

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Bocageopsis pleiosperma Maas (Annonaceae)**



ELZALINA RIBEIRO SOARES

**MANAUS
2014**

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

ELZALINA RIBEIRO SOARES*

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Bocageopsis pleiosperma Maas (Annonaceae)**



Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisitos para obtenção do Título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

Colaborador: MSc. Felipe Moura Araújo da Silva

***Bolsista CAPES**

**MANAUS
2014**

Ficha Catalográfica

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

S676e	Soares, Elzalina Ribeiro ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE Bocageopsis pleiosperma Maas (Annonaceae) / Elzalina Ribeiro Soares. 2014 214 f.: il. color; 31 cm. Orientador: Afonso Duarte Leão de Souza Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) - Universidade Federal do Amazonas. 1. Annonaceae. 2. Bocageopsis pleiosperma. 3. Alcaloides aporfínicos. 4. óleos essenciais. I. Souza, Afonso Duarte Leão de II. Universidade Federal do Amazonas III. Título
-------	--

Estudo Fitoquímico e Atividade Biológica de *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae)

Elzalina Ribeiro Soares

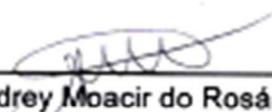
Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Química.

Aprovada em 17 de Junho de 2014

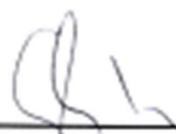
COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Prof. Dr. Andrey Moacir do Rosário Marinho
Universidade Federal do Pará



Prof.ª Dr.ª Maria Lúcia Belém Pinheiro
Universidade Federal do Amazonas

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 17 de Junho de 2014

*Aos meus pais Maria Paula Aquino e
Joaquim Soares, pelo amor, alicerce,
exemplo de vida e todo esforço para me
proporcionar uma educação digna.*

*A minha avó Maria Rosa Azevedo, pelo
companheirismo, carinho e motivação.*

A eles eu dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar a Deus por me proporcionar uma vida voltada à ciência, cheia de percalços, porém prazerosa vendo que o conhecimento ao final de tudo foi compensador.

Aos meus pais, Maria Paula Aquino e Joaquim Soares, de uma forma especial agradeço por todo amor, carinho, valores ensinados e acima de tudo compreensão com esse caminho que escolhi viver. E a minha avó Maria Rosa Ribeiro, pela motivação nos momentos difíceis, fazendo com que eu não desista dos meus objetivos.

O reconhecimento sincero e de todo coração pela grande ajuda, enorme paciência e compreensão do meu namorado Richardson Alves de Almeida. Todo carinho que ele revestiu em mim, refletiu nos momentos difíceis que eu passei durante esses dois anos de mestrado. A paciência por ter compreendido a redução do tempo passado ao lado dele para que esse trabalho fosse concluído.

Um agradecimento justo ao Professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pela orientação. Obrigada pelo aprendizado, por confiar no meu potencial e fazer com que o entendimento da ciência ficasse claro, o qual requer muita responsabilidade, porém deve ser feito de forma prazerosa.

Ao colaborador desse trabalho Felipe Moura Araújo da Silva, por ter idealizado esse projeto, pela paciência e por ter se feito sempre presente, não medindo esforços para que eu conseguisse entender essa nova linha de pesquisa, tornando cada dia vivido ao lado da espécie *B. pleiosperma* agradável e prazeroso.

As Professoras Maria Lúcia Belém Pinheiro, Maria da Paz Lima e Andrey Moacir do Rosário Marinho pelas colaborações e esclarecimentos.

Aos Professores Dra. Adriana Flach e Dr. Luiz Antônio Costa pelas análises realizadas de CG-MS no Laboratório de Química da Universidade Federal de Roraima – UFRR.

A Professora Dra. Antonia Queiroz Lima de Souza e ao aluno de I.C. Paulo Alexandre Albuquerque pelos ensaios biológicos realizados no Laboratório de Microrganismos do Grupo de Espectrometria de Massas e Microrganismos da Amazônia - GEMMA.

Ao Héctor Henrique Ferreira Koolen pelos ensinamentos passados e incentivos durante a iniciação científica, além dos ensaios biológicos realizados no Laboratório Dalton de Espectrometria de Massas - UFSCar.

Ao Professor Anderson Barison pela atenção e agilidade nas análises de Ressonância Magnética Nuclear realizada na Universidade Federal do Paraná.

Aos Professores Marcos Batista Machado, Rita de Cássia Saraiva Nunomura, Cecília Nunez, Sérgio Nunomura, Maria Lúcia Belém Pinheiro e Maria da Paz Lima pelos conhecimentos repassados e paciência durante as disciplinas cursadas.

Minha enorme gratidão aos amigos do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – Lab. Massas Felipe Moura, Richardson Almeida, Bruna Ribeiro e Francinaldo Araújo. Essas pessoas são parte da minha vida na pesquisa, sempre presentes ajudando no meu crescimento científico. Nunca vou esquecer essa Família Massas (“somos mais, somos massas”) que me recebeu.

A amiga Priscila Ferreira de Aquino pelo apoio, incentivo e ensinamentos passados na iniciação científica, além de todo apoio desde o início dessa jornada.

Aos amigos e companheiros de estudos pelo companheirismo, compreensão e por tornarem prazeroso esse caminho: Caroline Mathias, Igor Medeiros, Milena Campelo e Renyer Costa. Além daqueles que continuaram em disciplinas posteriores, sempre com descontração e uma alegria sem igual: Bruna Ribeiro, Fabiana Almeida, Adriana Cavalcante, Sidney Azevedo, Renan Feitosa, Orlando Amazonas, Samirimi Januário, Jessica Maria e Edzon Lopes.

Aos amigos do curso de inglês Fernanda Pontes, Ewerton Maia e Aline, pelos momentos de descontração e apoio durante os anos passados na UEA.

Aos amigos que a vida na Universidade Federal do Amazonas me proporcionou conhecer: Ariane Máximo, Leylane Araújo, Jaqueline Bezerra, Daniele Alencar, Aimee Oliveira, Mayane Pereira, Fátima Almeida, Paula, Flávia, Nataly, Thaís Nobre, Ingrity Suellem, Luana Monteiro. A estes eu agradeço pelos momentos alegres e palavras amigas de incentivo.

A todos que acreditaram em mim e tinham certeza que eu era capaz, até quando eu mesmo duvidava, a vocês muito obrigada.

*“Ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas
deixar de ser vítima dos seus problemas e se
tornar autor da sua própria história”.*

(Abrahan Lincon)

RESUMO

O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico e biológico de *Bocageopsis pleiosperma* Maas, uma espécie com distribuição restrita à Região Amazônica. O material botânico (folhas, galhos e cascas) foi coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke e submetido à hidrodestilação para obtenção dos óleos essenciais e tratamento ácido-base para obtenção das frações alcaloídicas. Através do estudo dos óleos essenciais das folhas, galhos e cascas foi possível identificar 51 compostos, sendo observado β -bisaboleno como composto majoritário. A análise por ESI-IT-MSⁿ das frações alcaloídicas em escala analítica evidenciou diversos íons de m/z par. Estes íons tiveram seus padrões de fragmentação estudados. Através da análise por ESI-IT-MSⁿ foi possível identificar a fração alcaloídica das folhas como promissora para o isolamento de substâncias inéditas no gênero *Bocageopsis*. A partir do fracionamento da fração alcaloídica das folhas de *B. pleiosperma*, obtida em escala preparativa, foi possível isolar e caracterizar por métodos de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais (RMN 1D/2D) e espectrometria de massas (EM), alcalóides do tipo aporfínico, proaporfínico, oxoaporfínico, benziltetraisoquinolínico e β -carbolínico. Dentre esses foram isolados os alcalóides nornuciferina, isoboldina, assimilobina e tetrahydroharmano e obtidos em mistura de dois e três compostos, os alcalóides reticulina e laurotetanina; anonaína e liriodenina; estefarina, isoboldina e *N*-metillaurotetanina. Todos os alcalóides estão sendo descritos pela primeira vez no gênero *Bocageopsis*, sendo o alcalóide tetrahydroharmano descrito pela primeira vez na ordem Magnoliales. Os óleos essenciais apresentaram baixa atividade antimicrobiana contra *C. albicans* and *P. aeruginosa*.

Palavras-Chave: Annonaceae, *Bocageopsis pleiosperma*, Alcaloides aporfínicos, óleos essenciais.

ABSTRACT

The present work describes the phytochemical and biological studies of *Bocageopsis pleiosperma* Maas, a specie with restricted distribution to the Amazon Region. The plant material (leaves, twigs and bark) was collected in the Adolpho Ducke Forest Reserve and submitted to hydrodistillation to obtain the essential oils and acid-base treatment to getting the alkaloidal fractions. In the study of the essential oils from leaves, twigs and bark it was identified 51 compounds, being β -bisabolene observed as major compound. The analysis by ESI-IT-MSⁿ of alkaloidal fractions in analytical scale showed several ions of m/z pair. These ions had their fragmentation patterns studied. Also through analysis by ESI-IT-MSⁿ it was possible to identified the alkaloidal fraction of the leaves as a promising source for the isolation of new compounds in the genus *Bocageopsis*. From the fractionation alkaloidal fraction of the leaves of *B. pleiosperma* obtained in preparative scale, it was isolated and characterized by nuclear magnetic resonance and unidimensional methods (NMR 1D/2D) and mass spectrometry (MS), alkaloids of aporphine type, proaporphine, oxoaporphine, benzyltetrahydroisoquinoline and β -carboline. Among these were isolated nornuciferine alkaloids, isoboldine, asimilobine and tetrahydroharmine and obtained as a mixture of two and three compounds, the reticuline and laurotetanine alkaloids; anonaine and liriodenine; estefarine, isoboldine and *N*-methyl-laurotetanine. All alkaloids are being described for the first time in the *Bocageopsis* genus, being tetrahydroharmine alkaloid described for the first time in Magnoliales order. The essential oils showed low antimicrobial activity against *C. albicans* and *P. aeruginosa*.

Keywords: Annonaceae, *Bocageopsis pleiosperma*, aporphine alkaloids, essential oils.

LISTA DE SIGLAS

CG	-----	Cromatografia Gasosa.
IT	-----	Ion Trap.
EM	-----	Espectrometria Massa.
ESI	-----	Electrospray Ionisation.
MS	-----	Mass Spectrometry.
LC	-----	Liquid chromatography.
APCI	-----	Atmospheric Pressure Chemical Ionization.
DAD	-----	Diode Array Detector.
CLAE	-----	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
RMN	-----	Ressonância Magnética Nuclear.
NADH	-----	Dinucleótido de nicotinamida e adenina.
EI	-----	Electron Ionization.
HPLC	-----	High Performance Liquid Chromatography.
IPP	-----	Isopentenyl Diphosphate.
DMAPP	-----	Dimethylallyl Diphosphate
sp	-----	Espécie.
DNA	-----	Ácido desoxirribonucléico.
RFAD	-----	Reserva Florestal Adolpho Ducke.
INPA	-----	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia.
IR	-----	Índice de Retenção.
TR	-----	Tempo de Retenção.
DCM	-----	Diclorometano.
HCl	-----	Ácido Clorídrico.
PPM	-----	Parte por Milhão.
TSQ	-----	Triple-Stage Quadrupole.
BHI	-----	Brain Heart Infusion.
DIM	-----	Diluição inibitória mínima.
Da	-----	Dalton.
µg	-----	Micro-grama.
HSQC	-----	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	-----	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
MHz	-----	MegaHertz.

C- α -----Carbono Alfa.

ABTS -----sal de amônio do ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzenotiazolina-6-sulfônico).

BpF-----*Bocageopsis pleiosperma* folha

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Medicamentos originados de produtos Naturais..	32
Figura 2: Substâncias oriundas de microrganismos.....	33
Figura 3: Índice de aplicabilidade dos produtos naturais como fármacos.	34
Figura 4: Distribuição geográfica da família Annonaceae.	39
Figura 5: Frutas comestíveis pertencentes à família Annonaceae: (A) <i>A. muricata</i> (graviola) ¹ ; (B) <i>A. cherimoia</i> , Mill (cherimóia) ² ; (C) Híbrido de <i>A. squamosa</i> e <i>A. squamosa</i> (atemóia) ³ ; (D) <i>A. squamosa</i> (pinha, ata ou fruta-do-conde) ⁴ ; (E) <i>R. deliciosa</i> (biriba) ⁵ ; (F) <i>R. mucosa</i> (biriba) ⁶ ; (G) <i>Asimina (pawpaw)</i> ⁷ ; (H) <i>A. diversifolia</i> (ilama) ⁸	41
Figura 6: Algumas espécies pertencentes a família Annonaceae: (A) <i>A. squamosa</i> ¹ ; (B) <i>X. aethiopica</i> ² ; (C) <i>X. parvilifera</i> ³ ; (D) <i>U. veneficiorum</i> ⁴ ; (E) <i>X. amazonica</i> ⁵	44
Figura 7: Acetogeninas isoladas de espécies da família Annonaceae.....	46
Figura 8: Substâncias isoladas de espécies da família Annonaceae: (3) discretamina ¹ , (4) azalhurenona ² , (5) liriodenina ³ , (6) lisicamina ⁴ , (7) 2,4,5-trimetoxilestireno ⁵ , (8) (+)-10b,14-allo-aromadendranodiol ⁶	47
Figura 9: Alcaloides isolados de <i>Guatteria dumetorum</i> : isodomeesticina (9), norisodomeesticina (10), nantenina (11) e neolitsina (12).....	48
Figura 10: Estrutura básica de alcaloides aporfínicos(13) e oxaporfínicos (14)..	49
Figura 11: Alcaloides aporfinoídes com potencial citotóxico e antimicrobiano, O-metilmoschatolina (15) e guatteriopticina (16).....	50
Figura 12: Rota biossintética dos alcaloides aporfínicos.....	51
Figura 13: Substâncias derivadas do alcaloide benzilisoquinolínico (17), cularina (18), isoquinolona (19), protoberberina (20).....	52
Figura 14: Rotas biossintéticas para formação de terpenos.....	53
Figura 15: Compostos majoritários identificados em espécies de <i>Guatteria</i> ..	54
Figura 16: Espécies de Annonaceae - <i>Bocageopsis multiflora</i> : (A) tronco, (B) fruto, (C) folha..	61
Figura 17: Distribuição Geográfica do gênero <i>Bocageopsis pleiosperma</i> Maas..	62

Figura 18: Espectro de UV/visível do pico m/z 328 presente na amostra BpF11, o espectro acima é referente a impurezas presentes na amostra.....	75
Figura 19: Espectro de massas da amostra BpF11. R.T.: 1.18 (acima) e 1.68 (abaixo), obtidos em CLAE analítico.	76
Figura 20: Cromatograma da amostra BpF11 (CLAE semi-preparativo).....	76
Figura 21: Esquema utilizado na realização do teste de diluição seriada em microplaca (*poços controles com antibiótico).	80
Figura 22: Estruturas referentes aos constituintes majoritários do óleo das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	84
Figura 23: Estruturas referentes aos constituintes majoritários do óleo essencial dos galhos de <i>B. pleiosperma</i>	86
Figura 24: Estruturas referentes aos constituintes majoritários do óleo essencial das cascas do tronco de <i>B. pleiosperma</i>	88
Figura 25: Estrutura do β -bisaboleno.	89
Figura 26: Rota biossintética para formação do β -bisaboleno..	90
Figura 27: Halos de inibição de <i>Candida albicans</i> das amostras das cascas do tronco (1), folhas (2) e galhos (3) de <i>B. pleiosperma</i> após 48 horas.....	94
Figura 28: Halos de inibição de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> das amostras das cascas do tronco (1), folhas (2) e galhos (3) de <i>B. pleiosperma</i> após 48 horas.	94
Figura 29: Resultado do ensaio de concentração inibitória mínima para <i>Candida albicans</i> das amostras das cascas (1a-1b); folhas (2a-2b); e galhos (3a-3b). *Poços controle (meio de cultura, antibiótico e bactéria).....	95
Figura 30: Resultado do ensaio de concentração inibitória mínima para <i>Pseudomonas aeruginosa</i> da amostra dos galhos (3). Poços controle (*meio de cultura, antibiótico e bactéria).....	95
Figura 31: Crescimento celular após reinoculação para avaliação da ação bacteriostática das amostras que apresentaram melhor inibição frente ao teste de diluição seriada foram: cascas do tronco (1), folhas (2), galhos (3).	97
Figura 32: Espectro de massas das frações alcaloides das folhas, galhos e cascas de <i>B. pleiosperma</i> , respectivamente de cima para baixa.....	99
Figura 33: Espectro de massas em MS ⁴ do íon de m/z 328 ([M+H] ⁺).....	100

Figura 34: Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 298 ([M+H] ⁺) presente nas frações alcaloídicas das folhas e galhos, respectivamente de cima para baixo.....	101
Figura 35: Esqueleto de alcaloides benzisoquinolínicos e tetrahidroprotoberberínicos.	102
Figura 36: Proposta de fragmentação para alcaloides benzilisoquinolínicos..	102
Figura 37: Proposta de fragmentação para os alcaloides tetrahidroprotoberberínicos..	103
Figura 38: Espectro de massas em MS ² obtidos de dois padrões de alcaloides protoberberínicos (discretina e discretamina) no sistema Ion Trap. Íons de <i>m/z</i> 342 e 328 respectivamente de cima para baixo.....	104
Figura 39: Espectros de massas até MS ⁵ do íon de <i>m/z</i> 282 ([M+H] ⁺) presente na fração das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	105
Figura 40: Estrutura do alcaloide Nornuciferina.	106
Figura 41: Espectros de massas até MS ⁴ do íon de <i>m/z</i> 268 ([M+H] ⁺) presente na fração alcaloídica das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	107
Figura 42: Estrutura da assimilobina.....	107
Figura 43: Espectro de massas MS ² do íon de <i>m/z</i> 330 (acima), presente na fração alcaloídica dos galhos de <i>B. pleiosperma</i> , e do íon de <i>m/z</i> 298 (abaixo) presente na fração alcaloídica das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	108
Figura 44: Espectro de massas até MS ² do íon de <i>m/z</i> 328, presente respectivamente na fração alcaloídica das folhas e galhos de <i>B. pleiosperma</i>	109
Figura 45: Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 328 presente na fração alcaloídica das cascas de <i>B. pleiosperma</i> e do alcaloide tetrahydroberberínico utilizado como padrão.	110
Figura 46: Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 356 presente na fração alcaloídica das cascas de <i>B. pleiosperma</i>	111
Figura 47: Espectro comparativo dos modos de ionização ESI e APCI, para a fração alcaloídica das folhas.	112
Figura 48: Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 282 presente na fração alcaloídica BpF3 das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	113
Figura 49: Espectro de massas em MS _n do íon de <i>m/z</i> 282 ([M+H] ⁺).....	114

Figura 50: Estrutura aporfínica sem <i>N</i> -metilação.	114
Figura 51: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) referente a região dos hidrogênios aromáticos da amostra BpF3.	115
Figura 52: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) referente a metoxilas da amostra BpF3.....	116
Figura 53: Ampliação dos mapas de contornos HSQC e HMBC (600 MHz, CDCl ₃) referente a região do H-6 (δ 66,6) da amostra BpF3.....	116
Figura 54: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl ₃) referente aos hidrogênios metoxílicos da amostra BpF3.	117
Figura 55: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) referente aos hidrogênios metoxílicos da amostra BpF3.....	117
Figura 56: Estrutura do alcaloide nornuciferina.....	118
Figura 57: Principais correlações observadas para amostra BpF3.	118
Figura 58: Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 328 e 330 presente na fração alcaloídica BpF13 das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	120
Figura 59: Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 328 ([M+H] ⁺).	121
Figura 60: Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 330 ([M+H] ⁺).	121
Figura 61: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) e ampliação do sinal relacionada a <i>N</i> -metila.	122
Figura 62: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF13.	124
Figura 63: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl ₃) referente a região dos hidrogênios aromáticos da amostra BpF13.	124
Figura 64: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) referente a região dos hidrogênios aromáticos da amostra BpF13.	125
Figura 65: Ampliação dos mapas de contornos HSQC e HMBC (600, MHz) referente a região da <i>N</i> -metila da amostra BpF13.	125
Figura 66: Estrutura do alcaloide reticulina.	125
Figura 67: Principais correlações observadas para o alcaloide reticulina	126
Figura 68: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF13.	128

Figura 69: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de metoxilas da amostra BpF13.....	128
Figura 70: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de metoxilas da amostra BpF13.....	129
Figura 71: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de metoxilas da amostra BpF13.....	129
Figura 72: Estrutura do alcaloide laurotetanina.....	130
Figura 73: principais correlações observadas para a amostra BpF13.....	130
Figura 74: Espectro de massas do íon de m/z 266 e 276 presente na fração alcaloídica BpF15 das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	132
Figura 75: Espectro de massas em MS^n do íon de m/z 266 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).....	133
Figura 76: Espectro de massas em MS^n do íon de m/z 276 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).....	133
Figura 77: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) e ampliação da região referente aos hidrogênios da ponte metilenodioxi da amostra BpF15.....	135
Figura 78: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente região referente aos hidrogênios da ponte metilenodioxi da amostra BpF15.	135
Figura 79: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente região dos hidrogênios da ponte metilenodioxi da amostra BpF15.....	136
Figura 80: Ampliação do espectro de RMN de ^1H , mapa de contornos HSQC e HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente ao sinal de hidrogênio aromático em δ 6.57 da amostra BpF15.....	136
Figura 81: Estrutura do alcaloide anonaina.....	137
Figura 82: Principais correlações observadas para a amostra BpF15.	137
Figura 83: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra 15.....	139
Figura 84: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF15.	140
Figura 85: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF15.....	141
Figura 86: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF15.	142

Figura 87: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF15.	142
Figura 88: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H, mapas de contornos HSQC e HMBC (600 MHz, CDCl ₃) referente a região dos sinais da ponte metiledióxido da amostra BpF15.	143
Figura 89: Estrutura do alcaloide liriodenina.	145
Figura 90: Principais correlações observadas para a amostra BpF15.	145
Figura 91: Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 328 presente na fração alcaloídica BpF11 das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	147
Figura 92: Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 328 ([M+H] ⁺).	148
Figura 93: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF11.	149
Figura 94: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) referente aos sinais metoxilas (esquerda) e <i>N</i> -metila (direita) presentes na amostra BpF11.	149
Figura 95: Estrutura do alcaloide isoboldina.	150
Figura 96: Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 268 presente na fração alcaloídica BpF6 das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	152
Figura 97: Espectro de massas até MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 328, presente na fração alcaloídica BpF6 das folhas <i>B. pleiosperma</i>	153
Figura 98: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF6.	154
Figura 99: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) referente ao sinal do H-3 da amostra BpF6.	154
Figura 100: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) referente ao sinal de metoxíla da amostra BpF6.	155
Figura 101: Estrutura do alcaloide assimilobina.	156
Figura 102: Principais correlações observadas para o alcaloide assimilobina.	156
Figura 103: Espectro de massas dos íons de <i>m/z</i> 298, 328 e 342 presente na fração alcaloídica BpF9 das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	158
Figura 104: Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 298 ([M+H] ⁺).	159

Figura 105: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF9.	160
Figura 106: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF9.	160
Figura 107: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF9.	161
Figura 108: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de metoxilas da amostra BpF9.	162
Figura 109: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente ao sinal do H-3 da amostra BpF9.	162
Figura 110: Estrutura do alcaloide estefarina.	163
Figura 111: Principais correlações observadas para a amostra BpF9.	164
Figura 112: Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 328 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).	166
Figura 113: Estrutura do alcaloide isoboldina.	166
Figura 114: Principais correlações observadas para a amostra BpF9.	167
Figura 115: Espectro de massas em MS^n do íon de m/z 342 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).	168
Figura 116: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da amostra BpF9.	169
Figura 117: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região de metoxilas da amostra BpF9.	170
Figura 118: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região de hidrogênios de <i>N</i> -metila da amostra BpF9.	170
Figura 119: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente ao H-3 da amostra BpF9.	171
Figura 120: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente ao H-3 da amostra BpF9.	171
Figura 121: Estrutura do alcaloide <i>N</i> -metillaurotetanina.	172
Figura 122: Principais correlações observadas para amostra BpF9.	172
Figura 123: Espectro de massas do íon de m/z 187 presente na fração alcaloídica BpF4 das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	174
Figura 124: Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 187 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).	175

Figura 125: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF4.	176
Figura 126: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF4.	176
Figura 127: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos e do hidrogênio ligado ao heteroátomo da amostra BpF4.	177
Figura 128: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HSQC, HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênio metílicos amostra BpF4.	178
Figura 129: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HSQC, HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênio metílicos amostra BpF4.	179
Figura 130: Estrutura do alcaloide tetrahydroharmano.	179
Figura 131: Principais correlações observados para a amostra BpF4.	180
Figura 132: Rota biossintética dos alcaloides β -carbolínicos.	182
Figura 133: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF3. ...	203
Figura 134: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF3.	203
Figura 135: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF3.	204
Figura 136: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF13.	204
Figura 137: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF13.	205
Figura 138: Mapa de contornos (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF13.	205
Figura 139: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF15.	206
Figura 140: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF15.	206
Figura 141: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF15.	207
Figura 142: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF11.	207

Figura 143: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF11.	208
Figura 144: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF11.	208
Figura 145: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF6. ...	209
Figura 146: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF6.	209
Figura 147: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF6.	210
Figura 148: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF9. ...	210
Figura 149: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF9.	211
Figura 150: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF9.	211
Figura 151: Espectro de RMN de H (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF4.....	212
Figura 152: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF4.	212
Figura 153: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl ₃) da amostra BpF4.	213

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Extração alcaloídica em escala analítica.....	72
Esquema 2: Extração alcaloídica em escala preparativa.....	73
Esquema 3: Representação do estudo químico da fração alcaloídica das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Aspectos físico-químicos e rendimentos dos óleos essenciais obtidos das amostras de <i>B. pleiosperma</i> Maas.	83
Tabela 2: Principais constituintes do óleo essencial das folhas de <i>B. pleiosperma</i> determinados por CG-MS.....	83
Tabela 3: Principais constituintes do óleo essencial dos galhos de <i>B. pleiosperma</i> determinados por CG-MS	85
Tabela 4: Principais constituintes do óleo essencial das cascas de <i>B. pleiosperma</i> determinados por CG-MS.	87
Tabela 5: Resultado do teste em difusão em ágar de <i>B. pleiosperma</i>	93
Tabela 6: Dados de RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF3.	119
Tabela 7: Dados de RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF13.	126
Tabela 8: Dados de RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF13.	131
Tabela 9: Dados de RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF15.	138
Tabela 10: Dados de RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF15. ...	146
Tabela 11: Dados de RMN de ¹ H da amostra BpF11.	150
Tabela 12: Dados de RMN de ¹ H da amostra BpF6.	157
Tabela 13: Dados de RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF9.	164
Tabela 14: Dados de RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF9.	167
Tabela 15: Dados RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF9.	173
Tabela 16: Dados de RMN de ¹ H, gHSQC e gHMBC da amostra BpF4.	180
Tabela 17: Classificação dos alcaloides β-carbolínicos.....	181

SUMÁRIO

RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xii
LISTA DE SIGLAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
LISTA DE ESQUEMAS.....	xxiv
LISTA DE TABELAS.....	xxv
1. INTRODUÇÃO.....	30
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	37
2.1 A Família Annonaceae.....	38
2.1.1 Etnobotânica da Família Annonaceae.....	39
2.1.2 Fitoquímica da Família Annonaceae.....	44
2.2 Alcaloides aporfinóides.....	49
2.3 Óleos essenciais na Família Annonaceae.....	52
2.4 Atividade Antimicrobiana na Família Annonaceae.....	57
2.5 O Gênero <i>Bocageopsis</i>	59
2.5.1 A espécie <i>Bocageopsis pleiosperma</i> Maas.....	61
3. OBJETIVOS.....	63
3.1 Geral.....	64
3.2 Específicos.....	64
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	65
4.1 Análises Cromatográficas.....	66
4.1.1 Cromatografia em camada delgada - CCD.....	66
4.1.2 Cromatografia em coluna – CC.....	66
4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica – CLAE.....	66
4.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa – CLAE semi-preparativa.....	67

4.2 Solventes e reagentes reveladores.....	67
4.2.1 Solventes.....	67
4.2.2 Reagentes reveladores	67
4.3 Métodos espectrométricos e espectroscópicos	67
4.4 Outros equipamentos	68
4.5 Material Botânico.....	69
4.5.1 Coleta e identificação do material botânico	69
4.5.2 Processamento do material Botânico	69
4.6 Extração dos óleos essenciais	69
4.7 Análises por GC-MS dos óleos essenciais	70
4.8 Marcha alcaloídica	70
4.9 Análises por ESI-IT-MSⁿ das frações alcaloídicas das folhas, galhos e cascas do tronco de <i>B. pleiosperma obtidas em escala analítica.</i>	73
4.10 Isolamento, caracterização e identificação estrutural das substâncias obtidas em escala preparativa das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	74
4.11 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de <i>Bocageopsis pleiosperma</i> Maas.	77
4.11.1 Modo de preparo dos meios de cultura	77
4.11.2 Preparo do material biológico	78
4.11.3 Preparo das amostras e micro-organismos para inóculo.	78
4.11.4 Teste de difusão em Ágar	78
4.11.5 Teste de diluição seriada em microplaca	79
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.1 Extração dos óleos essenciais de <i>B. pleiosperma</i> Maas.....	82
5.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) do óleo essencial das folhas de <i>Bocageopsis pleiosperma</i>	83
5.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) do óleo essencial das galhos de <i>Bocageopsis pleiosperma</i>	85
5.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) do óleo essencial das cascas de <i>Bocageopsis pleiosperma</i>.....	87
5.5 Constituinte majoritário dos óleos essenciais das folhas, galhos e cascas de <i>Bocageopsis pleiosperma</i>.....	89
5.6. Ensaio antimicrobianos dos óleos essenciais	93
5.6.1. Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar	93
5.6.2. Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de diluição seriada	95

5.7 Análises por ESI-IT-MSⁿ das frações alcaloídicas obtidas em escala analítica de <i>B. pleiosperma</i>	99
5.7.1 Análise espectrométrica da fração alcaloídica das folhas de <i>B. pleiosperma</i>	99
5.7.2 Análise espectrométrica da fração alcaloídica dos galhos de <i>B. pleiosperma</i>	108
5.7.3 Análise espectrométrica da fração alcaloídica das cascas de <i>B. pleiosperma</i>	110
5.8 Análises por ESI-MS e APCI-MS da fração alcaloídica obtida das folhas em escala preparativa de <i>B. pleiosperma</i>	112
5.9 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração alcaloídica das folhas de <i>B. pleiosperma</i> Maas.....	113
5.9.1 Determinação estrutural da amostra BpF3.....	113
5.9.2 Determinação estrutural da amostra BpF13.....	120
5.9.3 Determinação estrutural da amostra BpF15.....	132
5.9.4 Determinação estrutural da amostra BpF11.....	147
5.9.5 Determinação estrutural da amostra BpF6.....	152
5.9.6 Determinação estrutural da amostra BpF9.....	158
5.9.7 Determinação estrutural da amostra BpF4.....	174
6. CONCLUSÕES	185
7. REFERÊNCIAS.....	187
8. ANEXOS 1 (Espectros de RMN de ¹H e mapas de contornos HSQC e HMBC)	203
9. ANEXOS 2 (Publicações).....	214



1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são explorados há anos e as plantas tem representado a principal fonte natural de compostos usados na medicina popular. A humanidade sempre utilizou produtos naturais para aliviar suas dores e moléstias, mesmo sem conhecer os princípios ativos e modos de ação, buscando sempre melhorar suas condições de vida (CRAGG & NEWMAN, 2013; STROBEL et al., 2004). Uma amostra destes procedimentos são os relatos históricos referentes aos sumérios que em torno de 4.000 a.C., já utilizavam o tomilho (*Thymus vulgaris*), o ópio (*Papaver somniferum*), o alcaçuz (*Glycyrrhiza glabra*), a mostarda (*Brassica sp.*) e o elemento químico enxofre, para fins medicinais (BEVILACQUA et al., 2010).

Devido à vasta quantidade de substâncias ativas presentes nas plantas (Figura 1), estas acabam sendo exploradas com a finalidade de descobrir novos fármacos. Como exemplo de sucesso destas práticas, temos a descoberta do taxol (anticâncer), isolado de espécies do gênero *Taxus* e comercializado pela primeira vez como fármaco em 1992; a descoberta da quinina (antimalárico), isolado pela primeira vez das cascas de espécies de *Cinchona* (*C. officinalis*) e comercializada como fármaco em 1820; e a descoberta da morfina, isolada do ópio (*Papaver somniferum*) em 1804, devido as suas propriedades analgésicas e soporíferas, porém sendo comercializada apenas em 1853. Além da morfina, outros alcaloides produzidos pelo ópio são conhecidos, como: a codeína, a tebaína, a narcotina e a papaverina (HOSTETTAMANN et al., 2003; VIEGAS JR. et al., 2006; CRAGG & NEWMAN, 2013).

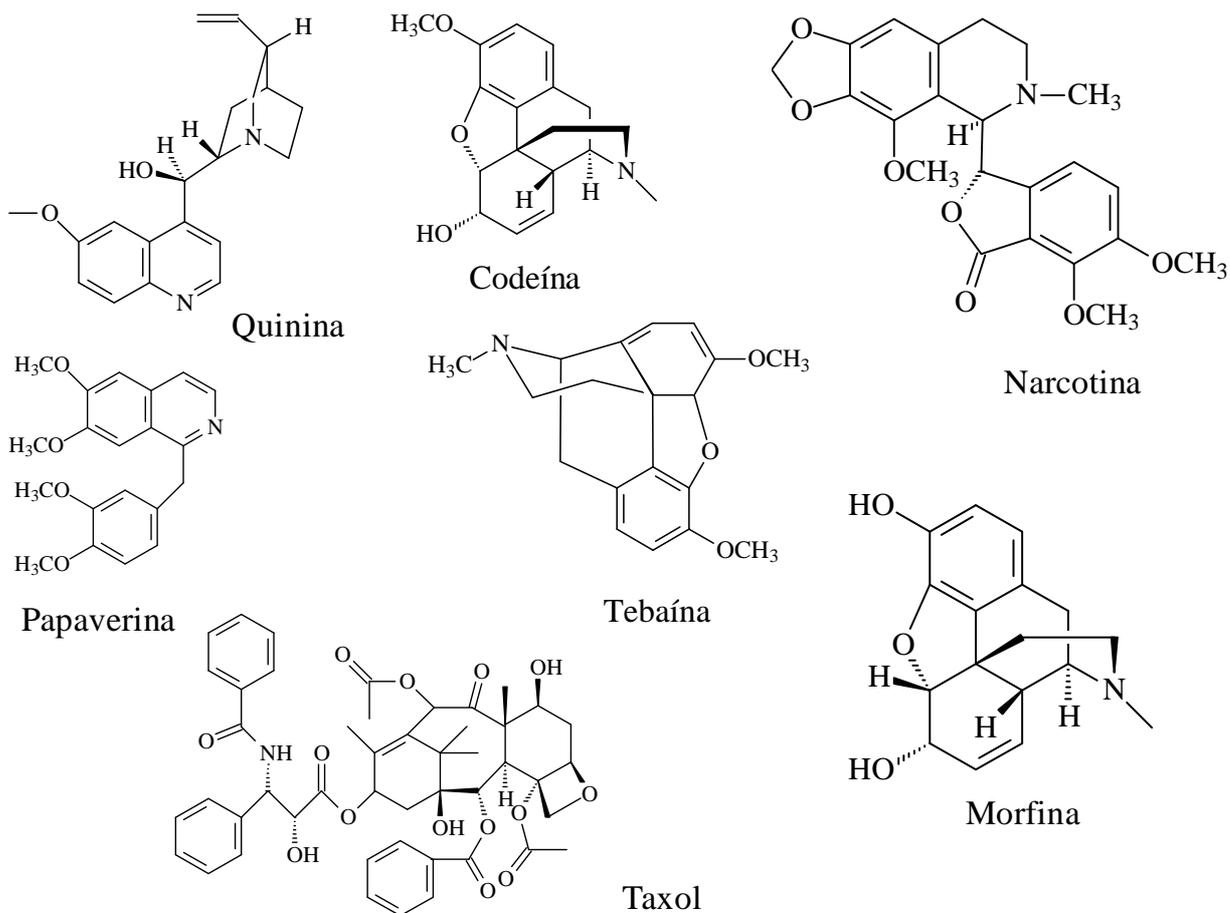


Figura 1: Medicamentos originados de produtos Naturais. Fonte: Hostettamann et al., 2003.

Além dos tipos de substâncias oriundas de plantas, é válido citar a busca por substâncias bioativas produzidas por microrganismos, a qual é considerada mais recente. A descoberta da penicilina por Fleming, em 1929, tornou-se um marco para o início das pesquisas de metabólitos bioativos derivados de microrganismos para tratamento de infecções bacterianas, e essas pesquisas resultaram em um grande número de fármacos com uma variedade de indicações terapêuticas (PUPO et al, 2007).

Dentre esses compostos incluem-se: agentes antibacterianos como a cefalosporina de *Cephalosporium cryptosporium* e tetraciclina de espécies de *Streptomyces*; agentes imunossuppressores, como a rapamicina de *Streptomyces* sp. e ciclosporina de *Beauveria nivea*; agentes redutores do

colesterol sangüíneo, tais como a mevastatina de *Penicillium citrinum* e lovastatina de *Aspergillus terreus*; anti-helmínticos e antiparasitários, tais como a ivermectina de *Streptomyces* sp.; ergotamina um alcaloide utilizado como vasoconstritor isolado de *Claviceps purpúrea*; ácido clavulânico de *Streptomyces clavuligerus*; cloranfenicol de *Streptomyces venezuela* (Figura 2; NEWMAN & CRAGG, 2007; PUPO et al, 2007; DEWICK, 2009; GUIMARÃES et al., 2010).

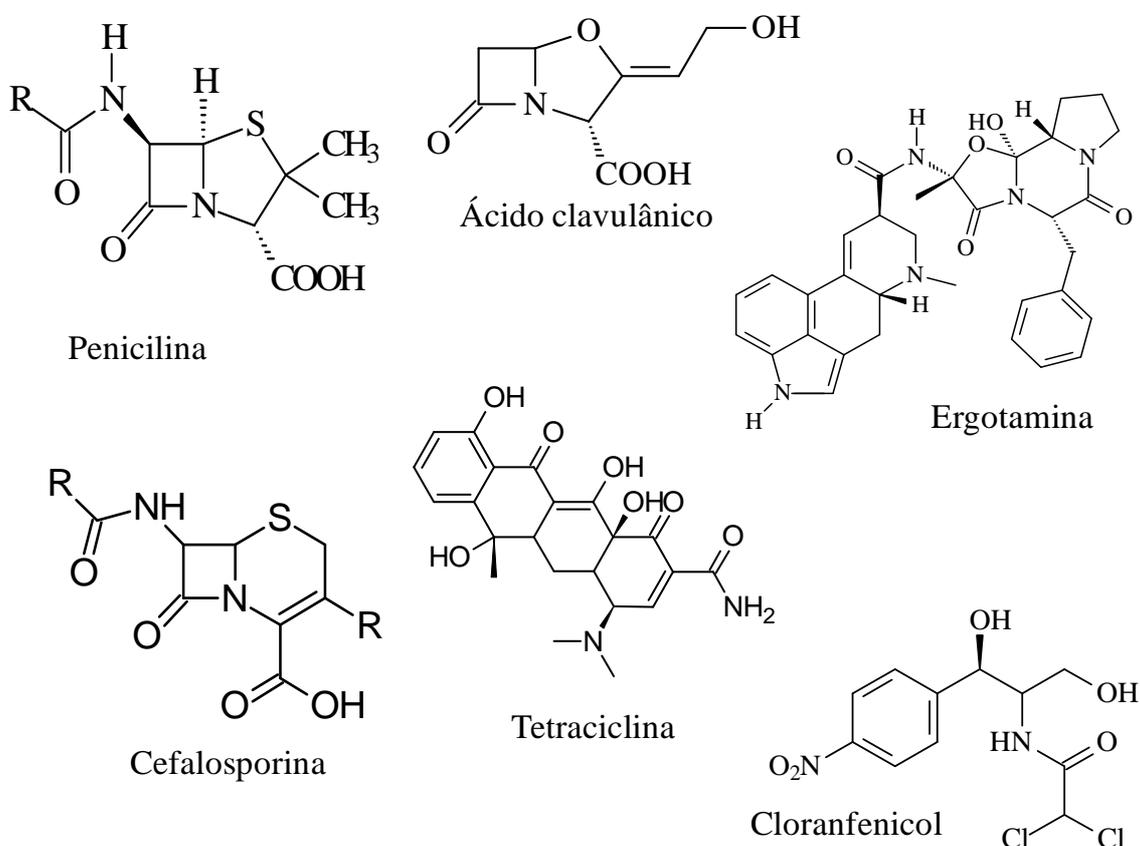


Figura 2: Substâncias oriundas de microrganismos. Fonte: Newman & Cragg, 2007; Pupo et al, 2007; Dewick, 2009; Guimarães et al., 2010

A história mostra que apesar de muitos produtos naturais serem eficazes no tratamento das mais diversas doenças, apenas 6% dos produtos comercializados como fármacos são totalmente naturais, sendo 56% dos fármacos comercializados de origem sintética (Figura 3) (HOSTETTAMANN et

al., 2003). Apesar desta realidade, ainda hoje grande parte da população mundial, principalmente a que reside em países em desenvolvimento, usa extratos ou poções oriundas de plantas para fins medicinais (NODARI et al., 2000; MONTANARI & BOLZANI, 2001; HOSTETTAMANN et al., 2003; KIATKOSKI, 2011). O conhecimento da etnobotânica, transmitido ao longo dos anos, somado à crescente busca pela compreensão da química de produtos naturais, é considerado um fator essencial na descoberta de novas substâncias, sejam elas tóxicas ou terapêuticas (MACIEL et al. 2002; VIEGAS JR. et al., 2006; KIATKOSKI, 2011).

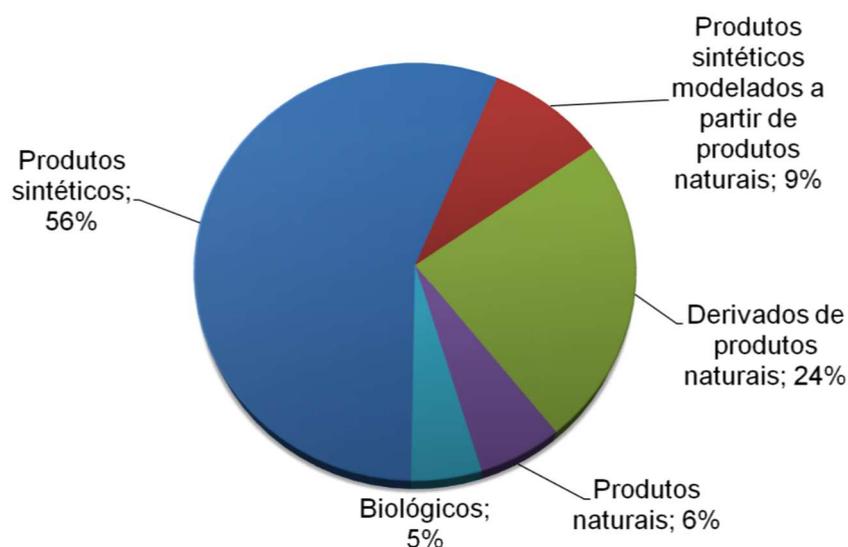


Figura 3: Índice de aplicabilidade dos produtos naturais como fármacos.

Fonte: Hostettamann et al., 2003.

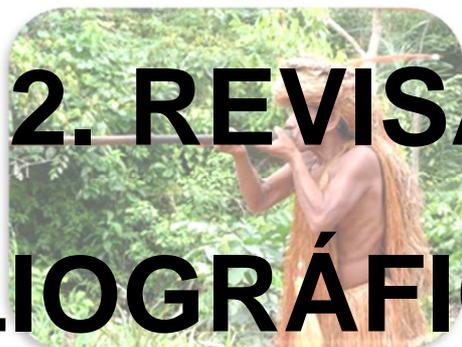
A floresta amazônica, a maior floresta tropical existente no mundo (6 milhões de Km²), possui 1/3 das florestas tropicais úmidas do planeta. No território brasileiro, a área verde compreende 60% da floresta amazônica. No entanto, somente as regiões do Tapajós, Xingu e Belém são totalmente brasileiras e consideradas áreas endêmicas. Estas áreas endêmicas restringem

tipos de organismos para determinadas zonas geográficas, e são importantes por serem consideradas como as menores unidades geográficas para análise de biogeografia histórica com diversos fatores responsáveis pela sua natureza e extensão. O Brasil é considerado o único país que possui áreas representativas de todas as regiões de endemismo (DIRZO & RAVEN, 2003; DA SILVA et al., 2005).

Estima-se que na Região Amazônica existam pelo menos 40.000 espécies de plantas, das quais aproximadamente 1200 sejam comercializadas como plantas medicinais, demonstrando a importância que esta floresta possui como maior reservatório natural da diversidade vegetal do planeta (OLIVEIRA & AMARAL, 2004; DA SILVA et al., 2005).

Em meio a esta grande diversidade, encontram-se espécies pertencentes à família Annonaceae. Esta família compreende aproximadamente 2500 espécies, cuja importância medicinal, justifica as abordagens fitoquímicas realizadas nos últimos anos (SILVA et al., 2012). Como resultado destas investigações, diversas informações sobre a química da família Annonaceae são conhecidas, podendo-se destacar o amplo conhecimento adquirido sobre a química de alcaloides, terpenóides e acetogeninas na família (LEBOEUF et al., 1982). Diversos representantes destas classes tiveram suas atividades biológicas reconhecidas, destacando-se a atividade antitumoral, antimicrobiana e antiparasitária (ALALI et al., 1999; COSTA et al., 2006 e 2008). Apesar de ser uma família bastante explorada do ponto de vista fitoquímico, existem gêneros com pouco ou nunca estudado, como é o caso do gênero *Bocageopsis*, com apenas uma espécie submetida a alguma investigação fitoquímica (OLIVEIRA, 2012).

Visando contribuir para o conhecimento químico e biológico do gênero *Bocageopsis*, o presente trabalho tem como objetivo, realizar o estudo dos óleos essenciais e das frações alcalóidicas (folhas, cascas do tronco e galhos) de *B. pleiosperma*, para o conhecimento da sua composição de alcaloides e terpenóides, e em busca de novos agentes com potencial antimicrobiano.



2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A Família Annonaceae

A classificação filogenética caracteriza as Annonaceae como pertencente ao grupo de plantas denominado Angiosperma. Tal família localiza-se no subgrupo Magnoliidae, e é descrita como a mais diversificada família da ordem das Magnoliales, sendo esta ordem composta por seis famílias (Annonaceae, Degeneriaceae, Eupomatiaceae, Himantandraceae, Magnoliaceae e Myristicaceae), 160 gêneros e mais de 3000 espécies. Os membros das Magnoliales ocorrem como árvores e arvoretas, e raramente como lianas (COSTA, 2009a; BREMER et al., 2009; AMINIMOGHADAMFAROUJ et al., 2011; MAAS et al., 2011; CHATROU et al., 2012a).

A família Annonaceae é composta por cerca de 2500 espécies, distribuídas em 130 gêneros. Os indivíduos desta família normalmente se apresentam como árvores, arbustos e trepadeiras, sendo sua distribuição geográfica do tipo pantropical (Figura 4), com cerca de 900 espécies (40 gêneros) na região dos neotrópicos (RICHARDSON et al., 2004; CHATROU et al., 2004). No Brasil são registradas 260 espécies em regiões de endemismo que se distribuem aproximadamente em 26 gêneros (MAAS et al., 2001). Uma característica marcante da família Annonaceae é o forte odor característico exalado quando seu tronco ou ramos são cortados. Além da presença de fibras longas e resistentes nas cascas (conhecida popularmente como envira), a presença de folhas dísticas e pelas marcas de chamuscas quando feito um corte transversal no tronco (RIBEIRO et al., 1999).



Figura 4: Distribuição geográfica da família Annonaceae.

Fonte: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv. Acessado em 02/10/2013.

2.1.1 Etnobotânica da Família Annonaceae

Esta família representa um importante papel na economia de vários países devido à comercialização de seus frutos e produtos derivados, além da atividade farmacológica de algumas espécies, e de sua aplicabilidade como matéria-prima para fabricação de cosméticos e na indústria de perfumes e aromatizantes (ISMAN, 2006; NASCIMENTO et al., 2003).

Os frutos comestíveis são exemplificados (Figura 5), pelas espécies dos gêneros *Annona* (graviola, pinha e cherimolia), *Rollinia mucosa* (biribá) e *Asimina* (pawpaw). Destas espécies é importante ressaltar a *Rollinia mucosa*, devido sua origem na Amazônia (MURILLO-A, 2001; COSTA, 2009a; SOBRINHO, 2010; CHATROU et al., 2012b). Este gênero foi incorporado ao gênero *Annona* devido estudos moleculares e análises filogenética (RICHARDSON et al., 2004; RAINER, 2007; CHATROU et al., 2012a).

Outro fruto interessante é oriundo da espécie *Annona diversifolia* conhecido popularmente na região mexicana como ilama (Figura 5), interessante pela coloração vermelha de sua polpa, uma exceção aos padrões conhecidos

sobre os frutos provenientes de espécies da família Annonaceae no Brasil (SOBRINHO, 2010).

As espécies dos gêneros *Annona* (Figura 5) ocorrem na América Central e na parte norte da América do Sul. No Brasil os estados da Bahia e São Paulo são os maiores produtores e exportadores de seus frutos e polpas. Um híbrido das espécies *A. cherimolia* e *A. squamosa*, conhecido popularmente como atemóia, teve sua comercialização nos mercados brasileiros na década de 1980. Esta espécie é cultivada nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Por se tratar de uma mistura entre duas espécies, exige a incorporação de tecnologias diferenciadas para o aumento de produção, qualidade e sustentabilidade. Esta fruta tem algumas vantagens que estão fazendo toda diferença na hora da comercialização, devido apresentar um menor número de sementes e conseqüentemente mais polpa, tem um melhor tempo de prateleira pós-colheita, apresenta ausência de rachaduras e um mecanismo melhor de defesa contra pragas e doenças (LOBÃO et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2006; SOBRINHO, 2010).

Algumas sementes são fonte para óleos essenciais que podem ser utilizados na produção de óleos comestíveis e sabão. Madeiras do gênero *Annona* possuem aplicabilidade na produção de papel. As flores perfumadas da espécie *Cananga odorata*, são utilizadas como matéria-prima para produção de perfumes (LEBOEUF et al., 1982; PAULINHO-NETO & OLIVEIRA, 2006; BENINI et al., 2012; CHATROU et al., 2012b).

Esses usos comerciais e domésticos representam certas aplicabilidades de partes de espécies que compõem a família Annonaceae, todavia algumas espécies também possuem um vasto uso na medicina natural, aplicabilidade na

indústria farmacêutica e agrícola, devido apresentarem atividades antimicrobianas, inseticidas, citotóxicas e antitumoral já descritas em literaturas (STÉVIGNY et al., 2005; TORRES et al., 2007; BOYOM et al., 2011).

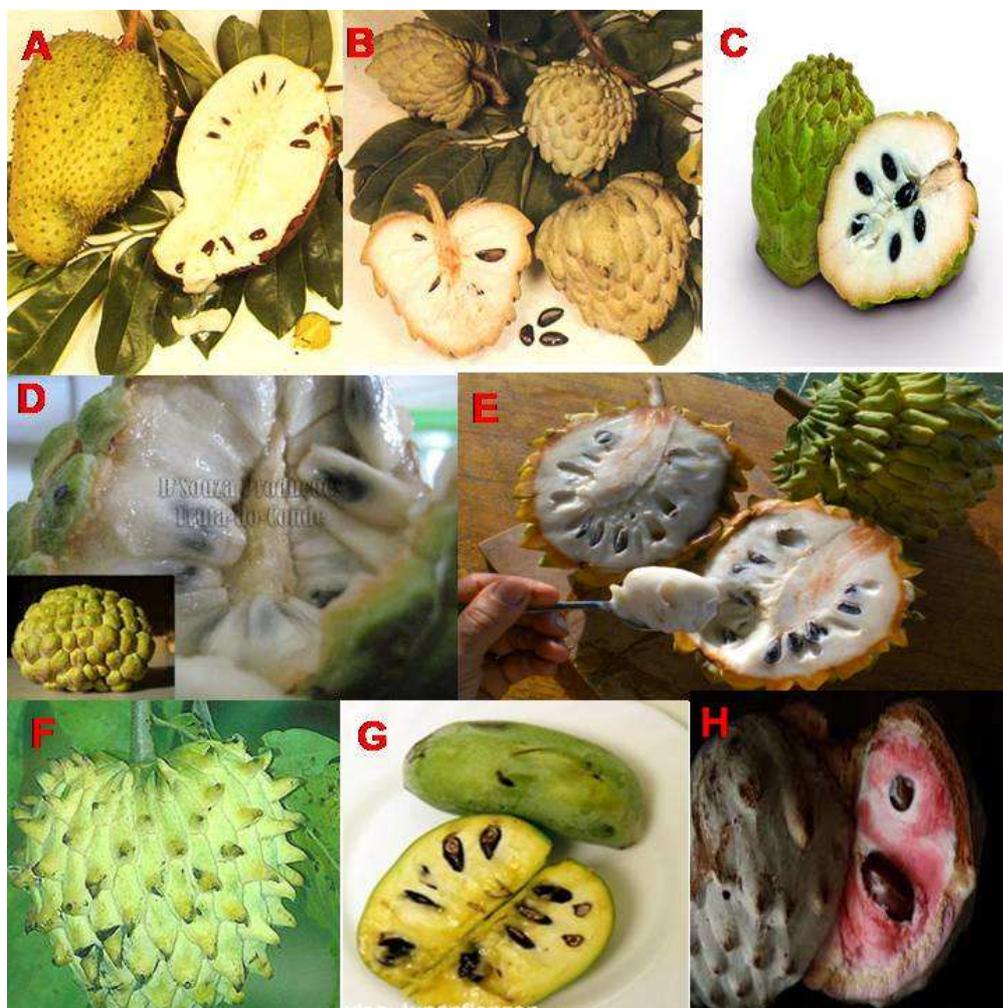


Figura 5: Frutas comestíveis pertencentes à família Annonaceae: (A) *A. muricata* (graviola)¹; (B) *A. cherimóia*, Mill (cherimóia)²; (C) Híbrido de *A. squamosa* e *A. squamosa* (atemóia)³; (D) *A. squamosa* (pinha, ata ou fruta-do-conde)⁴; (E) *R. deliciosa* (biriba)⁵; (F) *R. mucosa* (biriba)⁶; (G) *Asimina* (*pawpaw*)⁷; (H) *A. diversifolia* (ilama)⁸.

Fonte: <http://www.flipper.diff.org/app/items/39581>¹; <http://www.prota4u.info>². Acessado em 03/05/2013; <http://www2.zaffari.com.br>³; <http://www.belezadacaatinga.blogspot.com.br>⁴. Acessado em 03/05/2013; www.seedvill.com⁵. Acessado em 02/05/2013; <http://www.fazendacitra.com.br>⁶. Acessado em 03/05/2013; <http://www.koju.de/pflanzen>⁷. Acessado em 03/05/2013; <http://www.picasaweb.google.com>⁸. Acessado em 03/05/2013.

Diversas espécies são utilizadas na medicina tradicional, dentre estas se destacam as espécies dos gêneros *Annona*, *Xylopia* e *Rollinia* por seu uso frequente na Região Amazônica. Como exemplo, a espécie *A. squamosa* (fruta-

do-conde) tem suas folhas pulverizadas (Figura 6) empregadas no tratamento de úlceras e feridas, e as cascas como um tônico contra diarreia (YANG et al., 2002; COSTA, 2009a); a espécie *X. aethiopica* (Figura 6) é utilizada para dores no estômago, bronquite e disenterias (BOYOM et al., 2003); e a espécie *A. mucosa* (biribá) tem várias partes usadas no tratamento de tumores (KUO et al., 2001).

O suco do fruto de *Annona muricata* Liin é utilizado como diurético e o pó de seus frutos triturados, possui aplicabilidade no tratamento de disenterias (CONSOLACION et al., 2012). Os frutos secos de *Xylopia aethiopica* quando cozidos são utilizados para o tratamento de bronquite, asma, artrite, reumatismo, dores de cabeça e cólicas, além de serem utilizados como tabaco na Libéria (BELE et al., 2011; OBIRI et al., 2014). O óleo essencial de *X. parviflora* (Figura 6) é utilizado na África como aromatizante em molhos e bebidas. A raiz cozida é usada para curar distúrbios estomacais. As cascas têm aplicabilidade analgésica e antiespasmódica e suas folhas são aplicadas no tratamento da malária (WOGUEM et al., 2014).

Algumas utilizações empíricas foram relatadas por Schultes (1993) e Adams et al. (2007) referentes ao gênero *Unonopsis*, onde menciona-se o uso de *U. veneficiorum* (Figura 6) por índios da floresta Amazônica para o tratamento de demência senil em pacientes idosos, utilização como veneno em pontas de flechas e como antifertilizantes. As folhas pulverizadas de *U. stipitata* são utilizadas na comida daqueles que apresentam dificuldade na fala (SILVA et al., 2014). A espécie *U. lindmanii* apresentou atividade citotóxica contra células tumorais do tipo KB (linhagem de células tumorais formadas de queratina), pulmão e tumor de cólon de útero (SIQUEIRA et al., 1998).

Na Região Amazônica, espécies de Annonaceae são popularmente conhecidas como “cargueiros”; devido suas cascas serem resistentes, possuindo assim aplicabilidade para o suporte no transporte de cargas, atividade bastante comum nessa região devido à atividade agrícola e madeireira em vilas distantes dos centros comerciais. Entre as espécies com essa aplicabilidade destacam-se *Bocageopsis* spp., *Fusae longifolia*, *Guatteria megalophylla*, *G. stipitata*, *Oxandra polyanthia*, *O. lanceolata*, *Xylopia aethiopia* e *X. villosa* (KESSLER, 1993; SÁNCHEZ, 1997; MURILLO & RESTREPO, 2000).

De acordo com Revilla (2002) o uso na confecção de caibros e em linhas de construção são bastante comuns com madeiras de *X. amazonica* F. E. Fries. Felfili e colaboradores (2010) ressaltam o uso de *A. coriácea* na fabricação de vigas, caibros, batentes de portas, janelas, molduras, lâminas, postes, moirões e dormentes; *A. crassiflora* tem sua madeira aplicadas na produção de caixotarias, miolo de portas e painéis; as madeiras de *X. aromatica* (Figura 6) são aplicadas na confecção de forros e caixas leves; *X. sericea* tem suas madeiras aplicadas na produção de cabos de ferramentas e de cepas para tamancos e escovas.

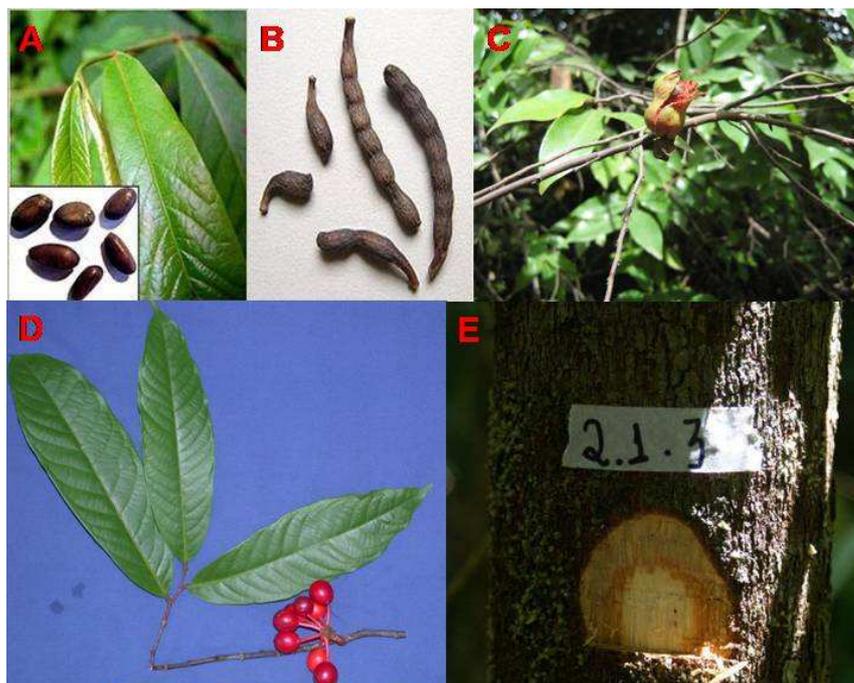


Figura 6: Algumas espécies pertencentes a família Annonaceae: (A) *A. squamosa*¹; (B) *X. aethiopicus*²; (C) *X. parvilifera*³; (D) *U. veneficiorum*⁴; (E) *X. amazonica*⁵

Fonte: <http://portuguese.alibaba.com/product-tp/annona-squamosa>¹. Acessado em 10/12/2013; http://linebylineproductions.com/My%20Spices/negro_pepper.htm². Acessado em 10/12/2013; <http://www.eastafricanplants.senckenberg.de/root>³. Acessado em 10/12/2013; <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metastats/view/17962>⁴. Acessado em 10/12/2013; <http://www.kew.org/science/tropamerica/imagetdatabase>⁵. Acessado em 10/12/2013.

2.1.2 Fitoquímica da Família Annonaceae

A busca por constituintes químicos de espécies vegetais é algo imprescindível para o conhecimento fitoquímico. Esse interesse pelos constituintes químicos fez com que aumentasse a pesquisa em relação à química de produtos naturais. Essa ampliação fitoquímica foi acompanhada pelo avanço de técnicas que proporcionam isolamento e análise dos compostos bioativos em plantas, além da facilidade de busca por informações em vários sistemas de bases de dados (SIMÕES, 2000a; NIERO et al, 2003; KIATKOSKI, 2011).

Em algumas espécies da família Annonaceae, tem sido encontrado alcaloides, principalmente aqueles derivados do esqueleto isoquinolínico,

terpenóides e acetogeninas (Figura 7), estas consideradas como marcadores químicos, pois são encontradas somente em espécies de Annonaceae. Os gêneros mais estudados fitoquimicamente são *Annona*, *Monodora*, *Rollinia*, *Uvaria*, *Xylopia* e *Duguetia*. O gênero *Annona* possui relatos na literatura relativos ao isolamento de numerosas acetogeninas tetra-hidrofurânicas com potencial anti-parasitário (LEBOEUF et al., 1982; BERMEJO et al., 2005; RINALDI, 2007).

As acetogeninas de Annonaceas são metabolitos secundários produzidos pela via do ácido acético, derivadas de ácido graxos de cadeia longa, podendo conter de 35 a 37 átomos de carbono, sustentando um anel γ -lactônico terminal, anéis tetra-hidrofurânicos ou tetra-hidropirânicos, epóxidos ou ligações duplas, e variado grau e oxigenação. Essas substâncias são conhecidas por possuírem capacidade de inibir o complexo mitocondrial I (NADH-ubiquinona redutase) e indutores de apoptoses celulares. Elas apresentam interessantes atividades biológicas, como: citotóxica, pesticida, vermícida, abortiva, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antimalárica (ALALI et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2003; ISMAN, 2006; DERBRÉ et al., 2008).

Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas (Figura 8), mas também encontrados em menor quantidade em micro-organismos e animais. Eles são classificados de acordo com o aminoácido precursor (ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, histidina, ácido antranílico e triptofano), sendo alguns obtidos através de reações de transaminação (DEWICK, 2009).

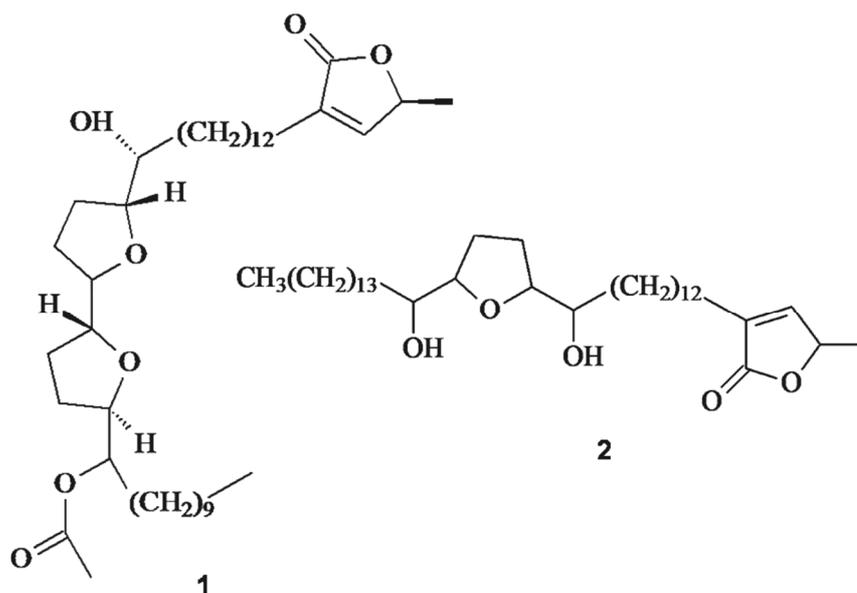


Figura 7: Acetogeninas isoladas de espécies da família Annonaceae. Fonte: Nascimento et al., 2003, Alali et al., 1999.

Em estudos realizados com as espécies *Duguetia panamensis* e *D. glabriúscula*, foram obtidas respectivamente as substâncias (Figura 8) 2,4,5-trimetoxilestireno (7) e (+)-10b,14-allo-aromadendranodiol (8), que apresentaram baixa toxicidade e atividade tumoral (7), além de baixa atividade antimicrobiana (8) (SIQUEIRA et al., 2001).

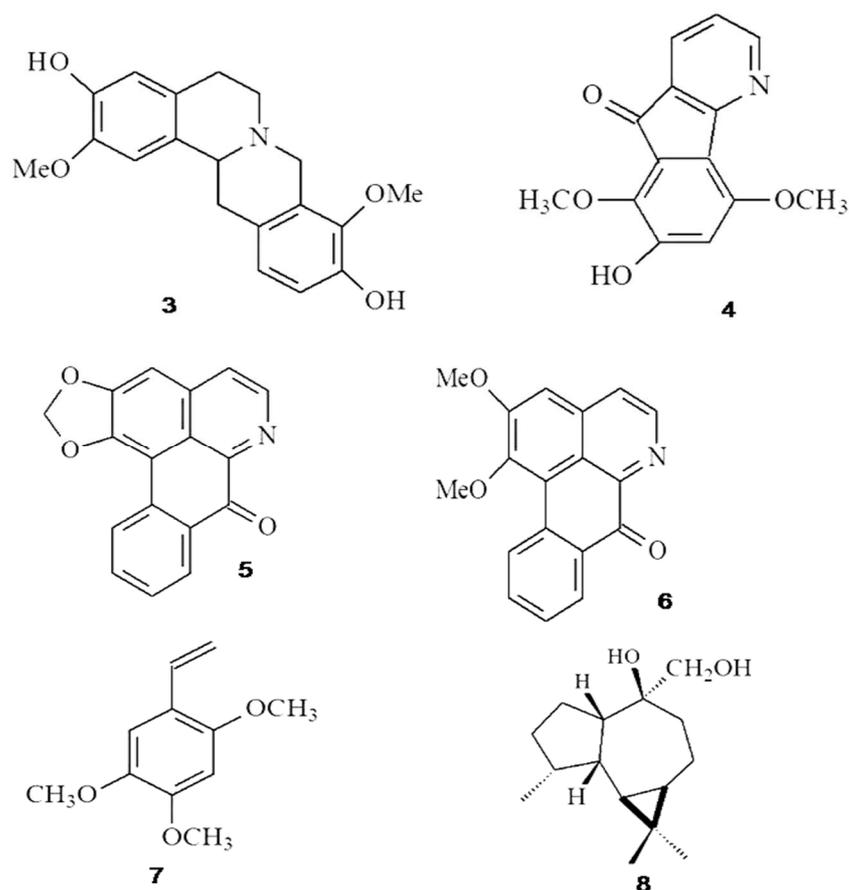


Figura 8: Substâncias isoladas de espécies da família Annonaceae: (3) discretamina¹, (4) azalhurenona², (5) liriodenina³, (6) lisicamina⁴, (7) 2,4,5-trimetoylestireno⁵, (8) (+)-10b,14-alloaromadendranodiol⁶. Fonte: Almeida et al., 2007¹, Silva et al., 2012², Siqueira et al., 1998^{3,4}, Siqueira et al., 2001^{5,6}.

Estudos realizados por Lúcio (2011) com a espécie *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith levaram ao isolamento do alcaloide azafenantreno sampangina que possui atividades como: antifúngica, antimalárica, antibacteriana e antitumoral frente a células HL-60 (leucemia mielóide aguda) e células humanas malignas de melanona (PETERSON et al., 1992; KLUZA et al., 2003; AGARWAL et al., 2008).

Correa e colaboradores (2006) avaliaram a atividade antileishmânica de alguns alcaloides isolados das folhas de *Guatteria dumetorum*, dentre os quais se destacaram os alcaloides: isodomesticina (9), norisodomesticina (10), nantenina (11) e neolitsina (12). Essa atividade foi relacionada pelos autores à

presença de substituintes metilendióxido nas posições 1 e 2 (anel A) de cada estrutura (Figura 9).

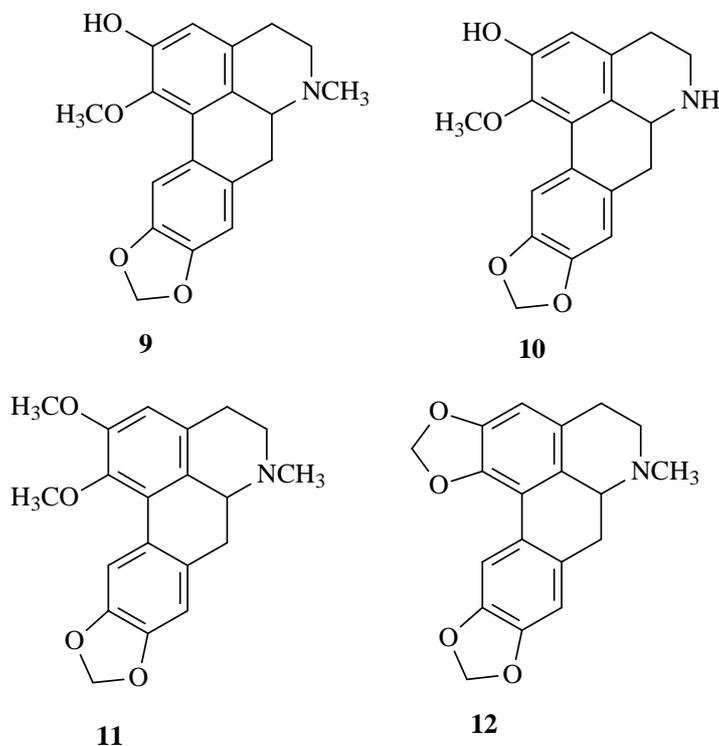


Figura 9: Alcaloides isolados de *Guatteria dumetorum*: isodomecicina (9), norisodomecicina (10), nantenina (11) e neolitsina (12). Fonte: Correa et al., 2006.

