

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

The logo of the Universidade Federal do Amazonas is a circular emblem. It features a central shield with a cross, surrounded by a laurel wreath. Above the wreath are three pink flowers. The text "UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS" is written in a circle around the top, and "IN UNIVERSA SCIENTIA VERITAS" is written around the bottom. Two small black dots are positioned on the left and right sides of the emblem.

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E
QUIMIOTAXONÔMICO DO GÊNERO *UNONOPSIS* DA
REGIÃO AMAZÔNICA**

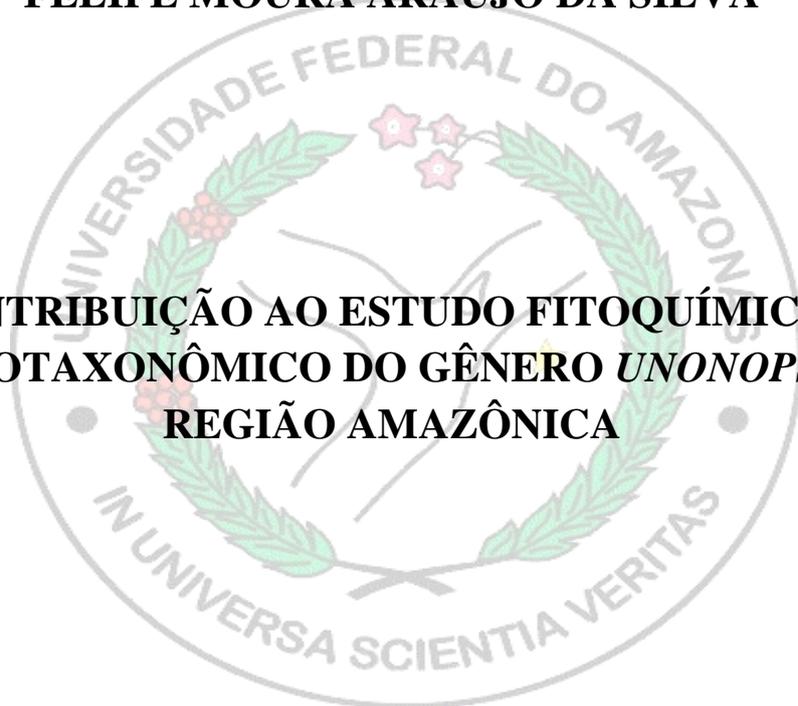
FELIPE MOURA ARAUJO DA SILVA

**MANAUS
2016**

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

FELIPE MOURA ARAUJO DA SILVA

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E
QUIMIOTAXONÔMICO DO GÊNERO *UNONOPSIS* DA
REGIÃO AMAZÔNICA**



Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Química, área de concentração Química Orgânica.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro

Coorientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza

**MANAUS
2016**

Ficha Catalográfica

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

S586c Silva, Felipe Moura Araujo da
Contribuição ao Estudo Fitoquímico e Quimiotaxonômico do
Gênero Unonopsis da Região Amazônica / Felipe Moura Araujo da
Silva. 2016
160 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Lúcia Belém Pinheiro
Coorientador: Afonso Duarte Leão de Souza
Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal
do Amazonas.

1. Unonopsis. 2. Alcaloides. 3. Annonaceae. 4. Óleos essenciais.
5. Espectrometria de massas. I. Pinheiro, Maria Lúcia Belém II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

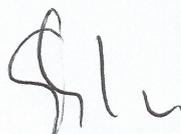
“CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E
QUIMIOTAXONÔMICO DO GÊNERO *UNONOPSIS* DA REGIÃO
AMAZÔNICA”

Felipe Moura Araújo da Silva

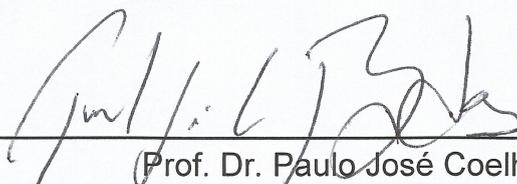
Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em
Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas
como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em Química.

Aprovado em 29 de fevereiro de 2016

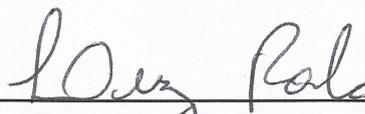
COMISSÃO EXAMINADORA



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



Prof. Dr. Paulo José Coelho Benevides
Membro CBA



Prof. Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva
Membro CBA



Prof. Dr. Marcos Batista Machado
Membro (UFAM)



Prof. Dr. Sérgio Massayoshi Nunomura
Membro INPA

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 29 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a Deus e à
minha família.

“Se andarmos apenas por caminhos já traçados, chegaremos apenas aonde os outros chegaram.”

Alexander Graham Bell

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e por ter me oferecido tantas oportunidades de aprendizado;

À minha família, em especial aos meus pais Luisa e Francinaldo (*in memoriam*), pelo amor, educação e apoio dedicados;

Aos meus irmãos, Gunther e Francinaldo Filho, pela amizade, amor e carinho;

À minha orientadora, Prof^{ta}. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro e meu co-orientador, Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pelos conhecimentos transmitidos, amizade, apoio e confiança;

Aos meus grandes amigos Hector e Richardson, pela amizade sincera e momentos de descontração;

Aos meus amigos André e Erika pelo suporte durante o período no Paraná;

Aos membros da banca examinadora da qualificação, Dr. Sergio Massayoshi Nunomura, Dr^a Maria da Paz Lima e Dr. Adrian Martin Pohlit, por todas as correções e sugestões feitas;

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de aprimoramento;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Webber, do Departamento de Biologia (UFAM), pela identificação botânica das espécies *U. guatteroides* e *U. sipitata*;

Ao Dr. Andersson Barison e à doutoranda Livia Dutra, da UFPR, pelas análises de NMR;

Ao Dr. Luiz Antonio M. A. da Costa, pelas análises de GC-MS;

A toda equipe do PDBFF pelo suporte logístico na coleta botânica do Distrito Agrupecuário da SUFRAMA (DAS);

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

No presente trabalho são apresentados os dados fitoquímicos e quimiotaxonômicos de cinco espécies do gênero *Unonopsis* (*U. guatterioides*, *U. stipitata*, *U. duckei*, *U. floribunda* e *U. rufescens*) comumente encontradas na Região Amazônica. Folhas, galhos e cascas do tronco destes indivíduos foram coletados em diferentes locais do Estado do Amazonas, sendo as folhas submetidas à hidrodestilação e tratamento ácido-base. Os óleos essenciais e frações alcaloídicas obtidas foram submetidos a análises por GC-MS e ESI-MS, respectivamente, verificando-se após tratamento quimiométrico dos dados (PCA e HCA), significativa diferença entre espécies investigadas e seus respectivos pontos de coleta. Através da análise dos óleos essenciais por GC-MS foram identificados 57 constituintes, observando-se a predominância dos sesquiterpenos espatulenol e óxido de cariofileno em praticamente todas as espécies investigadas. A análise por ESI-MS das frações alcaloídicas evidenciou alcaloides aporfínicos, proaporfínicos e tetrahidroprotoberberínicos como responsáveis pela segregação das espécies estudadas, sendo estes tentativamente identificados por ESI-MSⁿ. Devido à utilização medicinal das folhas de *U. stipitata* e cascas do tronco de *U. floribunda*, suas respectivas frações alcaloídicas, FASF e FAFC, foram investigadas por ESI-MSⁿ e HPLC-DAD-MS. O fracionamento cromatográfico de FASF resultou no isolamento dos alcaloides norisocoridina, norglaucina, nornantenina, oxoglaucina e *N*-formil-norglaucina, enquanto o fracionamento de FAFC resultou no isolamento dos alcaloides pallidina, assimilobina, liriodenina, norushinsunina, nornuciferina, isopilina, anonaina, lisicamina, oxoxylopina e *O*-metilisopilina. Todas as estruturas foram determinadas a partir da análise de dados espectroscópicos e comparação com dados da literatura. *N*-formil-norglaucina é reportada pela primeira vez como produto natural. Pallidina, norisocoridina,

normantenina, isolipina, oxoxylopina e *O*-metilisopilina são descritos pela primeira vez no gênero *Unonopsis*. Em adição, o triterpeno policarpol foi confirmado por TLC e MS nos galhos e cascas do tronco de *U. duckei*, *U. floribunda*, *U. rufescens* e *U. stipitata*, reforçando sua importância como marcador químico do gênero.

Palavras-Chave: *Unonopsis*, Alcaloides, Annonaceae, Óleos essenciais, Espectrometria de massas

ABSTRACT

In the present work are presented phytochemicals and chemotaxonomic data from five species of the *Unonopsis* genus (*U. guatterioides*, *U. stipitata*, *U. duckei*, *U. floribunda* and *U. rufescens*) commonly found in the Amazon region. Leaves, twigs and trunk barks from each species were collected in different locations in the Amazonas State, being the leaves submitted to hydrodistillation and acid-base treatment. The obtained essential oils and alkaloidal fractions were subjected to analysis by GC-MS and ESI-MS, respectively, verifying after chemometric data processing (PCA and HCA), significant difference between investigated species and their collection points. Through the essential oils analysis by GC-MS were identified 57 constituents, observing the predominance of the sesquiterpenes spathulenol and caryophyllene oxide in practically all investigated species. Analysis by ESI-MS of the alkaloidal fractions evidenced aporphine, proaporphine and tetrahydroprotoberberine alkaloids as responsible for the segregation of the studied species, which are tentatively identified by ESI-MSⁿ. Due to the medicinal use of leaves of *U. stipitata* and trunk barks of *U. floribunda*, their respective alkaloidal fractions, FASF and FAFC, were investigated by ESI-MSⁿ and HPLC-DAD-MS. The chromatographic fractionation of FASF resulted in the isolation of the alkaloids norisocorydine, norglaucine, nornantenine, oxoglaucine and *N*-formyl-norglaucine, while the fractionation of FAFC resulted in the isolation of the alkaloids pallidine, asimilobine, liriodenine, norushinsunine, nornuciferine, isopiline, anonaine, lysicamine, oxoxylophine and *O*-methylisopiline. All the structures were determined from the spectroscopic data analysis and comparison with literature data. *N*-formyl-norglaucine is reported for the first time as natural products. Pallidine, norisocorydine, nornantenine, isopiline, oxoxylophine and *O*-methylisopiline are described for the first time in *Unonopsis* genus. In addition, the recurrent lanostane-type

triterpene polycarpol was confirmed by TLC and MS in the aerial parts (twigs and trunk barks) of *U. duckei*, *U. floribunda*, *U. rufescens* and *U. stipitata*, reinforcing its significance as chemical marker of the genus.

Keywords: *Unonopsis*, Alkaloids, Annonaceae, Essential oil, Mass spectrometry

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
APCI	<i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>
C18	Octadecilsilano
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
(CD₃)₂CO	Acetona deuterada
CD₃OD	Metanol deuterado
DAD	<i>Diode Array Detection</i>
DAS	Distrito Agropecuário da SUFRAMA
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
FAFC	Fração Alcaloídica das Cascas do Tronco de <i>U. floribunda</i>
FASF	Fração Alcaloídica das Folhas de <i>U. stipitata</i>
GC	<i>Gas Chromatography</i>
HCA	<i>Hierarchical Cluster Analysis</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatography</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
IT	<i>Ion trap</i>
<i>m/z</i>	Razão massa/carga
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MSⁿ	<i>Multiple-Stage Mass Spectrometry</i>
NMR	<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
ppm	Parte por milhão

Psi	<i>Pound force per square inch</i>
RFAD	Reserva Florestal Adolpho Ducke
SUFRAMA	Superintendência da Zona Franca de Manaus
TFA	<i>Trifluoroacetic acid</i>
TLC	<i>Thin-layer chromatography</i>
TMS	Tetrametilsilano
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFRR	Universidade Federal de Roraima

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Distribuição geográfica da família Annonaceae.	03
Figura 2. Distribuição da família Annonaceae no Brasil. Espécies por: (A) região brasileira, (B) domínio fitogeográfico e (C) estado brasileiro.....	04
Figura 3. Principais frutas de Annonaceae cultivadas no mundo. (A) <i>Annona muricata</i> (graviola), (B) <i>A. squamosa</i> (pinha, fruta do conde, ata), (C) híbrido de <i>A. squamosa</i> com <i>A. cherimola</i> (atemoia) e (D) <i>A. cherimola</i> (cherimólia).....	05
Figura 4. Exemplos de acetogeninas previamente isoladas de Annonaceae.....	07
Figura 5. Exemplos de constituintes não alcaloídicos reportados na família Annonaceae.....	08
Figura 6. Exemplos de alcaloides reportados na família Annonaceae.....	09
Figura 7. Exemplos de fragmentações chave observadas para alcaloides aporfínicos <i>sensu stricto</i>	11
Figura 8. Fragmentações chave observadas para o alcaloide benzilisoquinólico reticulina.....	12
Figura 9. Fragmentações chave observadas para alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos.....	13
Figura 10. Ocorrência de espécies de <i>Unonopsis</i> no Brasil.....	14
Figura 11. Classes de alcaloides reportadas no genero <i>Unonopsis</i>	16
Figura 12. Distribuição geográfica de <i>U. guatteroides</i> no Brasil.....	19
Figura 13. Sitios de coleta próximos à área metropolitana de Manaus.....	26
Figura 14. Dendograma de HCA das diferentes espécies de <i>Unonopsis</i> baseado na composição química dos óleos essenciais.....	39
Figura 15. Grafico de PCA das diferentes espécies de <i>Unonopsis</i> baseado na composição química dos óleos essenciais.....	40
Figura 16. Espectro de íons totais das frações alcaloídicas das folhas de <i>U. guatteroides</i> (A), <i>U. duckei</i> (B), <i>U. stipitata</i> (C), <i>U. floribunda</i> (D) e <i>U. rufescens</i> (E). * denota o pico base para cada amostra.....	41
Figura 17. Grafico de score de PCA (A) e biplot (B e C).....	42
Figura 18. Dendograma de HCA e substâncias tentativamente identificadas através das análises de fragmentação.....	45
Figura 19. Espectro de massas e proposta de fragmentação para as perdas sequenciais do policarpol observadas na fonte de APCI.....	46
Figura 20. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a amostra FASF. Gradiente de eluição: 30-80% de B em 14 minutos (1 mL.min ⁻¹). Fases móveis: solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B). DAD: 200-400 nm. Coluna: C18 (5 µm, 150 x 4,60 mm).....	48
Figura 21. Espectros de DAD dos picos majoritários (a-f) presentes na amostra FASF e esqueleto do alcaloide norglaucina.....	49
Figura 22. Espectro de ESI-MS ⁿ (modo positivo) do íon de <i>m/z</i> 328 presente na amostra FAFC.	51
Figura 23. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a amostra FAFC. Gradiente de eluição: 30-80% de B em 14 minutos (1 mL.min ⁻¹). Fases móveis: solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B). DAD: 200-400 nm. Coluna: C18 (5 µm, 150 x 4,60 mm).....	51
Figura 24. Espectros de DAD dos picos majoritários g-l presentes na amostra FAFC...52	
Figura 25. Espectro de MS ² da amostra FASF13.....	54
Figura 26. Espectro de NMR de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) da amostra FASF13.....	55

Figura 27. Mapa de contorno HSQC (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) da amostra FASF13.....	56
Figura 28. Mapa de contorno HMBC (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) da amostra FASF13.....	56
Figura 29. Estrutura do alcaloide norisocoridina.....	58
Figura 30. Espectro de MS^2 da amostra FASF16.....	58
Figura 31. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FASF16.....	59
Figura 32. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FASF16.....	60
Figura 33. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FASF16.	60
Figura 34. Estrutura do alcaloide norglaucina.....	62
Figura 35. Espectro de MS^2 da amostra FASF18.....	62
Figura 36. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF18.....	63
Figura 37. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF18.....	64
Figura 38. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF18.....	64
Figura 39. Estrutura do alcaloide nornantenina.....	66
Figura 40. Espectro de MS^2 da amostra FASF22.....	66
Figura 41. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF22.....	67
Figura 42. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF22.....	68
Figura 43. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF22.....	68
Figura 44. Estrutura do alcaloide oxoglaucina.....	70
Figura 45. Espectro de MS^2 da amostra FASF29.....	70
Figura 46. Ampliação do espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.....	71
Figura 47. Ampliação do espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.....	72
Figura 48. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.....	73
Figura 49. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.	74
Figura 50. Espectro de NOESY 1D (^1H 600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.....	75
Figura 51. Estruturas dos rotâmeros (<i>Z</i>) (A) e (<i>E</i>) (B) do alcaloide <i>N</i> -formil-norglaucina	77
Figura 52. Propostade fragmentação para o alcaloide <i>N</i> -formil-norglaucina.....	77
Figura 53. Espectro de MS^2 da amostra FAFC5.....	79
Figura 54. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC5.....	80
Figura 55. Espectro de NMR de ^{13}C (150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC5.....	81
Figura 56. Possibilidades estruturais para a amostra FAFC5. (A) pallidina e (B) flavinantina.....	82
Figura 57. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC5.....	83
Figura 58. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC5.....	84
Figura 59. Estrutura do alcaloide pallidina.....	85
Figura 60. Espectro de MS^2 da amostra FAFC12.3.....	85

Figura 61. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC12.3.....	86
Figura 62. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC12.3.....	87
Figura 63. Estrutura do alcaloide assimilobina.....	88
Figura 64. Espectro de MS^2 da amostra FAFC13.3.....	89
Figura 65. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CD_3OD) da amostra FAFC13.3.....	89
Figura 66. Estrutura do alcaloide liriodenina.....	90
Figura 67. Espectro de MS^2 da amostra FAFC14.4.....	91
Figura 68. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC14.4.....	92
Figura 69. Ampliação do espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC14.4.....	93
Figura 70. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC14.4.....	93
Figura 71. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC14.4.....	94
Figura 72. Estrutura do alcaloide norushinsunina.....	95
Figura 73. Espectro de MS^2 da amostra FAFC15.....	95
Figura 74. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC15.....	96
Figura 75. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC15.....	97
Figura 76. Estrutura do alcaloide nornuciferina.....	98
Figura 77. Espectro de MS^2 da amostra FAFC18.3.....	98
Figura 78. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC18.3.....	99
Figura 79. Estrutura do alcaloide isopilina.....	100
Figura 80. Espectro de MS^2 da amostra FAFC18.4.....	101
Figura 81. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC18.4.....	102
Figura 82. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC18.4.....	102
Figura 83. Estrutura do alcaloide anonaina.....	103
Figura 84. Espectro de MS^2 da amostra FAFC20.3.....	104
Figura 85. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC20.3.....	105
Figura 86. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC20.3.....	105
Figura 87. Estrutura do alcaloide lisicamina.....	106
Figura 88. Espectro de MS^2 da amostra FAFC20.4.....	107
Figura 89. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC20.4.....	108
Figura 90. Estrutura do alcaloide oxoxylopina.....	109
Figura 91. Espectro de MS^2 da amostra FAFC21.3.....	109
Figura 92. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC21.3.....	110
Figura 93. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC21.3.....	111
Figura 94. Estrutura do alcaloide <i>O</i> -metilisopilina.....	112
Figura 95. Biossíntese geral para alcaloides aporfínicos e morfínicos. PLP: piridoxal fosfato. SAM: <i>S</i> -Adenosilmetionina. NADP+: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina. NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido.....	114

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Usos medicinais de algumas espécies da família Annonaceae.....	06
Tabela 2. Espécies do gênero <i>Unonopsis</i> endêmicas do Brasil.....	14
Tabela 3. Nomes populares registrados para a espécie <i>U. guatterioides</i>	18
Tabela 4. Informações sobre o material botânico coletado.	26
Tabela 5. Rendimento dos óleos de espécies de <i>Unonopsis</i> obtidos por hidrodestilação	27
Tabela 6. Massa das frações alcaloídicas obtidas em escala analítica.....	30
Tabela 7. Frações submetidas à análises de NMR 1D e 2D.....	33
Tabela 8. Subfrações de FAFC submetidas a fracionamento em cromatógrafo semi- preparativo.....	34
Tabela 9. Composição percentual dos constituintes químicos dos óleos essenciais das diferentes espécies de <i>Unonopsis</i>	35
Tabela 10. Íon precursor e fragmentos chave observados por ESI-MS ⁿ	44
Tabela 11. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FASF13.....	57
Tabela 12. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FASF16.....	61
Tabela 13. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FASF18.....	65
Tabela 14. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FASF22.....	69
Tabela 15. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FASF29 para o rotâmero (<i>Z</i>).....	75
Tabela 16. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FASF13 para o rotâmero (<i>E</i>).....	76
Tabela 17. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FAFC5.....	84
Tabela 18. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FAFC12.3.....	87
Tabela 19. Dados de NMR de ¹ H da amostra FAFC13.3.....	90
Tabela 20. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FAFC14.4.....	94
Tabela 21. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FAFC15.....	97
Tabela 22. Dados de NMR de ¹ H da amostra FAFC18.3.....	100
Tabela 23. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FAFC18.4.....	103
Tabela 24. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FAFC20.3.....	106
Tabela 25. Dados de NMR de ¹ H da amostra FAFC20.4.....	108
Tabela 26. Dados de NMR de ¹ H e ¹³ C da amostra FAFC21.3.....	111

LISTA DE ANEXOS

Figura A1. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. guatterioides</i> (GU).....	129
Figura A2. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. stipitata</i> (SUA).....	129
Figura A3. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. stipitata</i> (SUB).....	129
Figura A4. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. floribunda</i> (FDA).....	130
Figura A5. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. floribunda</i> (FDB).	130
Figura A6. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. rufescens</i> (RD).....	130
Figura A7. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. duckei</i> (DRA).....	131
Figura A8. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. duckei</i> (DRB).....	131
Figura A9. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. duckei</i> (DDA).....	131
Figura A10. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. duckei</i> (DDB).....	132
Figura A11. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. duckei</i> (DDC).....	132
Figura A12. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de <i>U. duckei</i> (DDD).....	132
Figura A13. Espectro de ESI-MS ⁿ (modo positivo) do ion de <i>m/z</i> 268 presente nas folhas de <i>U. guatterioides</i>	133
Figura A14. Espectro de ESI-MS ⁿ (modo positivo) do ion de <i>m/z</i> 298 presente nas folhas de <i>U. duckei</i>	133
Figura A15. Espectro de ESI-MS ² (modo positivo) do ion de <i>m/z</i> 328 presente nas folhas de <i>U. floribunda</i>	133
Figura A16. Espectro de ESI-MS ² (modo positivo) do ion de <i>m/z</i> 328 presente nas folhas de <i>U. rufescens</i>	134
Figura A17. Espectro de ESI-MS ⁿ (modo positivo) do ion de <i>m/z</i> 342 presente nas folhas de <i>U. stipitata</i>	134
Figura A18. Espectros de <i>full scan</i> dos picos majoritários (a-f) presentes na amostra FASF.	134
Figura A19. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF13.....	135
Figura A20. Espectros de <i>full scan</i> dos picos majoritários (g-l) presentes na amostra FAF13.....	135
Figura A21. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF13.....	135
Figura A22. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF16.....	136
Figura A23. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF18.....	136
Figura A24. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF22.....	136
Figura A25. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF29.....	137
Figura A26. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF13.....	137
Figura A27. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF13.3.....	137
Figura A28. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF13.3.....	138

Figura A29. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF14.4.....	138
Figura A30. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF15.....	138
Figura A31. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF18.3.....	139
Figura A32. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF18.4.....	139
Figura A33. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF20.3.....	139
Figura A34. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF20.4.....	140
Figura A35. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAF21.3.....	140
Tabela A1. Dados utilizados na análise de PCA, baseados na intensidade dos picos obtidos entre m/z 200 a 400, após eliminação dos sinais de intensidade abaixo de 5%.....	141

SUMÁRIO

RESUMO	VI
ABSTRACT	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	X
LISTA DE FIGURA.....	XII
LISTA DE TABELAS	XV
LISTA DE ANEXOS	XVI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1. A Família Annonaceae Juss.....	3
2.1.1. Etnobotânica da Família Annonaceae	6
2.1.2. Fitoquímica da Família Annonaceae	7
2.1.2.1. Alcaloides de Annonaceae.....	8
2.2. Espectrometria de massas (MS) aplicada ao estudo de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico	9
2.3. O gênero <i>Unonopsis</i>	13
2.3.1. Etnobotânica do gênero <i>Unonopsis</i>	15
2.3.2. Fitoquímica do gênero <i>Unonopsis</i>	15
2.3.3. A espécie <i>Unonopsis guatterioides</i> (A. D.C.) R. E. Fr.	18
2.3.4. A espécie <i>Unonopsis stipitata</i> Diels.....	20
2.3.5. A espécie <i>Unonopsis duckei</i> R. E. F.....	20
2.3.6. A espécie <i>Unonopsis rufescens</i> (Baill.) R.E. Fr.	21
2.3.7. A espécie <i>Unonopsis floribunda</i> Diels	21
2.4. Quimiotaxonomia e quimiometria.....	22
3. OBJETIVOS	23
3.1. Geral	23
3.2. Específicos.....	23
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	24
4.1. Análises cromatográficas.....	24
4.1.1. Cromatografia em camada delgada (TLC)	24
4.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	24
4.1.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)	24
4.2. Solventes.....	24
4.3. Métodos espectroscópicos/espectrométricos	25
4.4. Coleta e identificação do material botânico	25
4.5. Obtenção dos óleos essenciais	27
4.6. Análise por GC-MS dos óleos essenciais e tratamento quimiométrico dos dados..	28
4.7. Marcha alcaloídica em escala analítica	29
4.8. Análise por ESI-MS das frações alcaloídicas e tratamento quimiométrico dos dados	30
4.9. Prospecção de policarpol por TLC e MS.....	31
4.10. Investigação das frações alcaloídicas biologicamente promissoras por ESI-MS ⁿ e HPLC-DAD-MS	32
4.11. Marcha alcaloídica em escala preparativa	32
4.12. Fracionamento cromatográfico das frações alcaloídicas das folhas de <i>U. stipitata</i> (FASF) e das cascas de <i>U. floribunda</i> (FAFC)	33
4.13. Purificação das subfrações de FAFC.....	34
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	35

5.1. Óleos essenciais de <i>Unonopsis</i> e quimiotaxonomia.....	35
5.2. Perfil alcaloídico de <i>Unonopsis</i> e quimiotaxonomia.....	40
5.3. Policarpol no gênero <i>Unonopsis</i> e quimiotaxonomia.....	46
5.4. Análises de ESI-MS ⁿ e HPLC-DAD-MS da amostra FASF (<i>U. stipitata</i>)	48
5.5. Análises de ESI-MS ⁿ e HPLC-DAD-MS da amostra FAFC (<i>U. floribunda</i>)	50
5.6. Determinação estrutural das substâncias isoladas	53
5.6.1. Substâncias isoladas da fração alcaloídica das folhas de <i>U. stipitata</i> (FASF)	53
5.6.1.1. Determinação estrutural da amostra FASF13.....	54
5.6.1.2. Determinação estrutural da amostra FASF16.....	58
5.6.1.3. Determinação estrutural da amostra FASF18.....	62
5.6.1.4. Determinação estrutural da amostra FASF22.....	66
5.6.1.5. Determinação estrutural da amostra FASF29.....	70
5.6.2. Substâncias isoladas da fração alcaloídica das cascas de <i>U. floribunda</i> (FAFC)	78
5.6.2.1. Determinação estrutural da amostra FAFC5	79
5.6.2.2. Determinação estrutural da amostra FAFC12.3	85
5.6.2.3. Determinação estrutural da amostra FAFC13.3	88
5.6.2.4. Determinação estrutural da amostra FAFC14.4	91
5.6.2.5. Determinação estrutural da amostra FAFC15	95
5.6.2.6. Determinação estrutural da amostra FAFC18.3	98
5.6.2.7. Determinação estrutural da amostra FAFC18.4	101
5.6.2.8. Determinação estrutural da amostra FAFC20.3	104
5.6.2.9. Determinação estrutural da amostra FAFC20.4	107
5.6.2.10. Determinação estrutural da amostra FAFC21.3	109
5.7. Relevância biossintética dos alcaloides isolados.....	112
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	115
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
8. ANEXOS	129

1. INTRODUÇÃO

O reino vegetal tem contribuído significativamente com o fornecimento de metabólitos secundários, substâncias de notório potencial farmacológico (DEWICK, 2009). Desde o início do século XIX, com o advento da química farmacêutica, estas substâncias desempenham papel fundamental no desenvolvimento de novos fármacos (PINTO et al., 2002). Dentre as diferentes classes de metabólitos secundários reportadas na literatura, destacam-se os alcaloides, eficientes agentes terapêuticos no tratamento das mais diversas doenças (BACAB & RODRIGUEZ, 2001; ROCHA et al., 2005; MISHRA et al., 2009).

A floresta Amazônia é considerada o maior reservatório natural da diversidade vegetal do planeta, onde o contingente florístico é rico e variado, sendo muitas vezes exclusivo de determinado ambiente (OLIVEIRA & AMARAL, 2004). Em meio a esta grande diversidade, inúmeras espécies pertencentes à família Annonaceae destacam-se devido o seu uso na medicina popular (VAN ANDEL, 2000; YANG et al., 2002; KVIST et al., 2006; ADAMS et al., 2007; FRAUSIN et al., 2014).

O gênero neotropical *Unonopsis*, atualmente constituído por cerca de 50 espécies, apresenta ampla distribuição na Região Amazônica (MAAS et al., 2007), tendo algumas espécies utilizadas na medicina popular (JOVEL, et al., 1996; VAN ANDEL, 2000; ADAMS et al., 2007). Do ponto de vista fitoquímico este gênero se apresenta como uma fonte promissora de alcaloides aporfinóides *lato sensu* (SILVA et al., 2012a).

O gênero *Unonopsis* apresenta problemas taxonômicos, claramente observados através das inúmeras tentativas de posicioná-lo dentro da família Annonaceae, ou mesmo pela dificuldade de classificar algumas espécies, como é o caso de *U. guatteroides*, que em 2007 passou a ter 13 espécies consideradas sinônimas (MAAS et

al., 2007). Como auxílio à taxonomia, a quimiotaxonomia ou quimiosistemática, ciência através da qual caracteres químicos são empregados na sistemática formal de plantas, fungos, etc., vem sendo considerada uma ferramenta que juntamente com a morfologia, anatomia e citogenética, pode auxiliar grandemente no trabalho de organização sistemática (WATERMAN & GRAY, 1987). Observa-se, contudo, que o sucesso desta abordagem depende da máxima acumulação de informações acerca da distribuição dos metabólitos secundários dentro de um determinado taxon (WATERMAN, 2007).

Com o avanço significativo da instrumentação, principalmente nas áreas da espectrometria e cromatografia (CHIARADIA et al., 2008), as análises químicas têm se tornado mais fáceis e rápidas, e como consequência, um grande volume de dados químicos é facilmente obtido, fazendo-se necessária a utilização de ferramentas estatísticas para a máxima exploração destas informações (MOITA NETO & MOITA, 1998; MATOS, 2003; BARROS NETO et al., 2006;).

Visando contribuir para o conhecimento fitoquímico e quimiotaxonômico do gênero *Unonopsis*, o presente trabalho teve como ênfase a investigação de frações alcaloídicas e óleos essenciais de cinco espécies do gênero *Unonopsis* através de instrumentação analítica e ferramentas quimiométricas, bem como o isolamento de novas substâncias.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A Família Annonaceae Juss

Annonaceae, uma das maiores famílias da ordem Magnoliales, é atualmente constituída por cerca de 2500 espécies distribuídas em 130 gêneros. Esta família é composta por árvores, arbustos e trepadeiras, tendo sua distribuição geográfica predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais (Figura 1) (RICHARDSON et al., 2004). Estima-se que aproximadamente 950 espécies (51 gêneros) estejam distribuídas entre a Ásia e a Austrália, 450 espécies (40 gêneros) distribuídas na África e Madagascar, e 740 espécies (38 gêneros) distribuídas no continente americano (LEBOEUF et al., 1982). No Brasil, são registradas 392 espécies distribuídas em 29 gêneros, sendo 162 espécies endêmicas. A Região Norte detém pouco mais de 70% desta diversidade (284 espécies), possuindo o Estado do Amazonas 203 espécies registradas (MAAS et al., 2015) (Figura 2).

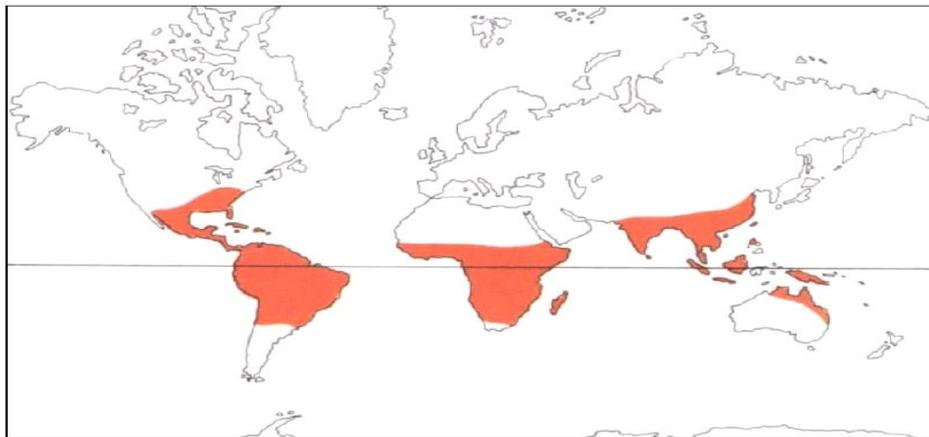


Figura 1. Distribuição geográfica da família Annonaceae.
Fonte: HEYWOOD, 1978.

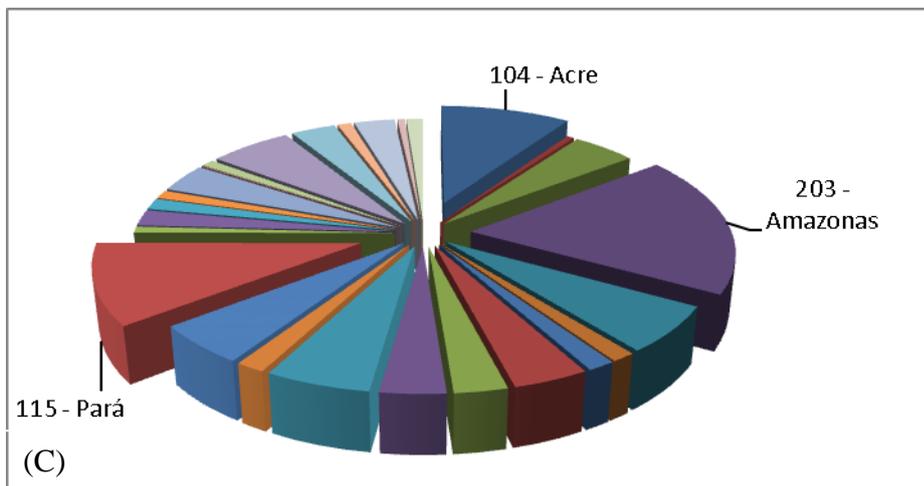
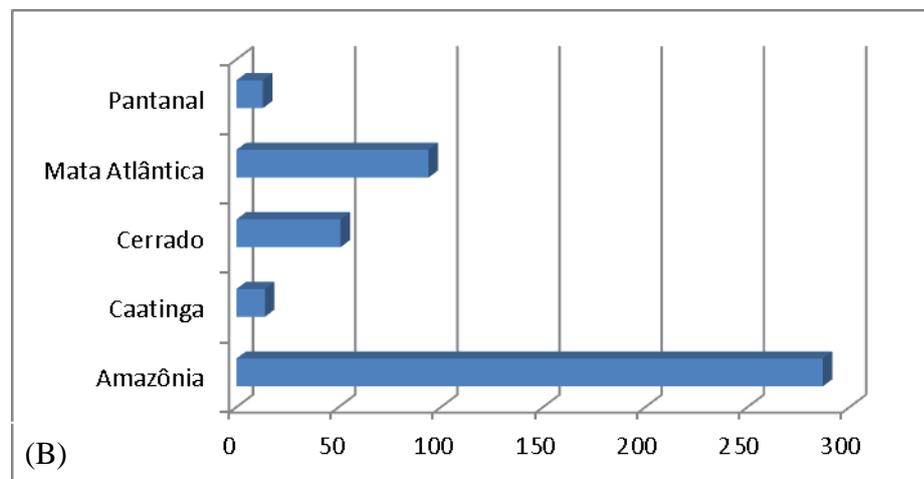
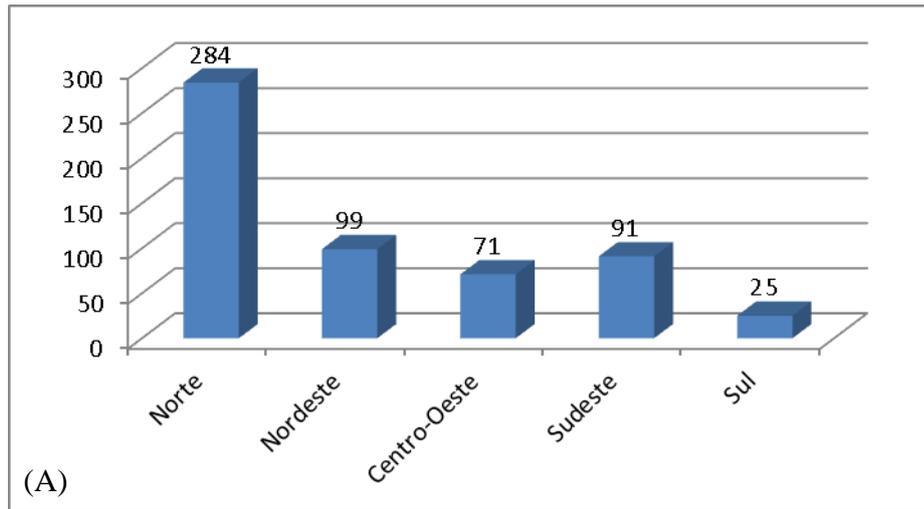


Figura 2. Distribuição da família Annonaceae no Brasil. Espécies por: (A) região brasileira, (B) domínio fitogeográfico e (C) estado brasileiro.
Fonte: MAAS et al., 2015.

A família Annonaceae é popularmente conhecida por seus frutos comestíveis, o que tem agregado valor econômico à família. Neste contexto, o gênero *Annona* se destaca, sendo seus frutos cultivados em pomares comerciais ou coletados de forma extrativista (SÃO JOSÉ et al., 2014). Das 13 espécies de *Annona* que produzem frutos comestíveis, 5 possuem maior importância econômica, destacando-se no mercado as espécies *Annona muricata* (graviola), *A. squamosa* (pinha, fruta do conde, ata), *A. cherimola* (cherimólia) e o híbrido de *A. squamosa* com *A. cherimola* (atemoia) (Figura 3). Outras espécies, tais como *A. mucosa* (biribá), *A. diversifolia* (ilama), *Annona crassiflora* (marolo) e *Annona coriacea* (araticum) são cultivadas em maior ou menor escala em diversas partes do mundo (CORREA, 1984; SÃO JOSÉ et al., 2014). No geral, essas frutas são comercializadas *in natura* ou sob a forma de polpa fresca ou congelada, sendo empregadas no preparo de sucos, geleias, iogurtes, sorvetes, entre outras finalidades alimentares (CORREA, 1984; SÃO JOSÉ et al., 2014).

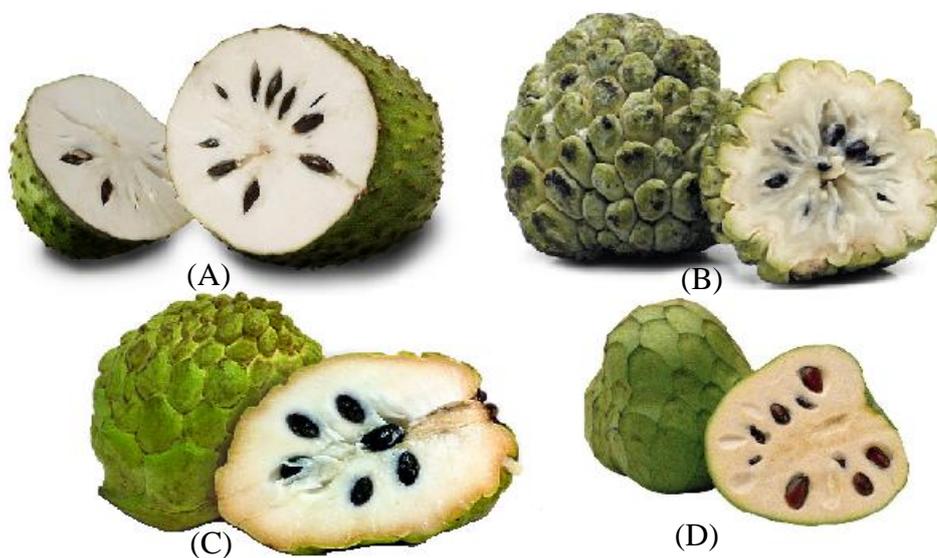


Figura 3. Principais frutas de Annonaceae cultivadas no mundo. (A) *Annona muricata* (graviola), (B) *A. squamosa* (pinha, fruta do conde, ata), (C) híbrido de *A. squamosa* com *A. cherimola* (atemoia) e (D) *A. cherimola* (cherimólia).

Fonte: A-<http://saude.umcomo.com.br>.

B-<http://alimentossaudaveis.net>.

C- <http://www.casacamponesa.com.br>.

D- <http://penninckxplantes.penninckx.org>.

2.1.1. Etnobotânica da Família Annonaceae

Espécies de diversos gêneros tais como *Annona*, *Guatteria*, *Unonopsis* e *Xylopia* têm sido utilizadas na medicina popular, algumas das quais no tratamento de doenças negligenciadas, tais como a malária (TSABANG et al., 2012; FRAUSIN et al., 2014). Na Tabela 1 são apresentados exemplos de espécies da família Annonaceae utilizadas para fins medicinais.

Tabela 1. Usos medicinais de algumas espécies da família Annonaceae.

Espécie	Uso popular
<i>Annona muricata</i>	Malária e febre (FRAUSIN et al., 2014).
<i>A. exsucca</i>	Febre e prevenção de aborto espontâneo (VAN ANDEL, 2000).
<i>A. mucosa</i>	Tratamento de tumores (KUO et al., 2001).
<i>A. squamosa</i>	Úlceras, feridas (YLANG et al., 2002) e malária (FRAUSIN et al., 2014).
<i>Duguetia megalophylla</i>	Picadas de cobras (VAN ANDEL, 2000).
<i>D. pauciflora</i>	Picadas de cobras (VAN ANDEL, 2000).
<i>Guatteria boliviana</i>	Vermes e febre (MAHIOU et al., 2000).
<i>G. cardoniana</i>	Repelente de inseto (PAREDES et al., 2001).
<i>Unonopsis floribunda</i>	Artrites, bronquites, reumatismo, diarreia e malária (JOVEL, et al., 1996; KVIST et al., 2006).
<i>U. stipitata</i>	Doenças cognitivas (ADAMS et al., 2007).
<i>U. glaucopetala</i>	Picadas de cobras (VAN ANDEL, 2000).
<i>Xylopia aethiopica</i>	Bronquites, disenterias (BOYOM et al., 2003) e malária (FRAUSIN et al., 2014).
<i>X. parviflora</i>	Distúrbios estomacais (WOGUEM et al., 2014).
<i>X. cf. frutescens</i>	Analgésico e anti-inflamatório (DI STASI & HIRUMALIMA, 2002).

Algumas espécies como *Anaxagorea dolichocarpa*, *Annona symphyocarpa* e *Bocageopsis multiflora* têm suas cascas utilizadas como amarras. Outras espécies tais

como *Xylopia cayennensis* e *Xylopia* cf. *surinamensis* têm sua madeira utilizada na construção civil (VAN ANDEL, 2000).

2.1.2. Fitoquímica da Família Annonaceae

Apesar do perfil de metabólitos secundários bastante diversificado, a família Annonaceae é caracterizada pela presença de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico (LEBOEUF et al., 1982) e acetogeninas (**1** e **2**) (Figura 4), classe química restrita a esta família, cuja crescente lista de atividades biológicas tem atraído grande interesse nos últimos anos (RUPPRECHT et al., 1990; FANG et al., 1993; CUNHA et al., 2009).

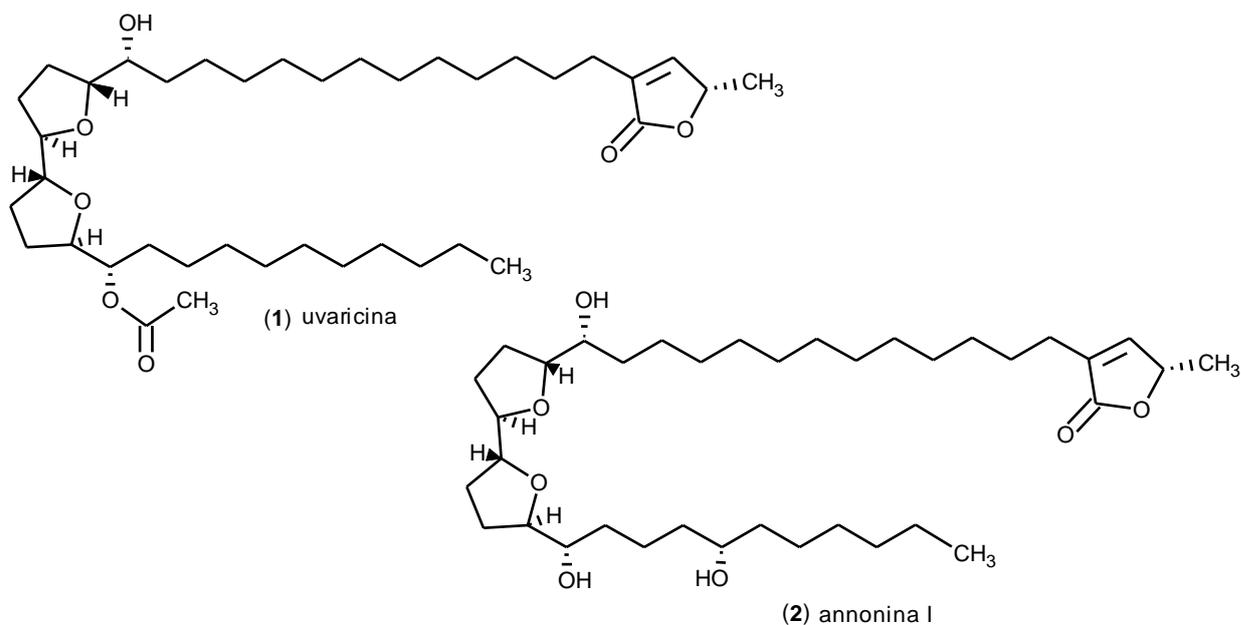


Figura 4. Exemplos de acetogeninas previamente isoladas de Annonaceae.

Fonte: RUPPRECHT et al., 1990.

Embora alcaloides sejam considerados seus principais metabólitos secundários, outras classes podem ser encontradas nesta família, tais como: flavonoides (**3** e **4**), terpenóides (**5** e **6**), compostos aromáticos (**7** e **8**), entre outros (**9**) (Figura 5) (LEBOEUF et al., 1982).

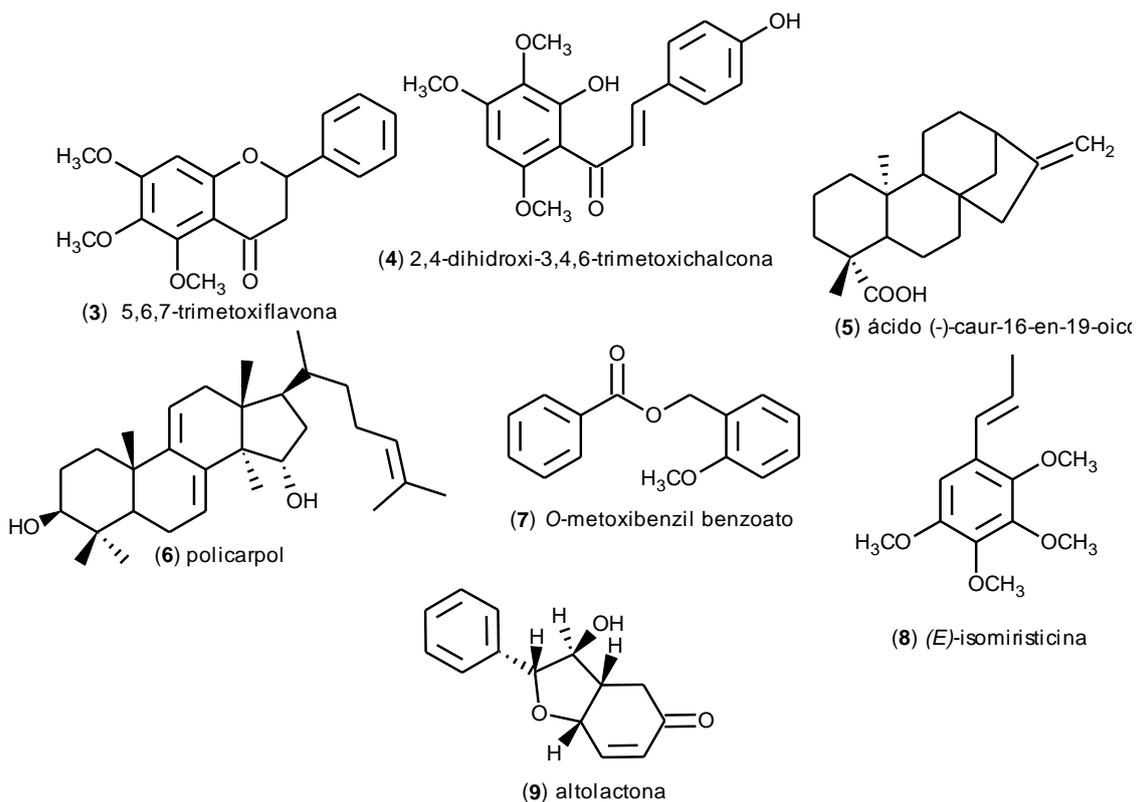


Figura 5. Exemplos de constituintes não alcalóidicos reportados na família Annonaceae.

Fonte: LEBOEUF et al., 1982.

2.1.2.1. Alcaloides de Annonaceae

Apesar de outras classes de alcaloides tais como pirimidino- β -carbolínicos e β -carbolínicos (**10** e **11**) estarem presentes na família (LEBOEUF et al., 1982; SOARES et al., 2015), os alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico são considerados predominantes, podendo ser divididos nas seguintes classes: isoquinolínicos simples (**12**), benziltetrahydroisoquinolínicos (**13**), bisbenziltetrahydroisoquinolínicos (**14**), bisbenzilisquinolínicos (**15**), protoberberínicos (**16**), tetrahydroprotoberberínicos (**17**), aporfínicos *sensu lato*, incluindo aporfínicos *sensu stricto* (**18**), oxoaporfínicos (**19**), fenantrênicos (**20**) e alcaloides “miscelâneos” (**21**) (LEBOEUF et al., 1982) (Figura 6).

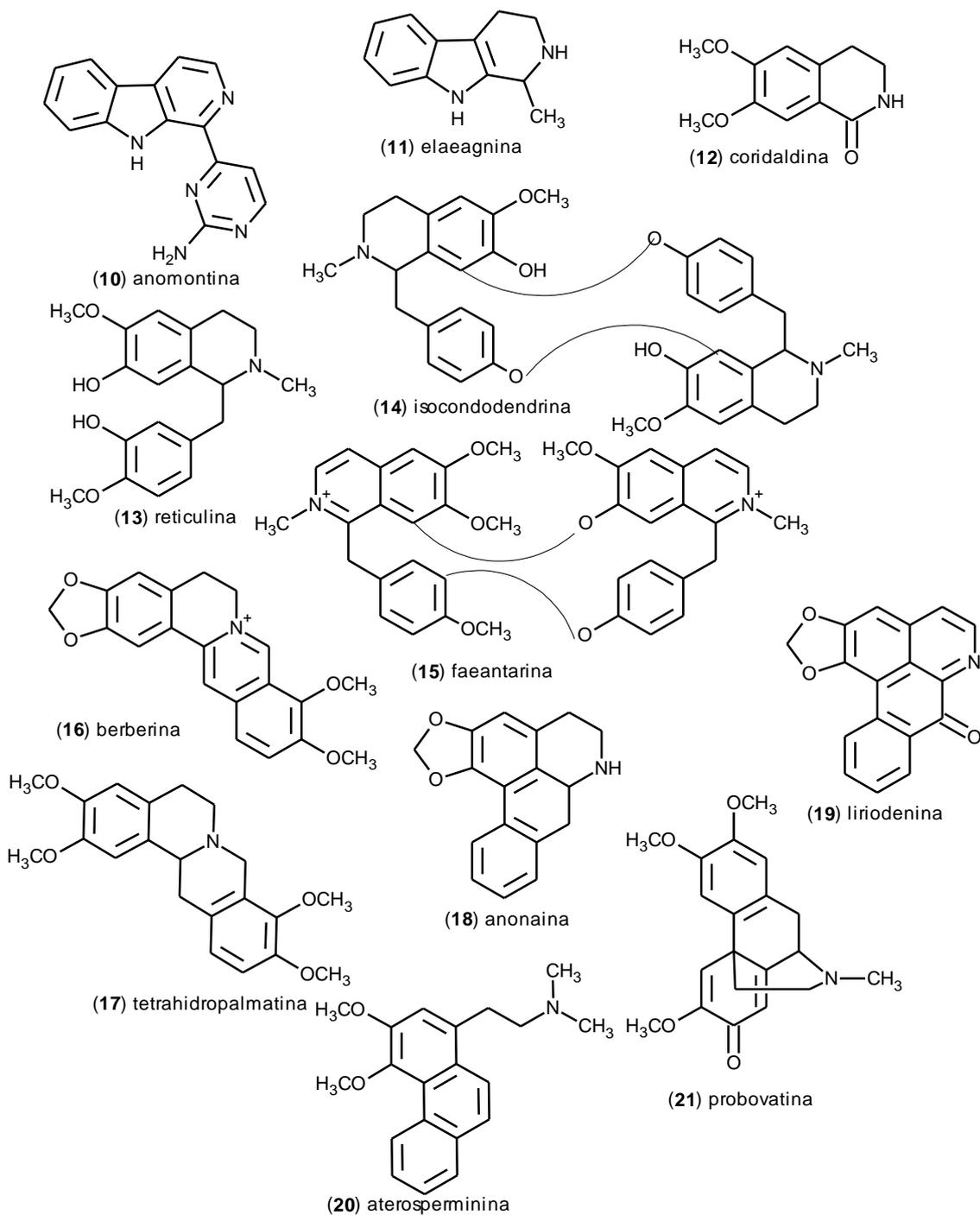


Figura 6. Exemplos de alcaloides reportados na família Annonaceae.
Fonte: LEBOEUF et al., 1982; SOARES et al., 2015.

2.2 . Espectrometria de massas (MS) aplicada ao estudo de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico

A caracterização de alcaloides em matrizes biológicas através de técnicas espectrométricas é uma prática que já vem sendo desenvolvida há bastante tempo

(ROUSH & COOKS, 1984), sendo particularmente atrativa devido a sua sensibilidade e seletividade (KOULMAN et al., 2007). Estudos com infusão direta em fonte de *electrospray* (ESI) têm demonstrado a potencialidade da técnica no *screening* de alcaloides de Annonaceae dos gêneros *Unonopsis* (SILVA et al., 2012a, 2014) e *Bocageopsis* (SOARES et al., 2015). Esta técnica fornece imediata informação composicional das substâncias mais ionizáveis, tais como produtos de reação ácido-base, de complexação e reação redox (CROTTI et al., 2006), permitindo a identificação de compostos característicos em extratos (ABREU et al., 2007; SCHIOZER et al., 2012).

Embora a análise por infusão direta em fonte ESI apresente problemas relatados ao efeito de matriz, resultando em redução de sensibilidade e capacidade de identificação de metabólitos (LIN et al., 2010), a técnica tem sido aplicada com sucesso como um método rápido de *screening* (ABREU et al., 2007; SILVA et al., 2014, SCHIOZER et al., 2012; SOARES et al., 2015), em alguns casos, apresentando capacidade de classificação e predição comparável à análise de LC-MS (LIN et al., 2010).

Alcaloides aporfínicos *sensu stricto* quando investigados através de fonte de ESI revelaram um padrão de fragmentação útil na caracterização de diferentes grupos substituintes (STÉVIGNY et al., 2004). Enquanto na primeira etapa de fragmentação é observada a perda do grupo amino e seus substituintes (NH_3 ou CH_3NH_2 , -17 ou -31 u, respectivamente), na etapa seguinte observa-se a saída dos grupos periféricos (Figura 7). Na segunda etapa, perdas consecutivas de CH_3OH (-32 u) e CO (-28 u) são atribuídas a estruturas contendo grupos OH e OCH_3 vicinais, enquanto estruturas contendo grupo metilenodioxí apresentam perdas consecutivas de CH_2O (-30 u) e CO (-28 u) (STÉVIGNY et al., 2004). Outra fragmentação chave característica é observada para estruturas contendo grupos metoxilas vicinais, observando-se na segunda etapa perdas

competitivas de $\cdot\text{CH}_3$ (-15 u) e $\cdot\text{OCH}_3$ (-31 u), e consecutivas de $\cdot\text{CH}_3$ (-15 u) (SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015) (Figura 7). As fragmentações chave observadas para alcaloides aporfínicos parecem ser válidas para alcaloides proaporfínicos (SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015).

