



Universidade Federal do Amazonas

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

**Estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica das cascas do caule de *Duguetia surinamensis* (Annonaceae)**

Rodolfo Nascimento de Oliveira

Ingresso: Setembro de 2015

Orientador: Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa

Manaus – AM

2017

Universidade Federal do Amazonas

Instituto de Ciências Exatas

Departamento de Química

Programa de Pós-Graduação em Química

Linha de Pesquisa: Produtos Naturais e Biomoléculas

**Estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica das cascas do caule de *Duguetia surinamensis* (Annonaceae)**

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

Rodolfo Nascimento de Oliveira

Ingresso: Setembro de 2015

Orientador: Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa

Manaus – AM

2017

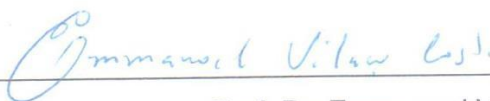
**“Estudo Fitoquímico e investigação da atividade citotóxica das cascas do caule de *Duguetia surinamensis* (Annonaceae)”**

**Rodolfo Nascimento de Oliveira**

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

Aprovado, em 30 de novembro de 2017.

COMISSÃO EXAMINADORA



Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa  
Universidade Federal do Amazonas  
Orientador



Prof. Dr. Hector Henrique Ferreira Koolen  
Membro UFAM



Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida  
Membro Externo

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 30 de novembro de 2017.

## **DEDICATÓRIA**

Ao Deus Criador e sustentador de tudo que existe. À minha esposa Juliana Gomes de Souza Oliveira, aos meus pais Valdeci Batista de Oliveira e Glorimar Nascimento de Oliveira, pelo apoio e incentivo antes e durante o período de realização desse mestrado.

## AGRADECIMENTOS

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

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela concessão da bolsa de mestrado e pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

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

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

Ao Herbário do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia pela identificação da espécie, possibilitando seu estudo.

À toda equipe do Laboratório de Espectrometria de Massas da Central Analítica da UFAM pela eficiência e disponibilidade sempre dispensados a mim.

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

Às colegas que integram e integraram o grupo de pesquisa GEQBiom, Nathalya, Laís, Gabriela, Liviane, Albert, Natalie, Kamila, Juliana, Max, Cesar, Morgana, Thiago e Richelly, com quem partilhei momentos de aprendizagem e companheirismo.

Aos colegas de turma Airi, David, Karen Alves, Karen Maciel, Kidney, Paula, Yara, e Weider pelas diversas conversas nos corredores que ajudaram tornar mais leve as dificuldades do mestrado.

Aos colegas de LAEQ e LPN, que marcaram meu convívio diário com alegria e descontração.

Às minhas irmãs Renata e Roberta, que sempre foram excelentes exemplos de dedicação, contribuindo muito para minha formação moral e acadêmica.

Aos meus pais, Valdeci e Glorimar, que desde minha infância me incentivaram aos estudos, forjaram meu caráter e pavimentaram o caminho que hoje trilho com alegria.

À minha esposa e ajudadora Juliana, com quem partilho todos os meus momentos, pelo encorajamento, amor e carinho que me motivam diariamente.

Enfim, sou imensamente grato a Deus que cria as plantas, as faz produzirem seus metabólitos e nos permite encontrá-los.

*“No princípio era aquele que é a Palavra. Ele estava com Deus, e era Deus...Todas as coisas foram feitas por intermédio dele; sem ele, nada do que existe teria sido feito. Nele estava a vida, e esta era a luz dos homens.”* (Evangelho de João 1: 1, 3 e 4)

## Resumo

*Duguetia surinamensis* R. E. Fries é uma espécie de Annonaceae endêmica da Amazônia, podendo ser encontrada no Brasil, Colômbia e Guianas. De acordo com a literatura, não há relatos de estudos químicos e farmacológicos a seu respeito. Nesse trabalho, foi realizado o estudo fitoquímico e de citotoxicidade *in vitro* dos extratos brutos e frações das cascas do caule de *D. surinamensis*, que levou ao isolamento de nove substâncias, sendo oito delas da classe dos alcaloides. Para isso foram empregadas técnicas cromatográficas clássicas para o isolamento dos constituintes químicos, e técnicas espectroscópicas (RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D) e espectrométrica (EM) para a identificação desses constituintes. Os alcaloides isolados foram identificados como pertencentes às subclasses dos aporfínicos (duguetina, duguetina *N*-óxido, dicentrina e 7-hidroxinordicentrina), oxoaporfínicos (dicentrinona), tetraidroprotoberberínicos (tetrahydrojathrorrizina), morfínanodienonas (pallidina), além de um alcaloide com esqueleto isoquinolínico inédito. A nona substância isolada foi o benzenoide 1,2,4-trimetoxibenzeno. Dessas substâncias, apenas os alcaloides tetrahydrojathrorrizina, duguetina, duguetina *N*-óxido e dicentrinona possuem relato no gênero. A pallidina é o primeiro alcaloide da subclasse morfínanodienona isolado no gênero e a 7-hidroxinordicentrina foi isolado pela primeira vez na família. O extrato metanólico apresentou atividade moderada frente às linhagens de células tumorais HepG2 e K562 com valores de  $\text{CI}_{50}$  iguais a 46,86 e 35,58  $\mu\text{g/mL}$  respectivamente. Os alcaloides 7-hidroxinordicentrina, dicentrina, duguetina e duguetina *N*-óxido apresentaram atividade citotóxica promissora contra as linhagens de células tumorais MCF7, HCT116, HepG2, HL-60 com  $\text{CI}_{50}$  abaixo de 8,0  $\mu\text{g/mL}$  para todas as células testadas, com exceção da duguetina *N*-óxido frente à linhagem HepG2, que apresentou  $\text{CI}_{50}$  igual a 10,41  $\mu\text{g/mL}$ . 7-Hidroxinordicentrina apresentou potente atividade citotóxica contra as linhagens tumorais MCF7, HCT116 e HL-60 com  $\text{CI}_{50}$  de 3,41, 1,38 e 0,69  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente, enquanto que a duguetina apresentou elevada atividade citotóxica frente à linhagem HepG2 ( $\text{CI}_{50}=1,78$   $\mu\text{g/mL}$ ). Os resultados confirmam que *D. surinamensis* é quimicamente uma representante da família Annonaceae, e uma fonte promissora de substâncias bioativas com potencial atividade citotóxica.

**Palavras-chaves:** *Duguetia surinamensis*; *Duguetia*; Annonaceae; Alcaloides; Citotoxicidade; Perfil cromatográfico.

## Abstract

*Duguetia surinamensis* R. E. Fries is a species of Annonaceae endemic to the Amazon, and can be found in Brazil, Colombia and Guianas. According to the literature, there are no reports of chemical and pharmacological studies about it. In this work, the phytochemical and *in vitro* cytotoxicity studies of the crude extracts and fractions of the stem of *D. surinamensis* were carried out, which led to the isolation of nine substances, eight of them of the alkaloid class. For this, classical chromatographic techniques were used for the isolation of the chemical constituents, and spectroscopic techniques (NMR  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  1D/2D) and spectrometric (MS) for the identification of these constituents. The alkaloids isolated were identified as belonging to the subclasses of aporphines (duguetine, duguetine *N*-oxide, dicentrine and 7-hydroxynordicentrine), oxoaporphines (dicentrinone), tetrahydroprotoberberines (tetrahydrojathrorizine), morphinanodienone (pallidine), and an alkaloid with a novel isoquinoline skeleton. The ninth isolated substance was benzene 1,2,4-trimethoxybenzene. Of these substances, only the alkaloids tetrahydrojathrorizine, duguetine, duguetine *N*-oxide and dicentrinone are reported in the genus. 7-hydroxynordicentrin was isolated for the first time in the family. The methanolic extract presented moderate activity against the HepG2 (human hepatocellular carcinoma) and K562 (human chronic myelocytic leukemia) tumor cell lines with  $\text{IC}_{50}$  values equal to 46.86 and 35.58  $\mu\text{g/mL}$ , respectively. The alkaloids 7-hydroxynordicentrine, dicentrine, duguetine, and duguetine *N*-oxide showed promising cytotoxic activity against MCF7 (human breast adenocarcinoma), HCT116 (human colon carcinoma), HepG2, HL-60 (human promyelocytic leukemia) tumor cells with  $\text{IC}_{50}$  below 8.0  $\mu\text{g/mL}$  for all cells tested, with except for the duguetine *N*-oxide compared to the HepG2 line, which had an  $\text{IC}_{50}$  of 10.41  $\mu\text{g/mL}$ . 7-hydroxynordicentrine showed potent cytotoxic activity against the MCF7, HCT116 and HL-60 tumor lines with  $\text{IC}_{50}$  of 3.41, 1.38 and 0.69  $\mu\text{g/mL}$ , respectively, whereas duguetin showed high cytotoxic activity against the HepG2 lineage ( $\text{IC}_{50} = 1.78 \mu\text{g/mL}$ ). The results confirm that *D. surinamensis* is chemically a representative of the Annonaceae family, and a promising source of bioactive substances with potential cytotoxic activity.

**Keywords:** *Duguetia surinamensis*; *Duguetia*; Annonaceae; Alkaloids; Cytotoxicity; Chromatographic profile



# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SIGLAS</b> .....	viii
<b>LISTA DE ESQUEMAS</b> .....	ix
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	xvi
<b>1. Introdução</b> .....	1
<b>2. Revisão bibliográfica</b> .....	4
<b>2.1 A família Annonaceae Juss.</b> .....	4
2.1.1 Aspectos gerais .....	4
2.1.2 Aspectos químicos .....	5
<b>2.2 O gênero <i>Duguetia</i> A. St.-Hil.</b> .....	7
2.2.1 Aspectos gerais .....	7
2.2.2 Aspectos químicos .....	8
2.2.3 Atividade biológica .....	17
<b>2.3 A espécie <i>Duguetia surinamensis</i> R. E. Fries</b> .....	19
<b>2.4 Ensaio de citotoxicidade</b> .....	20
<b>3. Objetivos</b> .....	22
3.1. Objetivo geral .....	22
3.2. Objetivos específicos .....	22
<b>4. Metodologia</b> .....	23
4.1 Cromatografia em coluna (CC) .....	23
4.2 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) .....	23
4.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) .....	23
4.4 Reveladores .....	23
4.5 Solventes .....	24
4.6 Equipamentos .....	24
4.7 Coleta do material vegetal .....	25
4.8 Preparo dos extratos .....	25
4.9 Tratamento ácido-base do extrato metanólico .....	26
4.11 Isolamento .....	29
4.11.1 Grupo de frações FADSC11 .....	29
4.11.3 Grupo de frações FADSC141 .....	30
4.11.4 Grupo de frações FADSC81 .....	31
4.12 Estudo da atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	33
4.12.1 Preparo das amostras .....	33
4.12.2 Células .....	33

4.12.3 Ensaio de citotoxicidade.....	34
5. Resultados e discussões .....	37
5.1 Identificação estrutural das substâncias isoladas das cascas do caule de <i>D. surinamensis</i> .....	39
5.1.1 Identificação estrutural do benzenoide DS1 .....	39
5.1.2 Identificação estrutural dos alcaloides aporfínicos .....	44
5.1.3 Identificação estrutural dos alcaloides oxoaporfínicos .....	69
5.1.4 Identificação estrutural do alcaloide tetrahidroprotoberberínico DS7 .....	74
5.1.5. Identificação estrutural alcaloide morfinanodienona DS6.....	80
5.1.6 Identificação estrutural do alcaloide com esqueleto isoquinolínico modificado DS3.....	87
5.2. Investigação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> .....	95
6. Conclusões.....	100
Referências bibliográficas.....	101

## LISTA DE ABREVIATURAS, FÓRMULAS E SIGLAS

DS	<i>Duguetia surinamensis</i>
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDA	Cromatografia em camada delgada preparativa
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	Diclorometano
CI <sub>50</sub>	Concentração inibitória (50%)
Da	Dalton
EHDSC	Extrato hexânico das cascas de <i>D. surinamensis</i>
EMDSC	Extrato metanólico das cascas de <i>D. surinamensis</i>
ESI+	Eletrospray modo positivo
FADSC	Fração alcaloídica das cascas de <i>D. surinamensis</i>
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
FNDSC	Fração neutra das cascas de <i>D. surinamensis</i>
HepG2	Carcinoma hepatocelular humano
HCl	Ácido clorídrico
HCT116	Carcinoma de cólon humano
HL-60	Leucemia promielocítica humana
HMBC	Correlação múltiplas de ligações heteronucleares
HSQC	Correlação simples de ligações heteronucleares
K562	Leucemia mielocítica Crônica humana
MCF7	Adenocarcinoma de mama humano
MDS	Mistura de substâncias oriundas de FADSC
MeOH	Metanol
MRC5	Células de pulmão humano saudáveis
<i>m/z</i>	Razão massa-carga
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de amônio
RMN de <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio <sup>1</sup> H
RMN de <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono <sup>13</sup> C
RMN 1D/2D	Ressonância magnética nuclear unidimensional e bidimensional
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UV	Ultravioleta

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 - Fluxograma geral de maceração .....	26
ESQUEMA 2 - Fluxograma do tratamento ácido-base.....	27
ESQUEMA 3 - Fracionamento da FADSC.....	28
ESQUEMA 4 - Grupo de frações FADSC11 .....	29
ESQUEMA 5 - Grupo de frações FADSC121 .....	30
ESQUEMA 6 - Grupo de frações FADSC141 .....	31
ESQUEMA 7 - Fracionamento da FADSC81.....	31
ESQUEMA 8 - Grupo de frações FADSC81(83) .....	32
ESQUEMA 9 - Ensaio para verificação de atividade citotóxica.....	35

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Alcaloides utilizados como medicamentos quimioterápicos. ....	2
FIGURA 2 - Distribuição geográfica da família Annonaceae. ....	4
FIGURA 3 - Flores (a) e frutos(b) de <i>Duguetia furfuracea</i> e flores (c) e frutos (b) de <i>Duguetia lanceolata</i> (respectivamente), duas das espécies mais abundantes no Brasil.....	7
FIGURA 4 - Estrutura dos alcaloides benziltetrahydroisoquinolínicos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> . ....	8
FIGURA 5 - Estrutura dos alcaloides tetrahydroprotoberberínicos e protoberberínico isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	9
FIGURA 6 - Estrutura dos alcaloides aporfínicos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	12
FIGURA 7 - Estrutura dos alcaloides oxaporfínicos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> . ....	14
FIGURA 8 - Estrutura dos alcaloides fenantrenos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> . ...	15
FIGURA 9 - Estrutura dos alcaloides isoquinolínicos de subclasses pouco observadas em de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	16
FIGURA 10 - Estrutura dos alcaloides não isoquinolínicos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> . ....	17
FIGURA 11 - Características botânicas de <i>D. surinamensis</i> (a) fruto em processo de amadurecimento e amadurecido caído; (b) caule da árvore; (c) caule e casca fibrosa;. (d) folha seca e verde. ....	20
FIGURA 12 – Reação de oxirredução da resazurina. ....	21
FIGURA 13 - Esqueletos dos alcaloides identificados nas cascas de <i>D. surinamensis</i> . ....	37
FIGURA 14 - Benzenoide isolado de <i>D. surinamensis</i> .....	37
FIGURA 15 - Alcaloides aporfínicos isolado de <i>D. surinamensis</i> . ....	38
FIGURA 16 - Alcaloide oxoaporfínico isolado de <i>D. surinamensis</i> .....	38
FIGURA 17 - Alcaloide isoquinolínico de subclasse indefinida isolado de <i>D. surinamensis</i> . ...	38
FIGURA 18 - Alcaloide tetrahydroprotoberberínico identificado em <i>D. surinamensis</i> . ....	38
FIGURA 19 - Alcaloide morfinaodienona isolado em <i>D. surinamensis</i> .....	39
FIGURA 20 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.....	40
FIGURA 21 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.....	40
FIGURA 22 - Ampliação da região de hidrogênios metoxílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.....	40
FIGURA 23 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.....	41
FIGURA 24 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS1. ....	41
FIGURA 25 - Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.....	42

FIGURA 26 - Ampliação da região de hidrogênios metoxílicos do mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.....	42
FIGURA 27 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.....	42
FIGURA 28 - Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de DS1.....	43
FIGURA 29 - Estrutura do 1,2,4-trimetoxibenzeno.....	43
FIGURA 30 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS2.....	44
FIGURA 31 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS2. ....	45
FIGURA 32 - Ampliação da região dos hidrogênios metínicos, metilênicos, metílicos e metoxílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS2.....	45
FIGURA 33 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS2.....	46
FIGURA 34 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS2. ....	46
FIGURA 35 - Ampliação da região de hidrogênio da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS2.....	46
FIGURA 36 - Ampliação da região de hidrogênio aromático do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS2. ....	47
FIGURA 37 - Ampliação da região de hidrogênio metílico, metínico, e metilênico do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS2. ....	47
FIGURA 38 - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS2. ....	48
FIGURA 39 - Ampliação da região metoxílica do mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS2. ....	48
FIGURA 40 - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS2.....	48
FIGURA 41 - Espectro de Massas da substância DS2.....	50
FIGURA 42 - Estrutura da dicentrina. ....	50
FIGURA 43 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS4.....	51
FIGURA 44 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS4. ....	51
FIGURA 45 - Ampliação da região de hidrogênios metilênicos, metínico e metoxílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS4. ....	52
FIGURA 46 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS4.....	53
FIGURA 47 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS4. ....	53
FIGURA 48 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS4. ....	53
FIGURA 49 - Ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos, dos metilênicos e metínicos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS4.....	54

FIGURA 50 - Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ + gotas de $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DS4.....	54
FIGURA 51 - Ampliação da região das metoxilas do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS4. ....	55
FIGURA 52 - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS4.....	55
FIGURA 53 - Espectro de Massas da substância DS4.....	56
FIGURA 54 - Estrutura da 7-hidroxinordicentrina. ....	57
FIGURA 55 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS8.....	57
FIGURA 56 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS8. ....	58
FIGURA 57 - Ampliação da região de hidrogênios metilênicos, metílicos, metínico e metoxílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS8.....	58
FIGURA 58 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS8.....	59
FIGURA 59 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS8. ....	59
FIGURA 60 - Ampliação da região de aromáticos e da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS8. ....	60
FIGURA 61 - Ampliação da região de hidrogênios metoxilílicos, metilênicos e metínicos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS8.....	60
FIGURA 62 - Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS8.....	60
FIGURA 63 - Ampliação da região de metoxilas do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS8. ....	61
FIGURA 64 - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS8.....	62
FIGURA 65 - Espectro de Massas da substância DS8.....	62
FIGURA 66 - Estrutura da Duguetina <i>N</i> -óxido.....	63
FIGURA 67- Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS9.....	63
FIGURA 68 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS9. ....	64
FIGURA 69 - Ampliação da região de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos e metoxílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS9.....	64
FIGURA 70 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS9.....	65
FIGURA 71 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ + gotas de $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DS9.....	65
FIGURA 72 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS9.....	65

FIGURA 73 - Ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos, metilênicos e metínicos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS9.....	66
FIGURA 74 - Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ + gotas de $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DS9.....	66
FIGURA 75 - Ampliação da região dos hidrogênios das metoxilas do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS9.....	67
FIGURA 76 - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS9.....	68
FIGURA 77 - Espectro de Massas da substância DS9.....	68
FIGURA 78- Estrutura da Duguetina.....	69
FIGURA 79 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS5.....	69
FIGURA 80 - Ampliação do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS5.....	70
FIGURA 81 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS5. ....	70
FIGURA 82 - Ampliação do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS5.....	71
FIGURA 83 - Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS5. ....	71
FIGURA 84 - Ampliação da região das metoxilas do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS5. ....	72
FIGURA 85 - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS5.....	72
FIGURA 86 - Espectro de massas da substância DS5. ....	73
FIGURA 87 - Estrutura da dicentrinona. ....	74
FIGURA 88 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura MDS2 (dicentrinona + DS7). ....	74
FIGURA 89 - Sinais referentes à dicentrinona no espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura MDS2. ....	75
FIGURA 90 - Sinais referentes ao alcaloide DS7 no espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura MSD2. ....	75
FIGURA 91 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS7.....	76
FIGURA 92 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de MSD2....	77
Figura 93 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ + gotas de $\text{CD}_3\text{OD}$ ) dos sinais referentes ao alcaloide DS7. .	77
FIGURA 94 - Ampliação do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) dos sinais referentes ao alcaloide DS7. Os sinais destacados em verde são referentes ao alcaloide dicentrinona. ....	77
FIGURA 95 - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de MSD2... 78	78



FIGURA 96 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) dos sinais referentes ao alcaloide DS7.....	78
FIGURA 97 - Ampliação do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ + gotas de $\text{CD}_3\text{OD}$ ) dos sinais referentes ao alcaloide DS7.....	78
FIGURA 98 - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS7.....	79
FIGURA 99 - Espectro de Massas da substância DS7.....	80
FIGURA 100 – Estrutura da Tetrahydrojathrorrizina.....	80
FIGURA 101 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância DS6.....	81
FIGURA 102 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos vinílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS6.....	81
FIGURA 103 - Ampliação da região de hidrogênios metílicos, metilênicos e metoxílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS6.....	82
FIGURA 104 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS6.....	82
FIGURA 105 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS6.....	83
FIGURA 106 - Ampliação da região de hidrogênios de metoxilas, metilenos e metila do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS6.....	83
FIGURA 107 - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ + gotas de $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de DS8.....	84
FIGURA 108 - Ampliação da região dos aromáticos do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS6.....	84
FIGURA 109 - Ampliação da região das metoxilas, metilenos e metila do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS6.....	85
FIGURA 110 - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS6.....	85
FIGURA 111 - Espectro de massas da substância DS6.....	86
FIGURA 112 - Estrutura da pallidina.....	87
FIGURA 113 - Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.....	87
FIGURA 114 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.....	88
FIGURA 115 - Ampliação da região de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos e metoxílicos do espectro de RMN de $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.....	88
FIGURA 116 - Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da substância DS3.....	88
FIGURA 117 - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.....	89
FIGURA 118 - Esqueleto alcaloídico azahomoaporfino.....	90
FIGURA 119 - Estrutura dos alcaloides azahomoaporfinos spiguetina (a) e spiguetidina (b).....	90

FIGURA 120 - Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.....	90
FIGURA 121 - Ampliação da região dos hidrogênios das metoxilas, metilenos e metínica do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.....	91
FIGURA 122 - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS3....	91
FIGURA 123 - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.....	92
FIGURA 124 - Ampliação da região de hidrogênios da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS3. ....	92
FIGURA 125 - Ampliação da região de hidrogênios dos metilenos, metoxilas e metínica do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.....	92
FIGURA 126 - Ampliação da região de hidrogênios dos metilenos e metila do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz; $^{13}\text{C}$ : 125 MHz; $\text{CDCl}_3$ ) de DS3. ....	93
FIGURA 127 - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS3.....	93
FIGURA 128 - Espectro de massas da substância DS3 .....	94
FIGURA 129 - Comparação dos espectros de RMN $^1\text{H}$ dos alcaloides Duguetina (superior) e DS3 (inferior).....	95
FIGURA 130 - Estrutura da substância oxaduguetina. ....	95
FIGURA 131 - Estrutura das substâncias submetidas aos ensaios citotóxicos. ....	97

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Espécies de Annonaceae que apresentaram atividade biológica.....	6
TABELA 2 - Alcaloides benziltetrahydroisoquinolínicos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	8
TABELA 3 - Alcaloides tetrahidroprotoberberínicos e protoberberínico isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	9
TABELA 4 - Alcaloides aporfínicos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	10
TABELA 5 - Alcaloides oxoaporfínicos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	14
TABELA 6 - Alcaloides fenantrenos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	15
TABELA 7 - Alcaloides isoquinolínicos sem subclasse definida isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	16
TABELA 8 - Alcaloides não isoquinolínicos isolados de espécies do gênero <i>Duguetia</i> .....	16
TABELA 9 - Espécies de <i>Duguetia</i> que apresentam atividade biológica.....	18
TABELA 10 - Alcaloides de <i>Duguetia</i> que apresentam atividade biológica.....	18
TABELA 12 - Reunião das frações da coluna FADSC.....	28
TABELA 13 - Reunião das frações da coluna FADSC81.....	32
TABELA 14 - Amostras enviadas para análise citotóxica.....	35
TABELA 15 - Classe de alcaloides identificados de <i>D. surinamensis</i> .....	37
TABELA 16 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS1.....	43
TABELA 17 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS2.....	49
TABELA 18 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS4.....	55
TABELA 19 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS8.....	61
TABELA 20 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS9.....	67
TABELA 21 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS5.....	72
TABELA 22 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS7.....	79
TABELA 23 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS6.....	85
TABELA 24 - Dados de RMN de $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de DS3.....	93
TABELA 25 - Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para os extratos de <i>D. surinamensis</i> .....	96
TABELA 26 - Atividade citotóxica das substâncias isoladas de <i>D. surinamensis</i> .....	97
TABELA 27 - Índice de seletividade dos alcaloides que apresentaram atividade citotóxica.....	99

## 1. Introdução

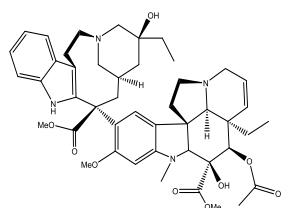
Desde a antiguidade, a cultura popular associa as plantas à cura de doenças. Devido ao avanço da ciência, as propriedades medicinais dos vegetais têm sido comprovadas e diversas substâncias isoladas a partir deles têm dado origem a fármacos amplamente comercializados. Segundo Newman & Cragg (2016), 87% de todas as enfermidades existentes podem ser tratadas com medicamentos derivados de produtos naturais, incluindo doenças causadas por bactérias, parasitas, doenças imunossupressoras e até alguns tipos de câncer. Entre os anos de 1981 a 2014 chegaram ao mercado 174 novas moléculas para o tratamento do câncer, sendo 76% delas derivadas ou inspiradas em produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2016).

O sucesso na utilização de substâncias oriundas de produtos naturais para a fabricação de fármacos tem intensificado a busca dessas substâncias por indústrias farmacêuticas desde os anos 90. Em geral, as substâncias utilizadas como princípios ativos dos fármacos são os metabólitos secundários produzidos pelas plantas. Nelas, eles podem exercer funções variadas como defesa contra predadores e atração de polinizadores, que desempenham papel vital para a sobrevivência da planta (DEWICK, 2009). Os metabólitos secundários podem ser classificados como terpenos, lignanas, taninos, esteroides, chalconas, flavonas, flavanonas, alcaloides e quinonas, dentre outros (DEWICK, 2009).

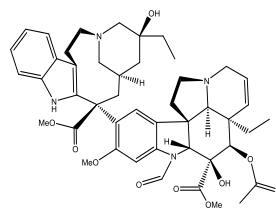
Dentre as classes de metabólitos citadas, os alcaloides têm sido amplamente utilizados como princípio ativo ou como precursores para o desenvolvimento de medicamentos, como por exemplo os quimioterápicos vimblastina (Velban<sup>®</sup>) e vincristina (Oncovin<sup>®</sup>) isolada de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don e os seus análogos vindesina (Eldisine<sup>®</sup>) e vinorelbina (Navelbine<sup>®</sup>); o paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>) isolado de *Taxus brevifolia* Nutt. e seu análogo docetaxel (Taxotere<sup>®</sup>); e a camptotecina, isolada de *Camptotheca acuminata* Decne. e os seus análogos topotecano (Hycamtin<sup>®</sup>) e irinotecano (Camptosar<sup>®</sup>) (FIGURA 1). A produção e consumo desses medicamentos movimentam cerca de 50 bilhões de dólares por ano (NEWMAN e CRAGG, 2016).

Considerando que a maior biodiversidade do planeta encontra-se no Brasil (MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, 2016), a busca por novos compostos bioativos derivados de plantas no território nacional, é plenamente justificada.

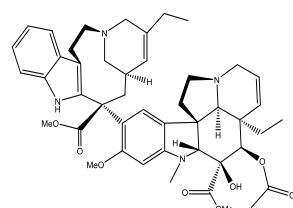
**FIGURA 1-** Alcaloides utilizados como medicamentos quimioterápicos.



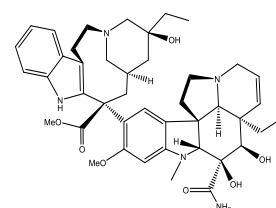
Vinblastina



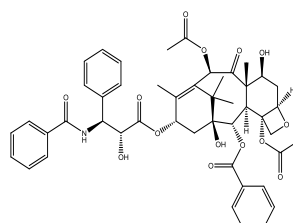
Vincristina



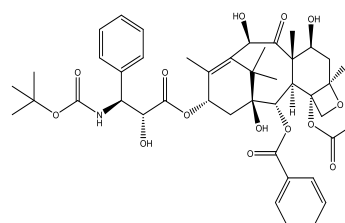
Vinorelbina



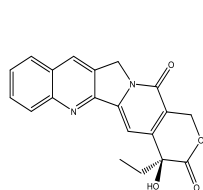
Vindesina



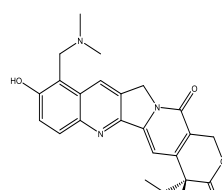
Paclitaxel



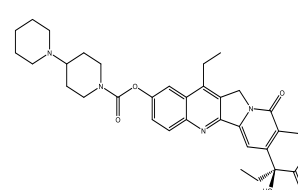
Docetaxel



Camptotecina



Topotecano



Irinotecano

Dentre as 230 mil espécies de plantas classificadas como angiosperma presentes no planeta, as pertencentes a família Annonaceae são representantes de grande importância, pois possuem mais de 2400 espécies e são distribuídas principalmente nas regiões tropicais (CHATROU *et al.*, 2012).

Mesmo sendo considerada uma família primitiva e conhecida, ainda é pequena a quantidade de estudos químicos com ênfase em seus constituintes biologicamente ativos. Porém, estudos recentes têm comprovado seu potencial no combate de células tumorais. Isso sugere que estudos com espécies dessa família são um caminho promissor na busca por medicamentos de origem vegetal. Extratos vegetais, óleos

essenciais e substâncias isoladas de espécies de Annonaceae, têm apresentado resultados relevantes quando submetidos aos testes de atividade com linhagens de células tumorais humanas (BRITTO *et al.*, 2012; FERRAZ *et al.*, 2014; FONTES *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 1999; QUINTANS *et al.*, 2013).

Dentre as muitas espécies dessa família que não possuem estudo focado em substâncias biologicamente ativas ou mesmo nos constituintes químicos, encontra-se a *Duguetia surinamensis* R. E. Fries, uma espécie endêmica da região amazônica e pouco conhecida pela população.

## 2. Revisão bibliográfica

### 2.1 A família Annonaceae Juss.

#### 2.1.1 Aspectos gerais

A família Annonaceae está entre as maiores representantes da ordem Magnoliales com aproximadamente 108 gêneros e mais de 2400 espécies (CHATROU *et al.*, 2012). Possui ocorrência pantropical (FIGURA 2), e grande parte de suas espécies apresentam-se como árvores e arvoretas (arbustos), e em poucos casos como lianas (RIBEIRO *et al.*, 2002). Cerca de 40 dos seus 108 gêneros encontram-se na região neotropical (CHATROU *et al.*, 2012), com 29 desses ocorrendo no Brasil, sendo sete endêmicos, alcançando a proximidade de 390 espécies no território nacional, e três quartos delas, presentes na região amazônica (LOPES e MELLO-SILVA, 2014). Em geral, a família pode ser reconhecida pelo odor forte de seus troncos ou ramos, pelas suas folhas dísticas (exceto no gênero *Tetrameranthus*, onde são espiraladas) e por possuir uma casca com longas e resistentes fibras, conhecidas popularmente como enviras (RIBEIRO *et al.*, 2002).

**FIGURA 2** - Distribuição geográfica da família Annonaceae. (FONTE: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/magnolialesweb.htm>)



Diversas espécies da família Annonaceae possuem destacado valor econômico, principalmente por fornecerem frutos comestíveis de sabor bastante apreciado, como as espécies do gênero *Annona*: *A. cherimola* Mill. (cherimola), *A. squamosa* L. (ata, fruta do conde ou pinha), *A. montana* Macfad. (graviola da montanha), *A. mucosa* Jacq. (biribá) e *A. muricata* L. (graviola). A pesar da notoriedade dos frutos de *Annona*, também encontram-se frutos comestíveis igualmente comercializados em outros

gêneros, como *Artabotrys*, *Asimina*, *Polyalthia*, *Uvaria* e *Duguetia*, esse último representado principalmente pelos frutos conhecidos popularmente como pindaíba (*Duguetia lanceolata*) (FORMAGIO *et al.*, 2010; LOPES E MELLO-SILVA).

Somando-se às aplicações já assinaladas, a família Annonaceae possui uma quantidade considerável de espécies que são utilizadas para fins terapêuticos na medicina popular (CRUZ *et al.*, 2009; FECHINE, I. M. *et al.*, 2002; NUNES *et al.*, 2012). No extenso território brasileiro, foi identificado o uso frequente de espécies dos gêneros *Annona*, *Guatteria* e *Xylopia*, para esses fins.

### 2.1.2 Aspectos químicos e farmacológicos

Apesar de possuir uma grande quantidade de espécies conhecidas, até 2012 apenas 150 delas (pouco mais de 6%) possuíam investigação química, taxonômica e farmacológica (LÚCIO *et al.*, 2015a).

A família Annonaceae é caracterizada quimicamente por possuir como principais metabólitos secundários os alcaloides de esqueleto isoquinolínico, os terpenos, e as acetogeninas, essa última classe encontrada somente em espécies dessa família e por isso são também chamadas de acetogeninas de anonáceas. No entanto, outras classes de metabólitos secundários podem ser encontrados em anonáceas, como substâncias aromáticas, flavonoides, catequinas, esteroides, dentre outras (LÚCIO *et al.*, 2015a; NUNES *et al.*, 2012).

Devido à sua composição química rica em alcaloides, acetogeninas e terpenos, as espécies de Annonaceae têm apresentado resultado promissor quando submetidas a ensaios de atividade biológica dos mais diversos tipos. Foi constatado que o extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora* Mart., apresenta atividade antimicrobiana contra *Stafilococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, e *Candida albicans* (LAGE, 2011). Santos, Pimenta, e Boaventura (2007), isolaram as acetogeninas esquamocina-L e esquamocina-D do extrato etanólico das sementes de *A. cornifolia*, que apresentaram atividade larvicida quando testadas com o microcústacio *Artemia salina*. Os extratos metanólicos de folhas e caules de *A. crassiflora*, *Annona coriacea* Mart., *Annona dioica* A. St. Hil. e *Annona sylvatica* A. St.-Hil. apresentaram caráter alelopático, reduzindo a porcentagem de germinação e vigor da semente de



alface, afetando negativamente o tempo médio de germinação (FORMAGIO *et al.*, 2010).

O extrato etanólico do talo e o extrato hexânico das folhas do híbrido Atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*), apresentaram atividade antioxidante. Além desta, o extrato etanólico do talo e o extrato metanólico de folha apresentaram atividade antimicrobiana (RABÊLO, 2014).

Somando-se às propriedades já elencadas, os extratos brutos obtidos dos exemplares dessa família, seus óleos essenciais e as substâncias isoladas a partir destes, têm apresentado excelentes resultados frente a diversas linhagens de células tumorais. Os extratos brutos das espécies *Annona pickelii* (Diels) H. Rainer, e *A. salzmannii* (RIBEIRO *et al.*, 2012) e os óleos essenciais de *Guatteria pogonopus* Mart. (FONTES *et al.*, 2013), *X. laevigata* (QUINTANS *et al.*, 2013) *Guatteria friesiana* (BRITTO *et al.*, 2012), *Guatteria blepharophylla* Mart. e *Guatteria hispida* (R.E. Fr.) Erkens & Maas obtiveram efeitos relevantes frente aos testes antitumorais realizados (FERRAZ *et al.*, 2014; RIBEIRO *et al.*, 2012).

Abaixo, encontra-se um resumo das atividades biológicas encontradas em algumas espécies da família Annonaceae.

**TABELA 1-** Espécies de Annonaceae que apresentaram atividade biológica.

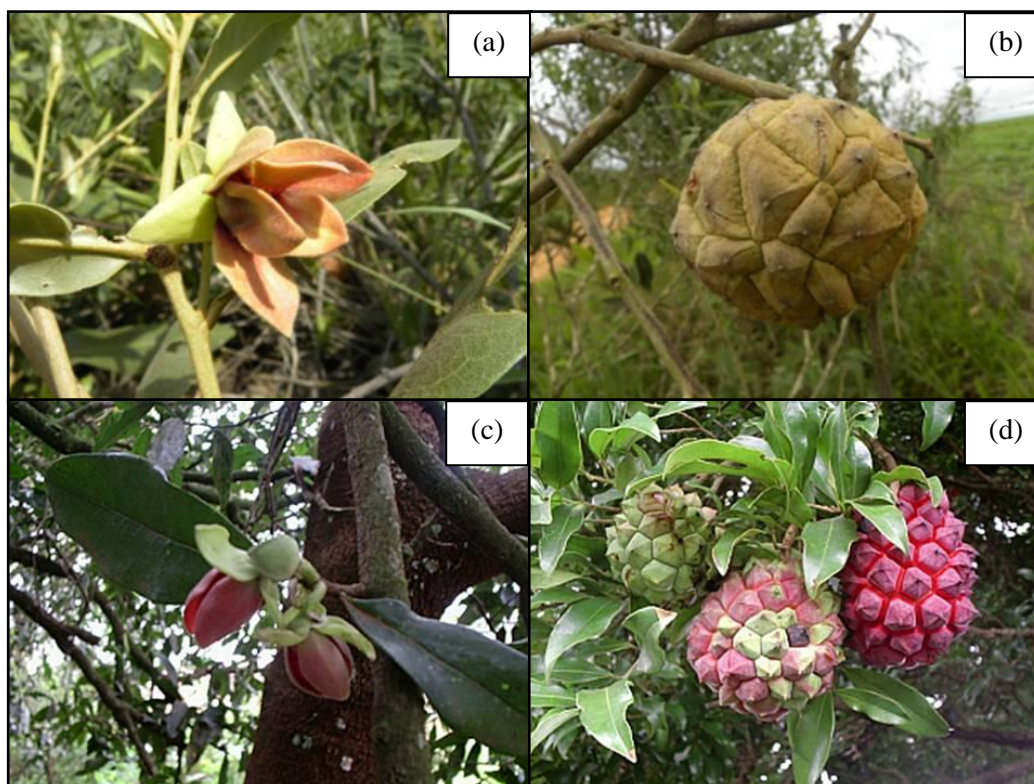
<b>Espécie</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Referência</b>
<i>Annona crassiflora</i>	Antimicrobiana	(LAGE, 2011)
	Citotóxica	
	Antioxidante	
<i>Annona coriácea</i>	Caráter alelopático	(FORMAGIO <i>et al.</i> , 2010)
	Caráter alelopático	(FORMAGIO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Annona dioica</i>	Caráter alelopático	(FORMAGIO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Annona sylvatica</i>	Caráter alelopático	(FORMAGIO <i>et al.</i> , 2010)
<i>Annona cornifolia</i>	Larvicida	(SANTOS, PIMENTA e BOAVENTURA, 2007)
<i>Annona atemoia</i>	Antioxidante	(RABELO, 2014)
	Antimicrobiana	
<i>Annona pickelii</i>	Antitumoral	(RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Annona salzmannii</i>	Antitumoral	(RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Xylopiia laevigata</i>	Antitumoral	(QUINTANS <i>et al.</i> , 2013)
<i>Guatteria blepharophylla</i>	Antitumoral	(RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Guatteria hispida</i>	Antitumoral	(RIBEIRO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Guatteria friesiana</i>	Antitumoral	(BRITTO <i>et al.</i> , 2012)
<i>Guatteria pogonopus</i>	Antitumoral	(FONTES <i>et al.</i> , 2013)

## 2.2 O gênero *Duguetia* A. St.-Hil.

### 2.2.1 Aspectos Gerais

O gênero *Duguetia* A. St.-Hil. pertence à tribo Duguetiae e é representado por aproximadamente 90 espécies, com ocorrência de 66 delas no Brasil, sendo 29 endêmicas. Seus exemplares podem ser encontrados também da Nicarágua ao Paraguai e quatro espécies foram observadas na costa oeste da África. As espécies desse gênero podem ser árvores ou arbustos e são reconhecidos por seus tricomas que se diferenciam dos demais gêneros da família por serem estrelados ou escamiformes. Seus frutos podem ser carnosos ou lenhosos, e assim como os frutos do gênero *Annona*, têm cardípios agregados. A espécie mais comum no Brasil é a *Duguetia furfuracea* (A.St.-Hil.) Saff., sendo distribuída no Cerrado e na Caatinga (LOPES E MELLO-SILVA, 2014).

**FIGURA 3** - Flores (a) e frutos(b) de *Duguetia furfuracea* e flores (c) e frutos (b) de *Duguetia lanceolata* (respectivamente), duas das espécies mais abundantes no Brasil. (FONTE: <http://www.colecionandofrutas.org/duguetiafurfuracea.htm> e <http://www.colecionandofrutas.org/duguetialanceolata.htm>)



## 2.2.2 Aspectos químicos

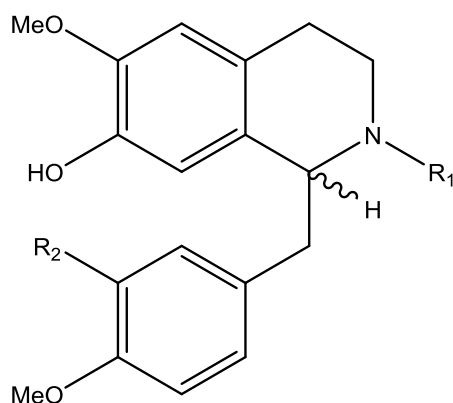
O gênero *Duguetia*, não está entre os gêneros mais estudados fitoquimicamente sendo precedido pelos gêneros *Annona*, *Goniothalamus*, *Monodora*, *Uvaria* e *Xylopi* (CUNHA, 2009). Contudo, mesmo em face da pouca investigação científica, observa-se que suas características químicas são semelhantes aos demais gêneros da família.

Os alcaloides com esqueleto isoquinolínico estão entre os metabólitos secundários mais encontrados no gênero, porém outros tipos de esqueletos de alcaloides também foram identificados, além de outras classes de substâncias. Os alcaloides identificados em espécies do gênero *Duguetia* até o presente momento, estão apresentados nas TABELAS 2 a 8 e nas FIGURAS 4 a 10.

**TABELA 2** - Alcaloides benziltetrahydroisoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie	Referência
Codamina <i>N</i> -óxido	1	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1987)
Reticulina	2	<i>D. trunciflora</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)

**FIGURA 4** - Estrutura dos alcaloides benziltetrahydroisoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

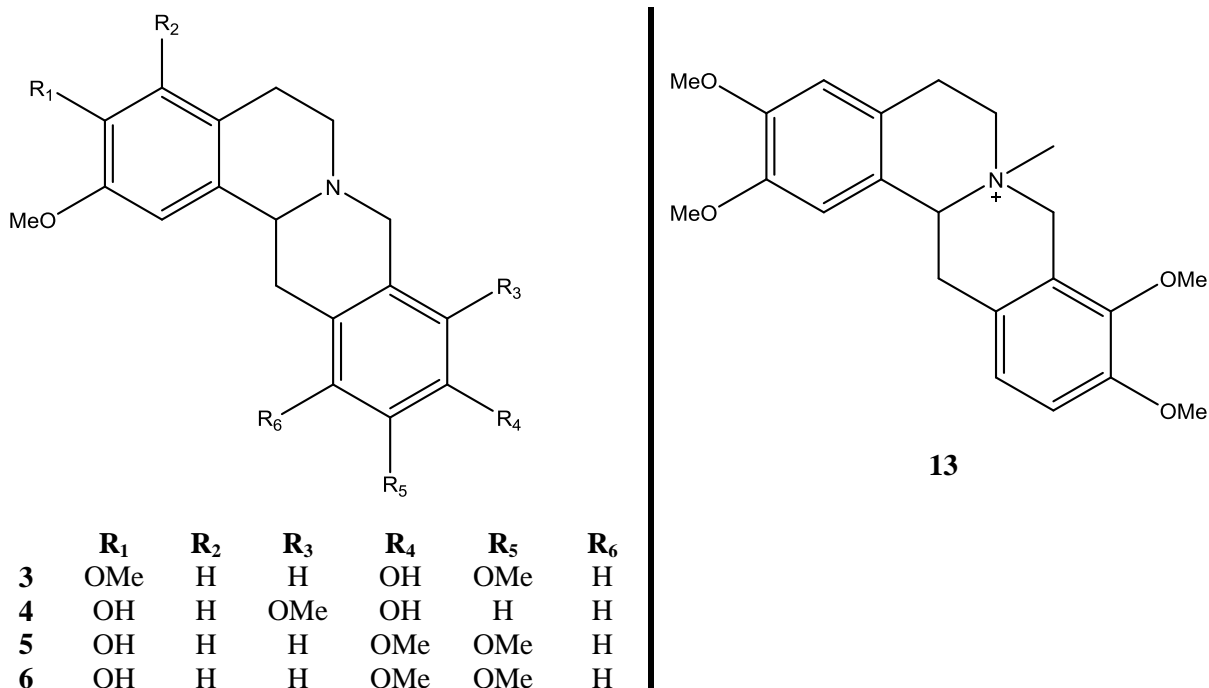


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1	<i>N</i> -óxido	OMe
2	Me	OH

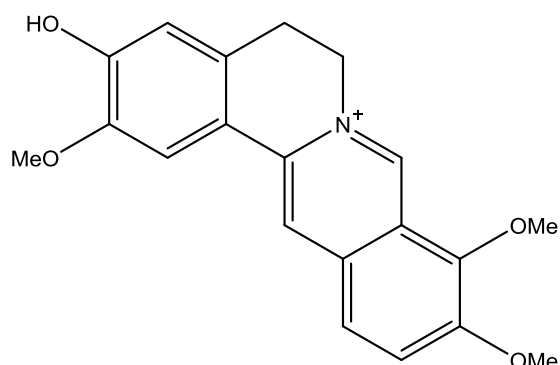
**TABELA 3** - Alcaloides tetrahidroprotoberberínicos e protoberberínico isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie	Referências
10-Demetilxylopinina	3	<i>D. calycina</i>	(LEBOEUF <i>et al.</i> , 1980)
Discretamina	4	<i>D. gardneriana</i>	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2007)
Discretina	5	<i>D. obovata</i>	(ROBLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
(-)-Discretina	6	<i>D. obovata</i>	(ROBLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
3-Hidroxi-2,9,10-trimetoxitetrahidroprotoberberina	7	<i>D. stelichantha</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Spiduxina	8	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Tetrahydrojatrorrizina	9	<i>D. gardneriana</i>	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2007)
Tetrahidropalmatina	10	<i>D. gardneriana</i>	(ALMEIDA <i>et al.</i> , 2007)
(-)-Tetrahidropalmatina	11	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIWFY, HOCQUEMILLER e Cave, 1987)
Thaicantina	12	<i>D. trunciflora</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
<i>N</i> -metiltetrahidropalmatina	13	<i>D. furfuracea</i>	(SILVA <i>et al.</i> , 2009)
Jatrorrhizina	14	<i>D. trunciflora</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)

**FIGURA 5** - Estrutura dos alcaloides tetrahidroprotoberberínicos e protoberberínico isolados de espécies do gênero *Duguetia*.



