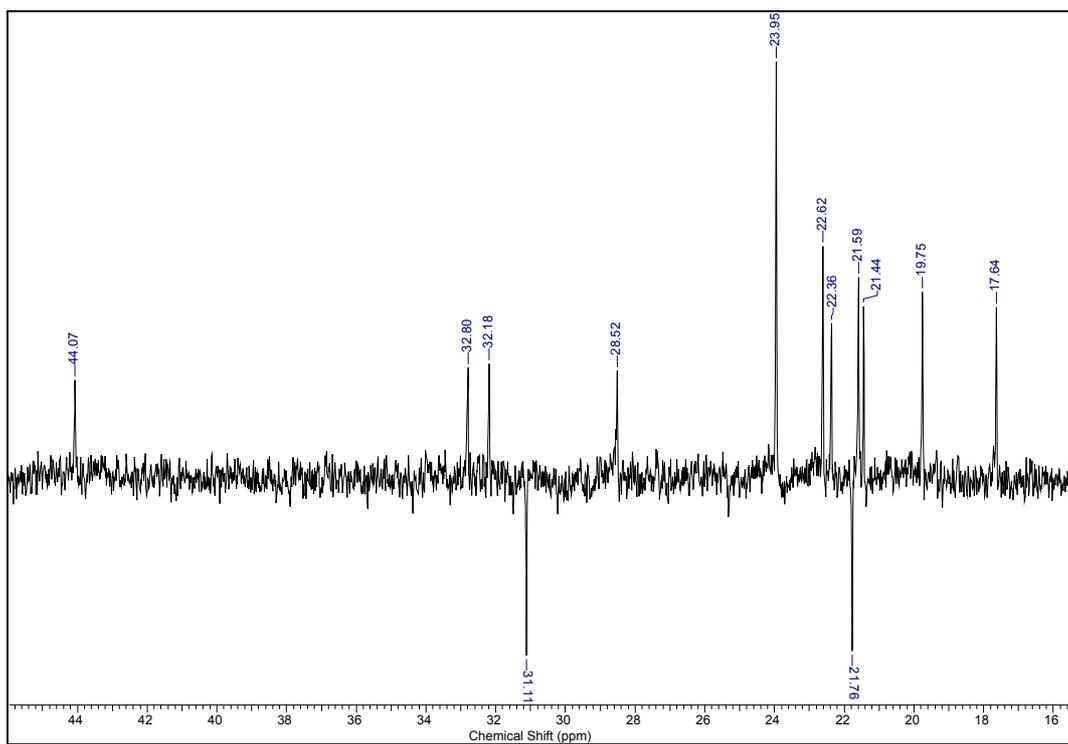


Tabela 4: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) e de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do sesquiterpeno (2) e de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) e de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do *trans*-calameneno relatados por Serra & Fuganti, 2005.

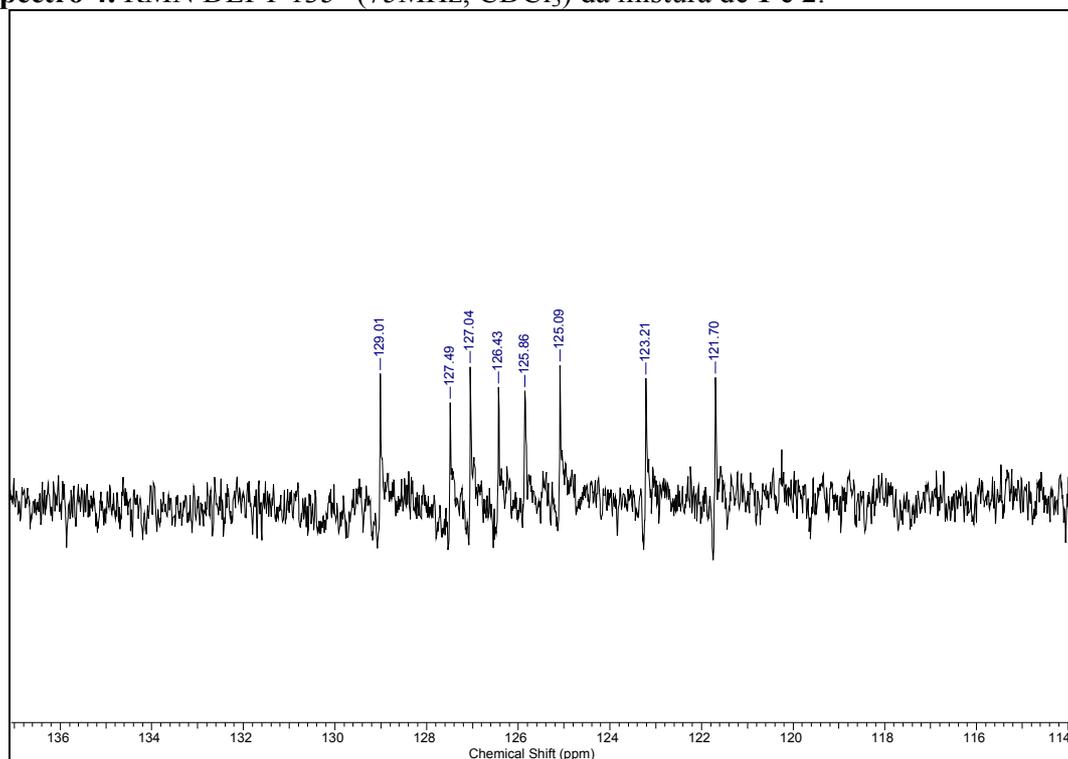
C	δ_{C}^2	δ_{H}^2	HMBC (H \rightarrow C)	$\delta_{\text{C}}^{2,*(\text{lit.})}$	$\delta_{\text{H}}^{2,*(\text{lit.})}$
1	32,5	2,60-2,80 m	C-10	32,6	2,70-2,81 m
2a	30,8	1,30-1,40 m	-	30,9	1,27-1,39 m
2b		1,90-2,00 m			1,91-2,00 m
3a	21,5	1,50-1,60 m	-	21,7	1,54-1,65 m
3b		1,75-1,85 m			1,78-1,88 m
4	43,8	2,60-2,80 m	C-10	44,1	2,64-2,72 m
5	140,1	-	C-4, C-8, C-15	140,1	-
6	128,7	7,01 sl	-	128,8	7,01 s
7	134,4	-	-	134,4	-
8	126,1	6,93 dl (7,8 Hz)	-	126,3	6,93 d (7,9 Hz)
9	126,8	7,10 d (7,8 Hz)	C-1	126,8	7,11 d (7,9 Hz)
10	139,9	-	-	139,9	-
11	31,9	2,15-2,25 m	C-13	32,1	2,16-2,28 m
12	17,3	0,70 d (6,8 Hz)	C-11, C-13	17,6	0,72 d (6,8 Hz)
13	21,3	0,99 d (6,8 Hz)	C-11, C-12	21,3	0,99 d (6,8 Hz)
14	22,3	1,25 d (6,9 Hz)	C-1, C-2, C-10	22,3	1,26 d (7,0 Hz)
15	21,1	2,29 s	C-6, C-7, C-8	21,1	2,29 s



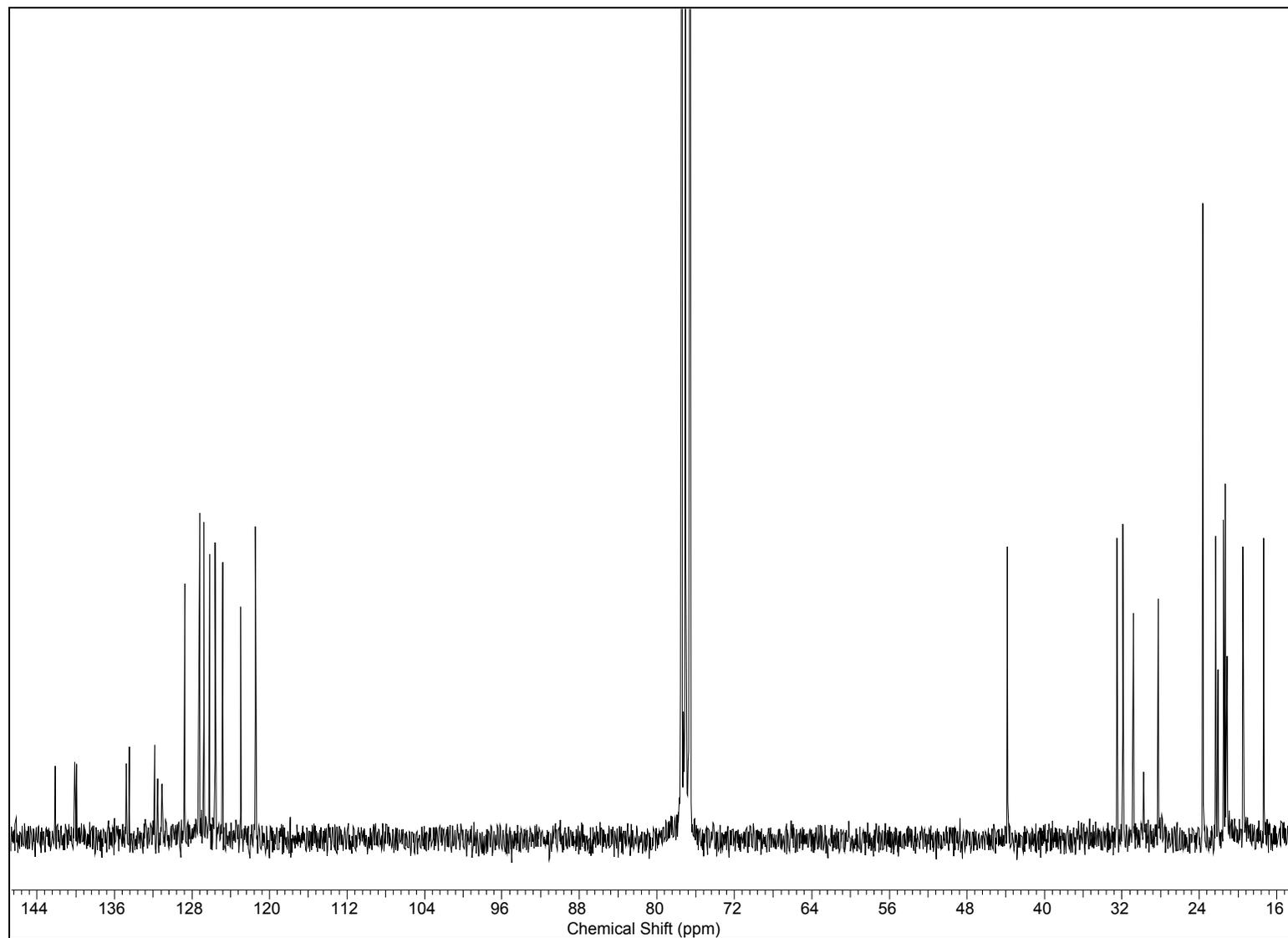
Espectro 1. RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) da mistura de **1** e **2**.



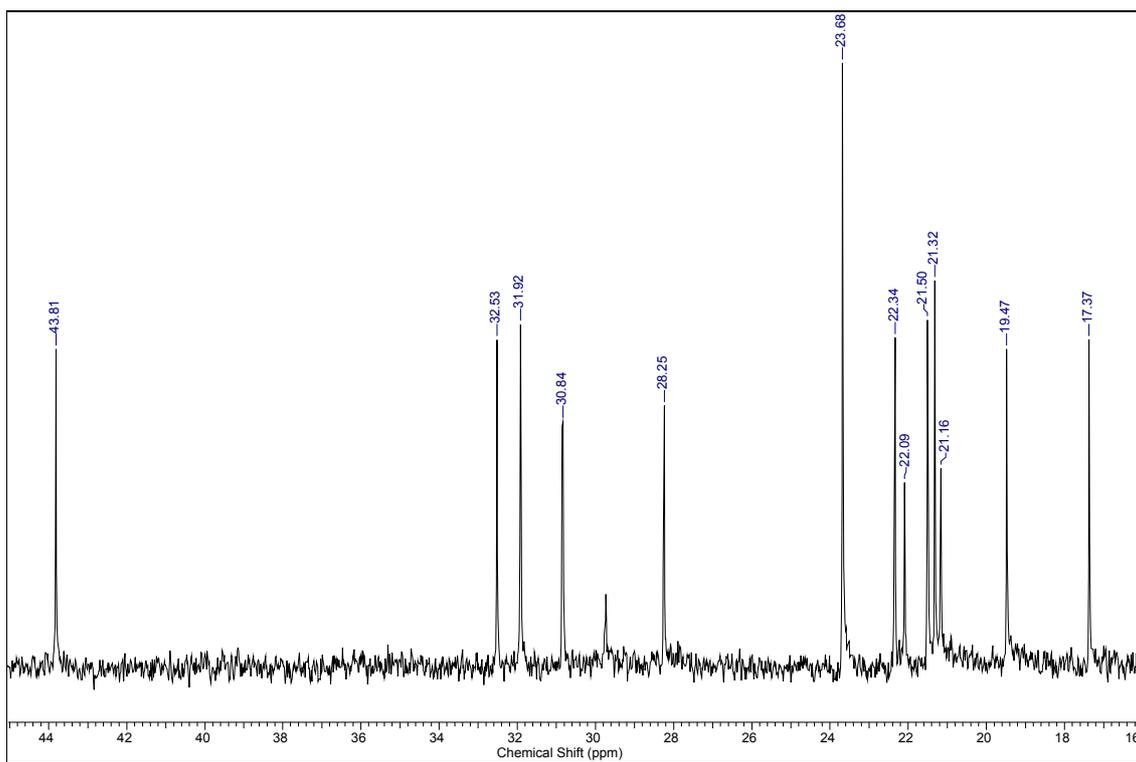
Espectro 4. RMN DEPT 135° (75MHz, CDCl₃) da mistura de **1** e **2**.



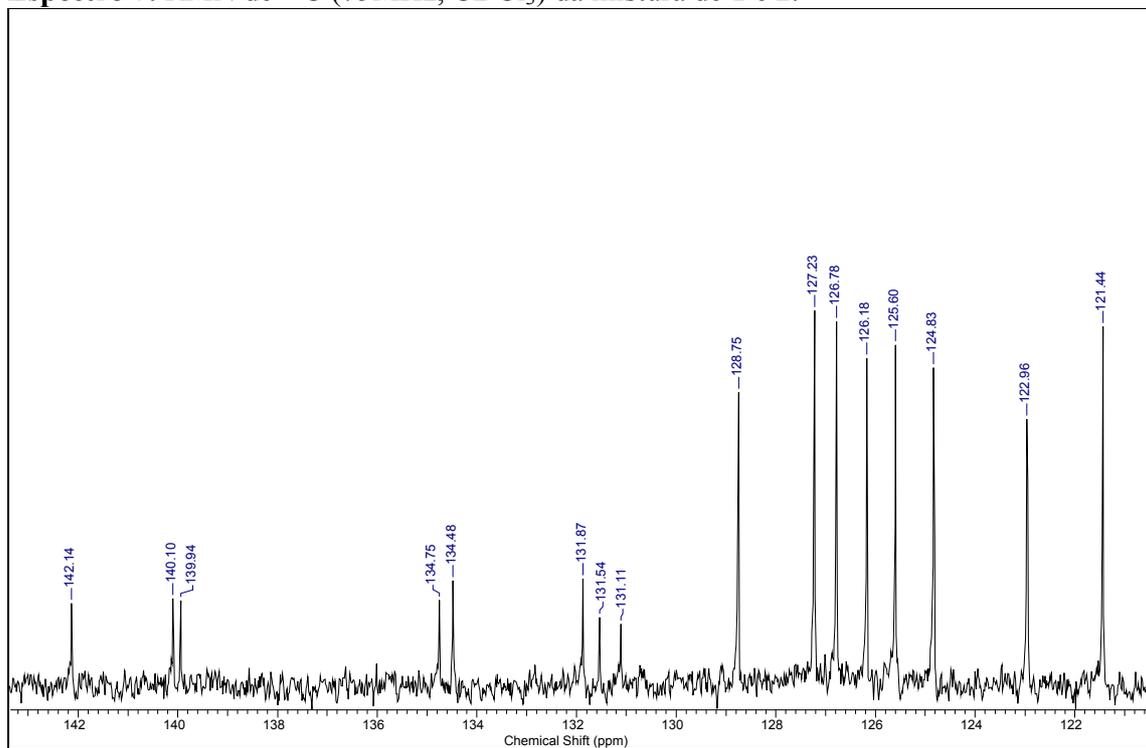
Espectro 5. RMN DEPT 135° (75MHz, CDCl₃) da mistura de **1** e **2**.



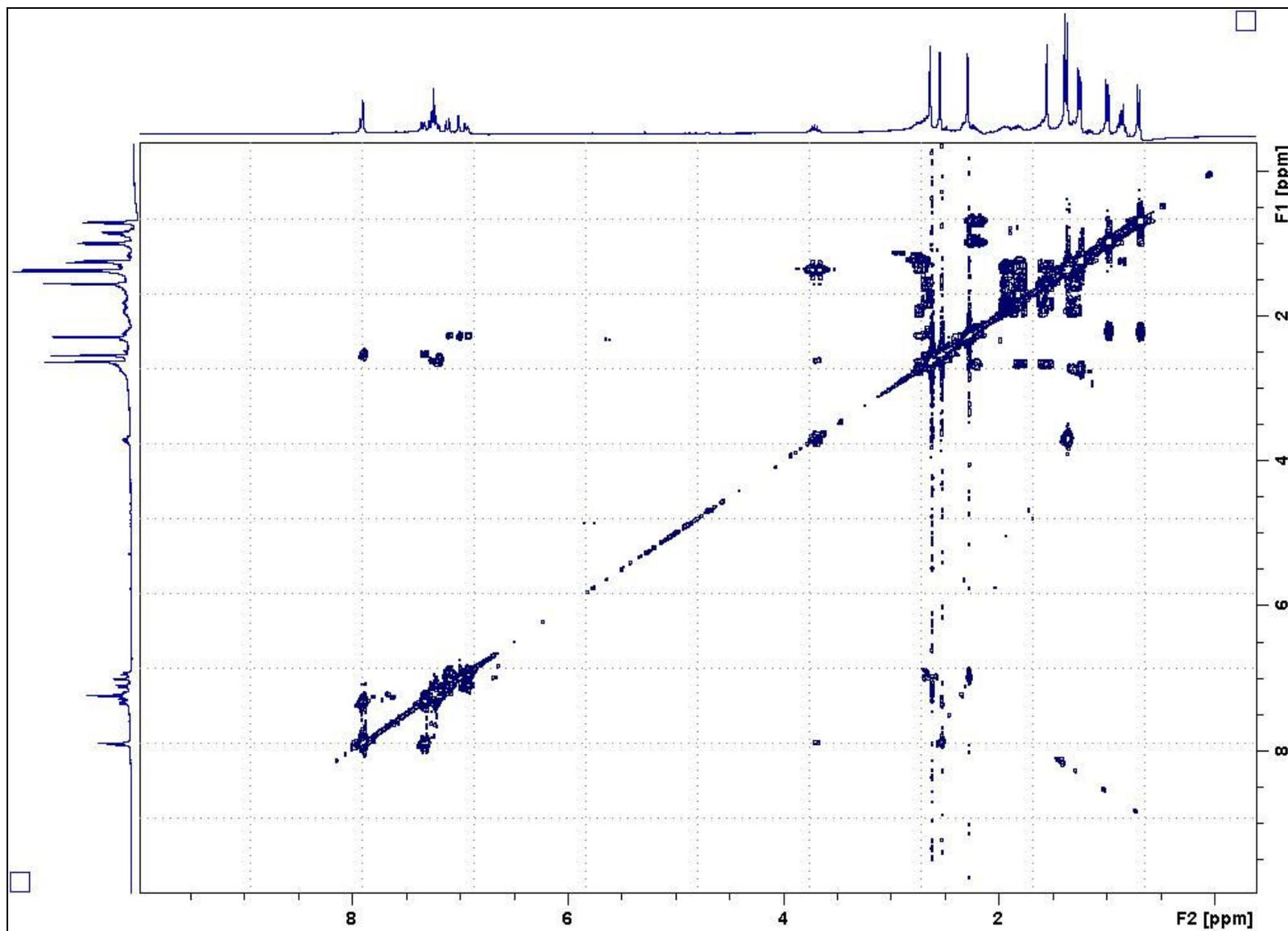
Espectro 6. RMN de ¹³C (75MHz, CDCl₃) da mistura de **1** e **2**.



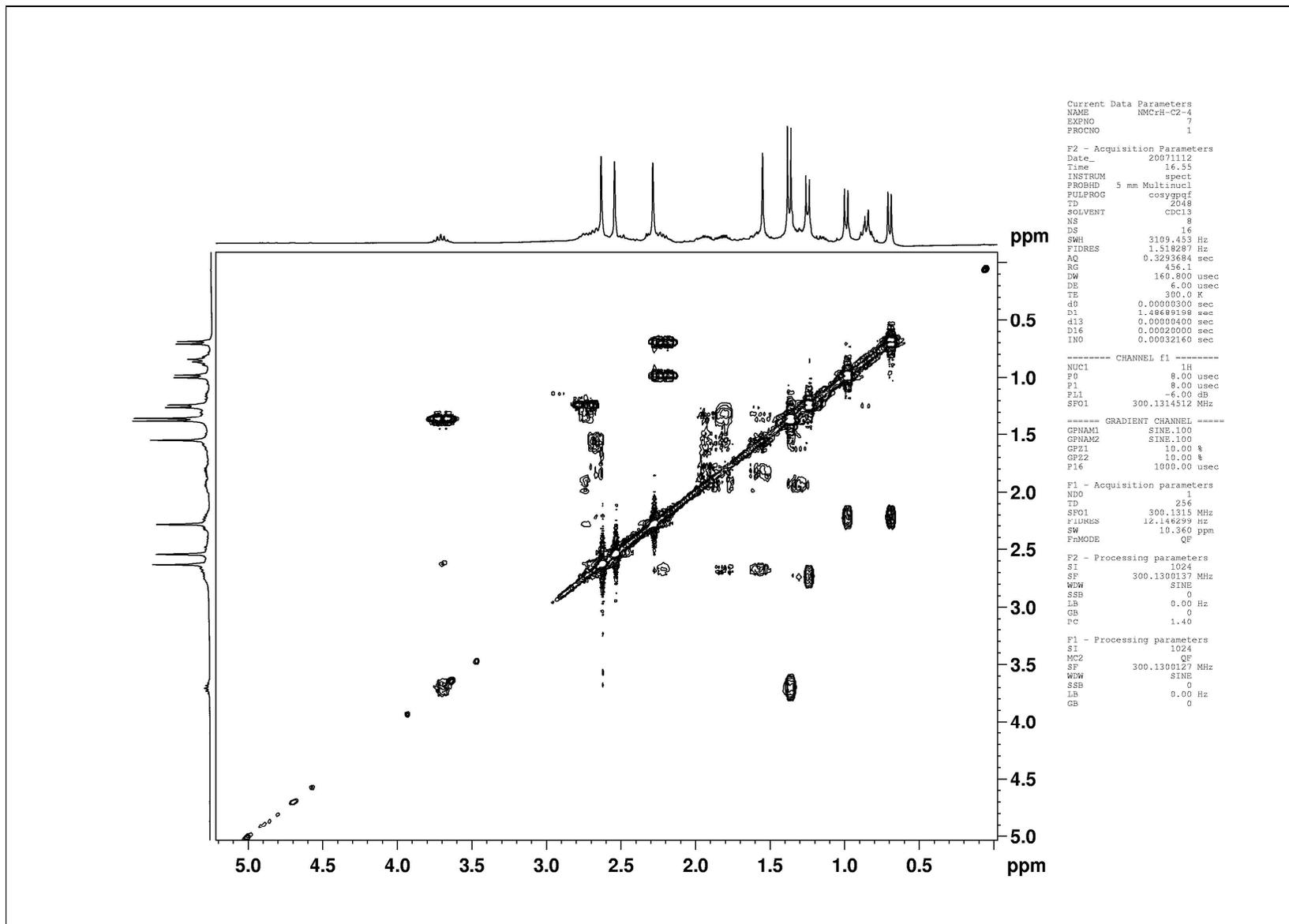
Espectro 7. RMN de ^{13}C (75MHz, CDCl_3) da mistura de **1** e **2**.



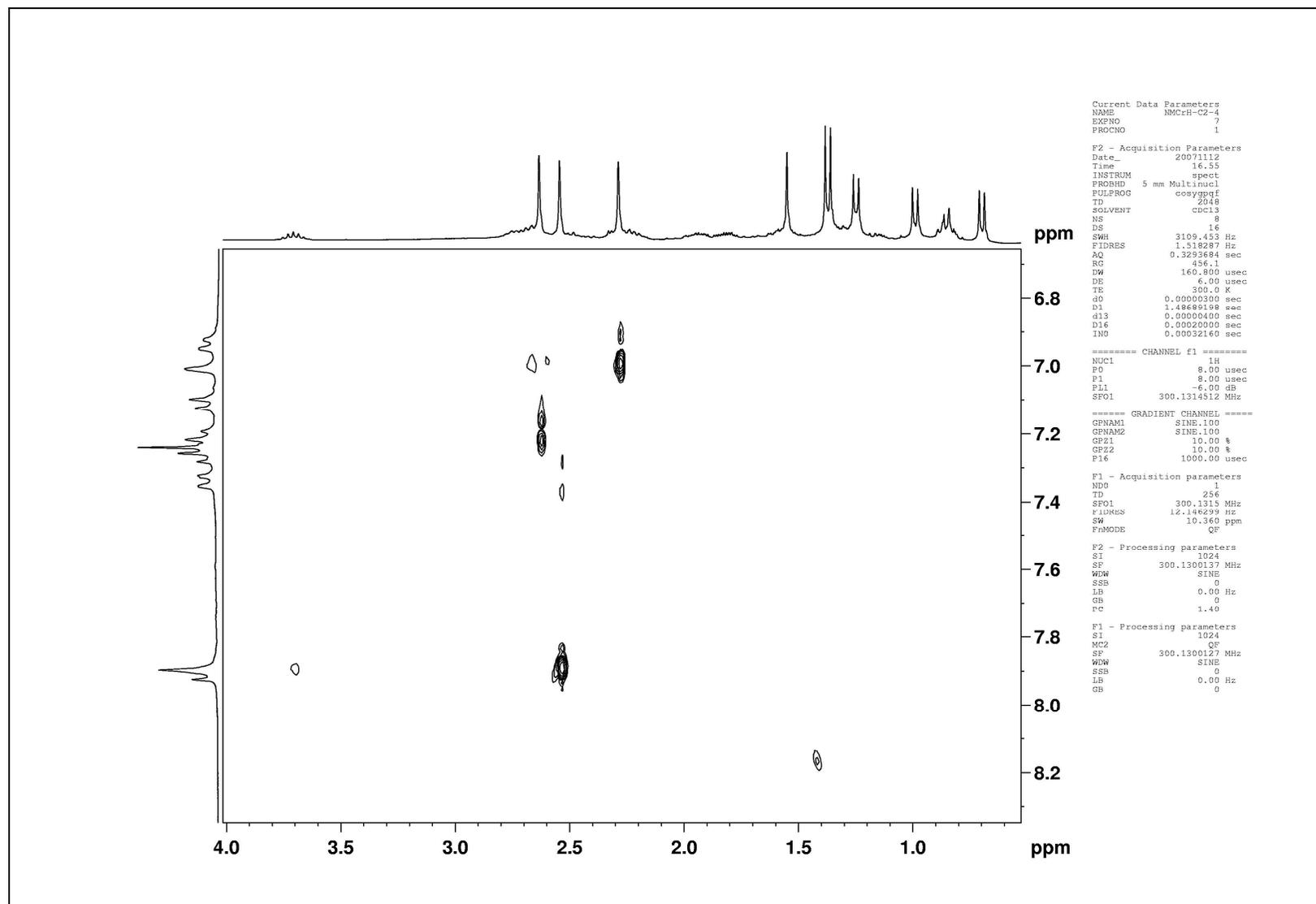
Espectro 8. RMN de ^{13}C (75MHz, CDCl_3) da mistura de **1** e **2**.



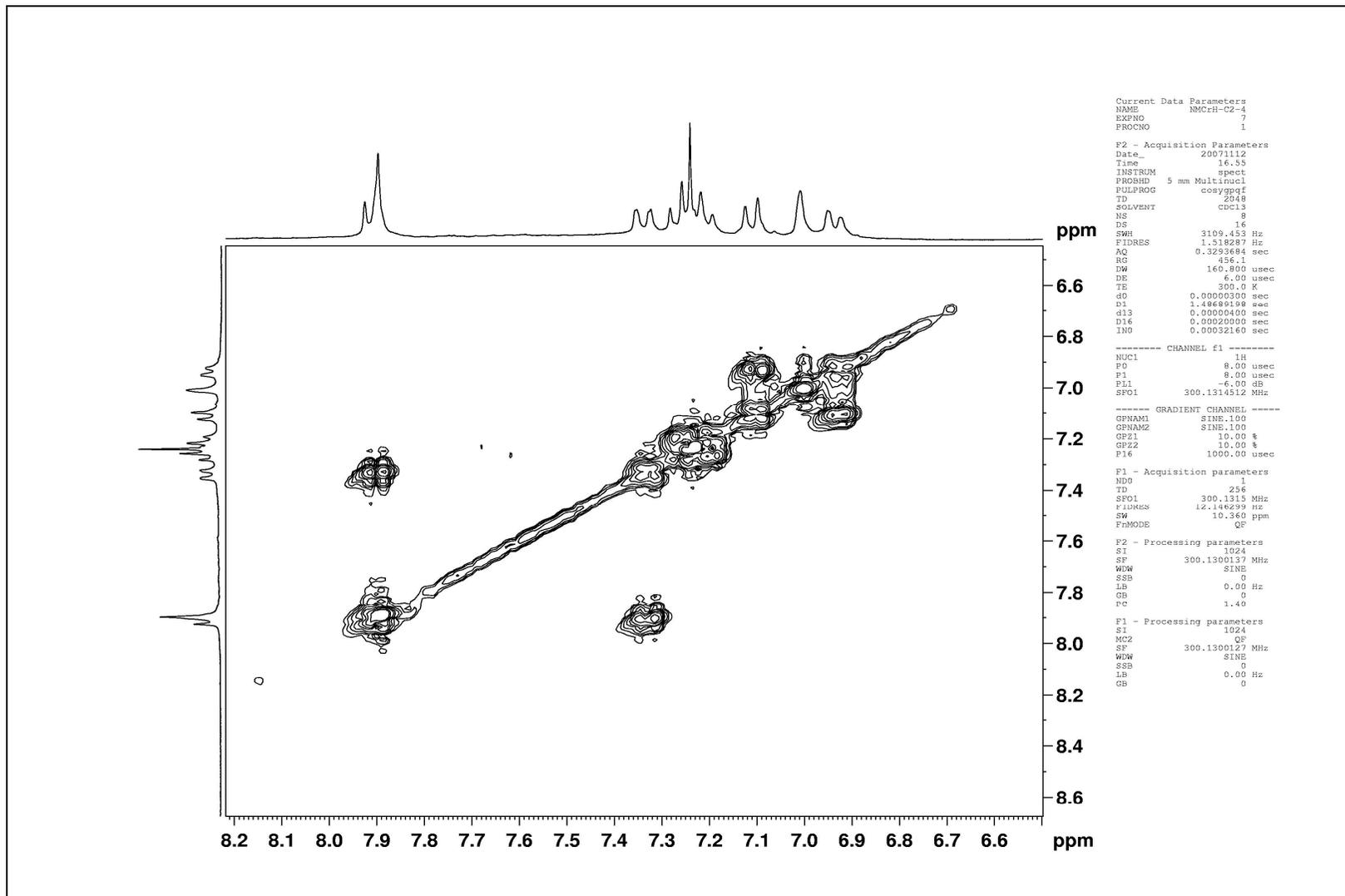
Espectro 9. RMN COSY (300MHz, CDCl_3) da mistura de 1 e 2.



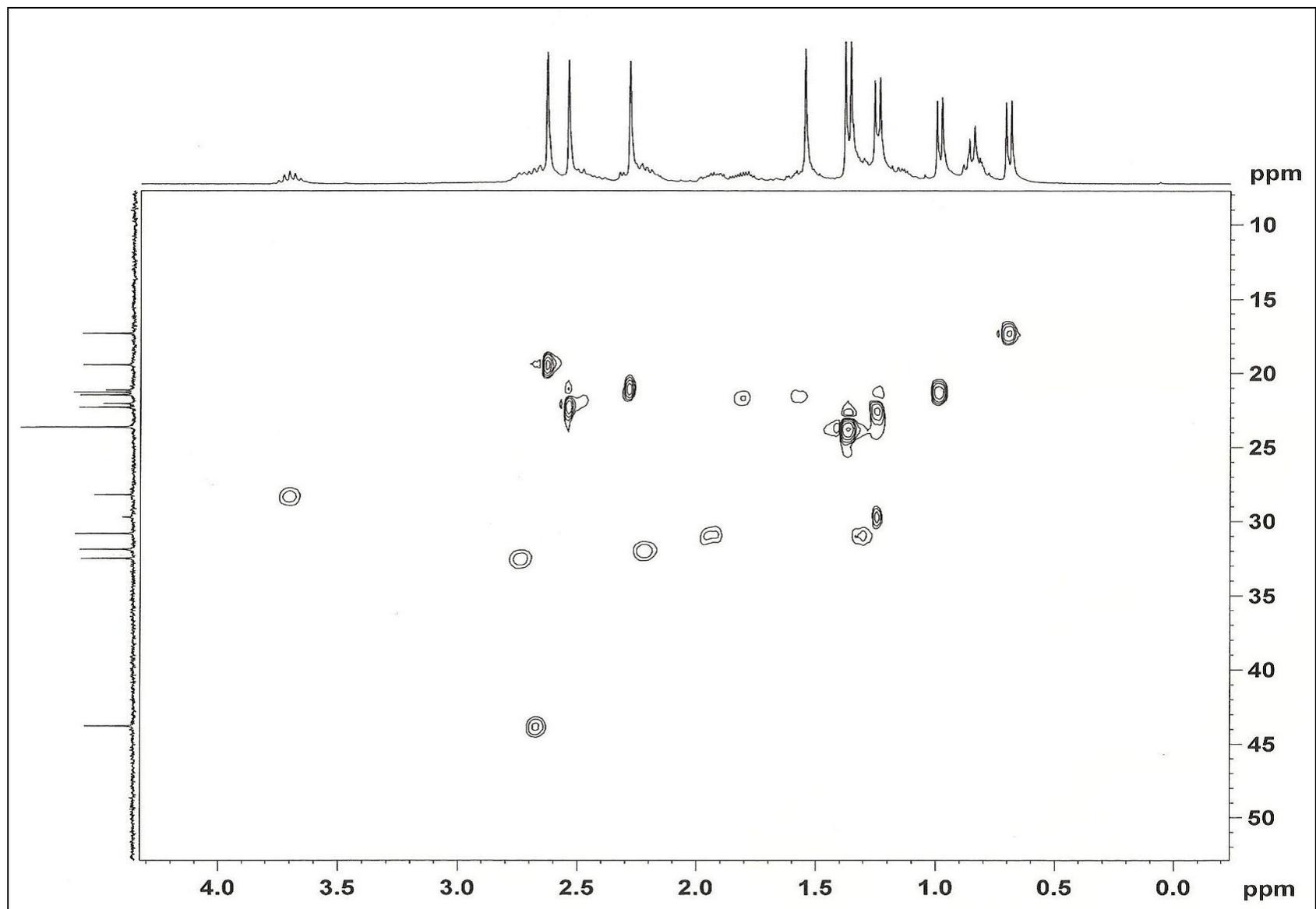
Espectro 10. RMN COSY (300MHz, CDCl₃) da mistura de **1** e **2**.



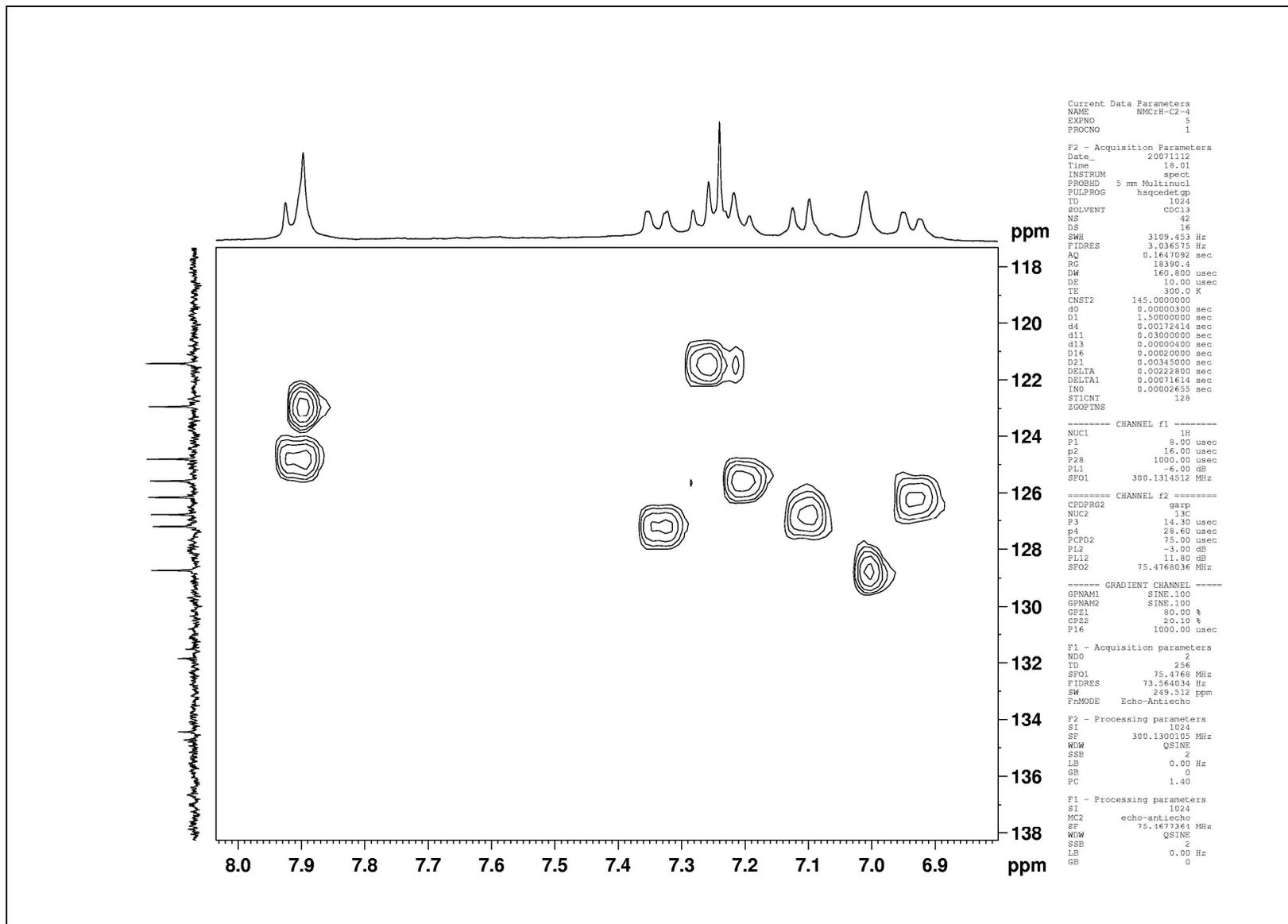
Espectro 11. RMN COSY (300MHz, CDCl₃) da mistura de **1** e **2**.