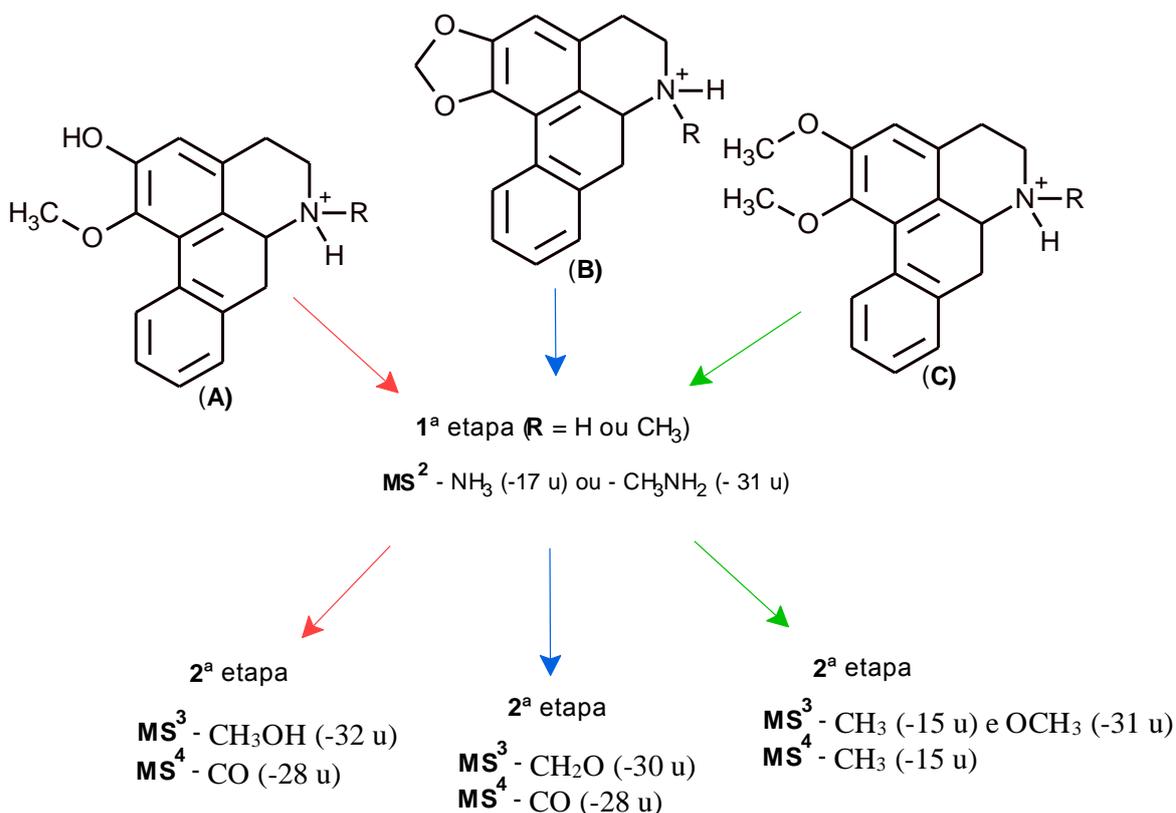


Figura 7. Exemplos de fragmentações chave observadas para alcaloides aporfínicos *sensu stricto*.

Fonte: STÉVIGNY et al., 2004; SILVA et al., 2012; 2014; SOARES et al., 2015.

Investigações através de sistema ESI-MS demonstraram que alcaloides do tipo benzilisoquinolínico também possuem fragmentações chave (íons diagnóstico) através das quais é possível determinar os substituintes em duas partes essenciais do esqueleto benzilisoquinolínico (unidade benzílica e isoquinolínica) (SCHMIDT et al., 2005). Ions do tipo **b** e **e** informam sobre a substituição das unidades isoquinolinica e benzílica, respectivamente, enquanto os do tipo **a** indicam a presença de substituição no nitrogênio (H ou CH_3) (Figura 8).

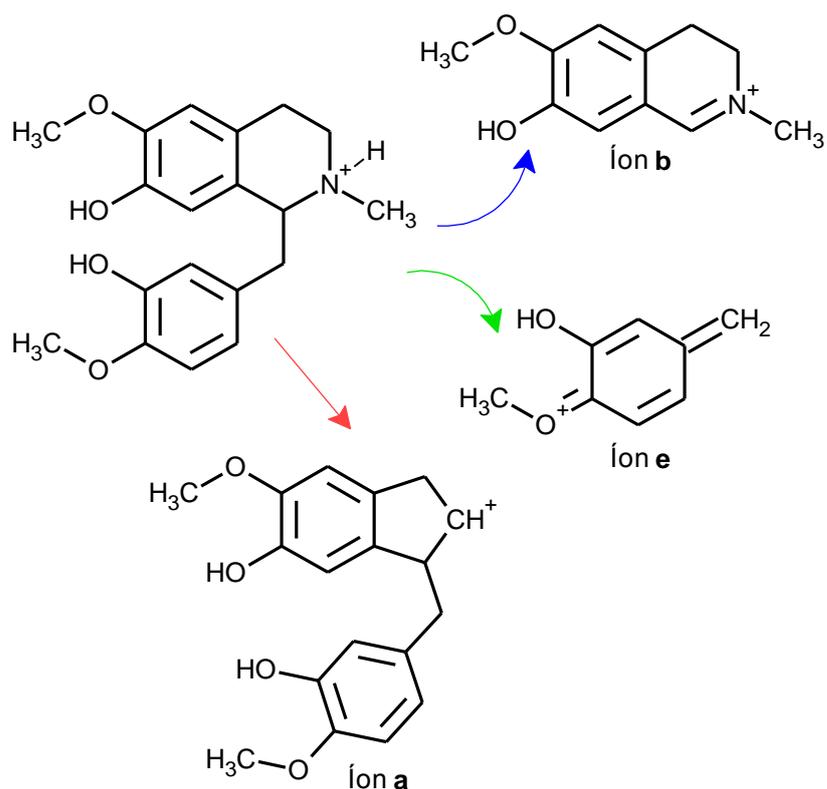


Figura 8. Fragmentações chave observadas para o alcaloide benzilisoquinolínico reticulina.

Fonte: SCHMIDT et al., 2005; SOARES et al., 2015.

Interessantes fragmentações devido a reações retro-Diels-Alder (RDA) foram reportadas para alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos quando investigados por ESI-MS. Suas fragmentações chave (íons diagnóstico **a** e **b**) permitem a determinação do padrão de substituição dos anéis A e D (SHIM et al., 2013), conforme pode ser observado na Figura 9.

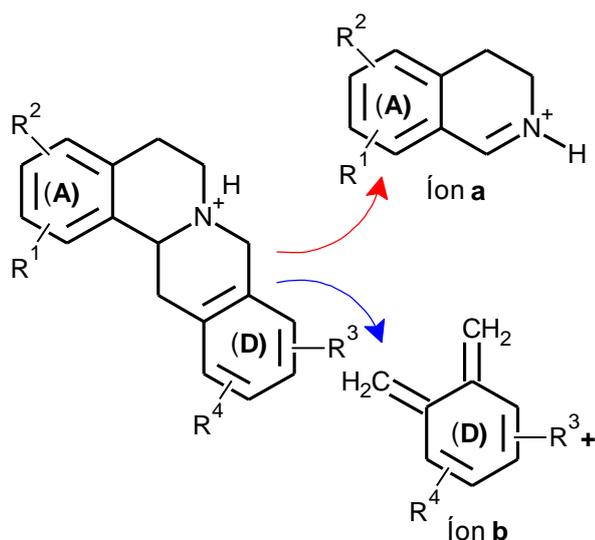


Figura 9. Fragmentações chave observadas para alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos.

Fonte: SHIM et al., 2013; SOARES et al., 2015.

2.3. O gênero *Unonopsis*

O gênero neotropical *Unonopsis*, um dos 130 gêneros da família Annonaceae (RICHARDSON et al., 2004), é constituído por arbustos e árvores, apresentando distribuição limitada a região entre a América do Sul tropical e a América Central. Seu nome é derivado do antigo gênero *Unona* L.f. (= *Xylophia* L.) e da palavra “opsis” (do grego antigo “face”), devido à similaridade superficial. O gênero foi primeiramente publicado por Robert E. Fries em 1900, alcançando o número de 27 espécies em 1959. Em revisão recente foram reconhecidas 47 espécies, das quais 25 são novas (MAAS et al., 2007).

No Brasil são registradas 16 espécies do gênero *Unonopsis*, sendo sua ocorrência limitada à Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (Figura 10) (MAAS et al., 2007, 2015). As espécies endêmicas do Brasil são apresentadas na Tabela 2.

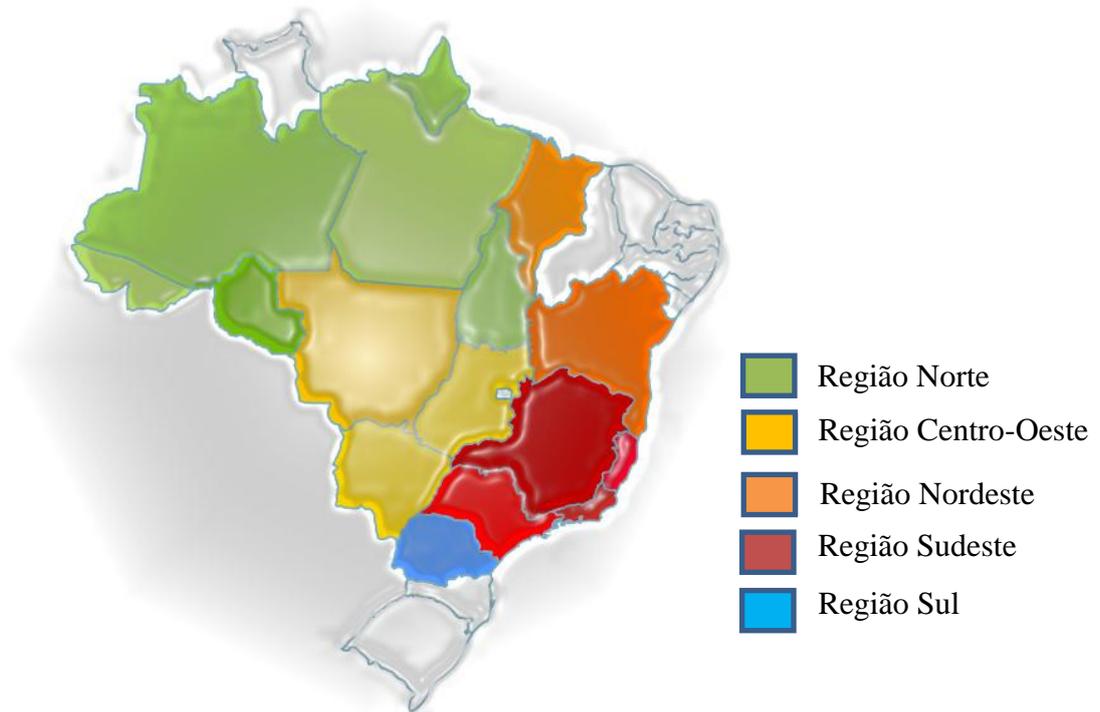


Figura 10. Ocorrência de espécies de *Unonopsis* no Brasil.
Fonte: MAAS et al., 2015.

Tabela 2. Espécies do gênero *Unonopsis* endêmicas do Brasil.

Espécie	Estado
<i>Unonopsis aurantiaca</i> Maas & westra	Espírito Santo
<i>Unonopsis bahiensis</i> Maas & Orava	Bahia
<i>Unonopsis bauxitae</i> Maas	Minas Gerais
<i>Unonopsis duckei</i> R.E.Fr	Amazonas, Pará, Rondônia
<i>Unonopsis heterotricha</i> Maas & Westra	Pará
<i>Unonopsis renati</i> Maas & Westra	Espírito Santo
<i>Unonopsis riedeliana</i> R.E.Fr	Rio de Janeiro
<i>Unonopsis sanctae-teresae</i> Maas & Westra	Espírito Santo

Fonte: MAAS et al., 2007, 2015.

No Estado do Amazonas existem registros de 7 espécies, sendo elas: *U. floribunda*, *U. rufescens*, *U. duckei*, *U. guatterioides*, *U. stipitata*, *U. spectabilis*, e *U. veneficiorum* (MAAS et al., 2007).

O gênero *Unonopsis* apresenta problemas taxonômicos, claramente observados através das inúmeras tentativas de posicioná-lo dentro da família Annonaceae, ou mesmo pela dificuldade de classificar algumas espécies, como é o caso de *U. guatterioides*, que em 2007 passou a ter 13 espécies como sinônimas (MAAS et al., 2007). Devido a similaridades morfológicas este gênero é considerado botanicamente próximo dos gêneros *Onychopetalum* e *Bocageopsis* (MAAS et al., 2007).

2.3.1. Etnobotânica do gênero *Unonopsis*

Algumas espécies do gênero *Unonopsis* são empregadas na medicina popular. Como exemplo, as cascas do tronco de *U. floribunda* têm sido utilizadas no tratamento de artrites, bronquites, reumatismo, diarreia (JOVEL, et al., 1996) e malária (KVIST et al., 2006), enquanto as folhas de *U. stipitata* e *U. veneficiorum* têm sido empregadas por povos indígenas no tratamento de doenças cognitivas (ADAMS et al., 2007). O uso das cascas de *U. spectabilis* tem sido reportado devido a suas propriedades antirreumáticas e antimicrobianas (SATALAYA et al., 2009). Em adição, as cascas de *U. glaucopetala* são consideradas um eficiente remédio contra picadas de cobras (VAN ANDEL, 2000). Existem relatos sobre o uso de *U. veneficiorum* no preparo de veneno de caça e como agente antifertilizante (SCHULTES, 1993), além do uso de *U. spectabilis* no processo de inicialização xamânica (JAUREGUI et al., 2011).

2.3.2. Fitoquímica do gênero *Unonopsis*

O gênero *Unonopsis* é quimicamente caracterizado pela presença de alcaloides aporfínicos *sensu lato*, incluindo aporfínicos *sensu stricto* (22), oxoaporfínicos (23), azafluorenonas (24), fenantrênicos (25) e bisaporfínicos (26) (Figura 11) (SILVA et al., 2012a). Embora alcaloides sejam considerados seus principais metabólitos secundários,

outras classes tais como esteroides, terpenoides e fenólicos podem ser encontradas neste gênero. Trabalhos fitoquímicos relevantes são citados a seguir:

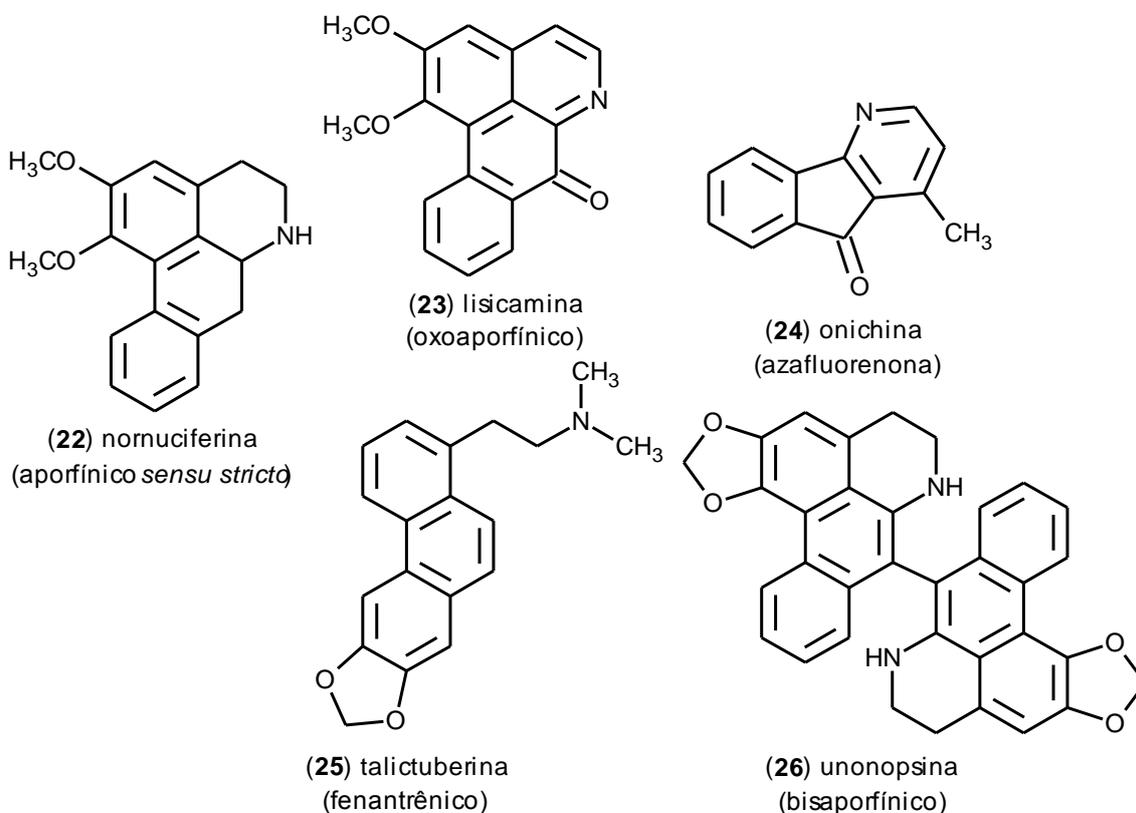


Figura 11. Classes de alcaloides reportadas no gênero *Unonopsis*.
Fonte: SILVA et al., 2012a.

Das cascas do tronco da espécie *U. spectabilis* foram isolados os alcaloides bisaporfínicos urabaína, unonopsina e heteropsina; as azafluorenonas onichina, 6-hidroxionichina, macondina, ursulina e isoursulina, além dos alcaloides oxoaporfínicos lirioidenina e lisicamina. Os esteróides estigmasterol e β -sitosterol também foram isolados de suas cascas (LAPRÉVOTE et al., 1987, 1988).

Em estudo realizado com as cascas do tronco de *U. pacifica* foram isolados os alcaloides unonopsina, heteropsina, lirioidenina, norushinsunina e norcepharadiona A (ARANGO, et al., 1988).

O estudo fitoquímico das cascas do tronco da espécie *U. buchtienii* resultou no isolamento dos alcaloides liriodenina, lisicamina, O-metilmoscatoлина e unonopsina, além dos esteroides estigmasterol e β -sitosterol (WAECHTER et al., 1999).

O fracionamento biomonitorado das cascas do tronco de *U. lindmanii* permitiu o isolamento dos alcaloides liriodenina, lisicamina e unonopsina (SIQUEIRA et al., 1998). Em trabalho recente foram isolados os alcaloides anonaina, asimilobina, liriodenina e 5,8-dimetóxi-7-hidróxi-1-metil-4-azafluoren-9-ona, além do megastigmano (-)-(5R,6S)-megastigman-3-ona-10,7-olidio, sendo estes dois últimos inéditos. Em adição foi reportado o isolamento das seguintes substâncias não alcaloídicas: hidróxi-megastigma-6,7-dien-9-ona (*grasshopper* cetona), *N-trans*-feruloiltiramina e (-)-siringaresinol (YOSHIDA et al., 2013).

São escassos os trabalhos com óleos essenciais de *Unonopsis*, sendo descritos na literatura os estudos dos óleos essenciais das raízes, cascas e frutos de *U. guatterioides* (FOURNIER et al., 1997), das flores de *U. stipitata* (TEICHERT et al., 2009) e das folhas de *U. costaricensis* (PALAZZO et al., 2009).

Outra característica química marcante no gênero é a presença do triterpeno policarpol (**6**) (Figura 5), tendo esta substância sido reportada das cascas de *U. glaucopetala*, *U. guatterioides*, *U. spectabilis* e *U. pacifica* (JAYASURIYA et al., 2005; TOUCHÉ et al., 1981; SILVA et al., 2012b, LAPRÉVOTE et al., 1987; ARANGO et al., 1988). Policarpol apresenta uma crescente lista de atividades biológicas descrita na literatura, já tendo sido confirmadas suas atividades antifilárica (NYASSE et al., 2006), antineoplásica (MATOS et al., 2006), antitripanossômica (NGANTCHOU et al., 2009) e antiinflamatória (SAADAWI et al., 2012).

2.3.3. A espécie *Unonopsis guatterioides* (A. D.C.) R. E. Fr.

U. guatterioides é uma espécie constituída por arbustos e árvores, chegando a atingir 10 metros de altura. Sua distribuição ocorre principalmente na Região Amazônica (Colômbia, Venezuela, Peru, Bolívia e Brasil) (MAAS et al., 2007).

No Brasil essa espécie pode ser encontrada nos principais domínios fitogeográficos do país (Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica), tendo sido registrada nas Regiões Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia e Tocantins), Nordeste (Maranhão), Centro-oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná) (Figura 12) (MAAS et al., 2007, 2015). *U. guatterioides* pode ser encontrada em florestas de igapó, de terra-firme ou de várzea (MAAS et al., 2007).

Devido à sua ampla variabilidade morfológica, essa espécie é considerada a de mais difícil classificação dentro do gênero *Unonopsis*, tendo atualmente 13 espécies consideradas sinónimas, dentre as quais se destacam *U. buchtienii* e *U. lindmanii* devido aos estudos fitoquímicos recentes. No Brasil, assim como na Colômbia, Venezuela, Peru e Bolívia, diversos nomes populares são reportados para esta espécie (Tabela 3).

Tabela 3. Nomes populares registrados para a espécie *U. guatterioides*.

País	Nome popular
Bolívia	bilibëte (yuracare), chocolatillo, laurel, midha dhahua (tacana), monte-chirimoya, piraquina e xahuisi (chácobo).
Brasil	araticum, ariticum, ata do igapó, atinha, cundurú, envira, envira da várzea, envira do caiso, envira do igapó, envira preta, envira preta do igapó, envira surucucu, envira surucucu da várzea, invira, mejo de porco, mutambi, muxiba, pindaíba, pindaíba branca e pindaíba preta.
Colômbia	cajao dujecu (muinane), duguecu (muinane), foonïdujecu de hoja pequeña

	(muinane), sifcó (andoque), weé-goo-moo (makuna) e yáw-töt (makuna).
	achuana, anonilla, bara, bara caspi, barra, ciwánim yais, copal, espintana,
Peru	hicoja, hicoja amarilla, hicoja negra, hoja hedionda, icoja, namakia yais, uchi yais, yais e ycoje.
Venezuela	majãúe, palo salao, pojolóa.

Fonte: MAAS et al., 2015.

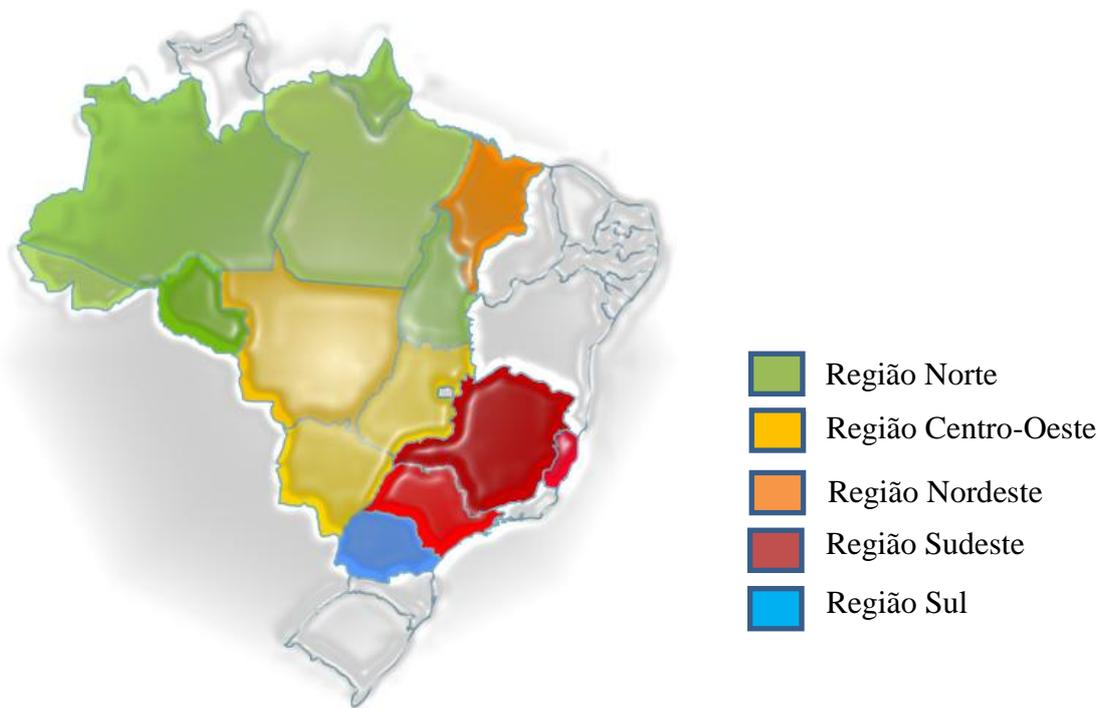


Figura 12. Distribuição geográfica de *U. guatteroides* no Brasil.
Fonte: MAAS et al., 2015.

U. guatteroides foi a primeira espécie do gênero *Unonopsis* estudada fitoquimicamente. No início dos anos 80 foram reportados os aminoácidos arginina, histidina e lisina em suas folhas, bem como policarpol em suas raízes (TOUCHE et al., 1981). Em trabalho posterior de *sreening* fitoquímico foi confirmada a presença de alcaloides, flavonoides e leucoantocianinas nas folhas e cascas do tronco, além de saponinas e cumarinas nas cascas do troco (FORGAGS et al., 1983). O primeiro isolamento de alcaloides de *U. guatteroides* ocorreu no ano de 1984, sendo reportados os alcaloides assimilobina, anonaina, lisicamina, liriodenina e norushinsunina

(GUINAUDEAU et al., 1988). Em trabalho recente, o alcaloide nornuciferina foi reportado nesta espécie, juntamente com outros alcaloides previamente descritos (SILVA et al., 2012a). Outro trabalho recente descreve a presença de policarpol nas cascas do tronco e galhos de *U. guatteroides* (SILVA et al., 2012b).

Análises de GC e GC-MS dos óleos essenciais das raízes e frutos de *U. guatteroides* revelaram δ -cadinol (21,6%), 1-terpinen-4-ol (15,7%) e óxido de cariofileno (15,3%) como constituintes majoritários dos frutos, enquanto β -cariofileno (22,5%), α -pineno (11,7%) e óxido de cariofileno (10,4%) foram descritos como principais constituintes das raízes (FOURNIER, et al., 1997).

2.3.4. A espécie *Unonopsis stipitata* Diels

Unonopsis stipitata é constituída por árvores e arvoretas, podendo atingir 12 metros de altura. Esta espécie encontra-se distribuída na Região Amazônica da Colômbia, Venezuela, Peru e Brasil, além das 3 Guianas (MAAS et al., 2007). No Brasil, essa espécie apresenta distribuição restrita à Região Norte (Acre, Amazonas, Amapá, Pará, Rondônia), sendo conhecida como envira cascuda, envira preta, envira surucucu, envireira, pindaíba e pindaíba preta (MAAS et al., 2007, 2015).

Estudos fitoquímicos relataram a presença dos alcaloides fenantrênicos argentinina, stiptatina e talictuberina nessa espécie (GUINAUDEAU et al., 1988). Não existem relatos desta classe de alcaloides em outras espécies do gênero *Unonopsis*.

2.3.5. A espécie *Unonopsis duckei* R. E. F

Essa espécie é constituída exclusivamente por árvores, podendo alcançar 30 metros de altura. É uma espécie endêmica do Brasil, sendo encontrada apenas na Região Norte do país (Amazonas, Pará e Rondônia) (MAAS et al., 2007). No Brasil é conhecida como envira, envira cascuda, envira preta, envira surucucu e envireira. *U.*

duckei apresenta florescência de junho a dezembro e frutos durante todo o ano, podendo ser encontrada em florestas de terra firme (MAAS et al., 2007, 2015).

Os alcaloides anonaina, asimilobina, glaucina, norglaucina, normuciferina, lirioidenina, lisicamina e glaziovina foram reportados recentemente nesta espécie (SILVA et al., 2014).

2.3.6. A espécie *Unonopsis rufescens* (Baill.) R.E. Fr.

Unonopsis rufescens é uma espécie constituída exclusivamente por árvores. Essa espécie tem distribuição na Guiana, Suriname, Guiana Francesa e Brasil. No Brasil, essa espécie apresenta distribuição restrita à Região Norte (Amazonas, Amapá, Pará). *Unonopsis rufescens* apresenta florescência de abril a dezembro e frutos durante todo o ano, sendo encontrada em floresta de terra firme (MAAS et al., 2007). É conhecida como envira, envira preta e envireira (MAAS et al., 2007, 2015). Na literatura não existem estudos relativos à sua composição química.

2.3.7. A espécie *Unonopsis floribunda* Diels

Essa espécie é constituída exclusivamente por árvores. Sua distribuição ocorre em toda Região Amazônica da Colômbia, Peru, Equador, Bolívia e Brasil, sendo encontrada em florestas de terra-firme e várzea. *Unonopsis floribunda* apresenta florescência e frutos durante todo o ano, o que facilita a sua identificação no campo (MAAS et al., 2007). No Brasil, essa espécie apresenta distribuição restrita à Região Norte (Acre, Amazonas), sendo conhecida como envira, envira preta e envireira, mesmos nomes dados à espécie *U. floribunda* (MAAS et al., 2007, 2015). Na literatura não existem estudos relativos à sua composição química.

2.4. Quimiotaxonomia e quimiometria

A quimiotaxonomia ou quimiosistemática pode ser entendida como a ciência que faz uso do conhecimento químico, tal como a distribuição restrita de determinadas classes de metabólitos secundários em famílias botânicas (ex. acetogeninas em Annonaceae; quassinóides em Simaroubaceae; limonóides em Rutaceae e Meliaceae), para auxiliar na sistemática formal de plantas, fungos, etc., sendo considerada uma ferramenta que juntamente com a morfologia, anatomia e citogenética, auxilia no trabalho de identificação sistemática (SILVA & GOTTLIEB, 1987; WATERMAN & GRAY, 1987; SILVA et al., 1988; FANG et al., 1993). Observa-se, contudo, que o sucesso desta abordagem depende da máxima acumulação de informações acerca da distribuição desses metabólitos dentro de um determinado táxon (WATERMAN & GRAY, 1987; WATERMAN, 2007).

Com o avanço significativo da instrumentação, principalmente na área de espectrometria de massas e cromatografia (CHIARADIA et al., 2008), um volume de dados químicos cada vez maior é gerado em um curto espaço de tempo, sendo fundamental a utilização de ferramentas estatísticas para a melhor compreensão destas informações (MOITA NETO & MOITA, 1998; BARROS NETO et al., 2006).

Nas últimas décadas a aplicação de análises multivariadas, tais como a análise de componentes principais (PCA) e análise de agrupamento hierárquico (HCA) na interpretação de conjuntos significativos de dados tem se tornado recorrente. Diversos são os trabalhos que relatam com sucesso a utilização destas ferramentas para melhor compreensão de dados químicos (DUNLOP et al., 2000; AZEVEDO et al., 2001; SKAL TSA et al., 2001; FRANCISCO et al., 2008; KAPETANOS et al., 2008; DEV et al., 2010; STASHENKO et al., 2010; WESTON, 2010; GONG et al., 2014).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Contribuir para o conhecimento fitoquímico e quimiotaxonômico do gênero *Unonopsis*, a partir de investigações por técnicas instrumentais e quimiométricas.

3.2. Específicos

- Identificar por GC-MS os principais constituintes dos óleos essenciais das folhas de *U. floribunda*, *U. rufescens*, *U. duckei*, *U. guatterioides* e *U. stiptata*;
- Caracterizar por ESI-MS as frações alcaloídicas das folhas de *U. floribunda*, *U. rufescens*, *U. duckei*, *U. guatterioides* e *U. stiptata*;
- Realizar análises multivariadas (HCA e PCA) dos conjuntos de dados obtidos por GC-MS e ESI-MS;
- Investigar as frações alcaloídicas biologicamente promissoras por ESI-MSⁿ e HPLC-DAD-MS;
- Elucidar através de técnicas de NMR 1D/2D e MS as substâncias isoladas;
- Realizar a prospecção de policarpol nos galhos e cascas do tronco das espécies estudadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Análises cromatográficas

4.1.1. Cromatografia em camada delgada (TLC)

As análises em camada delgada foram realizadas em cromatoplaças de sílica gel 60 (Merck), com espessura de 0,25 mm suportadas em alumínio e indicador de fluorescência F₂₅₄. Os *spots* foram relevados com luz UV (254 e 366 nm), bem como revelador vanilina sulfúrica.

4.1.2. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

As análises em HPLC analítico foram realizadas em cromatógrafo modelo Surveyor Plus[®] (Thermo Scientific) equipado com bomba Surveyor LC Pump Plus, autoamostrador Surveyor Autosampler Plus, válvula de injeção Rheodyne (25 µL), operando simultaneamente com detector de arranjo de diodos (DAD) Surveyor PDA Plus Detector e de espectrometria de massas (MS) (TSQ Quantum Access).

As análises em HPLC semi-preparativo foram realizadas em cromatógrafo modelo UFLC[®] (Shimadzu) equipado com duas bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A₅, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, modulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 ou 500 µL).

4.1.3. Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS)

As análises de GC-MS foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Roraima (UFRR) em colaboração com o Prof. Dr. Luiz Antonio M. A. da Costa, utilizando-se um equipamento Shimadzu modelo GC2010/QP2010 Plus.

4.2. Solventes

Todos os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos e em experimentos de MS eram grau de pureza HPLC da Tedia. Solventes deuterados da

marca Merck foram utilizados para obtenção dos espectros de Ressonância Magnética Nuclear (NMR). Água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q, modelo *Synthesis* (Millipore).

4.3. Métodos espectroscópicos/espectrométricos

As análises de NMR foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em colaboração com o Prof. Dr. Andersson Barison. Os espectros de uma e duas dimensões (1D e 2D) foram adquiridos em equipamentos Bruker, modelo AVANCE 400 ou AVANCE III 600, operando a 9,4 e 14,1 Tesla (T), observando ^1H a 400,13 e 600,13 MHz, respectivamente, e ^{13}C a 100,62 e 150,90 MHz, respectivamente. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3), metanol deuterado (CD_3OD) ou acetona deuterada ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$). Todos os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em ppm relativos ao sinal do tetrametilsilano (TMS). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

As análises de MS foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas da UFAM. Os espectros foram registrados em equipamento do tipo *ion-trap*, modelo LCQ Fleet[®] (Thermo Scientific), ou Triplo Quadrupolo, modelo TSQ Quantum Access Thermo Scientific), operando com fonte de *electrospray* (ESI) ou com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI).

4.4. Coleta e identificação do material botânico

O material botânico (folhas, galhos e casca do tronco) de *U. guatterioides*, *U. stipitata*, *U. duckei*, *U. floribunda* e *U. rufescens* foi coletado em setembro de 2012 nos três principais sítios de coleta do Estado do Amazonas: Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), Distrito Agropecuário da SUFRAMA (DAS) e campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) (Figura 13). 4 espécimes de *U. duckei*, 2

de *U. floribunda* e 1 de *U. rufescens* foram coletadas em DAS; 2 espécimes de *U. duckei* foram coletadas em RFAD; 2 espécimes de *U. stipitata* e 1 de *U. guatterioides* foram coletados na UFAM. Espécimes coletadas em RFAD e DAS foram previamente identificadas e marcadas, enquanto espécies coletadas na UFAM foram identificadas pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Webber, do Departamento de Biologia da UFAM. A exsicata de cada indivíduo está depositada de acordo com a tabela 4.



Figura 13. Sítios de coleta próximos à área metropolitana de Manaus.

Tabela 4. Informações sobre o material botânico coletado.

Espécie	Código	Local de coleta	Nº da exsicata
<i>U. duckei</i>	DRA	RFAD	2627 ^a
<i>U. duckei</i>	DRB	RFAD	3289 ^a
<i>U. duckei</i>	DDA	DAS	3478 ^b
<i>U. duckei</i>	DDB	DAS	3504 ^b
<i>U. floribunda</i>	FDA	DAS	6701 ^b
<i>U. floribunda</i>	FDB	DAS	7394 ^b
<i>U. rufescens</i>	RD	DAS	3767 ^b
<i>U. duckei</i>	DDC	DAS	80 ^b
<i>U. duckei</i>	DDD	DAS	610 ^b

<i>U. stipitata</i>	SUA	UFAM	8164 ^c
<i>U. stipitata</i>	SUB	UFAM	8250 ^c
<i>U. guatterioides</i>	GU	UFAM	8249 ^c

^aHerbário do INPA (Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia); ^bColeção Botânica do PDBFF/INPA (Projeto Dinâmica Biológica de Fragmentos Florestais); ^cHerbário da UFAM (Universidade Federal do Amazonas).

4.5. Obtenção dos óleos essenciais

Após a coleta, as folhas de cada indivíduo foram secas a temperatura ambiente por um período de 20 dias. 100 g das folhas secas de cada indivíduo foram pesadas, trituradas e submetidas à extração por hidrodestilação em aparelho do tipo *Clevenger* por um período de quatro horas. Os óleos essenciais foram extraídos com CH₂Cl₂, secos sobre Na₂SO₄ anidro e filtrados. Após evaporação do solvente e pesagem, o rendimento de cada óleo essencial foi calculado dividindo-se a massa do óleo pela massa de folhas secas e o resultado multiplicado por 100 (Tabela 5). Os óleos foram acondicionados em *vials* e armazenados na temperatura de -15°C até as análises.

Tabela 5. Rendimento dos óleos de espécies de *Unonopsis* obtidos por hidrodestilação.

Espécie	Código	Rendimento (%)
<i>U. duckei</i>	DRA	0,089 (89 mg)
<i>U. duckei</i>	DRB	0,056 (56 mg)
<i>U. duckei</i>	DDA	0,063 (63 mg)
<i>U. duckei</i>	DDB	0,065 (65 mg)
<i>U. floribunda</i>	FDA	0,429 (429 mg)
<i>U. floribunda</i>	FDB	0,380 (380 mg)
<i>U. rufescens</i>	RD	0,527 (527 mg)
<i>U. duckei</i>	DDC	0,064 (64 mg)
<i>U. duckei</i>	DDD	0,088 (88 mg)
<i>U. stipitata</i>	SUA	0,150 (150 mg)
<i>U. stipitata</i>	SUB	0,137 (137 mg)
<i>U. guatterioides</i>	GU	0,105 (105 mg)

4.6. Análise por GC-MS dos óleos essenciais e tratamento quimiométrico dos dados

As análises dos óleos essenciais foram realizadas em um equipamento GC-MS modelo GC2010/ QP2010 Plus (Shimadzu) usando detector seletivo e coluna capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) (Restek). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,02 mL.min⁻¹. A solução de injeção foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 15 mg de óleo em 1 mL de acetato de etila bidestilado, sendo injetado 1 µL de solução em modo Split, na razão 1:50. A programação da temperatura da coluna foi de 60 a 280°C, com aumento gradativo de 3°C.min⁻¹. As temperaturas do injetor, da fonte de íons e linha de transferência foram de 220, 260 e 280 °C, respectivamente.

Para obtenção dos índices de retenção (IR) foi injetada uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares (C₇-C₃₀) e o cálculo foi feito de acordo com a equação de Van Den Dool e Kratz (1963):

$$IR = 100n + 100i \times \frac{t_{R(x)} - t_{R(ha)}}{t_{R(hp)} - t_{R(ha)}}$$

Onde:

$t_{R(x)}$ = Tempo de retenção da substância alvo

$t_{R(ha)}$ = Tempo de retenção do hidrocarboneto anterior

$t_{R(hp)}$ = 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 percentagem de cada substância foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todas as substâncias presentes na amostra e o resultado multiplicado por 100. A identificação dos constituintes foi baseada na comparação dos

espectros obtidos com aqueles armazenados na biblioteca Wiley 8ª edição e comparação dos índices de retenção com dados da literatura (Adams, 2007).

A análise multivariada dos dados obtidos através da análise de GC-MS foi realizada através do software Chemoface versão 1.5 (NUNES et al., 2012). A análise dos componentes principais (PCA) foi calculada através da normalização da variação das 54 substâncias identificadas, sendo a análise hierárquica de cluster (HCA) calculada através da distância euclidiana e média de ligação das três principais componentes cuja variância acumulada representou 93,45%.

4.7. Marcha alcaloídica em escala analítica

As frações alcaloídicas em escala analítica foram obtidas como descrito por SOARES et al., 2015. Após a coleta, as folhas de cada indivíduo foram secas a temperatura ambiente por um período de 20 dias e pulverizadas. O material pulverizado (500 mg de cada planta, exceto FDA, FDB, RD e GU, onde foi utilizado 1 g) foi vigorosamente agitado utilizando um misturador vortex (1 min) com uma mistura de hidróxido de amônio 10 % (NH_4OH) (5 mL) e diclorometano (CH_2Cl_2) (5 mL) em um recipiente de vidro. A fase orgânica foi transferida para outro recipiente de vidro e submetido à agitação vigorosa (1 min) com ácido acético ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) 10% (5 mL). A fase aquosa foi removida e tratada com NH_4OH até alcançar pH 10, sendo em seguida submetida a vigorosa agitação (1 min) com CH_2Cl_2 (5 mL). A fase orgânica foi separada, seca sobre Na_2SO_4 anidro e transferida para um novo recipiente de vidro. As frações alcaloídicas (Tabela 6) foram obtidas após evaporação do solvente orgânico sob corrente de nitrogênio gasoso.

Tabela 6. Massa das frações alcaloídicas obtidas em escala analítica.

Espécie	Código	Frações alcaloídicas (mg)
<i>U. duckei</i>	DRA	1,2 (0,24%)
<i>U. duckei</i>	DRB	1,1 (0,22%)
<i>U. duckei</i>	DDA	1,1 (0,22%)
<i>U. duckei</i>	DDB	1,2 (0,24%)
<i>U. floribunda</i>	FDA	1,1 (0,11%)
<i>U. floribunda</i>	FDB	1,0 (0,10%)
<i>U. rufescens</i>	RD	1,1 (0,11%)
<i>U. duckei</i>	DDC	1,1 (0,22%)
<i>U. duckei</i>	DDD	1,2 (0,24%)
<i>U. stipitata</i>	SUA	1,0 (0,20%)
<i>U. stipitata</i>	SUB	1,0 (0,20%)
<i>U. guatterioides</i>	GU	1,1 (0,11%)

4.8. Análise por ESI-MS das frações alcaloídicas e tratamento quimiométrico dos dados

Soluções estoque (1 mg.mL⁻¹) das frações alcaloídicas das folhas foram preparadas em metanol. Aliquotas (5 µL) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a 5 µg.mL⁻¹, sendo as soluções resultantes analisadas por infusão direta no espectrometro de massas.

Todos os espectros de massas foram registrados em modo de monitoramento contínuo (Thermo LCQ Fleet Tune application) utilizando-se um equipamento LCQ Fleet, equipado com fonte de ESI e operando no modo positivo de aquisição para as análises de ESI-MS e ESI-MSⁿ. Os espectros foram obtidos a partir da média de pelo menos 10 espectros adquiridos. As amostras foram infundidas na fonte de ESI através da bomba seringa do equipamento (10 µL.min⁻¹). As condições analíticas da análise foram as seguintes: *spray voltage*, 5 kV; *sheath gas*, 10 arb; *auxiliary gas*, 5 arb; *sweep gas*, 0 arb; *capillary temp*, 200 °C; *capillary voltage*, 40 V; *tube lens*, 115 V; *mass range*, *m/z* 200 a 400; *collision gas*, He. Os espectros de ESI-MSⁿ foram obtidos a partir da aplicação de energia de 20 a 30%.

As análises multivariadas dos dados obtidos a partir das análises por ESI-MS foram realizadas através do software Chemoface versão 1.5 (NUNES et al., 2012). Íons com intensidade abaixo de 5% relativa aos íons mais abundantes foram negligenciados, durante a análise dos dados (SCHIOZER et al., 2012). A análise de componentes principais (PCA) foi calculada através da variação dos íons registrados (variáveis), sendo a análise de HCA calculada através da distância euclidiana e média de ligação das quatro principais componentes, cuja variância acumulada representou 99,18 %.

4.9. Prospeção de policarpol por TLC e MS

A extração de policarpol das espécies *U. duckei*, *U. floribunda*, *U. rufescens* e *U. stipitata* foi realizada de acordo com o método adaptado anteriormente descrito para a espécie *U. guatterioides* (SILVA et al., 2012b). Aproximadamente 10 g de material botânico pulverizado (galhos e cascas do tronco) foram macerados por três dias com hexano (80 ml). Os extratos foram concentrados em evaporador rotatório. O precipitado formado foi lavado com hexano e recristalizado em acetato de etila. Aproximadamente 1 mg de cada amostra foi separada para análises de TLC e MS. Os experimentos de TLC e MS foram conduzidos em comparação com um padrão autêntico de policarpol previamente isolado e caracterizado por NMR (SILVA et al., 2012b).

As análises de MS foram realizadas em equipamento LCQ Fleet equipado com fonte de APCI e operando no modo positivo. Todos os espectros foram adquiridos no modo de monitoramento contínuo. Soluções estoque (1 mg.mL^{-1}) das amostras foram preparadas em acetato de etila. Aliquotas ($5 \text{ }\mu\text{L}$) das soluções estoque foram posteriormente diluídas a $5 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo as soluções resultantes infundidas na fonte de APCI através da bomba seringa do equipamento ($30 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$).

As análises de TLC foram realizadas utilizando a mistura hexano/acetato de etila (7:3) como fase móvel e vanilina sulfúrica e luz UV (254 e 366) como reveladores. Todas as amostras foram solubilizadas em acetato de etila (1 mg.ml⁻¹).

4.10. Investigação das frações alcaloídicas biologicamente promissoras por ESI-MSⁿ e HPLC-DAD-MS

Devido à aplicação medicinal das folhas de *U. stipitata* e das cascas de *U. floribunda*, suas respectivas frações alcaloídicas foram selecionadas para investigações por ESI-MSⁿ e HPLC-DAD-MS. A fração alcaloídica das cascas de *U. floribunda* (FDA) (1,2 mg) foi obtida de acordo com a metodologia descrita no item 4.7, sendo utilizado 1 g de material botânico. Ambas as amostras foram analisadas por ESI-MSⁿ de acordo com a metodologia descrita no item 4.8.

10 µL de cada solução estoque (1 mg.mL⁻¹) foram analisados em sistema HPLC-DAD-MS, tal como descrito no item 4.1.2. Foi utilizada durante a análise uma coluna C18 (Luna) (5µm, 150 x 4,60 mm) da Phenomenex. Como fases móveis foram utilizadas uma solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B), com gradiente de eluição de 30-80% (B) em 14 minutos (1 mL.min⁻¹), seguido de 80% por mais 10 minutos. O detector de DAD monitorou a faixa de 200-400 nm. Os parâmetros analíticos utilizados na fonte de APCI foram os seguintes: *discharge current*: 5 µA; *vaporizer temperature*: 350 °C; *capillary temperature*: 270 °C; *sheath gas*: 35 psi; *aux gas*: 15 arb, *mass range, m/z* 150-800.

4.11. Marcha alcaloídica em escala preparativa

As frações alcaloídicas em escala preparativa foram obtidas como descrito por SOARES et al., 2015. 300 g de material botânico pulverizado, folhas de *U. stipitata* (SUA) e cascas do tronco de *U. floribunda* (FDA), foram extraídos com NH₄OH 10% (2 L) e CH₂Cl₂ (2 L) a temperatura ambiente por 72 horas. A fase orgânica recuperada

foi transferida para um funil de separação e extraída com solução aquosa de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 10% (2x 1 L). A fase aquosa ácida foi removida e tratada com NH_4OH até alcançar pH 10, sendo em seguida extraída com CH_2Cl_2 (2x 0,3 L). As frações CH_2Cl_2 foram separadas e concentradas em evaporador rotatório, fornecendo as frações alcaloídicas das folhas de *U. stipitata* (FASF) (668 mg) e das cascas do tronco de *U. floribunda* (FAFC) (344 mg).

4.12. Fracionamento cromatográfico das frações alcaloídicas das folhas de *U. stipitata* (FASF) e das cascas de *U. floribunda* (FAFC)

Cerca de 100 mg das amostras FASF e FAFC foram solubilizados, individualmente, em 500 μL de metanol/diclorometano (1:1) e submetidos a fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo, tal como descrito no item **4.1.2**. Nesta etapa utilizou-se uma coluna C18 (Luna) (5 μm , 250 x 15,00 mm) da Phenomenex. As fases móveis, assim como o gradiente de eluição, foram as mesmas utilizadas no item **4.10**, sendo monitorados os comprimentos de onda de 250 e 280 nm. O fluxo utilizado em ambas as análises foi de 6 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. O fracionamento de FASF resultou em 30 frações, enquanto o fracionamento de FAFC resultou em 32 frações. Após análises por MS e MS^2 em equipamento TSQ Quantum Acess, sete frações (Tabela 7) foram encaminhadas para análises de NMR 1D e 2D.

Tabela 7. Frações submetidas à análises de NMR 1D e 2D.

Código	Massa obtida (mg)
FASF13	3,8
FASF16	67,7
FASF18	5,4
FASF22	3,7
FASF29	1,3
FAFC5	63,4
FAFC15	3,1

4.13. Purificação das subfrações de FAFC

As amostras **FAFC12** (3,2 mg), **FAFC13** (1,8 mg), **FAFC14** (5,6 mg), **FAFC18** (3,4 mg), **FAFC20** (2,0 mg) e **FAFC21** (1,6 mg) foram solubilizadas, individualmente, em 200 μL de metanol/diclorometano (1:1) e submetidas a fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo, tal como descrito no item **4.1.2**. Nesta etapa utilizou-se uma coluna fenil-hexil (Luna) (5 μm , 250 x 10,00 mm) da Phenomenex. As fases móveis, bem como os comprimentos de onda utilizados foram os mesmos descritos no item **4.12**. As análises foram conduzidas em modo isocrático de eluição (Tabela 8) por 15 min, com fluxo de 3 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$. Após análises por MS e MS² em equipamento TSQ Quantum Access as frações purificadas (Tabela 8) foram encaminhadas para análises de NMR 1D e 2D.

Tabela 8. Subfrações de FAFC submetidas a fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo.

Amostras	Fase móvel	Frações	Massa obtida (mg)
FAFC12	(B – 50%)	FAFC12.3	1,5
FAFC13	(B – 50%)	FAFC13.3	1,1
FAFC14	(B – 50%)	FAFC14.4	3,8
FAFC18	(B – 50%)	FAFC18.3 FAFC18.4	0,5 2,1
FAFC20	(B – 60%)	FAFC20.3 FAFC20.4	0,6 0,5
FAFC21	(B – 60%)	FAFC21.3	1,0

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Óleos essenciais de *Unonopsis* e quimiotaxonomia

Os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação apresentaram coloração amarelo-esverdeada, com rendimentos variando entre 0,064% e 0,527% (Tabela 5). *U. duckei* apresentou os rendimentos mais baixos, enquanto os melhores rendimentos foram observados para *U. floribunda* e *U. rufescens*.

Na análise dos óleos essenciais por GC-MS foram identificados 57 constituintes diferentes (Tabela 9), sendo a porcentagem de identificação de 76,02 a 95,72%. Dentre as substâncias identificadas foi observada a predominância de sesquiterpenos, enquanto traços de monoterpenos foram registrados em espécimes de *U. duckei*.

Os sesquiterpenos espatulenol (**27**) e óxido de cariofileno (**28**) foram observados como principais constituintes dos óleos essenciais para todas as espécies, com exceção de *U. guatterioides* e *U. stipitata*. Como pode ser observado na tabela 9, as maiores concentrações de espatulenol foram registradas em espécimes de *U. duckei* (19,10-40,20%) e as menores em *U. guatterioides* (4,80%), enquanto as maiores concentrações de óxido de cariofileno foram registradas em *U. rufescens* (15,95%) e as menores em *U. guatterioides* (4,80%).

U. stipitata apresentou altas concentrações de (*E*)-cariofileno (**29**) (7,99-18,76%) e biciclogermagreno (**30**) (8,86-19,97%), juntamente com elemol (**31**) (11,20%) para a espécie SUB, o que não foi observado em outras espécies.

Tabela 9. Composição percentual dos constituintes químicos dos óleos essenciais das diferentes espécies de *Unonopsis*.

RF ^a	Substâncias	GU ^b	SUA	SUB	FDA	FDB	RD	DRA	DDA	DDC	DDD	DRB	DDB
1095	Linalol	-	-	-	-	-	-	0,29	-	-	0,25	-	-
1223	Citronelol	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	-	-	-
1335	δ-Elemeno	2,51	0,99	-	0,27	-	-	0,48	0,46	0,70	1,29	2,07	-
1345	α-Cubebeno	1,19	-	-	0,83	0,61	0,24	0,34	-	0,17	0,21	0,36	0,18
1350	Acetato de citronelila	-	-	-	-	-	-	-	-	0,60	-	-	-
1369	Ciclosativeno	0,71	0,11	0,27	0,27	0,38	-	0,40	-	0,33	-	-	0,17

1373	α -Ylangeno	0,34	-	-	0,17	0,60	0,31	-	-	0,26	-	-	0,22
1374	α -Copaeno	11,26	0,40	0,66	6,26	6,96	3,71	1,99	1,65	3,05	1,39	3,88	2,59
1387	β -Bourboneno	0,90	-	0,45	1,24	1,48	1,44	0,46	0,30	0,31	0,37	0,30	0,18
1387	β -Cubebeno	0,84	-	5,64	0,84	0,74	0,26	0,49	0,36	0,55	0,43	1,00	0,63
1389	β -Elemene	2,03	1,31	-	0,89	1,00	0,42	2,65	2,17	4,38	2,37	2,60	1,89
1409	α -Gurjuneno	-	-	-	0,19	0,16	-	1,26	0,49	-	0,11	-	-
1417	(<i>E</i>)-Cariofileno	3,91	18,76	7,99	4,06	4,04	3,97	1,22	0,70	0,61	0,58	1,32	0,46
1431	β -Gurjuneno	0,76	-	-	0,15	0,20	0,32	0,80	-	0,40	0,38	0,42	-
1434	γ -Elemeno	0,44	-	-	0,12	-	-	-	-	0,47	-	-	-
1437	α -Guaiano	-	-	-	2,48	2,30	2,58	-	-	-	-	-	-
1439	Aromadendreno	1,13	2,38	0,74	-	-	-	0,44	0,48	0,55	0,59	0,21	0,50
1449	Sinulareneno	0,18	0,21	-	-	-	-	-	-	0,29	-	-	-
1452	α -Humuleno	1,74	5,18	1,13	0,94	1,06	0,84	0,96	-	0,75	0,56	0,92	0,79
1458	<i>allo</i> -Aromadendreno	3,55	-	-	-	-	-	0,40	-	-	-	-	-
1478	γ -Muuroleno	2,79	0,45	-	4,18	3,90	6,37	1,11	0,58	0,52	0,54	1,11	0,45
1484	Germacreno D	1,62	4,56	0,90	1,54	1,17	2,59	1,24	1,82	1,05	0,93	0,90	-
1489	β -Selineno	0,31	0,30	0,64	0,80	1,17	0,50	0,54	-	-	0,50	0,57	-
1492	δ -Selineno	-	0,22	-	0,53	0,24	-	-	-	-	-	-	-
1496	Valenceno	1,94	-	-	2,10	1,30	-	0,37	0,66	0,47	0,48	0,48	-
1500	Biciclogermacreno	-	19,97	8,86	1,55	0,70	3,67	-	-	-	-	-	-
1500	α -Muuroleno	1,26	0,23	0,25	1,93	2,13	2,38	0,57	-	0,32	0,34	-	0,18
1509	α -Bulneseno	-	0,40	1,46	1,69	1,70	1,24	-	-	-	-	-	-
1513	γ -Cadineno	1,91	0,26	0,67	4,96	3,54	4,26	0,92	0,84	2,82	0,65	1,01	0,56
1522	δ -Cadineno	2,24	0,70	0,60	5,37	2,90	4,02	0,83	0,86	0,72	0,75	1,23	0,41
1533	(<i>E</i>)-Cadina-1,4-dieno	-	-	0,21	0,43	-	-	-	-	0,28	0,50	-	0,40
1537	α -Cadineno	0,25	-	-	0,39	0,41	0,55	-	-	-	-	-	-
1544	α -Calacoreno	-	-	-	2,16	2,31	2,56	-	-	-	0,19	-	-
1548	Elemol	1,60	1,29	11,20	1,30	1,70	0,68	7,86	1,84	1,48	1,70	1,17	4,73
1554	β -Vetiveneno	0,63	0,53	1,07	1,14	1,46	1,09	1,29	1,39	0,87	0,88	0,66	0,95
1559	Germacreno B	1,84	0,56	-	0,52	0,50	0,29	-	1,38	3,63	-	0,25	0,28
1561	(<i>E</i>)-Nerolidol	0,52	-	-	-	-	-	0,63	-	-	-	-	-
1565	(3 <i>Z</i>) Benzoato de hexenila	-	-	-	-	-	-	0,53	-	0,75	1,06	0,74	-
1567	1,5-Epoxisalvial-4(14)-eno	0,46	0,88	1,75	0,30	0,33	0,26	3,65	2,18	0,96	1,97	4,29	2,48
1577	Espatuleno	4,80	20,46	17,9	15,66	13,96	17,13	19,1	37,49	30,6	28,77	20,70	40,20
1582	Óxido de cariofileno	4,80	8,41	8,47	9,77	10,54	15,95	9,67	9,75	8,16	7,60	9,19	10,64
1590	β -Copaen-4 α -ol	0,32	0,27	-	0,75	0,81	0,56	-	0,54	1,05	0,54	0,70	0,34
1592	Viiridiflorol	1,61	1,60	0,87	0,99	1,30	0,84	-	-	1,05	1,22	-	-
1594	Salvial-4(14)-en-1-ona	-	0,47	0,26	-	-	-	0,25	1,04	-	-	1,71	0,50
1599	Widdrol	-	-	-	1,14	1,36	0,63	-	-	-	-	-	-
1600	Guaiol	5,14	0,85	5,06	1,43	1,60	1,57	6,41	2,78	1,57	1,52	0,49	3,16
1600	Rosifoliol	-	0,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1602	Ledol	-	-	2,82	-	-	-	1,83	0,93	-	-	-	-
1608	Epóxi de humuleno II	0,95	0,98	2,69	2,26	3,32	2,89	3,21	2,71	2,04	3,15	2,91	3,21
1631	Isospatuleno	5,51	1,60	0,36	3,14	1,47	2,21	2,57	4,54	2,86	6,39	10,81	1,96
1644	α -Muurolol	2,45	-	0,86	1,35	4,30	0,78	1,37	1,77	0,98	2,06	2,40	1,43
1649	β -Eudesmol	1,13	-	0,97	1,10	1,51	1,16	1,49	1,85	1,01	1,52	1,24	1,16

1652	α -Cadinol	3,64	0,59	1,70	1,62	1,85	2,09	3,05	2,90	2,07	2,90	3,58	2,00
1670	Bulnesol	2,65	-	1,85	0,70	0,69	0,80	2,40	1,49	0,52	0,48	-	1,03
1675	Cadaleno	-	-	-	0,48	0,41	0,62	0,52	-	-	0,56	0,23	0,36
1845	(2 <i>E</i> , 6 <i>E</i>)-Acetato de farnesila	-	-	-	-	-	-	0,24	-	-	0,29	-	-
1913	(5 <i>E</i> , 9 <i>E</i>)-Farnesil acetona	1,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Monoterpenos	-	-	-	-	-	-	0,29	-	1,00	0,25	-	-
	Sesquiterpenos Hidrocarbonetos	46,28	57,52	31,54	48,48	43,37	44,23	19,28	14,14	23,50	14,60	19,52	11,20
	Sesquiterpenos Oxigenados	37,10	38,20	56,76	41,51	44,74	47,55	64,26	71,81	55,10	61,17	59,93	72,84
	Total Identificado (%)	83,38	95,72	88,30	89,99	88,11	91,78	83,83	85,95	79,60	76,02	79,45	84,04

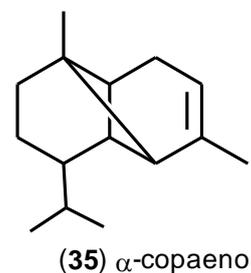
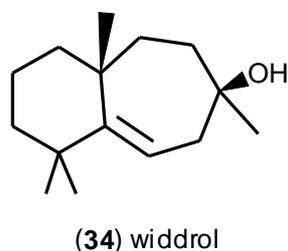
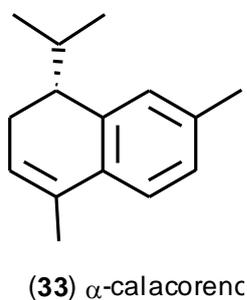
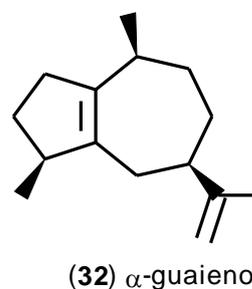
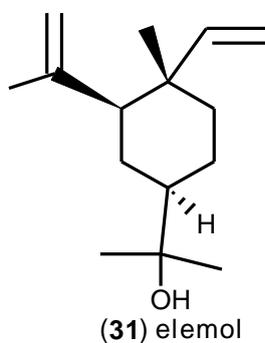
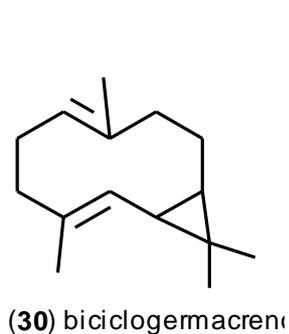
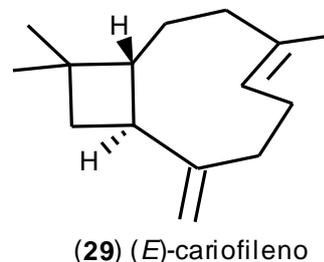
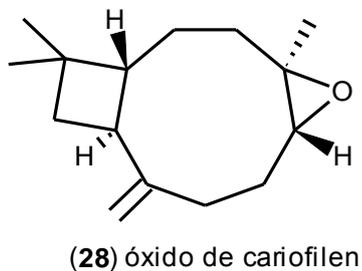
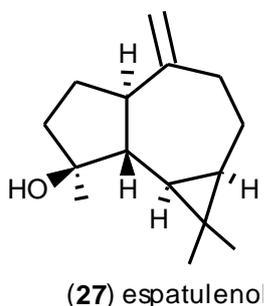
^aRI = Índice de retenção descrito na literatura (Adams, 2007).^bGU - *U. guatterioides* (UFAM); SUA - *U. stipitata* (UFAM); SUB - *U. stipitata* (UFAM); FDA - *U. floribunda* (DAS); FDB - *U. floribunda* (DAS); RD - *U. rufescens* (DAS); DRA - *U. duckei* (RFAD); DDA - *U. duckei* (DAS); DDC - *U. duckei* (DAS); DDD - *U. duckei* (DAS); DRB - *U. duckei* (RFAD); DDB - *U. duckei* (DAS).