Outros tipos de substâncias como carboidratos, lipídios, aminoácidos, proteínas e polifenóis também podem ser encontrados nessa família. Estudos relatam a importância econômica dos açúcares, lipídios e proteínas encontrados em *Annona* (FARNSWORTH et al., 1974; LEBOEUF et al., 1982).

Uma classe de alcaloides muito encontrada nessa família é a dos alcaloides aporfínicos ou aporfinoídes, que possuem algumas atividades antitumorale antimicrobiana (SILVA et al., 2007; ANISZEWSKI, 2007; COSTA, 2009 a e b).

2.2 Alcaloides aporfinóides

Os alcaloides aporfinóides (13), ou aporfínicos (Figura 10) são um grupo extenso e ainda em fase de ampliação de alcaloides isoquinolínicos, possuindo até o momento mais de 500 compostos isolados de mais de 90 gêneros de plantas ou sintetizados (ZANIN & LORDELLO, 2007). Esses alcaloides constituem-se de bases tetracíclicas (Figura 9), incluem também os oxaporfínicos (14), que possuem esqueleto aromático e a presença de um grupo carbonílico no carbono sete. Estes compostos são formados pelo acoplamento direto dos anéis aromáticos A e D (Figura 12) do núcleo benziltetraidroisoquinolino (SILVA et al., 2007).

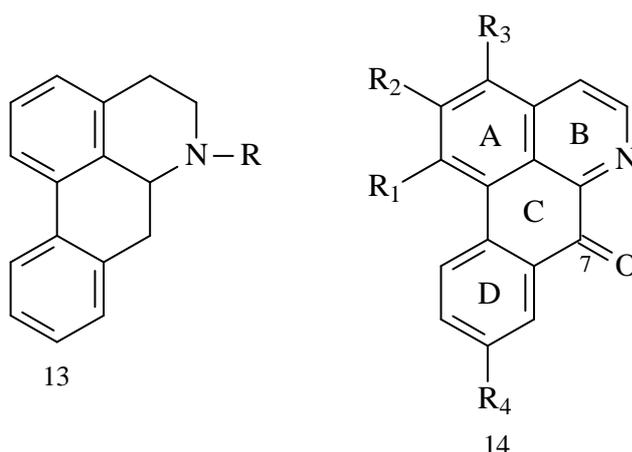


Figura 10: Estrutura básica de alcaloides aporfínicos(13) e oxaporfínicos (14). Fonte: Silva et al., 2007.

Na família Annonaceae os alcaloides aporfínicos são encontrados como principais produtos biossintéticos, além de serem encontrados em outras famílias como Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, entre outras (STÉVIGNY et al., 2005).

Na literatura existem diversas atividades biológicas descritas para a classe dos alcaloides isoquinolínicos, tais como: antifúngica, antiinflamatória,

antiviral, antioxidante, antimicrobiana e citotóxica (ANISZEWSKI, 2007; COSTA et al., 2013a). Na Figura 11 são apresentados os alcaloides *O*-metilmoschatolina (15) e guatterriopsina (16), cujos respectivos potenciais citotóxico (SILVA et al., 2007) e antimicrobiano (COSTA, 2009a) foram descritos na literatura.

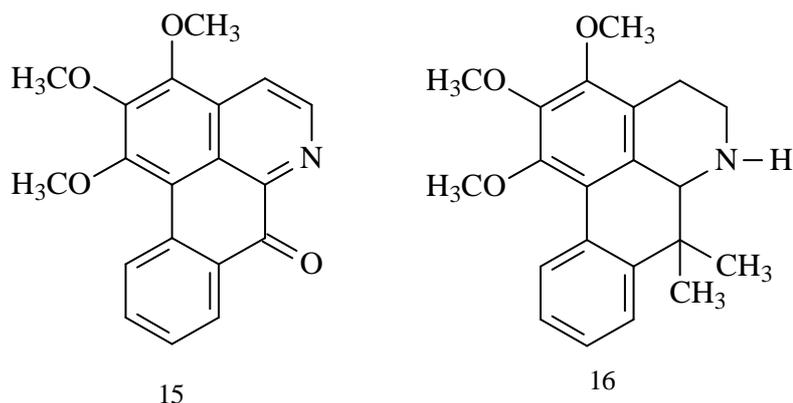


Figura 11: Alcaloides aporfínicos com potencial citotóxico e antimicrobiano, *O*-metilmoschatolina (15) e guatterriopsina (16). Fonte: Silva et al., 2007; Costa, 2009a.

Os alcaloides aporfínicos têm sua origem biossintética (Figura 12) no aminoácido *L*-tirosina, que sofre inicialmente duas reações paralelas: descarboxilação, seguida de oxidação para formação de dopamina e transaminação seguida de descarboxilação, para originar o 4-hidroxifenil acetaldéido. Em seguida, ocorre a condensação dos dois produtos da descarboxilação através da reação do tipo Mannich, originando o alcaloide benzilisoquinolínico (*S*)-norcoclaurina (DEWICK, 2009).

Ao ocorrer a *O*-metilação da (*S*)-norcoclaurina forma-se a (*S*)-coclaurina, esta sofre *N*-metilação e fornece a (*S*)-*N*-metilcoclaurina. Depois dessas etapas, o anel D sofre uma oxidação formando a (*S*)-3'-hidroxi-*N*-metilcoclaurina, que sofre uma *O*-metilação formando a (*S*)-reticulina (DEWICK, 2009; LÚCIO, 2011). A (*S*)-reticulina é precursora dos alcaloides aporfínicos, protoberberínicos e

benzofenantridinas, que são formados por acoplamentos oxidativos (STÉVIGNY et al., 2005; LÚCIO, 2011).

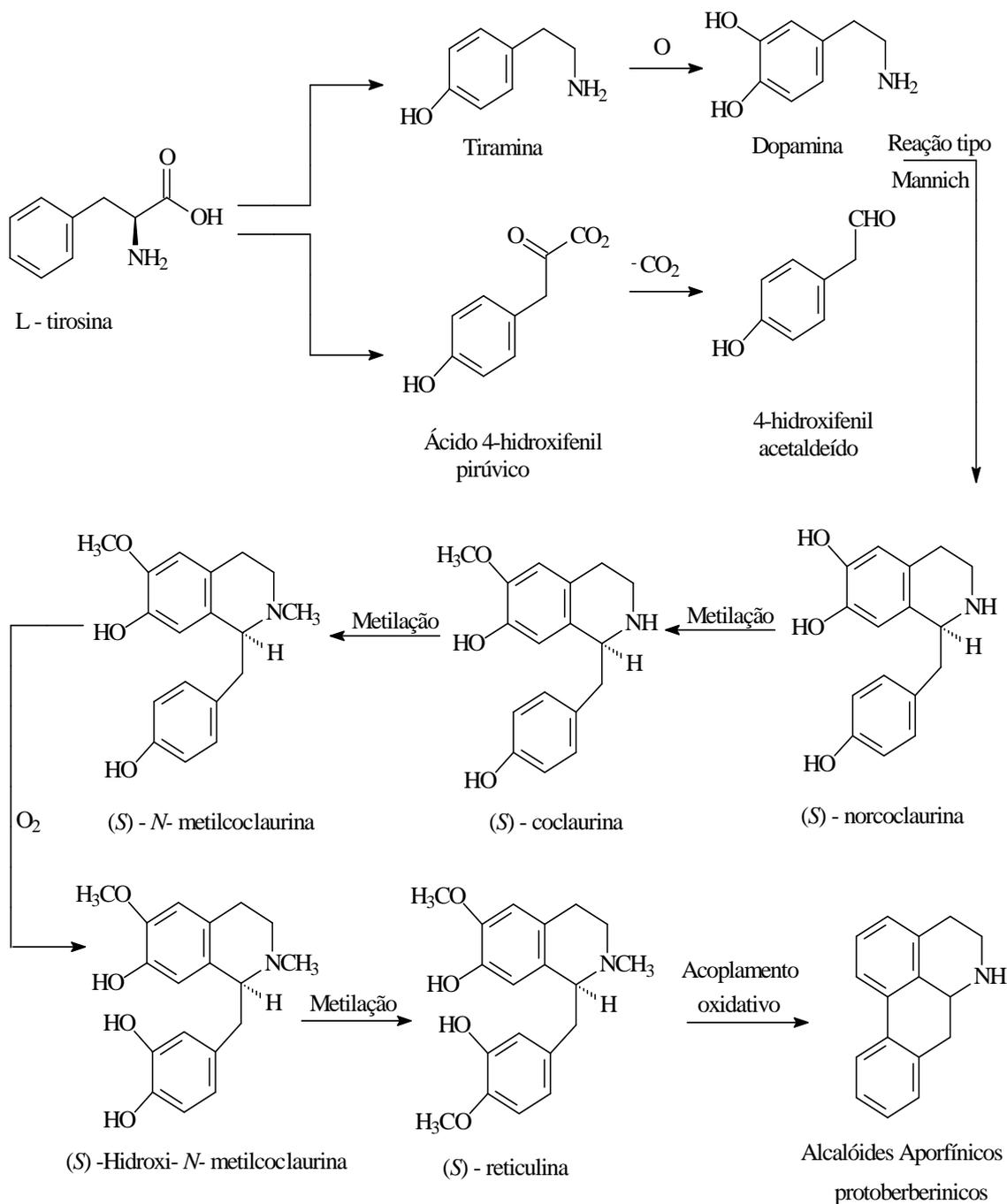


Figura 12: Rota biossintética dos alcalóides aporfínicos. Fonte: Dewick, 2009.

Além dos alcaloides aporfínicos derivados do esqueleto benzilisoquinolínico (17), outros alcaloides (18, 19 e 20) frequentes na família Annonaceae são oriundos desse esqueleto (Figura 13).

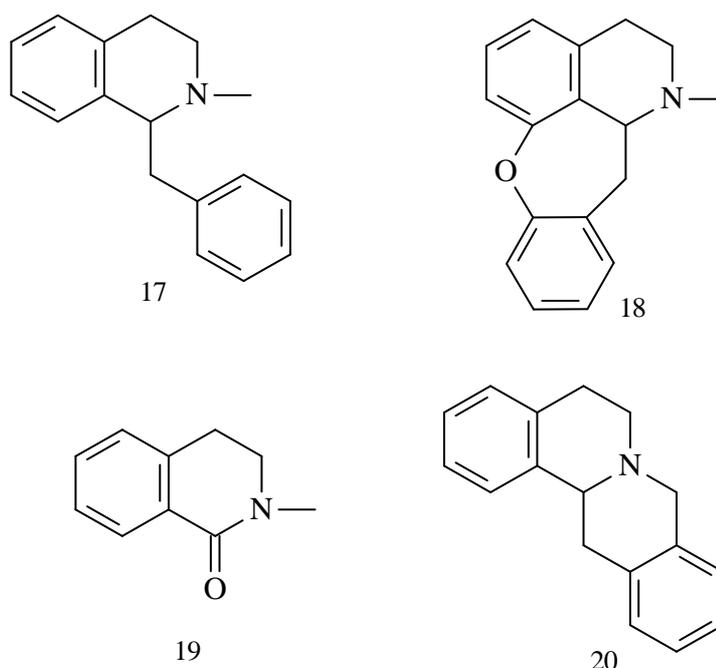


Figura 13: Substâncias derivadas do alcaloide benzilisoquinolínico (17), cularina (18), isoquinolona (19), protoberberina (20). Fonte: Cavé, 1985.

2.3 Óleos essenciais na Família Annonaceae

Os óleos essenciais são produtos lipossolúveis, voláteis e viscosos obtidos de plantas e podem ou não exalar odor. São componentes responsáveis pelo aroma e fragrância das plantas, e estão presentes nas suas cascas, caule, flores, folhas, frutos, rizomas e sementes. São constituídos principalmente de mistura de substâncias de natureza terpênica e arilpropanóide, incluindo derivados alcoólicos e aldeídos. Comercialmente, possuem aplicabilidade na indústria farmacêutica, cosméticos e inseticidas (SIMÕES et al., 1999; SIMÕES & SPITZER 2000b; SARTORATTO et al., 2004; SHAALAN et al., 2005).

Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isoprenos (Figura 14): hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40) (DEWICK, 2009; FLORÃO, 2006).

Tem sua origem a partir de duas vias biossintéticas denominadas, via do mevalonato e via deoxixilulose fosfato, que por conversão enzimática formando o difosfato de isopentenil (IPP) e o dosfosfato de dimetilalil (DMAPP), ambos com cinco unidades de carbonos (Figura 14). A partir desses ocorre à combinação de unidades de isopreno formando as moléculas mais simples: geraniol (C10), farnesol (C15) e geranilgeraniol (C20) (Figura 14) e as mais complexas esqualeno (C30) e fitoene (C40). Nas moléculas mais simples as ligações entre as unidades de isoprenos são descritas como cabeça-cauda e as mais complexas tem no centro de uma das moléculas ligações do tipo cauda-cauda (DEWICK, 2009).

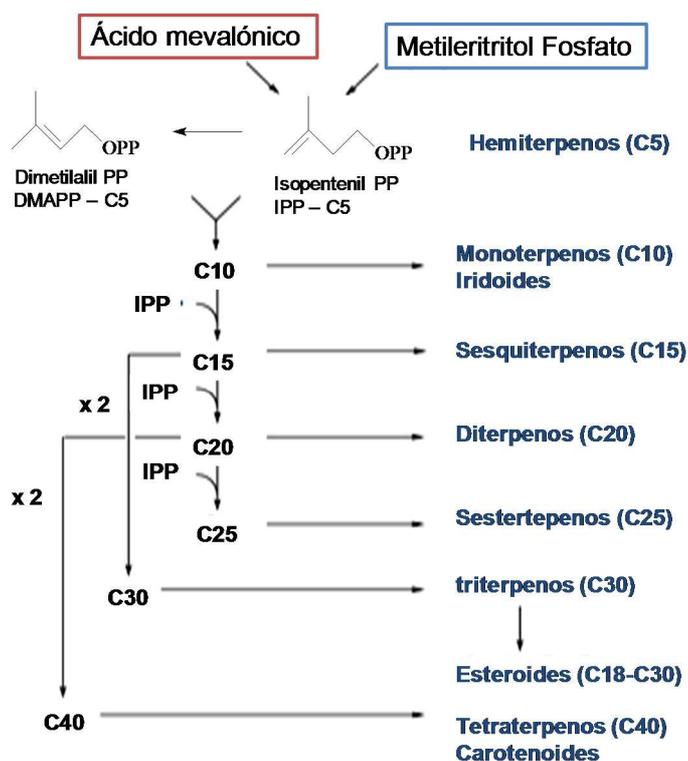


Figura 14: Rotas biossintéticas para formação de terpenos. Dewick, 2009.

Em estudos realizados por Costa (2009a) verificou-se que as espécies *Guatteria hispida*, *G. blepharophylla* e *G. friesiana* possuíam mais de 90% de sesquiterpenos, e que os principais constituintes (Figura 15) eram: o óxido de cariofileno (21) com 69,25% para *G. blepharophylla*; o β -eudesmol (22) com 51,60%, γ -eudesmol com 23,70% e o α -eudesmol (23) com 14,56% para a *G. friesiana*, e o β -pineno (24) com (38,18%), o α -pineno (25) com (30,77%) e a β -cariofileno com (20,59%) *G. hispida*.

Valter e colaboradores (2008) apresentaram um estudo sobre a variação química em óleos essenciais presentes nas folhas de alguns indivíduos de *Duguetia furfuracea*, os quais apresentaram como constituintes majoritários o β -felandreno (42,2%), o sabineno (25,1%) e o biciclogermacreno (29,1%).

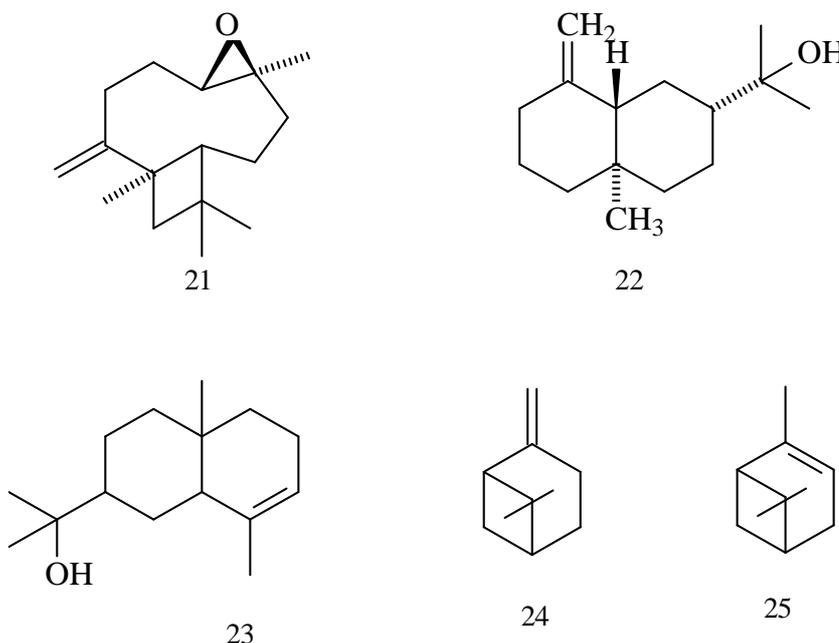


Figura 15: Compostos majoritários identificados em espécies de *Guatteria*. Fonte: Costa et al., 2009a; Dewick, 2009.

Para a obtenção desses óleos existem inúmeras técnicas de extração: destilação a vapor, hidrodestilação, extração com solvente orgânico, destilação assistida por microondas, hidrodifusão de microondas e gravidade, extração de

solvente a alta pressão, extração supercrítica com CO₂, extração ultra-sônica e extração de microondas sem solvente. Essas técnicas devem estar de acordo com os conhecimentos químicos sobre a matéria-prima utilizada, pois suas propriedades físico-químicas podem sofrer alterações de acordo com o método utilizado (SANTOS et al., 2004; OKOH et al., 2010). No entanto, os métodos mais utilizados são:

I - Extração hidrodestilação: é o método mais comum para extração dos óleos essenciais. Nele o material vegetal é colocado completamente imerso em água destilada, sempre observando a temperatura para evitar a perda de compostos mais sensíveis. Nesta técnica o vapor faz com que ocorra a quebra das paredes celulares, fazendo com que o óleo que está entre as células acabe evaporando junto com a água. O óleo depois é arrefecido e separado por diferença de densidade. Depois que o óleo é recolhido, a água que sobra é chamada hidrolato, e pode reter compostos com propriedades terapêuticas. Em extrações em escala analítica o aparelho utilizado é o Clevenger (SIMÕES et al., 2000a; DIAS, 2013; WOGUEM et al., 2014).

II - Extração com solvente: neste método as partes da planta mais utilizadas são as flores e as folhas aromáticas. Este é um método de extração onde utiliza-se solvente orgânico com baixo ponto de ebulição, que varia de 60 °C a 80 °C (pentano, éter de petróleo, benzeno, cloro de metileno, etc.). Essa técnica apresenta a vantagem por consumir pouca energia e água, pois é realizada sob condições de temperatura e pressão leve (REIPERT et al., 2011; DIAS, 2013).

III - Extração com método de enfloração: é utilizado como matéria-prima para extração, das pétalas de flores delicadas, como violeta e jasmim. Esta

técnica é relativamente cara, devido exigir muita mão-de-obra. Nesta extração as pétalas são colocadas em molduras de vidro untadas com gordura vegetal. Nessa moldura irão se impregnar os compostos aromáticos, originando um produto denominado de pomada floral, muito utilizado na indústria farmacêutica como pomada para massagem (DIAS, 2013).

IV - Prensagem a frio: este método de extração é bastante usado para a obtenção do óleo essencial de frutas cítricas como, a laranja e o limão. Nele as frutas são prensadas extraíndo tanto o óleo essencial como o sumo. Em seguida, é feita uma centrifugação ou decantação da mistura para a separação do óleo essencial (OKOH et al., 2010; DIAS, 2013).

V - Extração com dióxido de carbono líquido: é um método utilizado para extração de óleos essenciais de extrema delicadeza, sendo esta técnica considerada sustentável. Nela usa-se o dióxido de carbono líquido (CO_2 em fase supercrítica), o qual é inerte, não-tóxico, e permite a extração em menor temperatura e baixa pressão. Este método é considerado o de maior eficiência para extrair óleos essenciais de melhor qualidade e de maior potencial terapêutico. Esta técnica pode substituir os métodos tradicionais de extração como, destilação, extração líquido-líquido e extração sólido-líquido, sendo considerada uma das mais promissoras para na indústria alimentícia (DIAS, 2013; PORTO et al., 2014).

A aplicabilidade econômica dos óleos essenciais como fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de utilidade doméstica vem crescendo, devido ao aumento do cultivo de plantas com potencial aromatizante (WOOLF, 1999; FLORÃO, 2006). Os potenciais de suas aplicabilidades relacionam-se à atividade antimicrobiana, devido sua capacidade

de degradar a parede bacteriana e alterar a membrana plasmática. Possuem muitas atividades relatadas em literatura, justificando o crescente interesse em estudos relacionados aos constituintes dos óleos essenciais pela indústria farmacêutica (BURT, 2004; GUSTAFSON et al., 1998; ULTEE et al., 2002).

2.4 Atividade Antimicrobiana na Família Annonaceae

Estudos científicos realizados ao longo dos anos confirmam as propriedades dos produtos naturais e revelam o seu potencial para o controle de doenças infecciosas. Tendo em vista o aumento nos casos de micro-organismos resistentes aos fármacos antimicrobianos conhecidos tem aumentado o incentivo à procura de mais produtos naturais para suprir tais necessidades (SOUZA et al., 2004; ASSIS et al., 2009; COSTA et al., 2011a; KOOLEN et al., 2012).

Algumas espécies de Annonaceae possuem atividade antimicrobiana descritas na literatura. A espécie *Annona cherimolia* é utilizada para o tratamento de doença de pele; das espécies *A. muricata* e *A. reticulata*, foram isoladas algumas acetogeninas, as quais foram atribuídas algumas atividades biológicas (ALALI et al., 1999). Algumas atividades são atribuídas a alcaloides isolados desta família, como a jatrorhizina, O-metilmoschatolina, liriodenina, anonaina e nornuciferina (GRICOVÁ et al., 2007; COSTA et al., 2010 a e b; CHEN et al., 2013).

Costa e colaboradores (2010a) estudaram as cascas de *Guatteria hispida*, e isolaram vários compostos. Neste estudo também observaram a ação antimicrobiana para essa espécie contra *Staphylococcus epidermidis* e *Candida dubliniensis* com valores de MIC entre 12.5-100 µg/mL.

Das cascas de *G. blepharophylla* dentre os compostos isolados o alcaloide isomoschatolina, apresentou atividade antifúngica contra *C. albicans*, significativa quando comparada com o seu controle positivo (MIC = 50.81 $\mu\text{mol L}^{-1}$, MIC = 54.00 $\mu\text{mol L}^{-1}$ respectivamente) (COSTA et al., 2011).

Alguns óleos essenciais de plantas são eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. O interesse por essas essências capazes de destruir ou minimizar o crescimento de patógenos esta crescendo no mundo (SOUZA et al., 2004; DUARTE, 2006; KOOLEN et al., 2012).

As atividades antimicrobianas dos óleos essenciais estão na maioria das vezes associadas à presença de compostos oxigenados de baixo peso molecular, devido serem capazes de estabelecer pontes de hidrogênio. Estes compostos atuam modificando a permeabilidade da membrana externa dos micro-organismos e inibindo enzimas da cadeia respiratória, comprometendo o balanço energético da célula (DIAS, 2013)

No Brasil, as investigações relacionadas a produtos naturais com atividade antimicrobiana aumentaram nos últimos anos. Ainda assim, apesar da rica diversidade biológica, somente estão disponíveis dados referentes a 44 espécies de plantas pertencentes a 20 famílias, com atividade positiva, onde estão incluídas espécies nativas e exóticas. Esse baixo número de registros pode esta relacionada com a divulgação restrita dos resultados de pesquisa, por vezes apenas em eventos científicos locais ou regionais. Contudo, faz-se necessárias mais investigações científicas que visem à determinação do potencial terapêutico das plantas, pois existe um déficit de estudos científicos

experimentais que confirmem as possíveis propriedades antibióticas da ampla maioria de plantas amazônicas (DUARTE, 2006; OSTROSKY et al., 2008).

Dentre os vários micro-organismos utilizados em testes antimicrobianos pode-se ressaltar pela importância epidemiológica as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SOUZA et al., 2004; ANTUNES et al., 2006; ASSIS et al., 2008).

2.5 O Gênero *Bocageopsis*

O gênero neotropical *Bocageopsis*, um dos 130 gêneros da família Annonaceae, é constituído por 4 espécies: *B. canescens* (Benth.) R.E. Fr., *B. multiflora* (Mart.) R.E. Fr., *B. mattogrossensis* (R.E. Fr.) R.E. Fr. e *B. pleiosperma* Maas. As espécies que apresentam ampla distribuição na Região Amazônica são às *B. multiflora* (Figura 16) e *B. pleiosperma* (MAAS, 2001 e 2007; CHATROU et al., 2012a). Apenas a *B. multiflora* foi submetida a algum estudo fitoquímico, relacionado a constituição química dos óleos essenciais explorada (OLIVEIRA et al., 2014).

Devido às suas similaridades morfológicas, o gênero *Bocageopsis* e os gêneros *Onychopetalum* e *Unonopsis* pertenciam a um único grupo, denominado “Grupo-*Unonopsis*”, que também incluía cinco gêneros da África (*Dennettia*, *Dielsiothamnus*, *Polyceratocarpus*, *Uvariastrum* e *Uvariadendron*) e um da Ásia (*Neouvaria*) (MAAS, 2007). No entanto, avaliações mais recentes colocaram em questão a autenticidade da semelhança entre esses gêneros (RICHARDSON et al., 2004; KOEK-NORMAN & WESTRA, 2012).

Richardson e colaboradores (2004) analisaram a biogeografia histórica da família Annonaceae através de procedimentos filogenéticos, além de sequenciamento de DNA. Dois anos mais tarde, taxonomistas chegaram à conclusão, que o gênero *Unonopsis* é monofilético, ou seja, é um grupo que descende de um único ancestral, e que os demais gêneros que compunham o chamado “Grupo-*Unonopsis*” possuem uma insuficiência de informações capazes de possibilitar distinções ou seu possível agrupamento (MAAS, 2007).

Koek-Norman & Westra (2012), aprofundaram os estudos sobre anatomia microscópica da madeira dos gêneros da família Annonaceae, acabaram proporcionando um melhor entendimento da classificação filogenética dos gêneros da família em estudo. O autor realça que os três gêneros *Bocageopsis*, *Onychopetalum* e *Unonopsis* estão intimamente relacionados e pertencentes ao mesmo clado. No estudo são descritos os raios largos e grandes vasos, como sendo característica comum nos três gêneros. No entanto, é necessário um estudo aprofundado relacionando fatores filogenéticos e determinações por DNA para que se tenha certeza da proximidade dos três gêneros. Adicionalmente, estudos quimissistemáticos podem dar importantes contribuições.

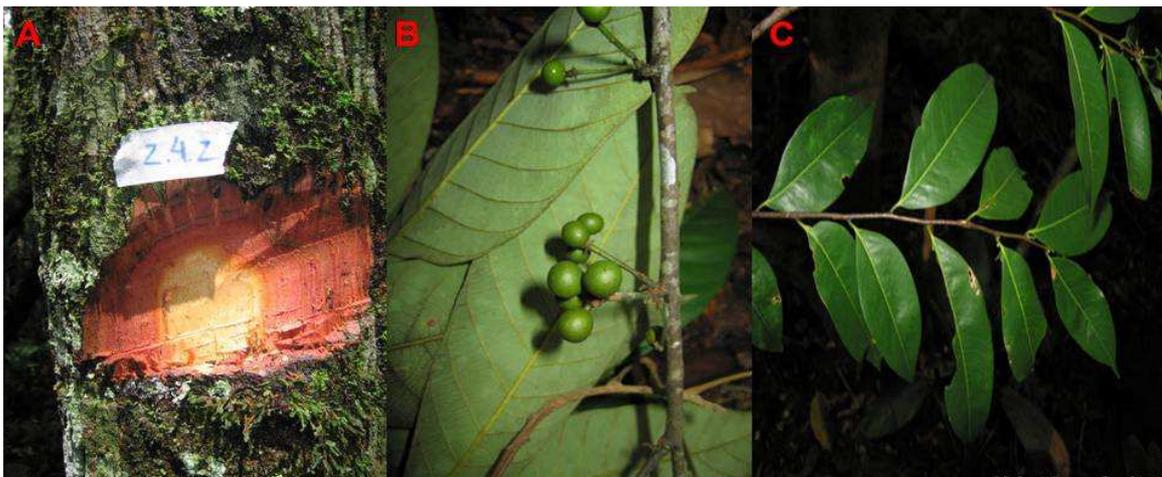


Figura 16: Espécies de Annonaceae - *Bocageopsis multiflora*: (A) tronco, (B) fruto, (C) folha.
Fonte: http://www.kew.org/science/tropamerica/imagedatabase/large49/cat_single49-4.htm.
Acessado em: 15/01/2014.

2.5.1 A espécie *Bocageopsis pleiosperma* Maas

A espécie *B. pleiosperma* Maas se apresenta como uma árvore, cuja altura pode atingir 28 metros (40 cm de diâmetro). Sua distribuição é restrita à Região Amazônica (Amazonas e Pará – Figura 17), sendo comumente encontrada em florestas não inundadas, com solo argiloso ou areia argilosa, e em baixas altitudes. No Brasil é conhecida popularmente como envira preta e jurueira sangue. Suas frutificações ocorrem entre os meses de agosto a novembro. Esta espécie se diferencia das outras espécies do seu gênero pelo maior número de sementes do monocarpo (RIBEIRO et al., 1999; MAAS et al., 2007). Não existem dados na literatura sobre a composição química desta espécie.



Figura 17: Distribuição Geográfica do gênero *Bocageopsis pleiosperma* Maas. Fonte: Maas et al., 2007.



3. OBJETIVOS

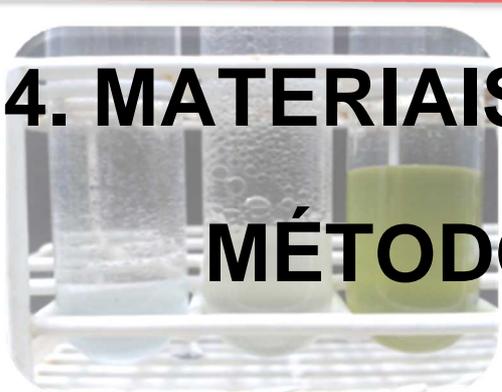
3.1 Geral:

Contribuir para o conhecimento químico e biológico do gênero *Bocageopsis* através da análise fitoquímica dos óleos essenciais e das frações alcaloídicas de *B. pleiosperma* Maas, e da busca por novos agentes com potencial antimicrobiano.

3.2 Específicos:

- ✓ Caracterizar por CG-MS os principais constituintes dos óleos essenciais das folhas, galhos e cascas do tronco de *B. pleiosperma*;
- ✓ Caracterizar os principais alcaloides presentes nas frações alcaloídicas das folhas, galhos e cascas do tronco de *B. pleiosperma* através de análises por ESI-IT-MS, obtidas através da extração em escala analítica do material vegetal;
- ✓ Investigar substâncias ainda não descritas no gênero *Bocageopsis* através de análises cromatográficas, RMN 1D/2D e MS das frações promissoras obtidas por marcha alcaloídica em escala preparativa;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.

4. MATERIAIS E MÉTODOS



4.1 Análises Cromatográficas

4.1.1 Cromatografia em camada delgada - CCD

As análises foram realizadas em cromatoplaças pré-fabricadas de sílica gel de 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência F_{254} , da Sorbent Technologies. Para detecção dos compostos usou-se irradiação com lâmpada ultravioleta (UV) (264 e 365 nm), seguida de revelação com reagente de Dragendorff.

4.1.2 Cromatografia em coluna – CC

Utilizou-se uma coluna de vidro de 24 cm de altura por 3,5 cm de diâmetro. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se como suporte sílica gel 60 (70-230 mesh) – Machery Nagel®, previamente tratada com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 10%. Como fases móveis foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila e metanol.

4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica – CLAE

Utilizou-se um cromatógrafo Acella® (Thermo Scientific), operando simultaneamente com um detector PDA e um detector de EM (TSQ Quantum access - Thermo Scientific). As análises foram realizadas em uma coluna analítica amino (NH_2) de 150 x 4,6 mm (100A, 5u) - Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol e água.

4.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa – CLAE semi-preparativa

O isolamento em escala semi-preparativa foi realizado em cromatógrafo modelo Shimadzu®, CBM – 20A, equipado com detector de UV SPD-20A, degaseificador DGU-20A e sistema binário de solventes LC-6AD. As análises foram realizadas em uma coluna analítica amino (NH₂) de 150 x 10,0 mm (100A, 5u) - Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol e água.

4.2 Solventes e reagentes reveladores

4.2.1 Solventes

Foram utilizados solventes grau PA (Nuclear®) durante o fracionamento cromatográfico em coluna aberta e preparo dos extratos. Para as análises cromatográficas em CLAE e CLAE semi-preparativa, bem como em análises por EM utilizaram-se solventes grau HPLC (TEDIA®). Os espectros de RMN foram obtidos em solventes deuterados.

4.2.2 Reagentes reveladores

Reagente de Dragendorff (modificação de Munier) (MUNIER, 1953 apud Merck, 1971): Solução A: 1,7 g de nitrato de bismuto III e 20,0 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada. Solução B: 16,0g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das cromatoplasmas, adicionaram-se 10,0 g de ácido tartárico, dissolvidos em 50 mL de água destilada. Após borrifação das placas cromatográficas os spots das substâncias alcaloídicas apresentaram coloração laranja.

4.3 Métodos espectrométricos e espectroscópicos

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro do tipo *Íon-trap*, modelo *LCQ Fleet* (Thermo scientific), operando com fonte de *eletronspray (ESI)*; e espectrômetro do tipo triplo-quadrupolo, modelo *TSQ Quantum Acess*, operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI). As análises de EM foram realizadas no laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (Central Analítica) da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foram realizadas em um equipamento GC-MS, modelo GC2010/QP2010 Plus (Shimadzu®,) usando detector seletivo e coluna capilar Rtx-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). As análises foram realizadas no Laboratório de Química da Universidade Federal de Roraima – UFRR.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C foram obtidos em equipamento modelo Bruker Avance 600 (600 MHz), do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná – UFPR. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl₃). Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

4.4 Outros equipamentos

- ✓ Evaporador rotatório: Heidolph, tipo Heizbad OB;
- ✓ Liquidificador Industrial: Modelo JBM35 - Motor: 1/2 CV - 50/60 Hz;
- ✓ Estufa de circulação de ar: Deleo, tipo A6 sefaf;
- ✓ Ultravioleta (UV): Lâmpada de 264-365 nm, da Solab;

- ✓ Balança analítica: Bel engineering, classe 1 (máx. 220 g – mín. 10 mg);
- ✓ Pipeta automática: Gilson®, P 1000 e P 100;
- ✓ Ultrasson: Unique, modelo USC-2800.

4.5 Material Botânico

4.5.1 Coleta e identificação do material botânico

O material botânico (folhas, galhos e casca do tronco) de *B. pleiosperma* foi coletado em Março de 2013 na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), localizada no Km 26 da estrada AM-010 (Manaus-Itacoatiara). Foi feita a coleta de um indivíduo previamente marcado (2573) e identificado durante a execução do Projeto Flora da Reserva Ducke, estando a sua exsicata (183125) depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

4.5.2 Processamento do material Botânico

O material botânico (folhas, galhos e casca do tronco) de *B. pleiosperma* Maas, após secagem em temperatura ambiente durante 20 dias, foi pulverizado em liquidificador industrial modelo *Bel Engineering*, para posterior obtenção das frações alcalóidicas e óleos essencial.

4.6 Extração dos óleos essenciais

Aproximadamente 100 g de material botânico triturado (folhas, cascas do tronco e galhos) foram submetidos ao processo de hidrodestilação em aparelho do tipo *Clevenger* modificado. As amostras foram colocadas em um balão de destilação de 4 L e imersas em 2 L de água destilada. Os óleos essenciais foram coletados em um frasco pequeno de vidro tipo âmbar, sendo

adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para remover resíduos de água. Em seguida, o material foi filtrado e lavado com diclorometano (CH_2Cl_2). Após evaporação do solvente, os óleos foram pesados, e o rendimento de cada óleo essencial foi calculado dividindo-se a massa do óleo pela massa do respectivo material vegetal seco e o resultado multiplicado por 100. Os óleos foram acondicionados em vidros pequenos e armazenados a $-15\text{ }^\circ\text{C}$ até as análises.

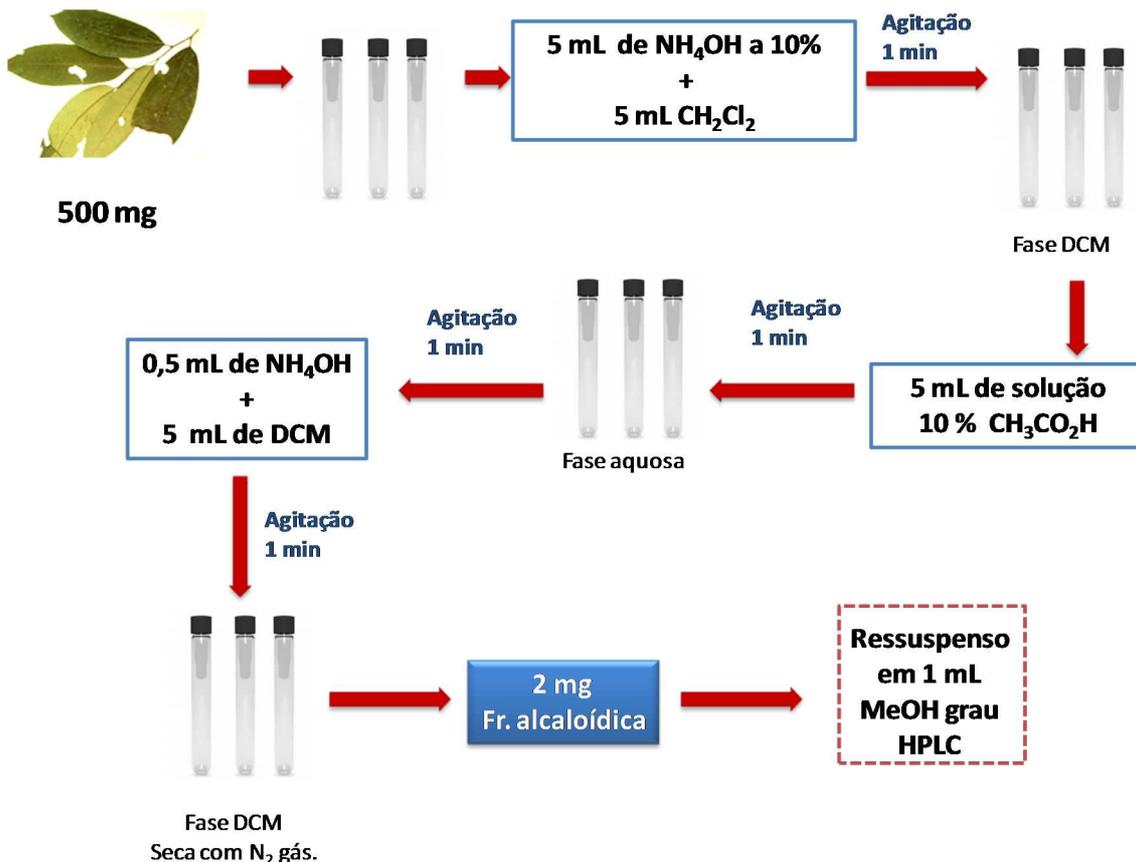
4.7 Análises por GC-MS dos óleos essenciais

Para as análises dos óleos essenciais foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1.02 mL/min. A solução de injeção foi preparada dissolvendo-se cerca de 15 mg de cada óleo em 1 ml de acetato de etila. Foi injetado 1 μL da solução estoque, usando um split de 50. A temperatura da coluna foi programada de 60 a $280\text{ }^\circ\text{C}$ com gradiente de $3\text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. A temperatura do injetor e da fonte foi configurada para $220\text{ }^\circ\text{C}$ e $260\text{ }^\circ\text{C}$, respectivamente. Para obtenção do índice de retenção foi injetada uma série homóloga de hidrocarbonetos (C7-C30). O cálculo do índice de retenção (IR) foi feito de acordo com a equação de Van der Dool and Kratz (Dool & Kratz, 1963) e as identificações dos constituintes foram baseadas na comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles armazenados na biblioteca Wiley 8ª edição do equipamento e comparação dos índices de retenção com dados da literatura (ADAMS, 2007).

4.8 Marcha alcaloídica (escala analítica e escala preparativa)

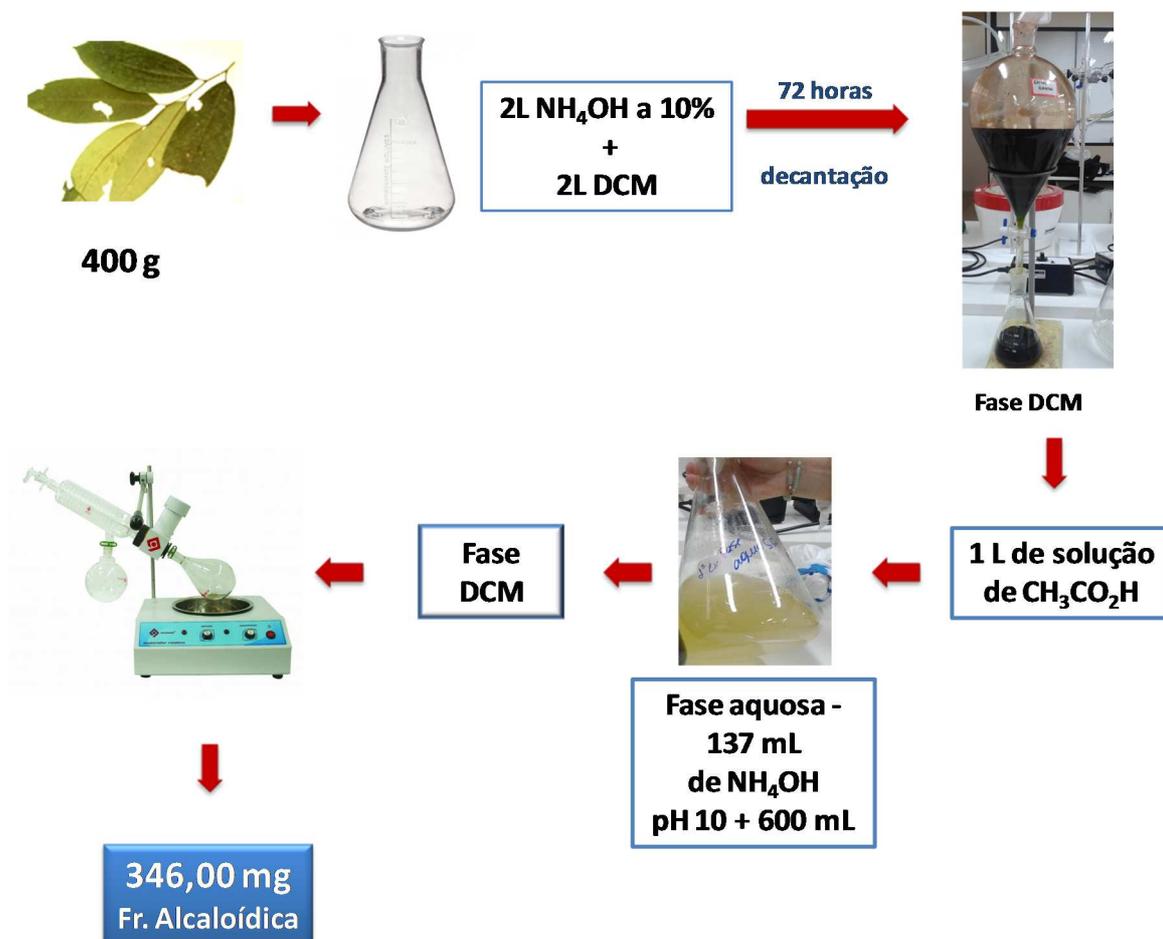
Para a obtenção das frações alcaloídicas em escala analítica (Esquema 1), foram feitas modificações e adaptações do método utilizado por Silva e colaboradores (2007), conforme descrito a seguir: aproximadamente 500 mg de

cada parte da planta, pulverizado, foram transferidos para tubos de ensaio, sendo em seguida submetidos a maceração com 5 mL de hidróxido de amônio - NH_4OH a 10% e 5 mL diclorometano - DCM (CH_2Cl_2). Após agitação vigorosa por 1 minuto a fase DCM foi transferida para outro tubo de ensaio, onde foram adicionados 5 mL de uma solução 10% de ácido acético. Em seguida, o tubo foi submetido à agitação vigorosa por 1 minuto. Feito isso, a fase aquosa foi transferida para outro tubo de ensaio e acrescentado 0,5 mL de NH_4OH para elevação do pH até 10. Posteriormente adicionou-se 5 mL de DCM ao tubo e novamente os tubos foram submetidos a agitação vigorosa. A fase DCM foi transferida para um novo tubo de ensaio e seco sob uma corrente de nitrogênio gasoso. Em seguida foi pesado e calculado seu rendimento, resultando em aproximadamente 2 mg. Cada material foi ressuspensão em 1 mL de metanol – MeOH grau HPLC, filtrado e transferido para *vials*.



Esquema 1: Extração alcaloídica em escala analítica. Adaptado e modificado de Silva et al., 2007.

Para a obtenção das frações alcaloídicas em escala preparativa (Esquema 2), foram feitas modificações e adaptações do método utilizado por Silva et al., 2007, conforme descrito a seguir: 400 g das folhas foram submetidas à maceração com 2 L de NH_4OH a 10%, seguida da adição de 2 L de DCM e mantido em repouso por 72 h. A fase DCM foi transferida para um novo recipiente onde a extração fora realizada com solução de ácido acético 10%. Posteriormente, transferiu-se a camada ácida para outro recipiente e acrescentado volume de NH_4OH suficiente para elevação do pH até 10. Em seguida realizou-se a extração com 300 mL de DCM. Esse procedimento final foi realizado duas vezes, resultando em uma fração alcaloídica com 346,00 mg.



Esquema 2: Extração alcaloídica em escala preparativa. Fonte: Adaptado e modificado de Silva et al., 2007.

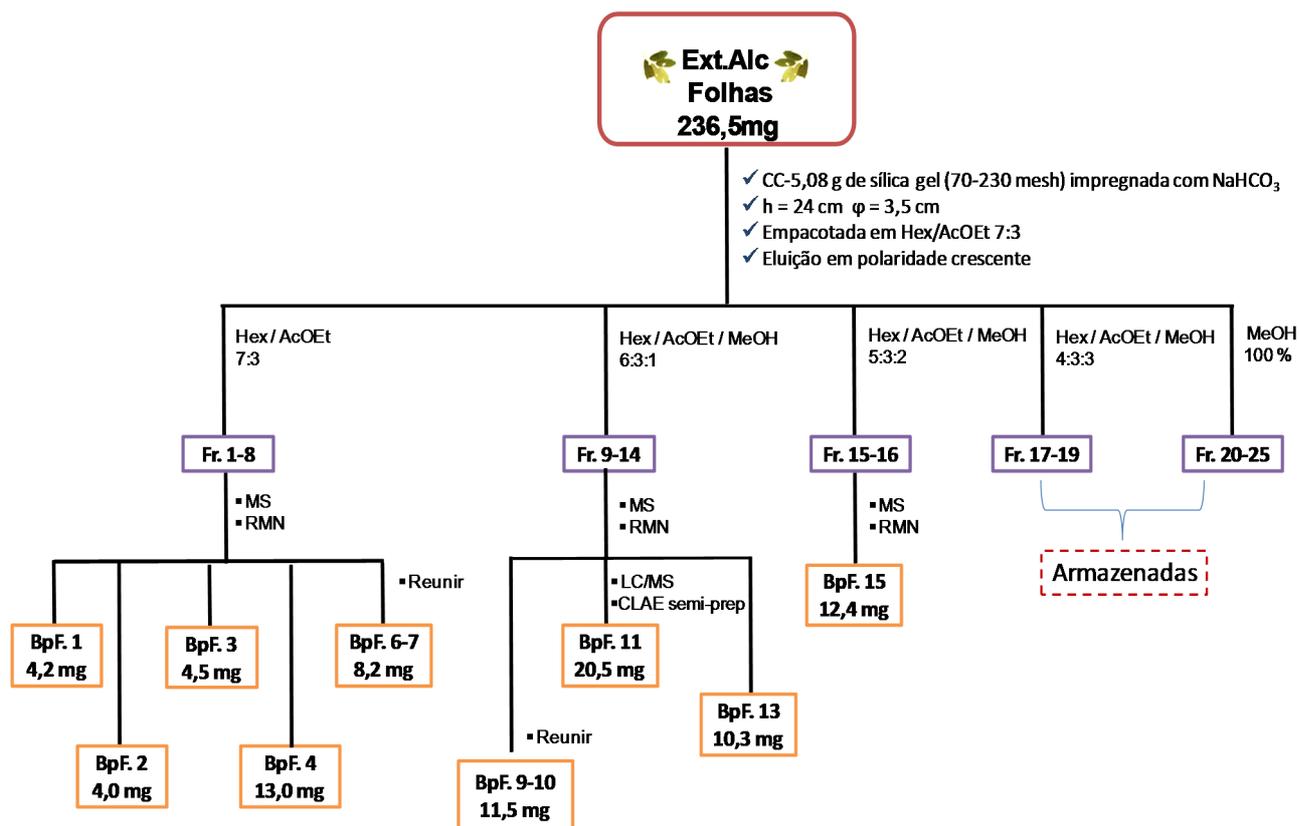
4.9 Análises por ESI-IT-MSⁿ das frações alcaloídicas das folhas, galhos e cascas do tronco de *B. pleiosperma obtidas* em escala analítica.

Separou-se 1 mg das frações alcaloídicas para o preparo da solução estoque (1mg/mL). A partir da solução estoque foram preparadas soluções com 10 ppm em metanol grau HPLC e analisadas por inserção direta em espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (LCQ Fleet) equipado com fonte de *eletrospray* e operando em modo positivo de aquisição. Para a obtenção dos espectros foram utilizadas energias de colisão entre 15 e 20% da capacidade do equipamento.

4.10 Isolamento, caracterização e identificação estrutural das substâncias obtidas em escala preparativa das folhas de *B. pleiosperma*

A fração alcaloídica das folhas (236,5 mg) foi tratada em coluna de sílica gel (previamente tratada com bicarbonato 10% (70-230 mesh), conforme ilustrado no esquema 3, sendo utilizados como fase móvel hexano, acetato de etila e metanol em ordem crescente de polaridade, fornecendo 25 frações. Após a análise por CCD e análises de espectrometria de massas, as frações semelhantes foram reunidas, pesadas e codificadas. Posteriormente as frações codificadas como BpF1 (4,2 mg), BpF2 (4,0 mg), BpF3 (4,5 mg), BpF4 (13,0 mg), BpF6 (8,2 mg), BpF9 (11,0 mg), BpF11 (20,5 mg), BpF13 (10,3 mg) e BpF15 (12,4 mg) foram submetidas a análises de MSⁿ e RMN 1D e 2D para determinação estrutural, sendo a fração BpF11 submetida a processos para purificação devido seu rendimento como descrito abaixo.

Nas análises preliminares de espectrometria de massas, a fração BpF11 (20,5 mg), apresentou um pico intenso referente ao íon *quasi*-molecular em *m/z* 328, porém apresentou também algumas impurezas, sendo a fração submetida à análise em CLAE analítico acoplado a espectrometria de massas (LC/MS) para desenvolvimento do método de purificação e posterior escalonamento para CLAE semi-preparativo (Figura 18, 19, 20). O método utilizado no processo de purificação foi o seguinte: fluxo de 2,5 mL por minuto, gradiente de 60 a 100% (MeOH), UV1 = 280, UV2 = 305, coluna amino (NH₂) de 250 x 10,0 mm (5u, 100A - Phenomenex). Deste processo pôde-se obter a subfração codificada como BpF11.1 com 12,2 mg.



Esquema 3: Representação do estudo químico da fração alcalóidica das folhas de *B. pleiosperma*.

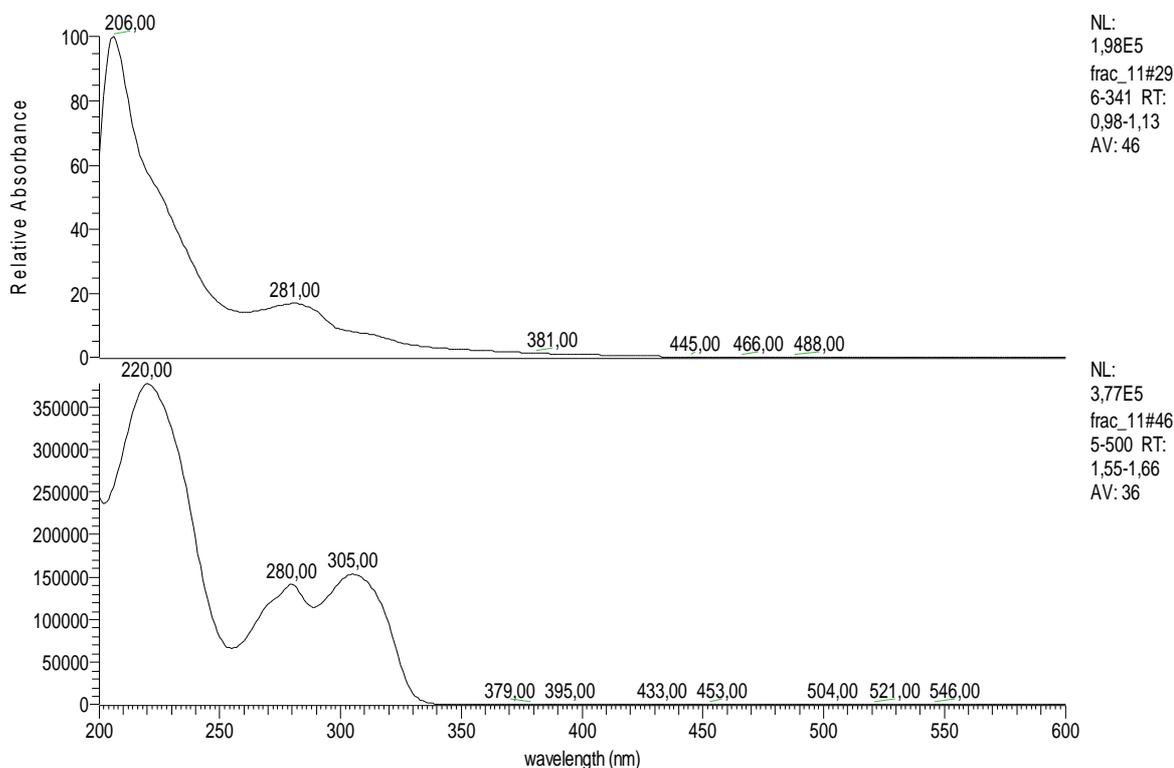


Figura 18: Espectro de UV/visível do pico *m/z* 328 presente na amostra BpF11, o espectro acima é referente a impurezas presentes na amostra.

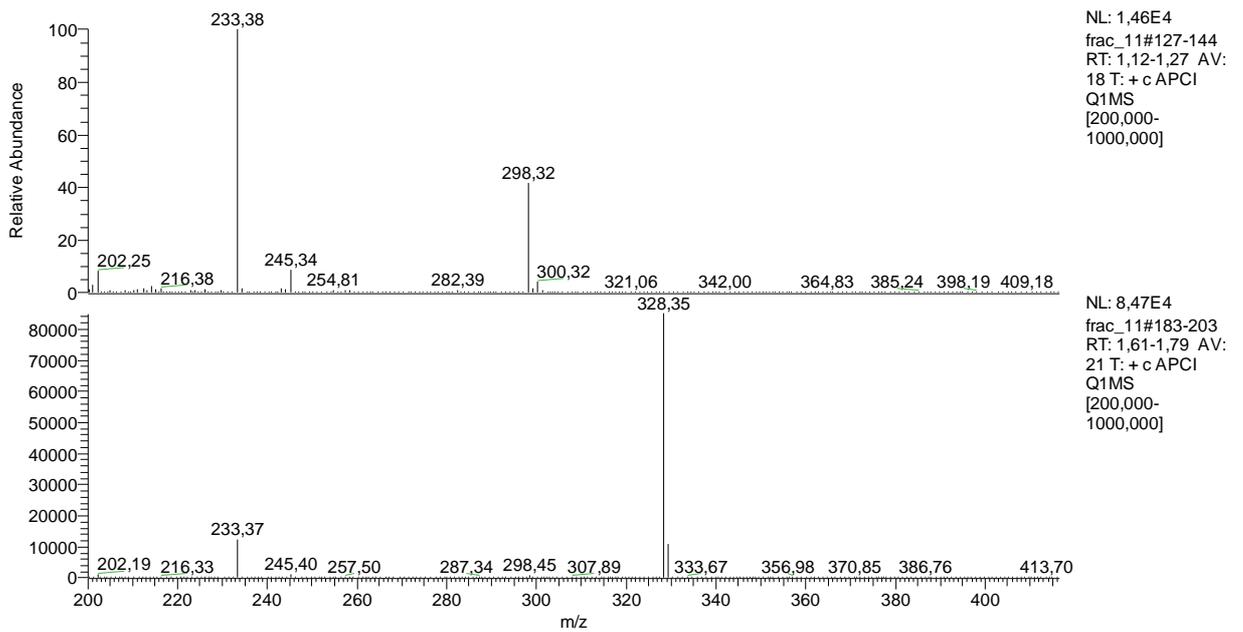


Figura 19: Espectro de massas da amostra BpF11. R.T.: 1.18 (acima) e 1.68 (abaixo), obtidos em CLAE analítico.

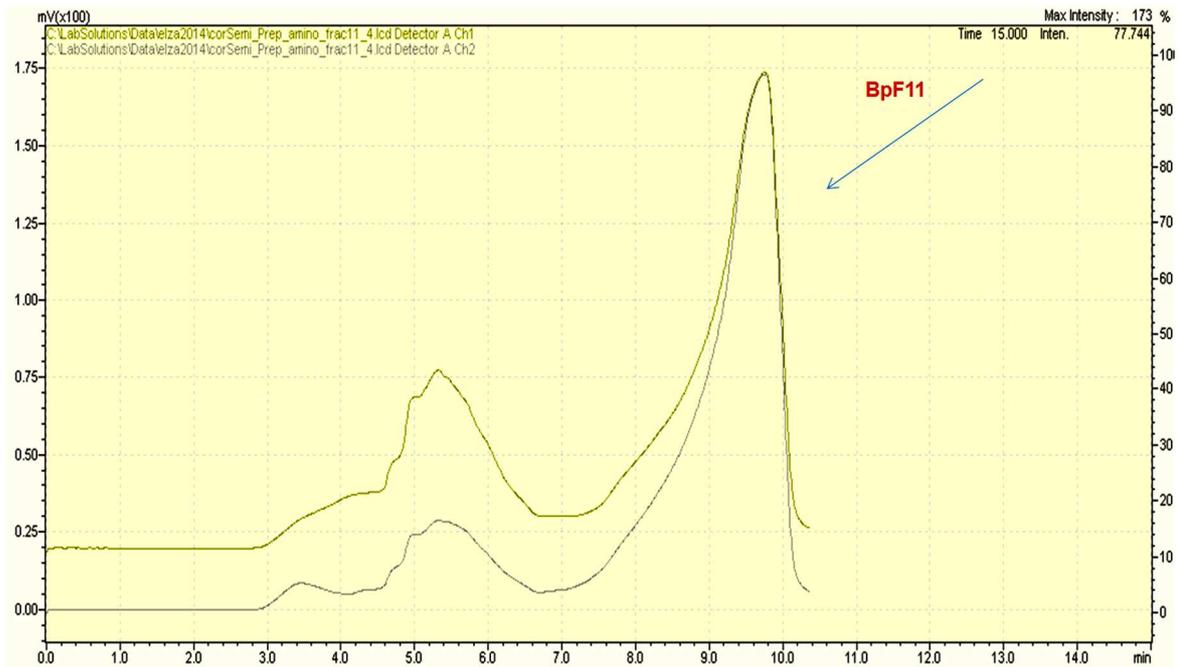


Figura 20: Cromatograma da amostra BpF11 (CLAE semi-preparativo).

4.11 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas de *Bocageopsis pleiosperma* Maas.

Os experimentos para a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das cascas do tronco, folhas e galhos de *B. pleiosperma* foram realizados no Laboratório de Micro-organismos da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

4.11.1 Modo de preparo dos meios de cultura

a) BHI (*Brain Heart Infusion*) - Ágar

Extrato BHI	10 g
Dextrose	4 g
Ágar Microbiológico	15 g
Água destilada	1 L

Após pesados o extrato de BHI, a dextrose e o ágar, foram colocados em um *Erlenmeyer* de 1 L e adicionado a água destilada. O meio de cultura foi autoclavado a 121 °C por 15 minutos para esterilização.

b) Sabouraud - Ágar

Extrato Sabouraud	10 g
Dextrose	4 g
Ágar	15 g
Água destilada	1 L

Após pesados o extrato Sabouraud, a dextrose e o ágar, foram colocados em um *Erlenmeyer* de 1 L e adicionado a água destilada. O meio de cultura foi esterilizado conforme descrito anteriormente.

4.11.2 Preparo do material biológico

As culturas microbianas foram reativadas em meio sólido apropriado, a 37°C, em incubadora microbiológica. Para *Cândida albicans* usou-se o meio de cultura Sabouraud Ágar e para *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis* usou-se o meio de cultivo BHI Ágar. Após 24 horas os patógenos foram então passados para os meios de cultura líquido correspondente com um volume de 10 mL.

Os controles positivos utilizados foram específicos para cada patógeno:

C. albicans – Fluconazol (2 mg/mL);

P. aeruginosa – Tetraciclina (2 mg/mL);

S. aureus e *E. faecalis* – Ampicilina (2 mg/mL);

Para *C. albicans* usou-se INT (Cloreto de Iodonitrotetrazólio) como revelador e para as demais bactérias, usou-se TTC (Cloreto de 2,3,5-Trifeniltetrazólio).

4.11.3 Preparo das amostras e micro-organismos para inóculo.

Os óleos essenciais, assim como os antibióticos foram colocados em microtubos do tipo eppendorf e diluídos em DMSO até a concentração de 2 mg/mL. Após o crescimento do micro-organismo em meio líquido, ele foi ajustado para a concentração de células de acordo com o tubo de número 1 (3×10^8 mL) da escala de Mc Farland – MF.

4.11.4 Teste de difusão em Ágar

Para a avaliação de antibiose por difusão em ágar foram utilizadas placas de Petri de 14 cm de diâmetro contendo o meio específico para cada

micro-organismo (item 4.9.1.2), onde foram espalhados 100 μ L da suspensão de células com auxílio de uma alça de *Drigaslki*. Posteriormente foram feitos poços no meio de cultura (5 mm de diâmetro), nos quais 100 μ L das amostras foram aplicadas. A incubação ocorreu a 37°C e foi acompanhada por 24 e 48 horas, após este período foram medidos os halos de inibição formados.

4.11.5 Teste de diluição seriada em microplaca

Primeiramente foram aplicados 100 μ L do meio de cultura correspondente em cada poço da microplaca de Elisa. A microplaca foi dividida em quatro conjuntos marcados com cores diferentes, cada um contendo três fileiras de poços. As duas primeiras fileiras de cada conjunto continham as soluções das amostras de óleos essenciais e a terceira o controle - antibiótico (Figura 21).

Em seguida foram aplicados 100 μ L das soluções de óleos essenciais e dos antibióticos (para obtermos uma concentração de 1 mg/mL nos poços da fileira A. Após isso, foi realizada a diluição seriada de um poço para o posterior como mostrado na figura 21.

Após a diluição foram inoculados 10 μ L da suspensão de micro-organismo teste, obedecendo à escala de MF garantindo assim a mesma quantidade de células em todos os poços.

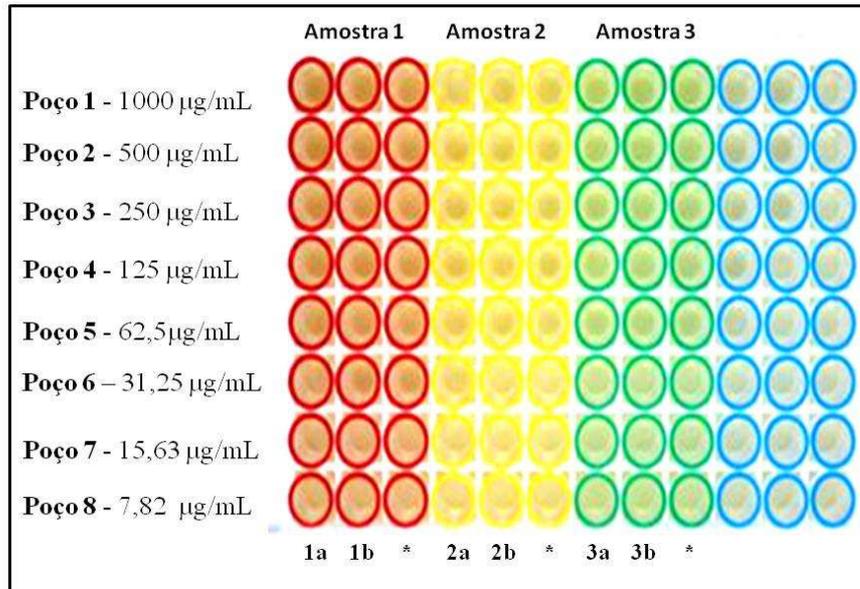
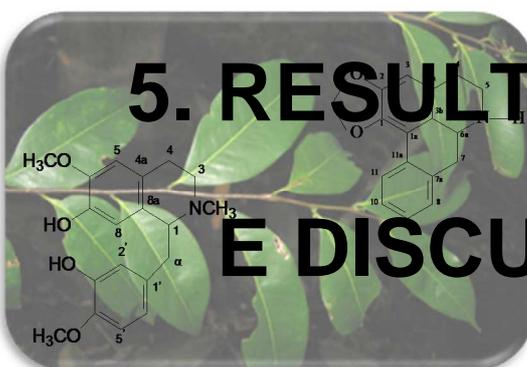
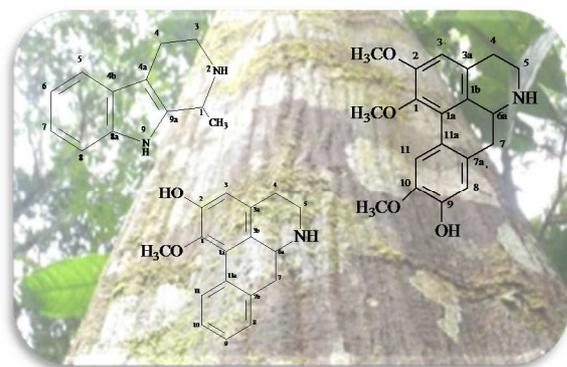


Figura 21: Esquema utilizado na realização do teste de diluição seriada em microplaca (*poços controles com antibiótico). Fonte: Adaptado do site <http://www.gendiag.com.br>.

Com 24 horas do inoculo em microplaca, os poços foram revelados pela aplicação de 10 µL de INT para *C. albicans* e TTC para as demais bactérias. Também foi avaliada a eficácia das amostras contra o crescimento das colônias dos patógenos com a reinoculação do terceiro poço que não apresentou crescimento celular em meios de cultura apropriados e depois cultivados por 24 h, a 37°C. Este reinoculo permite avaliar se a ação das substâncias são letais ou apenas estáticas.



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Extração dos óleos essenciais de *B. pleiosperma* Maas

A partir da extração por hidrodestilação dos óleos essenciais da espécie em estudo, foi obtido o rendimento dos óleos essenciais (Tabela 1). As folhas renderam 0,28%, as cascas 0,17% e os galhos 0,25%. Esses dados foram comparados com literatura relacionada à família Annonaceae.

O óleo essencial dos frutos secos de *Xylopia parviflora* foi estudado por Woguem e colaboradores (2014), tendo apresentado um rendimento de 0,60% e um forte odor, além de uma coloração amarela claro. Os óleos essenciais das folhas de *Guatteriaopsis blepharophylla*, *G. friesiana* e *G. hispida* também foram submetidos a estudos, e os rendimentos desses óleos foram de 0,24%, 0,50% e 0,41% respectivamente (COSTA et al., 2008).

Estudos das folhas de *X. frutescens* realizados por Ferraz e colaboradores (2013) revelaram 0,09% de rendimento de óleo essencial com uma coloração incolor.

Os constituintes químicos dos óleos essenciais provenientes das cascas do caule e das folhas da espécie *X. aromatica* foram estudados por Fournier e colaboradores (1994). O rendimento para o óleo da casca do caule foi de 0,85% e o das folhas de 0,50%. Os óleos essenciais de *X. phloiodora* e *X. aethiopia* foram extraídos para avaliação anti-plasmodial e seus rendimentos foram de 0,12% e 0,6% respectivamente (BOYOM et al., 2003). Esses dados mostram que o rendimento dos óleos da espécie *B. pleiosperma* (Tabela 1) está em um intervalo significativo quando comparados com outras espécies da família Annonaceae.

Tabela 1: Aspectos físico-químicos e rendimentos dos óleos essenciais obtidos das amostras de *B. pleiosperma* Maas.

Amostra	Aspecto Físico-químico	Rendimento %
Cascas	Amarelo-esverdeado claro	0,17
Folhas		0,28
Galhos		0,25

5.2 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) do óleo essencial das folhas de *Bocageopsis pleiosperma* Maas

Através da análise por CG-MS do óleo essencial obtido das folhas de *B. pleiosperma*, foi possível caracterizar 87,64% dos constituintes do óleo essencial, além de observar a predominância dos constituintes β -bisaboleno, trans- α -bergamoteno e β -farneseno (*E*), com teores de 55,71%, 6,94% e 6,05% (Figura 22), respectivamente, o que representa 68,70% dos constituintes do óleo essencial. Outros constituintes minoritários (Figura 22) também foram observados e estão descritos na tabela 2.

Tabela 2: Principais constituintes do óleo essencial das folhas de *B. pleiosperma* Maas determinados por CG-MS.

Composto	Teor (%)	I.A (calc.)	I.A* (lit.)
α -copaeno	1,16	1376	1374
sesquitujeno<7-epi>	0,56	1390	1390
Trans- α -bergamoteno (<i>E</i>)	6,94	1436	1432
β -farneseno (<i>Z</i>)	2,09	1443	1440
β -farneseno (<i>E</i>)	6,05	1457	1456
curcumeno<ar>	0,74	1483	1479
β -selineno	0,29	1486	1489
α -muuroleno	0,25	1501	1500
β -bisaboleno	55,71	1514	1505
δ -cadineno	1,42	1525	1522

α-calacoreno	1,00	1544	1544
Epóxido de humuleno II	2,80	1610	1608
cubenol<1-epi->	0,41	1629	1627
epoxi-allo-aromadendreno	0,60	1633	1639
α-muurolol	0,22	1643	1644
α-cadinol	0,47	1655	1652
cariofileno<14-hidroxi-Z->	0,36	1663	1666
calamen-10-ol<E->	0,23	1669	1668
β-bisabolol	0,47	1672	1675
cadaleno	0,22	1675	1675
α-bisabolol	1,45	1684	1685
farnesol (2E,6Z)	0,98	1714	1714
Cryptomeriona	2,58	1728	1724
β-bisabolenol	0,64	1788	1789
TOTAL	87,64		

I.A* (lit.): índice Aritmético encontrado na literatura; I.A (calc.): índice Aritmético calculado; (-) substâncias não identificadas.