7	OH	H	OMe	OMe	H	H
8	OMe	H	H	OMe	OH	CHO
9	OH	H	OMe	OMe	H	H
10	OMe	H	OMe	OMe	H	H
11	OMe	H	OMe	OMe	H	H
12	OMe	OH	OMe	OMe	H	H



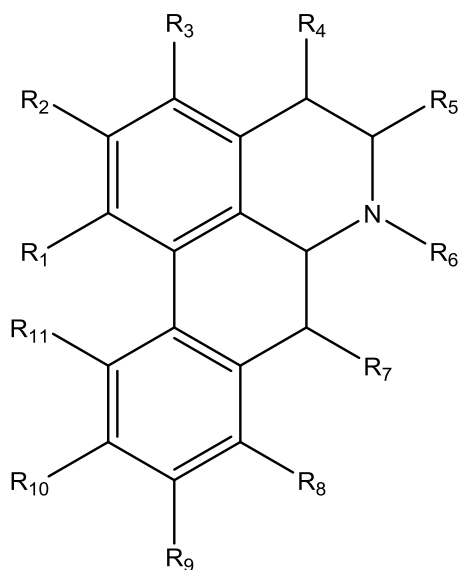
**14**  
(protoberberínico)

**TABELA 4** - Alcaloides aporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie	Referência
(-)-Anolobina	15	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
(-)-Anonaina	16	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987)
(-)-Buxifolina	17	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
Calycinina	18	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
Duguevanina	19	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
(-)-Duguevanina	20	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
(-)- <i>N</i> -formilbuxifolina	21	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER e CAVÉ, 1983)
(-)- <i>N</i> -formilduguevanina	22	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
(-)- <i>N</i> -formilxylopina	23	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
(-)-3-Hidroxinornuciferina	24	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987)
(-)-Isolaurelina	25	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
Isopilina	26	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
<i>N</i> -metilasimilobina	27	<i>D. spixiana</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
(-)- <i>N</i> -metilbuxifolina	28	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
(-)- <i>N</i> -metilcalycinina	29	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
(-)- <i>N</i> -metiduguevanina	30	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
<i>O</i> -metilisopilina	31	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987)
(-)- <i>O</i> -metilisopilina	32	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
<i>N</i> -metilputerina	33	<i>D. calycina</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
<i>N</i> -nitrosoanonaina	34	<i>D. furfuracea</i>	(CAROLLO <i>et al.</i> , 2006)
<i>N</i> -nitrosoxylopina	35	<i>D. furfuracea</i>	(CAROLLO <i>et al.</i> , 2006)
Nornuciferina	36	<i>D. flagellaris</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
(-)-Nornuciferina	37	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
Obovanina	38	<i>D. calycina</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Puterina	39	<i>D. calycina</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Xylopina	40	<i>D. calycina</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
(-)-Xylopina	41	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)

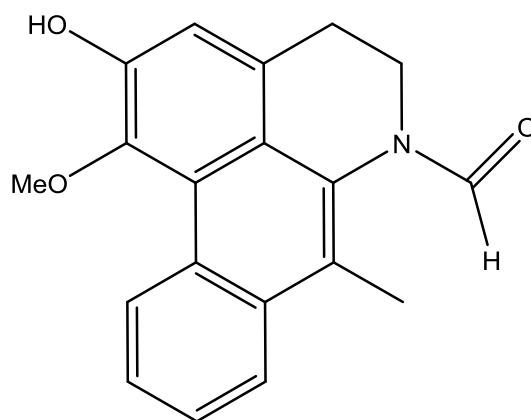
<b>Alcaloide (Continuação)</b>	<b>Nº</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referência</b>
Duguecalina	42	<i>D. calycina</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Duguenaina	43	<i>D. calycina</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Duguetina	44	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
(-)-Duguetina	45	<i>D. furfuracea</i>	(VALÉRIA <i>et al.</i> , 2014)
(-)-Duguetina <i>N</i> -óxido	46	<i>D. furfuracea</i>	(VALÉRIA <i>et al.</i> , 2014)
Duguxina	47	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
(-)-Duguxina	48	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIWFY, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Duguxina <i>N</i> -óxido	49	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Nornuciferidina	50	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIWFY, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Noroliveridina	51	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
(-)-Noroliveridina	52	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIWFY, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Norpachyconfina	53	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Oliveridina	54	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
(-)-Oliveridina	55	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIWFY, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Oliveridina <i>N</i> -óxido	56	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIWFY, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Oliverolina	57	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
(-)-Oliverolina	58	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
Oliverolina <i>N</i> -óxido	59	<i>D. flagellaris</i>	(FECHINE, I. M. <i>et al.</i> , 2002)
Pachyconfina	60	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Pachyconfina <i>N</i> -óxido	61	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
(+)-Pachypodanthina	62	<i>D. flagellaris</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Polyalthina	63	<i>D. glabriuscula</i>	(SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2001)
Roemerolidina	64	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIWFY, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Rurrebanidina	65	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Rurrebanina	66	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Spixianina	67	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Spixianina <i>N</i> -óxido	68	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987))
Duguespoxina	69	<i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)

**FIGURA 6** - Estrutura dos alcaloides aporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.



	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>	R <sub>11</sub>
15	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	H	OH	H	H	H	H
16	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
17	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	H	H	H	OMe	H	H	H	H
18	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	H	OMe	H	H	H	OH
19	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	H	H	H	OMe	H	H	H	OH
20	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	H	H	H	OMe	H	H	H	OH
21	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	H	H	CHO	OMe	H	H	H	H
22	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	H	H	CHO	OMe	H	H	H	OH
23	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	CHO	OMe	H	H	H	H
24	OMe	OMe	OH	H	H	H	H	H	H	H	H
25	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	Me	OMe	H	H	H	H
26	OH	OMe	OMe	H	H	H	H	H	H	H	H
27	OMe	OH	H	H	H	Me	H	H	H	H	H
28	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	H	H	Me	OMe	H	H	H	H
29	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	Me	OMe	H	H	H	OH
30	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	H	H	Me	OMe	H	H	H	OH
31	OMe	OMe	OMe	H	H	H	H	H	H	H	H
32	OMe	OMe	OMe	H	H	H	H	H	H	H	H
33	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	Me	H	H	H	H	OMe
34	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	NO	H	H	H	H	H
35	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	NO	OMe	H	H	H	H
36	OMe	OMe	H	H	H	H	H	H	H	H	H
37	OMe	OMe	H	H	H	H	H	H	H	H	H
38	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	H	H	H	H	H	OH
39	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	H	H	H	H	H	OMe

(Cont.)	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>	R <sub>8</sub>	R <sub>9</sub>	R <sub>10</sub>	R <sub>11</sub>
40	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	H	OMe	H	H	H	H
41	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	H	OMe	H	H	H	H
42	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	OAc	β-OMe	H	H	H	H
43	OMe	OH	H	H	H	H	α-OH	H	H	H	H
44	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	β-OH	H	OMe	OMe	H
45	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	β-OH	H	OMe	OMe	H
46	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	<i>N</i> -óxido	β-OH	H	OMe	OMe	H
47	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	H	H	H	H	OH
48	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	H	H	H	H	OH
49	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	<i>N</i> -óxido	H	H	H	H	OH
50	OMe	OMe	H	H	H	H	OH	H	H	H	H
51	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	H	β-OH	H	OMe	H	OH
52	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	H	β-OH	H	OMe	H	OH
53	OMe	OH	H	H	H	H	OH	H	H	H	H
54	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	β-OH	H	OMe	H	H
55	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	β-OH	H	OMe	H	H
56	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	<i>N</i> -óxido	β-OH	H	OMe	H	H
57	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	β-OH	H	OMe	OMe	H
58	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	β-OH	H	OMe	OMe	H
59	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	<i>N</i> -óxido	β-OH	H	H	H	H
60	OMe	OH	H	H	H	Me	β-OH	H	H	H	H
61	OMe	OH	H	H	H	<i>N</i> -óxido	β-OH	H	H	H	H
62	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	H	β-OMe	H	H	H	H
63	OCH <sub>2</sub> O		OMe	H	H	Me	β-OH	H	OMe	H	H
64	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	OH	H	OH	H	H
65	OMe	OMe	OH	H	H	H	OH	H	H	H	H
66	OMe	OMe	OMe	H	H	H	OH	H	H	H	H
67	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	Me	OH	H	OMe	H	OH
68	OCH <sub>2</sub> O		H	H	H	<i>N</i> -óxido	OH	H	OMe	H	OH



69

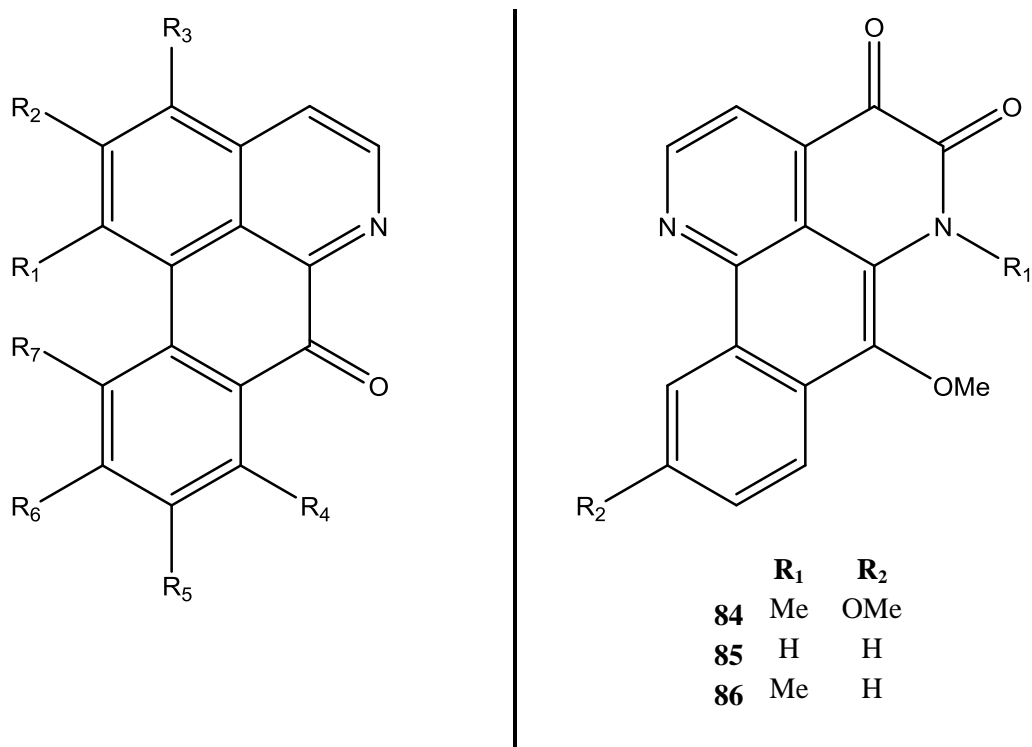
(Dehidroporfínico)



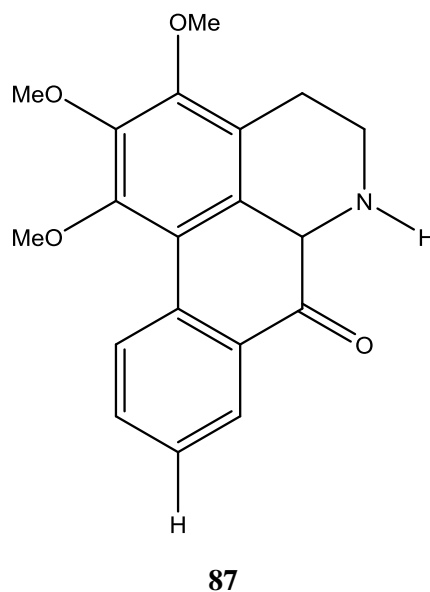
**TABELA 5** - Alcaloides oxaporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie	Referências
Atherospermidina	70	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
Dicentrinona	71	<i>D. furfuracea</i>	(SILVA <i>et al.</i> , 2009)
Duguevallina	72	<i>D. vallicola</i>	(PÉREZ <i>et al.</i> , 2004)
11-Hidroxiliriodenina	73	<i>D. eximia</i>	(GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1978)
11-Hidroxi-1,2-metilenedioxioxoaporfina	74	<i>D. eximia</i>	(GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1978)
Lanuginosina	75	<i>D. glabriuscula</i>	(SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2001)
(+)-Lanuginosina	76	<i>D. glabriuscula</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Liriodenina	77	<i>D. riparia</i>	(CUNHA, 2009)
Lysicamina	76	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIWFY, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
11-Metoxi-1,2-metilenedioxioxoaporfina	79	<i>D. eximia</i>	(GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1978)
O-metilmoschatolina	80	<i>D. eximia</i>	(GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1978)
Oxobuxifolina	81	<i>D. glabriuscula</i>	(SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2001)
Oxopukateina	82	<i>D. eximia</i>	(GOTTLIEB <i>et al.</i> , 1978)
Oxoputerina	83	<i>D. calycina</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Hadranthina A	84	<i>D. hadrantha</i>	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
Hadranthina B	85	<i>D. hadrantha</i>	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
Imbilina I	86	<i>D. hadrantha</i>	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
1,2,3-trimetoxioxoaporfina	87	<i>D. stelechantha</i>	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)

**FIGURA 7** - Estrutura dos alcaloides oxaporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.



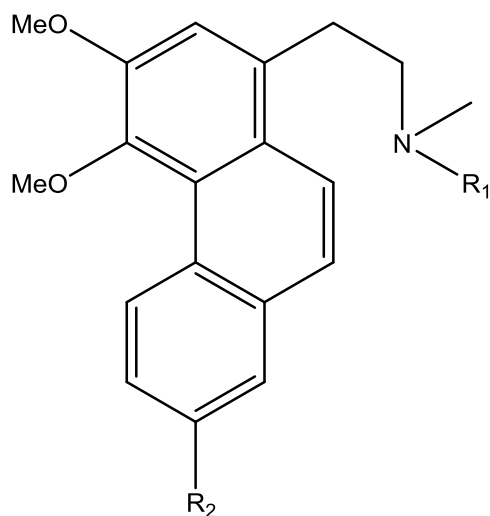
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>	R <sub>7</sub>
70	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	H	H	H	H
71	OCH <sub>2</sub> O	H	H	OMe	OMe	H	H
72	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	OMe	H	OH	OH
73	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	OH	OH
74	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	OH	OH
75	OCH <sub>2</sub> O	H	H	OMe	H	H	H
76	OCH <sub>2</sub> O	H	H	OMe	H	H	H
77	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	H	H
78	OMe	OMe	H	H	H	H	H
79	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	OMe	OMe
80	OMe	OMe	OMe	H	H	H	H
81	OCH <sub>2</sub> O	OMe	H	OMe	H	H	H
82	OH	OMe	H	OMe	OMe	H	H
83	OCH <sub>2</sub> O	H	H	H	H	OMe	OMe



**TABELA 6** - Alcaloides fenantrenos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Espécie	Referência
Atherospeminina	88 <i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Atherospeminina <i>N</i> -óxido	89 <i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)
Metoxiatherospeminina	90 <i>D. spixiana</i>	(DEBOURGES, ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVE, 1987)

**FIGURA 8** - Estrutura dos alcaloides fenantrenos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

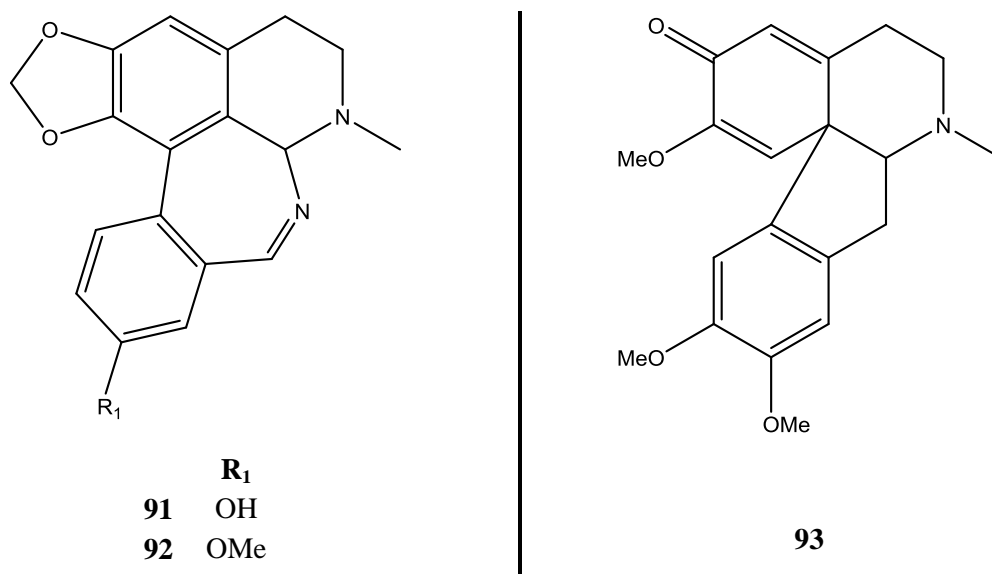


	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>88</b>	Me	H
<b>89</b>	<i>N</i> -óxido	H
<b>90</b>	Me	OMe

**TABELA 7** - Alcaloides isoquinolínicos sem subclasse definida isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie	Referência
Spiguetidina	91	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987)
Spiguetina	92	<i>D. spixiana</i>	(RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987)
Probovatina	93	<i>D. obovata</i>	(LEBOEUF <i>et al.</i> , 1980)

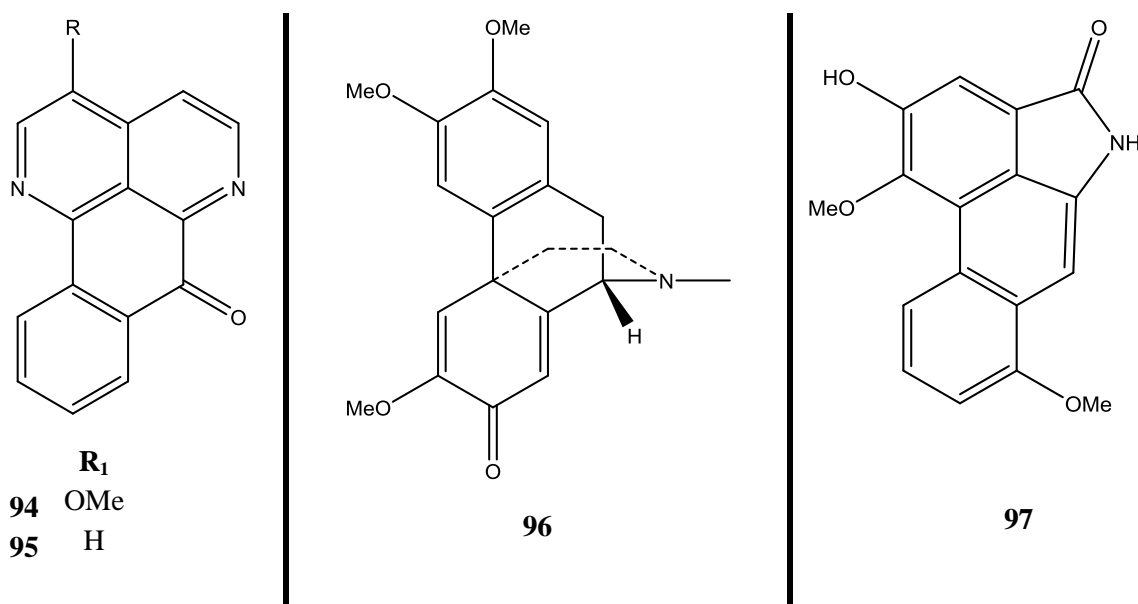
**FIGURA 9** - Estrutura dos alcaloides isoquinolínicos de subclasses pouco observadas em de espécies do gênero *Duguetia*.



**TABELA 8** - Alcaloides não isoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide		Espécie	Referência
3-Metoxisampangina	94	<i>D. hadrantha</i>	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
Sampangine	95	<i>D. hadrantha</i>	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
(9S)-Sebiferine	96	<i>D. obovata</i>	(ROBLLOT, HOCQUEMILLER E CAVÉ, 1983)
Cleistopholine	97	<i>D. vallicola</i>	(PÉREZ <i>et al.</i> , 2004)

**FIGURA 10** - Estrutura dos alcaloides não isoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.



### 2.2.3 Atividade biológica

Semelhantemente aos demais gêneros de Annonaceae, o gênero *Duguetia* tem apresentado bons resultados quando submetidos a testes de atividade biológica.

O extrato hexânico de *Duguetia riparia*, apresentou atividade antioxidante, antitumoral e atividade leishmanicida quando testado contra *Leishmania amazonensis*. Seu extrato metanólico e sua fração alcaloídica apresentaram atividade leishmanicida e antioxidante (CUNHA, 2009).

O extrato metanólico das folhas de *D. furfuracea* apresentou atividade anti-inflamatória com baixa toxicidade (SANTOS *et al.*, 2018) e além disso, quando testado seu caráter alelopático, o extrato metanólico de *D. furfuracea* também reduziu a porcentagem de germinação da semente de alface, e vigor da mesma, porém com maior influência que as espécies do gênero *Annona* (FORMAGIO *et al.*, 2010).

Diversos extratos vegetais e extratos obtidos de fungos endofíticos das folhas, galhos e flagelos de *D. flagellaris* apresentaram atividade antitumoral para células tumorais de HTC116 (côlon) e MCF-7 (mama) e atividade antimicrobiana quando confrontados com cepas de *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* (OLIVEIRA, 2013).

O óleo essencial das folhas de *D. gardneriana*, apresentou atividade citotóxica *in vitro* quando testado contra as células tumorais B16-F10, HepG2, HL-60 e K562

apresentando  $CI_{50}$  igual a 16,89, 19,16, 13,08 e 19,33  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente para as células tumorais citadas. O mesmo óleo apresentou também atividade antitumoral *in vivo*, inibindo células tumorais em ratos (RODRIGUES *et al.*, 2015).

Abaixo, pode-se observar um resumo das atividades biológicas de espécies do gênero *Duguetia*.

**TABELA 9** - Espécies de *Duguetia* que apresentam atividade biológica.

<b>Espécie</b>	<b>Atividade biológica</b>	<b>Referência</b>
<i>D. riparia</i>	Leishmanicida Antioxidante	(CUNHA, 2009)
<i>D. fufuracea</i>	Anti-inflamatória	(SANTOS <i>et al.</i> , 2018)
<i>D. fufuracea</i>	Caráter alelopático	(FORMAGIO <i>et al.</i> , 2010)
<i>D. vallicola</i>	Antiplasmódica	(PÉREZ <i>et al.</i> , 2004)
<i>D. flagellaris</i>	Antitumoral Antimicrobiana	(OLIVEIRA, 2013)
<i>D. gardneriana</i>	Citotóxica	(RODRIGUES <i>et al.</i> , 2015)

Além das atividades verificadas em extratos e óleos de espécies de *Duguetia*, uma ampla faixa de propriedades biológicas foi observada para os alcaloides isolados no gênero, conforme segue a tabela abaixo:

**TABELA 10** - Alcaloides de *Duguetia* que apresentam atividade biológica.

<b>Alcaloide</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
Atherospermidina	Anticâncer	(WIJERATNE, KITHSIRI E. M. HATANAKA <i>et al.</i> , 1996)
Cleistopholina	Antiplasmódico	(PÉREZ <i>et al.</i> , 2004)
<i>S</i> -(+)-Dicentrina	Analgésica	(MIGUEL <i>et al.</i> , 2016)
Discretamina	Antinocicetive	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Duguetina	Antileishmania	(SILVA <i>et al.</i> , 2009)
	Citotóxico	
Hadranthina A	Tripanocida	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
	Antimalárico	
Hadranthina B	Citotóxico	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
10-Hidroxiliriodenina	Citotóxico	(HARRIGAN <i>et al.</i> , 1994)
(-)-3-Hidroxinornuciferina	Tripanocida	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
Liriodenina	Analgésico	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
	Antibactéria	
	Sedativa	
Liriodenina	citotóxico	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
	antileishmania	
	anticâncer	(HARRIGAN <i>et al.</i> , 1994)

<b>Alcaloide (Continuação)</b>	<b>Atividade Biológica</b>	<b>Referência</b>
Liriodenina	tripanocida	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
	antiploriferato	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
3-Metoxisampangina	antifúngico, antimalárico	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
<i>N</i> - metiltetrahidropalmatina	antileshimania	(SILVA <i>et al.</i> , 2009)
(-)-Nornuciferina	antileshimania	(MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2003)
	antidepressivo	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
	inibdor de CD45 tirosine fosfatase	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
(-)-Oliverolina	antiplasmódico	(PÉREZ <i>et al.</i> , 2004)
Reticulina	analgésico	(LÚCIO <i>et al.</i> , 2015b)
	antimicrobiano	
	bloqueador de receptor de dopamina	
	espasmolítico	
	estimulante de CNS	
Sampangina	antifungico	(MUHAMMAD <i>et al.</i> , 2001)
	antimalárico	
	citotóxico	
Xylopina	antitumoral	(PÉREZ <i>et al.</i> , 2004)
	antileshimania	(MONTENEGRO <i>et al.</i> , 2003)

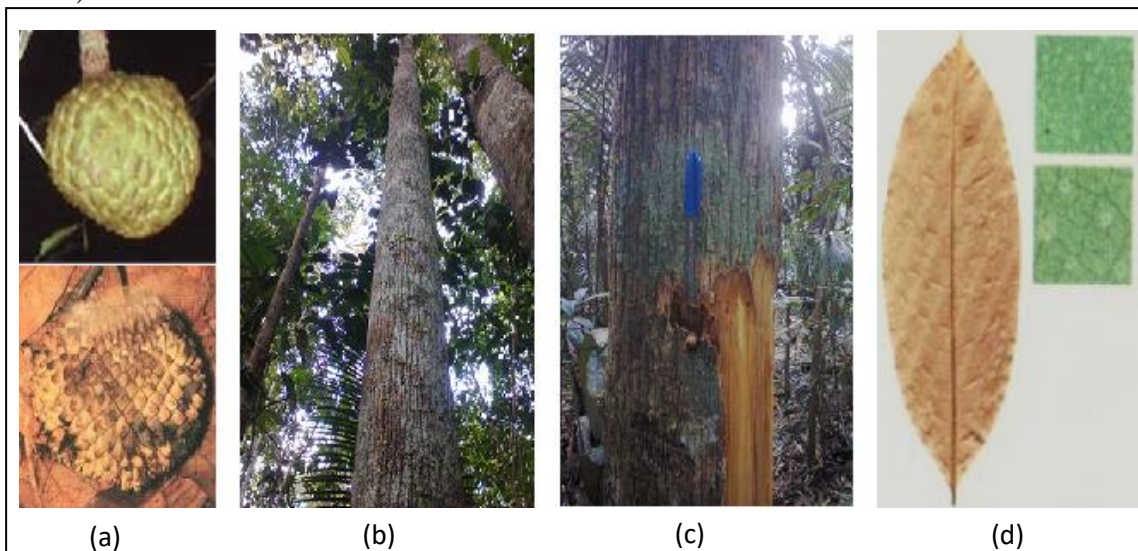
Esses resultados por si só justificam a continuidade do estudo das espécies do gênero *Duguetia*, em especial os estudos com a *D. surinamensis*, que é endêmica da região amazônica e desconhecida na literatura em relação aos seus constituintes químicos e propriedades biológicas, o que torna esse estudo inédito para a espécie.

### 2.3 A espécie *Duguetia surinamensis* R. E. Fries

Por tratar-se de uma espécie pouco estudada e pouco conhecida popularmente, a *D. surinamensis* recebe os mesmos nomes de outras espécies da família, devido a semelhança de seus frutos, podendo ser chamada de ‘araticum’, ‘ata braba’ e ‘biribarana’. A *D. surinamensis* possui como sinonímia a *Duguetia caudata* R.E. Fr, porém, mesmo ela, não apresenta estudos fitoquímicos, nos principais bancos de dados. É uma árvore de platô e vertente, com ocorrência na Colômbia, em toda a região amazônica e nas Guianas. Suas folhas possuem uma nervura central impressa e seus frutos são semelhantes aos conhecidos como pindaíba (FIGURA 11). Esses possuem coloração esverdeada quando maduros e mesmo depois de amadurecidos e caídos,

duram um longo tempo próximo à árvore que o gerou, facilitando a identificação da mesma (FIGURA 11) (RIBEIRO, 1999).

**FIGURA 11** - Características botânicas de *D. surinamensis* (a) fruto em processo de amadurecimento e amadurecido caído; (RIBEIRO, 1999) (b) caule da árvore; (COSTA, 2015). (c) caule e casca fibrosa; (COSTA, 2015). (d) folha seca e verde (RIBEIRO, 1999).



## 2.4 Ensaios de Citotoxicidade

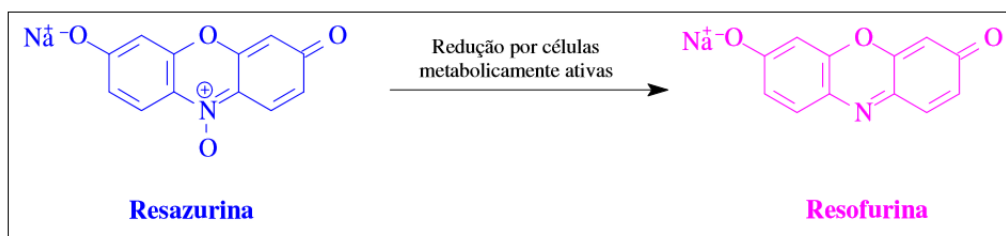
A denominação câncer é feita a um grupo de mais de 100 doenças, que tem por similaridade a multiplicação desordenada de células que adentram em tecidos e órgãos, podendo ser inclusive disseminadas para outros órgãos e outras regiões do corpo. Esse crescimento muito acelerado e desordenado provoca a formação de tumores malignos, também chamados de neoplastia maligna (INCA, 2015).

Dentre as diversas classes de produtos naturais, os alcaloides, terpenos e acetogeninas, metabólitos característicos de Annonaceae, conforme já citados anteriormente, tem demonstrado atividade citotóxica promissora.

Diversos testes já foram desenvolvidos com esse fim, e os colorimétricos se destacam pela sua confiabilidade, seu baixo custo e agilidade na obtenção de resultados quanto à capacidade citotóxica apresentada por determinada amostra (ESCOBAR, ALFONSO e ARISTIZÁBAL, 2009). Conhecer as propriedades citotóxicas de uma matriz complexa pode facilitar no direcionamento das ações a serem tomadas no decorrer da pesquisa.

Os ensaios colorimétricos utilizados avaliam a diminuição da proliferação celular ou citotoxicidade ( $CI_{50}$ ) frente à amostra. O teste colorimétrico do Alamar Blue é bastante difundido, pois é realizado num processo relativamente simples e permite a análise de um grande número de amostras. O Alamar blue (resazurina) é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Quando em seu estado fundamental, a resazurina apresenta coloração azul não fluorescente, indicando a presença de células não-viáveis, enquanto que a forma reduzida é rósea fluorescente, indicando célula viável (FIGURA 12). Por muitos anos, esse ensaio com resazurina, foi utilizado para monitorar a contaminação do leite por bactéria ou levedura, sendo posteriormente utilizado também para quantificação da proliferação celular e de citotoxicidade em diversas células (ESCOBAR, ALFONSO e ARISTIZÁBAL, 2009).

**FIGURA 12** - Reação de oxirredução da resazurina. (FONTE: MENEZES, 2015).





### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo geral**

- Estudar a composição química das cascas do caule de *D. surinamensis* e investigar o potencial anticâncer *in vitro* das substâncias isoladas a partir dessa espécie.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Realizar o estudo fitoquímico das cascas do caule de *D. surinamensis*;
- Isolar e identificar os constituintes químicos dos extratos brutos hexânico e/ou metanólico bioativos das cascas do caule de *D. surinamensis*;
- Analisar o perfil químico dos extratos brutos das cascas do caule de *D. surinamensis* por métodos espectroscópicos e espectrométricos;
- Submeter aos ensaios de atividade citotóxica *in vitro*, os extratos brutos das cascas do caule de *D. surinamensis*, bem como suas frações e substâncias isoladas destes.

## **4. Metodologia**

### **4.1 Cromatografia em coluna (CC)**

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro aberta, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) da Macherey-Nagel tratada previamente com solução de bicarbonato de sódio 10% (NaHCO<sub>3</sub>) (COSTA *et al.*, 2011). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem cromatografadas. A proporção de sílica utilizada nas separações foi de 20 vezes a massa do produto bruto a ser purificado, e a das pastilhas, 2 vezes (MATTOS, 1997).

### **4.2 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)**

As análises por cromatografia em camada delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas Fluka, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>, com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura.

### **4.3 Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)**

As análises em escala preparativa foram desenvolvidas em cromatoplasmas de vidro impregnada com sílica gel, com tamanho 20 x 20 cm com espessura de sílica de 1,0 mm. As placas foram preparadas usando 21 g de sílica gel 60 para preparativa com fluorescência F<sub>254</sub> da marca Macherey-Nagel e 60 mL de água destilada. Após a evaporação da água à temperatura ambiente foram ativadas em estufa a 100 °C por uma hora. A recuperação das amostras foi efetuada utilizando como solventes diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), metanol (MeOH) e/ou misturas destes.

### **4.4 Reveladores**

A revelação das faixas (*spots*) nas CCDA e CCDP foi feita sob luz ultravioleta 254 e 365 nm, solução de anisaldeído (revelador para terpenoides), e reagente de Dragendorff (revelador para alcaloides).

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

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

#### 4.5 Solventes

Para todas as técnicas cromatográficas foram utilizados solventes das marcas Hexis, J. T. Baker e Qhemis. Para obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados da marca Tédia Brasil. Para obtenção dos espectros de massas foram utilizados solventes grau HPLC marca Tedia Brasil.

#### 4.6 Equipamentos

Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bi-dimensionais (RMN 1D/2D) foram registrados em um aparelho Bruker Avance III 500 operando a 11,75 Tesla, (500,13 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e 125,76 MHz para RMN de  $^{13}\text{C}$ ), da Central Analítica da UFAM. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *d* (duplete), *dd* (duplo duplete), *ddd* (duplo duplete), *t* (triplete), *dt* (duplo triplete), *m* (multiplete). As constantes de acoplamento (*J*) foram registradas em Hertz (Hz);

Os espectros de massas das substâncias isoladas foram adquiridos em um espectrômetro LQC Fleet (Thermo Scientific) pertencente à Central Analítica da UFAM, com analisador de massas do tipo *ion trap* e equipado com uma fonte de eletrospray (ESI) programada para operar no modo positivo de aquisição.

Foram utilizados para realização dos procedimentos em bancada um evaporador rotativo com banho-maria com temperatura controlada da marca Fisatom Brasil, uma estufa incubadora da marca DeLeo, balança analítica da marca Adventure Ohaus, balança semi-analítica da marca Adventure Ohaus e pHmetro portátil modelo Jenway 350.

#### **4.7 Coleta do material vegetal**

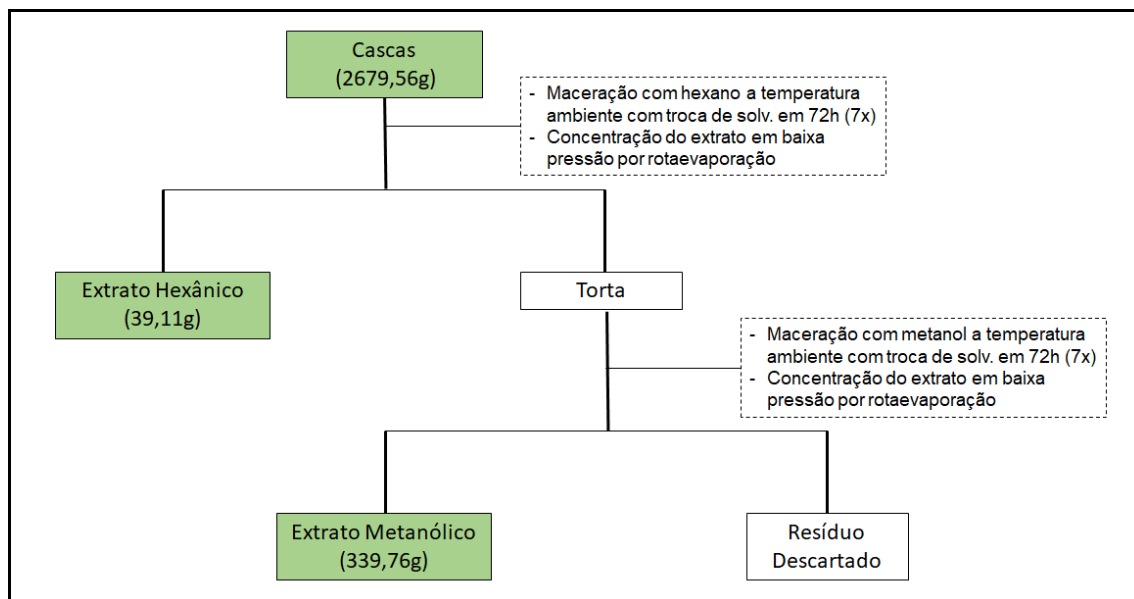
As cascas do caule de *D. surinamensis* foram coletadas no dia 24 de junho de 2015 na Reserva Florestal Adolpho Ducke (coordenadas S 02° 55' 37.4" e W 059° 58' 36.0"), próxima à cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. A espécie foi identificada pelos botânicos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Uma exsicata (número 267893) da espécie foi depositada no Herbário do próprio INPA.

#### **4.8 Preparo dos extratos**

As cascas do caule de *D. surinamensis* foram colocadas para secar à temperatura ambiente, sendo posteriormente, transferidas para uma estufa de ar circulante a 45 °C. Depois de secas, foram moídas em moinho de facas e a sua massa foi aferida em balança semi-analítica (2679,56 g). Todo material vegetal moído e pesado, foi transferido para um Mariotte e submetido à extração por maceração à temperatura ambiente, com solventes em ordem crescente de polaridade, com renovação de solvente a cada 72 horas. Inicialmente, foi utilizado o hexano (sete repetições) e depois o metanol (sete repetições). A cada etapa de maceração os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura entre 40-50 °C, sendo posteriormente colocados para secar em capela e conservados em freezer. O solvente evaporado foi reutilizado para a etapa seguinte de maceração, sendo gasto inicialmente 6L de solvente, e a cada renovação foi necessário acrescentar aproximadamente mais 500 mL, totalizando um gasto de 9L de hexano e 9 L de metanol. O resíduo vegetal da extração foi descartado. Uma alíquota dos extratos hexânico (30,8 mg) e metanólico (27,8 mg) foi separada e enviada para a realização dos ensaios de atividade citotóxica no Instituto Gonçalo Moniz (IGM) da Fundação Osvaldo Cruz do estado da Bahia (Fiocruz-BA), sob coordenação do Dr. Daniel Pereira Bezerra.

Após a secagem, o extrato hexânico apresentou massa igual a 39,11 g e o extrato metanólico apresentou massa igual a 339,76 g.

**ESQUEMA 1** - Fluxograma geral de maceração.



#### 4.9 Tratamento ácido-base do extrato metanólico

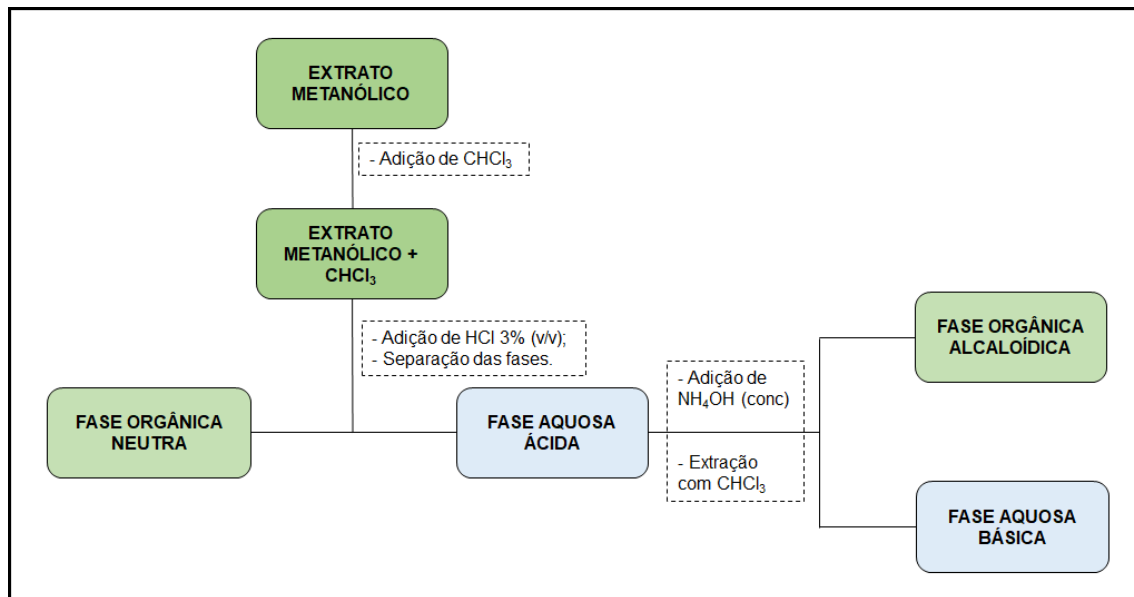
O extrato metanólico foi dividido em duas porções (321,76 g e 18 g), a porção menor foi reservada para análises futuras, a porção que continha 321,76 g foi submetida ao tratamento ácido-base convencional, conforme a metodologia proposta por Costa *et al.* (2006).

Inicialmente o extrato foi transferido para um erlenmeyer de 1 L e suspenso em 600 mL de  $\text{CHCl}_3$  com auxílio de ultrassom. Adicionou-se 300 mL de HCl 3% e observou-se a formação de duas fases (orgânica neutra e aquosa ácida), além de uma emulsão de coloração vermelho tijolo e de um material pastoso de coloração castanho escura. A fase aquosa ácida foi cuidadosamente transferida com o auxílio de uma pipeta pasteur para um outro erlenmeyer de 3 L. Foram realizadas mais cinco adições de 300 mL de HCl 3%, e na última adição de HCl, foi verificado que a fase aquosa já possuía coloração mais clara, quase incolor. A fase aquosa apresentou pH igual a 2,56 e foi basificada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (1700 mL), acrescentado gradativamente até que não houvesse variação significativa de pH (10,16). A cada adição de  $\text{NH}_4\text{OH}$  (100 mL), observou-se a formação de um precipitado amarelo.

Utilizando um funil de separação, a fase aquosa foi particionada com  $\text{CHCl}_3$  (3 x), gerando uma fase aquosa básica e uma fase orgânica alcaloídica. Após a partição, adicionou-se mais 1L de  $\text{CHCl}_3$  à fase aquosa básica, que foi extraída no dia seguinte e unida a fase orgânica. A fase orgânica alcaloídica apresentou coloração amarela intensa

e foi concentrada com evaporador rotativo, enquanto a fase aquosa foi descartada, conforme fluxograma abaixo:

**ESQUEMA 2** - Fluxograma do tratamento ácido-base.

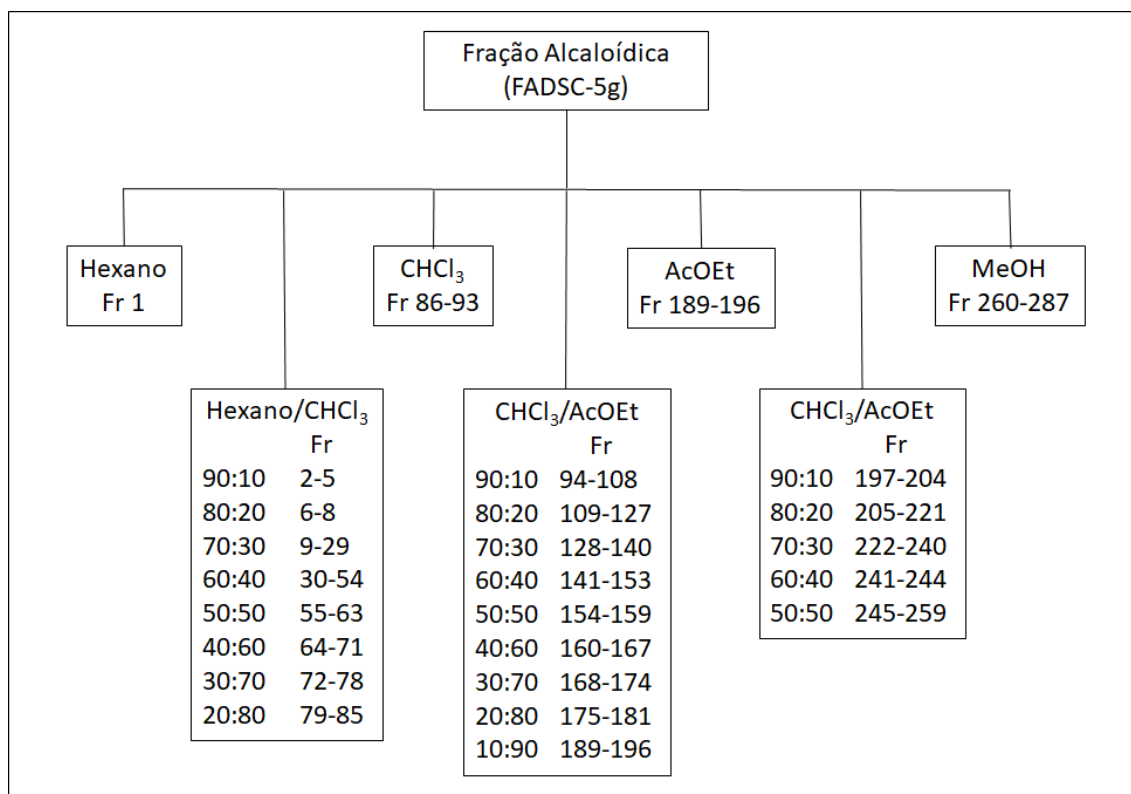


Concluído o procedimento citado acima, confirmou-se a presença de alcaloides por cromatografia em camada delgada, tendo como eluente a mistura  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:05), como reveladores a luz UV (254 nm) e o reagente de Dragendorff. Após secagem em dessecador, a massa de fração alcaloídica obtida foi igual a 16,24 g, apresentando rendimento de 4,8%. Uma alíquota de 38,6 mg da fração alcaloídica e uma alíquota de 36,6 mg de fração neutra foram enviadas para a realização dos ensaios de atividade citotóxica pela Fundação Osvaldo Cruz (Fiocruz) do estado da Bahia.

#### 4.10 Fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica (FADSC)

Uma parte da FADSC (5 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CC;  $\Phi$  x h de 2,8 x 51 cm) com sílica tratada com solução de  $\text{NaHCO}_3$  a 10%, eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente, obtendo-se 287 frações (ESQUEMA 3).

### ESQUEMA 3 - Fracionamento da FADSC.



Após a secagem das frações, as mesmas foram reunidas devido às semelhanças evidenciadas pela cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), conforme a tabela abaixo. O eluente utilizado para todas as placas foi  $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$  (9:1).