As espécies *U. floribunda* e *U. rufescens* apresentaram em sua composição química a presença de α -guaieno (**32**) (2,30-2,58%), α -calacoreno (**33**) (2,16-2,56%) e widdrol (**34**) (0,63-1,36%), substâncias não observadas nas outras espécies investigadas, com exceção de α -calacoreno, detectado em nível de traço em umas das espécimes de *U. duckei* (0,19%). A ausência de aromadendreno foi outra importante particularidade observada para as espécies *U. floribunda* e *U. rufescens*.

A espécie *U. guatterioides* foi a única que apresentou α -copaeno (**35**) (11,26%) como constituinte majoritário. A predominância de sesquiterpenos nos óleos essenciais de espécies de *Unonopsis* (Tabela 9) está de acordo com estudo prévio realizado com *U. costaricensis* (PALAZZO et al., 2009), onde foram reportados como constituintes majoritários dos óleos essenciais das folhas os sesquiterpenos germacreno D (62,9%), viridiflorol (12,1%) e biciclogermagreno (10,0%). Sesquiterpenos também foram observados como constituintes majoritários dos óleos essenciais das raízes e frutos de *U. guatterioides* (FOURNIER et al., 1997), sendo descritos δ -cadinol (21,6%) e (*E*)-cariofileno (22,5%) como principais constituintes das raízes e frutos, respectivamente. Estas observações estão de acordo com estudos prévios realizados com espécies de Annonaceae (FOURNIER & LEBOEUF, 1999).

Embora monoterpenos tenham sido observados em nível de traço em *U. duckei* e não tenham sido observadas nas outras espécies, trabalhos prévios reportam esta

classe em altas concentrações nas flores de *U. stipitata* (TEICHERT et al., 2009), sendo sugerido que estas substâncias desempenham uma importante função no processo de polinização.



A análise estatística (PCA e HCA) dos dados de GC-MS dos óleos essenciais permitiu inequívocas correlações entre as espécies estudadas (Figuras 14 e 15). Quatro grupos principais foram observados no dendrograma de HCA, sendo *U. guatterioides* (Grupo I) e *U. stipitata* (Grupo II) claramente separadas das demais espécies. O grupo III foi constituído pelas espécies *U. rufescens* e *U. floribunda*, onde uma composição química ligeiramente diferente foi observada. Para *U. floribunda* observou-se a presença

de ciclosativeno, α -gurjeneno, δ -selineno e valenceno, substâncias não observadas em *U. rufescens*.

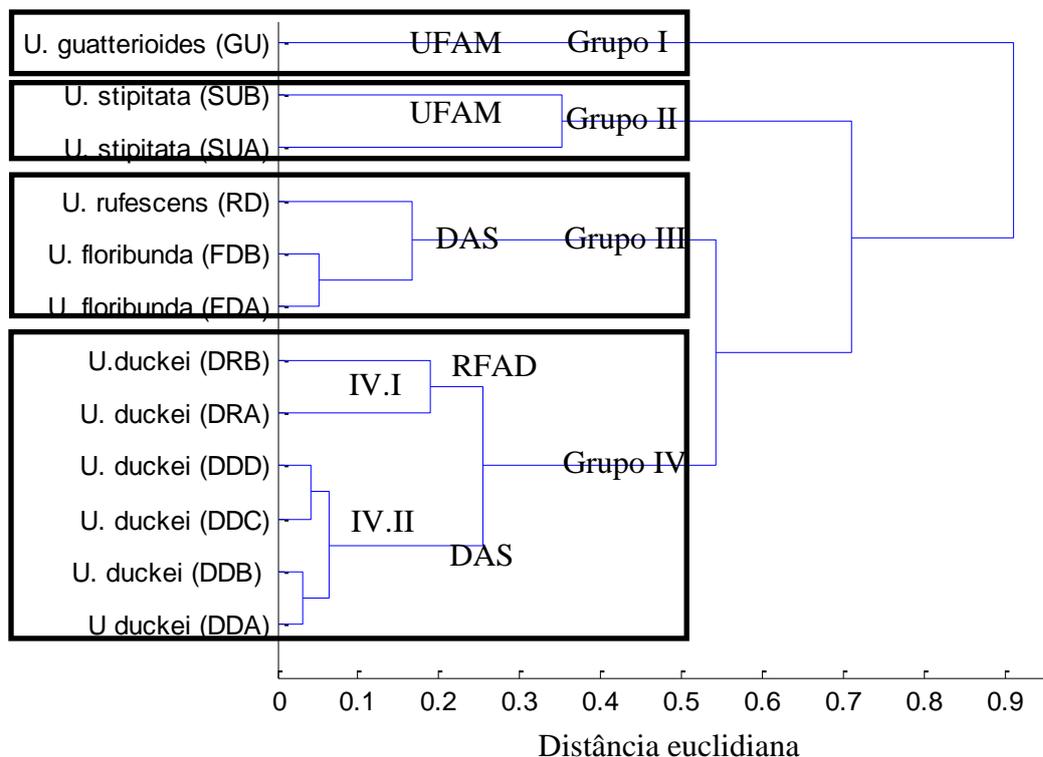


Figura 14. Dendrograma de HCA das diferentes espécies de *Unonopsis* baseado na composição química dos óleos essenciais.

O grupo IV (Figura 14) foi constituído por espécimes de *U. duckei*, com formação de dois subgrupos (IV.I e IV.II), sendo estes correspondentes aos diferentes sítios de coleta. Analisando a variabilidade química destas populações é possível observar que indivíduos coletados em RFAD exibiram maior diferença na composição química quando comparados a indivíduos coletados em DAS. Quando a variabilidade química do grupo IV é comparada com a do grupo III é possível observar como *U. floribunda* e *U. rufescens* são quimicamente próximas.

No grupo II (Figura 14) observa-se baixa similaridade química entre os espécimes de *U. stipitata*, SUA e SUB, se comparada aos demais grupos formados, sugerindo que espécimes de *U. stipitata* apresentam alta variabilidade química na constituição dos óleos essenciais.

O grupo I, constituído por *U. guatterioides*, apresentou a maior variabilidade química. Esta observação não é surpresa, uma vez que *U. guatterioides* é de longe a espécie mais problemática e variável dentro do gênero *Unonopsis* (MAAS et al., 2007).

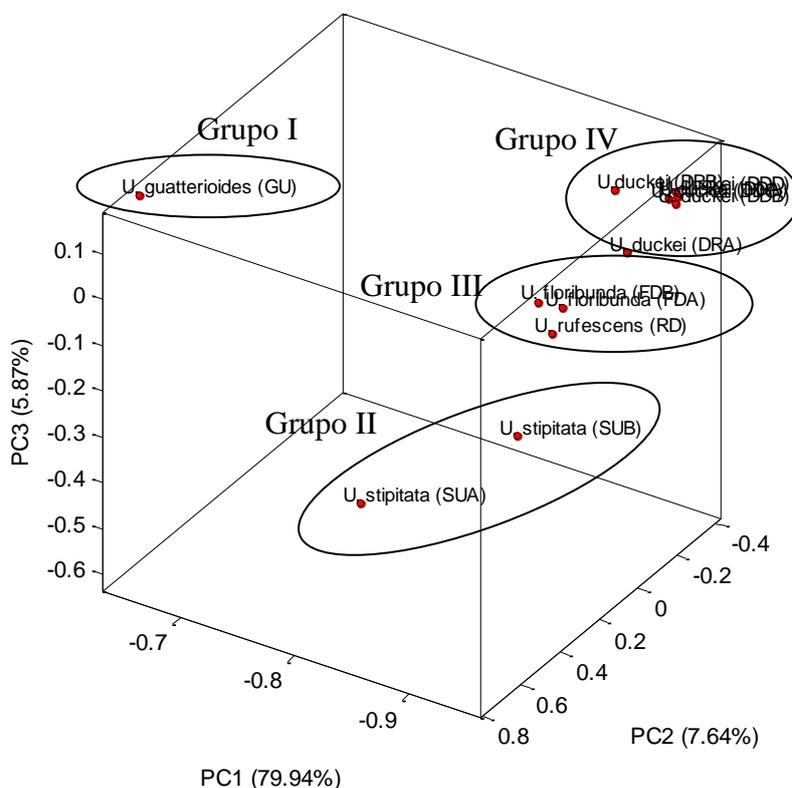


Figura 15. Gráfico de PCA das diferentes espécies de *Unonopsis* baseado na composição química dos óleos essenciais.

5.2. Perfil alcaloídico de *Unonopsis* e quimiotaonomia

As frações alcaloídicas foram obtidas com rendimentos variando entre 0,10% e 0,24% (Tabela 6). *U. guatterioides*, *U. floribunda* e *U. rufescens* apresentaram os rendimentos mais baixos, enquanto os melhores rendimentos foram observados para *U. duckei* e *U. stipitata*.

O *fingerprint* por infusão direta das frações alcaloídicas das folhas revelou diversos ions de m/z par (Figuras A1 a A12 do material anexo), sugerindo a potencial presença de alcaloides. Esta proposta foi baseada em estudos previos realizados com diferentes alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico, tais como aporfínicos,

tetrahidroprotoberberínicos, benzilisoquinolínicos e proaporfínicos, onde o processo de protonação ocorre em maiores proporções quando comparados a outras reações (SILVA et al., 2012a, 2014, SOARES et al., 2015). Os picos base correspondendo aos íons de m/z 268, 298 e 342 $[M+H]^+$ foram observados nos espectros de massas das espécies *U. guatteroides*, *U. duckei* e *U. stipitata*, respectivamente, enquanto o pico base de m/z 328 $[M+H]^+$ foi observado nos espectros das espécies *U. floribunda* e *U. rufescens* (Figura 16). Diversos outros íons com valores de m/z par foram observados, apontando para amostras complexas com alta diversidade de alcaloides.

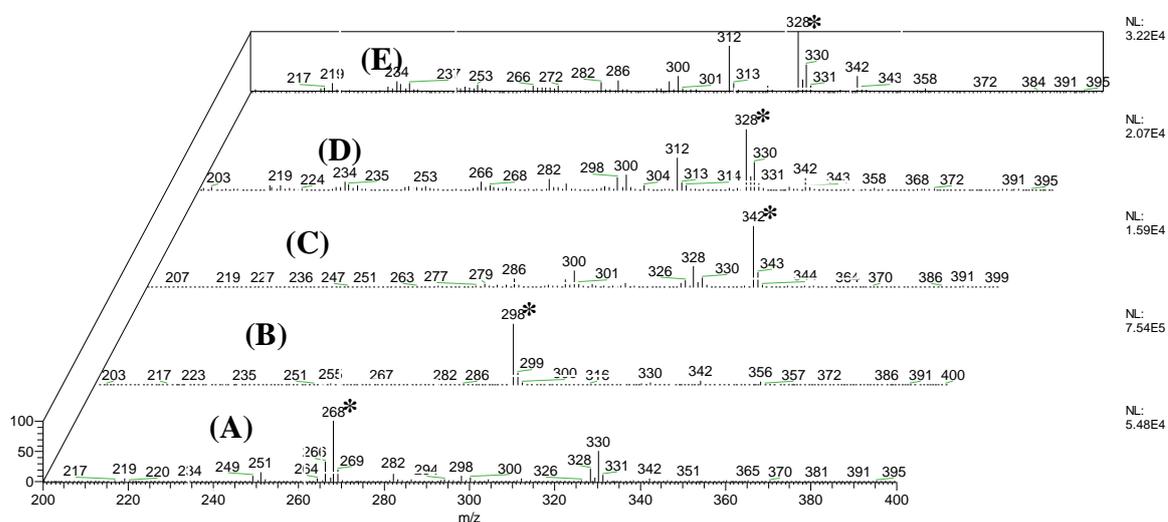


Figura 16. Espectro de íons totais das frações alcaloídicas das folhas de *U. guatteroides* (A), *U. duckei* (B), *U. stipitata* (C), *U. floribunda* (D) e *U. rufescens* (E). * denota o pico base para cada amostra.

A análise dos espectros de MS revelou que 54 íons permaneceram após eliminação dos íons abaixo de 5% (Tabela A1). Estes íons e suas intensidades relativas foram submetidas a análises de PCA e HCA.

No gráfico de escore de PCA (Figura 17A) foram observados quatro grupos principais, onde os espécimes de *U. guatteroides* (Grupo I), *U. stipitata* (Grupo II) e *U. duckei* (grupo III) foram claramente segregadas, sendo o grupo IV constituído pelos espécimens de *U. rufescens* e *U. floribunda*, o que não é surpresa, uma vez que estas espécies botanicamente próximas (MAAS et al., 2007) foram observadas ser

quimicamente próximas (item 5.1).

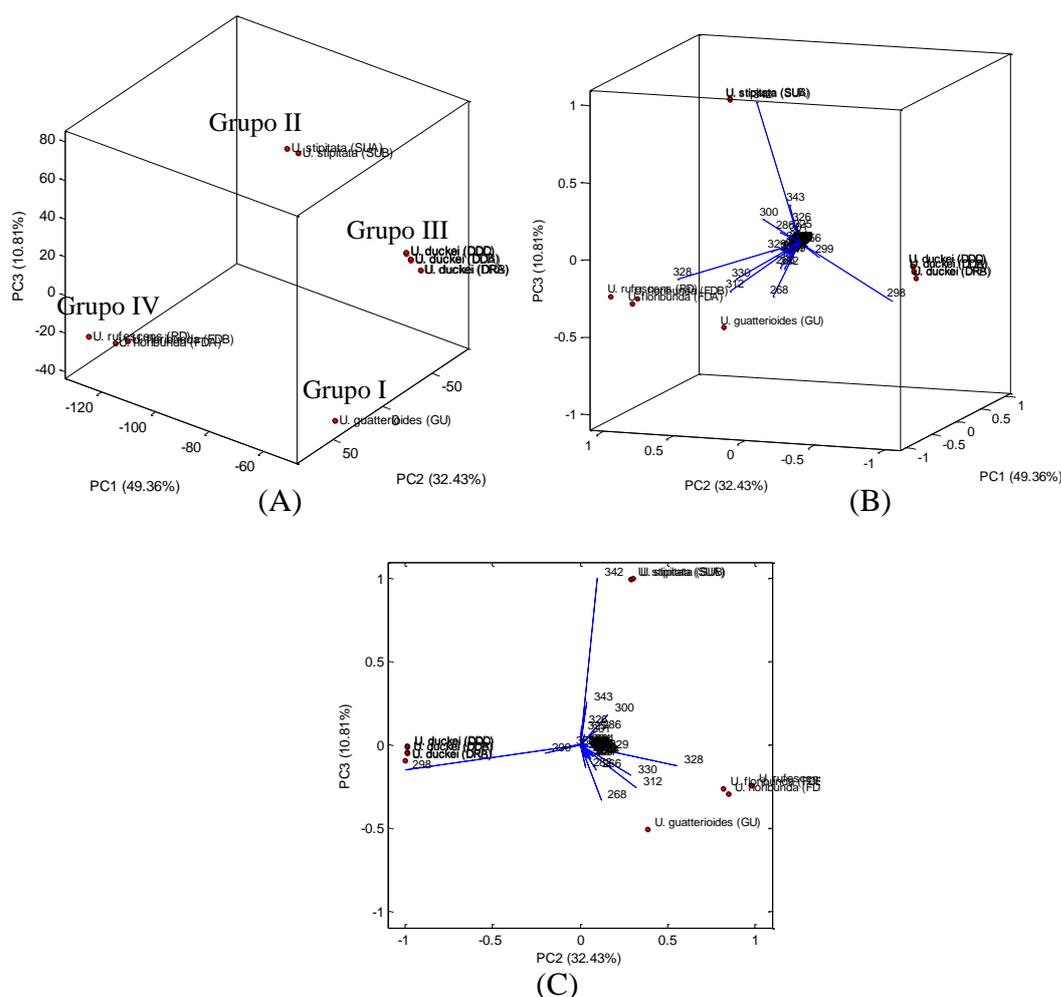


Figura 17. Grafico de escore de PCA (A) e biplot (B e C).

De acordo com o biplot de PCA (Figura 17 2B e 2C), os íons de m/z 268, 298, 328 e 342 $[M+H]^+$, foram os principais responsáveis pela segregação dos grupos I-IV. Através dos espectros de MS^n destes íons (Figura A13 a A17 do material anexo) foram observadas fragmentações chave previamente descritas para alcaloides aporfínicos, proaporfínicos e tetrahidroprotoberberínicos (SILVA et al., 2012a, 2014; SOARES et al., 2015; Stévigny et al., 2004).

O espectro de MS^n dos íons de m/z 268 e 298 $[M+H]^+$ apresentou fortes evidências de esqueleto aporfínico, sendo observadas perdas iniciais de 17 ($-NH_3$) (m/z 268 \rightarrow 251) e 31 u ($-NH_2CH_3$) (m/z 298 \rightarrow 267), o que está em acordo com a presença e

ausência, respectivamente, de metila no nitrogênio do heterociclo, além de perdas subsequentes de 32 (-CH₃OH) (m/z 251 → 219 e m/z 267 → 235) e 28 u (-CO) (m/z 219 → 191 e m/z 235 → 207), o que está em acordo com a presença de grupos metoxil e hidroxil vicinais (STÉVIGNY et al., 2004). O padrão de fragmentação observado para o íon de m/z 268 é consistente com a estrutura do alcaloide aporfínico asimilobina (**35**) (SILVA et al., 2012a, 2014; SOARES et al., 2015), previamente reportado nas folhas de *U. guatterioides* (SILVA et al., 2012a), enquanto a fragmentação observada para o íon de m/z 298 está de acordo com a estrutura do alcaloide proaporfínico glaziovina (**36**), previamente reportado nas folhas de *U. duckei*. (SILVA et al., 2014).

No espectro de MS² do íon de m/z 328 foram observados diversos íons fragmento, destacando-se o intenso produto de m/z 178 e um íon menor de m/z 151. Altas perdas de massa são incomuns em alcaloides aporfínicos, porém comuns em alcaloides benzilisoquinolínicos e tetrahidroprotoberberínicos (SOARES et al., 2015; SCHMIDT et al., 2005; SHIM et al., 2013). Os íons de m/z 178 e 151 foram previamente descritos como fragmentos chave de compostos tetrahidroprotoberberínicos contendo grupos metoxil e hidroxil no anel A (SOARES et al. 2015). Embora seja possível predizer o padrão de substituição da substância (tipo escoulerina) (**37**), não é possível garantir a exata posição de substituição, uma vez que para este esqueleto diferentes posições com os mesmos substituintes irão fornecer os mesmos íons fragmentos.

No espectro de MSⁿ do íon de m/z 342, além da perda inicial 17 u (-NH₃) (m/z 342 → 325), perdas de 15 u (·CH₃) (m/z 325 → 310) e 31 u (·OCH₃) (m/z 325 → 294) em MS³, e perda de 15 u (·CH₃) (m/z 310 → 295) em MS⁴ foram observadas. Estas fragmentações chave estão de acordo com a presença de esqueleto aporfínico *N*-metilado e grupos metoxil adjacentes (STÉVIGNY et al., 2004). O padrão de

fragmentação observado para o íon de m/z 342 é consistente com a estrutura do alcaloide norglaucina (**38**) previamente reportado nas folhas de *U. duckei* (SILVA et al., 2014). Todas as fragmentações observadas estão sumarizadas na tabela 10.

Tabela 10. Íon precursor e fragmentos chave observados por ESI-MS^a.

Espécies	[M+H] ⁺	MS ²	MS ³	MS ⁴	Tipo de esqueleto
<i>U. guatterioides</i>	268 ^a	251 ^a (-17u) ^b	219 ^a (-32u)	191 (-28u)	Aporfínico
<i>U. duckei</i>	298 ^a	267 ^a (-17u)	235 ^a (-32u)	207 (-28u)	Proaporfínico
<i>U. stipitata</i>	342 ^a	325 ^a (-17u)	310 ^a (-15u)	295 (-15u)	Aporfínico
			294 (-31u)		
<i>U. floribunda</i>	328 ^a	178 (-150u)	-	-	Tetrahidroprotoberberínico
		151 (-177u)			
<i>U. rufescens</i>	328 ^a	178 (-150u)	-	-	Tetrahidroprotoberberínico
		151 (-177u)			

^aÍon precursor; ^bPerdas neutras observadas.

A análise de PCA mostrou que os alcaloides tentativamente identificados asimilobina (aporfínico), glaziovina (proaporfínico) e norglaucina (aporfínico) desempenham um papel fundamental na segregação das espécies *U. guatterioides*, *U. duckei* e *U. stipitata*, respectivamente, enquanto o alcaloide tetrahidroprotoberberínico desconhecido foi responsável pela formação do grupo IV constituído por espécimes de *U. floribunda* e *U. rufescens*.

No dendrograma de HCA (Figura 18) foram observados dois subgrupos com espécimes de *U. duckei* (grupo III), sendo estes correspondentes aos diferentes sítios de coleta (RFAD e DAS). A variabilidade química observada entre estas espécimes foi próxima à observada entre espécimes de *U. stipitata* (grupo II), enquanto para *U. floribunda* e *U. rufescens* (grupo IV) maior variabilidade química foi observada. Maior similaridade química foi observada entre os grupos II e IV, sendo este grupo maior quimicamente próximo de grupo I. O grupo III apresentou menor similaridade química quando comparado aos demais grupos.

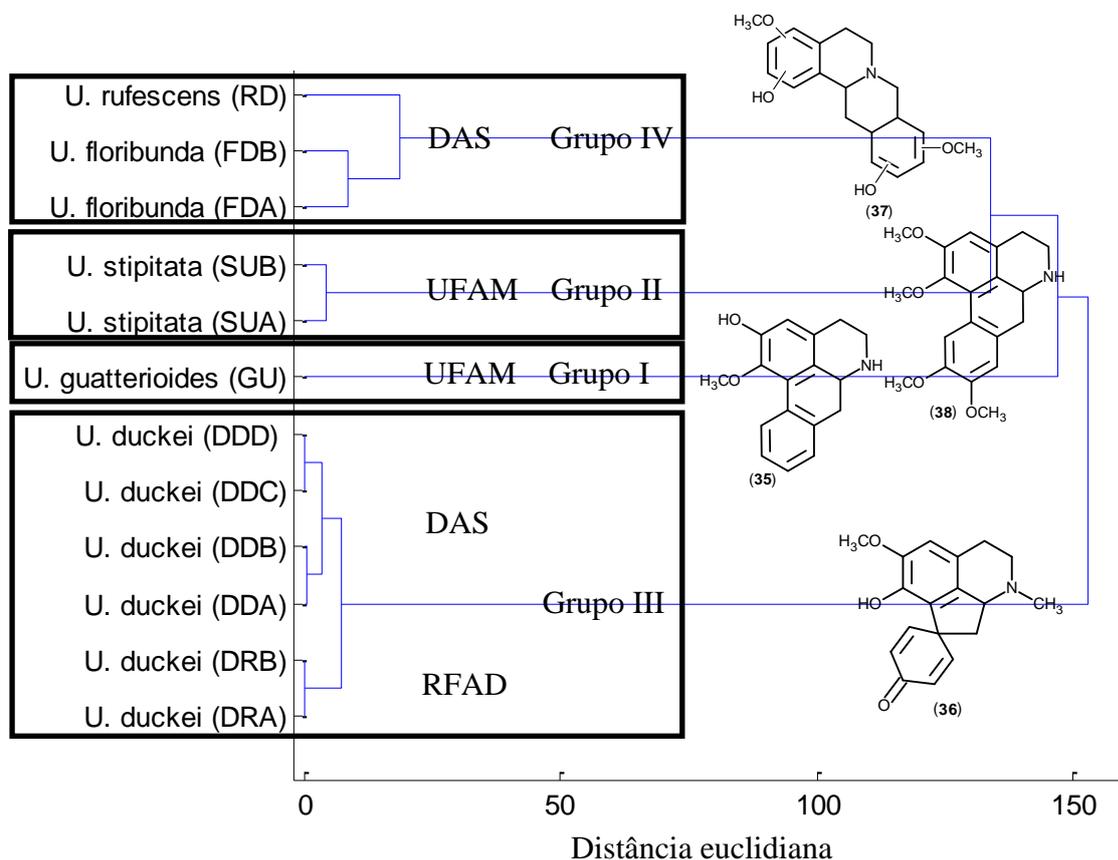


Figura 18. Dendrograma de HCA e substâncias tentativamente identificadas através das análises de fragmentação.

Embora a análise multivariada dos óleos essenciais tenha apresentado diferença significativa entre espécies e sítios de coleta (item 5.1), a variabilidade química entre as espécies estudadas se mostrou superior à observada com a abordagem alcaloídica, sugerindo que constituintes não voláteis (alcaloides) apresentam melhor potencial para propostas quimiotaxonômicas do que constituintes voláteis (terpenóides). Outro fator que contribui para o uso de *fingerprint* de alcaloides em abordagens quimiotaxonômicas é a presença recorrente destas substâncias no gênero *Unonopsis*.

A presença de tetrahidroprotoberberínicos em *U. rufescens* e *U. floribunda* é um fato importante uma vez que este tipo de alcaloide não foi reportado no gênero *Unonopsis*. Estas observações juntamente com as observadas no item 5.1 poderiam suportar uma futura aproximação botânica entre estas espécies.

5.3. Policarpol no gênero *Unonopsis* e quimiotaxonomia

Das cascas do tronco e galhos de *U. duckei*, *U. floribunda*, *U. rufescens* e *U. stipitata* foi possível obter um sólido branco após procedimento de extração e recristalização. Na análise por TLC, em comparação com um padrão autêntico de policarpol (SILVA et al., 2012b), observou-se que todas as amostras apresentaram o mesmo fator de retenção ($R_f = 0,6$) quando eluídas com uma mistura de hexano-acetato de etila (7:3) e revelada com vanilina sulfúrica (*spot* azul) e luz UV (254 nm). A observação de um intenso *spot* azul em todas as amostras esta de acordo com resultados esperados para triterpenos (OLESZEK et al., 2008).

As amostras quando submetidas a análise de MS em modo *full scan*, apresentaram íons majoritários de m/z 441, 423 e 405 (Figura 19).

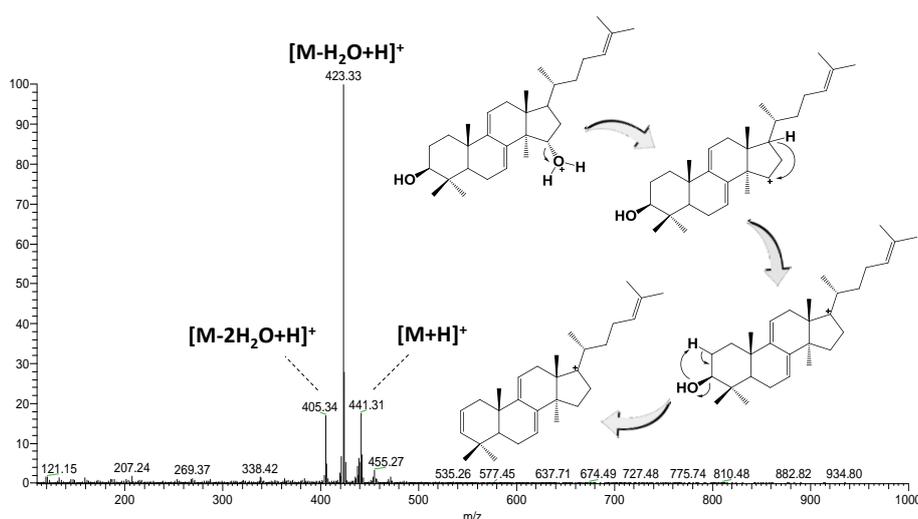


Figura 19. Espectro de massas e proposta de fragmentação para as perdas sequenciais do policarpol observadas na fonte de APCI.

O íon de m/z 441 corresponde à molécula protonada esperada para o policarpol, enquanto os íons de m/z 423 e 405 são consistentes com perdas sequenciais neutras de H_2O . Triterpenos parecem apresentar este comportamento dissociativo devido a aplicação da alta temperatura de dessolvatação em experimentos de APCI (KOOLEN et al., 2013). Todas as amostras apresentaram esses mesmos três íons quando submetidas a

análises de MS. Estas evidências juntamente com as observações por TLC auxiliaram na confirmação da presença de policarpol nos galhos e cascas do tronco das espécies investigadas, sendo essa substância reportada pela primeira vez nessas espécies.

A importância quimiotaxonômica do policarpol para a família Annonaceae foi primeiramente reconhecida por LÉBOEUF et al. (1982) durante pesquisas sistemáticas com diversas espécies pertencentes a famílias vizinhas, tais como Lauraceae, Monimiaceae e Menispermaceae. Na oportunidade, não foi encontrado policarpol nessas famílias, sendo sugerido pela primeira vez como marcador quimiotaxonômico. Essa ideia foi sustentada por anos (GOULART et al., 1986; JUNG et al., 1990). Recentemente foi reportado seu isolamento de *Duguetia glabriuscula* (PEREIRA et al., 2003), *Duguetia furfuraceae* (SILVA et al., 2007), *Artabotrys madagascariensis* (MURPHY et al., 2008), *Piptostigma preussi* (NGANTCHOU et al., 2009) e *Artabotrys spinosus* (SICHAEM et al., 2011), todas espécies da família Annonaceae, reforçando a proposta inicial deste composto como marcador quimiotaxonômico. Considerando sua ampla ocorrência em nível de gênero é apropriado restringir o termo “marcador quimiotaxonômico” em nível de família, sendo sugerido o uso do termo “marcador químico” para nível de gênero.

No gênero *Unonopsis*, o policarpol foi reportado em *U. glaucopetala* (JAYASURIYA et al., 2005), *U. guatteroides* (TOUCHE et al., 1981; SILVA et al., 2012b), *U. spectabilis* (LAPRÉVOTE et al., 1987) e *U. pacifica* (ARANGO et al., 1988). A recorrente observação de policarpol em espécies do gênero *Unonopsis*, o qual foi reportado em todas as espécies submetidas a abordagens fitoquímicas, demonstra o potencial quimiotaxonômico desta substância, sendo policarpol sugerido como marcador químico regular do gênero *Unonopsis*.

5.4. Análises de ESI-MSⁿ e HPLC-DAD-MS da amostra FASF (*U. stipitata*)

Conforme discutido no item 5.2, a análise do perfil alcaloídico da fração FASF por ESI-MSⁿ evidenciou a presença de diversos alcaloides, sendo o pico base tentativamente caracterizado como norglaucina.

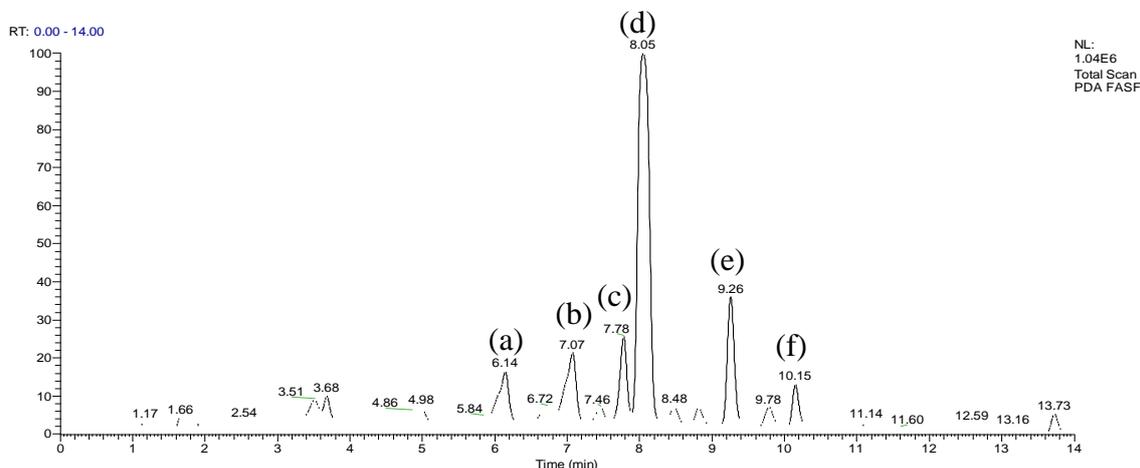


Figura 20. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a amostra FASF. Gradiente de eluição: 30-80% de B em 14 minutos ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Fases móveis: solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B). DAD: 200-400 nm. Coluna: C18 ($5 \mu\text{m}$, $150 \times 4,60 \text{ mm}$).

Através da análise do cromatograma obtido por HPLC-DAD da amostra FASF (Figura 20), observou-se 6 picos cromatográficos majoritários **a**, **b**, **c**, **d**, **e** e **f**, correspondendo o pico **d** à substância de m/z 342 (Figura A18), enquanto os demais picos **a**, **b**, **c**, **e** e **f** foram atribuídos às substâncias protonadas de m/z 328, 328, 356, 326 e 352 $[\text{M}+\text{H}]^+$, respectivamente (Figura A18).

A análise do perfil de DAD dos picos majoritários na região do UV (200-400 nm) (Figura 21) evidenciou similaridades espectrais entre as substâncias **b-e**, além de revelar absorções características, de grande valor para o diagnóstico de estruturas aporfínicas e oxoaporfínicas.

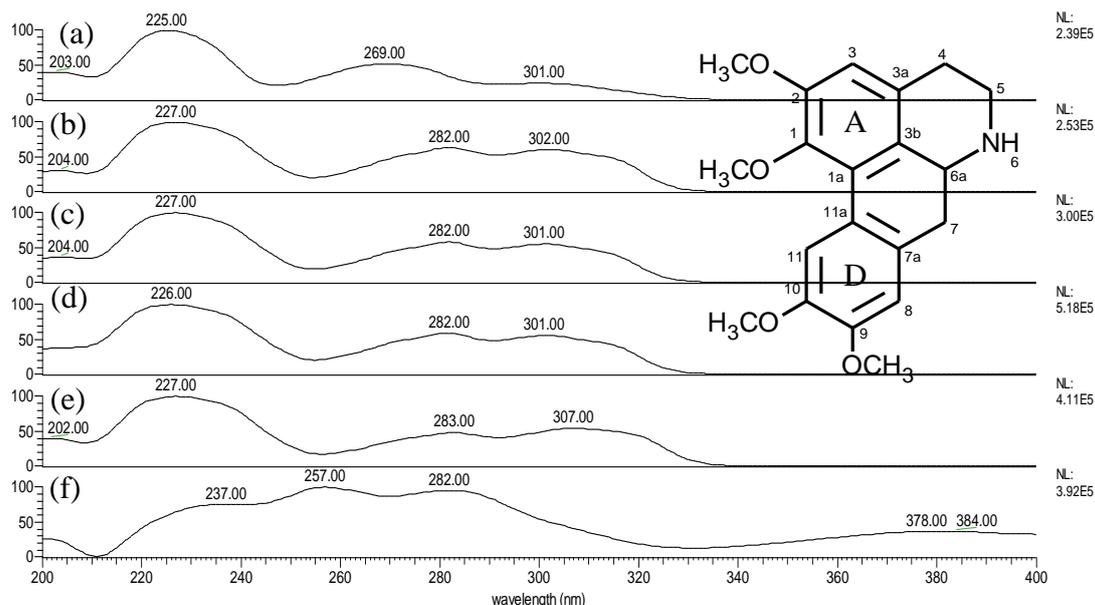


Figura 21. Espectros de DAD dos picos majoritários (a-f) presentes na amostra FASF e esqueleto do alcaloide norglaucina.

Segundo SANGSTER & STUART (1965), quando as posições 10 e 11 de esqueletos aporfínicos não estão substituídas, o espectro apresenta um máximo de absorção entre 270-280 nm e pode apresentar um pico de absorção menor entre 310-320 nm. Embora a substituição nas posições 10 e/ou 11 não sejam recorrentes, todos os alcaloides aporfínicos são invariavelmente substituídos nas posições 1 e 2. (SANGSTER & STUART, 1965). Substâncias com ausência de substituição na posição 11 apresentam máximo de absorção em 282 e 303-310 nm, ambos com intensidade equivalente, enquanto as substâncias substituídas nesta posição apresentam um máximo de absorção entre 268-272 nm e outra absorção de menor intensidade entre 303-310 nm (SANGSTER & STUART, 1965). Em geral, diversos alcaloides aporfínicos apresentam um máximo de absorção em torno de 220 nm e dois na região de 270-310 nm, sendo a forma da curva e a intensidade dos últimos dois máximos dependente das substituições no anel D. Para alcaloides oxoaporfínicos o espectro de UV é descrito com extensão de absorção entre as regiões do UV e visível (400-800 nm).

Considerando as informações apresentadas anteriormente a cerca das absorções características de alcaloides aporfinóides, juntamente com a observação de similaridade espectral entre as substâncias **b-e** (Figura 21), é possível propor que as substâncias **b**, **c**, e **e** apresentem substituição na posição 10, e possivelmente na 9, além de ausência de substituição na posição 11, tal como o alcaloide norglaucina (substancia **d**), tentativamente identificada no item **5.2**.

Os máximos de absorção observados para a substância **a** em 269 nm e 301 nm (menor intensidade) estão de acordo com estruturas substituídas na posição 11 (SANGSTER & STUART, 1965), não existindo relatos sobre esse tipo de substituição em estruturas isoladas de espécies de *Unonopsis*.

Devido à extensão de absorção observada entre as regiões do UV e visível para a substância **f**, bem como o reconhecimento deste perfil de UV para alcaloides oxoaporfínicos (SANGSTER & STUART, 1965), é possível propor que tal substância seja um representante da classe dos oxoaporfínicos, tal como o alcaloide liriodenina, anteriormente reportado nas espécies *U. guatterioides* (GUINAUDEAU et al., 1988), *U. spectabilis* (LAPRÉVOTE, et al., 1988), *U. pacifica* (ARANGO, et al., 1988), *U. lindmanii* (SIQUEIRA et al., 1998), *U. buchtienii* (WAECHTER et al., 1999) e *U. duckei* (SILVA et al., 2014).

5.5. Análises de ESI-MSⁿ e HPLC-DAD-MS da amostra FAFC (*U. floribunda*)

No espectro de íons totais da amostra FAFC (Figura A19) foi possível verificar a presença de diversos íons, destacando-se como pico base o de m/z 328. Embora esta mesma observação tenha sido feita para a fração alcaloídica das folhas de *U. floribunda* (item **5.2**), observaram-se fragmentações distintas para ambas as amostras através da análise de MSⁿ (Figura 22).

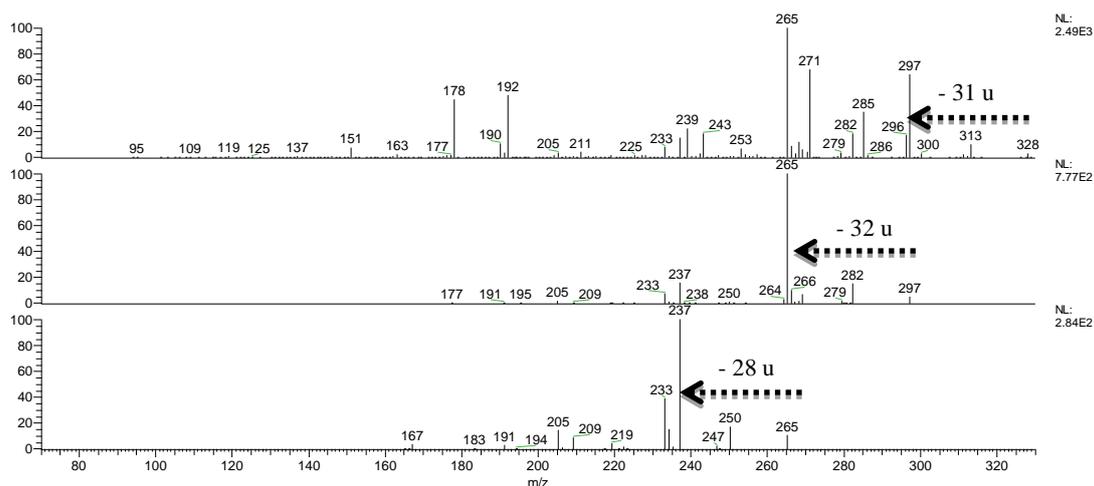


Figura 22. Espectro de ESI-MSⁿ (modo positivo) do íon de m/z 328 presente na amostra FAFC.

Para o íon de m/z 328 presente nas folhas foram observadas perdas elevadas de massa, enquanto para o íon presente nas cascas foram observadas perdas competitivas, incluindo as perdas observadas para o íon presente nas folhas, o que sugere a presença de isômeros. Apesar do complexo espectro de MS², foram observadas nos espectros de MS²-MS⁴ evidências de esqueleto aporfínico contendo metilação no nitrogênio e metoxila adjacente a hidroxila (STÉVIGNY et al., 2004).

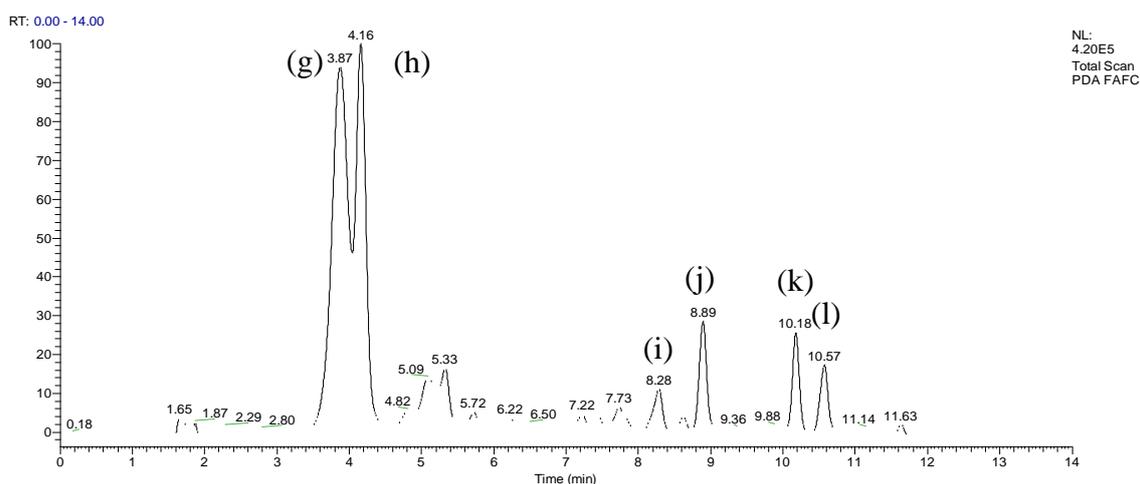


Figura 23. Cromatograma obtido por HPLC-DAD para a amostra FAFC. Gradiente de eluição: 30-80% de B em 14 minutos ($1 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$). Fases móveis: solução aquosa ácida (0,01% TFA) (A) e metanol (B). DAD: 200-400 nm. Coluna: C18 ($5 \mu\text{m}$, $150 \times 4,60 \text{ mm}$).

Através da análise do cromatograma obtido por HPLC-DAD da amostra FAFC (Figura 23), foram observados 6 picos cromatográficos majoritários **g**, **h**, **i**, **j**, **k** e **l**, correspondendo os picos majoritários **g** e **h** à substâncias de m/z 328 $[M+H]^+$ (Figura A20). Os picos **i** e **l** foram atribuídos aos íons de m/z 266 e 268 $[M+H]^+$, respectivamente, enquanto os picos **j** e **k** se apresentaram como isômeros de m/z 282 $[M+H]^+$, sendo observada perda de H_2O (-18 u) na fonte (Figura A20) para o pico **j**, o que é incomum em estruturas aporfínicas.

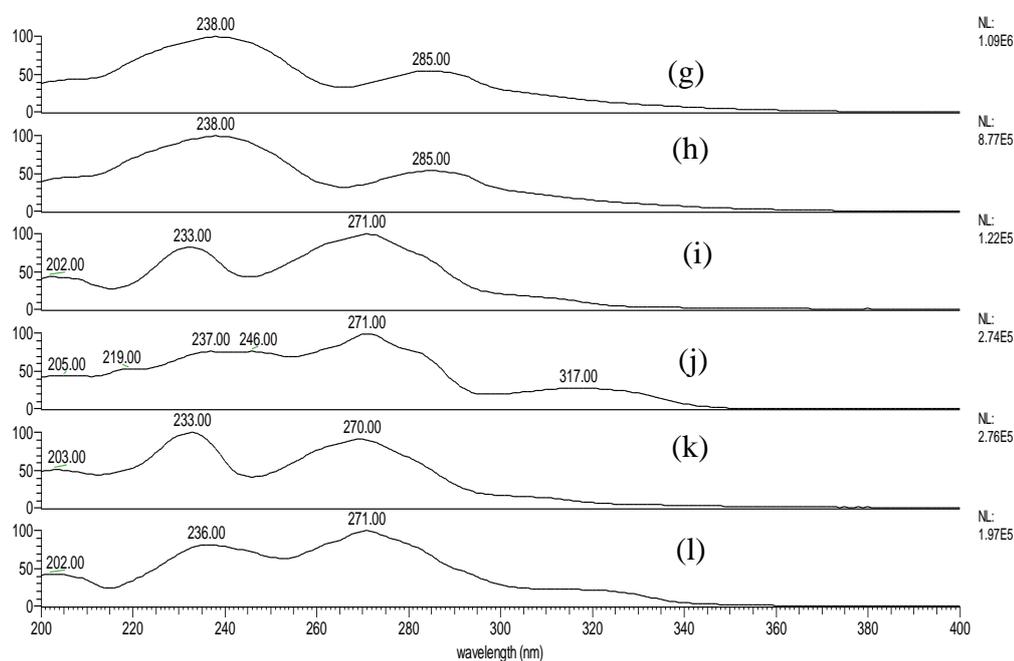


Figura 24. Espectros de DAD dos picos majoritários **g-l** presentes na amostra FAFC.

A análise do perfil de DAD dos picos majoritários na região do UV (200-400 nm) (Figura 24) revelou similaridades espectrais entre as substâncias **g** e **h**, além das substâncias **i**, **k** e **l**. Embora a substância **j** tenha apresentado um máximo de absorção em torno de 270 nm, conforme observado para as substâncias **i**, **k** e **l**, foi observada uma distorção no máximo de absorção em torno de 230 nm, sendo seu espectro considerado próximo ao da substância **l**.

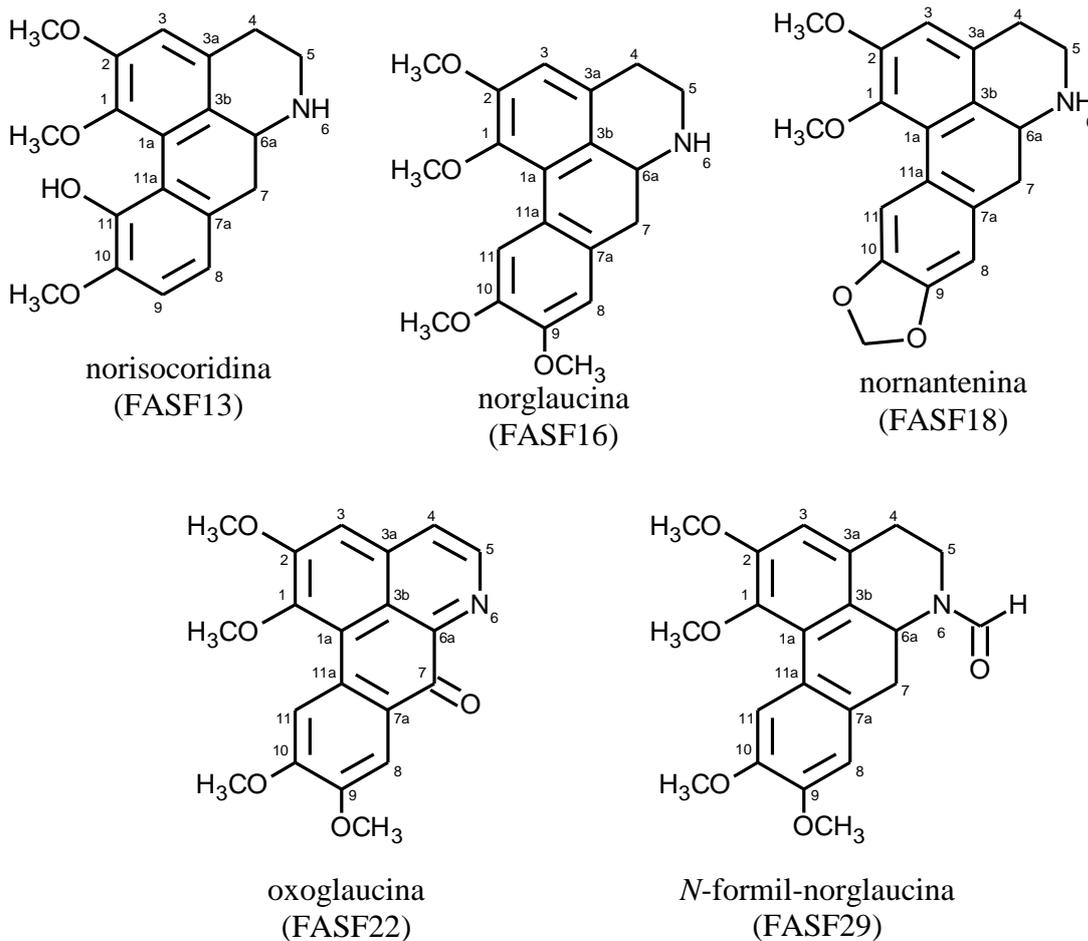
Conforme discutido no item 5.4 a ausência de substituição nas posições 10 e 11 de esqueletos aporfínicos são acompanhadas por um máximo de absorção entre 270-280

nm, podendo apresentar em adição um pico de absorção menor entre 310-320 nm (SANGSTER & STUART, 1965). Com base nestas informações, e através da comparação com os espectros de substâncias tetrasubstituídas Figura 21, é possível sugerir para as substâncias **i-l** estruturas aporfínicas não substituídas no anel D.

Os máximos de absorção observados para as substâncias **g** e **h** (Figura 24) não refletem as absorções esperadas para estruturas aporfínicas, sendo os seus respectivos espectros diferentes dos demais analisados (Figuras 21 e 24).

5.6. Determinação estrutural das substâncias isoladas

5.6.1. Substâncias isoladas da fração alcaloídica das folhas de *U. stipitata* (FASF)



5.6.1.1. Determinação estrutural da amostra FASF13

A amostra codificada como FASF13 (3,8 mg), apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A21) foi observado um pico base de m/z 328 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação, este íon apresentou perda inicial de 17 u e perdas competitivas de 15 e 31 u, estando este padrão, como discutido anteriormente, em acordo com estruturas aporfínicas apresentando ausência de metilação no nitrogênio e metoxilas adjacentes no anel A (Figura 25) (STÉVIGNY et al., 2004; SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015).

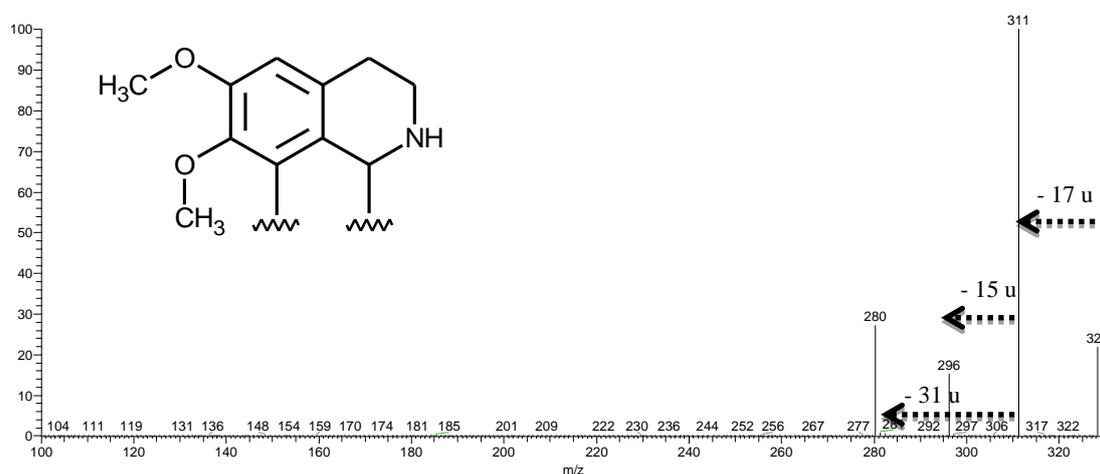


Figura 25. Espectro de MS^2 da amostra FASF13.

No espectro de NMR de 1H (Figura 26) foram observados sinais de três hidrogênios aromáticos, distribuídos em dois anéis benzênicos: um sinal em δ 6,75 (1H, s), compatível com o H-3 do anel A 1,2,3,4,5-pentassubstituído de estrutura aporfínicas, e dois sinais de hidrogênios orto acoplados em δ 6,82 (1H, d, 8,24 Hz) e 6,87 (1H, d, 8,24 Hz), compatíveis com um anel D 1,2,3,4-tetrasubstituído. Foram ainda observados sinais de três hidrogênios metoxílicos em δ 3,74 (3H, s), 3,92 (3H, s) e 3,93 (3H, s), seis hidrogênios metilênicos em δ 2,96 (1H, m), δ 2,99 (1H, m), 3,12 (1H, m), 3,22 (1H, m), 3,45 (1H, m) e 3,76 (1H, m), além de um hidrogênio metínico em δ 4,10 (1H, m),

confirmando as características de alcaloides aporfínicos, evidenciadas nas análises dos espectros de massas.

Através dos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figura 27 e 28) foi possível ratificar as substituições propostas para o anel A. Foram observadas as correlações J^1 dos hidrogênios das metoxilas em δ 3,74 e 3,93 com os carbonos em δ 62,3 e 56,1, e a longa distância com os carbonos em δ 143,1 e 153,0. Observou-se que o hidrogênio aromático mais blindado (típico H-3) em δ 6,75 (1H, s), apresentava correlação J^1 com o carbono em δ 111,2 (C-3) e correlação a longa distância com os carbonos em δ 153,0 (C-2), 143,1 (C-1), 122,8 (C-3a) e em δ 25,6 (C-4), confirmando assim o padrão de substituição do anel A. A correlação J^3 do sinal em δ 6,75 (1H, s) com o carbono em δ 25,6 assinalado como C-4, é uma observação importante para confirmar o hidrogênio aromático da posição H-3. (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

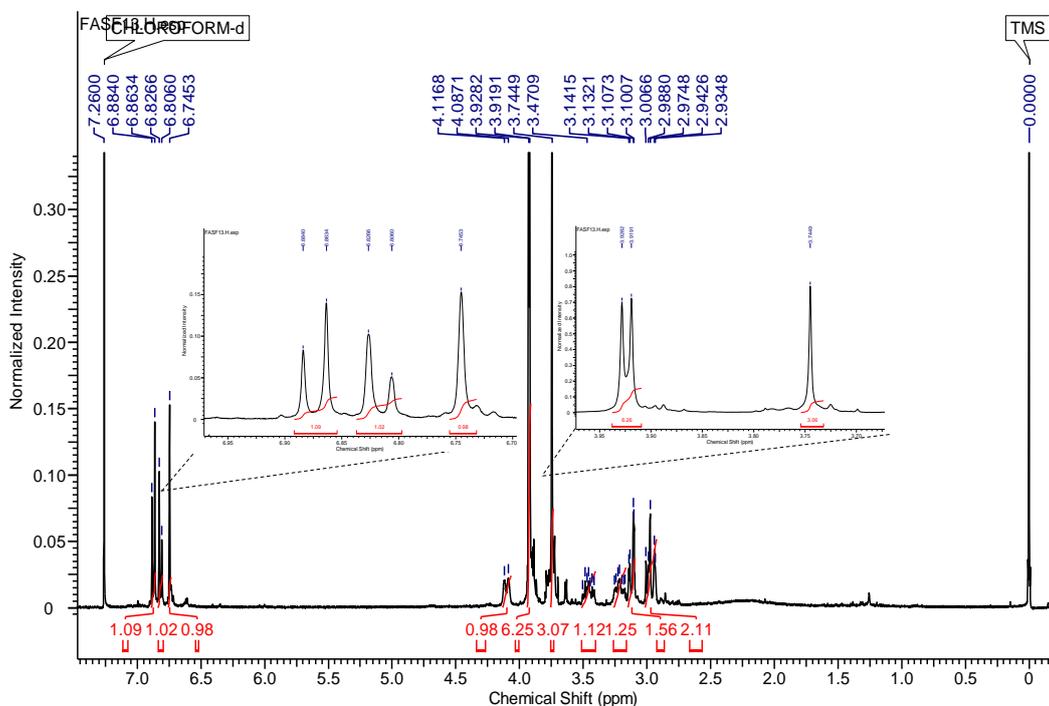


Figura 26. Espectro de NMR de ^1H (400 MHz, CDCl_3) da amostra FASF13.

