UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE QUÍMICA

Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos
secundários de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)

TESE DE DOUTORAMENTO

MARIKO FUNASAKI

ORIENTADOR

Massuo Jorge Kato

SÃO PAULO

Março de 2006

Depositado na SPG do IQUSP
em 31/03/2006 (trinta e hum de
março de dois mil e seis)
CIRC. CoPGr/009/2000 de
25/02/2000

Estruturas, atividade biológica e biossíntese de metabólitos
secundários de *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae)

Agradecimentos

Ao Prof. Massuo J. Kato pela orientação e amizade durante todo o período de convivência.

Ao Prof. Massayoshi Yoshida pela oportunidade de iniciar o trabalho no Laboratório de Produtos Naturais do IQ-USP e pela sabedoria.

À Profa. Eny E. I. S. Floh e colegas do laboratório da BIO-CEL: Carmen, Claudete, Tiago, Vanildo pela oportunidade do trabalho conjunto e pelo convívio.

Aos funcionários da Central Analítica: Alessandra, Alfredo, Antônio, Fernando, Márcio, Míriam e Cristiane pela atenção na obtenção dos espectros e análises obtidos.

À todos os funcionários do IQ-USP e IB-USP.

À Profa. Edna T. M. Kato e Dominique C. H. Fischer pelo apoio e alegria.

Ao Prof. Oswaldo Horikawa pelo conselho.

Ao Prof. Katsuhiko Konno pela obtenção de espectros de massas.

À Dra. Maria C. M. Young pela realização dos ensaios contra fungos.

Aos colegas do Instituto Butantã: Gisele e Yara, pela colaboração nos ensaios de atividade antiinflamatória.

Aos colegas do Laboratório de Produtos Naturais: Adalberto, Alberto, Ana Paula, Antônio, Clécio, Daniel Vassão, Diego, Elba, Elvis, Fernando Macabro, Ingrid, João Homero, João Lago, Joca, Juliana, Karina, Lucas, Lydia, Marcos, Marisi, Renata, Sérgio e Tatiana pela amizade, discussão e acompanhamento do projeto.

Aos amigos de outros laboratórios do IQ-USP: Celize, Giovana e Sandra pela coragem transmitida.

Aos meus pais e irmãos por tudo.

Ao CNPq, CAPES e FAPESP pelas bolsas concedidas e outros auxílios concedidos.

CONTEÚDO

Lista de figuras	iv
Lista de tabelas	vi
Abreviaturas	viii
Resumo	x
Abstract	xi
1. Introdução	1
1.1. O gênero <i>Ocotea</i> e seus metabólitos secundários	2
1.2. <i>Ocotea catharinensis</i>	33
1.3. Atividade biológica de lignóides	33
1.4. Biossíntese de lignóides	34
1.5. Lignóides em cultura de células e tecidos	39
2. Objetivos	42
3. Experimental	43
3.1. Instrumentos	43
3.2. Materiais	44
3.2.1. Solventes e reagentes	44
3.2.2. Colunas e placas cromatográficas	44
3.2.3. Material vegetal	44
3.3. Estudo fitoquímico dos extratos das folhas	45
3.3.1. Obtenção dos extratos das folhas	45
3.3.2. Fracionamento dos extratos das folhas	46
3.3.3. Recristalização e análise por cristalografia de raios-X	47
3.3.4. Extração do óleo essencial das folhas	47
3.4. Propagação <i>in vitro</i> de <i>O. catharinensis</i> e estudo fitoquímico dos embriões somáticos e calos	48
3.4.1. Obtenção e multiplicação de material vegetal <i>in vitro</i>	48
3.4.1.1. Embriões somáticos	48
3.4.1.2. Calos	49
3.4.1.3. Suspensões celulares	49

3.4.1.4. Obtenção da curva de crescimento	50
3.4.1.5. Condições de cultivo <i>in vitro</i>	50
3.4.2. Obtenção dos extratos de embriões somáticos, calos e suspensões celulares	51
3.4.3. Fracionamento do extrato dos embriões somáticos	51
3.4.4. Extração do óleo essencial dos embriões somáticos	51
3.5. Atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas	52
3.5.1. Atividade antioxidante através do método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila).....	52
3.5.2. Atividade antifúngica através do método de bioautografia	53
3.5.3. Atividade antiinflamatória através do método de edema de pata	53
3.5.3.1. Método 1: preparação com detergente Tween-80	53
3.5.3.2. Método 2: preparação com albumina bovina sérica.....	54
3.6. Estudo biossintético das neolignanas isoladas de <i>O. catharinensis</i>	55
3.6.1. Preparação do ácido [8- ¹⁴ C]-ferúlico	55
3.6.2. Administração de L-[U- ¹⁴ C]-fenilalanina nos embriões somáticos.....	55
3.6.3. Administração de L-[1- ¹³ C]-fenilalanina nos embriões somáticos	56
3.6.4. Administração de ácido [8- ¹⁴ C]-ferúlico nos embriões somáticos.....	56
3.6.5 Bioconversão de precursores nas suspensões celulares.....	56
3.6.5.1. Teste de bioconversão de precursores sob luz.....	56
3.6.5.2. Teste de bioconversão de precursores na ausência de luz	58
3.6.6. Bioconversão de precursores por frações enzimáticas	58
3.6.6.1 Preparação de tampões e soluções para extração das enzimas.....	58
3.6.6.2. Extração das proteínas solúveis dos embriões.....	59
3.6.6.3. Extração das proteínas de parede celular das folhas	59
3.6.6.4. Dosagem de proteínas totais nos extratos enzimáticos.....	60
3.6.6.5. Teste de bioconversão de precursores por frações enzimáticas	60
3.6.6.6. Avaliação da atividade peroxidásica de frações enzimáticas.....	61
3.7. Dados espectroscópicos das substâncias isoladas.....	61
 4. Resultados e Discussão	 80
4.1. Considerações sobre as neolignanas isoladas.....	80
4.2. Determinação estrutural das substâncias isoladas.....	80
4.2.1. Neolignanas	80
4.2.2. Sesquiterpenos.....	90

4.2.3. Flavonóide glicosilado	92
4.2.4. Fenilpropanóide.....	93
4.2.5. Ácidos graxos e esteróides	94
4.4. Análise dos óleos essenciais das folhas e embriões somáticos.....	95
4.4.1. Óleos essenciais das folhas	95
4.4.2. Óleos essenciais dos embriões somáticos.....	98
4.5. Atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas	98
4.5.1. Atividade antioxidante através do método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila)	98
4.5.2 Atividade antifúngica através do método de bioautografia	99
4.5.3. Atividade antiinflamatória através do método de edema de pata	100
4.5.3.1. Método 1: Preparação com detergente Tween-80	100
4.5.3.2. Método 2: Preparação com albumina bovina sérica (BSA)	101
4.6. Estudo biossintético das neolignanais isoladas de <i>O. catharinensis</i>	103
4.6.1. Preparação do ácido [8- ¹⁴ C]-ferúlico	103
4.6.2. Administração de L-[U- ¹⁴ C]-fenilalanina nos embriões somáticos.....	103
4.6.3. Administração de L-[1- ¹³ C]-fenilalanina nos embriões somáticos	105
4.6.4. Administração de ácido [8- ¹⁴ C]-ferúlico nos embriões somáticos.....	111
4.6.5. Bioconversão de precursores nas suspensões celulares.....	113
4.6.5.1. Curva de crescimento de suspensões celulares	113
4.6.5.2. Teste de bioconversão de precursores nas suspensões celulares	113
4.6.6. Bioconversão de precursores por frações enzimáticas	116
4.6.6.1. Dosagem de proteínas totais nos extratos enzimáticos	116
4.6.6.2. Teste de bioconversão de precursores utilizando frações enzimáticas.....	116
4.6.6.3. Avaliação da atividade peroxidásica de frações enzimáticas	118
5. Conclusões	119
6. Referências bibliográficas	121

Lista de figuras

Figura 1-1. Diagrama de Dahlgren para Angiospermae	2
Figura 1-2. Interconversão entre neolignanas benzofurânica e biciclooctânica.....	4
Figura 1-3. Rearranjo de Cope, retro-Claisen e Claisen de neolignanas benzofurânicas ..	4
Figura 1-4. Estruturas de lignóides biologicamente ativos	34
Figura 1-5. Principais conexões entre o metabolismo primário e secundário em plantas	35
Figura 1-6. Rota biossintética de fenilpropanóides.....	36
Figura 1-7. Estruturas de ressonância dos radicais fenilpropanoídicos.....	36
Figura 1-8. Incorporação <i>in vivo</i> de fenilpropanóides em <i>Forsythia suspensa</i>	37
Figura 1-9. Biossíntese de lignanas de espécies de <i>Forsythia</i>	38
Figura 1-10. Formação do (+)-conocarpano a partir de <i>p</i> -hidróxi-propenil-benzeno	38
Figura 1-11. Formação do grandisina a partir do <i>E</i> -5-metóxi-isoeugenol.....	39
Figura 1-12. Biogênese de neolignanas benzofurânicas e biciclooctânicas	41
Figura 3-1. Plantas de <i>O. catharinensis</i> localizadas no Parque Estadual da Cantareira-SP	45
Figura 3-2. Fluxograma de fracionamento do extrato das folhas de <i>O. catharinensis</i>	46
Figura 3-3. Cultura de tecidos e células de <i>O. catharinensis</i>	50
Figura 3-4. Fluxograma de fracionamento do extrato dos embriões somáticos de <i>O. catharinensis</i>	52
Figura 3-5. Curva de calibração da neolignana 2	54
Figura 3-6. Experimento de bioconversão de precursores nas suspensões celulares	57
Figura 3-7. Espectro de RMN de ^1H de 1 (200 MHz, CDCl_3).....	63
Figura 3-8. Espectro de RMN de ^1H de 2 (200 MHz, CDCl_3).....	64
Figura 3-9. Espectro de RMN de ^{13}C de 2 (50 MHz, CDCl_3)	65
Figura 3-10. Espectro de RMN de ^1H de 3 (200 MHz, CDCl_3).....	66
Figura 3-11. Espectro de RMN de ^{13}C de 3 + 4 (50 MHz, CDCl_3)	67
Figura 3-12. Espectro de RMN de ^1H de 4 (200 MHz, CDCl_3).....	68
Figura 3-13. Espectro de RMN de ^1H de 5 + 1 (200 MHz, CDCl_3).....	69
Figura 3-14. Espectro de RMN de ^1H de 6 (200 MHz, CDCl_3).....	70
Figura 3-15. Espectro de RMN de ^1H de 7 (200 MHz, CDCl_3).....	71
Figura 3-16. Espectro de RMN de ^1H de 8 (200 MHz, CDCl_3).....	72
Figura 3-17. Espectro de RMN de ^{13}C de 8 (50 MHz, CDCl_3)	73
Figura 3-18. Espectro de RMN de ^1H de 9 (200 MHz, CDCl_3).....	74
Figura 3-19. Espectro de RMN de ^{13}C de 9 (50 MHz, CDCl_3).	75

Figura 3-20. Espectro de RMN de ^1H de 10 (200 MHz, MeOH- d_6).....	76
Figura 3-21. Espectro de RMN de ^1H de 10 (300 MHz, acetona- d_6)	77
Figura 3-22. Espectro de RMN de ^{13}C de 10 (50 MHz, MeOH- d_6)	78
Figura 3-23. Espectro de RMN de ^1H do ácido ferúlico (200 MHz, CDCl_3).....	79
Figura 4-1. Esqueletos de neolignanas isoladas de <i>O. catharinensis</i>	80
Figura 4-2. Proposta de fragmentação do espectro de EM-EM (ESI) da neolignana 1	81
Figura 4-3. Cristais obtidos por recristalização da neolignana 2	86
Figura 4-4. Estrutura molecular ORTEP para neolignana 2	86
Figura 4-5. Substâncias analisadas por teste de atividade antioxidante através do método de DPPH.....	99
Figura 4-6. Aumento do volume das patas em ensaio antiinflamatório da neolignana 2 utilizando o método de Tween	100
Figura 4-7. Aumento do volume das patas em ensaio antiinflamatório da neolignana 2 utilizando o método de BSA	101
Figura 4-8. Aumento do volume das patas em ensaio de antiinflamatório da fração clorofórmica do extrato das folhas utilizndo o método de BSA.....	102
Figura 4-9. CLAE da fração clorofórmica do extrato dos embriões somáticos.	104
Figura 4-10. Espectros de EM-EM (ESI) da neolignana 2 , após incorporação de L-[1- ^{13}C]-fenilalanina, no modo positivo: (A) m/z=389,0/390,5/391,5; (B) ampliação de (A).....	107
Figura 4-11. Espectros de EM-EM (ESI) da neolignana 3 após incorporação de L-[1- ^{13}C]-fenilalanina, no modo positivo: (A) m/z=373,0/374,0/375,0; (B) ampliação de (A).....	108
Figura 4-12. Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação de L-[1- ^{13}C]-fenilalanina (A) na neolignana 2 e (B) na neolignana 3	109
Fig 4-13. Espectro de RMN de ^{13}C (A) de abundância natural de neolignana 2 ; (B) obtido após a administração do L-[1- ^{13}C]-fenilalanina em neolignana 2 ; (C) neolignana 3	110
Figura 4-14. Análise por CLAE da incorporação de ácido [8- ^{14}C]-ferúlico nos embriões somáticos (12 horas após a administração do ácido [8- ^{14}C]-ferúlico).	112
Figura 4-15. Curva de crescimento de suspensões celulares.	113
Figura 4-16. Análise por CLAE da bioconversão de precursores nas suspensões celulares na condição (a); A: extrato das células; B: extrato dos meios.....	115

Figura 4-17. Análise por CLAE da bioconversão dos precursores pelo A extrato enzimático da proteína solúvel da fração 20-50% de (NH ₄) ₂ SO ₄ ; B extrato enzimático da parede celular.	117
Figura 5-1. Proposta de rota biossintética de neolignanas em <i>O. catharinensis</i>	120

Lista de tabelas

Tabela 1-1. Metabólitos secundários de espécies de <i>Ocotea</i>	7
Tabela 3-1. Parâmetro de análises por cristalografia de raios-X da neolignana 2	47
Tabela 4-1. Dados de RMN de ¹ H de 1 [CDCl ₃ , 200 MHz, δ (<i>J</i> em Hz)].	81
Tabela 4-2. Neolignanas hexaidrobenzofurânicas isoladas de <i>O. catharinensis</i>	82
Tabela 4-3. Dados de RMN de ¹ H de 2-5 [CDCl ₃ , 200 MHz, δ (<i>J</i> em Hz)].	84
Tabela 4-4. Dados de RMN de ¹³ C de 2-4 [CDCl ₃ , 50 MHz, δ (<i>J</i> em Hz)].	85
Tabela 4-5. Comprimentos de ligação (Å) determinados por cristalografia de raios-X para a neolignana 2	87
Tabela 4-6. Ângulos de ligação (°) determinados por cristalografia de raios-X para a neolignana 2	88
Tabela 4-7. Dados de RMN de ¹ H de 6 e 7 [CDCl ₃ , 200MHz, δ (<i>J</i> em Hz)].	90
Tabela 4-8. Dados de RMN de ¹ H (200 MHz) e de ¹³ C (50 MHz) de 8 [CDCl ₃ , δ (<i>J</i> em Hz)].	91
Tabela 4-9. Dados de RMN de ¹ H (200MHz) e de ¹³ C (50 MHz) de 9 [CDCl ₃ , δ].	92
Tabela 4-10. Dados de RMN de ¹ H de 10 [δ (<i>J</i> em Hz)].	93
Tabela 4-11. Dados de RMN de ¹³ C de 10 [50 MHz; δ].	94
Tabela 4-12. Substâncias identificadas dos calos de <i>O. catharinensis</i> por CG/EM.	95
Tabela 4-13. Índice de retenção em coluna DB-5 e LM-120 e porcentagens relativas de componentes nos óleos essenciais das folhas de <i>O. catharinensis</i>	97
Tabela 4-14. Quantidade relativa dos grupos de componentes de óleos essenciais das folhas de <i>O. catharinensis</i>	98
Tabela 4-15. Excesso enantiomérico (% ee) de monoterpenos.	98
Tabela 4-16. Teste de atividade antioxidante do extrato e substâncias isoladas de <i>O. catharinensis</i> empregando o método de DPPH.	99
Tabela 4-17. Teste de atividade antifúngica do extrato etanólico e do óleo essencial das folhas empregando o método de bioautografia.	100
Tabela 4-18. Incorporação de L-[U- ¹⁴ C]-fenilalanina nas neolignanas (%) nos embriões somáticos de <i>O. catharinensis</i>	104

Tabela 4-19. Incorporação da L -[1- ^{13}C]-fenilalanina nas neolignanas 2 e 3 (%).	106
Tabela 4-20. Incorporação de ácido [8- ^{14}C]-ferúlico nos embriões somáticos (%; incorporação).	111

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AcOEt	acetato de etila
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CG	cromatografia gasosa
CH ₂ Cl ₂	diclorometano
CL	cromatografia líquida
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CPC	cromatografias planares comparativas
CPP	cromatografias planares preparativas
<i>d</i>	dubleto
Da	Dalton
<i>dd</i>	duplo dubleto
DMSO	dimetilsulfóxido
DPM	desintegração por minuto
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazila
DTT	ditiotreitól
EDTA	ácido etileno diamino tetracético
EM	espectrometria de massas
EtOH	etanol
g	gramas
Gu	guaiacila (4-hidroxi-3-metóxfenila)
hex	hexano
HRP	("horseradish peroxidase") peroxidase de raíz forte
Hz	hertz
<i>i. pl.</i>	intraperitoneal
i-PrOH	isopropanol
<i>J</i>	constante de acoplamento
Kgf	kilograma-força
K-Pb	tampão fosfato básico
LD ₅₀	50% da dose letal
LQPN	laboratório de química de produtos naturais
M	molar
<i>m</i>	múltiplo
Me	metila

MeOH	metanol
MHz	megahertz
Mp	metóxi piperonila (3,4-metilenodioxo-5-metóxi fenila)
m/z	relação massa-carga
NADH	nicotinamida adenina dinucleotídeo (forma reduzida)
OMe	metoxila
pH	potencial de hidrogênio
PVPP	polivinil-pirrolidona
Pi	piperonila (3,4-metilenodioxifenila)
RMN	ressonância magnética nuclear
rpm	rotação por minuto
s	singleto
Si	siringila (4-hidroxi-3,5-dimetóxi fenila)
THF	tetraidrofurano
TOF	tempo de voo
UV	ultravioleta
VCS	volume celular sedimentado
Ve	veratril (3,4-dimetoxifenila)
W	watt
Z	“ <i>zusammen</i> ” (<i>cis</i>)
δ	deslocamento químico
λ	comprimento de onda

RESUMO

O estudo fitoquímico das folhas de *Ocotea catharinensis* (Lauraceae) resultou no isolamento da neolignana tetraidrofurânica veraguensina (**1**) e do flavonóide glicosilado afzelina (**10**), ainda não descritas para a espécie, além de quatro neolignanas hexaidrobenzofurânicas (**2-5**) anteriormente descritas para mesma. Nos embriões somáticos *in vitro* constatou-se o acúmulo de duas neolignanas hexaidrobenzofurânicas (**2, 3**) e duas biciclo[3.2.1]octânicas (**6, 7**), dois sesquiterpenos (**8, 9**) e um fenilpropanóide (**11**). A neolignana biciclo[3.2.1]octânica (7*S*,8*R*,1'*R*,2'*R*,3'*R*)-2'-acetoxi-3,4-metilenodioxi-3',5'-dimetoxi-4'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.3'-neolignana (**7**), o sesquiterpeno (-)-eudesm-11-em-4 α -ol (**9**) e o fenilpropanóide 6-metóxieugenol (**11**) não haviam sido isolados anteriormente desta espécie. O perfil dos metabólitos secundários incluíram análises do óleo essencial das folhas cuja análise indicou a predominância de mono- e sesquiterpenos e ausência de fenilpropanóides. Além disso, foram avaliadas atividades antifúngica e antioxidante nos extratos e substâncias isoladas. A fração de CHCl₃ do extrato etanólico mostrou atividade antifúngica contra *Cladosporium cladosporioide* ou *C. sphaerospermum*. As frações de CHCl₃ e de AcOEt do extrato etanólico, as neolignanas hexaidrobenzofurânica (**5**), biciclooctânica (**6**), o flavonóide glicosilado (**10**) e o fenilpropanóide (**11**) apresentaram atividade antioxidante através do método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila). A avaliação de hipóteses biossintéticas envolvidas na formação de neolignanas em *O. catharinensis* fizeram uso de culturas embriogênicas como modelo experimental. Foram realizados diversos estudos de bioconversões de precursores como o isoeugenol e 5-metoxieugenol utilizando-se suspensões celulares e frações enzimáticas porém as conversões *in vivo* utilizando-se precursores marcados e os embriões foram melhor sucedidas. Entre os precursores radioativos, a *L*-[U-¹⁴C]-fenilalanina foi incorporada às neolignanas hexaidrobenzofurânicas (**2**, 0,30% e **3**, 0,19%) e biciclooctânica (**6**, 0,12%). No caso do ácido [8-¹⁴C]-ferúlico, esse foi incorporado à neolignana hexaidrobenzofurânica (**2**, 0,17%). Por outro lado, o uso de *L*-[1-¹³C]-fenilalanina e análise por espectrometria de massas-massas confirmou o enriquecimento de ¹³C nas neolignanas hexaidrobenzofurânicas (**2** e **3**). A análise por RMN de ¹³C indicou o enriquecimento de 4,3 e 5,0% nos carbonos C9 e C9', respectivamente. Desta maneira, através dos dados de incorporação desses precursores, desvenda-se parte da via biossintética de neolignanas em *O. catharinensis*.

ABSTRACT

The phytochemical study of *Ocotea catharinensis* (Lauraceae) leaves resulted in the isolation of tetrahydrofuran neolignan veraguensin (**1**) and glycosylated flavonoid afzelin (**10**), not yet described for this species, besides four hexahydrobenzofuran neolignans (**2-5**), which had been previously described. The *in vitro* somatic embryos showed the accumulation of two hexahydrobenzofuran (**2, 3**) and two bicyclo[3,2,1]octane (**6, 7**) neolignans, two sesquiterpenes (**8, 9**) and one phenylpropanoid (**11**). Among these compounds (7*S*,8*R*,1'*R*,2'*R*,3'*R*)-2'-acetoxy-3,4-methylenedioxy-3',5'-dimethoxy-4'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.3'-neolignan (**7**), (-)-eudesm-11-en-4 α -ol (**9**) and 6-methoxy-eugenol (**11**) have not been previously described for this species. The profile of secondary metabolite included the analysis of essential oil of leaves which indicated the predominance of mono- and sesquiterpene and no phenylpropanoids. In addition, antifungal and antioxidative activities were performed with extracts and isolated compounds. The CHCl₃ fraction of ethanol extract exhibited antifungal activities against *Cladosporium cladosporioides* or *C. sphaerospermum*. The CHCl₃ and EtOAc fractions of ethanol extract, the hexahydrobenzofuran (**5**) and a bicyclo[3.2.1]octane (**6**) neolignans, afzelin (**10**) and 6-methoxy-eugenol (**11**) displayed antioxidant activities using DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl). The evaluations of biosynthetic hypothesis for neolignan formation in *O. catharinensis* were based on the use of embryogenic culture as an experimental model. Several assessment for conversion of putative precursors such as eugenol and 5-methoxyeugenol were evaluated using suspension cells and cell free preparations but none of them were as effective as *in vivo* conversion using labeled precursors directly in embryos. Among the radioactive precursors *L*-[U-¹⁴C]-phenylalanine was incorporated to hexahydrobenzofuran (**2**, 0.30%; **3**, 0.19%) and bicyclo[3.2.1]octane (**6**, 0.17%) neolignans while [8-¹⁴C]-ferulic acid was incorporated only to the hexahydrobenzofuran neolignan (**2**, 0.17%). The tandem mass spectrometry analysis confirmed the incorporation of ¹³C atoms in the neolignans (**2, 3**) indicating the incorporation of one or two molecules of *L*-[1-¹³C]-phenylalanine. The analysis of ¹³C NMR data revealed the enrichment of 4.3 and 5.0% at the positions C9 and C9', respectively. In summary, the labeling experiments have contributed to unravel the biosynthesis of neolignans in *O. catharinensis*.

1. Introdução

Os metabólitos secundários ocorrem em todas as plantas e geralmente apresentam alta diversidade estrutural, cujo número total em plantas foi estimado acima de 500.000 (Mendersohn e Balick, 1995; Dixon, 1999). Foram considerados, originalmente, como produtos do rejeito do metabolismo primário que possuem função primordial para sobrevivência das plantas e incluem funções como divisão e crescimento de células, respiração, estoque energético e reprodução (Firn e Jones, 2003). Em termos proporcionais, os metabólitos secundários apresentam pequena abundância, com menos de 1% de carbono total e são acumulados em células ou órgãos específicos. Nestes 50 anos, o desenvolvimento de tecnologia analítica permitiu a descrição de diversas estruturas de moléculas e, devido ao avanço dos estudos bioquímicos e de biologia molecular, foram reveladas muitas funções principais desses produtos em relação à adaptação aos diferentes estímulos ambientais (Bourgaud *et al.*, 2001).

Diferentemente dos animais, as plantas, por não terem mobilidade, não podem fugir quando atacadas por insetos ou predadores e nem utilizam o sistema imunológico quando infectadas por bactérias, fungos ou vírus (Cooper-Driver e Bhattacharya, 1998). O convívio com microorganismos e herbívoros no curso da evolução das angiospermas, que iniciou-se a cerca de 140 milhões anos, resultou no desenvolvimento de diversas estratégias de sobrevivência que incluíram a produção de defesa química. Por outro lado, as interações positivas com animais são importantes, especialmente nos processos de polinização ou dispersão de sementes e, nesses casos, os metabólitos secundários atuam de maneira altamente seletiva (Harborne, 1993).

A ocorrência de uma classe de metabólitos secundários é relativamente restrita dentro de determinados grupo taxonômicos (Reimann, *et al.*, 2004). Muitas vezes os componentes principais são acompanhados por componentes minoritários que frequentemente são derivados resultantes de reações de oxidação, redução, metilações, acetilações ou glicosilações (Wink, 2003). Os metabólitos secundários são geralmente classificados através das vias biossintéticas e incluem, resumidamente, os compostos fenólicos, terpenos e alcalóides (Luckner, 1990). Os fatores que afetaram o recrutamento diferencial dessas vias metabólicas ainda são muito pouco conhecidos, mas constituem-se nas bases para a quimiotaxonomia.