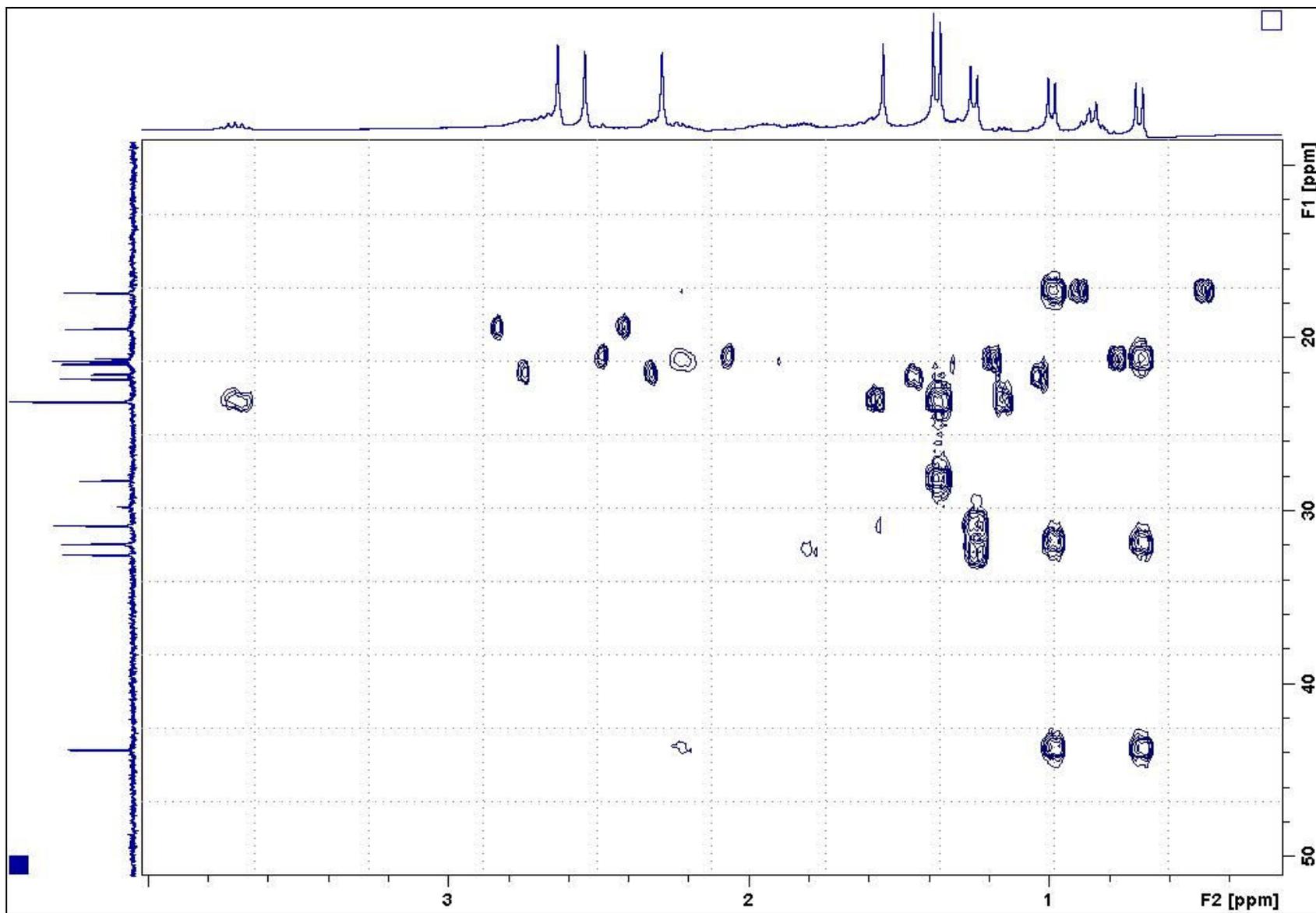
Espectro 12. RMN COSY (300MHz, CDCl₃) da mistura de 1 e 2.



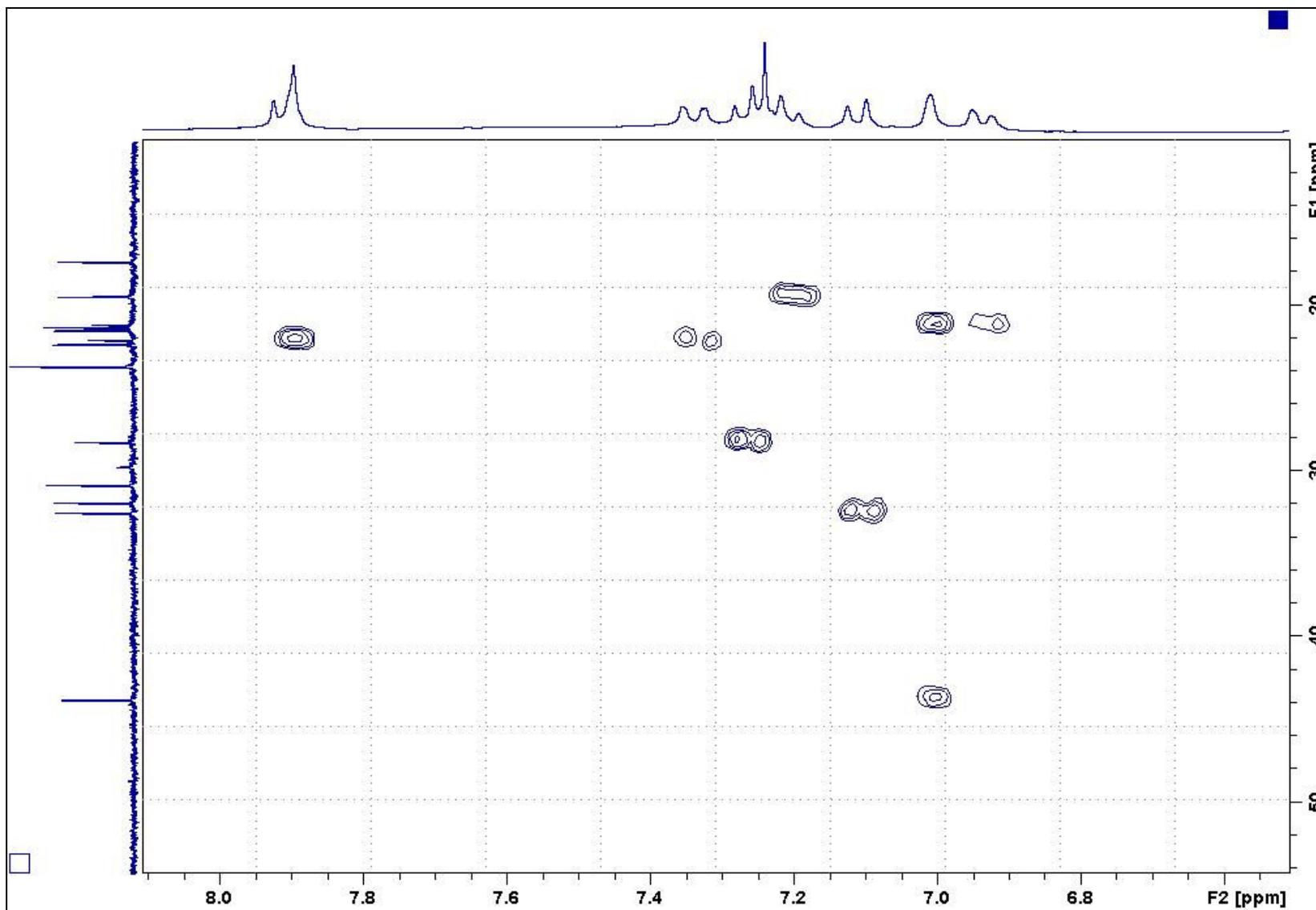
Espectro 13. RMN HSQC (300MHz, CDCl_3) da mistura de 1 e 2.



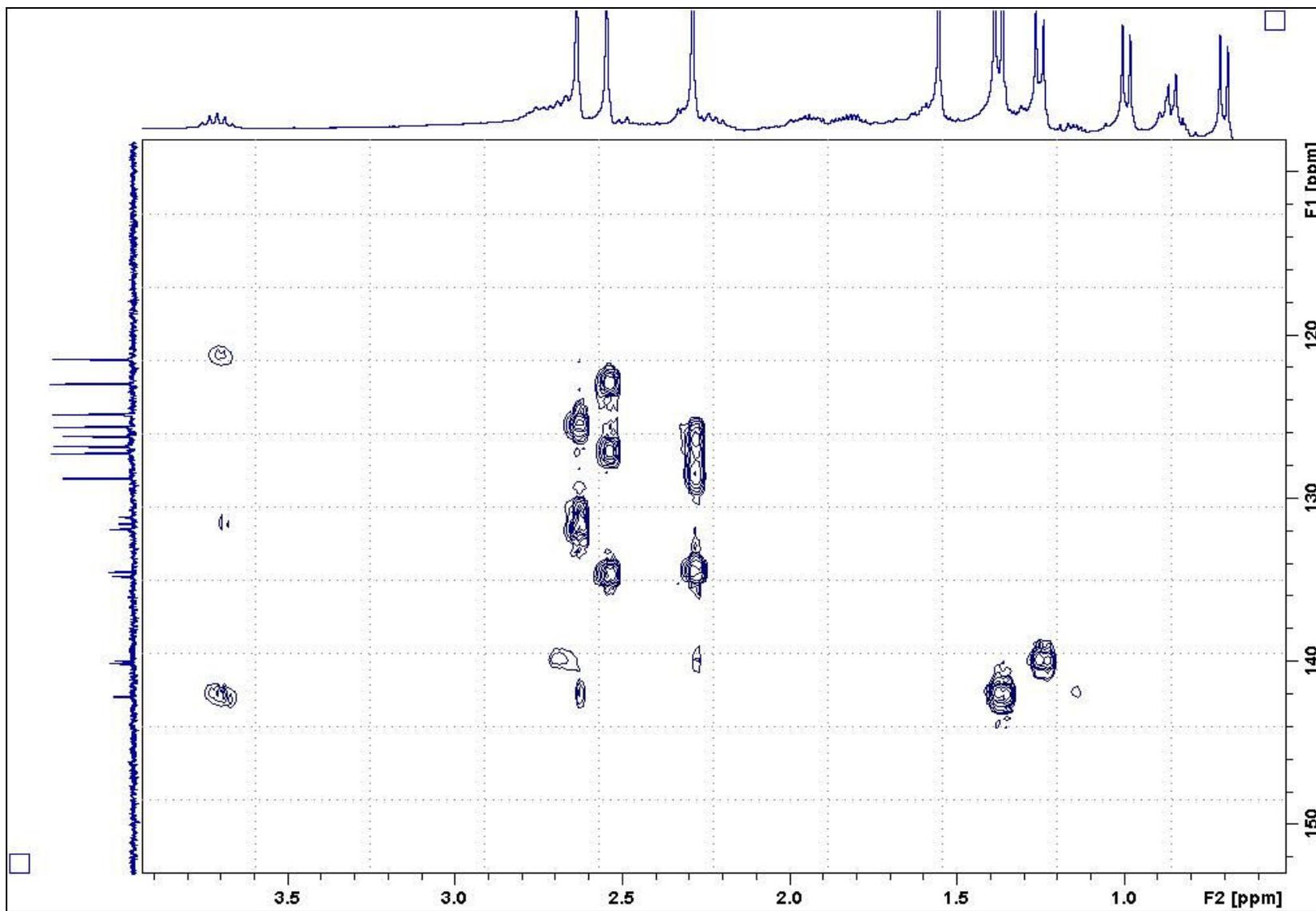
Espectro 14. RMN HSQC (300MHz, CDCl₃) da mistura de **1** e **2**.



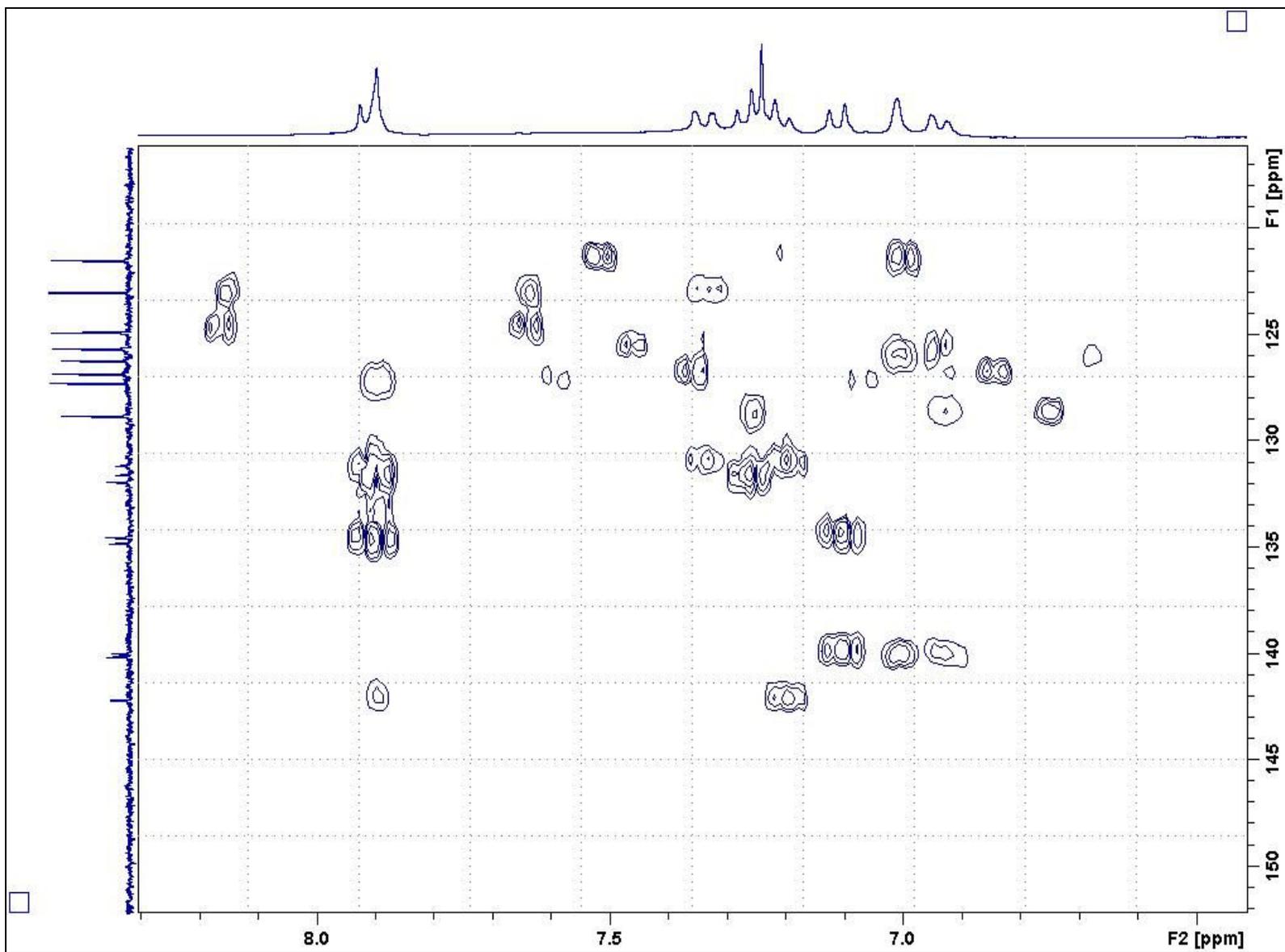
Espectro 15. HMBC (300MHz, CDCl₃) da mistura de **1** e **2**.



Espectro 16. HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (CDCl_3) da mistura de **1** e **2**.

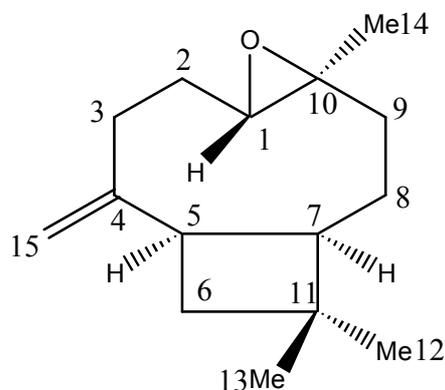


Espectro 17. HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (CDCl_3) da mistura de 1 e 2.



Espectro 18. HMBC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (CDCl_3) da mistura de **1** e **2**.

4.1.2 Identificação de *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (**3**)



O composto **3**, foi obtido da fração NMCrH-C3-77/81, de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2.2, pág. 27..

O espectro de RMN de ^{13}C (espectro 21, pág. 57), revelou com auxílio das informações presentes no espectro DEPT 135° (espectro 20, pág. 57), para o composto majoritário, a presença de quinze de sinais sugestivos de um sesquiterpeno. Foram observados sinais referentes a três metilas a 16,9; 21,6 e 22,9 δ , dois carbonos metínicos e um oximetínico (48,7; 50,7 e 63,7 δ), seis carbonos metilênicos, sendo um referente a um carbono olefínico a 112,7 δ e três carbonos quaternários, sendo um deles olefínico a 151,7 δ e outro sugestivo de um carbono oxigenado a 59,7 δ .

No espectro de RMN de ^1H (espectro 19, pág. 56) foram observados singletos relativos a três metilas a 0,94; 0,96 e 1,15 δ , além de dois singletos largos a 4,81 e 4,92 δ . Estes confirmaram a presença de uma ligação dupla exocíclica na estrutura de **3**, já evidenciada no espectro de RMN de ^{13}C . A presença de um duplo dubleto a 2,85 δ ($J=4,13; 10,70$ Hz), em conjunto com os sinais de carbonos a 63,7 δ (CH) e 59,7 δ (C) foram compatíveis com a presença de um epóxido.

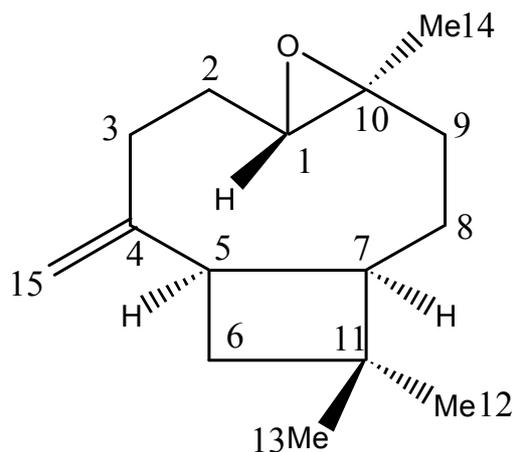
Estes dados sugeriram a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$, revelando que **3** possuía um esqueleto derivado de um sesquiterpeno bicíclico portando um grupo epóxido onde uma das quatro metilas foi convertida a um carbono metilênico exocíclico.

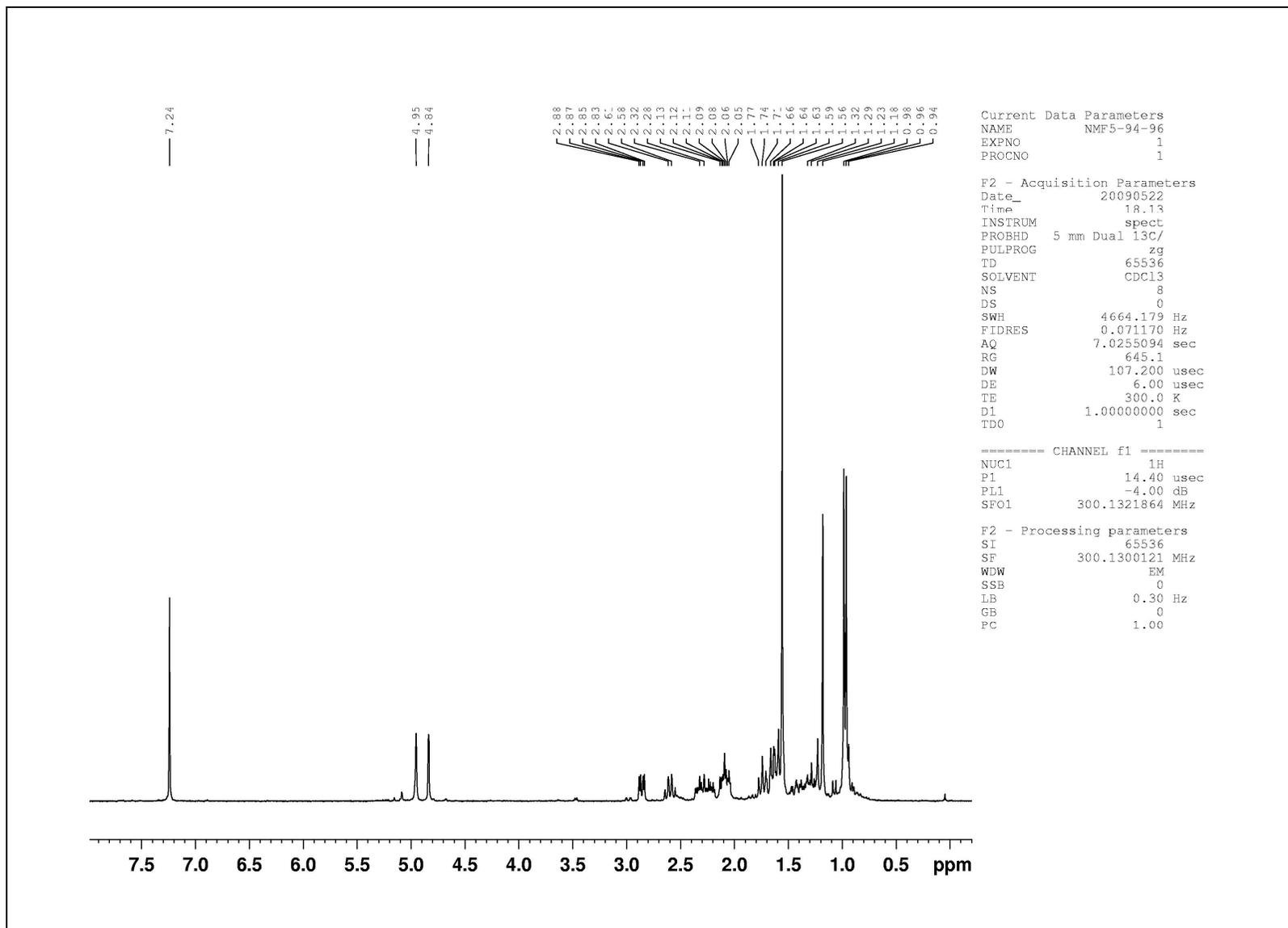
Com base nestas informações e nos valores de deslocamento químico e multiplicidades dos demais sinais presentes nos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , chegou-se à conclusão que o sesquiterpeno **3** tratava-se do *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno (tabela

5) já isolado da casca do caule de um exemplar de *N. megapotamica* estudado em nosso laboratório (GARCEZ *et. al.*, 2009).

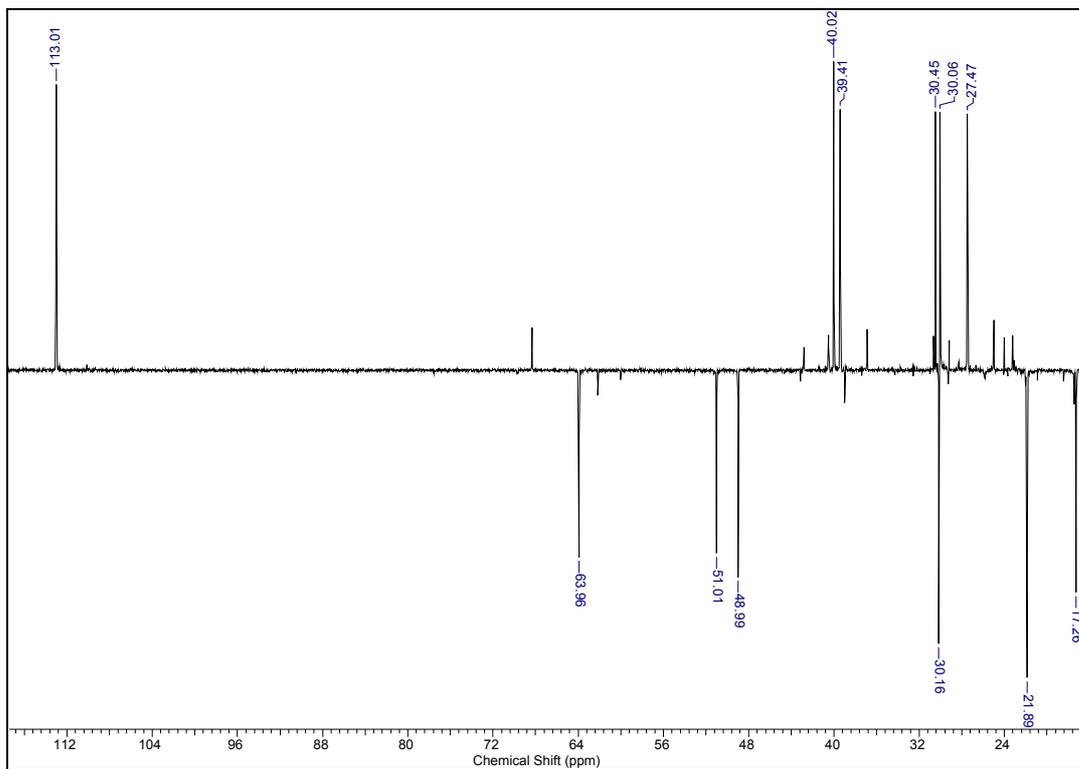
Tabela 5. Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno 3.

C	δ_c	C	δ_c
1	63,9	9	39,1
2	30,1	10	59,7
3	29,9	11	33,9
4	151,7	12	21,6
5	48,7	13	29,9
6	39,7	14	16,9
7	50,8	15	112,7
8	27,2		

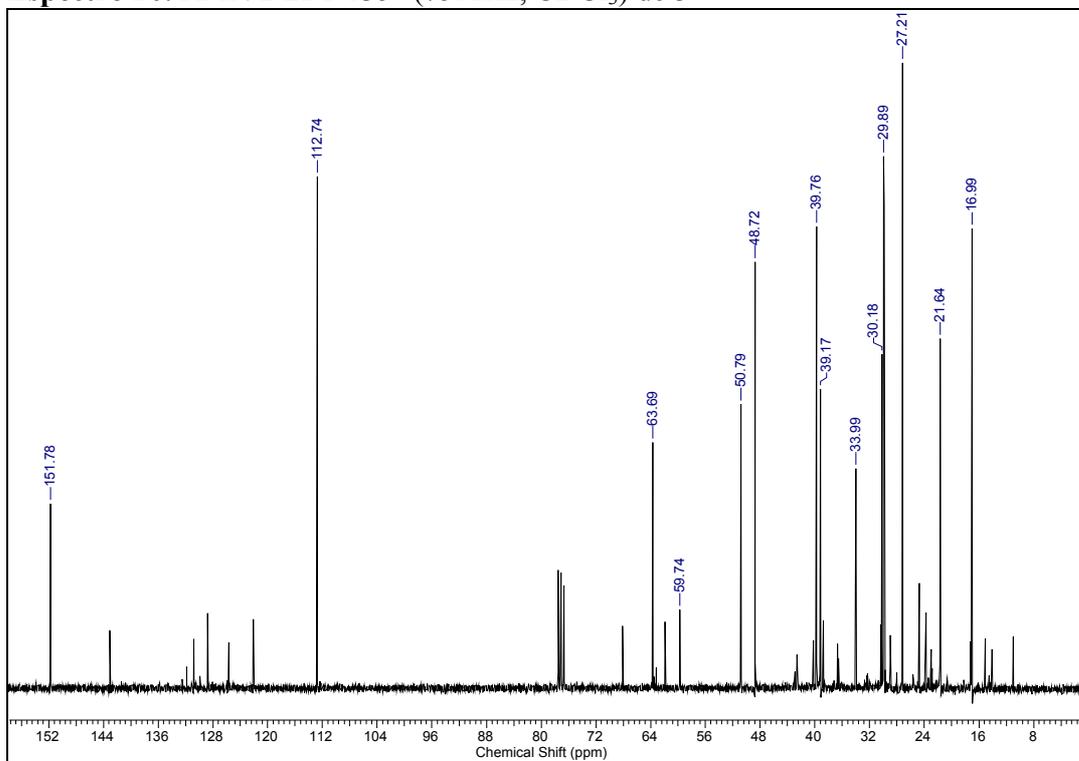




Espectro 19. RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) de **3**



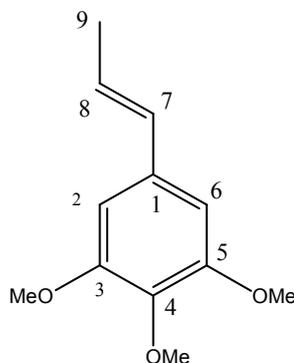
Espectro 20. RMN DEPT 135° (75MHz, CDCl₃) de **3**



Espectro 21. RMN de ¹³C (75MHz, CDCl₃) de **3**

4.2 Fenilpropanóides da madeira de *N. megapotamica*

4.2.1 Identificação de isoelemicina (4)



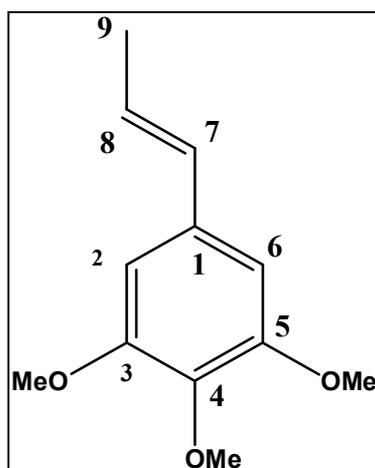
O composto 4 foi obtido na fração NMCrA-C2-61 de acordo com a metodologia descrita em item 3.2.3.3, pág. 30.

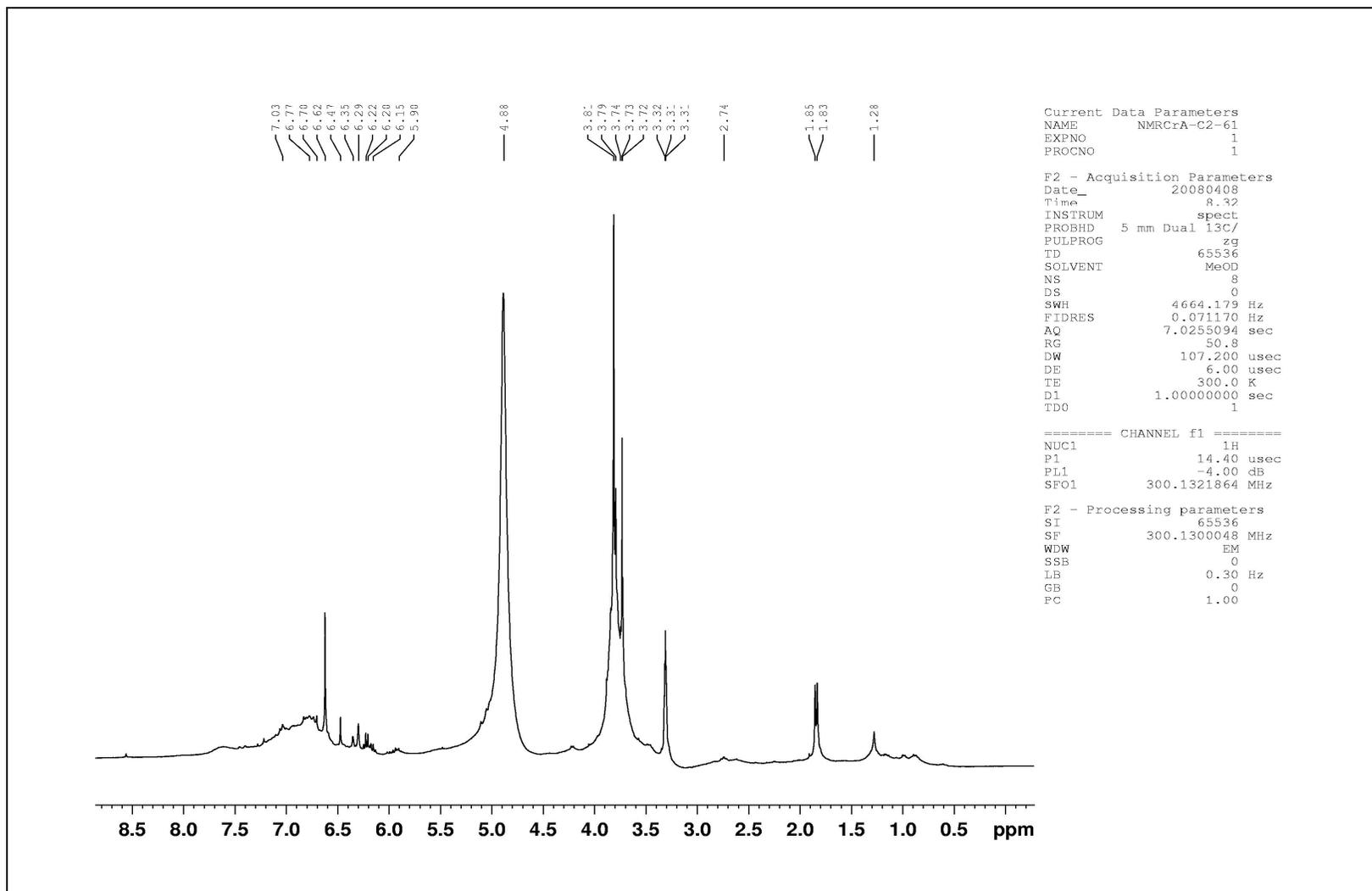
O espectro de RMN de ^1H (espectro 22, pág. 60) do material presente na fração apresentou dois singletos a 3,72 e 3,79 δ relativos a hidrogênios de grupos metoxila e um singlete a 6,62 δ sugestivo de dois hidrogênios equivalentes de um anel aromático, atribuídos ao componente majoritário presente nesta fração. Além destes sinais, foram também observados um dubleto largo a 1,83 δ ($J= 6,3$ Hz), um dubleto largo a 6,39 δ ($J= 15,8$ Hz) e um multipletto na região de 6,15 a 6,22 δ indicativos da presença de um grupo 1-propenila ligado ao anel aromático e assim sugerindo um esqueleto do tipo fenilpropanóide para esta substância.

Os espectros de DEPT – 135° e RMN ^{13}C (espectros 23 e 24, pág. 61) apresentaram sinais que confirmaram a presença de uma ligação dupla, dois sinais de carbonos olefinicos metínicos a 126,1 δ e a 132,1 δ e um carbono metílico a 18,5 δ . O sinal a 56,5 δ foi atribuído a dois carbonos de grupo metoxila equivalentes, enquanto que o sinal a 61,1 δ ao carbono de um grupo metoxila estericamente impedido. Os sinais relativos aos carbonos do anel aromático foram observados a 138,1 δ (C); 104,2 δ (CH, 2 carbonos); 154,4 δ (C, 2 carbonos) e 135,6 δ (C). Com base nestas informações, a estrutura de 4 foi definida como sendo 1,2,3-trimetóxi-5-(1-propenila), seus dados estão apresentados na tabela 6 (página 59), esse fenilpropanóide já foi isolado das cascas do caule e das folhas de um exemplar de *N. megapotamica* estudado em nosso laboratório (GARCEZ *et. al.*, 2009; HAMERSKI & MARQUES, 2007) e apresenta atividade citotóxica (KARWICKA *et. al.*, 2008)

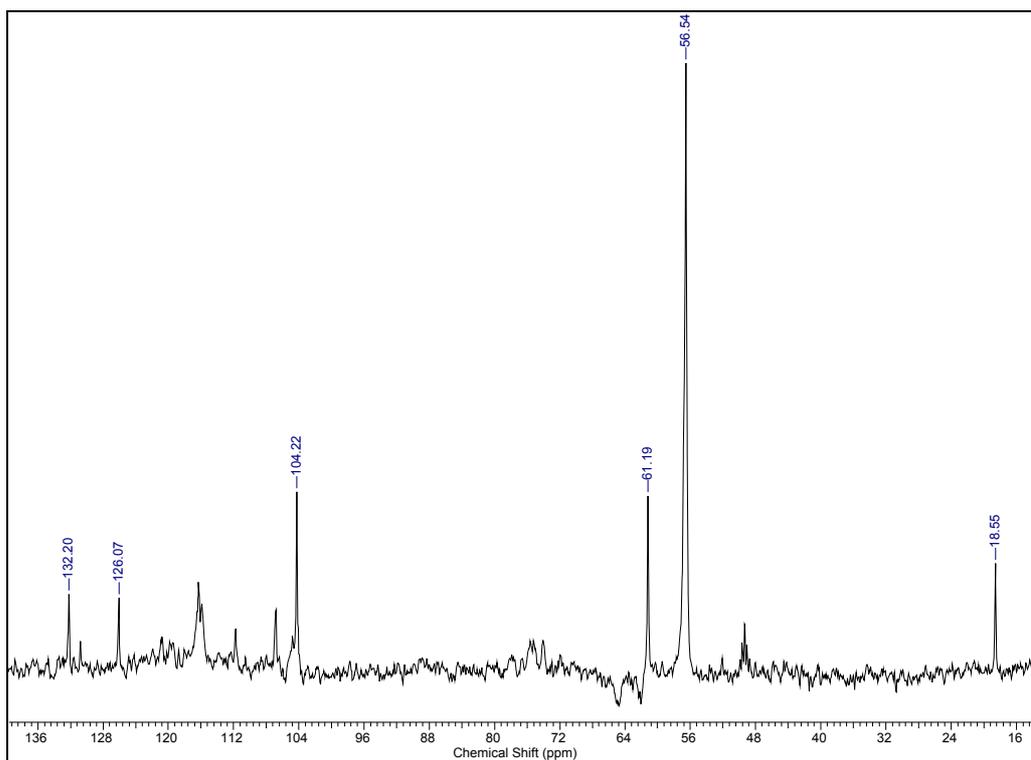
Tabela 6: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) e RMN ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) de isoelemicina (4).

