

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO – PROPESP
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – PPGQ

FRANCISCO ALBERTO NASCIMENTO NETO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Pseudoxandra*
leiophylla (ANNONACEAE) E INVESTIGAÇÃO DO SEU EFEITO
CITOTÓXICO**

MANAUS – AM

2021

FRANCISCO ALBERTO NASCIMENTO NETO

**ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Pseudoxandra
leiophylla* (ANNONACEAE) E INVESTIGAÇÃO DO SEU EFEITO
CITOTÓXICO**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (PPGQ/UFAM) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, linha de pesquisa Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa

MANAUS – AM

2021

Ficha Catalográfica

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

N244e Nascimento Neto, Francisco Alberto
Estudo fitoquímico das folhas de *Pseudoxandra leiophylla* (Annonaceae) e investigação do seu efeito citotóxico / Francisco Alberto Nascimento Neto . 2021
127 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Emmanoel Vilaça Costa
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. *Pseudoxandra leiophylla*. 2. *Pseudoxandra coriacea*. 3. Annonaceae. 4. Alcaloides. 5. Terpenoides. I. Costa, Emmanoel Vilaça. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

FRANCISCO ALBERTO NASCIMENTO NETO

ESTUDO FITOQUÍMICO DAS FOLHAS DE *Pseudoxandra leiophylla* (ANNONACEAE) E INVESTIGAÇÃO DO SEU EFEITO CITOTÓXICO

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (PPGQ/UFAM) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química, linha de pesquisa Química de Produtos Naturais e Biomoléculas.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa, Presidente
Universidade Federal do Amazonas

Prof. Dr. Josean Fachine Tavares, Membro externo
Universidade Federal da Paraíba

Prof. Dr. Alan Diego da Conceição, Membro interno
Universidade Federal do Amazonas

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, minha esposa e ao professor Dr. Emmanoel Vilaça Costa, por todo apoio e incentivo durante o período de realização deste mestrado, na qual sem eles essa conquista não seria possível.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Universidade Federal do Amazonas, ao Departamento de Química e em especial ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de desenvolver esse trabalho.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de mestrado e ao CNPq e CAPES pelo financiamento dos projetos de pesquisa do Grupo de Estudos Químicos de Biomoléculas (GEQBiom), pois sem os recursos desses órgãos de fomento nada disso seria possível.

Ao Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa, meu orientador, pela imensa paciência, dedicação e entusiasmo no ensino e instrução das atividades desse trabalho.

Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra e à toda sua equipe de trabalho do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-BA) pela colaboração na realização dos ensaios de citotoxicidade.

Ao Herbário (HUAM) do Departamento de Biologia da UFAM pela identificação da espécie, permitindo seu estudo.

À toda equipe do Laboratório de Espectrometria de Massas e do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Central Analítica pela cordialidade e pelo profissionalismo com que conduziram cada análise.

Aos professores do PPGQ, pelos ensinamentos.

Aos colegas que integram e integraram o grupo de pesquisa GEQBiom, Nathalya Dorzani, Weider Paz, Brina Silva, Thayline Menezes, César Souza, Liviane Soares, Thiago Damasceno, Steve Manickchand, obrigado pela convivência, troca de experiências e demais momentos.

Aos meus pais Jader Cleber e Marília Costa, que desde minha infância sempre incentivaram meus estudos.

A minha esposa Tatiane Nascimento, pela compreensão e apoio e sustento durante toda essa caminhada.

Por fim, meu agradecimento à Deus e a todos que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

“A persistência é o menor caminho do êxito”

(Charles Chaplin)

RESUMO

Pseudoxandra leiophylla (Diels) é uma espécie pertencente a família Annonaceae, nativa do território amazônico, com ocorrência na Venezuela, Colômbia e Brasil. Possui como sinônimo a espécie *Pseudoxandra coriacea* R. E. Fr. De acordo com a literatura, não há registros de estudos químicos e farmacológicos a respeito desta espécie. Nesse trabalho, foi realizado o estudo fitoquímico e a investigação da citotoxicidade *in vitro* dos extratos brutos, frações (neutra e alcaloídica) e compostos isolados das folhas de *P.leiophylla*. O estudo das folhas resultou no isolamento de seis substâncias pertencentes à classe dos alcaloides, terpenos e lignoides. Para o isolamento dos constituintes químicos foram empregadas técnicas cromatográficas clássicas tais como cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa, e para a identificação foram utilizadas técnicas espectroscópicas (ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C 1D/2D) e espectrométrica (espectrometria de massas). Os alcaloides pertencem a classe dos aporfinos e oxoaporfinos e foram identificados como sendo a liriodenina e a asimilobina, respectivamente. Os terpenos se tratam dos triterpenos ácido heínico, a mistura de breina e maniladiol, e a lactona sesquiterpênica loliolida, além da lignana tetraidrofurânica identificada como grandisina. Estes compostos são descritos pela primeira vez na espécie. Os extratos (hexânico e metanólico), frações (neutra e alcaloídica), assim como as substâncias isoladas das folhas de *P. leiophylla* foram submetidas aos ensaios de atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais utilizando o ensaio do *Alamar Blue*. Os resultados do ensaio de citotoxicidade dos extratos e frações evidenciaram potencial atividade citotóxica frente às linhagens de células tumorais com valores de CI_{50} abaixo de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$, onde dentre os extratos avaliados, o extrato hexânico foi o mais ativo com valores de CI_{50} iguais a 28,50 e $13,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ contra as células de carcinoma de cólon humano (HCT116) e carcinoma hepatocelular humano (HepG2), respectivamente. O extrato metanólico foi ativo apenas frente ao tipo de célula tumoral HepG2 com valor de CI_{50} igual a $12,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Por outro lado, as frações neutra e alcaloídica apresentaram valores de CI_{50} iguais a 42,47 e $8,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$, e 31,86 e $9,85 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para HCT116 e HepG2, respectivamente, melhorando a atividade do extrato metanólico com o tratamento ácido-base. Entretanto, os resultados são considerados próximos com ambas as frações ativas com prováveis substâncias promissoras. Para as substâncias isoladas apenas a mistura de breina e maniladiol apresentou alguma atividade citotóxica com valor de CI_{50} de $8,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente as células tumorais B16-F10. Os resultados contribuíram para o conhecimento químico e farmacológico das espécies de Annonaceae do Amazonas, particularmente para as espécies do gênero *Pseudoxandra*.

Palavras-chaves: *Pseudoxandra leiophylla*; *Pseudoxandra coriacea*; Annonaceae; Alcaloides; Terpenoides; Lignanas; Citotoxicidade.

ABSTRACT

Pseudoxandra leiophylla (Diels) is a species belonging to the Annonaceae family, native to the Amazonian territory, occurring in Venezuela, Colombia and Brazil. Its synonymy is *Pseudoxandra coriacea* R. E. Fr. According to the literature, there are no records of chemical and pharmacological studies on this species. In this work, the phytochemical study and the "in vitro" cytotoxicity investigation of the extracts, fractions (neutral and alkaloidic) and isolated compounds from *P. leiophylla* leaves. The study of the leaves resulted in the isolation of six substances belonging to the class of alkaloids, terpenes and lignoids. Classical chromatographic techniques such as column chromatography and preparative thin-layer chromatography were used to isolate the chemical constituents, and spectroscopic (^1H and ^{13}C 1D/2D nuclear magnetic resonance) and spectrometric (mass spectrometry) techniques were used. The alkaloids belong to the aporphin and oxoaporphin classes and were identified as liriodenin and asimilobin, respectively. The terpenes are the triterpenes heynic acid, the mix of brein and manniladiol, and the sesquiterpene lactone loliolide, as well as the tetrahydrofuran lignan identified as grandisin. All these compounds are described for the first time in the species. The extracts (hexanic and methanolic), fractions (neutral and alkaloidic), as well as the substances isolated from *P. leiophylla* leaves were submitted to cytotoxic activity assays against tumor cell lines using the *Alamar Blue* assay. The results of the cytotoxicity assay of the extracts and fractions showed potential cytotoxic activity against tumor cell lines with IC_{50} values below $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, where among the extracts evaluated, the hexanolic extract was the most active with IC_{50} values equal to 28.50 and $13.12 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against human colon carcinoma (HCT116) and human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells, respectively. The methanolic extract was active only against the tumor cell type HepG2 with CI_{50} value equal to $12.85 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. On the other hand, the neutral and alkaloidic fractions showed IC_{50} values equal to 42.47 and $8.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, and 31.86 and $9.85 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ for HCT116 and HepG2, respectively, improving the activity of the methanolic extract with acid-base treatment. However, the results are considered close with both active fractions having probable promising substances. For the isolated substances only the brein and manniladiol mixture showed some cytotoxic activity with a IC_{50} value of $8.32 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ against B16-F10 tumor cells. The results contributed to the chemical and pharmacological knowledge of Annonaceae species from Amazonas, particularly for species of the gender *Pseudoxandra*.

Keywords: *Pseudoxandra leiophylla*; *Pseudoxandra coriacea*; Annonaceae; Alkaloids; Cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

| | |
|-------------------------------------|--|
| β | beta |
| δ | Deslocamento químico |
| ϕ | Diâmetro |
| μg | Micrograma |
| AcOEt | Acetato de etila |
| CC | Cromatografia em coluna |
| CCDA | Cromatografia em camada delgada analítica |
| CCDP | Cromatografia em camada delgada preparativa |
| CDCl₃ | Metanol deuterado |
| CDCl₃ | Clorofórmio deuterado |
| CH₂Cl₂ | Diclorometano |
| CH₃OH | Metanol |
| CI₅₀ | Concentração inibitória média |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| cm | Centímetros |
| CPqGM | Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz |
| <i>d</i> | Dupleto |
| Da | Dalton |
| <i>dd</i> | Duplo dupleto |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| Dox | Doxorrubicina |
| EM | Espectrometria de massas |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| PXCFEH | <i>Pseudoxandra leiophylla</i> - Folhas Hextrato Hexânico |
| PXCFEM | <i>Pseudoxandra leiophylla</i> - Folhas Extrato Metanólico |
| PXCFFA | <i>Pseudoxandra leiophylla</i> - Folhas Fração Alcaloídica |
| PXCFFN | <i>Pseudoxandra leiophylla</i> - Folhas Fração Neutra |
| HCl | Ácido clorídrico |
| HepG2 | Carcinoma Hepatocelular Humano |
| HMBC | <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i> |
| HSQC | <i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i> |

| | |
|-----------------------------|---|
| Hz | Hertz |
| <i>J</i> | Constante de acoplamento |
| m | Metro |
| <i>m</i> | Multiplete |
| <i>m/z</i> | Relação massa/carga |
| HCT116 | Carcinoma de colón humano |
| MeOH | Metanol |
| MHz | Megahertz |
| mL | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| MRC-5 | Fibroblasto de pulmão humano |
| NH₄OH | Hidróxido de amônio |
| nm | Nanômetro |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| <i>R_f</i> | Fator de retenção |
| RMN ¹H | Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio |
| rpm | Rotações por minuto |
| <i>s</i> | Singleto |
| <i>t</i> | Triplete |
| TMS | Tetrametilsilano |
| v/v | Volume/volume |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| FIGURA 1: Algumas substâncias (fármacos) provenientes de produtos naturais. | 22 |
| FIGURA 2: Distribuição geográfica da família Annonaceae..... | 25 |
| FIGURA 3: Algumas espécies da família Annonaceae. | 26 |
| FIGURA 4: Estrutura química dos alcaloides bisbenzilisquinolinos isolados de espécies <i>Pseudoxandra</i> | 33 |
| FIGURA 5: Estrutura química dos alcaloides bezilisquinolinos isolados de espécies <i>Pseudoxandra</i> | 35 |
| FIGURA 6: Fórmula estrutural do alcaloide oxoaporfino isolado da espécie do gênero <i>Pseudoxandra</i> | 35 |
| FIGURA 7: Estrutura química dos alcaloides azaantracenos isolados de espécies do gênero <i>Pseudoxandra</i> | 36 |
| FIGURA 8: Características botânicas de <i>P. leiophylla</i> : (1) caule da árvore; (2) folha verde; (3) fruto em processo de amadurecimento. | 38 |
| FIGURA 9: Núcleos de alcaloides. | 39 |
| FIGURA 10: Esqueleto básico dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos..... | 41 |
| FIGURA 11: Formas da resazurina - indicador de viabilidade celular..... | 46 |
| FIGURA 12: Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de <i>P. leiophylla</i> (PXCFEM). | 69 |
| FIGURA 13: Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de <i>P. leiophylla</i> (PXCFFA). | 70 |
| FIGURA 14: Espectro de massas da fração neutra das folhas de <i>P. leiophylla</i> (PXCFFN). | 70 |
| FIGURA 15: Esqueletos dos alcaloides caracterizados nas folhas de <i>P. leiophylla</i> | 71 |
| FIGURA 16: Esqueletos dos terpenos caracterizados nas folhas de <i>P. leiophylla</i> | 72 |
| FIGURA 17: Esqueleto da lignana tetraidrofurânica caracterizada nas folhas de <i>P. leiophylla</i> | 72 |
| FIGURA 18: Espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A. | 74 |
| FIGURA 19: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A..... | 74 |
| FIGURA 20: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A..... | 75 |
| FIGURA 21: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A..... | 75 |
| FIGURA 22: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A..... | 75 |
| FIGURA 23: Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A..... | 76 |
| FIGURA 24: Espectro de RMN de ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A. | 76 |
| FIGURA 25: Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A. | 77 |
| FIGURA 26: Mapa de correlação HSQC (¹ H: 500 MHz; ¹³ C: 125 MHz; CDCl ₃ + gotas de CD ₃ OD) de PXCM-1A..... | 77 |

| | |
|---|----|
| FIGURA 27: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A. | 77 |
| FIGURA 28: Visão geral do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-1A. | 78 |
| FIGURA 29: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-1A. | 78 |
| FIGURA 30: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-1A. | 79 |
| FIGURA 31: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-1A. | 79 |
| FIGURA 32: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-1A. | 80 |
| FIGURA 33: Visão do cromatograma de íons totais e espectro de massas de PXCM-1A. | 81 |
| FIGURA 34: Fórmula estrutural da grandisina. | 82 |
| FIGURA 35: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-2A. | 83 |
| FIGURA 36: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-2A. | 83 |
| FIGURA 37: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-2A. | 84 |
| FIGURA 38: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-2A. | 84 |
| FIGURA 39: Perfil de fragmentações da substância PXCM-2A. | 86 |
| FIGURA 40: Proposta de fragmentação para o íon m/z 276 $[\text{M}+\text{H}]^+$ (PXCM-2A). | 86 |
| FIGURA 41: Fórmula estrutural da lirioidenina. | 87 |
| FIGURA 42: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-3A. | 87 |
| FIGURA 43: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 88 |
| FIGURA 44: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 88 |
| FIGURA 45: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 89 |
| FIGURA 46: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 89 |
| FIGURA 47: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 89 |
| FIGURA 48: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 90 |
| FIGURA 49: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 91 |
| FIGURA 50: Espectro de DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 91 |
| FIGURA 51: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 91 |
| FIGURA 52: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 92 |
| FIGURA 53: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A. | 92 |

| | |
|--|-----|
| FIGURA 54: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A..... | 93 |
| FIGURA 55: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A..... | 93 |
| FIGURA 56: Espectro de massas de PXCM-3A..... | 95 |
| FIGURA 57: Fórmula estrutural da loliolida. | 95 |
| FIGURA 58: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-4A. | 96 |
| FIGURA 59: Visão da região aromática ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-4A. | 97 |
| FIGURA 60: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-4A..... | 97 |
| FIGURA 61: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-4A..... | 98 |
| FIGURA 62: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A. | 99 |
| FIGURA 63: Espectro de RMN de DEPT 135 ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A. | 99 |
| FIGURA 64: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A. | 99 |
| FIGURA 65: Visão da região aromática ampliada do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A. | 100 |
| FIGURA 66: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A..... | 100 |
| FIGURA 67: Visão geral do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A..... | 101 |
| FIGURA 68: Visão do mmpliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A..... | 101 |
| FIGURA 69: Espectro de massas de PXCM-4A..... | 103 |
| FIGURA 70: Perfil de fragmentações da substância PXCM-4A. | 103 |
| FIGURA 71: Proposta de fragmentação para o íon m/z 268 (PXCM-4A). | 104 |
| FIGURA 72: Fórmula estrutural da assimilobina. | 104 |
| FIGURA 73: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-5A. | 105 |
| FIGURA 74: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-5A..... | 105 |
| FIGURA 75: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-5A..... | 106 |
| FIGURA 76: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-5A..... | 106 |
| FIGURA 77: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de PXCM-5A. | 107 |
| FIGURA 78: Visão ampliada do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-5A. | 107 |
| FIGURA 79: Visão ampliada do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-5A | 107 |
| FIGURA 80: Visão ampliada do espectro de DEPT 135 (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-5A. | 108 |
| FIGURA 81: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) e DEPT 135 de PXCM-5A. | 108 |
| FIGURA 82: Estrutura da breina e maniladiol. | 110 |
| FIGURA 83: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A. | 111 |

| | |
|---|-----|
| FIGURA 84: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A. | 111 |
| FIGURA 85: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A. | 111 |
| FIGURA 86: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A. | 112 |
| FIGURA 87: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A. | 112 |
| FIGURA 88: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A. | 113 |
| FIGURA 89: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) e DEPT 135 de PXCM-6A. | 113 |
| FIGURA 90: Estrutura do ácido heínico. | 114 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| TABELA 1: Reunião das frações obtidas do fracionamento de PXCFFA. | 55 |
| TABELA 2: Agrupamento das frações obtidas do fracionamento de PXCFFA3-4..... | 57 |
| TABELA 3: Classes de alcaloides identificados nas folhas de <i>P. leiophylla</i> | 72 |
| TABELA 4: Classes de terpenoides identificados nas folhas de <i>P. leiophylla</i> | 72 |
| TABELA 5: Classes de lignoides identificados nas folhas de <i>P. leiophylla</i> | 73 |
| TABELA 6: Total de massa das substâncias extraídas e caracterizadas das folhas de <i>P. leiophylla</i> | 73 |
| TABELA 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PXCM-1A. | 80 |
| TABELA 8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PXCM-2A. | 84 |
| TABELA 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de PXCM-3A..... | 94 |
| TABELA 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de PXCM-4A..... | 102 |
| TABELA 11: Dados de RMN de ^{13}C de PXCM-4A..... | 109 |
| TABELA 12: Dados de RMN de ^{13}C em comparação com os dados da literatura de PXCM-6A. | 113 |
| TABELA 13: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para os extratos e frações de <i>P. leiophylla</i> | 116 |
| TABELA 14: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para as substâncias isoladas de <i>P. leiophylla</i> | 117 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|---|----|
| QUADRO 1: Espécies de Annonaceae que apresentaram atividade biológica..... | 28 |
| QUADRO 2: Terpenos e lignoides identificadas na família Annonaceae. | 29 |
| QUADRO 3: Alcaloides bisbenzilisquinolinos isolados de espécies de <i>Pseudoxandra</i> | 32 |
| QUADRO 4: Alcaloides bezilisquinolinos isolados de espécies do gênero <i>Pseudoxandra</i> . . | 34 |
| QUADRO 5: Alcaloide oxoaporfino isolado de espécie de <i>Pseudoxandra</i> | 35 |
| QUADRO 6: Alcaloides azaantracenos isolado de espécies de <i>Pseudoxandra</i> | 36 |

LISTA DE ESQUEMAS

| | |
|---|----|
| ESQUEMA 1: Rota biosintética de terpenoides. | 30 |
| ESQUEMA 2: Rota biosintética de lignanas..... | 31 |
| ESQUEMA 3: Formação de iminas e reação de Mannich. | 40 |
| ESQUEMA 4: Rota biosintética de alcaloides benziltetraidroisoquinolinos. | 42 |
| ESQUEMA 5: Rota biosintética dos alcaloides aporfinos. | 43 |
| ESQUEMA 6: Biossíntese dos alcaloides oxoaporfinos. | 43 |
| ESQUEMA 7: Preparação dos extratos orgânicos das folhas de <i>P. leiophylla</i> | 51 |
| ESQUEMA 8: Fluxograma da obtenção dos extratos pelo método de maceração. | 52 |
| ESQUEMA 9: Fluxograma geral do tratamento ácido-base do extrato metanólico de <i>P. leiophylla</i> | 54 |
| ESQUEMA 10: Fluxograma do fracionamento cromatográfico de PXCFFA. | 55 |
| ESQUEMA 11: Isolamento e purificação de PXCFFA3-4.C. | 58 |
| ESQUEMA 12: Isolamento e purificação de PXCFF3-4.DE. | 59 |
| ESQUEMA 13: Isolamento e purificação de PXCFF3-4.F. | 60 |
| ESQUEMA 14: Isolamento e purificação de PXCFFA6. | 61 |
| ESQUEMA 15: Frações PXCFFA7. | 62 |
| ESQUEMA 16: Isolamento e purificação de PXCFFA8-9. | 63 |
| ESQUEMA 17: Isolamento e purificação de PXCFFA14. | 64 |
| ESQUEMA 18: Isolamento e purificação de PXCFFA18. | 65 |
| ESQUEMA 19: Ensaio de citotoxicidade. | 67 |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 21 |
| 2. OBJETIVOS | 24 |
| 2.1 Objetivo geral:..... | 24 |
| 2.2 Objetivos específicos: | 24 |
| 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA | 25 |
| 3.1 A família Annonaceae..... | 25 |
| 2.1.1 Terpenos e lignoides..... | 28 |
| 3.2 O Gênero <i>Pseudoxandra</i> R. E. Fries | 31 |
| 3.2.1 Aspectos Gerais..... | 31 |
| 3.2.2 Aspectos Químicos..... | 32 |
| 3.2.3 Aspectos Farmacológicos..... | 36 |
| 3.3 A espécie <i>Pseudoxandra leiophylla</i> (Diels) | 37 |
| 3.4 Alcaloides: Definição e Biossíntese | 38 |
| 3.4.1 Biossíntese dos Alcaloides Aporfinoides | 40 |
| 3.5 Ensaio de citotoxicidade | 44 |
| 4. METODOLOGIA | 47 |
| 4.1 Cromatografia em coluna (CC) | 47 |
| 4.2 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) | 47 |
| 4.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) | 47 |
| 4.4 Gel de sílica 60 impregnada com NaHCO ₃ | 47 |
| 4.5 Reveladores | 48 |
| 4.6 Solventes | 48 |
| 4.7 Equipamentos | 48 |
| 4.8 Coleta do material vegetal..... | 50 |
| 4.9 Preparo dos extratos | 50 |
| 4.10 Tratamento ácido-base do extrato metanólico..... | 52 |
| 4.11 Fracionamento cromatográfico da fase alcaloídica (PXCFFA) | 54 |
| 4.12 Isolamento | 56 |
| 4.12.1 Frações PXCFFA3-4 | 56 |
| 4.12.2 Frações PXCFFA3-4.C | 57 |
| 4.12.3 Frações PXCFFA3-4.DE..... | 58 |
| 4.12.4 Frações PXCFFA3-4.F..... | 59 |
| 4.12.5 Frações PXCFFA6 | 60 |
| 4.12.6 Frações PXCFFA7 | 61 |
| 4.12.7 Isolamento e purificação de PXCFFA8-9 | 62 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 4.12.8 | Frações PXCFFA14 | 63 |
| 4.12.9 | Frações PXCFFA18 | 64 |
| 4.13 | Estudo da atividade citotóxica das folhas de <i>P. leiophylla</i> | 65 |
| 4.13.1 | Preparo das amostras | 65 |
| 4.13.2 | Células..... | 65 |
| 4.13.3 | Ensaio de citotoxicidade..... | 66 |
| 5. | RESULTADOS E DISCUSSÕES | 69 |
| 5.1 | Análise de substâncias nitrogenadas no extrato metanólico, fração neutra e fração alcaloídica por espectrometria de massas..... | 69 |
| 5.2 | Caracterização estrutural das substâncias isoladas das folhas de <i>P. Leiophylla</i> | 71 |
| 5.2.1 | Caracterização estrutural de PXCM-1A..... | 73 |
| 5.2.2 | Caracterização estrutural de PXCM-2A..... | 82 |
| 5.2.3 | Caracterização estrutural de PXCM-3A..... | 87 |
| 5.2.4 | Caracterização estrutural de PXCM-4A..... | 96 |
| 5.2.5 | Caracterização estrutural de PXCM-5A..... | 104 |
| 5.2.6 | Caracterização estrutural de PXCM-6A..... | 110 |
| 5.3 | Investigação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> pelo Ensaio Alamar Blue..... | 115 |
| 6. | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 119 |
| 7. | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 120 |

1. INTRODUÇÃO

A prática da fitoterapia está presente desde muito tempo na vida da humanidade, empregada como uma maneira de prevenção e cura de diversas doenças e enfermidades, atividade esta a qual tem-se evoluído cada vez mais com o passar dos anos. Mesmo com os avanços farmacológicos, a utilização de plantas para uso medicinal de modo popular ainda ocorre em elevada escala, na qual cerca de 65% da população mundial faz uso de plantas para tratamentos de diversas enfermidades, sendo por fins culturais, baixo custo econômico ou até mesmo pela facilidade de acesso (HYACIENTH & ALMEIDA, 2015; SANTOS et al., 2011; COSTA et al., 2018).

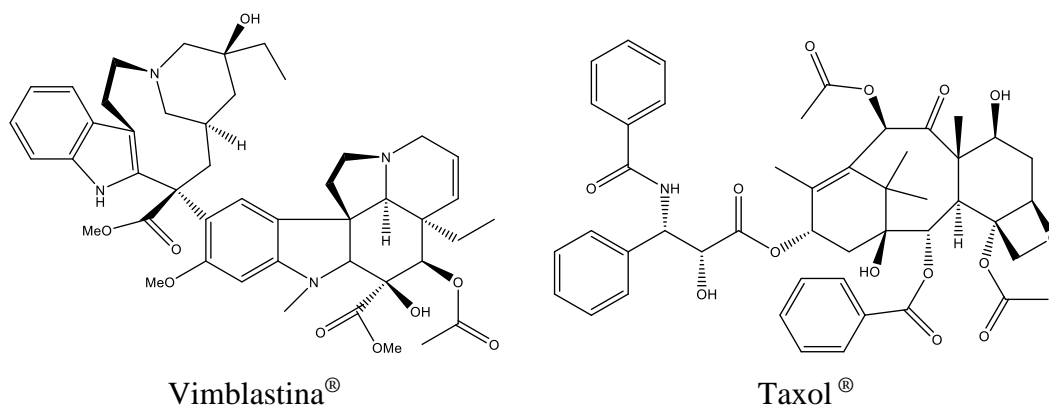
A automedicação acontece inúmeras vezes sem o conhecimento sobre os índices de toxicidade das plantas. De tal modo, por conta do seu uso continuado, a OMS (Organização Mundial da Saúde) autenticou de forma oficial, a utilização de plantas medicinais, assim como medicamentos fitoterápicos para o tratamento de doenças. No Brasil, mais de 350 mil espécies de plantas foram identificadas e dessas, cerca de 10 mil apresentam alguma propriedade medicinal. A partir de então, existe uma tendência de nível global em prol da defesa, estímulo e inclusão da fitoterapia nos programas de pesquisa, de forma que vem incentivar o desenvolvimento desse estudo, buscando futuras formas de aplicações na medicina (CARELLI et al., 2011; COSTA et al., 2018; BENTO et al., 2016).

A ocorrência do efeito de inibição de doenças a partir dos princípios ativos das plantas acontece por meio da atividade de uma variedade de metabólitos que são produzidos por esses vegetais, sendo estes de caráter essencial e não essencial, que ocorrem para assegurar a vida desses vegetais em determinado ambiente. Os metabólitos primários estão atrelados a respiração e fotossíntese dos vegetais, enquanto que os metabólitos secundários, os não essenciais, que atribuem à esses organismos, dentre outras funções, a função protetora em relação à estresses abióticos (PEREIRA, 2012; WOLFENDER et al., 2013).

Os metabólitos secundários compreendem as classes de alcaloides, terpenoides, esteroides, flavonoides, acetogeninas, lignanas, cumarinas, dentre outros (DEWICK, 2009). Muitos destes metabólitos secundários, estão sendo empregados no âmbito medicinal como modelo para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos por conta das inúmeras propriedades biológicas que apresentam, na qual foram comprovadas no decorrer dos anos. Como resultado, um grande número des substâncias isoladas a partir de plantas têm-se empregado como fármacos comercializados em grande escala, como Vimblastina[®],

vincristina[®] e vindesina[®], medicamentos utilizados para o tratamento terapêutico da leucemia linfoblástica aguda, desenvolvidos com base no extrato de *Catharanthus roseus* (L) G. Don. Pode-se também citar os medicamentos Marinol[®] e Cesamet[®] desenvolvidos a partir de pesquisas com espécies do gênero *Cannabis*, empregados para tratar de vômitos e náuseas provenientes dos tratamentos quimioterápicos, além do Taxol[®], desenvolvido a partir de *Taxus brevifolia* Nutt, dentre outros como Velban[®], Oncovin[®] Paclitaxel[®], docetaxe[®], Etoposídeo[®], teniposídeo[®], Eldisine[®], Navelbine[®], Taxotere[®], Etopophos[®], Vumon[®] e Hycamtin[®] (FIGURA 1). (NEWMAN & CRAGG, 2000; CRAGG & NEWMAN, 2005; COSTA-LOTUFO et al., 2010; DAVID et al., 2015; PRATA & CAES, 2016).

FIGURA 1: Algumas substâncias (fármacos) provenientes de produtos naturais.



Estima-se que aproximadamente 87% de todas as doenças conhecidas e presentes na atualidade podem ser tratadas com medicamentos oriundos de produtos naturais, mesmo as doenças causadas por bactérias, parasitas e também alguns tipos de câncer. Em um período de vinte anos, foram obtidos cerca 175 novos compostos no mercado farmacêutico direcionados para o tratamento do câncer, sendo um total de 75% inspirados em plantas (NEWMAN & CRAGG, 2016).

Na flora Amazônica, dentre as diversas famílias estudadas afim de extrair esses componentes por conta de suas propriedades medicinais, encontra-se a Annonaceae, que apresenta algumas aplicações na medicina tradicional, devido a atividade proveniente de seus metabólitos secundários, especialmente os adivindos das classes dos alcaloides, terpenoides e as acetogeninas (SOARES, 2014).

Recentemente, estudos realizados com espécies dessa família têm comprovado o seu potencial biológico, inclusive no combate às células cancerígenas (MOGHADAMTOUSI et al., 2015; QUINTANS et al., 2013). Tratando de espécies com potencial biológico, destaca-se a espécie *Annona muricata* L. que encontrou-se a substância eugenol (anticâncer), além da *Annona squamosa* L. na qual foram isolados squamocin e squamostatin, ambas antitumorais e a *Annona montana* Macfad. & R. E. Fr., onde o anticâncer montanacin foi isolado de suas folhas (BIBA et al., 2014; FEITOZA, TERRA & GRASSELLI, 2021). O desenvolvimento de estudos com substâncias provenientes de produtos naturais que apresentam atividade antineoplásica, sendo estas, substâncias utilizadas no tratamento quimioterápico do câncer, mostram-se cada vez mais necessárias como uma ferramenta no combate a essa doença (INCA, 2017 e 2019; SOUZA et al., 2007).

Segundo levantamentos, mais da metade dos casos de câncer já possuem cura, na qual o tratamento pode ser realizado por meio de cirurgias, radioterapia ou quimioterapia (RODRIGUES & POLIDORI, 2012). Isso explica o grande interesse nos estudos voltados para fontes de produtos naturais, tendo como objetivo o desenvolvimento de novos métodos para tratamentos mais eficientes. Com isso, uma variedade de testes tem sido desenvolvidos afim de encontrar substâncias com potencial biológico, como o Alamar Blue, um teste colorimétrico que se destaca pela sua confiabilidade, custo e eficácia nos resultados diante das atividades conferidas para determinadas amostras (ESCOBAR et al., 2009).

Nesta perspectiva, a família Annonaceae, ainda que considerada uma das mais primitivas e mais conhecidas, não se ignora a possibilidade de apresentar contribuições inéditas a respeito de estudos químicos com ênfase nos constituintes químicos biologicamente ativos de suas plantas. Dentre as espécies dessa família, encontra-se a *Pseudoxandra leiophylla* (Diels) desconhecida pela população, de modo que não há relatos na literatura a respeito de sua investigação fitoquímica e de suas propriedades farmacológicas.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral:

- Explanar o conhecimento acerca da composição química das folhas da espécie *P. leiophylla*, assim como avaliar o seu potencial citotóxico frente a diferentes linhagens de células tumorais humana.

2.2 Objetivos específicos:

- Isolar através dos métodos cromatográficos clássicos as substâncias químicas presentes no extrato metanólico das cascas de *P. leiophylla*;
- Identificar os constituintes químicos através de métodos espectroscópicos e espectrométricos;
- Avaliar a presença de substâncias nitrogenadas no extrato metanólico e suas respectivas frações alcaloídica e neutra por espectrometria de massas;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* contra diferentes células tumorais e não tumorais, dos extratos, frações e substâncias isoladas das folhas de *P. leiophylla*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 A família Annonaceae

Uma das maiores representantes da ordem Magnoliales é a família Annonaceae, possuindo cerca de 109 gêneros e aproximadamente 2500 espécies, com distribuição pantropical, ou seja, situada entre os trópicos do globo terrestre (FIGURA 2), sendo a América Central e a América do Sul o centro da sua distribuição (CHATROU et al., 2004; SILVA et al., 2009; LÚCIO et al., 2015b; KRINSKI et al., 2014; CHATROU et al., 2012). No Brasil, a família apresenta um total de 386 espécies, distribuídas em 29 gêneros, sendo a região Amazônica a região que detém de três quartos da diversidade de Annonaceae com 27 gêneros e 280 espécies. A Mata Atlântica, vem em segundo lugar, com 15 gêneros e 91 espécies. (LOPES & MELLO-SILVA, 2014).

FIGURA 2: Distribuição geográfica da família Annonaceae.



Fonte: Adaptado de http://www.thecompositaehut.com/www_tch/images/webcurso_spv/mapas/annonaceae.jpg
Acesso em 20 de junho de 2020.

As espécies da família Annonaceae são em grande maioria, formadas por árvores ou arbustos, sendo grande parte delas frutíferas, que são comumente cultivadas em certos países para fins de consumo, até mesmo no Brasil, uma vez que estas apresentam um sabor muito apreciado pela população. Das frutas cultivadas, pode-se citar as espécies do gênero *Annona*, como a *Annona montana* Macfad. (graviola da montanha), *Annona mucosa* Jacq. (biribá) e *Annona muricata* L. (graviola). Outros gêneros da família Annonaceae também apresentam frutos de grande interesse, como *Artabotrys*, *Asimina*, *Polyalthia*, *Uvaria* e *Duguetia*. As

árvores apresentam folhas inteiras, de disposição alternada dística, sem estípulas, conforme é ilustrado na FIGURA 3. Observa-se ainda que as flores são isoladas ou reunidas em inflorescências, seu tamanho pode ser grande ou pequeno. Os frutos são apocárpicos baciformes. As sementes apresentam endosperma com curto período de germinação. Além de seu uso na culinária, algumas espécies são ainda empregados na fabricação de cosméticos (JOLY, 1993; RIBEIRO et al., 1999; FORMAGIO et al., 2010; SOUZA, 2013; LOPES & MELLO-SILVA, 2014; NUNES et al., 2012; KRINSKI et al., 2014).

FIGURA 3: Algumas espécies da família Annonaceae.



Anaxagorea crassipetala Hemsl



Duguetia odorata J. F. Macbr.



Annona cherimola Mill.



Annona muricata L.



Anaxagorea panamensis Standl



Anaxagorea panamensis Standl



Hornschuchia myrtillus Nees



Annona acuminata Saff

Fonte: <https://fieldguides.fieldmuseum.org/other-idtools> . Acesso em 19 de dezembro de 2020.

A família Annonaceae é caracterizada principalmente por conta dos metabólitos secundários da classe dos alcaloides, que são compostos que possuem átomos de nitrogênio em

sua composição, de modo geral, são farmacologicamente ativos. Outras classes são comuns em espécies desta família, como os terpenos e acetogeninas. (COSTA et al., 2013). A descoberta de acetogeninas tem sido motivo nos últimos anos, por trazer muita atenção para essas plantas, na qual o interesse dos pesquisadores está atrelado às diversas atividades biológicas presentes e comprovadas, de modo particular no combate às células tumorais (PAES et al., 2016). Além das classes citadas acima, os flavonóides, catequinas, lignanas, esteroides e dentre outras substâncias também foram relatadas na família Annonaceae (NUNES et al., 2012; LÚCIO et al., 2015b).

Com uma vasta diversidade de compostos químicos relatados, as espécies da família Annonaceae vem apresentando resultados promissores frente aos ensaios de atividade biológica (antitumoral *in vitro* e *in vivo*, antimicrobiana, antioxidante, entre outras). Logo, houve um aumento gradual de estudos farmacêuticos envolvendo extratos de espécies de Annonaceae, objetivando o isolamento dos compostos químicos presentes em folhas e cascas da planta (RABELO et al., 2014a, 2014b; ALMEIDA et al., 2014). Estudos revelaram a presença de propriedades biológicas em espécies da família Annonaceae, atividades estas como antitumoral (SUN et al., 2014), antimicrobiana (ALMEIDA et al., 2014), antifúngica (LIMA et al., 2014), anti-inflamatória (SILVA et al., 2015a) e também antimalárica (PIMENTA et al., 2014). Conforme descrito anteriormente, espécies da família mostraram um potencial químico-biológico muito relevante para o tratamento de linfomas, sendo em muitos casos, utilizadas na medicina popular como produtos fitoterapêuticos (PAES et al., 2016).

Diante do que foi discutido, abaixo encontra-se listado algumas espécies que em seus estudos, apresentaram atividade biológica (QUADRO 1). Os dados demonstram que estudos com a família Annonaceae sofreram um relativo aumento no decorrer dos últimos anos, mas ainda assim, apesar do conhecimento de muitas dessas espécies, apenas um valor aproximado de 7% do total de espécies da família foram investigado até o momento (LÚCIO et al., 2015).

QUADRO 1: Espécies de Annonaceae que apresentaram atividade biológica.

| Espécie | Atividade biológica | Referência |
|---|----------------------------|----------------------------|
| <i>Annona hypoglauca</i> Mart. | Citotóxica | RINALDI et al., 2016 |
| | Antibacteriana | |
| <i>Annona muricata</i> f. <i>mirabilis</i> R.E.Fr. | Anticancerígena | MOGHADAMTOUSI et al., 2015 |
| | Antiparasitária | |
| | Inseticida | |
| <i>Annona pickelii</i> Diels | Antifúngicas | COSTA et al., 2015 |
| | Antioxidantes | |
| <i>Uvaria grandiflora</i> Roxb. Ex Hornem | Antioxidante | |
| <i>Annona foetida</i> Mart. | Antimicrobiana | AZIZ et al., 2016 |
| <i>Annona cherimola</i> Miller | Antimicrobiana | |
| <i>Pseudoxandra cuspidata</i> Maas | Antimalárica | ROUMY et al., 2006 |
| <i>Xylopia laevigata</i> R.E.Fr. | Antitumoral | QUINTANS et al., 2013 |
| <i>Xylopia aromatica</i> Mart. | Citotóxica | MESQUITA et al., 2009 |
| <i>Xylopia frutescens</i> Aubl. | Antitumoral | SILVA et al., 2015b |

2.1.1 Terpenos e lignoides.

Dentre os estudos fitoquímicos realizados com as plantas da família Annonaceae, pode-se destacar duas classes de substâncias que em outros estudos foram isoladas de suas plantas, sendo elas os terpenos e lignoides (QUADRO 2).

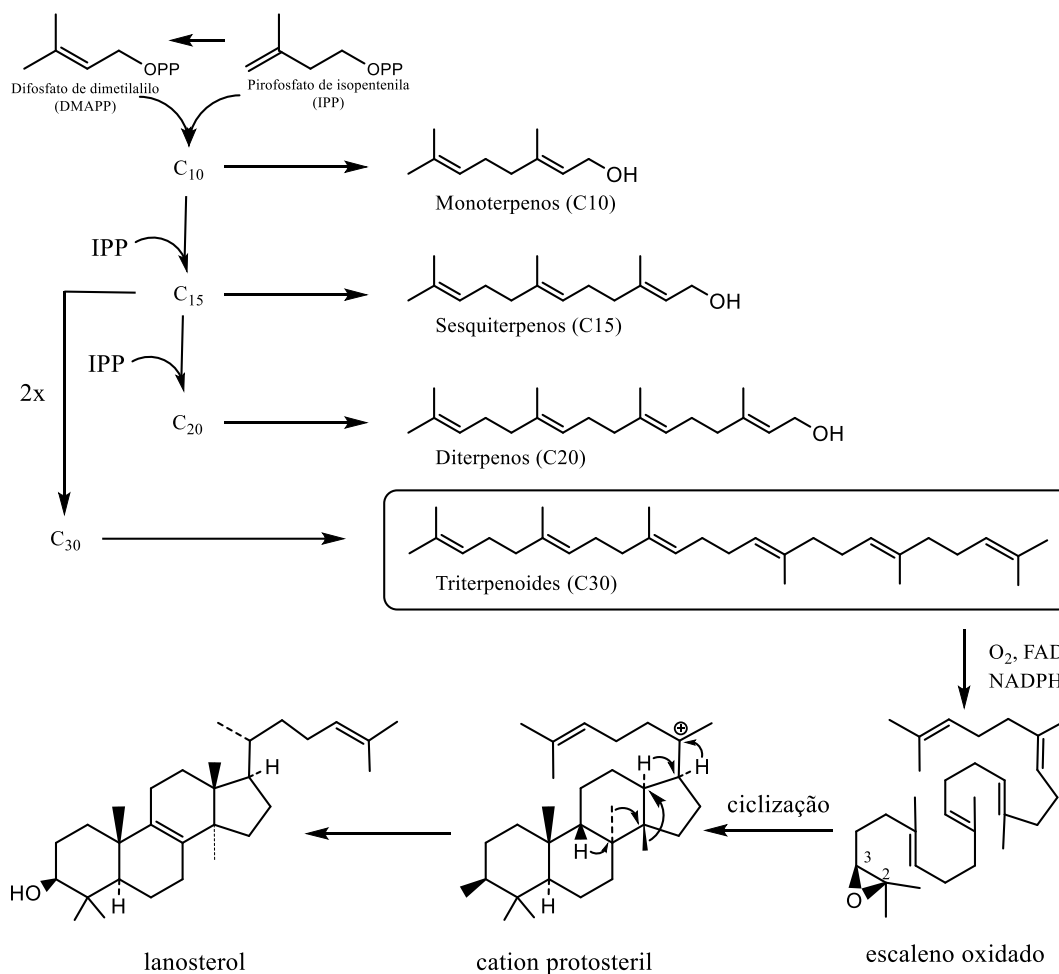
QUADRO 2: Terpenos e lignoides identificadas na família Annonaceae.

| Substância | Classe | Espécie | Referência |
|---|----------|---------------------------|---|
| 3'-metoxi-3,4-metilenedioxi-4',7-epoxi-9-nor-8,5'-neolignan-7-8'-dieno | Lignoide | <i>Anaxagorea clavata</i> | DIAZ, 1997 |
| Ácido 3'-metoxy-3,4-metilenedioxi-4',7-epoxi-9-nor-8,5'-neolignan-7-em-9'-oico | | | |
| Yangambina | | <i>Rollinia pickelii</i> | COSTA et al., 2011c |
| Eudesmina | | | |
| magnolina | | | |
| ácido <i>ent</i>-3β-hidroxi-16-cauren-19-oico | Terpeno | <i>Xylopi laevigata</i> | COSTA et al., 2011b |
| ácido <i>ent</i>-16-cauren-19-oico | | | |
| Ácido caurenico | | <i>Xylopi amazonica</i> | MARTINS et al., 1995; MOREIRA et al., 2013 |
| Beireno | | | |
| ácido 4-<i>epi</i>-caurenico | | | |
| <i>ent</i>-cauran-16β-ol | | | |

Os terpenos, ou também chamados de terpenoides, são compostos com uma grande diversidade de substâncias de origem natural, possuindo alguns subtipos estruturais como os hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, onde estes contém em sua estrutura uma quantidade de cinco, dez, quinze, vinte e trinta carbonos respectivamente, conforme pode ser observado na ESQUEMA 1.

A menor unidade dos compostos do tipo terpenos é o hemiterpeno, os demais compostos podem apresentar uma diversidade de tipos estruturais, como cadeias abertas, monocíclicas, bicíclicas, tricíclicas, tetracíclicas e pentacíclicas, assim também como aromáticas. A seguir, no ESQUEMA 1 pode-se observar a rota biosintética dos terpenos assim como de um composto do tipo triterpênico, pertencente a esta classe.