Fonte: Adams, 2007.

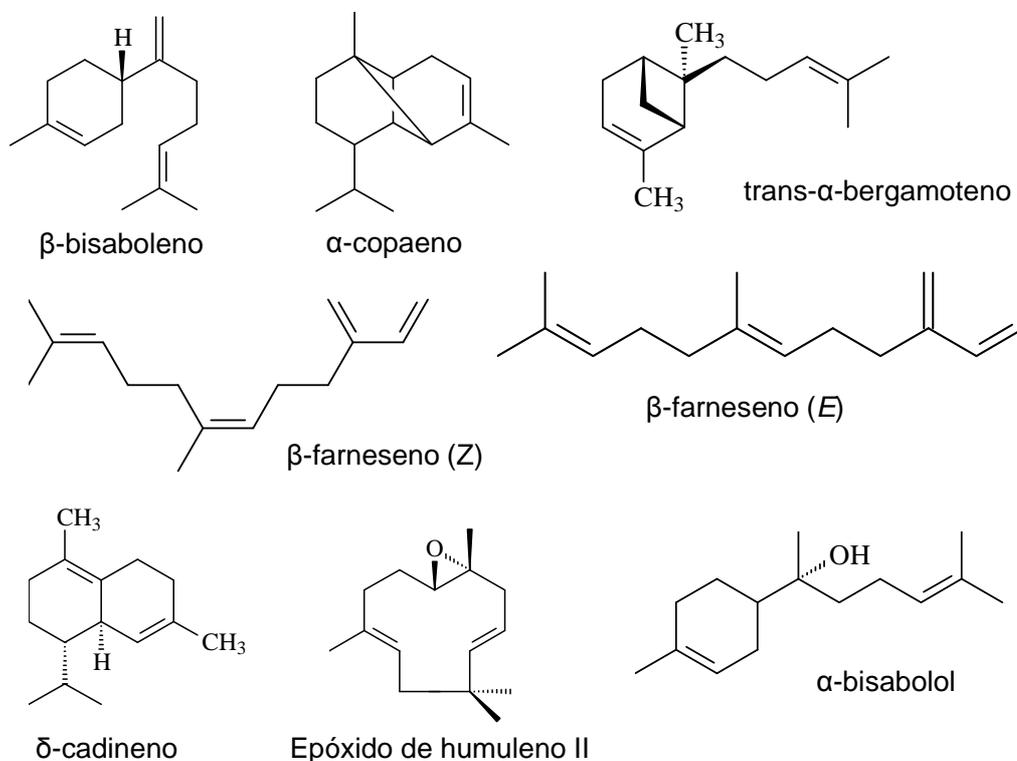


Figura 22: Estruturas referentes aos constituintes majoritários do óleo das folhas de *B. pleiosperma*. Fonte: Dewick, 2009.

5.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) do óleo essencial das galhos de *Bocageopsis pleiosperma* Maas

Através da análise de CG-MS do óleo essencial obtido dos galhos de *B. pleiosperma*, foi possível identificar 75,96% dos constituintes do óleo essencial, além de observar a predominância dos constituintes β -bisaboleno, cryptomeriona e farnesol (2Z, 6Z) com teores de 34,37%, 9,60% e 7,20% (Figura 23), respectivamente, o que representa 48,06% destes constituintes do óleo essencial. Outros constituintes minoritários (Figura 23) podem ser observados na tabela 3.

Tabela 3: Principais constituintes do óleo essencial dos galhos de *B. pleiosperma* determinados por CG-MS

Composto	Teor (%)	I.A (calc.)	I.A* (lit.)
β -elemeno	0,22	1392	1389
trans- α -bergamoteno	2,49	1436	1432
aromadendreno	0,63	1444	1439
β -farneseno (<i>E</i>)	1,04	1457	1456
curcumene<ar>	0,49	1483	1479
β -selineno	0,39	1486	1489
β -bisaboleno	34,37	1514	1505
γ -bisaboleno< <i>E</i> >	0,62	1529	1528
dendrolasin	0,26	1574	1570
turmerol<ar>	0,72	1580	1582
salvial-4(14)-ene-1-one	0,31	1594	1594
β -atlanol	4,09	1610	1608
α -bisabolol óxido <i>B</i>	1,43	1655	1656
β -atlantona	0,74	1669	1668
β -bisabolol	0,94	1673	1675
α -bisabolol	1,89	1685	1685
epóxido de allo-aromadendreno	1,79	1633	1639
α -bisabolol óxido <i>B</i>	1,43	1655	1656

Farnesol (2Z,6Z)	7,20	1694	1698
β -sinensal	0,35	1710	1699
Farnesol (2E,6Z)	3,54	1715	1714
cryptomeriona	9,60	1730	1724
farnesol (2E,6E)	0,50	1751	1742
α -sinensal	1,53	1765	1755
β -bisabolenal	0,62	1768	1768
β -bisabolenol	0,25	1789	1789
TOTAL	75,96		

I.A* (lit.): índice Aritmético encontrado na literatura; I.A (calc.): índice Aritmético calculado; (-) substâncias não identificadas.

Fonte: Adams, 2007.

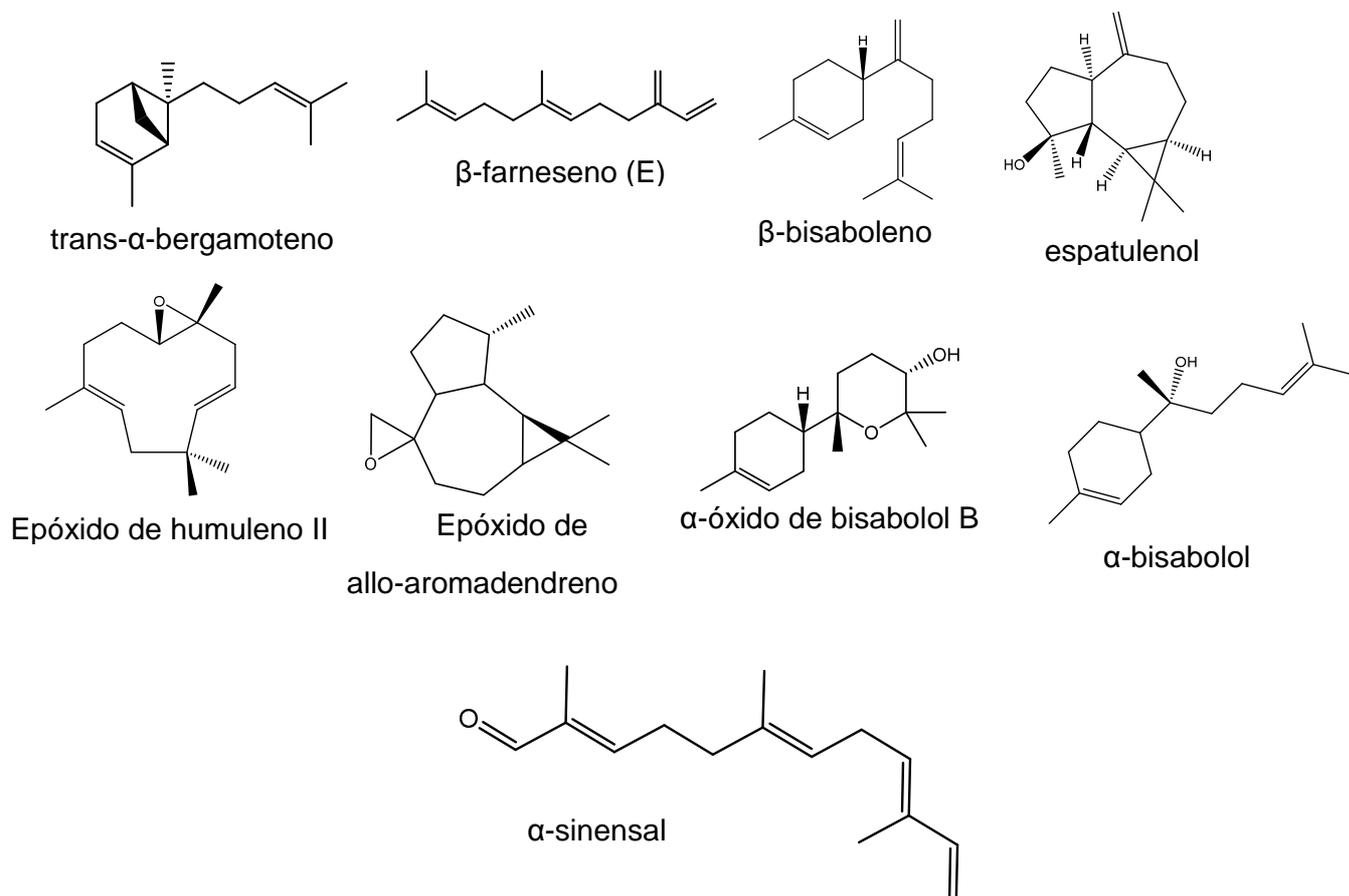


Figura 23: Estruturas referentes aos constituintes majoritários do óleo essencial dos galhos de *B. pleiosperma*. Fonte: Dewick, 2009.

5.4 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS) do óleo essencial das cascas de *Bocageopsis pleiosperma*

Através da análise de CG-MS do óleo essencial obtido das cascas de *B. pleiosperma*, foi possível a caracterização de 97,11% dos seus constituintes do, além de observar a predominância de β -bisaboleno, δ -cadineno, β -selineno e α -selineno com teores de 38,53%, 7,55%, 6,46% e 5,18% (Figura 24), respectivamente, o que representa 57,72% dos constituintes do óleo essencial. Outros constituintes minoritários (Figura 24) podem ser observados na tabela 4.

Tabela 4: Principais constituintes do óleo essencial das cascas de *B. pleiosperma* determinados por CG-MS.

Composto	Teor (%)	I.A (calc.)	I.A* (lit.)
α -cubebeno	1,62	1349	1345
α -copaeno	3,28	1375	1374
β -cubebeno	1,10	1390	1387
β -elemeno	0,88	1392	1389
β -longipineno	0,47	1399	1399
cariofileno (<i>E</i>)	3,61	1419	1417
trans- α -bergamoteno	1,54	1436	1432
α -humulene	0,98	1453	1452
β -farnesene (<i>E</i>)	1,24	1457	1456
Allo-aromadentreno	3,66	1460	1458
γ -muuroleno	1,70	1477	1478
β -selineno	6,46	1486	1489
muurola-4(14),5-diene (<i>E</i>)	0,35	1491	1493
α -selineno	5,18	1495	1498
α -muuroleno	0,96	1500	1500
β -bisaboleno	38,53	1510	1505
α -cadineno	1,60	1514	1513

δ-cadineno	7,55	1524	1522
α-calacoreno	0,52	1543	1544
germacreno B	0,32	1557	1559
óxido de cariofileno	3,00	1582	1582
gleenol	0,34	1585	1586
Epoxido de humuleno II	0,89	1609	1608
cubenol<1-epi->	3,55	1628	1627
cubenol	3,20	1643	1644
α-muurolol	0,97	1647	1644
α-cadinol	0,37	1655	1652
α-bisabolol	2,21	1676	1685
cryptomeriona	1,03	1728	1724
TOTAL	97,11		

I.A* (lit.): índice Aritmético encontrado na literatura; I.A (calc.): índice Aritmético calculado; (-) substâncias não identificadas.

Fonte: Adams, 2007.

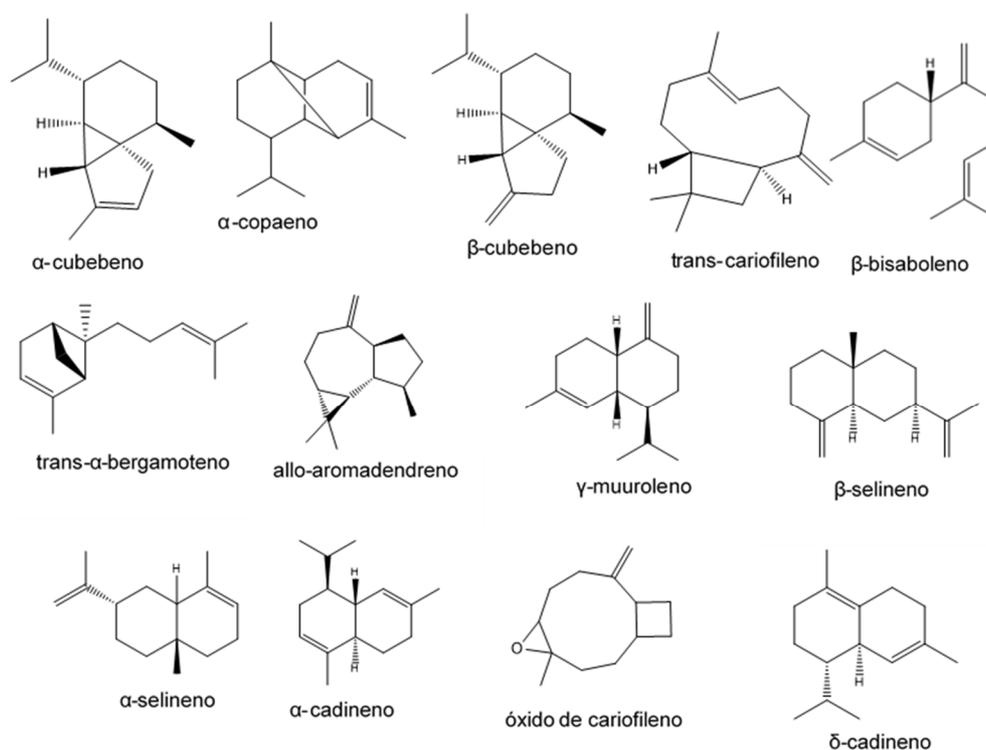


Figura 24: Estruturas referentes aos constituintes majoritários do óleo essencial das cascas do tronco de *B. pleiosperma*. Fonte: Dewick, 2009.

5.5 Constituinte majoritário dos óleos essenciais das folhas, galhos e cascas de *Bocageopsis pleiosperma*

Para a espécie *B. pleiosperma* foram identificados em maior quantidade sesquiterpenos. As folhas apresentaram em sua composição 69,48% de sesquiterpenos, nas cascas do tronco tem-se 78,37% de sesquiterpenos identificados e nos galhos 49,27% da composição é de sesquiterpenos, sendo que existem ainda componentes presentes nos óleos essenciais que ainda não foram identificados.

Dentre os compostos, o que mais chamou atenção pelo seu teor em cada amostra (galhos 34,37%, cascas 38,53% e plantas 55,71%) foi o sesquiterpeno β -bisaboleno (Figura 25), que está presente em uma quantidade majoritária.

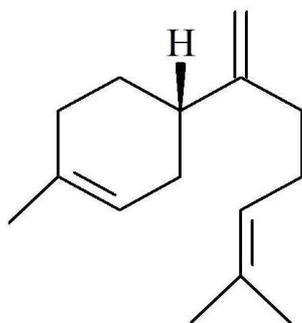


Figura 25: Estrutura do β -bisaboleno.

O β -bisaboleno provém da rota biossintética do geranyl PP (Figura 26), onde a priori ocorre uma quebra enzimática para formação do cátion alil, seguida de uma adição eletrofílica, formando assim um cátion terciário. Na sequência ocorre a perda de um próton, dando origem ao farnesil PP, que através de perdas enzimáticas forma os cátions *E,E*-farnesil e *E,Z*-farnesil. O *E,Z*-farnesil sofre uma

ciclização para formação do cátion bisabolil, seguida de uma perda protônica para formação do β -bisaboleno (DEWICK, 2009).

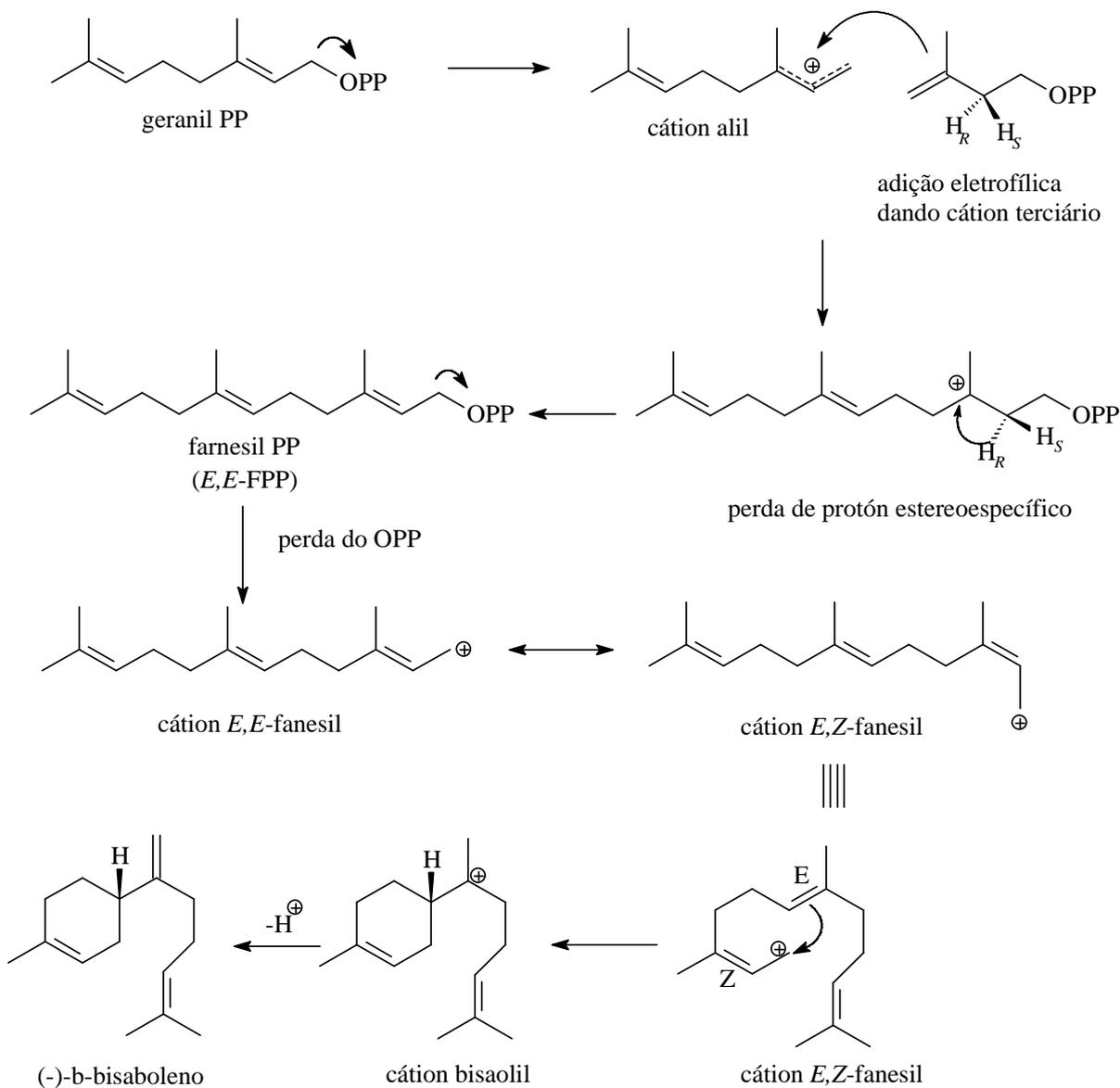


Figura 26: Rota biossintética para formação do β -bisaboleno. Fonte: Dewick, 2009.

De acordo com estudos relatados na literatura, foi observado um teor elevado em algumas espécies da família Annonaceae para o constituinte β -bisaboleno. Por exemplo, para a espécie *Uvariastrum pierreanum* foi identificado 28,20% de β -bisaboleno nas cascas e 4,30% nas folhas. Várias espécies

apresentaram menores teores, como *Guatteria blepharophylla* onde foram identificados 0,31% de β -bisaboleno nas folhas e 0,94% nas cascas e *Cleistopholis patens*, apenas 1,00% nas suas folhas (COSTA et al., 2008; BOYOM et al., 2011).

Em grande parte dos trabalhos publicados com óleos essenciais dificilmente é relatado à ação farmacológica de apenas um componente, mas sim de todo o óleo essencial. Vários trabalhos têm evidenciado importantes atividades biológicas para óleos essenciais ricos em β -bisaboleno. O óleo essencial das partes aéreas de *Psammogeton canescens* apresentou atividade antioxidante satisfatória, sendo este constituído por 33,35% de β -bisaboleno. A atividade anti-plasmódica do óleo essencial das cascas de *Uvariastrum pierreanum* Engl. foi descrita e seu maior componente foi o β -bisaboleno com 28,20% (GHOLIVAND et al., 2010, BOYOM et al., 2011).

Recentemente foi relatada a atividade anticonvulsivante através de testes *in vivo* realizados com peixes-zebra e ratos, onde foi identificado o bisaboleno, obtido a partir de purificação e fracionamento do óleo essencial de *Curcuma longa*, este composto apresentou atividade anticonvulsivante em concentrações mais baixa que Valproato de sódio que é a droga usada em tratamentos de epilepsia, anorexia nervosa, ataque de pânico e outros transtornos psicológicos (PAUCAR, et al 2012). No trabalho de Oliveira e colaboradores (2014) com o óleo essencial obtido das folhas frescas de *Bocageopsis multiflora* testado contra *Leishmania amazonenses* apresenta como constituinte majoritário o bisaboleno e relata uma excelente atividade pró-coagulante quando testado *in vivo* e comparado com o fármaco controle.

Estes resultados demonstram uma relação do β -bisaboleno com problemas do sistema nervoso e podem ser associados a observações da medicina popular, já que antigamente o gênero *Bocageopsis* pertencia ao grupo do gênero *Unonopsis* e algumas espécies pertencentes a esse gênero eram usadas por índios da Floresta Amazônica para o tratamento de demência senil em pacientes idosos (SCHULTES, 1993; ADAMS et al., 2007, SILVA et al., 2014).

A potencialidade farmacológica do sesquiterpeno β -bisaboleno, constituinte principal dos óleos essenciais das três partes da espécie *B. pleiosperma*, sugere a necessidade de um estudo aprofundado dos óleos essenciais do gênero *Bocageopsis*.

5.6. Ensaios antimicrobianos dos óleos essenciais

5.6.1. Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar

Nos testes de antibiose (item 4.9.1.4) foram observados pequenos halos de inibição (Figura 27 e 28) do crescimento da bactéria gram-negativa *P. aeruginosa* e da levedura *C. albicans* (Tabela 5).

Tabela 5: Resultado do teste em difusão em ágar de *B. pleiosperma*.

Amostra	Poço	Leitura 24h	Leitura 48h	Leitura 24h	Leitura 48h	Leitura 24h	Leitura 48h
		PLACA A		PLACA B		PLACA C	
<i>Candida albicans</i> (Ágar Sab; halos em mm)							
Cascas	1	1,3	1,3	1,4	1,4	0,6	0,6
Folhas	2	1,4	1,4	1,3	1,3	0,6	0,6
Galhos	3	1,7	1,7	1,2	1,2	0,6	0,6
Fluconazol (2mg/mL)	5	2,8	2,8	2,2	2,2	2,7	2,7
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Ágar B.H.I.; halos em mm)							
Cascas	1	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Folhas	2	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6
Galhos	3	1,1	1,1	1,2	1,2	0,6	0,6
Tetraciclina (2mg/mL)	5	3,5	3,5	3,4	3,4	3,5	3,5

Os resultados do método de difusão em ágar (Figura 27 e 28) mostraram que os óleos tiveram atividade antimicrobiana inferior para *C. albicans* e *P. aeruginosa*, quando comparado com os valores médios dos antibióticos (fluconazol 2,56 mm e tetraciclina 3,46 mm) usados como controle respectivamente para cada organismo testado. O valor médio referente aos halos de inibição para os óleos essenciais testados contra *C. albicans* (Figura 27) foram de 1,1 mm para as cascas e folhas, e 1,12 mm para os galhos. Enquanto que os halos de inibição dos óleos essenciais testados contra *P.*

aeruginosa (Figura 28) foram de 0,6 mm para as cascas e folhas, e de 0,96 mm para os galhos.

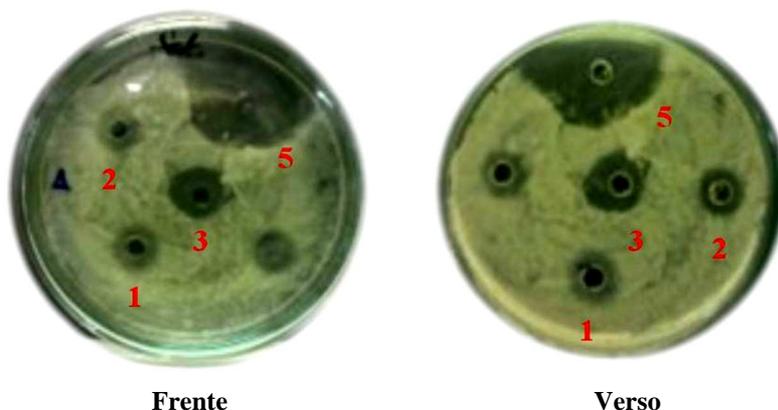


Figura 27: Halos de inibição de *Candida albicans* das amostras das cascas do tronco (1), folhas (2) e galhos (3) de *B. pleiosperma* após 48 horas.



Figura 28: Halos de inibição de *Pseudomonas aeruginosa* das amostras das cascas do tronco (1), folhas (2) e galhos (3) de *B. pleiosperma* após 48 horas.

Foi observada uma diferença inferior relacionada com o desenvolvimento dos halos de inibição da placa C das amostras testadas contra o fungo e a amostra dos galhos testada contra bactéria, os halos foram menores que nas placas A e B, e supõe-se que este fato possa ter ocorrido devido o menor crescimento ou concentração de bactéria e fungos na placa C (Figura 28) do que nas demais placas.

5.6.2. Avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de diluição seriada

A atividade antimicrobiana dos óleos da espécie *B. pleiosperma* das amostras que deram atividade contra *C. albicans* (cascas, folhas e galhos) e *P. aeruginosa* (galhos) foram avaliadas para determinação da dosagem inibitória mínima – DIM, obtida através da realização do método de diluição seriada em microplaca tipo Elisa (Figura 29 e 30).

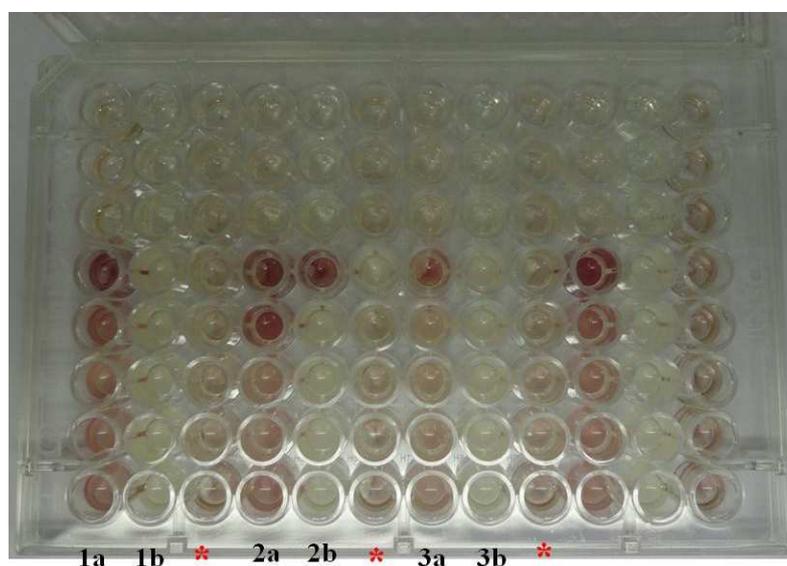


Figura 29: Resultado do ensaio de concentração inibitória mínima para *Candida albicans* das amostras das cascas (1a-1b); folhas (2a-2b); e galhos (3a-3b). *Poços controle (meio de cultura, antibiótico e bactéria).

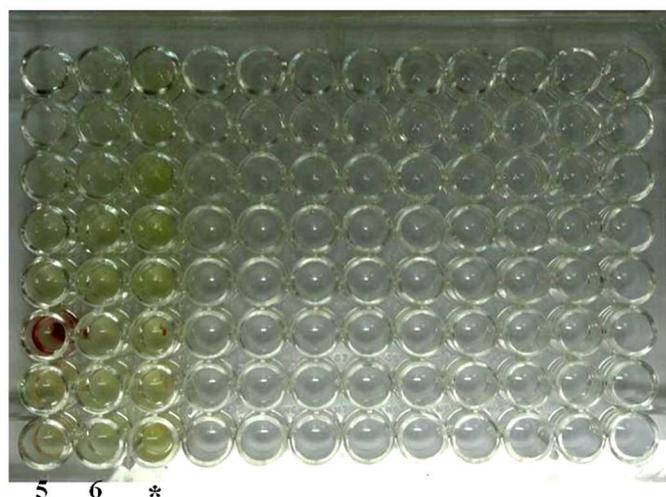


Figura 30: Resultado do ensaio de concentração inibitória mínima para *Pseudomonas aeruginosa* da amostra dos galhos (3). Poços controle (*meio de cultura, antibiótico e bactéria).

A mudança de coloração quando acrescentado os reveladores INT para *C. albicans* e TTC para *P. aeruginosa*, indicam crescimento microbiano, ou seja, a caracterização da redução deste corante acusando a possibilidade bacteriana, onde o óleo nessa concentração não foi eficaz ao ponto de matar as bactérias e o fungo. Sendo a DIM aquela concentração mínima da amostra, ou seja, do óleo essencial capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos utilizados no ensaio antimicrobiano, verificado pela permanência da cor rosada (COSTA, 2009b). Os resultados para as DIM mostram que as amostras dos óleos essenciais de *B. pleiosperma* (galhos, folhas e cascas) inibiram o crescimento do fungo *C. albicans* até a terceira diluição (250 µg/mL), e para a bactéria gram-negativa *P. aeruginosa* inibiram o crescimento até a quinta diluição (62,5 µg/mL).

As bactérias gram-positivas são mais susceptíveis do que as bactérias gram-negativas aos compostos lipofílicos dos óleos essenciais, isso está relacionado com a dificuldade dos óleos essenciais em difundir a membrana externa, pois existe uma barreira hidrofílica que impede a passagem de macromoléculas e combinações hidrofóbicas, embora não seja totalmente impermeável. Por isso, as bactérias gram-negativas são relativamente resistentes a combinações de antibióticos hidrofóbicos e drogas tóxicas (MARQUES et al., 2012).

No entanto, isto não foi observado para o óleo essencial dos galhos de *B. pleiosperma* que apresentou atividade bacteriostática para a bactéria gram-negativa *P. aeruginosa*, ou seja, apenas inibiu o crescimento das bactérias, porém não as inviabilizou (MARQUES et al., 2012). A ação bacteriostática foi comprovada pelo crescimento bacteriano visualizado após o procedimento de reinoculo descrito no item 4.9.1.5 (Figura 31).

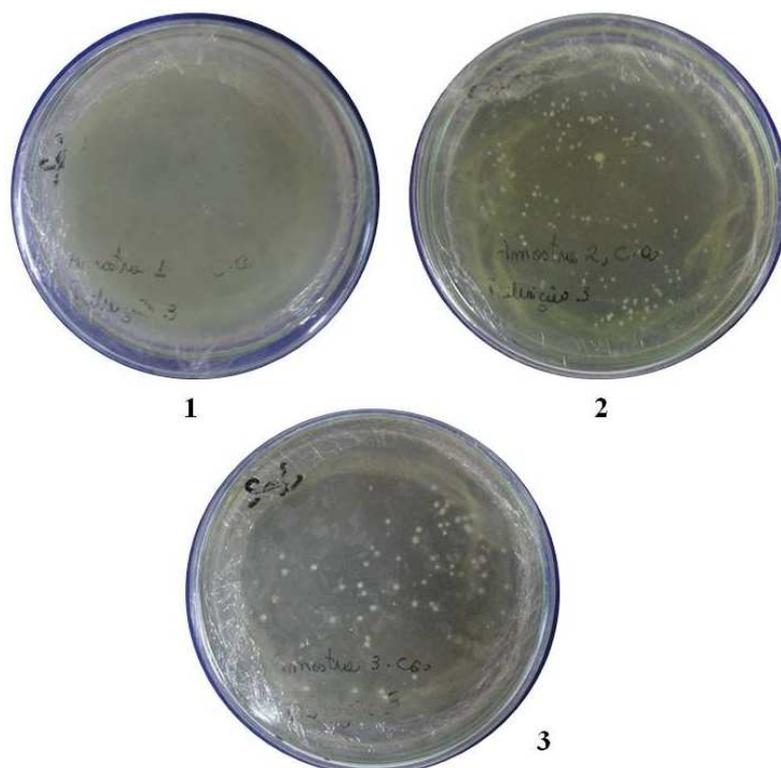


Figura 31: Crescimento celular após reinoculação para avaliação da ação bacteriostática das amostras que apresentaram melhor inibição frente ao teste de diluição seriada foram: cascas do tronco (1), folhas (2), galhos (3).

Os resultados dos testes antimicrobianos estão compatíveis com relatos descritos na literatura para espécies diferentes de plantas, onde mostram que os óleos essenciais que possuem como constituinte majoritário ou em alta concentração o β -bisaboleno, apresentam inibição fraca ou moderada frente a bactérias gram-positivas.

Em estudos realizados por Stepanov & Kamarova, 1972 relatam que o bisaboleno não possui atividade antimicrobiana contra a bactéria gram-positiva *S. aureus*. Ibrahim e colaboradores (2009) realizaram estudos para verificar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas secas, pseudocaulis e rizomas da espécie *Alpinia conchigera* Griff. (KL 5049). Dentre os constituintes dos óleos essenciais das folhas secas, pseudocaulis e rizomas estavam o β -bisaboleno como constituinte majoritário com 15,3%, 19,9% e 13,9%

respectivamente. Os resultados da atividade antimicrobiana testadas contra as bactérias gram-negativas *P. cepacia* e *P. aeruginosa*, e contra bactérias gram-positivas *S. aureus* e *S. epidermidis* apresentaram fraca inibição.

Outro estudo comparativo da atividade antimicrobiana realizado por Barman & Jha (2013) frente às bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*; as bactérias gram-negativas *P. aeruginosa*, *E. coli*, *S. flexneri* e *K. pneumoniae*; e os fungos *C. albicans*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. foi realizado utilizando óleos essenciais de gengibre orgânico e natural, apresentando o β -bisaboleno como constituinte, porém em pequena quantidade, 6,1% e 5,8% respectivamente. Os resultados mostraram uma atividade antimicrobiana significativa, onde o óleo essencial de gengibre orgânico apresentou uma maior atividade frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, e frente a todos os fungos, menos *Penicillium* sp. em comparação com o óleo de gengibre normal. Contudo, supõe-se que com o aumento do constituinte β -bisaboleno a um óleo essencial, a tendência da atividade antimicrobiana diminua com o aumento da concentração desse sesquiterpeno, devido à diminuição dos compostos oxigenados que acabam por inviabilizar o processo da atividade antimicrobiana (BARMAN & JHA, 2013).

5.7 Análises por ESI-IT-MSⁿ das frações alcalóidicas obtidas em escala analítica de *B. pleiosperma*

5.7.1 Análise espectrométrica da fração alcalóidica das folhas de *B. pleiosperma*

No espectro de íons totais das frações alcalóidicas das folhas, cascas do tronco e galhos de *B. pleiosperma* (Figura 32) foram observados diversos picos de m/z par, indicando possíveis alcaloides, destacando-se por sua intensidade os íons de m/z 328, 298, 282 e 268 ($[M+H]^+$). Estes foram submetidos ao processo de fragmentação em sequência (*tandem* ou MSⁿ).

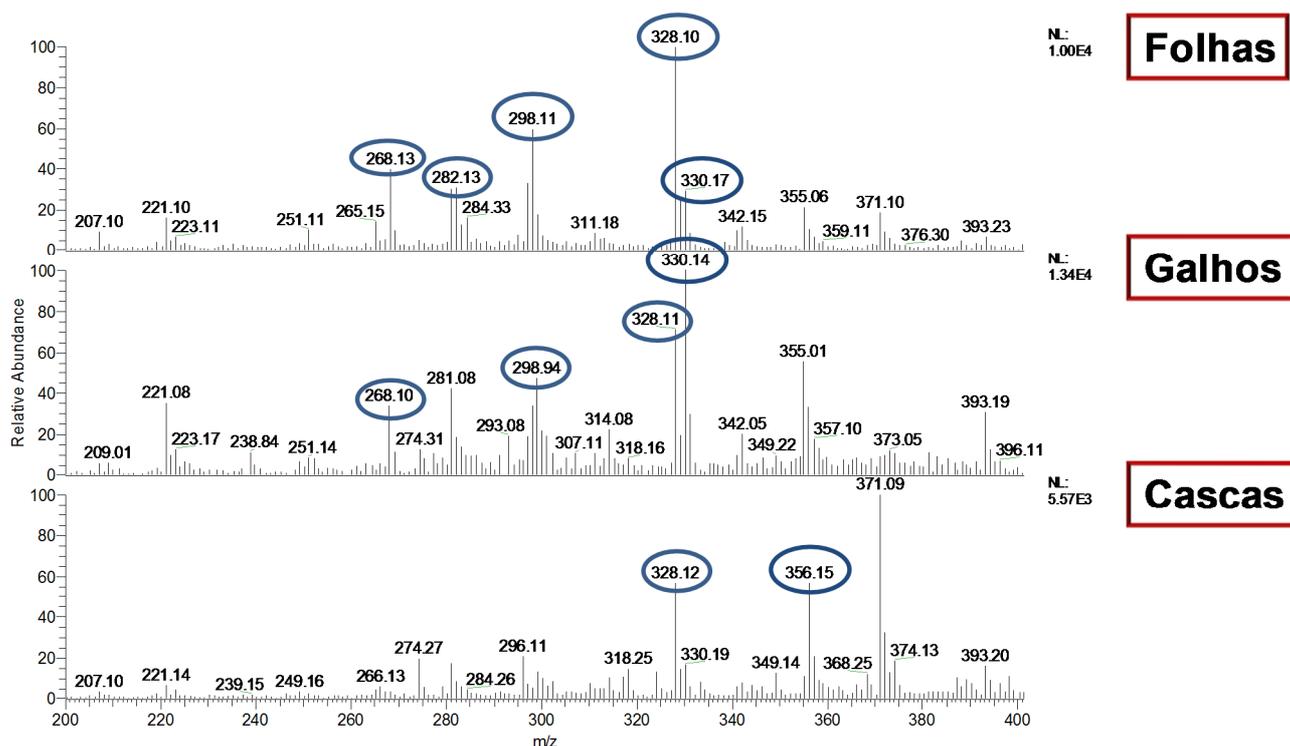


Figura 32: Espectro de massas das frações alcaloides das folhas, galhos e cascas de *B. pleiosperma*, respectivamente de cima para baixa.

Analisando o espectro de MS⁴ (Figura 33) do íon de m/z 328, observam-se perdas sequenciais de 31, 32 e 28 Da. De acordo com os padrões de fragmentações chaves propostas por Stévigny e colaboradores (2004) esta

sequencia de fragmentação ocorre em alcaloides aporfínicos, e a primeira perda está associada a saída do nitrogênio e respectivo substituinte, o qual pode ser -H ou -CH₃, com perdas de 17 ou 31 Da, respectivamente. A perda inicial de 31 Da do íon de *m/z* 328, portanto é coerente com um alcaloide aporfínico contendo uma metila ligada diretamente ao nitrogênio (N-CH₃).

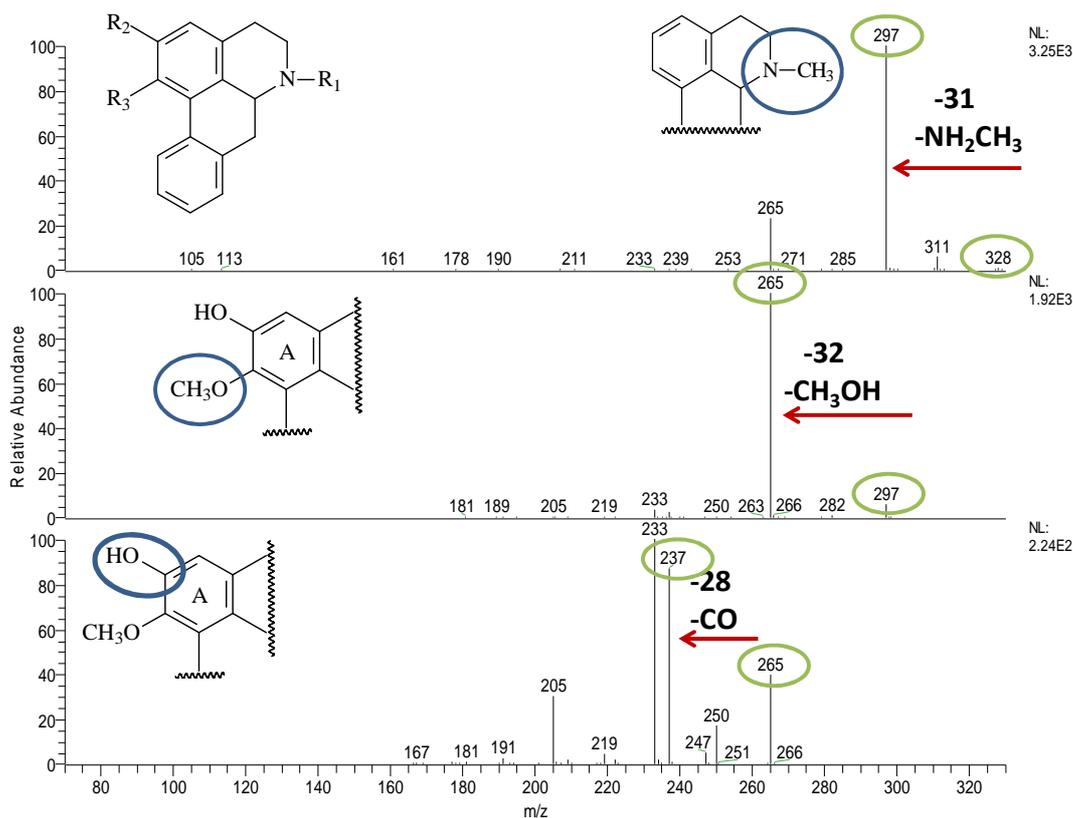


Figura 33: Espectro de massas em MS⁴ do íon de *m/z* 328 ([M+H]⁺).

As perdas seguintes, observadas através dos espectros de MS³ e MS⁴ (Figura 33), estão associadas aos substituintes dos anéis A do esqueleto aporfínico. No caso do íon de *m/z* 328, a perda sequencial de 32 e 28 Da pode ser associada a um grupo metoxila adjacente a um grupo hidroxila, uma vez que esta perda de massa é considerada uma fragmentação chave para identificar estes grupos em esqueletos aporfínicos.

Analisando o espectro de MS² (Figura 34) do íon de *m/z* 298, observa-se uma perda inicial de 17 Da, o que é coerente com uma estrutura aporfínica com hidrogênio ligado ao nitrogênio, porém é possível observar ainda uma perda de elevada massa (resultando em um íon fragmento de *m/z* 192), o que é incomum em alcaloides aporfínicos, porém comum em alcaloides benzilisoquinólicos e tetrahidroprotoberberínicos (Figura 35), apontando assim para uma mistura de alcaloides de *m/z* 298.

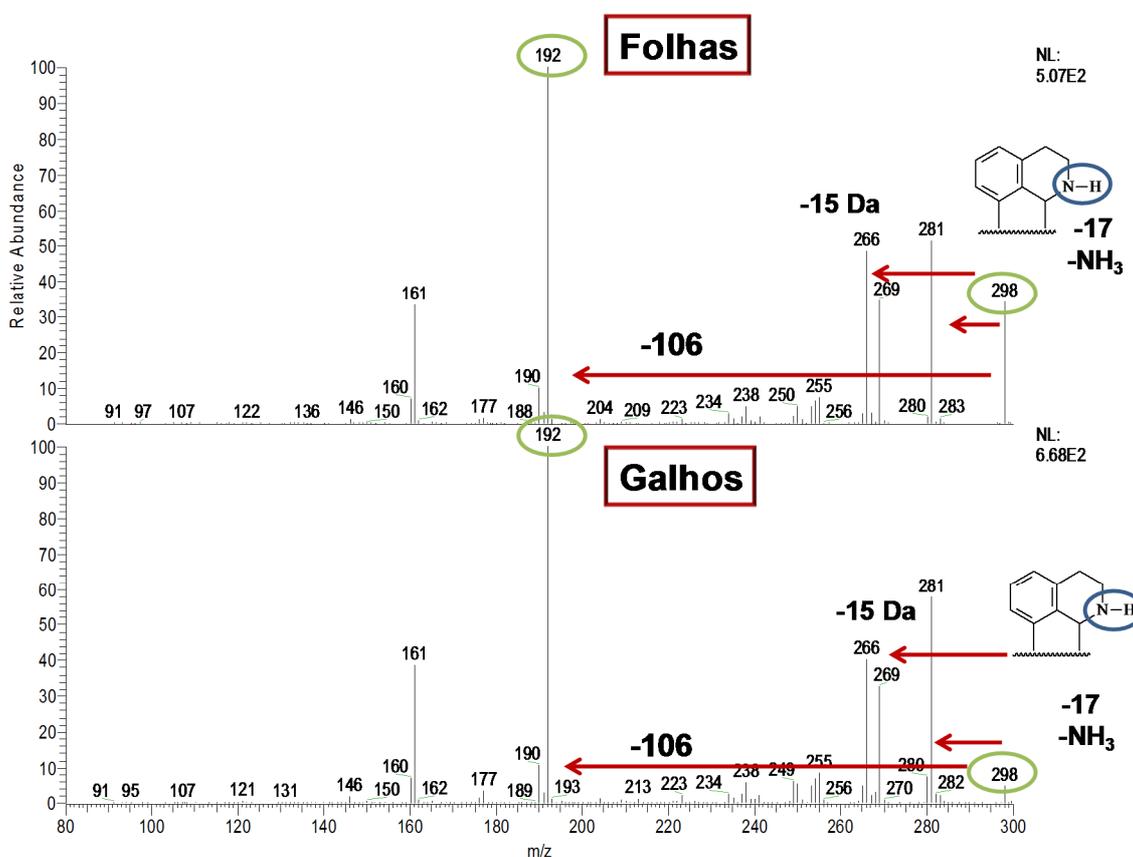
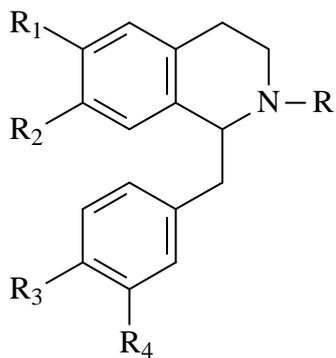
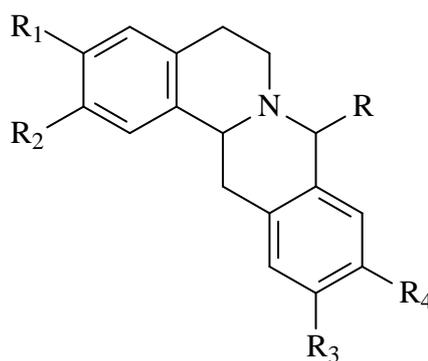


Figura 34: Espectro de massas em MS² do íon de *m/z* 298 ([M+H]⁺) presente nas frações alcalóidicas das folhas e galhos, respectivamente de cima para baixo.



Benzilisoquinolínicos



Tetrahidroprotobeberínico

Figura 35: Esqueleto de alcaloides benzilisoquinolínicos e tetrahidroprotobeberínicos.

Em estudo realizado por Schmidt e colaboradores (2005), diversos alcaloides benzilisoquinolínicos foram submetidos a estudo de fragmentação, sendo sugerido um conjunto de chaves (a, b, c e e) (Figura 36), através das quais é possível determinar o sítio de substituição em duas partes essenciais do esqueleto benzilisoquinolínico, a parte isoquinolínica e a parte benzílica.

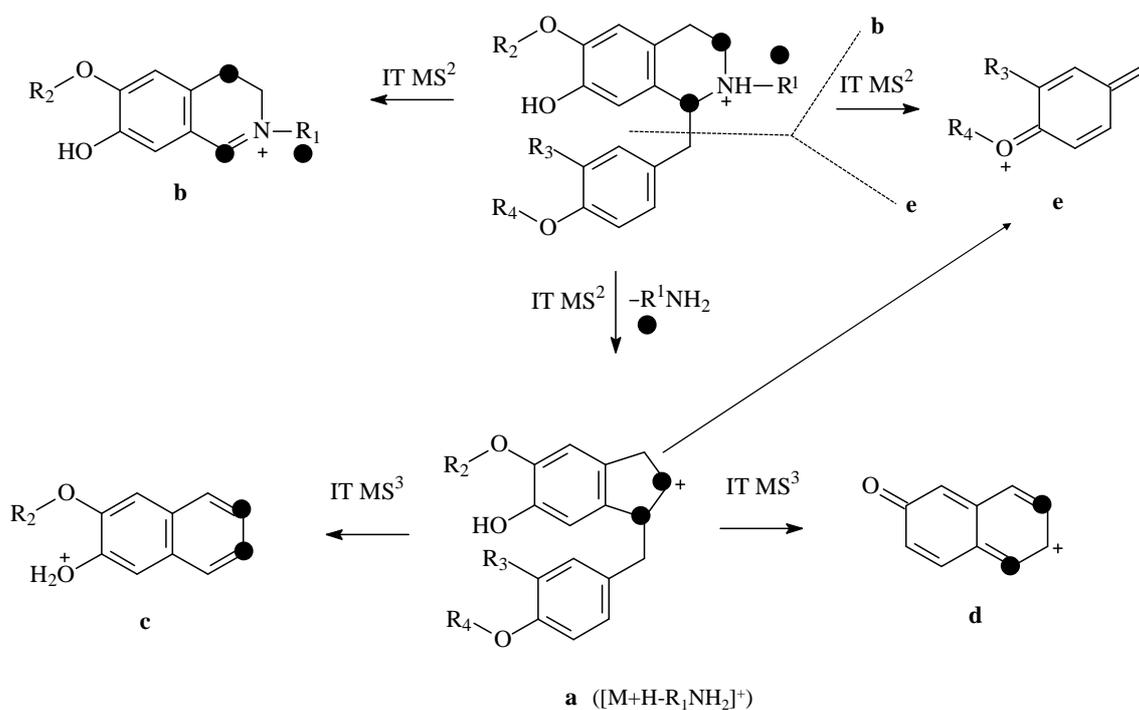


Figura 36: Proposta de fragmentação para alcaloides benzilisoquinolínicos. Fonte: Schmidt et al., 2005.

O íon observado de m/z 192 para alcaloides benzilisoquinolínicos pode ser assinalado como o fragmento chave do tipo b, observado em isoquinolínicos contendo *N*-metila e metoxila adjacente à hidroxila, conforme observado para os alcaloides *N*-metil-3-hidroxicoclaurina, reticulina e *N*-metilcoclaurina (Schmidt et al., 2005).

Alcaloides tetrahidroprotoberberínicos também apresentam perdas elevadas de massa durante o processo de fragmentação (Chen & Maclean, 1968). Em geral são formados durante o processo de fragmentação íons diagnósticos (**a**, **b**, **c** e **d**) (Figura 37), sendo estes íons resultado da abertura “retro Diels-Alder” do anel C.

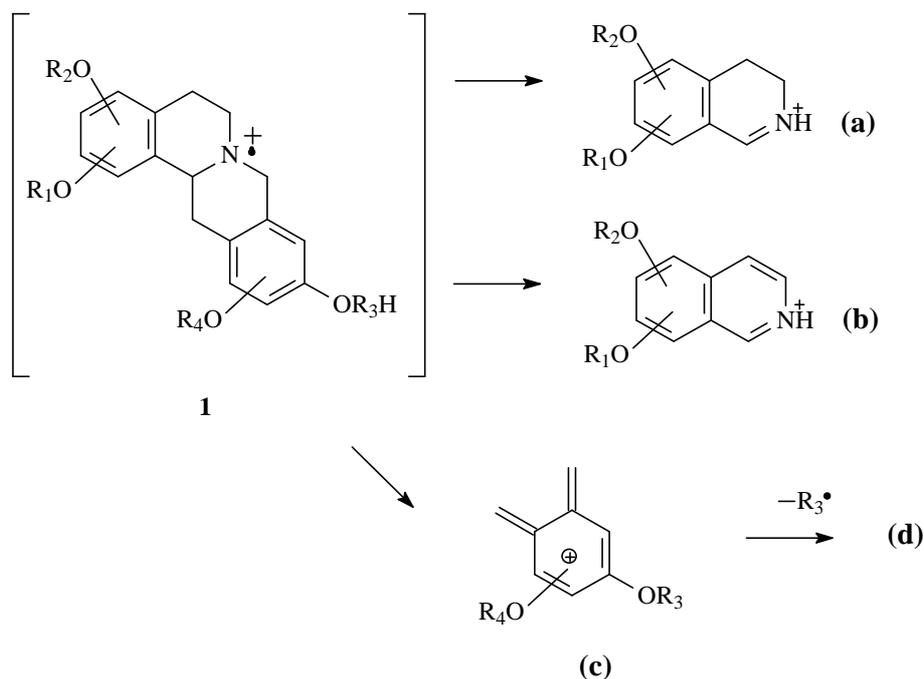


Figura 37: Proposta de fragmentação para os alcaloides tetrahidroprotoberberínicos. Fonte: Chen & Maclean, 1968).

Apesar do estudo de Chen & Maclean (1968) ter sido realizado com íons radiculares, estudos realizados com alcaloides tetrahidroprotoberberínicos

(dados não publicados) protonados apontam para a formação de íons fragmentos característicos, conforme demonstrado na figura 38. Ambos os alcaloides (isolados anteriormente por nosso grupo de pesquisa) apresentaram elevada perda de massa, gerando o íon de m/z 178, podendo este ser caracterizado como íon chave do tipo **a**, também observado para os alcaloides escoulerina e caseamina, os quais apresentam uma metoxila e uma hidroxila no anel A do esqueleto tetrahidroprotoberberínico.

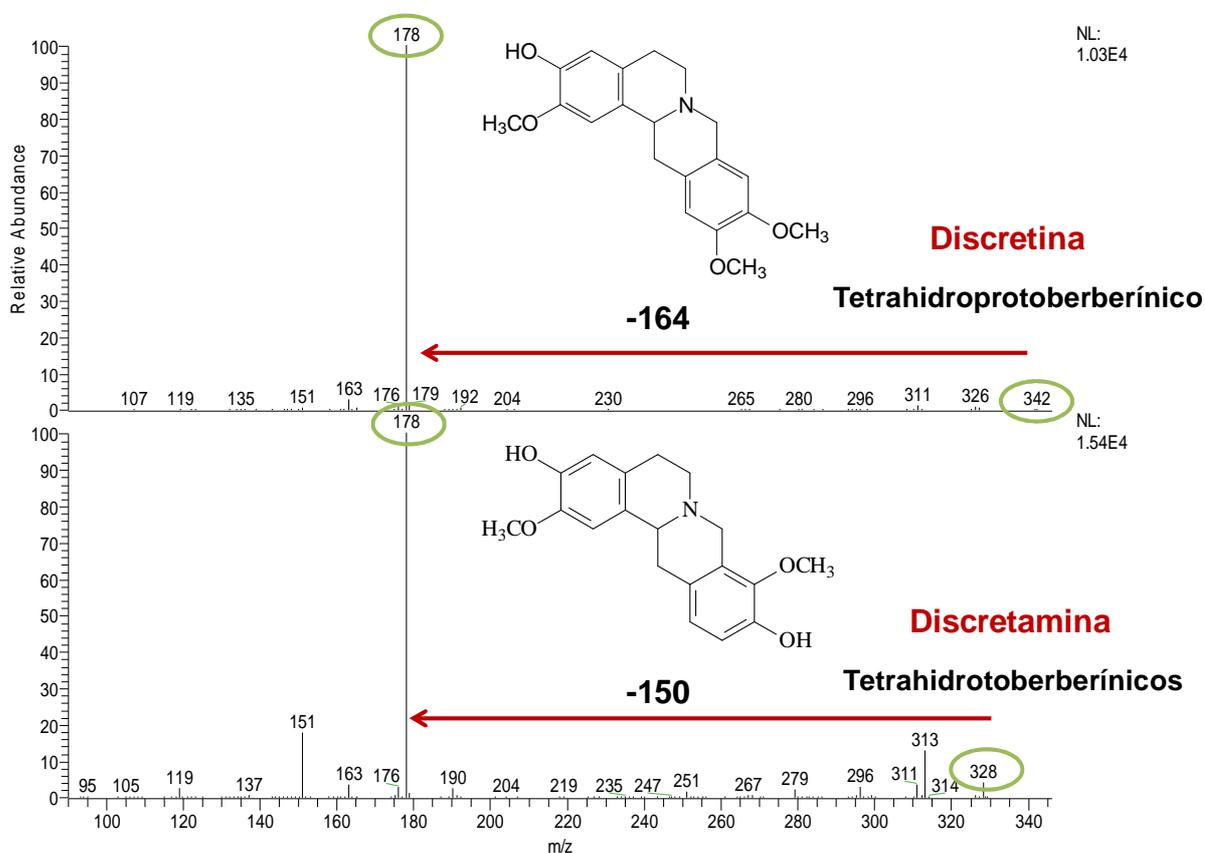


Figura 38: Espectro de massas em MS² obtidos de dois padrões de alcaloides protoberberínicos (discretina e discretamina) no sistema Ion Trap. Íons de m/z 342 e 328 respectivamente de cima para baixo.

Analisando o espectro de MS⁵ (Figura 39) do íon de m/z 282, observou-se uma perda inicial de 17 Da, seguida por perdas de 15, 15 e 28 Da. A perda inicial sugere a ausência de uma metila ligada ao nitrogênio do heterociclo. Perdas de 15 Da (-CH₃) em sequência são um indicativo da presença de grupos

metoxilas adjacentes ligados a um dos anéis aromáticos. Estas características estão de acordo com o alcaloide nornuciferina (Figura 40), substância anteriormente descrita em *Unonopsis guatterioides* (SILVA et al., 2012), além de diversas outras espécies da família Annonaceae como *Annona pickelii* (DUTRA et al., 2012), *Duguetia flagellaris* Huber (NAVARRO et al., 2001) e *Rollinia ulei* (MISKI et al., 1995). Estudos *in vivo* realizados com partes aéreas da planta *Annona cherimolia*, mostraram que o extrato bruto que possuía entre seus constituintes o alcaloide nornuciferina (Figura 40) apresentou potencial terapêutico como agente antidepressivo (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2012).

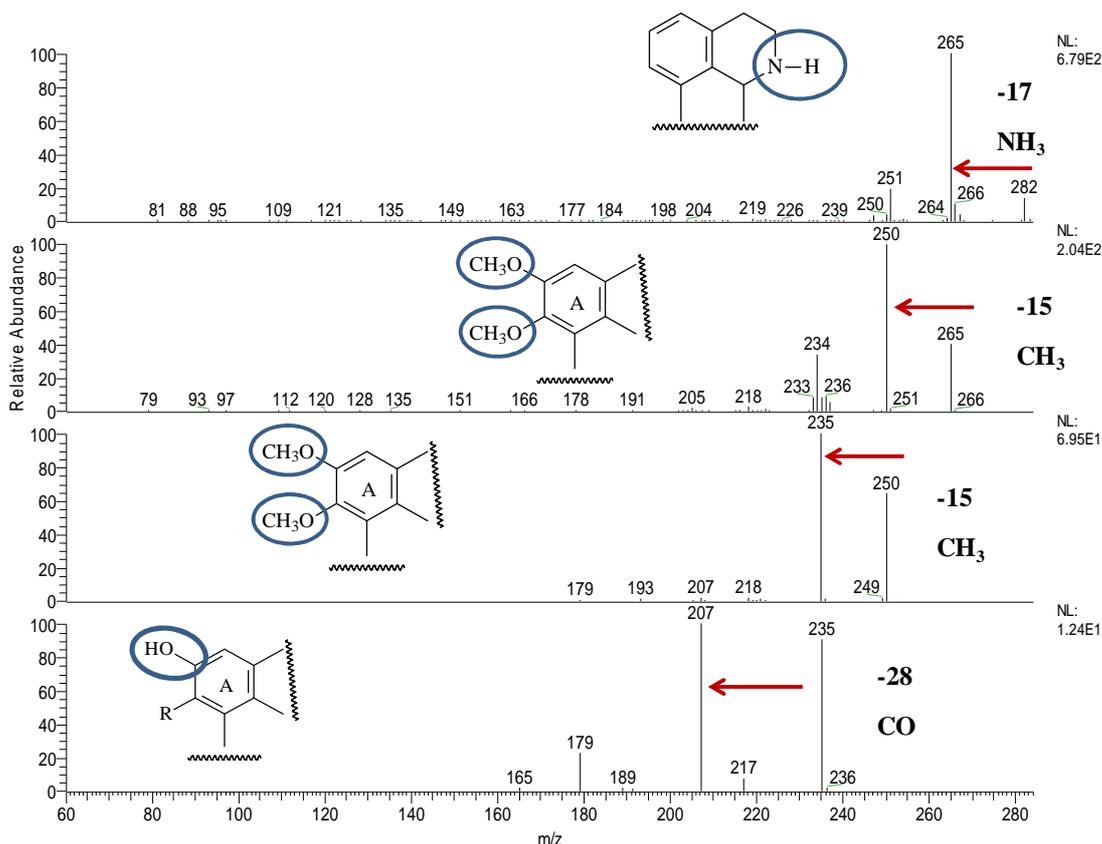


Figura 39: Espectros de massas até MS^5 do íon de m/z 282 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) presente na fração das folhas de *B. pleiosperma*.

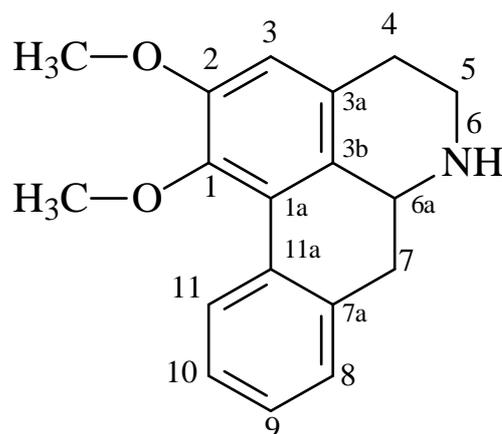


Figura 40: Estrutura do alcaloide Nornuciferina.

O íon de m/z 268 (Figura 41), quando submetido à análise de MS⁴, revelou perdas de 17, 32 e 28 Da. Como discutido anteriormente, estas perdas estão associadas à ausência de metila no nitrogênio do heterociclo e presença de metoxila adjacente à hidroxila no anel aromático. Estas características estruturais estão de acordo com o alcaloide asimilobina (Figura 42) substância anteriormente descrita em *U. lindmanii* e *U. guatterioides*, (SILVA et al., 2012), além de descrita em diversas outras espécies da família Annonaceae como *Annona cherimolia* (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2012) e *Annona crassiflora* Mart. (EGYDIO et al., 2013). O alcaloide aporfínico asimilobina possui atividades antimicrobiana (VILLAR et al., 1987; PAULO et al., 1992; COSTA et al., 2013b) e citotóxica (CORRECHÉ et al., 2008), já descritas em literaturas.

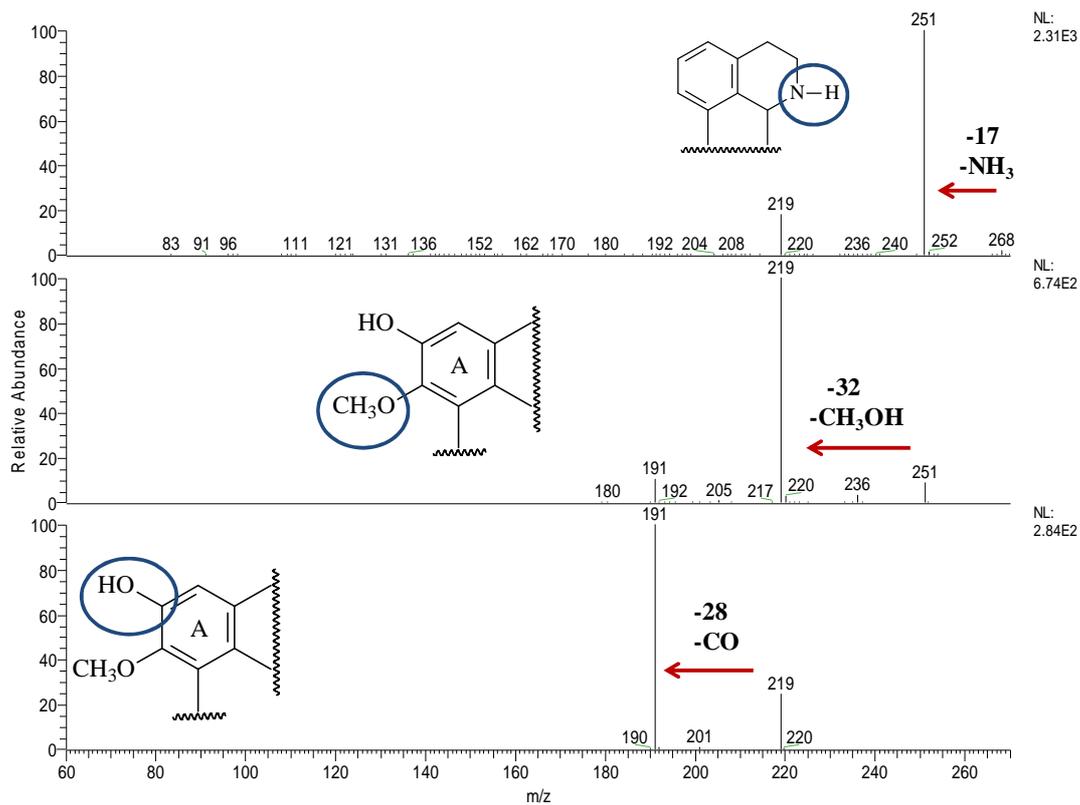


Figura 41: Espectros de massas até MS⁴ do íon de m/z 268 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica das folhas de *B. pleiosperma*.

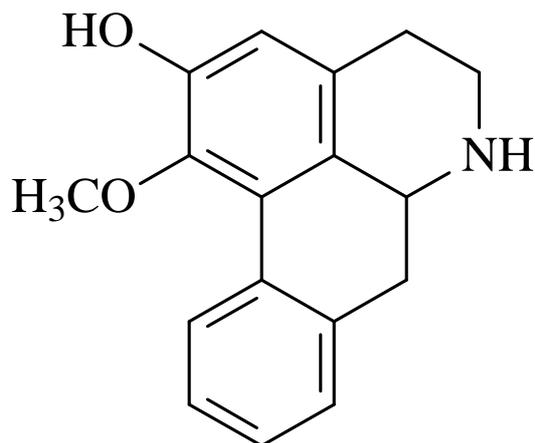


Figura 42: Estrutura da asimilobina.

5.7.2 Análise espectrométrica da fração alcaloídica dos galhos de *B.*

pleiosperma

A análise por ESI-IT-MS da fração alcaloídica dos galhos revelou um perfil alcaloídico muito semelhante ao observado para a fração alcaloídica das folhas (Figura 32), destacando-se apenas uma maior intensidade do íon de m/z 330. A análise do espectro de MS^2 do íon de m/z 330 (Figura 43) apontou para uma elevada perda de massa gerando um íon de m/z 192, característico de alcaloides isoquinolínicos. Além do íon chave do tipo b, foi possível observar os íons chave a (m/z 299) e c (m/z 175), apontando assim para uma estrutura contendo *N*-metila, metoxila e hidroxila no anel A, além de metoxila e hidroxila no anel C. Uma comparação entre os espectros de MS - MS do alcaloide de m/z 298 presente nas folhas e do alcaloide de m/z 330 presente nos galhos é apresentado na figura 44.

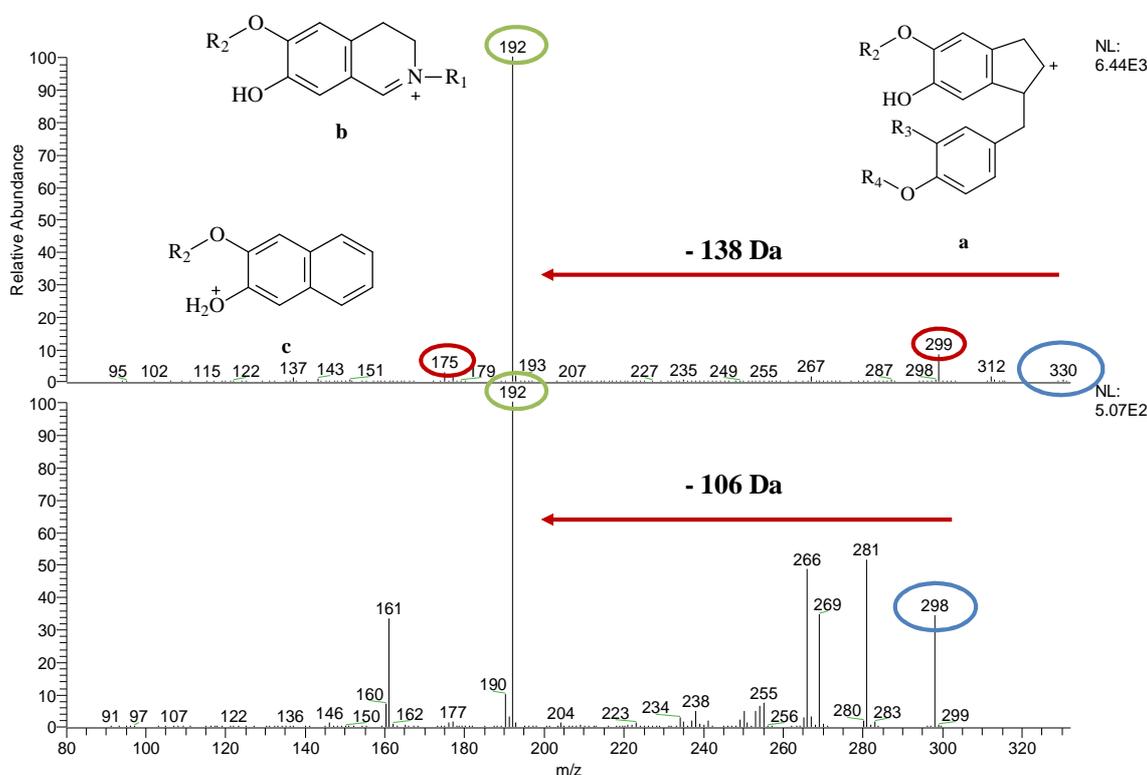


Figura 43: Espectro de massas MS^2 do íon de m/z 330 (acima), presente na fração alcaloídica dos galhos de *B. pleiosperma*, e do íon de m/z 298 (abaixo) presente na fração alcaloídica das folhas de *B. pleiosperma*.

