

## MUDAS DE *Ocotea puberula* (LAURACEAE): IDENTIFICAÇÃO E MONITORAMENTO DE ALCALOIDES APORFINOIDES

Sandra Maria Warumby Zanin, Obdúlio Gomes Miguel, Deise Prehs Montrucchio, Camila Klocker Costa e Jessé Boquett Lagos

Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Paraná, Av. Prefeito Lothário Meissner, 632, 80210-170 Curitiba – PR, Brasil  
 Ana Luísa Lacava Lordello\*

Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, CP 19081, 81531-990 Curitiba – PR, Brasil

Recebido em 19/3/10; aceito em 3/12/10; publicado na web em 25/2/11

SEEDLINGS OF *Ocotea puberula* (LAURACEAE): IDENTIFICATION AND MONITORING OF APORPHINOID ALKALOIDS. This work describes the occurrence and contents of aporphinoids alkaloids in seedlings of *Ocotea puberula* from germination until 12 months old and in leaves from adult plants. Seedling leaves showed an alkaloids profile similar to leaves of adult plant. However, leaves in seedlings showed higher contents of the alkaloids boldine, dicentrine, leucoxine and isodomesticine when compared to adult plants. The alkaloids concentration in stems and leaves increased during the development of the seedlings, followed by a remarkable decrease of these compounds in roots. Cultivation in a seedling-nursery method is also described.

Keywords: *Ocotea puberula*; seedlings; aporphinoids alkaloids.

### INTRODUÇÃO

O uso de mudas para a exploração de metabólitos secundários de interesse terapêutico e cosmético pode ser uma alternativa ecologicamente interessante, em especial quando se trata de espécies ameaçadas, não só no Brasil como em outros países, pelo uso desordenado destes recursos.<sup>1</sup>

Considerando a relevância da temática apresentada, neste trabalho foram obtidas mudas de *Ocotea puberula* e monitorada a ocorrência de metabólitos secundários em raízes, caules e folhas destas mudas, usando como referência os metabólitos secundários obtidos de folhas de árvores adultas da mesma espécie. Na espécie *Ocotea puberula* já foi relatada a ocorrência de lignoides e alcaloides.<sup>2,3</sup> Os alcaloides aporfinoídes têm ocorrência destacada no gênero *Ocotea*<sup>2,4</sup> e estes abrangem os aporfínicos *stricto sensu* e os aporfínicos *lato sensu*, como os proaporfínicos, os oxoaporfínicos e também os fenantrenos. As formas diméricas e os desidroaporfínicos, caracterizados por uma insaturação adicional no carbono 6a, estão incluídos neste grupo.<sup>5</sup> Quimicamente falando, os alcaloides aporfínicos *stricto sensu* são bases tetracíclicas formadas por ligação direta dos anéis aromáticos A e D dos núcleos benzilisoquinolínicos típicos conforme Figura 1.

Vários alcaloides aporfinoídes comumente encontrados no gênero *Ocotea* apresentam pronunciada bioatividade, como a nantenina (bloqueador de contração muscular e translocação de Ca<sup>2+</sup>), os derivados da nantenina, (antagonista  $\alpha_1$ -adrenoreceptor), a coclaurina (anti-HIV); a glaucina (citotóxica); os derivados halogenados da predicentrina (derivados halogenados bloqueiam receptores dopaminérgicos D1), a dicentrina (inibição da topoisomerase II e atividade antineoplásica), a dicentrinona (inibição da topoisomerase I), e talicsimidina, N-metil-laurotetanina, lirinidina, entre outros (inibição de agregação induzida por colágeno, ácido araquidônico e pelo fator de agregação plaquetária). Vários desses alcaloides têm sido alvo de patentes, o que tem despertado grande interesse por essa classe de compostos.<sup>5,6</sup>