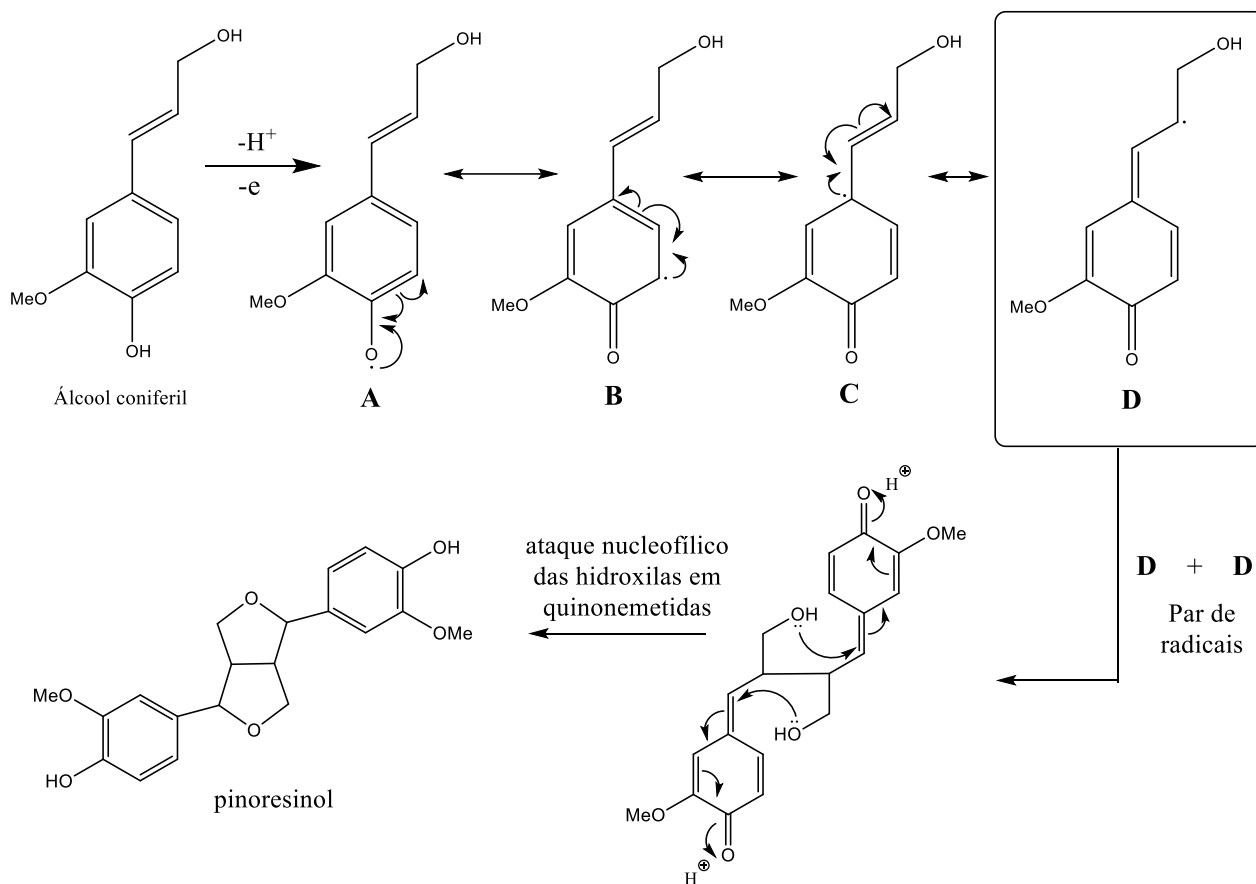
ESQUEMA 1: Rota biosintética de terpenoides.



Fonte: Adaptado de DEWICK (2009).

Outra classe de substâncias a se destacar na família annonaceae são os lignoides. Esses compostos são substâncias que possuem em sua estrutura o grupo fenil-propânico, podendo apresentar uma vasta variedade de formas estruturais de acordo com o demais aspectos estruturais que possam estar atrelados a elas. Este grupo de substância se divide em duas subclasses, sendo elas as lignanas e as ligninas. Estes compostos podem ser obtidos por meio da redução de ácidos cinâmicos via ésteres e aldeios da coenzima A, conforme pode ser observada no ESQUEMA 2.

ESQUEMA 2: Rota biosintética de lignanas.



Fonte: Adaptado de DEWICK (2009).

3.2 O Gênero *Pseudoxandra* R. E. Fries

3.2.1 Aspectos Gerais

O gênero *Pseudoxandra* não passou por nenhum estudo de revisão entre os anos de 1937 e meados dos anos 80, até que um estudo foi iniciado e destacou a presença de 22 espécies, na qual 14 delas seriam novas (MAAS & WESTRA, 2003). O gênero possui algumas características estruturais as quais permitem uma fácil identificação de suas plantas, como o caule curto e articulados das flores com duas brácteas abaixo da articulação, flores pequenas e de formato globular com pétalas côncavas, arredondadas e imbricadas, além de carpelos pontiagudos com um óvulo e placentação lateral, assim como a presença de monocarpelos globulares contendo uma única semente achatada com sulco equatorial (MAAS & WESTRA, 2003).

As plantas desse gênero têm ocorrência neotropical, sendo em sua maioria encontradas em florestas não inundadas, no entanto algumas espécies como *Pseudoxandra lucida* R. E. Fries, e *Pseudoxandra polyphleba* (Diels) R. E. Fries ocorrem em florestas temporariamente inundadas, em baixas elevações. O gênero *Pseudoxandra* foi descrito pelo botânico sueco Robert E. Fries, este por muito tempo considerado autoridade em Annonaceae. O nome ao gênero foi assim atribuído devido à sua semelhança geral com *Oxandra*, outro gênero neotropical de Annonaceae (MAAS & WESTRA, 2003).

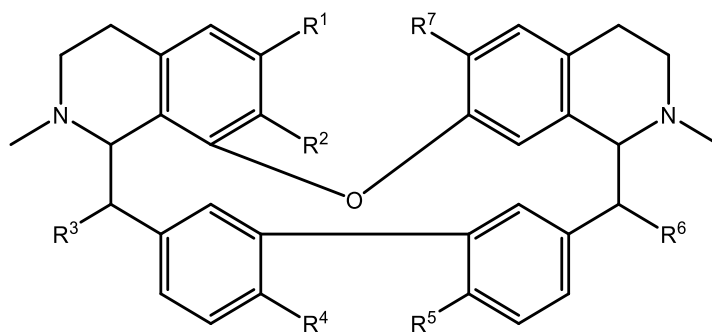
3.2.2 Aspectos Químicos

De acordo com a literatura, o gênero *Pseudoxandra* possui poucos estudos a respeito de sua composição, ou seja, pouco se sabe sobre a sua constituição química. As classes mais caracterizadas na literatura para suas espécies são os alcaloides, variando de estrutura como as do tipo bisbenzilisquinolino, benzilisquinolino e isoquinolínica. As figuras de 4 a 7 destacam uma revisão dos principais alcaloides descritos para as espécies de *Pseudoxandra* quanto ao seu estudo fitoquímico.

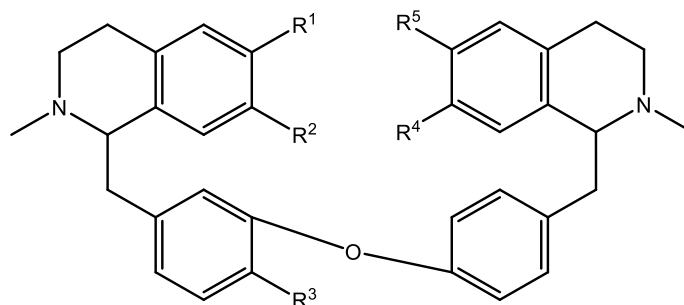
QUADRO 3: Alcaloides bisbenzilisquinolinos isolados de espécies de *Pseudoxandra*.

| Nº | Alcaloide | Parte da planta | Espécie | Referência |
|-----|--------------------|-----------------|--------------------------------------|---------------------|
| [1] | 1S,1'R - Rodiasina | Cascas | <i>Pseudoxandra cuspidata</i> Maas | ROUMY et al., 2006 |
| [2] | Oxandrinina | | | |
| [3] | Antioquina | | | |
| [4] | Pseudoxandrinina | | | |
| [5] | Oxandrina | | <i>Pseudoxandra sclerocarpa</i> Maas | PIETRO et al., 2015 |
| [6] | Berbamunina | | | |
| [7] | Taligrisina | | | |
| [8] | Secolucidina | | | |
| [9] | Medellina | | | |

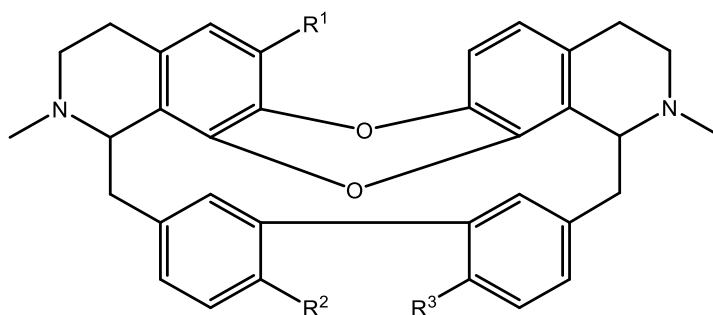
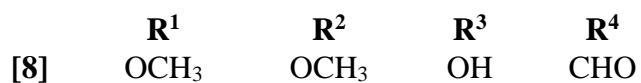
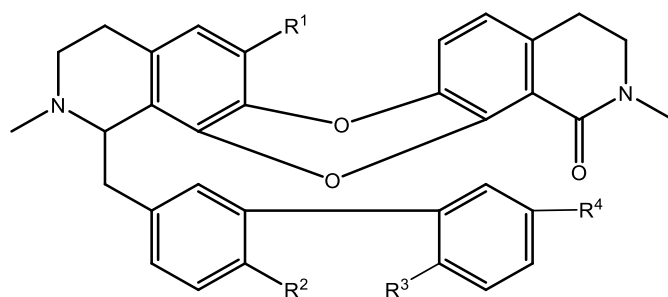
FIGURA 4: Estrutura química dos alcaloides bisbenzilisquinolinos isolados de espécies *Pseudoxandra*.



| | R¹ | R² | R³ | R⁴ | R⁵ | R⁶ | R⁷ |
|-----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| [1] | OCH ₃ | OCH ₃ | H | OCH ₃ | OH | H | OCH ₃ |
| [2] | OCH ₃ | OH | H | OCH ₃ | OCH ₃ | O | OCH ₃ |
| [3] | OCH ₃ | OH | H | OCH ₃ | OH | H | OCH ₃ |
| [4] | OCH ₃ | OCH ₃ | O | OH | OCH ₃ | H | OCH ₃ |
| [5] | OCH ₃ | OH | H | OCH ₃ | OH | O | OCH ₃ |



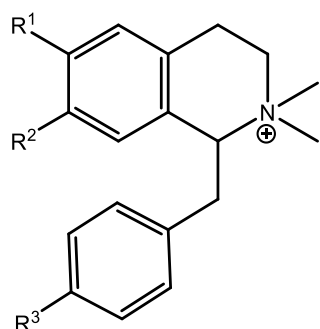
| | R¹ | R² | R³ | R⁴ | R⁵ |
|-----|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| [6] | OCH ₃ | OH | OH | CHO | OCH ₃ |
| [7] | OCH ₃ | OH | OCH ₃ | OH | OCH ₃ |



QUADRO 4: Alcaloides bezilisoquinolinos isolados de espécies do gênero *Pseudoxandra*.

| Nº | Alcaloide | Parte da planta | Espécie | Referência |
|------|--------------------------------|-----------------|-----------------------|---|
| [10] | Luxandrina | Casca | <i>P. sclerocarpa</i> | PIETRO et al., 2015; CORTES et al., 1986 |
| 11 | <i>O,O</i> -dimetilluxandrina | | | |
| 12 | <i>O,O</i> -diacetilluxandrina | | <i>P. sclerocarpa</i> | CORTES et al., 1986 |
| 13 | Magnocuranina | | | |
| 14 | <i>O</i> -dimetilluxandrina | | | |

FIGURA 5: Estrutural química dos alcaloides bezilisoquinolinos isolados de espécies *Pseudoxandra*.

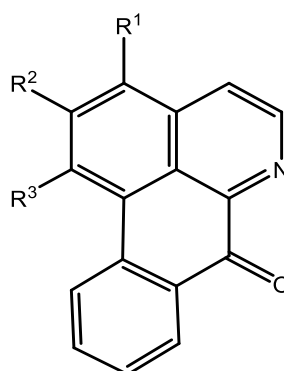


| | R¹ | R² | R³ |
|------|----------------------|----------------------|----------------------|
| [10] | OH | OH | OCH ₃ |
| [11] | OCH ₃ | OCH ₃ | OCH ₃ |
| [12] | Ac | Ac | OCH ₃ |
| [13] | OCH ₃ | OH | OH |
| [14] | OH | OH | OH |

QUADRO 5: Alcaloide oxoaporfino isolado de espécie de *Pseudoxandra*.

| Nº | Alcaloide | Parte da planta | Espécie | Referência |
|------|----------------------------|-----------------|---------------------|--------------------|
| [15] | <i>O</i> -metilmoscatolina | Cascas | <i>P. cuspidata</i> | ROUMY et al., 2006 |

FIGURA 6: Fórmula estrutural do alcaloide oxoaporfino isolado da espécie do gênero *Pseudoxandra*.

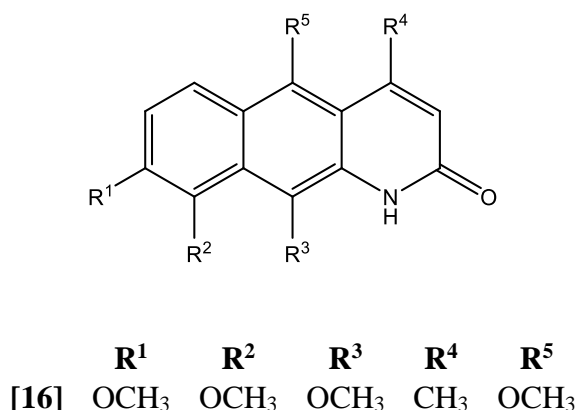


| | R¹ | R² | R³ |
|------|----------------------|----------------------|----------------------|
| [15] | OCH ₃ | OCH ₃ | OCH ₃ |

QUADRO 6: Alcaloides azaantracenos isolado de espécies de *Pseudoxandra*.

| Nº | Alcaloide | Parte da planta | Espécie | Referência |
|------|---|-----------------|---------------------|--------------------|
| [16] | 1-Aza-7,8,9,10-tetrametoxi-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroantraceno | Cascas | <i>P. cuspidata</i> | ROUMY et al., 2006 |

FIGURA 7: Estrutura química dos alcaloides azaantracenos isolados de espécies do gênero *Pseudoxandra*.



3.2.3 Aspectos Farmacológicos

Assim como os demais gêneros de Annonaceae, o gênero *Pseudoxandra* tem apresentado resultados positivos quando submetidos a estudos de atividade biológica, conforme pode ser observado a seguir.

Extratos e frações das cascas de *P. cuspidata*, quando submetidos ao ensaio plasmodium yoelli *in vivo e in vitro*, apresentaram moderada atividade antimalárica com percentual de inibição da proliferação celular de 7,0 µg.mL⁻¹ para o ensaio *in vitro*, no entanto, inibiu apenas 38% dos parasitas no ensaio *in vivo*. Com estes resultados, demonstrou-se que a espécie é promissora de substâncias com potencial atividade antimalárica (BERTANI et al., 2005). Um outro estudo envolvendo o isolamento de quatro constituintes químicos da *P. cuspidata*, demonstrou que a substância chamada rodiasina apresentou atividade antimalárica para o ensaio contra *plasmodium falciparum in vitro*, apresentando percentual de inibição da proliferação celular de 0,71 µg.mL⁻¹ para o ensaio *in vitro* além de baixa toxicidade (ROUMY et al., 2006).

Uma vez que são poucos os estudos realizados com as plantas do gênero *Pseudoxandra*, a continuidade aos estudos voltados para estes são justificados a partir do potencial biológico

observado para as plantas do gênero, em especial com a espécie *P. leiophylla*, que é endêmica da região amazônica, planta esta que não apresenta relatos de estudos químicos e biológicos na literatura, o que torna esse estudo relevante.

3.3 A espécie *Pseudoxandra leiophylla* (Diels)

Não foram encontrados relatos de estudos com a espécie *P. leiophylla* nos principais bancos de dados (Scifinder, Scopus e Web of Science) com respeito aos aspectos químicos e farmacológicas da planta, assim também como apresenta poucos estudos a respeito de suas características botânicas. A espécie possui um sinônimo, sendo este conhecido por *Pseudoxandra coriacea* R. E. Fr. Esta planta é distribuída na região Amazônica, abrangendo Colômbia, Brasil e Venezuela (MAAS & WESTRA, 2003).

Conforme pode ser observado na FIGURA 8, as árvores dessa espécie apresentam variação de 4 a 25 metros de altura e 10 a 45 cm de diâmetro, as folhas caracterizadas por terem um forte brilho, possuem pecíolos que medem 2-8 mm de comprimento por 1-2 mm de diâmetro, a lamina foliar, também chamado de limbo, mede de 10-20 por 4 -7 cm e tem coloração marrom escura ou marrom esverdeado, apresentando pêlos deprimidos nas superfícies superiores quando na fase jovem. A planta possui de 1 a 2 flores que têm coloração branco-creme, apresentam-se de forma axilares ou produzidos a partir de ramos sem folhas, no qual seus pedúnculos medem de 1 a 2 mm, assim como estes medem de 3 a 5 mm de comprimento para pedúnculos de frutificação. Os monocarpas são verdes, com maturação em amarelo, marrom, vermelho para preto, tem formato globular que mede de 2-15 mm de diâmetro. As sementes possuem formato elipsoide medindo de 4-7 mm por 7-9 mm e possuem coloração marrom brilhante. A floração ocorre entre os meses de junho e setembro e a frutificação entre outubro e novembro (MAAS & WESTRA, 2003).

FIGURA 8: Características botânicas de *P. leiophylla*: (1) caule da árvore; (2) folha verde; (3) fruto em processo de amadurecimento.



Fonte: NASCIMENTO NETO, 2019.

3.4 Alcaloides: Definição e Biossíntese

A classe dos alcaloides é um grupo de substâncias químicas de origem vegetal com propriedades alcalinas, característica a qual justifica o caráter básico, uma vez que há a presença de nitrogênio em sua estrutura. Esta classe em algumas situações também inclui substâncias com caráter neutro e até mesmo fracamente ácido (ACOSTA, 2002).

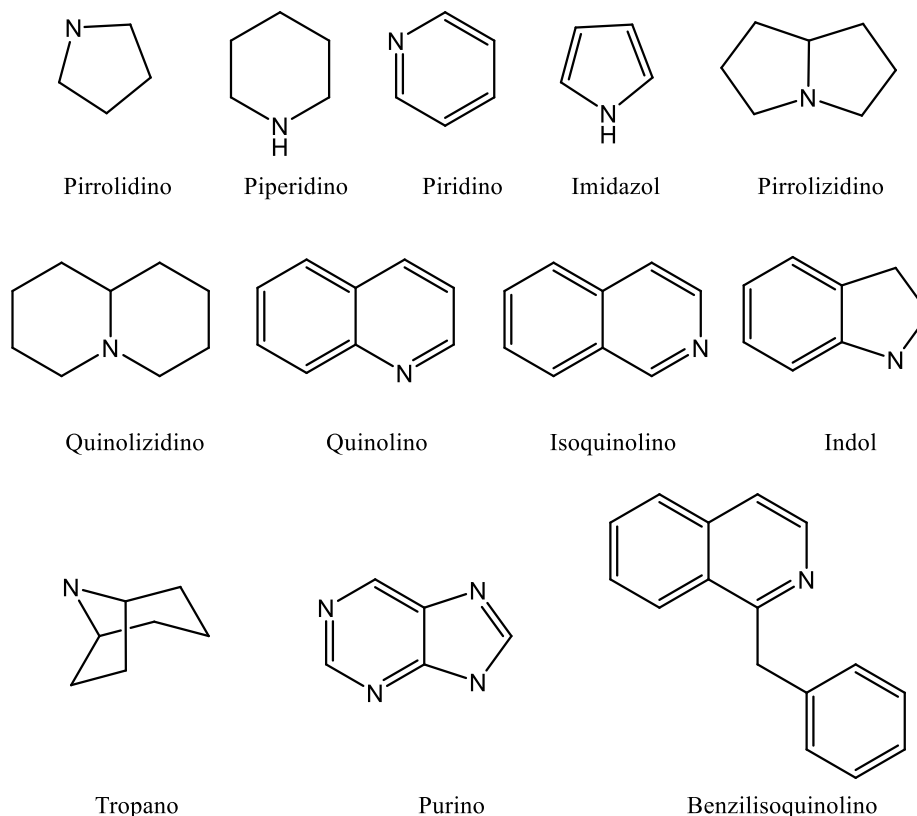
Os compostos desse grupo são originados a partir de uma grande variedade de organismos, como de bactérias, fungos, plantas e animais. Geralmente os alcaloides são tóxicos, embora tenha um grande efeito terapêutico quando ministrado em pequenas quantidades. Quando presentes nas plantas, eles estão atrelados com o sistema de defesa do organismo vegetal contra ataques de herbívoros e patógenos (antibacterianas e antifúngicas). Foi verificado que cerca de 20% das espécies de plantas possuem alcaloides em sua composição (ROY, 2017).

Sabe-se que mais de 27 mil estruturas distintas de alcaloides já foram caracterizadas até o momento. De modo geral, são bases orgânicas capazes de formar sais com substâncias ácidas. A presença do nitrogênio na estrutura confere aos alcaloides o caráter básico que é descrito na literatura, tornando assim favorável o isolamento e a purificação de muitos compostos desse

grupo, desde que favorável a formar sais solúveis quando em meio aquoso. Esse caráter básico tem grandes tendências a sofrer variações e dependem da sua estrutura molecular (ROY, 2017; DEWICK, 2009).

Os alcaloides de modo geral, são classificados conforme a natureza da estrutura que contém o elemento nitrogênio, podendo dessa forma serem considerados pirrolinos, piperidinos, piridinos, pirrolizidinos, quinolinos, isoquinolinos, indols, tropânicos, purínicos, benzilisoquinolinos, entre outros (FIGURA 9).

FIGURA 9: Núcleos de alcaloides.

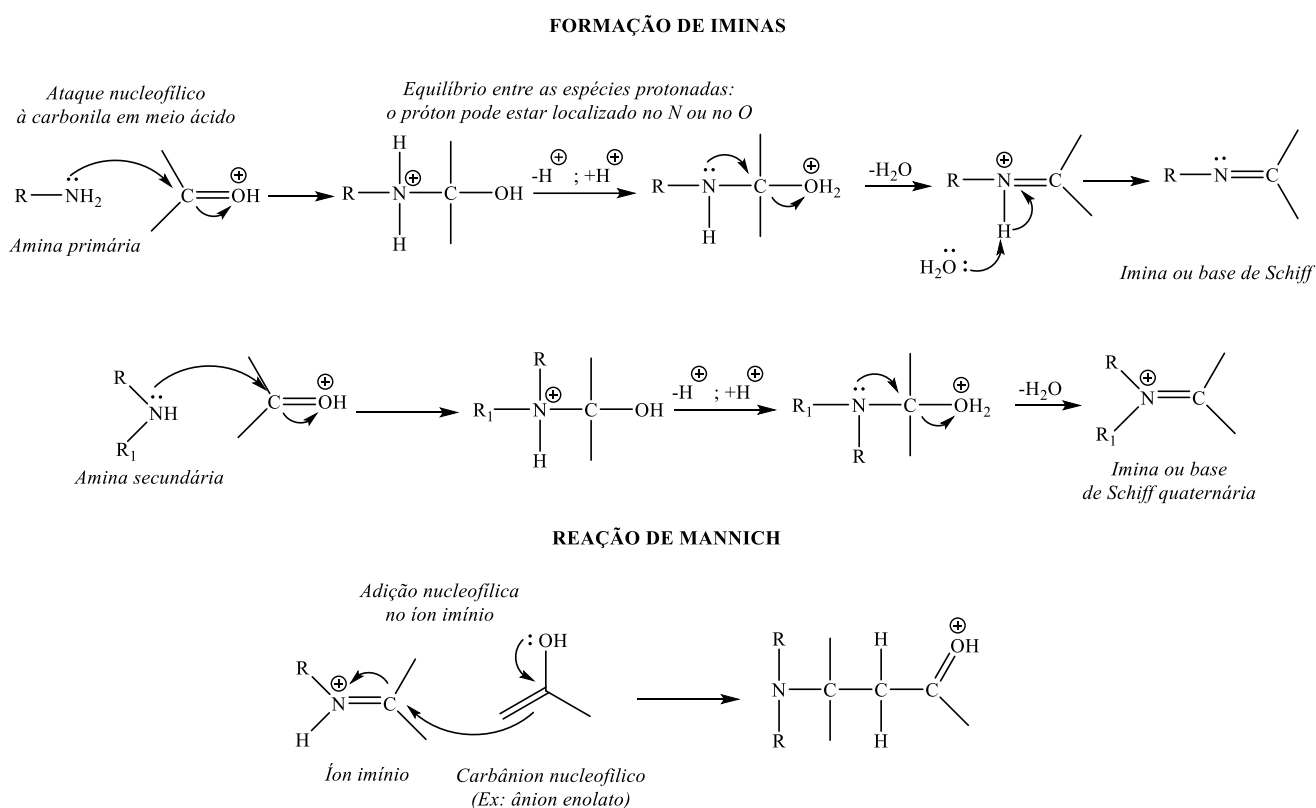


Os átomos de nitrogênio são provenientes de aminoácidos e em muitos casos, a estrutura do aminoácido precursor se mantém quase intacta no alcaloide, ainda que o carbono do ácido carboxílico seja normalmente perdido através de descarboxilação. Dessa maneira, os alcaloides podem ser subdivididos em grupos, conforme o aminoácido empregado como precursor (DEWICK, 2009).

Os principais aminoácidos e seus derivados envolvidos na biossíntese de substâncias alcaloidicas são L-ornitina, L-lisina, ácido nicotínico, L-tirosina, L-triptofano, ácido antranílico

e L-histidina. Fragmentos de outras moléculas, a partir da rota do acetato, do chiquimato, ou 4-fosfato de metileritritol também podem ser agregadas às estruturas dos alcaloides. As rotas biosintéticas traçadas estão de acordo com muitos estudos que foram desenvolvidos no decorrer dos anos, mas pode-se dizer que ainda não foram completamente descritas para muitos compostos, devido as muitas enzimas envolvidas no processo. O sistema heterocíclico desses compostos é formado normalmente através de dois mecanismos gerais: formação de iminas e reações de Mannich (ESQUEMA 3) (DEWICK, 2009).

ESQUEMA 3: Formação de iminas e reação de Mannich.



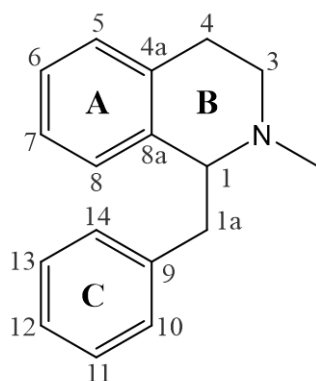
Fonte: Adaptado de DEWICK (2009).

3.4.1 Biosíntese dos Alcaloides Aporfinoides

Os aporfinoides representam um grupo ainda em expansão de alcaloides isoquinolinos. São bases tetracíclicas formadas pelo acoplamento direto dos anéis aromáticos A e C do característico núcleo benziltetraidroisoquinolino (DEWICK, 2009).

Conforme é descrito por Pelletier (1987), os precursores do esqueleto aporfino são estabelecidos como sendo 1-benziltetraidroisoquinolinos (FIGURA 10).

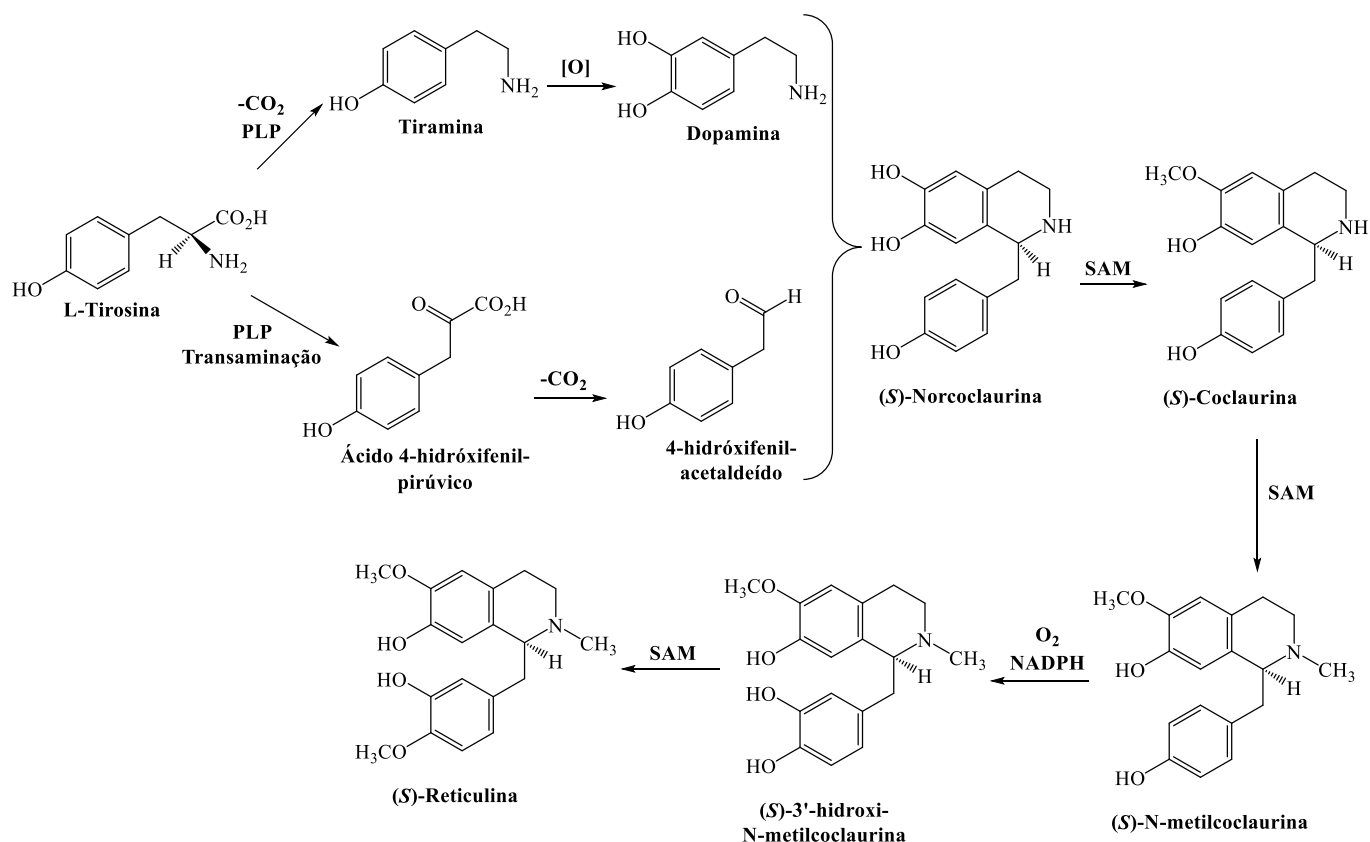
FIGURA 10: Esqueleto básico dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos.



O caminho biosintético para os alcaloides simples isoquinolinos, benzilisoquinolinos, benziltetraidroisoquinolinos, ocorre através de duas moléculas de *L*-tirosina, sendo uma delas descarboxilada para então formar o composto tiramina e que então sofre a ação da enzima fenol oxidase gerando a *L*-dopamina. O esqueleto benzil da (*S*)-norcoclaurina é gerado pela transaminação da segunda molécula de *L*-tirosina, gerando o ácido 4-hidroxifenilpirúvico que em seguida é descarboxilado, formando 4-hidroxifenilacetaldeído. A condensação da dopamina e 4-hidroxifenilacetaldeído leva a formação do composto (*S*)-norcoclaurina (COSTA, 2009).

Uma variedade de enzimas envolvidas em reações de metilação e oxidação leva a formação do intermediário benziltetraidroisoquinolino (*S*)-reticulina e (*S*)-norcoclaurina, que são precursoras dos alcaloides simples isoquinolinos e benziltetraidroisoquinolinos incluindo os compostos derivados bisbenziltetraidroisoquinolinos, benzilisoquinolinos, bisbenzilisoquinolinos, aporfinos, protoberberinos e tetraidroprotoberberinos (ESQUEMA 4) (CROTEAU et al., 2000; DEWICK, 2009; STÉVIGNY et al., 2005; FACCHINI et al., 2008a,b).

ESQUEMA 4: Rota biosintética de alcaloides benziltetraidroisoquinolinos.

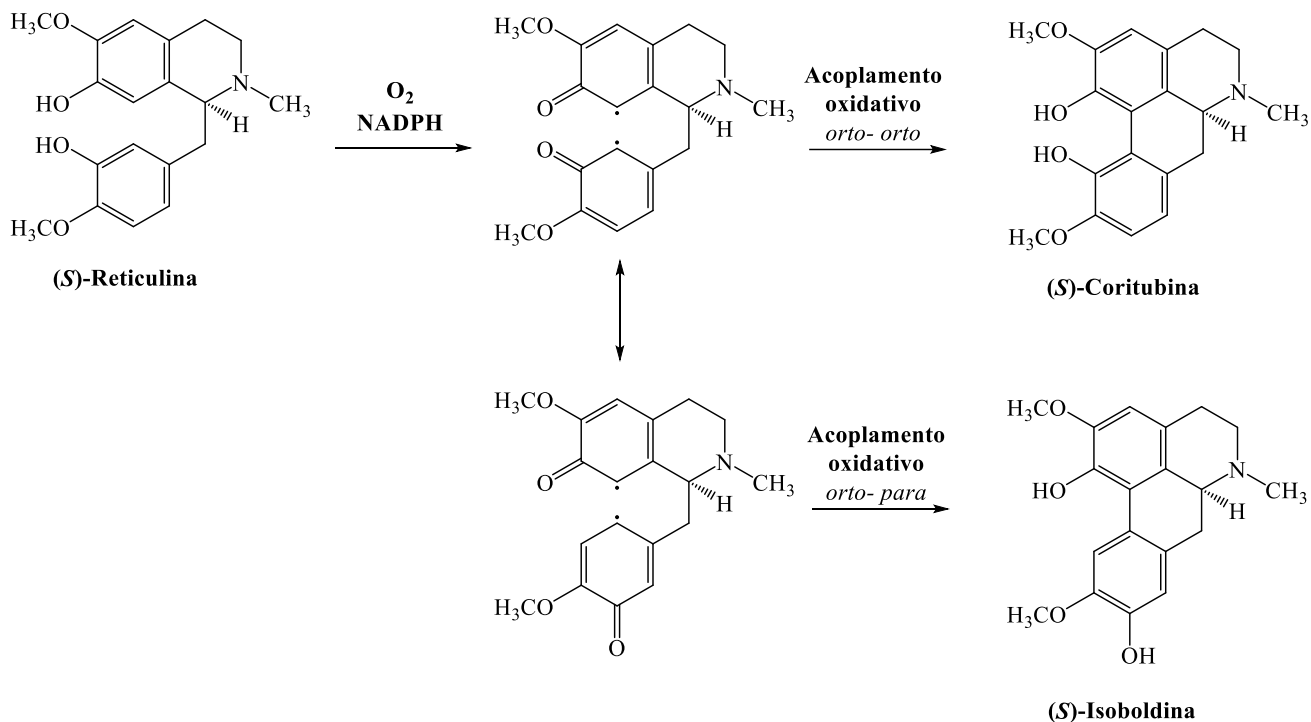


Fonte: Adaptado de DEWICK (2009).

Os alcaloides aporfinos representam o maior grupo dos aporfinoídeos dividido em quatro subgrupos: aporfinos *sensu stricto*, desidroaporfinos, 7-alkilaporfinos e os aporfinos 7-oxigenados ou ocasionalmente 4,7-dioxigenados (SHAMMA & GUINAUDEAU, 1984; COSTA, 2009).

A rota biosintética para os alcaloides aporfinos envolve o acoplamento oxidativo direto (radicais *orto-orto* ou *orto-para*) da (S)-reticulina na forma do radical *bis*-dienona (ESQUEMA 5) (STÉVIGNY et al., 2005).

ESQUEMA 5: Rota biosintética dos alcaloides aporfinos.

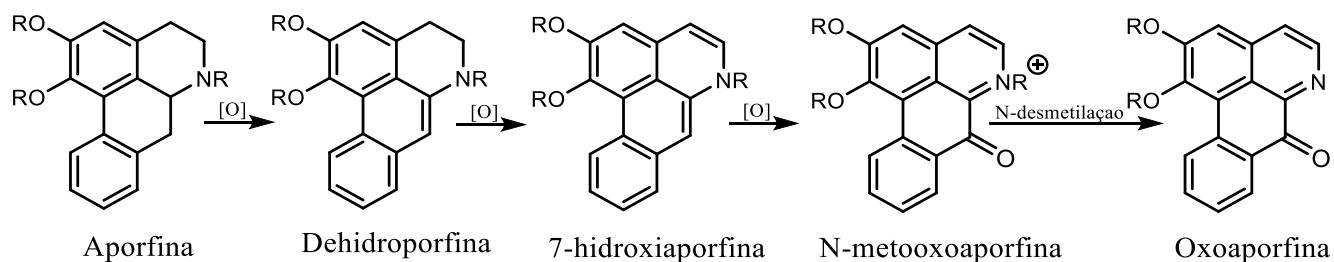


Fonte: Adaptado de DEWICK (2009).

Oxoaporfinos também é uma subclasse dos alcaloides aporfinoídes, na qual em seu núcleo estrutural apresentam uma carbonila em C-7 e também um esqueleto aporfino aromático, contendo assim um alto grau de insaturação e destaca aos compostos uma coloração amarela, laranja ou laranja avermelhada (MENEZES, 2015).

A biossíntese desses alcaloides envolve uma sequência racional de transformações, que leva um aporfino ao seu oxoaporfino correspondente através de intermediários desidroaporfinos, que são biossintetizados pela oxidação em de seus aporfinos correspondentes (ESQUEMA 6) (SHAMMA & GUINAUDEAU, 1984).

ESQUEMA 6: Biossíntese dos alcaloides oxoaporfinos.



Fonte: Adaptado de SHAMMA & GUINAUDEAU, 1984.

3.5 Ensaios de citotoxicidade

De acordo com o INCA 2019, câncer é um grupo de mais de cem doenças, responsáveis pela propagação desordenada de células que penetram os tecidos e órgãos, sendo ainda capazes de se propagarem em outras áreas do corpo. O crescimento de modo acelerado, torna possível que essas células venham a se tornar agressivas ao organismo, podendo então gerar tumores malignos.

Segundo uma pesquisa realizada pelo Instituto Nacional do Câncer (Inca), estimou-se que surgiriam cerca de 500 mil novos casos da doença até o ano de 2019. Nos quais apontam estar relacionados na maioria das vezes, ao estilo de vida adotado pelas pessoas. Atividades ditas comuns, como o tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, sedentarismo, obesidade e ainda, a exposição excessiva aos raios solares, uma vez que estando presentes em um país tropical como o Brasil, aumentam as chances de incidência desse tipo de doença. A variedade nos tipos de câncer se dá pela diversidade de células existentes no corpo, de modo que terá um desenvolvimento diferenciado para cada grupo de célula de acordo com a região na qual elas se encontram. A velocidade de propagação vem a determinar o tipo do câncer (INCA, 2019).

Na atualidade, vários tipos de câncer tem a possibilidade de cura, desde que o tratamento ocorra ainda em estágios iniciais da doença, uma vez que metade dos casos desse tipo de doenças já possuem cura, segundo o que é relatado em pesquisas. O seu tratamento pode ser realizado por meio de cirurgias, radioterapias ou quimioterapias, sendo alguns destes uma das formas mais desestimulantes para o paciente, como o caso da quimioterapia, em vista de que possui período de duração extenso, de forma que os pacientes desenvolvam diversos efeitos colaterais, como vômitos, queda de cabelo, náuseas, entre outros fatores que acabam resultando no abandono do tratamento. Dessa forma é justificado a atenção aos estudos em fontes de produtos naturais, de maneira a buscar novas formas de terapias de caráter menos agressivo, visando o bem-estar dos pacientes (RODRIGUES & POLIDORI, 2012).

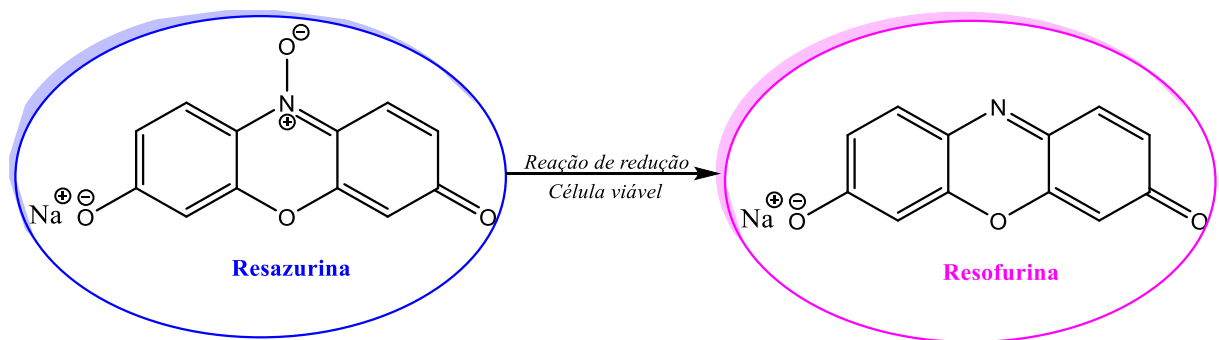
Para a maioria dos medicamentos utilizados, estes não limitam a agredir apenas as células cancerígenas, ou seja, atuam também nas células sadias do organismo do paciente, causando efeitos colaterais. Apesar de causar a redução no crescimento do tumor, não resulta na sua completa inatividade ou destruição (INCA, 2018; LI et al., 2011). Outras falhas que podem ocorrer ao se tratar dos atuais fármacos são adquirir resistência pelo tumor com o tempo de uso destes fármacos (ZHAO et al., 2013) e o reaparecimento da doença após certo período de remissão (LUKIANOVA-HLEB et al., 2012). De tal modo, estes pontos explicam

o grande interesse nos estudos voltados para fontes de produtos naturais, tendo como objetivo o desenvolvimento de novos métodos para tratamentos mais eficientes e menos agressivos aos pacientes, buscando dessa forma o bem-estar dos mesmos.

Uma variedade de testes tem sido desenvolvidos com a finalidade de encontrar substâncias com potencial citotóxico, dentre estes, os colorimétricos utilizando o método Alamar Blue, que garantem confiabilidade, baixo custo e agilidade na obtenção de resultados diante da capacidade citotóxica manifestada por certa amostra (O'BRIEN et al., 2000; ESCOBAR et al., 2009). Este ensaio tem sido largamente empregado nos últimos anos em pesquisas voltadas a viabilidade celular e citotoxicidade em uma variedade de sistemas biológicos e ambientais, os quais tem confirmado sua eficácia (RAMPERSAD, 2012). Sendo os alcaloides, terpenos e as acetogeninas, em meio a outras diversas classes de produtos naturais encontrados na família Annonaceae, esta tem evidenciado atividade citotóxica promissora frente aos estudos desenvolvidos a respeito de ensaios biológicos em plantas (KRINSKI et al., 2014).

Os ensaios colorimétricos avaliam a diminuição da proliferação celular ou citotoxicidade (CI_{50}) de uma determinada amostra em estudo. O teste colorimétrico do Alamar Blue é comumente aplicado por vários pesquisadores, por se tratar de um processo relativamente simples e que ainda assim permite a análise de um grande número de amostras, sem contar que as células empregadas podem até mesmo serem usadas novamente em outros experimentos (O'BRIEN et al., 2000; QUINTANS et al., 2013). O Alamar blue, identificado como resazurina, é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades de oxirredução. Essa substância se apresenta no estado fundamental com uma coloração de tonalidade azul não fluorescente, indicando assim, que há a presença de células não-viáveis no sistema, enquanto que a forma reduzida da substância se apresenta com coloração rósea fluorescente, de modo a indicar a presença de células viáveis (FIGURA 11). A técnica utilizando a resazurina tem sido largamente utilizada nos últimos anos em pesquisas sobre viabilidade celular e citotoxicidade em vários sistemas biológicos e ambientais (RAMPERSAD, 2012).

FIGURA 11: Formas da resazurina - indicador de viabilidade celular



Fonte: NASCIMENTO NETO, 2020.

4. METODOLOGIA

4.1 Cromatografia em coluna (CC)

Os métodos de separação cromatográficos ocorreram em coluna de vidro aberta, fazendo uso como fase estacionária sílica gel 60 com partículas medindo entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) da marca Sigma-Aldrich, onde esta foi inicialmente tratada com solução de bicarbonato de sódio 10% (NaHCO_3) conforme COSTA et al. (2006). As colunas variaram em suas dimensões conforme as massas das amostras a serem trabalhadas. A proporcionalidade de sílica empregada no processo para o empacotamento da coluna foi de acordo com a quantidade de amostra, variando de 20 à 30 vezes a quantidade de massa do produto bruto a ser purificado e de duas vezes para a preparação da pastilha (MATOS, 2009).

4.2 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

As análises cromatográficas em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel 60 da marca Fluka com indicador de fluorescência F_{254} , em suporte em alumínio de 0,2 mm de espessura.

4.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As análises cromatográficas em camada delgada preparativa ocorreram em cromatoplasmas de vidro com tamanho de 20 x 20 cm, com 1,0 mm de espessura. As placas foram preparadas adicionando-se 21g de sílica gel 60 F_{254} da Macherey-Nagel em um erlenmeyer, na qual foi adicionado água destilada a este recipiente, sendo então fortemente agitado por alguns minutos, a fim de que apresentasse fase homogênea. Em sequência, o conteúdo do erlenmeyer foi então colocado sob uma cromatoplasma de vidro, onde esta foi inicialmente limpa com acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$). O conteúdo foi espalhado sobre a placa de forma uniforme. Após secar à temperatura ambiente por um período de 48 à 72h, as placas foram ativadas em estufa com temperatura de 110 °C por um período de 1h. Para a visualização das bandas, fez-se uso de luz ultravioleta (254 nm e 365 nm). Enfim, para a recuperação das amostras utilizou-se os solventes diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (CH_3OH) e/ou a mistura destes.