H/C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	138,1
2,6	6,62 s	104,2
3,5	-	154,4
4	-	135,6
7	6,29 d (J= 15,8 Hz)	132,1
8	6,20 m	126,0
9	1,83 dl (6,3 Hz)	18,5
OCH ₃ 3,5	3,79 s	56,5
OCH ₃ 4	3,72 s	61,1

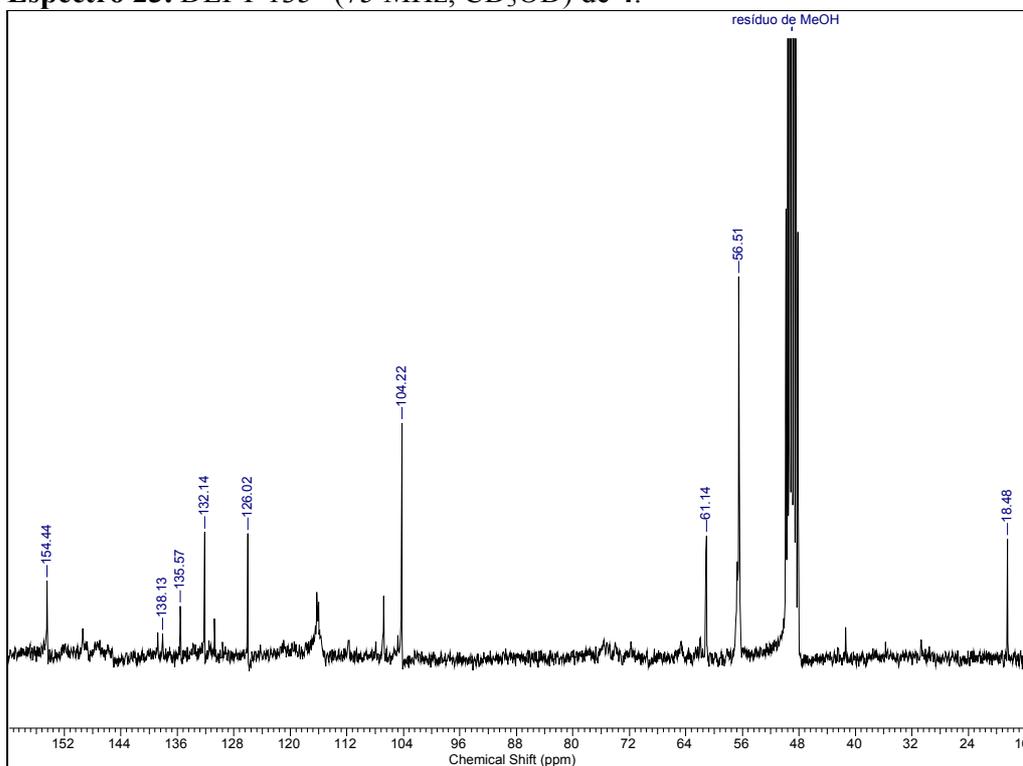




Espectro 22. RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de **4**.



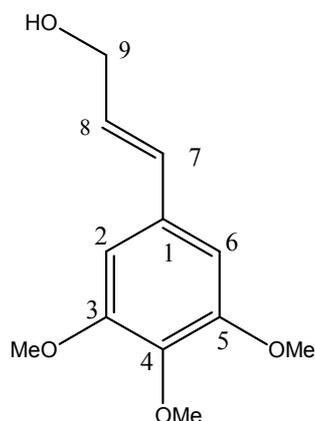
Espectro 23. DEPT 135° (75 MHz, CD₃OD) de **4**.



Espectro 24. RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) de **4**.

4.2.2 Identificação de (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol (**5**)

Estudo químico da madeira e do óleo essencial das folhas de um espécime de Nectandra megapotamica ocorrente no Cerrado de Mato Grosso do Sul



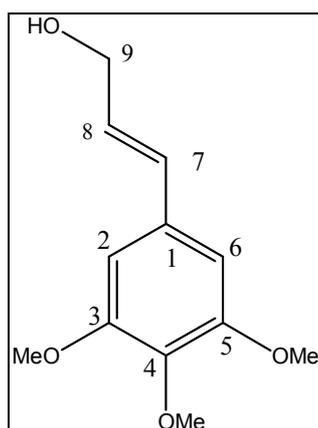
O composto 5 foi obtido na fração NMCrA-C1-2C2, de acordo com a metodologia descrita no ítem 3.2.3.2, página 30.

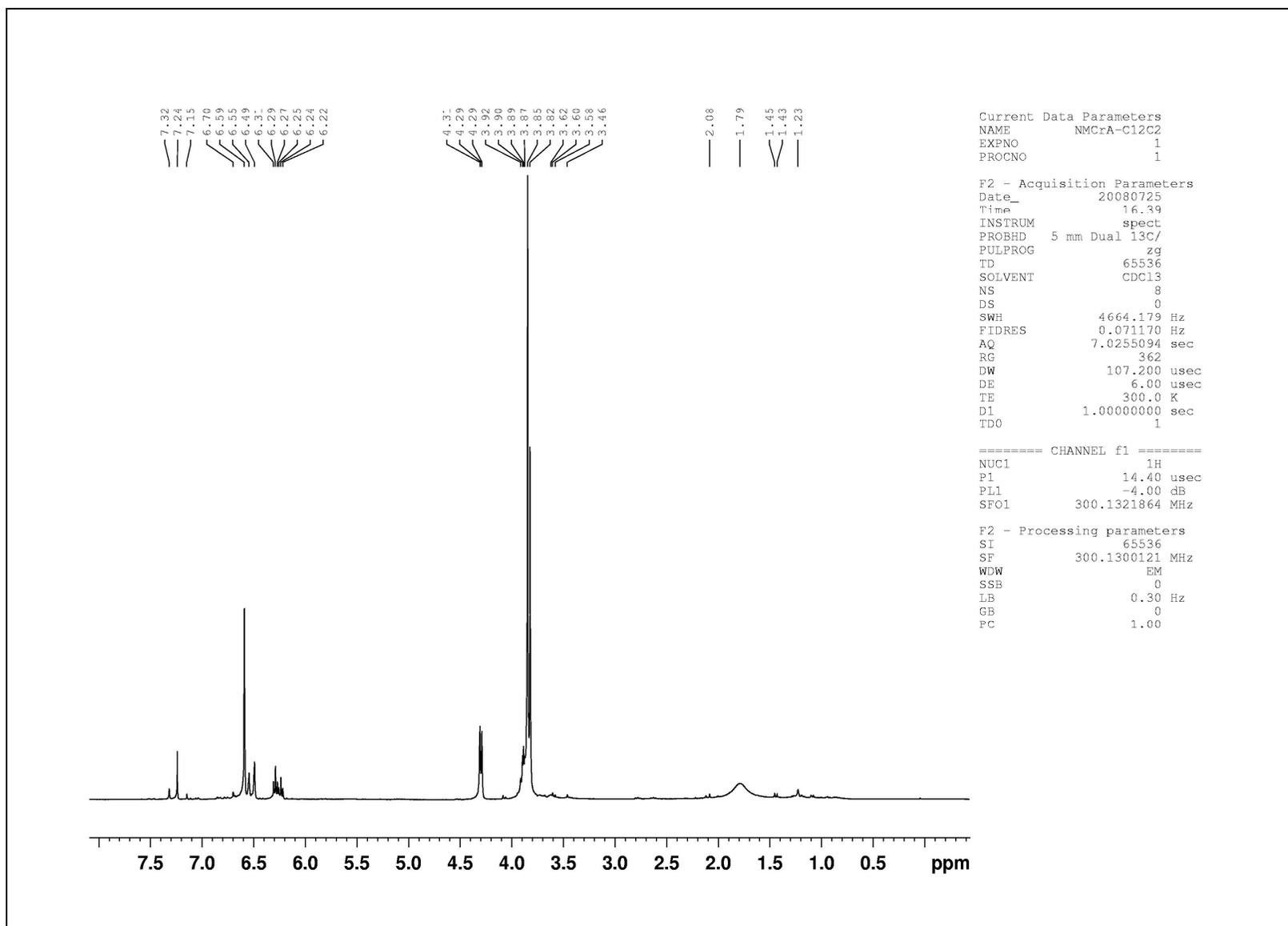
Os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C mostraram-se bastante semelhantes aos da isoelemicina (espectros 22 a 24, págs. 60 e 61), revelando que 5 também possuía um esqueleto do tipo fenilpropanóide. Da mesma forma que no espectro da isoelemicina, foram observados no espectro de RMN de ^1H (espectro 25, pág. 64) dois singletos relativos aos hidrogênios dos grupos metoxila ligados ao anel aromático a 3,73 δ e 3,82 δ e um singlete a 6,69 δ relativo aos hidrogênios equivalentes H-2,6. No entanto, os sinais dos hidrogênios relativos à cadeia lateral foram observados a 6,49 δ (dublete largo, $J = 15,8$ Hz); 6,24 δ (duplo tripleto, $J = 5,6$ e 15,8 Hz) e a 4,29 δ (duplo dublete, $J = 5,8$ e 1,2 Hz), indicativos de 1-propen-2-ol. Nos espectros DEPT – 135° e RMN de ^{13}C (espectro 26 e 27, pág. 65) os sinais dos carbonos metínicos a 128,4 δ e 130,4 atribuídos aos carbonos olefínicos da cadeia lateral C-8 e C-7, respectivamente, além do sinal a 62,4 δ , atribuído ao carbono hidroximetilênico oxigenado C-9 confirmaram esta proposta. Assim, a estrutura do componente da fração NMCrA-C1-2C2 foi caracterizada como sendo a do fenilpropanóide (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol (tabela 7, pág. 63).

O composto (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol, ou álcool 3,4,5-trimetoxicinâmico, já foi previamente isolado de *Loranthus globulosus* (Loranthaceae) e de acordo com a literatura possui atividade antifúngica e antibacteriana. (SADIK *et al.*, 2003). Não há registro desse composto na família Lauraceae.

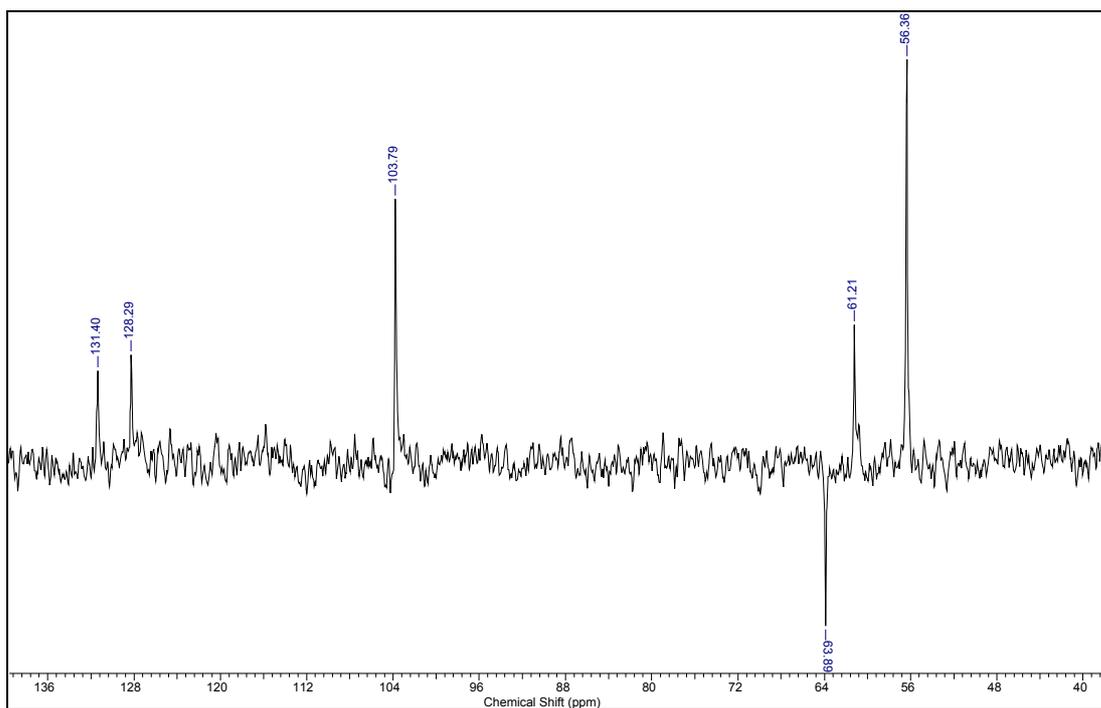
Tabela 7: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) e ^1H (300 MHz, CDCl_3) de (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol (5) e dados relatados por Sadik *et al.*, 2003 (RMN de ^1H 400 MHz; CDCl_3 e RMN de ^{13}C 100 MHz; CDCl_3).

H/C	δ_{H}	δ_{H} Lit.	δ_{C}	δ_{C} Lit.
1	-	-	131,5	132,7
2,6	6,59 s	6,60 s	104,8	103,8
3,5	-	-	154,6	153,5
4	-	-	137,9	138,0
7	6,49 dl (15,8)	6,52 d (15,8 Hz)	131,5	132,7
8	6,24 dt (15,8 e 5,6 Hz)	6,27 dt (15,8 e 5,7 Hz)	129,6	128,3
9	4,29 dd (5,8 e 1,2 Hz)	4,31 dd (5,7 e 1,3 Hz)	63,6	63,7
OCH ₃ 3,5	3,82 s	3,86 s	56,1	56,2
OCH ₃ 4	3,85 s	3,84 s	61,1	61,1

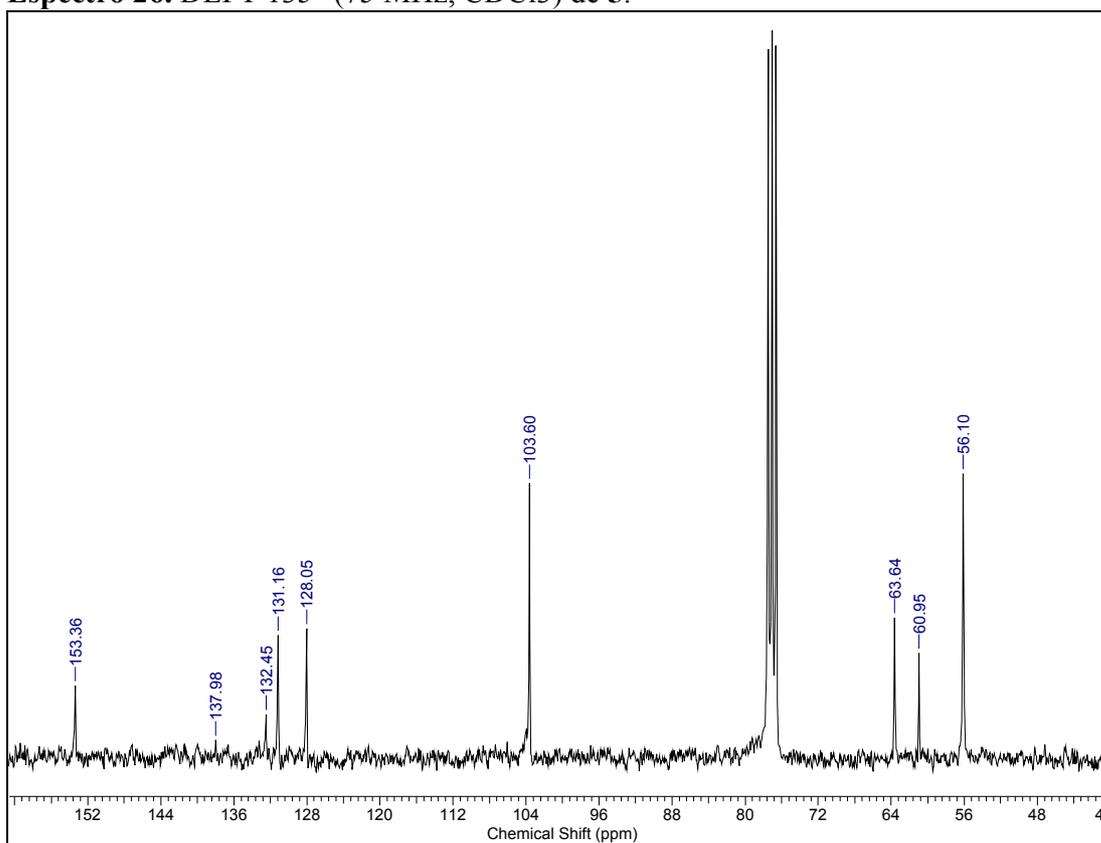




Espectro 25. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **5**.

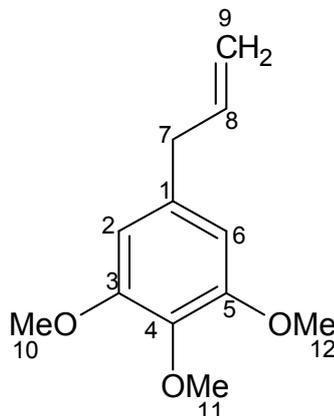


Espectro 26. DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de **5**.



Espectro 27. RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de **5**.

4.2.3 Identificação de elemicina (6)



O composto 6, obtido da fração NMCrH-C4-141/149 de acordo com metodologia descrita em item 3.2.2.3, página 27.

Os sinais presentes tanto no espectro de RMN de ^1H (espectro 28, pág. 68) como no de ^{13}C (espectro 30, pág. 69) mostraram-se bastante semelhantes aos já observados nos espectros do fenilpropanóide isoelemicina (espectros 22 a 24, págs. 60 e 61), ou seja, um singlete a 6,39 δ correspondente aos dois hidrogênios equivalentes em C-2 e C-6 do anel aromático (105,3 δ) e singletos relativos aos grupos metoxila em C-3/C-5 e C-4, a 3,80 δ e 3,83 δ e a 55,9 δ e 60,7 δ .

Com relação à cadeia lateral de três carbonos em C-1, os valores de deslocamento químico dos hidrogênios e carbonos correspondentes foram indicativos de um grupo propenila com uma ligação dupla terminal. Assim, o dubleto a 3,32 δ ($J = 6,66$ Hz) foi atribuído aos hidrogênios metilênicos H-7; o multiplete na região de 5,87 δ a 6,00 δ , ao hidrogênio olefínico H-8 e o multiplete na região de 5,05 δ a 5,12 δ , correspondente aos hidrogênios olefínicos H-9 (espectro 28, pág. 68).

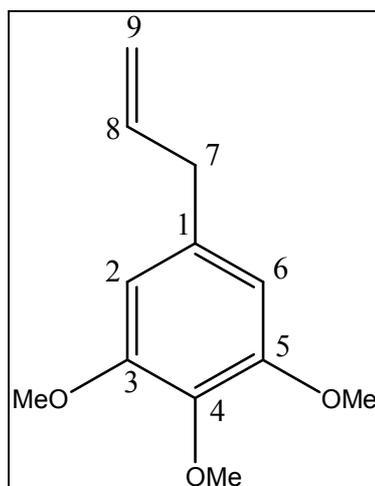
No espectro de RMN de ^{13}C e DEPT-135 $^\circ$ (espectros 30 e 29, pág. 69) os sinais para os carbonos olefínicos C-8 e C-9 foram observados a 137,1 δ (CH) e 115,9 δ (CH₂), respectivamente, enquanto que o sinal relativo ao carbono metilênico C-7 a 40,4 δ .

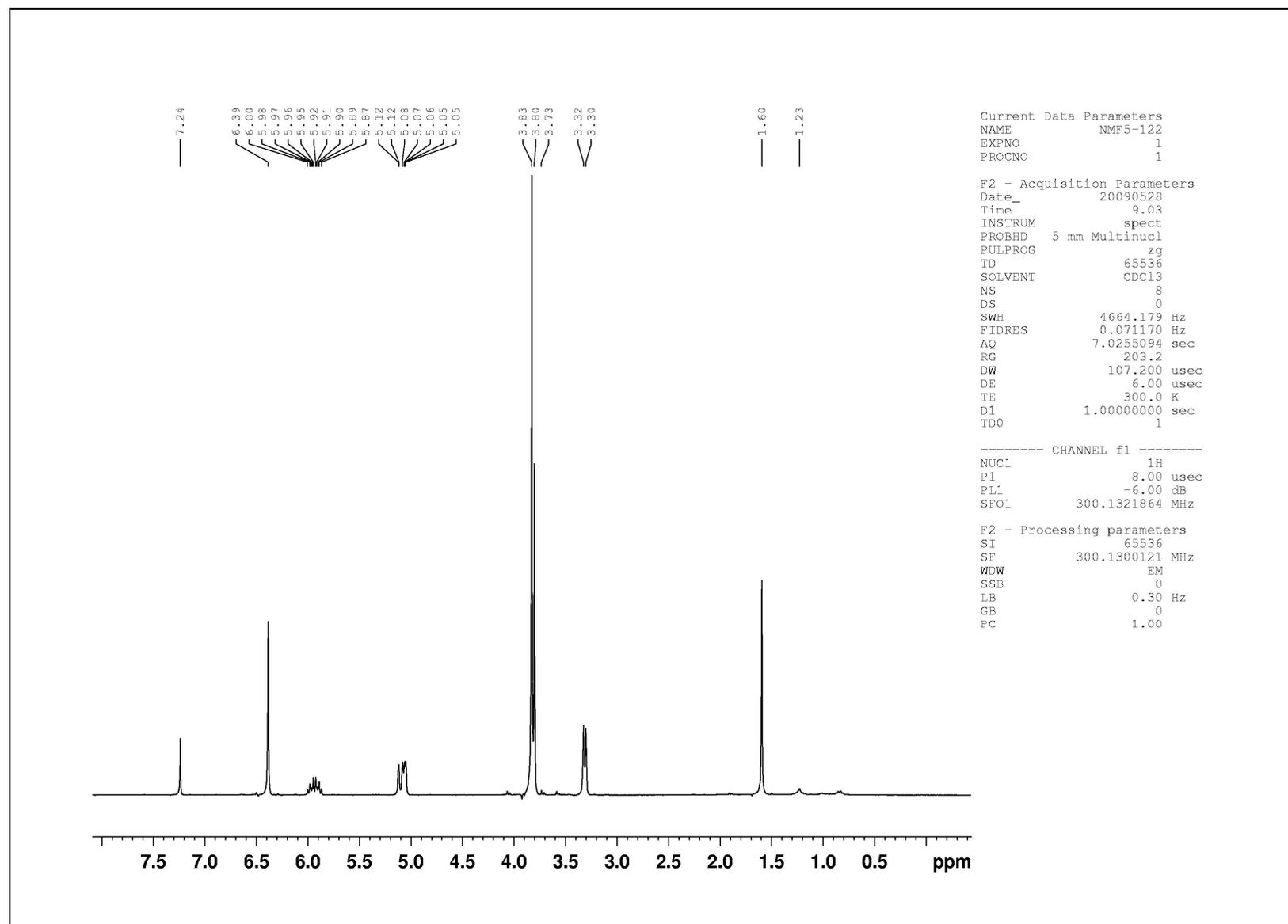
Desta forma, o componente presente foi identificado como sendo 5-álila-1,2,3-trimetoxibenzeno, cujos dados espectrais mostraram-se de acordo com os relatados para elemicina (Tabela 8, pág. 67), componente comumente encontrado em óleos essenciais de plantas aromáticas (VICENZI *et. al.*, 2004; GOTTLIEB *et. al.*, 1981), e já foi isolado das cascas do caule

N. megapotamica (GARCEZ, 2009). Esse composto é relatado como inseticida natural (LIU *et al.*, 2003).

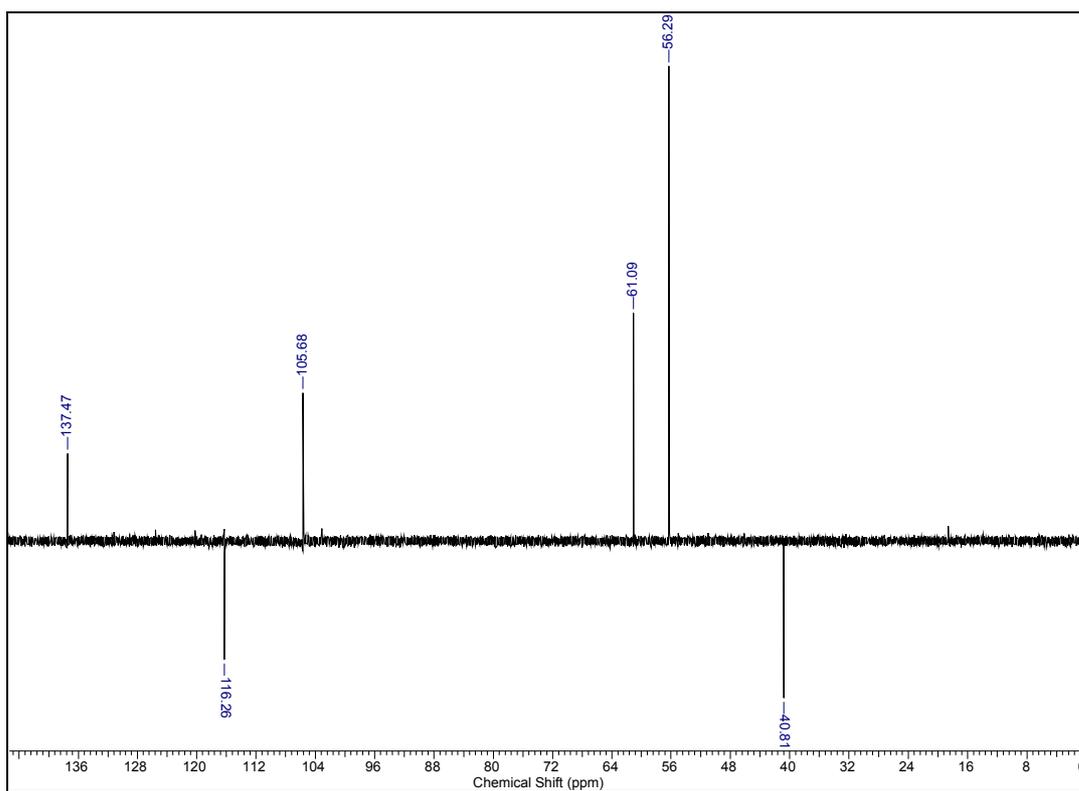
Tabela 8. Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e RMN de ^{13}C (75MHz, CDCl_3) da elemicina (6) e dados relatados na literatura. (FUJITA *et al.*, 1972)

H/C	δ_{H}	δ_{H} lit.	δ_{C}	δ_{C} lit.
1	-	-	137,1	136,2
2,6	6,39 s	6,41 s	105,7	105,3
3,5	-	-	153,0	153,1
4	-	-	135,5	135,8
7	3,32 d (6,7 Hz)	3,32 d (6,5 Hz)	40,4	40,5
8	5,95 m	5,95 m	137,2	137,2
9	5,12 m	5,12 m	116,3	116,0
OCH ₃ 3,5	3,82 s	3,85 s	56,3	56,1
OCH ₃ 4	3,80 s	3,82 s	61,1	60,8

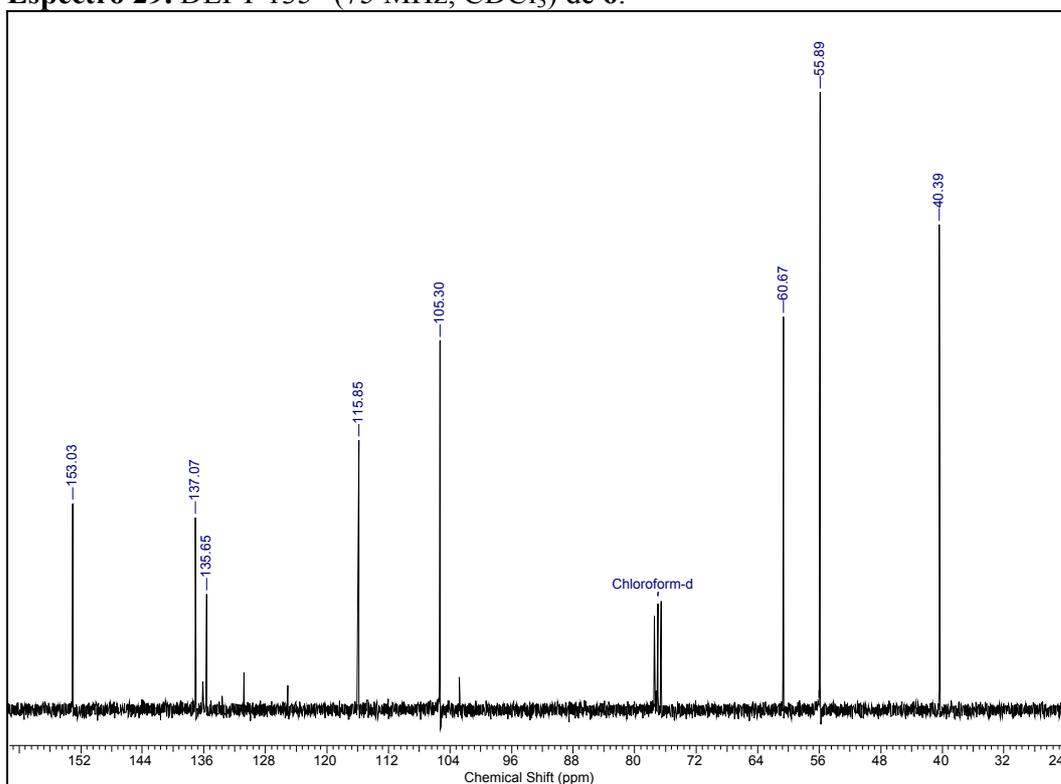




Espectro 28. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de 6.

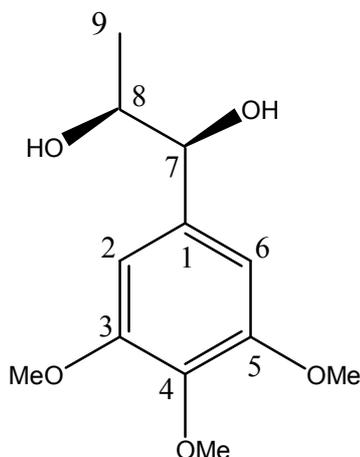


Espectro 29. DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de **6**.



Espectro 30. RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de **6**.

4.2.4 Identificação de *treo*-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol (7)



O composto 7 foi obtido na fração NMCrA-C4-B após fracionamentos cromatográficos descritos no item 3.2.3.1, página 29.

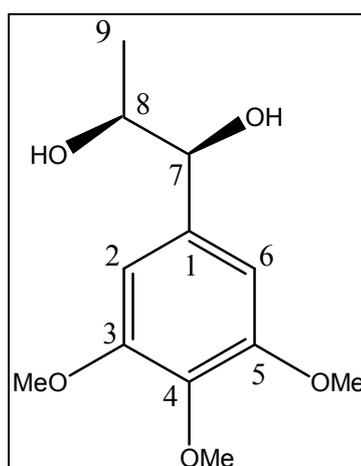
Os espectros de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C (espectros 31-33, pág. 72-73) revelaram que a estrutura do componente principal desta fração apresentava o mesmo padrão de substituição de anel aromático presente nos três fenilpropanóides descritos nos item 4.2.1 a 4.2.3. No entanto, os sinais relativos aos hidrogênios olefinicos da cadeia lateral estavam ausentes, tendo sido substituídos por um duplete a 4,28 δ ($J = 9,0$ Hz) e um multiplete a 3,83 δ (parcialmente encoberto pelos sinais das metoxilas), além de um duplete a 0,99 δ ($J = 9,0$ Hz) indicativo da presença de uma metila terminal vizinha a um carbono metínico (espectro 31, pág. 72). Nos espectros de RMN de ^{13}C (espectro 33, pág. 73) e DEPT – 135° (espectro 32, pág. 73) foram observados sinais referentes a dois carbonos carbinólicos a 72,8 δ e 80,1 δ e a um carbono metílico a 19,3 δ atribuídos a C-8, e C-7 e C-9, respectivamente. Estes conjunto de dados (tabela 9, pág. 71) indicou que o fenilpropanóide presente na fração tratava-se de *treo*-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol.

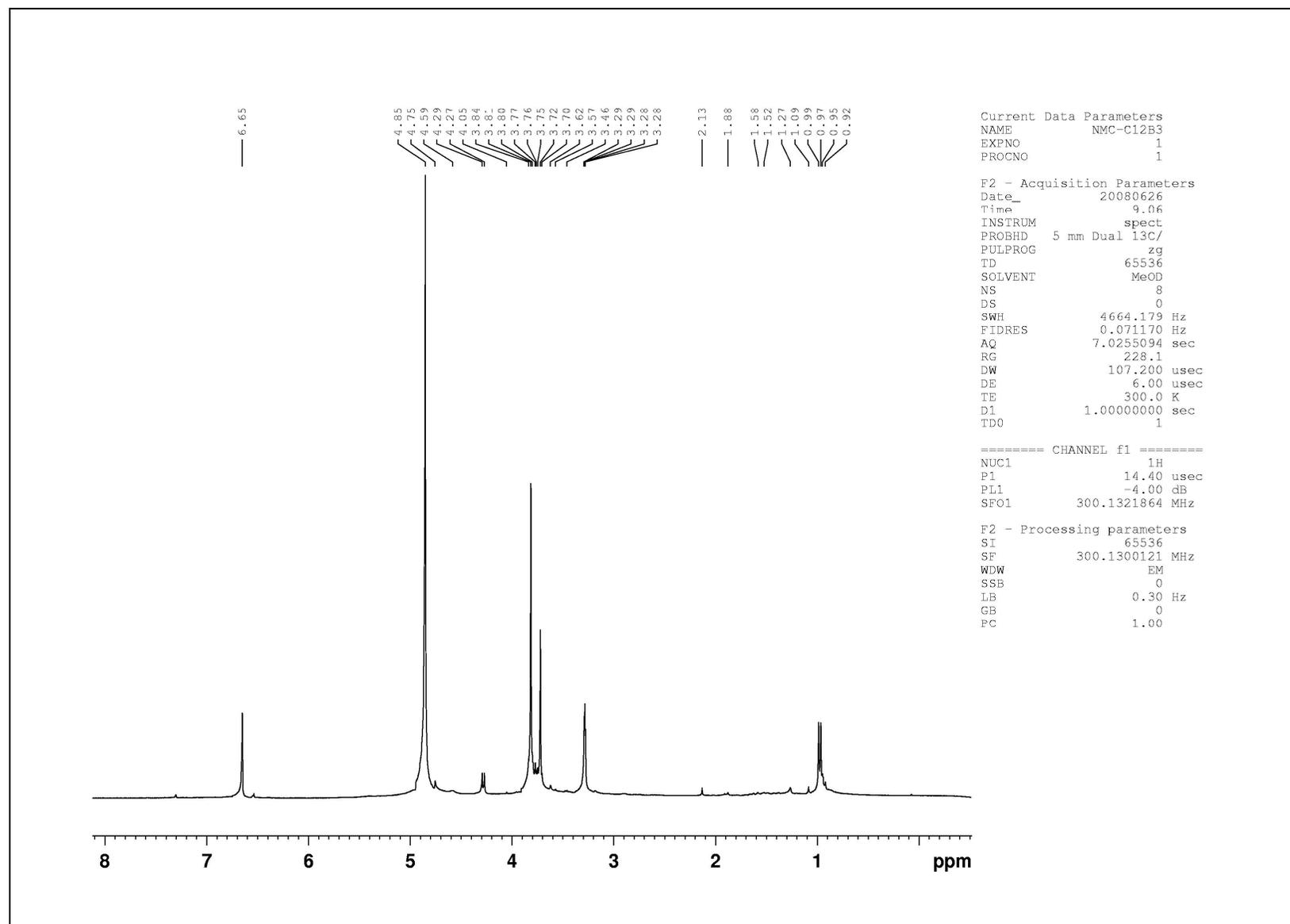
A confirmação da estereoquímica relativa da cadeia lateral do composto foi determinada pelo valor da constante de acoplamento entre os hidrogênios H-7 e H-8 (9,0 Hz). Segundo a literatura, em isômeros *eritro* de fenilpropanóides semelhantes ao obtido no presente trabalho, o valor da constante de acoplamento entre H-7 e H-8 é de 4Hz aproximadamente, enquanto que em isômeros *treo* este valor é de aproximadamente 7 – 8 Hz (BALBUL *et al.*,1996; LEE, A. L. & LEY, S. V., 2003). Portanto, o composto presente na fração é *treo*-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol. Esse composto já foi obtido das cascas do caule de um exemplar estudado em

nossol laboratório *N. megapotamica* (GARCEZ *et. al.*, 2009), quando foi descrito pela primeira vez como um composto de origem natural.

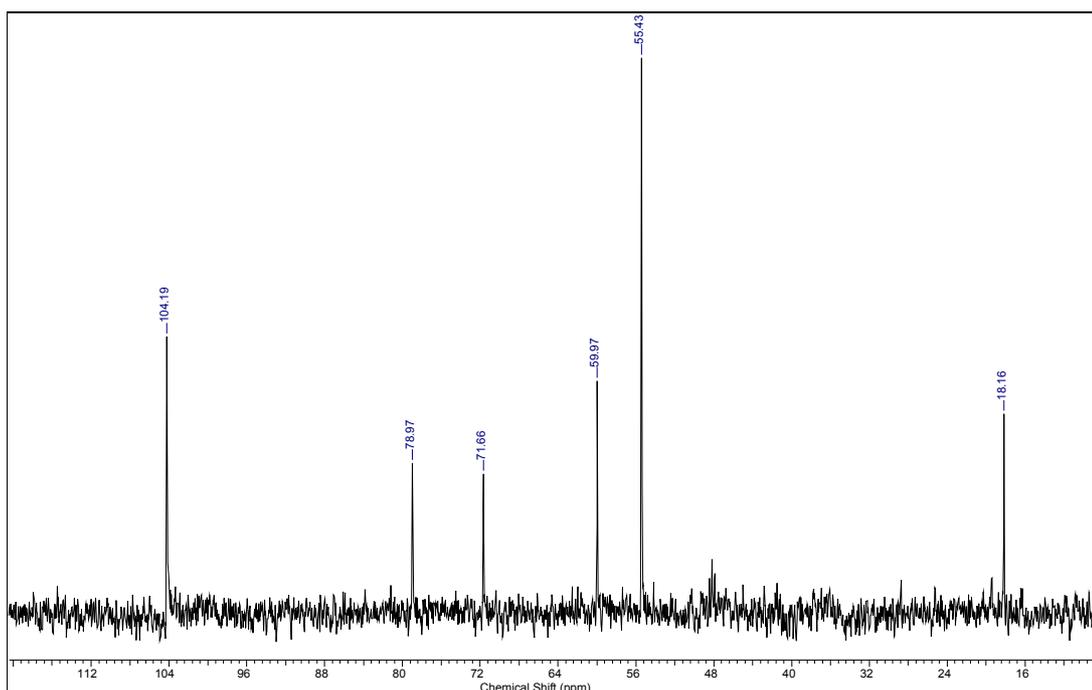
Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) e de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de *treo*-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol (7).

