

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

MORGANA DE SOUZA ARAÚJO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
CITOTÓXICO DAS CASCAS E FOLHAS DE *Guatteria olivacea*
(ANNONACEAE)**

MANAUS – AM

2019

MORGANA DE SOUZA ARAUJO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
CITOTÓXICO DAS CASCAS E FOLHAS DE *Guatteria olivacea*
(ANNONACEAE)**

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

ORIENTADOR: Prof^o. Dr^o. Emmanoel Vilaça Costa

MANAUS – AM

2019

Ficha Catalográfica

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

Araújo, Morgana de Souza

A663c Constituintes Químicos e Investigação do Potencial Citotóxico das cascas e folhas de *Gutteria olivacea* (Annonaceae) / Morgana de Souza Araújo. 2019

172 f.: il. color; 31 cm.

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

1. *Gutteria olivacea*. 2. Annonaceae. 3. Alcaloides. 4. Sesquiterpenos. 5. Citotoxicidade. I. Costa, Emmanoel Vilaça II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

MORGANA DE SOUZA ARAUJO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL
CITOTÓXICO DAS CASCAS E FOLHAS DE *Guatteria olivacea*
(ANNONACEAE)**

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

BANCA EXAMINADORA

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

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

Prof^o. Dr^o. Hector Henrique Ferreira Koolen, Membro
Universidade Estadual do Amazonas

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho especialmente aos meus pais, meu namorado e meu irmão, por todo apoio e incentivo durante o período de realização desse mestrado, sem eles nenhuma das minhas conquistas seriam possíveis.

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.

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

Ao Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa, meu 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 (HUAM) do Departamento de Biologia da UFAM pela identificação da espécie, possibilitando seu estudo.

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

Aos professores do PPGQ, pelos ensinamentos.

Aos colegas que integram e integraram o grupo de pesquisa GEQBiom, Nathalya Dorzani, Albert Santos, Natalie Araujo, Rodolfo Oliveira, Alberto Nascimento, Weider Paz, Brina Silva, Thayline Menezes, César Souza, Liviane Soares, Camila Ruzo, Thiago Damasceno Richelly Andrade, Steve Manickchand e Jessica Auzier, obrigada pelo convívio, troca de experiências e momentos de descontração.

Aos colegas de turma Poliane Corrêa, Gabriela Silva, Giecson Oliveira, Milena Campelo e Luana Leão pelas diversas conversas nos corredores que ajudaram tornar mais leve as dificuldades do mestrado.

A minha família, meu irmão Moisés Araújo e meus pais Antonio Araújo e Nancy Araújo, que desde minha infância sempre incentivaram meus estudos e apoiaram minhas decisões.

Ao meu namorado Alex Pereira, por me compreender e apoiar minhas escolhas e principalmente por ser um homem maravilhoso com o qual partilho meus melhores momentos.

Enfim, sou imensamente grata a Deus e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

"O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis."

(José de Alencar)

RESUMO

Guatteria olivacea R. E. Fries é uma espécie amazônica pertencente a família Annonaceae conhecida popularmente como “araticum”, “ata” e “envireira”, que ocorre em floresta pluvial de terra firme com distribuição no Brasil, particularmente nos estados do Amazonas e do Pará. De acordo com a literatura, não há registros de estudos químicos e farmacológicos a seu respeito. Deste modo, neste trabalho foi realizado o estudo fitoquímico e de citotoxicidade *in vitro* dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas das cascas e do óleo essencial das folhas de *G. olivacea*. O estudo com as cascas resultou no isolamento e caracterização de dez substâncias pertencentes à classe dos alcaloides, sendo duas delas obtidas em mistura. Para o isolamento dos constituintes químicos foram empregadas técnicas cromatográficas clássicas (CC e CCDP) e para a identificação desses constituintes técnicas espectroscópicas (RMN de ¹H e ¹³C 1D/2D) e espectrométricas (EM). Os alcaloides isolados e identificados são pertencentes as subclasses dos aporfínicos (asimilobina, puterina e discoguatina), oxoaporfínicos (liriodenina e oxoputerina), fenantrenos (atherosperminina, argentinina e *N*-óxido de atherosperminina) e tetraidroprotoberberinos (coripalmina e discretina). Todos os alcaloides identificados possuem relato no gênero, porém são inéditos na espécie em estudo, sendo os alcaloides do tipo fenantreno de rara ocorrência. Dentre todos os extratos (hexânico e metanólico) e frações das cascas, submetidos ao ensaio de atividade citotóxica *in vitro*, a fração alcaloídica proveniente do extrato metanólico foi a que apresentou maior atividade contra as linhagens de células tumorais avaliadas, com valores de CI₅₀ iguais a 20,16 µg.mL⁻¹ para MCF-7 e 18,25 µg.mL⁻¹ para HepG2. Dentre os alcaloides isolados que foram avaliados, atherosperminina foi o que apresentou os melhores resultados contra as linhagens de células MCF-7, HCT116, HepG2 e HL-60 com valores de CI₅₀ iguais a 41,10, 33,07, 42,10 e 33,79 µmol.L⁻¹, respectivamente. O óleo essencial extraído das folhas foi analisado por CG-DIC e CG-EM e apresentou como constituintes majoritários os sesquiterpenos germacreno D (17,65%), β-atlantol (13,21%), óxido de cariofileno (12,03%), espatulenol (11,26%) e (*E*)-cariofileno (7,26%). A avaliação citotóxica desse óleo exibiu atividade promissora frente as linhagens de células tumorais MCF-7, HCT116, HepG2, e HL-60 com valores de CI₅₀ iguais a 27,22, 25,74, 34,95 e 16,11 µg.mL⁻¹, respectivamente. Os resultados obtidos corroboram o potencial químico e citotóxico das espécies de Annonaceae Brasileiras, em particular das espécies de ocorrência no Amazonas, e justificam a continuidade do seu estudo em futuros projetos em busca de substâncias com propriedades citotóxicas.

Palavras-chaves: *Guatteria olivacea*; Annonaceae; Alcaloides; Sesquiterpenos; Citotoxicidade.

ABSTRACT

Guatteria olivacea R. E. Fries is an Amazonian species belonging to the Annonaceae family popularly known as “araticum”, “ata” and “envireira”, which occurs in rainforest solid ground with distribution in Brazil, particularly in the states of Amazonas and Pará. According to the literature, there are no records of chemical and pharmacological studies about it. Thus, in this work, the phytochemical study and in vitro cytotoxicity of the crude extracts, fractions and isolated substances of the bark, and of the essential oil of *G. olivacea* leaves were performed. The study of the bark resulted in the isolation and characterization of ten substances belonging to the class of alkaloids, two obtained in a mixture. For the isolation of the chemical constituents classical chromatographic techniques (CC and CCDP) was performed and for the identification of these constituents spectroscopic (^1H and ^{13}C 1D/2D) and spectrometric (MS) techniques was used. The isolated and identified alkaloids belong to the subclasses of aporphines (asimilobine, puterine and discoguattine), oxoaporphines (liriodenine and oxoputerine), phenanthrenes (atherosperminine, argentinine and atherosperminine *N*-oxide) and tetrahydroprotoberberines (corypalmine and discretine). All identified alkaloids are reported in the genus but unprecedented in the species investigated, with phenanthrene alkaloids being the least occurring. Among all bark extracts (hexane and methanolic) and fractions submitted to the in vitro cytotoxic activity assay, the alkaloid fraction from the methanolic extract showed the highest activity against the evaluated tumor cell lines, with IC_{50} values of $20.16 \mu\text{g. mL}^{-1}$ for MCF-7 and $18.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for HepG2. Among the isolated alkaloids that were evaluated, atherosperminine presented the best results against MCF-7, HCT116, HepG2 and HL-60 cell lines with IC_{50} values of 41.10, 33.07, 42.10 and $33.79 \mu\text{mol.L}^{-1}$, respectively. The essential oil extracted from the leaves was analyzed by GC-DIC and GC-MS and presented as major constituents sesquiterpenes germacrene D (17.65%), β -atlantol (13.21%), caryophyllene oxide (12.03%), spatulenol (11.26%) and (*E*)-caryophyllene (7.26%). Cytotoxic evaluation of this oil showed promising activity against MCF-7, HCT116, HepG2, and HL-60 tumor cell lines with IC_{50} values of 27.22, 25.74, 34.95 and $16.11 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively. The obtained results corroborate the chemical and cytotoxic potential of the Brazilian Annonaceae species, in particular of the species occurring in the Amazonas, and justify the continuity of their study in future projects in search of substances with cytotoxic properties.

Key-words: *Guatteria olivacea*; Annonaceae; Alkaloids; Sesquiterpenes; Cytotoxicity.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

β	beta
δ	Deslocamento químico
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
AcOEt	Acetato de etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CD_3OD	Metanol deuterado
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CH_2Cl_2	Diclorometano
CH_3OH	Metanol
CI ₅₀	Concentração inibitória média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
cm	Centímetros
COSY	<i>Correlation Spectroscopy</i>
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
<i>d</i>	Dupleto
Da	Dalton
<i>dd</i>	Duplo dupleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dox	Doxorrubicina
EM	Espectrometria de massas
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
g	Grama
GOCEH	<i>Guatteria olivacea</i> - Cascas Hextrato Hexânico
GOCEM	<i>Guatteria olivacea</i> - Cascas Extrato Metanólico
GOCHA	<i>Guatteria olivacea</i> - Cascas Fração Alcaloídica

GOCFN	<i>Guatteria olivacea</i> - Cascas Fração Neutra
HCl	Ácido clorídrico
HepG2	Carcinoma Hepatocelular Humano
HL-60	Leucemia Promielocítica Humana
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
Hz	Hertz
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
<i>J</i>	Constante de acoplamento
L	Litro
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
m	Metro
<i>m</i>	Multiplete
<i>m/z</i>	Relação massa/carga
MCF-7	Carcinoma de mama humano
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano
NH₄OH	Hidróxido de amônio
nm	Nanômetro
°C	Graus Celsius
Pax	Pseudoaxial
Peq	Pseudoequatorial
pH	Potencial de hidrogênio
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
TR	Tempo de retenção
<i>s</i>	Simpleto
<i>t</i>	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
v/v	Volume/volume

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Distribuição geográfica da família Annonaceae.....	4
FIGURA 2: Algumas espécies da família Annonaceae.	5
FIGURA 3: Biossíntese dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos.	9
FIGURA 4: Esqueleto básico dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos.....	10
FIGURA 5: Biossíntese geral para os alcaloides tetraidroprotoberberinos.....	10
FIGURA 6: Estrutura dos alcaloides tetraidroprotoberberinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	11
FIGURA 7: Estrutura dos alcaloides protoberberinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	12
FIGURA 8: Estrutura dos alcaloides oxoaporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	14
FIGURA 9: Estrutura dos alcaloides proaporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	14
FIGURA 10: Estrutura dos alcaloides aporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i> . .	15
FIGURA 11: Estrutura dos alcaloides 7-hidroxi-7-metilaporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	16
FIGURA 12: Estrutura dos alcaloides 7,7-dimetilaporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	17
FIGURA 13: Características botânicas de <i>G. olivacea</i> (1) Árvore; (2) botão flor imaturo; (3) botão de flor maduro; (4) frutos e (5) detalhes das folhas.....	23
FIGURA 14: Esqueletos dos alcaloides identificados nas cascas de <i>G. olivacea</i>	43
FIGURA 15: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO1	44
FIGURA 16: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO1	45
FIGURA 17: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO1	45
FIGURA 18: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de GO1	46
FIGURA 19: Espectro de RMN de DEPT135 (125 MHz, CDCl_3) de GO1	46
FIGURA 20: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO1 . .	47

FIGURA 21: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO1 .	47
FIGURA 22: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO1 .	48
FIGURA 23: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO1 .	48
FIGURA 24: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO1 .	48
FIGURA 25: Espectro de massas de GO1 .	50
FIGURA 26: Perfil de fragmentações de GO1 .	50
FIGURA 27: Estrutura do alcaloide atherosperminina.	51
FIGURA 28: Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO1 (a) e GO8 (b).	51
FIGURA 29: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO8 .	52
FIGURA 30: Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO8 .	52
FIGURA 31: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO8 .	53
FIGURA 32: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO8 .	54
FIGURA 33: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO8 .	54
FIGURA 34: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO8 .	55
FIGURA 35: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO8 .	55
FIGURA 36: Espectro de massas de GO8 .	57
FIGURA 37: Perfil de fragmentações de GO8 .	57
FIGURA 38: Estrutura do alcaloide argentinina.	58
FIGURA 39: Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO1 (a) e GO9 (b).	58
FIGURA 40: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO9 .	59
FIGURA 41: Ampliação da região aromática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO9 .	59

FIGURA 42: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO9 ...	60
FIGURA 43: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO9	60
FIGURA 44: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO9 ..	61
FIGURA 45: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO9	61
FIGURA 46: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO9	62
FIGURA 47: Espectro de massas de GO9	63
FIGURA 48: Perfil de fragmentações de GO9	64
FIGURA 49: Estrutura do alcaloide <i>N</i> -óxido de atherosperminina.....	64
FIGURA 50: Proposta de fragmentação para alcaloides fenantrenos.....	65
FIGURA 51: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de GO2	66
FIGURA 52: Ampliação da região aromática no espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de GO2	67
FIGURA 53: Mapa de correlação HSQC (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de GO2	67
FIGURA 54: Mapa de correlação HMBC (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de GO2	68
FIGURA 55: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de GO2	68
FIGURA 56: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO2	69
FIGURA 57: Espectro de massas de GO2	70
FIGURA 58: Perfil de fragmentações de GO2	70
FIGURA 59: Estrutura do alcaloide liriodenina.....	71
FIGURA 60: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO5	72
FIGURA 61: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO5	73
FIGURA 62: Mapa de correlação COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO5	73
FIGURA 63: Espectro de massas de GO5	74

FIGURA 64: Perfil de fragmentações de GO5 .	75
FIGURA 65: Estrutura do alcaloide oxoputerina.	75
FIGURA 66: Proposta de fragmentação para alcaloides oxoaporfinos.	76
FIGURA 67: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO3 .	77
FIGURA 68: Ampliação da região aromática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO3 .	78
FIGURA 69: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO3 .	78
FIGURA 70: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO3 .	79
FIGURA 71: Ampliação da região aromática do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO3 .	79
FIGURA 72: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO3 .	80
FIGURA 73: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO3 .	80
FIGURA 74: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO3 .	81
FIGURA 75: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO3 .	81
FIGURA 76: Espectro de massas de GO3 .	82
FIGURA 77: Perfil de fragmentações de GO3 .	83
FIGURA 78: Estrutura da assimilobina.	83
FIGURA 79: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO6 .	84
FIGURA 80: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO6 .	84
FIGURA 81: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO6 .	85
FIGURA 82: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO6 .	85
FIGURA 83: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO6 .	86
FIGURA 84: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO6 .	86
FIGURA 85: Ampliação da região das correlações observadas de H-3 no mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO6 .	87

FIGURA 86: Ampliação da região aromática no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO6 .	87
FIGURA 87: Ampliação da região de carbonos substituídos no anel D no mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO6 .	88
FIGURA 88: Ampliação dos grupos metoxílicos no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO6 .	89
FIGURA 89: Ampliação da região dos grupos metilênicos no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO6 .	89
FIGURA 90: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO6a .	90
FIGURA 91: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO6b .	90
FIGURA 92: Espectro de massas de GO6 .	93
FIGURA 93: Perfil de fragmentações de GO6a .	93
FIGURA 94: Perfil de fragmentações de GO6b .	94
FIGURA 95: Estrutura dos alcaloides puterina e discoguatina.	94
FIGURA 96: Proposta de fragmentação para alcaloides aporfinos <i>sensu stricto</i> .	95
FIGURA 97: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO4 .	96
FIGURA 98: Ampliação da região alifática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO4 .	97
FIGURA 99: Ampliação da região de hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO4 .	98
FIGURA 100: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO4 .	98
FIGURA 101: Ampliação do mapa de correlação HSQC mostrando os grupos metoxílicos (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO4 .	99
FIGURA 102: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO4 .	99
FIGURA 103: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO4 .	100
FIGURA 104: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO4 .	100
FIGURA 105: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO4 .	101

FIGURA 106: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de GO4	101
FIGURA 107: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO4	102
FIGURA 108: Espectro de massas de GO4	104
FIGURA 109: Perfil de fragmentações de GO4	105
FIGURA 110: Estrutura da coripalmina.....	105
FIGURA 111: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO7	106
FIGURA 112: Ampliação região aromática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO7	106
FIGURA 113: Ampliação da região alifática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de GO7	107
FIGURA 114: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO7	108
FIGURA 115: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO7	108
FIGURA 116: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO7	109
FIGURA 117: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO7	109
FIGURA 118: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de GO7	110
FIGURA 119: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de GO7	110
FIGURA 120: Espectro de massas de GO7	112
FIGURA 121: Perfil de fragmentações de GO7	112
FIGURA 122: Estrutura da discretina.....	113
FIGURA 123: Proposta de fragmentação para alcaloides tetraidroprotoberberinos.....	113
FIGURA 124: Cromatograma dos íons totais do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria olivacea</i>	114

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Espécies de Annonaceae que apresentaram atividade biológica.	7
TABELA 2: Alcaloides tetraidroprotoberberinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i> . 11	11
TABELA 3: Alcaloides protoberberinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	12
TABELA 4: Alcaloides oxoaporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	13
TABELA 5: Alcaloides proaporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	14
TABELA 6: Alcaloides aporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	14
TABELA 7: Alcaloides 7-hidroxi-7-metilaporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	16
TABELA 8: Alcaloides 7,7-dimetilaporfinos isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	16
TABELA 9: Principais substâncias encontradas nos óleos essenciais de espécies de <i>Guatteria</i>	18
TABELA 10: Atividades biológicas reportadas para os alcaloides do gênero <i>Guatteria</i>	22
TABELA 11: Reunião das frações obtidas do fracionamento de GOCFA	33
TABELA 12: Reunião das frações obtidas do fracionamento de G2	34
TABELA 13: Classe de alcaloides identificados de <i>G. olivacea</i>	43
TABELA 14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO1	49
TABELA 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO8	56
TABELA 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO9	63
TABELA 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO2	69
TABELA 18: Dados de RMN de ^1H de GO5	74
TABELA 19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO3	82
TABELA 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO6a	91
TABELA 21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO6b	92
TABELA 22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C GO4	103
TABELA 23: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C GO7	111

TABELA 24: Composição química do óleo essencial das folhas de <i>G. olivacea</i>	115
TABELA 25: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para o óleo essencial de <i>G. olivacea</i>	118
TABELA 26: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para os extratos de <i>G. olivacea</i>	120
TABELA 27: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para as substâncias isoladas das cascas de <i>G. olivacea</i>	121
TABELA 28: Importância quimiotaxonômica dos alcaloides isolados de <i>G. olivacea</i>	123

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: Fluxograma geral de obtenção dos extratos pelo método de maceração.	30
ESQUEMA 2: Fluxograma do tratamento ácido-base.	31
ESQUEMA 3: Fluxograma do fracionamento cromatográfico de GOCFA	32
ESQUEMA 4: Fluxograma do fracionamento cromatográfico de G2	34
ESQUEMA 5: Grupo de frações G2.8	35
ESQUEMA 6: Grupo de frações G2.9	36
ESQUEMA 7: Grupo de frações G3	36
ESQUEMA 8: Grupo de frações G4	37
ESQUEMA 9: Grupo de frações G5	38
ESQUEMA 10: Grupo de frações G6	38
ESQUEMA 11: Grupo de frações G12	39
ESQUEMA 12: Formas da resazurina - Indicador de viabilidade celular.	41
ESQUEMA 13: Ensaio de citotoxicidade.	42

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
2.1. A família Annonaceae.....	4
2.1.1. Aspéctos gerais.....	4
2.2. O gênero <i>Guatteria</i> Ruiz et Pav.....	8
2.2.1. Aspectos gerais.....	8
2.2.2. Aspectos químicos.....	8
2.2.2.1. Alcaloides de <i>Guatteria</i>	8
2.2.2.2. Óleos essenciais de <i>Guatteria</i>	18
2.2.3. Aspectos farmacológicos.....	21
2.3. A espécie <i>Guatteria olivacea</i> R. E. Fries.....	23
3. OBJETIVOS	24
3.1. Objetivo geral:	24
3.2. Objetivos específicos:	24
4. METODOLOGIA.....	25
4.1. Cromatografia em coluna (CC).....	25
4.2. Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)	25
4.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).....	25
4.4. Gel de sílica 60 impregnada com NaHCO ₃	25
4.5. Reveladores.....	26
4.6. Solventes	26
4.7. Equipamentos.....	26
4.8. Outros equipamentos	28
4.9. Coleta do material vegetal	29

4.10. Preparo dos extratos.....	29
4.11. Tratamento ácido-base do extrato metanólico	30
4.12. Fracionamento cromatográfico da fase alcalóidica (GOCFA)	32
4.13. Isolamento.....	33
4.13.1. Grupo de frações G2	33
4.13.2. Grupo de frações G3	36
4.13.3. Grupo de frações G4	37
4.13.4. Grupo de frações G5	37
4.13.5. Grupo de frações G6	38
4.13.6. Grupo de frações G12	39
4.14. Extração do óleo essencial.....	39
4.15. Estudo biológico: atividade citotóxica.....	40
4.15.1. Preparo das amostras.....	40
4.15.2. Células.....	40
4.15.3. Ensaio de citotoxicidade.....	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	43
5.1. Identificação estrutural das substâncias isoladas das cascas de <i>G. olivacea</i>	43
5.1.1. Identificação estrutural dos alcaloides do tipo fenantreno	44
5.1.1.1. Identificação estrutural de GO1	44
5.1.1.2. Identificação estrutural de GO8.....	51
5.1.1.3. Identificação estrutural de GO9.....	58
5.1.2. Identificação estrutural dos alcaloides do tipo oxoaporfino.....	66
5.1.2.1. Identificação estrutural de GO2.....	66
5.1.2.2. Identificação estrutural de GO5.....	71
5.1.3. Identificação estrutural dos alcaloides do tipo aporfino <i>sensu stricto</i>	77
5.1.3.1. Identificação estrutural de GO3.....	77
5.1.3.2. Identificação estrutural de GO6 (GO6a e GO6b).....	84

5.1.4. Identificação estrutural dos alcaloides do tipo tetraidroprotoberberino.....	96
5.1.4.1. Identificação estrutural de GO4.....	96
5.1.4.2. Identificação estrutural de GO7.....	105
5.2. Estudo dos constituintes voláteis das folhas de de <i>G. olivacea</i>	114
5.3. Investigação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> pelo Método Alamar Blue.....	117
5.3.1. Investigação da atividade citotóxica do óleo essencial extraído das folhas de <i>G. olivacea</i>	118
5.3.2. Investigação da atividade citotóxica dos extratos e frações das cascas de <i>G. olivacea</i>	119
5.3.3. Investigação da atividade citotóxica das substâncias isoladas das cascas de <i>G. olivacea</i>	120
5.4. Importância quimiotaxonômica	123
6. CONCLUSÕES.....	126
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	127
8. ANEXOS.....	143

1. INTRODUÇÃO

A prática da fitoterapia sempre esteve presente na vida da humanidade, como forma de prevenção e cura de doenças. Mesmo com os avanços farmacológicos, o uso popular de plantas para fins medicinais ainda é grande, sendo por questões de tradição, de baixo custo, ou até mesmo pela acessibilidade (COSTA *et al.*, 2018b).

Em contrapartida, essa automedicação ocorre muitas das vezes, sem a ciência sobre os índices de toxicidade das plantas. Desse modo, devido ao seu uso contínuo, a Organização Mundial da Saúde (OMS) declarou oficialmente legitimidade na utilização de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos no tratamento de doenças e encorajou a busca pelos conhecimentos necessários para seu uso. Desde então, há uma tendência mundial de defesa, estímulo, e inserção da fitoterapia nos programas de pesquisa, para incentivar o estudo visando futuras aplicações na medicina (COSTA *et al.*, 2018b).

O efeito inibitório de doenças a partir dos princípios ativos das plantas se dá por meio da realização de uma série de metabólitos produzidos por esses vegetais, sendo estes essências para sustentar suas vidas em um determinado ambiente, tais como: respiração e fotossíntese (metabólitos primários), assim como também os não essenciais (metabólitos secundários), mas que ainda assim conferem a esses organismos, entre outras funções, a ação protetora em relação à estresses abióticos, como: resistência à mudanças de temperatura, níveis de água, incidência de luz, exposição à UV, deficiência de nutrientes, atração de polinizadores, entre outros fatores (PERES, 2019; RINALDI, 2007; WOLFENDER *et al.*, 2013).

Os metabólitos primários incluem os aminoácidos, nucleotídeos e lipídeos, já os metabólitos secundários compreendem os alcaloides, terpenoides, esteroides, flavonoides, taninos, ácidos graxos, acetogeninas, lignanas, ligninas e cumarinas, entre outros (DEWICK, 2009). Diversos destes metabólitos secundários, têm sido utilizados na medicina como modelo para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos devido as suas inúmeras propriedades biológicas, frequentemente comprovadas com o passar dos anos. Como consequência, grande parte das substâncias isoladas a partir deles, têm virado fármacos amplamente comercializados (PRATA; CAES, 2016).

Como exemplo de fármacos originados com base em substâncias isoladas ou inspiradas em produtos naturais podemos citar o Acheflan[®], um anti-inflamatório fitofarmacêutico desenvolvido com base no extrato das folhas de *Cordia verbenacea* L., os medicamentos Marinol[®] e Cesamet[®] idealizados a partir de estudos com espécies do gênero *Cannabis* sendo empregados no tratamento de vômitos e náuseas associadas à quimioterapia. Incluindo os

fármacos com propriedades anticâncer, como o Velban[®] e o Oncovin[®] produzidos com base nas substâncias isoladas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don, o Taxol[®] desenvolvido a partir de metabólitos secundários isolados de *Taxus brevifolia* Nutt, dentre outros como Eldisine[®], Navelbine[®], Taxotere[®], Etopophos[®], Vumon[®], Hycamtin[®] e Camptosar[®] (CRAGG; NEWMAN, 2000; CRAGG; NEWMAN, 2005; PINTO *et al.*, 2002; BRANDÃO *et al.*, 2010; DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015).

Segundo Newman e Cragg (2016), cerca de 87% de todas as doenças atuais podem ser tratadas com medicamentos derivados de produtos naturais, até mesmo doenças causadas por bactérias, parasitas, doenças imunossupressoras, e ainda, alguns tipos de câncer. Entre os anos de 1981 a 2014 obtiveram-se cerca 175 novas moléculas para o tratamento do câncer no mercado farmacêutico, sendo 75% derivadas ou inspiradas em produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A presença dessas substâncias, são muitas vezes, limitadas a um conjunto de espécies dentro de um grupo filogenético. Na flora Amazônica, em meio as muitas famílias estudadas com a finalidade de extrair esses componentes para fins medicinais, encontra-se a família Annonaceae, que se destaca por apresentar uma grande aplicação na medicina tradicional devido a atividade oriunda de seus metabólitos secundários, especialmente os alcaloides, os terpenoides e as acetogeninas (SOARES, 2014).

Estudos recentes com espécies da família Annonaceae, têm corroborado particularmente o seu potencial no combate às células tumorais cancerígenas (MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015; FERRAZ *et al.*, 2014; FONTES *et al.*, 2013; QUINTANS *et al.*, 2013). Visto que o câncer atualmente vem atingindo proporções epidêmicas e como consequência tem se tornado um grave problema de saúde, subentende-se que a realização de estudos com substâncias oriundas de produtos naturais que apresentam atividade antineoplásica, mostram-se cada vez mais como uma importante ferramenta no combate a essa enfermidade (SOUZA *et al.*, 2007).

Estima-se que surjam até o ano de 2030, 28 milhões de novos casos de câncer em todo o mundo (PORTICH *et al.*, 2017). Os quais justificam ser causados na maioria das vezes, pelo estilo de vida que as pessoas levam. Hábitos como tabagismo, consumo de álcool, sedentarismo, obesidade e ainda, em um país tropical como o Brasil, a exposição excessiva ao sol aumentam as chances de incidência da doença (INCA, 2019).

Atualmente, muitos tipos de câncer podem ser curados, desde que tratados em estágios iniciais, pesquisas vem demonstrando que mais da metade dos casos de câncer já possuem cura. Onde o seu tratamento pode ser feito por cirurgias, radioterapias ou quimioterapias, sendo esta

última uma das formas mais desestimulantes para o paciente, visto que possui uma longa duração e faz com que se desenvolvam efeitos colaterais como vômitos, queda de cabelo, tontura, falta de apetite, entre outros fatores que na maioria dos casos, resultam no abandono do tratamento (RODRIGUES; POLIDORI, 2012). Sendo assim, justifica-se o interesse no estudo em fontes de produtos naturais que vise o desenvolvimento de novas formas de terapias mais eficientes e menos agressivas buscando o bem-estar dos pacientes.

Sendo metabolitos característicos da família Annonaceae, os alcaloides, terpenos e as acetogeninas, em meio a diversas classes de produtos naturais encontrados nessa família, tem evidenciado atividade citotóxica promissora (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014). Uma variedade de testes tem sido desenvolvida com essa finalidade, dentre eles, os colorimétricos utilizando o método Alamar Blue, que se destacam pela sua confiabilidade, baixo custo e rapidez na obtenção de resultados frente a capacidade citotóxica apresentada por determinada amostra (ESCOBAR; ALFONSO; ARISTIZÁBAL, 2009). Este ensaio tem sido amplamente utilizado nos últimos anos em estudos sobre viabilidade celular e citotoxicidade em uma variedade de sistemas biológicos e ambientais os quais confirmam sua eficácia (RAMPERSAD, 2012).

Nesta perspectiva, ainda que, considerada uma das famílias mais primitivas e mais conhecidas, não se descarta a possibilidade de realizar contribuições inéditas acerca de estudos químicos com ênfase nos constituintes biologicamente ativos das anonáceas. Dentre as espécies dessa família, encontra-se a *Guatteria olivacea* R. E. Fries, endêmica da região amazônica e particularmente desconhecida pela população, não havendo relatos na literatura quanto a sua investigação fitoquímica e de suas propriedades farmacológicas.

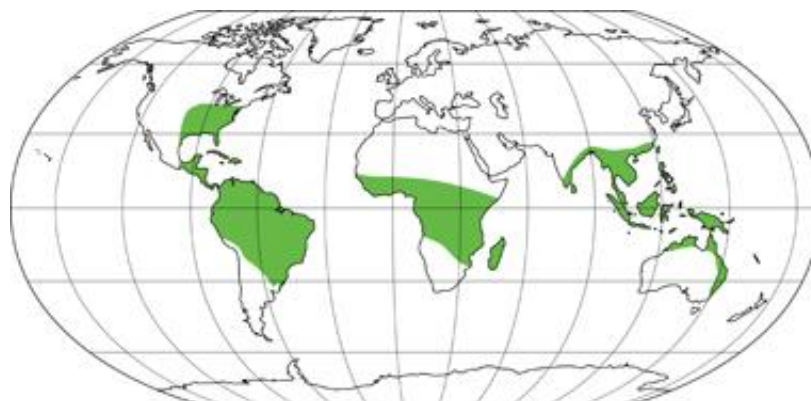
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. A família Annonaceae

2.1.1. Aspectos gerais

A família Annonaceae constitui uma das maiores representantes da ordem Magnoliales, possuindo cerca de 2500 espécies e 108 gêneros, com distribuição pantropical (entre os trópicos) (FIGURA 1) (LÚCIO *et al.*, 2015; CHATROU *et al.*, 2012). No Brasil, estão presentes um total 386 espécies, distribuídas em 29 gêneros, sendo a Amazônia a região que comporta três quartos da diversidade de anonáceas, com 27 gêneros e 280 espécies, e a Mata Atlântica, a maior totalidade restante com 15 gêneros e 91 espécies, onde também são encontrados dois gêneros e cerca de 40 espécies endêmicas (LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

FIGURA 1: Distribuição geográfica da família Annonaceae.



Fonte: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/images/webcurso_spv/mapas/annonaceae.jpg Acesso em 01 de julho de 2019.

A família Annonaceae pode ser caracterizada por suas flores, frutos e seu hábito vegetativo, assim como também por sua madeira característica onde o corte do tronco ou ramos apresenta forte odor. São plantas lenhosas, geralmente na forma de árvores ou arbustos com folhas dísticas, alternas e simples, sem margem inteira e estípulas, podendo possuir uma casca com longas e resistentes fibras (KOEK-NOORMAN; WESTRA, 2012; JOLY, 2002).

Popularmente, essa família é conhecida por possuir frutos comestíveis (pinha), que são muito cultivados com fins de consumo em alguns países como no Chile, no México, na Venezuela, na Austrália e no Brasil. A Bahia e Pernambuco são os estados que tem maior produção de pinha no Brasil, seguidos por Alagoas e São Paulo (FIGURA 2) (SOBRINHO, 2014).

FIGURA 2: Algumas espécies da família Annonaceae.



Annona cherimola
Mill.



Annona squamosa L.



Annona montana
Macfad.



Annona muricata
Linnaeus



Annona mucosa
Jacq.



Duguetia lanceolata
A.St.-Hil.



Artabotrys
hexapetalus
(Lf.) Bhandari



Polyalthia longifolia
(Sonn.) Thwaites

Fonte: <https://fieldguides.fieldmuseum.org/other-idtools> . Acesso em 27 de abril de 2019.

Devido ao sabor característico bastante apreciado dos seus frutos, estes são um fator de destaque econômico de suas espécies. O gênero que se destaca por sua comercialização é o gênero *Annona*, como nas espécies: *Annona cherimola* Mill. (cherimoia), *Annona squamosa* L. (ata, fruta do conde ou pinha), *Annona montana* Macfad. (graviola da montanha), *Annona mucosa* Jacq. (biribá) e *Annona muricata* L. (graviola). Apesar da popularidade dos frutos de *Annona*, também encontram-se frutos comestíveis muito consumidos em outros gêneros, como *Artabotrys*, *Asimina*, *Polyalthia*, *Uvaria* e *Duguetia*, esse último representado principalmente pelos frutos conhecidos popularmente como pindaíba (*Duguetia lanceolata* A.St.-Hil) (FORMAGIO *et al.*, 2010; LOPES; MELLO-SILVA, 2014; NUNES *et al.*, 2012; SOUZA, 2013).

Além de fazer parte da dieta de muitos brasileiros, as plantas do gênero *Annona* também são empregadas na fabricação de cosméticos, como a *Annona muricata* L. frequentemente utilizada para a obtenção de produtos que previnem a degeneração e diminuição do colágeno na pele (BARATA *et al.*, 2009; KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

Apesar de possuir um grande quantitativo de espécies conhecidas, apenas 150 de suas espécies (pouco mais de 7%) pertencentes a 41 gêneros (aproximadamente 33%) foram investigadas até o momento, quanto à caracterização química, taxonômica e farmacológica (LÚCIO *et al.*, 2015).

As espécies pertencentes a esta família são caracterizadas por possuir como principais metabólitos secundários os alcaloides, que são compostos nitrogenados em geral farmacologicamente ativos, além dos alcaloides, também são comumente encontrados em suas espécies: os terpenos, e as acetogeninas (LÚCIO *et al.*, 2015). A descoberta de acetogeninas tem atraído nos últimos anos, o interesse de pesquisadores devido as suas diversas atividades biológicas apresentadas e comprovadas, particularmente contra células tumorais (PAES *et al.*, 2016). Entretanto, flavonoides, catequinas, esteroides, dentre outras classes de substâncias também podem ser encontradas nesta família (LÚCIO *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2012).

Arelado a sua riqueza de composto químicos, espécies de diversos gêneros dessa família como *Annona*, *Guatteria*, *Unonopsis* e *Xylopia* têm sido utilizadas frequentemente na medicina popular, no tratamento de doenças negligenciadas, tais como doença de chagas e malária (TSABANG *et al.*, 2012; FRAUSIN *et al.*, 2014). Observou-se ainda, que suas espécies apresentam resultados promissores quando submetidas a ensaios de atividade biológica dos mais diversos tipos, como: antitumoral (BOMFIM *et al.*, 2016); leishmanicida (LÓPEZ; CUCA; DELGADO, 2009; COSTA *et al.*, 2009b); antiviral (OLIVIER; VUUREN; MOTEETEE, *et al.*, 2015); antimalárica (BOYOM *et al.*, 2003); tripanocida (SILVA *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2012; PINHEIRO *et al.*, 2009 e SILVA *et al.*, 2013); larvicida (SOONWERA, 2015) e antimicrobiana (SOUSA *et al.*, 2012). Com isso, houve um aumento gradativo de pesquisas com o estudo dos óleos essenciais e extratos brutos de espécies de Annonaceae, visando o isolamento dos componentes químicos presentes nas suas folhas, cascas, frutos e raízes (RABELO *et al.*, 2014; ALMEIDA *et al.*, 2014).

As atividades farmacológicas apresentadas nessa família são atribuídas aos metabólitos secundários (terpenos, alcaloides, acetogeninas, etc.) isolados de suas espécies, onde vem sendo apontada como uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas com possíveis aplicações medicinais (PAES *et al.*, 2016).

Na TABELA 1 são apresentados alguns exemplos de espécies dessa família utilizadas na medicina popular, algumas das quais com atividades biológicas comprovadas.

TABELA 1: Espécies de Annonaceae que apresentaram atividade biológica.

Espécie	Uso popular	Atividade biológica
<i>Annona cherimola</i>	Doença de pele do tipo furúnculo (CHEN <i>et al.</i> , 2001).	Antibacteriana (CASTILLO-JUÁREZ <i>et al.</i> , 2009).
<i>Annona crassiflora</i>	Diarréia crônica (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).	Antiinflamatória e quimiopreventiva (ROCHA <i>et al.</i> , 2015).
<i>Annona foetida</i>	Reumatismo, febre e dores estomacais (CORRÊA, 1984).	Antimicrobiana e antileishmania (COSTA <i>et al.</i> , 2006; COSTA <i>et al.</i> , 2009b).
<i>Annona leptopetala</i>	Problemas no sistema digestivo (AGRA <i>et al.</i> , 2007).	Larvicida (FEITOSA <i>et al.</i> , 2009).
<i>Annona muricata</i>	Antiparasitária, diarréia, gripe, asma, febre, malária, hipertensão e repelentífera (CORIA-TÉLLEZ <i>et al.</i> , 2016).	Antibacteriana, antitumoral, antioxidante, antiprotozoária, antiviral, citotóxica e inseticida (CORIA-TÉLLEZ <i>et al.</i> , 2016).
<i>Annona salzmanii</i>	Antiparasitária, desenterias, dores e inflamações estomacais (AGRA, 1977).	Antimicrobiana, tripanocida, antitumoral e larvicida (CRUZ <i>et al.</i> , 2011; COSTA <i>et al.</i> , 2013c).
<i>Duguetia furfuracea</i>	Antiparasitária, calmante, reumatismo, dores nos rins e coluna (SILVA, 1998).	Citotóxica, antiinflamatória e antioxidante (MESQUITA <i>et al.</i> , 2009; SANTOS <i>et al.</i> , 2018b).
<i>Guatteria boliviana</i>	Febrífugo e vermífugo (MAHIOU <i>et al.</i> , 2000).	Leishmanicida <i>in vitro</i> (MAHIOU <i>et al.</i> , 2000).
<i>Guatteria cardoniana</i>	Repelentífera (PAREDES <i>et al.</i> , 2001).	Antiviral (PAREDES <i>et al.</i> , 2001).
<i>Xylopiya aromatica</i>	Tempero, vermífugo e tônico para o estômago e intestino (GEMTCHÚJNICOV, 1976).	Citotóxica (MESQUITA <i>et al.</i> , 2009).
<i>Xylopiya frutescens</i>	Estimulante de bexiga, reumatismo e antiparasitária (TAKAHASHI <i>et al.</i> , 1995; MELO <i>et al.</i> , 2001).	Anticâncer <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> (FERRAZ <i>et al.</i> , 2013).

2.2. O gênero *Guatteria* Ruiz et Pav.

2.2.1. Aspectos gerais

O gênero *Guatteria* Ruiz et Pav. está entre os mais antigos gêneros da família Annonaceae (MAAS *et al.*, 2015) e é considerado o terceiro maior gênero de árvores neotropicais, com 307 espécies distribuídas no México, Bolívia e Brasil, com grande diversidade na Amazônia (LOBÃO; MELLO-SILVA; FORZZA, 2012).

São encontradas no território brasileiro, cerca de 90 espécies, das quais, 49 são endêmicas (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2019). Distribuem-se ao longo do Brasil pelo Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Acre, Rondônia), Nordeste (Maranhão, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (MAAS; LOBÃO; RAINER, 2019).

Suas árvores possuem o tronco reto, monopodial, em geral cilíndrico com coloração cinzenta-branca, as ramificações estão somente no ápice da árvore, seus galhos são finos e horizontais. Suas flores são produzidas na parte axilar das folhas, de modo único ou em pares, e quando abertas são de coloração amarela possuindo caráter ligeiramente aromático. Seus frutos apresentam sabor adocicado e têm em média 6 cm de diâmetro e os bagos são pequenos de tonalidade marrom escuro, contendo um cerne-colorido, com semente em formato oval (RABELO, 2008). Devido ao grande interesse visando futuras aplicações farmacológicas, as plantas desse gênero assim como as demais da família Annonaceae são frequentemente utilizadas como objeto de estudos fitoquímicos bem como na medicina popular (COSTA *et al.*, 2010).

2.2.2. Aspectos químicos

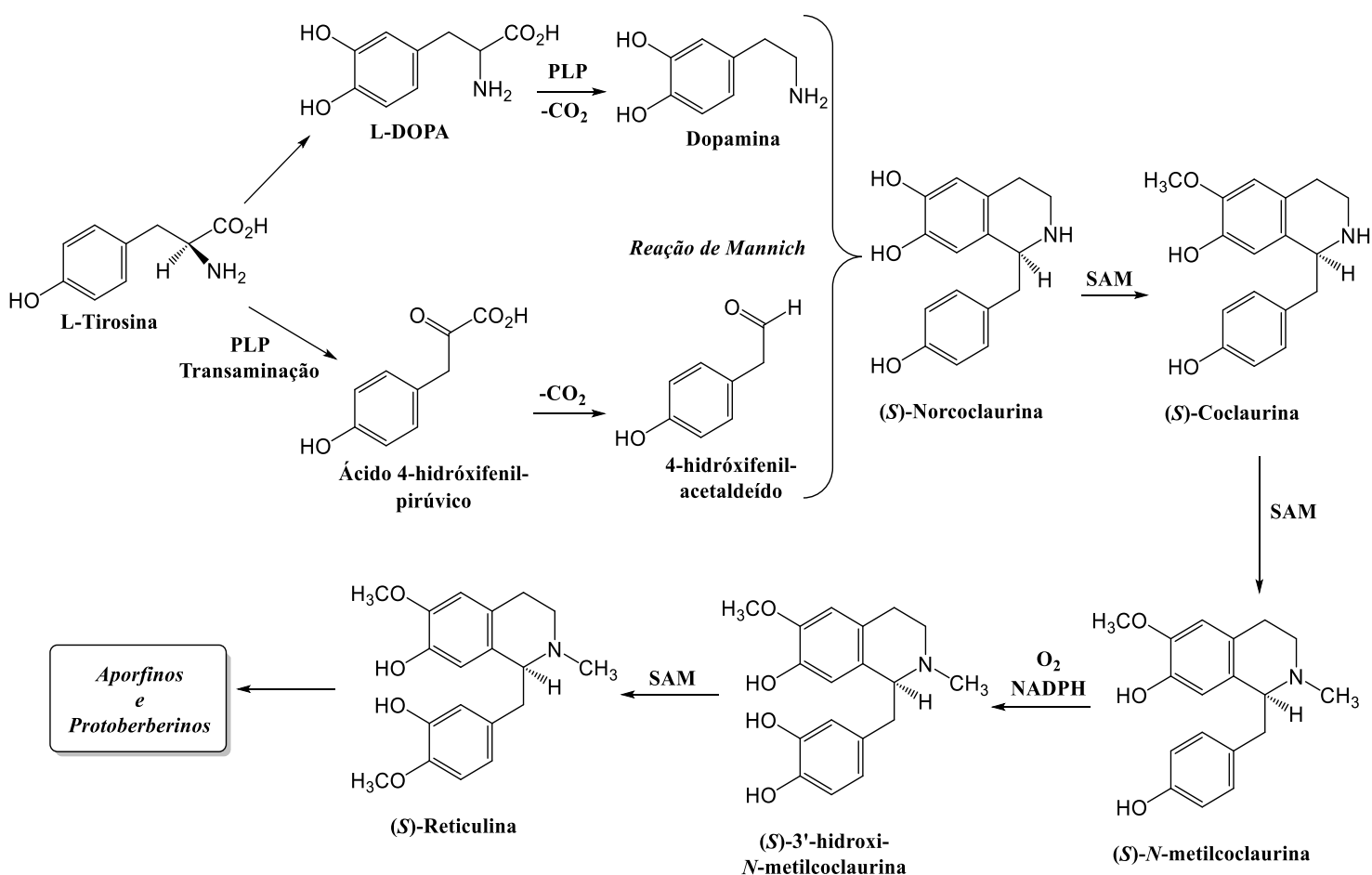
As espécies pertencentes ao gênero *Guatteria*, têm mostrado que suas características químicas são semelhantes as demais dos gêneros da família Annonaceae, sendo assim, caracterizadas em geral pela ocorrência de alcaloides, embora outras classes de substâncias como os terpenos sejam de frequente relato no gênero (SANTOS *et al.*, 2018a).

2.2.2.1. Alcaloides de *Guatteria*

Fitoquimicamente o gênero *Guatteria* é reconhecido pela presença de diversas classes de metabólitos secundários, sendo as classes mais relatadas na literatura para suas espécies os alcaloides contendo estrutura isoquinolínica (LÚCIO *et al.*, 2015).

Os alcaloides isoquinolinos são precursores de importantes alcaloides tais como os aporfinos e os tetrahidroprotoberberinos. A rota biossintética para os benziltetraidroisoquinolinos (FIGURA 3) inicia-se a partir do aminoácido L-tirosina. Duas moléculas de L-tirosina paralelamente sofrem reação, onde uma é descarboxilada para formar a dopamina e a outra sofre uma reação de transaminação dando origem ao ácido 4-hidroxifenilpirúvico. Posteriormente, os produtos das duas reações sofrem condensação através da reação de Mannich, formando assim o benziltetraidroisoquinolino (S)-Norcoclaurina. Reações seguintes de metilação e oxidação levam a formação de (S)-Reticulina. Sendo a (S)-Reticulina precursora dos alcaloides aporfinos e protoberberinos (DEWICK, 2009).

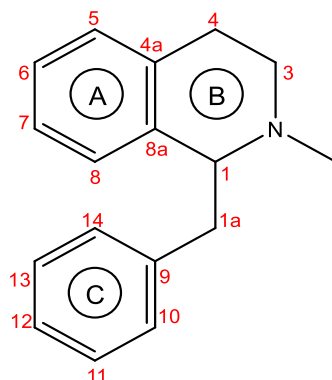
FIGURA 3: Biossíntese dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos.



Fonte: Adaptado de DEWICK (2009); COSTA (2009).

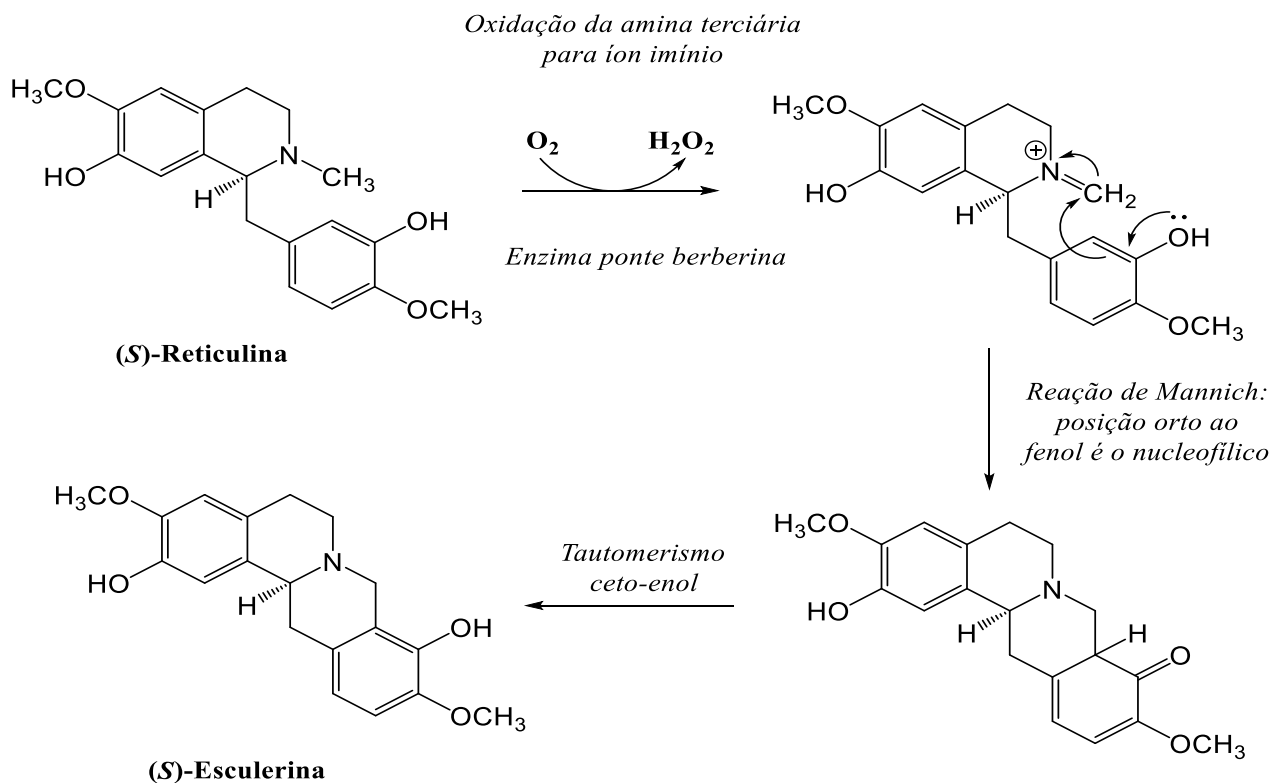
Os **aporfinos** e seus derivados constituem um dos maiores grupos de alcaloides isoquinolinos em Annonaceae. Quimicamente estes alcaloides são caracterizados como bases tetracíclicas formadas pelo acoplamento oxidativo direto entre os anéis aromático A e D de núcleos típicos benzilisoquinolínicos (FIGURA 4) (STÉVIGNY et al., 2004).

FIGURA 4: Esqueleto básico dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos.



Os **tetrahidroprotoberberinos** são alcaloides com esqueleto do tipo protoberberino. Estes compostos são formados pela oxidação (via enzimática), da amina terciária do núcleo benzilisoquinolino, seguida por uma reação do tipo Mannich, resultando na ciclização da molécula (DEWICK, 2009) (FIGURA 5).

FIGURA 5: Biossíntese geral para os alcaloides tetrahidroprotoberberinos.



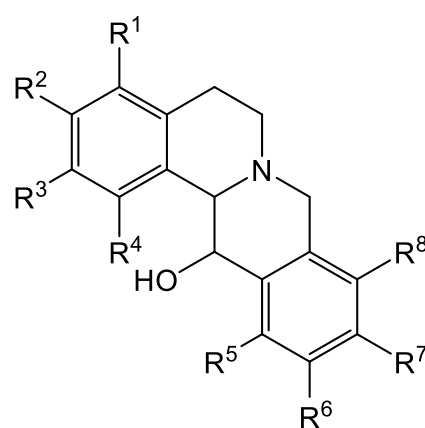
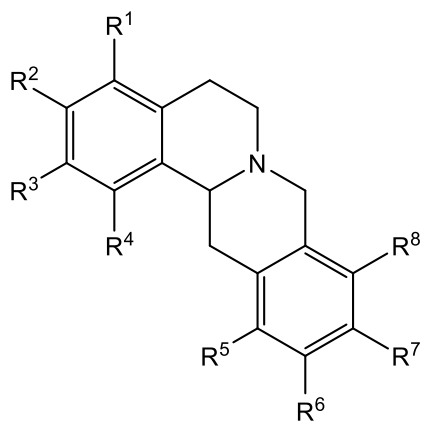
Fonte: Adaptado de DEWICK (2009); COSTA (2009).

As TABELAS 2-8 juntamente com as FIGURAS 6-12 apresentam uma revisão das principais substâncias alcalóidicas descritas para as espécies de *Guatteria* quanto ao estudo fitoquímico nos últimos dez anos.

TABELA 2: Alcaloides tetraidroprotoberberinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[1]	Coreximina	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
[2]	Isocoreximina	<i>G. hispida</i> <i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010 COSTA <i>et al.</i> , 2011a
[3]	(-)-Tetrahydropseudocolumbamina	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2018a
[4]	Discretamina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017
[5]	Caseadina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017
[6]	13-Hidroxi-discretinina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[7]	13-Hidroxi-2,3,9,10-tetrametoxiprotoberberina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a

FIGURA 6: Estrutura dos alcaloides tetraidroprotoberberinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.



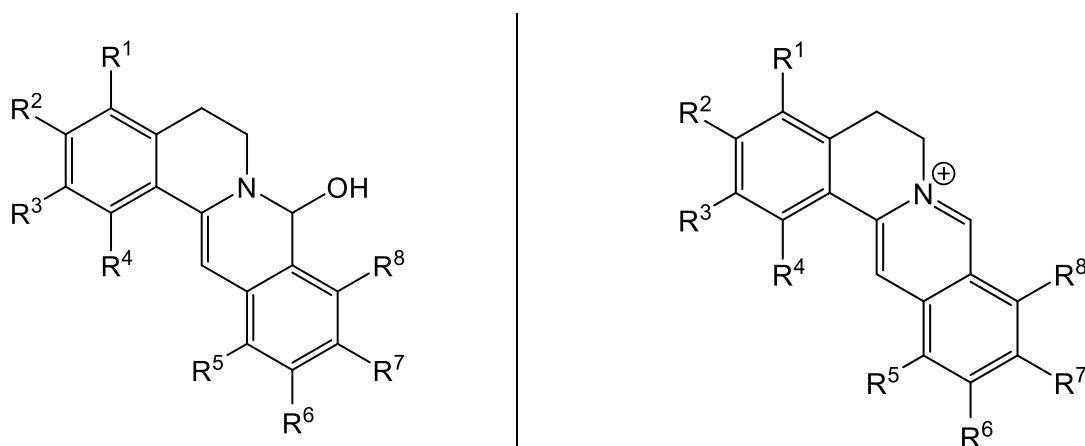
	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
[1]	H	OCH ₃	OH	H	H	OH	OCH ₃	H
[2]	H	OH	OCH ₃	H	H	OH	OCH ₃	H
[3]	H	OCH ₃	OH	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
[4]	H	OH	OCH ₃	H	H	H	OH	OCH ₃
[5]	H	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
[6]	H	OH	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃
[7]	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃

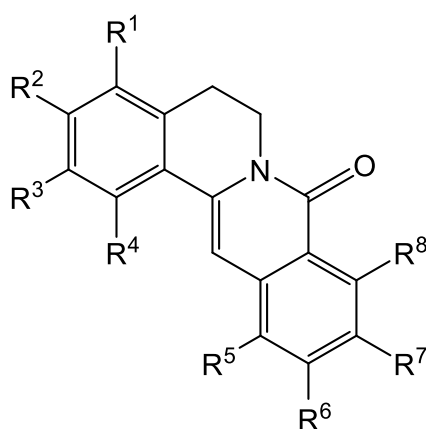
TABELA 3: Alcaloides protoberberinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[8]	Palmatina	<i>G. citriodora</i> <i>G. friesiana</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014 COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[9]	7,8-Diidro-8-hidroxipalmatina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[10]	Isocerasonina	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
[11]	8-Oxopseudopalmatina		

FIGURA 7: Estrutura dos alcaloides protoberberinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸		R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
[8]	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃	[9]	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	OCH ₃	OCH ₃



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
[10]	H	OH	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H
[11]	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H

TABELA 4: Alcaloides oxoaporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[12]	9-Metoxi- <i>O</i> -metilmoschatolina	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
[13]	9-Metoxiisomoschatolina	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
[14]	<i>O</i> -metilmoschatolina	<i>G. latifolia</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017a
		<i>G. citriodora</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014
		<i>G. blepharophylla</i>	ANDREAZZA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
[15]	Lisicamina	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
		<i>G. citriodora</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014
		<i>G. latifolia</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017a
		<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. blepharophylla</i>	ANDREAZZA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
		<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2018a
[16]	Liriodenina	<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
		<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
		<i>G. latifolia</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017a
		<i>G. citriodora</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014
		<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2015
		<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. blepharophylla</i>	ANDREAZZA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[17]	10-Metoxiliriodenina	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2018a
		<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
[18]	Isomoschatolina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017
		<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
		<i>G. latifolia</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017a
		<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. blepharophylla</i>	ANDREAZZA <i>et al.</i> , 2016
[19]	3-Metoxioxoputerina	<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
[20]	Oxoputerina	<i>G. citriodora</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014
[21]	Lanuginosina	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2015
		<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[22]	Subsessilina	<i>G. blepharophylla</i>	ANDREAZZA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
[23]	Atherospermidina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[24]	Telkovina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017

FIGURA 8: Estrutura dos alcaloides oxoaporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

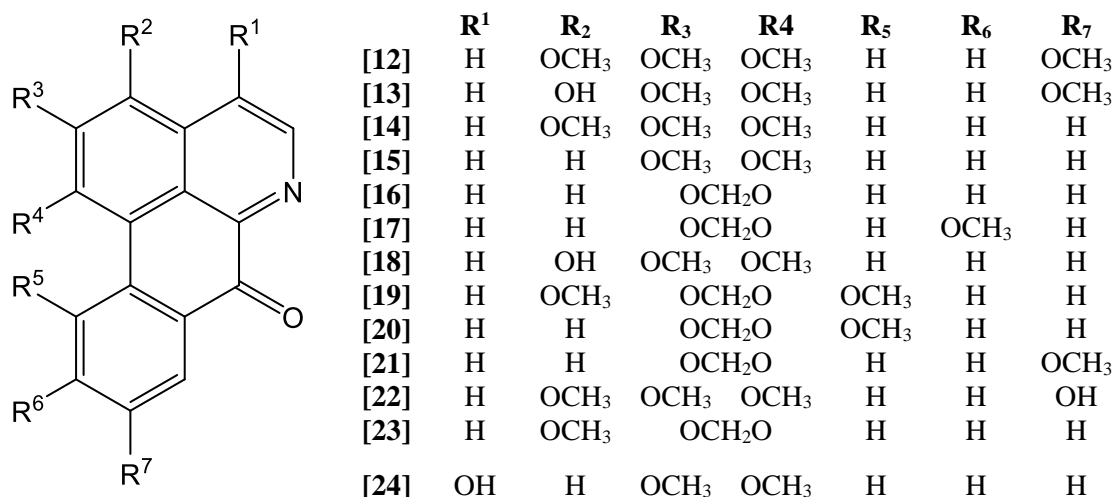


TABELA 5: Alcaloides proaporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[25]	Estefarina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017

FIGURA 9: Estrutura dos alcaloides proaporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

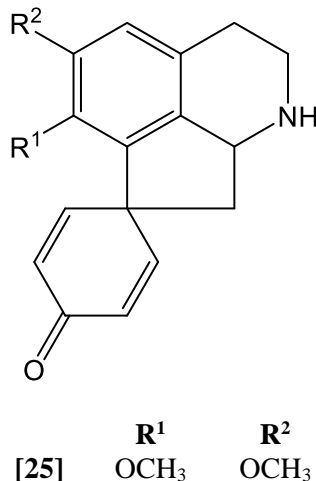


TABELA 6: Alcaloides aporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[26]	(+) -Nornuciferina	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
		<i>G. ferruginea</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017a
		<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
		<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2015
		<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017
		<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2018a

Cont.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[27]	Anonaina	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
		<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2015
		<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2018a
[28]	Xylopina	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
		<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2015
[29]	3-Hidroxi-nornuciferina	<i>G. ferruginea</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017
[30]	Puterina		
[31]	Isopilina		
[32]	O-metilisopilina	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2015
[33]	Launobina		
[34]	Obovanina		
[35]	(+)-Isocoridina		
[36]	(+)-Nuciferina		
[37]	(+)-Roemerina		
[38]	1,2,9-Trimetoxi-10-hidroxiaporfino	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2018a
[39]	Bulbocapnina		
[40]	(+)-N-metillindicarpina		
[41]	Asimilobina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017
[42]	Coritubina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017
[43]	N-óxido de oliverina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017
[44]	Dehidronantenina	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017

FIGURA 10: Estrutura dos alcaloides aporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
[26]	H	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
[27]	H	H	OCH ₂ O		H	H	H	H
[28]	H	H	OCH ₂ O		H	H	OCH ₃	H
[29]	H	OH	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
[30]	H	H	OCH ₂ O		OCH ₃	H	H	H
[31]	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H	H	H
[32]	H	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
[33]	H	H	OCH ₂ O		H	OCH ₃	H	H
[34]	H	H	OCH ₂ O		OH	H	H	H
[35]	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H
[36]	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	H	H	H
[37]	CH ₃	H	OCH ₂ O		H	H	H	H
[38]	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OH	OCH ₃	H
[39]	CH ₃	H	OCH ₂ O		OH	OCH ₃	H	H
[40]	CH ₃	H	OH	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	H
[41]	H	H	OH	OCH ₃	H	H	H	H
[42]	CH ₃	H	OCH ₃	OH	OH	OCH ₃	H	H
[43]	N-óxido	H	OH	OH	H	H	OCH ₃	OCH ₃
[44]	CH ₃	H	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₂ O		H

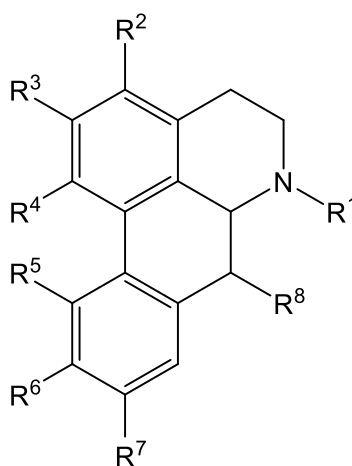


TABELA 7: Alcaloides 7-hidroxi-7-metilporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[45]	Guattescidina	<i>G. citriodora</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014
[46]	9-Desmetoxiisoguattouregina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
[47]	9-Desidroxi-1-metoxi-dihidroguaattouregidina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[48]	7-Hidroxiguaatteriopsiscina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2018a

FIGURA 11: Estrutura dos alcaloides 7-hidroxi-7-metilporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

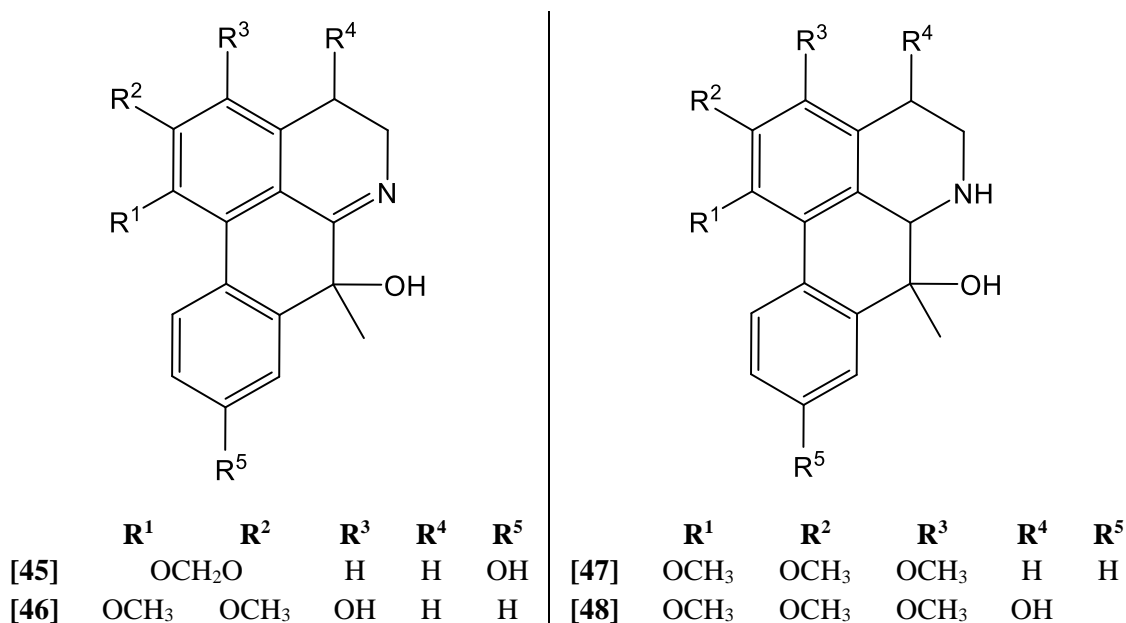


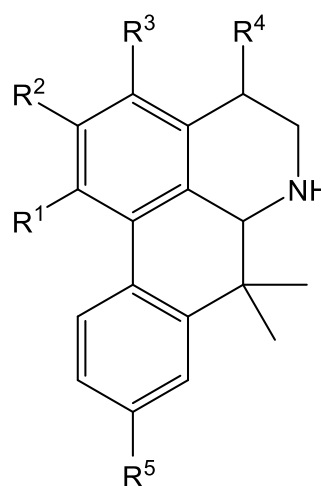
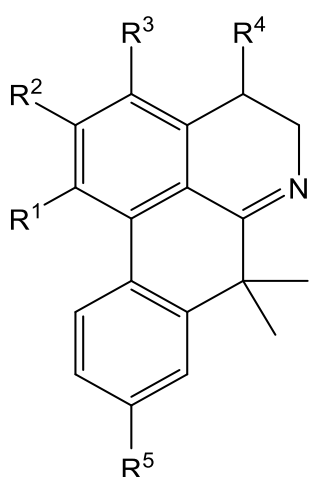
TABELA 8: Alcaloides 7,7-dimetilporfinos isolados de espécies do gênero *Guatteria*.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[49]	3-Metoxiguadiscidina	<i>G. citriodora</i> <i>G. friesiana</i> <i>G. friesiana</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014 COSTA <i>et al.</i> , 2016 COSTA <i>et al.</i> , 2018a
[50]	3-Metoxi-demetoxiguadiscidina		
[51]	Guatteriscina		
[52]	Guatterfriesina		
[53]	Desmetoxiguadiscidina		
[54]	4,5-Desidro-9-metoxiguatterfriesina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
[55]	9-Metoxiguatteriscina		
[56]	3-Metoxiguadiscidina		
[57]	9-Metoxiguatterfriesina		
[58]	9-Hidroxiguaattescina		
[59]	9-Hidroxiguaatterfriesina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
[60]	Guadiscidina		
[61]	Guadiscidina		

Cont.