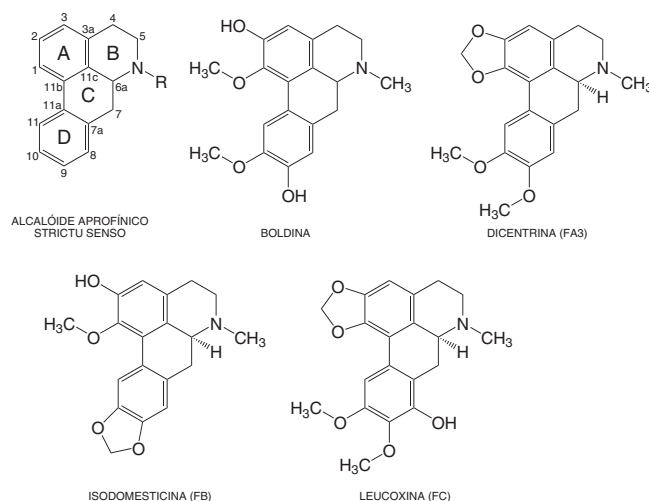


Figura 1. Estrutura dos alcaloides aporfínicos *stricto sensu* e de folhas de espécimens adultos de *Ocotea puberula*

### PARTE EXPERIMENTAL

#### Equipamentos

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo Merck-Hitachi Lachrom Elite configurado com detector de arranjo de diodos e software EZchrom Elite para aquisição de dados e controle total do sistema. Os espectros no IV foram obtidos em espectrofotômetro de IV Bommem MB-100/Hartmann & Braun. Os espectros de RMN foram obtidos em espectrômetro de RMN modelo Bruker Avance 400, solvente CDCl<sub>3</sub> e TMS como referência. Os extratos brutos foram obtidos em extrator Soxhlet e os extratos alcaloídicos em extrator Soxhlet modificado com alargamento do sifão lateral a partir da curva superior, impedindo o refluxo do solvente de extração

\*e-mail: lordello@ufpr.br

que é transferido para o balão por gotejamento. Para a germinação de sementes foram utilizados recipientes do tipo *gerbox* e câmara de germinação Marconi.

### Reagentes e materiais

Para cromatografias em coluna de baixa pressão foi usado sílica gel 60 (0,063-0,210 mm) Merck® e solventes de grau analítico Synth®. Para CLAE foram usados solventes de grau Omnisolv da Merck® ou similar e água purificada em sistema Milli-Q® da Millipore. O padrão boldina (99,8% de pureza) foi adquirido da Fluka® (lote 438.298/1).

### Material vegetal

Todo o material vegetal (folhas e frutos) utilizado para realização deste trabalho foi coletado de cinco matrizes localizadas no Município de Irati, Paraná, Brasil. As exsicatas estão depositadas no Museu Botânico de Curitiba, PR, Brasil, sob números 301.144, 301.145, 301.146, 301.147 e 301.148. Com as folhas procedeu-se ao isolamento dos padrões de alcaloides aporfinoídeos, que posteriormente foram utilizados no monitoramento das mudas. As mudas foram obtidas a partir da germinação das sementes retiradas dos frutos de *Ocotea puberula* e posterior plantio e crescimento em viveiro.

### Obtenção de mudas

Após coleta, os frutos maduros foram separados manualmente, removendo-se a seguir o tegumento e a polpa, eliminando-se todo o resíduo das sementes, que então foram secas em ambiente ventilado. A dormência das sementes foi quebrada por escarificação ácida por 5 min com ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>).<sup>7,8</sup> A germinação foi conduzida em recipientes do tipo *gerbox* sanitizados com álcool etílico (EtOH) 77 °GL<sup>9</sup> contendo substrato de vermiculita na proporção de 30 g do produto para 45 mL de água destilada.<sup>10</sup> A germinação foi conduzida em germinador Marconi, com iluminação direta de luz fria a 25 °C, ambientado em câmara fria à 5 °C. As sementes germinadas foram coletadas semanalmente e transferidas para viveiro,<sup>9</sup> onde foram transplantadas individualmente para sacos de polietileno de 20 cm de altura por 10 cm de diâmetro<sup>7</sup> com substrato de terra comum peneirada, colocados sobre a superfície do solo próximos uns aos outros, em canteiro a céu aberto coberto com tela de poliolefina (sombrite 30) para proteção contra intempéries e excesso de luz.<sup>8,11</sup>

