



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

**ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES
CITOTÓXICAS DAS CASCAS DOS RAMOS DE *Annona amazonica*
(ANNONACEAE)**

ALDIMARA FABA MARTINS

MANAUS-AM
Julho/2024

ALDIMARA FABA MARTINS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES
CITOTÓXICAS DAS CASCAS DOS RAMOS DE *Annona amazonica*
(ANNONACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), como requisito para o título de Mestre em Química, com ênfase na linha de pesquisa de Produtos Naturais e Biomoléculas.

EMMANOEL VILAÇA COSTA
Orientador

MANAUS-AM
Julho/2024

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

M386e Martins, Aldimara Faba

Estudo Fitoquímico e Investigação das Propriedades Citotóxicas
das Cascas dos Ramos de *Annona amazonica* (ANNONACEAE) /
Aldimara Faba Martins. - 2024.

118 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Emmanoel Vilaça Costa.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas,
Programa de Pós-Graduação em Química de Prod. Naturais,
Manaus, 2024.

1. Annonaceae. 2. *Annona amazonica*. 3. Alcaloides. 4.
Citotoxicidade. I. Costa, Emmanoel Vilaça. II. Universidade Federal
do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em Química de Prod.
Naturais. III. Título

**ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DAS PROPRIEDADES
CITOTÓXICAS DAS CASCAS DOS RAMOS DE *Annona amazonica*
(ANNONACEAE)**

ALDIMARA FABIA MARTINS

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

Aprovada em, 26 de julho de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **EMMANOEL VILAÇA COSTA**
Data: 26/07/2024 12:40:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

EMMANOEL VILAÇA COSTA (PPGQ/UFAM)

Presidente/Orientador

Documento assinado digitalmente
 **ALISSON MEZA NOVAIS**
Data: 26/07/2024 12:43:45-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

ALISSON MEZA NOVAIS (PPGQ/UFAM)

Membro Interno

Documento assinado digitalmente
 **DANIEL PEREIRA BEZERRA**
Data: 26/07/2024 12:48:26-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

DANIEL PEREIRA BEZERRA (IGM/FIOCRUZ-BA)

Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 26 de julho de 2024.

Dedicatória

Dedico este trabalho em especial ao meu querido e sempre presente esposo, também aos meus pais Mateus Martins e Aldiana Nascimento, aos meu irmãos e amigos que foram meu alicerce nessa caminhada e que sempre me apoiaram.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha gratidão à Universidade Federal do Amazonas, ao Departamento de Química e, em especial, ao Programa de Pós-Graduação em Química pela oportunidade de realizar este trabalho.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto de pesquisa.

Ao Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa, meu estimado orientador, agradeço pela paciência, dedicação, ensinamentos e entusiasmo na orientação e direção das atividades desenvolvidas neste trabalho.

Agradeço ao Dr. Daniel Pereira Bezerra e a toda sua equipe do Instituto de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-BA) pela colaboração nos ensaios de citotoxicidade.

Agradeço ao Herbário (HUAM) do Departamento de Biologia da UFAM pela identificação da espécie, possibilitando o desenvolvimento do estudo.

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

Sou grata aos professores do PPGQ pelos ensinamentos.

Agradeço aos colegas do grupo de pesquisa GEQBiom, incluindo Liciane Assis, Aline dos Reis, Thaynara Sousa, Jéssica Auzier, Victória Nardelli, Melissa Pires, Karollen Serrão, Genésio Liarte e Cesar Augusto, pelo convívio, troca de experiências e momentos de descontração.

Aos colegas de turma, Márcia Grace, Leandro Anselmo, Brenna Ferreira, Josias Martins, Brenda Leocadio e Jonathan Pereira, agradeço pelas diversas conversas que ajudaram a tornar mais leves as dificuldades do mestrado.

Agradeço em especial as minhas duas amigas queridas Leandra Protázio e Márcia Grace, por estarem sempre ao meu lado nos momentos mais difíceis, sempre me apoiando e aconselhando.

Agradeço imensamente à minha família: meus irmãos Airton Martins, Marcelo Martins e Marlinara Martins, e aos meus pais Mateus Martins e Aldiana Nascimento, que desde minha infância sempre incentivaram meus estudos.

Ao meu marido Romeu Souza, agradeço por compreender e apoiar minhas escolhas, pelas palavras de incentivo e fé, e principalmente por ser um homem maravilhoso com quem compartilho meus melhores momentos.

Sou profundamente grata a Deus por ser minha rocha inabalável todos os dias e a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Annona amazonica R. E. Fries é uma espécie amazônica pertencente à família Annonaceae, que ocorre em florestas de terra firme com distribuição no território brasileiro, principalmente nos estados do Amazonas e Pará. Além da grande importância econômica para a indústria alimentícia, estudos fitoquímicos e biológicos têm sido realizados com essa família de plantas e têm revelado propriedades farmacológicas importantes. Desse modo, esta pesquisa teve como objetivo realizar o estudo fitoquímico das cascas dos ramos de *A. amazonica* e investigar as propriedades citotóxicas através de ensaio com os extratos, frações e substâncias isoladas. O extrato bruto metanólico das cascas dos ramos foi obtido por maceração a temperatura ambiente e indicou a presença de alcaloides frente ao reagente de Dragendorff, e posteriormente, foi submetido ao tratamento ácido-base do qual obteve-se a fração alcaloídica. O extrato metanólico e a fração alcaloídica tiveram o seu perfil químico investigado por espectrometria de massas (EM) e através da prospecção química de ambos, foram identificadas substâncias de m/z par indicativo de possíveis compostos nitrogenados como os alcaloides. Foram utilizadas para identificação desses constituintes as técnicas espectroscópicas de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D e espectrométrica (EM). O estudo com as cascas dos ramos de *A. amazonica*, resultou no isolamento de seis substâncias, das quais, cinco são pertencentes à classe dos alcaloides: liriodenina e *N*-metil-actinodafinina (já descritas na espécie), discretamina relatada pela primeira vez na espécie, dicentrinona e nordicentrina, e um terpeno pertencente à subclasse dos sesquiterpeno conhecido como 1β , 6α -Diidroxi-4(15)-eudesmeno, descrito pela primeira vez no gênero e na espécie em estudo. Dentre os extratos e frações que foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade *in vitro*, a fração alcaloídica (proveniente do extrato metanólico) apresentou percentagem de inibição de 67% para as células tumorais HCT116 (carcinoma de cólon humano) e 54% para HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), sendo consideradas atividades moderadas. Dentre os alcaloides isolados que foram avaliados, a *N*-metil-actinodafinina foi o que apresentou os melhores resultados contra as linhagens de células HCT116, B16-B10 e MRC-5, com valores de CI_{50} iguais a 4,27, 10,01, 12,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Os resultados obtidos neste trabalho, são descritos pela primeira vez nas cascas dos ramos de *A. amazonica* e com exceção dos alcaloides liriodenina e *N*-metil-actinodafinina, todas as outras substâncias são registradas pela primeira vez na espécie, corroborando com o potencial químico das espécies de Annonaceae brasileiras, em particular das espécies de ocorrência no Amazonas e contribuindo para a ampliação do conhecimento químico da espécie em estudo e justificando a continuidade da investigação em futuros projetos em busca de substâncias com propriedades citotóxicas.

Palavras chaves: Annonaceae; *Annona amazonica*; Alcaloides; Citotoxicidade.

ABSTRACT

Annona amazonica R. E. Fries, is an Amazonian species belonging to the Annonaceae family, which occurs in dryland forests and is distributed throughout Brazil, mainly in the states of Amazonas and Pará. In addition to its great economic importance for the food industry, phytochemical and biological studies have been carried out on this family of plants and have revealed important pharmacological properties. The aim of this research was to carry out a phytochemical study of the bark of the branches of *A. amazonica* and to investigate its cytotoxic properties by testing the extracts, fractions and isolated substances. The crude methanolic extract of the bark of the branches was obtained by maceration at room temperature and indicated the presence of alkaloids using Dragendorff's reagent, after which it was subjected to acid-base treatment and the alkaloid fraction was obtained. The chemical profile of the methanolic extract and the alkaloid fraction was investigated by mass spectrometry (MS) and, through chemical prospecting of both, substances of even m/z were identified, indicative of possible nitrogen compounds such as alkaloids. ^1H and ^{13}C 1D/2D NMR spectroscopy and mass spectrometry (MS) techniques were used to identify these constituents. The study of the bark of the branches of *A. amazonica* resulted in the isolation of six substances, five of which belong to the alkaloid class: liriodenine and *N*-methyl-actinodafinine (already described in the species), discretamine reported for the first time in the species, dicentrinone and nordicentrin, and a terpene belonging to the sesquiterpene subclass known as 1β , 6α -Dihydroxy-4 (15)-eudesmene, described for the first time in the genus and species under study. Among the extracts and fractions that were submitted to the *in vitro* cytotoxicity test, the alkaloid fraction (from the methanolic extract) showed an inhibition percentage of 67% for HCT116 tumor cells (human colon carcinoma) and 54% for HepG2 (human hepatocellular carcinoma), which were considered moderate activities. Among the isolated alkaloids evaluated, *N*-methyl-actinodafinin showed the best results against the HCT116, B16-B10 and MRC-5 cell lines, with CI_{50} values of 4.27, 10.01 and 12.16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The results obtained in this work are described for the first time in the bark of the branches of *A. amazonica* and, with the exception of the alkaloids liriodenine and *N*-methyl-actinodafinine, all the other substances are recorded for the first time in the species, corroborating the chemical potential of Brazilian Annonaceae species, particularly those occurring in Amazonas, and contribute to the expansion of chemical knowledge of the species under study and justify the continuation of its study in future projects in search of substances with cytotoxic properties.

Key-words: Annonaceae; *Annona amazonica*; Alkaloids; Cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
AAEHCR	<i>Annona amazonica</i> extrato hexânico da casca dos ramos
AAEMCR	<i>Annona amazonica</i> extrato metanólico da casca dos ramos
AAEMCR-FA	<i>Annona amazonica</i> extrato metanólico da casca dos ramos- fração alcaloídica
AAEMCR-FN	<i>Annona amazonica</i> extrato metanólico da casca dos ramos- fração neutra
B16-F10	Melanoma murino
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
CH_3OH	Metanol
CI_{50}	Concentração inibitória média
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
<i>d</i>	Dupleto
Da	Dalton
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOX	Doxorrubicina
EM	Espectrometria de Massas
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
<i>g</i>	Grama
HCl	Ácido clorídrico
HCT116	Carcinoma de colón humano
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
L	Litro
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
<i>m</i>	Multipeto
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
<i>Min</i>	Minuto
<i>mL</i>	Mililitro

MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano
NH ₄ OH	Hidróxido de amônio
<i>Pax</i>	Pseudoaxial
<i>Peq</i>	Pseudoequatorial
pH	Potencial de hidrogênio
<i>R_f</i>	Fator de retenção
RMN de ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singlete
<i>t</i>	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
v/v	Volume/volume
α	Alfa
β	Beta
δ	Deslocamento químico
μ g	Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição geográfica da família Annonaceae no mundo.	14
Figura 2: Frutos comestíveis pertencentes ao gênero <i>Annona</i>	16
Figura 3: Frutos de diferentes espécies do gênero <i>Annona</i> : (a) <i>A. muricata</i> (b) <i>A. squamosa</i> (c) <i>A. cherimola</i>	19
Figura 4: Distribuição fitogeográfica das espécies de <i>Annona</i> no Brasil.	20
Figura 5: Estrutura de alguns alcaloides aporfínicos e oxoaporfínico isolados de <i>A. cherimolia</i>	21
Figura 6: Alcaloides isolados de <i>A. sericea</i>	22
Figura 7: Alcaloides isolados de <i>A. salzmannii</i>	23
Figura 8: Alcaloides oxoaporfínicos isolados de <i>A. cacans</i>	24
Figura 9: Características botânicas de <i>A. amazonica</i> (a) Árvore; (b) botão de flor imaturo e folha; (c) fruto; (d) fruto e sementes.	26
Figura 10: Distribuição geográfica de <i>A. amazonica</i> no Brasil.	26
Figura 11: Constituintes químicos isolados do caule de <i>A. amazonica</i>	27
Figura 12: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas e galhos de <i>A. amazonica</i>	28
Figura 13: Estrutura dos principais alcaloides e seus precursores.	29
Figura 14: Biossíntese dos alcalóides benziltetraidroisoquinolinos.	30
Figura 15: Estrutura geral dos alcaloides aporfínóides.	31
Figura 16: Rota biossintética dos alcaloides aporfínicos.	32
Figura 17: Rota biossintética para os alcaloides tetraidroprotoberberinos.	32
Figura 18: Espectro de massas <i>full scan</i> em fonte APCI, no modo positivo do extrato metanólico de <i>A. amazonica</i>	52
Figura 19: Espectro de massas <i>full scan</i> em fonte APCI, no modo positivo da fração alcaloídica de <i>A. amazonica</i>	53
Figura 20: Perfil de fragmentação para o íon de m/z 328 $[M+H]^+$	53
Figura 21: Espectro de EM^2 do íon de m/z 286 $[M+H]^+$	54
Figura 22: Espectro de EM^2 dos íons de m/z 266, 282, 312, 326 $[M+H]^+$	55
Figura 23: Espectro de $APCI-MS^2$ do íon de m/z 276 $[M+H]^+$	56
Figura 24: Espectro de $APCI-M^2$ do íon de m/z 336 $[M+H]^+$	56
Figura 25: Espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 500 MHz) da substância AACRFA-L.	59

Figura 26: Ampliação da região aromática no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância AACRFA-L.	59
Figura 27: Mapa de correlação COSY na região de hidrogênios aromáticos (a) região de hidrogênios piridínicos (b) ampliação da região dos prótons do anel D.	60
Figura 28: Mapa de correlação HSQC (a) ampliação da região dos prótons do grupo metilenodióxi (b) ampliação da região dos prótons do anel A, B e D.	61
Figura 29: Mapa de correlação HMBC (a) ampliação da região do grupo metilenodióxi, (b) demais relações observadas.	62
Figura 30: Espectro de massas da amostra AACRFA-L.	64
Figura 31: Perfil de fragmentação da amostra AACRFA-L.	64
Figura 32: Proposta de fragmentação para AACRFA-L.	65
Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AACRFA-D.	66
Figura 34: Ampliação da região de hidrogênios aromáticos.	66
Figura 35: Mapa de correlação COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AACRFA-D.	67
Figura 36: Mapa de correlação HSQC ^1H - ^{13}C (500 MHz e 125 MHz) de AACRFA-D.	67
Figura 37: Mapa de correlação HMBC da amostra AACRFA-D.	68
Figura 38: Espectro de massas da amostra AACRFA-D.	70
Figura 39: Perfil de fragmentação para AACRFA-D.	70
Figura 40: Proposta de fragmentação para o íon de m/z 336.	71
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AACRFA-5.8.	72
Figura 42: Mapa de correlação HSQC, ampliação da região do hidrogênio metínico.	72
Figura 43: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3).	73
Figura 44: Mapa de correlação HSQC, ampliação da região de hidrogênios metilênicos.	74
Figura 45: Mapa de correlação HMBC da amostra AACRFA-5.8.	75
Figura 46: Correlações observadas no mapa HMBC de AACRFA-5.8.	76
Figura 47: Espectro de massas da amostra AACRFA 5.8.	78
Figura 48: Perfil de fragmentação para a amostra AACRFA-5.8.	78
Figura 49: Proposta de fragmentação para a amostra AACRFA-5.8.	79
Figura 50: Espectro de RMN de H^1 da amostra A4.7.7.	80

Figura 51: Mapa de correlação HSQC, ampliação da região de hidrogênios metilênicos e metínico.....	81
Figura 52: Mapa de correlação HMBC.....	82
Figura 53: Mapa de correlação HSQC.....	82
Figura 54: Mapa de correlação HMBC.....	83
Figura 55: Mapa de contorno HMBC com região ampliada.....	83
Figura 56: Espectro de massa <i>full scan</i> da amostra A4.7.7	85
Figura 57: Perfil de fragmentação para o íon de m/z 326 $[M+H]^+$	85
Figura 58: Proposta de fragmentação para o íon m/z 326.....	86
Figura 59: Espectro de RMN de 1H da amostra A4.6.1	87
Figura 60: Ampliação da região de hidrogênios aromáticos.....	87
Figura 61: Ampliação do espectro de RMN de 1H da região de metilênicos de A4.6.1.....	88
Figura 62: Ampliação do mapa de correlação HSQC da região de metilênicos de A4.6.1.....	88
Figura 63: Mapa de correlação HMBC dos hidrogênios do anel A.....	89
Figura 64: Mapa de correlação HMBC dos hidrogênios do anel D.....	90
Figura 65: Ampliação do mapa de correlação HMBC da região de metoxila. .	90
Figura 66: Espectro de massas <i>full scan</i> da amostra A4.6.1.....	92
Figura 67: Proposta de fragmentação para o íon de m/z 328.....	93
Figura 68: Perfil de fragmentação para o íon de m/z 328.....	93
Figura 69: Cromatograma de íons totais (TIC) de AACRFA 2.7 obtido po CG/EM.	93
Figura 70: Espectro de massas de AACRFA 2.7	94
Figura 71: Espectro de RMN 1H da amostra AACRFA 2.7	94
Figura 72: Ampliação do espectro de RMN de 1H , olefínicos, metínicos e metílicos.....	95
Figura 73: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, $CDCl_3$) de AACRFA 2.7	96
Figura 74: Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (125 MHz, $CDCl_3$) de AACRFA 2.7	96
Figura 75: Ampliação do mapa HSQC da região de metilas de AACRFA 2.7 .	97
Figura 76: Mapa de correlação HMBC na região de metilas de AACRFA 2.7	97

Figura 77: Ampliação do mapa HSQC da região de hidrogênios e carbonos metilênicos de AACRFA 2.7	98
Figura 78: Mapa de correlação HMBC na região de metilênos de AACRFA 2.7	98
Figura 79: Mapa de correlação HMBC na região de hidrogênios e carbonos metínicos de AACRFA 2.7.....	99
Figura 80: Ampliação do mapa HSQC da região de hidrogênios e carbonos metínicos de AACRFA 2.7.....	99
Figura 81: Mapa de correlação HSQC de AACRFA 2.7.....	100
Figura 82: Mapa de correlação HMBC da amostra AACRFA 2.7.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de Annonaceae que apresentaram atividade biológica. ...	17
Tabela 2: Reunião das frações obtidas do fracionamento de AACR-FA.	42
Tabela 3: Reunião das frações obtidas do fracionamento de AACR-FA 8-14.	47
Tabela 4: Íons observados no espectro de EM ² para a fração alcaloídica.	57
Tabela 5: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de AACRFA-L.....	63
Tabela 6: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de AACRFA-D.	69
Tabela 7: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de AACRFA-5.8.....	77
Tabela 8: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C de A4.7.7	84
Tabela 9: Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C A4.6.1	91
Tabela 10: Dados de RMN ¹ H, ¹³ C e HMBC da amostra AACRFA 2.7	101
Tabela 11: Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais em concentração única de 50 µg/mL.....	103
Tabela 12: Valores de CI ₅₀ para a atividade citotóxica <i>in vitro</i> em linhagens de células tumorais e não tumorais das substâncias isoladas das cascas dos ramos de <i>A. amazonica</i>	104
Tabela 13: Importância quimiofenética dos alcaloides isolados de <i>A. amazonica</i>	106

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fluxograma geral de obtenção dos extratos pelo método de maceração.....	39
Esquema 2: Fluxograma do tratamento ácido-base para extração de alcalóides.	40
Esquema 3: Fluxograma do fracionamento cromatográfico de AACR-FA.	41
Esquema 4: Grupo de frações AACR-FA 02.....	43
Esquema 5: Grupo de frações AACR-04.	44
Esquema 6: Grupo de frações AACR-05.	44
Esquema 7: Grupo de frações AACRF-06.	45
Esquema 8: Grupo de frações AACRF-07.	46
Esquema 9: Repurificação da amostra AACRFA- 7.6.....	46
Esquema 10: Isolamento das substâncias da fração FA 04.....	48
Esquema 11: Isolamento das substâncias da fração FA 09.....	48
Esquema 12: Reação de oxirredução da Resazurina- Indicador de viabilidade celular.....	50
Esquema 13: Ensaio da atividade citotóxica do extrato, frações e substâncias isoladas.	51

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 Geral.....	13
2.2 Específicos	13
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
3.1 A família Annonaceae.....	14
3.2 Etnobotânica da Família Annonaceae.....	15
3.3 O Gênero <i>Annona</i>	18
3.3.1 Aspectos fitoquímicos	20
3.4 Aspectos farmacológicos.....	24
3.5 A espécie <i>Annona amazonica</i> R. E. Fries.....	25
3.5.1 Estudos fitoquímicos de <i>Annona amazonica</i>	27
3.6 Alcaloides	29
3.6.1 Alcaloides Aporfinoides	31
3.7 Câncer e atividade citotóxica	33
4 METODOLOGIA	34
4.1 Cromatografia em coluna (CC).....	34
4.1.1 Sílica gel 60 tratada com bicarbonato de sódio (NaHCO ₃).....	34
4.2 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)	34
4.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)	35
4.4 Reveladores	35
4.5 Solventes	35
4.6 Métodos espectrométricos e espectroscópicos	36
4.6.1 Espectrometria de Massas (EM)	36
4.6.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	36
4.6.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM)	36
4.7 Outros equipamentos	37
4.8 Coleta do material vegetal	38
4.9 Preparo dos extratos.....	38
4.10 Tratamento ácido-base do extrato metanólico	39
4.11 Fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica (AAEMCR-FA)	41
4.12 Isolamento	42
4.12.1 Grupo de frações AACR-FA 02	43

4.12.2 Grupo de frações AACR-FA 04	43
4.12.3 Grupo de frações AACR-FA 05	44
4.12.4 Grupo de frações AACR-FA 06	45
4.12.5 Grupo de frações AACR-FA 07	45
4.12.6 Repurificação da amostra AACRFA-7.6	46
4.12.7 Grupo de frações AACRFA 8-14	46
4.12.8 Grupo de frações FA 04.....	47
4.12.9 Grupo de frações FA 09.....	48
4.13 Estudo biológico: atividade citotóxica <i>in vitro</i>	49
4.13.1 Ensaio de Atividade Citotóxica <i>In Vitro</i>	49
4.13.2 Preparo das amostras	49
4.13.3 Células	49
4.13.4 Ensaio de citotoxicidade	49
4.13.5 Cálculo de porcentagem de inibição celular	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Análise do perfil químico do extrato metanólico e fração alcaloídica das cascas dos ramos de <i>A. amazonica</i> por espectrometria de massas.....	52
5.2 Determinação estrutural das substâncias isoladas por CCDP da fração alcaloídica das cascas dos ramos de <i>A. amazonica</i>	58
5.2.1 Determinação estrutural da amostra AACRFA-L	58
5.2.2 Determinação estrutural da amostra AACRFA-D	65
5.2.3 Determinação estrutural da amostra AACRFA-5.8.....	71
5.2.4 Determinação estrutural da amostra A4.7.7	80
5.2.5 Determinação estrutural da amostra A4.6.1	86
5.2.6 Determinação estrutural da amostra AAGFA 2.7	93
5.3 Estudo da atividade citotóxica dos extratos brutos e frações provenientes das cascas dos ramos de <i>A. amazonica</i>	102
5.4 Investigação da atividade citotóxica das substâncias isoladas das cascas dos ramos de <i>A. amazonica</i>	103
5.5 Relação quimiofenética	105
6 CONCLUSÃO	107
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é uma prática milenar que existe em todas as culturas do mundo. No Brasil, essa prática é particularmente forte, com um vasto conhecimento tradicional sobre as propriedades curativas das plantas. Durante séculos, as plantas medicinais foram a única forma de tratamento disponível para a maioria da população. As pessoas aprendiam sobre as propriedades medicinais das plantas com os seus ancestrais e transmitiam esse conhecimento de geração em geração (Badke *et al.*, 2016).

O uso empírico das plantas medicinais é baseado na observação dos efeitos que elas têm no corpo humano após seu consumo. Com o avanço da ciência e das tecnologias, o uso dessas plantas passou a ser estudado de forma mais rigorosa, com o intuito de descobrir as substâncias responsáveis por sua ação curativa e melhorar sua eficácia, além de oferecer mais segurança para um consumo consciente (Mengue; Mentz; Schenkel, 2001).

Estudos científicos atrelados ao conhecimento popular comprovam que muitas plantas medicinais possuem propriedades terapêuticas, podendo ser utilizadas para o tratamento de várias doenças, sendo fundamental a divulgação destes estudos para que a população possa usufruir dos benefícios naturais das plantas (Brito *et al.*, 2008; Pedroso; Andrade; Pires, 2021).

Os produtos naturais têm sido fundamentais para a descoberta e o desenvolvimento de novos fármacos. Atualmente, muitas pesquisas têm se concentrado na identificação de substâncias bioativas com o objetivo de desenvolver medicamentos que possam auxiliar no combate ao câncer (Felício; Oliveira; Debonisi, 2012).

O câncer é considerado um dos principais problemas de saúde pública que o sistema de saúde brasileiro enfrenta e é considerado a segunda maior causa de morte no país e no mundo, com tendência de aumento nos últimos anos (INCA, 2020).

Pode-se dizer que câncer é o termo geral dado a um conjunto de mais de 100 doenças malignas, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que tendem a invadir tecidos próximos ou órgãos a distância (INCA, 2022).

São conhecidas várias substâncias provenientes de produtos naturais e que estão sendo empregadas no tratamento do câncer, da quais podemos citar os conhecidos como alcaloides da vinca (*Catharanthus roseus*), a vincristina (Oncovin®),

vimblastina (Velban®), vindesina (Eldisine®) e vinorelbina (Navelbine®) e os taxanos, o paclitaxel (Taxol®) e o análogo docetaxel (Taxotere®) (Rocha; Lopes; Schwartzmann, 2001).

As plantas são as principais fontes de produtos naturais. Nelas são sintetizadas uma grande variedade de metabólitos que são fundamentais para o seu processo de crescimento e defesa. Os metabólitos primários são considerados essenciais para vida da planta (carboidratos, lipídios, aminoácidos e nucleotídeos) pois estão envolvidos no processo de fotossíntese e respiração das plantas (Dewick, 2009).

Em contrapartida, os metabólitos secundários (alcaloides, terpenos, esteroides, ácidos graxos, flavonoides, taninos, acetogeninas, lignanas, ligninas, cumarinas, etc.) são encontrados em organismos específicos ou em grupos de organismos, podendo ser usados como defesa contra herbívoros, atrativos para polinizadores, proteção UV, sinalização molecular, entre outros (Dewick, 2009; Vizzotto, Krolow, Weber, 2010).

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente o Brasil é um país com uma enorme biodiversidade, com cerca de 15 a 20% das espécies de plantas do planeta. O país possui uma flora diversificada, com mais de 55 mil espécies descritas, que corresponde a 22% do total mundial, incluindo algumas das florestas mais ricas em plantas do mundo, a Amazônia, a Mata Atlântica e o Cerrado. A Amazônia, embora ainda não totalmente catalogada, abriga uma riqueza natural imensa, com uma estimativa de cerca de 60.000 espécies de plantas (Nascimento *et al.*, 2017).

A Amazônia é considerada a maior reserva de diversidade biológica do mundo, e também o maior bioma brasileiro em extensão ocupando quase metade do território nacional (49,29% de todo território brasileiro), com aproximadamente 6,5 milhões de quilômetros quadrados (IBGE, 2023). Dentre as 60 mil espécies de plantas reconhecidas na Amazônia brasileira, muitas ainda não foram estudadas do ponto de vista químico e biológico.

Dentre as várias espécies de plantas distribuídas na Região Amazônica, podemos destacar aquelas pertencentes à família Annonaceae, que ganharam destaque por possuir frutos com sabor adocicado muito apreciado pela população, e que tem considerável importância econômica, em particular as espécies do gênero *Annona*. Exemplos conhecidos popularmente são a graviola, ata, biribá, atemoia, araticum, entre outros (São José *et al.*, 2014).

Além disso, as espécies pertencentes à família Annonaceae têm sido muito utilizadas dentro da medicina popular, e vem sendo estudadas quanto as suas

propriedades biológicas, como por exemplo, o extrato das cascas e cernes de *Guatteria hispida* (R. E. Fries) Erkens & Maas apresentou atividade antioxidante e antimicrobiana (Costa *et al.* 2010), o óleo essencial das folhas de *Annona vepretorum* Mart. apresentou atividade antioxidante frente ao radical DPPH (Araújo *et al.*, 2015), o óleo essencial das folhas de *Annona foetida* Mart. apresentou atividade leishmanicida e antimicrobiana (Costa *et al.*, 2009a), e o extrato das cascas de *Annona amazonica* apresentou significativa atividade tripanocida contra as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Pinheiro *et al.*, 2009).

Dentre as muitas espécies dessa família que não possuem estudo focado em substâncias biologicamente ativas ou mesmo nos constituintes químicos, encontra-se a *Annona amazonica* R. E. Fries, uma espécie endêmica da região amazônica e pouco conhecida pela população. Nesta perspectiva, este trabalho consiste em realizar o estudo fitoquímico das cascas dos ramos de *A. amazonica* e investigar as propriedades citotóxicas, direcionada para o extrato, frações e substâncias isoladas.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

- ✓ Realizar o estudo fitoquímico das cascas dos ramos de *Annona amazonica*, assim como suas propriedades biológicas, investigando o potencial citotóxico do extrato, frações e substâncias isoladas.

2.2 Específicos

- ✓ Isolar os principais metabólitos secundários presentes no extrato metanólico das cascas dos ramos de *Annona amazonica*.
- ✓ Realizar o estudo do perfil químico do extrato metanólico e fração alcaloídica.
- ✓ Identificar os constituintes químicos isolados da fração alcaloídica por meio de técnicas espectroscópicas (RMN 1D e 2D) e espectrométricas (EM).
- ✓ Avaliar a atividade citotóxica do extrato metanólico, frações e substâncias isoladas *in vitro* contra diferentes células tumorais.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

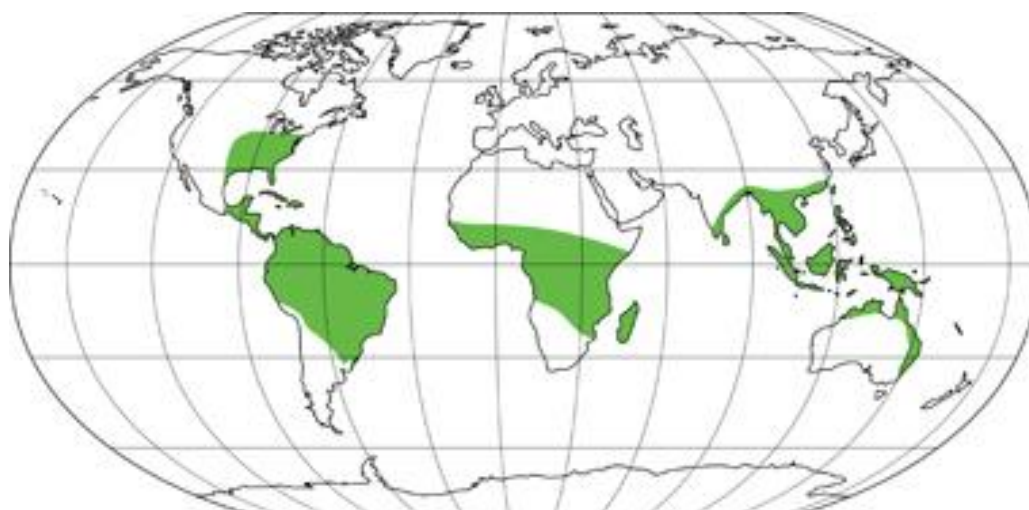
3.1 A família Annonaceae

A família de plantas Annonaceae constitui uma das maiores representantes da ordem Magnoliales por ser considerada a mais rica em espécies. Essa importante família de angiospermas possui aproximadamente 2.440 espécies em 108 gêneros que estão distribuídas em regiões tropicais e subtropicais (figura 1) (Chatrou *et al.*, 2012; Rainer; Chatrou, 2014; Lúcio *et al.*, 2015).

No Brasil, existem 386 espécies diferentes de anonáceas distribuídas em 29 gêneros. A Amazônia abriga a maior parte dessa diversidade com 280 espécies e 27 gêneros, concentrando cerca de três quartos das espécies encontradas no país. Embora menos numerosas, as anonáceas também ocorrem na Mata Atlântica, Cerrado, e em regiões do Nordeste, como o norte de Minas Gerais e a Bahia (Lopes; Mello-Silva, 2014; São José *et al.*, 2014).

A ordem Magnoliales é constituída por plantas que incluem arbustos com características lenhosas, trepadeiras e árvores. Os indivíduos que integram a família Annonaceae apresentam-se como árvores, arvoretas e raramente são encontradas na forma de lianas (Costa, 2009a; Aminimoghadamfarouj; Nematollahi; Wiart, 2011).

Figura 1: Distribuição geográfica da família Annonaceae no mundo.



Fonte: https://www.thecompositaeht.com/www_tch/webcurso_spv/famílias. Acesso em: 01 de setembro de 2023.

3.2 Etnobotânica da Família Annonaceae

A família Annonaceae pode ser caracterizada morfológicamente por suas folhas alternas, simples e dísticas, margem inteira e estípulas ausentes, flores isoladas ou em florescência, com três sépalas, seis pétalas, estames poucos numerosos, podendo possuir cascas com longas e resistentes fibras (conhecida popularmente como envira), frutos do tipo sincárpico, pseudosincárpico ou apocárpico (Lima-Brito *et al.*, 2006; Koek-Noorman; Westra, 2012; Lobão, 2016).

A família destaca-se entre as demais devido a sua grande importância econômica atribuída aos seus frutos comestíveis e seus derivados, bem como, as atividades farmacológicas descritas para algumas espécies de anonáceas, além da utilização industrial da matéria-prima para a produção de cosméticos, perfumaria e indústria alimentícia (Nunes *et al.*, 2012; Sobrinho, 2014; Lobão, 2016).

Os frutos de Annonaceae são muito cultivados em alguns países com a finalidade comercial, como Chile, México, Venezuela, Austrália e Brasil. No território brasileiro, as anonáceas podem ser encontradas desde o Norte do país até o Estado de São Paulo. A região Nordeste destaca-se por apresentar o maior avanço no cultivo destas frutíferas. O Estado da Bahia é considerado o maior produtor, seguido pelos Estados de Alagoas e São Paulo (Sobrinho, 2014).

Algumas espécies do gênero *Annona* destacam-se por seus frutos comestíveis como: *A. squamosa* L (pinha, ata ou fruta do conde), *A. cherimolia* Mill (cherimoia), *A. crassiflora* (Marôlo, cabeça-de-negro, panã), *A. muricata* L. (graviola, guanabara, araticum), *A. montana* (graviola da montanha), *A. mucosa* Jacq. (biribá) e o híbrido *A. squamosa* e *A. cherimolia* (atemoia) (figura 2). Apesar do gênero *Annona* apresentar uma grande diversidade de frutos comestíveis e popularmente conhecidos, podemos encontrar outros gêneros dos quais seus frutos são consumidos, porém não são comuns, tais como, *Asimina*, *Duguetia*, *Polyalthia* e *Uvaria* (Costa *et al.*, 2009b; Souza, 2013; Sobrinho, 2014; Ferreira *et al.*, 2019).

Figura 2: Frutos comestíveis pertencentes ao gênero *Annona*.



***Annona squamosa* L**
(Pinha, ata ou fruta do conde)



***Annona crassiflora* L**
(Marôlo)



***Annona cherimolia* Mill**
(Cherimóia)



Annona montana
(Graviola da montanha)



***Annona mucosa* Jacq.**
(Biribá)



***Annona muricata* L.**
(Graviola, guanabara, araticum)

Fonte: Disponível em: <https://www.monaconatureencyclopedia.com/annonamontana/?lang=em>. Acesso em: 05.11.2023; <https://www.wikidata.org/wiki/Q3926733>. Acesso em: 07.10.2023; https://www.123rf.com/photo_20960813_custard-apple-fruit-on-tree-annona-squamosa.html. Acesso em: 07.10.2023; <https://plantidtools.fieldmuseum.org/pt/nlp/-catalogue/3686577>. Acesso em: 07.10.2023.

Além da grande importância econômica para a indústria alimentícia, estudos fitoquímicos e biológicos têm sido realizados com essa família de plantas e têm revelado propriedades farmacológicas importantes, tais como: tripanocida (Pinheiro *et al.*, 2009), antimicrobianas, antioxidante, citotóxica (Lima *et al.*, 2012; Almeida *et al.*, 2014; Araújo *et al.*, 2015), anti-inflamatório (Mendes, 2018), antileishmanicida (Lima *et al.*, 2012), antiparasitária (Rabêlo *et al.*, 2014).

O aumento progressivo de pesquisas que envolvem o estudo dos óleos essenciais e extratos brutos de espécies de Annonaceae, visando o isolamento dos componentes químicos presentes nas suas folhas, cascas, frutos e raízes, está diretamente relacionado com a descoberta de propriedades biológicas e farmacológicas promissoras de muitas espécies dessa família de plantas (Almeida *et al.*, 2014; Mendes, 2018).

A família Annonaceae vem sendo apontada como uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas com possíveis aplicações medicinais em todo o

mundo. As propriedades farmacológicas estudadas e descritas para a família Annonaceae são atribuídas à classe dos alcaloides, dos terpenos, acetogeninas e flavonoides, que são metabólitos secundários presentes em plantas e que já foram isolados e estudados em muitas espécies desta família (Nunes *et al.*, 2012; Paes *et al.*, 2016).

Grande parte dos povos indígenas faz uso de plantas medicinais para o tratamento e prevenção de doenças, entre elas, podemos citar *Guatteria foliosa* Benth. uma espécie de Annonaceae que é utilizada pelos povos indígenas da Bolívia como repelente de insetos (Mahiou *et al.*, 1994).

Na literatura são descritos diversos estudos etnofarmacológicos sobre o uso medicinal de espécies de Annonaceae, baseados no conhecimento tradicional popular. A tabela 01, apresenta alguns exemplos de espécies dessa família utilizadas na medicina popular, com suas respectivas indicações e algumas com atividades biológicas testadas e comprovadas cientificamente.

Tabela 1: Espécies de Annonaceae que apresentam relatos de atividades biológicas.

Espécie	Uso popular	Partes utilizadas	Atividade biológica
<i>Annona muricata</i> L. (Graviola)	Diabete, diarreia, febre, hipertensão (Barata <i>et al.</i> , 2009; Salesse <i>et al.</i> , 2018).	Folhas, Sementes, Flores, Cascas.	Antitumoral, antifúngica, antiviral, antibacteriana (Barata <i>et al.</i> , 2009; Silva <i>et al.</i> , 2015).
<i>Annona cherimola</i> Mill. (Cherimoia)	Doenças de pele (furúnculo) (Chen <i>et al.</i> , 2001), dor de estômago, anti-helmíntica (Capelinha, 2018).	Raiz, Cascas, Folhas, Sementes.	Antibacteriana, antioxidante (Castillo-Juárez <i>et al.</i> , 2009; Rodrigues, 2019).
<i>Annona crassiflora</i> L. (Marôlo, Araticunzeiro)	Diarreia (Rodrigues; Carvalho, 2001).	Folhas	Anti-inflamatória, quimiopreventiva (Rocha <i>et al.</i> , 2015).
<i>Annona squamosa</i> L. (Pinha, ata ou fruta do conde)	Dor de cabeça, analgésico, anti-inflamatório, banho contra piolhos (Agra; Freitas; Barbosa-Filho, 2007).	Folhas, Sementes, Caule.	Antioxidante, citotóxicas, antitumoral, antidiabéticas (Wang <i>et al.</i> , 2014).
<i>Annona leptopetala</i> (R.E. Fries) H.Rainer (Pinha-brava; banana de macaco)	Antitumoral e anti-inflamatório (Brito <i>et al.</i> , 2018); Problemas no sistema digestivo (Agra; Freitas; Barbosa-Filho, 2007).	Cascas	Antioxidante, antitumoral (Brito <i>et al.</i> , 2018); Larvicida (Feitosa <i>et al.</i> , 2009).

Continuação...

<i>Annona foetida</i> Mart. (Araticum caatinga; graviola do mato)	Reumatismo, febre e dores estomacais, úlceras (Corrêa, 1984; Costa <i>et al.</i> , 2009b).	Folhas e Casca.	Antimicrobiana e antileishmania (Costa <i>et al.</i> , 2006; Costa <i>et al.</i> , 2009b).
<i>Annona mucosa</i> Jacq. (Biribá)	Analépticos, antiescorbúticos (Falcão <i>et al.</i> , 1981).	Frutos, Sementes, Folhas.	Atividade antiplaquetária (Kuo <i>et al.</i> , 2001); Citotóxica (Shi; Macdougall; McLaughlin, 1997); Antileishmania (Lima <i>et al.</i> , 2012).
<i>Annona amazonica</i> R.E Fries (Araticum árvore gigante)	--	--	Atividade tripanocida (Pinheiro <i>et al.</i> , 2009).
<i>Duguetia furfuracea</i> (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f. (Araticum-do-cerrado, ata de lobo)	Antirreumático, cicatrização de feridas, dores renais, contra pediculose (Favareto <i>et al.</i> , 2019; Agra; Freitas; Barbosa-Filho, 2007).	Casca	Antitumoral, atividade leishmanicida, tripanocida (Silva <i>et al.</i> , 2009a).
<i>Guatteria citriodora</i> Duck (Envira-amarela, laranjinha)	--	--	Atividade antibacteriana e antifúngica (Souza <i>et al.</i> , 2022); Antiplasmódica (Rabelo <i>et al.</i> , 2014).
<i>Guatteria boliviana</i> H. Winkler	Antipirético e vermífugo (Mahiou <i>et al.</i> , 2000).	--	Antileishmania (Mahiou <i>et al.</i> , 2000).
<i>Guatteria cardoniana</i> R. E. Fries	Repelente (Paredes <i>et al.</i> , 2001).	Folhas	Antiviral (Paredes <i>et al.</i> , 2001).
<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart. (Pimenta-de-macaco)	Diurético, tratamento de doenças digestivas e tempero (Fournier <i>et al.</i> , 1994a).	Folhas, Casca, Flores.	Atividade antibacteriana, antifúngica (Nascimento <i>et al.</i> , 2018); Citotóxica (Mesquita <i>et al.</i> , 2009).
<i>Xylopia frutescens</i> Aubl. (Envira-vermelha)	Reumatismo, Halitose, Cárie dentária, Doenças intestinais (Takahashi <i>et al.</i> , 1995).	Sementes, Folhas, Casca.	Atividade citotóxica (Ferraz <i>et al.</i> , 2013); antibacteriana, antifúngica, (Fournier <i>et al.</i> , 1994b).

3.3 O Gênero *Annona*

Segundo São José *et al.* (2014), o gênero *Annona* é representado por 118 espécies, das quais 108 são nativas da América Tropical, 10 são encontradas na África Tropical e apenas a espécie *Annona glabra* está presente em ambos os continentes. Este gênero ganha destaque por possuir treze espécies que produzem frutos comestíveis, dos quais nove são obtidos por meio de plantio e cinco apresentam maior importância econômica, sendo três com maior visibilidade de mercado: *A. muricata*, *A. squamosa* e *A. cherimola* (Figura 3).

Figura 3: Frutos de diferentes espécies do gênero *Annona*: (a) *A. muricata* (b) *A. squamosa* (c) *A. cherimola*.



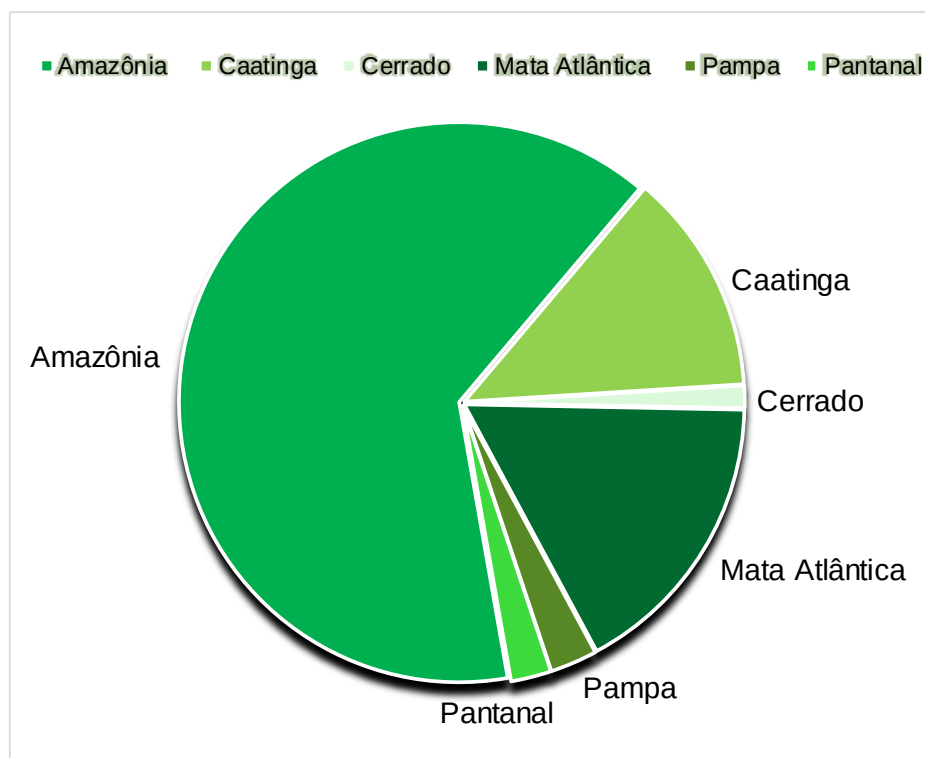
Fonte: <https://www.infoescola.com/frutas/graviola/>; <https://www.biodiversity4all.org/taxa/69973-Annona-squamosa>; <https://www.biodiversity4all.org/taxa/126236-Annona-cherimola>. Acesso em: 01.12.2023.

O gênero *Annona* tem ocorrência confirmada geograficamente no território brasileiro nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), (Lopes, Mello-Silva, 2014; Mendes-Silva *et al.*, 2020).

No Brasil, são catalogadas 79 espécies do gênero *Annona*, dentre estas 24 são consideradas endêmicas. Estão distribuídas nos domínios fitogeográficos da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal, conforme é demonstrado na figura 4 (Mendes-Silva *et al.*, 2020).

As espécies do gênero *Annona* podem ser encontradas na forma de árvores, arbustos, subarbusto e menos comum como lianas e trepadeiras. Suas folhas apresentam nervura primária impressa, plana ou proeminente na face adaxial. Suas flores são geralmente bissexuais; com 3 sépalas; de 3 a 6 pétalas; estames numerosos; carpelos numerosos livres; sementes numerosas (Chatrou *et al.*, 2012; Mendes-Silva *et al.*, 2020).

Figura 4: Distribuição fitogeográfica das espécies de *Annona* no Brasil.



Fonte: Adaptado de Mendes-Silva *et al.*, (2020).

De acordo com Costa *et al.* (2010), em virtude de seu potencial medicinal, as espécies do gênero *Annona*, bem como as demais da família, são frequentemente estudadas para fins farmacológicos e também são muito utilizadas na medicina tradicional.