Nº	Alcaloide	Espécie	Referência
[62]	6,6a-Desidroguaatterriopsiscina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[63]	Iso-9-metoxiguaatterfriesina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2018a
[64]	(<i>R</i>)-6,6a-Dihidro-9-metoxiguaatterfriesina		
[65]	(<i>R</i>)-4,5,6,6a-Tetrahidromelosmidina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
[66]	6,6a-Dihidrodemetoxiguadisina		
[67]	Guaatterriopsiscina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
[68]	(<i>R</i>)-Dihidroguaatteriscina	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2018a

FIGURA 12: Estrutura dos alcaloides 7,7-dimetilaporfino isolados de espécies do gênero *Guaatteria*.



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
[49]	OCH ₂ O		OCH ₃	H	OH
[50]	OCH ₂ O		OCH ₃	H	H
[51]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H
[52]	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	H
[53]	OCH ₂ O		H	H	H
[54]	OCH ₃	OCH ₃	H	H	OCH ₃
[55]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OCH ₃
[56]	OCH ₂ O		OCH ₃	H	OCH ₃
[57]	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OCH ₃
[58]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
[59]	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OH
[60]	OCH ₂ O		H	H	OCH ₃
[61]	OCH ₂ O		H	H	OH
[62]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
[63]	OCH ₃	OH	OCH ₃	H	OCH ₃

	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵
[64]	OCH ₃	OCH ₃	OH	H	OCH ₃
[65]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	OH
[66]	OCH ₂ O		H	H	H
[67]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	OH	H
[68]	OCH ₃	OCH ₃	OCH ₃	H	H

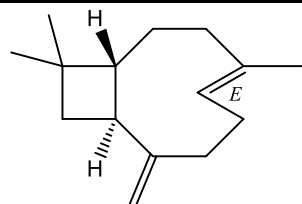
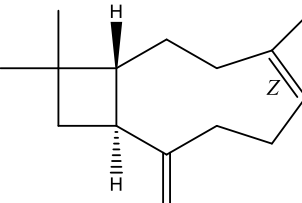
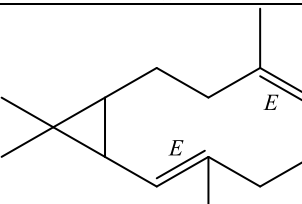
2.2.2.2. Óleos essenciais de *Guatteria*

Óleos essenciais são misturas complexas de substâncias constituídas por terpenóides (mono e sesquiterpenos) e fenilpropanóides (BAKKALI *et al.*, 2008). Possuem características voláteis, lipofílicas, odoríferas, líquidas, são geralmente incolores e apresentam baixa estabilidade principalmente na presença de ar, luz, calor e umidade, tendem a oxidar-se, escurecendo e resinificando (BERGER, 2007; TZORTZAKIS; ECONOMAKIS, 2007). São encontrados com maior frequência nas plantas, sendo produzidos em diferentes partes delas (folhas, cascas, caule, flores, frutos e sementes) (PREEDY, 2016).

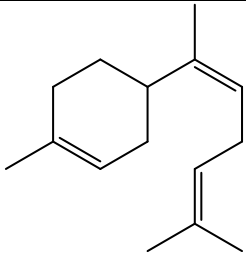
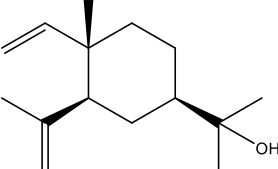
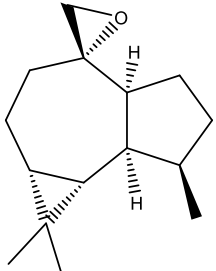
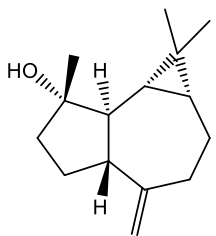
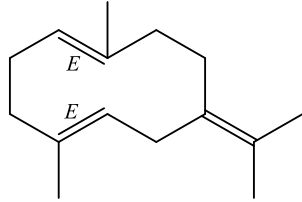
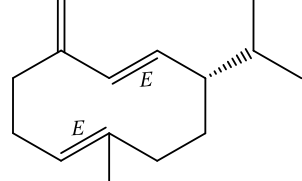
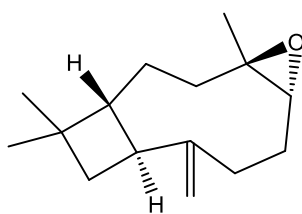
Embora os alcalóides sejam seus principais produtos biossintéticos, investigações fitoquímicas realizadas com espécies de *Guatteria* tem destacado a presença de mono e sesquiterpenos, através de vários estudos com óleos essenciais (TABELA 9). As substâncias mais comuns encontradas nas espécies de *Guatteria* são o óxido de cariofileno e espatulenol, consideradas marcadores quimiotaxonômicos da família Annonaceae sendo relatadas em diferentes espécies (COSTA *et al.*, 2008).

A TABELA 8 apresenta um resumo das principais substâncias terpênicas identificadas em composição majoritária nos óleos essenciais de espécies de *Guatteria* nos últimos dez anos.

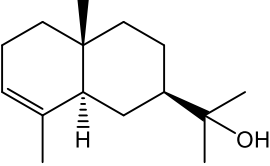

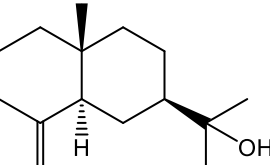
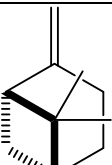
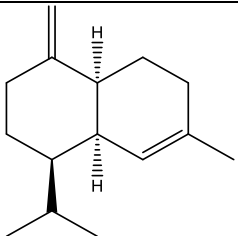
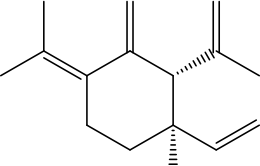
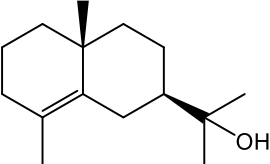
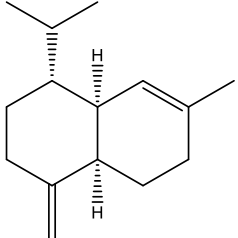
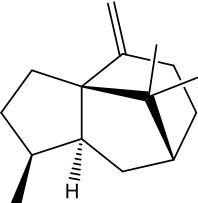
TABELA 9: Principais substâncias encontradas nos óleos essenciais de espécies de *Guatteria*.

Substância	Estutura	Espécie	Referência
(E)-Cariofileno		<i>G. hispida</i>	ACIOLE <i>et al.</i> , 2011
		<i>G. pogonopus</i>	FONTES <i>et al.</i> , 2013 MEIRA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. australis</i>	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2015
(Z)-Cariofileno		<i>G. pogonopus</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
Biciclogermacreno		<i>G. pogonopus</i>	FONTES <i>et al.</i> , 2013

Cont.

Substância	Estutura	Espécie	Referência
<i>cis</i> - α -Bisaboleno		<i>G. sellowiana</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017b
Elemol		<i>G. friesiana</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
Epóxido de aloaromadendreno		<i>G. pogonopus</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
Espatuleno		<i>G. australis</i>	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2015
		<i>G. elliptica</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017b
		<i>G. pogonopus</i>	FERREIRA <i>et al.</i> , 2017
		<i>G. latifolia</i>	FONTES <i>et al.</i> , 2013
		<i>G. ferruginea</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
Germacreno B		<i>G. latifolia</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017b
		<i>G. sellowiana</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017b
Germecreno D		<i>G. pogonopus</i>	FONTES <i>et al.</i> , 2013
		<i>G. australis</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
Óxido de cariofileno		<i>G. pogonopus</i>	FONTES <i>et al.</i> , 2013
		<i>G. australis</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. blepharophylla</i>	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2015
		<i>G. elliptica</i>	SIQUEIRA <i>et al.</i> , 2015
		<i>G. latifolia</i>	ACIOLE <i>et al.</i> , 2011
		<i>G. ferruginea</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. sellowiana</i>	FERREIRA <i>et al.</i> , 2017

Cont.

Substância	Estutura	Espécie	Referência
α -Eudesmol		<i>G. friesiana</i>	ACIOLE <i>et al.</i> , 2011 MEIRA <i>et al.</i> , 2016 BRITTO <i>et al.</i> , 2012
α -Pinoeno		<i>G. hispida</i>	ACIOLE <i>et al.</i> , 2011
		<i>G. pogonopus</i>	FONTES <i>et al.</i> , 2013
β -Eudesmol		<i>G. friesiana</i>	ACIOLE <i>et al.</i> , 2011 MEIRA <i>et al.</i> , 2016 BRITTO <i>et al.</i> , 2012
β -Pinoeno		<i>G. hispida</i>	ACIOLE <i>et al.</i> , 2011
		<i>G. pogonopus</i>	FONTES <i>et al.</i> , 2013
		<i>G. australis</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017b
γ -Amorfeno		<i>G. pogonopus</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
γ -Elemeno		<i>G. pogonopus</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
γ -Eudesmol		<i>G. friesiana</i>	ACIOLE <i>et al.</i> , 2011 MEIRA <i>et al.</i> , 2016 BRITTO <i>et al.</i> , 2012
γ -Muuroleno		<i>G. pogonopus</i>	MEIRA <i>et al.</i> , 2016
γ -Patchouleno		<i>G. pogonopus</i>	FONTES <i>et al.</i> , 2013

2.2.3. Aspectos farmacológicos

Semelhantemente aos demais gêneros da família Annonaceae, o gênero *Guatteria* tem apresentado resultados significativos quanto ao estudo com óleos essenciais, extratos brutos e substâncias isoladas de suas espécies quando submetidas à testes de atividade biológica, como consequência os estudos farmacológicos e fitoquímicos com o gênero estão se intensificando.

O óleo essencial obtido das folhas de *G. friesiana* constituído em sua maioria por sesquiterpenos, exibiu atividade antimicrobiana significativa para diferentes microrganismos testados: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus hirae*, *Candida albicans*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi*, com valores de CIM (Concentração Inibitória Mínima) iguais a 60, 100, 100, 125, 125, 125 e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (COSTA *et al.*, 2008).

O estudo antimicrobiano dos óleos essenciais de quatro espécies de *Guatteria* (*G. australis*, *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana*) exibiu resultados promissores. Foi observado para os óleos essenciais das quatro espécies forte atividade contra *Rhodococcus equi*, com CIM entre 62 e 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os óleos de *G. sellowiana*, *G. latifolia* e *G. ferruginea* exibiram ainda, atividade moderada contra *Bacillus subtilis*, com CIMs iguais a 350, 250, e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Observou-se ainda que o óleo essencial de *G. ferruginea* mostrou atividade contra *Enterococcus hirae*, com CIM de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, seguido pelos óleos de *G. sellowiana* e *G. latifolia* com CIMs de 700 mg/mL e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (SANTOS *et al.*, 2017b).

O extrato hexânico obtido das cascas de *G. blepharophylla* apresentou significativa atividade antiproliferativa para as células UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), NCI-ADR/RES (mama resistente a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão), PC-3 (próstata), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (cólon) e K-562 (leucemia) com valores de TGI (Total Growth Inhibition - concentração inibitória de crescimento total da linhagem da célula cancerígena) iguais a 21,37, 28,16, 16,18, 16,18, 9,05, 34,32, 16,96, 39,20 e 7,23 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente, indicando ser uma fonte promissora de substâncias biologicamente ativas (COSTA *et al.*, 2011a).

As frações alcaloídicas das folhas e galhos finos obtidas dos extratos hidroalcoólicos (etanol/água 8:2) de *G. citriodora* exibiram resultados promissores contra *Plasmodium falciparum*, com elevada atividade antiplasmódica apresentando valores de CI_{50} (concentração inibitória média) iguais a 1,18 e 0,33 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ respectivamente. A fração alcaloídica das folhas exibiu ainda, uma moderada atividade frente à bactéria *Enterococcus faecalis* com CIM = 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (RABELO *et al.*, 2014).

Possuindo um teor relevante de constituintes alcaloídicos, destacam-se pesquisas voltadas para os testes de atividades biológicas com esses compostos no gênero. Apesar da atividade biológica de grande parte dos alcaloides ainda ser desconhecida, estudos tem se tornado cada vez mais frequentes e tal classe de compostos vêm se mostrando como uma importante fonte de substâncias biologicamente ativas. A TABELA 10 apresenta um resumo de algumas das atividades biológicas reportadas para os alcaloides isolados de espécies do gênero *Guatteria* nos últimos anos.

TABELA 10: Atividades biológicas reportadas para os alcaloides do gênero *Guatteria*.

Alcaloide	Atividade Biológica	Espécie	Referência
Liriodenina [16]	Citotóxica	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016
	Antioxidante	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
	Antimicrobiana		
	Antiproliferativa	<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
(+)-Nornuciferina [26]	Citotóxica	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2018a
(+)-Isocoridina [35]			
(+)-Nuciferina [36]			
(+)-Roemerina [37]			
(-)-Tetrahidropseudo columbamina [3]			
9-Metoxiisomoschatolina [13]	Antioxidante	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
Coreximina [1]			
Isocoreximina [2]	Antioxidante	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
	Antiproliferativa	<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
<i>O</i> -metilmoschatolina [14]	Antioxidante	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010
	Antimicrobiana		
Lisicamina [15]	Antimicrobiana	<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
	Antiproliferativa		
Isomoschatolina [18]	Antimicrobiana e antiproliferativa	<i>G. blepharophylla</i>	ANDREAZZA <i>et al.</i> , 2016
			COSTA <i>et al.</i> , 2011a
Palmatina [8]	Citostática	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2013a
Guatterfriesidina [49]	Antiglicante	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2018a

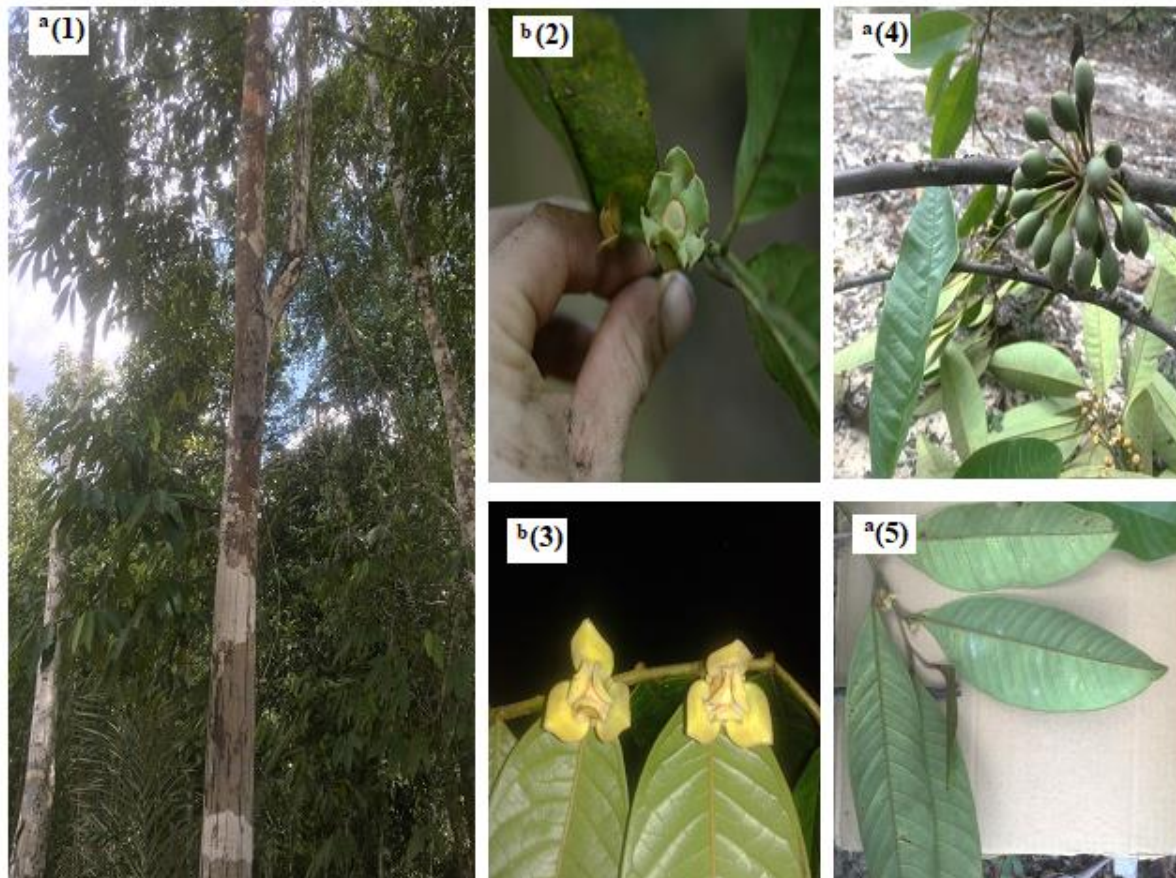
Devido a série de substâncias isoladas com potencial biológico marcante em espécies do gênero *Guatteria*, é justificável a continuidade de estudos com o gênero em especial com a espécie *Guatteria olivacea*, endêmica da região amazônica, e que não apresenta relatos na literatura quanto aos seus constituintes químicos e propriedades biológicas, o que a torna relevante para esse estudo.

2.3. A espécie *Guatteria olivacea* R. E. Fries

Apesar de constituir um dos maiores gêneros da família Annonaceae, a espécie *Guatteria olivacea*, não apresenta estudo relatado nos principais bancos de dados (*Scifinder*, *Scopus*, *Web of Science* e *Google Scholar*) quanto aos aspectos fitoquímicos e farmacológicos. A espécie é conhecida popularmente pelas mesmas denominações atribuídas as outras espécies da família, devido a semelhança de seus frutos, podendo ser chamada de “araticum”, “ata” e “envireira”, possuindo ocorrência natural nos estados do Amazonas, Pará e Acre (MAAS *et. al.*, 2015).

A espécie se assemelha as demais do gênero, apresentando-se na forma de árvores, sendo facilmente reconhecida por suas flores e frutos (FIGURA 10). As flores quando imaturas, possuem pétalas patentes, porém quando maduras, as pétalas internas tornam-se eretas e seus frutos possuem numerosos carpódios livres, com uma única semente cada um (LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

FIGURA 13: Características botânicas de *G. olivacea* (1) Árvore; (2) botão flor imaturo; (3) botão de flor maduro; (4) frutos e (5) detalhes das folhas.



Fonte: ^aARAUJO, M. S., 2018; ^bwww. <http://atrium.andesamazon.org/index.php> . Acesso em 13 Maio de 2019.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral:

- Realizar o estudo fitoquímico das folhas e cascas da espécie *Guatteria olivacea*, assim como sua atividade biológica, investigando o potencial anticâncer *in vitro* do óleo essencial e das substâncias isoladas a partir dessas matrizes.

3.2. Objetivos específicos:

- Isolar através dos métodos cromatográficos clássicos os alcaloides presentes no extrato metanólico das cascas de *Guatteria olivacea*;
- Identificar os constituintes alcaloídicos por RMN 1D e 2D, bem como Espectrometria de Massas;
- Extrair o óleo essencial das folhas de *Guatteria olivacea* e caracterizar por CG-DIC e CG-EM;
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* contra diferentes células tumorais e não tumoral, dos extratos, frações e substâncias isoladas das cascas, bem como do óleo essencial das folhas de *Guatteria olivacea*.

4. METODOLOGIA

4.1. Cromatografia em coluna (CC)

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro aberta, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) da Sigma-Aldrich tratada previamente com solução de bicarbonato de sódio 10% (NaHCO_3). 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 à 30 vezes a massa do produto bruto a ser purificado para o empacotamento da coluna e de 2 vezes para pastilha (MATOS, 2009).

4.2. Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

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

4.3. Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As análises em escala preparativa foram desenvolvidas em cromatoplasmas de vidro de tamanho 20×20 cm com espessura de 1,0 mm. As placas foram preparadas adicionando-se 21 g de sílica gel 60 F_{254} da Macherey-Nagel em um erlenmeyer, em seguida, adicionou-se água destilada ao erlenmeyer, e agitou-se a solução vigorosamente por alguns minutos de modo que ficasse homogênea. Em seguida, verteu-se a solução sob uma cromatoplasma de vidro recém-limpa com acetona ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$), espalhando sobre a placa de maneira uniforme. Após evaporação da água à temperatura ambiente por um período de 48 à 72h, as cromatoplasmas foram ativadas em estufa a 110°C por 1h. A visualização das bandas foi efetuada com auxílio de luz ultravioleta (254 nm e 365 nm). A recuperação das amostras foi efetuada utilizando como solventes: diclorometano (CH_2Cl_2) e metanol (CH_3OH) e/ou a mistura destes.

4.4. Gel de sílica 60 impregnada com NaHCO_3

Para o fracionamento cromatográfico em coluna aberta, a sílica utilizada foi tratada com uma solução de bicarbonato de sódio (NaHCO_3). Cerca de 1000 mL de uma solução de bicarbonato de sódio 10% foi adicionado a 300 g de gel de sílica 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) da Sigma-Aldrich. Após completa adição a solução foi agitada para que bolhas existentes fossem eliminadas. Posteriormente, a sílica foi mantida em repouso por 24 horas. Após esse período a sílica foi filtrada em funil de Büchner para retirar o excesso de

solução de bicarbonato de sódio. Em seguida foi armazenada em uma cápsula de porcelana e mantida em estufa à 180 °C com agitação frequente para evitar a formação de grumos, até sua secagem completa.

4.5. Reveladores

A revelação das faixas (*spots*) nas CCDAs e CCDPs foi feita sob luz ultravioleta (254 nm 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 20,00 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada. Solução B: 16,00 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais (1:1) destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das placas, 5,0 mL da solução estoque foi adicionada a 10,00 g de ácido tartárico dissolvido em 50 mL de água destilada.

4.6. Solventes

Para todas as técnicas cromatográficas foram utilizados solventes das marcas Hexis, Merck, Synth e Qhemis. Para obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados da marca Tédia Brasil e Sigma-Aldrich. Para obtenção dos espectros de massas foram utilizados solventes grau HPLC da marca Tédia Brasil.

4.7. Equipamentos

Espectroscopia por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) – Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bi-dimensionais (RMN 1D/2D) das substâncias isoladas foram registrados em um aparelho Bruker Avance III 500 operando a 11,75 Tesla (500 MHz para RMN de ^1H e 125 MHz para RMN de ^{13}C) e Avance III-600 operando a 14,1 Tesla, (600 MHz para RMN de ^1H e 150 MHz para RMN de ^{13}C). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e/ou a mistura de clorofórmio com gotas de metanol deuterado (CDCl_3 + gotas de CD_3OD). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (dupleto), dd (duplo

duplete), ddd (duplo duplo duplete), t (triplete), dt (duplo triplete), m (multiplete). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

Espectrometria de Massas (EM) – Os espectros de massas dos extratos, frações e substâncias isoladas foram adquiridos em um espectrômetro modelo LQC Fleet (Thermo Scientific) com analisador de massas do tipo *ion trap* e equipado com uma fonte de ionização por *eletrospray* (ESI) programada para operar no modo positivo de aquisição. As informações foram registradas através do modo de aquisição contínua, disponível no software LCQ Fleet Tune. As amostras foram diluídas até a concentração de 10 ppm em metanol grau HPLC e injetadas no *looping* de 5 μL do espectrometro de massas. Utilizou-se uma bomba ACCELA 600 (Fluxo de 200 $\mu\text{L min}^{-1}$ de metanol grau HPLC) para levar as amostras do *looping* até a fonte de ionização.

Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG-EM e CG-DIC) - As análises foram realizadas conforme a metodologia proposta por Silva *et al.* (2013). Para a análise por CG-DIC utilizou-se um sistema Shimadzu GC-17A equipado com detector de ionização de chama (DIC) e um integrador eletrônico. Para a separação dos compostos utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm espessura do filme) revestida com 5%-fenil-arileno-95%-dimetilpolisiloxano. O gás de arraste usado na análise foi o Hélio (99,999%) na taxa de fluxo de 1,0 mL.min^{-1} . A temperatura programada foi 40 $^{\circ}\text{C} / 4 \text{ min}$, a uma taxa de 4 $^{\circ}\text{C} / \text{min}$ a 240 $^{\circ}\text{C}$, então a 10 $^{\circ}\text{C} / \text{min}$ a 280 $^{\circ}\text{C}$, e a 280 $^{\circ}\text{C} / 2 \text{ min}$. As temperaturas do injetor e dos detectores foram de 250 $^{\circ}\text{C}$ e 280 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. As amostras (10 mg.mL^{-1} em CH_2Cl_2) foram injetadas com uma relação de separação 1:50. Os índices de retenção foram gerados com uma solução padrão de n-alcenos ($\text{C}_8\text{-C}_{20}$). As áreas dos picos e os tempos de retenção foram medidos de modo eletrônico com um integrador. As quantidades relativas de indivíduos compostos foram calculadas a partir das áreas dos picos por CG sem um DIC como correção do fator de resposta. As análises de CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo-Scientific) acoplado com um espectrômetro de massas ISQ com amostrador automatico modelo Tri Plus RSH. Utilizou-se como fase estacionária, uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30m \times 0,25 mm \times 0,25 μm espessura do filme) revestida com 5%-fenil-arileno-95%-dimetilpolisiloxano. Os EM foram alcançados a 70 eV com intervalos de varredura de 0,5s e fragmentos de 40-550 Da. As demais condições foram semelhantes às utilizadas para análise por CG.

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

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

onde: Tr_x = Tempo de retenção do composto problema;

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

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

N = Número de carbonos do hidrocarboneto posterior;

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

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

4.8. Outros equipamentos

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

Bomba de vácuo - Tecnal;

Moinho - Modelo Marconi com quatro facas;

Estufa incubadora - Med Clave e De Leo;

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

Balança semi-analítica – Modelo UX6200H da marca SHIMADZU;

Ultrassom – Unique, modelo USC-2800.

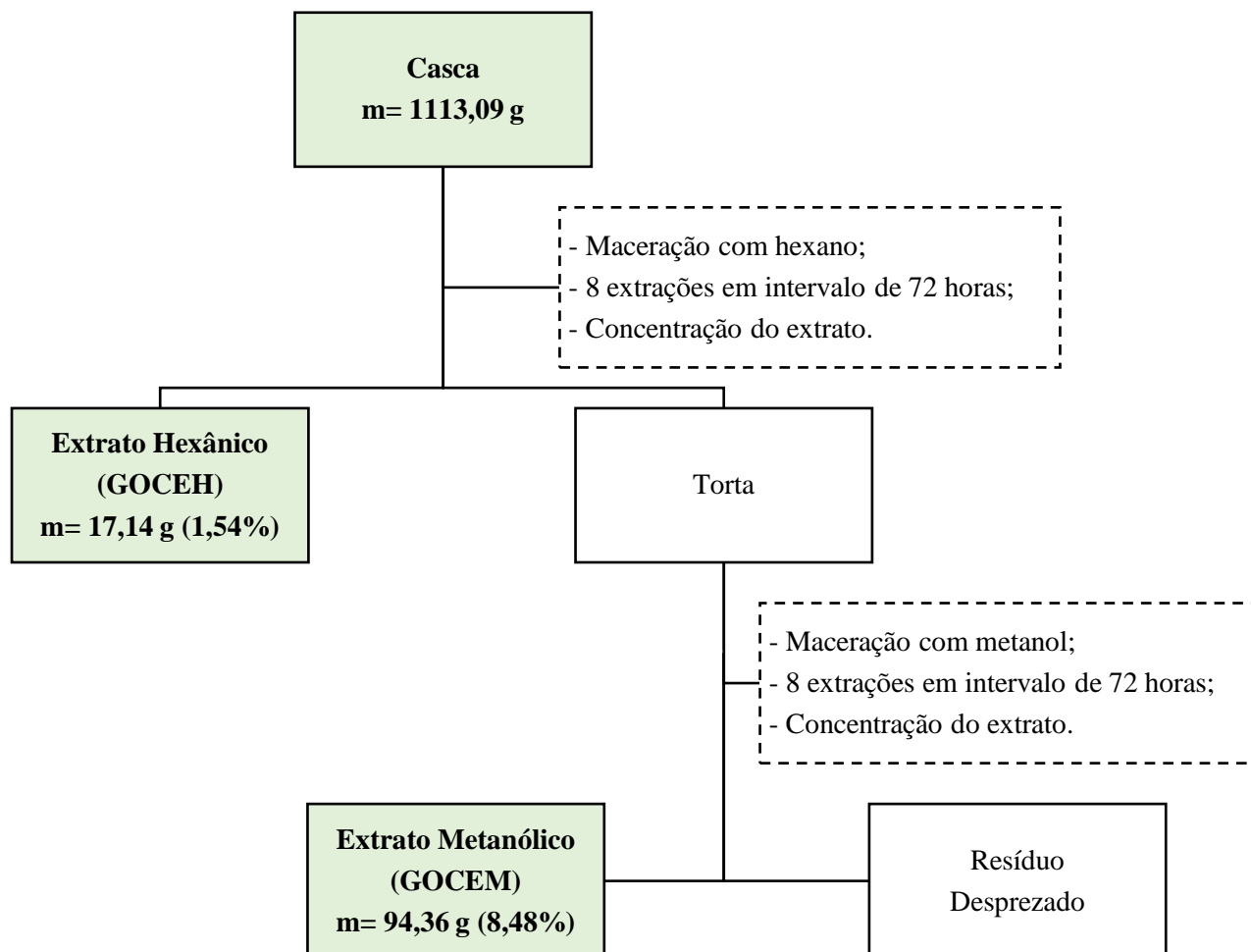
4.9. Coleta do material vegetal

As folhas e cascas de *Guatteria olivacea* foram coletadas no dia 27 de maio de 2017 na Reserva Florestal Adolpho Ducke sob as coordenadas 2°54'47'' S e 59°58'48'' W, próxima à cidade de Manaus, Amazonas, Brasil. A espécie passou pela identificação com o professor Dr. Antônio Carlos Webber do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas. Para caráter de consulta, uma exsicata da espécie foi depositada no herbário (HUAM) do Departamento de Biologia da própria UFAM sob o número 11423. O acesso (espécime) foi cadastrado no **Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN)** sob o número de registro **A70EDCD**.

4.10. Preparo dos extratos

O material botânico da espécie em estudo (cascas de *Guatteria olivacea*), foi seco em local aberto à temperatura ambiente, sendo posteriormente, transferido para uma estufa com circulação de ar a 40 °C. Em seguida, a amostra vegetal seca foi moída em moinho de facas e teve sua massa determinada em uma balança semi-analítica, resultando em 1113,09 g de casca. Com o peso obtido, a amostra vegetal foi submetida à extração pelo método de maceração (ESQUEMA 1), onde foi transferida para um frasco Mariotte com adição de solventes em ordem crescente de polaridade, com renovação a cada 72 horas. Inicialmente, foi utilizado hexano (oito extrações) e posteriormente metanol (oito extrações). A cada etapa de maceração, os extratos obtidos foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida e temperatura controlada entre 40-50 °C, sendo posteriormente secos em dessecador. O solvente evaporado foi reutilizado em cada etapa da maceração, houve um gasto inicial 3 L de solvente e a cada renovação necessitou-se acrescentar mais 250 mL, totalizando um gasto de 5 L de hexano e 5 L de metanol. Ao término do processo, o resíduo vegetal proveniente da extração foi descartado. Após completa a secagem, o extrato hexânico apresentou massa igual a 17,14 g e o extrato metanólico apresentou massa igual a 94,36 g, desse modo, pôde-se calcular seus respectivos rendimentos. Uma alíquota (30,0 mg) dos extratos hexânico e metanólico foi separada e enviada para a realização dos ensaios de atividade citotóxica no Instituto Gonçalo Moniz (IGM) da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do estado da Bahia (Fiocruz-BA), sob a coordenação do Dr. Daniel Pereira Bezerra.

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



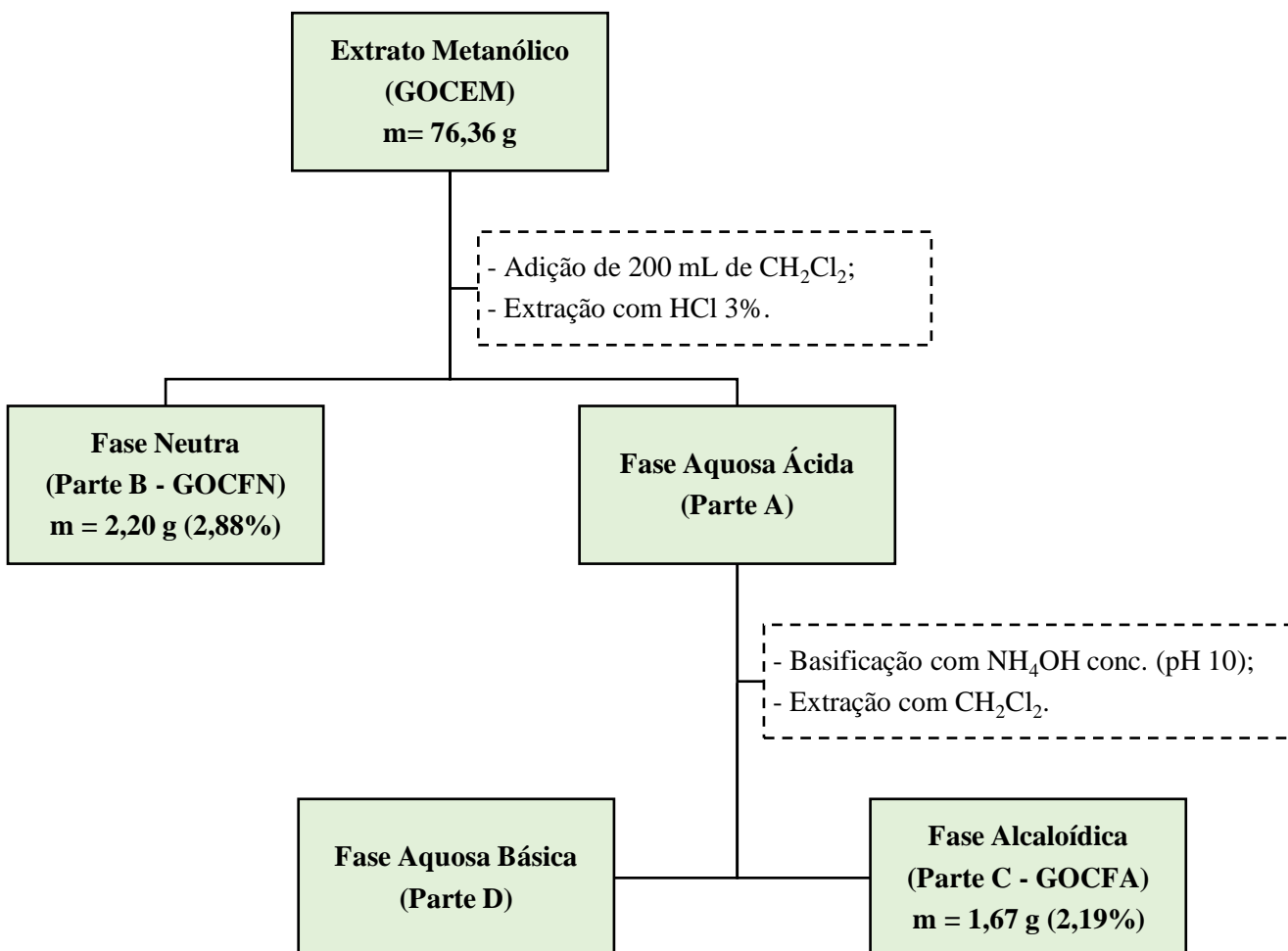
4.11. Tratamento ácido-base do extrato metanólico

Pela análise cromatográfica do extrato metanólico por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), utilizando diferentes sistemas de solventes, observou-se a presença de constituintes nitrogenados, através da utilização do reagente de Dragendorff (indicativo de alcaloides, coloração alaranjada). Baseado nesta análise, o mesmo foi então submetido à extração ácido-base (ESQUEMA 2) de acordo com a metodologia de Costa *et al.* (2006).

O material foi dividido em 2 porções (76,36 g) e (18 g), a porção menor foi reservada para análises futuras, já a porção que continha 76,36 g foi submetida ao tratamento ácido-base. Inicialmente foi adicionado ao extrato 200 mL de CH_2Cl_2 (solubilizando parte do extrato), e posteriormente submetido a extração sucessiva com o mesmo volume de CH_2Cl_2 (200 mL) e solução de ácido clorídrico 3% v/v (HCl), obtendo-se duas fases: a fase aquosa ácida (**Parte A**) e a fase neutra (**Parte B**). A fase aquosa ácida com pH igual a 3,0 foi cuidadosamente separada da fase neutra e basificada com hidróxido de amônio (NH_4OH) até pH igual a 10,0, sendo em

seguida extraída sucessivamente com CH_2Cl_2 , formando duas novas fases: fase alcaloídica (**Parte C**) e fase aquosa básica (**Parte D**). A fase alcaloídica apresentou coloração amarelada e foi concentrada com evaporador rotativo, enquanto a fase aquosa básica foi descartada, conforme fluxograma abaixo.

ESQUEMA 2: Fluxograma do tratamento ácido-base.

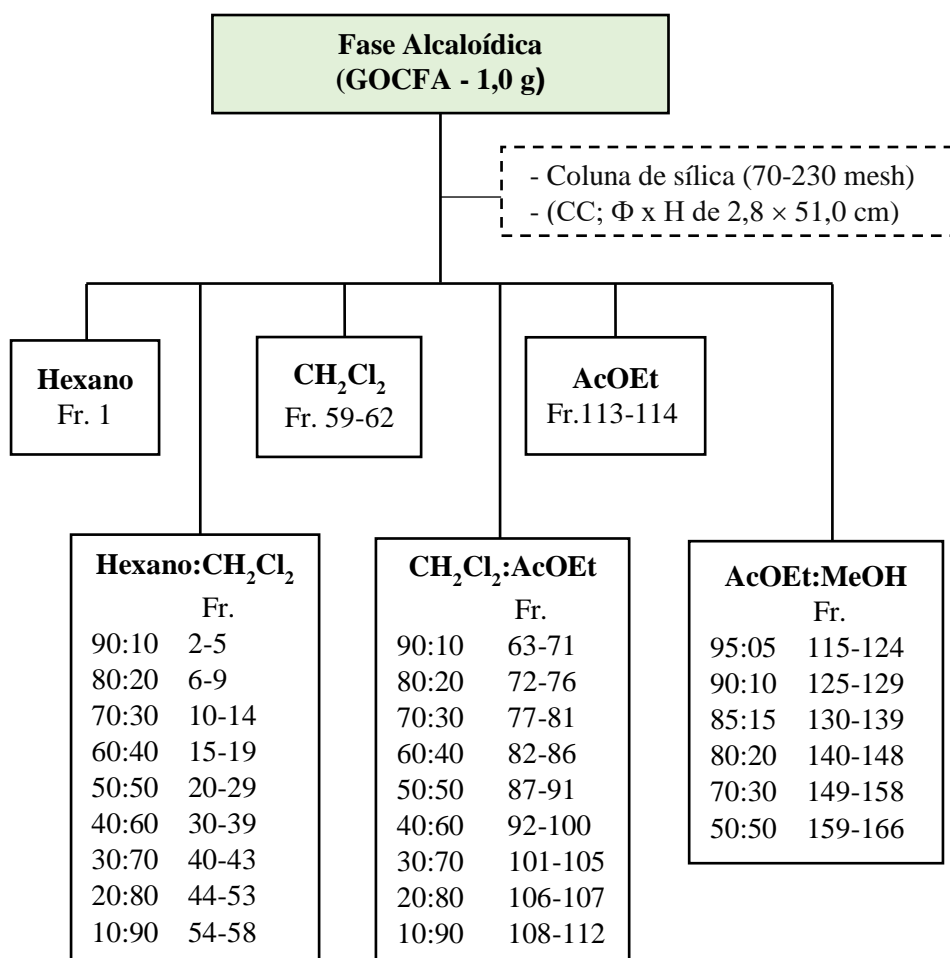


Concluído o tratamento ácido-base, confirmou-se a presença de alcaloides na fase alcaloídica por cromatografia em camada delgada, tendo como eluente a mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$ (9,5:0,5), como reveladores a luz UV (254 nm) e o reagente de Dragendorff. Após a secagem, a fase alcaloídica apresentou massa igual a 1,67 g e a fase neutra apresentou massa igual a 2,20 g. Uma alíquota de 30,0 mg tanto da fase alcaloídica quanto da fase neutra foi enviada para a realização dos ensaios de atividade citotóxica pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do estado da Bahia.

4.12. Fracionamento cromatográfico da fase alcalóidica (GOCFA)

Uma parte da GOCFA (1 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CC; Φ x H de 2,8 x 51,0 cm) com sílica tratada com solução de NaHCO_3 a 10%, eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente, obtendo-se 166 frações (EQUEMA 3).

ESQUEMA 3: Fluxograma do fracionamento cromatográfico de GOCFA.



Após a secagem, as frações oriundas do fracionamento foram agrupadas de acordo com as semelhanças evidenciadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), conforme a TABELA 11. O eluente utilizado para as placas foi CH_2Cl_2 :MeOH na proporção 9,5:0,5 para as frações de 1 a 63 e na proporção 9,0:1,0 para as frações de 64 a 166. A revelação foi feita com luz UV 254 nm, solução de anisaldeído e reagente de Dragendorff.

TABELA 11: Reunião das frações obtidas do fracionamento de **GOCFA**.

Frações	Grupo de frações (G)	Massa (mg)
1-5	1	34,70
6-15	2	180,20
16-17	3	49,30
18-24	4	65,30
25-30	5	26,50
31-70	6	111,4
71-80	7	6,90
81-90	8	20,70
91-117	9	66,50
118-121	10	149,10
122-123	11	45,00
124-130	12	83,20
131-132	13	8,10
133-134	14	39,00
135-150	15	82,40
151-160	16	140,60
161-166	17	142,80

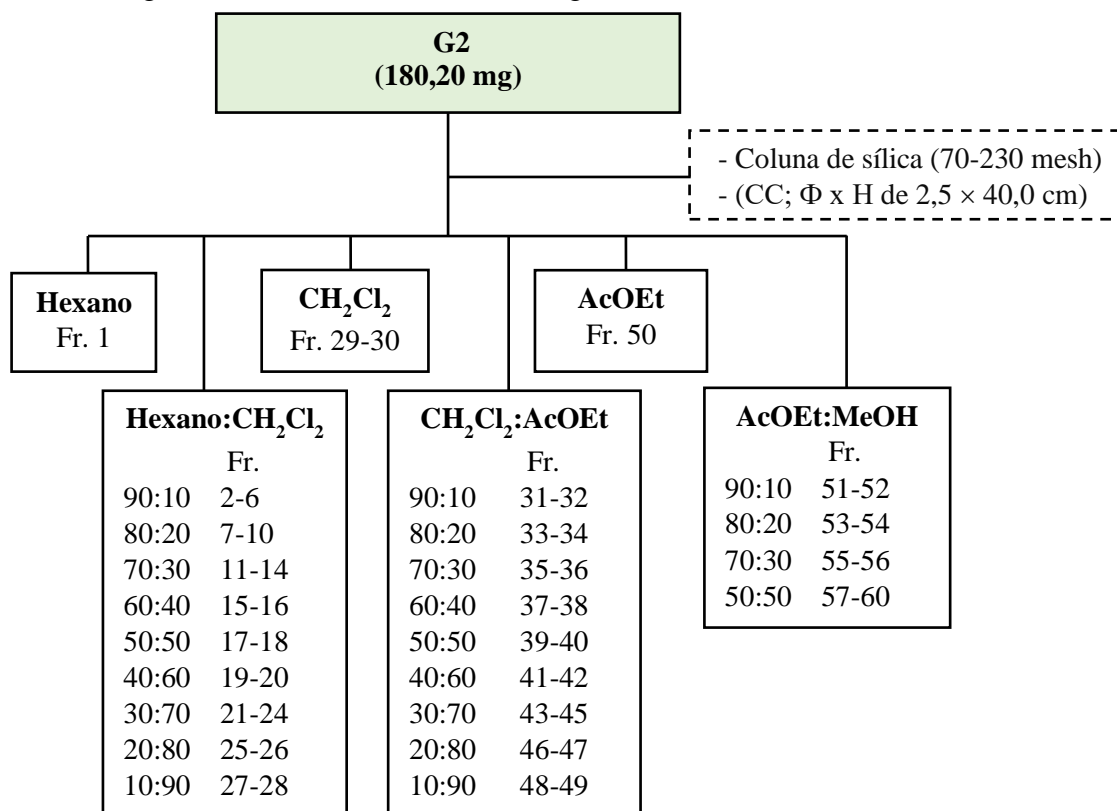
4.13. Isolamento

Os grupos de frações na TABELA 11 foram selecionados para isolamento de acordo com o perfil observado nas CCDAs. Os que apresentaram boa resolução e fatores de retenção bem distintos, possibilitando a purificação, foram submetidos a separação por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). As placas cromatográficas foram eluídas por 2 ou 3 vezes com $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:05) e as substâncias foram extraídas da sílica com a mistura de solventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (9,5:0,5), sendo posteriormente filtradas à vácuo em funil com placa porosa, rotaevaporadas e pesadas.

4.13.1. Grupo de frações G2

Visando a melhor separação dos componentes em mistura, o grupo de frações **G2** (180,20 mg) foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CC; $\Phi \times h$ de 2,5 x 40,0 cm) com sílica tratada com solução de NaHCO_3 a 10%, eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente, obtendo-se 60 frações (ESQUEMA 4).

ESQUEMA 4: Fluxograma do fracionamento cromatográfico de **G2**.



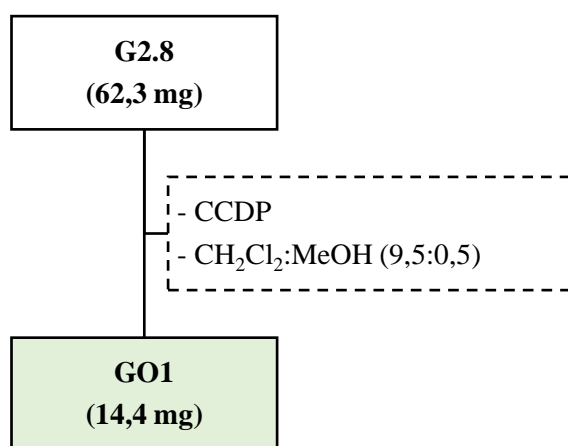
Após a secagem, as frações oriundas do fracionamento foram agrupadas conforme as semelhanças evidenciadas por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) (TABELA 12). O eluente utilizado para as placas foi CH₂Cl₂:MeOH (9,5:0,5). A revelação foi feita com luz UV 254 nm, solução de anisaldeído e reagente de Dragendorff.

TABELA 12: Reunião das frações obtidas do fracionamento de **G2**.

Frações	Grupo de frações (G2)	Massa (mg)
1	1	0,8
2	2	1,0
3	3	0,8
4	4	0,5
5	5	0,3
6	6	0,7
7	7	2,3
8-12	8	62,3
13-26	9	47,0
27-31	10	2,2
32-35	11	6,4
36-38	12	1,3
39-50	13	1,0
51-53	14	4,4
54-58	15	2,2
59-60	16	0,5

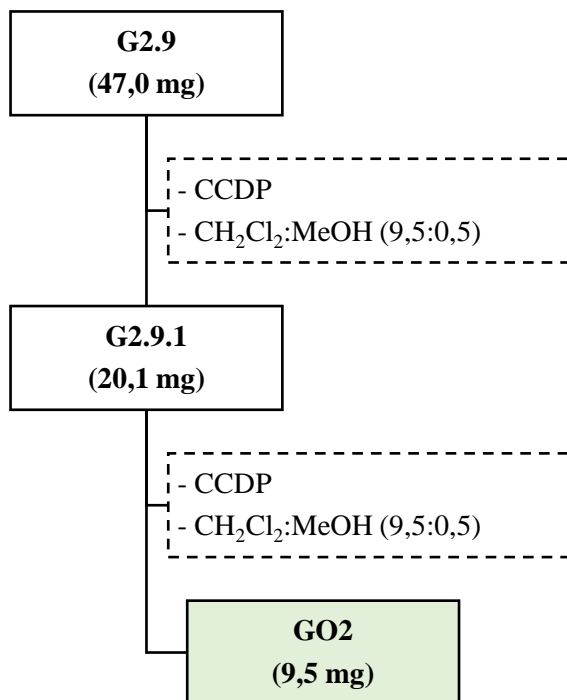
Com o resultado obtido pela análise por CCDA, o grupo de frações **G2.8** (62,3 mg) foi selecionado para o isolamento, onde de acordo com o ESQUEMA 5 foi submetido à CCDP, utilizando como eluente a mistura $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:05), resultando no isolamento de uma substância codificada como **GO1**. Na análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes, observou-se a presença de apenas um *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm. A amostra foi então encaminhada para análise por EM e RMN.

ESQUEMA 5: Grupo de frações **G2.8**.



De acordo com o ESQUEMA 6, o grupo de frações **G2.9** também foi submetido à CCDP eluída com uma mistura de $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{MeOH}$ (95:05), resultando em uma amostra denominada **G2.9** (20,1 mg). O material foi submetido a análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes, observou-se a presença de apenas um *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetido a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm. A amostra foi encaminhada para análise por EM e RMN, onde observou-se a presença de dois componentes em mistura. Visando a separação dos mesmos, foi submetida novamente a CCDP nas mesmas condições anteriores, onde obteve-se uma substância isolada de código **GO2** (9,5 mg), que foi encaminhada novamente para análise por EM e RMN.

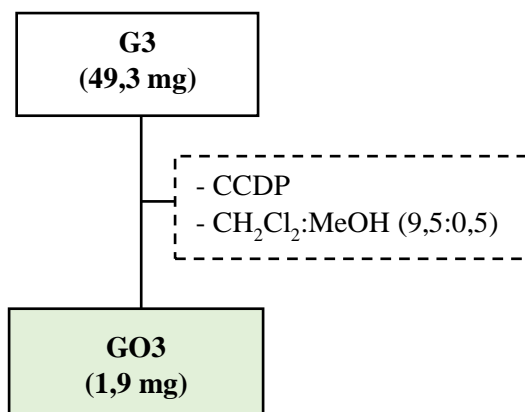
ESQUEMA 6: Grupo de frações **G2.9**.



4.13.2. Grupo de frações **G3**

A representação no ESQUEMA 7 mostra o resultado do estudo do grupo de frações **G3** (49,3 mg) que foi submetido à CCDP, utilizando como eluente a mistura de CH₂Cl₂:MeOH (95:05), resultando em uma fração **GO3**. Após o processo de extração a amostra foi submetida a análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes, sendo observada a presença de apenas um *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm. Ao término do processo de isolamento a amostra foi encaminhada para análise por EM e RMN.

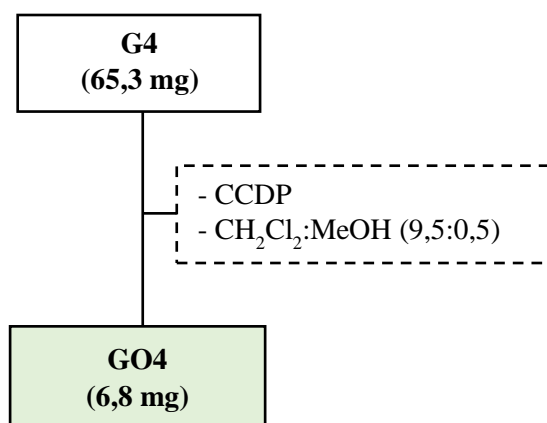
ESQUEMA 7: Grupo de frações **G3**.



4.13.3. Grupo de frações G4

A representação no ESQUEMA 8 mostra o resultado do estudo do grupo de frações **G4** (65,3 mg) que foi submetido à CCDP utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2 :MeOH (95:05), resultando no isolamento de uma substância **GO4**. A mostra foi submetida a análise por CCDA utilizando diferentes sistemas de solventes, sendo observada a presença de apenas um *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm. Ao término do processo de isolamento a amostra foi encaminhada para análise por EM e RMN.

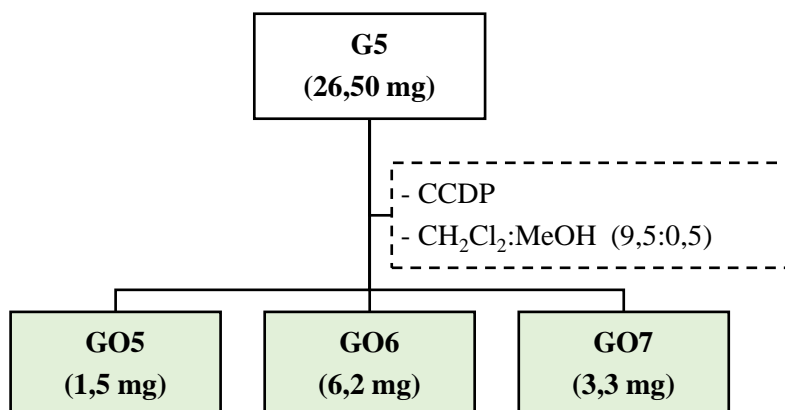
ESQUEMA 8: Grupo de frações **G4**.



4.13.4. Grupo de frações G5

O grupo de frações **G5** (26,50 mg) foi submetido à CCDP (ESQUEMA 9) utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2 :MeOH (95:05), resultando no isolamento de três substâncias **GO5**, **GO6** e **GO7**. Cada amostra foi submetida a análise por CCDA utilizando diferentes sistemas de solventes, sendo observada a presença de apenas um *spot* em cada caso, quando reveladas com reagente de Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetidas a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm. Ao término do processo de isolamento todas as amostras foram encaminhadas para análise por EM e RMN.

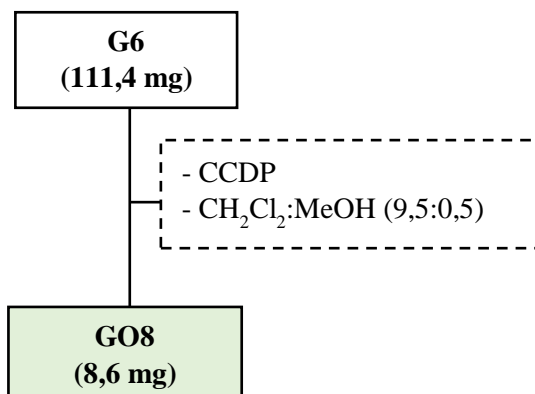
ESQUEMA 9: Grupo de frações **G5**.



4.13.5. Grupo de frações G6

O grupo de frações **G6** (111,4 mg) foi submetido à CCDP utilizando como eluente a mistura de CH₂Cl₂:MeOH (95:05), conforme a representação no ESQUEMA 10, resultando no isolamento de uma substância **GO8**. A mostra foi submetida a análise por CCDA utilizando diferentes sistemas de solventes, sendo observada a presença de apenas um *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm. Ao término do processo de isolamento a amostra foi encaminhada para análise por EM e RMN.