Devido as diversas atividades biológicas, os metabólitos secundários têm sido utilizados tradicionalmente por séculos com diversas finalidades, entre os quais os usos medicinais são um dos mais importantes mas incluem ainda os usos como cosméticos e como matéria-prima para a química fina. Os produtos naturais vegetais constituem-se

A tabela 1-1 apresenta os metabólitos secundários das espécies do gênero *Ocotea* e incluem os fenilpropanóides, lignanas, neolignanas, alcalóides, flavonóides e derivados de C₆C₁ que foram estudados até este momento (março/ 2006) e não inclui terpenóides.

Fenilpropanóides

Os fenilpropanóides são constituintes de ocorrência muito frequente em *Ocotea* e quase sempre estão presentes nas frações voláteis obtidas de troncos e folhas junto com mono- e sesquiterpenos. São normalmente do tipo alil- ou propenilfenóis cujo precursor básico é o aminoácido *L*-fenilalanina que através de uma série de transformações, os quais incluem a formação do ácido cinâmico, resulta na formação de aldeídos, álcoois e finalmente dos alil- e propenilfenóis. O cinamaldeído é constituinte responsável pelo aroma de canela (*Cinnamomum verum*, *sin. zeylanicum*) é, possivelmente, um dos fenilpropanóides mais conhecidos. O safrol (**1.1.3**) é o constituinte principal do óleo de sassafrás obtido de *O. fragrantissima*, *O. odorifera* e *O. pretiosa* e foi muito utilizado comercialmente como matéria-prima para a síntese de piperonal (heliotropina) que ainda é utilizado como fixador de perfumes e como material de partida para a síntese de agentes sinérgicos de inseticidas como o butóxido de piperonila (Casida, 1970; Huyen, 1996; Costa, 2000).

Lignanas

A diversidade estrutural de lignanas (dímeros de álcoois coniferílicos) (Figura 1-6, p. 36) é bastante restrita em espécies de Lauraceae. O lioniresinol (**1.2.1**) foi isolado de *O. cymbarum* (Andrei *et al.*, 1988) e *O. minarum* (Garcez *et al.*, 2005), e as lignanas furofurânicas **1.2.2-1.1.9** isoladas de *O. duckei* (Moraes *et al.*, 1996; Moraes *et al.*, 1998; Barbosa-Filho *et al.*, 1999). Jesus-Moraes *et al.* (2000) sugerem que iangambina (**1.2.6**) é um antagonista seletivo de PAF, capaz de discriminar subtipos de receptores PAF em órgão isolado de ratos.

Neolignanas

As neolignanas (dímeros de alilpropenilfenóis) (Figura 1-6, p. 36), especialmente aqueles com esqueletos biciclooctânico e benzofurânico, constituem-se no principal grupo biogenético de Lauraceae, devido a elevada frequência, e apresentam grande variedades de substituintes e configurações (Gottlieb, 1972). Estas neolignanas são interconversíveis através de isomerização por catálise ácida (de Alvarenga *et al.*, 1977)

(Figura 1-2). A direção do rearranjo pode ser determinada pelas estereoquímicas específicas dos centros quirais (Gottlieb e Yoshida, 1984).

Figura 1-2. Interconversão entre neolignanas benzofurânica e biciclooctânica.

As neolignanas benzofurânicas do tipo IX podem originar os tipos XVI, XIX e XX através de rearranjos de Cope, seguido de retro-Claisen e, por último, de Claisen (Gottlieb e Yoshida, 1984) (Figura 1-3).

Figura 1-3. Rearranjo de Cope, retro-Claisen e Claisen de neolignanas benzofurânicas.

A espécie *O. porosa*, conhecida popularmente por imbuía, é uma das espécies de Lauraceae mais investigadas quimicamente. A composição química de espécimens de São Paulo-SP (Dias *et al.*, 1986; de Carvalho *et al.*, 1988), Cunha-SP (Marques *et al.*, 1992) e Santa Maria-RS (David *et al.*, 1994) foram investigadas e constatou-se diferenças na composição química, com predominância da neolignana benzofurânica porosina (**1.3.65**), acompanhado pelas várias neolignanas minoritárias do tipo benzofurânico e biciclooctânico nas espécies coletadas em São Paulo-SP e Santa Maria-RS, porém apenas neolignanas biciclooctânicas foram isoladas em Cunha-SP. No caso de

espécimens de *O. catharinensis* de São Paulo e de Santa Catarina, foi observado que poucas neolignanas são comuns nas duas regiões (Lordello, 1996).

Estudos mais recentes realizados com frutos de *O. veraguensis* demonstraram que os teores de neolignanas benzofurânicas, contendo grupamentos metilenodioxifenilas nas sementes eram predominantes, enquanto que aqueles metoxilados eram predominantes nas polpas dos frutos (Dodson *et al.*, 1987).

As neolignanas com esqueletos tetraidrofurânicos foram isoladas apenas de duas espécies de *O. foetens* (Lopez *et al.*, 1995B) e de *O. veraguensis* (Crossley e Djerassi, 1962).

Alcalóides

Os alcalóides aporfínicos e morfínicos constituem-se numa classe de grande importância em Lauraceae devido às diferentes atividades biológicas, que pode ser exemplificado pela morfina, e pela importância taxonômica. São derivados dos alcalóides benzilisoquinolínicos que têm como precursores os aminoácidos *L*-fenilalanina ou *L*-tirosina que sofrem reações de descarboxilação mediadas por descarboxilases e uma série de etapas incluindo reações de condensação de Mannich (Mann, 1994). Possuem ocorrência bastante freqüente em espécies de *Ocotea*, tendo sido descritas em *O. acutangula* (Vecchiatti *et al.*, 1981), *O. brachybotra* (alcalóides morfínicos) (Vecchiatti *et al.*, 1976 e 1977), *O. minarum* (Vecchiatti *et al.*, 1979; Garcez *et al.*, 2005) e *O. vellosiana* (alcalóides aporfínicos) (Garcez *et al.*, 1995) (Tabela 1-1).

Glaziovina (**1.4.22**) é um alcalóide mais importante extraído de espécies brasileiras de Lauraceae conhecido como “Suavedol”. Comercialmente, possui propriedades tranquilizante e ansiolítica (Ferrari *et al.*, 1975).

O alcalóide bis-benzilisoquinolínico, a rupununina, isolada de *O. rodiaei* (Grundon e McGarvey, 1960), foi patenteado em 1994 como febrífugo, contraceptivo, como inibidor do crescimento de tumores, antiviral, antimitótico, agente neuroativo e ainda como pesticida (Gorinsky, 1994).

O alcalóide aporfínico dicentrinona (**1.4.59**), isolado de *O. leucoxydon*, apresentou atividade inibitória de topoisomerase I (Zhou *et al.*, 2000).

Curiosamente, a co-ocorrência de lignanas ou neolignanas e alcalóides ainda não foi registrada e pode ter algum sentido filogenético.

rupununina

Flavonóides

Apesar dos flavonóides serem uma classe biossintética de ocorrência muito freqüente no reino vegetal, é de ocorrência muito restrita em Lauraceae. Entre os poucos casos descritos, encontram-se catequina (1.5.2), epicatequina (1.5.8), flavonol (1.5.3), diidroflavonol (1.5.4), flavanonas glicosilados (1.5.6; 1.5.7) e flavonóis glicosilados (1.5.5; 1.5.11-1.5.17), além do um flavonóide baseado em dibenzeno-cicloheptatrieno (1.5.1).

Terpenos

Os compostos terpênicos foram descritos com bastante freqüência em *Ocotea* e, como em outros casos, é constituintes típico em óleos essenciais. Entretanto, essa sub-classe de terpenos ainda deve ter muito para ser descrita em Lauraceae. Sesquiterpenos com esqueletos eudesmânicos e calamenênicos foram descritos em *O. corymbosa* (Chavez *et al.*, 1995; David e Yoshida, 1998) ou com esqueleto eudesmânico em *O. pulchella* (Botega *et al.*, 1993). No caso de *O. odorifera* (Lordello *et al.*, 2000) foi descrito um sesquiterpeno cadinânico.

Tabela 1-1. Metabólitos secundários de espécies de *Ocotea*.

Espécies	Fenil-propanóides	Lignanas	Neolignanas	Alcalóides	Flavonóides	Derivados de C₆C₁	Referências
<i>O. aciphylla</i>	1.1.9		1.3.6-1.3.11				Felício <i>et al.</i> , 1986.
			1.3.1-1.3.5				Romoff <i>et al.</i> , 1984.
<i>O. acutangula</i>				1.4.1-1.4.6			Vecchietti <i>et al.</i> , 1981.
<i>O. atirrensis</i>				1.4.8			Lopez <i>et al.</i> , 1995A.
<i>O. brachybotra</i>				1.4.1; 1.4.11-1.4.17			Vecchietti <i>et al.</i> , 1976.
				1.4.18-1.4.24			Vecchietti <i>et al.</i> , 1977.
<i>O. brenesii</i>				1.4.25-1.4.27			Lopez <i>et al.</i> , 1996.
<i>O. bucherri</i>				1.4.28-1.4.30			Roensch <i>et al.</i> , 1983.
<i>O. bullata</i>			1.3.12				Sehlapelo <i>et al.</i> , 1993.
			1.3.14; 1.3.16				Drewes <i>et al.</i> , 1995.
			1.3.18				Zschocke <i>et al.</i> , 2000.
<i>O. caesia</i>				1.4.31-1.4.35			Vilegas <i>et al.</i> , 1989.
<i>O. caniculata</i>	1.1.1						de Diaz <i>et al.</i> , 1977.
<i>O. caparrapi</i>	1.1.2-1.1.5		1.3.19	1.4.36			Cuca Suarez, 1980.
	1.1.6-1.1.8					1.6.1	de Diaz e Diaz D, 1991.
<i>O. catharinensis</i>			1.3.2; 1.3.20; 1.3.23; 1.3.39; 1.3.40; 1.3.42; 1.3.43				Haraguchi <i>et al.</i> , 1983.

<i>O. catharinensis</i>			1.3.21; 1.3.22; 1.3.11; 1.3.24- 1.3.26; 1.3.28; 1.3.32; 1.3.41				Ishige <i>et al.</i> , 1991.
			1.3.27; 1.3.33; 1.3.34; 1.3.36- 1.3.38; 1.3.44; 1.3.47; 1.3.49- 1.3.51				Lordello, 1996.
			1.3.29-1.3.31; 1.3.35; 1.3.45; 1.3.46; 1.3.48				Lordello <i>et al.</i> , 1997.
<i>O. costulatum</i>			1.3.52-1.3.56				da Silva <i>et al.</i> , 1989.
<i>O. cymbarum</i>	1.1.9-1.1.12	1.2.1					Andrei <i>et al.</i> , 1988.
			1.3.57-1.3.59				de Diaz <i>et al.</i> , 1980.
<i>O. duckei</i>		1.2.2-1.2.4					Morais <i>et al.</i> , 1996.
		1.2.5					Morais <i>et al.</i> , 1998.
		1.2.6-1.2.8		1.4.36			Barbosa-Filho <i>et al.</i> , 1999.
				1.4.37			da Silva <i>et al.</i> , 2002.
<i>O. foetens</i>	1.1.5				1.5.1		Kijjoo <i>et al.</i> , 1994.
	1.1.2; 1.1.6; 1.1.13; 1.1.14; 1.1.28						Pino <i>et al.</i> , 2004.
			1.3.60-1.3.64				Lopez <i>et al.</i> , 1995B.
<i>O. fragrantissima</i>	1.1.3; 1.1.4						Gottlieb, 1957.
<i>O. glaziovii</i>				1.4.22; 1.4.40;			Gilbert, 1964.

<i>O. glaziovii</i>				1.4.42-1.4.46; 1.4.89			Gilbert, 1964.
				1.4.31; 1.4.38; 1.4.39; 1.4.41			Casagrande e Ferrari, 1975.
<i>O. gomezii</i>				1.4.9			Lopez <i>et al.</i> , 1995A.
<i>O. guianensis</i>	1.1.1						de Diaz <i>et al.</i> , 1977.
<i>O. holdridgeiana</i>				1.4.25; 1.4.26; 1.4.47; 1.4.48	1.5.2; 1.5.3		Castro e Ruiz, 1994.
				1.4.49; 1.4.50			Vargas <i>et al.</i> , 1996.
<i>O. insularis</i>				1.4.51- 1.4.53			Hasbun e Castro, 1993.
<i>O. leucoxylon</i>				1.4.19; 1.4.20; 1.4.54			Goodwin <i>et al.</i> , 1960.
				1.4.55			Ahmad e Cava, 1977.
				1.4.59			Zhou <i>et al.</i> , 2000.
<i>O. macrophylla</i>				1.4.56			Franca <i>et al.</i> , 1975.
<i>O. macropoda</i>				1.4.23; 1.4.56; 1.4.57			Cava <i>et al.</i> , 1968.
				1.4.58; 1.4.59			Cava e Venkateswarlu, 1971.
<i>O. meiziana</i>				1.4.10			Lopez <i>et al.</i> , 1995A.
<i>O. minarum</i>	1.1.15	1.2.1		1.4.60	1.5.4-1.5.7		Garcez <i>et al.</i> , 2005.
				1.4.18-1.4.20; 1.4.23; 1.4.54; 1.4.59; 1.4.61; 1.4.72; 1.4.82- 1.4.87			Vecchietti <i>et al.</i> , 1979.

<i>O. neesiana</i>	1.1.1						de Diaz <i>et al.</i> , 1977.
<i>O. odorifera</i>	1.1.2; 1.1.3; 1.1.7; 1.1.16- 1.1.21						Lordello <i>et al.</i> , 2000.
<i>O. opifera</i>	1.1.1						de Diaz <i>et al.</i> , 1977.
<i>O. pichurim</i>				1.4.31			Ferrari <i>et al.</i> , 1971.
<i>O. porosa</i>			1.3.65				Aiba <i>et al.</i> , 1976.
			1.3.66-1.3.70; 1.3.74-1.3.76				Dias <i>et al.</i> , 1986.
			1.3.77-1.3.83.				de Carvalho <i>et al.</i> , 1988.
			1.3.84-1.3.96				Marques <i>et al.</i> , 1992.
			1.3.97-1.3.117				David <i>et al.</i> , 1994A.
					1.5.8-1.5.10		David <i>et al.</i> , 1994B.
<i>O. pretiosa</i>	1.1.2; 1.1.3						Mors <i>et al.</i> , 1959.
	1.1.22						Mollan, 1961.
	1.1.6						Maia <i>et al.</i> , 1987.
						1.6.2	Gottlieb e Magalhães, 1958.
<i>O. puberula</i>				1.4.61			Jacobucci, 1954.
				1.4.71			Baralle <i>et al.</i> , 1972.
				1.4.72			Baralle <i>et al.</i> , 1973.
<i>O. pulchella</i>				1.4.62-1.4.65			Botega <i>et al.</i> , 1993.

<i>O. quixos</i>	1.1.22-1.1.24; 1.1.29						Naranjo <i>et al.</i> , 1981.
	1.1.22; 1.1.25-1.1.27					1.6.3; 1.6.4	Bruni <i>et al.</i> , 2003.
<i>O. rodiaei</i>				1.4.66-1.4.68			Grundon e McGarvey, 1960.
				1.4.69; 1.4.70			Hearst, 1964.
<i>O. simulans</i>	1.1.4		1.3.118				de Diaz, 1996.
<i>O. sp 42208</i>	1.1.1						de Diaz <i>et al.</i> , 1977.
<i>O. teleiandra</i>						1.6.5; 1.6.6	Naves <i>et al.</i> , 1961.
				1.4.10; 1.4.73- 1.4.76			Vilegas e Gottlieb, 1992.
<i>O. usambarensis</i>		1.2.9					Carmmalm, 1956.
<i>O. variabilis</i>				1.4.77			Cava <i>et al.</i> , 1972.
<i>O. vellosiana</i>				1.4.18; 1.4.19; 1.4.23; 1.4.25; 1.4.36; 1.4.54; 1.4.61; 1.4.78; 1.4.79; 1.4.81; 1.4.82	1.5.11-1.5.17		Garcez, 1995.
<i>O. venenosa</i>				1.4.66			Kostermans <i>et al.</i> , 1969.
<i>O. veraguensis</i>			1.3.61				Crossley e Djerassi, 1962.
			1.3.2; 1.3.9; 1.3.20; 1.3.21; 1.3.42; 1.3.119- 1.3.122				Khan <i>et al.</i> , 1987.
			1.3.123-133				Dodson <i>et al.</i> , 1987.

Fenilpropanóides

1.1.2 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = \text{H}$

1.1.3 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = \text{H}$

1.1.4 $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = \text{H}$

1.1.5 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$

1.1.6 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$

1.1.9 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = \text{OMe}$

1.1.10 $R_1 = R_4 = \text{OMe}$, $R_2R_3 = \text{CH}_2\text{O}_2$

1.1.11 $R_1 = R_3 = R_4 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$

1.1.13 $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_2 = \text{OMe}$

1.1.14

1.1.16 $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

1.1.17 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{H}$

1.1.18 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = \text{H}$

1.1.7 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = \text{H}$

1.1.8 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$

1.1.19 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = \text{H}$

1.1.22 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

1.1.20 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$

1.1.26 $R_1 = R_2 = \text{H}$

1.1.1 $R_1 = \text{Me}$, $R_2 = \text{OH}$

1.1.23 $R_1 = R_2 = \text{H}$

1.1.28 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{Et}$

1.1.29 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{Me}$

1.1.21 $R_1 R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$

1.1.27 $R_1 = R_2 = \text{H}$

1.1.15

1.1.12

1.1.25

Lignanas

1.2.1

1.2.2 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_6 = \text{OMe}$, $R_5 = \text{OH}$

1.2.3 $R_1 = R_3 = R_4 = R_6 = \text{OMe}$, $R_2 = R_5 = \text{OH}$

1.2.5 $R_1 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{H}$

1.2.4 $R_1 R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$

1.2.7 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$

1.2.6 $R_1 = R_2 = R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$

1.2.8 $R_1 = R_2 = R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 R_5 = \text{CH}_2\text{O}_2$

1.2.9 $R_1 R_2 = R_4 R_5 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_6 = \text{H}$

Neolignanas

1.3.1 Ar = β -Pi, α -Me, R₁ = R₅ = OH, R₂ = R₄ = R₇ = H, R₃ = R₆ = Me

1.3.39 Ar = β -Pi, α -Me, R₁ = R₅ = OH, R₂ = R₄ = H, R₃ = OMe, R₆R₇ = O

1.3.40 Ar = β -Pi, α -Me, R₁ = R₅ = OH, R₂ = R₄ = H, R₃ = OMe, R₆R₇ = O

1.3.41 Ar = β -Pi, α -Me, R₁ = R₄ = H, R₂ = R₅ = OH, R₃ = OMe, R₆R₇ = O

1.3.52 Ar = β -Mp, α -Me, R₁R₂ = O, R₃ = R₆ = OMe, R₄ = R₇ = H, R₅ = OH

1.3.53 Ar = β -Mp, α -Me, R₁R₂ = O, R₃R₆ = OMe, R₄ = R₇ = H, R₅ = OAc

1.3.91 Ar = α -Mp, β -Me, R₁ = OH, R₂ = R₄ = H, R₃ = OMe, R₅ = OAc, R₆R₇ = O

1.3.92 Ar = α -Pi, β -Me, R₁ = OH, R₂ = R₄ = H, R₃ = OMe, R₅ = OAc, R₆R₇ = O

1.3.104 Ar = β -Pi, α -Me, R₁ = R₄ = OH, R₂ = R₃ = R₅ = R₆ = H, R₇ = OMe

1.3.109 Ar = β -Pi, α -Me, R₁R₂ = O, R₃ = R₅ = R₇ = H, R₄ = OH, R₆ = OMe

1.3.130 Ar = α -Pi, β -Me, R₁ = OAc, R₂ = R₆ = H, R₃ = R₇ = OMe, R₄R₅ = O

1.3.131 Ar = α -Pi, β -Me, R₁ = OH, R₂ = R₆ = H, R₃ = R₇ = OMe, R₄R₅ = O

1.3.132 Ar = α -Ve, β -Me, R₁ = OAc, R₂ = R₆ = H, R₃ = R₇ = OMe, R₄R₅ = O

1.3.133 Ar = α -3-hidroxi-4-metoxifenil, β -Me, R₁ = OH, R₂ = R₆ = H, R₃ = R₇ = OMe, R₄R₅ = O

II

1.3.2 Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = R_5 = \text{OH}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$

1.3.3 Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4R_5 = \text{O}$

1.3.42 Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = R_4 = \text{OH}$, $R_2 = R_5 = \text{H}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$

1.3.43 Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = R_6 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{OMe}$, $R_4R_5 = \text{O}$

1.3.44 Ar = β -Ve, α -Me, $R_1 = \text{OAc}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4R_5 = \text{O}$

1.3.45 Ar = β -Pi, α -Me, $R_1R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{H}$

1.3.46 Ar = β -Pi, α -Me, $R_1R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{OH}$

1.3.47 Ar = β -Pi, α -Me, $R_1R_2 = R_4R_5 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$

1.3.48 Ar = β -Mp, α -Me, $R_1R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = \text{H}$

1.3.49 Ar = β -Mp, α -Me, $R_1R_2 = R_4R_5 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$

1.3.54 Ar = β -Mp, α -Me, $R_1R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{OH}$

1.3.55 Ar = β -Mp, α -Me, $R_1R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{OAc}$

1.3.56 Ar = α -Tp, β -Me, $R_1R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{OAc}$, $R_5 = \text{H}$

1.3.79 Ar = α -Pi, β -Me, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4R_5 = \text{O}$, $R_6 = \text{OMe}$

1.3.80 Ar = α -Pi, β -Me, $R_1 = R_3 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_4R_5 = \text{O}$, $R_6 = \text{OMe}$

1.3.81 Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$, $R_4R_5 = \text{O}$, $R_6 = \text{OMe}$

1.3.84 Ar = α -Pi, β -Me, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_5 = \text{OAc}$

1.3.85 Ar = α -Mp, β -Me, $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_4 = \text{H}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_5 = \text{OAc}$

1.3.86 Ar = α -Gu, β -Me, $R_1R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{OAc}$

1.3.87 Ar = α -Mp, β -Me, $R_1R_2 = \text{O}$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{OAc}$

- 1.3.88** Ar = α -Si, β -Me, $R_1R_2 = O$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4 = H$, $R_5 = OAc$
- 1.3.89** Ar = β -Gu, α -Me, $R_1R_2 = O$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4 = OAc$, $R_5 = H$
- 1.3.90** Ar = β -Ve, α -Me, $R_1R_2 = O$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4 = OAc$, $R_5 = H$
- 1.3.93** Ar = α -Mp, β -Me, $R_1 = R_6 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = OMe$, $R_4R_5 = O$
- 1.3.94** Ar = α -Mp, β -Me, $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4R_5 = O$
- 1.3.95** Ar = α -Pi, β -Me, $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4R_5 = O$
- 1.3.96** Ar = α -Mp, β -Me, $R_1 = OAc$, $R_2 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4R_5 = O$
- 1.3.101** Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = OAc$, $R_2 = R_3 = H$, $R_4R_5 = O$, $R_6 = OMe$
- 1.3.102** Ar = α -Pi, β -Me, $R_1 = R_3 = H$, $R_2 = OAc$, $R_4R_5 = O$, $R_6 = OMe$
- 1.3.103** Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = R_4 = OH$, $R_2 = R_3 = R_5 = H$, $R_6 = OMe$
- 1.3.105** Ar = α -Gu, β -Me, $R_1R_2 = R_4R_5 = O$, $R_3 = H$, $R_6 = OMe$
- 1.3.106** Ar = β -Gu, α -Me, $R_1R_2 = R_4R_5 = O$, $R_3 = H$, $R_6 = OMe$
- 1.3.107** Ar = β -Pi, α -Me, $R_1R_2 = R_4R_5 = O$, $R_3 = H$, $R_6 = OMe$
- 1.3.108** Ar = β -Pi, α -Me, $R_1R_2 = O$, $R_3 = R_5 = H$, $R_4 = OH$, $R_6 = OMe$
- 1.3.119** Ar = β -Mp, α -Me, $R_1 = R_4 = OH$, $R_2 = R_5 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$
- 1.3.120** Ar = β -Gu, α -Me, $R_1R_2 = R_4R_5 = O$, $R_3 = H$, $R_6 = OMe$
- 1.3.121** Ar = β -Gu, α -Me, $R_1R_2 = O$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4 = OH$, $R_5 = H$
- 1.3.123** Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = OAc$, $R_2 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4R_5 = O$
- 1.3.124** Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = OAc$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_5 = OH$
- 1.3.125** Ar = β -Pi, α -Me, $R_1 = OH$, $R_2 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4R_5 = O$
- 1.3.126** Ar = β -Ve, α -Me, $R_1 = OAc$, $R_2 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4R_5 = O$
- 1.3.127** Ar = β -Ve, α -Me, $R_1 = OAc$, $R_2 = R_4 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_5 = OH$
- 1.3.128** Ar = β -Tp, α -Me, $R_1 = OAc$, $R_2 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4R_5 = O$
- 1.3.129** Ar = β -Mp, α -Me, $R_1 = OAc$, $R_2 = H$, $R_3 = R_6 = OMe$, $R_4R_5 = O$

III

1.3.50 Ar = Pi**1.3.51** Ar = Mp

IV

1.3.6

V

1.3.12 α -Me**1.3.14** β -Me

VI

1.3.18

VII

1.3.16

VIII

1.3.4 Ar = β -Pi, β -Me, β -alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.5 Ar = α -Pi, β -Me, β -alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.7 Ar = α -Pi, β -Me, β -alil, R_1 = OH, R_2 = R_4 = OMe, R_3 = H

1.3.8 Ar = α -Pi, β -Me, β -alil, R_1 = R_2 = OH, R_3 = R_4 = H

1.3.28 Ar = α -Pi, β -Me, α -alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.29 Ar = β -Pi, β -Me, α -alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.30 Ar = β -Pi, β -Me, α -alil, R_1 = OMe, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.31 Ar = α -Ve, β -Me, α -alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.32 Ar = β -Ve, β -Me, α -alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.33 Ar = β -Ve, β -Me, α -alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = OMe