4.4 Gel de sílica 60 impregnada com NaHCO_3

No estudo cromatográfico ocorrido em coluna aberta, a sílica utilizada no procedimento foi tratada com solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Cerca de 1 L de uma solução de bicarbonato de sódio 10% foi acrescentado a uma quantidade de 300 g em sílica gel 60 com

partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) da Sigma-Aldrich. Após a mistura, o conteúdo foi agitado de maneira que bolhas existentes fossem eliminadas. Em seguida, a sílica foi colocada em repouso por um período de 24 horas. A sílica foi então filtrada em um funil de Büchner para a remoção do excesso de solução de bicarbonato de sódio. Por fim, o conteúdo foi armazenado em uma cápsula de porcelana, mantida em estufa com temperatura de 180 °C até sua secagem enquanto sofria agitação frequente com afim de evitar a formação de grumos.

4.5 Reveladores

Para a revelação das faixas (*spots*) nas CCDAs e CCDPs fez-se uso de luz ultravioleta (254 nm e 365 nm), solução de anisaldeído (revelador para terpenoides) e também de reagente de Dragendorff (revelador para alcaloides).

Solução de Anisaldeído – A solução foi preparada com a adição de 5 mL de anisaldeído em 90 mL de álcool etílico, juntamente com 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e de 1 mL de ácido acético glacial.

Reagente de Dragendorff com modificação de Munier – (MUNIER, 1953 apud MERCK, 1971). Para a preparação do revelador Dragendorff, inicialmente fez-se uma solução A, que envolve 1,7 g de nitrato de bismuto III e 20,00 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada. Posteriormente uma solução B na qual é empregada 16,00 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. Com a mistura das soluções A e B em iguais proporções (1:1) constitui uma solução estoque. Para a então borrifação das placas, 5,0 mL da solução estoque foi adicionada a um total 10 g de ácido tartárico dissolvido em 50 mL de água destilada.

4.6 Solventes

Em todas a técnicas cromatográficas, foram utilizados solventes das marcas Hexis, Merck, Synth e Qhemis. Na obtenção dos espectros de RMN fez-se uso de solventes deuterados da marca Merck (Sigma-Adrich). Na obtenção dos espectros de massas foram empregados solventes de grau HPLC da marca Tédia Brasil.

4.7 Equipamentos

Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) – Os espectros de ressonância magnética nuclear das substâncias isoladas, tanto uni-dimensional quanto bi-dimensional (RMN 1D/2D) foram conferidas no aparelho Bruker Avance III 500 operando a

11,75 Teslas (500 MHz para RMN de ^1H e 125 MHz para RMN de ^{13}C) e Avance III-600 operando a 14,1 Tesla, (500 MHz para RMN de ^1H e 125 MHz para RMN de ^{13}C). As amostras foram solubilizadas em crolofórmio deuterado (CDCl_3), ou mesmo em mistura de clorofórmio com gotas de metanol deuterado (CDCl_3 + gotas de CD_3OD). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as multiplicidades dos sinais que segundo a convenção, são indicadas por: s (singleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), dt (duplo triplete) e m (multiplete). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). Como padrão de referência interno foi utilizado o tetrametilsilano (TMS), δ 0,00.

Espectrometria de Massas (EM) – Referente aos espectros de massas dos extratos, frações e substâncias isoladas, estes foram obtidos por meio de um espectrômetro LQC Fleet (Thermo Scientific) com analisador de massas do tipo *ion trap* equipado com uma fonte ionização química a pressão atmosférica (APCI), operando no modo positivo de aquisição. As informações foram registradas através do modo de aquisição contínua, disponível no LCQ Fleet Tune. Para as análises, as amostras foram diluídas a 10 ppm em solvente metanol de grau HPLC e injetadas no *looping* de 5 μL do espectrometro de massas. Fez-se uso de uma bomba ACELA 600 (Fluxo de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ de metanol de grau HPLC) para levar as amostras do *looping* até a fonte de ionização.

Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM) - As análises de CG-EM ocorreram em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo-Scientific) acoplado com um espectrômetro de massas ISQ com amostrador automatico modelo Tri Plus RSH. Fez-se uso como fase estacionária, uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30m \times 0,25 mm \times 0,25 μm espessura do filme revestida com 5%-fenil-arileno-95%-dimetilpolisiloxano. Os EM foram alcançados a 70 eV com intervalos de varredura de 0,5s e fragmentos de 40-500 Da para a substância PXCM-1A, na qual a programação do forno teve como temperatura inicial de 180 $^\circ\text{C}$ até 300 $^\circ\text{C}$ (20 $^\circ\text{C/min}$), com aplicação de isoterminia de 25 min e entrada de 250 $^\circ\text{C}$ com taxa de 35 mL/min. Para a substância PXCM-3A foram as mesmas condições anteriores, porém com fragmentos de 40-400 Da e a programação do forno teve como temperatura inicial de 240 $^\circ\text{C}$ até 280 $^\circ\text{C}$ (10 $^\circ\text{C/min}$), com aplicação de isoterminia de 2 min e entrada à 250 $^\circ\text{C}$ e taxa de 30 mL/min. As demais condições foram semelhantes às empregadas para análise por CG.

Outros equipamentos – Nos procedimentos em bancada, fez-se uso de um evaporador rotativo com banho-maria e temperatura controlada (Fisatom Brasil); estufa incubadora (DeLeo); balança analítica (Adventure Ohaus); balança semi-analítica (Adventure Ohaus); moinho (SP Labor); ultrassom (Unique) e luz ultravioleta (254 nm e 365 nm) da marca Boitton.

4.8 Coleta do material vegetal

As folhas de *P. leiophylla* foram coletadas no dia 19 de setembro de 2018 na Reserva Florestal Adolpho Ducke. A planta se encontrava em um local de mata fechada, em ambiente seco, distante de cursos de água, com coordenadas 2°53'00.0" S 59° 58'00.0" W, próxima à cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. A espécie foi identificada pelo professor Dr. Antônio Carlos Webber do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas. Para caráter de consulta, uma exsicata da espécie foi depositada no herbário (HUAM) do Departamento de Biologia da própria UFAM, com número de registro 11424. O acesso (espécime) foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob o número de registro **A7EDCD**.

4.9 Preparo dos extratos

O material coletado da espécie em estudo (folhas) foi seco em um local aberto à temperatura ambiente. Posteriormente este foi transferido para uma estufa, na qual esta permitia circulação de ar e operava à temperatura de 40 °C. Em seguida, o material seco foi moído em um moinho de facas e para determinação de sua massa, utilizou-se uma balança semi-analítica, resultando no valor de 929,15 g de folha. A material vegetal foi submetido à extração a frio pelo método de maceração (ESQUEMA 7 e 8), sendo transferido para um marlotte com adição de solventes em ordem crescente de polaridade e renovação a cada 72 horas. Inicialmente, fez-se uso de hexano, com ocorrência de oito extrações e depois o uso do solvente metanol, com 7 extrações. A cada etapa de maceração, os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à baixa pressão e temperatura entre 40-50 °C, sendo posteriormente secos em dessecador. O solvente evaporado foi reutilizado nas demais etapas da maceração, houve um gasto inicial 3 L de solvente e a cada renovação necessitou-se acrescentar mais 250 mL, gerando um gasto total de 5 L de hexano e 4,750 L de metanol. Ao fim do processo, o resíduo vegetal obtido da maceração foi descartado. Quando secos, conferiu-se uma massa de 59,1885 g do extrato heânico e 210,10 g do extrato metanólico. Uma alíquota de 0,03 g de cada extrato foi separada e enviada para a realização dos ensaios de atividade citotóxica no Instituto Gonçalo

Moniz (IGM) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do estado da Bahia (Fiocruz-BA), sob a coordenação do Dr. Daniel Pereira Bezerra.

ESQUEMA 7: Preparação dos extratos orgânicos das folhas de *P. leiophylla*.



1-Secagem do material vegetal a temperatura ambiente (24 horas).



2-Secagem em estufa de ventilação forçada a 40°C por 48 horas



3-Moagem do material vegetal em moinho de facas.



6-Extratos finais

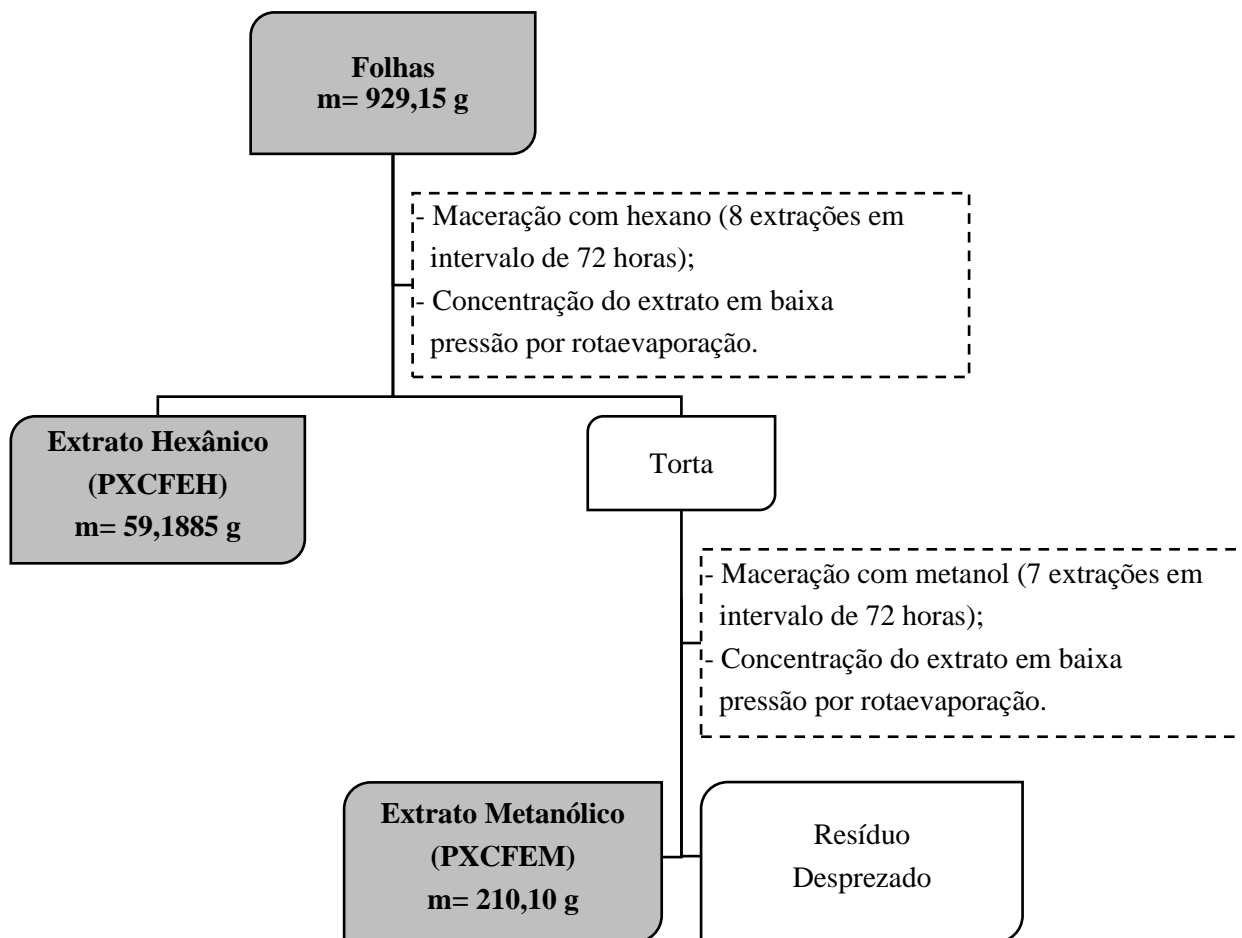


5-Concentração dos extratos em rotaevaporador rotativo com pressão reduzida



4-Maceração com solventes (hexano e metanol) com renovação a cada 72 horas

ESQUEMA 8: Fluxograma da obtenção dos extratos pelo método de maceração.



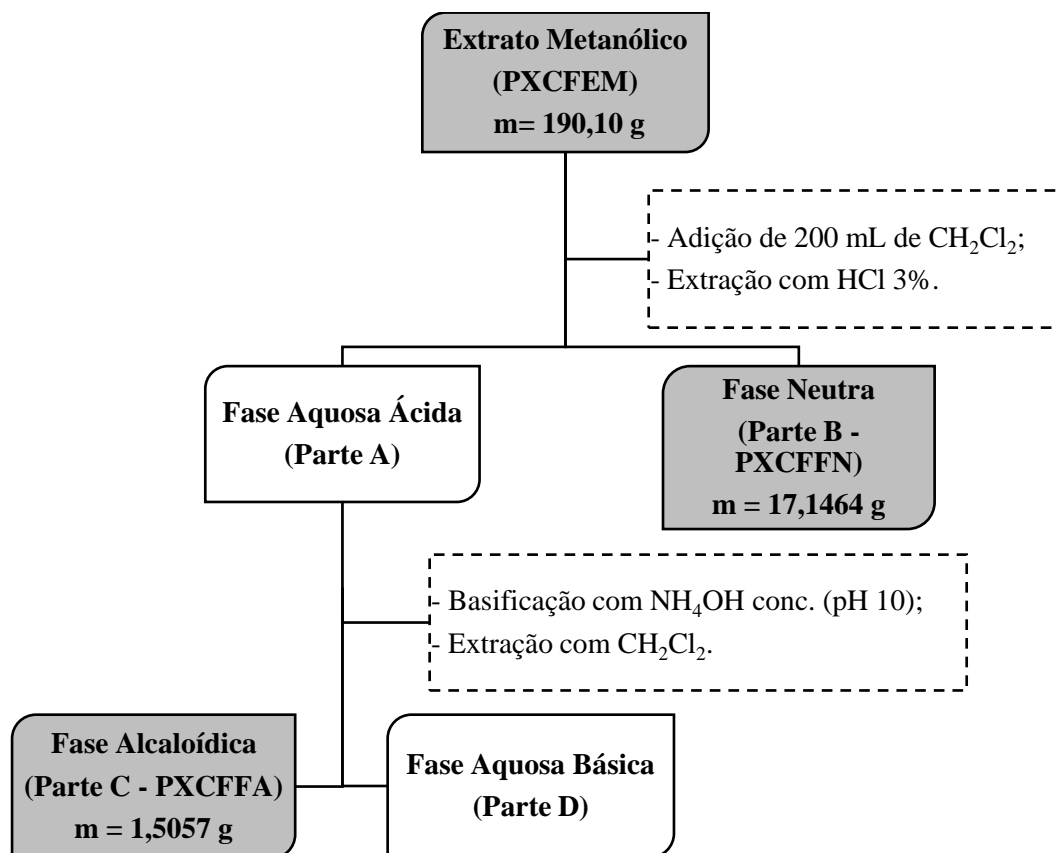
4.10 Tratamento ácido-base do extrato metanólico

Nas análises realizadas por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) do extrato metanólico, utilizando diferentes sistemas de solvente, foi possível observar a presença de constituintes nitrogenados (alcaloides) a partir do uso do revelador Dragendorff, que apresenta uma coloração alaranjada indicando a presença de substâncias nitrogenadas nas amostras, sendo estas, possíveis alcaloides. Partindo dessa análise, o extrato foi então submetido à extração ácido-base (ESQUEMA 9) de acordo com a metodologia descrita por Costa et al., (2006).

Para o procedimento, o material foi dividido em 2 porções, sendo uma de 190,10 g e outra de 20 g. Reservou-se a menor porção do extrato para futuras análises, enquanto que a maior porção (190,10 g) foi submetida ao tratamento ácido-base. Inicialmente acrescentou-se 200 mL de CH_2Cl_2 ao extrato, de modo a solubilizar parte do conteúdo, e este foi posteriormente submetido a extração sucessiva com solução de ácido clorídrico 3% v/v (HCl) com o mesmo

volume de CH_2Cl_2 (200 mL), obtendo assim duas fases, sendo a fase aquosa ácida (Parte A) e a fase neutra (Parte B). A fase aquosa ácida que apresentou pH igual a 3,0, foi separada da fase neutra e posteriormente basificada com hidróxido de amônio (NH_4OH) de modo a atingir o pH igual a 10,0, sendo em seguida submetida a sucessivas extrações com CH_2Cl_2 , formando assim duas novas fases: a fase alcaloídica (Parte C) e a fase aquosa básica (Parte D). A fase alcaloídica apresentou coloração amarelada e foi concentrada em um evaporador rotativo, enquanto que a fase aquosa básica foi descartada, conforme pode ser conferido no fluxograma abaixo.

ESQUEMA 9: Fluxograma geral do tratamento ácido-base do extrato metanólico de *P. leiophylla*.

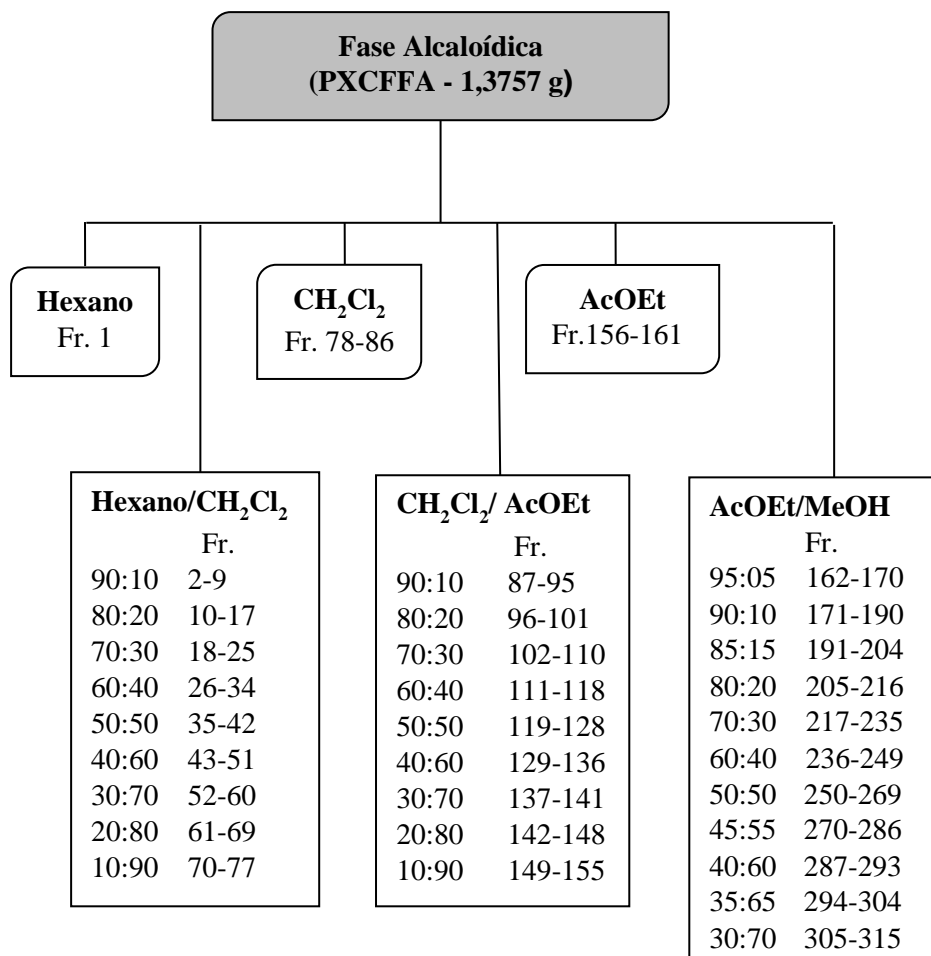


Com o fim do tratamento ácido-base, a fase alcaloídica foi submetida a cromatografia em camada delgada, tendo como eluente a mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9,5:0,5), e a partir das observações em luz UV (254 e 365 nm) e o reagente de Dragendorff, este apresentou teste positivo para substâncias nitrogenadas, ou seja, possíveis alcaloides. Após seca, a fase alcaloídica apresentou massa igual a 1,5057 g e a fase neutra massa igual a 17,1464 g. Uma alíquota de 30,0 mg da fase alcaloídica e também da fase neutra foram enviadas para a realização dos ensaios de atividade citotóxica pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Salvador - BH.

4.11 Fracionamento cromatográfico da fase alcaloídica (PXCFFA)

Parte da fração alcaloídica (PXCFFA = 1.3757 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico por cromatografia em coluna aberta (CC; $\Phi \times H$ de 2,8 \times 51,0 cm) com sílica tratada com solução de NaHCO_3 a 10%, eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente, obtendo-se 315 frações (ESQUEMA 10).

ESQUEMA 10: Fluxograma do fracionamento cromatográfico de **PXCFFA**.



Após a secagem, as frações oriundas do fracionamento foram agrupadas de acordo com as semelhanças evidenciadas pela análise por CCDA, conforme a TABELA 1. O eluente utilizado para as placas foi CH₂Cl₂/MeOH na proporção 9,5:0,5 para as frações de 1 à 155 e na proporção 9,0:1,0 para a frações de 156 à 315. A revelação foi feita com luz UV 254 e 365 nm, solução de anisaldeído e reagente de Dragendorff.

TABELA 1: Reunião das frações obtidas do fracionamento de **PXCFFA**.

| Frações | Grupo de frações PXCFFA | Massa (mg) |
|---------|-------------------------|------------|
| 1 | 1 | 3,0 |
| 2 | 2 | 0,8 |
| 3-19 | 3-4 | 414,0 |
| 20-23 | 5 | 38,5 |
| 24-37 | 6 | 73,4 |
| 38-51 | 7 | 49,4 |

| | | |
|---------|-------|-------|
| 52-78 | 8-9 | 62,6 |
| 79-105 | 10-12 | 63,8 |
| 106-129 | 13 | 13,2 |
| 130-132 | 14 | 40,9 |
| 133-147 | 15 | 7,7 |
| 148-155 | 16 | 0,9 |
| 156-167 | 17 | 9,2 |
| 168-174 | 18 | 51,7 |
| 175-185 | 19-20 | 85,8 |
| 186-193 | 21 | 35,7 |
| 194-221 | 22 | 122,8 |
| 222-257 | 23 | 196,0 |
| 258-293 | 24 | - |
| 294-315 | 25 | - |

4.12 Isolamento

Os grupos de frações foram selecionados para isolamento de acordo com o perfil observado nas CCDAs. Os que vieram a apresentar boa resolução e fatores de retenção bem distintos, possibilitando a separação por CCDF, foram selecionados para isolamento.

4.12.1 Frações PXCFFA3-4

De modo a melhorar a separação dos componentes em mistura, o grupo de frações **PXCFFA3-4** (414,0 mg) foi submetido ao fracionamento cromatográfico por cromatografia em coluna aberta (CC; Φ x h de 2,5 x 40,0 cm) com sílica tratada com solução de NaHCO₃ a 10%, eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente, obtendo-se 164 frações.

Após a secagem, as frações oriundas do fracionamento cromatográfico foram agrupadas conforme as semelhanças evidenciadas pelas análises por CCDA (TABELA 2). O eluente utilizado para as placas foi CH₂Cl₂:MeOH (95:05). A revelação foi feita com luz UV 254 nm e 365 nm, solução de anisaldeído e reagente de Dragendorff.

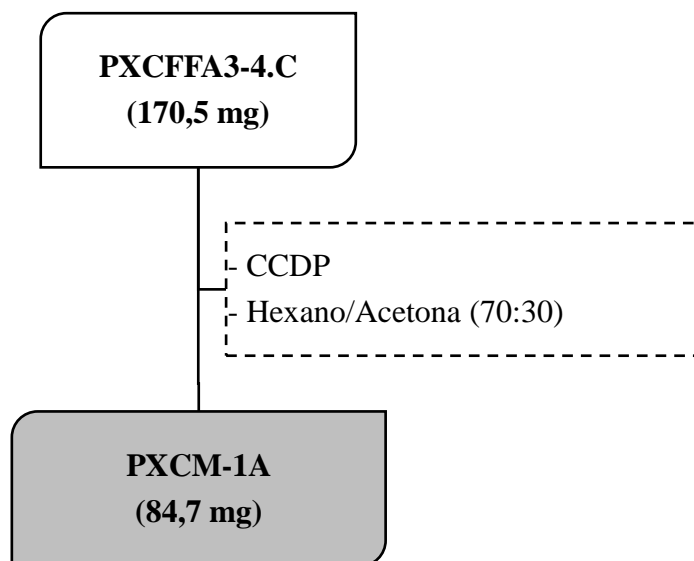
TABELA 2: Agrupamento das frações obtidas do fracionamento de **PXCFFA3-4**.

| Frações | Grupo de frações PXCFFA3-4 | Massa (mg) |
|---------|----------------------------|------------|
| 1-6 | A | 4,6 |
| 7-13 | B | 33,6 |
| 14-28 | C | 170,5 |
| 29-47 | DE | 64,9 |
| 48-53 | F | 180,1 |
| 54-76 | GH | 16,6 |
| 77-90 | I | - |
| 91-164 | J | - |

4.12.2 Frações PXCFFA3-4.C

Com o resultado obtido pela análise por CCDA, o grupo de frações **PXCFFA3-4.C** (170,5 mg) foi selecionado para o isolamento, onde de acordo com o ESQUEMA 11, foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Esta amostra foi dividida em duas partes devido sua massa, de modo que duas CCDP's foram empregadas. As placas cromatográfica foram eluidas quatro vezes, tendo como eluente uma mistura de hexano/acetona (70:30), e reveladores a luz UV (254 nm e 365 nm) e o reagente de Dragendorff, rendendo uma amostra codificada como PXCf3-4.C2, na qual foi denominada a substância de código **PXCM-1A**. Esta foi extraída da sílica com uma mistura dos solventes CH₂Cl₂:MeOH (9,5:0,5), sendo posteriormente filtrada a vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporada e pesada. A amostra foi submetida a análises por CCDA utilizando como eluente CH₂Cl₂:MeOH (95:05), no qual foi possível observar a presença de um único *spot* para PXCM-1A quando reveladas com reagente de Dragendorff e Anisaldeído, bem como quando submetidas a irradiação de luz ultravioleta em 254 e 365 nm. A amostra foi então encaminhada para análise por EM e RMN.

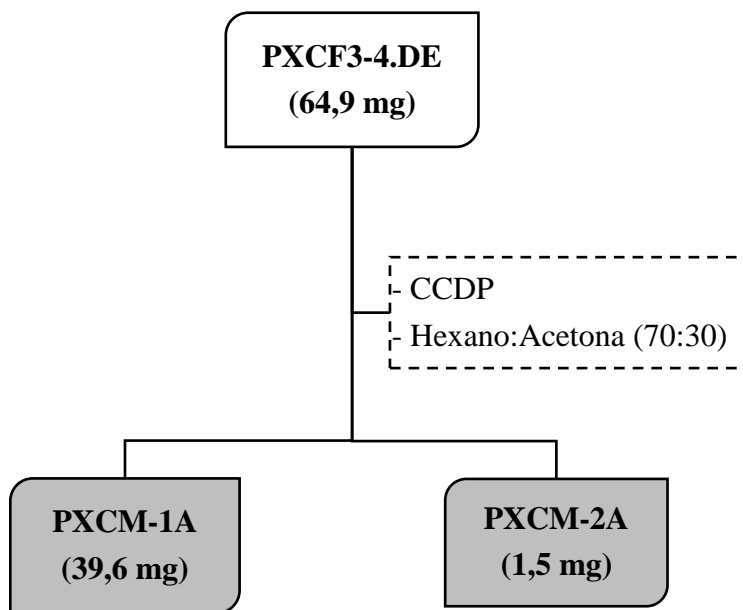
ESQUEMA 11: Isolamento e purificação de PXCFFA3-4.C.



4.12.3 Frações PXCFFA3-4.DE

De acordo com o ESQUEMA 12, o grupo de frações **PXCFFA3-4.DE** (64,9 mg) também foi submetido à CCDP, sendo a placa eluída quatro vezes com uma mistura de hexano/acetona (70:30), assim como revelada com luz UV (254 nm e 365 nm) e reagente de Dragendorff, rendendo três amostras. As substâncias **PXCМ-1A** (PXCf3-4.DE1) e **PXCМ-2A** (PXCf3-4.DE3) foram extraídos da sílica com uma mistura dos solventes CH₂Cl₂:MeOH (95:05), sendo posteriormente filtrados a vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporados e pesados. As amostras foram submetidas a análise por CCDA utilizando como eluente hexano:acetona (70:30) e observou-se a presença de apenas um único *spot* quando reveladas com reagente de Dragendorff e Anisaldeído, bem como quando submetidos a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm e 365 nm. As amostras foram encaminhadas para análise por EM e RMN.

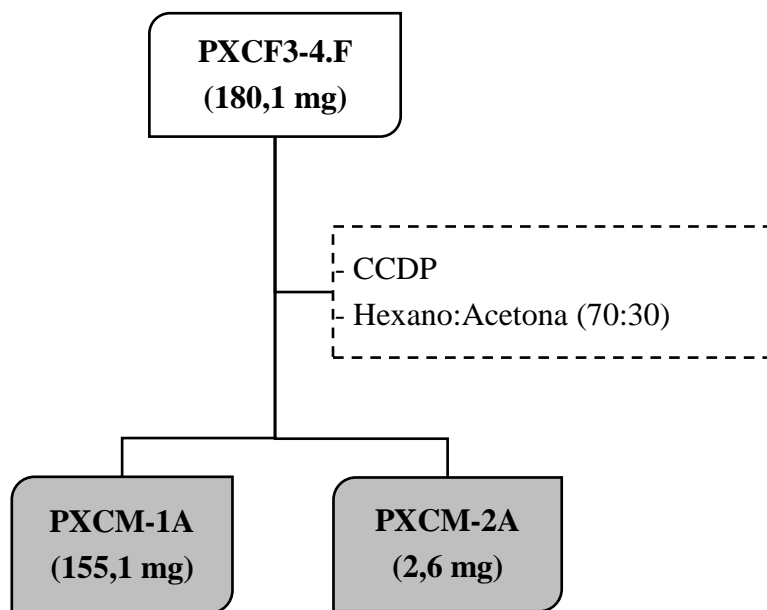
ESQUEMA 12: Isolamento e purificação de **PXCF3-4.DE**.



4.12.4 Frações **PXCFFA3-4.F**

De acordo com o ESQUEMA 13, o grupo de frações **PXCFFA3-4.F** (180,1 mg) foi repartido devido sua elevada massa, de modo que duas placas foram empregadas para serem submetidas à CCDP, na qual foram eluídas quatro vezes com uma mistura de hexano/acetona (70:30), sendo reveladas com luz UV (254 nm e 365 nm) e reagente de Dragendorff, rendendo duas amostras. As substâncias **PXCM-1A** (PXCF3-4.F1) e **PXCM-2A** (PXCF3-4.F2) foram extraídas da sílica com uma mistura dos solventes CH₂Cl₂:MeOH (95:05), sendo posteriormente filtradas a vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporadas e pesadas. As amostras foram submetidas a análise por CCDA utilizando como eluente Hexano:Acetona (70:30), sendo possível observar a presença de apenas um *spot* quando reveladas com reagente de Dragendorff e Anisaldeído, bem como quando submetidos a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm e 365 nm, em seguida foram encaminhadas para análise por EM e RMN.

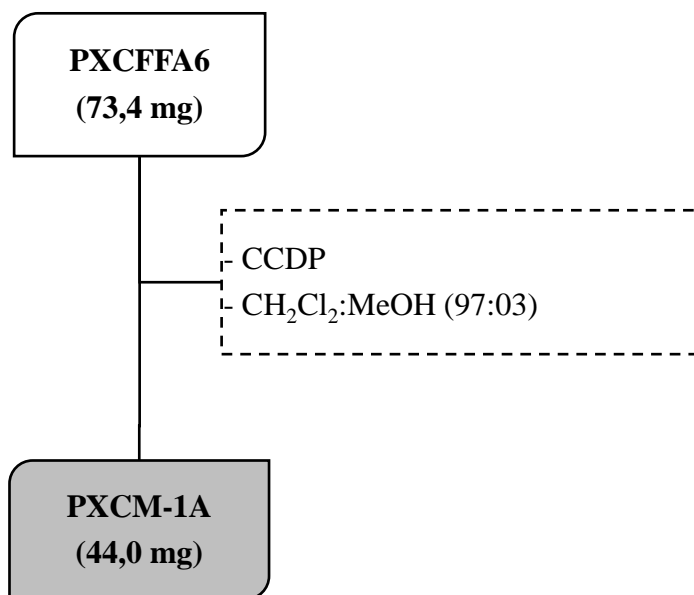
ESQUEMA 13: Isolamento e purificação de **PXCF3-4.F**.



4.12.5 Frações **PXCFFA6**

O grupo de frações **PXCFFA6** (73,4 mg) foi também submetido à CCDP. A placa cromatográfica foi eluída duas vezes, tendo como eluente uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:03), e reveladores luz UV (254 e 365 nm) e o reagente de Dragendorff, resultando em uma amostra, codificada como **PXCM-1A** (PXCf6.2) (ESQUEMA 14) que foi extraída da sílica com uma mistura dos solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:05), sendo posteriormente filtrada a vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporada e pesada. Após o processo de extração, a amostra foi submetida a análise por CCDA com eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (97:03), na qual observou-se a presença de apenas um único *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e Anisaldeído, bem como quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm e 365 nm. A amostra foi encaminhada para análise por EM e RMN.

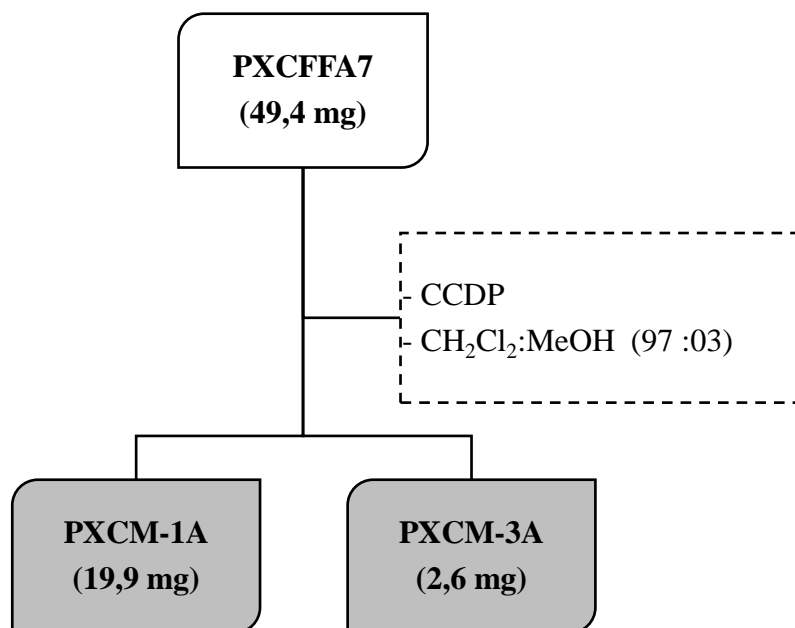
ESQUEMA 14: Isolamento e purificação de **PXCFFA6**.



4.12.6 Frações **PXCFFA7**

O grupo de frações **PXCFFA7** (49,4 mg) foi submetido à CCDP. A placa cromatográfica foi eluída duas vezes, tendo como eluente uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (97:03), e reveladores luz UV (254 nm e 365 nm) e o reagente de Dragendorff, resultando em duas amostras, sendo as substâncias **PXCM-1A** (PXCf7.2) e **PXCM-3A** (PXCf7.8) (ESQUEMA 15) extraídas da sílica com uma mistura dos solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:05), sendo posteriormente filtradas a vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporadas e pesadas. Após o processo de extração, as amostras foram submetidas a análise por CCDA com eluente $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (97:03), sendo observada a presença de apenas um único *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e Anisaldeído, bem como quando submetido a irradiação de luz ultravioleta em 254 e 365 nm. As amostras foram encaminhadas para análise por EM e RMN.

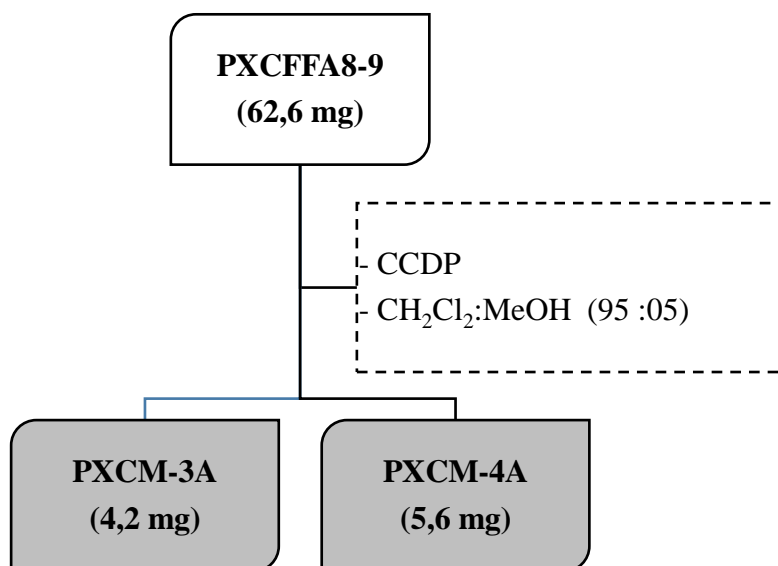
ESQUEMA 15: Frações **PXCFFA7**.



4.12.7 Isolamento e purificação de **PXCFFA8-9**

O grupo de frações **PXCFFA8-9** (62,6 mg) foi submetido à CCDP. A placa cromatográfica foi eluída duas vezes, tendo como eluente uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH (95:05), e reveladores luz UV (254 nm e 365 nm) e o reagente de Dragendorff, resultando em duas substâncias denominadas de **PXCM-3A** (PXCf8-9.3) e **PXCM-4A** (PXCf8-9.5) (ESQUEMA 16) que foram extraídas da sílica com uma mistura dos solventes CH₂Cl₂:MeOH (95:05), sendo posteriormente filtradas a vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporadas e pesadas. Após o processo de extração, as amostras foram submetidas a análise por CCDA com eluente CH₂Cl₂:MeOH (95:05), sendo observada a presença de apenas um único *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e Anisaldeído para ambas as amostras, bem como quando submetidas a irradiação de luz ultravioleta em 254 e 365 nm. As amostra foram então encaminhadas para análise por EM e RMN.

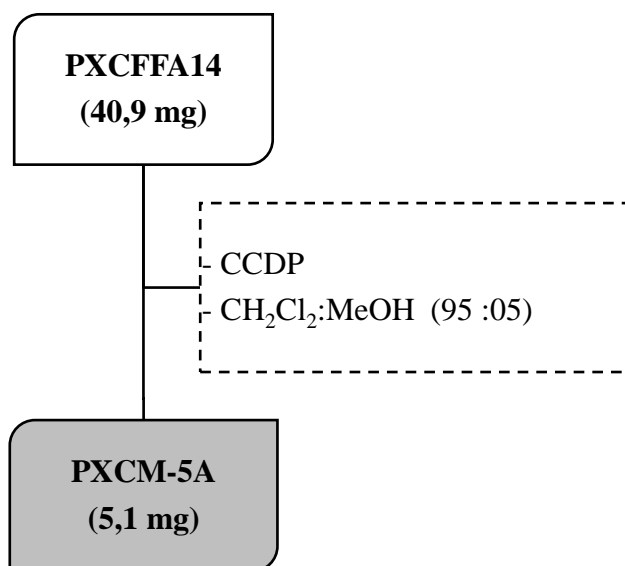
ESQUEMA 16: Isolamento e purificação de **PXCFFA8-9**.



4.12.8 Frações **PXCFFA14**

O grupo de frações **PXCFFA14** (40,9 mg) foi submetido à CCDP. A placa cromatográfica foi eluída três vezes, tendo como eluente uma mistura de CH_2Cl_2 :MeOH (95:05), e reveladores luz UV (254 nm e 365 nm) e o reagente de Dragendorff, resultando em uma substância codificada como **PXCМ-5A** (PXCf14.1) (ESQUEMA 17) que foi extraída da sílica com uma mistura dos solventes CH_2Cl_2 /MeOH (95:05), sendo posteriormente filtrada a vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporada e pesada. Após o processo de extração, a amostra foi submetida a análise por CCDA com eluente CH_2Cl_2 :MeOH (95:05), sendo observada a presença de apenas um único *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e Anisaldeído, bem como quando submetido a irradiação de luz ultravioleta em 254 e 365 nm. A amostra foi então encaminhada para análise por EM e RMN.

ESQUEMA 17: Isolamento e purificação de PXCFFA14.



4.12.9 Frações PXCFFA18

O grupo de frações **PXCFFA18** (51,7 mg) foi submetido à CCDP. A placa cromatográfica foi eluída três vezes, tendo como eluente uma mistura de CH_2Cl_2 :MeOH (95:05), e reveladores luz UV (254 nm e 365 nm) e o reagente de Dragendorff, resultando em uma substância codificada como **PXCM-6A** (PXCf14.1) (ESQUEMA 18) que foi extraída da sílica com uma mistura dos solventes CH_2Cl_2 :MeOH (95:05), sendo posteriormente filtrada a vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporada e pesada. Após o processo de extração, a amostra foi submetida a análise por CCDA com eluente CH_2Cl_2 :MeOH (95:05), sendo observada a presença de apenas um único *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e Anisaldeído, bem como quando submetido a irradiação de luz ultravioleta em 254 e 365 nm. A amostra foi então encaminhada para análise por EM e RMN.

atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Diariamente acompanhou-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes.

Para a manutenção de células aderidas, utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células se despregassem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para microplasma, conforme avaliado pela colocação com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

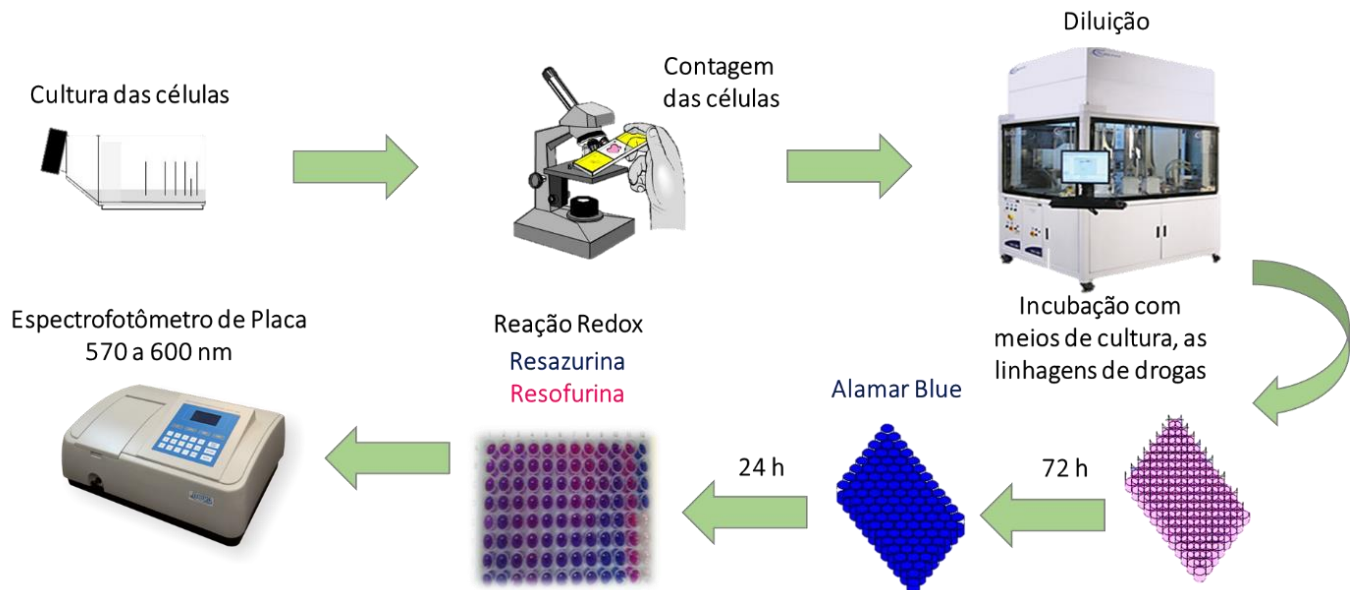
4.13.3 Ensaio de citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade das substâncias sobre a proliferação de células não tumorais, fez-se uso da célula MCR-5 (fibroblasto de pulmão humano), obtidas da ATCC (coleção de cultura americana).

As células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/poço de uma solução de $0,3 \times 10^6$ células/mL para células em suspensão e $0,7 \times 10^5$ células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. Fez-se uso de doxorrubicina como controle positivo. O controle negativo recebeu igual quantidade de DMSO.

Quatro horas (vinte e quatro horas para o PBMC) antes do fim do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa. O alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN et al., 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades de oxirredução. Assim como os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se nas células em proliferação. Sua forma oxidada tem coloração azul (não fluorescente/célula não viável) e sua forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável) (ESQUEMA 19) (AHMED et al., 1994).

ESQUEMA 19: Ensaio de citotoxicidade.



Fonte: MENEZES, (2015).

A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} realizado a partir de regressão não-linear fazendo uso do programa Prisma, versão 5.0 (GraphPad Software).

A proliferação celular foi calculada utilizando a fórmula:

$$\% \text{ proliferação} = A_{LW} - (A_{HW} \times R_0) \times 100$$

Onde, A_{LW} e A_{HW} caracterizam as absorvâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente.