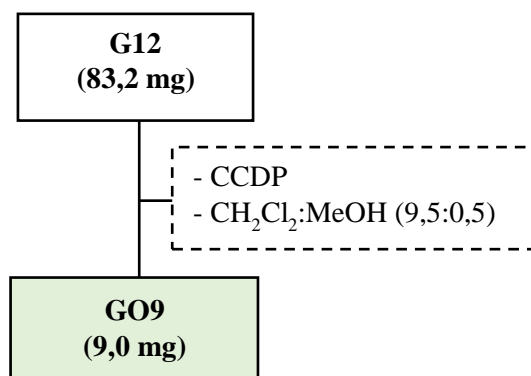
ESQUEMA 10: Grupo de frações **G6**.



4.13.6. Grupo de frações G12

O grupo de frações **G12** (83,2 mg) foi submetido à CCDP utilizando como eluente a mistura de CH₂Cl₂:MeOH (95:05) (ESQUEMA 11), resultando no isolamento de uma substância codificada como **G09**. Na análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes, observou-se a presença de apenas um *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e anisaldeído, bem como quando submetida a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm. Ao término do processo de isolamento a amostra foi encaminhada para análise por EM e RMN

ESQUEMA 11: Grupo de frações **G12**.



4.14. Extração do óleo essencial

O óleo essencial das folhas trituradas e secas (por um período de 24 horas em estufa com circulação de ar à 40 °C) de *G. olivacea* foi extraído por hidrodestilação utilizando um sistema do tipo Clevenger, acoplado a um balão de fundo redondo de 4000 mL, com uma manta elétrica aquecedora mantendo-se a temperatura em 100 °C. Para cada extração adicionou-se 300g do material vegetal e completou-se o volume com água destilada mantendo o nível até a metade do balão, as quais foram realizadas em triplicatas. O óleo essencial foi extraído por um período de quatro horas, onde no final do processo foi recolhido e filtrado com sulfato de sódio anidro para remoção da água residual, sendo posteriormente acondicionado em frasco de vidro âmbar e mantido sob refrigeração, para evitar possíveis perdas e degradação dos constituintes voláteis. O rendimento da extração foi calculado com base na massa do óleo volátil obtido em relação à massa de material vegetal utilizado, multiplicado por 100. Os valores foram expressos em porcentagem.

Após a obtenção do óleo essencial, este foi submetido às análises cromatográficas e testes de atividade citotóxica.

4.15. Estudo biológico: atividade citotóxica

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

4.15.1. Preparo das amostras

As amostras foram dissolvidas/diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10,0 mg.mL⁻¹ para óleo essencial, extratos e frações, e na concentração de 5,0 mg.mL⁻¹ para substâncias isoladas, as quais foram testadas em concentrações que variaram de 0,19 à 50 µg.mL⁻¹.

4.15.2. Células

Foram utilizadas células tumorais MCF7 (adenocarcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de cólon humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), 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 cm³, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO₂ a 37 °C.

Vale ressaltar que para extratos e frações os mesmos são avaliados apenas frente as células tumorais HepG2 e HL-60 em concentração única de 50 µg.mL⁻¹, pois é realizado apenas um 'screening'.

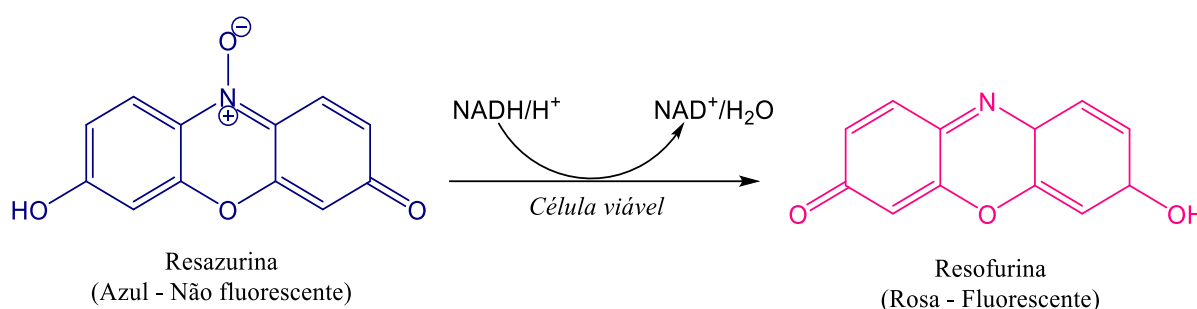
Para avaliar a citotoxicidade das substâncias sobre a proliferação de células não tumorais, utilizou-se a célula MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtida da ATCC (coleção de cultura americana).

Acompanhou-se diariamente o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células se despregassem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para micoplasma, conforme avaliado pela colocação com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

4.15.3. Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade das amostras, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com os compostos em teste. O reagente de viabilidade celular de alamar blue constitui uma solução baseada em resazurina, é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. A resazurina, apresenta em seu estado fundamental, uma coloração azul não fluorescente, indicando a presença de células não-viáveis, enquanto que a forma reduzida é rósea fluorescente, indicando célula viável (ESQUEMA 12).

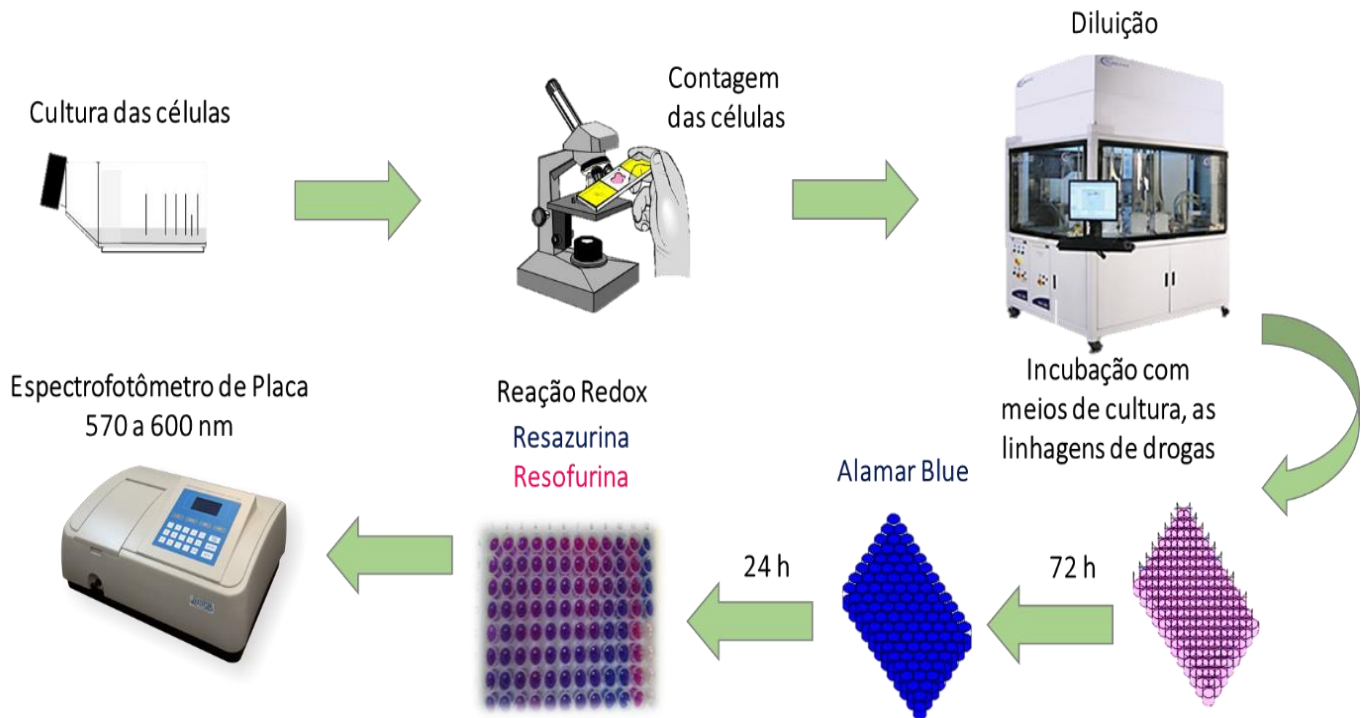
ESQUEMA 12: Formas da resazurina - Indicador de viabilidade celular.



Fonte: <http://www.abpbio.com/wp-content/uploads/2017/11/Alamarblue-1.png>. Acesso em 03 de Agosto de 2018.

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 doxorubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (ESQUEMA 13) (AHMED *et al.*, 1994).

ESQUEMA 13: Ensaio de citotoxicidade.



Fonte: MENEZES, L.R.A. (2015).

A proliferação celular foi calculada utilizando a fórmula:

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

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

O R_0 foi calculado utilizando a fórmula:

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

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

As amostras foram testadas em diluição seriada, em triplicata (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).

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

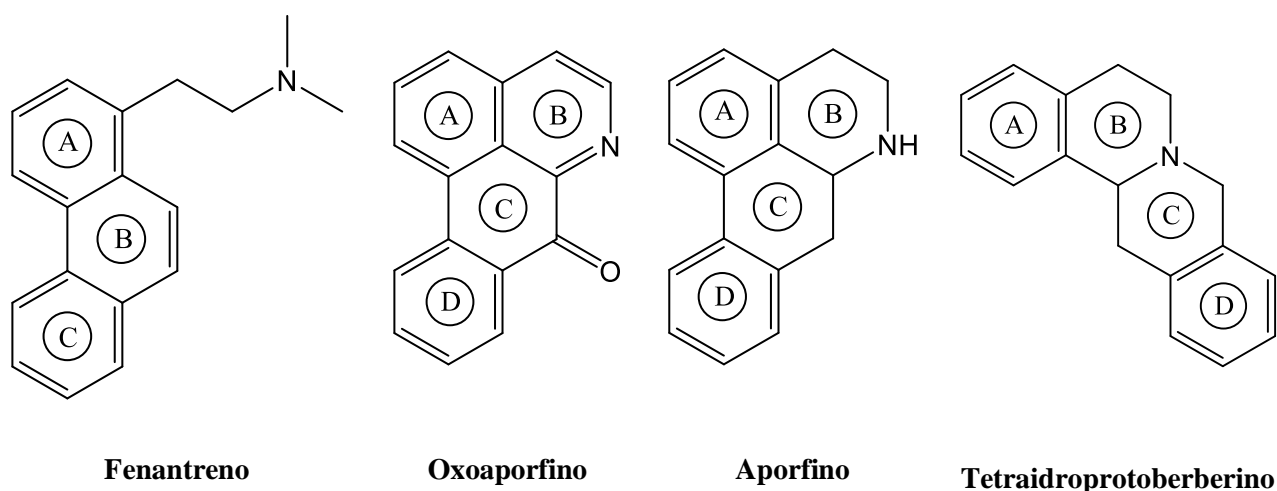
5.1. Identificação estrutural das substâncias isoladas das cascas de *G. olivacea*

A realização do estudo fitoquímico das cascas de *G. olivacea* empregando técnicas cromatográficas convencionais, como CC, CCDA e CCDP, possibilitou o isolamento e a caracterização de 10 substâncias conhecidas, sendo duas delas obtidas em mistura. Para a identificação das substâncias, utilizaram-se técnicas modernas de elucidação estrutural, tais como RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D e EM, assim como também a comparação dos dados obtidos com os descritos na literatura. Os alcaloides isolados (TABELA 13), são pertencentes à duas subclasses, os aporfinoídes: subdivididos em aporfinos, oxoaporfinos e fenantrenos; e os tetraidroprotoberberinos, de acordo com a FIGURA 14.

TABELA 13: Classe de alcaloides identificados de *G. olivacea*.

Aporfinoídes			Tetraidroprotoberberino
Fenantreno	Oxoaporfino	Aporfino	
GO1	GO2	GO3	GO4
GO8	GO5	GO6 (mistura de GO6a e GO6b)	GO7
GO9			

FIGURA 14: Esqueletos dos alcaloides identificados nas cascas de *G. olivacea*.

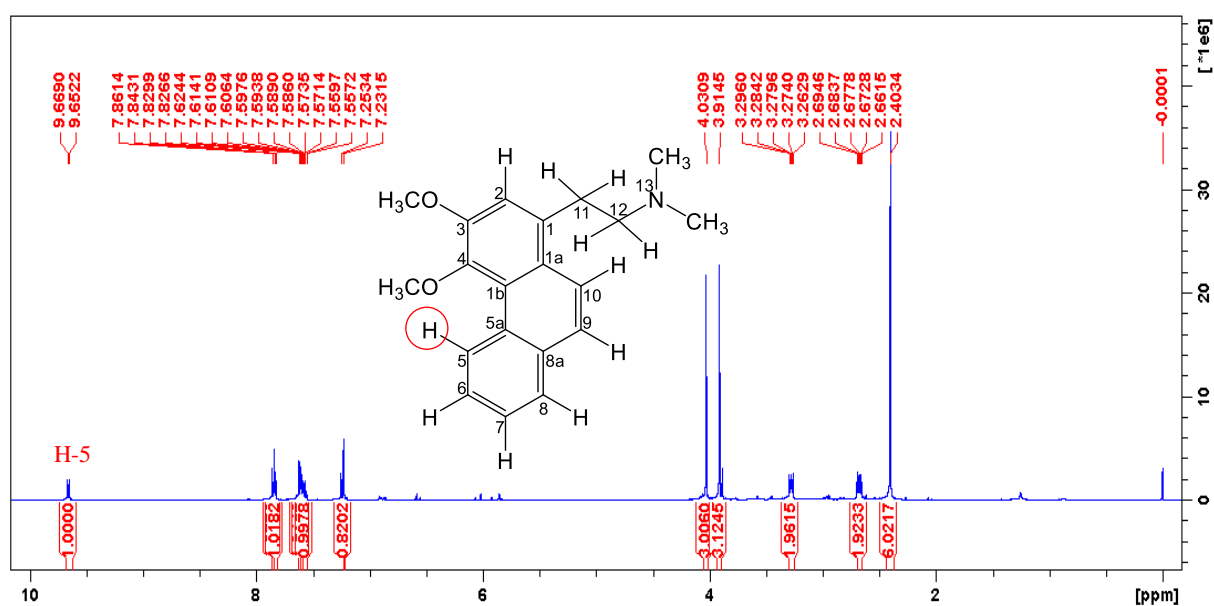


5.1.1. Identificação estrutural dos alcaloides do tipo fenantreno

5.1.1.1. Identificação estrutural de GO1

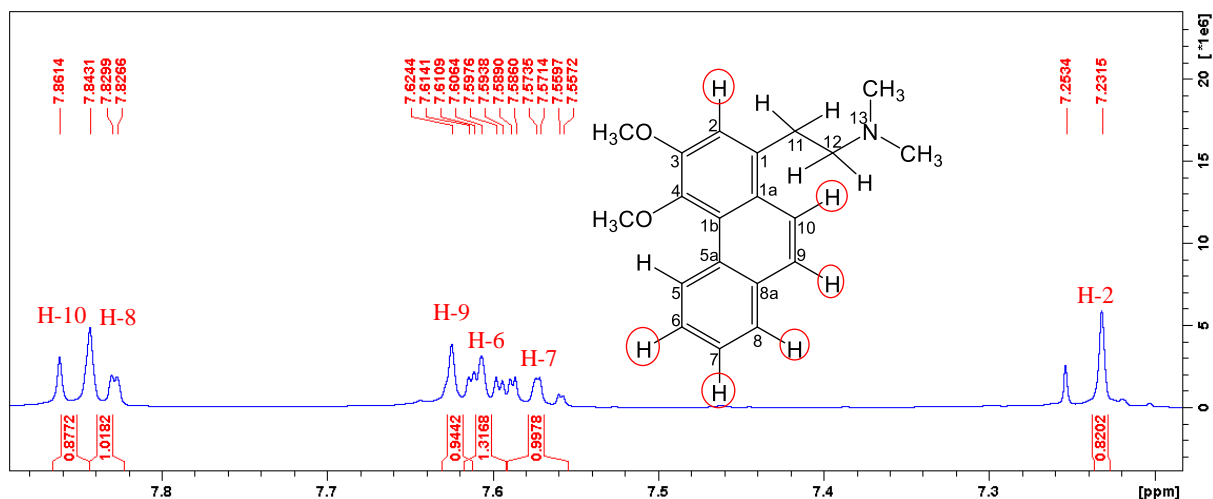
A substância **GO1** (14,4 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração avermelhada, com teste positivo para alcaloides frente ao reagente de Dragendorff. Através da análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 15) foram observadas características de um alcaloide do tipo fenantreno devido ao padrão de sinais de hidrogênios na região aromática e na região dos hidrogênios metilênicos (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

FIGURA 15: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO1**.



Os sinais dos hidrogênios aromáticos foram observados na faixa de deslocamento entre δ 9,66 - 7,24, sendo quatro em δ 9,66 (1H, *dd*, $J = 8,4$ e $0,7$ Hz), δ 7,60 (1H, *dd*, $J = 8,2$ e $1,7$ Hz), δ 7,57 (1H, *td*, $J = 8,2$ e $1,4$ Hz) e δ 7,83 (1H, *dd*, $J = 8,2$ e $1,7$ Hz), atribuídos a H-5, H-6, H-7 e H-8, respectivamente, cujas multiplicidades são coerentes com ausência de substituição do anel C do sistema fenantreno. Outro sinal com deslocamento em δ 7,24 (1H, *s*) foi atribuído a posição H-2, sendo este, típico do anel A do sistema fenantreno substituído. Os dois sinais de hidrogenios aromáticos remanescentes observados em δ 7,61 (1H, *d*) e δ 7,85 (1H, *d*) ambos dupletos com constante de acoplamento (J) de $9,1$ Hz mostraram características de um sistema compatível com o anel B do esqueleto fenantreno referentes aos hidrogênios H-9 e H-10, respectivamente (FIGURA 16, TABELA 14).

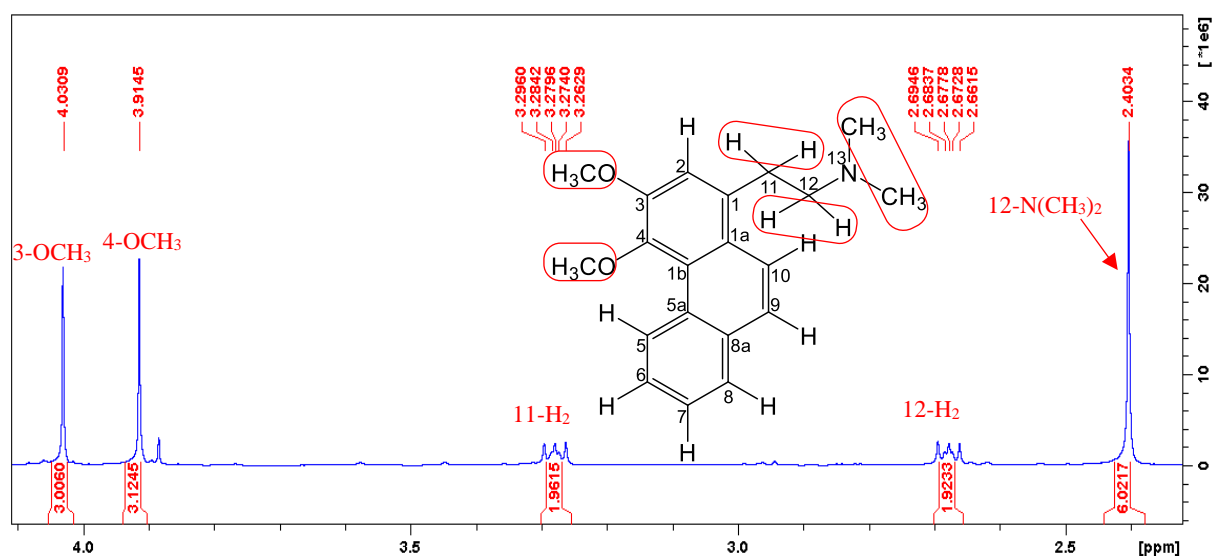
FIGURA 16: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO1**.



Observou-se ainda, a presença de dois multipletos, em δ 3,28 (2H, *m*) e δ 2,67 (2H, *m*), com integração para dois hidrogênios cada, típicos de hidrogênios metilênicos atribuídos à cadeia etilamina do esqueleto fenantreno equivalentes a H-11 e H-12, constituindo os quatro prótons alifáticos, incluindo o sinal em δ 2,40 (6H, *s*), com integração para seis hidrogênios que levantou a hipótese de que se teria um grupo *N*-dimetil na estrutura (FIGURA 17).

A presença de um simpleto observado em δ 4,03 (3H, *s*) e outro em δ 3,92 (3H, *s*) ambos com integração para três hidrogênios cada, confirmou a presença das outras substituições no anel A, sendo estes referentes à dois grupos metoxílicos nas posições C-3 e C-4 (FIGURA 17) atribuídos com base nas análises dos mapas de correlação HMBC (FIGURA 20 e 21) e HSQC (FIGURA 22 e 23).

FIGURA 17: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO1**.



A análise realizada por RMN de ^{13}C e DEPT135, exibiu na região aromática sete carbonos metínicos entre δ 128,1 - 114,8, bem como confirmou os metilênicos atribuídos em δ 32,4 e δ 60,9 referentes aos carbonos C-11 e C-12, respectivamente (FIGURA 18 e 19).

FIGURA 18: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **G01**.

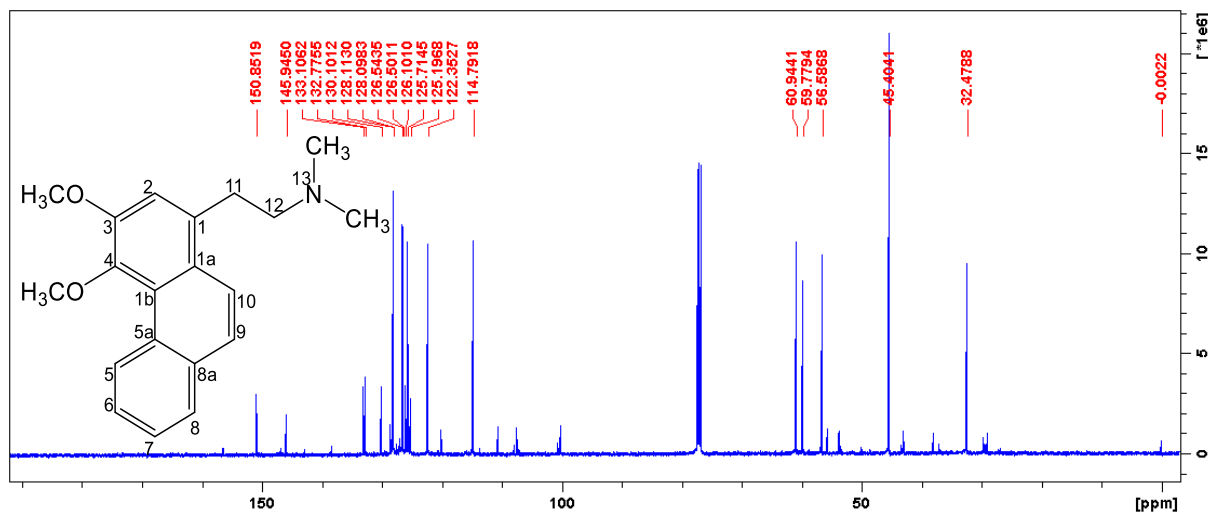
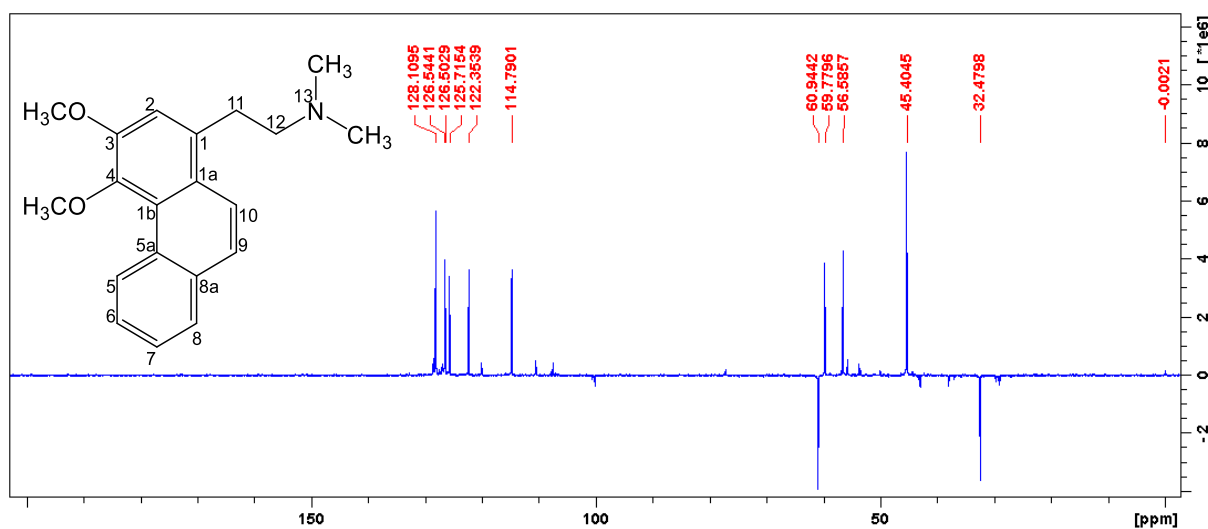


FIGURA 19: Espectro de RMN de DEPT135 (125 MHz, CDCl_3) de **G01**.



Através dos mapas de correlação HMBC (FIGURA 20 e 21) e HSQC (FIGURA 22 e 23) juntamente com os RMN de ^1H e ^{13}C , foi possível atribuir todos os carbonos da molécula sem ambiguidades. Observou-se a presença de 20 carbonos, sendo 14 aromáticos entre δ 150,8 - 114,8, onde o sinal em δ 150,8 (C-3) apresentou correlação a J^3 com os hidrogênios do grupo metoxílico em δ 4,03 (3H, s) ligados ao carbono em δ 56,5 (3-OCH₃), de mesmo modo, o sinal de carbono em δ 145,9 (C-4) apresentou correlação a J^3 com os hidrogênios do grupo metoxílico em δ 3,92 (3H, s) ligados ao carbono em δ 59,8 (4-OCH₃), além do sinal em δ 45,4 atribuído

a [12- $N(\text{CH}_3)_2$] correlacionando-se a J^1 com o sinal em δ 2,40 referente aos hidrogênios metílicos (6H, *s*) do grupo *N*-dimetil.

A correta atribuição dos grupos metoxílicos foi definida pelo mapa de correlação HMBC, onde o sinal em δ 7,24 (1H, *s*) referente a H-2 apresentou correlação a J^3 com o sinal do carbono em δ 145,9 e a J^2 com o sinal do carbono em δ 150,8, definidos anteriormente em C-4 e C-3, respectivamente. Este sinal (δ 7,24) mostrou ainda correlação a J^3 com o sinal do carbono metilênico em δ 32,4 (C-11), confirmando sua localização no anel A (FIGURA 20 e 21). As demais correlações observadas estão dispostas na FIGURA 24.

FIGURA 20: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO1**.

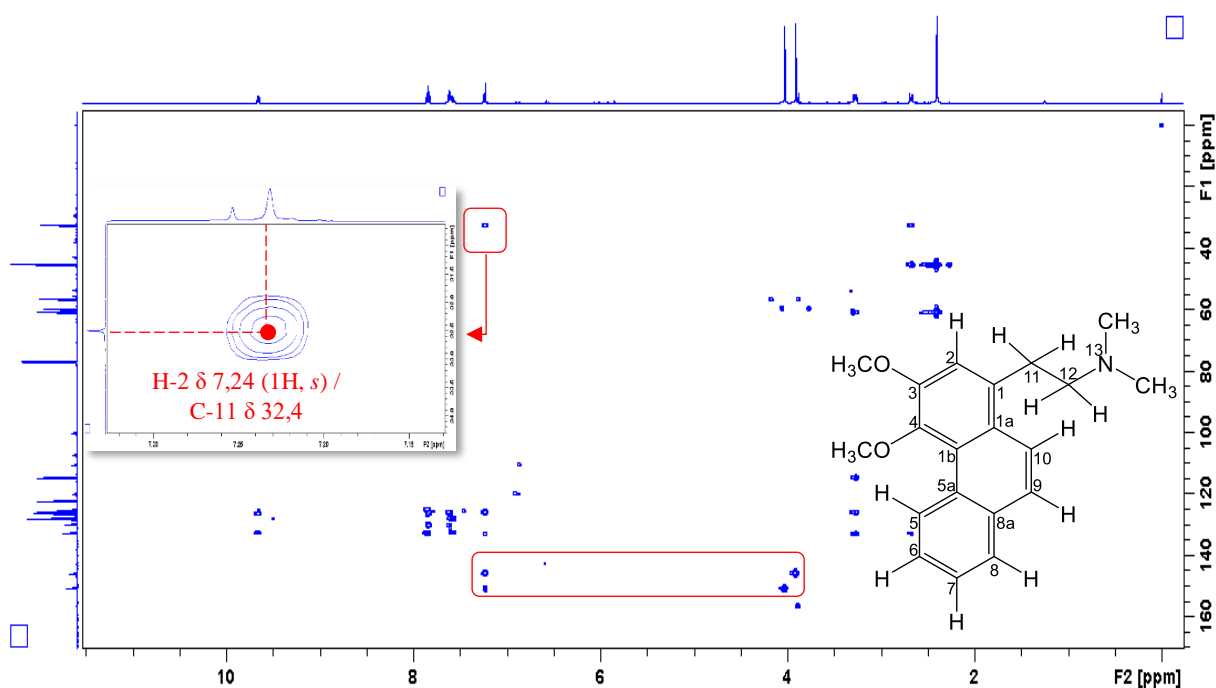


FIGURA 21: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO1**.

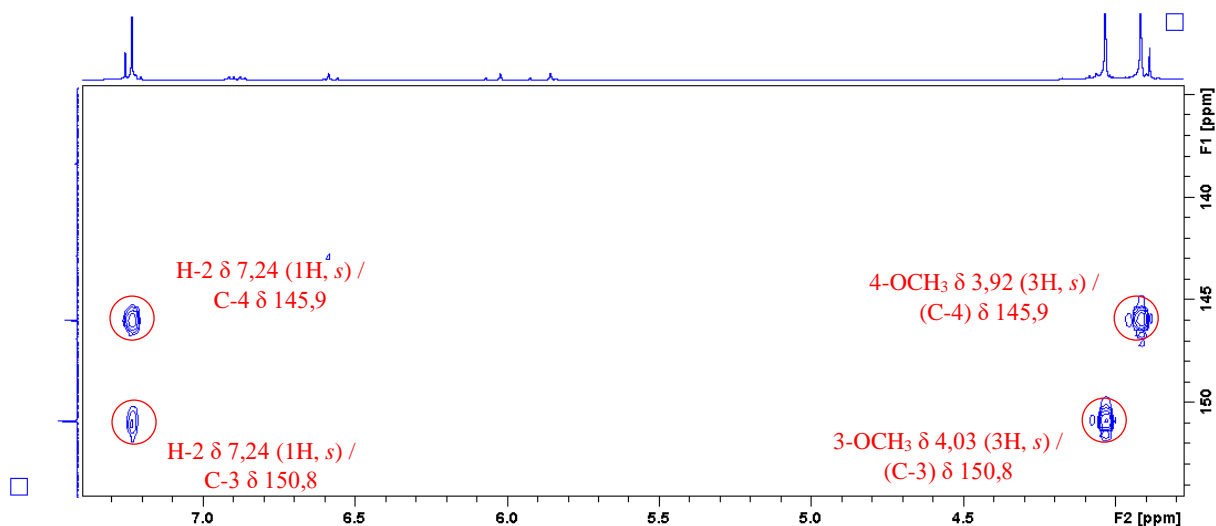


FIGURA 22: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO1**.

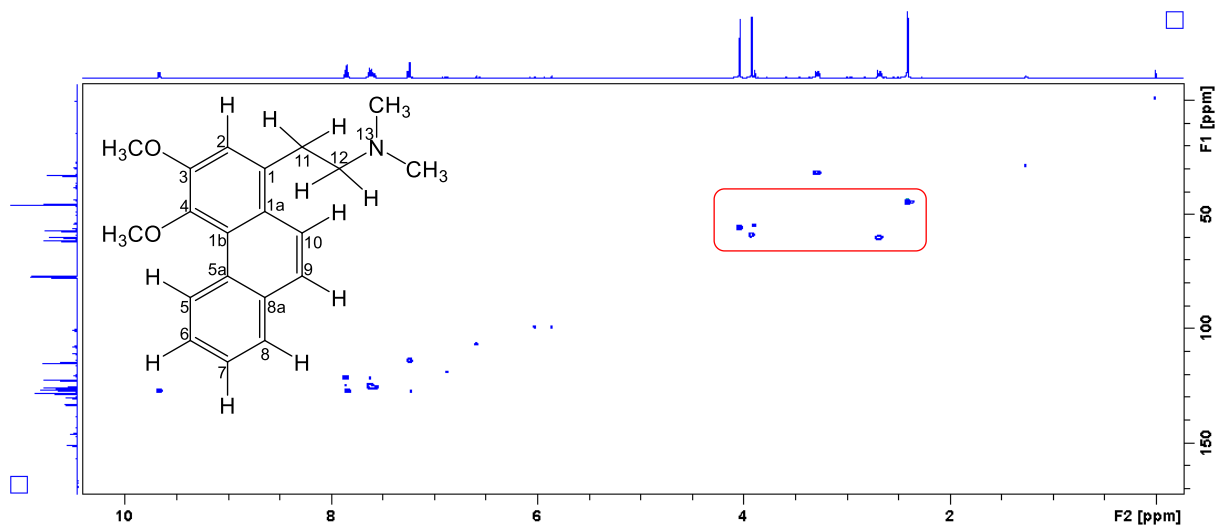


FIGURA 23: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO1**.

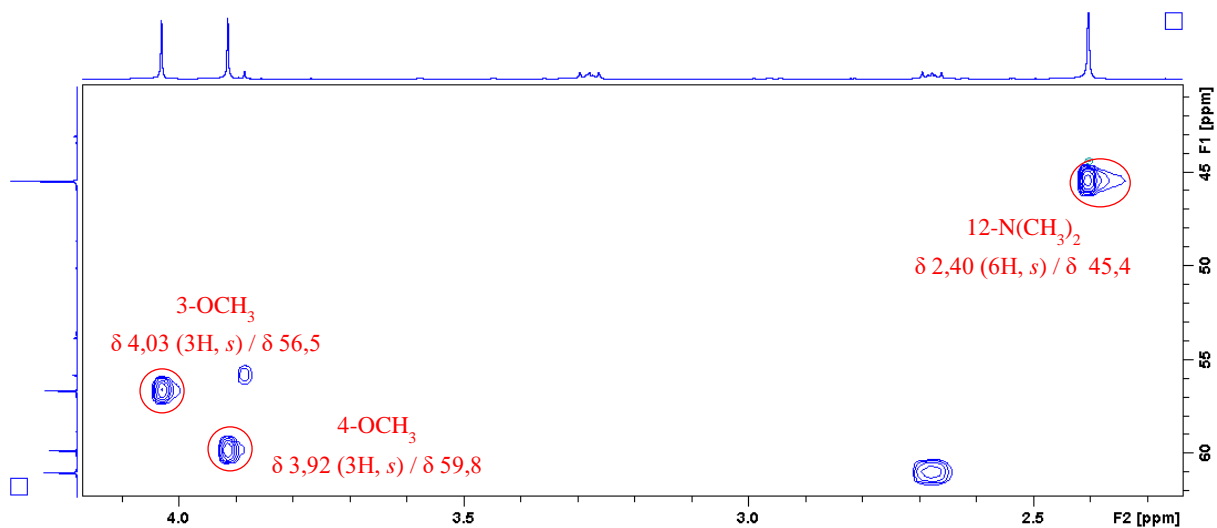
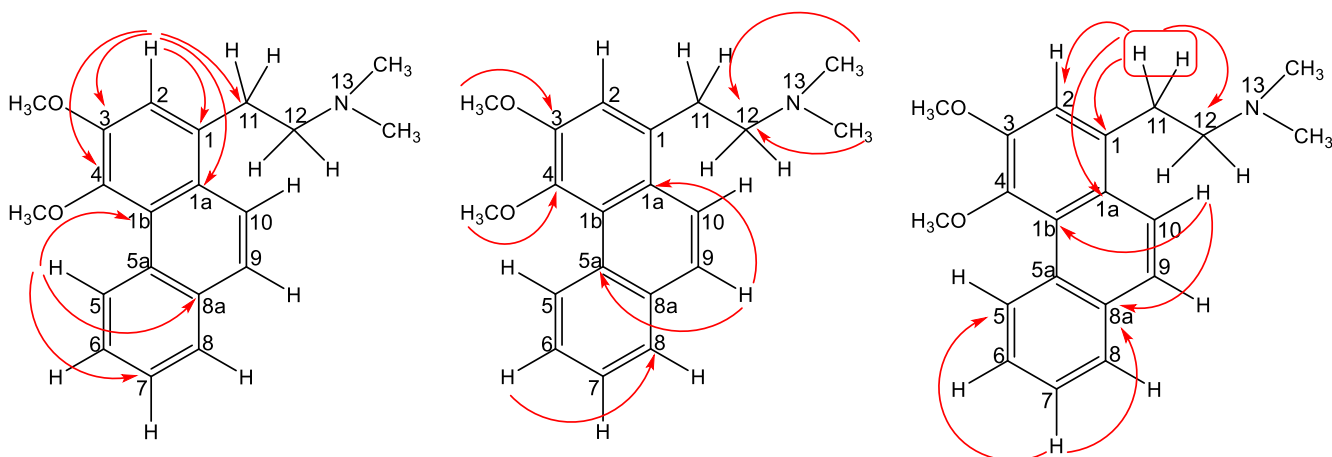


FIGURA 24: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO1**.



Na TABELA 14 são apresentados os valores de ^1H e ^{13}C de **GO1** atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC com suas respectivas correlações observadas e comparações com os dados da literatura, consistindo nos dados do alcaloide fenantreno conhecido como atherosperminina, que embora já tenha sido relatado no gênero, não apresenta dados completos de RMN, sendo assim, os dados apresentados aqui auxiliarão novas pesquisas na identificação desse composto.

TABELA 14: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **GO1**.

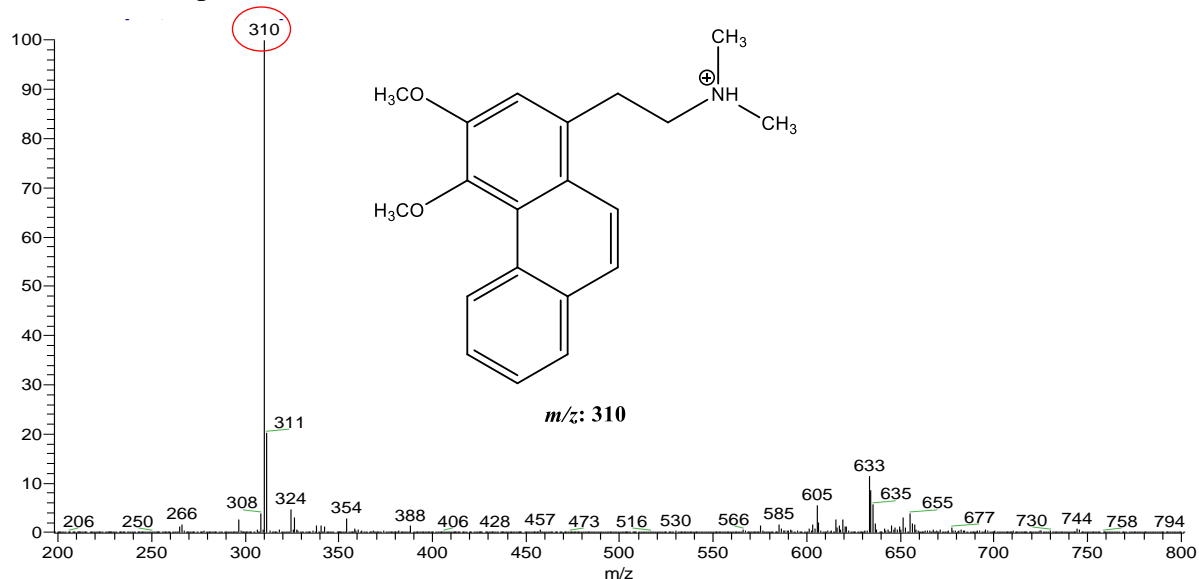
Posição	GO1			Atherosperminina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., J em Hz) ^d	^{13}C (δ) ^e
1	-	133,1 C	-	-	130,0 C
1a	-	126,1 C	-	-	126,1 C
1b	-	125,2 C	-	-	125,2 C
2	7,24 (1H, <i>s</i>)	114,8 CH	1a, 1, 3f, 4F e 11	7,1 (1H, <i>s</i>)	114,8 CH
3	-	150,8 C	-	-	162,5 C
4	-	145,9, C	-	-	ou 150,8 C
5	9,66 (1H, <i>dd</i> , 8,4 e 0,7)	128,1 CH	1b, 7 e 8a	9,67 (1H, <i>m</i>)	122,3 CH
5a	-	130,1 C	-	-	132,7 C
6	7,60 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 1,7)	126,5 CH	8	-	126,5 CH
7	7,57 (1H, <i>td</i> , 8,2 e 1,4)	126,5 CH	5 e 8a	-	126,5 CH
8	7,83 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 1,7)	128,1 CH	6 e 5a	-	125,7 CH
8a	-	132,8 C	-	-	132,7 C
9	7,61 (1H, <i>d</i> , 9,1)	125,7 CH	1a e 5a	-	128,1 CH
10	7,85 (1H, <i>d</i> , 9,1)	122,3 CH	1b e 8a	-	128,1 CH
11	3,28 (2H, <i>m</i>)	32,4 CH ₂	1, 1a, 2 e 12	2,80 (4H, <i>m</i>)	32,2 CH ₂
12	2,67 (2H, <i>m</i>)	60,9 CH ₂	1, 11 e 13		60,7 CH ₂
13-N(CH₃)₂	2,40 (6H, <i>s</i>)	45,4 (CH ₃) ₂	12 e 13	2,25 (6H, <i>s</i>)	45,2 (CH ₃) ₂
3-OCH₃	4,03 (3H, <i>s</i>)	56,5 (CH ₃)	3	3,91 (3H, <i>s</i>)	56,6 (CH ₃)
4-OCH₃	3,92 (3H, <i>s</i>)	59,8 (CH ₃)	4	3,88 (3H, <i>s</i>)	ou 59,7 (CH ₃)

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

^bMultiplicidades determinadas mapas de correlação HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^{d,e}BICK; DOUGLAS, 1965 (^1H : CDCl_3 , 100,0 MHz); LU; WU; LEOU, 1985 (^{13}C : CDCl_3 , 60,0 MHz); (δ) Deslocamentos em ppm.

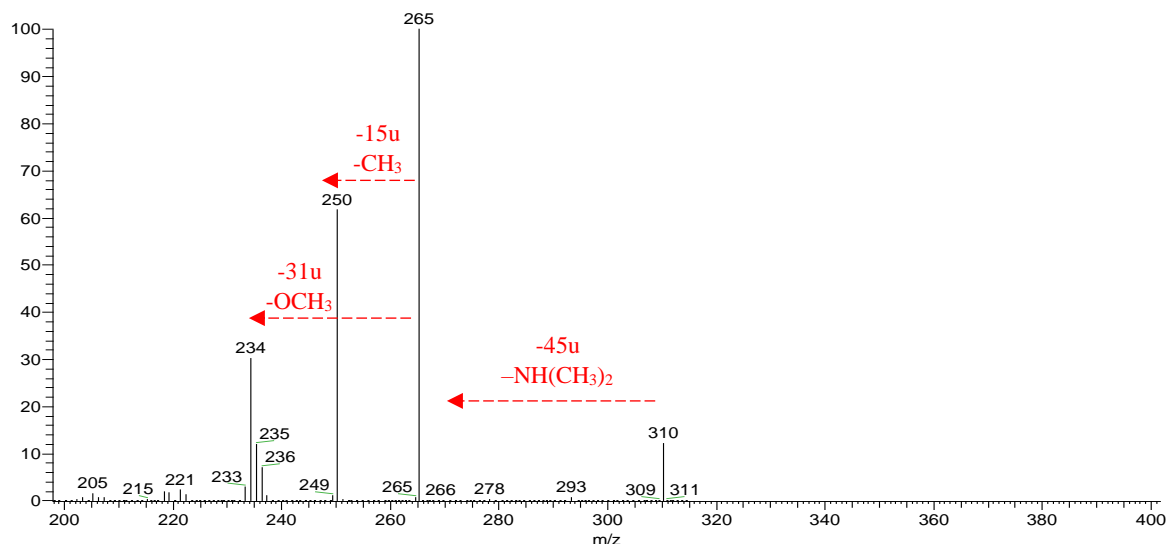
A análise por espectrometria de massas (FIGURA 25), obtida através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z 310 Da, compatível com a fórmula molecular $C_{20}H_{23}NO_2$.

FIGURA 25: Espectro de massas de **GO1**.



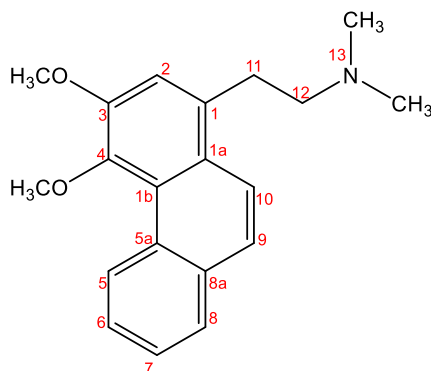
Quando submetido à fragmentação este íon (m/z 310) apresentou uma perda inicial característica em alcaloides do tipo fenantreno de 45 u, consistente com o radical dimetilamino $-N(CH_3)_2$ (-45) e perdas competitivas de 15 u e 31 u, sendo estas perdas já descritas como fragmentos chave para aporfinóides, onde é observada em estruturas contendo grupos metoxilas vicinais, características da segunda etapa, com perdas competitivas de grupos $-CH_3$ (-15 u) e $-OCH_3$ (-31 u) (FIGURA 26 e 50) (SILVA *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2015; WU; HUANG, 2006), corroborando assim com o que foi observado pelas análises de RMN.

FIGURA 26: Perfil de fragmentações de **GO1**.



Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D, EM e comparação com os dados descritos na literatura (BICK; DOUGLAS, 1965; LU; WU; LEOU, 1985), foi possível identificar **GO1** como sendo o alcaloide fenantreno conhecido como **atherosperminina** (FIGURA 27).

FIGURA 27: Estrutura do alcaloide atherosperminina.



5.1.1.2. Identificação estrutural de GO8

A substância **GO8** (8,6 mg) apresentou-se como um sólido de coloração avermelhada, com teste positivo para alcaloides quando revelada com solução de Dragendorff. Através da análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 28 e 29) foram observados sinais semelhantes quando comparados com os dados de **GO1**, diferenciando-se desta, apenas pela ausência de um dos sinais de hidrogênios característicos de grupo metoxílico em alcaloides (simpleto com integração para três hidrogênios), indicando um substituinte diferente, sendo este, provavelmente um grupo hidroxila, de acordo com os dados disponíveis na literatura (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

FIGURA 28: Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO1** (a) e **GO8** (b).

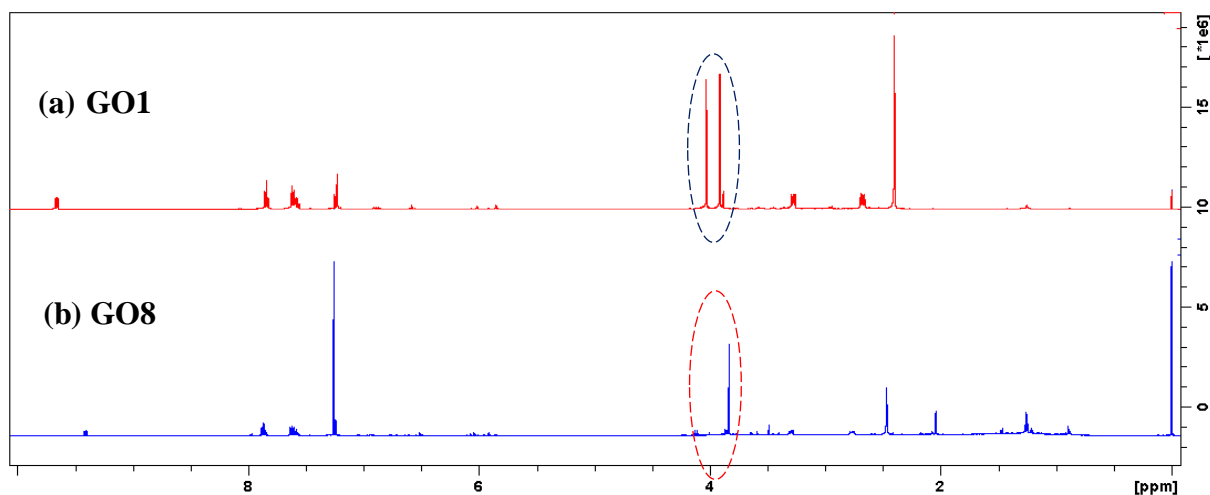
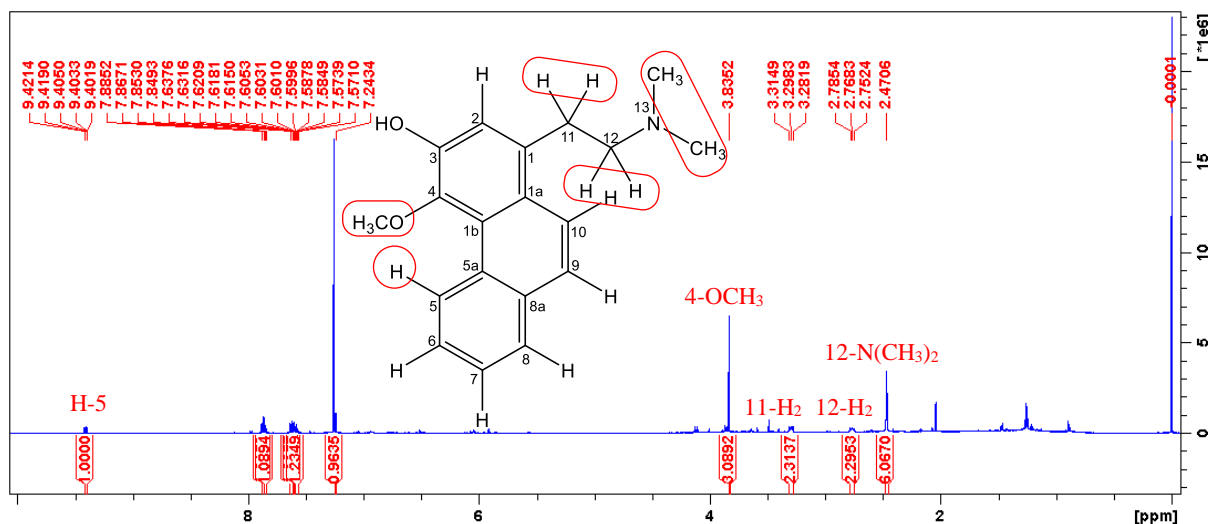
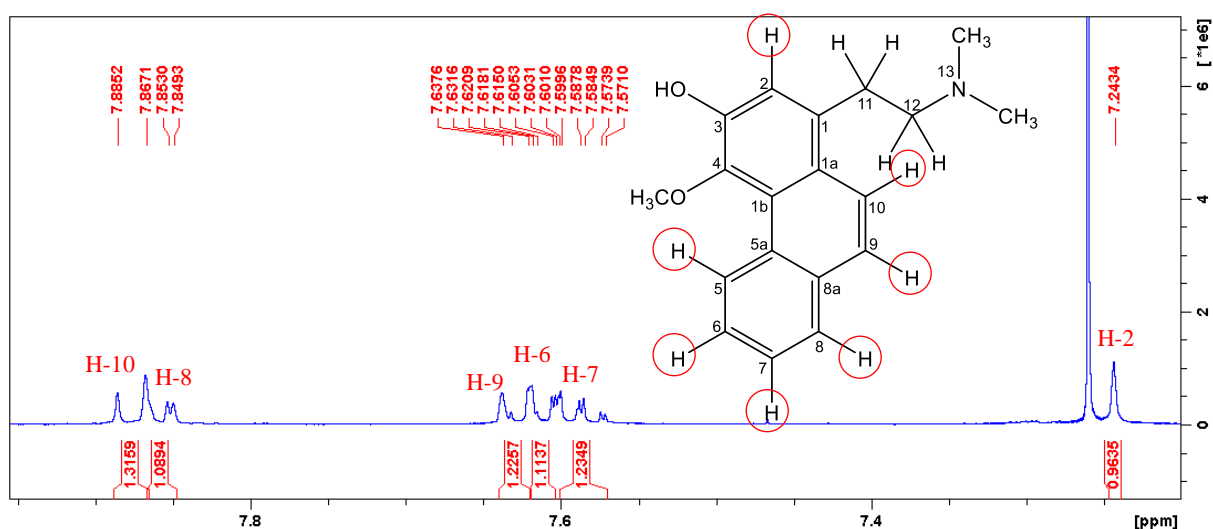


FIGURA 29: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO8**.



Verificou-se desse modo, na região dos hidrogênios aromáticos a presença de sete sinais com integração para um hidrogênio cada, sendo quatro em δ 9,41 (1H, *ddd*, $J = 8,2, 1,4$ e $0,7$ Hz), δ 7,61 (1H, *dd*, $J = 8,2$ e $1,7$ Hz), δ 7,58 (1H, *td*, $J = 8,2$ e $1,4$ Hz) e δ 7,86 (1H, *dd*, $J = 8,2$ e $1,7$ Hz) típicos dos hidrogênios aromáticos H-5, H-6, H-7 e H-8, respectivamente do anel C não substituído, dois em δ 7,62 (1H, *d*, $J = 9,1$ Hz) e δ 7,87 (1H, *d*, $J = 9,1$ Hz), referente as posições H-9 e H-10 e um em δ 7,24 (1H, *s*), característico de H-2 do anel A do sistema fenantreno substituído (FIGURA 29 e 30).

FIGURA 30: Ampliação da região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO8**.



Pela análise dos mapas de correlação HSQC (FIGURA 31-32) e HMBC (FIGURA 33-34) de **GO8** foi possível observar a presença de 19 carbonos, sendo 14 aromáticos entre δ 147,6 - 117,4, dois metilênicos em δ 31,3 e δ 60,4 característicos de C-11 e C-12, respectivamente, dois metílicos em δ 44,9 típico de grupo *N*-dimetil em [12-*N*(CH₃)₂] e um metoxílico em δ 60,1.

Assim como observado em **GO1**, foi possível evidenciar para **GO8** a presença do sinal em δ 142,6 definido em C-4 apresentando correlação a J^3 com os hidrogênios do grupo metoxílico em δ 3,83 (3H, *s*) ligados ao carbono em δ 60,1 (4-OCH₃) (FIGURA 32 e 34).

Pôde-se observar também, a presença de dois multipletos, um em δ 3,28 (2H, *m*) e outro em δ 2,75 (2H, *m*), com integração para dois hidrogênios cada, sendo estes os sinais típicos dos hidrogênios metilênicos, atribuídos assim à cadeia lateral do esqueleto fenantreno, equivalentes a H-11 e H-12, o quais apresentaram correlação direta (J^1) com os sinais de carbono em δ 31,3 (C-11) e δ 60,4 (C-12) respectivamente, como observado para a estrutura anterior (FIGURA 29 e 32). Outro sinal observado em δ 2,45 (6H, *s*), um simpleto com integração para seis hidrogênios correlacionando-se a J^1 com o sinal de carbono em δ 44,9 confirmou que a substância também teria um grupo *N*-dimetil na estrutura (FIGURA 29 e 32).

FIGURA 31: Mapa de correlação HSQC (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz; CDCl₃) de **GO8**.

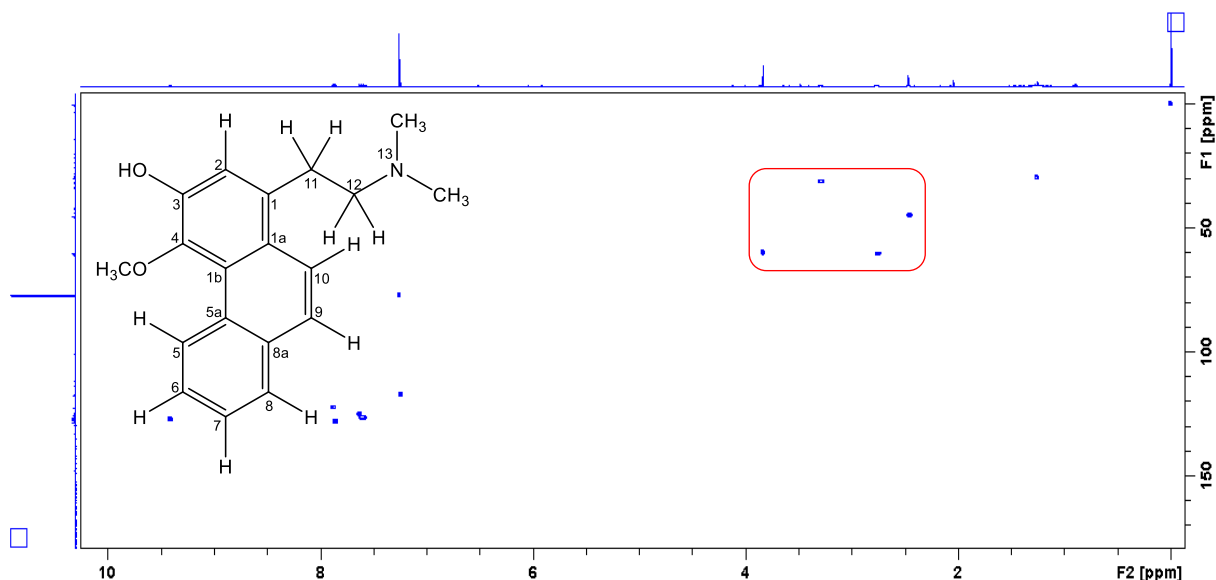
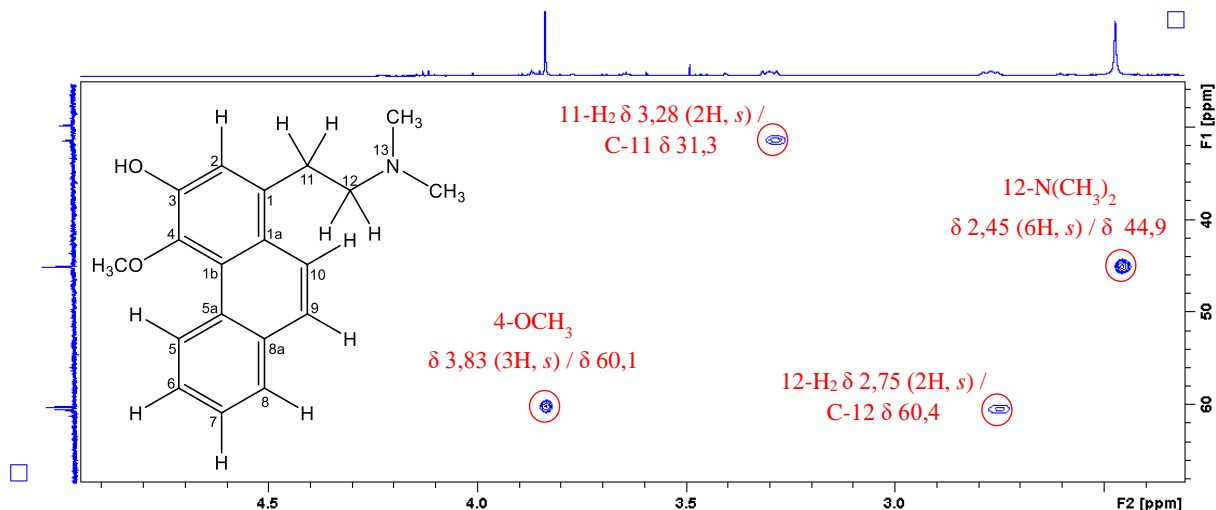


FIGURA 32: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO8**.



Foi possível definir a correta posição do grupo metoxílico através de análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 33-34), onde observou-se que o sinal de hidrogênio em δ 7,24 (1H, *s*) definido em H-2, apresentou correlação a J^3 com os sinais de carbono em δ 31,3 (C-11) e δ 142,6 (C-4), sendo que este último exibiu ainda uma outra correlação a J^3 com o sinal em δ 3,83 (4-OCH₃) conforme descrito anteriormente, confirmando assim, o grupo metoxílico substituído em C-4. Este sinal (δ 7,24), apresentou ainda uma correlação a J^2 com o sinal de carbono em δ 147,6 (C-3), característico de carbono aromático oxigenado, o qual não apresentou correlação com nenhum sinal de hidrogênio referente à grupos metoxílicos, confirmando desse modo, o grupo hidroxila substituído nessa posição. As demais correlações observadas estão expressas na FIGURA 35.

FIGURA 33: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO8**.