1.3.34 Ar = α -Mp, β -Me, α = alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.35 Ar = β -Tp, β -Me, α -alil, R_1 = OH, R_2R_3 = O, R_4 = H

1.3.69 Ar = α -Pi, β -Me, β -alil, R_1 = OMe, R_2 = OH, R_3 = R_4 = H

IX

1.3.9 Ar = α -Pi, β -alil, R = OMe

1.3.10 Ar = β -Pi, α -alil, R = OMe

1.3.23 Ar = α -Pi, α -alil, R = OMe

1.3.77 Ar = α -Pi, β -alil, R = H

1.3.78 Ar = β -Pi, α -alil, R = H

X

1.3.11 Ar = α -Pi, β -Me, β -OMe, R = OMe

1.3.24 Ar = β -Pi, α -Me, β -OMe, R = OMe

1.3.25 Ar = β -Pi, β -Me, β -OMe, R = OMe

1.3.26 Ar = β -Ve, β -Me, β -OMe, R = OMe

1.3.27 Ar = α -Tp, β -Me, β -OMe, R =

OMe

1.3.65 Ar = β -Ve, β -Me, β -OMe, R = H

1.3.66 Ar = β -Pi, β -Me, α -OMe, R = H

1.3.67 Ar = β -Pi, β -Me, β -OMe, R = H

XI

1.3.36 Ar = α -Pi, R₁ = α -H, R₂ = OMe

1.3.37 Ar = β -Mp, R₁ = α -H, R₂ = OMe

1.3.116 Ar = β -Ve, R₁ = β -Me, R₂ = H

XII

1.3.38 Ar = Ve, R = OMe

1.3.83 Ar = Ve, R = H

XIII

1.3.70

XIV

1.3.74 $R_1 = H, R_2 = H, \alpha\text{-OH}$

1.3.75 $R_1 = H, R_2 = H, \beta\text{-OH}$

1.3.112 $R_1 = Me, R_2 = H, \alpha\text{-OH}$

1.3.113 $R_1 = H, R_2 = OH, \alpha\text{-OH}$

1.3.114 $R_1 = H, R_2 = OH, \beta\text{-OH}$

XV

1.3.115

XVI

1.3.20 $\alpha\text{-Pi}, \alpha\text{-alil}, R = OMe$

1.3.110 $\alpha\text{-Pi}, \beta\text{-alil}, R = H$

1.3.111 $\beta\text{-Pi}, \alpha\text{-alil}, R = H$

1.3.122 $\alpha\text{-Pi}, \alpha\text{-alil}, R = H$

XVII

1.3.76

XVIII

1.3.97 $Ar = Gu$

1.3.98 $Ar = Pi$

XIX

1.3.21 $Ar = Pi$

1.3.22 $Ar = Mp$

XX

1.3.117

XXI

1.3.82 $R_1 = \text{alil}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{OMe}$ 1.3.99 $R_1 = \text{OMe}, R_2 = \text{alil}, R_3 = \text{H}$ 1.3.100 $R_1 = \text{OMe}, R_2 = \text{H}, R_3 = \text{alil}$

XXII

1.3.118

XXIII

1.3.19

XXIV

1.3.60 $Ar_1 = Ar_2 = \alpha\text{-Ve}, \beta\text{-Me}_1, \beta\text{-Me}_2$ 1.3.61 $Ar_1 = Ar_2 = \beta\text{-Ve}, \beta\text{-Me}_1, \alpha\text{-Me}_2$ 1.3.62 $Ar_1 = \beta\text{-Tp}, Ar_2 = \alpha\text{-2,5-dimetoxifenil},$
 $\alpha\text{-Me}_1, \alpha\text{-Me}_2$ 1.3.62 $Ar_1 = \beta\text{-2,5-dimetoxifenil}, Ar_2 = \alpha\text{-Ve}, \beta\text{-Me}_1, \beta\text{-Me}_2$

XXV

1.3.64

XXVI

1.3.57

XXVII

1.3.58 R = H

1.3.59 R = Me

Alcalóides

1.4.1 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{H}$

1.4.2 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{H}$

1.4.13 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{H}$

1.4.3 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{H}$

1.4.4 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{H}$

1.4.11 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{OH}$

1.4.16 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = R_3 = \text{OMe}$

1.4.5 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{H}$

1.4.15 $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{OH}$

1.4.6 $R_1 = R_4 = \text{OMe}$, $R_2 = R_3 = \text{H}$

1.4.17 $R_1 = R_4 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{OMe}$

1.4.12 $R = OH$

1.4.14 $R = OMe$

1.4.8 $R_1 = OMe, R_2 = OH, R_3 = R_4 = H$

1.4.36 $R_1 = R_3 = OH, R_2 = OMe, R_4 = Me$

1.4.37 $R_1 = R_2 = OH, R_3 = R_4 = H$

1.4.52 $R_1 = R_2 = OMe, R_3 = OH, R_4 = Me$

1.4.62 $R_1 R_2 = O$

1.4.63 $R_1 = H, R_2 = OH$

1.4.64 $R_1 R_2 = O$

1.4.65 $R_1 = H, R_2 = OH$

1.4.22 $R_1 = OH, R_2 = OMe, R_3 = Me$

1.4.40 $R_1 = R_2 = OMe, R_3 = Me$

1.4.42 $R_1 = OH, R_2 = OMe, R_3 = H$

1.4.89

1.4.7 $R_1 = R_6 = \text{OMe}$, $R_2 = R_5 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.9 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.10 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_8 = \text{H}$, $R_6 = \text{OH}$, $R_7 = \text{OMe}$

1.4.18 $R_1 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.19 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_5 = R_6 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.20 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_7 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.21 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_5 = \text{OH}$, $R_6 = \text{OMe}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.23 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_7 = \text{H}$, $R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.24 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_7 = \text{H}$, $R_4 = \text{OAc}$, $R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.25 $R_1 = R_2 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.28 $R_1 = R_2 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.29 $R_1 = R_2 = R_3 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.30 $R_1 = R_2 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{OAc}$, $R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.31 $R_1 = R_5 = \text{OH}$, $R_2 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.32 $R_1 = R_5 = \text{OH}$, $R_2 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_7 = R_8 = \text{H}$

1.4.35 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_5 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_6 = R_7 = R_8 = \text{H}$

1.4.41 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.47 $R_1 = R_2 = R_6 = R_7 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.49 $R_1 = R_2 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_8 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$

1.4.50 $R_1 = R_7 = \text{OH}$, $R_2 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.54 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.55 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = \text{OH}$, $R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.57 $R_1 = R_6 = \text{OMe}$, $R_2R_3 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_7 = \text{OH}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.61 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.73 $R_1 = R_7 = \text{OMe}$, $R_2 = R_6 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_8 = \text{H}$

1.4.74 $R_1R_2 = R_6R_7 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_8 = \text{H}$

1.4.75 $R_1 = R_5 = \text{OMe}$, $R_2 = R_6 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = R_7 = R_8 = \text{H}$

1.4.77 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_7 = \text{H}$, $R_6 = \text{N}(\text{CH}_2\text{-Ph})_2$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.78 $R_1 = R_2 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.79 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_6 = R_7 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_8 = \text{H}$

1.4.80 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.81 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_4 = R_7 = R_8 = \text{H}$

1.4.82 $R_1R_2 = R_4R_5 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_7 = \text{H}$, $R_6 = \text{OMe}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.84 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_7 = R_8 = \text{H}$

1.4.86 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = R_6 = R_7 = \text{OMe}$, $R_4 = R_5 = \text{H}$,

1.4.26 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.33 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_7 = R_8 = \text{H}$

1.4.34 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = R_6 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.38 $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = \text{H}$

1.4.39 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = R_8 = \text{H}$

1.4.43 $R_1 = R_6 = \text{OH}$, $R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.44 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_7 = R_8 = \text{H}$, $R_6 = \text{OH}$

1.4.46 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.48 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OMe}$, $R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.76 $R_1 = \text{OMe}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = R_4 = R_5 = R_8 = \text{H}$, $R_6 = R_7 = \text{CH}_2\text{O}_2$

1.4.83 $R_1R_2 = R_4R_5 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_6 = \text{OMe}$, $R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.27 $R_1 = R_2 = \text{OMe}$, $R_3 = \text{OH}$, $R_4 = R_5 = R_6 = R_7 = \text{H}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.56 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_4 = R_7 = \text{H}$, $R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.58 $R_1R_2 = \text{CH}_2\text{O}_2$, $R_3 = R_7 = \text{H}$, $R_4 = R_5 = R_6 = \text{OMe}$, $R_8 = \text{Me}$

1.4.71

1.4.85

1.4.59 $R_1 = R_2 = H$

1.4.72 $R_1 = OMe, R_2 = H$

1.4.87 $R_1 = R_2 = OMe$

1.4.51 $R = OH$

1.4.53 $R = OMe$

1.4.60

1.4.66 $R_1 = R_2 = Me$

1.4.67 $R_1 = H, R_2 = Me$

1.4.70 $R_1 = R_2 = H$

1.4.68 $R = \beta-H$

1.4.69 $R = \alpha-H$

Flavonóides

Glc = β -D-glucopiranosídeo

1.5.2 $R_1 = R_4 = R_6 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = R_5 = \text{H}$

1.5.4 $R_1 = R_4 = R_6 = \text{OH}$, $R_2R_3 = \text{O}$, $R_5 = \text{H}$

1.5.6 $R_1 = \text{OH}$, $R_2R_3 = \text{O}$, $R_4 = R_5 = \text{H}$, $R_6 = \text{O-Glc}$

1.5.7 $R_1 = \text{O-Glc}$, $R_2R_3 = \text{O}$, $R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$

1.5.8 $R_1 = R_5 = R_6 = \text{OH}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$

Ram = α -L-raminosídeo

1.5.3 $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OH}$

1.5.5 $R_1 = \text{O-Glc}$, $R_2 = R_3 = \text{OH}$

1.5.14 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{O-Glc}$, $R_3 = \text{H}$

1.5.15 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{O-Glc}$, $R_3 = \text{OH}$

1.5.16 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{O-Ram}$, $R_3 = \text{H}$

1.5.17 $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{O-Ram}$, $R_3 = \text{OH}$

1.5.11 $R_1 = R_2 = H$

1.5.12 $R_1 = H, R_2 = C$

1.5.13 $R_1 = C, R_2 = H$

1.5.1

1.5.9 $Ar = \beta\text{-4-hidroxifenila}$

1.5.10 $Ar = \alpha\text{-4-hidroxifenila}$

Derivados de C₆C₁ **1.6.1** **1.6.2** **1.6.3** **1.6.4** **1.6.5** **1.6.6**

1.2. *Ocotea catharinensis*

Ocotea catharinensis Mez. (Lauraceae), conhecida pelo nome comum de “canela preta” ou “canela amarela”, encontrada na Floresta Atlântica do Brasil, é de ocorrência natural nos Estados do Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e São Paulo. Possui, quando adulta, cerca de 30 m de altura e 60-90 cm de diâmetro. Possui importância econômica pela produção de madeira de excelente qualidade para construção civil e naval. A dificuldade de propagação desta espécie é devido à curta viabilidade de semente, frutificação errática e crescimento lento. Tais fatores levaram essa espécie à ameaça de extinção, razão pela qual um sistema alternativo de propagação através do uso de culturas embriogênicas foi desenvolvido (Viana e Mantell, 1999).

Estudos fitoquímicos prévios com *O. catharinensis* mostraram acúmulo de grande diversidade de neolignanas hexaidrobenzofurânicas e biciclooctânicas nas suas folhas e caules (Haraguchi *et al.*, 1983; Ishige *et al.*, 1991; Lordello *et al.*, 1997), e que os mesmos são produzidos pelos embrióides cultivados *in vitro* (Lordello, 1996).

1.3. Atividade biológica de lignóides

Nos últimos anos foram realizados diversos estudos farmacológicos com lignanas e neolignanas. Shen *et al.* (1985) observaram a atividade inibitória de agregação plaquetária de kadsurenona (**1.3.134**, Figura 1-2), uma neolignana isolada de *Piper futokadsura*. *Coptis Japonica* é conhecida como medicamento tradicional para tratamento de processos inflamatórios e os estudos fitoquímicos resultaram na descrição de cinco neolignanas diidrobenzofurânicas (**1.3.135**) (Cho *et al.*, 2000).

Outra neolignana biciclo[3,2,1]octânica, sibilenona (**1.3.18**), isolada do tronco da madeira *O. bullata*, que tem sido utilizada como medicamento tradicional na África do Sul, apresentou alta atividade antiinflamatória com efeito inibitório da 5-lipoxigenase (Zschocke *et al.*, 2000).

A iangambina (**1.2.6**) tem apresentado várias atividades além de ser antagonista de PAF (platelet activating factor), efeito de proteção contra colapso cardiovascular e choque anafilático (Tibirica *et al.*, 2001). Além disso, observou-se a atividade antialérgica (Serra *et al.*, 1997), analgésico e antitumoral (Hausott *et al.*, 2003).

A lignana podofilotoxina (**1.3.136**), isolada de espécies do gênero *Podophyllum* possui importante atividade antitumoral e tem sido modificada visando potencializar sua atividade, melhorar a solubilidade e minimizar sua toxicidade. Desse tipo de estudos

resultaram os derivados semissintéticos teniposídeo e etoposídeo (Srivastava *et al.*, 2005).

A diversidade de atividade biológica inclui também a atividade antiparasitária. A grandisina (**1.3.137**), uma lignana tetraidrofurânica, bem como alguns análogos isolados de *Piper solmsianum*, apresentaram potente atividade tripanossomicida (Martins *et al.*, 2003). Além disso, a neolignana surinamensina (**1.3.138**), isolada de *Virola surinamensis* e *V. pavonis* e os análogos sintéticos mostraram atividade antileishmania (Barata *et al.*, 2000).

Figura 1-2. Estruturas de lignóides biologicamente ativos.

1.4. Biossíntese de lignóides

O metabolismo secundário é originado a partir de poucos intermediários-chave, que por sua vez, são resultantes do metabolismo primário compartilhado por praticamente todos os organismos vivos (Figura 1-3).

Os fenilpropanóides possuem como esqueleto básico a unidade C_6C_3 que são biossintetizadas a partir da *L*-fenilalanina. A primeira etapa da via fenilpropanoídica é a desaminação da *L*-fenilalanina pela enzima fenilalanina-amônia-liase (PAL) (Figura 1-4). A fenilalanina é convertida ao ácido cinâmico através dessa etapa, que é seguida de uma reação de hidroxilação e redução produzindo o álcool *p*-cumárico (Dixon *et al.*, 2001). Após uma série de etapas, incluindo outra etapa de hidroxilação do anel aromático, metilação, formação do tioéster de CoA e redução, resultam as unidades propenil- ou

alilfenóis. Dimerizações de fenilpropanóides oxidados no C-9 (ácidos e álcoois) produzem lignanas através de acoplamento oxidativo por enzimas específicas.

Figura 1-3. Principais conexões entre o metabolismo primário e secundário em plantas. (Mann, 1994)

Por outro lado, as dimerizações de propenil/alilfenóis resultariam nas neolignanas (Gottlieb, 1978). Em ambos os casos os acoplamentos são iniciados com a formação do radical livre fenóxido que pode formar estruturas de ressonância (Figura 1-5), com o radical livre localizado nas posições 1, 3, 5 e 8. Assim, combinações dos vários radicais através das posições 8-8', 8-1', 8-5' e 8-O-4' etc., resultam em uma grande variedade de lignanas e neolignanas.

As ligninas são metabólitos primários que são constituintes de paredes celulares, cuja subestrutura é mesma das lignanas, pois ligninas são polímeros de álcoois cinamílicos. Um aspecto importante é que as lignanas são opticamente ativas, enquanto as ligninas são produtos racêmicos. Acredita-se que o acoplamento oxidativo para formação das ligninas ocorre através da participação de peroxidases e lacases. A biossíntese de lignanas deve envolver uma enzima específica com estereo/enantioseletividade em função da atividade ótica da maioria das lignanas.

Figura 1-6. Rota biossintética de fenilpropanóides.

Figura 1-7. Estruturas de ressonância dos radicais fenilpropanoídicos.

O primeiro estudo experimental da biossíntese foi realizado em *Forsythia suspensa* (Stöckigt e Klischies, 1977), utilizando precursores sintetizados como ácido glicoferúlico, aldeído glicoferúlico e álcool glicoferúlico marcados com ^3H e ^{14}C (Figura 1-8). Através da constatação da incorporação destes precursores nas lignanas arctina e filirina, concluiu-se que os compostos hidroxilados são precursores diretos aos dímeros de fenilpropanóides e a incorporação em uma etapa de dimerização ocorre sem degradação do esqueleto C_6C_3 .

Figura 1-8. Incorporação *in vivo* de fenilpropanóides em *Forsythia suspensa*.

* : marcação de radioativo

Davin *et al.* (1997) realizaram um estudo biossintético *in vitro* utilizando preparações enzimáticas obtidas de diversas partes de *Forsythia* e verificaram o acoplamento oxidativo estereosseletivo de álcool coniferílico a lignana furofurânica (+)-pinoresinol (Figura 1-9).

O (+)-pinoresinol, em etapa seguinte, sofre uma redução e produz a lignana (+)-lariciresinol e, posteriormente, (-)-secoisolariciresinol (Katayama *et al.*, 1992) e a estereoespecificidade desta redução foi investigada (Chu *et al.*, 1993). O (-)-secoisolariciresinol foi estereoespecificamente oxidado para (-)-matairesinol, que é considerado o precursor da lignana podofilotoxina.

Figura 1-9. Biossíntese de lignanas de espécies de *Forsythia*.

O acoplamento oxidativo na formação de neolignanas foi realizado por Sartorelli *et al.* (2001). A preparação enzimática das folhas de *P. regnellii* converteu enantioseletivamente o *p*-hidróxi-propenil-benzeno na neolignana di-hidrobenzofurânica (+)-conocarpano (85% ee) (Figura 1-10).

Figura 1-10. Formação do (+)-conocarpano a partir de *p*-hidróxi-propenil-benzeno.

Em outro estudo sobre biossíntese de neolignana observou-se a formação da neolignana tetraidrofurânica em *P. solmsianum* a partir do *E*-5-metóxi-isoeugenol marcado com ^{14}C em incubação com preparação enzimática das folhas (Martins, 2002) (Figura 1-11).

Figura 1-11. Formação do grandisina a partir do *E*-5-metóxi-isoeugenol.

1.5. Lignóides em cultura de células e tecidos

O cultivo de plantas *in vitro* possui algumas vantagens em comparação a o de planta intactas ou cultivada em campo (Alfermann *et al.*, 2003). A produção de metabólitos como lignóides pode ser controlada independente dos fatores geográficos, climáticos e do efeito de herbicidas e inseticidas etc.

A micropropagação é uma técnica básica *in vitro* que permite a produção em massa de clones isentos de vírus. Foi desenvolvido um protocolo de micropropagação de *Ocotea bullata*, que é uma espécie bastante explorada por causa da atividade farmacológica observada para sua constituintes (Kowalski e Van Staden, 2001).

Em 1982, Kadkade mostrou, pela primeira vez, que a cultura de calos de *Podophyllum peltatum* poderia ser uma importante fonte alternativa de podofilotoxina. Nesta cultura foi observado um acúmulo de até 0,38% de podofilotoxina em massa seca. Após isso, foram desenvolvidas culturas *in vitro* em várias espécies de plantas que fornecem vários tipos de lignóides (Fuss, 2003).

Outra espécie na qual foi investigada a produção de podofilotoxina, *Linum album*, constatou-se rápido crescimento e o acúmulo de 0,3% de podofilotoxina (Smolny *et al.*, 1992). Porém, em geral, as suspensões celulares ou raízes (e raízes cabeludas) *in vitro* acumularam a 6-metóxi-podofilotoxina como produto principal (Konuklugil *et al.*, 1999; Van Uden *et al.*, 1991).

Os rendimentos do produto em cultura de planta podem ser aumentados por otimização das condições de cultivo, por exemplo, cultivo sob luz/escuro (Konuklugil *et al.*, 1999; Smolny *et al.*, 1998), composição do meio (concentração de açúcar, reguladores de crescimento, fosfato, pH e fonte de nitrogênio) (Chattopadhyay *et al.*, 2002 e 2003) e quantidade do inoculo. A elicitação provocada pelo uso de agentes bióticos ou abióticos também foi utilizada em cultura de planta *in vitro*. A adição de jasmonato de metila ao

meio de cultura de *Forsythia intermedia* aumentou a produção de pinoresinol em 3 vezes e matairesinol em 7 vezes (Schmitt e Petersen, 2002). Porém, não se sabe ainda o mecanismo dessa eliciação.

A administração de precursores tem sido realizada com três objetivos. Num primeiro caso, a administração de intermediário (mais barato) pode aumentar o rendimento do produto desejado quando o intermediário é etapa limitante. Observou-se um aumento do rendimento do 6-metóxi-podofilotoxina de 0,004% para 0,02% de peso seco, em suspensões celulares de *Linum flavum* através de adição de *L*-fenilalanina, disponível comercialmente (Van Uden *et al.* 1990). No segundo, fornece-se os precursores à culturas que são capazes de efetuar determinadas conversões. Um exemplo é diastereomerização de lignanas por cultura de células de *Catharanthus roseus*, onde o dibenzilbutanolídeo 4*R***S**-1 foi adicionado e convertido para 4*R**-1 com 80% de rendimento químico e 0% de excesso enantiomérico (Takemoto *et al.*, 2000 e 2001). Finalmente, o último objetivo é elucidação de vias biossintéticas. Os experimentos de administração de precursores marcados (¹⁴C, ³H ou ¹³C) em micropropagações foram realizados com bastante sucesso. Rahman *et al.* (1990) produziram matairesinol marcado com ¹⁴C por administração de *L*-[U-¹⁴C]-fenilalanina em cultura de *Forsythia intermedia*. O matairesinol marcado foi administrado em cultura de *Forsythia intermedia* e incorporado em arctigenina. Seidel *et al.* (2002) mostrou a incorporação de ácido [2-¹³C]-metilenodioxicinâmico, ácido [2-¹³C]-ferúlico e ácido [2,3-¹³C]-ferúlico em desoxipodofilotoxina e podofilotoxina através de administração para suspensões celulares de *Linum álbum*. No entanto, a metilenodioxifenila foi formado no início da via biossintética como indicado pela incorporação do ácido metilenodioxicinâmico. Esse resultado causou bastante controversia, pois Stöckigt e Klischies (1977) haviam demonstrado a não incorporação de ácido metilenodioxicinâmico nas lignanas de *Forsythia intermedia*.

Os estudos de administração *in vivo* de precursores, como apresentado acima, constituem-se no ponto de partida para estudos nos quais as enzimas devem ser investigadas. Assim, suspensões celulares foram muito utilizadas nos estudos enzimológicos resultaram em avanços significativos em diversas rotas biossintéticas (Kuhkman *et al.*, 2002). As vantagens da utilização de cultura de células ao invés planta adulta diferenciada nos estudos de enzima são a disponibilidade constante de material, ausência de compostos fenólicos interferentes e outras facilidades na obtenção de proteína, incluindo os estímulos provocados por agentes eliciadores (Zenk, 1990).

Os estudos fitoquímicos realizados em espécies de Lauraceae forneceram as bases para uma proposta de rota biossintética para as neolignanas benzofurânicas

utilizando-se como etapa-chave a reação de acoplamento oxidativo de alil- e propenilfenol (Gottlieb, 1972) (Figura 1-12). Porém, como até o presente nenhum experimento foi descrito para comprovar esta proposta, a disponibilidade de culturas embriogênicas de *O. catharinensis* constituiu-se num modelo para tal investigação.

Figura 1-12. Biogênese de neolignanas benzofurânicas e biciclooctânicas.

2. Objetivos

Considerando a importância econômica e biológica de *O. catharinensis*, a produção de diversas neolignanas nas diferentes partes da planta e ainda as perspectivas da utilização de culturas embriogênicas nos estudos de micropropagação e nos estudos fisiológicos, esse projeto teve os seguintes objetivos:

- Inferir sobre o metabolismo secundário de *O. catharinensis* nas folhas e cultura de células e tecidos através do isolamento e caracterização dos principais produtos visando fornecer subsídios para estudos de biossíntese;
- Avaliar as atividades antioxidante, antifúngica e antiinflamatória dos extratos e substâncias isoladas de *O. catharinensis* de maneira a agregar valor à essa espécie ameaça de extinção;
- Avaliar as hipóteses biossintéticas para as neolignanas de *O. catharinensis* através do uso de precursores em cultura de células e tecidos e/ou através do uso de frações enzimáticas contribuindo para descrever melhor essa tão pouco conhecida via metabólica.

3. Experimental

3.1. Instrumentos

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e de ^{13}C foram registrados em espectrômetros Bruker AC-200, operando, respectivamente, a 200 e 50 MHz e Varian DPX-500 operando, respectivamente, a 300 e 75 MHz utilizando como solvente a acetona, clorofórmio e metanol deuterados da Aldrich.

Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos através do sistema CG-EM da Shimadzu modelo CG-17A e em espectrômetro de massas MS-QP-5050A com analisador quadrupolo, ambos operando por impacto eletrônico (IE) a 70 eV, equipado com coluna capilar DB-5 de 30 m de comprimento e 0,25 mm de diâmetro com fase estacionária de 5% de fenil em 95% de metil-silicone. As condições empregadas nos experimentos foram: programa da temperatura 100 a 280°C em uma taxa de 10°C/min; temperatura do injetor 230°C, temperatura do detector 250°C.

Os espectros de EM/EM foram obtidos em Q-TOF Ultima API no modo positivo utilizando ionização eletrospray (Micromass), disponível no CAT (Centro de Análises Toxinológicas) do Instituto Butantã.

A análise de raios-X foi realizada em um aparelho CAD4-Mach3, Enraf-Nonius de Central Analítica do Instituto de Química da USP.

As análises cromatográficas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram realizadas em cromatógrafo Shimadzu modelo LC-10 com detector espectrofotométrico na região do UV/VIS (SPD-10A) ou com detector de arranjo de diodos modelo SPD-M10Avp. As análises foram realizadas em coluna de fase reversa Supelcosil LC-18 ou Inertsil ODS-EP (5 μm , 4,6 x 250 mm). As amostras foram preparadas em metanol/ H_2O (9:1), filtradas em Sep-Pak C-18 para eliminar a matriz lipofílica e, posteriormente, filtrados em filtro Millipore 0,45 μm visando retirar o material particulado. As substâncias purificadas foram solubilizadas em metanol e filtradas em filtro Millipore 0,45 μm .