Analisando o espectro de MS² do íon de m/z 328 (Figura 44), observa-se uma perda inicial de 17 Da, além de uma perda inicial de 31 Da, seguida de 32 Da, e uma perda de elevada massa, gerando o íon de m/z 178, anteriormente observado em alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos. Neste caso, suspeita-se que existam ao menos 3 substâncias de m/z 328 nos galhos, sendo elas: um alcaloide aporfínico contendo uma *N*-metila e uma hidroxila adjacente à uma metoxila (mesma substância presente nas folhas), um alcaloide aporfínico sem *N*-metila e um alcaloide do tipo tetrahidroprotoberberínico.

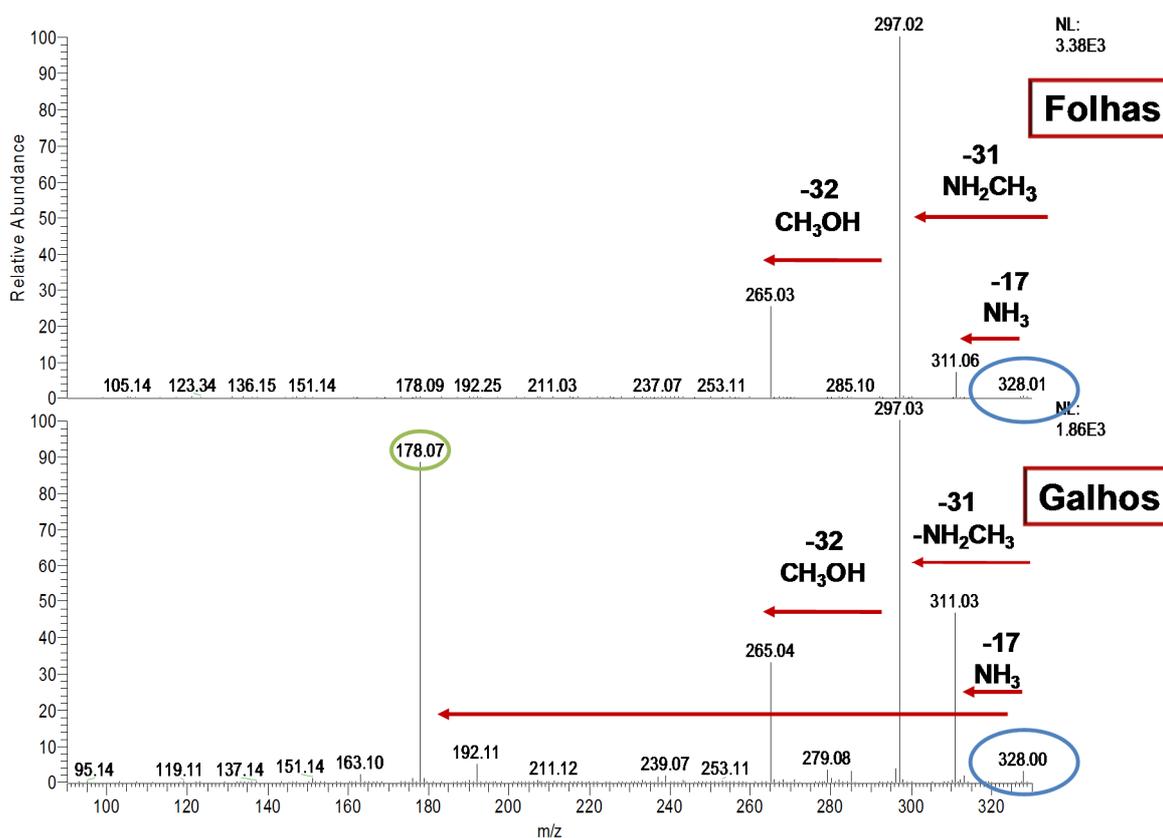


Figura 44: Espectro de massas até MS² do íon de m/z 328, presente respectivamente na fração alcaloídica das folhas e galhos de *B. pleiosperma*.

5.7.3 Análise espectrométrica da fração alcaloídica das cascas de *B. pleiosperma*

No espectro de íons totais da fração alcaloídica das cascas (Figura 32) são observados principalmente os picos de m/z par 328 e 356. O espectro de MS^2 do íon de m/z 328 (Figura 45) revela um padrão de fragmentação semelhante aos alcaloides estudados por ESI-IT-MS, sendo proposto um esqueleto do tipo tetrahidroprotoberberínico com o mesmo padrão de substituição para os anéis A e D. O espectro de MS^2 do íon em m/z 356 (Figura 46) aponta para uma mistura de substâncias, podendo-se destacar o íon fragmento de m/z 192, sugerido anteriormente como íon característico de alcaloides benzilisoquinolínicos.

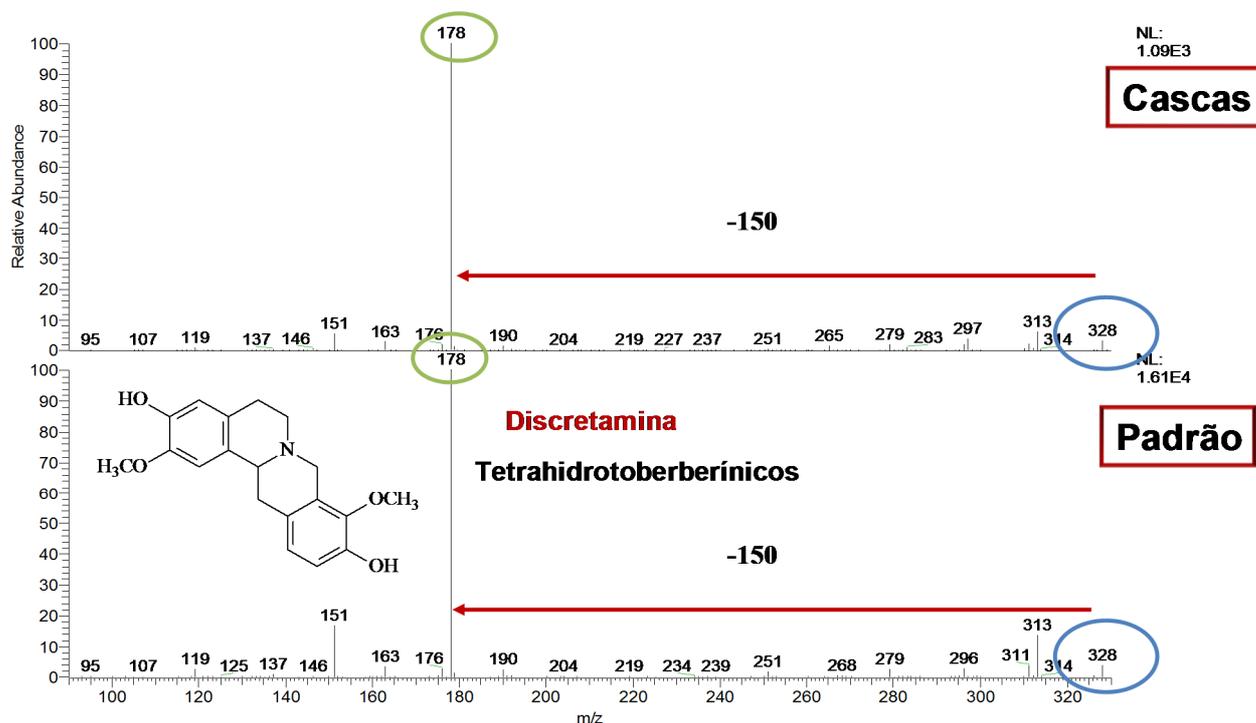


Figura 45: Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 328 presente na fração alcaloídica das cascas de *B. pleiosperma* e do alcaloide tetrahidroberberínico utilizado como padrão.

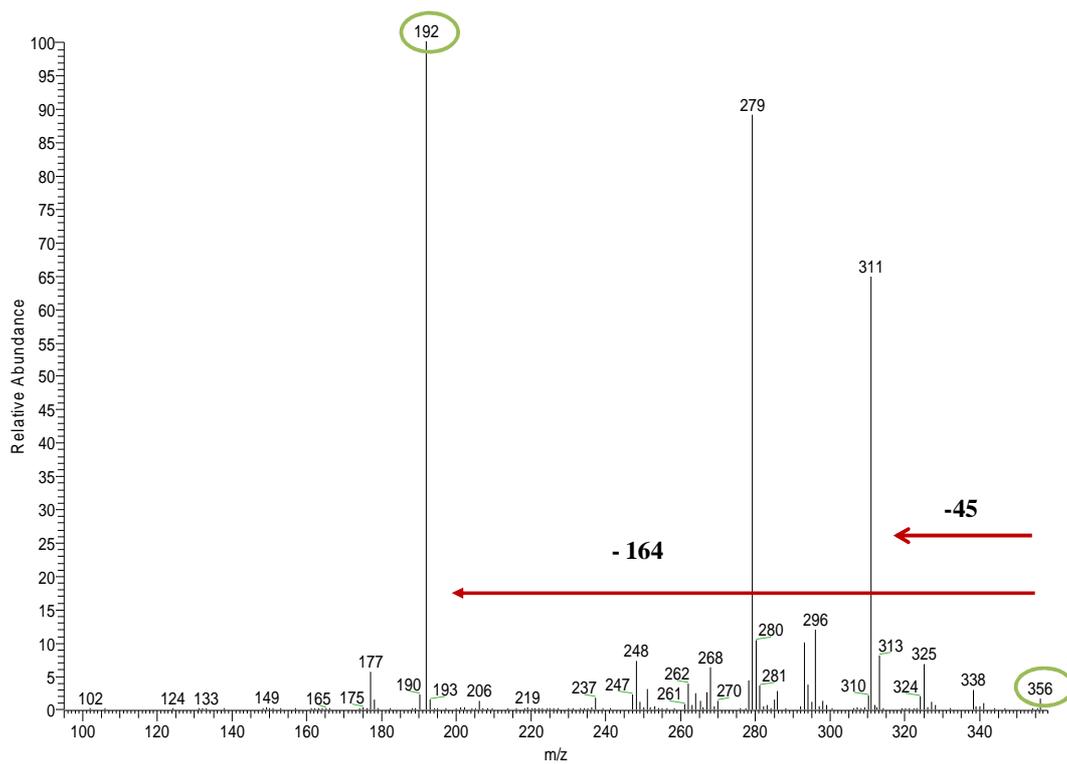


Figura 46: Espectro de massas em MS² do íon de m/z 356 presente na fração alcaloídica das cascas de *B. pleiosperma*.

5.8 Análises por ESI-MS e APCI-MS da fração alcaloídica obtida das folhas em escala preparativa de *B. pleiosperma*

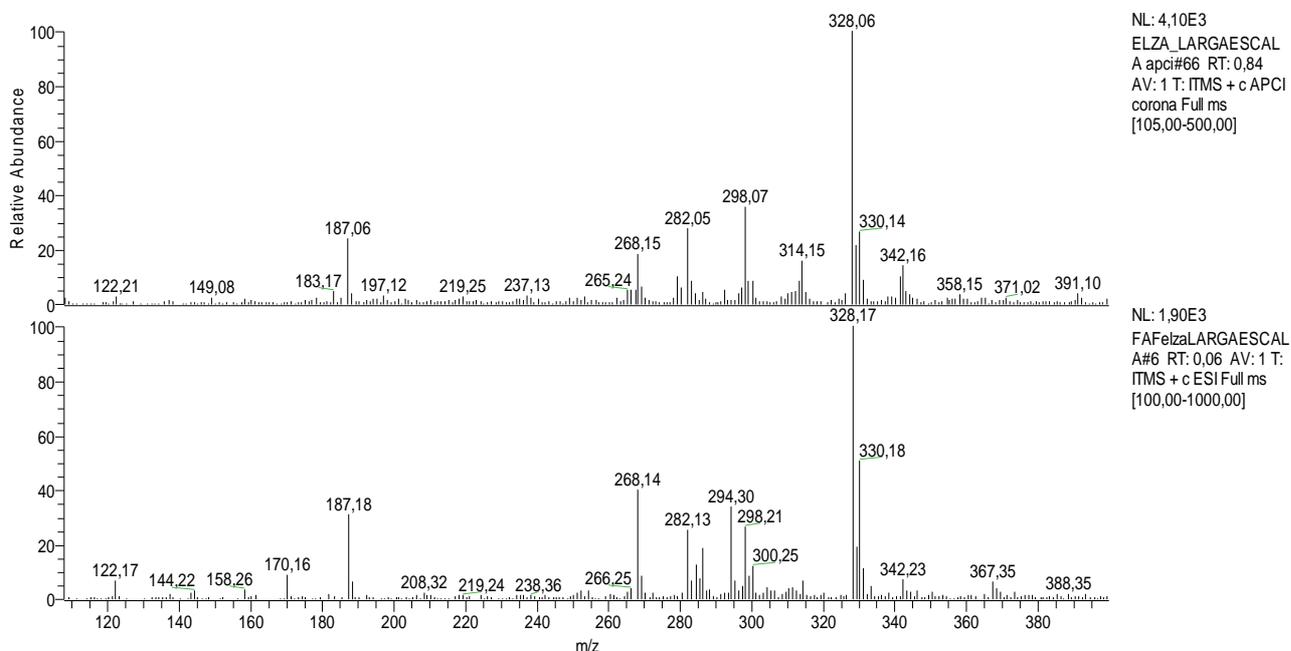


Figura 47: Espectro comparativo dos modos de ionização ESI e APCI, para a fração alcaloídica das folhas.

Análise comparativa da fração alcaloídica das folhas obtida em escala preparativa através de duas técnicas de ionização diferentes (APCI e ESI) (Figura 47), não evidenciou significativa diferença entre os espectros, estando os constituintes majoritários de acordo com aqueles observados na análise em micro extração. Desta forma foi possível destacar os íons de m/z 268, 282, 298, 328 e 330, os quais se destacam por sua intensidade, além do íon de m/z 187.

5.9 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração alcaloídica das folhas de *B. pleiosperma* Maas

5.9.1 Determinação estrutural da amostra BpF3.

A amostra codificada como BpF3 (4,5 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. A análise de massas desta amostra evidenciou um íon *quasi*-molecular de m/z 282 $[M+H]^+$ (Figura 48), sendo este, submetido à análise de MS^n (Figura 49). No espectro de MS^n é possível observar além da perda inicial de 17 Da, perdas sequenciais de 15 Da, o mesmo padrão observado nas análises em escala analítica (Figura 39). A perda inicial de 17 Da sugere a ausência da metila ligada ao nitrogênio do anel B do esqueleto aporfínico, enquanto que as perdas sucessivas de 15 Da apontam para a presença de metoxilas adjacentes no anel A. Estas evidências apontam para uma estrutura aporfínica sem *N*-metilação (Figura 50), com duas metoxilas adjacentes e sem substituição do anel D.

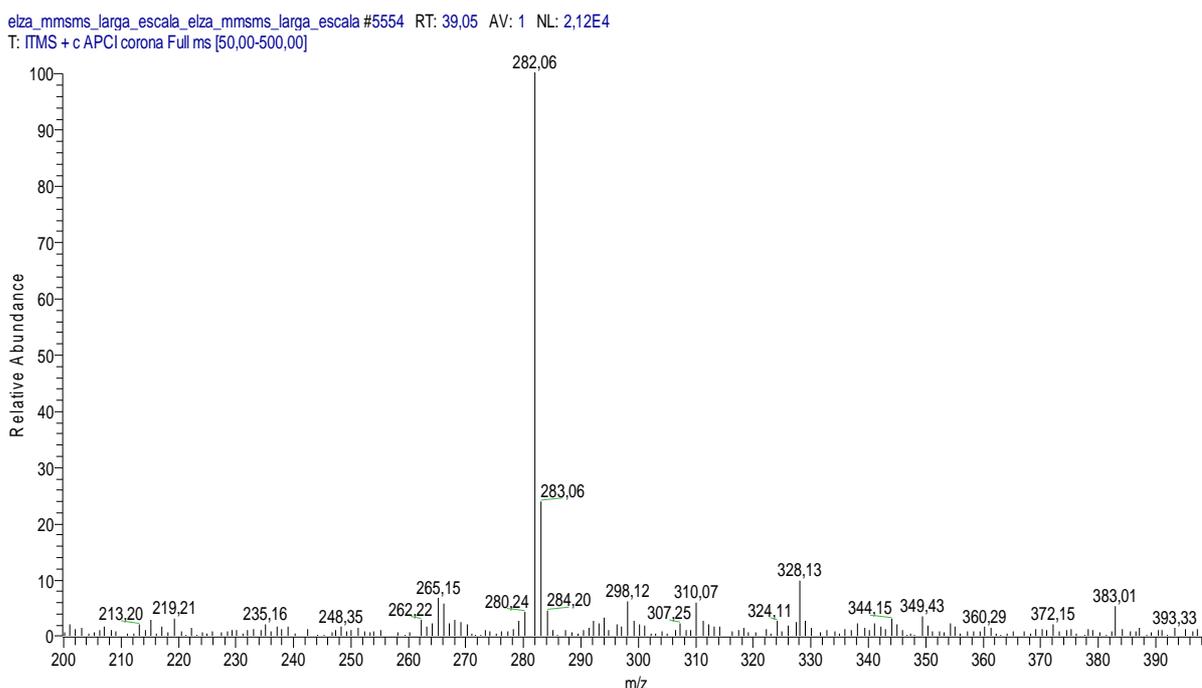


Figura 48: Espectro de massas do íon de m/z 282 presente na fração alcaloídica BpF3 das folhas de *B. pleiosperma*.

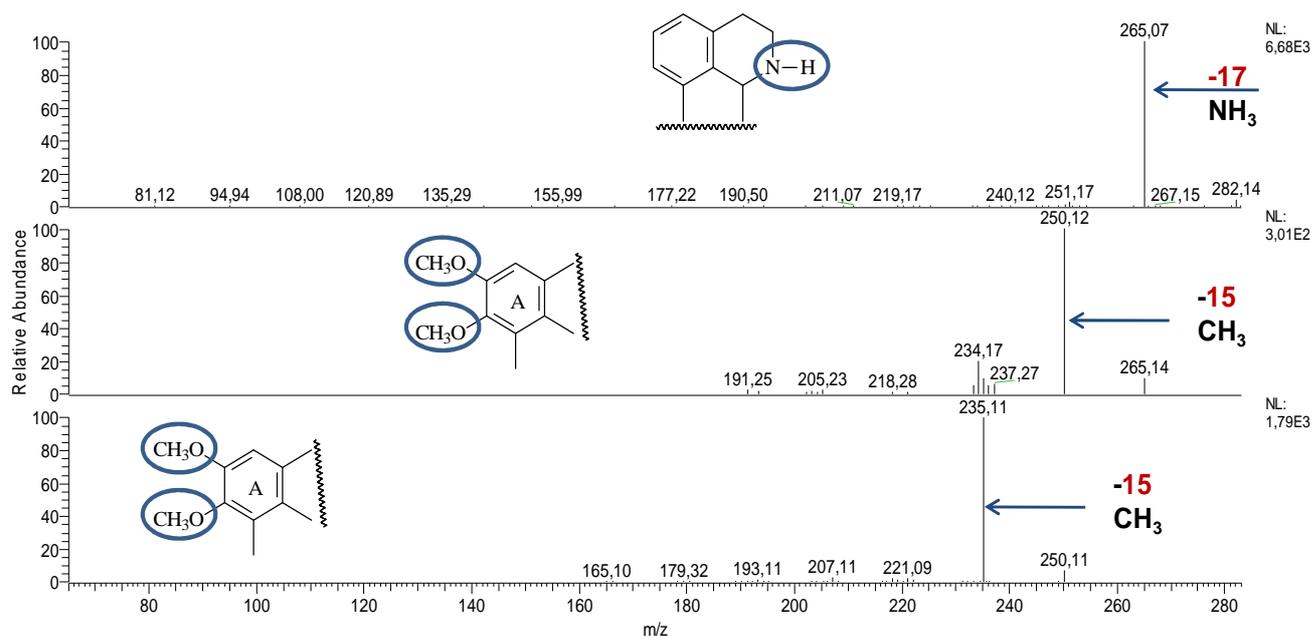


Figura 49: Espectro de massas em MSn do íon de m/z 282 ([M+H]⁺).

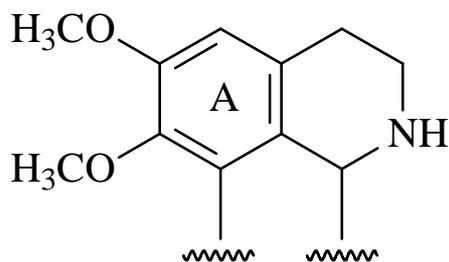


Figura 50: Estrutura aporfínica sem *N*-metilação.

No espectro de RMN de ¹H (Figura 51, Figura 133 – Anexo 1) foi possível observar os sinais referentes aos hidrogênios aromáticos em δ 7,24 (m, 2H), 7,31(m, 1H) e 8,40(d, 7,8 Hz, 1H), característicos do anel D de esqueletos aporfínico não substituído, um singlete em δ 6,66 (s, 1H), com deslocamento característico da posição H-3 do esqueleto aporfínico com substituições no anel A, além de dois singletos (Figura 52) em δ 3,68 (s, 3H) e 3,90 (s, 3H), cada um integrando para três hidrogênios, característico de metoxilas. Nos mapas de contorno de HSQC e HMBC (Figura 53, Figura 134 e 135 – Anexo 1) verifica-se

que o hidrogênio em δ 6,66, ligado ao carbono em δ 111,90 (C-3), se correlaciona com os carbonos em δ 145,6, 152,8 e 28,24, as duas primeiras, apontando para um anel A dissustituído. Este fato fora confirmado através dos mapas de contornos HSQC e HMBC (Figura 54 e 55), onde foi observado para os hidrogênios das metoxilas em δ 3,68 e 3,90, ligadas aos carbonos 60,2 e 55,3, uma correlação com os carbonos em δ 145,6 (C-1) e 152,8 (C-2), respectivamente. Outras correlações significativas são apresentadas na Tabela 6 e o espectro total de RMN de ^1H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figura 133, 134 e 135).

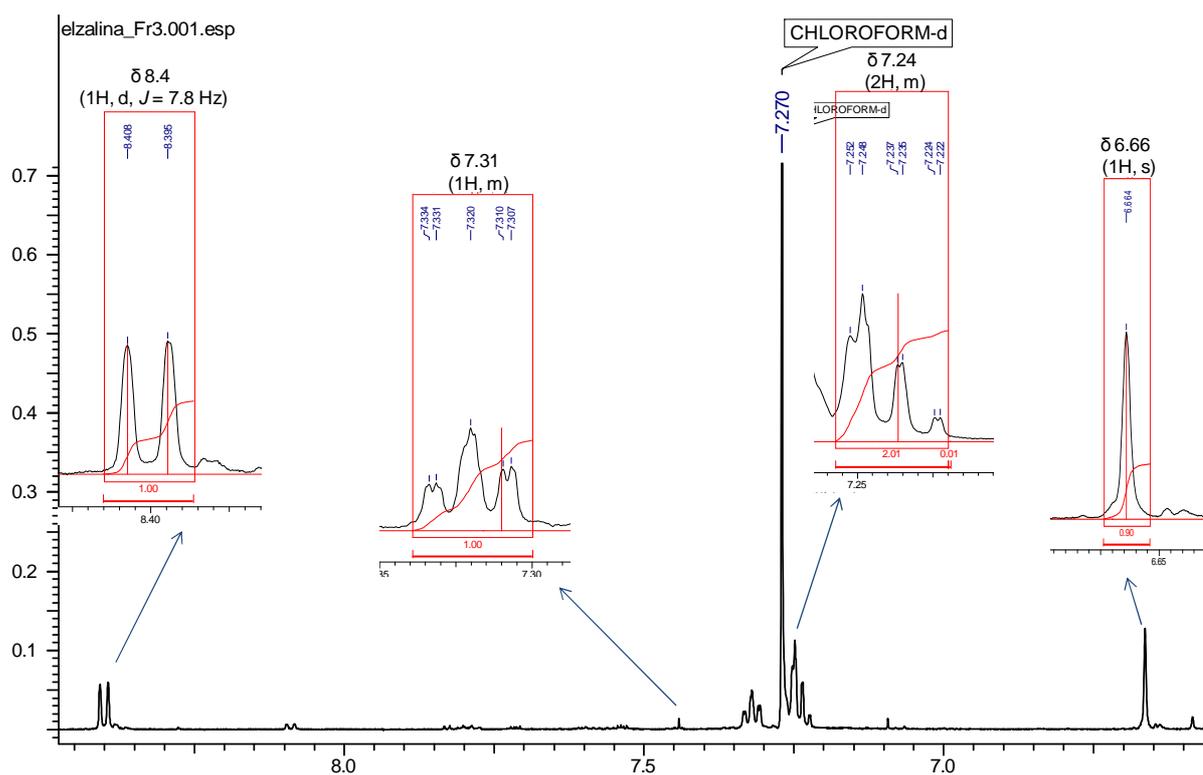


Figura 51: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da amostra BpF3.

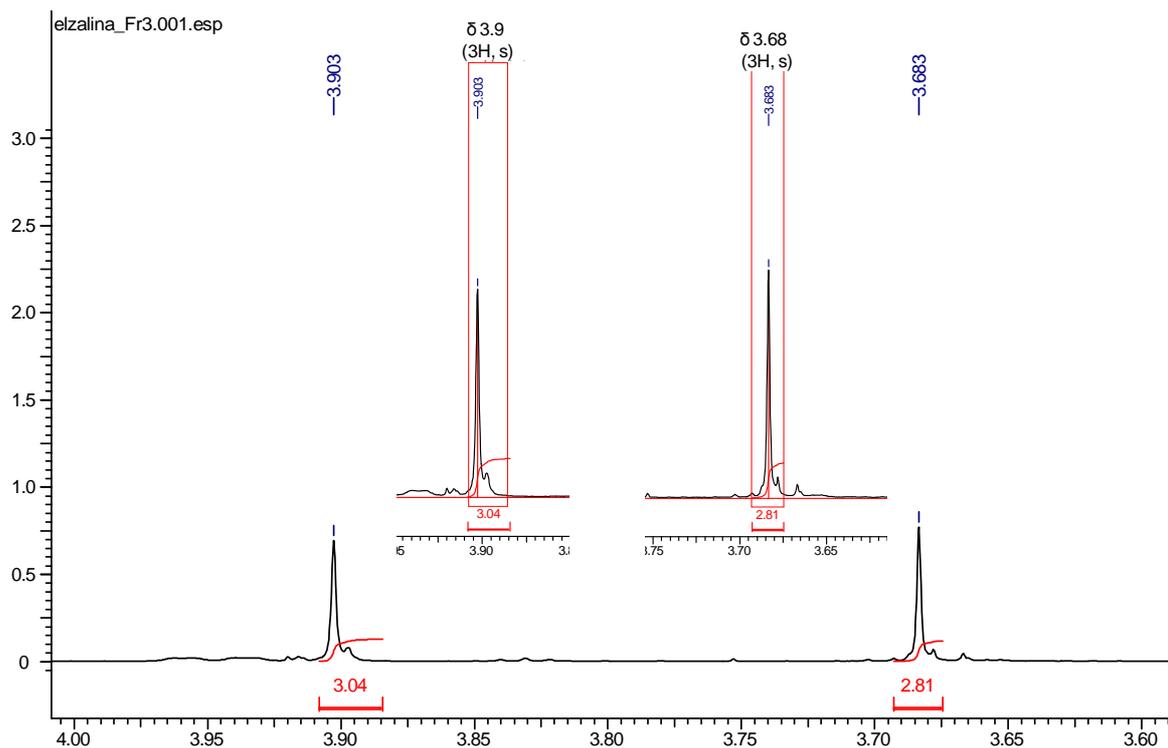


Figura 52: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente a metoxilas da amostra BpF3.

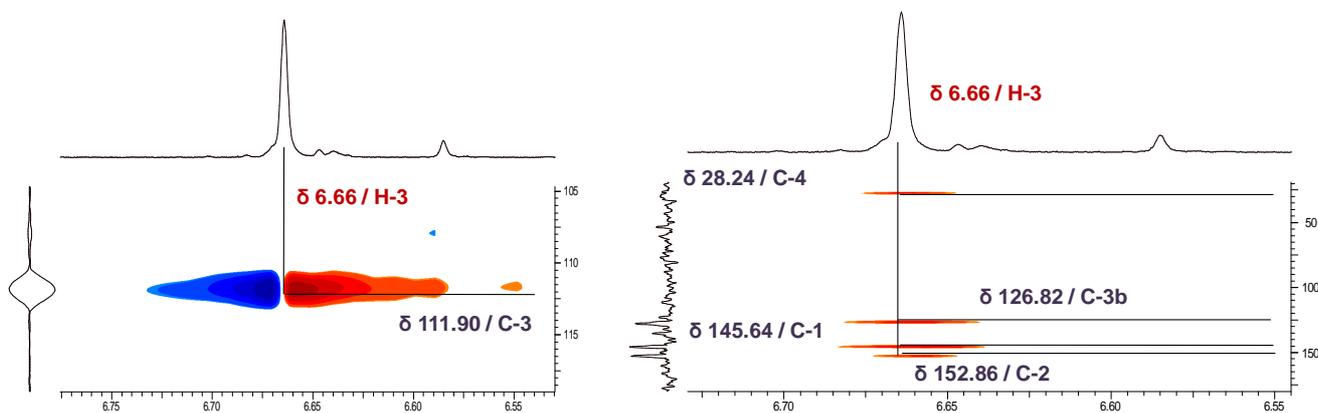


Figura 53: Ampliação dos mapas de contornos HSQC e HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região do H-6 (δ 66,6) da amostra BpF3.

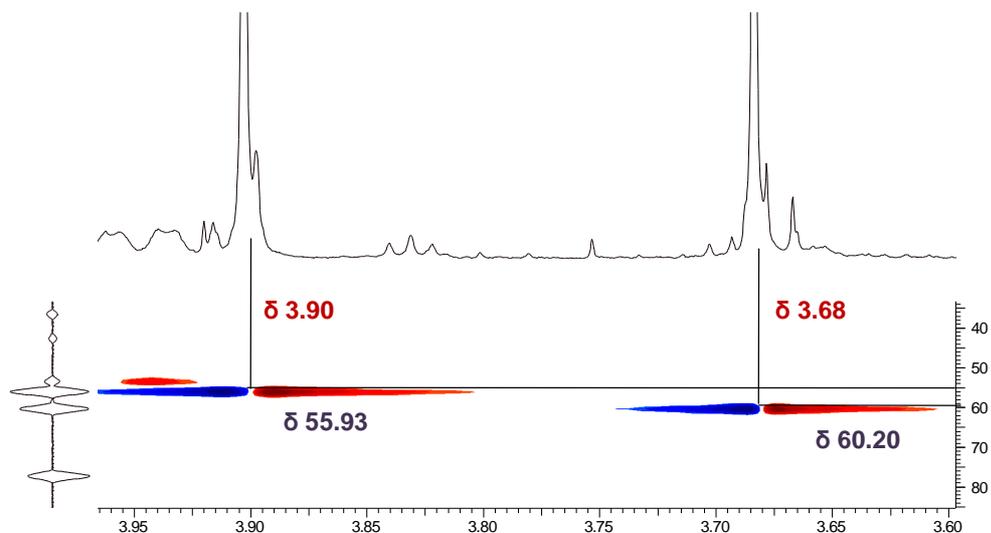


Figura 54: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente aos hidrogênios metoxílicos da amostra BpF3.

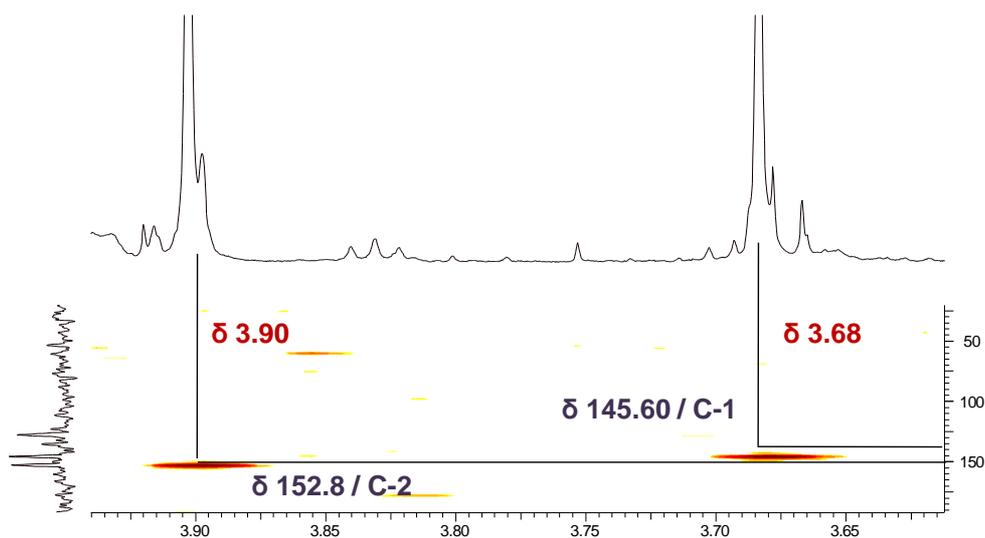


Figura 55: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente aos hidrogênios metoxílicos da amostra BpF3.

A partir das análises dos dados espectrométricos e espectroscópicos, foi possível propor que a amostra em questão se trata do alcaloide aporfínico nornuciferina (Figura 56 e 57), o que foi confirmado por comparação com dados existentes na literatura (Tabela 6; GUINAUDEAU et al., 1994; HASRAT et al., 1997; ORTIZ et al., 2007; DUTRA et al., 2012).

O alcaloide aporfínico nornuciferina, é uma substância comumente encontrada em espécies da família Annonaceae, como *Rollinia pittieri* (TORRES

et al., 2007), *Annona muricata* (GUINAUDEAU et al., 1988; HASRAT et al., 1997), *Annona sericea* (CAMPOS et al., 2008), *Unonopsis guatterioides*, *Unonopsis duckei* (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2014). Esta substância possui atividades antidepressiva (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2012) e atividade leishmanicida já descrita em literatura (MONTENEGRO et al., 2003).

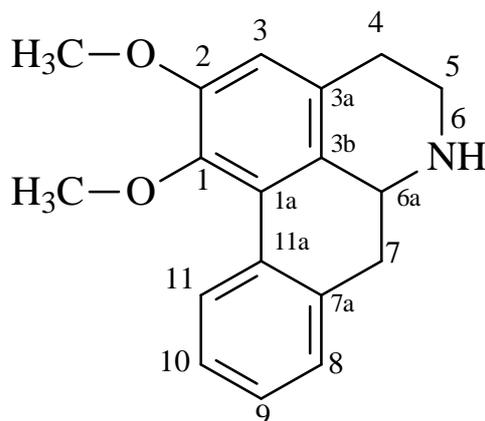


Figura 56: Estrutura do alcaloide nornuciferina.

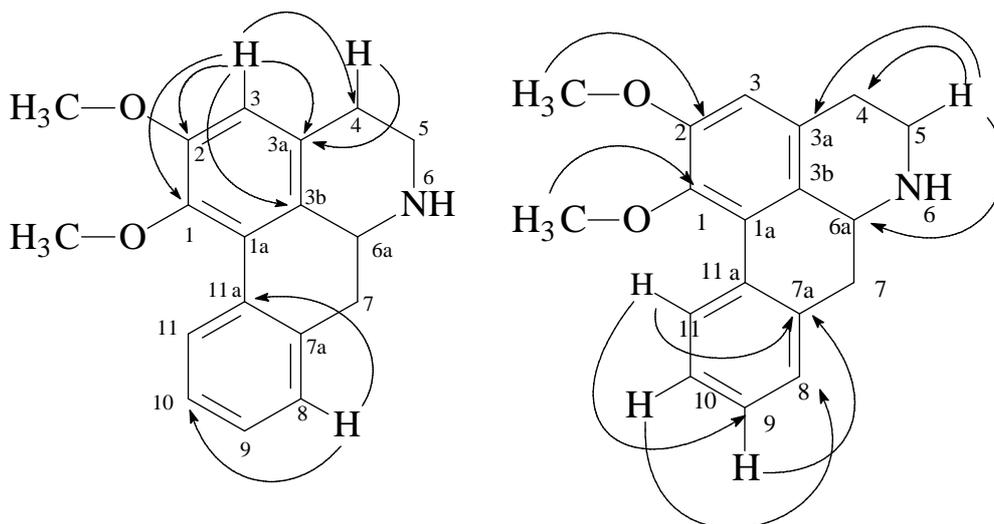


Figura 57: Principais correlações observadas para amostra BpF3.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H , $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ da amostra BpF3.

BpF3 (Nornuciferina)					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	$g\text{HSQC}$ ^a	^{13}C ^c	$g\text{HMBC}$ (^1H - ^{13}C) ^a
1	–	–	145,64	145,5	–
1a	–	–	126,76	126,71	–
2	–	–	152,86	152,54	–
3	6,66 (s, 1H)	6, 65 (1H, s)	111,90	111,77	28,24, 145,64; 152,86; 126,82
3a	–	–	128,04	128,15	–
3b	–	–	126,82	127,08	–
4 _{Pseudoax}	3,13 (1H, m)	3,12 (1H, m)	28,24	28,31	–
4 _{Pseudoeq}	2,77 (1H, dd, 15,9 e 3,3)	2,76 (1H, dd, 15,8 e 2,6)	28,24	28,24	128,04
5 _{Pseudoax}	3,06 (1H, dd, 12,3 e 4,2)	3,06 (1H, dd, 12,0 e 2,6)	42,55	42,67	–
5 _{Pseudoeq}	3,50 (1H, dd, 11,1 e 5,40)	3,49 (1H, dd, 12,0 e 5,0)	42,55	42,67	128,04; 53,37; 28,24
6a	4,03 (1H, dd, 13,56 e 4,8)	3,93 (1H, dd, 13,6 e 4,8)	53,37	53,41	–
7 _{Pseudoax}	2,88 (1H, t, 13,8 Hz)	2,86 (1H, t, 13,7)	36,43	36,68	–
7 _{Pseudoeq}	2,98 (1H, dd, 13,8 e 4,4)	2,97 (1H, dd, 13,8 e 4,7)	36,43	36,68	–
7a	–	–	135,43	135,47	–
8	7,24 (1H, m)	7,23 (1H, m)	127,0	127,91	132,10; 127,43
9	7,24 (1H, m)	7,23 (1H, m)	127,60	127,57	135,43
10	7,31 (m, 1H)	7,31 (1H, m)	127,43	127,21	127,90
11	8,40 (1H, d, 7.8)	8,39 (1H, d, 7,7)	128,32	128,48	135,43; 127,60
11a	–	–	132,10	132,03	–
1-OCH ₃	3,68 (3H, s)	3,66 (3H, s)	60,25	60,28	145,60
2-OCH ₃	3,90 (3H, s)	3,89 (3H, s)	55,93	55,95	152,86
N-H	2,08 (1H, s)	–	–	–	–

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^{b,c}Dados da literatura de acordo com Dutra et. al., 2012 e Ortiz et al., 2007 (H; 400 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.9.2 Determinação estrutural da amostra BpF13.

A amostra codificada como BpF13 (10,3 mg) apresentou-se como um sólido amorfo. A análise de espectrometria de massas (Figura 58) desta amostra apontou para a presença de duas substâncias, sendo observados majoritariamente os íons *quasi*-moleculares de m/z 328 e 330 $[M+H]^+$. Estes íons foram submetidos à análise de MS^n (Figura 59 e 60), sendo observados padrões distintos de fragmentação. Enquanto o íon de m/z 328 apresentou perda inicial de 17 Da, seguida de perdas sequenciais de 15 Da, coerente com o padrão observado para esqueletos aporfínicos, o íon de m/z 330 apresentou uma perda de 138 Da, gerando um íon de m/z 192. Alcaloides isoquinolínicos tendem a gerar íons de m/z par, a partir de perdas de massa elevada quando o anel isoquinolínico contém uma *N*-Metila.

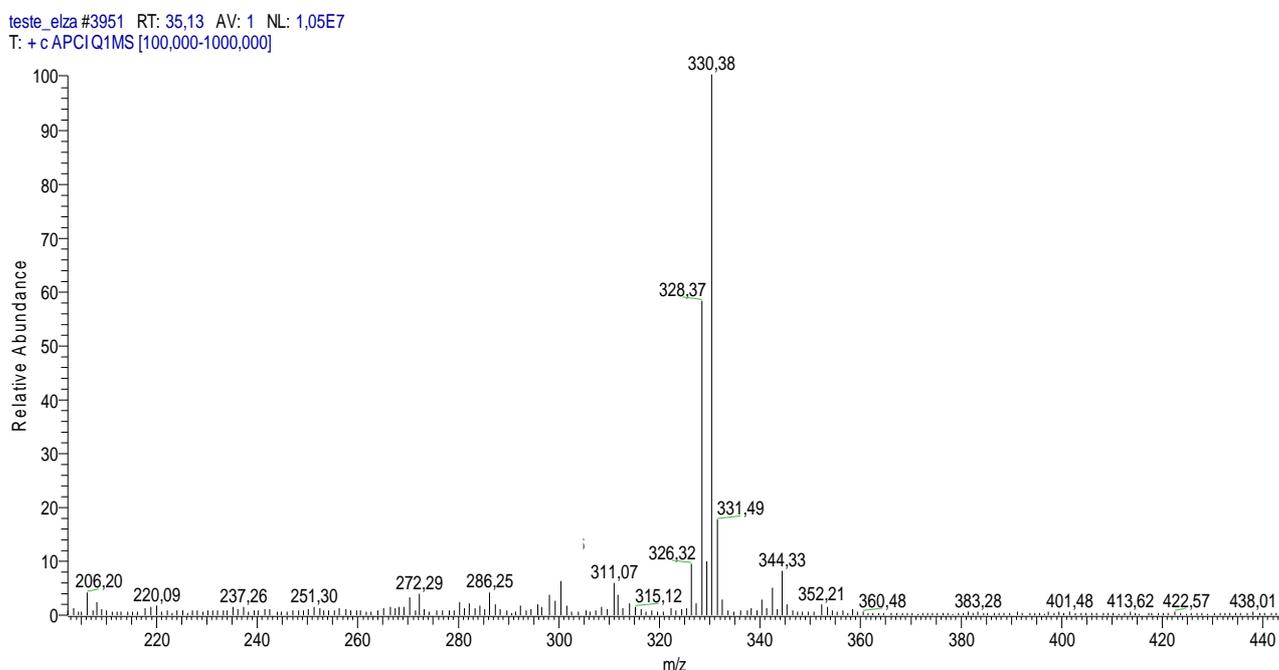


Figura 58: Espectro de massas do íon de m/z 328 e 330 presente na fração alcaloídica BpF13 das folhas de *B. pleiosperma*.

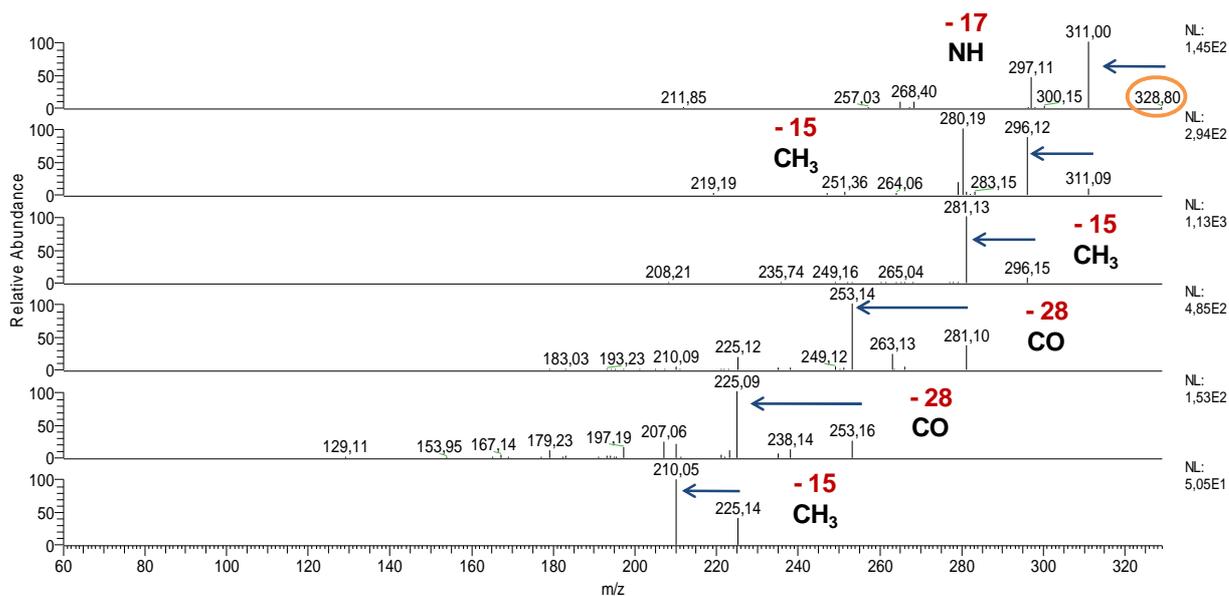


Figura 59: Espectro de massas em MSⁿ do íon de m/z 328 ([M+H]⁺).

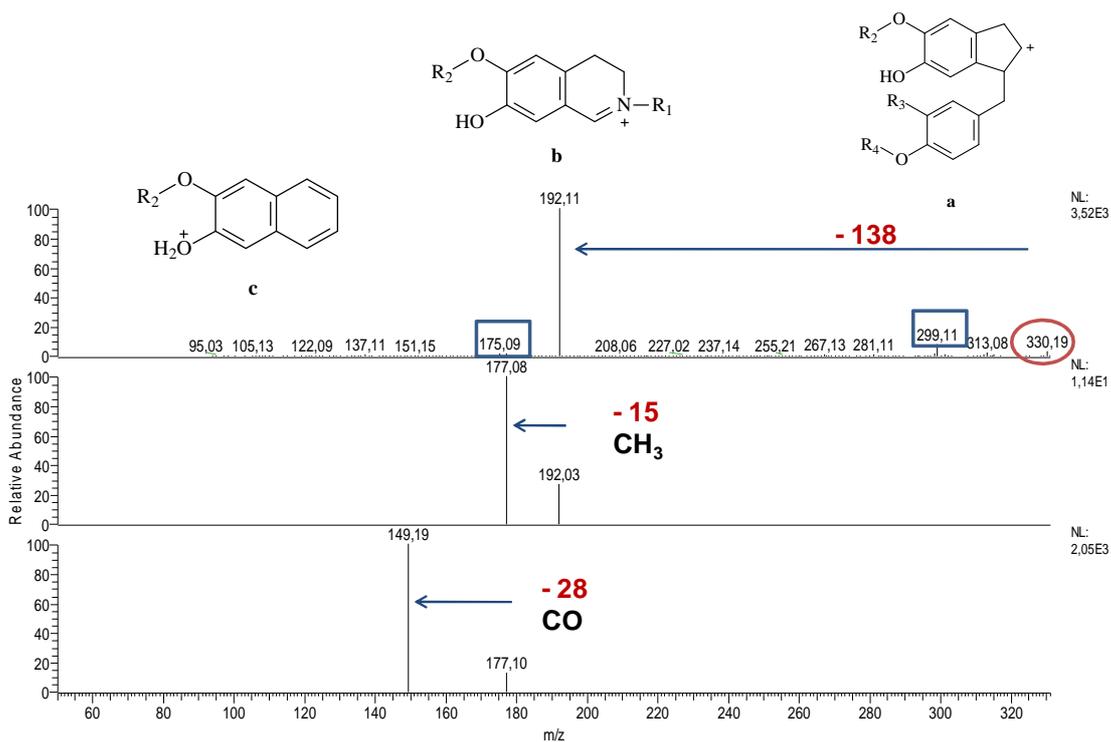


Figura 60: Espectro de massas em MSⁿ do íon de m/z 330 ([M+H]⁺).

Sabendo-se que o íon de m/z 192 trata-se na verdade dos anéis A e B, contendo uma metila ligada ao nitrogênio, o que é confirmado através do sinal característico de *N*-metila em δ 2,55 no espectro de RMN de ¹H (Figura 61), e a perda de 138 Da referente à saída do anel C, do esqueleto isoquinolínico. É

possível propor que existam em cada fragmento uma metoxila e uma hidroxila (Figura 60).

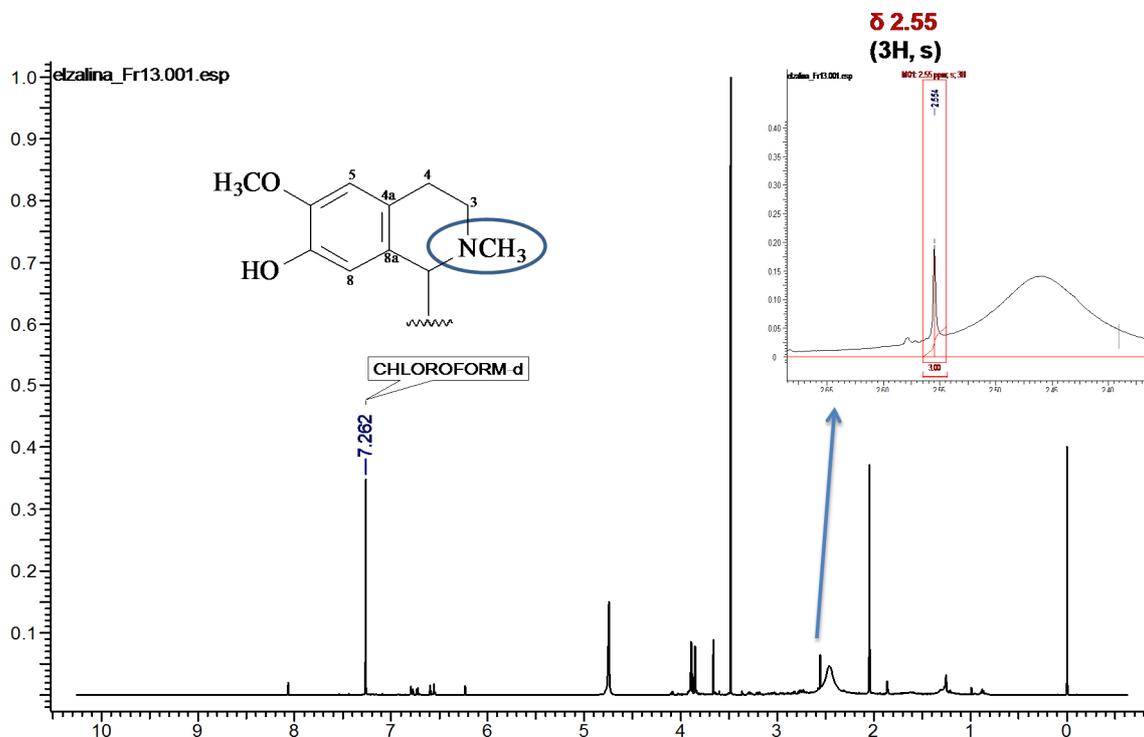


Figura 61: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) e ampliação do sinal relacionada a *N*-metila.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 62) é possível destacar na região de aromáticos os sinais em δ 6,78 (1H, d, $J = 2,1$ Hz, H-2'), δ 6,73 (1H, d, $J = 8,1$ Hz, H-5') e δ 6,54 (1H, dd, $J = 8,1$ e $2,1$ Hz, H-6'), cujas constantes de acoplamento estão de acordo com o anel C isoquinolínico dissustituído nas posições C-3' e C-4', sendo confirmado através dos mapas de contornos HSQC e HMBC (Figura 63 e 64). No mapa de contornos HSQC é possível observar as correlações dos hidrogênios em H-2', H-5' e H-6', com os carbonos em δ 116,05, 110,60 e 121,21 respectivamente. Além das correlações observadas no mapa de contornos HMBC para o H-5' (δ 110,60), o qual se correlaciona a J^β com o C-

1' (δ 131,52) e a J^{β} com o C-4' (δ 145,30), e para o H-6' foram observadas as correlações a J^{β} com os carbonos C-2' e C-4' (δ 116,02 e 145,30).

No espectro de RMN de ^1H aparecem dois singletos em δ 6,54 e δ 6,23, indicando que a metoxila esteja adjacente à hidroxila nas posições C-6 ou C-7 do anel A isoquinolínico, em acordo com a sugestão do espectro de massas. Os hidrogênios em δ 2,55 ligados ao carbono da *N*-metila, cujo sinal é observado em δ 41,00, correlacionam-se no HMBC com os carbonos em δ 45,50 (C-1) e 64,45 (C-3). Estas informações estruturais apontam para o alcaloide reticulina (Figura 66 e 67), um alcaloide isoquinolínico comumente descrito na família Annonaceae, sendo conhecido como precursor dos alcaloides aporfínicos em geral (LEBOEUF et al., 1981; ICHIMARU et al. 1997; DEWICK, 2009). Na tabela 7 são apresentadas as comparações com dados da literatura com os sinais atribuídos para a estrutura da reticulina. O espectro total de RMN de ^1H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 136, 137 e 138).

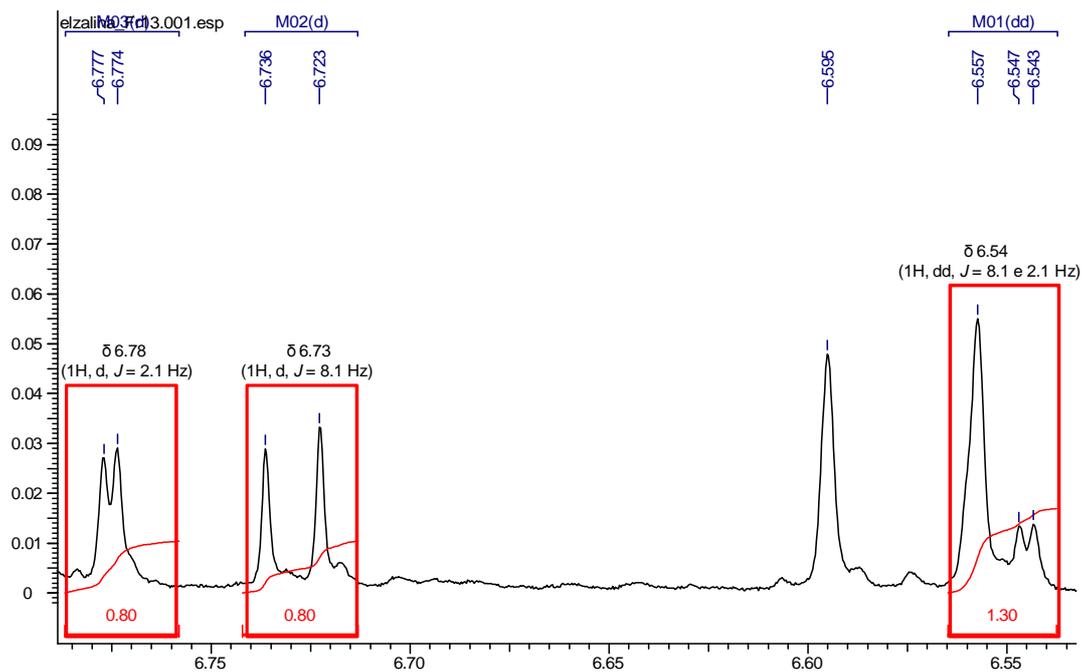


Figura 62: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF13.

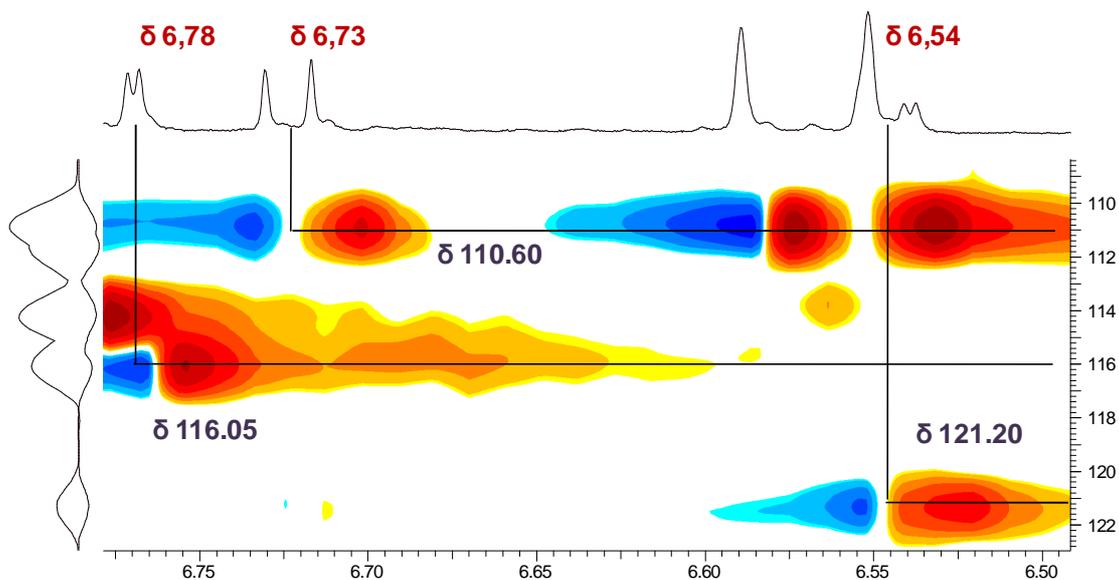


Figura 63: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da amostra BpF13.

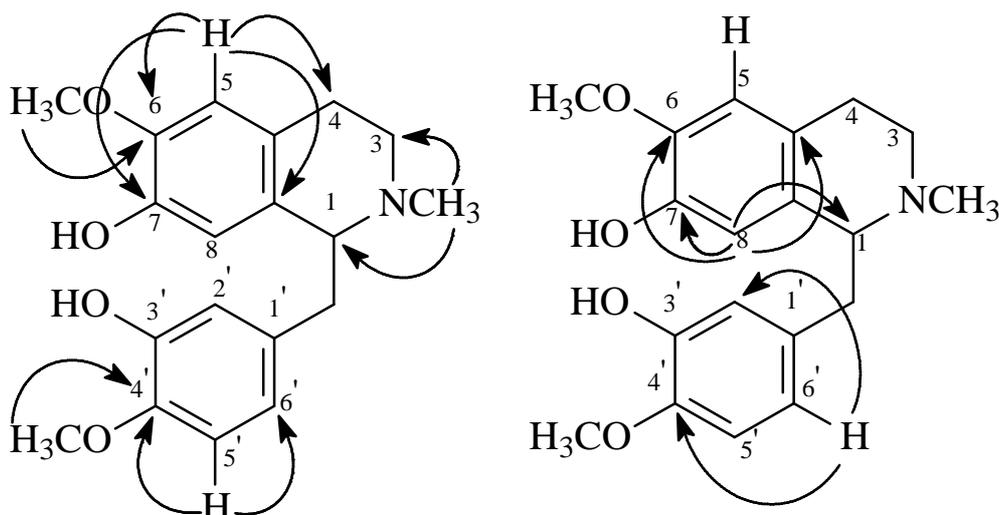


Figura 67: Principais correlações observadas para o alcaloide reticulina

A reticulina é amplamente encontrado em espécies da família Annonaceae como *A. cherimolia*, *A. muricata*, *A. reticulata*, *X. parviflora*, *D. trunciflora* Maas (LEBOEUF et al., 1982; LÉBOUF et al., 1981; STADLER et al., 1987; ICHIMARU et al. 1997; FECHINE et al., 2002).

Em estudo realizado com células cancerígenas por Suresh e colaboradores (2012), mostra que o alcaloide reticulina isolado das raízes de *Annona reticulata*, tem uma atividade citotóxica satisfatória (13.0-19.8 µg/mL), podendo ser usada como agente quimiopreventivo na terapia para o tratamento contra o câncer.

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H , $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ da amostra BpF13.

BpF13 (Reticulina)				
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	$g\text{HSQC}$ ^a	$g\text{HMBC}$ (^1H - ^{13}C) ^a
1	–	3,72 (1H, dd, 7,0 e 5,2)	64,45	–
2	–	–	–	–
3	–	3,17 (1H, m) 2,80 (1H, m)	45,50	–
4	–	2,86 (1H, m) 2,64 (1H, m)	24,04	64,45
4a	–	–	123,70	–

5	6,54 (1H, s)	6,55 (1H, s)	110,60	24,04; 127,92; 144,60; 145,45
6	–	–	145,45	–
7	–	–	144,60	–
8	6,23 (1H, s)	6,20 (1H, s)	114,13	64,45; 123,70; 144,60; 145,40
8a	–	–	127,92	–
α	3,10 (1H, dd, 14,0 e 5,0)	3,07 (1H, dd, 13,8 e 5,2) 2,74 (1H, dd, 13,8 e 7,0)	40,00	–
1'	–	–	131,52	–
2'	6,78 (1H, d, 2,1)	6,70 (1H, d, 2,0)	116,05	–
3'	–	–	–	–
4'	–	–	145,30	–
5'	6,73 (1H, d, 8,1)	6,74 (1H, d, 8,2)	110,60	131,52; 145,30
6'	6,54 (1H, dd, 8,1 e 2,1)	6,54 (1H, dd, 8,2 e 2,0)	121,20	116,02; 145,30
6-OCH ₃	3,85 (3H, s)	3,83 (3H, s)	55,70	145,45
4'-OCH ₃	3,86 (3H, s)	3,84 (3H, s)	55,90	145,30
N-CH ₃	2,55 (3H, s)	2,47 (3H, s)	41,00	45,50; 64,45

^aExperimento realizado a 600 MHz para ¹H em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Da Cruz et al., 2011 (H; 400 MHz, CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (–) não identificado.

Após atribuir os demais sinais da reticulina, a partir da comparação com os dados da literatura, foi possível observar quais sinais pertencem a substância de *m/z* 328. Como evidenciado através do estudo de fragmentação, o alcaloide de *m/z* 328 trata-se de um composto aporfínico sem *N*-metilação, com duas metoxilas adjacentes do anel A, porém, com substituições no anel D. A diferença de massa aponta para a presença de uma metoxila e uma hidroxila no anel D, não definindo ainda se são adjacentes ou não. No espectro de RMN de ¹H (Figura 68), são observados três singletos em δ 8,07 (s, 1H), δ 6,80 (s, 1H), δ 6,60 (s, 1H), confirmando o padrão de substituição 1, 2, 9, 10, do anel aporfínico. Ainda nos espectros de RMN de ¹H, mapas de contornos HSQC e HMBC é possível observar três sinais de metoxilas em δ 3,67 (s, 3H), 3,89 (s, 3H) e 3,91 (s, 3H), ligadas aos carbonos em δ 60,00 55,75 e 55,92, e correlacionando-se com os carbonos em δ 144,66, 152,70 e 144,60, correspondentes,

respectivamente, a C-1, C-2 e C-10, conforme apresentado nas figuras 69, 70 e 71. Outras correlações importantes são apresentadas na tabela 8.

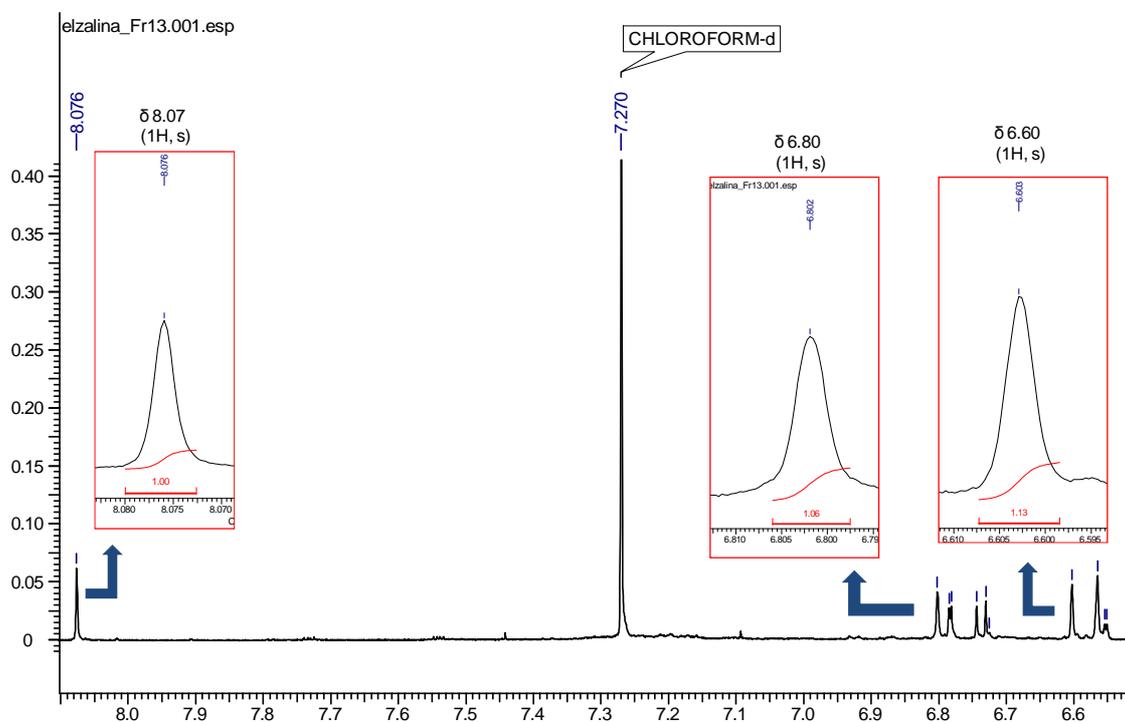


Figura 68: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF13.

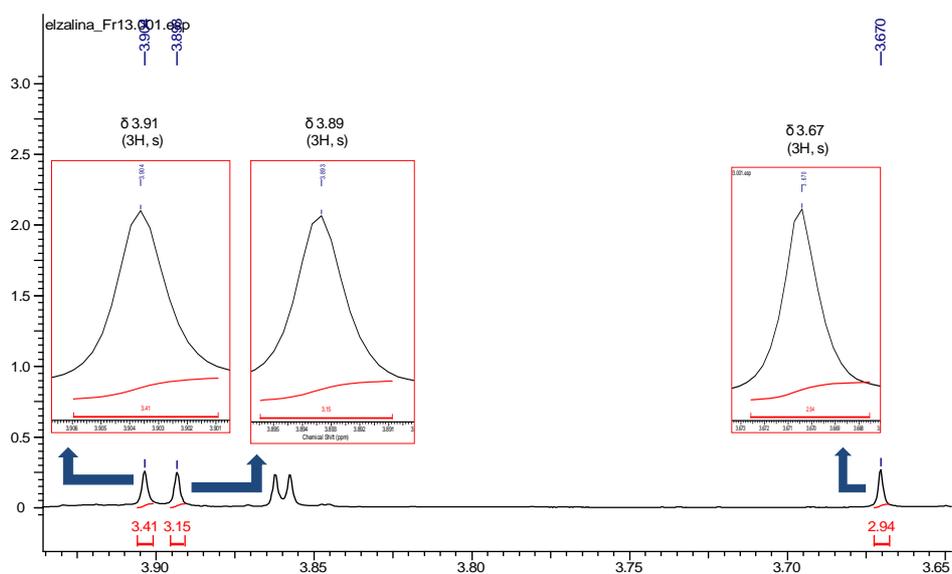


Figura 69: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de metoxilas da amostra BpF13.

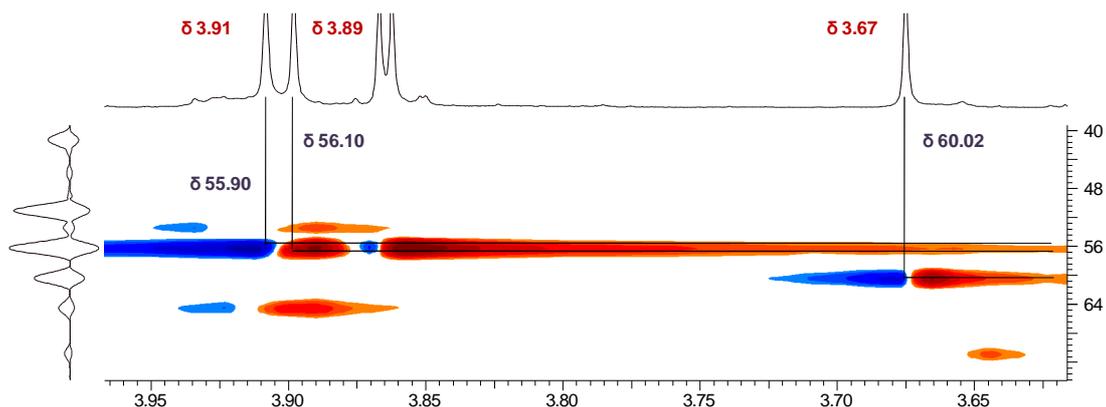


Figura 70: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl₃) referente aos sinais de metoxilas da amostra BpF13.

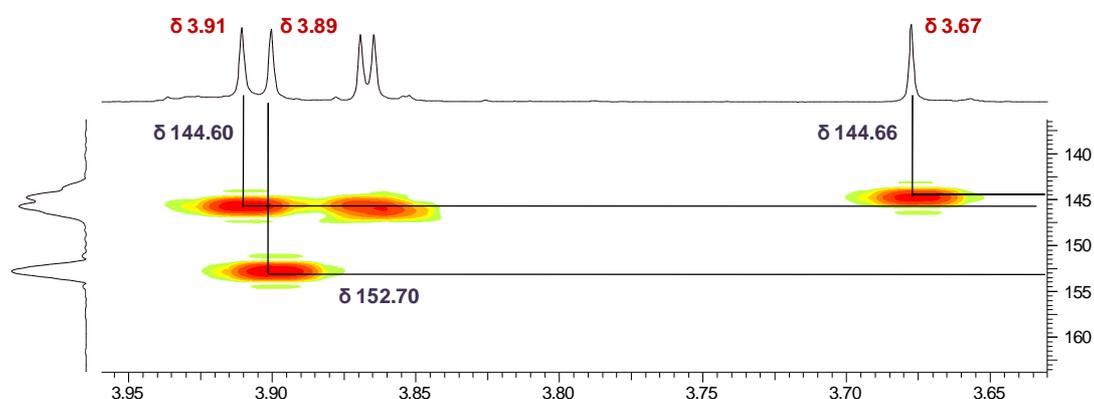


Figura 71: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl₃) referente aos sinais de metoxilas da amostra BpF13.

Com base nestas evidências foi possível propor o alcaloide laurotetanina (Figura 72 e 73), como sendo o alcaloide de m/z 328, sendo sua confirmação obtida através de comparação dos dados da literatura, bem com os dados espectroscópicos (Tabela 8; Costa et al., 2013c). O espectro total de RMN de ¹H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 136, 137 e 138).

Este alcaloide já foi encontrado em diversos gêneros da família Annonaceae, como *Xylopia*, *Guatteria* (HOCQUEMILLER et al., 1983; GUINAUDEAU et al., 1994; NISHIYAMA et al., 2006).

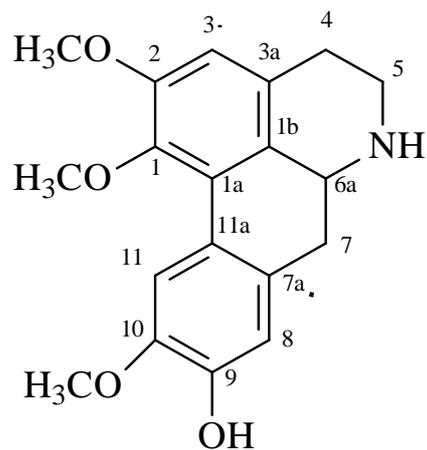


Figura 72: Estrutura do alcaloide laurotetanina.