**TABELA 11** -- Reunião das frações da coluna FADSC.

Frações	Grupo de frações FADSC	Massa (mg)
1-12	11	12,4
13-14	13	32,3
15-20	15	124,3
21-23	21	19,3
24-30	24	21,8
31-90	81	1267,9
91-104	101	242,3
105-115	111	262,5
116-130	121	178,0
131-150	141	138,3
151-207	201	188,0
208-220	214	618,7
221-287	256	98,9

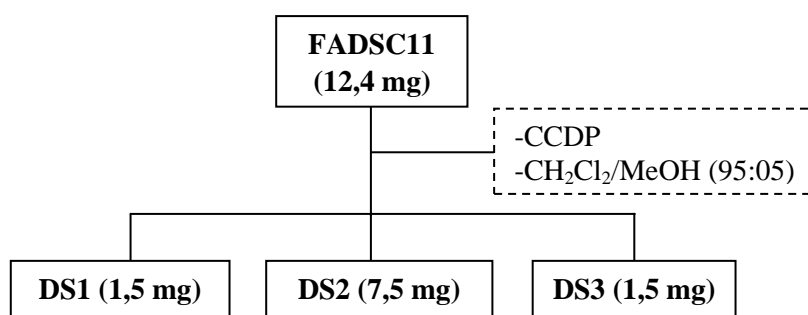
## 4.11 Isolamento

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

### 4.11.1 Grupo de frações FADSC11

O grupo de frações **FADSC11** (12,4 mg) foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). A placa cromatográfica foi submetida à corrida 2 vezes, tendo como eluente a mistura  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:05), e reveladores a luz UV (254 nm) e o reagente de Dragendorff. As substâncias foram separadas, extraídas da sílica com uma mistura dos solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:05), sendo posteriormente filtradas a vácuo em funil com placa porosa, evaporadas e pesadas. Verificou-se a presença de três substâncias isoladas, que receberam os códigos **DS1**, **DS2** e **DS3**, e foram submetidas à análise por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D.

**ESQUEMA 4** - Grupo de frações **FADSC11**.



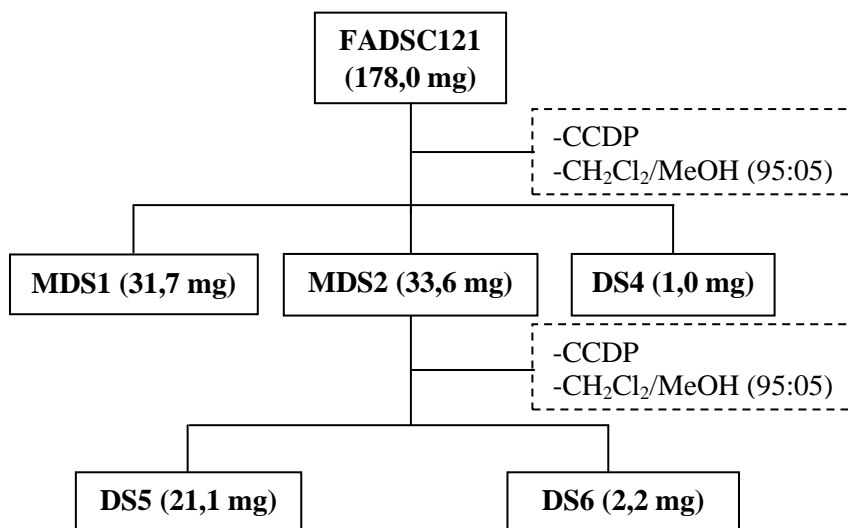
### 4.11.2 Grupo de frações FADSC121

O grupo de frações **FADSC121** (178,0 mg) foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). Devido a massa dessa fração (178,0 mg), ela foi dividida em três, sendo aplicada em três placas diferentes. As placas cromatográficas foram eluídas duas vezes, tendo como eluente a mistura de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:05), e reveladores a luz UV (254 nm) e o reagente de Dragendorff. As substâncias foram separadas, extraídas da sílica com uma mistura dos solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:05), sendo posteriormente filtradas a vácuo em funil com placa porosa, evaporadas e pesadas. Verificou-se a presença de uma substância isolada, que recebeu o código **DS4** e foi submetida à análise por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D. Além da substância DS4,



obteve-se 4 misturas binárias que foram, analisadas por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D, tendo seus constituintes caracterizados. As misturas foram reunidas em dois grupos e receberam os códigos **MDS1** e **MDS2**.

#### ESQUEMA 5 - Grupo de frações **FADSC121**.

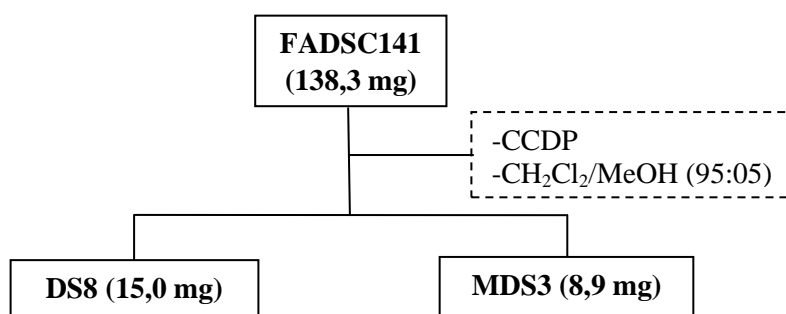


Com o objetivo de isolar os alcaloides da mistura **MDS1**, foi realizada uma nova CCDP nas mesmas condições anteriores, porém não ocorreu o isolamento conforme esperado. No entanto, mesmo sem o isolamento dos componentes da mistura, foi identificado por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D a substância **DS7**. O mesmo procedimento foi realizado com a mistura **MDS2**, onde obteve-se mais uma substância isolada de código **DS5** (21,1 mg), que foi analisada por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D.

#### 4.11.3 Grupo de frações **FADSC141**

O grupo de frações **FADSC141** (138,3 mg) foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). A placa cromatográfica foi submetida a duas eluições, tendo como eluente a mistura  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:05), e reveladores a luz UV (254 nm) e o reagente de Dragendorff. As substâncias foram separadas, extraídas da sílica com uma mistura dos solventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  (95:05), sendo posteriormente filtradas a vácuo em funil com placa porosa, evaporadas e pesadas. Obteve-se mais uma substância isolada, que recebeu o código **DS8** (15,0 mg), e foi submetida a análise por EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D. Obteve-se também uma mistura (**MDS3**) que apresentou apenas um íon de massa 328 Da no espectro de massas, porém o RMN revelou duas substâncias que não foram isoladas.

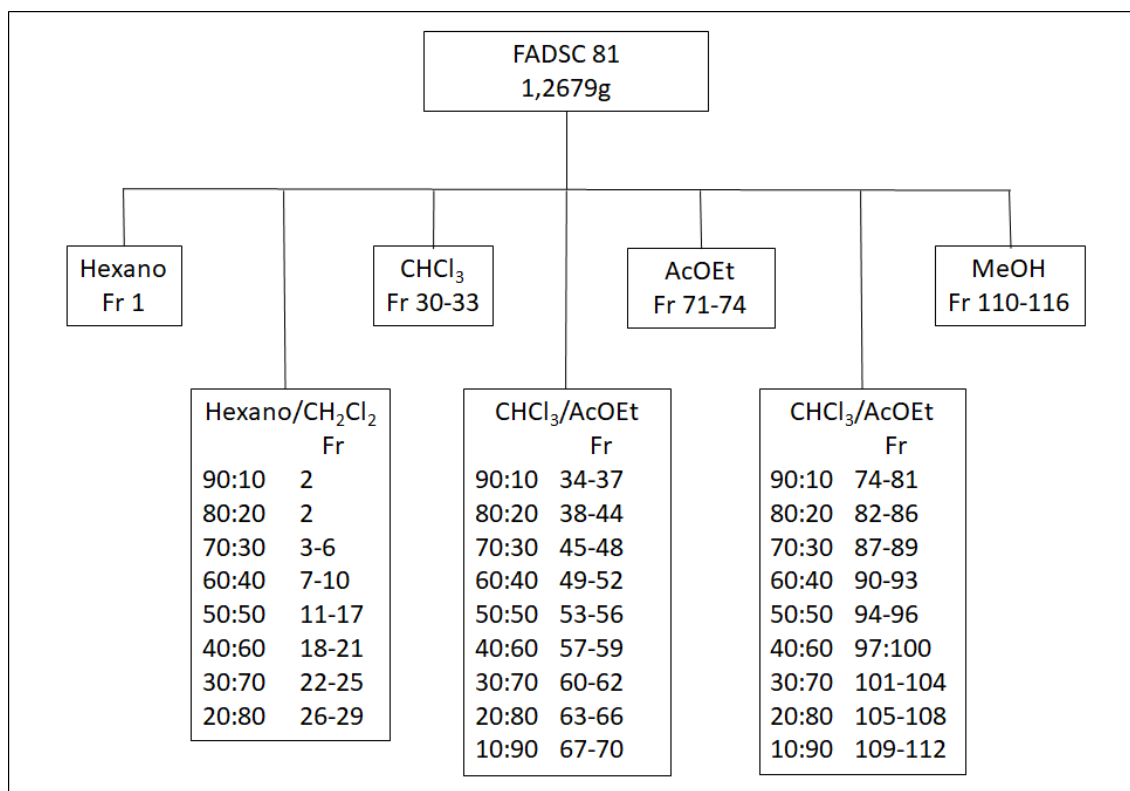
## ESQUEMA 6 - Grupo de frações FADSC141.



### 4.11.4 Grupo de frações FADSC81

Devido à grande quantidade de massa (1,2679 g) do grupo de frações FADSC 81, o mesmo foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CC;  $\Phi$  x h de 2,8 x 51 cm) com sílica tratada com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 10%, eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente, obtendo-se 116 frações (ESQUEMA 7).

### ESQUEMA 7 - Fracionamento da FADSC81.

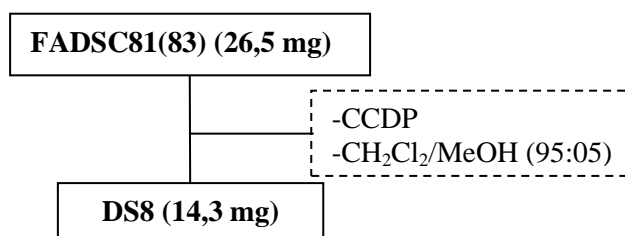


Após a secagem das frações, as mesmas foram reunidas devido às semelhanças observadas por CCDA, conforme a tabela abaixo. O eluente utilizado para todas as placas foi CHCl<sub>3</sub>/MeOH (9:1).

**TABELA 12** - Reunião das frações da coluna **FADSC81**.

Frações	Grupo de frações	Massa (mg)
1-9	Não revelou	-----
10-11	11	7,1
12-15	15	88,6
16-20	20	63,7
21-30	30	117,6
31-35	35	74,6
36-40	40	177,2
41-44	44	256,9
45-50	50	138,0
51	51	35,3
52-55	55	99,3
56-60	60	56,0
61-62	62	9,4
63	63	3,2
64-70	70	16,9
71-79	79	10,6
80	80	2,3
81-82	82	17,9
83-84	83	26,5
85	85	54,3
86	86	18,9
87	87	13,2
88-89	89	19,5
90	90	5,2
91-116	Não revelou	-----

O grupo de frações FADSC81(83) (26,5 mg) foi submetido à CCDP nas mesmas condições descritas anteriormente, sendo isolada uma substância, que foi analisada por EM e por RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D. Após a análise dos espectros de massas e RMN, verificou-se que a substância isolada se tratava da **DS8**, isolada do grupo de frações 141.

**ESQUEMA 8** - Grupo de frações **FADSC81(83)**.

O grupo de frações FADSC81(50) apresentou uma grande quantidade de cristais. Uma alíquota de 6 mg desses cristais foi retirada e analisada por EM e por RMN  $^1\text{H}$  e

<sup>13</sup>C 1D/2D, observando-se mais uma substância que recebeu o código **DS9**. Outras alíquotas de cristais foram retiradas, mas após análise por CCDA verificou-se que essas novas alíquotas eram compostas por misturas, ao contrário da primeira que se tratava da substância pura **DS9**.

## **4.12 Estudo da atividade citotóxica *in vitro***

### **4.12.1 Preparo das amostras**

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10 mg/mL (para extratos) e 5,0 mg/mL (para substâncias puras). As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,19-50 µg/mL.

### **4.12.2 Células**

Foram utilizadas células tumorais HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células despregassem-se das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para micoplasma, conforme avaliado pela colocação com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

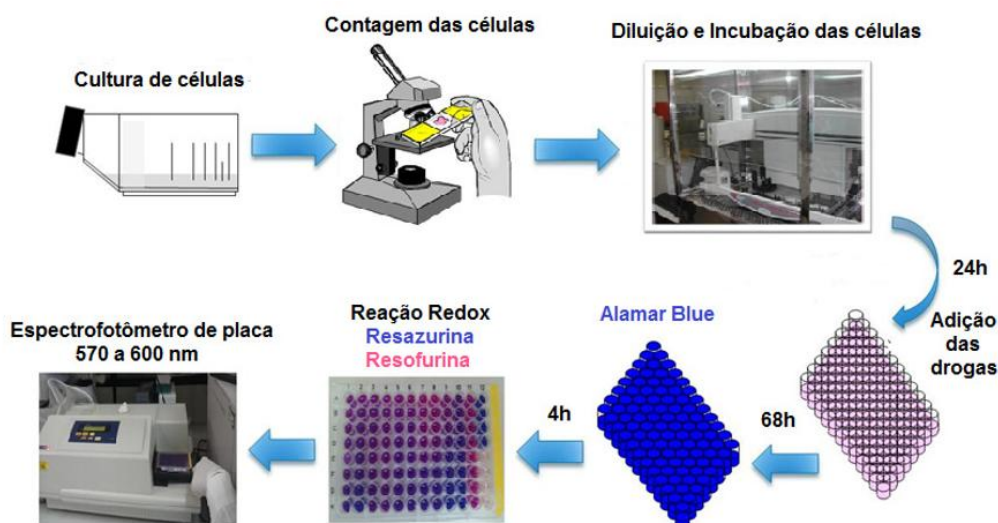
Para avaliar a citotoxicidade das substâncias sobre a proliferação de células não tumorais, PBMC (*peripheral blood mononuclear cells* – linfócitos e monócitos periféricos) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. A coleta do sangue foi realizada em frasco heparinizados por profissionais capacitados, nas dependências do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI-Fiocruz-Bahia), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 4 mL. As PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de cerca de 3 mL de sangue,

acrescida de 5 mL de salina. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 15 minutos de centrifugação a 1.500 rpm, e feita a aspiração dos PBMC, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. A suspensão de PBMC foi transferida para um outro tubo o qual foi acrescido com salina até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 5 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de PBMC foi ressuscitado em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino e 10 µg/mL de ConA) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

#### **4.12.3 Ensaio de citotoxicidade**

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/poço de uma solução de  $0,3 \times 10^6$  células/mL para células em suspensão e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas (vinte e quatro horas para o PBMC) antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa. A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas  $CI_{50}$  realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

**ESQUEMA 9** - Ensaio para verificação de atividade citotóxica. (FONTE: MENEZES, 2015).



A proliferação celular foi calculada utilizando a fórmula  $\% \text{ proliferação} = \frac{A_{LW}}{(A_{HW} \times R_0)} \times 100$ , onde,  $A_{LW}$  e  $A_{HW}$  são as absorvâncias no menor e maior comprimento de onda.

O  $R_0$  foi calculado utilizando a fórmula  $R_0 = \frac{AO_{LW}}{AO_{HW}}$ , onde,  $AO_{LW}$  e  $AO_{HW}$  são as absorvâncias do meio adicionado ao alamar blue, subtraído das absorvâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. Utiliza-se o parâmetro  $R_0$  para eliminar a absorção característica do meio puro, que possui uma coloração levemente rósea. A amostra foi testada em diluição seriada, em triplicata (dependendo da quantidade de amostra). A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas  $CI_{50}$  realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

Este ensaio foi realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, localizado na Fundação Oswaldo Cruz no estado da Bahia em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra. As amostras enviadas para ensaio, bem como suas respectivas massas estão dispostos na TABELA 14.

**TABELA 13** - Amostras enviadas para análise citotóxica.

	<b>Amostra</b>	<b>Massa (mg)</b>
Extrato	EHDSC	30,8
	EMDSC	27,8

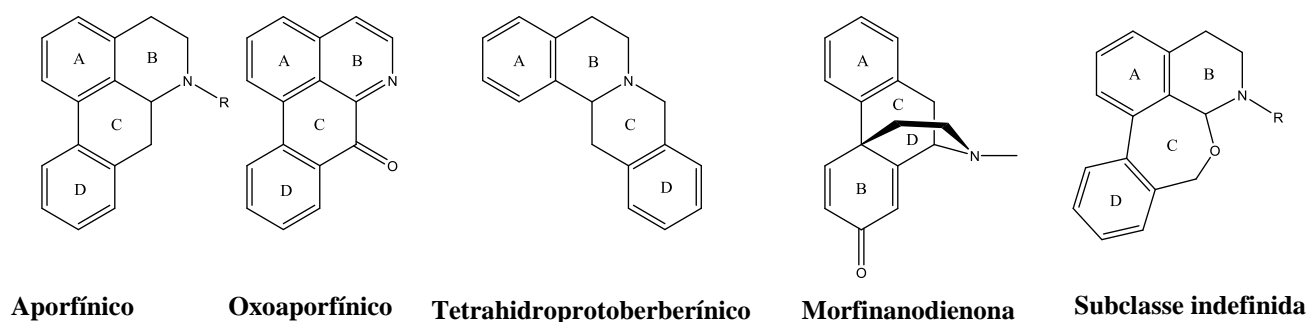
<b>Amostra (Continuação)</b>		<b>Massa (mg)</b>
Fração	FNDSC	36,6
	FADSC	38,6
Substância Isolada	DS1 (1,2,4- trimetoxibenzeno)	1,5
	DS2 (Dicentrina)	7,5
	DS4 (7-hidroxinordicentrina)	1,0
	DS5 (Dicentrinona)	10,0
	DS6 (Pallidina)	2,2
	DS8 (Duguetina <i>N</i> -óxido)	4,9
	DS9 (Duguetina)	10,9

## 5. Resultados e discussão

O estudo fitoquímico das cascas de *D. surinamensis*, realizado através de métodos cromatográficos clássicos, possibilitou o isolamento e a caracterização de 8 substâncias e a caracterização de mais uma que não foi isolada. Das 9 substâncias caracterizadas, 8 são alcaloides e uma é um benzenoide. Na caracterização das substâncias foram utilizadas técnicas modernas de elucidação estrutural como EM e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D. Os dados dos espectros obtidos foram interpretados e comparados com a literatura disponível.

Os alcaloides identificados possuem em sua maioria um esqueleto isoquinolínico da subclasse aporfinoide (aporfínico e oxoaporfínico), porém foi caracterizado um alcaloide da subclasse tetrahidroprotoberberínico, e um alcaloide sem classe definida. Apenas um alcaloide não isoquinolínico foi caracterizado e pertence à subclasse morfinaodienona.

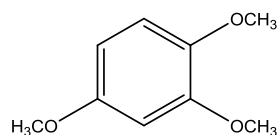
**FIGURA 13** - Esqueletos dos alcaloides identificados nas cascas de *D. surinamensis*.



**TABELA 14** - Classe de alcaloides identificados de *D. surinamensis*.

Aporfinoide		Tetrahidro	Morfinao	Indefinido
Aporfínico	Oxoaporfínico	protoberberínico	dienona	
DS2, DS4, DS8, DS9	DS5	DS7	DS6	DS3

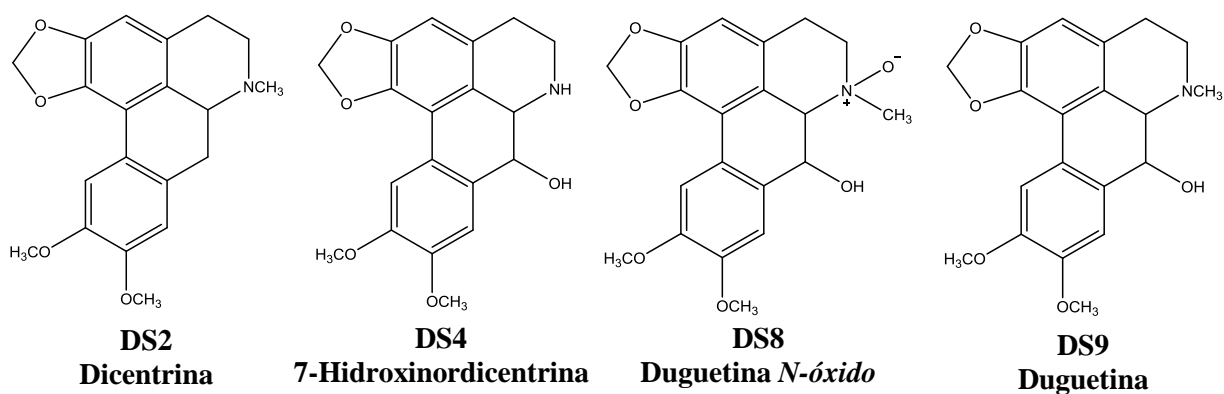
**FIGURA 14** - Benzenoide isolado de *D. surinamensis*.



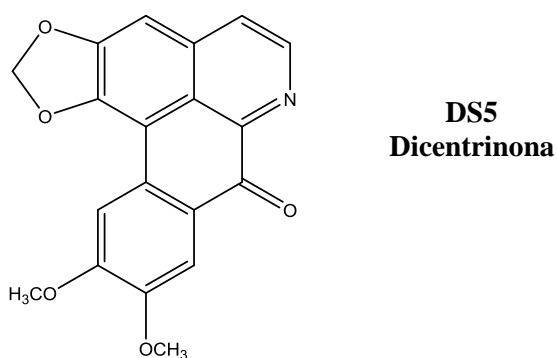
**DS1**  
**1,2,4-Trimetoxibenzeno**



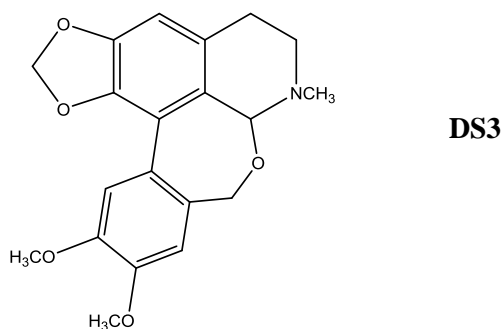
**FIGURA 15** - Alcaloides aporfínicos isolado de *D. surinamensis*.



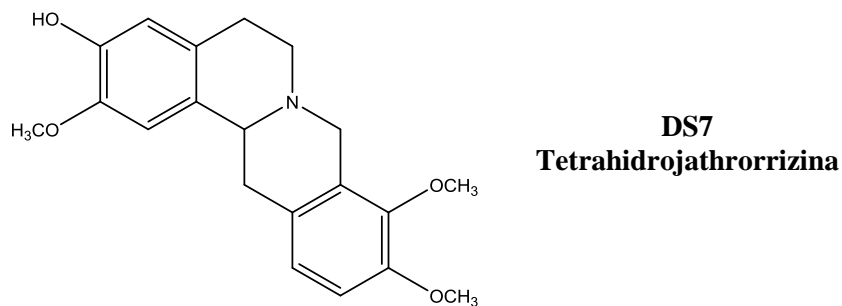
**FIGURA 16** - Alcaloide oxoaporfínico isolado de *D. surinamensis*.



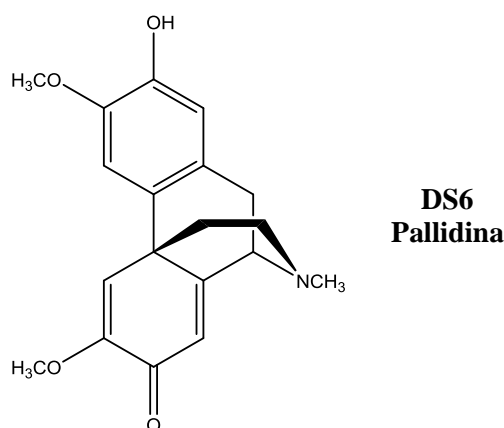
**FIGURA 17** - Alcaloide isoquinolínico de subclasse indefinida isolado de *D. surinamensis*.



**FIGURA 18** - Alcaloide tetrahidroprotoberberínico identificado em *D. surinamensis*.



**FIGURA 19** - Alcaloide morfinanodienona isolado em *D. surinamensis*.



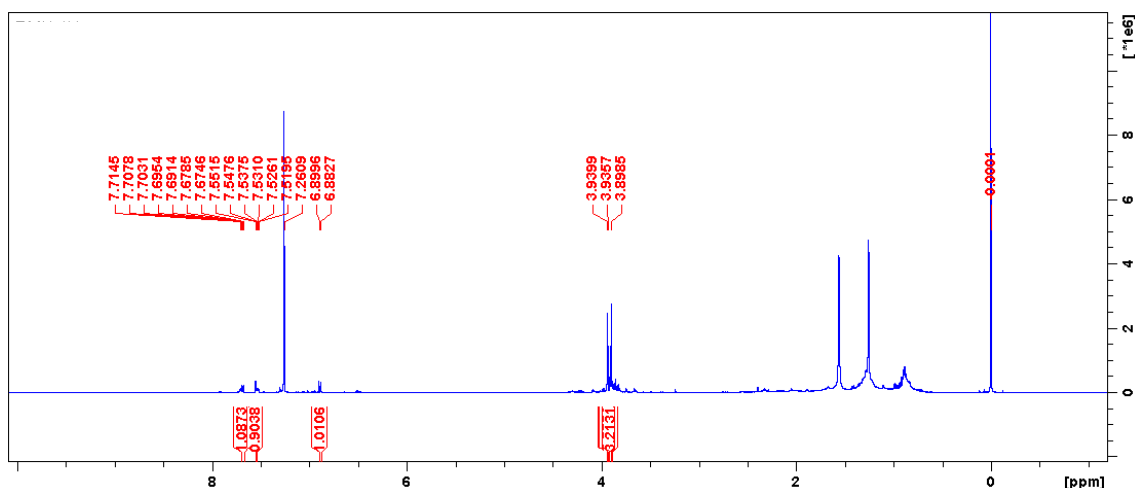
## 5.1 Identificação estrutural das substâncias isoladas das cascas do caule de *D. surinamensis*

### 5.1.1 Identificação Estrutural do Benzenoide (DS1)

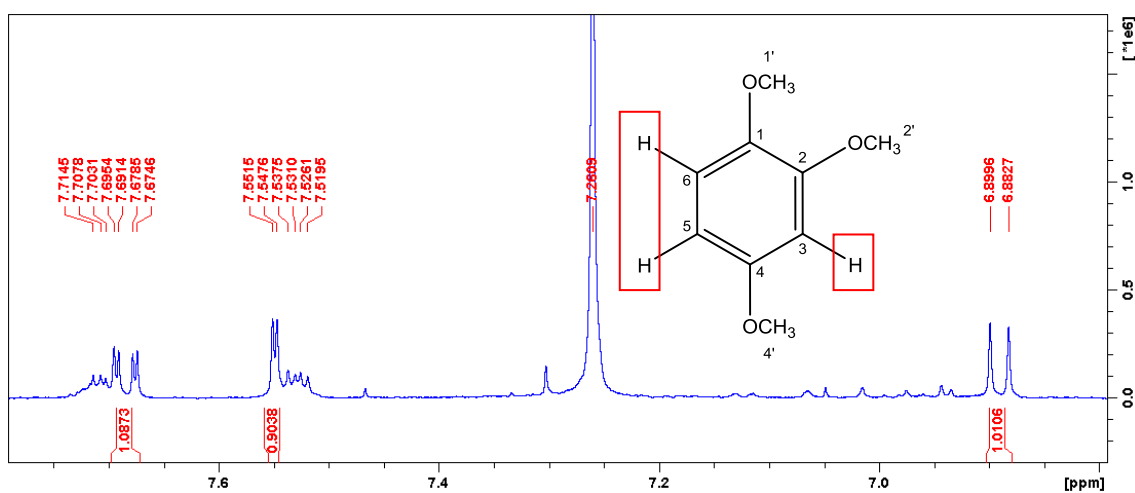
A substância **DS1** apresentou-se como sólido amorfo de massa igual a 1,5 mg e coloração castanho escuro. A substância apresentou teste negativo frente ao reagente de Dragendorff, indicando ausência de nitrogênio.

Pela análise de RMN de  $^1\text{H}$  (500M Hz,  $\text{CDCl}_3$ ), (FIGURA 20) observou-se sinais característicos de uma substância com caráter aromático. Foram observados três sinais na região dos hidrogênios aromáticos, em  $\delta$  7,68 (1H, *dd*,  $J = 8,5$  e  $2,0$  Hz),  $\delta$  6,89 (1H, *d*,  $J = 8,5$  Hz) e  $\delta$  7,54 (1H, *d*,  $J = 2,0$  Hz), e três sinais, integrando para 3H cada, em  $\delta$  3,94 (*s*),  $\delta$  3,93 (*s*) e  $\delta$  3,89 (*s*), característicos de grupos metoxila ligados a anel aromático (FIGURA 21 e TABELA 16). A constante de acoplamento elevada de 8,5 Hz indica que os hidrogênios de deslocamento químico  $\delta$  7,68 e  $\delta$  6,89 são vizinhos. Já a constante de acoplamento mais baixa 2,0 Hz, indica que os hidrogênios  $\delta$  7,68 e  $\delta$  7,54 não são vizinhos, porém acoplam entre si, estando em orientação *meta* em relação ao outro. Essa informação nos permite concluir que a substância analisada é um benzenóide *orto, para* trimetoxilado.

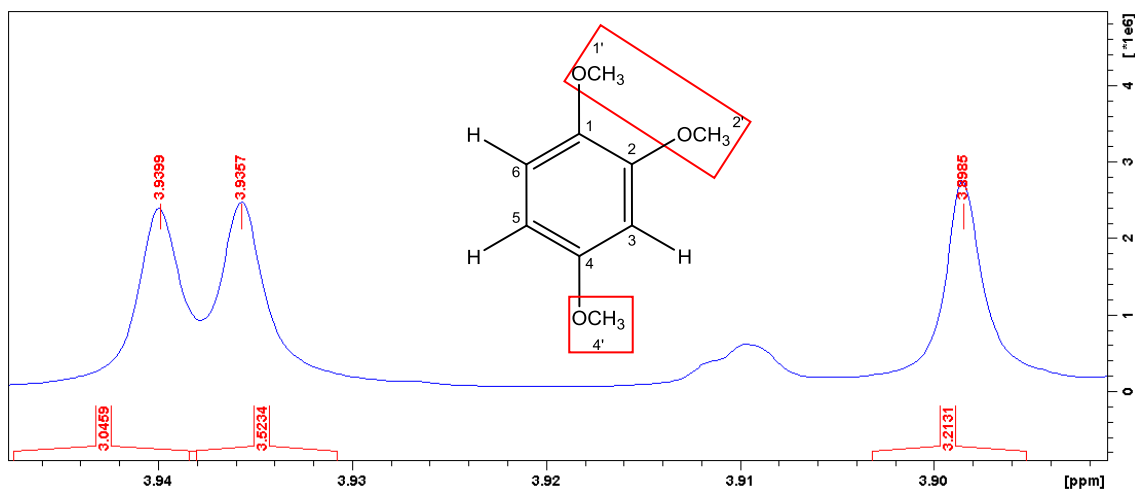
**FIGURA 20** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS1**.



**FIGURA 21** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS1**.



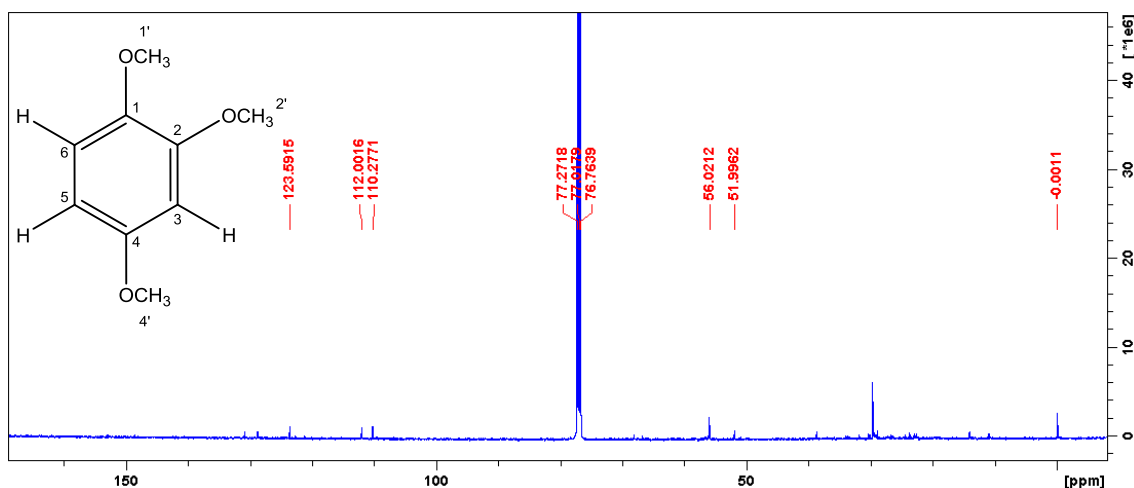
**FIGURA 22** - Ampliação da região de hidrogênios metoxílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS1**.



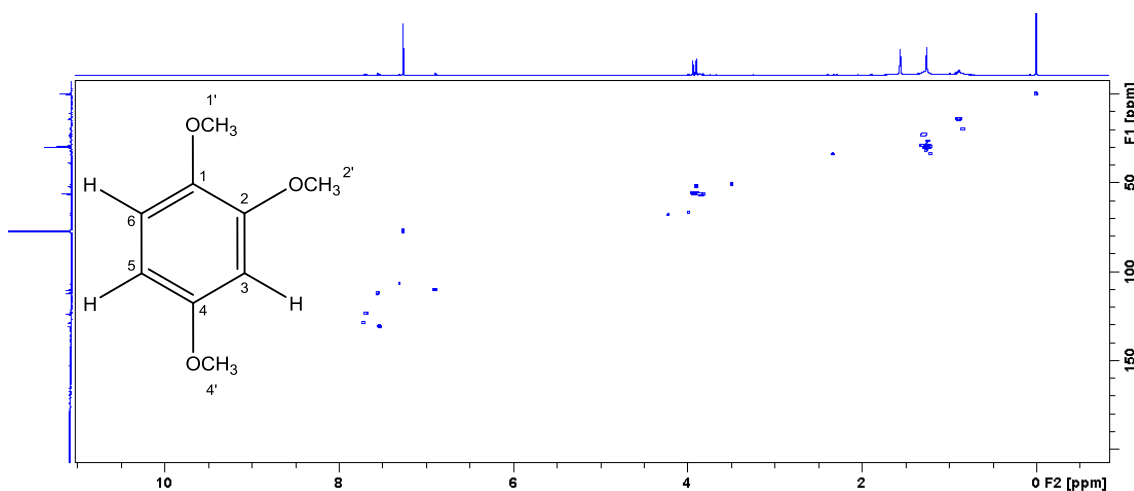
Pelas correlações observadas nos mapas HSQC e HMBC, foi possível confirmar a posição dos grupos metoxílicos no anel nas posições 1, 2 e 4. O mapa de correlações

HMBC, permitiu verificar a correlação do hidrogênio metoxílico em  $\delta$  3,93 com o carbono aromático com deslocamento químico igual a  $\delta$  148,7; do hidrogênio em  $\delta$  3,94 com o carbono aromático em  $\delta$  153,0; e do hidrogênio  $\delta$  3,89 com o carbono aromático em  $\delta$  166,7.

**FIGURA 23** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS1**.

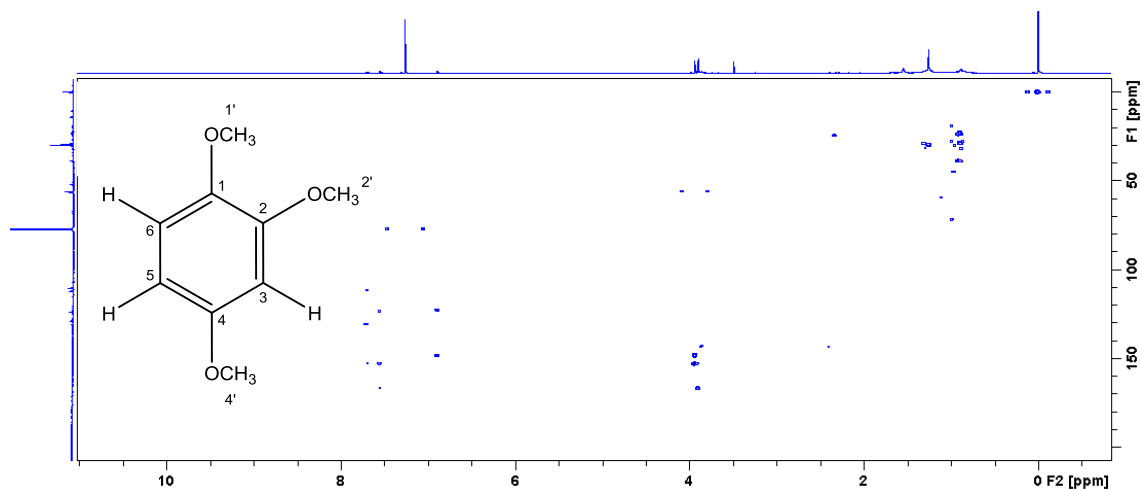


**FIGURA 24** - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS1**.

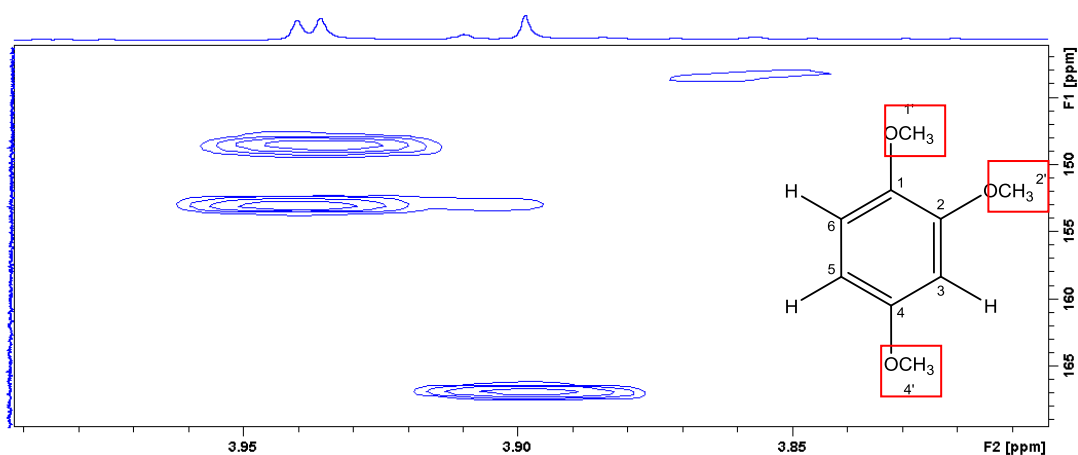


Pelo mapa de correlações HMBC, pode-se verificar que o hidrogênio em  $\delta$  7,68 correlaciona a  $^3J$  com os carbonos em  $\delta$  112,0 (C-3) e  $\delta$  153,0 (C-1) e a  $^2J$  com o carbono em  $\delta$  166,9 (C-2). O hidrogênio em  $\delta$  7,54 correlaciona a  $^3J$  com os carbonos em  $\delta$  122,9 (C-5) e  $\delta$  153,0 (C-1), e a  $^2J$  com os carbonos em  $\delta$  148,7 (C-4) e  $\delta$  166,9 (C-2). O hidrogênio em  $\delta$  6,89 correlaciona a  $^3J$  com o carbono em  $\delta$  148,7 (C-4) e a  $^2J$  com o carbono em  $\delta$  153,0 (C-1), conforme pode ser observado nas FIGURAS 25, 26 e 27.

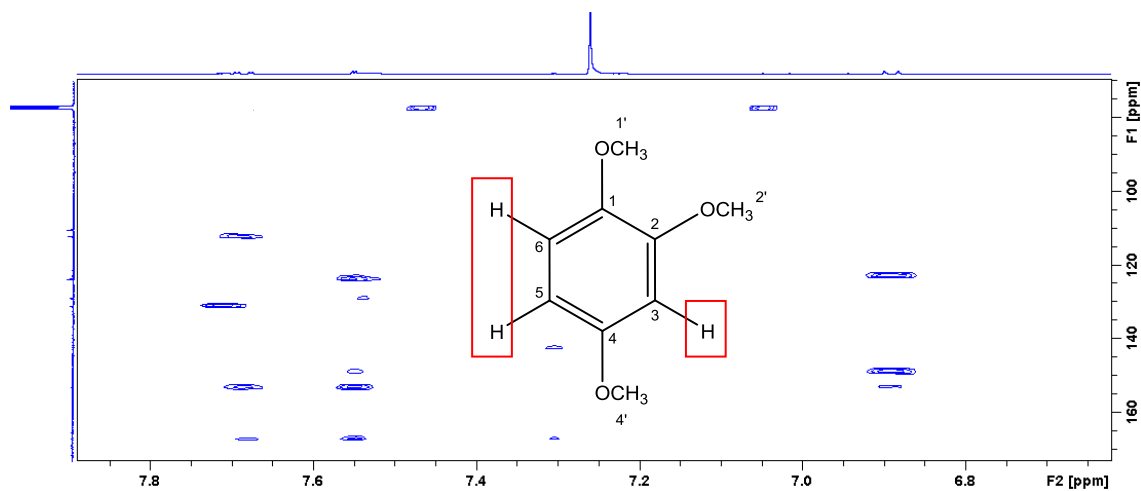
**FIGURA 25** - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.



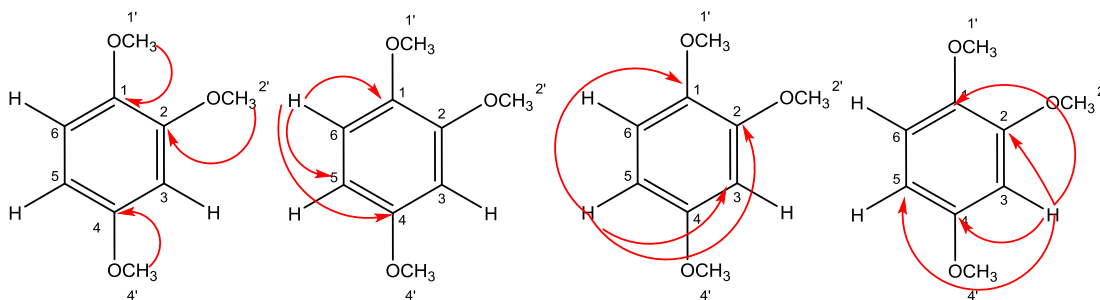
**FIGURA 26** - Ampliação da região de hidrogênios metoxílicos do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.



**FIGURA 27** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de DS1.



**FIGURA 28** - Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **DS1**.

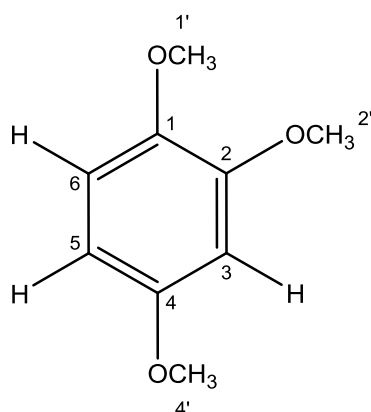


**TABELA 15** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **DS1**.

Posição	Substância <b>DS1</b>		
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ )
1	-----	153,0, C	-----
1'-OCH <sub>3</sub>	3,94 (3H, <i>s</i> )	56,02, CH <sub>3</sub>	1
2	-----	166,7, C	-----
2'-OCH <sub>3</sub>	3,89 (3H, <i>s</i> )	52,01, CH <sub>3</sub>	2
3	7,54 (1H, <i>d</i> , 2,0)	112,0, CH	1, 2, 4, e 5
4	-----	148,7, C	-----
4'-OCH <sub>3</sub>	3,93 (3H, <i>s</i> )	56,02, CH <sub>3</sub>	3
5	7,68 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 2,0)	122,9, CH	1, 2 e 3
6	6,89 (1H, <i>d</i> , 8,4)	110,2, CH	1, 4 e 5

Os dados fornecidos pelas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D, e a comparação com os dados da literatura (ALVES *et al.*, 2009), permitiu-nos concluir que a substância **DS1** trata-se do benzenoide 1,2,4-trimetoxibenzeno.

**FIGURA 29** - Estrutura do 1,2,4-trimetoxibenzeno.



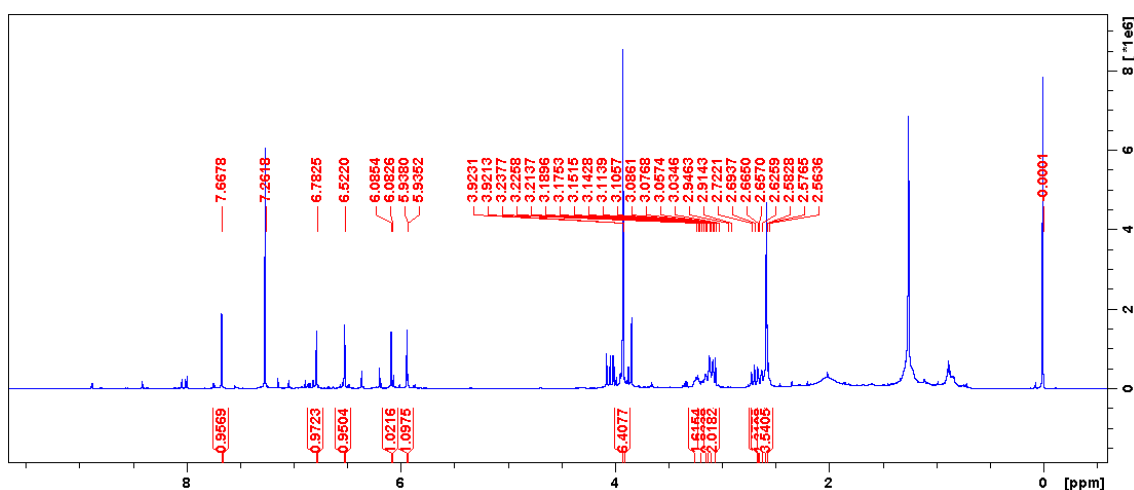
## 5.1.2 Identificação estrutural dos alcaloides aporfínicos

### 5.1.2.1 Alcaloide DS2

O alcaloide **DS2** apresentou-se como um sólido amorfo de massa igual a 7,5 mg e coloração castanho escuro. Apresentou coloração laranja frente ao reagente de Dragendorff indicativo da presença de nitrogênio na estrutura. Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (FIGURA 30) pôde-se identificar sinais característicos de um alcaloide do tipo aporfínico.