Os espectros de UV foram obtidos em espectrofotômetro UV/VIS Shimadzu Multispec-1501 com cubetas de quartzo com caminho ótico de 1 cm.

A radioatividade foi medida em amostras dissolvidas em 10 mL de coquetel de cintilação líquido (EcoLume, ICN) utilizando-se um cintilador LKB Wallac modelo 1214 Rackbeta.

3.2. Materiais

3.2.1. Solventes e reagentes

Os solventes de grau P.A. para extrações, partições e eluições cromatográficas foram fornecidos pela Synth e submetidos à destilação fracionada. Para separações em CLAE utilizaram-se solventes (grau espectroscópico) desgaseificados e ultrafiltrados, fornecidos pela Tedia. *L*-[U-¹⁴C]-fenilalanina (460 mCi/mmol), ácido [2-¹⁴C]-malônico (3,6 mCi/mmol) e *L*-[1-¹³C]-fenilalanina (99% ¹³C) foram adquiridos da Sigma.

3.2.2. Colunas e placas cromatográficas

As fases estacionárias utilizadas na cromatografia em coluna foram de sílica gel 60 com partículas de 63-120 µm e do tipo “flash” (sílica gel 60, 40-63 µm) para cromatografias sob pressão. Para as cromatografias planares comparativas (CPC) foram utilizadas placas em folhas de alumínio enquanto que aquelas em escala preparativas (CPP) foram feitas em placas de vidro (200 x 200 x 1 mm). As revelações das substâncias foram feitas com irradiações no UV (254 e/ou 356 nm) e/ou solução de sulfato cérico seguida de aquecimento.

3.2.3. Material vegetal

Foram utilizadas folhas e sementes de *O. catharinensis*, coletadas em dezembro de 2002 e fevereiro de 2003, respectivamente. As coletas foram realizadas na Parque Estadual de Cantareira do Instituto Florestal de São Paulo. Este espécimen foi catalogado no herbário do Instituto Florestal de São Paulo, como o número do registro SPSF-31062. Também foram utilizadas culturas embriogênicas e calos mantidos *in vitro*, de acordo com a metodologia descrita por Moura-Costa *et al.* (1993) Viana e Mantell (1999).

Figura 3-1. Plantas de *O. catharinensis* localizadas no Parque Estadual da Cantareira-SP.

3.3. Estudo fitoquímico dos extratos das folhas

3.3.1. Obtenção dos extratos das folhas

As folhas foram secas em estufa a 45°C e moídas. O pó foi macerado a temperatura ambiente com hexano, seguido de etanol e, finalmente com solução aquosa de etanol (50%). As soluções resultantes foram concentradas à exaustão em rotaevaporador sob pressão reduzida para a obtenção dos extratos que apresentaram consistência viscosa tanto para os extratos hexânico (43,2 g) e etanólico (50,3 g).

3.3.2. Fracionamento dos extratos das folhas

Os extratos das folhas foram submetidos ao fracionamento, utilizando-se etapas de partição, em colunas cromatográficas (Figura 3-2) as quais permitiram isolar as substâncias **1-5** e **10** com graus de pureza suficientes para a análise espectrométrica.

Figura 3-2. Fluxograma de fracionamento do extrato das folhas de *O. catharinensis*.

- a: Extração com hexano, EtOH e EtOH/H₂O (1:1);
- b: partição com hexano e EtOH/H₂O (1:1);
- c: coluna de sílica gel eluída com gradiente de hexano/AcOEt;
- d: CPP em CHCl₃/ AcOEt/i-PrOH (9:1:0,4);
- e: partição com hexano, CHCl₃ e AcOEt;
- f: coluna filtrante eluída com gradiente de hexano/AcOEt;
- g: recristalização com MeOH;
- h: coluna *flash* eluída com gradiente de CH₂Cl₂/AcOEt/i-PrOH;
- i-1: CPP em CH₂Cl₂/AcOEt/i-PrOH (83:9,5:7,5);
- i-2: CPP em CHCl₃/MeOH (98,5:1,5) x 6;
- j: CPP em CH₂Cl₂/AcOEt/i-PrOH (9:1:0,2);
- k: -Suspendeu-se em DCM e adicionou-se MeOH até dissolução dos sólidos;
 -Extraiu-se com H₂O/NaHCO₃ (8%);
 -Neutralizou-se com HCl até pH 7. Extraiu-se com AcOEt;
 -Submeteu-se a coluna de Sephadex eluída com CHCl₃/MeOH (1:1).

3.3.3. Recristalização e análise por cristalografia de raios-X

Os cristais formados nas frações da coluna de sílica **f** foram submetidas à recristalização com metanol à temperatura ambiente, resultando em 1050 mg. Estes cristais (Fig 4-3) foram analisados por RMN de ^1H e de ^{13}C e também por raios-X (Tabela 3-1). O cálculo do mapa de Patterson para a resolução da estrutura foi gerado utilizando-se o programa SHELXS86 (Sheldrick, 1990). O refinamento foi feito utilizando SHELXL97 (Sheldrick, 1993) e as representações da molécula e do empacotamento foram obtidos através do programa Oak Ridge Thermal Elipsoid Plot (ORTEP) (Zsolnai, 1995).

Tabela 3-1. Parâmetro de análises por cristalografia de raios-X da neolignana **2**.

Fórmula	$\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_6$
Massa molecular	388,44
Temperatura	293(2) K
Comprimento de onda	0,71073 Å
Sistema cristalino	monoclínico
Grupo especial	$P2_1/m$
Dimensões da cela unitária	$a = 10,179 (4) \text{ Å}$ $b = 7,9602 (17) \text{ Å}$ $c = 12,966 (3) \text{ Å}$ $\beta = 92,984 (3)^\circ$
Volume	$1049,1 (5) \text{ Å}^3$
Z	2
Densidade (calculada)	$1,230 \text{ Mg/m}^3$

3.3.4. Extração do óleo essencial das folhas

As folhas frescas foram separadas (300 g), cortadas e submetidas à destilação por arraste a vapor em aparelho tipo Clevenger por 4 horas. Após este período, o óleo foi extraído com CH_2Cl_2 e o solvente foi evaporado obtendo-se 480 mg de óleo bruto (rendimento aproximado: 0,16%).

Os óleos essenciais das folhas foram submetidos à análise em Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG/EM).

Cromatografia gasosa (CG)

A análise por CG foi realizada em cromatógrafo Shimadzu GC-17 A, utilizando-se hélio como gás de arraste, equipado com duas colunas: coluna apolar DB-5 (5% fenil 95% polidimetildifenilsiloxano, 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μm espessura do filme) e polar LM-

120 (propilenoglicol, 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m espessura do filme). As condições das análises foram:

coluna DB-5:

- Intervalo de temperatura do forno: 60 a 300 °C (3 °C/min);
- Temperatura do injetor: 220 °C;
- Temperatura do detector: 250 °C;

coluna LM-120:

- Intervalo de temperatura do forno: de 60 a 250 °C (3 °C/min);
- Temperatura do injetor: 220 °C;
- Temperatura do detector: 230 °C.

Para identificação dos isômeros monoterpênicos, a análise foi realizada em um cromatógrafo Shimadzu GC-17A equipado com coluna quiral Supelco B-CDX 120 (β -ciclodextrina, 30 m x 0,25 mm d.i. x 0,25 μ m espessura do filme). As condições da análise foram:

coluna Supelco B-CDX 120:

- Intervalo de temperatura do forno: 60 a 200 °C (3 °C/min);
- Temperatura do injetor: 220 °C;
- Temperatura do detector: 230 °C.

CG/EM

A análise foi realizada utilizando-se o mesmo equipamento acima, porém acoplado a um espectrômetro de massas Shimadzu QP5000, equipado com analisador quadrupolar cilíndrico operando com ionização por impacto eletrônico a 70 eV.

3.4. Propagação *in vitro* de *O. catharinensis* e estudo fitoquímico dos embriões somáticos e calos

3.4.1. Obtenção e multiplicação de material vegetal *in vitro*

3.4.1.1. Embriões somáticos

Embriões somáticos de *O. catharinensis* foram mantidos em meio de cultura WPM (Wood Wlant Medium; Lloyd e McCown, 1981), suplementado com sacarose (20 g/L), sorbitol (22 g/L), glutamina (0,4 g/L) e fitagel (Phytigel, Sigma Co., USA) (2 g/L). O pH do meio foi ajustado para 5,8 com NaOH antes da adição do fitagel. Em seguida, os meios foram distribuídos em tubos de ensaio (8 mL/tubo), fechados e autoclavados a 121 °C por 15 minutos, a 1,1 Kgf/cm².

Após 4 semanas de cultivo, os embriões somáticos no estágio globular foram inoculados em novo meio de cultura, para a manutenção das culturas embriogênicas *in vitro*.

Durante o crescimento e desenvolvimento, os embriões somáticos foram separados por classes de tamanho e morfologia, tendo sido utilizada a seguinte classificação por estágios:

Estágio 1 – Globular (≤ 2 mm)

Estágio 2 – Cotiledonar inicial (2 – 3,5 mm)

Estágio 3 – Cotiledonar intermediário (3,5 – 4,9 mm)

Estágio 4 – Maduro (≥ 5 mm)

Os embriões somáticos com 4 semanas de cultivo foram utilizados para a obtenção de extratos que foram avaliados quanto à atividade biológica e para a caracterização dos metabólitos secundários.

3.4.1.2. Calos

Culturas de calos de *O. catharinensis* foram mantidas em meio de cultura MS (Murashige e Skoog, 1962), suplementando com sacarose (20 g/L), ágar (7 g/L), carvão ativado (3 g/L) e o regulador de crescimento ácido 2,4-diclorofenoxyacético (2,4-D) (40 mg/L). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da adição de ágar. Em seguida, os meios foram distribuídos em frascos de cultura tipo “Weathon” (30 mL/frasco) e autoclavados a 121 °C por 15 minutos a 1,1 Kgf/cm². Após 4 semanas de cultivo *in vitro*, os calos foram subcultivados para novo meio de cultura, visando a sua manutenção *in vitro*.

Calos com 4 semanas de cultivo foram submetidos à extração e o extrato foi analisado por CG/EM.

3.4.1.3. Suspensões celulares

Para a obtenção das suspensões celulares, calos com 4 semanas de cultivo foram transferidos para o meio de cultura MS líquido, suplementado com sacarose (20 g/L) e 2,4-D (40 mg/L). O pH do meio foi ajustado para 5,8 antes da autoclavagem a 121 °C por 15 minutos, a 1,1 Kgf/cm².

Após a inoculação, as suspensões celulares foram mantidas sob movimento contínuo em agitador rotatório horizontal a 100 rpm, em sala de crescimento. Estas suspensões celulares foram subcultivadas a cada 15 dias para novo meio de cultura líquido, visando tanto a manutenção *in vitro* quanto os experimentos de estudo biossintético.

3.4.1.4. Obtenção da curva de crescimento

A caracterização da curva de crescimento das suspensões celulares foi determinada através da dinâmica de crescimento por volume celular sedimentado (VCS). O VCS foi determinado através da inversão do erlenmeyer, promovendo a sedimentação celular no dispositivo lateral, durante um período de 30 min. Esse volume foi expresso em mL de células/mL de meio de cultura. Foram realizadas leituras em intervalos de dois a cinco dias, sendo iniciadas com a leitura no tempo zero de cultivo e finalizadas aos 30 dias de cultivo. Os dados são mostrados através das médias e desvios padrão e o VCS foi corrigido para o volume inicial de 1 mL.

3.4.1.5. Condições de cultivo *in vitro*

Os embriões somáticos, calos e suspensões celulares foram mantidos em sala de crescimento com temperatura controlada de $25 \pm 2^\circ\text{C}$, fluxo de fótons de $22 \mu\text{mol.m}^2.\text{s}^{-1}$, produzido por lâmpadas fluorescentes Phillips TDL, Umidade Relativa de 70% e fotoperíodo de 16 horas de luz.

Figura 3-3. Cultura de tecidos e células de *O. catharinensis*. **A**: Embriões somáticos; **B**: Calos; **C**: Suspensões celulares; **D**: Equipamento utilizado na determinação de volume celular sedimentado (VCS).

3.4.2. Obtenção dos extratos de embriões somáticos, calos e suspensões celulares

Foram utilizados dois métodos de extração para a obtenção de extratos dos embriões somáticos. Na primeira, 140 g de massa fresca de embriões somáticos, com aproximadamente quatro semanas de cultura *in vitro*, foram coletadas e congeladas em nitrogênio líquido. Esses embriões foram triturados com pistilo e extraídos exaustivamente com MeOH.

Devido à quantidade insuficiente da massa do extrato, acumulou-se mais embriões somáticos e repetiu-se a extração utilizando-se um segundo método. Neste segundo método, embriões somáticos (326 g de massa fresca) foram extraídos com 300 mL de MeOH, 300 mL de MeOH/CH₂Cl₂ (1:2) duas vezes e, posteriormente, com 300 mL de CH₂Cl₂, utilizando o aparelho ultra turrax (T25 basic, IKA Labortechnik) a 11.000 rpm visando a obtenção de material finamente dividido. Os solventes foram reunidos e concentrados com rotaevaporador.

Os calos de *O. catharinensis* foram coletados e congelados em nitrogênio líquido para posterior análise de metabólitos secundários. Os calos foram extraídos com MeOH, MeOH/CH₂Cl₂ (1:2) e CH₂Cl₂, sucessivamente. Os solventes foram reunidos, secos com Na₂SO₄ anidro, filtrados e concentrados com rotoevaporador.

3.4.3. Fracionamento do extrato dos embriões somáticos

Os extratos dos embriões foram fracionados de acordo com a Figura 3-4, sendo i) primeira extração e ii) segunda extração.

3.4.4. Extração do óleo essencial dos embriões somáticos

Os embriões somáticos 59 g de massa fresca, aproximadamente quatro semanas de cultivo, foram coletados e congelados em nitrogênio líquido. Estes embriões foram submetidos à micro-extração dos óleos essenciais através da destilação por arraste a vapor. Nesse caso não foi possível quantificar os óleos extraídos devido à pequena quantidade obtida, em solução de AcOEt. Assim, o óleo foi diretamente analisado por CG/EM nas condições descritas no item **3.3.6**.

Figura 3-4. Fluxograma de fracionamento do extrato dos embriões somáticos de *O. catharinensis*.

I: extração com i) MeOH ou ii) MeOH/CH₂Cl₂;

m: partição com hexano, CHCl₃ e AcOEt;

n: coluna de sílica gel eluída com gradiente de hexano/AcOEt;

o: coluna *flash* eluída com gradiente de CH₂Cl₂/AcOEt/i-PrOH;

p: coluna de sílica gel eluída com gradiente de CH₂Cl₂/acetona;

q: análise por CG/EM;

3.5. Atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas

3.5.1. Atividade antioxidante através do método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila)

Os extratos e as substâncias puras foram aplicados em CPC, utilizando sistemas de eluição conforme a polaridade dos extratos e substâncias. O DPPH foi dissolvido em MeOH numa concentração final de 30 µM e aplicado na placa utilizando-se borrifador. Após 1 hora, observou-se a perda da coloração violeta inicial. Considerando-se que o DPPH é um radical livre estável com coloração violeta, ao receber um próton de um composto antioxidante, este perde a coloração violeta adquirindo a coloração amarelada, indicando assim a capacidade antioxidante de uma substância (Blois, 1958).

Utilizou-se um antioxidante sintético ácido 2-carboxílico-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano (Trolox, Aldrich) como padrão positivo.

Trolox

3.5.2. Atividade antifúngica através do método de bioautografia

A atividade antifúngica foi avaliada utilizando-se o método de bioautografia em CPC (Homans e Fuchs, 1970). Os extratos foram aplicados sobre placa cromatográfica e, após a evaporação do solvente, uma suspensão de *Cladosporium cladosporioides* ou *Cladosporium sphaerospermum* foi borrifada sobre placa e incubada no escuro, a 25°C. Decorrido o período de 48 horas, a presença de um halo de inibição evidenciou a capacidade antifúngica de um ou mais produtos.

3.5.3. Atividade antiinflamatória através do método de edema de pata

3.5.3.1. Método 1: preparação com detergente Tween-80

Foram utilizados ratos machos de 200 g cada. Para provocar o edema de pata foi injetado na pata do rato 100 μ L de solução salina contendo carragenina (200 μ g/pata). Foram maceradas a neolignana **2** (100 mg) e Tween-80 (2,5 mL) com gral e pistilo, adicionou-se etanol (1 mL) e água (6,5 mL) e misturou-se. Na mistura, uma parte da neolignana precipitou e a suspensão foi submetida a centrifugação. Obteve-se 80 mg do precipitado e a concentração resultante da solução de neolignana **2** foi de 2 mg/mL. A solução de neolignana **2** foi administrada via intraperitoneal (*i. pl.*) (1,5 mL/rato) uma hora antes do tratamento da inflamação. Após o tratamento, o aumento do volume das patas foi medido a cada hora durante 5 horas. Para o controle uma solução salina foi

administrada antes da injeção de carragenina e o volume do aumento foi medido igualmente.

3.5.3.2. Método 2: preparação com albumina bovina sérica

O método acima foi alterado e a albumina foi utilizada como transportador das substâncias a serem analisadas, através da formação de soluções coloidais (Yamaguchi *et al.*, 1999).

Foram misturados 12 mg de albumina e 12 mL de água destilada com agitação magnética. Após a dissolução de albumina, 12 mg da neolignana **2** solubilizada em 1,2 mL de acetona foi adicionada gota-a-gota durante 3 minutos e observou-se uma turvação da solução. Após 20 minutos de agitação, a mistura decantou durante 2 horas e, após este período, observou-se a precipitação de sólido branco. O sobrenadante foi recolhido e a concentração final da neolignana **2** foi determinada (0,8 mg/mL) espectrofotometricamente utilizando a curva de calibração de neolignana **2** em 275 nm (Figura 3-5). A solução de neolignana **2** foi administrada por via *i. pl.* (2 mL/rato) e o ensaio do edema foi feito da mesma maneira que o descrito no Método 1.

Figura 3-5. Curva de calibração da neolignana **2**.

O teste antiinflamatório foi realizado para a fração clorofórmica do extrato das folhas. A metodologia realizada foi a mesma do teste anterior utilizando-se 36 mg de extrato. A solução do extrato foi administrada por via *i. pl.* (2 mL/rato) e o ensaio do edema foi feito igualmente ao método anterior.

3.6. Estudo biossintético das neolignanais isoladas de *O. catharinensis*

3.6.1. Preparação do ácido [8-¹⁴C]-ferúlico

A preparação do ácido ferúlico não marcado foi otimizada para a obtenção do melhor rendimento possível do ácido ferúlico marcado, através da condensação de Knoevenagel (Jones, 1967). Foram utilizadas as seguintes condições:

Em um balão de duas bocas, equipado com condensador de refluxo protegido com tubo secante contendo CaCl₂ e termômetro, aquecido a 50-55 °C com agitação magnética, foram adicionadas vanilina (22,8 mg, 0,150 mmol), ácido [2-¹⁴C]-malônico (4,2 mg, 0,0403 mmol, 146 µCi), ácido malônico não marcado (13 mg, 0,1247 mmol), piridina (0,5 mL), piperidina (5 µL) e anilina (5 µL). Após 25 horas a mistura foi aquecida a 70-80 °C por 2 horas, a reação foi monitorada por CPC.

Ao término deste período foram adicionados 2 mL de HCl (0,5 N) e 2 mL de AcOEt. A fase orgânica foi extraída com AcOEt (3 x 2 mL) e esta fase orgânica foi novamente extraída com 5% de NaHCO₃ (3 x 2 mL). A solução de NaHCO₃ foi lavada com CH₂Cl₂ (2 x 2 mL) e posteriormente, foi adicionado HCl (12 N) até ocorrer precipitação. A solução foi extraída com AcOEt (3 x 2 mL) e depois lavada com 2 mL de uma solução saturada de NaCl (2 mL). Após secagem com Na₂SO₄ anidro, o solvente foi evaporado resultando em 17,8 mg, 0,0917 mmol (61%). A radioatividade específica do produto foi de 0,99 µCi/mmol.

RMN ¹H (200 MHz, CDCl₃): δ 7,60 (H-8, *d*, *J* = 15,8); 7,17 (H-2, *d*, *J* = 1,7); 7,06 (H-6, *dd*, *J* = 8,1 e 1,7); 6,81 (H-5, *d*, *J* = 8,1); 6,31 (H-7, *d*, *J* = 15,8); 3,89 (MeO-3, *s*). Figura 3-23.

3.6.2. Administração de L-[U-¹⁴C]-fenilalanina nos embriões somáticos

Foi preparada uma solução de L-[U-¹⁴C]-fenilalanina (4,9 µCi/100 µl) em água destilada. Os embriões somáticos nos estágios cotiledonar intermediário e maduro foram retirados do meio de cultura, lavados para retirar o excesso de meio e secados por 20 minutos no fluxo laminar. Estes embriões foram transferidos para tubos de ensaio para os quais foram adicionados cerca de 950 mg de massa fresca de embriões. Nestes foram adicionados 40 µL de solução de L-[U-¹⁴C]-fenilalanina (2 µCi). Após 5, 24, 48 e 96 horas, os embriões foram removidos e congelados em nitrogênio líquido, triturados, extraídos com 15 mL de AcOEt e filtrados em algodão. Após a filtração, o solvente foi evaporado para a obtenção dos extratos. O controle, na ausência de L-[U-¹⁴C]-fenilalanina, foi

incubado por 96 horas. Os extratos foram submetidos à CLAE e coletados a cada minuto para medição da radiação.

3.6.3. Administração de *L*-[1-¹³C]-fenilalanina nos embriões somáticos

Após 4 semanas de cultivo, embriões somáticos no estágio maduro ($\pm 1,5$ g de massa fresca) foram transferidos para placas de Petri esterilizadas contendo 2 folhas de papel de filtro. Nestes foram adicionados 300 μ L de solução de *L*-[1-¹³C]-fenilalanina (1 mg/100 μ L em água destilada). As placas foram mantidas em sala de cultura, a 25 °C. Após 4 dias, os embriões foram congelados em nitrogênio líquido, triturados, extraídos com 15 mL de AcOEt e o solvente foi evaporado. Este extrato foi submetido a CPP utilizando o solvente hexano/AcOEt (3:7), obtendo-se duas frações. Após a evaporação do solvente, as frações foram analisadas por espectrometria de massa de ionização por electrospray no modo positivo e analisador quadrupolar acoplado com “tempo de voo” (ESI-Q-TOF), e RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃).

3.6.4. Administração de ácido [8-¹⁴C]-ferúlico nos embriões somáticos

Foi preparada uma solução de ácido [8-¹⁴C]-ferúlico (2 μ Ci/80 μ L) em água destilada/acetona (4:1). Os embriões nos estágios cotiledonar intermediário e maduro foram retirados do meio e transferidos para tubos de ensaio contendo $\pm 0,9$ g de massa fresca de embriões. Nestes foram adicionados 80 μ L de solução de ácido [8-¹⁴C]-ferúlico (2 μ Ci). Após 12, 24, 48 e 96 horas, os embriões foram congelados em nitrogênio líquido, triturados, extraídos com 10 mL de AcOEt e o solvente foi evaporado. Os extratos foram submetidos à análise por CLAE, sendo que os eluatos foram coletados a cada minuto e, posteriormente, tiveram a radiação medida por cintilação no contador.

3.6.5 Bioconversão de precursores nas suspensões celulares

3.6.5.1. Teste de bioconversão de precursores sob luz

O *E*-isoeugenol e 6-metóxieugenol, obtidos comercialmente, foram purificados por cromatografia em camada delgada e analisados por CLAE e RMN de ¹H. Estes precursores foram solubilizados em etanol e esterilizados por filtração (25 mm, 0,22 μ m CA., Cole-Parmer). Estas soluções foram adicionadas ao meio de cultura na metade do período de crescimento (9º dia após a transferência), de acordo com a curva de crescimento (item 3.4.1.4.) e incubados até o 20º dia (Figura 3-6).

Figura 3-6. Experimento de bioconversão de precursores nas suspensões celulares.

Estas incubações foram realizadas em duplicatas, em erlenmeyers de 125 mL contendo 50 mL de meio cada, nas seguintes condições:

- 500 μ L de solução de *E*-isoeugenol (10 mg/mL) e 500 μ L de solução de 5-metóxi-eugenol (10 mg/mL);
- 100 μ L de solução de *E*-isoeugenol (10 mg/mL) e 100 μ L de solução de 5-metóxi-eugenol (10 mg/mL);
- 500 μ L de solução de *E*-isoeugenol (10 mg/mL);
- 100 μ L de solução de *E*-isoeugenol (10 mg/mL);
- 500 μ L de solução de 5-metóxi-eugenol (10 mg/mL);
- 100 μ L de solução de 5-metóxi-eugenol (10 mg/mL);
- sem adição de precursor;
- sem células e com precursores: 500 μ L de solução de *E*-isoeugenol (10 mg/mL) e 500 μ L de solução de 5-metóxi-eugenol (10 mg/mL).

Após 20 dias, a incubação foi interrompida e as células foram separadas do meio de cultura por filtração a vácuo em filtro de vidro sinterizado. Foram adicionados 50 μ L de solução de licarina A (10 mg/mL) para as células e 12,5 μ L para os meios, que foi utilizada como padrão interno na análise. Dentre as diversas neolignanas disponíveis no LQPN, a licarina A foi a que apresentou as melhores características para ser adotada como padrão interno. As células foram pesadas, congeladas em nitrogênio líquido e maceradas com o

auxílio de gral e pistilo. Em seguida, extraiu-se com MeOH/H₂O (9:1) (50-75 mL x 3 vezes) e evaporou-se o solvente. Os meios foram extraídos com AcOEt (50-75 mL x 3 vezes) e o solvente, seco, concentrado e analisados por CLAE.

licarina A

3.6.5.2. Teste de bioconversão de precursores na ausência de luz

Foram realizadas incubações dos precursores sem adição de células na ausência de luz nas condições a baixo. As extrações e as análises seguiram o procedimento análogo ao descrito acima, como se segue:

- (i) 500 µL de solução de *E*-isoeugenol (5 mg/mL) e 500 µL de solução de 5-metóxieugenol (5 mg/mL) no escuro;
- (j) 500 µL de solução de *E*-isoeugenol (5 mg/mL) no escuro;
- (k) 500 µL de solução de 5-metóxieugenol (5 mg/mL) no escuro.