H/C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	138,4
2,6	6,65 s	105,4
3,5	-	154,3
4	-	138,4
7	4,27 d (9,0 Hz)	80,1
8	3,83 m	72,8
9	0,99 d (9,0 Hz)	19,3
OCH ₃ 3,5	3,83 s	56,6
OCH ₃ 4	3,73 s	61,1

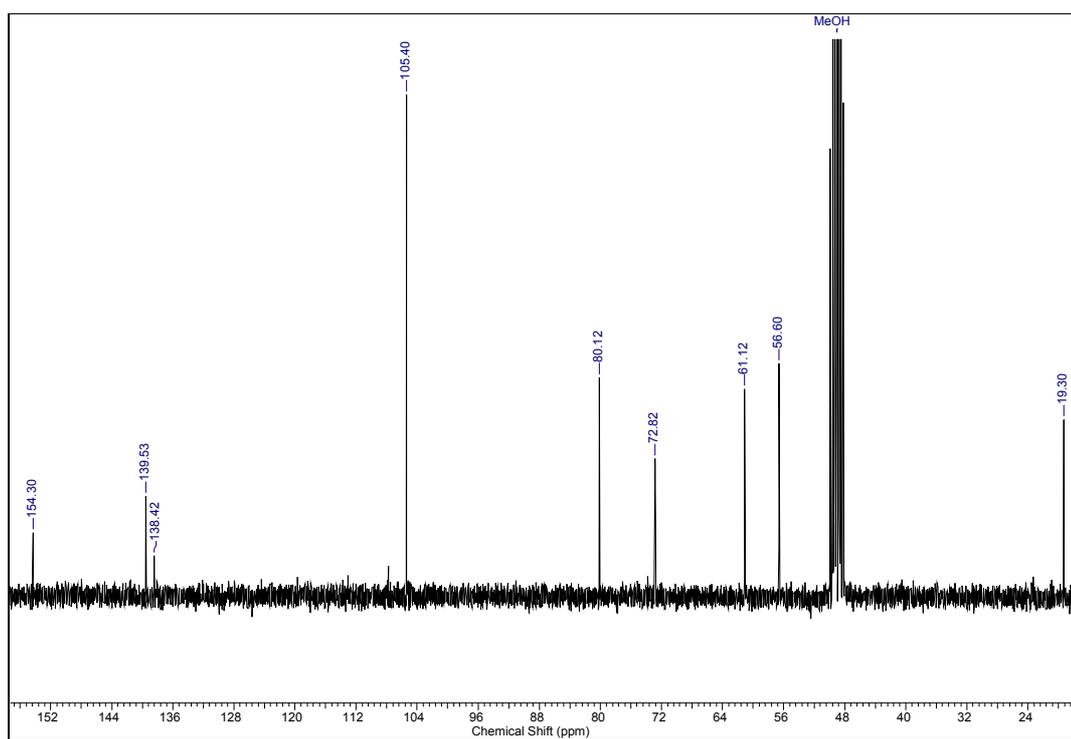




Espectro 31. RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de 7.

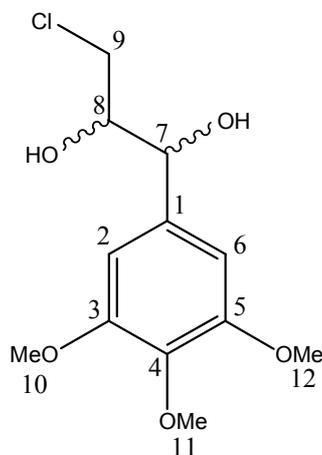


Espectro 32. DEPT 135° (75 MHz, CD₃OD) de 7.



Espectro 33. RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) de 7.

4.2.5 Identificação de 3-cloro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol (8)



A substância 8 foi obtida na fração NMCrA-C1-2B5, de acordo com fracionamentos cromatográficos descritos no item 3.2.3.2, página 30.

Os dados espectrais de RMN de ^1H , DEPT 135° e RMN de ^{13}C (espectros 34, 35, 36 pág. 77 e 78) revelaram que apresentava os mesmos sinais presentes nos espectros dos fenilpropanóides isolados anteriormente (item 4.2.1 a 4.2.4; págs. 58 a 70) relativos ao anel aromático 3,4,5-trimetoxilado (3,75 δ /61,1 δ ; 3,85 δ /56,4 δ e 6,73 δ /105,5 δ), contendo uma cadeia lateral em C-1. Os demais sinais presentes nestes espectros indicaram que a modificação na estrutura estaria localizada na cadeia lateral.

As informações que permitiram definir a estrutura desta cadeia foram obtidas a partir dos demais sinais presentes nos espectros de RMN de ^{13}C (espectro 36, pág. 78) e DEPT 135° (espectro 35, pág. 78), assim como dos dados espectrais do produto do produto 8a, resultante da acetilação de 8.

O espectro de RMN de ^{13}C de 8 mostrou, em conjunto com o espectro DEPT 135° , um sinal de carbono metilênico a 47,0 δ e de dois carbonos carbinólicos a 75,9 e 76,3 δ . No espectro de IV (espectro 37, pág. 79), uma absorção característica de hidroxila alcoólica foi observada a 3425 cm^{-1} , o que confirmou a proposta. O valor de 47,0 δ obtido para o carbono metilênico foi sugestivo para presença de um átomo de cloro ligado no carbono terminal da cadeia. Dessa forma, foi proposta a estrutura de 8 como sendo 3-cloro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol, seus dados espectrais estão listados na tabela 10, pág. 76.

Uma vez que a amostra era de natureza polar, o que impedia a obtenção de um espectro de massas por impacto de elétrons (70 eV) e na ausência de um outro

espectrômetro de massas na Instituição que operasse através de técnicas suaves de ionização, submeteu-se o composto 8 a uma reação de acetilação, de modo a permitir a obtenção do espectro de massas e assim, confirmar a proposta estrutural.

No espectro de IV (espectro 40, pág. 82) do produto obtido 8a, a banda relativa aos grupos hidroxila presentes em 8 não foi mais observada, tendo sido substituída por uma absorção a 1780 cm^{-1} , relativa à carbonila de éster.

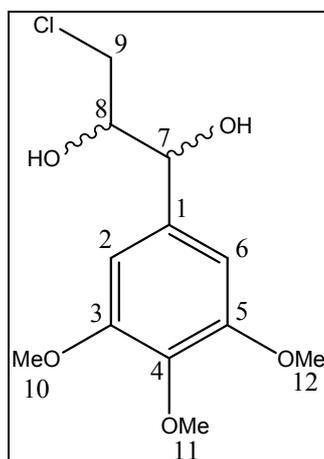
No espectro de RMN de ^1H (espectro 38, pág. 81) de 8a mostrou, além dos sinais relativos ao anel aromático 3,4,5-trimetoxilado e um multiplete a $3,62\ \delta$, dois singletos $2,02$ e $2,12\ \delta$ indicativos da presença de dois grupos acetato, assim como um dubleto a $5,97\ \delta$ ($J= 6,0\ \text{Hz}$) e um multiplete a $5,36\ \delta$, compatíveis com a localização destes grupos em C-7 e C-8 da cadeia lateral.

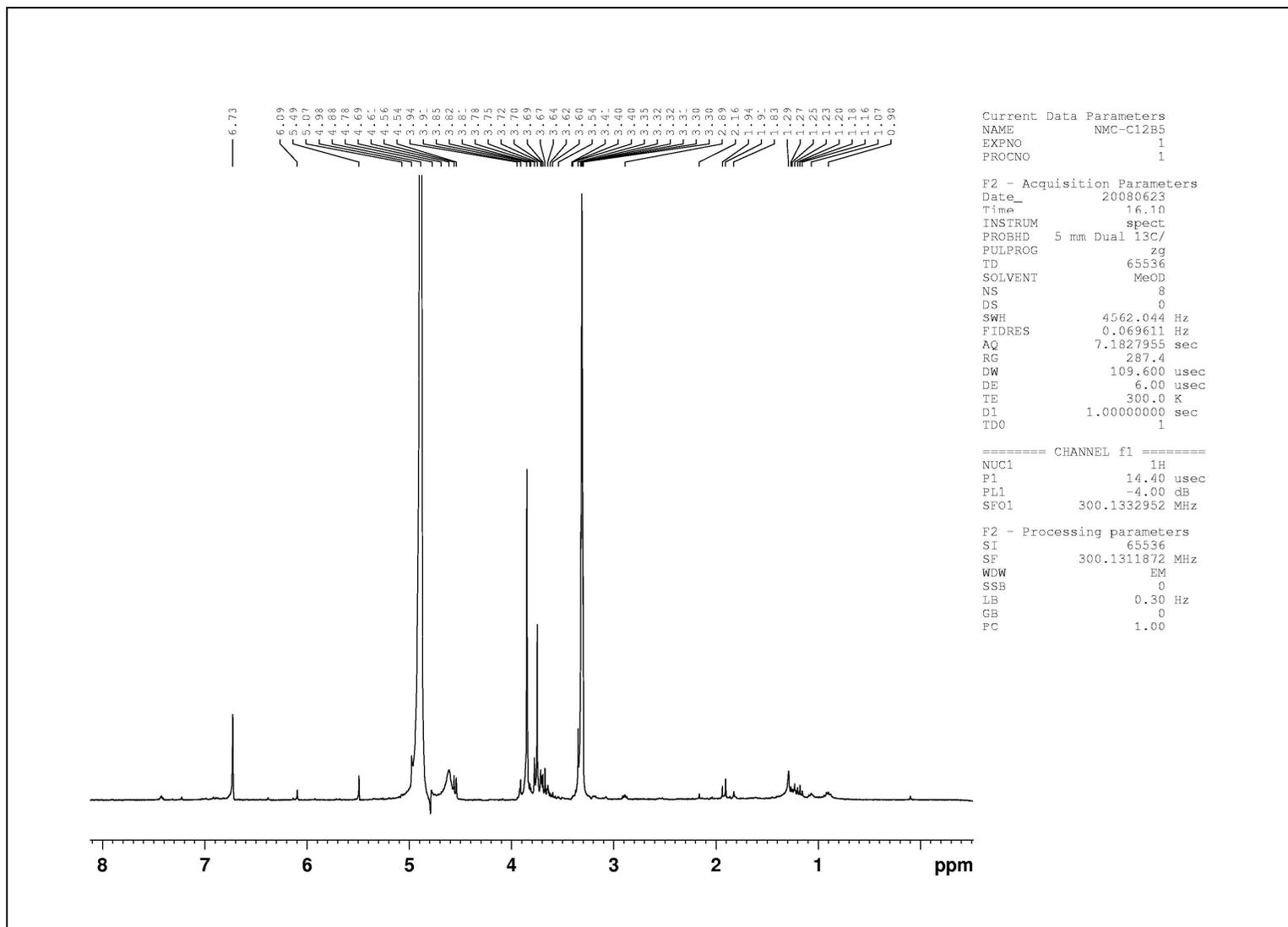
No espectro de RMN de ^{13}C de 8a (espectro 39, pág. 82), os sinais relativos às duas carbonilas e metilas dos grupos acetato foram observados a $169,4/169,9\ \delta$ e $20,8/21,0$, respectivamente. Este espectro também mostrou os sinais dos carbonos oximetínicos a $73,6$ e $73,8\ \delta$ e o do carbono metilênico C-9 a $42,1\ \delta$.

A análise do espectro de baixa resolução a $70\ \text{eV}$ (espectro 41, pág. 83) do composto acetilado 8a mostrou dois picos a $m/z\ 360\ [M]^+\bullet$ e $362\ [M+2]^+\bullet$ e com uma relação de abundância relativa de aproximadamente 3:1, respectivamente. Estes dados foram compatíveis com a presença de um único átomo de cloro na estrutura de 8a, definida como mostrada na figura 26, sendo seus dados espectrais mostrados na tabela 10, página 76. Assim, a estrutura proposta para o fenilpropanóide 8 foi confirmada como sendo correspondente a 3-cloro-1-(trimetoxifenil)-propan-1,2-diol e o valor de α_D encontrado foi $[\alpha]_D^{20} = +13,2$ ($c. 0,14; \text{CHCl}_3$). Não foram encontrados relatos sobre este composto na literatura, sendo, portanto, inédito, embora já se tenha relato de um fenilpropanóide clorado do tipo 1,3,4-trissubstituído, denominado *treo*-3-cloro-(4-hidróxi-3-metoxifenil)-propano-1,2-diol, isolado de *Pimenta dioica* (Myrtaceae) de um espécime coletado na Jamaica. (KIKUZAKI *et. al.*, 1999)

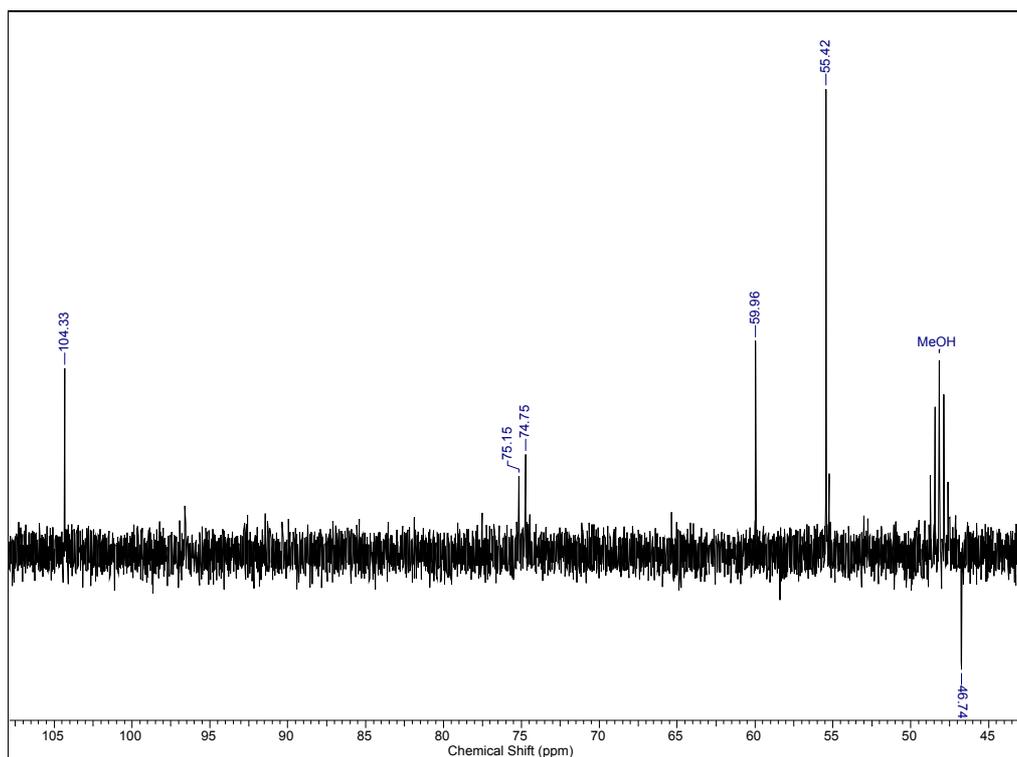
Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CD_3OD) e de RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de 3-cloro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol (8).

H/C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	139,3
2,6	6,73 s	105,5
3,5	-	154,3
4	-	-
7	4,56 d (6,0 Hz)	76,3
8	3,71 m	75,9
9	2,89 d (6,0 Hz)	48,0
OCH ₃ 3,5	3,85 s	56,4
OCH ₃ 4	3,72 s	61,1

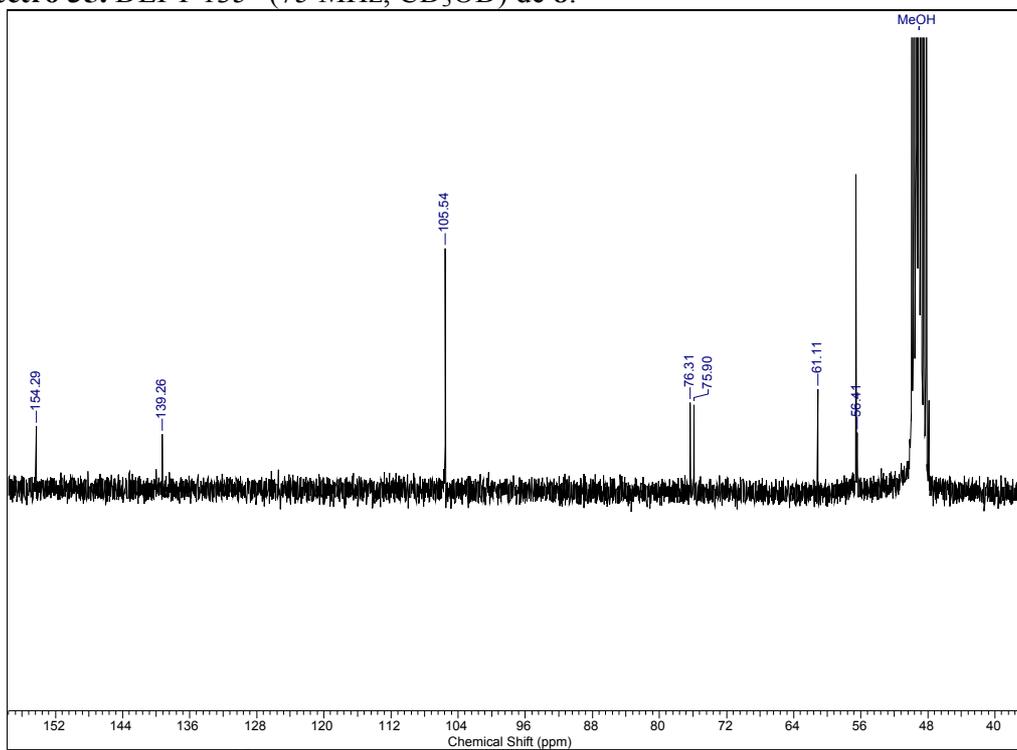




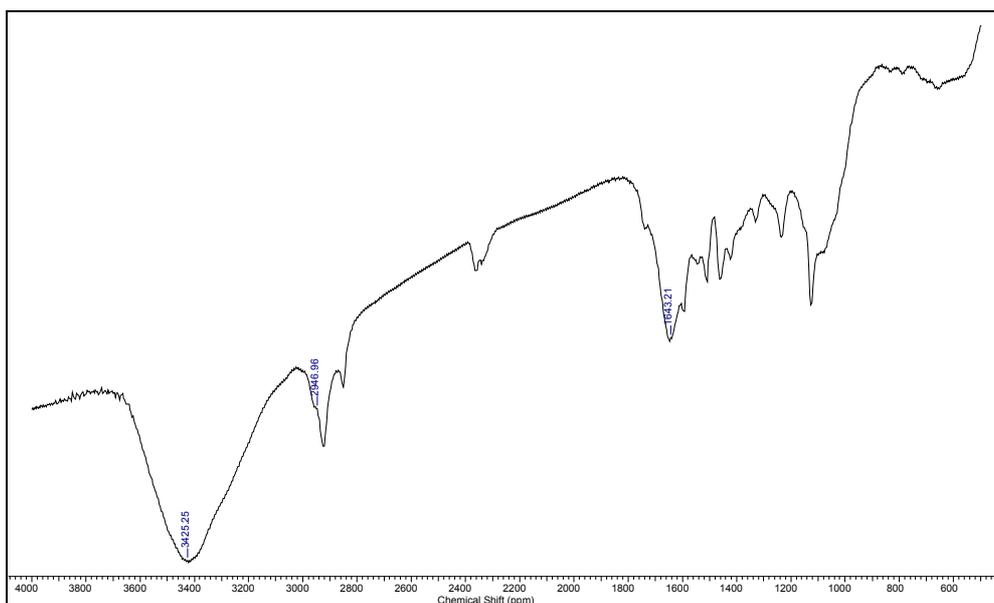
Espectro 34. RMN de ^1H (300 MHz, CD_3OD) de **8**.



Espectro 35. DEPT 135° (75 MHz, CD₃OD) de **8**.



Espectro 36. RMN de ¹³C (75 MHz, CD₃OD) de **8**.



Espectro 37. Infra-vermelho de **8**.

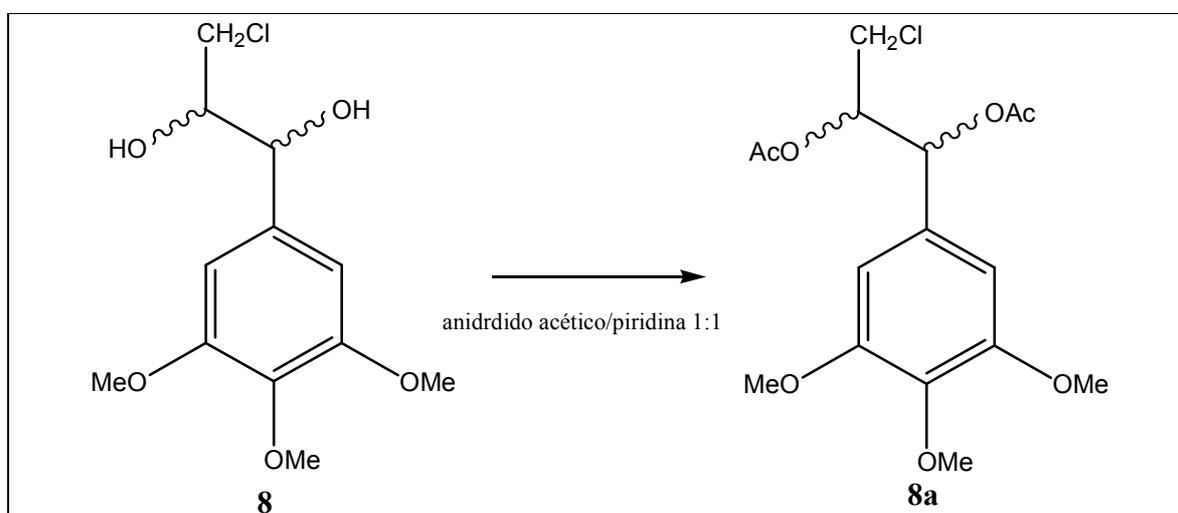


Figura 25: Acetilação de 3-cloro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)propano-1,2-diol (**8**) e o produto diacetilado resultante (**8a**).

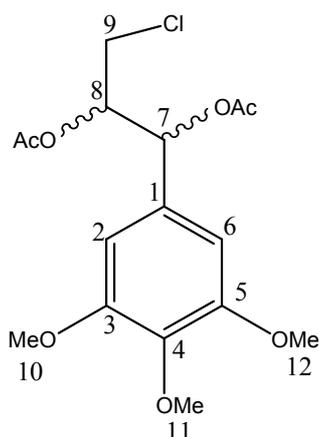
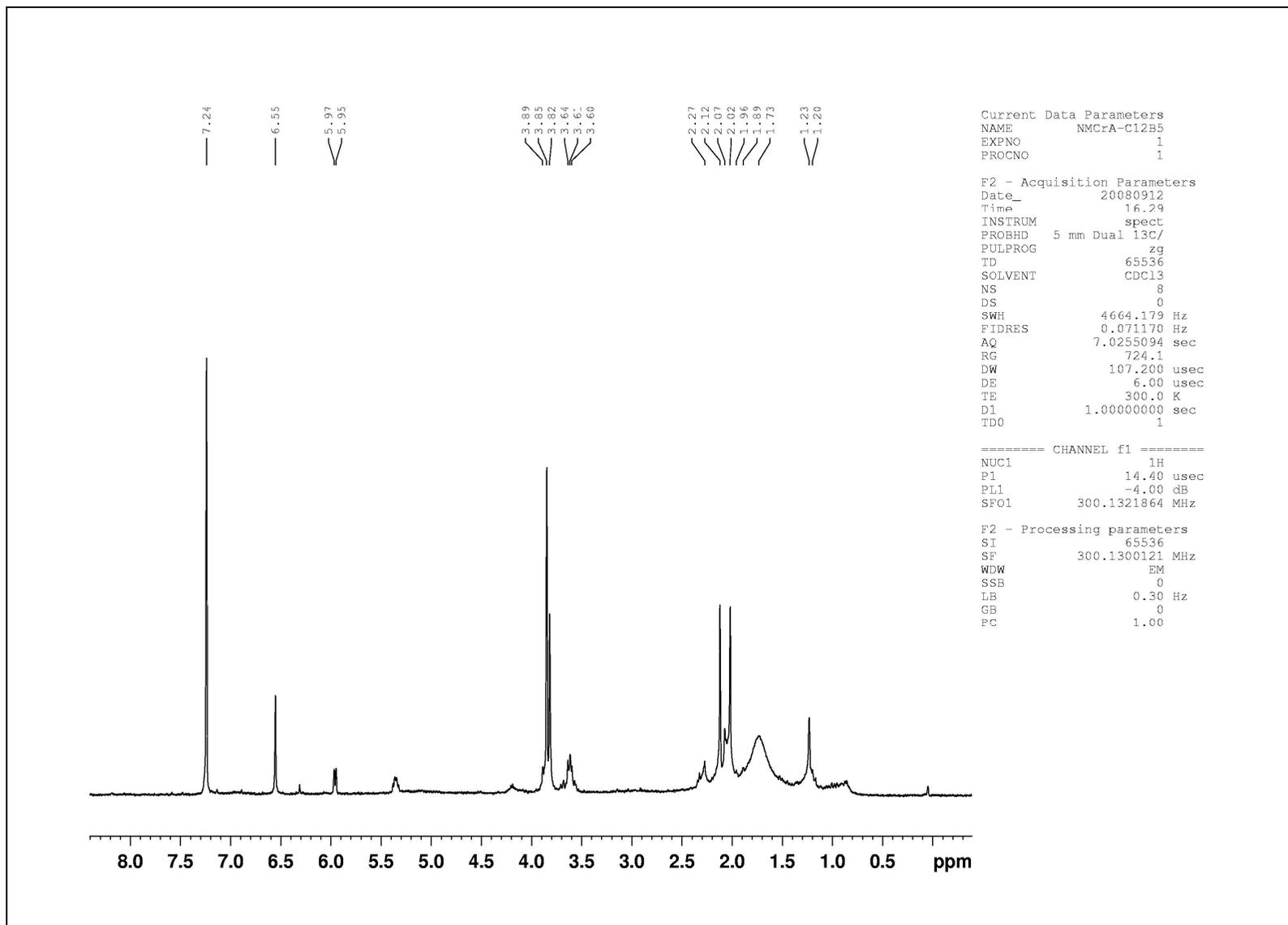


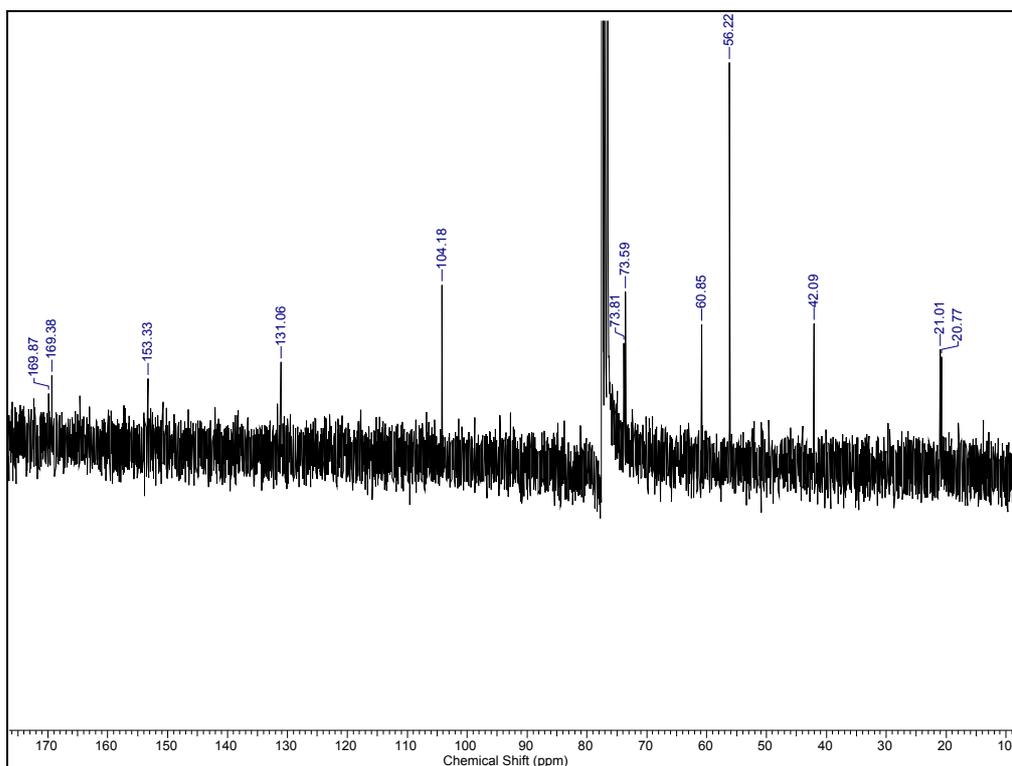
Figura 26: Estrutura do derivado diacetilado 8a obtido a partir de 8.

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) e ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 8a.

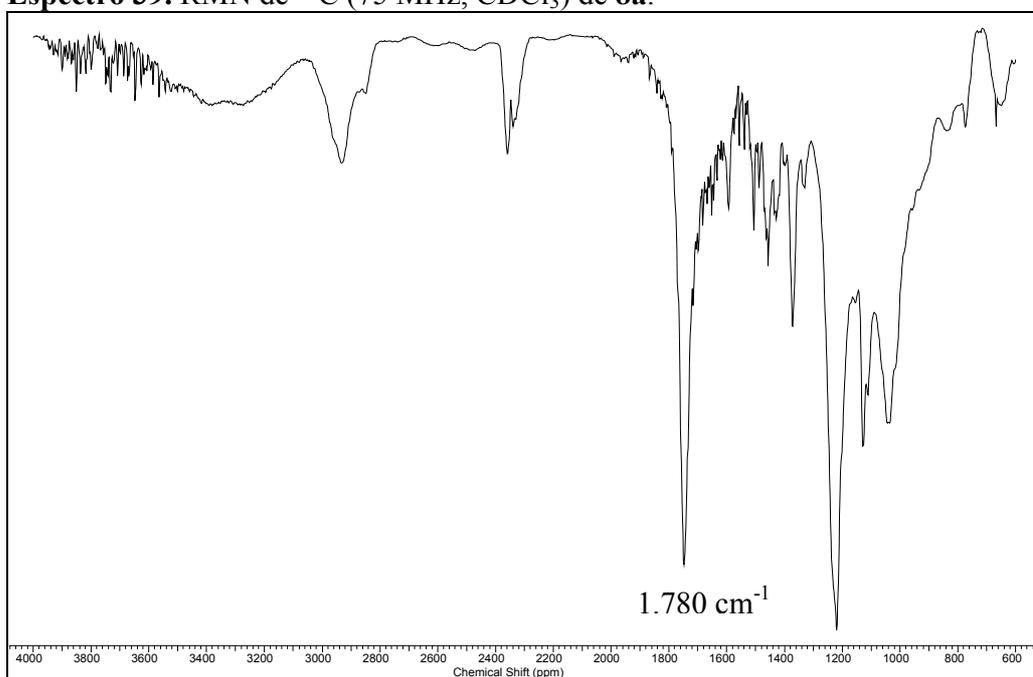
H/C	δ_{H}	δ_{C}
1	-	131,6
2,6	6,55 s	105,5
3,5	-	154,3
4	-	-
7	5,97 d (6,0 Hz)	73,8
8	5,36 m	73,6
9	3,62 m	42,1
OCH_3 3,5	3,85 s	56,5
OCH_3 4	3,82 s	61,0
COCH_3	2,02/ 2,12	20,0/20,7
CO	-	169,8/169,3



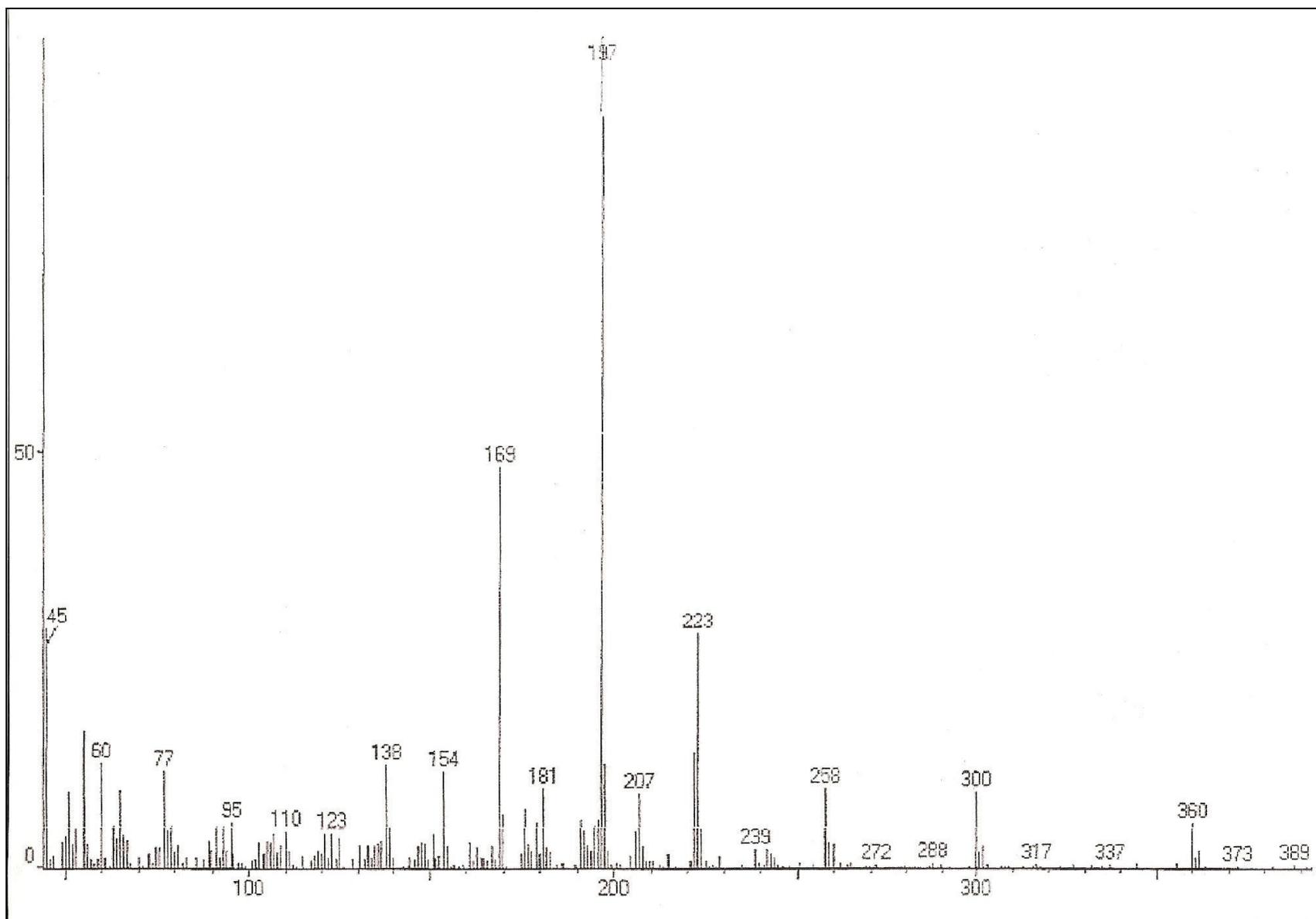
Espectro 38. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **8a**.



Espectro 39. RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **8a**.



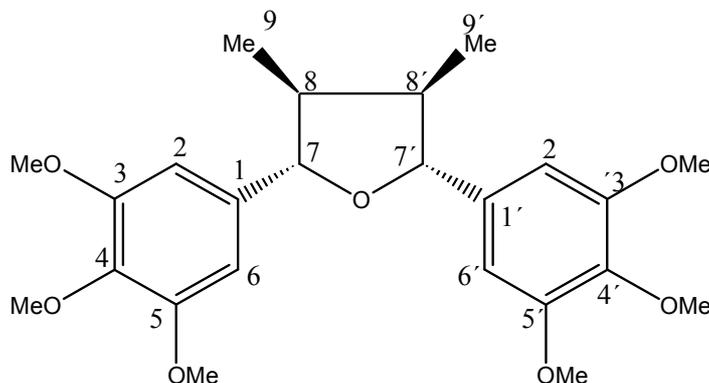
Espectro 40. Infra-vermelho de **8a**.



Espectro 41: Espectro de massas 70 eV de **8a**.

4.3 Neolignana da madeira de *N. megapotamica*

4.3.1 Identificação de *rel*-(7*S*, 8*S*, 7' *R*, 8' *R*) – 3, 3', 4, 4', 5, 5' -hexametoxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana (9)



O composto 9, foi obtido na fração NMCrH-C1-15 a partir de separação cromatográfica da fase hexanica, descritos no item 3.2.2.5, página 27.

Os espectros de RMN de ^1H , de ^{13}C e de DEPT-135° (espectros 42 a 44, pág. 87 e 88) da substância indicaram, da mesma forma que os dos fenilpropanóides isolados (4 a 8), que a estrutura desta substância também possuía um anel aromático 1,3,4,5-tetrassubstituído contendo grupos metoxila nas posições 3, 4 e 5, tendo em vista os valores de deslocamento químico e multiplicidades apresentados pelos sinais observados (Tabela 12, pág. 86). A principal diferença no espectro de RMN de ^1H (espectro 42, pág. 87) com relação aos dos fenilpropanóides consistiu na presença de dois dubletos, um à δ 0,99 ($J = 6,0$ Hz) e 4,45 δ ($J = 6,0$ Hz) e um multipletto na região de 2,20 a 2,30 δ dos H-8,8'. Nos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (espectros 44 e 43, págs. 88) foram observados sinais referentes a um carbono metílico a 13,0 δ , um carbono oximetínico a 87,3 δ e um carbono metínico a 44,2 δ .

Tais informações foram compatíveis com um esqueleto de uma neolignana tetraidrofurânica, especificamente do tipo 7,7'-monoepoxilignana (LE QUESNE *et. al.*, 1980; DA SLIVA FILHO, *et. al.*, 2004; DA SILVA FILHO *et. al.*, 2008; MORO *et. al.*, 1987; DE MELO *et. al.*, 2004; AGRAWAL & THAKUR, 1985).