Para o calculo do R_0 foi fez-se uso da fórmula:

$$R_0 = A_{OLW} / A_{OHW}$$

Na qual, A_{OLW} e A_{OHW} são as absorvâncias do meio adicionado ao alamar blue, subtraído das absorvâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. Utiliza-se o parâmetro R_0 para descartar a absorção característica do meio puro, que possui uma coloração levemente rósea. A amostra foi testada em diluição seriada, em triplicata (dependendo da quantidade de amostra). O percentual de inibição foi calculado e registrado a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} realizado

a partir de regressão não-linear fazendo uso do programa Prisma (GraphPad Software), em sua versão 5.0.

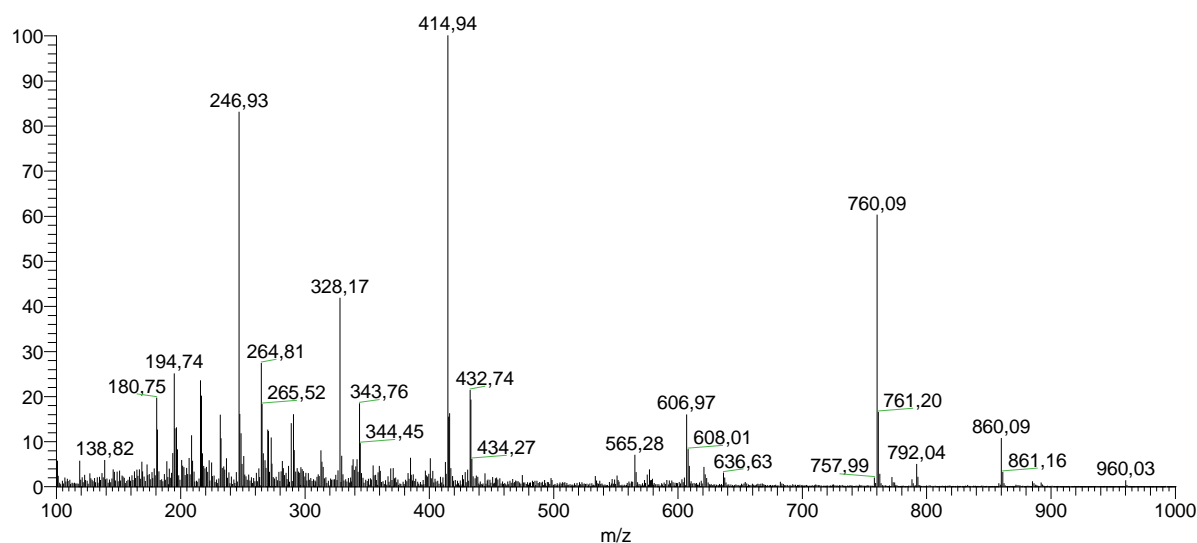
Este ensaio foi realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, localizado na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no estado da Bahia em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Análise de substâncias nitrogenadas no extrato metanólico, fração neutra e fração alcaloídica por espectrometria de massas.

O espectro de massas obtido por meio de ionização química a pressão atmosférica em modo positivo de aquisição (APCI+) do extrato metanólico das folhas de *P. leiophylla* (FIGURA 12) exibiu uma variedade de sinais conferidos entre m/z 138-434, mostrando sinais majoritários com m/z iguais a 180, 194, 246, 264, 328, 432 em maiores abundâncias. Pode-se ainda observar no espectro, outros sinais com m/z de 138, 344, 434 em menor abundância. Esses valores, em sua maioria de m/z par, levantam a suspeita de possíveis alcaloides presentes no extrato, com isso, o tratamento ácido-base deste material permitiu a separação dos constituintes alcaloidicos, na qual costumam estes apresentar m/z em numero par quando da presença de um único nitrogênio (COSTA et al., 2006; LIMA, 2019).

FIGURA 12: Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *P. leiophylla* (PXCFFEM).



Com a realização do tratamento ácido-base para o extrato metanólico, obteve-se as frações alcaloídica e neutra, na qual pode-se observar os seus espectros nas FIGURAS 13 e 14, respectivamente. A partir de um comparativo dos espectros das frações obtidas, é possível conferir se o tratamento ocorrido para a extração dos alcaloides foi efetiva na sua realização, de modo que os compostos com m/z par se manifestassem majoritariamente na fração alcaloídica após o tratamento.

Quando comparados os espectros das frações alcaloídica e neutra, notou-se que a fração alcaloídica (FIGURA 13) é detentora majoritariamente de sinais abundantes com m/z pares, como 180, 194, 246, 264, 414 e 432. No entanto, nota-se que a fração neutra (FIGURA 14) possui perfil complexo, com sinais registrados entre m/z 168-432, apresentando uma variedade de valores de m/z pares e ímpares, o que pode levar a hipótese de que o tratamento acido-base não foi realizado de modo efetivo na extração das substâncias alcaloídicas. Os sinais observados na fração neutra de m/z ímpar são: 247, 265, 269, 343, 415 e 433, assim também como os sinais de m/z pares iguais a 180, 194, 264 e 414, sendo estes, comuns a fração alcaloídica.

FIGURA 13: Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *P. leiophylla* (PXCFFA).

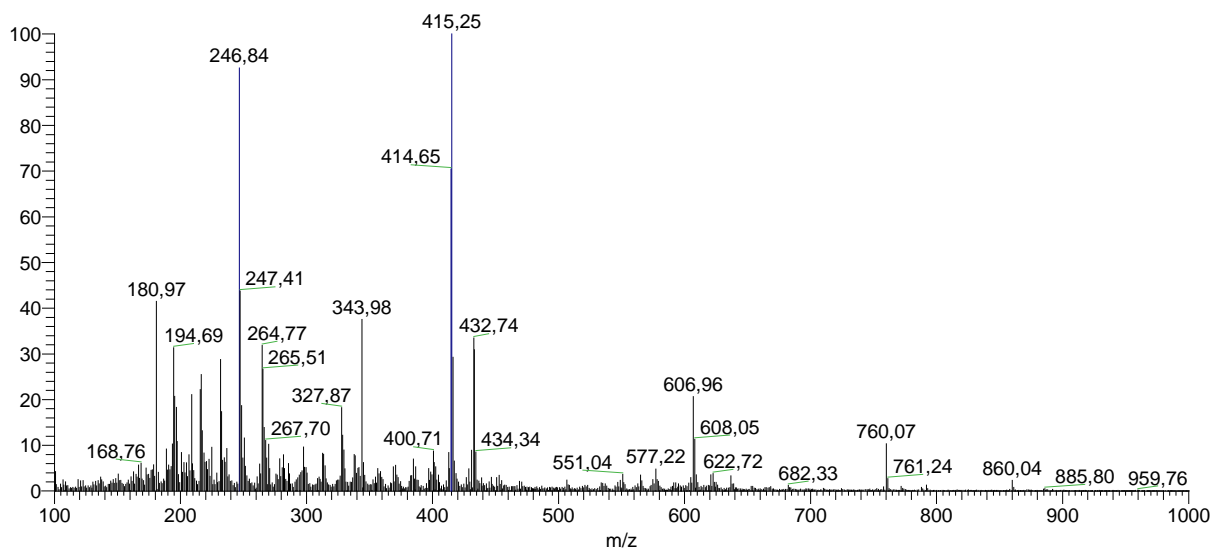
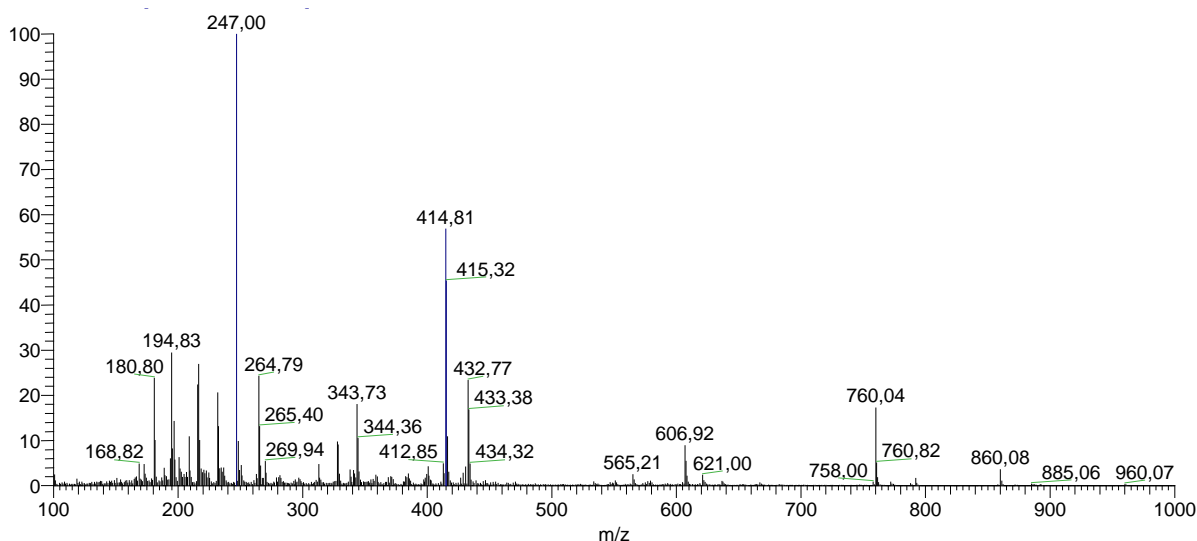


FIGURA 14: Espectro de massas da fração neutra das folhas de *P. leiophylla* (PXCFFN).



Com base nas comparações, entre os espectros de massas das frações alcaloídica e neutra, estima-se que não houve uma efetiva separação dos constituintes a partir do tratamento ácido-base, na qual teve como objetivo a separação das substâncias alcaloídicas presentes no extrato metanólico das folhas de *P. leiophylla* (COSTA et al., 2006).

5.2 Caracterização estrutural das substâncias isoladas das folhas de *P. Leiophylla*.

O estudo fitoquímico das folhas de *P. leiophylla* empregando as técnicas cromatográficas convencionais, como CC, CCDA e CCDP, permitiu o isolamento de seis substâncias conhecidas, sendo **PXCM-2A** e **PXCM-4A**, pertencentes a classe dos alcaloides, três substâncias da classe dos terpenos, sendo **PXCM-5A** e **PXCM-6A** e **PXCM-3A**, além da substância **PXCM-1A**, pertencente a classe das lignanas. Para a identificação das substâncias isoladas, utilizou-se as técnicas modernas de elucidação estrutural, como RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D e EM, assim como também a comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura.

Os alcaloides isolados (TABELA 3), são pertencentes a subclasses dos aporfinoides: subdivididos em aporfins e oxoaporfinos, conforme pode ser observado na FIGURA 15. Os terpenoides isolados (TABELA 4) são pertencentes a subclasse de sesquiterpeno e triterpeno, conforme observado na FIGURA 16. A lignana isolada (TABELA 5) é do tipo tetraidrofurânica, tendo seu esqueleto observado na FIGURA 6, assim também como na TABELA 6, onde se encontra listados todos as substâncias isoladas.

FIGURA 15: Esqueletos dos alcaloides caracterizados nas folhas de *P. leiophylla*

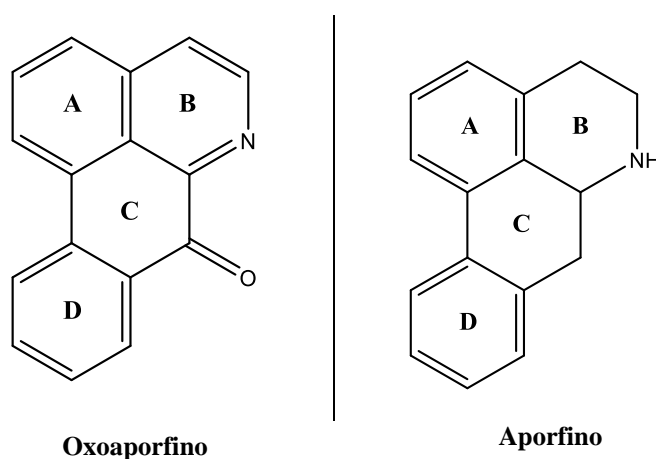


TABELA 3: Classes de alcaloides identificados nas folhas de *P. leiophylla*.

| Aporfinoides | |
|--------------|----------|
| Oxoaporfino | Aporfino |
| PXCM-2A | PXCM-4A |

FIGURA 16: Esqueletos dos terpenos caracterizados nas folhas de *P. leiophylla*

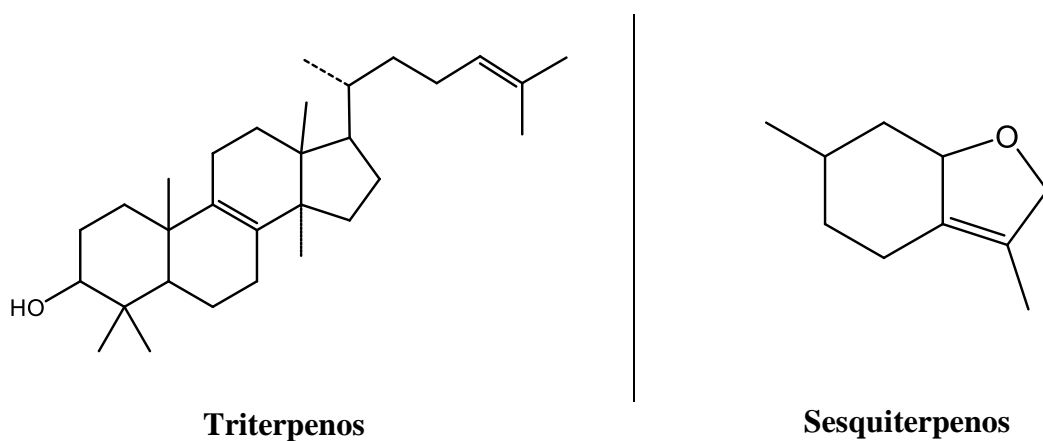
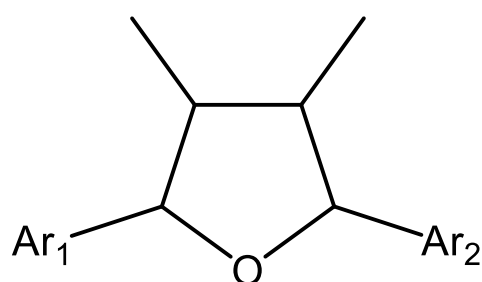


TABELA 4: Classes de terpenoides identificados nas folhas de *P. leiophylla*.

| Terpenoides | |
|-------------|---------------|
| Triterpeno | Sesquiterpeno |
| PXCM-5A | PXCM-3A |
| PXCM-6A | |

FIGURA 17: Esqueleto da lignana tetraidrofurânica caracterizada nas folhas de *P. leiophylla*.



Lignana tetraidrofurânica

TABELA 5: Classes de lignoides identificados nas folhas de *P. leiophylla*.

| |
|--------------------------|
| Lignanas |
| Tetraidrofurânica |
| PXCM-1A |

TABELA 6: Total de massa das substâncias extraídas e caracterizadas das folhas de *P. leiophylla*.

| Substância | Amostras | Descrição | Massa total (mg) |
|------------|---|--------------------------------|------------------|
| PXCM-1A | PXCFFA3-4.C1 PXCFFA3-4.DE1 PXCFFA3-4.F1 PXCFFA6.2 PXCFFA7.2 | Grandisina | 319,6 |
| PXCM-2A | PXCFFA3-4.DE3 PXCFFA3-4.F2 | Liriodenina | 4,1 |
| PXCM-3A | PXCFFA7.8 PXCFFA8-9.3 | Loliolida | 6,8 |
| PXCM-4A | PXCFFA8-9.5 | Asimilobina | 5,6 |
| PXCM-5A | PXCFFA14.1 | Breina e Maniladdiol | 5,1 |
| PXCM-6A | PXCFFA18.1 | Ácido Hiênico (Heynic acid) | 5,3 |

5.2.1 Caracterização estrutural de PXCM-1A

A amostra **PXCM-1A** apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarela com rendimento total após o isolamento e purificação de 319,6 mg. Através da análise realizada por CCDA com uso do reagente de Dragendorff, observou-se a presença de uma coloração alaranjada não tão intensa que poderia sugerir a presença de uma substância nitrogenada. No entanto, as análises espectrométricas revelaram ser um falso positivo, em vista de que a substância não apresentava nitrogênio em sua estrutura.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da amostra **PXCM-1A** (FIGURA 18 a 23) observou-se a presença de seis sinais com integração para 32 hidrogênios, sendo um sinal em δ 6,63 (s) com integração para quatro hidrogênios aromáticos equivalentes

indicando a presença de dois anéis aromáticos, sendo cada um tetrassubstituído, dois sinais em δ 3,88 (*s*) e 3,84 (*s*) com integração para doze e seis hidrogênios respectivamente, típicos de grupos metoxílicos, dois pares de grupos metoxílicos equivalentes, um sinal em δ 4,65 (*d*, $J = 9,2$ Hz) com integração para dois hidrogênios típicos de hidrogênio carbinólico, um sinal em δ 1,79 (*m*) com integração para dois hidrogênio característico de grupo metínico, e um sinal em δ 1,09 (*d*, $J = 6,0$ Hz) com integração para seis hidrogênios típicos de grupo metílico (TABELA 7). Esses dados nos levaram a sugerir que a molécula trata-se de um substância de baixo peso molecular contendo dois anéis aromáticos tetrassubstituídos com seis metoxilas, sendo quatro equivalentes e uma cadeia ciclica central, contendo um anel heterocíclico de cinco membros. As características da estrutura apontam para um composto do tipo lignana.

FIGURA 18: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.

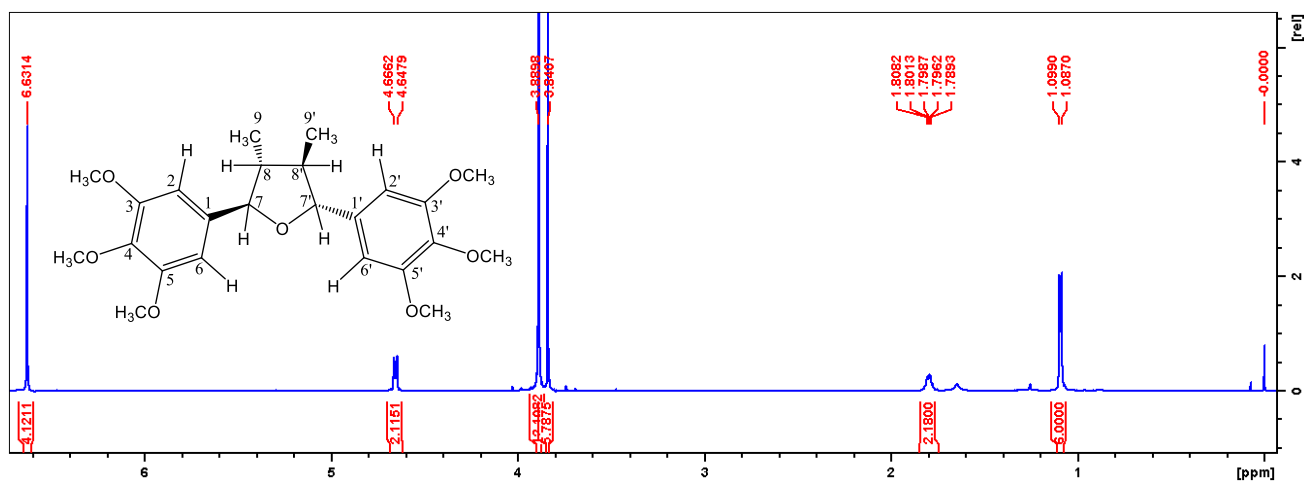


FIGURA 19: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.

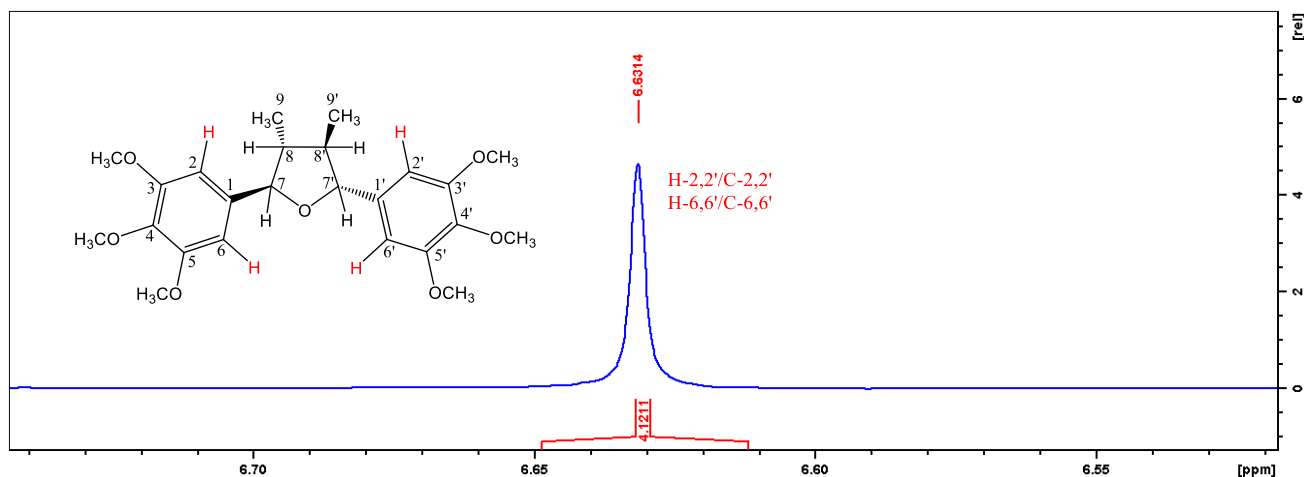


FIGURA 20: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.

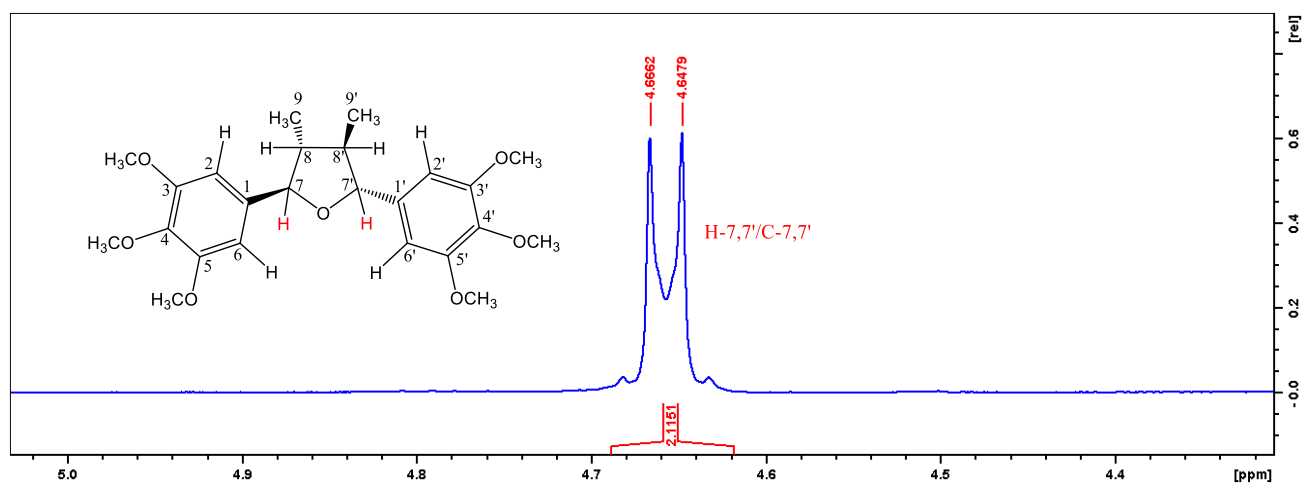


FIGURA 21: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.

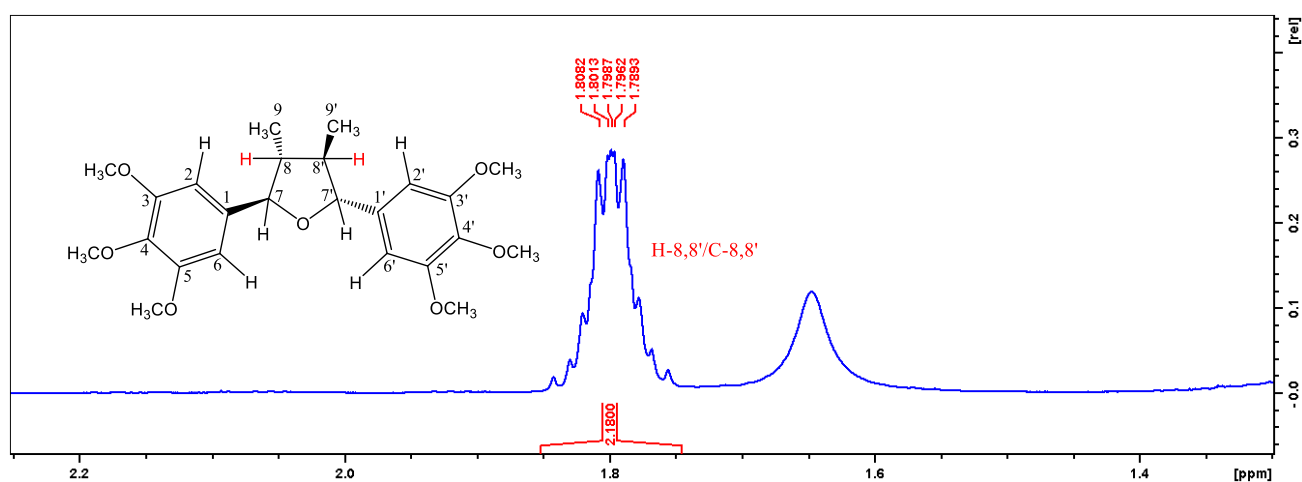


FIGURA 22: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.

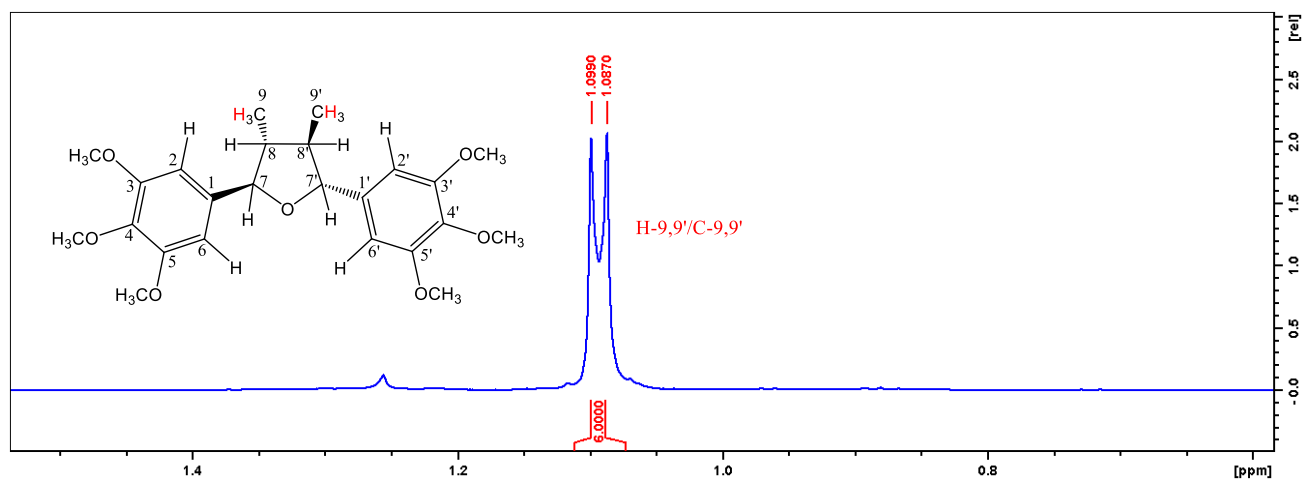
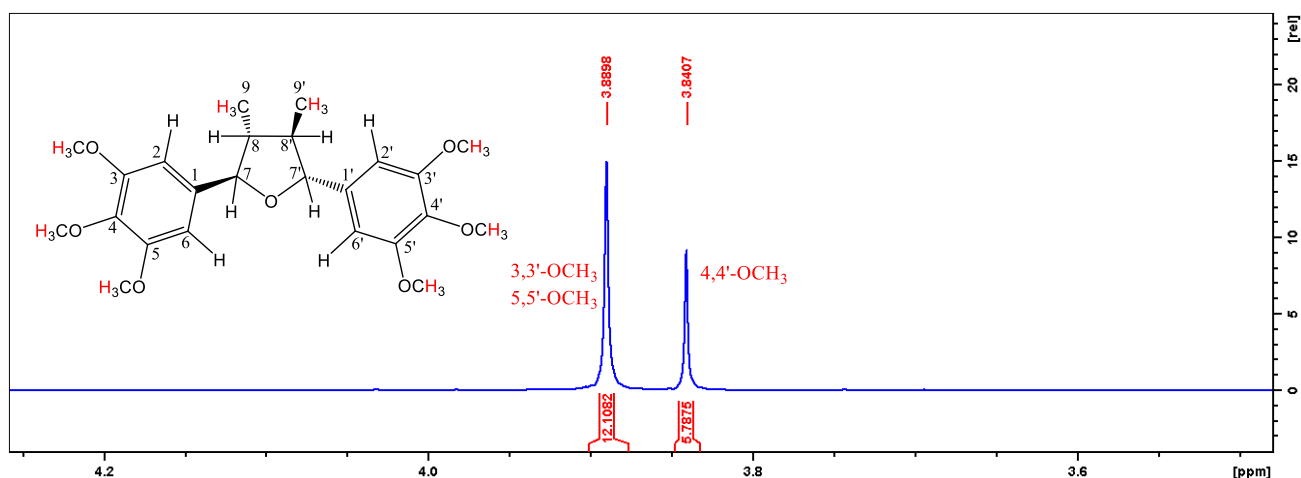


FIGURA 23: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.



A confirmação desses dados foi ainda evidenciada pela análise dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 24), DEPT 135 (FIGURA 25), e mapas de correlação HSQC (FIGURA 26 e 27) e HMBC (FIGURA 28 a 32). Com base nesses experimentos, foi possível observar nove sinais correspondentes a 24 carbonos, sendo doze aromáticos em δ 153,2 (4C), δ 138,0 (2C), δ 137,3 (2C) e δ 102,9 (4C), dois carbinólicos em δ 88,5, seis metoxílicos em δ 60,8 (2C) e δ 56,1 (4C), dois metínicos em δ 51,0 e dois metílicos em δ 14,0 estando em concordância com os dados fornecidos pelo espectro de RMN de ^1H (TABELA 7). Os corretos valores dos carbonos hidrogenados da molécula foram determinados com base na análise do mapa de correlação HSQC (FIGURAS 26 e 27) (TABELA 7).

FIGURA 24: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.

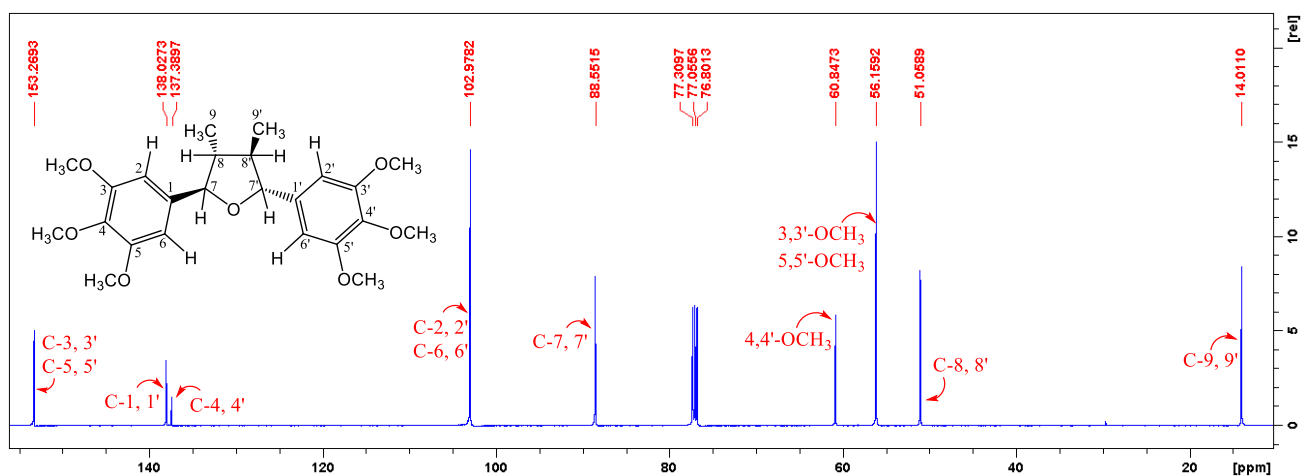


FIGURA 25: Espectro de RMN de DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.

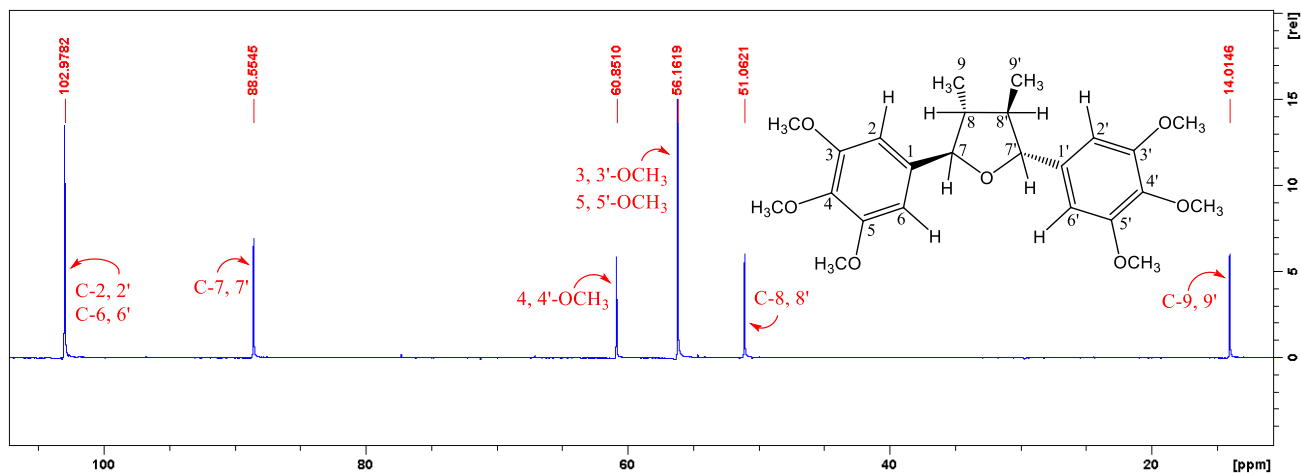


FIGURA 26: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.

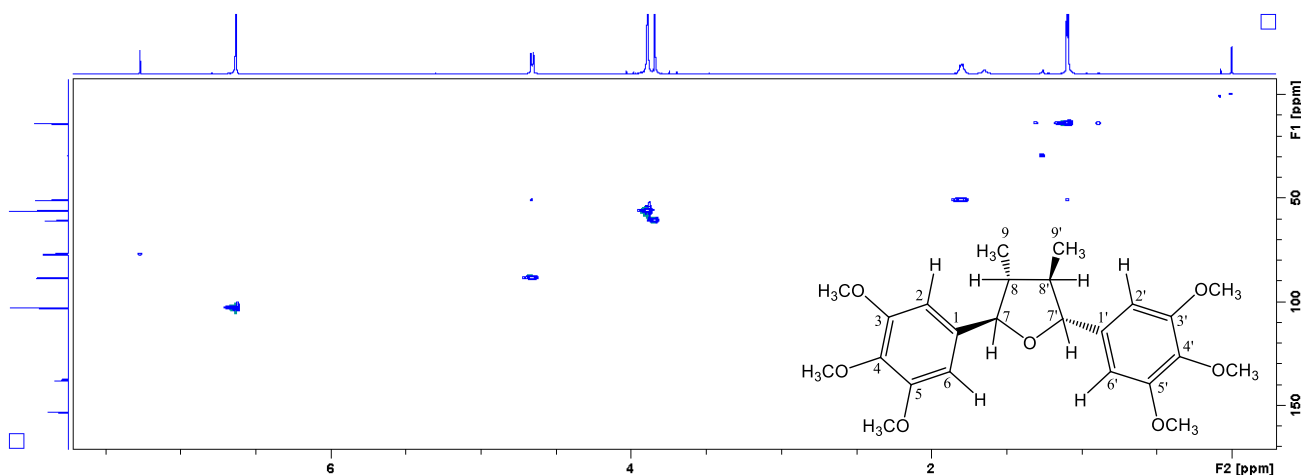
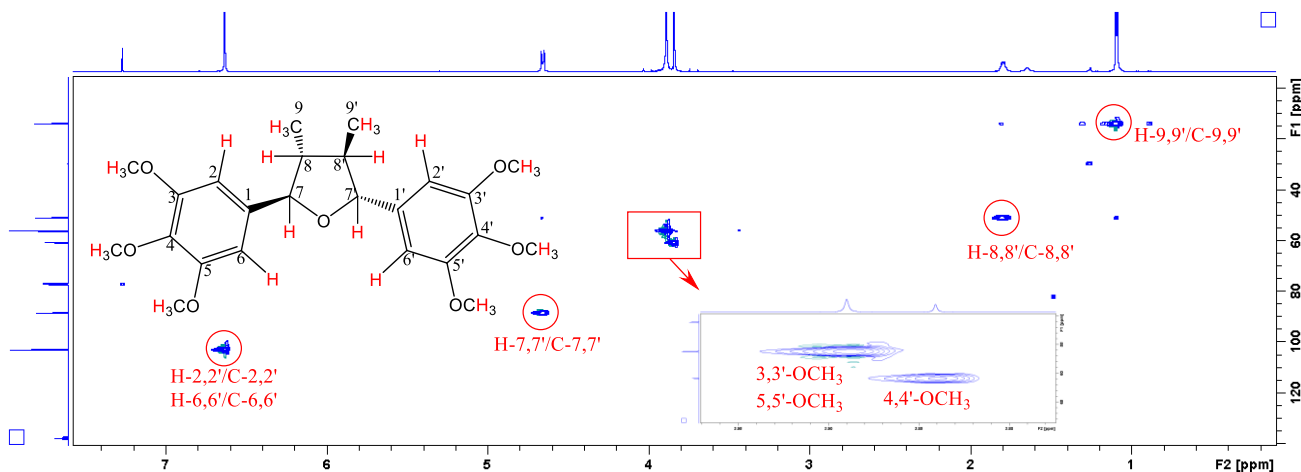


FIGURA 27: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-1A.



A presença dos anéis aromáticos tetrassubstituídos assim como a cadeia heterocíclica central foi confirmada pela análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 48 a 32), devido a correlação a J^3 dos sinais dos hidrogênios em δ 6,63 (H-2,2' e H-6,6') com os sinais dos carbonos em δ 137,5 (C-4,4') portador de um dos grupos metoxilas, δ 102,9 (C-6,6') referente aos outros carbonos hidrogenados e δ 88,5 atribuído aos carbonos carbinólicos, e a J^2 com os sinais em δ 153,2 (C-3,3' e C-5,5') portador dos outros dois grupos metoxilas e δ 138,0 (C-1,1') atribuídos aos últimos carbonos aromáticos da estrutura. Observou-se também uma correlação fraca a J^4 com o sinal do carbono metínico em δ 51,0 (C-8,8') (TABELA 7).

FIGURA 28: Visão geral do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXXM-1A.

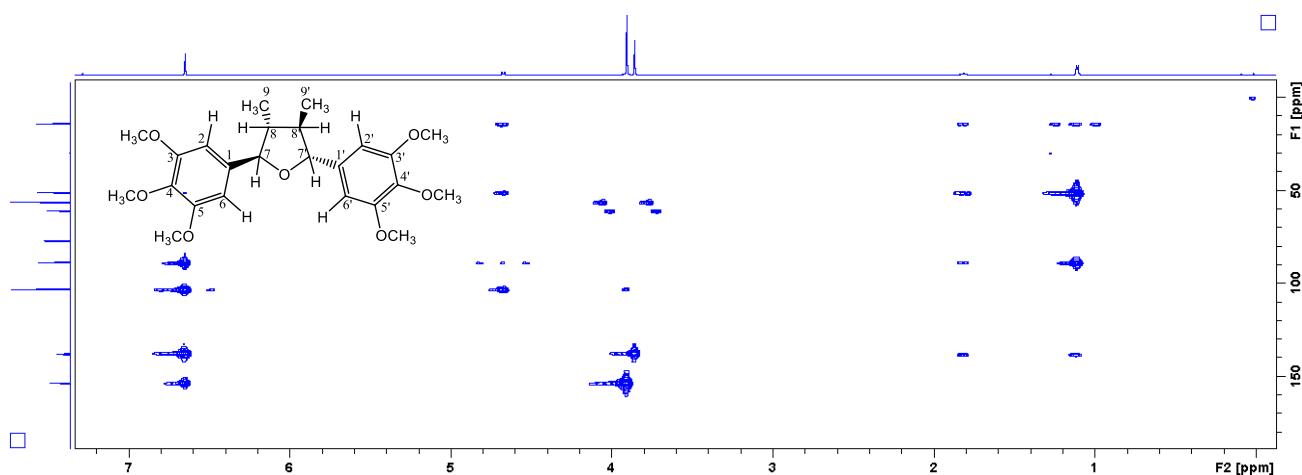
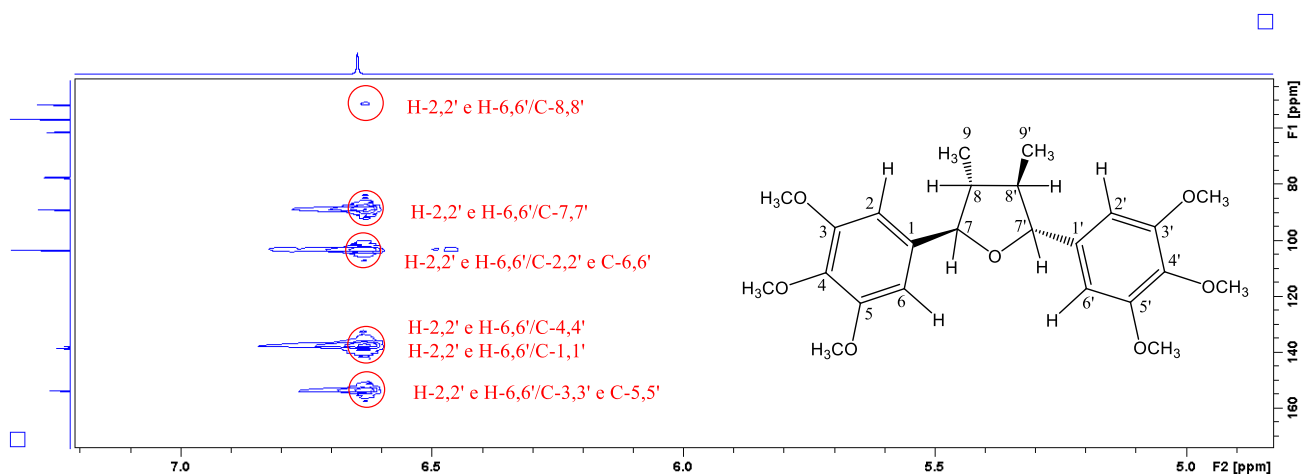


FIGURA 29: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXXM-1A.



Outras correlações importantes observadas no mapa de correlação HMBC (FIGURAS 30 a 32) que sustentam a molécula proposta foram evidenciadas pela correlação a J^3 dos sinais

em δ 4,65 (H-7,7') com os sinais dos carbonos em δ 102,9 (C-2,2' e C-6,6') e δ 14,0 (C-9,9'), e J^2 com o sinal em δ 51,0 (C-8,8'); δ 1,79 (H-8,8') com o sinal do carbono em δ 138,0 (C-1,1') e a J^2 com os sinais em δ 88,5 (C-7,7') e δ 14,0 (C-9,9'); e δ 1,09 (H-9,9') com o sinal em δ 88,5 (C-7,7'), J^2 com o sinal em δ 51,0 (C-8,8'), e J^4 com o sinal em δ 138,0 (C-1,1') (TABELA 7).

FIGURA 30: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXXM-1A.

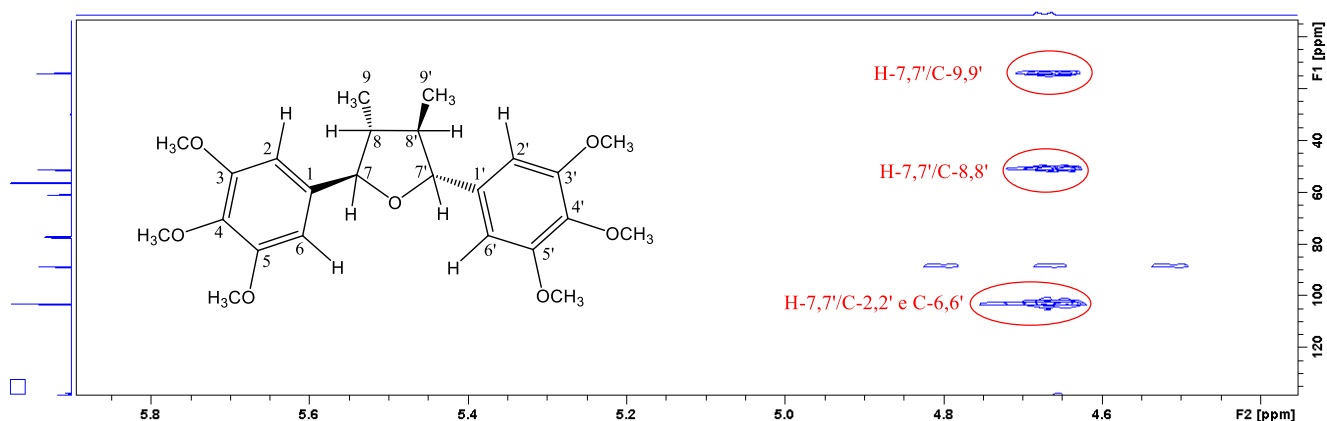


FIGURA 31: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXXM-1A.