As mudas foram coletadas com 3, 6, 9 e 12 meses. Após separação das folhas, caules e raízes, estas foram secas em estufa<sup>12</sup> a 40-45 °C e moídas em moinho de facas<sup>13</sup> com controle da granulometria do pó.<sup>14</sup>

### Obtenção de extratos brutos de folhas, caules e raízes de mudas

Com as folhas dos espécimens adultos procedeu-se ao isolamento dos padrões de alcaloides aporfinoídeos que, posteriormente, foram utilizados no monitoramento das mudas. Os extratos brutos de folhas, caules e raízes de mudas foram obtidos em extrator de Soxhlet em extrações consecutivas de 30 h<sup>4,15</sup> cada, com os solventes de ordem crescente de polaridade: éter de petróleo (EP 30-60 °C), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH). Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram concentrados em rotaevaporador a 40 °C. A avaliação do perfil cromatográfico dos extratos de folhas de mudas de 3 meses obtidos a partir dos solventes EP, DCM e MeOH mostrou não haver diferenças significativas entre eles, portanto, foram unificados para posterior extração alcaloídica. O mesmo procedimento foi realizado para os extratos obtidos de folhas de mudas de 6, 9 e 12 meses, caules de mudas de 3, 6, 9 e 12 meses e raízes de mudas de 3, 6, 9 e 12 meses.

### Obtenção de extrato alcaloídico bruto de folhas, caules e raízes de mudas

Os extratos brutos unificados foram solubilizados em HCl 2%, filtrados e posteriormente submetidos a extrações em extrator de Soxhlet modificado.<sup>16</sup> A primeira extração foi feita com DCM, desprezando-se a fase orgânica. A seguir a fase aquosa foi alcalinizada a pH 10 com NH<sub>4</sub>OH 25% e submetida a nova extração com DCM. O procedimento foi repetido, e as fases orgânicas alcaloídicas unificadas e, posteriormente, concentradas em rotaevaporador a 40 °C.

### Padrões obtidos de folhas adultas

Para obtenção dos padrões de alcaloides de folhas de plantas adultas, 2,5 kg de folhas de *Ocotea puberula* foram secas e moídas e posteriormente extraídas por maceração em EtOH a frio por 5 dias. Este procedimento foi repetido por 5 vezes. O extrato etanólico bruto de folhas obtido, após reunião dos filtrados, foi concentrado em rotaevaporador a 40 °C e posteriormente submetido à extração alcaloídica e forneceu 8,55 g de extrato alcaloídico bruto. Desse extrato foram isolados, através de cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), os alcaloides aporfinoídeos dicentrina (FA3), isodomeesticina (FB) e leucoxina (FC) (Figura 1). Nas diversas etapas do fracionamento cromatográfico foram utilizadas misturas dos solventes hexano, EP, DCM, clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), acetato de etila (AcOEt), MeOH e dietilamina em proporções adequadas para cada fração analisada. Ambiente amoniacal apresentou melhor resolução em todas as etapas de purificação.<sup>17</sup>

### Identificação estrutural dos compostos isolados

A identificação dos alcaloides isolados foi feita a partir da comparação dos respectivos dados no IV e RMN uni e bidimensionais com dados da literatura. Os dados de RMN dos alcaloides identificados estão disponibilizados como material suplementar.