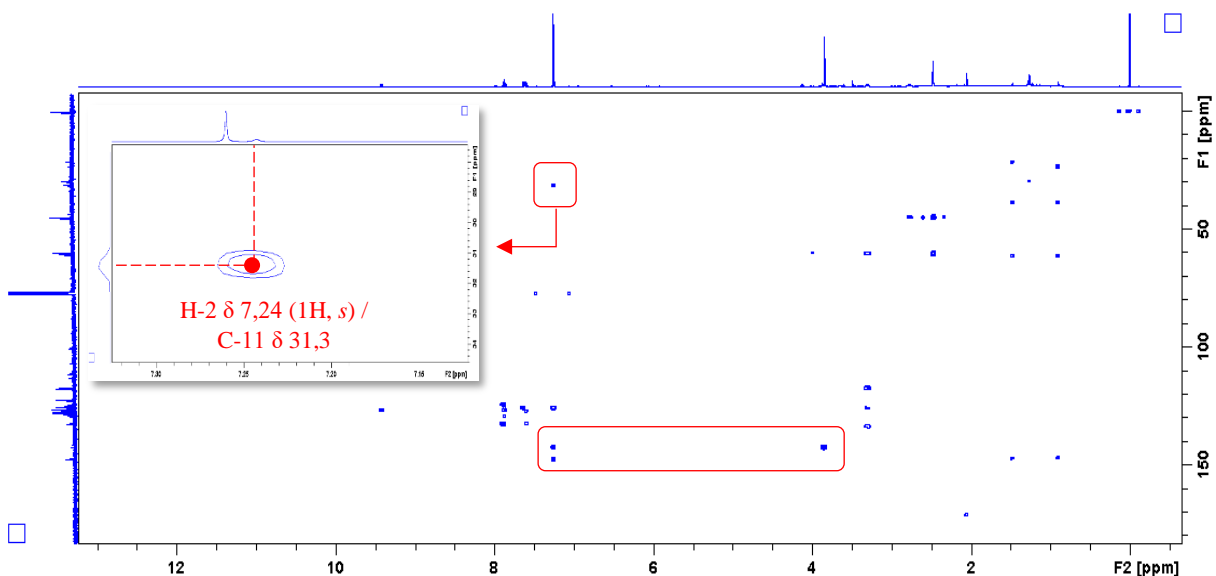


FIGURA 34: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO8**.

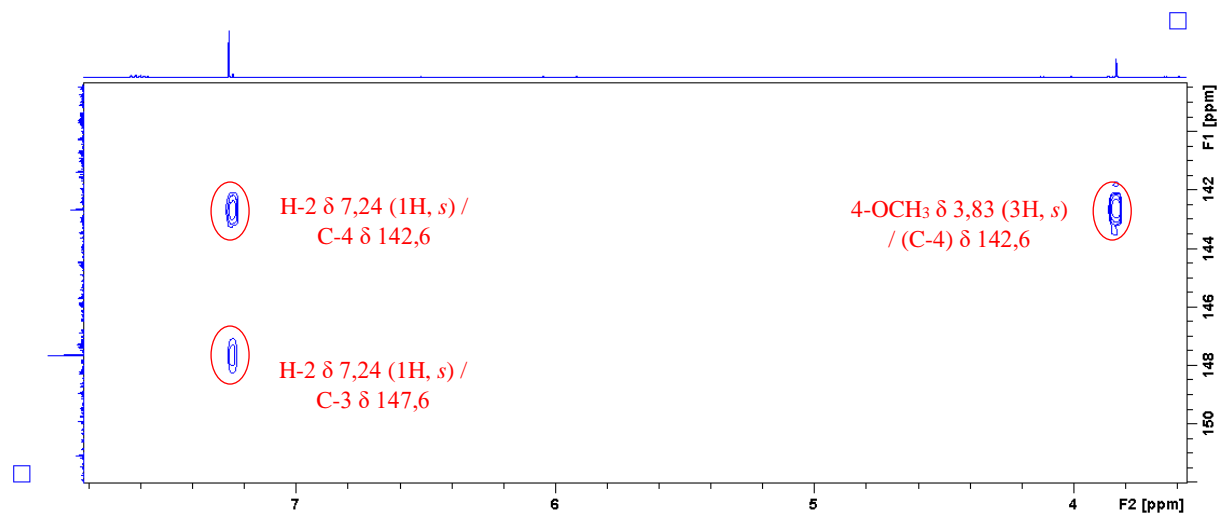
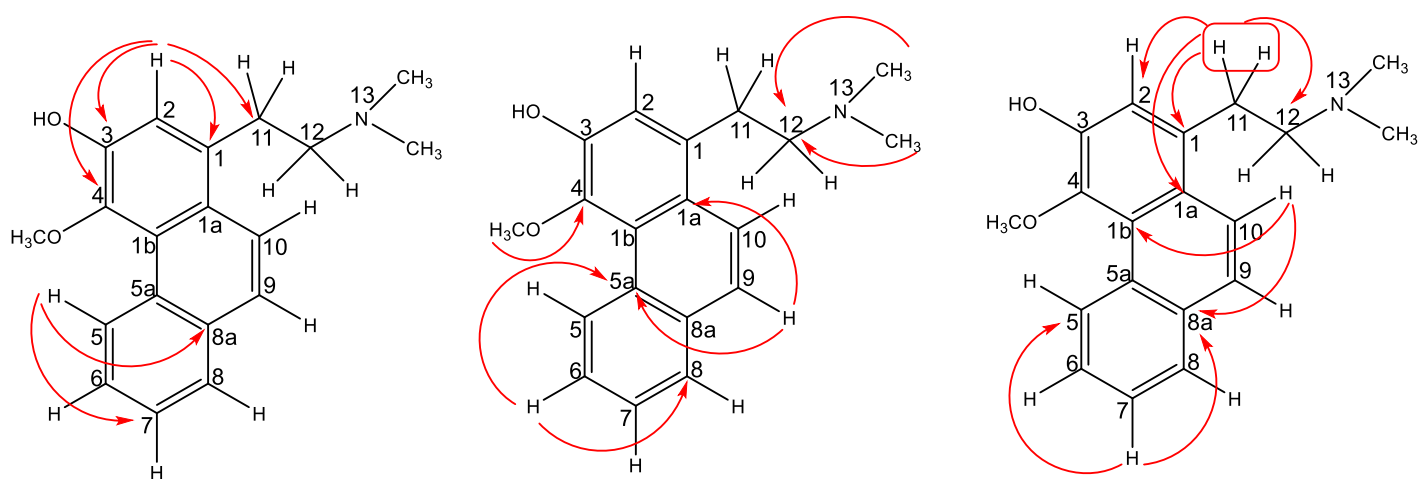


FIGURA 35: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO8**.



Pela análise de RMN ^1H e ^{13}C 1D/2D pôde-se atribuir corretamente todos os sinais de hidrogênios e carbonos de **GO8** bem como suas respectivas correlações (TABELA 15), elucidando-o como sendo um alcaloide do tipo fenatreno denominado argentinina.

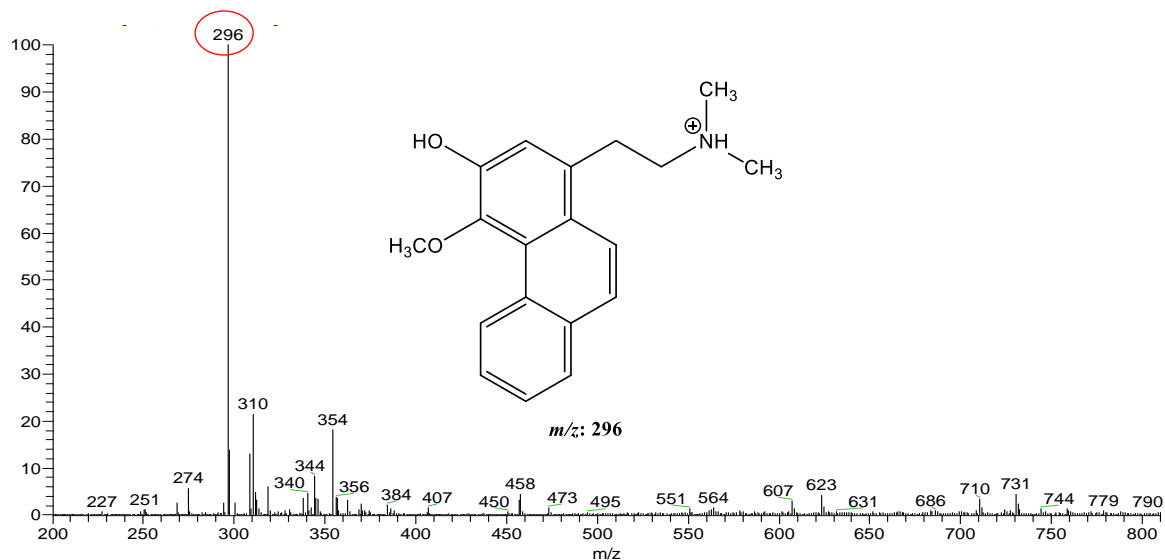
TABELA 15: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **GO8**.

Posição	GO8			Argentinina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., J em Hz) ^d	^{13}C (δ) ^d
1	-	133,6 C	-	-	131,9 C
1a	-	125,9 C	-	-	125,2 C
1b	-	124,3 C	-	-	124,1 C
2	7,24 (1H, <i>s</i>)	117,4 CH	1a, 3f, 4F e 11	7,28 (1H, <i>s</i>)	117,8 CH
3	-	147,6 C	-	-	150,4 C
4	-	142,6 C	-	-	147,8 C
5	9,41 (1H, <i>ddd</i> , 8,2, 1,4 e 0,7)	127,2 CH	7 e 8a	9,42 (1H, <i>brd</i> , 9,2)	127,2 CH
5a	-	129,1 C	-	-	128,9 C
6	7,61 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 1,7)	126,4 CH	5a e 8	7,86 (1H, <i>brd</i> , 9,2)	128,3 CH
7	7,58 (1H, <i>td</i> , 8,2 e 1,4)	126,6 CH	5 e 8a	7,61 (1H, <i>td</i> , 8,4 e 1,6)	126,9 CH
8	7,86 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 1,7)	128,2 CH	5a, 6, 7 e 9	7,53 (1H, <i>brd</i> , 8,8)	126,2 CH
8a	-	132,6 C	-	-	131,4 C
9	7,62 (1H, <i>d</i> , 9,1)	125,2 CH	1a e 5a	7,68 (1H, <i>d</i> , 9,2)	125,6 CH
10	7,87 (1H, <i>d</i> , 9,1)	122,5 CH	1b e 8a	7,91 (1H, <i>d</i> , 9,2)	121,8 CH
11	3,28 (2H, <i>m</i>)	31,3 CH ₂	1, 1a, 2 e 12	3,59 (2H, <i>ddd</i> , 16,8 11,6 e 5,2)	29,7 CH ₂
12	2,75 (2H, <i>m</i>)	60,4 CH ₂	1, 11 e 13	3,21 (2H, <i>ddd</i> , 16,8 11,6 e 5,2)	58,7 CH ₂
13-N(CH₃)₂	2,45 (6H, <i>s</i>)	44,9 (CH ₃) ₂	12 e 13	2,84 (6H, <i>s</i>)	43,3 (CH ₃) ₂
4-OCH₃	3,83 (3H, <i>s</i>)	60,1 (CH ₃)	4	3,84 (3H, <i>s</i>)	60,1 (CH ₃)

^aExperimento realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno; ^bMultiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C (ANEXO-E1 e E2), HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^dLÓPEZ-MARTÍN *et al.*, 2002 (^1H : 400,0 MHz; ^{13}C : 100,0 MHz; CDCl_3); (δ) Deslocamentos em ppm.

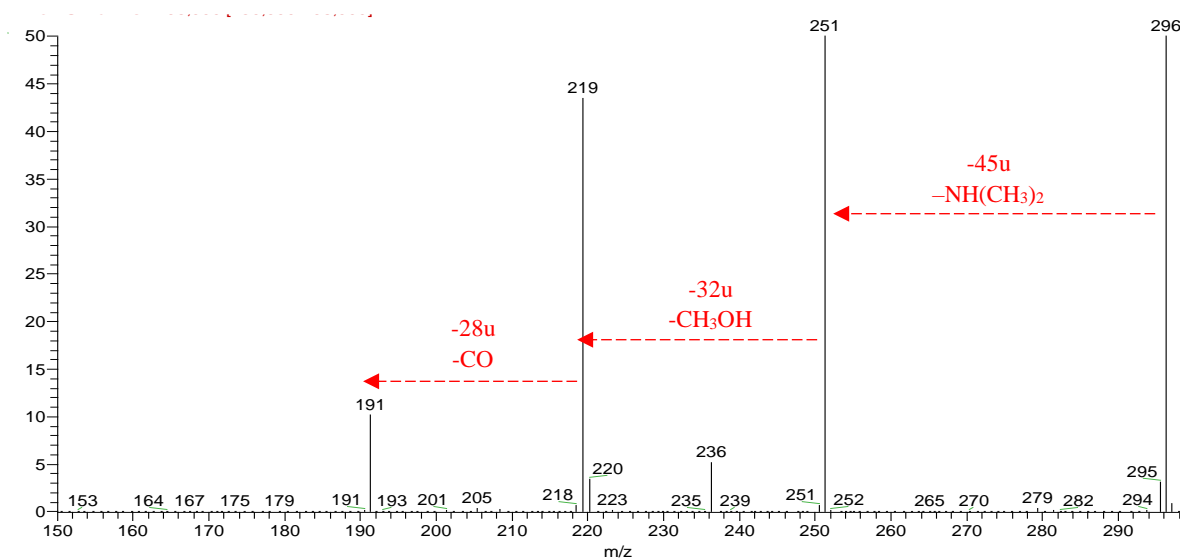
A análise por espectrometria de massas (FIGURA 36), obtida através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z 296 Da, compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{21}NO_2$.

FIGURA 36: Espectro de massas de **GO8**.



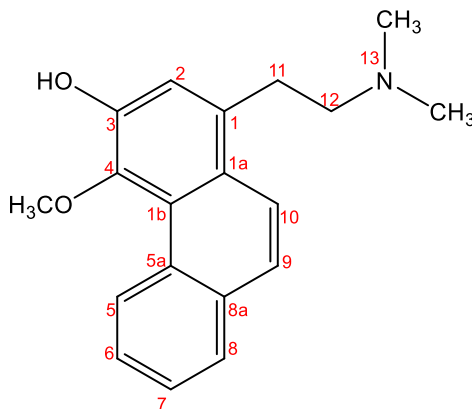
Quando submetido à fragmentação este íon (m/z 296) apresentou perda inicial de 45 u, sendo esta a perda característica para alcaloides do tipo fenantreno contendo um grupo *N*-dimetil na estrutura $-N(CH_3)_2$ (-45 u), conforme observado anteriormente em **GO1**. Verificou-se ainda, perdas posteriores de 32 u ($-CH_3OH$) e 28 u ($-CO$) que sugerem uma estrutura contendo grupo metoxílico adjacente a hidroxílico (FIGURA 37 e 50), conforme os registros da literatura (WU; HUANG, 2006; STÉVIGNY *et al.*, 2004). Corroborando desse modo, com os dados obtidos por RMN.

FIGURA 37: Perfil de fragmentações de **GO8**.



Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D e EM, bem como comparação com os dados da literatura LÓPEZ-MARTÍN *et al.* (2002), foi possível identificar a substância **GO8** como sendo o alcaloide fenatreno **argentinina** (FIGURA 38).

FIGURA 38: Estrutura do alcaloide argentinina.



5.1.1.3. Identificação estrutural de GO9

A substância **GO9** (9,0 mg) apresentou-se como um sólido de coloração avermelhada, com teste positivo para alcaloides quando revelada com solução de Dragendorff. Através da análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 39 e 40) foram observados sinais semelhantes quando comparados com os espectros de **GO1**, diferenciando-se desta, pelo deslocamento mais pronunciado dos sinais referentes a cadeia etilamina da estrutura fenatrenica, sugerindo que essa desblindagem adicional seria ocasionada possivelmente por um grupo *N*-óxido conforme os registros da literatura (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

FIGURA 39: Sobreposição dos espectros de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO1** (a) e **GO9** (b).

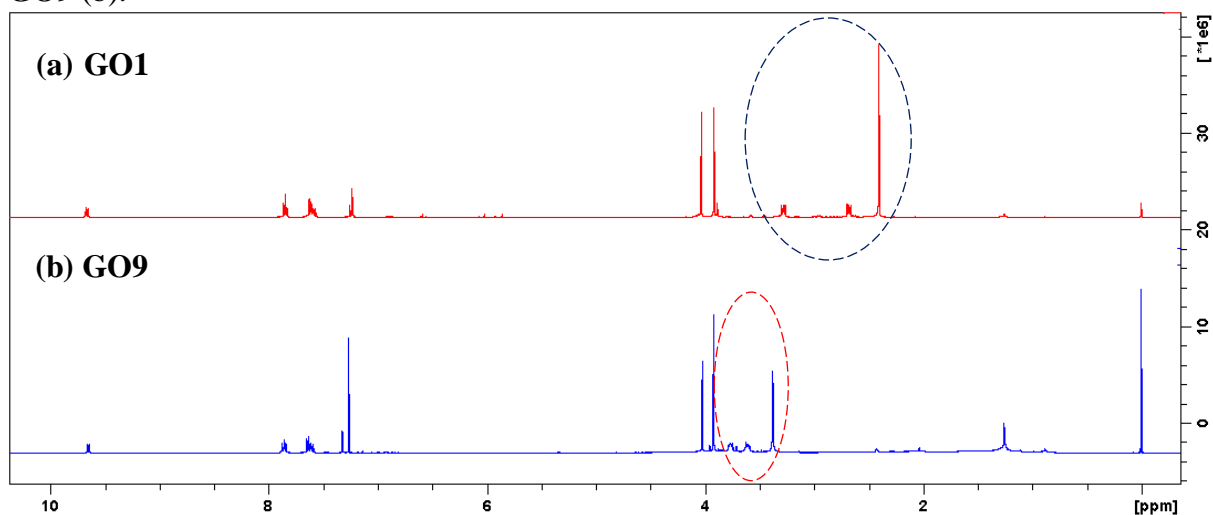
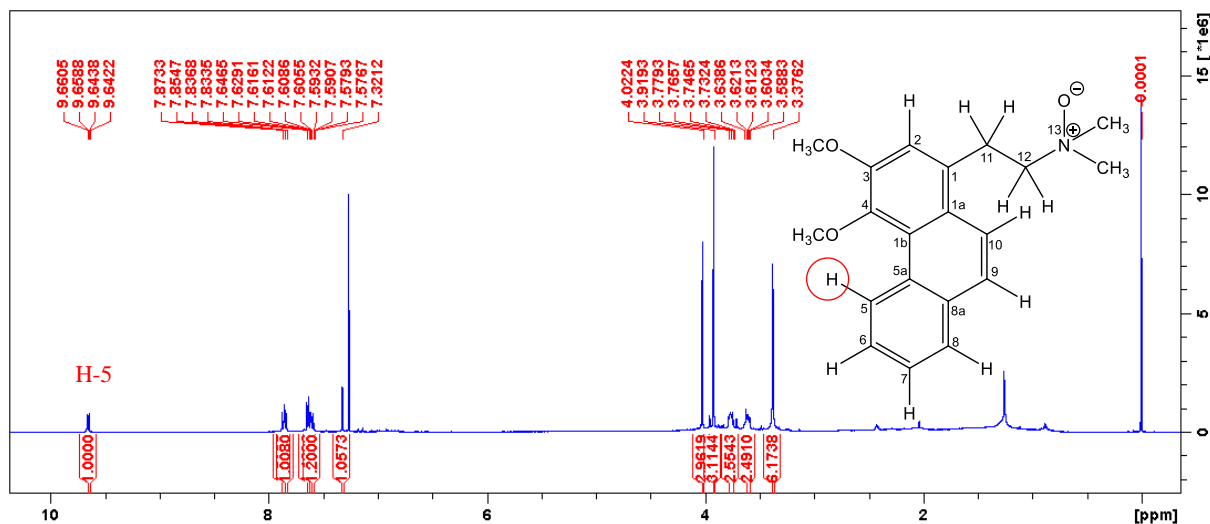
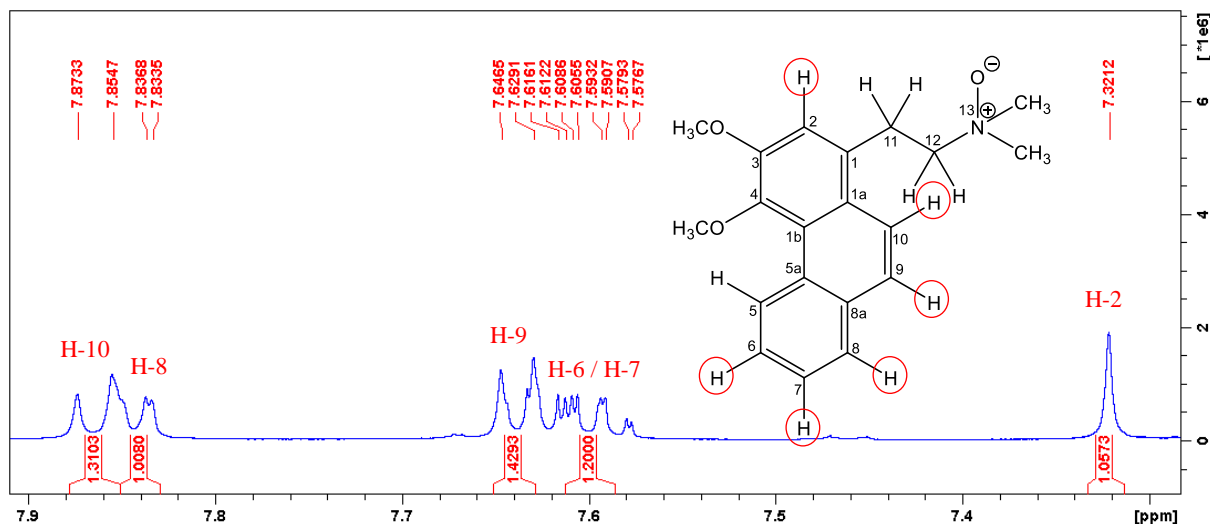


FIGURA 40: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO9**.



Assim como observado em **GO1**, foi possível evidenciar a presença de sinais na região dos hidrogênios aromáticos com deslocamento entre δ 9,65 - 7,32, sendo três em δ 9,65 (1H, *ddd*, $J = 8,3, 1,3$ e $0,6$ Hz), δ 7,60 (2H, *m*) e δ 7,84 (1H, *dd*, $J = 8,0$ e $1,6$ Hz) referentes aos hidrogênios aromáticos H-5, H-6/H-7 e H-8, respectivamente do anel C não substituído, dois em δ 7,63 (1H, *d*, $J = 9,3$ Hz) e δ 7,86 (1H, *d*, $J = 9,3$ Hz), típicos das posições H-9 e H-10, e um sinal em δ 7,32 (1H, *s*), característico de H-2 do anel A do sistema fenantreno substituído (FIGURA 40 e 41).

FIGURA 41: Ampliação da região aromática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO9**.



Observou-se ainda dois multipletos em δ 3,76 (2H, *m*) e δ 3,60 (2H, *m*) correlacionando-se com os carbonos em δ 27,9 e δ 71,0 no mapa de correlação HSQC (FIGURA 42 e 43) característicos das posições C-11 e C-12 da cadeia etilamina em fenantrenos, bem como a presença de um simpleto com integração para seis hidrogênios em δ 3,37 (6H, *s*) ligados aos carbonos de sinal δ 58,5 referentes ao grupo dimetil *N*-óxido [12-*N*⁺(CH₃)₂O⁻].

FIGURA 42: Mapa de correlação HSQC (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz; CDCl₃) de **GO9**.

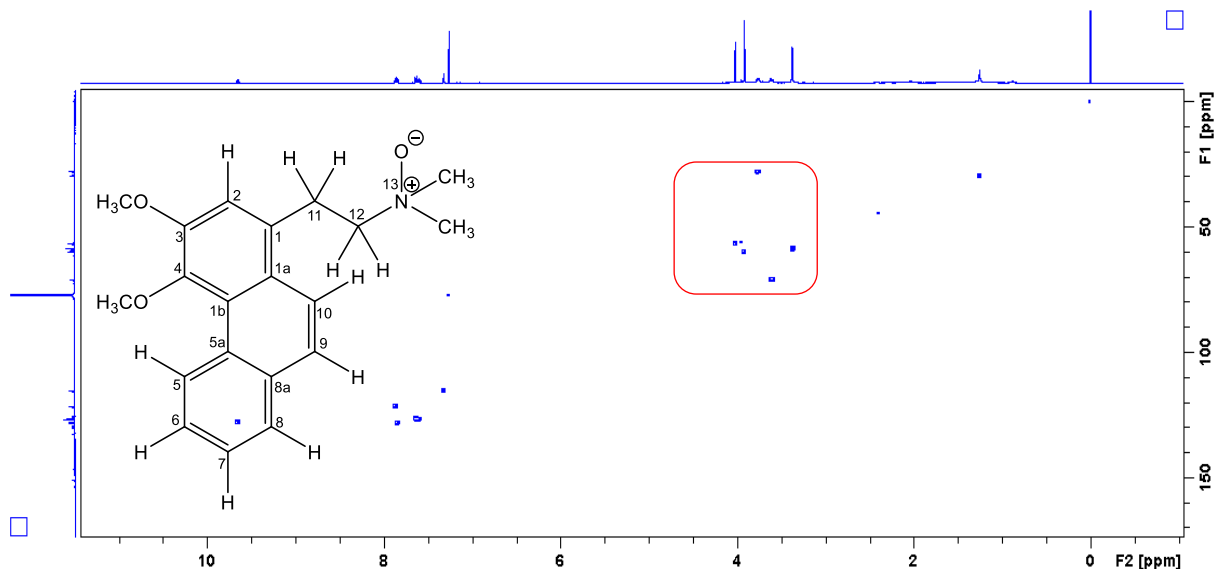
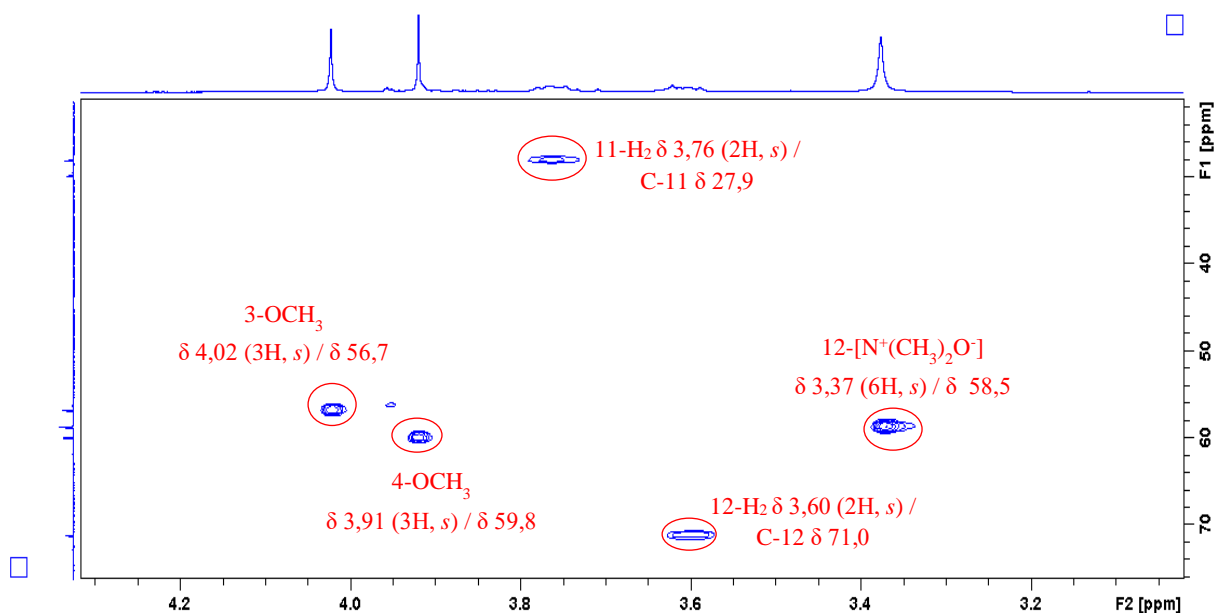


FIGURA 43: Ampliação do mapa de correlação HSQC (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz; CDCl₃) de **GO9**.



Também foi possível evidenciar a presença de dois simpletos em δ 3,91 (3H, *s*) e δ 4,02 (3H, *s*) correlacionados aos carbonos em δ 59,8 e δ 56,7 no mapa de correlação HSQC (FIGURA 43) sugerindo a presença de dois grupos metoxílicos no anel A. A correta atribuição desses grupos foi estabelecida de acordo com os mapas de correlação HSQC (FIGURA 43) e HMBC (FIGURA 44 e 45). Onde observou-se que o sinal do hidrogênio em δ 7,32 (1H, *s*, H-2) apresentou correlação a J^3 com o sinal do carbono em δ 146,6, portador do grupo metoxílico em δ 3,91 (carbono δ 59,8) e a J^2 com o sinal em do carbono em δ 151,0, portador do grupo metoxílico δ 4,02 (carbono δ 56,7), estabelecendo assim os grupos metoxílicos substituídos em C-4 e C-3, respectivamente (FIGURA 45).

FIGURA 44: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO9**.

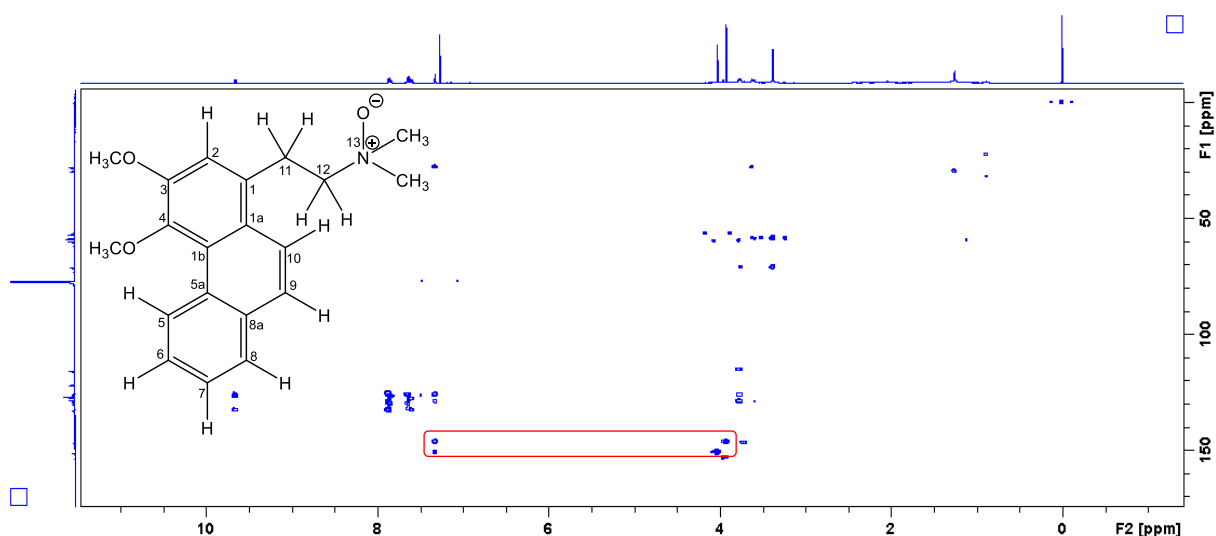
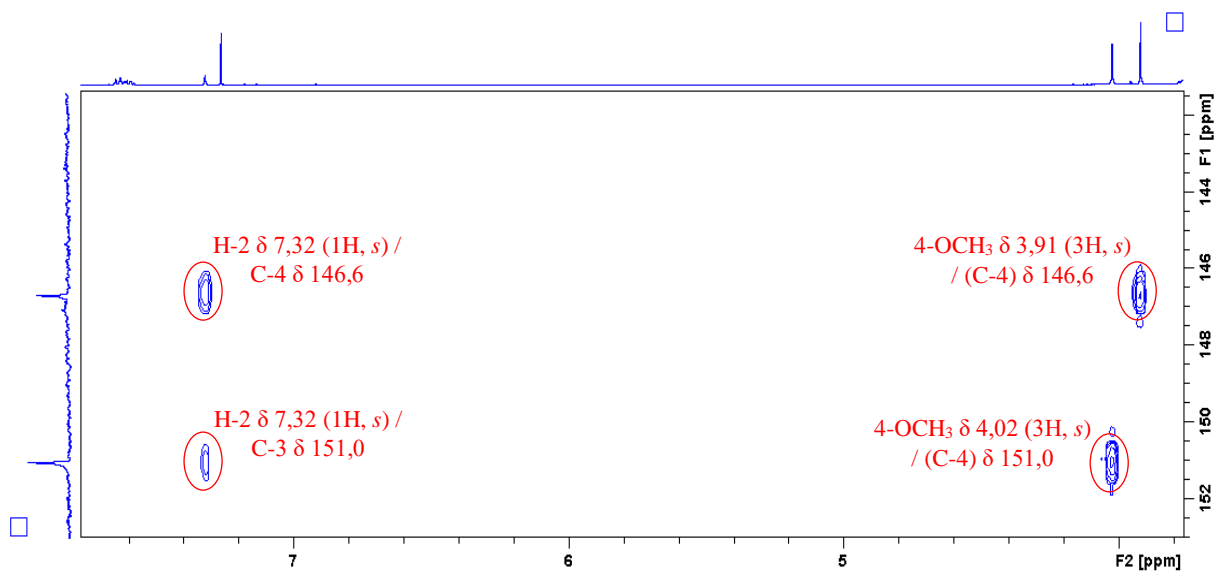


FIGURA 45: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO9**.



Pela análise de RMN ^1H e ^{13}C 1D/2D pôde-se atribuir os corretamente todos os sinais de hidrogênios e carbonos de **GO9** bem como suas respectivas correlações (FIGURA 46, TABELA 16), elucidando-o como sendo um alcaloide do tipo fenatreno denominado *N*-óxido de atherosperminina, que embora já tenha sido relatado no gênero, não apresenta dados completos de RMN na literatura, sendo assim, os dados apresentados aqui auxiliarão novas pesquisas na identificação desse composto.

FIGURA 46: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO9**.

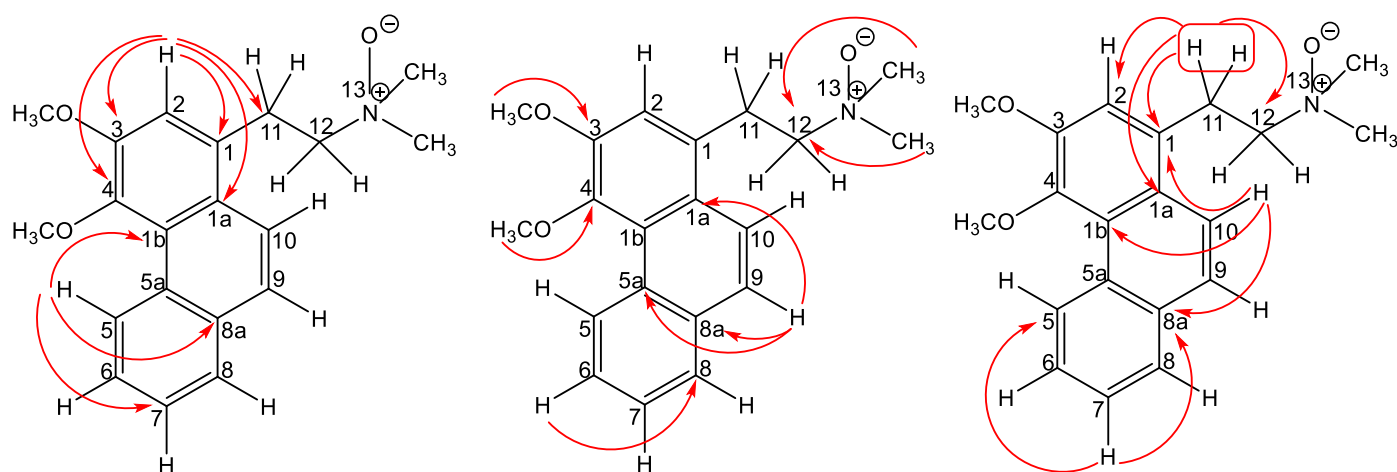


TABELA 16: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO9.

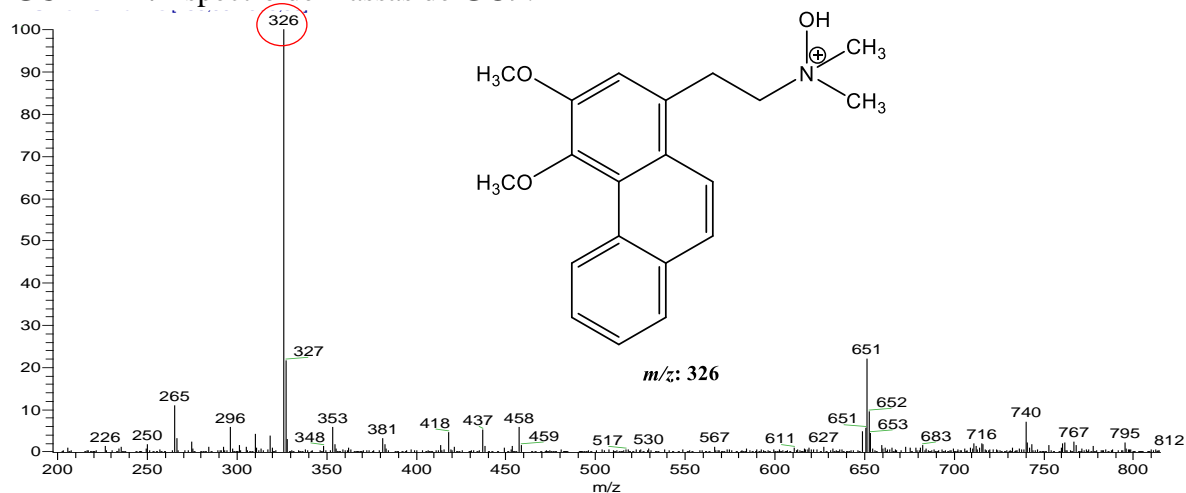
Posição	GO9			N-óxido de atherosperminina
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., J em Hz) ^d
1	-	129,3 C	-	-
1a	-	126,1 C	-	-
1b	-	125,4 C	-	-
2	7,32 (1H, <i>s</i>)	115,4 CH	1aF, 1f, 3f, 4F e 11	7,33 (1H, <i>s</i>)
3	-	151,0 C	-	-
4	-	146,6 C	-	-
5	9,65 (1H, <i>ddd</i> , 8,3, 1,3 e 0,6)	128,0 CH	1b, 7 e 8a	9,61 (1H, <i>m</i>)
5a	-	130,0 C	-	-
6	7,60 (2H, <i>m</i>)	126,8 CH	5a e 8	8,30 até 7,48 (5H, <i>m</i>)
7	7,60 (2H, <i>m</i>)	126,8 CH	5 e 8a	
8	7,84 (1H, <i>dd</i> , 8,0 e 1,6)	128,2 CH	6 e 5a	
8a	-	132,7 C	-	
9	7,63 (1H, <i>d</i> , 9,3)	126,5 CH	1a, 5a e 8a	
10	7,86 (1H, <i>d</i> , 9,3)	121,6 CH	1b, 1 e 8a	
11	3,76 (2H, <i>m</i>)	27,9 CH ₂	1, 1a, 2 e 12	3,70 (4H, <i>s</i>)
12	3,60 (2H, <i>m</i>)	71,0 CH ₂	1, 11 e 13	
13-NO(CH ₃) ₂	3,37 (6H, <i>s</i>)	58,5 (CH ₃) ₂	12 e 13	3,38 (6H, <i>s</i>)
3-OCH ₃	4,02 (3H, <i>s</i>)	56,7 (CH ₃)	3	4,07 (3H, <i>s</i>)
4-OCH ₃	3,91 (3H, <i>s</i>)	59,8 (CH ₃)	4	ou 3,97 (3H, <i>s</i>)

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

^bMultiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C (ANEXO-E3 e E4), HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^dHOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1984 (^1H : 60 MHz, CDCl_3); (δ) Deslocamentos em ppm.

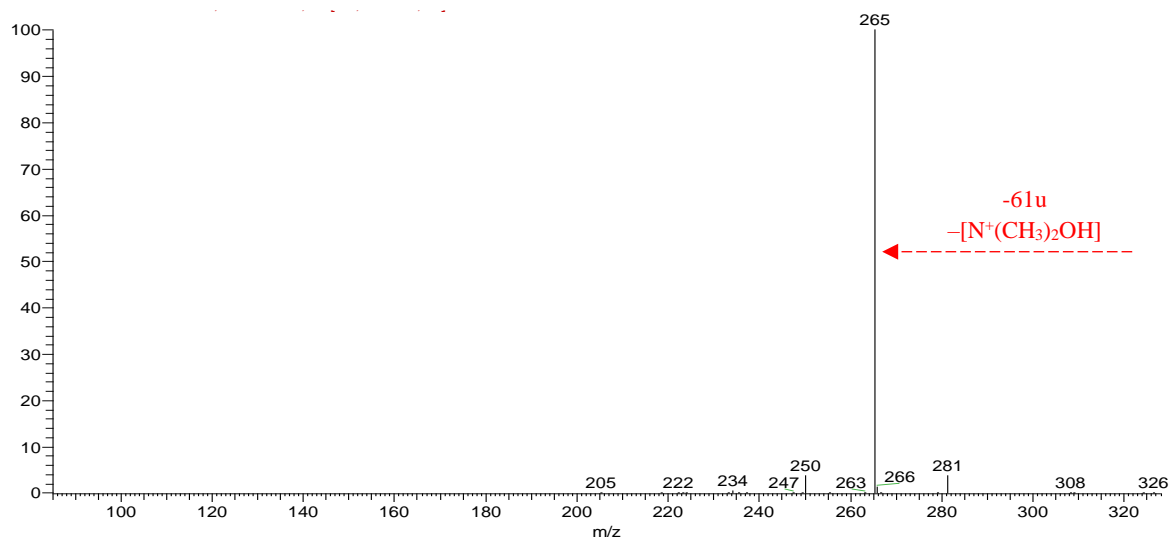
Por meio da análise de espectrometria de massas (FIGURA 47), obtida através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou-se uma molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 326 Da, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_3$.

FIGURA 47: Espectro de massas de GO9.



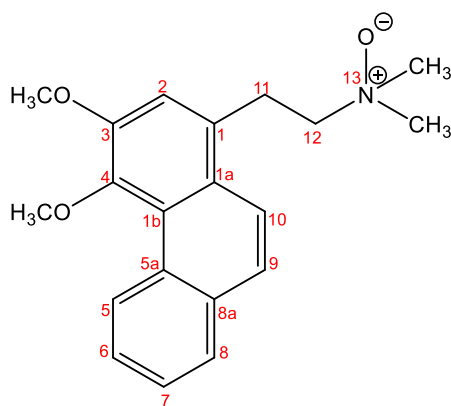
Quando submetido à fragmentação, foi possível observar uma perda de 61 u, diferenciando-se do observado para os alcaloides em **GO1** e **GO8**, com a formação do íon fragmento de m/z 265, coerente com a perda do grupo $-[N^+(CH_3)_2OH]$ (-61 u), com isso, pôde-se confirmar o grupo *N*-óxido atribuído a estrutura, corroborando com os dados obtidos por RMN (FIGURA 48 e 50).

FIGURA 48: Perfil de fragmentações de **GO9**.



Pelas análises de RMN de 1H e ^{13}C 1D/2D e EM, bem como comparação com os dados da literatura (HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1984), foi possível elucidar a substância **GO9** como sendo o alcaloide fenatreno *N*-óxido de atherosperminina (FIGURA 49).

FIGURA 49: Estrutura do alcaloide *N*-óxido de atherosperminina.



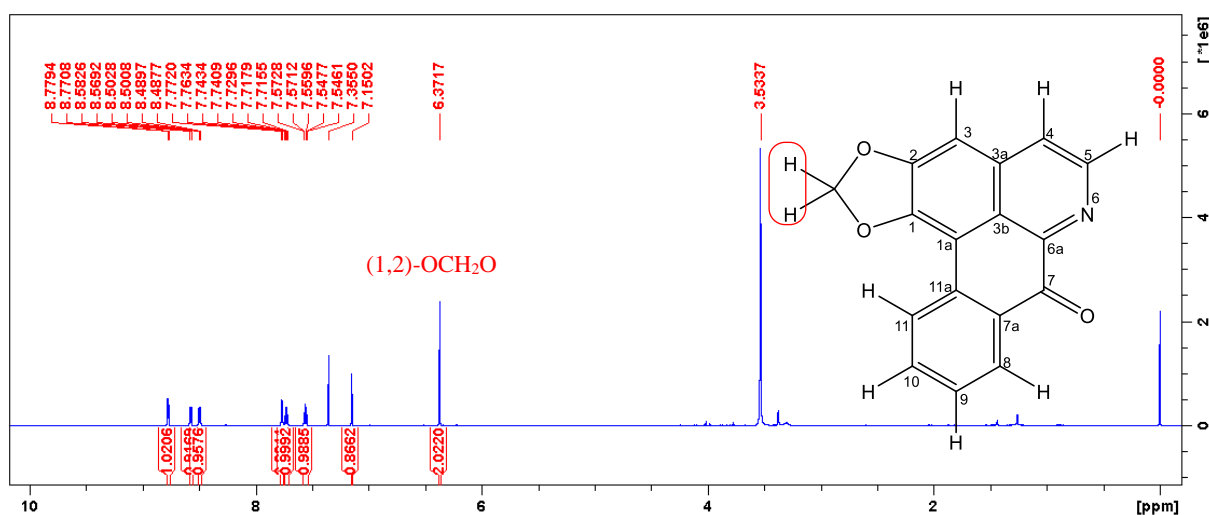
5.1.2. Identificação estrutural dos alcaloides do tipo oxoaporfino

5.1.2.1. Identificação estrutural de GO2

A substância **GO2** apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarelada de massa igual a 9,5 mg. A análise por CCDA apresentou teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

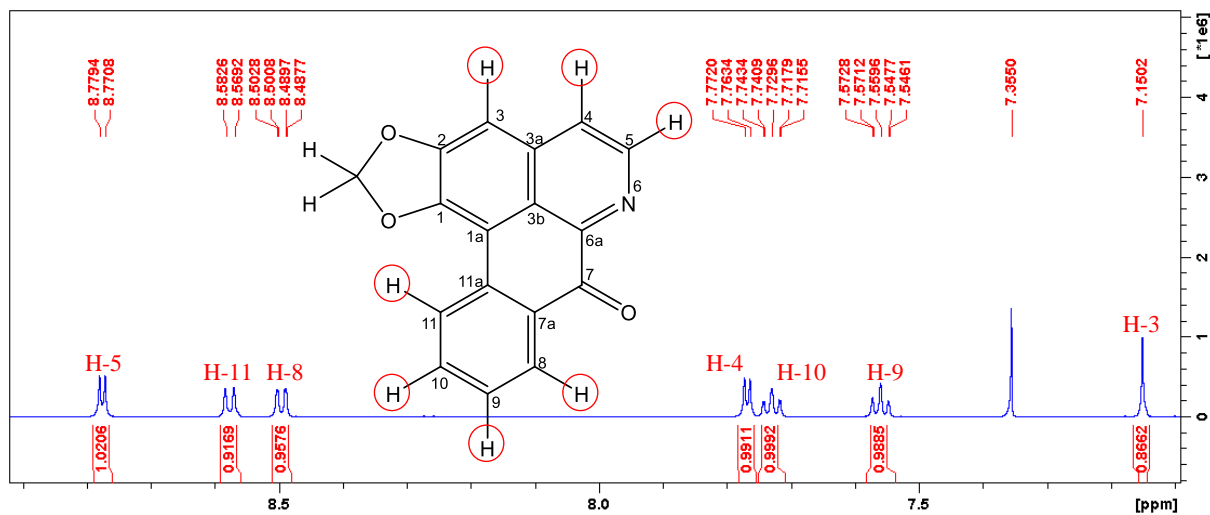
Pela análise do espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) (FIGURA 51) foram observadas características de um alcaloide do tipo oxoaporfino disubstituído (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994). Verificou-se a presença de sete sinais na região de hidrogênios aromáticos com integração para um hidrogênio cada, incluindo um sinal em δ 6,37 (2H, *s*, OCH_2O) típico de grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 (ORTIZ; SUAREZ; PATIÑO, 2007).

FIGURA 51: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **GO2**.



Quatro sinais observados em δ 8,57 (1H, *d*, $J = 8,1\text{Hz}$), δ 7,72 (1H, *ddd*, $J = 8,1, 7,0$ e $1,4\text{ Hz}$), δ 7,55 (1H, *m*, $J = 7,8, 7,0$ e $1,0\text{ Hz}$) e δ 8,49 (1H, *dd*, $J = 7,8$ e $1,4\text{ Hz}$) foram atribuídos aos hidrogênios H-11, H-10, H-9 e H-8 respectivamente, cujas multiplicidades são coerentes com ausência de substituição do anel D e um sinal em δ 7,15 (1H, *s*) foi atribuído a H-3 sendo este típico do anel A do sistema oxoaporfino dissubstituído. Os dois sinais remanescentes observados em δ 8,77 e δ 7,76 ambos dupletos ($J = 5,1\text{ Hz}$) mostraram características de um sistema piridínico compatível com o anel B do sistema oxoaporfino, referentes aos hidrogênios H-5 e H-4, respectivamente (FIGURA 52).

FIGURA 52: Ampliação da região aromática no espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **G02**.



Pela análise dos mapas de correlação HSQC (FIGURA 53) e HMBC (FIGURA 54), observou-se a presença de 17 carbonos sendo 15 aromáticos entre δ 152,1 - 103,3, um carbonílico em δ 182,6 (C-7) evidenciando a presença do esqueleto oxoaporfino na estrutura e um sinal em δ 102,8 típico de grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 (FIGURA 53 - 55) (ORTIZ; SUAREZ; PATIÑO, 2007).

FIGURA 53: Mapa de correlação HSQC (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **G02**.

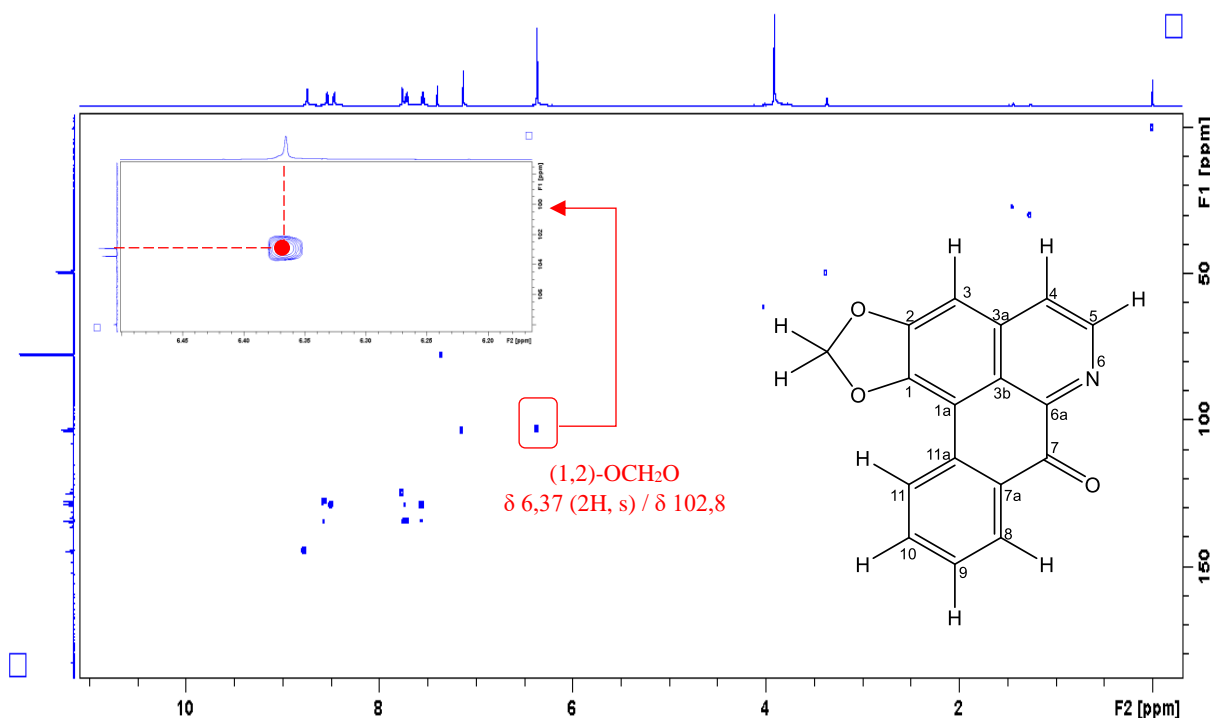
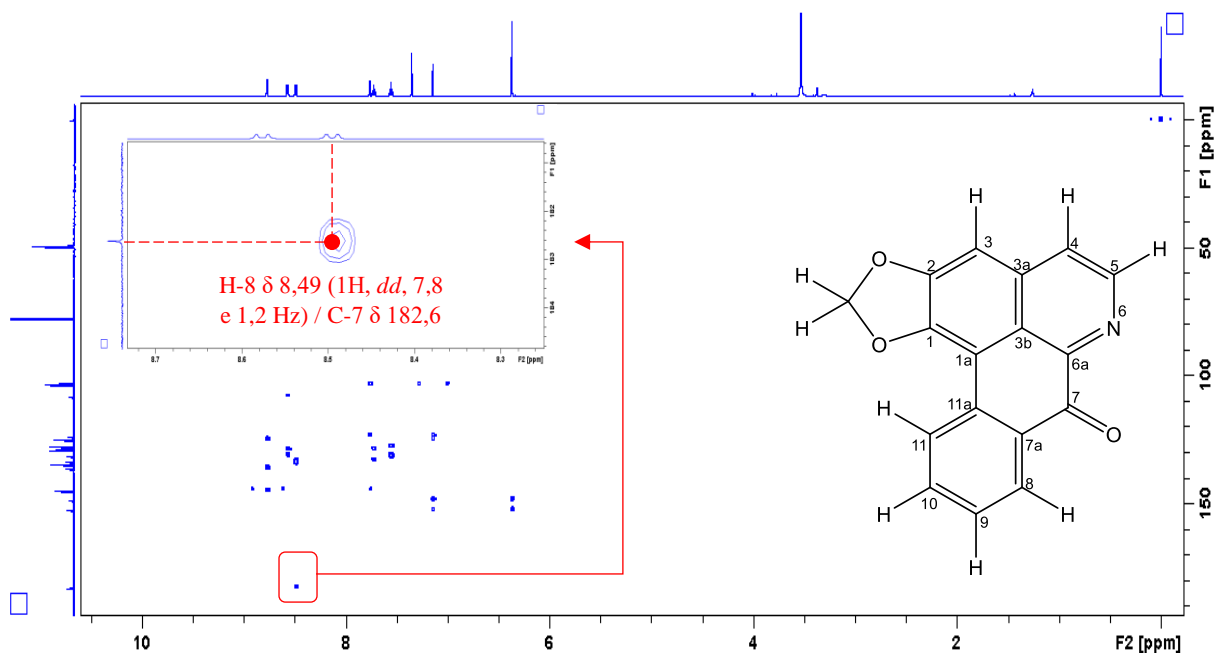


FIGURA 54: Mapa de correlação HMBC (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **GO2**.



Ainda pelo mapa de correlação HMBC, o grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 foi confirmado devido à correlação no mapa de contorno HMBC do seu respectivo sinal em δ 6,37 a J^3 com os sinais dos carbonos em δ 148,4 e δ 152,1. As corretas atribuições de C-1 e C-2 foram definidas também através do mesmo experimento, devido à correlação do sinal em δ 7,15 (H-3) a J^3 com o sinal do carbono em δ 148,4 e a J^2 com o sinal do carbono em δ 152,1, definindo-os assim em C-1 e C-2, respectivamente (FIGURA 55), as demais correlações observadas são mostradas na FIGURA 56.

FIGURA 55: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 600 MHz, ^{13}C : 150 MHz, CDCl_3 + gotas de CD_3OD) de **GO2**.

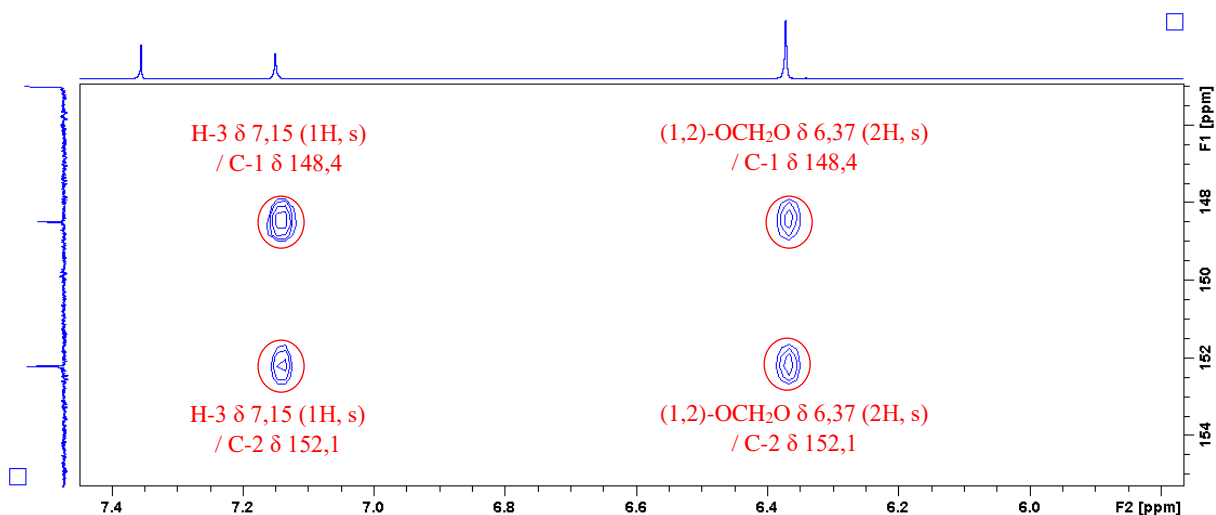
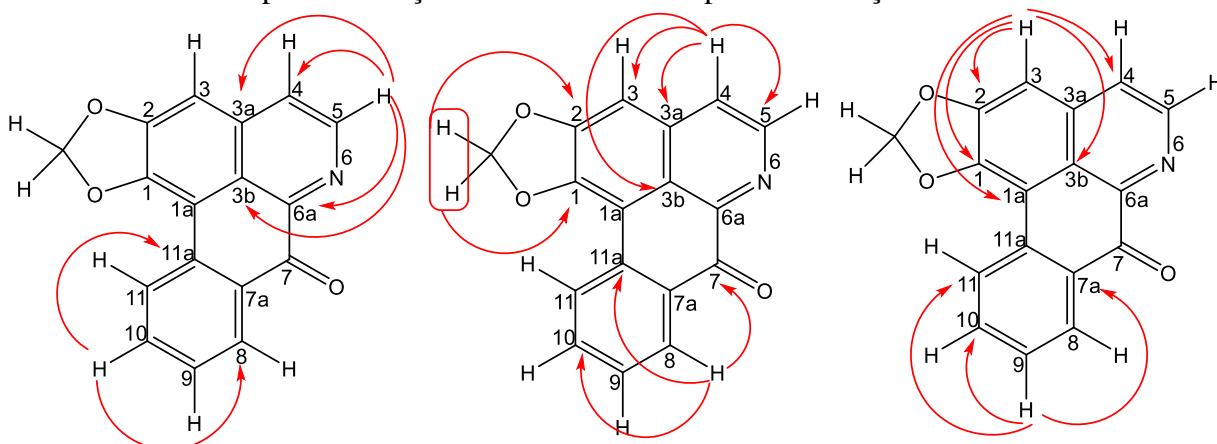


FIGURA 56: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO2**.



Na TABELA 17 são apresentados os corretos valores de ^1H e ^{13}C de **GO5** atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC, e comparações com os dados da literatura consistindo com os dados do alcaloide oxoaporfino conhecido como lirioidenina.

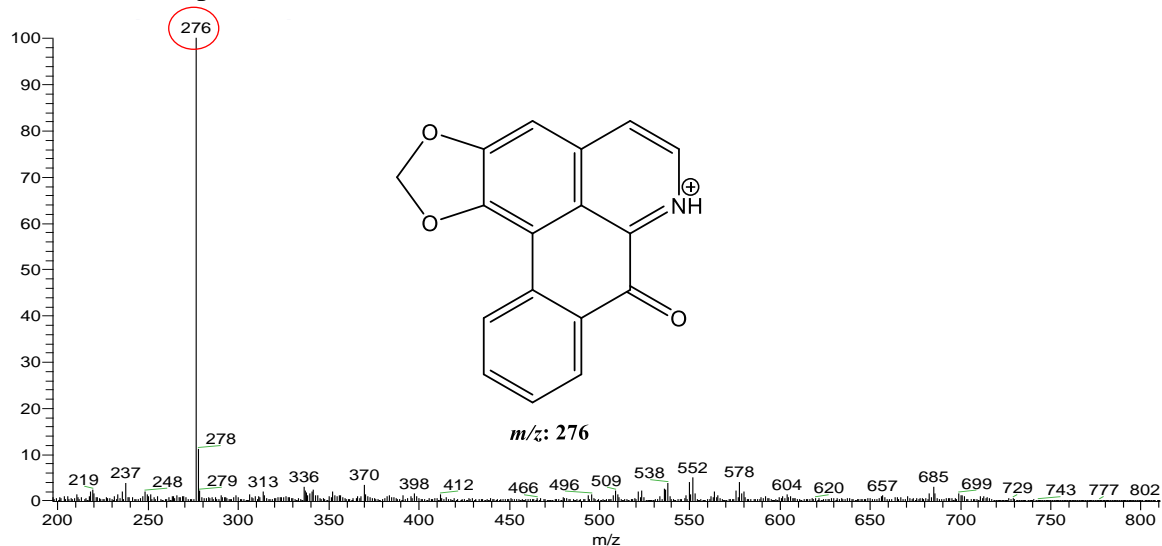
TABELA 17: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **GO2**.