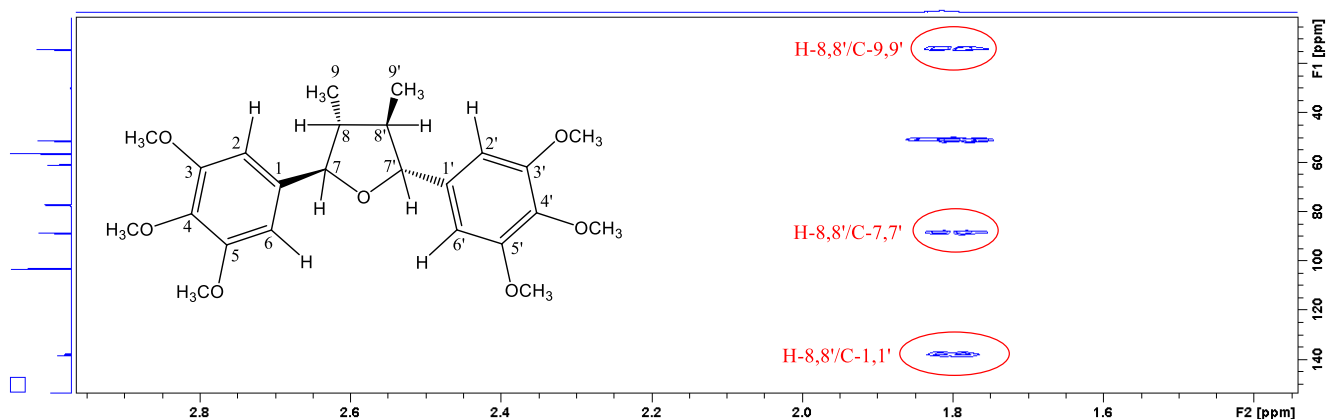
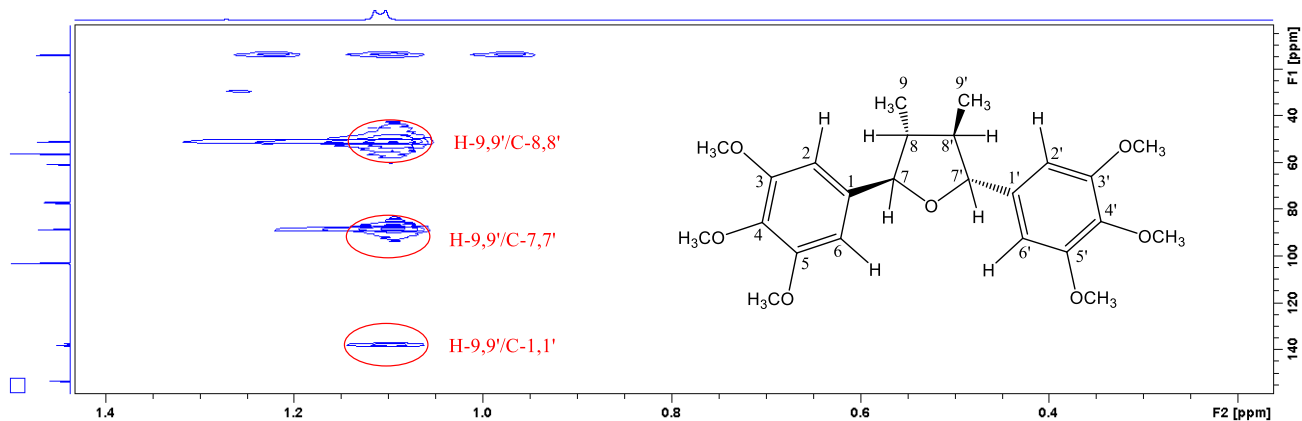


FIGURA 32: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXXM-1A.



Na TABELA 7 estão presentes os corretos valores de ^1H e ^{13}C de PXXM-1A conforme a análise do mapa de HSQC (FIGURA 26 e 27) e HMBC (FIGURA 28 a 32).

TABELA 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PXXM-1A.

| Posição | PXXf3-4.F3 | | | Grandisina |
|-----------|--|---|---|--|
| | ^1H δ (mult., J em Hz) ^a | ^{13}C (δ) ^a | HMBC (^1H - ^{13}C) ^b | ^1H δ (mult., J em Hz) ^c |
| 1 | - | 138,0 C | - | - |
| 1' | - | 138,0 C | - | - |
| 2 | 6,63 <i>s</i> (2H) | 102,9 CH | 1f; 7, 8f; 3, 4, 5 e 6 | 6,62 <i>s</i> |
| 2' | 6,63 <i>s</i> (2H) | 102,9 CH | 1'f; 7', 8'f; 3', 4', 5' e 6' | 6,62 <i>s</i> |
| 3 | - | 153,2 C | - | - |
| 3' | - | 153,2 C | - | - |
| 4 | - | 137,5 C | - | - |
| 4' | - | 137,5 C | - | - |
| 5 | - | 153,2 C | - | - |
| 5' | - | 153,2 C | - | - |
| 6 | 6,63 <i>s</i> (2H) | 102,9 CH | 1f; 7, 2, 8f, 3, 4, e 5 | 6,62 <i>s</i> |
| 6' | 6,63 <i>s</i> (2H) | 102,9 CH | 1'f; 7', 2', 8'f, 3', 4', e 5' | 6,62 <i>s</i> |
| 7 | 4,65 <i>d</i> (1H, 9,2) | 88,5 CH | 9, 8, 2 e 6 | 4,67 <i>d</i> (6,6) |
| 7' | 4,65 <i>d</i> (1H, 9,2) | 88,5 CH | 9', 8', 2' e 6' | 4,67 <i>d</i> (6,6) |
| 8 | 1,79 <i>m</i> (1H) | 51,0 CH | - | 1,75 <i>m</i> |

| | | | | |
|------------------------------|--------------------|----------------------|---------------------|---------------------|
| 8' | | | | |
| 9 | 1,09 <i>d</i> (3H, | 14,0 CH ₃ | 1, 7, e 8 | 1,08 <i>d</i> (8,8) |
| 9' | 6,0) | | 1', 7' e 8' | |
| 3,5-OCH₃ | 3,88 <i>s</i> (6H) | 56,1 CH ₃ | 2, 3, 4, 5 e 6 | 3,87 <i>s</i> (6H) |
| 3',5'-OCH₃ | | | 2', 3', 4', 5' e 6' | |
| 4-OCH₃ | 3,84 <i>s</i> (3H) | 60,8 CH ₃ | 4, 3 e 5 | 3,89 <i>s</i> (3H) |
| 4'-OCH₃ | | | 4', 3' e 5' | |

^aExperimento realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno.

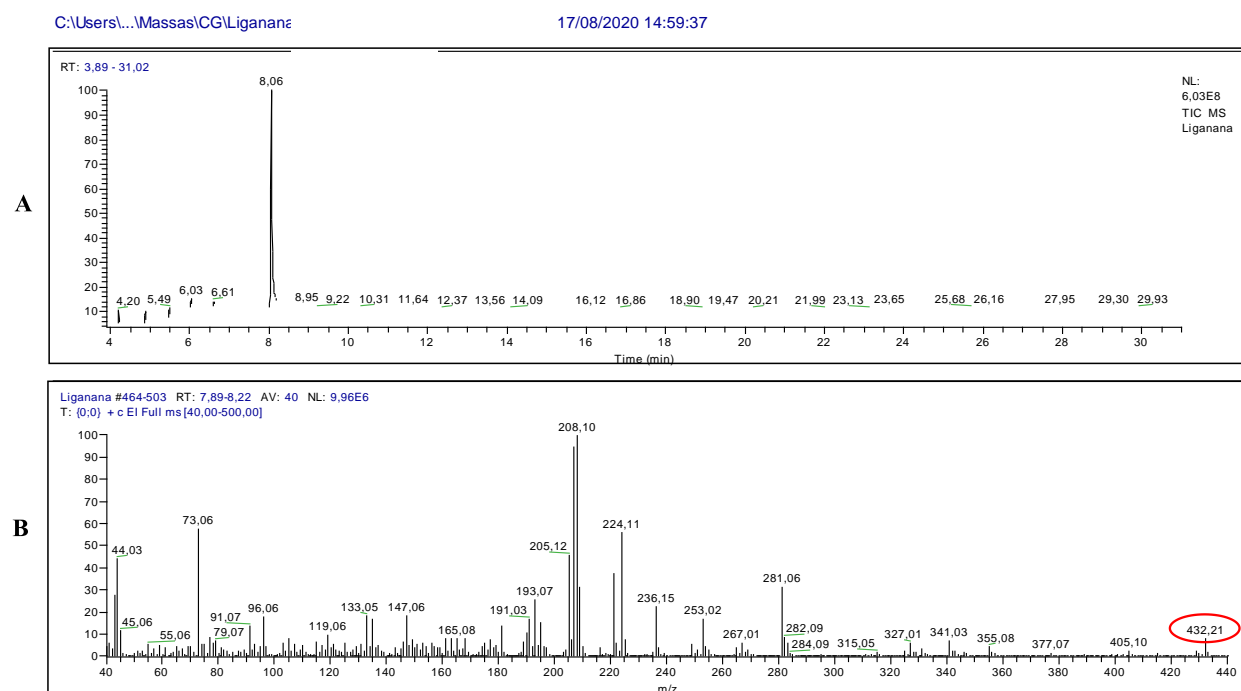
^bMultiplicidades determinadas mapas de correlação HSQC e HMBC.

^cDados da literatura de acordo com MARTINS, 2002 (¹H a 300 MHz em CDCl₃).

f = correlação fraca.

Pela análise por CG/EM (FIGURA 33) observou-se a presença de uma substância com tempo de retenção de 8,06 minutos que após submetido a técnica de bombardeamento por impacto eletrônico (IE) evidenciou um íon radicar em m/z 432 M⁺ compatível com a estrutura da substância proposta pelas análises por RMN de ¹H e ¹³C 1D e 2D. Pela análise conjunta desses experimentos (EM e RMN) foi possível sugerir a fórmula molecular C₂₄H₃₂O₇.

FIGURA 33: Visão do cromatograma de íons totais e espectro de massas de PXCM-1A.

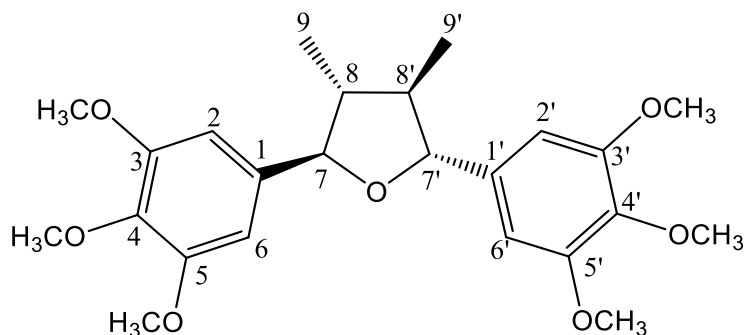


^ACromatograma de íons totais

^BEspectrometro de massas da amostra PXCM-1A

Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D, bem como pela análise de CG/EM, permitiu-se sugerir que **PXCM-1A** é um dímero da classe das lignanas, de subclasse tetraidrofurânico, conhecido como **grandisina** (FIGURA 34) de fórmula molecular $\text{C}_{24}\text{H}_{32}\text{O}_7$, substância essa a qual não possui relatos no gênero *Pseudoxandra*.

FIGURA 34: Fórmula estrutural da grandisina.

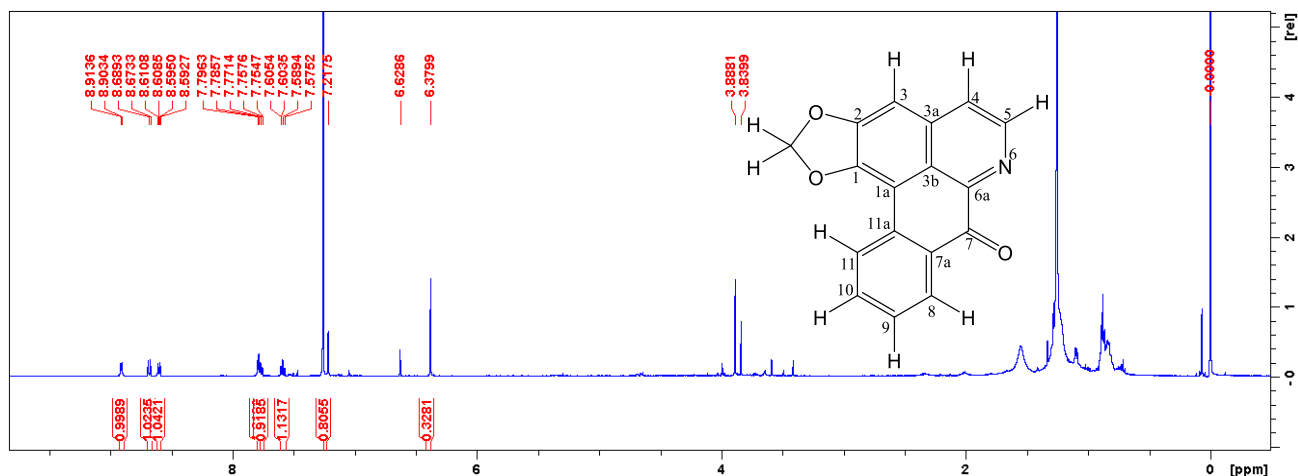


5.2.2 Caracterização estrutural de PXCM-2A

A amostra **PXCM-2A** apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarelada com rendimento igual a 4,1 mg. Pela análise por CCDA com o uso do reagente de Dragendorff observou-se um *spot* de coloração alaranjada mais intenso e diferente do observado para **PXCM-1A**, indicando a provável presença de um nitrogênio na estrutura.

Por meio da análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) (FIGURA 35 a 38) observou-se características de um alcaloide do tipo oxoaporfino dissustituído devido sinais característicos de hidrogênios entre 6,37 e 8,91 ppm e ausência de sinais de hidrogênios metilênicos entre 2,00 e 3,80 ppm (GUINAUDEAU et al., 1979, 1983, 1988, 1994). Verificou-se a presença de sete sinais na região de hidrogênios aromáticos com integração para um hidrogênio cada.

FIGURA 35: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-2A.



Quatro sinais dos sete hidrogênios aromáticos foram observados, em δ 8,68 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz), δ 8,60 (1H, *dd*, $J = 7,9$ e $1,1$ Hz), δ 7,72 (1H, *d*, $J = 8,0$ Hz) e 7,58 (1H, *ddd*, $J = 7,9$, 7,6 e $1,0$ Hz) que são característicos de H-11, H-8, H-10 e H-9 do anel D não substituído do esqueleto oxoaporfínico. O sinal em δ 7,21 (1H, *s*) é típico de H-3 do anel A do sistema oxoaporfino dissustituído. Os dois sinais restantes em δ 8,90 (1H, *d*, $J = 5,1$ Hz) e δ 7,79 (1H, *d*, $J = 5,1$ Hz) apresentaram características de um sistema piridínico correspondente com o anel B de um sistema oxoaporfino, os quais se referem aos hidrogênios H-5 e H-4, respectivamente (FIGURA 36 a 38, TABELA 8). Foi ainda possível observar um sinal em δ 6,37, apresentando-se como simpleto, integrado para dois hidrogênios típicos de grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 no anel A do sistema oxoaporfino (TABELA 8).

FIGURA 36: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-2A.

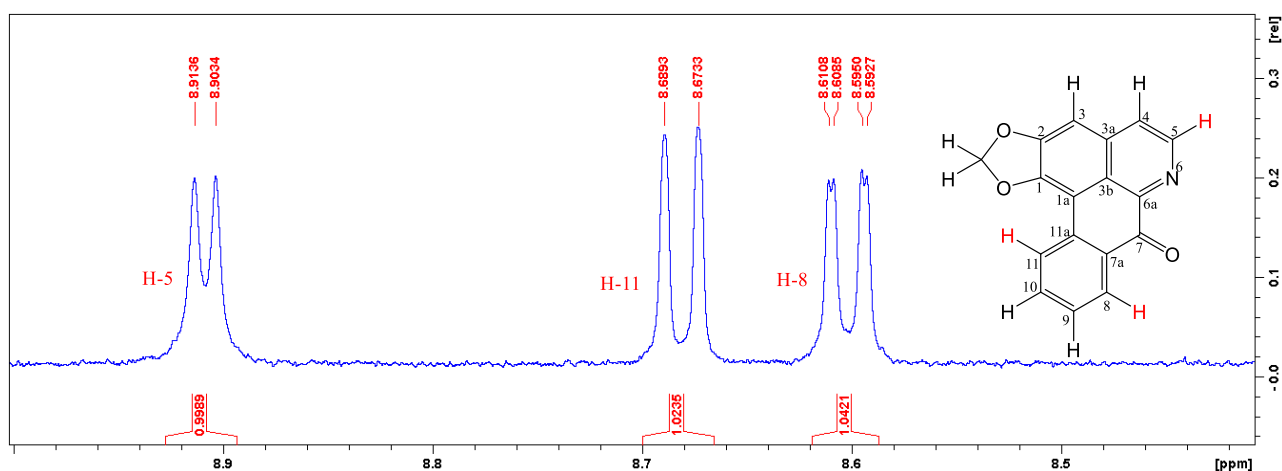


FIGURA 37: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-2A.

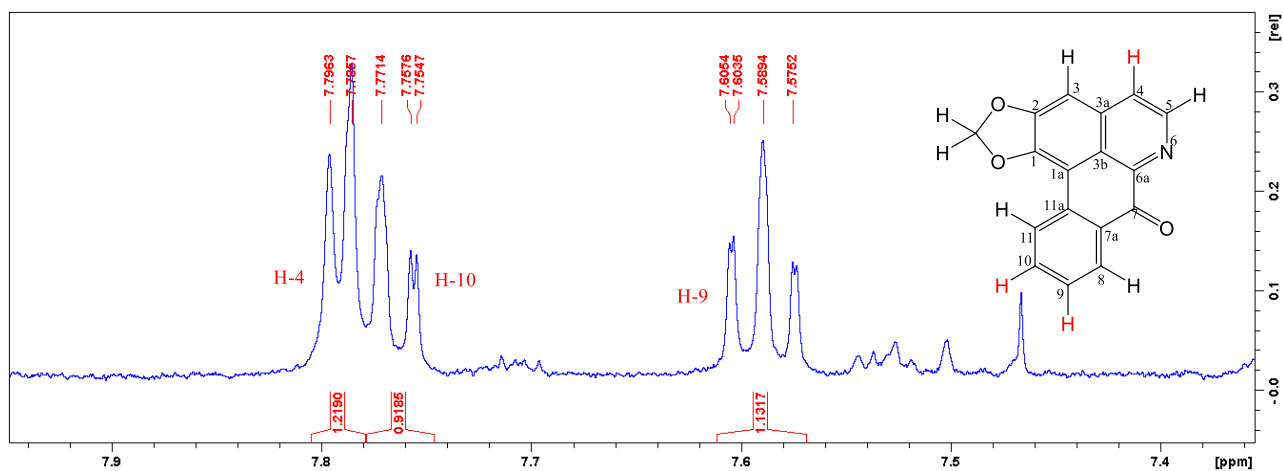
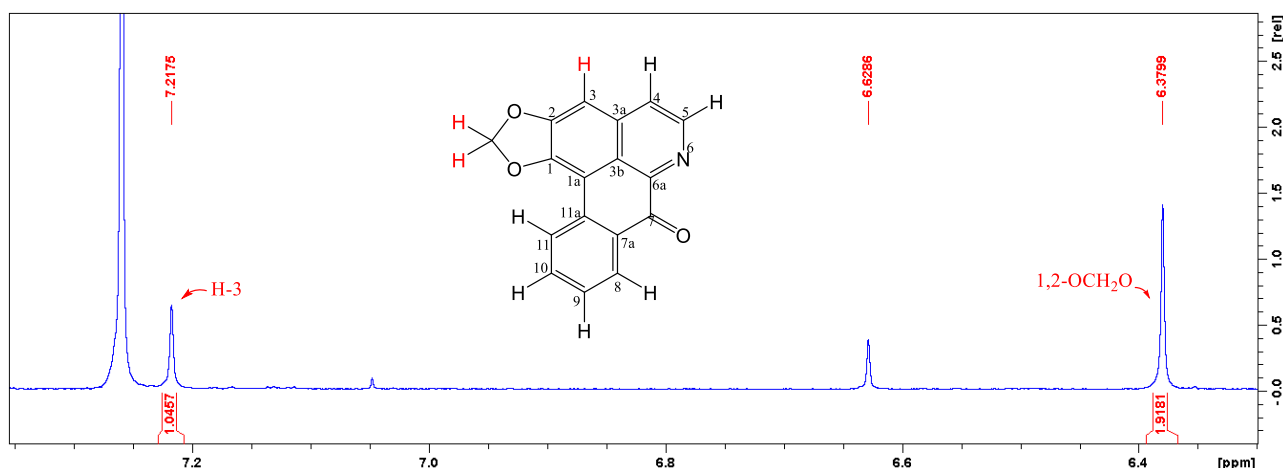


FIGURA 38: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-2A.



Na TABELA 8 estão presentes os corretos valores de ^1H de **PXCM-2A**, assim como comparações com os dados da literatura, de modo que os dados confirmam que a substância em questão se trata do alcaloide oxoaporfino conhecido como lirioidenina.

TABELA 8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da substância PXCM-2A.

| Posição | PXCM-2A | | Lirioidenina |
|-----------|--|--|--|
| | ^1H δ (mult., J em Hz) ^a | | ^1H δ (mult., J em Hz) ^b |
| 1 | - | | - |
| 1a | - | | - |
| 2 | - | | - |
| 3 | 7,21 | | 7,16 |

| | (s) | (s) |
|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| 3a | - | - |
| 3b | - | - |
| 4 | 7,79 (d, 5,1) | 7,75 (d, 5,2) |
| 5 | 8,90 (d, 5,1) | 8,87 (d, 5,2) |
| 6a | - | - |
| 7 | - | - |
| 7a | - | - |
| 8 | 8,60 (dd, 7,9 e 1,1) | 8,57 (ddd, 7,9; 1,4 e 0,5) |
| 9 | 7,58 (ddd, 7,9; 7,6 e 1,1) | 7,56 (ddd, 7,9; 7,4 e 1,0) |
| 10 | 7,77 (d, 8,0) | 7,73 (ddd, 8,1; 7,4 e 1,4) |
| 11 | 8,68 (d, 8,0) | 8,61 (ddd, 8,1; 1,0 e 0,5) |
| 11a | - | - |
| (1,2)-OCH₂O | 6,37 (s) | 6,37 (2H, s) |

^aExperimento realizado a 500 MHz para ¹H (CDCl₃ + gotas de CD₃OD).

^bDados da literatura de acordo com COSTA et al., 2011a; COSTA, 2009 (¹H, 400 MHz CDCl₃).

A análise por espectrometria de massas proveniente de ionização química a pressão atmosférica em modo positivo de aquisição (APCI+), evidenciou uma molécula protonada [M+H]⁺ com *m/z* 276 Da, mostrando compatibilidade com a fórmula molecular C₁₇H₉NO₃ e de acordo com os dados de RMN.

Submetido à fragmentação, este íon apresentou perdas sequenciais de 28u (FIGURA 39 e 40), evidenciando uma estrutura não aporfínica do tipo *stricto sensu*. Este comportamento apresenta conformidade com o que ocorre para alcaloides oxoaporfínicos, sendo estas perdas características com a estrutura da substância liriodenina (SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015).

FIGURA 39: Perfil de fragmentações da substância PXCМ-2A.

Frag PC - 2.A89_APCI. #95-100 RT: 1,36-1,42 AV: 6 NL: 4,50E7
F: + c APCI Full ms2 276,000 [100,000-2

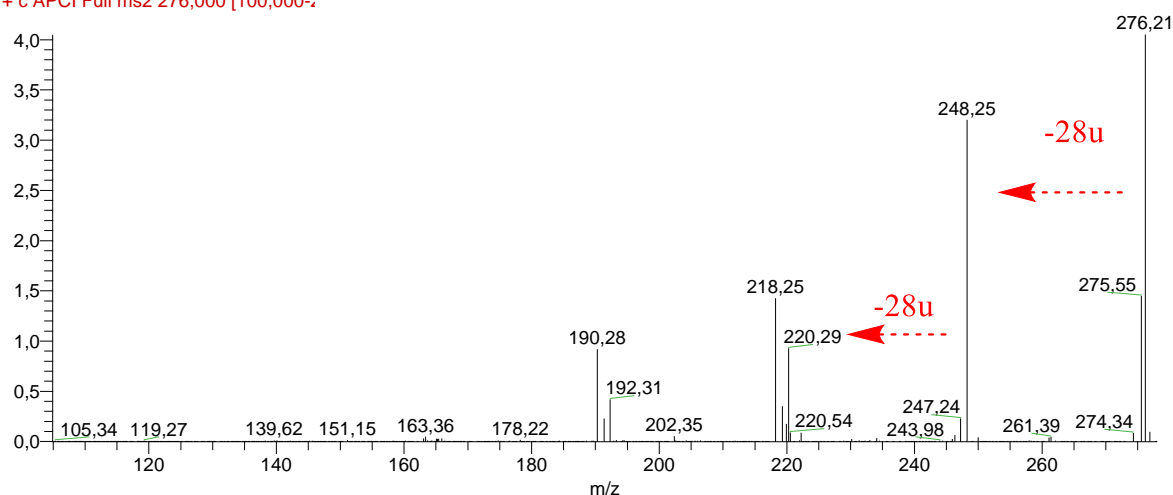
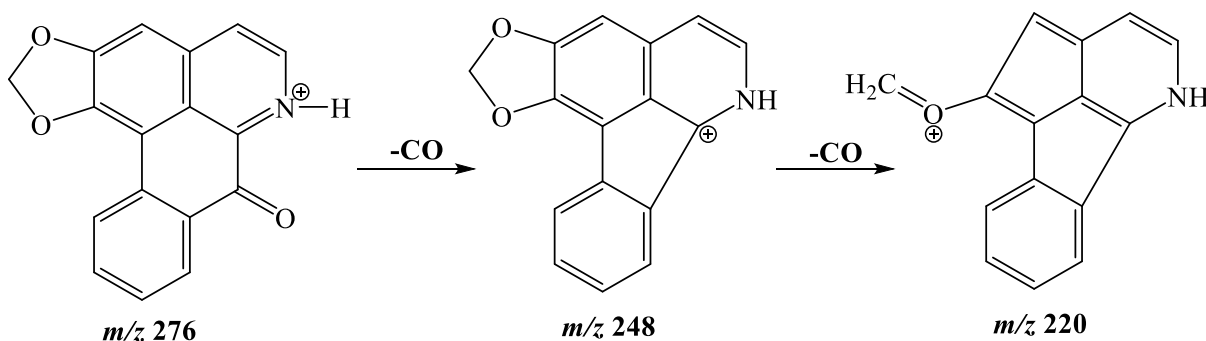
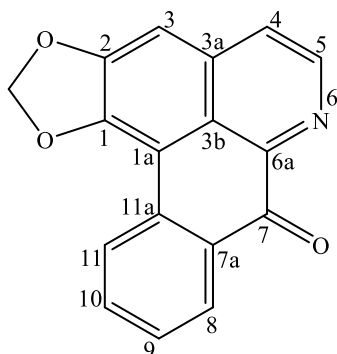


FIGURA 40: Proposta de fragmentação para o íon m/z 276 [M+H]⁺ (PXCМ-2A).



A partir dos dados obtidos pelas análises de RMN de ¹H, EM e comparação com os dados descritos na literatura (COSTA et al., 2011a), permitiu-nos identificar **PXCМ-2A** como sendo o alcaloide oxoaporfino conhecido como **liriodenina** (FIGURA 41). Este alcaloide é bastante distribuído na família Annonaceae sendo encontrado praticamente em quase todos os gêneros já estudados (GUINAUDEAU et al., 1979, 1983, 1988, 1994; OLIVEIRA et al., 1987; RABELO et al., 2014b; TELES et al., 2015; LÚCIO, 2015a).

FIGURA 41: Fórmula estrutural da liriiodenina.



5.2.3 Caracterização estrutural de PXCM-3A

A amostra **PXCM-3A** apresentou-se como sólido amorfo de coloração branca com rendimento de 6,8 mg. A análise realizada por CCDA com uso do reagente de Dragendorff não evidenciou a presença de nitrogênio na molécula (coloração alaranjada), indicando não se tratar de um alcaloide.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 42 a 48) observou-se sinais em δ 5,69 (1H, *s*), caracterizando um hidrogênio olefínico H-7 (FIGURA 43) e δ 4,33 (1H, *quinteto*, $J = 3,5$ Hz) indicando um hidrogênio oximetínico H-3 (FIGURA 44).

FIGURA 42: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-3A.

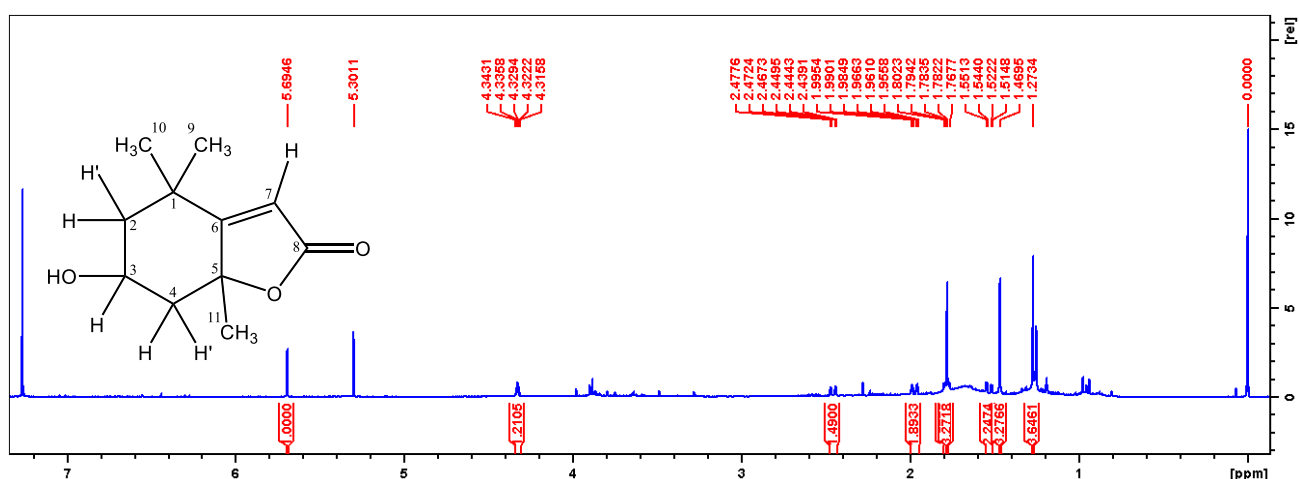


FIGURA 43: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.

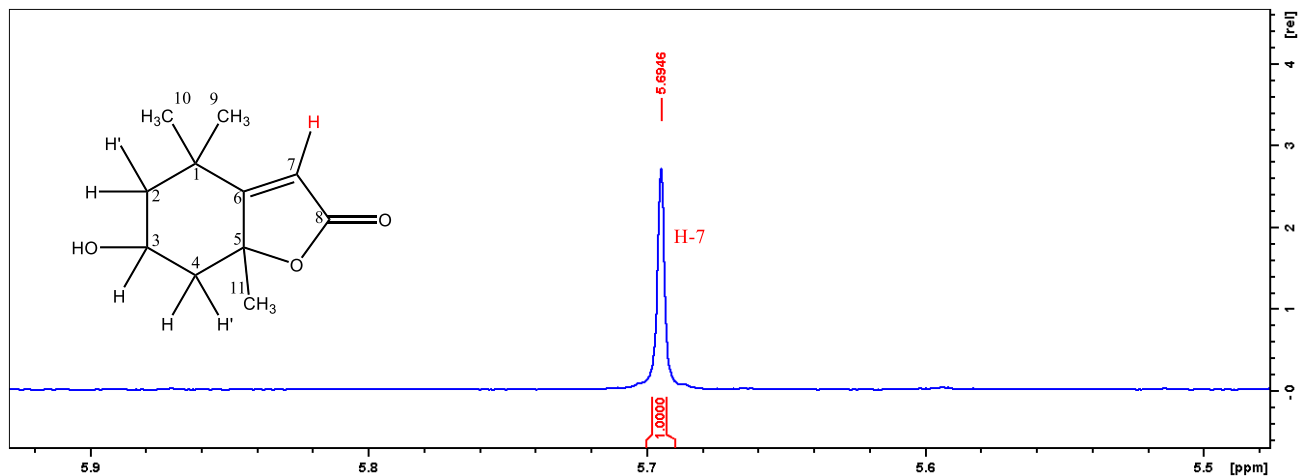
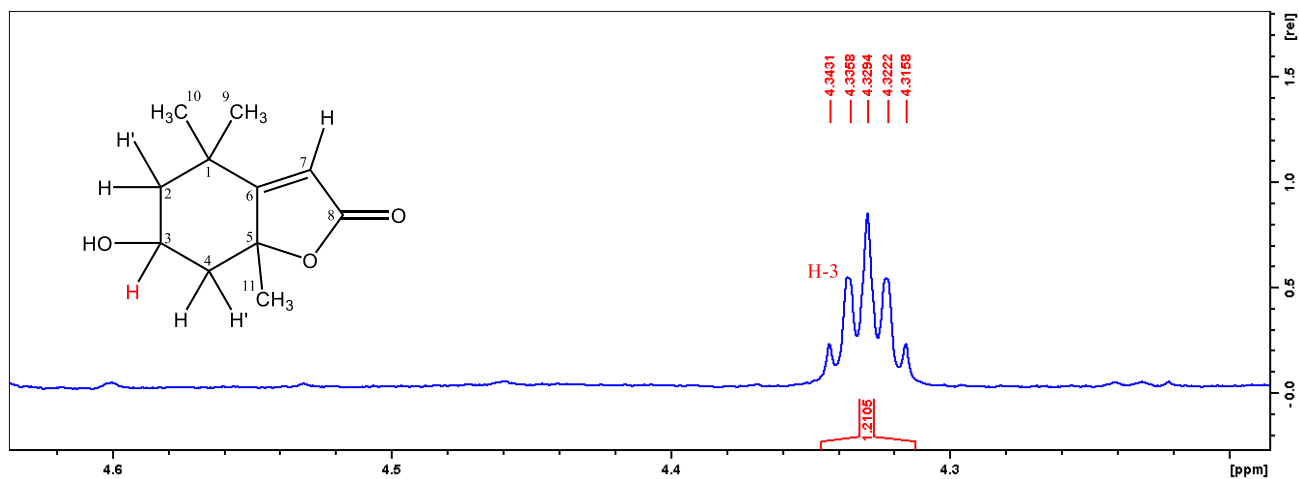


FIGURA 44: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.



Os deslocamentos dos sinais dos hidrogênios em δ 2,45 (1H, *dt*, $J = 14,0$ e $2,5$ Hz), δ 1,97 (1H, *dt*, $J = 14,5$ e $2,5$ Hz), δ 1,79 (1H, *dd*, $J = 14,0$ e $4,0$ Hz) e δ 1,53 (1H, *dd*, $J = 14,5$ e $3,6$ Hz) caracterizam os hidrogênios metilênicos H-4, H-2, H-4' e H-2' respectivamente (FIGURA 45, 46 e 47).

FIGURA 45: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.

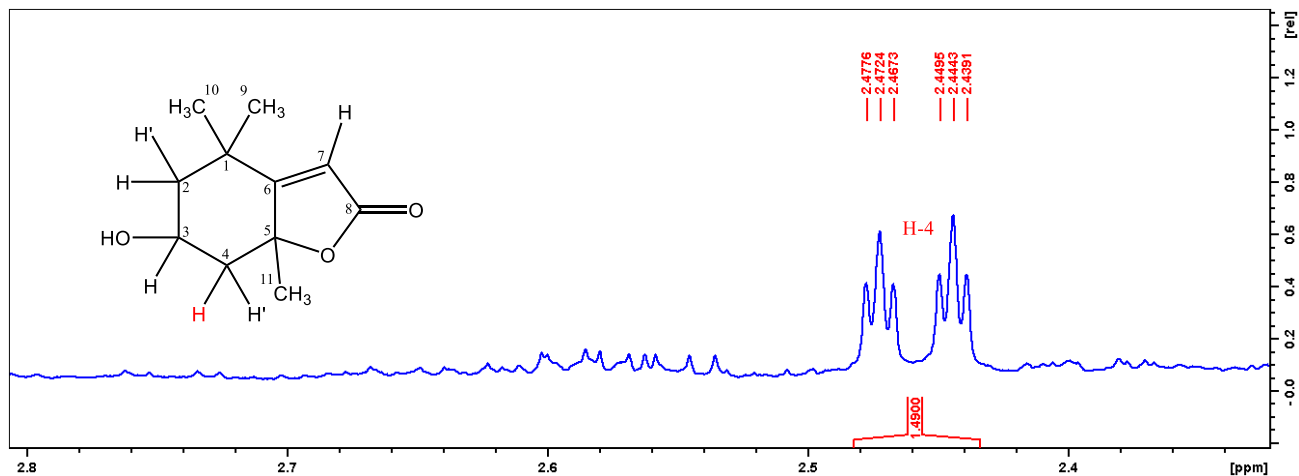


FIGURA 46: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.

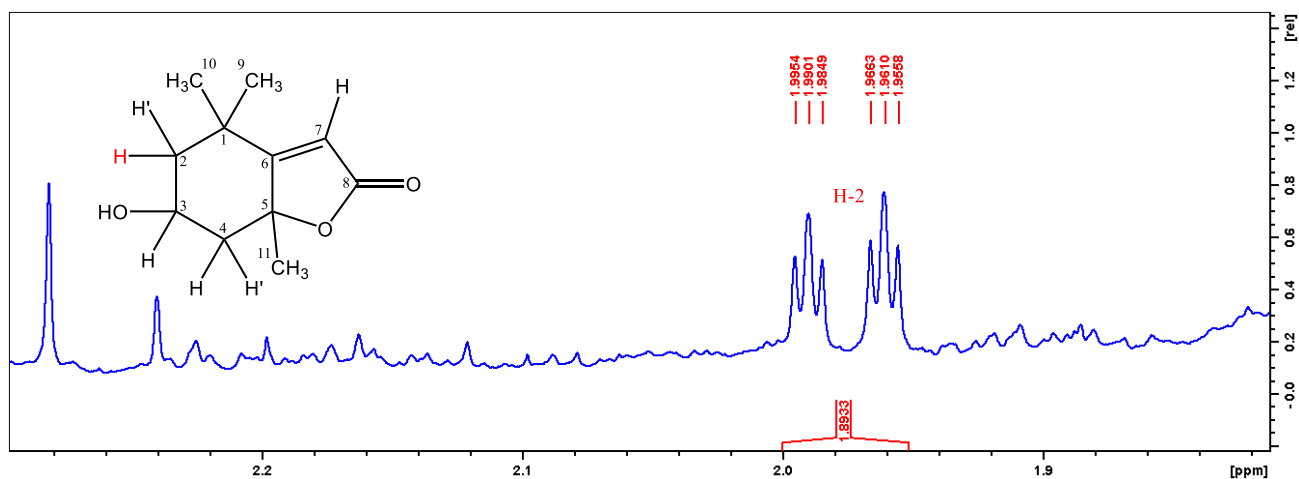
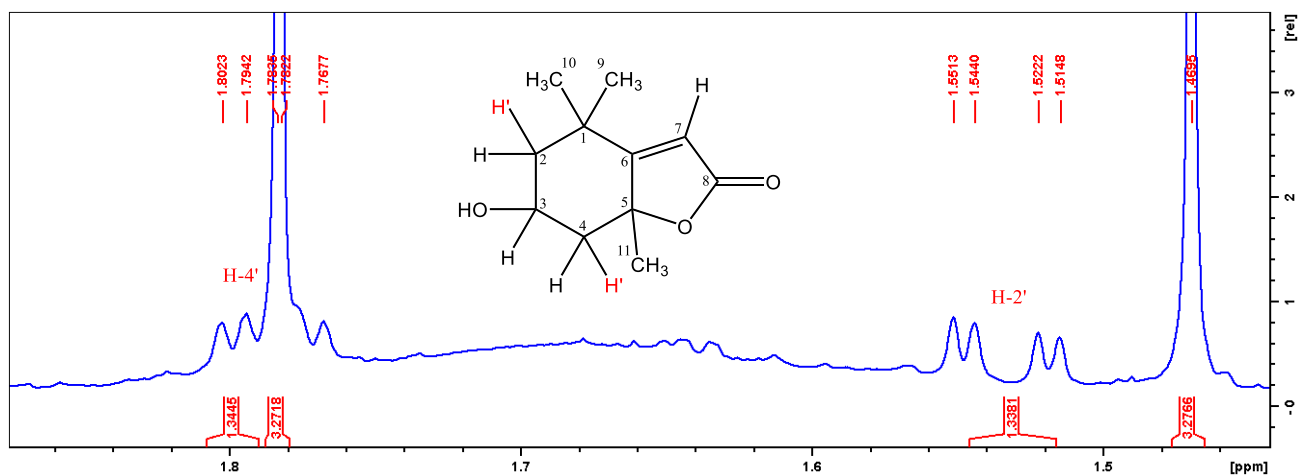
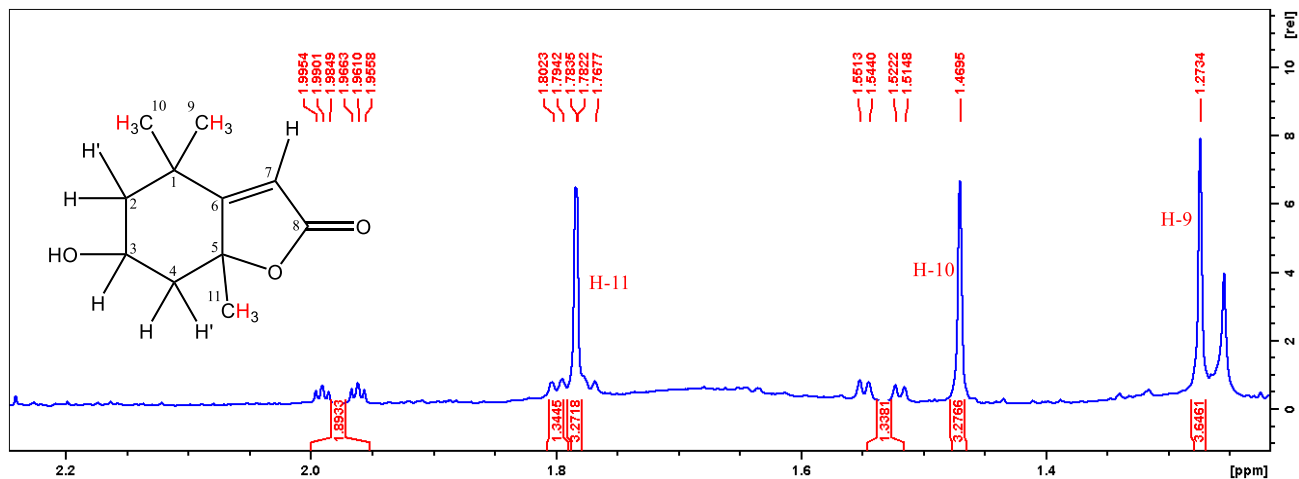


FIGURA 47: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.



Pode-se ainda observar três sinais em δ 1,27 (3H, s), δ 1,47 (3H, s) e δ 1,78 (3H, d, $J = 0,7$ Hz), que caracterizam os hidrogênios metílicos H-9, H-10 e H-11 respectivamente (FIGURA 48).

FIGURA 48: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCМ-3A.



Pelas análises dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 49) e DEPT 135 (FIGURA 50), e dos mapas de correlação HSQC (FIGURA 51 a 53) e HMBC (FIGURA 54 e 55) foi possível observar a presença de onze carbonos, sendo os sinais em δ 26,4 (C-9), δ 27,0 (C-11) e δ 30,6 (C-10) atrelados a três grupos metilas, enquanto que os sinais em δ 171,8 e δ 112,9 referem-se aos carbonos olefínicos trissubstituídos C-8 e C-7, enquanto que o deslocamento em δ 66,8 refere-se ao carbono portador do grupo hidroxila secundária em C-3. Pode-se ainda conferir os sinais em δ 182,3 referente ao carbono olefínico C-6 e δ 86,6 referente ao C-5. O sinal em δ 45,6 refere-se a C-4,4', δ 47,3 refere-se a C-2,2' e o sinal δ 35,9 atribuiu-se ao C-1 (FIGURA 49 e 50, TABELA 9).

FIGURA 49: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.