Os valores de deslocamento químico dos grupos metila equivalentes (δ_{H} 0,99), assim como dos hidrogênios benzílicos H-7 e H-7' (δ_{H} 4,45) indicaram uma relação *trans*

entre os grupos arila e metila (CONSERVA *et. al.*, 1990; RAO & ALVAREZ, 1982) no esqueleto 9, sendo que a relação *cis* entre os grupos Me/arila seriam observados sinais a 0,65 δ para o hidrogênio metílico.

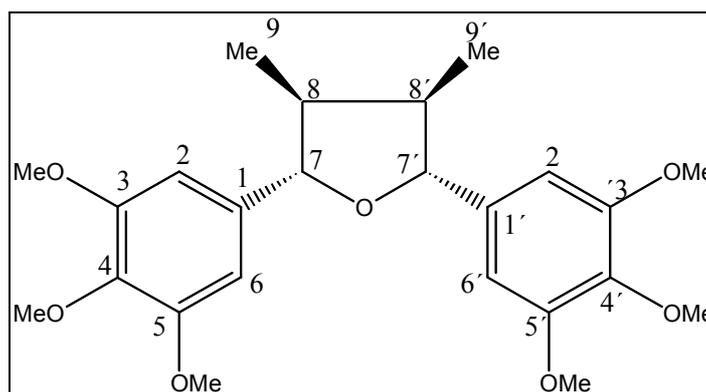
De acordo com a literatura, neolignanas do tipo diariltetraidrofurânicas que possuem os grupos arila em posição pseudoequatoriais com orientação *trans* em relação aos grupos metila pseudoequatoriais, estando estas numa orientação *cis* uma em relação à outra, apresentam valores típicos de deslocamento químico para os carbonos metílicos C-9/C-9' (δ em torno de 13 ppm), carbonos oxibenzílicos C-7/C-7' (δ aproximadamente 87 ppm) e carbonos metínicos C-8/C-8' (δ em torno de 44 ppm) (AGRAWAL & THAKUR, 1985; FONSECA *et. al.*, 1979). Além disso, o valor observado para o multiplete relativo aos hidrogênios equivalentes H-8/H-8' (2,20-2,30 δ) corroborou a configuração *cis* entre as duas metilas 9/9' (DOMINGUEZ *et. al.*, 1990).

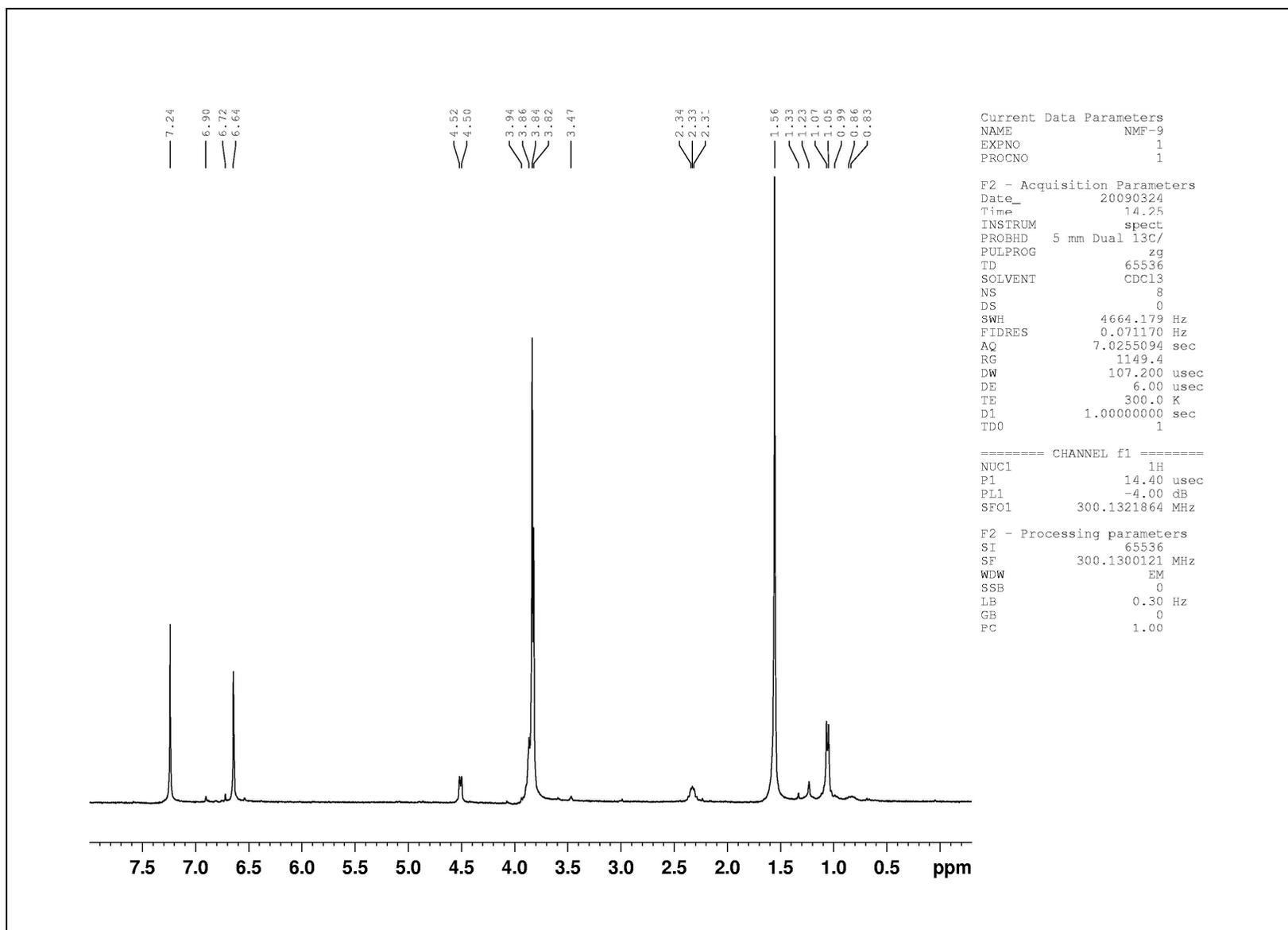
Desta forma, a estrutura de 9 foi estabelecida, correspondendo a uma neolignana de configuração *meso*, apresentando uma relação *trans* entre os grupos arila e as metilas 9/9', estando com orientação *cis* uma em relação a outra. O valor de $[\alpha]_D = 0^\circ$ observado para 9 (2 g/100 mL; CHCl₃) reforçou a proposta.

Seus dados espectrais (tabela 12, pág. 86) mostraram-se semelhantes aos descritos na literatura para a neolignana 2,5-bis-(3', 4', 5'-trimetoxifenil)-3, 4-dimetiltetraidrofurano, de nome *rel*-(7*S*, 8*S*, 7'*R*, 8'*R*) – 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexametoxi-7.O.7- 8, 8'-lignana, isolado *Aristolochia birostris* - Aristolochiaceae (CONSERVA *et. al.*, 1990) e *Bonamia spectabilis* - Convolvulaceae (TOFFERN *et. al.*, 2000; KRAFT *et. al.*, 2002), sendo o primeiro relato na família Lauraceae.

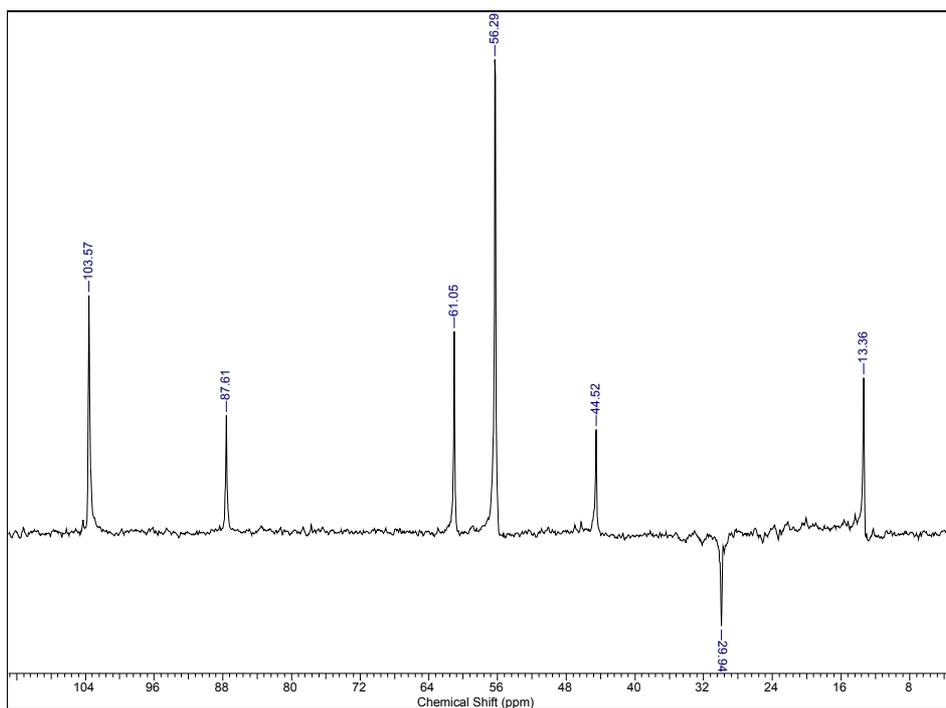
Tabela 12: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3). e de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de *rel*-(7*S*, 8*S*, 7'*R*, 8'*R*) – 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexametoxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana (9) e dados de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) relatados para esta substância na literatura por Tofern *et al.*, 2000.

H/C	δ_{H}	δ_{C}	$\delta_{\text{CLit.}}$
1	-	137,9	137,9
2,6	6,64 s	103,3	103,4
3,5	-	153,1	153,3
4	-	137,3	137,5
7	4,50 d (6,0 Hz)	87,5	87,4
8	2,31-2,34 m	44,5	44,3
9	0,99 d (6,0 Hz)	13,3	13,1
3,3',3'', 5, 5',5''- OMe	3,86 s	56,2	56,1
4, 4',4''- OMe	3,82 s	61,0	60,8

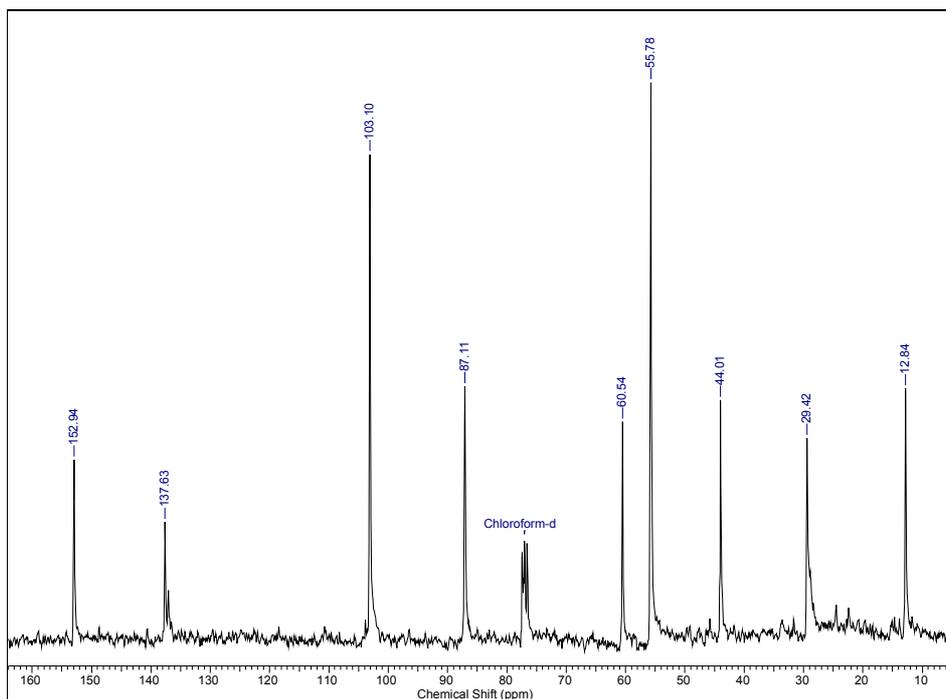




Espectro 42. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **9**.



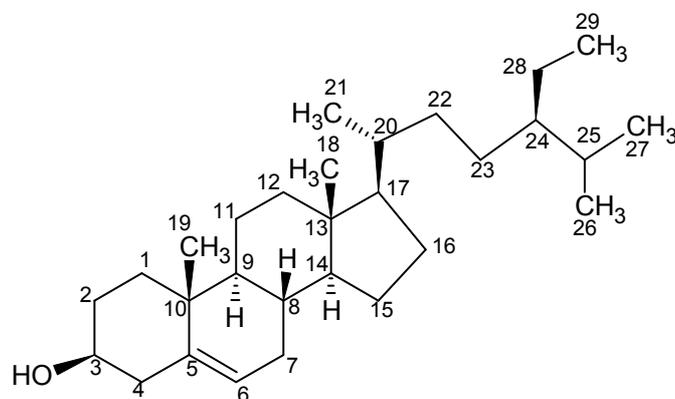
Espectro 43. DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de **9**.



Espectro 44. RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de **9**.

4.4 Esteróide da madeira de *N. megapotamica*

4.4.1 Identificação de β -sitosterol (10)



O composto 10 foi obtido na fração NMCrH-C1-12 de acordo com a metodologia descrita no item 3.2.2.4, página 27.

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C dessa fração revelou a presença de sinais característicos de um composto de natureza triterpênica ou esteroidal.

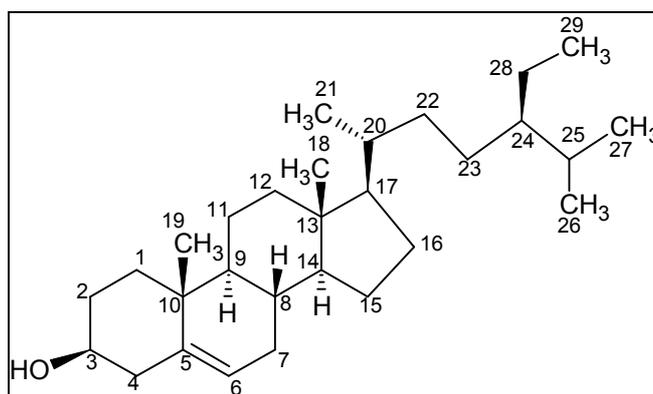
No espectro de RMN ^1H (espectro 45, pág. 91) foram identificados seis grupos metila na região de 0,83 δ a 1,18 δ , além de um sinal a 5,32 δ , atribuído a um hidrogênio ligado a carbono sp^2 e um multiplete na região de 3,85 δ correspondente a um hidrogênio carbinólico.

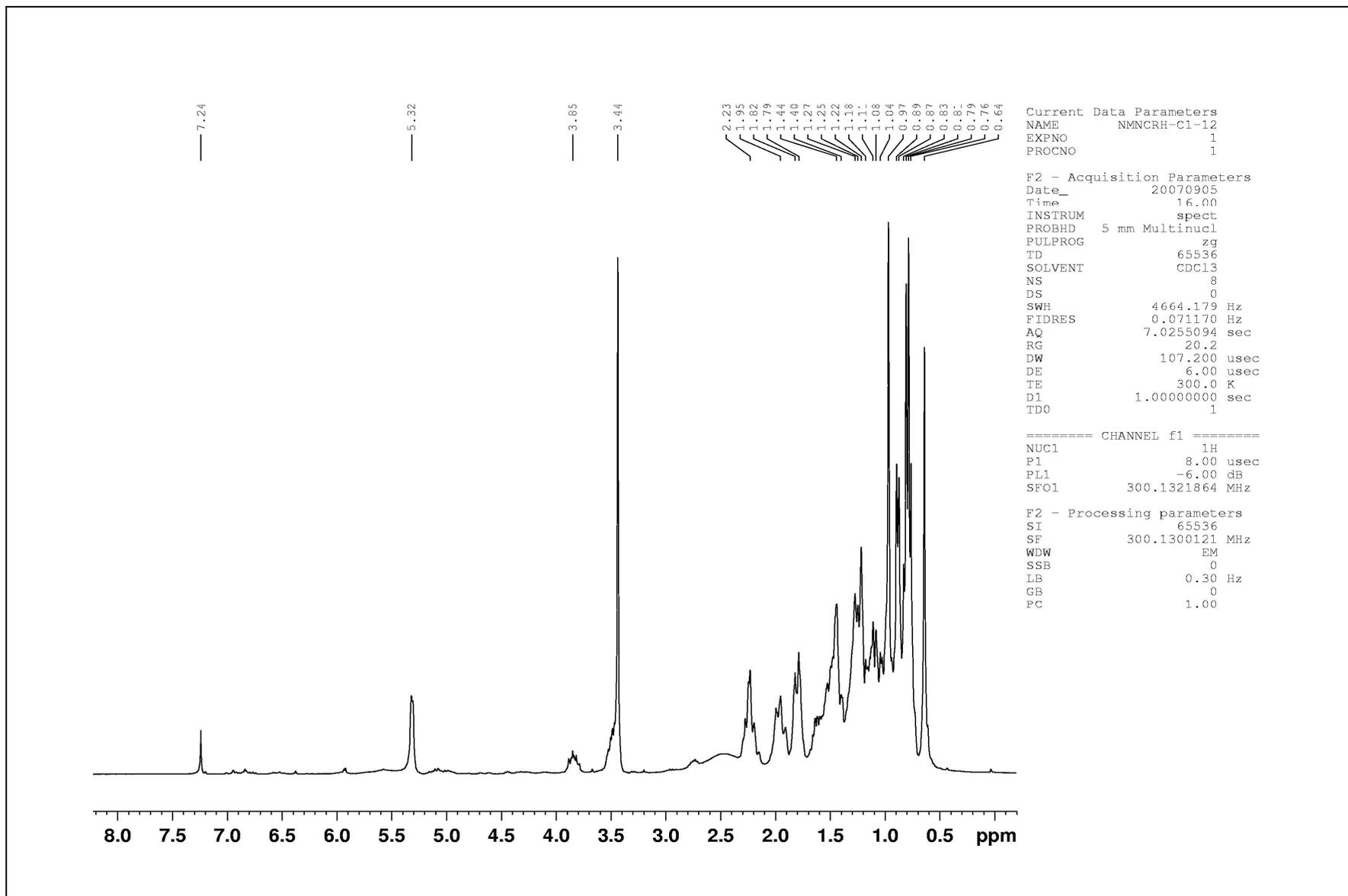
A análise do espectro de RMN de ^{13}C (espectro 47, pág. 92) aliada aos dados de obtidos do espectro DEPT 135° (espectro 46, pág. 92) indicou a presença de seis metilas (na região de 11,9 a 19,8 δ), um carbono carbinólico a 71,8 δ uma ligação dupla trissubstituída (sinais a 121,7 e 140,7 δ), além de sinais de onze carbonos metilênicos e mais sete carbonos metínicos e dois quaternários.

Com base nos dados espectrais apresentados (tabela 13, pág. 90) e por comparação com os descritos na literatura (WRIGHT *et al.*, 1978), o composto presente na fração NMCrH-C1-12 foi identificado como o esteróide β -sitosterol.

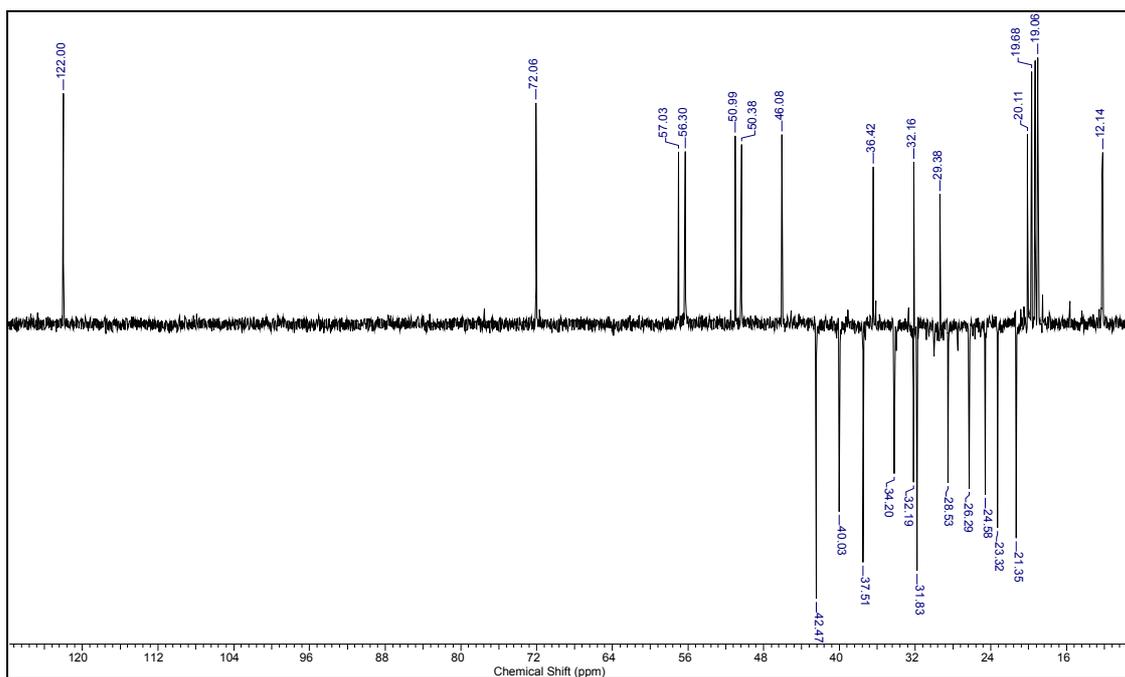
Tabela 13: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do β -sitosterol (10) e dados relatados na literatura (WRIGHT *et al.*, 1978).

C	δ_{C}	δ_{C} literatura	C	δ_{C}	δ_{C} literatura
1	37,3	37,3	16	28,3	28,9
2	31,5	31,6	17	56,1	56,1
3	71,4	71,7	18	11,9	11,9
4	42,2	42,3	19	19,4	19,4
5	140,7	140,8	20	36,1	36,2
6	121,7	121,6	21	18,8	18,8
7	31,9	31,9	22	33,9	34,0
8	31,8	31,9	23	26,0	26,1
9	50,1	50,2	24	45,8	45,9
10	36,5	36,5	25	29,1	29,2
11	21,1	21,1	26	19,8	19,8
12	39,8	39,8	27	19,0	19,1
13	42,3	42,3	28	23,0	23,1
14	56,8	56,8	29	11,9	12,3
15	24,3	24,3			

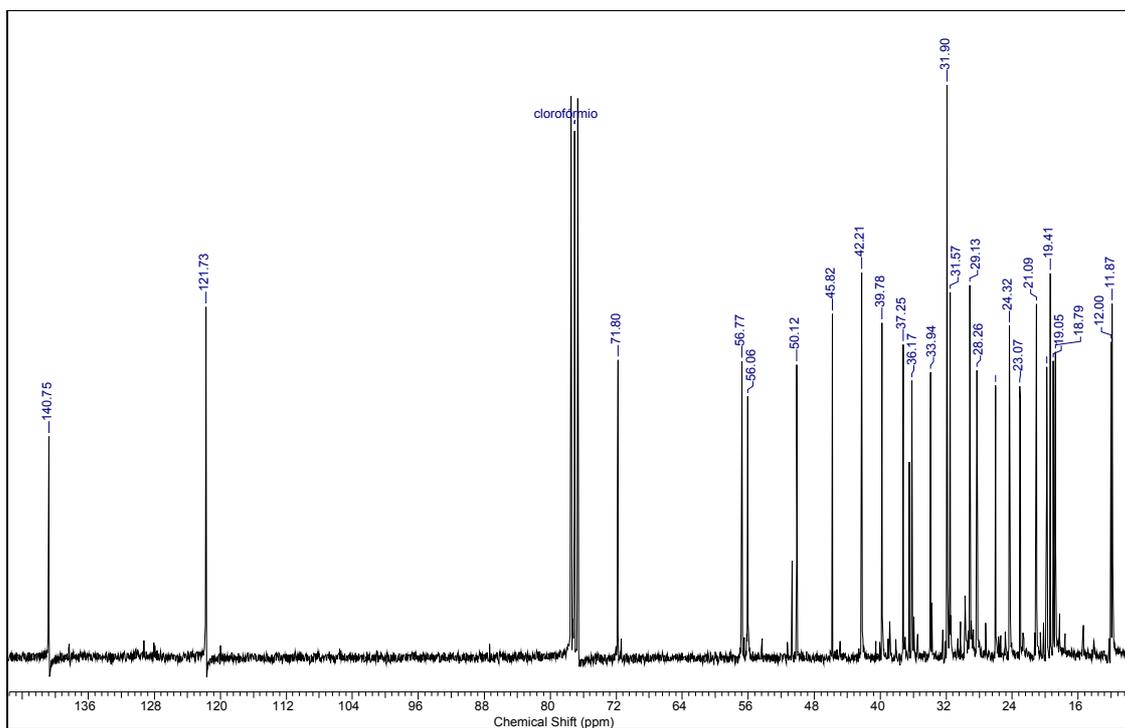




Espectro 45. RMN de ^1H (300MHz, CDCl_3) de **10**.



Espectro 46. RMN DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de **10**.



Espectro 47. RMN de ¹³C (75 MHz, CDCl₃) de **10**.

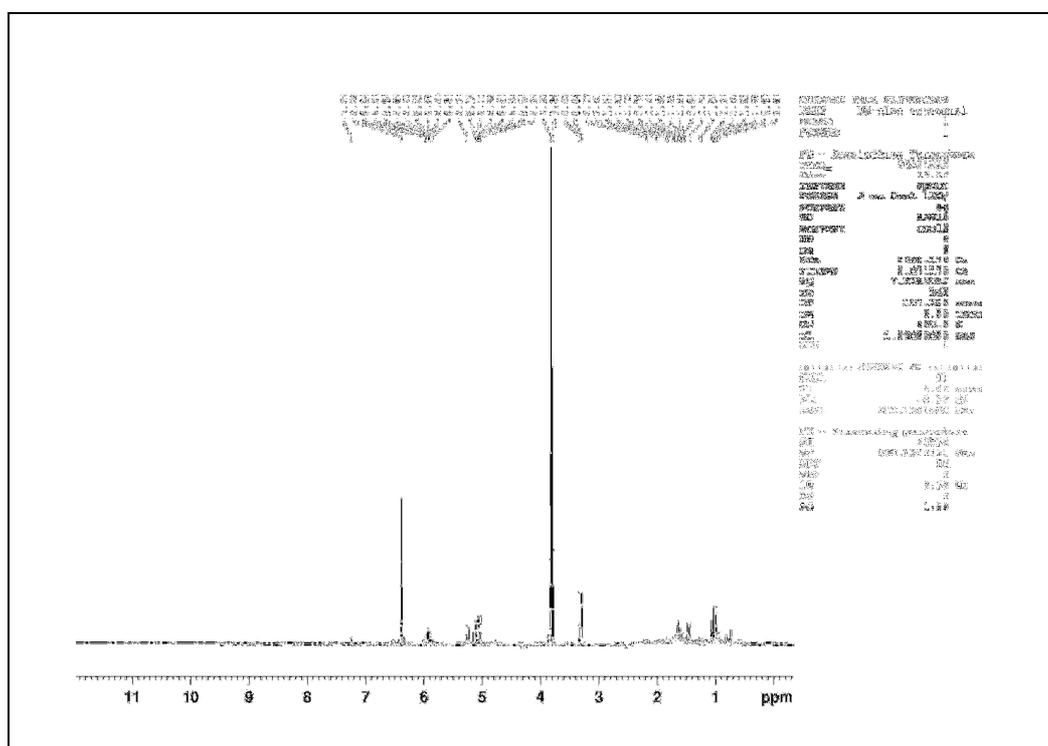
4.5 Composição química do óleo essencial das folhas de *Nectandra megapotamica*

Conforme apresentado no item 1.2 (págs. 16 a 21) da introdução, o estudo químico dos componentes fixos das folhas de *N. megapotamica* ocorrente em Mato Grosso do Sul foi realizado em nosso laboratório (GARCEZ *et. al.*, 2007).

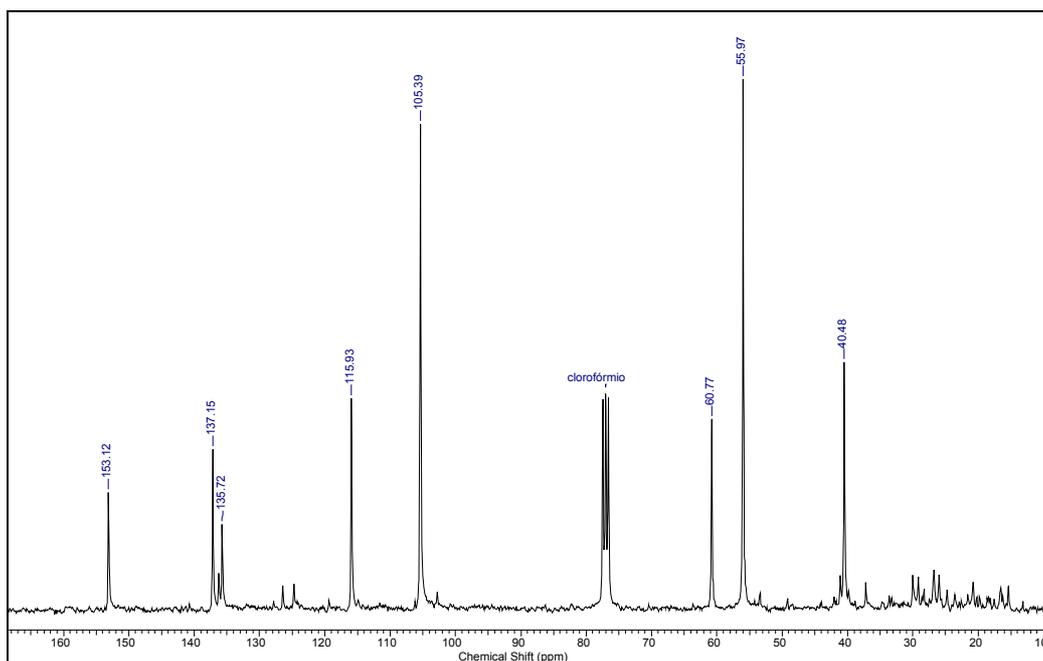
Uma vez que não havia registros na literatura sobre a composição química do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*, decidiu-se investigar também no presente trabalho os componentes voláteis presentes nas folhas deste trabalho.

O óleo essencial foi inicialmente submetido a análise por RMN de ^1H , RMN de ^{13}C e CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas)

De acordo com os espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (espectros 48 e 49, págs. 93 e 94) o óleo apresentou, um componente majoritário identificado como o fenilpropanóide elemicina (6), previamente isolado do extrato etanólico da madeira (descrito no item 3.2.2.3, pág. 27).



Espectro 48. ^1H (300MHz, CDCl_3) do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*.



Espectro 49. RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*

4.5.1 Análise por CG-EM

Os constituintes presentes no óleo e identificados por CG-EM (figura 27, pág. 95) foram identificados com base aos dados de índice de retenção gerados pela equação de Van Den Dool e Kratz, banco de dados Saturn e Nist e pela comparação dos dados com a literatura especializada em óleos essenciais (ADAMS, 1995), sendo as informações apresentadas na tabela 14, página 95

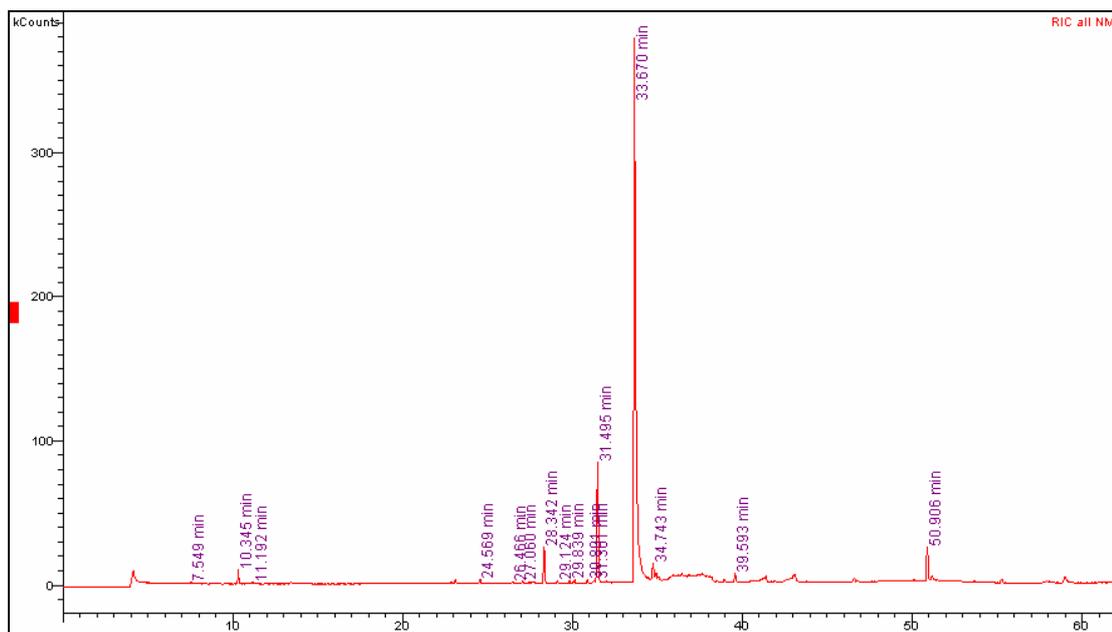


Figura 27. Cromatograma de íons totais do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*.

Tabela 14. Composição do óleo essencial das folhas de um espécime de *N. megapotamica*, coletado em Campo Grande, MS, por CG-EM.

n°	Tr	IR	IR*	Nome	F.M.	%Área
1	7.549	933	931	α -tujeno	$C_{10}H_{16}$	0,036
2	10.345	1010	1011	3- δ -careno	$C_{10}H_{16}$	0,836
3	11.192	1030	1031	limoneno	$C_{10}H_{16}$	0,074
4	24.569	1332	1339	δ -elemeno	$C_{15}H_{24}$	0,072
5	26.466	1376	1373	isoleveno	$C_{15}H_{24}$	0,024
6	27.060	1389	1391	β -elemeno	$C_{15}H_{24}$	0,086
7	28.342	1420	1418	cariofileno	$C_{15}H_{24}$	2,738
8	29.124	1439	1439	α -guaieno	$C_{15}H_{24}$	0,039
9	29.839	1456	1454	α -humuleno	$C_{15}H_{24}$	0,184
10	30.891	1482	1480	germacreno D	$C_{15}H_{24}$	0,133
11	31.301	1492	1491	valenceno	$C_{15}H_{24}$	0,034
12	31.495	1496	1494	biciclogermacreno	$C_{15}H_{24}$	9,838
13	33.670	1551	1554	elemicina	$C_{12}H_{16}O_3$	82,33
14	34.743	1579	1576	espatulenol	$C_{15}H_{24}O$	1,049
15	50.906	2047	-	*	-	2,529

*ADAMS, 1995

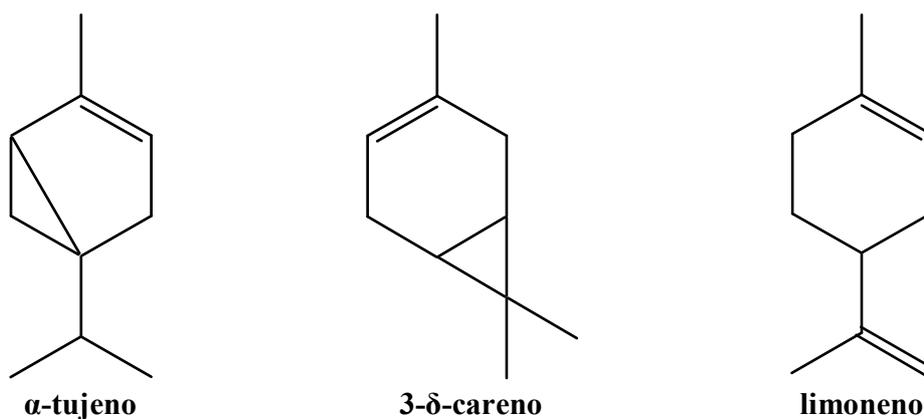
Tr= Tempo de retenção da amostra;

IR= Índice de Retenção da amostra;

IR*=Índice de Retenção do analito na literatura;

- Total de monoterpenos: (3)- α -tujeno; 3-careno; limoneno
- Total de sesquiterpenos: (9)- δ -elemeno; β -elemeno; cariofileno; α -guaieno; α -humuleno; germacreno D; valenceno; biciclogermacreno
- Total de sesquiterpenos oxigenados: (1)- espatulenol
- Total de fenilpropanóides: (1)- elemicina
- Total de diterpenos: (1)* - não identificado com base nas informações presentes nos bancos de dados)

A análise em CG-EM do óleo essencial *N. megapotamica*, coletado em Campo Grande resultou na identificação quinze substâncias (figs. 28 a 31, págs. 96 a 98) e apresentou como componentes majoritários, o fenilpropanóide elemicina (6) (82,33 %), sesquiterpenos já detectado nos espectros de RMN do óleo bruto, sendo um oxigenado, representados por biciclogermacreno (9,83 %) e espatulenol (1,04 %) e um componente não identificado (2,53 %), cujo tempo de retenção (50,9 min.) sugeriu-se tratar de um diterpeno.