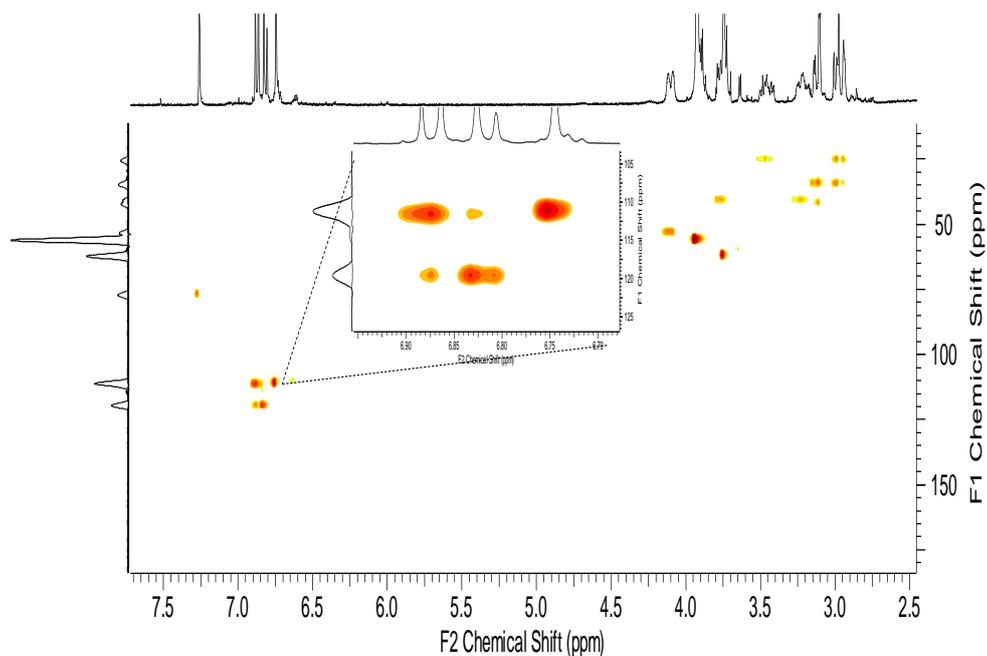


Figura 27. Mapa de contorno HSQC (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) da amostra FASF13.

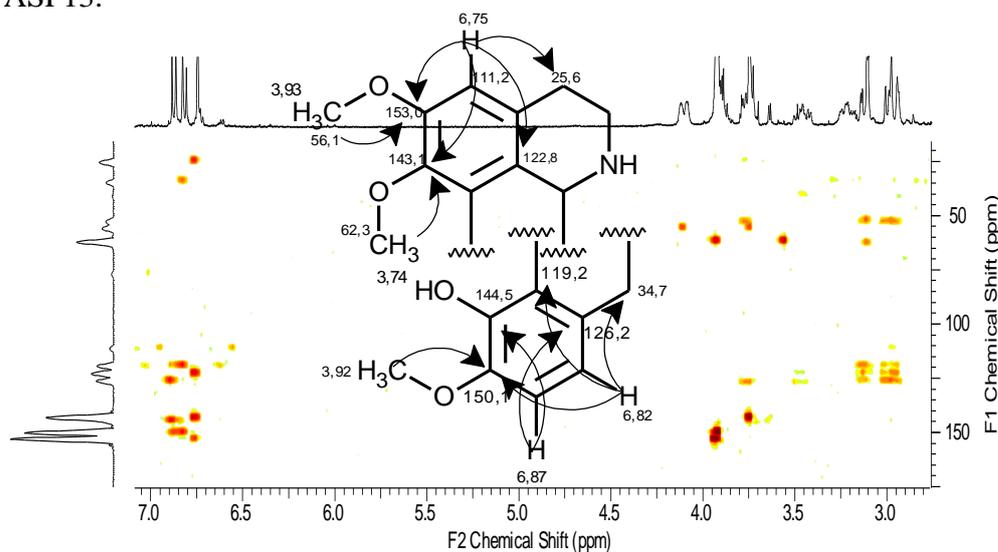


Figura 28. Mapa de contorno HMBC (^1H 400 MHz, ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) da amostra FASF13.

Através da análise das correlações observadas para os hidrogênios orto-coplados em δ 6,82 (1H, d, 8,24 Hz) e 6,87 (1H, d, 8,24 Hz) no mapa de contorno HSQC (Figura 27) e HMBC (Figura 28) foi possível atribuir inequivocamente os substituintes do anel D. Para o hidrogênio em δ 6,82 (H-8), correlacionado J^1 com o carbono em δ 119,6 (C-8) foram observadas correlações J^3 com os carbonos em δ 34,7 (C-7), 119,2 (C-11a) e 150,1 (C-10), enquanto para o hidrogênio em δ 6,87 (H-9)

correlacionado J^1 com o carbono em δ 111,6 (C-9) foram observadas correlações J^3 com os carbonos em δ 126,2 (C-7a) e 144,5 (C-11). No geral, a correlação J^3 observada com o hidrogênio em torno de δ 34 (C-7) é uma evidência útil para caracterizar o hidrogênio aromático H-8. A confirmação da metoxilação no carbono em δ 150,1 (C-10) foi possível através das correlações J^3 dos hidrogênios da metoxila em δ 3,92 e do hidrogênio em δ 6,82 (H-8) com este carbono. Considerando o íon molecular do composto, restava incluir um grupamento hidroxila na estrutura, o qual foi adequadamente posicionado no carbono desblindado em δ 144,5 (C-11). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 11) com dados da literatura (CHANG et al., 2001) foi confirmada a estrutura do alcaloide norisocoridina (Figura 31), sendo este reportado pela primeira vez no gênero *Unonopsis*. Este também é o primeiro relato de alcaloide substituído na posição 11 no gênero.

Tabela 11. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FASF13.

Posição	FASF13 (Norisocoridina)			
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}	HMBC ^a
1	-	-	143,1	-
1a	-	-	-	-
2	-	-	153,0	-
3	6,75 (1H, s)	6,90 (1H, s)	111,2	25,6; 122,8; 143,1 e 153,0
3a	-	-	127,1	-
3b	-	-	122,8	-
4	2,96 (1H, m) e 3,45 (1H, m)	-	25,6	41,0; 122,8 e 127,1
5	3,22 (1H, m) e 3,76 (1H, m)	-	41,0	53,4 e 127,1
6a	4,10 (1H, m)	3,63 (1H, d, 3,6)	53,4	-
7	2,99 (1H, m) e 3,12 (1H, m)	-	34,7	53,4, 119,2; 122,8 e 126,2
7a	-	-	126,2	-
8	6,82 (1H, d, 8,24)	6,87 (1H, d, 8,4)	119,6	34,7; 119,2 e 150,1
9	6,87 (1H, d, 8,24)	6,95 (1H, d, 8,4)	111,6	126,2 e 144,5
10	-	-	150,1	-
11	-	-	144,5	-
11a	-	-	119,2	-
1-OCH ₃	3,74 (3H, s)	3,67 (3H, s)	62,3	143,1
2-OCH ₃	3,93 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,1	153,0
10-OCH ₃	3,92 (3H, s)	3,87 (3H, s)	56,1	150,1

^aO experimento foi realizado a 400 MHz para ^1H e 100 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com CHANG et al., 2001 (CD_3OD , 400 MHz)

^cCarbonos protonados e quaternários foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

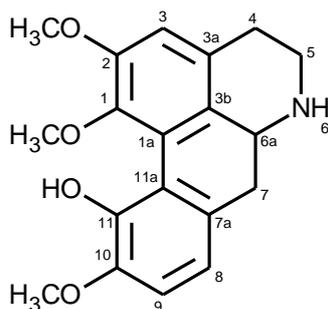


Figura 29. Estrutura do alcaloide norisocoridina.

5.6.1.2. Determinação estrutural da amostra FASF16

A amostra codificada como FASF16 (67,7 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A22) foi observado um pico base de m/z 342 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 17 u e perdas competitivas de 15 e 31 u (Figura 30), tal como observado para a amostra FASF13, sendo esperado padrão de substituição semelhante.

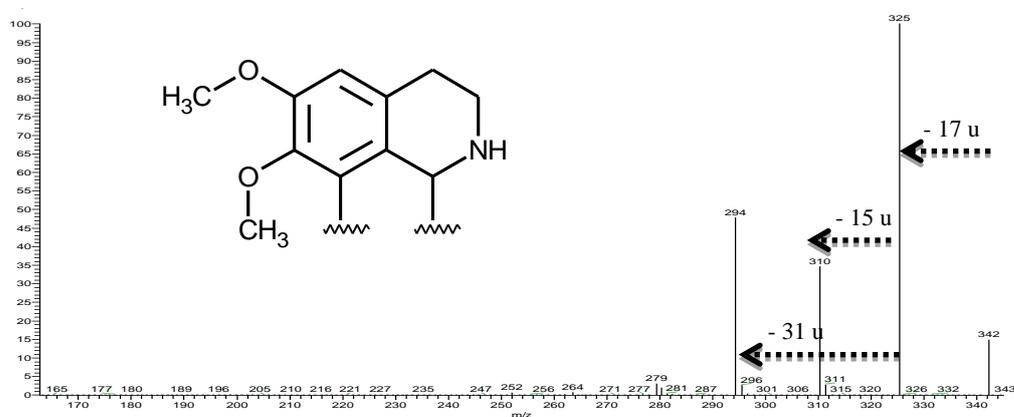


Figura 30. Espectro de MS^2 da amostra FASF16.

No espectro de NMR de 1H (Figura 31) foram observados sinais de três hidrogênios aromáticos, distribuídos em dois anéis benzênicos: um sinal em δ 6,88 (1H, s), compatível com o H-3 de um anel A, similar ao do alcaloide norisocoridina (FASF13), e dois sinais de hidrogênios com relação *para* em δ 6,96 (1H, s) e 8,07 (1H, s), compatíveis com um anel D 1,2,4,5- tetrassubstituído. Ainda no espectro de NMR de

^1H foram observados quatro hidrogênios metoxílicos em δ 3,71 (3H, s), 3,85 (3H, s), 3,87 (3H, s) e 3,91 (3H, s), seis hidrogênios metilênicos em δ 2,99 (1H, m), 3,01 (1H, m), 3,17 (1H, d, 13,8 e 4,6 Hz), 3,37 (1H, m), 3,41 (1H, m) e 3,81 (1H, m), além do hidrogênio metínico em δ 4,37 (1H, dd, 14,2 e 4,6 Hz). Este padrão de multiplicidade para hidrogênios aromáticos é tipicamente observado em estruturas aporfínicas tetrasubstituídas nas posições 1, 2, 9 e 10 (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

Através dos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figura 32 e 33) foi possível observar para o típico hidrogênio H-3 em δ 6,61 (1H, s), correlacionado J^1 com o carbono em δ 112,2 (C-3) e J^3 com os carbonos em δ 26,6 (C-4), 122,3 (C-3b) e 146,2 (C-1). Ainda através dos mapas de contorno foram observadas as correlações J^1 dos hidrogênios das metoxilas em δ 3,71 e 3,91 com os carbonos em δ 60,3 e 56,4, e J^3 com os carbonos em δ 146,2 (C-1) e 154,6 (C-2), respectivamente, confirmando assim o padrão de substituição do anel A.

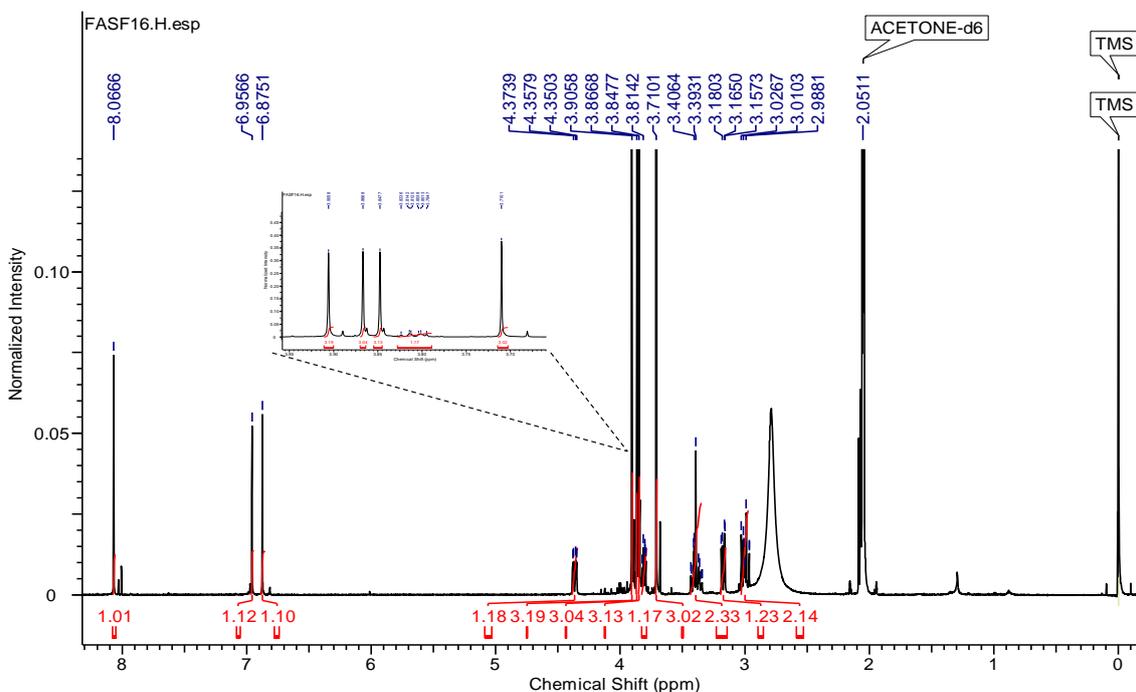


Figura 31. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FASF16.

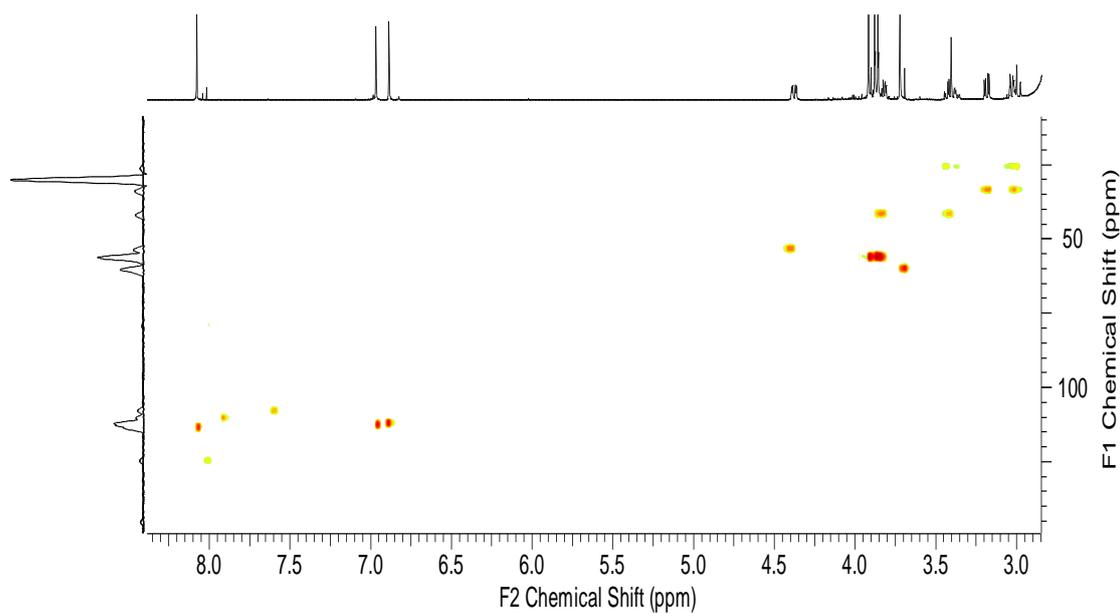


Figura 32. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FASF16.

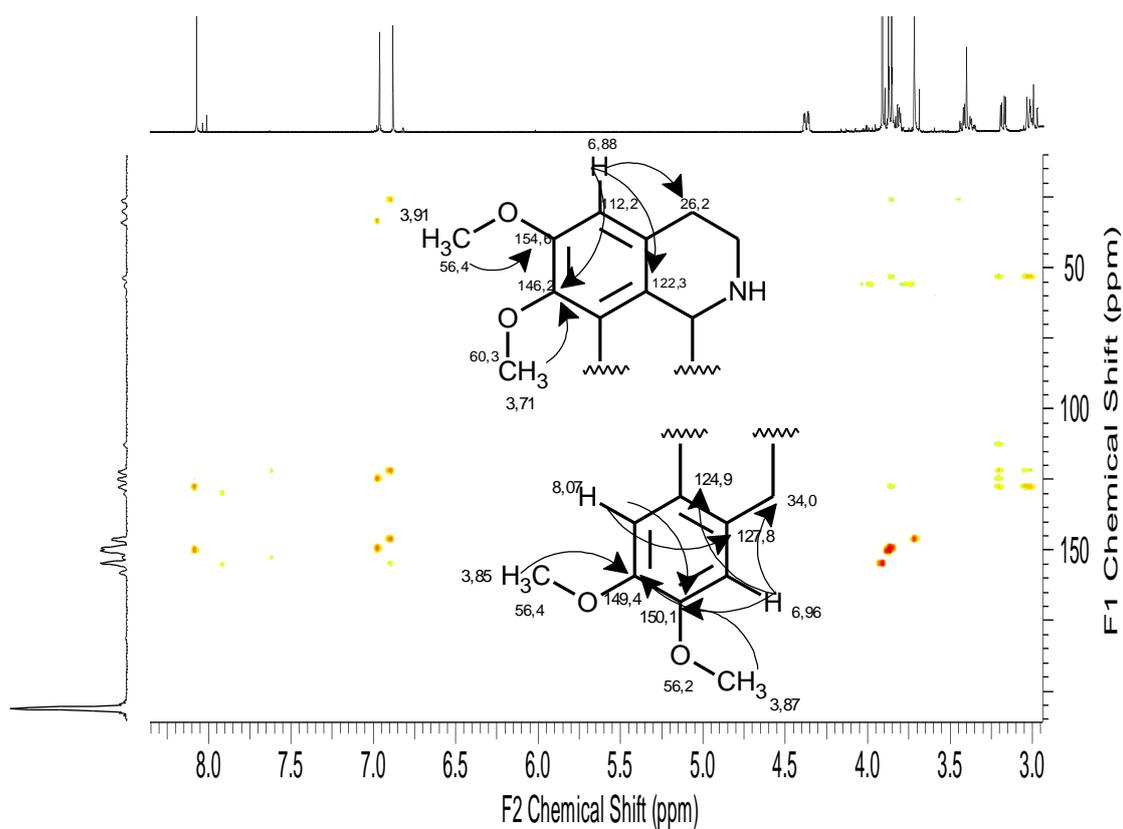


Figura 33. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FASF16.

Através da análise das correlações observadas para os demais hidrogênios aromáticos no mapa de contorno HMBC (Figura 33) foi possível atribuir inequivocamente os substituintes do anel D. A identificação do hidrogênio em δ 6,96 como sendo o hidrogênio H-8 foi possível através da correlação J^3 com o carbono em δ 34,0 (C-7). Outras correlações de H-8 foram observadas com os carbonos em δ 124,9 (C-11a) e 149,4 (C-11). Para o hidrogênio em δ 8,07 (H-11) foram observadas correlações com os carbonos em δ 127,8 (C-7a) e 150,1 (C-9). Em geral, em estruturas aporfínicas o hidrogênio mais desblindado é atribuído ao H-11 (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994). A confirmação das metoxilas nos carbonos em δ 149,4 (C-10) e 150,1 (C-9) foi possível através da correlação J^3 dos hidrogênios em δ 3,87 e 3,85, respectivamente, com estes carbonos. A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 12) com dados da literatura (CHIU et al., 2012), FASF16 foi identificado como o alcaloide norglaucina (Figura 34), tendo este alcaloide sido reportado anteriormente nas folhas de *U. duckei* (SILVA et al., 2014).

Tabela 12. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FASF16.

Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	FASF16 (Norglaucina)		$^{13}\text{C}^{\text{a,c}}$	HMBC ^a
		^1H δ (mult., J em Hz) ^b			
1	-	-	-	146,2	
1a	-	-	-	-	
2	-	-	-	154,6	
3	6,88 (1H, s)	6,61 (1H, s)	-	112,2	26,2; 122,3 e 146,2
3a	-	-	-	127,7	
3b	-	-	-	122,3	
4	3,01 (1H, m) e 3,41 (1H, m)	-	-	26,2	
5	3,37 (1H, m) e 3,81 (1H, m)	-	-	42,0	26,2; 53,7 e 127,7
6a	4,37 (1H, dd, 14,2 e 4,6)	-	-	53,7	
7	2,99 (1H, m) e 3,17 (1H, d, 13,8 e 4,6)	-	-	34,0	53,7; 112,7; 122,3; 124,9 e 127,8
7a	-	-	-	127,8	
8	6,96 (1H, s)	6,78 (1H, s)	-	112,7	34,0; 124,9 e 149,4
9	-	-	-	150,1	
10	-	-	-	149,4	
11	8,07 (1H, s)	8,09 (1H, s)	-	113,6	127,8 e 150,1
11a	-	-	-	124,9	
1-OCH ₃	3,71 (3H, s)	3,66 (3H, s)	-	60,3	146,2

2-OCH ₃	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,4	154,6
9-OCH ₃	3,87 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,2	150,1
10-OCH ₃	3,85 (3H, s)	3,93 (3H, s)	56,4	149,4

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C em (CD₃)₂CO, utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com CHIU et al., 2012 (CD₃OD, 500 MHz)

^cCarbonos protonados e quaternários foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

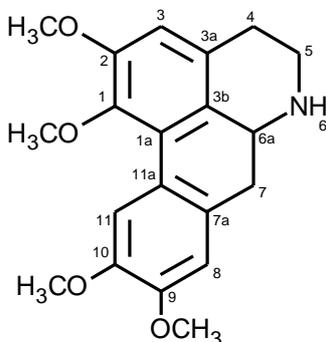


Figura 34. Estrutura do alcaloide norglaucina.

5.6.1.3. Determinação estrutural da amostra FASF18

A amostra codificada como FASF18 (5,4 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A23) foi observado um pico base de m/z 326 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 17 u e perdas competitivas de 15 e 31 u (Figura 35), tal como observado para as amostras FASF13 e FASF16, sugerindo padrão de substituição semelhante.

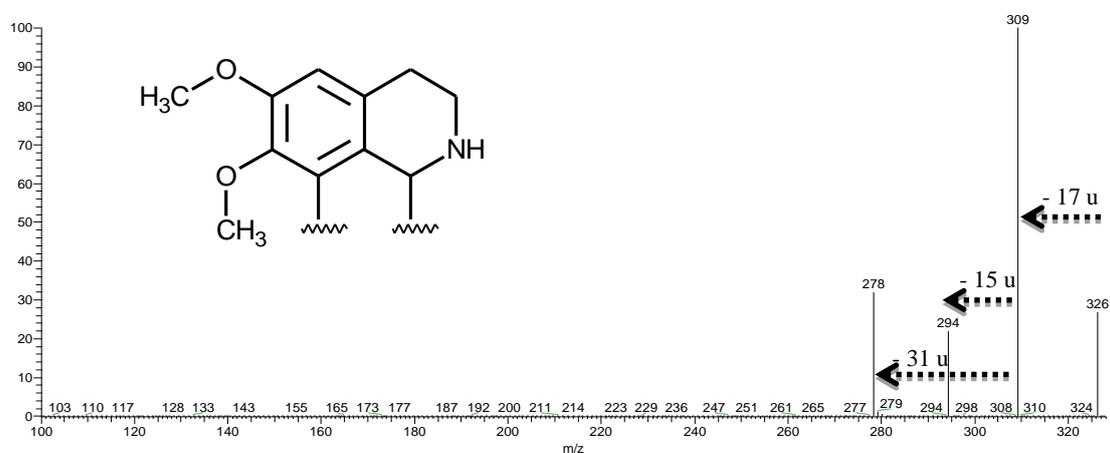


Figura 35. Espectro de MS² da amostra FASF18.

No espectro de NMR de ^1H (Figura 36) foi possível observar a presença de hidrogênios aromáticos em δ 6,63 (1H, s), 6,71 (1H, s) e 7,95 (1H, s), hidrogênios de metoxilas em δ 3,68 (3H, s) e 3,89 (3H, s), hidrogênios típicos de ponte metilenodioxi em δ 5,98 (1H, d, 1,2 Hz) e 6,00 (1H, d, 1,2 Hz), seis hidrogênios metilênicos em δ 2,91 (1H, dd, 17,2 e 3,9 Hz), 3,03 (2H, m), 3,24 (1H, m), 3,40 (1H, m) e 3,74 (1H, m), além do hidrogênio metínico em δ 4,21 (1H, dd, 13,3 e 4,7 Hz). Como discutido anteriormente, este padrão de multiplicidade para hidrogênios aromáticos é tipicamente observado em estruturas aporfínicas tetrasubstituídas nas posições 1, 2, 9 e 10 (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

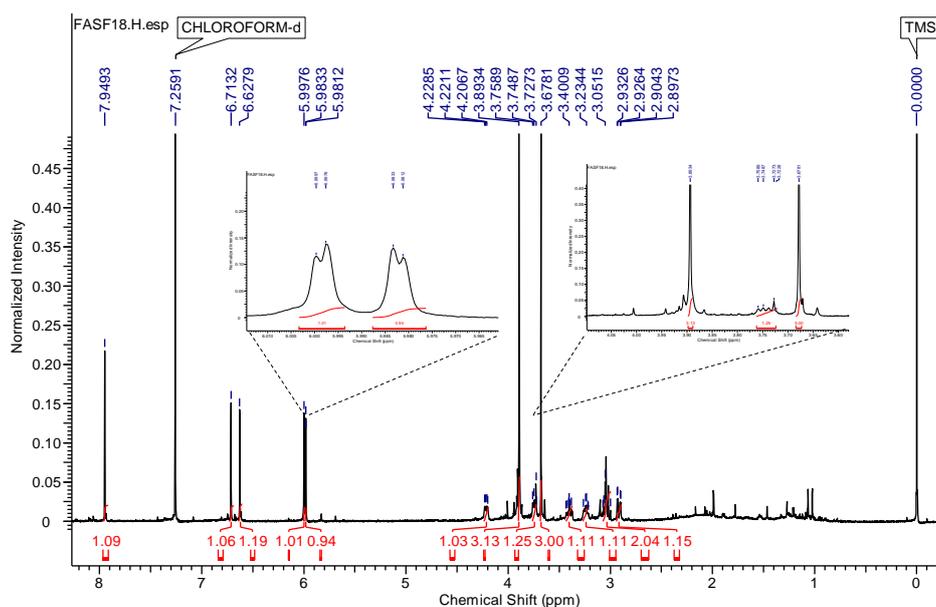


Figura 36. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF18.

Através dos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figura 37 e 38) foi possível observar para o hidrogênio H-3 em δ 6,63 (1H, s), correlação J^1 com o carbono em δ 110,7 (C-3), e a longa distância com os carbonos em δ 153,7 (C-2), 145,7 (C-1) e 25,5 (C-4). Ainda através dos mapas de contorno foram observadas as correlações J^1 dos hidrogênios das metoxilas em δ 3,68 e 3,89 com os carbonos em δ 60,2 e 55,9, e J^3 com

os carbonos em δ 145,7 (C-1) e 153,7 (C-2), respectivamente, confirmando assim o padrão de substituição do anel A.

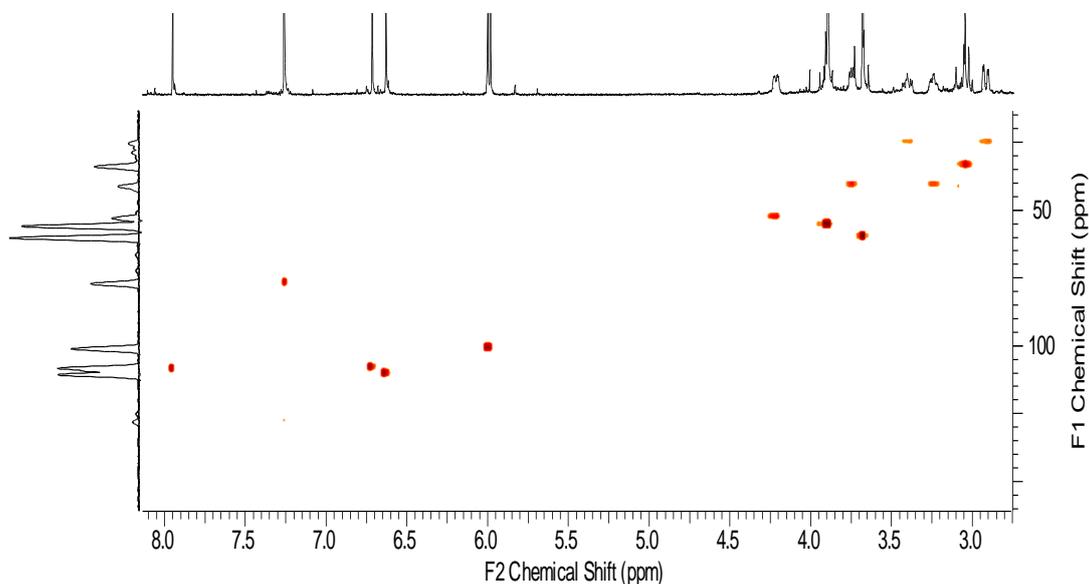


Figura 37. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF18.

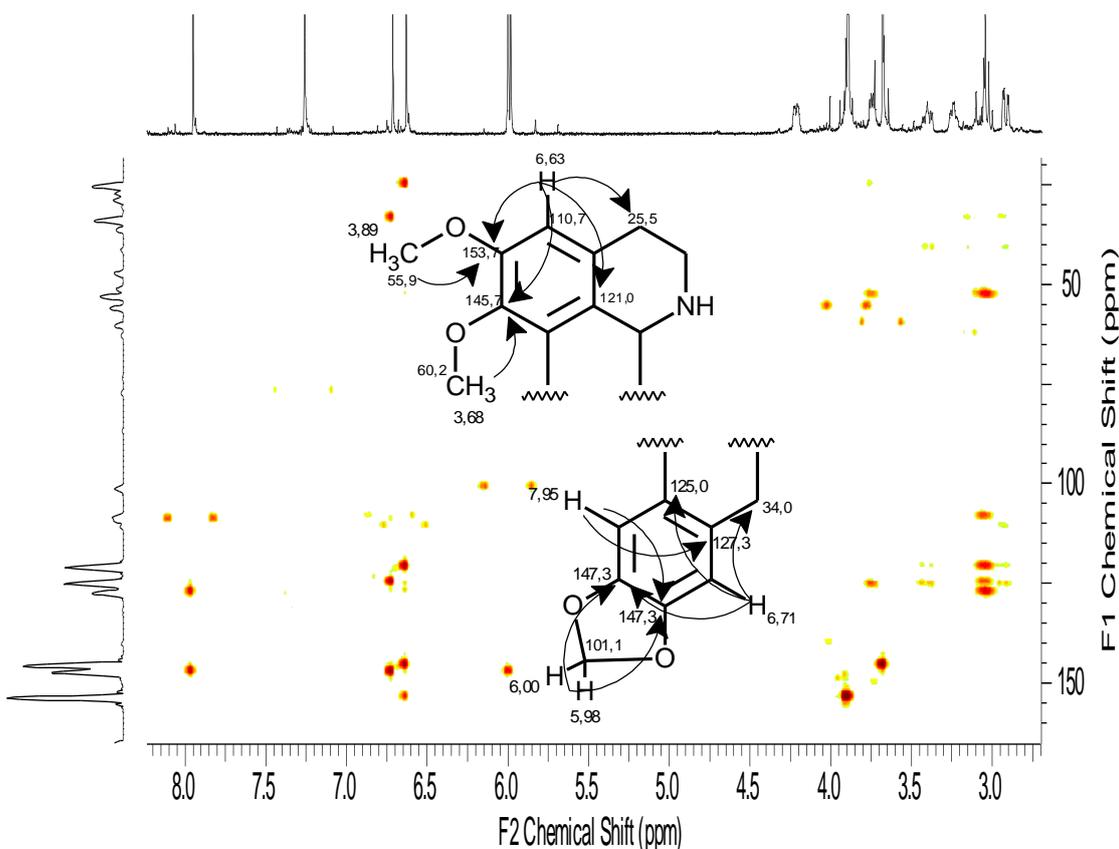


Figura 38. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF18.

Através da análise das correlações observadas para os demais hidrogênios aromáticos no mapa de contorno HMBC (Figura 38) foi possível atribuir inequivocamente os substituintes do anel D. A identificação do hidrogênio em δ 6,71 como sendo o hidrogênio H-8 foi possível através da correlação J^3 com o carbono em δ 34,0 (C-7), sendo ainda observada correlação com o carbono em δ 147,3 (C-9 e C-10). Para o hidrogênio mais desblindado em δ 7,95 (H-11) foram observadas correlações com os carbonos em δ 127,3 (C-7a) e 147,3 (C-9 e C-10). A confirmação da presença da ponte metilenodioxí no anel D foi obtida a partir das correlações J^1 e J^3 dos hidrogênios em δ 5,98 e 6,00 com os carbonos em δ 101,1 (OCH₂O) e 147,3 (C-9 e C-10), respectivamente. A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 13) com dados da literatura (JOHNS et al., 1967) foi confirmada a estrutura do alcaloide nornantenina (Figura 39), sendo este o primeiro relato de um alcaloide aporfínico contendo ponte metilenodioxí no anel D no gênero *Unonopsis*.

Tabela 13. Dados de NMR de ¹H e ¹³C da amostra FASF18.

Posição	FASF18 (Nornantenina)			
	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ H δ (mult., J em Hz) ^b	¹³ C ^{a,c}	HMBC ^a
1	-	-	145,7	
1a	-	-	-	
2	-	-	153,7	
3	6,63 (1H, s)	6,57 (1H, s)	110,7	25,5; 145,7 e 153,7
3a	-	-	125,6	
3b	-	-	121,0	
4	2,91 (1H, dd, 17,2 e 3,9) e 3,40 (1H, m)	-	25,5	41,3; 53,0; 110,7; 121,0 e 125,6
5	3,24 (1H, m) e 3,74 (1H, m)	-	41,3	53,0 e 125,6
6a	4,21 (1H, dd, 13,3 e 4,7)	-	53,0	
7	3,03 (2H, m)	-	34,0	53,0; 108,3; 121,0; 125,0 e 127,3
7a	-	-	127,3	
8	6,71 (1H, s)	6,69 (1H, s)	108,3	34,0 e 147,3
9	-	-	147,3	
10	-	-	147,3	
11	7,95 (1H, s)	7,92 (1H, s)	109,1	127,3 e 147,3
11a	-	-	125,0	
1-OCH ₃	3,68 (3H, s)	3,67 (3H, s)	60,2	145,7
2-OCH ₃	3,89 (3H, s)	3,86 (3H, s)	55,9	153,7
O-CH ₂ -O	5,98 (1H, d, 1,2) e 6,00 (1H, d, 1,2)	5,92 (2H, s)	101,1	147,3

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C em CDCl₃, utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com JOHNS et al., 1967 (60 MHz)

^cCarbonos protonados e quaternários foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

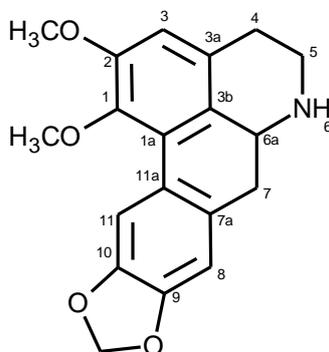


Figura 39. Estrutura do alcaloide nornantenina.

5.6.1.4. Determinação estrutural da amostra FASF22

A amostra codificada como FASF22 (3,7 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração laranja. No espectro de massas (Figura A24) foi observado um pico base de m/z 352 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 15 u e perdas competitivas de 15 e 31 u (Figura 40), apontando para uma estrutura não aporfínica. Estudos anteriores relataram este comportamento peculiar para alcaloides contendo o nitrogênio na forma imino, tal como alcaloides oxoaporfínicos (SILVA et al., 2012a, SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015)

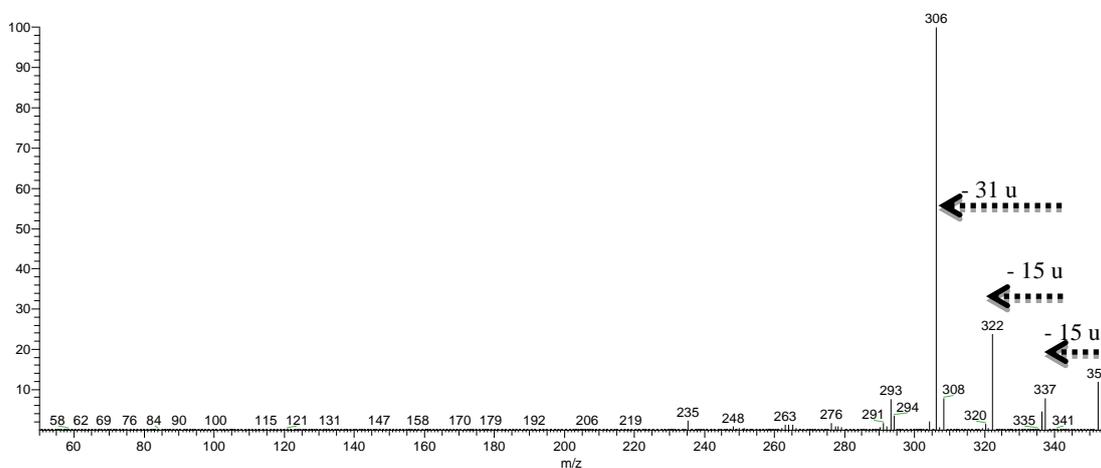


Figura 40. Espectro de MS² da amostra FASF22.

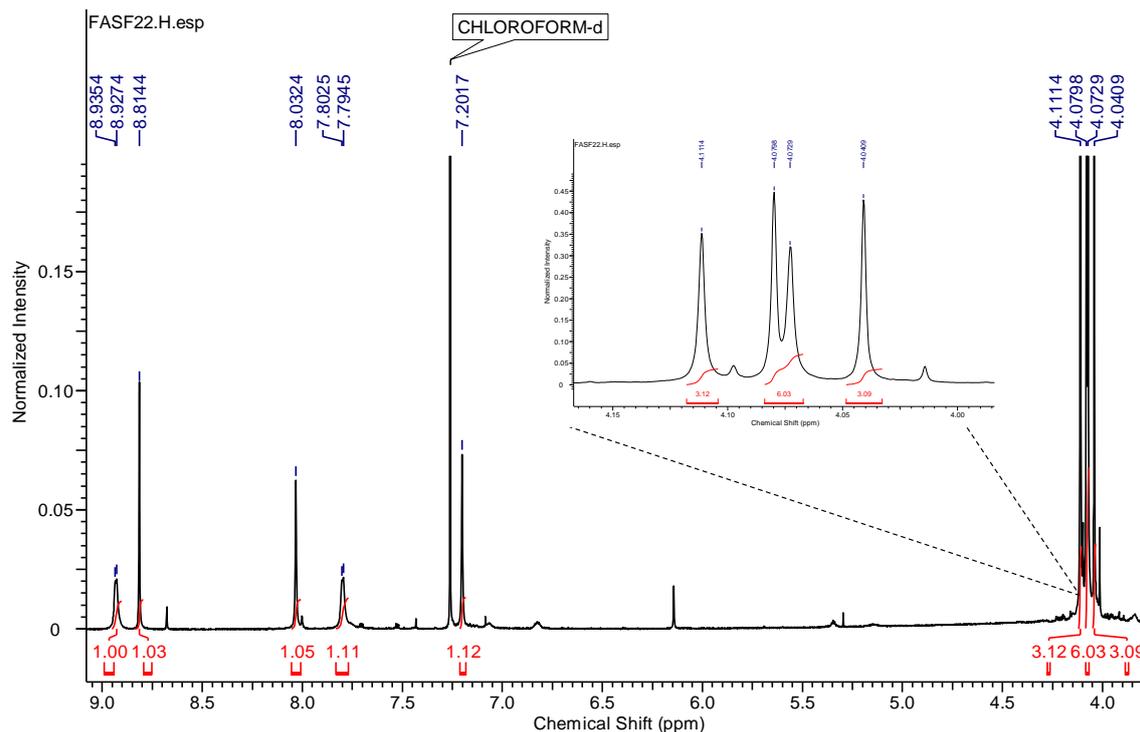


Figura 41. Espectro de NMR de ¹H (600 MHz, CDCl₃) da amostra FASF22.

No espectro de NMR de ¹H (Figura 41) foram observados cinco hidrogênios aromáticos em δ 7,20 (1H, s), 7,80 (1H, d, 4,8 Hz), 8,03 (1H, s), 8,81 (1H, s) e 8,93 (1H, d, 4,8 Hz), além de hidrogênios metoxílicos em δ 4,04 (3H, s), 4,07 (3H, s), 4,08 (3H, s) e 4,11 (3H, s). Os hidrogênios orto acoplados em δ 7,80 e 8,93, com constantes de acoplamento de 4,8 Hz, foram atribuídos aos hidrogênios α e β do anel piridínico do esqueleto oxoaporfínico, devido suas características típicas (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994). O padrão de multiplicidade observado para os demais hidrogênios aromáticos está de acordo com estruturas oxoaporfínicas tetrasubstituídas nas posições 1, 2, 9 e 10 (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

Através do mapa de contorno HSQC (Figura 42) foi possível observar a correlação J^1 dos hidrogênios em δ 7,80 e 8,93 com os carbonos em δ 123,5 (C-4) e 144,6 (C-5), respectivamente, sendo o carbono mais desblindado atribuído como C-5, devido à presença do nitrogênio adjacente.

Através dos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figura 42 e 43) foi possível observar para o hidrogênio mais blindado em δ 7,20 (1H, s), correlação J^1 com o carbono em δ 106,0 (C-3), a longa distância com os carbonos em δ 157,0 (C-2), δ 121,7 (C-3b), 123,5 (C-4) e 151,2 (C-1). Ainda através dos mapas de contorno foram observadas as correlações J^1 dos hidrogênios das metoxilas em δ 4,04 e 4,11 com os carbonos em δ 60,6 e 56,1, e J^3 com os carbonos em δ 151,2 (C-1) e 157,0 (C-2), respectivamente, confirmando assim o padrão de substituição do anel A.

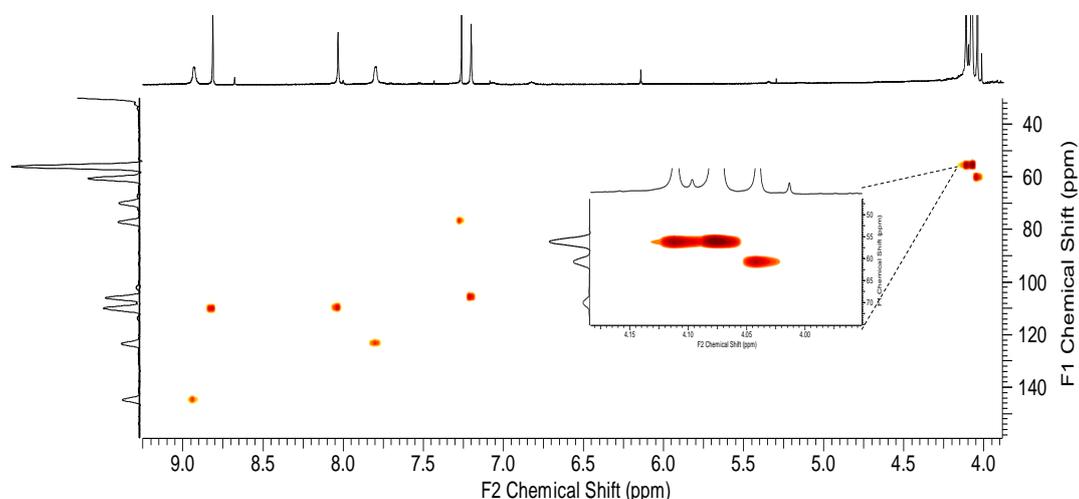


Figura 42. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF22.

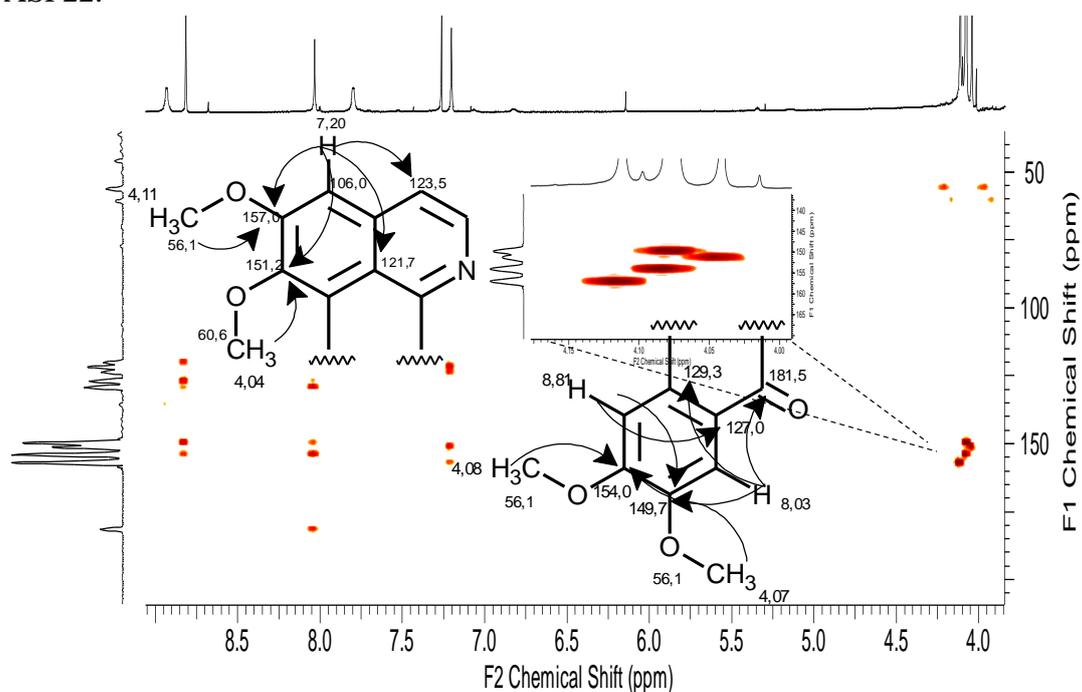


Figura 43. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF22.

A identificação do hidrogênio em δ 8,03 como sendo o hidrogênio H-8 foi possível através da correlação J^3 com o carbono carbonílico em δ 181,5 (C-7), observada através do mapa de contorno HMBC. Outras correlações J^3 do sinal do hidrogênio H-8 foram observadas com os carbonos em δ 129,3 (C-11a) e 154,0 (C-10).

Para o hidrogênio em δ 8,81 (H-11) foram observadas correlações com os carbonos em δ 127,0 (C-7a) e 149,7 (C-9). A confirmação da metoxilação dos carbonos em δ 149,7 (C-9) e 154,0 (C-10) foi possível através da correlação J^3 dos hidrogênios em δ 4,07 e 4,08, respectivamente, com estes carbonos. A partir desses dados e comparação (Tabela 14) com os da literatura (HARRIGAN et al. 1994), FASF22 foi identificado como o alcaloide oxoglaucina (Figura 44), sendo este o primeiro relato de alcaloide oxoaporfínico tetrasubstituído nas posições 1, 2, 9 e 10 no gênero *Unonopsis*.

Tabela 14. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FASF22.

Posição	FASF22 (Oxoglaucina)			
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}	HMBC ^a
1	-	-	151,2	
1a	-	-	120,2	
2	-	-	157,0	
3	7,20 (1H, s)	7,31 (1H, s)	106,0	121,7; 123,5; 151,1 e 157,0
3a	-	-	-	
3b	-	-	121,7	
4	7,80 (1H, d, 4,8)	7,79 (1H, d, 5,3)	123,5	
5	8,93 (1H, d, 4,8)	8,92 (1H, d, 5,3)	144,6	
6a	-	-	-	
7	-	-	181,5	
7a	-	-	127,0	
8	8,03 (1H, s)	8,03 (1H, s)	109,9	127,0; 129,3; 149,7; 154,0 e 181,5
9	-	-	149,7	
10	-	-	154,0	
11	8,81 (1H, s)	8,83 (1H, s)	110,2	120,2; 127,0; 129,3; 149,7 e 154,0
11a	-	-	129,3	
1-OCH ₃	4,04 (3H, s)	4,03 (3H, s)	60,6	
2-OCH ₃	4,11 (3H, s)	4,11 (3H, s)	56,1	
9-OCH ₃	4,07 (3H, s)	4,08 (3H, s)	56,1	
10-OCH ₃	4,08 (3H, s)	4,08 (3H, s)	56,1	

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com HARRIGAN et al. 1994 (CDCl_3 , 275 MHz).

^cCarbonos protonados e quaternários foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

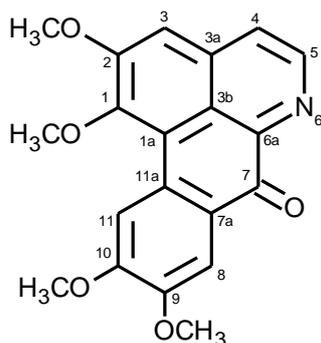


Figura 44. Estrutura do alcaloide oxoglucina.

5.6.1.5. Determinação estrutural da amostra FASF29

A amostra codificada como FASF29 (1,3 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. No espectro de massas (Figura A25) foi observado um pico base de m/z 370 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perdas iniciais competitivas de 32 e 45 u, e perdas sequenciais de 28 e 17 u (Figura 45), sendo este padrão ainda não reportado na literatura dos alcaloides aporfínicos e derivados.

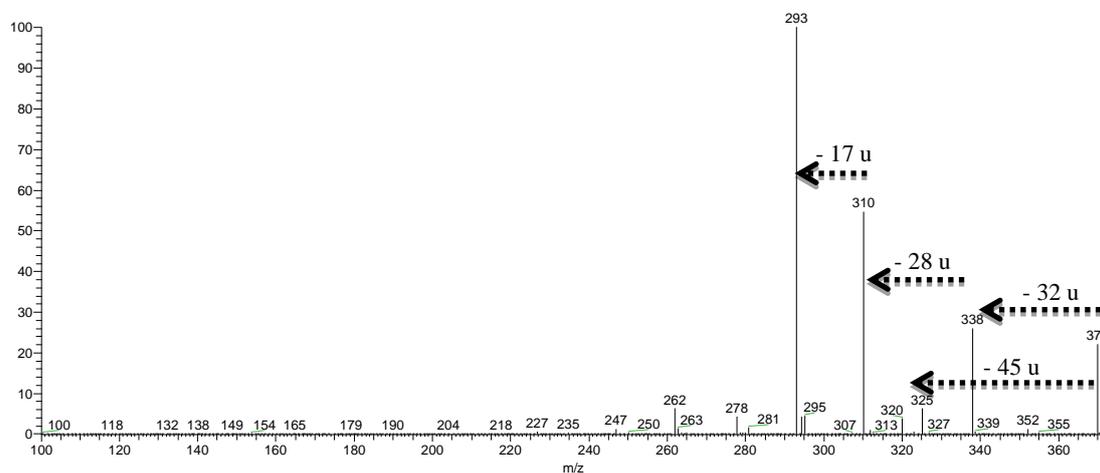


Figura 45. Espectro de MS^2 da amostra FASF29.

No espectro de NMR de 1H foram observados quatro hidrogênios duplicados na região dos aromáticos (Figura 46) na proporção de 2:1. Para a substância majoritária foram atribuídos os sinais em δ 6,62 (1H, s), 6,80 (1H, s), 8,14 (1H, s) e 8,26 (1H, s), sendo os sinais em δ 6,65 (1H, s), 6,77 (1H, s), 8,15 (1H, s) e 8,39 (1H, s) atribuídos à

substância minoritária. Ainda no espectro de NMR de ^1H (Figura 47) foram observados sinais de hidrogênios metoxílicos duplicados em δ 3,68 (3H, s), 3,91 (6H, s) e 3,92 (3H, s), os quais foram devidamente atribuídos à substância majoritária, e δ 3,67 (3H, s), 3,91 (3H, s) e 3,92 (3H, s) e 3,94 (3H, s), atribuídos à minoritária. Sinais com deslocamentos típicos de hidrogênio H-6a de estruturas aporfínicas foram observados em δ 4,92 (1H, dd, 14,2 e 4 Hz) e 4,49 (1H, dd, 14,4 e 4,5 Hz). Ainda no espectro de NMR de ^1H (Figura 47) foram observados diversos hidrogênios metilênicos, destacando-se o hidrogênio em δ 4,43 (1H, dt, 12,9 e 4 Hz) com deslocamento atípico, atribuído à estrutura minoritária.

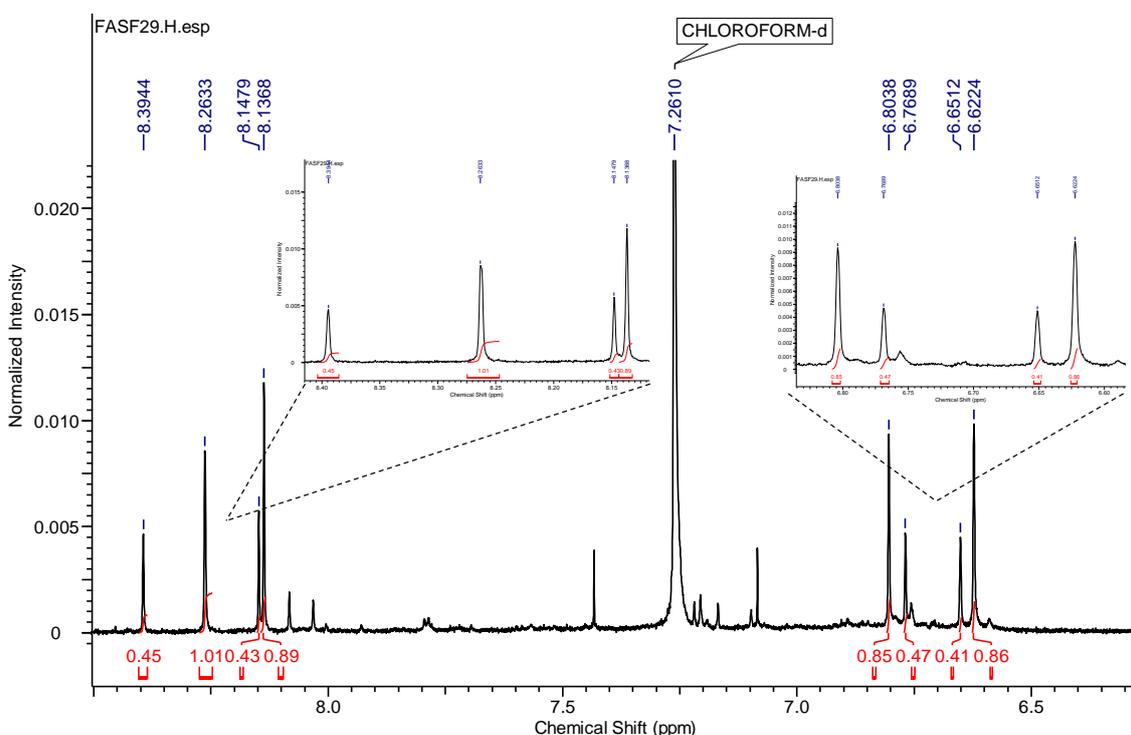


Figura 46. Ampliação do espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.

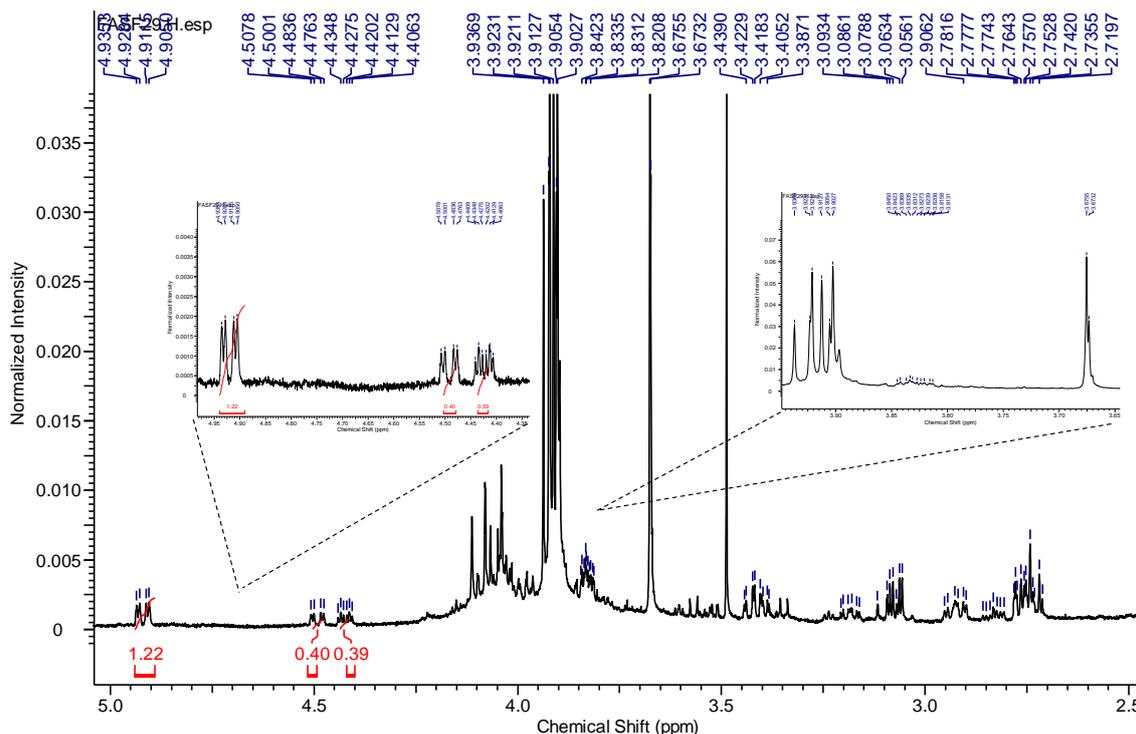


Figura 47. Ampliação do espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.