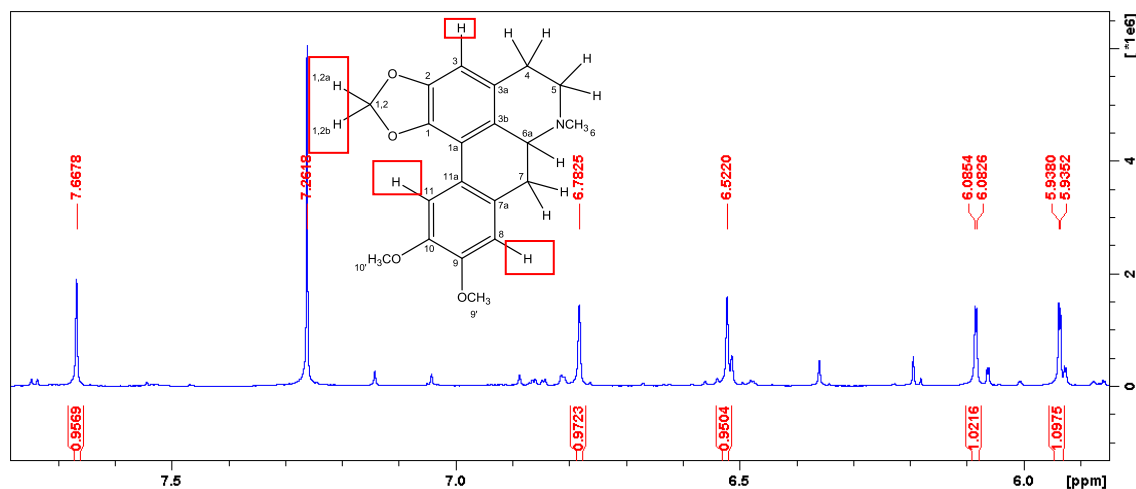
Foi observado na região dos hidrogênios aromáticos, a presença de dois sinais típicos do anel D substituído em  $\delta$  7,66 (1H, s) e  $\delta$  6,78 (1H, s) referentes aos hidrogênios H-11 e H-8 e um sinal típico do H-3 do anel A do sistema aporfínico dissustituído em  $\delta$  6,52 (1H, s) (FIGURA 31).

FIGURA 30 - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.

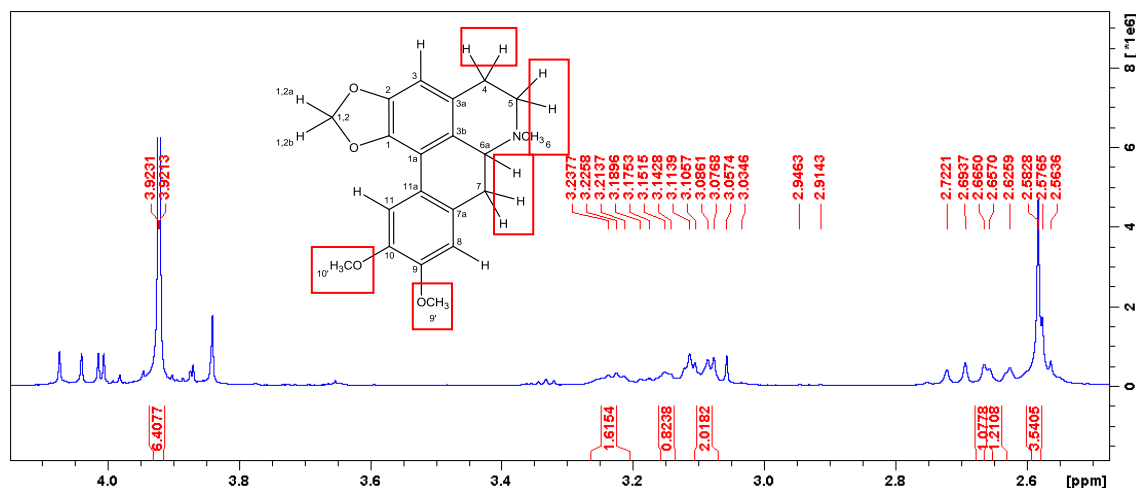


A presença dos sinais dos dupletos em  $\delta$  6,08 e  $\delta$  5,93 ( $J=1,4$  Hz), correlacionados com o sinal de carbono em  $\delta$  100,6 Hz no mapa de correlação HSQC, indicou a presença de um grupo metilenodióxi na estrutura. Devido à torção do sistema bifenil, os hidrogênios não possuem o mesmo ambiente químico, não sendo equivalentes.

**FIGURA 31** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.



**FIGURA 32** - Ampliação da região dos hidrogênios metínicos, metilênicos, metílicos e metoxílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.

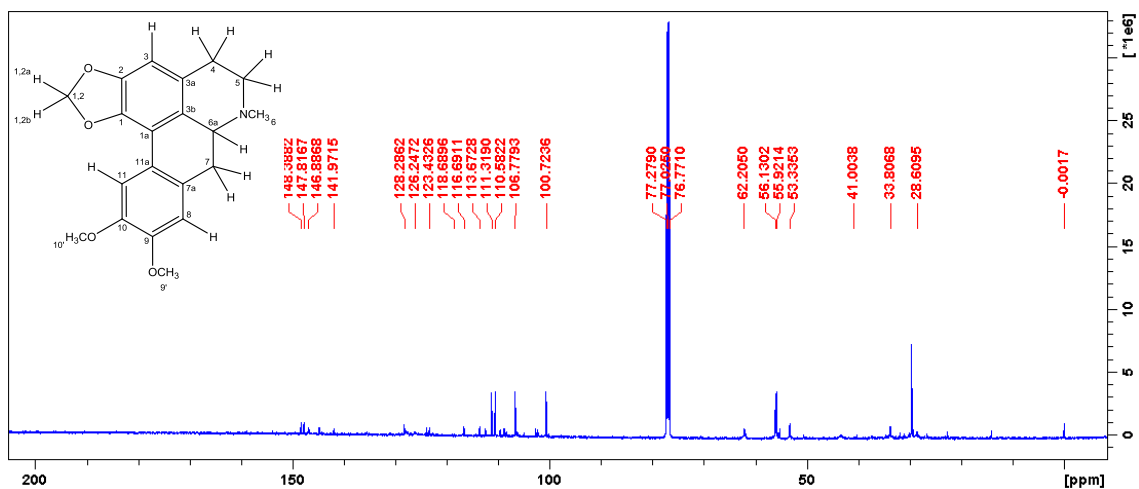


Entre  $\delta$  2,56 e  $\delta$  3,23, encontram-se os sinais dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-4, H-5 e H-7, e do hidrogênio metínico H-6a. Os hidrogênios com deslocamento químico  $\delta$  2,63 (1H, *m*) e 3,15 (1H, *m*), estão correlacionados com o carbono em  $\delta$  28,7, que possui deslocamento típico do C-4 do anel B do sistema aporfínico. Os hidrogênios multipletos  $\delta$  2,58 (1H, *m*) e 3,09 (1H, *m*), correlacionam com o carbono em  $\delta$  53,3 e são característicos da posição 5 do anel B. O sinal observado em  $\delta$  2,58, possui integração para 4 hidrogênios, indicando que além do H-5, há outros três hidrogênios que possuem o mesmo deslocamento químico. Pelo mapa de correlação HSQC se observa a correlação desse hidrogênio com o carbono metílico característico da posição 6 ( $\delta$  43,4). O hidrogênio tripleto com deslocamento  $\delta$  3,23 e  $J = 6,0$  Hz, está correlacionado com o carbono  $\delta$  62,1, característico da posição 6a do sistema

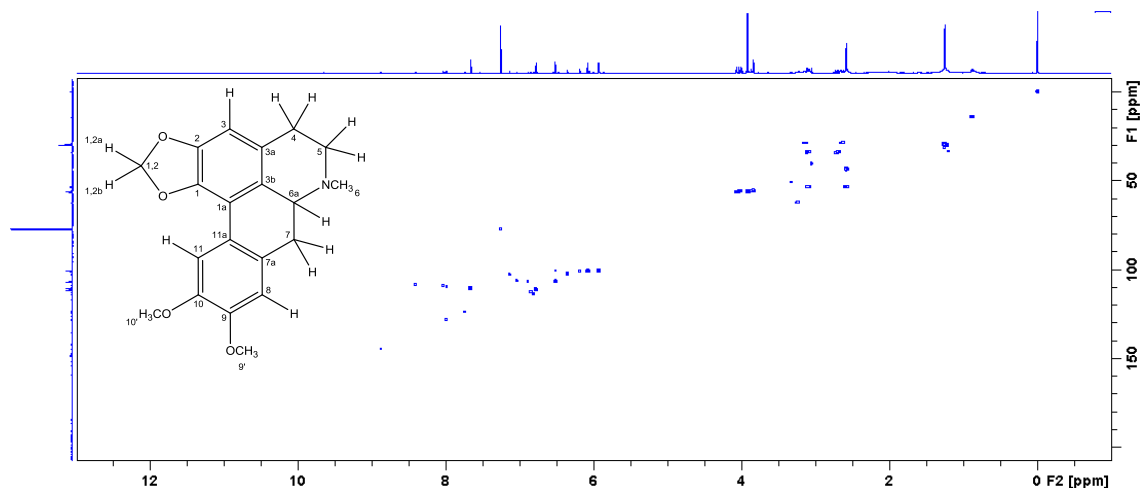


aporfínico. Já os hidrogênios de deslocamento químico  $\delta$  2,70 e  $\delta$  3,09, são multipletos que se correlacionam com o carbono em  $\delta$  33,8, conforme o mapa de correlação HSQC.

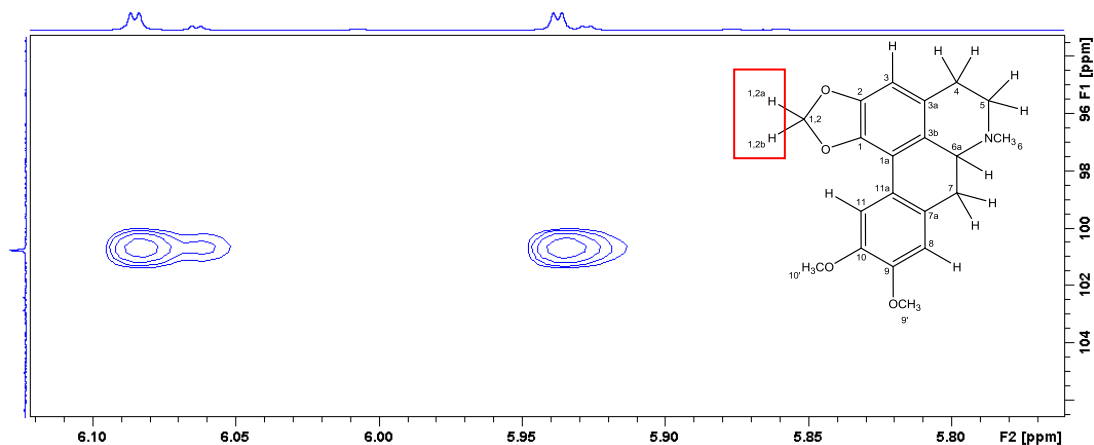
**FIGURA 33** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.



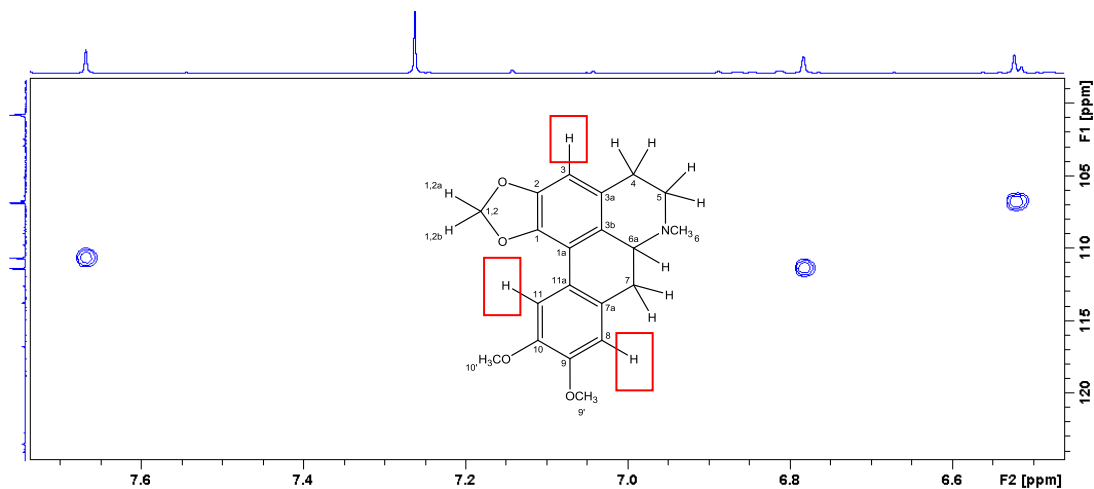
**FIGURA 34** - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.



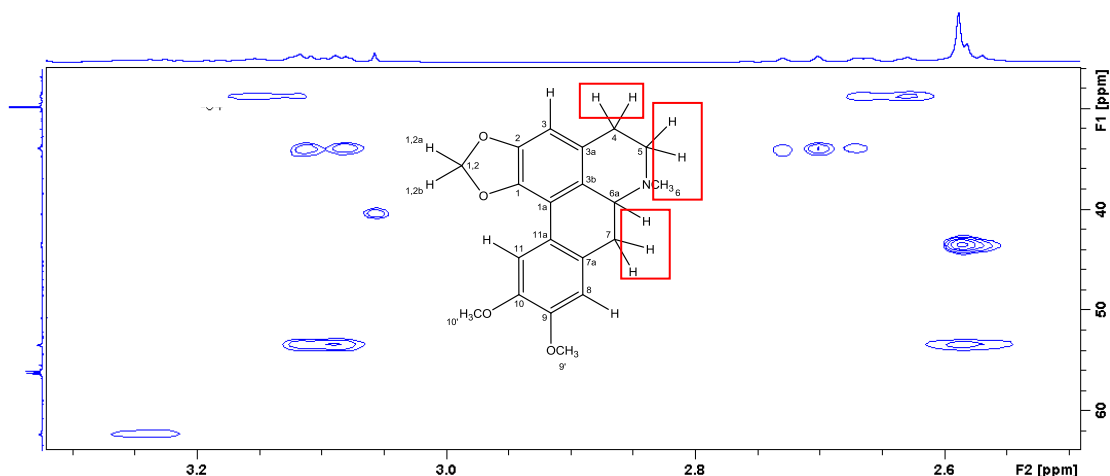
**FIGURA 35** - Ampliação da região de hidrogênio da ponte metilenodióxi do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.



**FIGURA 36** - Ampliação da região de hidrogênio aromático do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.

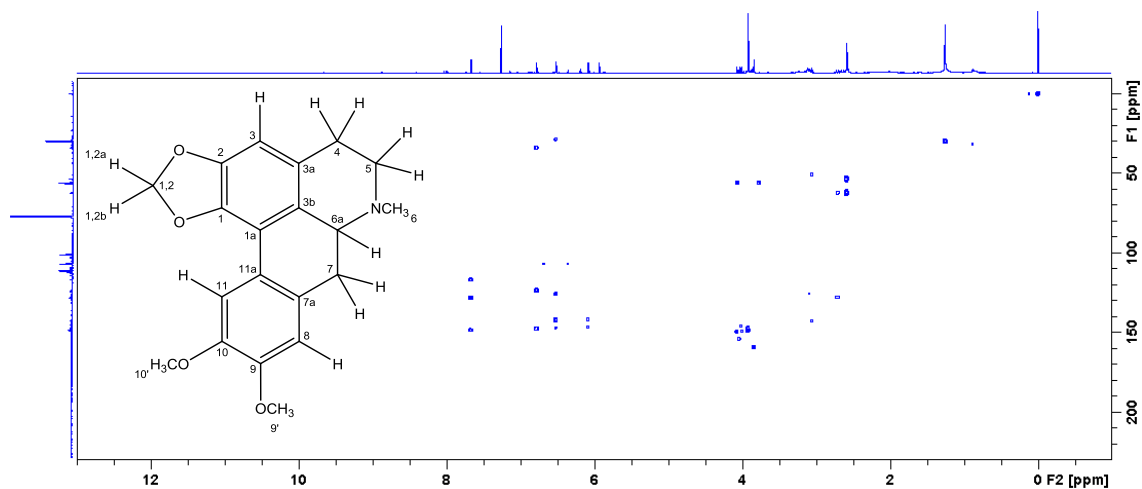


**FIGURA 37** - Ampliação da região de hidrogênio metílico, metínico, e metilênico do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.

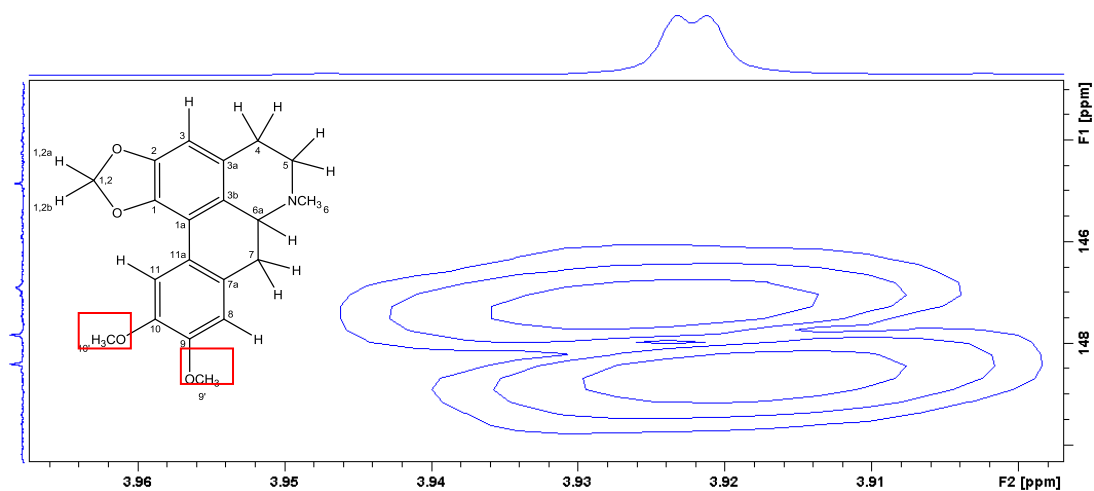


O sinal em  $\delta$  3,92 com integração para seis hidrogênios, refere-se ao sinais dos hidrogênios das duas metoxilas do anel D. Por possuírem o mesmo ambiente químico, os seis hidrogênios metoxílicos, possuem o mesmo deslocamento químico, implicando na magnitude do sinal. As metoxilas se ligam ao anel D nos carbonos de deslocamento  $\delta$  148,4 e  $\delta$  147,8 Hz, o que foi confirmado pelo mapa de correlação HMBC.

**FIGURA 38** - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.



**FIGURA 39** - Ampliação da região metoxílica do mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS2**.



**FIGURA 40** - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de **DS2**.

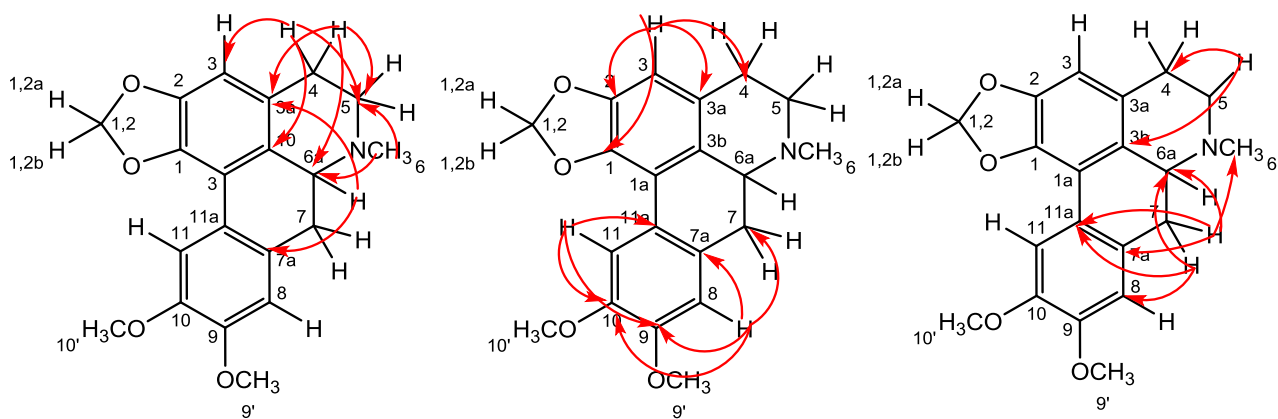


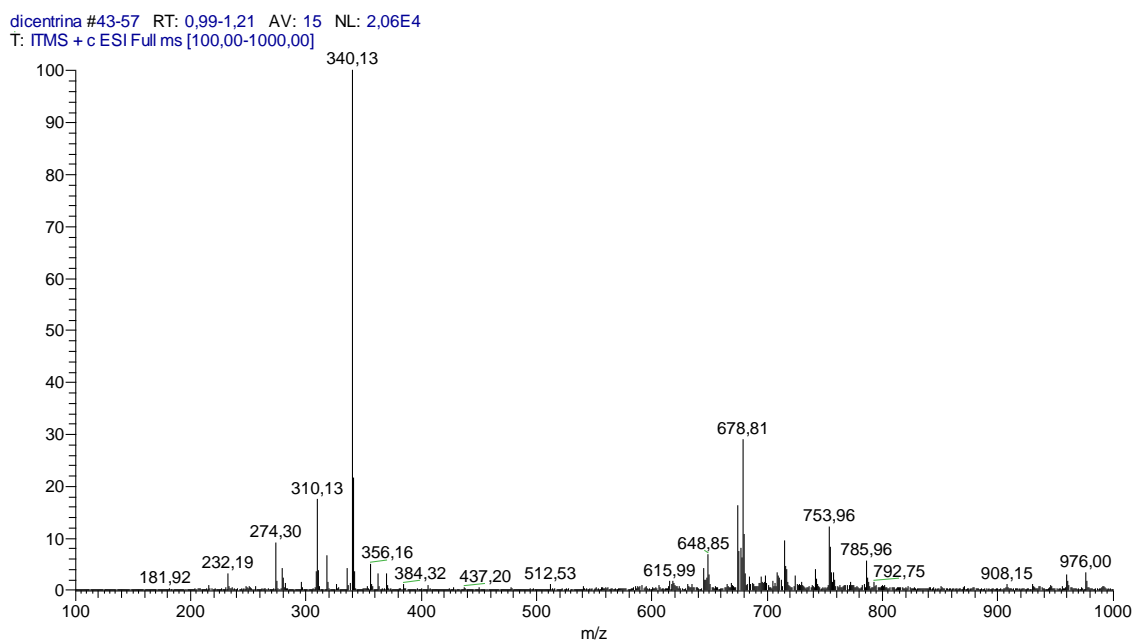
TABELA 16 - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DS2.

Posição	Substância DS2			Dicentrina*
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ )	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
1	-----	142,0, C	-----	141,7, C
1a	-----	116,6, C	-----	116,6, C
2	-----	147,1, C	-----	146,6, C
3	6,52 (1H, <i>s</i> )	106,6, CH	1, 2, 3b e 4	106,1, CH
3a	-----	118,2, C	-----	126,5, C
3b	-----	125,8, C	-----	126,4, C
4	2,64 (1H, <i>m</i> ) 3,15 (1H, <i>m</i> )	28,6, CH <sub>2</sub>	3, 3b e 5 3a, 5, 6a	29,2, CH <sub>2</sub>
5	2,58 (1H, <i>m</i> ) 3,09 (1H, <i>m</i> )	53,3, CH <sub>2</sub>	6a 3b, 4, 6a, 7a, 8	53,6, CH <sub>2</sub>
6	2,58 (3H, <i>s</i> )	43,4, CH <sub>3</sub>	5 e 6a	44,0, CH <sub>3</sub>
6a	3,23 (1H, <i>t</i> , 5,94)	62,1, CH	3, 3a, 7a	62,4, CH
7	2,69 (1H, <i>t</i> , 14,3) 3,09 (1H, <i>dd</i> , 4,1 e 13,9)	33,8, CH <sub>2</sub>	6, 6a, 7a, 11a 4, 6a, 7a, 8, 11a	34,3, CH <sub>2</sub> -----
7a	-----	127,9, C	-----	128,3, C
8	6,78 (1H, <i>s</i> )	111,2, CH	7, 7a, 9, 10, 11a,	110,5, CH
9		148,7, C		148,2, C
10		147,6, C		147,6, C
11	7,66 (1H, <i>s</i> )	110,5, CH	2, 3a, 3b, 7a, 9, 10 e 11a,	111,2, CH
11a	-----	123,4, C	-----	123,4, C
(1,2)- OCH <sub>2</sub> O	5,93 (1H, <i>d</i> , 1,4) 6,08 (1H, <i>d</i> , 1,4)	100,6, CH <sub>2</sub>	1 e 2 1 e 2	-----
9- OCH <sub>3</sub>	3,92 (3H, <i>s</i> )	55,9, CH <sub>3</sub>	9, 10	55,9, CH <sub>3</sub>
10- OCH <sub>3</sub>	3,92 (3H, <i>s</i> )	55,9, CH <sub>3</sub>	9, 10	56,1, CH <sub>3</sub>

\*Extraído de Guinaudeau, Leboeuf, e Cavé 1975.

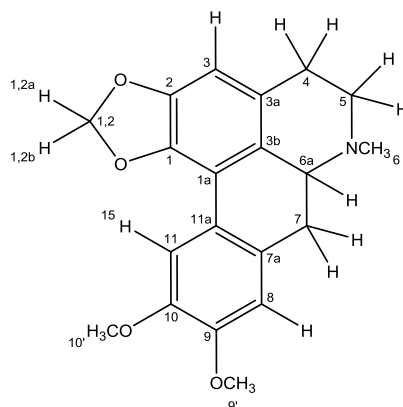
A análise do espectro de massas do alcaloide aporfínico DS2 obtido através de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+), indicou a presença de uma molécula protonada com  $m/z$  340,13 Da  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , compatível com os dados de RMN que indicam fórmula molecular  $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_4$ .

**FIGURA 41** - Espectro de Massas da substância **DS2**.



Após análise dos dados RMN e EM e da comparação com os dados da literatura (GUINAUDEAU, LEBOEUF, & CAVÉ, 1975), pode-se concluir que a substância **DS2** trata-se do alcaloide aporfínico **dicentrina**.

**FIGURA 42** - Estrutura da **dicentrina**.

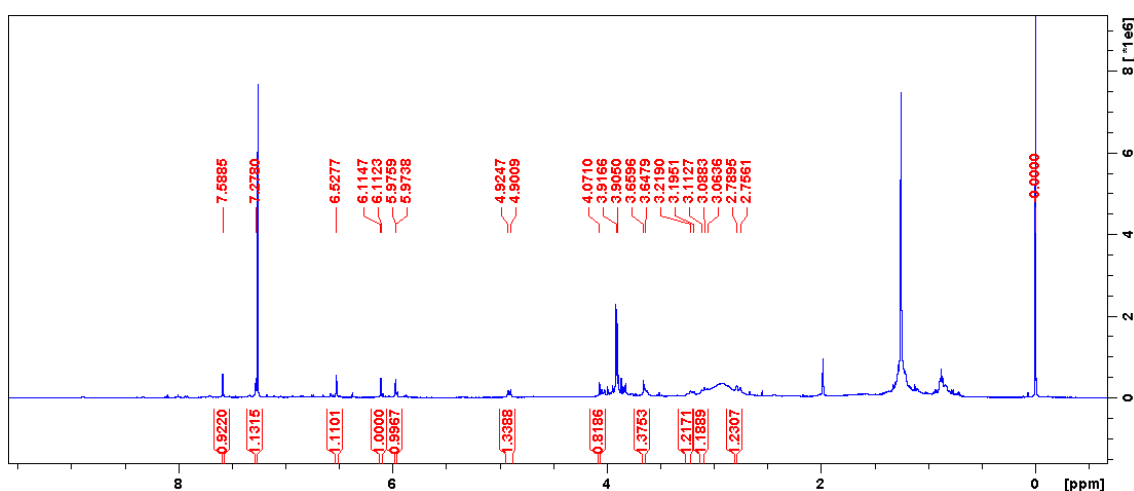


#### 5.1.2.2 Alcaloide **DS4**

O alcaloide **DS4** apresentou-se como um sólido amorfo de massa igual a 1,0 mg e coloração castanho escuro. Apresentou teste positivo frente ao reagente de Dragendorff com coloração alaranjada. Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), pôde-se identificar sinais característicos de um alcaloide aporfínico substituído nas posições 4 ou 7.

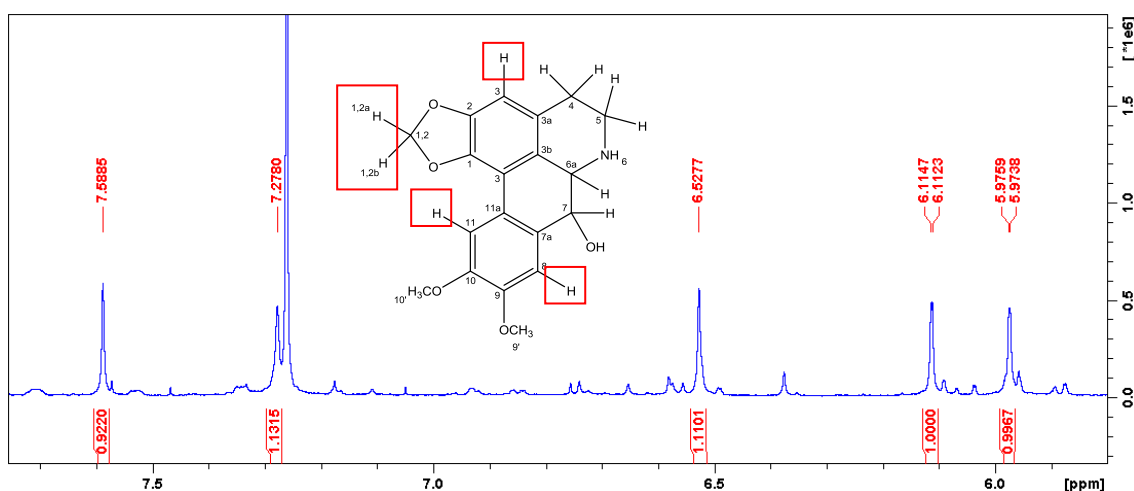
Na região dos hidrogênios aromáticos foi observado a presença de dois sinais típicos do anel D substituído em  $\delta$  7,58 (1H, *s*) e  $\delta$  7,27 (1H, *s*) referentes aos hidrogênios H-11 e H-8 e um sinal típico do H-3 do anel A do sistema aporfínico dissustituído em  $\delta$  6,52 (1H, *s*) (FIGURA 43).

**FIGURA 43** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS4**.

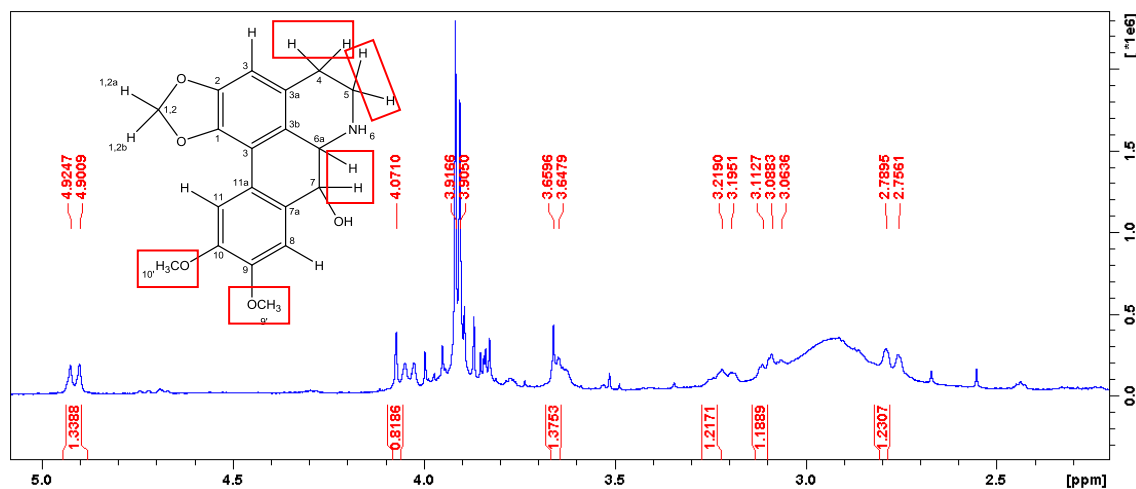


A presença dos dupletos em  $\delta$  6,11 e  $\delta$  5,97 ( $J=1,1\text{Hz}$ ), correlacionados com o sinal de carbono em  $\delta$  101,1 no mapa de correlação HSQC, caracteriza a presença do grupo metilenodióxi na estrutura. Devido a torção do sistema bifenil, os dois hidrogênios não possuem o mesmo ambiente químico, não sendo equivalentes (FIGURA 44).

**FIGURA 44** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxo do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS4**.



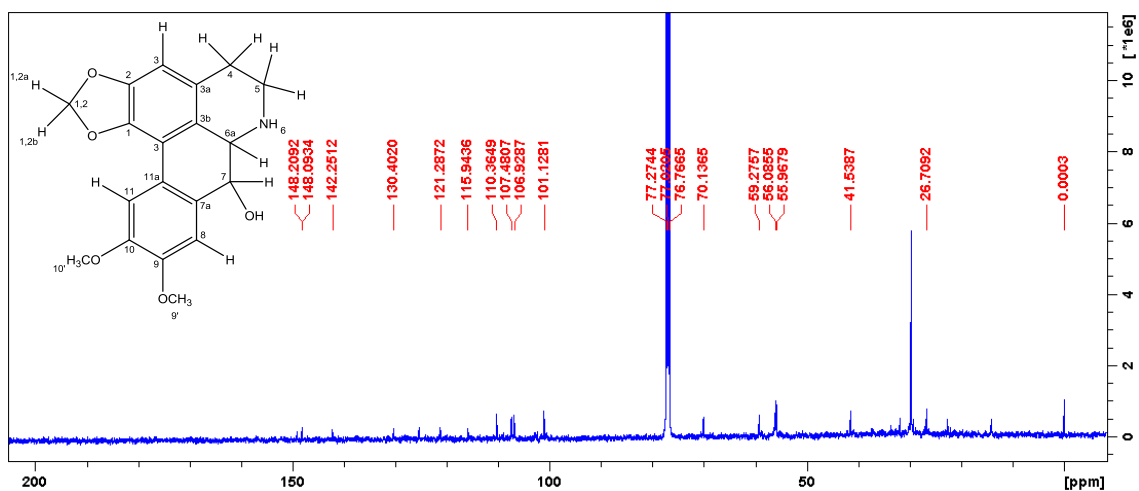
**FIGURA 45** - Ampliação da região de hidrogênios metilênicos, metínico e metoxílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS4**.



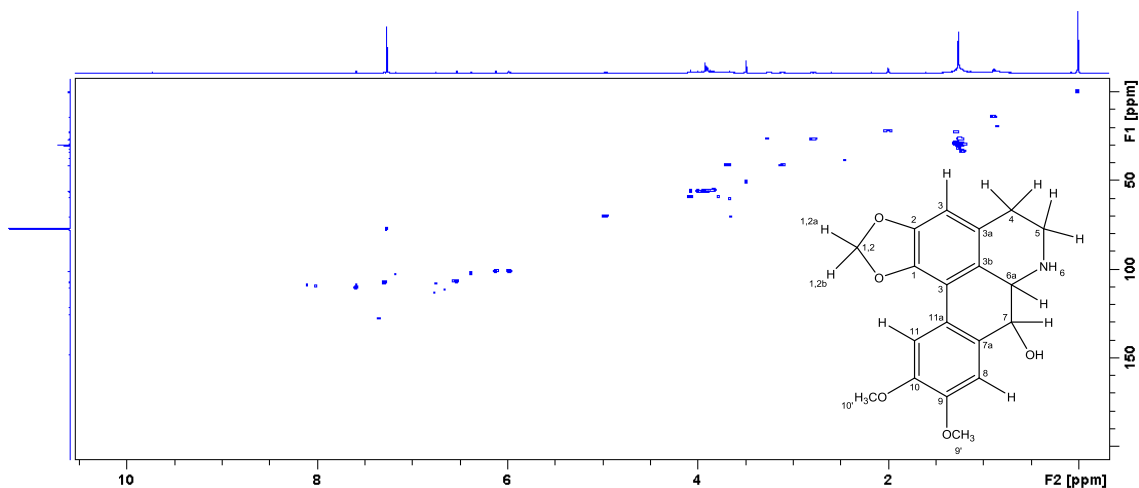
Entre  $\delta$  2,78 e  $\delta$  4,92, encontram-se os sinais dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-4, H-5 e H-7, e do hidrogênio metínico H-6a. Na posição 4, os hidrogênios são multipletos com deslocamento químico de  $\delta$  2,78 e  $\delta$  3,25, correlacionados com o carbono em  $\delta$  26,5 no mapa HSQC. Na posição 5, os hidrogênios são multipletos com deslocamento de  $\delta$  3,10 e  $\delta$  3,67, correlacionados ao carbono em  $\delta$  41,3. Na posição 6a, o hidrogênio é um duplete de deslocamento  $\delta$  4,07 ( $J = 11,8$  Hz), correlacionado com o carbono em  $\delta$  62,1. O hidrogênio da posição sete (7), é um duplete de deslocamento  $\delta$  4,91 ( $J=11,8$  Hz) que se correlaciona com o carbono em  $\delta$  70,0, conforme o mapa de correlação HSQC. As constantes de acoplamento iguais ( $J=11,8$  Hz) dos hidrogênios  $\delta$  4,07 e  $\delta$  4,91, indicam que ambos são vizinhos e que ambos estão ligados a um carbono metínico.

Diferente do observado para o alcaloide **dicentrina (DS2)**, a substância **DS4**, apresenta deslocamento químico mais elevado para o C-7 e apenas um hidrogênio ligado a ele, indicando uma substituição na posição 7 do anel C do sistema aporfínico. O deslocamento químico  $\delta$  70,0 para o C-7, é característico de ligação com hidroxila. A ausência do sinal no espectro de carbono em 43 ppm, caracteriza a ausência da metila ligada ao nitrogênio na posição 6. Os demais deslocamentos químicos são semelhantes, sugerindo semelhança na estrutura da molécula.

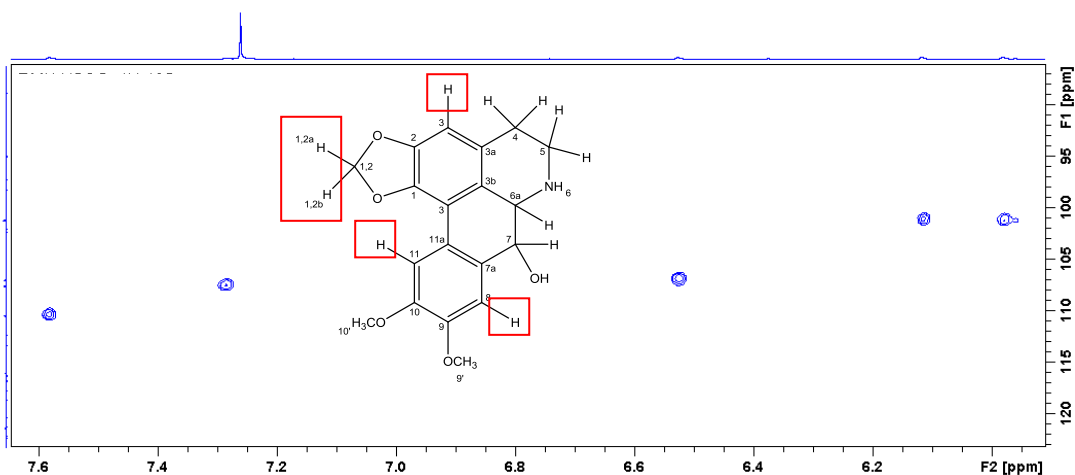
**FIGURA 46** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS4**.



**FIGURA 47** - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS4**.

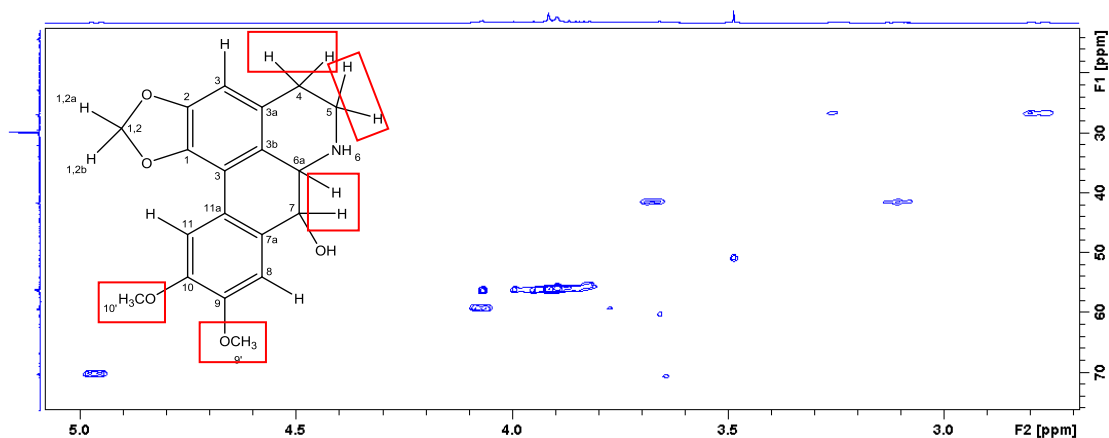


**FIGURA 48** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS4**.



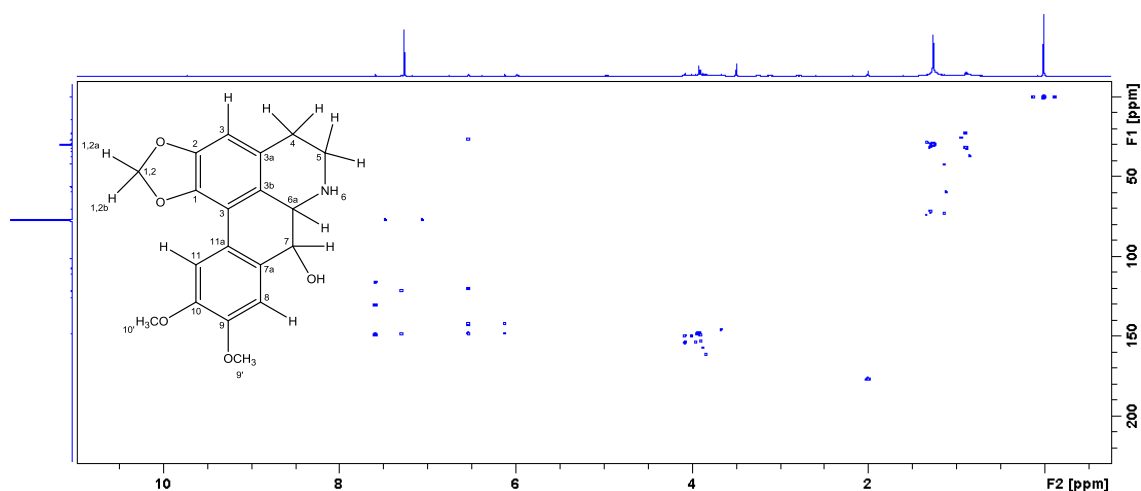


**FIGURA 49** - Ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos, dos metilênicos e metínicos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS4**.

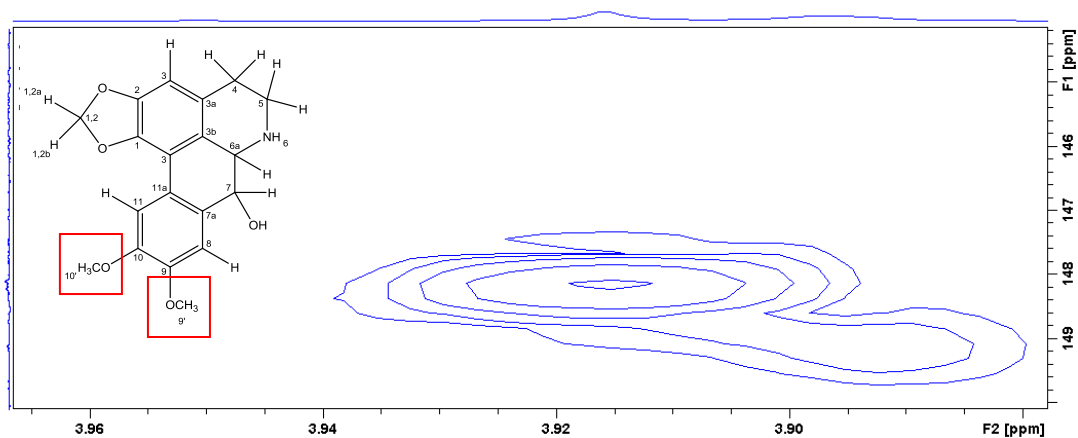


Os sinais em  $\delta$  3,90 e 3,91 com integração para três (3) hidrogênios, referem-se aos sinais dos hidrogênios das duas metoxilas do anel D. As metoxilas se ligam ao anel D nos carbonos com deslocamentos químicos de  $\delta$  148,9 e  $\delta$  148,0, o que foi confirmado pelos mapas de correlação HMBC e HSQC.

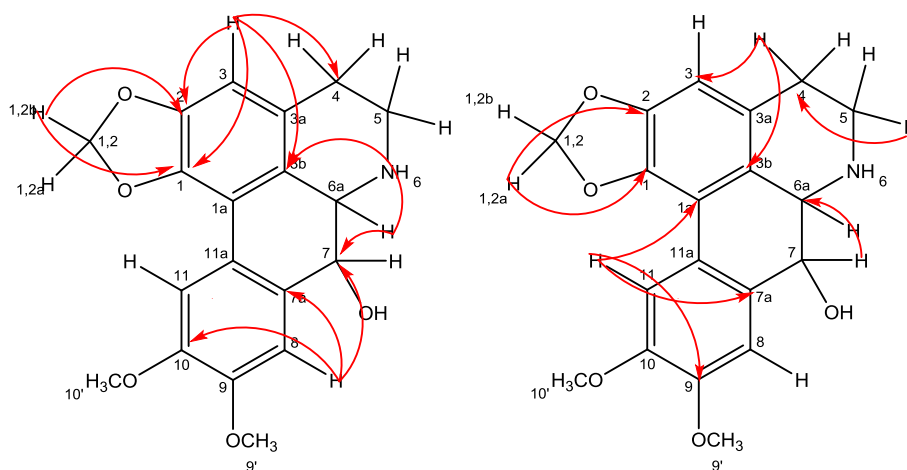
**FIGURA 50** - Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$  + gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **DS4**.