3.6.6. Bioconversão de precursores por frações enzimáticas

3.6.6.1. Preparação de tampões e soluções para extração das enzimas

Foram preparadas duas soluções de fosfato de sódio:

Solução A: 27,8 g de NaH₂PO₄·H₂O (0,2 M) em 1 L

Solução B: 71,7 g de Na₂HPO₄·12H₂O (0,2 M) em 1 L

Foi preparado 1 L de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) contendo: 195 mL de solução A; 305 mL de solução B; 1 mL de β-mercaptoetanol (0,1%); 0,292 g de EDTA (1 mM) e 0,771 g de DTT (5 mM).

Os reagentes foram dissolvidos em 1 L de água destilada e o pH foi ajustado para 7,0 utilizando as soluções de HCl e NaOH.

Também foram preparadas as soluções de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) contendo 1% de Triton X-100 (acrescentando-se 10 mL de Triton X-100 para 1 L de tampão descrita acima) e tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0) contendo NaCl (1 M).

3.6.6.2. Extração das proteínas solúveis dos embriões

Foram retiradas 6,6 g de massa fresca de embriões somáticos, com quatro semeadas de cultivo *in vitro*, do meio de cultura. Congelou-se em nitrogênio líquido e pulverizou-se o tecido com gral e pistilo, sempre na presença de nitrogênio líquido. Adicionou-se 10% (w/w) (660 mg) de PVPP (polivinil-polipirrolidona) e sílica gel para contribuir na granulação. Após 15 minutos de granulação, adicionou-se 80 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7) contendo 0,1% de β -mercaptoetanol e homogenizou-se a solução por 5 minutos com gral e pistilo. Filtrou-se a solução em gase e centrifugou-se por 30 minutos a 10.000 rpm a 4 °C. A seguir, o sobrenadante foi submetido à precipitação com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ com concentrações 0-20, 20-50 e 50-80%. Centrifugou-se a cada solução por 30 minutos a 9.000 rpm a 4 °C. Os precipitados foram ressuspensos em 3 mL de tampão e foram filtrados em uma coluna Sephadex G25 para retirar os sais e armazenados a -80 °C. Todos os procedimentos foram realizados a 4 °C.

3.6.6.3. Extração das proteínas de parede celular das folhas

A busca por atividade enzimática em paredes celulares foi baseada no fato de que os estudos biossintéticos da formação de lignanas que foram realizados com galhos de *Forsythia intermedia* (Katayama *et al.* 1992) indicaram a presença de enzimas ligadas. Para *O. catharinensis*, utilizou-se o seguinte procedimento:

- 40 g de folhas frescas da planta adulta foram pulverizadas em gral e pistilo na presença de nitrogênio líquido;
- Adicionou-se 4 g de PVPP (10% [w/w] de folhas) e sílica gel para ajudar na granulação e, após 15 minutos de pulverização, adicionou-se 120 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7 contendo 0,1% de β -mercaptoetanol e homogenizou-se a solução por 5 minutos com gral e pistilo;
- Filtrou-se a solução em gase e centrifugou-se por 30 minutos a 10.000 rpm a 4 °C;
- Lavou-se o resíduo com acetona gelada (-20 °C, 100 mL, 30 minutos, por três vezes);
- Filtrou-se através de 4 camadas de gaze;
- Lavou-se o resíduo com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 (160 mL, 30 minutos);
- Filtrou-se a solução em gaze;
- Lavou-se o resíduo com 150 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo 1% de Triton X-100 por 4 horas;
- Filtrou-se a solução em gaze;
- Lavou-se o resíduo com 150 mL de tampão por 16 horas;

- Filtrou-se a solução em gaze;
- Extraíu-se as proteínas com 100 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,0 contendo 1 M de NaCl por 4 horas;
- Filtrou-se a solução em gaze e centrifugou-se o filtrado por 20 minutos a 10.000 rpm a 4°C;
- Filtrou-se 30 mL do sobrenadante através de filtro de membrana de porosidade 0,22 µm;
- Concentrou-se o filtrado até 3 mL por centrifugação a 5.000 rpm em concentrador do tipo CENTRIPLUS-10 (AMICON, USA), utilizando uma membrana de porosidade para 15.000 Dalton. Todos os procedimentos foram realizados a 4°C.

3.6.6.4. Dosagem de proteínas totais nos extratos enzimáticos

Para estimar-se a quantidade de proteína presente no extrato dos embriões e das folhas foi adquirido um “kit” que se baseia no método de dosagem do ácido bicinconínico (BCA), seguindo-se o protocolo do manual do fabricante (Pierce, Rockford, USA). Albumina sérica bovina foi utilizada como padrão.

3.6.6.5. Teste de bioconversão de precursores por frações enzimáticas

Em um microtubo cônico de 1,5 mL adicionou-se 200 µL de solução enzimática, 20 µL de solução etanólica de *E*-isoeugenol (50 mM), 20 µL de solução etanólica de 5-metóxieugenol (50 mM), 20 µL de β-NADH (4 mM), 40 µL de H₂O₂ (10 mM) e 180 µL de tampão fosfato de sódio 0,1 M. A solução foi incubada por 30 minutos a 30°C e a seguir extraída duas vezes com 300 µL de AcOEt. Após a eliminação do solvente, o resíduo foi ressuspeso em MeOH/H₂O (4:1) e foi analisado por CLAE.

Para o experimento acima descrito foram utilizados controles, incubando os substratos e os co-fatores (controle-1) tanto quanto a preparação enzimática e os co-fatores (controle-2). Além destes, foi realizado um controle utilizando-se enzima desnaturada por aquecimento a 98°C durante 30 minutos (controle-3).

3.6.6.6. Avaliação da atividade peroxidásica de frações enzimáticas

Em um frasco de 5 mL, adicionou-se 1,5 mL de tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0), 25 µL de solução de guaiacol (20,1 mM) e 15 µL de solução de H₂O₂ (12,3 mM, 0,042%) e 25 µL de solução enzimática. A reação foi iniciada através de adição da solução de H₂O₂. A absorbância da solução foi medida em 436 nm a 25°C por 5 minutos em espectrofotômetro (Pütter, 1965).

3.7 Dados espectroscópicos das substâncias isoladas

- 1** (7*S*,8*S*,7'*R*,8'*S*)-3,4,5,3',4',5'-Hexametoxi- $\Delta^{1,3,5,1',3',5'}$ -8,8'.7.O.7'-neolignana (veraguensina).

RMN de ¹H: Tabela 4-1 e Figura 3-7.

EM/ESI, m/z (int. rel): 374 (M⁺, 7), 373 (37), 355 (6), 236 (5), 235 (100), 217 (12), 179 (6), 167 (5), 165 (4), 151 (4).

- 2** (7*R*,8*S*,1'*R*,3'*R*)-3,4,3',5'-Tetrametoxi-4'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.O.6'-neolignana.

RMN de ¹H: Tabela 4-3 e Figura 3-8.

RMN de ¹³C: Tabela 4-4 e Figura 3-9.

EM/IE 70 eV, m/z (int. rel): 388 (M⁺, 22), 347 (80), 319 (73), 287 (38), 255 (33), 227 (35), 181 (49), 178 (100), 151 (65), 115 (44), 107 (72), 91 (67), 77 (60), 65 (37), 41 (77).

- 3** (7*S*,8*S*,1'*R*,3'*R*)-3,4-Metilenodioxi-3'5'-dimetoxi-4'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.O.6'-neolignana.

RMN de ¹H: Tabela 4-3 e Figura 3-10.

RMN de ¹³C: Tabela 4-4 e Figura 3-11.

EM/IE 70 eV, m/z (int. rel.): 372 (M⁺, 19), 342 (32), 331 (99), 303 (86), 271 (44), 260 (14), 239 (35), 211 (37), 190 (22), 181 (30), 162 (100), 149 (49), 135 (74), 115 (53), 103 (48), 91 (55), 77 (88), 65 (48), 53 (42), 41 (80).

- 4** (7*R*,8*R*,1'*R*,3'*R*)-3,4-Metilenodioxi-3'5'-dimetoxi-4'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.O.6'-neolignana.

RMN de ¹H: Tabela 4-3 e Figura 3-12.

RMN de ¹³C: Tabela 4-4 e Figura 3-11.

- 5** (7*R*,8*S*,1'*R*,2'*S*)-2'-Hidroxi-3,4-dimetoxi-3'-oxo- $\Delta^{1,3,5,4',8'}$ -8.1',7.O.2'-neolignana.

RMN de ¹H: Tabela 4-3 e Figura 3-13.

- 6** (7*S*,8*R*,1'*R*,2'*R*,3'*R*)-2'-Acetoxi-3,4,3',5'-tetrametoxi-4'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.3'-neolignana.

RMN de ¹H: Tabela 4-7 e Figura 3-14.

EM/IE 70 eV, m/z (int. rel.): 430 (M^+ , 25), 210 (100), 195 (28), 181 (47), 178 (41), 167 (25), 150 (20), 107 (19), 91 (16), 43 (79).

- 7** (7*S*,8*R*,1'*R*,2'*R*,3'*R*)-2'-Acetoxi-3,4-metilenodioxi-3',5'-dimetoxi-4'-oxo- $\Delta^{1,3,5,5',8'}$ -8.1',7.3'- neolignana.

RMN de ^1H : Tabela 4-7 e Figura 3-15.

EM/IE 70 eV, m/z (int. rel.): 414 (M^+ , 17), 210 (100), 195 (21), 181 (46), 162 (16), 150 (15), 135 (11), 103 (9), 91 (11), 77 (19), 55 (17), 43 (77).

- 8** Espatulanol

RMN de ^1H : Tabela 4-8 e Figura 3-16.

RMN de ^{13}C : Tabela 4-8 e Figura 3-17.

EM/IE 70 eV, m/z (int. rel.): 205 (M^+ , 2), 187 (2), 177 (1), 159 (4), 145 (3), 31 (4), 119 (9), 105 (11), 91 (18), 79 (14), 67 (15), 55 (19), 43 (100).

- 9** (-)-Eudesm-11-em-4 α -ol.

RMN de ^1H : Tabela 4-9 e Figura 3-18.

RMN de ^{13}C : Tabela 4-9 e Figura 3-19.

$[\alpha]^{25}_{\text{D}} = -13.1^\circ$ (CHCl_3 , c 0.7)

EM/IE 70 eV, m/z (int. rel.): 222 (M^+ , 10), 204 (100), 189 (77).

- 10** Afzelina

RMN de ^1H : Tabela 4-10 e Figura 3-20 (MeOH-d_6) e 3-21 (Acetona- d_6).

RMN de ^{13}C : Tabela 4-11 e Figura 3-22.

EM/ESI, m/z (int. rel.): 455 (M^+ , 7), 433 (100), 362 (5), 340 (4), 287 (68), 214 (47), 158 (2), 147 (<1).

- 11** 6-Metóxieugenol

EM/IE 70 eV, m/z (int. rel.): 194 (M^+ , 100), 179 (13), 167 (12), 151 (23), 147 (19), 131 (30), 119 (38), 103 (27), 91 (72), 77 (56), 65 (35), 55 (50), 45 (62).

Figura 3-7. Espectro de RMN de ¹H de 1 (200 MHz, CDCl₃)

Figura 3-8. Espectro de RMN de ¹H de 2 (200 MHz, CDCl₃)

Figura 3-9. Espectro de RMN de ^{13}C de 2 (50 MHz, CDCl_3)

Figura 3-10. Espectro de RMN de ^1H de **3** (200 MHz, CDCl_3)

Figura 3-11. Espectro de RMN de ^{13}C de 3 + 4 (50 MHz, CDCl_3)

Figura 3-12. Espectro de RMN de ¹H de 4 (200 MHz, CDCl₃)

Figura 3-13. Espectro de RMN de ¹H de 5 + 1 (200 MHz, CDCl₃)

Figura 3-14. Espectro de RMN de ¹H de **6** (200 MHz, CDCl₃)

Figura 3-15. Espectro de RMN de ¹H de 7 (200 MHz, CDCl₃)

Figura 3-16. Espectro de RMN de ¹H de 8 (200 MHz, CDCl₃)

Figura 3-17. Espectro de RMN de ¹³C de **8** (50 MHz, CDCl₃)

Figura 3-18. Espectro de RMN de ¹H de **9** (200 MHz, CDCl₃)

Figura 3-19. Espectro de RMN de ^{13}C de **9** (50 MHz, CDCl_3)

Figura 3-20. Espectro de RMN de ¹H de **10** (200 MHz, MeOH-d₆)

Figura 3-21. Espectro de RMN de ^1H de **10** (300 MHz, acetona- d_6)

Figura 3-22. Espectro de RMN de ^{13}C de **10** (50 MHz, MeOH-d_6)

Figura 3-23. Espectro de RMN de ¹H do ácido ferúlico (200 MHz, CDCl₃)

4. Resultados e Discussão

4.1. Considerações sobre as neolignanas isoladas

As neolignanas mais frequentemente isoladas do gênero *Ocotea* são pertencentes aos esqueletos benzofurânico e bicicloctânico (Figura 4-1). No estudo atual de *O. catharinensis*, foram isoladas as neolignanas **2** a **6**, também foi isolada e caracterizada pela primeira vez a neolignana tetraidrofurânica **1** (veraguensina) e a bicicloctânica **7**.

Figura 4-1. Esqueletos de neolignanas isoladas de *O. catharinensis*.

4.2. Determinação estrutural das substâncias isoladas

4.2.1. Neolignanas

Neolignana tetraidrofurânica

A neolignana **1** foi identificada como sendo a veraguensina através da análise do espectro de RMN de ^1H , do espectro de massas e por comparação com dados da literatura (Talapatra *et al.*, 1982).

No espectro de RMN de ^1H , observou-se dois dubletos em δ 1,07 ($J = 6,58$) e em δ 0,66 ($J = 7,02$) que foram atribuídos a dois grupos metílicos H-9 e H-9', sendo o ultimo protegido pelo efeito anisotrópico de grupos arílicos em *cis*. Os prótons oxibenzílicos H-7' sofrem desproteção, apresentando dubletos em δ 5,14 ($J = 8,34$), enquanto que no caso *trans*, o mesmo foi observado em torno de δ 4,5 (Lopes *et al.*, 1996B).

A fórmula molecular da neolignana **1** foi definida como $\text{C}_{22}\text{H}_{28}\text{O}_5$ com base no pico relativo ao íon pseudomolecular em 373 Daltons, no espectro de massas com ionização por electrospray em modo positivo, confirmando a presença dos quatro grupos metoxílicos. A proposta de fragmentação do espectro de EM-EM é apresentada na Figura 4-2. Pico base em 235 Da formado após a perda de um anel é semelhante da fragmentação da podofilotoxina (Seidel *et al.*, 2000). O cátion acílio diOMeArCO $^+$ em m/z 165 foi também observado no espectro de massas obtido sob impacto de elétrons, porém aquele em m/z 355 Da, resultante da perda de molécula de água, não foi observado sob impacto de elétrons (Lopes, 1997).

Tabela 4-1. Dados de RMN de ^1H de **1** [CDCl_3 , 200MHz, δ (J em Hz)].

posição	δ
7	4,43 (<i>d</i> , $J = 9,66$)
7'	5,14 (<i>d</i> , $J = 8,34$)
8	1,73 - 1,86 (<i>m</i>)
8'	2,20 - 2,32 (<i>m</i>)
9	1,07 (<i>d</i> , $J = 6,58$)
9'	0,66 (<i>d</i> , $J = 7,02$)
OMe	3,86; 3,88; 3,90; 3,91 (<i>s</i>)
ArH	6,82 - 7,07

Figura 4-2. Proposta de fragmentação do espectro de EM-EM (ESI) da neolignana **1**.

A veraguensina foi inicialmente isolada de *O. veraguensis* e entre suas propriedades biológicas podem ser mencionadas a atividade tripanosomicida (Lopes et al., 1998) e, em função disso, foram sintetizados diversos análogos visando a otimização de sua atividade (Nihei et al., 2005.)

Neolignanas hexaidrobenzofurânicas

As neolignanas hexaidrobenzofurânicas **2** a **5** haviam sido anteriormente isoladas e identificadas pela comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C relatados na literatura.

Tabela 4-2. Neolignanas hexaidrobenzofurânicas isoladas de *O. catharinensis*.

neolignana	nome usual	planta	referência
2	5'-metoxi-porosina	<i>Ocotea catharinensis</i>	Ishige <i>et al.</i> (1991)
3	armenina-B	<i>Licaria armeniaca</i>	Aiba <i>et al.</i> (1978)
		<i>O. aciphylla</i>	Felício <i>et al.</i> (1986)
4	canelina-B	<i>L. canella</i>	Giesbrecht <i>et al.</i> (1974)
5	ferrearina-E	<i>O. catharinensis</i>	Ishige <i>et al.</i> (1991)
			Lordello e Yoshida (1997)

As neolignanas hexaidrobenzofurânicas **2** a **4**, que foram classificadas com base nos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C como sendo do tipo “porosina”, possuem

configurações relativas diferentes nos grupos arila/metila/alila: neolignana **2** em *cis/trans*, neolignana **3** em *trans/trans* e neolignana **4** em *trans/cis*.

O espectro de RMN de ^1H de **2** apresentou um sinal referente aos hidrogênios metílicos H-9 em torno de δ 0,5, protegidos pelo anel aromático quando a relação arila/metila é *cis*. Valor de deslocamento químico próximo, em δ 0,74, foi observado para a neolignana **5**. No caso das neolignanas **3** e **4** observou-se H-9 acima de δ 1,0. Em função dessa configuração, observou-se no espectro de RMN de ^{13}C um efeito γ do grupo metílico sobre o C-2', em torno de δ 32, quando a relação entre eles é *cis* como apresenta nas neolignanas **2** e **3**. Quando a relação é *trans*, no caso da neolignana **4**, a absorção do C-2' ocorre em δ 38,7.

A identificação da neolignana **5**, classificada como sendo do tipo “ferrearina”, foi realizada pela comparação dos dados de RMN de ^1H descrita na literatura (Ishige *et al.* 1991).

Tabela 4-3. Dados de RMN de ^1H de **2-5** [CDCl_3 , 200MHz, δ (J em Hz)].

	2	3	4	5
1	—	—	—	—
2	6,75 (<i>d</i> , 1,5)	6,74 - 6,84 (<i>m</i>)	6,74 - 6,83 (<i>m</i>)	6,77-6,86 (<i>m</i>)
3	—	—	—	—
4	—	—	—	—
5	6,88 (<i>d</i> , 8,3)	6,74 - 6,84 (<i>m</i>)	6,74 - 6,83 (<i>m</i>)	6,77-6,86 (<i>m</i>)
6	6,81 (<i>dd</i> , $J = 1,5$; 8,3)	6,74 - 6,84 (<i>m</i>)	6,74 - 6,83 (<i>m</i>)	6,77-6,86 (<i>m</i>)
7	5,89 (<i>d</i> , $J = 5,3$)	5,26 (<i>d</i> , $J = 1,7$)	5,09 (<i>d</i> , 10,5)	5,42 (<i>d</i> , $J = 9,4$)
8	2,44 - 2,71	2,66 (<i>dd</i> , $J = 7,3$; 1,7)	2,40 - 2,66 (<i>m</i>)	2,88 (<i>dq</i> , $J = 9,4$, 7,5)
9	0,53 (<i>d</i> , $J = 7,5$)	1,19 (<i>d</i> , $J = 7,3$)	1,05 (<i>d</i> , $J = 7,0$)	0,74 (<i>d</i> , $J = 7,5$)
1'	—	—	—	—
2'	1,89 (<i>dd</i> , $J = 12,3$, 12,3) 2,28 (<i>dd</i> , $J = 12,3$; 5,3)	1,83 (<i>dd</i> , $J = 12,3$; 12,3) 2,20 - 2,29 (<i>m</i>)	1,76 (<i>dd</i> , $J = 12,3$; 12,3) 2,00 - 2,12 (<i>m</i>)	—
3'	4,01 (<i>dd</i> , $J = 12,3$; 5,3)	3,91 (<i>dd</i> , $J = 12,3$; 5,3)	4,06 (<i>dd</i> , $J = 12,3$; 5,7)	—
4'	—	—	—	6,26 (<i>dd</i> , 10,1; 2,6)
5'	—	—	—	6,86-6,90 (<i>m</i>)
6'	—	—	—	1,99-2,04 (<i>m</i>) 2,50-2,61 (<i>m</i>)
7'	2,45 - 2,78 (<i>m</i>)	2,20 - 2,29 (<i>m</i>)	2,40 - 2,66 (<i>m</i>)	2,10-2,15 (<i>m</i>) 2,44 (<i>d</i> , $J = 6,6$)
8'	5,82 - 6,10 (<i>m</i>)	5,55 - 5,76 (<i>m</i>)	5,80 - 6,02 (<i>m</i>)	5,49 -5,68 (<i>m</i>)
9'	5,31 (<i>dl</i> , $J = 14,9$) 5,32 (<i>dl</i> , $J = 9,7$)	4,81 (<i>dd</i> , $J = 16,7$; 1,3) 5,12 (<i>dl</i> , $J = 10,1$)	5,19 - 5,32 (<i>m</i>)	4,91-5,16 (<i>m</i>)
CH₂O₂	—	5,99 (<i>s</i>)	5,99 (<i>s</i>)	—
MeO-3	—	—	—	3,70 (<i>s</i>)
MeO-4	3,89 (<i>s</i>)	—	—	3,88 (<i>s</i>)
MeO-3'	3,63 (<i>s</i>)	3,82 (<i>s</i>)	3,60 (<i>s</i>)	—
MeO-5'	3,81 (<i>s</i>)	3,62 (<i>s</i>)	3,76 (<i>s</i>)	—
HO-2'	—	—	—	4,72 (<i>s</i>)

Tabela 4-4. Dados de RMN de ^{13}C de **2-4** [CDCl_3 , 50 MHz, δ (J em Hz)].

posição	2	3	4
1	128,7	132,3	131,3
2	109,0	104,9	106,5
3	149,1	148,2	148,3
4	148,9	147,1	148,2
5	111,2	108,4	108,2
6	118,1	117,3	120,7
7	87,5	92,9	90,9
8	42,8	44,7	47,1
9	11,6	17,5	8,8
1'	48,8	47,3	53,3
2'	32,2	31,8	38,7
3'	77,4	77,4	77,1
4'	192,5	192,4	192,8
5'	131,5	132,7	131,5
6'	169,8	170,5	169,7
7'	39,8	41,6	37,6
8'	132,8	134,5	133,8
9'	119,9	120,0	119,3
CH₂O₂	—	101,3	101,3
MeO-3	56,0	—	—
MeO-4	55,9	—	—
MeO-3'	59,2	59,2	59,0
MeO-5'	60,4	60,5	60,5

Como a neolignana **2** foi obtida na forma cristalina (Figura 4-3), a mesma foi submetida ao estudo por cristalografia por raios-X. Os parâmetros geométricos de análise de raios-X da neolignana **2** foram listados na Tabela 4-5 e 4-6. Foram definidas configurações absolutas para os átomos C7, C8, C1' e C3' como *R*, *S*, *R* e *R*, respectivamente (Figura 4-4), confirmando-se a estrutura como determinada anteriormente (Ishige *et al.*,1991).

Na estrutura representada pelo ORTEP (Figura 4-4), constata-se que os grupos metoxílicos em C3 e C4 estão quase no mesmo plano do anel apresentando ângulos torcionais de $-7,141^\circ$ em C-17-C-16-O-5-C-15 e de $-4,335^\circ$ em C-14-C-15-O-6-C-18. No entanto, o grupo metoxílico em C5' foi direcionado para frente com ângulo torcional de $-96,506^\circ$ em C-4-C-3-O-3-C-21.

Figura 4-3. Cristais obtidos por recristalização da neolignana **2**.

Figura 4-4. Estrutura molecular ORTEP para a neolignana **2**.

Tabela 4-5. Comprimentos de ligação (Å) determinados por cristalografia de raios-X para a neolignana **2**.

O(1)-C(20)	1,397(6)
O(1)-C(1)	1,409(6)
O(2)-C(2)	1,212(5)
O(3)-C(3)	1,373(5)
O(3)-C(21)	1,414(8)
O(4)-C(4)	1,353(5)
O(4)-C(5)	1,472(5)
O(5)-C(16)	1,357(5)
O(5)-C(19)	1,398(6)
O(6)-C(15)	1,373(5)
O(6)-C(18)	1,402(7)
C(1)-C(2)	1,518(7)
C(1)-C(8)	1,526(7)
C(2)-C(3)	1,446(6)
C(3)-C(4)	1,342(6)
C(4)-C(7)	1,500(6)
C(5)-C(12)	1,505(6)
C(5)-C(6)	1,539(7)
C(6)-C(22)	1,510(8)
C(6)-C(7)	1,554(6)
C(7)-C(8)	1,535(7)
C(7)-C(9)	1,565(7)
C(9)-C(10)	1,489(9)
C(10)-C(11)	1,095(15)
C(12)-C(13)	1,371(7)
C(12)-C(17)	1,402(7)
C(13)-C(14)	1,378(7)
C(14)-C(15)	1,379(7)
C(15)-C(16)	1,387(6)
C(16)-C(17)	1,390(6)

Tabela 4-6. Ângulos de ligação (°) determinados por cristalografia de raios-X para a neolignana **2**.