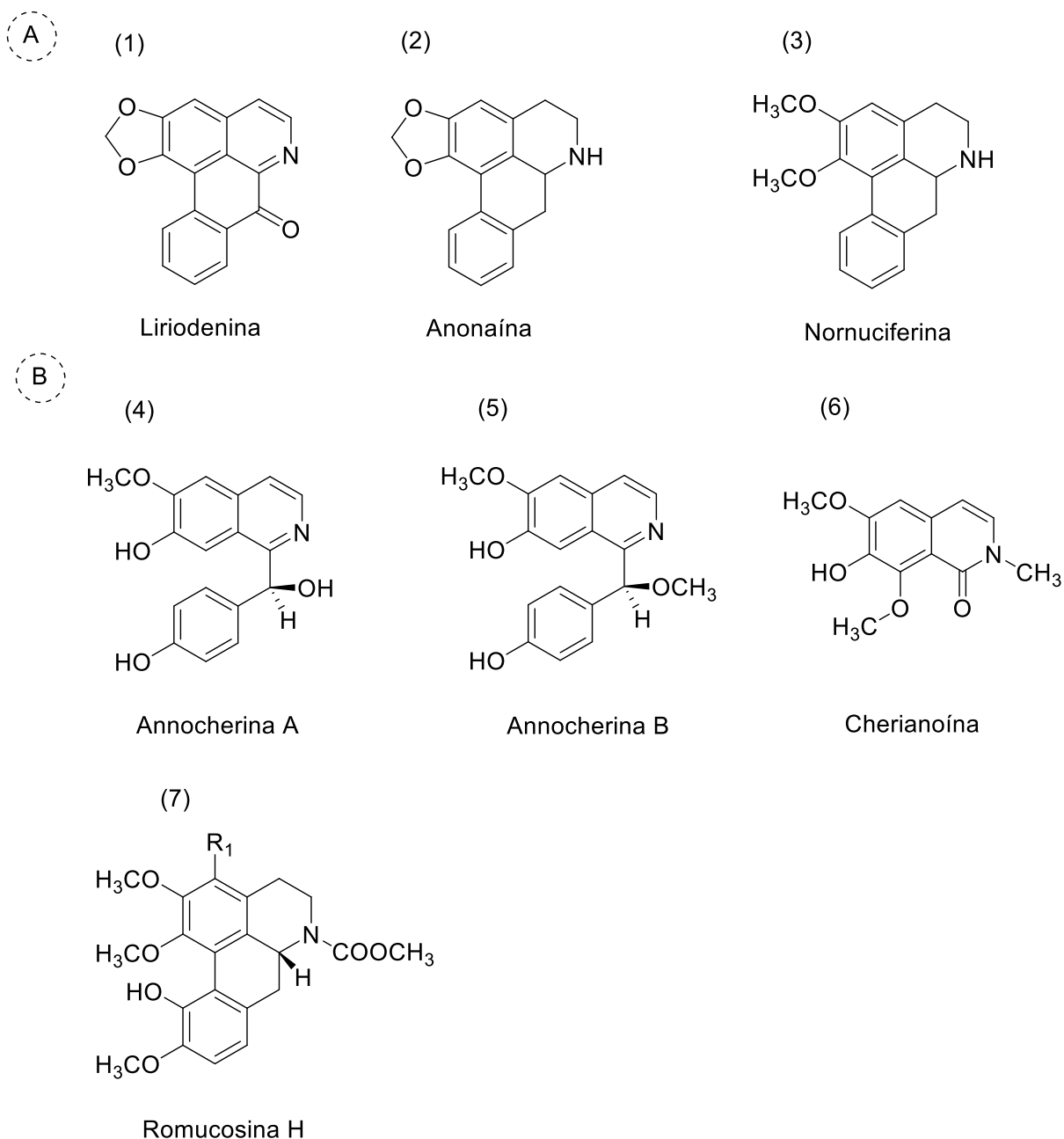
3.3.1 Aspectos fitoquímicos

Estudos anteriores sobre a química e atividade biológica de algumas espécies do gênero *Annona* sugerem a presença de compostos bioativos importantes com várias propriedades com potencial para diversas aplicações. As espécies pertencentes ao gênero *Annona* destacam-se quimicamente por produzir esteroides, flavonoides, peptídeos, diterpenos, acetogeninas e alcaloides (Paes *et al.*, 2016).

O gênero *Annona* é reconhecido quimicamente pela presença de diversas classes de metabólitos secundários, sendo a classe dos alcaloides os mais comuns e são reconhecidos por apresentar uma notável variedade de atividades farmacológicas comprovadas, das quais podemos citar antibacterianas, antiviral, atividade citotóxica contra diferentes células cancerosas entre outros (Aminimoghdamfarouj; Nematollahi; Wiart, 2011).

O estudo fitoquímico realizado com extrato metanólico das folhas de *A. cherimolia* resultou no isolamento e identificação de um alcaloide oxoaporfínico (liriodenina) e dois aporfínicos (anonaína e nornuciferina) (figura 5a) (Martinez-Vazquez *et al.*, 2012). Em outro estudo realizado por Chen *et al.* (2001), do extrato metanólico do caule de *A. cherimolia*, foram isolados quatro alcaloides: annocherina A, annocherina B, cherianoína e romucosina H (figura 5b).

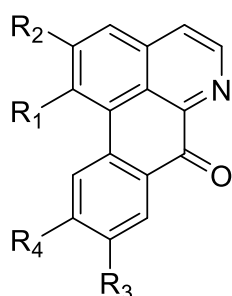
Figura 5: Estrutura de alguns alcaloides aporfínicos e oxoaporfínico isolados de *A. cherimolia*.



Um estudo realizado por Campos *et al.* (2008) identificou nas folhas de *A. sericea* Dunal oito alcaloides que já haviam sido descritos para outras plantas, no entanto foram relatados pela primeira vez na espécie, sendo dois oxoaporfínicos (oxonuciferina e oxonantenina), quatro aporfínicos (nornuciferina, nornantenina, isoboldina e 3-hidroxinornuciferina) e dois benziltetraidroisoquinolínicos (reticulina e (S)-N-metilcoclaurina) (figura 6).

Figura 6: Alcaloides isolados de *A. sericea*.

(8) Oxoaporfínicos



Oxonuciferina

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$;

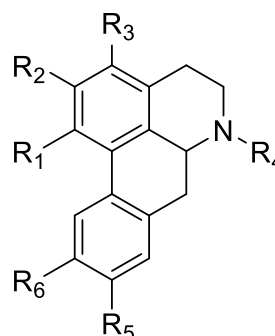
$R_3 = R_4 = \text{H}$.

Oxonantenina

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$;

$R_3 = R_4 = \text{OCH}_2\text{O}$.

(9) Aporfínicos



Nornuciferina

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$;

$R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$.

Nornantenina

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$;

$R_3 = R_4 = \text{H}$;

$R_5 = R_6 = \text{OCH}_2\text{O}$.

Isoboldina

$R_1 = R_5 = \text{OH}$;

$R_2 = R_6 = \text{OCH}_3$;

$R_3 = \text{H}$; $R_4 = \text{CH}_3$.

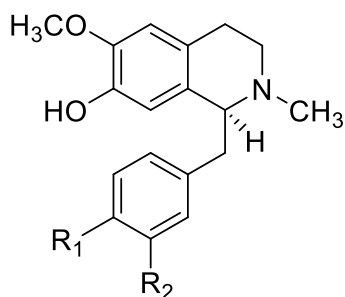
3-hidroxinornuciferina

$R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$;

$R_3 = \text{OH}$;

$R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$.

(10) Benziltetraidroisoquinolínicos



(S)-reticuline

$R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{OH}$.

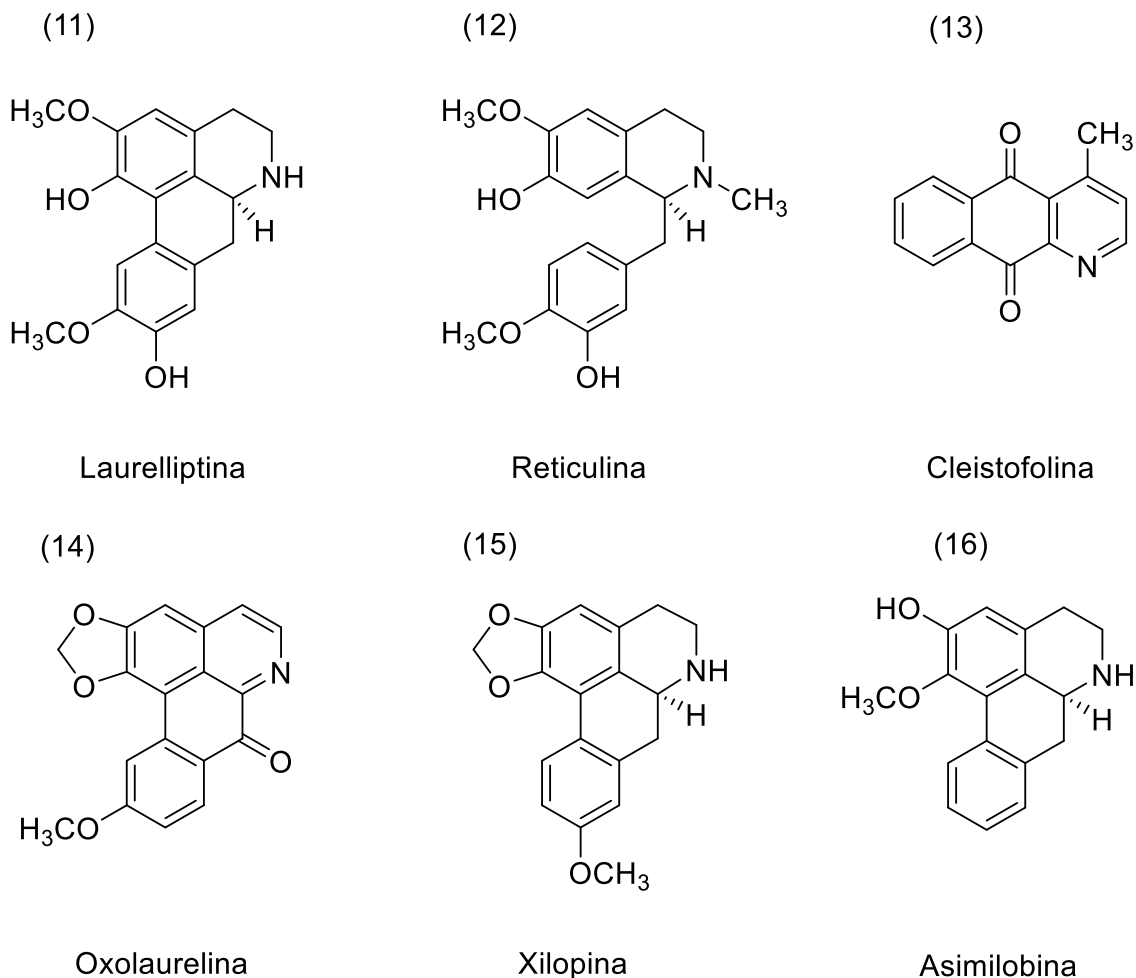
(S)-N-metilcoclaurina

$R_1 = \text{OH}$; $R_2 = \text{H}$.

O estudo conduzido por Paulo *et al.* (1992) com as cascas de *A. salzmannii*, resultou no isolamento dos alcaloides aporfínicos (anonaína, isoboldina e laurelliptina) e benzilisoquinolínicos (reticulina) (figura 7). Ainda com as cascas de *A. salzmannii* A.

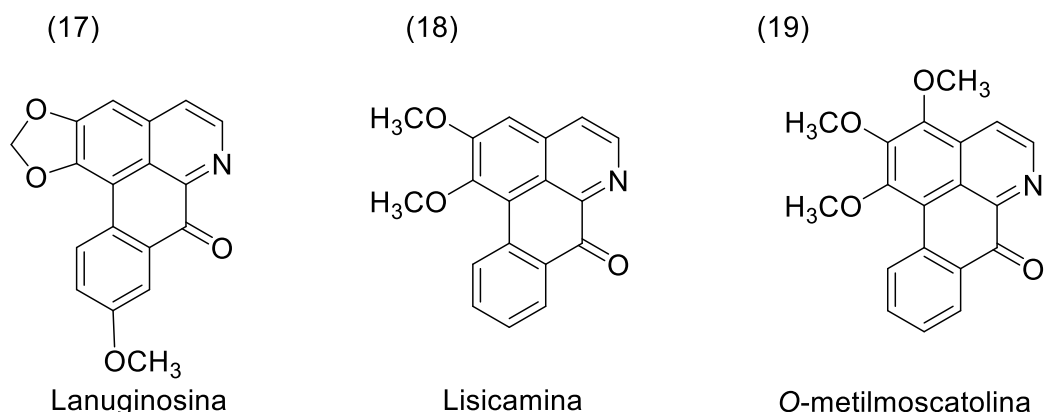
DC, Cruz *et al.*, (2011) identificaram 7 alcaloides, sendo um azaantraceno (cleistofolina), dois oxoaporfina (liriodenina e oxolaurelina), três aporfina (anonaina, xilopina e assimilobina) e um benziltetrahydroisoquinolino (reticulina) (figura 7).

Figura 7: Alcaloides isolados de *A. salzmannii*.



A investigação fitoquímica dos extratos etanólicos da madeira e folhas de *Annona cacans* Warming resultou no isolamento e na identificação de cinco alcaloides oxoaporfínicos: liriodenina (1,2-metilenodioxido-7-oxoaporfina), oxolaurelina (10-metóxi-1,2-metilenodioxido-7-oxoaporfina), lanuginosina (9-metóxi-1,2-metilenodioxido-7-oxoaporfina), lisicamina e O-metilmoscatolina (figura 8) (Nascimento, 2008).

Figura 8: Alcaloides oxoaporfínicos isolados de *A. cacans*.



3.4 Aspectos farmacológicos

O gênero *Annona*, assim como os demais gêneros da família Annonaceae, é rico em compostos bioativos com potencial para diversas aplicações farmacológicas. Pesquisas que envolvem espécies deste gênero têm apresentado resultados significativos quanto ao estudo com extratos brutos e substâncias isoladas submetidas a testes de atividade biológica, como consequência, os estudos fitoquímicos e farmacológicos com o gênero estão se intensificando (Aminimoghadamfarouj; Nematollahi; Wiart, 2011; Cunha *et al.*, 2021).

Pesquisadores identificaram quatro alcaloides aporfínicos no extrato bruto do caule da *Annona hypoglauca* Mart., uma planta nativa da região amazônica. O extrato e os alcaloides foram testados contra bactérias e células cancerígenas, e os resultados mostraram atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, e atividade citotóxica contra células cancerígenas de mama e cólon (Rinaldi *et al.*, 2017).

Um estudo mostrou pela primeira vez atividade antioxidante de extratos e frações obtidos das sementes das espécies *A. cherimola*, *A. muricata* e *A. squamosa*. Os resultados obtidos durante o teste confirmam o alto potencial dos extratos dessas espécies de *Annona* como antioxidantes (Larrotá; Baquero, 2018).

Cunha *et al.* (2021) estudaram o extrato das folhas da *A. muricata* L. e avaliaram o seu potencial citotóxico e antimicrobiano. Os resultados demonstraram toxicidade frente as larvas de *Artemia salinas* (náuplios) nas concentrações a partir de 250 µg.mL⁻¹ de extrato e a concentração de 25 µg.mL⁻¹ e a de 50 µg.mL⁻¹ mostraram halos de inibição frente à cepa de *Escherichia coli*, demonstrando o potencial dessa

espécie como fonte de compostos antibacterianos, que pode ser atribuída à classe dos alcaloides.

Sosa-Rueda *et al.* (2022) pesquisaram o extrato metanólico das sementes de *Annona globiflora* Schltdl. e seus constituintes mostraram atividade citotóxica contra linhas celulares: DU-145 (câncer de próstata humano) e HeLa (carcinoma cervical humano). Claramente, *A. globiflora* é uma importante fonte de moléculas bioativas, que poderiam promover a exploração sustentável desta espécie subvalorizada.

Silva *et al.* (2016) investigaram o extrato das folhas de *A. crassiflora* quanto ao aspecto químico e biológico. Como resultado, a atividade antioxidante do extrato foi potencialmente ativa, sugerindo que *A. crassiflora* possui potente atividade antioxidante *in vitro* em comparação com as folhas de *A. muricata* e *A. reticulata*, sugerindo que a espécie pode ser um agente eficaz de remoção de radicais livres. Já nos testes de atividade leishmanicida os resultados não se mostraram promissores.

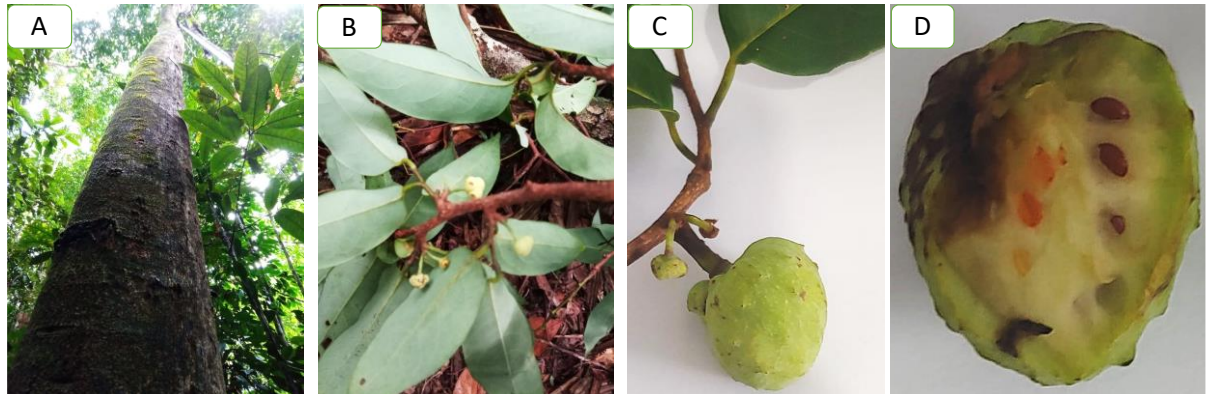
O efeito antidepressivo da fração alcaloídica da parte aérea de *A. cherimola* (folhas) foi investigado em camundongos. Os resultados demonstraram que o tratamento repetido com o extrato de *A. cherimola* produziu efeitos semelhantes aos antidepressivos em ratos. Esses resultados apoiam o uso tradicional de *A. cherimola* na medicina, como um antidepressivo e sugerem o seu potencial para o desenvolvimento de novos fármacos com base nessa planta (Martínez-Vázquez *et al.*, 2012).

Devido a série de substâncias isoladas com potencial biológico marcante em espécies do gênero *Annona*, é justificável a continuidade de estudos com o gênero. Em especial, a espécie *A. amazonica*, endêmica da região amazônica, pois apresenta poucos relatos na literatura quanto aos seus constituintes químicos e propriedades biológicas

3.5 A espécie *Annona amazonica* R. E. Fries

Annona amazonica R. E. Fries é uma árvore tropical que tem seu tamanho entre 20-30 m de altura, tronco ereto, frutos de cor acastanhado-verde, polpa amarelo-alaranjada, com 2,5–4 cm diâmetro, sementes de cor castanha medindo de 5–8 mm comprimento (figura 9). A espécie pode ser distinguida das demais por apresentar flores muito pequenas com pétalas externas e internas conatas e frutos glaucos (Mendes-Silva *et al.*, 2020).

Figura 9: Características botânicas de *A. amazonica* (a) Árvore; (b) botão de flor imaturo e folha; (c) fruto; (d) fruto e sementes.



Fonte: COSTA, 2021.

A *A. amazonica* é encontrada desde o Panamá até a América do Sul. No Brasil, está distribuída geograficamente nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia); Nordeste (Maranhão) e Centro-Oeste (Mato Grosso) (figura 10) (Mendes-Silva et al., 2020).

Figura 10: Distribuição geográfica de *A. amazonica* no Brasil.



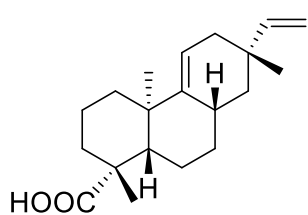
Fonte: Adaptado de Mendes-Silva et al., (2020).

3.5.1 Estudos fitoquímicos de *Annona amazonica*

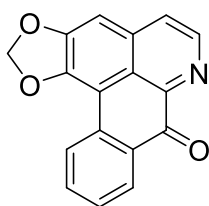
De acordo com a revisão bibliográfica realizada em diversas bases de dados como, *Google Acadêmico*, *Web of Science*, *Scielo*, *Pubmed*, Portal de periódicos, BDTD, até onde sabemos, apenas três estudos foram conduzidos com *A. amazonica*.

O estudo de Thomsen e Brimer (1997) que descreveram o isolamento e a identificação de constituintes cianogênicos na espécie. Pinheiro *et al.* (2009) investigaram os constituintes químicos do caule de *A. amazonica*, resultando no isolamento e na identificação do ácido acantoico (constituente majoritário), um diterpeno do tipo pimaradieno que possui várias e importantes atividades biológicas descritas na literatura. Também isolaram e identificaram os alcaloides liriodenina e cassiticina (também conhecida como *N*-metil-actinodafinina) (figura 11), entre outros compostos, tais como esteroides e ácidos graxos.

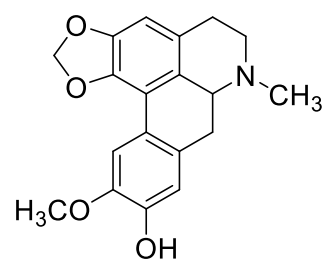
Figura 11: Constituintes químicos isolados do caule de *A. amazonica*.



Ácido acantóico

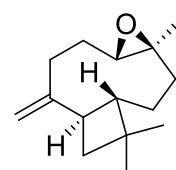
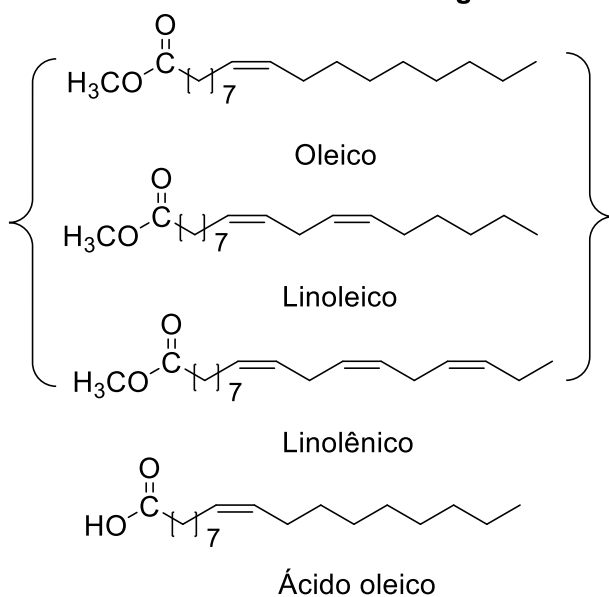


Liriodenina

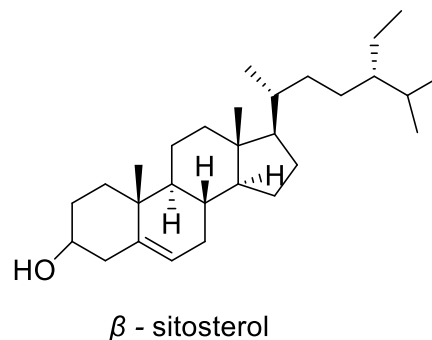


Cassiticina

Ésteres metílicos de ácidos graxos



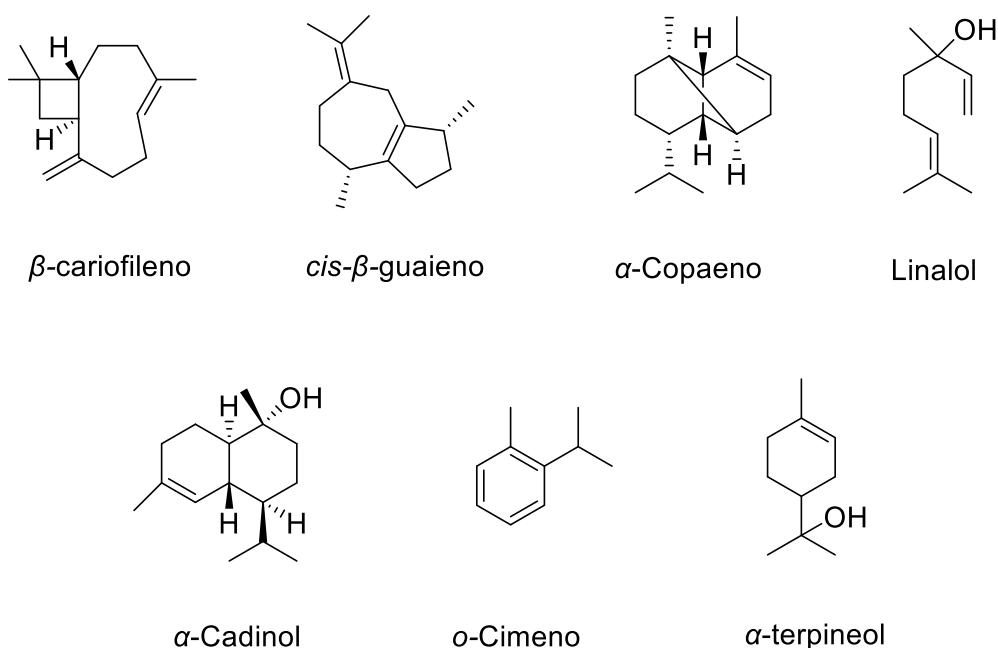
Óxido de cariofileno



β - sitosterol

Alcântara *et al.* (2013) realizaram o estudo da composição química do óleo essencial das folhas e galhos de *A. amazonica*, resultando na identificação de 59 constituintes químicos das folhas e 60 nos galhos. O componente principal do óleo essencial das folhas foi β -cariofileno (14,63%), seguido de *cis*- β -guaieno (6,63%), óxido de cariofileno (6,19%) e α -copaeno (5,73%). Nos galhos, os principais componentes foram linalol (11,41%), α -cadinol (10,04%), *o*-cimeno (8,69%) e α -terpineol (6,16%) (figura 12).

Figura 12: Constituintes químicos do óleo essencial das folhas e galhos de *A. amazonica*.

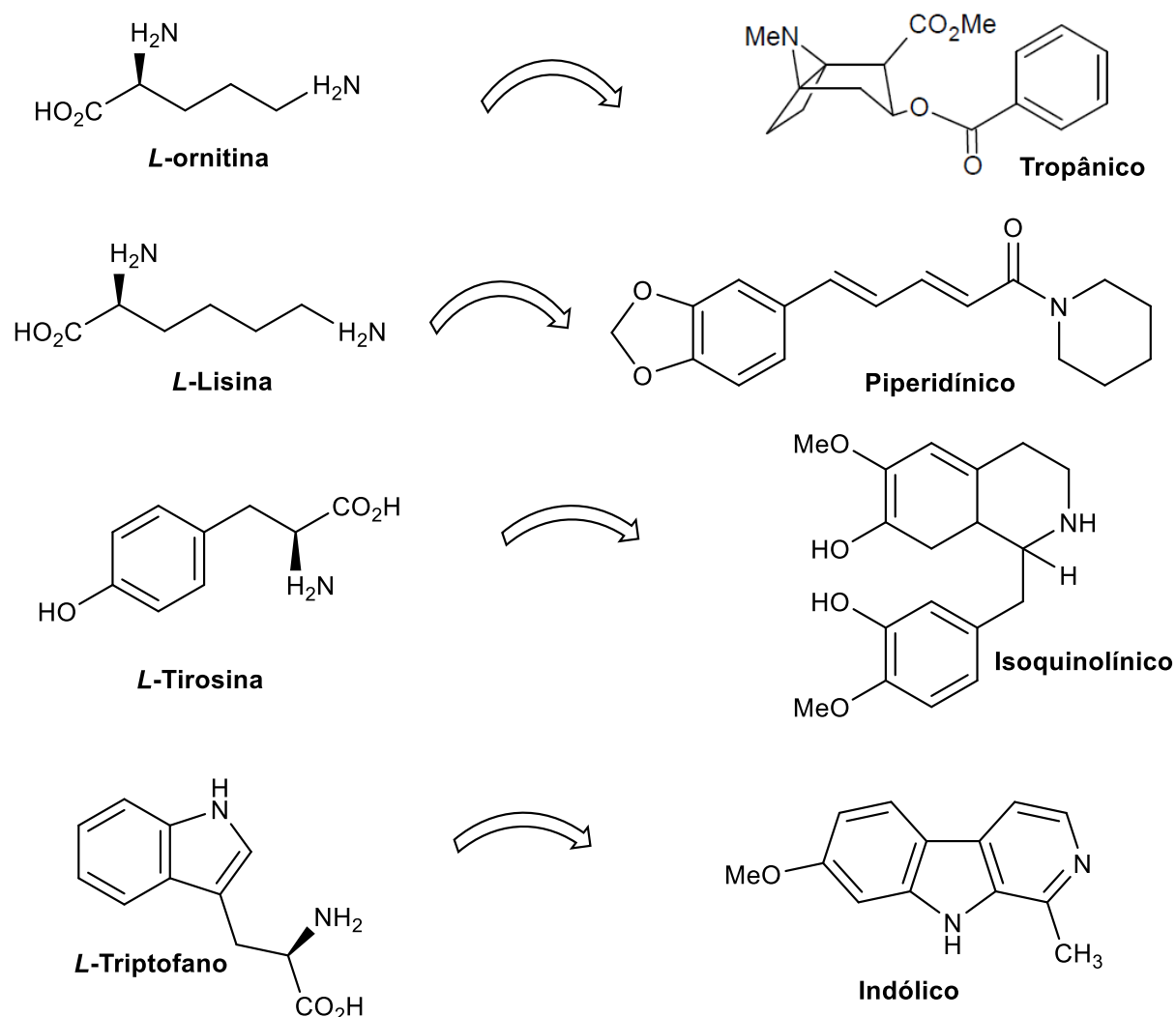


3.6 Alcaloides

Definição: Os alcaloides são compostos de baixo peso molecular que contêm um ou mais átomos de nitrogênio em sua estrutura, podendo existir na forma de aminas primárias, secundárias, terciárias ou quaternárias. A presença do átomo de nitrogênio confere aos alcaloides suas propriedades básicas, o que facilita seu isolamento e purificação (Dewick, 2009).

A basicidade típica desses compostos varia de acordo com a estrutura molecular e a presença de outros grupos funcionais e são classificados conforme a natureza do átomo de nitrogênio em sua estrutura e sua rota biossintética. A maioria dos alcaloides derivam diretamente de aminoácidos na biossíntese. Entre eles, a *L*-ornitina, *L*-lisina, *L*-tirosina e *L*-triptofano são precursores de alcaloides como os tropânicos, piperidínicos, isoquinolínicos, indólicos, (figura 13) (Dewick, 2009).

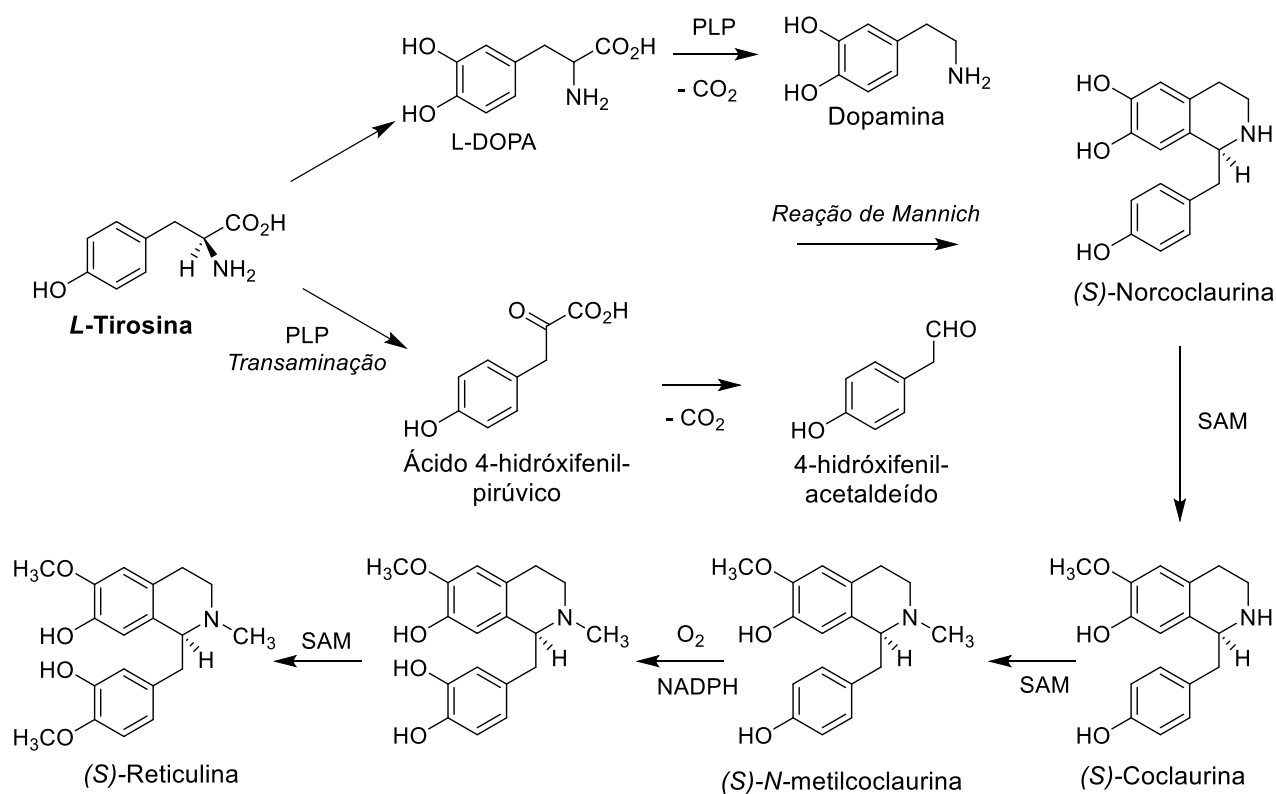
Figura 13: Estrutura dos principais alcaloides e seus precursores.



Fonte: Adaptado de Dewick, 2009.

O caminho biossintético dos alcaloides benziltetraisoquinolínicos começa com duas moléculas de L-tirosina. Uma delas é descarboxilada para formar tiramina e pode ser convertida em L-dopamina pela ação de uma enzima fenol-oxidase. O esqueleto benzil da (S)-norcoclaurina é formado quando a segunda molécula de L-tirosina sofre transaminação, resultando em ácido 4-hidroxifenilpirúvico, que é então descarboxilado para 4-hidroxifenilacetaldeído. Dopamina e 4-hidroxifenilacetaldeído são estereoseletivamente condensados, formando (S)-norcoclaurina. Uma série de reações de metilação e oxidação transforma (S)-norcoclaurina no intermediário benziltetraidroisoquinolino (S)-reticulina, precursor dos alcaloides isoquinolínicos e benziltetraidroisoquinolínicos, incluindo derivados como bisbenziltetraidroisoquinolinos, benzilisoquinolinos, bisbenzilisoquinolinos, aporfinos, protoberberinos e tetraidroprotoberberinos (figura 14) (Dewick, 2009; Stévigny; Bailly; Quetin-Laclercq, 2005).

Figura 14: Biossíntese dos alcaloides benziltetraisoquinolínicos.

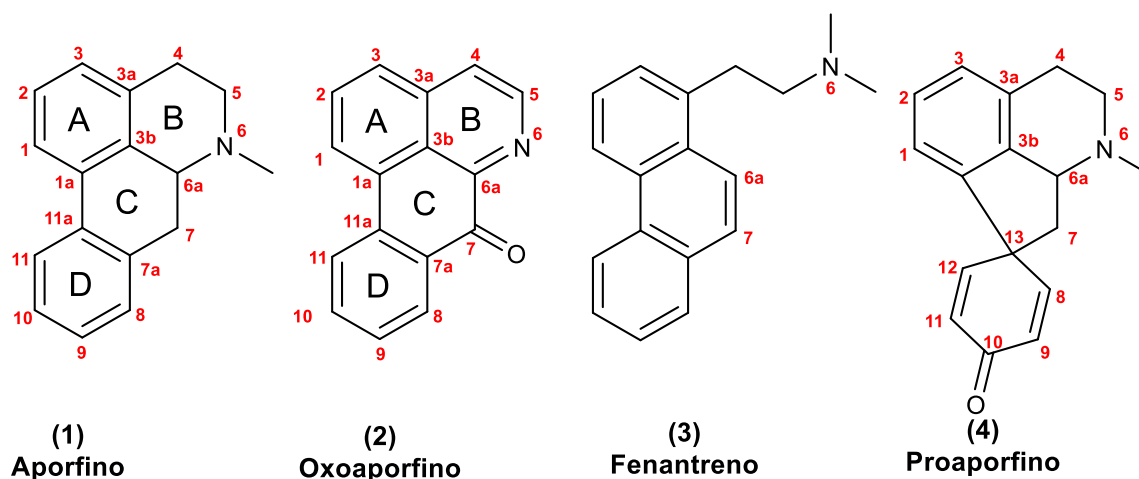


Fonte: Adaptado de Dewick (2009); Costa (2009a).

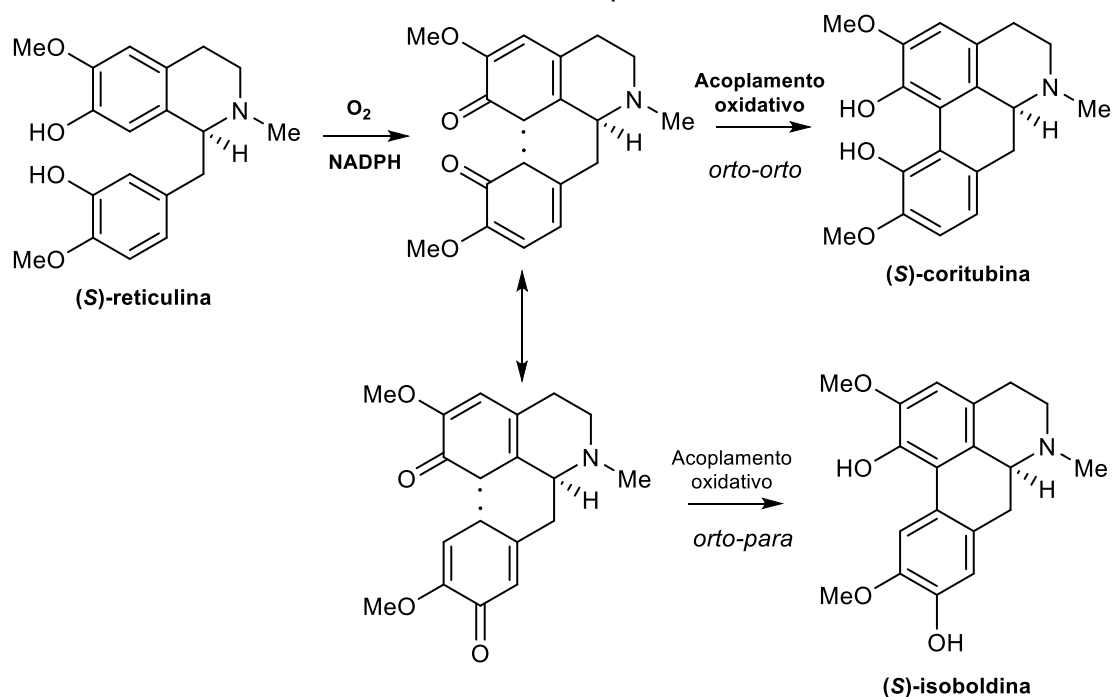
3.6.1 Alcaloides Aporfinoides

Os alcaloides aporfinoides e seus derivados são encontrados em variadas espécies da família Annonaceae e constituem um subgrupo com uma grande diversidade de substâncias. Os aporfinoides são subdivididos em quatro grupos: aporfino (1), oxoaporfino (2), fenantreno (3) e proaporfino (4) (figura 15).

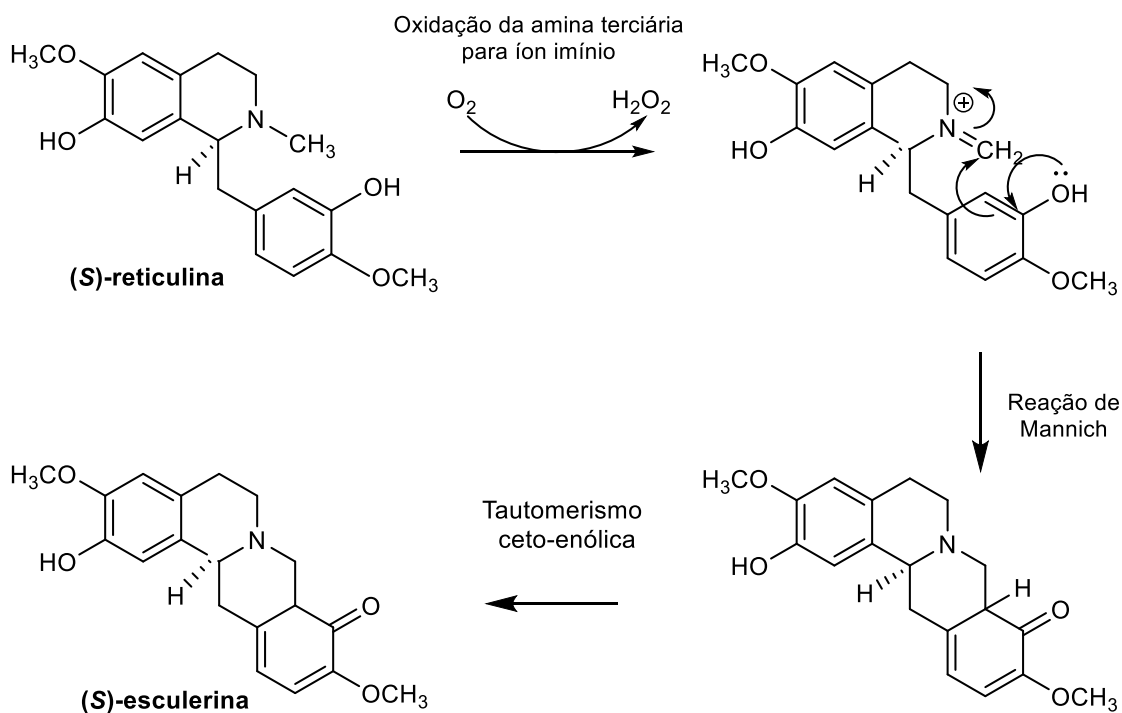
Figura 15: Estrutura geral dos alcaloides aporfinoides.



A rota mais simples para a biossíntese dos aporfinoides envolve o acoplamento oxidativo direto da (S)-reticulina formando o radical bis-dienona. Nesse processo, os dois radicais podem se acoplar de forma *orto-orto* nos anéis A e D que contêm o grupamento fenol, resultando em um padrão de substituição nas posições 1,2,10,11, ou *orto-para*, produzindo um aporfino com substituição nas posições 1,2,9,10 (figura 16) (Pelletier, 1987; Stévigny; Bailly; Quetin-Laclercq, 2005).

Figura 16: Rota biossintética dos alcaloides aporfinos.**Fonte:** Adaptado de Dewick (2009).

Os alcaloides tetraidroprotoberberinos possuem um esqueleto do tipo protoberberino. Estes compostos são formados por meio da oxidação enzimática da amina terciária presente no núcleo benzilisoquinolino, seguida por uma reação de Mannich, que resulta na ciclização da molécula (Dewick, 2009) (figura 17).

Figura 17: Rota biossintética para os alcaloides tetraidroprotoberberinos.**Fonte:** Adaptado de Dewick (2009).

3.7 Câncer e atividade citotóxica

O câncer é um grupo diverso de doenças que compartilham uma característica comum: a multiplicação desordenada de células. Diferente das células saudáveis que têm um ciclo de vida, as células cancerígenas ignoram os sinais de parada e continuam se dividindo de forma descontrolada, originando um grande número de células anormais. Esse crescimento acelerado resulta na formação de tumores malignos, capazes de invadir tecidos adjacentes e se disseminar para outras regiões do corpo (INCA, 2020).

O câncer é um problema de saúde pública crescente no mundo e no Brasil, especialmente nas regiões Sul e Sudeste do país, onde é estimado que ocorram cerca de 704 mil novos casos até 2025 (INCA, 2022). A Organização Mundial da Saúde estima que cerca de 40% das mortes por câncer são evitáveis, o que demonstra a importância de adotar hábitos de vida saudáveis.

As principais formas de tratar o câncer são a cirurgia, a radioterapia e a quimioterapia. Essas modalidades podem ser combinadas de diferentes maneiras, dependendo do tipo de tumor e da sua resposta a cada tratamento. A quimioterapia é a forma de tratamento sistêmico do câncer que usa medicamentos denominados “quimioterápicos” (ou antineoplásicos) administrados em intervalos regulares (INCA, 2022). A quimioterapia, por seus efeitos colaterais como náuseas, queda de cabelo e fadiga, pode ser muito desgastante para os pacientes, levando muitos a interromper o tratamento (Andrade; Sawada; Barichello, 2013).

A quimioterapia, apesar de eficaz no combate ao câncer, causa danos em células saudáveis além das células cancerígenas. Por isso, a busca por substâncias naturais, que sejam menos agressivas ao organismo, é uma área de grande interesse na pesquisa contra o câncer. As pesquisas em produtos naturais têm sido fundamentais para a descoberta de novas moléculas com atividade anticancerígena, abrindo novas perspectivas para o tratamento da doença (Stévigny; Bailly; Quetin-Leclercq, 2005).

4 METODOLOGIA

4.1 Cromatografia em coluna (CC)

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro aberta, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 Mesh) da Sigma-Aldrich tratada previamente com solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 10%. O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem fracionadas. A quantidade de adsorvente a ser utilizado dependeu da quantidade de amostra a ser eluída, onde foi adotado que a proporção de sílica utilizada nas separações fosse de 20 a 30 vezes a massa do produto bruto a ser purificado para o empacotamento da coluna, e de 2 vezes para pastilha (Matos, 2009).

Como fases móveis foram utilizados os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, das marcas Qhemis e Synth.

4.1.1 Sílica gel 60 tratada com bicarbonato de sódio (NaHCO_3)

A sílica utilizada para o fracionamento cromatográfico em coluna aberta, foi tratada com solução de bicarbonato (NaHCO_3) de sódio a 10%. Foram utilizados 100 g de NaHCO_3 para preparar 1000 mL (1 L) da solução para homogeneização de 500 g de sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) da marca Sigma-Aldrich. Após a adição da solução de bicarbonato, a sílica foi agitada constantemente com o auxílio de um bastão de vidro para retirar as bolhas formadas. A sílica ficou em repouso durante 24 horas. Posteriormente a sílica foi filtrada com o auxílio do funil de Büchner para retirar o excesso de solução de bicarbonato de sódio, ficando no funil apenas a sílica tratada. Em seguida, a sílica foi transferida para cápsulas de porcelana e levada para estufa à temperatura de 200 °C, com agitação periódica para evitar a formação de grumos. A sílica ficou na estufa por 24 horas para a secagem completa (Costa *et al.*, 2006).

4.2 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

As análises em camada delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas sílica gel 60 da Macherey-Nagel, com indicador de fluorescência F_{254} , com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura.

4.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As análises em escala preparativa foram desenvolvidas em cromatoplasacas de vidro de tamanho 20X20 cm com espessura de 1,0 mm.

Modo de preparo das CCDP: As placas foram preparadas adicionando-se 22 g ou 23 g de sílica gel 60 F₂₅₄ da Macherey-Nagel em um Erlenmeyer de 250 mL, em seguida, adicionou-se entre 55-65 mL de água destilada e agitou-se a solução vigorosamente por alguns minutos de modo que ficasse completamente homogênea. Em seguida, verteu-se a solução sob uma cromatoplasaca de vidro recém-limpa com acetona (C₃H₆O), espalhando sobre a placa de maneira uniforme. Após evaporação da água à temperatura ambiente por um período de 48 à 72h, as cromatoplasacas foram ativadas em estufa a 110 °C por 1h. A visualização das bandas foi efetuada com auxílio de luz ultravioleta (254 e 365 nm). A recuperação das amostras foi efetuada utilizando como solventes mistura de diclorometano (CH₂Cl₂) e metanol (CH₃OH) nas proporções de 9,5:0,5 e 9,0:1,0.

4.4 Reveladores

A revelação das faixas (*spots*) nas CCDAs e CCDPs foi realizada sob luz ultravioleta (254 e 365 nm), solução de anisaldeído (revelador para terpenóides) e reagente de Dragendorff (revelador para alcaloides).