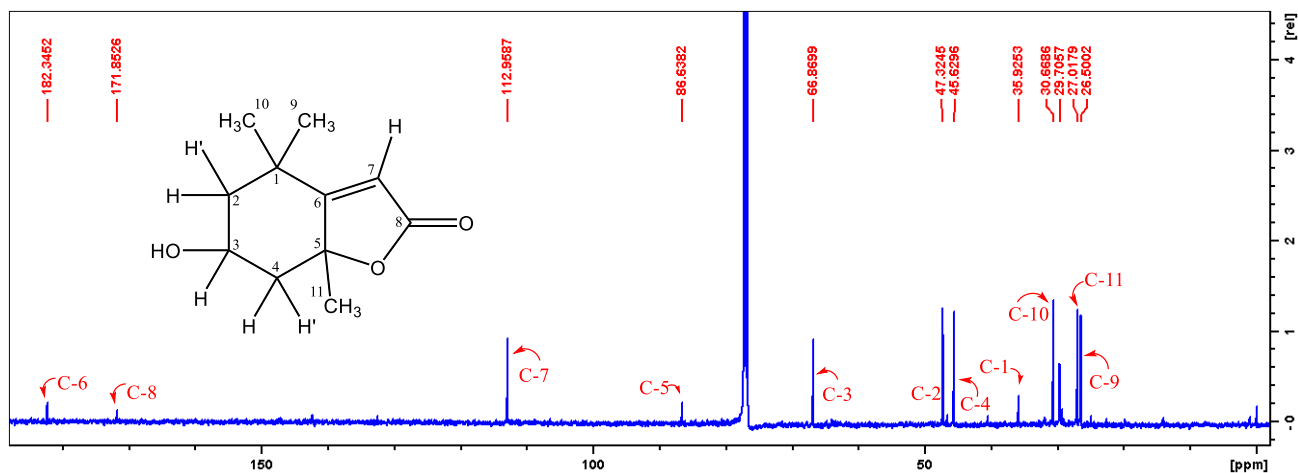


FIGURA 50: Espectro de DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.

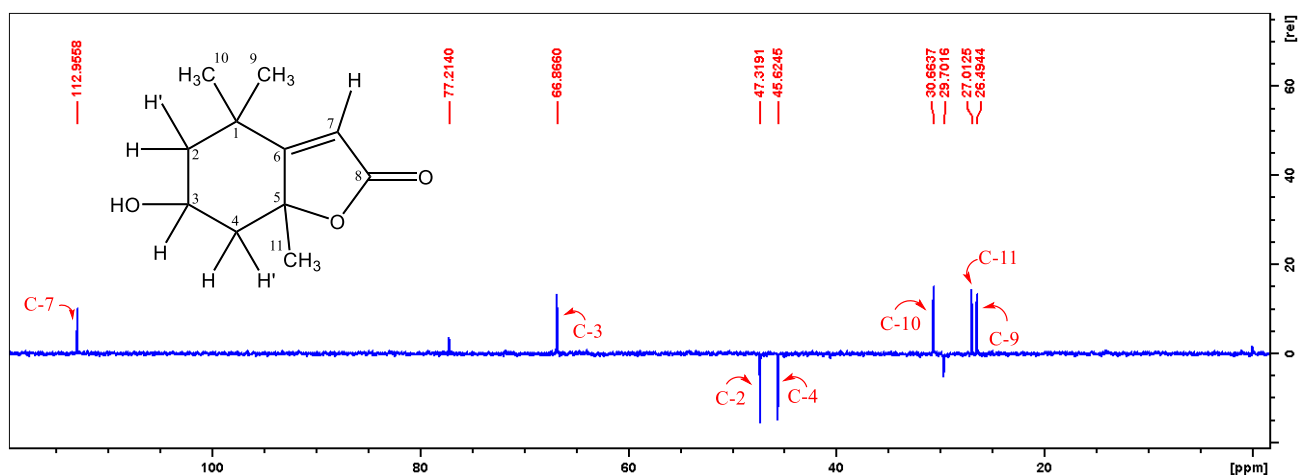


FIGURA 51: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.

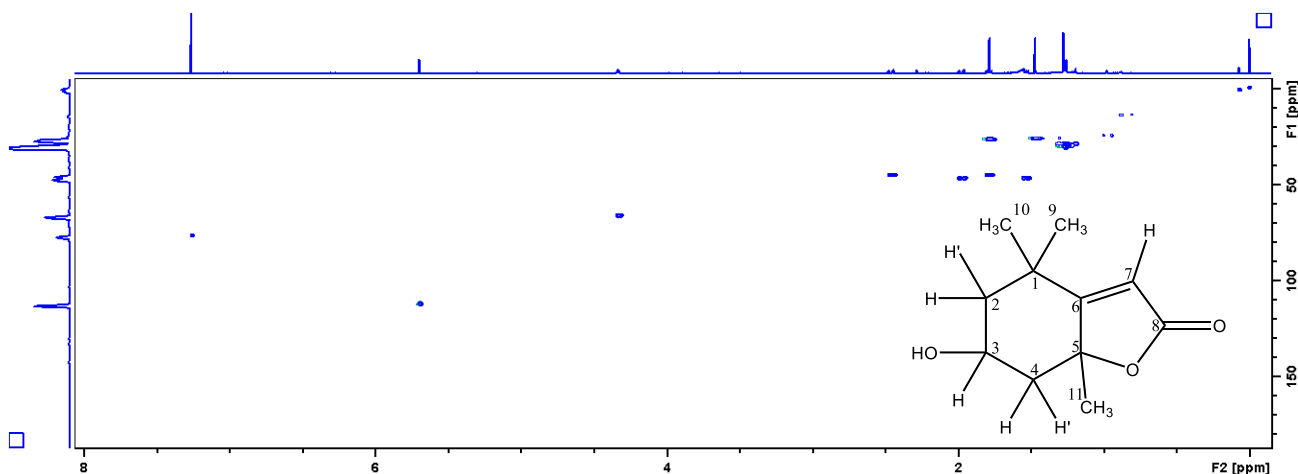


FIGURA 52: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.

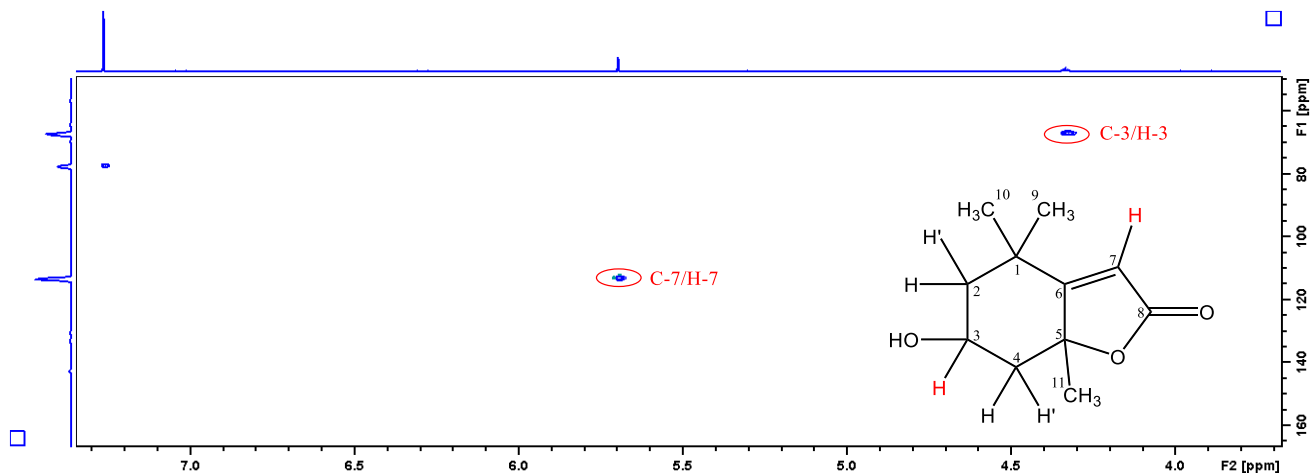
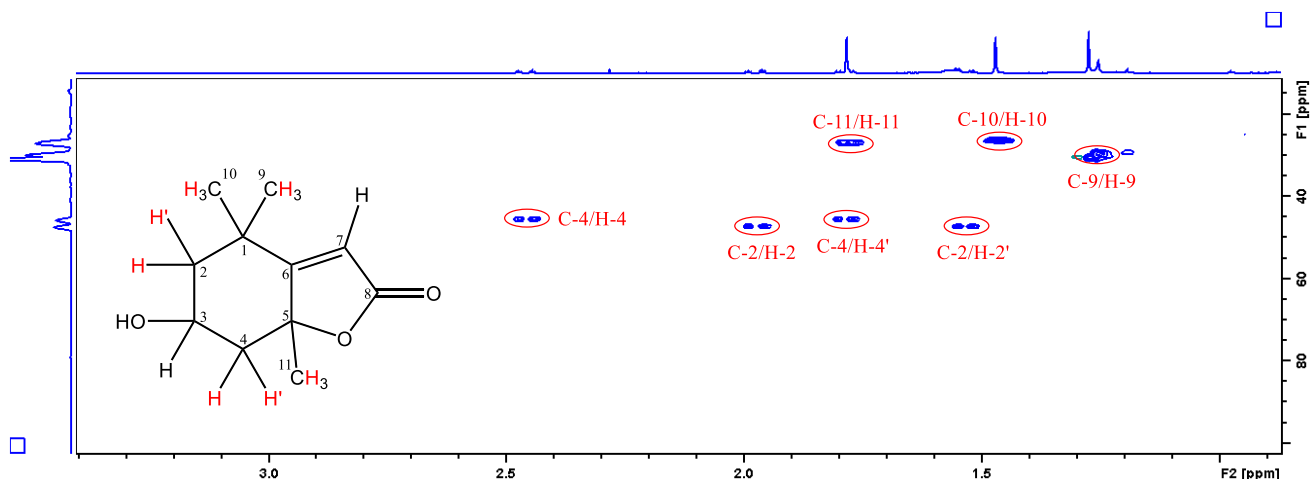


FIGURA 53: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.



Por meio das observações no mapa de correlações HMBC (FIGURA 54 e 55), verificou-se as correlações do H-11 a J^3 com o sinal do carbono metilênico em δ 51,0 (C-4), J^2 com o sinal de carbono em δ 86,6 (C-5) e em J^3 com o sinal de carbono em δ 182,3 (C-6). No mapa de HMBC (FIGURA 54 e 55) também foi possível observar as correlações dos hidrogênios H-9 e H-10, sendo observados para o H-10 correlações em J^2 com o sinal de carbono em 35,9 (C-1) e em J^3 com os sinais em δ 26,4, δ 47,3 e δ 182,3, referentes aos sinais de carbonos C-10, C-2 e C-6, respectivamente, enquanto que para o H-9 correlações em J^2 com o sinal de carbono em 35,9 (C-1) e em J^3 com os sinais em δ 30,6, δ 47,3 e δ 182,3, referentes aos sinais de carbonos C-10, C-2 e C-6, respectivamente. Estas entre outras correlações podem ser conferidas na TABELA 9.

FIGURA 54: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.

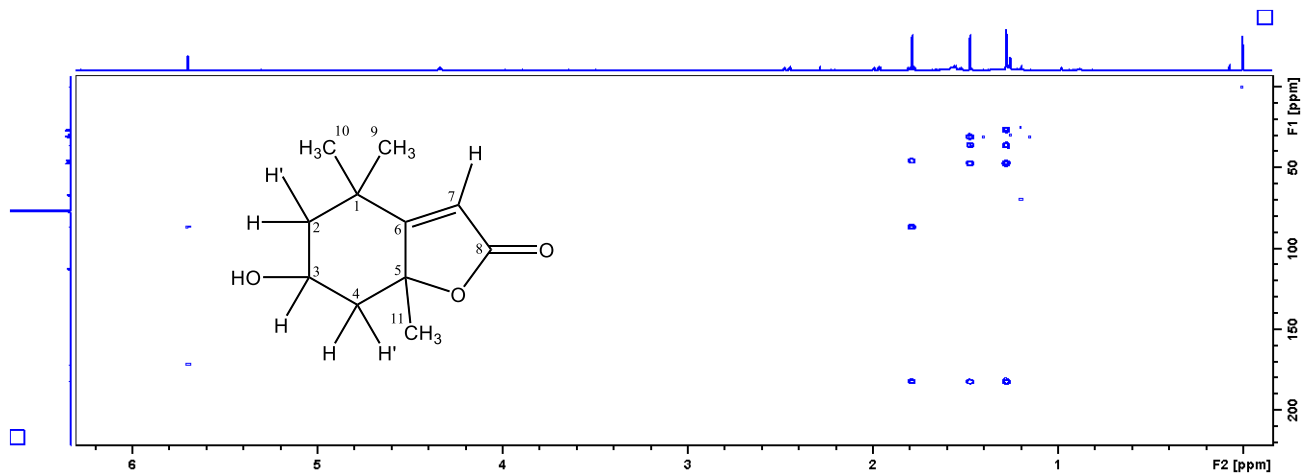
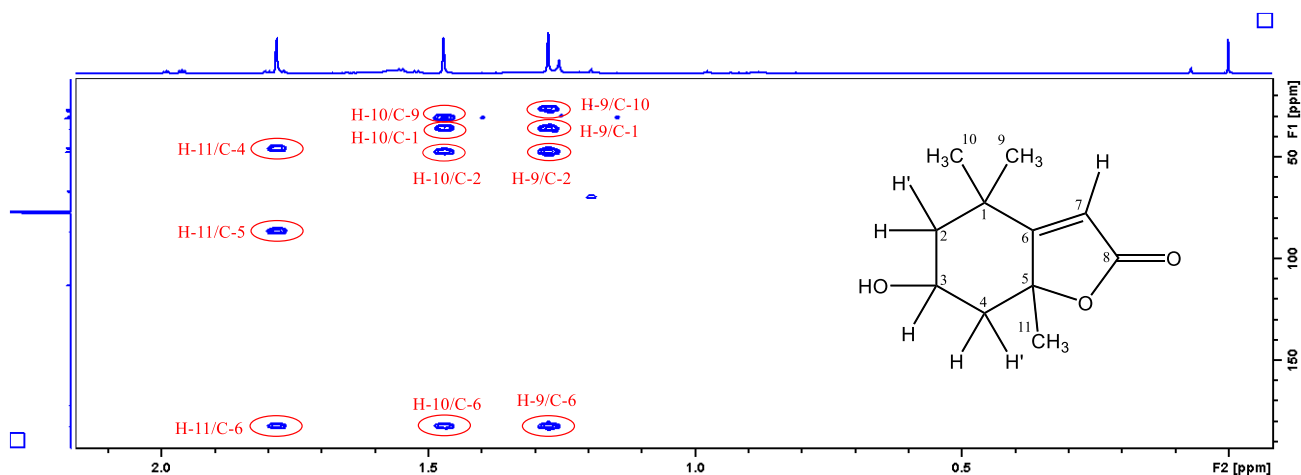


FIGURA 55: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-3A.



Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D, bem como comparações com os dados da literatura observou-se semelhanças quando comparados com os dados da lactona terpênic loliolida conforme descrito na TABELA 9.

TABELA 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de PXCM-3A.

| Posição | PXCM-3A | | | Loliolida | |
|-----------|--|---|---|---|---|
| | ^1H δ (mult., J em Hz) ^a | ^{13}C (δ) ^{a,b} | HMBC (^1H - ^{13}C) ^a | ^1H δ (mult., J em Hz) ^c | ^{13}C (δ) ^c |
| 1 | - | 35,9 C | - | - | 36,0 |
| 2 | 1,97 <i>ddd</i> (14,5; 2,8 e 2,4) | 47,3 CH ₂ | 3, 4 e 9 | 2,00 <i>ddd</i> | 47,3 |
| 2' | 1,53 <i>dd</i> (14,5 e 3,7) | | 1, 9 e 10 | 1,56 <i>dd</i> | |
| 3 | 4,33 <i>quinteto</i> (3,5) | 66,8 CH | - | 4,36 <i>m</i> | 66,6 |
| 4 | 2,45 <i>ddd</i> (14,1; 2,8 e 0,4) | 45,6 CH ₂ | 2, 3, 5, 6 e 11 | 2,48 <i>ddd</i> | 45,6 |
| 4' | 1,79 <i>ddd</i> (14,1; 4,0 e 0,7) | | 3 e 11 | 1,81 <i>dd</i> | |
| 5 | - | 86,6 C | - | - | 86,8 |
| 6 | - | 182,3 C | - | - | 183,0 |
| 7 | 5,69 <i>s</i> | 112,9 CH | 5, 6 e 8 | 5,78 <i>s</i> | 113,0 |
| 8 | - | 171,8 C | - | - | 171,9 |
| 9 | 1,47 <i>s</i> | 26,4 CH ₃ | 1, 2, 6 e 10 | 1,49 <i>s</i> | 26,5 |
| 10 | 1,27 <i>s</i> | 30,6 CH ₃ | 1, 2, 6 e 9 | 1,30 <i>s</i> | 30,7 |
| 11 | 1,78 <i>d</i> (0,7) | 27,0 CH ₃ | 4, 5 e 6 | 1,81 <i>s</i> | 27,0 |

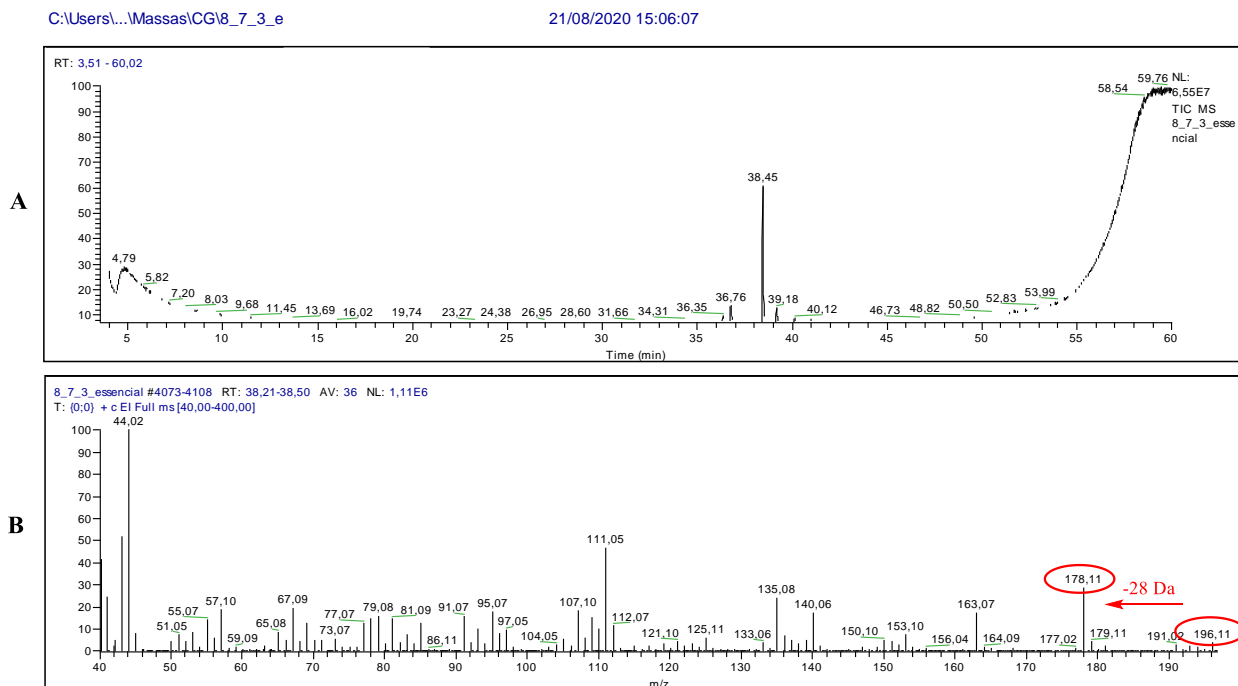
^aExperimento realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno.

^bMultiplicidades determinadas mapas de correlação HSQC e HMBC.

^cMURATA et al., 2019 RMN (^1H : 500 MHz, ^{13}C : 125 MHz; CD_3OD). (δ) Deslocamentos em ppm.

A presença da loliolida foi ainda confirmada pela análise por CG/EM (FIGURA 56) que evidenciou a presença de uma substância com tempo de retenção de 38,45 minutos que após submetida a técnica de bombardeamento por impacto eletrônico (IE) forneceu um íon radicalar em m/z 196,11 M^+ compatível com a estrutura da substância proposta pelas análises por RMN de ^1H e ^{13}C 1D e 2D. Pela análise conjunta desses experimentos (EM e RMN) foi possível sugerir a fórmula molecular $\text{C}_{11}\text{H}_{16}\text{O}_3$. Um fragmento em m/z 178 sugere a perda de água na molécula $[\text{M}-18]^+$. Observou-se ainda que os fragmentos em m/z 178, 163, 153, 140, 111, 95, 85, 67 e 57 estão de acordo com os descritos na literatura para a loliolida (MURATA et al., 2019)

FIGURA 56: Espectro de massas de PXCM-3A.

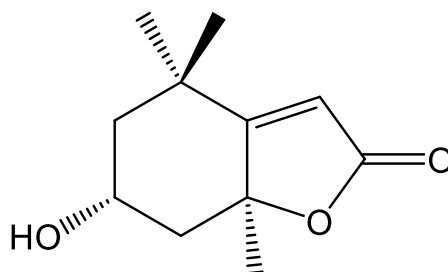


^ACromatograma de íons totais

^BEspectrometro da amostra PXCM-1A

Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D, CG/EM e comparação com os dados descritos na literatura (KIM et al., 2004; HATTAB et al., 2007; CHO et al., 2016; CONEGERO et al., 2003 e TESTA et al., 2012; MURATA et al., 2019) foi possível identificar **PXCM-3A** como sendo a lactona terpênic, conhecida como **loliolida** (FIGURA 57). Este composto já foi identificado em gêneros da família Annonaceae como *Duguetia*, *Rollinia* e *Annona* (DANTAS, 2018, COLOM, POPICH, BARDON, 2007; NARDELLI et al., 2021). Vale ressaltar que as espécies de *Rollinia* foram transferidas para dentro do gênero *Annona*.

FIGURA 57: Fórmula estrutural da loliolida.

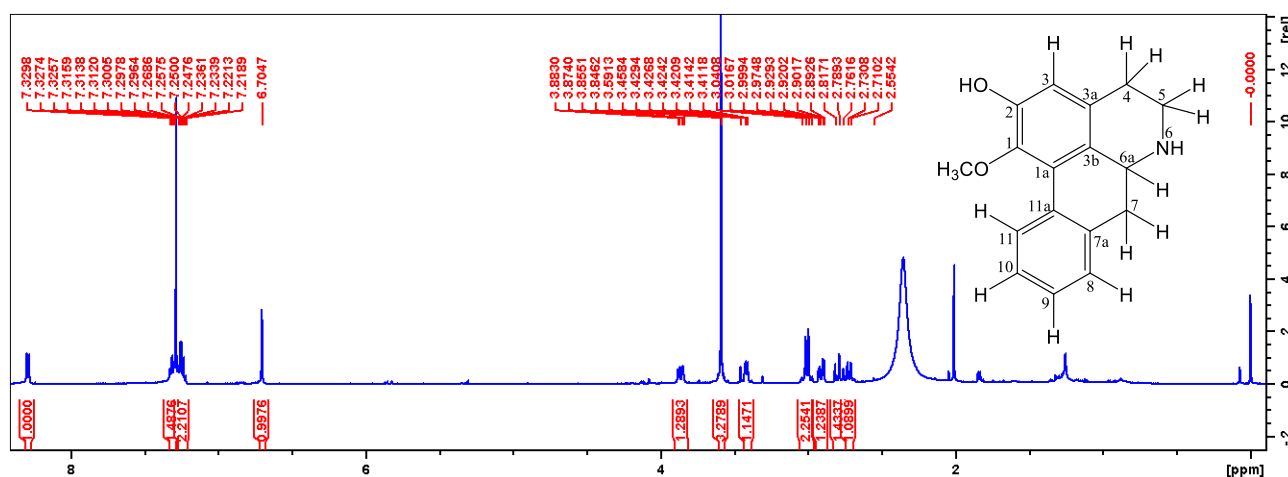


5.2.4 Caracterização estrutural de PXCM-4A

A amostra **PXCM-4A** apresentou-se como sólido amorfo de coloração marrom de com rendimento de 5,6 mg. A análise realizada por CCDA com uso do reagente de Dragendorff evidenciou um *spot* de coloração alaranjada diferente da substância PXCM-1A, mas semelhante a substância PXCM-2A, indicando uma provável presença de nitrogênio na estrutura.

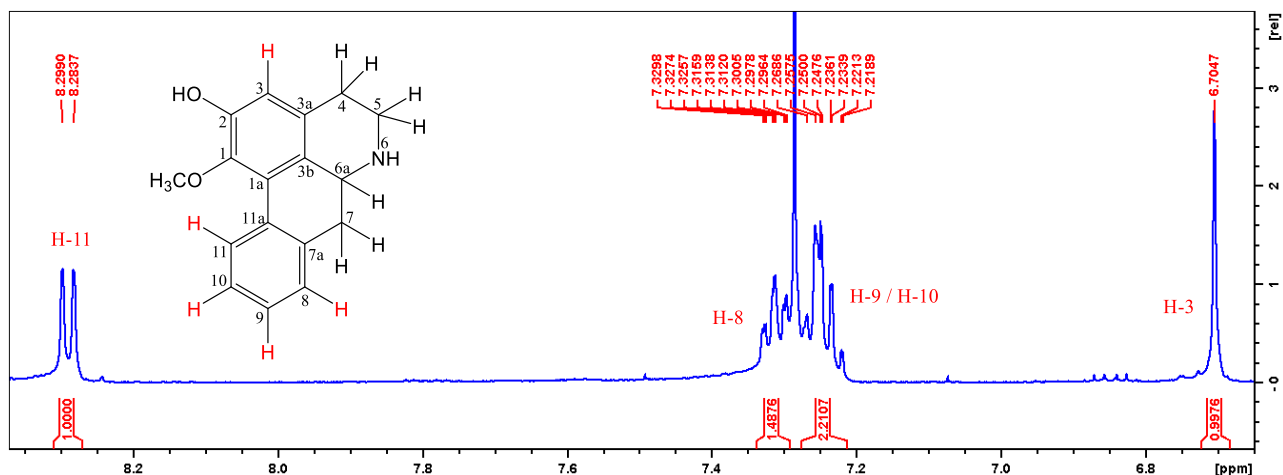
Pela análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 58 a 61) observou-se sinais característicos de um alcaloide do tipo aporfino *sensu stricto*, devido a presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos entre 8,30 a 6,70 ppm, metilênicos e metínico entre δ 3,87-2,70, conforme GUINAUDEAU et al., (1979, 1983, 1988 e 1994).

FIGURA 58: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-4A.



Na região dos hidrogênios aromáticos foi possível observar a presença de quatro sinais, sendo três deles localizados em δ 8,29 (1H, *d*, $J = 7,9$ Hz), δ 7,24 (2H, *m*) e δ 7,32 (1H, *m*) característicos dos hidrogênios aromáticos H-11, H-9/H-10 e H-8, respectivamente, ligados ao anel D não substituído do sistema aporfino *sensu stricto*, assim como um sinal em δ 6,70 (1H, *s*), característico de H-3 do anel A do sistema aporfino dissustituído (FIGURA 59, TABELA 10).

FIGURA 59: Visão da região aromática ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-4A.



Pôde-se observar também, a presença de sinais típicos de hidrogênios metilênicos diastereotópicos, sendo o deslocamento de δ 3,00 (2H, *m*) conferidos aos hidrogênios H-4 pseudoequatorial e H-5 pseudoaxial, já o sinais δ 2,71 (1H, *m*) e δ 3,40 (1H, *m*) atribuiu-se aos hidrogênios H-4 pseudoaxial e H-5 pseudoequatorial respectivamente, característicos do anel B do esqueleto aporfino. Os sinais dos hidrogênios H-7 pseudoequatorial e H-7 pseudoaxial foram observados em δ 2,90 (1H, *dd*, $J=13,8$ e $4,5$ Hz) e δ 2,80 (1H, *t*, $J = 13,5$ Hz), além de um sinal de hidrogênio metínico presente em δ 3,85 (1H, *dd*, $J = 13,9$ e $4,5$ Hz) referente a posição H-6a (FIGURA 60 e 61), as posições foram confirmadas com base nos mapas de correlação HSQC (FIGURA 22 a 24) e HMBC (FIGURA 25 e 26), tornando possível também a atribuição dos seus respectivos carbonos.

FIGURA 60: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-4A.

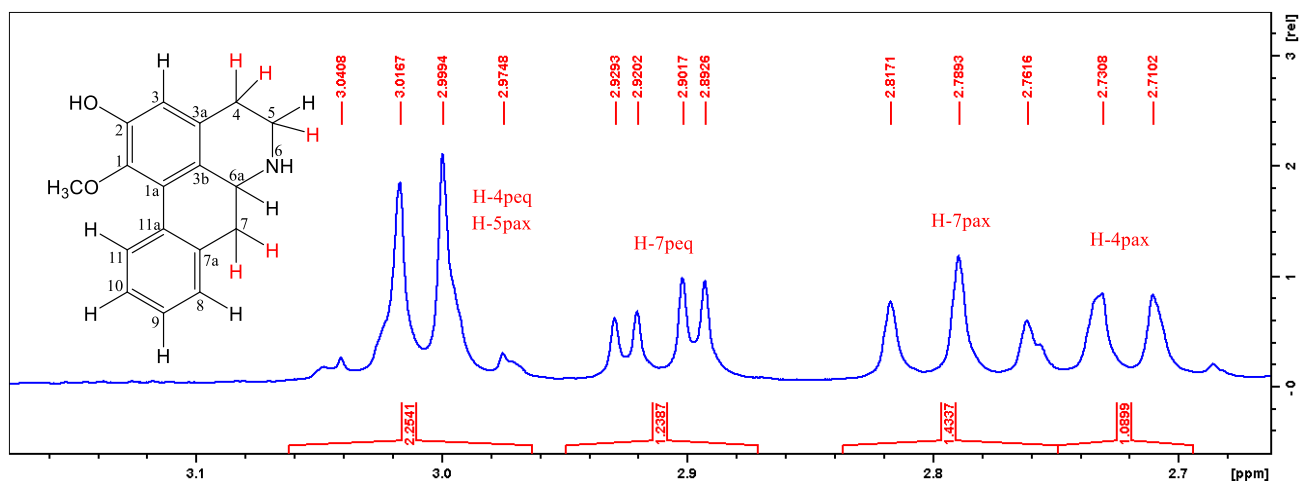
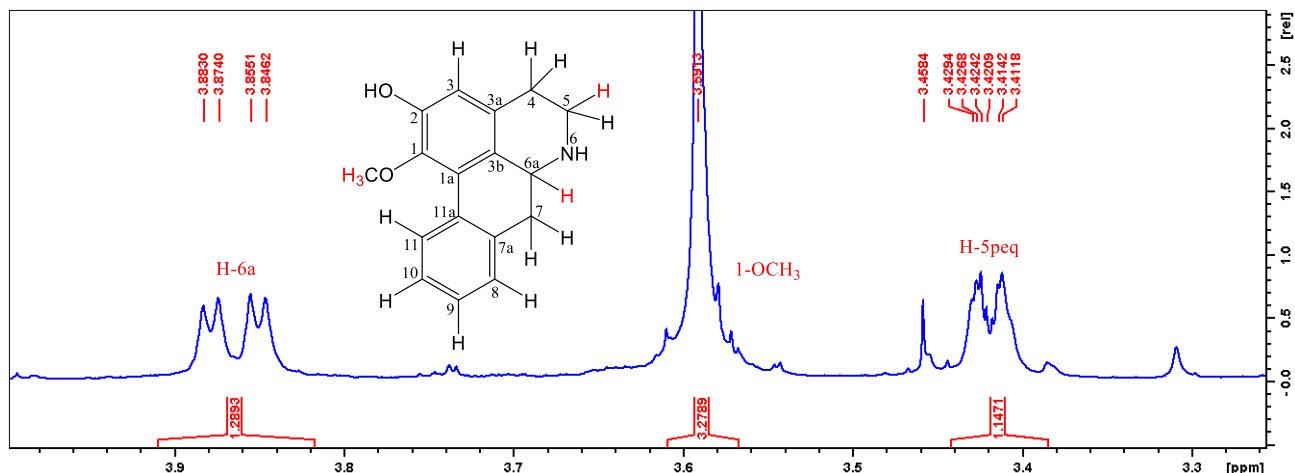


FIGURA 61: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-4A.



O deslocamento observado em δ 3,59 (3H, s) com integração para três hidrogênios, característico de um grupo metoxílico, possibilitou a hipótese de que haveria uma estrutura na qual o anel A seria dissustituído, sendo o outro um provável substituinte oxigenado, como um grupo hidroxila, ideia esta a qual foi confirmada observando-se os dados da literatura e mapa de correlação HMBC. Seus respectivos carbonos hidrogenados foram dispostos a partir da análise do mapa de correlação HSQC (FIGURA 22 a 24) (TABELA 10).

Pelas análises dos espectros de RMN de ^{13}C (FIGURA 62) e DEPT 135 (FIGURA 63), e os mapas de correlação HSQC (FIGURA 64 a 66) e HMBC (FIGURA 65 e 66) observou-se a presença de 17 carbonos, sendo 12 aromáticos localizados entre δ 128 e δ 114,6, além de três sinais de carbonos metilênicos em δ 42,5, δ 36,4 e δ 27,9 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente e um carbono metínico em δ 53,2, atrelado ao C-6a, podendo também atribuir o valor do carbono metoxílico em δ 60,3.

FIGURA 62: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A.

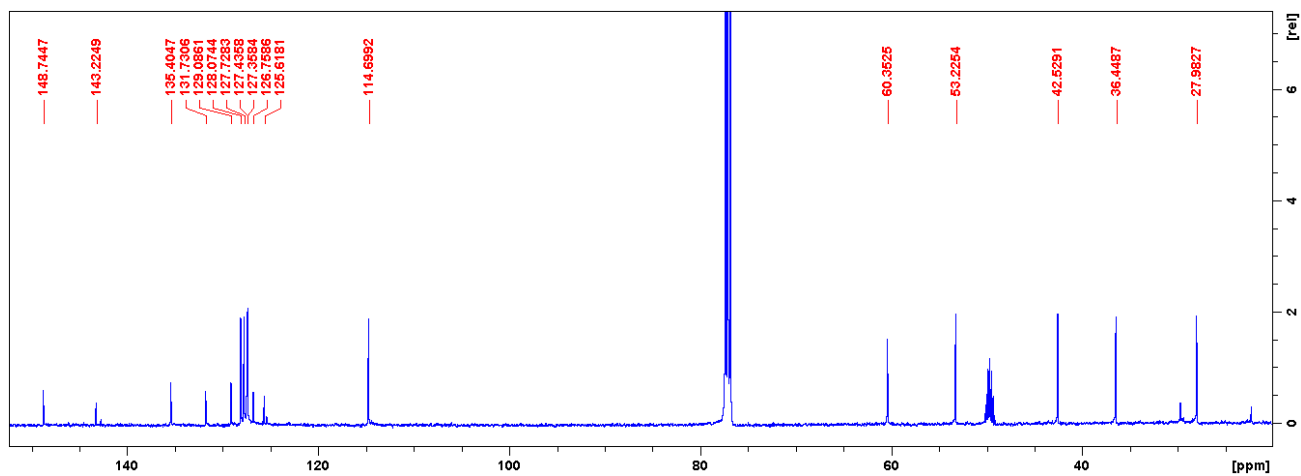


FIGURA 63: Espectro de RMN de DEPT 135 ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A.

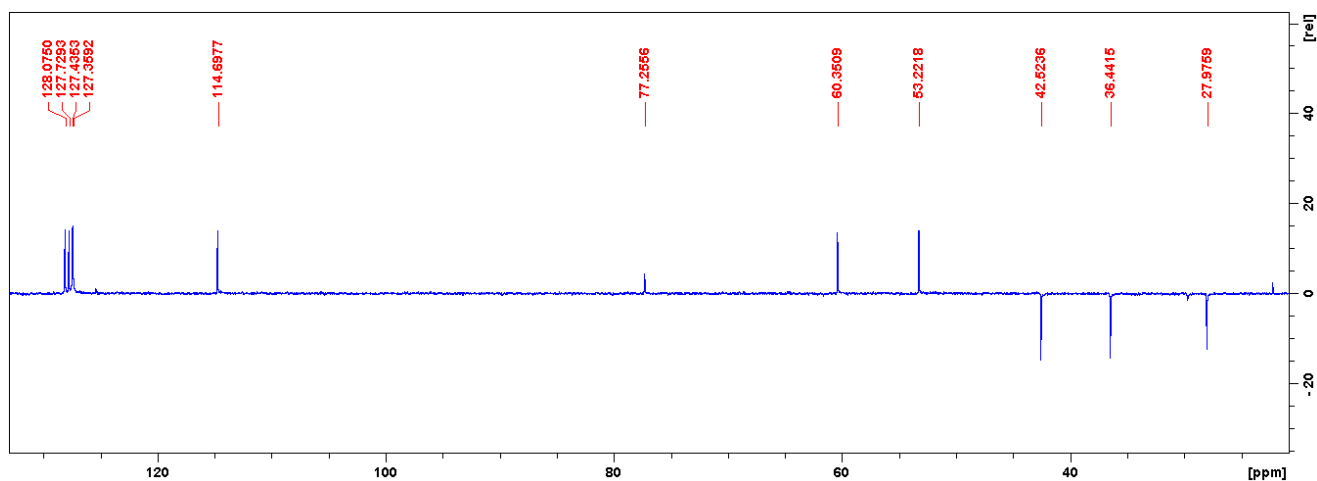


FIGURA 64: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A.

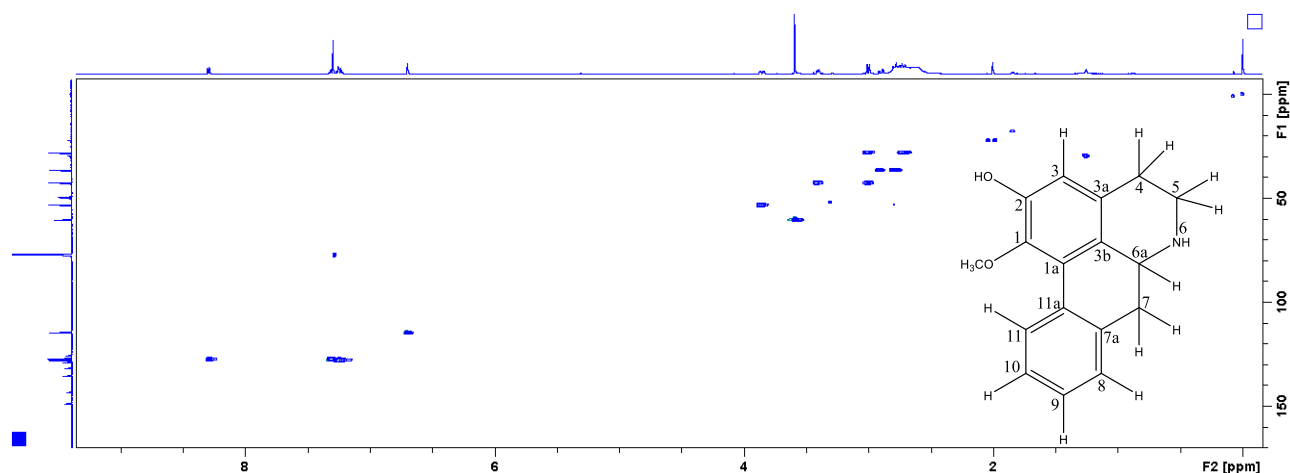


FIGURA 65: Visão da região aromática ampliada do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A.

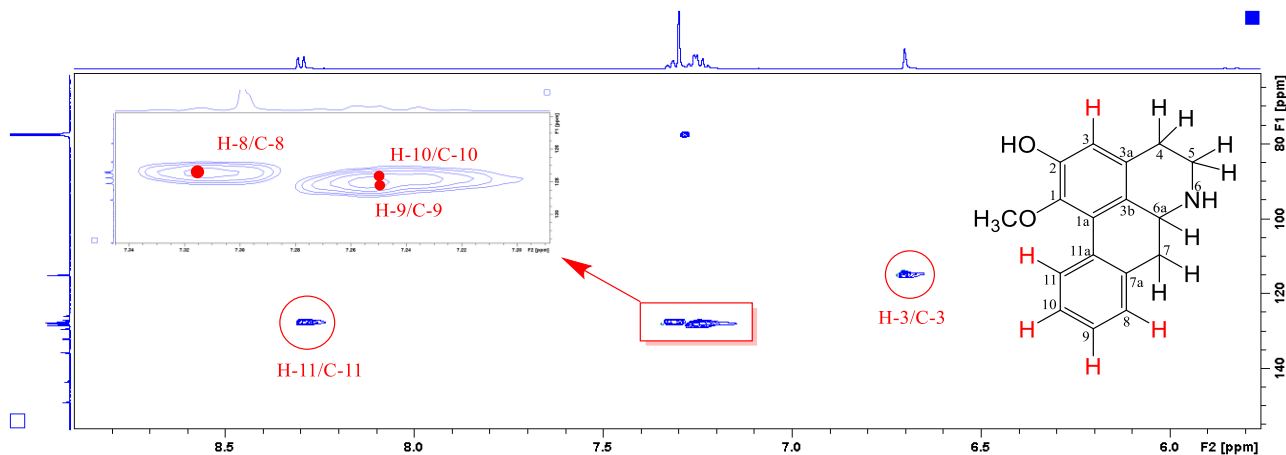
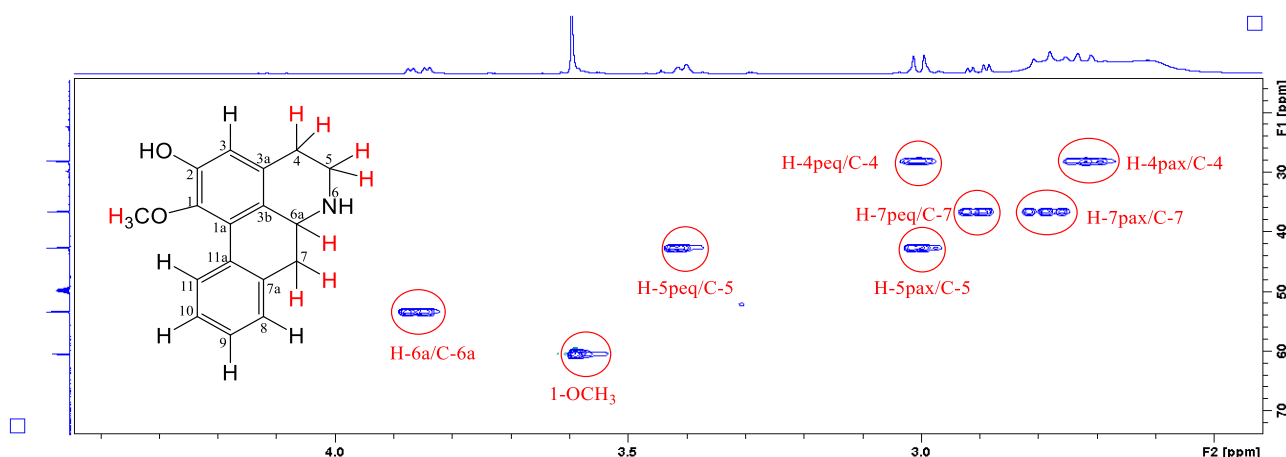


FIGURA 66: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A.



O deslocamento químico de hidrogênio em δ 6,72 (1H, *s*) conferido ao H-3, permitiu confirmar o grupo hidroxila presente no composto, uma vez que mostrou correlação em J^2 com o sinal do carbono em δ 148,7 atribuído a C-2. Este sinal de hidrogênio apresentou ainda uma outra correlação à J^3 com o sinal em δ 143,2 conferido ao C-1, portador do grupo metoxílico em δ 3,59 (1-OCH₃). O mesmo sinal (δ 6,72) mostrou ainda correlação a J^3 com o deslocamento do carbono metilênico em δ 27,9, atribuído ao C-4, de tal forma, esses fatores levaram a confirmação de sua localização no anel A do composto (FIGURA 67 e 68).

FIGURA 67: Visão geral do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A.