C(20)-O(1)-C(1)	114,1(5)
C(3)-O(3)-C(21)	113,2(5)
C(4)-O(4)-C(5)	108,8(3)
C(16)-O(5)-C(19)	118,0(4)
C(15)-O(6)-C(18)	117,6(4)
O(1)-C(1)-C(2)	108,5(4)
O(1)-C(1)-C(8)	111,8(5)
C(2)-C(1)-C(8)	110,9(4)
O(2)-C(2)-C(3)	121,9(4)
O(2)-C(2)-C(1)	121,4(4)
C(3)-C(2)-C(1)	116,6(4)
C(4)-C(3)-O(3)	120,9(4)
C(4)-C(3)-C(2)	120,1(4)
O(3)-C(3)-C(2)	119,1(4)
C(3)-C(4)-O(4)	122,2(4)
C(3)-C(4)-C(7)	126,8(4)
O(4)-C(4)-C(7)	110,9(4)
O(4)-C(5)-C(12)	108,2(4)
O(4)-C(5)-C(6)	103,9(3)
C(12)-C(5)-C(6)	119,0(4)
C(22)-C(6)-C(5)	113,8(4)
C(22)-C(6)-C(7)	114,9(4)
C(5)-C(6)-C(7)	100,0(4)
C(4)-C(7)-C(8)	108,0(4)
C(4)-C(7)-C(6)	99,3(3)
C(8)-C(7)-C(6)	118,0(4)
C(4)-C(7)-C(9)	110,0(4)
C(8)-C(7)-C(9)	110,3(4)
C(6)-C(7)-C(9)	110,5(4)
C(1)-C(8)-C(7)	110,5(4)
C(10)-C(9)-C(7)	112,5(5)
C(11)-C(10)-C(9)	137,2(12)
C(13)-C(12)-C(17)	118,9(4)
C(13)-C(12)-C(5)	123,9(4)
C(17)-C(12)-C(5)	117,2(4)
C(12)-C(13)-C(14)	121,0(4)
C(13)-C(14)-C(15)	120,6(5)
O(6)-C(15)-C(14)	125,3(4)
O(6)-C(15)-C(16)	115,1(4)
C(14)-C(15)-C(16)	119,5(4)
O(5)-C(16)-C(15)	116,3(4)
O(5)-C(16)-C(17)	123,9(4)
C(15)-C(16)-C(17)	119,8(4)
C(16)-C(17)-C(12)	120,2(5)

Neolignanas bicicloctânicas **6** **7**

As neolignanas **6** e **7** foram identificadas pela comparação dos dados de RMN de ^1H e espectro de massas descritos na literatura (Dodson *et al.*, 1987; Lordello, 1996).

A neolignana **6** foi isolada anteriormente das sementes de *O. veraguensis* por Dodson *et al.* (1987) e dos embriões somáticos de *O. catharinensis* por Lordello (1996).

A neolignana **7**, que foi isolada também das sementes de *O. veraguensis* (Dodson *et al.*, 1987) difere da neolignana **6** somente pela presença do grupo metilenodioxí na posição 3, 4 do anel (2H, δ 5,93, *d*, $J = 1,3$) ao invés de metoxilas.

A posição da ponte metínica foi confirmada como α através da análise do espectro de RMN de ^1H , onde se observaram dois dubletos em δ 0,91 e 2,62 e um singleto em δ 5,69, referentes aos hidrogênios H-9, H-7 e H-6' respectivamente (Dodson *et al.*, 1987). A observação de um singleto em δ 5,4, no espectro de RMN de ^1H , mostrou localização do grupo acetoxílico como C-2'.

Tabela 4-7. Dados de RMN de ^1H de **6** e **7** [CDCl_3 , 200MHz, δ (J em Hz)].

posição	6	7
1	—	—
2	6,74-6,88 (<i>m</i>)	6,96 (<i>d</i> , $J = 1,3$)
3	—	—
4	—	—
5	6,74-6,88 (<i>m</i>)	6,64 (<i>dd</i> , $J = 7,9; 1,7$)
6	6,74-6,88 (<i>m</i>)	6,70 (<i>d</i> , $J = 7,9$)
7	2,62 (<i>d</i> , $J = 8,8$)	2,59 (<i>d</i> , $J = 8,3$)
8	2,34-2,56 (<i>m</i>)	2,32-2,51 (<i>m</i>)
9	0,91 (<i>d</i> , $J = 6,1$)	0,90 (<i>d</i> , $J = 6,6$)
1'	—	—
2'	5,43 (<i>s</i>)	5,40 (<i>s</i>)
3'	—	—
4'	—	—
5'	—	—
6'	5,69 (<i>s</i>)	5,68 (<i>s</i>)
7'	2,34-2,56 (<i>m</i>)	2,32-2,51 (<i>m</i>)
8'	5,72 - 5,90 (<i>m</i>)	5,71 - 5,89 (<i>m</i>)
9'	5,15 (<i>dd</i> , $J = 11,8; 3,6$) 5,16 (<i>dd</i> , $J = 15,4; 3,6$)	5,14 (<i>dd</i> , $J = 11,9; 3,5$) 5,15 (<i>dd</i> , $J = 15,4; 3,5$)
MeO-3	3,89 (<i>s</i>)	—
MeO-4	3,86 (<i>s</i>)	—
MeO-3'	3,23 (<i>s</i>)	3,23 (<i>s</i>)
MeO-5'	3,69 (<i>s</i>)	3,68 (<i>s</i>)
AcO-4'	2,27 (<i>s</i>)	2,28 (<i>s</i>)
CH ₂ O ₂	—	5,93 (<i>d</i> , $J = 1,3$) 5,95 (<i>d</i> , $J = 1,3$)

4.2.2. Sesquiterpenos

8

O sesquiterpeno **8**, classificado como sendo do tipo aromadendrano, foi anteriormente isolado das folhas de *O. catharinensis* por Lordello e Yoshida (1997) e identificada com base nos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C .

O espectro de RMN de ^1H apresentou três singletos em δ 1,03, 1,05 e 1,27, sendo que os dois primeiros referem-se aos grupos metílicos ligados a átomos de carbono quaternário e o último ao grupo metílico ligado a carbono quaternário carbinólico. Além disso, pela comparação dos dados de RMN de ^{13}C e EM obtidos para substância **8** com aqueles descritos na literatura (Iwabuchi *et al.*, 1989) confirmou-se que a substância isolada é o espatulenol.

O sesquiterpeno **9** foi identificado como (-)-eudesm-11-en-4 α -ol através da comparação dos dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da literatura (San Feliciano *et al.*, 1990), isolado anteriormente das folhas de *O. corymbosa* (Chávez, 1991).

Tabela 4-8. Dados de RMN de ^1H (200 MHz) e de ^{13}C (50 MHz) de **8** [CDCl_3 , δ (J em Hz)].

posição	^1H	^{13}C
1		54,3
2		24,8
3		41,7
4	—	81,0
5		53,4
6	0,45 (<i>m</i>)	27,5
7	0,73 (<i>m</i>)	26,7
8		29,9
9		38,8
10	—	153,4
11	—	20,2
12	1,03 (<i>s</i>)	28,6
13	1,05 (<i>s</i>)	16,3
14	1,27 (<i>s</i>)	26,0
15	4,66 (<i>s</i>)/4,69 (<i>s</i>)	106,2

A análise do espectro de RMN de ^1H indica a presença de um grupo olefínico, devido a observação dos dois singletos em δ 4,69 e δ 4,71. No espectro de RMN de ^{13}C , foram observados três grupos de hidrogênios metílicos, característicos do esqueleto do tipo eudesmano.

9Tabela 4-9. Dados de RMN de ^1H (200MHz) e de ^{13}C (50 MHz) de **9** [CDCl_3 , δ].

posição	^1H	^{13}C
1		43,4
2		20,1
3		44,7
4	—	72,2
5	—	54,9
6		26,1
7		46,4
8		26,9
9		41,1
10	—	34,6
11	—	150,7
12	4,69 (s)/4,71 (s)	108,1
13	1,75 (s)	22,7
14	0,89 (s)	18,7
15	1,12 (s)	21,0

4.2.3. Flavonóide glicosilado

10

O flavonóide glicosilado **10** foi identificado como afzelina pelas análises de espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C , além de espectro de massas, e posterior confirmação com dados da literatura (Silva, 1997). O flavonóide glicosilado, afzelina, foi isolado pela primeira vez nesta espécie.

No espectro de RMN de ^1H em acetona- d_6 observaram-se dois dubletos em δ 6,47 ($J = 2,1$) e δ 6,26 ($J = 2,1$) referentes aos hidrogênios 6 e 8 do anel A, dois dubletos em δ

7,85 ($J = 9,0$) e δ 7,01 ($J = 9,0$) referentes aos hidrogênios 2' ou 6' e 3' ou 5' do anel B. Foi observado também um dubleto em δ 0,88 (3H), além das absorções de hidrogênios carbinólicos entre δ 3,2–4,3, comprovando-se a presença de raminose nesta substância.

Na análise de espectrometria de massa com ionização por electrospray (ESI), foram observadas as seguintes massas: 455 (M + Na), 433 (M + H), 287 (flavonóide + H), 147 (açúcar).

Tabela 4-10. Dados de RMN de ^1H de **10** [δ (J em Hz)].

posição	10 acetona- d_6 , 300 MHz	10 metanol- d_6 , 200 MHz	afzelina ^a DMSO- d_6 , 200 MHz
6	6,47 (d ; 2,1)	6,38 (d ; 2,0)	6,36 (d ; 1,9)
8	6,26 (d ; 2,1)	6,20 (d ; 2,0)	6,16 (d ; 1,9)
2' e 6'	7,85 (d ; 9,0)	7,76 (d ; 8,8)	7,73 (d ; 8,7)
3' e 5'	7,01 (d ; 9,0)	6,93 (d ; 8,8)	6,89 (d ; 8,7)
HO-5		12,55 (s)	12,60 (s)
1"	5,53 (d ; 1,5)	5,37 (s)	5,27 (s)
2", 3", 4" e 5"	3,2-3,4 (m)	3,6-3,8 (m)	3,0-3,2 (m)
6"	0,88 (d , 6,0)	0,91 (d ; 5,3)	0,77 (d , 5,4)

^aSilva, 1997

4.2.4. Fenilpropanóide

A fração de AcOEt dos embriões foi submetida à análise de CG/EM no qual foi observada a presença de 5-metóxieugenol (**11**). Esse fenilpropanóides simples não havia ainda sido isolado de espécies de Lauraceae e é importante sob o ponto de vista biogenético, considerando que pode ser o precursor das neolignanas hexaidrobenzofurânicas e biciclooctânicas que foram isoladas de *O. catharinensis*.

11

Tabela 4-11. Dados de RMN de ^{13}C de **10** [50 MHz; δ].

posição	10 metanol-d₆,	afzelina^a DMSO-d₆,
2	159,3	157,3
3	136,3	134,4
4	179,7	177,6
5	163,3	161,5
6	99,9	99,2
7	165,9	165,4
8	94,8	94,1
9	158,6	156,8
10	103,5	104,0
1'	122,7	120,8
2'	131,9	130,8
3'	116,6	115,7
4'	161,6	160,2
5'	116,6	115,7
6'	131,9	130,8
1''	106,0	102,0
2''	71,9	70,3
3''	72,0	70,6
4''	73,2	71,4
5''	72,2	70,9
6''	17,7	17,7

^aSilva, 1997

4.2.5. Ácidos graxos e esteróides

A fração hexânica e a fração clorofórmica do extrato dos calos foram analisadas pelo espectro de RMN de ^1H e CG/EM. O espectro de RMN de ^1H mostrou a presença de triglicerídios e não mostrou os sinais aromáticos ou os sinais característicos de lignóides. A análise dessa fração por CG/EM e de busca no banco de dados disponível no instrumento, foi possível identificar ácidos graxos e diversos esteróides (Tabela 4-12). Muito possivelmente, tais constituintes fazem parte de membranas celulares e não foram investigadas com relação a outros aspectos.

Tabela 4-12. Substâncias identificadas nos calos de *O. catharinensis* por CG/EM.

	T_R	substância	M_w
Fr. hexânica	45,5	ácido hexadecanóico	256
	51,0	ácido octadecanóico	284
	71,8	estigmastan-6,22-dieno	394
	72,2	estigmastan-3,5-dieno	396
	78,7	estigmastan-3,5-dieno	396
	80,0	estigmastan-3,5-dieno-7-ona	410
Fr. CHCl ₃	45,5	ácido hexadecanóico	256
	51,3	ácido 9-octadecanóico	280
	79,6	estigmastan-3,5-dieno-7-ona	410

4.4. Análise dos óleos essenciais das folhas e embriões somáticos

Neste trabalho foi feita a análise do óleo essencial das folhas, anteriormente, feita por Lopes, *et al.* (1996A), com a diferença de que foram utilizadas duas colunas para melhorar caracterizar os compostos, procurando avaliar a presença de fenilpropanóides, e para alguns de seus componentes foi realizada a análise do excesso enantiomérico. Esse tipo de análise pode indicar Além disso, foi feita também a micro-extração e análise de óleo essencial dos embriões somáticos.

4.4.1. Óleos essenciais das folhas

Após a extração das folhas de *O. catharinensis* em aparelho de Clevenger foi obtido um óleo levemente amarelado com rendimento de 0,16%.

A análise deste óleo permitiu a identificação de 30 componentes (98,2% do óleo total) sendo que foram observados monoterpenos (53,1%), sesquiterpenos (44,4%) e álcoois alifáticos (0,7%) (Tabela 4-13). Os fenilpropanóides que estariam envolvidos na biossíntese de neolignanas não foram detectados. Os constituintes majoritários de monoterpenos foram sabineno (19,8%), α -pineno (10,8%) e terpinen-4-ol (8,8%). Na fração de sesquiterpenos, o componente em maior quantidade foi espatulenol (6,6%) que foi isolado anteriormente do extrato hexânico das folhas de *O. catharinensis* (Lordello *et al.*, 1997) e do extrato metanólico dos embriões somáticos neste trabalho. No trabalho anterior (Lopes *et al.*, 1996A), óleos essenciais eram constituídos pelos monoterpenos (27,2%) e sesquiterpenos (53,5%), sendo que a fração de sesquiterpenos foi maior do que no óleo analisado pelo trabalho atual (Tabela 4-14). Os monoterpenos majoritários foram α -pineno (6,9%), cimeno (5,5%) e β -pineno (5,1%) e os sesquiterpenos majoritários foram α -humuleno (5,9%), β -cariofileno (5,5%) e curcumeno (5,3%). O teor de

componentes oxigenados (18,5%) foi significativamente menor que no trabalho atual (34,8%) e tais diferenças podem estar relacionadas com os diferentes períodos nos quais as folhas foram coletadas (julho, 1994 e dezembro, 2002).

A importância da determinação das antípodas predominantes nas estruturas dos terpenos cíclicos opticamente ativos reside no fato de que a etapa de ciclização é mediada por uma ciclase e que as diferentes topologias das estruturas resultam em propriedades biológicas muito distintas (Wust *et al.*, 1999; Schwab *et al.*, 2001).

O excesso enantiomérico de monoterpenos foi determinado pela primeira vez com espécies de Lauraceae. Utilizando-se uma coluna β -ciclodextrina foram identificadas as distribuições para os quatro componentes (Tabela 4-15). Para α -pineno e β -pineno, os isômeros (+)-tiveram ee de 33 e 5%, respectivamente. No caso do sabineno e terpinen-4-ol, os isômeros (-)- foram componentes majoritários (85 e 64% ee, respectivamente).

Tabela 4-13. Índice de retenção em coluna DB-5 e LM-120 e porcentagens relativas de componentes nos óleos essenciais das folhas de *O. catharinensis*.

componente	IR DB-5^a	IR LM-120^b	porcentagem
5-metil-2-hexanol	897	—	0,7
triciclano	919	1009	0,7
α -pineno	925	1014	10,8
sabineno	964	1104	19,8
β -pineno	967	1107	6,8
α -terpineno	1008	1122	0,8
orto-cimeno	1015	1275	0,5
limoneno	1019	1187	1,3
1,8-cineol	1022	1230	0,9
γ -terpineno	1049	1188	1,4
cis-hidrato de sabinene	1059	—	0,6
trans-hidrato de sabineno	1091	1463	0,4
cis-hidrato de pineno	1114	—	0,3
terpinen-4-ol	1169	1527	8,8
α -copaeno	1365	1432	0,7
β -cariofileno	1408	1585	6
α -humuleno	1440	1598	2,1
germacreno-D	1467	1598	1,5
biciclogermacreno	1483	1721	4,9
δ -cadineno	1509	1745	0,6
elemol	1540	2078	0,4
espatulenol	1572	2090	6,6
óxido de cariofileno	1576	1954	5,3
globulol	1585	2044	1
epóxido de humuleno I	1602	2015	0,7
γ -eudesmol	1627	2180	0,8
α -muurolol	1644	2175	1,2
β -eudesmol	1647	2250	3,7
α -eudesmol	1651	2241	4,1
Z-acetato de nerolidol	1663	—	4,8

^aÍndice de retenção em coluna DB-5.^bÍndice de retenção em coluna LM-120.

Tabela 4-14. Quantidade relativa dos grupos de componentes de óleos essenciais das folhas de *O. catharinensis* [porcentagem (número de componentes)].

Classes	julho, 1994^a	dezembro, 2002
álcoois alifáticos	0	0,7(1)
hidrocarbonetos monoterpênicos	26,3(8)	42,1(8)
monoterpenos oxigenados	0,9(2)	11(5)
hidrocarbonetos sesquiterpênicos	35,9(15)	21,3(8)
sesquiterpenos oxigenados	17,6(9)	23,1(8)
total	80,7(34)	98,2(30)

^a Lopes *et al.*, 1996

Tabela 4-15. Excesso enantiomérico (% ee) de monoterpênos.

componentes	(% ee)
(+)- α -pineno	33
(+)- β -pineno	5
(-)-sabineno	85
(-)-terpinen-4-ol	64

4.4.2. Óleos essenciais dos embriões somáticos

Os óleos essenciais dos embriões somáticos foram submetidos à micro-extração através da destilação por arraste a vapor, o que permitiu a identificação de um sesquiterpeno eudesm-11-en-4 α -ol que foi isolado da fração hexânica do extrato de MeOH dos embriões somáticos. Concluiu-se que a diversidade de terpenos, bem como de neolignanas, nos embriões é relativamente limitada em comparação com as folhas de *O. catharinensis* que apresentaram 29 terpenos.

4.5. Atividade biológica dos extratos e substâncias isoladas

4.5.1. Atividade antioxidante através do método de DPPH (1,1-difenil-2-picril-hidrazila)

As substâncias e extratos apresentados na Tabela 4-16 e na Figura 4-5 foram submetidos ao ensaio de atividade antioxidante utilizando o método de DPPH. Foi observada a perda de coloração violeta na placa de CPC onde foram aplicadas as soluções das frações de CHCl₃ e de AcOEt do extrato etanólico das folhas e as substâncias **5**, **6**, **10** e **11** em comparação à solução de Trolox, o que indica a capacidade antioxidante, representando na tabela pelo sinal (+). O extrato hexânico, a fração hexânica do extrato etanólico e as substâncias **1**, **2**, **3**, **4**, **7** e **9** não apresentaram perda de coloração violeta na placa de CPC o que indica que não possuem a capacidade

antioxidante, representado na tabela pelo sinal (-). A atividade antioxidante através do método de DPPH da afzelina (**10**) já foi descrita anteriormente (Ribeiro *et al.*, 2005).

Tabela 4-16. Teste de atividade antioxidante do extrato e substâncias isoladas de *O. catharinensis* empregando o método de DPPH.

	Trolox	Ex. Hex	Ex. EtOH			Substância										
			Fr.Hex	Fr.CHCl ₃	Fr.AcOEt	1	2	3	4	5	6	7	9	10	11	
atividade	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	

Trolox: padrão positivo

Figura 4-5. Substâncias analisadas por teste de atividade antioxidante através do método de DPPH.

As substâncias **10** e **11** possuem grupo fenólico, o que favorece o sequestro do radical livre, porém, **5** e **6** mesmo não possuindo o grupo fenólico também apresentam atividade antioxidante. Desta forma, seriam necessárias outras análises para investigar o mecanismo do sequestro do radical livre através da comparação de vários análogos.

4.5.2. Atividade antifúngica através do método de bioautografia

Os resultados do teste de atividade antifúngica são mostrados na Tabela 4-17.

Na fração clorofórmica do extrato etanólico das folhas foi observada a atividade antifúngica forte na origem da placa de CPC. Posteriormente, esta fração foi submetida ao fracionamento com o objetivo de isolar a substância que possui a atividade antifúngica. Porém, as substâncias isoladas não apresentaram atividades antifúngicas, sugerindo que a atividade esteja relacionada com a presença de várias substâncias conjuntas.

Tabela 4-17. Teste de atividade antifúngica do extrato etanólico e do óleo essencial das folhas empregando o método de bioautografia.

	Ex. EtOH			óleo essencial
	Fr. hexânica	Fr. CHCl ₃	Fr. AcOEt	
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	-	+	-	-
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	-	+	-	-

4.5.3. Atividade antiinflamatória através do método de edema de pata

A avaliação da atividade antiinflamatória foi realizada utilizando o método de edema de pata e administração foi via intraperitoneal (*i. pl.*).

Como a neolignana **2** e a fração CHCl₃ do extrato etanólico das folhas foram insolúveis em água, foram submetidos dois métodos para preparar a solução:

1) Preparação com detergente Tween-80 Tween-80 é um detergente que tem sido utilizado como agentes emulsificante e dispersante nos produtos medicinais ou comidas (The Merck Index, 2001);

2) Preparação com albumina bovina sérica (BSA) Neste método foi incorporada a neolignana ou a fração CHCl₃ do extrato etanólico em uma proteína BSA e através da formação de micela solubilizou-se em água.

Carragenina (Cg) foi utilizada para indução do edema e salina como controle.

4.5.3.1. Método 1: Preparação com detergente Tween-80

Resultado do método 1 utilizando Tween-80 está descrito na Figura 4-6:

Figura 4-6. Aumento do volume das patas em ensaio antiinflamatório da neolignana **2** utilizando o método de Tween (◆: lignana **2** + veículo+Cg; ■: veículo + Cg; ▲: salina + Cg).

Após 1 hora, a pata que foi tratada com solução salina e carragenina, aumentou o edema em até 40%, o efeito da inflamação continuou até 5 horas. A pata em que foi injetada neolignana **2** não apresentou o aumento do edema. Esse teste utilizou como controle negativo a mistura de etanol e Tween, que não apresentaram aumento do edema. A princípio o efeito antiinflamatório foi atribuído ao etanol incluído no veículo. Esta hipótese foi sugerida porque o etanol é conhecido como antiinflamatório (Oga *et al.*, 1983). Observou-se que houve uma morte do rato com aplicação do controle e duas mortes com aplicação da neolignana **2**. Foi administrada 0,25 mL de tween para 200 mg de rato (1,25 mL/kg) e este valor é menor que a toxidez para rato descrita na literatura ($LD_{50} = 6,3$ mL/kg, *i.pl.*, The Merck Index, 2001). Concluiu-se o este método de preparar a solução não foi adequado para avaliar a atividade antiinflamatória.

4.5.3.2. Método 2: Preparação com albumina bovina sérica (BSA)

A mudança do edema no decurso do tempo foi mostrada na Figura 4-7. Após 1 hora, a pata que foi tratada com solução salina e carragenina, aumentou o edema até 40%, o efeito da inflamação continuou até 5 horas. A pata em que foi injetada a neolignana mostrou o aumento do edema até 30% e no veículo também. Essas quedas do aumento do edema não foram significativas e concluiu-se que a neolignana **2** não possui atividade antiinflamatória.

Figura 4-7. Aumento do volume das patas em ensaio antiinflamatório da neolignana **2** utilizando o método de BSA (◆: lignana + veículo+Cg; ■: veículo + Cg; ▲: salina + Cg).

Foi realizado o ensaio antiinflamatório para uma fração clorofórmica do extrato hidroalcoólico das folhas em que foram isoladas 23 neolignanas por Lordello (1996) inclusive a neolignana **2**.

A mudança do edema por tempo foi mostrada na Figura 4-8. Após 1 hora, a pata que foi tratada com solução salina e carragenina aumentou o edema até 30% e o efeito da inflamação continuou até 5 horas. A pata em que foi injetado o extrato mostrou o aumento do edema até 30% e no veículo também. Essas quedas do aumento do edema não foram significativas e concluiu-se que a fração clorofórmica do extrato das folhas também não possui a atividade antiinflamatória.

Figura 4-8. Aumento do volume das patas no ensaio de antiinflamatório da fração clorofórmica do extrato das folhas utilizando o método de BSA (◆: lignana + veículo+Cg; ■: veículo + Cg; ▲: salina + Cg).

4.6. Estudo biossintético das neolignanas isoladas de *O. catharinensis*

4.6.1. Preparação do ácido [8-¹⁴C]-ferúlico

O ácido [8-¹⁴C]-ferúlico foi preparado para realizar a incorporação dele nos embriões somáticos.

O ácido [8-¹⁴C]-ferúlico foi obtido a partir do aldeído vanilina, ácido [2-¹⁴C]-malônico e piridina com traços de piperidina e anilina como catalisadores através da reação de condensação de Knoevenagel que produziu diretamente o ácido ferúlico (Jones, 1967).

4.6.2. Administração de L-[U-¹⁴C]-fenilalanina nos embriões somáticos

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE indicou o acúmulo das neolignanas hexaidrobenzofurânica e biciclooctânica nos embriões somáticos (Figura 4-9). Como a biossíntese das neolignanas hexahidrobenzofurânica e biciclooctânica nunca foram investigadas, decidiu-se pela realização de experimentos preliminares nos quais foi administrada a L-[U-¹⁴C]-fenilalanina nos embriões para verificar a incorporação de ¹⁴C.

Figura 4-9. CLAE das fração clorofórmica do extrato dos embriões somáticos. Condições de CLAE: Coluna Inertsil ODS-EP, 5 μ m, 4,6 x 250 mm (GL Sciences); fase móvel CH₃CN/H₂O (2:3) –18 min– CH₃CN/H₂O (4:1) –2 min– CH₃CN –2 min– CH₃CN –2 min– CH₃CN/H₂O (2:3) –2 min– CH₃CN/H₂O (2:3); fluxo 1 mL/min; detecção em 275 nm.

Tabela 4-18. Incorporação de L-[U-¹⁴C]-fenilalanina nas neolignanais (%) nos embriões somáticos de *O. catharinensis*.

Tempo (h)	neolignana		
	2	3	6
5	0,08	0,06	0,07
24	0,15	0,10	0,08
48	0,30	0,19	0,12
96	0,24	0,18	0,11

Observou-se que as neolignanais **2**, **3** e **6** incorporaram radioatividade originária da L-[U-¹⁴C]-fenilalanina após 5 horas de incubação de fenilalanina (Tabela 4-18). Após 48 horas observou-se o máximo de incorporação (0,30%) na neolignana **2**, 0,19% na neolignana **3** e 0,12% na neolignana **6**. Tais níveis decresceram após 96 horas.