Posição	GO2			Lirioidenina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., J em Hz) ^d	^{13}C (δ) ^e
1	-	148,4 C	-	-	147,9 C
1a	-	107,9 C	-	-	107,9 C
2	-	152,1 C	-	-	151,6 C
3	7,15 (1H, s)	103,3 CH	1, 1af, 2f, 3b e 4	7,16 (1H, s)	103,2 CH
3a	-	136,1 C	-	-	135,7 C
3b	-	123,3, C	-	-	123,1 C
4	7,76 (1H, d, 5,1)	124,7 CH	3, 3af, 3b e 5	7,75 (1H, d, 5,2)	124,3 CH
5	8,77 (1H, d, 5,1)	144,4 CH	3a, 3bf, 4 e 6a	8,87 (1H, d, 5,2)	144,7 CH
6a	-	144,9 C	-	-	145,3 C
7	-	182,6 CO	-	-	182,5 CO
7a	-	131,1 C	-	-	131,2 C
8	8,49 (1H, dd, 7,8 e 1,4)	128,7 CH	7, 10 e 11a	8,57 (1H, ddd, 7,9; 1,4 e 0,5)	128,8 CH
9	7,55 (1H, ddd, 7,8; 7,0 e 1,0)	128,6 CH	7a, 8, 10 e 11	7,56 (1H, ddd, 7,9; 7,4 e 1,0)	128,5 CH
10	7,72 (1H, ddd, 8,1; 7,0 e 1,4)	134,2 CH	8, 9, 11 e 11a	7,73 (1H, ddd, 8,1; 7,4 e 1,4)	133,8 CH
11	8,57 (1H, d, 8,1)	127,5 CH	1a, 7a e 9	8,61 (1H, ddd, 8,1; 1,0 e 0,5)	127,3 CH
11a	-	133,0 C	-	-	132,8 C
(1,2)-OCH₂O	6,37 (2H, s)	102,8 CH ₂	1 e 2	6,37 (2H, s)	102,4 CH ₂

^aExperimento realizado a 600 MHz para ^1H e 150 MHz para ^{13}C em CDCl_3 + gotas de CD_3OD , utilizando o TMS como padrão interno; ^bMultiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C (ANEXO-E5 e E6), HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^dCOSTA *et al.*, 2011b (^1H : 400 MHz, CDCl_3); COSTA, 2009a (^{13}C : 100 MHz; CDCl_3); (δ) Deslocamentos em ppm.

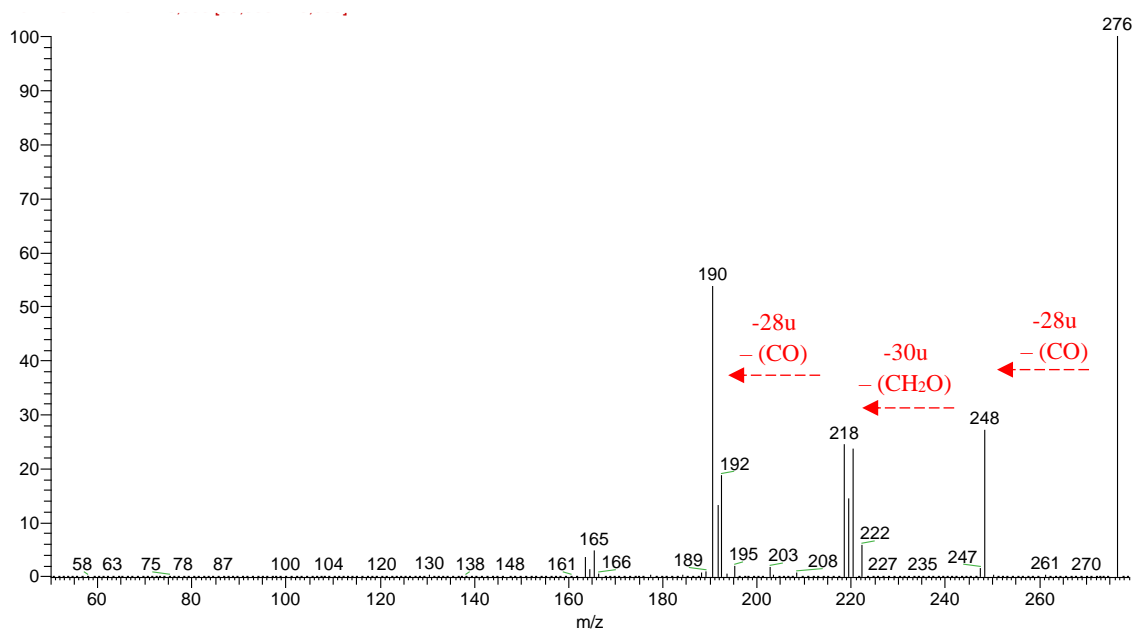
A análise por espectrometria de massas (FIGURA 57), obtida através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada $[M+H]^+$ com m/z 276 Da, compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_9NO_3$.

FIGURA 57: Espectro de massas de **GO2**.



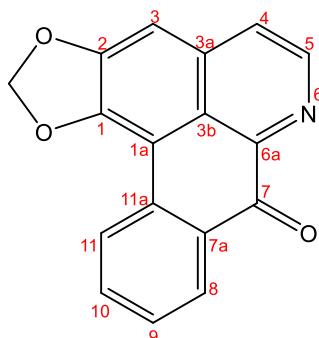
Quando submetido à fragmentação este íon com m/z 276 Da apresentou uma perda inicial de -28 u (-CO) indicando uma quebra na carbonila do sistema oxoaporfino e perdas posteriores de -30 u e -28 u possibilitadas pela deslocalização dos elétrons π através dos anéis A e B devido a ruptura da ponte de dióxido de metileno (FIGURA 58 e 66), estando de acordo com o perfil de fragmentação observado para o alcaloide liriodenina, conforme analisado por Silva *et al.* (2017), corroborando assim com os dados obtidos pelas análises de RMN

FIGURA 58: Perfil de fragmentações de **GO2**.



Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D, EM e comparação com os dados descritos na literatura (COSTA *et al.*, 2011b; COSTA, 2009a), foi possível identificar **GO2** como sendo o alcaloide oxoaporfino conhecido como **liriodenina** (FIGURA 59). Este alcaloide é bastante distribuído na família Annonaceae sendo encontrado praticamente em quase todos os gêneros já estudados (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

FIGURA 59: Estrutura do alcaloide liriodenina.



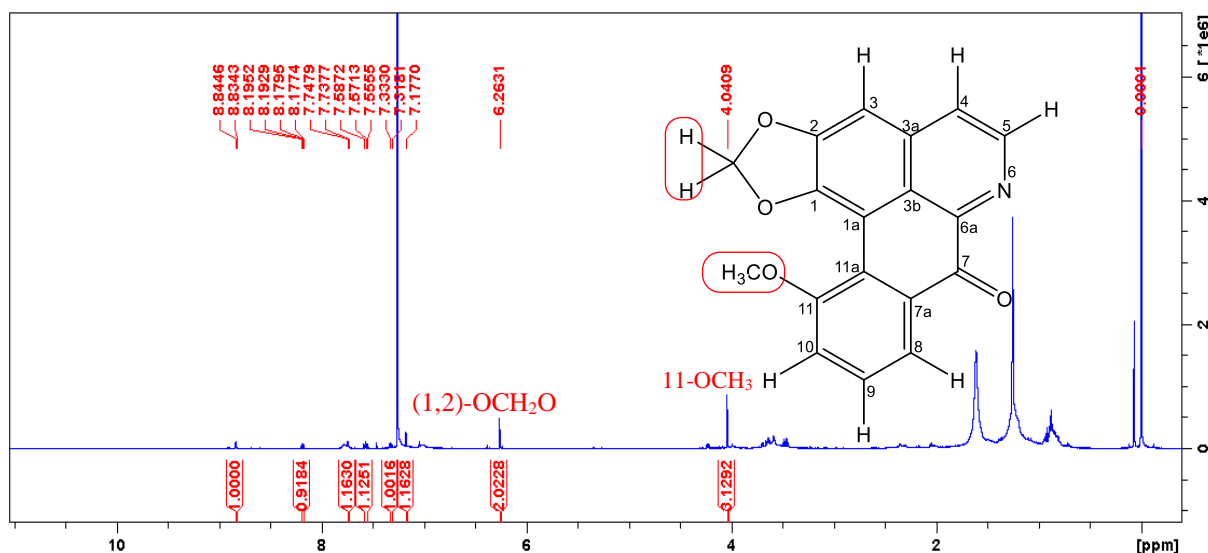
5.1.2.2. Identificação estrutural de GO5

A substância **GO5** apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarelada de massa igual a 1,5 mg. A análise por CCDA evidenciou teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

Pela análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 60) foram observadas características comuns quando comparado com os dados espectrais de **GO2**, diferenciando desta pela ausência de um dos sinais de hidrogênios aromáticos, verificando-se dessa forma seis sinais entre δ 8,83 - 7,17, bem como a presença de um sinal em δ 4,04 (3H, s) característico de grupo metoxílico, nos fazendo sugerir que **GO5** tratava-se de um alcaloide oxoaporfino análogo à **GO2** substituído por um grupo oxigenado.

A comparação direta com os dados de **GO2** indicaram o grupo metoxílico substituído no anel D em **GO5**, o qual pôde ser confirmado com base nos dados disponíveis na literatura (FIGURA 60; TABELA 18) (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

FIGURA 60: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO5**.



Na região aromática entre δ 8,83 - 7,17 observaram-se a presença de seis sinais com integração para um hidrogênio cada, sendo dois em δ 7,74 (1H, *d*) e 8,83 (1H, *d*) com constantes de acoplamento (*J*) igual a 5,1 Hz, característico dos hidrogênios α e β do anel piridínico em H-4 e H-5, respectivamente, típicos do anel B nos alcaloides oxoaporfinos (FIGURA 61).

A presença de sinais correspondentes a três hidrogênios aromáticos em δ 7,32 (1H, *dd*, *J* = 8,0 e 1,0 Hz), δ 7,57 (1H, *t*, *J* = 8,0 Hz) δ 8,18 (1H, *dd*, *J* = 7,7 e 1,0 Hz), característicos de H-10, H-9 e H-8 respectivamente, além de um sinal de simpleto em δ 4,04 com integração para três hidrogênios (3H, *s*), sugeriu que o anel D seria substituído com um grupo metoxílico na posição C-11 (FIGURA 60 e 61), o qual foi confirmado com base no mapa de correlação COSY, onde foi observada a correlação entre os hidrogênios metínicos H-10/H-9 e H-9/H-8 (FIGURA 62), bem como a comparação com os dados disponíveis na literatura (TABELA 18).

Os sinais remanescentes foram observados em δ 6,26, sendo este um simpleto com integração para dois hidrogênios (2H, *s*, OCH_2O) indicando a presença de um grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 no anel A (ORTIZ; SUAREZ; PATIÑO, 2007), e um em δ 7,17 (1H, *s*) típico da posição H-3 em alcaloides oxoaporfinos (FIGURA 60 e 61). Esses dados sugeriram a presença de um derivado da liriodenina substituído com um grupo metoxila em C-11. (TABELA 18).

FIGURA 61: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO5**.

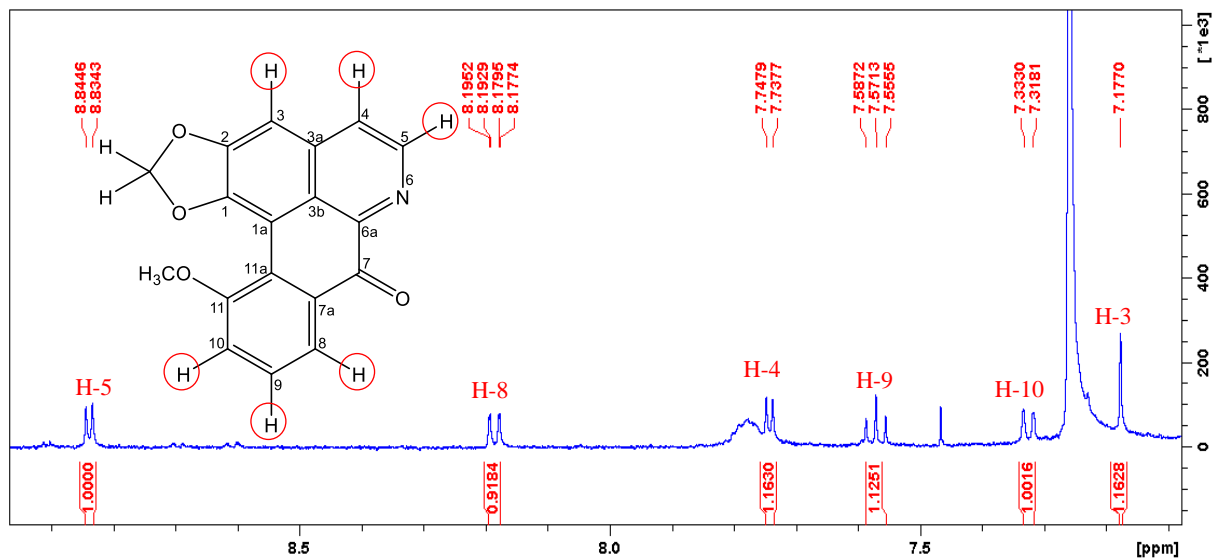
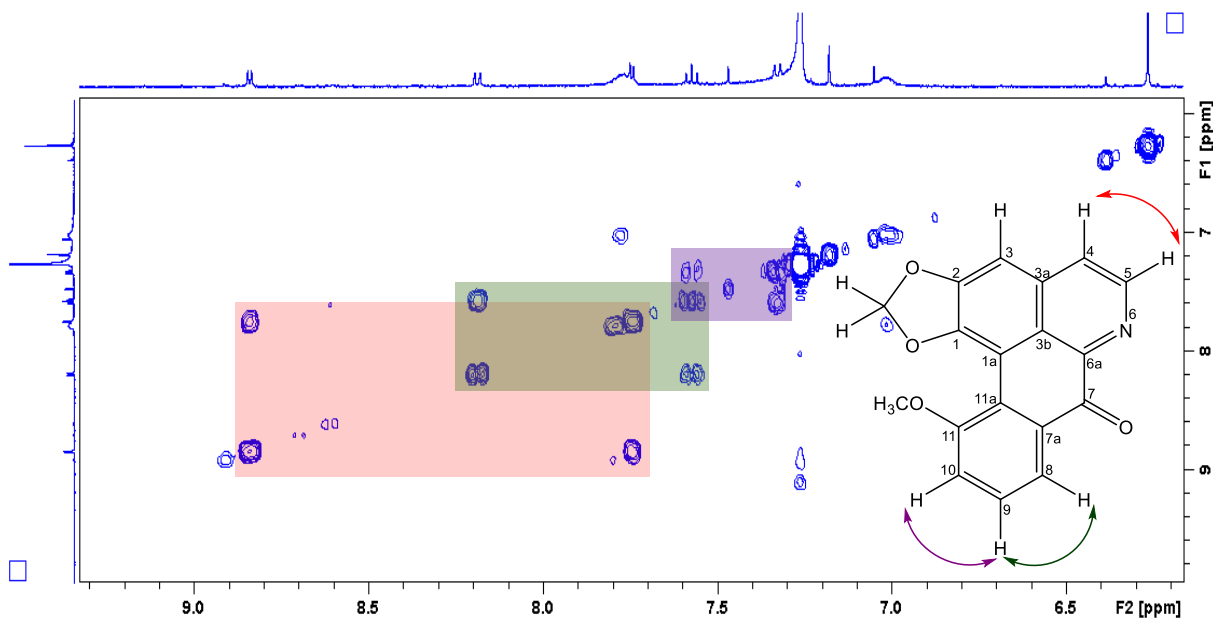


FIGURA 62: Mapa de correlação COSY ^1H - ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO5**.



Na TABELA 18 são apresentados os corretos valores de ^1H de **GO5** atribuídos de acordo com a análise do espectro de RMN de ^1H e mapa de contorno COSY, bem como nas comparações com os dados da literatura, consistindo nos dados do alcaloide oxoaporfino conhecido como **oxoputerina**.

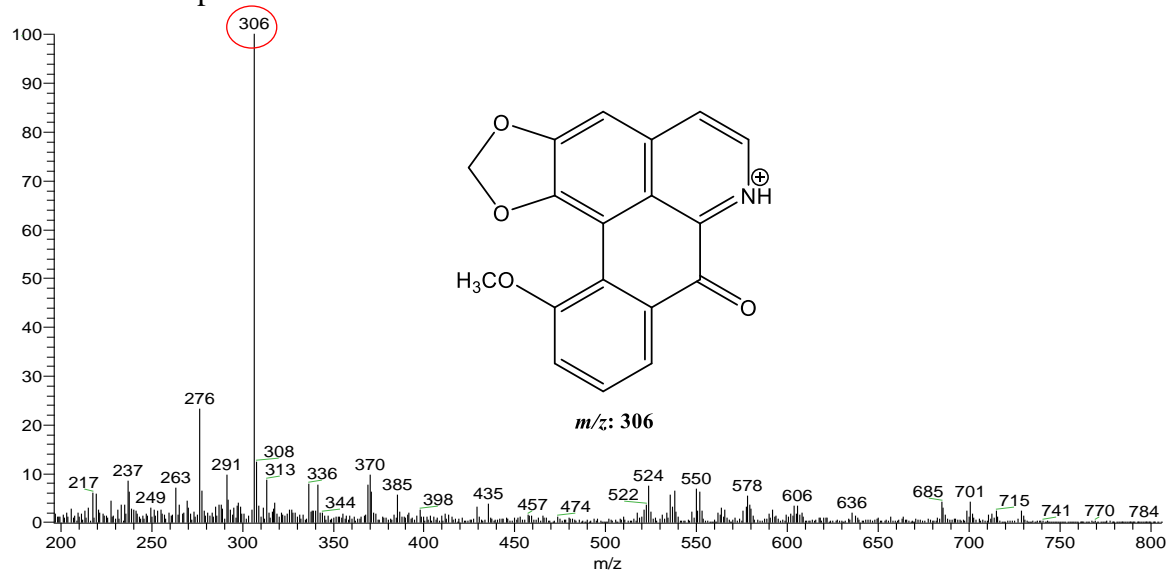
TABELA 18: Dados de RMN de ^1H de **GO5**.

Posição	GO5	Oxoputerina
	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz) ^b
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	7,17 (1H, <i>s</i>)	7,15 (1H, <i>s</i>)
3a	-	-
3b	-	-
4	7,74 (1H, <i>d</i> , 5,1)	7,73 (1H, <i>d</i> , 5,1)
5	8,83 (1H, <i>d</i> , 5,1)	8,83 (1H, <i>d</i> , 5,1)
6a	-	-
7	-	-
7a	-	-
8	8,18 (1H, <i>dd</i> , 7,7 e 1,0)	8,17 (1H, <i>dd</i> , 7,8 e 1,1)
9	7,57 (1H, <i>t</i> , 8,0)	7,55 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 7,8)
10	7,32 (1H, <i>dd</i> , 8,0 e 1,0)	7,30 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 1,1)
11	-	-
11a	-	-
11-OCH₃	4,04 (3H, <i>s</i>)	4,02 (3H, <i>s</i>)
(1,2)-OCH₂O	6,26 (2H, <i>s</i>)	6,26 (2H, <i>s</i>)

^aExperimento realizado a 500 MHz para ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno; ^bRABELO *et al.*, 2014 (^1H : 600 MHz, CDCl_3); (δ) Deslocamentos em ppm.

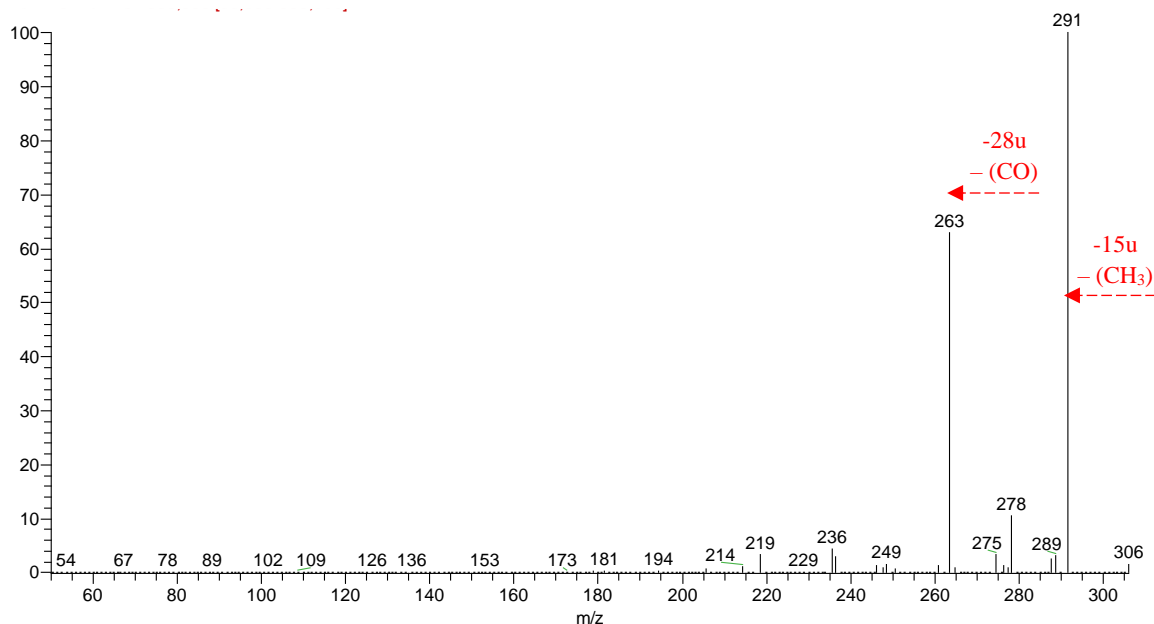
A análise por espectrometria de massas (FIGURA 63), utilizando a técnica de ionização por eletrospray operando no modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 306 Da compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{NO}_4$, corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 63: Espectro de massas de **GO5**.



Na análise da fragmentação do íon com m/z 306 Da observou-se a perda inicial de -15 u característica grupo metila e uma perda posterior de -28 u o que sugere a perda do grupo -CO da carbonila, confirmando o perfil de fragmentação para um alcaloide oxoaporfino, conforme os estudos realizados por Silva *et al.* (2017), onde é relatado que as perdas iniciais sejam referentes à saída dos seus grupos periféricos.

FIGURA 64: Perfil de fragmentações de **GO5**.



Pelas análises de RMN de ¹H, EM, e comparação com os dados da literatura (RABELO *et al.*, 2014), foi possível identificar a substância **GO5** como sendo o alcaloide oxoaporfino **oxoputerina** (FIGURA 65).

FIGURA 65: Estrutura do alcaloide oxoputerina.

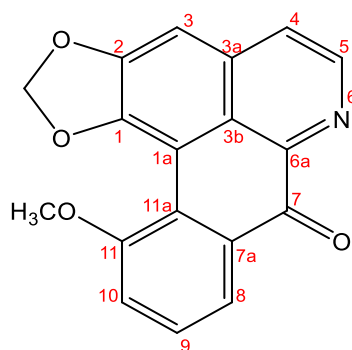
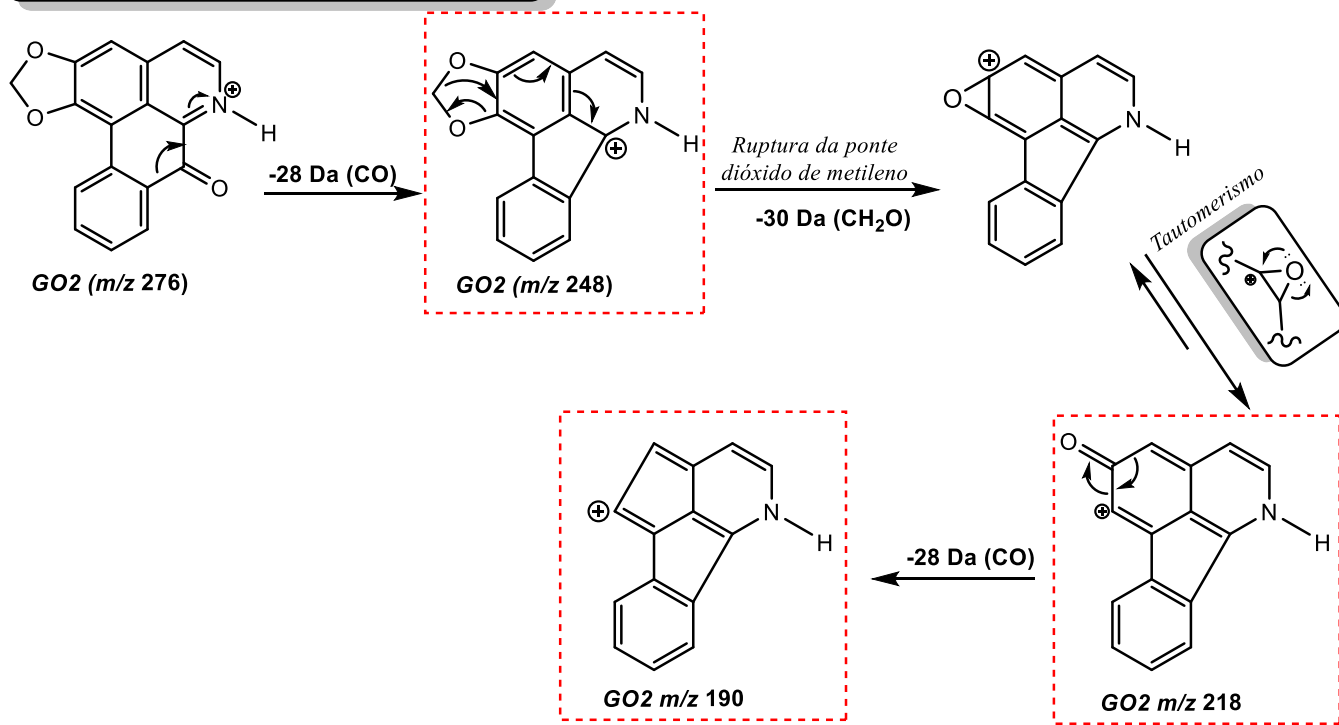
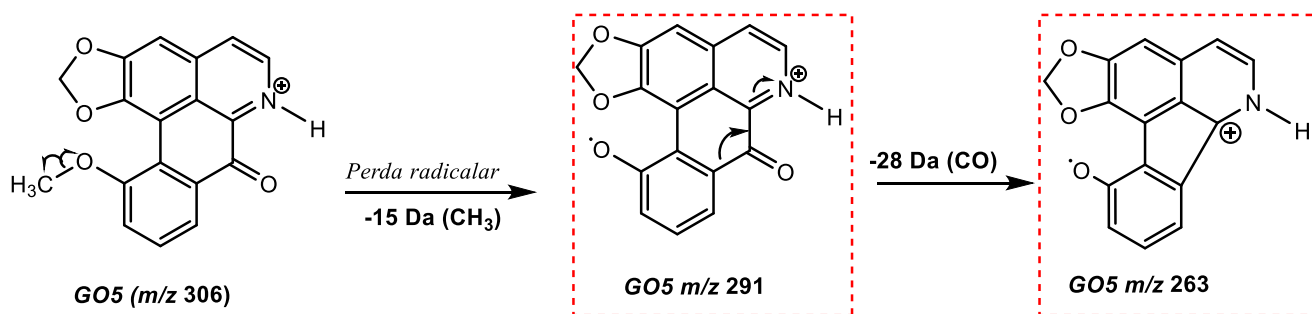


FIGURA 66: Proposta de fragmentação para alcaloides oxoaporfinos.

Oxoaporfinos não substituídos no anel D



Oxoaporfinos com substituição no anel D



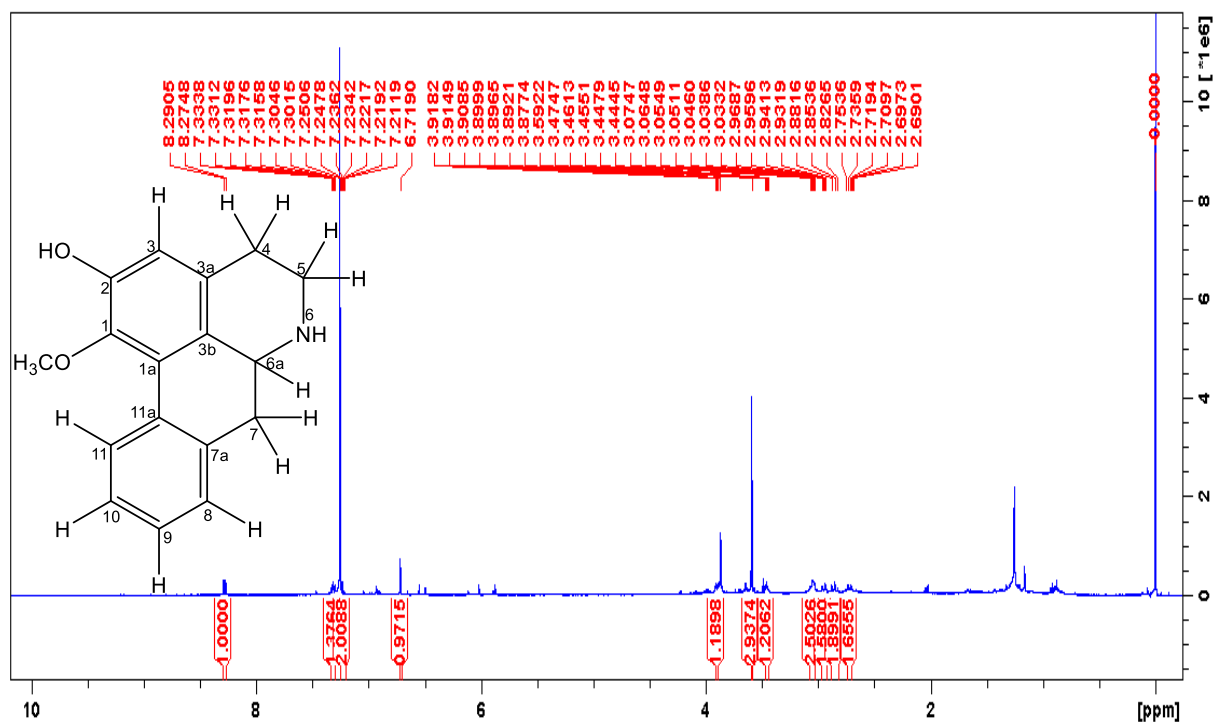
5.1.3. Identificação estrutural dos alcaloides do tipo aporfino *sensu stricto*

5.1.3.1. Identificação estrutural de GO3

A substância **GO3** apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarelada de massa igual a 1,9 mg. A análise por CCDA utilizando o reagente de Dragendorff evidenciou característica da presença de nitrogênio na molécula (coloração alaranjada).

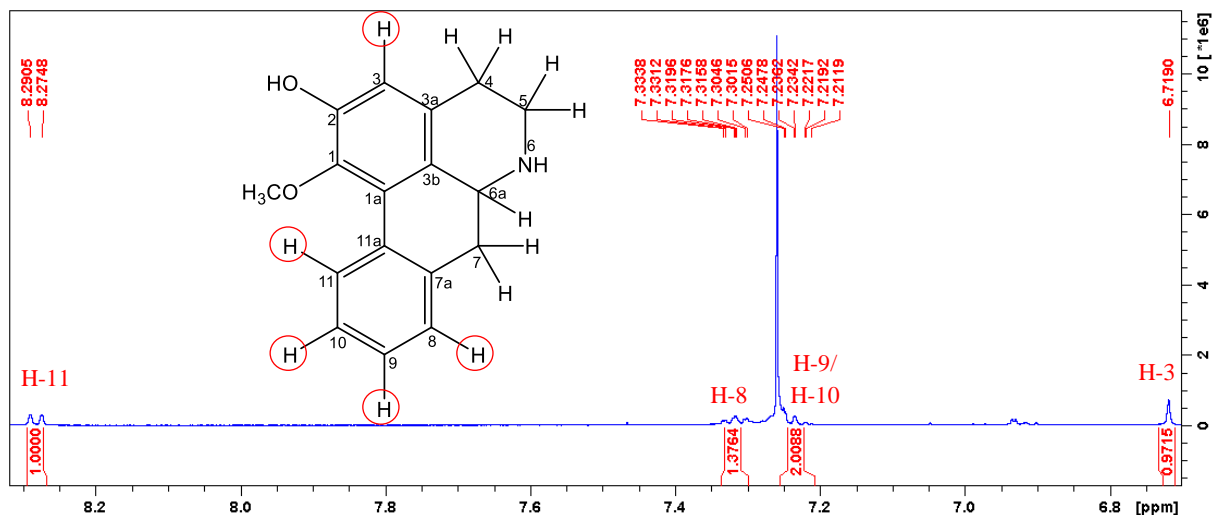
Através da análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 67) foi possível observar sinais característicos de um alcaloide do tipo aporfino *sensu stricto*, devido a presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos entre δ 8,28 - 6,72, metilênicos entre δ 3,46 - 2,72 e um metínico de acordo com GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994.

FIGURA 67: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO3**.



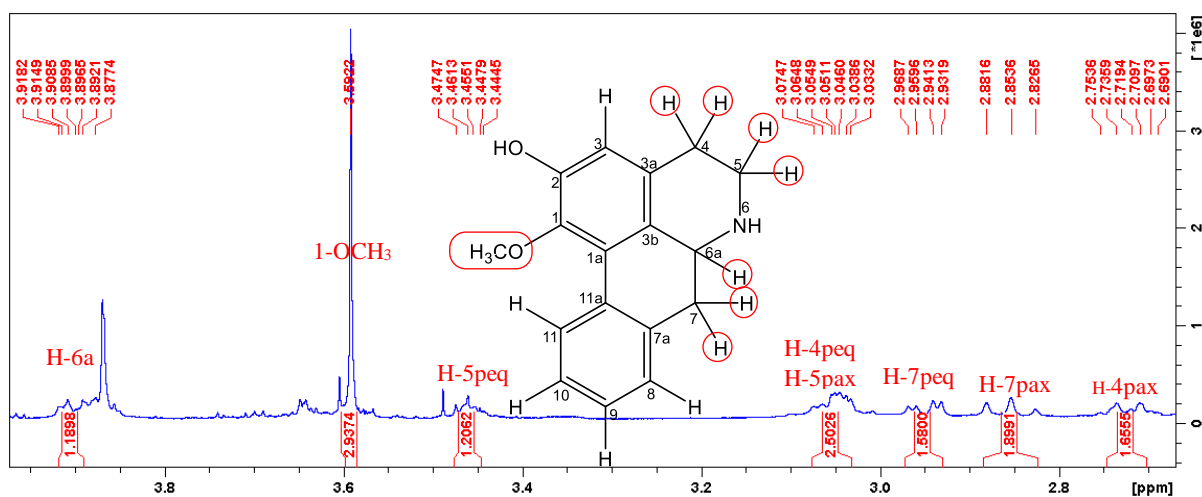
Na região dos hidrogênios aromáticos verificou-se a presença de quatro sinais, sendo três em δ 8,28 (1H, *d*, $J = 7,8$ Hz), δ 7,22 (2H, *m*) e δ 7,31 (1H, *m*) típicos dos hidrogênios H-11, H-9/H-10 e H-8, respectivamente, correlacionados à J^I com os sinais de carbonos em δ 127,4, δ 128,1, δ 127,8 e δ 127,3 atribuídos a (C-11), (C-10), (C-9) e (C-8) no anel D, além de um sinal observado em δ 6,72 (1H, *s*), característico de H-3 ligado ao carbono em δ 114,5 (C-3) típico do anel A do sistema aporfino dissustituído (FIGURA 68 e 71).

FIGURA 68: Ampliação da região aromática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO3**.



Pôde-se observar também a presença de hidrogênios diastereotópicos para três grupos metilênicos em δ 3,05 (2H, *m*), δ 2,72 (1H, *m*) e δ 3,46 (1H, *m*), típicos dos sinais de hidrogênios H-4peq/H-5pax, H-4pax e H-5peq, respectivamente, característicos do anel B do esqueleto aporfino, correlacionados a J^I com os sinais de carbonos em δ 28,1 (C-4), δ 42,7 (C-5). Os sinais para os hidrogênios H-7peq e H-7pax foram verificados em δ 2,95 (1H, *dd*, $J=13,7$ e 4,5 Hz) e δ 2,85 (1H, *t*, $J=13,7$ Hz) ligados ao carbono de sinal δ 36,5 (C-7), assim como o sinal de hidrogênio metínico em δ 3,90 (1H, *m*) referente a posição H-6a correlacionando-se diretamente com o sinal de carbono em δ 53,4 (C-6a) (FIGURA 69 e 72)

FIGURA 69: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO3**.



Pôde-se observar ainda a presença de um sinal com integração para três hidrogênios em δ 3,59 (3H, *s*), ligados ao carbono de sinal δ 60,5 (1-OCH₃) característico de um grupo metoxílico (FIGURA 69 e 72), que levantou a hipótese de que se teria uma estrutura em que o anel A seria dissubstituído, sendo o outro provável substituinte oxigenado, um grupo hidroxila, o qual foi confirmado com base nos dados da literatura e mapa de correlação HMBC (FIGURA 74) e (TABELA 19).

FIGURA 70: Mapa de correlação HSQC (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz; CDCl₃) de **GO3**.

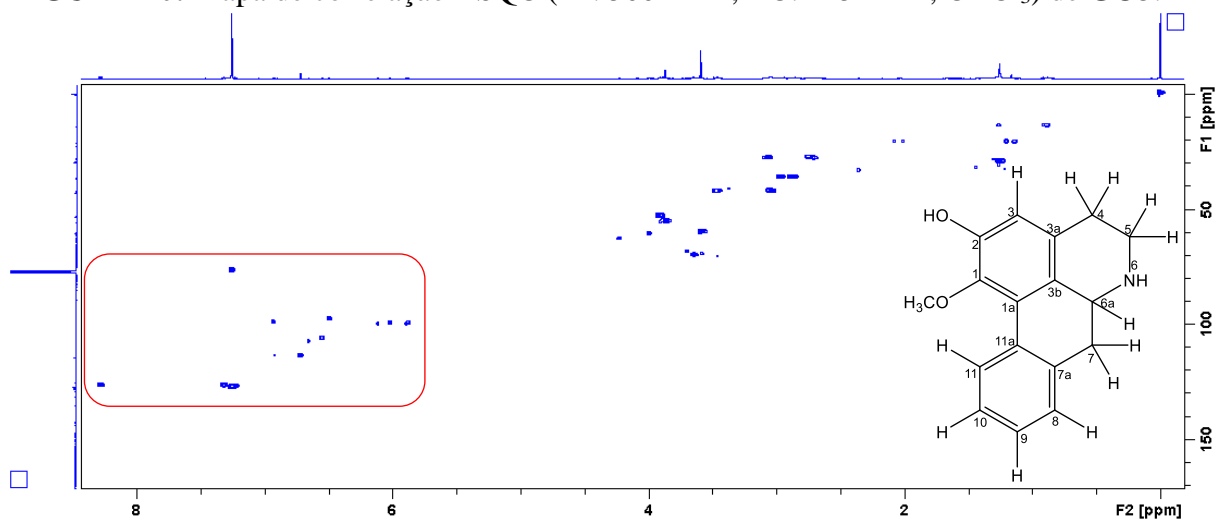


FIGURA 71: Ampliação da região aromática do mapa de correlação HSQC (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz; CDCl₃) de **GO3**.

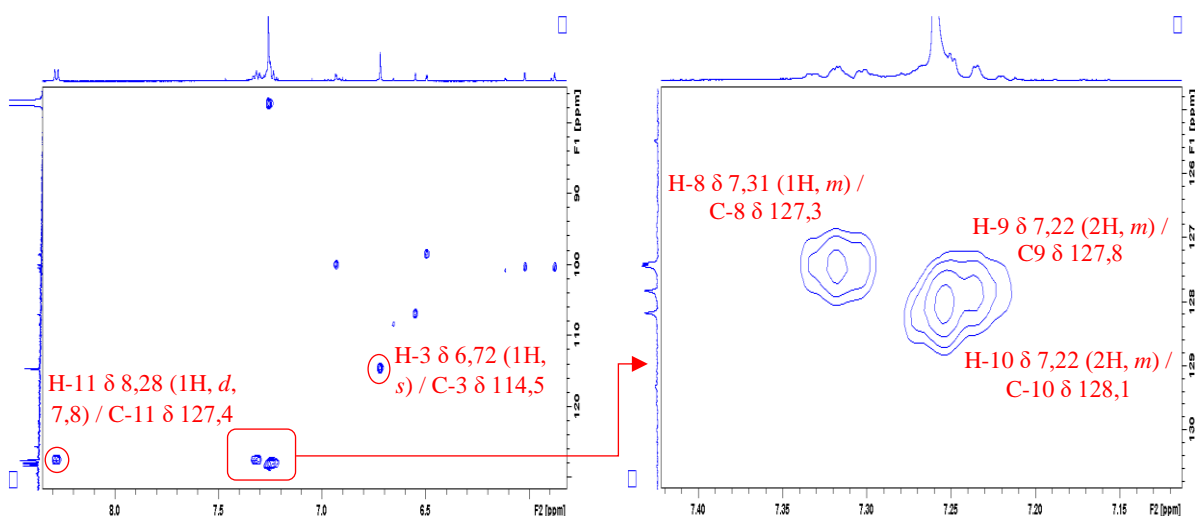


FIGURA 72: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO3**.

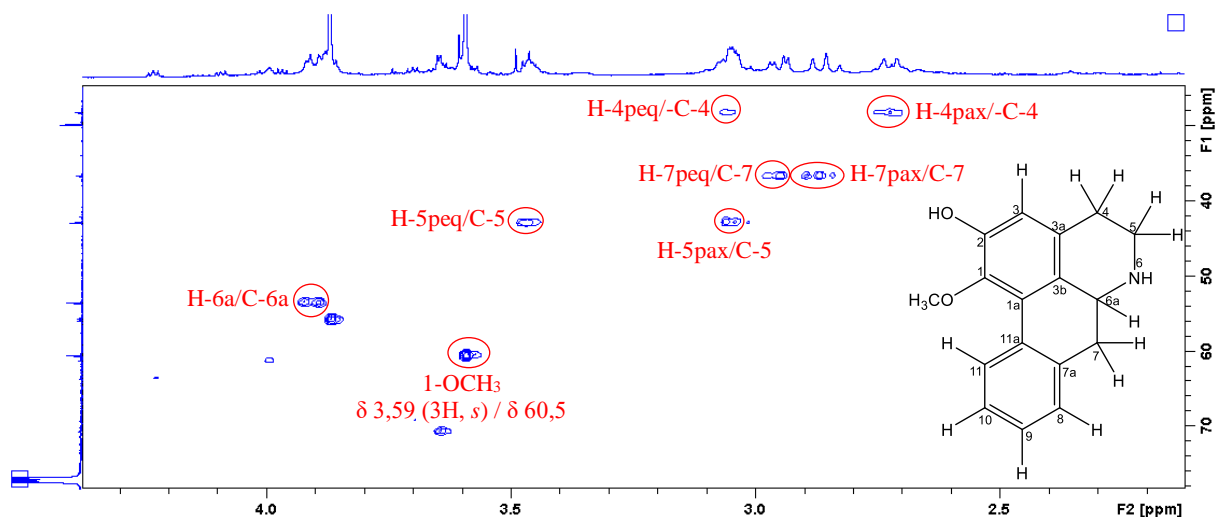
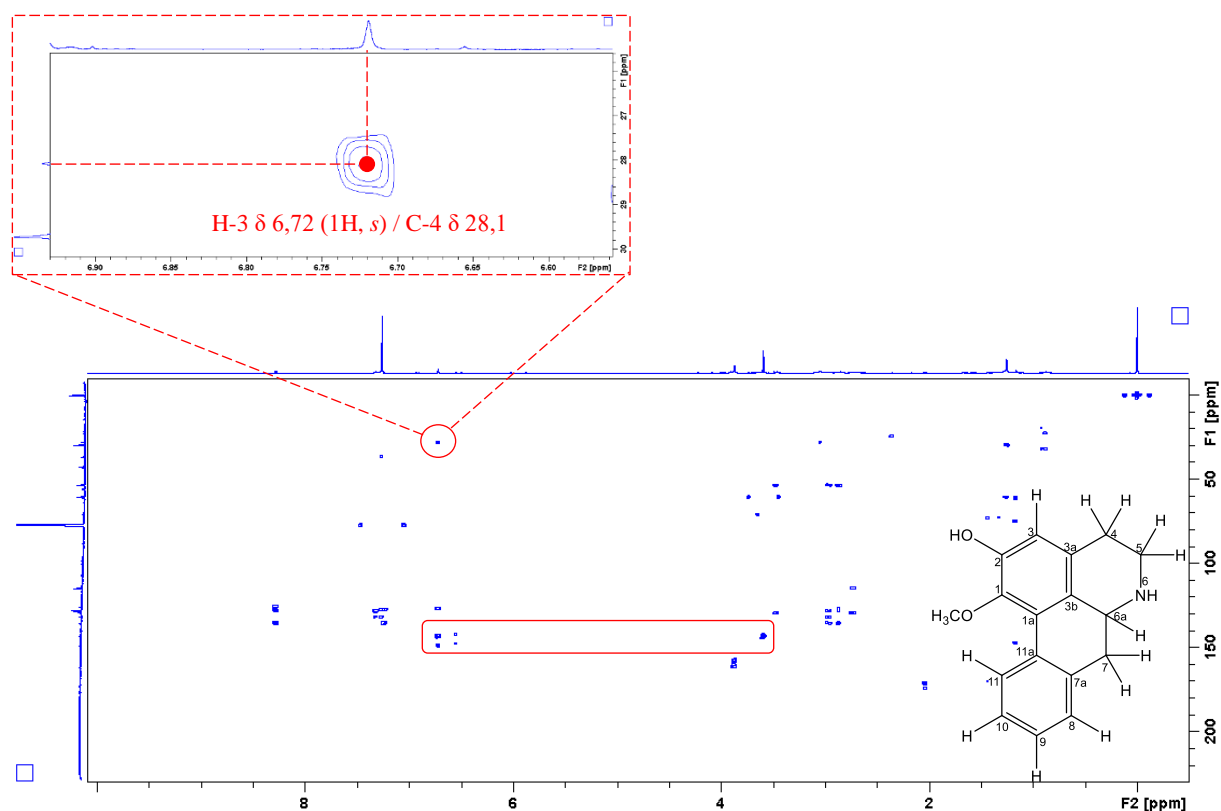


FIGURA 73: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO3**.



O sinal de hidrogênio em δ 6,72 (1H, s) referente a H-3, confirmou o grupo hidroxila devido a sua correlação a J^2 com o sinal do carbono em δ 148,6 (característico de carbono aromático oxigenado) atribuído a C-2 que por sua vez não apresentou correlação com nenhum sinal de hidrogênio de grupo metoxílico. Esse mesmo sinal de hidrogênio (δ 6,72) apresentou correlações a J^3 com o sinal em δ 143,0 referente a C-1, portador do grupo metoxílico em δ 3,59

(1-OCH₃), e com o sinal do carbono metilênico em δ 28,1 (C-4), confirmando sua localização no anel A (FIGURA 73 e 74). As demais correlações observadas estão dispostas na FIGURA 75.

FIGURA 74: Ampliação do mapa de correlação HMBC (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz; CDCl₃) de **GO3**.

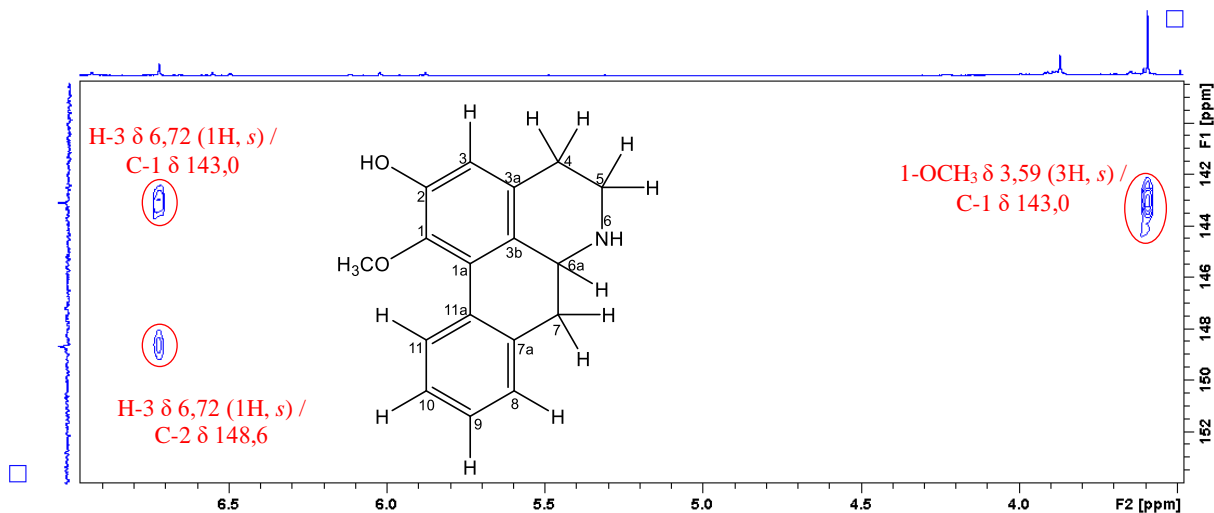
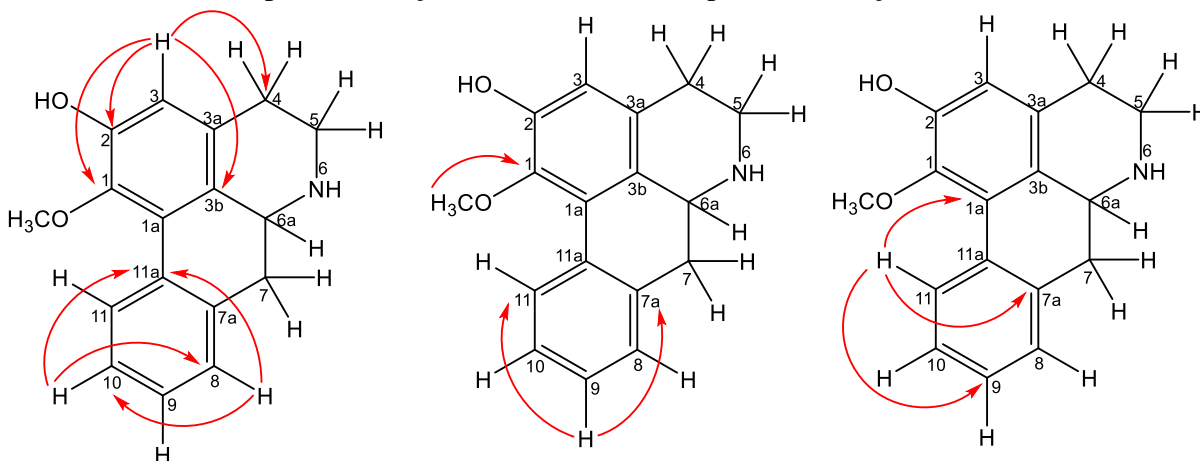


FIGURA 75: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO3**.



Os dados evidenciados através das análises de RMN mostraram indícios de que se teria a estrutura compatível com o alcaloide assimilobina, os quais foram confirmados com base nas informações disponíveis na literatura, conforme registrado na TABELA 19.

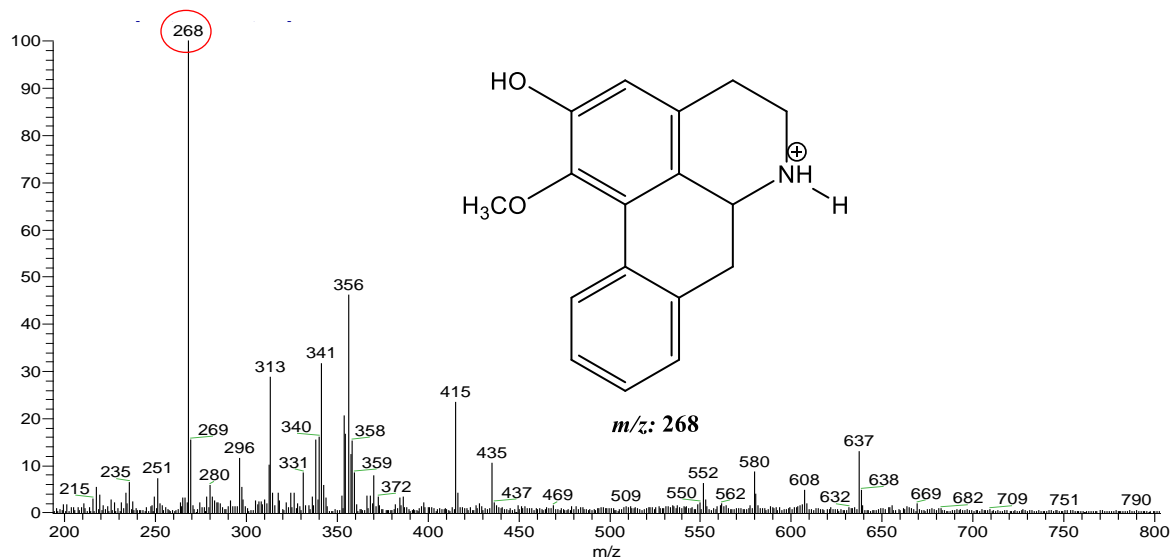
TABELA 19: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO3.

Posição	GO3			Asimilobina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., J em Hz) ^d	^{13}C (δ) ^d
1	-	143,0 C	-	-	143,5 C
1a	-	125,4 C	-	-	125,9 C
2	-	148,6 C	-	-	148,9 C
3	6,72 (1H, <i>s</i>)	114,5 CH	1, 2, 3b e 4	6,68 (1H, <i>s</i>)	115,1 CH
3a	-	129,3 C	-	-	129,2 C
3b	-	126,8 C	-	-	127,4 C
4 peq	3,05 (2H, <i>m</i>)	28,1 CH ₂	-	3,01 (1H, <i>m</i>)	28,3 CH ₂
4 pax	2,72 (1H, <i>m</i>)		3, 3a	2,70 (1H, <i>m</i>)	
5 peq	3,46 (1H, <i>m</i>)	42,7 CH ₂	3a e 6a	3,35 (1H, <i>m</i>)	42,8 CH ₂
5 pax	3,05 (2H, <i>m</i>)		4	3,02 (1H, <i>m</i>)	
6a	3,90 (1H, <i>m</i>)	53,4 CH	-	3,81 (1H, <i>dd</i> , 13,8 e 4,6)	53,4 CH
7 peq	2,95 (1H, <i>dd</i> , 13,7;4,5)	36,5 CH ₂	3b, 6a, 7a, 9 e 11a	2,86 (1H, <i>dd</i> , 13,8 e 4,6)	36,9 CH ₂
7 pax	2,85 (1H, <i>t</i> , 13,7)			2,76 (1H, <i>t</i> , 13,8)	
7a	-	135,4 C	-	-	135,7 C
8	7,31 (1H, <i>m</i>)	127,3 CH	10 e 11a	7,31 (1H <i>ddd</i> , 6,7; 2,0 e 0,6)	127,3 CH
9	7,22 (2H, <i>m</i>)	127,8 CH	7a e 11	7,22 (2H, <i>m</i>)	127,6 CH
10	7,22 (2H, <i>m</i>)	128,1 CH	8 e 11a	7,22 (2H, <i>m</i>)	128,0 CH
11	8,28 (1H, <i>d</i> , 7,8)	127,4 C	1a, 7a e 9	8,32 (1H, <i>dd</i> , 8,1 e 0,6)	127,6 CH
11a	-	131,7 C	-	-	132,9 C
1-OCH₃	3,59 (3H, <i>s</i>)	60,5 CH ₃	1	3,60 (3H, <i>s</i>)	60,2 CH ₃

^aExperimento realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno; ^bMultiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C (ANEXO-E7 e E8), HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^dCOSTA *et al.*, 2015 (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD); (δ) Deslocamentos em ppm.

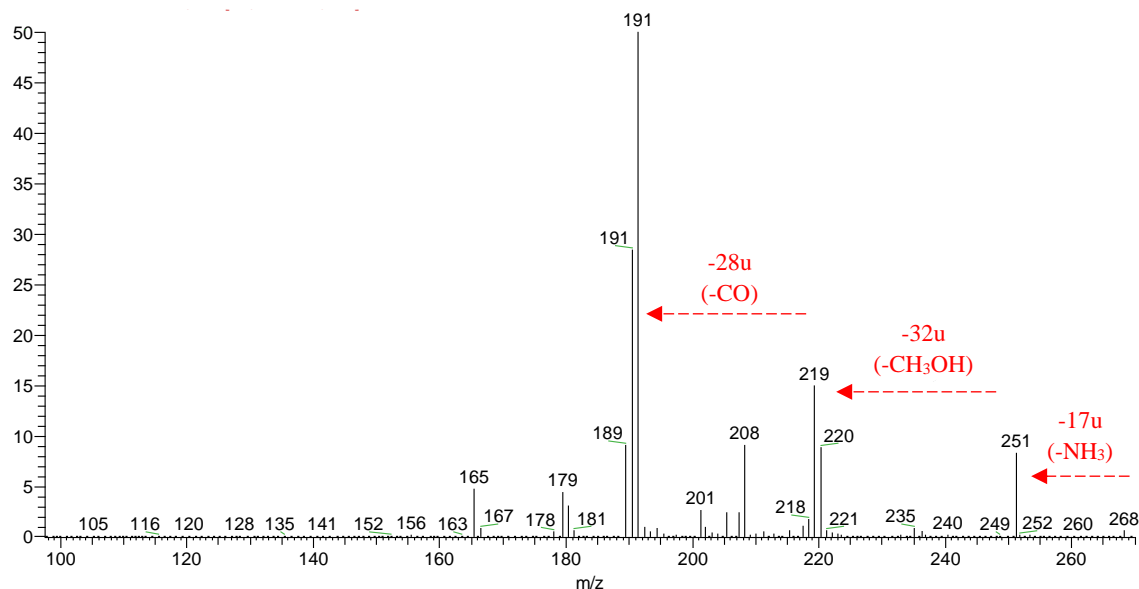
A análise por espectrometria de massas (FIGURA 76), obtida através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 268 Da, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{17}\text{H}_{17}\text{NO}_2$.

FIGURA 76: Espectro de massas de GO3.



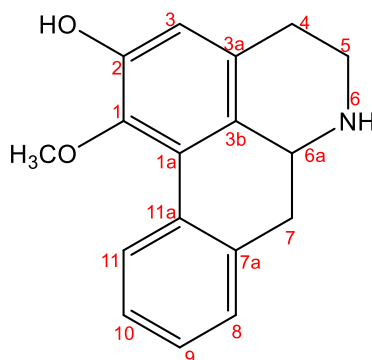
Quando submetido à fragmentação este íon com m/z 268 (FIGURA 77 e 96) apresentou perdas sequencias de 17, 32 e 28 u, características das perdas dos grupos $-NH_3$, $-CH_3OH$ e $-CO$, sendo estas perdas coerentes com a com a proposta de fragmentação para o alcaloide assimilobina conforme observado por Yan *et al.* (2013), corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 77: Perfil de fragmentações de **GO3**.



Pelas análises de RMN de 1H e ^{13}C 1D/2D, EM e comparação com os dados descritos na literatura (COSTA *et al.*, 2015), foi possível identificar **GO3** como sendo o alcaloide aporfino *sensu stricto* conhecido como **asimilobina** (FIGURA 78). Este alcaloide é bastante distribuído na família Annonaceae ocorrendo em vários gêneros, entre eles *Annona*, *Guatteria* e *Xylopia* (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

FIGURA 78: Estrutura da assimilobina.



5.1.3.2. Identificação estrutural de GO6 (GO6a e GO6b)

A amostra **GO6** apresentou-se como sólido amorfo de coloração marrom com massa igual a 6,2 mg. A análise por CCDA evidenciou teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

Através da análise preliminar dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 79), e mapas de correlação HSQC (FIGURA 80) e HMBC (FIGURA 81) observaram-se sinais referentes a mistura de dois alcaloides aporfinos *sensu stricto* (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994). Foram verificados sinais de hidrogênios na região aromática entre δ 7,23 - 6,44, bem como a presença de sinais na região de hidrogênios metilênicos entre δ 3,36 - 2,63 e um metínico em δ 3,81 (2H, *m*), os alcaloides foram codificados como **GO6a** e **GO6b**.