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

Reagente de Dragendorff com modificação de Munier – (Munier, 1953 *apud* Merck, 1971). Solução A: 1,7 g de nitrato de bismuto III e 20,00 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada. Solução B: 16,00 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais (1:1) destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das placas, 5,0 mL da solução estoque foi adicionada a 10,00 g de ácido tartárico dissolvido em 50 mL de água destilada.

4.5 Solventes

Para a preparação dos extratos foram utilizados solventes das marcas Synth e Nuclear. Nas técnicas cromatográficas foram utilizados solventes das marcas Nuclear,

Synth e Qhemis. Para obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados da marca Tédia Brasil e Sigma-Aldrich. Para obtenção dos espectros de massas foram utilizados solventes grau HPLC da marca Tédia Brasil.

4.6 Métodos espectrométricos e espectroscópicos

4.6.1 Espectrometria de Massas (EM) - As análises por espectrometria de massas (EM) do extrato, frações e substâncias isoladas foram realizadas no Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas (LABCEM) da Central Analítica (UFAM), sob a coordenação do Dr. Felipe Moura Araújo da Silva. Os espectros de massas no modo *full scan* e tandem (MS^2) foram registrados em espectrômetro do tipo *ion trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific), equipado com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI) e operando nos modos positivo e negativo. Os espectros foram adquiridos e processados através do software Xcalibur® versão 2.7 (Thermo Scientific).

4.6.2 Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) - As análises por RMN 1D e 2D foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (NMRLAB) da Central Analítica (UFAM), coordenado pelo professor Dr. Marcos Batista Machado. Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bi-dimensionais (RMN 1D/2D) das substâncias foram registrados em um aparelho Bruker Avance III 500 operando a 11,75 Tesla (500 MHz para RMN de 1H e 125 MHz para RMN de ^{13}C). As amostras foram solubilizadas em crolofórmio deuterado ($CDCl_3$) e metanol deuterado (CH_3OD) e referência interna de tetrametilsilano (TMS). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), dt (duplo triplete), m (multiplete). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em hertz (Hz).

4.6.3 Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM) - As análises de CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo-Scientific) acoplado a um espectrômetro de massas ISQ com amostrador automático modelo Tri Plus RSH. Utilizou-se como fase estacionária uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 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 40-550 Da. As demais condições foram semelhantes às utilizadas para análise por CG.

Para o cálculo do índice de retenção IR foi utilizada a equação de Van Den Doll; Kratz (1963) em relação a série homóloga de *n*-alcanos (C8-C20) e fez-se a identificação através da comparação com outros espectros de massas da literatura (ADAMS, 2007). A porcentagem de cada componente foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todos os componentes presentes na mistura.

$$IR = 100 \times \frac{Tr_X - Tr_{HA}}{Tr_{HP} - Tr_{HA}} + 100N$$

onde:

Tr_X = Tempo de retenção do composto de análise;

Tr_{HA} = Tempo de retenção do hidrocarboneto anterior;

Tr_{HP} = Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior;

N = Número de carbonos do hidrocarboneto posterior;

i = Diferença entre o número de carbono dos hidrocarbonetos anterior e posterior.

A identificação dos compostos foi feita com base nos índices de retenção (Van Den Dool e Kratz, 1963) e na comparação computadorizada dos espectros de massas adquiridos com aqueles armazenados no banco de dados de espectros de massas do sistema CG-EM (NIST107 e NIST21; WILEY) e com espectros de massas da literatura (ADAMS, 2007).

4.7 Outros equipamentos

Evaporador rotativo - Fisatom em banho-maria com temperatura controlada;

Bomba de vácuo - Tecnal;

Moinho - Modelo Marconi com quatro facas;

Balança analítica - Modelos ARC 120 e AR 2140 da marca Adventurer OHAUS;

Balança semi-analítica – Modelo UX6200H da marca SHIMADZU;

Ultrassom – Unique, modelo USC-2800.

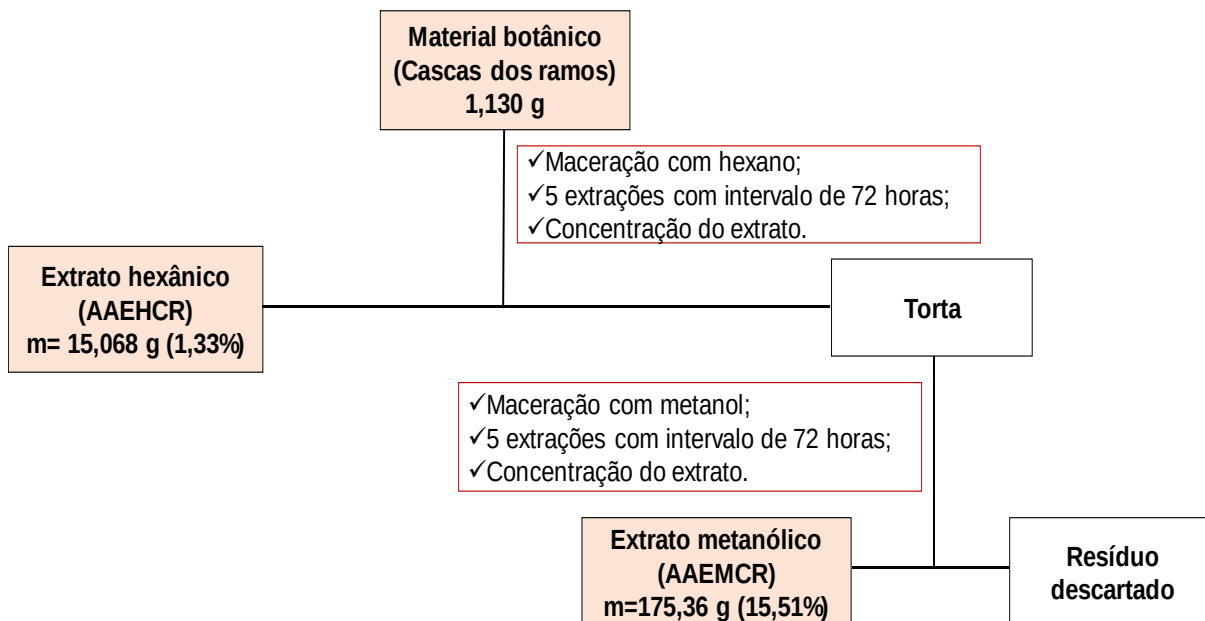
4.8 Coleta do material vegetal

As cascas dos ramos de *A. amazonica*, foi coletado no dia 3 de dezembro de 2021 pelo mateiro José Edmilson da Costa Souza, na Reserva Florestal Adolpho Ducke, sob as coordenadas 2°54'49.9" S e 59°58'43.6" W, próxima à cidade de Manaus-Amazonas, Brasil. A espécie passou pela identificação botânica com o 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 instituição sob o número 012098. O acesso ao patrimônio genético da espécie foi concedido pelo Sistema Nacional de Gestão de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob o código A70EDCD.

4.9 Preparo dos extratos

O material botânico da espécie em estudo (cascas dos ramos) foi seco em local aberto à temperatura ambiente. Em seguida, a amostra vegetal seca e moída em moinho de facas, teve sua massa determinada em uma balança semi-analítica, resultando em 1,130 g. O material vegetal foi adicionado em um Marriotte de 5000 mL para à extração a frio pelo método de maceração, onde foi adicionado ao frasco solventes em ordem crescente de polaridade, com renovação a cada 72 horas. Inicialmente, foi utilizado o solvente hexano (cinco extrações) e posteriormente metanol (cinco extrações). A cada etapa de maceração, os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura controlada entre 40-50 °C. O solvente recuperado foi reutilizado em cada etapa da maceração, houve um gasto inicial 5 L e a cada renovação foi necessário acrescentar mais 200 mL de cada solvente, totalizando um gasto de 6 L de hexano e 6 L de metanol. Ao término do processo, o resíduo vegetal proveniente da extração foi descartado e o extrato obtido foi seco à temperatura ambiente. Após completar a secagem, pôde-se calcular seus respectivos rendimentos, onde obteve-se do extrato hexânico massa igual a 15,068 g e o extrato metanólico massa igual a 175,36 g (esquema 1). Os solventes hexano e metanol após o final das extrações foram redistilados para posterior uso.

Esquema 1: Fluxograma geral de obtenção dos extratos pelo método de maceração.



O extrato metanólico foi dividido em 2 partes 170,0 g e 5,36 g. A porção menor foi reservada para análises futuras, já a porção maior foi submetida ao tratamento ácido-base

Uma alíquota (25,0 mg) dos extratos hexânico e metanólico foi separado e enviado para a realização do ensaio de atividade citotóxica no Instituto Gonçalo Moniz (IGM) da Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz) do estado da Bahia (Fiocruz-BA), sob a coordenação do Dr. Daniel Pereira Bezerra.

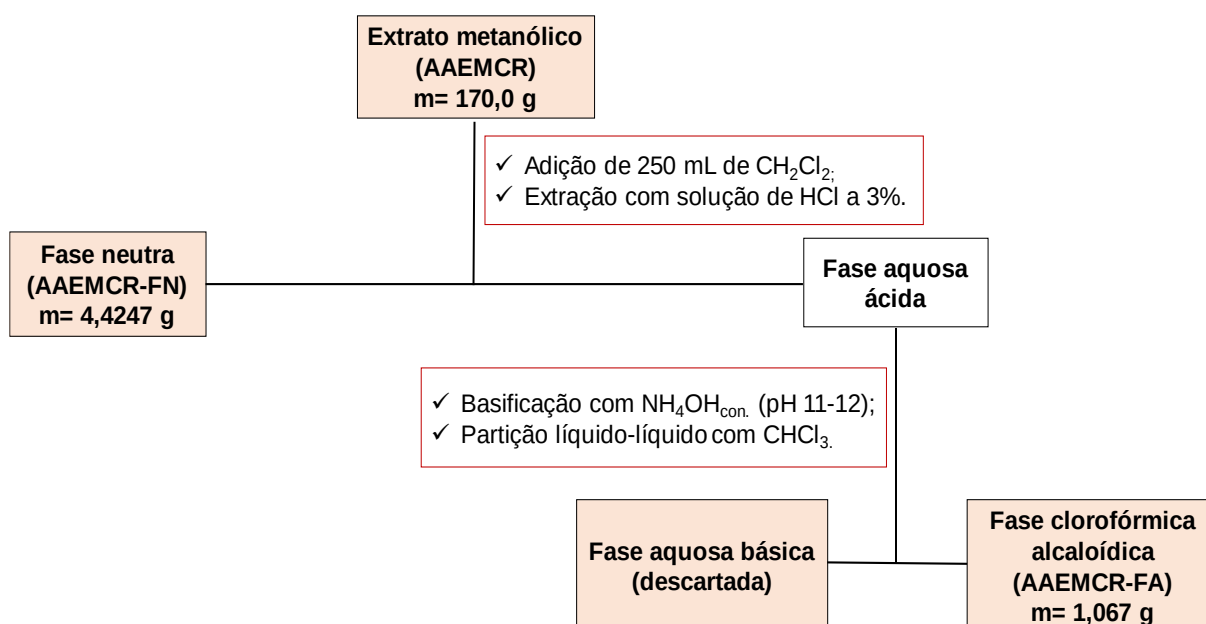
4.10 Tratamento ácido-base do extrato metanólico

Utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi realizada a análise do extrato metanólico, no qual foram testados diferentes sistemas de solventes. Essa investigação química indicou a presença de alcaloides por exposição ao reagente Dragendorff (reagente que evidencia compostos nitrogenados). Fundamentado nesta análise, o extrato metanólico foi submetido à extração ácido-base, seguindo a ordem do esquema 2 e de acordo com a metodologia de Costa *et al.*, (2006).

Inicialmente foram adicionados ao extrato 250 mL de diclorometano (CH_2Cl_2), que solubilizaram apenas uma pequena parte do extrato. Posteriormente, a mistura foi submetida à extração sucessiva com 200 mL de solução de ácido clorídrico 3% v/v (HCl), obtendo-se duas frações: a fração aquosa ácida e a fração orgânica neutra. A

fase aquosa ácida com pH igual a 3,0 foi cuidadosamente separada da fase neutra e basificada com hidróxido de amônio (NH_4OH) até pH entre 11-12. Após o processo de basificação, a solução foi extraída sucessivamente com o solvente clorofórmio (CHCl_3), do qual originaram-se duas novas frações: fração clorofórmica alcaloídica e fração aquosa básica. A fração alcaloídica foi levada ao evaporador rotativo e posteriormente foi transferida para um frasco e deixada secar em temperatura ambiente.

Esquema 2: Fluxograma do tratamento ácido-base para extração de alcalóides.

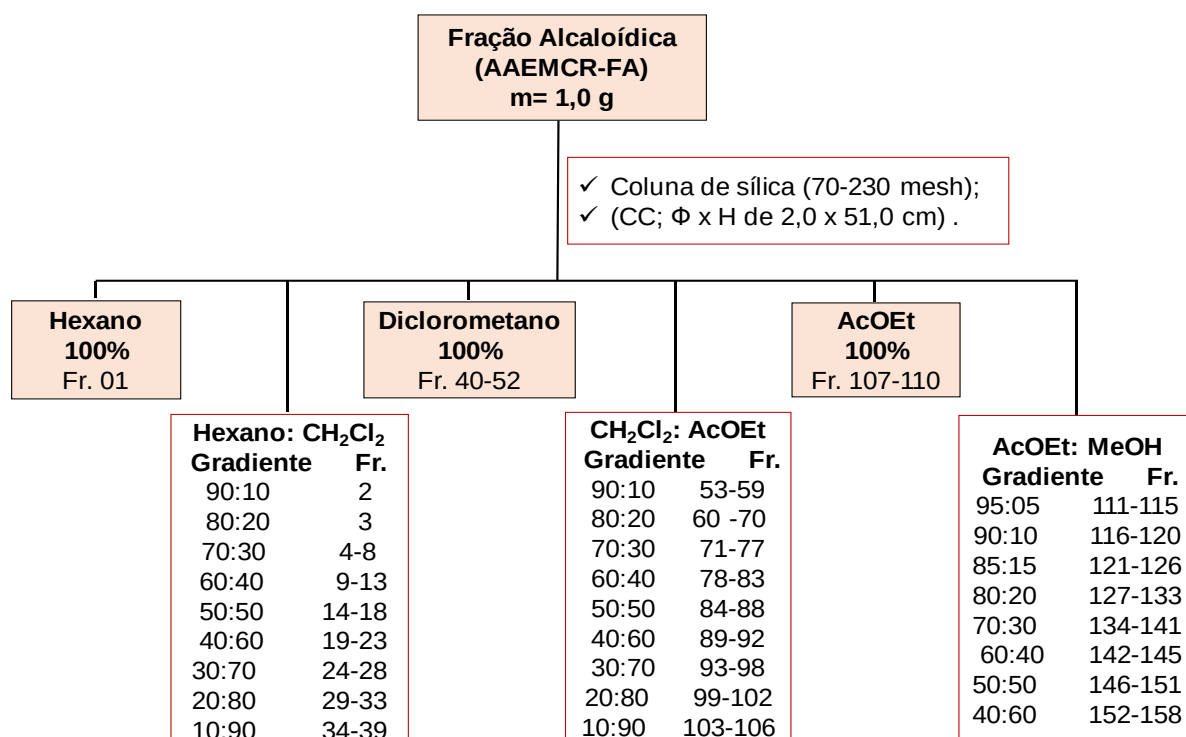


Uma alíquota da fração alcaloídica foi retirada para verificar a presença de alcaloides através de cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando como fase móvel o gradiente $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9,5:0,5). Foi usado como revelador físico o Ultravioleta (UV) na luz de 254 e 365 nm e como revelador químico o reagente Dragendorff e anisaldeído. Após a secagem em temperatura ambiente, o rendimento da fração alcaloídica foi igual a 1,067 g e a fração neutra apresentou massa igual a 4,4247 g. Uma alíquota de 20,0 mg da fração alcaloídica e 30,0 mg da fração neutra foi retirada e enviada para a realização dos ensaios de atividade citotóxica pela Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz) do estado da Bahia.

4.11 Fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica (AAEMCR-FA)

Uma parte da fração alcaloídica (1,0 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CC; $\Phi \times H$ de 2,0 x 51,0 cm) utilizando como fase estacionária sílica tratada com solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 10%, eluída com as seguintes fases móveis: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente, obtendo-se 158 frações (esquema 3).

Esquema 3: Fluxograma do fracionamento cromatográfico de AAEMGF-FA.



Posteriormente, as frações foram agrupadas de acordo com as semelhanças químicas e fator de retenção (R_f) observados por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) (tabela 2). O eluente utilizado para as placas foi CH_2Cl_2 :MeOH na proporção 9,5:0,5 para as frações de 01 a 90; na proporção 9,0:1,0 para a frações de 91 a 146 e na proporção de 8:2 para as frações 147-158. A revelação nas placas foi feita com luz UV 254 e 365 nm, solução de anisaldeído e reagente de Dragendorff.

Tabela 2: Reunião das frações obtidas do fracionamento de **AACR-FA**.

Frações	Grupo de frações	Massa (g)
1-3	AACR-FA 01	0,0296
4-7	AACR-FA 02	0,0185
8-23	AACR-FA 03	0,0316
24-31	AACR-FA 04	0,0139
32-41	AACR-FA 05	0,0219
42-54	AACR-FA 06	0,0338
55-59	AACR-FA 07	0,0352
60-66	AACR-FA 08	0,0537
67-73	AACR-FA 09	0,0177
74-91	AACR-FA 10	0,0617
92-99	AACR-FA 11	0,0311
100-113	AACR-FA 12	0,2082
114-118	AACR-FA 13	0,0680
119-123	AACR-FA 14	0,0505
124-127	AACR-FA 15	0,0187
128-135	AACR-FA 16	0,0554
136-141	AACR-FA 17	0,0563
142-146	AACR-FA 18	0,0413
147-158	AACR-FA 19	0,0393

4.12 Isolamento

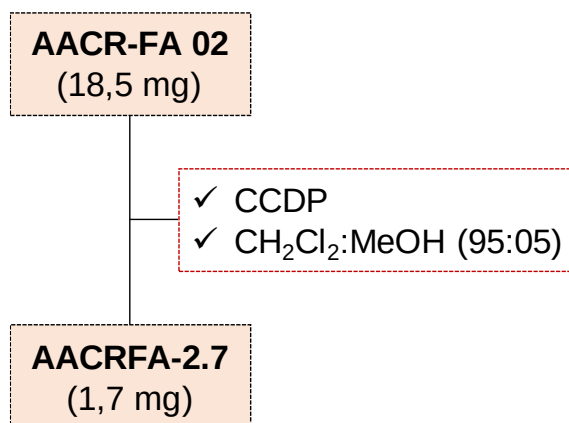
Os grupos de frações apresentados na tabela 02 foram selecionados para isolamento de acordo com o perfil químico observado nas CCDAs. Os que apresentaram boa resolução e fatores de retenção bem distintos, possibilitando a purificação das substâncias observadas, foram submetidos à separação por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). As placas cromatográficas foram eluídas por 2 ou 3 vezes no gradiente CH_2Cl_2 :MeOH nas proporções de 95:05 totalizando 100 mL, e as substâncias foram extraídas da sílica com a mistura de solventes CH_2Cl_2 :MeOH na proporção 9,5:0,5, por 30-40 min, sendo posteriormente filtradas à vácuo em funil com placa porosa. O filtrado foi em seguida rotaevaporado

e transferido para frascos previamente pesados e deixados para secagem em temperatura ambiente. Posteriormente foram calculados os rendimentos em massa.

4.12.1 Grupo de frações AACR-FA 02

O grupo de frações **AACR-FA 02** (18,5 mg) foi submetido à CCDP (esquema 04), utilizando o eluente CH_2Cl_2 :MeOH na proporção de 95:05 totalizando 100 mL da solução, resultando no isolamento de uma substância codificada como **AACRFA-2.7**. Na análise por CCDA utilizando o sistema CH_2Cl_2 :MeOH (9,5:0,5), a amostra não revelou em Dragendorff, foi observada a presença de um *spot* quando revelado com anisaldeído, bem como quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm, onde foi possível observar um bom grau de pureza. A amostra foi então encaminhada para análises por espectrometria de massas (EM) e por ressonância magnética nuclear (RMN).

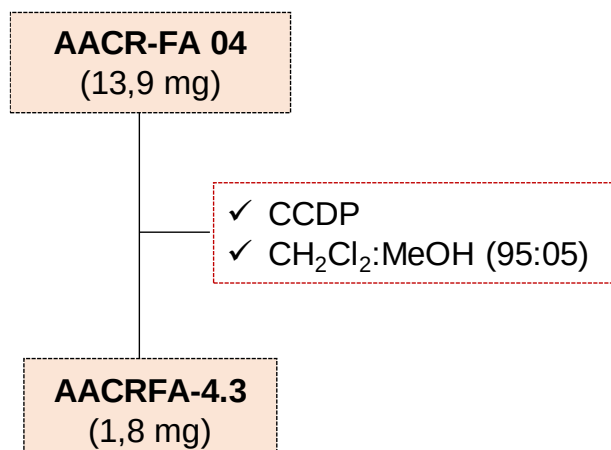
Esquema 4: Grupo de frações AACR-FA 02.



4.12.2 Grupo de frações AACR-FA 04

O grupo de frações **AACR-FA 04** (13,9 mg) foi submetido à CCDP conforme o esquema 05, utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2 :MeOH na proporção de 95:05 totalizando 100 mL da solução, resultando no isolamento de uma substância codificada como **AACRFA-4.3**. Na análise por CCDA utilizando o sistema CH_2Cl_2 :MeOH (9,5:0,5), observou-se a presença de um *spot* quando revelado com reagente Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetido à irradiação de luz ultravioleta em 254 nm, onde foi possível observar um bom grau de pureza. A amostra foi então encaminhada para análises por espectrometria de massas (EM) e por ressonância magnética nuclear (RMN).

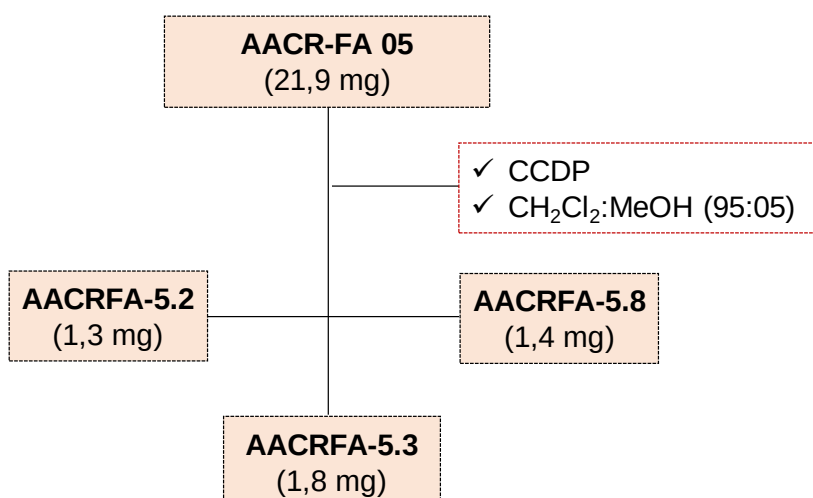
Esquema 5: Grupo de frações AACR-04.



4.12.3 Grupo de frações AACR-FA 05

O grupo de frações AACR-FA 05 (21,9 mg) foi submetido à CCDP (esquema 06) utilizando como eluente a mistura de CH₂Cl₂:MeOH na proporção de 95:05 totalizando 100 mL da solução, resultando no isolamento de três substâncias codificadas como **AACRFA-5.2**, **AACRFA-5.3**, **AACRFA-5.8**. Na análise por CCDA utilizando o sistema CH₂Cl₂:MeOH (9,5:0,5), observou-se a presença de um *spot* quando revelado com reagente Dragendorff e anisaldeído, quando submetido a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm, observou-se um *spot*. As mostras foram então encaminhadas para análises por ressonância magnética nuclear (RMN) e espectrometria de massas (EM).

Esquema 6: Grupo de frações AACR-FA 05.

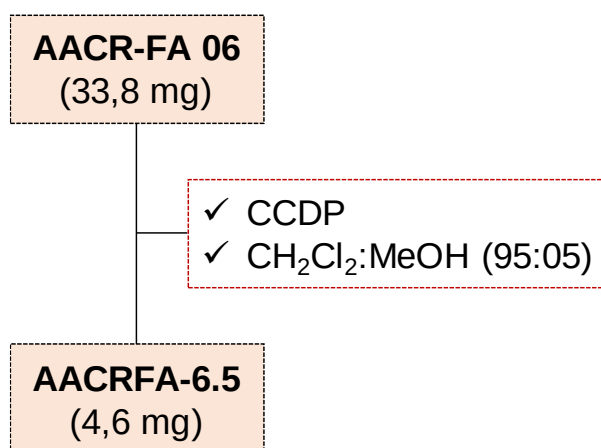


4.12.4 Grupo de frações AACR-FA 06

O grupo de frações AACR-FA 06 (33,8 mg) foi submetido à CCDP (esquema 07), utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2 :MeOH na proporção de 95:05 totalizando 100 mL da solução, resultando no isolamento de uma substância codificada como AACRFA-6.5.

Na análise por CCDA utilizando o sistema CH_2Cl_2 :MeOH (9,5:0,5) observou-se a presença de um *spot* quando revelado com reagente Dragendorff e anisaldeído, assim como na irradiação de luz ultravioleta em 254 nm, apresentando um bom grau de pureza. A amostra foi então encaminhada para análises por espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear.

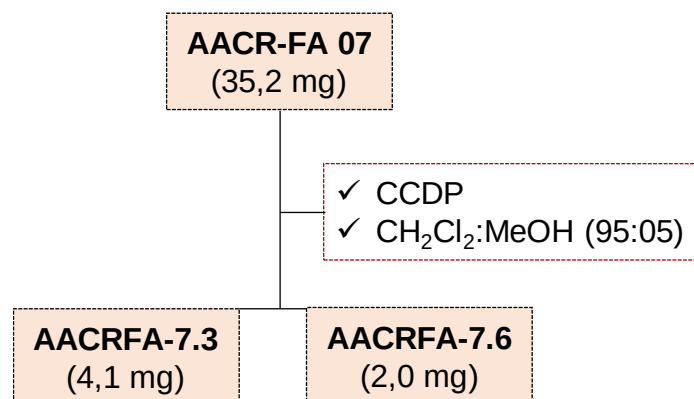
Esquema 7: Grupo de frações AACR-FA 06.



4.12.5 Grupo de frações AACR-FA 07

O grupo de frações AACR-FA 07 (35,2 mg) foi submetido à CCDP (esquema 08), utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2 :MeOH na proporção de 95:05, resultando no isolamento de duas substâncias codificadas como **AACRFA-7.3** e **AACRFA-7.6**. Na análise por CCDA utilizando o sistema CH_2Cl_2 :MeOH (9,5:0,5), observou-se a presença de um *spot* quando revelado com reagente Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetida à irradiação de luz ultravioleta em 254 nm para a amostra 7.3. A amostra foi então encaminhada para análises por espectrometria de massas e por ressonância magnética nuclear.

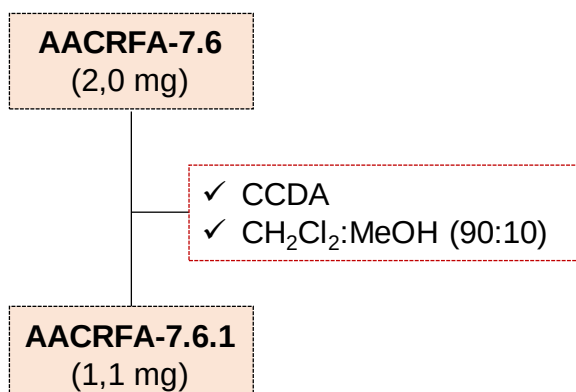
Esquema 8: Grupo de frações AACR-FA 07.



4.12.6 Repurificação da amostra AACRFA-7.6

A amostra AACRFA-7.6 (2,0 mg) foi repurificada na placa de CCDA (esquema 9), utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2 :MeOH na proporção de 90:10 totalizando 100 mL da solução, resultando no isolamento de uma substância codificada como **AACRFA-7.6.1**. Na análise por CCDA utilizando o sistema CH_2Cl_2 :MeOH (9:1), observou-se a presença de um *spot* quando revelado com reagente Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm, dessa forma apresentando um bom grau de pureza. A amostra foi então encaminhada para análises por espectrometria de massas (EM) e por ressonância magnética nuclear (RMN).

Esquema 9: Repurificação da amostra AACRFA- 7.6.



4.12.7 Grupo de frações AACRFA 8-14

Com o intuito de obter uma melhor separação dos componentes em mistura, o grupo de frações **AACR-FA 8-14** (490,9 mg) foi submetido ao fracionamento por

cromatografia em coluna aberta (CC; Φ x H de 2,0 x 51,0 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 162 frações.

Tabela 3: Reunião das frações obtidas do fracionamento de **AACR-FA 8-14**.

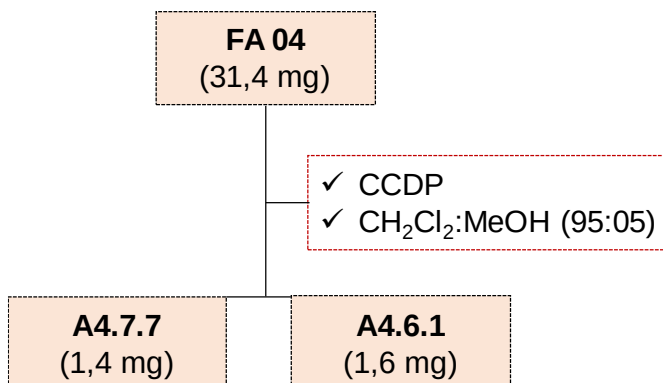
Frações	Grupo de frações	Massa (g)
1-13	FA 01	0,0094
14-53	FA 02	0,0107
54-59	FA 03	0,0023
69-76	FA 04	0,0314
60-68	FA 05	0,0130
77-83	FA 06	0,0354
84-93	FA 07	0,0704
100-104	FA 08	0,0247
94-99	FA 09	0,0408
105-111	FA 10	0,0177
112-117	FA 11	0,0058
118-128	FA 12	0,0159
129-133	FA 13	0,0998
134-139	FA 14	0,0566
140-144	FA 15	0,0971
145-162	FA 16	0,1536

4.12.8 Grupo de frações FA 04

O grupo de frações **FA 04** (esquema 10), foi submetido à CCDP e eluída com uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH (95:05), resultando em duas amostras codificadas como **A4.7.7** e **A4.6.1**. As amostras foram submetidas a análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes, onde observou-se a presença de apenas um *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff, não revelou em anisaldeído, e quando submetido a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm um *spot* foi visualizado para a amostra A4.7.7. A amostra A4.6.1, apresentou dois *spots* quando revelada em Dragendorff assim como em irradiação ultravioleta, e um *spot* em anisaldeído. Após

observado um bom grau de pureza a amostra foi encaminhada para análise por EM e RMN.

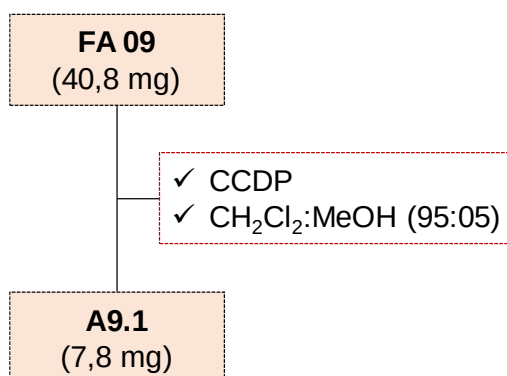
Esquema 10: Isolamento das substâncias da fração FA 04.



4.12.9 Grupo de frações FA 09

De acordo com o esquema 11, o grupo de frações **FA 09**, foi submetido à CCDP utilizando como eluente a mistura de CH₂Cl₂:MeOH (95:05), resultando no isolamento de uma substância denominada de **A9.1** (7,8 mg). A amostra foi submetida à análise por CCDA utilizando diferentes sistemas de solventes, sendo observada a presença de dois *spots* quando revelada com reagente de Dragendorff, não revelou em anisaldeído, e dois *spots* quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm. Após ser observado um bom grau de pureza, a amostra foi encaminhada para análise por EM e RMN.

Esquema 11: Isolamento das substâncias da fração FA 09.



4.13 Estudo biológico: atividade citotóxica in vitro

4.13.1 Ensaio de Atividade Citotóxica *In Vitro*

Este ensaio foi realizado em colaboração com o pesquisador Dr. Daniel Pereira Bezerra do **Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI)** do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, Brasil.

4.13.2 Preparo das amostras

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10,0 mg/mL (para extratos e frações) ou 5,0 mg/mL (para amostras puras). As amostras foram testadas na concentração única de 50 µg/mL (extratos) ou 25 µg/mL (puras).

4.13.3 Células

Foram utilizadas as células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HCT116 (carcinoma de cólon humano) obtidas da ATCC. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO₂ a 37 °C. Diariamente, acompanhava-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 apresentaram-se negativas para micoplasma, conforme avaliado pela coloração com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

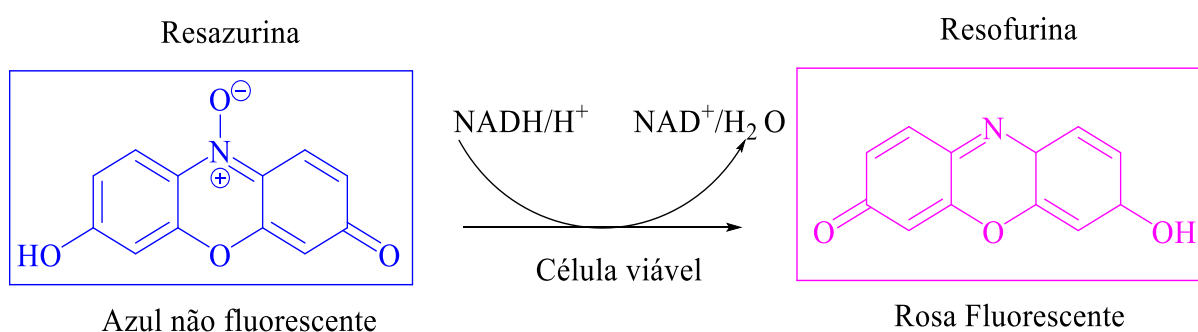
4.13.4 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com os compostos em teste. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.*, 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de tetrazólio, o

alar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/ célula viável) (esquema 12).

A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (Ahmed; Gogal; Walsh, 1994) e atualmente apresenta várias aplicações. Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (100 μL /poço de uma solução de $0,7 \times 10^5$ células/mL). Após 24 horas de incubação, os compostos testes dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço e incubados por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

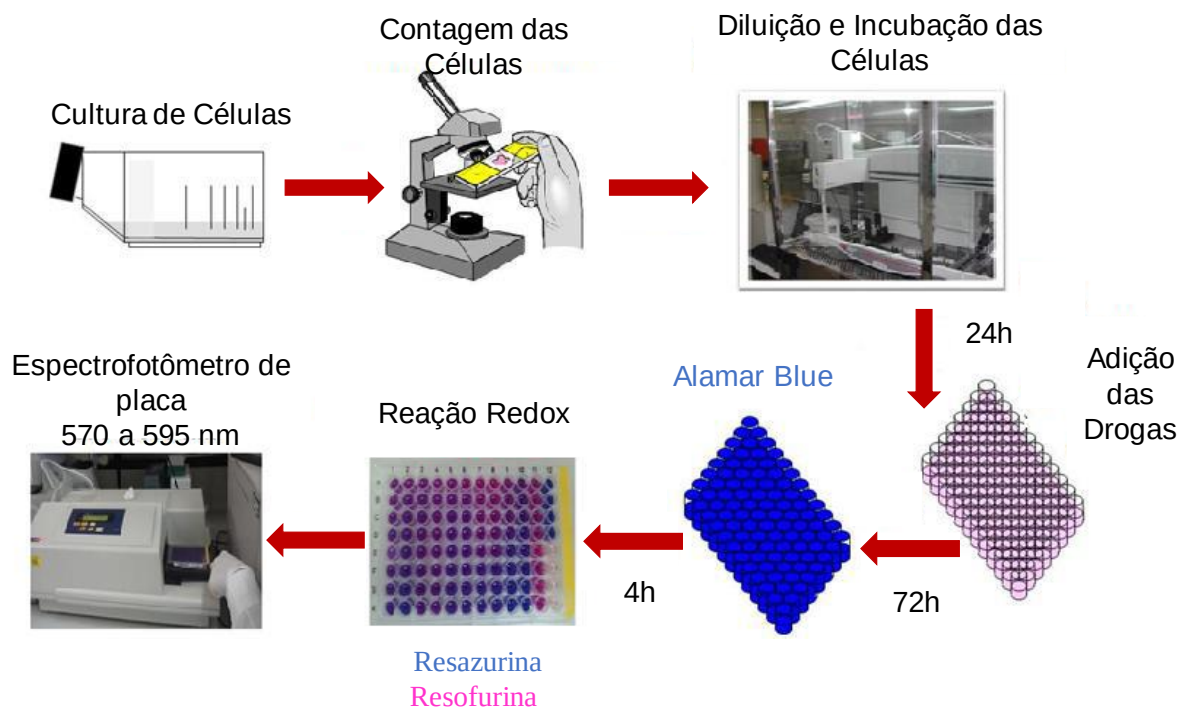
Esquema 12: Reação de oxirredução da Resazurina- Indicador de viabilidade celular.



Fonte: Adaptado O'BRIEN *et al.*, (2000).

O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 μL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorvâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (Ahmed; Gogal; Walsh, 1994) (esquema 13).

Esquema 13: Ensaio da atividade citotóxica do extrato, frações e substâncias isoladas.



Fonte: Adaptado de Menezes (2015).

4.13.5 Cálculo de porcentagem de inibição celular

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

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

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

O R_0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

$$R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$$

Onde, AO_{LW} e AO_{HW} são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. Utiliza-se o parâmetro R_0 para eliminar a absorção característica do meio puro, que possui uma coloração levemente rósea.

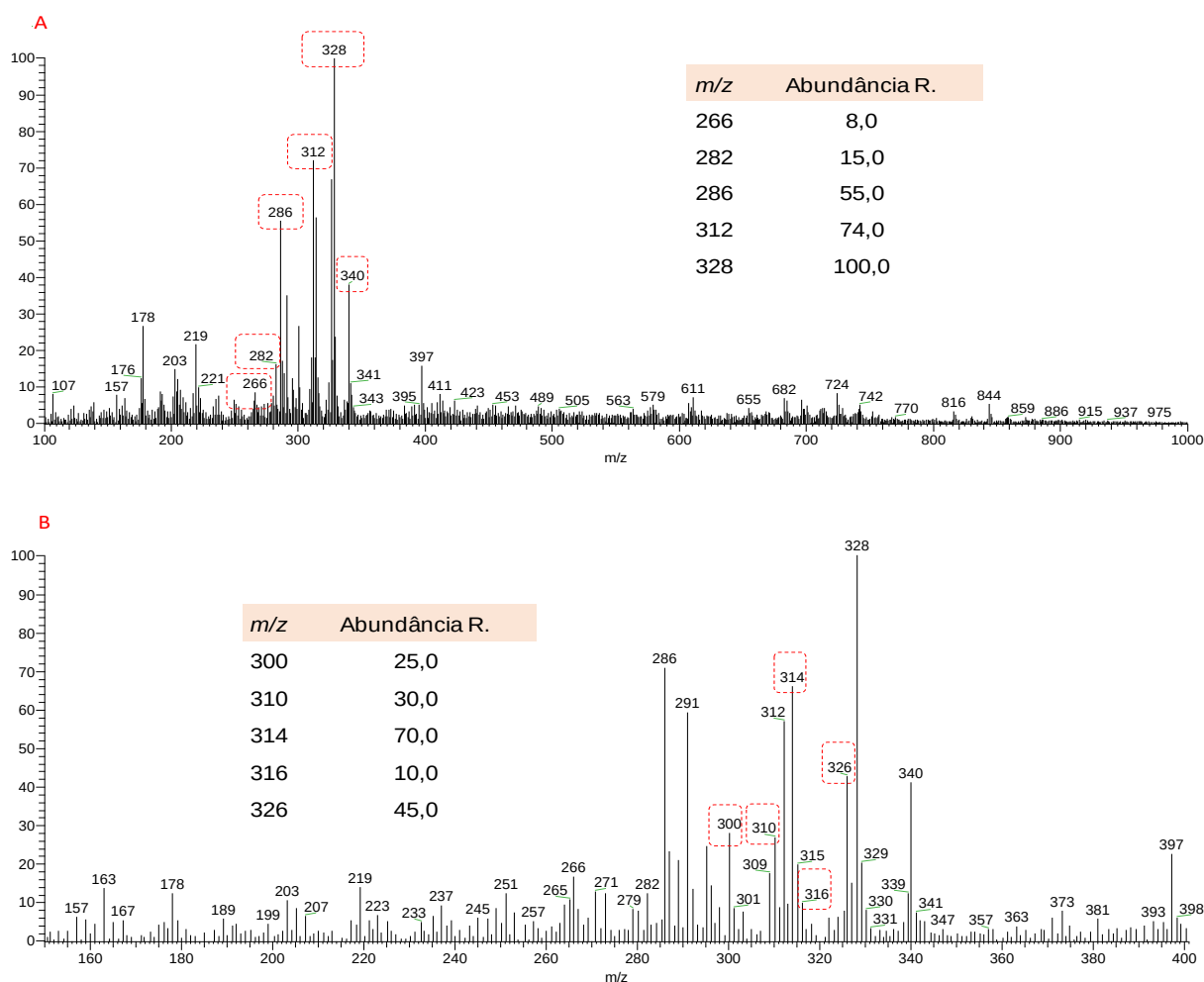
As amostras foram testadas em diluição seriada, em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} realizado a partir de regressão não linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise do perfil químico do extrato metanólico e fração alcaloídica das cascas dos ramos de *Annona amazonica* por espectrometria de massas.

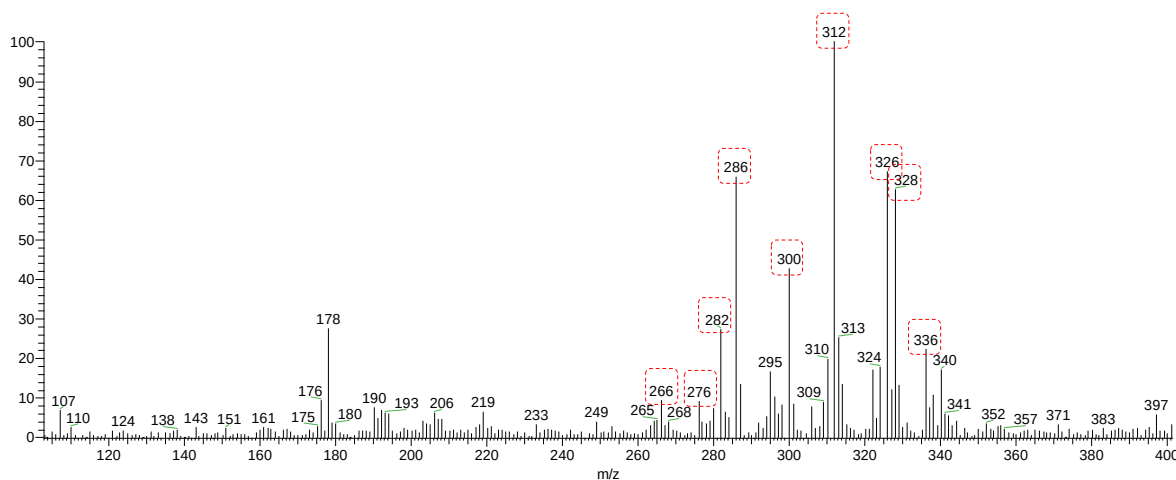
O espectro de massas *full scan* do extrato metanólico (AAEMCR) (Figura 18a), no modo positivo de aquisição de dados, exibiu um perfil complexo, com diversos íons protonados na faixa de m/z 100-1000, no qual foram observados diversos picos de m/z par, indicando possíveis substâncias nitrogenadas (possíveis alcaloides). Na ampliação da faixa de m/z 150-400 (figura 18b), também foi possível observar substâncias protonadas de m/z par, com intensidade significativas, podendo ser indicativo de alcaloides. Após a análise do perfil químico do extrato metanólico, o mesmo foi submetido ao tratamento ácido-base.

Figura 18: Espectro de massas *full scan* em fonte APCI, no modo positivo do extrato metanólico de *A. amazonica*.



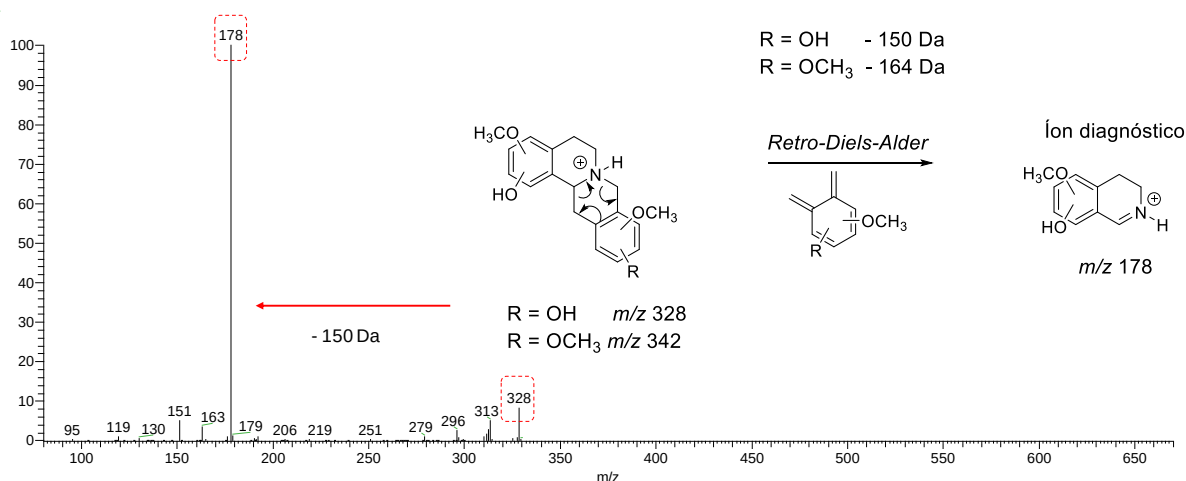
No espectro de massas *full scan* da fração alcaloídica (AAEMCR-FA) de *A. amazonica* (Figura 19), no modo positivo $[M+H]^+$, foram observados os mesmos picos de m/z par identificados no extrato metanólico, indicando possíveis alcaloides e também mostrando que o tratamento ácido-base foi eficiente na separação dos constituintes alcaloídicos. Esses íons detectados foram submetidos ao processo de fragmentação em tandem (MS^2) e comparados com a literatura.

Figura 19: Espectro de massas *full scan* em fonte APCI, no modo positivo da fração alcaloídica de *A. amazonica*.