**FIGURA 51** - Ampliação da região das metoxilas do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS4**.



**FIGURA 52** - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de **DS4**.



**TABELA 17** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **DS4**.

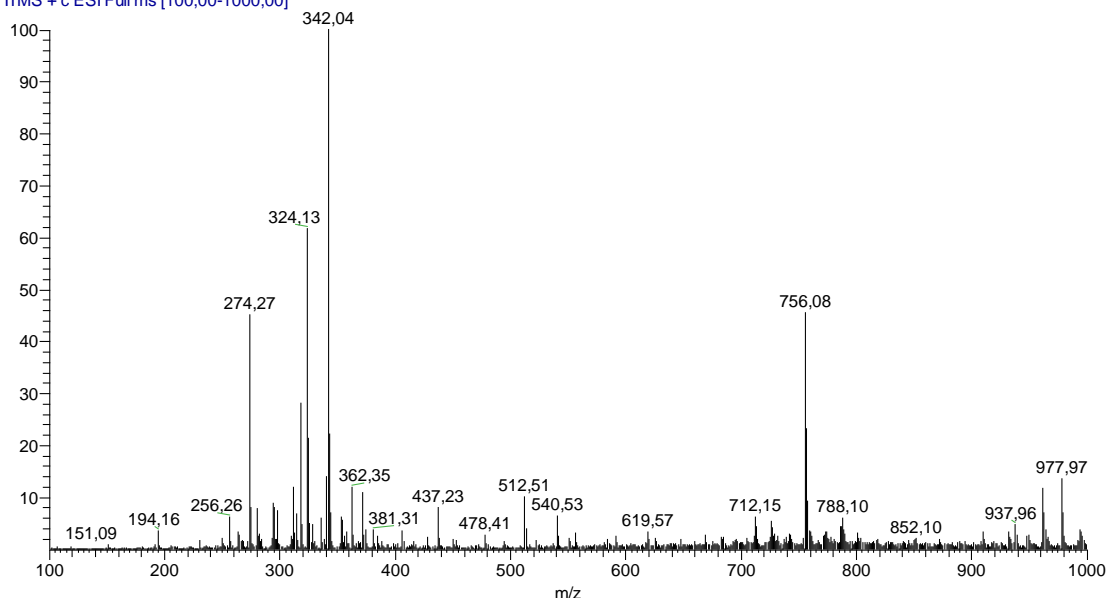
Posição	Substância <b>DS4</b>		
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ )
1	-----	142,2, C	-----
1a	-----	115,8, C	-----
2	-----	148,0, C	-----
3	6,52 (1H, <i>s</i> )	106,9, CH	1, 2, 3b e 4
3a	-----	-----	-----
3b	-----	119,8, C	-----
4	2,77 (1H, <i>m</i> ) 3,25 (1H, <i>m</i> )	26,5, $\text{CH}_2$	3 e 3b
5	3,10 (1H, <i>m</i> ) 3,67 (1H, <i>m</i> )	41,3, $\text{CH}_2$	----- 4
6a	4,07 (1H, <i>d</i> , 11,8)	59,2, CH	3b e 7

Posição	Substância DS4 (continuação)		
	$^1\text{H } \delta$ (mult., $J$ em Hz)	$^{13}\text{C } (\delta)$	HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ )
7a	-----	130,2, C	-----
8	7,27 (1H, <i>s</i> )	107,5, CH	7, 7a, 10, 11a,
9	-----	148,9, C	-----
10	-----	148,0, C	-----
11	7,58 (1H, <i>s</i> )	110,4, CH	1a, 7a e 10
11a	-----	121,1, C	-----
(1,2)- OCH <sub>2</sub> O	5,97 (1H, <i>d</i> , 1,1) 6,11 (1H, <i>d</i> , 1,1)	101,1, CH <sub>2</sub>	1 e 2 1 e 2
9- OCH <sub>3</sub>	3,90 (3H, <i>s</i> )	55,9, CH <sub>3</sub>	9, 10
10- OCH <sub>3</sub>	3,91 (3H, <i>s</i> )	56,1, CH <sub>3</sub>	9, 10

A análise do espectro de massas do alcaloide aporfínico **DS4** obtido através de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+), indicou a presença de uma molécula protonada com  $m/z$  342 Da  $[\text{M}+\text{H}]^+$ , compatível com os dados de RMN que indicam fórmula molecular  $\text{C}_{19}\text{H}_{19}\text{NO}_5$ . Pode-se notar um íon com abundância relativa acima de 60%, que indica uma fragmentação na fonte com perda de uma molécula de água (18 Da), dado compatível com a estrutura proposta com uma hidroxila na posição sete (7) do anel C do sistema aporfínico.

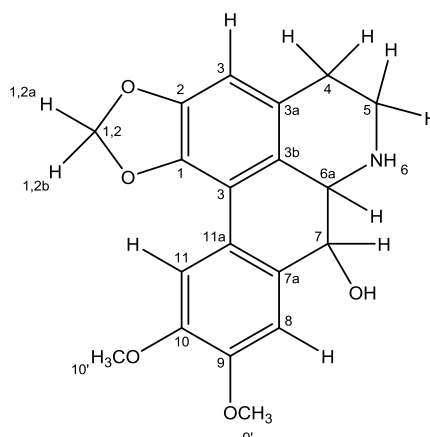
**FIGURA 53** - Espectro de Massas da substância **DS4**.

sem nome #48-61 RT: 0,77-0,92 AV: 14 NL: 2,52E4  
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



Após análise dos dados RMN e EM e da comparação com os dados da literatura (KONISH *et al.*, 1998) pode-se concluir que a substância **DS4** é o alcaloide aporfínico **7-hidroxinordicentrina**.

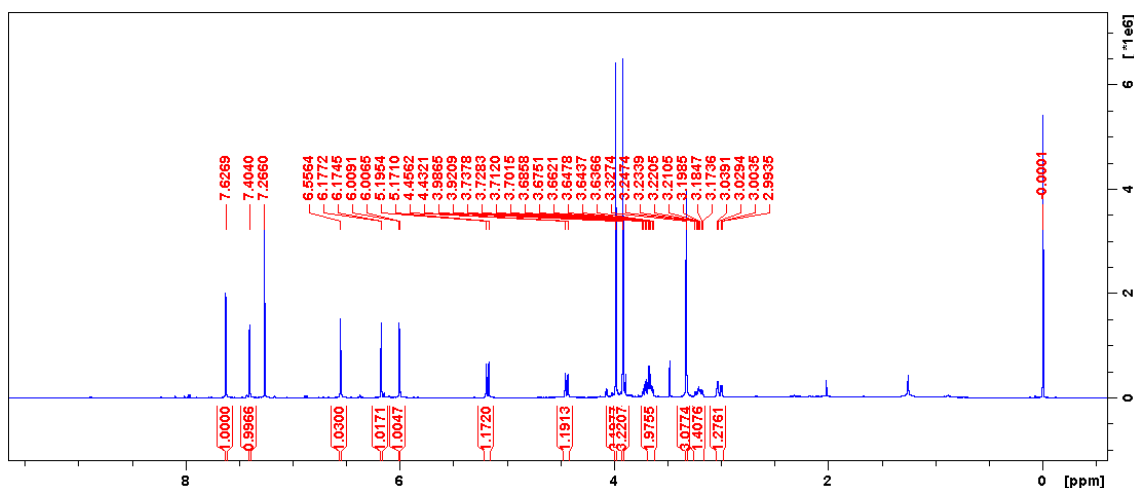
**FIGURA 54** - Estrutura da 7-hidroxinordicentrina.



### 5.1.2.3 Alcaloide DS8

O alcaloide **DS8** apresentou-se como sólido amorfo de massa igual a 29,3 mg e coloração castanho escuro. Apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff. A análise preliminar do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$  + gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), (FIGURA 55) pôde-se identificar sinais característicos de um alcaloide aporfínico.

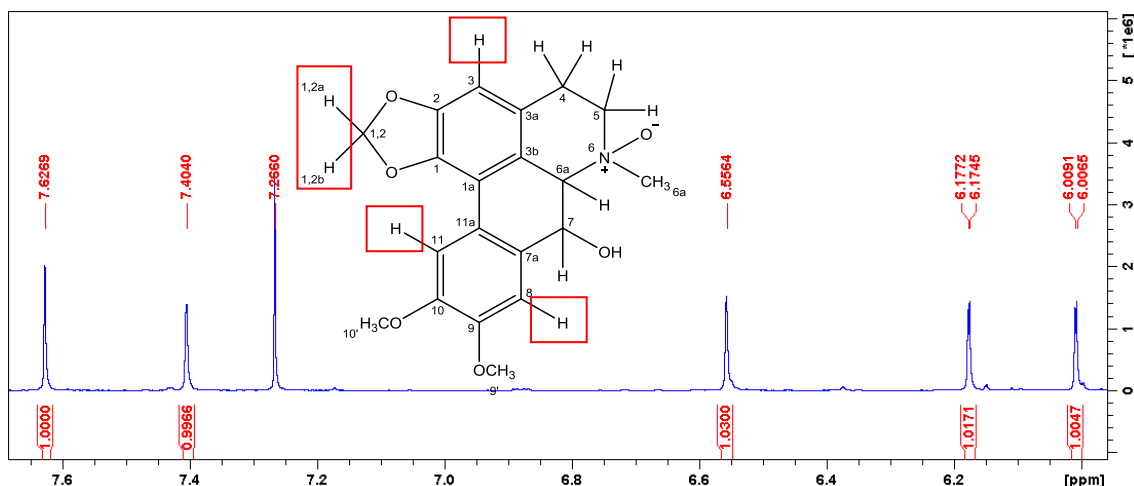
**FIGURA 55** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.



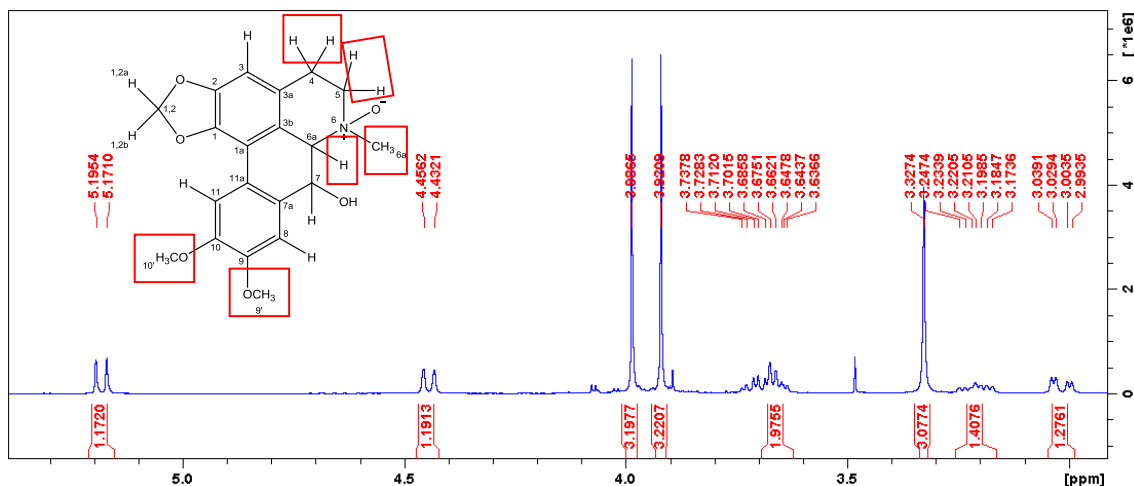
Observou-se algumas semelhanças com os alcaloides **dicentrina** e **7-hidroxinordicentrina**. O alcaloide **DS8** possui na região dos hidrogênios aromáticos a presença de dois sinais típicos do anel D substituído em  $\delta$  7,62 (1H, s) e  $\delta$  7,40 (1H, s) referentes aos hidrogênios H-11 e H-8, um sinal típico do H-3 do anel A do sistema aporfínico dissustituído em  $\delta$  6,55 (1H, s), e dois sinais em  $\delta$  6,17 e  $\delta$  6,00 (d,  $J=1,3$

Hz), correlacionados com o sinal de carbono em  $\delta$  101,4 no mapa de correlação HSQC, indicando a presença de um grupo metilenodióxi.

**FIGURA 56** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.



**FIGURA 57** - Ampliação da região de hidrogênios metilênicos, metílicos, metínico e metoxílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.

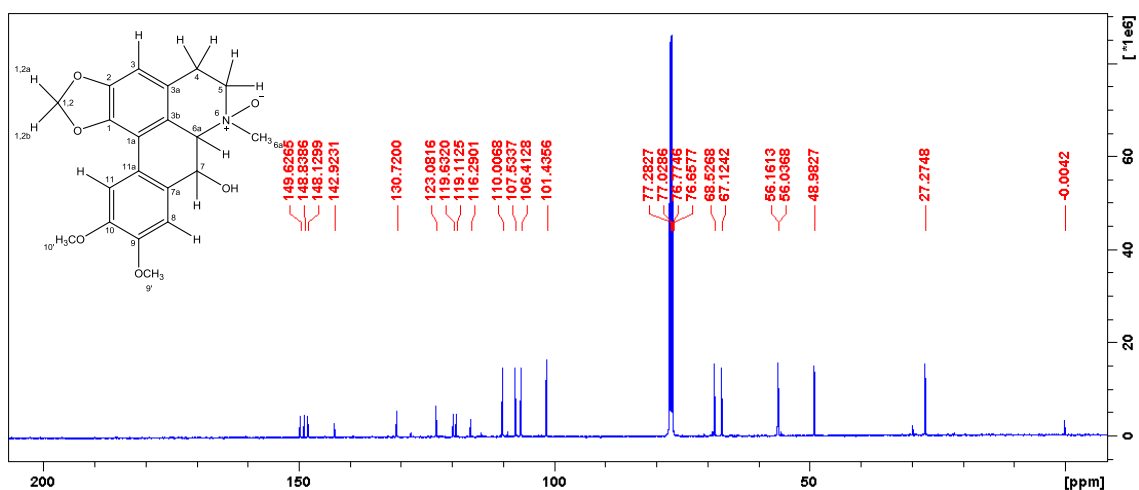


Os sinais de hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-4, H-5 e H-7 e o sinal do hidrogênio metínico H-6a, encontram-se entre  $\delta$  3,01 e 5,18, deslocamentos químicos mais desblindados que os hidrogênios análogos dos alcaloides **dicentrina (DS2)** e **7-hidroxindicentrina (DS4)**. Os carbonos ligados a esses hidrogênios foram determinados com o auxílio do mapa de correlação HSQC. Os hidrogênios  $\delta$  3,19 (*m*) e  $\delta$  3,01 (*dd*,  $J = 17,7$  e 4,8 Hz), correlacionam com o carbono em  $\delta$  27,3, característico da posição quatro (4). O multipletto largo em  $\delta$  3,67 está correlacionado ao carbono em  $\delta$  67,2, característico da posição cinco (5). O hidrogênio dupletto em  $\delta$  4,44 com constante de acoplamento 12,1 Hz está correlacionado com o carbono em  $\delta$  76,6, característico da

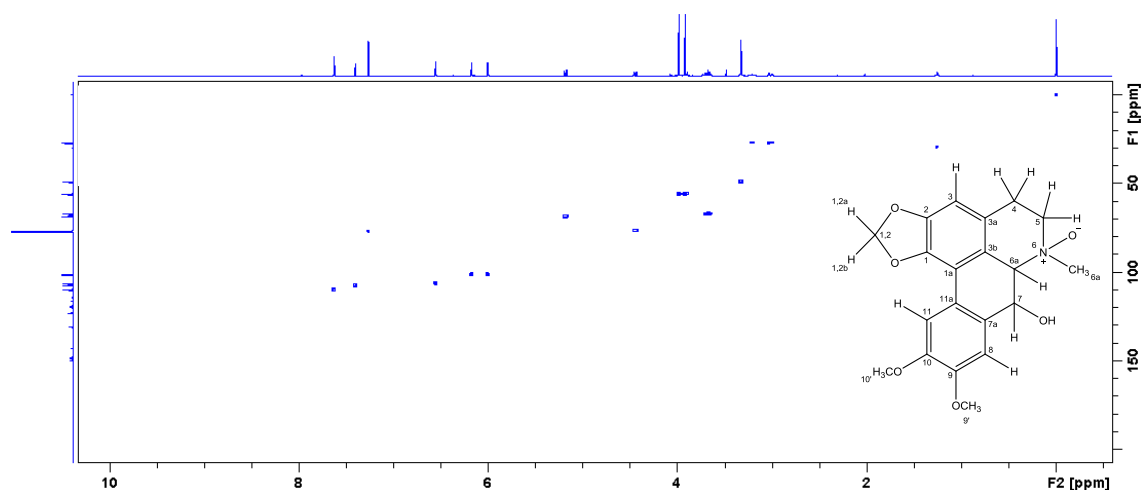
posição 6a. O duplo duplete com deslocamento químico de  $\delta$  5,18 e constantes de acoplamento iguais 12,1 e 0,8 Hz, se correlacionam com o carbono em  $\delta$  68,5, característico de carbono ligado a hidroxila. As igualdades e magnitude das constantes de acoplamento (12,1 Hz) dos hidrogênios  $\delta$  4,44 e  $\delta$  5,18, indicam que são vizinhos, ocupando as posições 6a e 7 respectivamente.

Os sinais em  $\delta$  3,98 e  $\delta$  3,92, ambos simpletos, com integração para três (3) hidrogênios, referem-se aos hidrogênios das duas metoxilas do anel D. As metoxilas se ligam ao anel D dos carbonos com deslocamentos químicos de  $\delta$  149,6 e 148,2, o que foi confirmado pelos mapas de correlação HMBC e HSQC. O simpleto em  $\delta$  3,32 com integração para três (3), está correlacionado ao carbono em  $\delta$  49,0 no mapa de correlação HSQC. A presença de um simpleto com integração para três (3) hidrogênios em torno de  $\delta$  3,30 a 3,33 é típico de grupo metílico de aporfínico *N*-óxido.

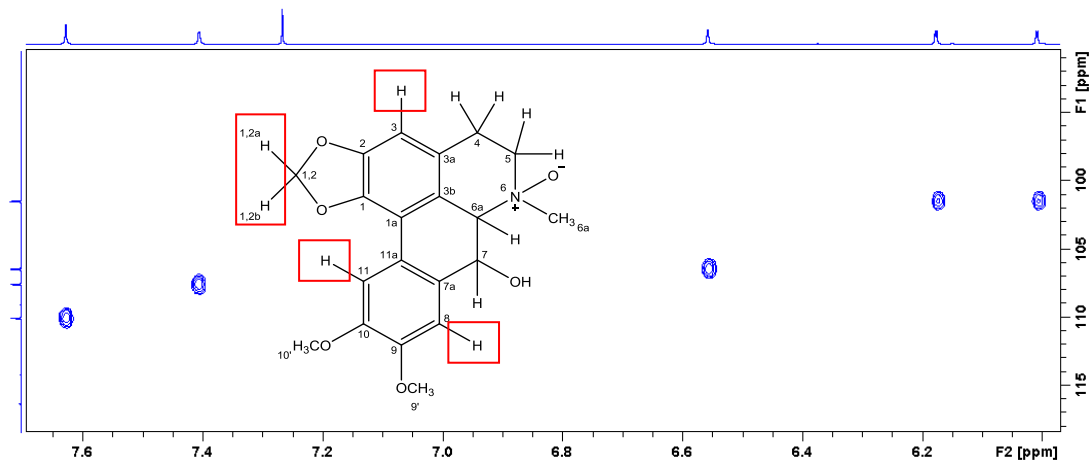
**FIGURA 58** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.



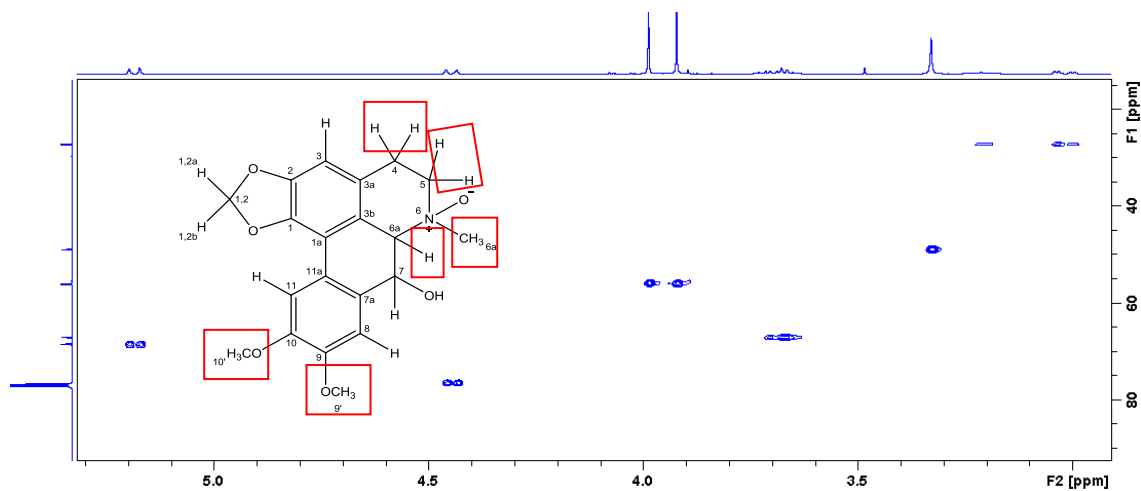
**FIGURA 59** - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.



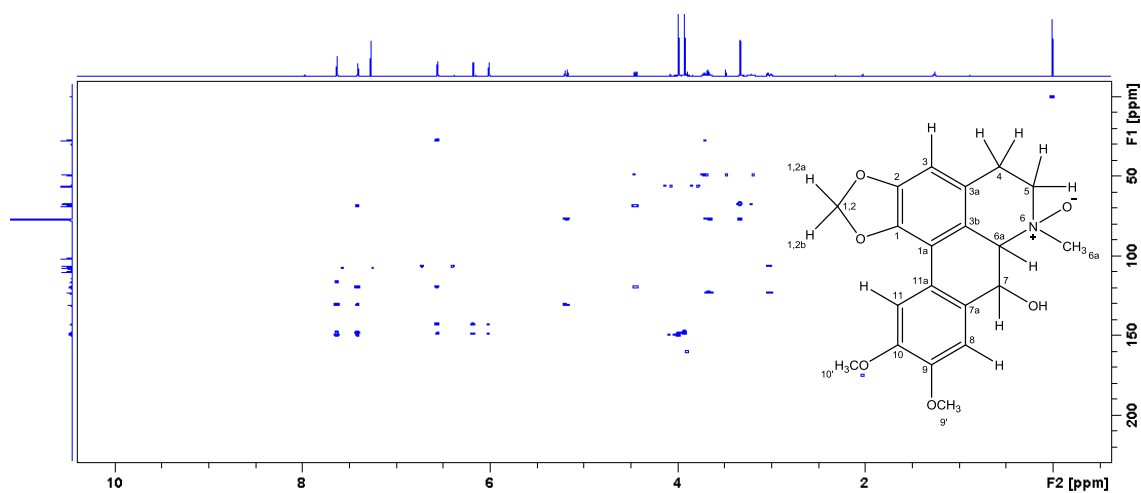
**FIGURA 60** - Ampliação da região de aromáticos e da ponte metilenodioxi do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.



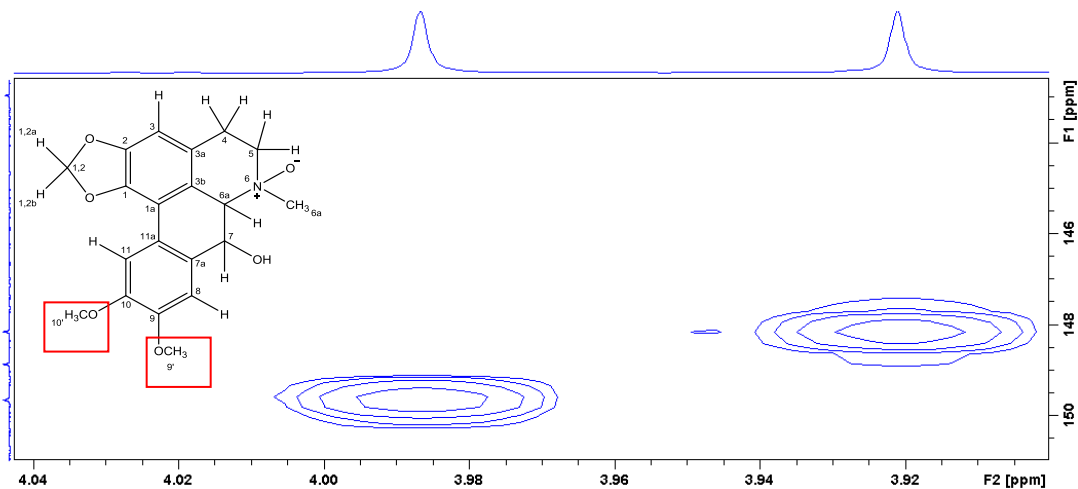
**FIGURA 61** - Ampliação da região de hidrogênios metoxilílicos, metilênicos e metínicos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.



**FIGURA 62** - Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.



**FIGURA 63** - Ampliação da região de metoxilas do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS8**.

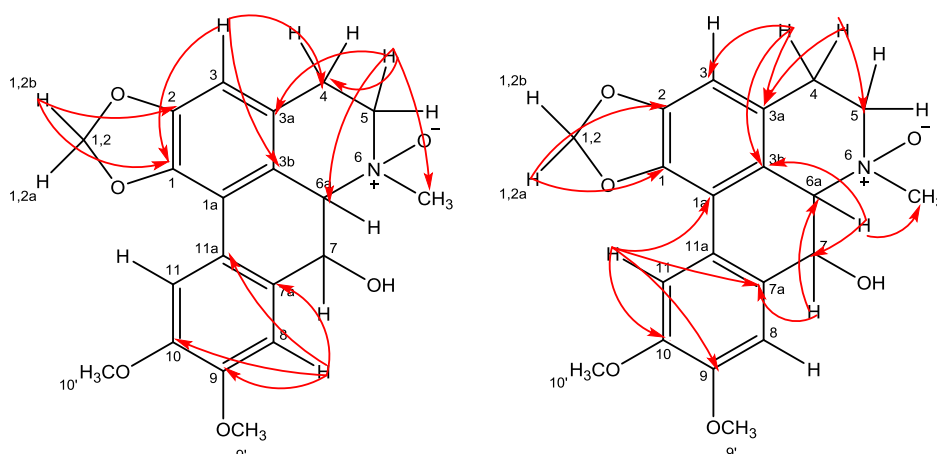


**TABELA 18** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **DS8**.

Posição	Substância DS8		
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ )
1	-----	142,9, C	-----
1a	-----	116,2, C	-----
2	-----	148,8, C	-----
3	6,55 (1H, <i>s</i> )	106,1, CH	1, 2, 3b e 4
3a	-----	123,0, C	-----
3b	-----	119,1, C	-----
4	3,01 (1H, <i>dd</i> , 17,7 e 4,8)	27,3 CH <sub>2</sub>	3, 3a e 3b
	3,19 (1H, <i>m</i> )		3a, 5, 6
5	3,65 (1H, <i>m</i> )	67,2 CH <sub>2</sub>	3a, 4, 6 e 6a
	3,65(1H, <i>m</i> )		-----
6	3,32 (3H, <i>s</i> )	49,0 CH <sub>3</sub>	5 e 6a
6a	4,44 (1H, <i>d</i> , 12,1)	76,6, CH	3b, 6 e 7
7	5,18 (1H, <i>dd</i> , 0,8 e 12,1)	68,5 CHOH	6a e 7a
7a	-----	130,7, C	-----
8	7,40 (1H, <i>s</i> )	107,6, CH	7a, 9, 10 e 11a,
9	-----	149,5, C	-----
10	-----	148,0, C	-----
11	7,62 (1H, <i>s</i> )	110,0, CH	1a, 7a, 9, 10 e 11a
11a	-----	119,2, C	-----
(1,2)- OCH <sub>2</sub> O	6,00 (1H, <i>d</i> , 1,1)	101,4, CH <sub>2</sub>	1 e 2
	6,17 (1H, <i>d</i> , 1,1)		1 e 2
9- OCH <sub>3</sub>	3,98 (3H, <i>s</i> )	56,1, CH <sub>3</sub>	9 e 10
10- OCH <sub>3</sub>	3,92 (3H, <i>s</i> )	56,1, CH <sub>3</sub>	9 e 10



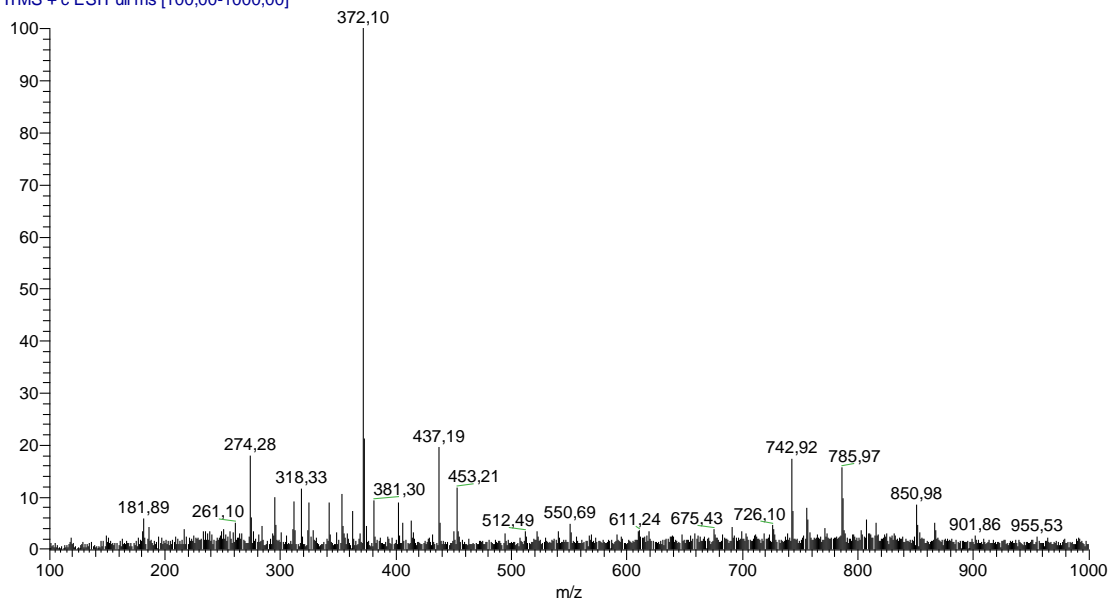
**FIGURA 64** - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de **DS8**.



A análise do espectro de massas do alcaloide aporfínico **DS8** obtido através de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+), indicou a presença de uma molécula protonada com  $m/z$  372 Da  $[M+H]^+$ , compatível com os dados de RMN que indicam fórmula molecular  $C_{20}H_{21}NO_6$ .

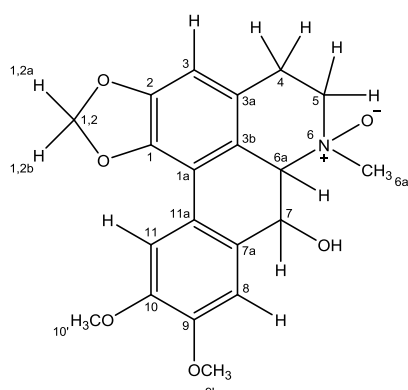
**FIGURA 65** - Espectro de Massas da substância **DS8**.

15\_03\_17 #1687-1720 RT: 25,67-26,15 AV: 34 NL: 2,39E3  
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



Após análise dos dados RMN e EM e a comparação com a literatura, (SILVA *et al.*, 2009) pode-se concluir que a substância **DS8** é o alcaloide aporfínico **Duguetina N-óxido**.

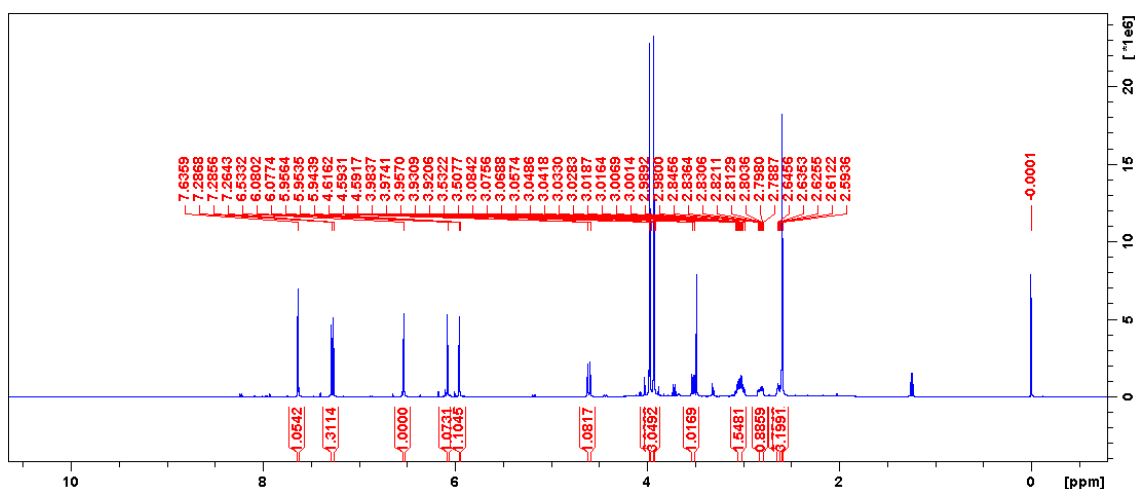
**FIGURA 66** - Estrutura da **Duguetina N-óxido**.



### 5.1.2.3 Alcaloide DS9

O alcaloide **DS9** apresentou massa igual a 10,9 mg e coloração castanho escuro. Apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff. Pela análise preliminar do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (FIGURA 67) pôde-se identificar sinais característicos de um alcaloide do tipo aporfínico.

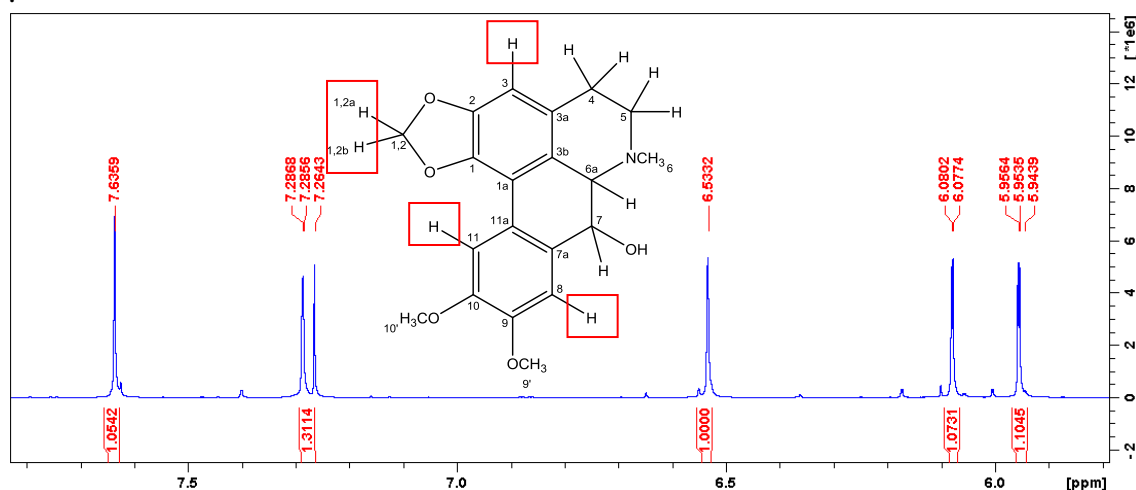
**FIGURA 67**- Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS9**.



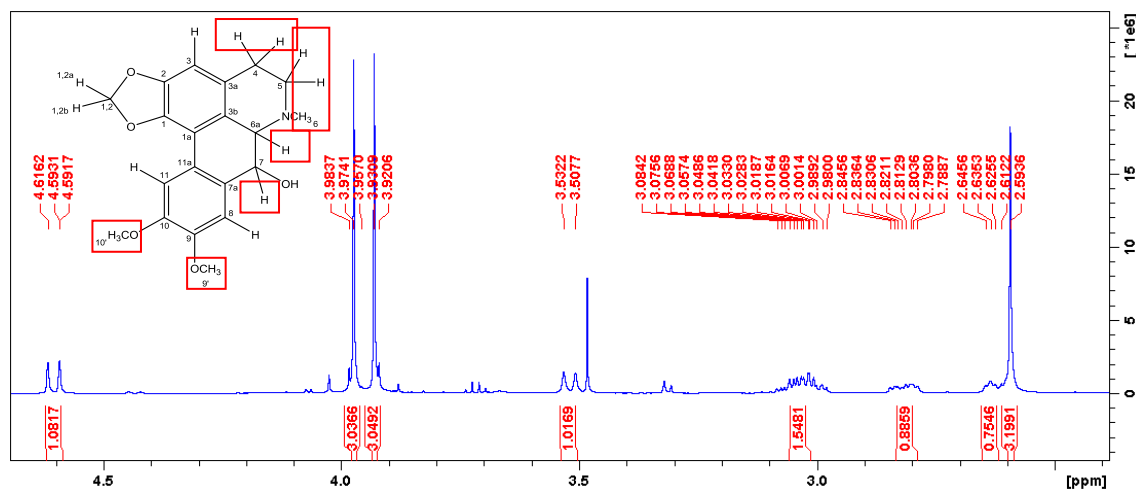
Na região dos hidrogênios aromáticos foi observado a presença de dois sinais típicos do anel D substituído em  $\delta$  7,63 (1H, s) e  $\delta$  7,27 (1H, d,  $J=0,7$  Hz) referentes aos hidrogênios H-11 e H-8, correlacionados aos carbonos em  $\delta$  110,4 e  $\delta$  107,3, e um sinal típico do H-3 do anel A do sistema aporfínico dissustituído em  $\delta$  6,53 (1H, s), referente ao carbono em  $\delta$  106,8 (TABELA 20) de acordo com o mapa de correlação HSQC. Verificou-se também a presença dos sinais dos dupletos em  $\delta$  6,07 e  $\delta$  5,95 (d,  $J=1,4$  Hz), correlacionados com o sinal de carbono em  $\delta$  100,7 no mapa de correlação HSQC, indicando a presença de um grupo metilenodióxi na estrutura. Esses sinais são

compatíveis com os observados nos demais alcaloides aporfínicos identificados neste trabalho, indicando uma semelhança estrutural.

**FIGURA 68** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS9**.



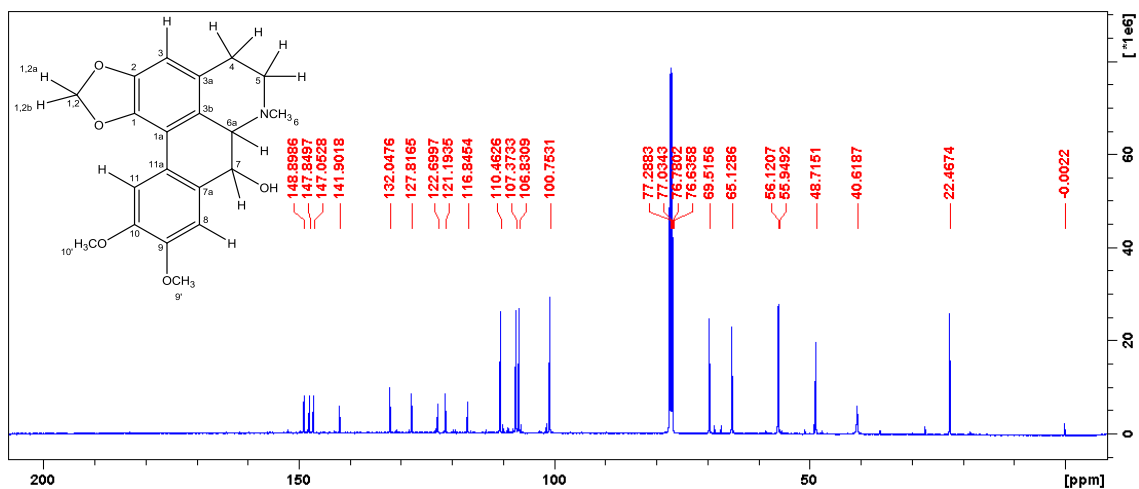
**FIGURA 69** - Ampliação da região de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos e metoxílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS9**.



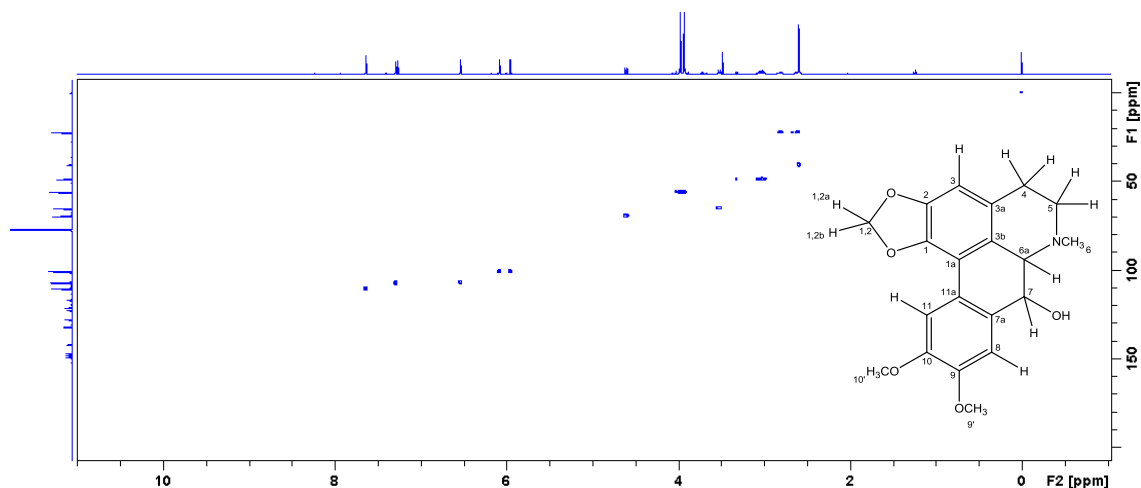
Entre  $\delta$  2,63 e  $\delta$  4,60, encontram-se os sinais dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-4, H-5 e H-7, dos metílicos e do metínico H-6a. Os carbonos ligados a esses hidrogênios foram determinados com o auxílio do mapa de correlação HSQC. Na posição quatro (4), os hidrogênios são  $\delta$  2,81 (1H, *ddd*,  $J=16,3, 7,5, 4,5$  Hz) e 2,61 (*m*), correlacionados ao carbono  $\delta$  22,4. Na posição cinco (5), os hidrogênios são multipletos com deslocamento químico de  $\delta$  3,02, correlacionados ao carbono  $\delta$  48,7. Na posição 6a, o hidrogênio é um duplete em  $\delta$  3,52 com constante de acoplamento igual a 12,2 Hz, correlacionado com o carbono em  $\delta$  65,1. O hidrogênio da posição sete (7) em  $\delta$  4,60 é um duplo duplete constantes de acoplamento iguais 12,2 e 0,7 Hz, que

se correlaciona com o carbono em  $\delta$  69,5, indicando uma ligação carbono-hidroxila na posição 7.

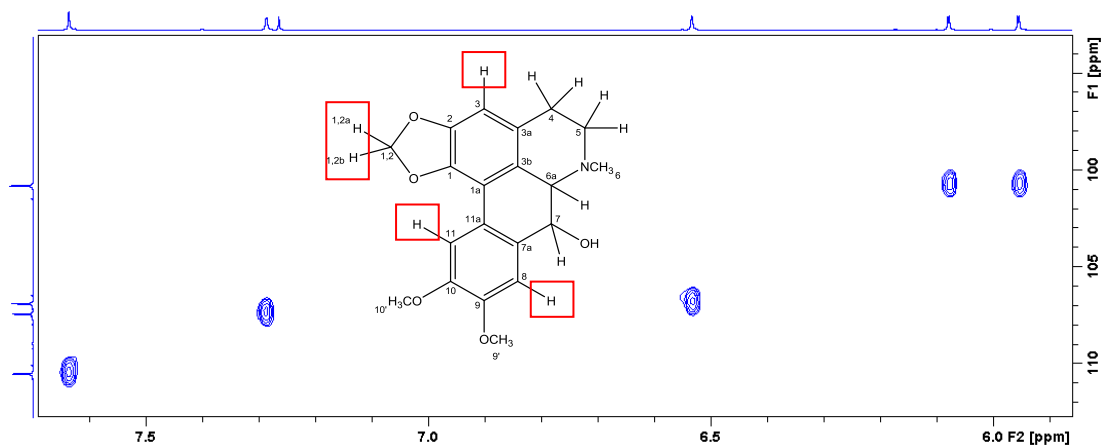
**FIGURA 70** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS9**.



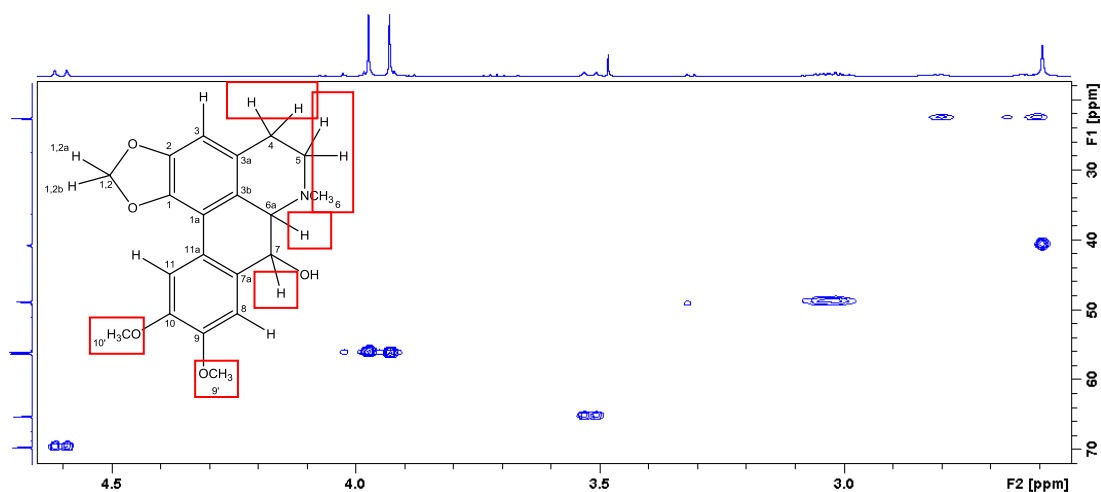
**FIGURA 71** - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$  + gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **DS9**.



**FIGURA 72** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS9**.

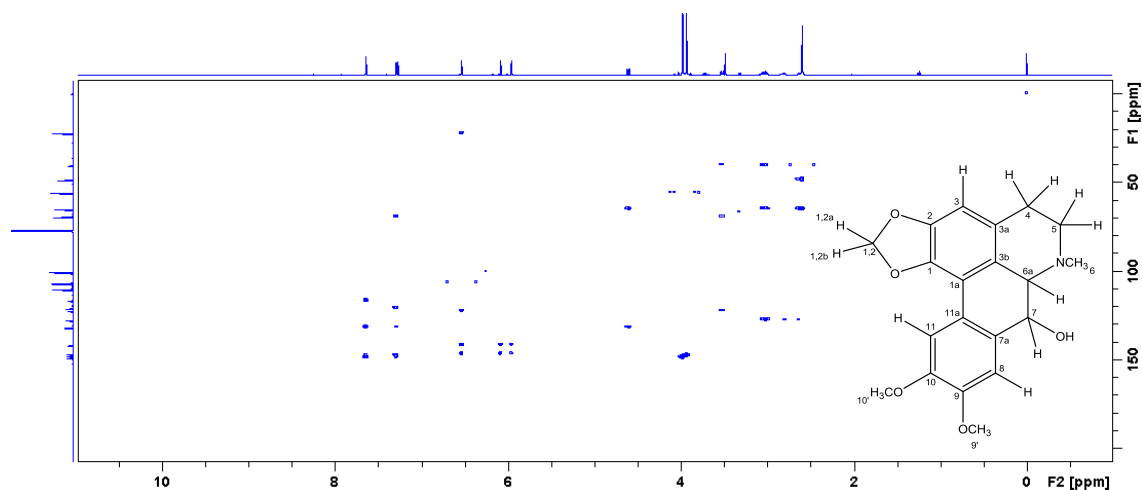


**FIGURA 73** - Ampliação da região dos hidrogênios metoxílicos, metilênicos e metínicos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS9**.