-Figura 28: Monoterpenos do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*

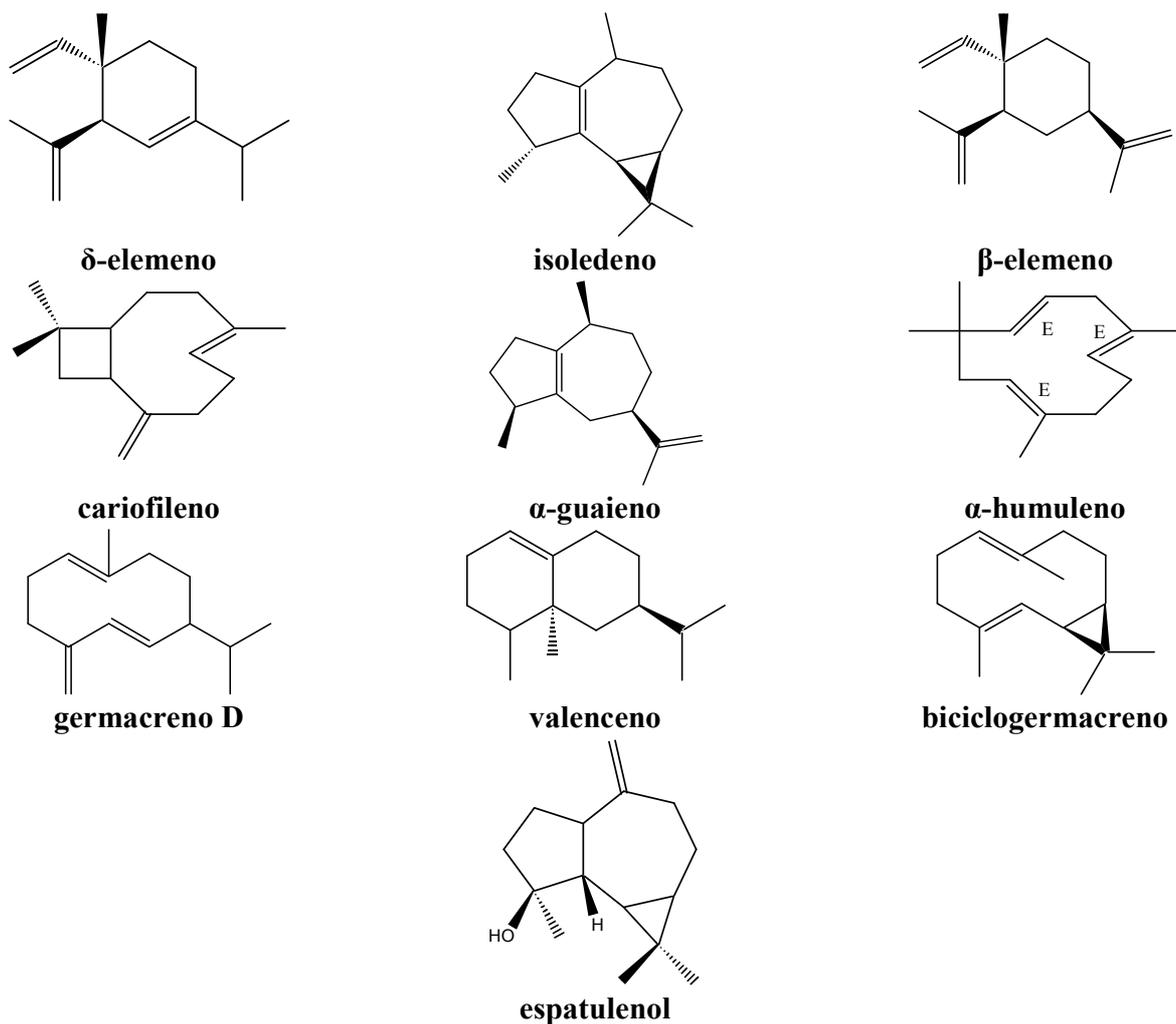


Figura 29: Sesquiterpenos do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*

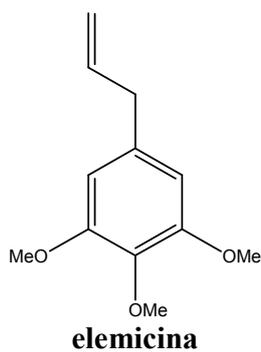
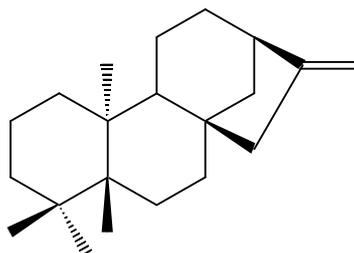


Figura 30: Fenilpropanóide do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*



ent-caur-16-eno*

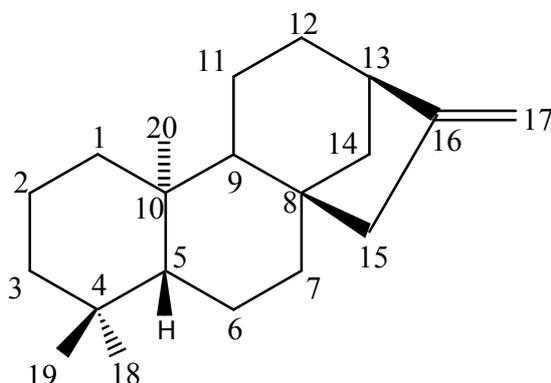
Figura 31: Diterpeno do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica*

A composição do óleo essencial das folhas de *N. megapotamica* coletado em Mato Grosso do Sul diferiu da encontrada em outras espécies de *Nectandra*. Por exemplo, nas folhas e casca do caule em um espécime de *N. salicina* coletado em Costa Rica (CICCIÓ *et. al.*, 2009), foram identificados como componentes majoritários, atractilone (14,6 %), viridifloreno (10,1%), α -pineno (9,4 %), β -cariofileno (7,2 %), α -humuleno (7,0 %), δ -cadineno (6,1 %), β -pineno (6,0 %) e germacreno D (5,8 %) e nas cascas do caule, atractilone (21,1 %), germacreno D (10,7 %), viridifloreno (7,9 %) e 7-epi- α -selineno (5,0 %).

4.5.2 Identificação e caracterização dos constituintes majoritários

Uma vez que não foi possível identificar um dos componentes majoritários presentes no óleo essencial pela técnica de CG-EM, cujo tempo de retenção sugeria ser o de um diterpeno, submeteu-se o óleo à uma cromatografia em coluna de sílica, conforme descrito no item 3.3.2, página 31. Através deste processo, cinco componentes majoritários foram isolados e caracterizados, incluindo o componente supracitado.

4.5.2.1 Identificação do diterpeno *ent-caur-16-eno* (11)



O composto 11, obtido na fração NMF-28-31 de acordo com metodologia descrita em 3.3.2, página 31.

Após análise por CG-EM, verificou-se que 11 tratava-se de um dos compostos majoritários que não havia sido identificado na análise anterior (item 4.5.1, pág. 94).

O espectro de RMN de ^1H (espectro 50, pág. 101) da fração apresentou três singletos em 1,00; 0,83 e 0,79 δ , referentes a três grupos metila, um singlete largo em 2,61 δ , proporcional a um hidrogênio, além de dois singletos largos em 4,71 δ e 4,77 δ , indicativos de hidrogênios de uma ligação dupla exocíclica.

No espectro de RMN de ^{13}C (espectros 52, pág. 103) foram observados vinte sinais. No espectro DEPT 135° (espectro 51, pág. 102), foi possível observar sinais de três carbonos metílicos, dez metilênicos, três metínicos e quatro tetrasubstituídos onde aqueles a 102,8 δ e 156,2 δ confirmam a presença de uma ligação dupla exocíclica.

Dessa forma foi possível propor a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{32}$ para o composto 11, compatível com a de um diterpeno tetracíclico, confirmada pelo íon a m/z 272 $[\text{M}]^{+\bullet}$ observado no espectro de massas obtido pela técnica CG-EM (espectro 53 e figura 32, pág.104). Os dados de 11 (tabelas 15 e 16, pág. 100), ao serem comparados com os diterpeno *ent-caur-16-eno* isolado das folhas como componente fixo (HAMERSKI & MARQUES, 2007) revelaram que se tratavam da mesma substância.

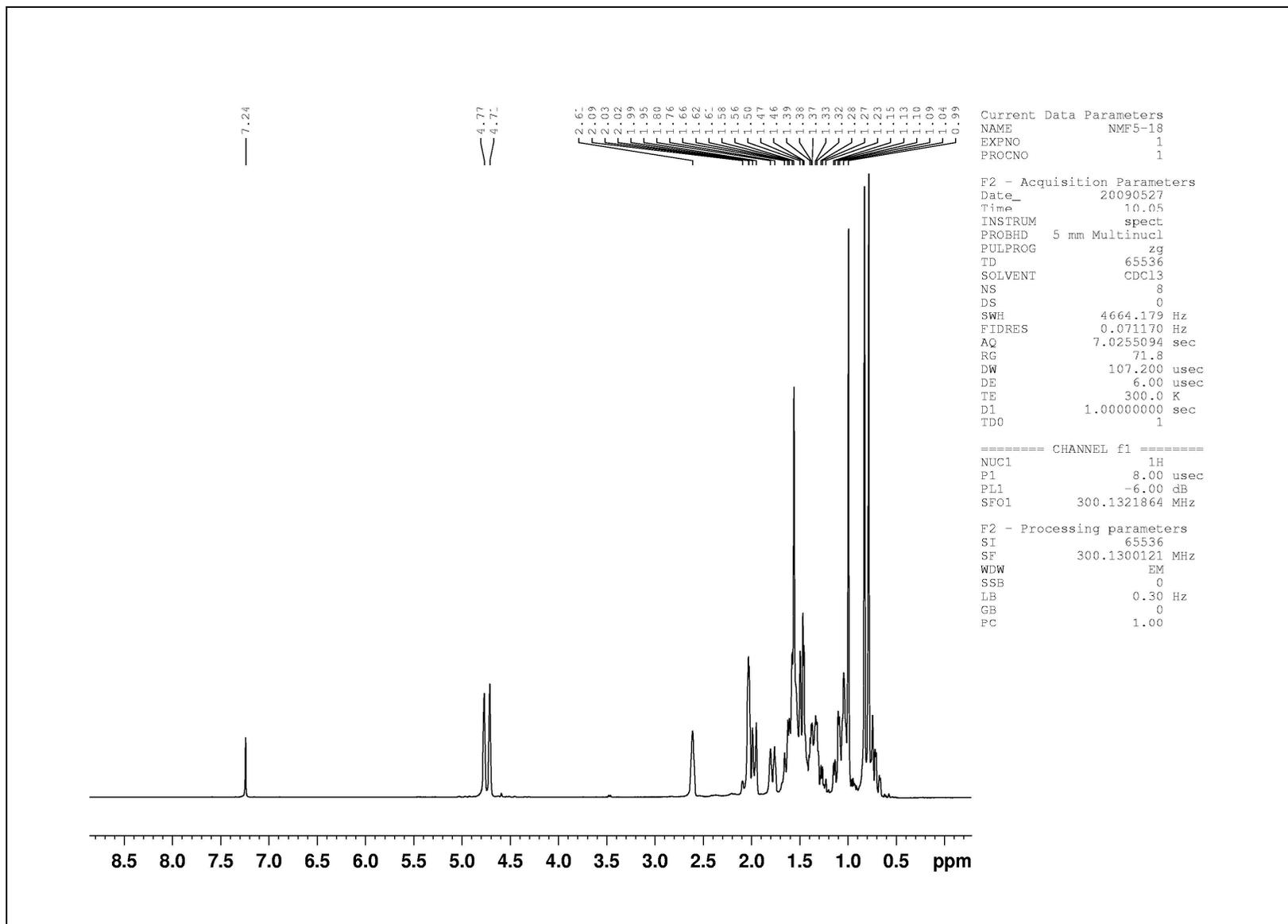
Embora *ent-caur-16-eno* tenha sido relatado em Lauraceae, no óleo essencial das folhas de *Ocotea* coletadas em Monte Verde, Costa Rica (SETZER *et. al.*, 2006), está sendo descrito pela primeira vez como componente de óleo essencial de uma espécie de *Nectandra*.

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do diterpeno *ent-caur-16-eno* (11).

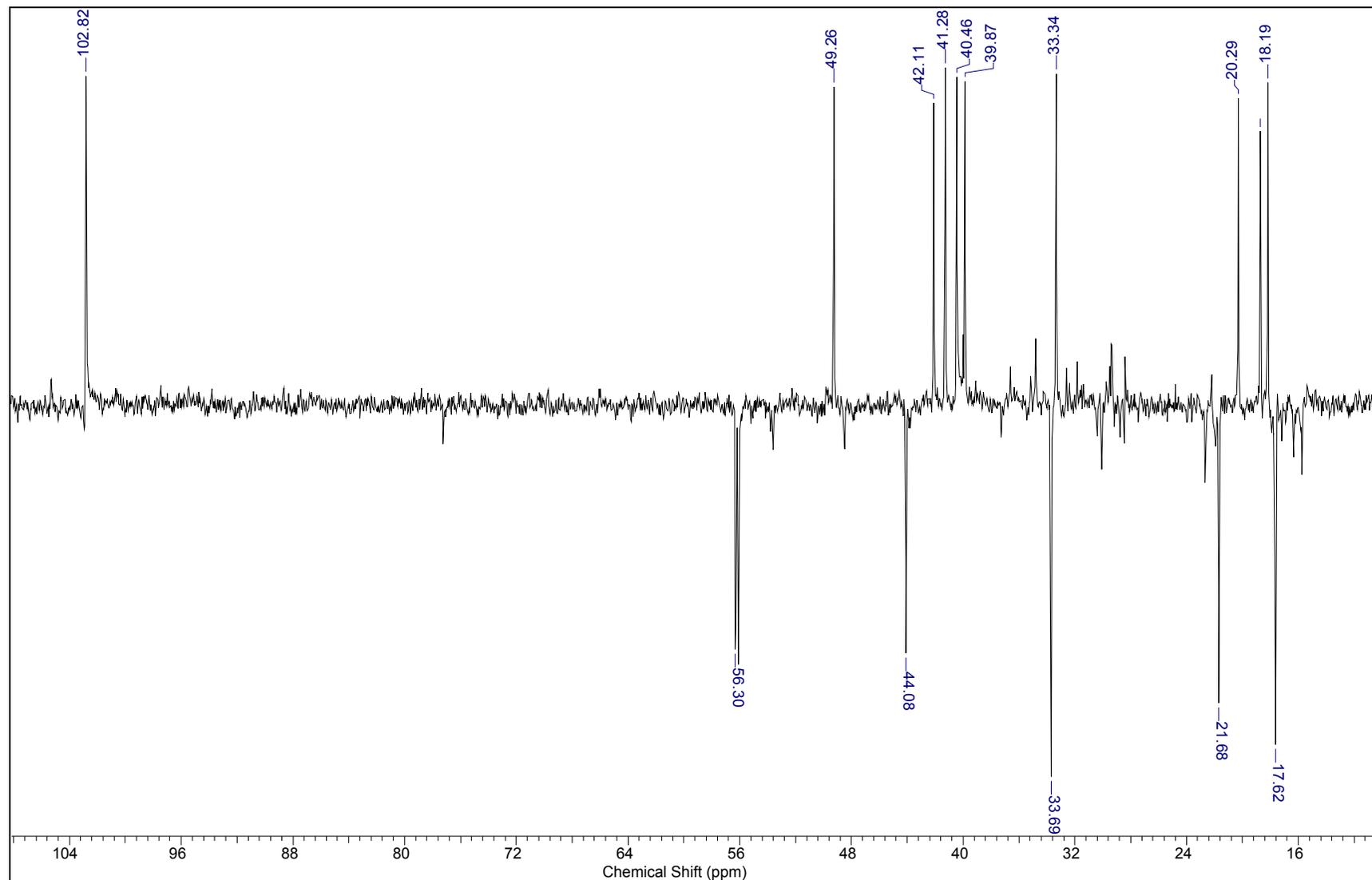
H	δ_{H}
13	2,61 sl
17	4,77 sl (H-17a); 4,71 sl (H-17b)
18	0,83 s
19	0,79 s
20	1,00 s

Tabela 16: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) do diterpeno *ent-caur-16-eno* (11) e da literatura (HANSON *et. al.*, 1976)

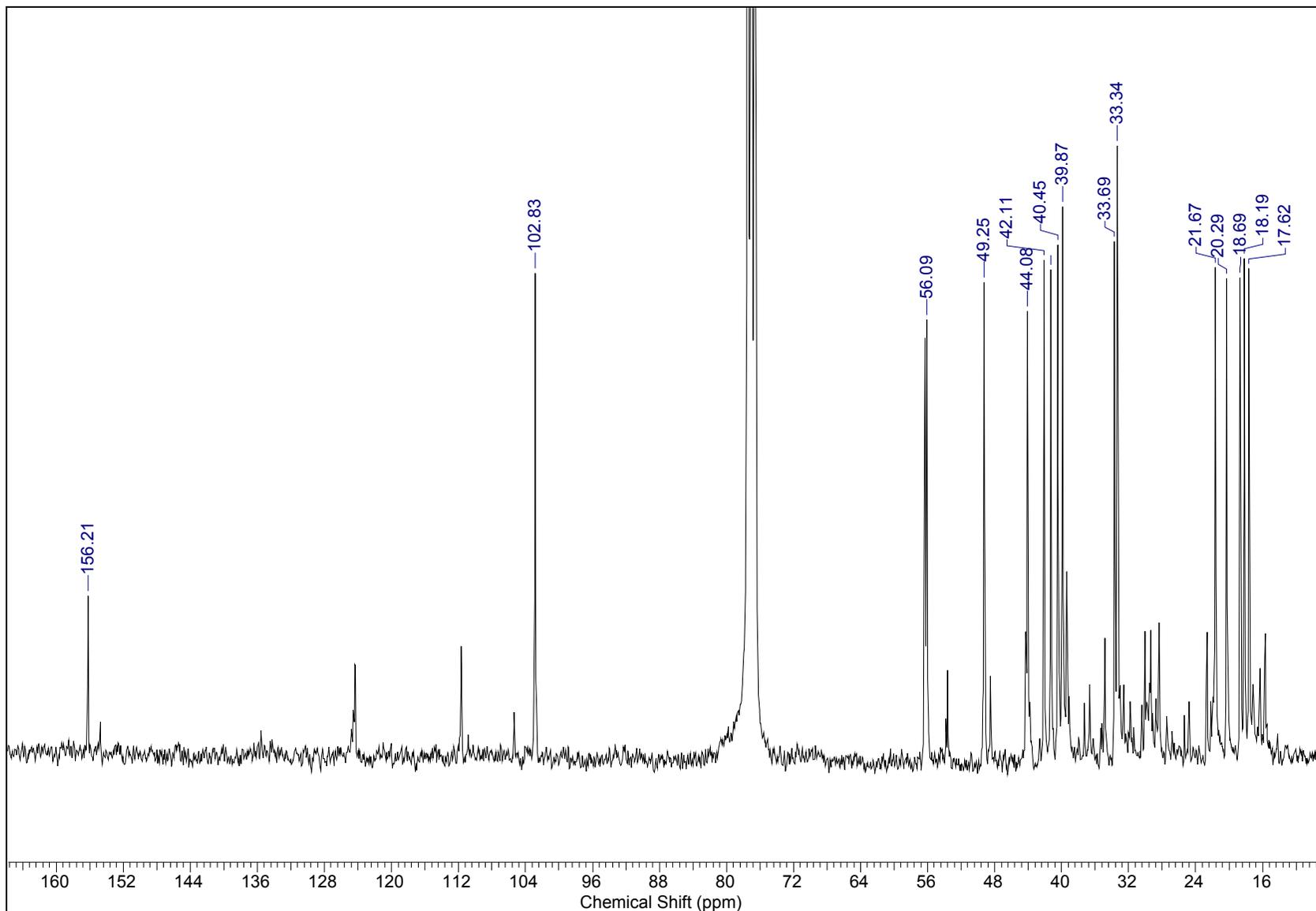
C	δ_{C}	δ_{C} literatura
1	41,3	41,3
2	18,7	18,8
3	42,1	42,0
4	33,3	33,3
5	56,1	56,1
6	20,3	20,3
7	40,5	40,4
8	44,0	44,2
9	56,1	56,1
10	39,9	39,3
11	18,2	18,1
12	33,3	33,3
13	44,1	44,2
14	39,9	39,9
15	49,2	49,2
16	156,2	156,0
17	102,8	102,8
18	33,7	33,7
19	21,6	21,7
20	17,6	17,6



Espectro 50. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **11**.



Espectro 51. DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de **11**



Espectro 52. RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **11**.

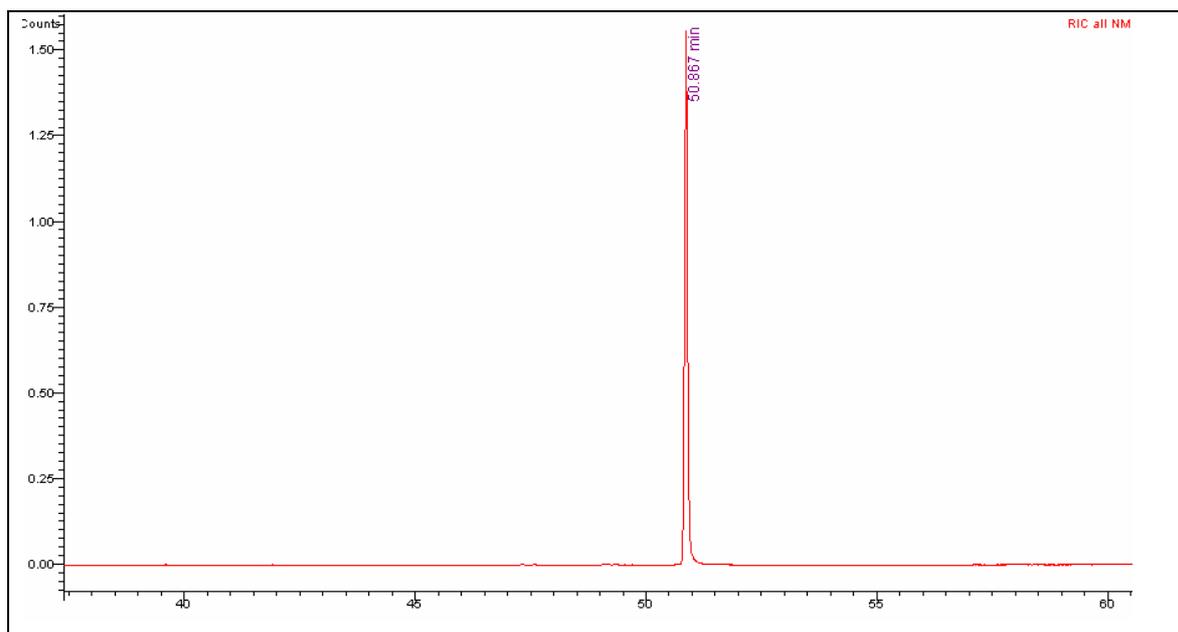
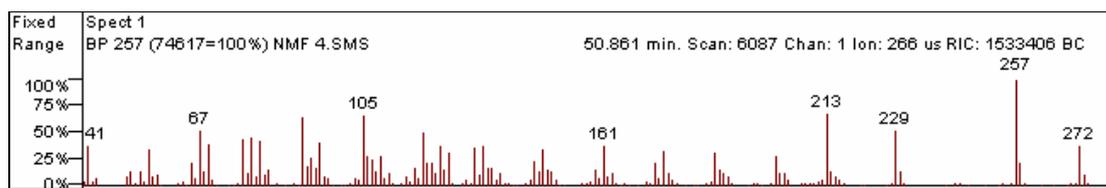
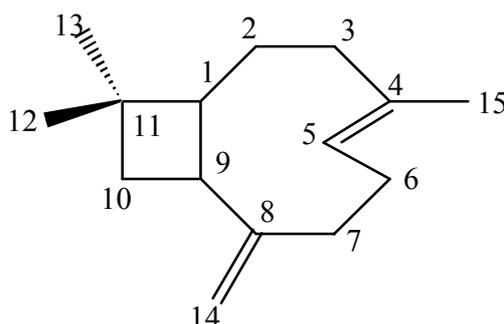


Figura 32: Cromatograma de íons totais de **11**.



Espectro 53. Espectro de massas (70 eV) de **11**.

4.5.2.2 Identificação do sesquiterpeno cariofileno (**12**)



O composto **12** foi obtido na fração NMF 32-35 de acordo com a metodologia descrita no 3.3.2, página 31.

Os espectros de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135° de **12** mostraram uma grande semelhança com os do sesquiterpeno *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno **3** (espectros 19 a 21, págs. 56 e 57) obtido da madeira. No espectro de RMN de ^{13}C de **12** (espectro 56, pág.

108), a principal diferença observada foi a ausência dos sinais referentes aos carbonos oxigenados C-1 e C-10 em 3 sendo substituídos por dois sinais de carbonos olefínicos a 124,3 δ (CH) e 135,5 δ (C), respectivamente. No espectro de RMN de ^1H (espectro 54, pág. 106), um multiplete na região de 5,73 a 5,79 δ , ausente no espectro de 3, foi atribuído ao H-1 em 12.

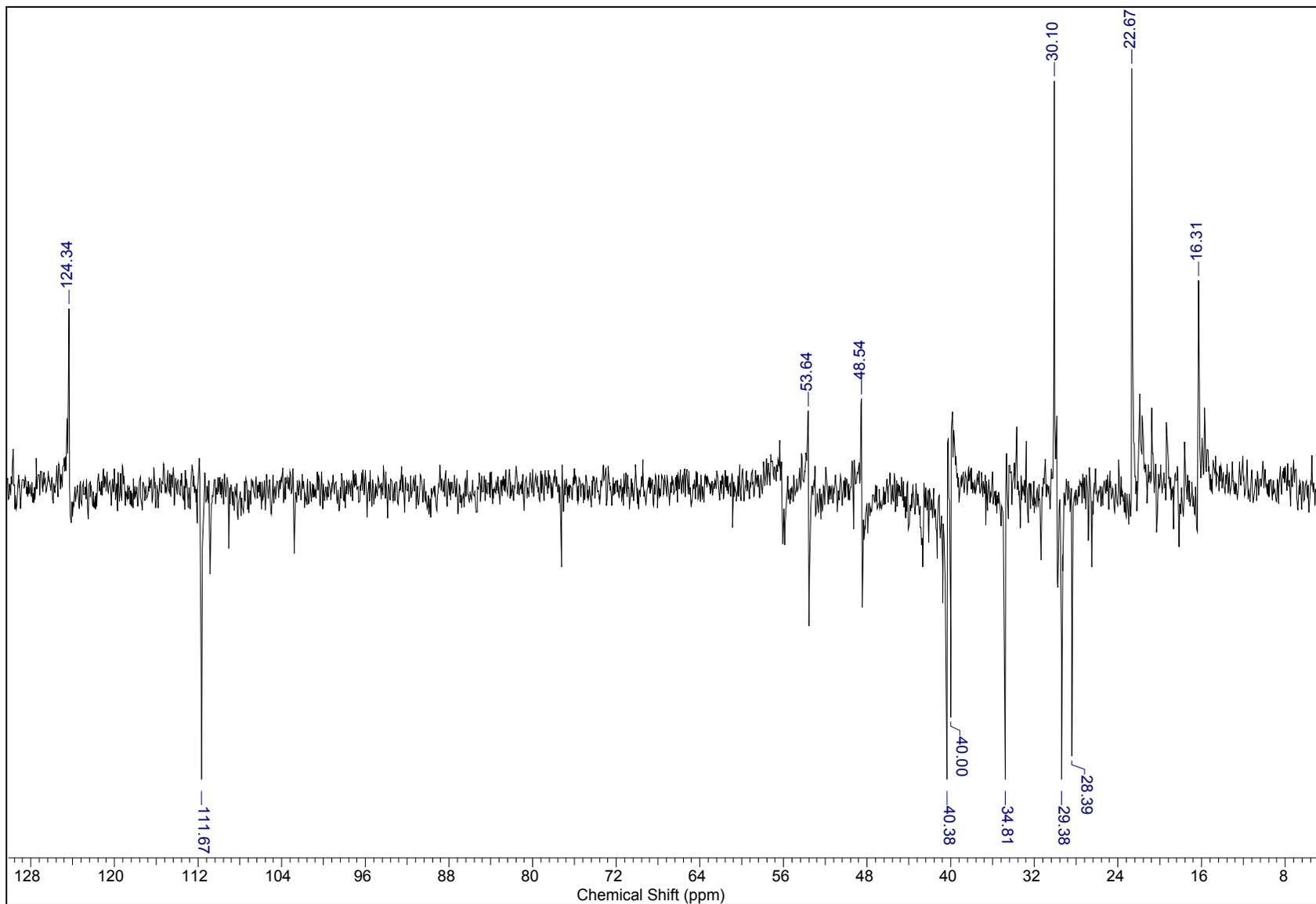
Assim, o componente principal 12 da fração 32-35 foi identificado como sendo o sesquiterpeno cariofileno (tabela 17), já detectado na análise por CG-EM do óleo (item 4.5.1, pág. 94).

A análise por CG-EM da fração 32-35 confirmou a proposta, com base no índice de retenção apresentado pelo componente majoritário e também pelo espectro de massas, com íon molecular a m/z 204, obtido para este componente. (espectro 57 e fig. 33, pág. 109)

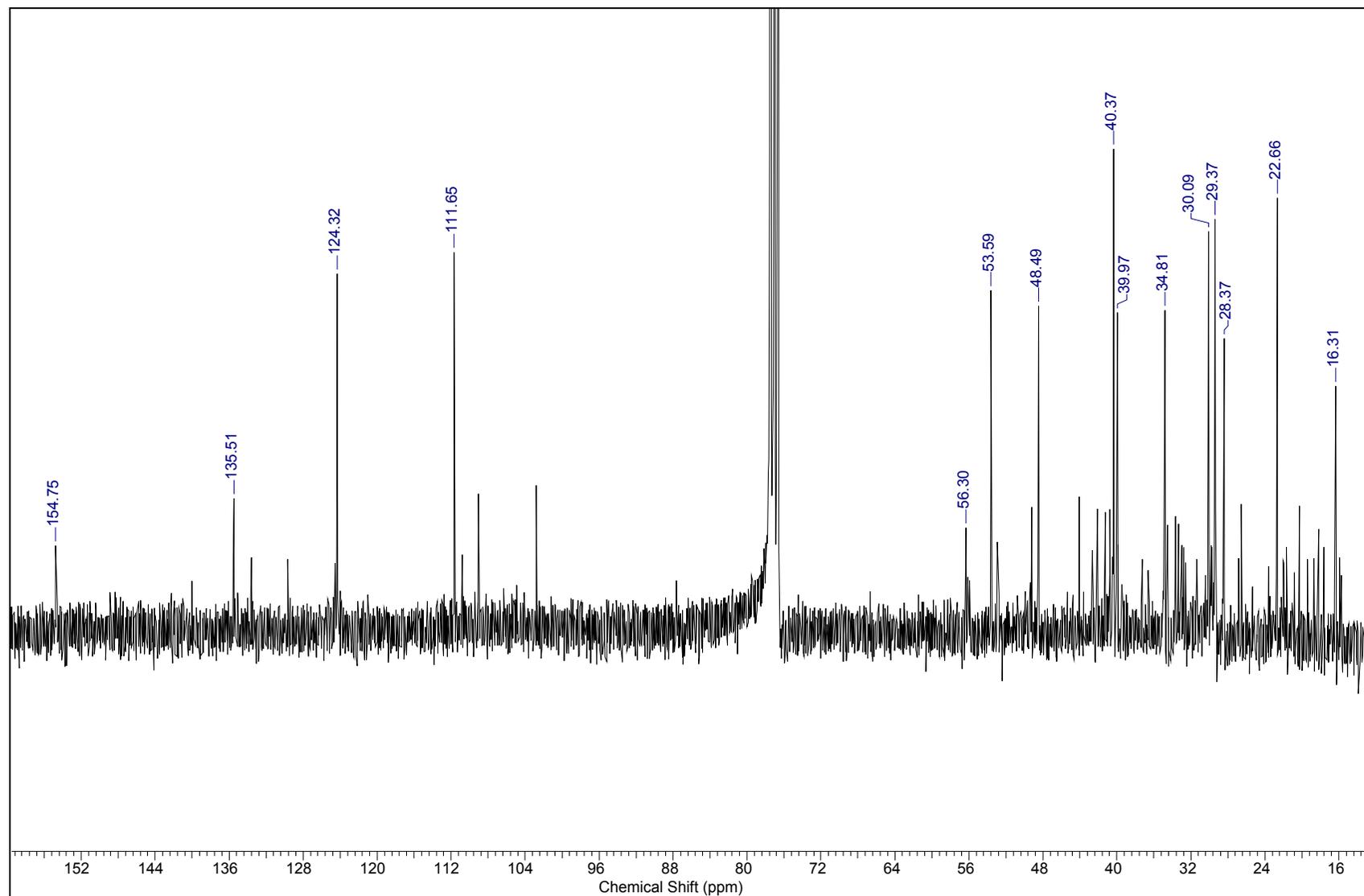
Esse composto é comumente encontrado em óleos essenciais e já relatado em Lauraceae, como por exemplo, no óleo essencial das folhas de *Beilschmiedia brenesii* (AGIUS *et. al.*, 2007) bem como em famílias vegetais de plantas oriundas da floresta Amazônica (GOTTLIEB *et. al.*, 1981) também já foi relatado no gênero, no óleo essencial das folhas de um espécime de *Nectandra falcifolia* ocorrente em Santiago, Argentina (TALENTI *et. al.*, 1981). Este composto está sendo relatado pela primeira vez em *N. megapotamica*.

Tabela 17: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de 12 e dados de ^{13}C (67,5 MHz, CDCl_3) de Bohlmann & Zdero, 1978.

C	δ_{C}	δ_{Clit}	C	δ_{C}	δ_{Clit}
1	53,5	53,6	9	48,5	48,6
2	28,3	28,4	10	30,1	30,1
3	22,6	24,8	11	40,0	40,0
4	135,5	135,0	12	30,1	30,1
5	48,5	124,5	13	22,7	22,6
6	29,3	29,4	14	111,7	111,8
7	40,4	40,4	15	16,3	16,3
8	154,7	154,3			



Espectro 55: DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de **12**.



Espectro 56: RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **12**.

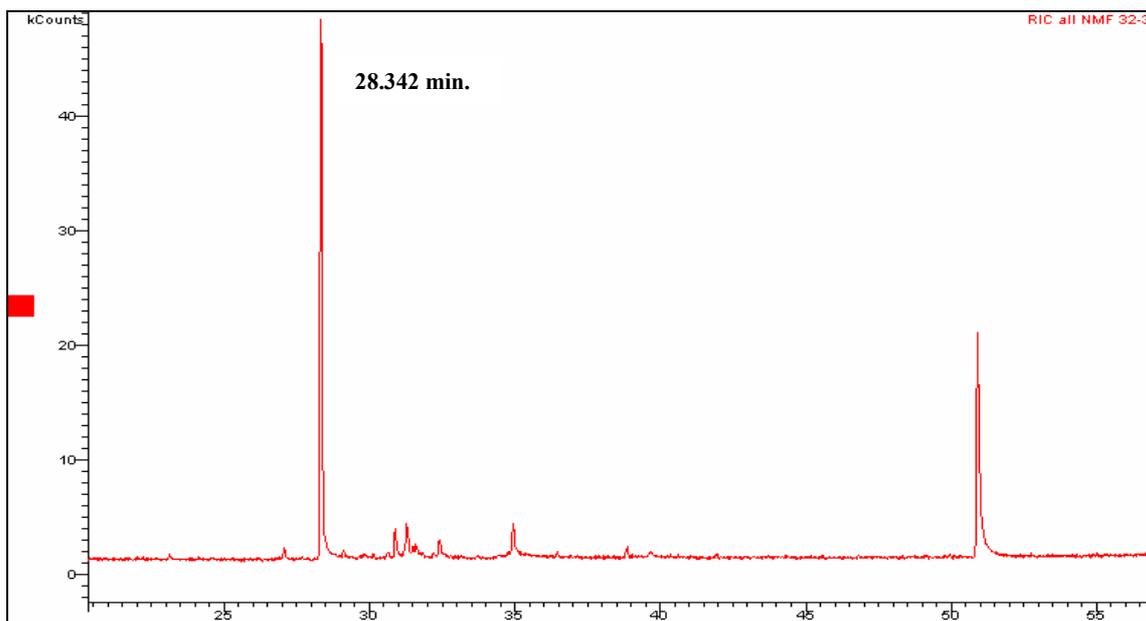
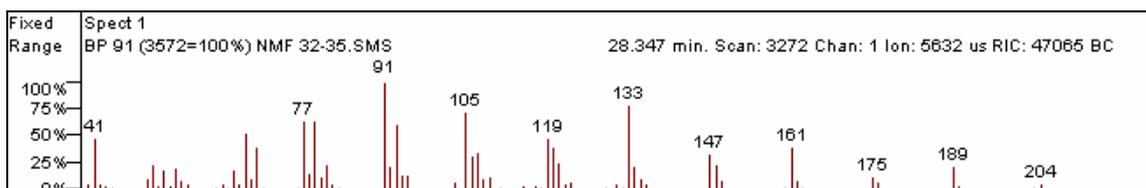
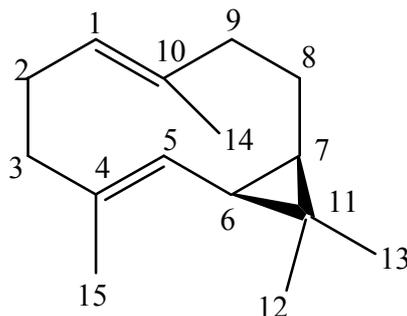


Figura 33: Cromatograma de íons totais do 12.



Espectro 57. Espectro de massas (70 eV) de 12.

4.5.2.3 Identificação do sesquiterpeno bicilogermacreno (13)



O composto 13 foi obtido na fração NMF 37-45 de acordo com a metodologia descrita em 3.3.2, página 31.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C desta forma revelou que mesma era composta por um sesquiterpeno.

O espectro de RMN de ^1H (espectro 60, pág. 114) mostrou quatro singletos relativos a grupos metila, sendo dois a 1,43 δ e 1,60 δ e dois a 1,0 δ e 1,06 δ , além de dois sinais de hidrogênios olefínicos, sendo um dubleto a 4,31 δ ($J = 12,0$ Hz) e um multiplete a 4,80 δ .

No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 59, pág. 113) foram observados 15 sinais, os quais com o auxílio do espectro DEPT 135°, foram atribuídas a quatro metilas (15,4; 16,5; 20,9 e 26,9 δ), quatro carbonos metilênicos, quatro metínicos, dois dos quais olefínicos (124,8 e 126,5 δ) e três carbonos quaternários, sendo dois olefínicos (127,9 e 140,8 δ) e um indicativo da presença de um anel ciclopropânico (19,8 δ). Estes dados foram compatíveis com a fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}$ e indicaram, portanto, que 13 se tratava de um sesquiterpeno bicíclico. Com base nestas informações (tabela 18, pág. 110) e de acordo com os sesquiterpenos identificados através da análise por CG-EM do óleo essencial, foi possível identificar o componente da fração 37-45 como sendo bicilogermacreno 13. O valor de $[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +42,3$, ($c. 0,035$; CHCl_3), para 13 indicou a estereoquímica apresentada.

O valor do índice de retenção e o espectro de massas obtido após análise de 13 por CG-EM (item 3.3.1, pág. 31 e espectro 61 e fig. 34, pág. 115) confirmaram a identificação.