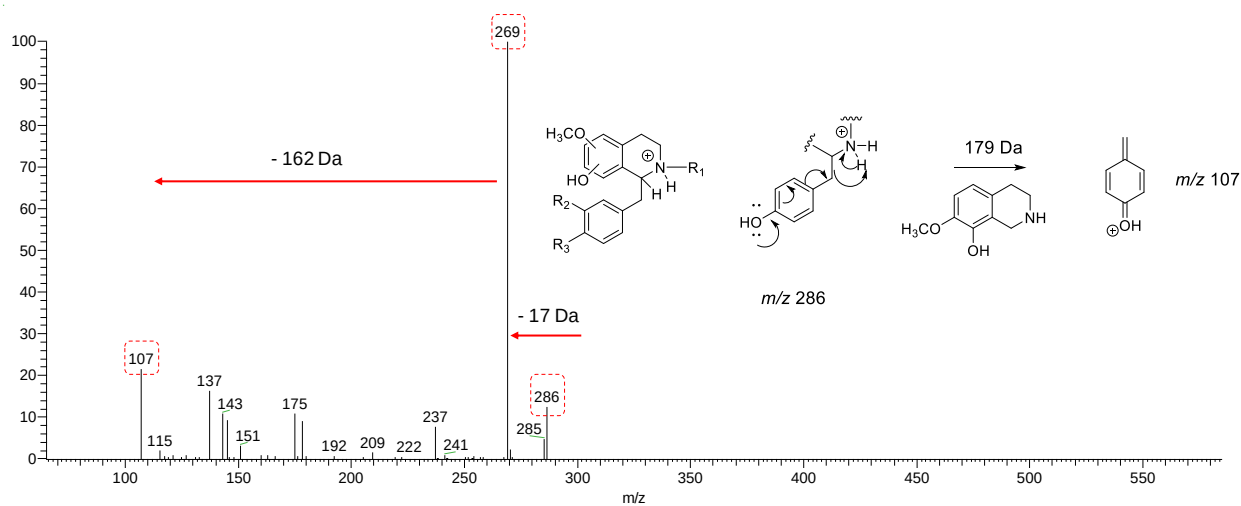
No espectro de MS^2 do íon de m/z 328, observou-se uma perda de 150 Da, resultando no íon fragmento de m/z 178 (Figura 20). Perdas de elevada massa são comumente observados em alcaloides contendo o esqueleto do tipo tetrahidroprotoberberínicos. A formação do íon de m/z 178 ocorre com a abertura de anel através de retro-Diels-Alder (RDA) para a classe proposta, que apresentam em sua estrutura química hidroxila e metoxila no anel A (Lima *et al.*, 2020; Jeong *et al.*, 2012).

Figura 20: Perfil de fragmentação para o íon de m/z 328 $[M+H]^+$.



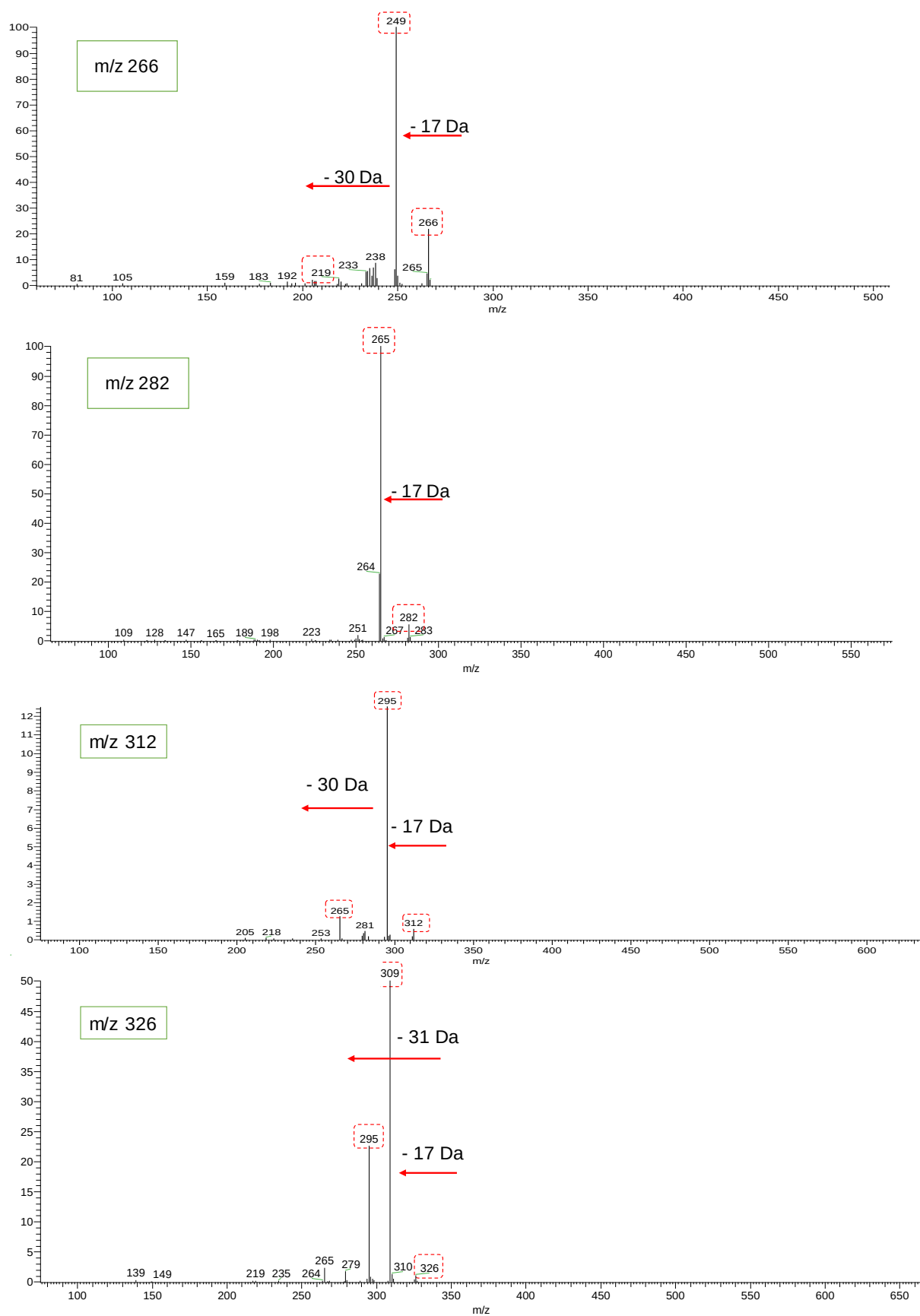
Quando submetido ao processo de fragmentação (EM^2) o íon de m/z 286, apresentou uma perda inicial de 17 Da, característico de grupo ($-NH_3$) e descrito em estruturas com ausência do grupo N -metila (Figura 21). A segunda perda de elevada massa (-162 Da) levou a formação do íon de m/z 107, a formação desse fragmento é descrita em estruturas de alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos (Lima *et al.*, 2020).

Figura 21: Espectro de EM^2 do íon de m/z 286 $[M+H]^+$.



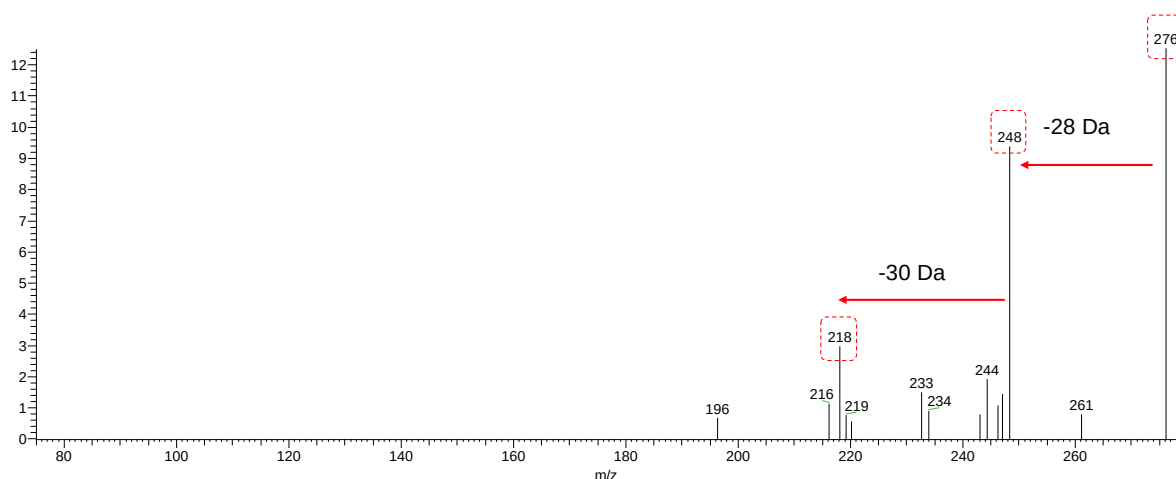
Os espectros de EM^2 dos íons de m/z 266, 282, 312, 326 apresentaram perfil de fragmentação coerente com àqueles observados para os alcaloides contento esqueleto aporfínicos (Figura 22). Para esses íons as, perdas iniciais foram de 17 Da, indicando a presença de hidrogênio ligado ao nitrogênio no anel B. A perda inicial sugere ausência de N -metilação na estrutura, enquanto as perdas seguintes de 30 e 31 Da são características de estruturas contendo grupo metilenodioxí no anel A e metoxila no anel D (Stévigny *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2017; Lima *et al.*, 2020). Vale ressaltar que para o íon de m/z 282 essas perdas não foram observadas, indicando que na estrutura da molécula não há o grupo metilenodioxí e nem substituintes no anel D.

Figura 22: Espectro de EM² dos íons de m/z 266, 282, 312, 326 $[M+H]^+$.



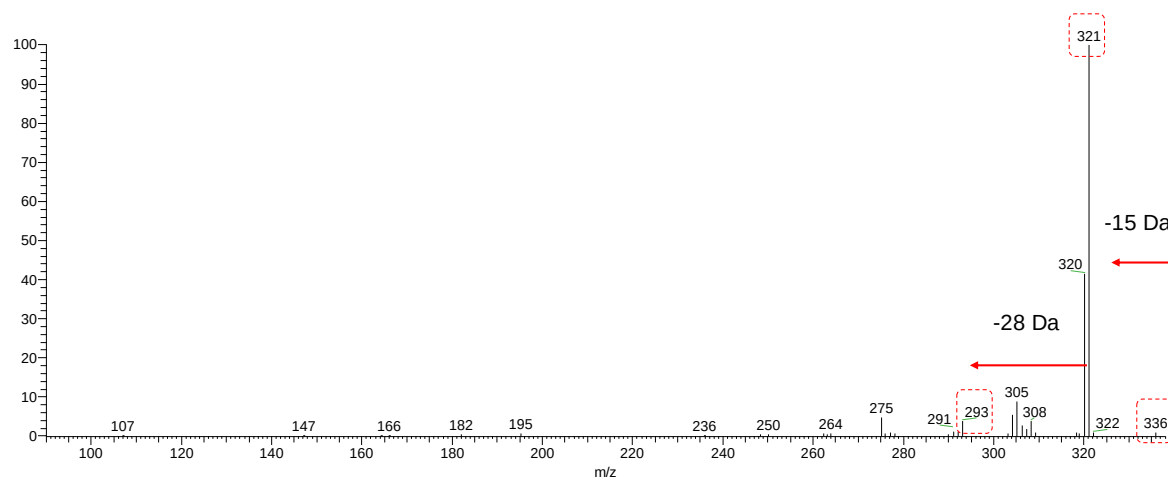
O íon com m/z 276 Da (figura 23) apresentou uma perda inicial de 28 Da resultando na formação do íon de m/z 248. A segunda perda foi de 30 Da, resultando no íon de m/z 218, sendo compatíveis com o padrão de fragmentação para alcaloide oxoaporfínico, conforme analisado por Silva *et al.*, (2017)

Figura 23: Espectro de $APCI-MS^2$ do íon de m/z 276 $[M+H]^+$.



Na análise do espectro da fragmentação do íon de m/z 336 $[M+H]^+$ (Figura 24), observou-se a perda inicial de 15 Da, que pode ser atribuído a presença de grupo metila na estrutura e uma perda posterior de 28 Da, podendo ser atribuído ao grupo $-CO$, confirmando o perfil de fragmentação para um alcaloide oxoaporfino, conforme o estudo realizado por Silva *et al.*, (2017), onde é relatado que as perdas iniciais sejam referentes à saída dos seus grupos periféricos.

Figura 24: Espectro de $APCI-M^2$ do íon de m/z 336 $[M+H]^+$.



A análise do perfil químico do extrato metanólico e da fração alcaloídica possibilitou um diagnóstico prévio das prováveis classes de alcaloides presentes. Essa abordagem permitiu a tentativa de identificação eficiente das substâncias em extratos complexos e posteriormente o isolamento por CCDP e identificação utilizando técnicas espectroscópicas e espectrométricas. Na tabela 4, estão representados os principais íons observados na fração alcaloídica, assim como suas abundâncias relativas e comparados com os dados disponíveis em literatura.

Tabela 4: Íons observados no espectro de EM² para a fração alcaloídica.

Espectrometria de massas <i>full scan</i> da fração alcaloídica				
[M+H] ⁺ (m/z)	EM ²	Classe proposta	Literatura	Alcaloides Anotados
266	249 (100) 238 (10)	Aporfínico	Lima <i>et al.</i> , 2020; Stévigny <i>et al.</i> , 2004; Silva <i>et al.</i> , 2017.	Anonaína
276	248 (10) 218 (5)	Oxoaporfinicos	Silva <i>et al.</i> , 2017;	Liriodenina
282	265 (100)	Aporfínico	Lima <i>et al.</i> , 2020; Stévigny <i>et al.</i> , 2004; Silva <i>et al.</i> , 2017.	Nornuciferina
286	269 (100) 107 (25)	Benziltetraidroisoquinolínica	Lima <i>et al.</i> , 2020.	Norjuzifina
312	295 (100)	Aporfínico	Lima <i>et al.</i> , 2020; Stévigny <i>et al.</i> , 2004; Silva <i>et al.</i> , 2017.	O-metilisopilina ou Actinodafinina
326	309 (100) 295 (25)	Aporfínico	Lima <i>et al.</i> , 2020; Stévigny <i>et al.</i> , 2004; Silva <i>et al.</i> , 2017.	Nordicentrina ou N-metil- actinodafinina
328	178 (100)	Tetrahidroprotoberberínicos	Lima <i>et al.</i> , 2020; Jeong <i>et al.</i> , 2012.	Desmetildiscretina ou Discretamina
336	321 (71) 292 (20)	Oxoaporfinico	Silva <i>et al.</i> , 2017.	Dicentrinona

5.2 Determinação estrutural das substâncias isoladas por CCDP da fração alcaloídica das cascas dos ramos de *A. amazonica*.

5.2.1 Determinação estrutural da amostra AACRFA-L

As amostras **AACRFA-6.5**, **AACRFA-7.3**, **AACRFA-7.6.1**, foram recodificadas para **AACRFA-L**, pois foram identificadas como a mesma substância. A amostra **AACRFA-L** (9,8 mg) apresentou-se como sólido cristalino amarelo. A análise por CCDA apresentou teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff. No espectro de massas *full scan* da fração alcaloídica foi observado o pico base de m/z 276 $[M+H]^+$. Quando submetida à fragmentação, a amostra apresentou uma perda inicial de 28 Da, gerando o íon de m/z 248, estando esta perda de acordo com a estrutura do alcaloide liriodenina já reportada em espécies do gênero *Annona* (Paulo *et al.*, 1992; Nascimento, 2008), assim como para *A. amazonica* (Pinheiro *et al.*, 2009).

Pela análise do espectro de RMN de 1H (figura 25) da amostra **AACRFA-L**, foram observadas características de um alcaloide do tipo oxoaporfino. Verificou-se a presença de sete sinais na região de hidrogênios aromáticos, sendo seis sinais com integração para um hidrogênio e um sinal integrando pra dois, incluindo um sinal em δ 6,37 (2H, s, OCH₂O) típico de grupo metilenodióxi substituído em C1 e C2 (Costa, 2009).

Quatro sinais observados em δ 8,63 (1H, *d*, $J = 8,1$ Hz), δ 7,74 (1H, *ddd*, 8,1; 7,0; 1,4), δ 7,55 (1H, *ddd*, 7,9; 7,0; 1,0) e δ 8,57 (1H, *dd*, $J = 8,0$ e 1,4 Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-11, H-10, H-9 e H-8 respectivamente, cujas multiplicidades são coerentes com ausência de substituição do anel D, e um sinal em δ 7,18 (1H, s) foi atribuído a H-3 sendo este típico do anel A do sistema oxoaporfino dissustituído. Os dois sinais remanescentes observados em δ 8,88 e δ 7,76 ambos dupletos ($J = 5,1$ Hz) mostraram características de um sistema piridínico compatível com o anel B do sistema oxoaporfino, referentes aos hidrogênios H-5 e H-4, respectivamente (figura 26a e 26b).

Figura 25: Espectro de RMN de ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) da substância AACRFA-L.

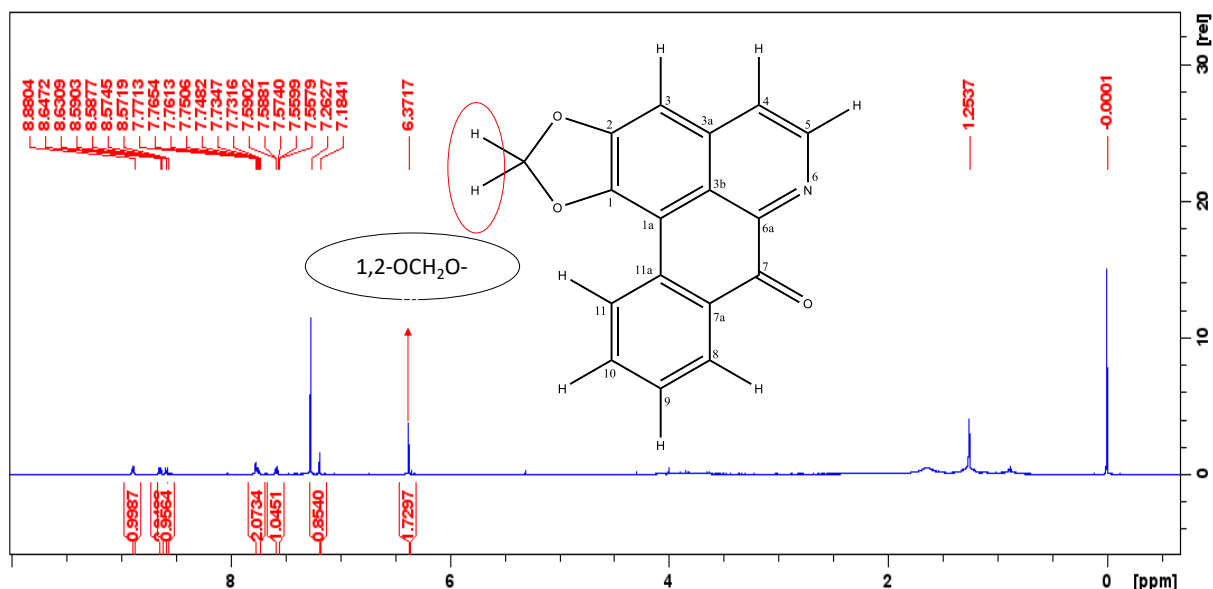
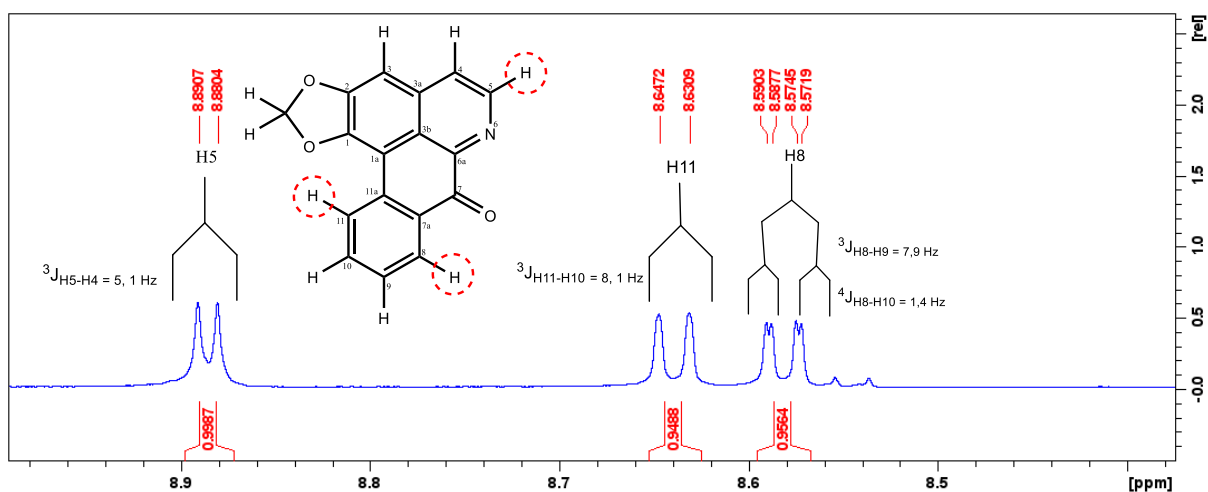
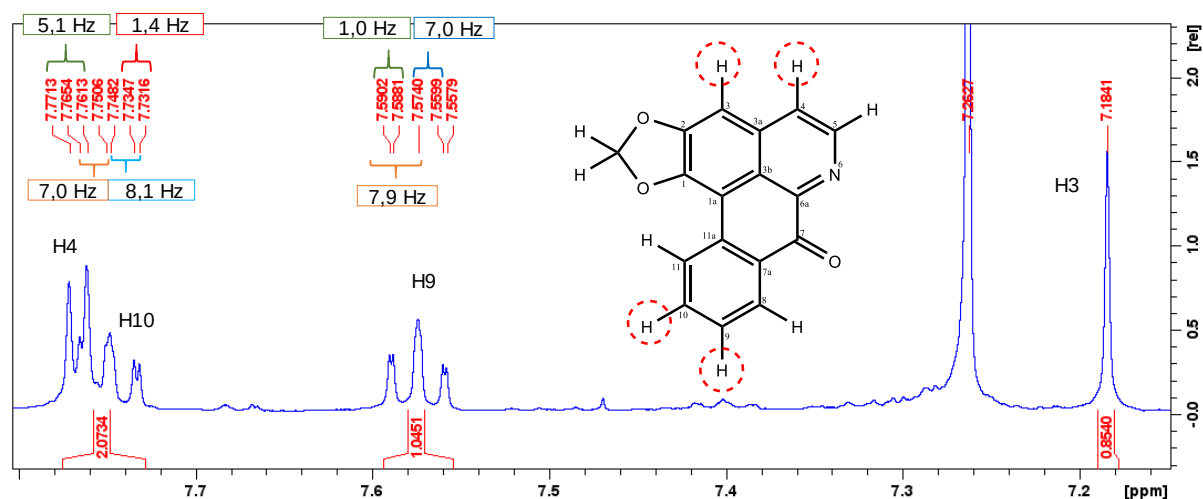


Figura 26: Ampliação da região aromática no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) da substância AACRFA-L.

A

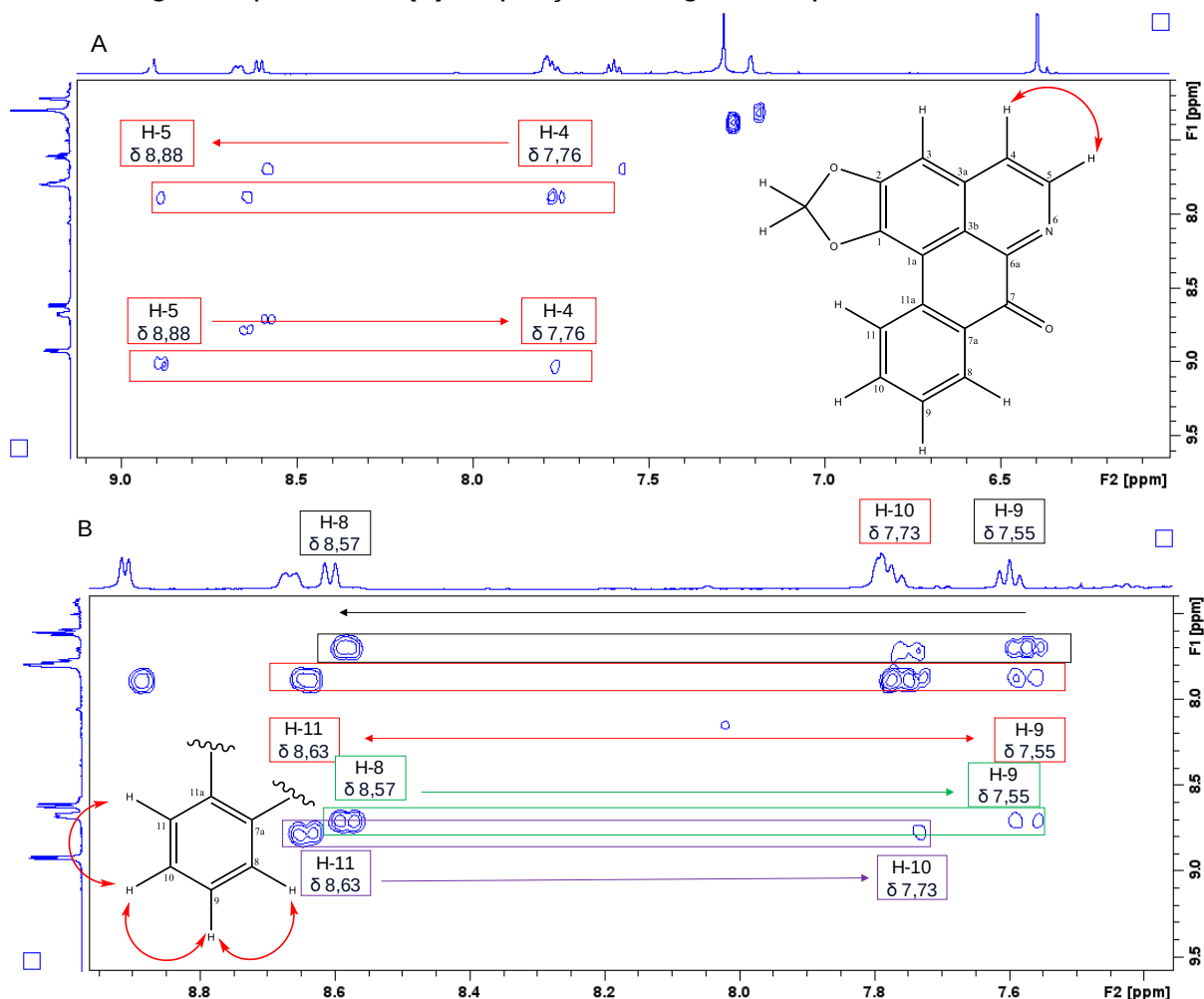


B



Através do mapa de correlação COSY ^1H - ^1H (Figura 27a) foram observadas as correlações homonucleares dos seguintes sinais de prótons entre δ 8,88 (H-5) e δ 7,76 (H-4), característicos de um sistema piridínico compatível com o anel B do sistema oxoaporfino e coerentes com os sinais observados no espectro de ^1H . As correlações em δ 8,63 (H11) e δ 7,73 (H10) com δ 7,55 (H9) e δ 8,63 (H11); δ 7,55 (H9) com δ 7,73 (H10) e δ 8,57 (H8); δ 8,57 (H8) e δ 7,55 (H9), essas correlações dos hidrogênios aromáticos (figura 27b) são coerentes com ausência de substituição do anel D e de acordo com a análise realizada por Costa (2009a).

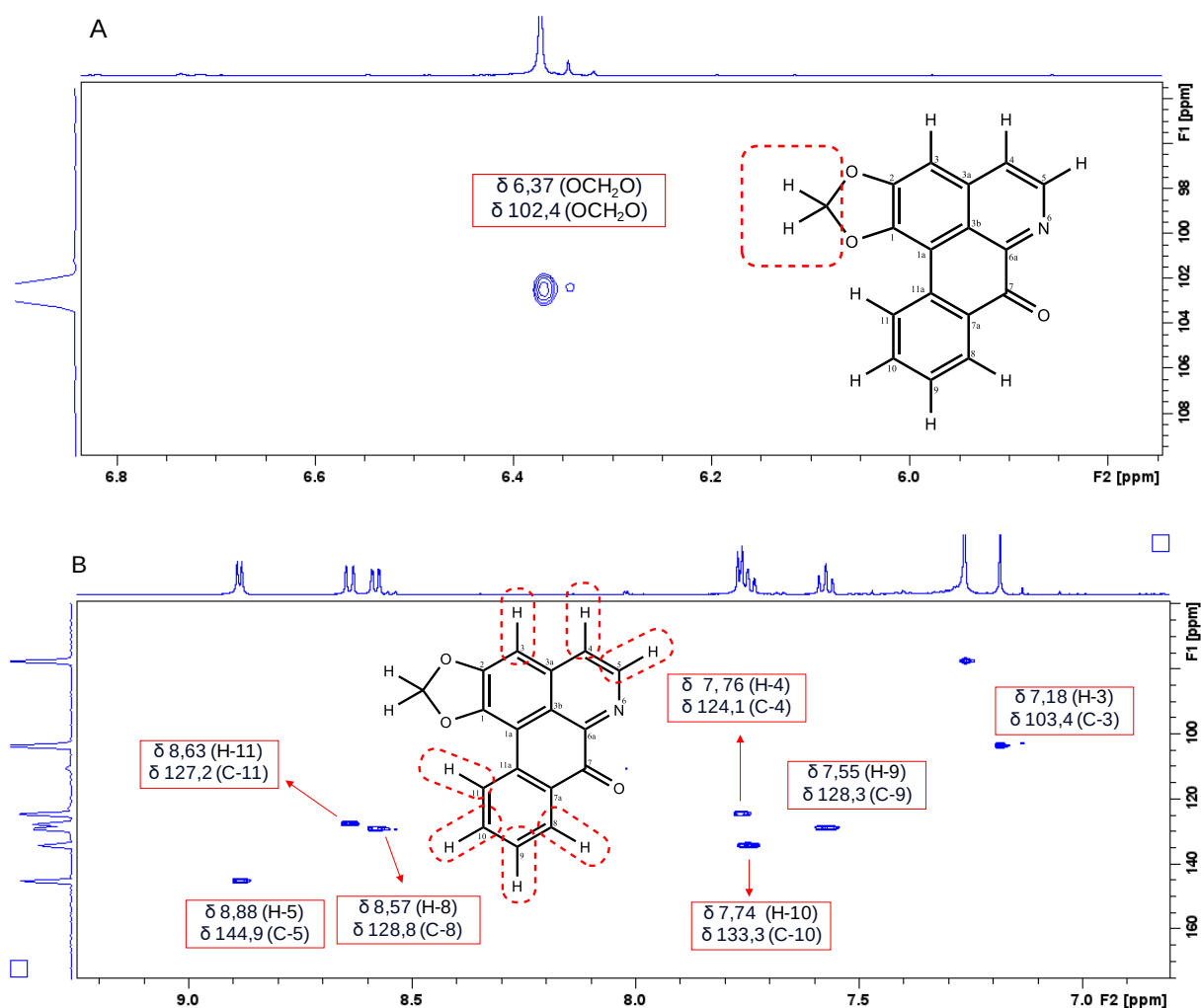
Figura 27: Mapa de correlação COSY na região de hidrogênios aromáticos **(a)** região de hidrogênios piridínicos **(b)** ampliação da região dos prótons do anel D.



Ao analisar o mapa de contorno HSQC (figura 28) foi possível assinalar todos os carbonos hidrogenados da substância. Observou-se a correlação do sinal em δ 6,37 (-OCH₂O) com o carbono em δ 102,4 (-OCH₂O) típico de grupo metilenodióxi substituído em C1 e C2 (figura 28a), sete prótons na região de aromáticos, com os

deslocamentos em δ 8,63 (H-11) com o carbono em δ 127,2 (C-11); δ 7,74 com δ 133,3 (C-10); δ 7,55 (H-9) com δ 128,3 (C-9); δ 8,57 (H-8) com δ 128,8 (C-8), referentes aos acoplamento dos hidrogênios do anel D e δ 8,88 (H-5) com δ 144,9 (C-5); δ 7,76 (H-4) com δ 124,1 (C-4) referentes ao acoplamento dos hidrogênios piridínicos e um sinal δ 7,18 (H-3) com o δ 103,4 (C-3) referente ao hidrogênio do anel A (figura 28b).

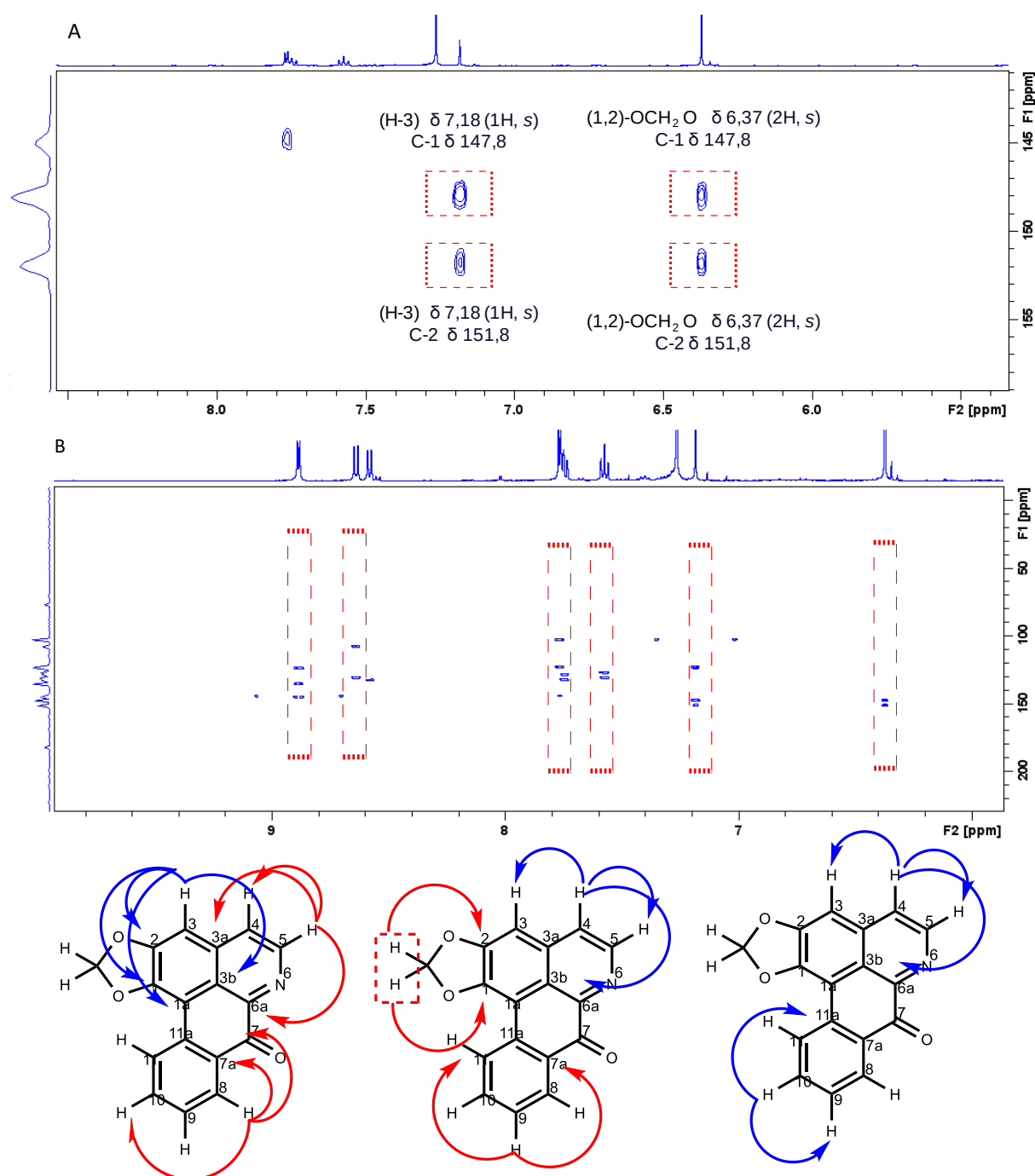
Figura 28: Mapa de correlação HSQC (a) ampliação da região dos prótons do grupo metilenodióxi (b) ampliação da região dos prótons do anel A, B e D.



Pela análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC, observou-se a presença de 17 carbonos sendo 15 aromáticos, um carbonílico em δ 182,3 (C-7) evidenciando a presença do esqueleto oxoaporfino na estrutura e um sinal em δ 102,4 típico de grupo metilenodióxi substituído em C1 e C2.

Ainda pelo mapa de correlação HMBC (figura 29), o grupo metilenodióxi substituído em C1 e C2 foi confirmado devido à correlação do seu respectivo sinal em δ 6,37 a 3J com os sinais dos carbonos em δ 147,8 e δ 151,8 (figura 29a). As corretas atribuições de C1 e C2 foram definidas também através do mesmo experimento, devido à correlação do sinal em δ 7,18 (H-3) a 3J com o sinal do carbono em δ 147,8 e a 2J com o sinal do carbono em δ 151,8 definindo-os assim em C1 e C2 respectivamente, as demais correlações observadas são mostradas na figura 29b.

Figura 29: Mapa de correlação HMBC (a) ampliação da região do grupo metilenodióxi, (b) demais relações observadas.



Na tabela 5, são apresentados os corretos valores de ^1H e ^{13}C de **AACRFA-L** atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC, e comparações com os dados da literatura consistindo com os dados do alcaloide oxoaporfino conhecido como liriodenina.

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de AACRFA-L.

Posição	AACRFA-L			Liriodenina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^c	^{13}C (δ) ^c
1	-----	147,8	-----	-----	147,9 C
1a	-----	108,1	-----	-----	107,9 C
2	-----	151,8	-----	-----	151,6 C
3	7,18 (1H, s)	103,4	123,7; 147,8; 151,7; 108,2	7,16 (1H, s)	103,2 CH
3a	-----	135,7	-----	-----	135,7 C
3b	-----	123,2	-----	-----	123,1 C
4	7,76 (1H, d, 5,1)	124,1	103,2; 123,2 e 144,7	7,75 (1H, d, 5,2)	124,3 CH
5	8,88 (1H, d, 5,1)	144,9	124,6; 135,7 e 145,4	8,87 (1H, d, 5,2)	144,7 CH
6a	-----	145,4	-----	-----	145,3 C
7	-----	182,4	-----	-----	182,5 CO
7a	-----	131,3	-----	-----	131,2 C
8	8,57 (1H, dd, 8,0; 1,4)	128,8	133,0; 182,4 e 131,3	8,57 (1H, ddd, 7,9; 1,4; 0,5)	128,8 CH
9	7,55 (1H, ddd, 7,9; 7,0; 1,0)	128,3	127,3; 131,3	7,56 (1H, ddd, 7,9; 7,4; 1,4)	128,5 CH
10	7,74 (1H, ddd, 8,1; 7,0; 1,4)	133,9	128,8	7,73 (1H, ddd, 8,1; 7,4; 1,4)	133,8 CH
11	8,63 (1H, d, 8,1)	127,2	108,1; 128,5; 131,2; 133,9	8,61 (1H, ddd, 8,1; 1,0; 0,5)	127,3 CH
11a	-----	132,8			132,8 C
(1,2)- OCH₂O	6,37 (2H, s)	102,4	147,8; 151,8	6,37 (2H, s)	102,4 CH ₂

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

^bOs carbonos hidrogenados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo COSTA *et al.*, 2011 (^1H : 400 MHz, CDCl_3); COSTA, 2009a (^{13}C : 100 MHz; CDCl_3); (δ) deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas *full scan* (figura 30), obtida através de ionização por *APCI* em modo positivo de aquisição de dados para a amostra AACRFA-L, evidenciou uma molécula protonada com m/z 276 Da $[M+H]^+$ compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_9NO_3$.

Quando submetido à fragmentação (figura 31) este íon com m/z 276 Da apresentou uma perda inicial de 28 Da (-CO) indicando uma quebra na carbonila do sistema oxoaporfino e uma perda posterior de 30 Da ($-CH_2O$) possibilitadas pela deslocalização dos elétrons π através dos anéis A e B devido a ruptura da ponte de dióxido de metileno (figura 32), estando de acordo com o perfil de fragmentação observado para o alcaloide liriodenina e conforme analisado por Silva *et al.* (2017), corroborando assim com os dados obtidos pelas análises de RMN.

Figura 30: Espectro de massas da amostra AACRFA-L.

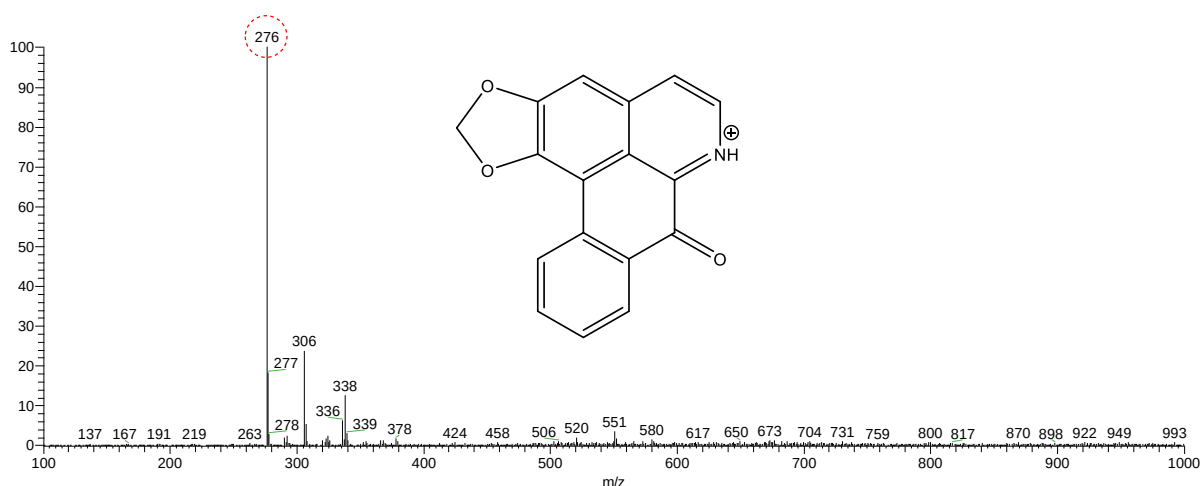


Figura 31: Perfil de fragmentação da amostra AACRFA-L.

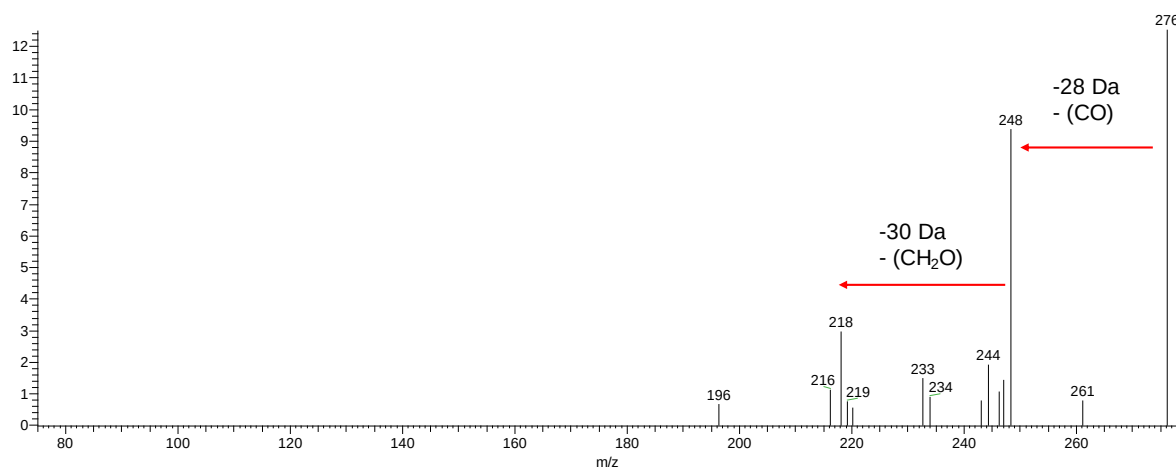
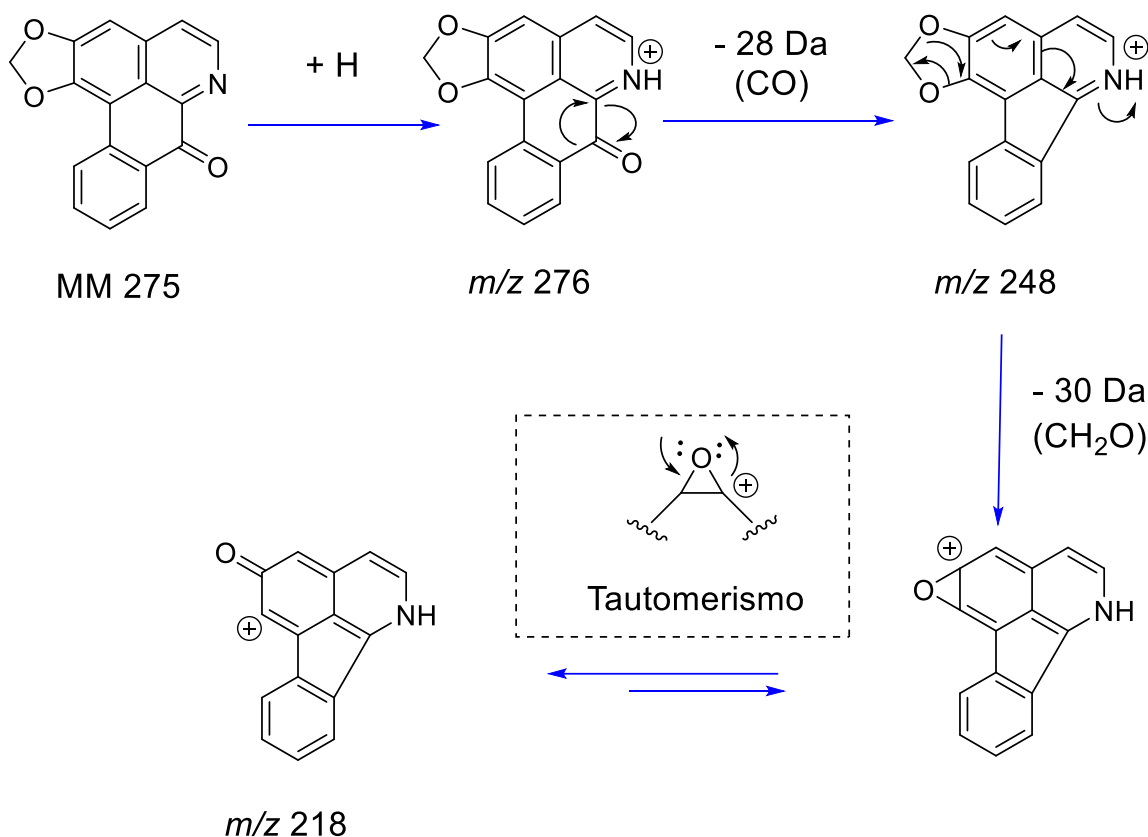


Figura 32: Proposta de fragmentação para AACRFA-L.