### Análises cromatográficas

A metodologia desenvolvida foi específica e considerou aspectos dos métodos citados por diversos pesquisadores.<sup>18</sup> As análises por CLAE foram feitas em coluna RP-18 Waters X-Terra® (250 x 4,6 mm, 5 µm) associada a uma pré-coluna empacotada com a mesma fase estacionária. A fase móvel ternária foi composta por solução aquosa (A) de 1,24 mM de heptanossulfonato de sódio 0,029 M de ácido fosfórico e 0,01 M de ácido sulfúrico; metanol (B) e acetonitrila/água 9:1 (v/v) (C). A eluição foi realizada no modo gradiente, segundo a seguinte programação: A/B/C 82:13:05 até 53:42:05 em 77 min, então até 05:90:05 em mais 1 min. A seguir, em gradiente reverso, a fase móvel voltou à condição inicial em 5 min. Vazão da fase móvel: 0,7 mL min<sup>-1</sup>. Detecção no UV a 280 nm.<sup>16,19</sup>

### Preparação das soluções padrões

Os padrões boldina, isodomeesticina (FB), leucoxina (FC) e dicentrina (FA3) foram dissolvidos em solução aquosa ácida (A) e MeOH 2:1 (v/v), nas concentrações de 125, 157, 165 e 145 µg mL<sup>-1</sup>, respectivamente (Figuras 2 e 3).

### Curva analítica

A análise quantitativa utilizou o método do padrão externo. Para a curva de calibração foi utilizado um padrão boldina comercial. A escolha do alcaloide boldina como padrão foi motivada,