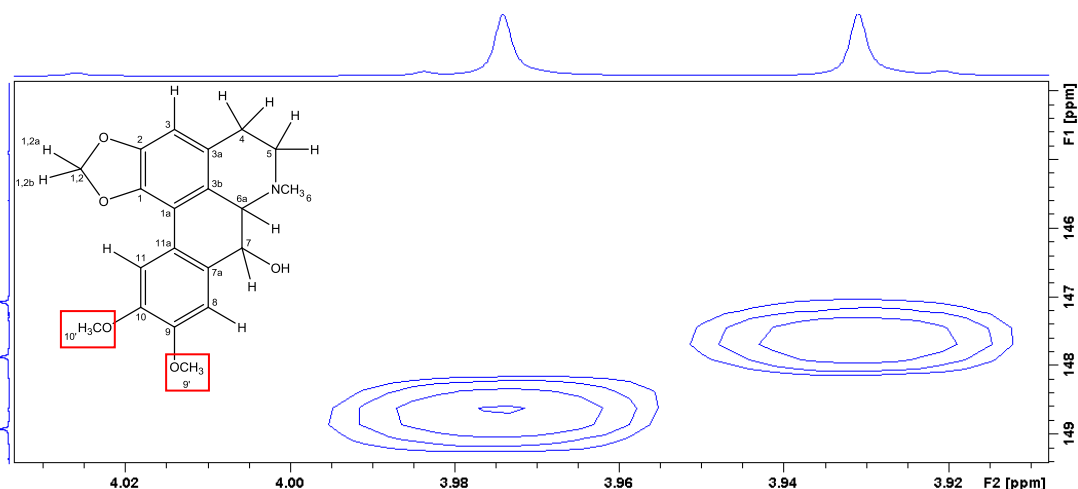


Os sinais em  $\delta$  3,97 e  $\delta$  3,93 com integração para três (3) hidrogênios, referem-se aos sinais dos hidrogênios das duas metoxilas do anel D. As metoxilas se ligam ao anel D nos carbonos com deslocamento de  $\delta$  148,9 e  $\delta$  147,8, o que foi confirmado pelos mapas de correlação HMBC e HSQC.

**FIGURA 74** - Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$  + gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **DS9**.



**FIGURA 75** - Ampliação da região dos hidrogênios das metoxilas do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de DS9.

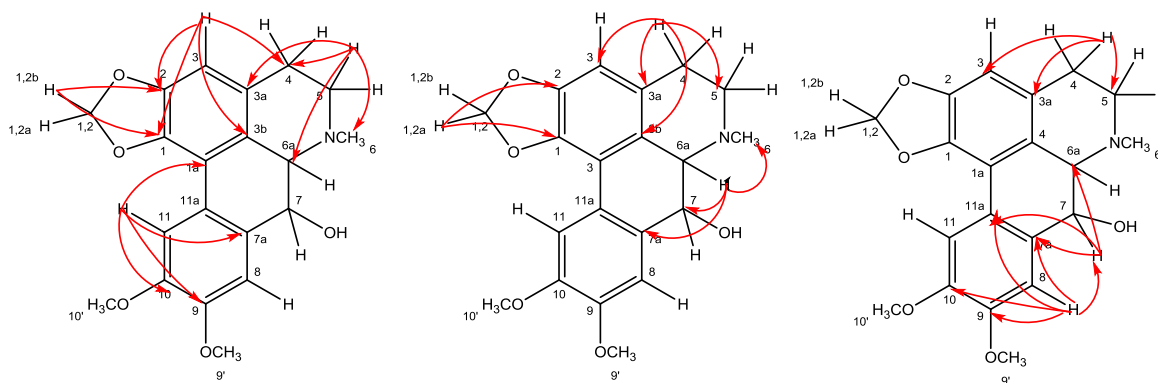


**TABELA 19** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DS9.

Posição	Substância DS9			Duguetina*
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ )	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
1	-----	141,9, C	-----	141,1, C
1a	-----	116,8, C	-----	115,8, C
2	-----	147,0, C	-----	147,2, C
3	6,53 (1H, <i>s</i> )	106,8, CH	1, 2, 3b e 4	106,7 CH
3a	-----	127,8, C	-----	127,7, C
3b	-----	122,7, C	-----	121,0, C
4	2,81 (1H, <i>ddd</i> , 16,3, 7,5 e 4,5) 2,61 (1H, <i>m</i> )	22,4 CH <sub>2</sub>	3, 3a, 3b e 5  3, 3a, 3b, 5 e 6a	24,6, CH <sub>2</sub>
5	3,02 (1H, <i>m</i> ) 3,02(1H, <i>m</i> )	48,7 CH <sub>2</sub>	3a, 4, 6 e 6a  -----	50,8 CH <sub>2</sub>
6	2,59 (3H, <i>s</i> )	40,6, CH <sub>3</sub>	5 e 6a	39,9 CH <sub>3</sub>
6a	3,52 (1H, <i>d</i> , 12,2)	65,1, CH	3b, 6, 7 e 7a	64,6, CH
7	4,60 (1H, <i>dd</i> , 0,7 e 12,2)	69,5 CHOH	6a, 7a e 11a	69,8 CHOH
7a	-----	131,7, C	-----	133,4, C
8	7,27 (1H, <i>d</i> , 0,7)	107,3, CH	7, 7a, 9, 10 e 11 <sup>a</sup>	108,1, CH
9	-----	148,9, C	-----	148,3 C
10	-----	147,8, C	-----	146,1 C
11	7,63 (1H, <i>s</i> )	110,4, CH	1a, 7a, 7, 9, 10 e 11a	110,5 CH
11a	-----	121,2, C	-----	123,6, C
(1,2)- OCH <sub>2</sub> O	5,95 (1H, <i>d</i> , 1,4) 6,07 (1H, <i>d</i> , 1,4)	100,7, CH <sub>2</sub>	1 e 2  1 e 2	100,5, CH <sub>2</sub>
9- OCH <sub>3</sub>	3,97 (3H, <i>s</i> )	55,9, CH <sub>3</sub>	9 e 10	55,3, CH <sub>3</sub>
10- OCH <sub>3</sub>	3,93 (3H, <i>s</i> )	56,1, CH <sub>3</sub>	9 e 10	56,3, CH <sub>3</sub>

\* Extraído de Guinaudeau, Leboeuf, e Cavé, 1975.

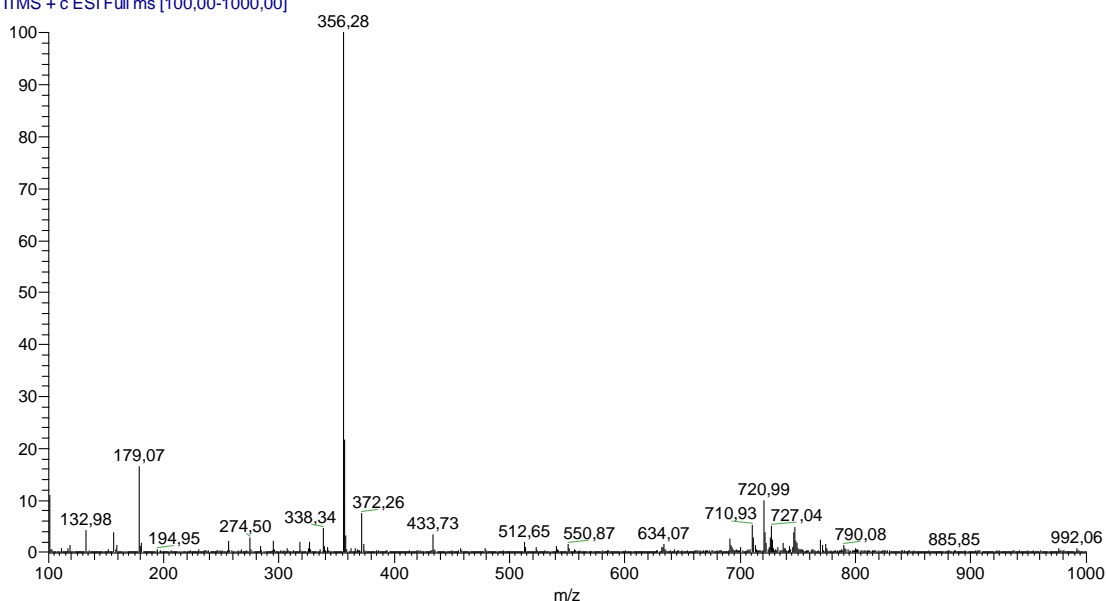
**FIGURA 76** – Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS9.



A análise do espectro de massas do alcaloide aporfínico **DS9** obtido através de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+), indicou a presença de uma molécula protonada com  $m/z$  356 Da  $[M+H]^+$ , compatível com os dados de RMN que indicam fórmula molecular  $C_{20}H_{21}NO_5$ .

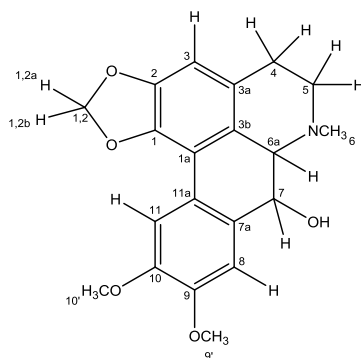
**FIGURA 77** - Espectro de Massas da substância DS9

alcaloide356msms #14-19 RT: 0,25-0,32 AV: 6 NL: 2,13E4  
T: PTMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



Após análise dos dados RMN e EM e da comparação com a literatura (GUINAUDEAU, LEBOEUF, & CAVÉ, 1975), pode-se concluir que a substância DS9 é o alcaloide aporfínico **Duguetina**.

**FIGURA 78** - Estrutura da Duguetina.

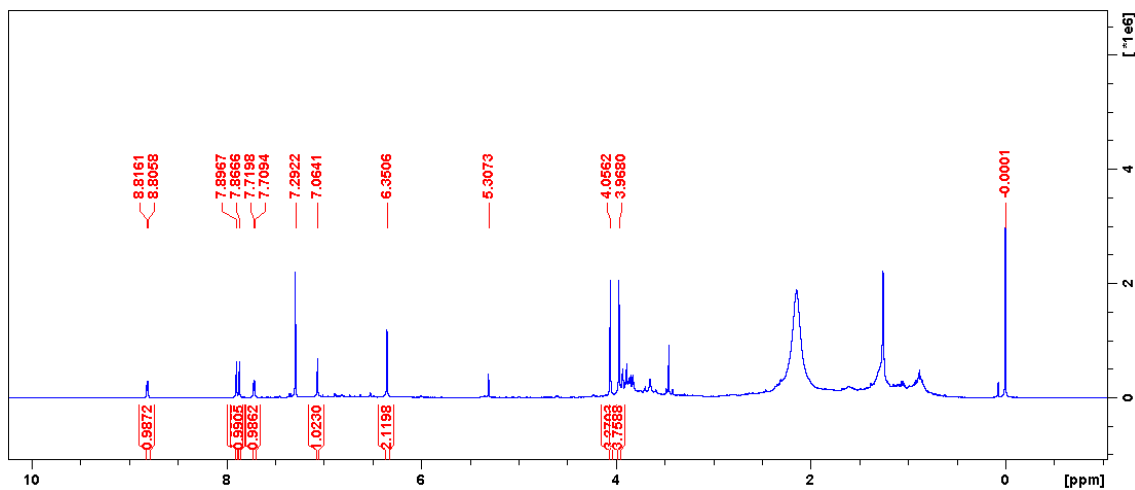


### 5.1.3 Identificação estrutural dos alcaloides oxoaporfínicos

#### 5.1.3.1 Alcaloide DS5

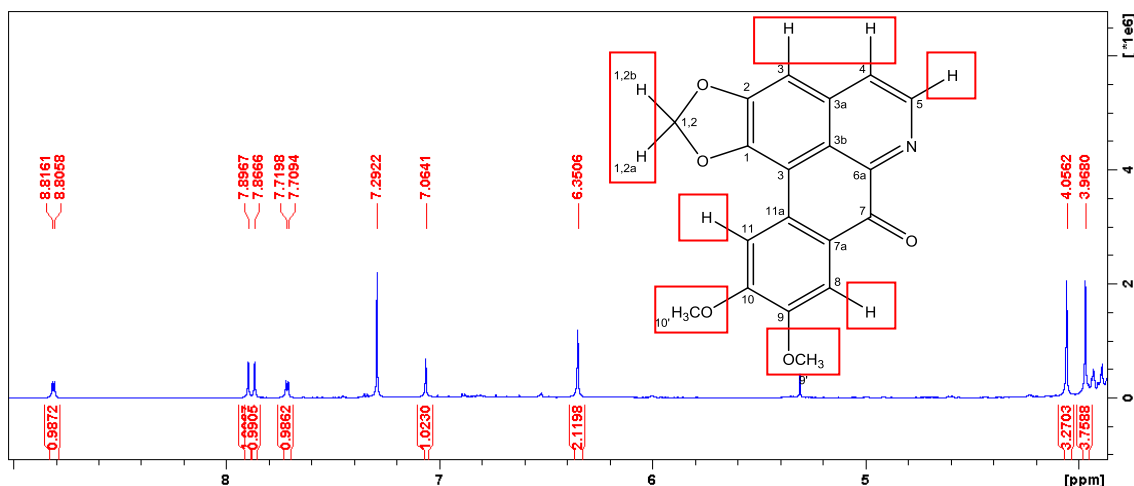
O alcaloide **DS5** apresentou-se como sólido amorfo de massa igual a 21,1 mg e coloração alaranjada. Apresentou resultado positivo para alcaloide frente ao reagente de Dragendorff com coloração alaranjada. A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>), (FIGURA 79) constata a ausência de hidrogênios metilênicos, característica de alcaloides oxoaporfínicos.

**FIGURA 79** - Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **DS5**.





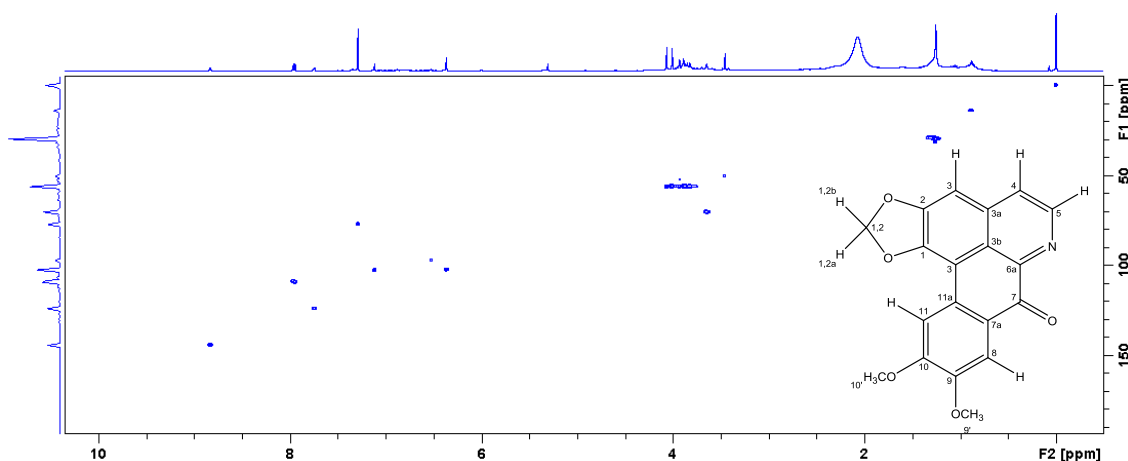
**FIGURA 80** - Ampliação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS5**.



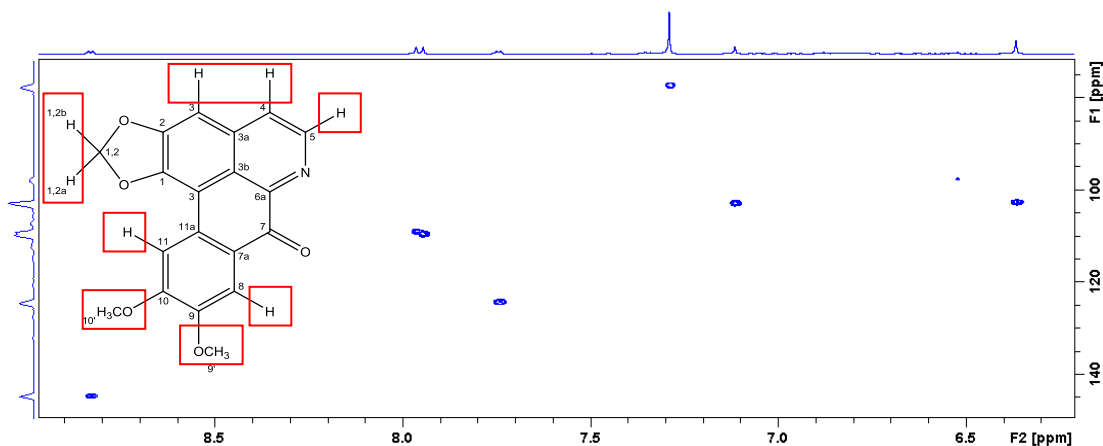
Foi observado na região dos hidrogênios aromáticos, a presença de 5 sinais de com integração para um hidrogênio cada. Os dois dupletos observados em  $\delta$  8,83 e  $\delta$  7,74 ( $d$ ,  $J= 5,1$  Hz) são característicos do sistema piridínico do anel B do esqueleto oxoaporfínico, referem-se ao H-5 e H-4, e se correlacionam com os carbonos  $\delta$  124,1 e 144,5 respectivamente. Os dois sinais, em  $\delta$  7,94 (1H,  $s$ ) e  $\delta$  7,96 (1H,  $s$ ) são típicos do anel D substituído referentes aos hidrogênios H-8 e H-11 e se correlacionam com os carbonos em  $\delta$  109,5 e em  $\delta$  108,8, respectivamente. O sinal em  $\delta$  7,11 (1H,  $s$ ) é típico do H-3 do anel A do sistema oxoaporfínico substituído, e correlaciona com o carbono em  $\delta$  102,7.

A presença do sinal em  $\delta$  6,36 (1H,  $s$ ) com integração para dois (2) hidrogênios, correlacionado com o sinal de carbono em  $\delta$  102,4 no mapa de correlação HSQC, indica a presença de um grupo metilenodióxi nas posições C-1 e C-2 do anel A do esqueleto oxoaporfínico.

**FIGURA 81** - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS5**.

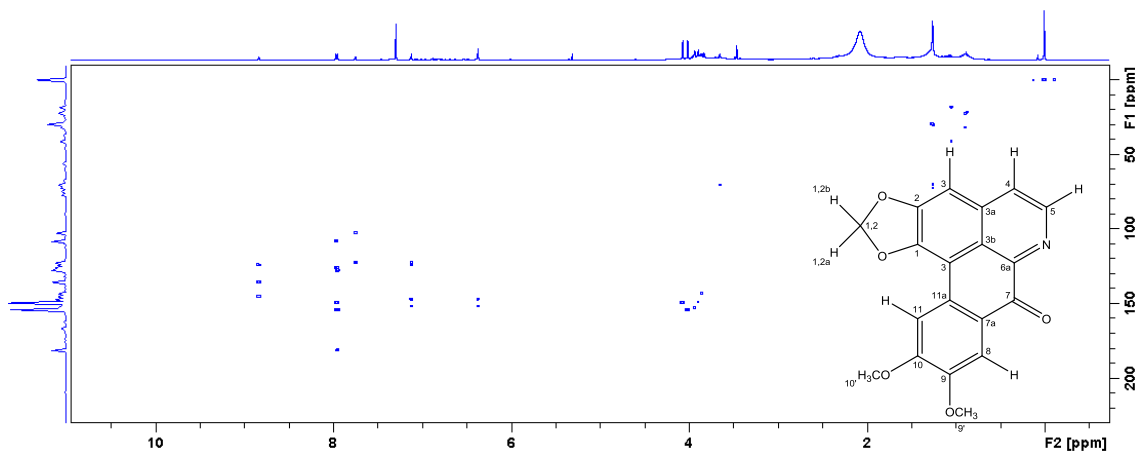


**FIGURA 82** - Ampliação do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de DS5.

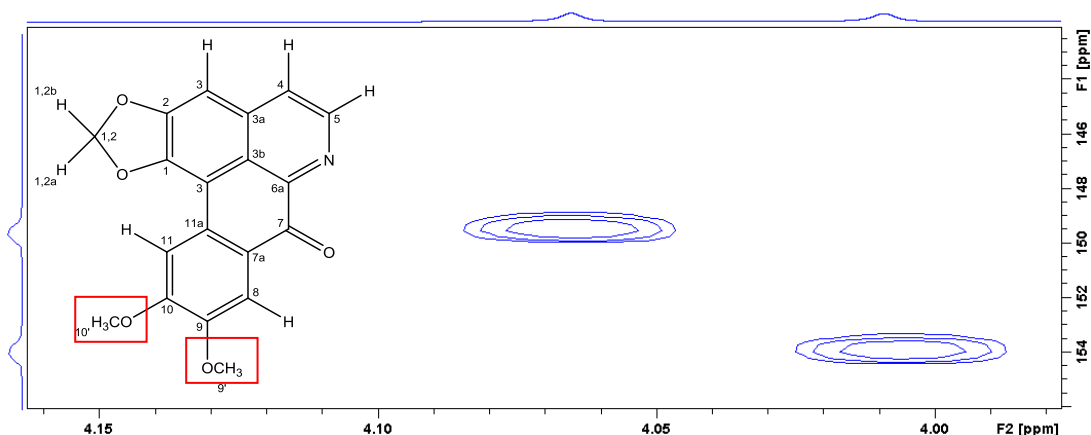


Os sinais em  $\delta$  4,00 e  $\delta$  4,06 com integração para três (3) hidrogênios, referem-se aos sinais dos hidrogênios das duas metoxilas do anel D. As metoxilas se ligam ao anel D nos carbonos com deslocamentos químicos de  $\delta$  154,1 (C-10) e  $\delta$  149,5 (C-9), o que foi confirmado pelos mapas de correlação HMBC e HSQC.

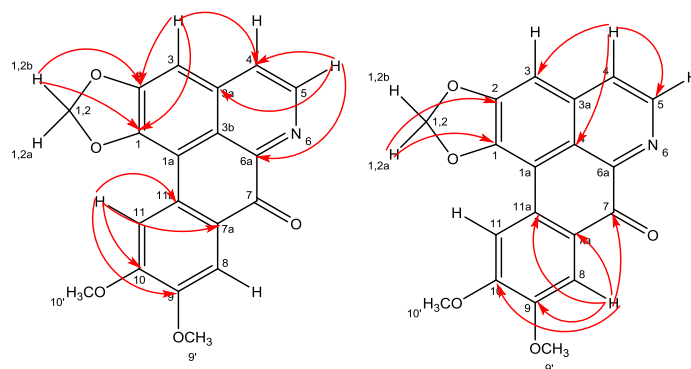
**FIGURA 83** – Mapa de correlação HMQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de DS5.



**FIGURA 84** - Ampliação da região das metoxilas do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS5**.



**FIGURA 85** – Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de **DS5**.



**TABELA 20** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **DS5**.

Posição	Substância DS5			Dicentrinona*	
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ )	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
1	-----	147,0, C	-----	-----	152,3, C
1a	-----	108,4, C	-----	-----	121,3, C
2	-----	141,5, C	-----	-----	149,8, C
3	7,11 (1H, <i>s</i> )	102,7, CH	1, 2, 3b e 4	7,25 (1H, <i>s</i> )	103,5, CH
3a	-----	135,6, C	-----	-----	-----
3b	-----	122,7, C	-----	-----	122,7, C
4	7,74(1H, <i>d</i> , 5,1)	124,1, CH	3, 3a, 3b e 5	7,74(1H, <i>d</i> , 6,5)	124,8, CH
5	8,83 (1H, <i>d</i> , 5,1)	144,5, CH	3a, 3b, 4 e 6a	8,85 (1H, <i>d</i> , 6,5)	142,9, CH
6a	-----	145,3, CH	-----	-----	144,2, CH
7	-----	181,1, C=O	-----	-----	180,7, C=O
7a	-----	126,0, C	-----	-----	128,9, C
8	7,94 (1H, <i>s</i> )	109,5, CH	1a, 7a, 7, 9, 10 e 11a	7,97(1H, <i>s</i> )	109,5, CH
9	-----	149,7, C	-----	-----	149,9 C

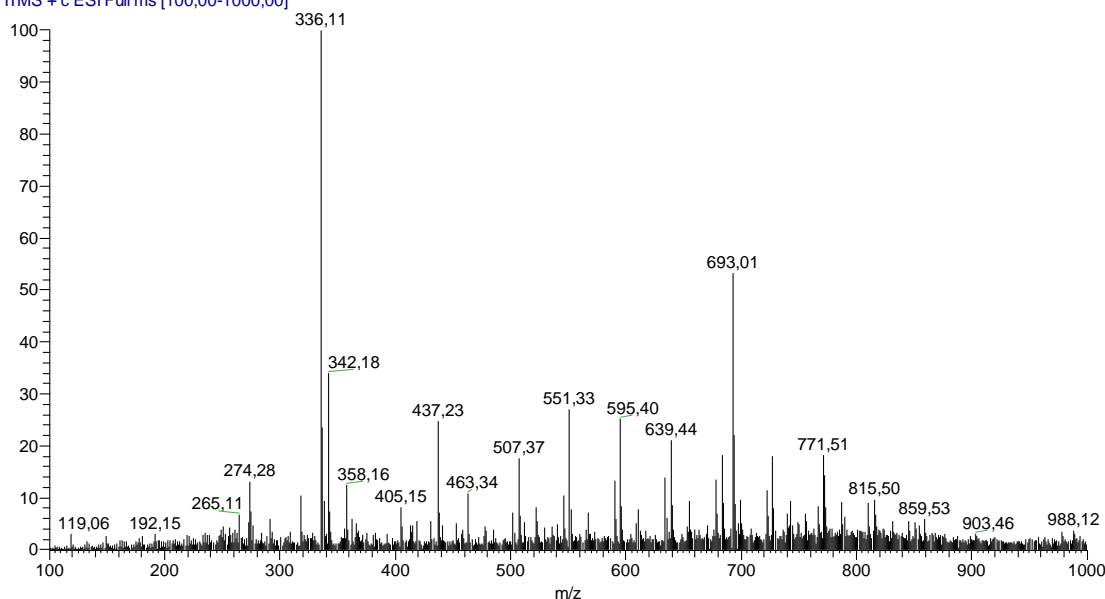
Posição	Substância DS5 (continuação)			Dicentrinona*	
	<sup>1</sup> H δ (mult., J em Hz)	<sup>13</sup> C (δ)	HMBC ( <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C)	<sup>1</sup> H δ (mult., J em Hz)	<sup>13</sup> C (δ)
10	-----	154,0, C	-----	-----	155,1, C
11	7,96 (1H, s)	108,8, CH	1a, 7a, 7, 9, 10 e 11a	8,52(1H, s)	108,5, CH
11a	-----	127,6, C	-----	-----	124,8, C
(1,2)- OCH <sub>2</sub> O	6,36 (2H, s)	102,4, CH <sub>2</sub>	1 e 2 1 e 2	6,76 (2H, s)	102,3, CH <sub>2</sub>
9- OCH <sub>3</sub>	4,06 (3H, s)	56,2, CH <sub>3</sub>	9	4,04 (3H, s)	55,6, CH <sub>3</sub>
10- OCH <sub>3</sub>	4,00 (3H, s)	56,2, CH <sub>3</sub>	10	3,95 (3H, s)	55,7, CH <sub>3</sub>

\*Extraído de R. C. dos Santos et al. 2018.

A análise do espectro de massas do alcaloide oxoaporfínico **DS5** obtido através de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+), indicou a presença de uma molécula protonada com  $m/z$  336 Da  $[M+H]^+$ , compatível com os dados de RMN que indicam fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>5</sub>.

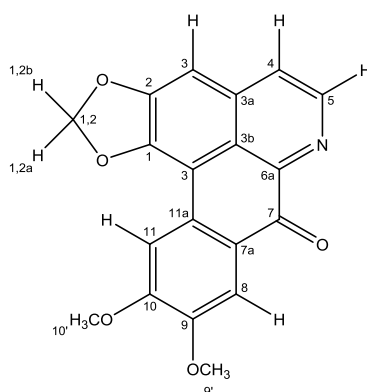
**FIGURA 86** - Espectro de massas da substância **DS5**.

FA121\_ESI\_posi #603-619 RT: 9,12-9,35 AV: 17 NL: 2.66E3  
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



Os dados fornecidos pelas análises de RMN e de EM, bem como comparações com dados descritos na literatura (DOS SANTOS *et al.* 2018), permitiu-nos concluir que o composto **DS5** trata-se do alcaloide oxoaporfínico **dicentrinona**.

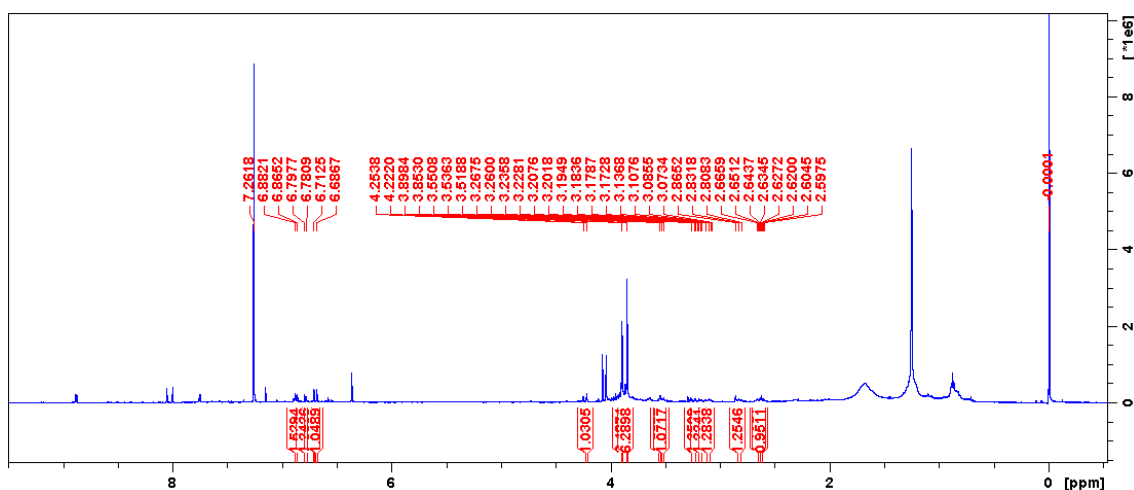
**FIGURA 87** - Estrutura da **Dicentrinona**.



#### 5.1.4 Identificação estrutural do alcaloide tetrahidroprotoberberínico DS7

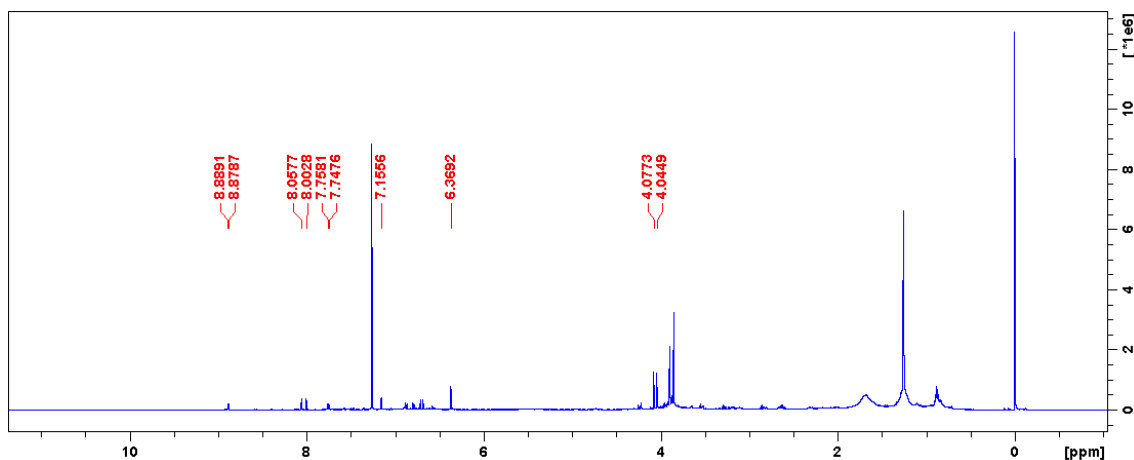
O alcaloide **DS7** foi identificado apenas em mistura (MDS2) com a **dicentrinona** (**DS5**), porém a mistura apresentou resultado positivo para alcaloides quando testada com o reagente de Dragendorff, apresentando coloração alaranjada. Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (FIGURA 88) pôde-se identificar além dos sinais característicos do alcaloide oxoaporfínico dicentrinona, sinais típicos de um alcaloide tetrahidroprotoberberínico.

**FIGURA 88** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura **MDS2** (dicentrinona + DS7).



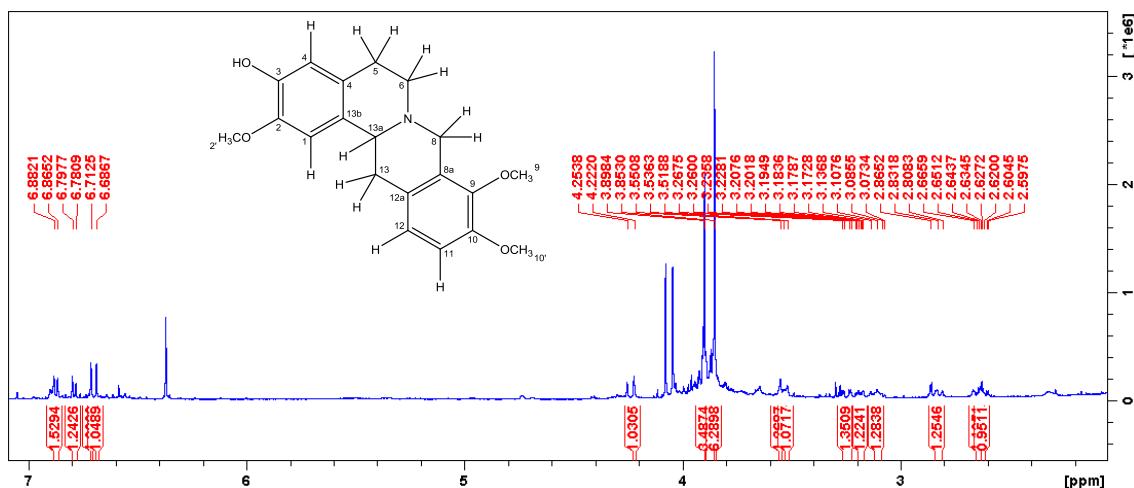
Para análise dos espectros, foi feita a exclusão dos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  8,88 (1H, *d*,  $J=5,2\text{Hz}$ ),  $\delta$  8,05 (1H, *s*),  $\delta$  8,00 (1H, *s*),  $\delta$  7,75 (1H, *d*,  $J=5,2\text{Hz}$ ),  $\delta$  7,15 (1H, *s*),  $\delta$  6,36 (2H, *s*),  $\delta$  4,04 (3H, *s*) e  $\delta$  4,07 (3H, *s*), referentes ao alcaloide **dicentrinona**.

**FIGURA 89** - Sinais referentes à dicentrinona no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura **MDS2**.



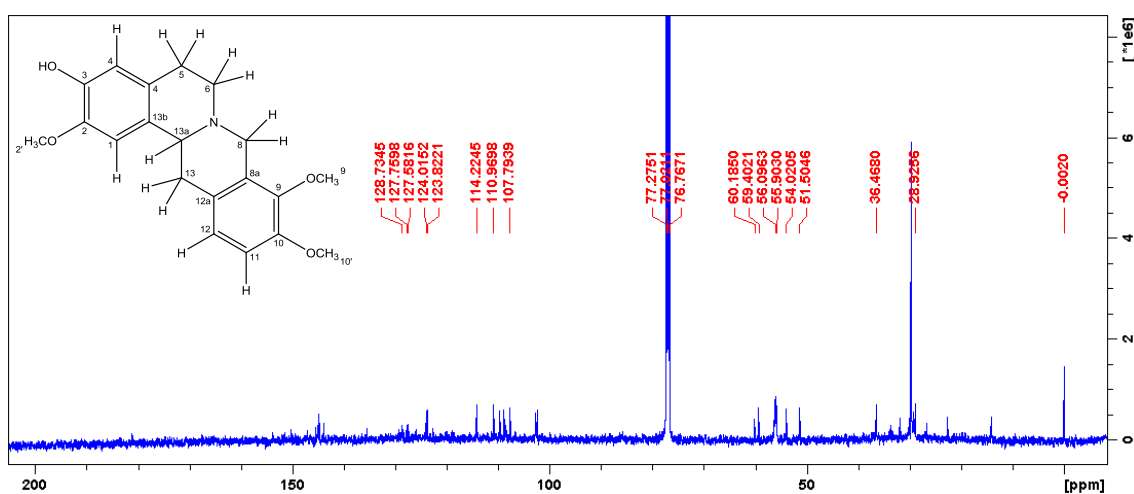
Analisando os espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e o mapa de correlação HSQC, constatou-se a presença de hidrogênios diastereotópicos de quatro grupos metilênicos em  $\delta$  3,10 (1H, *m*)/ 2,63 (1H, *m*),  $\delta$  3,18 (1H, *m*)/ 2,62 (1H, *m*),  $\delta$  4,23/ 3,53 (1H, *d*,  $J=16\text{Hz}$ ) e  $\delta$  3,24 (1H, *dd*,  $J=15,8$  e  $3,6\text{Hz}$ )/ 2,84 (1H, *dd*,  $J=11,9$  e  $3,9\text{Hz}$ ), típicos dos hidrogênios, H-5<sub>Peq</sub>/H-5<sub>Pax</sub>, H-6<sub>Peq</sub>/H-6<sub>Pax</sub>, H-8<sub>Peq</sub>/H-8<sub>Pax</sub>, e H-13<sub>Peq</sub>/H-13<sub>Pax</sub>, correlacionados aos sinais dos carbonos em  $\delta$  28,9,  $\delta$  51,5,  $\delta$  54,0 e  $\delta$  36,5, respectivamente, bem como um sinal de um hidrogênio metínico em  $\delta$  3,54 (1H, *dd*,  $J = 16,0$  e  $3,9$  Hz) correlacionado ao sinal do carbono em  $\delta$  59,4 característico de H-13a. Estes hidrogênios metilênicos juntamente com o sinal do hidrogênio metínico em  $\delta$  3,54 confirmaram o sistema tetrahidroprotoberberínico da molécula (TABELA 22).

**FIGURA 90** - Sinais referentes ao alcaloide **DS7** no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura **MSD2**.



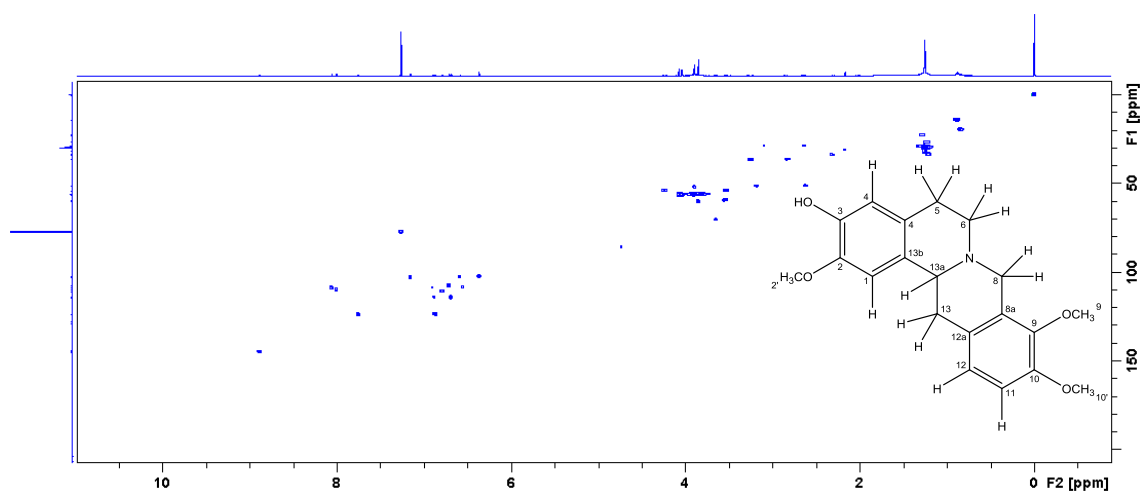
Observou-se também dois simpletos em  $\delta$  3,89 (H-9) e  $\delta$  3,85 (H-2 e H-10) com integração para três (3) e seis (6) hidrogênios, indicando três (3) grupos metoxílicos, sendo dois com mesmo ambiente químico. Pelas correlações dos mapas HSQC e HMBC, essas metoxilas estão ligadas ao C-2 ( $\delta$  144,9), C-9 ( $\delta$  145,1) e C-10 ( $\delta$  150,1). Pelo espectro de RMN de  $^1\text{H}$  observou-se ainda quatro (4) sinais típicos de hidrogênios aromáticos de anel benzênico tetrassubstituído, sendo dois em  $\delta$  6,79 (1H, *s*) e  $\delta$  6,87 (1H, *s*) típico de H-11 e H-12, e dois em  $\delta$  6,71 (1H, *s*) e  $\delta$  6,68 (1H, *s*) característicos de H-1 e H-4, respectivamente.

**FIGURA 91** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS7**.

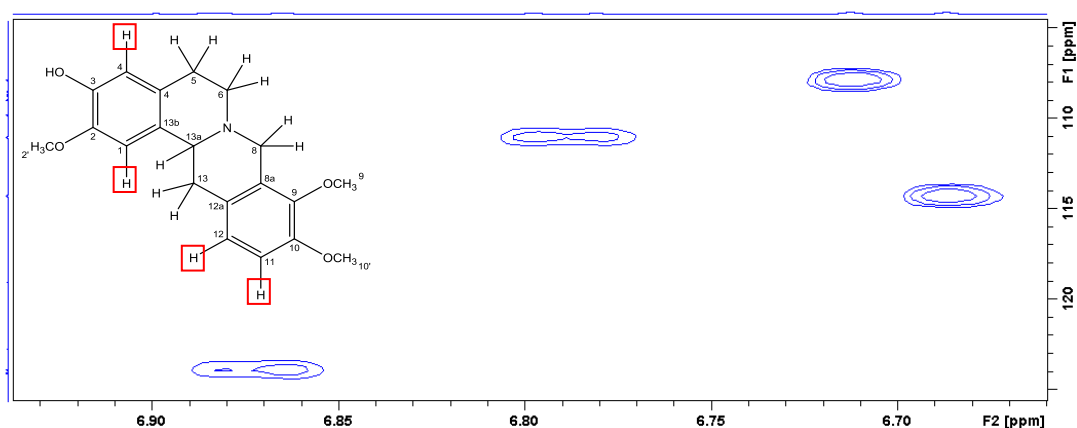


Através da análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  e dos mapas de correlação HSQC e HMBC observou-se a presença de 20 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  150,1 e 107,6, três metoxílicos em  $\delta$  56,1,  $\delta$  55,9 e  $\delta$  60,0, um metínico em  $\delta$  59,3 típico de C-13a, e quatro metilênicos em  $\delta$  54,0 (C-8),  $\delta$  51,5 (C-6),  $\delta$  36,4 (C-13) e  $\delta$  28,6 (C-5) confirmando a presença do esqueleto tetrahidroprotoberberínico, estando de acordo com as informações contidas no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , consistente com a estrutura proposta para **DS7**.

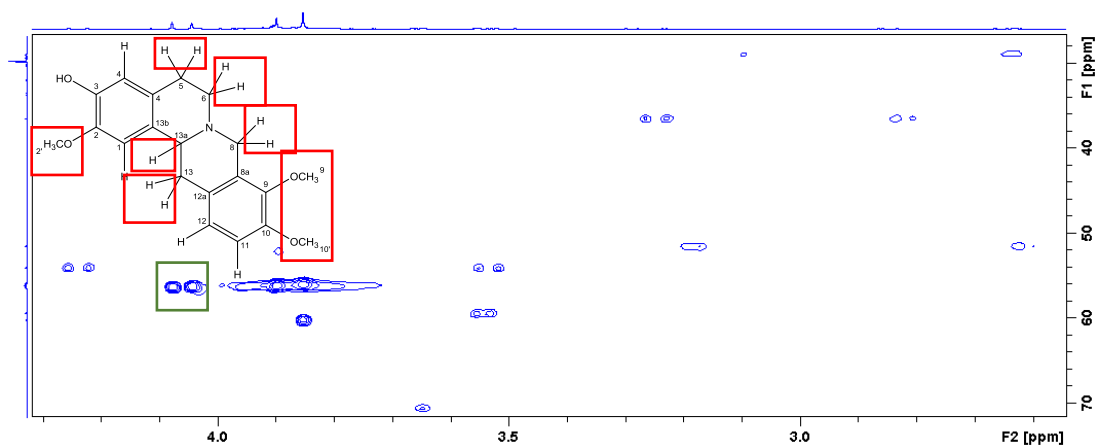
**FIGURA 92** – Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de MDS2.



**Figura 93** – Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$  + gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) dos sinais referentes ao alcaloide **DS7**.

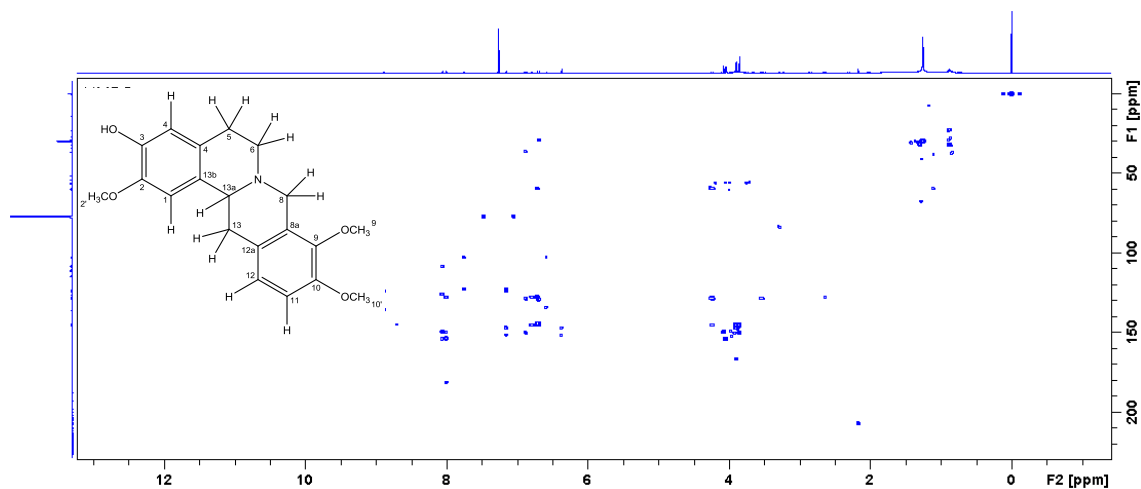


**FIGURA 94** - Ampliação do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) dos sinais referentes ao alcaloide **DS7**. Os sinais destacados em verde são referentes ao alcaloide dicentrinona.