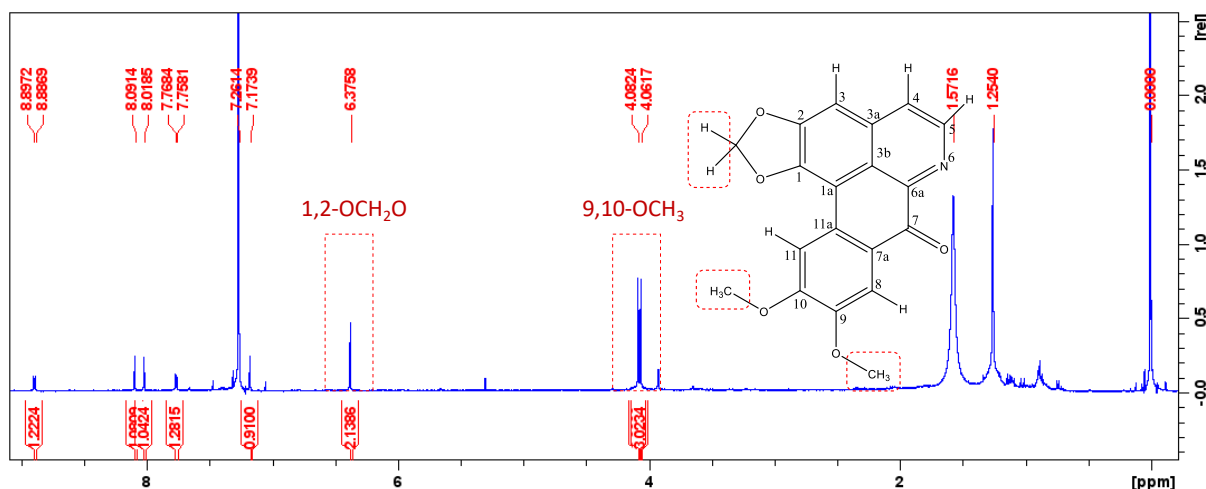


5.2.2 Determinação estrutural da amostra AACRFA-D

As amostras **AACRFA-4.3**, **AACRFA-5.2**, **AACRFA-5.3** foram recodificadas para **AACRFA-D**, pois foram identificadas como a mesma substância. A substância **AACRFA-D**, apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarelada de massa igual a 5,0 mg. A análise por CCDA apresentou teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

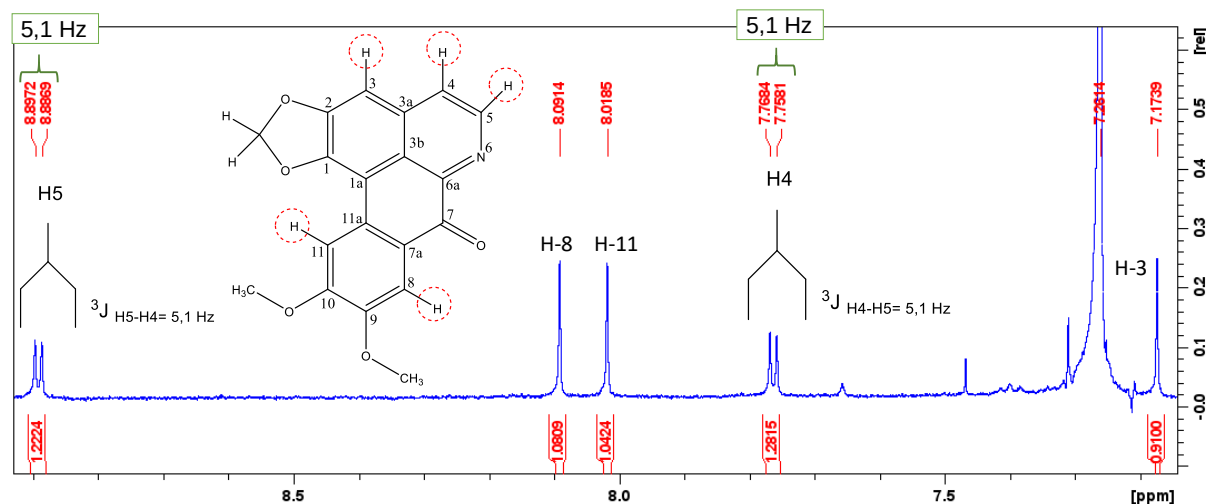
Pela análise do espectro de RMN de ^1H (figura 33), foram observadas características de um alcaloide do tipo oxoaporfino. Verificou-se a presença de cinco sinais na região de hidrogênios aromáticos, todos com integração para um hidrogênio. A presença do sinal em δ 6,37 (s) integrando para dois hidrogênios é característico de grupo metilenodióxi substituído em C1 e C2, bem como a presença de dois sinais em δ 4,06 (3H, s) δ 4,08 (3H, s), característico de grupo metoxílico (Barbosa *et al.*, 2020).

Figura 33: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AACRFA-D.



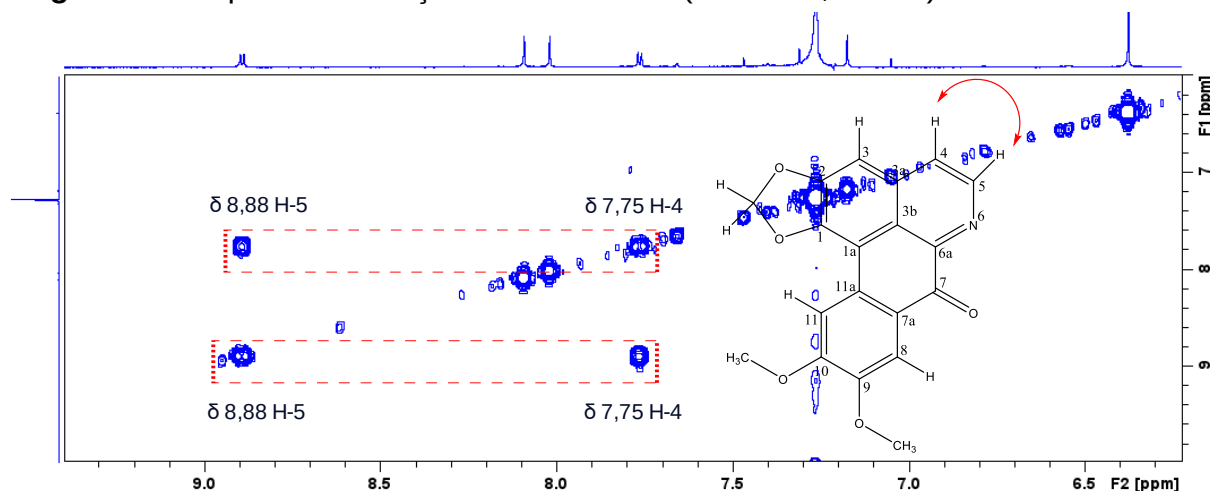
Na região de hidrogênios aromáticos entre δ 8,89 e δ 7,17 observaram-se a presença de cinco sinais com integração para um hidrogênio cada, sendo dois em δ 7,75 (1H, *d*) e 8,88 (1H, *d*) com constantes de acoplamento (*J*) igual a 5,1 Hz, característico dos hidrogênios α e β do anel piridínico em H-4 e H-5, respectivamente, típicos do anel B nos alcaloides oxoaporfínicos (figura 34). A presença de sinais correspondentes a três hidrogênios aromáticos em δ 8,09 (1H, *s*), δ 8,01 (1H, *s*) δ 7,17(1H, *s*), são característicos de H8, H11 e H3 respectivamente. Os sinais de doublets em δ 4,08 e δ 4,06 com integração para três hidrogênios cada (3H, *s*), sugeriu que o anel D seria substituído com dois grupos metoxilas na posição C9 e C10 atribuídos com base no mapa de correlação HSQC, bem como a comparação com os dados disponíveis na literatura (Barbosa *et al.*, 2020).

Figura 34: Ampliação da região de hidrogênios aromáticos.



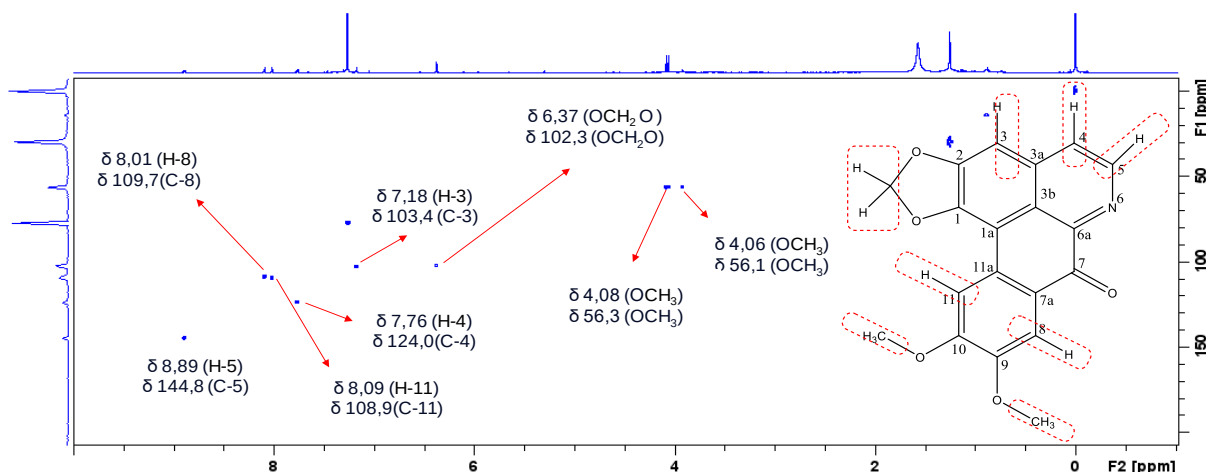
Pelo mapa de correlação COSY (figura 35), foi possível observar a correlação do hidrogênio em δ 7,75 (H4) com δ 8,88 referentes ao H5, confirmando dessa forma a presença dos hidrogênios aromáticos do anel piridínico.

Figura 35: Mapa de correlação COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$ (500 MHz, CDCl_3) de AACRFA-D.



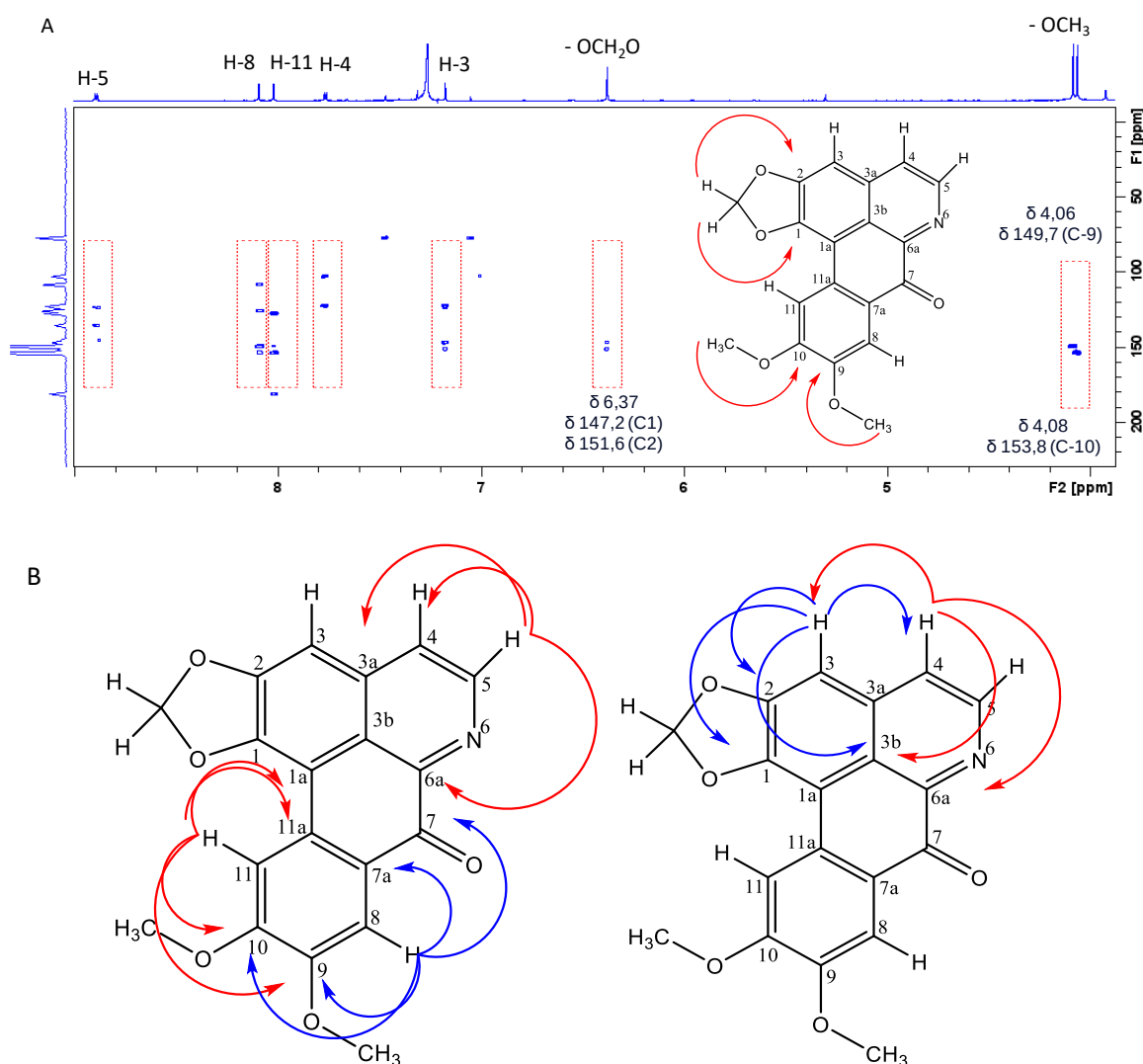
Ao analisar o mapa de contorno HSQC (figura 36), foi possível assinalar todos os carbonos hidrogenados da substância. Observou-se a correlação do sinal em δ 6,37 (OCH_2O) com o carbono em δ 102,3 (OCH_2O) típico de grupo metilenodióxi substituído em C1 e C2, os prótons na região de aromáticos com os respectivos carbonos em δ 8,89 (H5) com o carbono em δ 144,8 (C5); δ 7,76 (H4) com δ 124,02 (C4); δ 7,17 (H3) com δ 102,8 (C3), referentes aos hidrogênios do anel A e B. Foi observado os acoplamentos em δ 8,01 (H8) com o carbono em δ 109,7 (C8); δ 8,09 (H11) com δ 108,9 (C11) dos hidrogênios do anel D, assim como os sinais em δ 4,08 (OCH_3) com δ 56,3 (OCH_3) e δ 4,06 (OCH_3) com δ 56,1 (OCH_3), confirmando os dois grupos metoxilas no anel D (Paz *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2020).

Figura 36: Mapa de correlação HSQC $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ (500 MHz e 125 MHz) de AACRFA-D.



Ainda pelo mapa de correlação HMBC, o grupo metilenodióxi substituído em C1 e C2 foi confirmado devido à correlação observada no mapa de contorno HMBC do seu respectivo sinal em δ 6,37 a 3J com os carbonos em δ 147,2 (C1) e δ 151,6 (C2) (figura 37a). As corretas atribuições de C1 e C2 foram definidas também através do mesmo experimento, devido à correlação do sinal em δ 7,17 (H3) a 3J com o sinal do carbono em δ 147,2 e a 2J com o carbono em δ 151,6 definindo-os assim em C-1 e C-2 respectivamente. Pode-se confirmar também a presença das metoxilas através dos sinais correlacionando-se em δ 4,06 (OCH₃) com o carbono δ 149,7 (C9) e δ 4,08 (OCH₃) com δ 153,8 (C10) característico de metoxilas ligadas ao anel D. Um sinal carbonílico foi observado em δ 182,2 (C7) evidenciando a presença do esqueleto oxoaporfino na estrutura (Paz *et al.*, 2019; Barbosa *et al.*, 2020). As demais correlações observadas são mostradas na figura 37b.

Figura 37: Mapa de correlação HMBC da amostra AACRFA-D.



Na tabela 6 são apresentados os valores de ^1H e ^{13}C de **AACRFA-D** atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC, e comparação com os dados da literatura (Paz *et al.*, 2019), consistindo com os dados do alcaloide oxoaporfino conhecido como dicentrinona.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de AACRFA-D.

Posição	AACRFA-D			Dicentrinona	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^c	^{13}C (δ) ^c
1	-----	147,2	-----	-----	147,0 C
1a	-----	108,4	-----	-----	108, 2 C
2	-----	151,6	-----	-----	151,5C
3	7,17 (1H, s)	102,8	122,6;124,0; 147,2; 151,6	7,11 (s)	102,7 CH
3a	-----	135,7	-----	-----	135,4 C
3b	-----	122,6	-----	-----	122,5 C
4	7,76 (1H, d, 5,1)	124,0	122,6; 145,6; 102,8	7,76 (d, 5,2)	124,01CH
5	8,89 (1H, d, 5,1)	144,8	124,2; 135,7; 145,6	8,79 (d, 5,2)	144,7 CH
6a	-----	145,6	-----	-----	145,3 C
7	-----	181,2	-----	-----	181,0 CO
7a	-----	126,0	-----	-----	125,8 C
8	8,01 (1H, s)	109,7	126,0;149,7; 153,8; 181,2	7,91 (s)	109,6CH
9	-----	149,7	-----	-----	149,4 CH
10	-----	153,8	-----	-----	153,7 CH
11	8,09 (1H, s)	108,9	108,4;127,7; 149,7; 153,8	7,94 (s)	108,8 CH
11a	-----	127,7	-----	-----	127,6 C
(1,2)- OCH₂O	6,37 (2H, s)	102,3	147,2; 151,6	6,38 (s)	102,5 CH ₂
9- OCH₃	4,06 (3H s)	56,1	153,8	4,06 (s)	56,3 CH ₃
10- OCH₃	4,08 (3H s)	56,3	149,7	4,00 (s)	56,1 CH ₃

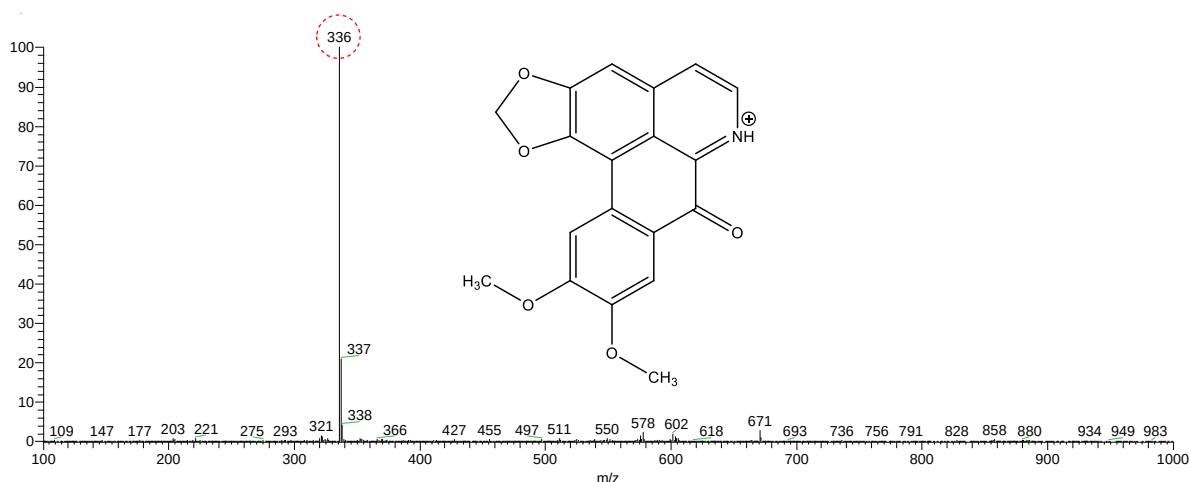
^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H em CDCl_3 e 125 MHz ^{13}C , utilizando o TMS como padrão interno.

^bOs carbonos hidrogenados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo Paz *et al.*, 2019 (^1H : 500 MHz, CDCl_3 ; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3); (δ) deslocamentos em ppm.

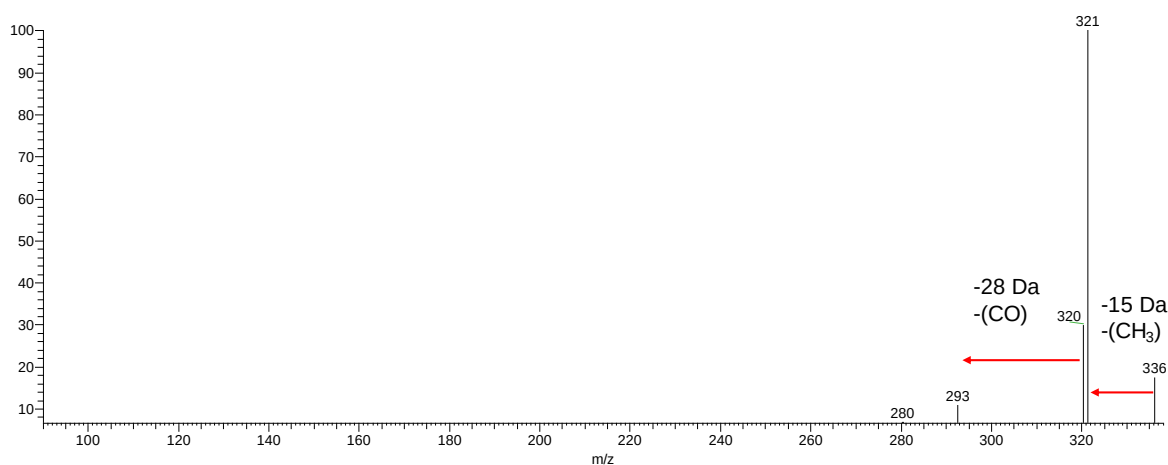
A análise por espectrometria de massas *full scan* (figura 38), obtida através de ionização por *APCI* em modo positivo de aquisição de dados para a amostra AACRFA-D, evidenciou uma molécula protonada com m/z 336 Da $[\text{M}+\text{H}]^+$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{NO}_5$.

Figura 38: Espectro de massas da amostra AACRFA-D.



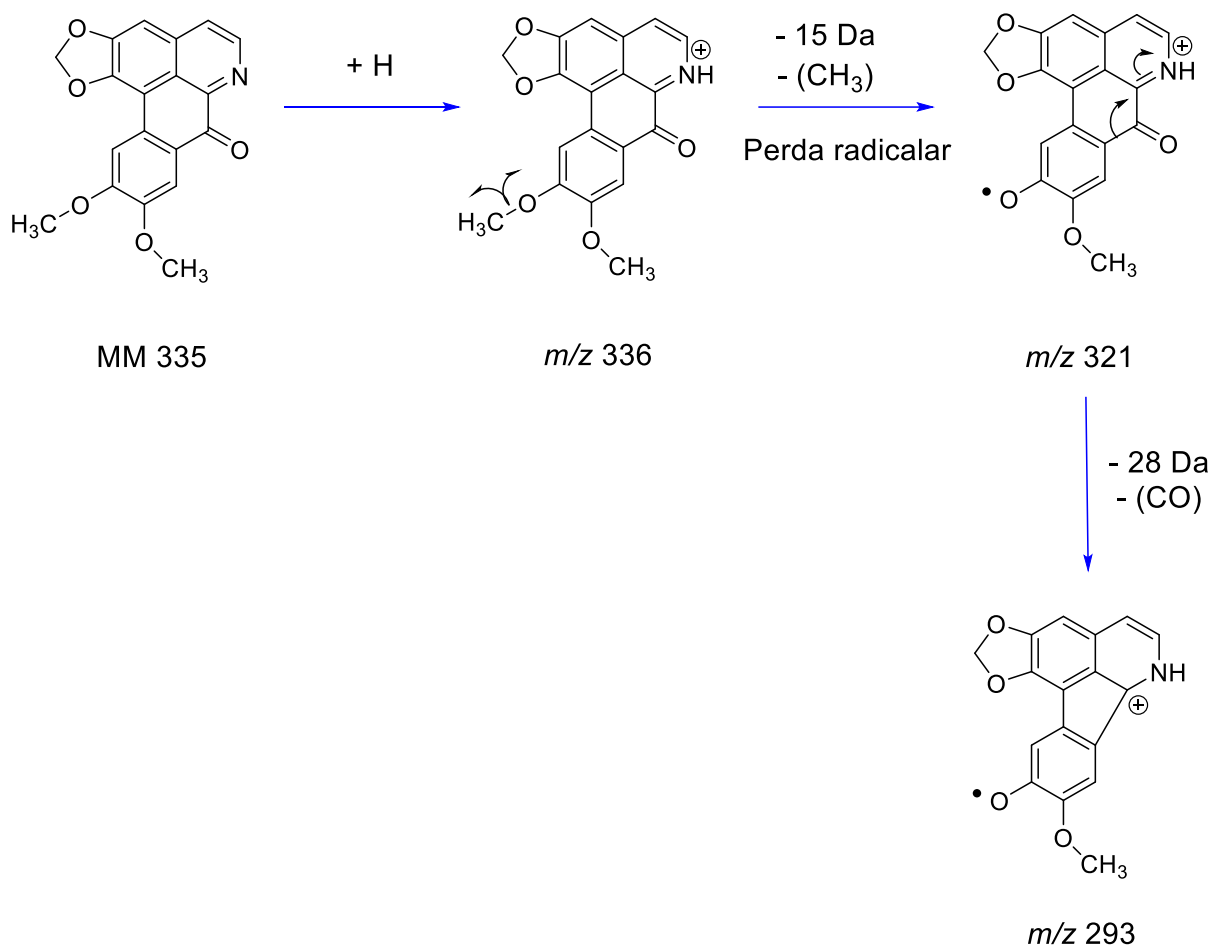
Na análise da fragmentação do íon com m/z 336 Da (figura 39), observou-se a perda inicial de -15 Da característica do grupo metila e uma perda posterior de -28 Da, o que sugere a perda do grupo - CO da carbonila, confirmando o perfil de fragmentação para um alcaloide oxoaporfino, conforme os estudos realizados por Silva *et al.* (2017), são relatadas que as perdas iniciais sejam referentes à saída dos seus grupos periféricos, de acordo com o mecanismo de fragmentação representado na figura 40.

Figura 39: Perfil de fragmentação para AACRFA-D.



Pelas análises de RMN de ^1H , HSQC, HMBC, EM e comparação com os dados da literatura (Paz *et al.*, 2019; Barbosa *et al.* 2020), foi possível identificar a substância AAGFA-D como sendo o alcaloide oxoaporfina dicentrinona de fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{13}\text{NO}_5$.

Figura 40: Proposta de fragmentação para o íon de m/z 336.



5.2.3 Determinação estrutural da amostra AACRFA-5.8

A amostra **AACRFA-5.8** (1,4 mg), apresentou-se como sólido amorfo de cor amarelo claro. A análise por CCDA apresentou teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada). No espectro de massas *full scan* da fração alcaloídica (Figura 19), foi observado o pico base de m/z 326 [M+H]⁺ e ao ser submetido a fragmentação apresentou uma perda inicial de 17 Da gerando o íon de m/z 309, uma segunda perda de 31 Da gerando o íon de 295 m/z , estando esta perda de acordo com a estrutura do alcaloide nordicentrina já reportada na família Annonaceae (*Xylopia championii* Hook.f. & Thomson do Sri Lanka) (Puvanendran *et al.*, 2008), porém é descrita pela primeira vez para o gênero e a espécie *A. amazonica*.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz em CDCl_3) (figura 41) da amostra, foram verificados sinais de hidrogênios na região aromática entre δ 7,65 - 6,54, bem como a presença de sinais na região de hidrogênios metilênicos entre δ 3,85 - 2,84. O sinal referente ao hidrogênio metínico em δ 4,34 (1H, *m*) foi atribuído com base no mapa de correlação HSQC (figura 42).

Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de AACRFA-5.8.

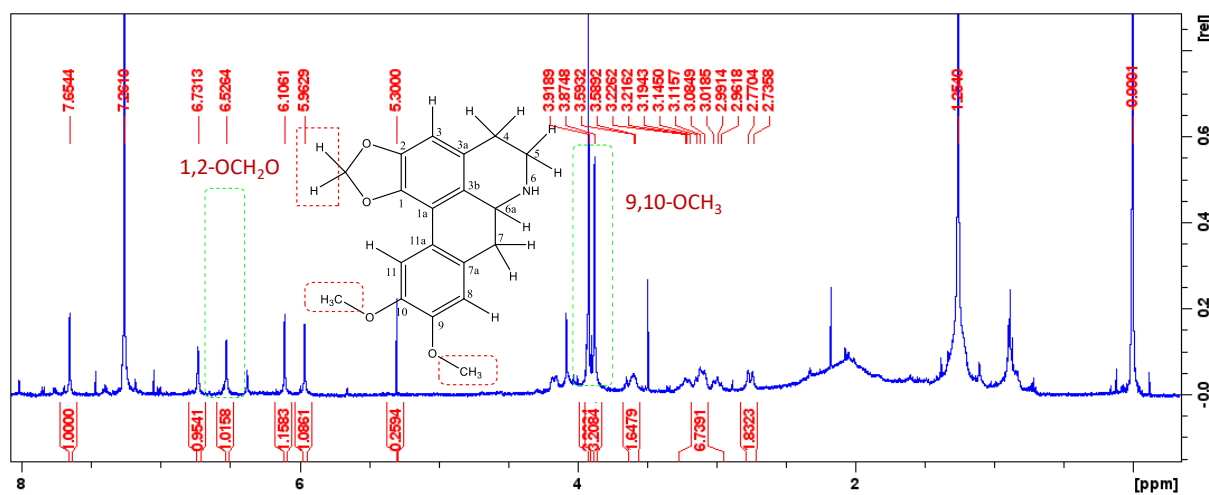
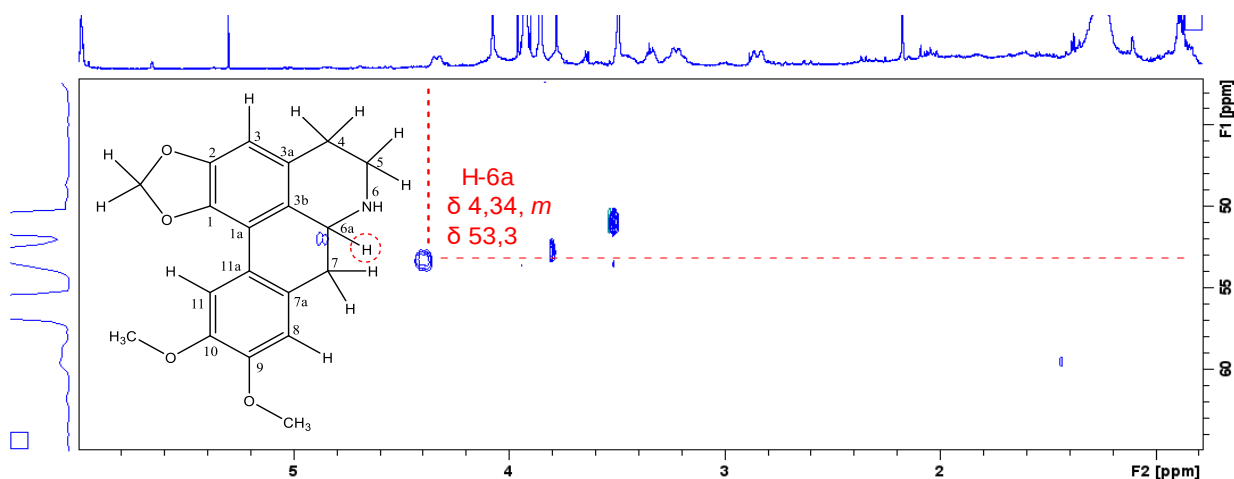
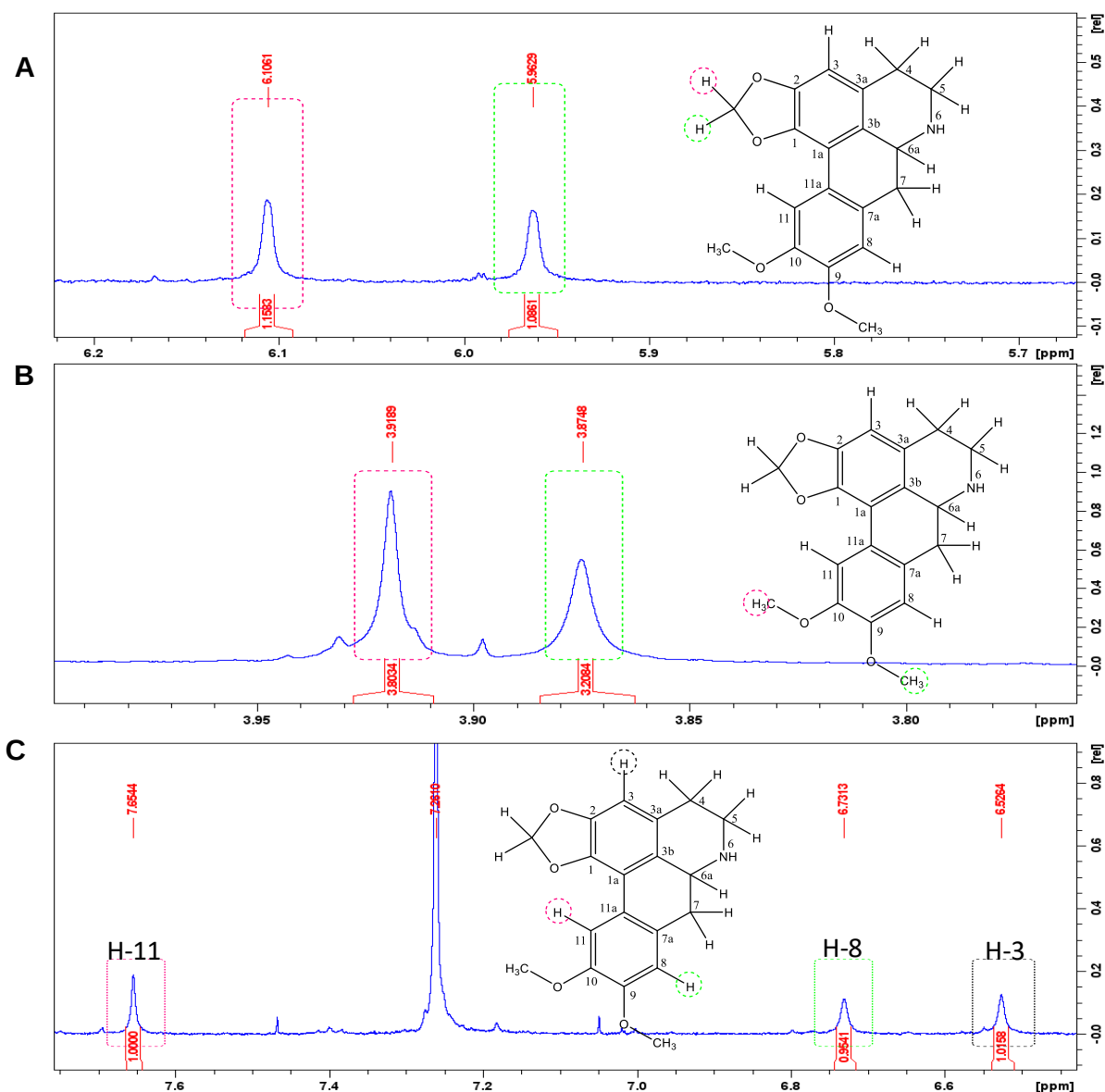


Figura 42: Mapa de correlação HSQC, ampliação da região do hidrogênio metínico.



A presença do grupo metilenodióxi na estrutura da substância foi observado entre δ 6,10-5,96 no espectro de RMN de ^1H na forma de simpleto largo com integração para um hidrogênio (figura 43a).

Figura 43: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3).

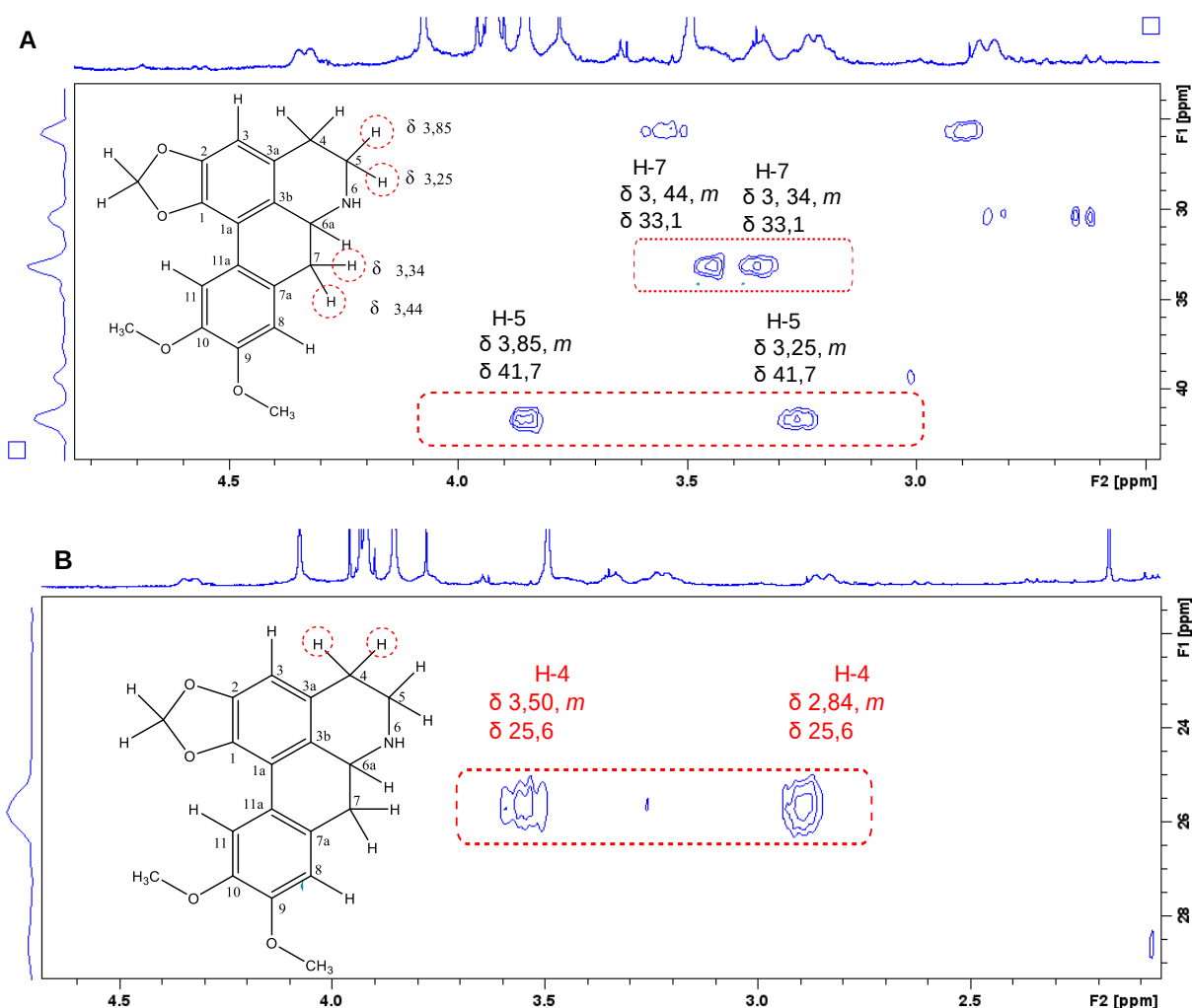


Ainda no espectro de RMN, foi observado os sinais em δ 3,87 e 3,91 na forma de simples, referentes aos hidrogênios do grupo metoxila, integrando para três hidrogênios cada, característicos de alcaloides aporfino substituídos no anel D (figura 43b) (Likhitwitayawuid *et al.*, 1993).

Na região de prótons aromáticos (figura 43c) foram observados sinais em δ 7,65 (1H s), δ 6,73 (1H, s) e δ 6,52 (1H s), que foram atribuídos a H-11, H-8 e H-3 respectivamente. A ausência de sinais na região de prótons aromáticos é indicativa da presença de dois substituintes no anel D, que pode ser atribuído as duas metoxilas identificadas anteriormente.

Continuando a análise do espectro de RMN de ^1H , juntamente com os dados obtidos pelo mapa de correlação HSQC, pode-se observar a presença de hidrogênios diastereotópicos, no qual a substância apresentou três grupos metilênicos com os sinais em δ 3,44 (*eq.*) e 3,34 (*ax.*) (*m*), referente ao H7 que correlacionavam-se com o carbono em δ 33,1 (C-7), um segundo sinal foi observado em δ 3,85 (*eq.*) e 3,25 (*ax.*) (*m*), atribuído ao H5, com o carbono em δ 41,7 (C-7) (figura 44a) e um sinal em δ 3,50 (*ax.*) e 2,84 (*eq.*) (*m*), identificado como H4, com o sinal de carbono em δ 25,6 (C-4) (figura 44b).

Figura 44: Mapa de correlação HSQC, ampliação da região de hidrogênios metilênicos.



Pelo mapa de contorno HMBC, foi possível confirmar a presença das duas metoxilas no anel D, assim como definir suas posições, através da relação do hidrogênio H11 com os carbonos em δ 147,2 e 148,5, atribuídos aos C10 e C9

respectivamente. Foi observada também a correlação do H8 com o carbono em δ 148,8 referentes ao C9 (figura 45a).

Ainda foi possível identificar a presença do grupo metilenodioxi no anel A através das correlações do H3 com os sinais de carbono em δ 142,9 e 148,5 característicos desse grupo, e foi atribuído aos C1 e C2, respectivamente (figura 45b). As demais correlações observadas no mapa HMBC são mostrados na figura 46.

Figura 45: Mapa de correlação HMBC da amostra AACRFA-5.8

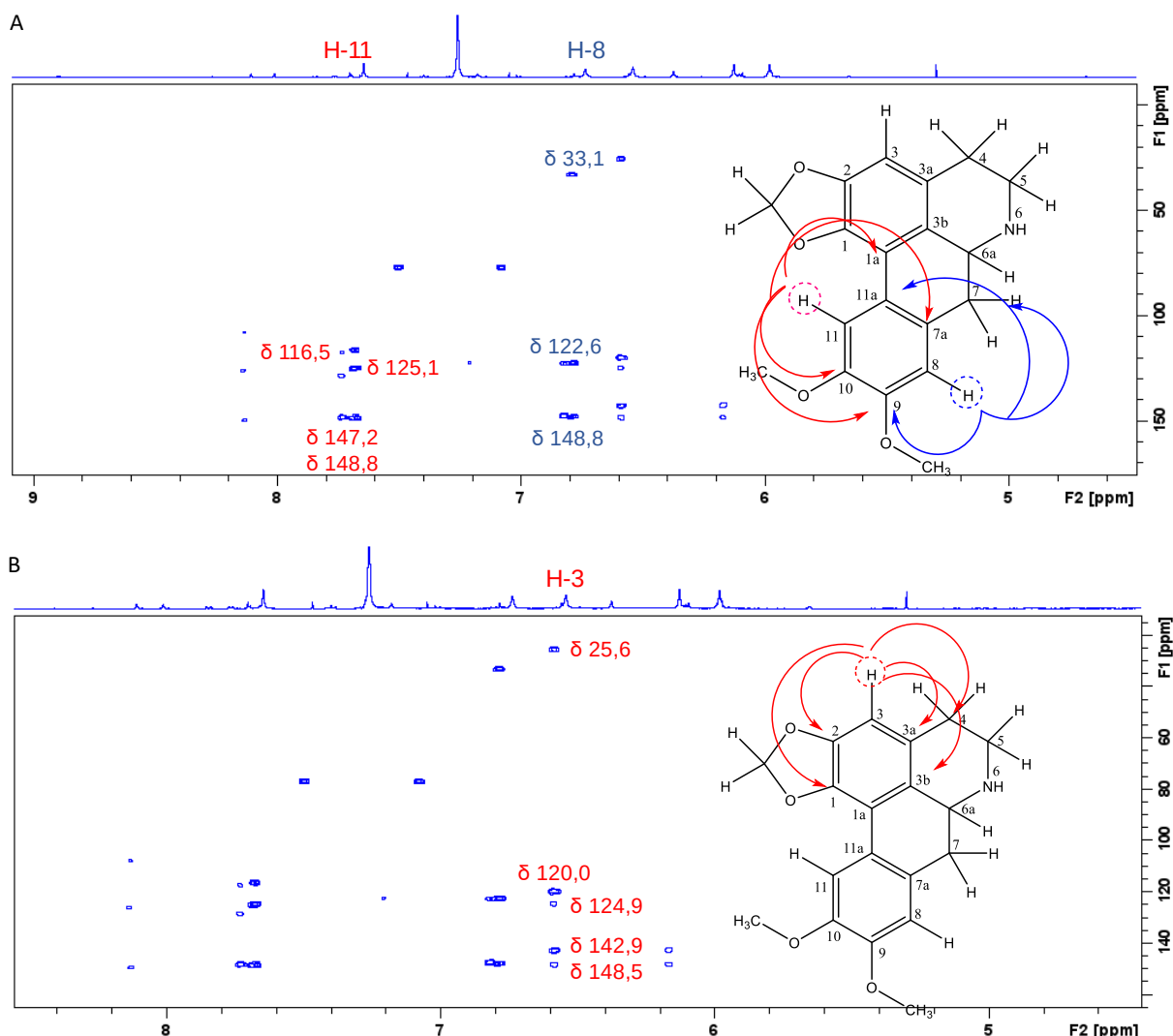
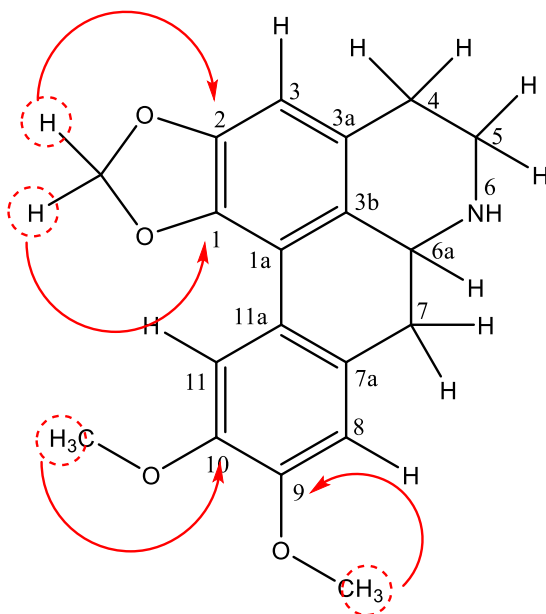
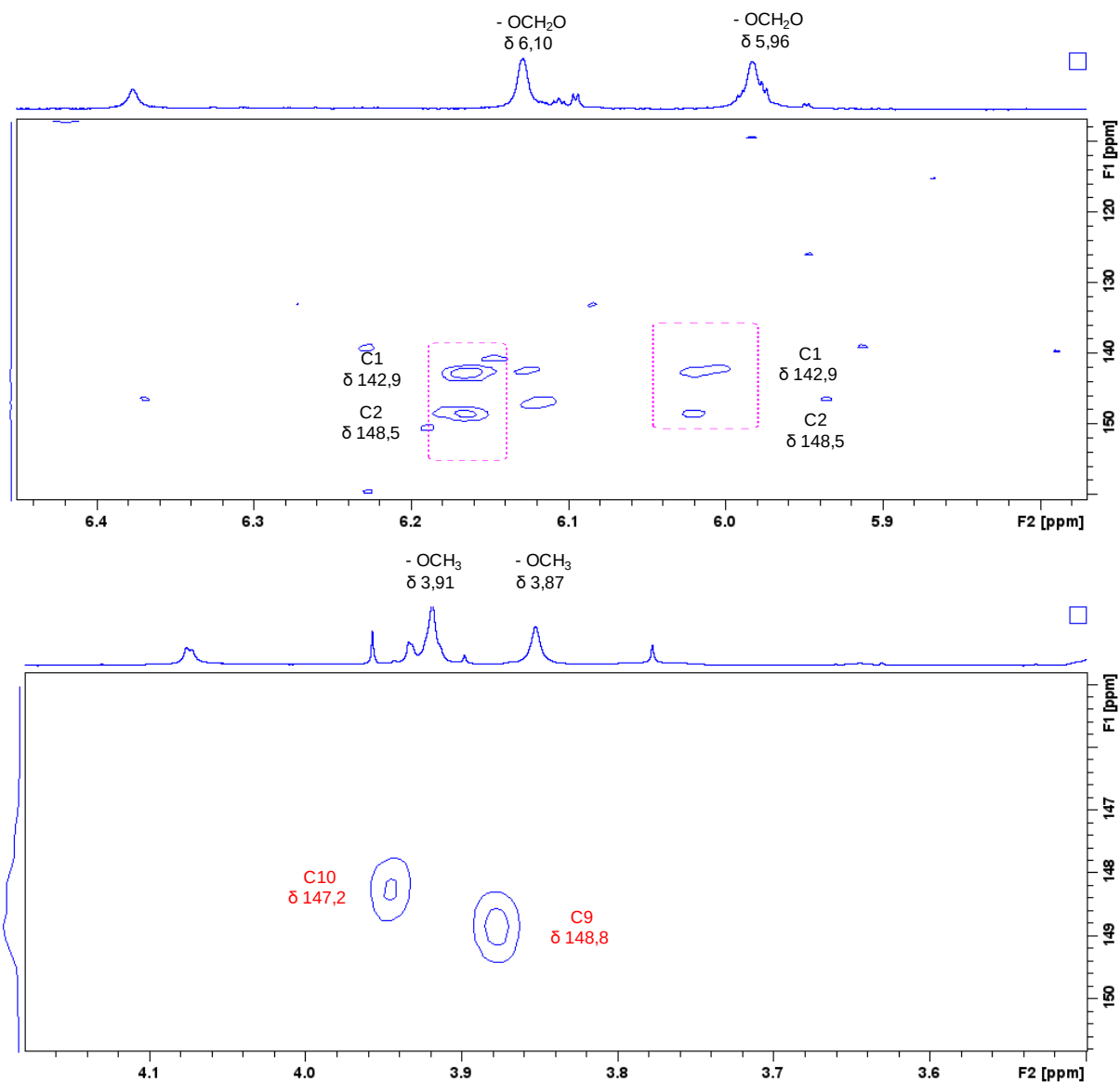


Figura 46: Correlações observadas no mapa HMBC de AACRFA-5.8



Na tabela 7 são apresentados os valores de RMN de ^1H e ^{13}C de **AACRFA-5.8**, atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC com suas respectivas correlações observadas, e comparações com os dados da literatura consistindo nos dados do alcaloide nordicentrina. É importante destacar que esse alcaloide não havia sido relatado na literatura para espécies do gênero *Annona*, tornando este o primeiro registro de nordicentrina em *A. amazonica*.