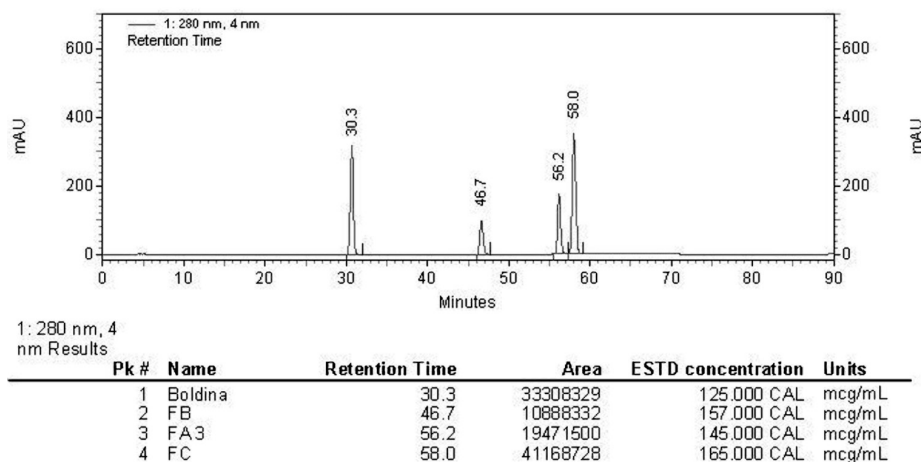


Figura 2. Cromatograma dos padrões

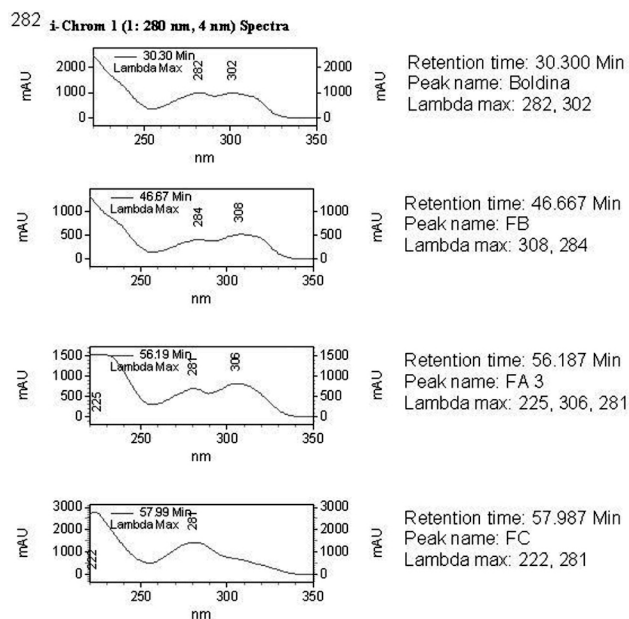


Figura 3. Tempo de retenção e absorção no UV dos padrões

em grande parte, pelo fato deste alcaloide já ter sido identificado previamente, por CLAE, em folhas de espécimens adultos de *Ocotea puberula* e ter as mesmas características estruturais dos outros alcaloides aporfínicos *stricto sensu* isolados, conforme Figuras 1 e 3. Uma curva analítica com 7 pontos foi construída partindo-se de uma solução de boldina com  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  em MeOH nas diluições de 75, 100, 125, 150, 175, 200 e  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  e injetadas em triplicata por ponto. A curva de calibração com a boldina mostrou linearidade segundo a equação  $y = 3.85913x - 006x$  e coeficiente de correlação ( $R^2$ ) de 0,9992.

#### Diluição das amostras

O extrato alcaloídico bruto de folha adulta foi dissolvido em metanol ( $6,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e a seguir diluído na solução aquosa ácida (A) para  $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os extratos alcaloídicos brutos de folhas (F3 a F12) foram dissolvidos em metanol ( $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e então diluídos na solução aquosa ácida (A) para  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ . Os extratos alcaloídicos brutos de caules (C3 a C12) e raízes (R3 a R12) foram inicialmente dissolvidos em metanol ( $3,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e a seguir diluídos em solução

aquosa ácida (A) até  $0,48 \text{ mg mL}^{-1}$ . Após diluição adequada de cada amostra foram injetados  $20 \mu\text{L}$  no cromatógrafo.

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

As sementes que geraram as mudas foram originadas dos mesmos 5 espécimens de *Ocotea puberula* que forneceram os padrões dos alcaloides dicentrina (FA3), isodomesticina (FB) e leucoxina (FC), conforme Figura 1.

As características do lote de sementes usadas foram de  $170,7 \text{ g/1.000}$  sementes,  $5,856$  sementes/kg e umidade de  $35,3\%$ , sendo submetidas ao processo de germinação um lote de  $12.058$  sementes.

O rendimento da germinação de sementes de *Ocotea puberula* foi considerado baixo, uma vez que somente  $38,58\%$  das sementes germinaram. Durante o período de germinação foram realizadas coletas semanais do material germinado no período, que foi transferido sucessivamente para o viveiro, totalizando  $1.470$  sementes germinadas.

Para obtenção dos extratos de mudas de 3, 6, 9 e 12 meses foram coletados no viveiro respectivamente 240, 239, 248 e 232 mudas, com aproveitamento de  $65,23\%$  das mudas produzidas.

Os rendimentos obtidos para os extratos alcaloídicos brutos aos 3 meses ( $0,43\%$  para folhas,  $0,44\%$  para caules e  $0,40\%$  para raízes); aos 6 meses ( $1,20\%$  para folhas,  $0,38\%$  para caules e  $0,43\%$  para raízes); aos 9 meses ( $1,10\%$  para folhas,  $0,33\%$  para caules e  $0,32\%$  para raízes) e aos 12 meses ( $1,16\%$  para folhas,  $0,39\%$  para caules e  $0,34\%$  para raízes) foram significativamente maiores para as folhas das mudas de 6, 9 e 12 meses do que para caules e raízes. Mudanças com 3 meses de idade apresentaram rendimento semelhante para folhas, caules e raízes.

O monitoramento dos alcaloides por CLAE avaliou o acúmulo desses metabólitos em folhas, caules e raízes de mudas de *Ocotea puberula* ao longo de 12 meses com coleta trimestral.