FIGURA 79: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO6**.

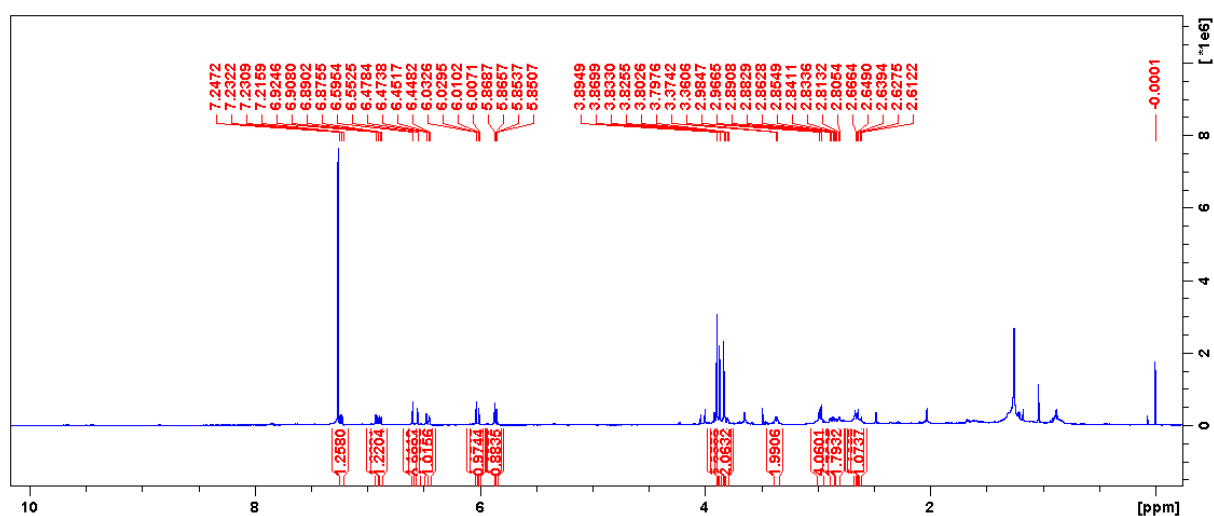


FIGURA 80: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO6**.

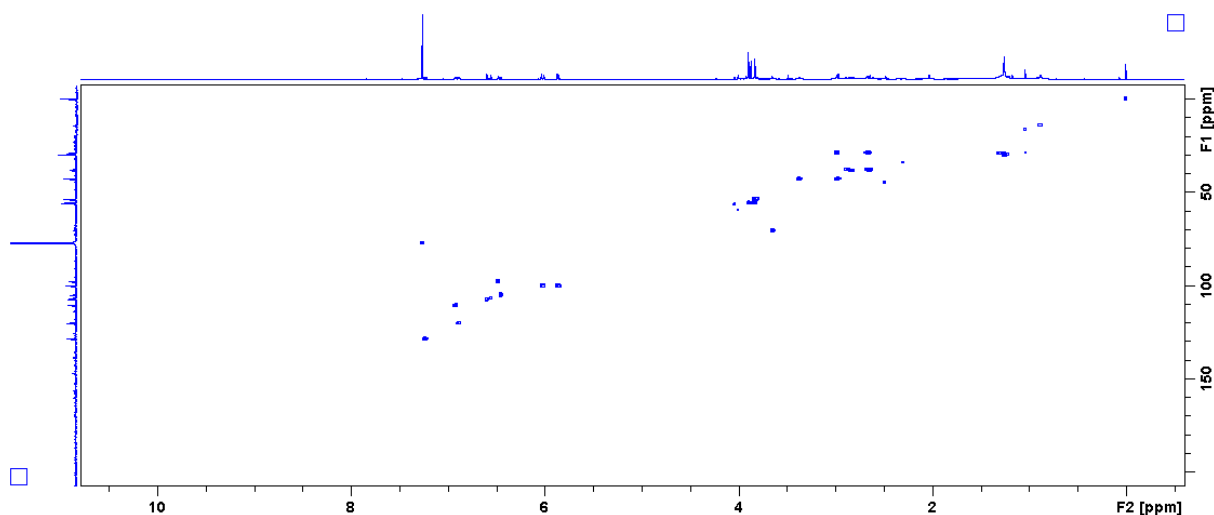
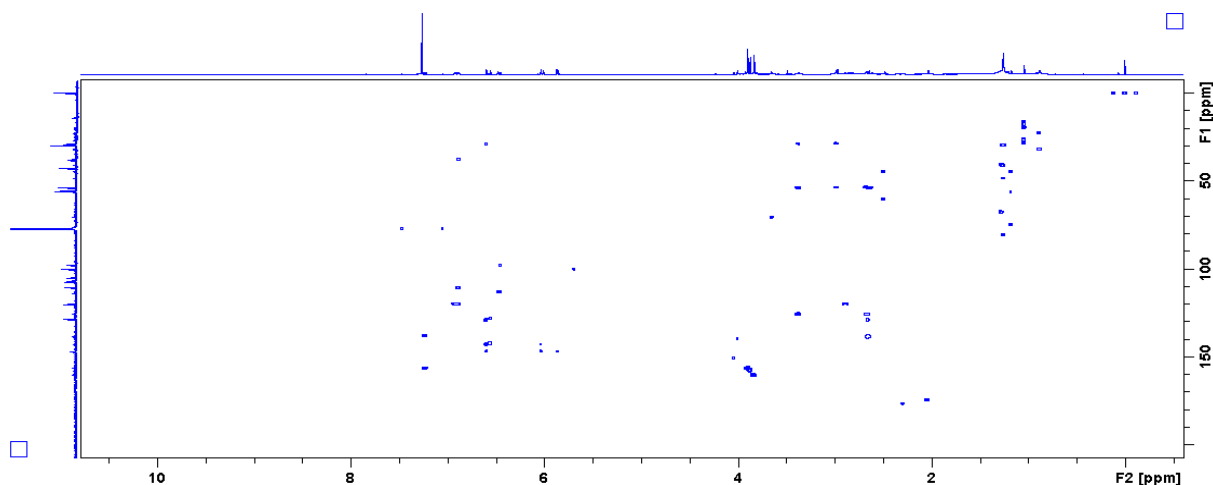


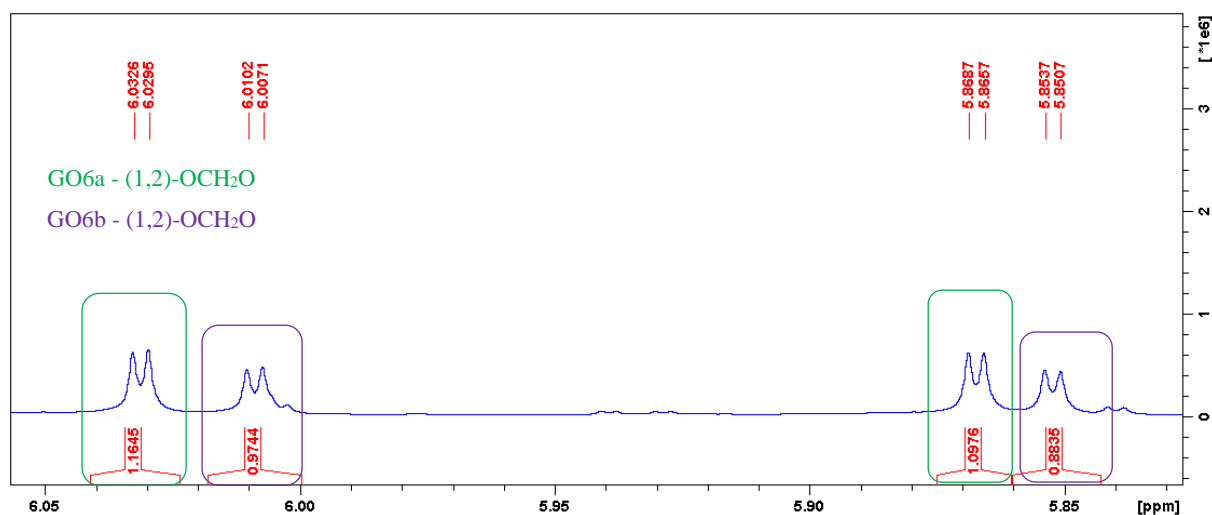
FIGURA 81: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO6**.



Os alcaloides presentes na mistura **GO6a** e **GO6b** apresentam em suas estruturas o sinal característico de grupo metilenodióxi que pode ser facilmente identificado entre δ 6,03 - 5,85 no espectro de RMN de ^1H na forma de dupletos com integração para um hidrogênio cada. Além disso, observou-se que os pares de dupletos, referentes a cada estrutura, apresentaram intensidades diferentes, sugerindo tratar-se de dois grupos metilenodióxi presentes em moléculas distintas (FIGURA 82). Analisando estes e outros sinais no espectro pertencentes a estes dois alcaloides, pôde-se sugerir que **GO6a** encontrava-se em maior quantidade.

Assim, os sinais do grupo metilenodióxi de **GO6a** foram definidos como sendo os dois dupletos em δ 6,03 (1H) e δ 5,86 (1H) com constante de acoplamento (J) de 1,5 Hz, correlacionados a J' com o sinal de carbono em δ 100,2. Para o alcaloide **GO6b** os dois dupletos ocorreram em δ 6,00 (1H) e δ 5,85 (1H) com constante de acoplamento de 1,5 Hz correlacionados a J' com o sinal de carbono em δ 100,1 no mapa de correlação HSQC (FIGURA 82 e 84).

FIGURA 82: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO6**.



Continuando a análise do espectro de RMN de ^1H , juntamente com os dados obtidos pelo mapa de correlação HSQC, observaram-se dois simples, integrando para um hidrogênio cada, em δ 6,59 e δ 6,55, que se correlacionaram com os carbonos δ 107,6 e δ 106,8, típicos de H-3/C-3 de **GO6a** e **GO6b**, respectivamente (FIGURA 83 e 84).

FIGURA 83: Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO6**.

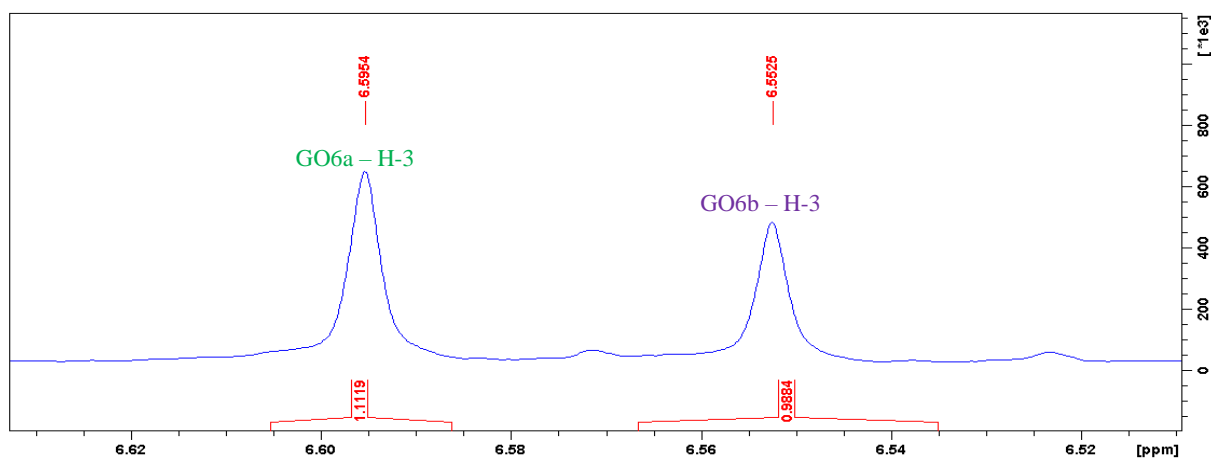
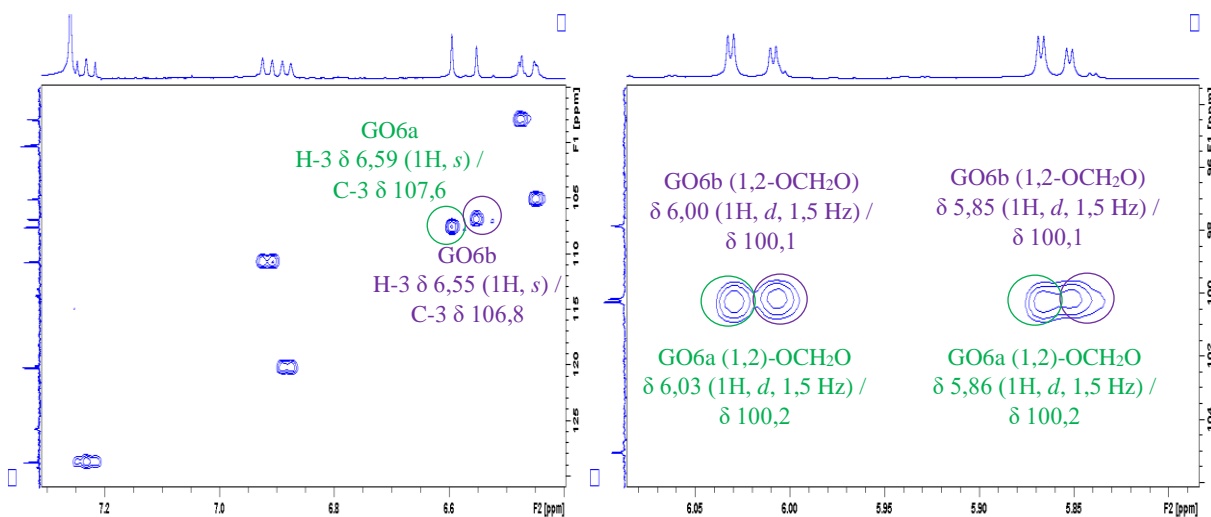
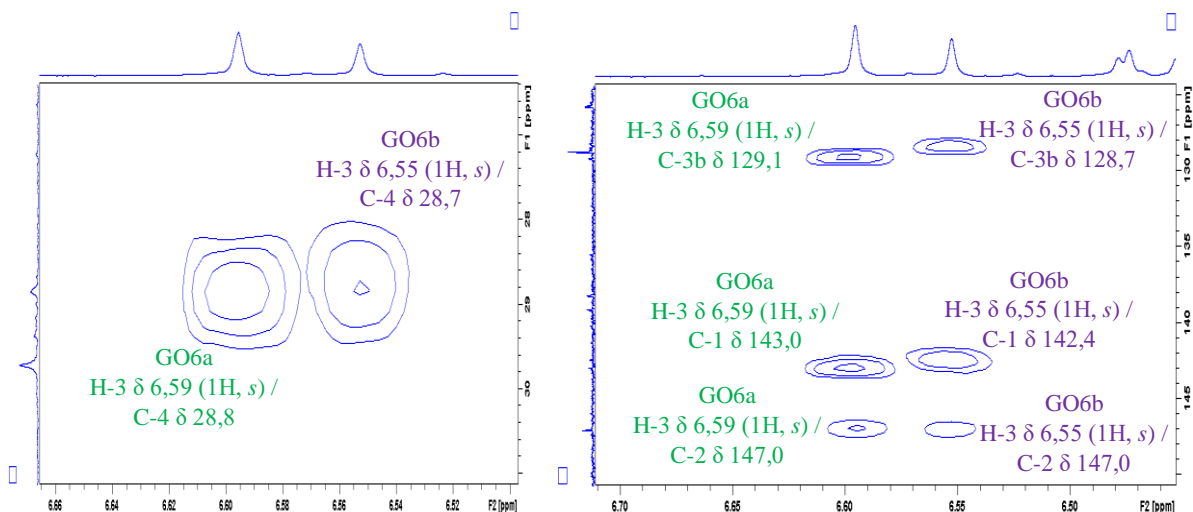


FIGURA 84: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO6**.



No mapa de correlação HMBC, observou-se a correlação a J^3 de H-3 (δ 6,59) referente à **GO6a** com os sinais dos carbonos em δ 143,0 (C-1), δ 28,8 (C-4) e δ 129,1 (C-3b) e a J^2 com o sinal do carbono em δ 147,0 (C-2). Para o alcaloide **GO6b** observou-se a correlação a J^3 de H-3 (δ 6,55) com os sinais dos carbonos em δ 142,4 (C-1), δ 28,7 (C-4) e δ 128,7 (C-3b) e a J^2 com o sinal do carbono em δ 147,0 (C-2), confirmando, assim, a presença de substituintes oxigenados nos carbonos C-1 e C-2 dos anéis A dos sistemas aporfinos dos referidos alcaloides (FIGURA 85).

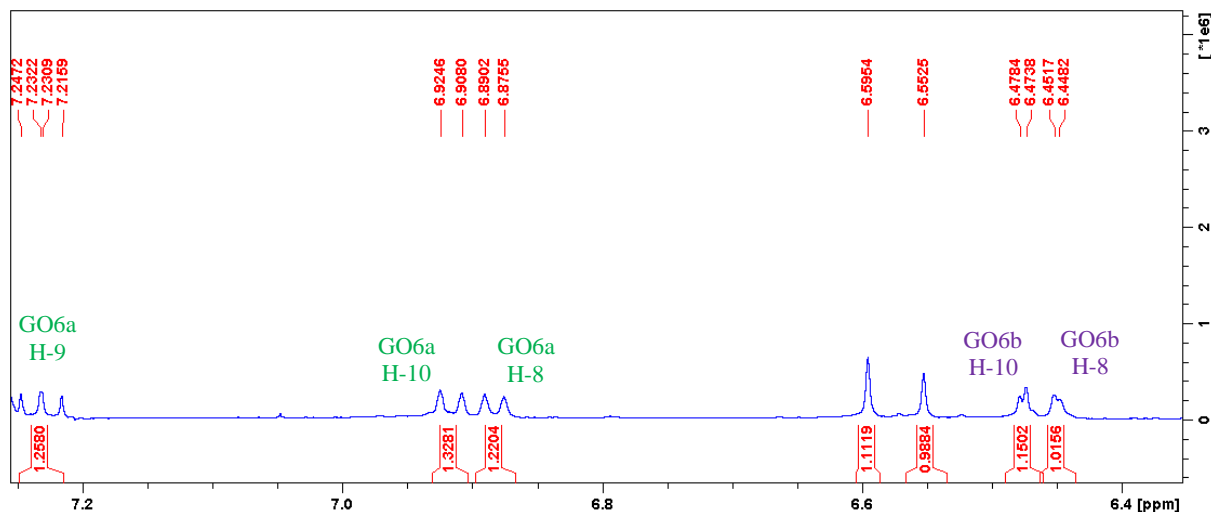
FIGURA 85: Ampliação da região das correlações observadas de H-3 no mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO6**.



Pôde-se perceber ainda, similaridades entre outros hidrogênios aromáticos encontrados nos espectros na região entre δ 7,23 - 6,44. O padrão destes sinais sugeriu que um dos alcaloides presentes nesta mistura apresentavam o anel D monossustituído e o outro com dupla substituição.

Para o alcaloide monossustituído no anel D foi observado os sinais em δ 6,91 (1H, *d*, $J = 8,3$ Hz), δ 7,23 (1H, *dd*, $J = 8,3$ e 7,3 Hz) e 6,88 (1H, *d*, $J = 7,3$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-10, H-9 e H-8 de **GO6a** respectivamente. Outro padrão de sinais na região aromática evidenciou a presença de um anel D com dupla substituição, verificada através dos sinais em δ 6,47 (1H, *d*) e δ 6,44 (1H, *d*), com constante de acoplamento *meta* ($J = 2,4$ Hz), atribuídos aos hidrogênios H-10 e H-8 de **GO6b**, respectivamente (FIGURA 86).

FIGURA 86: Ampliação da região aromática no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO6**.



A presença do anel D substituído por um grupo metoxila atribuído ao alcaloide **GO6a** foi confirmada pelo mapa de correlação HMBC que evidenciou a correlação a J^3 do sinal do hidrogênio em δ 7,23 (H-9) com o sinal do carbono em δ 156,4 (C-11) característico de carbono aromático oxigenado. Por sua vez, os hidrogênios do grupo metoxílico em δ 3,89 ligados ao carbono em δ 55,8 (11-OCH₃), apresentaram correlação também a J^3 com o sinal do carbono em δ 156,4 (C-11) definindo assim, a posição da metoxila em (C-11) (FIGURA 87 e 88).

A presença do anel D disubstituído no alcaloide **GO6b** foi confirmada também pelo mapa de correlação HMBC, onde evidenciou-se a correlação a J^2 do sinal do hidrogênio em δ 6,47 (H-10) com os sinais de carbono em δ 157,7 (C-11) e δ 160,5 (C-9), sendo estes, característicos de carbonos aromáticos oxigenados. Por sua vez, os hidrogênios dos grupos metoxílicos em δ 3,87 ligados ao carbono em δ 55,8 (11-OCH₃) apresentaram correlação a J^3 com o sinal do carbono em δ 157,7 (C-11) definindo assim, a posição de uma das metoxilas em (C-11), da mesma forma, os hidrogênios do outro grupo metoxílico em δ 3,83 ligados ao carbono em δ 55,4 (9-OCH₃) apresentaram correlação a J^3 com o sinal do carbono em δ 160,5 (C-9) definindo assim, a posição da segunda metoxila em (C-9) (FIGURA 87 e 88).

FIGURA 87: Ampliação da região de carbonos substituídos no anel D no mapa de correlação HMBC (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz; CDCl₃) de **GO6**.

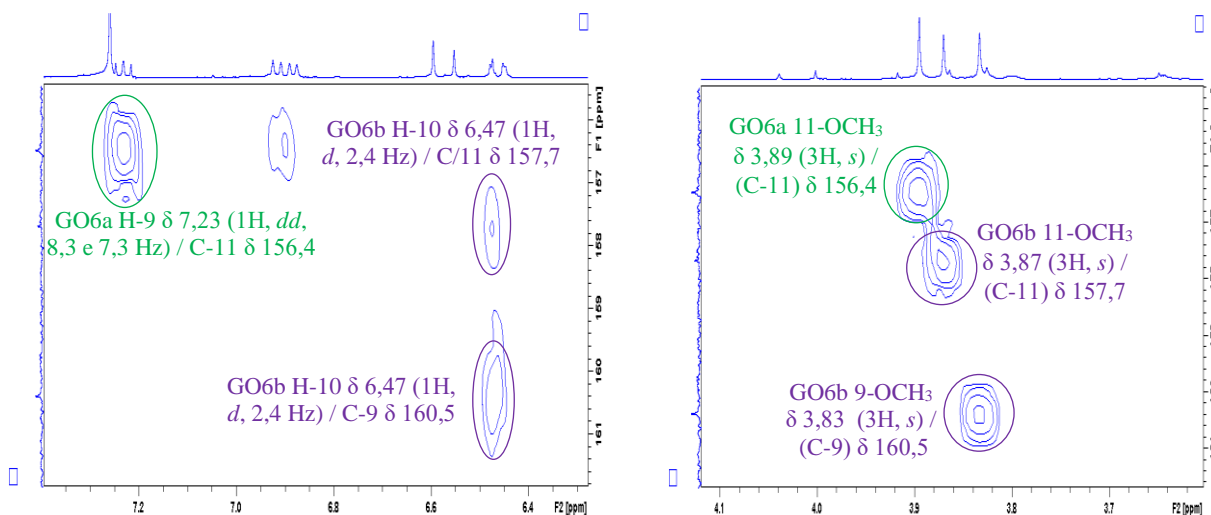
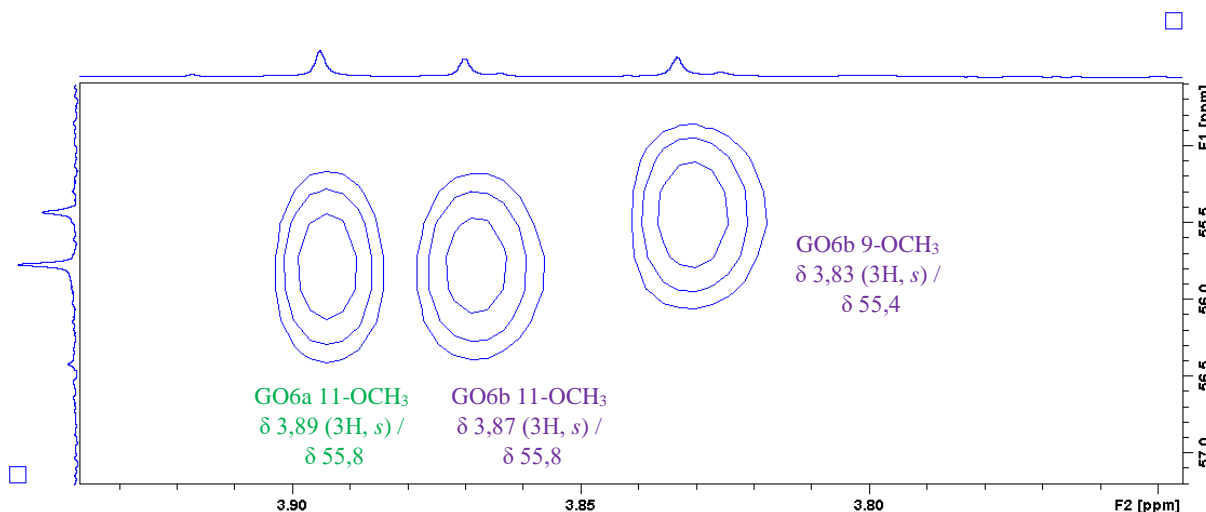


FIGURA 88: Ampliação dos grupos metoxílicos no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO6**.



Pôde-se observar também a presença de hidrogênios diastereotópicos no qual a substância **GO6a** apresentou três grupos metilênicos em δ 2,65 (2H, *m*)/2,97(4H, *m*), δ 3,36 (2H, *m*), δ 2,64 (1H, *t*, $J = 14,0$ Hz)/2,87 (1H, *dd*, $J = 14,0$ e 4,0 Hz) típicos dos sinais de hidrogênios H-4pax/(H-4peq/H-5pax), H-5peq e H-7pax/H-7peq correlacionados aos sinais de carbonos em δ 28,8 (C-4), δ 42,8 (C-5) e δ 37,8 (C-7) no mapa de correlação HSQC, assim como um sinal de hidrogênio metínico em δ 3,81 (2H, *m*) correlacionado ao sinal de carbono em δ 53,7 característico de H-6a/C-6a (FIGURA 89). De forma semelhante foram determinados os hidrogênios diastereotópicos para **GO6b** (TABELA 21). As demais correlações observadas estão dispostas nas FIGURAS 90 e 91.

FIGURA 89: Ampliação da região dos grupos metilênicos no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO6**.

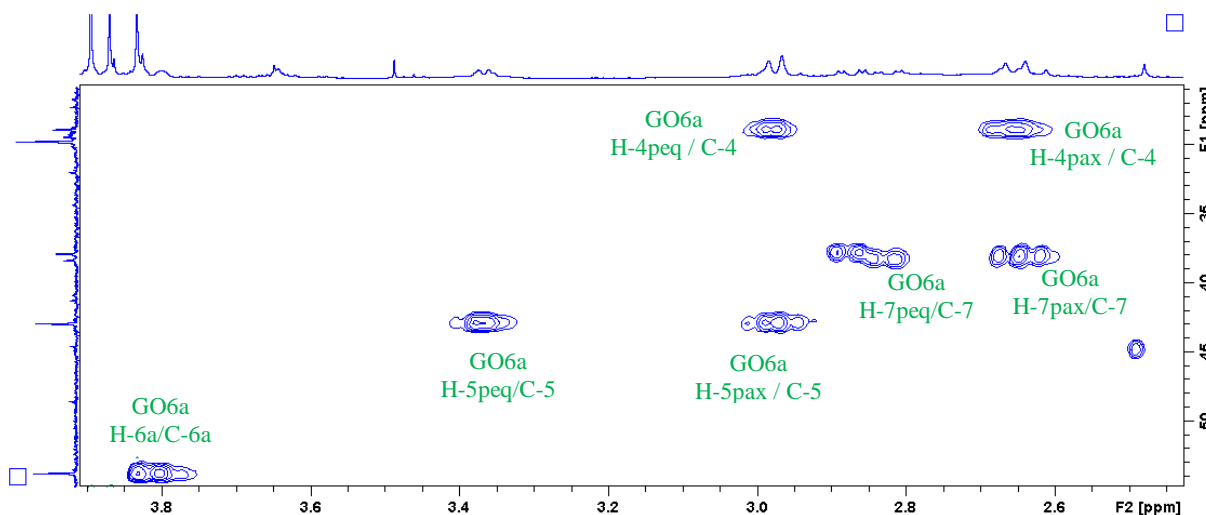


FIGURA 90: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO6a**.

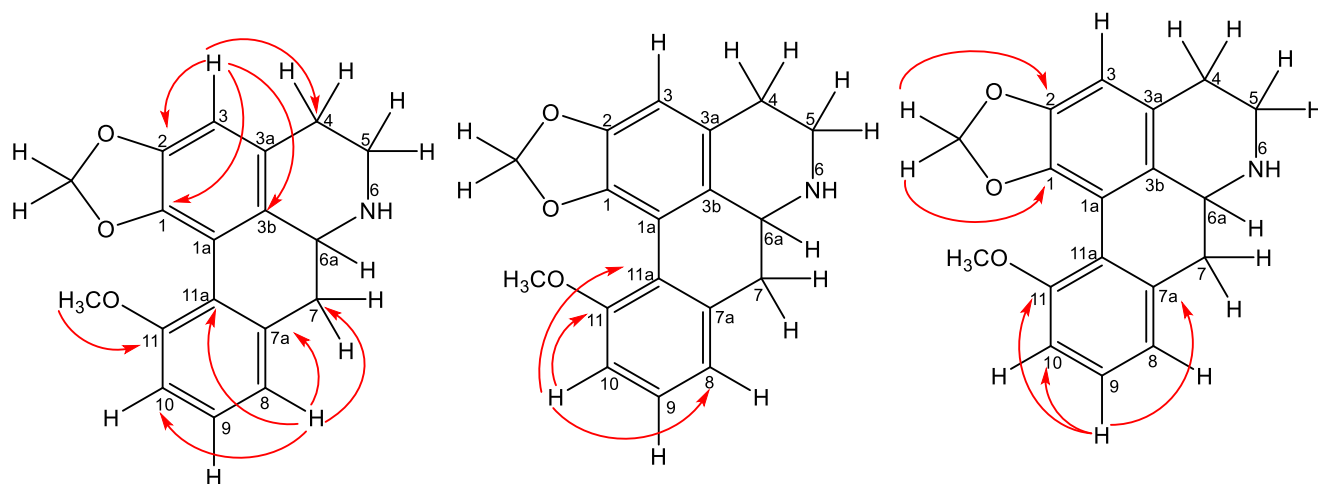
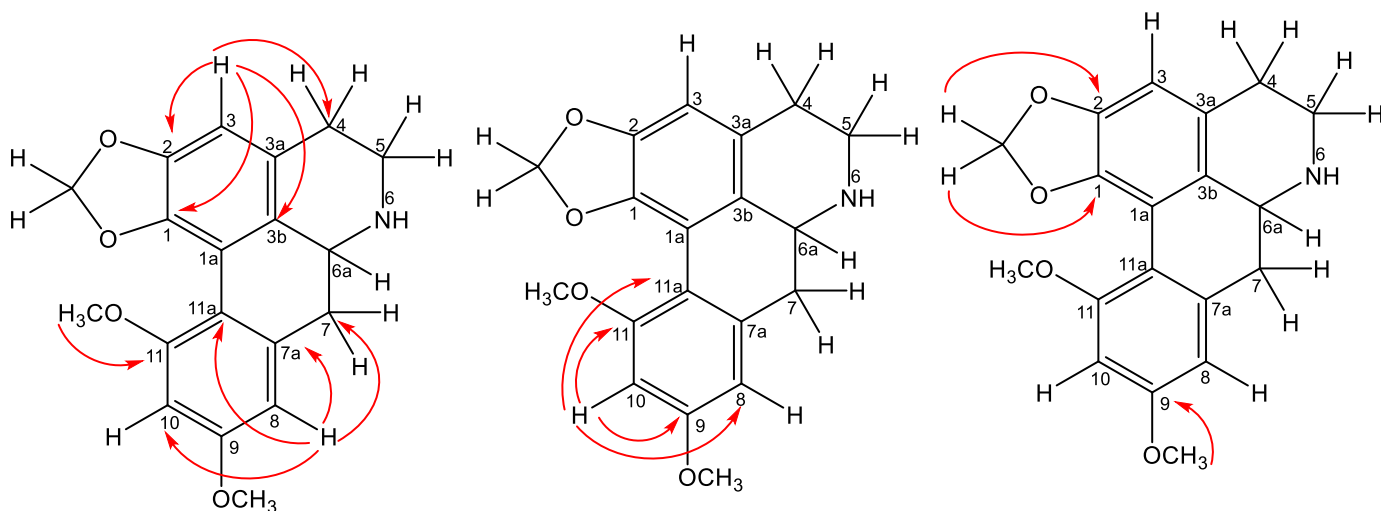


FIGURA 91: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO6b**.



Nas TABELAS 20 e 21 são apresentados os corretos valores de ^1H e ^{13}C de **GO6a** e **GO6b** atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC, e comparações com os dados da literatura consistindo nos dados de dois alcaloides aporfina conhecidos como puterina (**GO6a**) e discoguatina (**GO6b**).

Embora **GO6b** (discoguatina) já tenha sido relatada no gênero, não apresenta dados completos de RMN disponíveis na literatura, sendo assim, os dados apresentados aqui auxiliarão novas pesquisas na identificação desse composto.

TABELA 20: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de GO6a.

Posição	GO6a			Puterina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., J em Hz) ^d	^{13}C (δ) ^d
1	-	143,0 C	-	-	143,2 C
1a	-	113,6 C	-	-	113,5 C
2	-	147,0 C	-	-	147,2 C
3	6,59 (1H, <i>s</i>)	107,6 CH	1, 2, 3b e 4	6,60 (1H, <i>s</i>)	107,6 CH
3a	-	125,8 C	-	-	124,9 C
3b	-	129,1 C	-	-	127,3 C
4 peq	2,97 (4H, <i>m</i>)	28,8 CH ₂	5	3,13 (1H, <i>m</i>)	27,8 CH ₂
4 pax	2,65 (2H, <i>m</i>)		3 e 3b	2,71 (1H, <i>m</i>)	
5 peq	3,36 (2H, <i>m</i>)	42,8 CH ₂	4, 3a e 6a	3,48 (1H, <i>m</i>)	42,7 CH ₂
5 pax	2,97 (4H, <i>m</i>)		4, 3a e 6a	3,02 (1H, <i>m</i>)	
6a	3,81 (2H, <i>m</i>)	53,7 CH	-	3,91 (1H, <i>m</i>)	53,4 CH
7 peq	2,87 (1H, <i>dd</i> , 14 e 4,0)	37,8 CH ₂	3b, 5, 6a, 7a, 8 e 11a	3,01 (1H, <i>m</i>)	36,9 CH ₂
7 pax	2,64 (1H, <i>t</i> , 13,0)		5, 6a, 7a, 8 e 11a	2,79 (1H, <i>m</i>)	
7a	-	138,1 C	-	-	137,4 C
8	6,88 (1H, <i>d</i> , 7,3)	120,2 CH	7, 7a, 10 e 11a	6,88 (1H, <i>d</i> , 7,4)	120,4 CH
9	7,23 (1H, <i>dd</i> , 8,3 e 7,3)	128,5 CH	7a, 10 e 11	7,24 (1H, <i>m</i>)	128,9 CH
10	6,91 (1H, <i>d</i> , 8,3)	110,6 CH	8, 11 e 11a	7,23 (1H, <i>m</i>)	110,6 CH
11	-	156,4 C	-	-	156,4 CH
11a	-	120,0 C	-	-	119,6 C
11-OCH₃	3,89 (3H, <i>s</i>)	55,8 CH ₃	11	3,89 (3H, <i>s</i>)	55,7 CH ₃
(1,2)-OCH₂	6,03 (1H, <i>d</i> , 1,5)	100,2 CH ₂	1 e 2	6,04 (1H, <i>d</i> , 1,4)	100,3
	5,86 (1H, <i>d</i> , 1,5)			5,87 (1H, <i>d</i> , 1,4)	CH ₂

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

^bMultiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C (ANEXO-E9 e E10), HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^dSANTOS *et al.*, 2015 (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3); (δ) Deslocamentos em ppm.

TABELA 21: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C de **GO6b**.

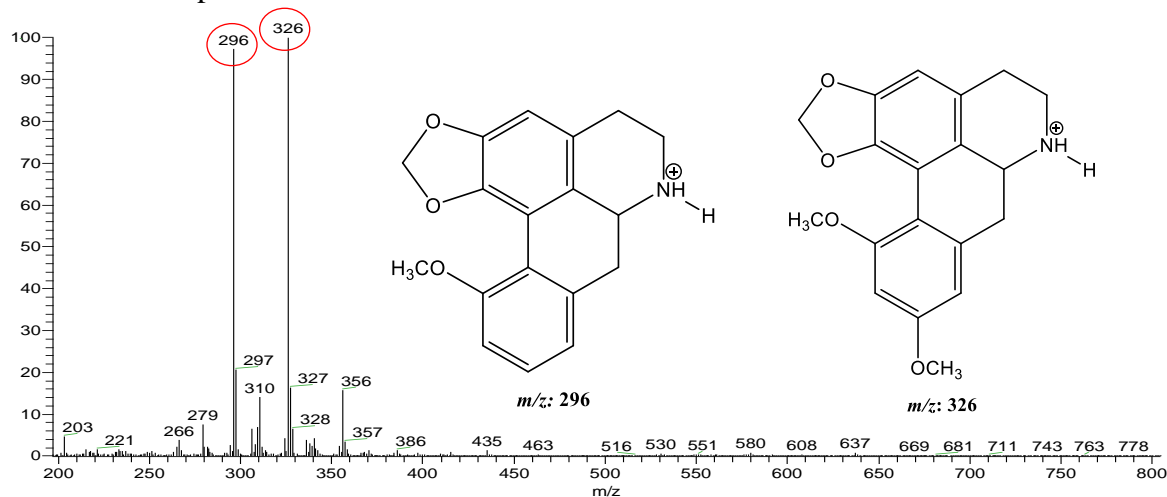
Posição	GO6b			Discoguatina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., J em Hz) ^d	^{13}C (δ) ^e
1	-	142,4 C	-	-	142,1 C
1a	-	109,5 C	-	-	113,7 C
2	-	147,0 C	-	-	146,9 C
3	6,55 (1H, <i>s</i>)	106,8 CH	1, 2, 3b e 4	6,55 (1H, <i>s</i>)	104,9 CH
3a	-	125,6 C	-	-	125,4 C
3b	-	128,7 C	-	-	128,1 C
4 peq	2,97 (4H, <i>m</i>)	28,7 CH ₂	3a e 5	-	28,6 CH ₂
4 pax	2,65 (2H, <i>m</i>)		3a e 5		
5 peq	3,36 (2H, <i>m</i>)	42,8 CH ₂	3a, 4 e 6a	-	42,7 CH ₂
5 pax	2,97 (4H, <i>m</i>)		3a, 4 e 6a		
6a	3,81 (2H, <i>m</i>)	53,7 CH	-	-	53,6 CH
7 peq	2,82 (1H, <i>m</i>)	38,2 CH ₂	3b, 5, 6a, 7a, 8 e 11a	-	38,1 CH ₂
7 pax	2,63 (1H, <i>m</i>)		3b, 6a e 8		
7a	-	139,1 C	-	-	138,8 C
8	6,44 (1H, <i>d</i> , 2,4)	105,0 CH	7, 9, 10 e 11a	6,47 (1H, <i>s</i>)	106,7 CH
9	-	160,5 C	-	-	160,3 CH
10	6,47 (1H, <i>d</i> , 2,4)	97,9 CH	8, 9, 11 e 11a	6,47 (1H, <i>s</i>)	97,7 CH
11	-	157,7 C	-	-	157,6 CH
11a	-	113,0 C	-	-	112,9 C
9-OCH₃	3,83 (3H, <i>s</i>)	55,4 CH ₃	9	3,88 (3H, <i>s</i>)	55,3 CH ₃
11-OCH₃	3,87 (3H, <i>s</i>)	55,8 CH ₃	11	3,85 (3H, <i>s</i>)	55,5 CH ₃
(1,2)-OCH₂	6,00 (1H, <i>d</i> , 1,5)	100,1	1 e 2	6,01 (1H, <i>d</i> , 1,5)	100,0 CH ₂
	5,85 (1H, <i>d</i> , 1,5)			5,86 (1H, <i>d</i> , 1,5)	

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

^bMultiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C (ANEXO- E9 e E10), HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^{d,e}GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1983 (^1H , 60 MHz, CDCl_3); ROBLOT; HOCQUEMILLER; CAVÉ, 1983 (^{13}C : 25,2 MHz, CDCl_3); (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 92), obtida através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou dois íons de maior intensidade, indicando as duas moléculas protonadas $[M+H]^+$ com m/z 296 e 326 Da, compatíveis com as fórmulas moleculares $C_{18}H_{17}NO_3$ e $C_{19}H_{19}NO_4$ respectivamente.

FIGURA 92: Espectro de massas de **GO6**.



Quando submetidos à fragmentação tanto o íon de m/z 296 quanto o íon de m/z 326 Da apresentaram perdas sequenciais de 17, 30 e 28 u (FIGURA 93 e 94), estas perdas estão de acordo com os relatos de Stévigny *et al.* (2004), para alcaloides do tipo aporfino, comuns de grupos $-NH_3$ (-17), $-CH_2O$ (-30) e $-CO$ (-28), onde na primeira etapa de fragmentação é observada a perda do grupo amino e nas etapas seguintes, observam-se perdas características de estruturas contendo grupo metilenodioxi no anel A (FIGURA 96), estando desse modo, de acordo com os dados obtidos por RMN.

FIGURA 93: Perfil de fragmentações de **GO6a**.

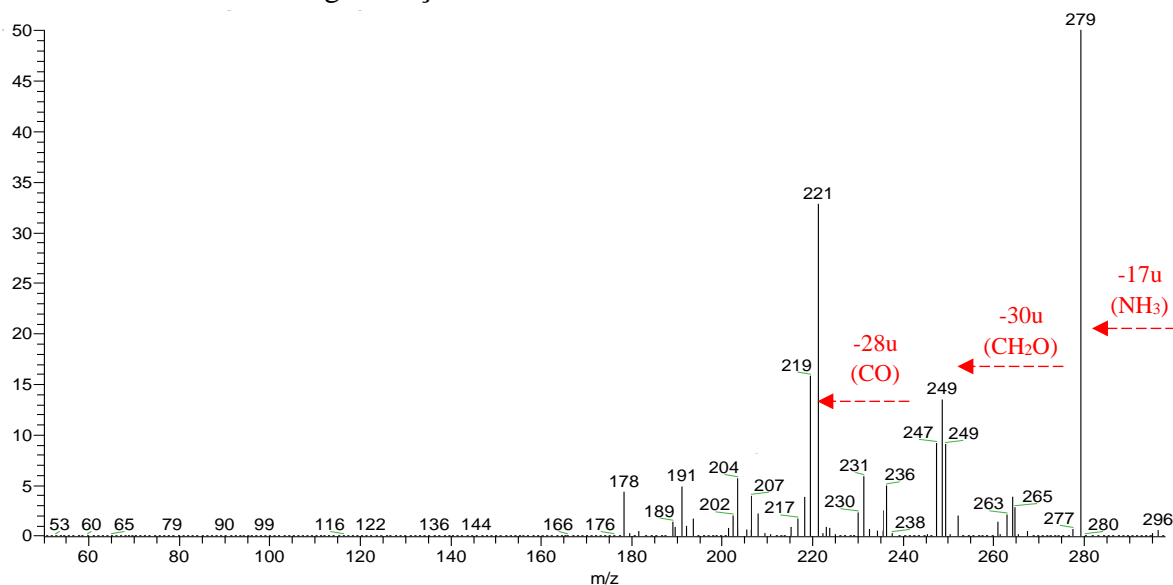
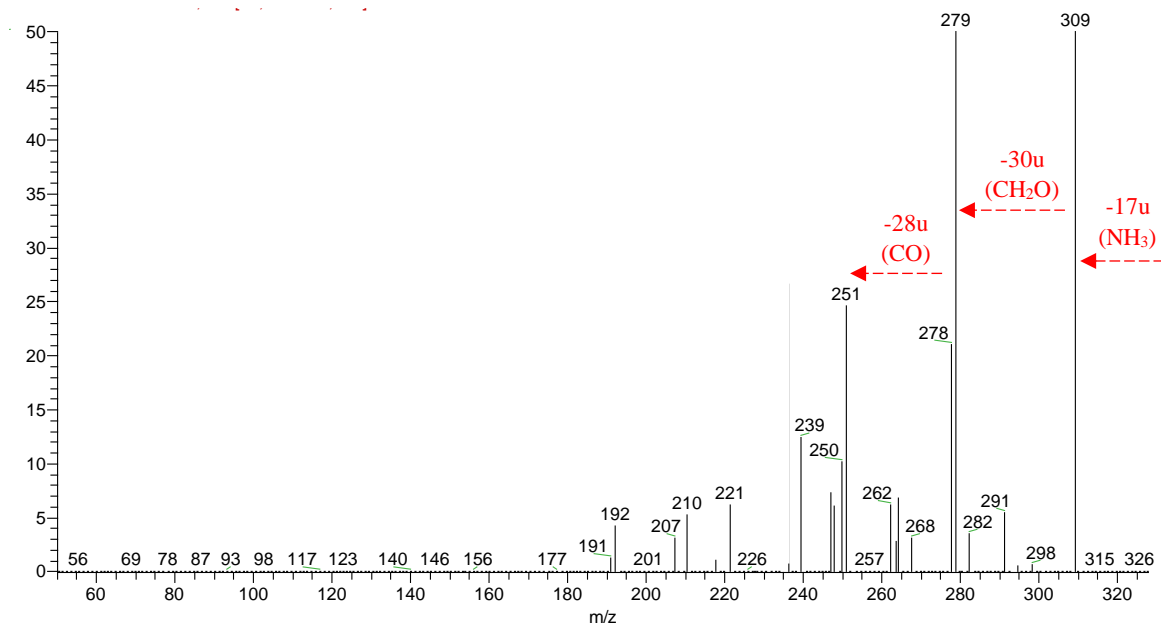


FIGURA 94: Perfil de fragmentações de **GO6b**.



As análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D, EM e comparação com os dados descritos na literatura (SANTOS *et al.*, 2015; GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1983; ROBLLOT; HOCQUEMILLER; CAVÉ, 1983), permitiu-nos identificar que **GO6** continha a mistura dos alcaloides aporfínicos *sensu stricto* conhecidos como **puterina (GO6a)** e **discoguatina (GO6b)** (FIGURA 95). Sendo estes alcaloides já relatados na família Annonaceae, encontrados principalmente no gênero *Guatteria* (GUINAUDEAU *et al.*, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

FIGURA 95: Estrutura dos alcaloides puterina e discoguatina.

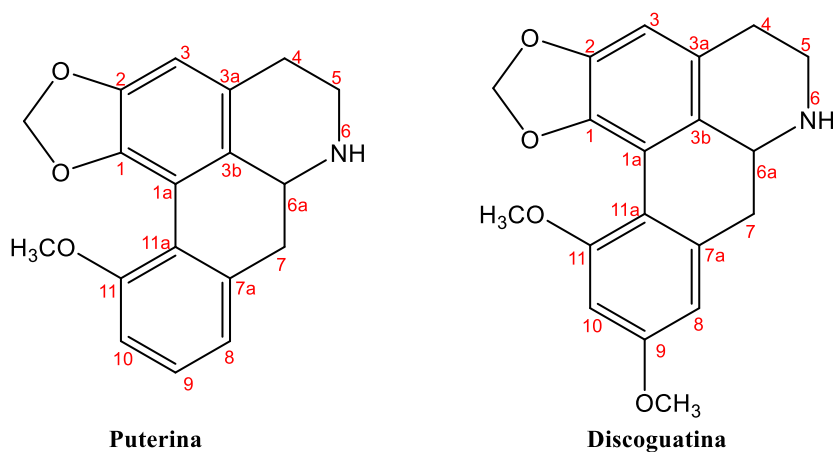
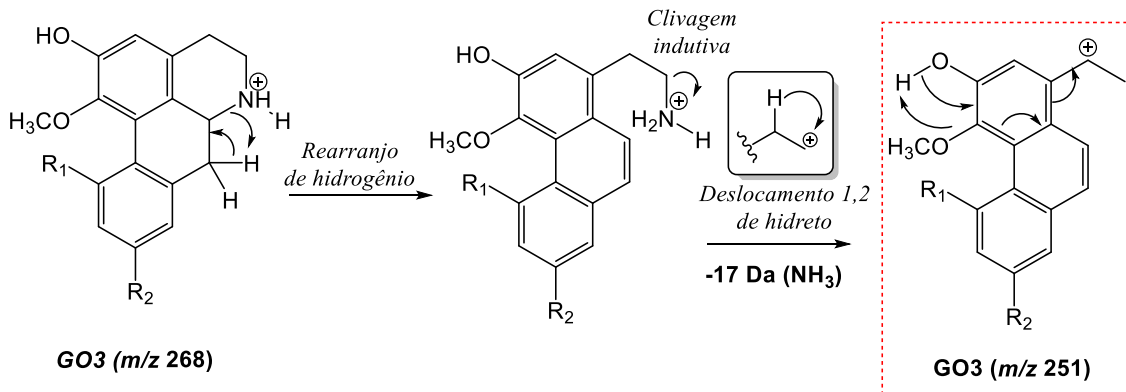
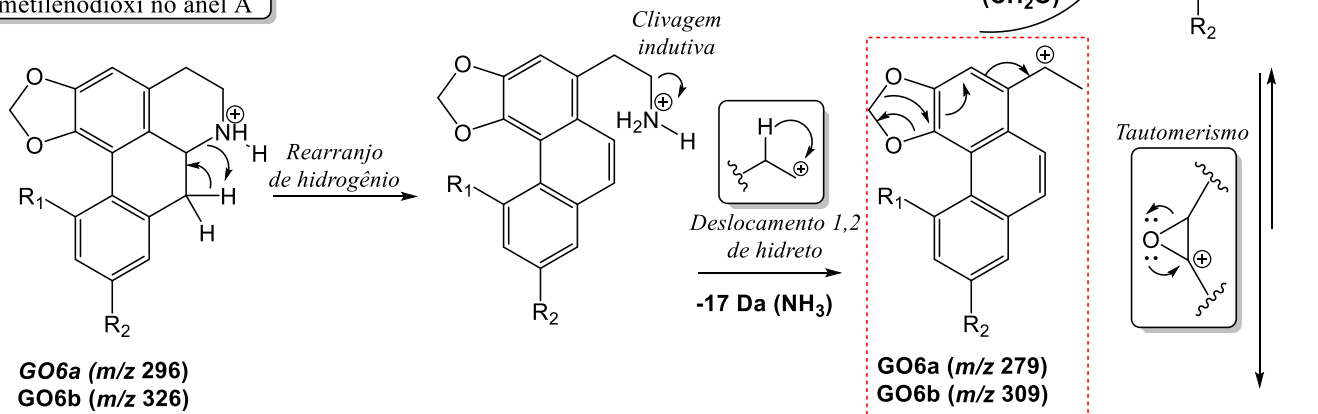


FIGURA 96: Proposta de fragmentação para alcaloides aporfinos *sensu stricto*.

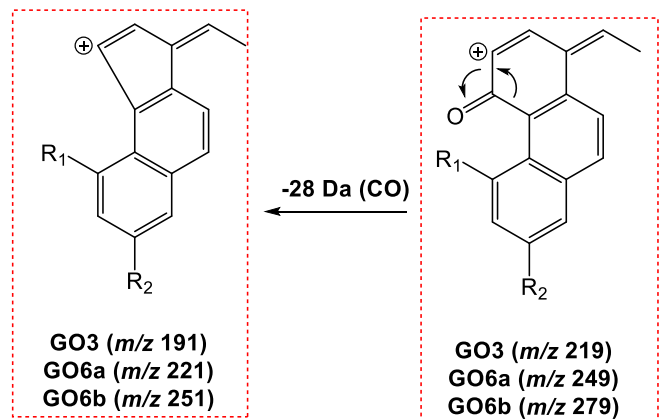
Aporfinos contendo grupos hidroxila adjacente a metoxila no anel A



Aporfinos contendo ponte metilenodioxi no anel A



GO3 (R₁=H; R₂=H)
GO6a (R₁=OCH₃; R₂=H)
GO6b (R₁=OCH₃; R₂=OCH₃)



5.1.4. Identificação estrutural dos alcaloides do tipo tetraidroprotoberberino

5.1.4.1. Identificação estrutural de GO4

A substância **GO4** apresentou-se como sólido amorfo de coloração amarelada de massa igual a 6,5 mg. A análise por CCDA utilizando o reagente de Dragendorff evidenciou característica da presença de nitrogênio na molécula (coloração alaranjada), indicando a presença de um constituinte alcaloídico. Através da análise preliminar dos espectros de RMN de ^1H (FIGURA 97) observaram-se características de um alcaloide do tipo tetraidroprotoberberino.

Analisando o espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 97 - 99) juntamente com o mapa de correlação HSQC (FIGURA 100 - 103) verificou-se a presença de sinais de hidrogênios diastereotópicos para quatro grupos metilênicos em δ 3,10 (1H, *m*)/ δ 2,62 (2H, *m*), δ 3,18 (1H, *m*)/ 2,62 (2H, *m*), δ 4,23 (1H, *d*, $J = 15,7$ Hz)/ δ 3,53 (1H, *d*, $J = 15,7$ Hz) e δ 3,24 (1H, *dd*, $J = 15,8$ e 3,8 Hz)/ δ 2,83 (1H, *dd*, $J = 15,8$ e 11,3 Hz) típicos dos hidrogênios, H-5_{peq}/H-5_{pax}, H-6_{peq}/H-6_{pax}, H-8_{peq}/H-8_{pax}, e H-13_{peq}/H-13_{pax}, correlacionados aos sinais dos carbonos em δ 28,9 (C-5), δ 51,5 (C-6), δ 54,0 (C-8) e δ 36,4 (C-13), respectivamente, bem como um sinal de um hidrogênio metínico em δ 3,54 (1H, *dd*, $J = 11,3$ e 3,8 Hz) correlacionado ao sinal do carbono em δ 59,4 (C-13a) característico de H-13a. Estes hidrogênios metilênicos juntamente com o sinal do hidrogênio metínico em δ 3,54 confirmaram o sistema tetraidroprotoberberino da molécula.

FIGURA 97: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO4**.

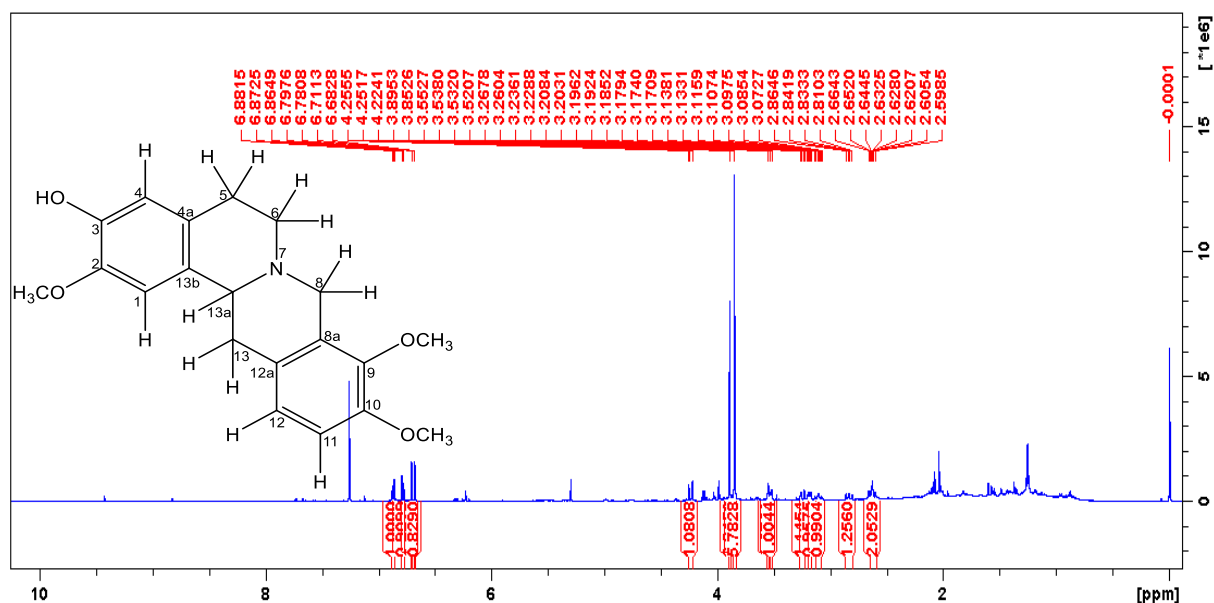
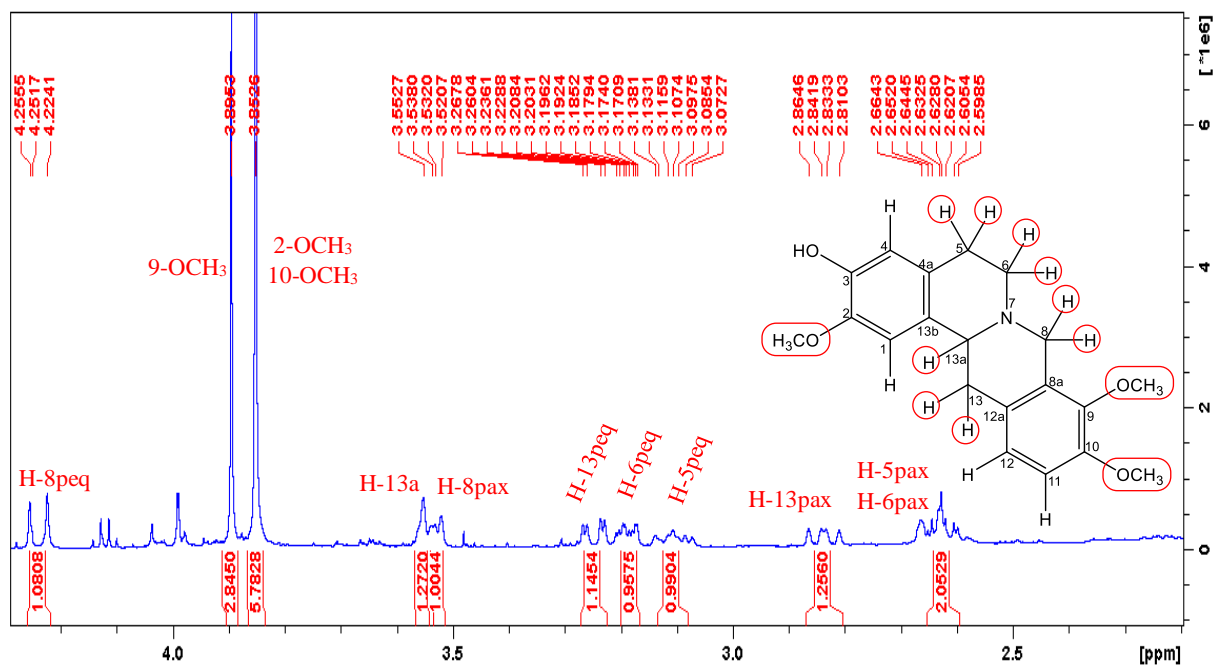


FIGURA 98: Ampliação da região alifática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **G04**.

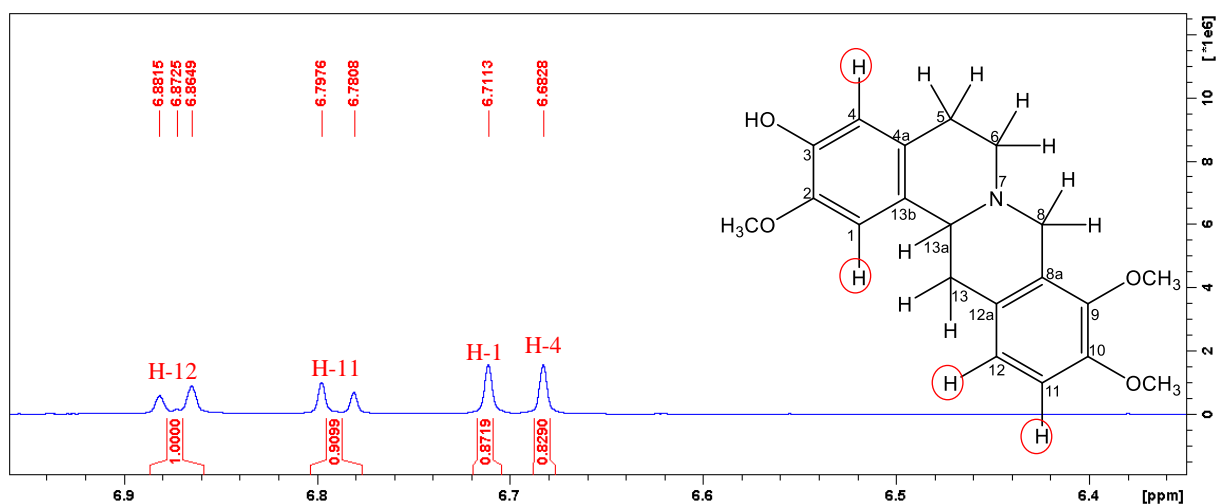


Observou-se também um sinal em δ 3,89 (3H, *s*), sendo um simpleto com integração para três hidrogênios característico de grupo metoxílico, o qual foi atribuído à uma substituição em C-9 e outro simpleto em δ 3,85 (6H, *s*) com integração para seis hidrogênios observado, foi atribuído à dois grupos metoxílicos nas posições C-10 e C-2 (FIGURA 98).