Através do mapa de contorno HSQC e HMBC (Figura 48 e 49) foi possível observar a correlação J^1 dos hidrogênios em δ 8,26 e 8,39 com o carbono em δ 162,3, e J^3 com o carbono em δ 49,9. Hidrogênios com estas características foram anteriormente descritos em estruturas aporfínicas contendo um grupo formil ligado ao nitrogênio (GUINAUDEAU et al., 1983, 1988, 1994). Esta funcionalidade no nitrogênio permite a formação de rotâmeros (*Z*) e (*E*), estando estes na proporção de 2:1 (GUINAUDEAU et al., 1983, 1988, 1994). Este fenômeno não se limita apenas a esqueletos aporfínicos, tendo sido relatado em compostos de natureza sintética e natural (ZHANG et al., 2008; SULIMA et al., 2013). Considerando esta proposta, o padrão de multiplicidade observado para os hidrogênios aromáticos está de acordo com estruturas aporfínicas tetrasubstituídas nas posições 1, 2, 9 e 10 (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

Nos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figura 48 e 49) foi possível observar para o hidrogênio aromático mais blindado do composto majoritário em δ 6,62 (H-3),

correlação J^1 com o carbono em δ 110,8 (C-3) e J^3 com os carbonos em δ 31,2 (C-4), 124,8 (C-3b) e 145,3 (C-1), sendo o deslocamento químico atípico de C-4 devido ao efeito do grupo formil. Ainda através dos mapas de contorno foram observadas as correlações J^1 dos hidrogênios das metoxilas em δ 3,68 e 3,91 com os carbonos em δ 60,3 e 56,1, e J^3 com os carbonos em δ 145,3 (C-1) e 152,6 (C-2), respectivamente, confirmando assim o padrão de substituição do anel A.

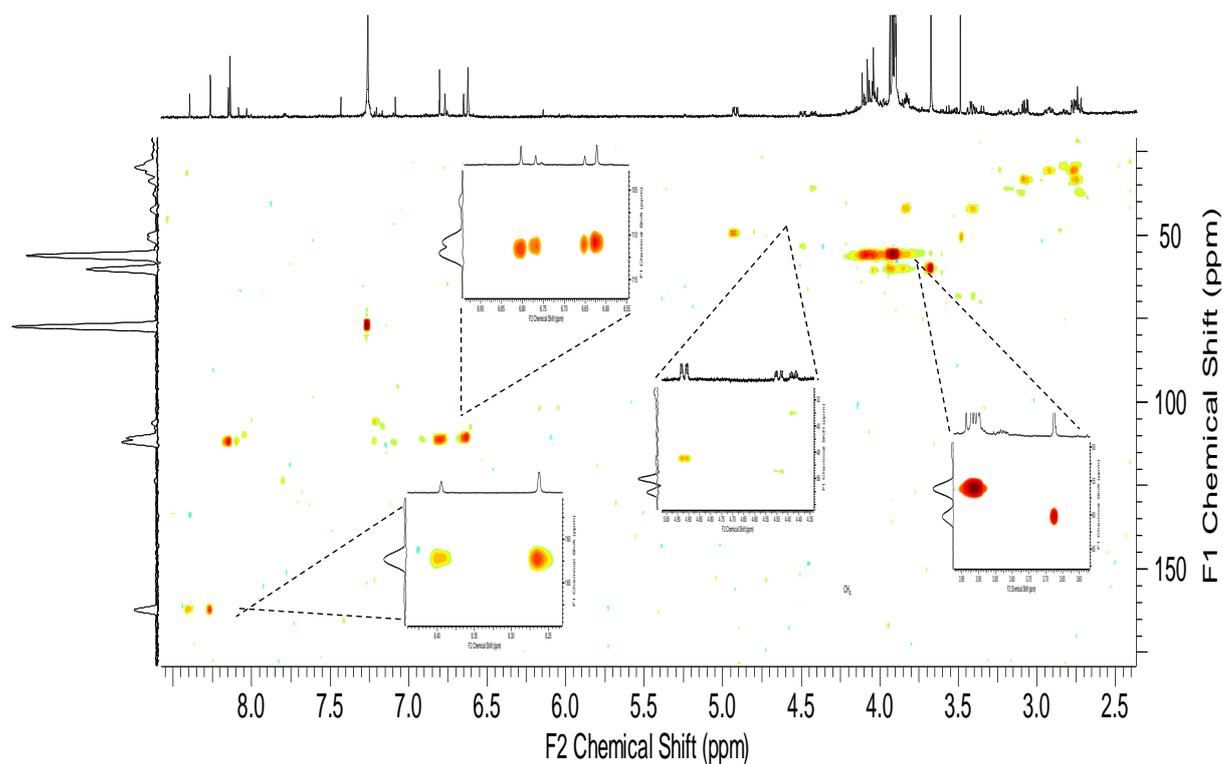


Figura 48. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.

A identificação do hidrogênio em δ 6,80 como sendo H-8 da substância majoritária foi possível através da correlação J^3 com o carbono em δ 33,7 (C-7). Outras correlações foram observadas com os carbonos em δ 124,1 (C-11a) e 147,8 (C-10). Para o hidrogênio em δ 8,14 (H-11) foram observadas correlações com os carbonos em δ 129,3 (C-7a) e 148,4 (C-9). A confirmação da metoxilação dos carbonos em δ 147,8 (C-10) e 148,4 (C-9) foi possível através da correlação J^3 dos hidrogênios em δ 3,91 e 3,93,

respectivamente, com estes carbonos, confirmando assim o padrão de substituição do anel D da substância majoritária.

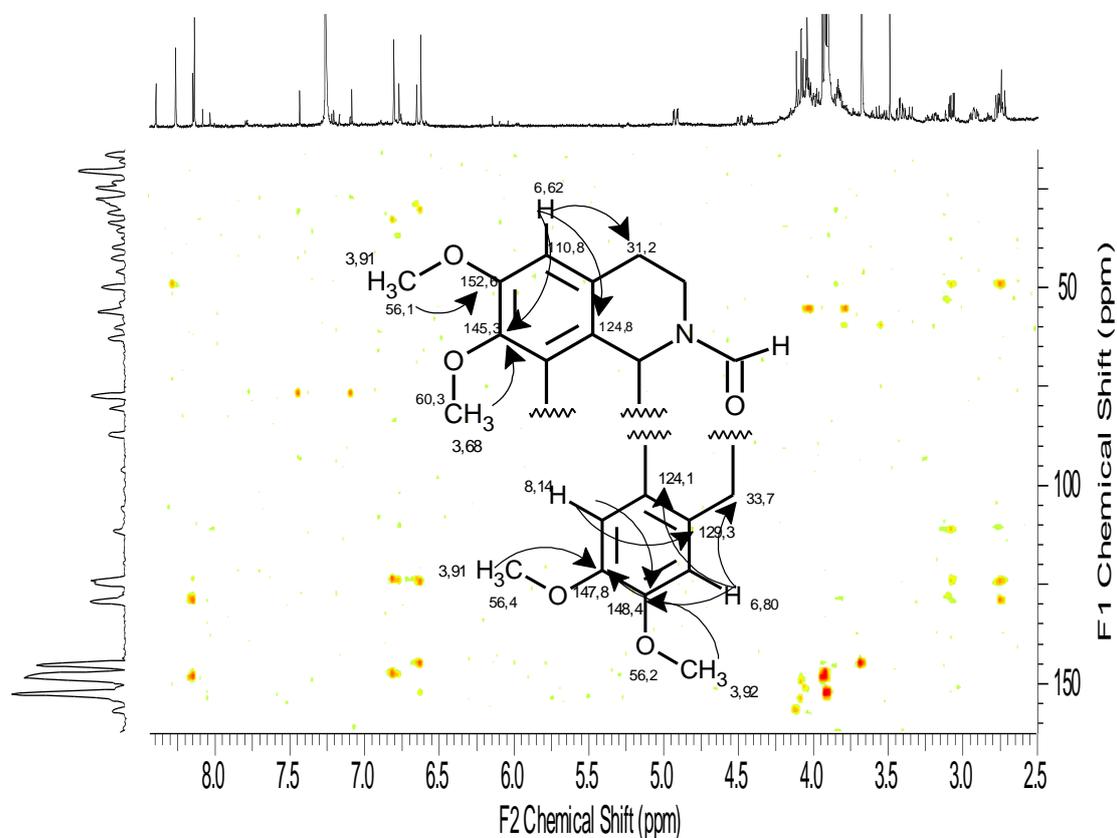


Figura 49. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.

Através do espectro de NOESY 1D (Figura 50) foi possível observar o acoplamento espacial entre os hidrogênios do grupo formil em δ 8,26 e 8,39 com os hidrogênios metilênico e metínico, respectivamente, em δ 3,83 e 4,49, confirmando assim o rotameo (*Z*) como sendo a substância majoritária. Esta observação está de acordo com dados da literatura, onde o rotâmero (*Z*) é reportado como majoritário na proporção de 2:1 em relação ao rotâmero (*E*). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 15) com dados da literatura (CHIOU et al., 2013) foi confirmada a estrutura do alcaloide *N*-formil-norglaucina (Figura 51), sendo este alcaloide inédito como produto

natural. Na Figura 52 é apresentada uma proposta de fragmentação para a estrutura determinada.

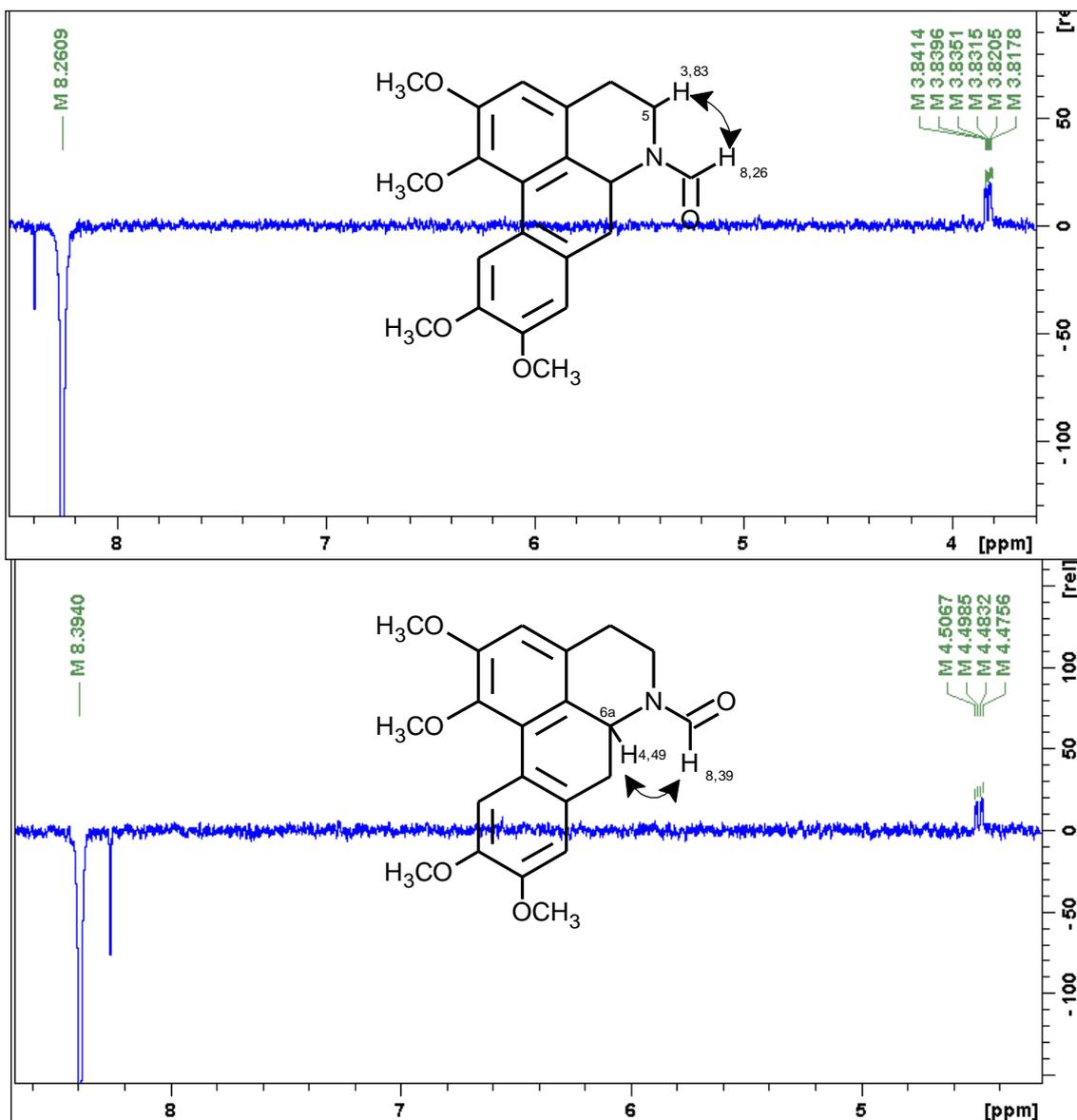


Figura 50. Espectro de NOESY 1D (^1H 600 MHz, CDCl_3) da amostra FASF29.

Tabela 15. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FASF29 para o rotâmero (Z).

FASF29 (<i>N</i> -formil-norglaucina) (Z)				
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}	HMBC ^a
1	-	-	145,3	-
1a	-	-	-	-
2	-	-	152,6	-
3	6,62 (1H, s)	6,60 (1H, s)	110,8	31,2;124,8; 145,3 e 152,6
3a	-	-	-	-

3b	-	-	124,8	-
4	2,76 (1H, m) e 2,92 (1H, m)	-	31,2	-
5	3,41 (1H, m) e 3,83 (1H, m)	-	42,4	-
6a	4,92 (1H, dd, 14,2 e 4)	4,89 (1H, dd, 13,9 e 4,2)	49,9	-
7	2,75 (1H, m) e 3,07 (1H, dd, 13,6 e 4,4)	-	33,7	49,9; 111,5; 124,9 e 129,3
7a	-	-	129,3	-
8	6,80 (1H, s)	6,74 (1H, s)	111,5	33,7; 124,1 e 147,8
9	-	-	148,4	-
10	-	-	147,8	-
11	8,14 (1H, s)	8,11 (1H, s)	112,0	148,4 e 129,3
11a	-	-	124,1	-
1-OCH ₃	3,68 (3H, s)	3,65 (3H, s)	60,3	145,3
2-OCH ₃	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,1	152,6
9-OCH ₃	3,92 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,1	148,4
10-OCH ₃	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,1	147,8
N-CHO	8,26 (1H, s)	8,23 (1H, s)	162,3	49,9

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ¹H e 150 MHz para ¹³C em CDCl₃, utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com CHIOU et al., 2013 (CDCl₃, 400 MHz)

^cCarbonos protonados e quaternários foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

Tabela 16. Dados de NMR de ¹H e ¹³C da amostra FASF29 para o rotâmero (*E*).

Posição	FASF29 (<i>N</i> -formil-norglaucina) (<i>E</i>)			
	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ H δ (mult., J em Hz) ^b	¹³ C ^{a,c}	HMBC ^a
1	-	-	145,2	-
1a	-	-	-	-
2	-	-	152,6	-
3	6,65 (1H, s)	6,63 (1H, s)	111,0	29,6; 124,2 e 145,2
3a	-	-	-	-
3b	-	-	124,2	-
4	2,74 (1H, m) e 2,83 (1H, m)	-	29,6	-
5	3,18 (1H, m) e 4,43 (1H, dt, 12,9 e 4)	-	36,7	-
6a	4,49 (1H, dd, 14,4 e 4,5)	4,46 (1H, dd, 14,4 e 4,3 Hz)	53,8	-
7	2,73 (1H, m) e 3,09 (1H, m)	-	37,6	-
7a	-	-	128,7	-
8	6,77 (1H, s)	6,78 (1H, s)	111,2	37,6; 124,3 e 148,0
9	-	-	148,5	-
10	-	-	148,0	-
11	8,15 (1H, s)	8,12 (1H, s)	112,0	128,7 e 148,5
11a	-	-	124,3	-
1-OCH ₃	3,67 (3H, s)	3,65 (3H, s)	60,3	145,2
2-OCH ₃	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,1	152,6
9-OCH ₃	3,94 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,1	148,5
10-OCH ₃	3,92 (3H, s)	3,90 (3H, s)	56,1	148,0
N-CHO	8,39 (1H, s)	8,37 (1H, s)	162,3	-

^aO experimento foi realizado a 400 MHz para ¹H e 100 MHz para ¹³C em CDCl₃, utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com CHIOU et al., 2013 (CDCl₃, 400 MHz)

^cCarbonos protonados e quaternários foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

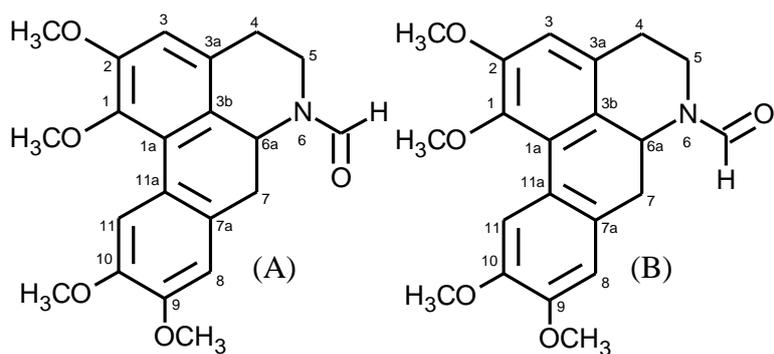


Figura 51. Estruturas dos rotômeros (*Z*) (A) e (*E*) (B) do alcaloide *N*-formil-norglaucina.

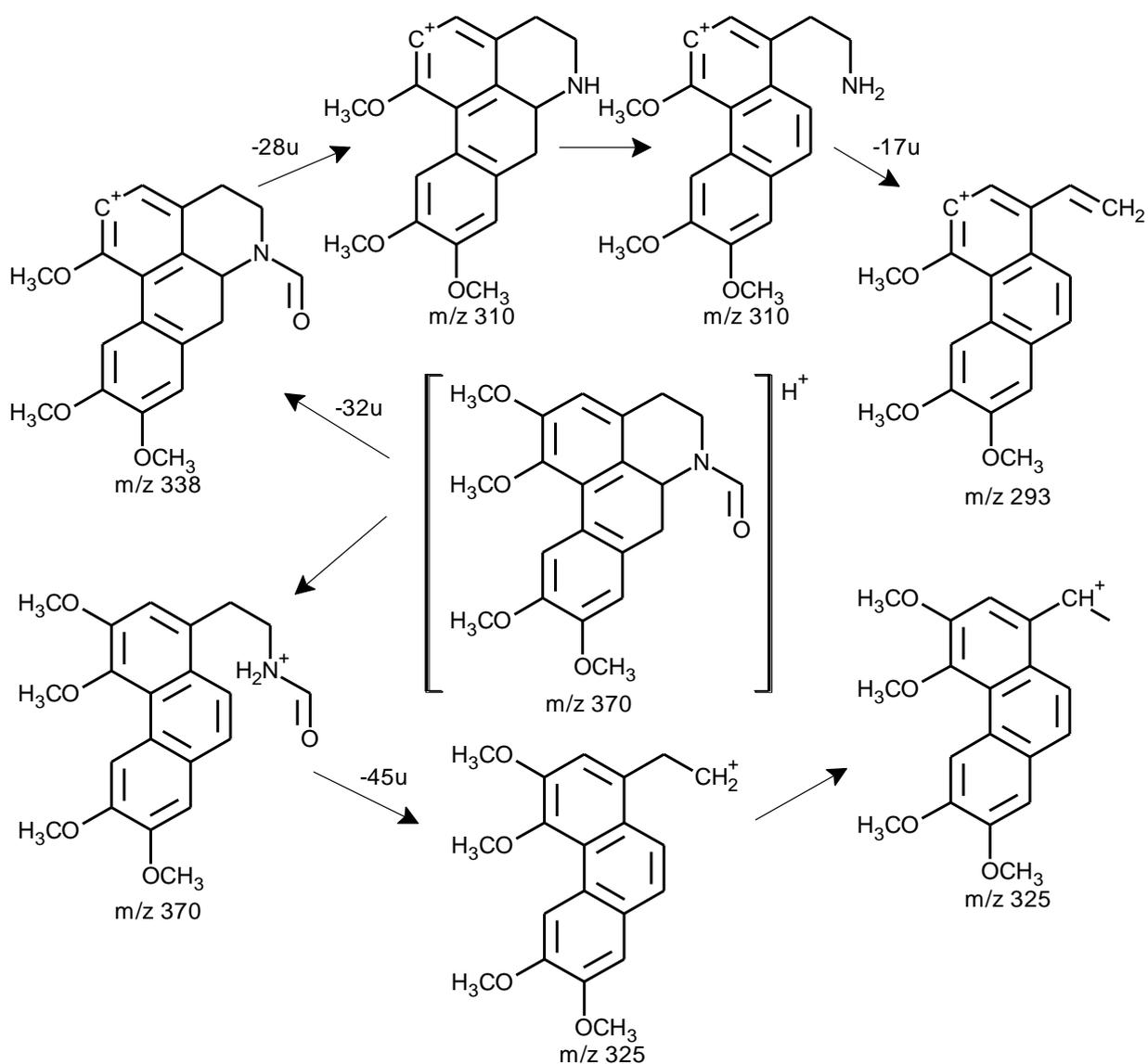
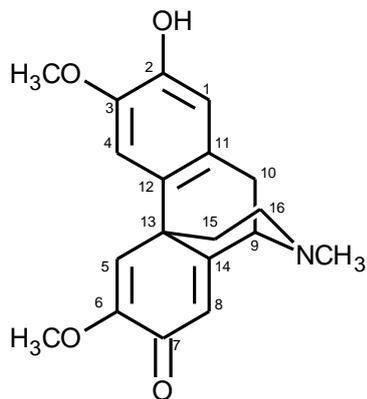
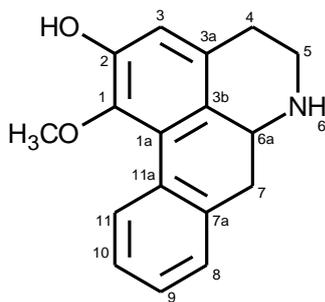


Figura 52. Proposta de fragmentação para o alcaloide *N*-formil-norglaucina.

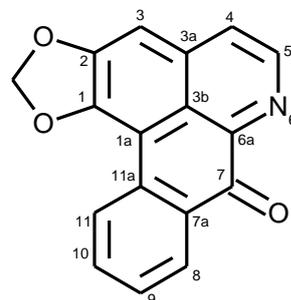
5.6.2. Substâncias isoladas da fração alcaloídica das cascas de *U. floribunda* (FAFC)



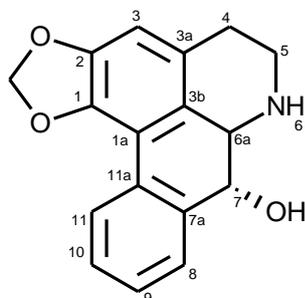
pallidina
(FAFC5)



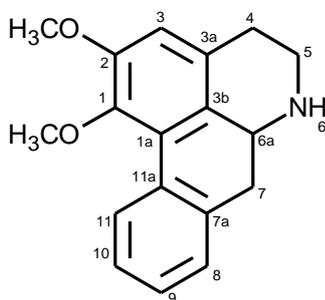
assimilobina
(FAFC12.3)



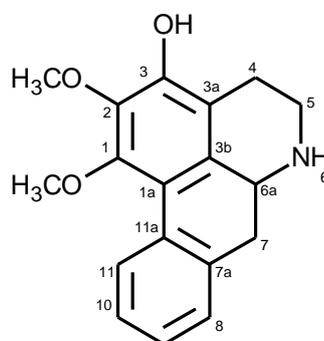
liriodenina
(FAFC13.3)



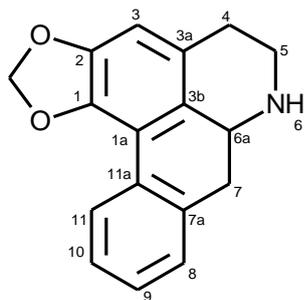
norunshinsunina
(FAFC14.4)



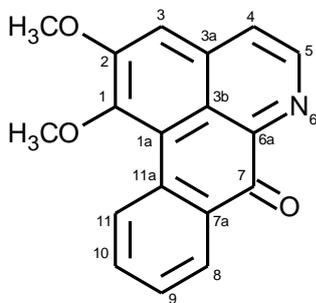
nornuciferina
(FAFC15)



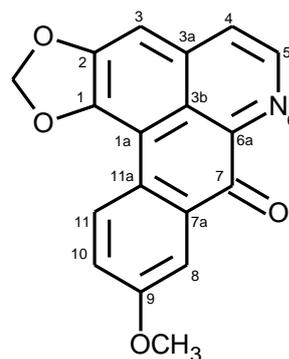
isopilina
(FAFC18.3)



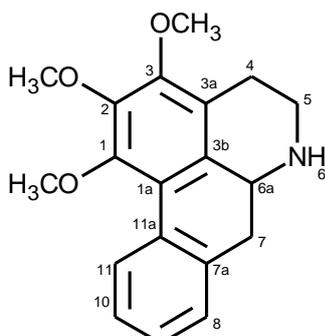
anonaina
(FAFC18.4)



lisicamina
(FAFC20.3)



oxoxylopina
(FAFC20.4)



O-metilisopilina
(FAFC21.3)

5.6.2.1. Determinação estrutural da amostra FAFC5

A amostra codificada como FAFC5 (63,4 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração amarela. No espectro de massas (Figura A26) foi observado um pico base de m/z 328 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 31 u, além de perdas sequenciais de 32 e 28 u (Figura 53). Embora estas perdas estejam em acordo com uma estrutura aporfínica contendo grupos metoxil e hidroxil adjacentes (STÉVIGNY et al., 2004; SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015), a perda elevada de massa gerando o íon de m/z 178, previamente descritos como fragmento chave de compostos tetrahidroprotoberberínicos (SOARES et al. 2015), inviabiliza esta proposição.

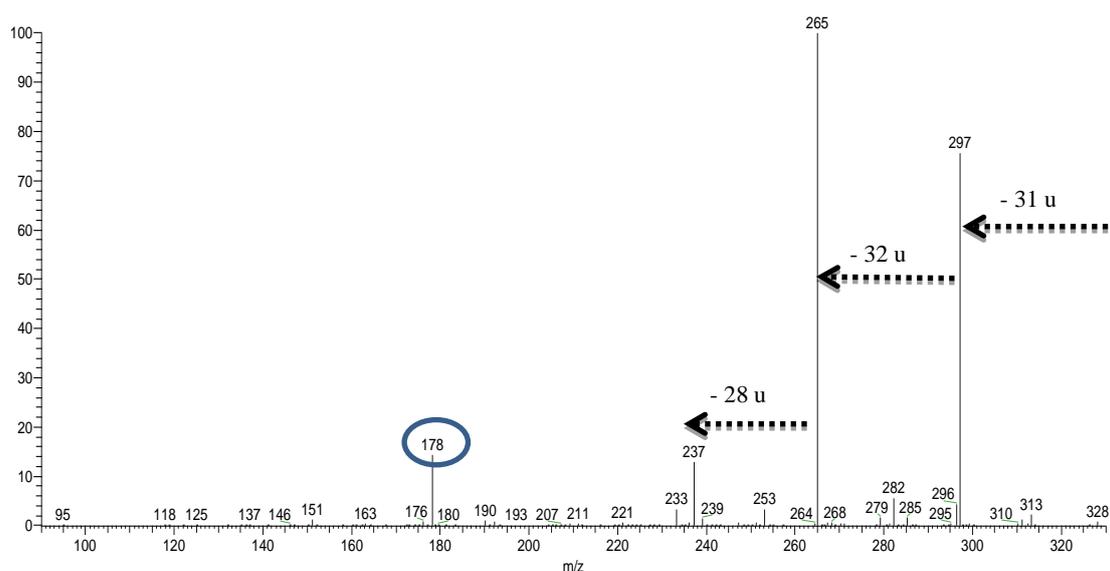


Figura 53. Espectro de MS^2 da amostra FAFC5.

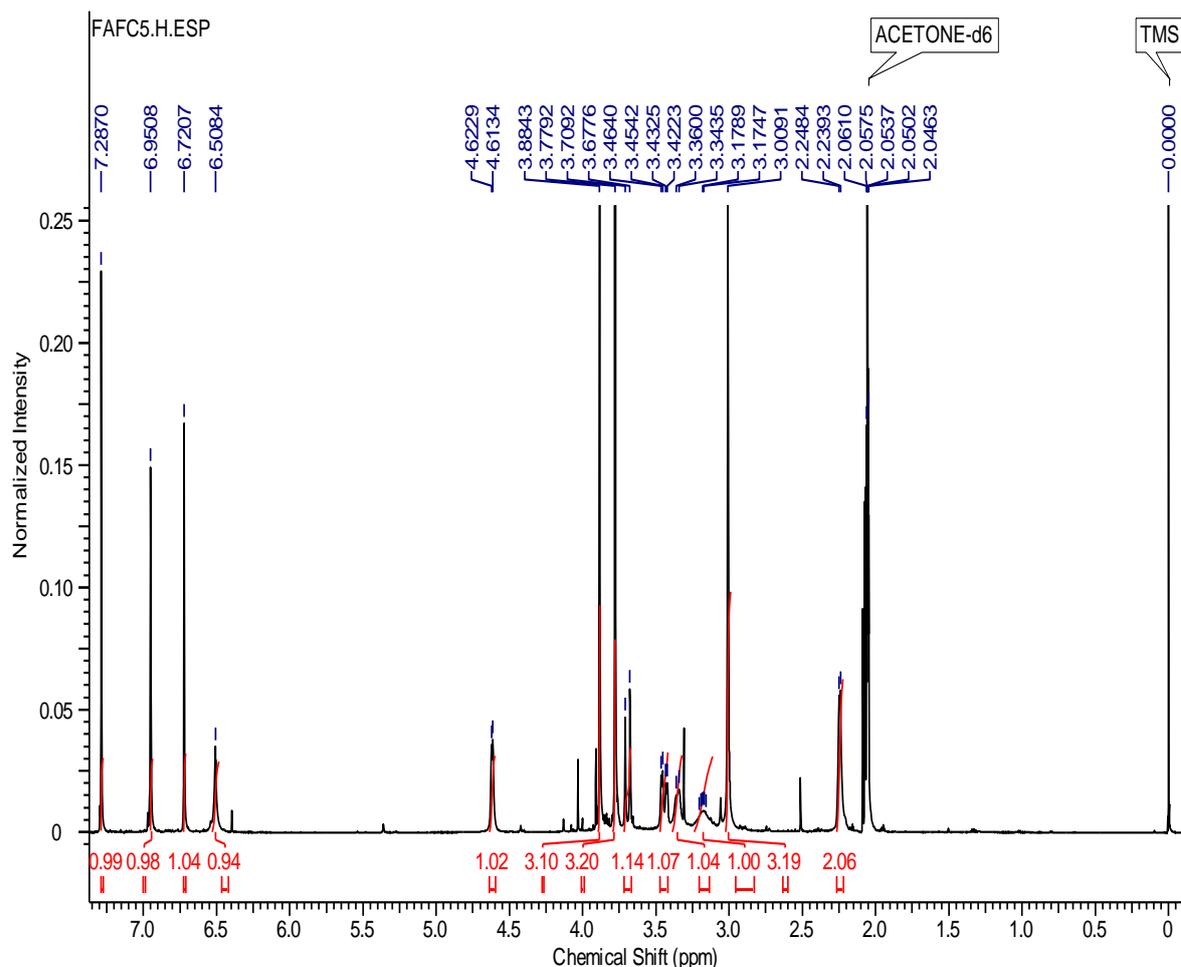


Figura 54. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC5.

No espectro de NMR de ^1H (Figura 54) foram observados quatro hidrogênios aromáticos em δ 7,29 (1H, s), 6,95 (1H, s), 6,72 (1H, s) e 6,51 (1H, s), dois hidrogênios metoxílicos em δ 3,88 (3H, s) e 3,78 (3H, s), hidrogênios metílicos em δ 3,01 (3H, s), seis hidrogênios metilênicos em δ 2,25 (2H, d, 5,5 Hz), 3,18 (1H, m), 3,35 (1H, m), 3,44 (1H, dd, 18 e 5,7 Hz), 3,69 (1H, d, 18 Hz), além de um hidrogênio metínico em δ 4,62 (1H, d, 5,7 Hz).

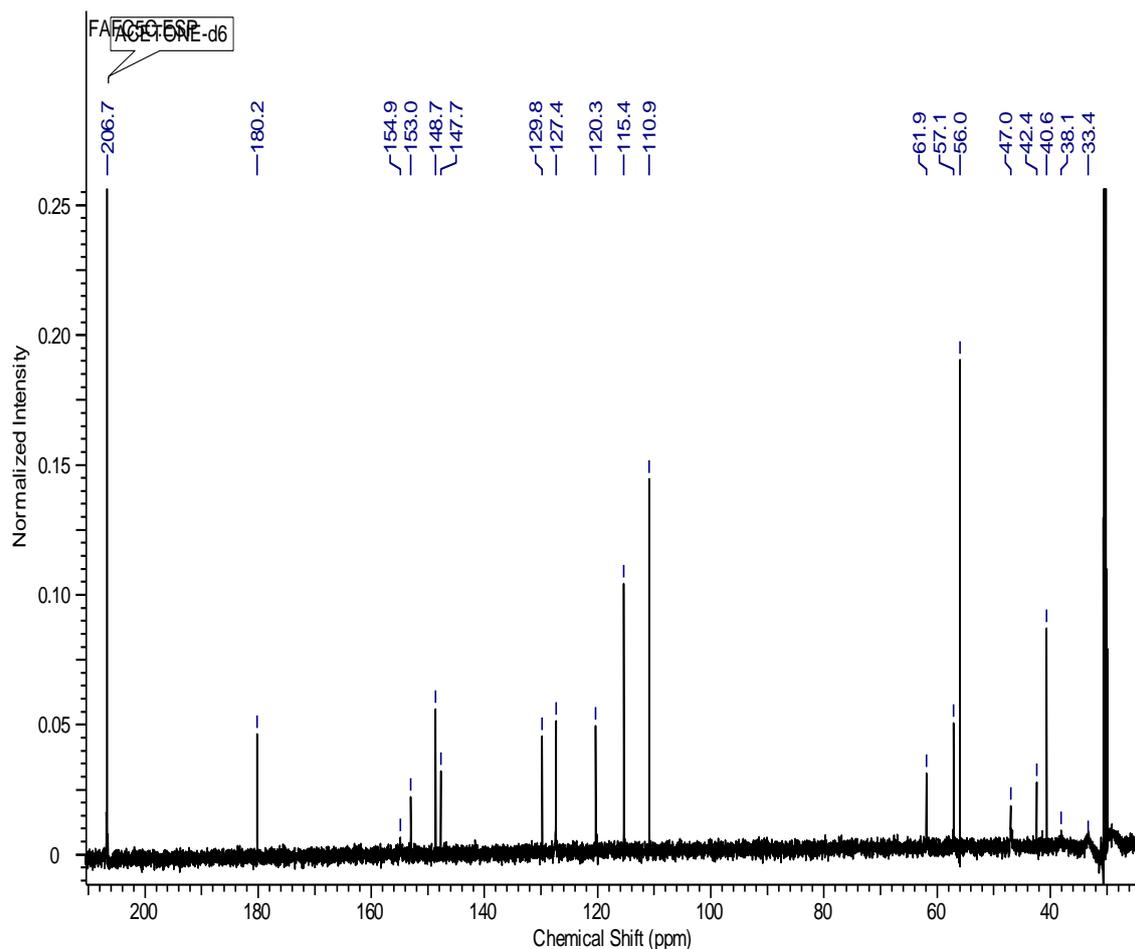


Figura 55. Espectro de NMR de ^{13}C (150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC5.

No espectro de NMR de ^{13}C (Figura 55) foram observados sinais compatíveis com carbonos olefinicos entre δ 129,8-110,9, e um típico sinal de carbonila de sistema α,β -insaturado em δ 180,2, comum em esqueletos do tipo oxoaporfínicos, proaporfínicos e morfina-dienonas (SOARES et al., 2015; SILVA et al., 2015; CHENG et al., 2008). A ausência dos sinais característicos dos hidrogênios α e β do anel piridinico do esqueleto oxoaporfínico, e do típico sistema de multipletos do anel D do esqueleto proaporfínico (SOARES et al., 2015) eliminou a hipótese destes tipos de esqueletos, sendo levantada a possibilidade da amostra se tratar de um alcaloide do tipo morfina-dienona. Esta hipótese foi reforçada pela presença de um sistema ABX representado pelos acoplamentos dos hidrogênios metilênicos [3,44 (1H, dd, 18 e 5,7)/ 3,69 (1H, d, 18)], com o hidrogênio metínico em δ 4,62 (1H, d, 5,7 Hz), compatível

com o segmento C-10(H₂)-C9(H), de estruturas de morfinodienonas (DOPKE et al., 1968).

Com base nos dados de NMR e MS, juntamente com a limitada distribuição deste tipo de esqueleto na família Annonaceae, foram levantadas duas possibilidades estruturais, os alcaloide isômeros pallidina e flavinantina (Figura 56), ambos previamente isolados de espécies da família Annonaceae (HSIEH et al., 2001; CHANG et al., 2000, SÉGUINEAU et al., 1991, CASTEDO et al., 1991).

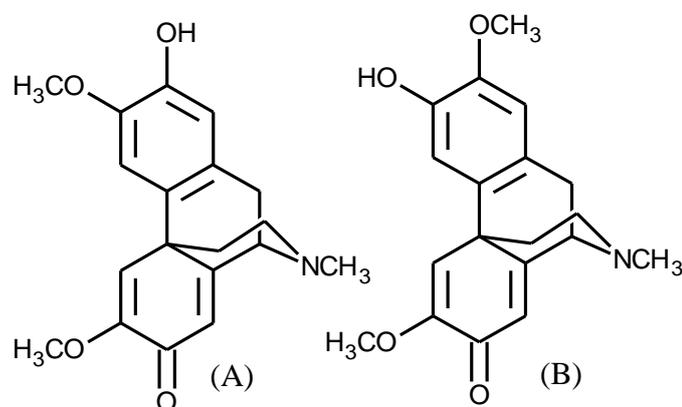


Figura 56. Possibilidades estruturais para a amostra FAFC5. (A) pallidina e (B) flavinantina.

Através dos mapas de contorno HSQC e HMBC (Figura 57 e 58) foi possível confirmar o padrão de substituição do anel A. Para o hidrogênio aromático mais desblindado em δ 7,29 foi observada correlação a J^1 com o carbono em δ 110,9 (C-4), e J^3 com os carbonos em δ 42,4 (C-13) e 147,7 (C-2), enquanto para o hidrogênio em δ 6,72, foi observada correlação a J^1 com o carbono em δ 115,4 (C-1), e J^3 com os carbonos em δ 129,8 (C-11) e 148,7 (C-3). A confirmação da metoxilação na posição C-3 foi obtida a partir da correlação a J^3 dos hidrogênios da metoxila em δ 6,72 com o carbono em 148,7 (C-3). A outra metoxila [δ 3,79 (s, 3H) / 56,0] foi posicionada em C-6 com base nos acoplamentos J^3 de seus hidrogênios com o carbono em δ 153,0. Um singlete correspondente a um hidrogênio em δ 6,51, acoplado a longa distancia com os

carbonos em δ 153,0 (C-6) e δ 180 (C=O) confirmou parte do sistema α,β insaturado da dienona. Estas observações aliadas à presença de um carbono quaternário em δ 154,9 (C-14) e às correlações do hidrogênio metínico em δ 4,62 (H-9) com os carbonos em δ 42,4 (C-13) e 127,4 (C-8), completaram o anel dienônico. Outras correlações a longa distância foram observadas, destacando-se a dos hidrogênios da metila ligada ao nitrogênio [δ 3,91(s, 3H)/ 40,6] com os carbonos em δ 47,0 (C-16) e 61,9 (C-9). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 17) com dados da literatura (ROBLOT et al., 1984) foi confirmada a estrutura do alcaloide pallidina (Figura 59), sendo este o primeiro relato de alcaloide morfinadienona no gênero *Unonopsis*.

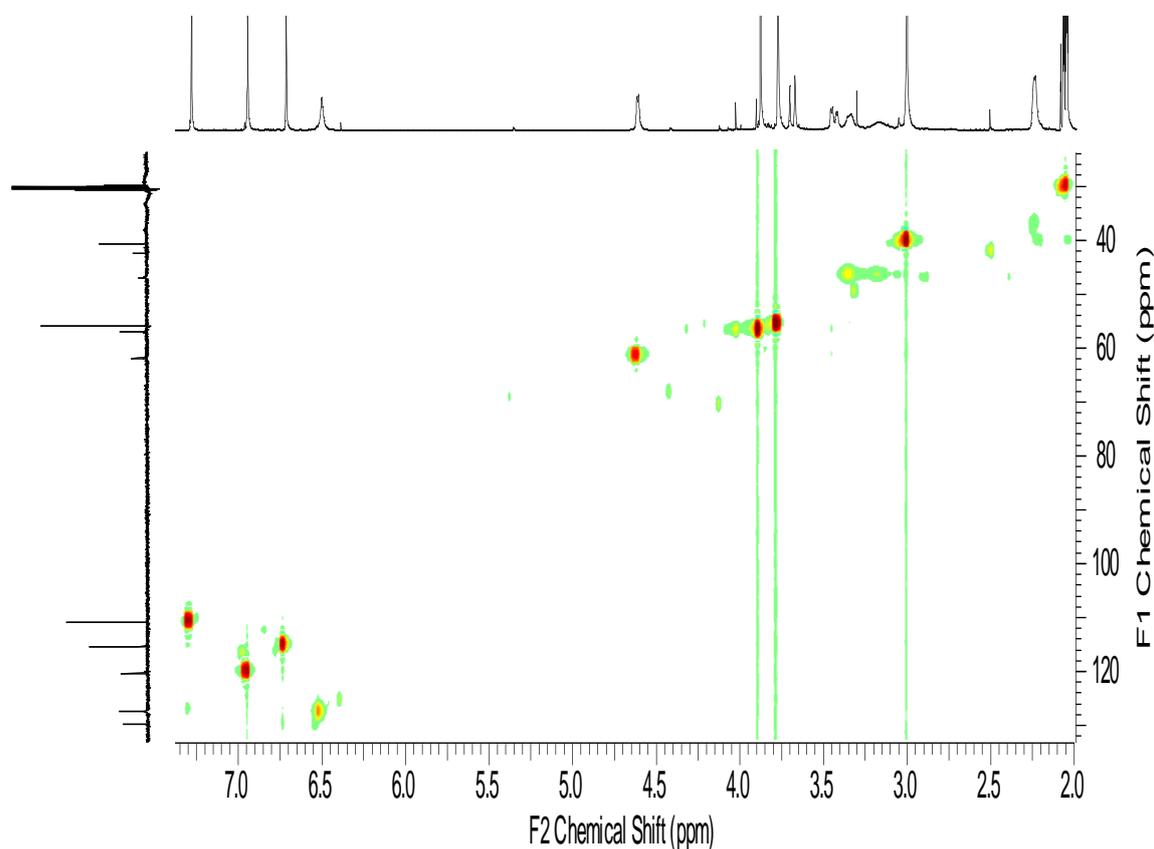


Figura 57. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC5.

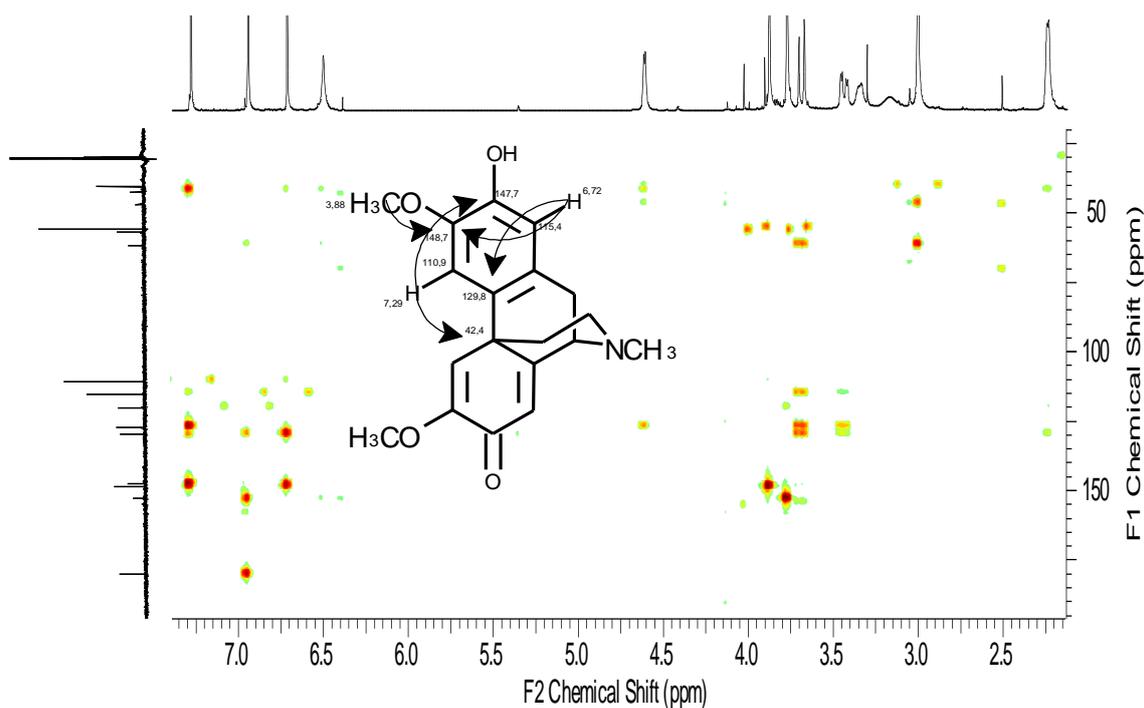


Figura 58. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC5.

Tabela 17. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FAFC5.

FAFC5 (Pallidina)				
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^a	HMBC ^a
1	6,72 (1H, s)	6,68 (1H, s)	115,4	129,8 e 148,7
2	-	-	147,7	
3	-	-	148,7	
4	7,29 (1H, s)	6,75 (1H, s)	110,9	42,4, 127,4 e 147,7
5	6,95 (1H, s)	6,32 (1H, s)	120,3	153,0 e 180,2
6	-	-	153,0	
7	-	-	180,2	
8	6,51 (1H, s)	6,30 (1H, s)	127,4	-
9	4,62 (1H, d, 5,7)	3,67 (1H, d, 6)	61,9	42,4 e 127,4
10	3,44 (1H, dd, 18 e 5,7) e 3,69 (1H, d, 18)	2,99 (1H, dd, 17,5 e 6) e 3,31 (1H, d, 17,5)	33,4	61,9, 115,4, 127,4 e 129,8
11	-	-	127,4	
12	-	-	129,8	
13	-	-	42,4	
14	-	-	154,9	
15	2,25 (2H, d, 5,5)	1,94 (1H, ddd, 13,0, 10,0 e 7,0) e 1,82 (1H, ddd, 13,0, 3,0 e 2,5)	38,7	42,4 e 129,8
16	3,18 (1H, m) e 3,35 (1H, m)	2,58 (2H, m)	47,0	-
3-OCH ₃	3,88 (3H, s)	3,89 (3H, s)	57,1	148,7
6-OCH ₃	3,78 (3H, s)	3,79 (3H, s)	56,0	153,0
N-CH ₃	3,01 (3H, s)	2,37 (3H, s)	40,6	47,0 e 61,9

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com ROBLOT et al., 1984 (CDCl_3 , 400 MHz).

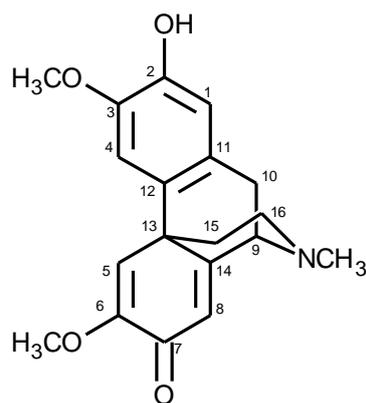


Figura 59. Estrutura do alcaloide pallidina.

5.6.2.2. Determinação estrutural da amostra FAFC12.3

A amostra codificada como FAFC12.3 (1,5 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A27) foi observado um pico base de m/z 268 $[M+H]^+$, apresentando perdas sequencias de 17, 32 e 28 u (Figura 60) quando submetido à fragmentação. Como observado anteriormente, este padrão sugere a presença de um esqueleto aporfínico com grupos metoxil e hidroxil vicinais (STÉVIGNY et al., 2004), sendo estas perdas consistentes com a estrutura do alcaloide assimilobina, previamente reportado em *U. guatteroides* e *U. duckei* (SILVA et al., 2012, 2014).

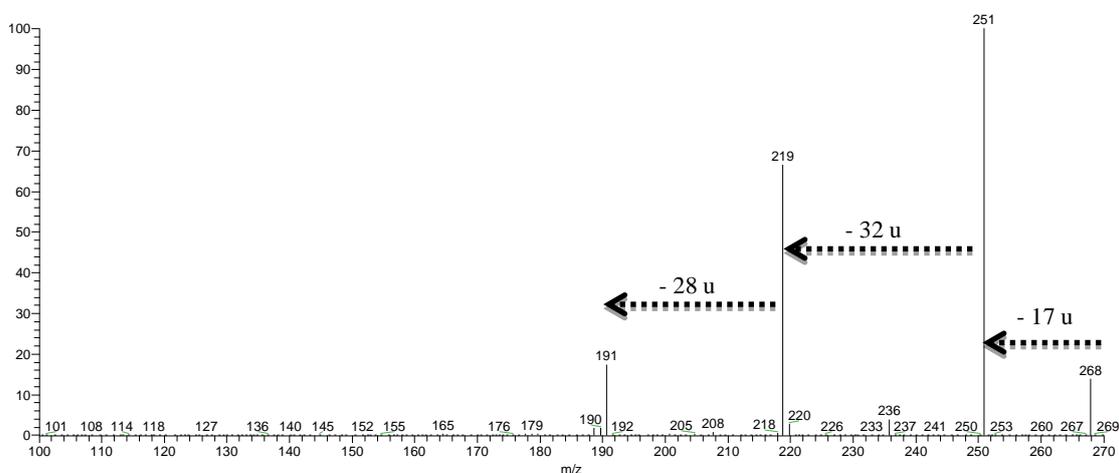


Figura 60. Espectro de MS^2 da amostra FAFC12.3.

No espectro de NMR de ^1H (Figura 61) foram observados sinais de hidrogênios aromáticos com multiplicidade característica de esqueleto aporfínico com ausência de substituição no anel D em δ 8,36 (1H, d, 8,2 Hz), 7,35 (2H, m) e 7,29 (1H, m), além dos típicos hidrogênios H-3 em δ 6,79 (1H, s) e H-6a em δ 4,29 (1H, dd, 13,8 e 3,9 Hz). Ainda no espectro de NMR de ^1H foram observados sinais característicos de hidrogênios metoxílicos em δ 3,61 (3H, s). Seis hidrogênios metilênicos foram observados em 2,90 (1H, dd, 16,5 e 3,9 Hz), 3,01 (1H, m), 3,21 (1H, dd, 13,8 e 4,5 Hz), 3,28 (1H, m), 3,35 (1H, m) e 3,74 (1H, m), sendo atribuídos aos seus respectivos carbonos a partir da análise do mapa de contorno HSQC (Figura 62). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 18) com dados da literatura (SOARES et al., 2015) foi confirmada a estrutura do alcaloide assimilobina (Figura 63), sendo este alcaloide amplamente distribuído na família Annonaceae (GUINAUDEAU et al., 1983, 1988, 1994).

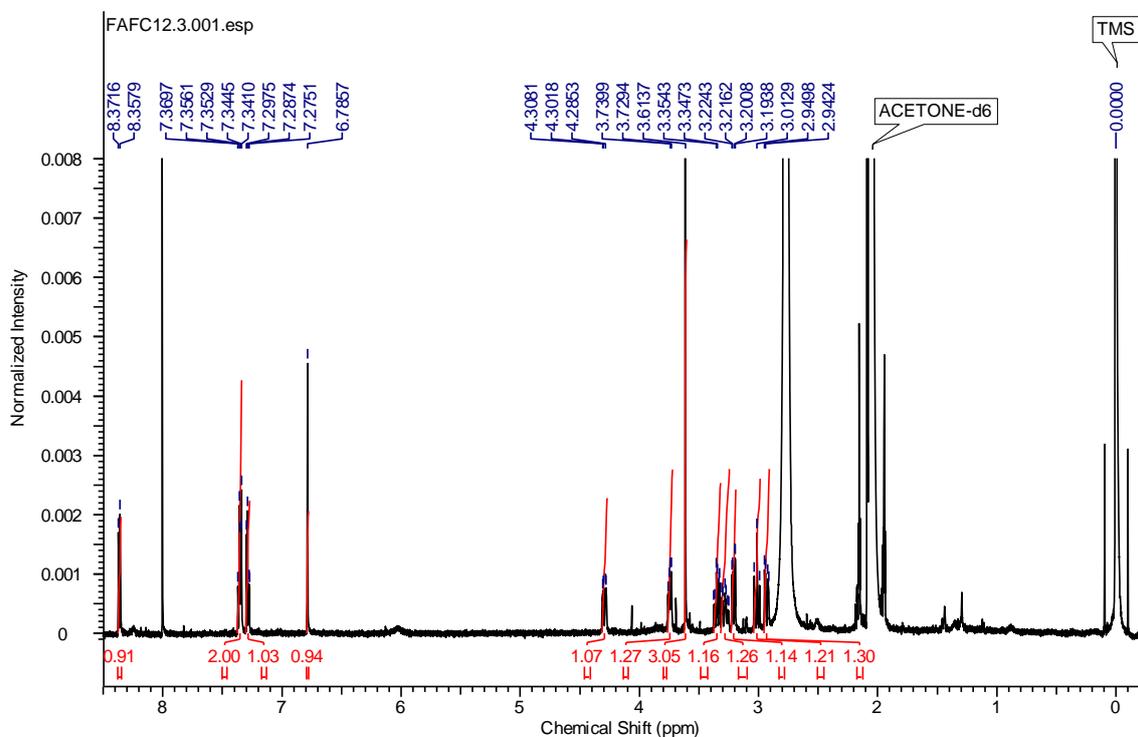


Figura 61. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC12.3

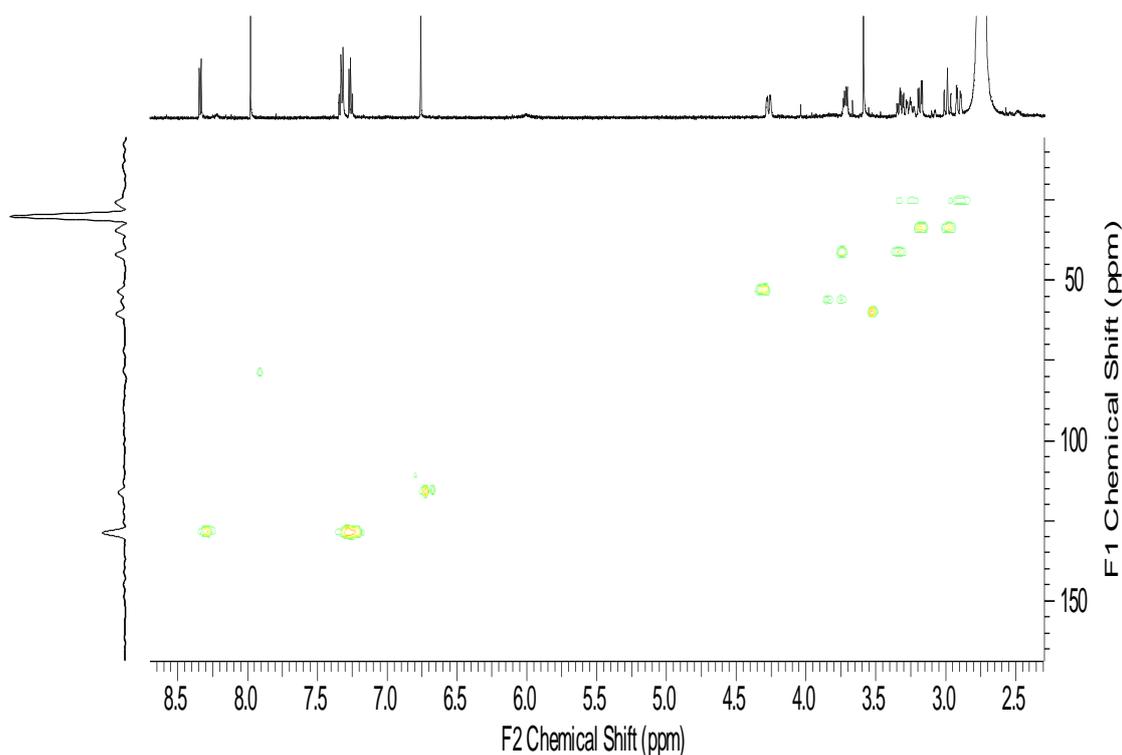


Figura 62. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$) da amostra FAFC12.3.

Tabela 18. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FAFC12.3.