Os resultados obtidos, por seu pioneirismo nesta espécie, carecem de referências para análise comparativa com mudas, razão pela qual buscamos analisar comparativamente os dados com folhas de plantas adultas. A Tabela 1 apresenta os resultados de acúmulo desses metabólitos nas folhas, caules e raízes, respectivamente. Cromatogramas representativos de folhas, caules e raízes de mudas de *Ocotea puberula*, podem ser vistos no material suplementar.

Observou-se que, mesmo com variações individuais, o resultado acumulado dos alcaloides em folhas foi de crescimento gradativo no período estudado (Tabela 1). O acúmulo dentre os alcaloides monitorados em mudas de até 12 meses foi de 6,5 vezes maior que o encontrado nas folhas adultas.

**Tabela 1.** Concentração de alcalóides em folhas (F), caules (C) e raízes (R) de mudas de 3, 6, 9 e 12 meses de idade e em folhas adultas em ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

Alcaloide	Parte	3 m	6 m	9 m	12 m	Folhas adultas
Boldina	F	23,12	33,15	76,60	29,86	404,20
	C	37,63	46,00	29,55	19,25	-
	R	41,76	25,06	10,77	-	-
Isodomeesticina	F	316,20	689,27	1098,17	1061,34	505,03
	C	154,21	138,92	231,73	229,71	-
	R	95,21	91,06	51,04	15,48	-
Dicentrina	F	859,68	2887,17	2067,35	2906,37	196,91
	C	91,20	62,18	71,24	212,67	-
	R	35,08	68,60	47,02	25,98	-
Leucoxina	F	645,73	1584,40	3120,81	2582,36	366,35
	C	49,75	30,32	25,96	88,57	-
	R	53,37	49,23	45,02	37,12	-
Total	F	1844,73	5193,95	6362,93	9536,07	1472,49
	C	332,79	277,42	358,48	550,22	-
	R	225,42	233,95	153,85	78,59	-

Já nos caules (Tabela 1), dentro do período analisado, a concentração acumulada dos alcalóides foi significativamente menor que nas folhas, mesmo apresentando uma leve tendência de crescimento, exceto para o alcaloide boldina.

Nas raízes (Tabela 1), diferentemente de folhas e caules, observou-se uma redução gradativa nas concentrações dos alcalóides analisados, com destaque para a ausência da boldina aos 12 meses.

A Tabela 2 apresenta os resultados dos alcalóides acumulados, com foco nas mudas de forma geral.

**Tabela 2.** Concentração acumulada de alcalóides em folhas, caules e raízes de mudas de 3, 6, 9 e 12 meses de idade e folhas adultas em ( $\mu\text{g g}^{-1}$ )

Total em	3 m	6 m	9 m	12 m	Folhas adultas
Folhas	1844,73	5193,95	6362,93	9536,07	1472,49
Caules	332,79	277,42	358,48	550,22	-
Raízes	225,42	233,95	153,85	78,59	-
Mudas	2402,94	5705,32	6875,26	10164,88	-

A análise do acúmulo dos alcalóides para folhas, caules e raízes das mudas separadamente mostrou que a presença destes alcalóides nas folhas é significativamente maior que em caules e raízes, respectivamente. A tendência observada para os alcalóides em folhas e caules é de aumento de concentração e para raízes de redução, durante o desenvolvimento das mudas dentro do período analisado.

## CONCLUSÃO

O presente trabalho abrangeu a coleta de frutos, germinação das sementes e desenvolvimento em viveiro, coleta de mudas, processos extrativos, desenvolvimento de método por CLAE, obtenção de padrões em folhas de espécimens adultos e monitoramento desses padrões nas amostras de folhas, caules e raízes de mudas de 3, 6, 9 e 12 meses.

O método desenvolvido por CLAE apresentou boa separação cromatográfica para os alcalóides, boa simetria de picos, apesar da similaridade estrutural dos alcalóides analisados.