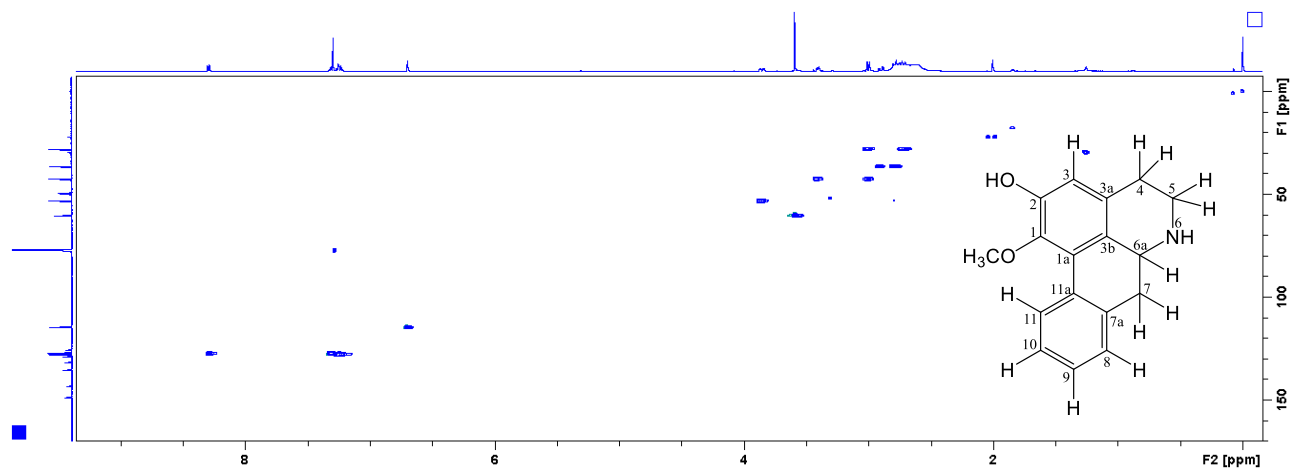
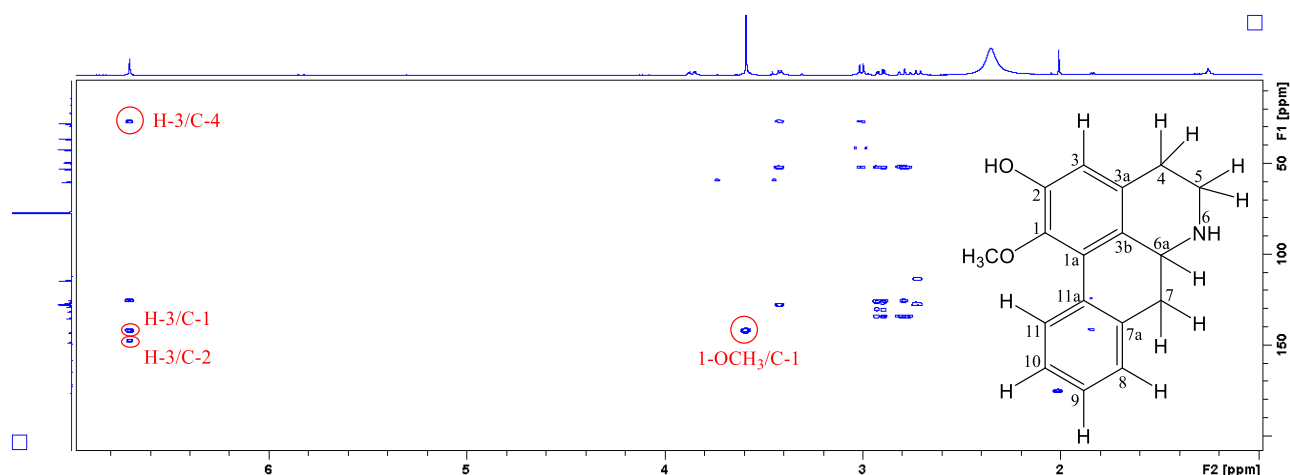


FIGURA 68: Visão de mmpliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de PXCM-4A.



Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D, bem como dados da literatura observou-se evidências compatíveis com o alcaloide aporfino *sensu stricto* asimilobina, conforme observado na TABELA 10.

TABELA 10: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de PXCM-4A.

| Posição | PXCM-4A | | | Asimilobina | |
|--------------------------|---|---|---|--|---|
| | ^1H δ (mult., J em Hz) ^a | ^{13}C (δ) ^{a,b} | HMBC (^1H - ^{13}C) ^a | ^1H δ (mult., J em Hz) ^c | ^{13}C (δ) ^c |
| 1 | - | 143,2 C | - | - | 143,5 C |
| 1^a | - | 125,6 C | - | - | 125,9 C |
| 2 | - | 148,7 C | - | - | 148,9 C |
| 3 | 6,70 <i>s</i> | 114,6 CH | 1, 2, 3 ^a e 4 | 6,68 <i>s</i> | 115,1 CH |
| 3^a | - | 129,0 C | - | - | 129,2 C |
| 3b | - | 126,7 C | - | - | 127,4 C |
| 4 peq | 3,00 <i>m</i> | 27,9 CH ₂ | - | 3,01 <i>m</i> | 28,3 CH ₂ |
| 4 pax | 2,71 <i>m</i> | | | 3, 3 ^a | |
| 5 peq | 3,40 <i>m</i> | 42,5 CH ₂ | 3 ^a e 6 ^a | 3,35 <i>m</i> | 42,8 CH ₂ |
| 5 pax | 3,00 <i>m</i> | | | 4 | |
| 6^a | 3,85 <i>m</i> | 53,2 CH | - | 3,81 <i>dd</i> (13,8; 4,6) | 53,4 CH |
| 7 peq | 2,90 <i>dd</i> , (13,8; 4,5 2,80 <i>t</i> (13,8)) | 36,4 CH ₂ | 3 ^a , 6 ^a , 7 ^a , 9 e 11a | 2,86 <i>dd</i> (13,8; 4,6) | 36,9 CH ₂ |
| 7 pax | | | | 2,76 <i>t</i> (13,8) | |
| 7^a | - | 135,4 C | - | - | 135,7 C |
| 8 | 7,32 <i>m</i> | 127,4 CH | 10 e 11 ^a | 7,31 <i>ddd</i> (6,7; 2,0; 0,6) | 127,3 CH |
| 9 | 7,24 <i>m</i> | 127,4 CH | 7 ^a e 11 | 7,22 <i>m</i> | 127,6 CH |
| 10 | 7,24 <i>m</i> | 128,0 CH | 8 e 11 ^a | 7,22 <i>m</i> | 128,0 CH |
| 11 | 8,29 <i>d</i> (7,9) | 127,4 C | 1 ^a , 7 ^a e 9 | 8,32 <i>dd</i> (8,1; 0,6) | 127,6 CH |
| 11^a | - | 131,7 C | - | - | 132,9 C |
| 1-OCH₃ | 3,59 <i>s</i> | 60,3 CH ₃ | 1 | 3,60 <i>s</i> | 60,2 CH ₃ |

^aExperimento realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno.

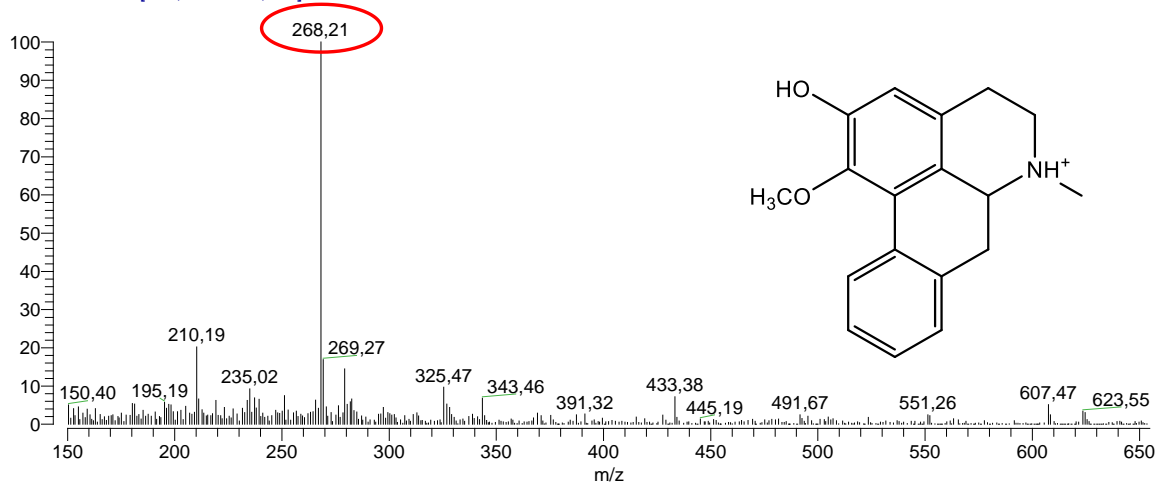
^bMultiplicidades determinadas mapas de correlação HSQC e HMBC.

^cCOSTA et al., 2015 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD). (δ) Deslocamentos em ppm.

Pela análise por espectrometria de massas (FIGURA 69), obtida por meio de ionização química a pressão atmosférica em modo positivo de aquisição (APCI+), observou-se uma molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 268 Da, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$, estando de acordo com os dados de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D.

FIGURA 69: Espectro de massas de PXCM-4A.

PC - A8.9_APCI. #195 RT: 3,35 AV: 1 NL: 8,49E6
T: + c APCI Q1MS [150,000-1000,000]



Quando submetido à fragmentação, este íon com m/z 268 (FIGURA 70) apresentou perdas sequenciais de 17, 32 e 28 u (FIGURA 70 e 71), características das perdas dos grupos $-\text{NH}_3$, $-\text{CH}_3\text{OH}$ e $-\text{CO}$, estando relacionadas com a estrutura do alcaloide assimilobina, conforme observado por Yan et al. (2013), compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$ e suportando a estrutura proposta pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D.

FIGURA 70: Perfil de fragmentações da substância PXCM-4A.

MS Frag PC874 - 5.A89_APCI. #86-88 RT: 1,17-1,19 AV: 3 NL: 1,73E7
F: + c APCI Full ms2 268,000 [100,000-270,000]

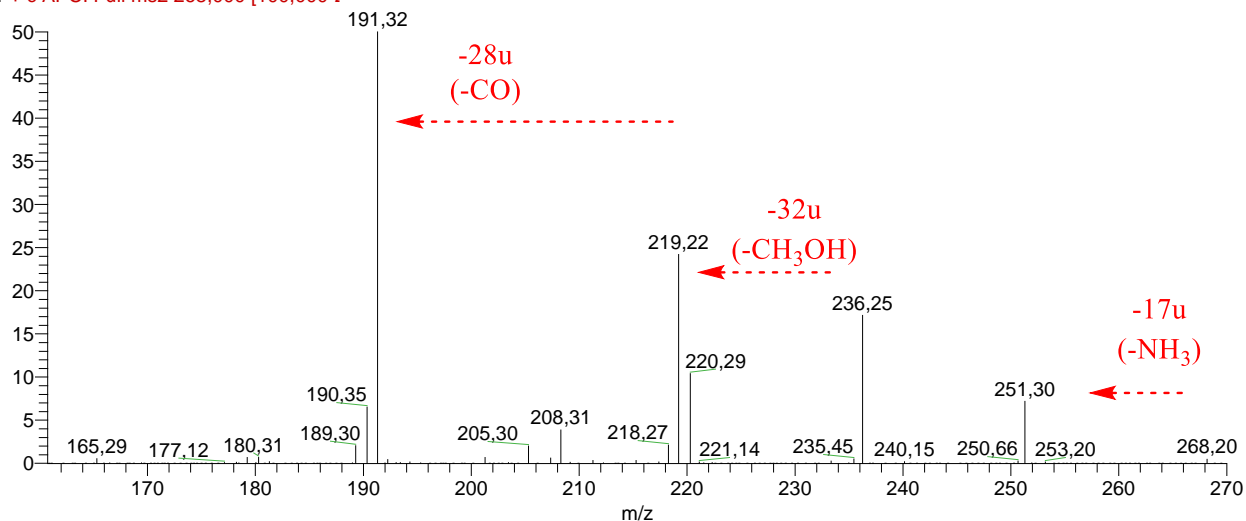
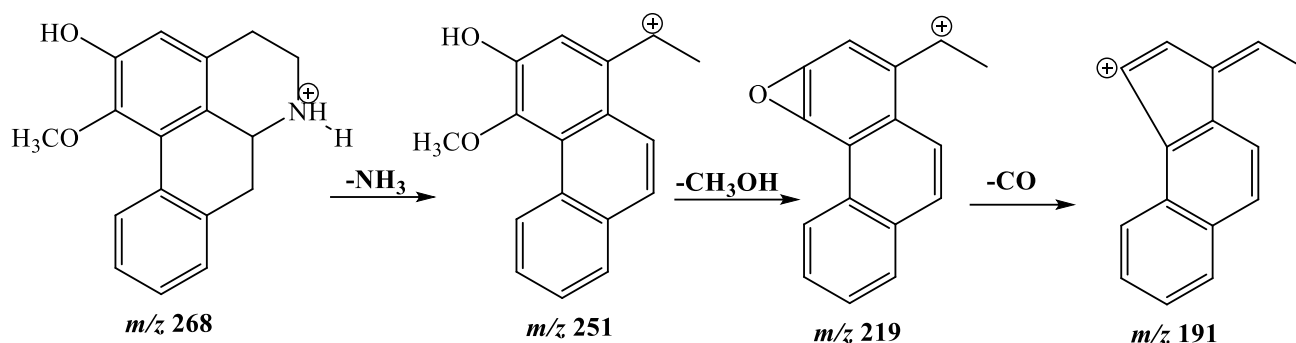
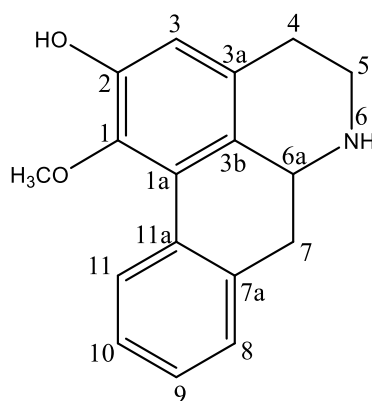


FIGURA 71: Proposta de fragmentação para o íon m/z 268 (PXCM-4A).



Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D, EM e comparação com os dados descritos na literatura (COSTA et al., 2015) foi possível identificar **PXCM-4A** como sendo o alcaloide *sensu stricto*, conhecido como **asimilobina** (FIGURA 72). Este alcaloide tem vasta distribuição na família Annonaceae, ocorrendo em vários gêneros, como *Annona*, *Anaxagorea*, *Artobotrys*, *Cymbopetalum*, *Hexalobus*, *Melodrum*, *Duguetia*, *Mitrella*, *Monocyclantus*, *Oncodostigma*, *Orophea*, *polyalthia*, *Guatteria*, *Xylopia dentre outros* (GUINAUDEAU et al., 1983, 1988, 1994; CUNHA, 2009; TELES et al., 2015; LÚCIO, 2015a).

FIGURA 72: Fórmula estrutural da asimilobina.



5.2.5 Caracterização estrutural de PXCM-5A

A amostra **PXCM-5A** apresentou-se como sólido amorfo de coloração branca com rendimento de 5,1 mg. A análise realizada por CCDA com uso do reagente de Dragendorff não evidenciou a presença de nitrogênio na molécula (coloração alaranjada), indicando não se tratar de um alcaloide. Por outro lado, quando submetido a revelação com solução de anisaldeído, observou-se um *spot* de coloração azul típica de terpenoide.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 73), observou-se a presença de simpletos em δ 1,21, 1,15, 1,02, 1,00, 0,98, 0,93, 0,79, 0,78 e 0,77 e dois dupletos em δ 0,90 ($J = 8,5$ Hz) e δ 0,94 ($J = 7,5$ Hz) na região de hidrogênios metílicos, o que levou-se a uma quantidade de doze metilas para a amostra PXCM-5A. Os sinais em δ 3,22 (2H, $J = 11,4$ Hz e 5,2 Hz), δ 4,19 (1H, $J = 11,4$ Hz e 5,0 Hz) e δ 4,22 (1H, $J = 11,4$ Hz e 5,1 Hz), todos duplos dupletos, caracterizam a presença de hidroxilas. Sinais de hidrogênios olefínicos foram observados devido os deslocamentos δ 5,26 (1H, t , $J = 3,5$ Hz) e δ 5,20 (1H, t , $J = 3,6$ Hz) na região de alquenos (FIGURA 74 a 76).

FIGURA 73: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-5A.

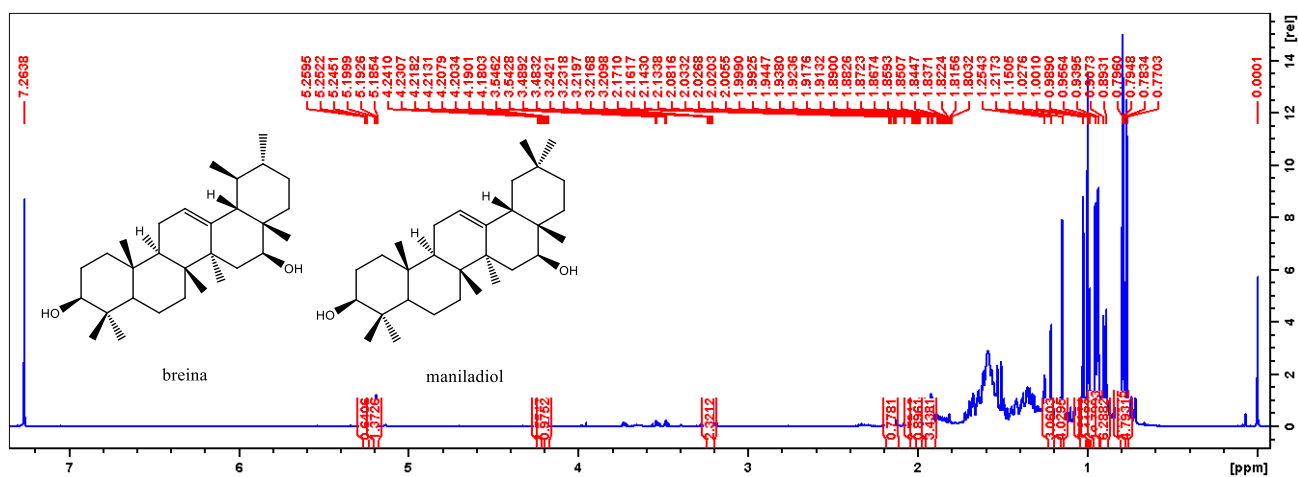


FIGURA 74: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXCM-5A.

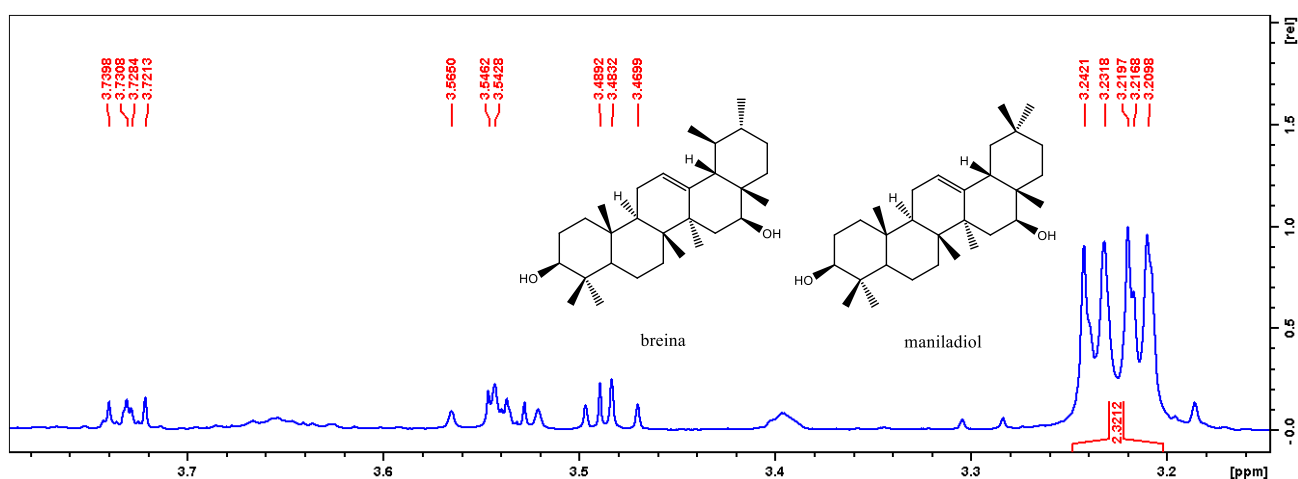


FIGURA 75: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXXM-5A.

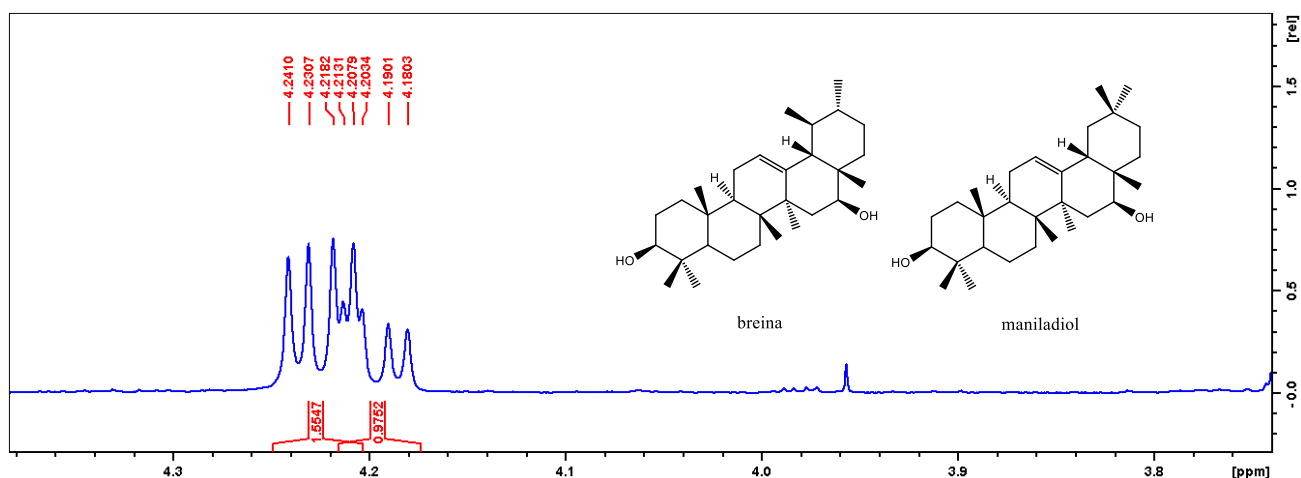
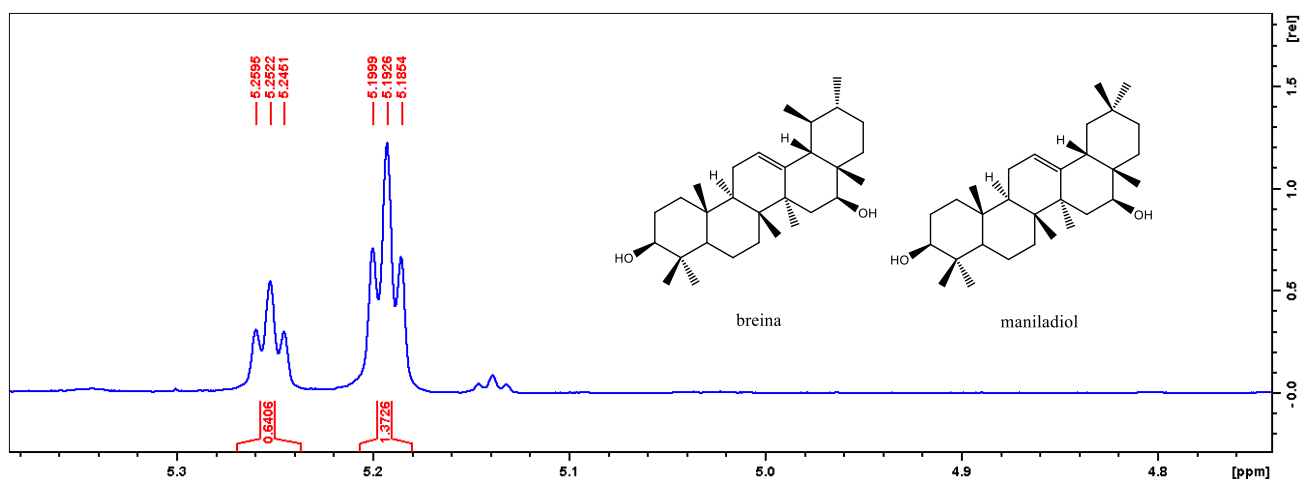


FIGURA 76: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de PXXM-5A.



Em comparação com a literatura, os sinais apresentados estão em conformidade com a mistura dos triterpenos breina e maniladiol, no qual para a confirmação, fez-se uso do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz CDCl_3) (FIGURA 77 a 79), o que foi possível observar a presença de 59 sinais. Quatro sinais em δ 66,0, δ 67,0, δ 78,9 e δ 79,0, segundo a literatura, é caracterizado como metino ligado a hidroxila (FIGURA 78). Conforme comparado com dados literários, os sinais confirmam a mistura binária de breina e maniladiol, onde a mesma já foi observada em outros trabalhos também como uma mistura dos dois compostos (RUDIGER, 2012; MAIA et al., 2000; COSTA, 1996). Os sinais em 122,3 (CH) e 143,5 (C) referem-se aos C-12 e C-13 do composto maniladiol e os sinais em 125,1 (CH) e 137,9 (C) referem-se aos C-12 e C-13 do composto breina (FIGURA 79).

FIGURA 77: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de PXCM-5A.

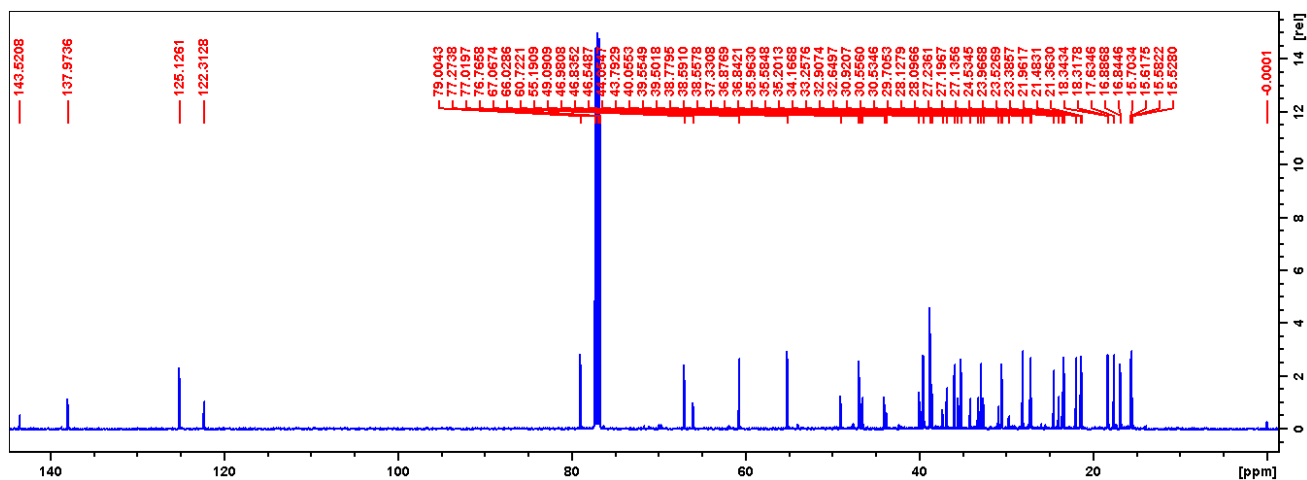


FIGURA 78: Visão ampliada do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-5A.

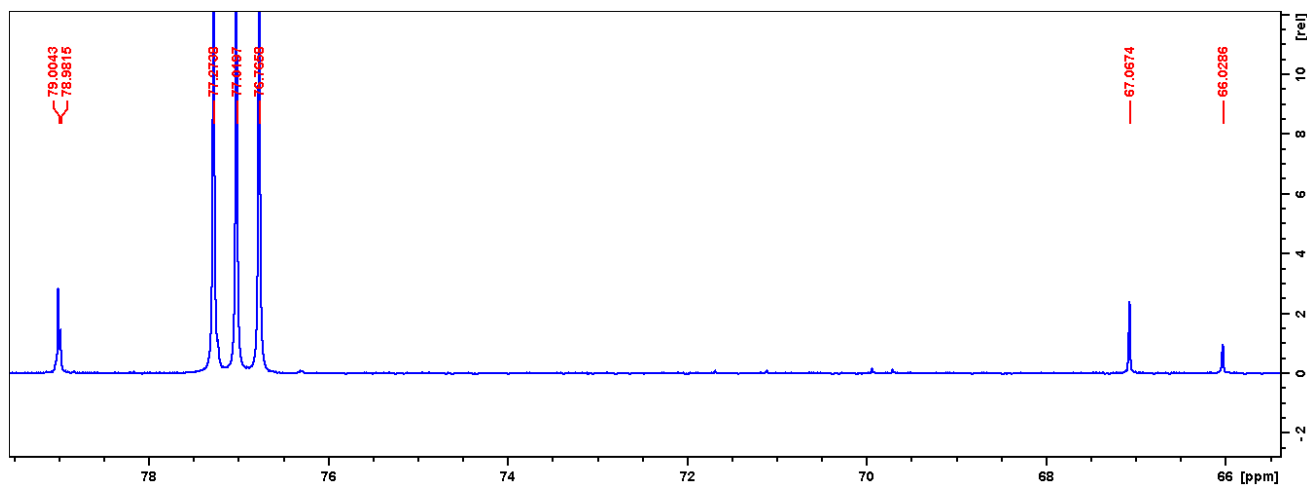
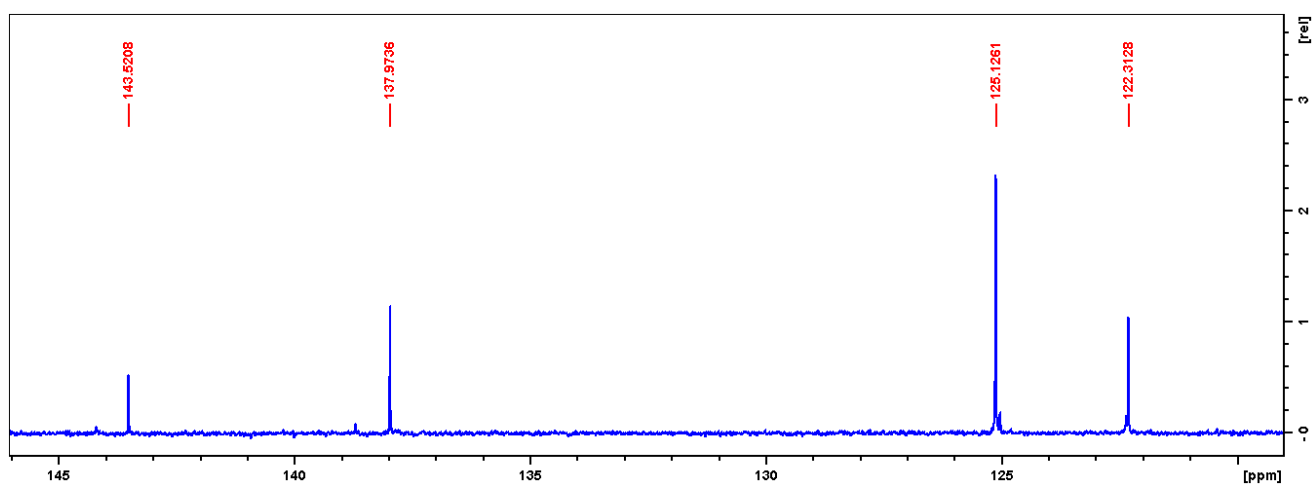
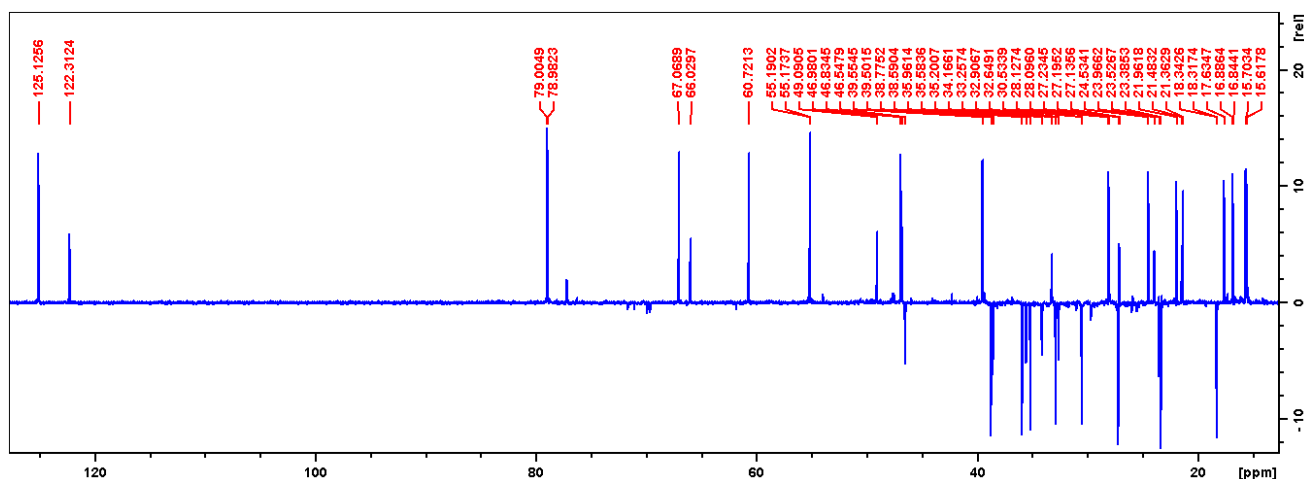


FIGURA 79: Visão ampliada do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) de PXCM-5A



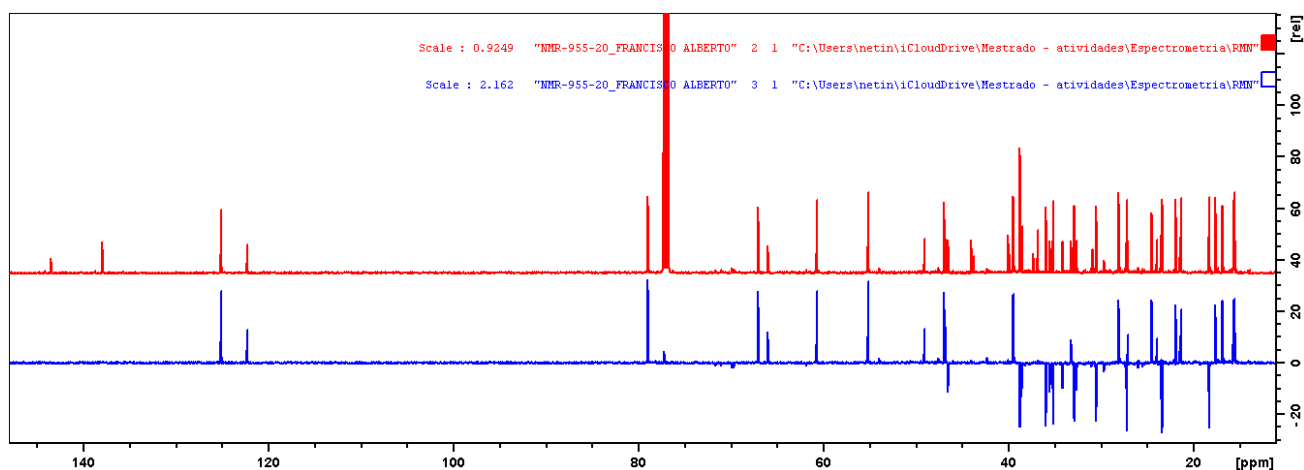
Pela análise do espectro de DEPT 135 (FIGURA 80) foi possível conferir 17 sinais que conferem a carbonos metilênicos (CH₂), 30 sinais de deslocamento químicos que referem-se a carbonos metílicos (CH₃) e metínicos (CH), sendo dois sinais em δ 122,3 e δ 125,1, ambos metínicos, atrelados a carbonos olefínicos.

FIGURA 80: Visão ampliada do espectro de DEPT 135 (125 MHz; CDCl₃) de PXCM-5A.



Foi ainda possível conferir também a presença de doze sinais de carbonos não hidrogenados, devido a presença de sinais presentes no espectro de RMN de ¹³C e ausência dos mesmos no espectro de DEPT 135, conforme é ilustrado na FIGURA 81.

FIGURA 81: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz; CDCl₃) e DEPT 135 de PXCM-5A.



Todos os dados de deslocamentos químicos obtidos a partir do espectro de RMN de ¹³C em comparação com a literatura podem ser observados na TABELA 11.

TABELA 11: Dados de RMN de ^{13}C de PXCM-4A.

| N ^o | Breina | | | | Maniladiol | | | |
|----------------|--|---|-----------------|---|--|---|-----------------|---|
| | ^1H δ (ppm) <i>a</i> | ^{13}C δ (ppm) <i>a</i> | DEPT | ^{13}C δ (ppm) <i>b</i> | ^1H δ (ppm) <i>a</i> | ^{13}C δ (ppm) <i>a</i> | DEPT | ^{13}C δ (ppm) <i>b</i> |
| 1 | 1,64 | 38,7 | CH ₂ | 38,8 | 1,64 | 38,5 | CH ₂ | 38,6 |
| 2 | 1,61 | 27,2 | CH ₂ | 27,2 | 1,21 | 27,2 | CH ₂ | 27,2 |
| 3 | 3,22 | 78,9 | CH | 79,0 | 3,22 | 79,0 | CH | 79,0 |
| 4 | - | 38,5 | C | 38,5 | - | 36,8 | C | 36,9 |
| 5 | 0,74 | 55,1 | CH | 55,2 | 0,72 | 55,1 | CH | 55,2 |
| 6 | 1,55 | 18,3 | CH ₂ | 18,3 | 1,40 | 18,3 | CH ₂ | 18,3 |
| 7 | 1,54 | 32,9 | CH ₂ | 32,9 | 1,36 | 32,6 | CH ₂ | 32,7 |
| 8 | - | 40,0 | C | 40,1 | - | 39,8 | C | 39,9 |
| 9 | 1,68 | 46,9 | CH | 47,0 | 1,49 | 46,8 | CH | 46,8 |
| 10 | - | 36,8 | C | 36,8 | - | 36,8 | C | 36,8 |
| 11 | 1,91 | 23,3 | CH ₂ | 23,4 | 1,91 | 23,5 | CH ₂ | 23,5 |
| 12 | 5,19 | 125,1 | CH | 125,1 | 5,25 | 122,3 | CH | 122,3 |
| 13 | - | 137,9 | C | 138,0 | - | 143,5 | C | 143,5 |
| 14 | - | 44,0 | C | 44,1 | - | 43,7 | C | 43,8 |
| 15 | 1,43 | 30,5 | CH ₂ | 30,5 | 1,42 | 30,5 | CH ₂ | 30,6 |
| 16 | 4,22 | 67,0 | CH | 67,0 | 4,19 | 66,0 | CH | 66,0 |
| 17 | - | 38,7 | C | 38,8 | - | 37,3 | C | 37,3 |
| 18 | 1,52 | 60,7 | CH | 60,7 | 2,15 | 49,0 | CH | 49,1 |
| 19 | 0,94 | 39,5 | CH | 39,6 | 1,68 | 46,5 | CH ₂ | 46,6 |
| 20 | 1,34 | 39,5 | CH | 39,5 | - | 30,9 | C | 30,9 |
| 21 | 2,01 | 35,2 | CH ₂ | 35,2 | 1,35 | 34,1 | CH ₂ | 34,2 |
| 22 | 1,32 | 35,9 | CH ₂ | 36,0 | 2,02 | 35,5 | CH ₂ | 35,6 |
| 23 | 0,99 | 28,1 | CH ₃ | 28,1 | 1,01 | 28,1 | CH ₃ | 28,1 |
| 24 | 0,79 | 15,6 | CH ₃ | 15,6 | 0,79 | 15,6 | CH ₃ | 15,6 |
| 25 | 0,95 | 15,7 | CH ₃ | 15,7 | 0,76 | 15,5 | CH ₃ | 15,5 |
| 26 | 1,02 | 16,8 | CH ₃ | 16,9 | 0,78 | 17,6 | CH ₃ | 17,6 |
| 27 | 1,15 | 24,5 | CH ₃ | 24,5 | 1,61 | 27,2 | CH ₃ | 27,1 |
| 28 | 0,94 | 21,4 | CH ₃ | 21,5 | 0,91 | 21,3 | CH ₃ | 21,3 |
| 29 | 0,99 | 16,8 | CH ₃ | 16,9 | 0,89 | 33,2 | CH ₃ | 33,2 |
| 30 | 0,79 | 21,9 | CH ₃ | 21,9 | 0,91 | 23,9 | CH ₃ | 24,0 |

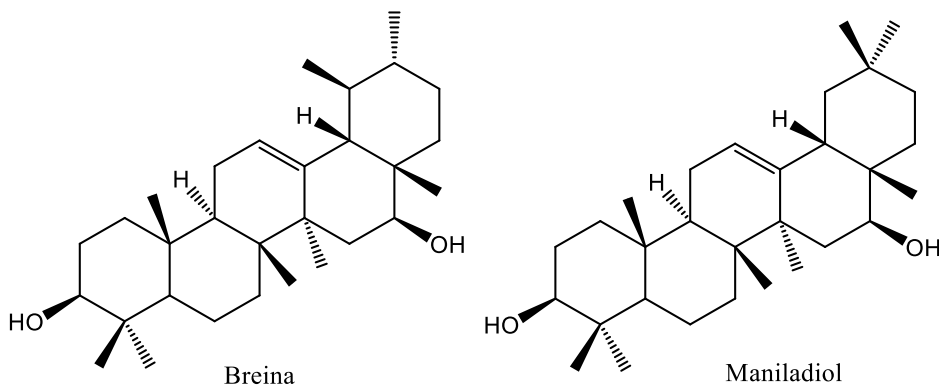
^aExperimento realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno.

^bRUDIGER et al., 2015 (^{13}C : 125 MHz; CDCl_3). (δ) Deslocamentos em ppm.

Pelas análises dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , chegou-se a conclusão que a amostra **PXCM-5A**, tratava-se da mistura das substâncias triterpênicas **breina** e **maniladiol**, de fórmula

molecular $C_{30}H_{50}O_2$ e massa molecular estimada em 441 Da, presentes nesse trabalho como mistura binária (FIGURA 82).

FIGURA 82: Estrutura da breina e maniladiol.



5.2.6 Caracterização estrutural de PXXM-6A

A amostra **PXXM-6A** apresentou-se como sólido amorfo de coloração branca com rendimento de 5,3 mg. A análise realizada por CCDA com uso do reagente de Dragendorff não evidenciou a presença de nitrogênio na molécula (coloração alaranjada), indicando não se tratar de um alcaloide. Por outro lado, quando submetido a revelação com solução de anisaldeído, observou-se um *spot* de coloração azul, típica de terpenoide.

Através da análise do espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$ + gotas de CD_3OD) (FIGURA 83 a 87) observou-se dois pares de dupletos com deslocamentos em δ 0,27 e δ 0,56, ambos com $J = 4,0$ Hz, que são característicos de hidrogênios da estrutura de triterpênico tipo cicloartano. Observou-se também cinco sinais de hidrogênios metílicos em δ 0,79 (3H, s), δ 0,89 (3H, s), δ 0,95 (3H, s), δ 1,00 (6H, t, $J = 13,4$ Hz), δ 1,05 (3H, s). Foram ainda observados sinais em δ 2,19 (1H, m), δ 2,32 (1H, m), δ 3,29 (1H, dd, $J = 11,0$ Hz e 4,4 Hz) e δ 4,71 (2H, d).

FIGURA 83: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A.

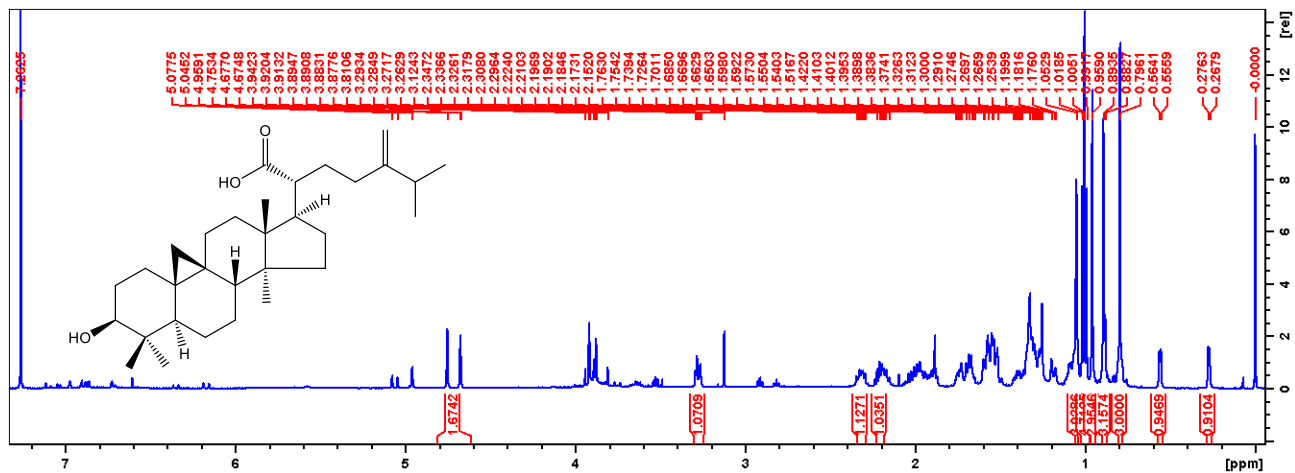


FIGURA 84: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A.

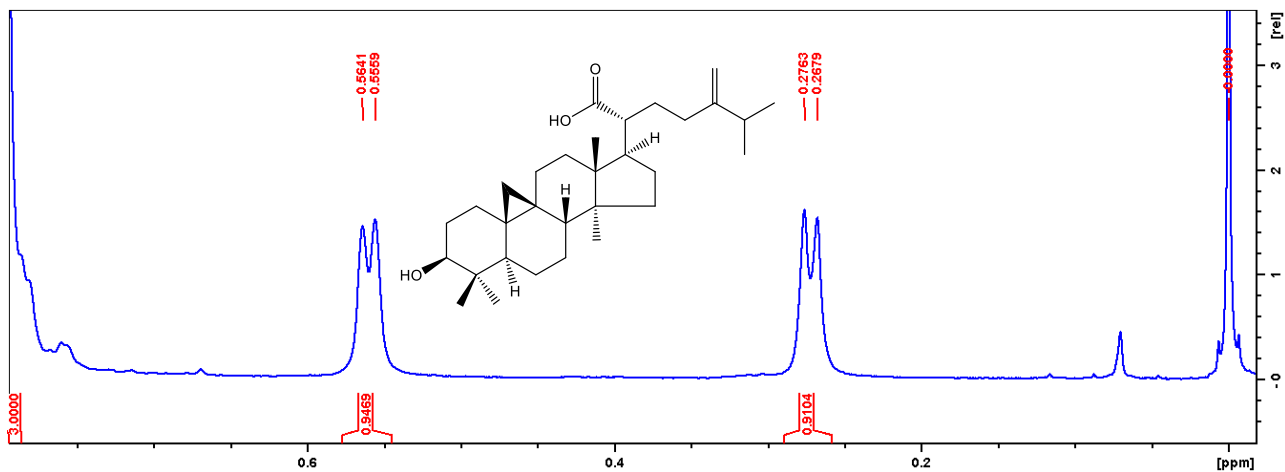


FIGURA 85: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A.