Pelo espectro de RMN de ^1H observou-se ainda quatro sinais típicos de hidrogênios aromáticos, sendo dois sinais em δ 6,71 (1H, *s*) e δ 6,68 (1H, *s*) atribuídos a dois hidrogênios aromáticos isolados situados em posição *para* característicos de anel benzênico 2,3,5-6-tetrassubstituído, e dois em δ 6,87 (1H) e δ 6,78 (1H) ambos dupletos com constante de acoplamento *orto* em torno de 8,4 Hz sugerindo outro anel benzênico tetrassubstituído (FIGURA 99).

A correta localização destes hidrogênios aromáticos, bem como para os grupos metoxílicos foi estabelecida com a análise dos mapas de contorno HSQC e HMBC, sendo verificado o padrão de substituição dos anéis A e D do sistema tetraidroprotoberberino.

FIGURA 99: Ampliação da região de hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **G04**.



Pela análise dos espectros de HSQC (FIGURA 100-103) e HMBC (FIGURA 104-106) observou-se a presença de 20 carbonos, sendo 12 aromáticos entre δ 150,3 e δ 107,8, três metoxílicos em δ 60,1, δ 56,1 e δ 55,9, um metínico em δ 59,4 típico de C-13a, e quatro metilênicos em δ 54,0 (C-8), δ 51,5 (C-6), δ 36,4 (C-13) e δ 28,9 (C-5) confirmando a presença do esqueleto tetraidroprotoberberino na molécula, estando de acordo com as informações contidas no espectro de RMN de ^1H . Verificou-se também que o sinal do carbono em δ 144,0 típico de carbono aromático oxigenado, não apresentou nenhuma correlação com os grupos metoxílicos, indicando provavelmente a presença de um grupo hidroxila presente na molécula.

FIGURA 100: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **G04**.

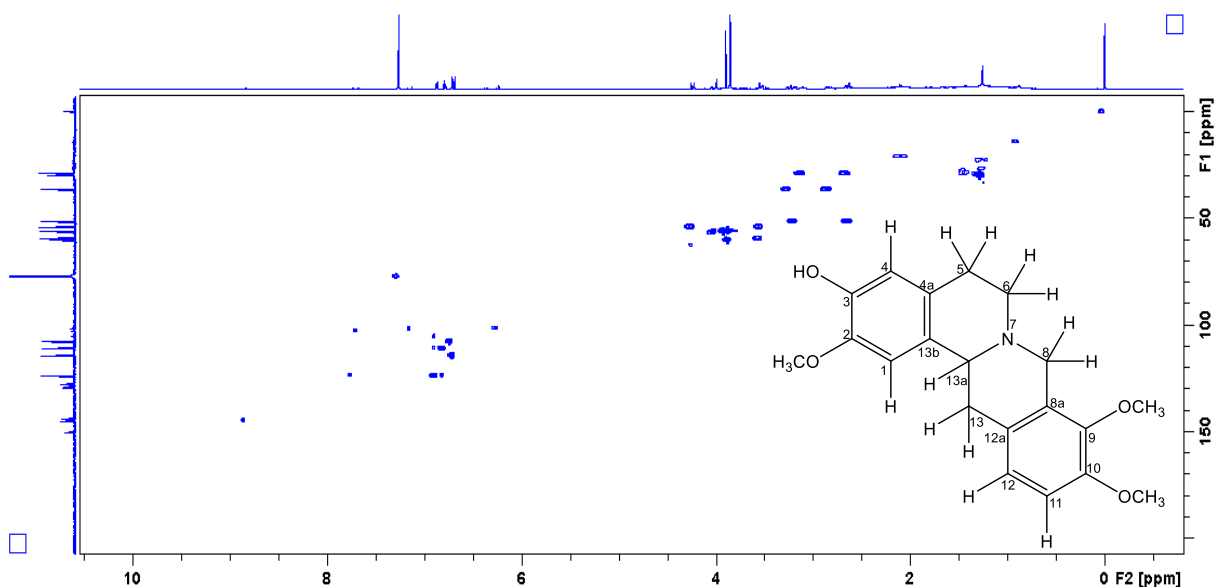


FIGURA 101: Ampliação do mapa de correlação HSQC mostrando os grupos metoxílicos (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de **GO4**.

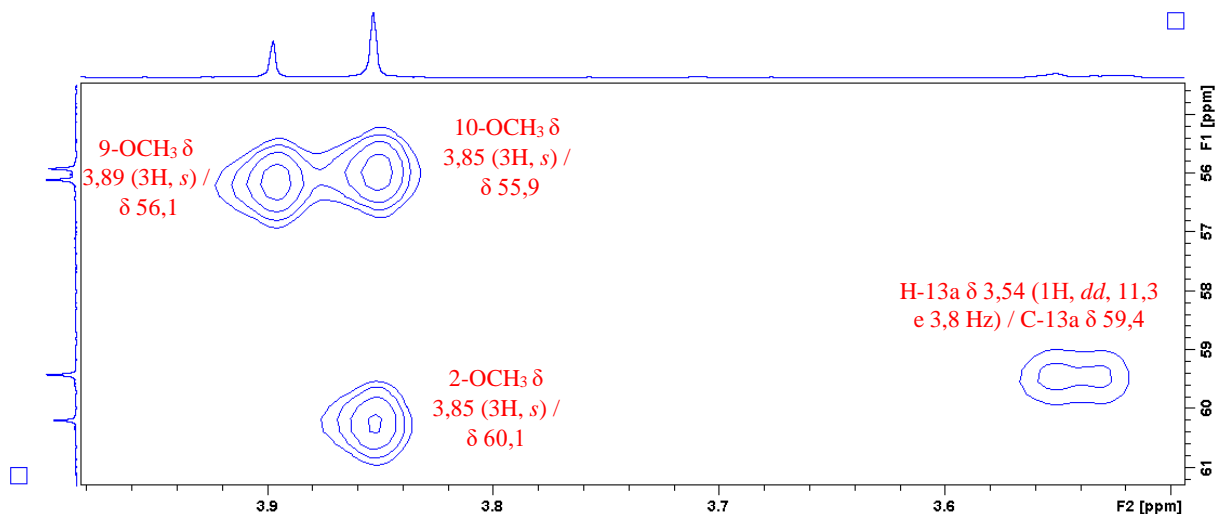
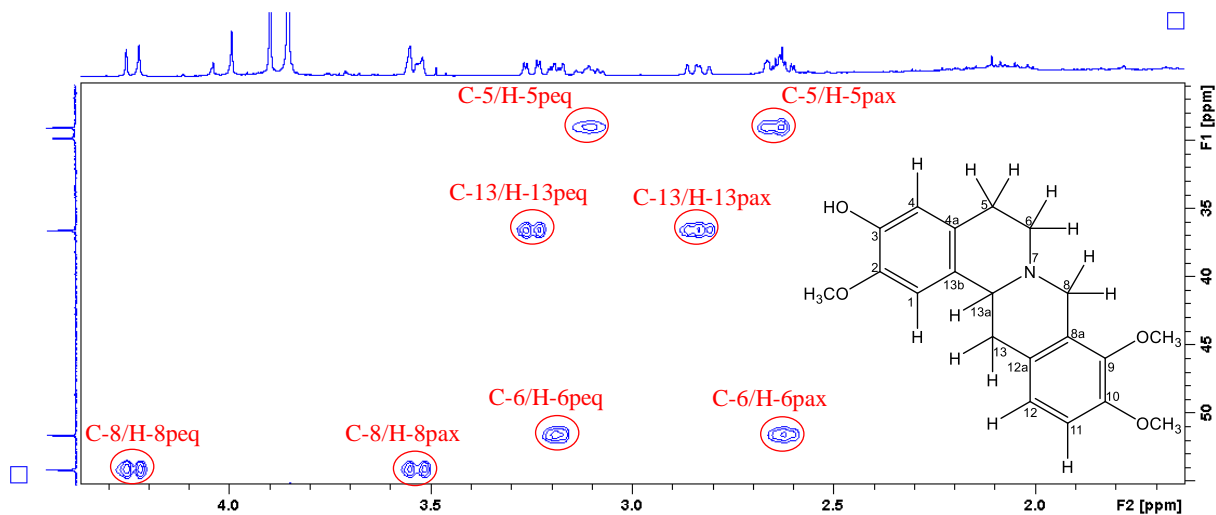


FIGURA 102: Ampliação do mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de **GO4**.



As corretas posições dos hidrogênios aromáticos foram determinadas pelas análises dos mapas de contorno HSQC (FIGURA 103) e HMBC (FIGURA 104-106) com os carbonos aromáticos vicinais e alifáticos. Os sinais dos hidrogênios em δ 6,71 ligado ao carbono δ 107,8 e δ 6,68 ligado ao carbono δ 114,2 foram atribuídos a H-1/C-1 e H-4/C-4, respectivamente definindo assim o sistema *para* no anel A. Da mesma forma, os sinais dos hidrogênios em δ 6,87 e δ 6,78 foram atribuídos a H-12 e H-11, ligados aos carbonos de sinais δ 123,8 (C-12) e δ 110,9 (C-11) respectivamente, definindo assim o sistema *orto* no anel D.

FIGURA 103: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de **GO4**).

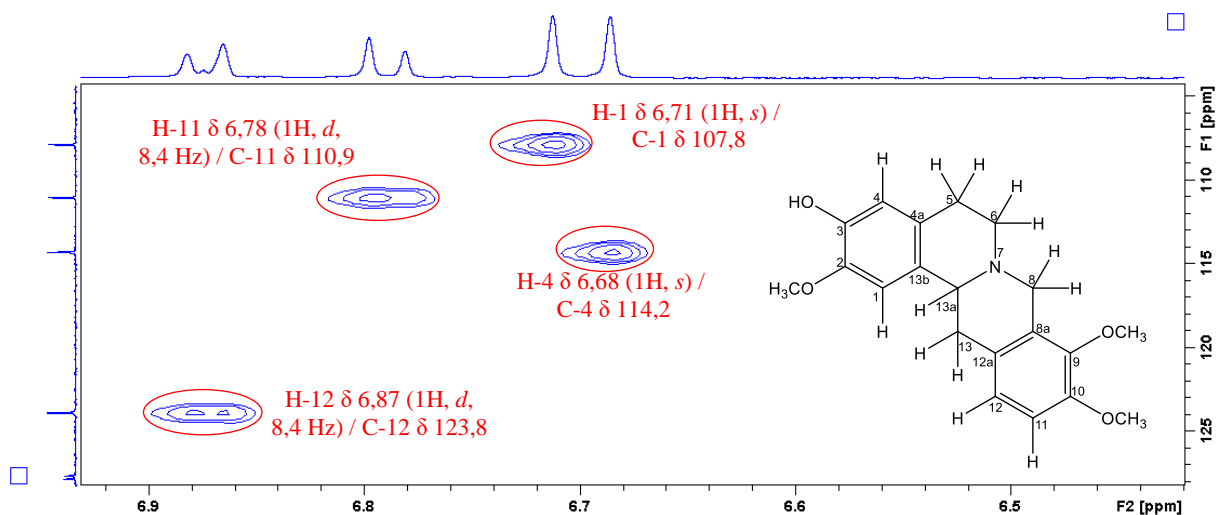
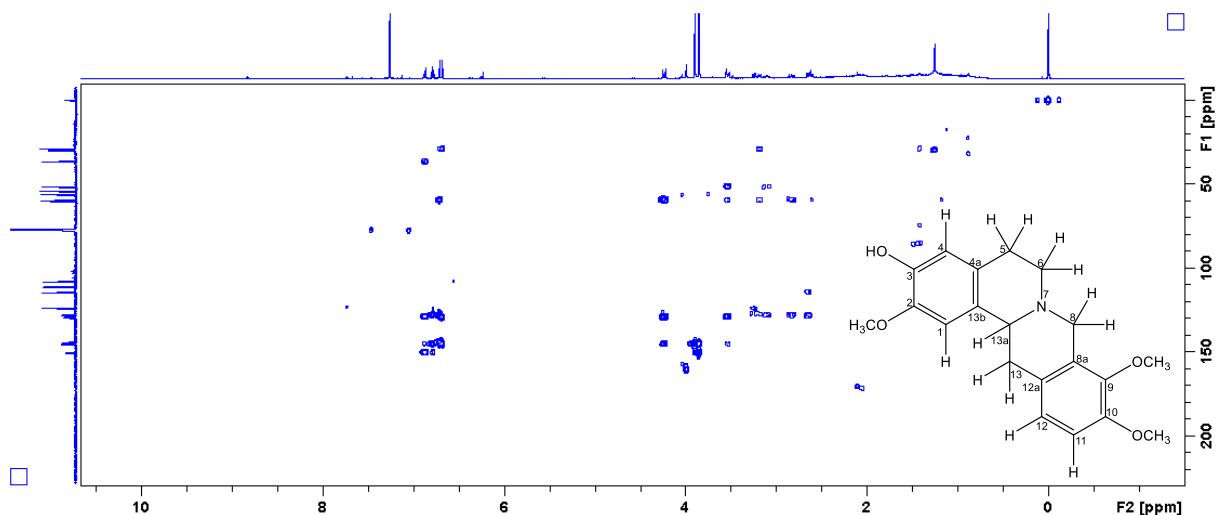


FIGURA 104: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO4**.



A existência da correlação do sinal em δ 6,68 (H-4) a J^3 com o sinal do carbono em δ 28,9 (C-5), e do sinal em δ 6,71 (H-1) a J^3 com o sinal do carbono em δ 59,4 (C-13a) indicou a posição de ambos os hidrogênios aromáticos do anel A sem ambiguidades. Consequentemente o sistema *orto* foi definido no anel D pela correlação do sinal em δ 6,87 (H-12) a J^3 com os sinais dos carbonos em δ 36,4 (C-13), δ 128,7 (C-8a) e δ 150,3 (C-10), e do sinal em δ 6,78 (H-11), também a J^3 com os sinais dos carbonos em δ 127,7 (C-12a) e δ 145,1 (C-9) (FIGURA 104, 105 e 106).

FIGURA 105: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO4**.

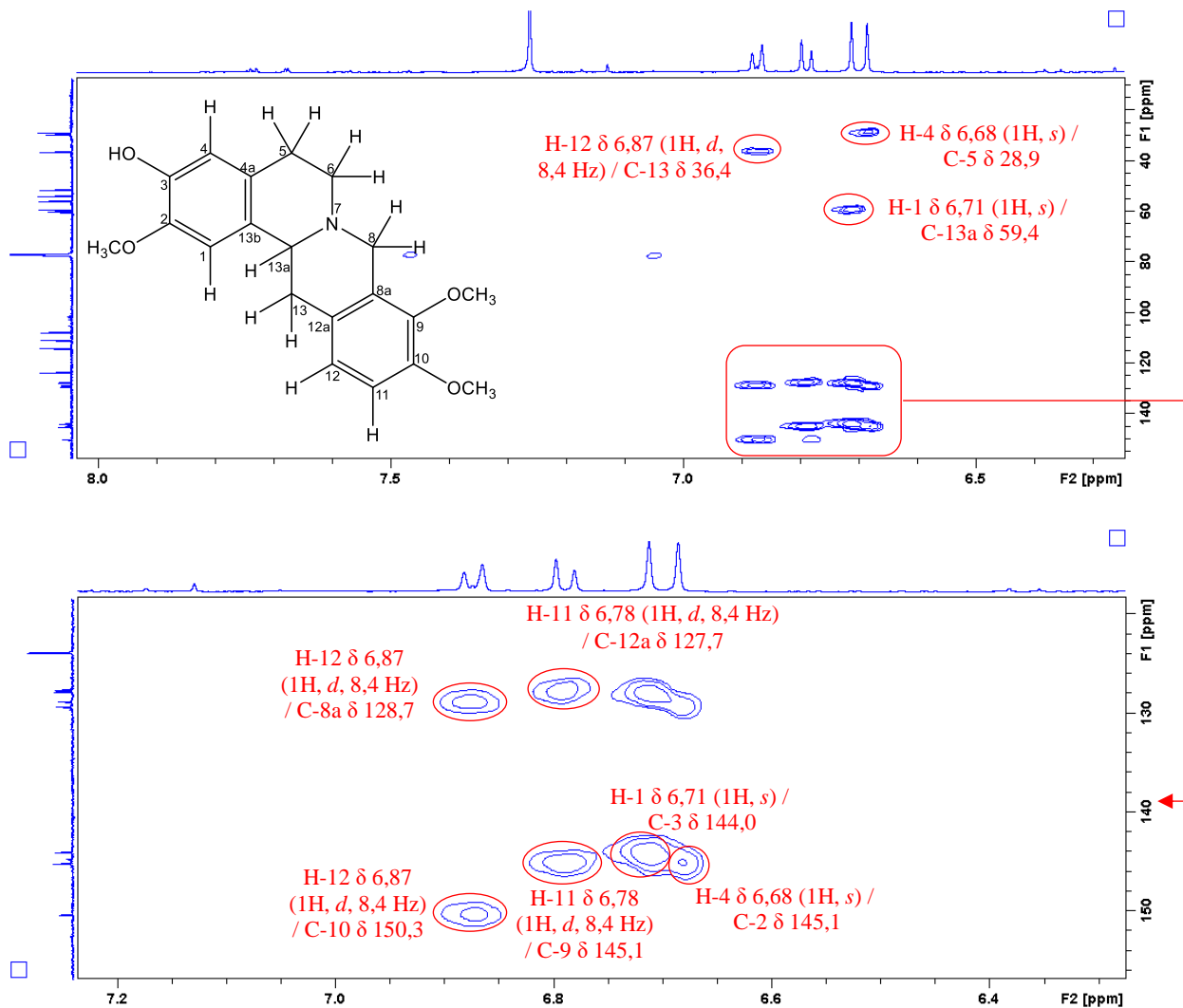
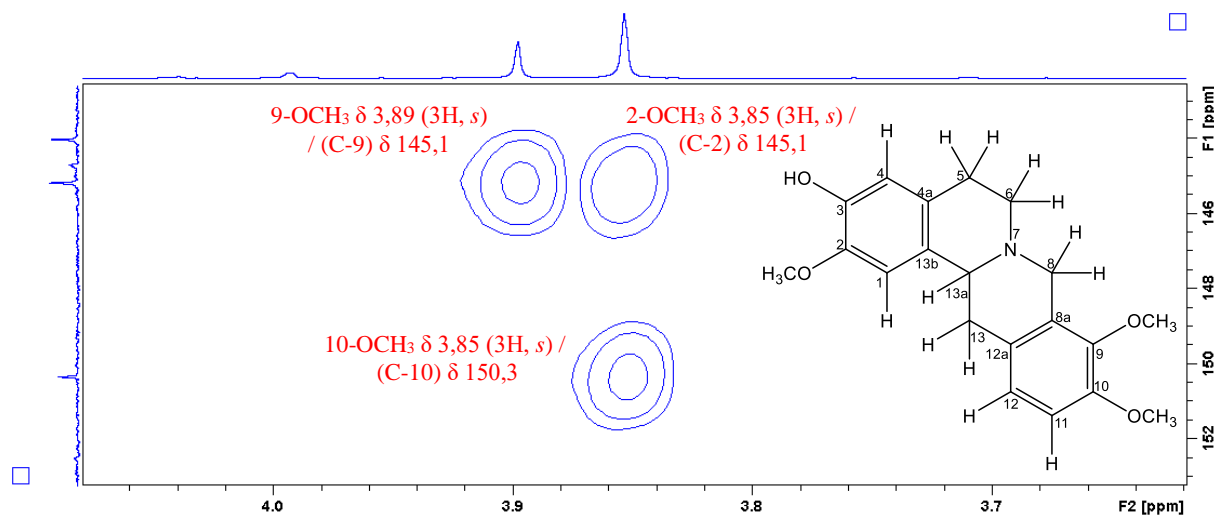


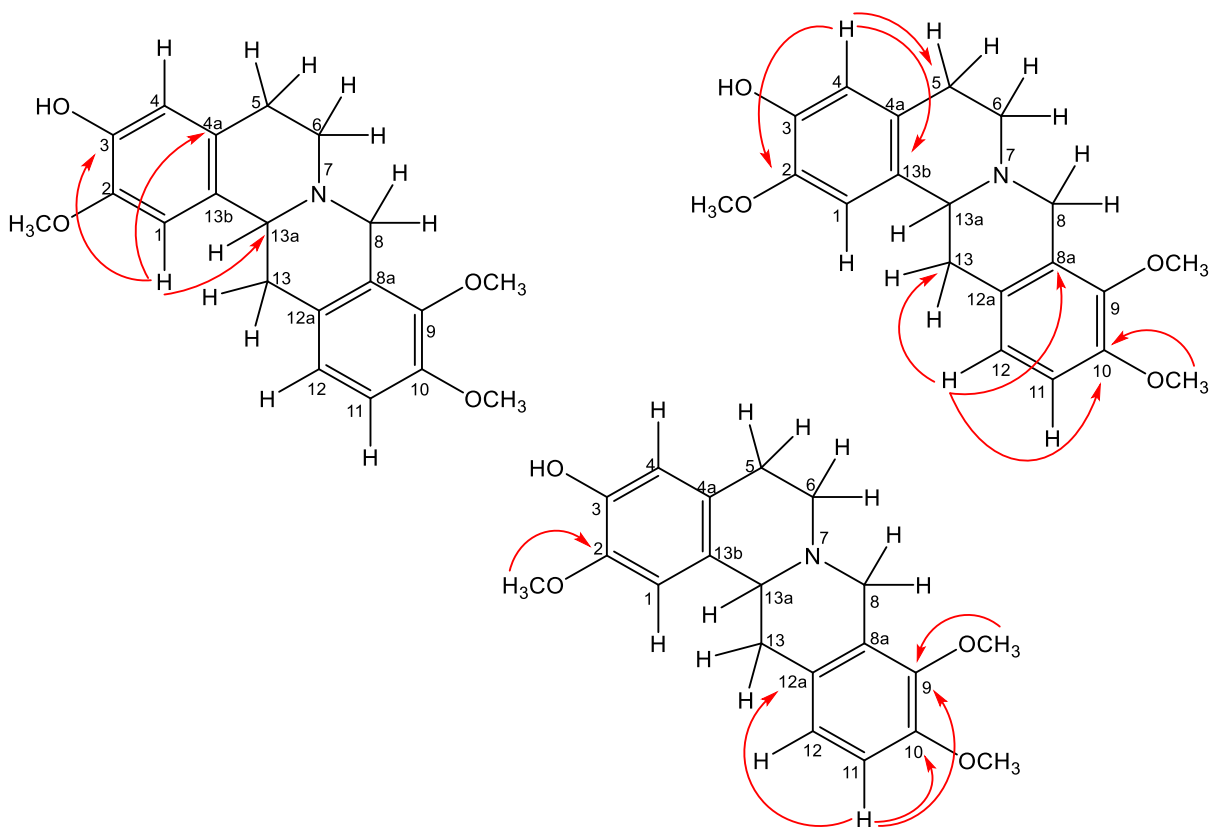
FIGURA 106: Ampliação do mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3) de **GO4**.



Pelo mapa de contorno HMBC pôde-se definir as corretas posições dos grupos hidroxila e metoxílico no anel A. Assim, observou-se que o sinal em δ 6,71 (H-1) mostrou uma forte correlação a J^3 com o sinal de carbono em δ 144,0 (C-3) (característico de carbono aromático oxigenado) que não apresentou nenhuma correlação com os sinais de hidrogênios dos grupos metoxílicos, atribuindo assim o grupo hidroxila substituído nessa posição, já o sinal em δ 6,68 (H-4) apresentou também uma correlação a J^3 com o sinal de carbono em δ 145,1 portador do grupo metoxílico com sinal de hidrogênio em δ 3,85 ligados ao carbono em δ 60,1 (2-OCH₃), atribuindo um dos grupos metoxílicos em C-2 (FIGURA 101, 105 e 106).

Da mesma forma para o anel D, observou-se que o sinal em δ 6,87 (H-12) mostrou uma forte correlação a J^3 com o sinal de carbono em δ 150,3 (C-10) portador do outro grupo metoxílico com sinal de hidrogênio em δ 3,85 ligados ao carbono em δ 55,9 (10-OCH₃) confirmando assim o segundo grupo metoxílico em C-10, já o sinal em δ 6,78 (H-11) mostrou uma forte correlação a J^3 com o sinal de carbono em δ 145,1 (C-9) portador do terceiro grupo metoxílico com sinal de hidrogênio em δ 3,89 ligados ao carbono em δ 56,1 (9-OCH₃) estabelecendo-o assim em C-9 (FIGURA 101, 105 e 106). As demais correlações observadas estão registradas na FIGURA 107.

FIGURA 107: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO4**.



Na TABELA 22 são apresentados os valores de RMN de ^1H e ^{13}C de **GO4** atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC com suas respectivas correlações observadas, e comparações com os dados da literatura consistindo nos dados do alcaloide coripalmina. Vale ressaltar que embora esse alcaloide já possua relato na literatura, os dados publicados para esse composto apresentam-se incompletos ou com algumas ambiguidades, desse modo, os dados apresentados aqui auxiliarão novas pesquisas na identificação desse composto.

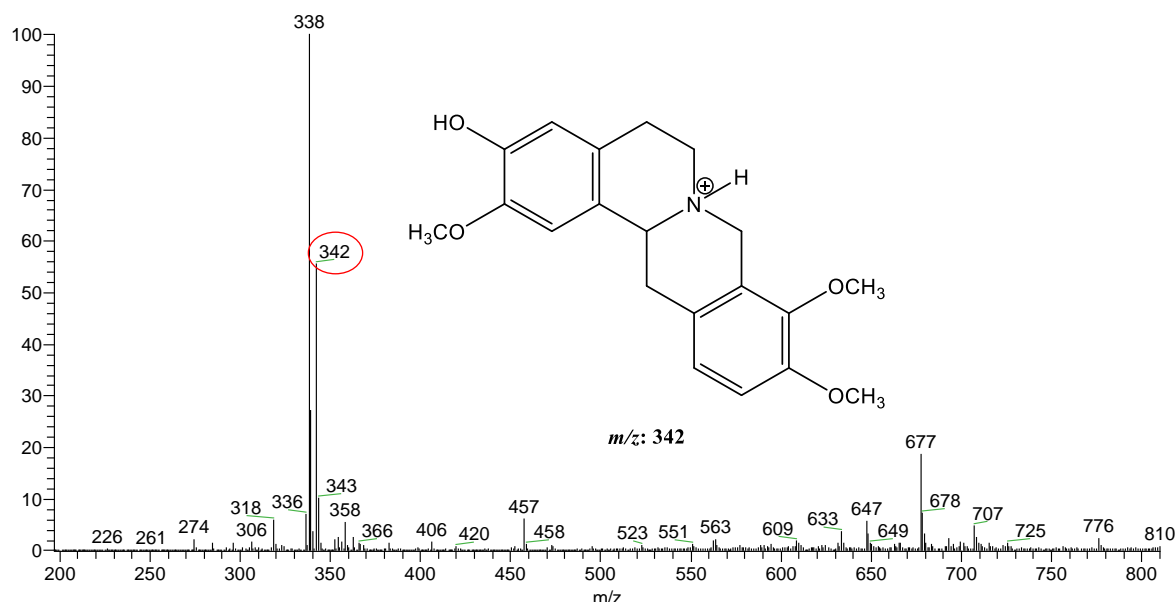
TABELA 22: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C **GO4**.

Posição	GO4			Coripalmina	
	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., J em Hz) ^d	^{13}C (δ) ^d
1	6,71 (1H, <i>s</i>)	107,8 CH	3, 4a e 13a	6,73 (1H, <i>s</i>)	108,7 CH
2	-	145,1 C	-	-	147,5 C
3	-	144,0 C	-	-	147,6 C
4	6,68 (1H, <i>s</i>)	114,2 CH	2, 5 e 13b	6,62 (1H, <i>s</i>)	114,4 CH
4a	-	127,5 C	-	-	126,7 C
5 peq	3,10 (1H, <i>m</i>)	28,9 CH ₂	6 e 4a	3,14 (1H, (<i>dd</i> , 11,7 e 5,0))	29,0 CH ₂
5 pax	2,62 (2H, <i>m</i>)		4 e 13b	2,65 (1H, (<i>dd</i> , 11,1 e 3,4))	
6 peq	3,18 (1H, <i>m</i>)	51,5 CH ₂	4a, 5 e 13a	3,21 (1H, (<i>dd</i> , 5,1 e 3,5))	51,5 CH ₂
6 pax	2,62 (2H, <i>m</i>)		4a e 13a	2,69 (1H, <i>m</i>)	
8 peq	4,23 (1H, <i>d</i> 15,7)	54,0 CH ₂	8a, 9, 12a e 13a	4,21 (1H, <i>d</i> , 15,4)	53,8 CH ₂
8 pax	3,53 (1H, <i>d</i> 15,7)		6, 8a e 13a	3,59 (1H, <i>d</i> , 15,3)	
8a	-	128,7 C	-	-	127,3 C
9	-	145,1 C	-	-	143,2 C
10	-	150,3 C	-	-	146,5 C
11	6,78 (1H, <i>d</i> 8,4)	110,9 CH	9, 10 e 12a	6,81 (1H, <i>d</i> , 8,3)	114,0 CH
12	6,87 (1H, <i>d</i> 8,4)	123,8 CH	8a, 10 e 13	6,84 (1H, <i>d</i> , 8,3)	124,9 CH
12a	-	127,7 C	-	-	127,2 C
13 peq	3,24 (1H, <i>dd</i> 15,8 e 3,8)	36,4 CH ₂	12 e 12a	3,26 (1H, <i>dd</i> , 15,8 e 3,8)	36,2 CH ₂
13 pax	2,83 (1H, <i>dd</i> 15,8 e 11,3)		12a e 13a	2,82 (1H <i>dd</i> , 15,4 e 11,7)	
13a	3,54 (1H, <i>dd</i> 11,3 e 3,8)	59,4 CH	6 e 13b	3,58 (1H, <i>dd</i> , 11,5 e 3,8)	59,4 CH
13b	-	129,2 C	-	-	129,7 C
2-OCH₃	3,85 (3H, <i>s</i>)	60,1 (CH ₃)	2	3,91 (3H, <i>s</i>)	56,3 (CH ₃)
9-OCH₃	3,89 (3H, <i>s</i>)	56,1 (CH ₃)	9	3,85 (3H, <i>s</i>)	60,7 (CH ₃)
10-OCH₃	3,85 (3H, <i>s</i>)	55,9 (CH ₃)	10	3,90 (3H, <i>s</i>)	55,7 (CH ₃)

^aExperimento realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno; ^bMultiplicidades determinadas pelos espectros de ^{13}C (ANEXO-E11 e E12), HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^dRODRIGUES, *et al.*, 2016 (^1H : 600 MHz; ^{13}C : 150 MHz; CDCl_3); (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 108), obtida através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição de dados (ESI+), mostrou dois íons de maior intensidade, provavelmente devido à presença de uma outra substância em concentração mínima não podendo ser identificada através dos dados de RMN sendo que o íon com $[M+H]^+$ m/z 338 Da, apresentou maior evidência possivelmente devido à sua maior propensão em aceitar prótons (mais facilmente ionizado), por sua vez, o íon com $[M+H]^+$ com m/z 342 se mostrou compatível com os dados de RMN que indicam a fórmula molecular $C_{20}H_{23}NO_4$.

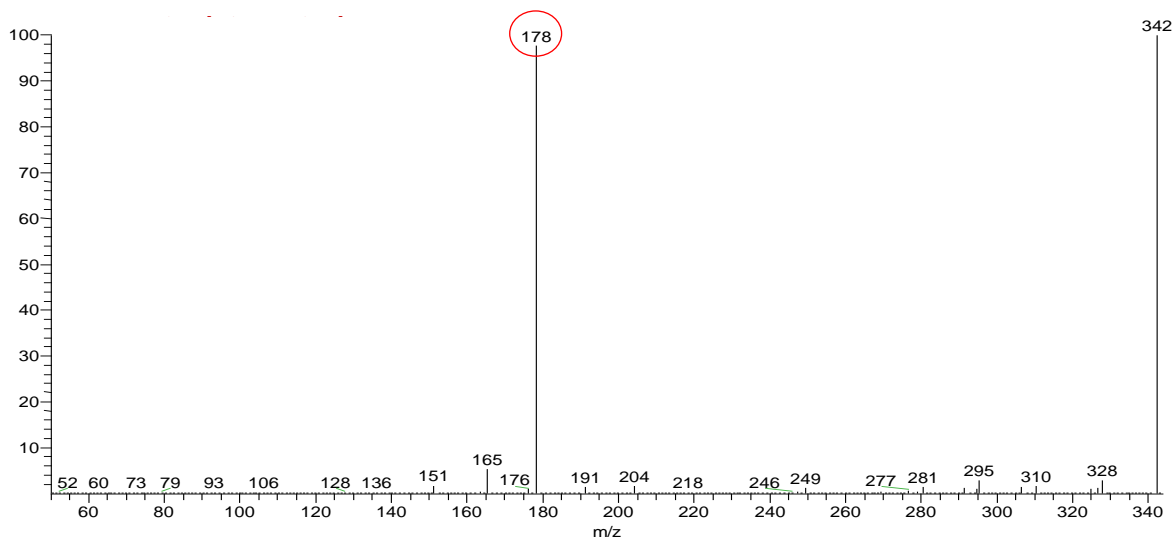
FIGURA 108: Espectro de massas de **GO4**.



Quando submetido à fragmentação o íon $[M+H]^+$ com m/z 342 (FIGURA 109), evidenciou a formação de um intenso produto de m/z 178, representando uma alta perda de massa inicial, que é incomum em alcaloides aporfínicos, porém comuns em alcaloides tetrahidroprotoberberínicos (SOARES *et al.*, 2015; SCHMIDT *et al.*, 2005; SHIM *et al.*, 2013).

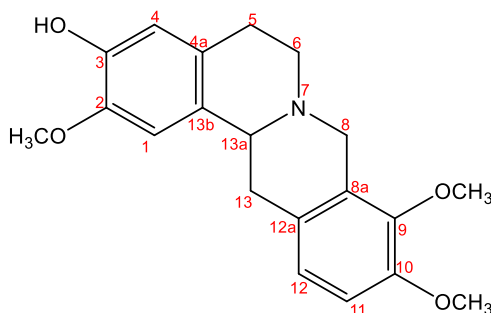
Este íon (m/z 178) foi previamente descrito como fragmento chave de compostos tetrahidroprotoberberínicos contendo grupos metoxil e hidroxil no anel A, consistindo em um produto formado por meio de uma abertura do anel C via uma reação retro-Diels-Alder (FIGURA 123) (SOARES *et al.*, 2015; DEMARQUE *et al.*, 2016), corroborando desse modo com as observações realizadas por RMN.

FIGURA 109: Perfil de fragmentações de **GO4**.



Pelas análises de RMN de ^1H e ^{13}C 1D/2D, EM e comparação com os dados descritos na literatura (RODRIGUES, *et al.*, 2016), foi possível identificar **GO4** como sendo o alcaloide conhecido como **coripalmina** (FIGURA 110).

FIGURA 110: Estrutura da coripalmina.



5.1.4.2. Identificação estrutural de **GO7**

A substância **GO7** apresentou-se como sólido de coloração amarelada de massa igual a 3,3 mg com teste positivo para alcaloides quando revelada com solução de Dragendorff. Através da análise do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (FIGURA 111) foram observados sinais semelhantes quando comparados com os espectros de **GO4**, nos fazendo sugerir que a substância presente em **GO7** também seria constituída por um alcaloide do tipo tetrahydroprotoberberino, diferenciando-se apenas, pelo padrão das posições dos hidrogênios aromáticos, onde evidenciou-se a ausência do sistema *orto*, e a presença de mais um sistema *para*, sendo assim, foram observados dois sinais em δ 6,66 (1H, *s*) e 6,57 (1H, *s*) típico de H-12 e H-9, e dois em δ 6,72 (1H, *s*) e 6,68 (1H, *s*) característicos de H-1 e H-4, respectivamente, indicando que **GO7** seria possivelmente um isômero estrutural de **GO4** (FIGURA 111 e 112).

FIGURA 111: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO7**.

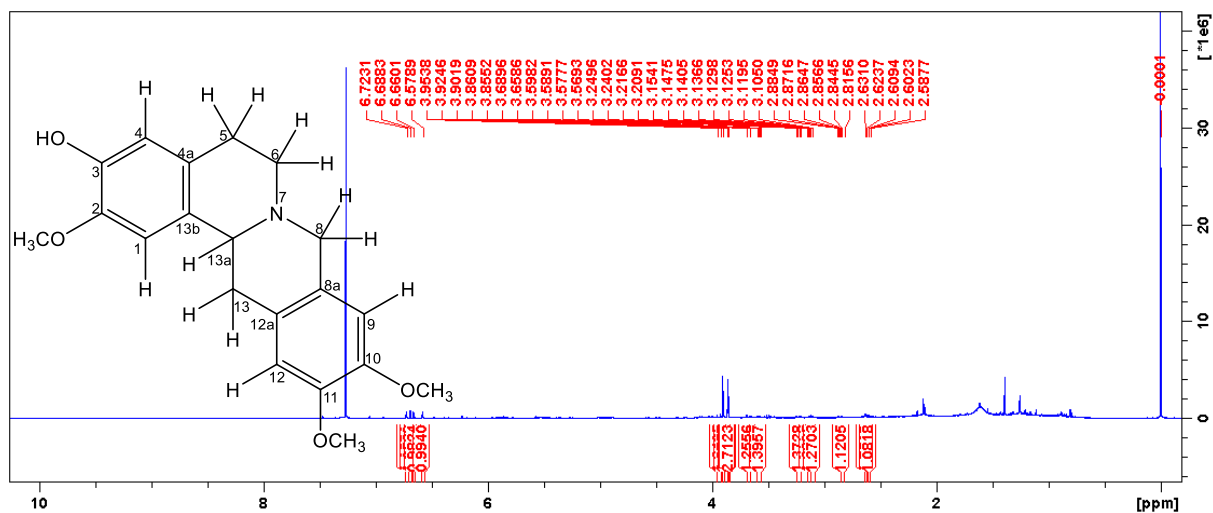
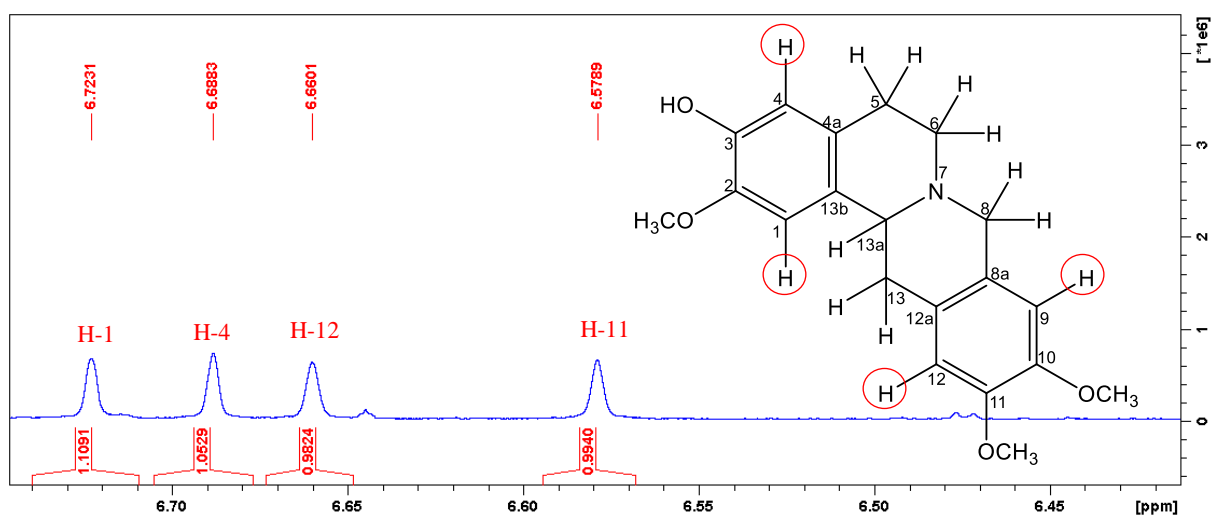


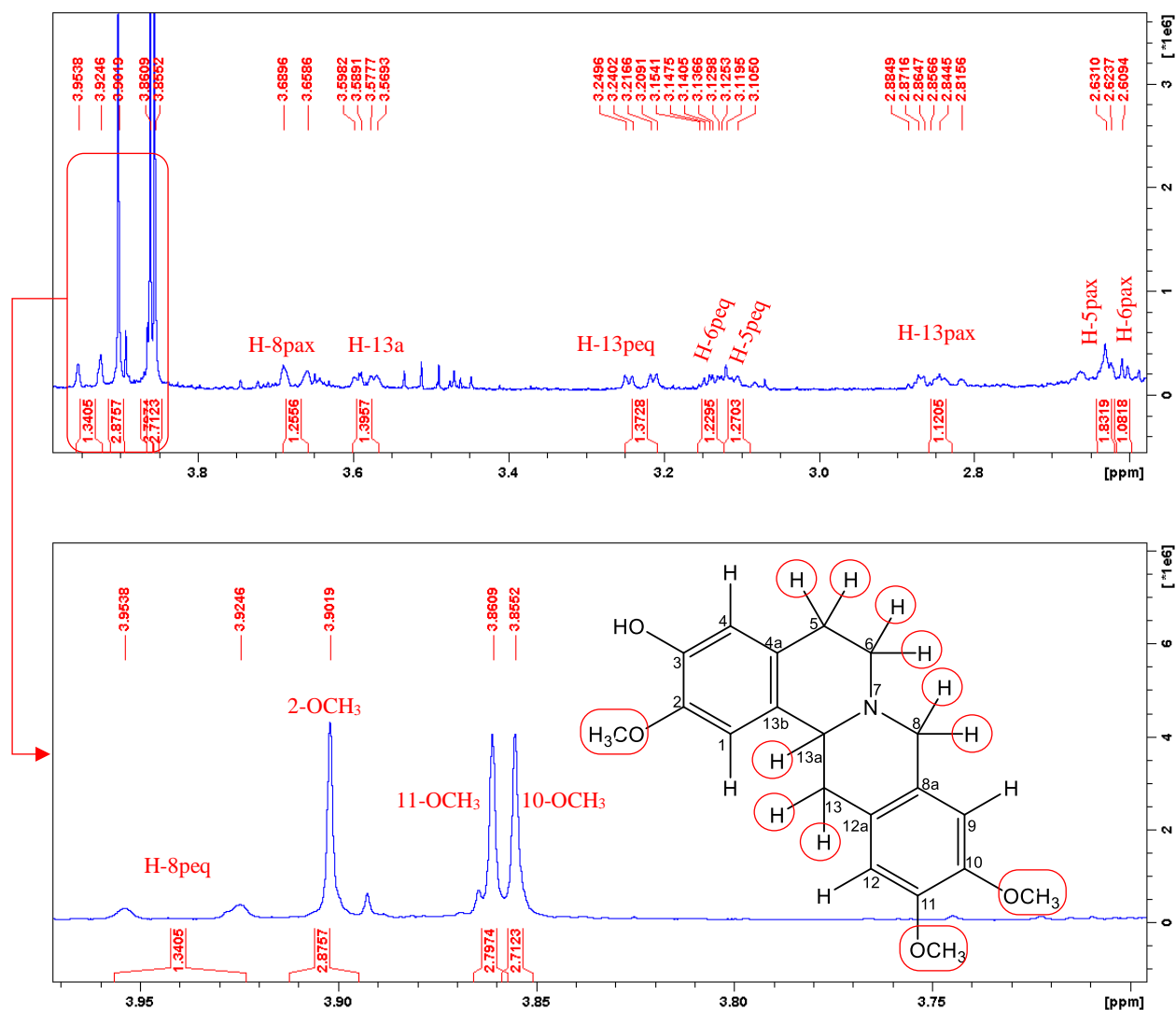
FIGURA 112: Ampliação região aromática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **GO7**.



Assim como observado em **GO4**, verificou-se a presença de sinais de hidrogênios diastereotópicos para quatro grupos metilênicos entre δ 3,93 – 2,60 referentes aos hidrogênios, H-5_{peq}/H-5_{pax}, H-6_{peq}/H-6_{pax}, H-8_{peq}/H-8_{pax}, e H-13_{peq}/H-13_{pax}, bem como um sinal de um hidrogênio metínico em δ 3,58 (1H, *dd*, $J = 11,2$ e $4,2$ Hz) característico de H-13a (FIGURA 113). Estes hidrogênios metilênicos juntamente com o sinal do hidrogênio metínico em δ 3,58 confirmaram o sistema tetraidroprotoberberínico da molécula, seus respectivos carbonos foram definidos com base no mapa de correlação HSQC (TABELA 23).

Também foram observados a presença de três sinais em δ 3,90, δ 3,85 e δ 3,86, todos simples com integração para três hidrogênios cada, típicos de grupos metoxílicos (FIGURA 113).

FIGURA 113: Ampliação da região alifática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de **G07**.



Assim como realizado para **G04**, as posições dos hidrogênios aromáticos de **G07** foram determinadas pelas análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC (TABELA 23) com os carbonos aromáticos vicinais e alifáticos. Os sinais dos hidrogênios em δ 6,72 ligado ao carbono em δ 107,7 e δ 6,68 ligado ao carbono δ 114,2 foram atribuídos a H-1/C-1 e H-4/C-4, respectivamente definindo um dos sistemas *para* no anel A. Da mesma forma, para o anel D os sinais dos hidrogênios em δ 6,66 ligado ao carbono em δ 111,4 e δ 6,57 ligado ao carbono em δ 109,0 foram atribuídos a H-12/C-12 e H-9/C-9, respectivamente, definindo assim o outro sistema *para* no anel D (FIGURA 114 e 115).

FIGURA 114: Mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de **GO7**).

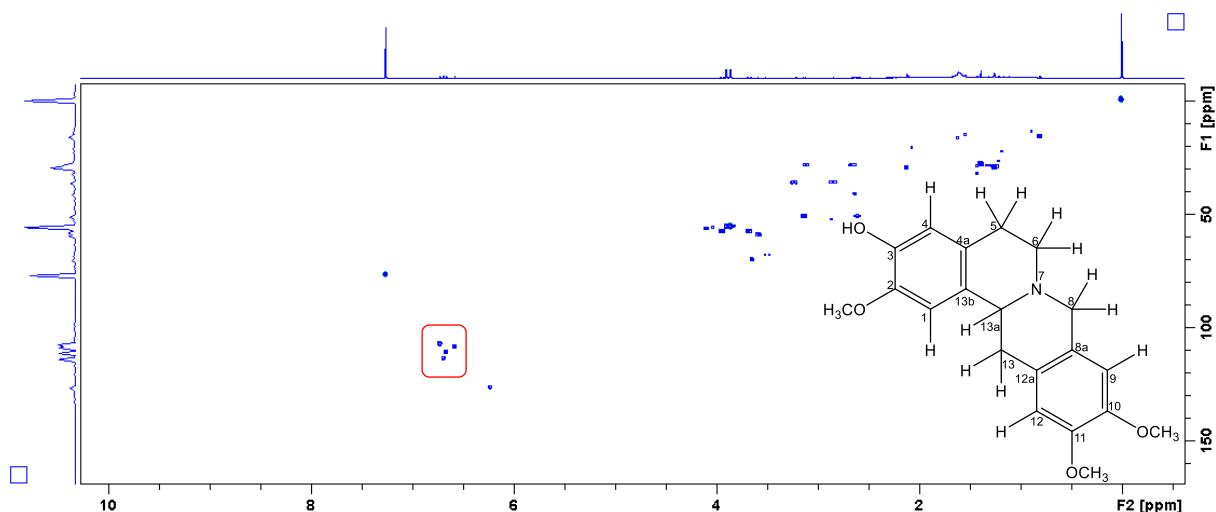
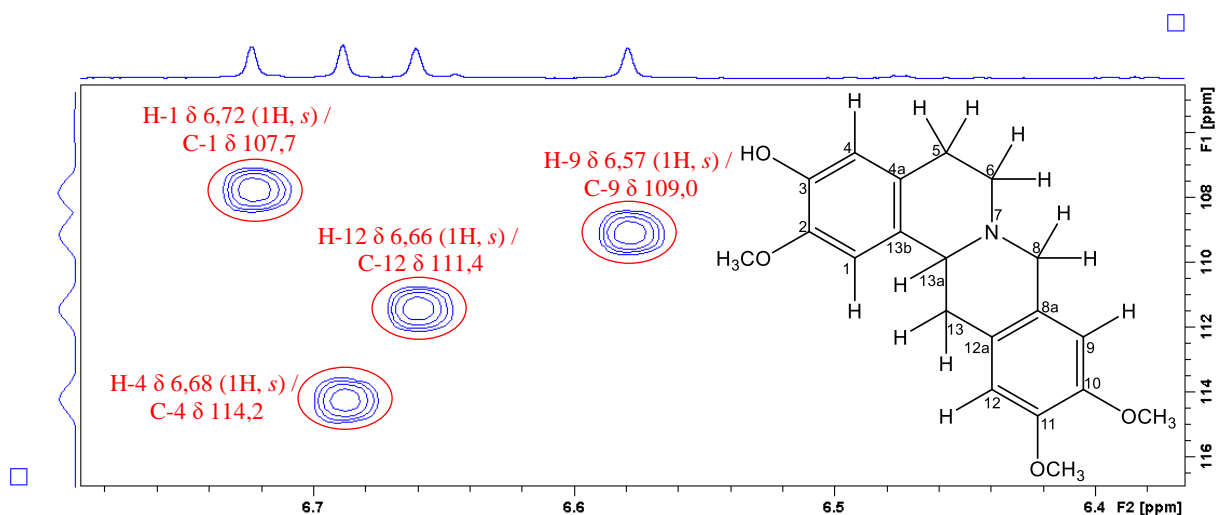


FIGURA 115: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HSQC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de **GO7**).



A existência das correlações a J^3 do sinal em δ 6,68 (H-4) com o sinal do carbono em δ 28,8 (C-5) e do sinal em δ 6,72 (H-1) com o sinal do carbono em δ 59,7 (C-13a), bem como as correlações também a J^3 do sinal em δ 6,57 (H-9) com o sinal do carbono em δ 58,4 (C-8) e do sinal em δ 6,66 (H-12) com o sinal do carbono em δ 36,5 (C-13) indicou a correta posição dos hidrogênios aromáticos sem ambiguidades. (FIGURA 116 e 117, TABELA 23).

FIGURA 116: Mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de **GO7**).

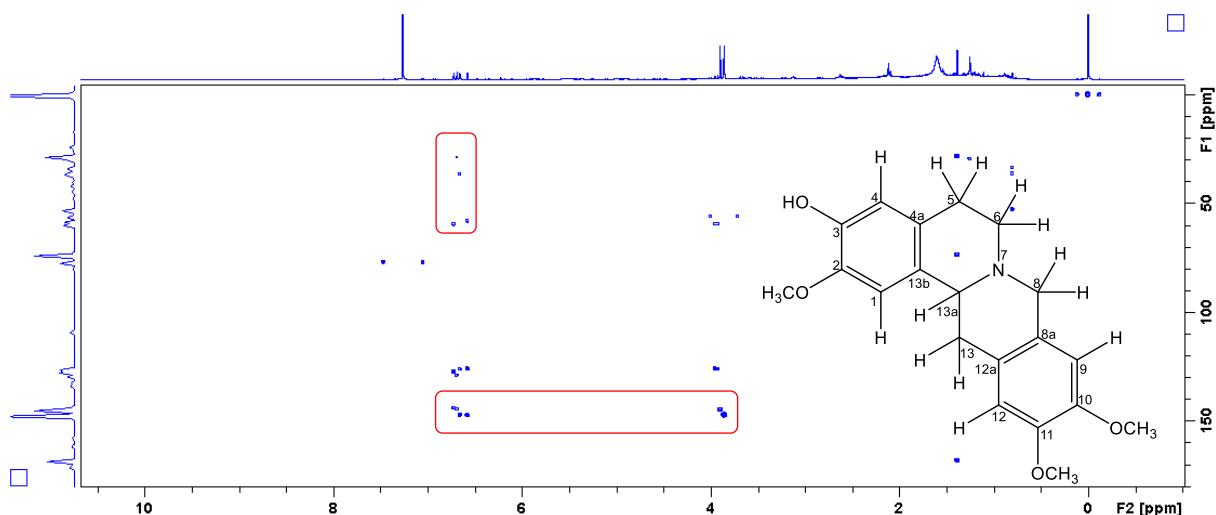
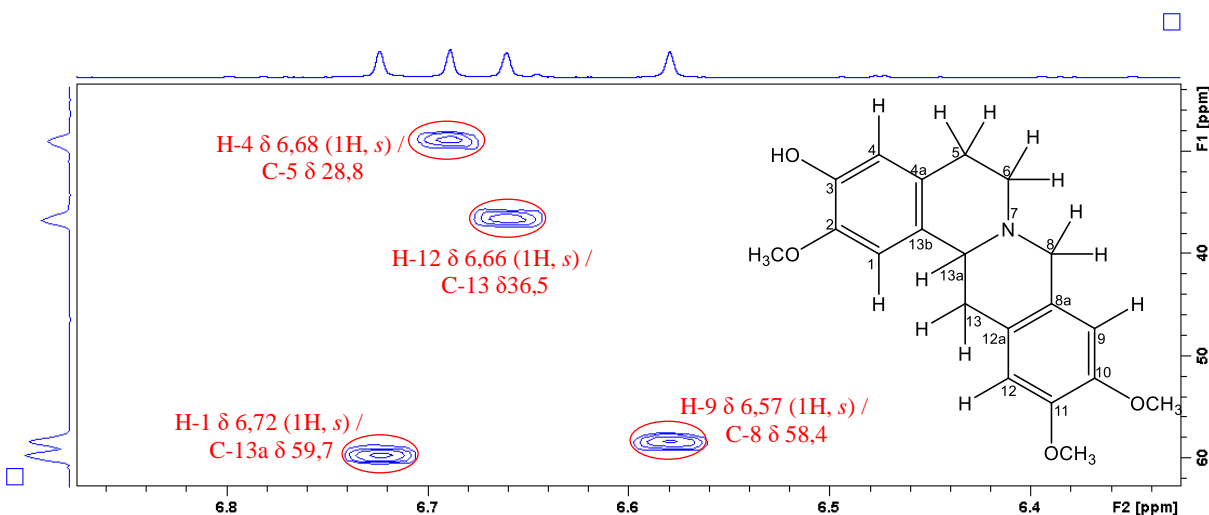


FIGURA 117: Ampliação da região aromática no mapa de correlação HMBC (^1H : 500 MHz; ^{13}C : 125 MHz; CDCl_3 de **GO7**).



Pelo mapa de contorno HMBC pôde-se também definir as corretas posições dos grupos hidroxílico e metoxílicos. Observou-se desse modo, para o anel A, que o sinal em δ 6,72 (H-1) mostrou uma forte correlação a J^3 com o sinal de carbono em δ 144,4 (C-3) o qual não apresentou nenhuma correlação com os sinais de hidrogênios dos grupos metoxílicos, atribuindo assim, o grupo hidroxila em C-3, e o sinal em δ 6,68 (H-4) apresentou uma forte correlação a J^3 com o sinal de carbono em δ 145,0 (C-2), portador do grupo metoxílico em δ 3,90 (2-OCH₃), atribuindo assim um dos grupos metoxílico em C-2 (FIGURA 118).

Da mesma forma, para o anel D, observou-se que o sinal em δ 6,66 (H-12) mostrou uma forte correlação a J^3 com o sinal de carbono em δ 147,5 portador do grupo metoxílico em 3,85

(10-OCH₃) confirmando o outro grupo metoxílico em C-10, e o sinal em δ 6,57 (H-9) apresentou uma forte correlação a J^3 também com o sinal em δ 147,5 atribuído em C-11, sendo este portador de outro grupo metoxílico em 3,86 (11-OCH₃) confirmando o grupo metoxílico em C-11 (FIGURA 118). As demais correlações observadas estão dispostas na FIGURA 119.

FIGURA 118: Ampliação do mapa de correlação HMBC (¹H: 500 MHz; ¹³C: 125 MHz; CDCl₃ de **GO7**.

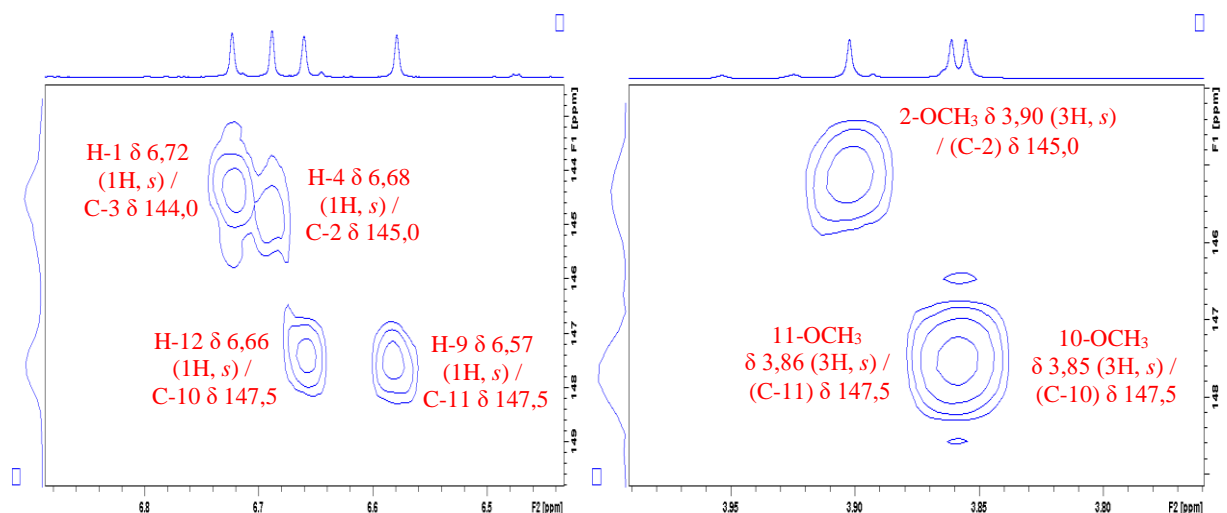
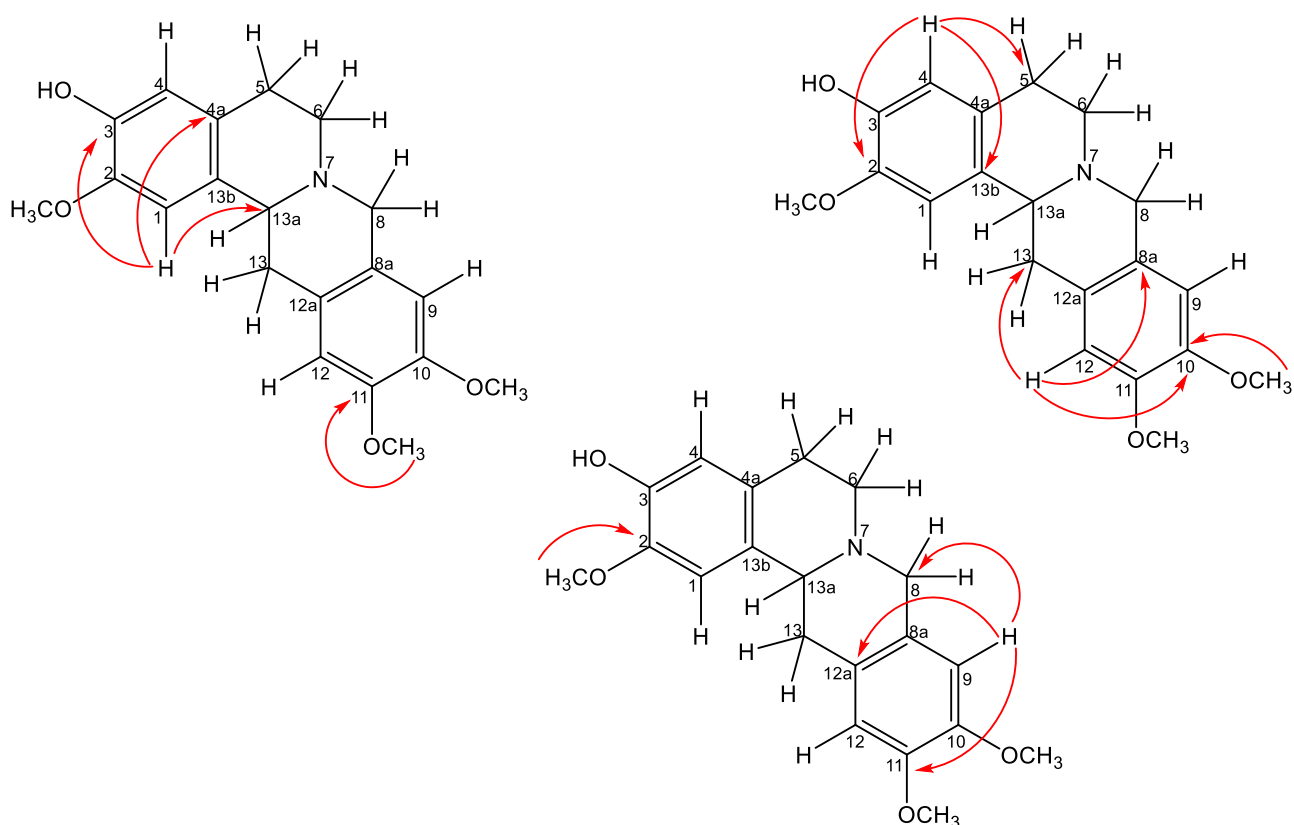


FIGURA 119: Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de **GO7**.