Para os alcalóides aporfínicos *stricto sensu* isodomeesticina, dicentrina, leucoxina e boldina monitorados, podemos concluir que as mudas de *Ocotea puberula* até 12 meses, da mesma forma que as plantas em fase adulta, apresentam basicamente o mesmo perfil alcaloídico.

A concentração desses alcalóides em raízes, caules e folhas das mudas é distinta, com acúmulo maior nas folhas, seguido de caules e raízes em ordem decrescente no período analisado. A quantidade acumulada de alcalóides nas folhas das mudas é maior que nas folhas dos espécimens adultos analisados. Este resultado sugere o uso de mudas em substituição ao uso de árvores adultas.

Este trabalho evidencia oportunidades de obtenção e utilização de mudas como fonte de metabólitos secundários, preservando espécies florestais, sendo que o período estudado neste trabalho não restringe a iniciativa de se aperfeiçoar métodos e resultados, desta ou de outras espécies, para viabilização do uso de mudas.

## MATERIAL SUPLEMENTAR

Os dados espectroscópicos dos alcalóides isolados e os cromatogramas representativos de folhas, caules e raízes de mudas de *Ocotea puberula*, estão disponíveis em <http://quimicanova.s bq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

## AGRADECIMENTOS

Às agências de fomento CNPQ e Fundação Araucária pelo apoio financeiro.

## REFERÊNCIAS

- Zanin, S. M. W.; *Tese de Doutorado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2006.
- Zanin, S. M. W.; Lordello, A. L. L.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 92.
- Shamma, M.; Guinadeau, H.; *Biogenetic pathways for the aporphinoid alkaloids*, Pergamon Press: Great Britain, Tetrahedron report number 175, Tetrahedron **1984**, *40*, 4795; Santos, R. I. Em *Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários*; Simões, C. M. O.; Shenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentez, L. A.; Petrovick, P. R., eds.; Eds. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 1999, cap. 16; Shepherd, G. J.; *Conhecimento de diversidade de plantas terrestres do Brasil*, Ed. Unicamp: São Paulo, 2000; Kubitzki, K.; Rohwer, J. G.; Bittrich, V. Em *Flowering plants Dicotyledons, magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families.*; Kubitzki, K., ed.; Springer Verlag: Berlin, 1993, cap. Dicotiledoneae.
- Araujo, A. J.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2000.
- Stevigny, C.; Bailly, C.; Quetin-Leclercq, J.; *Curr. Med. Chem. Anti-cancer Agents*. **2005**, *5*, 173.