FAFC12.3 (Asimilobina)			
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}
1	-	-	-
1a	-	-	-
2	-	-	-
3	6,69 (1H, s)	6,73 (1H, s)	116,0
3a	-	-	-
3b	-	-	-
4	2,90 (1H, dd, 16,5 e 3,9) e 3,28 (1H, m)	2,75 (1H, m) e 3,04 (1H, m)	26,2
5	3,35 (1H, m) e 3,74 (1H, m)	3,04 (1H, m) e 3,49 (1H, m)	42,1
6a	4,29 (1H, dd, 13,8 e 3,9)	3,93 (1H, m)	53,6
7	3,01 (1H, m) e 3,21 (1H, dd, 13,8 e 4,5)	2,85 (1H, m) e 2,97 (1H, dd, 13,8 e 4,4)	34,8
7a	-	-	-
8	7,29 (1H, m)	7,28 (1H, m)	128,5
9	7,35 (1H, m)	7,25 (1H, m)	128,6
10	7,35 (1H, m)	7,33 (1H, m)	128,6
11	8,36 (1H, d, 8,2)	8,29 (1H, d, 7,4)	128,5
11a	-	-	-
1-OCH ₃	3,61 (3H, s)	3,59 (3H,s)	60,2

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com SOARES et al., 2015 (CDCl_3 , 600 MHz).

^cCarbonos protonados assinalados através dos dados de HSQC.

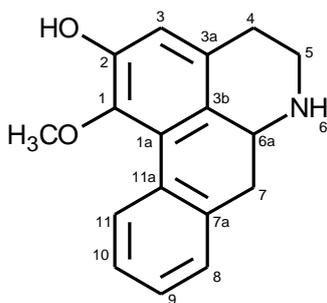


Figura 63. Estrutura do alcaloide asimilobina.

5.6.2.3. Determinação estrutural da amostra FAFC13.3

A amostra codificada como FAFC13.3 (1,1 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração laranja. No espectro de massas (Figura A28) foi observado um pico base de m/z 276 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perdas sequenciais de 28 u (Figura 64), apontando para uma estrutura não aporfínica. Como observado anteriormente para a amostra FAFC22, este comportamento peculiar está de acordo com o esperado para alcaloides oxoaporfínicos, sendo estas perdas consistentes com a estrutura do alcaloide liriodenina (SILVA et al., 2012a, SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015), previamente reportado nas espécies *U. guatterioides* (GUINAUDEAU et al., 1988), *U. spectabilis* (LAPRÉVOTE, et al., 1988), *U. pacifica* (ARANGO, et al., 1988), *U. lindmanii* (SIQUEIRA et al., 1998), *U. buchtienii* (WAECHTER et al., 1999) e *U. duckei* (SILVA et al., 2014) .

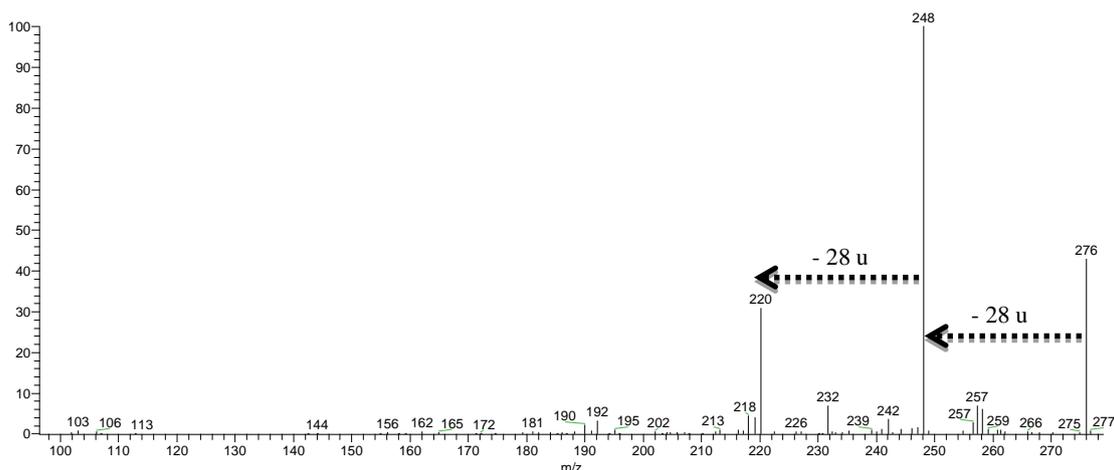


Figura 64. Espectro de MS² da amostra FAFC13.3.

No espectro de NMR de ¹H (Figura 65) foram observados diversos hidrogênios aromáticos, destacando-se os hidrogênios α e β do anel piridinico do esqueleto oxoaporfínico em δ 8,76 (1H, d, 5,3 Hz) e 8,03 (1H, d, 5,3 Hz), os hidrogênios em δ 8,81 (1H, d, 8,2 Hz), 8,50 (1H, dd, 8,1 e 1,2 Hz), 7,87 (1H, ddd, 8,3, 7,1 e 1,4 Hz) e 7,65 (1H, m), cujas multiplicidades são coerentes com ausência de substituição do anel D, além dos hidrogênios em δ 6,48 (2H, s), com deslocamento e integração característica de grupo metilenodioxi de estruturas oxoaporfínicas planares (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

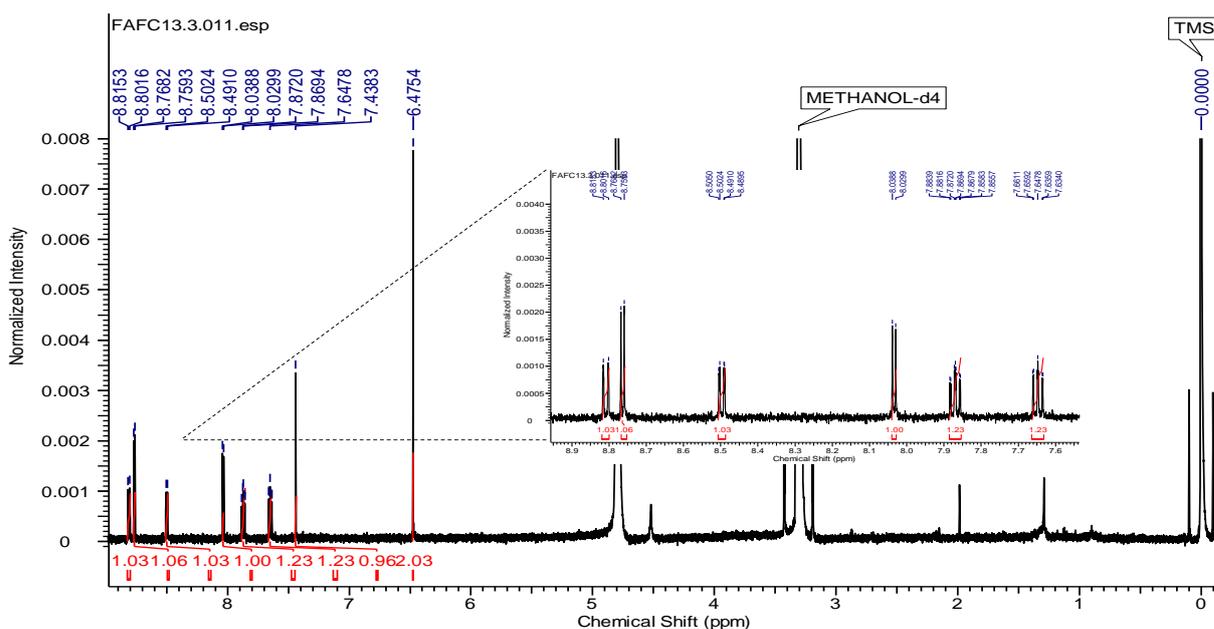


Figura 65. Espectro de NMR de ¹H (600 MHz, CD₃OD) da amostra FAFC13.3.

A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 19) com dados da literatura (SOARES et al., 2015) foi confirmada a estrutura do alcaloide liriodenina (Figura 66), sendo este alcaloide amplamente distribuído na família Annonaceae (GUINAUDEAU et al., 1983, 1988, 1994).

Tabela 19. Dados de NMR de ^1H da amostra FAFC13.3.

FAFC13.3 (Liriodenina)		
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	7,44 (1H, s)	7,22 (1H, s)
3a	-	-
3b	-	-
4	8,03 (1H, d, 5,3)	7,79 (1H, d, 5,0)
5	8,76 (1H, d, 5,3)	8,90 (1H, d, 5,2)
6a	-	-
7	-	-
7a	-	-
8	8,50 (1H, dd, 8,1 e 1,2)	8,59 (1H, dd, 7,8 e 1,2)
9	7,65 (1H, m)	7,59 (1H, t, 8,1)
10	7,87 (1H, ddd, 8,3, 7,1 e 1,4)	7,78 (1H, m)
11	8,81 (1H, d, 8,2)	8,68 (1H, d, 7,9)
11a	-	-
O-CH ₂ -O	6,48 (2H, s)	6,38 (2H, s)

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H em CD₃OD, utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com SOARES et al., 2015 (CDCl₃, 600 MHz).

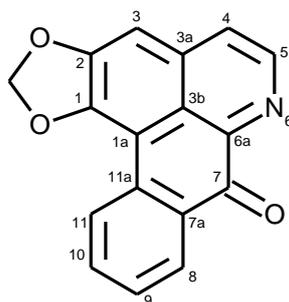


Figura 66. Estrutura do alcaloide liriodenina.

5.6.2.4. Determinação estrutural da amostra FAFC14.4

A amostra codificada como FAFC14.4 (3,8 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A29) foi observado um pico base de m/z 282 $[M+H]^+$, apresentando perdas sequencias de 18, 30 e 28 u (Figura 67) quando submetido à fragmentação. Embora a perda inicial de 18 u não tenha sido relatada para esqueletos aporfínicos, as perdas sequenciais de 30 e 28 u são fortes evidências da presença de grupo metilenodioxi em tal esqueleto (STÉVIGNY et al., 2004, SILVA et al., 2012, SOARES et al., 2015).

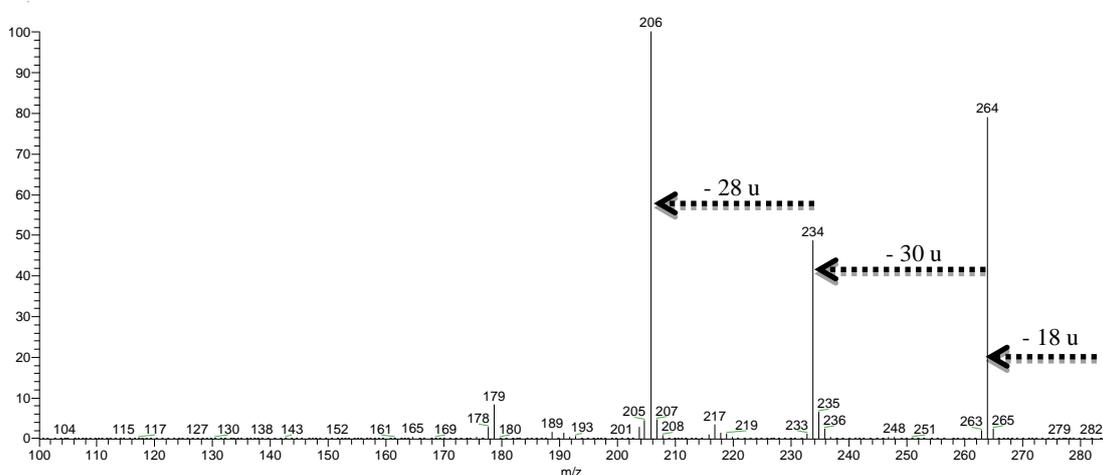


Figura 67. Espectro de MS^2 da amostra FAFC14.4.

No espectro de NMR de 1H (Figuras 68 e 69) foi possível observar similaridade espectral entre o sistema de hidrogênios aromáticos em δ 8,17 (1H, d, 7,6 Hz), 7,45 (1H, td, 7,6 e 1,5 Hz), 7,41 (1H, m) e 7,35 (1H, m) com o sistema da amostra FAFC12.3, sugerindo ausência de substituição no anel D do esqueleto aporfínico. Hidrogênios típicos de ponte metilenodioxi foram observados em δ 6,01 (1H, d, 1,3 Hz) e 6,16 (1H, d, 1,3 Hz). Sinais referentes aos hidrogênios metilênicos e ao típico hidrogênio H-6a foram também observados em δ 2,92-3,74, e δ 4,47 (1H, sl), respectivamente.

Ainda no espectro de NMR de 1H foi observado um segundo sinal de hidrogênio metínico mais desblindado em δ 4,94 (1H, d, 3,3 Hz), com deslocamento característico de hidrogênio carbinólico, sendo sua natureza confirmada através da correlação J^1 com

o carbono em δ 66,7 (Figura 70). Em geral, esqueletos aporfínicos apresentam hidroxilas não fenólicas preferencialmente nas posições C-4 ou C-7 (GUINAUDEAU et al., 1983, 1988).

Através do mapa de contorno HSQC (Figura 70) foi possível observar a presença de sinais em δ 25,4 e 41,3, atribuídos aos carbonos C-4 e C-5, respectivamente, além da ausência do sinal referente à posição C-7 em torno de δ 34, o que está de acordo com a proposta de substituição nesta posição.

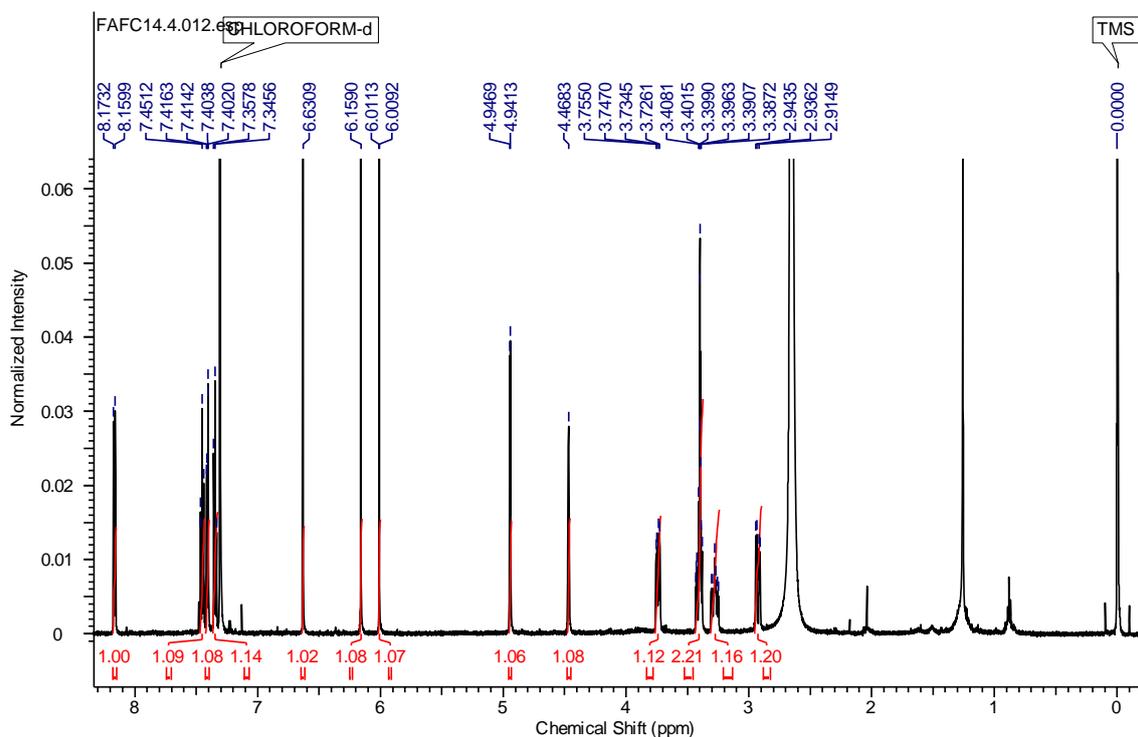


Figura 68. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC14.4.

Ainda através dos mapas de contorno (Figura 70 e 71) foi possível observar para o hidrogênio aromático H-3 em δ 6,63 (1H, s), correlação J^1 com o carbono em δ 107,7, e a longa distância com os carbonos em δ 25,4 (C-4), 117,3 (C-3b), 143,8 (C-1) e 148,7 (C-2). A confirmação da presença da ponte metilenodioxí no anel A foi obtida a partir das correlações J^1 dos hidrogênios em δ 6,01 e 6,16 com os carbonos em δ 101,5, e J^3 com os carbonos em δ 143,8 (C-1) e 148,7 (C-2). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 20) com dados da literatura (ISMAIL et al., 2012) foi confirmada a

estrutura do alcaloide norushinsunina (Figura 72), sendo este alcaloide anteriormente reportado em *U. guatterioides* (GUINAUDEAU et al., 1988) e *U. pacifica* (Arango et al., 1988).

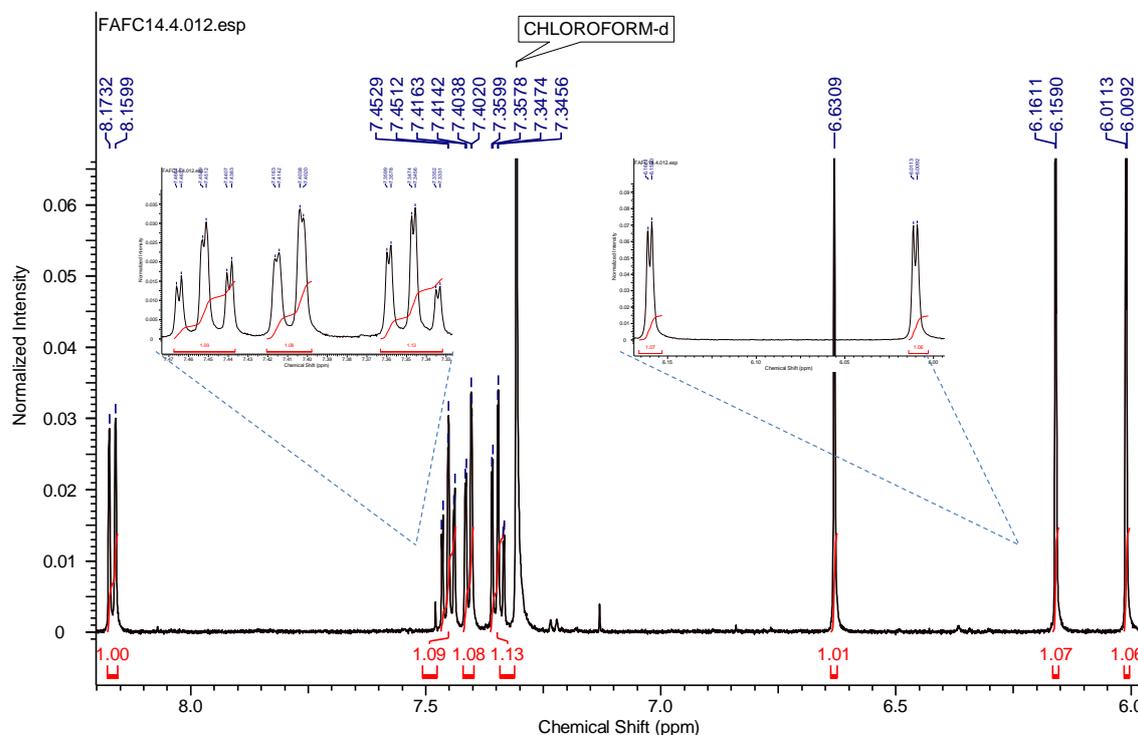


Figura 69. Ampliação do espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC14.4.

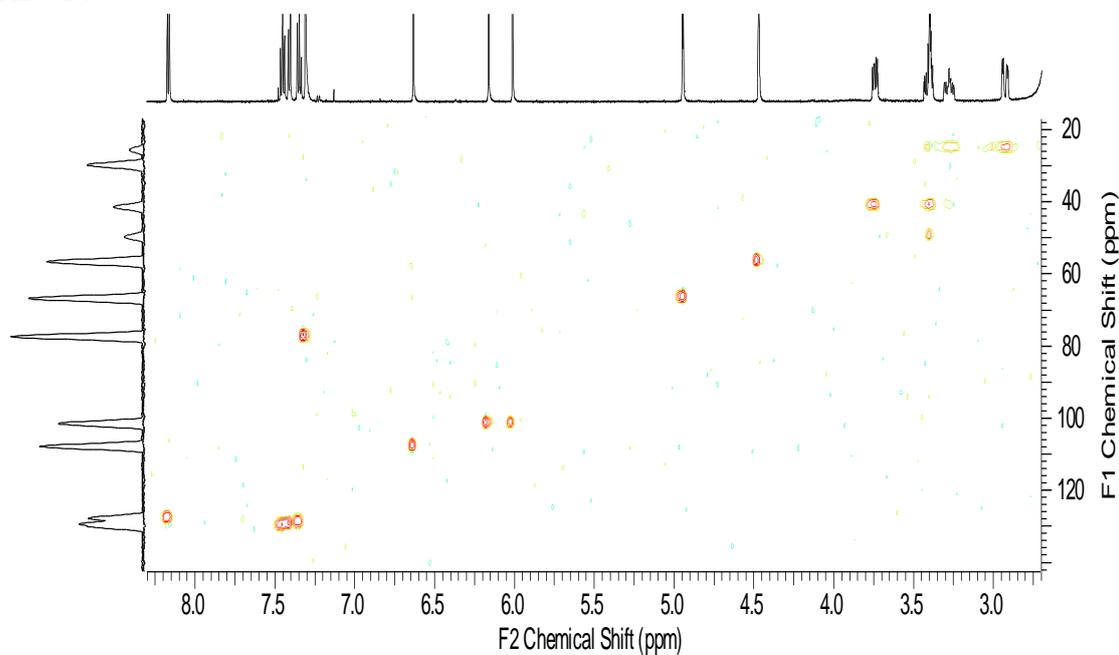


Figura 70. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC14.4.

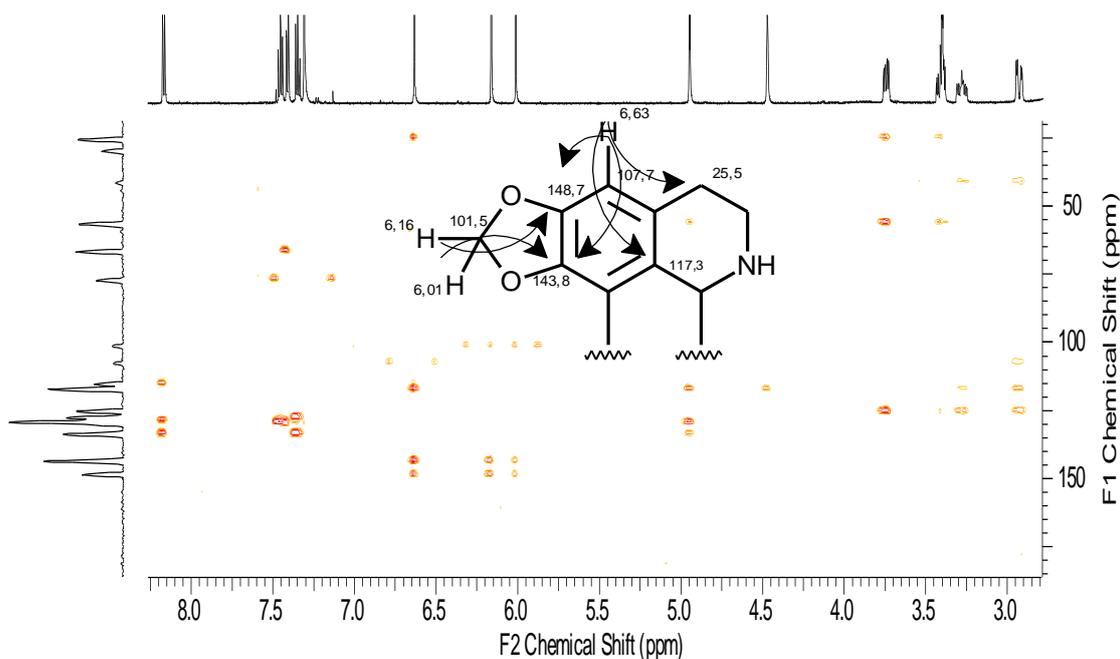


Figura 71. Mapa de contorno HMBC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC14.4.

Tabela 20. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FAFC14.4.

Posição	FAFC14.4 (Norushinsunina)			HMBC ^a
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}	
1	-	-	143,8	
1a	-	-		
2	-	-	148,7	
3	6,63 (1H, s)	6,59 (1H, s)	107,7	25,4, 117,3, 143,8 e 148,7
3a	-	-	125,3	
3b	-	-	117,3	
4	3,27 (1H, m) e 2,92 (1H, dd, 17,0 e 4,3)	3,37 (1H, ddd, 5,0, 3,9 e 1,2) e 2,68 (1H, dd, 16,2 e 3,9)	25,4	41,3, 107,7, 117,3 e 125,3
5	3,74 (1H, m) e 3,40 (1H, m)	-	41,3	25,4, 56,5 e 125,3
6a	4,47 (1H, sl)	4,06 (1H, d, 3,3)	56,5	117,3
7	4,94 (1H, d, 3,3)	4,61 (1H, d, 3,0)	66,7	56,5, 117,3, 129,4 e 133,7
7a	-	-	133,7	
8	7,41 (1H, m)	7,40 (1H, dd, 8,1 e 0,9)	129,4	66,7 e 129,9
9	7,35 (1H, m)	7,34 (1H, td, 7,2 e 1,2)	128,9	127,7 e 133,7
10	7,45 (1H, td, 7,6 e 1,5)	7,45 (1H, td, 8,7 e 1,2)	129,9	129,4
11	8,17 (1H, d, 7,6)	8,16 (1H, dd, 7,2 e 1,2)	127,7	115,3, 128,9 e 133,7
11a	-	-	115,3	
O-CH ₂ -O	6,16 (1H, d, 1,3) e 6,01 (1H, d, 1,3)	6,11 (1H, d, 1,5) e 5,95 (1H, d, 1,2)	101,5	143,8 e 148,7

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com ISMAIL et al., 2012 (CDCl_3 , 300 MHz)

^cCarbonos protonados e quaternários foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

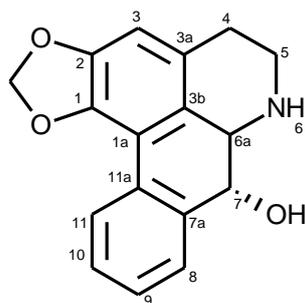


Figura 72. Estrutura do alcaloide norushinsunina.

5.6.2.5. Determinação estrutural da amostra FAFC15

A amostra codificada como FAFC15 (3,1 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A30) foi observado um pico base de m/z 282 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 17 u e perdas competitivas de 15 e 31 u (Figura 73), tal como observado para as amostras FASF13, FASF16 e FASF18, sugerindo o mesmo padrão de substituição. Estas perdas são consistentes com a estrutura do alcaloide normuciferina, previamente reportado em *U. guatterioides* e *U. duckei* (SILVA et al., 2012, 2014).

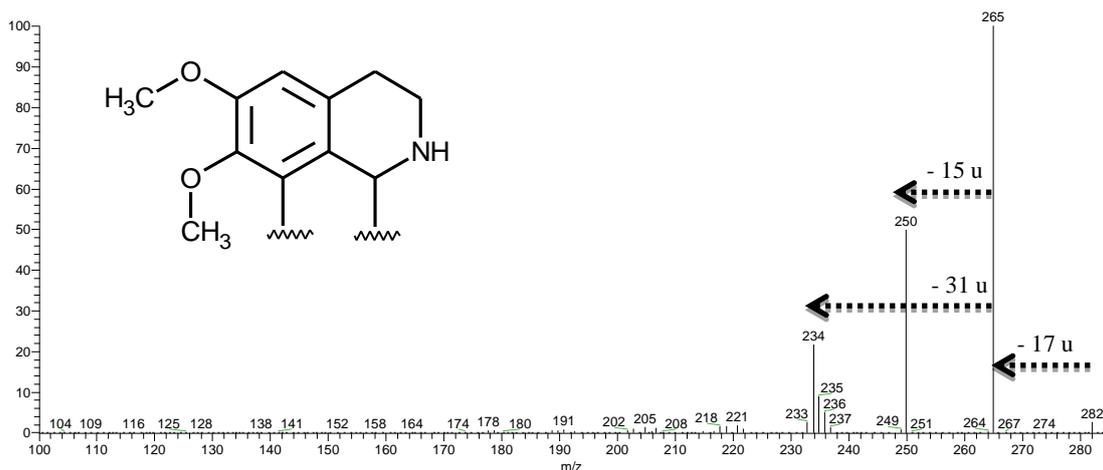


Figura 73. Espectro de MS^2 da amostra FAFC15.

No espectro de NMR de ^1H (Figura 74) foram observados sinais de hidrogênios aromáticos semelhantes ao sistema das amostras FAFC12.3 e FAFC14.4 [δ 8,40 (1H, d, 7,8 Hz), 7,35 (1H, m) e 7,25 (2H, m)], sugerindo ausência de substituição no anel D do esqueleto aporfínico, além do hidrogênio H-3 em δ 6,68 (1H, s) e H-6a em δ 4,27 (1H, d, 12,2 Hz).

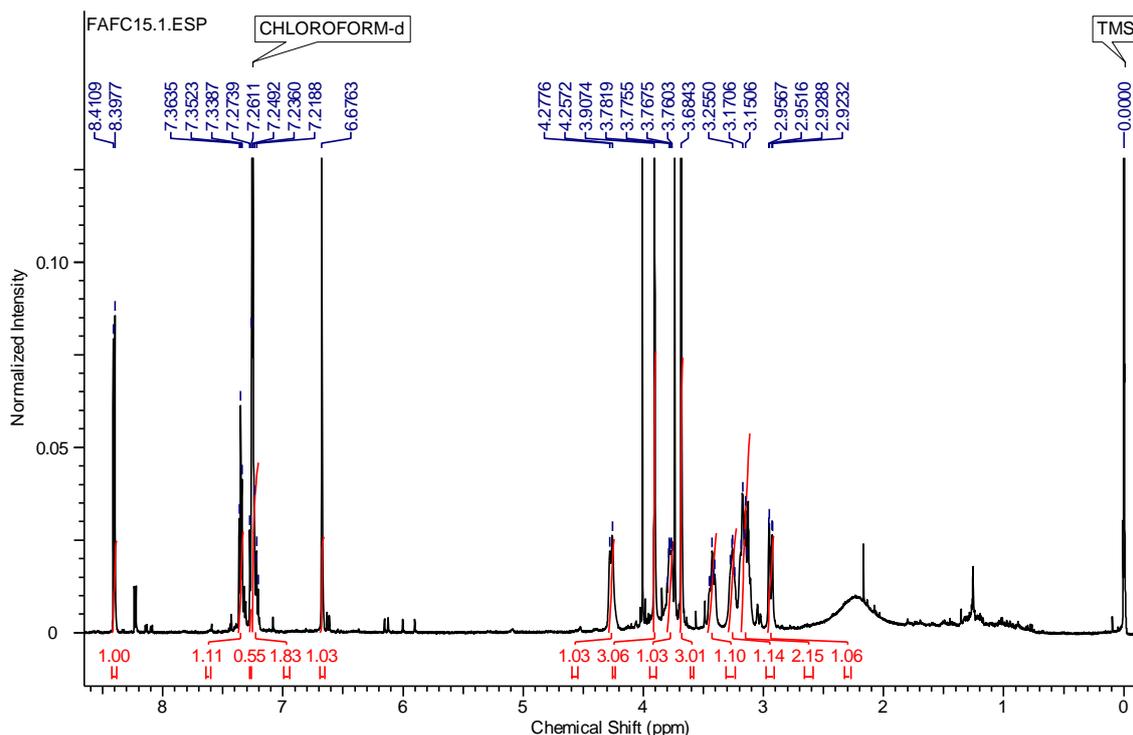


Figura 74. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC15.

Ainda no espectro de NMR de ^1H foram observados sinais característicos de hidrogênios metoxílicos em δ 3,91 (3H, s) e 3,68 (3H, s). Hidrogênios metilênicos foram observados em δ 2,94 (1H, dd, 16,9 e 3,2 Hz), 3,15 (2H, m), 3,26 (1H, m), 3,43 (1H, m) e 3,78 (1H, m), sendo atribuídos aos seus respectivos carbonos a partir da análise do mapa de contorno HSQC (Figura 75). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 21) com dados da literatura (SOARES et al., 2015) foi confirmada a estrutura do alcaloide nornuciferina (Figura 76), sendo este alcaloide reportado previamente em *U. guatteroides* e *U. duckei* (Silva et al., 2012, 2014).

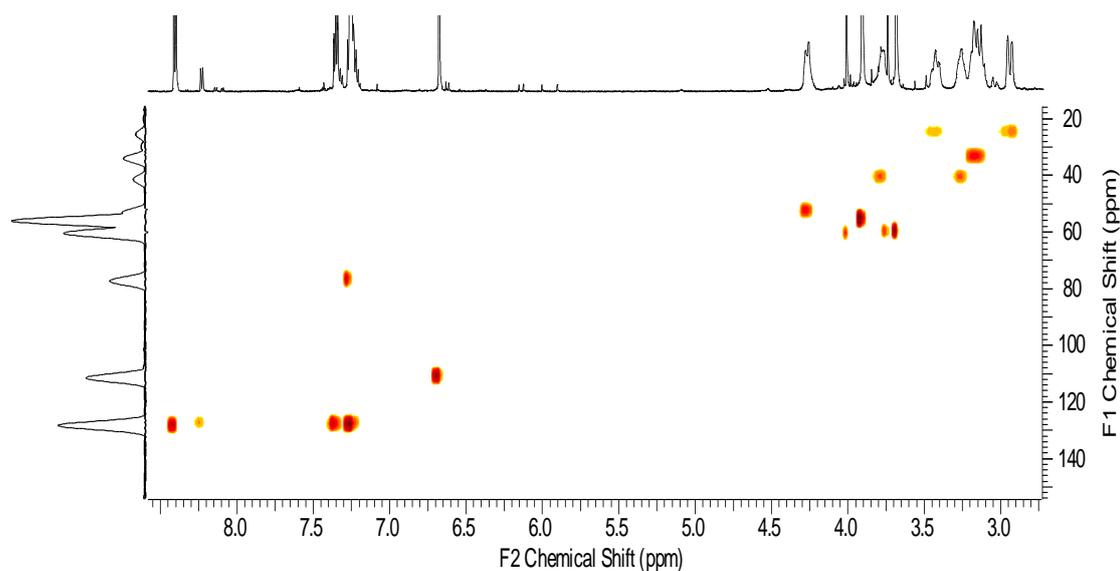


Figura 75. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC15.

Tabela 21. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FAFC15.

FAFC15 (Nornuciferina)			
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}
1	-	-	-
1a	-	-	-
2	-	-	-
3	6,68 (1H, s)	6,67 (1H, s)	111,5
3a	-	-	-
3b	-	-	-
4	2,94 (1H, dd, 16,9 e 3,2) e 3,43 (1H, m)	2,78 (1H, dd, 16,1 e 3,4) e 3,20 (1H, m)	25,3
5	3,26 (1H, m), 3,78 (1H, m)	3,10 (1H, m), 3,54 (1H, m)	41,3
6a	4,27 (1H, d, 12,2)	3,98 (1H, m)	53,2
7	3,15 (2H, m)	2,92 (1H, m) e 3,06 (1H, m)	33,7
7a	-	-	-
8	7,25 (1H, m)	7,25 (1H, m)	128,4
9	7,25 (1H, m)	7,25 (1H, m)	128,4
10	7,35 (1H, m)	7,33 (1H, m)	128,0
11	8,40 (1H, d, 7,8)	8,40 (1H, d, 7,8)	128,5
11a	-	-	-
1-OCH ₃	3,68 (3H, s)	3,68 (3H, s)	60,5
2-OCH ₃	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)	55,9

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com SOARES et al., 2015 (CDCl_3 , 600 MHz).

^cCarbonos protonados assinalados através dos dados de HSQC.

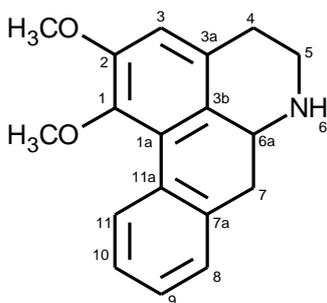


Figura 76. Estrutura do alcaloide nornuciferina.

5.6.2.6. Determinação estrutural da amostra FAFC18.3

A amostra codificada como FAFC18.3 (0,5 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A31) foi observado um pico base de m/z 298 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 17 u, além de perdas características de grupos metoxil adjacentes (-15 e -31 u, competitivas) e grupos metoxil e hidroxil adjacentes (-32 e -28 u, sequenciais) (Figura 77) em esqueleto aporfínico (STÉVIGNY et al., 2004).

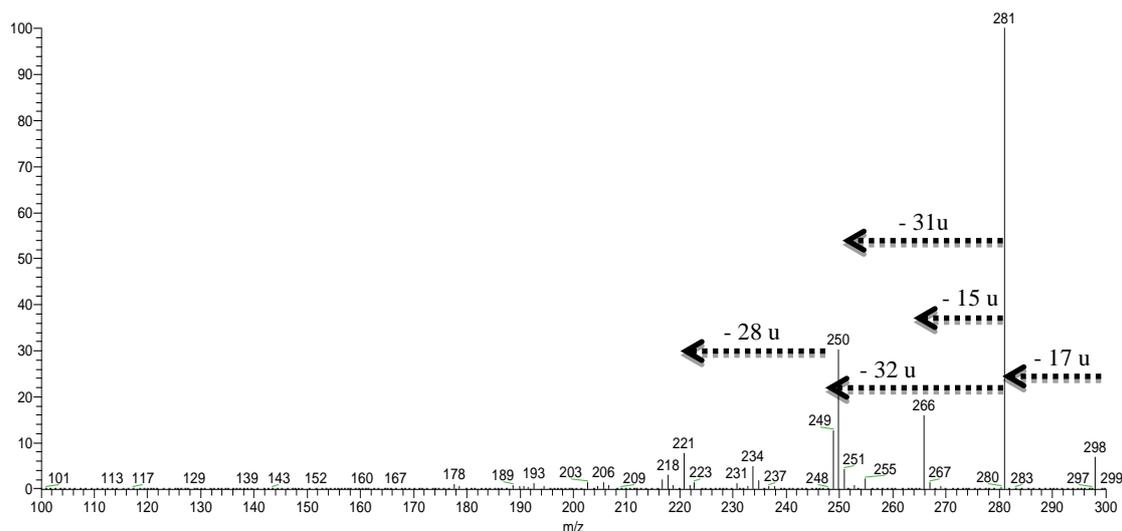


Figura 77. Espectro de MS^2 da amostra FAFC18.3.

No espectro de NMR de ^1H (Figura 78) foram observados sinais de hidrogênios aromáticos característicos de esqueleto aporfínico com ausência de substituição no anel D em δ 8,23 (1H, d, 7,5 Hz), 7,33 (1H, t, 7,6 Hz) e 7,24 (2H, m), sugerindo que os grupos funcionais observados a partir da análise de fragmentação estão situados no anel A. Ainda no espectro de NMR de ^1H foram observados sinais correspondentes à duas metoxilas em δ 4,01 (3H, s) e 4,01 (3H, s), o típico hidrogênio H-6a em δ 4,25 (1H, dd, 13,5 e 4,5 Hz), além de seis hidrogênios metilênicos em δ 4,85-3,09, cujas atribuições não foram feitas devido à intensa sobreposição de sinais e ausência de experimentos 2D. Não foi observado o sinal característico do hidrogênio da posição C-3, sugerindo uma substituição nesta posição.

A partir da análise dos dados de MS e NMR (Tabela 22), e comparação com dados da literatura (GUINAUDEAU et al., 1979.) foi proposta a estrutura do alcaloide isopilina (Figura 79), sendo este alcaloide anteriormente reportado em alguns gêneros da família Annonaceae, tais como: *Isolona*, *Polyalthia* e *Guatteria* (GUINAUDEAU et al., 1979, 1983, 1988, 1994). Este é o primeiro relato deste alcaloide no gênero *Unonopsis*.

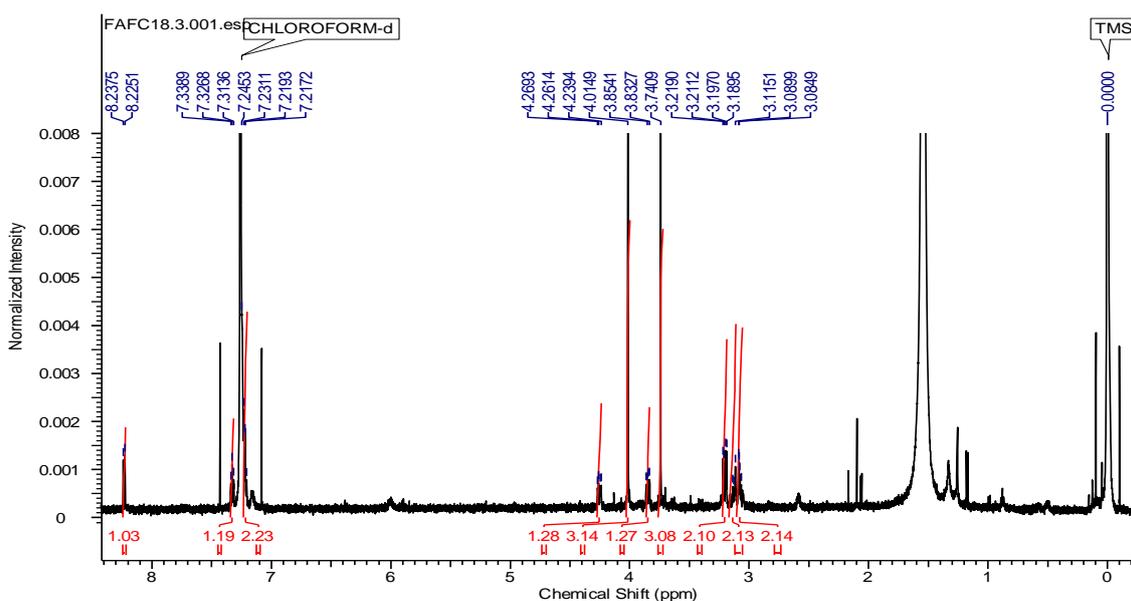


Figura 78. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC18.3.

Tabela 22. Dados de NMR de ^1H da amostra FAFC18.3.

FAFC18.3 (isopilina)		
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	-	-
3a	-	-
3b	-	-
4	-	-
5	-	-
6a	4,25 (1H, dd, 13,5 e 4,5)	-
7	-	-
7a	-	-
8	7,24 (1H, m)	7,24 (1H, m)
9	7,24 (1H, m)	7,24 (1H, m)
10	7,33 (1H, t, 7,6)	7,24 (1H, m)
11	8,23 (1H, d, 7,5)	8,30 (1H, m)
11a	-	-
2-OCH ₃	4,01 (3H, m)	3,95 (3H, m)
3-OCH ₃	3,74 (3H, m)	3,88 (3H, m)

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H , utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com GUINAUDEAU et al., 1979.

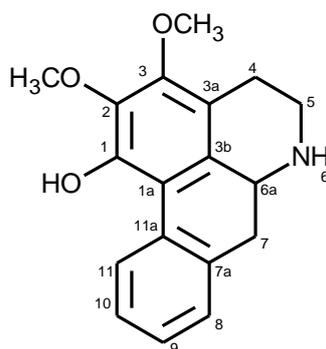


Figura 79. Estrutura do alcaloide isopilina.

5.6.2.7. Determinação estrutural da amostra FAFC18.4

A amostra codificada como FAFC18.4 (2,1 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A32) foi observado um pico base de m/z 266 $[M+H]^+$, apresentando perdas sequencias de 17, 30 e 28 u (Figura 80) quando submetido à fragmentação. Como observado para a amostra FAFC14.4, este padrão é consistente com a presença de grupo metilenodioxí em esqueleto aporfínico (STÉVIGNY et al., 2004, SILVA et al., 2012, SOARES et al., 2015), estando estas perdas de acordo com a estrutura do alcaloide anonaina, previamente reportado em *U. guatterioides* e *U. duckei* (SILVA et al., 2012, 2014).

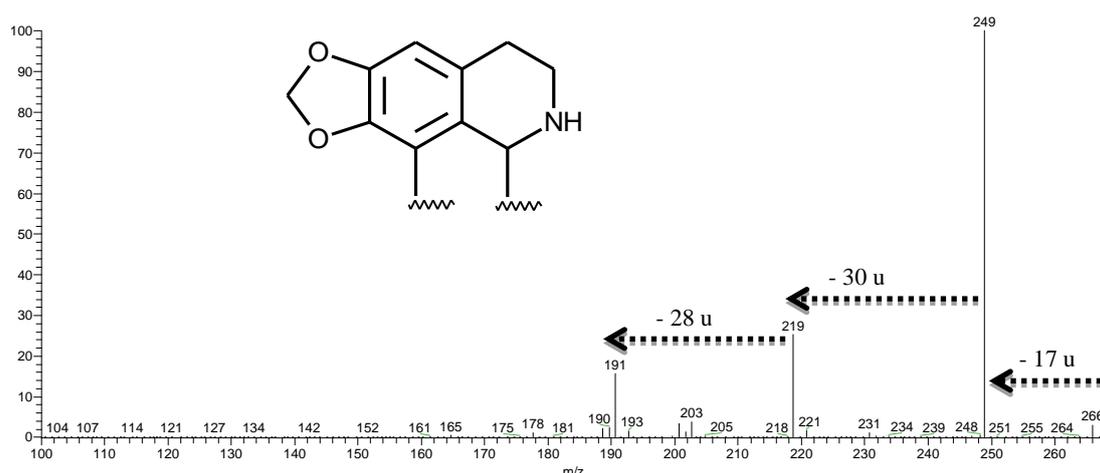


Figura 80. Espectro de MS^2 da amostra FAFC18.4.

No espectro de NMR de 1H (Figura 81) foi possível observar o típico sistema de hidrogênios aromáticos do anel D não substituído em δ 8,09 (1H, d, 7,8 Hz), 7,35 (1H, m) e 7,24 (2H, m), H-3 em δ 6,61 (1H, s), hidrogênios de ponte metilenodioxí em δ 6,15 (1H, d, 1,5 Hz) e 6,00 (1H, d, 1,5 Hz), além de H-6a em δ 4,40 (1H, dd, 13,8 e 4 Hz). Hidrogênios metilênicos foram observados em δ 2,90 (1H, m), 3,18 (1H, m), 3,27 (2H, m), 3,39 (1H, m) e 3,75 (1H, m), sendo atribuídos aos seus respectivos carbonos a partir da análise do mapa de contorno HSQC (Figura 82). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 21) com dados da literatura (SOARES et al., 2015) foi

confirmada a estrutura do alcaloide anonaina (Figura 83), sendo este alcaloide reportado previamente em *U. guatteroides* e *U. duckei* (Silva et al., 2012, 2014).

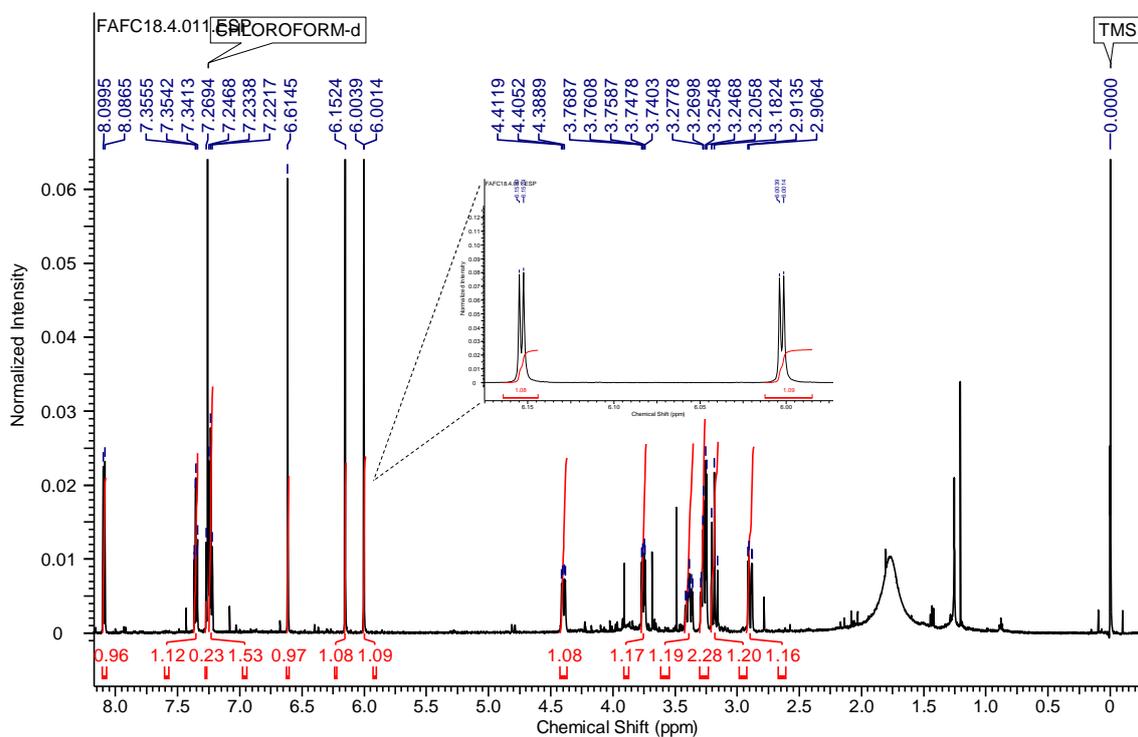


Figura 81. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC18.4.

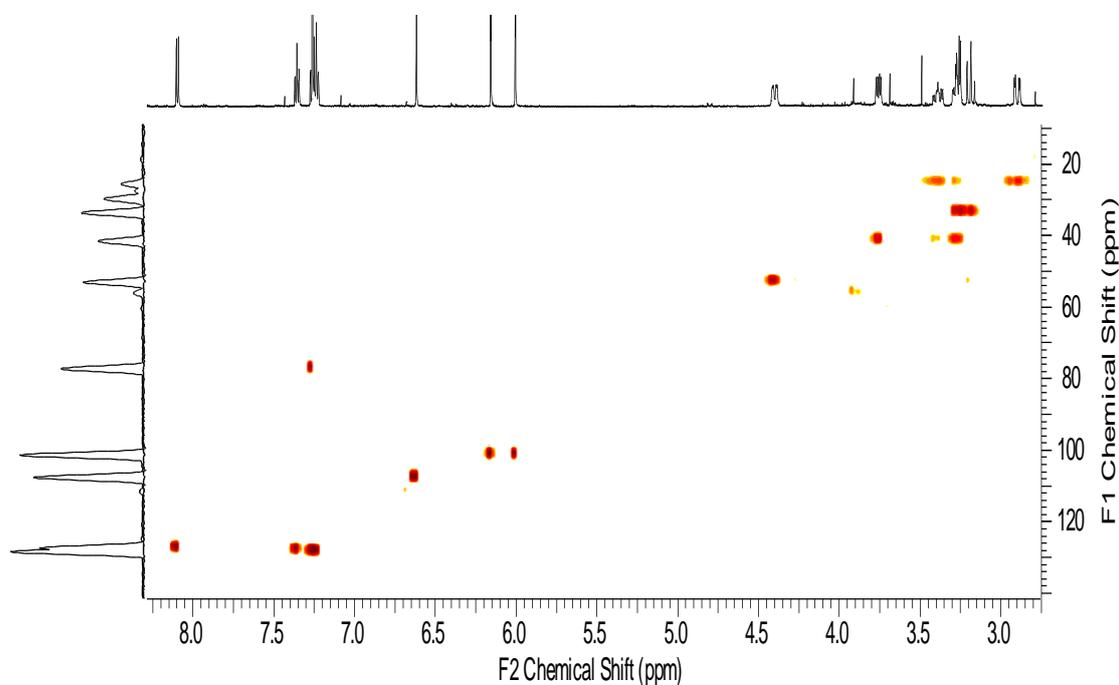


Figura 82. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC18.4.

Tabela 23. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FAFC18.4.

FAFC18.4 (Anonaina)			
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}
1	-	-	-
1 ^a	-	-	-
2	-	-	-
3	6,61 (1H, s)	6,58 (1H, s)	107,5
3 ^a	-	-	-
3b	-	-	-
4	2,90 (1H, m) e 3,39 (1H, m)	2,78 (1H, m) e 2,81 (1H, m)	25,5
5	3,27 (1H, m) e 3,75 (1H, m)	3,08 (1H, m) e 3,51 (1H, m)	41,4
6 ^a	4,40 (1H, dd, 13,8 e 4,0)	4,09 (1H, dd, 13,9 e 5,2)	53,0
7	3,18 (1H, m) e 3,27 (1H, m)	2,92 (1H, t, 14,3 Hz) e 3,08 (1H, m)	33,5
7 ^a	-	-	-
8	7,24 (1H, m)	7,24 (1H, m)	128,4
9	7,24 (1H, m)	7,24 (1H, m)	128,4
10	7,35 (1H, m)	7,32 (1H, m)	127,9
11	8,09 (1H, d, 7,8)	8,08 (1H, d, 7,9)	127,3
11 ^a	-	-	-
O-CH ₂ -O	6,00 (1H, d, 1,5) e 6,15 (1H, d, 1,5)	5,96 (1H, d, 1,3) e 6,10 (1H, d, 1,3)	101,2

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com SOARES et al., 2015 (600 MHz)

^cCarbonos protonados assinalados através dos dados de HSQC.

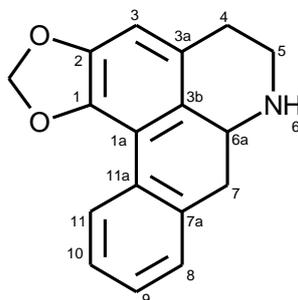


Figura 83. Estrutura do alcaloide anonaina.

5.6.2.8. Determinação estrutural da amostra FAFC20.3

A amostra codificada como FAFC20.3 (0,6 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração laranja. No espectro de massas (Figura A33) foi observado um pico base de m/z 292 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perdas sequenciais de 15 e 29 u (Figura 84), apontando para uma estrutura não aporfínica. Como descrito anteriormente, este comportamento peculiar está de acordo com o esperado para alcaloides oxoaporfínicos, sendo estas perdas consistentes com a estrutura do alcaloide lisicamina (SILVA et al., 2012a, SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015), previamente reportado nas espécies *U. guatterioides* (GUINAUDEAU et al., 1988, Silva et al., 2012), *U. spectabilis* (LAPRÉVOTE, et al., 1988), , *U. lindmanii* (SIQUEIRA et al., 1998), *U. buchtienii* (WAECHTER et al., 1999) e *U. duckei* (SILVA et al., 2014).

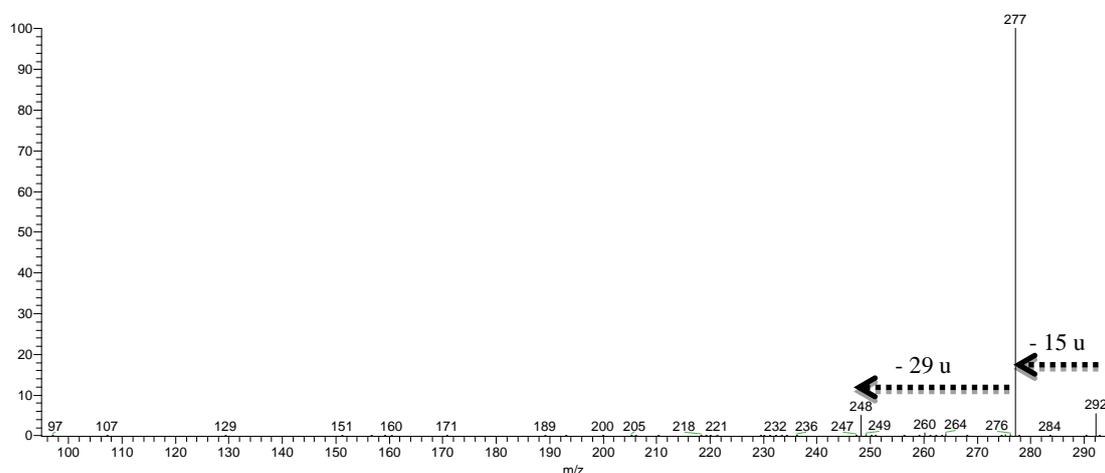


Figura 84. Espectro de MS^2 da amostra FAFC20.3.

No espectro de NMR de 1H (Figura 85) foram observados sinais semelhantes aos observados para a amostra FAFC13.3, destacando-se os hidrogênios α e β do anel piridinico do esqueleto oxoaporfínico em δ 8,95 (1H, d, 5,1 Hz) e 7,84 (1H, d, 5,1 Hz), além da presença de duas metoxilas em δ 4,04 (3H, s) e 4,12 (3H, s). Não foi observado o sinal referente ao hidrogênio aromático H-3, havendo sobreposição com o sinal do

solvente. A partir do mapa de contorno HSQC (Figura 86) foi possível confirmar esta observação, além de atribuir corretamente o deslocamento químico para H-3.

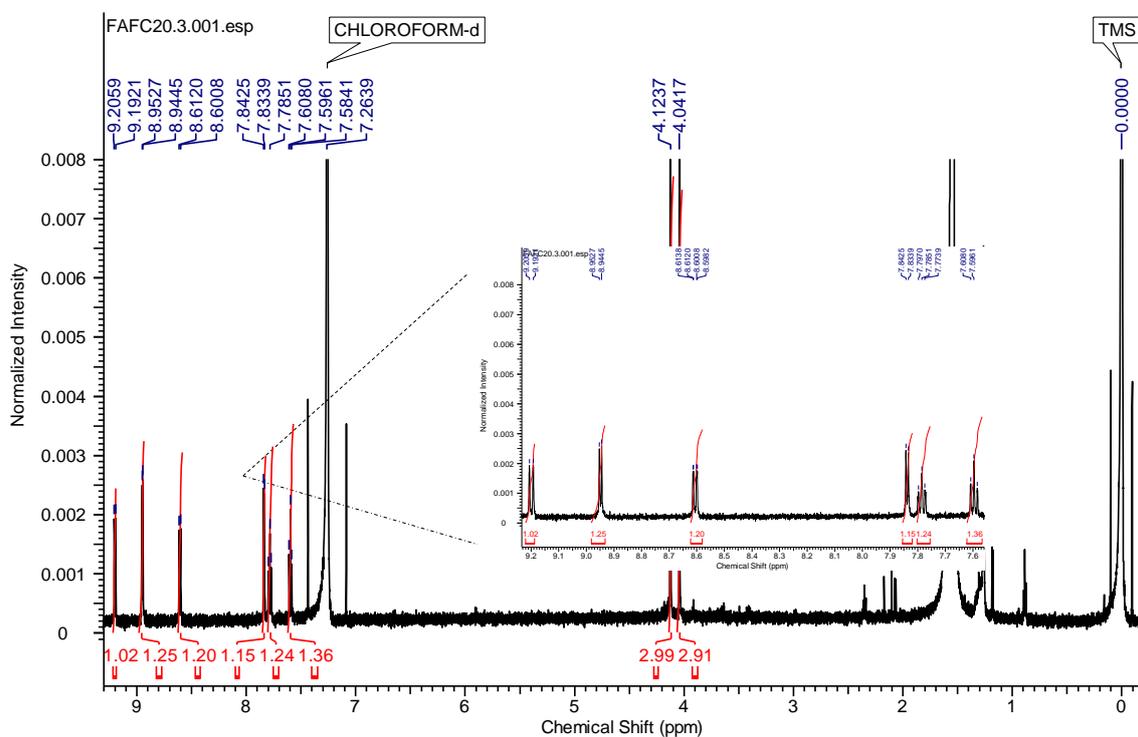


Figura 85. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC20.3.