O estudo feito nas folhas de *Piper regnellii* mostrou que a incorporação de L-[U-¹⁴C]-fenilalanina na neolignana di-hidrobenzofurânica foi de 0,26% (Sartorelli *et al.*, 2001).

Martins (2002) observou a incorporação atingindo apenas 0,02% na neolignana tetraidrofurânica nas folhas jovens de *P. solmsianum*. Assim, a incorporação de L -[U- ^{14}C]-fenilalanina na neolignana **2** de *O. catharinensis* pode ser considerado alto comparando com os trabalhos anteriores.

Entretanto, o estudo realizado com lignanas demonstrou 1,19% de incorporação de L -[U- ^{14}C]-fenilalanina em plantas de *Podophyllum hexandrum* (Jackson e Dewick, 1984). A espécie *Blechnum spicant*, que acumula como lignana ácido braínico, mostrou a incorporação de 4,2% nos frondes (Davin *et al.*, 2003).

Esta análise demonstrou que a formação de dímeros é a rota preferencial e a enzima fenilalanina ammonia liase (PAL), que converte a fenilalanina a ácido cinâmico, encontra-se bastante ativa no sistema embriogênico *in vitro*.

4.6.3. Administração de L -[1- ^{13}C]-fenilalanina nos embriões somáticos

Uma vez detectada a incorporação de L -[U- ^{14}C]-fenilalanina nas neolignanas hexaidrobenzofurânica e bicicloctânica, a mesma foi quantificada utilizando-se L -[1- ^{13}C]-fenilalanina. O extrato dos embriões, na qual, foi adicionada a L -[1- ^{13}C]-fenilalanina foi purificada por CPP, obtendo-se duas frações correspondentes às neolignanas **2** e **3**. As frações purificadas foram submetidas à análise de EM e de RMN de ^{13}C .

A análise por EM utilizando ionização por electrospray (ESI) no modo positivo e analisador por quadrupolo acoplado com TOF (“tempo de vô”) possibilitou a observação de enriquecimento com ^{13}C na neolignana **2** ($M = 388$) para fração 1 e neolignana **3** ($M = 372$) para fração 2.

Nos espectros de EM-EM da neolignana **2** não marcado (Figura 4-10 **A**) os picos 389,5, 390,0 e 391,0 apresentaram as fragmentações de EM-EM esperadas para a neolignana **2**. Para neolignana **3** também obteve-se a mesma observação sendo que as fragmentações de EM-EM dos picos 373,0, 374,0 e 375,0 foram semelhantes (Figura 4-10 **B**). A massa molecular de 390,0 ou 374,0 ($[M+H+1]^+$) foi atribuída às neolignanas enriquecidas com um carbono ^{13}C e a massa molecular de 391,0 ou 375,0 ($[M+H+2]^+$) que são resultantes de neolignanas contendo dois átomos de carbono ^{13}C .

Nos espectros de massas das neolignanas marcadas (Figura 4-11 e 4-12) foram comparadas as áreas relativas da massa molecular de $[M+H]^+$, $[M+H+1]^+$ e $[M+H+2]^+$ com as mesmas das neolignanas não marcadas e observou-se enriquecimento mostrado na Tabela 4-19. O aumento da área relativa da massa molecular de 390,0 ou 374,0 ($[M+H+1]^+$) indica a incorporação de uma molécula de L -[1- ^{13}C]-fenilalanina em posição C-9 ou C-9' e a presença da massa molecular de 391,0 ou 375,0 ($[M+H+2]^+$) indica a

incorporação de duas moléculas de L -[1- ^{13}C]-fenilalanina em ambos as posições C-9 e C-9'.

Na neolignana **2** foram observadas as porcentagens de incorporação 8,0% e 2,3% em $M^+ = 390$ e $M^+ = 391$ respectivamente e na neolignana **3** foram observadas as mesmas 4,7% e 1,1% em $M^+ = 374$ e $M^+ = 375$ respectivamente.

Tabela 4-19. Incorporação da L -[1- ^{13}C]-fenilalanina nas neolignanas **2** e **3** (%).

	neolignana 2			neolignana 3		
	389	390	391	373	374	375
controle	100	15.0	1.2	100	10.6	1.1
marcado	100	23.0	3.5	100	15.3	2.2
incorporação		8.0	2.3		4.7	1.1

A análise dos espectros de RMN de ^{13}C localizou claramente a posição do enriquecimento nas neolignanas (Figura 4-13 **A**). Através da comparação do espectro da neolignana **2** marcada com o espectro da neolignana **2** não marcada (Figura 4-13 **A**), considerando que a abundância natural de ^{13}C é 1,1%, foram determinadas as porcentagens das incorporações em C-9 (δ 11,9) como 4,3% e em C-9' (δ 120,1) como 5,0%.

Na Figura 4-13 **B**, também foi observada o enriquecimento com ^{13}C em C-9 (δ 17,8) e C-9' (δ 120,2) da neolignana **3**, porém não foi quantificada devido a baixa resolução.

Figura 4-10. Espectros de EM-EM (ESI) da neolignana **2**, após incorporação de *L*-[1-¹³C]-fenilalanina, no modo positivo: (A) $m/z=389,0/390,5/391,5$; (B) ampliação de (A).

Figura 4-11. Espectros de EM-EM (ESI) da neolignana **3** após incorporação de L -[1- ^{13}C]-fenilalanina, no modo positivo: (A) $m/z=373,0/374,0/375,0$; (B) ampliação de (A).

Figura 4-12. Espectro de massas (ESI) do experimento de incorporação de *L*-[1-¹³C]-fenilalanina (**A**) na neolignana **2** e (**B**) na neolignana **3** [m/z, intensidade relativa].

Fig 4-13. Espectro de RMN de ^{13}C da neolignana **2** com abundância natural (**A**); da neolignana **2** obtido após a administração da L -[1- ^{13}C]-fenilalanina (**B**); da neolignana **3** obtido após a administração da L -[1- ^{13}C]-fenilalanina(**C**).

4.6.4. Administração de ácido [8- ^{14}C]-ferúlico nos embriões somáticos

A fenilalanina, biossinteticamente, sofre desaminação, hidroxilação e metilação por enzimas conhecidas formando uma série de derivados do ácido cinâmico, dentre os quais o ácido ferúlico (Figura 1-4).

O ácido [8- ^{14}C]-ferúlico sintetizado no ítem **4.6.1** foi administrado nos embriões somáticos para comprovar a bioconversão de ácido para neolignana, que envolveria menor número de etapas biossintéticas do que a conversão de fenilalanina até a neolignana. Os embriões foram extraídos e analisados após 12, 24, 48 e 96 horas por CLAE seguido de análise por contador de cintilação

Na cromatograma CLAE (Figura 4-14) foram observados sinais intensos em 2,1-3,2 min além dos sinais do ácido ferúlico (5,5 min) e das neolignanas durante todo o tempo de observação. A análise por cintilação mostrou a incorporação de ^{14}C nas neolignanas **2** e substâncias **x** ($t_R = 2,1-3,2$ min, não foram identificadas) produzidos depois da adição do ácido ferúlico. Após 12 horas foi observada a incorporação de 0,17% na neolignana **2**, cujo nível esmaeceu até 96 horas (Tabela 4-20). Esta incorporação de ácido ferúlico nas neolignanas podem ser consideradas relativamente elevadas comparando-se com trabalho realizados com plantas jovens (2/3 anos) do *Podophyllum hexandrum* nos quais foram observadas 0,053% de incorporação na lignana podofilotoxina (Jackson *et al.*, 1983).

Tabela 4-20. Incorporação de ácido [8- ^{14}C]-ferúlico nos embriões somáticos (% incorporação).

	substâncias x ($t_R = 2,1-3,2$ min)	neolignana 2
12h	13,27	0,17
24h	7,94	0,16
48h	7,07	0,15
96h	2,77	0,14

Figura 4-14. Análise por CLAE do incorporação de ácido $[8-^{14}\text{C}]$ -ferúlico nos embriões somáticos (12 horas após a administração do ácido $[8-^{14}\text{C}]$ -ferúlico). Condições de CLAE: Coluna Inertsil ODS-EP, 5 μm , 4,6 x 250 mm (GL Sciences); fase móvel $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:3) –18 min– $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (4:1) –2 min– CH_3CN –2 min– CH_3CN –2 min– $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:3) –2 min– $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ (2:3); fluxo 1 mL/min; detecção em 275 nm.

4.6.5. Bioconversão de precursores nas suspensões celulares

4.6.5.1. Curva de crescimento de suspensões celulares

O desenvolvimento das suspensões celulares foi determinado visando otimizar os experimentos de bioconversão de precursores (item 4.6.5) (Figura 4-15). No gráfico observou-se a ocorrência da fase exponencial (5º a 15º dias), da fase estacionária (15º a 19º dias) e da fase letal (após do 19º dia).

Figura 4-15. Curva de crescimento de suspensões celulares.

4.6.5.2. Teste de bioconversão de precursores nas suspensões celulares

O estudo fitoquímico dos embriões mostrou acúmulo das neolignanas hexaidrobenzofurânicas e bicicloctânicas. Tendo como base a proposta biossintética destas neolignanas (Figura 1-12), foram escolhidos o *E*-isoeugenol e o 5-metóxieugenol como precursores desta rota biossintética.

E-isoeugenol

5-metóxieugenol

Utilizou-se suspensões celulares para estudo da bioconversão em função da facilidade de manipulação, crescimento rápido e produção limitada de metabólitos.

Após onze dias de administração de precursores, as células e meios foram extraídos separadamente. Os extratos brutos das suspensões celulares e dos meios foram analisados por CLAE (Figura 4-16). A maioria dos compostos produzidos e os precursores foram detectadas somente nos extratos do meio e não nos extratos da célula.

Nos experimentos em que foram adicionados os dois precursores, observou-se uma maior variedade de compostos produzidos (não identificados), tanto em relação aos experimentos em que não houve adição de precursores quanto nos que houve adição de apenas um dos precursores.

No controle contendo precursores e o meio de cultura também foram produzidas as mesmas substâncias, de acordo com a análise por CLAE. Assim, concluiu-se que as reações não devem ser enzimáticas. A fim de confirmar uma possibilidade de reação fotoquímica, os precursores foram incubados no meio de cultura com ausência de luz. Pelos cromatogramas obtidos (dados não apresentados) não foram observadas diferenças entre os meios incubados sob luz e no escuro. Assim, essa conversão pode ser considerada como degradação do precursor (principalmente isoeugenol) ou dimerização química dos dois precursores (não enzimaticamente), pois o radical propenilfenila é extremamente reativo, além do fato da presença do grupo metóxi em *orto* estabilizar as estruturas de ressonâncias possíveis (Figura 1-7).

Figura 4-16. Análise por CLAE da bioconversão de precursores nas suspensões celulares na condição (a); **A:** extrato das células; **B:** extrato dos meios. Condições de CLAE: Coluna Supelcosil LC18 (250 x 4,6 mm, 5,0 μ m); fase móvel MeOH:H₂O (2:3) –20 min– MeOH:H₂O (4:1) –1,5 min– MeOH –3,5 min– MeOH; fluxo 1 mL/min; detecção em 254 nm. (**1**: licarina A; **2**: 5-metóxieugenol; **3**: *E*-isoeugenol).

4.6.6. Bioconversão de precursores por frações enzimáticas

Foram extraídas as proteínas solúveis e as proteínas de parede celulares para avaliar a bioconversão de precursores e atividade peroxidásica das frações enzimáticas dos embriões somáticos e folhas.

4.6.6.1. Dosagem de proteínas totais nos extratos enzimáticos

Os teores de proteínas nos extratos enzimáticos dos embriões somáticos foram:

proteínas solúveis totais	1,13 mg/mL
proteínas solúveis (NH ₄) ₂ SO ₄ 0-20%	8,35 mg/mL
proteínas solúveis (NH ₄) ₂ SO ₄ 20-50%	15,16 mg/mL
proteínas solúveis (NH ₄) ₂ SO ₄ 50-80%	7,22 mg/mL

As proteínas de parede celulares totais nos extratos enzimáticos dos embriões somáticos e das folhas foram:

proteínas de parede celulares totais dos embriões somáticos	0,21 mg/mL
proteínas de parede celulares totais das folhas	7,76 mg/mL

4.6.6.2. Teste de bioconversão de precursores utilizando frações enzimáticas

Foram incubados dois precursores, *E*-isoeugenol e 5-metóxieugenol com várias frações enzimáticas obtidas a partir dos embriões somáticos e das folhas. Na análise de CLAE, foram observados apenas sinais de precursores e dos constituintes presentes nas soluções enzimáticas (Figura 4-17). Foi também determinada a atividade de peroxidases, uma enzima envolvida em reações semelhantes (Blee *et al.*, 2003)

Figura 4-17. Análise por CLAE da bioconversão dos precursores pelo **A** extrato enzimático da proteína solúvel da fração 20-50% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; **B** extrato enzimático da parede celular; Condições de CLAE: Coluna Supelcosil LC18 (25,0 x 4,6 mm, 5,0 μm); fase móvel MeOH:H₂O (2:3) –20 min– MeOH:H₂O (4:1) – 1,5 min– MeOH –3,5 min– MeOH; fluxo 1 mL/min; detecção em 254 nm. (1: constituinte presente na solução enzimática; 2: 6-metóxieugenol; 3: *E*-isoeugenol).

4.6.6.3. Avaliação da atividade peroxidásica de frações enzimáticas

A atividade peroxidásica da solução enzimática foi calculada da seguinte forma:

$$\begin{aligned}\text{Atividade por volume} &= (V \times \Delta E \times 1000) / (\epsilon \times d \times \Delta t \times v) \\ &= (1,565 \times \Delta E \times 1000) / (6,36 \times 1 \times \Delta t \times 0,025) \\ &= 9,84 \times 10^3 \times \Delta E / \Delta t\end{aligned}$$

ϵ coeficiente de absorvência [cm^2/mmol]

E absorvência

V volume total [mL]

v volume de amostra utilizado em teste [mL]

t tempo [min.]

d tamanho da cubeta [cm]

Atividade peroxidásica da solução enzimática:

Proteína solúvel dos embriões $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0-20 % N.D.

Proteína solúvel dos embriões $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20-50 % N.D.

Proteína solúvel dos embriões $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 50-80 % N.D.

Proteína de parede celular dos embriões N.D.

Proteína de parede celular das folhas N.D.

Nas proteínas solúveis dos embriões somáticos e da fração de proteína de parede celular das folhas não foi observada a atividade peroxidásica para guaiacol.

5. Conclusões

Os estudos fitoquímicos realizados com *O. catharinensis* resultaram no isolamento de cinco neolignanas e um flavonóide glicosilado do extrato das folhas e quatro neolignanas, dois sesquiterpenos e um fenilpropanóide do extrato dos embriões, sendo que a neolignana tetraidrofurânica **1** e neolignana biciclo[3.2.1]octânica **7**, o sesquiterpeno eudesmano **9**, flavonóide glicosilado **10** e o fenilpropanóide **11** não haviam sido isolados anteriormente desta espécie. A estrutura tridimensional da neolignana **2** foi elucidada através da difração de raios-X e confirmou suas configurações. O óleo essencial das folhas possui um perfil semelhante ao da análise anterior (Lopez *et al.*, 1996A) verificando-se ausência de fenilpropanóides. A análise do óleo essencial dos embriões somáticos constatou-se menor diversidade de terpenos quando comparado com as folhas.

A fração CHCl₃ do extrato etanólico mostrou atividade antifúngica. As frações CHCl₃ e AcOEt do extrato etanólico e as neolignanas **5**, **6**, e o flavonóide glicosilado **10** mostraram atividade antioxidante através do método de DPPH. A neolignana **2** e a fração CHCl₃ do extrato etanólico das folhas não mostraram atividade antiinflamatória.

Um sistema embriogênico *in vitro* mostrou grande acúmulo de neolignanas (0,3% de peso seco). No estudo de bioconversão utilizando este sistema, a *L*-[U-¹⁴C]-fenilalanina foi incorporada à neolignana hexaidrobenzofurânica **2**, **3** e biciclo[3.2.1]octânica **6**, sendo incorporação máxima de 0,3% na neolignana **2**, sendo esse no período de 48 horas (Figura 5-1). A análise por espectrometria de massas-massas possibilitou a detecção de enriquecimento nas neolignanas **2** e **3** quando do experimento de incorporação de *L*-[1-¹³C]-fenilalanina que resultou na incorporação máxima de 8,0% na neolignana **2**. Foi localizada a incorporação de *L*-[1-¹³C]-fenilalanina na neolignana **2** através da análise por RMN de ¹³C, sendo observados os enriquecimentos nas posições C-9 (4,3%) e em C-9' (5,0%). O ácido [8-¹⁴C]-ferúlico sintetizado foi administrado nos embriões somáticos e após 12 horas foi observada a incorporação de 0,17% na neolignana **2**. Através desses experimentos de incorporação, a taxa de metabolismo nos embriões somáticos pode ser considerada elevada quando comparada aos resultados obtidos com outras espécies.

Os resultados obtidos, embora preliminares, constituem-se num trabalho pioneiro nos estudos biossintéticos em espécies de Lauraceae e contribuiu na definição de precursores e de algumas etapas que eram apenas hipótese. Uma proposta de via biossintética, incluindo tanto os produtos isolados quanto aqueles nos quais foram constatadas incorporações, é apresentada na Figura 5-1. As incorporações nas

neolignananas **2**, **3** e **6** está compatível com os teores nos quais essas são acumuladas nos folhas e nos embriões. Cabe destacar que as culturas embriogênicas de *O. catharinensis* apresentou excelentes características para tais estudos em função da expressão aparentemente voltada para a produção de neolignananas.

Figura 5-1. Proposta de rota biossintética de neolignananas em *O. catharinensis*.

6. Referências bibliográficas

- Ahmad, R. e Cava, M.P. (1977) Leucoxylophine and ocoxylophine - hexaoxygenated aporphines from *Ocotea leucoxylon*. *Heterocycles* **7**, 927-931.
- Alfermann, A.W., Petersen, M. e Fuss, E. (2003) Production of natural products by plant cell biotechnology: results, problems and perspectives. In: Plant tissue culture, 100 years since Gottlieb Haberlandt, Laimer, M. e Rücker, W. (Eds.) Springer, Wien/New York.
- Andrei, C.C., Braz-Filho, R. e Gottlieb, O.R. (1988) Allylphenols from *Ocotea cymbarum*. *Phytochemistry* **27**, 3992-3993.
- Aiba, C.J., Gottlieb, O.R., Maia, J.G.S., Pagliosa, F.M. e Yoshida, M. (1978) Benzofuranoid neolignans from *Licaria armeniaca*. *Phytochemistry* **17**, 2038-2039.
- Aiba, C.J., Gottlieb, O.R., Yoshida, M., Mourão, J.C. e Gottlieb, H.E. (1976) Structure of porosin. *Phytochemistry* **15**, 1031-1032.
- Baralle, F., Schvarzberg, N., Vernengo, M. e Comin, J. (1972) Dehydroocoteine and didehydroocoteine from *Ocotea puberula*. *Experientia* **28**, 875-876.
- Baralle, F., Schvarzberg, N., Vernengo, M.J., Moltrasio, G.Y. e Giacomello, D. (1973) Thaliminine from *Ocotea puberula*. *Phytochemistry* **12**, 948-949.
- Barata, L.E.S., Santos, L.S., Ferri, P.H. Phillipson, J.D., Paine, A. e Croft, S.L. (2000) Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry* **55**, 589-595.
- Barbosa-Filho, J.M., Vargas, M.R.W., Silva, I.G., Franca, I.S., Moraes, L.C.S. L., da Cunha, E.V.L., da Silva, M.S., Souza, M.F.V., Chaves, M.C.O., Almeida, R.N. e Agra, M.F. (1999) *Ocotea duckei*: exceptional source of yangambin and other furofuran lignans. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* **71**, 231-238.
- Blee, K.A., Choi, J.W., O'Connell, A.P., Schuch, W., Lewis, N.G. e Bolwell, G.P. (2003) A lignin-specific peroxidase in tobacco whose antisense suppression leads to vascular tissue modification. *Phytochemistry*, **64**, 163-176.
- Blois, M.S. (1958) Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* **181**, 1199-1200.
- Botega, C., Pagliosa, F.M., Bolzani, V.S., Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. (1993) Benzylisoquinoline alkaloids and eudesmane sesquiterpenes from *Ocotea pulchella*. *Phytochemistry* **32**, 1331-1333.
- Bourgaud, F., Gravot, A., Milesi, S. e Gontier, E. (2001) Production of plant secondary metabolites: a historical perspective, *Plant Science* **161**, 839-851.

- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesa, M., Romagnoli, C. e Sacchetti, G. (2003) Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, **85**, 415-421.
- Carmalm, B. (1956) Constitution of resin phenols and their biogenetic relations. XX. Identity of pseudocubebin and d-sesamin. *Acta Chemica Scandinavica* **10**, 134-135.
- Casagrande, C. e Ferrari, G. (1975) Minor alkaloids of *Ocotea glaziovii*. *Il Farmaco, Edizione Scientifica* **30**, 479-490.
- Castro, O. e Ruiz, I. (1994) Aporphine alkaloids and flavonoids from *Ocotea holdridgeana* leaves. *International Journal of Pharmacognosy* **32**, 406-408.
- Cava, M.P. e Venkateswarlu, A. (1971) Dehydroocopodine, dicentrinone, and other alkaloids from *Ocotea macropoda* and *Hernandia jamaicensis*. *Tetrahedron* **27**, 2639-2643.
- Cava, M.P., Watanabe, Y., Bessho, K., Mitchell, M.J. e da Rocha, A.I. (1968) *Ocotea* alkaloids: The characterization and structures of four new aporphine bases. *Tetrahedron Letters*, 2437-2442.
- Cava, M.P., Behforouz, M. e Mitchell, M.J. (1972) *Ocotea* alkaloids. Variabiline, a novel aminoaporphine. *Tetrahedron Letters* **46**, 4647-4649.
- Chattopadhyay, S., Srivastava, A.K. e Bisaria, V.S. (2002) Optimization of culture parameters for production of podophyllotoxin in suspension culture of *Podophyllum hexandrum*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **102-103**, 381-393.
- Chattopadhyay, S., Mehra, R.S., Srivastava, A.K., Bhojwani, S.S. e Bisaria, V.S. (2003) Effect of major nutrients on podophyllotoxin production in *Podophyllum hexandrum* suspension cultures. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **60**, 541-546.
- Chávez, J.P. (1991) Terpenóides de *Ocotea corymbosa* [Meissn] Mez. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.
- Chávez, J.P., Gottlieb, O.R. e Yoshida, M. (1995) 10-Demethyl-1-methyl-eudesmanes from *Ocotea corymbosa*. *Phytochemistry* **39**, 849-852.
- Cho, J.Y., Baik, K.U., Yoo, E.S., Yoshikawa, K. e Park, M.H. (2000) *In vitro* antiinflammatory effects of neolignan woorenosides from the rhizomes of *Coptis japonica*. *Journal of Natural Products* **63**, 1205-1209.
- Chu, A., Dinkova, A., Davin, L.B., Bedgar, D.L. e Lewis, N.G. (1993) Stereospecificity of (+)-pinoresinol and (+)-lariciresinol reductases from *Forsythia intermedia*. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 27026-27033.

- Cocker, E., e Cocker, W. (1952) An anthocyanidin of *Louro Inamui* (*Nectandra eleophora*). *Journal of the Chemical Society*, 5035-5036.
- Cooper-Driver, G.A. e Bhattacharya, M. (1998) Role of phenolics in plant evolution. *Phytochemistry* **49**, 1165-1174.
- Cordell G. A. (2000) Biodiversity and drug discovery – a symbiotic relationship. *Phytochemistry* **55**, 463–480.
- Costa, P.R.R. (2000) Safrole and eugenol: study of the chemical reactivity and use in the synthesis of biologically active natural products and its derivatives. *Quimica Nova*, **23**, 357-369.
- Cragg, G.M., Boyd, M.R., Hallock, Y.F., Newman, D.J., Sausville, E.A. e Wolpert, M.K. (2000) Natural products drug discovery at the national cancer institute. Past achievements and new directions for the new millennium. In: Biodiversity New Leads for the Pharmaceutical and Agrochemical Industries, Wrigley, S.K., Hayes, M.A., Thomas, R., Chrystal, E.J.T. e Nicholson, N., (Eds.), Royal Society of Chemistry, Cambridge, Reino Unido.
- Crossley, N.S. e Djerassi, C. (1962) Naturally occurring oxygen heterocyclics. XI. Veraguensin. *Journal of the Chemical Society*, 1459-1462.
- Cuca Suarez, L.E. (1980) Hydroxyotobain and reticuline from *Ocotea caparrapi*. *Revista Latinoamericana de Quimica* **11**, 110-111.
- Dahlgren, R. (1980) A revised system of classification of the angiosperms. *Botanical Journal of the Linnean Society* **80**, 91-124.
- da Silva, I.G., Barbosa-Filho, J.M., da Silva, M.S., de Lacerda, C.D.G. e da-Cunha, E.V.L. (2002) Coclaurine from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology* **30**, 881-883.
- da Silva, W.D., Braz-Filho, R. e Gottlieb, O.R. (1989) Bicyclooctanoid neolignans from *Ocotea costulatum*. *Phytochemistry* **28**, 661-662.
- David, J.M., Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. (1994A) Neolignans from bark and leaves of *Ocotea porosa*. *Phytochemistry* **36**, 491-499.
- David, J.M., Yoshida, M., e Gottlieb, O.R. (1994B) Phenylpropanoid-catechins from bark of *Ocotea porosa*. *Phytochemistry* **35**, 545-546.
- David, J.P. e Yoshida, M. (1998) Bicalamenes from *Ocotea corymbosa*. *Revista Latinoamericana de Quimica* **26**, 91-94.
- Davin, L.B., Wang, W.B., Crowell, A.L., Bedgar, D.L., Sarcenen, S. e Lewis, N.G. (1997) Stereoselective bimolecular phenoxy radical coupling by auxiliary (dirigent) protein without an active center. *Science* **275**, 362-366.