6. Jia, Q.; Qiu, Z.; Nissanka, A.; Mahiou, B.; Farrow, T. M.; *US pat. 6210680* **2001**; Ribeiro, R. A.; Carmo, L. G.; Vladimirova, J.; Jurkiewicz, N. H.; Jurkiewicz, A.; *Eur. J. Pharmacol.* **2003**, *37*, 470; Indra, B.; Matsunaga, K.; Hoshini, O.; Suzuki, Y.; Ogasawara, H.; Ohizumi, Y.; *Eur. J. Pharmacol.* **2002**, *437*, 173; Kashiwada, Y.; Aoshima, A.; Ikeshiro, Y.; Chen, Y. P.; Furukawa, H.; Itoigawa, M.; Fujioka, K. M.; Cosentino, L. M.; Natschke, S. L. M.; Lee, K. H.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 443; Hoet, S.; Stevigny, S.; Block, S.; Opperdoes, F.; Colson, P.; Baldeyrou, B.; Lansiaux, A.; Bailly, C.; Quetin-Leclercq, J.; *Planta Med.* **2004**, *70*, 407; Asencio, M.; Guzmán, C. H.; López, J. J.; Cassels, B. K.; Protais, P.; Chagraoui, A.; *Bioorg. Med. Chem.* **2005**, *13*, 3699; Chaves, D. S. A.; Costa, S. S.; Almeida, A. P.; Frattani, F.; Assafim, M.; Zingali, R. B.; *Quim. Nova* **2010**, *33*, 172.
7. Carvalho, P. E. R.; *Espécies Arbóreas Brasileiras*, 1ª ed., Embrapa Informação Tecnológica: Brasília, 2003.
8. Lorenzi, H.; *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*, 4ª ed., Instituto Plantarum: São Paulo, 2002.
9. Brasil, Ministério da Agricultura, Departamento Nacional de Produção Vegetal (DNPM), Divisão de Sementes e Mudas (DISEM); *Regras para Análise de Sementes*, Brasília, 1976.
10. Nogueira, A. C.; Portela, O.; Nazário, P.; *Resumos do 53º Congresso Nacional de Botânica/25ª Reunião Nordestina de Botânica*, Recife, Brasil, 2002.
11. Inoue, M. T.; Roderjan, C. V.; Kunikyoshi, Y. S.; *Projeto madeira do Paraná*, Fundação de Pesquisas Florestais do Paraná: Curitiba, 1984; Carneiro, J. G. A.; *Produção e controle de qualidade de mudas florestais*, UFPR/FUPEF/UENF: Curitiba/Campos, 1995.
12. Prista, L. N.; Alves, A. C.; Morgado, R.; Lobo, J. S.; *Tecnologia Farmacêutica*, 6ª ed., Fundação Calouste Gulbenkian: Lisboa, 2003.
13. Sonaglio, D.; Ortega, G. G.; Petrovick, P. R.; Bassani, V. L. Em *Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos*; Simões, C. M. O.; Shenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentez, L. A.; Petrovick, P. R., eds.; 1ª ed.; Ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 1999, cap. 13.
14. *Farmacopéia Brasileira IV*, 4ª ed., São Paulo, 1991, parte I.
15. Falkenberg, M. B.; Santos, R. I.; Simões, C. M. O. Em *Introdução à análise fitoquímica*; Simões, C. M. O.; Shenkel, E. P.; Gosman, G.; Mello, J. C. P.; Mentez, L. A.; Petrovick, P. R., eds.; 1ª ed.; Ed. UFRGS/UFSC: Porto Alegre/Florianópolis, 1999, cap. 10.
16. Davet, A.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2005; Carvalho, J. L. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal do Paraná, Brasil, 2001.
17. Stahl, E.; *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*, 2ª ed., Springer-Verlag: Berlin, 1969.
18. Liang, Y. Z.; Xie, P.; Chan, K.; *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *53*, 812; Tseng, L. H.; Braumann, U.; Godejohann, M.; Lee, S. S.; Albert, K.; *J. Chin. Chem. Soc.* **2000**, *47*, 1231; Sun, S. W.; Lee, S. S.; Huang, H. M.; *J. Pharm. Biomed. Anal.* **1996**, *14*, 1383; Jacome, R. L. R.; Oliveira, A. B.; *Quim. Nova* **2004**, *27*, 897; Stevigny, C.; Wautier, M. C.; Jiwan J. L. H.; Chiap, P.; Hubert, P.; Leclercq, J. Q.; *Planta Med.* **2004**, *70*, 764.
19. Merck; *Introdução à técnica de HPLC*, 2005; Guimarães, L. F. L. Em *Cromatografia líquida de alta eficiência*, Collins, C. H., ed.; 7ª ed., Ed. Unicamp: Campinas, 1998, cap. IX; Ciola, R.; *Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho*, Edgard Blücher: S. Paulo, 1998.
20. Zhou, B. N.; Johnson, R. K.; Mattern, M. R.; Wang, X.; Hecht, S. M.; Beck, H. T.; Ortiz, A.; Kingston, D. G. J.; *J. Nat. Prod.* **2000**, *63*, 217.
21. Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; *Lloydia* **1975**, *38*, 275; Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; *J. Nat. Prod.* **1979**, *42*, 325; Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; *J. Nat. Prod.* **1983**, *46*, 761; Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 389; Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1033.