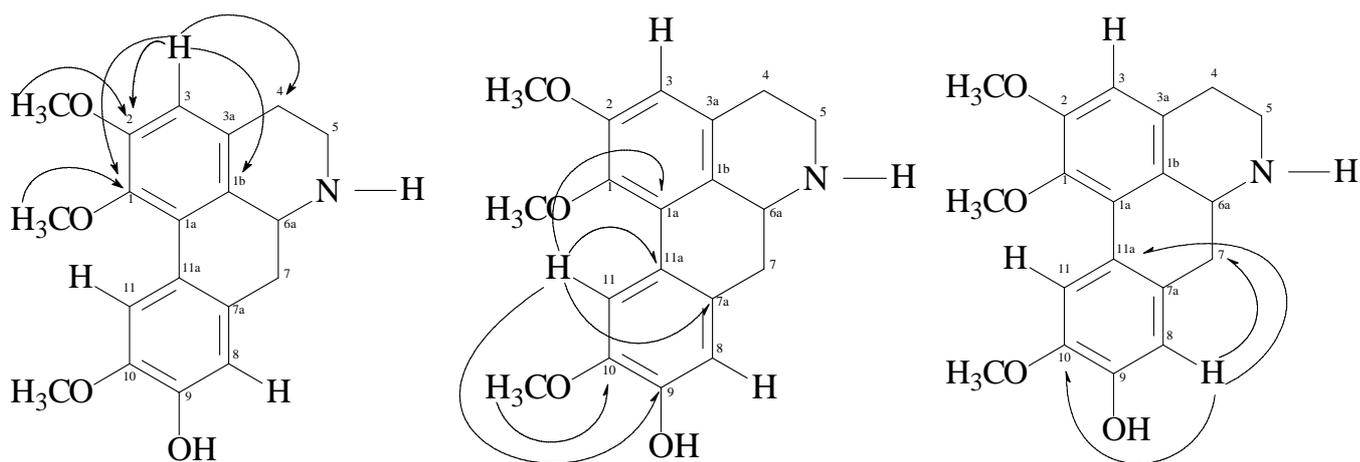


Figura 73: principais correlações observadas para a amostra BpF13.

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H , $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ da amostra BpF13.

BpF13 (Laurotetanina)					
Posição	^1H (δ) (mult., J em Hz)^a	$g\text{HSQC}$ (^1H-^{13}C)^b	$g\text{HMBC}$ (^1H-^{13}C)^{a,b}	^1H (δ) (mult., J em Hz)^c	^{13}C (δ)^c
1	–	144,66	–	–	144,30
1a	–	127,19	–	–	127,10
1b	–	126,10	–	–	126,50
2	–	152,70	–	–	152,20
3	6,60 (s, 1H)	110,60	28,17; 126,10; 144,66; 152,70	6,61 (1H, s)	110,70
3a	–	128,80	–	–	128,40
4_{pseudoaxial}	–	28,17	–	2,75 (1H, m)	28,20
4_{pseudoequatorial}	–	–	–	3,04 (1H, m)	–
5_{pseudoaxial}	3,90 (m, 1H)	53,10	–	3,02 (1H, m)	42,50
5_{pseudoequatorial}	–	–	–	3,41 (1H, m)	–
6	–	–	–	–	–
6a	–	61,00	–	3,84 (dd, 14,5 e 4,9)	53,50
7_{pseudoaxial}	–	35,30	–	2,68 (dd, 14,5 e 4,9)	35,70
7_{pseudoequatorial}	–	–	–	2,78 (dd, 13,8 e 4,9)	–
7a	–	129,10	–	–	129,10
8	6,80 (s, 1H)	111,60	35,34; 123,68; 145,28	6,77 (1H, s)	114,40
9	–	145,28	–	–	145,60
10	–	144,60	–	–	146,10
11	8,07 (s, 1H)	114,07	123,68; 145,28; 127,19; 129,10	8,06 (1H, s)	111,80
11a	–	123,68	–	–	123,60
1-OCH₃	3,67 (s, 3H)	60,00	144,66	3,67 (3H, s)	60,02
2-OCH₃	3,89 (s, 3H)	55,75	152,70	3,89 (3H, s)	56,10
10-OCH₃	3,91 (s, 3H)	55,92	144,60	3,90 (3H, s)	55,90

^aO experimento realizado a 600 MHz para ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Multiplicidade obtida pelo mapa de correlação e $g\text{HSQC}$. ^cDados da literatura de acordo com Costa et. al., 2013c (H; 400 MHz, CDCl_3). ^dÁtomos de carbonos que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.9.3 Determinação estrutural da amostra BpF15.

A amostra codificada como BpF15 (12,4 mg) apresentou-se como um sólido amorfo. A análise de massas (Figura 74) desta amostra apontou para a presença de duas substâncias, sendo observados majoritariamente os íons *quasi*-moleculares de m/z 266 e 276 $[M+H]^+$. Estes íons foram submetidos à análise de MS^n (Figura 75 e 76), sendo observados padrões distintos de fragmentação.

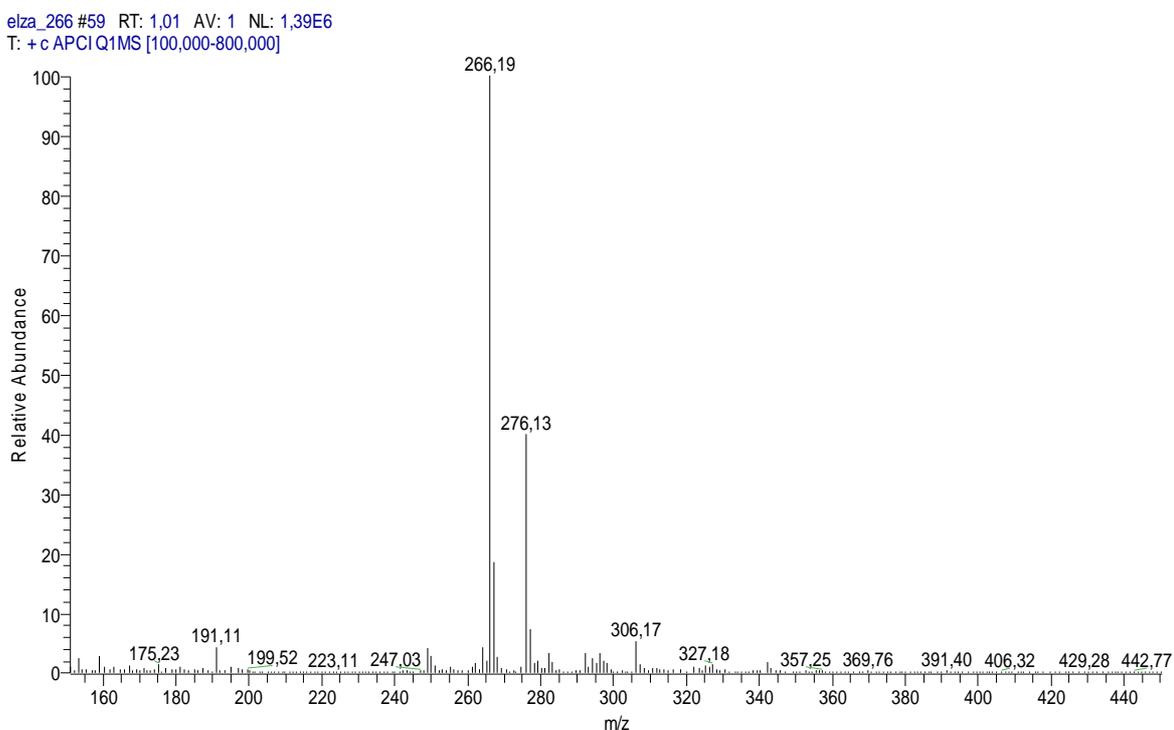


Figura 74: Espectro de massas do íon de m/z 266 e 276 presente na fração alcaloídica BpF15 das folhas de *B. pleiosperma*.

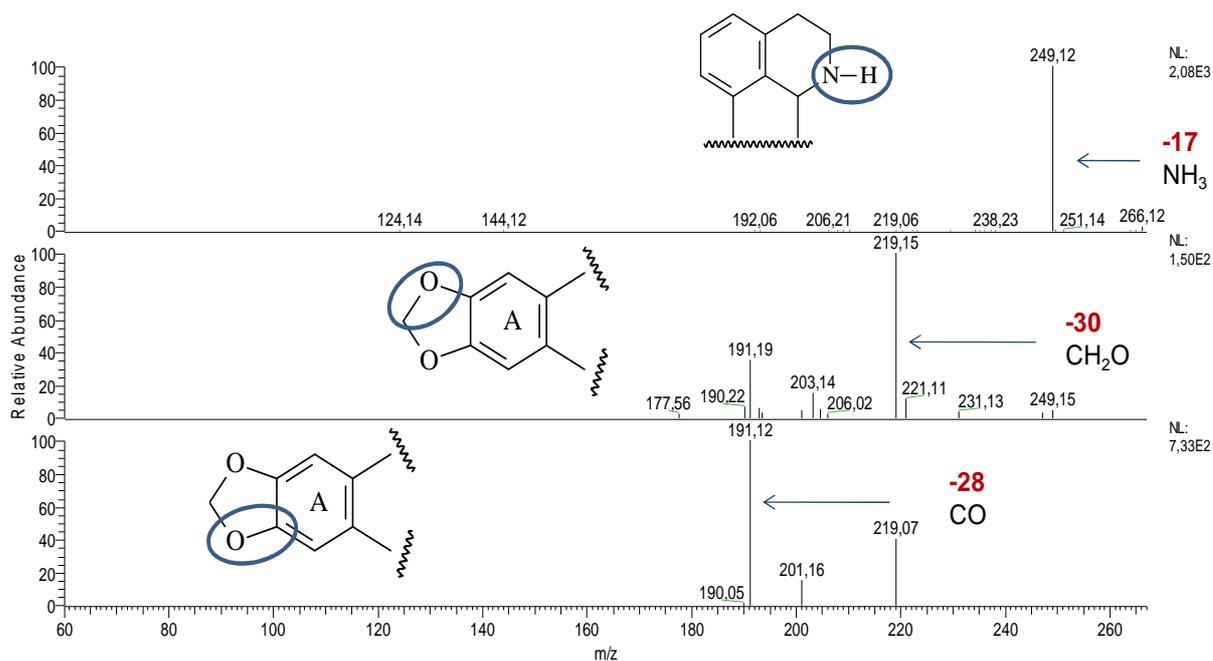


Figura 75: Espectro de massas em MS^n do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).

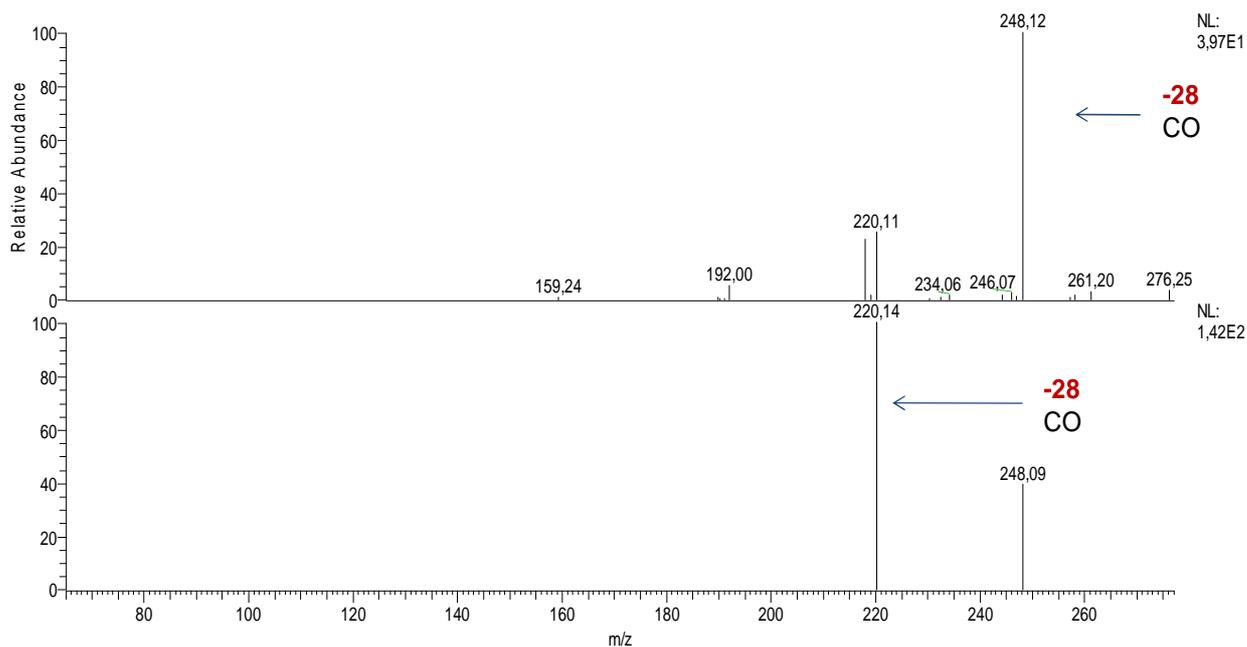


Figura 76: Espectro de massas em MS^n do íon de m/z 276 ($[M+H]^+$).

Para o íon de m/z 266 foram observadas perdas de 17 Da, seguidas por perdas de 30 Da e 28 Da, características de substâncias aporfínicas contendo uma ponte metilenodioxí no anel A, e ausência de *N*-metila, enquanto que para

o íon de m/z 276, observou-se perda inicial de 28 Da, perda anteriormente reportada para alcaloides oxaporfínicos (SILVA et al., 2012).

No espectro de RMN de ^1H , e mapas de contornos HSQC e HMBC é possível observar os sinais característicos dos hidrogênios da ponte metilenodioxí em δ 6,11 (1H, d, 1,3 Hz) e δ 5,96 (1H, d, 1,3 Hz), ligados ao carbono em δ 100,97, correlacionando-se com os carbonos em δ 143,34 e δ 147,86, respectivamente (Figura 77, 78 e 79), além do singleto em δ 6,57, ligado ao carbono em δ 107,87, se correlacionando aos carbonos aromáticos em δ 143,34 e δ 147,86, 126,71 e ao carbono metilênico em δ 29,50 (Figura 80), confirmando a estrutura do anel A. Estas evidências apontam para o alcaloide anonaina (Figura 81 e 82) como o alcaloide de m/z 266, sendo sua confirmação obtida através da comparação dos dados da literatura com os dados espectroscópicos (Tabela 9). O espectro total de RMN de ^1H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 139, 140 e 141).

Anonaina é um alcaloide amplamente isolado de espécies família Annonaceae, sendo apontado como um marcador quimiotaxonômico (LEBOUEF et al., 1981; PAULO et al., 1999; ORTIZ et al., 2007).

Paulo e colaboradores (1999) relatam atividade antimicrobiana contra os patogênicos *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* para o alcaloide anonaina, isolado das cascas de *Annona salzmanii* D.C.

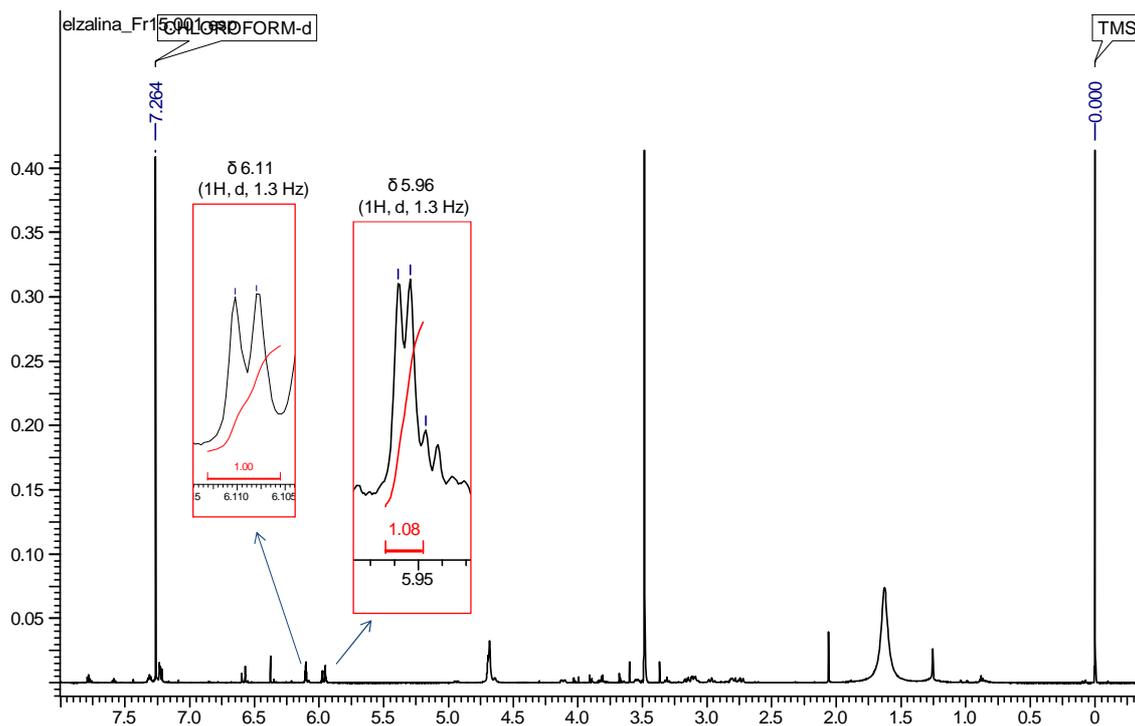


Figura 77: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) e ampliação da região referente aos hidrogênios da ponte metilenodioxi da amostra BpF15.

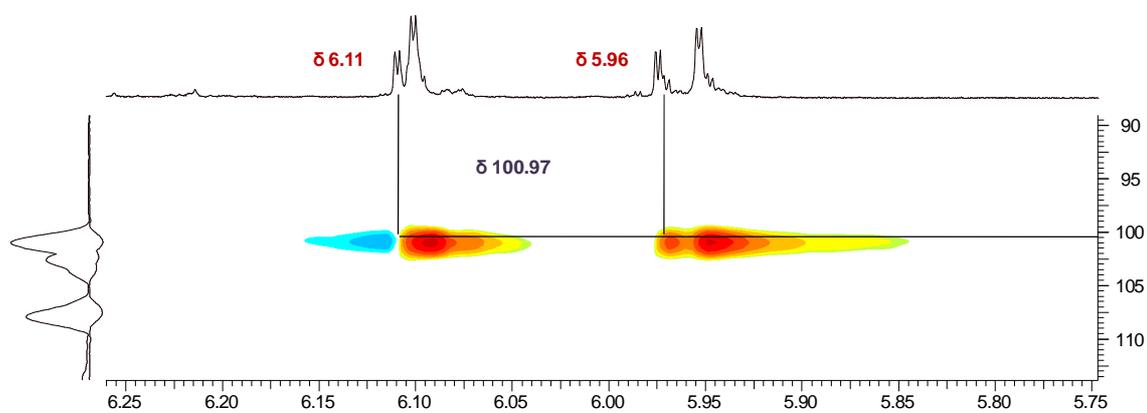


Figura 78: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente região referente aos hidrogênios da ponte metilenodioxi da amostra BpF15.

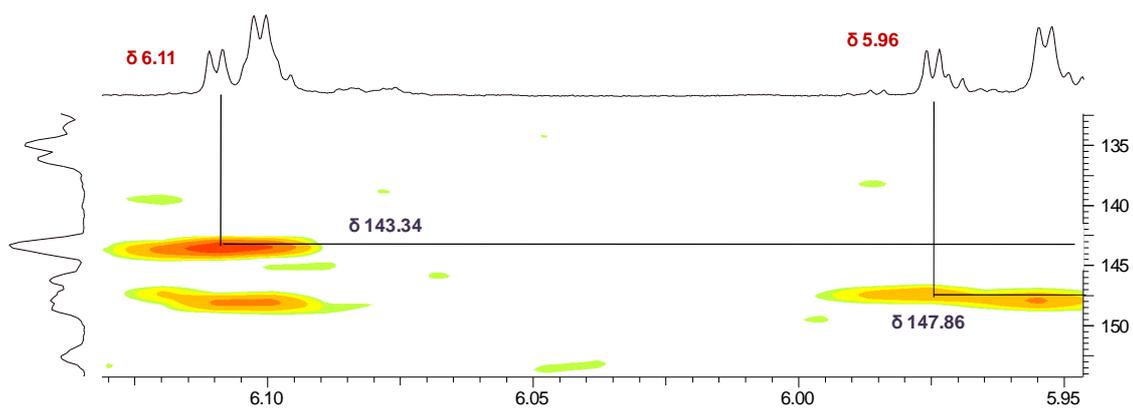


Figura 79: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente região dos hidrogênios da ponte metilenodioxi da amostra BpF15.

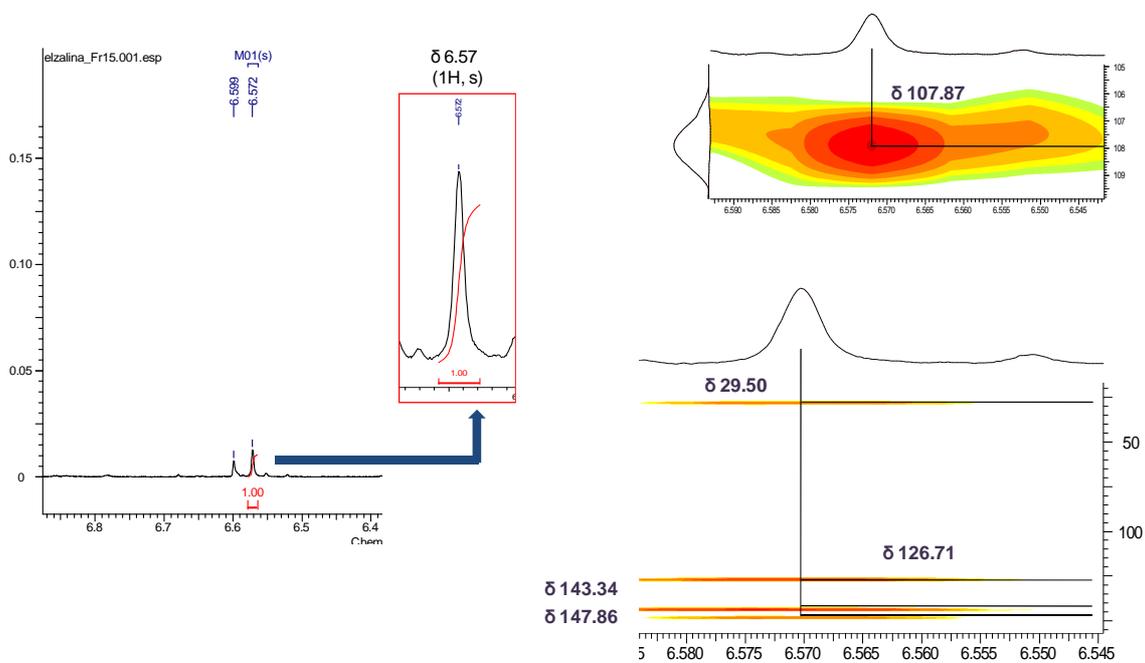


Figura 80: Ampliação do espectro de RMN de ^1H , mapa de contornos HSQC e HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente ao sinal de hidrogênio aromático em δ 6,57 da amostra BpF15.

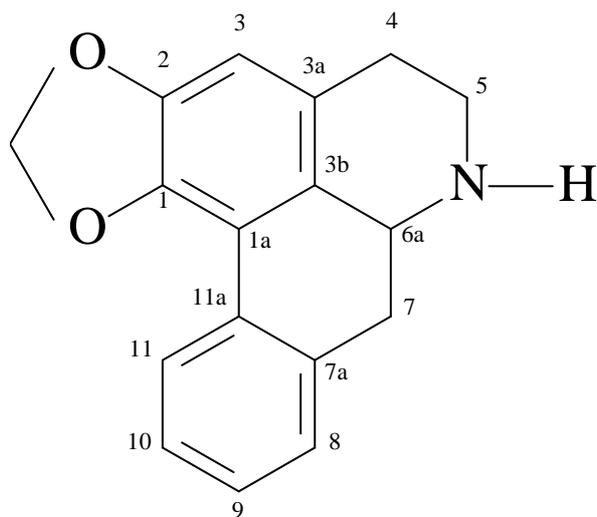


Figura 81: Estrutura do alcaloide anonaina.

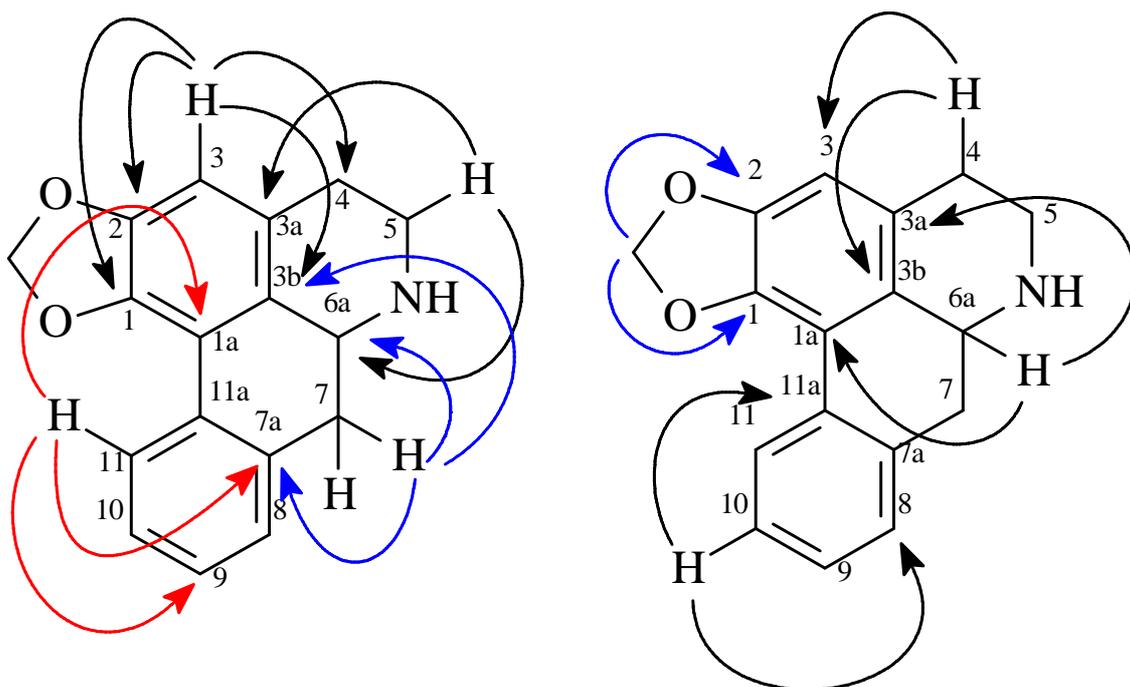


Figura 82: Principais correlações observadas para a amostra BpF15.

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H , gHSQC e gHMBC da amostra BpF15.

BpF15 (Anonáina)					
Posição	$^1\text{H } \delta$ (mult., J em Hz) ^a	$^1\text{H } \delta$ (mult., J em Hz) ^b	gHSQC	gHSQC ^b	gHMBC (1H-13C)
1	–	–	143,34	142,60	–
1a	–	–	116,82	116,10	–
2	–	–	147,86	147,08	–
3	6,57 (1H, s)	6,56 (1H, s)	107,87	107,98	29,50; 126,71; 143,34 e 147,86
3a	–	–	128,76	127,80	–
3b	–	–	126,71	126,55	–
4 ^{Pseudoax}	2,81 (1H, m)	3,05 (1H, m)	29,50	28,51	–
4 ^{Pseudoeq}	2,74 (1H, m)	2,70 (1H, m)	29,50	28,51	126,71 e 107,87
5 ^{Pseudoax}	3,10 (1H, m)	3,06 (1H, m)	42,91	43,03	–
5 ^{Pseudoeq}	3,52 (1H, m)	3,42 (1H, m)	42,91	43,03	53,72; 128,76
6a	3,83(1H, dd, 4,7 e 12,0)	3,92 (1H, dd, 4,7 e 14,1)	53,72	53,48	116,82; 128,76
7 ^{Pseudoax}	2,81 (1H, m)	2,87 (1H, m)	35,59	36,81	53,72; 126,71; 134,77
7 ^{Pseudoeq}	2,97 (1H, m)	2,99 (1H, m)	35,59	36,81	–
7a	–	–	134,77	134,51	–
8	7,24(1H, m)	7,23 (1H, m)	128,12	127,67	–
9	7,24(1H, m)	7,23 (1H, m)	128,12	127,67	–
10	7,32 (1H, m)	7,31 (1H, m)	127,13	127,17	128,12 e 131,38
11	8,08 (1H, d, 8,1)	8,08 (1H, d, 8,1)	127,10	127,14	116,82; 128,12 e 134,77
11a	–	–	131,38	131,53	–
O-CH ₂ -O	6,11 (1H, d, 1,3)	6,09 (1H, d, 1,2)	100,97	100,76	143,34
	5,96 (1H, d, 1,3)	5,94 (1H, d, 1,2)	100,97	100,76	147,86

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Lebouef et al., 1981 e Ortiz et al., 2007 (H; 400 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

Após atribuir os sinais da anonaina, foi possível observar quais sinais pertencem a substância de m/z 276. Foram observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 83) a presença de sete sinais na região aromática, sendo quatro atribuídos aos hidrogênios com deslocamentos em δ 8,69 (1H, d, 8,4), δ 7,78 (1H, dd, 8,4 e 1,2), δ 7,59 (1H, t, 7,8 3X(2)), δ 8,59 (1H, dd, 7,8 e 1,2), relacionados aos H-11, H-10, H-9 e H-8 respectivamente. Tais hidrogênios são característicos do anel D do sistema aromático não substituído. Outro sinal em δ 7,22 (1H, s), foi associado ao H-3 do anel A, típico de um sistema oxoaporfínicos dissustituído. De acordo com o mapa de contornos HSQC

(Figura 84), os mesmos se correlacionam com os carbonos em δ 127,32, δ 133,80, δ 128,56, δ 128,81 e δ 103,20 respectivamente (tabela 10).

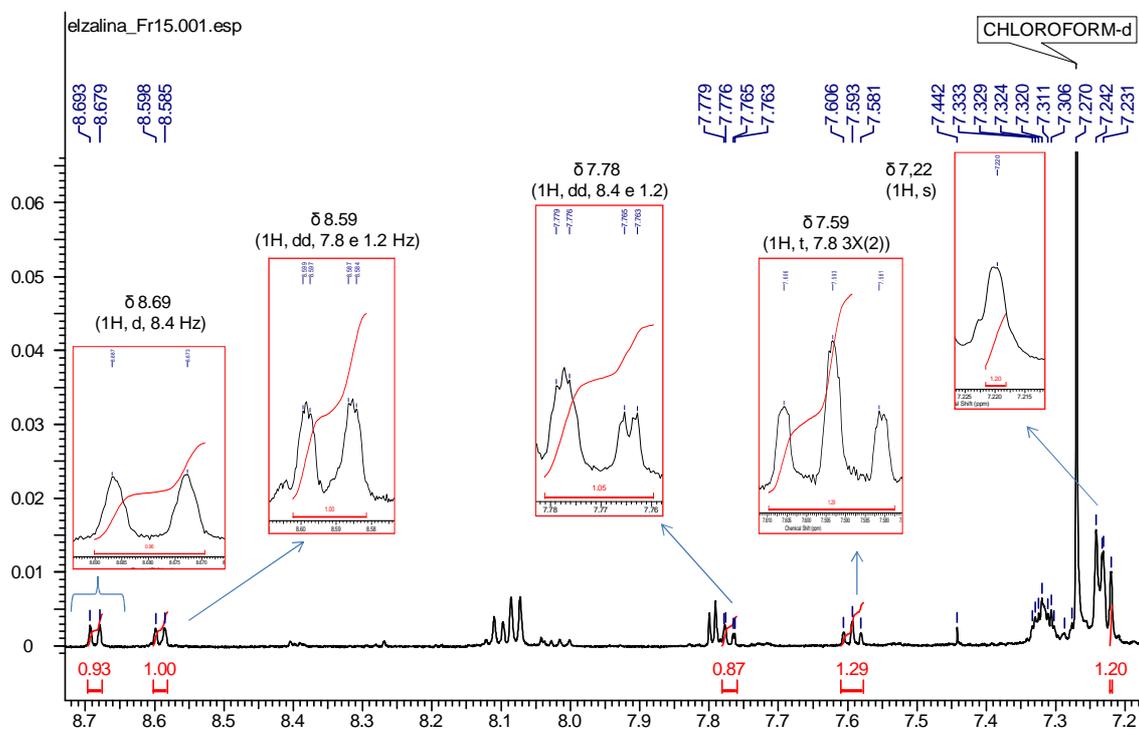


Figura 83: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra 15.

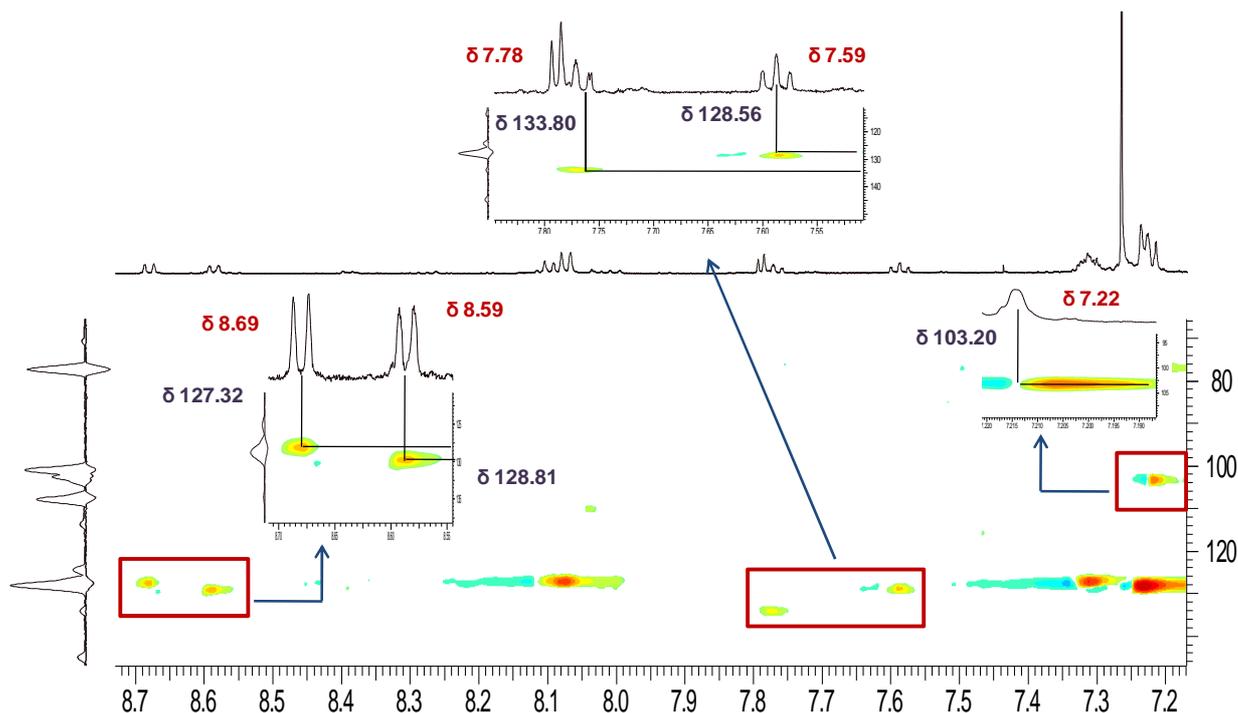


Figura 84: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF15.

Dois sinais aromáticos foram observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 85) em δ 7,8 (1H, d, 4,8) e δ 8,90 (1H, d, 4,8), e indicam semelhanças com um sistema piridínico, compatível com o anel B do sistema oxoaporfínico, foram atribuídos aos hidrogênios H-4 e H-5, respectivamente (CHANG et al., 2004). Conforme o mapa de contornos HSQC (Figura 85), os mesmos estão se correlacionando com os carbonos em δ 124,33 e δ 144,74 (Tabela 10).

Analisando o mapa de contornos HMBC (Figura 86 e 87) pôde-se evidenciar as correlações desses hidrogênios aromáticos. Para o H-3 foram observadas correlações a J^β com os C-4 (δ 124,4 x4) e C-1 (δ 148,56), e J^α para o C-2 (δ 152,44); O H-4 apresentou somente correlações J^β com os C-3 (δ 103,25), C-3b (δ 123,93) e C-5 (δ 144,95), e para o H-5 foram constatadas correlações a J^β com os C-3a (δ 136,38), C-6a (δ 145,95) e J^α com o C-4 (δ 124,44); As correlações a J^β também foram verificadas para o H-8 com os C-10

(δ 134,10) e C-7 (δ 183,07), o H-9 com os C-11 (δ 127,42) e C-7a (δ 131,97), o H-10 com os C-8 (δ 129,06) e C-11a (δ 133,55), e o H-11 com os C-1a (δ 108,88), C-9 (δ 128,80) e C-7a (δ 131,97) (tabela 10).

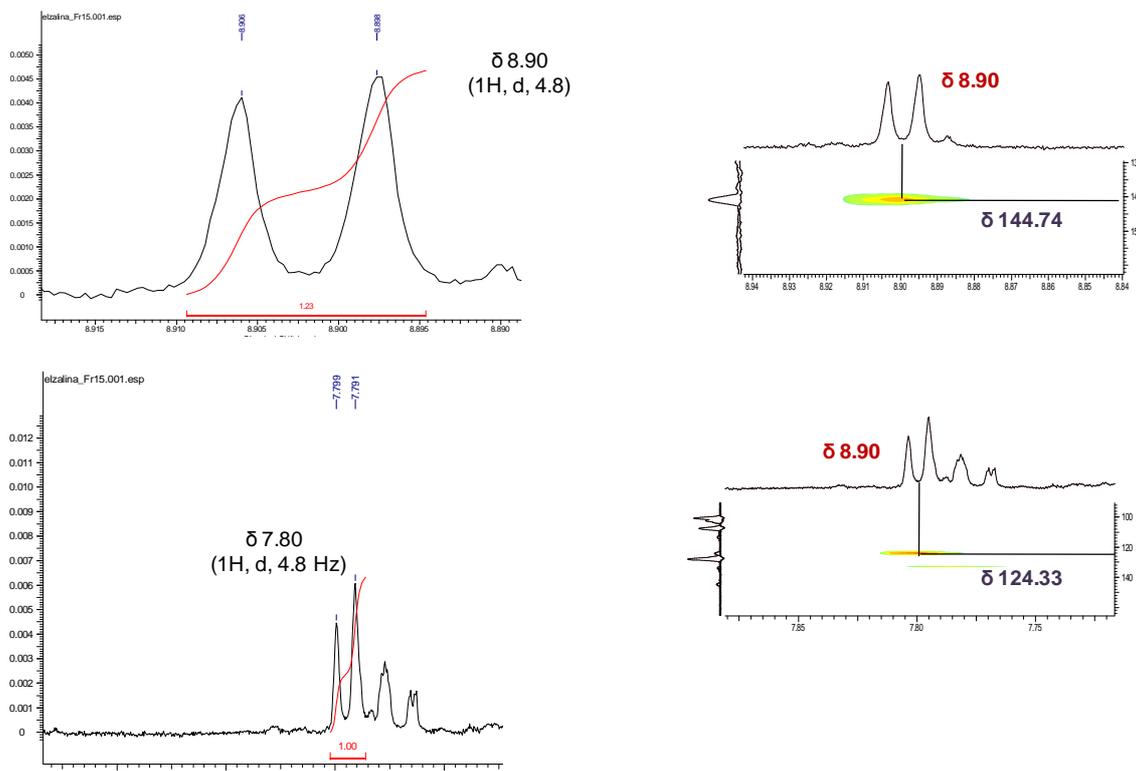


Figura 85: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrôgenios aromáticos da amostra BpF15.

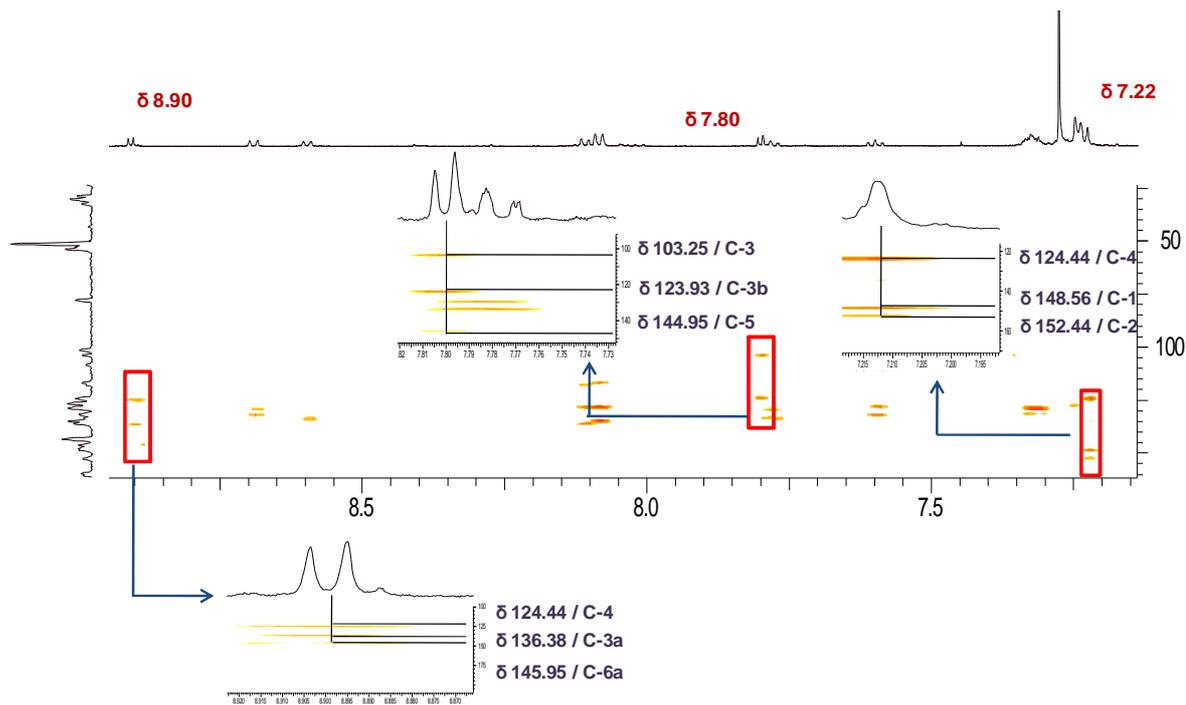


Figura 86: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl₃) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF15.

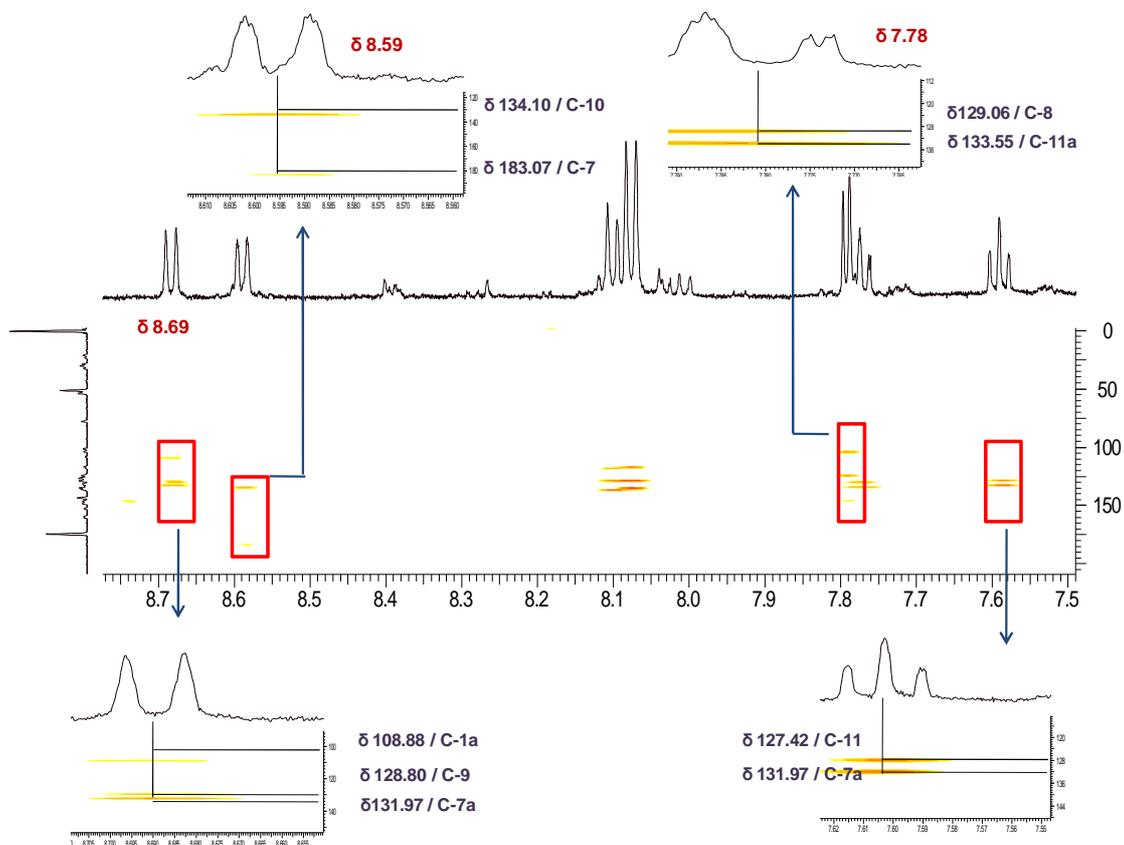


Figura 87: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl₃) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF15.

Um sinal de hidrogênio foi observado em δ 6,38 (2H, s), correlacionado a um carbono em δ 102,56, sugerindo a presença de um grupo metilenodióxi (Figura 88) substituído nos carbonos C-1 e C-2, este dado foi confirmado através dos dados referentes ao mapa de contornos HMBC (Figura 88), onde evidenciou correlações em J^β com os carbonos em δ 148,56 e 152,44. Estes dados de HMBC estão de acordo com os observados na região dos hidrogênios aromáticos para o H-3 (δ 103,25), devido este se correlacionar a J^α com o C-2 (δ 152,44) e J^β com C-1 (δ 148,56), definindo a presença desse grupo metilenodióxido na substância Bp15B. Ainda pelo mapa de contornos HMBC (Figura 87), pôde-se evidenciar a presença de um grupo carbonílico na substância, revelado através de correlações do sinal do H-8 (δ 8,59) a J^β com o carbono C-7 (δ 183,07) (tabela 10).

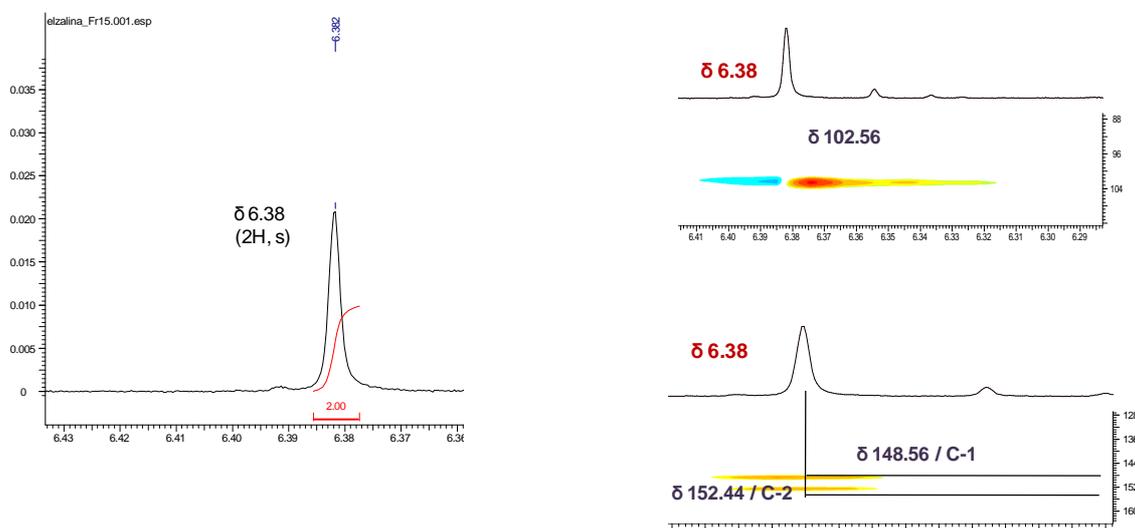


Figura 88: Ampliação do espectro de RMN de ^1H , mapas de contornos HSQC e HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais da ponte metiledióxido da amostra BpF15.

Com as análises do espectro de RMN de ^1H , análises dos mapas de contornos HSQC e HMBC, além de comparações com dados presentes na literatura (Tabela 10), foi possível a confirmação da substância BpF15 como

sendo o alcaloide oxoaporfínico liriodenina (Figura 89 e 90), bastante encontrado em espécies da família Annonaceae, o qual é considerado como um marcador quimiotaxonômico (LAPRÉVOTE, et al., 1988; PINHEIRO et al., 2009; FECHINE et al., 2002; ORTIZ et al., 2007; TORRES et al., 2007; COSTA et al., 2010a; DA CRUZ et al., 2011; EGYDIO et al., 2013). O espectro de RMN de ^1H total e mapas de contornos HSQC e HMBC encontram-se no anexo 1 (Figura 139, 140 e 141).

Estudos mostram a importância farmacológica para esse alcaloide, porém ainda não é comercializado como fármaco. Dentre suas inúmeras propriedades são destacadas a atividade antimicrobiana, antifúngica, antitumoral, antiplaquetária e como sedativa do sistema nervoso central (CHEN et al., 2013).

Estudos realizados com esse alcaloide mostram o potencial citotóxico em vários tipos de células cancerosas humanas, exercendo efeitos indutores de apoptose anti-proliferativo nas células de cancro do pulmão humano (CHANG et al., 2004). Em trabalhos realizados com as cascas de *Guatteria hispida* por Costa e colaboradores (2010b), relatam a presença de atividade contra os patógenos *S. epidermidis* e *C. dubliniensis*, qual apresentou um valor de MIC na faixa de 12.5-100 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Suresh e colaboradores (2012) apresentam resultados citotóxicos satisfatórios (12.0 – 18.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) para o alcaloide em questão, isolado das raízes de *Annona reticulata*, ressaltando a importância de produtos sintéticos para o tratamento de câncer, a partir de alcaloide aporfínicos.

O potente efeito tripanocida deste alcaloide foi evidenciado por Costa e colaboradores (2011b), quando avaliado contra epimastigotas e tripomastigotas, estes que são formas de *Trypanosoma cruzi* protozoário flagelo agente da

doença de Chagas. Nesse estudo ainda ressaltam atividades contra o protozoário *Leishmania braziliensis* and *L. guyanensis*.

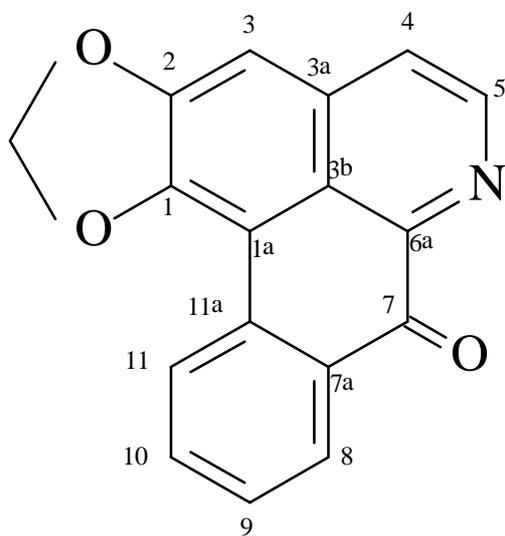


Figura 89: Estrutura do alcaloide lirioidenina.

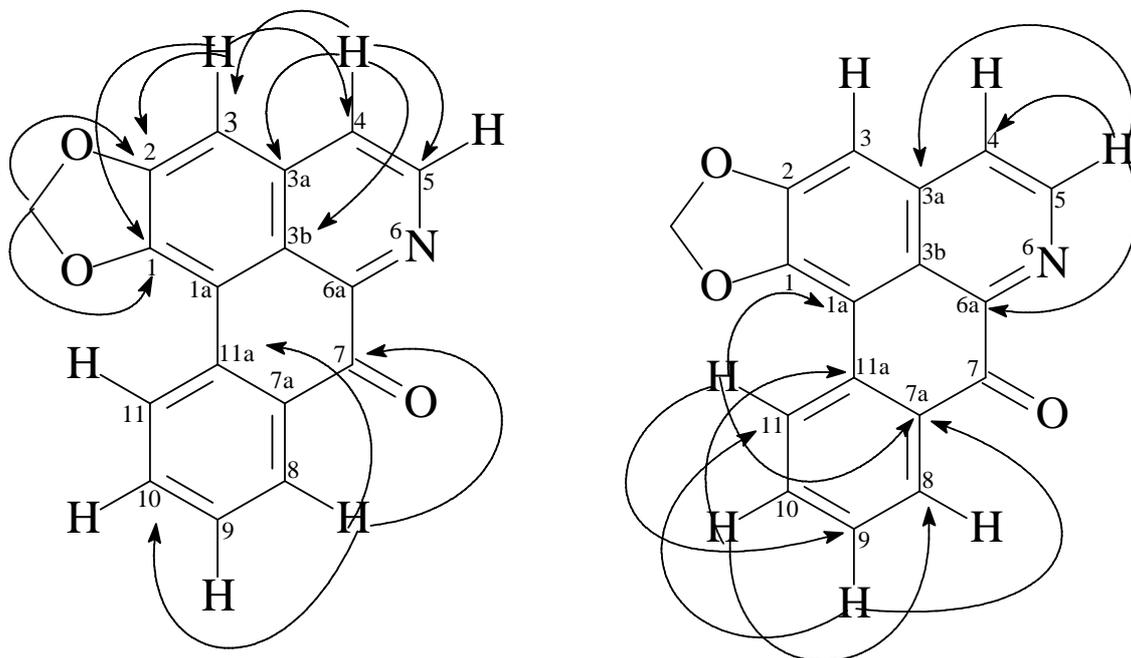


Figura 90: Principais correlações observadas para a amostra BpF15.

Tabela 10: Dados de RMN de ^1H , $g\text{HSQC}$ e $g\text{HMBC}$ da amostra BpF15.

BpF15 (Liriodenina)					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz)^a	^1H δ (mult., J em Hz)^b	$g\text{HSQC}$	$g\text{HSQC}^b$	$g\text{HMBC}$ (^1H-^{13}C)
1	–	–	148,56	147,92	–
1^a	–	–	108,88	107,98	–
2	–	–	152,44	151,65	–
3	7,22 (1H, s)	7,16 (1H, s)	103,25	103,20	124,44; 148,56 e 152,44
3^a	–	–	136,38	135,73	–
3^b	–	–	123,93	123,16	–
4	7,80 (1H, d, 4,8)	7,75 (1H, d, 5,2)	124,44	124,33	103,25; 123,93 e 144,95
5	8,9 (1H, d, 4,8)	8,87 (1H, d, 5,2)	144,95	144,74	124,44; 136,38 e 145,95
6^a	–	–	145,95	145,31	–
7	–	–	183,07	182,51	–
7^a	–	–	131,97	131,25	–
8	8,59 (1H, dd, 7,8 e 1,2)	8,57 (1H, dd, 7,93 e 1,22)	183,07	128,81	134,10 e 183,07
9	7,59 (1H, t, 7,8 3x(2))	7,57 (1H, dt, 7,93 e 1,22)	128,80	128,56	127,42 e 131,97
10	7,78 (1H, dd, 8,4 e 1,2)	7,73 (1H, ddd 8,1, 7,4 e 1,4)	134,10	133,80	129,06 e 133,55
11	8,69 (1H, d, 8,4)	8,60 (1H, d, 7,94)	127,42	127,32	108,80; 128,80 e 131,97
11^a	–	–	133,55	132,87	–
(1-2)-OCH₂	6,38 (2H, s)	6,37 (2H, s)	102,56	102,44	148,56 e 152,44

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Ortiz et al., 2007 (H; 400 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.9.4 Determinação estrutural da amostra BpF11.

A fração BpF11, após purificação em coluna semi-preparativa, forneceu um sólido amorfo (12,2 mg). A análise de massas deste sólido evidenciou a presença de um íon intenso de m/z 328 (Figura 91). Quando submetido à fragmentação em MS^n , o mesmo apresentou uma perda inicial de 31 Da, e perdas seqüenciais de 32 Da e 28 Da (Figura 92), sugerindo se tratar de um alcaloide aporfínico contendo uma *N*-metila e uma metoxila adjacente à uma hidroxila no anel A. Ainda no espectro de MS^n foi possível observar perdas sequenciais de 32 Da e 28 Da, apontando para a presença de uma metoxila e hidroxila também no anel D.

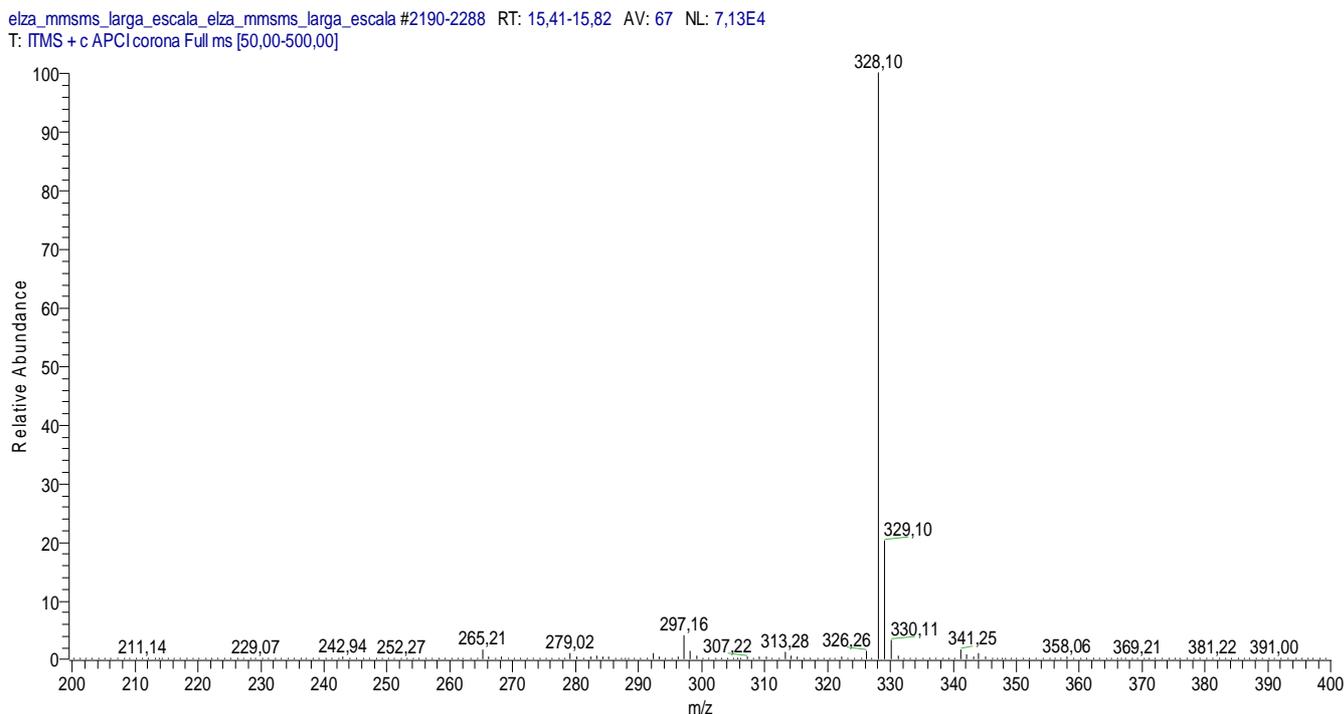


Figura 91: Espectro de massas do íon de m/z 328 presente na fração alcaloídica BpF11 das folhas de *B. pleiosperma*.

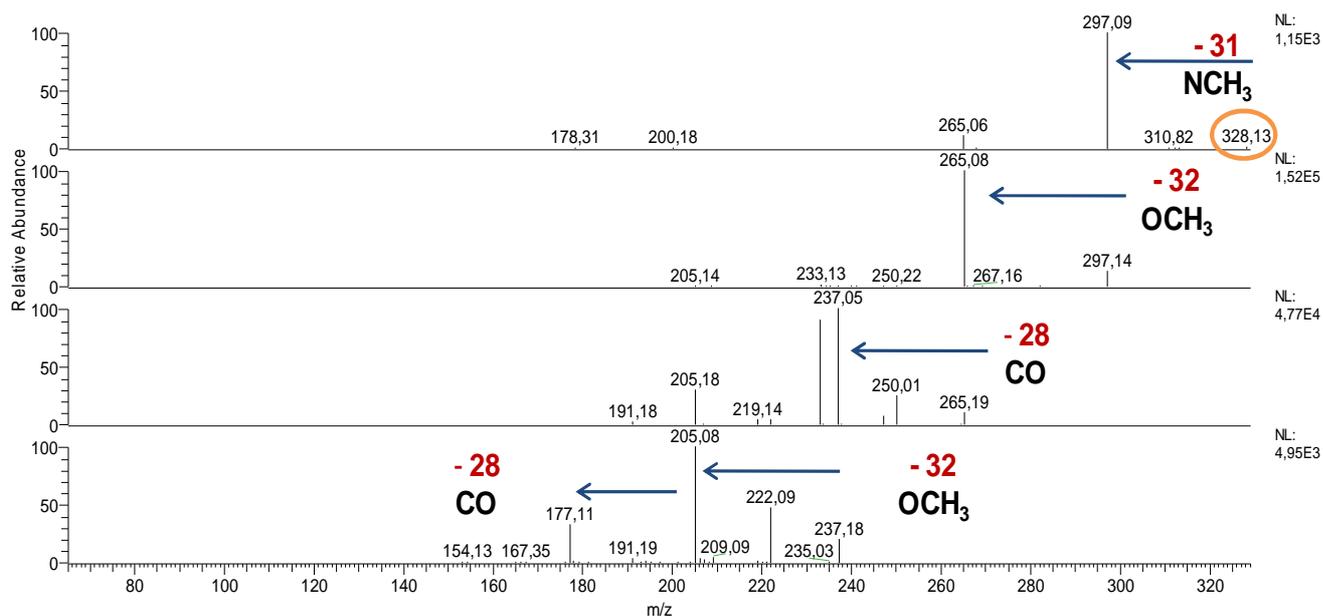


Figura 92: Espectro de massas em MSⁿ do íon de m/z 328 ([M+H]⁺).

Na análise do espectro de RMN de ¹H (Figura 93) é possível observar a presença de três sinais na região de aromáticos, em δ 6,55 (1H, s), δ 6,82 (1H, d, 0,6), δ 8,02 (1H, s). A ausência de outros sinais nesta região sugere um padrão de substituição 1, 2, 9, 10 do esqueleto aporfínico. Ainda no espectro de RMN de ¹H (Figura 94) é possível observar os sinais em δ 3,92 (3H, s) e 3,94 (3H, s), característicos de metoxilas, estando uma presente no anel A, além do sinal da *N*-metila em δ 2,55 (3H, s), confirmando as informações obtidas através do estudo de fragmentação. Outros sinais são apresentados na tabela 11 e o espectro total de RMN de ¹H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 142, 143 e 144). A confirmação da estrutura foi feita através da comparação dos dados de RMN de ¹H com os dados existentes na literatura, sendo identificado o alcaloide isolado neste trabalho como isoboldina (Figura 95), comumente encontrado em espécies da família Annonaceae (GUINAUDEAU et al., 1988; PAULO et al., 1992; IWASA et al., 2008; CAMPOS et al., 2008; VENDRAMIN et al., 2013).

Para esse alcaloide há registros na literatura de atividades biológicas, tal como, antileishmania, anti-poliiovirus e antimicrobiana (BOUSTIE et al., 1998; CORREA et al., 2006; MOLLATAGHI et al., 2012).

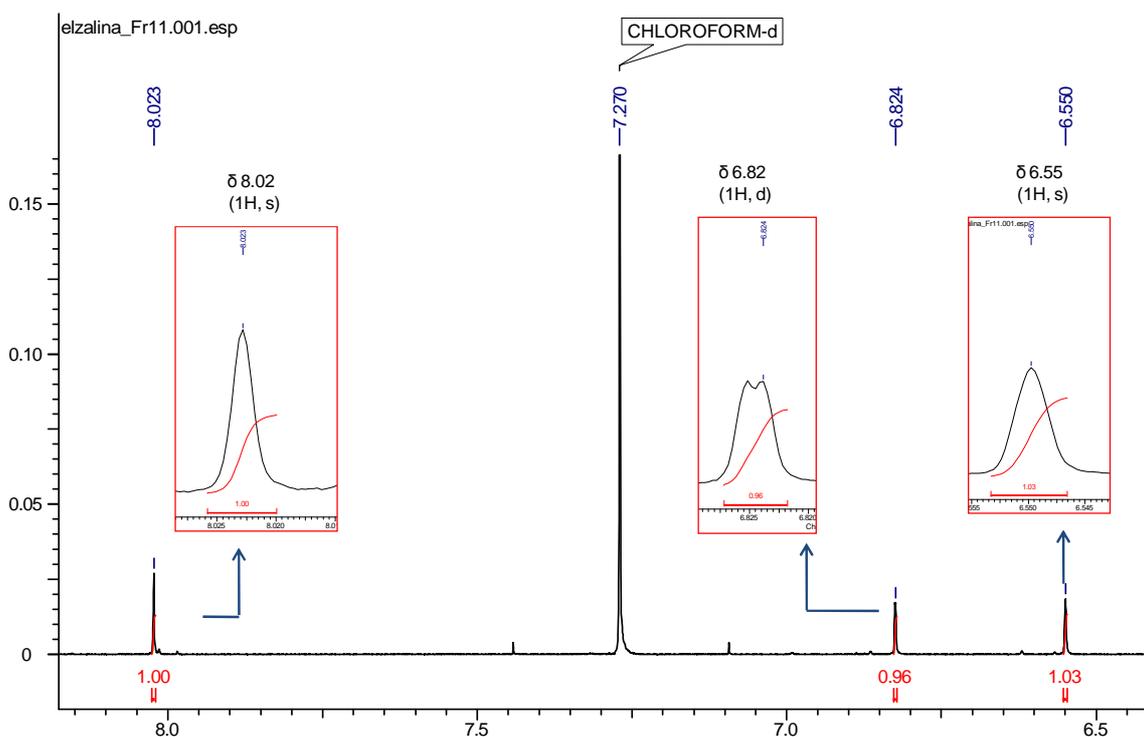


Figura 93: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF11.

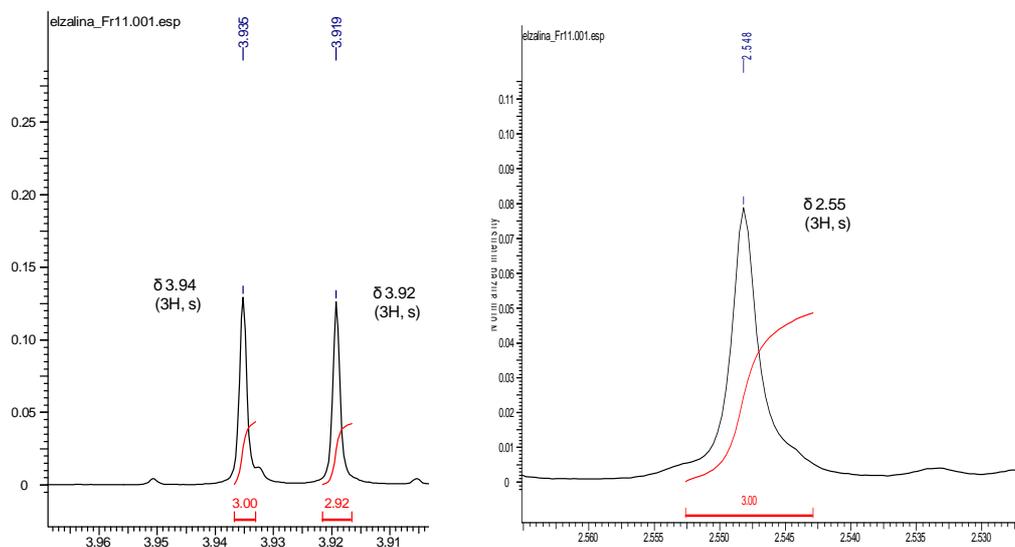


Figura 94: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais metoxilas (esquerda) e *N*-metila (direita) presentes na amostra BpF11.

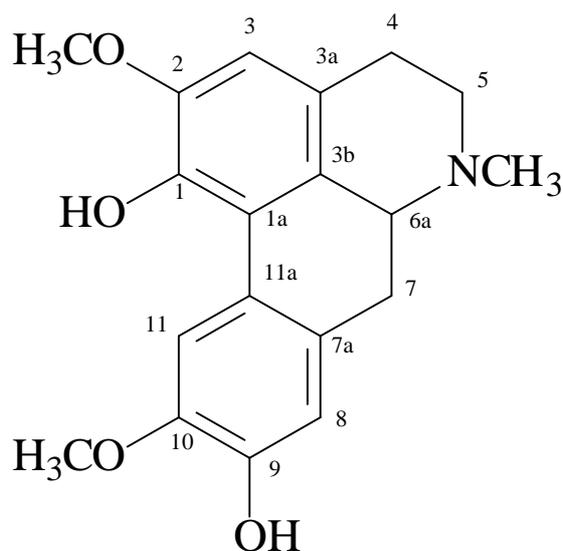


Figura 95: Estrutura do alcaloide isoboldina.

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H da amostra BpF11.

BpF11 (Isoboldina)					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	gHSQC ^a	gHMBC ^a	^{13}C ^b
1	–	–	–	–	140,6
1a	–	–	–	–	119,7
2	–	–	–	–	146,5
3	6,55 (1H, s)	6,77 (1H, s)	108,85	29,29; 127,77 e 140,79	109,2
3a	–	–	–	–	126,7
3b	–	–	–	–	123,5
4 _{Pseudoax}	3,0 (1H, dd, 13,8 e 4,2)	2,94 (1H, m)	34,17	62,88; 114,06 e 124,37	28,4
4 _{Pseudoeq}	2,64 (1H, dd 15,6 e 3,6)	3,22 (1H, m)	–	–	–
5 _{Pseudoax}	2,58 (1H, dd 13,8 e 0,6)	3,36 (1H, m)	–	–	52,9
5 _{Pseudoeq}	2,52 (1H, dd 12,0 e 4,2)	3,65 (1H, m)	–	–	–
6a	3,15 (1H, m)	4,12 (1H, m)	–	–	62,4
7 _{Pseudoax}	3,06 (1H, m)	2,74 (1H, t, 13,5)	–	–	33,7
7 _{Pseudoeq}	3,08 (1H, m)	3,18 (1H, m)	–	–	–
7a	–	–	–	–	129,1
8	6,82 (1H, d, 0,6)	6,83 (1H, s)	113,99	33,56; 124,60; 129,97; 145,76 e 145,28	114,9
9	–	–	–	–	145,4

10	–	–	–	–	145,3
11	8,02 (1H, s)	8,02 (1H, s)	111,89	119,74 e 124,60	113,6
11a	–	–	–	–	123,0
N-CH₃	2,55 (3H, s)	2,55 (3H, s)	44,13	53,89 e 62,95	43,6
2-OCH₃	3,92 (3H, s)	3,82 (3H, s)	56,25	145,44	55,8
10-OCH₃	3,94 (3H, s)	3,85 (3H, s)	56,25	145,28	55,8

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ¹H em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Iwasa et. al., 2008 (LC-RMN de H; 500 MHz, MeOH/ACN). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.9.5 Determinação estrutural da amostra BpF6.