- Davin, L.B., Wang, C.-Z., Helms, G.L. e Lewis, N.G. (2003) [¹³C]-Specific labeling of 8-2' linked (-)-*cis*-blechnic, (-)-*trans*-blechnic and (-)-brainic acids in the fern *Blechnum spicant*. *Phytochemistry* **62**, 501-511.
- de Alvarenga, M.A., Castro, C.O. Giesbrecht, A.M. e Gottlieb, O.R. (1977) Bicyclo[3,2,1]octanoid neolignans from *Aniba simulans*. *Phytochemistry* **16**, 1801-1804.
- de Carvalho, M., Yoshida, M., Gottlieb, O.R. e Gottlieb, H.E. (1988) Bicyclooctanoid, carinatone and megaphone type neolignans from *Ocotea porosa*. *Phytochemistry* **27**, 2319-2323.
- de Diaz, A.M.P. (1996) Bisnorneolignan from the wood of *Ocotea simulans*. *Revista Colombiana de Quimica* **25**, 1-6.
- de Diaz, A.M.P. e Diaz D., P.P. (1991) Metabolites from the essential oil of the wood bark of *Ocotea caparrapi*. *Revista Latinoamericana de Quimica* **22**, 60-62.
- de Diaz, A.M.P., Diaz D., P.P., Ferreira, Z.S., Gottlieb, O.R., de Lima, R.A. e Cavalcante, S.H. (1977) Ferulic esters from *Endlicheria* and *Ocotea* species. *Acta Amazônica* **7**, 292-293.
- de Diaz, A.M.P., Gottlieb, H.E. e Gottlieb, O.R. (1980) Dehydrodieugenols from *Ocotea cymbarum*. *Phytochemistry* **19**, 681-682.
- Dias, D.A., Yoshida, M., Gottlieb, O.R. (1986) Further neolignans from *Ocotea porosa*. *Phytochemistry* **25**, 2613-2616.
- Dixon, R.A. (1999) Plant natural products: the molecular genetic basis of biosynthetic diversity. *Current Opinion in Biotechnology* **10**, 192-197.
- Dixon, R.A., Chen, F., Guo, D. e Parvathi, K. (2001) The biosynthesis of monolignols: a "metabolic grid", or independent pathways to guaiacyl and syringyl units? *Phytochemistry*, **57**, 1069-1084.
- Dodson, C.D., Stermitz, F.R., Castro, O. e Janzen, D.H. (1987) Neolignans from fruits of *Ocotea veraguensis*. *Phytochemistry* **26**, 2037-2040.
- Drewes, S.E., Horn, M.M., Sehlapelo, B.M., Ramesar, N., Field, J.S., Shaw, R.S., Sandor, P. (1995) Iso-ocobullenone and a neolignan ketone from *Ocotea bullata* bark. *Phytochemistry* **38**, 1505-1508.
- Felício, J.D.A., Motidome, M., Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. (1986) Further neolignans from *Ocotea aciphylla*. *Phytochemistry* **25**, 1707-1710.
- Ferrari, G., Fervidi, O., Ferrari, M. (1971) Occurrence of isoboldine in *Nectandra pichurim*. *Phytochemistry* **10**, 465-466.
- Ferrari, G. e Casagrande, C. (1975) *Ocotea* alkaloid for relief of anxiety. U.S., 5 pp. Division of U.S. 3,711,485.

- Firn, R.D. e Jones, C.G., Natural products – a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 382-391.
- Franca, N.C., Giesbrecht, A.M., Gottlieb, O.R., Magalhaes, A.F., Magalhaes, E.G. e Maia, J.G.S. (1975) Benzyloquinolines from *Ocotea* species. *Phytochemistry* **14**, 1671-1672.
- Fuss, E. (2003) Lignans in plant cell and organ cultures: An overview, *Phytochemistry Review*, **2**, 307-320.
- Garcez, W.S. (1995) Benzyloquinoline alkaloids and flavonols from *Ocotea vellosiana*. *Phytochemistry* **39**, 815-816.
- Garcez, W.S., Garcez, F.R., da Silva, L.M.G.E. e Shimabukuro, A.A. (2005) Indole alkaloid and other constituents from *Ocotea minarum*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16** (6B), 1382-1386.
- Giesbrecht, A.M., Franca, N.C., Gottlieb, O.R. e Rocha, A.I. (1974) The neolignans of *Licaria canella*. *Phytochemistry* **13**, 2285-2293.
- Gilbert, B., Gilbert, M.E.A., de Oliveira, M.M., Ribeiro, O., Wenkert, E., Wickberg, B., Hollstein, U. e Rapoport, H. (1964) Aporphine and isoquinolinedienone alkaloids of *Ocotea glaziovii*. *Journal of the American Chemical Society* **86**, 694-696.
- Goodwin, S., Smith, A.F. e Horning, E.C. (1960) Leucoxine and leucoxylophine. *Chemistry & Industry (London, United Kingdom)*, 691-692.
- Gorinsky, C. (1994) Bisbenzyloquinoline derivatives from *Ocotea rodiei* for pharmaceutical use. *Eur. Pat. Appl.*, pp 9.
- Gottlieb, O.R. (1957) Essential oil of the wood of *Ocotea fragrantissima*. *Perfumery and Essential Oil Record* **48**, 386.
- Gottlieb, O.R. (1972) Chemosystematics of the Lauraceae. *Phytochemistry* **11**, 1537-1570.
- Gottlieb, O.R. (1978) Neolignans. In: Progress In: Chemistry Of Organic Natural Products, Herz, W., Grisebach, H. e Kirby, G.W. (Eds.), **35**, 1. Springer Verlag, Viena.
- Gottlieb, O.R. e Magalhaes, M.T. (1958) Isolation of piperonylic acid from *Ocotea pretiosa*. *Nature* **182**, 742-743.
- Gottlieb, O.R. e Yoshida, M. (1984) Lignoids with special attention to the chemistry of neolignans. *Quimica Nova* **7**, 250-273.
- Grundon, M.F. e McGarvey, J.E.B. (1960) Isolation of the alkaloids, and the structure of sepeperine. *Journal of the Chemical Society*, 2739-2745.
- Haraguchi, M., Motidome, M., Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. (1983) Neolignans from *Ocotea-catharinensis*. *Phytochemistry* **22**, 561-563.

- Harborne, J.B. (1993) Introduction to Ecological Biochemistry, fourth ed. Academic Press, London.
- Hasbun, C. e Castro, O. (1993) A novel phenanthrene alkaloid from *Ocotea insularis*. *Fitoterapia* **64**, 440-441.
- Hausott, B., Greger, H. e Marian, B. (2003) Naturally occurring lignans efficiently induce apoptosis in colorectal tumor cells. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, **129**, 569-576.
- Hearst, P.J. (1964) Isolation and characterization of seven alkaloids. *Journal of Organic Chemistry* **29**, 466-470.
- Homans, A.L. e Fuchs, A. (1970) Direct bioautography on thin-layer chromatograms as a method for detecting fungitoxic substances. *Journal of Chromatography* **5**, 327-329.
- Huyen, L. (1996) Semi-synthesis of heliotropin from the essential oil of "Xa xi". *Tap Chi Duoc Hoc* **8**, 10-12.
- Ishige, M., Motidome, M., Yoshida, M., e Gottlieb, O.R. (1991) Neolignans from *Ocotea catharinensis*. *Phytochemistry* **30**, 4121-4128.
- Iwabuchi, H., Yoshikura, M. e Kamisako, W. (1989) Studies on the sesquiterpenoids of *Panax ginseng* C. A. Meyer. III. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* **37**, 509-510.
- Jackson, D.E. e Dewick, P.M. (1984) Cinnamic acid precursors of podophyllotoxin in *Podophyllum hexandrum*. *Phytochemistry* **23**, 1029-1035.
- Jacobucci, G.A. (1954) Ocoteine, the alkaloid separated from the bark of *Ocotea puberula*. *Anales de la Asociacion Quimica Argentina* (1921-2001), **42**, 18-29.
- Jesus-Morais, C.M.Q., Assis, E.F., Cordeiro, R.S.B., Barbosa-Filho, J.M., Lima, W.T., Silva, Z.L., Bozza, P.T. e Castro-Faria-Neto, H.C. (2000) Yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*, differentiates putative PAF receptor subtypes in the gastrointestinal tract of rats. *Planta Medica* **66**, 211-216.
- Jones, G. (1967) The knoevenagel condensation. In: *Org. React.* Adams, R., Cairns, T.L., Blatt, A.H., Cram, D.J., Boekelheide, V. e House, H.O. (Eds.), John Willey & Sons, Inc. New York, **15**, 204-599.
- Kadkade, P.G. (1982) Growth and podophyllotoxin production in callus tissues of *Podophyllum peltatum*. *Plant Sci. Lett.* **25**, 107-115.
- Katayama, T., Davin, L.B. e Lewis, N.G. (1992) An extraordinary accumulation of (-)-pinoresinol in cell-free extracts of *Forsythia intermedia*: evidence for enantiospecific reduction of (+)-pinoresinol. *Phytochemistry* **31**, 3875-3881.
- Khan, M.R., Gray, A.I. e Waterman, P.G. (1987) Neolignans from stem bark of *Ocotea veraguensis*. *Phytochemistry* **26**, 1155-1158.

- Kijjoo, A., Pinto, M.M.M., Carreiras, M.C., Gottlieb, H.E., Hezroni-Langerman, D. e Gottlieb, O.R. (1994) An unusual, dibenzo-cycloheptatriene based, flavonoid from *Ocotea foetens*. *Natural Product Letters* **4**, 85-92.
- Konuklugil, B., Schmidt, T.J. e Alfermann, A.W. (1999) Accumulation of aryltetralin lactone lignans in cell suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Planta Medica* **65**, 587-588.
- Kostermans, A.J., Pinkley, H.V. e Stern, W.L. (1969) New Amazonian arrow poison: *Ocotea venenosa*. *Botanical Museum Leaflets*, Harvard University, **22**, 241-252.
- Kowalski, B. e Van Staden, J. (2001) *In vitro* culture of 2 threatened South African medicinal trees - *Ocotea bullata* and *Warburgia salutaris*. *Plant Growth Regulation*, **34**, 223-228.
- Kuhlmann, S., Kranz, K., Lücking, B., Alfermann, A.W. e Petersen, M. (2002) Aspects of cytotoxic lignan biosynthesis in suspension cultures of *Linum nodiflorum*. *Phytochem. Rev.* **1**, 37-43.
- Lewis, N.G. e Davin, L.B. (1994) *Isopentenoids and Other Natural Products: Evolution and Function*; Nes, W.D. Ed.; ACS Symposium Series: Washington, DC, **562**, pp 202-246.
- Lloyd, G. e McCown, B. (1981) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.* (1980) **30**, 421-427.
- Lopes, D., Godoy, R.L.O., Koketsu, M., Gonçalves, S.L. e Sakita, M.N. (1996A) Óleo essencial das folhas e galhos de *Ocotea catharinensis* Mez. *19ª Reunião Anual de Sociedade Brasileira de Química*, PN-065.
- Lopes, N.P., Blumenthal, E.E.A., Cavalheiro, A.J., Kato, M.J. and Yoshida, M. (1996B) Lignans, γ -lactones and propiophenones of *Virola surinamensis*. *Phytochemistry* **43**, 1089-1092.
- Lopes, N.P. (1997) Metabólitos secundários de *Virola surinamensis* (Myristicaceae). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.
- Lopez, J.A., Barillas, W., Gomez-Laurito, J., Lin, F.-T., Al-Rehaily, A.J., Sharaf, M.H. M. e Schiff, P.L. (1995A) Aporphine alkaloids of selected species of *Nectandra* and *Ocotea*. *Planta Medica* **61**, 589.
- Lopez, H., Valera, A. e Trujillio, J. (1995B) Lignans from *Ocotea foetens*. *Journal of Natural Products* **58**, 782-785.
- Lopez, J.A., Barillas, W., Gomez-Laurito, J., Lin, F.-T., Al-Rehaily, A.J., Sharaf, M.H.M. e Schiff, P.L.J. (1996) Aporphine alkaloids of *Ocotea brenesii*. *International Journal of Pharmacognosy* **34**, 145-147.

- Lordello, A.L.L. (1996) Constituintes químicos de folhas e de cultura de células e tecidos de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae), Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.
- Lordello, A.L.L., Cavalheiro, A.J., Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. (2000) Phenylpropanoids, sterols and sesquiterpene from wood of *Ocotea odorifera* (Lauraceae). *Revista Latinoamericana de Quimica* **28**, 35-39.
- Lordello, A.L.L. e Yoshida, M. (1997) Neolignans from leaves of *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Phytochemistry* **46**, 741-744.
- Luckner, M. (1990) Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants and Animals. Third Revised and Enlarged Edition, VEB Gustav Fischer Verlag Jena.
- Maia, J.G.S., da Silva, M.L., Luz, A.I.R., Zoghbi, M.G.B. e Ramos, L.S. (1987) Species of *Piper* of the Amazon region rich in safrole. *Quimica Nova* **10**, 200-204.
- Mann, J. (1994) Chemical aspects of biosynthesis. New York, Oxford University.
- Marques, M.O.M., Gomes, M.C.C.P., Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. (1992) Bicyclo[3.2.1]octanoid neolignans from *Ocotea porosa*. *Phytochemistry* **31**, 275-277.
- Martins, R.S.S. (2002) Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. Dc. (*Piperaceae*). Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.
- Martins, C.C.M., Lago, J.H.G., Albuquerque, S. e Kato, M.J. (2003) Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry* **64**, 667-670.
- Mendelsohn, R. e Balick, M. (1995) The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economic Botany* **49**, 223-228.
- Mollan, T.R.M. (1961) The safrole cinnamic aldehyde type of sassafras laurel. *Perfumery and Essential Oil Record* **52**, 411-412.
- Morais, L.C.S.L., Pachu, C.O., Santos, V.L. e Barbosa-Filho, J.M. (1996) New lignan from *Ocotea duckei*. *Fitoterapia* **67**, 557.
- Morais, L.C.S.L., Pachu, C.O., Santos, V.L., Athayde-Filho, P.F., Almeida, R.N. e Barbosa-Filho, J.M. (1998) (+)-4'-O-Demethylepimagnolin A from *Ocotea duckei*. *Fitoterapia* **69**, 91-92.
- Mors, W.B., Magalhães, M.T. e Gottlieb, O.R. (1959) Physiological varieties of *Ocotea pretiosa*. *Perfumery and Essential Oil Record* **50**, 26-27.
- Moura-costa, P.H., Viana, A.M. e Mantell, S.H. (1993) *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **35**, 279-286.

- Murashige, T. e Skoog, F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497.
- Naranjo, P., Kijjoa, A., Giesbrecht, A.M. e Gottlieb, O.R. (1981) *Ocotea quixos*, American cinnamon. *Journal of Ethnopharmacology* **4**, 233-236.
- Naves, Y.R., Gottlieb, O.R. e Magalhaes, M.T. (1961) Essential oil of *Ocotea teleiandra*. *Helvetica Chimica Acta* **44**, 1121-1123.
- Nihei, K., Konno, K., Bernardes, L.S. C., Lopes, N. P., Albuquerque, S., de Carvalho, I., Pupo, M., Martins, R.C.C. e Kato, M.J. (2004) Synthesis of trypanocidal tetrahydrofuran lignans. *Arkivoc* (6), 112-126.
- Oga, S., Hanada, S., Basile, A.C., Sertie, J.A. e Yasaka, W.J. (1983) Effects of ethanol on experimental inflammation. *Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy* **35**, 201-207.
- Pino, J.A., Fernandes, P., Marbot, R. e Sa Fontinha, S. (2004) Chemical composition of the leaf oil of *Ocotea foetens* (Alt.) Benth. et Hook. from Madeira. *Journal of Essential Oil Research* **16**, 131-132.
- Pütter, J. (1965) Peroxidases. In: Methods of enzymatic analysis. Bergmeyer, H. U. (Ed.), Weinheim; New York, Verlag Chemie, Academic Press, **2**, pp 685-689.
- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenköhler, A. e Ober, D. (2004) Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages. *The Plant Cell* **16**, 2772-2784.
- Rahman, M.M.A., Dewick, P.M., Jackson, D.E. e Lucas, J.A. (1990) Biosynthesis of lignans in *Forsythia intermediacell* cultures. *Phytochemistry* **29**, 1841-1846.
- Ribeiro, A.B., Bolzani, V.S., Massayoshi, Y., Santos, L.S., Eberlin, M.N. e Silva, D.H.S. (2005) A new neolignan and antioxidant phenols from *Nectandra grandiflora*. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **16**, 526-530.
- Roensch, H., Preiss, A., Schreiber, K. e de Cordoba, F.H. (1983) Structure elucidation and carbon-13 NMR of the new aporphine alkaloid 3-hydroxyglaucine. *Liebigs Annalen der Chemie* **5**, 744-752.
- Romoff, P., Yoshida, M. e Gottlieb, O.R. (1984) Neolignans from *Ocotea aciphylla*. *Phytochemistry* **23**, 2101-2104.
- Sardini, D. e Marzo, A. (1977) The quantitative determination of glaziovine. *Farmaco, Edizione Pratica* **32**, 503-511.
- San Feliciano, A., Medarde M., Rey, B.D. e Corral, J.M.M.D., (1990) Eudesmane glycosides from *Carthamus lanatus*, *Phytochemistry* **29**, 3207.

- Sartorelli, P., Benevides, P.J.C., Ellensohn, R.M., Rocha, M.V.A.F., Moreno, P. R.H. e Kato, M.J. (2001) Enantioselective conversion of *p*-hydroxypropenylbenzene to (+)-conocarpan in *Piper regnellii*. *Plant Science* **161**, 1083-1088.
- Schmitt, J. e Petersen, M. (2002) Influence of methyl jasmonate and coniferyl alcohol on pinoresinol and matairesinol accumulation in a *Forsythia intermedia* cell suspension culture. *Plant Cell Reports* **20**, 885-889.
- Schwab, W., Williams, D.C., Davis, E., M.; Croteau, R. (2001) Mechanism of monoterpene cyclization: Stereochemical aspects of the transformation of noncyclizable substrate analogs by recombinant (-)-limonene synthase, (+)-bornyl diphosphate synthase, and (-)-pinene synthase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, **392**(1), 123-136.
- Sehlapelo, B., Drewes, S.E. e Sandor, P. (1993) Ocobullenone: a bicyclo[3.2.1]octanoid neolignan from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry* **32**, 1352-1353.
- Seidel, V., Windhövel, J., Eaton, G., Alfermann, A.W., Arroo, R.R.J., Medarde, M., Petersen, M. e Woolley, J.G. (2002) Biosynthesis of podophyllotoxin in *Linum album* cell cultures, *Planta* **215**, 1031-1039.
- Serra, M. F., Diaz, B.L., Barreto E.O., Pereira A.P., Lima M.C., Barbosa-Filho J.M., Cordeiro R.S., Martins M.A. e de Silva P.M. (1997) Anti-allergic properties of the natural PAF antagonist yangambin. *Planta Medica* **63**, 207-212.
- Sheldrick, G.M. (1990) SHELXS-86. Program for the solution of crystal structures, University of Göttingen, Germany.
- Sheldrick, G.M. (1993) SHELXL-97. Program for the refinement of crystal structures. University of Göttingen, Germany.
- Shen, T.Y., Hwang, S.B. e Chang, M.N. (1985) Characterization of a platelet-activating factor receptor antagonist isolated from haifenteng (*Piper futokadsura*): Specific inhibition of *in vitro* and *in vivo* platelet-activating factor-induced effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**, 672-676.
- Silva, D.H.S. (1997) Constituintes químicos de *Iryanthera sagotiana* e *Iryanthera lancifolia*. Tese de doutorado, Universidade de São Paulo.
- Smollny, T., Wichers, H., de Rijk, T., van Zwam, A., Shasavari, A. e Alfermann, A.W. (1992) Formation of lignans in suspension cultures of *Linum album*. *Planta Medica* Suppl. **1**, A622.
- Smollny, T., Wichers, H., Kalenberg, S., Shasavari, A., Petersen, M. e Alfermann, A.W. (1998) Accumulation of podophyllotoxin and related lignans in cell suspension cultures of *Linum album*. *Phytochemistry* **48**, 975-979.

- Srivastava, V., Negi, A.S., Kumar, J.K., Gupta, M.M. e Khanuja, S.P.S. (2005) Plant-based anticancer molecules: A chemical and biological profile of some important leads. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* **13**, 5892-5908.
- Stöckigt, J. e Klischies, M. (1977) Biosynthesis of lignans. 1. Biosynthesis of arctiin and phillyrin. *Holzforschung* **31**, 41-44.
- Takemoto, M., Matsuoka, Y., Achiwa, K. e Kutney, J.P. (2000) Biocatalytic dediastereomerization of dibenylbutanolides by plant cell cultures. *Tetrahedron Letters* **41**, 499-502.
- Takemoto, M., Matsuoka, Y., Tanaka, K., Achiwa, K., Stoyanov, N. e Kutney, P. (2001) Enzyme-catalyzed dediastereomerization of dibenzylbutanolides by plant cell cultures. *Heterocycles* **56**, 227-234.
- Talapatra, B., Chaudhuri, P.K. e Talapatra, S.K. (1982) (-)-Maglifloenone, a novel spirocyclohexadienone neolignan and other constituents from *Magnolia liliflora*. *Phytochemistry* **21**, 747-750.
- The Merck Index (2001) Thirteenth edition, O'Neil, M. J., Smith, A. e Heckelman, P.E. (Eds.), Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ.
- Tibirica, E. (2001) Cardiovascular properties of yangambin, a lignan isolated from Brazilian plants. *Cardiovascular Drug Reviews*, **19**, 313-328.
- Van Uden, W., Pras, N., Battermann, S., Visser, J.F. e Malingré, T.M. (1990) The accumulation and isolation of coniferin from a high-producing cell suspension of *Linum flavum*L. *Planta* **183**, 25-30.
- Van Uden, W., Pras, N., Homan, B. e Malingé, T.M. (1991) Improvement of the production of 5-methoxypodophyllotoxin using a new selected root culture of *Linum flavum*L. *Plant Cell Tissue and Organ Cultures* **27**, 115-121.
- Vargas, L., Barrios, M., Cabezas, J.M. e Castro, O. (1996) Aporphine alkaloids from *Ocotea holdridgeana* bark. *Fitoterapia* **67**, 184-185.
- Vecchietti, V., Casagrande, C. e Ferrari, G. (1976) Ocobotrine and 14-episinomenine. New trans-morphinan alkaloids of *Ocotea brachybotra*. *Tetrahedron Letters* **19**, 1631-1634.
- Vecchietti, V., Casagrande, C., Ferrari, G. e Severini, R.G. (1979) New aporphine alkaloids of *Ocotea minarum*. *Farmaco, Edizione Scientifica* **34**, 829-840.
- Vecchietti, V., Casagrande, C., Ferrari, G., Danieli, B. e Palmisano, G. (1981) Alkaloids of *Ocotea acutangula*. *Journal of the Chemical Society - Perkin Transactions* **1**, 578-581.
- Viana, A.M. e Mantell, S.H. (1999) Somatic Embryogenesis of *Ocotea catharinensis*: An Endangered Tree of the Mata Atlantica (S. Brazil). In: Somatic Embryogenesis in

- Woody Plants, Jain, S. e Newton, R. (Eds.), Kluwer Publishers, Netherlands, **5**, pp 3-30.
- Vilegas, J.H., Y., Gottlieb, O.R., Kaplan, M.A.C. e Gottlieb, H.E. (1989) Aporphine alkaloids from *Ocotea caesia*. *Phytochemistry* **28**, 3577-3578.
- Vilegas, J.H.Y. e Gottlieb, O.R. (1992) Benzylisoquinoline alkaloids from *Ocotea teleiandra*. *Revista Latinoamericana de Quimica* **23**, 18-19.
- Wink, M. (2003) Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* **64**, 3-19.
- Wust, M. e Mosandl, A. (1999) Important chiral monoterpenoid ethers in flavors and essential oils. Enantioselective analysis and biogenesis. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und -Forschung A: Food Research and Technology*, 209(1), 3-11.
- Yamaguchi, L.F., Martinez, G.R., Catalani, L.H., Medeiros, M.H.G. e Mascio, P.D. (1999) Lycopene entrapped in human albumin protects 2'-deoxyguanosine against singlet oxygen damage. *Archivos Latino Americanos de Nutricion*, 49, 1-S.
- Zenk, M.H. (1990) Chasing the enzymes of secondary metabolism: plant cell cultures as a pot of gold. *Phytochemistry* **30**, 3861-3863.
- Zhou, B.-N., Johnson, R.K., Mattern, M.R., Wang, X., Hecht, S.M., Beck, H.T., Ortiz, A. e Kingston, D.G.I. (2000) Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxydon*. *Journal of Natural Products* **63**, 217-221.
- Zschocke, S., Staden, J., Paulus, K., Bauer, R., Horn, M.M., Munro, O.Q., Brown, N.J. e Drewes, S.E. (2000) Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea bullata*. *Phytochemistry* **54**, 591-595.
- Zsolnai, L. (1995) ZORTEP. An interactive molecular graphics program. University of Heidelberg, Germany.

Curriculum vitae

MARIKO FUNASAKI

Local e data de nascimento

Tóquio, Japão, 19 de agosto de 1976.

Formação acadêmica

1992 - 1995 Toyama high school, Toyama-shi, Toyama

1995 - 1999 Tokyo Institute of Technology

Department of Biomolecular Engineering

1999 - 2001 Tokyo Institute of Technology

Graduate School of Bioscience and Biotechnology

Master course

Publicação

Mori, T., Funasaki, M., Kobayashi, A. e Okahata, Y. (2001) Reversible activity changes of a lipid-coated lipase for enantioselective esterification in supercritical fluoroform. *Chem. Commun.* **18**, 1832-1833.

Participações em congressos

Funasaki, M., Santa-Catarina, C., Lago, J.H.G., Kato, M.J., Floh, E.I.S. e Yoshida, M. Sesquiterpeno de suspensões celulares de *Ocotea catharinensis* (Lauraceae). XXV Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, São Paulo-SP, 16 a 18 de outubro de 2003.

Funasaki, M., Santa-Catarina, C., Lago, J.H.G., Kato, M.J., Floh, E.I.S. e Yoshida, M. Metabolismo secundário em cultura de células e tecidos de *Ocotea catharinensis* Mez (Lauraceae). XXVI Congresso Latinoamericano de Química 27^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ), PN-278. Salvador-BH, 30 de maio a 2 de junho de 2004.

Funasaki, M., Santa-Catarina, C., Lago, J.H.G., Kato, M.J. e Floh, E.I.S. Metabólitos secundários de embriões de *Ocotea catharinensis*. XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, Campos do Jordão-SP. 1 a 3 de dezembro de 2004.