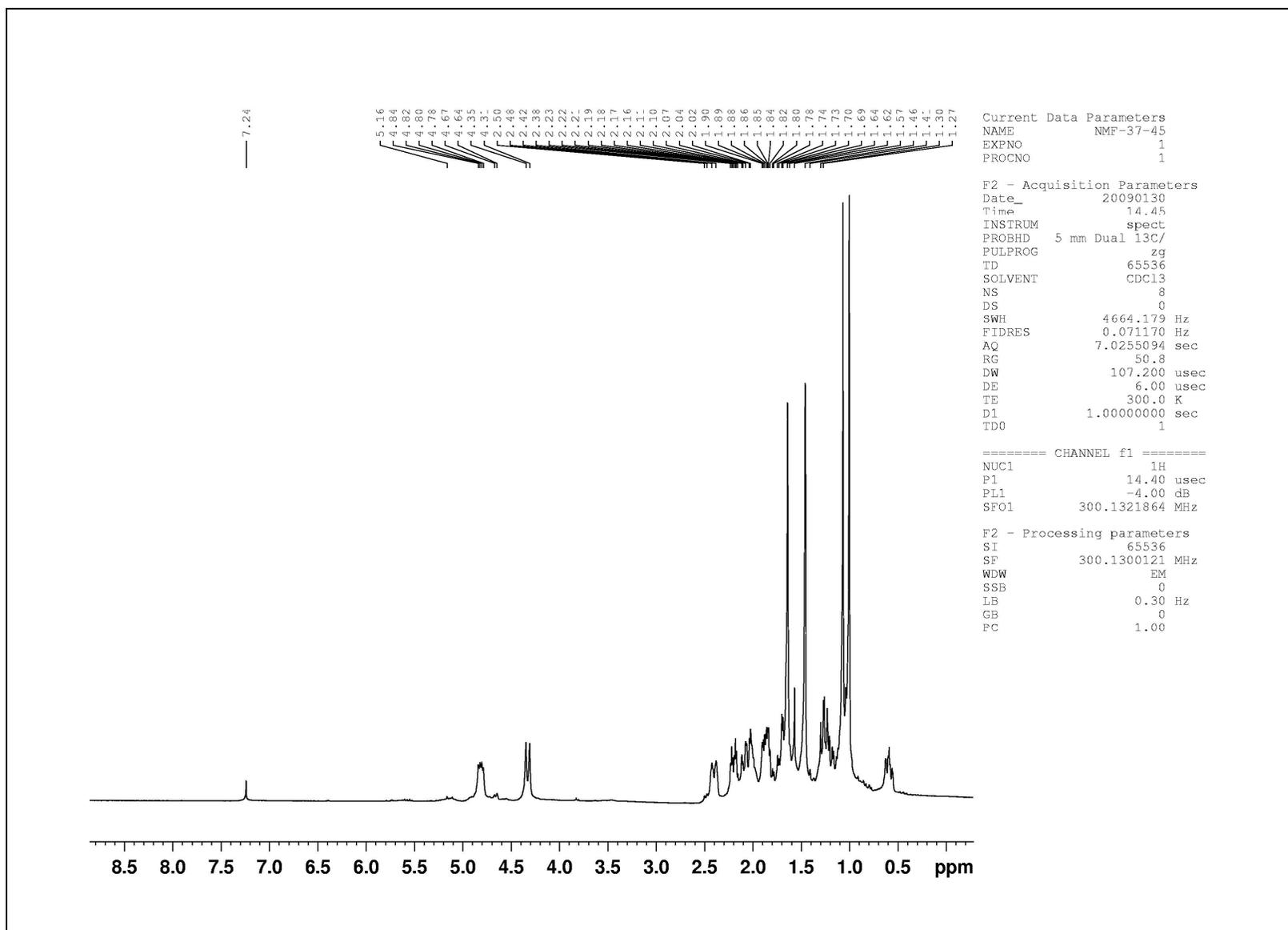
Embora comum em óleos essenciais, o sesquiterpeno (+)-bicilogermacreno seja relatado em plantas da família Lauraceae, no óleo essencial das folhas de sete espécies ocorrentes em *Ocotea*, Monte Verde - Costa Rica (SETZER *et. al.*, 2006) e está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Nectandra*.

Tabela 18: Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) do bicilogermacreno (13) e dados da literatura (300 MHz, CDCl_3) relatados Riveiro-Cruz *et. al.*, 2006.

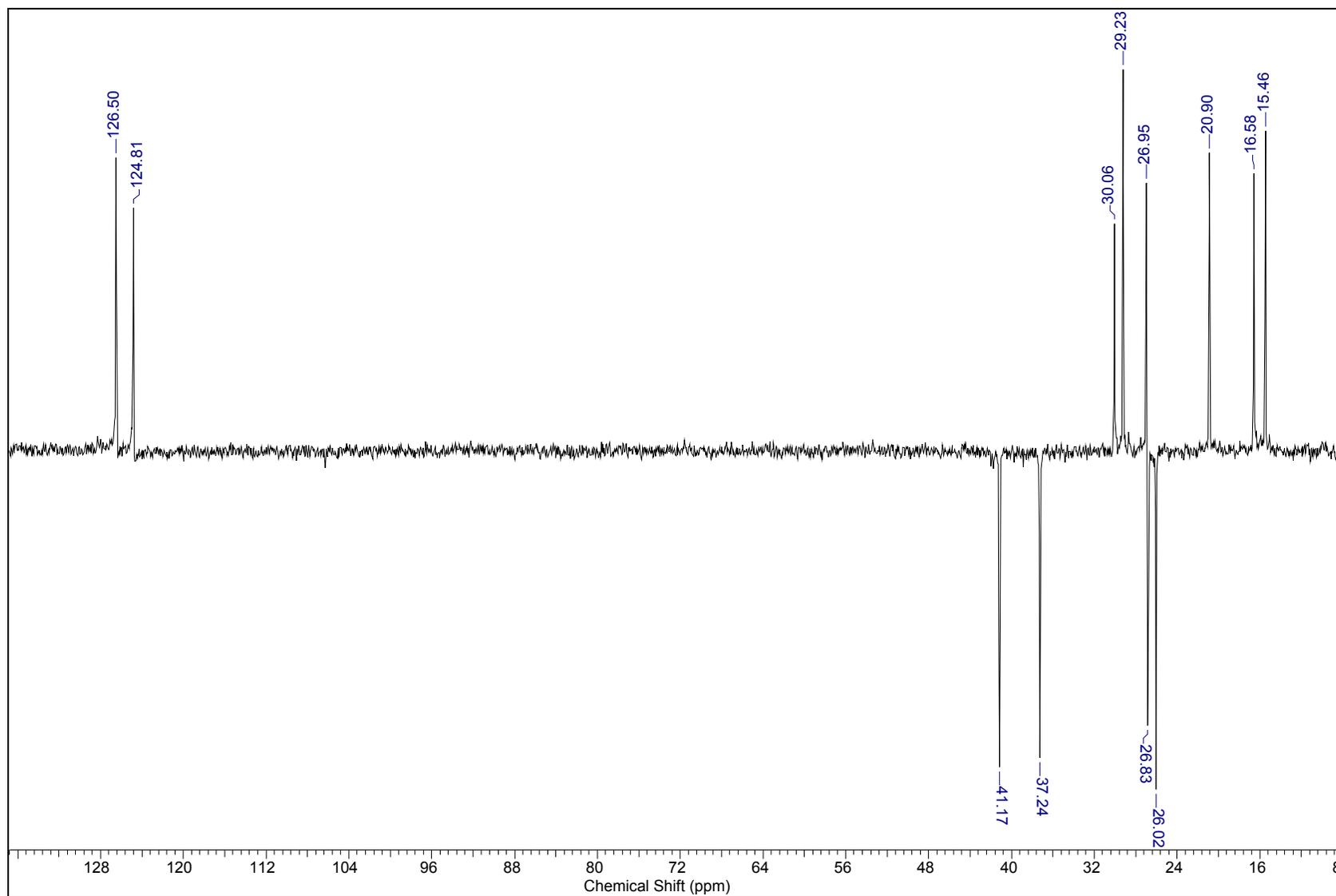
H	$^{13}\delta$ (ppm)	δ Literatura
1	4,80 (1H; mult.)	4,80 (m)
5	4,31 (1H; d; 12 Hz)	4,33 (1H, d; 11,5 Hz)
12	1,00 (3H, s)	1,00 (3H, s)
13	1,06 (3H, s)	1,07 (3H, s)
14	1,43 (3H, s)	1,45 (3H, s)
15	1,6 (3H, s)	1,6 (3H, s)

Tabela 19: Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de biciclogermacreno (13) e dados da literatura (22,49 MHz, CDCl_3) relatados por McMurry & Bosch, 1987.

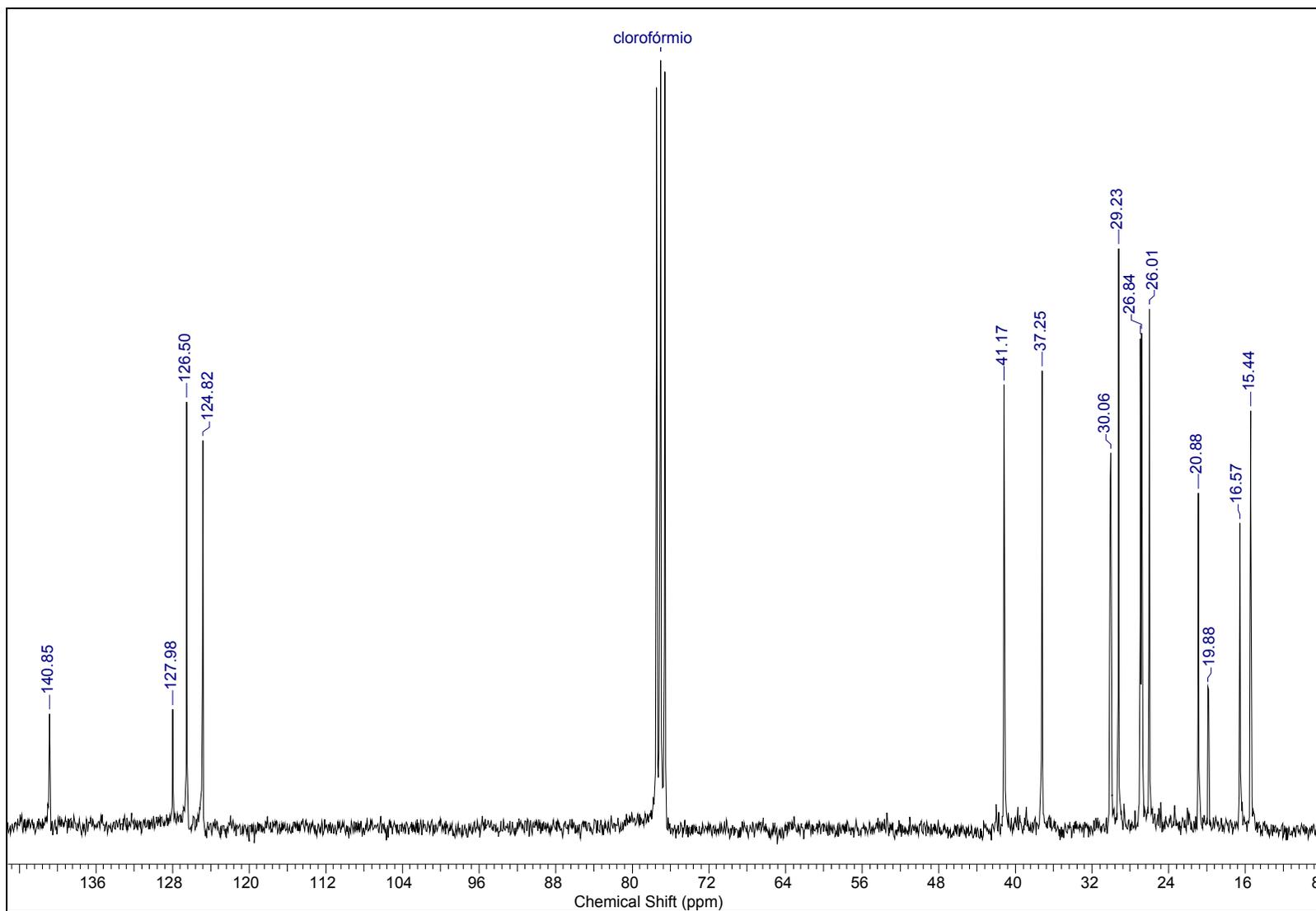
C	$^{13}\delta_{\text{C}}$	δ_{C} Literatura
1	124,8	124,7
2	25,9	26,0
3	41,1	41,2
4	127,9	126,4
5	126,5	126,5
6	29,2	29,2
7	30,0	30,0
8	26,8	26,8
9	37,2	37,2
10	140,8	140,7
11	19,8	19,8
12	20,9	20,8
13	26,9	26,9
14	16,5	16,5
15	15,4	15,4



Espectro 58. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **13**.



Espectro 59. DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de **13**.



Espectro 60. RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **13**.

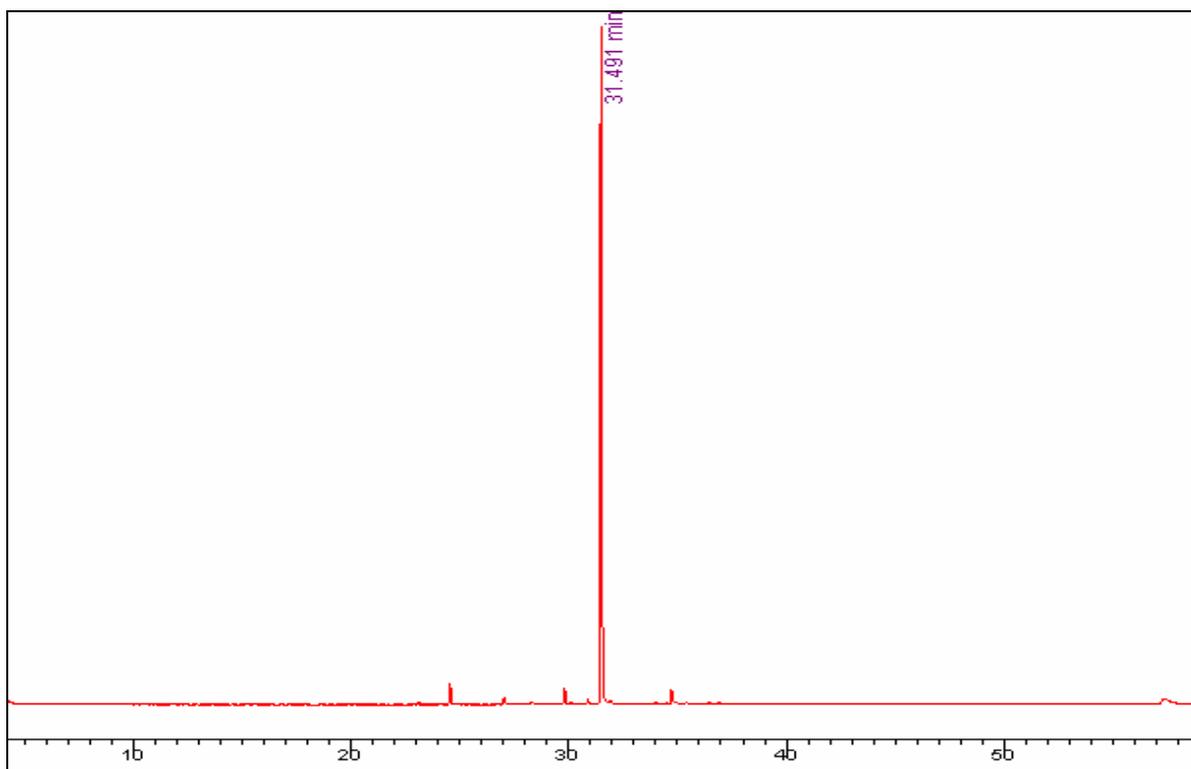
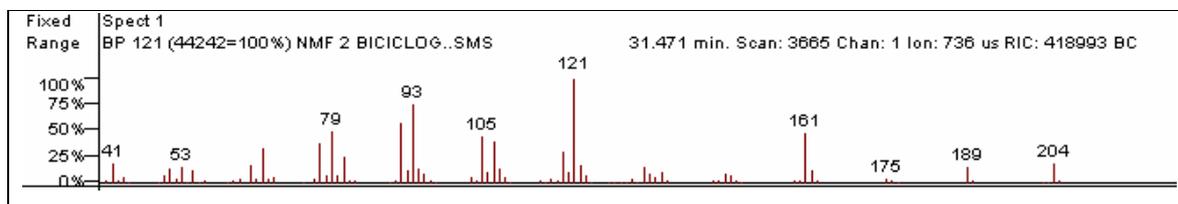
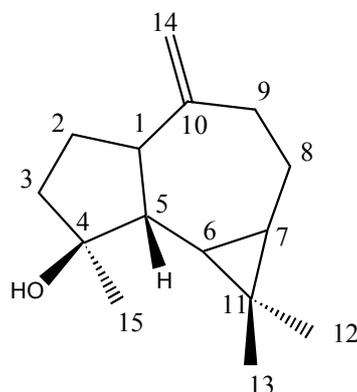


Figura 34: Cromatograma de íons totais de **13**.



Espectro 61. Espectro de massas 70 eV de **13**.

4.5.2.4 Identificação do espatulenol (14)



O composto 14 foi obtido na fração NMF-136-138 de acordo com a metodologia descrita no item 3.3.2, pág. 31.

A análise dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C da fração mostrou sinais relativos a dois compostos, sendo um grupo de sinais relativo ao fenilpropanóide elemicina (6) (item 4.2.3, pág. 66; espectros 28 a 30; pág. 68 e 69), e outro grupo de sinais sugestivos de um composto da classe terpênica.

No espectro de RMN de ^1H da fração NMF-136-138 (espectro 62, pág. 119), os sinais referentes ao componente terpênico desta fração identificados como, três singletos em 1,01 δ ; 1,03 e 1,26 δ e o último sugestivo de um grupo metila ligado a um carbono quaternário carbinólico. Este espectro também mostrou dois singletos a 4,65 δ e 4,67 δ relativos a dois hidrogênios olefinicos de uma dupla exocíclica, além de um tripleto a 0,44 δ sugerindo um anel ciclopropânico.

No espectro de RMN de ^{13}C (espectro 64, pág. 121), além dos sinais relativos ao fenilpropanóide elemicina, foram observados quinze sinais atribuídos ao composto 14. Estes foram identificados, com o auxílio do espectro DEPT 135° (espectro 63, pág. 120), como sendo referentes a quinze carbonos, atribuídos a três metilas (16,3; 26,1; 28,6 δ) cinco metilênos, sendo um olefinico (106,2 δ), quatro carbonos metínicos, dois deles sugestivos de um anel ciclopropânico (27,5 e 29,9 δ) e três carbonos quaternários (um olefinico a 153,4 δ , um oxigenado a 81,0 δ e um atribuível ao do anel ciclopropânico a 20,1 δ). Estas informações aliadas às obtidas pela análise por CG-EM do óleo essencial (item 3.3.1, pág. 31) e da fração NMF-136-138 (espectro 65 e fig. 35, pág. 122) permitiram concluir que o composto 14 presente nesta fração tratava-se do sesquiterpeno espatulenol.

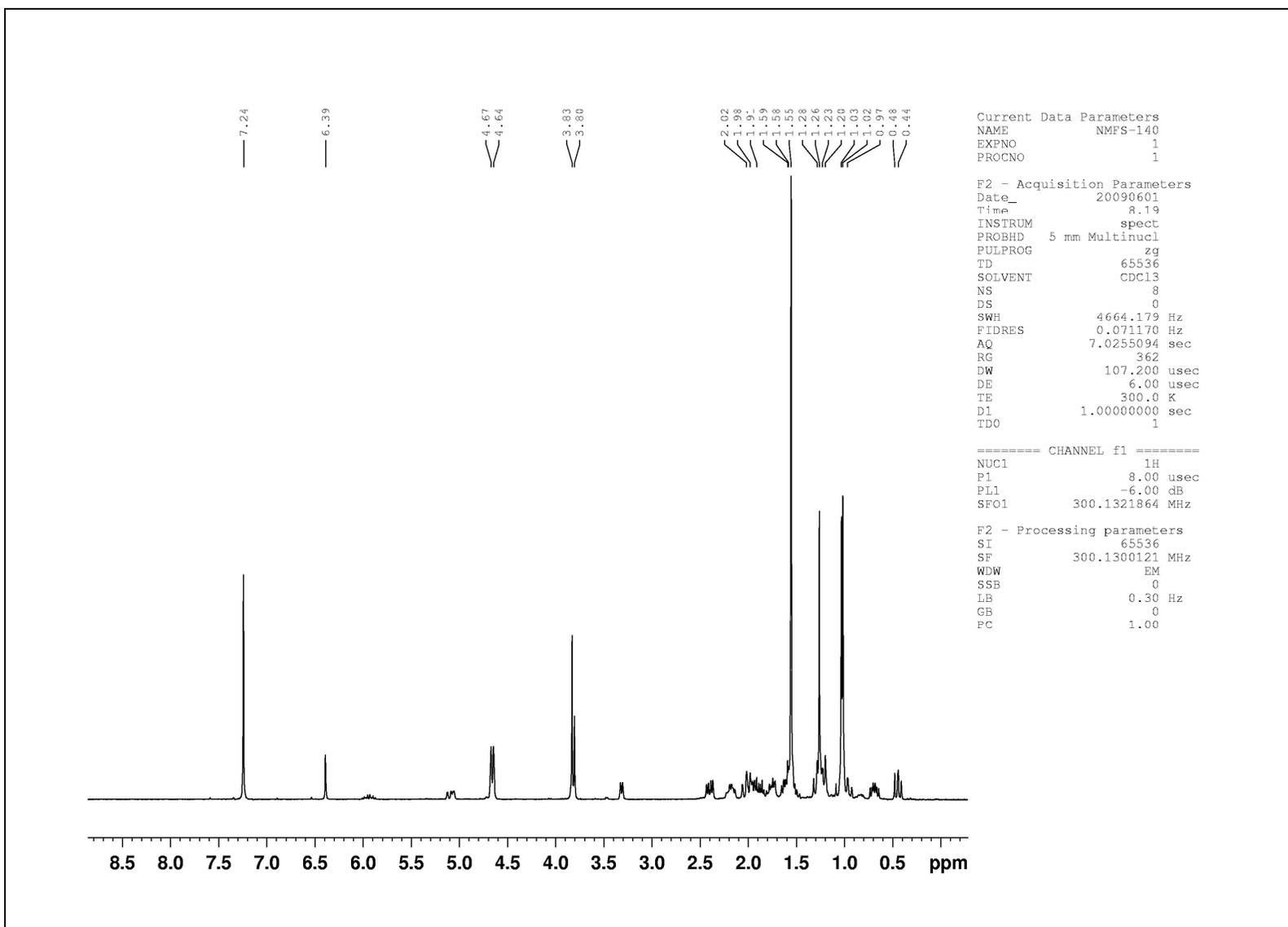
Esse composto é comumente encontrado em óleos essenciais e já foi relatado em Lauraceae, em um espécime de *Cinnamomum paratriplinerve* (SETZER *et. al.*, 2007), de frutos de *Nectandra umbrosa* (VALLEY & SCORA, 1999), de folhas de *N. umbrosa* e *N. salicina* (SCORA *et. al.*, 2001) e de folhas de *N. coriacea* (Sw) Griseb (PINO *et. al.*, 2005). O composto 14 está sendo descrito pela primeira vez em *N. megapotamica*.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de espatulenol (14) e dados (400 MHz, CDCl_3) da literatura (INAGAKE&ABE, 1985).

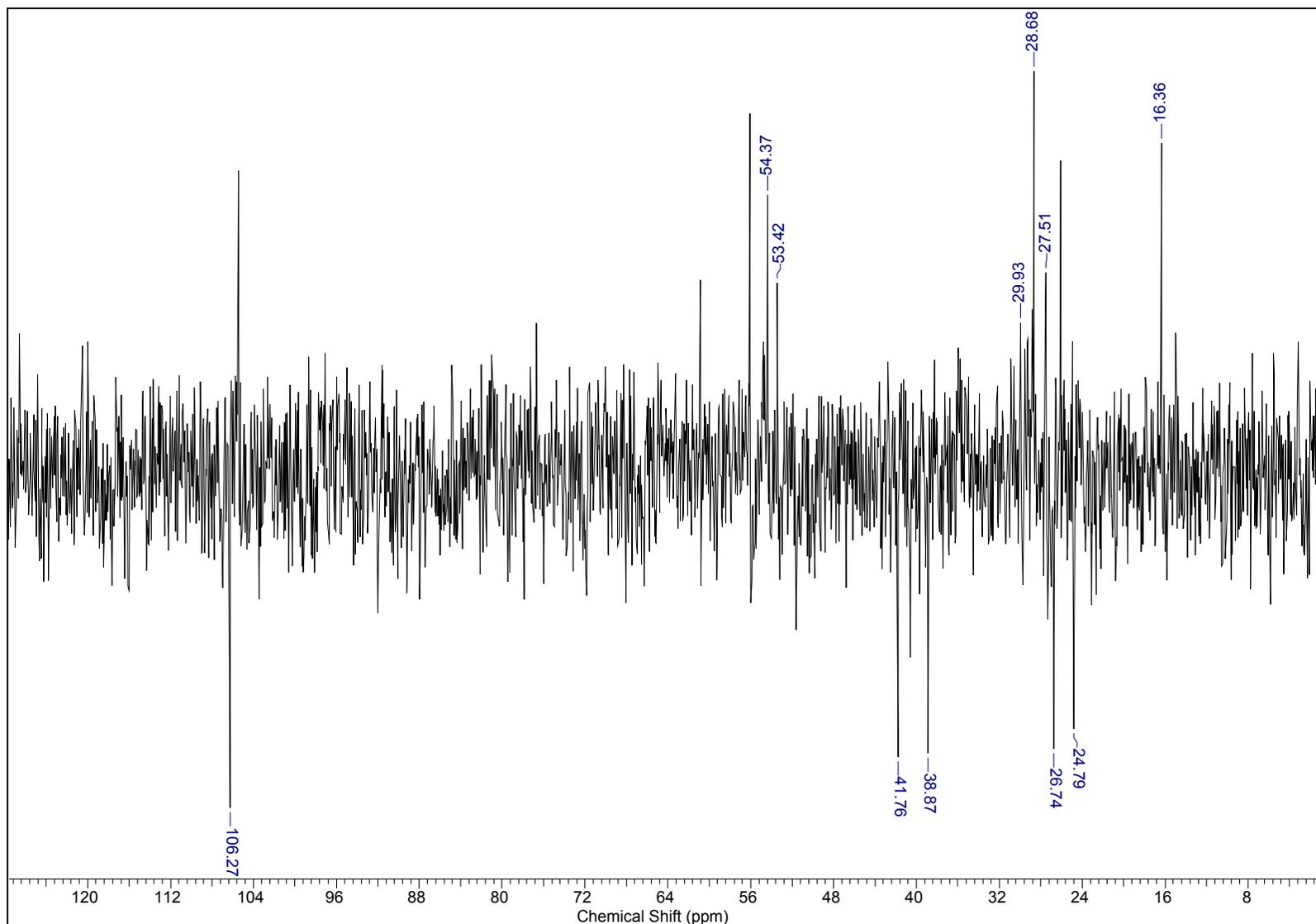
H	δ_{H}	$\delta_{\text{H}}^{\text{literatura}}$
6	0,45 t (J = 10,4 Hz)	0,46
7	0,65-0,75 m	0,71
12	1,02 s	1,04
13	1,03 s	1,05
14	4,67 s (H-14a); 4,64 s (H-14b)	4,66 – 4,68
15	1,26 s	1,28

Tabela 21. Dados de RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de espatulenol (14) e dados (100 MHz, CDCl_3) da literatura (INAGAKE&ABE, 1985)

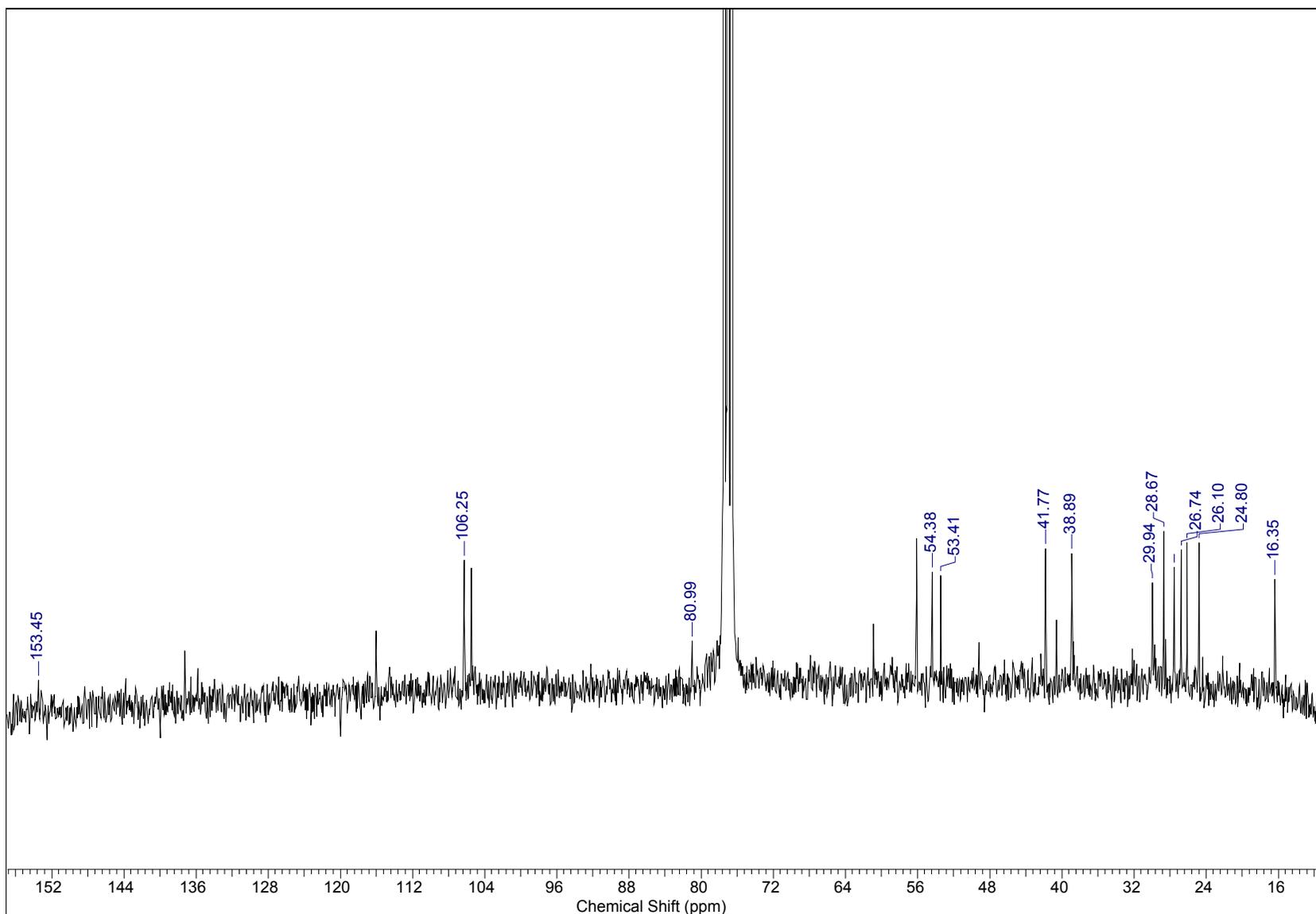
C	δ_{C}	$\delta_{\text{CLiteratura}}$
1	53,4	53,4
2	26,7	26,7
3	41,7	41,7
4	80,9	80,9
5	54,3	54,3
6	29,9	29,7
7	27,5	27,5
8	24,8	27,5
9	38,8	38,8
10	153,4	153,4
11	20,1	20,4
12	28,6	28,6
13	16,3	16,3
14	106,2	106,2
15	26,1	26,1



Espectro 62. RMN de ^1H (300 MHz, CDCl_3) de **14**.



Espectro 63. DEPT 135° (75 MHz, CDCl₃) de **14**.



Espectro 64. RMN de ^{13}C (75 MHz, CDCl_3) de **14**.

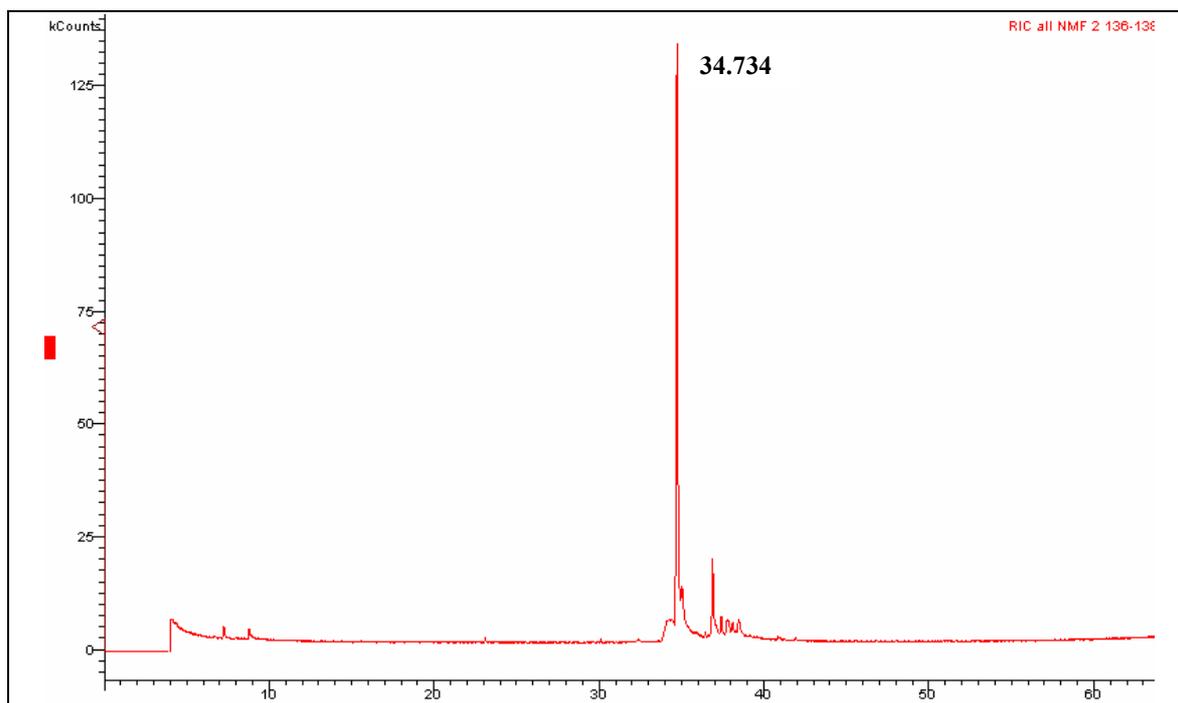
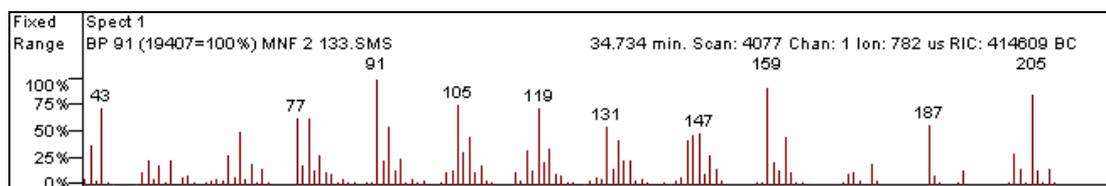


Figura 35: Cromatograma de íons totais de **14**.



Espectro 65. Espectro de massas (70 eV) de **14**.

4.6 Ensaios de atividade biológica

No presente trabalho também foram avaliadas as atividades antibacteriana, antifúngica e larvicida contra *Aedes aegypti* do fenilpropanóide elemicina (**6**), da neolignana *rel*-(7*S*, 8*S*, 7*R*, 8*R*) – 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexametoxi- 7*O*.7- 8, 8'-lignana (**9**), do óleo essencial obtido das folhas e de alguns de seus compostos (item 3.4, pág. 32).

4.6.1 Ensaio de atividade antibacteriana

Foram testados o óleo essencial das folhas e as substâncias elemicina (6), *rel*-(7*S*, 8*S*, 7'*R*, 8'*R*) – 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexametoxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana (9), *ent*-caur-16-eno (11) e biciclogermacreno (13) de acordo com metodologia descrita em 3.4.1, página 32.

Todas as amostras testadas mostraram-se inativas neste ensaio, com base nos valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) obtidos (acima de 1000 µg/ mL).

4.6.2 Ensaio de atividade antifúngica

O ensaio de atividade antifúngica foi realizado de acordo com metodologia (3.4.2, página 32) com compostos isolados do extrato etanólico (substâncias 5, 6 e 9) e também com o óleo essencial das folhas juntamente com os seus compostos majoritários isolados (substâncias 11-13 e mistura de 6 e 14). Os valores de CIM obtidos são apresentados na tabela 22. O óleo essencial das folhas apresentou uma fraca atividade frente à *Cryptococcus neoformans*, em uma concentração de 500 µg/mL e mostrou-se inativo frente a cepa *Candida krusei*. Os compostos cariofileno (12) e a mistura de espatulenol (14) + elemicina (6), oriundos do óleo e também um composto isolado da madeira, (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol (5) apresentaram fraca atividade, no limite máximo da concentração de 200 µg/mL.

Tabela 22: Valores de CIM (µg/mL) obtidos para o óleo essencial das folhas de *N. megapotamica* e para substâncias isoladas isoladas frente as cepas fúngicas de *Cândida krusei* e *Cryptococcus neoformans*.

Substâncias puras/frações	<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 27853)	<i>Candida krusei</i> (ATCC 6258)
óleo essencial das folhas	500	inativo
elemicina (6)	inativo	inativo
biciclogermacreno (13)	inativo	inativo
<i>rel</i> -(7 <i>S</i> , 8 <i>S</i> , 7' <i>R</i> , 8' <i>R</i>) – 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexametoxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana (9)	inativo	inativo
<i>ent</i> -caur-16-eno (11)	inativo	inativo
cariofileno (12)	-	200
elemicina (6) + espatulenol (14)	-	200
(E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol (5)	-	200
Anfotericina B	(0,26-16)	(0,25-0,50)

(inativo: CIM > 1000 µg/mL)

O CIM (Concentração mínima inibitória), 200 µg/ml a 1,56µg/ml para as frações puras, a diferença é a concentração do antifúngico Anfotericina B, que variou de 16 µg/ml a 0,125 µg/ml para *Cryptococcus neoformans* e de 0,25 µg/ml a 0,50 µg/ml para *Cândida krusei*.

4.6.3 Ensaio de atividade larvicida contra a larva do mosquito *Aedes aegypti*

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia (item 3.4.3, página 32) utilizando-se larvas do 3º estágio de *Aedes aegypti*.