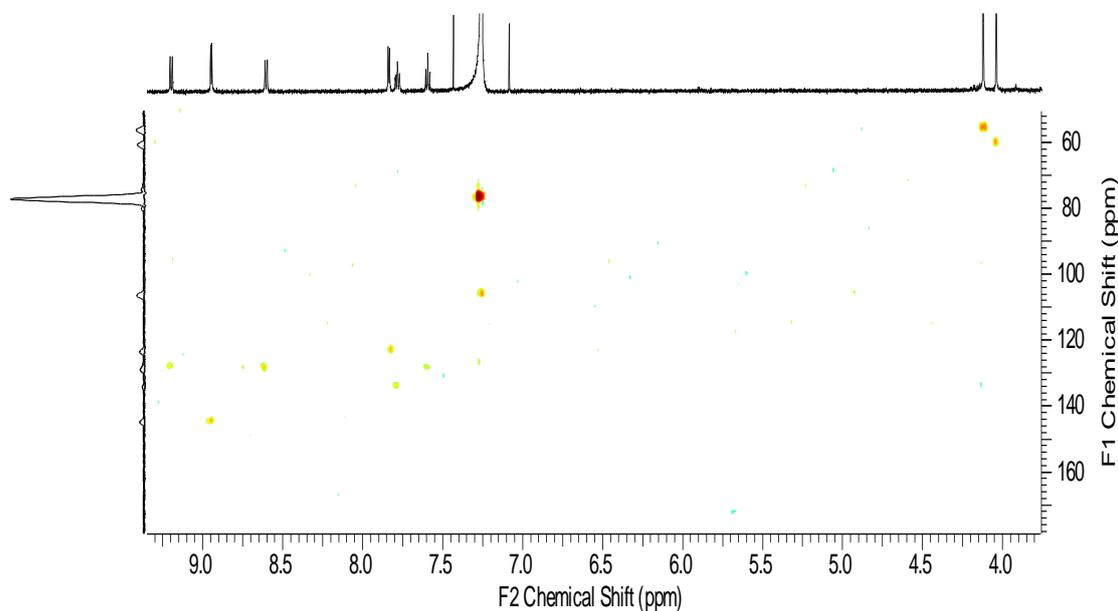


Figura 86. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC20.3.

A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 24) com dados da literatura (RABELO et al., 2014) foi confirmada a estrutura do alcaloide lisicamina (Figura 87), sendo este alcaloide amplamente distribuído na família Annonaceae (GUINAUDEAU et al., 1983, 1988, 1994).

Tabela 24. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FAFC20.3.

FAFC20.3 (Lisicamina)			
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}
1	-	-	-
1a	-	-	-
2	-	-	-
3	7,25 (1H, s)	7,56 (1H, s)	106,2
3a	-	-	-
3b	-	-	-
4	7,84 (1H, d, 5,1)	8,02 (1H, d, 5,3)	123,5
5	8,95 (1H, d, 5,1)	8,74 (1H, d, 5,3)	144,8
6a	-	-	-
7	-	-	-
7a	-	-	-
8	8,61 (1H, dd, 8,1 e 1,3)	8,45 (1H, dd, 8,1 e 1,3)	128,9
9	7,60 (1H, t, 7,0)	7,61 (1H, ddd, 8,1, 7,1 e 1,1)	128,8
10	7,79 (1H, t, 7,0)	7,83 (1H, ddd, 8,4, 7,1 e 1,3)	134,2
11	9,20 (1H, d, 8,3)	9,21 (1H, dd, 8,4 e 1,1)	128,3
11a	-	-	-
1-OCH ₃	4,04 (3H, s)	4,07 (3H, s)	60,7
2-OCH ₃	4,12 (3H, s)	4,14 (3H, s)	56,2

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com RABELO et al., 2014 (CD_3OD , 600 MHz).

^cCarbonos protonados assinalados através dos dados de HSQC.

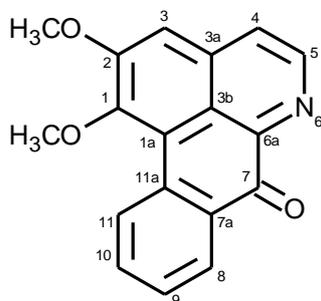


Figura 87. Estrutura do alcaloide lisicamina.

5.6.2.9. Determinação estrutural da amostra FAFC20.4

A amostra codificada como FAFC20.4 (0,5 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração laranja. No espectro de massas (Figura A34) foi observado um pico base de m/z 306 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perdas sequenciais de 15 e 28 u (Figura 88), consistentes com o esqueleto oxoaporfínico (SILVA et al., 2012a, SILVA et al., 2014; SOARES et al., 2015).

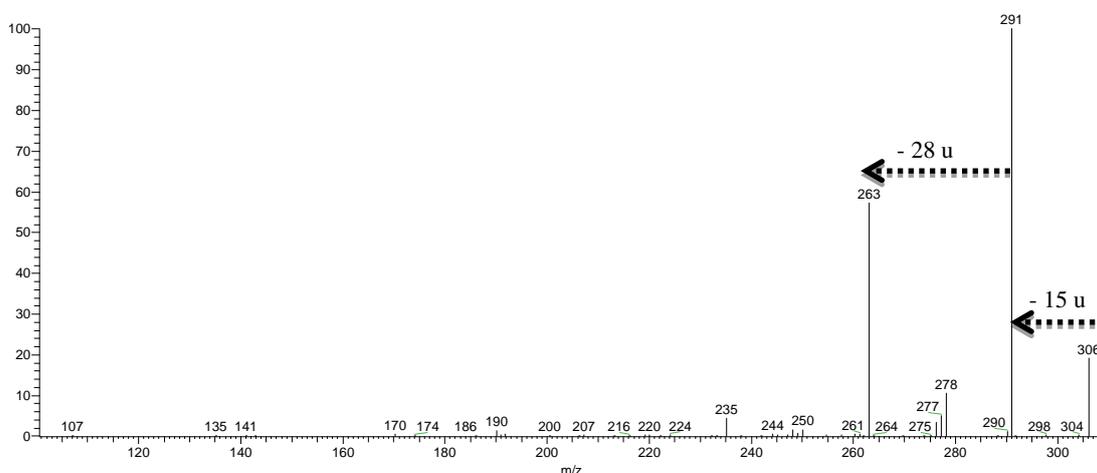


Figura 88. Espectro de MS^2 da amostra FAFC20.4.

No espectro de NMR de 1H (Figura 89) foram observados sinais semelhantes aos observados para as amostras FAFC13.3, destacando-se os hidrogênios α e β do anel piridinico do esqueleto oxoaporfínico em δ 8,85 (1H, d, 5,1 Hz) e 7,83 (1H, d, 5,1 Hz), o típico hidrogênio H-3 em δ 7,12 (1H, s), além dos hidrogênios em δ 6,48 (2H, s), com deslocamento e integração característica de grupo metilenodioxí (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994). Ainda no espectro de NMR de 1H foram observados sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,62 (1H, d, 9,0 Hz), δ 8,04 (1H, d, 3,0 Hz) e δ 7,35 (1H, d, 9,0 e 3,0 Hz), evidenciando um típico sistema ABX, o qual foi devidamente atribuído aos substituintes do anel D.

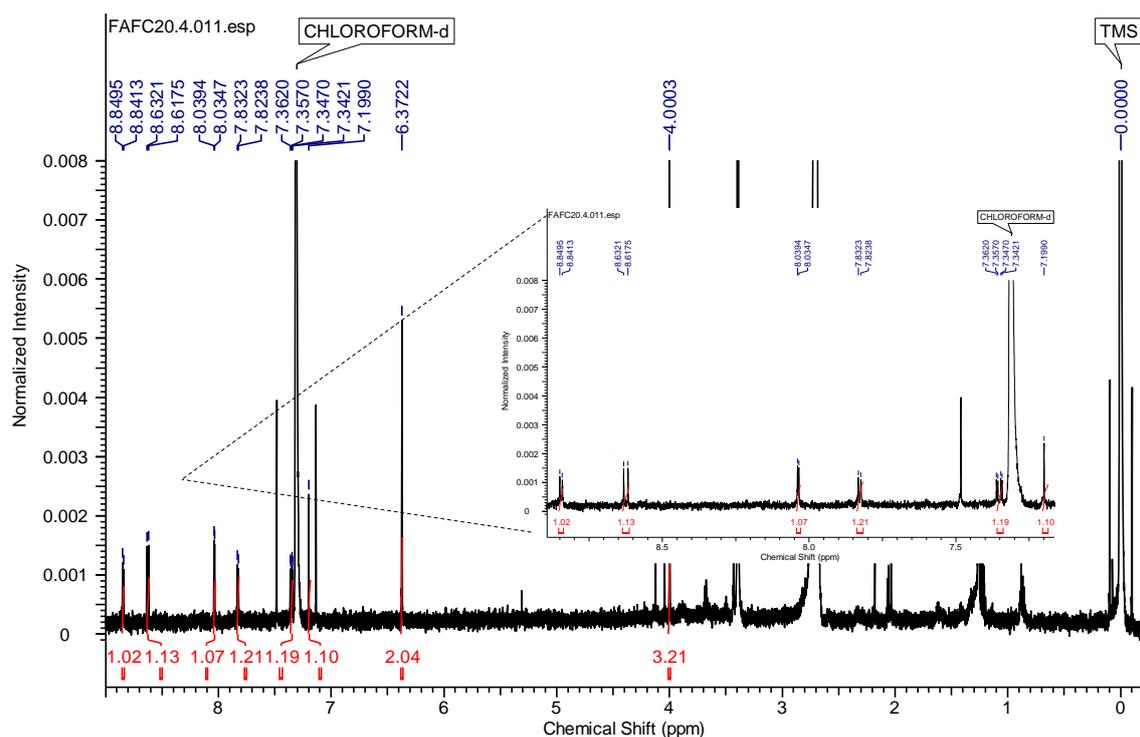


Figura 89. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC20.4.

A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 25) com dados da literatura (ISLAMIL et al., 2014) foi confirmada a estrutura do alcaloide oxoxylopina (Figura 90). Embora este alcaloide se apresente amplamente distribuído na família Annonaceae (GUINAUDEAU et al., 1983, 1988, 1994), este é seu primeiro relato no gênero *Unonopsis*.

Tabela 25. Dados de NMR de ^1H da amostra FAFC20.4.

FAFC20.4 (Oxoxylopina)		
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	7,12 (1H, s)	7,17 (1H, s)
3a	-	-
3b	-	-
4	7,83 (1H, d, 5,1)	7,79 (1H, d, 5,4)
5	8,85 (1H, d, 5,1)	8,85 (1H, d, 5,4)
6a	-	-
7	-	-
7a	-	-
8	8,04 (1H, d, 3,0)	8,04 (1H, d, 3,0)
9	-	-
10	7,35 (dd, 9,0 e 3,0)	7,32 (1H, dd, 9,0 e 3,0)
11	8,62 (1H, d, 9,0)	8,58 (1H, d, 9,0)

11a	-	-
O-CH ₂ -O	6,26 (2H, s)	6,47 (2H, s)
9-OCH ₃	4,00 (3H, s)	-

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ¹H em CDCl₃, utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com ISLAMIL et al., 2012 (CDCl₃, 300 MHz).

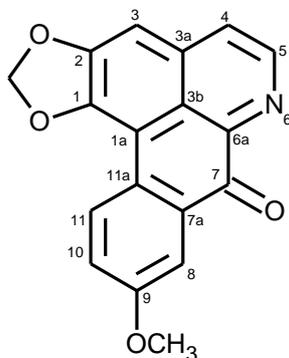


Figura 90. Estrutura do alcaloide oxoxylopinina devidamente numerada.

5.6.2.10. Determinação estrutural da amostra FAFC21.3

A amostra codificada como FAFC21.3 (1,0 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas (Figura A35) foi observado um pico base de m/z 312 $[M+H]^+$. Quando submetido à fragmentação este íon apresentou perda inicial de 17 u e perdas competitivas de 15 e 31 u (Figura 91), tal como observado para as amostras FASF13, FASF16, FASF18 e FAFC15, sugerindo mesmo padrão de substituição.

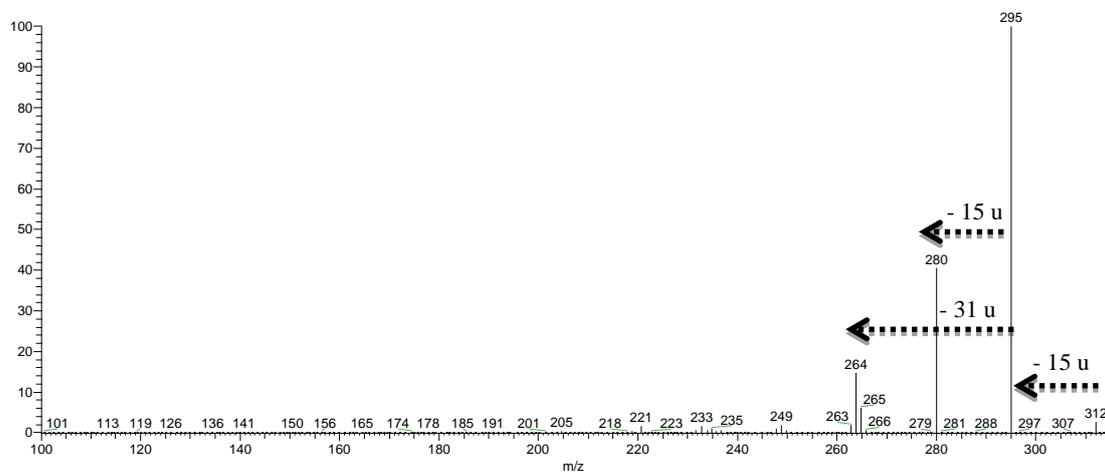


Figura 91. Espectro de MS² da amostra FAFC21.3.

No espectro de NMR de ^1H (Figura 92) foram observados sinais semelhantes aos observados para as amostras FAFC18.3, destacando-se o típico sistema de hidrogênios aromáticos em δ 8,30-7,24, sugerindo ausência de substituição no anel D, a sobreposição de hidrogênios metilênicos em δ 3,17-3,10, e a ausência do sinal H-3 característico. Em adição foram observadas três metoxilas em δ 3,76 (3H, s), 3,96 (3H, s) e 3,94 (3H, s), apontando para metoxilações nas posições C-1, C-2 e C-3, além do típico hidrogênio H-6a em δ 4,23 (1H, dd, 13,9 e 4,5 Hz).

Através do mapa de contorno HSQC foi possível atribuir aos hidrogênios metilênicos em δ seus respectivos carbonos (Figura 93). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 26) com dados da literatura (GUINAUDEAU et al., 1979) foi confirmada a estrutura do alcaloide *O*-metilisopilina (Figura 94), sendo este alcaloide reportado pela primeira vez no gênero *Unonopsis*.

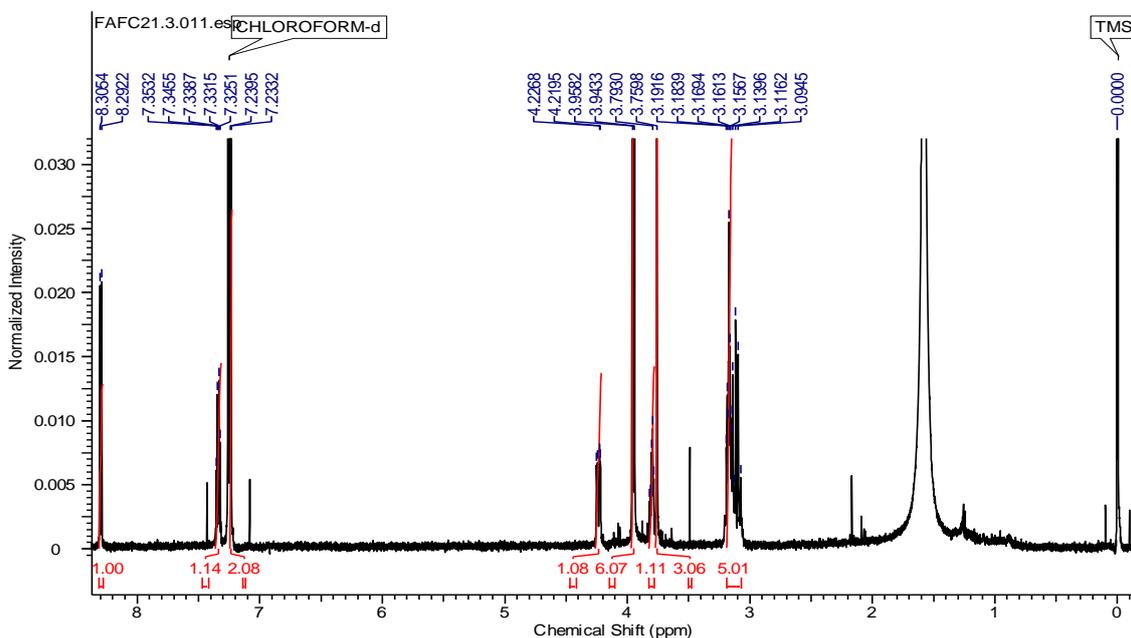


Figura 92. Espectro de NMR de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC21.3.

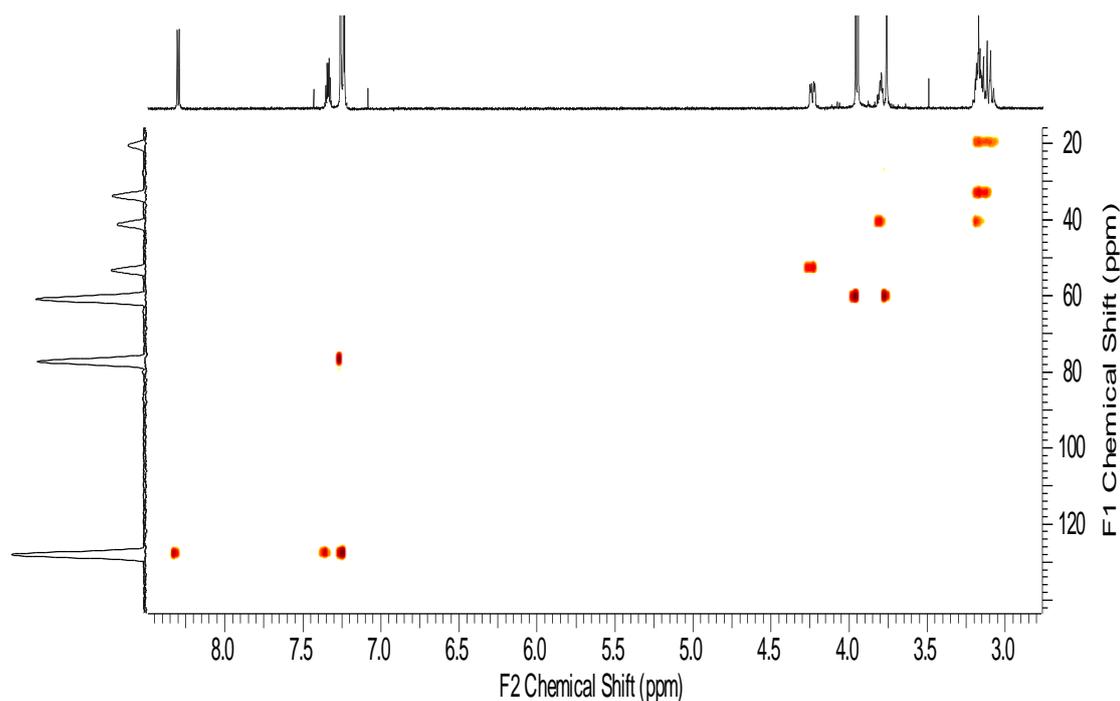


Figura 93. Mapa de contorno HSQC (^1H 600 MHz, ^{13}C 150 MHz, CDCl_3) da amostra FAFC21.3.

Tabela 26. Dados de NMR de ^1H e ^{13}C da amostra FAFC21.3.

FAFC21.3 (<i>O</i> -metilisopilina)			
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C ^{a,c}
1	-	-	-
1a	-	-	-
2	-	-	-
3	-	-	-
3a	-	-	-
3b	-	-	-
4	3,10 (1H, m) e 3,17 (1H, m)	-	20,4
5	3,17 (1H, m) e 3,78 (1H, m)	-	41,0
6a	4,23 (1H, dd, 13,9 e 4,5)	-	53,3
7	3,13 (1H, m) e 3, 17 (1H, m)	-	33,6
7a	-	-	-
8	7,24 (1H, m)	7,20 (1H, m)	127,9
9	7,24 (1H, m)	7,20 (1H, m)	127,9
10	7,34 (1H, m)	7,20 (1H, m)	128,0
11	8,30 (1H, d, 7,9)	8,24 (1H, m)	128,1
11a	-	-	-
1-OCH ₃	3,76 (3H, s)	3,74 (3H, s)	60,8
2-OCH ₃	3,96 (3H, s)	3,96 (3H, s)	60,8
3-OCH ₃	3,94 (3H, s)	3,92 (3H, s)	60,8

^aO experimento foi realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz em ^{13}C em CDCl_3 , utilizando TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com GUINAUDEAU et al., 1979.

^cCarbonos protonados assinalados através dos dados de HSQC.

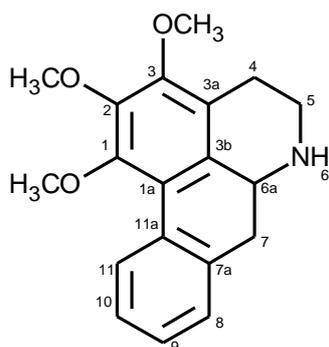


Figura 94. Estrutura do alcaloide *O*-metilisopilina.

5.7. Relevância biossintética dos alcaloides isolados

As substâncias isoladas e devidamente caracterizadas por NMR e MS puderam ser divididos em duas classes distintas de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico, morfinanos e aporfínicos (Figura 95). Enquanto *U. stipitata* se mostrou uma fonte promissora de aporfínicos *sensu stricto*, com um padrão de substituição bem definido (1, 2, 9 e 10), *U. floribunda* exibiu estruturas diversas, com aporfínicos *sensu stricto* apresentando padrão de substituição preferencialmente nas posições C-1 e C-2, e ausência de substituição no anel D. Ao analisar a natureza destes substituintes observou-se forte tendência à metoxilação nos alcaloides presentes em *U. stipitata*, diferente de *U. floribunda*, onde além de estruturas com metoxilas adjacentes à hidroxilas, destacaram-se estruturas contendo ponte metilenodioxi.

Além dos aporfínicos *sensu stricto*, apenas um derivado oxoaporfínico e um *N*-formil-aporfínico foram isolados das folhas de *U. stipitata*, todos apresentando o mesmo padrão de substituição. Das cascas de *U. floribunda* foi isolado um maior número de derivados aporfínicos, tais como oxoaporfínicos, 7-hidroxi-aporfínicos, além de aporfínicos com substituição em C-3. Estas observações estão de acordo com dados previamente reportados para espécies deste gênero, onde esqueletos biossinteticamente mais complexos são frequentemente reportados nas cascas (LAPRÉVOTE et al., 1987,

1988, ARANGO et al., 1988, WAECHTER et al., 1999, SIQUEIRA et al., 1998, SILVA et al., 2012a). A presença do alcaloide morfina também nas cascas de *U. floribunda* é uma evidência que sustenta esta observação.

No geral, os padrões de substituição observados para alcaloides aporfinóides estão de acordo com estruturas previamente reportadas no gênero *Unonopsis* (ARANGO et al., 1988, GUINAUDEAU et al., 1988, WAECHTER et al., 1999, SILVA et al., 2012a), com exceção dos alcaloides isolipina, *O*-metilisopilina, norisocoridina, normantenina e *N*-formil-norglaucina, cujas peculiaridades estruturais tais como: substituição em C-3 e C-11, presença de ponte metilenodioxo no anel D, e formilação do nitrogênio, são descritos pela primeira vez no gênero *Unonopsis*.

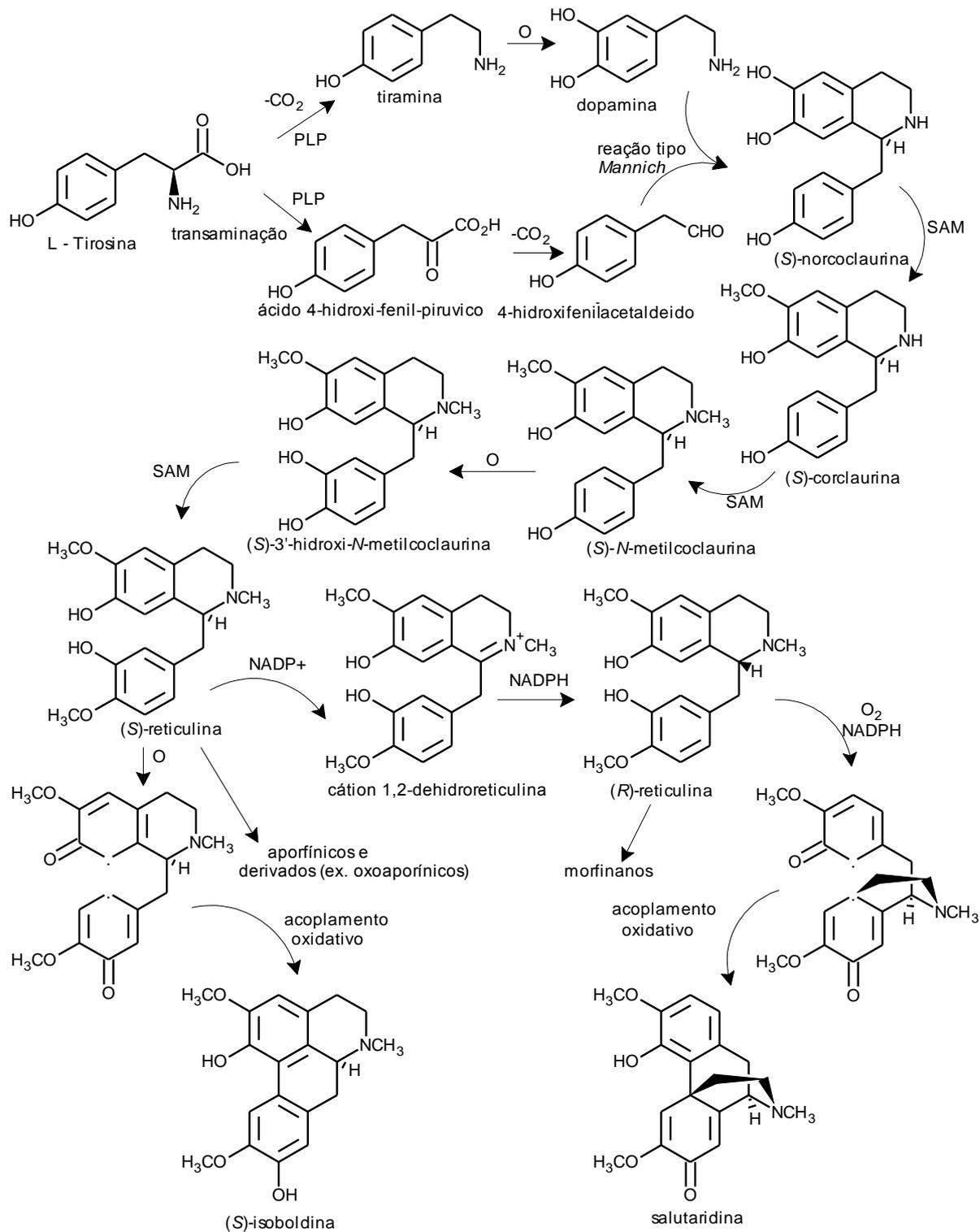


Figura 95. Biossíntese geral para alcaloides aporfínicos e morfínicos. PLP: piridoxal fosfato. SAM: S-Adenosilmetionina. NADP+: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina. NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido.
Fonte: DEWICK, 2009.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Espécies com maior rendimento de óleos essenciais apresentaram baixos rendimentos de fração alcaloídica, e vice-versa, sugerindo existir uma tendência biossintética acentuada em cada indivíduo. Neste caso, *U. floribunda* e *U. rufescens* se apresentaram como fontes promissoras de óleos essenciais, assim como *U. duckei* e *U. stipitata* como fontes promissoras de alcaloides.

Apesar da análise multivariada dos óleos essenciais ter apresentado diferença significativa entre espécies e sítios de coleta, a variabilidade química entre as espécies estudadas se mostrou superior em relação à abordagem alcaloídica, sugerindo que constituintes não voláteis apresentam melhor potencial para propostas quimiotaxonômicas do que constituintes voláteis.

A recorrente observação de policarpol em espécies do gênero *Unonopsis* demonstra o potencial quimiotaxonômico desta substância, sendo policarpol sugerido como marcador químico regular do gênero *Unonopsis*.

As análises por ESI-MSⁿ e HPLC-DAD-MS foram fundamentais para o reconhecimento prévio da natureza química das frações investigadas.

Observou-se para *U. stipitata* recorrência de aporfínicos *sensu stricto*, com padrão de substituição bem definido (1, 2, 9 e 10), enquanto *U. floribunda* se apresentou como uma fonte diversificada de estruturas, destacando-se aporfínicos com padrão de substituição distintos, além do morfinano, esqueleto até então não reportado no gênero. Em adição, algumas peculiaridades estruturais tais como: substituição em C-3 e C-11, presença de ponte metilenodioxo no anel D, e formilação do nitrogênio foram observadas. Estes dados contribuem fortemente para o conhecimento fitoquímico do gênero *Unonopsis*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, I. N.; MAZZAFERA P.; EBERLIN, M. N.; ZULLO, M. A. T.; SAWAYA, A. C. H. F. Characterization of the variation in the imidazole alkaloid profile of *Pilocarpus microphyllus* in different seasons and parts of the plant by electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting and identification of novel alkaloids by tandem mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 1205-1213, 2007.

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, 4a ed.; Allured Publishing Corporation: Illinois, USA, 2007.

ADAMS, M.; GMUNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders- A survey of ethnobotanical literature. *J. Ethnopharmacol.* **113**: 363–381, 2007.

AZEVEDO, N. R.; CAMPOS, I. F. P.; FERREIRA, H. D.; PORTES, T. A.; SANTOS, S. C.; SERAPHIN, J. C.; PAULA, J. R.; FERRI, P. H. Chemical variability in the essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Phytochemistry* **57**: 733–736, 2001.

VAN ANDEL, T. Non timber forest products of the North West district of Guyana. Part II, University of Utrecht, Tropenbos Guyana series 8b, p. 350, 2000.

ARANGO, G. J.; CORTES, D.; CAVÉ, A.; D'OCÓN, M. F. 7-7'-bisdesidroaporfns de *Unonopsis pacifica*. *An. Quim. C-Org. Bio.* **84**: 124-127, 1988.

BACAB, M. J. C.; RODRIGUEZ, L. M. P. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* **18**: 674–688, 2001.

BARROS NETO, B.; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Quim. Nova* **29**: 1401-1406, 2006.

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

CASTEDO, L.; GRANJA, J. A.; LERA, A. R.; VILLAVERDE, M. C. Alkaloids from *Gutteria goudotiana*. *Phytochemistry* **30**: 2781-2783, 1991.

CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; WU, P. H.; KUO, R. Y.; CHANG, Y. C.; WU, Y. C. New alkaloids from *Annona purpurea*. *J. Nat. Prod.* **63**: 746-748, 2000.

CHANG, Y. C.; CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Alkaloids from *Lindera glauca*. *J. Chin. Chem. Soc.* **48**: 811-815, 2001.

CHENG, X.; WANG, D.; JIANG, L.; YANG, D. DNA Topoisomerase I inhibitory alkaloids from *Corydalis saxicola*. *Chem. Biodivers.* **5**: 1335-1344, 2008.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. *Quim. Nova* **31**: 623-636, 2008.

CHIOU, C. M.; LIN, C. T.; HUANG, W. J.; CHANG, Y. M.; HO, Y. J.; SU, M. J.; LEE, S. S. Semisynthesis and myocardial activity of thaliporphine *N*-homologues. *J. Nat. Prod.* **76**: 405-412, 2013.

CHIU, C. C.; CHOU, H. L.; WU, P. F.; CHEN, W. L.; WANG, H. M.; CHEN, C. Y. Bio-functional constituents from the stems of *Liriodendron tulipifera*. *Molecules* **17**: 4357-4372, 2012.

CORREA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, v.1, p.195, 1984.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por "electrospray": processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quim. Nova* **29**: 287-292, 2006.

CUNHA, M. M.; NASCIMENTO, F. C.; SANTOS PIMENTA, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; SALAS, C. E.; LOPES, M. T. P. Screening of cytotoxic

activity in hexanic and ethanolic extracts of *Rollinia laurifolia*. *Latin America Journal of Pharmacy* **28**: 234-240, 2009.

DEV, V.; WHALEY, W. H.; BAILEY, S. R.; CHEA, E.; DIMAANO, J. G. JOGANI, D. K.; LY, B.; EGGETT, D. Essential oil composition of nine Apiaceae species from western United States that attract the female Indra Swallowtail butterfly (*Papilio indra*). *Biochem. Syst. Ecol.* **38**: 538–547, 2010.

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: A biosynthetic approach. Chichester, New York: John Wiley, v. 3. p.550, 2009.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Ed. UNESP, São Paulo, p. 605, 2002.

DOPKE, W.; FLENTJE, H.; JEFFS, P. W. The structures of amurine and nudaurine. *Tetrahedron* **24**: 4459-4476, 1968.

DUNLOP, P. J.; BIGNELL, C. M.; HIBBERT, D. B. Use of gas chromatograms of essential leaf oils to compare clones of *Eucalyptus camaldulensis*. *Biochem. Syst. Ecol.* **28**: 383-91, 2000.

FANG, X. P.; RIESER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; MCLAUGHLIN J. L. Annonaceous acetogenins: An updated review. *Phytochem. Anal.* **4**: 27-48, 1993.

FORGACS, P.; JACQUEMIN, H.; MORETTI, C.; PROVOST, J.; TOUCHÉ, A. Etudes phytochimiques et activités biologiques de 18 plantes de la Guyane Française. *Plantes Medicinales et Phytotherapie* **17**: 22-32, 1983.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; LEBOEUF, M.; CAVÉ A.; CHARLES, B. Essential oils of Annonaceae. Part VII. Essential oils of *Monanthotaxis dyclina* (Sprague) Verdcourt and *Unonopsis guatterioides* R. E. Fries. *Flavour Fragr. J.* **12**: 95-98, 1997.

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; Cavé, A. Annonaceae essential oils: A review. *J Essent Oil Res.* **11**: 131-142, 1999.

FRANCISCO, C. S.; MESSIANO, G. B.; LOPES, L. M. X.; TININIS, A. G. OLIVEIRA, J. E. CAPELLARI JR, LINDOLPHO. Classification of *Aristolochia* species based on GC-MS and chemometric analyses of essential oils. *Phytochemistry* **69**: 168-175, 2008.

FRAUSIN, G.; LIMA, R. B. S.; HIDALGO, A. F.; MAAS, P.; POHLIT, A. M. Plants of the Annonaceae traditionally used as antimalarials: a review. *Rev. Bras. Frutic.* **36**: 315-336, 2014.

GIL, E .S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.* **29**: 223-230, 2008.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Aporphine Alkaloids. *Lloydza.* **38**: 275-339, 1975.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, II. *J. Nat. Prod.* **42**: 325-360, 1979.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, III. *J. Nat. Prod.* **46**: 761-835, 1983.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, IV. *J. Nat. Prod.* **51**: 389-474, 1988.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, V. *J. Nat. Prod.* **57**: 1033-1135, 1994.

GONG, H. Y.; LIU, W. H.; Lv, G. Y.; ZHOU, X. Analysis of essential oils of *Origanum vulgare* from six production areas of China and Pakistan. *Rev. Bras. Farmacogn.* **24**: 25-32, 2014.

GOULART, M. O. F.; SANTANA, A. E. G.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G.; MAIA, J. G. S. Azafluorenones and azaanthraquinone from *Guatteria dielsiana*. *Phytochemistry* **25**: 1691–1695, 1986.

HARRIGAN, G. G.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I. Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two Annonaceous plants, *Xylopi aethiopica* and *Miliusa* CF. *banacea*. *J. Nat. Prod.* **57**: 68-73, 1994.

HEYWOOD, V. H. Flowering Plants of the World. University Press, Oxford, p. 336, 1978.

HSIEH, T. J.; CHEN, C. Y.; KUO, R. Y.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Two new alkaloids from *Artabotrys uncinatus*. *J. Nat. Prod.* **62**: 1192-1193, 1999.

ISMAIL, N. H; ALIAS, A; OSMAN, C. P. Alkaloids and anthraquinones from Malaysian flora, In: Phytochemicals – A global perspective of their role in nutrition and health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), In Tech, Rijeka, p. 287–306, 2012.

JAUREGUI, X.; CLAVO, Z. M.; JOVEL, E. M. PARDO DE SANTAYANA, M. “Plantas con madre”: Plants that teach and guide in the shamanic initiation process in the East-Central Peruvian Amazon. *J. Ethnopharmacol.* **134**: 739–752, 2011.

JAYASURIYA, H.; HERATH, K. B.; ONDEYKA, J. G.; GUAN, Z.; BORRIS, R. P.; TIWARI, S.; JONG, W.; CHAVEZ, F.; MOSS, J.; STEVENSON, D. W.; BECK, H. T.; SLATTERY, M.; ZAMORA, N.; SCHULMAN, M.; ALI, A.; SHARMA, N.; MACNAUL, K.; HAYES, N.; MENKE, J. G.; SINGH, S.B. Diterpenoid, steroid, and triterpenoid agonists of liver X receptors from diversified terrestrial plants and marine sources. *J. Nat. Prod.* **68**: 1247-1252, 2005.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A.; SIOUMIS, A. A. Cassytha alkaloids. IV. The alkaloids of *Cassytha racemosa* Nees (family Lauraceae). *Australian Journal of Chemistry* **20**: 1457- 1462, 1967.

JOVEL, E. M.; CABANILLAS, J.; TOWERS, G. H. N. An ethnobotanical study of the

traditional medicine of the Mestizo people of Suri Miraño, Loreto, Peru. *J. Ethnopharmacol.* **53**: 149-156, 1996.

JUNG, J. H.; PUMMANGURA, S.; CHAICHANTIPYUTH, P.; PATARAPANICH, C.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry* **29**: 1667–1670, 1990.

KAPETANOS, C.; KARIOTI, A.; BOJOVIĆ, S.; MARIN, P.; VELJIĆ, M.; SKAL TSA, H. Chemical and principal-component analyses of the essential oils of Apioideae taxa (Apiaceae) from central Balkan. *Chem. Biodivers.* **5**: 101-119, 2008.

KOOLEN, H. H. F.; SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; OLIVEIRA, A. A.; SOUZA, A. Q. L.; MEDEIROS, L. S.; RODRIGUES-FILHO, E.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. O.; MORAIS, M. O.; SALVADOR, M. J.; SOUZA, A. D. L. Mauritic acid: a new dammarane triterpene from the roots of *Mauritia flexuosa* L.f. (Arecaceae). *Nat. Prod. Res.* **27**: 2118–2125, 2013.

KOULMAN, A.; TAPPER, B. A.; FRASER, K.; CAO, M.; LANE, G. A.; RASMUSSEN, S. High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **21**: 421-428, 2007.

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* **57**: 421-425, 2001.

KVIST, L. P.; CHRISTENSEN, S. B.; RASMUSSEN, H. B.; MEJIA, K.; GONZALEZ, A. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* **106**: 390-402, 2006.

LAPRÉVOTE, O.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des annonacées, 84. Bisaporphidoides de *L'Unonopsis spectabilis*. *J. Nat. Prod.* **50**: 984-988, 1987.

- LAPRÉVOTE, O.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des annonacées, 87 Azafluorénones de L'*Unonopsis spectabilis*. *J. Nat. Prod.* **51**: 555-561, 1988.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry* **21**: 2783-2813, 1982.
- LIN, L.; YU, Q.; YAN, X.; HANG, W.; ZHENG, J.; XING, J.; HUANG, B. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer. *Analyst* **135**: 2970-2978, 2010.
- MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T.; VERMEER, M. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (Annonaceae). *BLUMEA* **52**: 413–554, 2007.
- MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. 2015. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 03 Set. 2015.
- MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). *Phytochemistry* **54**: 709-716, 2000.
- MATOS, G. D.; PEREIRA-FILHO, E. R.; POPPI, R. J.; ARRUDA, M. A. Z. Análise exploratória em química analítica com emprego de quimiometria: PCA e PCA de imagens. *Revista Analytica* **6**: 38-50, 2003.
- MATOS, M. F. C.; LEITE, L. I. S. P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J. M.; CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; PEREIRA, N. F. G.; SILVA, D. B. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. *Fitoterapia* **77**: 227-229, 2006.
- MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia* **80**: 81–90, 2009.

MOITA NETO, J. M.; MOITA, G. C. Uma introdução à análise exploratória de dados multivariados. *Quim. Nova* **21**: 467-469, 1998.

MURPHY, B. T.; CAO, S.; BRODIE, P. J.; MILLER, J. S.; RATOVOSON, F.; BIRKINSHAW, C.; RAKOTOBÉ, E.; RASAMISON, V. E.; TENDYKE, K.; SUH, E. M.; KINGSTON, D. G. I. Antiproliferative compounds of *Artabotrys madagascariensis* from the Madagascar rainforest. *Nat. Prod. Res.* **22**: 1169–1175, 2008.

NUNES, C. A.; FREITAS, M. P.; PINHEIRO A. C. M.; BASTOS S. C. Chemoface: a novel free user-friendly interface for chemometrics. *J. Brazil. Chem. Soc.* **23**: 2003-2010, 2012.

NGANTCHOU, I.; NKWENGOUA, E.; NGANSO, Y.; NYASSE, B.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; SCHNEIDER, B. Antitrypanosomal activity of polycarpol from *Piptostigma preussi* (Annonaceae). *Fitoterapia* **80**: 188-191, 2009.

NYASSE, B.; NGANTCHOU, I.; NONO, J. J.; SCHNEIDER, B. Antifilarial activity in vitro of polycarpol and 3-O-acetyl aleuritolic acid from cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. *Nat. Prod. Res.* **20**: 391-397, 2006.

OLESZEK, W.; KAPUSTA, I.; STOCHMAL, A. TLC of triterpenes (including saponins). in Waksmundzka-Hajnos, M. (Ed.), *Thin Layer Chromatography in Phytochemistry*. CRC Press, Taylor & Francis Group, LLC, New York, pp. 519–537, 2008.

OIVEIRA, A. N.; AMARAL, I. L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Acta amazonica* **34**: 21-34, 2004.

PALAZZO, M. C.; WRIGHT, H. L.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; MORIARITY, D. M.; HABER, W.A.; SETZER, W. N. Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of six species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. *Rec. Nat. Prod.* **3**: 153-160, 2009.

- PAREDES, A.; HASEGAWA, M.; PRIETO, F.; MENDEZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions. *J. Ethnopharmacol.* **78**: 129-132, 2001.
- PEREIRA, N. F. G.; CAROLLO, C.A.; GARCEZ, W. S. SIQUEIRA, J.M. Novel santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula* –Annonaceae. *Quim. Nova* **26**: 512-516, 2003.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Quim. Nova* **25**: 45-61, 2002.
- RABELO, D. M.; PINHEIRO, M. L. B.; A, BARISON.; SALOMÉ, K. S.; COSTA, E. V.; SILVA, F. M. A.; CHAVES, Y. O.; BASTOS, I. S. Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de *Guatteria citriodora* (Annonaceae). *Quim. Nova* **37**: 1453-1458, 2014.
- RICHARDSON, J. E.; CHATROU, L. W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H. J.; PIRIE, M.D. Historical biogeography of thow cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* **359**: 1495-1508, 2004.
- ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Study of morphinandienones: carbon-13 and proton NMR of sebiferine and related alkaloids. *Bull. Soc. Chim. Fr.* **3-4**: 139-141, 1984.
- ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural product with antileishmanial activity. *Phytomedicine* **12**: 514-535, 2005.
- ROUSH, R. A.; COOKS, R. G. Characterization of alkaloids and other secondary metabolites by multiple stage mass spectrometry. *J. Nat. Prod.* **47**: 197–214, 1984.
- RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLI J. L. Annonaceous acetogenins: a review. *J. Nat. Prod.* **53**: 237-278, 1990.

SAADAWI, S.; JALIL, J.; JASAMAI, M.; JANTAN, I. Inhibitory effects of acetylmelodorinol, chrysin and polycarpol from *Mitrella kentii* on prostaglandin E2 and thromboxane B2 production and platelet activating factor receptor binding. *Molecules* **17**: 4824–4835, 2012.

SÃO JOSÉ, A. R.; PIRES, M. M.; FREITAS, A. L. G. E.; RIBEIRO, D. P.; PEREZ, L. A. A. Atualidades e perspectivas das anonáceas no mundo. *Rev. Bras. Frutic.* **36**: 086-093, 2014.

SANGSTER, A. W.; STUART, K. L. Ultraviolet spectra of alkaloids. *Chem. Rev.* **65**: 69–130, 1965.

SCHMIDT, J.; RAITH, K.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. Analysis of benzylisoquinoline-type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. *Eur. J. Mass Spectrom.* **11**: 325-333, 2005.

SCHIOZER, A. L.; CABRAL, E. C.; GODOY, L. A. F.; CHAVES, F. C. M.; POPPI, R. J.; RIVEROS, J. M.; EBERLIN, M. N.; BARATA, L. E. S. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of extracts of the leaves of *Arrabidaea chica*. *J. Braz. Chem. Soc.* **23**: 409-414, 2012.

SCHULTES, R. E. Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon. *J. Ethnopharmacol.* **38**: 129-135, 1993.

SÉGUINEAU, C.; RICHOMME, P.; FOURNET, A.; GUINAUDEAU, H.; BRUNETON, J. Isoquinoline alkaloids from *Cardiopetalum calophyllum*. *Planta Med.* **57**: 581, 1991.

SHIM, H. J.; LEE, J. Y.; KIM, B.; HONG, J. General fragmentations of alkaloids in electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Mass Spectrom. Lett.* **4**: 79–82, 2013.

SICHAEM, J., RUKSILP, T., WORAWALAI, W., SIRIPONG, P., KHUMKRATOK, S., TIP-PYANG, S. A new dimeric aporphine from the roots of *Artabotrys spinosus*. *Fitoterapia* **82**: 422–425, 2012.

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). *J. Braz. Chem. Soc.* **18**: 1560–1565, 2007.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E.V. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. *Quím. nova* **35**: 944-947, 2012a.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; BARISSON, A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, L. B. Steroids and triterpene from the bark of *Unonopsis guatterioides* R. E. FR. (Annonaceae). *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* **4**: 522-523, 2012b.

SILVA, F. M. A.; DE SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F.; BARISON, A.; VENDRAMIN, M. E.; COSTA, E. V.; FERREIRA, A. G.; PINHEIRO, M. L. B. Phytochemical study of the alkaloidal fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. guided by electrospray ionisation ion-trap tandem mass spectrometry. *Phytochem. Anal.* **25**: 45-49, 2014.

SILVA, M. F. G. F.; GOTTLIEB, O. R. Evolution of Quassinoids and Limonoids in the Rutales. *Biochem. Syst. Ecol.* **15**: 85-103, 1987.

SILVA, M. F. G. F.; GOTTLIEB, O. R.; EHRENDORFER, F. Chemosystematics of the Rutaceae: suggestions for a more natural taxonomy and evolutionary interpretation of the family. *Pl. Syst. Evol.* **161**: 97-134, 1988.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, F.G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de toxicidade sobre a *artemia salina* leach. *Quim. Nova* **21**: 557-559, 1998.

SKAL TSA, H. D.; MAVROMMATI, A.; CONSTANTINIDIS, T. A. chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys subsect. Swainsonianae* (Labiatae). *Phytochemistry* **57**: 235-244, 2001.

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

STASHENKO, E. E.; MARTÍNEZ, J. R.; RUÍZ, C. A.; ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. *Lippia organoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. *J. Sep. Sci.* **33**: 93-103, 2010.

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

SULIMA, A.; CHENG, K.; JACOBSON, A. E.; RICE, K. C.; GAWRISCH, K.; LEE, Y. S. *Z* and *E* rotamers of *N*-formyl-1-bromo-4-hydroxy-3-methoxymorphinan-6-one and their interconversion as studied by ¹H/¹³C NMR spectroscopy and quantum chemical calculations. *Magn. Reson. Chem.* **51**: 82-88, 2013.

TEICHERT, H.; DOTTERL, S.; ZIMMA, B.; AYASSE, M.; GOTTSBERGER, G. Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology* **11**: 29-37, 2009.

TOUCHÉ, A.; DESCONCLOIS, J. F.; JACQUEMIN, H.; LELIÈVRE, Y.; FORGACS, P. Constituants de quelques annonacées guyanaises analyse qualitative et quantitative des acides aminés basiques libres. Présence d'un triterpène, Le polycarpol. *Plant. Med. Phytother.* **15**: 4-9, 1981.

TSABANG, N.; FOKOU, P. V. T.; TCHOKOUAHA, L. R. Y.; NOGUEM, B.; BAKARNGA-VIA, Y.; NGUEPI, M. S. D.; NKONGMENECK, B. A.; BOYOM, F. F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *J. Ethnopharmacol.* **139**: 171-180, 2012.

- VAN DEN DOOL, H.; Kratz, P. D. 1963. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. *J. Chroma A* **11**: 463-471.
- WATERMAN, P. G.; GRAY, A. I. Chemical systematics. *Nat. Prod. Rep.* **4**: 175- 203, 1987.
- WATERMAN, P. G. The current status of chemical systematic. *Phytochemistry* **68**: 2896-2903, 2007.
- WAECHTER, A.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; BORIES, V. M.; FOURNET, A. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis Buchtienii* (Annonaceae). *Phytother. Res.* **13**: 175-177, 1999.
- WESTON, R. J. Chemosystematic comparison of essential oils from eight species of four genera of the New Zealand Apiaceae. *Biochem. Syst. Ecol.* **38**: 691-696, 2010.
- WOGUEM, V.; FOGANG, H. P. D.; MAGGI, F.; TAPONDJOU, L. A.; WOMENI, H. M.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D.; LUPIDI, G.; PAPA, F.; VITTORI, S.; BARBONI, L. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopia parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. *Food Chem.* **149**: 183-189, 2014.
- YANG, Y. L.; CHANG, F.-R.; WU, C. C.; WANG, W. Y.; WU, Y. C. New ent-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. *J. Nat. Prod.* **65**: 1462-1467, 2002.
- YOSHIDA, N. C.; SIQUEIRA, J. M.; RODRIGUES, R. P.; CORREIA, R. P.; GARCEZ, W. S. An azafluorenone alkaloid and a megastigmane from *Unonopsis lindmanii* (Annonaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **24**: 529-533, 2013.
- ZHANG, M. L.; DONG, M.; Li, X. N.; Li, L. G.; SAURIOL, F.; HUO, C. H.; SHI, Q. W.; GU, Y. C.; KIYOTA, H.; CONG, B. A new taxane composed of two *N*-formyl rotamers from *Taxus Canadensis*. *Tetrahedron Lett.* **49**: 3405-3408, 2008.

8. ANEXOS

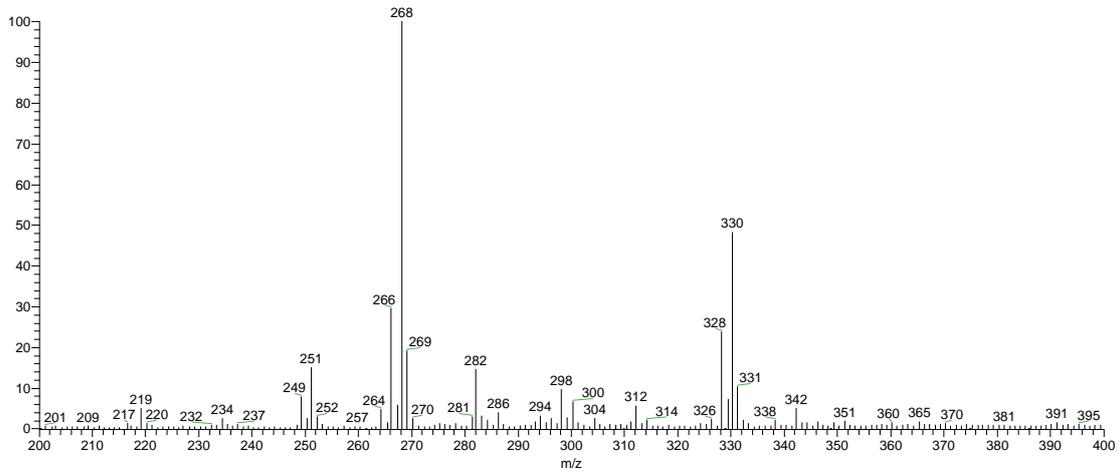


Figura A1. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. guatteroides* (GU).

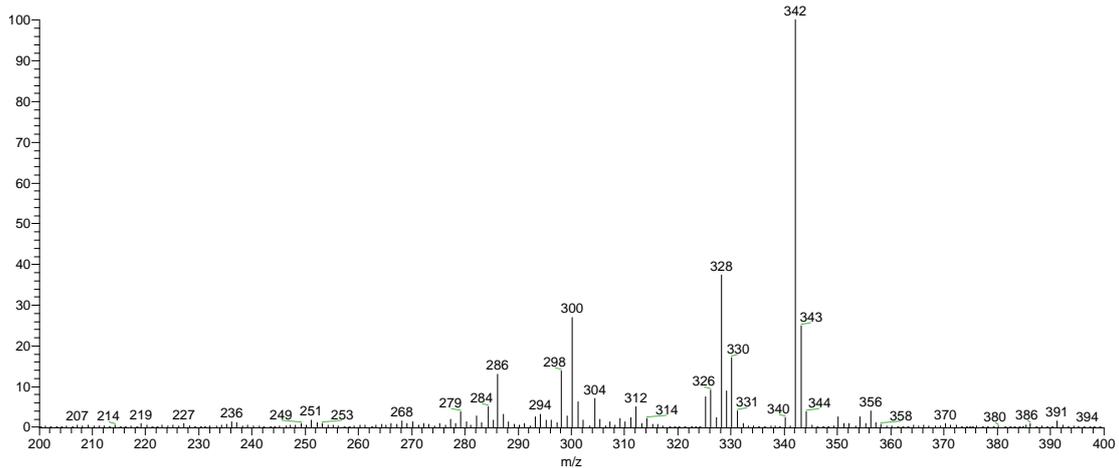


Figura A2. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. stipitata* (SUA).

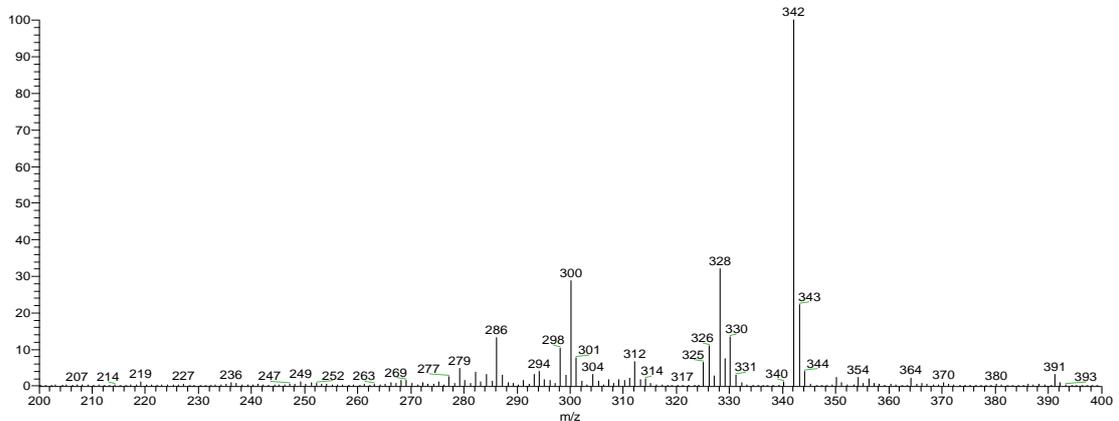


Figura A3. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. stipitata* (SUB).

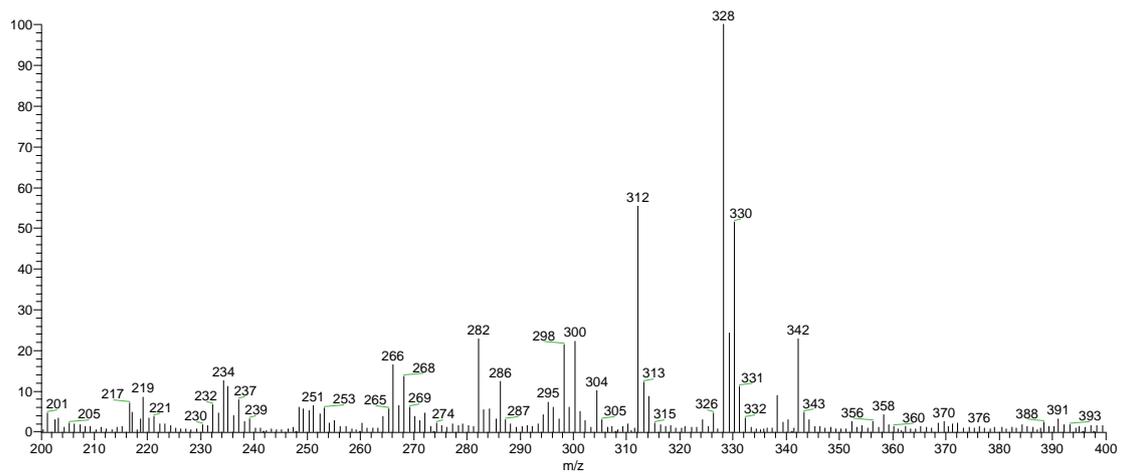


Figura A4. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. floribunda* (FDA).