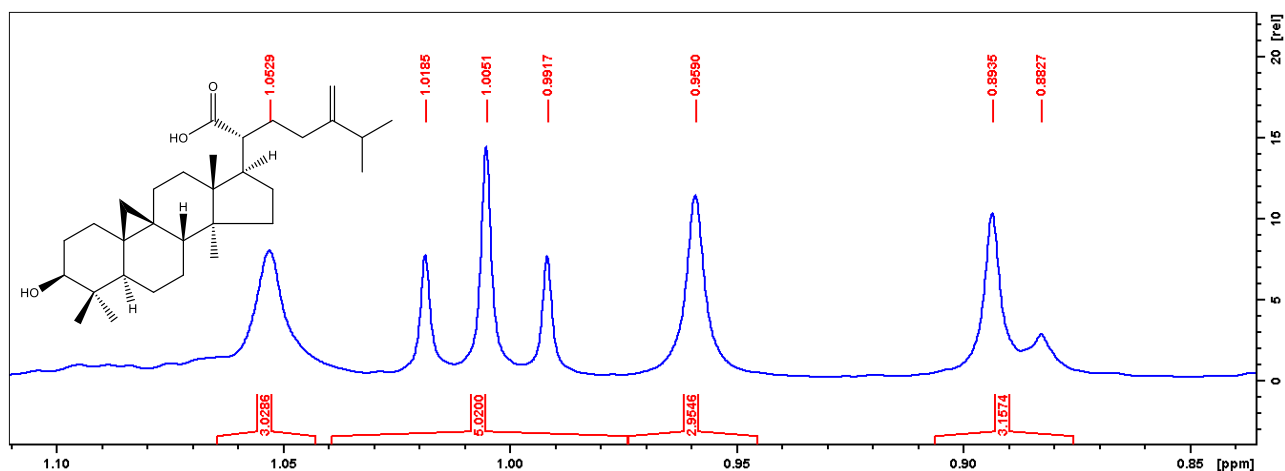


FIGURA 86: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A.

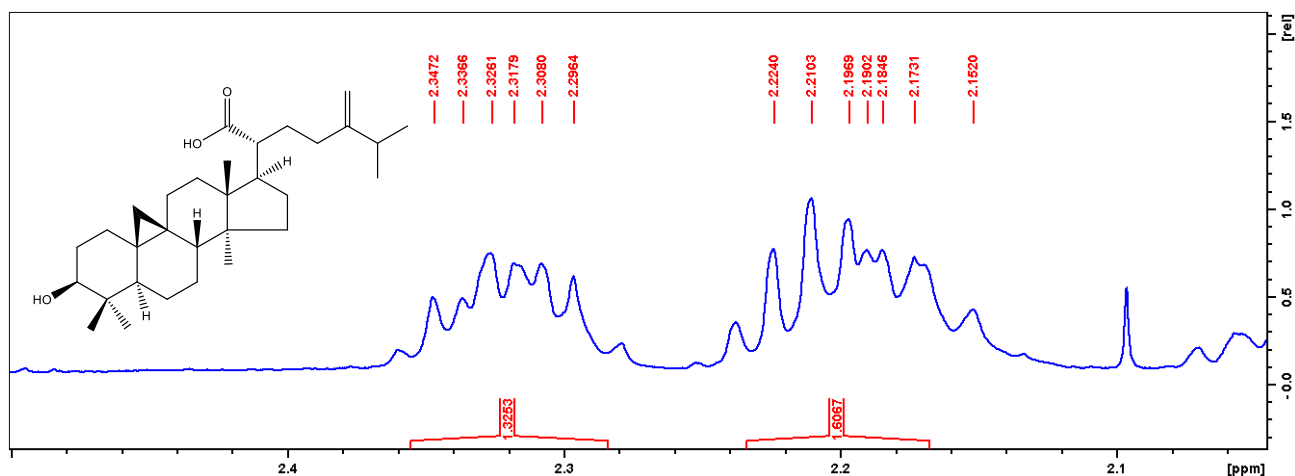
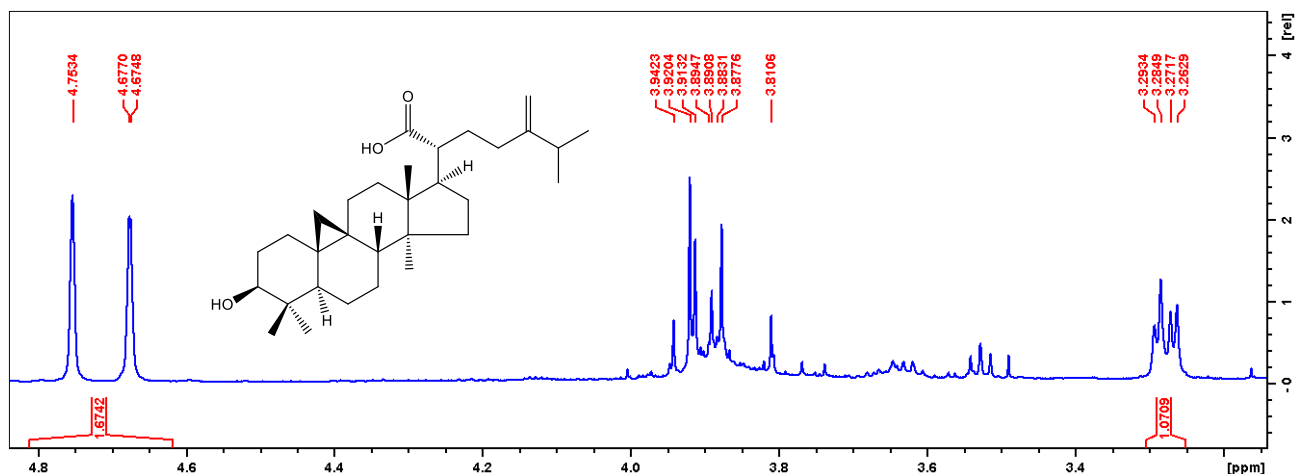


FIGURA 87: Visão ampliada do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A.



Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) (FIGURA 88), foi possível observar um total de 31 carbonos, no qual, por meio da análise do espectro de DEPT 135 (FIGURA 89), estimou-se doze carbonos metilênicos (CH_2), treze carbonos metínicos (CH) e metílicos (CH_3), assim também como foi possível conferir seis carbonos não hidrogenados, onde estes só foram possíveis serem determinados devido a ausências de sinais no espectro de DEPT 135 enquanto que presentes no espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 85). Dos sinais evidenciados, quando em comparação com a literatura, os dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão em conformidade com a substância conhecida como ácido heínico (heyenic acid) (SUN et al., 1992), conforme pode ser observado na TABELA 12.

FIGURA 88: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de PXCM-6A.

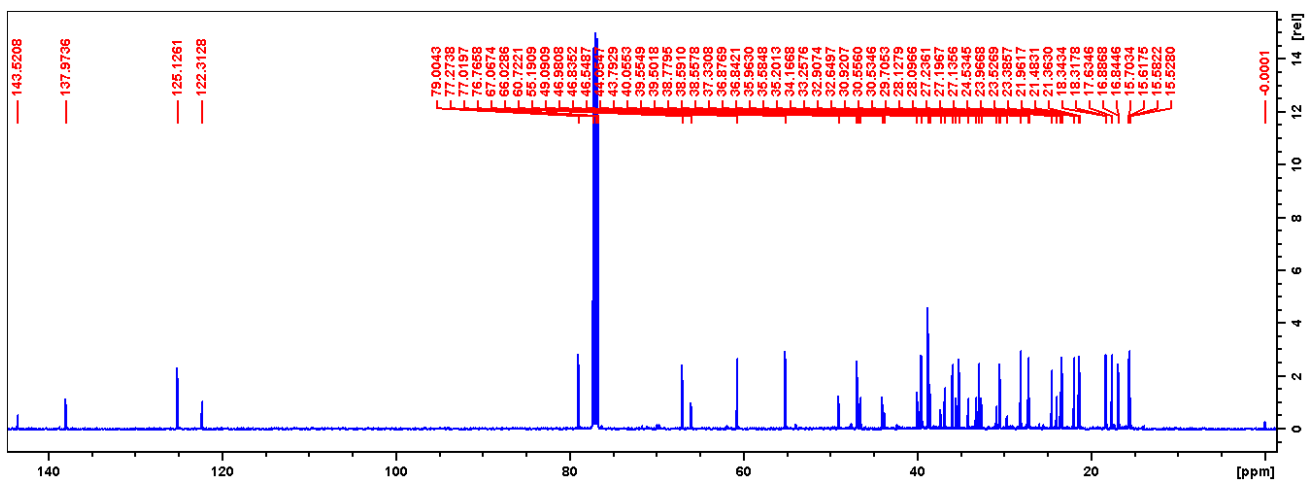


FIGURA 89: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz; CDCl_3) e DEPT 135 de PXCM-6A.

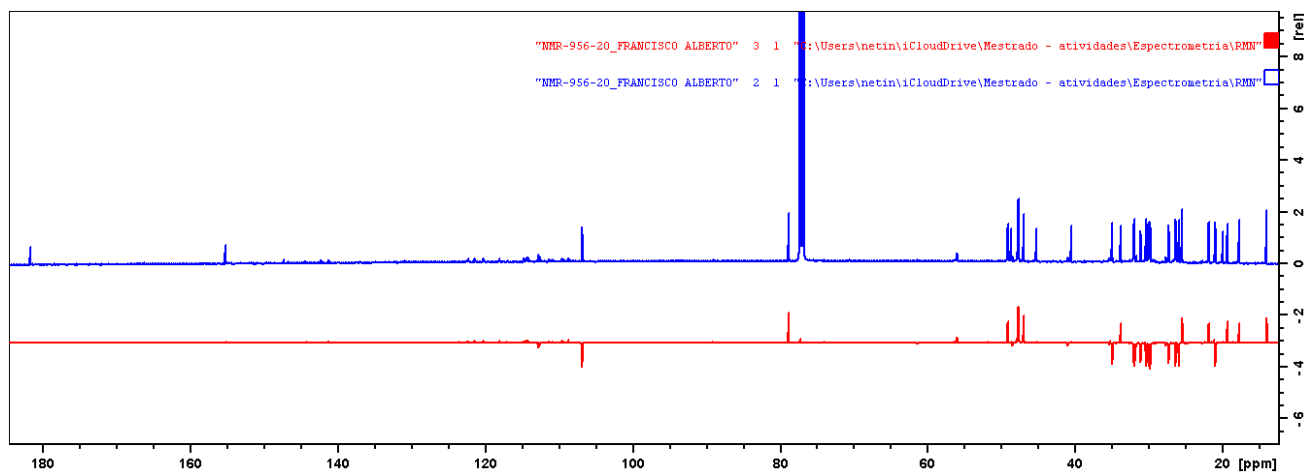


TABELA 12: Dados de RMN de ^{13}C em comparação com os dados da literatura de PXCM-6A.

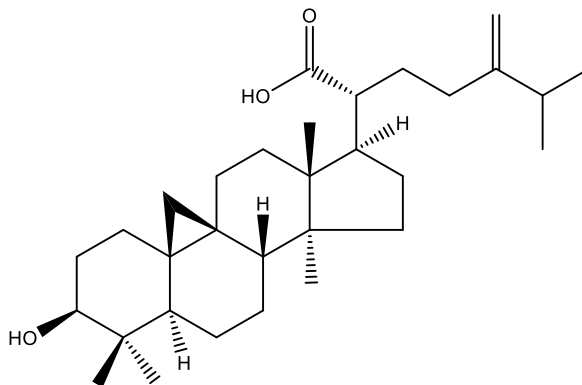
| Nº | PXCM-6A | | DEPT | Ácido heínico |
|----|---|--|-----------------|-----------------------------|
| | ^1H δ (ppm) ^a | ^{13}C δ (ppm) ^a | | δ (ppm) ^b |
| 1 | 1,54 | 31,9 | CH ₂ | 31,9 |
| 2 | 1,57 | 30,3 | CH ₂ | 30,3 |
| 3 | 3,29 | 78,7 | CH | 78,8 |
| 4 | - | 40,4 | C | 40,4 |
| 5 | 1,26 | 46,9 | CH | 46,9 |
| 6 | 1,56 | 20,9 | CH ₂ | 20,9 |
| 7 | 0,56 | 29,7 | CH ₂ | 29,7 |
| 8 | 1,53 | 47,6 | CH | 47,6 |
| 9 | - | 19,8 | C | 19,9 |
| 10 | 1,88 | 26,3 | CH ₂ | 26,3 |
| 11 | 1,05 | 26,2 | CH ₂ | 26,2 |

| | | | | |
|----|------|-------|-----------------|-------|
| 12 | 1,32 | 34,9 | CH ₂ | 34,9 |
| 13 | - | 45,1 | C | 45,2 |
| 14 | - | 48,6 | C | 48,6 |
| 15 | 2,00 | 32,0 | CH ₂ | 32,0 |
| 16 | 1,97 | 27,2 | CH ₂ | 27,2 |
| 17 | 2,17 | 49,0 | CH | 49,0 |
| 18 | 1,08 | 17,7 | CH | 17,7 |
| 19 | 0,27 | 29,9 | CH ₂ | 30,0 |
| 20 | 2,32 | 47,7 | CH | 47,6 |
| 21 | - | 181,6 | C | 181,5 |
| 22 | 1,32 | 25,8 | CH ₂ | 25,8 |
| 23 | 1,68 | 31,0 | CH ₂ | 31,0 |
| 24 | - | 155,2 | C | 155,2 |
| 25 | 2,21 | 33,7 | CH ₃ | 33,8 |
| 26 | 1,00 | 21,8 | CH ₃ | 21,8 |
| 27 | 0,95 | 21,7 | CH ₃ | 21,7 |
| 28 | 4,71 | 106,8 | CH ₂ | 106,8 |
| 29 | 0,89 | 19,3 | CH ₃ | 19,3 |
| 30 | 0,95 | 25,4 | CH ₃ | 25,4 |
| 31 | 0,79 | 13,9 | CH ₃ | 13,9 |

^aExperimento realizado a 500 MHz para ¹H e 125 MHz para ¹³C em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno.
^bSUN et al., 1992 (¹³C: 125 MHz; CDCl₃). (δ) Deslocamentos em ppm.

Uma vez que estando em conformidade com os dados da literatura, a partir das análises dos espectros de ¹H e ¹³C, a substância **PXCM-6A** trata-se do composto triterpênico **ácido heínico** (heynic acid) (FIGURA 90), com fórmula molecular C₃₁H₅₀O₃ e massa estimada de 470 Da (SUN et al., 1992). Este composto não foi relatado anteriormente no gênero *Pseudoxandra* e nem mesmo na família Annonaceae.

FIGURA 90: Estrutura do ácido heínico.



5.3 Investigação da atividade citotóxica *in vitro* pelo Ensaio Alamar Blue

Os estudos de viabilidade celular e citotoxicidade pelo ensaio Alamar Blue tem sido largamente utilizado nos últimos anos em uma diversidade de sistemas biológicos e ambientais, sendo uma importante referência para o estudo com substâncias (RAMPERSAD, 2012). Em média tem-se listado até o ano de 2018 nos registros da *SciFinder* um pouco mais de 400 publicações citando o estudo com Alamar Blue em pesquisa sobre o câncer.

A atividade citotóxica foi avaliada pelo ensaio descrito nos tópicos 2.5 e 4.3.2, conhecido como Alamar Blue (*7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one*), sendo também denominado por diazo-resorcinol, azoresorcina, resazoína e resazurina, que é um sal solúvel, estável em meio de cultura, não apresenta toxicidade e é reduzido apenas por células vivas, que o tornam insolúvel, alterando sua coloração. O potencial de oxidação-redução do Alamar Blue é de +380 mV em pH 7,0 à 25 °C, portanto, pode aceitar elétrons, mudando sua coloração do azul oxidado não-fluorescente para o estado reduzido de coloração rosa-fluorescente indicando assim a citotoxicidade correspondente as substâncias testadas (ESCOBAR et al., 2009; RAMPERSAD, 2012).

Na TABELA 13 estão expostos os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade dos extratos, frações com os seus respectivos valores de CI_{50} . De acordo a literatura são considerados ativos extratos e frações capazes de inibir pelo menos 75% da proliferação celular e que apresentarem valores de $CI_{50} < 30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (SUFFNES & PELUZO, 1990; BOIK, 2001). Dessa forma, dentre os extratos e frações, todos apresentaram pelo menos uma atividade frente às células avaliadas, no entanto, para as substâncias isoladas, na qual os resultados estão expostos na TABELA 13, apenas uma substância se destacou em relação as outras.

O extrato hexânico foi o mais ativo, pois apresentou atividade para ambas as células avaliadas HCT116 (carcinoma de colón humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). As frações neutra e alcaloídica apresentaram resultados similares, levando em consideração o intervalo de confiança, indicando que moléculas em ambas as frações apresentam promissora atividade citotóxica. Apesar do extrato hexânico ser o mais ativo, o mesmo foi o mais citotóxico em relação a célula não tumoral (MRC-5), optando-se assim pelo estudo do extrato metanólico, tendo em vista que não foi citotóxico para a mesma linhagem, CI_{50} superior a 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. É importante ressaltar que a linhagem MRC-5 se refere a células saudáveis, ou seja, quanto maior o valor de CI_{50} apresentado, mais promissor é a amostra.

TABELA 13: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para os extratos e frações de *P. leiophylla*.

| Amostra | ^a Percentual de inibição da proliferação celular (CI ₅₀) em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ^a | | | |
|----------|---|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | HCT116 | HepG2 | MRC-5 | |
| Extratos | PXCFEH | 28,50 24,62 – 32,98 | 13,12 7,89 – 21,80 | 37,33 32,50 – 42,88 |
| | PXCFEM | >50 | 12,85 8,55 – 19,30 | >50 |
| Frações | PXCFFA | 31,86 19,48 – 52,11 | 9,85 9,05 – 10,73 | 43,00 36,10 – 51,23 |
| | PXCFFN | 42,47 33,19 – 54,34 | 8,32 6,44 – 10,74 | 38,90 25,78 – 58,70 |
| DOX | 0,06 0,03 – 0,12 | 0,09 0,06 – 0,12 | 0,78 0,51 – 1,21 | |

^aA TABELA apresenta os valores de CI₅₀ (concentração inibitória média) e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. Doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo.

Com base nos resultados dispostos, o estudo fitoquímico concentrou-se na fração alcaloídica PXCFFA com o objetivo de definir os constituintes responsáveis pela atividade citotóxica observada nas análises dos extratos e frações. O respectivo isolamento dos constituintes químicos da fração alcaloídica ocorreu e estes foram submetidos ao ensaio de atividade citotóxica frente à diferentes linhagens tumorais e não tumorais. Os dados de proliferação celular com seus respectivos valores de CI₅₀ para as substâncias isoladas estão dispostas na TABELA 14. Dessas amostras, não foi observada nenhuma atividade promissora para as células, com exceção de uma única amostra que se mostrou promissora, sendo a PXC-5A (breina e maniladiol), atividade esta designada como moderada, tendo um valor de CI₅₀ de 8,32 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a célula tumoral B16-F10, enquanto que apresentou elevado valor de CI₅₀ para MRC-5 ($> \mu\text{g.mL}^{-1}$), mostrando assim não se tratar de um composto citotóxico para células saudáveis. Dos estudos realizados com as substâncias isoladas PXCM-1A (grandisina) (SILVA, 2008), PXCM-3A (loliolida) (COLOM, POPICH & BARDON, 2007), PXCM-4A (asimilobina) (LIKHITWITTAYAWUID et al., 1993) e PXCM-6A (ácido heínico) (SUN et al., 1992), segundo a literatura apresentam promissora atividade citotóxica, porém, os experimentos realizados neste trabalho não condizem com o relatado, pois mostrou que as substâncias não

apresentam promissora atividade citotóxica, uma vez que a proliferação das amostras apresentaram valores de CI_{50} superiores a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente as células tumorais.

Estudos de citotoxicidade foram relatadas para o composto PXCM-6A (ácido heínico), segundo SUN et al. (1992), o estudo realizado apresentou citotoxicidade, com valores de 0,40, 0,40 e $3,00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ frente as células tumorais A549 (carcinoma pulmonar), MCF7 (carcinoma mamário) e HT29 (carcinoma de colón humano), respectivamente, o que não está de acordo com os valores abordados neste trabalho ($>50 \mu\text{g.mL}^{-1}$), porém, os dados apontam para uma possível seletividade do composto para ação citotóxica, sendo necessário a realização de novas investigações com diferente linhas de células para uma efetiva colocação de sua atividade biológica. Entretanto, as células avaliadas são diferentes das descritas neste trabalho, assim como a metodologia empregada.

TABELA 14: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para as substâncias isoladas de *P. leiophylla*.

| Amostra | Percentual de inibição da proliferação celular (CI_{50}) em $\mu\text{g.mL}^{-1a}$ | | |
|---|--|----------------------|---------------------|
| | HCT116 | B16-F10 | MRC-5 |
| PXCM-1A (grandisina) | > 50 | > 50 | > 50 |
| PXCM-3A (loliolida) | > 50 | > 50 | > 50 |
| PXCM-4A (asimilobina) | > 50 | > 50 | > 50 |
| PXCM-5A (breina e maniladiol) | 42,47 33,19 – 54,34 | 8,32 6,44 – 10,74 | > 50 |
| PXCM-6A (ácido heínico) | 23,78 20,04 – 28,23 | > 25 | > 50 |
| DOX | 0,50 0,31 – 0,82 | 0,16 0,13 – 0,21 | 1,42 0,22 – 2,12 |

^aA TABELA apresenta os valores de CI_{50} (concentração inibitória média) e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células HCT116 (carcinoma de colón humano), B16-F10 (melanoma murino) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0. Doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo.

O alcaloide lirioidenina não foi submetido ao estudo de citotoxicidade devido a diversos estudos já desenvolvidos relatando ser um composto biologicamente ativo, conforme relatado por Costa et al. (2016). O composto asimilobina também possui relatos de ensaios citotóxicos na literatura (LIKHITWITTAYAWUID et al., 1993), de modo a apresentar-se como um composto biologicamente ativo.

Os alcaloides são descritos como substâncias que possuem uma ampla variedade de atividades biológicas, mostrando inúmeras propriedades, como analgésicas, antivirais, anti-maláricas, dentre outras. Uma propriedade biológica muito comum a ser relatada na classe dos alcaloides é a citotoxicidade contra células tumorais, tendo sido amplamente estudada de maneira a buscar futuras aplicações na área medicinal, por meio do seu uso para eliminação e/ou regressão de células cancerígenas (ANISZEWSKI, 2007).

Faz-se necessário realizações de novas investigações a respeito da espécie em estudo, tanto quanto ao estudo químico, quanto ao estudo de atividades citotóxicas, uma vez que algumas substâncias isolados e testados apresentaram-se biologicamente ativas em estudos anteriores, como grandisina (MARTINS, 2002;) e loliolida (GRANEGERO et al., 2003)

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do estudo fitoquímico da fração diclorometano alcaloídica (PXCFFA) obtida a partir do extrato metanólico (PXCFFEM) das folhas de *P. leiophylla*, resultou no isolamento de sete substâncias: dois alcaloides, três triterpenos, uma lignana e um sesquiterpeno. As substâncias foram identificadas como sendo o alcaloide aporfino *sensu stricto* **asimilobina** (PXCM-4A), o alcaloide oxaporfino **liriodenina** (PXCM-2A), a lignana tetraidrofurânica **grandisina** (PXCM-1A), a mistura de triterpenos **breina** e **maniladiol** (PXCM-5A) o **ácido heínico** (PXCM-6A) e a lactona terpênic **loliolida** (PXCM-3A).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos extratos, frações e substâncias isoladas revelou a capacidade citotóxica da espécie estudada frente a algumas linhagens de células tumorais humana. Dentre as amostras avaliadas, a fração diclorometano alcaloídica (PXCFFA) apresentou bons resultados com pronunciada atividade citotóxica para as linhagens tumorais HCT116 (31,86 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e HepG2 (9,85 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), o que assim justifica o seu estudo fitoquímico, em busca das substâncias responsáveis pela atividade antitumoral *in vitro* apresentada. No entanto, uma vez isoladas e submetidas a ensaio de citotoxicidade, as substâncias identificados não apresentaram atividade promissora. As substâncias grandisina, ácido heínico, loliolida e asimilobina apresetaram valores de CI_{50} superiores a 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, tanto para as células sadias quanto tumorais, o que aponta serem substâncias não prejudiciais às células sadias, porém, não tóxicas para as tumorais.

A mistura binária de breina e maniladiol (PXCM-5A) apresentou valores de CI_{50} de 42,47, e 8,32 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ frente as células tumorais HCT116 e B16-F10 respectivamente, e valor para a célula sadia MRC-5 de $\text{CI}_{50} = >50$, se mostrando uma amostra com moderada atividade citotóxica e não citotóxica.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que *P. leiophylla* é quimicamente uma espécie típica da família Annonaceae, assim como uma possível fonte promissora de substâncias biologicamente ativas. Os resultados contribuem ainda, de forma significativa para o conhecimento quimiotaxonômico da família, uma vez que três das suas substâncias isoladas e identificadas neste trabalho são encontradas em diversos gêneros dessa família, tais como *Annona*, *Guatteria*, *Xylopi*a e *Rollinia*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA, G. J. A. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. **Universidad de Antioquia**. Medellín, 2002.

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of Immunological Methods**, v. 170, p. 211-224, 1994.

ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAUJO, C. S.; PESSOA, C.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 258-264, Jaboticabal, 2014.

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

AZIZ, A.; TAHA, H.; ISMAIL, N. H.; YUSOF, F. Z. M.; BAKAR, M. Z. A. Therapeutic Potential of Plant Species Derived from Some Annonaceae Genus. **International Journal of Agriculture and Forestry**, v. 6, p. 214 – 221, 2016.

BENTO, E.B.; MONTEIRO, A.B.; LEMOS, I.C.S.; BRITO JUNIOR, F.E.; OLIVEIRA, D.R.; MENEZES, I.R.A.; KERNTOPF, M.R. Estudo etnofarmacológico comparativo na região do Araripe da *Annona muricata* L. (Graviola). **Revista cubana de Plantas Medicinales**, v. 21, n. 1, p. 9-19, 2016.

BERTANI, I.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J.C.; ESTERRE, PH.; DEHARO, E. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of ethnopharmacology**, v. 98, p. 45-54, 2005.

BIBA, V. S.; AMILY, A.; SANGEETHA, S.; REMANI, P. Anticancer, antioxidant and antimicrobial activity of Annonaceae family. **World Journal of Pharmacy and pharmaceutical Sciences**, v. 3, p. 1595 – 1604, 2014.

BOIK, J. Natural compounds in cancer therapy. **Oregon Medical Press**, 1 ed. p. 25, Minnesota, USA, 2001.

CARELLI, G.; MACEDO, S. M.; VALDUGA, A.; CORAZZA, M.; OLIVEIRA, J.; FRANCESCHI, E.; VIDAL, R.; JASKULSKI, M.R. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana do extrato de erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. - Hil.) obtido por extração com CO₂ supercrítico. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 110–11, 2011.

CHATROU, L.W.; RAINER, H.; MAAS, P.J.M. Annonaceae. In: SMITH, N.; MORI, S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V. Flowering plants of the neotropics. **Princeton University Press**, p.18- 20, New York, 2004.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERSR. 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, n. 1, p. 5-40, 2012.

CHO, S.; LEE, D. G.; JUNG, Y.S.; KIM, H. B.; CHO, E. J.; LEE, S. Phytochemical Identification from *Boehmeria nivea* Leaves and Analysis of (-)-Loliolide by HPLC. **Natural product sciences**, v.22, n.2, p. 134-139, 2016

COLOM, O. A., POPICH, S., BARDON, A. Bioactive constituents from *Rollinia emarginata* (Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 21, n.3, p.254–259, 2007

CONEGERO, L. S.; IDE, R. M.; NAZARI, A. S.; SARRAGIOTTO, M. H. CONSTITUÍNTES QUÍMICOS DE *Alchornea glandulosa* (EUPHORBIACEAE). **Química Nova**, v. 26, n.6, p. 825-827, 2003.

CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacées: alcaloides mineurs des écorces de *Pseudoxandra sclerocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 854-858, 1986.

COSTA, A.F. Farmacognosia. **Fundação Calouste Gulbenkian**, 5 ed, Lisboa, 1996

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.A pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **Journal of Natural Products**, vol.69, p.292-294, 2006.

COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e a-tividades biológicas de *Guatteriaopsis blepharophylla*, *Guatteriaopsis friesiana* e *Guatteriaopsis hispida* (Annonaceae). p. 380. **Tese (Doutorado em química orgânica)** – Doutorado em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciências. Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009

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. Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1111-1117 n. 6, 2011a.

COSTA, E.M.; SILVA, D. M.; DUTRA, L. M.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; VENDRAMIN, M.; BARISON, A.; PRATA, A. P. N. Terpenoides isolados do caule de *Xylopia laevigata* (Mart.) R.E. Fries (Annonaceae). **34ª reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. 2011b

COSTA, E.M.; DUTRA, L. M.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; VENDRAMIN, M.; BARISON, A.; PRATA, A. P. N. Lignanais furofurânicas isoladas do extrato éter de petróleo das folhas de *Rollinia pickelii* Diels (Annonaceae). **34ª reunião anual da Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**. 2011c

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; SALVADOR, M. J.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R.; CARVALHO, J. E. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural Product Research**, v. 27, n. 11, p. 997 – 1001, 2013.

COSTA, E. V.; SAMPAIO, M. F. C.; SALVADOR, M. J.; NEPEL, A.; BARISON, A. Chemical Constituents from the Stem Bark of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 38, n. 6, p. 769-776, 2015.

COSTA, E. V.; SOARES, L. N.; PINHEIRO, M. L. B.; MAIA, B. H. L. N. S.; MARQUES, F. A.; BARISON, A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; SOUSA, I. L.; GALAVERA, R. S.; HEERDT, G.; MORGON, N. H.; ACHO, L. D. R.; LIMA, E. S.; SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F. Guaianolide sesquiterpene lactones and aporphine alkaloids from the stem bark of *Guatteria friesiana*. **Phytochemistry**, v. 145, p. 18 – 25, 2018.

COSTA-LOTUFO, L. V.; MONTENEGRO, R. C.; ALVES, A. P. N. N., MADEIRA, S. V. F.; Pessoa, C.; Moraes, M. E. A.; Moraes, M. O A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual em Química**, n. 2, n. 1, p.47-58, 2010.

CRAGG, G. M., & NEWMAN, D. J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 72–79, 2005.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T.M.; LEWIS, N.G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & Molecular Biology of Plants. **American Society of Plant Physiologists**, cap. 24, p. 1250-1318, 2000.

CUNHA, A. M. A. Estudo Fitoquímico e Biológico de *Duguetia riparia* (Annonaceae). 2009. 157f. **Dissertação (mestrado em química)** – Universidade Federal do Amazonas.

DANTAS, E. P. *Duguetia lanceolata* St. -Hil (Annonaceae): composição química da fração alcaloídica e do óssencial e avaliação da atividade anti-Trypanosoma cruzi e antimicrobiana. **Dissertação (mestrado em biologia química e produtos naturais e sintéticos)** Universidade Federal de São Paulo, 2015

DAVID, B.; WOLFENDER, J-L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry**, v.14, p. 299–315, 2015.

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. Chichester: 3ª edição. **Editora John Wiley & Sons, LTD**, p. 509, 2009.

DIAZ, A. M. P. D. Neolignans from *Anaxagorea clavate*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 345. 1997.

EL-SAKKA, M.A. Phytochemistry alkaloids. 3 ed. **Faculty of Pharmacy - Department of Pharmacognosy**, Cairo, 2010.

ESCOBAR, L. M.; ALFONSO, P. A. R.; ARISTIZÁBAL, F. A. G. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. **Revista Colombiana de Biotecnología**, v. 11, n. 2, p. 49–56, 2009.

FACCHINI, P. J.; LISCOMBE, D. K. Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 173-180, 2008a.

FACCHINI, P. J.; ZIEGLER, J. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 735-769, 2008b.

- FEITOZA, L. Q.; TERRA, F. S.; GRASSELLI, C. S. M. Plantas Medicinais e seus Compostos com Potencial Terapêutico no Tratamento do Câncer: Revisão Integrativa. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 67, n. 1, 2021.
- FORMAGIO, S. A. N.; MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z.V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 349–354, 2010.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, III. **J. Natural Products**. v. 46, p. 761-835, 1983.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, IV. **J. Natural Products**. v. 51, p. 389-474, 1988.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, V. **J. Natural Products**. v. 57, p. 1033-1135, 1994.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids II. **J. Natural Products**. v. 42, p. 325-360, 1979.
- HATTAB, M. E.; CULIOLI, G.; VALLS, R.; RICHOU, M.; PIOVETTI, L. Apofucoanthinoids and loliolide from the brown alga *Cladostephus spongiosus* f. *verticillatus* (Heterokonta, Sphacelariales). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, p. 447e451. 2008
- HYACIENTH, D. C.; ALMEIDA, S. S. M. S. Estudo fitoquímico, toxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antibacteriana de *Pseudoxandra cuspidata* Maas. **Biota Amazônica**. v. 5 n. 4, p. 4-7, Macapá-AP, 2015
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.** Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 2019
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA.** Tipos de câncer. Rio de Janeiro, 2017.
- JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. **Nacional**. p. 286-289, São Paulo, 1993
- Kim, M.-R., Lee, S.-K., Kim, C.-S., Kim, K.-S., & Moon, D.-C. Phytochemical constituents of *Carpesium macrocephalum* FR- et SAV. **Archives of Pharmacal Research**, c. 27, n. 10, p. 1029-1033, 2004
- KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 225-242, Jaboticabal, 2014.
- LI, Y.; WICHA, M. S.; SCHWARTZ, S. J.; SUN, D. Implications of cancer stem cell theory for cancer chemoprevention by natural dietary compounds. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 22, n. 9, p. 799-806, 2011.
- LIKHITWITTAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from the Tubers of *Stephania Pierrei*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1468-1478, 1993

LIMA, B. R. Prospecção de inibidores da enzima acetilcolinesterase (AChE) em espécies do gênero *Onychopetalum* (Annonaceae) para o tratamento da doença de Alzheimer. 186 p., 2019. **Tese (doutorado em química de produtos naturais e biomoléculas)** – Instituto de ciências exatas. Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

LIMA, L. A.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; JUNIOR, P. A. S.; ROMANHA, A. J.; JOHANN, S.; CISALPINO, P. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. In vitro cytotoxic, antifungal, trypanocidal and leishmanicidal activities of acetogenins isolated from *Annona cornifolia* A. St. -Hil. (Annonaceae). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n. 2, p. 829-839. Rio de Janeiro, 2014.

LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 125-131, Jaboticabal, 2014.

LU, S-T.; WU, Y-C. The Oxidation of Isoquinoline Alkaloids with *m*-chloroperbenzoic Acid. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 34, p. 33-42, 1985.

LÚCIO, A. S. S. C.; Alcaloides de Annonaceae: ocorrência e compilação de suas atividades biológicas e avaliação fitoquímica e biológica de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). 305 p., 2015a. **Tese (doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos)**. Universidade Federal da Paraíba, Paraíba.

LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. **The alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 74, p. 233–409, 2015b.

LUKIANOVA-HLEB, E. Y.; REN, X.; ZASADZINSKI, J. A.; WU, X.; LAPOTKO, D. O. Plasmonic nanobubbles enhance efficacy and selectivity of chemotherapy against drug-resistant cancer cells. **Advanced Materials**, v. 24, n. 28, p. 3831-3837, 2012.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T. Revision of the neotropical genus *Pseudoxandra* (Annonaceae). **Blumea**, v. 48, p. 201–259, 2003.

MAIA, R.M., BARBOSA, P.R., CRUZ, F.G., ROQUE, N.F., FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): Caracterização em mistura binárias. **Química Nova**. 23 ed. p. 623-626, 2000

MARTINS, D.; ALVARENGA, M. A.; ROQUE, N. F.; FELÍCIO, J. D. Diterpenes and alkaloids from Brazilian *Xylopia* species. **Química Nova**, v. 18, p. 14-16, 1995

MARTINS, R. C. C.; Metabolismo fenilpropanoídico em *Piper solmsianum* C. Dc. (PIPERACEAE). p.166, São Paulo, 2002. **Tese (doutorado em química orgânica)**. Universidade de São Paulo.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. **Editores UFC, LTD**, 3 ed, p. 149, 2009.

MENEZES, L. R. A. Estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica do caule de *Xylopia laevigata* (Annonaceae) – **Dissertação (Mestrado em Química)**, 2015 - Universidade Federal de Sergipe, Sergipe.

- MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 439–445, 2009.
- MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **Molecular Sciences**, v. 16, p. 15625 – 15658, 2015.
- MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; VILEGAS, W.; ZALEWSKI, C. A.; LAGO, J. H. G.; FUNASAKI, M. Genus *Xylopia* (Annonaceae): chemical and biological aspects. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 11, p. 1921-1943, 2013
- MUNIER, R., *apud* MERCK. 1971. Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography. **E. Merck**, p. 118, Darmstadt, Germany, 1953.
- MURATA, M., NAKAI, Y., KAWAZU, K., ISHIZAKA, M., KAJIWARA, H., ABE, H., TAKEUCHI, K., ICHINOSE, Y., MITSUHARA, I., MOCHIZUKI, A., SEO, S. Loliolide, a carotenoid metabolite, is a potential endogenous inducer of herbivore resistance. **Plant Physiol.** v.179, p.1822–1833, 2019
- NARDELLI, V. B.; SOUZA, C. A. S.; CHAAR, J. S.; KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A.; COSTA, E. V. Isoquinoline-derived alkaloids and one terpene lactone from the leaves of *Duguetia pycnastera* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, 94, 2021.
- NEWMAN, D. J., Cragg, G. M., & Snader, K. M. The influence of natural products upon drug discovery. **Natural Product Reports**, v. 17, n. 3, p. 215–234, 2000.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.
- NUNES, C. R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; OLIVEIRA, D. B. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Vértices**, v. 14, p. 39–57, 2012.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the *Alamar Blue* (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v.267, p.5421 - 5426, 2000.
- OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G.; CARAZZA, F.; MAIA, J. G. S. Geovanine, a new azaanthracene alkaloid from *Annona ambotay* aubl. **Phytochemistry**.v.26, n. 9, p. 2650-2651, 1987.
- PAES, M. M.; VEGA, M. R. G.; CORTES, D.; KANASHIRO, M. M. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 945 – 980, 2016.
- PEREIRA, R. J. e CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**. v. 3, n. 4: p. 146-152, 2012.
- PELLETIER, S. W. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. **John Wiley & Sons**, v. 5, c. 3, New York, 1987.

PIETRO, J.; CORTES, D.; JAIMES, L.; LAURIDO, C. VINET, R.; MARTINEZ, L. *Pseudoxandra sclerocarpa* Maas, Colombian medicinal plant: a review. **Latin American and Caribe Bulletin of Medical and Aromatic Plant**. v 14, n.4, p. 308–316, 2015

PIMENTA, L. P.; GARCIA, G. M.; GONÇALVES, S. G.; DIONÍSIO, B. L.; BRAGA, E. M.; MOSQUEIRA, V. C. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, n.16, p. 1254, 2014.

PRATA, J. N.; CAES, A. L. O uso de plantas medicinais na cidade de Caldas Novas: as práticas de cura tradicional no contexto da expansão do mercado de fitoterápicos. **Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão**. v. 3. Pirenópolis – GO, 2016.

QUINTANS, J. S. S.; SOARES, B. M.; FERRAZ, R. P. C.; OLIVEIRA, A. C. A. SILVA, T. B.; MENEZES, L. R. A.; SAMPAIO, M. F. C.; PRATA, A. P. N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ANTONIOLLI, A. R.; COSTA, E. V. BEZERRA, D. L. P. Chemical Constituents and Anticancer Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopi laevigata*. **Planta Medica**, v. 79, p. 123–130, 2013.

RABELO, S. V.; COSTA, M. M.; LIBORIO, R. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 265-271, Jaboticabal, 2014a.

RABELO, S. V.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; COSTA, M. M.; DA SILVA, F. M. A.; CHAVES, Y. O.; BASTOS, I. S. alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de *Gutteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1453-1458, 2014b

RAMPERSAD, S. N. Multiple Applications of Alamar Blue as an Indicator of Metabolic Function and Cellular Health in Cell Viability Bioassays. **Sensors**, v. 12, p. 12347 – 12360, 2012.

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. **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 816f, 1999.

RINALDI, M. V. N.; DIAZ, I. E.C.; SUFFREDINI, I. B.; MORENOC, P. R. H. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 77 – 83, 2016.

RODRIGUES, F. S. S. & POLIDORI, M. M. Enfrentamento e Resiliência de Pacientes em Tratamento Quimioterápico e seus Familiares. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 58, n. 4, p. 619-627, 2012.

ROUMY, V.; FABRES, N.; SOUARD, F.; MASSOU, S.; BOURDY, G.; MAUREL, S.; VALENTIN, A. MOULIS, C. Isolamento e atividade antimalárica dos alcaloides de *Pseudoxandra cuspidata*. **Planta Medica** v. 72, p. 894-898, 2006.

ROY, A. A Review on the Alkaloids an Important Therapeutic Compound from Plants. **International Journal of Plant Biotechnology**, v. 3, n. 2, p. 1-9, 2017.

SANTOS, V. L. SOUZA, M.F.V.; BATISTA, L.M.; SILVA, B.A.; LIMA, M.S.; SOUZA, A.M.F.; BARBOSA, F.C.; CATÃO, R.M.R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.1, p.68-72, 2011.

SHAMMA, M. & GUINAUDEAU, H. Biogenetic pathways for the aporphinoid alkaloids. **Tetrahedron**, vol. 40, p. 4795-4822, 1984.

SILVA, A. M. Metabolismo secundário e ligninas de espécies de Piper. p. 169, 2009. (**Tese de doutorado na área de química orgânica**). Universidade de São paulo.

SILVA, F. M. A.; DE 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 ionisation ion-trap tandem mass spectrometry. **Phytochemical Analys.** 25: 45-49, 2014.

SILVA, H. N.; DINIZ, T. C.; TELES, R. B. A.; RABELO, S. V.; ALMEIDA, J. R. G. S. Prospecção Científica de Espécies do Gênero *Annona* (Annonaceae) com Atividade Antinociceptiva e Anti-Inflamatória. **Revista GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 3, p. 2326-2334, 2015a.

SILVA, L. E.; REIS, R. A.; MOURA, E. A.; AMARAL, W; SOUSA Jr., P.T. Plantas do Gênero *Xylopi*: Composição Química e Potencial Farmacológico. **Planta Medica**, v. 17 n. 4, p. 814 – 826, 2015b.

SOARES, E. R. Estudo fitoquímico e atividade biológica de *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae). p. 215, 2014. **Dissertação (Mestrado em química)** – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Amazonas.

SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R.; SILVA-FILHO, F. A.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L. Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae). **Phytochem. Anal.** v. 26, p. 339-345, 2015.

SOUZA, A. V. M. Atividade Anti-inflamatória do Extrato, de Frações e do Alcaloide Dicentrinona, obtidos de *Duguetia furfuracea* (St. Hil) em Camundongos. **Dissertação (mestrado em ciências da saúde)**, Faculdade de ciências da saúde. Universidade Federal da Grande. Doutorados, Mato Grosso do Sul ,2013.

SOUZA, M. V. N.; PINHEIRO, A. C.; FERREIRA, M. L.; GONÇALVES, R. S. B.; LIMA C. H. C. Produtos naturais em fase avançada de testes clínicos no tratamento contra o câncer. **Revista Fitos**, vol.3, p.25-42, 2007.

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

SUN, N.J., HO, D. K., SNEDDON, J. M., STEPHENS, R. E., CASSADY, J. M. New Cytotoxic Cycloartane Triterpenoids From *Desmos Cochinchinensis* (Annonaceae). **Natural Product Letters**, v. 1, n. 2, p.109–115. 1992

SUN, S., LIU, J., KADOUTH, H., SUN, X., ZHOU, K. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata* L.). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, n. 12, p. 2773, 2014.

TELES, M. N. O.; DUTRA, L. M.; BARISON, A.; COSTA, E. V. Alkaloids from leaves of *Annona salzmannii* and *Annona vepretorum* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 465–469, 2015

TESTA, G.; OLIVEIRA, P. R. N.; SILVA, C. C.; SCHUQUEL, I. T. A.; SANTIN, S. M. O. Constituintes químicos das folhas e avaliação da atividade anti-inflamatória de extratos das raízes e folhas de *Guettarda pohliana* müll. Arg. (*rubiacae*). **Quimica Nova**, v. 35, n.3, p. 527-529, 2012

WOLFENDER, J-L., RUDAZ, S., CHOI, Y. H., KIM, H. K. Plant Metabolomics: From Holistic Data to Relevant Biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, p. 1056-1090, 2013.

YAN, R.; WANG, W.; GUO, J.; LIU, H.; ZHANG, J.; YANH, B. Studies on the Alkaloids of the Bark of *Magnolia officinalis*: Isolation and On-line Analysis by HPLC-ESI-MSn. **Molecules**, v. 18, p. 7739-7750, 2013.

ZHAO, Y.; BUTLER, E. B.; TAN, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 3, p. e532, 2013.