Foram testados o óleo essencial das folhas e alguns de seus componentes (compostos 11, 13 e mistura de 7 e 14), bem como as substâncias 9 e 6 isoladas da madeira (este último também presente no óleo essencial). Os valores de CL₅₀ obtidos são apresentados tabela 23, abaixo.

Tabela 23: Atividade larvicida frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti* realizado com compostos isolados do extrato etanólico da madeira e do óleo essencial de *N. megapotamica*

Substância pura/Fração	CL ₅₀ [µg/mL]
óleo essencial das folhas	79,89
<i>ent-caur-16-eno</i> (11)	>1000
biciclogermacreno (13)	>1000
elemicina (6)	96,05
elemicina (6) + espatulenol (14)	>1000
<i>rel</i> -(7S, 8S, 7'R, 8'R) – 3, 3', 4, 4',5, 5'-hexametoxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana (9)	74,35

A neolignana, *rel*-(7S, 8S, 7'R, 8'R) – 3, 3', 4, 4',5, 5'-hexametoxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana (9), apresentou atividade larvicida com um valor de CL₅₀ igual a 74,35 µg/mL. O óleo essencial das folhas e o fenilpropanóide 6, componente majoritário do óleo, apresentaram valores de CL₅₀ 79,89 e 96,05 µg/mL, respectivamente,. A atividade larvicida ligeiramente superior apresentada pelo óleo, em comparação com o valor obtido para um de seus componentes (elemicina 6), pode ser atribuída a um efeito sinérgico de todos ou alguns de seus componentes. A literatura relata atividades de fenilpropanóides contra *A. aegypti* (SIMAS *et. al.*, 2004) e efeito genotóxico (KARWICKA *et. al.*, 2008).

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente trabalho foi investigado a composição química da madeira e do óleo essencial das folhas de um espécime do Cerrado Sul Matogrossense de *N. megapotamica*, coletado no município de Campo Grande-MS.

O estudo químico da madeira resultou no isolamento e caracterização de dez substâncias pertencentes às classes dos fenilpropanóides, sesquiterpenos, esteróides e neolignanas, compreendendo:

- cinco fenilpropanóides, elemicina **6**; isoelemicina **4**; (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-prop-2-en-1-ol **5**, *treo*-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol **7**; 3-cloro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol **8**;

- uma neolignana, *rel*-(7S, 8S, 7'R, 8'R) - 3, 3', 4, 4', 5, 5'-hexametoxi- 7.O.7- 8, 8'-lignana **9**;

- três sesquiterpenos, *trans*-calameneno **2.**; cadaleno **1**; *trans*-1(10)-epóxi-4(15)-cariofileno **3**;

- um esteróide, β -sitosterol **10**;

Dentre as substâncias isoladas, o fenilpropanóide clorado 3-cloro-1-(3,4,5-trimetoxifenil)-propano-1,2-diol **8** é inédito e sendo o primeiro relato de um composto clorado no gênero, enquanto que o fenilpropanóide **5**, a neolignana **9** e o sesquiterpeno **2** são relatados pela primeira vez em Lauraceae e o sesquiterpeno **1** no gênero *Nectandra*.

A análise da composição química do óleo essencial das folhas está sendo descrita pela primeira vez e resultou na identificação de quinze substâncias, incluindo três monoterpenos (α -tujeno; 3-careno; limoneno), dez sesquiterpenos (isoledeno; δ -elemeno; β -elemeno; cariofileno; α -guaieno; α -humuleno; germacreno D; valenceno; biciclogermacreno, espatulenol), um fenilpropanóide (elemicina) e um diterpeno (*ent*-caur-16-eno), sendo os componentes majoritários elemicina (**6**, 82,3 %), biciclogermacreno (5,7%), *ent*-caur-16-eno (2,5%) e espatulenol (1,0%).

O óleo essencial das folhas, bem como alguns dos compostos isolados da madeira (**5**, **6**, **9**) e do óleo essencial (*ent*-caur-16-eno **11**; biciclogermacreno **13** e cariofileno **12**) foram avaliados com relação às suas propriedades antifúngica, antibacteriana e larvicida frente a *Aedes aegypti*. Dentre os resultados obtidos, pode-se destacar: a atividade

antifúngica do óleo essencial e do cariofileno **12** contra *Cryptococcus neoformans* (CIM 500 e 200 µg/mL, respectivamente) e do fenilpropanóide **5** contra *Candida krusei* (CIM 200 e 200 µg/mL) e atividade larvicida contra *A. aegypti* do óleo essencial (CL₅₀ 79,89 µg/mL), da neolignana **9** (CL₅₀ 74,35 µg/mL) e do fenilpropanóide **6** (96,05 µg/mL).

O presente trabalho contribuiu para o conhecimento da composição química de um espécime de *N. megapotamica* ocorrente em Mato Grosso do Sul, cujos estudos da composição química da casca do caule e dos componentes fixos das folhas já haviam sido efetuados em nosso laboratório.

Apesar de a literatura apresentar relatos da ocorrência de neolignanas e alcalóides em espécimes de *Nectandra megapotamica* coletados em outras regiões do Brasil, o espécime coletado em Mato Grosso do Sul forneceu predominantemente alil/propenilfenóis, que são unidades fundamentais para a biossíntese de lignanas e neolignanas e também substâncias de origem terpênica.

6. REFERÊNCIAS

- ABOU-GAZAR, HASSAN; BEDIR, ERDAL; TAKAMATSU, SATOSHI; FERREIRA, DANEEL; KHAN, IKHLAS. Antioxidant lignans from *Larrea tridentata*. *Phytochemistry*, 65, 2499-2505, 2004.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oils components by gas chromatography/ion trap mass spectrometry, Allured Publishin Corporation, Carol Stream, IL, USA, 1995.
- AGIUS, B. R.; SETZER, M.C.; STOKES, S.L.; WALKER, T.M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Composition and bioactivity of essential oils of Lauraceae from Monte Verde, Costa Rica., *International Journal of Essential Oil Therapeutics*, 1(4), 167-171, 2007.
- AGRAWAL, P. K.; THAKUR, R. S. ¹³C NMR spectroscopy of lignan and neolignana derivatives, *Magnetic Resonance Chem.*, 23, 389-418, 1985.
- AGRIPINO, D. G.; LIMA, M. E. L.; DA SILVA, M. R.; MEDA, C. I.; BOLZANI, V. S.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C.; MORENO, P. R. H. Screening of brazilian plants for antimicrobial, and DNA-damaging activities. Atlantic Rain forest – Ecological Station Jurêia-Itatins, *Biota Neotropica*, v.4, n°2, endereço online: <http://www.biotaneotropical.org.br/v4n2/pt/abstract?article+BN03804022004>.
- AIBA, CACILDA J.; GOTTLIEB, OTTO R.; PAGLIOSA, FRIDA M.; YOSHIDA, MASSAYOSHI; MAGALHÃES, MAURO T.; The chemistry of brazilian Lauraceae. Part 37. Neolignans from *Nectandra miranda*, 16(6), 745-748, 1977.
- ALMA, MEHMET HAKKI; MAVI, AHMET; YILDIRIM, ALI; DIGRAK, METIN; HIRATA, TOSHIFUMI. Screening chemical composition and *in Vitro* antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils from *Origanum syriacum* L. growin in Turkey, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 26(12), 1725-1729, 2003.
- ALPANDE DE MORAIS, A.; MOURÃO, J. CORREA; GOTTLIEB, O. R.; KOKETSU, M.; MOURSA, L. LANNES; LEÃO DA SILVA, M.; MARX, M. C.; MENDES, P. H.; MAGALHÃES, M. TAVEIRA. Terpenic oils from the State of Rio de Janeiro. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 44, 320-322, 1972.
- ALVES, H. M. Plantas como fitofármcos – *Cadernos temáticos de Química Nova na escola*, n° 3, Maio, 2001.
- APEL, MIRIAN A.; LIMA, MARCOS E. L.; SOUZA, AMANDA; CORDEIRO, INÊS; YOUNG, MARIA C. M.; SOBRAL, MARCOS E. G.; SUFFREDINI, IVANA B.; MORENO, PAULO R. Screening of the biological activity from essential oils of native species from the atlantic rain forest (SÃO PAULO – BRASIL), *Pharmacologyonline*, 3, 376-383, 2006.
- AVENIENTE, MÁRIO; PINTO EDUARDO F.; SANTOS, LOURIVALDO S.; ROSSI-BERGMAN, BARTIRA; BARATA, LAURO E. S. Structure-activty relationship of antileishmanials neolignan analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15, 7337-7343, 2007.
- AYRES, D. C.; LOYKE, J. D. Lignans Chemical, Biological and Clinical Properties, *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, Cambridge University Press, Cambridge, 1990.
- BALBOU, B. A. A.; AHMED, A. A.; OTSUKA, H.; ADAMS, A. 4- Hidroxifenilpropan-7,8-diols and derivatives from *Marvalina dominguensis*. *Phytochemistry*, 42, 1191 – 1193, 1996.
- BALLABENI, VIGILIO; TOGNOLINI, MASSIMILIANO; BERTONI, SIMONA; BRUMI, RENATO; GUERRINI, ALESSANDRA; RUEDA, GABRIELA MORENO; BAROCELLI, ELISABETTA. Antiplatelet antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm.(Lauraceae)calices from Amazoniam Equador, *Pharmacological Research*, 55, 23-30, 2007.
- BARBOSA FILHO, J. M. 2000. Lignanas, neo-lignanas e seus análogos. In: Simões, C. M. O. *et al.* Eds. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 2ª ed. Porto Alegre, Editora da UFRGS, 471-488, 2000.
- BARBOSA FILHO, JOSÉ M.; YOSHIDA, MASSAYOSHI; GOTTLIEB, OTTO R. The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part 89. Lignans from *Nectandra amazonum* and *N. glabrescens*, *Phytochemistry*, 28(7), 1991.

- BARRERA, ERICSSON DAVID COY; SUÁREZ, LUIZ ENRINQUE CUCA. Three new 7.3',8.5'-connected bicyclo[3.2.1]octanoids and other neolignans from leaves of *Nectandra amazonum* NEES. (Lauraceae), *Chem. Pharm. Bull.*, v.57, n.6, 639-642, 2009.
- BERNRD, PHILIPPE; RASE, DIDIER. Use of Lignans in pharmaceutical, cosmetical and/or nutraceuticals compositions. *PCT Int. Appl.*, 23p., 2008.
- BERTUCCI, ANA; HARETCHE, FEDERICO; OLIVARO, CRISTINA; VÁSQUEZ, ALVARO. Prospección química del Bosque de galería del río Uruguay, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(1), 21-25, 2008
- BOHLKE, MARK; GUINAUDEAU, HELENE; ANGERHOFER, CINDY K; WONGPANICH, VARIMA; SOEJARTO, DJADJA D.; FARNSWORTH, NORMAN R.; MORA, GERARDO A.; POVEDA, LUIS J. Costaricicne, a new antiplasmodial bisbenzilquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* Trunk Bark, *Journal of Natural Products*, 59(6), 576-580, 1996.
- BOHLMANN, FERDINAND; ZDERO, CHRISTA. Neue furanoeremophilane und andere sesquiterpene aus vertretern der gattung *Euryops*, *Phytochemistry*, v. 17, 1135-1153, 1978.
- BORGES, LUISA M. S.; CRAGG, SIMON M.; BERGOT, JULIEN; WILLIAMS, JOHN R.; SHAYLER, BEN; SAWYER, GERVAIS S. Laboratory screening of tropical hardwoods for natural resistance to the marine borer *Limnoria quadripunctata*: The role of leachable and non-leachable factors. *Holzforschung*, v.2, 99-111, 2008.
- CABRAL, M. M. O.; MENDONÇA, P. M.; GOMES, C. M. S.; BARBOSA FILHO, J. M.; QUEIROZ, M. M. C.; MELO, R. P. Biological activity of nelignans on the post-embryonic development of *Chrysomya megacephala*, *Fitoterapia*, 78, 20-24, 2007.
- CASTRO, O.; HASBURN, C.; CALDERON, M. A new aporphine alkaloid from *Nectandra sinuata*, *Fitoterapia*, 1991.
- CHAVERRI, CALOS; CICCIO, JOSÉ F. Essential oil of trees of the genus *Ocotea* (Lauraceae) in costa Rica. I. *Ocotea brenesii*, *Rev. Biol. Trop.*, v. 53, 431-436, 2005.
- CHEN, JHI-JUNG; WANG, TZU-YING; HWANG, TSONG-LONG. Neolignans, a coumarinolignan, lignan derivatives, and a chromene: anti-inflammatory: constituents from *Zanthoxylum avicennae*, *Journal of Natural Products*, 71(2), 212-217, 2008.
- CHERIGO, LILA; POLANCO, VENANCIO, ORTEGA-BARRIA, EDUARDO; HELLER, MARIA V.; CAPSON, TODD L.; RIOS, LUIS CUBILLA. Antitrypanosoma activity of a novel norlignan purified from *Nectandra lineata*, *Natural Product Research*, 19(4), 373-377, 2005.
- CICCIO, JOSE F.; CHAVERRI, CARLOS. Volatile constituents of the *Podadaphne quadriporata* (Lauraceae) from "Alberto M. Brenes" biological preserv, Costa Rica. *Química Nova*, 31, 3, 605-609, 2008.
- CICCIO, JOSE F.; CHAVERRI, CARLOS; DÍAZ, CECILIA. Volatile compounds of *Nectandra salicina* (Lauraceae) from Costa Rica and their cytotoxic activity on cell lines, *Química Nova*, v.32, n°4, 417-420, 2009.
- CLSI/NCCLS M-7-A6, Methods for Dilution Antimicrobial Suscetibility Test for Bacteria That que Grow Aerobically; Approved Standart – Sixth Edition Wayne, 2005.
- CONSERVA, L. M.; SILVA, M. S.; BRAZ FILHO, R. Lignans from *Aristolochia birostris*. *Phytochemistry*, 29, 257-260, 1990.
- CORDELL, GEOFFREY A. Biodiversity and drugs discovery – a relationship. *Phytochemistry*, vol. 55, 463-480, 2000.
- CORREA, P. M. Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Imprensa Nacional, Rio de Janeiro, Brasil, 1984.
- DA SILVA FILHO, ADEMAR A.; ALBUQUERQUE, SERGIO; SILVA, MÁRCIO; EBERLYN, MARCOS N.; TOMAZELA, DANIELA M.; BASTOS, JAIRO K. Tetrahydrofuran lignans from *Nectandra megapotamica* with tripanocidal activitiy. *Journal of Natural Products*, vol. 67, 42-45, 2004.

- DA SILVA FILHO, ADEMAR A.; ANDRADE E SILVA, MÁRCIO L.; CARVALHO, JOSÉ CARLOS T.; BASTOS, JAIRO K. Evaluation of analgesic and anti-inflammatory activities of *Nectandra megapotamica* (Lauraceae) in mice and rats, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 56(9), 1179-1184, 2004.
- DA SILVA FILHO, ADEMAR A.; COSTA, EVELINE S.; CUNHA, WILSON R.; SILVA, MÁRCIO L. A.; NANAYKKARA, DHAMMIKA N. P.; BASTOS, JAIRO K. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae), *Phytoterapy Research*, 22(10), 1307-1310, 2008.
- DE CARVALHO, MARIO G.I; YOSHIDA MASSAYOSHI; GOTTLIEB, OTTO R.; GOTTLIEB, HUGO E. The chemistry of Brazilian Lauraceae. Part 83. Lignans from *Nectandra turbacensis*, *Phytochemistry*, 26(1), 265-267, 1986.
- DE MELO, JULIANA OLIVEIRA; TRUIT, MARIA CONCEIÇÃO TORRADO; MUSCARA, MARCELO NICOLAS; BOLONHEIS, SIMONE MARQUES; DANTAS, JAILSON ARAÚJO, CAPARROZ-ASSEF, SILVANA MARTINS; CUMAN, ROBERTO KENJI NAKAMURA; BERSANI-AMADO, CIOMAR APARECIDA. Anti-inflammatory activity of crude extract and fractions of *Nectandra falcifolia* leaves, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2241-2245, 2006.
- DE MELO, N. T. K.; DIAS, I. E. C.; YOSHIDA, M. Constituintes químicos de *Nectandra saligna*, XVIII Simpósio de plantas medicinais do Brasil, livro de reumos, p.234, Manaus, 2004.
- DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. A search for bioactive compounds through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians, *Journal of Ethnopharmacology*, 77, 91-98, 2001.
- DOMINGUEZ, X. A.; SANCHEZ, H. V.; ESPINOZA, G. C. B.; VERDE, J. S.; ACHENBACH, H.; UTZ, W. Lignans and *nor*-lignans from *Krameria interior*, *Phytochemistry*, 29, 2651-2653, 1990.
- DONGMO, PIERRE M. JAZET; TATSADJIEU, LÉOPOLD N.; TCHOUMBOUNANG, FRANCOIS; SAMEZA, MODESTE L.; DONGMO, BERNADIN, NDONGSON; ZOLLO, PAUL H. A.; MENUT, CHANTAL. Chemical composition, antiradical and antifungal activities of essential oil of the leaves of *Cinnamomum zeylanicum* Blume from Cameron, *Natural Product Communications*, v.2, n°12, 1287-1290, 2007.
- DOS SANTOS FILHO, D.; SARTI, SILVIO JOSE. Alkaloids from *Nectandra megapotamica* (Spreng.) Chodat and Hassler: inhibitory activity of the growth of *Crithidia fasciculata* and *Tripanossoma cruzi*. *Revista da Faculdade de Farmácia e Odontologia de Ribeirão Preto* (USP), 17, 21-24, 1980
- DOS SANTOS FILHO, DAVID; GILBERT, B. The alkaloids of *Nectandra megapotamica*. *Phytochemistry* 14, 821-822, 1975.
- EKLUND, PATRICK; LANGUIK, OTTO K.; WARNA, JOHAN P.; SALMI, TAPIO O.; WILLFOR, STEFAN M.; SJOHOLM, RAINER E. Chemical studies an antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 3, 3336-3347, 2005.
- FESTER, G. A.; MARTINUZZI, E. A.; RETAMAR, J. A.; RICCIARDI, A. I. A. Argentine essential oils, *Rev. Foc. Ing. Chim., Univ. Natl. Litoral*, Santa Fé, 29, 21-44, 1960.
- FILHO, VALDIR CECHINEL; YUNES, ROSENDO A. Estratégia para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividade, *Química Nova*, 21(1), 1998.
- FONSECA, S. F.; BARATA, L. E. S.; RÚVEDA, E. A.; BAKER, P. M. ¹³C Nuclear magnetic resonance spectral and conformational analysis of naturally occurring tetrahydrofuran lignans. *Can. J. Chem.*, 57, 441-443, 1979.
- FRANCA, N. C.; GOTTLIEB, O. R. Constitutions of Rubrenolide and Rubrynlide: an Alkene-Alkine pair from *Nectandra rubra*, *J. C. S. Chem Comm.*, 514-515, 1972.
- FRANCISCO, ILZA A.; PINOTTI, MARIA HELENA PIMENTA. Cyanogenic glycosides in plants, *Brazilian Archives of biology and technology*, 43(5), 487-492, 2000.

- FUJITA, S.; FUJITA, Y. Miscellaneous contributions to the essential oils of the plants from various territories. On the components of the essential oils of *Cymbopogon goeringii* A. camus– *Yakugaku Zasshi – Journal of the Pharmaceutical society of Japan*. 92, 1285, 1972.
- GADELHA, D. P. & TODA, A. T. Biologia e comportamento de *Aedes aegypti*, *Rev. Brás. Malariol*, 37, 29-36, 1985.
- GARCEZ, F. R. ; GARCEZ, W. S. ; HAMERSKI, L. ; MARQUES, A. P. ; MIGUITA, C. H. Constituintes químicos das cascas do caule e das folhas de *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). 30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, SP, PN-286, 2007.
- GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; HAMERSKI, L.; MIGUITA, C. H. Fenilpropanóides e outros constituintes de *Nectandra megapotamica*. *Quím. Nova*, v. 32, nº 2, 2009.
- GARCEZ, FERNANDA R.; GARCEZ, WALMIR S.; MARTINS, MILENA; CRUZ, ALESSANDRO C. A bioactive lactone from *Nectandra gardneri*, *Planta Medica*, 65, 775, 1999.
- GOTTLIEB, O. R. Chemosistemais of the Lauraceae. *Phytochemistry*, 11, 1537-1570, 1972.
- GOTTLIEB, O. R.; YOSHIDA, M. Lignans. In: Rowe, J. W. Ed. *Natural Products of Woody Plants, I*. Berlin, Springer-Verlag, 439-511, 1989.
- GOTTLIEB, OTTO R.; KOKETSU, MIDORI; MAGALHÃES, MAURO T.; MAIA, GUILHERME S.; MENDES, PAULO H.; DA ROCHA, A. I.; DA SILVA, MIRIAM L.; WILBERG, VIKTOR C. Óleos essenciais da Amazônia VII, *Acta Amazônica*, 11(1), 143-148, 1981.
- GRUNDON, M. F.; MCGARVEY, E. B. Alkaloids from Greenheart. Part III. The structure of rodiasine. Mass Spectra of bisbenzylquinoline Alkaloids, *Journal of the Chemical Society*, 1082-1084, 1966.
- HAASE, KAREN; WANTZEN, KARL MATHIAS. Analyses and decomposition of condensed tannins in tree leaves. *Environmental Chemistry Letters*, 6, 71-75, 2008.
- HAMERSKI, LIDILHONE; MARQUES, ALINE P. Avaliação da atividade antioxidante e anticolinesterásica de substâncias isoladas das folhas de *N. megapotamica* Spreng. (Lauraceae), Resultados não publicados, 2007.
- HANSON, J. R.; SIVERNS, M.; PIOZZI, F.; SAVANA, G. C¹³ Nuclear Magnetic Resonance of kaurenoid diterpenes, *Journal of the Chemical. Society. Perkin Transactions I*, 114-117, 1976.
- HERNES, P. J.; HEDGES, J. I. Tannin signatures of barks, needles, cones and wood at the molecular level, *Geochimica et Cosmochimica acta*, v.8, nº6, 1293-1307, 2004.
- INAGAKI, FUYIHIKO; ABE, AKIRA. Analysis of ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance of spathulenol by two-dimensional methods, *Journal of the Chemical. Society. Perkin Transactions II*, 1773-1778, 1985.
- JANG, OK D.; CHO, DAE H.; CHAN-MOON, CHUNG. Neuroprotective dibenzylbutirolactone lignans of *Torreya nucifera*. *Planta Medica*, 67, 470-472, 2001.
- JIN, DA. Q.; LIM, SEUNG C.; HWANG, JAE K.; HA, ILHO; HAN, JUNG-SOO. Antioxidant and anti-inflammatory activities of macelignan in murine hippocampal cell line and primary culture of rat microglial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 331, 1264-1269, 2005.
- JURGENS, ANDREAS; FELDHAAR, FELDMEYER; BARBARA; FIALA, BRIGITTE. Chemical composition of leaf volatiles in *Macaranga* species (Euphorbiaceae) and their potential role as olfactory cues in host-localization of foundress queens of specific ant partners. *Biochemical Systematics and Ecology*, 34, 97-113, 2006.
- KARWICKA, EWA; MARCZEWSKA, JADWIGA; ANUSZEWSKA, ELZBIETA; LOZOWICKA, BOZENA; CHILMONCZYK, ZDZISLAW. Genotoxic of α -asarone analogues, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16, 6069-6074, 2008.
- KOROISHI, ANDREA M.; FOSS, SIMONE R.; CORTEZ, DIÓGENES A. G.; UEDA-NAKAMURA, TÂNIA; NAKAMURA, CELSO VATARO; DIAS FILHO, BENEDITO P. In vitro antifungal activity of extracts and neolignans from *Pipper regnellii* against dermatophytes, *Journal of Ethnopharmacology*, 117, 270-277, 2008.

- KOYAMA, JUNKO; MORITA, IZUMI; KOBAYASHI, NORIHIRO; HIRAI, KEIICHI; SIMAMURA, ERIKO; NOBUKAWA, TAKAHIRO; KADOTA, SHIGETOSHI. Antiallergic activity of aqueous extracts and constituents of *Taxus yunnanensis*, *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 29(11), 2310-2312, 2006.
- KRAFT, CAROLA; JENETT-SIEMS, KRISTINA; KHOLER, INGA; REBLIN-TOFERN, BRITTA; SIEMS, KARSTEN; BIENZLE, ULRICH; EICH, ECKART. Antiplasmodial activity of sesquignans and sesqueneolignans from *Bonamia spectabilis*, *Phytochemistry*, 60, 167-173, 2002.
- KIKUZAKI, HIROE; HARA, SANAE; KAWAI, YAYOI; NAKATANI, NOBUJI. Antioxidative phenylpropanoids from berries of *Pimenta dioica*, *Phytochemistry*, 52, 1307-1312, 1999.
- KUBITZKI, K.; ROHWER, J. G. *Bot. Acta*, 106, 88-99, 1993.
- LE QUESNE, PHILIP W.; LARRAHONDO, JESUS E.; RAFFAUF, ROBERT F. Antitumor plants. X. Constituents of *Nectandra rigida*, *Journal of Natural Products*, 1980.
- LEY, STEVEN V. & LEE, AI-LAN The synthesis of the anti-malarial natural product poliphorin and analogues using polymers-supported reagents and scavengers. *Organic Biomolecular Chemistry*, 1, 3957, 2003.
- LIN, LIE-CHWEN; SHEN, CHIEN-CHANG; SHEN, YUH-CHIANG; TSAI, TUNG-HU. Anti-inflammatory neolignans from *Piper kadsura*, *Journal of Natural Products*, 69(5), 842-844, 2006.
- LIU, YANGI; ZHAO, YINGHUI; LU, CHUNMING; ZHANG, XIAOLIN. Synthesis of natural insecticide 1,2,3-trimethoxy-5-(2-propenyl)benzene, *Zhengzhou Gongcheng Xueyuan Xuebao*, 23(4), 25-28, 2003
- LORENZI, H. *Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil*. 4ª ed., Nova Odessa, Instituto Plantarum, v.1, 2002.
- MA, CHON. J.; KIM, SO R.; KIM, SINWOON; KIM, YUONG C. Meso dihydroguaiaretic acid and licarin A of *Machilins thunbergii* protect against glutamate-induced toxicity in primary cultures of a rat cortical cells. *British Journal of Pharmacology*, 146, 752-759, 2005.
- MA, CUIYING; ZHANG, HONG JIE; TAN, GHEE TENG; HUNG, NGUYEN VAN; CUONG, NGUYEN MANH; SOEJARTO, D. DOEL; FONG, HARRY H. S. Antimarial compounds from *Grewia billamelata*, *Journal of Natural Products*, 69, 346-350, 2006.
- MANN, J. Secondary Metabolism, second edition, Oxford University press, 1995.
- MARQUES, CARLOS A. Importancia econômica da família Lauraceae Lindl. *Floresta e ambiente*, 8, 1, 295-206, 2001.
- McMURRY, JOHN E.; BOSCH, GREGORY K. Synthesis of Macrocyclic Terpenoid hydrocarbons by intramolecular carbonyl coupling: bicyclogermacrene, lepidozene, and casbene, *The journal of Organic Chemistry*, 52, 4885-4893, 1987.
- MCRAE, W. D.; TOWERS, G. N. H.; Biological activities of lignans, *Phytochemistry*, 23, 1207-1220, 1984.
- MIRANDA, ANA C. M.; GARCEZ, FERNANDA R. Sesquiterpenos ácidos das cascas do caule de *N. cissiflora*, Dissertação de mestrado-UFMS, 2008.
- MORO, JOSE C.; FERNANDES, JOÃO B.; VIEIRA, PAULO C.; YOSHIDA MASSAYOSHI; GOTTLIEB, OTTO R.; GOTTLIEB, HUGO E. The chemistry of brazilian Lauraceae. Part LXXIX. Neolignans from *Nectandra puberula*, *Phytochemistry*, 26(1), 269-272, 1987.
- MUÑOZ, V., SAUVIAN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L. ORTIZ, B. GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part I: Evaluation of antimalarial activity of plants used by the Cacobo indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 69, 127-137, 2000.
- NAVES, YVES RENE. Volatile plant substances. CXVIII. The essential oil of Louro inhamuy (*Nectandra elaiophora*), Bulletin de la Societe Chimique de France, 987-981, 1951.
- NUNEZ, C. V.; ROQUE, N. F. Sesquiterpenos e esteróides da casca do tronco de *Guarea guidonea* (L.) Sleumer (Meliaceae). Dissertação de mestrado, Instituto de Química, USP, São Paulo, 1996.

- PINO, JORGE A.; MARBOT, ROLANDO; PAYO, ARMANDO; CHAO, DANIEL; HERRERA, PEDRO. Aromatic plants from Western Cuba. III. Compositions of the leaf oils of *Lippia strigulosa* (Mart Et Gal) Mold. And *Nectandra coriacea* (Sw) Griseb. *Journal of Essential Oil Research*, 17(6), 648-650, 2005.
- PIO CORRÊA, M. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 1-6, 1984.
- RAGGI, LUDMILA & YOUNG, MARIA C. M. Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano, Dissertação Mestrado – Instituto de Botânica da Secretaria do Estado do Meio Ambiente, 67p., 2008.
- RAO, K. V.; ALVAREZ, F. M. Chemistry of *Saururus cernuus*. I. Saucermetin, a new neolignan. *J. Nat. Prod.*, 45, 393, 1982.
- REZENDE, KÊNIA. R.; DAVINO, SOLANGE C.; BARROS, SILVIA, B. M.; KATO MASSUO J. Antioxidant activity of aryltetralone lignans and derivatives from *Virola sebifera* (Aubl.). *Natural Products Research*. 19, 661-666, 2005.
- RIBEIRO, ALAN B.; BOLZANI, VANDERLAN DA S.; YOSHIDA MASSAYOSHI; SANTOS, LEONARDO S.; EBERLIN, MARCOS N.; SILVA, DULCE H. S.; A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*, *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3B), 526-530, 2005.
- RIVEIRO-CRUZ, BLANCA; RIVEIRO-CRUZ, ISABEL; RODRÍGUEZ, JUAN, M.; CERDA-GARCÍA-ROJAS, CARLOS, M.; MATA, RACHEL. Qualitative and quantitative analysis of the active components of the essential oil from *Brickellia veronicaefolia* by nuclear magnetic resonance spectroscopy, *Journal of Natural Products*, v. 69, n°8, 1172-1176, 2006.
- ROYAL BOTANIC GARDENS, KEW. Vascular Plant Families and Genera. <http://www.rbgekew.org.uk/web/dbs/genlist.html>. Acessado em 14/2/2007.
- SADIK, G.; ISLAM, R.; RAHMAN, M. M.; KHONDKAR, P.; RASHID, M. A.; SARKER, S. D. Antimicrobial and cytotoxic constituents of *Laranthus globosus*. *Fitoterapia*, 74, 308-311, 2003.
- SCHOMBURG, G. Gas chromatography – A practical course. New York, ed. VCH Ltda., 293p., 1990.
- SCORA, RAINER W.; SCORA, PETER E. Essential oil leaf of *Persea* subgenus and closely related *Perseoid* genera, *Journal of Essential Oil Research*, 13(1), 37-42, 2001.
- SERRA, STEFANO; FUGANTI, CLAUDIO. Aromatic annulation on the *p*-menthane monoterpenes: enantiospecific synthesis of the trans and cis isomers of calamenene and 8-hydroxycalamenene, *Tetrahedron Letters*, 46, 4769-4772, 2005.
- SETZER, WILLIAM N.; STOKES, SEAN L.; PENTON, ASHLEY F.; TAKAKU, SAYAKA; HABER, WILLIAM A.; HANSELL, ELIZABETH, CAFFREY, CONOR R.; MCKERROW, JAMES H. Cruzain Inhibitory activity of leaf essential oil of neotropical Lauraceae and essential oil components, *Natural Product Communications*, v.2, n° 12, 1203-1210, 2007.
- SETZER, WILLIAM N.; TAKAKU, SAYAKA; STOKES, SEAN L.; PENTON, ASHLEY F. Inhibition of cruzain by *Ocotea* leaf essential oils from Monte Verde, Costa Rica, *Pharmacologyonline*, 3, 785-793, 2006.
- SILVA, MÁRCIO LUIS ANDRADE E.; BASTOS, JAIRO KENUPP; DONATE, PAULO MARCOS; DE ALBUQUERQUE, SÉRGIO; DA SILVA, ROSANGELA Process to obtain dibenzylbutyrolactonic, tetrahydrofuranic lignans and their synthetic and semi-synthetic derivatives, their analgesic and anti-inflammatory activities, topical and/or systemic formulations containing said lignans and their respective therapeutic method. *PCT Int. Appl.*, 20pp., 2006.
- SIMAS, NAOMI KATO; LIMA, ELISÂNGELA DA COSTA; CONCEIÇÃO, SHEILA DA ROCHA; KUSTER, RICARDO MACHADO; DE OLIVEIRA FILHO, ALFREDO MARTINS. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – Atividade larvicida de *Myrosylum balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides, *Química Nova*, v. 27, n° 1, 46-49, 2004.
- SLISH, D. F.; UEDA, H.; ARVIGO, R.; BALICK, M. J. Ethnobotany in the search for vasoactive herbal medicines, *Journal of ethnopharmacology*, 66(2), 159-165, 1999.

- SUAREZ, MARGOTH; BONILLA, JORGE; DE DIAS, AURA M. P.; ACHENBACH, HANS. Studies of Colombian Lauraceae. Dehydrodieneenols from *Nectandra polita*, *Phytochemistry*, 22(2), 609-610, 1983.
- TALENTI, EDILBERTO C. J.; MANCINI, PEDRO M. E.; RETAMAR, JUAN A. Essential oil of *Nectandra falcifolia*. *Essenze, Derivati Agrumari*, 51(2), 121-128, 1981
- TIWARI, SUDHANSHU. A rich source of Herbal Medicinal, *Journal of Natural Products*, v.1, 27-35, 2008.
- TOFERN, BRITTA; SIEMS-JENET, KRISTINA; SIEMS, KARSTEN; JAKUPOVIC, JASMIN; EICH, ECKART. Bonaspectins and neobonaspectins, first sesquilignans and sesquieolignans from a Convolvulaceous species. *Phytochemistry*, 53, 119-128, 2000.
- TRUITI, M. C. T.; FERREIRA, I. C. P.; ZAMUNER, M. L. M.; NAKAMURA, C. V.; SARRAGIOTTO, M. H.; SOUZA, M. C. Antiprotozoal and molluscicidal activities of five Brazilian plants, *Revista Brasileira de pesquisas médicas e biológicas*, 38(12), 1873-1878, 2005.
- TRUITI, M. C. T.; BERSANI-AMADO, CIOMAR APARECIDA; DIAS FILHO, BENEDITO PRADO; SARRAGIOTTO, M. H.; DE SOUZA, MARIA CONCEIÇÃO. Screening of five brazilian plants for anti-inflammatory and antimicrobial activities, *Pharmaceutical biology*, 4(7), 516-521, 2006.
- TRUITI, MARIA CONCEIÇÃO TORRADO; BERSANI-AMADO, CIOMAR APARECIDA; FILHO, BENEDITO PRADO DIAS; SARRAGIOTTO, MARIA HELENA; DE SOUZA, MARIA CONCEIÇÃO. Screening of five brazilian plants for Anti-inflammatory and Antimicrobial activities, *Pharmaceutical Biology*, v.4, n°7, 516-521, 2006.
- TRUITI, MARIA DA CONCEIÇÃO TORRADO; NAZARA, ANELISE SAMARA; SARRAGIOTTO, MARIA HELENA; DE SOUZA, MARIA CONCEIÇÃO. Isolamento do canferol 3-O-ramnopiranosídeo da espécie de *Nectandra falcifolia* (Lauraceae), XI Encontro de Química da Região Sul (XI SBQSUL), Pelotas-RS, 2003.
- UMEZAWA, TOSHIAKI. Diversity in lignan biosynthesis, *Phytochemistry Reviews* 2, 371-390, 2003.
- UMEZAWA, TOSHIAKI; SHIMADA, M. Formation of the lignan (+)-secoisolaricresinol by cell-free extracts of *Articum lappa*, *Bioscience biotechnology Biochemistry*, 60, 736-737, 1996.
- VALLEY, PETER SCORA MORENO; SCORA, RAYNER W. Phytochemistry of *Nectandra umbrosa* Berries, Cloudforest Food of the Resplendet Quetzal, *California Avocado Society*, 83, 163-171, 1999.
- VICENZI, M. DE; VICENZI, A. DE; SILANO, M. Constituents of aromatic plants: elemicin, *Fitoterapia*, 75, 615-618, 2004.
- WERFF, H. W.; RICHTER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. *Annals of Missouri Botanical Garden*, v.8, p.419-432, 1996.
- WERKA, JENNIFER SCHMIDT; BOEHME, AMELIA K.; SETZER, WILLIAM N. Biological activities of essential oils from MonteVerde, Costa Rica, *Natural Products Communications*, v.2, n°12, 1215-1219, 2007.
- WHO. World health fact sheet 94, WHO Press: Geneva, 1998.
- WRIGHT, J. L. C.; Mc INNES, A. G.; SHIMIZU, S.; SMITH, D.G.; WALTER, J. A.; IDLER, D.; KHALIL, W. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterol by carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Canadian Journal of Chemistry*, 56, 1898- 1903, (1978).
- WU, X.; VOGLER, B.; HABER, W.; SETZER, W. N. A phytochemical investigation of *Nectandra membranacea* from Monte Verde, Costa Rica – *Nat. Prod. Comm.* 1, 465-468, 2006.
- YAMAUCHI, SATOUSHI; HAYASHI, YOSHIMASA; NAKASHIMA, YUKI; KIRIKIHIRA, TAKUYA; YAMADA, KAZUKI; MASUBA, TOSHIYA. Effect of benzilic oxygen on the antioxidant activity of phenolic lignans. *Journal of Natural Products*, 68, 1459-1470, 2005.
- YU, Y. U.; KANG, S. Y.; PARK, H. Y.; SUNG, H. S.; LEE, E. J.; KIM, S. Y.; KIM, Y. C. Antioxidant lignans from *Machilus thunbergii* Project CCl₄ - injured primary cultures of rat hepatocytes. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 52, 1163-1169, 2000.

ZHAI, HAIFENG; INOUE, TAKAKO; MORIYAMA, MIYAKO; ESUMI TOMOYUKI; MITSUMOTO, YASUhide; FUKUYAMA. Neuroprotective effects of 2,5-diaryl-3,4-dimethyltetrahydrofuran neolignans. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, vol. 28, 289-293, 2005.