A fração codificada como BpF6 (8,2 mg) apresentou-se como um sólido amorfo marrom. A análise de massas revelou a presença de um íon de m/z 268 intenso (Figura 96). Quando submetido à fragmentação em MS^n , o mesmo apresentou uma perda inicial de 17 Da, e perdas 32 e 28 Da em sequência (Figura 97), apontando para uma estrutura aporfínica sem metilação no nitrogênio, contendo uma metoxila adjacente à uma hidroxila no anel A, além de não apresentar substituição no anel D.

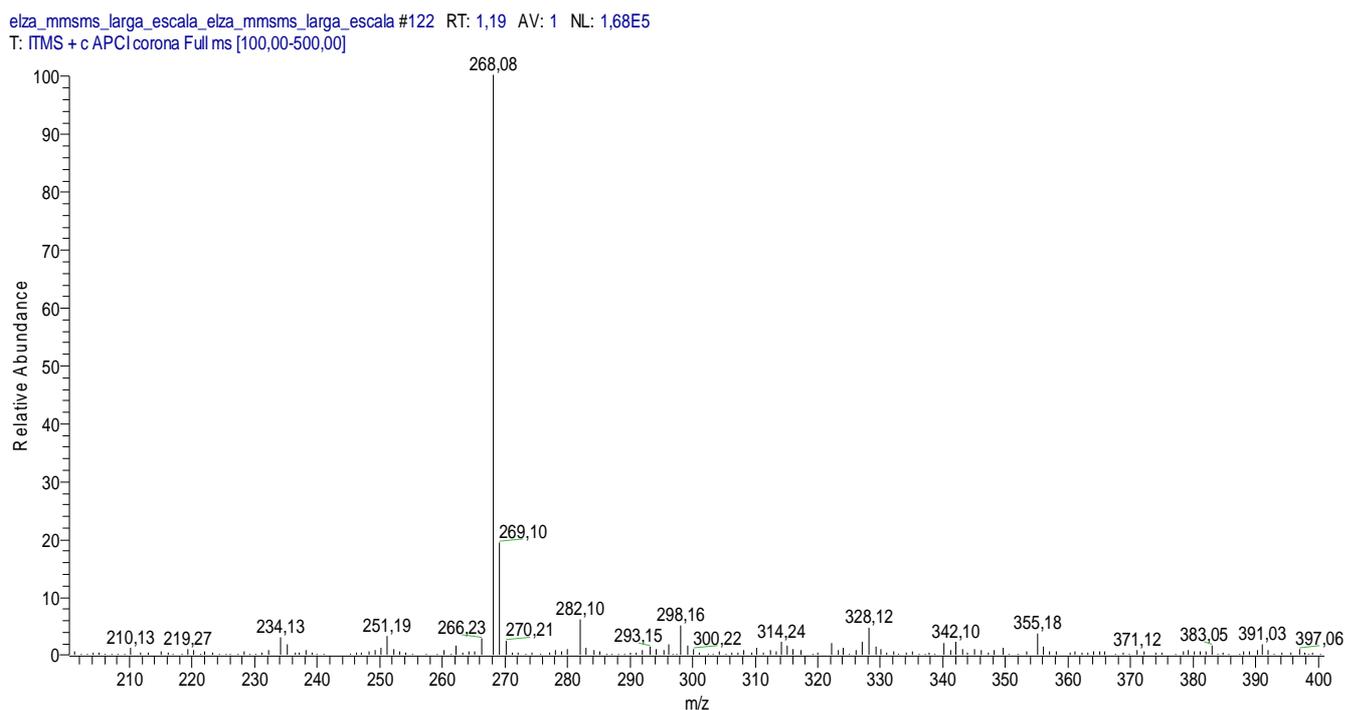


Figura 96: Espectro de massas do íon de m/z 268 presente na fração alcaloídica BpF6 das folhas de *B. pleiosperma*.

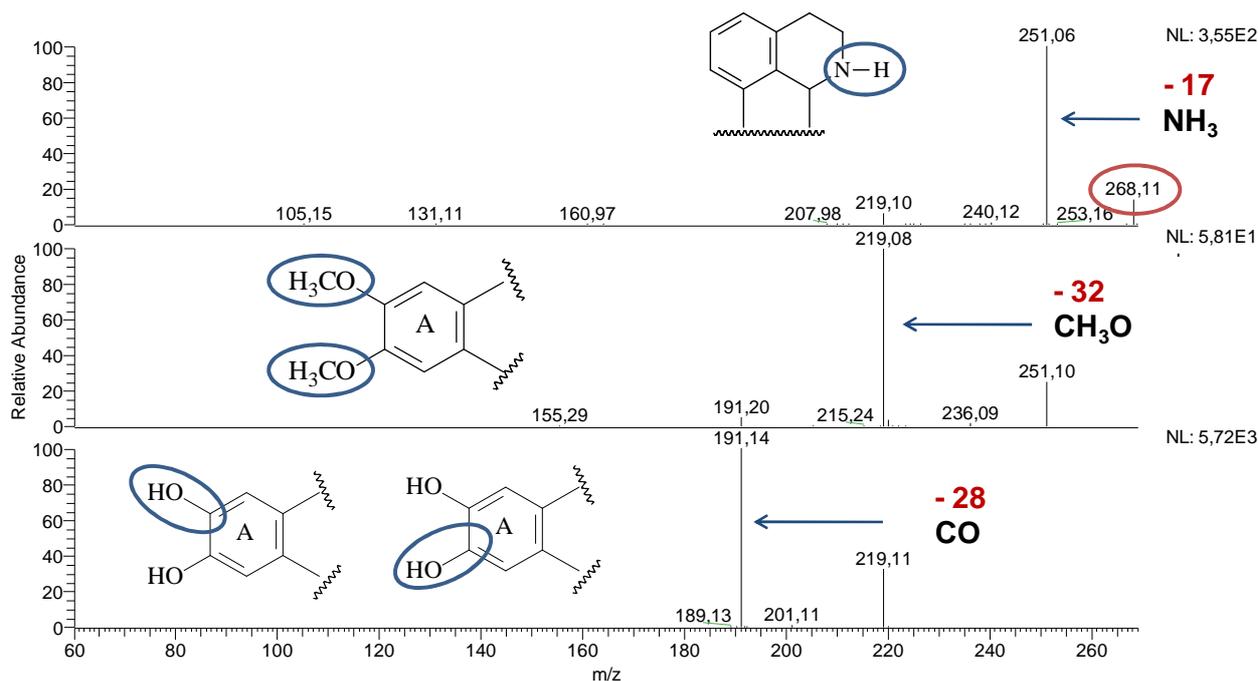


Figura 97: Espectro de massas até MSⁿ do íon de m/z 328, presente na fração alcaloídica BpF6 das folhas *B. pleiosperma*.

No espectro de RMN de ¹H (Figura 98) é possível observar na região de aromáticos 4 sinais em δ 7,28 (1H, m), δ 7,25 (1H, ddd, 7,2 e 1,2 Hz), δ 7,33 (1H, ddd, 7,8 e 1,8 Hz) e δ 8,29 (1H, d, 7,8 Hz), característicos do anel D do esqueleto aporfínico não substituído, além do singlete em δ 6,73 (1H, s), com deslocamento característico de H-3 do anel A dissubstituído. Através do mapa de contorno de HMBC (figura 99) é possível observar a correlação do H-3 com os carbonos em δ 28,04 (C-4), δ 126,61(C-3b), δ 143,45 (C-1) e δ 149,97 (C-2), além da correlação da metoxila em δ 3,59 (3H, s), com o carbono em δ 143,45 (C-1), confirmando assim a conectividade do anel A (Figura 100). Estas evidências permitiram caracterizar a substância BpF6 como sendo o alcaloide aporfínico assimilobina (Figura 101 e 102), sendo sua confirmação obtida através da comparação dos dados espectroscópicos com os existentes na literatura (Tabela 12). O espectro total de RMN de ¹H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 145, 146 e 147).

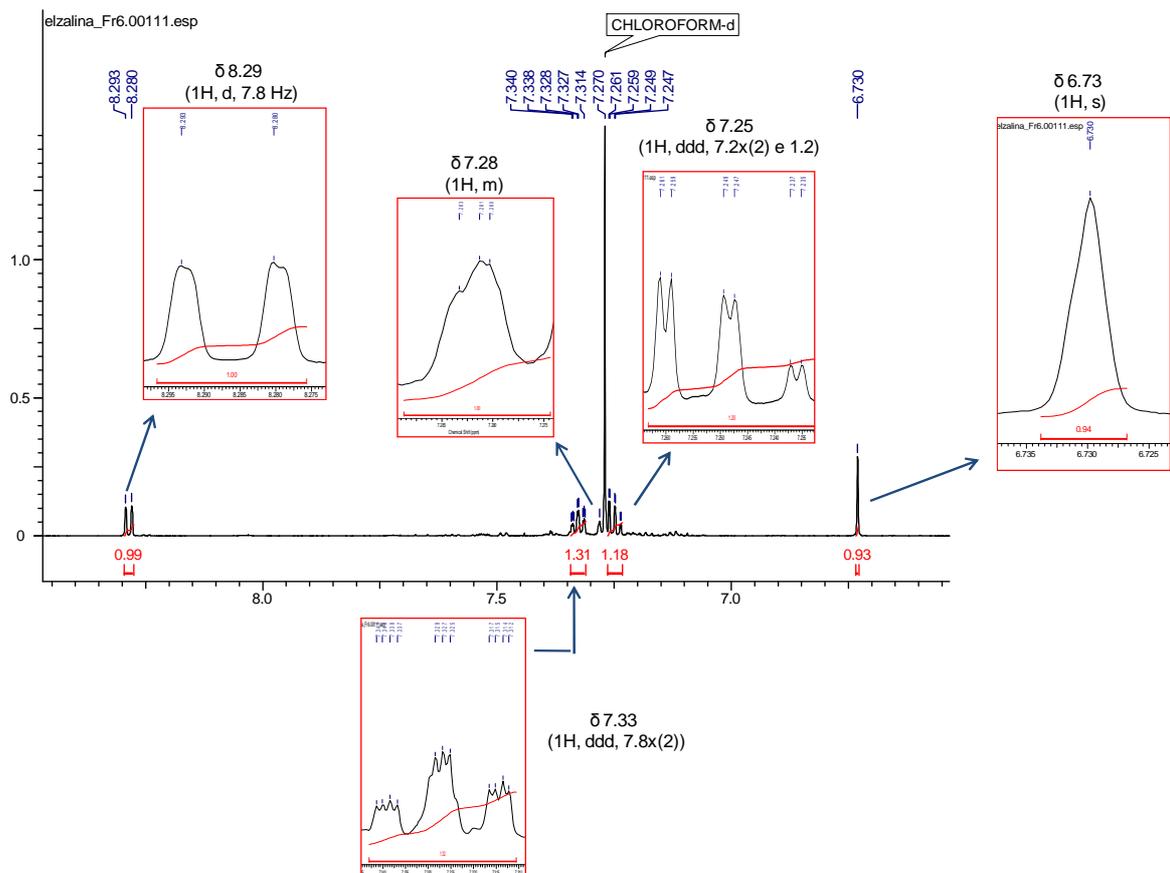


Figura 98: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF6.

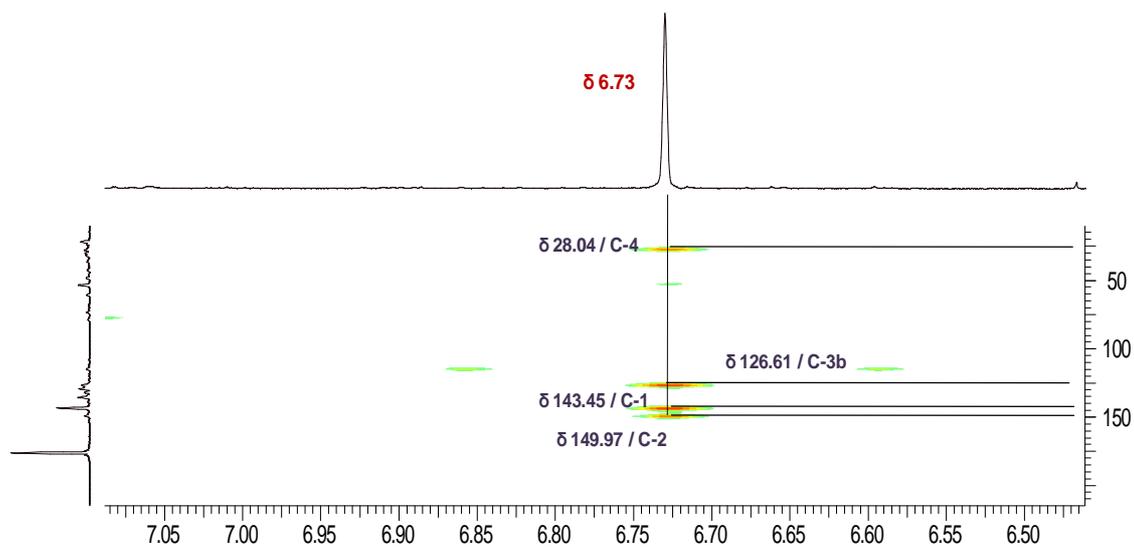


Figura 99: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente ao sinal do H-3 da amostra BpF6.

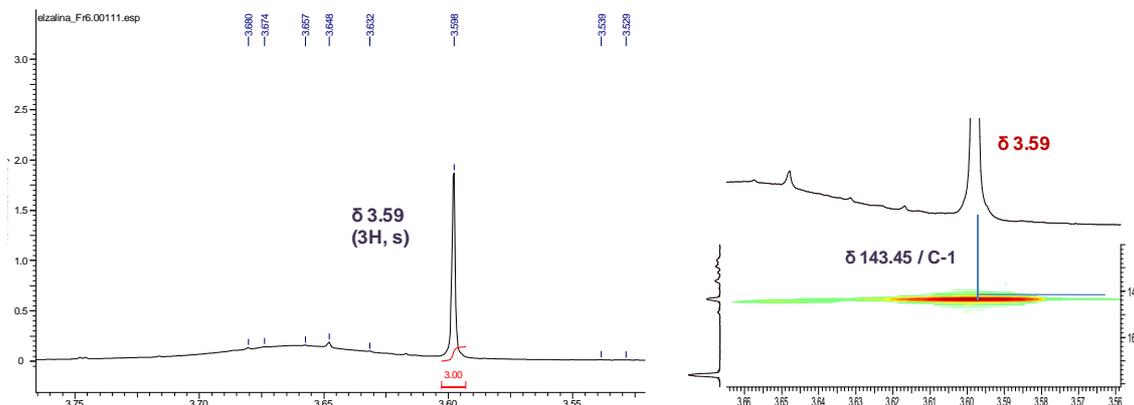


Figura 100: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente ao sinal de metoxila da amostra BpF6.

Asimilobina é um alcaloide comumente encontrado em gêneros da família Annonaceae, como *Xylopia*, *Annona* e *Guatteria* (LEBOEUF et al., 1982; HASRAT et al., 1997; VENDRAMIN et al., 2013; GUINAUDEAU et al., 1983), podendo ser considerado como um marcador taxonômico (DA CRUZ et al., 2011).

Trabalho realizado por Costa e colaboradores 2013b, com a espécie *Annona salzmannii*, evidenciou resultados satisfatórios, relacionados a atividade antioxidante e antimicrobiana para a asimilobina. Neste trabalho foi reportado que o alcaloide asimilobina possui atividade antioxidante de 2,09 TE relativo, e os ensaios antimicrobianos apresentaram valores CIM de $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ para os patógenos *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *S. aureus penicilinase*, *S. epidermidis* (ATCC 12228).

Egydio e colaboradores (2013) conseguiram identificar o alcaloide asimilobina por CG-MS e CG-FID em diferentes concentrações na espécie *Annona crassiflora* Mart. Em estudos realizados por Chen & Wu (2001) foi

possível o isolamento do alcaloide assimilobina a partir das folhas de *A. cherimolia*.

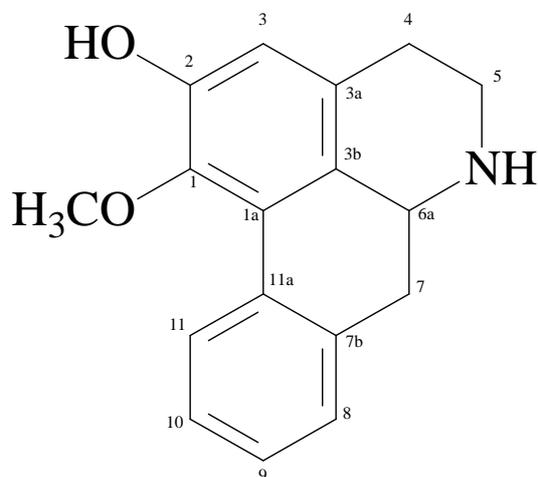


Figura 101: Estrutura do alcaloide assimilobina.

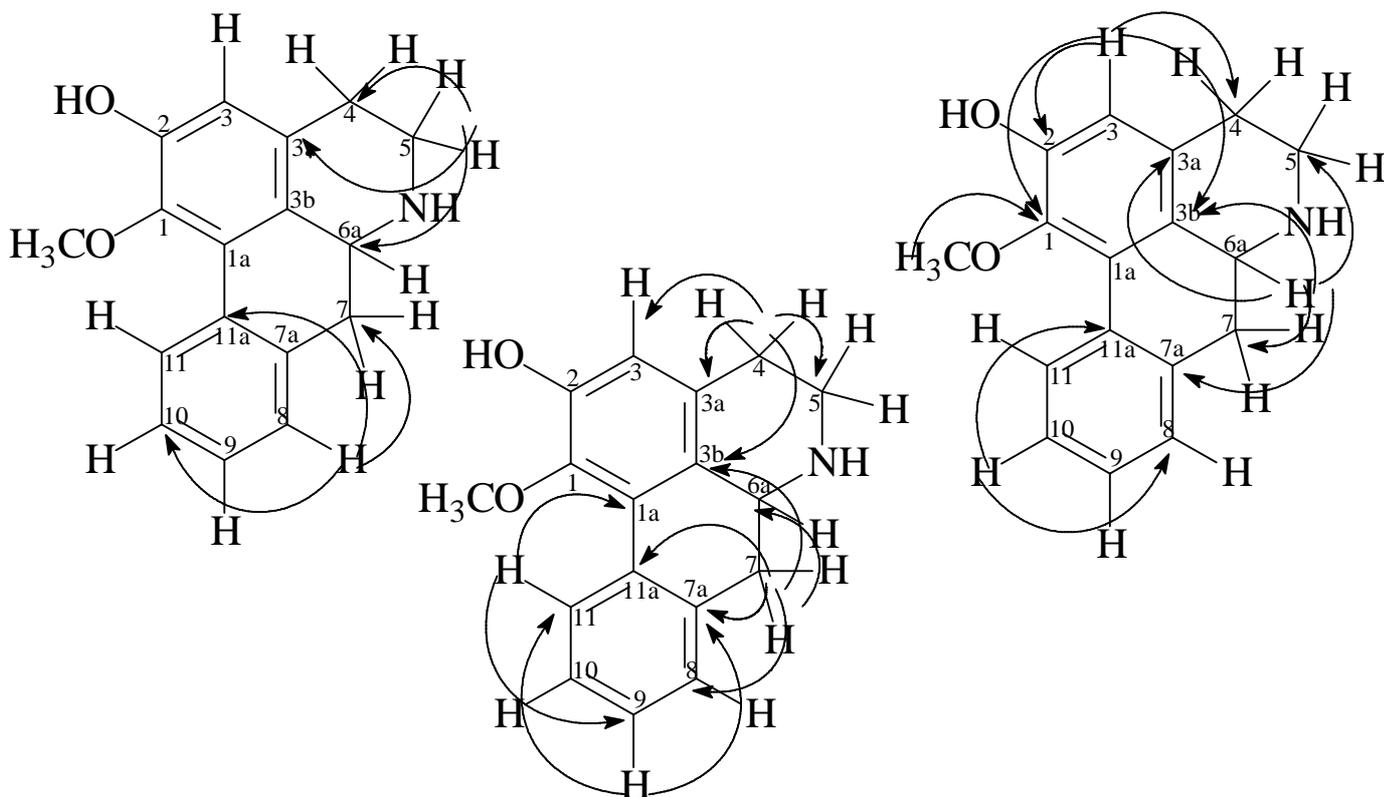


Figura 102: Principais correlações observadas para o alcaloide assimilobina.

Tabela 12: Dados de RMN de ¹H da amostra BpF6.

BpF6 (Asimilobina)					
Posição	¹H δ (mult., J em Hz)^a	¹H δ (mult., J em Hz)^b	gHSQC	¹³C^b	gHMBC (¹H-¹³C)
1a	–	–	125,86	124,97	–
1	–	–	143,45	142,53	–
2	–	–	149,97	147,96	–
3	6,73 (1H, s)	6,50 (1H, s)	114,61	114,24	28,04; 126,61; 143,45 e 149,07
3a	–	–	129,30	–	–
3b	–	–	126,61	127,82	–
4pseq	2,73 (1H, m)	–	28,04	28,35	42,49; 114,61; 129,30 e 126,61
4psax	2,76 (1H, m)	–	28,04	28,35	42,49, 114,61, 129,30 e 126,61
5psax	3,49 (1H, m)	–	42,49	42,74	28,04; 53,21 e 129,30
5pseq	3,04 (1H, m)	–	42,49	42,74	28,04; 53,21 e 129,30
6a	3,92 (1H, dd, 14,0 e 4,8)	3,87 (1H, dd, 13,2 e 4,8)	53,15	53,15	36,28; 42,49; 126,61; 129,30 e 135,61
7pseq	2,97 (1H, dd, 13,8 e 4,4)	–	36,28	36,83	53,15; 126,61; 128,32, 131,91 e 135,61
7psax	2,84 (1H, m)	–	36,28	36,83	53,15; 126,61; 128,32; 131,92 e 135,61
7a	–	–	135,61	135,62	–
8	7,28 (1H, m)	7,28 (1H, m)	128,32	127,60	36,28; 127,81 e 131,91
9	7,25 (1H, ddd, 7,2 e 1,2)	7,20 (1H, m)	128,08	127,18	127,44 e 135,61
10	7,33 (1H, ddd, 7,8 e 1,8)	7,34 (1H, m)	127,81	126,95	128,32 e 131,91
11	8,29 (1H, d, 7,8)	8,28 (1H, d, 7,5)	127,44	126,82	135,61; 125,86 e 128,08
11a	–	–	131,91	139,49	–
1-CH₃O	3,59 (3H, s)	3,58 (3H, s)	60,41	60,00	143,45

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ¹H em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Fischer et. al., 1999 (H, 300 MHz, CDCl₃; C, 75,5 MHz, CDCl₃) e Hasrat et al., 1997. (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.9.6 Determinação estrutural da amostra BpF9.

A fração codificada como BpF9 (11,0 mg) apresentou-se como um sólido amorfo marrom. A análise de massas apontou para a presença do íon majoritário de m/z 298 (Figura 103), além de outros dois outros de m/z 328 e 342, sendo este último observado como minoritário no espectro.

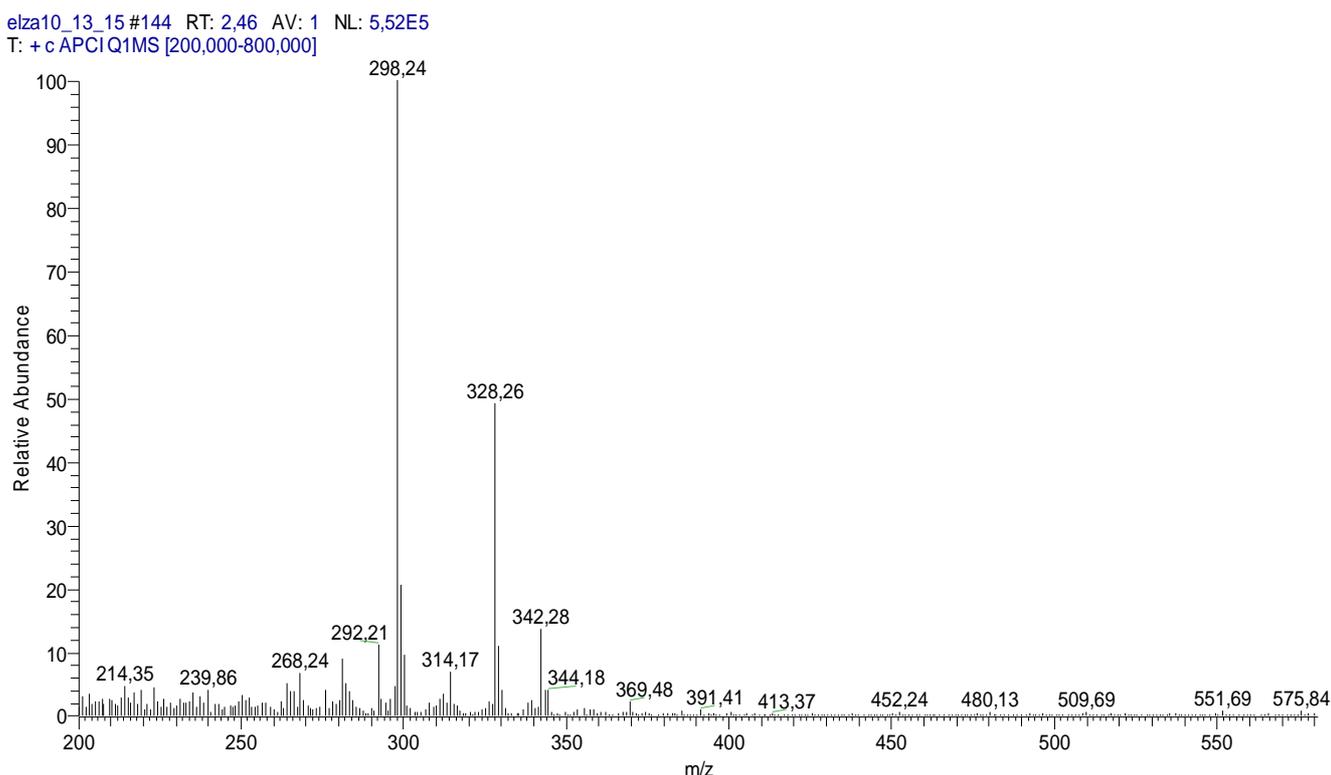


Figura 103: Espectro de massas dos íons de m/z 298, 328 e 342 presente na fração alcaloídica BpF9 das folhas de *B. pleiosperma*.

No espectro de MS^n do íon de m/z 298 foram observadas perdas sequenciais de 17, 15 e 31 Da (Figura 104), sugerindo a presença de hidrogênio ligado ao nitrogênio (N-H) e metoxilas adjacentes ao anel A.

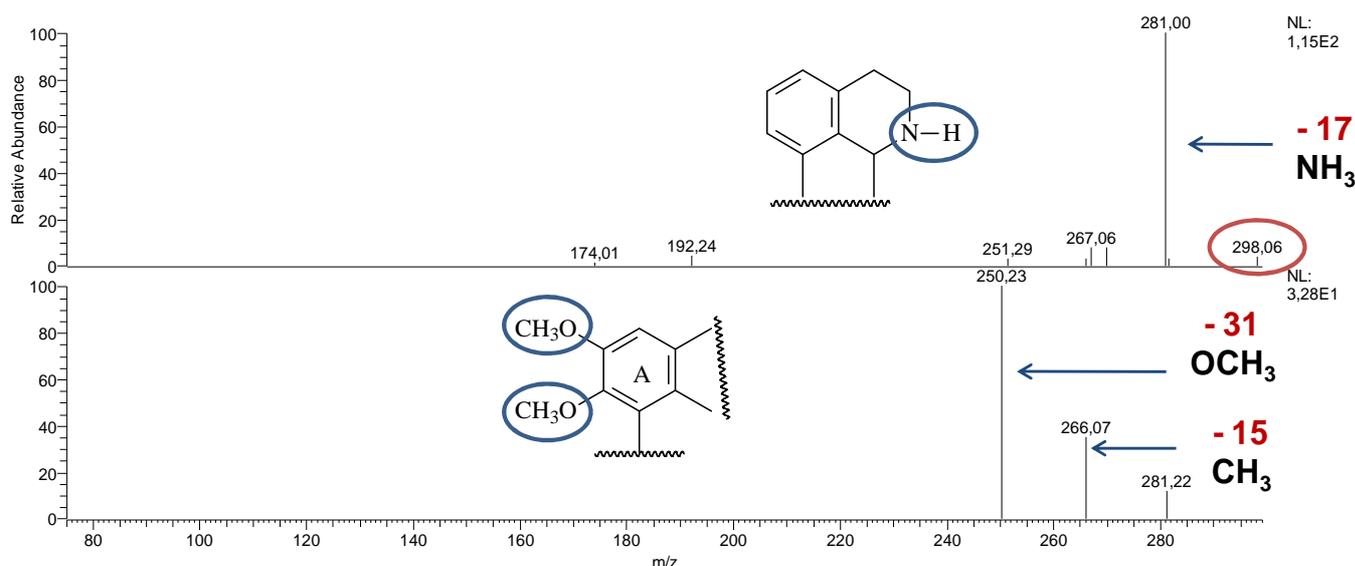


Figura 104: Espectro de massas em MS² do íon de m/z 298 ($[M+H]^+$).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 105) foi possível observar na região dos aromáticos a presença de 4 duplodubletos (dd) em δ 7,03 (1H, dd, 3,0 e 10,0 Hz, H-8), δ 6,42 (1H, dd, 10,0 e 1,8 Hz, H-9), δ 6,30 (1H, dd, 9,6 e 1,8 Hz, H-11), δ 6,89 (1H, dd, 10,0 e 3,0 Hz, H-12), sistema característico do anel D de esqueleto proaporfínico (Silva et al., 2014). No mapa de contornos HSQC (Figura 106) foi possível observar que estes hidrogênios estão acoplados aos carbonos em δ 150,30 (C-8), δ 128,97 (C-9), δ 127,80 (C-11) e δ 153,70 (C-12), sendo confirmada a presença do anel característico do esqueleto proaporfínico através das correlações dos hidrogênios de acordo com o mapa de contornos HMBC (Figura 107) em δ 6,42 e 6,30 com os carbonos em δ 127,80 e 51,82 (carbono spiro) e da correlação dos hidrogênios em δ 6,89 e 7,03 com os carbonos em δ 150,30 e 186,88 (carbonilas). A integração destes sinais possibilitou concluir que este sistema é parte do alcaloide majoritário.

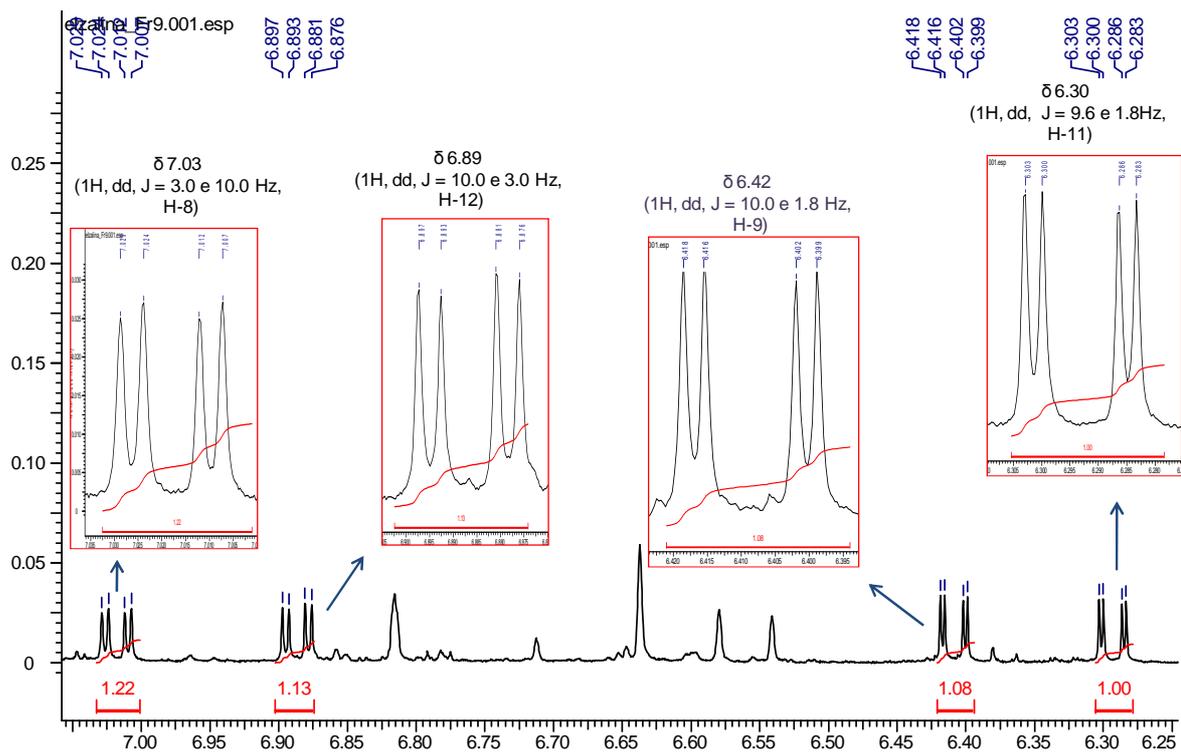


Figura 105: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF9.

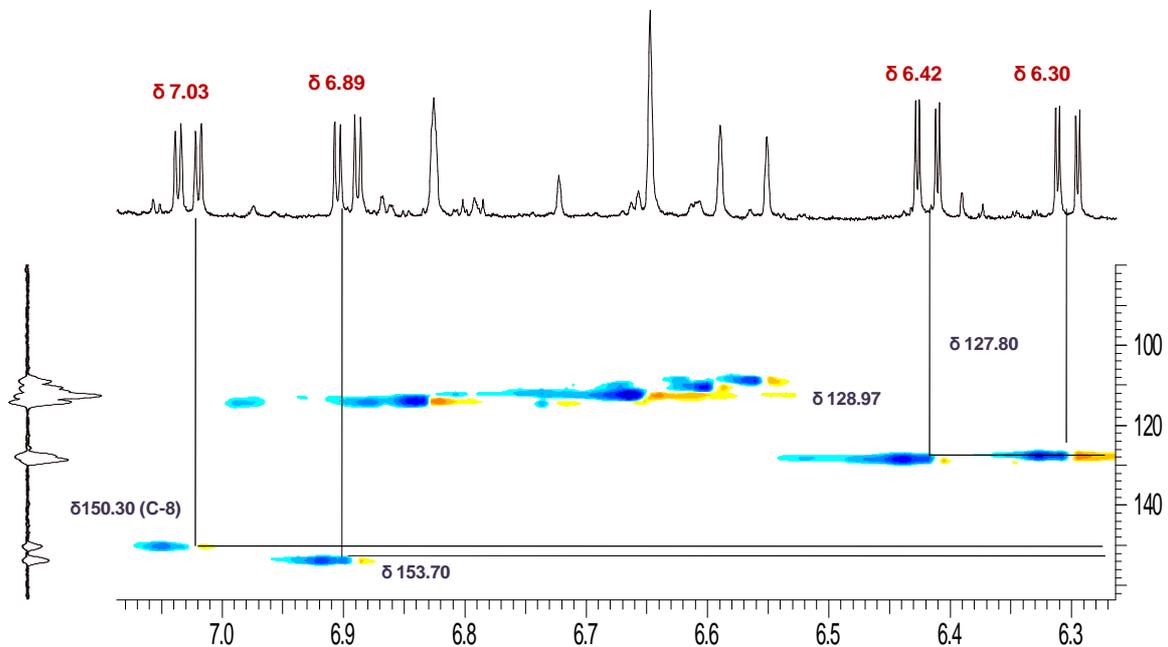


Figura 106: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF9.

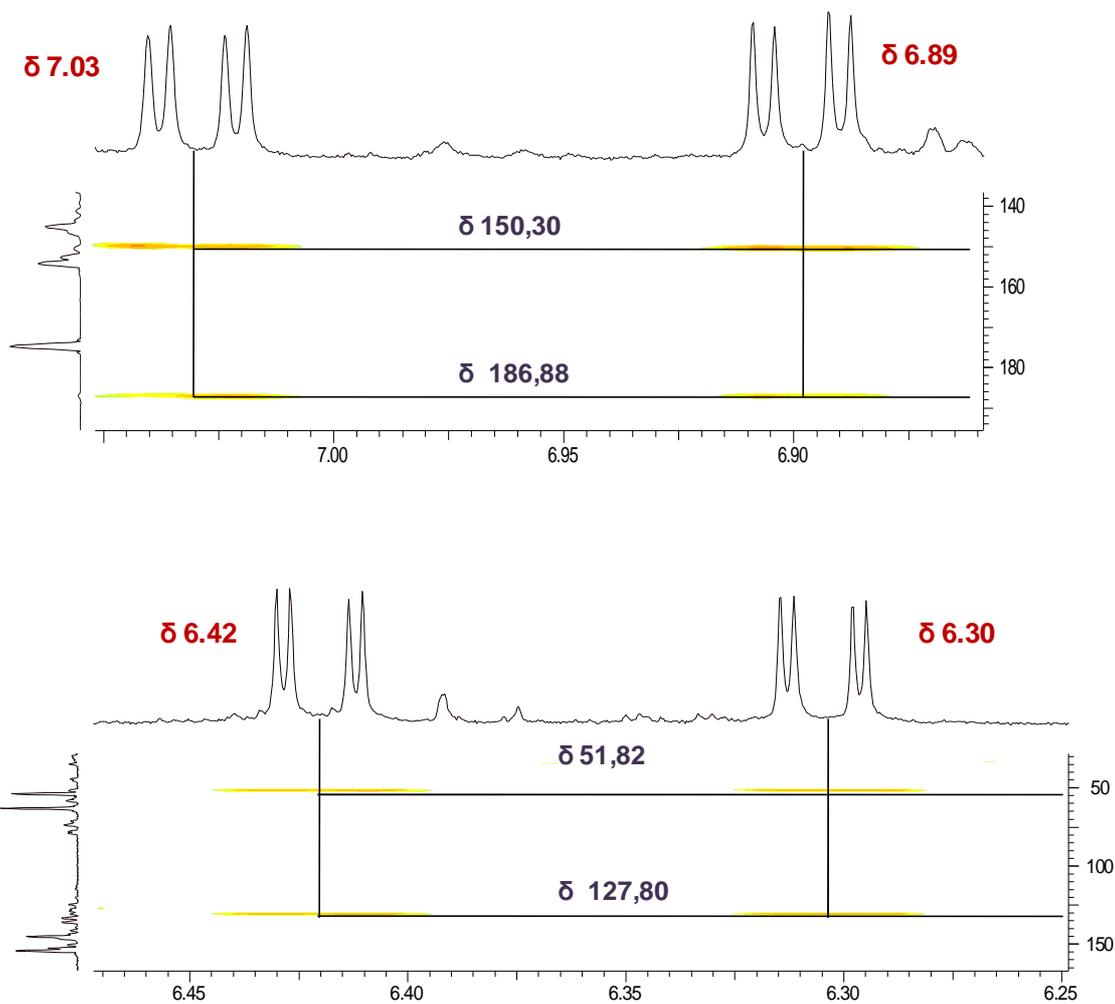


Figura 107: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF9.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 108) foi possível observar ainda os sinais em δ 3,82 (3H, s) e δ 3,61 (3H, s), referentes aos hidrogênios metoxílicos. No mapa de contornos HMBC observou-se que estes correlacionam-se com os carbonos em δ 154,20 e δ 145,20, respectivamente. Ainda no espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (Figura 109) é visualizado um singlete em δ 6,64, característico do H-3 do anel A dissustituído, que se correlaciona com os carbonos em δ 26,77, 128,63, 135,84, 145,20 e 154,20, confirmando assim a proposta inicial sugerida pela análise de fragmentação. Demais sinais e correlações são apresentados na tabela 13.

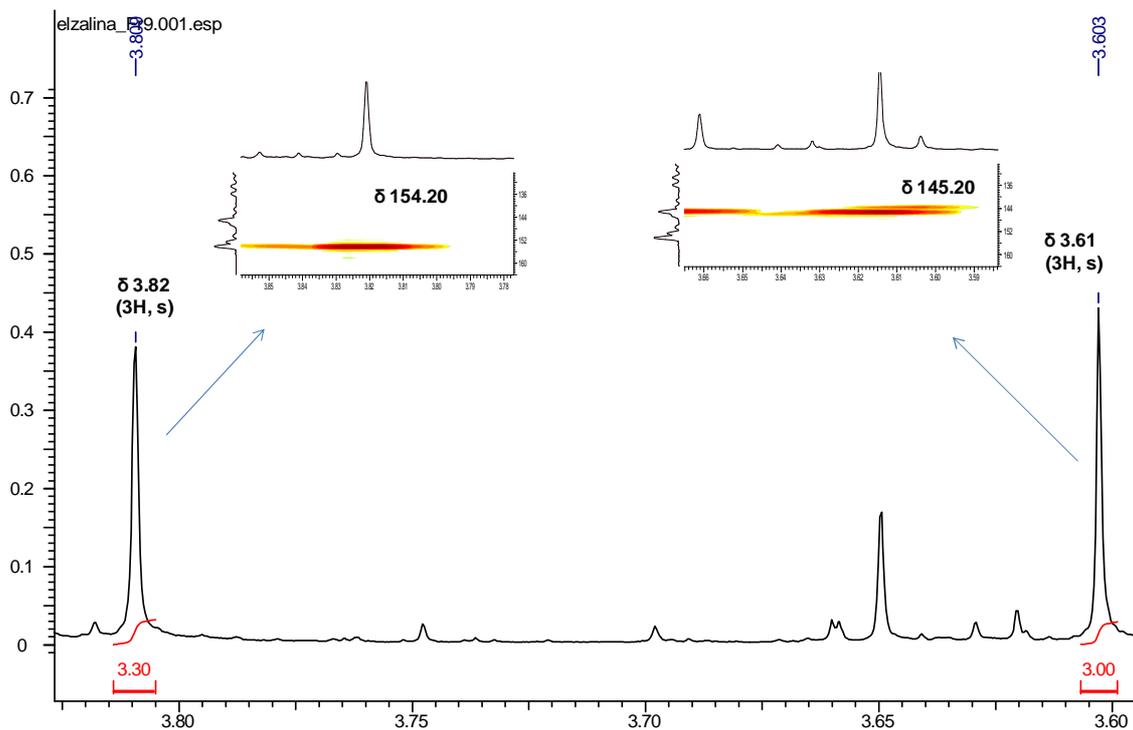


Figura 108: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente aos sinais de metoxilas da amostra BpF9.

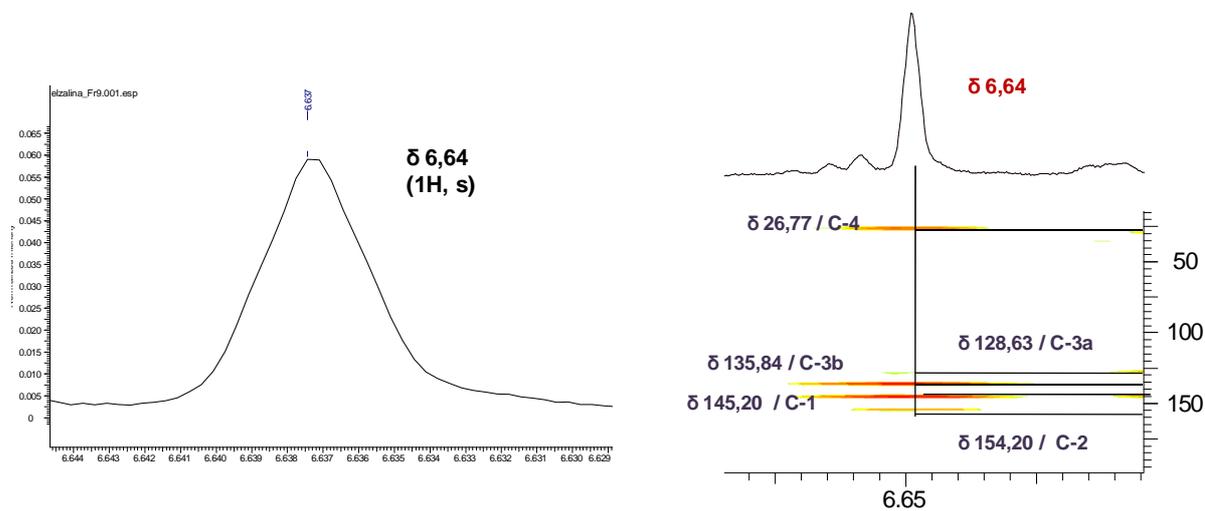


Figura 109: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente ao sinal do H-3 da amostra BpF9.

A partir desses dados pode-se concluir que a substância de m/z 298 trata-se do alcaloide proaporfínico estefarina (Figura 110 e 111). Este alcaloide

já foi relatado em espécies da família Annonaceae como *Xylopi* *laevigata*, *X. parviflora*, *Alphonsea sclerocarpa*, *Annona muricata* L. e *Monodora brevipes* (LEBOEUF et al., 1981; TADIC et al., 1987; NISHIYAMA et al., 2006; HOANG ANH et al., 2007; DAÍ et al., 2012; COSTA et al., 2013c). Uma comparação entre os dados espectroscópicos e os dados da literatura é apresentada na tabela 13. E o espectro total de RMN de ¹H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 148, 149 e 150).

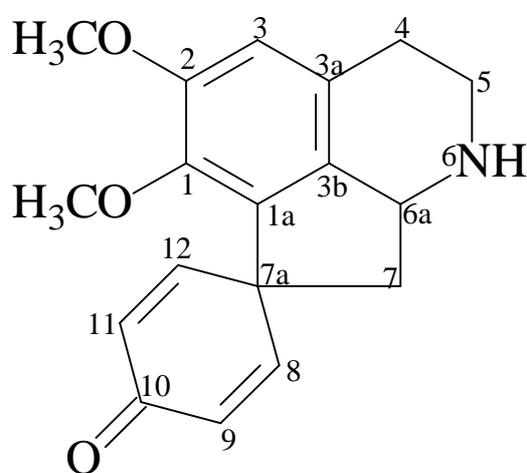


Figura 110: Estrutura do alcaloide estefarina.

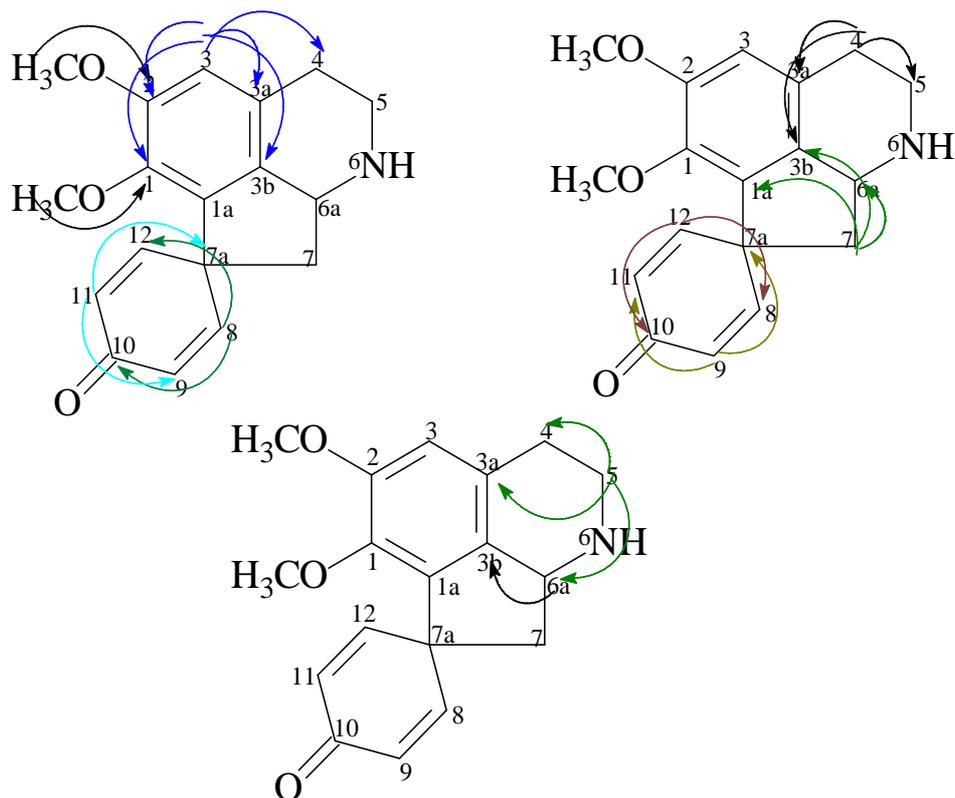


Figura 111: Principais correlações observadas para a amostra BpF9.

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H , gHSQC e gHMBC da amostra BpF9.

BpF9 (Estefarina)					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^c	gHSQC (^1H - ^{13}C) ^a	gHSQC (^1H - ^{13}C) ^c	gHMBC (^1H - ^{13}C) ^a
1	–	–	145,20	145,4	–
1a	–	–	133,13	135,1	–
2	–	–	154,20	154,9	–
3	6,64 (1H, s)	6,65 (1H, s)	112,63	113,4	26,76; 128,63; 135,67; 145,20 e 154,20
3a	–	–	128,63	129,2	–
3b	–	–	135,67	–	–
4	2,80 (2H, m)	2,81 (2H, m)	26,76	26,4	45,40; 128,63 e 135,67
5	3,46 (1H, dd, 6,6 e 1,2, 3,16 (1H, dd 5,4 e 1,8)	3,46 (1H, m) 3,15 (1H, m)	45,40	45,5	26,76; 58,22 e 128,63
6a	4,31 (1H, dd 10,5 e 6,6)	4,38 (1H, dd 10,00 e 6,50)	58,22	58,4	135,67
7	2,41 (2H, dd 12,0 e 6,6)	2,28 (1H, dd, 10,5 e 12,0)	48,53	48,1	58,22; 133,13 e 135,67

		2,39 (1H, dd, 6,5 e 12,0)			
7a	–	–	51,82	52,7	–
8	7,03 (1H, dd, 3,0 e 10,0)	7,03 (1H, dd, 2,9 e 9,9)	150,30	152,7	153,70 e 186,88
9	6,42 (1H, dd, 10,0 e 1,8)	6,38 (1H, dd, 1,9 e 9,9)	128,97	128,7	51,82 e 127,80
10	–	–	186,88	188,1	–
11	6,30 (1H, dd, 9,6 e 1,8)	6,26 (1H, dd, 1,9 e 9,9)	127,80	127,7	51,82 e 128,97
12	6,89 (1H, dd, 10,0 e 3,0)	6,90 (1H, dd 2,9 e 9,9)	153,70	156,1	150,30 e 186,88
2-OCH₃	3,82 (3H, s)	3,79 (3H, s)	56,74	56,7	154,20
1-OCH₃	3,61 (3H, s)	3,61 (3H, s)	61,39	61,3	145,20

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ¹H em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Hoang Anh et. al., 2007 (H; 300 MHz, CDCl₃) e Dai et al., 2012 (500 MHz, CDCl₃). ^cDados atribuídos de acordo com os dados da literatura e por comparação com o gHMBC. (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

O íon de *m/z* 328 quando submetido à análise de fragmentação, evidenciou perdas de 31, 32 e 28 Da (Figura 112), perdas semelhantes às observadas anteriormente para o alcaloide identificado como isoboldina (BpF11; Figura 93). Uma comparação dos de RMN de ¹H entre as amostras confirmou a presença de isoboldina (Figura 113) também nesta amostra. As correlações observadas nos mapas de HMBC e HSQC são apresentadas na Tabela 14. Além do espectro total de RMN de ¹H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 148, 149 e 150).

padraoelzalina4-11-_140514125346 #1302 RT: 11,52 AV: 1 NL: 1,00E6
F: + c APCI Full ms2 328,000 [100,000-330,000]

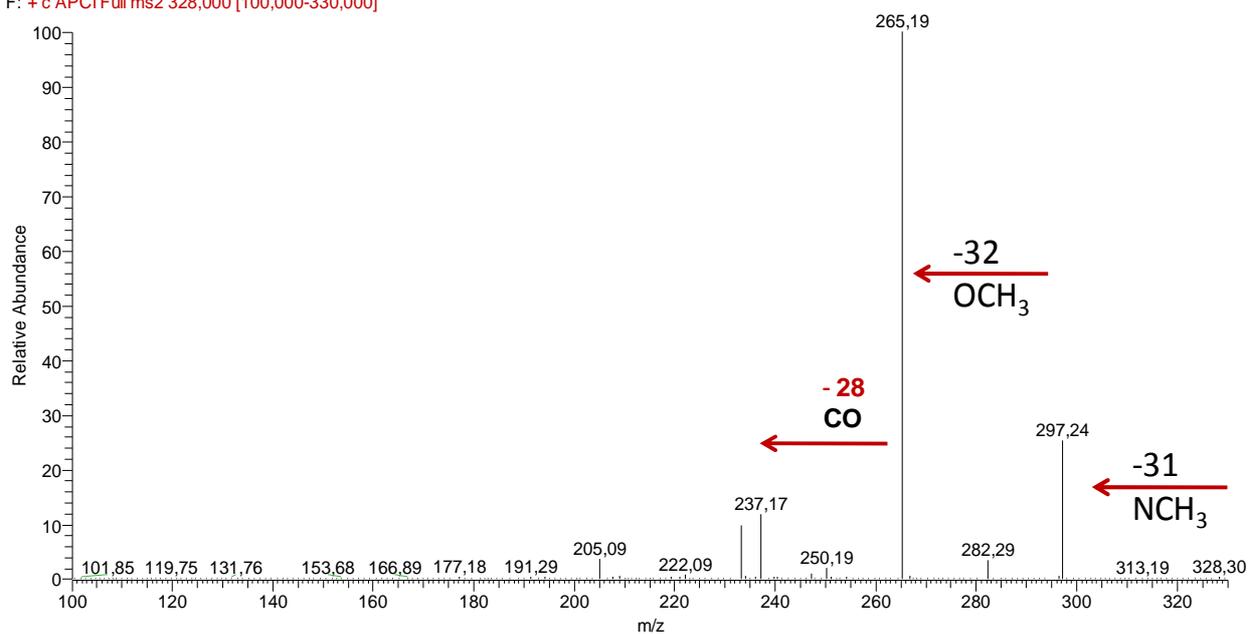


Figura 112: Espectro de massas em MS² do íon de m/z 328 ([M+H]⁺).

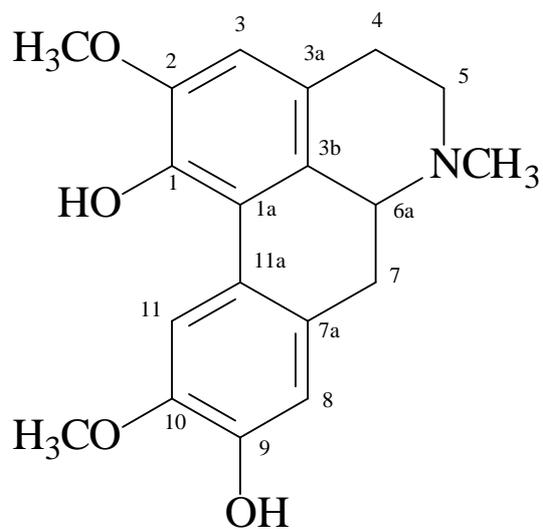


Figura 113: Estrutura do alcaloide isoboldina.

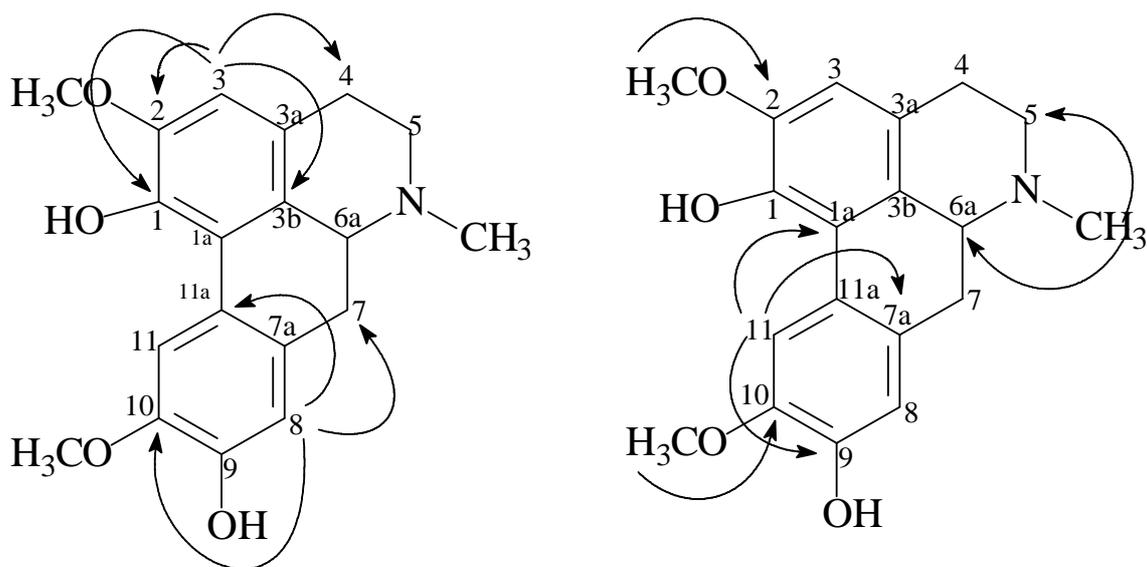


Figura 114: Principais correlações observadas para a amostra BpF9.

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H , gHSQC e gHMBC da amostra BpF9.

BpF9B (Isoboldina)					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC (^1H - ^{13}C) ^{a,c}	^{13}C ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a
1	–	–	141,15	140,6	–
1a	–	–	120,10	119,7	–
2	–	–	146,40	146,5	–
3	6,54 (s 1H)	6,77 (1H, s)	109,07	109,2	29,23; 127,50; 141,15 e 146,40
3a	–	–	–	126,7	–
3b	–	–	–	123,5	–
4	–	–	29,23	28,4	–
5	–	–	–	52,9	–
6a	–	–	–	62,4	–
7	–	–	–	33,7	–
7a	–	–	130,17	129,1	–
8	6,82 (1H, s)	6,83 (1H, s)	114,17	114,9	34,62; 124,55 e 145,70
9	–	–	144,70	145,4	–
10	–	–	145,70	145,3	–
11	8,02 (1H, s)	8,02 (1H, s)	112,00	113,6	120,10; 130,17 e 144,74
11a	–	–	124,55	123,0	–
N-CH ₃	2,55 (3H, s)	2,55 (3H, s)	43,97	43,6	53,76 e 63,01
2 OCH ₃	3,91 (3H, s)	3,82 (3H, s)	56,48	55,8	146,36
10 OCH ₃	3,93 (3H, s)	3,85 (3H, s)	56,48	55,8	145,58

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Iwasa et. al., 2008 (H; 500 MHz, CDCl_3). ^cDados atribuídos de acordo com os dados da literatura e por comparação com o HMBC. (δ) Deslocamento químico em ppm. (–) não identificado.

O íon de m/z 342 quando submetido à análise de fragmentação, evidenciou perdas sequenciais de 31, 15 e 31 Da (Figura 115), sugerindo uma estrutura aporfínica contendo uma *N*-metila e metoxila adjacentes no anel A.

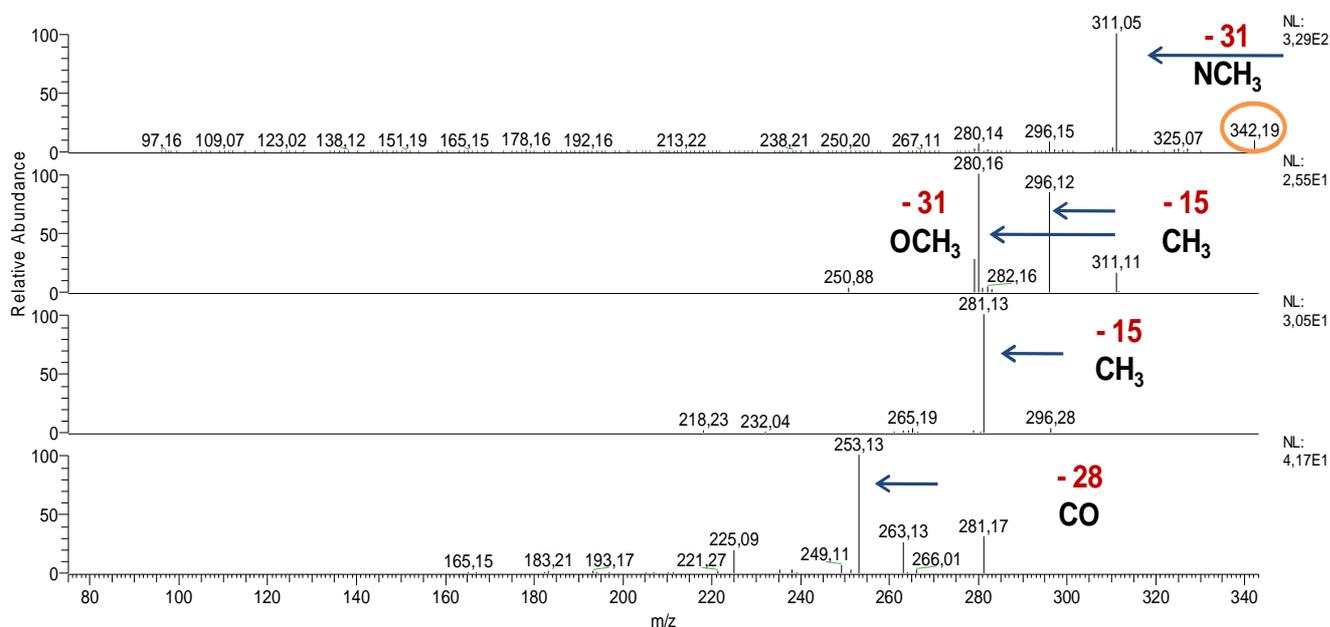


Figura 115: Espectro de massas em MSⁿ do íon de m/z 342 ([M+H]⁺).

Após discriminar os sinais referentes à estefarina e isoboldina, a integração dos sinais minoritários possibilitou identificar no espectro de RMN de ¹H (Figura 116) três singletos em δ 6,58 (s, 1H), 6,82 (s, 1H) e 8,06(s, 1H), sugerindo um sistema aporfínico 1, 2, 9, 10, tetrasubstituído, além dos sinais em δ 3,88 (s, 3H), 3,65 (s, 3H) e 3,90 (s, 3H), referentes à presença de três metoxilas (Figura 117), e um sinal em δ 2,54 (s, 3H), característico de *N*-metila. No mapa de contornos HSQC (Figura 119) é possível observar as correlações do hidrogênio em δ 6,58 (s, 1H), característico da posição H-3 do anel A, com o carbono em δ 110,69. Enquanto no HMBC (Figura 120) observam-se correlações as suas correlações com os carbonos em δ 29,58, 127,53, 144,83 e 152,55, confirmando a dissubstituição do anel As correlações dos hidrogênios metoxílicos (Figura 117) em δ 3,88 e 3,65 com os carbonos em δ 152,55 e 144,83

respectivamente, confirmam a presença das duas metoxilas no anel A. Ainda no mapa de contornos HMBC (Figura 118) é possível observar as correlações a β características dos hidrogênios *N*-metílicos com os carbonos em δ 53,76 e 63,02, ratificando assim a proposta obtida através do estudo de fragmentação. Outras correlações significativas são apresentadas na Tabela 15 e o espectro total de RMN de ^1H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 148, 149 e 150).

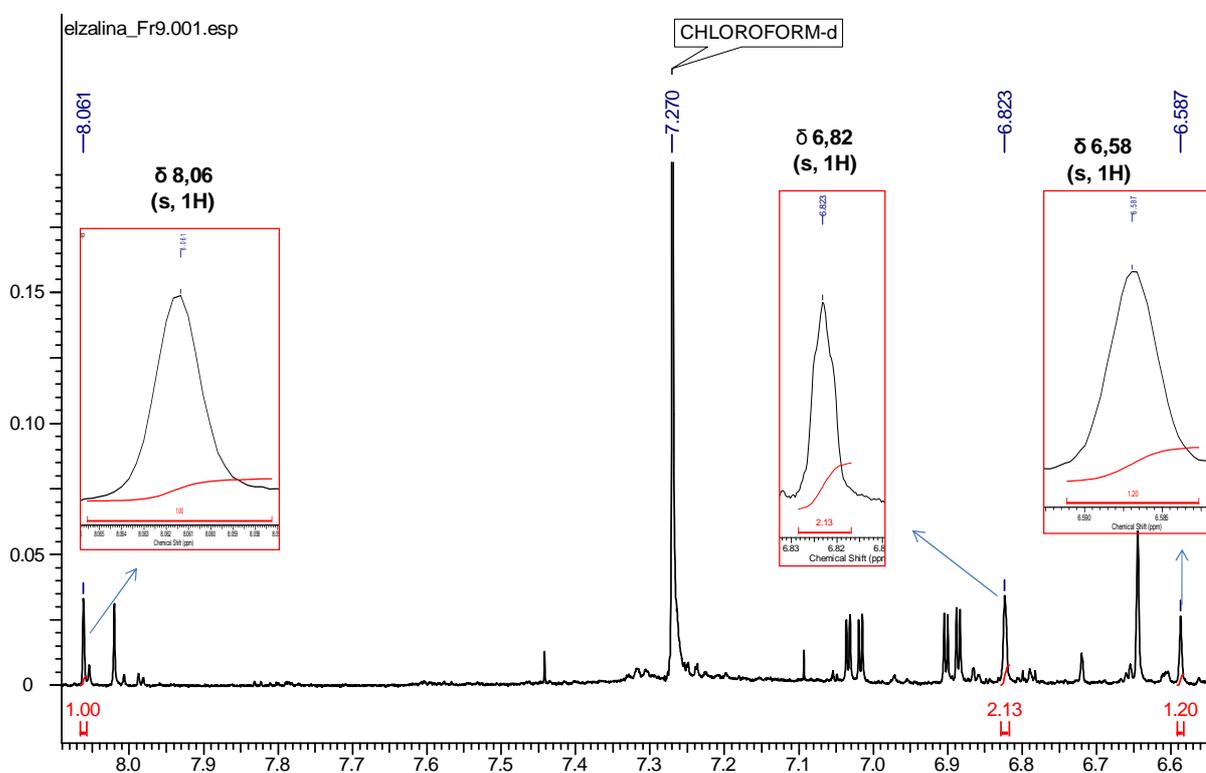


Figura 116: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da amostra BpF9.

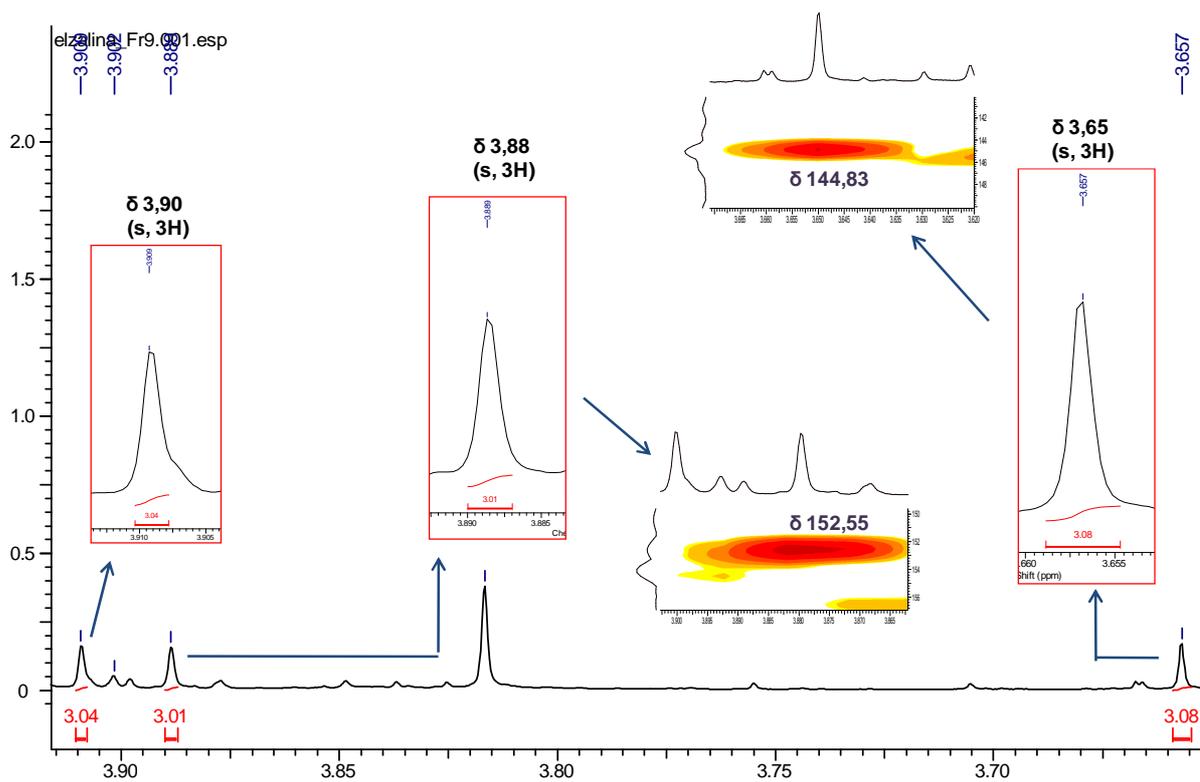


Figura 117: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região de metoxilas da amostra BpF9.

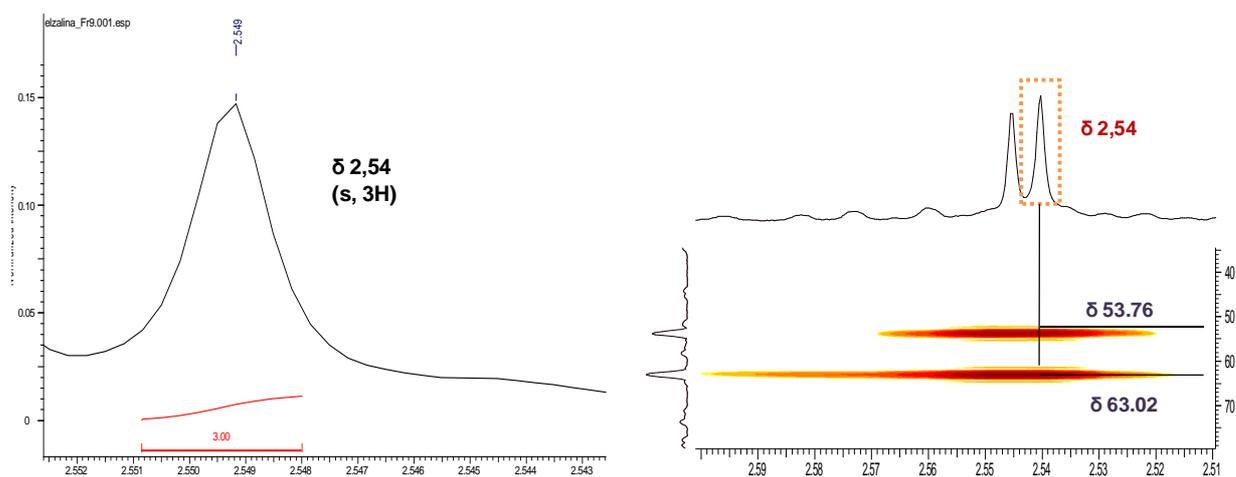


Figura 118: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região de hidrogênios de *N*-metila da amostra BpF9.