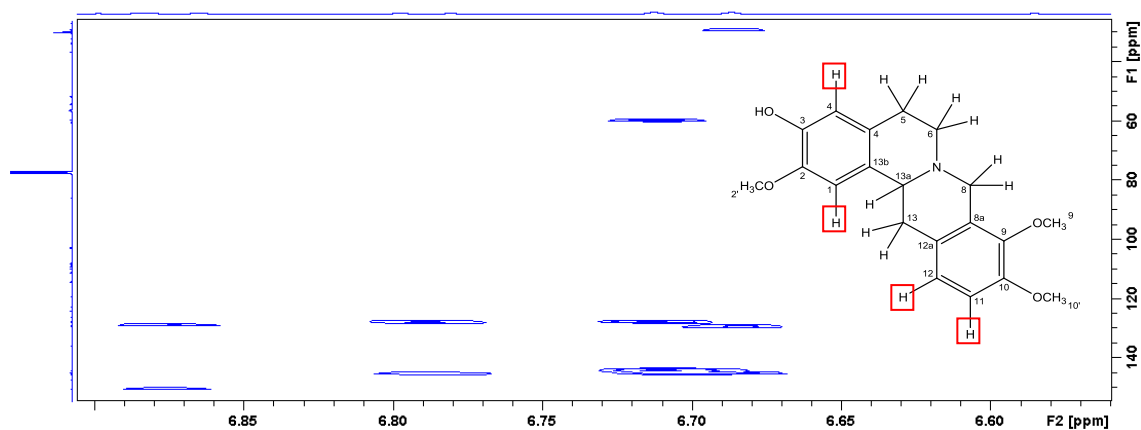




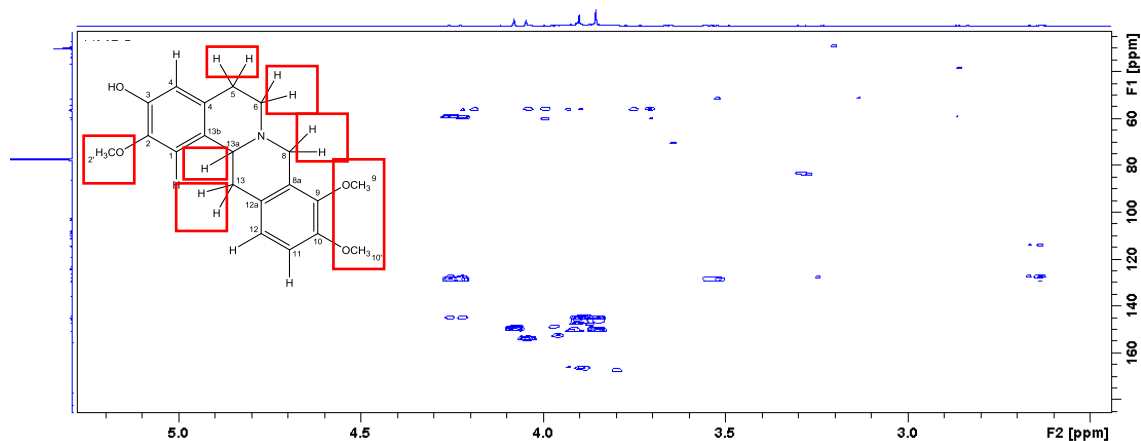
**FIGURA 95** - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de MSD2.



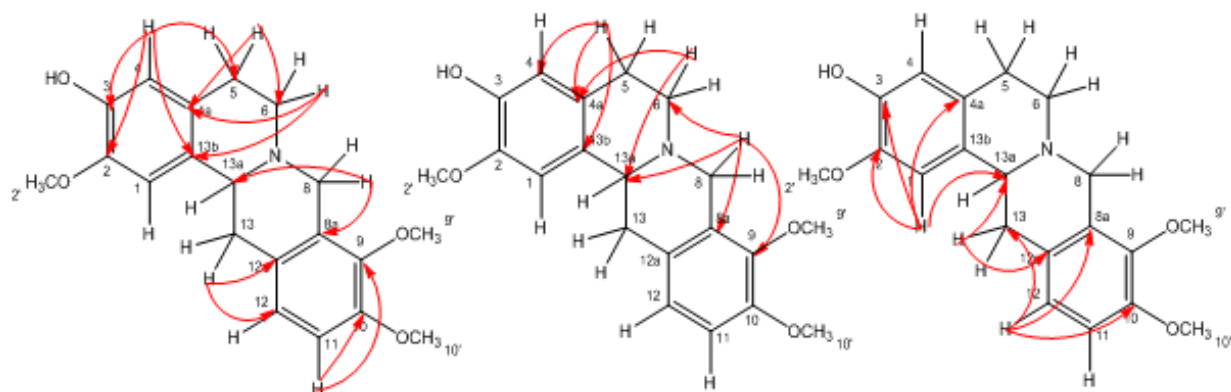
**FIGURA 96** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) dos sinais referentes ao alcaloide **DS7**.



**FIGURA 97** - Ampliação do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$  + gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) dos sinais referentes ao alcaloide **DS7**.



**FIGURA 98** - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de **DS7**.



**TABELA 21**– Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **DS7**.

Posição	Substância <b>DS7</b>			Tetrahydrojathrorrizina*	
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ )	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )
1	6,71 (1H, <i>s</i> )	107,6, CH	2, 3, 4a e 13a	6,67	107,8
2	-----	144,9, C	-----	-----	147,5
3	-----	144,0, C-OH	-----	-----	146,7
4	6,68 (1H, <i>s</i> )	114,1, CH	1, 2, 5 e 13b	6,64	114,6
4 <sup>a</sup>	-----	127,4, C	-----	-----	126,8
5ax	3,10 (1H, <i>m</i> )	28,6, CH <sub>2</sub>	6 e 4a	3,22	29,6
5eq	2,63 (1H, <i>m</i> )	-----	4, 4a e 13b	2,67	-----
6ax	2,62 (1H, <i>m</i> )	51,5, CH <sub>2</sub>	13a e 13b	2,69	51,4
6eq	3,18 (1H, <i>m</i> )	-----	4a e 13a	3,18	-----
8ax	3,53 (1H, <i>d</i> , 16,0)	54,0, CH <sub>2</sub>	6, 8a, 9 e 13a	3,55	53,8
8eq	4,23 (1H, <i>d</i> , 16,0)	-----	8a, 9 e 13a	4,23	-----
8 <sup>a</sup>	-----	128,6, C	-----	-----	127,0
9	-----	145,1, C	-----	-----	146,7
10	-----	150,1, C	-----	-----	143,4
11	6,79 (1H, <i>d</i> , 8,5)	110,8, CH	9, 10 e 12a	6,74	110,9
12	6,87 (1H, <i>d</i> , 8,5)	123,8, CH	8a, 10 e 13	6,77	124,6
12 <sup>a</sup>	-----	127,6, C	-----	-----	128,4
13ax	2,83 (1H, <i>m</i> )	36,4, CH <sub>2</sub>	12a e 13a	2,83	36,1
13eq	3,24 (1H, <i>m</i> )	-----	12 e 12a	3,24	-----
13 <sup>a</sup>	3,54 (1H, <i>dd</i> , 15,9 e 7,1)	59,3, CH	2, 8a e 12a	3,10	59,4
13b	-----	129,0, C	-----	-----	128,8
2-OCH <sub>3</sub>	3,85 (3H, <i>s</i> )	60,0, CH <sub>3</sub>	2	3,86	55,8
9-OCH <sub>3</sub>	3,89 (3H, <i>s</i> )	56,1, CH <sub>3</sub>	9	3,83	60,1
10-OCH <sub>3</sub>	3,85 (3H, <i>s</i> )	55,9, CH <sub>3</sub>	10	3,87	55,8

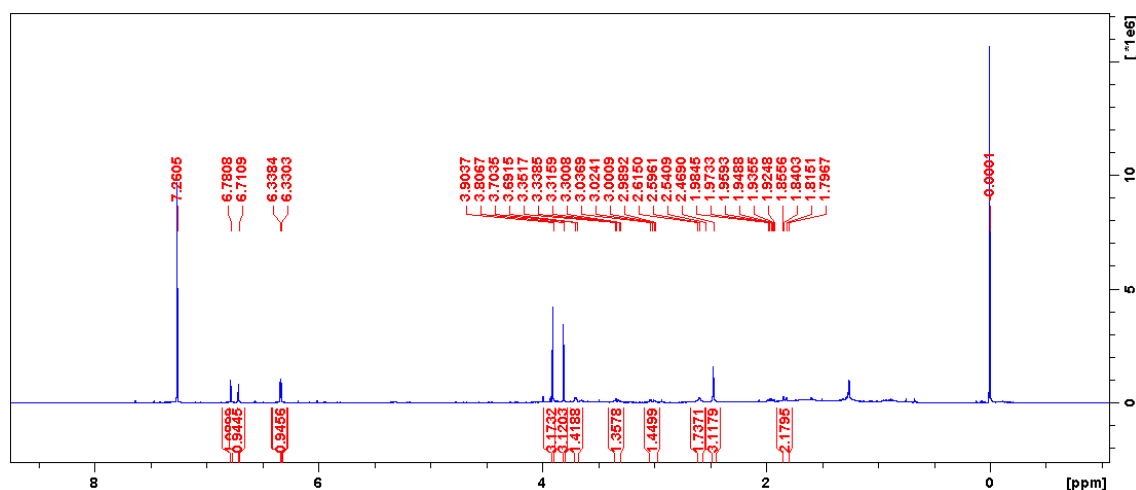
\*Extraído de Fechine *et al.* 2002.

A análise do espectro de massas do alcaloide tetrahidroprotoberberínico **DS7** obtido através de ionização por eletrospray em modo positivo (ESI+), indicou a

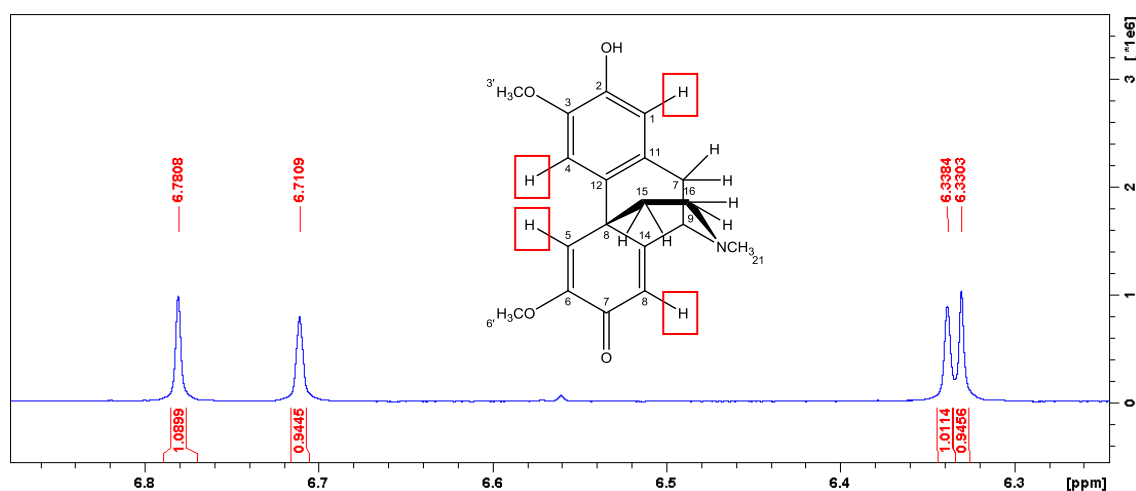


Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (FIGURA 101) juntamente com a análise do mapa de correlação HSQC (FIGURA 104), verificou-se a presença de dois sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,71 (1H, *s*) e  $\delta$  6,78 (1H, *s*), correlacionados aos sinais de carbonos em  $\delta$  113,5 e  $\delta$  107,4, bem como a presença de dois sinais de hidrogênios vinílicos em  $\delta$  6,34 (1H, *s*) e  $\delta$  6,33 (1H, *s*), correlacionados aos sinais de carbonos em  $\delta$  118,8 e  $\delta$  122,3, respectivamente, característicos do sistema morfinanodienona (LEBOUF, CAVÉ & TOHAMI, 1982). Observou-se ainda a presença de dois grupos metoxílicos em  $\delta$  3,80 (3H, *s*) e  $\delta$  3,90 (3H, *s*), assim como um grupo metila em  $\delta$  2,46 (3H, *s*), característico de grupo metila ligado a nitrogênio (*N*- $\text{CH}_3$ ).

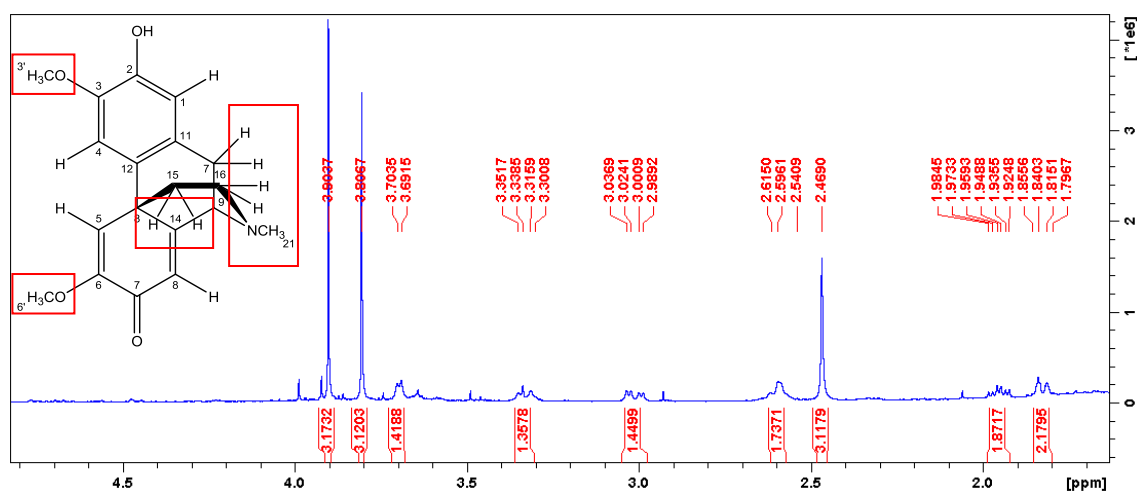
**FIGURA 101** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **DS6**.



**FIGURA 102** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos vinílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS6**.

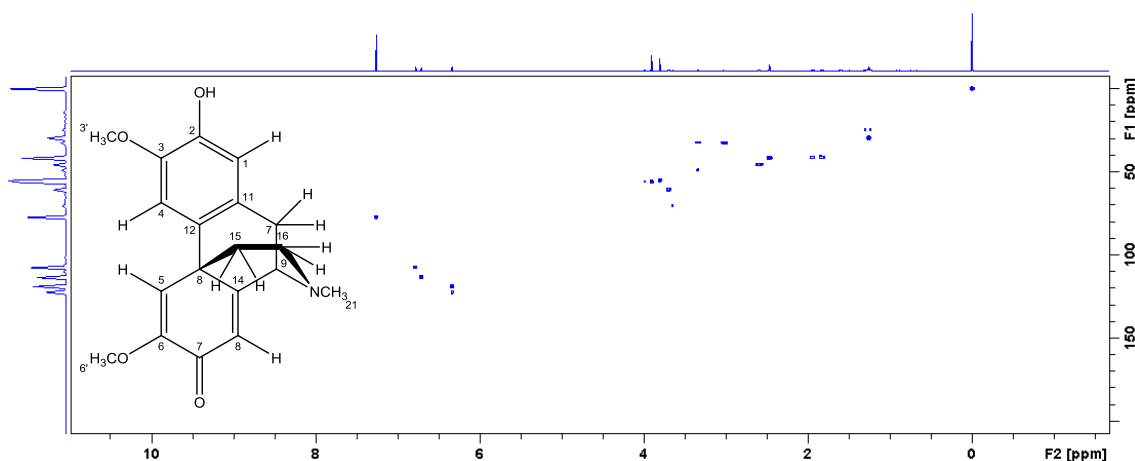


**FIGURA 103** - Ampliação da região de hidrogênios metílicos, metilênicos e metoxílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS6**.

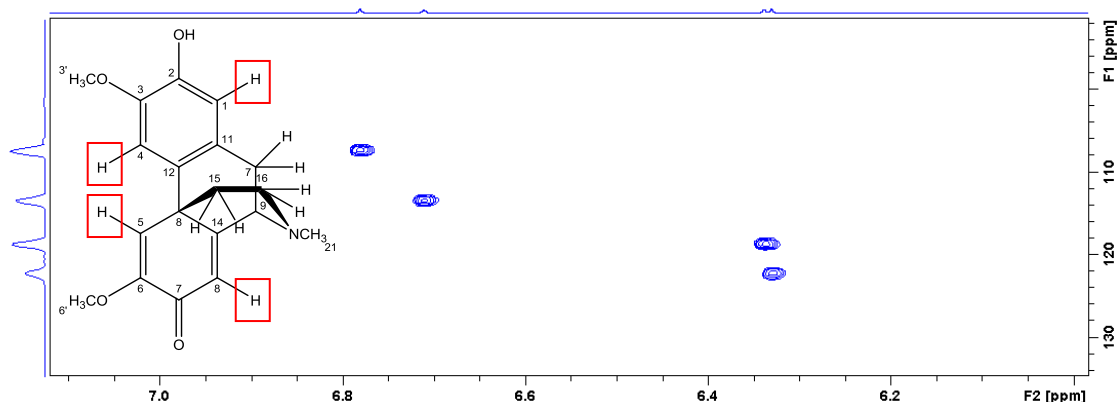


A presença do grupo hidroxila em **DS6** foi evidenciada pelo sinal do carbono em  $\delta$  144,6 (C-2) típico de carbono aromático oxigenado, o qual não apresentou correlação com os hidrogênios metoxílicos no mapa de correlação HSQC (FIGURA 104), porém apresentou correlação com os hidrogênios H-1 e H-4 no mapa de correlações HMBC (FIGURA 107).

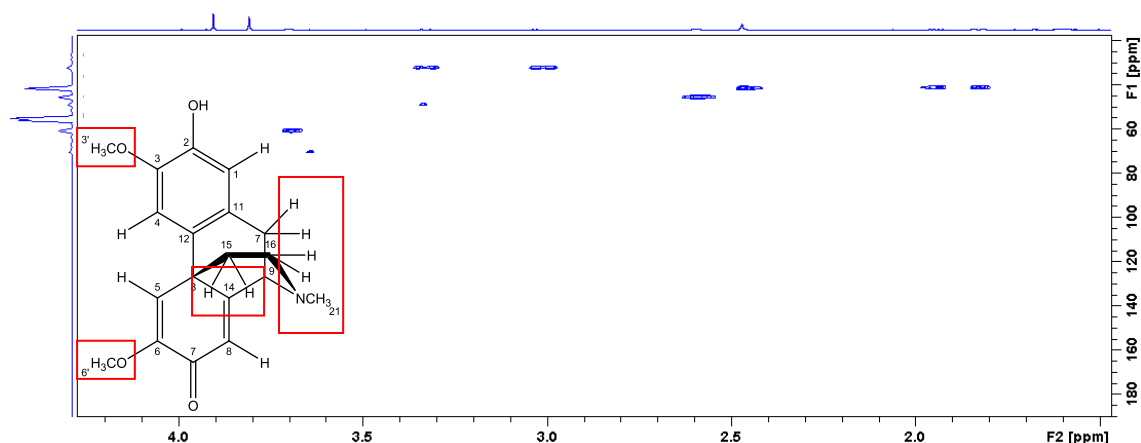
**FIGURA 104** - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS6**.



**FIGURA 105** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS6**.



**FIGURA 106** - Ampliação da região de hidrogênios de metoxilas, metilenos e metila do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS6**.

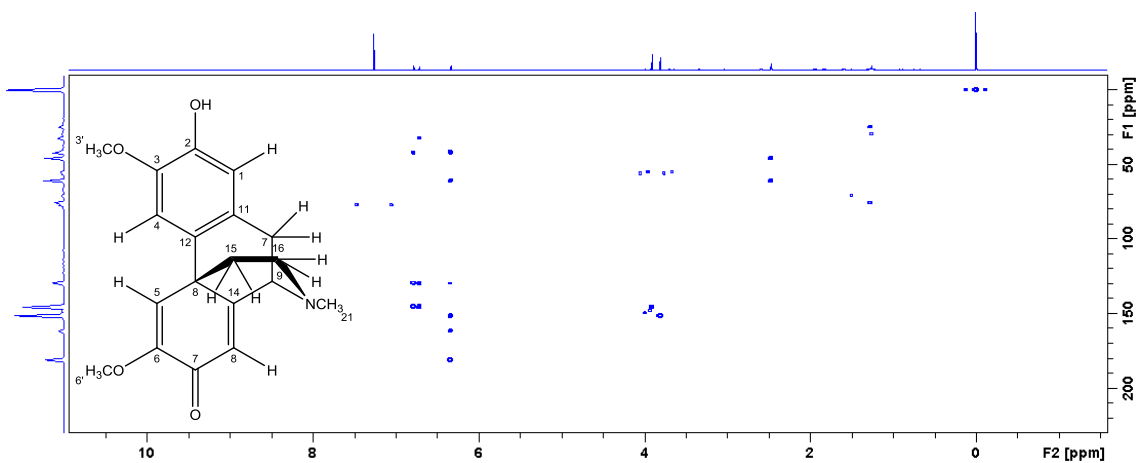


A correta posição dos grupos metoxílicos em **DS6** foram definidas pelas correlações no mapa de correlação HMBC (FIGURA 107) do sinal em  $\delta$  6,71 (H-4) com o sinal do carbono em  $\delta$  145,5 (C-2), no anel A, bem como a correlação do sinal em  $\delta$  6,33 (H-8) com o sinal do carbono em  $\delta$  151,3 (C-6) no anel D.

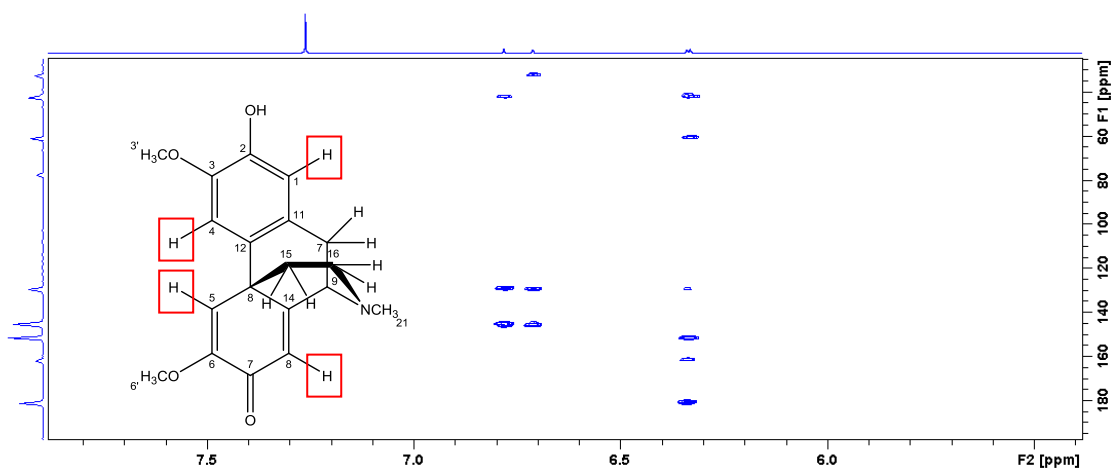
Pela análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC observou-se a presença de 19 carbonos sendo 6 aromáticos entre  $\delta$  145,7 e 107,4, três metilênicos em  $\delta$  45,7, 41,3 e 32,4 característicos de C-16, C-15 e C-10, respectivamente, do núcleo morfinanodienona, três metínicos em  $\delta$  122,3 (C-8),  $\delta$  118,8 (C-5) e  $\delta$  60,9 (C-9), dois metoxílicos em  $\delta$  56,1 (2-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta$  55,1 (6-OCH<sub>3</sub>), quatro carbonos quaternários, sendo um em  $\delta$  180,8 (C-7), típico de grupo carbonila, um em  $\delta$  42,3 (C-13) e dois carbonos  $\alpha,\beta$ -insaturados em  $\delta$  151,3 (C-6) e 161,9 (C-14). Além disso, foi possível observar a presença de um sinal referente a um grupo metila em  $\delta$  41,6 (N-CH<sub>3</sub>), típico

de carbono ligado a nitrogênio conforme indicado também no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , consistente com a estrutura de **DS6**.

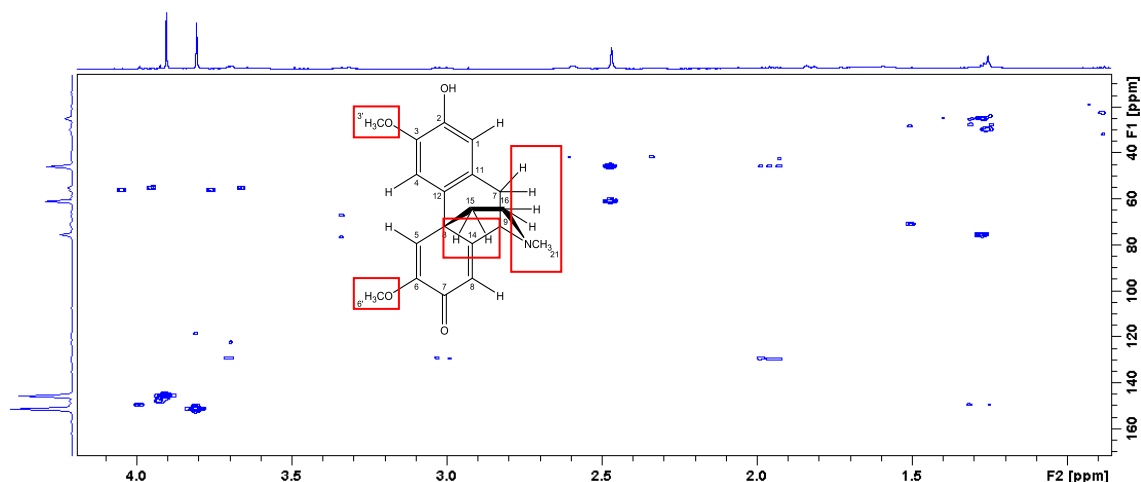
**FIGURA 107** - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$  + gotas de  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de **DS8**.



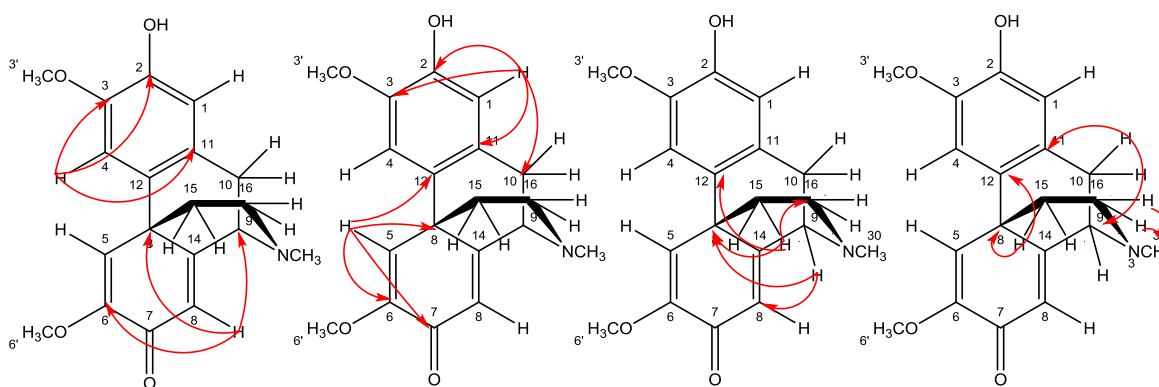
**FIGURA 108** - Ampliação da região dos aromáticos do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS6**.



**FIGURA 109** - Ampliação da região das metoxilas, metilenos e metila do mapa de correlação **HMBC** ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de DS6.



**FIGURA 110** - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de DS6.



**TABELA 22** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de DS6.

Posição	Substância DS8		HMBC ( $^1\text{H}$ x $^{13}\text{C}$ )	Pallidina*
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )		$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., $J$ em Hz)
1	6,71 (1H, <i>s</i> )	113,5	2, 3, 10 e 11	6,35
2	-----	144,6	-----	-----
3	-----	145,3	-----	-----
4	6,78 (1H, <i>s</i> )	107,4	2, 3, 11 e 13	6,66
5	6,34 (1H, <i>s</i> )	118,8	6, 7, 12 e 13	6,76
6	-----	151,3	-----	-----
7	-----	180,8	-----	-----
8	6,33 (1H, <i>s</i> )	122,3	6, 9, 13 e 14	6,30
9	3,69 (1H, <i>s</i> )	60,9	7, 8, 11, 13, 14 e 16	-----
10	3,35 (1H, <i>d</i> , 18,0) 3,03 (1H, <i>dd</i> , 18,0 e 6,2)	32,4	----- 9 e 11	-----
11	-----	129,4	-----	-----
12	-----	129,6	-----	-----

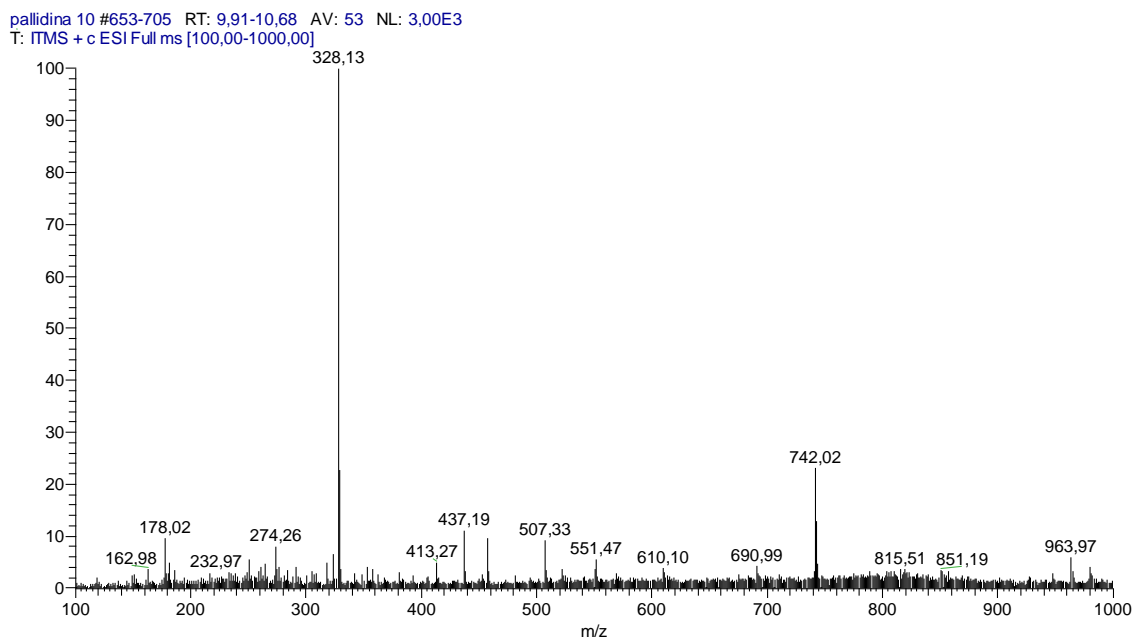


Posição	Substância DS8 (continuação)			Pallidina*
	<sup>1</sup> H δ (mult., J em Hz)	<sup>13</sup> C (δ)	HMBC ( <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C)	<sup>1</sup> H δ (mult., J em Hz)
13	-----	42,3	-----	-----
14	-----	161,9	-----	-----
15	1,82 (1H, <i>d</i> , 12,7) 1,95 1H,	41,3	12 e 13 12, 13 e 16	-----
16	2,61 (1H, <i>d</i> , 2,0) 2,61 (1H, <i>d</i> , 2,0)	45,7	16a	-----
16a(N- CH <sub>3</sub> )	2,46 (3H, <i>s</i> )	41,6	9 e 16	2,46
3-OCH <sub>3</sub>	3,90 (3H, <i>s</i> )	56,1	3	3,91
6-OCH <sub>3</sub>	3,80 (3H, <i>s</i> )	55,1	6	3,81

\*Extraído de Lebouf, Cavé, e Tohami 1982.

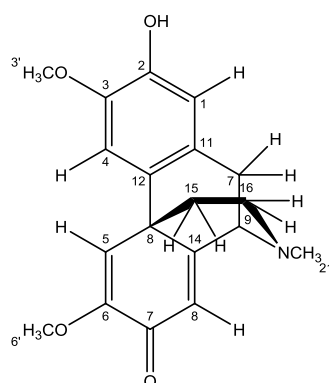
A análise por espectrometria de massas, utilizando a técnica de ionização por eletrospray operando no modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada [M+H]<sup>+</sup> com *m/z* 328 Da compatível com a fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>, corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN 1D/2D.

**FIGURA 111** - Espectro de massas da substância **DS6**.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D e EM, bem como comparação com os dados da literatura (LEBOUF, CAVÉ, & TOHAMI 1982) permitiu-nos concluir que a substância **DS6** trata-se do alcaloide morfinanodienona **pallidina**.

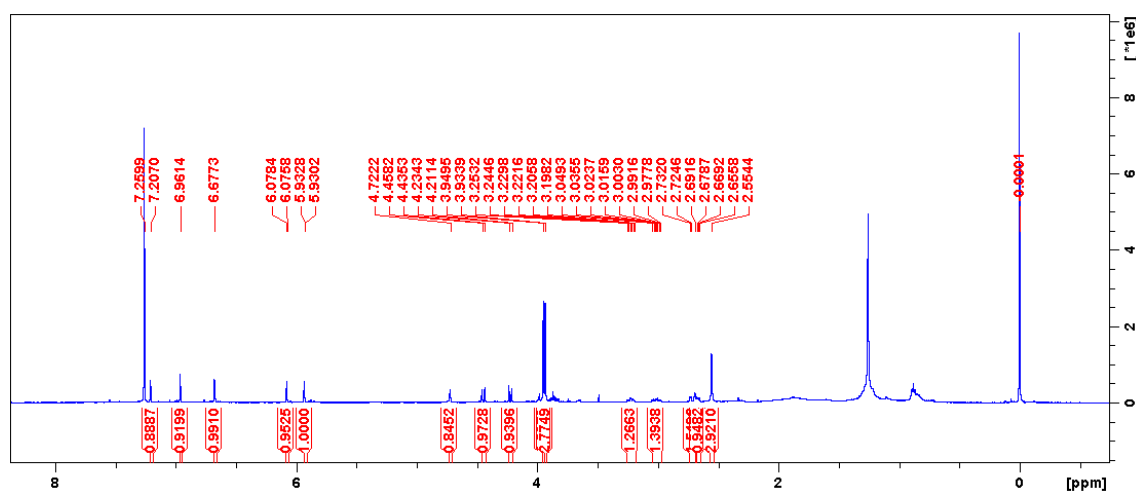
**FIGURA 112** - Estrutura da Pallidina.



### 5.1.6 Identificação estrutural do alcaloide com esqueleto isoquinolínico modificado DS3

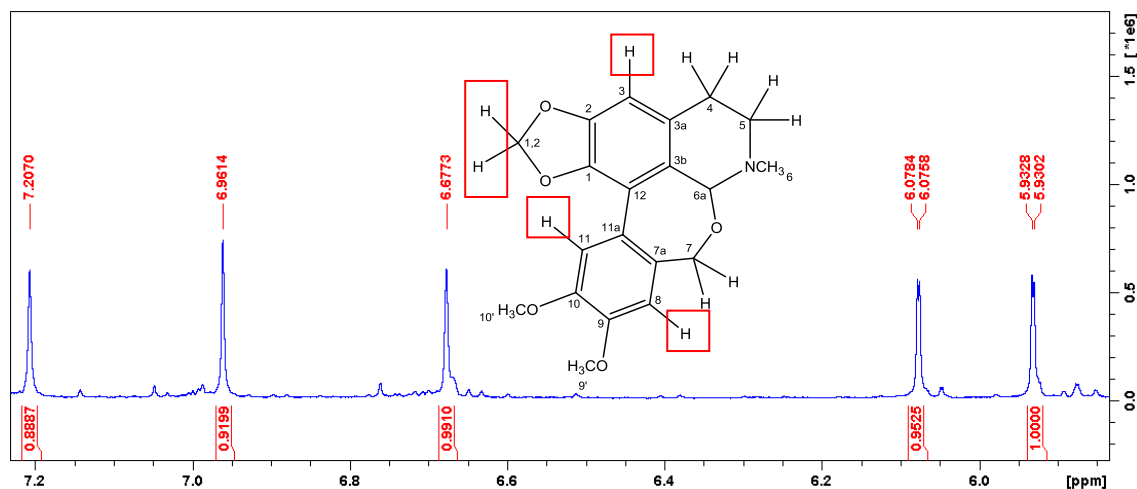
O alcaloide DS3 é um sólido amorfo de massa igual a 1,5 mg de coloração castanha e apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff. Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), (FIGURA 113) pôde-se identificar sinais característicos de um alcaloide isoquinolínico, porém com esqueleto modificado.

**FIGURA 113** - Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.

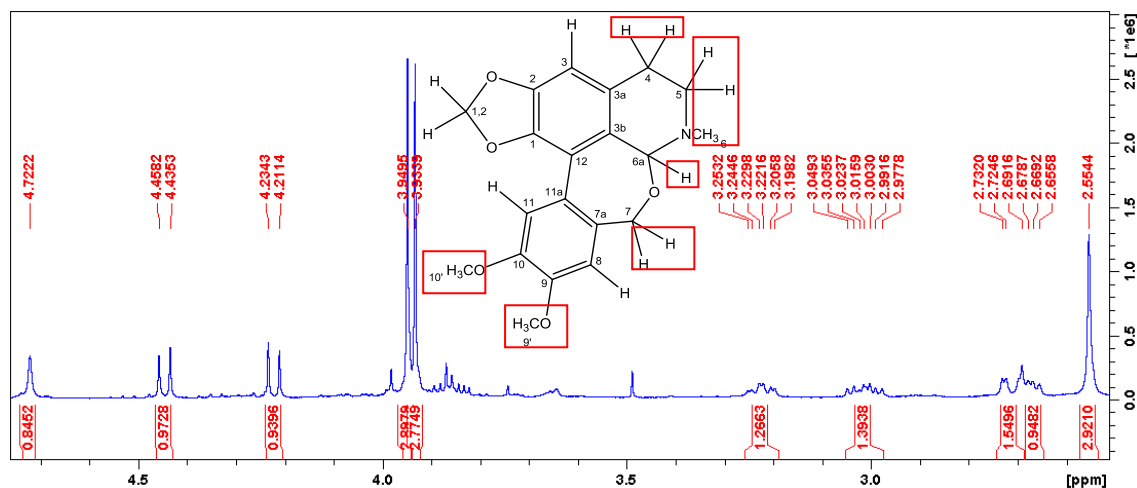


A semelhança dos alcaloides aporfínicos isolados nesse trabalho, foi observada na região dos hidrogênios aromáticos devido a presença de dois sinais típicos do anel D substituído em  $\delta$  7,20 (1H, s) e  $\delta$  6,96 (1H, s) referentes aos H-11 e H-8 e um sinal típico do H-3 do anel A do sistema aporfínico substituído em  $\delta$  6,67 (1H, s). A presença ainda dos dupletos em  $\delta$  6,07 e  $\delta$  5,93 (*d*,  $J=1,3$  Hz), correlacionados com o sinal de carbono em  $\delta$  101,24 no mapa de correlação HSQC (FIGURA 117), confirma o grupo metilenodióxi na estrutura. Devido a torção do sistema bifênil, os hidrogênios não possuem o mesmo ambiente químico, não sendo equivalentes.

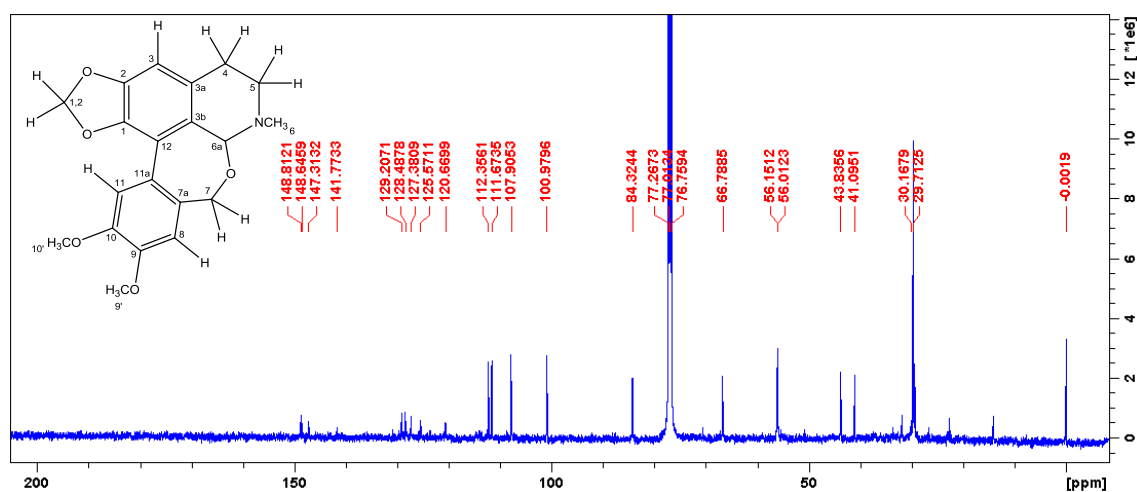
**FIGURA 114** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxi do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS3**.



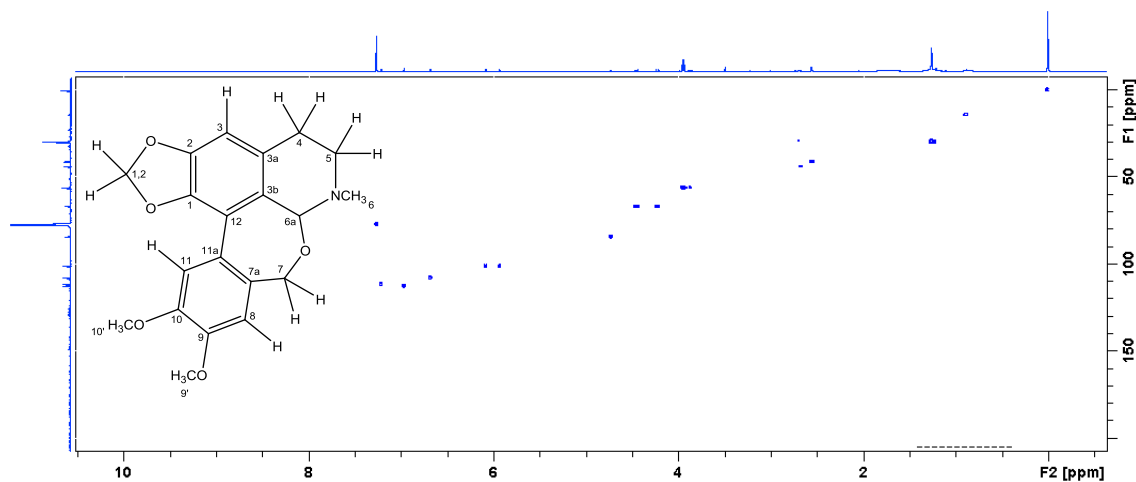
**FIGURA 115** - Ampliação da região de hidrogênios metílicos, metilênicos, metínicos e metoxílicos do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS3**.



**FIGURA 116** - Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância **DS3**.

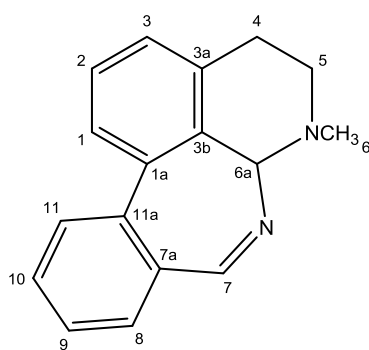


**FIGURA 117** - Mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de DS3.

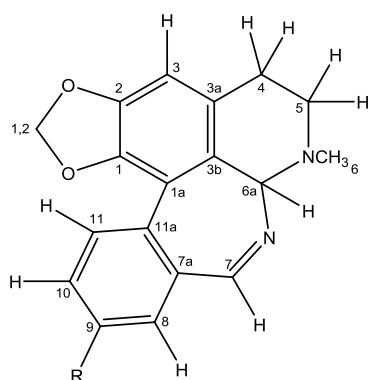


Na região entre  $\delta$  2,67 e  $\delta$  4,72, encontram-se os sinais dos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-4, H-5 e H-7, metílicos e o metínico H-6a. Os carbonos ligados a esses hidrogênios foram determinados com o auxílio do mapa de correlação HSQC. Na posição quatro (4), os hidrogênios são  $\delta$  3,01 (1H, *ddd*,  $J=6,7$  Hz, 12,5 Hz e 16,7 Hz) e 2,71 (*dd*,  $J=3,7$  Hz e 16,7 Hz) correlacionados com o carbono em  $\delta$  29,4. Na posição cinco (5), os hidrogênios são  $\delta$  3,22 (1H, *td*,  $J=11,4$  Hz e 3,7 Hz) e  $\delta$  2,67 (1H, *dd*,  $J=12,0$  Hz e 6,7 Hz) correlacionados com o carbono em  $\delta$  43,8. Na posição 6a, o hidrogênio é  $\delta$  4,72 (1H, *s*) correlacionado com o carbono em  $\delta$  84,3. O hidrogênio da posição 6a como simpleto, em alcaloides aporfínicos é incomum, ocorrendo em casos de dissustituição na posição 7, ou na formação de um anel heterocíclico. O deslocamento químico desblindado do carbono 6a, sugere que ele esteja ligado a um grupo retirador de elétrons, além do nitrogênio da estrutura isoquinolínica. Já os hidrogênios da posição 7 apresentam os sinais em  $\delta$  4,44 e  $\delta$  4,22, ambos dupletos, integrando para 1H, com  $J$  igual a 11,5 Hz, correlacionados com o carbono em  $\delta$  66,8. A ocorrência do simpleto na posição 6a, seria justificada facilmente se o carbono C-7 estivesse duplamente substituído, porém a presença dos dois hidrogênios dupletos na posição 7 exclui essa possibilidade e ainda indica que os mesmos também não possuem carbonos vizinhos hidrogenados. O deslocamento desblindado atípico do C-7 e de C-6a, indica que os mesmos estão ligados diretamente a um grupo retirador de elétrons, e, portanto, o anel C foi definido com um heterociclo de 7 membros, assim como na estrutura dos alcaloides do tipo azahomoaporfino (FIGURA 118), spiguetina e spiguetidina (FIGURA 119), isolados de *D. spixiana* (RASAMIZAFY *et al.*, 1987).