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de AACRFA-5.8

Posição	AACRFA-5.8			Nordicentrina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^c	^{13}C (δ) ^c
1	-----	142,9	-----	-----	141,5 C
1a	-----	116,5	-----	-----	116,1 C
2	-----	148,5	-----	-----	146,6 C
3	6,52 (1H, s)	106,9	120,0; 124,9; 142,9; 148,5; 25,6	6,47 (s)	107,0 CH
3a	-----	124,9	-----	-----	126,4 C
3b	-----	120,0	-----	-----	126,9 C
4 eq	2,84 (m)	25,6	-----	2,59 (m)	29,0 CH ₂
4 ax	3,50 (m)			2,94 (m)	
5 eq	3,85 (m)	41,7	-----	3,32 (m)	43,1 CH ₂
5 ax	3,25 (m)			2,94 (m)	
6a	4,34 (s)	53,3	-----	3,89 (dd, 14,3; 5,3)	53,5 CH
7 eq	3,44 (m)	33,1	-----	2,80 (dd, 14,3; 5,3)	36,3 CH ₂
7 ax	3,34 (m)			2,71 (dd, 14,3; 14,3)	
7a	-----			-----	
8	6,73 (s)	111,2	33,1; 122,6; 148,8	6,69 (s)	111,0 C
9	-----	148,8	-----	-----	148,1 C
10	-----	147,2	-----	-----	147,4 C
11	7,65 (s)	110,6	116,5; 125,1; 148,8; 147,2	7,62 (s)	110,4 CH
11a	-----	122,6	-----	-----	123,4 C
(1,2)- OCH₂O	5,96 (s) 6,10 (s)	101,1	142,9 148,5	5,82 (d) 6,02 (d)	100,4 CH ₂
9- OCH₃	3,87 (s)			3,86 (s)	
10- OCH₃	3,91 (s)	56,3	147,2	3,87 (s)	55,9 CH ₃

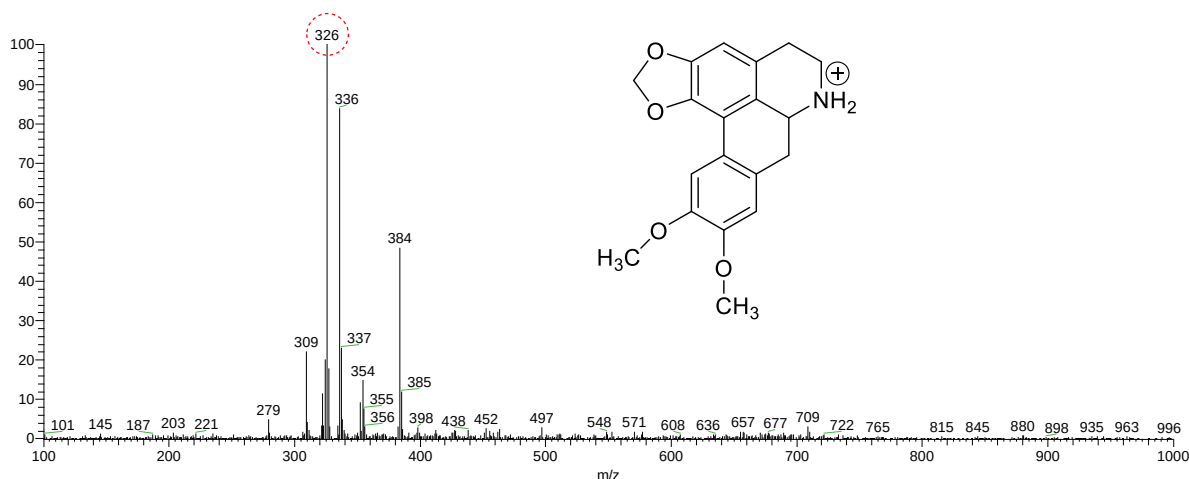
^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H em CDCl_3 e 125 MHz ^{13}C , utilizando o TMS como padrão interno.

^bOs carbonos hidrogenados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo Likhitwitayawuid *et al.*, 1993 (^1H : 300 MHz, CDCl_3 ; ^{13}C : 75,6 MHz; CDCl_3); (δ) deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas *full scan* (figura 47), obtida através de ionização por *APCI* em modo positivo de aquisição de dados para a amostra AACRFA-5.8, evidenciou uma molécula protonada com m/z 326 Da $[M+H]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{19}NO_4$.

Figura 47: Espectro de massas da amostra AACRFA 5.8



O espectro de *APCI-MS²* do íon de m/z 326 $[M+H]^+$ (figura 48) apresentou duas fragmentações, a primeira é a perda de 17 Da ($-NH_3$ amônia), resultando na formação do íon fragmento m/z 309. O segundo fragmento formado foi referente a perda de 30 Da ($-CH_2O$), que resulta na formação do íon de m/z 279. As perdas e os fragmentos formados são característicos de estruturas que contém substituintes como o grupo metilenodióxido e está de acordo com a proposta de fragmentação para o alcaloide nordicentrina (figura 49) e coerente com a análise realizado por (Likhitwitayawuid *et al.*, 1993; Puvanendran, 2008).

Figura 48: Perfil de fragmentação para a amostra AACRFA-5.8

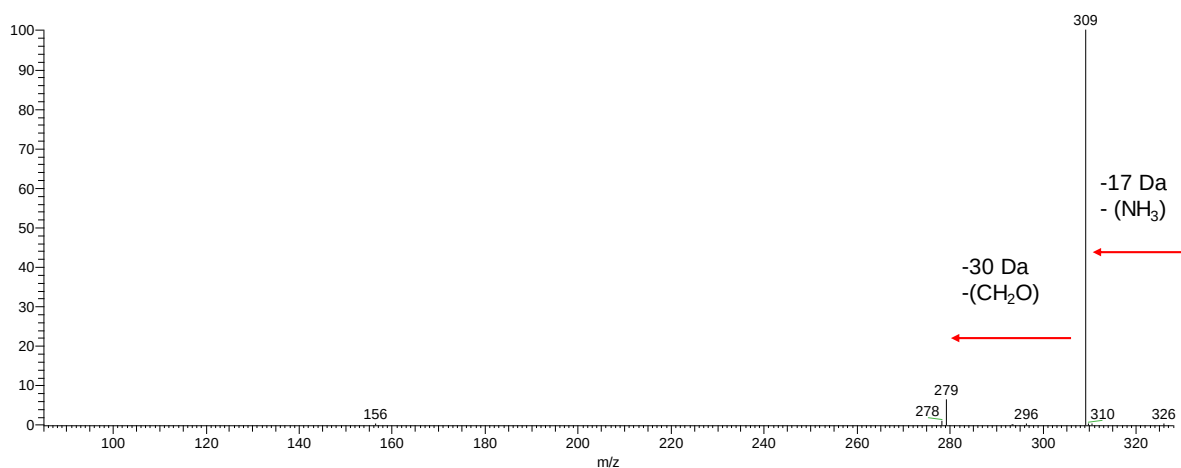
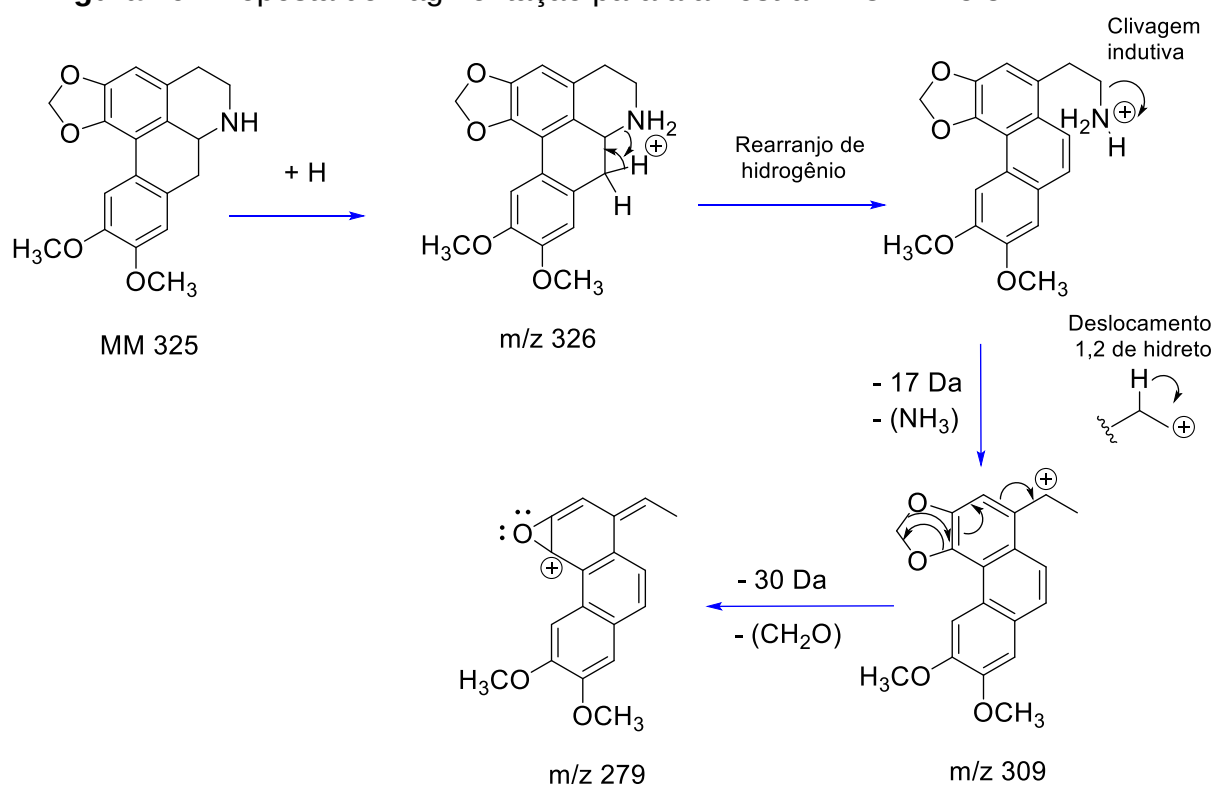
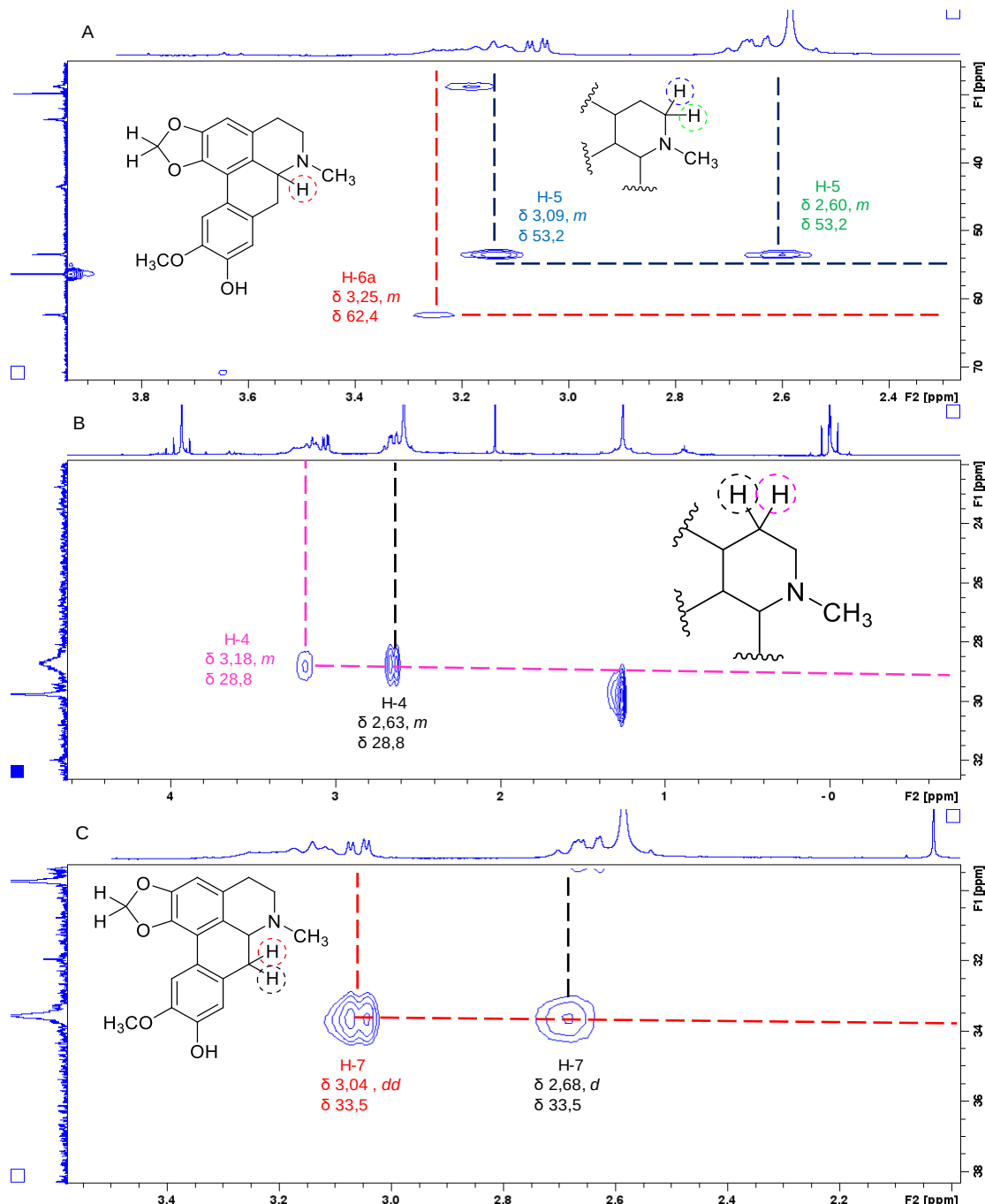


Figura 49: Proposta de fragmentação para a amostra AACRFA-5.8



Foram observados sinais na região de hidrogênios metilênicos entre δ 3,15 - 2,63 e um sinal referente ao hidrogênio metínico em δ 3,25 (1H, *m*) com o carbono em δ 62,4 (C-6) (figura 51a) que foi atribuído com base no mapa de correlação HSQC.

Figura 51: Mapa de correlação HSQC, ampliação da região de hidrogênios metilênicos e metínico.

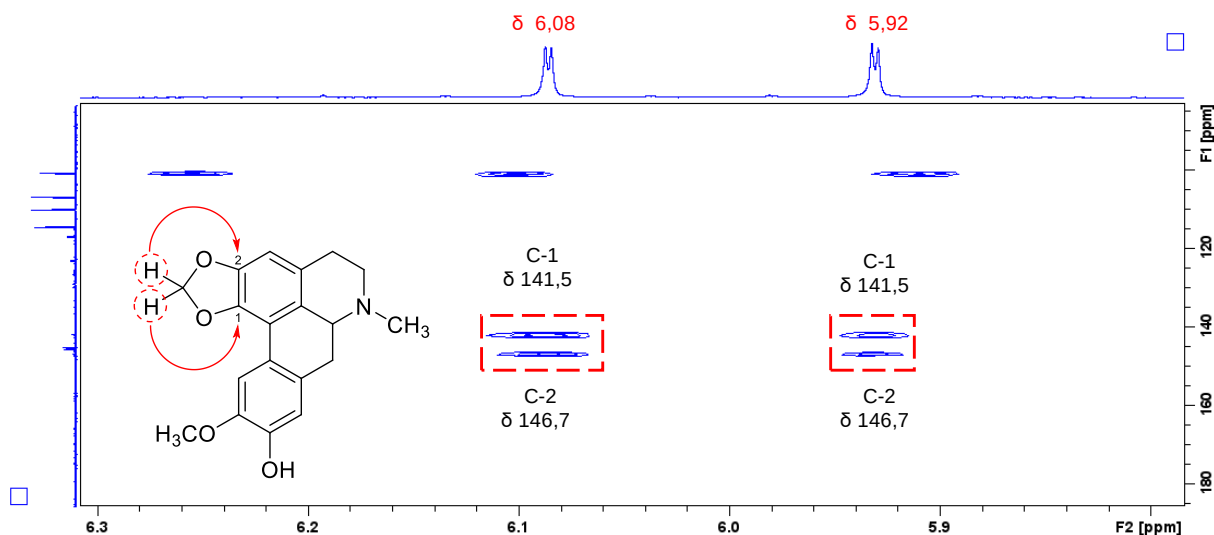


Na análise do espectro de RMN de ^1H juntamente com os dados obtidos pelo mapa de correlação HSQC, pode-se observar a presença de hidrogênios diastereotópicos, onde a substância apresentou três grupos metilênicos com os sinais em δ 3,09 (*m*) e 2,60 (*m*), referente aos H-5 que correlacionavam-se com o carbono

em δ 53,2 (C-5) (figura 51a), um segundo grupo de sinais foi observado em δ 3,18 (*m*) e 2,63 (*m*), atribuído ao H-4, com o carbono em δ 28,8 (C-4) (figura 51b) e um dos sinais em δ 3,04 (*dd*, 14,1; 4,3 Hz) e 2,68 (*d*, 4,3 Hz), identificados como H-7, com o sinal de carbono em δ 33,5 (C-7) (figura 51c).

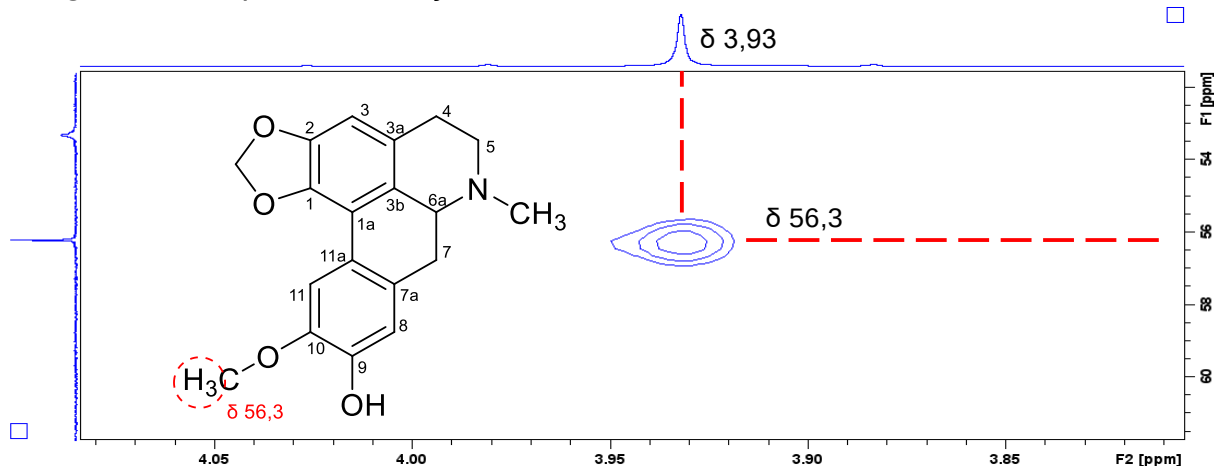
A presença do grupo (-OCH₂O) foi confirmado através dos espectros de RMN de ¹H e HSQC, onde verificou-se que os hidrogênios em δ 6,08 e 5,92, se correlacionavam com o carbono em δ 100,6. Através do mapa de contorno HMBC, verificou-se que estes hidrogênios se correlacionavam a *J*³ com os carbonos em δ 141,5 (C-1) e 146,7 (C-2), caracterizando a presença de uma ponte metilenodioxi no anel A e evidenciando a não planaridade da molécula (Figura 52).

Figura 52: Mapa de correlação HMBC.



A presença da metoxila assim como sua posição foi atribuída com base no mapa de correlação HSQC e HMBC. Verificou-se que o sinal em δ 3,93 estava correlacionando com o carbono em δ 56,3 (figura 53).

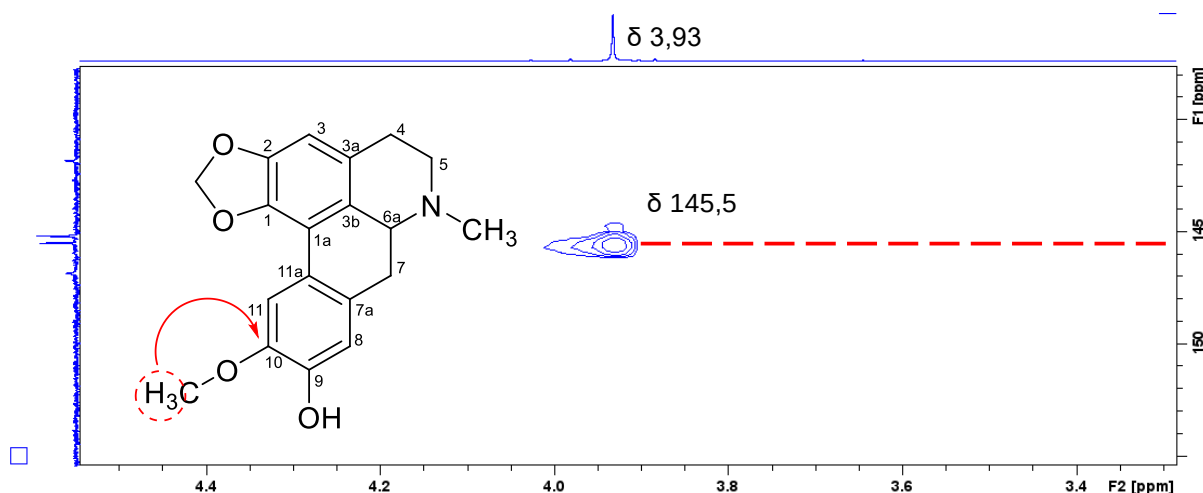
Figura 53: Mapa de correlação HSQC.



Através do mapa de correlação HMBC, foi possível verificar que o sinal de hidrogênio com deslocamento em δ 3,93 estava correlacionando-se com o carbono em δ 145,5 a J^3 (figura 54). Ainda pelo mapa HMBC foi possível observar que o hidrogênio com δ 7,63 estava correlacionando a J^2 com o carbono em δ 145,5, dessa forma confirmando a posição da metoxila na estrutura da substância.

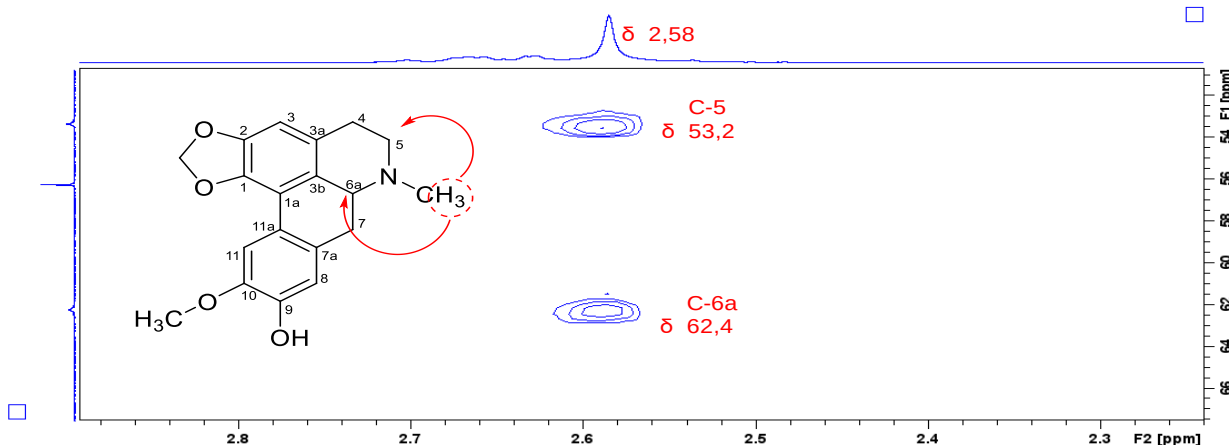
No mapa de contorno HMBC foi possível propor a posição da hidroxila através da correlação do sinal de hidrogênio em δ 7,63 com o carbono em δ 145,1 a J^3 .

Figura 54: Mapa de correlação HMBC.



A posição da metila observada no espectro de RMN de ^1H foi atribuída com base no mapa de correlação HSQC e HMBC onde verificou-se que o sinal em δ 2,58 está com o carbono em δ 43,5 e correlacionava-se a J^3 com os carbonos em δ 53,2 e 62,4 (figura 55), dessa forma confirmando a metila ligada ao nitrogênio do sistema aporfínico.

Figura 55: Mapa de contorno HMBC com região ampliada.



Os dados analisados através de RMN para a amostra A4.7.7, mostraram indícios de que a substância teria a estrutura compatível com o alcaloide *N*-Metil-actinodafinina, os quais foram confirmados com base nas informações disponíveis na literatura, conforme registrado na tabela 8. Vale ressaltar que esse alcaloide já possui relato na literatura para a espécie *A. amazonica*.

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de A4.7.7

Posição	A4.7.7			N-Metil-actinodafinina (Cassiticina)	
	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz) ^c	^{13}C (δ) ^c
1	-----	141,5	-----	-----	147,6
1a	-----	116,8	-----	-----	116,9
2	-----	146,7	-----	-----	142,3
3	6,51 (1H, s)	106,6	146,7; 141,5; 116,8; 126,7; 28,8	6,52 (s)	106,7
3a	-----	126,7	-----	-----	124,2
3b	-----	128,8	-----	-----	122,8
4	2,63 (1H, <i>m</i>) 3,18 (1H, <i>m</i>)	28,8	-----	2,73 3,38	27,1
5	2,60 (1H, <i>m</i>) 3,09 (1H, <i>m</i>)	53,2	-----	2,92 3,35	52,8
6a	3,25 (1H, <i>m</i>)	62,4	53,2	NO	61,9
7	2,68 (1H, <i>d</i> , 4,3) 3,04 (1H, <i>dd</i> , 4,3; 14,1)	33,5	62,4; 114,3; 122,9; 128,6; 128,8	2,96 3,11	32,3
7a	-----	128,6	-----	-----	127,2
8	6,82 (1H, s)	114,3	122,9; 144,5; 33,5	6,80 (s)	114,5
9-OH	-----	145,1	8,54	-----	145,5
10	-----	145,5	-----	-----	145,7
11	7,63 (1H, s)	109,9	145,1; 145,5; 128,8; 116,8	7,60 (s)	110,0
11a	-----	122,9	-----	-----	122,5
(1,2)- OCH ₂ O	5,92 (1H, <i>d</i> , 1,4) 6,08 (1H, <i>d</i> , 1,4)	100,6	141,5; 146,7	5,94 (<i>d</i> , 1,4) 6,10 (<i>d</i> , 1,4)	101,0
H3C-N	2,58 (3, s)	43,5	53,2; 62,4	2,76 (s)	42,1
10- OCH ₃	3,93 (3H, s)	56,3	145,5	3,90 (s)	56,6

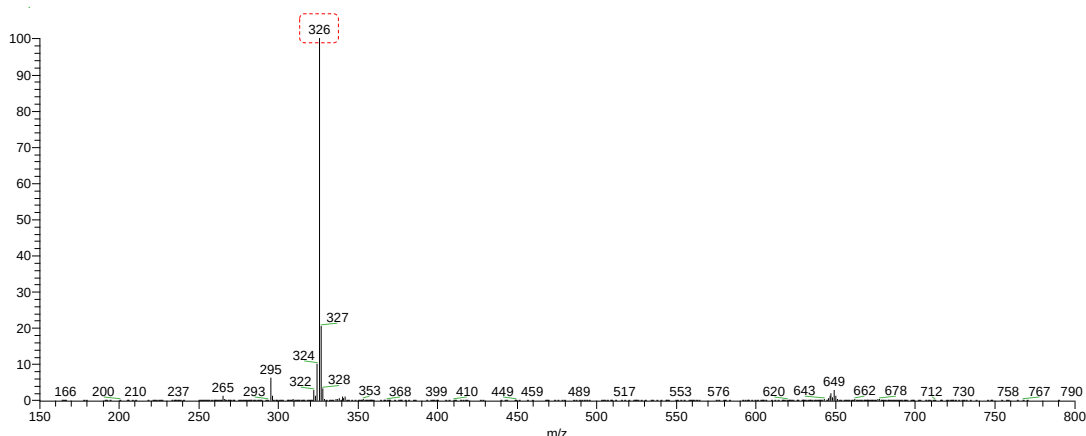
^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H em CDCl_3 e 125 MHz ^{13}C , utilizando o TMS como padrão interno.

^bOs carbonos hidrogenados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo Pinheiro *et al.*, 2009 (^1H : 400 MHz, CDCl_3 ; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3); (δ) deslocamentos em ppm. NO- não observado.

A análise por espectrometria de massas *full scan* (figura 56), obtida através de ionização por *APCI* em modo positivo de aquisição de dados para a amostra A4.7.7, evidenciou uma molécula protonada com m/z 326 Da $[M+H]^+$, compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{19}NO_4$.

Figura 56: Espectro de massa *full scan* da amostra A4.7.7



O espectro de *APCI-MS²* do íon de m/z 326 $[M+H]^+$ (figura 57) apresentou duas fragmentações, a primeira é a perda de 31 Da ($-NH_2CH_3$), resultando na formação do íon fragmento m/z 295. O segundo fragmento formado foi referente a perda de 30 Da ($-CH_2O$), que resulta na formação do íon de m/z 265. As perdas e os fragmentos formados são característicos de estruturas que contém substituintes como o grupo metila e metilenodióxi e está de acordo com o perfil de fragmentação para o alcaloide *N*-metil-actinodafinina e coerente com a análise realizado por (Pinheiro *et al.*, 2009). Um mecanismo de fragmentação foi proposto com base no descrito por Lima *et al.*, (2020) para alcaloides com estrutura aporfínica contendo o grupo metilenodioxio no anel A (figura 58).

Figura 57: Perfil de fragmentação para o íon de m/z 326 $[M+H]^+$.

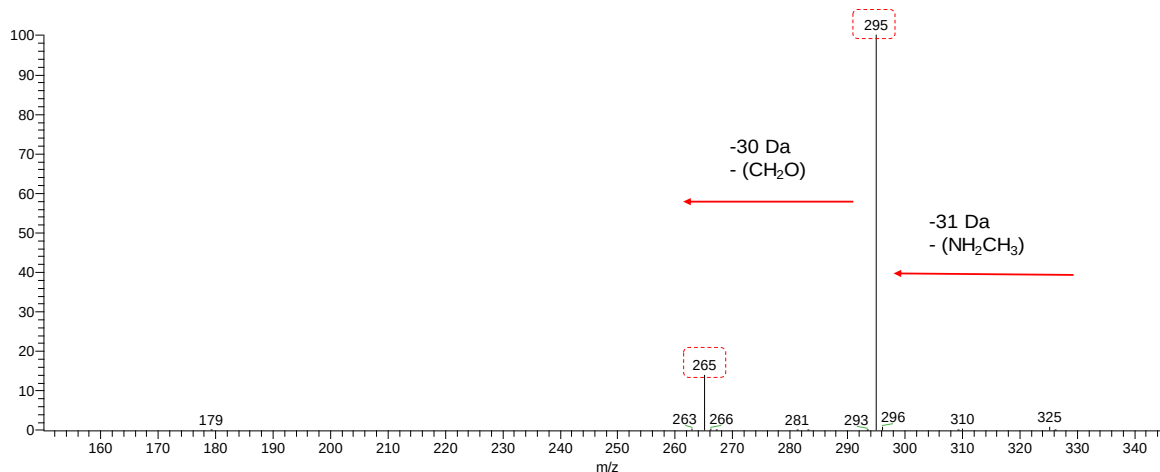
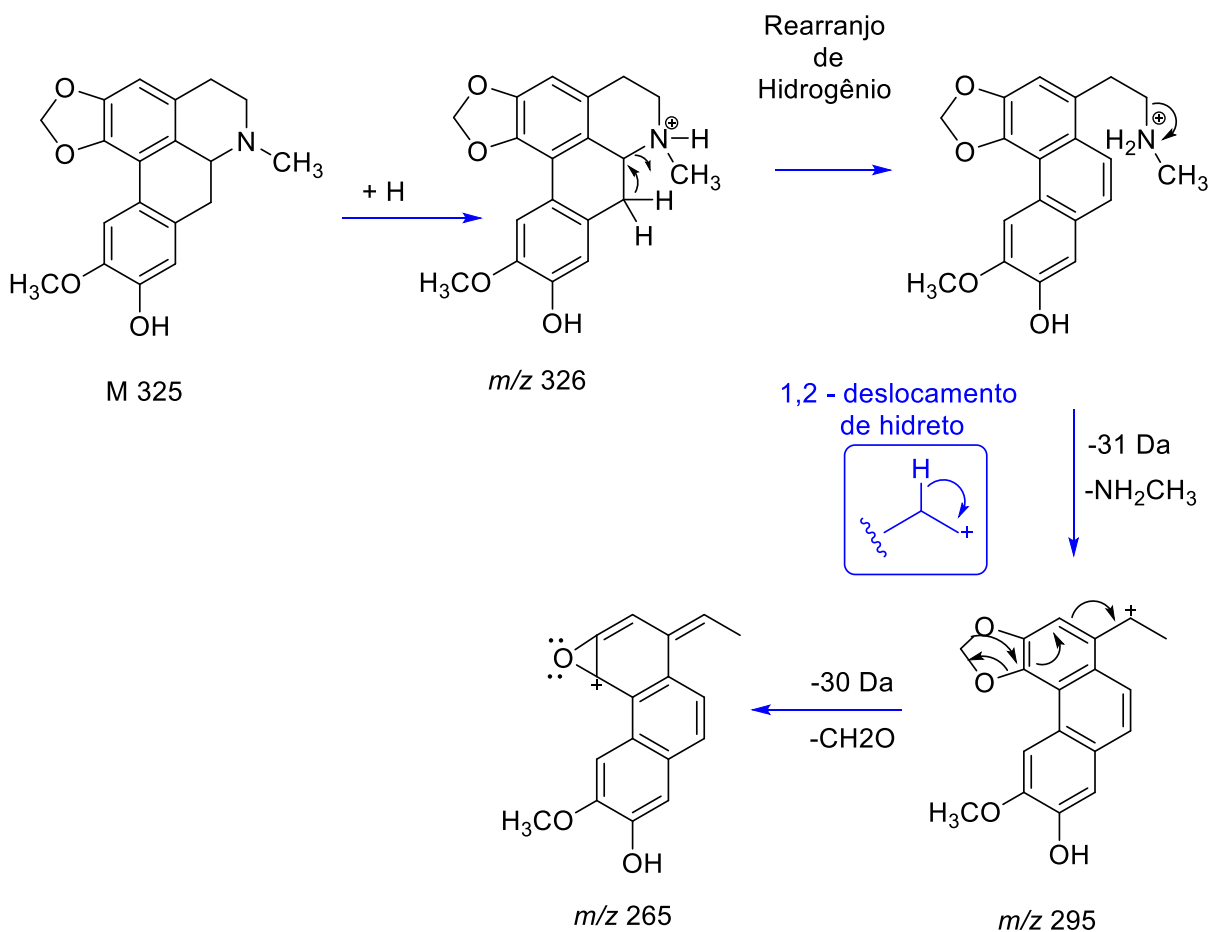


Figura 58: Proposta de fragmentação para o íon m/z 326.



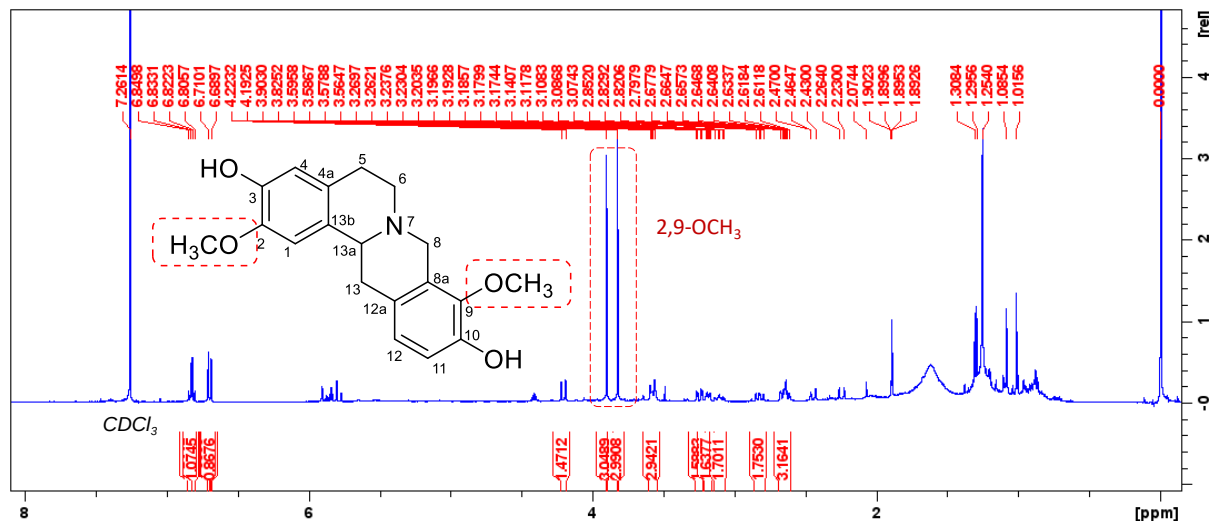
5.2.5 Determinação estrutural da amostra A4.6.1

A amostra codificada como A4.6.1 (1,6 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. A análise por CCDA utilizando o reagente de Dragendorff evidenciou característica da presença de nitrogênio na molécula (coloração alaranjada), indicando a presença de um constituinte alcaloídico. Na análise de massas da fração alcaloídica (Figura 19) evidenciou a presença de um íon em m/z 328 $[M+H]^+$. Este íon foi submetido à análise de EM^2 , onde foi observada uma elevada perda de massa (150 Da) formando o fragmento de m/z 178. Como descrito anteriormente este tipo de fragmentação chave tem sido observada em estruturas tetrahidroprotoberberínicas contendo metoxila e hidroxila no anel A.

Analisando o espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) (figura 59) observaram-se dois sinais na região de metoxila, um em δ 3,90 (3H, s), sendo um simpleto com integração para três hidrogênios e outro simpleto em δ 3,82 (3H, s) com integração

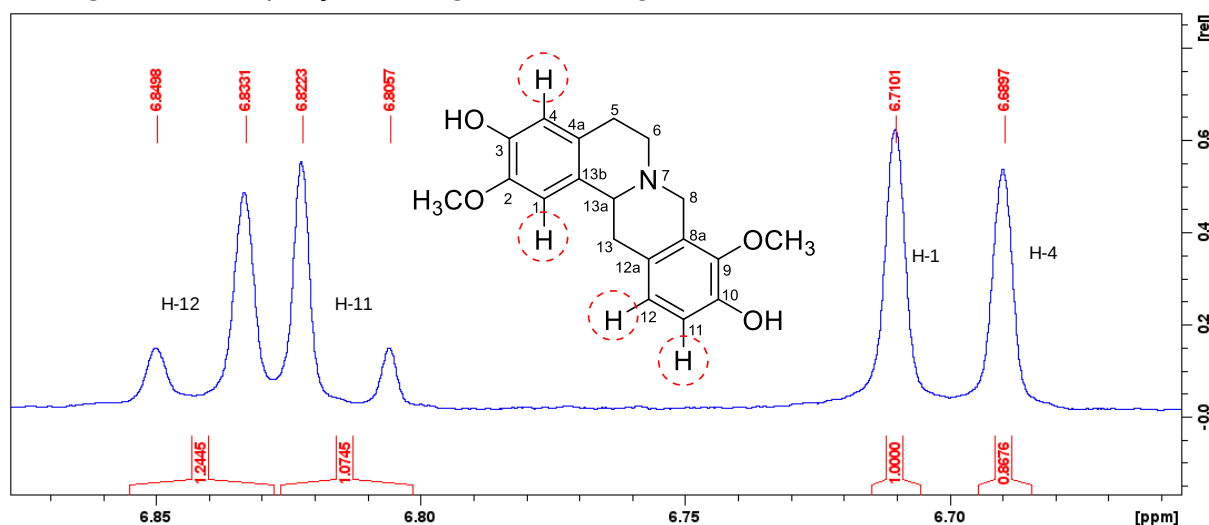
para três hidrogênios, dessa forma foi possível verificar que haviam duas metoxilas na estrutura da molécula.

Figura 59: Espectro de RMN de ^1H da amostra A4.6.1



Na região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H foi possível observar quatro sinais: o primeiro, com integração para um hidrogênio em δ 6,71 (1H, s) e outro em δ 6,68 (1H, s), caracterizando um anel aromático 1, 2, 4, 5, tetrassubstituído, contendo hidrogênios com relação *para*, típicos de H-1 e H-2 respectivamente. Dois dubletos com constante de acoplamento em *orto* foram identificados em δ 6,83 (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz) e δ 6,80 (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz), sugerindo outro anel benzênico tetrassubstituído (figura 60).

Figura 60: Ampliação da região de hidrogênios aromáticos.



Ainda pela análise do espectro de RMN de ^1H (figura 61) juntamente com o mapa de correlação HSQC (figura 62) verificou-se a presença de sinais de hidrogênios diastereotópicos para quatro grupos metilênicos em δ 3,10 (1H, *m*), δ 2,62 (2H, *m*),

δ 3,18 (1H, *m*), δ 2,64 (2H, *m*), δ 4,22 (1H, *d*, $J = 15,3$ Hz) δ 3,60 (1H, *d*, $J = 15,3$ Hz) e δ 3,28 (1H, *dd*, $J = 15,8$ e 3,8 Hz), δ 2,82 (1H, *dd*, $J = 15,8$ e 11,3 Hz) típicos dos hidrogênios, H-5_{peq}/H-5_{pax}, H-6_{peq}/H-6_{pax}, H-8_{peq}/H-8_{pax}, e H-13_{peq}/H-13_{pax}, correlacionados aos sinais dos carbonos em δ 28,2 (C-5), δ 51,6 (C-6), δ 53,9 (C-8) e δ 36,4 (C-13), respectivamente, bem como um sinal de um hidrogênio metínico em δ 3,57 (1H, *dd*, $J = 11,3$ e 3,8 Hz) correlacionado ao sinal do carbono em δ 59,5 (C-13a) característico de H-13a. Estes hidrogênios metilênicos juntamente com o sinal do hidrogênio metínico em δ 3,57 confirmaram o sistema tetraidroprotoberberino da molécula.

Figura 61: Ampliação do espectro de RMN de ^1H da região de metilênicos de A4.6.1

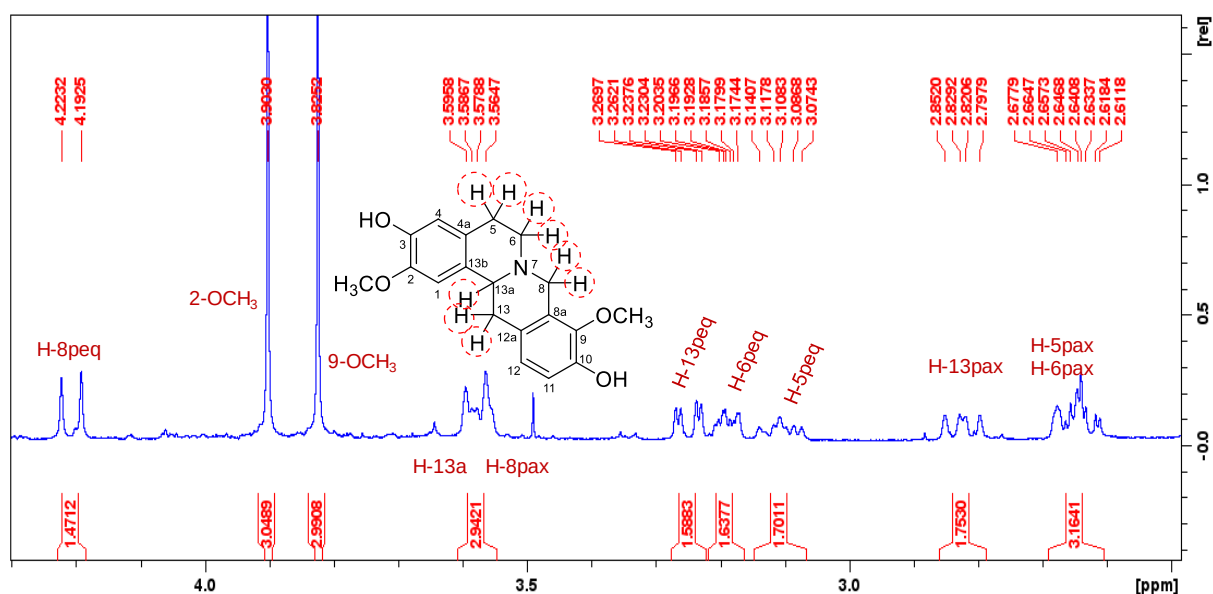
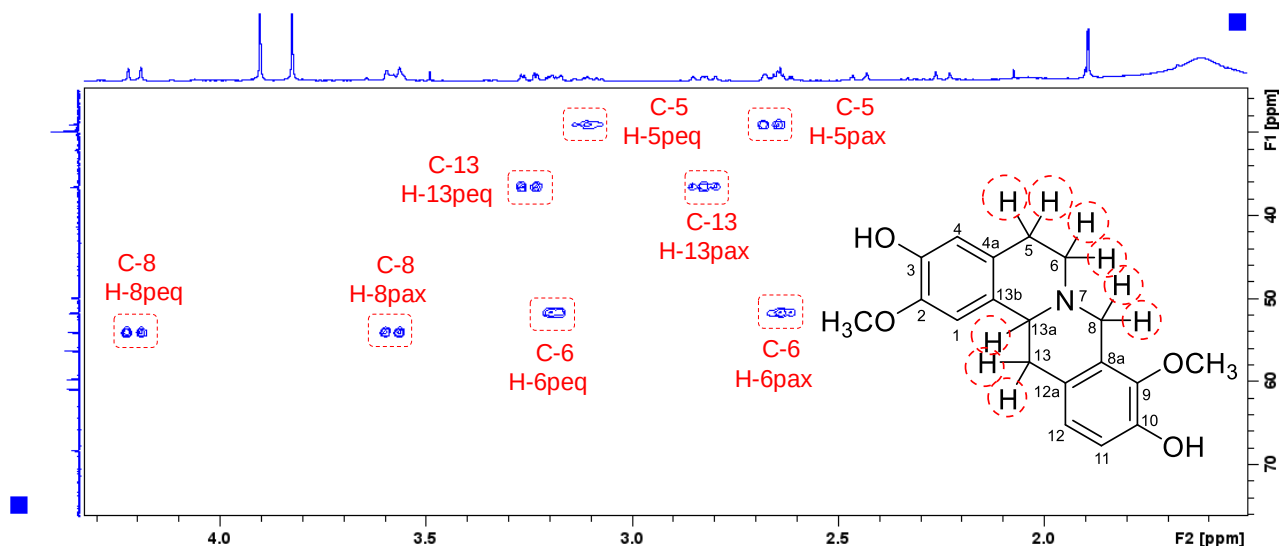


Figura 62: Ampliação do mapa de correlação HSQC da região de metilênicos de A4.6.1



A presença dos grupos hidroxilas na estrutura da substância foi evidenciada devido ao sinal dos carbonos em δ 144,4 (C-3) e 147,1 (C-11) típicos de carbono aromático oxigenado, para os quais não foi observada correlação com hidrogênios aromáticos no mapa de correlação HSQC, bem como nenhuma correlação com os grupos metoxílicos no mapa de correlação HMBC.