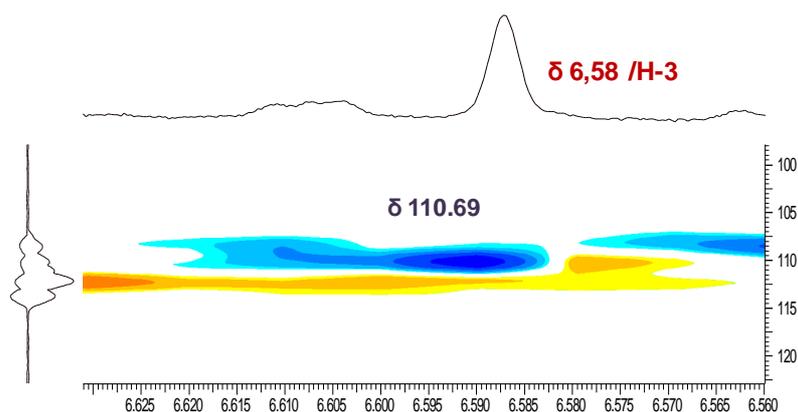


Figura 119: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) referente ao H-3 da amostra BpF9.

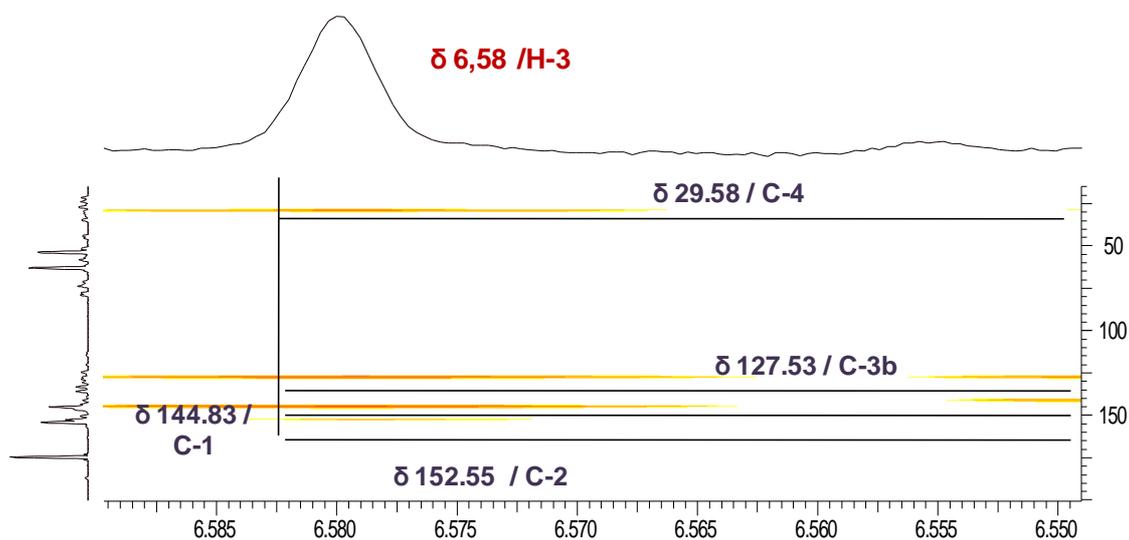


Figura 120: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente ao H-3 da amostra BpF9.

A estrutura do alcaloide de m/z 342 foi confirmada através da comparação dos dados espectroscópicos com os existentes na literatura (Tabela 15). A substância *N*-metillaurotetanina (Figura 121 e 122) é alcaloide aporfínico comumente encontrado em espécies da família Annonaceae, sendo descrita na literatura sua atividade antiagregante plaquetária, antileishmania e anti-poliovirus (GUINAUDEAU et al., 1988; TADIC et al., 1987; BOUSTIE et al., 1998; WU et al., 1998; SILVA, 2010).

Chen e colaboradores (1996) relataram a ação antiagregante plaquetária para o alcaloide *N*-metillaurotetanina, o qual apresentou uma forte inibição de ácido araquidônico (AA) - agregação de plaquetas induzida e também uma forte inibição da agregação de plaquetas induzida pelo colágeno.

Estudos realizados por Correa e colaboradores (2006) retratam a atividade antileishmania para este alcaloide, o qual é capaz de reduzir a produção do parasita *Leishmania mexicana*.

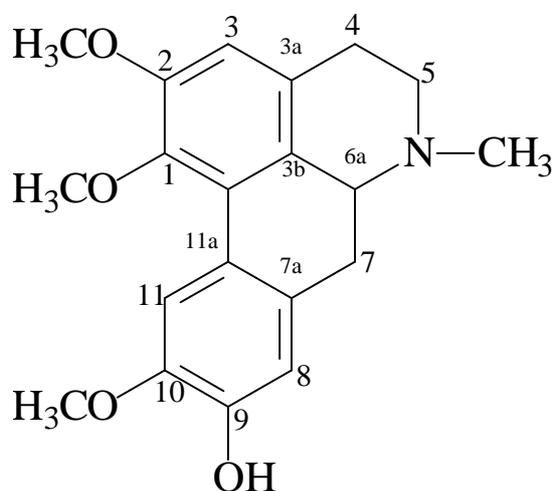


Figura 121: Estrutura do alcaloide *N*-metillaurotetanina.

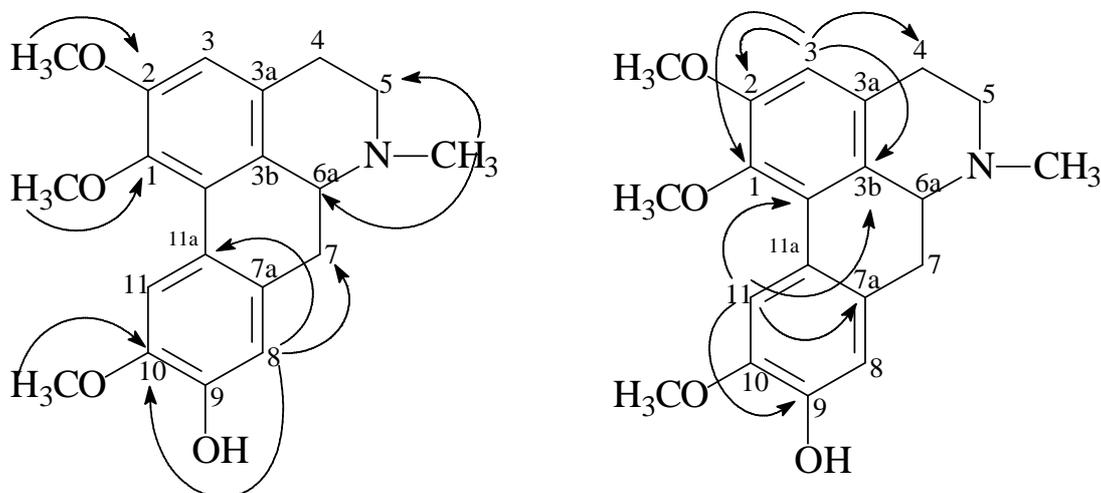


Figura 122: Principais correlações observadas para amostra BpF9.

Tabela 15: Dados RMN de ^1H , gHSQC e gHMBC da amostra BpF9.

BpF9 (N-metillaurotetanina)					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz)^a	^1H δ (mult., J em Hz)^b	gHSQC (^1H-^{13}C)^{a,c}	gHSQC (^1H-^{13}C)^b	gHMBC (^1H-^{13}C)^a
1	–	–	144,83	144,7	–
1a	–	–	146,45	–	–
2	–	–	152,55	152,7	–
3	6,58 (1H, s)	6,58 (1H, s)	110,69	110,4	29,58; 127,53; 144,83 e 152,55
3a	–	–	–	128,2	–
3b	–	–	127,53	127,4	–
4	–	–	29,58	28,1	–
5	–	–	53,76	53,1	–
6	–	–	–	–	–
6a	–	–	63,02	62,5	–
7	–	–	34,62	33,5	–
7a	–	–	130,61	129,4	–
8	6,82	6,81 (1H, s)	114,17	114,2	34,62; 124,55 e 145,70
9	–	–	145,23	145,7	–
10	–	–	145,70	145,3	–
11	8,06 (1H, s)	8,05 (1H, s)	111,57	111,4	127,53; 130,61; 145,23 e 146,45
11a	–	–	124,55	123,9	–
2-OCH ₃	3,88 (3H, s)	3,88 (3H, s)	56,02	55,9	152,55
1-OCH ₃	3,65 (3H, s)	3,65 (3H, s)	60,55	60,3	144,83
9-OCH ₃	3,90 (3H, s)	3,89 (3H, s)	56,06	55,9	145,23
N-CH ₃	2,54 (3H, s)	–	–	42,9	53,76 e 63,02

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Araújo, 2000 (H-300 MHz, CDCl_3 ; C-75 MHz, CDCl_3). ^cDados atribuídos de acordo com os dados da literatura e por comparação com o gHMBC. (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.9.7 Determinação estrutural da amostra BpF4.

A fração codificada como BpF4 (13,0 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. Na análise de massas foi observado um íon intenso de m/z 187 (Figura 123). Ao ser submetido à fragmentação em MS^2 , o mesmo apresentou perda de 17 Da (Figura 124), coerente com a perda de NH_3 característica de alcaloides, assim como fragmentos de m/z par. Suspeitando-se tratar de um alcaloide, o mesmo foi revelado com reagente de Dragendorff, sendo confirmada sua natureza alcaloídica. Com base na massa ímpar observada no espectro de massas, foi possível propor que se tratava de um alcaloide contendo um número par de átomos de nitrogênio (GUTSCHE & HERDERICH, 1998).

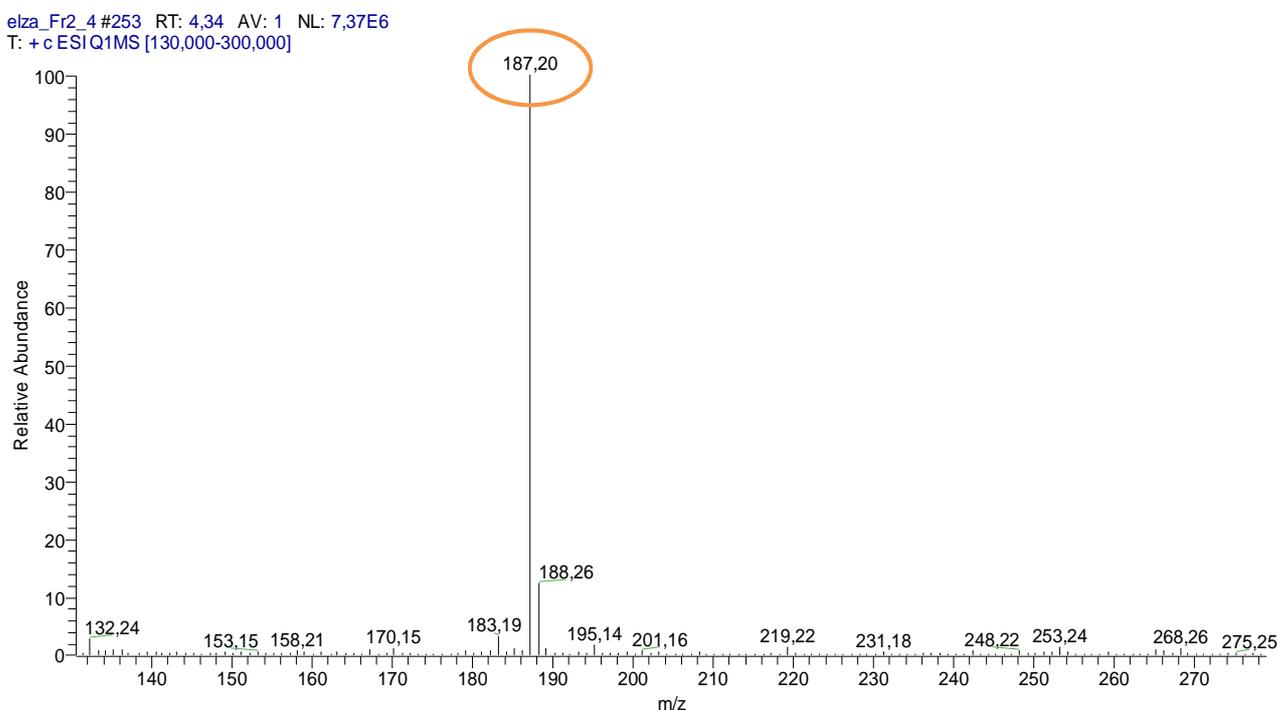


Figura 123: Espectro de massas do íon de m/z 187 presente na fração alcaloídica BpF4 das folhas de *B. pleiosperma*.

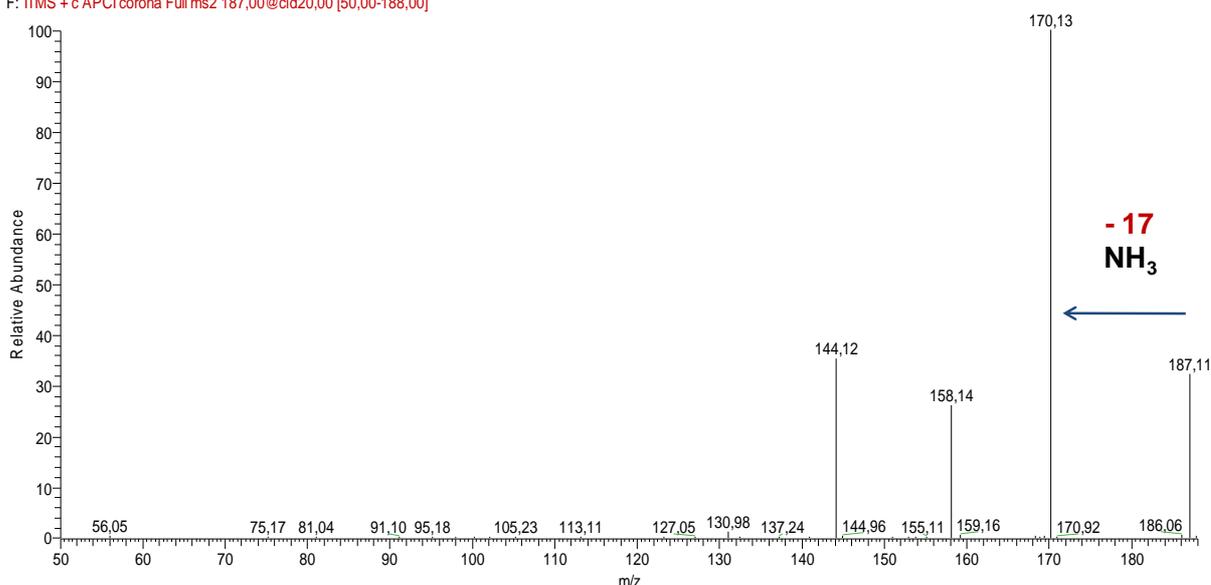


Figura 124: Espectro de massas em MS² do íon de m/z 187 ([M+H]⁺).

No espectro de RMN de ¹H (Figura 125; Tabela 16) são observados na região de aromático os sinais em δ 7,44 (1H, d, 7,8 Hz), δ 7,09 - 7,11 (1H, m), δ 7,15 - 7,18 (1H, m) e δ 7,33 (1H, d, 8,4 Hz), típico de um anel aromático com diss substituições adjacente, além de um singlete largo em δ 8,78 (1H, s). No mapa de contornos HSQC (Figura 126) observa-se que os 4 primeiros hidrogênios estão ligados aos carbonos em δ 119,73, 121,06, 123,63 e 112,54, respectivamente, não sendo observado carbono ligado ao hidrogênio em δ 8,78, sugerindo se tratar de um hidrogênio ligado a heteroátomo, sendo sugerido o nitrogênio, visto existir ao menos dois nitrogênios na estrutura, logo considera-se o tamanho reduzido da molécula.

No mapa de contornos HMBC (Figura 127) foi possível observar as correlações dos hidrogênios presentes no anel aromático, assim como as correlações do hidrogênio do heteroátomo. Estas correlações apontam para uma substituição de um carbono no anel aromático por um grupo N-H.

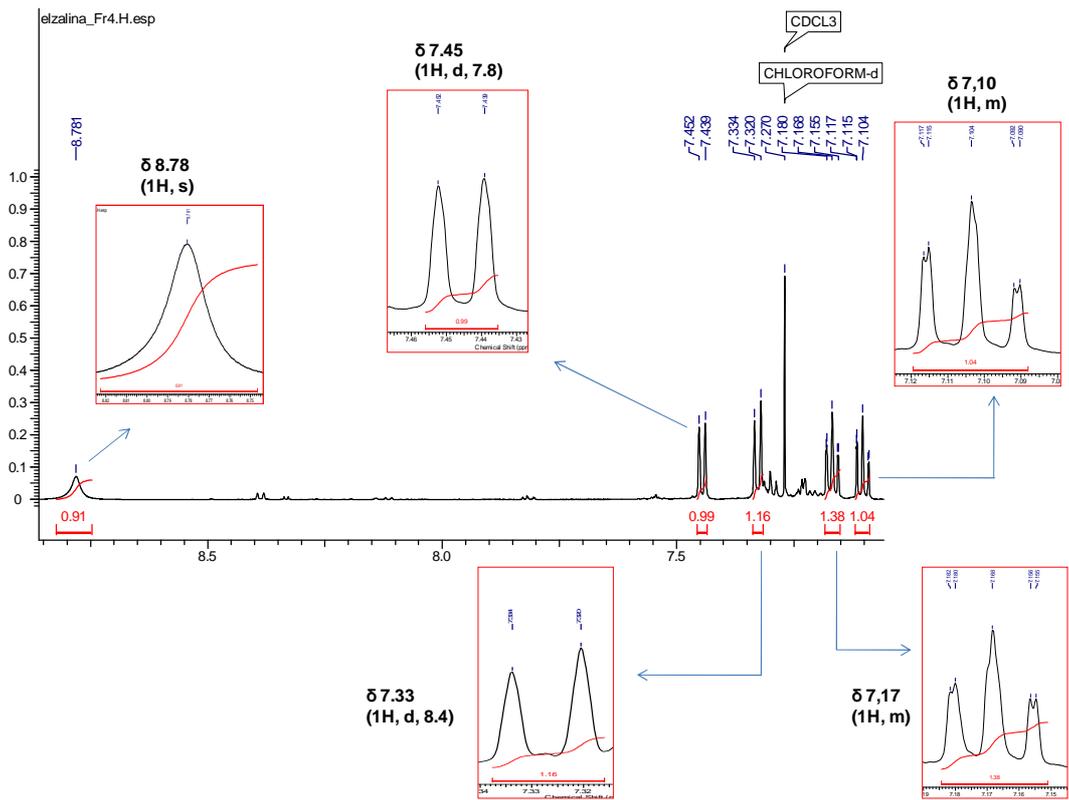


Figura 125: Ampliação do espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CDCl₃) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF₄.

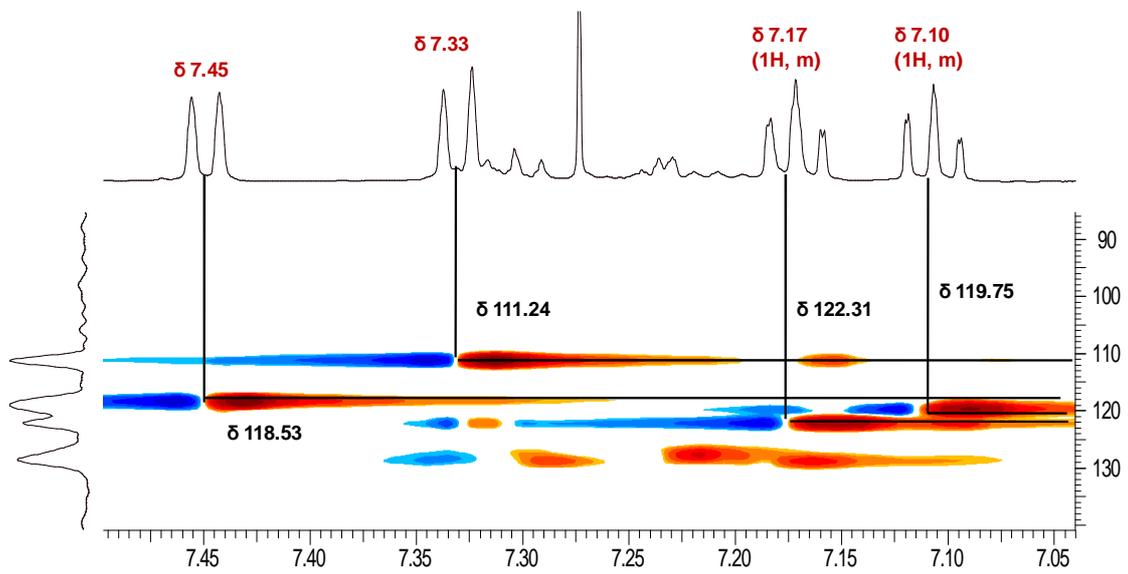


Figura 126: Ampliação do mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl₃) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da amostra BpF₄.

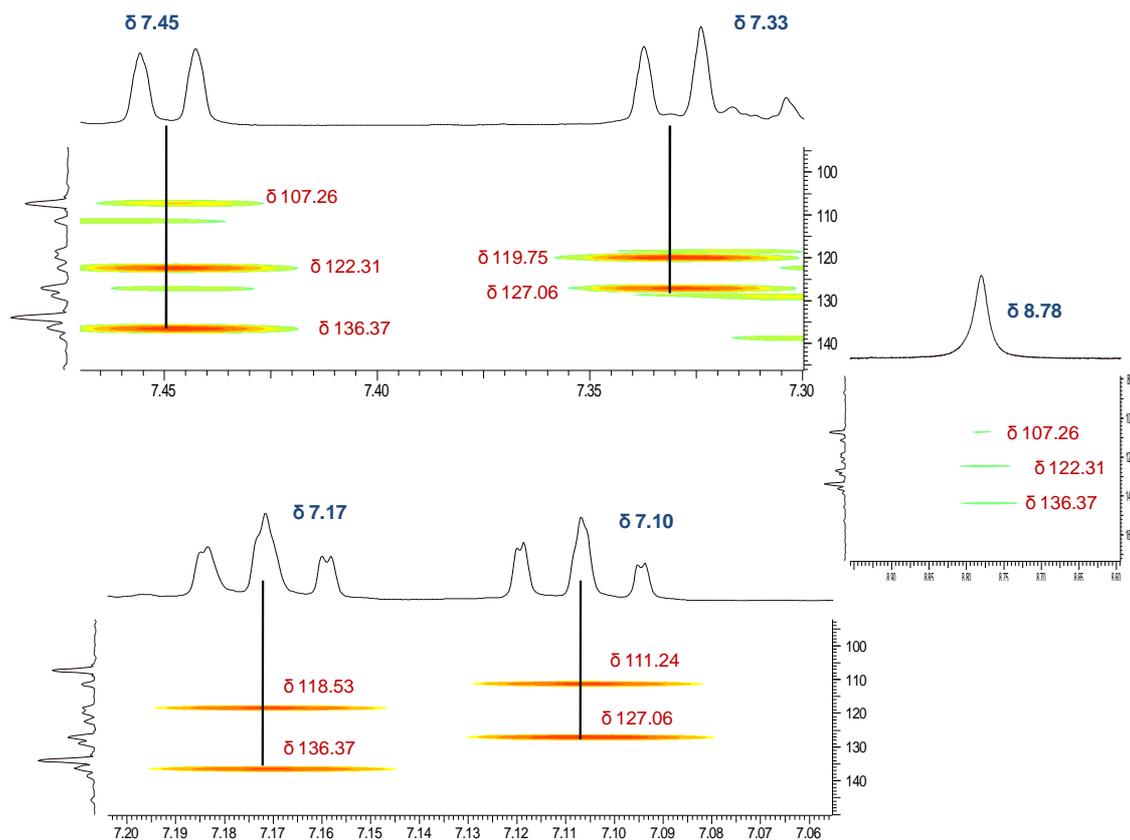


Figura 127: Ampliação do mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl₃) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos e do hidrogênio ligado ao heteroátomo da amostra BpF4.

No espectro de RMN de ¹H (Figura 128 e 129) foi observado um duplete intenso em δ 1,54 (3H, d, 6,6 Hz) e um quarteto em δ 4,37 (1H, q, 6,6 Hz), característico de hidrogênios de grupo metila ligado a carbono metínico. No mapa de contornos HMBC observam-se as correlações dos hidrogênios metílicos com os carbonos em δ 49,34 (observado no mapa de contornos HSQC como carbono metínico) e δ 135,13 além das correlações do hidrogênio metínico com os carbonos em δ 20,65, 42,11, 108,48 e 135,13. O deslocamento em δ 20,65 aponta para a presença de hidrogênios metilênicos, enquanto o carbono em δ 42,11 está de acordo com sinal decarbono adjacente a nitrogênio. A correlação observada para ambos os hidrogênios do sistema descrito acima com o carbono em δ 135,11, além da correlação do hidrogênio em δ 8,78 (1H, s) com este mesmo carbono, permitiu propor a estrutura da molécula (Figura 130 e 131).

Os sinais dos hidrogênios metilênicos, assim como demais correlações são descritas na tabela 16, além do espectro total de RMN de ^1H e mapas de contornos HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 151, 152 e 153). A comparação dos dados espectroscópicos com aqueles existentes na literatura permitiram confirmar a amostra BpF4 como sendo o alcaloide tetrahydroharmano (Figura 130 e 131) (BADGER & BEECHAN, 1951; FERNANDES, 2005; SONG et al., 2014).

O alcaloide tetrahydroharmano (1-Metil-2,3,4,9-tetrahydro-1H- β -carbolina; Figura 130 e 131), também conhecido como elaeagnina (IDOWU et al., 2006) é descrito pela primeira vez na família Annonaceae, sendo aparentemente inédito também na ordem Magnoliales (ANCOLIO et al., 2002; TOLKACHEV et al., 2008). Na literatura existem diversas atividades descritas para esta substância, o que inclui atividade antimalárica, antiviral e fungicida (FERNANDES, 2005; SONG et al., 2014).

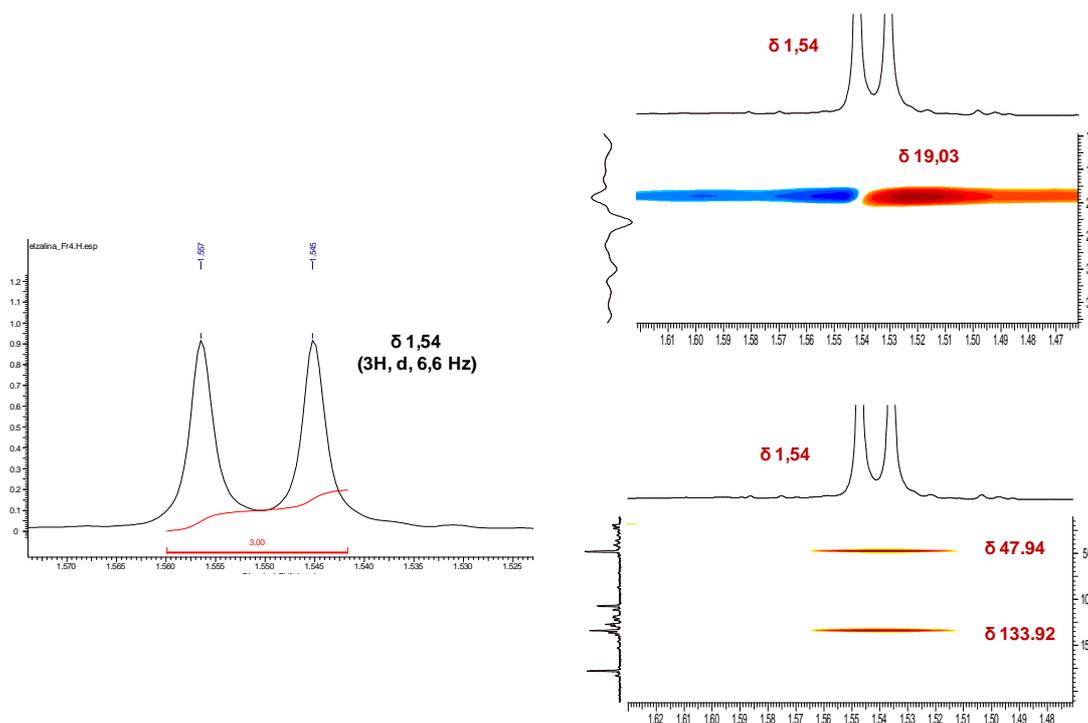


Figura 128: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HSQC, HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênio metílicos amostra BpF4.

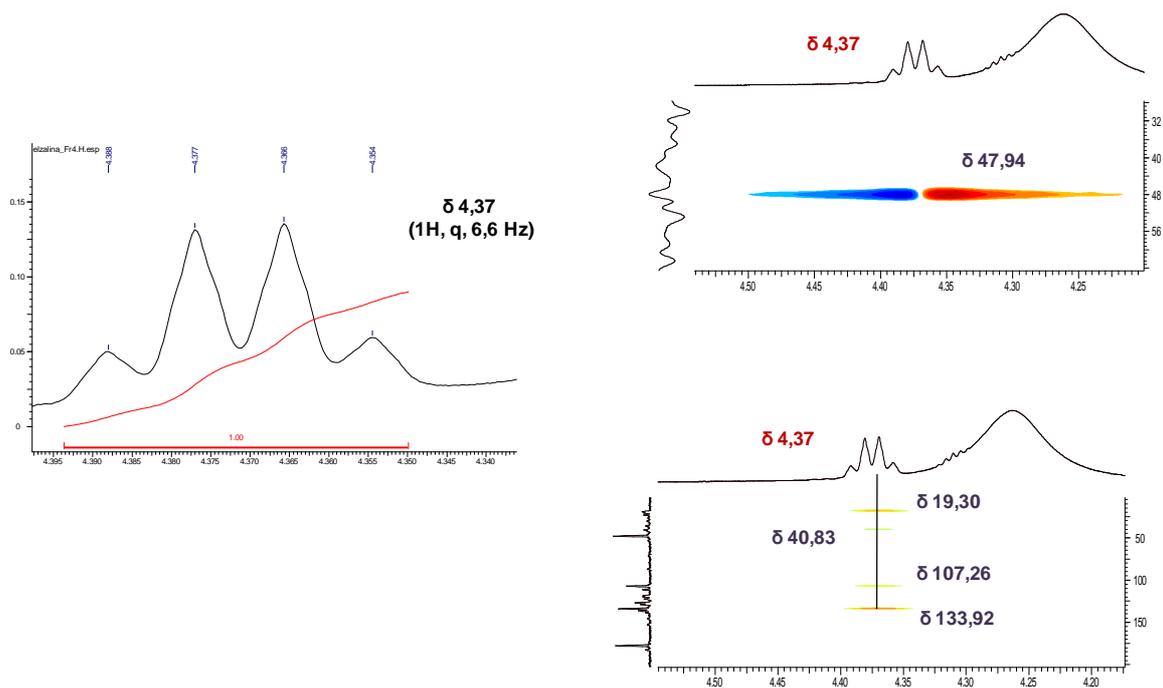


Figura 129: Ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapa de contornos HSQC, HMBC (600 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênio metílico amostra BpF4.

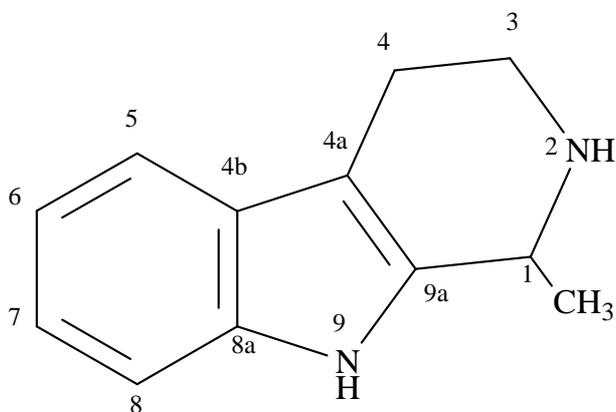


Figura 130: Estrutura do alcaloide tetrahidroharmano.

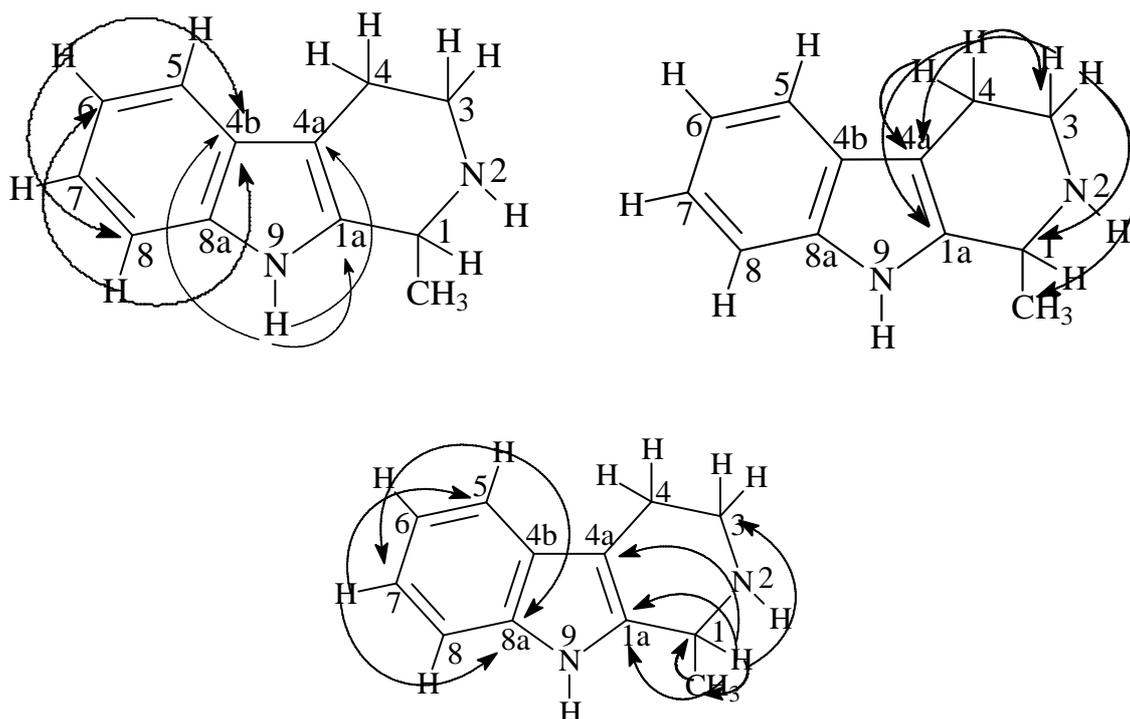


Figura 131: Principais correlações observados para a amostra BpF4.

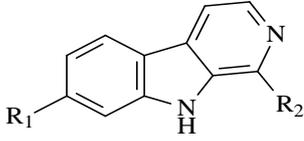
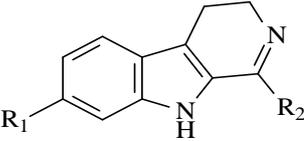
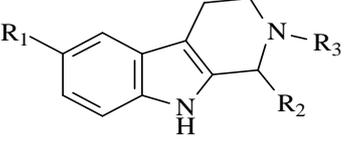
Tabela 16: Dados de RMN de ^1H , gHSQC e gHMBC da amostra BpF4.

BpF4 (Tetrahydroharmano)				
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	gHSQC ^a	gHMBC ^a
1	4,37 (1H, q, 6,6)	3,99-4,04 (1H, m)	49,34	20,65; 42,11; 108,48 e 135,13
2	–	–	–	–
3 _{Pseudoax}	3,15 (1H, ddd 12,9, 7,5 e 5,6)	2,81-2,87 (1H, m)	42,11	20,65; 49,34 e 108,48
3 _{Pseudoeq}	3,39 (1H, dt, 12,8 e 5,4)	3,14-3,19 (1H, m)	42,11	20,65; 49,34 e 108,48
4 _{Pseudoax}	2,81-2,86 (2H, m)	2,51-2,62 (2H, m)	38,50	42,11; 108,48 e 135,13
4 _{Pseudoeq}	–	–	38,50	–
4 ^a	–	–	108,48	–
4 ^b	–	–	137,67	–
5	7,33 (1H, d, 8,4)	7,27 (1H, d, 8,0)	112,54	121,06 e 128,21
6	7,15-7,18 (1H, m)	6,98-7,02 (1H, m)	123,63	119,73 e 137,67
7	7,09-7,11 (1H, m)	6,91-6,95 (1H, m)	121,06	112,54 e 128,21
8	7,44 (1H, d, 7,8)	7,35 (1H, d, 8,0)	119,73	123,63 e 137,67
8 ^a	–	–	128,21	–
9-NH	8,78 (1H, s)	10,68 (1H, s)	–	–
9a	–	–	135,13	–
1-CH ₃	1,55 (3H, d, 6,6)	1,36 (3H, d, 6,8)	20,65	49,34 e 135,13

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Song et. al., 2014 (400, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

Os alcaloides β -carbolínicos pertencem ao grupo de alcaloides indólicos, os quais apresentam um núcleo indólico, acoplado a um anel piridínico, cujo grau de saturação leva a três grupos de compostos (Tabela 17): os totalmente aromáticos, as dihidro- β -carbolinas (harmalano) e os tetrahidro- β -carbolinas que possuem um anel piridínico saturado (DEWICK, 2009).

Tabela 17: Classificação dos alcaloides β -carbolínicos.

	R ₁	R ₂	R ₃	Substâncias
Sistema β-carbolina 	H H OH OCH ₃	H CH ₃ CH ₃ CH ₃		Norharmano harmano harmol harmina
Sistema dihidro-β-carbolina 	OH OCH ₃	CH ₃ CH ₃		harmalol harmalina
Sistema tetrahidro-β-carbolina 	H H OCH ₃ H	H H H CH ₃	H CH ₃ H	1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina 2-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina 6-metoxi-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina 1-metil-1,2,3,4-tetrahidro- β -carbolina

Nas plantas, os alcaloides com esqueleto β -carbolinas são derivados do aminoácido triptofano (Figura 132). São formados a partir da reação que envolve a triptamina, um produto da descarboxilação do triptofano, com um aldeído ou um α -cetoácido, levando a formação de uma imina, seguida da formação de um novo anel heterocíclico de seis membros. A posição 2 do sistema indólico é nucleofílica, logo pode participar de uma reação tipo Mannich/Pictet-Spengler, atacando a imina gerada a partir de triptamina e de um aldeído (ou ceto-ácido).

A aromaticidade é restaurada por subsequente perda do próton em C-2 (DEWICK, 2009).

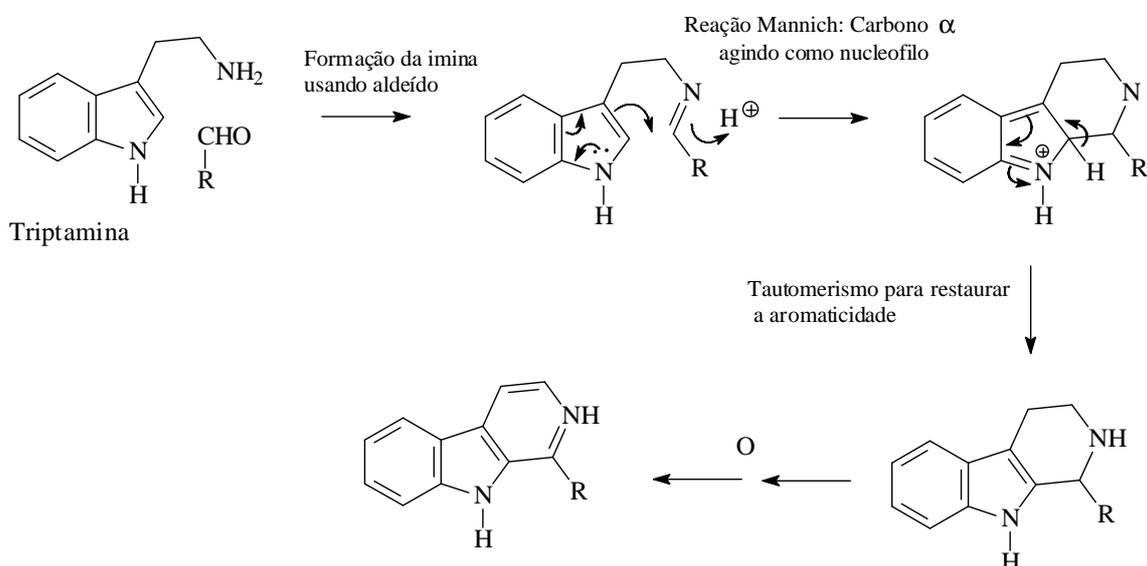


Figura 132: Rota biossintética dos alcalóides β -carbolínicos.

O Isolamento deste tipo de alcaloide como principal constituinte de espécie pertencendo a família Annonaceae, conhecida por produzir principalmente alcalóides derivados isoquinolínicos merece destaque, tendo em vista sua ampla ocorrência e potencialidade farmacológica, como evidenciado a seguir.

Estudos mostram uma distribuição diversificada desse tipo de alcaloide principalmente em plantas das famílias Zygophyllaceae, Malpighiaceae, Passifloraceae, Leguminosae, Myristicaceae e Eleganceae (ANCOLIO et al., 2002; TOLKACHEV et al., 2008; IDOWU et al., 2006). As cascas e folhas da espécie *Banisteriopsis caapi* (Malpighiaceae), são utilizadas junto com as folhas da espécie *Psycotria viridis* para a preparação de uma bebida conhecida como ayahuasca, que após fervura resultam em um potente alucinógeno (NARANJO, 1979; GROB et al., 1996; GRELLA et al., 1998).

Em estudos fitoquímicos realizados por Tolkachev e colaboradores (2008) com as cascas das espécies *Hippophäe rhamnoides* L., *Elaeagnus angustifolia* L., *E. orientalis* L., *E. umbellata* Thunb., *E. multiflora* Thunb. e *E. argentea* Pursh, evidenciaram a presença do composto tetrahydroharmano em todas as espécies, ressaltando a importância desses compostos para a indústria farmacêutica. Outro estudo fitoquímico com a espécie *Croton moritibensis* (Euphorbiaceae) relata o isolamento dos alcaloides β -carbolina harmano e o tetrahydroharmano como constituintes majoritários, comprovados por dados de RMN 1D e 2D (ARAÚJO-JÚNIOR et al., 2004).

Herraiz & Galisteo (2003) ressaltam que alguns alcalóides tetrahydro- β -carbolinas são encontrados naturalmente em algumas frutas e seus respectivos sucos, como tomate, laranjas, maçã, banana, onde atuam como antioxidantes. Nos ensaios de ABTS realizados o mesmo apresentou resultado satisfatório quando comparado com o ácido ascórbico, sugerindo que os alcaloides de tetra- β -carbolina podem atuar como antioxidantes quando absorvido e acumulado no organismo.

Algumas atividades biológicas já foram atribuídas aos alcaloides β -carbolínicos. Estudos realizados com as raízes de *Guiera senegalensis* (Combretaceae) e as folhas de *Feretia apodanthera* (Rubiaceae), evidenciaram a existência de dois alcaloides β -carbolínicos, o harmano e tetrahydroharmano, e tanto os dois alcaloide isolados como o extrato metanólico dessas espécies apresentaram atividade antimalárica (ANCOLIO et al., 2002).

Outro tipo de atividade foi ressaltada em um trabalho de Badger & Beecham (1951), no qual o alcaloide tetrahydroharmano foi isolado de

Petalostyles labicheoides (Leguminosae) e apresentou atividade antimicrobiana elevada, quando comparada com o antibiótico controle.

Estudo realizado com os cotilédones das sementes de *Chrysophyllum albidum* (Sapotaceae), mostram o potencial de testes realizados *in vivo* com o alcaloide tetrahydroharmano, o qual exibiu resultados satisfatório para os testes antinociceptivo e anti-inflamatório, porém uma propriedade antioxidante baixa, mostrando que esse composto é o responsável pelo uso etnobotânico nesta espécie (IDOWU et al., 2006).

Em um trabalho com *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae) é ressaltado que suas folhas são usadas em distúrbios gastrointestinais, infecções respiratórias, reumatismo, antimicrobiano e antimalarial. Através de estudos fitoquímicos para essa espécie foi possível o isolamento do tetrahydroharmano e a realização de testes antiplasmódico e antitumoral, mostraram uma atividade significativa, associada a uma baixa citotoxicidade (FIOT et al., 2006).

Um estudo *in vivo* realizado com 15 alcaloides β -carbolínicos sintéticos por Grella e colaboradores (1998), dentre eles o tetrahydroharmano, mostra que todos apresentaram atividade alucinógena, porém o alcaloide harmalina se destacou, servindo como uma droga de treinamento em 3,0 mg/kg, havendo uma semelhança entre os efeitos de estímulos produzidos pela harmalina e o fármaco comercializado 2,5-dimetoxi-4-metilamfetamina (DOM, STP), um derivado da amfetamina.

Adicionalmente, o alcaloides β -carbolínicos sintéticos relatados na literatura, confirmam as características antileishmania, antimalárica e antitumoral para este tipo de substância (FERNANDES, 2005; GELLIS et al., 2012; SONG et al., 2014).

6. CONCLUSÕES

Os resultados descritos neste trabalho permitem chegar às seguintes conclusões:

O estudo dos óleos essenciais evidenciou a presença de compostos já descritos na literatura para a espécie *Bocageopsis multiflora* e para espécies do gênero *Unonopsis*, sendo este último considerado taxonomicamente próximo ao gênero estudado.

A identificação de 51 substâncias nos óleos essenciais contribui para o conhecimento fitoquímico do gênero *Bocageopsis*, sendo a observação do β -bisaboleno como composto majoritário uma informação extremamente importante, desde que recentes atividades biológicas foram atribuídas a óleos ricos nesta substância, o que inclui atividade antimalárica.

Apesar da fraca ou não existente atividade antimicrobiana dos óleos essenciais, os resultados observados aumentam o conhecimento biológico sobre os óleos essenciais obtidos a partir do gênero *Bocageopsis*, uma vez que esta é a primeira avaliação da atividade antimicrobiana realizada no gênero.

As análises em ESI-IT-MSⁿ das frações alcalóidicas em escala analítica auxiliaram o reconhecimento da fração alcalóidica das folhas como promissora para o fornecimento de substâncias ainda não descritas no gênero *Bocageopsis*.

O fracionamento cromatográfico da fração alcalóidica das folhas de *B. pleiosperma* Maas resultou no isolamento/cacterização de dez alcaloides (dentre substâncias puras e em mistrura), sendo 6 aporfínicos (nornuciferina, anonaina, laurotetanina, *N*-metillaurotetanina, isoboldina e assimilobina), 1 oxoaporfínico (liriodenina), 1 proaporfínico (estefarina), 1 benziltetraisoquinolínico (reticulina) e 1 β -carbolínico (tetrahydroharmano).

Todos os alcaloides são descritos pela primeira vez no gênero *Bocageopsis*, sendo o alcaloide tetrahydroharmano descrito pela primeira vez na ordem Magnoliales.

Esses dados corroboram com o estudo fitoquímico e biológico do gênero *Bocageopsis*, tornando promissora a continuidade do estudo da espécie *Bocageopsis pleiosperma* Maas, bem como as demais espécies desse gênero.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R.P. Review of Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. American Society for Mass, v.1, p. 803-804, 2007.

AGARWAL, A. K. T.; JACOB, M. R.; FENG, Q.; LORENZ, M. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Role of Heme in the antifungal activity of the azaoxoporphine alkaloids sampangine. Eukaryotic Cell, v.7, p. 387-400, 2008.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. Journal of Natural Products, v.62, p. 504-540, 1999.

ALMEIDA, J. R. G. S.; LÚCIO, A. S. S. C.; BARBOSA FILHO, M.; ANGRA, M. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; UCHOA, D. E. A.; BRAZ FILHO, R. Alkaloids and a new cinnamate derivative from *Duguetia gardneriana*. Biochemical Systematics and Ecology, v.35, p. 456-458, 2007.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NOUSHIN, A.; WIAR, C.. Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. Journal of Asian Natural Products Research, v. 13, p. 465-476, 2011.

ANCOLIO, C.; AZAS, N.; MAHIOU, V.; OLLIVIER, E.; DI GIORGIO, C.; KEITA, A.; TIMON-DAVID, P.; BALANSARD, G. Antimalarial Activity of Extracts and Alkaloids Isolated from Six Plants Used in Traditional Medicine in Mali and Sao Tome. Phytotherapy Research, v.16, p. 646-649, 2002.

ANISZEWSKI, T. Alkaloids - Secrets of life (Alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological role). Elsevier's Science & Technology Rights Department in Oxford, 5 ed., p. 61-139, 2007.

ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana "in vitro" e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, p. 517-524, 2006.

ARAÚJO, A. J. Estudo fitoquímico das folhas de *Ocotea puberula* (Reich.) Nees (Lauraceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, 2000.

ARAÚJO-JÚNIOR, V. T.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; AGRA, M. F.; SILVA-FILHO, R. N.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and Diterpenes from *Croton moritibensis*. Pharmaceutical Biology, v. 42, p. 62-67, 2004.

ASSIS, C. M.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M.; CAMPOS, I. P. A.; Suffredini, I. B. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcaloides

majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.19, p. 626–631, 2009.

BADGER, G. M.; BEECHAM, A. F. Isolation of tetrahydroharman from *Petalostyles labicheoides*. Nature, v. 168, p. 517-518, 1951.

BARMAN, K. L.; JHA, D. K. Comparative chemical constituents and antimicrobial activity of normal and organic ginger oils (*Zingiber officinale roscoe*). International Journal of Applied Biology and Pharmaceutical Technology, v.4, p. 259–266, 2013.

BELE, M. Y.; FOCHO, D. A.; EGBE, E. A.; CHUYONG, B. G. Ethnobotanical survey of the uses of Annonaceae around mount Cameroon. African Journal of Plant Science, v. 5, p. 237-247, 2011.

BENINI, C.; MAHY, G.; BIZOUX, J.P.; WATHELETC, J.P.; JARDINA, P.; BROSTAUD, Y.; FAUCONNIERA, M.L. Comparative Chemical and Molecular Variability of *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson forma genuina (Ylang-Ylang) in the Western Indian Ocean Islands: Implication for Valorization. Chemistry & Biodiversity, v.9, p. 1389-402. 2012.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.;ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, E. E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. Natural Product Reports, v.22, p. 269-303, 2005.

BEVILACQUA, H. E. C. DE R. História das Plantas Mediciniais. In: Haraguchi, L. M. M.; Carvalho, O. B. DE (eds.). Plantas Mediciniais. São Paulo, p. 34-36, 2010.

BREMER, B.; BREMER, K.; CHASE, M.; FAY, MICHAEL F.; REVEAL, JAMES L.; SOLTIS, DOUGLAS E.; SOLTIS, PAMELA S. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. Botanical Journal of the Linnean Society, v. 161, p. 105–121, 2009

BOUSTIE, J.; STIGLIANI, J-L.; MONTANHA, J.; AMOROS, M.; PAYARD, M.; GIRRE, L.; Antipoliavirus Structure - Activity Relationships of Some Aporphine Alkaloids, Journal Natural Products. v.61, p. 480-484, 1998.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.;GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. Phytochemistry, v.64, p. 1269-1275, 2003.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; KEMGNE, A. M.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; Antiplasmodial volatile extracts from *Cleistopholis patens* Engler & Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. Parasitol Research, v.108, p. 1211–1217, 2011.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiol*, v.3, p. 223-253, 2004.

CAMPOS, F. R.; BATISTA, R. L.; BATISTA, C. L.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; SANTOS, A. G.; PINHEIRO, M. L. B. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.36, p. 804–806, 2008.

CAVÉ, A. Annonaceae Alkaloids. In: PHILLIPSON, J.D.; ROBERTS, M.F.; ZENK, M.H. *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. Berlin, New York: Springer-Verlag, p. 79-101, 1985.

CHANG, H. C.; Chang, F. R.; Wu, Y. C.; Lai, Y. H. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. *Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, v.20, p. 365-371, 2004.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. In: *Annonaceae (Soursop Family): Smith N. et al. (eds.). Flowering Plants of the Geotropism*. New York Botanical Garden, New York, p. 18-20, 2004.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.169, p. 5–40, 2012a.

CHATROU, L. W.; ERKENS, R. H. J.; RICHARDSON, J. E.; SAUNDERS, R. M. K.; FAY, M. F. The natural history of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.169, p. 1-4, 2012b.

CHEN, A. Y.; MACLEAN, D. B. Mass spectra and proton magnetic resonance spectra of some tetrahydroprotoberberine alkaloids. *Canadian Journal of Chemistry*, v.46, p. 2501, 1968.

CHEN, K. S.; KO, F. N.; TENG, C. M.; WU, Y. C. Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids. *Planta Medica*, v.62, p. 133, 1996.

CHEN, C. Y.; WU, Y. C. Annocherine C, a new C- α -hydroxy benzylisoquinoline and other constituents from the leaves of *Annona cherimola*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, vol.48, p. 1203-1206, 2001.

CHEN, C. Y.; WU, H. M.; CHAO, W. Y.; LEE, C. H. Review on pharmacological activities of liriodenine. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.7, p. 1067-1070, 2013.

CONSOLACION, Y. R.; GENEVEVE, S.; OSCAR B. T.; MING-JAW, D.; SHEN CHIEN-CHANG. Acetogenins from *Annona muricata*. *Pharmacognosy Journal*, v. 4, p.32-37, 2012.

CORREA, J. E.; RIOS, C. H.; CASTILLO, A.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A.; HELLER, M. V.; GERWICK, W. H.; RIOS, L. C. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. *Planta Medica*, v.72, p. 270, 2006.

CORRECHÉ, E. R.; ANDUJARA, S. A.; KURDELASC, R. R.; LECHÓND, M. J. G.; MÓNICA L. FREILEC, M. L.; ENRIZ, R. D. Antioxidant and cytotoxic activities of canadine: Biological effects and structural aspects. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v.16, p. 3641–3651, 2008.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L.L. P. J. A Pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products*, v.69, p. 292-294, 2006.

COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; TRIGO, J. R.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the *Amazon Guatteriopsis* species. *Phytochemistry*, v.69, p. 1895-1899, 2008.

COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriopsis blepharophylla*, *Guatteriopsis friesiana* e *Guatteriopsis hispida* (Annonaceae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, 2009a.

COSTA, A. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. e *Cinnamomum zeylanicum* B. contra bactérias multirresistentes. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba-UFPB. João Pessoa, Brasil, 2009b.

COSTA, E. M. M. B.; BARBOSA, A. S. B.; ARRUDA, T. A.; PATRÍCIA TEIXEIRA DE OLIVEIRA, P. T. O.; DAMETTO, F. R.; CARVALHO, R. A. C.; MELO, M. D. Estudo *in vitro* da ação antimicrobiana de extratos de plantas contra *Enterococcus faecalis*. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, v. 46, p. 175-180, 2010a.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SALVADOR, M. J.; MAIA, B. H. L. N. S.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N. Alkaloids from the Bark of *Guatteria hispida* and their Evaluation as Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Natural Products*, v. 73, p. 1180–1183, 2010b.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; BRAGA, R. M.; DELARMELINA, C.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical Constituents Isolated from the Bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their Antiproliferative and Antimicrobial Activities. *Journal Brazilian Chemical Society*, v. 22, p. 1111-1117, 2011a.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids

from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). *Molecules*, v. 16, p. 9714- 9720, 2011b.

COSTA, E. V.; CRUZ, P. E. O.; PINHEIRO, M. L. B.; FRANCISCO A. MARQUES, F. A.; ANA LÚCIA T. G. RUIZ, A. L. T. G.; MARCHETTI, G. M.; CARVALHO, J. E.; BARISON, A.; MAIA, B. H. L. N. S. Aporphine and tetrahydroprotoberberine alkaloids from the leaves of *Guatteria friesiana* (Annonaceae) and their cytotoxic activities. *Journal Brazilian of Chemical. Society*, v.24, p. 788-796, 2013a.

COSTA, E. V.; OLIVEIRA DA CRUZ, P. E.; CARAMANO DE LOURENCO, C.; MORAES, V. R. DE S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmanni* A. DC. (Annonaceae). *Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters*, v.27, p. 1002-6, 2013b.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; NEPEL, A.; BARISON, A.; Isoquinoline alkaloids from the leaves of *Xylopiia laevigata* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.51, p. 331-334, 2013c.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products : A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

DA CRUZ, P. E. O.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; VENDRAMIN, M. E.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G.; PRATA, A. P. N. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.39, p. 872–875, 2011.

DA SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A. B.; Da FONSECA, G. A. B. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*, v.19, p. 689-694, 2005.

DAI, X.; HU, R.; SUN, C.; PAN, .; Comprehensive separation and analysis of alkaloids from *Stephania yunnanensis* by counter-current chromatography coupled with liquid chromatography tandem mass spectrometry analysis. *Journal of Chromatography A*, v.1226, 18-23, 2012.

DERBRÉ, S.; GIL, S.; TAVERNA, M.; BOURSIER, C.; NICOLAS, V.; DEMEY-THOMAS, E.; VINH, E.; SUSIN, S. A.; HOCQUEMILLER, R.; POUPON, E. Highly cytotoxic and neurotoxic acetogenins of the Annonaceae: New putative biological targets of squamocin detected by activity-based protein profiling. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.18, p. 5741–5744, 2008.

DEWICK, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach*. Wiley & Sons, número da pagina, v.3, p. 187-192, 2009.

DIAS, P. C. M. S. *Utilização de produtos naturais em aromaterapia*. Dissertação de Mestrado, Bragança – Portugal, 2013.

DIRZO, R.; RAVEN, P. H. Global state of biodiversity and loss. *Annual Review of Environment and Resources*, v.28, p. 137-167, 2003.

DOOL, H.; KRATZ P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *Journal of Chromatography*, v.11, p. 463-471, 1963.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Medicinais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. Multiciência: construindo a história de Produtos Naturais. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, São Paulo, 2006.

DUTRA, L. M.; COSTA, E. V.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; VENDRAMIN, M. E.; BARISON, A.; PRATA, A. P. N. Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.41, p. 115–118, 2012.

EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. *Chemical Systematics and Ecology*, v.46, p. 145–151, 2013.

FARNSWORTH, N. R.; BLOMSTER, R. N.; QUIMBY, M. W.; SCHERMERHORN, J. W. The Lynn Index, Monograph, v.8, p. 60, 1974.

FECHINE, I. M.; LIMA, M. A.; NAVARRO, V. R.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcaloides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.12, p.17-19, 2002.

FELFILI, J. M. Estudos de vegetação para subsidiar a criação das Reservas Extrativistas Barra do Pacuí e Buritizeiro – MG. Brasília: MMA, p.109, 2010.

FERNANDES, S. A.; Técnicas de RMN de H Aplicadas a Complexos Supramoleculares de Calixarenos Quirais Envolvendo Reconhecimento Quiral e Reduções Assimétricas, Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP-SP, 2005.

FERRAZ, R. P. C.; CARDOSO, G. M. B.; SILVA, T. B.; FONTES, J. E. N.; PRATA, A. P. N.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). *Food Chemistry*, v.141, p. 196–200, 2013.

FIOT, J.; SANON, S.; AZAS, N.; MAHIOU, V.; JANSEN, O.; ANGENOT, L.; BALANSARD, G.; OLLIVIER, E. Phytochemical and pharmacological study of roots and leaves of *Guiera senegalensis* J.F. Gmel (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, v.106, p. 173–178, 2006.

FISCHER, D. C. H.; KATO, E. T. M.; ALVARENGA, M. A.; GONÇALVES, I. M. Constituents from *Siparuma apiosyce*. *Fitoterapia*, v.70, p. 322-323, 1999.

FLORÃO, A. Avaliação das atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná - UFPR, Curitiba, 2006.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; CHARLES, B.; FOURNIAT, J.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Essential oils of Annonaceae 4. Chemical and biological studies of *Xylopia aromatica* stem bark and leaf oils. *Planta Medica*, v.60, p. 4-283, 1994.

GELLIS, A.; DUMÈTRE, A.; LANZADA, G.; HUTTER, S.; OLLIVER, E.; VANELLE, P.; AZAS, N. Preparation and antiprotozoal evaluation of promising β -carboline alkaloids. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.66, p. 339–347, 2012.

GHOLIVAND, A. M. B.; NASRABADI, M. R.; BATOOLI, H.; EBRAHIMABADI, A. H. Chemical composition and antioxidant activities of the essential oil and methanol extracts of *Psammogeton canescens*. *Food and Chemical Toxicology*, v.48, p. 24-28, 2010.

GRELLA, B.; DUKAT, M.; YOUNG, R.; TEITLER, M.; HERRICK-DAVIS, K.; GAUTHIER, C. B.; GLENNON, R. A. Investigation of hallucinogenic and related β -carbolines. *Drug and Alcohol Dependence*, v.50, p. 99-107, 1998.

GROB, C. S.; MCKENNA, D.J.; CALLAWAY, J.C.; BRITO, G.S.; NEVES, E.S.; OBERLAENDER, G.; SAIDE, O.L.; LABIGALINI, E.; TACLA, C.; MIRANDA, C.T.; STRASSMAN, R.J.; BOONE, K.B. Human psychopharmacology of hoasca, a plant hallucinogen used in ritual context in Brazil. *Journal of Nervous Mental Disease*. V.184, p. 86–94, 1996.

GRYCOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; MAREK, R. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, v.68, p. 150-175, 2007.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*, v. 33, p. 677-679, 2010.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid Alkaloids, III. *Journal of Natural Products*, v. 46, p. 761-835, 1983.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. IV *Journal of Natural Products*, v. 51, p. 389-474, 1988.

GUINAUDEAU, H. Aporphinoid Alkaloids, V. *Journal of Natural Products*, v. 57, p. 1033-1135, 1994.

GUSTAFSON, J. E.; LIEW, Y. C.; CHEW, S.; MARKHAM, J.; BELL, H. C.; WYLLIE, S. G.; WARMINGTON, J. R. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Lett Appl Microbiol*, v.26, p. 194-198, 1998.

GUTSCHE, B.; HERDERICH, M. HPLC-MS/MS identification of tryptophan-derived tetrahydro- β -carboline derivatives in food. *Fresenius Journal Anal Chemical*, v. 360, p. 836–839, 1998.

HASRAT, J.A.; PIETERS, L.; DE BACKER, J.P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT_{1A} ligands:

Bioactiveisoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*. *Phytomedicine*, v. 4, p. 133-140, 1997.

HERRAIZ, T.; GALISTEO, J. Tetrahydro- β -carboline Alkaloids Occur in Fruits and Fruit Juices. Activity as Antioxidants and Radical Scavengers. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.51, p.7156–7161, 2003.

HOANG ANH, N. T.; SUNG, T. V.; ARNOLD, N.; WESSJOHANN, L.; Chemical constituents of *Zizyphus sativa* Gaertn fruits. *Journal of Chemistry*, v.45(2), p. 237–240 , 2007.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; CAVÉ, A. Alcaloides dês Annonacees XXXVII: Alcaloides du *Guatteria scandens*. *Journal of Natural Products*, v.46, p. 335-341, 1983.

HOSTETTAMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios Ativos de Plantas Superiores. São Carlos: Ed. UFSCar, 2003.

IBRAHIM, H.; AZIZ, A. N.; SYAMSIR, D. R.; ALI, N. A. M.; MOHTAR, M.; ALI, R. M.; AWANG, K. Essential oils of *Alpinia conchigera* Griff. and their antimicrobial activities. *Food Chemistry*, v.113, p. 575–577, 2009.

ICHIMARU, M.; MORIYASU, M.; NISHIYAMA, Y.; KATO, A.; JUMA, F.D.; NGANGA, J.N.; OGETO, J.O. Studies on African medicinal plants. Alkaloidal constituents of *Uvaria acuminata* and *U. lucida*. *Nature Medicine*, v.51, p. 272-274, 1997.

IDOWU, T.O.; IWALEWA, E. O.; ADEROGBA, M. A.; AKINPELU, B. A. Antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant activities of eleagnine: An alkaloid isolated from *Chrysophyllum albidum* Seed Cotyledons. *Journal of biological Sciences*, v6, p. 1029-1034, 2006.

ISMAN, M.B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, v.51, p. 45-46, 2006.

IWASA, K.; TAKAHASHI, T.; NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; SUGIURA, M.; TAKEUCHI, A.; TODE, C.; TOKUDA, H.; TAKEDA, K. Online Structural Elucidation of Alkaloids and other Constituents in Crude Extracts and Cultured Cells of *Nandina domestica* by Combination of LC-MS/MS, LC-NMR, and LC-CD Analyses. *Journal of Natural Products*, v.71, p. 1376-1385, 2008.

KESSLER, P. J. A. Annonaceae. In: K.Kubitzki., J. C. Rohwer & V. Bittrich (eds.) *The families and genera of vascular plants II: Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families*. Springer-Verlag, Berlin, p. 93-129, 1993.

KIATKOSKI, E.C. Estudo Fitoquímico dos Frutos e Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel e *Pterodon polygalaeflorus* Benth. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, 2011.

KLUZA, J.; CLARK, A. M.; BAILLY, C. Apoptosis induced by the alkaloid sampangine in HL-60 leukemia cells: correlation between the effects on the cell cycle progression and changes of mitochondrial potential. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v.1010, 2003.

KOEK-NOORMAN, J.; WESTRA, L. Y. T. Macrophotographic wood atlas of Annonaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.169, p. 135-189, 2012.

KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A. DA ; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L. DE ; MEDEIROS, L. S. DE ; RODRIGUES FILHO, E.; SOUZA, A. Q. L. DE. An antimicrobial alkaloid and other metabolites produced by *Penicillium* sp. An endophytic fungus isolated from *Mauritia flexuosa* L. f.. *Química Nova*, v.35, p. 771-774, 2012.

KUO, R.-Y.; CHANG, F.-R.; CHEN, C.-Y.; TENG, C.-M.; YEN, H.-F., WU, Y.-C. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, v.57, p. 421-425, 2001.

LAPREVOTE, O.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Alcaloides des Annonacees, 87. Azafluorenones del *Unonopsis spectabilis*. *Journal of Natural Products*, v.51, p. 555-561, 1988.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVÉ, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of Annonaceae XXIX. Alkaloids of *Annona muricata* L. *Planta Medica*, v.42, p.37-44, 1981.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, v.21, p. 2783-2813, 1982.

LOBÃO, A. Q.; FORZZA, R. C.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae da Reserva Biológica da Represa do Grama, Descoberto, Minas Gerais, Brasil, com uma Nova Espécie, *Unonopsis bauxitae*. *Rodriguésia*, v.57, p. 137-147, 2006.

LÚCIO, A. S. S. C. Alcaloides Azafenantrenos Isolados de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, 2011.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, v.52, p. 61-94, 2001.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. YH.; VERMEER, M. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (Annonaceae). *Blumea*, v.52, p. 413–554, 2007.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. TH.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q.; ERKENS, R. H. J. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. *Nordic Journal of Botany*, v.29, p. 257-356, 2011.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ENCHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, p. 429-438, 2002.

MARQUES, J. L.; VOLCÃO, L. M.; RIBEIRO, G. A. Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. frente a cepas bacterianas patogênicas e deteriorantes. *Anais do XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil*. Bento Gonçalves-RS, 2012.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, A. M.; ESTRADA-REYESB, R.; ESCALONA, A. G. A.; VELÁZQUEZ, I. L.; MARTÍNEZ-MOTA, L.; MORENOD, J.; HEINZE, G. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.139, p. 164–170, 2012.

MISKI, M.; SHEN, X.; COOPER, R.; GILLUM, A. M.; FISHER, D. K.; MILLER, R. W.; HIGGINS, T. J. Aporphine alkaloids, CD45 protein tyrosine phosphatase inhibitors, from *Rollinia ulei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v.14, p.1519-1522, 1995.

MOLLATAGHI, A.; COUDIERE, E.; HADI, A. H. A.; MUKHTAR, M. R.; AWANG, K.; LITAUDON, M.; ATA, ATHAR. Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia*, v.83, p. 298-302, 2012.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. *Química Nova*, v.24, p.105-111, 2001.

MONTENEGRO, H.; GUTIÉRREZ, M.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRIA, E.; CAPSON, T. L.; RIOS, L. C. 2003. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with leishmanicidal activity. *Planta Medica*, v.69, p.677-679, 2003.

MUNIER, R., *apud* MERCK, 1971. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. *E. Merck*, Darmstadt, Germany, p. 118, 1953.

MURILLO, J.; RESTREPO, D. Las anonáceas de la región de Araracuara Estudios en la Amazonía Colombiana XX, Soporte Editorial Bogotá, p. 218, 2000.

MURILLO-A, J. Las Annonaceae de Colombia. *Biota Comlobiana*, v.2, p. 49-58, 2001.

NARANJO, P. Hallucinogenic plant use and related indigenous belief systems in the Ecuadoran Amazon. *Journal of Ethnopharmacol*, v.1, p. 121–145, 1979.

NASCIMENTO, F.C.; BOAVENTURA, M.A.D.; Assunção, A.C.S.; Pimenta, L.P.S. Acetogeninas de Anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. *Química Nova*, v.26, p. 319-322, 2003.

NAVARRO, V. R.; SETTE, I. M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcaloides de *Buguetia flagellaris* Huber

(Annonaceae). Revista Brasileira de Plantas Medicinais, Botucatu, v. 3, p. 1516-0572, 2001.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. Journal of natural products, v. 70, p. 461-477, 2007.

NIERO, R. et al. Aspectos químicos e biológicos de plantas medicinais e considerações sobre fitoterápicos. In: Bresolin, T. M. B.; Cechinel filho, V. (Org.). Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao Desenvolvimento de Novos Fármacos e Medicamentos. Itajaí: UNIVALI, p. 11- 53, 2003.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU M.; ICHIMARU M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; CHALO MUTISO, P. B.; JUMA, F. D. Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopiya parviflora*. Phytochemistry, v.67, p. 2671–2675, 2006.

NODARI, R.O e GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: Farmacognosia: da planta ao Medicamento. Eds Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P.; Gosmann, G.; Mello, J. C. P. D.; Mentz, L. A. E.; PETRVICK, P. R. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC, p. 11-24, 2000.

NOGUEIRA, E. A.; MELO, N. D. C.; CASER, D. V. Anonáceas: do Brasil império a atemóia. Frutas e Derivados. p. 45-47, 2006. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/x-re/f-revista.html>. Acesso em 03/03/2014.