**FIGURA 118** – Esqueleto alcaloídico azahomoaporfino.



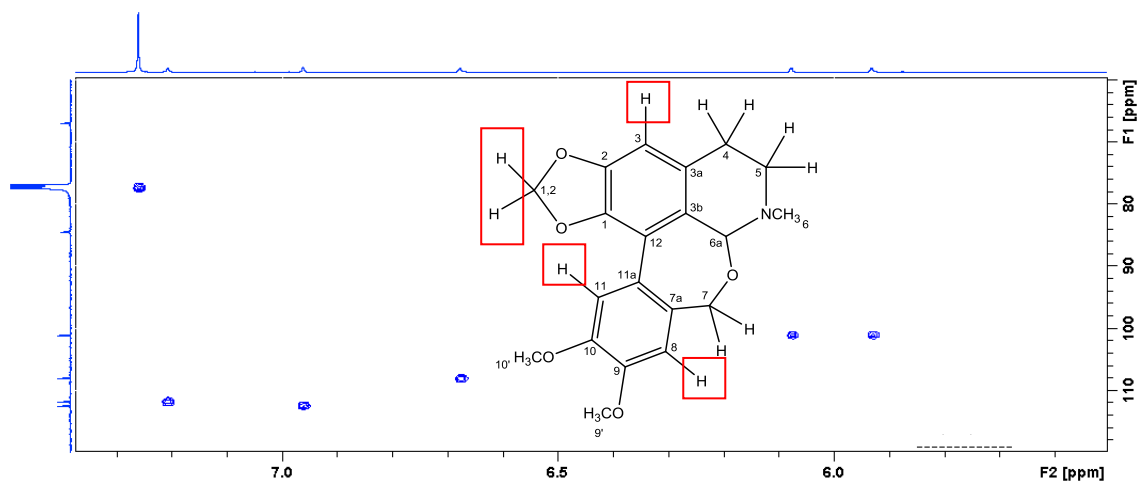
**FIGURA 119** – Estrutura dos alcaloides azahomoaporfinos spiguetina (a) e spiguetidina (b).



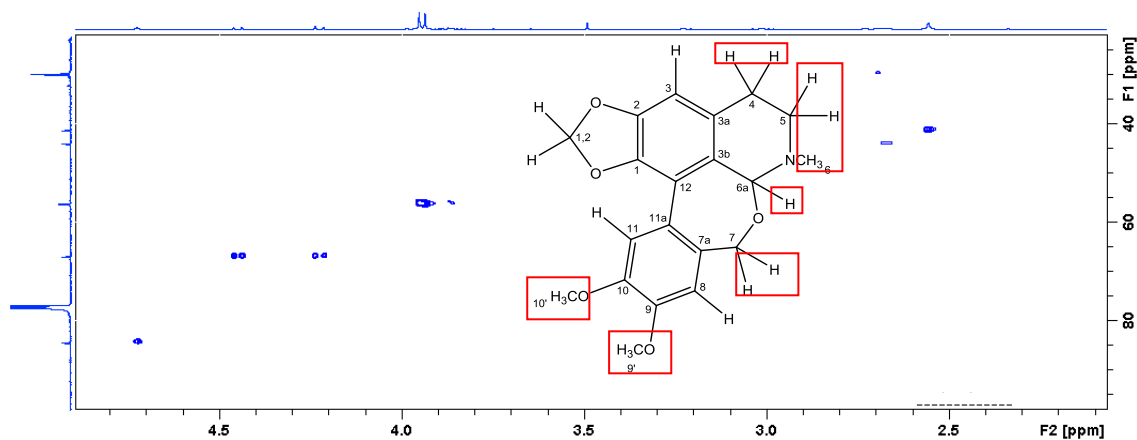
(a) R- OCH<sub>3</sub>

(b) R- OH

**FIGURA 120** - Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos e da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 500 MHz; <sup>13</sup>C: 125 MHz; CDCl<sub>3</sub>) de DS3.



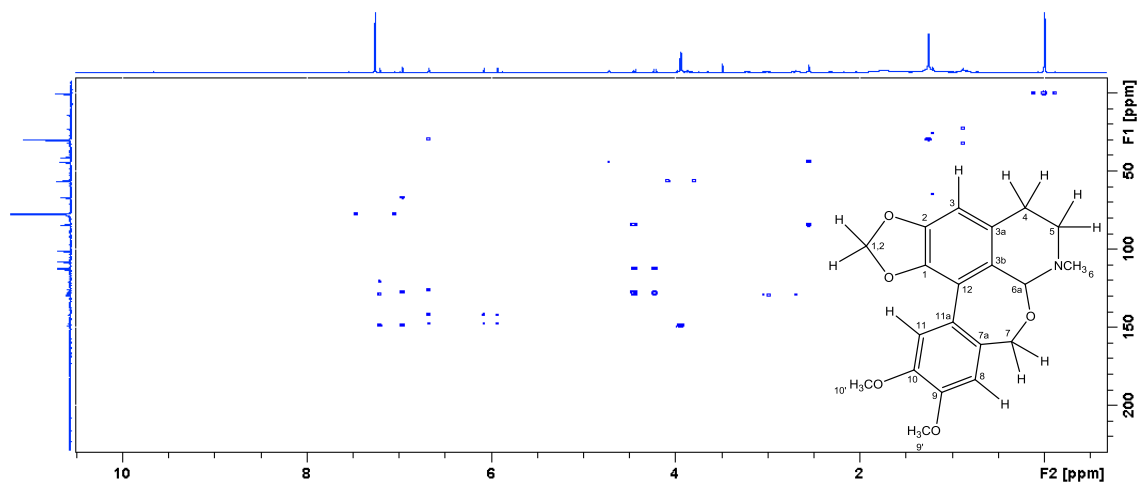
**FIGURA 121** - Ampliação da região dos hidrogênios das metoxilas, metilenos e metínica do mapa de correlação HSQC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS3**.



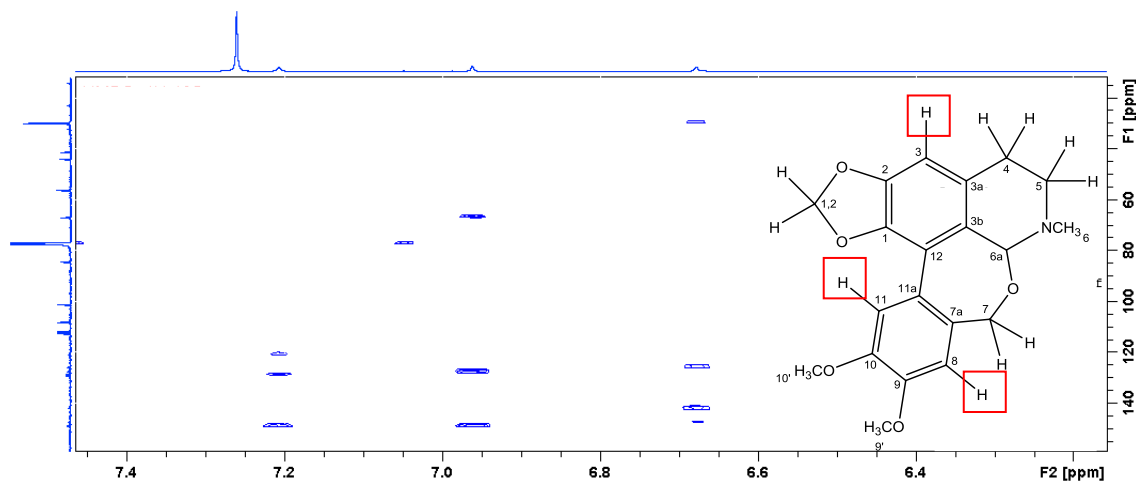
Os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  3,93 e  $\delta$  3,94, com integração para três hidrogênios, são típicos de metoxilas, e pelo mapa de correlações HMBC, pode-se observar a correlação com os carbonos C-9 ( $\delta$  148,6) e C-10 ( $\delta$  148,8) respectivamente.

Mesmo com a clara diferença ocasionada pela inclusão de um heteroátomo no anel C, pode-se observar diversas semelhanças estruturais entre a molécula **DS3** e os demais alcaloides aporfínicos isolados nesse trabalho.

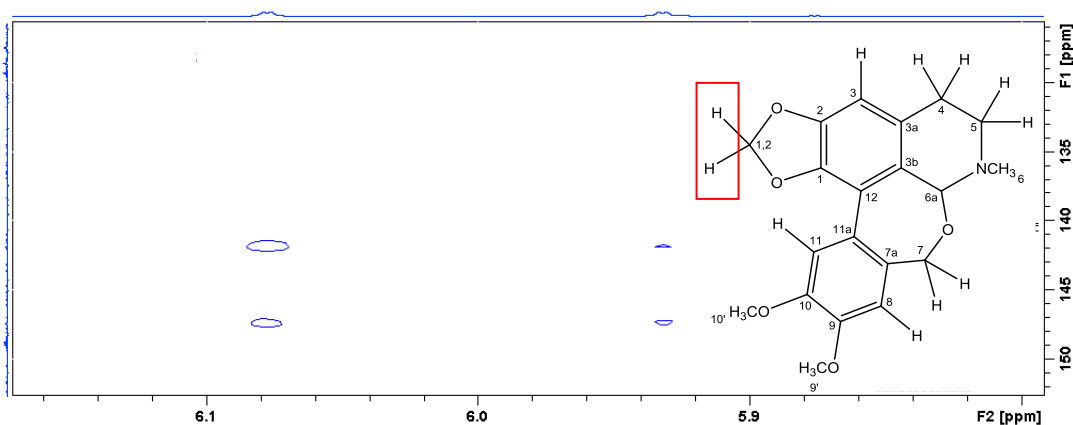
**FIGURA 122** - Mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS3**.



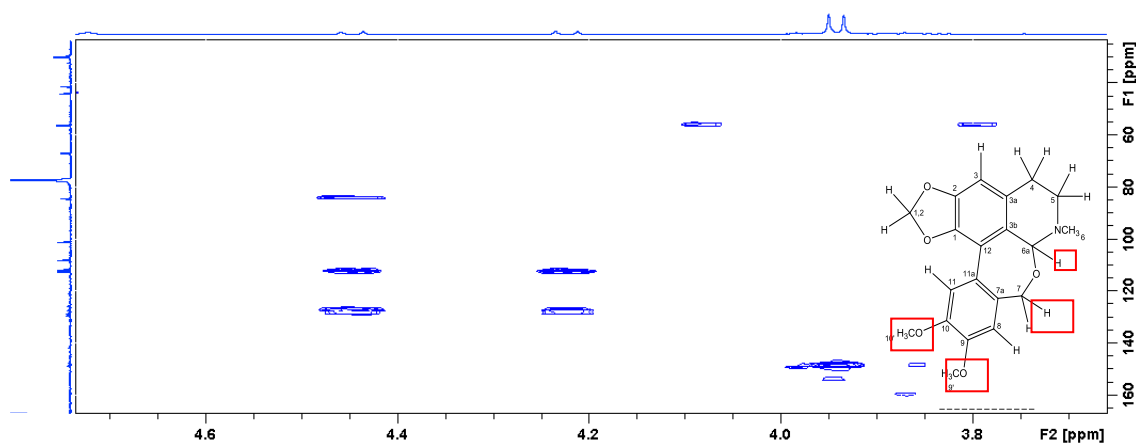
**FIGURA 123** - Ampliação da região de hidrogênios aromáticos do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS3**.



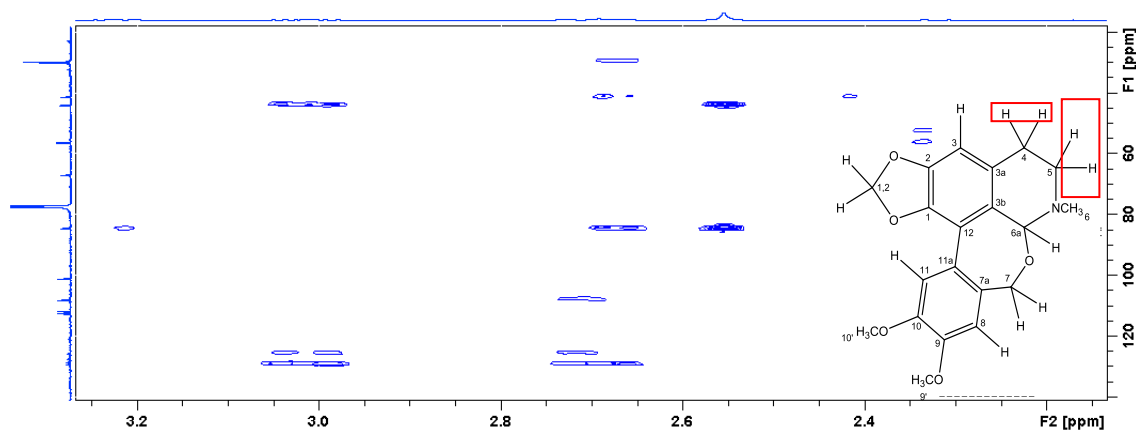
**FIGURA 124** - Ampliação da região de hidrogênios da ponte metilenodioxí do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS3**.



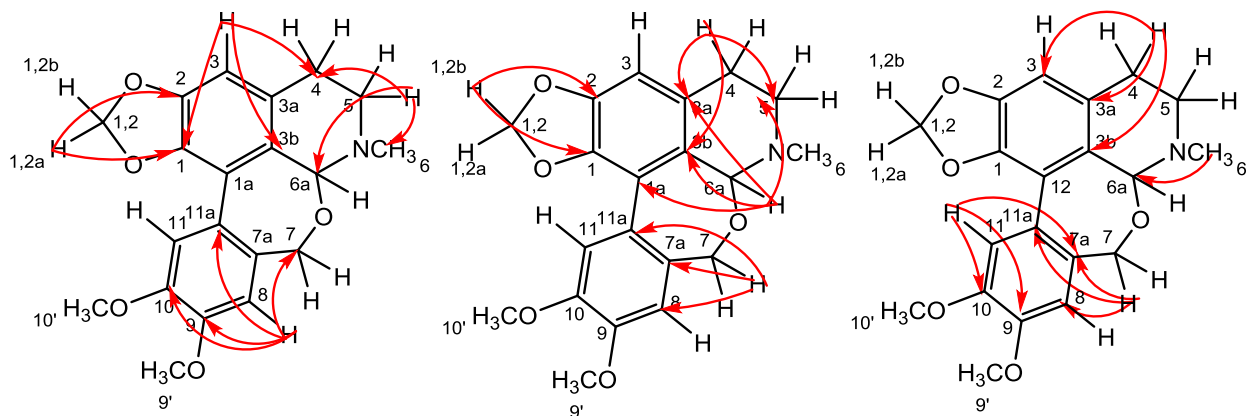
**FIGURA 125** - Ampliação da região de hidrogênios dos metilenos, metoxilas e metínica do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS3**.



**FIGURA 126** - Ampliação da região de hidrogênios dos metilenos e metila do mapa de correlação HMBC ( $^1\text{H}$ : 500 MHz;  $^{13}\text{C}$ : 125 MHz;  $\text{CDCl}_3$ ) de **DS3**.



**FIGURA 127** - Principais correlações observadas nos mapas de correlações HSQC e HMBC de **DS3**.



O mapa de correlações HMBC confirma as ligações carbono-hidrogênio já observadas no HSQC e estão resumidas na tabela abaixo (TABELA 24):

**TABELA 23** - Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de **DS3**.

Posição	Substância <b>DS3</b>		
	$^1\text{H}$ $\delta$ (mult., $J$ em Hz)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ )	HMBC ( $^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$ )
1	-----	141,7, C	1, 3a e 4
1 <sup>a</sup>	-----	120,7, C	-----
2	-----	147,3, C	-----
3	6,67 (1H, <i>s</i> )	107,9, CH	-----
3a	-----	125,5, C	-----
3b	-----	129,2, C	-----
4	3,01 (1H, <i>ddd</i> , 6,8, 12,5 e 16,7)	29,4, CH <sub>2</sub>	3a, 3b e 5
	2,71 (1H, <i>dd</i> , 3,7 e 16,7)		3, 3a e 3b
5	3,22 (1H, <i>td</i> 3,7 e 11,4)	43,8, CH <sub>2</sub>	6a
	2,67 (1H, <i>dd</i> , 6,7 e 12,0)		4, 6 e 6a

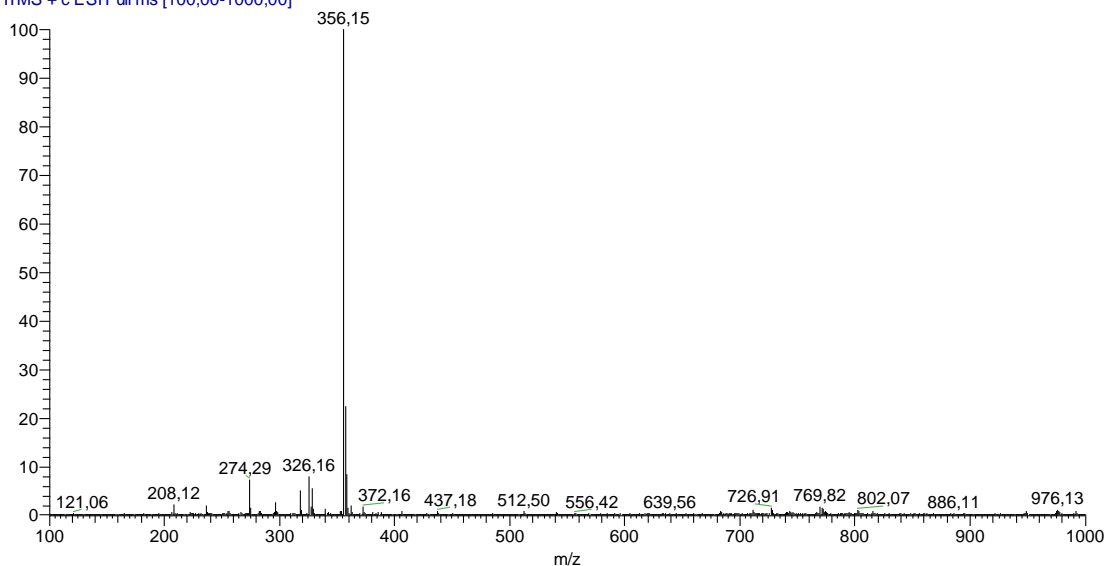


Posição	Substância DS3		
	<sup>1</sup> H δ (mult., J em Hz)	<sup>13</sup> C (δ)	HMBC ( <sup>1</sup> H x <sup>13</sup> C)
6	2,55 (1H, s)	41,1, CH <sub>3</sub>	5 e 6a
6a	4,72 (1H, s)	84,3, CH	1a, 3a, 3b e 5
7	4,44 (1H, d, 11,5)	66,8, CH <sub>2</sub>	7a, 8 e 11a
	4,22 (1H, d, 11,5)		7a, 8 e 11a
7a	-----	128,5, C	-----
8	6,96 (1H, s)	112,3, CH	7, 9, 10 e 11a
9	-----	148,6, C-O	-----
10	-----	148,8, C-O	-----
11	7,20 (1H, s)	111,6, CH	7a, 9 e 10
11a	-----	127,4, C	-----
(1,2)- OCH <sub>2</sub> O	5,93 (1H, d, 1,3)	101,0, CH <sub>2</sub>	1 e 2
	6,07 (1H, d, 1,3)		1 e 2
9-OCH <sub>3</sub>	3,93 (3H, s)	56,1, CH <sub>3</sub>	9
10-OCH <sub>3</sub>	3,94 (3H, s)	56,0, CH <sub>3</sub>	10

A análise do espectro de massas do alcaloide **DS3**, obtido através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição (ESI+), evidenciou a presença de uma molécula protonada com  $m/z$  356 Da  $[M+H]^+$ , compatível com os dados de RMN que indicam fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub>.

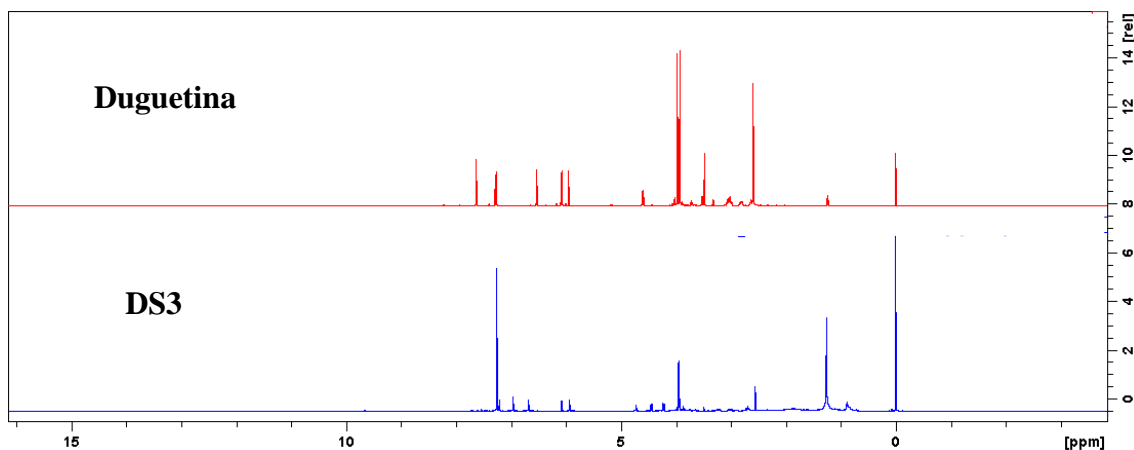
**FIGURA 128** - Espectro de massas da substância **DS3**

Amostra11\_5\_full\_frag #117-135 RT: 2,89-3,19 AV: 19 NL: 2,31E4  
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



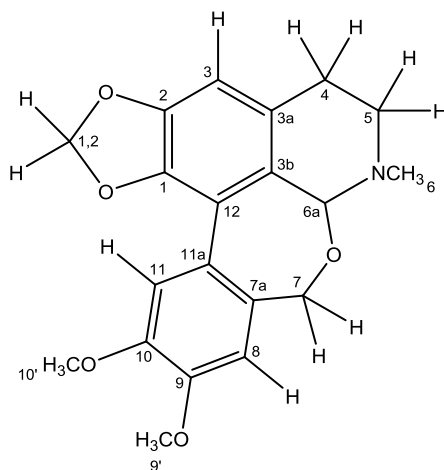
A massa observada é a mesma do alcaloide duguetina, porém a simples comparação de seus espectros de RMN de <sup>1</sup>H, são suficientes para constatar que os alcaloides **DS3** e **duguetina** são diferentes.

**FIGURA 129** - Comparação dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  dos alcaloides Duguetina (superior) e DS3 (inferior)



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D/2D e EM, bem como comparação com os dados da literatura (RASAMIZAFY *et al.*, 1987), permitiu-nos concluir que a substância **DS3** trata-se de um alcaloide com esqueleto isoquinolínico modificado inédito denominado **oxahomoaporfino**, e seu primeiro representante nomeado como **duguetinina**.

**FIGURA 130**– Estrutura da substância duguetinina.



## 5.2. Investigação da atividade citotóxica *in vitro*

A inibição do crescimento celular corresponde a um indicador da citotoxicidade causada pelas substâncias e extratos que estão sendo avaliados quanto à atividade antitumoral.

A atividade citotóxica foi avaliada pelo método descrito nos tópicos **2.4** e **4.12.3**, conhecido pelo nome de Alamar Blue (7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one). O alamar blue, também chamado de resazurina, é um sal solúvel que é reduzido apenas

por células vivas, que o tornam insolúvel, alterando sua coloração de azul não-fluorescente, para rósea fluorescente. (ESCOBAR, ALFONSO & ARISTIZÁBAL, 2009).

Os resultados do ensaio da atividade citotóxica do extrato hexânico (EHDSC), extrato metanólico (EMDSC), fração clorofórmica neutra (FNDSC) e fração clorofórmica alcaloídica (FADSC), estas provenientes de EMDSC das cascas de *D. surinamensis* estão apresentados na TABELA 25, com suas respectivas percentagens de inibição da proliferação celular em termos de  $CI_{50}$ .

**TABELA 24** - Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para os extratos de *D. surimensis*.

Amostra	Valores de $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )						
	HepG2	HL60	K562	PBMC	MCF7	HCT116	MRC5
EHDSC	>50	ND	>50	>50	-----	-----	-----
EMDSC	46,86	ND	35,58	>50	-----	-----	-----
	43,21 – 50,82		25,27 – 50,10				
FNDSC	>50	22,48	-----	-----	>50	30,59	36,60
		17,45 – 28,15	-----	-----		23,59 – 39,68	17,83 – 75,14
FADSC	15,81	8,66	-----	-----	8,00	5,59	9,38
	13,12 – 19,06	6,68 – 11,24	-----	-----	5,98 – 10,72	4,77 – 6,54	7,76 – 11,35
Doxorrubicina	0,46	0,06	0,33	0,67	1,22	0,26	7,20
	0,33 – 0,62	0,05 – 0,08	0,19 – 0,59	0,49 – 0,91	0,74 – 2,02	0,13 – 0,50	3,24 – 16,00

Observou-se que apenas **EMDSC** foi ativo frente as linhagens de células tumorais humanas, particularmente para **HepG2** e **K562** com  $CI_{50}$  abaixo de 47  $\mu\text{g/mL}$ . Após o tratamento ácido-base do **EMDSC**, que resultou em **FNDSC** e **FADSC**, verificou-se que a atividade citotóxica se concentrou em **FADSC** com pronunciada atividade frente as células **HCT116**, **MCF-7** e **HL60** com valores de  $CI_{50}$  iguais a **5,59**, **8,00** e **8,66  $\mu\text{g/mL}$** , respectivamente.

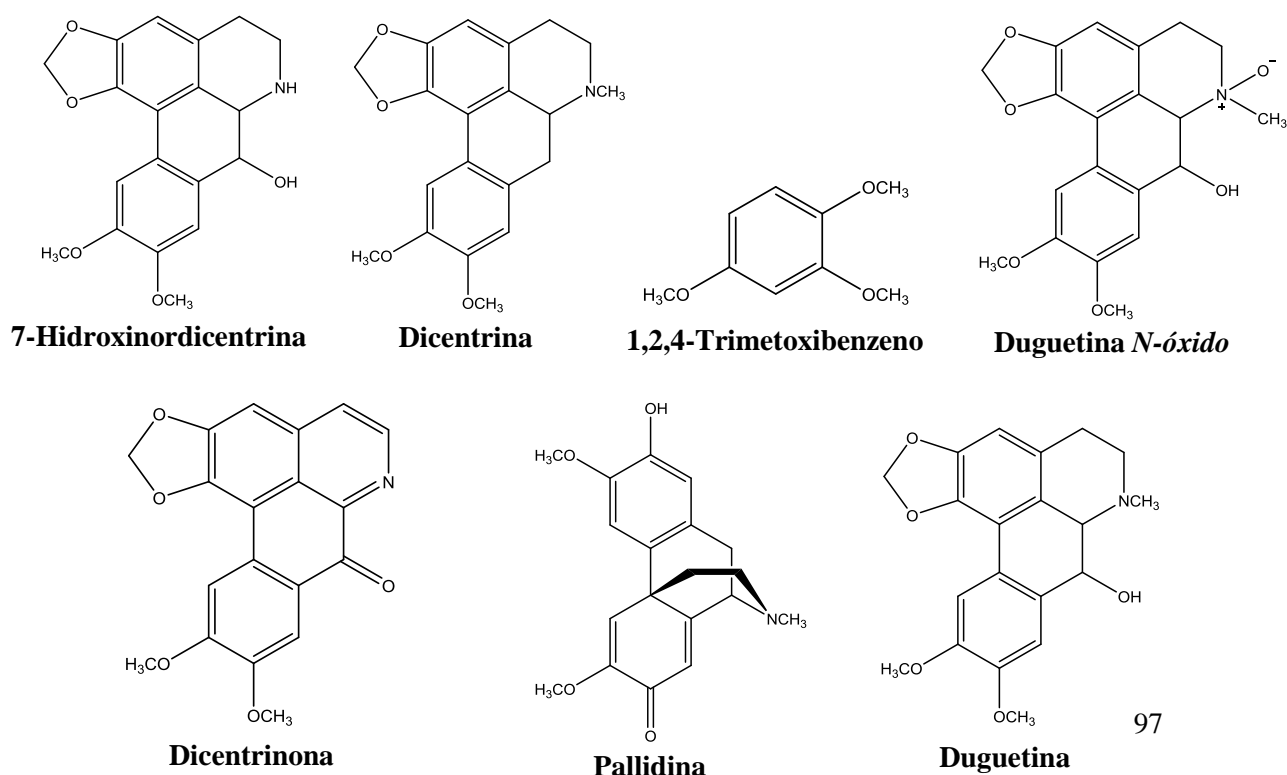
Com base nesses resultados, o estudo fitoquímico concentrou-se na fração clorofórmica alcaloídica levando ao isolamento de substâncias pertencentes à classe dos alcaloides descritos anteriormente. Sendo assim, considerando o estudo biomonitorado de FADSC e com o objetivo de buscar o(s) provável(éis) alcaloide(s) responsável(éis) pela atividade citotóxica de FADSC, os alcaloides isolados (TABELA 14) foram submetidos ao ensaio de atividade citotóxica frente às linhagens tumorais HCT116

(carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia promielocítica humana), MCF7 (adenocarcinoma de mama humano) e MRC5 (células de pulmão humano saudáveis). Na TABELA 26 estão dispostos os resultados da atividade citotóxica das substâncias isoladas de *D. surinamensis*.

**TABELA 25** - Atividade citotóxica das substâncias isoladas de *D. surinamensis*.

Amostras	Valores de $CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )				
	MCF7	HCT116	HepG2	HL-60	MRC5
<b>7-Hidroxinordicentrina</b>	<b>3,41</b> 2,27 - 5,13	<b>1,38</b> 1,15 - 1,67	<b>3,12</b> 2,46 - 3,92	<b>0,69</b> 0,54 - 0,88	<b>5,48</b> 1,96 - 9,32
<b>Dicentrina</b>	<b>6,65</b> 4,65 - 9,50	<b>2,98</b> 2,32 - 3,83	<b>6,69</b> 4,64 - 9,66	<b>1,26</b> 1,09 - 1,47	<b>9,12</b> 6,89 - 11,40
1,2,4-Trimetoxibenzeno	>25	>25	>25	21,36 15,16 - 30,10	>25
<b>Duguetina <i>N</i>-óxido</b>	<b>7,92</b> 5,23 - 12,01	<b>3,42</b> 2,78 - 4,20	<b>10,41</b> 6,76 - 16,04	<b>3,58</b> 2,58 - 4,97	<b>12,07</b> 8,90 - 17,30
Dicentrinona	>25	>25	>25	21,30 13,76 - 32,96	>25
Pallidina	>25	>25	>25	>25	>25
<b>Duguetina</b>	<b>3,84</b> 2,80 - 5,26	<b>6,83</b> 3,46 - 13,48	<b>1,78</b> 1,12 - 2,82	<b>1,70</b> 1,50 - 1,92	<b>9,93</b> 6,15 - 14,29
Doxorrubicina	0,86 0,53 - 1,42	0,14 0,09 - 0,36	0,02 0,01 - 0,13	0,02 0,01 - 0,07	1,28 0,13 - 2,57

**FIGURA 131** - Estrutura das substâncias submetidas aos ensaios citotóxicos.



A TABELA 26 indica que todos os alcaloides aporfínicos (7-hidroxinordicentrina, dicentrina, duguetina *N*-óxido e duguetina) isolados apresentaram relevante atividade citotóxica frente a todas linhagens de células tumorais testadas. Em contrapartida, os demais alcaloides (dicentrinona e pallidina) e o benzenoide não obtiveram resultado que indicasse citotoxicidade frente às linhas de células tumorais testadas, com valor de  $CI_{50}$  maior que a concentração experimental utilizada (25  $\mu\text{g/mL}$ ). Entre os alcaloides com atividade citotóxica, 7-hidroxinordicentrina apresentou maior atividade citotóxica contra as linhagens de células tumorais MCF7 ( $CI_{50}=3,41 \mu\text{g/mL}$ ), HCT116 ( $CI_{50}=1,38 \mu\text{g/mL}$ ) e HL-60 ( $CI_{50}=0,69 \mu\text{g/mL}$ ), e o alcaloide duguetina apresentou maior atividade citotóxica frente à linhagem tumoral de HepG2 ( $CI_{50}=1,78 \mu\text{g/mL}$ ). Tran e colaboradores (2010), relataram que os alcaloides aporfínicos, que possuem um grupo 1,2-metilenodioxí, foram os mais potentes contra as linhagens de células tumorais, o que sugere que esse grupo é um dos elementos-chave para a bioatividade. Porém, apenas a presença de um grupo 1,2-metilenodioxí não confere obrigatoriamente a molécula propriedades citotóxicas, pois conforme observado por MENEZES (2015), os alcaloides que foram isolados de *X. laevigata*, que possuíam o grupo metilenodioxí, mas não possuíam um grupo metoxila na posição 9 do anel D do sistema aporfínico, não apresentaram atividade citotóxica, o que indica que este também pode ser um elemento importante na atividade citotóxica dos alcaloides aporfínicos, confirmando a citotoxicidade dos alcaloides isolados de *D. surinamensis*. Tran e colaboradores (2010), relataram também que a presença do grupo *N*-óxido, poderia anular a atividade citotóxica de uma molécula, porém a atividade evidenciada pela Duguetina *N*-óxido, ainda que menor que a apresentada pelos demais alcaloides análogos, é bastante promissora para as linhagens HCT116 e HL-60.

Em discordância ao proposto por Chen *et al.* (2013), a conformação planar do alcaloide oxoaporfínico não contribuiu para a melhora na atividade citotóxica da dicentrinona, mas ao contrário, inibiu a atividade apresentada por seus análogos aporfínicos. Mesmo com a presença do grupo 1,2 metilenodioxí e as duas metoxilas nas posições 9 e 10, a dicentrinona não apresentou atividade citotóxica.

Baseado nos dados experimentais desse trabalho, pode-se sugerir que o alcaloide de esqueleto inédito **DS3**, provavelmente possuirá relevante atividade citotóxica frente aos grupos celulares testados, por apresentar semelhança com as demais substâncias

ativas nos anéis A, B e D, como a presença do grupo 1,2-metilenodioxí e as duas metoxilas nas posições 9 e 10.

A atividade citotóxica do extrato metanólico (EMDSC) e da fração alcaloídica (FADSC), pode ter relação com a presença dos alcaloides aporfínicos já citados, principalmente pela presença da duguetina e duguetina *N-óxido*, alcaloides majoritários na fração alcaloídica.

Os alcaloides que apresentaram atividade citotóxica para grupos de células tumorais, também apresentaram toxicidade para células sadias (MRC5), indicando baixa seletividade. Porém todos, exceto a dicentrina, apresentaram maior índice de seletividade que o controle positivo doxorrubicina, para a linhagem celular MCF7 (TABELA 27). O índice de seletividade (IS), foi calculado conforme a equação:  $IS = CI_{50} [célula\ sadia] / CI_{50} [célula\ tumoral]$ .

A principal diferença em termos estruturais entre a dicentrina e os demais alcaloides aporfínicos testados, é a ausência da hidroxila na posição 7 do anel C da dicentrina. Possivelmente, essa ausência se relacione de alguma forma com a redução na seletividade para a linhagem de células tumorais MCF7.

**TABELA 26** - Índice de seletividade dos alcaloides que apresentaram atividade citotóxica.

Amostras	Valores de IS			
	MCF7	HCT116	HepG2	HL-60
<b>7-hidroxinordicentrina</b>	<b>1,61</b>	3,97	1,76	7,94
Dicentrina	1,37	3,06	1,36	7,24
<b>Duguetina <i>N-óxido</i></b>	<b>1,52</b>	3,53	1,16	3,37
<b>Duguetina</b>	<b>2,59</b>	1,45	5,58	5,84
Doxorrubicina	1,49	9,14	64,00	64,00

Os estudos da atividade citotóxica dos compostos isolados de *D. surinamensis*, revelam resultados promissores, por isso, é de suma importância a continuidade da investigação dessas substâncias para que a viabilização da produção de novos fármacos com ação antitumoral.

## 6. Conclusões

O estudo fitoquímico da fração clorofórmica alcaloídica (FADSC) proveniente do extrato metanólico (EMDSC) das cascas de *D. surinamensis*, resultou no isolamento de nove (9) substâncias: oito (8) alcaloides e um (1) benzenoide. Dos oito alcaloides, cinco são inéditos no gênero, dois na família, e um é inédito. As substâncias isoladas foram identificadas como sendo: um benzenoide: 1,2,4-trimetoxibenzeno; quatro alcaloides aporfínicos: duguetina, duguetina *N*-óxido, dicentrina, 7-hidroxinordicentrina; um alcaloide oxaporfínico: dicentrinona; um alcaloide tetraidroprotoberberínico: tetrahydrojathrorrizina; um alcaloide morfinanodienona, pallidina; e um alcaloide do esqueleto inédito oxahomoaporfínico: duguetinina.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos extratos e frações revelou a capacidade antitumoral da espécie estudada. Dentre as amostras avaliadas, a fração alcaloídica (FADSC) foi a que apresentou os melhores resultados com pronunciada atividade para as linhagens tumorais **HCT116** (5,59 µg/mL), **MCF7** (8,00 µg/mL) e **HL60** (8,66 µg/mL), justificando assim o seu estudo fitoquímico, em busca da(s) substância(s) responsável(éis) pela atividade antitumoral *in vitro* apresentada.

Dentre os alcaloides testados provenientes da fração clorofórmica alcaloídica, os aporfínicos duguetina, duguetina *N*-óxido, dicentrina, 7-hidroxinordicentrina apresentaram atividade citotóxica mais significativa em todas as linhagens avaliadas, e apenas a dicentrina apresentou seletividade mais baixa que o controle positivo doxorrubicina para a linhagem celular HepG2. Esses dados justificam o aprofundamento dos estudos nos mecanismos de ação dessas substâncias nas linhagens testadas.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que *Duguetia surinamensis* é quimicamente uma espécie típica da família Annonaceae, além de uma fonte promissora de substâncias biologicamente ativas. Os resultados contribuem, ainda, de forma significativa para o conhecimento quimiotaxonômico da família, uma vez que suas substâncias isoladas e identificadas neste trabalho são encontradas em diversos gêneros dessa família, tais como, *Annona*, *Dasymachalon*, *Desmos*, *Guatteria*, *Xylopia*, *Monodora* e *Polyathia*.

## Referências Bibliográficas

ALMEIDA, J. R. G. DA S.; LÚCIO, A. S. S. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; SILVA, M. S. DA; CUNHA, E. V. L. DA; ANDRADE UCHOA, D. E. DE; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and a new cinnamate derivative from *Duguetia gardneriana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 7, p. 456–458, jul. 2007.

ALVES, A. P. L.; JUNIOR, J. A. B. C.; SLANA, G. B. A.; CARDOSO, J. N.; WANG, Q.; LOPES, R. S. C.; LOPES, C. C. Synthesis of 1,2,4-trimethoxybenzene and its selective functionalization at C-3 by Directed Metalation. **Synthetic Communications**, v. 39, n. 20, p. 3693–3709, 2009.

BRITTO, A. C. S.; OLIVEIRA, A. C. DE A.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, GA. M. B.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. *In Vitro* and *In Vivo* Antitumor Effects of the Essential Oil from the Leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v. 78, p. 409–414, 2012.

CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, M. DE; GARCEZ, W. S.; DINIZ, R.; FERNANDES, N. G. N -Nitrosoanonaine and N -Nitrosoxylopine , Aporphine Alkaloids from *Duguetia furfuracea*. **Journal of Natural Products**, v. 69, p. 1222–1224, 2006.

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

CHEN, Z.; LIU, Y.; HUANG, K.; LIANG, H. Alkaloid-Metal Based Anticancer Agents. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2104–2115, 2013.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine- $\beta$ -Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, p. 9714–9720, 2011.

CRUZ, P. E. O. DA; COSTA, E. V.; NOGUEIRA, P. C. DE L.; MORAES, V. R. S.; PRATA, A. P. DO N.; FERREIRA, A. G.; CAVALCANTI, S. C. DE H. **Constituintes químicos isolados do extrato éter de petróleo das cascas de *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae)** 34<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.



Anais.2009.

CUNHA, L. M. A. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Duguetia riparia* (Annonaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, 2009.

DEBOURGES, D.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Alcaloïdes des Annonacees, 77<sup>o</sup>. Alcaloïdes de *Duguetia spixiana*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 664–673, 1987.

DEBOURGES, D.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. *N*-oxycodamine, alcaloïde de *Duguetia spixiana*, synthese et RMN H de *N*-oxides de benzyltétrahydroisoquinoléïnes. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 5, p. 852–859, 1987.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2<sup>a</sup>. ed. London: John Wiley & Sons, 2002.

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

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

FECHINE, I. M.; NAVARRO, V. R.; CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloids and volatile constituents from *Duguetia flagellaris*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 267–269, 2002.

FERRAZ, R. P. C.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, N. C.; SOARES, M. B. P.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, V.; BEZERRA, D. P. Cytotoxic properties of the leaf essential oils of *Guatteria blepharophylla* and *Guatteria hispida* (Annonaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, p. 228–232, 2014.

FONTES, J. E. DO N.; FERRAZ, R. P. C.; BRITTO, A. C. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumor Effect of the Essential Oil from Leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, p. 722–729, 2013.

FORMAGIO, S. A. N.; MASETTO, T. E.; BALDIVIA, D. DA S.; VIEIRA, M. DO C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família

- Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 349–354, 2010.
- GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; MAIA, J. G. S.; MARSAIOLI, A. J. Oxoaporphine alkaloids from *Duguetia eximia*. **Phytochemistry**, v. 17, p. 837–838, 1978.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine Alkaloids II. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 4, p. 325–260, 1975.
- HARRIGAN, G. G.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; CHAN, G. W.; JOHNSON, R. K. Isolation of bioactive and other oxoaporphine alkaloids from two annonaceous plants, *Xylopia aethiopica* and *Miliusa cf. banacea*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 1, p. 68–73, 1994.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR - INCA. **Estimativa 2016 - Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 126 p. 2015.
- KONISHI, T.; KONISHI, K.; TAKEMURA, T.; MATUDA, M.; KONOSHIMA, T.; KIYOSAWA, S. Alkaloids from tissue culture of *Dicentra peregrina*, **Natural Medicines**, v. 52, p. 45-53, 1998.
- LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Minas Gerais, 2011.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1980.
- LEBOUF, M.; CAVÉ, A.; TOHAMI, M. EL. Alkaloids of Annonaceae. XXXV Alkaloids of *Desmos tiebaghiensis*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 5, p. 617–623, 1982.
- LIU, X.; ALALI, F. Q.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Two bioactive monotetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 815–821, 1999.
- LOPES, J. D. E. C.; MELLO-SILVA, R. **Diversidade e Caracterização das Annonaceae do Brasil** V Congresso Internacional e Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação. **Anais**. 2014.
- LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. DA S.; DA-CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J.

- F.; BARBOSA FILHO, J. M. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In: **The Alkaloids**, v. 74, p. 233–409, 2015.
- MENEZEZ, L. R. A. **Estudo fitoquímico e Investigação da atividade citotóxica do caule de *Xylopi* *laevigata* (Annonaceae)**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Sergipe, 2015.
- MIGUEL, O. G.; MONTUCCHIO, D. P.; SANTOS, A. R. S. DOS; DIAS, J. DE F. G.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W.; MELO, C. F. DE; ZANIN, P. **Identificação da propriedade antinoceptiva (analgésica) do alcaloide aporfínico S- (+) -dicentrina e usos do mesmo** Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil, 2016.
- MONTENEGRO, H.; GUTIÉRREZ, M.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; CAPSON, T. L.; RIOS, L. C. Aporphine Alkaloids from *Guatteria* spp. with Leishmanicidal Activity. **Planta Medica**, v. 69, p. 677–679, 2003.
- MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; TAKAMATSU, S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antimalarial, Cytotoxic, and Antifungal Alkaloids from *Duguetia hadrantha*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 559–562, 2001.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.
- NUNES, C. DOS R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. DE L.; OLIVEIRA, D. B. DE. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Vértices**, v. 14, p. 39–57, 2012.
- OLIVEIRA, J. G. DE S. **Estudo da Biodiversidade de Fungos Endofíticos, Potencial Citotóxico e Antimicrobiano de *Duguetia flagellaris* Huber**. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Amazonas, 2013.
- PÉREZ, E.; SÁEZ, J.; BLAIR, S.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B. Isoquinoline Alkaloids from *Duguetia Vallicola* Stem Bark with Antiplasmodial Activity. **Letters in Organic Chemistry**, v. 1, p. 102–104, 2004.
- QUINTANS, J. DE S. S. *et al.* Chemical Constituents and Anticancer Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopi* *laevigata*. **Planta Medica**, v. 79, p. 123–130, 2013.
- RABÊLO, S. V. **Revisão de Alcaloides do Gênero Annona, Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Biológica de Ateemoia (*Annona cherimola* x *Annona***

*squamosa*). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2014.

RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; FOURNET, E. A. Alcaloïdes des Annonacées, 78. Alcaloïdes des écorces d'un *Duguetia spixiana* de Bolivie. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 4, p. 674–679, 1987.

RIBEIRO, S. S. *et al.* Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. **Planta Med**, v. 78, p. 1601–1606, 2012.

ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloïdes des Annonacées, XLIV. Alcaloïdes de *Duguetia obovata*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 6, p. 862–873, 1983.

RODRIGUES, A. C. B. C.; BOMFIM, L. M.; NEVES, S. P.; MENEZES, L. R. A.; DIAS, R. B.; SOARES, M. B. P.; PRATA, A. P. N.; ROCHA, C. A. G.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumor Properties of the Essential Oil From the Leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta Medica**, v. 81, p. 798–803, 2015.

SANTOS, L. A. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St-Hil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, p. 48–51, 2007.

SANTOS, R. C. DOS; SOUZA, A. V. DE; ANDRADE-SILVA, M.; CRUZ, V.; APARECIDA, C.; KASSUYA, L.; ANDRÉA, C.; CARDOSO, L.; VIEIRA, C.; SAMARA, A.; FORMAGIO, N. Antioxidant , anti-rheumatic and anti-inflammatory investigation of extract and dicentrinone from *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil) Benth. & Hook. f. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 211, n. July 2017, p. 9–16, 2018.

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

SIQUEIRA, J. M. DE; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia Salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185–187, 2001.

SOUZA, A. V. M. **Atividade Anti-inflamatória do Extrato, de Frações e do**

**Alcaloide Dicentrinona, obtidos de *Duguetia furfuracea* (St. Hil) em Camundongos.**  
Dourados, Mato Grosso do Sul: Universidade Federal da Grande Dourados, 2013.

TRAN, T. D.; PHAM, N. B.; FECHNER, G.; QUINN, R. J. Chemical investigation of drug-like compounds from the Australian tree , *Neolitsea dealbata*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 19, p. 5859–5863, 2010.

VALÉRIA, F. *et al.* Phytochemical Constituents and Toxicity of *Duguetia furfuracea* Hydroalcoholic Extract in *Drosophila melanogaster*. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 11, 2014.

WIJERATNE, KITHSIRI E. M. HATANAKA, Y.; KIKUCHI, T.; TEZUKA, Y.; GUNATILAKA, L. A. A. A dioxoaporphine and other alkaloids of two Annonaceos Plants of Sri Lanka. **Phytochemistry**, v. 9422, n. 6, p. 1703–17706, 1996.

Disponível em:

<<http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/orders/magnolialesweb.htm>>. Acessado em 13 de Junho de 2016.

<<http://www.colecionandofrutas.org/duguetiafurfuracea.htm>>. Acessado em 13 de Novembro de 2017.

<<http://www.colecionandofrutas.org/duguetialanceolata.htm>>. Acessado em 13 de Novembro de 2017.