Através da análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC, foi possível determinar as corretas posições dos hidrogênios aromáticos com os carbonos aromáticos. A correlação do sinal em δ 6,68 (H-4) com o sinal a 3J dos carbonos em δ 28,2 (C-5), 128,3 (C-13b) e 145,0 (C-2), e δ 6,71 (H-1) com o sinal a 3J dos carbonos em δ 144,4 (C-3), 59,5 (C-13a) e 126,8 (C-4a) indicando a posição correta de ambos os hidrogênios aromáticos do anel A (figura 63). A posição dos hidrogênios aromáticos no anel D foram definidas pelas correlações do sinal em δ 6,83 (H-12) ligado ao carbono em δ 147,1 (C-10) δ 36,4 (C-13) e δ 123,3 (C-8a), e do sinal em δ 6,80 (H-11) ligado ao carbono δ 108,5, com os sinais dos carbonos em δ 126,2 (C-12a) e δ 143,6 (C-9) (figura 64). Ainda pelo mapa HMBC foi possível confirmar a posição das metoxilas através da correlação a 3J do sinal em δ 3,90 com o carbono em δ 145,0 e δ 3,82 com o carbono em δ 143,6 (figura 65).

Figura 63: Mapa de correlação HMBC dos hidrogênios do anel A.

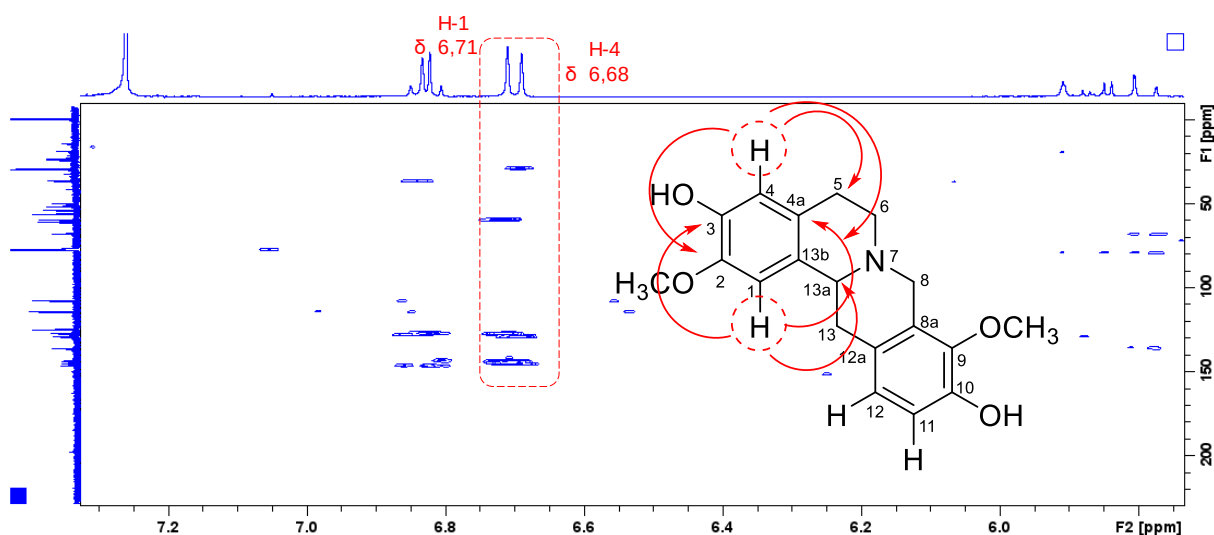


Figura 64: Mapa de correlação HMBC dos hidrogênios do anel D.

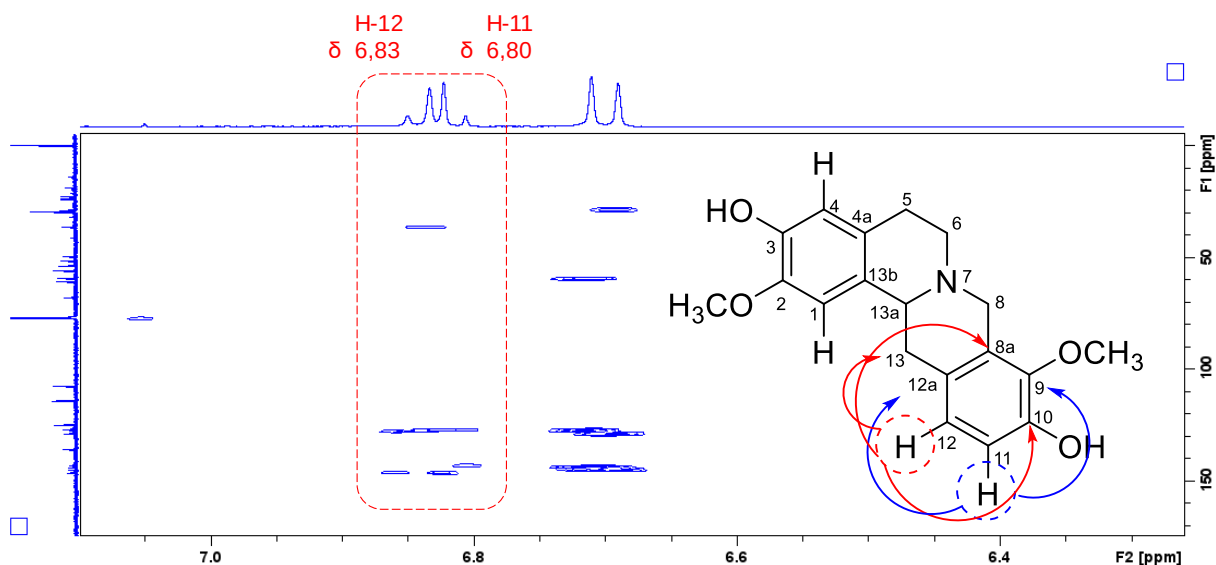
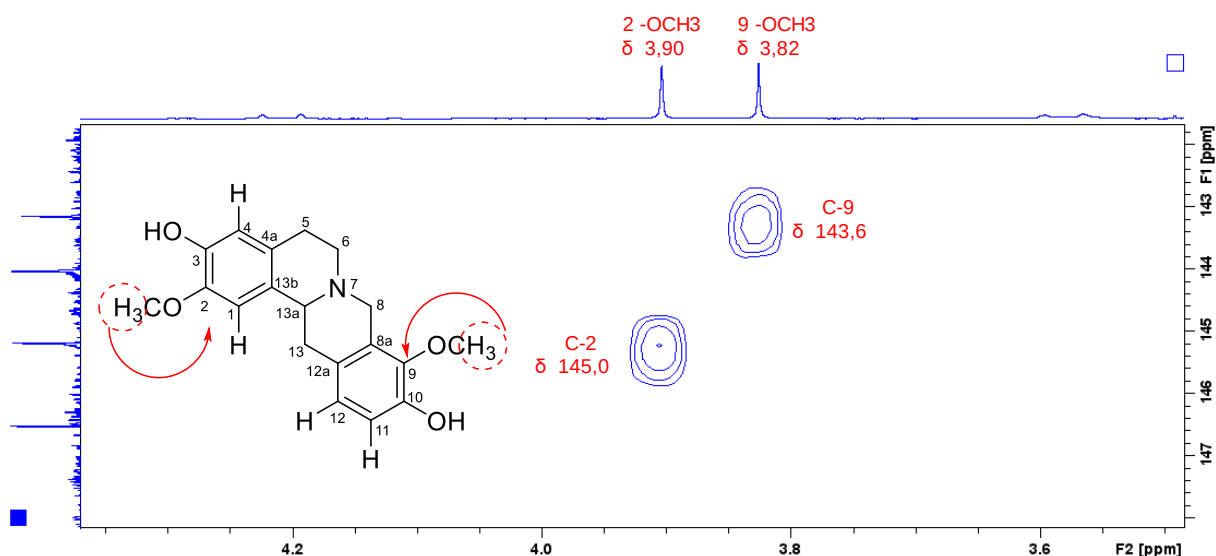


Figura 65: Ampliação do mapa de correlação HMBC da região de metoxila.



Na tabela 9 são apresentados os valores de RMN de ^1H e ^{13}C de **A4.6.1** atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC com suas respectivas correlações observadas, e comparações com os dados da literatura consistindo nos dados do alcaloide Discretamina. Vale ressaltar que esse alcaloide já foi relatado para as espécies da família Annonaceae como, *G. elliptica* (Rajca-Ferreira *et al.*, 2017), *Xylopia langsdorffiana* (Silva *et al.*, 2009b), *Annona pickelii* (Costa *et al.*, 2015), porém é relatado pela primeira vez para a espécie *A. amazonica*.

Tabela 9: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C A4.6.1

Posição	A4.6.1			Discretamina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^c	^{13}C (δ) ^c
1	6,71 (s)	107,8	59,5; 126,8; 144,4	6,71 (s)	108,3
2	-----	145,0		-----	145,8
3	-----	144,4		-----	144,4
4	6,68 (s)	114,3	28,2; 128,3; 145	6,64 (s)	114,7
4a		126,8			127,0
5 peq 5 pax	3,10 (m) 2,67 (m)	28,2	51,6; 126,8 51,6; 114,3; 126,8	3,08 (ddd) 2,67 (m)	28,4
6 peq 6 pax	3,18 (m) 2,64 (m)	51,6	28,2; 59,5; 126,8	3,19 (ddd) 2,63 (m)	51,6
8 peq 8 pax	4,22 (d, 15,3) 3,60 (d, 15,3)	53,9	59,5; 126,2; 143,6 36,4; 51,6; 59,5; 128,3; 143,6	4,20 (d, 15,5) 3,56 (d, 15,5)	53,9
8a	-----	127,3		-----	127,8
9	-----	143,6		-----	143,6
10	-----	147,1		-----	147,2
11	6,80 (d, 8,3)	114,1	126,2; 143,6	6,67 (d, 8,2)	115,1
12	6,83 (d, 8,3)	125,0	147,1; 36,4; 127,3	6,81 (d, 8,2)	124,7
12a	-----	126,2		-----	126,5
13 peq 13 pax	3,28 (dd, 3,8; 15,8) 2,82 (dd, 11,3; 15,8)	36,4	59,5; 125,0; 126,2; 127,3; 128,3 59,5; 126,2; 128,3	3,28 (dd, 16,0; 3,8) 2,82 (dd, 16,0; 11,4)	35,9
13a	3,57 (dd, 11,3; 3,8)	59,5	128,3	3,59 (dd, 11,4; 3,8)	59,6
13b	-----	128,3		-----	128,7
2- OCH ₃	3,90 (s)	56,1	145,0	3,88 (s)	56,2
9- OCH ₃	3,82 (s)	60,3	143,6	3,82 (s)	60,3

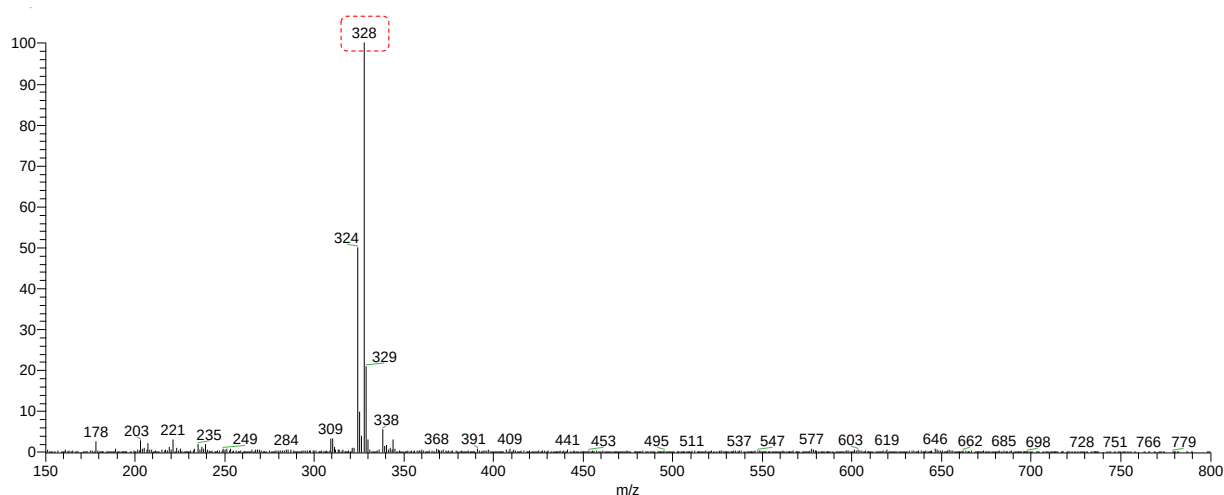
^aO experimento foi realizado a 500 MHz para ^1H em CDCl_3 e 125 MHz ^{13}C , utilizando o TMS como padrão interno.

^bOs carbonos hidrogenados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo Costa *et al.*, 2015 (^1H : 400 MHz CDCl_3 ; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3); (δ) deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (figura 66), obtida através de ionização por APCI em modo positivo de aquisição de dados $[M+H]^+$, mostrou dois íons de maior intensidade, provavelmente devido à presença de uma outra substância em concentração mínima, não podendo ser identificada através dos dados de RMN sendo que o íon com m/z 328 Da é compatível com a formula molecular $C_{19}H_{21}NO_4$ e apresentou maior evidência possivelmente devido à sua maior facilidade de ser ionizado.

Figura 66: Espectro de massas *full scan* da amostra A4.6.1



Quando submetido à fragmentação o íon $[M+H]^+$ com m/z 328 (figura 67), evidenciou a formação de um íon fragmento muito intenso de m/z 178 com abundância relativa de 100% sendo este o pico base, formado pela perda elevada de 150 Da, que é incomum em alcaloides com estrutura aporfínico, porém comuns em alcaloides tetrahidroprotoberberínicos (Lima *et al.*, 2020; Stévigny *et al.*, 2004). Este íon (m/z 178) foi previamente descrito como fragmento chave de compostos tetrahidroprotoberberínicos contendo grupos metoxilas e hidroxilas no anel A, consistindo em um produto formado por meio de uma abertura do anel C via uma reação retro-Diels-Alder (figura 68) (Lima *et al.*, 2020; Jeong *et al.*, 2012), corroborando desse modo com as atribuições realizadas por RMN. Pelas análises de RMN de 1H , HSQC, HMBC, EM e comparação com os dados relatados em literatura (Costa *et al.*, 2015), foi possível identificar A4.6.1 como sendo o alcaloide conhecido como discretamina.

Figura 67: Perfil de fragmentação para o íon de m/z 328.

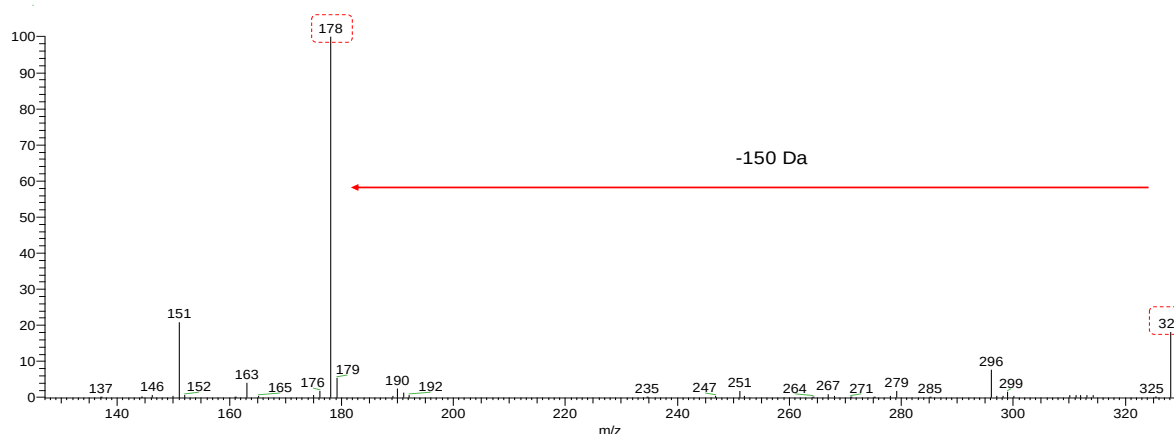
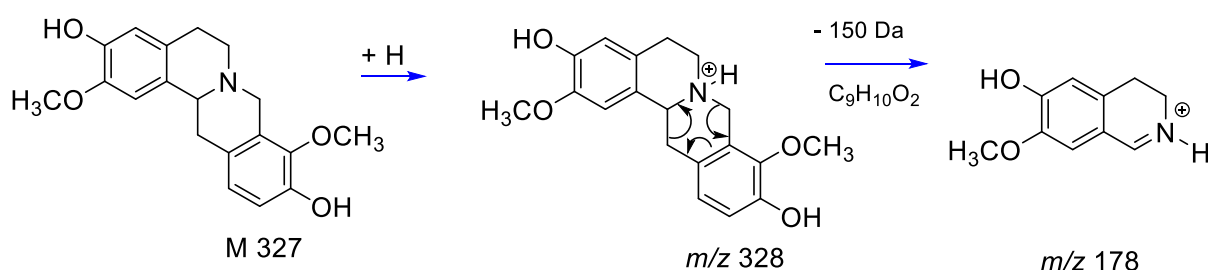


Figura 68: Proposta de fragmentação para o íon de m/z 328.



5.2.6 Determinação estrutural da amostra AAGFA 2.7

A amostra AAGFA 2.7 (1,7 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom e quando submetido ao revelador anisaldeído apresentou uma coloração azul intenso. A análise realizada por CG/EM (figura 69 e 70) evidenciou a presença de um pico majoritário em 41,27 min com íon molecular de m/z 238 Da compatível com a fórmula molecular C₁₅H₂₆O₂, que evidenciou a possibilidade de um terpeno pertencente a subclasse dos sesquiterpenos.

Figura 69: Cromatograma de íons totais (TIC) de AACRFA 2.7 obtido por CG/EM.

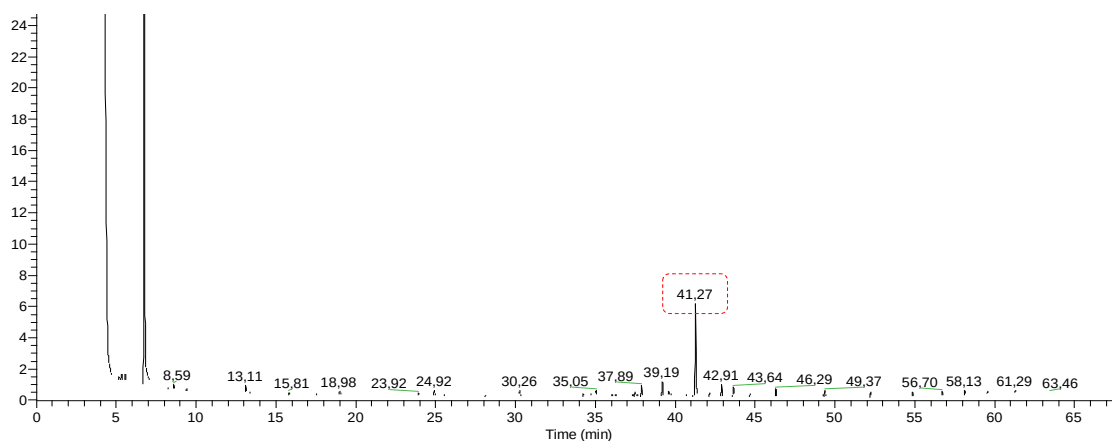
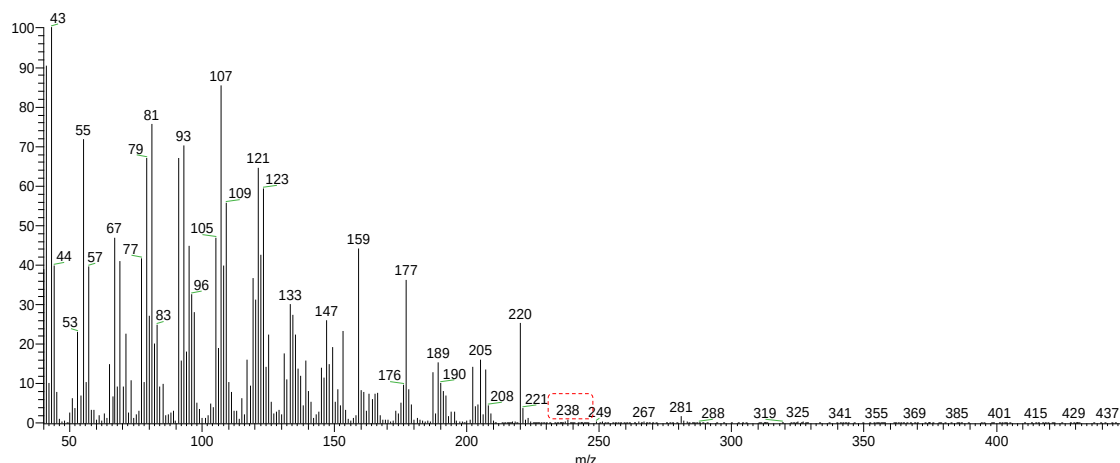


Figura 70: Espectro de massas de AACRFA 2.7

A comparação com os dados da biblioteca o aparelho (WILEY e NIST) não sugeriu nenhuma estrutura para a substância e nem foi possível encontrar na literatura pelo cálculo do índice de retenção (1862) quando comparado com o livro do ADAMS (2007).

A análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (figura 71 e 72) foram observados sinais característicos de hidrogênios olefínicos em δ 5,02 (1H, *d*, $J = 1,1$ Hz) e δ 4,74 (1H, *d*, $J = 1,1$ Hz), cinco sinais de hidrogênios metínicos, dos quais, dois com deslocamento em δ 3,42 (1H, *dd*, $J = 11,5$ e 4,7 Hz) e δ 3,69 (1H, *t*, $J = 9,9$ e 19,6 Hz) característico de hidrogênio ligado a carbono oxigenado, dois sinais δ 1,3 (*m*) e δ 1,75 (2H, *d*, $J = 9,9$ Hz) e um sinal δ 2,24 (2H, *m*) indicativo da presença de um grupo isopropil, que sustenta dois grupos metilas com deslocamento δ 0,92 (4H, *d*, $J = 7,0$ Hz) e δ 0,87 (4H, *d*, $J = 7,0$ Hz). Um sinal com deslocamento em δ 0,72 (3H, *s*) foi atribuído a um terceiro grupo metila. Na região de hidrogênios metilênicos foram observados sinais que foram atribuídos com base no mapa de correlação HSQC.

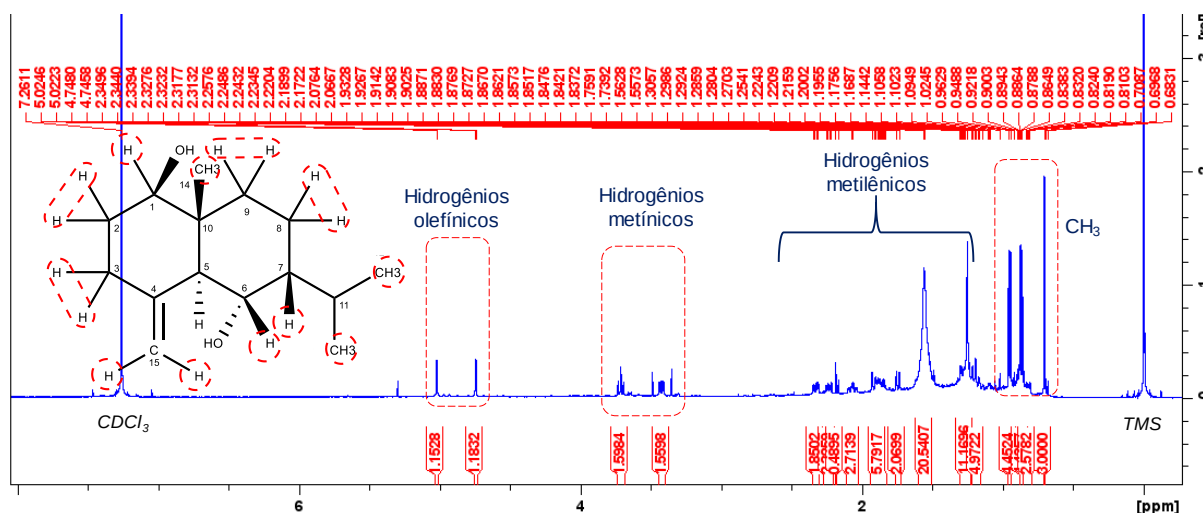
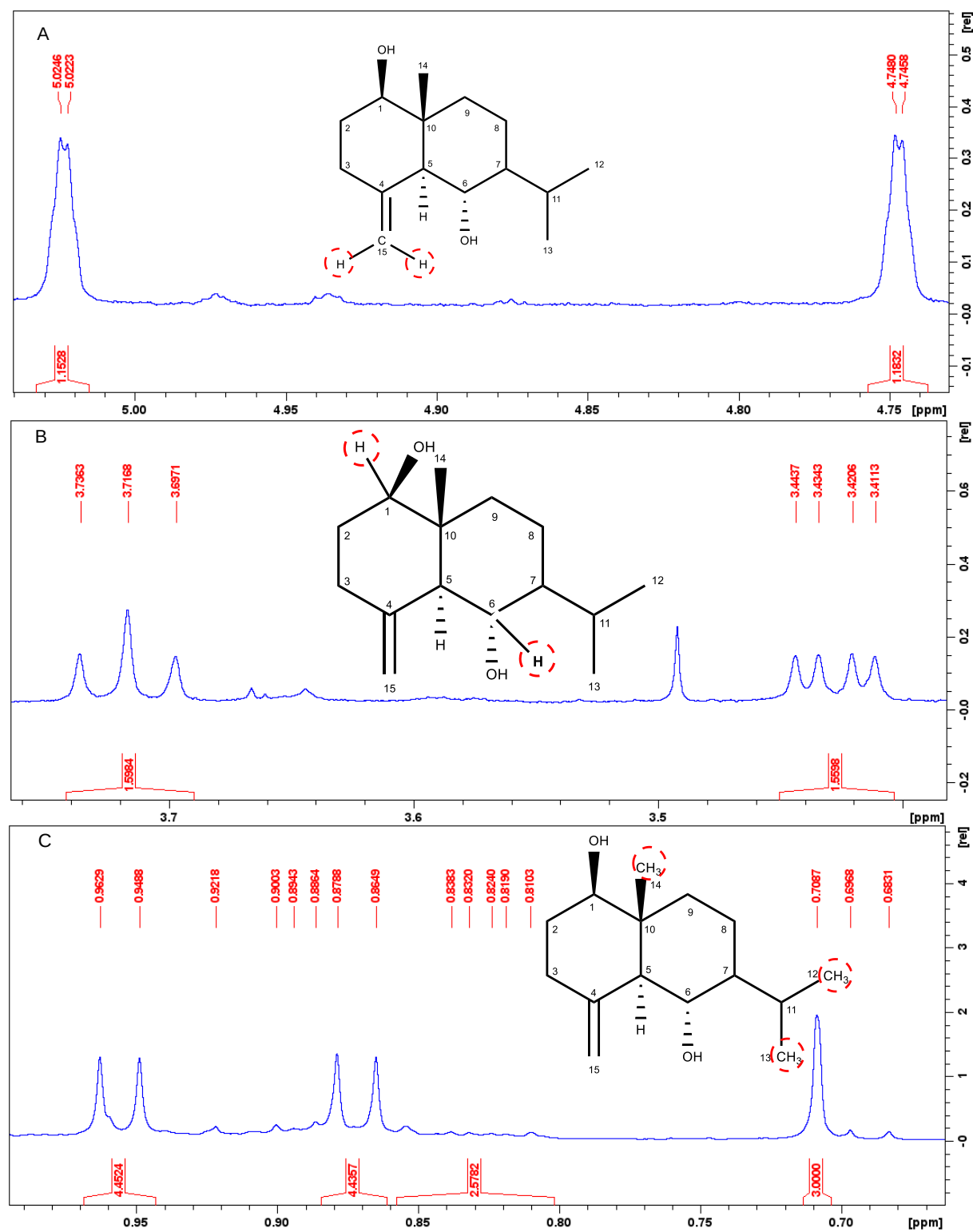
Figura 71: Espectro de RMN ^1H da amostra AACRFA 2.7

Figura 72: Ampliação do espectro de RMN de ^1H , olefínicos, metínicos e metílicos.



A análise dos espectros de RMN de ^{13}C e DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) (Figura 73 e 74) evidenciou características de um sesquiterpeno. Foi verificada a presença de 15 átomos de carbono, dois sinais de carbono oxigenado δ 79,0 e δ 66,9, e uma ligação dupla em δ 107,8 e δ 146,2 confirmando a presença do grupo metilênico terminal. Observaram-se ainda três sinais de carbono metílicos em δ 21,4 δ 16,1 e δ 11,5 atribuídos a C-12, C-13 e C-14 respectivamente. Foi observado quatro sinais referentes a carbono metilênicos em δ 31,9 (C-2), δ 35,0 (C-3), δ 18,1 (C-8), δ 36,2 (C-9), cinco sinais em δ 79,0 (C-1), δ 55,8 (C-5), δ 66,9 (C-6), δ 49,3 (C-7) e δ 26,0 (C-11) atribuídos aos carbonos metínicos, bem como dois sinais em δ 146,2 (C-4) e δ 41,6 (C-10), pertencentes a carbonos quaternários. Com base na análise de RMN de ^{13}C e DEPT 135, foi possível determinar todos os carbonos, assim como os grupos presentes na estrutura da molécula.

Figura 73: Espectro de RMN de ^{13}C desacoplado (125 MHz, CDCl_3) de AACRFA 2.7

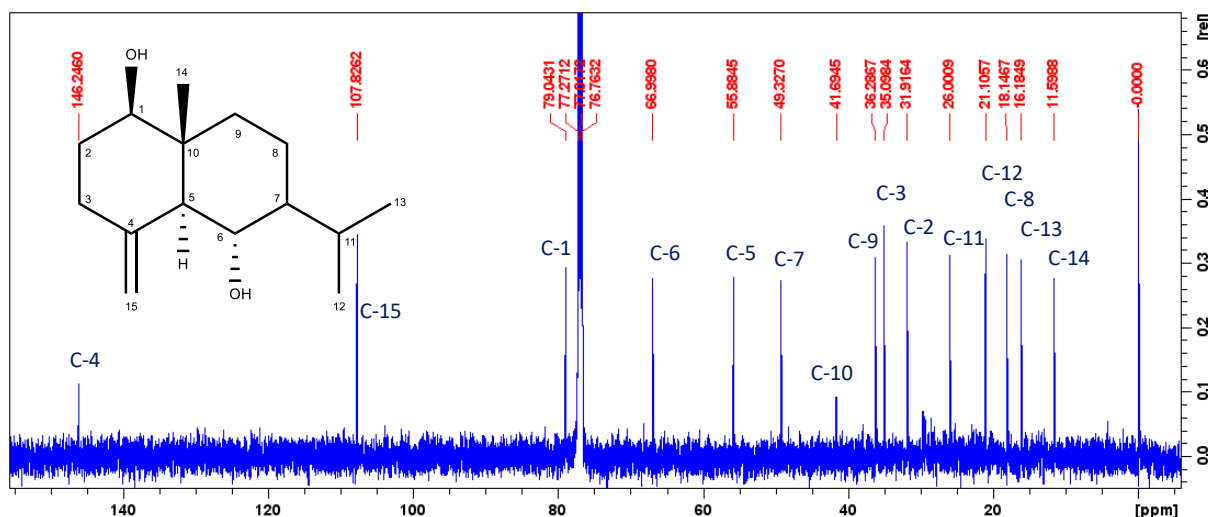
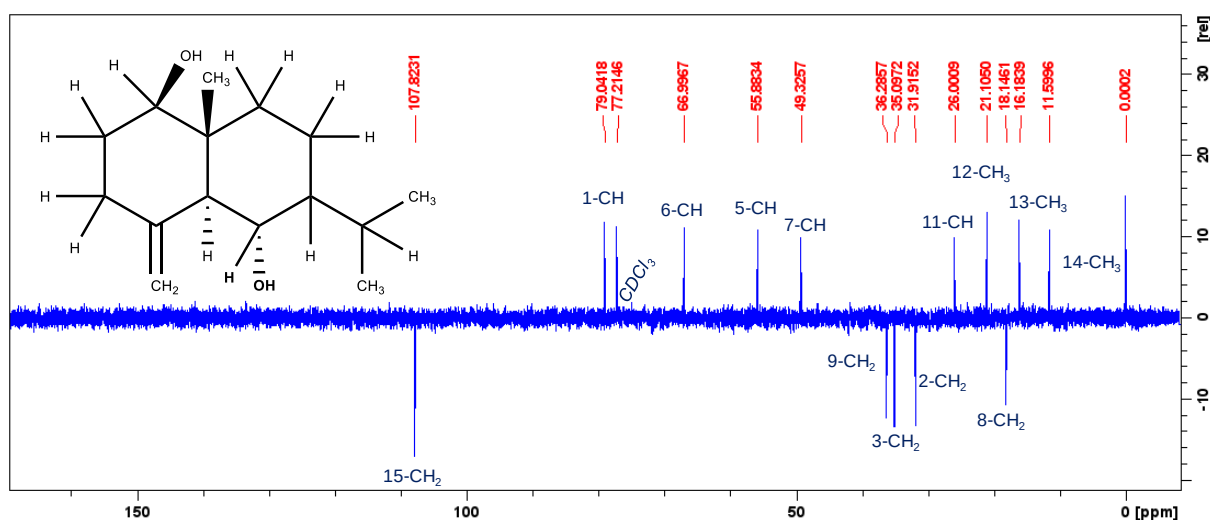


Figura 74: Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 (125 MHz, CDCl_3) de AACRFA 2.7



Pela análise dos mapas de correlação HSQC (Figura 75) e HMBC (Figura 76) pode-se verificar a correta posição dos grupos metílicos na estrutura da substância, através da correlação do sinal em δ 0,87 (H-12) com o carbono δ 16,1 (C-12), esse mesmo sinal correlacionava a 3J com os carbonos δ 21,4 (C-13), δ 49,3 (C-7) e a 2J com δ 26,0 (C-11), o sinal com deslocamento em δ 0,92 (H-13) estava com o carbono em δ 21,4 (C-13), e correlacionando-se a 3J com os carbonos em δ 16,1 (C-12) e δ 49,3 (C-7), a 5J com δ 36,2 (C-9) e a 2J com o carbono em δ 26,0 (C-11). O sinal em δ 0,71 (H-14) estava δ 11,5 (C-14), que correlacionavam-se a 3J com δ 36,2 (C-9), δ 55,8 (C-5) e δ 79,0 (C-1), também estava a 2J com o carbono δ 41,6 (C-10).

Figura 75: Ampliação do mapa HSQC da região de metilas de AACRFA 2.7

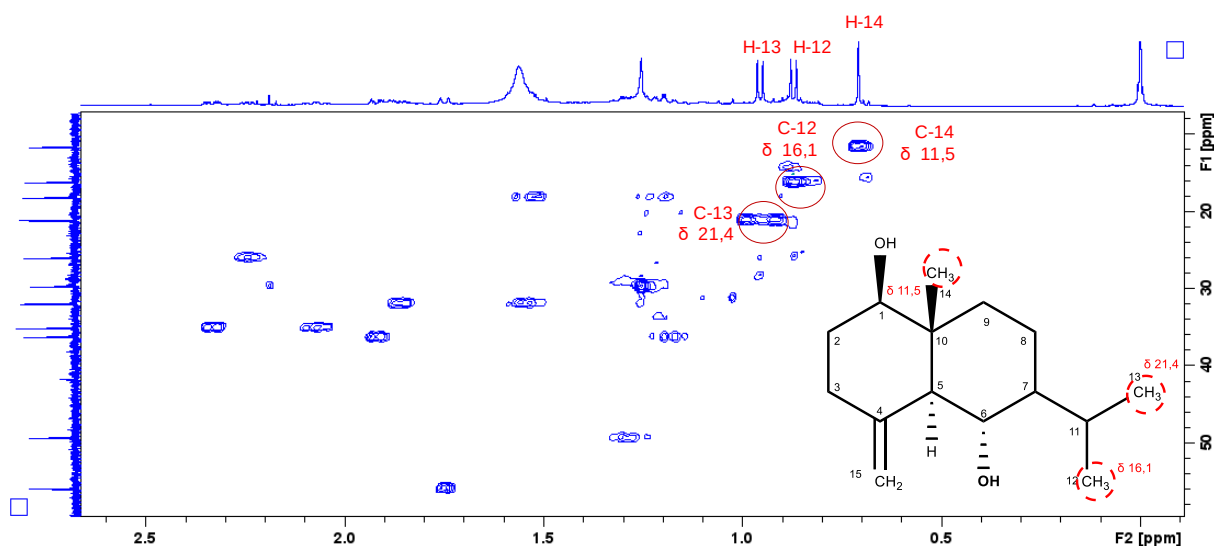
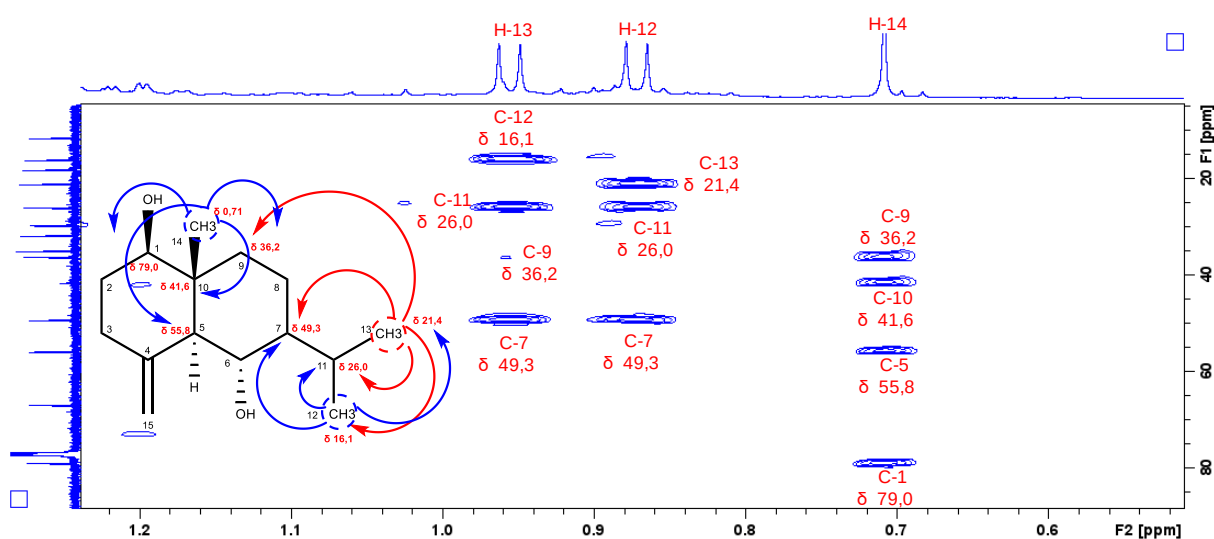


Figura 76: Mapa de correlação HMBC na região de metilas de AACRFA 2.7



Os grupos metilênicos foram atribuídos com base na correlação do sinal δ 1,84 (H-2) e δ 1,54 (H-2) com o carbono δ 31,9 (C-2), o sinal em δ 2,0 (H-3) e δ 2,32 (H-3) estavam com δ 35,0 (C-3), o sinal em δ 1,92 (H-14) e δ 1,16 (H-14) com o carbono em δ 36,2 (C-14) e o sinal em δ 1,19 (H-8) e δ 1,51 (H-8) correlacionando com o carbono em δ 18,1 (C-8) (figuras 77 e 78).

Figura 77: Ampliação do mapa HSQC da região de hidrogênios e carbonos metilênicos de AACRFA 2.7

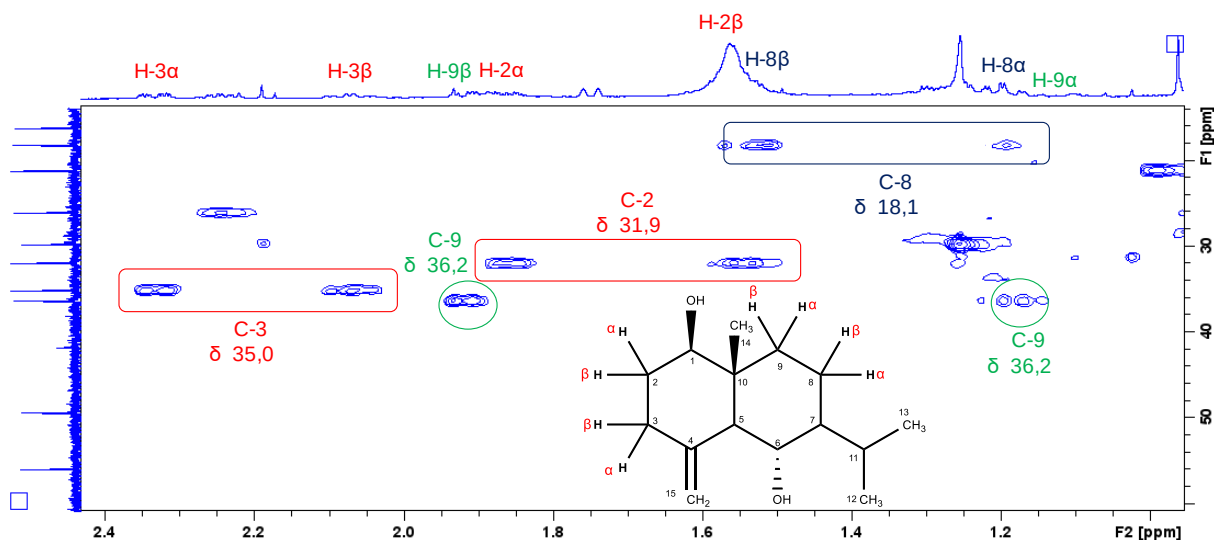
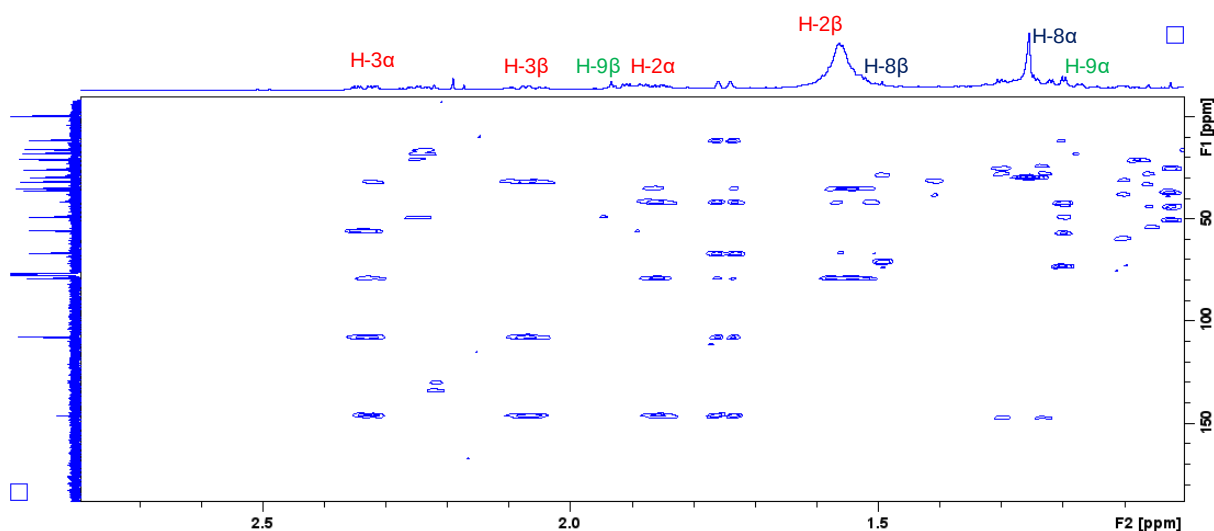


Figura 78: Mapa de correlação HMBC na região de metilênos de AACRFA 2.7



Os grupos metínicos (figuras 79 e 80) foram confirmados através do sinal em δ 3,42 (H-1) com o carbono δ 79,0 (C-1) que correlacionavam-se a 3J com os carbonos em δ 11,5 (C-14) e δ 36,2 (C-9), o sinal em δ 1,75 (H-5) com δ 55,8 (C-5) estava a 3J com δ 11,5 (C-14), δ 107,7 (C-15) e a 2J 146,2 (C-4) e δ 41,6 (C-10), o sinal δ 1,30

(H-7) com δ 49,3 (C-7), e a 2J δ 26,0 (C-11), o sinal em δ 2,24 (H-11) com δ 26,0 (C-11) e a 3J com os carbonos em δ 16,1 (C-12) e 18,1 (C-8) e a 2J com δ 49,3 (C-7) e 21,4 (C-13). A presença de uma ligação dupla exocíclica foi confirmada pelos sinais em δ 5,02 e δ 4,74 com o carbono em δ 107,8 (C-15) e correlacionavam-se a 3J com os carbonos em δ 35,0 (C-3) e δ 55,8 (C-5) (figuras 81 e 82). As informações obtidas pelas análises acima e comparadas com os dados da literatura corroboram com a estrutura de uma substância pertencente a classe dos terpenos, em específico um sesquiterpeno denominado de 1 β ,6 α -Diidroxí-4(15)-eudesmeno (González *et al.*, 1989; Sun, *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2007).