OBIRI, D.D.; OSAFO, N.; AYANDE, P.G.; ANTWI, A.O. *Xylopiya aethiopica* (Annonaceae) fruit extract suppresses Freund's adjuvant-induced arthritis in Sprague-Dawley rats. Journal Ethnopharmacol, v.28, p. 522, 2014.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. Food Chemistry, v. 120, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, I.L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. Acta Amazônica, v.34, p. 21-34, 2004.

OLIVEIRA, E. S. C. Investigação química e farmacológica de Espécies vegetais contra a leishmaniose. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, 2012.

OLIVEIRA, E. S. C.; Amaral, A. C. F.; Lima, E. S.; Silva, J. R. de A. Chemical composition and biological activities of *Bocageopsis multiflora* essential oil. Journal of Essential Oil Research, v.26, p. 161-165, 2014.

ORTIZ, A. A.; SUAREZ, L. E. C.; PATIÑO, G. S. Aporfinoídes en hojas de *Oxandra longipetala* R. E. FR. (Annonaceae). Scientia Et Technica, v. 13, p. 19-22, 2007.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para a avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, p. 301-307, 2008.

PAUCAR, A. M. O.; SERRUYS, A. S. K.; AFRIKANOVA, T.; MAES, J.; BORGGRAEV, J. A.; TAMARIZ, F. L.; ARIZÁBALA, I. M. W.; CRAWFORD, A. D.; WITTE, P. A. M.; ESGUERRA, C. V. Anticonvulsant activity of bisabolene sesquiterpenoids of *Curcuma longain* zebrafish and mouse seizure models. *Epilepsy & Behavior*, v.24, p. 14-22, 2012.

PAULINHO-NETO, H. F.; OLIVEIRA, P. E. A.M. As Anonáceas e os besouros. *Revista Ciência Hoje*, v.38, p. 59-61, 2006.

PAULO, M. Q.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; MAIA, BARBOSA, R. F.; R. C. B. B. C.; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* DC. *Journal of Ethnopharmacology*, v.36, p. 39-41, 1992.

PETERSON, J. R.; ZJAWIONY, J. K.; LIU, S.; HUFFORD, C. D. CLARK, A. M.; ROGERS, R. D. Copyrine alkaloids: synthesis, spectroscopic characterization, and antimycotic/antimycobacterial activity of A- and B-ring-functionalized sampangines. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 35, p. 4069-4077, 1992.

PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SOUZA, A. D. L.; RABELO, D. M.; BATISTA, C. L.; BATISTA, R. L.; COSTA, E. V.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Acanthoic Acid and other Constituents from the Stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v.20, p. 1095-1102, 2009.

PORTO, C.; NATOLINO, A.; DECORTI, D. Extraction of proanthocyanidins from grape marc by supercritical fluid extraction using CO₂ as solvent and ethanol-water mixture as co-solvent. *The Journal of Supercritical Fluids*, v.87, p. 59-64, 2014.

PUPO, M.T.; GALLO, M. B. C.; VIEIRA, P. C. *Biologia Química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais*. *Química Nova*, v. 30, p. 1446-1455, 2007.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.ST.-HIL. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien*, v. 108B, p. 191-205, 2007.

REIPERT, E. C. A.; RODRIGUES, C. E.C.; MEIRELLES, A. J. A. Phase equilibria study of systems composed of refined babassu oil, lauric acid, ethanol, and water at 303.2 K. *Journal Chemical Thermodynamics*, v.43, p. 1784-1790, 2011.

REVILLA, J. *Plantas úteis da Bacia Amazônica*. Manaus: INPA/SEBRAE, 2002.

RIBEIRO, J. E. L. S.; MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J. M.; WEBBER, A. Annonaceae. In: Ribeiro, J. E. L. S.; Hopkins, M. J. G.; Vicentini, A.; Sothers, C. A.; Costa, M. A. S.; Brito, J. M.; Souza, M. A. D.; Martins, L. H. P.; Lohmann, L. G.; Assunção, P. A. C. L.; Pereira, E. C.; Silva, C. F.; Mesquita, M. R.; Procópio, L. C. (Eds.). Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central, p.121-135. DFID (Departamento for International Development), INPA, Manaus – Amazonas, p. 121-135, 1999.

RICHARDSON, J. E.; CHATROU, L. W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H. J.; PIRIE, M.D. Historical biogeography of thow cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. Philosophical Transactions of the Royal Society B. v.359, p. 1495-1508, 2004.

RINALDI, M. V. N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2007.

SÁNCHEZ, M. Catálogo preliminar comentado de la flora del Medio Caquetá. Estudios en la Amazonía Colombiana XII Impreandes Presencia, Bogotá, p. 557, 1997.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. EMBRAPA: BELÉM-Pará, 2004.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, M. G.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil, Brazilian Journal of Microbiology, v.35, p. 275-280, 2004.

SHAALAN, E. A. S.; CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; ABDEL- WAHAB, H. & MANSOUR, A. H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. Environment International, v.31, p. 1149-1166, 2005.

SCHMIDT, J.; RAITH, K.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. Analysis of benzyloquinoline-type alkaloids by Electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. European Journal of Mass Spectrometry, v.11, p. 325-333, 2005.

SCHULTES, R. E. Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon. Journal of Ethnopharmacology, v.38, p. 129-135, 1993.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. Química Nova, v.30, p. 1809-1812, 2007.

SILVA, A. F. G. Estudo químico e avaliação de atividades citotóxica, genotóxica e antifúngica de *Ocotea acutifolia* (NEES) MEZ. (Lauraceae). Tese de doutorado, Universidade Federal de Goiás-UFG, Campo Grande-MS, 2010.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxaporfínicos de *Unonopsis Guatterioides* por ESI-IT-MS. Química Nova, v.35, p. 944-947, 2012.

SILVA, F. M. A.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; BARISON, A.; VENDRAMIN, M. E.; COSTA, E. V.; FERREIRA, A. G.; PINHEIRO, M. L. B. Phytochemical Study of the Alkaloidal Fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. Guided by Electrospray Ionization Ion-trap Tandem Mass Spectrometry. Phytochemical. Analysis, v.25, p. 45-49, 2014.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Ed. da Universidade, 1999.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da Planta ao Medicamento. 2 ed. rev. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2000a.

SIMÕES, C. M. O. & SPITZER, V. ÓLEOS VOLÁTEIS. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. (ed.) Farmacognosia. Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, 2ª ed., p. 387-416, 2000b.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo Fitoquímico de *Unonopsis Lindmanii* – Annonaceae, Biomonitorado pelo Ensaio de Toxicidade sobre a *Artemia Salina Leach*. Química Nova, v. 21, p. 557-559, 1998.

SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina leach*. Química. Nova v.24, p. 185-187, 2001.

SOBRINHO, R. B. Potencial de Exploração de Anonaceas no Nordeste do Brasil. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. XII Agroflores, 2010.

SONG, H.; LIU, Y.; LIU, Y.; WANG, L.; WANG, Q.; Synthesis and Antiviral and Fungicidal Activity Evaluation of β -Carboline, Dihydro- β -carboline, Tetrahydro- β -carboline Alkaloids, and Their Derivatives. Journal of Agricultural and Food Chemistry. v.62, p. 1010-1018, 2014.

SOUZA, A. Q. L.; SOUZA, A. D. L.; ASTOLFI FILHO, S.; PINHEIRO, M. L. B.; SARQUIS, M. I. M.; PEREIRA, J. O. Atividade antimicrobiana de fungos endofíticos isolados de plantas tóxicas da Amazônia: *Palicourea longiflora* (aubl.) rich e *Strychnos cogens* bentham. Acta Amazonica, v. 34, p. 185-195, 2004.

STADLER, R.; KUTCHAN, M. T.; LOEFFLER, S.; NAGAKURA, N.; CASSELS, B.; ZENK, M. H. Revision of the early steps of reticulina biosynthesis. *Tetrahedron Letters*, v.28, p. 1251-1254, 1987.

STEPANOV, E. V. & KOMAROVA, M. A. Composition and antimicrobial activity of volatile substances of a preparation from *Abies sibirica* needles. *Izvestiya Sibiriskogo Otdeleniya Akademii Nauk SSSR, Seriya Biologicheskikh Nauk*, v.1, p. 38-43, 1972.

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. L. H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E. LECLERCQ, J. Q. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom*, v. 18, p. 523-528, 2004.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LACLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. *Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents*, v.5, p. 173-182, 2005.

STROBEL, G. A.; DAISY, B.; CASTILLO, U.; HARPER, J. Natural products from endophytic microorganisms. *Journal of Natural Products*, v.67, p. 257-268, 2004.

SURESH, H. M.; SHIVAKUMAR, B.; SHIVAKUMAR, S. I. Cytotoxicity of Aporphine Alkaloids from the Roots of *Annona Reticulata* on Human Cancer Cell Lines. *International Journal of Plant Research*, v.2, p. 57 -60, 2012.

TADIC, D.; WANNIGAMA, G. P.; CASSELS, B. K.; CAVÉ, A.; Alkaloids of *Alphonsea Sclerocarpa*. *Journal of Natural Products*, v.50, nº3, p. 518-519, 1987.

TOLKACHEV, O. N.; ABIZOV, E. A.; ABIZOVA, E. V.; MAL'TSEV, S. D. Phytochemical study of the bark of some plants of the Elaeagnaceae family as a natural source of β -carboline indole alkaloids. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, v.42, p. 630-632, 2008.

TORRES, O.; SANTAFE, G.; ANGULO, A.; VILLA, H.; ZULUAGA, J.; DORIA, M. Obtención de alcaloides a partir de corteza y madera de La especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae). *Scientia et Technica*, n. 33, p. 333-336, 2007.

ULTEE, A.; BENNIK, M. H.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Appl Environ Microbiol*, v.68, p. 1561-1568, 2002.

VALTER, J. L.; ALENCAR, K. M. C.; SARTORI, A. L. B.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; LAURA, V. A.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; SILVA, D. B.; GRASSI, R. F.; FABRI, J. R.; SIQUEIRA, J. M. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). *Revista Brasileira de farmacognosia*, v.18, p. 373-378, 2008.

VENDRAMIN, M. E.; COSTA, E. V.; SANTOS, É. P.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R. Chemical constituents from the leaves of *Annona*

rugulosa (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.49, p. 152-155, 2013.

VIEGAS JR., C. Jr; BOLZANI, V. da S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos naturais e a Química Medicinal Moderna. *Química Nova*, Rio de Janeiro, v.29, p. 326-337, 2006.

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J. L.; CANTON, E.; GOBERNADO, M. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids. *Journal Pharmazie*, v.42, p. 50-248, 1987.

WOGUEM, V.; FOGANG, H. P. D.; MAGGI, F.; TAPONDJOU, L. A.; WOMENI, H. M.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D.; LUPIDI, G.; PAPA, F.; VITTORI, S.; BARBONI, L. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopia parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. *Food Chemistry*, p. 183-189, 2014.

WOOLF, A. Essential oil poisoning. *Journal of Clinical Toxicology*, v.37, p. 721-727, 1999.

WU, Y. C.; CHANG, F. R.; WEI, J. L.; TENG, C. M. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*, v.49, p. 2015-2018, 1998.

YANG, Y. L.; CHANG, F.-R.; WU, C. C.; WANG, W. Y.; WU, Y. C. New ent-Kaurane Diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*, v.65, p. 1462-1467, 2002.

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

8. ANEXOS 1 (Espectros de RMN de ^1H e mapas de contornos HSQC e HMBC)

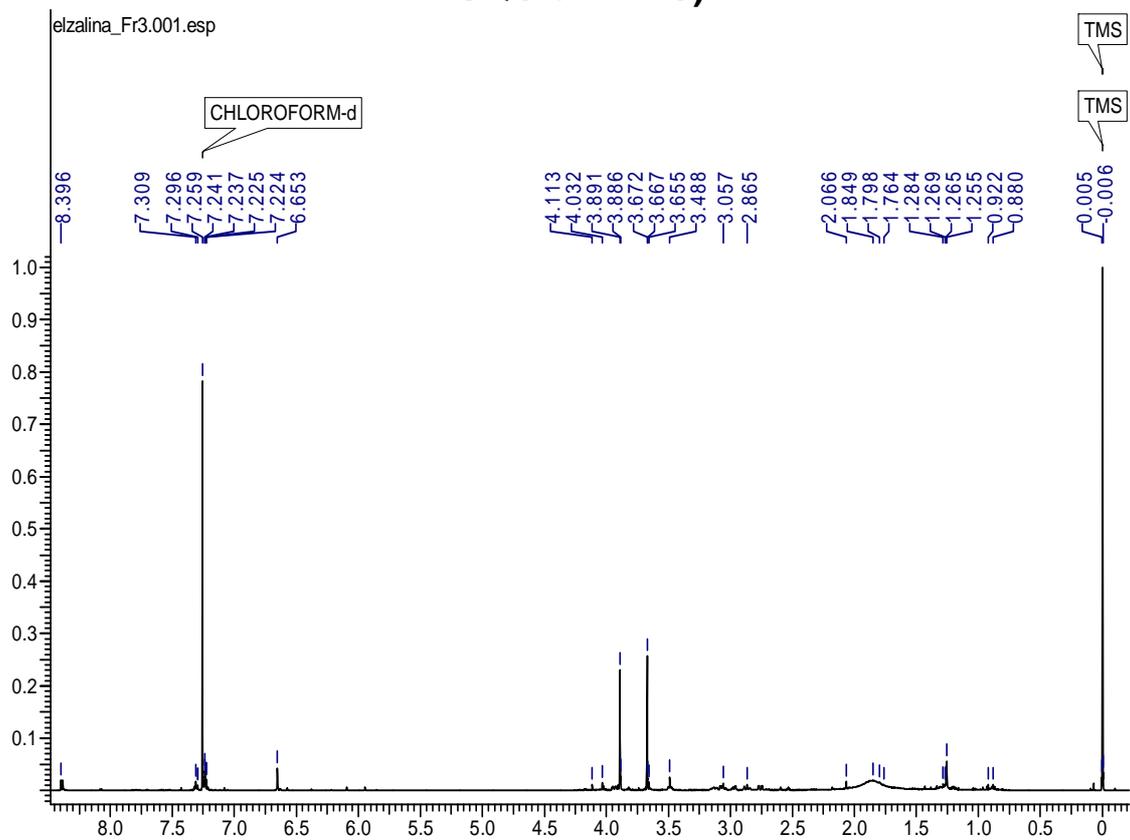


Figura 133: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF3.

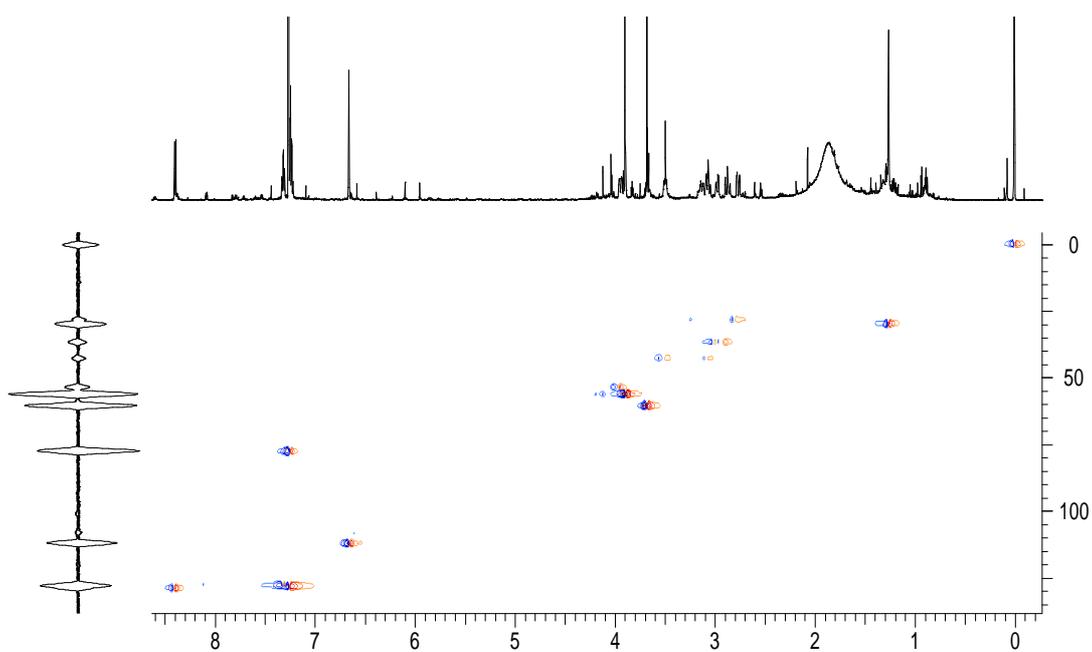


Figura 134: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF3.

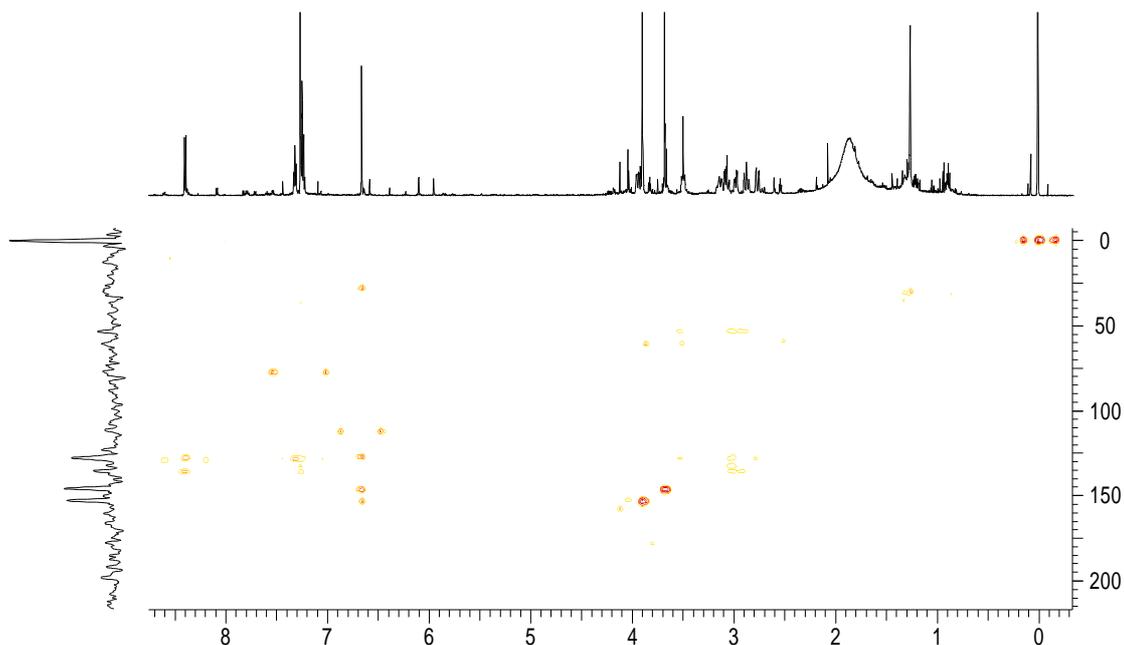


Figura 135: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF3.

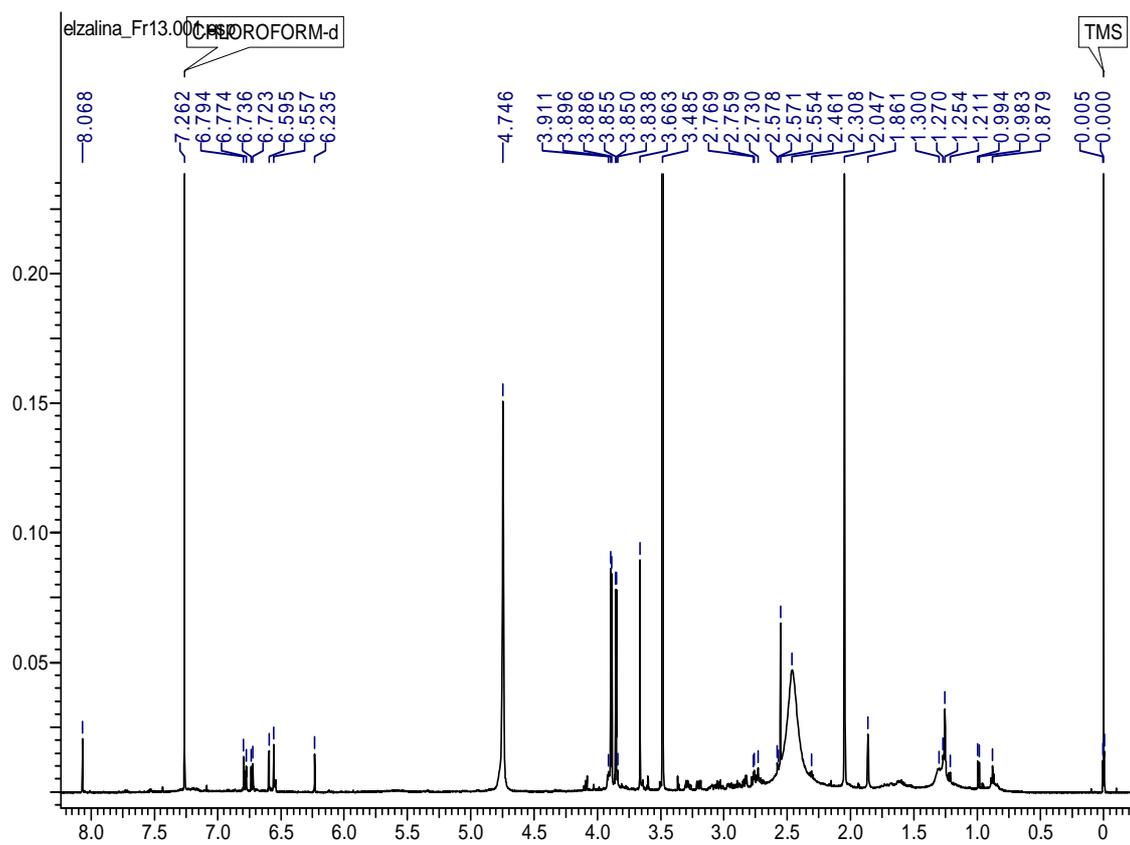


Figura 136: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF13.

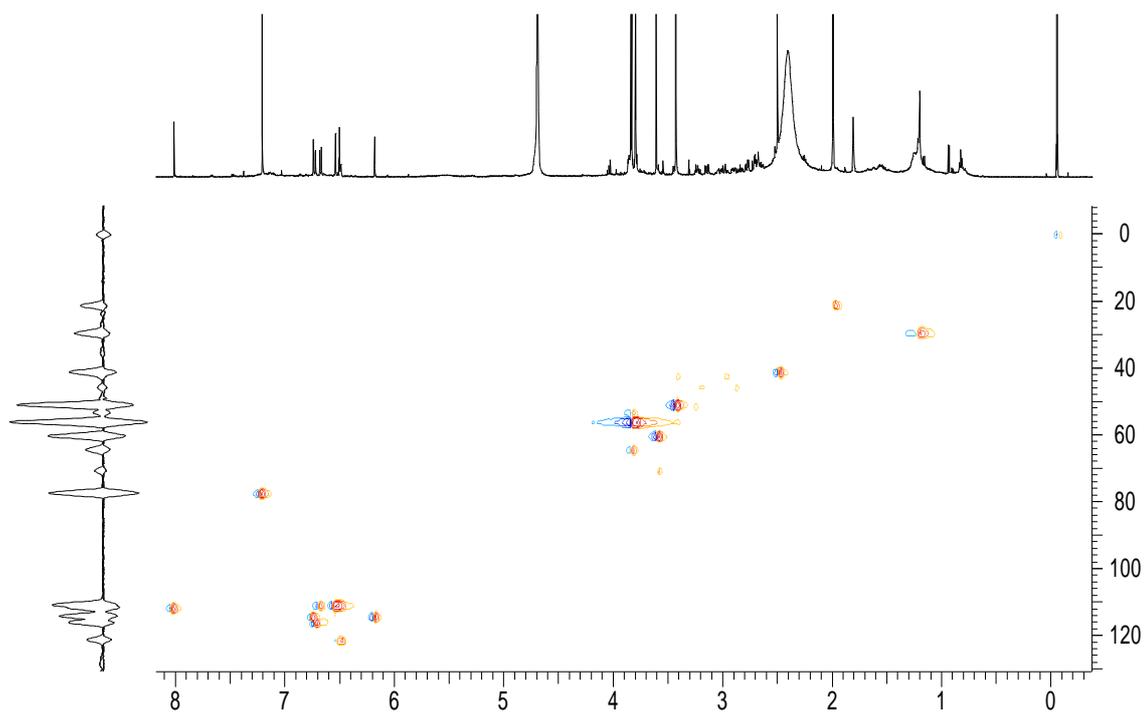


Figura 137: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF13.

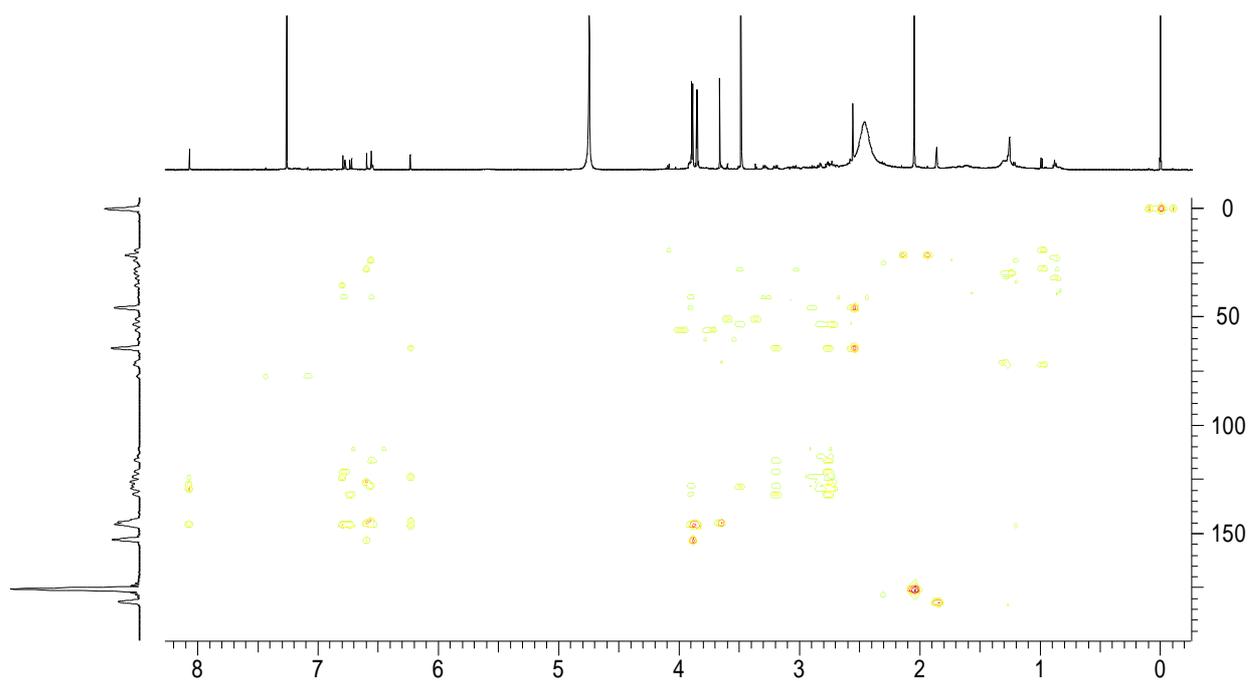


Figura 138: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF13.

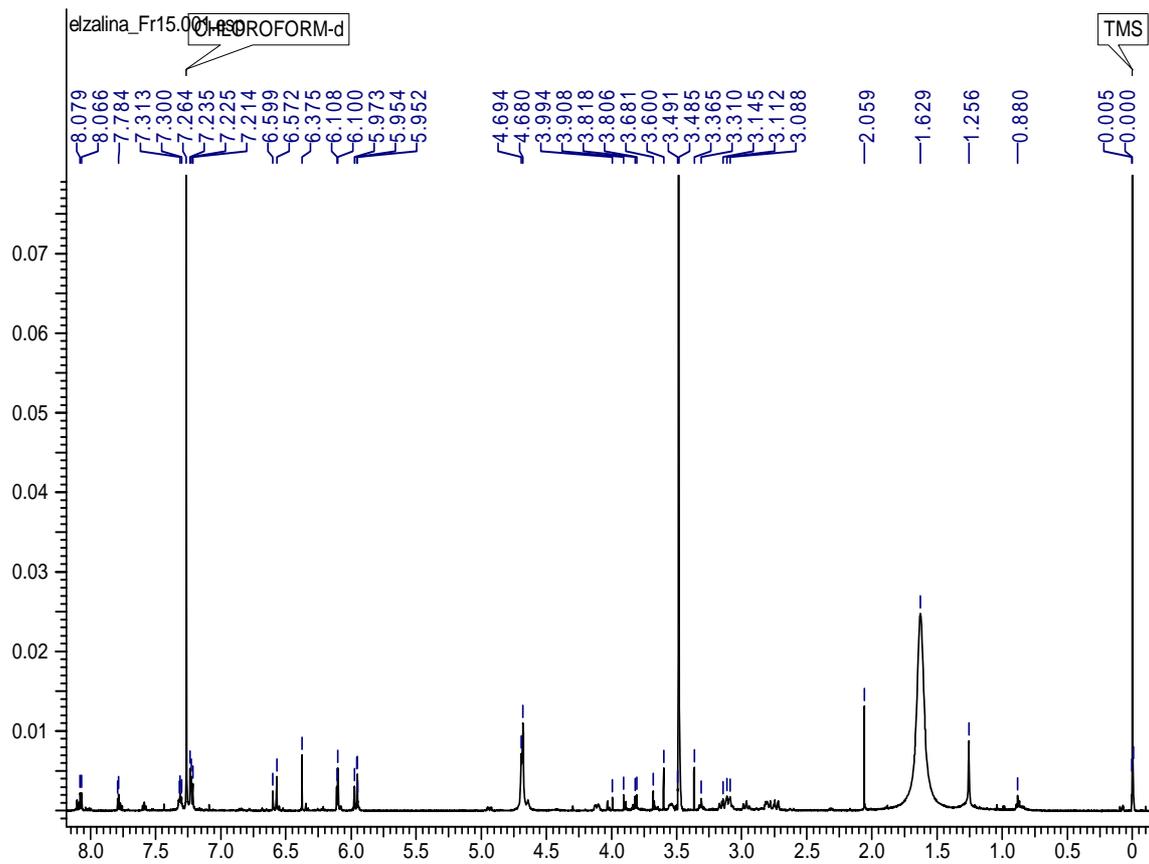


Figura 139: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF15.

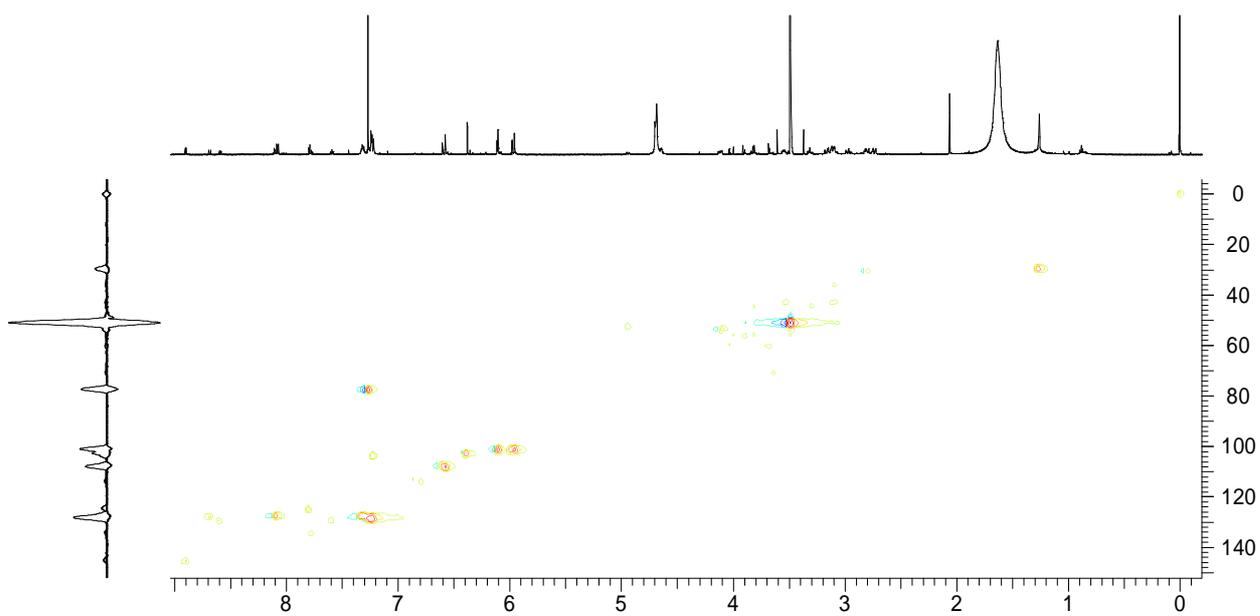


Figura 140: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF15.

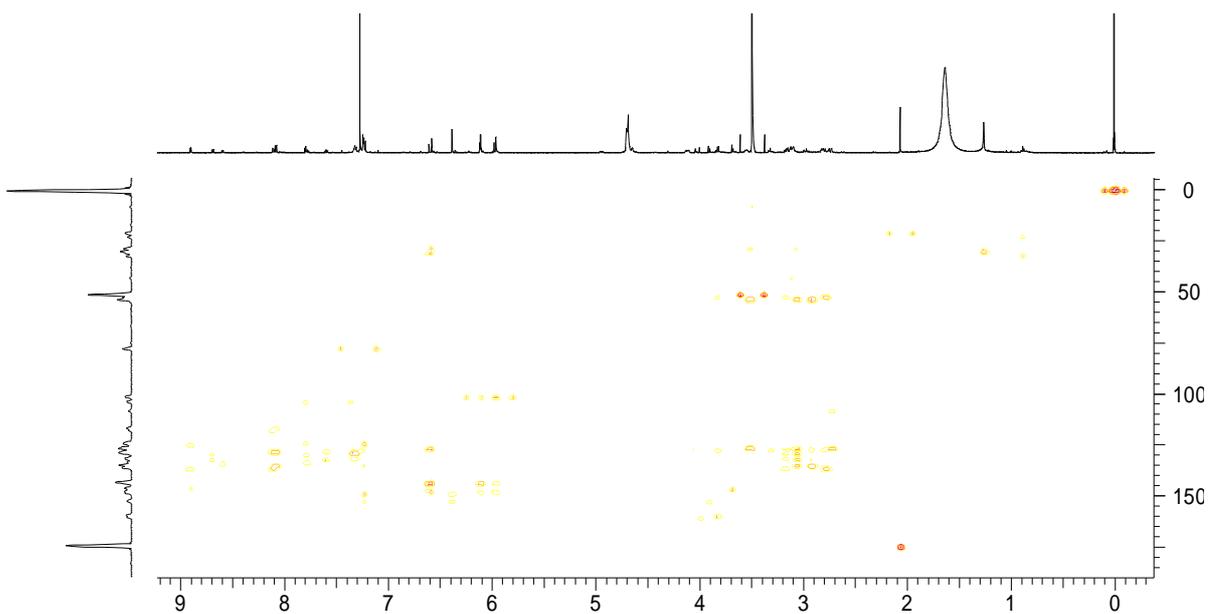


Figura 141: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF15.

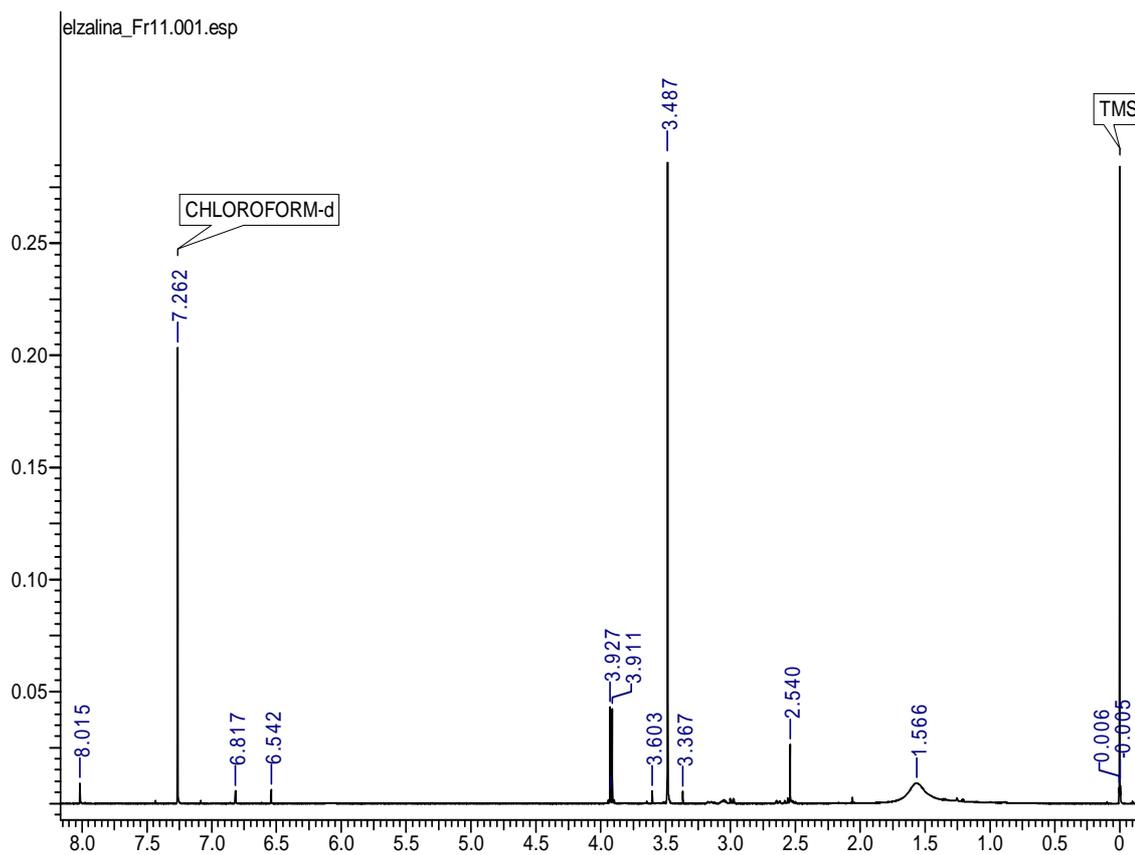


Figura 142: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF11.

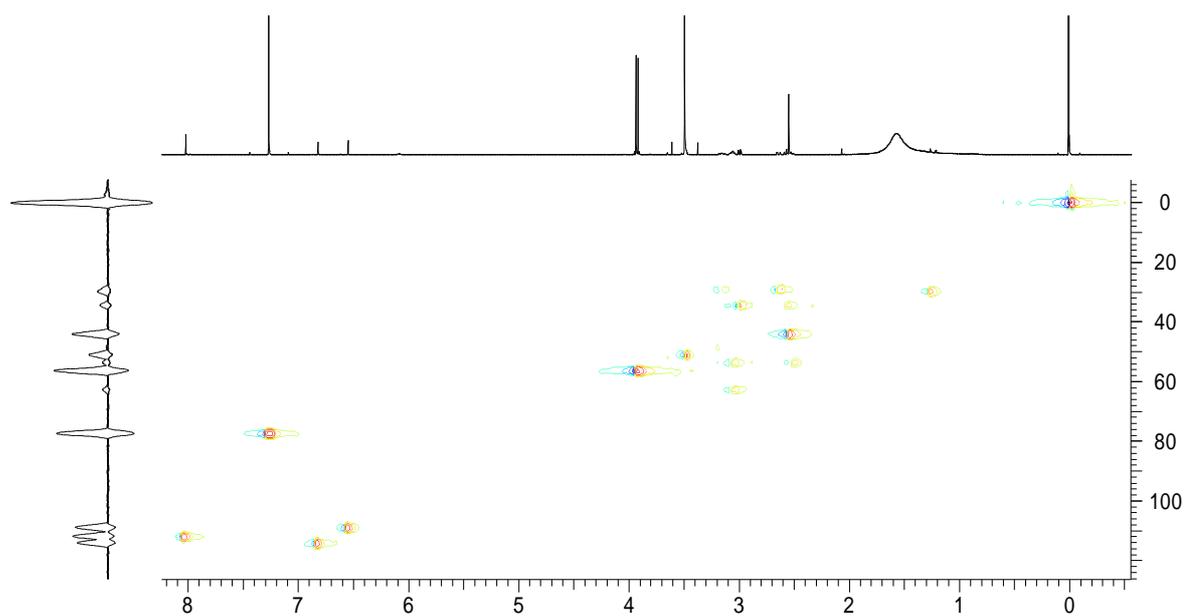


Figura 143: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl₃) da amostra BpF11.

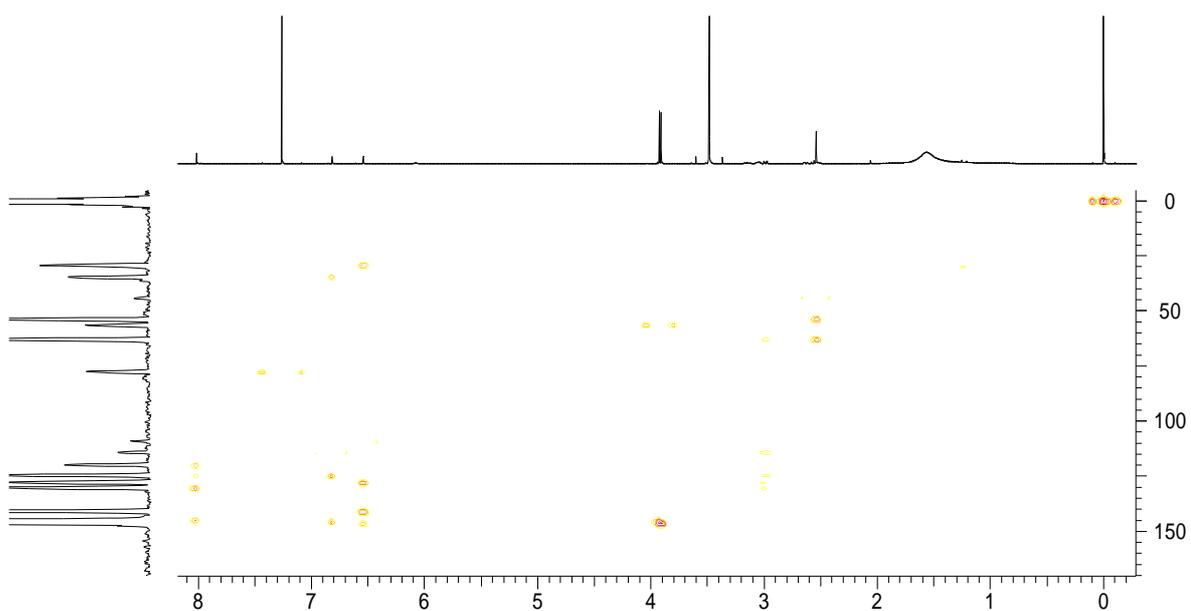


Figura 144: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl₃) da amostra BpF11.

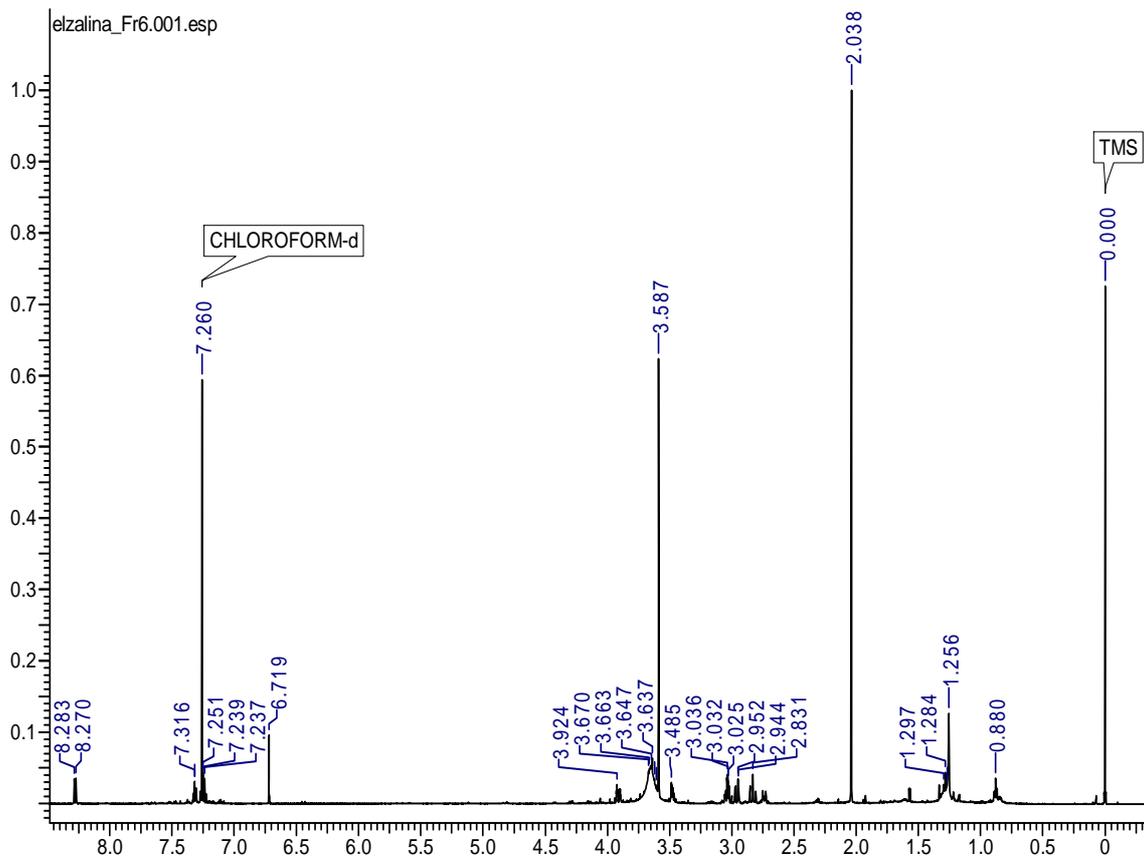


Figura 145: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF6.

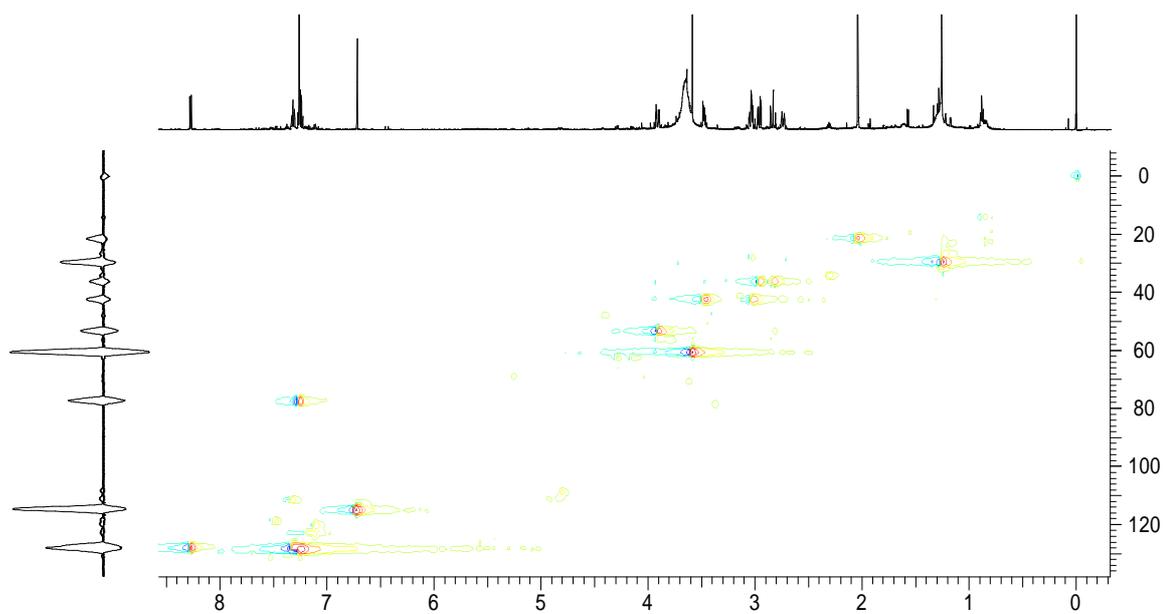


Figura 146: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF6.

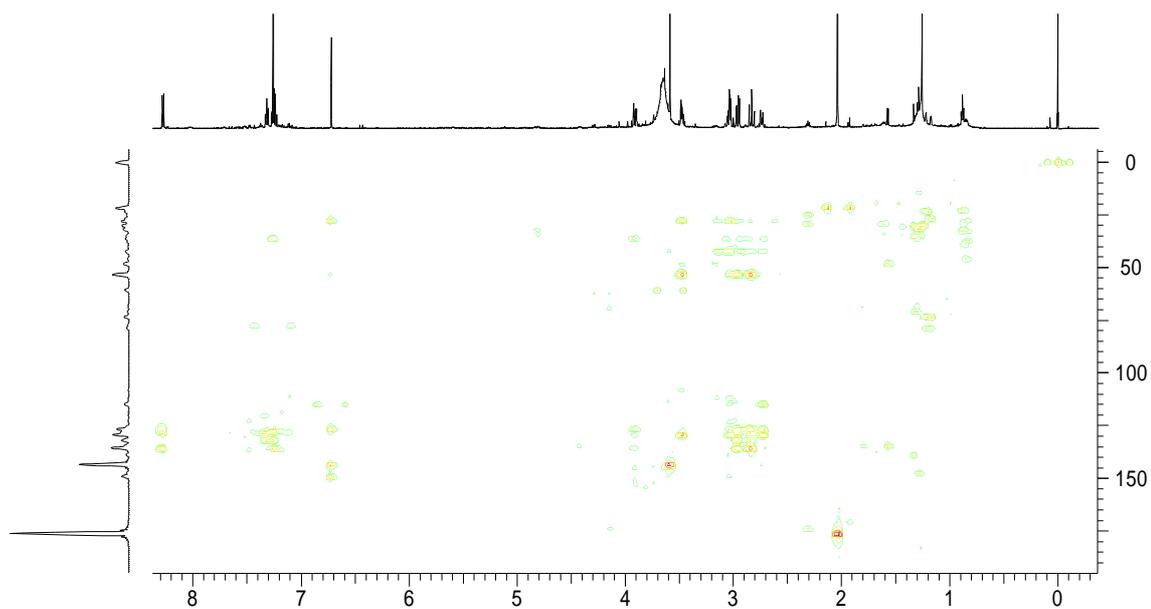


Figura 147: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF6.

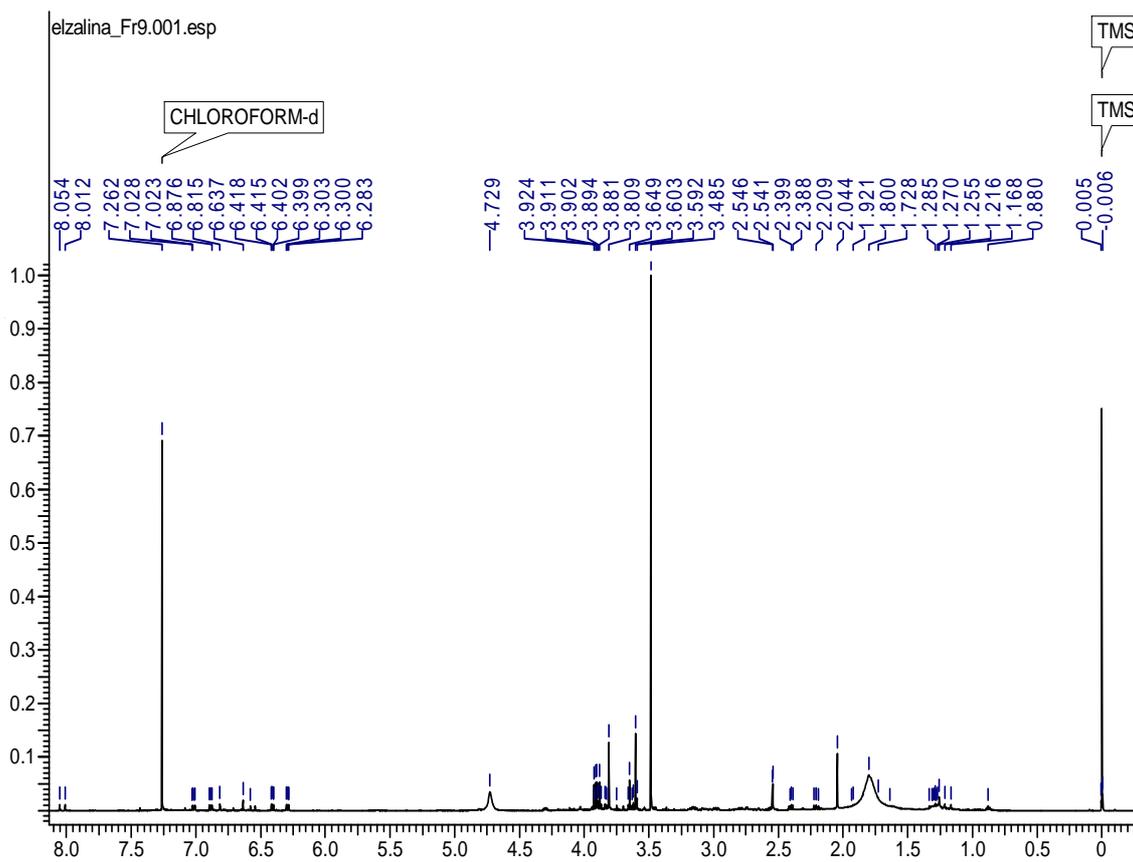


Figura 148: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF9.

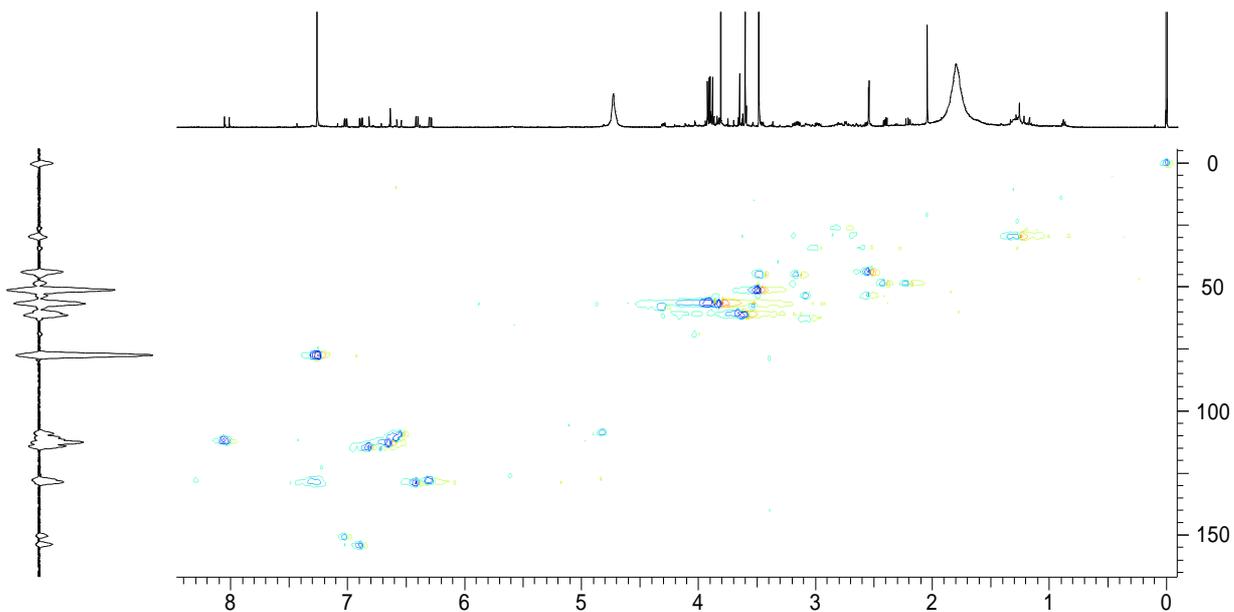


Figura 149: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF9.

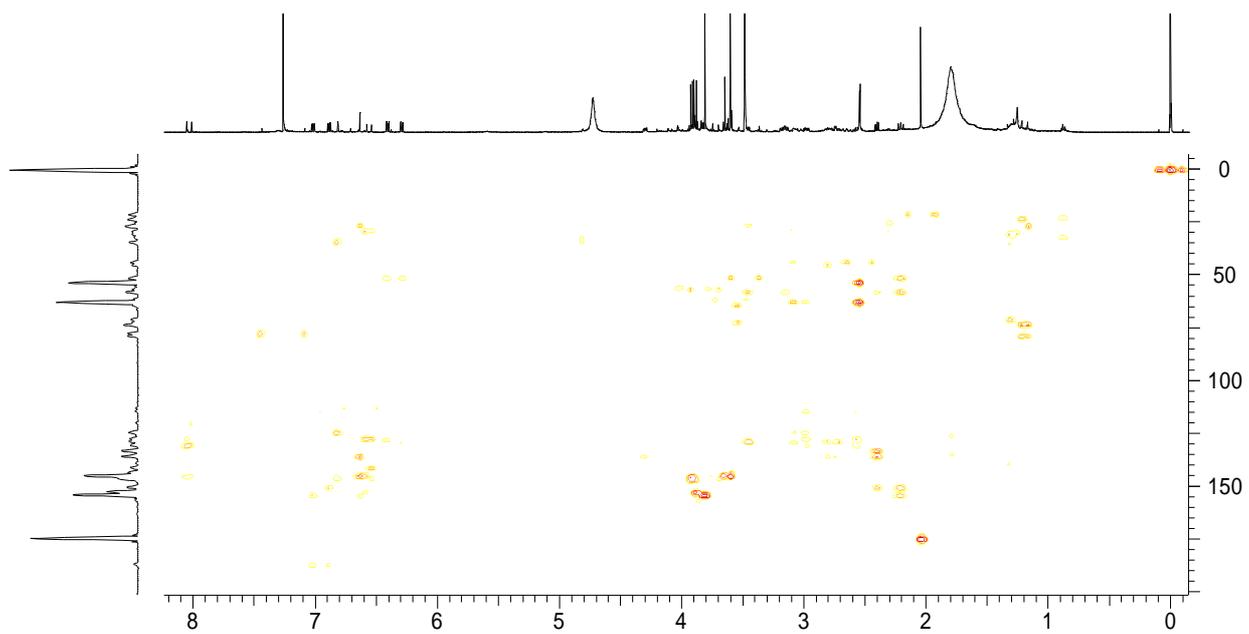


Figura 150: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF9.

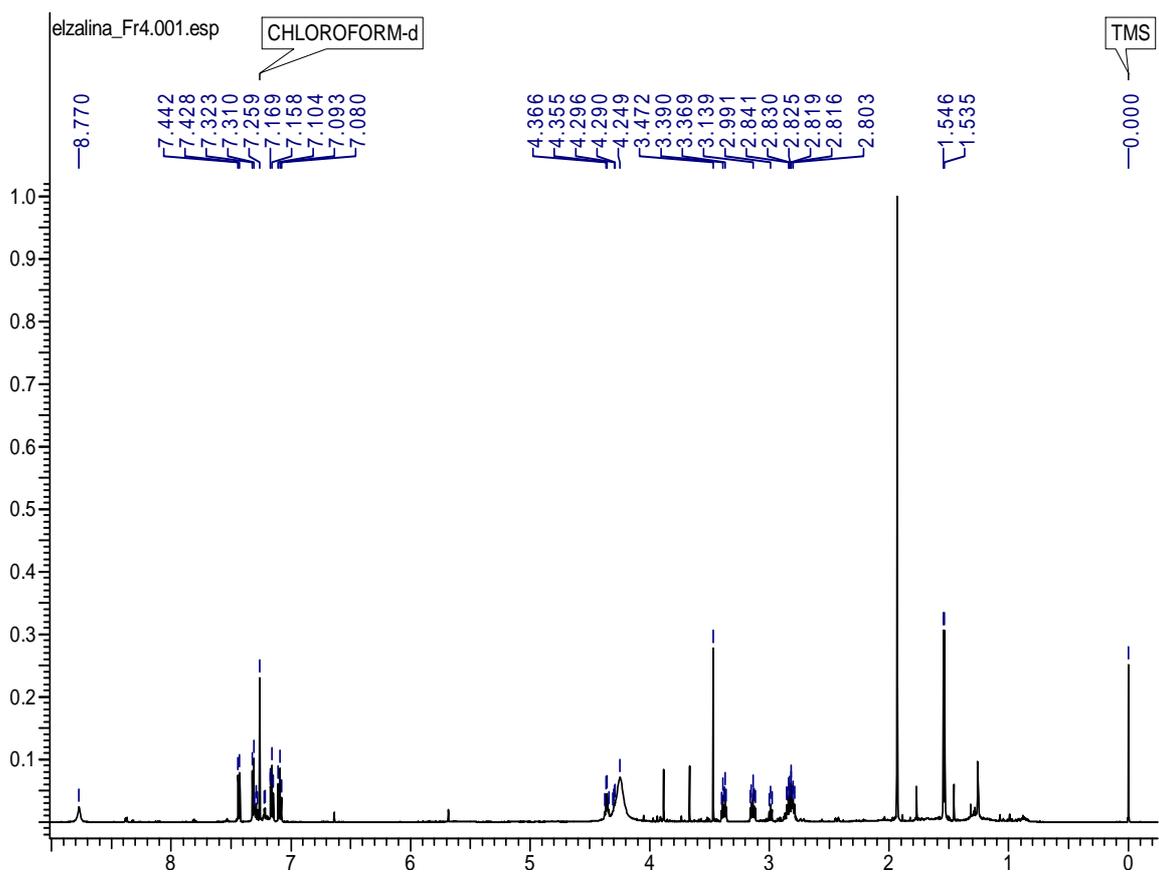


Figura 151: Espectro de RMN de H (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF4.

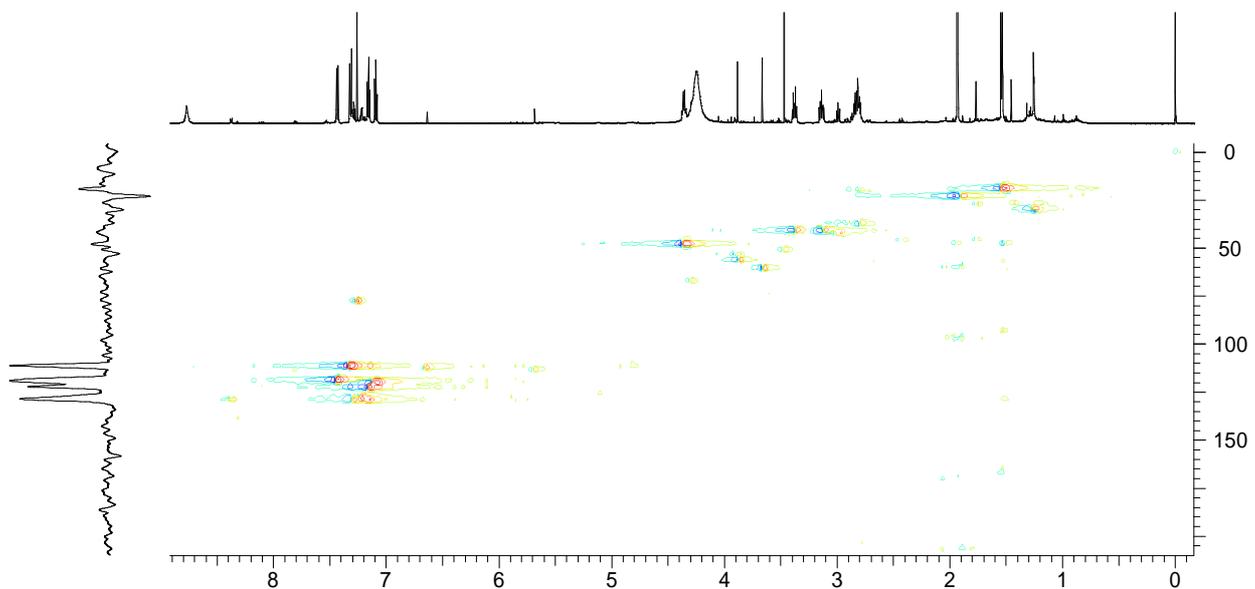


Figura 152: Mapa de contornos HSQC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF4.

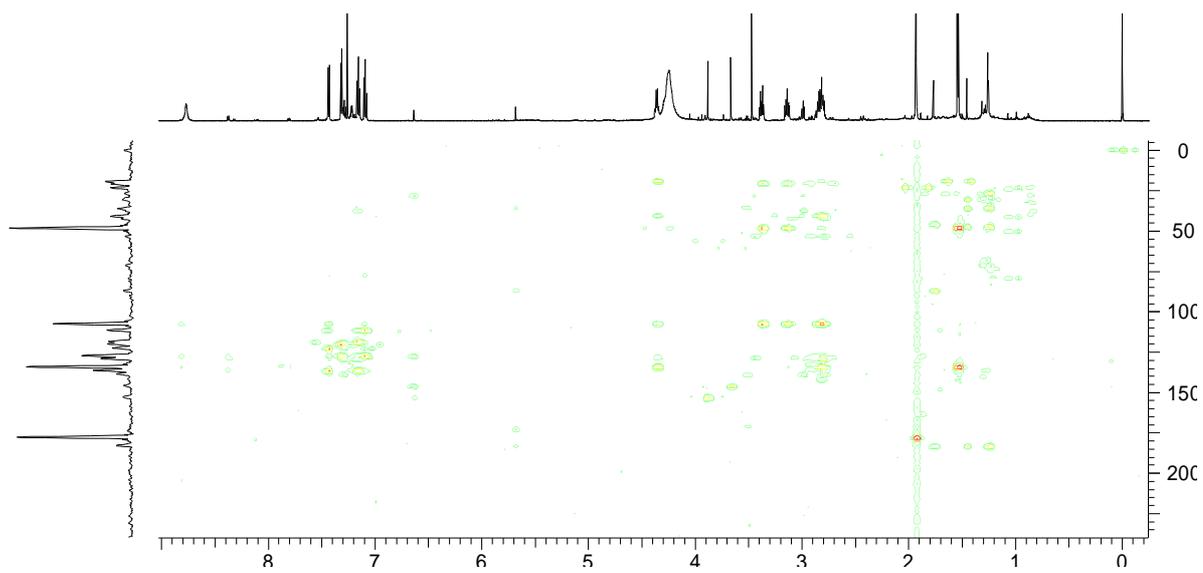


Figura 153: Mapa de contornos HMBC (600 MHz, CDCl_3) da amostra BpF4.

9. ANEXOS 2 (Publicações)

Natural Product Research, 2015

<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2014.996148>



SHORT COMMUNICATION

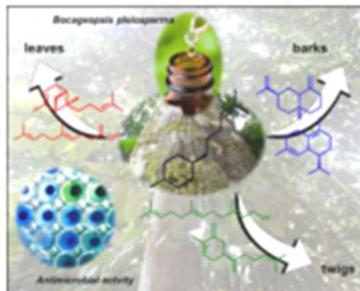
Chemical composition and antimicrobial evaluation of the essential oils of *Bocageopsis pleiosperma* Maas

Elzalina R. Soares^a, Felipe M.A. da Silva^{a*}, Richardson A. de Almeida^a, Bruna R. de Lima^a, Hector H.F. Koolen^{ab}, Caroline C. Lourenço^c, Marcos J. Salvador^c, Adriana Flach^d, Luiz Antonio M. A. da Costa^d, Antonia Q.L. de Souza^e, Maria L.B. Pinheiro^a and Afonso D.L. de Souza^a

^aDepartamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, 69077-000 Manaus, AM, Brasil;

^bInstituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil; ^cInstituto de Biologia, DBV, Universidade Estadual de Campinas, 13083-970 Campinas, SP, Brasil; ^dDepartamento de Química, Universidade Federal de Roraima, 69304-000 Boa Vista, RR, Brasil; ^eFaculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, 69077-000 Manaus, AM, Brasil

(Received 4 August 2014; final version received 4 December 2014)



Essential oils from the leaves, twigs and barks of *Bocageopsis pleiosperma* Maas were obtained by using hydrodistillation and analysed by using gas chromatography coupled to mass spectrometry. Several compounds (51) were detected and identified, being β -bisabolene the main component in all aerial parts of the plant, with higher concentration in the leaves (55.77%), followed by barks (38.53%) and twigs (34.37%). In order to increase the biological knowledge about the essential oil of *Bocageopsis* species, antimicrobial activities were evaluated against the microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* and *Candida albicans*. The essential oil obtained from the barks exhibited a moderate effect against *S. epidermidis* ATCC 1228 (MIC = 250 μ g/mL), while the other oils did not exhibit antimicrobial activity. These results represent the first report about the chemical composition of *B. pleiosperma* and the first antimicrobial evaluation with a *Bocageopsis* species.

Keywords: Annonaceae; *Bocageopsis pleiosperma*; essential oil; antimicrobial evaluation

*Corresponding author. Email: felipesaquarema@bol.com.br; felipemas@ufam.edu.br

Direct Infusion ESI-IT-MSⁿ Alkaloid Profile and Isolation of Tetrahydroharman and Other Alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae)

Elzalina R. Soares,^a Felipe M. A. da Silva,^{a*} Richardson A. de Almeida,^a Bruna R. de Lima,^a Francinaldo A. da Silva Filho,^a Andersson Barison,^b Hector H. F. Koolen,^{a,c} Maria Lúcia B. Pinheiro^a and Afonso D. L. de Souza^a

ABSTRACT:

Introduction – The Annonaceae family is known as a promising abundant source of secondary metabolites, especially annonaceous acetogenins, terpenoids and isoquinoline-derived alkaloids. Although widely investigated from the phytochemical viewpoint, this family still presents some largely unexplored genera, e.g. the *Bocageopsis*.

Objective – To investigate the alkaloid content of *Bocageopsis pleiosperma* Maas using direct infusion electrospray ionisation ion trap tandem mass spectrometry (ESI-IT-MSⁿ) analysis.

Methodology – Dichloromethane extracts of aerial parts were subjected to acid–base partitioning to yield the alkaloidal fractions. These fractions were analysed by direct infusion into a (+)ESI-IT-MSⁿ system. The alkaloidal fraction from the leaves was also obtained on a large scale and subjected to chromatographic separation.

Results – The tentative MSⁿ-based identification of alkaloids in leaves, twigs and trunk bark showed that aporphine alkaloids were restricted to the leaves and twigs, tetrahydroprotoberberine alkaloids were only found in the twigs and trunk bark while benzyloquinoline alkaloids were found in the leaves, twigs and trunk bark. Chromatographic separation of the leaf alkaloidal fraction yielded the aporphine alkaloids norruciferine, asimilobine and isoboldine, the β-carboline alkaloid tetrahydroharman and some mixtures containing benzyloquinoline and aporphine alkaloids, all described for the first time in the *Bocageopsis* genus. Furthermore, tetrahydroharman has not previously been reported in the Magnoliales order.

Conclusion – Direct infusion ESI-IT-MSⁿ analysis of alkaloids allowed fast recognition of alkaloidal classes previously reported in the Annonaceae family, aiding the chromatographic step and allowing a selective isolation of compounds previously not identified in the *Bocageopsis* genus. Copyright © 2015 John Wiley & Sons, Ltd.