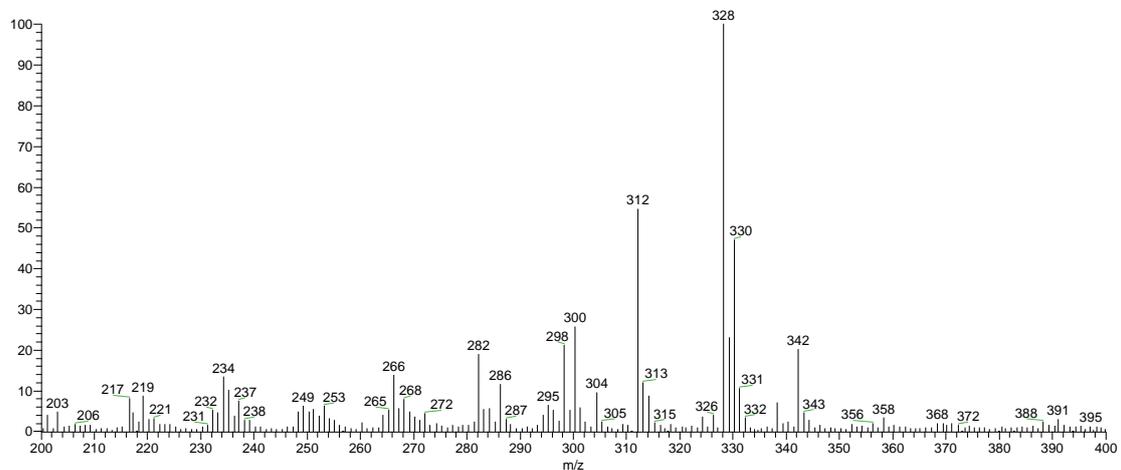


Figura A5. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. floribunda* (FDB).

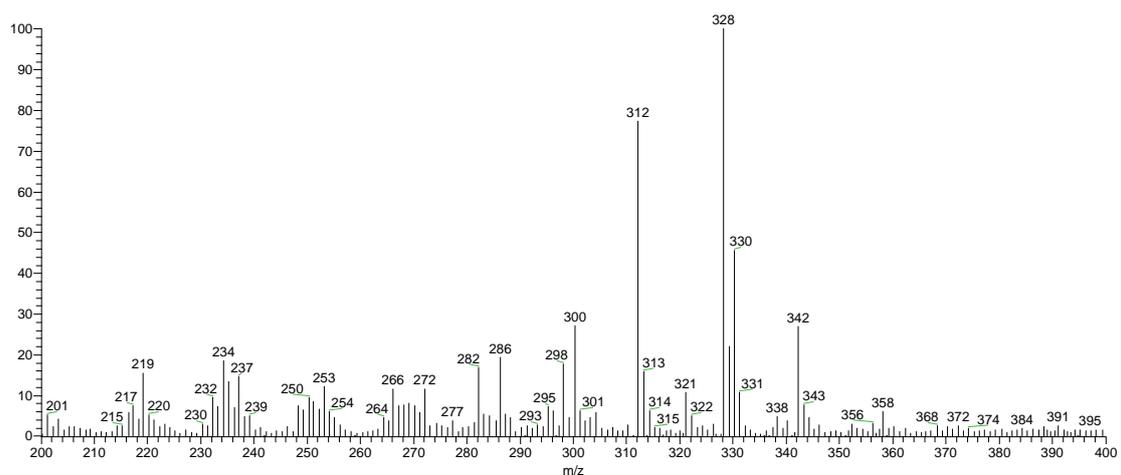


Figura A6. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. rufescens* (RD).

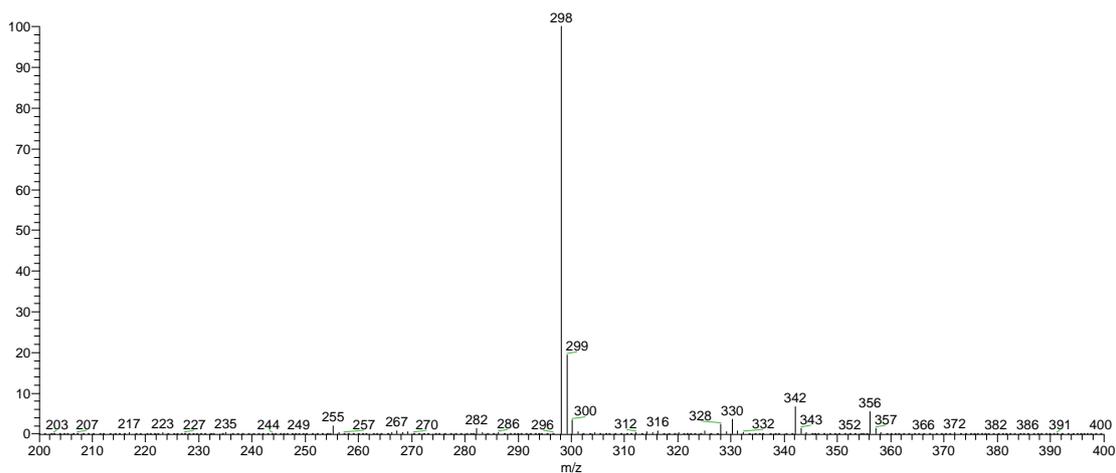


Figura A7. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (DRA).

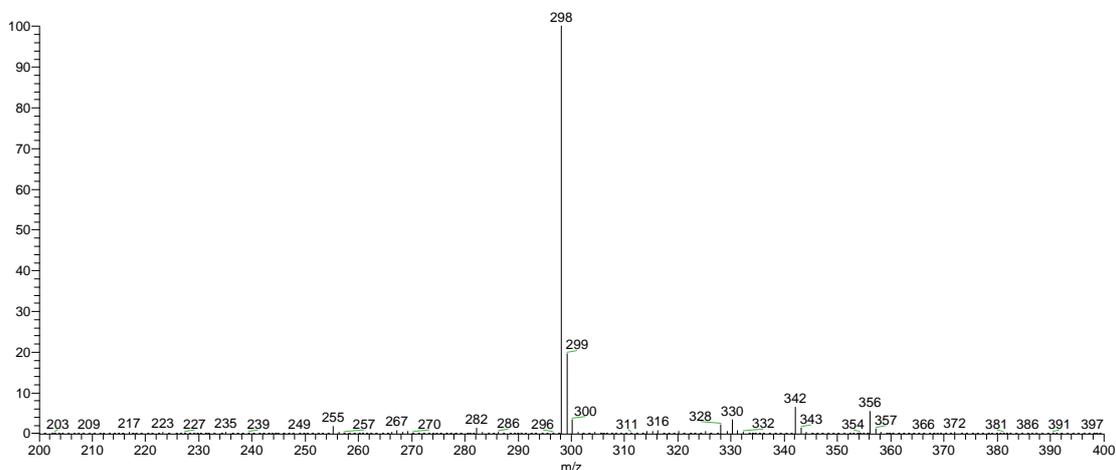


Figura A8. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (DRB).

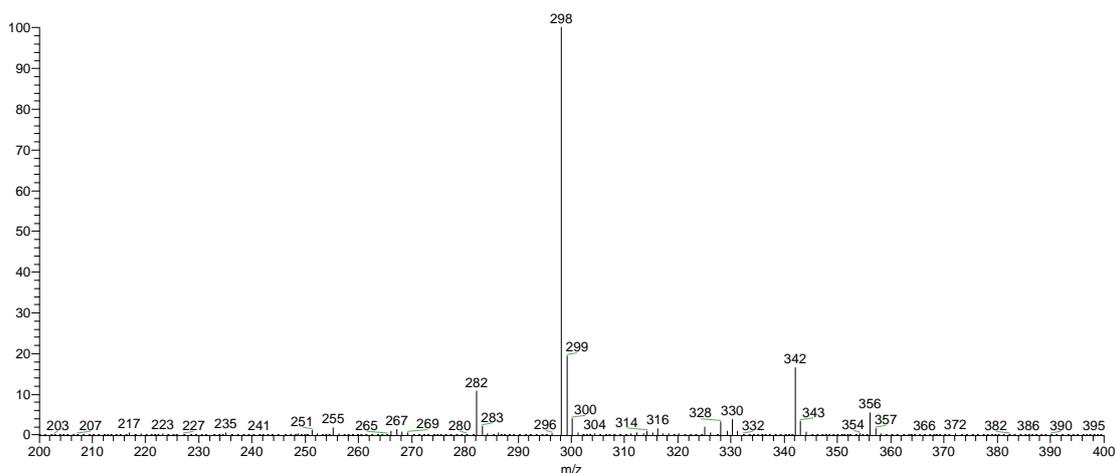


Figura A9. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (DDA).

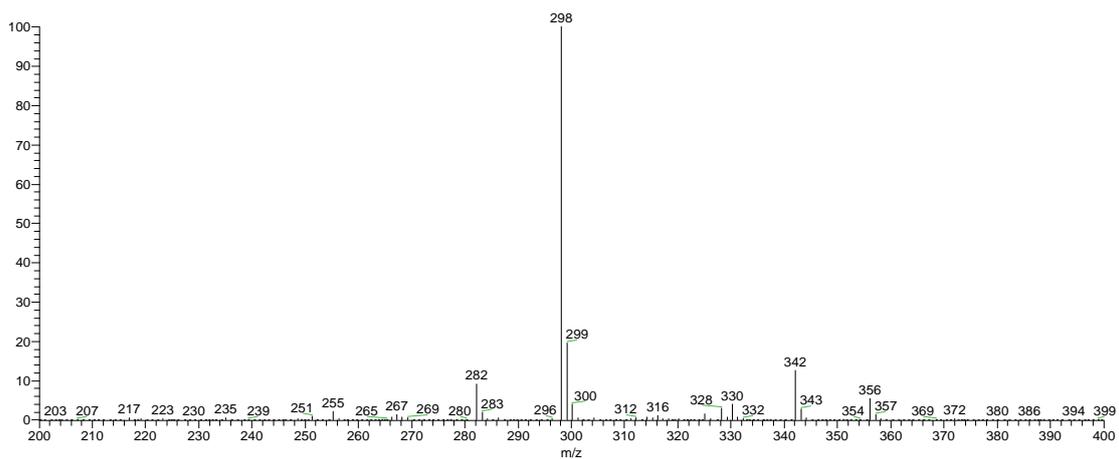


Figura A10. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (DDB).

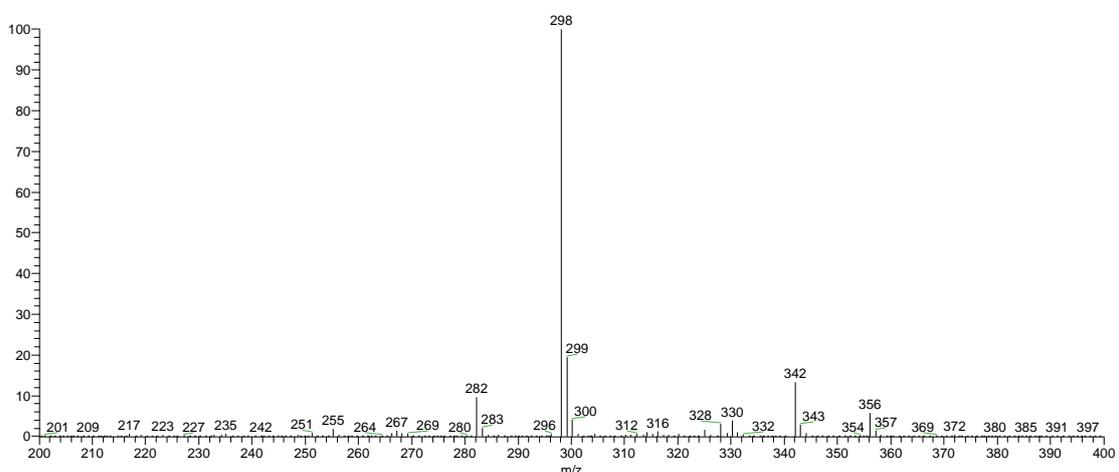


Figura A11. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (DDC).

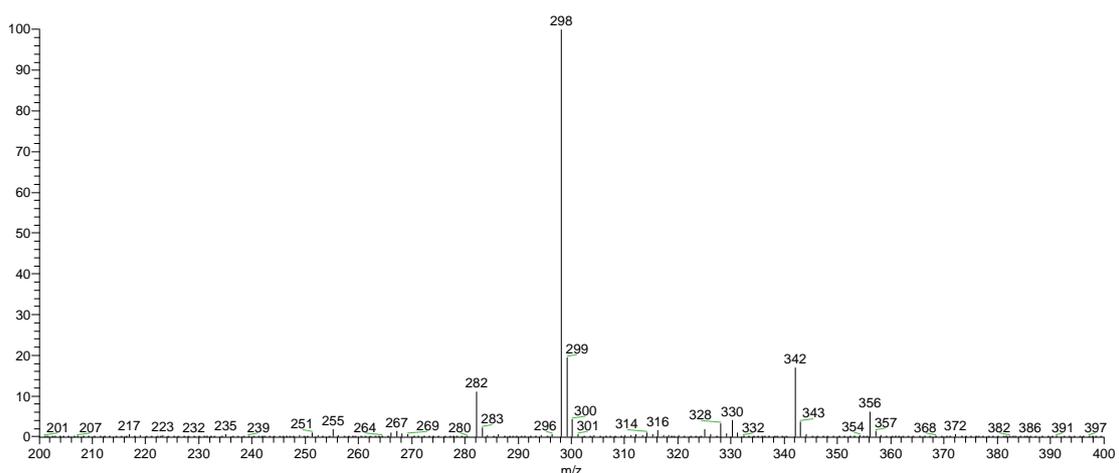


Figura A12. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (DDD).

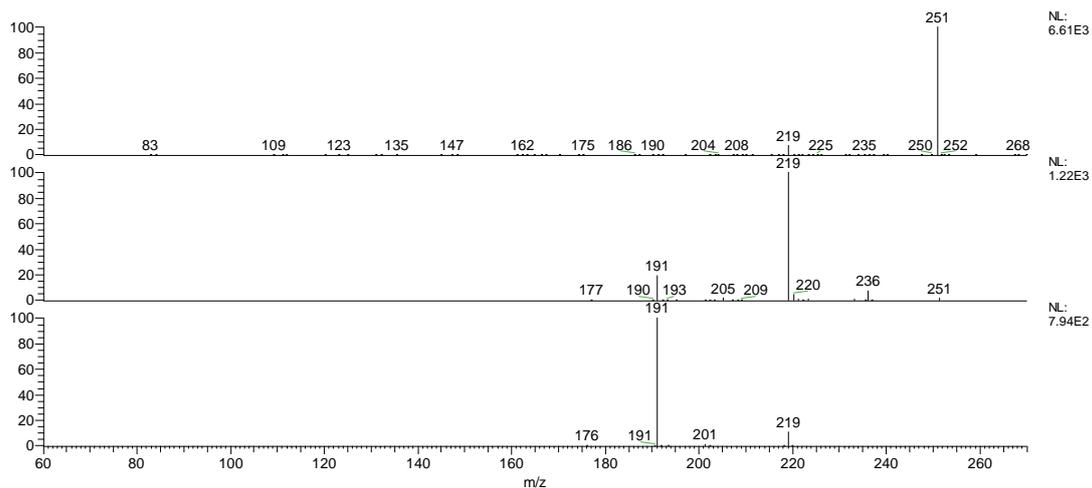


Figura A13. Espectro de ESI-MSⁿ (modo positivo) do ion de m/z 268 presente nas folhas de *U. guatterioides*.

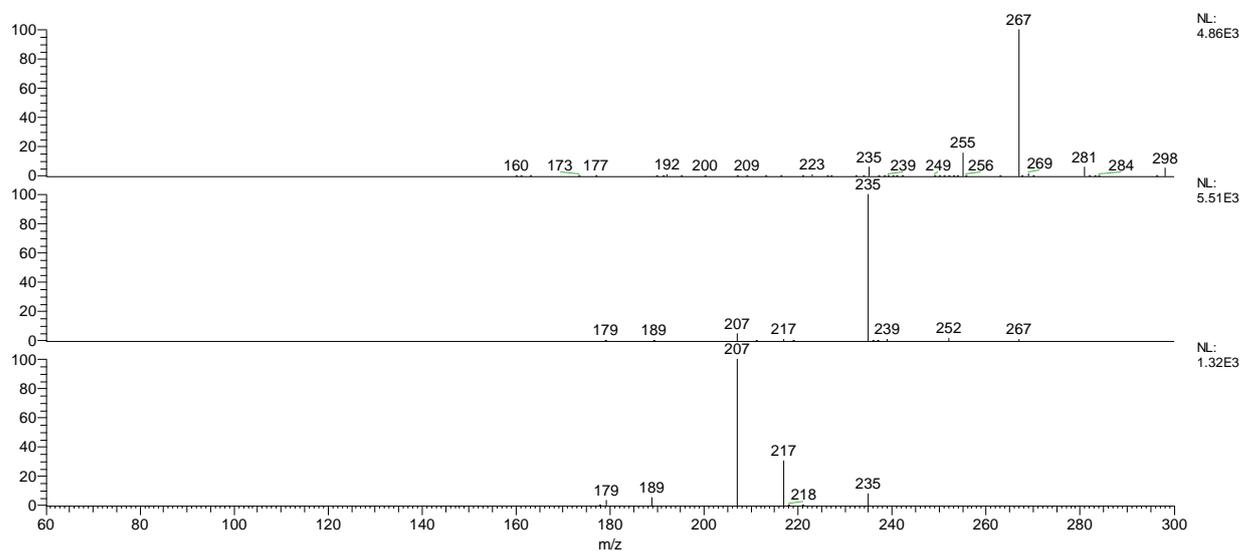


Figura A14. Espectro de ESI-MSⁿ (modo positivo) do ion de m/z 298 presente nas folhas de *U. duckei*.

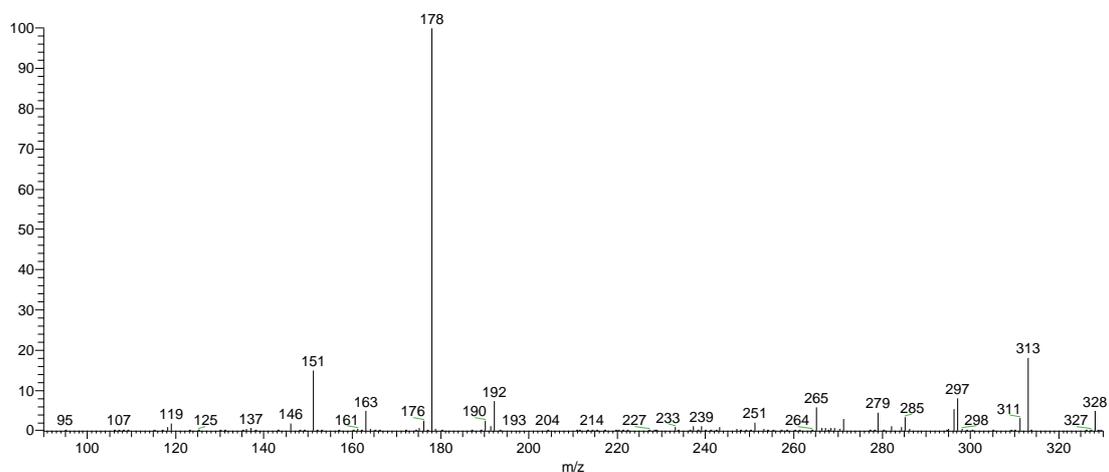


Figura A15. Espectro de ESI-MS² (modo positivo) do ion de m/z 328 presente nas

folhas de *U. floribunda*.

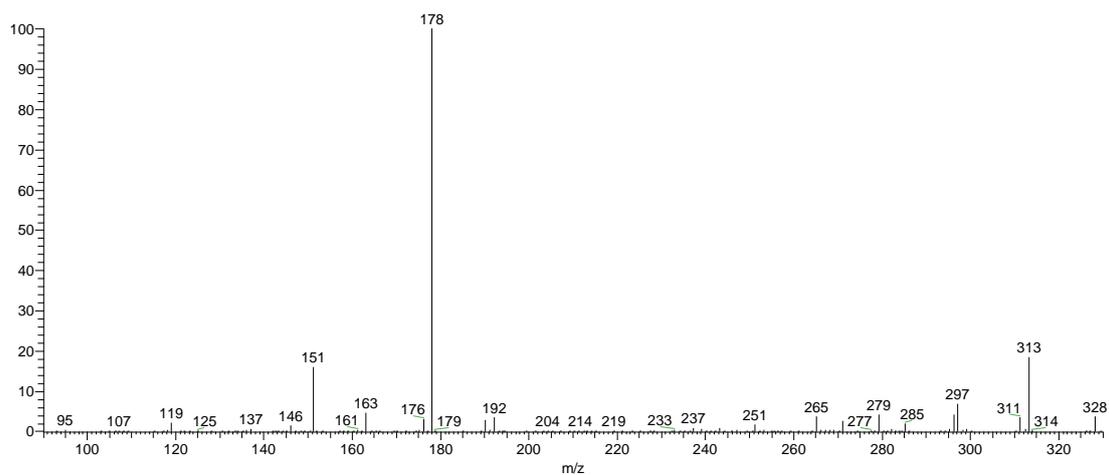


Figura A16. Espectro de ESI-MS² (modo positivo) do ion de m/z 328 presente nas folhas de *U. rufescens*.

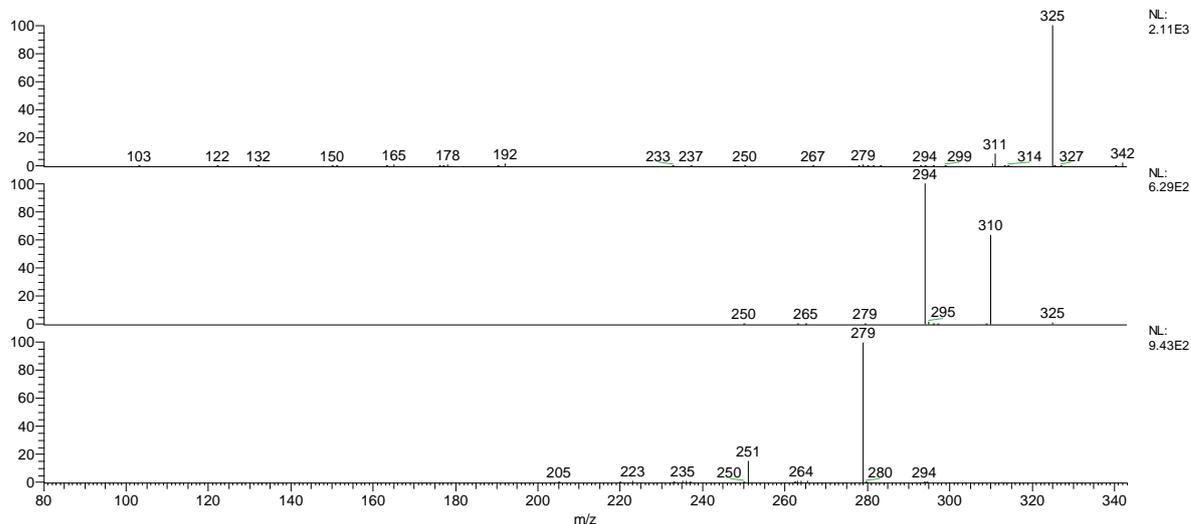


Figura A17. Espectro de ESI-MSⁿ (modo positivo) do ion de m/z 342 presente nas folhas de *U. stipitata*.

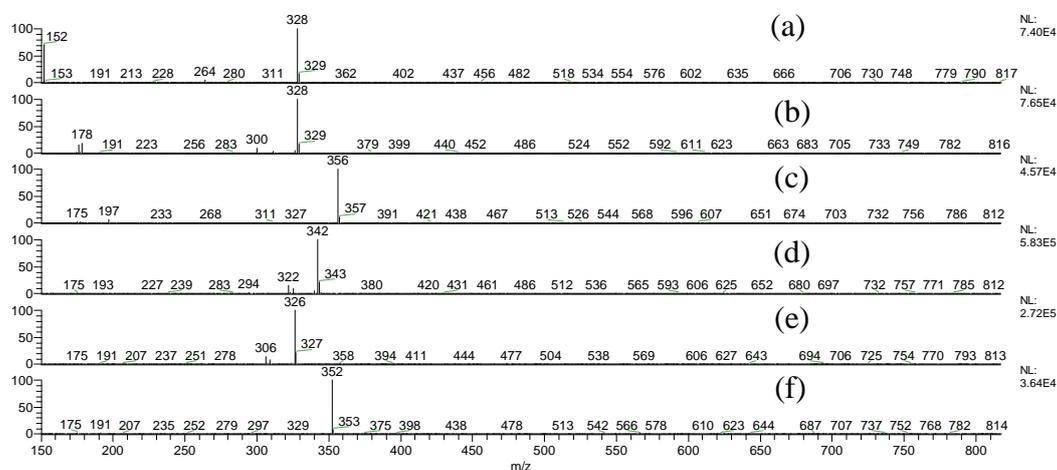


Figura A18. Espectros de *full scan* dos picos majoritários (a-f) presentes na amostra FASF.

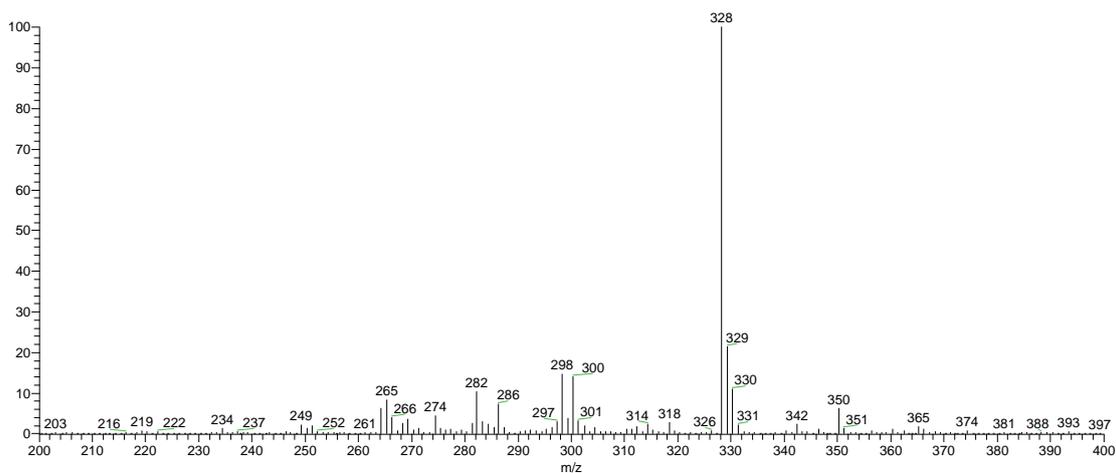


Figura A19. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC.

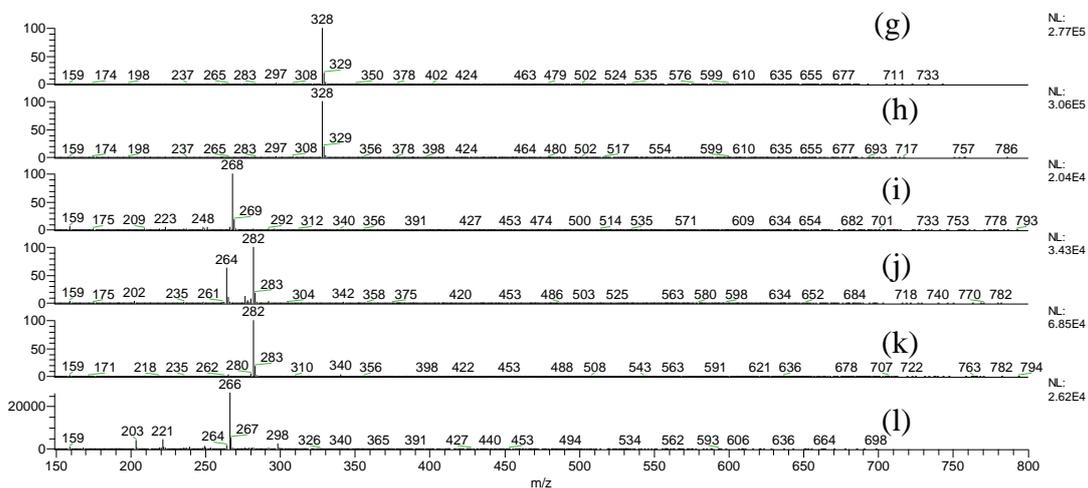


Figura A20. Espectros de *full scan* dos picos majoritários (g-l) presentes na amostra FAFC.

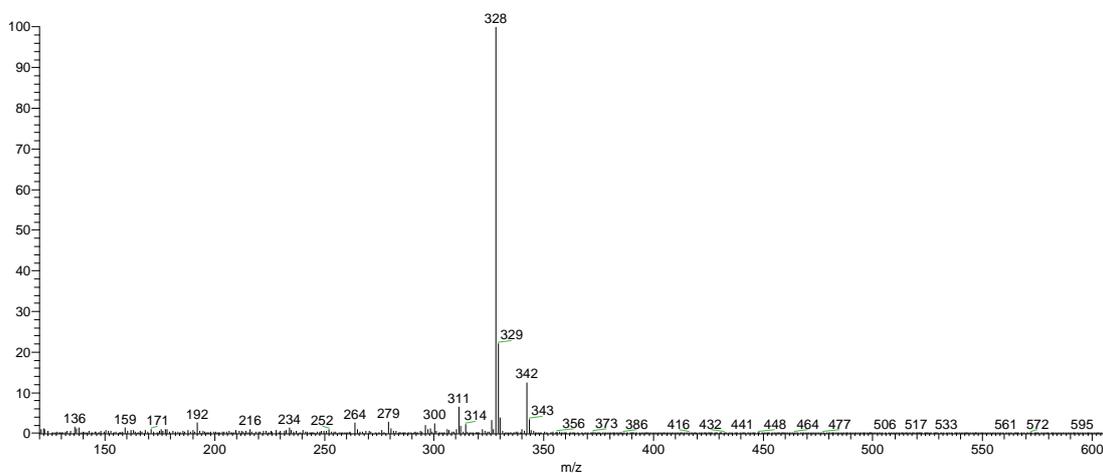


Figura A21. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF13.

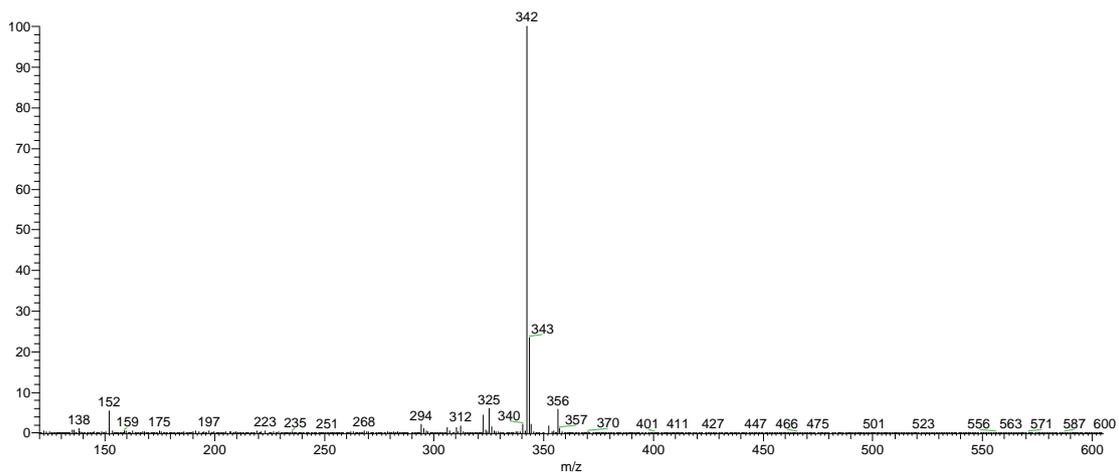


Figura A22. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF16.

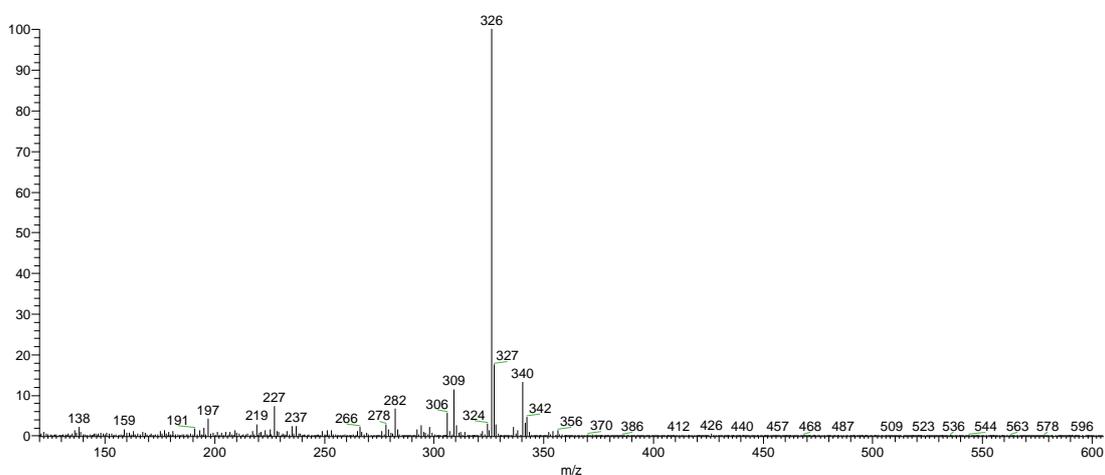


Figura A23. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF18.

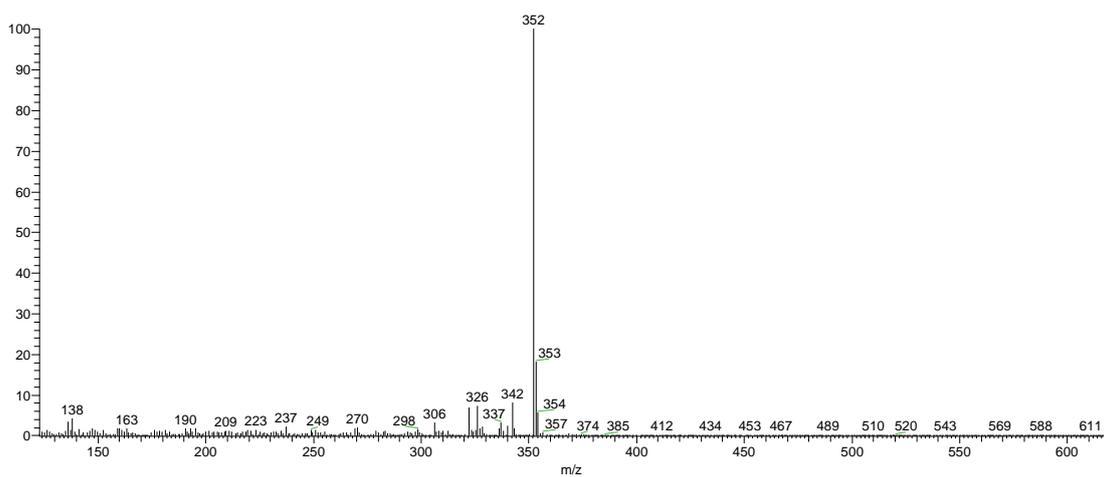


Figura A24. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF22.

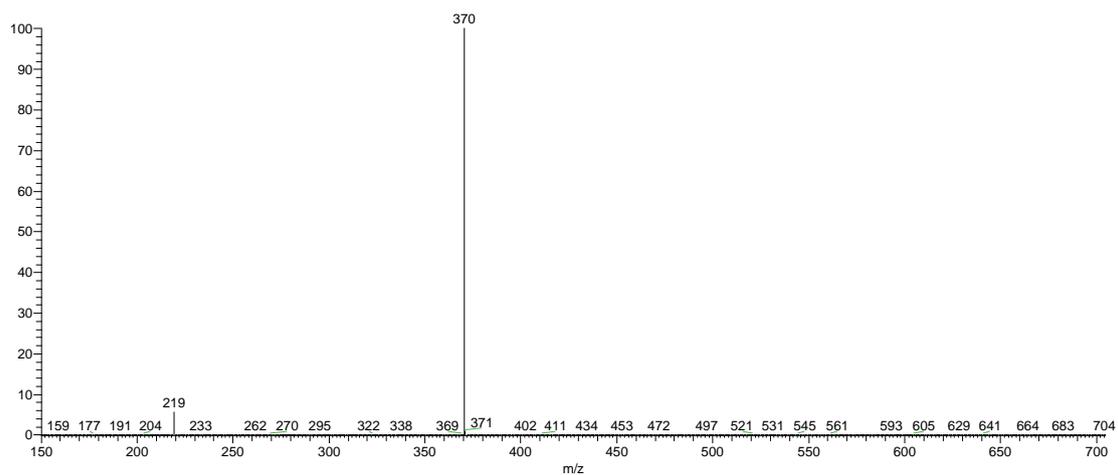


Figura A25. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FASF29.

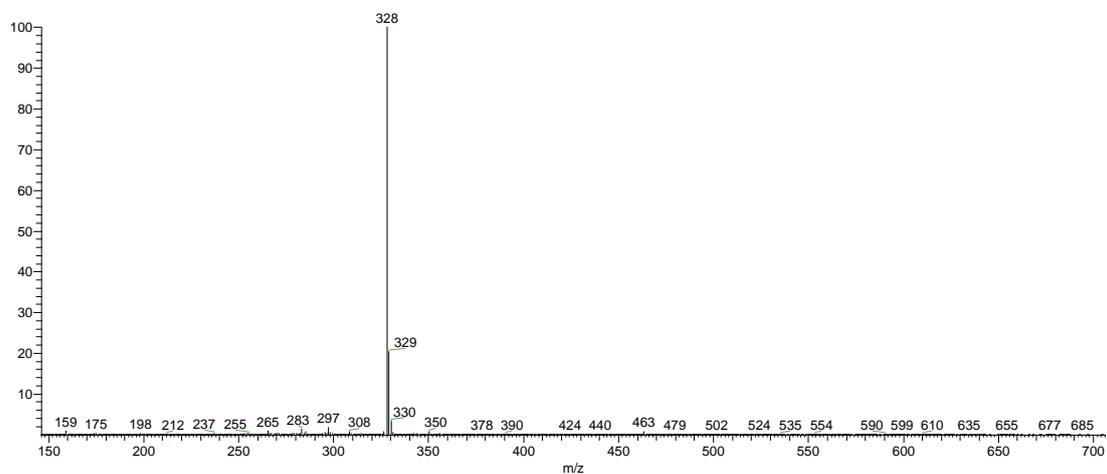


Figura A26. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC5.

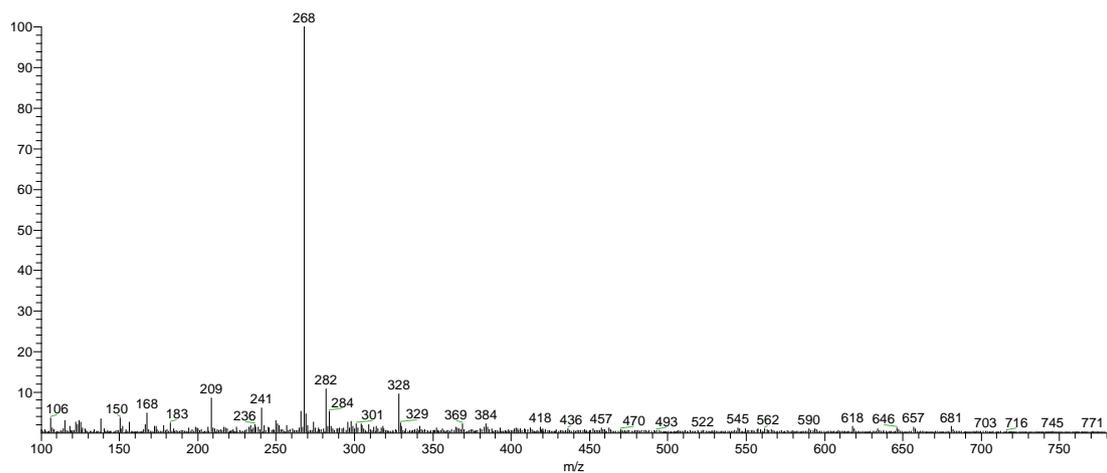


Figura A27. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC12.3.

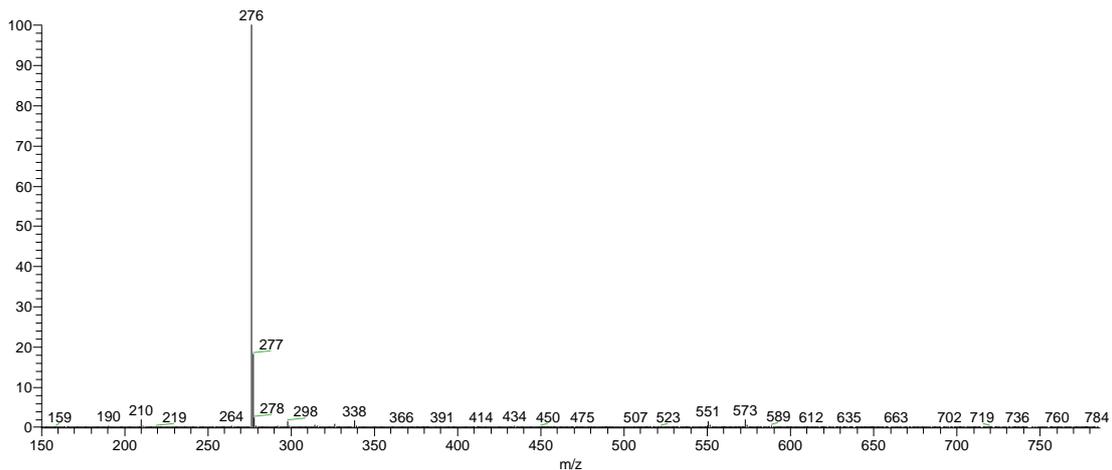


Figura A28. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC13.3.

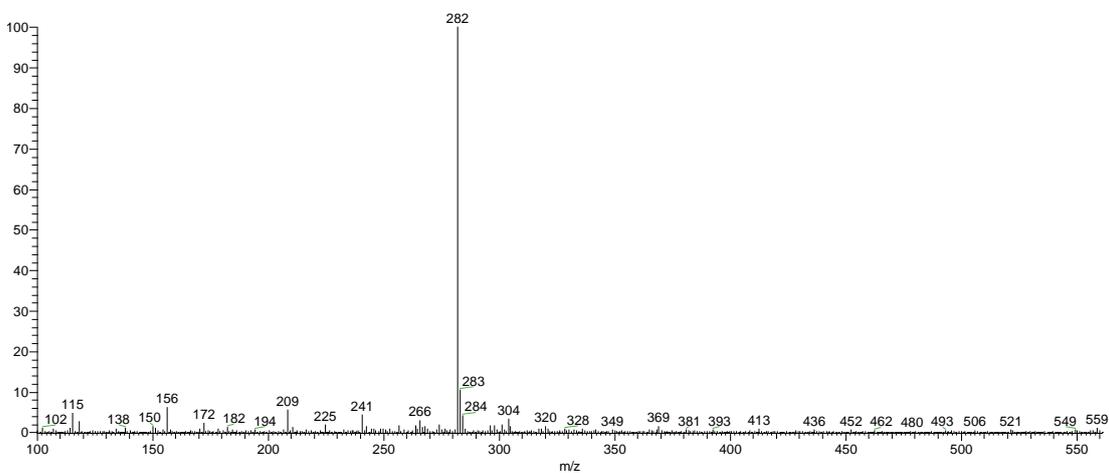


Figura A29. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC14.4.

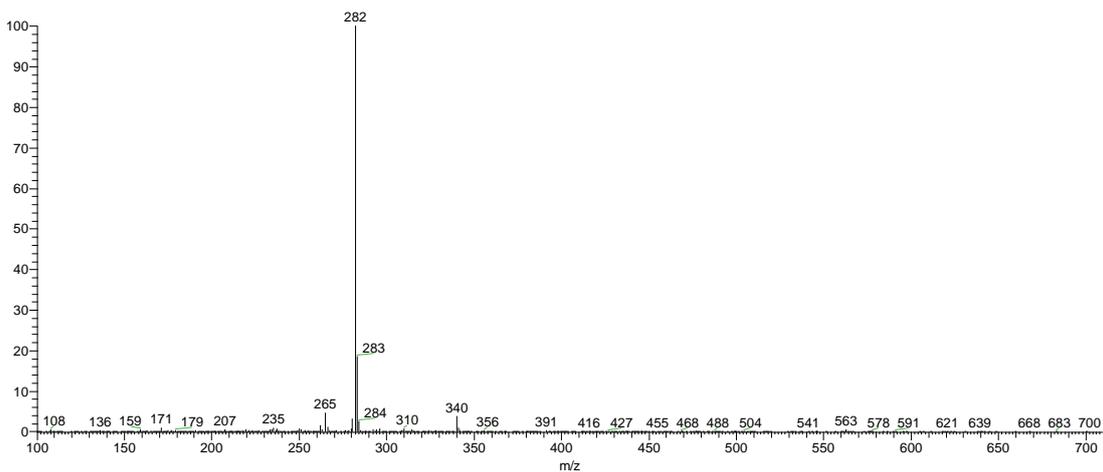


Figura A30. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC15.

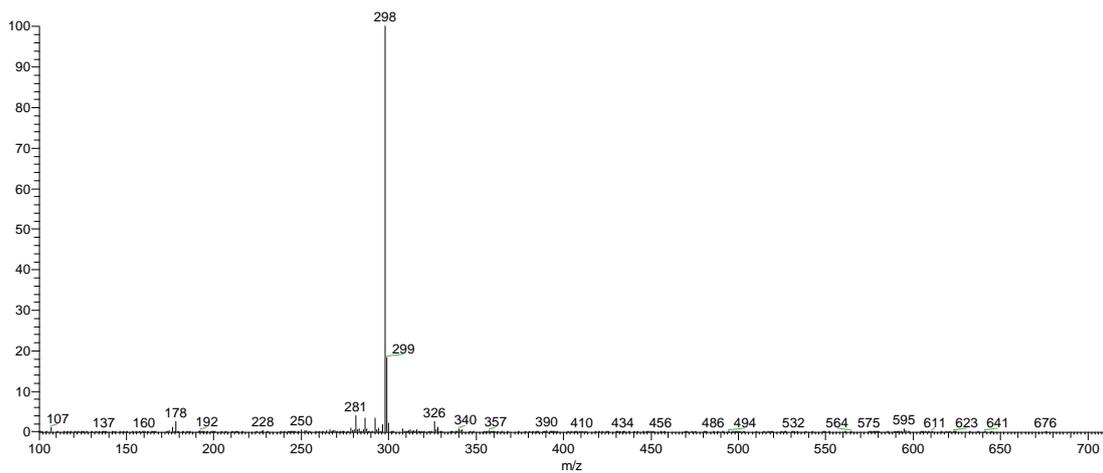


Figura A31. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC18.3.

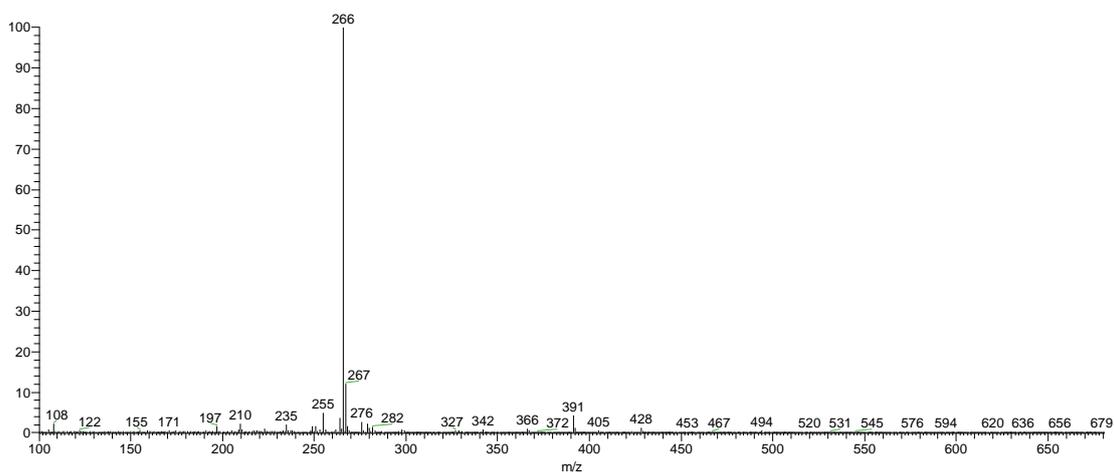


Figura A32. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC18.4.

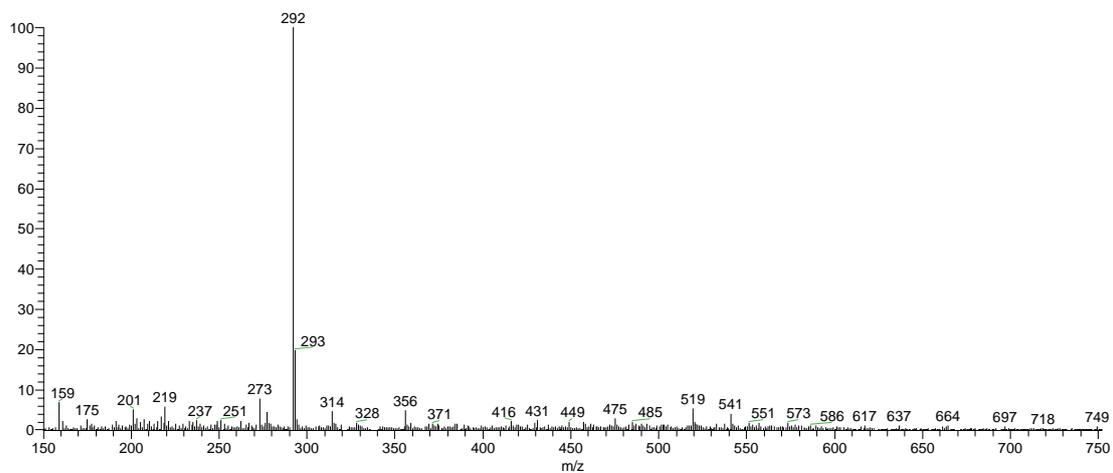


Figura A33. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC20.3.

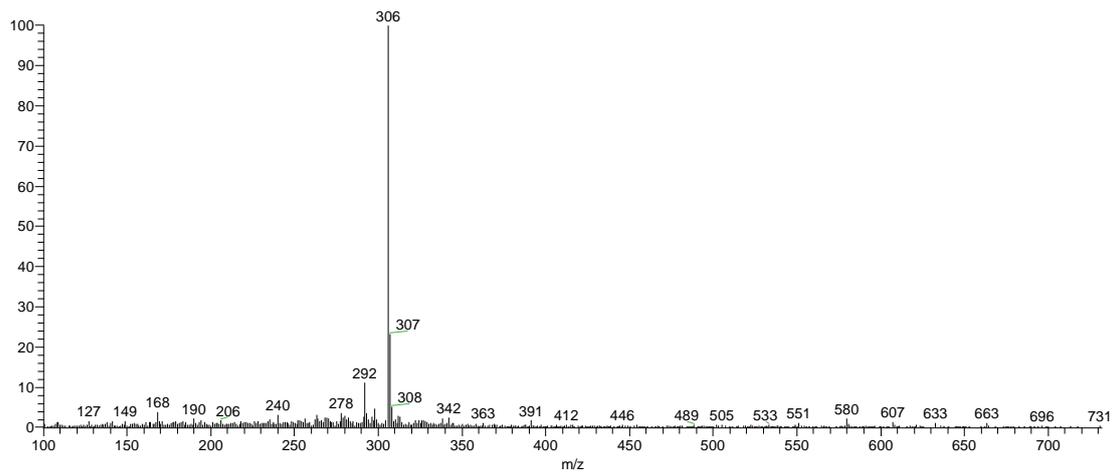


Figura A34. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC20.4.

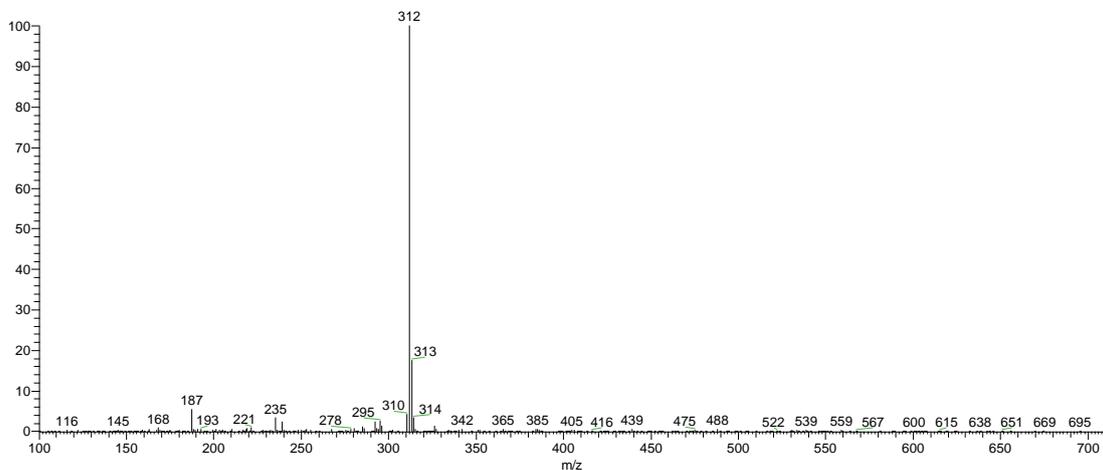


Figura A35. Espectro de ESI-MS (modo positivo) da amostra FAFC21.3.

Tabela A1. Dados utilizados na análise de PCA, baseados na intensidade dos picos obtidos entre m/z 200 a 400, após eliminação dos sinais de intensidade abaixo de 5%.

	U. guatterioides (GU)	U. stipitata (SUA)	U. stipitata (SUB)	U. floribunda (FDA)	U. floribunda (FDB)	U. rufescens (RD)	U. duckei (DRA)	U. duckei (DRB)	U. duckei (DDA)	U. duckei (ddb)	U. duckei (DDC)	U. duckei (DDD)
201	0	0	0	0	0	5.12	0	0	0	0	0	0
216	0	0	0	0	0	5.93	0	0	0	0	0	0
217	0	0	0	7.05	8.08	7.49	0	0	0	0	0	0
219	5.1	0	0	8.57	8.7	15.45	0	0	0	0	0	0
220	0	0	0	0	0	5.21	0	0	0	0	0	0
232	0	0	0	6.73	5.13	9.5	0	0	0	0	0	0
233	0	0	0	0	0	7.18	0	0	0	0	0	0
234	0	0	0	12.54	13.33	18.62	0	0	0	0	0	0
235	0	0	0	11.07	10.13	13.37	0	0	0	0	0	0
236	0	0	0	0	0	7.12	0	0	0	0	0	0
237	0	0	0	7.92	7.48	14.72	0	0	0	0	0	0
239	0	0	0	0	0	5.02	0	0	0	0	0	0
248	0	0	0	6.09	0	7.49	0	0	0	0	0	0
249	7.8	0	0	5.59	6.34	6.38	0	0	0	0	0	0
250	0	0	0	5.2	0	9.56	0	0	0	0	0	0
251	15.05	0	0	6.43	5.44	8.49	0	0	0	0	0	0
252	0	0	0	0	0	6.56	0	0	0	0	0	0
253	0	0	0	5.83	6.3	12.29	0	0	0	0	0	0
254	0	0	0	0	0	5.95	0	0	0	0	0	0
265	0	0	0	5.67	5.27	0	0	0	0	0	0	0
266	29.61	0	0	16.5	13.76	11.52	0	0	0	0	0	0
267	5.91	0	0	6.55	5.63	7.47	0	0	0	0	0	0
268	100	0	0	13.68	7.88	7.75	0	0	0	0	0	0
269	19.24	0	0	6.06	0	8.15	0	0	0	0	0	0
270	0	0	0	0	0	7.41	0	0	0	0	0	0
271	0	0	0	0	0	5.91	0	0	0	0	0	0
272	0	0	0	0	0	11.52	0	0	0	0	0	0
282	14.75	0	0	22.86	18.96	16.83	0	0	9.22	9.44	10.85	10.92
283	0	0	0	5.5	5.48	5.48	0	0	0	0	0	0
284	0	5.05	0	5.67	5.65	5.03	0	0	0	0	0	0
286	0	12.94	13.27	12.47	11.55	19.45	0	0	0	0	0	0
287	0	0	0	0	0	5.42	0	0	0	0	0	0
295	0	0	0	7.21	6.52	7.34	0	0	0	0	0	0
296	0	0	0	6.06	5.27	6.25	0	0	0	0	0	0
298	9.72	13.89	10.39	21.37	21.13	17.74	100	100	100	100	100	100
299	0	0	0	6.14	5.18	0	19.35	19.47	19.66	19.29	19.36	19.37
300	6.63	26.87	28.78	22.3	25.71	27.23	0	0	0	0	0	0
301	0	6.15	7.7	0	5.8	6.23	0	0	0	0	0	0
304	0	7.08	0	10.09	9.43	5.78	0	0	0	0	0	0
312	5.57	0	6.71	55.47	54.65	77.43	0	0	0	0	0	0
313	0	0	0	12.2	11.91	15.81	0	0	0	0	0	0
314	0	0	0	8.65	8.8	6.31	0	0	0	0	0	0
321	0	0	0	0	0	10.72	0	0	0	0	0	0
325	0	7.4	6.48	0	0	0	0	0	0	0	0	0
326	0	9.16	10.97	0	0	0	0	0	0	0	0	0
328	23.92	37.35	32.01	100	100	100	0	0	0	0	0	0
329	7.23	8.83	7.52	24.36	23.15	21.94	0	0	0	0	0	0
330	48.27	17.21	13.41	51.46	47.1	45.65	0	0	0	0	0	0
331	10.43	0	0	11.11	10.59	10.81	0	0	0	0	0	0
338	0	0	0	8.92	7.1	0	0	0	0	0	0	0
342	5.12	100	100	22.82	20.22	26.96	6.64	6.37	12.56	13.12	16.49	16.92
343	0	24.83	22.26	0	0	7.65	0	0	0	0	0	0
356	0	0	0	0	0	0	5.35	5.36	5.49	5.62	5.46	5.94
358	0	0	0	0	0	6.1	0	0	0	0	0	0