Figura 79: Ampliação do mapa HSQC da região de hidrogênios e carbonos metínicos de AACRFA 2.7

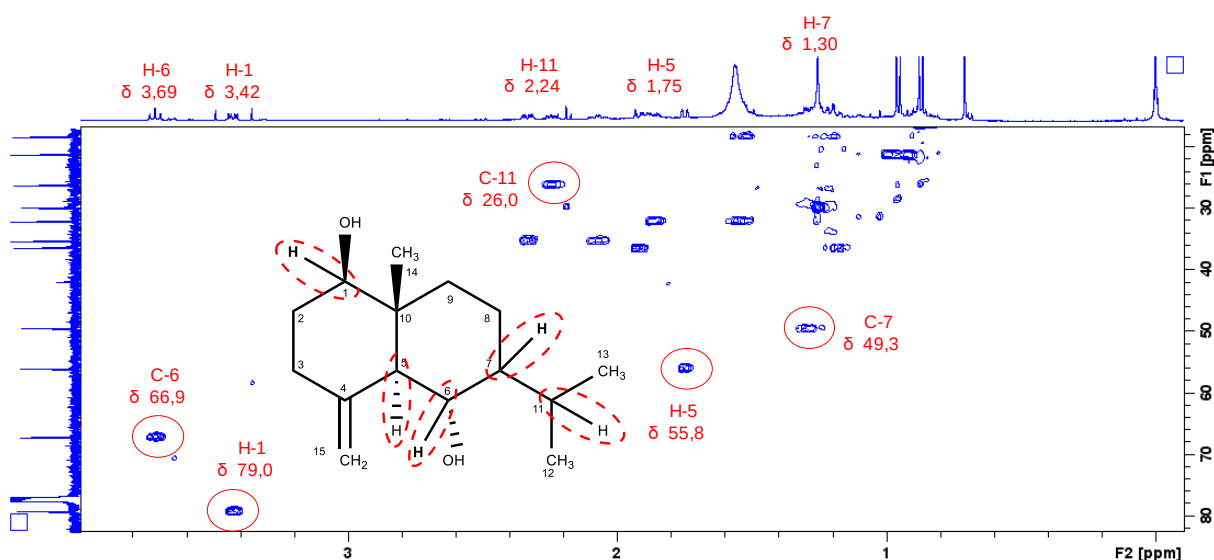


Figura 80: Mapa de correlação HMBC na região de hidrogênios e carbonos metínicos de AACRFA 2.7

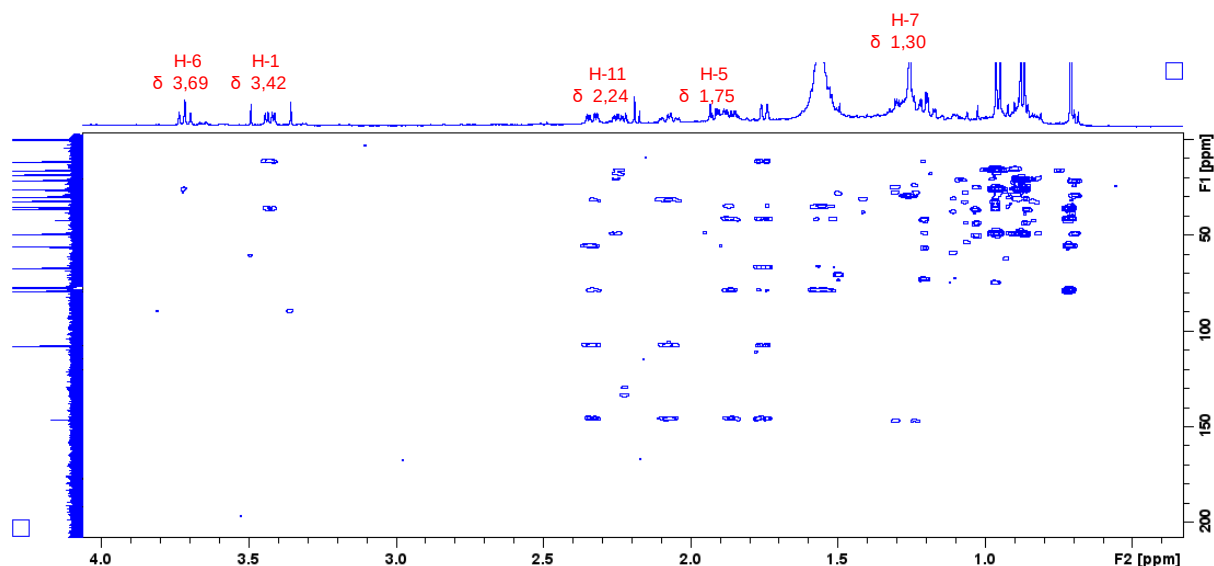
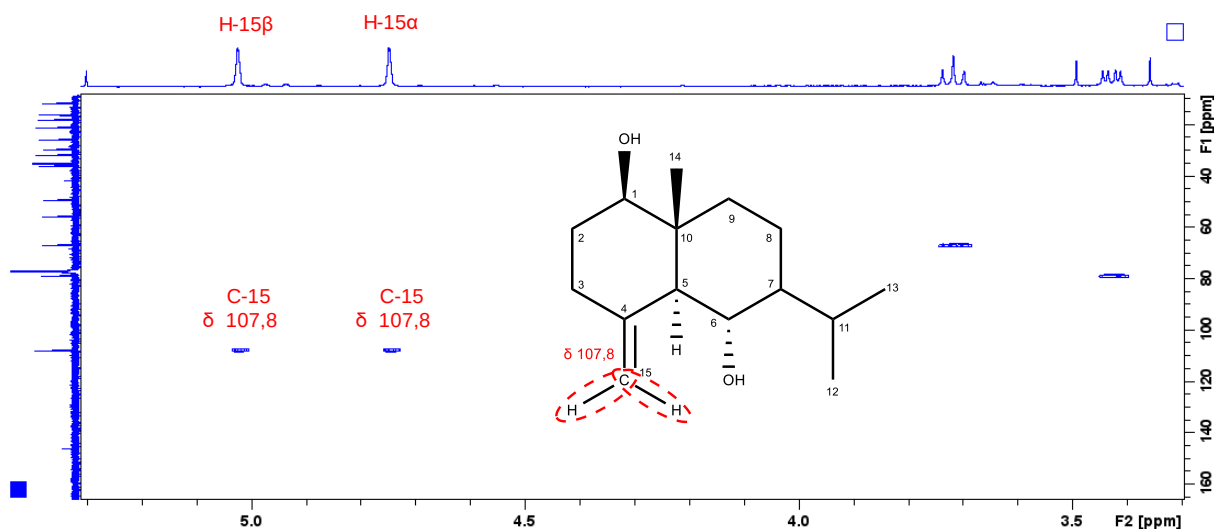
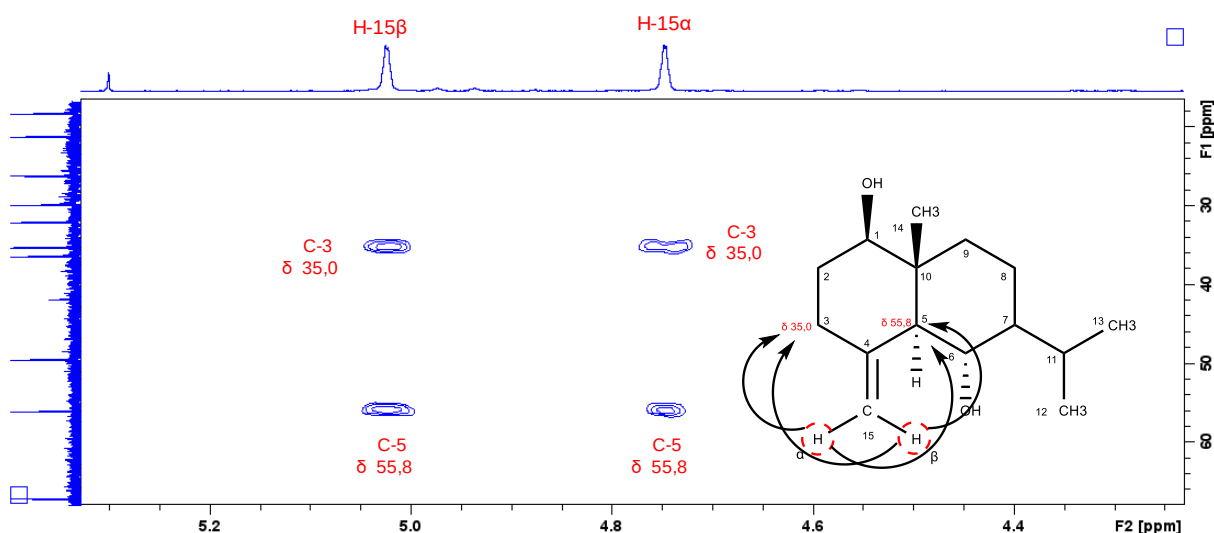


Figura 81: Mapa de correlação HSQC da amostra AACRFA 2.7**Figura 82:** Mapa de correlação HMBC de AACRFA 2.7

Na tabela 10 são apresentados os dados completos de RMN ^1H e ^{13}C e do HMBC. A partir da comparação dos dados obtidos, com os existentes na literatura (González *et al.*, 1989; Sun, *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2007) foi possível identificar a amostra AACRFA 2.7 como sendo o sesquiterpeno 1β , 6α -Diidrox-4 (15)-eudesmeno. De acordo com o levantamento realizado na base de dados *SciFinder*, este sesquiterpeno já foi anteriormente descrito em espécies da família Annonaceae como *Xylopia emarginata* (Moreira *et al.*, 2007) e *Oxandra sessiliflora* (SOUSA *et al.*, 2020), no entanto é descrito pela primeira vez no gênero *Annona*, assim como, para a espécie *A. amazonica*.

Tabela 10: Dados de RMN ^1H , ^{13}C e HMBC da amostra AACRFA 2.7

Posição	AACRFA 2.7			1 β , 6 α -Diidrox-4 (15)-eudesmeno	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^c	^{13}C (δ) ^c
1	3,42 (1H, <i>dd</i> , 11,5; 4,7)	79,0	11,5; 36,2	3,42, (<i>dd</i> , 11,7; 4,8)	79,1
2 α	1,84 (<i>m</i>)	31,9	(41,6; 35,0; 79,0; 146,2)	1,85 (<i>m</i>)	32,0
2 β	1,54 (<i>m</i>)		(35,0; 79,0)	1,53, (<i>qd</i> , 11,7; 5,0)	
3 α	2,32 (<i>m</i>)	35,0	(31,9; 55,8; 79,0; 107,8; 46,2)	2,35 (<i>m</i>)	35,2
3 β	2,06 (<i>m</i>)		(107,8; 31,9; 146,2)	2,09 (<i>m</i>)	
4	-----	146,2	-----	-----	146,3
5	1,75 (2H, <i>d</i> , 9,9)	55,8	11,5; 41,6; 66,9; 107,8; 146,2	1,75 (<i>d</i> , 9,8)	55,9
6	3,69 (1H, <i>t</i> , 9,9)	66,9	26,0; 49,3	3,71 (<i>td</i> , 9,8; 1,7)	67,1
7	1,30 (<i>m</i>)	49,3	26,0	1,30 (<i>m</i>)	49,4
8 α	1,19 (<i>m</i>)	18,1	(41,6; 49,3; 55,8)	1,25 (<i>m</i>)	18,2
8 β	1,51 (<i>m</i>)		(41)	1,53 (<i>m</i>)	
9 α	1,16 (<i>m</i>)	36,2	(18,1)	1,20 (<i>m</i>)	36,4
9 β	1,92 (<i>m</i>)		(CNO)	1,90 (<i>m</i>)	
10	-----	41,6	-----	-----	41,8
11	2,24 (<i>m</i>)	26,0	49,3; 16,1; 18,1; 21,4	2,25, (<i>sept</i> , <i>d</i> , 7,0; 2,4)	26,1
12	0,87 (4H, <i>d</i> , 7,0)	16,1	21,4; 26,0; 49,3	0,87 (<i>d</i> , 7,0)	16,2
13	0,92 (4H, <i>d</i> , 7,0)	21,4	16,1; 26,0; 36,2; 49,3	0,95 (<i>d</i> , 7,0)	21,2
14	0,71(3H, <i>s</i>)	11,5	36,2; 41,6; 55,8; 79,0	0,70 (<i>s</i>)	11,7
15 α	4,74 (1H, <i>d</i> , 1,1)	107,8	(35,0; 55,8)	4,74 (<i>d</i> , 1,1)	107,9
15 β	5,02 (1H, <i>d</i> , 1,1)		(35,0; 55,8)	5,02 (<i>d</i> , 1,1)	

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

^bOs carbonos hidrogenados e quaternários foram assinalados por meio dos dados de ^{13}C , HSQC e HMBC, respectivamente.

^cDados da literatura de acordo Sun *et al.*, 2004 (^1H : 500 MHz, CDCl_3 ; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3); (δ) deslocamentos em ppm.

CNO-Correlação não observada.

5.3 Estudo da atividade citotóxica dos extratos brutos e frações provenientes das cascas dos ramos de *A. amazonica*

A inibição da proliferação celular é essencial para controlar o crescimento desordenado de células no organismo, e é um indicador da citotoxicidade provocada pelos extratos, frações e substâncias testados e avaliados quanto à capacidade antitumoral.

Na tabela 11, são apresentados os resultados dos extratos brutos hexânico e metanólico das cascas dos ramos de *Annona amazonica*, bem como das frações neutra e alcaloídica provenientes do tratamento ácido-base do extrato metanólico no ensaio de citotoxicidade em concentração única de 50 µg/mL, frente às linhagens de células tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HCT116 (carcinoma de cólon humano).

De acordo com o protocolo estabelecido pelos pesquisadores do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Salvador, Bahia, são considerados ativas as amostras que inibirem cerca de 75% da proliferação das células tumorais para dar continuidade à investigação do cálculo de CI_{50} das células tumorais testadas.

Conforme observado na tabela 11, nenhum dos extratos e frações inibiram pelo menos 75% da proliferação das células tumorais HepG2 e HCT116 indicando uma baixa atividade. Por outro lado, observa-se que à medida que foram realizadas partições, como o tratamento ácido-base do extrato metanólico (AAEMCR) rendendo as frações neutra (AAEMCR-FN) e alcaloídica (AAEMCR-FA), a atividade citotóxica aumentou, sendo seletiva para a fração alcaloídica (AAEMCR-FA) com 67,40% de inibição de proliferação celular para HCT116 e 54,47% para HepG2, contra 15,16% e 5,19%, respectivamente observado para o extrato metanólico bruto (AAEMCR), podendo ser considerada uma atividade moderada. A fração neutra (AAEMCR-FN), foi considerada inativa para todas as células apresentadas pois sua capacidade de inibição de proliferação celular não foi significativa, dessa forma não foi possível estimar a concentração inibitória (IC_{50}).

Vale ressaltar também que durante o tratamento ácido-base, parte da fração neutra (AAEMCR-FN) acabou passando para a fração alcaloídica (AAEMCR-FA), prejudicando de certa forma a eficiência do tratamento ácido-base, diminuindo assim a atividade citotóxica da fração de interesse. Neste caso, a fração neutra (AAEMCR-

FN) não foi ativa, com inibição da proliferação celular abaixo de 5,5%, muito inferior a inibição da proliferação das células tumorais da fração alcaloídica que ficou entre 54% a 67% para HepG2 e HCT116. Isso indica que, possivelmente, a fração alcaloídica possa conter substâncias com promissoras atividades citotóxicas, as quais algumas foram investigadas de acordo com o seu isolamento, identificação e pureza.

Tabela 11: Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais em concentração única de 50 µg/mL.

<i>Extrato/Fração</i>	<i>% percentagem de inibição</i>	
	HepG2	HCT116
AAEHCR	24,59 ± 5,59	20,93 ± 9,04
AAEMCR	15,16 ± 5,02	5,19 ± 6,59
AAEMCR-FA	54,47 ± 1,61	67,40 ± 2,7
AAEMCR-FN	9,39 ± 1,55	10,42 ± 1,87
Dexorubicina *	99,18 ± 1,74	87,09 ± 2,86

A tabela apresenta as porcentagens de inibição celular ± erro padrão da média de dois experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com a célula HCT116 (carcinoma de cólon humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). As amostras foram testadas na concentração de 50 µg/mL (extratos e frações). Doxorubicina (DOX) foi usada como controle positivo. Compostos com inibição acima de 75% são considerados ativos.

5.4 Investigação da atividade citotóxica das substâncias isoladas das cascas dos ramos de *A. amazonica*

Na tentativa de encontrar os prováveis alcaloides responsáveis pela atividade citotóxica moderada verificada na fração alcaloídica, os alcaloides isolados e que não apresentavam estudos de citotoxicidade na literatura foram submetidos ao ensaio de atividade citotóxica com as linhagens tumorais, HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), B16-F10 (melanoma murino) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano), testadas na dose máxima de 25 µg.mL⁻¹.

Na tabela 12 são apresentados os resultados da atividade citotóxica das substâncias testadas. Segundo descrito na literatura, extratos com valores de IC₅₀ < 30 µg/mL e compostos puros com IC₅₀ < 4 µg/mL são considerados promissores (Suffness; Pezzuto, 1990; Boik, 2001).

De acordo com os dados descritos na tabela, apenas a substância *N*-metil-actinodafinina, foi ativa frente a capacidade antitumoral *in vitro* com promissora atividade frente as células HCT116 e B16-F10, com destaque para HCT116 com

valores de CI_{50} abaixo de 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Por outro lado, a substância também foi citotóxica para as células sadias MRC-5 com valores semelhantes aos obtidos para B16-F10, indicando uma seletividade frente a HCT116. Vale salientar que a linhagem MRC-5 é de células sadias e, portanto, quanto maior o valor CI_{50} , melhor o resultado. O ideal é uma substância que seja citotóxica para as células cancerígenas e não-tóxica para as células sadias ou normais.

Tabela 12: Valores de CI_{50} para a atividade citotóxica *in vitro* em linhagens de células tumorais e não tumorais das substâncias isoladas das cascas dos ramos de *A. amazonica*.

Substâncias	CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
	HepG2	HCT116	B16-F10	MRC-5
Discretamina	> 25	> 25	> 25	> 25
N-metil-actinodafinina	N.A	4,27 3,27 – 5,59	10,01 8,48 – 11,81	12,16 8,62 – 17,17
Dicentrinona	> 25	> 25	> 25	> 25
DOX	0,02 0,01 – 0,13	0,50 0,31 – 0,82	0,16 0,13 – 0,21	1,42 0,22 – 2,12

A tabela apresenta os valores de IC_{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 HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), 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. N.A. (não avaliado devido a viabilidade célula – contaminação celular).

Vale ressaltar que o alcaloide nordicentrina e o sesquiterpeno (1 β , 6 α -Diidroxi-4 (15)-eudesmeno), serão enviados para verificar sua atividade citotóxica. O alcaloide liriodenina não foi avaliado, pois já possui relatos na literatura com promissora atividade citotóxica frente a diferentes linhagens de células tumorais (Silva *et al.*, 2007a).

A família Annonaceae é conhecida por suas características medicinais, tais como: antiplasmodial, antiinflamatório, antimicrobiana, neuroprotetora, antioxidante e antitumoral (Larrotta e Baqueiro, 2018). Essas características biológicas podem ser atribuídas à classe dos alcaloides, substâncias que possuem uma grande variedade de atividades farmacológicas descritas na literatura (Costa *et al.*, 2015). Dentre as atividades mencionadas, a citotóxica é a mais representativa para a classe dos alcaloides, tendo demonstrado resultados promissores em diferentes linhagens de células tumorais.

Diversas pesquisas têm se concentrado na classe dos alcaloides aporfinoídes, com o objetivo de compreender a relação entre a estrutura-atividade e os mecanismos anticâncer para esses alcaloides. Liu *et al.*, (2013) destacaram que grupo 1,2-

metilenodioxí e a metilação do nitrogênio são elementos cruciais que influenciam a citotoxicidade desses alcaloides.

A atividade observada para o alcaloide *N*-metil-actinodafinina, assim como na fração alcaloídica, pode ser atribuída aos alcaloides aporfinoides, especialmente aqueles com o esqueleto oxoaporfino. Isso sugere que a presença da função oxo pode contribuir para essa atividade, possivelmente devido à conjugação estrutural que confere uma conformação planar à molécula. Essa planaridade conformacional é um dos fatores que contribuem para a eficácia citotóxica, inibindo a proliferação celular (Wu *et al.*, 1989; Silva *et al.*, 2007a). Em contraste, a remoção da função oxo, como observado na discretamina, resultou em uma redução significativa da atividade inibitória, exibindo baixa citotoxicidade entre os alcaloides aporfinos.

Além disso, os estudos indicam que os alcaloides aporfinos contendo um grupo 1,2-metilenodioxí demonstraram efeitos citotóxicos promissores contra linhagens de células tumorais testadas, sugerindo que esse grupo funcional é um dos elementos-chave para sua bioatividade (Wu *et al.*, 1989).

São imprescindíveis novas investigações para determinar a eficácia real e a toxicidade dos alcaloides estudados. Existem relatos na literatura sobre efeitos citotóxicos promissores associados aos esqueletos moleculares identificados, sugerindo um potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais derivados de fontes vegetais.

5.5 Relação quimiofenética

Por meio do nosso estudo fitoquímico com a espécie *A. amazonica*, através das técnicas cromatográficas usuais e das técnicas espectroscópicas e espectrométricas modernas, foi possível realizar o isolamento e identificação de seis substâncias das cascas dos ramos, sendo três inéditas no gênero e espécies (nordicentrina, dicentrinona e 1 β ,6 α -Diidroxí-4(15)-eudesmeno), duas já descritas para a espécie (*N*-metil-actinodafinina e liriodenina) e uma já relatada no gênero, porém inédita na espécie (discretamina).

Algumas das substâncias isoladas e identificadas são frequentemente encontradas em outras espécies do gênero *Annona*, bem como em outros gêneros da família Annonaceae, como *Duguetia*, *Guatteria*, *Polyalthia* e *Xylopia* (Puvanendran *et al.*, 2008; Costa, 2009a; Paz *et al.*, 2019; Santos *et al.*, 2017). Portanto, essas

substâncias podem contribuir significativamente para o conhecimento quimiofenético das espécies que compõem a família Annonaceae.

De acordo com a revisão bibliográfica e busca na plataforma *SciFinder*, o alcaloide dicentrinona já foi descrito para os gêneros *Guatteria*, *Duguetia* e *Xylopi* (Hocquemiller; Cavé, 1983; Silva *et al.*, 2007b; Puvanendran *et al.*, 2008, Paz *et al.*, 2019). O alcaloide nordicentrina foi descrito para o gênero *Guatteria* e *Xylopi* (Hocquemiller; Cavé, 1983; Puvanendran *et al.*, 2008). O sesquiterpeno 1 β , 6 α -Diidrox-4 (15)-eudesmeno já foi descrito para *Xylopi emarginata* (Moreira *et al.*, 2007) e *Oxandra sessiliflora* (Sousa *et al.*, 2020).

Na tabela 13 são apresentados os alcaloides isolados da espécie estudada, mostrando que o estudo fitoquímico têm uma grande relevância quimiofenética no gênero *Annona*, já que a família é caracterizada pela predominância de certos tipos de metabólitos secundários, como alcaloides e terpenos que podem ser encontrados em diversas espécies, gêneros e famílias do reino *Plantae*.

Tabela 13: Importância quimiofenética dos alcaloides isolados de *A. amazonica*.

Substâncias	Espécies	Referências
Nordicentrina	NRG	<i>SciFinder</i>
Dicentrinona	NRG	<i>SciFinder</i>
Discretamina	<i>Annona reticulata</i> <i>Annona pickelii</i>	Xu <i>et al.</i> , 1992 Costa <i>et al.</i> , 2015
N-metil-actinodafinina (Cassiticina)	<i>Annona amazonica</i> <i>Annona glabra</i>	Pinheiro <i>et al.</i> , 2009 Yang; Chen; Kuan (1971)
Liriodenina	<i>Annon foetida</i>	Costa <i>et al.</i> , 2006.
	<i>Annona glabra</i>	Warthen; Gooden; Jacobson (1969)
	<i>Annona diversifolia</i>	Chacón e González-Esquinca (2012)
	<i>Annona montana</i>	Wu <i>et al.</i> , (1993)
	<i>Annona cherimola</i>	Chen; Chang; Wu (1997)
	<i>Annona pickelii</i>	Costa <i>et al.</i> , (2015)
	<i>Annona mucosa</i>	Lima <i>et al.</i> , (2012)
	<i>Annona amazonica</i>	Pinheiro <i>et al.</i> , (2009).
1 β ,6 α -Diidrox-4(15)eudesmeno	NRG	<i>SciFinder</i>

NRG-Não há registros no gênero

6 CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico da fração alcaloídica (AAEMCR-FA) obtida do extrato metanólico (AAEMCR) das cascas dos ramos de *A. amazonica* resultou no isolamento de seis substâncias, sendo cinco delas alcaloides e uma pertencente à classe dos terpenos. Dentre estas, os alcaloides liriodenina e *N*-metil-actinodafinina já foram descritos para a espécie em estudo, enquanto dicentrinona, nordicentrina e o sesquiterpeno 1 β ,6 α -Diidrox-4(15)-eudesmeno são considerados inéditos tanto no gênero quanto na espécie estudada e discretamina e inédita na espécie.

Os extratos (metanólico e hexânico) e frações (alcaloídica e neutra) foram submetidos aos ensaios de atividade citotóxica utilizando o ensaio do Alamar Blue. Entre as amostras avaliadas, a fração alcaloídica (AAEMCR-FA) exibiu os melhores resultados na porcentagem de inibição celular, com 67% para as células tumorais HCT116 e 54% para HepG2. Entre os alcaloides isolados e testados da fração alcaloídica, a *N*-metil actinodafinina apresentou os melhores resultados de atividade citotóxica contra as linhagens celulares HCT116, B16-F10 e HepG2, com valores de Cl_{50} de 4,27, 10,01 e 12,16 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

Os resultados deste estudo confirmam que a espécie *A. amazonica* é quimicamente típica da família Annonaceae e uma fonte promissora de substâncias biologicamente ativas. Os dados também contribuem significativamente para o conhecimento quimiofenético da família, uma vez que as substâncias isoladas e identificadas neste trabalho são encontradas em diversos gêneros dessa família, como *Annona*, *Guatteria*, *Xylopia*, *Oxandra*, entre outros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry, ed. 4.1. 2007.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known a medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p.114-140, 2007.

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.

ALCÂNTARA, J. M; FACANALI, R; MARQUES, M. O. M; LIMA, M. P. Composição química dos óleos essenciais de *Annona amazonica*. **VII SBOE - Simpósio Brasileiro de óleos essenciais**. Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), 2013.

ALMEIDA, J.R.G.S; ARAÚJO, 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, 2014.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N; NEMATOLLAHI, A; WIART, C. Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. **Journal of Asian natural products research**, v. 13, n. 05, p. 465-476, 2011.

ANDRADE, V; SAWADA, N. O; BARICHELLO, E. Qualidade de vida de pacientes com câncer hematológico em tratamento quimioterápico. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 47, p. 355-361, 2013.

ARAÚJO, C. S; OLIVEIRA, A. P; LIMA, R. N; ALVES, P. B; DINIZ, T. C; ALMEIDA, J. R. G. S. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from leaves of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, n. 43, p. 615, 2015.

BADKE, M. R., SOMAVILLA, C. A., HEISLER, E. V., ANDRADE, A., BUDÓ, M. D. L. D., GARLET, T. M. B., & LAUTENSCHLEGER, G. Saber popular: uso de plantas medicinais como forma terapêutica no cuidado à saúde. **Rev enferm UFSM**, v. 6, n. 2, 2016.

BARATA, L. E. S; ALENCAR, A. A. J; TASCONE, M; TAMASHIRO, J. **Plantas medicinais brasileiras**. IV. *Annona muricata* L. (Graviola). 2009.

BARBOSA, H; SILVA, R. L. C. G; COSTA-SILVA, T.A; TEMPONE, A. G; ANTAR, G. M; LAGO, J. H. G; CASELI, L. Interaction of dicentrinone, an antitrypanosomal aporphine alkaloid isolated from *Ocotea puberula* (Lauraceae), in cell membrane models at the air-water interface. **Bioorganic Chemistry**, v. 101, p. 103978, 2020.

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

BRITO, H. O; NORONHA, E. P; FRANÇA, L. M; BRITO, L. M. O; PRADO, M. S. A. Análise da composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *Annona squamosa* (ATA). **Revista Brasileira Farmacognosia**, v. 89, n. 3, p. 180-184, 2008.

BRITO, M. T; FERREIRA, R. C; BELTRÃO, D. M; MOURA, A. P. G; XAVIER, A. L; PITA, J. C .L. R; BATISTA, T. M; LONGATO, G. B; RUIZ, A. L. T. G; CARVALHO, J. E; MEDEIROS, K. C. P; SANTOS, S. G; COSTA, V. C. O; TAVARES, J. S; DINIZ, M. F. F. M; SOBRAL, M. V. Antitumor activity and toxicity of volatile oil from the leaves of *Annona leptopetala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28, p. 602-609, 2018.

CAMPOS, F.; BATISTA, R. L; BATISTA, C. L; COSTA, E. V; BARISON, A; DOS SANTOS, A. G; PINHEIRO, M. L. B. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36, n. 10, p. 804-806, 2008.

CAPELINHA, B. K. Propriedades farmacológicas da *Annona cherimola* Mill. **Dissertação de Mestrado**. Univerdidade de Coimbra, 2018.

CASTILLO-JUÁREZ, I.; GONZÁLEZ, V.; JAIME-AGUILAR, H.; MARTÍNEZ, G.; LINARES, E.; BYE, R.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **J. Ethnopharmacol**, v. 122, p. 402–405, 2009.

CHACÓN, I. C; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenina alkaloid in *Annona diversifolia* during early development. **Natural Product Research**. v. 26, p. 42-49, 2012.

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.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.

CHEN, C. Y; CHANG, F. R; WU, Y. C. The constituents from the stems of *Annona cherimola*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 44, n. 3, p. 313-319, 1997.

CHEN, C.-Y.; CHANG F.-R.; PAN. W.-B.; WU, Y.-C. Four alkaloids from *Annona cherimolia*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 753-757, 2001.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. IBDF, Rio de Janeiro, 1984.

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

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SALVADOR, M. J.; MAIA, B. H. L. N. S.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, p. 1180-1183, 2010.

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**, v. 69, p.292-294, 2006.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MARCHADO, G. M. C.; LEON, L. L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 78-81, 2009b.

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. 06, p. 769-776, 2015.

CRUZ, P. E. O.; COSTA, E. V.; MORAIS, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; VENDRAMIN, M. E.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G.; PRATA, A. P. N. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical systematics and ecology**, v. 39, n. 4-6, p. 872-875, 2011.

CUNHA, H. R.; CANTUÁRIA, P. C.; COSTA, E. V. M.; FARIAS, A. L. F.; MIRANDA JÚNIOR, J. P.; MOTA, L. J. T.; SOUZA, A. C. F.; CANTUÁRIA, P. C.; FARIAS, J. E.; ALMEIDA, S. S. M. S. Screening fitoquímico, análise citotóxica e antimicrobiana do extrato das folhas de *Annona muricata* L. (Annonaceae). **Científica Digital**, p. 208-219, 2021.

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

FALCÃO, M. A.; LLERAS, E.; KERR, W.E; CARREIRA, L. M. M. Aspectos fenológicos, ecológicos e de produtividade do biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.). **Acta Amazonica**, v. 11, p. 297-306, 1981.

FAVARETO, R.; TEXEIRA, M. B.; SOARES, F. A. L.; BELISÁRIO, C. M.; CABRAL, J. F.; SILVA, E. A.; MOIA, T. A.; CARDOZO-FILHO, L. Extraction of bioactive compounds of leaves of *Duguetia furfuracea* (annonaceae) using green and organic solvents. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 36, p. 549-556, 2019.

FEITOSA, E. M. A.; ARRIAGA, A. M. C.; SANTIAGO, G. M. P.; LEMOS, T. L. G.; OLIVEIRA, M. C. F.; VASCONCELOS, F. N.; LIMA, J. Q.; MALCHER, G. T.; NASCIMENTO, R. F.; BRAZ-FILHO, R. Chemical composition and larvicidal activity of *Rollinia leptopetala* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 2, p. 375-378, 2009.

FELÍCIO, R; OLIVEIRA, A. L. L.; DEBONSI, H. M. Bioprospecção a partir dos oceanos: conectando a descoberta de novos fármacos aos produtos naturais marinhos. **Ciência e Cultura**, v. 64, n. 3, p. 39-42, 2012.

FERRAZ, R.P.C; CARDOSO, G.M.B; SILVA, T; FONTES, J.E.N; PRATA, A.P.N; CARVALHO, A.A; MORAES, M.O; PESSOA, C; COSTA, E.V; BEZERRA, D.P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopia frutescens* Aubl.(Annonaceae). **Food chemistry**, v. 141, n. 1, p. 196-200, 2013.

FERREIRA, G; CHACÓN, I.DLC; BOARO, C.S.F; BARON, D; LEMOS, E.E.P. Propagation of Annonaceous plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, p. e-500, 2019.

FOURNIER, G; HADJIAKHOONDI, A; CHARLES, B; FOURNIAT, J; LEBOEUF, M; CAVE, A. Chemical and Biological Studies of *Xylopia aromatica* Stem Bark and Leaf Oils. **Planta medica**, v. 60, n. 03, p. 283-284, 1994a.

FOURNIER, G; HADJIAKHOONDI, A; LEBOEUF, M; CAVE, A; CHARLES, B; FOURNIAT, J. Volatile constituents of *Xylopia frutescens*, *X. pynaertii* and *X. sericea*: Chemical and biological study. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 3, p. 166-169, 1994b.

GONZÁLEZ, A. G; BARRERA, J. B; YANES, A. C; DÍAZ, J. G; PÉREZ, E. M. R. Chromenes and benzofurans from *Ageratina glechonophylla*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2520-2522, 1989.

HOCQUEMILLER, R. S; CAVÉ, R. A. Alcaloides Annonaceae XXXVII: alcaloides de *Guatteria scandens*. **Journal of natural products**, v. 46, n. 3, p. 335-341, 1983.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). **O que é câncer?** Rio de Janeiro, 2022. Disponível em: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/o-que-e-cancer>. Acesso em: 06.06.2024.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer**. 6. ed. Rio de Janeiro, 2020. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document/livro>. Acesso em: 06.06.2024.

INTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATISTICA (IBGE). **IBGE atualiza estatísticas das espécies ameaçadas de extinção nos biomas brasileiros**. 2023. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-noticias/2012-agenciade-noticias/noticias/36972-ibge-atualiza-estatisticas-das-especies-ameacadas-de-extincao-nos-biomas-brasileiros>. Acesso em: 12.12.2023.

JEONG, E; LEE, S.Y; YU, S. M; PARK, N. H; LEE, H; YIM, Y; HWANG, G; CHEONG, C; JUNG, J. H; HONG, J. Indetification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.26, p.1661-1674, 2012.

KOEK-NOORMAN, J; WESTRA, L.Y.T. Macrophotographic wood atlas of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 135-189, 2012.

KUO, R.Y; CHANG, F. R; CHEN, C.Y; TENG, C. M; YEN, H. F; WU, Y. C. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, n. 3, p. 421-425, 2001.

LARROTA, H. R; BAQUERO, L. C. P. Antioxidant activity of ethanolic extracts and alkaloid fractions from seeds of three species of *Annona*. **Pharmacologyonline**, v. 2, p. 206-218, 2018.

LIKHITWITAYAWUID, K; ANGERHOFER, C. K; CORDELL, G. A; PEZZUTO, J. M. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 1, p. 30-38, 1993.

LIMA, B. R; SILVA, F. M. A; SOARES, E. R; ALMEIDA, R. A; FILHO, F. A. S; BARISON, A; COSTA, E. V; KOOLEN, H. H. F; SOUZA, A. D. L; PINHEIRO, M. L. B. Integrative approach based on leaf spray mass spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for comprehensive characterization of isoquinoline-derived alkaloids in leaves of *Onychopetalum amazonicum* RE Fr. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 1, p. 79-89, 2020.

LIMA, J. P. S; PINHEIRO, M. L. B; SANTOS, A. M. G; PEREIRA, J. L. S; SANTOS, D. M. F; BARISON, A; COSTA, E. V; SILVA-JARDIM, I. Atividade antileishmania e citotóxica *in vitro* de *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 6, p. 692-702, 2012.

LIMA-BRITO, A; BELLINTANI, M. C; RIOS, A. P. S; SILVA, J. R. S; DORNELLES, A. L. C. Morfologia de fruto, semente e plântula de três espécies de *Annona* (Annonaceae). **Sitientibus Série Ciências Biológicas**, v. 6, n. 2, p. 119-128, 2006.

LIU, Y; LIU, J; DI, D; LI, M; FEN, Y. Structural and mechanistic bases of the anticancer activity of natural aporphinoid alkaloids. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. V. 13, p. 2116-2126, 2013.

LOBÃO, A. Q. Flora das cangas da Serra dos Carajás, Pará, Brasil: Annonaceae. **Rodriguésia**, v. 67, p. 1205-1209, 2016.

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

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. **Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 74, p. 233–409, 2015.

MAHIOU, V; ROBLLOT, F; FOURNET, A; HOCQUEMILLER. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v. 54, n. 7, p. 709-716, 2000.

MAHIOU, V; ROBLOT, F; HOCQUEMILLER, CAVÉ, A; ARIAS, A.R; INCHAUSTI, A; YALUFF, G; FOURNET, A; ANGELI, A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 7, p. 890-895, 1994.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, M; ESTRADA-REYES, R; ESCALONA, A.G.A; VELÁZQUEZ, I.L; MARTÍNEZ-MOTA, L; MORENO; HEINZE, G. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 164-170, 2012.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3ª edição. **Editora Universidade Federal do Ceará, LTD**, p.149, 2009.

MENDES, R. F. V. Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Xylopia frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal de Pernambuco, 2018.

MENDES-SILVA, I; LOPES, J.C; SILVA, L.V; BAZANTE, M. L. *Annona in Flora e Funga do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2020. Disponível em: <<https://floradobrasil.jbrj.gov.br/FB110235>>. Acesso em: 18.12. 2023.

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

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista brasileira de Farmacognosia**, v. 11, p. 21-35, 2001.

MERCK. 1971. **Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography**. E. Merck, Darmstadt, Germany, p. 118, 1953.

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, n. 3, p. 439-445, 2009.

MOREIRA, I. C; ROQUE, N. F; CONTINI, K; LAGO, J. H. G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 17, p. 55-58, 2007.

NASCIMENTO, J. É. C., REATGUI, W. D. S., ARAÚJO, L. S. D., RIBEIRO, M. E. D. S., MAIA, D. C. D. S., GIACOMIN, L. L., BARATTO, L. C. Avaliação do potencial antioxidante e anti-*Helicobacter pylori* in vitro de extratos de plantas medicinais utilizadas popularmente na região amazônica. **Revista Fitos**, v. 11, n. 2, p. 140-152, 2017.

NASCIMENTO, M. C. B. S. Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades. **Tese de doutorado**. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

NASCIMENTO, M. N. G; JUNQUEIRA, J. G. M; TEREZAN, A. P; SEVERINO, R. P; SILVA, T. S; MARTINS, C. H.G; SEVERINO, V. G. P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from *Xylopia aromatica* (Annonaceae) flowers and leaves. **Rev. Virtual Quim**, v. 10, p. 1578-1590, 2018.

NUNES, C. R; BERNARDES, N. R; GLÓRIA, L. L; OLIVEIRA, D. B. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Revista Vertices**, v. 14, n. 1, 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.

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.

PAREDES, A; HASEGAWA, M; PRIETO, F; MENDEZ, J; RODRÍGUEZ; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions. **Journal of ethnopharmacology**, v. 78, n. 2-3, p. 129-132, 2001.

PAULO, M. Q; BARBOSA-FILHO, J. M; LIMA, E. O; MAIA, R. F; BARBOSA, R. C. B. B. C; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* DC. **Journal of ethnopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 39-41, 1992.

PAZ, W. H. P; OLIVEIRA, R. N; HEERDT; ANGOLINI, C. F. F; MEDEIROS, L. S; SILVA, V. R; SANTOS, L. S; SOARES, M. B. P; BEZERRA, D. P; MORGON, N. H; ALMEIDA, J. R. G. S; SILVA, F. M. A; COSTA, E. V; KOOLEN, H. H. F. Structure-based molecular networking for the target discovery of oxahomoaporphine and 8-oxohomoaporphine alkaloids from *Duguetia surinamensis*. **Journal of natural products**, v. 82, n. 8, p. 2220-2228, 2019.

PEDROSO, R. S; ANDRADE, G; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, 2021.

PELLETIER, S. W. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, Vol. 5; John Wiley & Sons: New York, Chapter 3, 1987.

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

PUVANENDRAN, S; WICKRAMASINGHE, A; KARUNARATNE, D; CARR, G; WIJESUNDARA, D. S. A; ANDERSEN, R; KARUNARATNE, V. Antioxidant Constituents from *Xylopia championii*. **Pharmaceutical Biology**, v. 46, n. 5, p. 352-355, 2008.

RABELO, D. M; PINHEIRO, M. L. B; BARISON, A; SALOMÉ, K. S; COSTA, E. V; SILVA, F. M. A; CHAVES, Y. O; BASTOS, I. S. Isoquinoline alkaloids and investigation of the antibacterial and antiplasmodial activities of *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, p. 1453-1458, 2014.

RABÊLO, S. V; COSTA, M. M; LIBÓRIO, 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, p. 265-271, 2014.

RAINER H.; CHATROU L.W. 2014. **Annon Base: Annonaceae GSD** (version Jan 2014). In: Species 2000 & ITIS Catalogue of Life, 2017 Annual Checklist. Disponível em: [http:// www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2017](http://www.catalogueoflife.org/annual-checklist/2017). Acessado em 10.09.2023.

RAJCA-FERREIRA, A. K.; KANEKO, T. M.; SARTORATTO, A.; MORAIS, D. R.; EBERLIN, M. N. LOPES, P. S.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Antimicrobial, antioxidant, antitumor activities of *Guatteria elliptica* R. E. Fries (Annonaceae) alkaloids and their safety. **International Journal of Scientific & Engineering Research**, v. 8, n. 7, p. 1130-1135, 2017.

RINALDI, M. V.N; DÍAZ, I. E. C; SUFFREDINI, I. B; MORENO, P. R. H. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 77-83, 2017.

ROCHA R. S.; KASSUYA C. A. L.; FORMAGIO A. S.; MAURO M. O.; SILVA M. A.; MONREAL A. C. D.; CUNHA-LAURA A. L.; VIEIRA M. C.; OLIVEIRA R. J. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 35-47, 2015.

ROCHA, A. B.; LOPES, R. M.; SCHWARTSMANN, G. Natural products in anticancer therapy. **Current opinion in pharmacology**, v. 1, n. 4, p. 364-369, 2001.

RODRIGUES, J. P. P. S. B. Estudo da aplicação na área da saúde da *Annona cherimola* mill, sua caracterização química. **Dissertação de Mestrado**. Egas Moniz School of Health & Science, Portugal, 2019.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento Etnobotânico de Plantas Medicinais no Domínio do Cerrado na Região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência e Agrotectonologia**, v. 5, n.1, p. 102-123, 2001.

SALESSE, D.; MEDEIROS, F. C; SILVA, C. C. M; LOURENÇO, E. L. B.; JACOMASSI, E. Etnobotânica e Etnofarmacologia das espécies de Amaryllidaceae, Anacardiaceae, Annonaceae e Apiaceae. **Arq. Cienc. Saúde UNIPAR**, Umuarama, v. 22, n. 3, p. 199-204, 2018.

SANTOS, A. R; PIRES, C; MARQUES, F. A; LOBÃO, A. Q; MAIA, B. H. L. N. S. Isoquinoline alkaloids isolated from three *Guatteria* species. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 73, p. 1-2, 2017.

SÃO JOSÉ, A. R. S; PIRES, M. M; FREITAS, A. L. G. E; RIBEIRO, D. P; PEREZ, L. A. A. Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 86-93, 2014.

SHI, G; MACDOUGAL, J. M; MCLAUGHLINT, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 719-723, 1997.

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

SILVA, D. B; TULLI, E. C. O; GARCEZ, W. S; NASCIMENTO, E. A; SIQUEIRA, J. M. Chemical constituents of the underground stem bark of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, p. 1560-1565, 2007b.

SILVA, D. B; TULLI, E. C. O; MILITÃO, G. C. G; COSTA-LOTUFO, L. V; PESSOA, C; MORAES, M. O; ALBUQUERQUE, S; SIQUEIRA, J. M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1059-1063, 2009a.

SILVA, E. M. F; NASCIMENTO, R. B. C; BARRETO, F. S; FILHO, M. O. M; GRIZ, S. A. S; SANTOS, A. F; MOUSINHO, K. C. Estudo *in vitro* do potencial citotóxico da *Annona muricata* L. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 36, n. 2, 2015.

SILVA, F. M. A; BATAGLION, G. A; ALMEIDA, R. A; HEERDT, G; SOUZA, I. L; FILHO, F. A. S; ALENCAR, D. C; COSTA, E. V; SOUZA, A. D.L; PINHEIRO, M. L. B; MORGON, N. H; KOOLEN, H. H. F. Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and ab initio computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 30-36, 2017.

SILVA, M. A; ROSA, C. P; BASTOS, R. G; SILVA, A. F; SILVA, G. A; MARQUES, M. J; ESPURI, P. F. Triagem fitoquímica, atividade antioxidante e leishmanicida do extrato hidroetanólico 70%(v/v) e das frações obtidas de (*Annona crassiflora* Mart.). **Revista Fitos**, v.10, p. 375-547, 2016.

SILVA, M.S; TAVARES, J.F; QUEIROGA, K.F; AGRA, M.F; FILHO, J.M.B; ALMEIDA, J.R.G.S; SILVA, S.A.S. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 1566-1570, 2009b.

SOBRINHO, R. B. Produção integrada de anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 102-107, 2014.

SOSA-RUEDA, J; DOMÍNGUEZ-MELÉNDEZ, V; ORTIZ-CELISEO, A; LÓPEZ-FENTANES, F. C; CUADRADO, C; FERNÁNDEZ, J. J; CEN-PACHECO, F. Squamins C–F, four cyclopeptides from the seeds of *Annona globiflora*. **Phytochemistry**, v. 194, p. 112839, 2022.

SOUSA, E. A; VERAS, M. D. A; ARAÚJO, B. Q; THEVENARD, F; LAGO, J. H. G; COSTA-SILVA, T. A; TEMPONE, A. G; CHAVES, M. H. In vitro anti-Trypanosoma cruzi evaluation of sesquiterpenes from the branches of *Oxandra sessiliflora*. **Phytochemistry letters**, v. 37, p. 59-62, 2020.

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** – Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Mato Grosso do Sul, 2013.

SOUZA, D. P; GONÇALVES, J. F. C; CARVALHO, J. C; SILVA, K. K. G; FERNANDES, A. V; NASCIMENTO, G. O; RAMOS, M. V; KOOLEN, H. H. F; BEZERRA, D. P; SANTOS, A. S. Untargeted metabolomics used to describe the chemical composition and antimicrobial effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria citriodora* Ducke. **Industrial Crops and Products**, v. 186, p. 115180, 2022.

STÉVIGNY, C; BAILLY, C; QUETIN-LACLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 2 p.173-182, 2005.

STÉVIGNY, C; JIWAN, J-L. H; ROZENBERG, R; HOFFMANN, E; QUETIN-LECLERCQ, J. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in mass spectrometry**. v. 18, n. 5, p. 523-528, 2004.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hostettmann K. Editor. **Methods in Plant Biochemistry: Assays for Bioactivity**. London: Academic Press; 1990: 71–133.

SUN, Z; CHEN, B; ZHANG, S; HU, C. Four New Eudesmanes from *Caragana intermedia* and Their Biological Activities. **Journal of natural products**, v. 67, n. 12, p. 1975-1979, 2004.

TAKAHASHI, J.A; BOAVENTURA, M.A.D; BAYMA, J.C; OLIVEIRA, A.B. Frutoic acid, a dimeric kaurane diterpene from *Xylopia frutescens*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607-609, 1995.

THOMSEN, K.; BRIMER, L. Cyanogenic constituents in woody plants in natural lowland rain forest in Costa Rica. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 124, n. 3, p. 273-294, 1997.

VAN DEN DOOL, H; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of chromatography**, 1963.

VIZZOTTO, M; KROLOW, A. C. R.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Embrapa Clima Temperado**. Pelotas, 2010.

WANG, De-S; RIZWANI, G. H; GUO, H; AHMED, M; AHMED, M; HASSAN, S. Z; HASSANS, A; CHEN, ZS; RUI-HUA, X. *Annona squamosa* Linn: cytotoxic activity found in leaf extract against human tumor cell lines. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 27, n. 5, p. 1559-1563, 2014.

WARTHEN, D; GOODEN, E. L; JACOBSON, M. Tumor Inhibitors: Liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 1969.

WU, Y. C; CHANG, G. Y; DUH, C. Y; WANG, S. K. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 497-500, 1993.

WU, Y-C.; LIOU, Y-F.; LU, S-T.; CHEN, C-H.; CHANG, J-J.; LEE, K-H. Cytotoxicity of Isoquinoline Alkaloids and Their *N*-Oxides. **Planta Médica**, v. 55, p. 163-165, 1989.

XU, L. Z; LI, K. M; SUN, N. J; KONG, J. Alkaloids of *Annona reticulata*. **Zhongguo Zhongyao Zazhi**, v. 17, n. 5, p. 295-296, 1992.

YANG, T. H; CHEN, C. M; KUAN, S. S. Studies on the alkaloids of *Annona glabra* L. The isolation of *N*-methylactinodaphnine. **Departamento of Pharmaceutical Chemistry College**. 1971.