Na TABELA 23 são apresentados os valores de RMN de ^1H e ^{13}C de **GO7** atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC com suas respectivas correlações observadas, e comparações com os dados da literatura consistindo nos dados do alcaloide discretina.

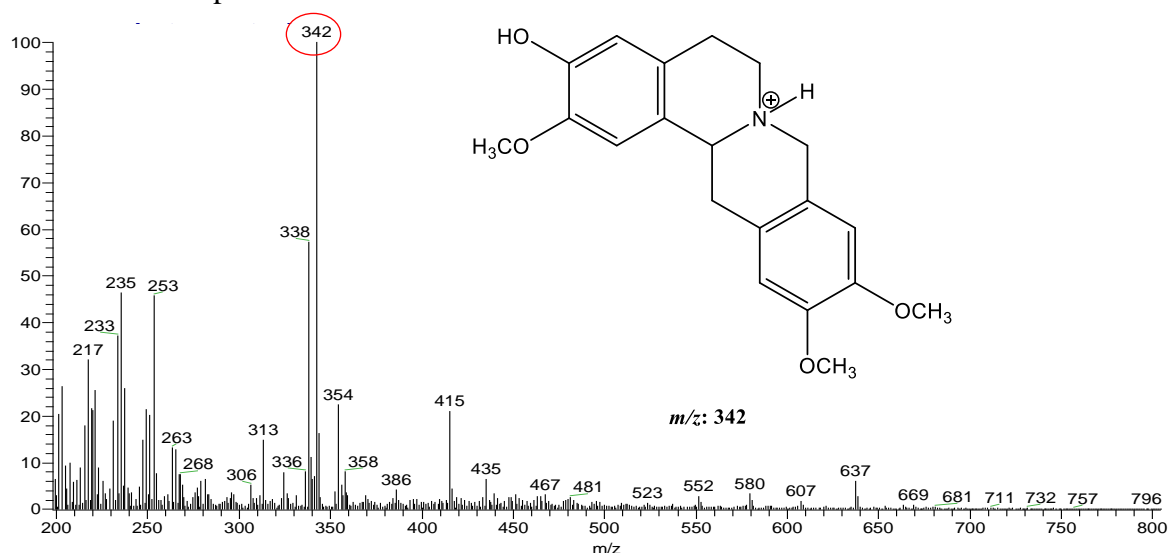
TABELA 23: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C **GO7**.

Posição	GO7			Discretina	
	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	^{13}C (δ) ^{a,b}	HMBC (^1H - ^{13}C) ^c	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz) ^d	^{13}C (δ) ^d
1	6,72 (1H, <i>s</i>)	107,7 CH	3, 4a e 13a	6,83 (1H, <i>s</i>)	109,8 CH
2	-	145,0 C	-	-	147,7 C
3	-	144,4 C	-	-	146,2 C
4	6,68 (1H, <i>s</i>)	114,2 CH	2, 5 e 13b	6,57 (1H, <i>s</i>)	115,8 CH
4a	-	127,7 C	-	-	127,3 C
5 peq	3,10 (1H, <i>m</i>)	28,8 CH ₂	6 e 4a	3,05 (1H, <i>ddd</i> , 17,4, 12,5 e 5,0)	28,4 CH ₂
5 pax	2,63 (1H, <i>m</i>)		4, 4a e 13b		
6 peq	3,13 (1H, <i>m</i>)	51,4 CH ₂	4a, 5 e 13a	3,19 (1H, <i>m</i>)	51,6 CH ₂
6 pax	2,60 (1H, <i>m</i>)		4a e 13a		
8 peq	3,93 (1H, <i>d</i> 14,5)	58,4 CH ₂	8a, 9, 12a e 13a	3,98 (1H, <i>d</i> 14,8)	58,7 CH ₂
8 pax	3,67 (1H, <i>d</i> 14,5)		8a e 12a		
8a	-	126,4 C	-	-	126,5 C
9	6,57 (1H, <i>s</i>)	109,0 CH	8, 11 e 12a	6,69 (1H, <i>s</i>)	110,4 C
10	-	147,5 C	-	-	148,9 C
11	-	147,5 C	-	-	149,2 CH
12	6,66 (1H, <i>s</i>)	111,4 CH	8a, 10 e 13	6,78 (1H, <i>s</i>)	112,8 CH
12a	-	126,3 C	-	-	127,2 C
13 peq	3,22 (1H, <i>dd</i> 16,2 e 4,2)	36,5 CH ₂	8a, 12, 12a e 13a	3,43 (1H, <i>dd</i> 16,2 e 3,9)	36,5 CH ₂
13 pax	2,83 (1H, <i>dd</i> 16,2 e 11,2)		8a, 12a e 13a		
13a	3,58 (1H, <i>dd</i> 11,2 e 4,2)	59,7 CH	4a, 8 e 13b	3,66 (1H, <i>dd</i> 11,4 e 3,9)	60,1 CH
13b	-	129,3 C	-	-	129,0 C
2-OCH₃	3,90 (3H, <i>s</i>)	56,1 (CH ₃)	2	3,85 (3H, <i>s</i>)	56,6 (CH ₃)
10-OCH₃	3,85 (3H, <i>s</i>)	55,9 (CH ₃)	9	3,81 (3H, <i>s</i>)	56,4 (CH ₃)
11-OCH₃	3,86 (3H, <i>s</i>)	55,9 (CH ₃)	11	3,82 (3H, <i>s</i>)	56,5 (CH ₃)

^aExperimento realizado a 500 MHz para ^1H e 125 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno; ^bMultiplicidades determinadas mapas de correlação HSQC e HMBC; ^cÁtomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; ^dCOSTA, *et al.*, 2013b (^1H : 400 MHz; ^{13}C : 100 MHz; CDCl_3 + gotas de CD_3OD); (δ) Deslocamentos em ppm.

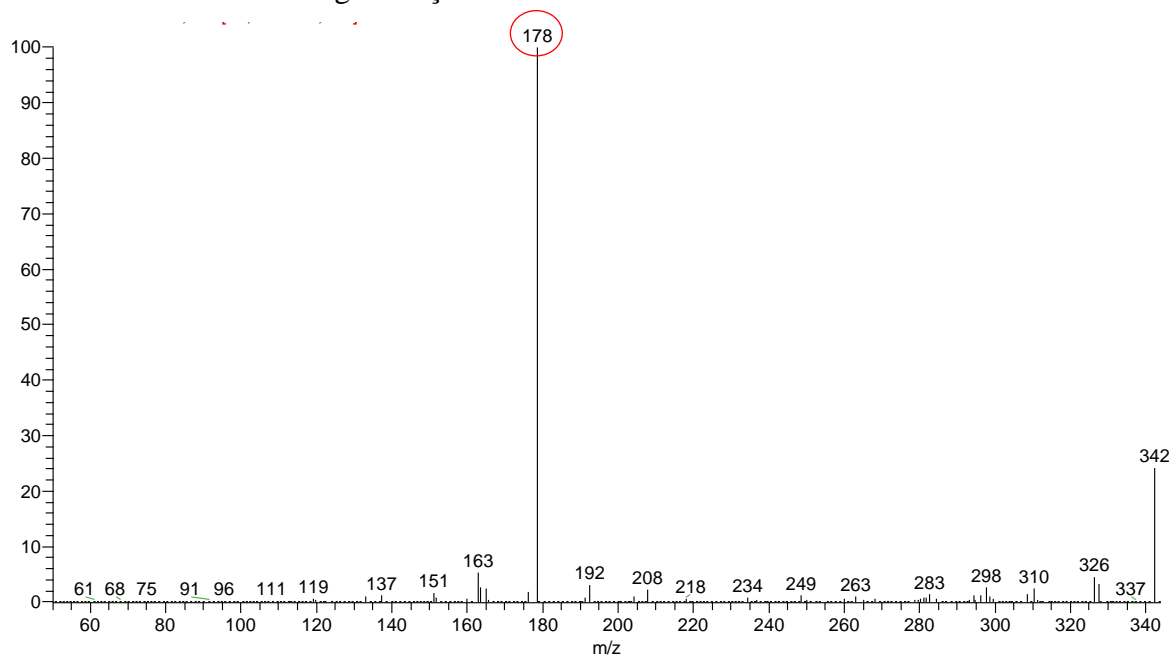
A análise por espectrometria de massas (FIGURA 120), obtida através de ionização por eletrospray em modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 342 Da, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_4$.

FIGURA 120: Espectro de massas de **GO7**.



Assim como observado em **GO4**, quando submetido à fragmentação o íon $[M+H]^+$ com m/z 342 referente a **GO7** (FIGURA 121), apresentou a formação de um intenso produto de m/z 178, representando uma alta perda de massa inicial, característica de alcaloides tetrahidroprotoberberinos (FIGURA 123) (SOARES *et al.*, 2015; SCHMIDT *et al.*, 2005; SHIM *et al.*, 2013). Sendo assim, suportam-se as ideias estipuladas por RMN, em que se teria a estrutura de um alcaloide do tipo tetrahidroprotoberberino em **GO7**.

FIGURA 121: Perfil de fragmentações de **GO7**.



Pelas análises de RMN de ^1H , HSQC, HMBC, EM e comparação com os dados descritos na literatura (COSTA, *et al.*, 2013b), foi possível identificar **GO4** como sendo o alcaloide conhecido como **discretina** (FIGURA 122).

FIGURA 122: Estrutura da discretina.

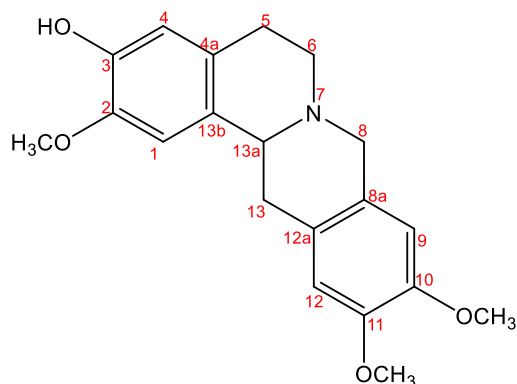
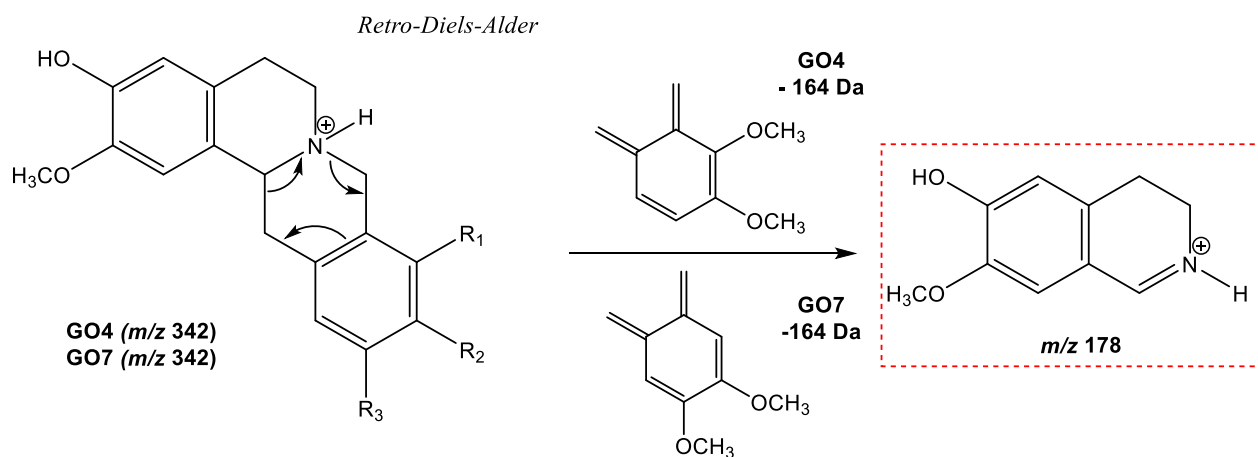


FIGURA 123: Proposta de fragmentação para alcaloides tetraidroprotoberberinos.



GO4 ($R_1=\text{OCH}_3$; $R_2=\text{OCH}_3$; $R_3=\text{H}$)
GO7 ($R_1=\text{H}$; $R_2=\text{OCH}_3$; $R_3=\text{OCH}_3$)

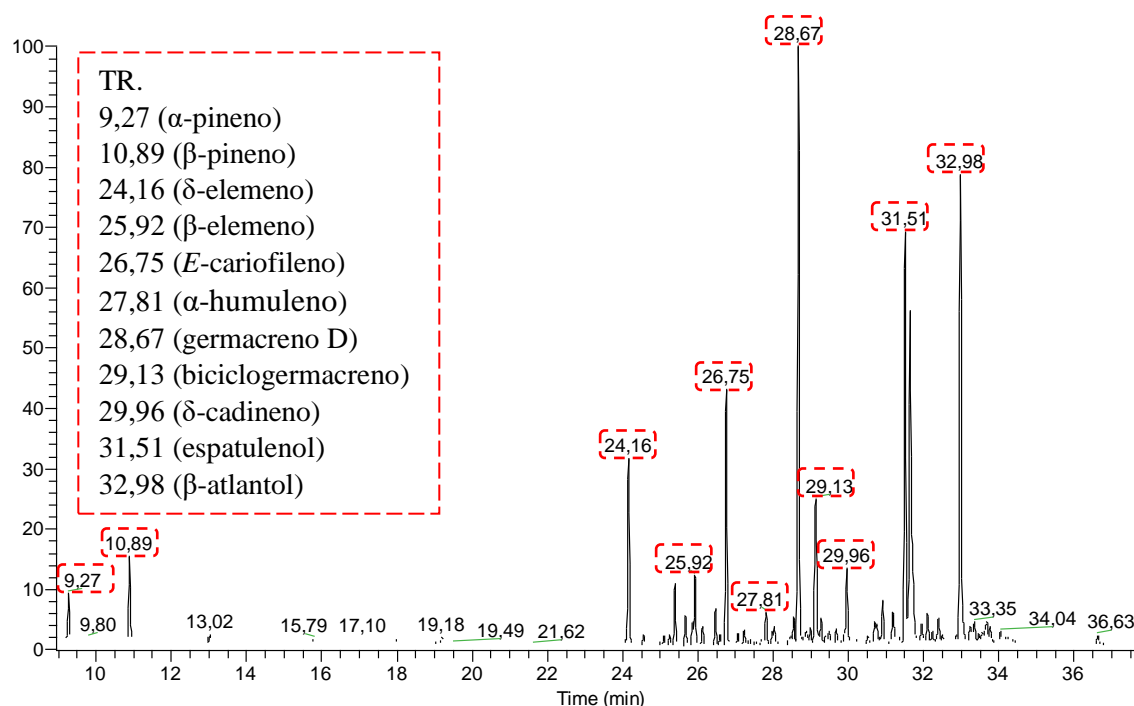
5.2. Estudo dos constituintes voláteis das folhas de *G. olivacea*

A análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e detector por ionização de chama (CG-DIC) possibilitou a determinação da composição química do óleo essencial de *G. olivacea* extraído das folhas secas apresentando um rendimento de 0,18% em relação ao peso do material seco. Os componentes voláteis foram identificados com base nos seus espectros de massas e seus respectivos índices de retenção, bem como a comparação com os dados disponíveis na literatura.

O óleo essencial de *G. olivacea* apresentou uma coloração esverdeada e ao ser avaliado quanto sua composição química observou-se a presença de monoterpenos (2) equivalentes à 2,75% do óleo, enquanto que os sesquiterpenos (37) identificados corresponderam a 94,07%, totalizando 39 substâncias identificadas em 96,82% da composição do óleo essencial (FIGURA 124).

Semelhante as análises de composição dos óleos essenciais de várias espécies da família Annonaceae descritas na literatura que destacam o espatulenol e o óxido de cariofileno como substâncias comuns em espécies dos gêneros *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia*, para a espécie em estudo observou-se equivalência nos resultados, apresentando ambas substâncias em sua composição (DUTRA, *et al.*, 2012).

FIGURA 124: Cromatograma dos íons totais do óleo essencial das folhas de *Guatteria olivacea*.



As principais substâncias identificadas foram o germacreno D com (17,65%), β -atlantol (13,21%), óxido de cariofileno (12,03%), espatulenol (11,26%) e (*E*)-cariofileno (7,26%) (ANEXO - E13 à E17). Outros compostos identificados com concentração acima de 1,5% foram: biciclogermacreno (5,87%), δ -elemeno (4,95%), δ -cadineno (2,08%), β -pineno (1,83%) e α -copaeno (1,69%). A presença de algumas dessas substâncias majoritárias foi observada em óleos essenciais de diferentes espécies de *Guatteria*, de acordo com os trabalhos de Maia *et al.* (2005), Costa *et al.* (2008), Palazzo *et al.* (2009) e Aciole *et al.* (2011), indicando que *G. olivacea* é uma espécie quimicamente típica da família de Annonaceae. (TABELA 24).

TABELA 24: Composição química do óleo essencial das folhas de *G. olivacea*.

N	Composto	IR ^a	IR ^b	% Óleo essencial
1	α -pineno	930	932	0,92±0,25
2	β -pineno	972	974	1,83±0,38
3	δ -elemeno	1335	1335	4,95±0,33
4	α -cubeno	1347	1348	0,45±0,06
5	Ciclosativeno	1364	1369	0,25±0,03
6	α -yalangeno	1368	1373	0,32±0,04
7	α -copaeno	1372	1374	1,69±0,18
8	β -bourboneno	1381	1387	0,92±0,09
9	β -cubeneno	1387	1387	0,27±0,07
10	β -elemeno	1389	1389	1,48±0,14
11	Cipereno	1395	1398	0,53±0,06
12	α -gurjuneno	1406	1409	1,06±0,10
13	(<i>E</i>)-cariofileno	1415	1417	7,26±0,71
14	β -copaeno	1425	1430	0,37±0,10
15	γ -elemeno	1431	1434	0,47±0,07
16	α -guaiano	1435	1437	0,26±0,05
17	6,9-guaiadieno	1440	1442	0,23±0,09
18	α -humuleno	1450	1452	1,02±0,08
19	allo- aromadrendeno	1457	1458	0,83±0,06
20	γ -muuroloeno	1474	1478	0,88±0,12
21	Germacreno D	1478	1480	17,65±0,32
22	<i>trans</i> -muurool-4(14),5-dieno	1488	1493	0,46±0,07
23	Biciclogermacreno	1493	1500	5,87±0,39
24	α -muuroloeno	1497	1500	0,80±0,07
25	δ -amorfenol	1504	1511	0,57±0,04
26	γ -cadineno	1511	1513	0,61±0,06
27	δ -cadineno	1521	1522	2,08±0,23
28	<i>trans</i> -cadina-1(2),4-dieno	1529	1533	0,30±0,07
29	α -calacoreno	1540	1544	0,47±0,09
30	Elemol	1546	1548	0,96±0,26
31	Germacreno B	1553	1559	1,19±0,14
32	N.I	1563	-	1,16±0,08

Cont.

N	Composto	IR ^a	IR ^b	% Óleo essencial	
33	Espatulenol	1574	1577	11,26±0,48	
34	Óxido de cariofileno	1579	1582	12,03±0,95	
35	N.I	1589	-	0,59±0,06	
36	Guaiol	1594	1600	0,87±0,01	
37	Epóxido de humuleno II	1605	1608	0,69±0,18	
38	β-atlantol	1618	1608	13,21±0,57	
39	Cubenol	1639	1645	0,64±0,08	
40	α-cadinol	1651	1652	0,80±0,12	
41	N.I	1655	-	0,36±0,11	
42	Bulnesol	1664	1670	0,40±0,12	
43	N.I	1761	932	0,41±0,21	
				Monoterpenos	2,75
				Sesquiterpenos	94,07
				Total identificados	96,82
				Total não identificados (N.I.)	3,18

IR^a- Índice de retenção calculado; IR^b- Índice de retenção de acordo com a literatura (Adams, 2007); N.I. – Não identificado; **Nota:** Os valores representam a média de três repetições ± desvio padrão.

É importante salientar que a composição química pode variar para diferentes espécies dentro de um mesmo gênero e ainda, sofrer alteração devido a ação dos fatores ambientais, como a temperatura, pluviosidade, nutrição e horário de coleta (MORAIS, 2009).

Desse modo, observou-se que os constituintes do óleo essencial de *Guatteria friesiana* analisado em diferentes estudos apresentou semelhança quanto à presença das substâncias majoritárias. O estudo realizado por Britto *et al.* (2012) identificou como componentes majoritários o β-eudesmol (52.0%), γ-eudesmol (24.0%), α-eudesmol (15.1%). De mesmo modo, as contribuições feitas por Alciole *et al.* (2011) mostraram os compostos β-, γ- e α-eudesmol com composição de 52,0%, 24,0% e 15,1% respectivamente.

Palazzo *et al.* (2009) analisaram a composição química de três espécies de *Guatteria* da Costa Rica e observaram diferenças na composição química. Para o óleo essencial das folhas de *G. costaricensis* foi observado que sua composição era constituída principalmente por α- e β-pineno (36,3% e 48,2%, respectivamente) e (*E*)-cariofileno (5,4%). Os componentes majoritários do óleo essencial das folhas de *G. diospyroides* foram germacreno D (46,4%), (*Z*)-β-ocimeno (17,4%), (*E*)-(β)-ocimeno (12,0%) e (*E*)-cariofileno (10,3%). O germacreno D (73,3%) também foi observado como componente predominante no óleo essencial das folhas de *G. oliviformis*, juntamente com α- e β-pineno (3,4% e 4,4%, respectivamente) e biciclogermacreno (4,5%).

O estudo realizado com as folhas de *Guatteria elliptica* coletada em localidades diferentes apresentou variação na composição de seus constituintes majoritários. Para a espécie coletada em Paranapiacaba/SP o composto principal foi o espatulenol (53,9%), já para a espécie de origem de Caraguatatuba /SP foi o óxido de cariofileno (40,9%) (FERREIRA, *et al.*, 2017).

Estas variações significativas na composição química dos constituintes majoritários, assim como também nos outros compostos encontrados nas espécies de *Guatteria* também podem ser observadas na espécie estudada. Por outro lado, a presença de óxido de cariofileno, (*E*)-cariofileno, germacreno D e espatulenol observados na composição do óleo essencial de *G. olivacea* e nas diferentes espécies de *Guatteria* relatadas acima reforçam que a espécie em estudo é quimicamente típica da família Annonacea.

5.3. Investigação da atividade citotóxica *in vitro* pelo Método Alamar Blue

Os estudos de viabilidade celular e citotoxicidade pelo método Alamar Blue tem sido amplamente utilizado nos últimos 50 anos em uma variedade de sistemas biológicos e ambientais, sendo uma importante referência para o estudo com substâncias (RAMPERSAD, 2012). Em média tem-se listado até o ano de 2019 nos registros da *SciFinder* um pouco mais de 400 publicações citando o estudo com Alamar Blue em pesquisa sobre o câncer.

A atividade citotóxica foi avaliada pelo método descrito nos tópicos 2.5 e 4.15, conhecido pelo nome de Alamar Blue (*7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one*), sendo também denominado por diazo-resorcinol, azoresorcina, resazoína e resazurina, é um sal solúvel, estável em meio de cultura, não é tóxico e é reduzido apenas por células vivas, que o tornam insolúvel, alterando sua coloração. Devido ao potencial de oxidação-redução do Alamar Blue, pode aceitar elétrons, mudando sua coloração do azul oxidado não-fluorescente, para o estado reduzido, rosa-fluorescente indicado assim a citotoxicidade correspondente a substância testada (ESCOBAR; ALFONSO; ARISTIZÁBAL, 2009; RAMPERSAD, 2012).

De acordo a literatura são considerados ativos óleos, extratos e frações capazes de inibir pelo menos 75% da proliferação celular e que apresentam valores de $CI_{50} < 30,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Da mesma forma, para substâncias puras, são consideradas drogas promissoras os compostos com valores de $CI_{50} < 4,0 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ou $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (SUFFNES; PELUZO, 1990; BOIK, 2001).

5.3.1. Investigação da atividade citotóxica do óleo essencial extraído das folhas de *G. olivacea*

A análise do óleo essencial testado na concentração de 50,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (TABELA 25), evidenciou resultados significativos de atividade citotóxica para as amostras, com valores CI_{50} inferiores à 30,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a maioria das células tumorais testadas. Esse efeito pode estar relacionado com o fato de que os óleos essenciais são constituídos por misturas complexas de numerosas moléculas que sinergicamente podem produzir efeitos biológicos potencialmente maiores que seus constituintes individuais.

No entanto, a atividade apresentada também pode ser atribuída ao seu alto grau de constituintes sesquiterpênicos, como por exemplo o germacreno D, óxido de cariofileno e espatulenol, substâncias predominantes mais comuns nos óleos essenciais de Annonaceae as quais possuem relatos de atividade citotóxica comprovada (CANTRELL, *et al.*, 2005; MEIRA, *et al.*, 2016; ARRUDA; LEMOS; CIUFFI, 2014).

O efeito anticarcinogênico dos óleos essenciais contra células neoplásicas tem sido demonstrado em diversos estudos (CALCABRINI, *et al.*, 2004; CHENG; CHANG; WU, 2001; SOUSA, *et al.*, 2004; LI, *et al.*, 2004). Desse modo, observa-se que os óleos essenciais são fontes naturais de suma importância, pois apresentam uma ampla atividade biológica especialmente contra o câncer, demonstrando assim a importância da realização deste ensaio farmacológico.

TABELA 25: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para o óleo essencial de *G. olivacea*.

Amostra		CI_{50} ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) ^a				
		MCF-7	HCT116	HepG2	HL-60	MRC-5
Óleo essencial	OEGO	27,22	25,74	34,95	16,11	45,49
		17,04 – 43,49	17,18 – 38,56	24,10 – 46,67	13,12 – 19,79	34,71 – 59,62
Doxorrubicina ^b		3,08	0,85	2,05	0,04	3,19
		1,52 – 6,27	0,59 – 1,24	1,34 – 3,16	0,03 – 0,05	1,89 – 5,40

^aA tabela apresenta os valores de CI_{50} (concentração inibitória média) e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células MCF-7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia humana) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0; ^bDoxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

5.3.2. Investigação da atividade citotóxica dos extratos e frações das cascas de *G. olivacea*

Os extratos e frações foram avaliados inicialmente frente às linhagens tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana), testados na dose máxima de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Na TABELA 26 são apresentados os resultados encontrados no ensaio de citotoxicidade dos extratos e frações com os seus respectivos valores de CI_{50} . Dessa forma, entre os extratos, o metanólico (GOCEM) apresentou um maior potencial de inibição frente as linhagens tumorais testadas. Após o tratamento ácido-base do extrato metanólico (GOCEM), que resultou na fração neutra (GOCFN) e fração alcaloídica (GOCFA), verificou-se que a atividade citotóxica se concentrou apenas na fração alcaloídica (GOCFA), enquanto que a fração neutra (GOCFN) foi considerada inativa para todas as células apresentadas pois sua capacidade de inibição de proliferação celular foi inferior a 75%, dessa forma não foi possível estimar a concentração inibitória (CI_{50}).

Vale ressaltar que a linhagem MRC-5 é de células sadias e, portanto, quanto maior o valor CI_{50} , melhor é o resultado. O ideal é encontrar uma amostra ou substância que seja tóxica para as células tumorais e não-tóxica para as células sadias ou normais. Após o tratamento ácido-base observou-se que a fração alcaloídica (GOCFA) não apresentou índices significativos de toxicidade para as células sadias testadas quando comparado aos extratos brutos hexânico e metanólico, sendo este um fator relevante para a continuidade do estudo.

Com base nesses resultados, o estudo fitoquímico concentrou-se na fração alcaloídica (GOCFA), com o objetivo de definir o(s) provável(éis) alcaloide(s) responsável(éis) pela atividade citotóxica apresentada, buscou-se o respectivo isolamento das substâncias, as quais também foram submetidas aos ensaios de atividade citotóxica frente à diferentes linhagens tumorais.

TABELA 26: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para os extratos de *G. olivacea*.

Amostra	CI ₅₀ (µg.mL ⁻¹) ^a		
	MCF7	HepG2	MRC5
Extratos	24,89	11,25	17,57
	21,11 – 29,35	9,43 – 13,43	15,18 – 20,34
Frações	18,78	4,23	10,00
	11,69 – 30,15	1,75 – 8,19	5,50 – 18,20
Frações	20,16	18,25	28,73
	13,87 – 29,31	14,53 – 22,92	24,49 – 33,70
Doxorrubicina ^b	ND	ND	ND
	2,35	0,04	1,62
	1,33 – 4,15	0,03 – 0,06	0,63 – 4,14

^aA tabela apresenta os valores de CI₅₀ (concentração inibitória média) e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células MCF-7 (carcinoma de mama humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0; ^bDoxorrubicina foi utilizada como controle positivo; ND: Não Determinado.

5.3.3. Investigação da atividade citotóxica das substâncias isoladas das cascas de *G. olivacea*

Em busca dos prováveis alcaloides reponsáveis pela atividade citotóxica de GOCFA, os alcaloides puros isolados e que não apresentavam estudos de citotoxicidade na literatura foram submetidos ao ensaio de atividade citotóxica com as linhagens tumorais, MCF-7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia humana) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano), testadas na dose máxima de 25 µg.mL⁻¹.

Na TABELA 27 são apresentados os resultados da atividade citotóxica das substâncias testadas. Dessa forma, dos compostos testados o alcaloide atherosperminina exibiu atividade citotóxica considerada moderada com valores de CI₅₀ entre 42,10 e 33,07 µmol.L⁻¹ para as células tumorais testadas, juntamente com o alcaloide argentinina que apresentou uma baixa citotoxicidade para a célula HCT116 com CI₅₀ = 69,02 µmol.L⁻¹.

TABELA 27: Índice de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para as substâncias isoladas das cascas de *G. olivacea*.

Substância	CI ₅₀ µg mL ⁻¹ (µmol L ⁻¹) ^a				
	MCF7	HCT116	HepG2	HL-60	MRC5
Atherosperminina	12,70	10,22	13,01	10,44	15,51
	(41,10)	(33,07)	(42,10)	(33,79)	(50,19)
	11,18 – 14,42	7,89 – 13,23	10,75 – 15,73	8,44 – 12,91	12,46 – 19,30
Argentínina	>25	20,36	>25	>25	>25
	(84,74)	(69,02)	(84,74)	(84,74)	(84,74)
		14,24 – 29,11			
<i>N</i> -óxido de atherosperminina	>25	>25	>25	>25	>25
	(76,92)	(76,92)	(76,92)	(76,92)	(76,92)
Doxorrubicina ^b	3,08	0,85	2,05	0,04	3,19
	(5,67)	(1,56)	(3,77)	(0,07)	(5,87)
	1,52 – 6,27	0,59 – 1,24	1,34 – 3,16	0,03 – 0,05	1,89 – 5,40

^aA tabela apresenta os valores de CI₅₀ (concentração inibitória média) e o respectivo intervalo de confiança de 95% obtido a partir de três experimentos independentes realizados em duplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células MCF-7 (carcinoma de mama humano), HCT116 (carcinoma de colón humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HL-60 (leucemia humana) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidos por regressão não-linear através do programa GraphPad Prisma versão 5.0; ^bDoxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

Devido ao baixo rendimento os demais alcaloides isolados não puderam ser testados, entretanto algumas dessas substâncias possuem relatos de ensaios citotóxicos na literatura como a liriodenina (COSTA *et al.*, 2016), assimilobina (LIKHITWITTAYAWUID *et al.*, 1993) e discretina (MENEZES *et al.*, 2016).

Os alcaloides são conhecidos por possuírem uma ampla gama de atividades biológicas, eles apresentam propriedades do mais diversor tipos, tais como as analgésicas, antivirais, anti-maláricas, antineoplásicas, dentre outras. Uma das propriedades biológicas mais comumente relatadas nos alcaloides é a sua citotoxicidade contra células tumorais, essa atividade tem sido amplamente estudada visando futuras aplicações medicinais através do seu uso para eliminação e/ou regressão de células cancerígenas (ANISZEWSKI, 2007).

Wu *et al.* (1989) estudaram a citotoxicidade de 53 alcaloides isoquinolinos e os seus *N*-óxidos contra as células A-549 (carcinoma de pulmão humano), HCT-8 (carcinoma de cólon humano), KB (carcinoma epidérmico de boca) e P-388 / L-1210 (leucemia promielocítica). Dentre todos os tipos de esqueletos estruturais investigados (tetraidroprotoberinos,

protoberberinos, aporfinos, morfínanodienonas, oxoaporfinos, fenantrenos e seus *N*-óxidos), os mais ativos foram os oxoaporfinos, sendo que o alcaloide lirioidenina mostrou uma forte atividade contra todas as linhagens celulares testadas. Este alcaloide possui uma ampla investigação de suas propriedades biológicas, com destaque para o seu potencial citotóxico (LÚCIO *et al.*, 2015; COSTA *et al.*, 2016).

Observou-se que os alcaloides com o esqueleto oxoaporfino exibiram uma atividade citotóxica promissora, sugerindo que a função oxo pode contribuir para essa atividade apresentada, sendo possibilitada pela conjugação da estrutura, que torna o efeito citotóxico eficaz devido a planaridade conformacional da molécula. Por sua vez, pôde-se notar que a remoção da função oxo reduziu drasticamente a atividade, exibindo baixa citotoxicidade para os aporfinos. No entanto, os alcaloides aporfinos que continham um grupo 1,2-metilenodioxí, mostram efeitos citotóxicos promissores contra as linhagens de células tumorais testadas, sugerindo que esse grupo é um dos elementos-chave para sua bioatividade (WU *et al.*, 1989).

Entretanto a presença de um grupo 1,2-metilenodioxí não confere por si só propriedades citotóxicas nos aporfinoides, pois conforme observado por MENEZES (2015), os alcaloides isolados de *X. laevigata*, que possuíam o grupo metilenodioxí, mas não possuíam um grupo metoxila na posição 9 do anel D do sistema aporfino, não apresentaram atividade citotóxica, o que indica que este também pode ser um elemento importante na atividade citotóxica dos alcaloides aporfinos.

Estudos de atividade antitumoral *in vitro* realizados com alcaloides do tipo tetraidroprotoberberinos tem revelado para este grupo baixa ou moderada citototoxicidade quando comparados aos aporfinos (KIM *et al.*, 2010; CHEN; DUH; CHEN, 1999; COSTA *et al.*, 2013a; MENEZES *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2018a).

Os resultados da atividade citotóxica obtidos para os alcaloides do tipo fenantreno isolados de *G. olivacea* são considerados intrigantes, uma vez que essa classe apresentou um potencial efeito citotóxico em estudos anteriores, indicando que podem exibir seletividade contra alguns tipos de células tumorais (WU *et al.*, 1993; WU *et al.*, 1989).

A atividade citotóxica do extrato metanólico (GOCEM) e da fração alcaloídica (GOCEFA), pode ter relação com o efeito sinérgico resultante da mistura dos alcaloides majoritários fenantrenos, fato este não observado para as substâncias testadas quando isoladas. Assim como também, pode ser atribuída pela presença dos alcaloides oxoaporfinos e aporfinos com grupos 1,2-metilenodioxí obtidos.

Sendo assim, são necessárias realizações de novas investigações, com o intuito estabelecer sua verdadeira eficácia, assim como a toxicidade desses e dos outros alcaloides presentes identificados neste trabalho, uma vez que há relatos na literatura de efeitos citotóxicos promissores para os esqueletos observados, visando com isso, a procura por novos fármacos com ação antitumoral provenientes de origem vegetal.

5.4. Importância quimiotaxonômica

Por meio de nosso estudo fitoquímico com a espécie *Guatteria olivacea*, através das técnicas cromatográficas usuais e das técnicas espectroscópicas e espectrométricas modernas, foi possível realizar a caracterização do óleo essencial extraído de suas folhas, bem como o isolamento e a identificação estrutural de 10 substâncias pertencentes à classe dos alcaloides obtidas de suas cascas, sendo todos considerados inéditos na espécie.

No entanto, algumas das substâncias isoladas são comumente encontradas em outras espécies do gênero *Guatteria* assim como também nos demais gêneros da família Annonaceae, principalmente em *Annona*, *Artabotrys*, *Duguetia*, *Polyalthia* e *Xylopia* (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994); LEBOEUF *et al.*, 1982; HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1984; MENEZES *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2015; LÚCIO *et al.*, 2015). Portanto, elas podem contribuir de forma significativa para o conhecimento quimiotaxonômico das espécies que compõem a família Annonaceae.

Como pode ser observado na TABELA 28, os alcaloides isolados têm uma grande relevância quimiotaxonômica no gênero *Guatteria*, podendo ser encontrados em diversas espécies, além de contribuir com a botânica em estudo de filogenia levando também em consideração os constituintes químicos.

TABELA 28: Importância quimiotaxonômica dos alcaloides isolados de *G. olivacea*.

Alcaloide	Espécies de <i>Guatteria</i>	Referência
Atherosperminina	<i>G. discolor</i>	HOCQUEMILLER; DEBITUS; ROBLLOT, 1984
Argentininina	<i>G. discolor</i>	HOCQUEMILLER; DEBITUS; ROBLLOT, 1984
	<i>G. foliosa</i>	MAHIOU <i>et al.</i> , 1994
	<i>G. goudotiana</i>	CASTEDO <i>et al.</i> , 1991
N-óxido de atherosperminina	<i>G. discolor</i>	HOCQUEMILLER; DEBITUS; ROBLLOT, 1984

Cont.

Alcaloide	Espécies de <i>Guatteria</i>	Referência	
Oxoputerina	<i>G. calva</i>	RODRIGUEZ <i>et al.</i> , 1999	
	<i>G. schomburgkiana</i>	CARVALHO-BAYMA <i>et al.</i> , 1987;	
		CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ, 1985	
	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2018a	
	<i>G. citriodora</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014	
	<i>G. elata</i>	HSU <i>et al.</i> , 1977a	
	Liriodenina	<i>G. amplifolia</i>	WENIGER <i>et al.</i> , 2000;
		<i>G. blepharophylla</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2011a
			ANDREAZZA <i>et al.</i> , 2016
		<i>G. chrysopetala</i>	HOCQUEMILLER; DEBITUS; ROBLOT, 1984
<i>G. cubensis</i>		DIAZ; SCHREIBER; RIPPERGER, 1981	
<i>G. dielsiana</i>		GOULART <i>et al.</i> , 1986;	
<i>G. goudotiana</i>		CASTEDO <i>et al.</i> , 1991;	
<i>G. melosma</i>		AMMAR ; SCHIFF; SLATKIN., 1983;	
		PHOEBE <i>et al.</i> , 1980	
<i>G. modesta</i>		ABD-EL_ATTI <i>et al.</i> , 1982	
<i>G. multivenia</i>	ZHANG <i>et al.</i> , 2002		
<i>G. oliviformis</i>	LÓPEZ <i>et al.</i> , 1990		
Puterina	<i>G. scandens</i>	HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ; 1982a,b	
	<i>G. schomburgkiana</i>	CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ, 1985	
		COSTA <i>et al.</i> , 2009c	
	<i>G. friesiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2016	
		COSTA <i>et al.</i> , 2013a	
	<i>G. hispida</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2010	
	<i>G. latifolia</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2017a	
	<i>G. citriodora</i>	RABELO <i>et al.</i> , 2014	
	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2015	
	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017	
<i>G. discolor</i>	GOULART <i>et al.</i> , 1987;		
Discoguatina	<i>G. elata</i>	HSU <i>et al.</i> , 1977b	
	<i>G. pogonopus</i>	SANTOS <i>et al.</i> , 2015	
	<i>G. discolor</i>	HOCQUEMILLER; DEBITUS; ROBLOT, 1984	
		CARVALHO- BAYMA <i>et al.</i> , 1987	
Asimilobina	<i>G. sagotiana</i>	RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1986	
	<i>G. discolor</i>	HOCQUEMILLER; DEBITUS; ROBLOT, 1984	
Coripalmina	<i>G. scandens</i>	HOCQUEMILLER <i>et al.</i> , 1982a,b	
	<i>G. elliptica</i>	RAJCA-FERREIRA <i>et al.</i> , 2017	
Discretina	<i>G. discolor</i>	HOCQUEMILLER; DEBITUS; ROBLOT, 1984	
	<i>G. fresiana</i>	COSTA <i>et al.</i> , 2009	
Discretina	<i>G. discolor</i>	HOCQUEMILLER; DEBITUS; ROBLOT, 1984	
	<i>G. scandens</i>	HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982a,b	

O resultado obtido com o estudo do óleo essencial das folhas, também possibilitou uma ampla contribuição para a quimiotaxonomia do gênero, uma vez que a composição química deste óleo apresentou semelhança com outros estudos realizados em diferentes espécies do gênero *Guatteria* (ACIOLE *et al.*, 2011; FONTES *et al.*, 2013; MEIRA *et al.*, 2016; SIQUEIRA *et al.*, 2015; SANTOS *et al.*, 2017b; FERREIRA *et al.*, 2017; ACIOLE *et al.*, 2011).

Desse modo, o estudo fitoquímico da família Annonacea é de fundamental importância para o conhecimento de suas espécies, pois a família tem sido caracterizada pela presença majoritária de determinados tipos de metabolitos secundários, como os alcaloides e terpenos. Sendo assim, este trabalho ressalta a importância da quimiotaxonomia, uma vez que pode ser utilizado de forma significativa na diferenciação de diversas espécies, gêneros e famílias do reino Plantae.

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da fração alcaloídica (GOCFA) proveniente do extrato metanólico (GOCEM) das cascas de *G. olivacea*, resultou no isolamento de dez (10) substâncias pertencentes à classe dos alcaloides, sendo todas inéditas na espécie em estudo. As substâncias isoladas foram identificadas como sendo: três alcaloides do tipo fenantreno: **atherosperminina**, **argentinina** e **N-óxido de atherosperminina**; dois oxoaporfins: **oxoputerina** e **liriodenina**; três aporfins *sensu stricto*: **puterina**, **discoguatina** e **asimilobina**; e dois tetraidroprotoberberino, **coripalmina** e **discretina**.

A análise do óleo essencial das folhas evidenciou a presença majoritária de sesquiterpenos, sendo os principais constituintes o germacreno D com (17,65%), β -atlantol (13,21%), óxido de cariofileno (12,03%), espatulenol (11,26%) e (*E*)-cariofileno (7,26%).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos extratos, frações e óleo essencial revelou a capacidade antitumoral da espécie estudada. Dentre as amostras avaliadas, a fração alcaloídica (GOCFA) foi a que apresentou os melhores resultados com pronunciada atividade para as linhagens tumorais MCF7 (20,16 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) e HepG2 (18,25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), e ainda, apresentando baixa toxicidade para as células saudáveis MRC-5 (28,73 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em relação ao óleo essencial, observou-se uma atividade citotóxica promissora para as linhagens de células MCF-7, HCT116, HepG2, e HL-60 com valores de CI_{50} iguais a 27,22, 25,74, 34,95 e 16,11 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ respectivamente.

Dentre os alcaloides testados provenientes da fração alcaloídica, atherosperminina foi o que exibiu os melhores resultados de atividade citotóxica contra as linhagens celulares MCF-7, HCT116, HepG2 e HL-60 com valores de CI_{50} iguais a 41,10, 33,07, 42,10 e 33,79 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Apesar da baixa capacidade de inibição celular apresentada pelos alcaloides do tipo fenantreno, há relatos na literatura para os quais estes apresentaram seletividade contra diferentes células testadas com resultados promissores, justificando assim a continuidade do estudo dessas substâncias, para podermos conhecer o real mecanismo de ação que explica a atividade citotóxica destes e dos demais alcaloides isolados neste trabalho.

Os resultados obtidos confirmam que *G. olivacea* é quimicamente uma espécie típica da família Annonaceae, além de uma fonte promissora de substâncias biologicamente ativas. Tais 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*, *Xylopi*a, *Monodora* e *Polyathia*.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABD-EL ATTI, S.; AMMAR, H.A.; PHOEBE, JR., C.H.; SCHIFF, JR. P.L.; SLATKIN, D.J. Alkaloids of *Guatteria melosma* and *Cleistopholis patens*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 4, p. 476-480, 1982.
- ACIOLE, S. D. G.; PICCOLI, C. F.; DUQUE L., J. E.; COSTA, E. V.; NAVARRO-SILVA, M. A.; MARQUES, F. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; PINHEIRO, M. L. B.; REBELO, M. T. Insecticidal activity of three species of *Guatteria* (Annonaceae) against *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomología**, v. 37, n. 2, p. 262-268, 2011.
- ACOSTA, G. J. A. Alcaloides y Compuestos Nitrogenados. **Universidad de Antioquia**, Medellín, 2002.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4.Ed. **Carol Stream: Allured Publishing**, Corp, 2007. 803p.
- AGRA, M. de F. **Farmacopéia Popular da Paraíba**. Universidade Federal da Paraíba (MEC), João Pessoa – Paraíba, 1977.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known a medicinal and poisonous in northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.17, p.114-140, 2007.
- AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E.A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay.**Journal of Immunological Methods**, v.170, p.211-224, 1994.
- ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAUJO, C. S.; PESSOA, C.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. spe1, p. 258-264, 2014.
- AMMAR, H.A.; SCHIFF, JR., P.L., SLATKIN, D.J. Alkaloids of *Guatteria modesta*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 392, 1983.
- ANDREAZZA, N. L.; LOURENÇO, C. C.; HERNANDEZ-TASCO, A. J.; PINHEIRO, M. L. B.; STEFANELLO, M. E. A.; COSTA, E. V.; SALVADOR, M. J. Antimicrobial photodynamic effect of extracts and oxoaporphine alkaloid isomoschatoline from *Guatteria blepharophylla*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**. v. 160, p. 154-162, 2016.
- ANISZEWSKI, T. Alkaloids- Secrets of life (Alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological role). 5 ed. Elsevier's Science & Technology Rights Department in Oxford, 2007.
- ARRUDA, C.; LEMOS, F. M.; CIUFFI, K. J. Oxidação do β -citronelol e do β -cariofileno por peróxido de hidrogênio catalisada por sistema mimético ao citocromo p-450. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, supl. 1, 2014.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, D. Biological effects of essential oils - a review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p.446-475, 2008.

BARATA, L. E. S.; ALENCAR, A. A. J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J. Plantas Medicinais Brasileiras. IV. *Annona muricata* L. (Graviola). **Revista Fitos**, v. 4, n. 1, 2009.

BERGER, R. G. **Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability**. Springer, v. 1, 648 p. 2007.

BICK, I. R. C.; DOUGLAS, G. K. The Alkaloids of *Atherosperma Moschatum* Labill. II. Non-Phenolic Alkaloids. **Australian Journal of Chemistry**, v. 18, p. 1997-2004, 1965.

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

BOMFIM, L. M.; MENEZES, L. R. A.; RODRIGUES, A. C. B. C.; DIAS, R. B.; ROCHA, C. A. G.; SOARES, M. B. P.; NETO, A. F. S.; NASCIMENTO, M. P.; CAMPOS, A. F.; SILVA, L. C. R. C. E.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumour Activity of the Microencapsulation of *Annona vepretorum* Essential Oil. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 118, p. 208–213, 2016.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, vol. 64, n. 7, p. 1269-1275, 2003.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P. DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, vol. 33, n. 6, p. 1359-1369, 2010.

BRITO, M. T.; FERREIRA, R. C.; BELTRÃO, D. M.; MOURA, A. P. G.; XAVIER, A. L.; PITA, J. C. L. R.; BATISTA, T. M.; LONGATO, G. B.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MEDEIROS, K. C. P.; SANTOS, S. G.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; DINIZ, M. F. F. M.; SOBRAL, M. V. Antitumor activity and toxicity of volatile oil from the leaves of *Annona leptopetala*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 28(5), p. 602-609, 2018.

BRITTO, A. C. S.; OLIVEIRA, A. C. A.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, G. 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.

BRUGINSKI, E. R. D. **Identificação de alcaloides e acetogeninas diretamente em tecidos de folhas e sementes de *Annona rugulosa* (Annonaceae) por DESI-MSI** – Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 88 p., 2015.

CALCABRINI, A.; STRINGARO, A.; TOCCACIELI, L.; MESCHINI, S.; MARRA, M.; COLONE, M.; SALVATORE, G.; MONDELLO, F.; ARANCIA, G.; MOLINARI, A. Terpinen-4-ol, the main component of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil inhibits the in vitro growth of human melanoma cells. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 122, p. 349–360, 2004.

- CANTRELL, C. L.; KLUN, J. A.; BRYSON, C. T.; KOBASISY, M.; DUKE, S. O. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoid from leaves of American (*Callicarpa Americana*) and Japanese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 15, p. 5948-5953, 2005.
- CARVALHO-BAYMA, J.; OLIVEIRA, A.B.; CAVÉ, A.; DADOUN, H. Aporphinoid alkaloids from *Guatteria schomburgkiana* leaves (1). **Letters**, 1987.
- CASTEDO, L., GRANJA, J. A., LERA, A. R., VILLAVERDE, M. C. Alkaloids from *Guatteria goudotiana*. **Phytochemistry**. v. 30. n. 8, p. 2781-2783, 1991.
- CASTILLO-JUÁREZ, I.; GONZÁLEZ, V.; JAIME-AGUILAR, H.; MARTÍNEZ, G.; LINARES, E.; BYE, R.; ROMERO, I. Anti-*Helicobacter pylori* activity of plants used in Mexican traditional medicine for gastrointestinal disorders. **J. Ethnopharmacol**, v. 122, p. 402–405, 2009.
- CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.
- CHEN, C.-Y.; CHANG F.-R.; PAN. W.-B.; WU, Y.-C. Four alkaloids from *Annona cherimolia*. **Journal of Natural Products**, v. 56, p. 753-757, 2001.
- CHEN, J.-J.; DUH, C.-Y.; CHEN, I.-S. New Tetrahydroprotoberberine N-Oxide Alkaloids and Cytotoxic Constituents of *Corydalis tashiroi*. **Planta Médica**, v. 65, p. 643-647, 1999.
- CHENG, J.; CHANG, G.; WU, W. A controlled clinical study between hepatic arterial infusion with embolized Curcuma aromatic oil and chemical drugs in treating primary liver cancer. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, v. 21, p. 165–167, 2001.
- CORIA-TÉLLEZ, A.V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E.M.; OBLEDÓ-VÁZQUEZ, E. N. *Annona muricata*: a comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arab. J. Chem.**, 2016.
- CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. IBDF, Rio de Janeiro, 1984.
- CORTES, D.; RAMAHATRA, A.; CAVÉ, A. Alcaloides des *Annonacees*, LVIII. Alcaloides des écorces de *Guatteria schomburgkiana*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 2, p. 254-259, 1985.
- COSTA, E. V. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriopsis blepharophylla*, *Guatteriopsis friesiana* e *Guatteriopsis hispida* (Annonaceae)** – Tese (Doutorado) – Doutorado em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 380 p., 2009a.

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

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

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R. Essential Oil from the Leaves of *Annona vepretorum*: Chemical Composition and Bioactivity. **Natural Product Communications**, vol. 7, n. 2, p. 265-266, 2012.

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

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; BRAGA, R. M.; DELARMELINA, C.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MAIA. Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, p. 1111-1117 n. 6, 2011a.

COSTA, E. 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- β -Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9714-9720, 2011b.

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

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; MAIA, B. H. L. N. S.; MARQUES, F. A.; RUIZ, A. L. T. G.; MARCHETTI, G. M.; CARVALHO, J. E.; SOARES, M. B. P.; COSTA, C. O. S.; GALVÃO, A. F. C.; LOPES, N. P.; KOOLEN, H. H. F.; BEZERRA, D. P.; BARISON, A. 7,7-Dimethylaporphine and Other Alkaloids from the Bark of *Guatteria friesiana*. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1524-1531, 2016.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; MAIA, B. H. L. N. S.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C. F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L., Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, vol. 32, n. 1, p. 78-81, 2009b.

COSTA, E.V.; MARQUES, F.A.; PINHEIRO, M.L.B.; VAZ, N.P.; DUARTE, M.C.T.; DELARMELINA, C.; BRAGA, R.M.; MAIA, B.H.L.N.S. 7,7-dimethylaporphine alkaloids from the stem of *Guatteria friesiana*. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1516-1519, 2009c.

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

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

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

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

COSTA, J. W. DA; FERREIRA, K. C. M. A.; MOUTINHO, N. F.; BEZERRA, T. DA S.; NUNES, V. M. DE A. A FITOTERAPIA NO CONTEXTO DA ATENÇÃO BÁSICA. **Revista Extensão & Sociedade**, v. 8, n. 2, p. 19-32, 2018b.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Antineoplastic agents from natural sources: achievements and future directions. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 9, n. 12, p. 2783-2797, 2000.

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

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

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

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

DEMARQUE, D. P.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **Natural Product Reports**, v.33, p.432-455, 2016.

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

DIAZ, M.; SCHREIBER, C.; RIPPERGER, H. *Guatteria moralesii* and *Guatteria cubensis* alkaloids. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 15, n. 1, p. 93-96, 1981.

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

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

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

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

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

FERRAZ, R. P. C.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, N. C.; SOARES, M. B. P.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E. 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.

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

FERREIRA, A. K. R.; LOURENÇO, F. R.; CLÁUDIA, M.; YOUNG, M.; LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; SUFFREDINI, I. B.; LOPES, P. S.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and biological activities of *Guatteria elliptica* R. E. Fries (Annonaceae) essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, [S.l.], v. 30 n. 1, p. 69-76, 2017.

FONTES, J. E. 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. S.; VIEIRA, M. C.; ZÁRATE, N. A. H.; PEREIRA, Z.V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 8, p. 349-354, 2010.

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

GEMTCHÚJNICOV, I. D. **Manual de Taxonomia Vegetal: plantas de interesse econômico.** São Paulo-SP, Ed. Agronômica Ceres, 368 p. Il, 1976.

GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G.; DE OLIVEIRA, A.B.; GEOVANE, G.; MAIA, J.G.S. In: Dep. Quim., Univ. Fed. Alagoas, Maceio-Alagoas. Guatteric acid a new constituent of *Guatteria CF discolor* R. E. Fries (Annonaceae). F.E.C.S. Third International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products, [Proc.], v. 4, p 367-71, 1987.

GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G; DE OLIVEIRA, A.B.; DE OLIVEIRA, G.G; MAIA, J.G.S. Azafluorenones and azaanthraquinone from *Guatteria dielsiana*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p.1691-1695,1986.

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

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

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

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

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids. **Lloydia**, v. 38, p. 275-338, 1975.

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P.R. H. Alcaloides: generalidades e aspectos básicos. In: COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P.S. **Fundamentos de Cromatografia.** Campinas, SP: Editora da Unicamp, 2006.

HOCQUEMILLER, R.; DEBITUS, C.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.. Alcaloides des Annonacées XVIII: Alcaloides des Écorces de *Guatteria discolor*. **Journal of Natural Products**,v.47, p.335-341, 1984.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacees XXXVII: alcaloides du *Guatteria scandens*. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v. 46, n. 3, p. 335-341, 1982a.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; CAVÉ, A. Guattescine et guattescidine, nouveaux alcaloides aporphiniques de *Guatteria scandens*, Annonacees (1). **Tetrahedron**, v. 38, n.7, p. 911-915, 1982b.

HSU, C.C.; DOBBERSTEIN, R.H.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Isolation of lauterine and oxoputerine, two new oxoaporphine alkaloids from *Guatteria elata*. **Lloydia**, v. 40, n. 2, p. 152-156, 1977a.

HSU, C.C.; DOBBERSTEIN, R.H.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Structure elucidation of norlaureline and puterine, new noraporphine alkaloid from *Guatteria elata*. **Lloydia**, v. 40, n. 5, p. 505-507, 1977b.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA. Disponível em: < <https://www.inca.gov.br/> >. Acesso em: 25 jul. 2019.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 13. Ed. São Paulo: Nacional, 286p, 2002.

KIM, K. H.; PIAO, C. J.; CHOI, S. U.; SON, M. W.; LEE, K. R. New Cytotoxic Tetrahydroprotoberberine-Aporphine Dimeric and Aporphine Alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. **Planta Médica**, v. 76, p. 1732-1738, 2010.

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

KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, n. spe1, p. 225-242, 2014.

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

LI, Y.; LI, M.; WANG, L.; JIANG, Z.; LI, W.; LI, H. Induction of apoptosis of cultured hepatocarcinoma cell by essential oil of *Artemisia annul* L. **Journal of West China University of Medical Science**, v. 35, p. 337-339, 2004.

LIKHITWITTAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Cytotoxic and Antimalarial Alkaloids from the Tubers of *Sthephania Pierrei*. **Journal of Natural Products**, v. 56, n. 9, p. 1468-1478, 1993.

LOBÃO, A. Q.; MELLO-SILVA, R.; FORZZA, R. C. *Guatteria* (Annonaceae) da Floresta Atlântica brasileira. **Rodriguésia**, v. 63, p. 1039-1064, 2012.

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

LÓPEZ, J.A.; LAURITO, J.G.; BRENES, A. M.; LIN, F. T.; SHARAF, M.; WONG L.K.; SCHIFF, P.L. Aporphinoid alkaloids of *Guatteria oliviformis* and *G. Tonduzii*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1899-1901, 1990.

LÓPEZ, R.; CUCA, L. E.; DELGADO, G. Antileishmanial and immunomodulatory activity of *Xylopiá discreta*. **Parasite Immunol**, v. 31, p. 623-30, 2009.

LÓPEZ-MARTÍN, J.; ANAM, E. M.; BOIRA, H.; SANZ, M. J.; BLÁZQUEZ, M. A. Chromone and Phenanthrene Alkaloids from *Dennettia tripetala*. **Chem. Pharm. Bull**, v. 50, p. 1613-1615, 2002.

LU, S-T.; WU, Y-C & LEOU, S. P. Alkaloids of Formosan *Fissistigma* Species and *Goniothalamus*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 8 p. 1829-1834, 1985.

LU, S-T.; WU, Y-C & LEOU, S. P. The Oxidation of Isoquinoline Alkaloids with *m*-chloroperbenzoic Acid. **Journal of the Chinese Chemical Society**. v. 34, p. 33-42, 1987.

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

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T.; GUERRERO, S. A.; LOBÃO, A. Q.; SCHARF, U.; ZAMORA, N. A.; ERKENS, R. H. J. Confronting a morphological nightmare: revision of the Neotropical genus *Guatteria* (Annonaceae). **Blumea**, v. 60, n. 1-3, p. 1–219, 2015.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. 2015 *Annonaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110373>>. Acesso em: 25 jul. 2019.

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

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; DE ARIA, A.R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO, A. Alkaloids of the Annonaceae. 98. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 890-895, 1994.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; OLIVEIRA, J.; ARAÚJO, J. S. 2005. Essential oils of the Amazon *Guatteria* and *Guatteropsis* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 478–480, 2005.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3ª edição. **Editora UFC, LTD**, 149p., 2009.

MEIRA, C. S.; MENEZES, L. R. A.; SANTOS, T. B.; MACEDO, T. S.; FONTES, J. E. N.; COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, T. B.; GUIMARÃES, E. T.; SOARES, M. B. P. Chemical composition and antiparasitic activity of essential oils from leaves of *Guatteria friesiana* and *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 29, n. 2, p. 156-162, 2016.

MELO, A. C.; COTA, B. B.; OLIVEIRA, A. B.; BRAGA, F. C. HPLC quantification of kaurene diterpenes in *Xylopi*a species. **Fitoterapia**, vol. 72, p. 40-45, 2001.

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

MENEZES, L. R. A.; COSTA, C. O. D. S.; RODRIGUES, A. C. B. C.; SANTO, F. R. E.; NEPEL, A.; DUTRA, L. M.; SILVA, F. M. A.; SOARES, M. B. P.; BARISON, A.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Cytotoxic Alkaloids from the Stem of *Xylopi*a *laevigata*. **Molecules**, v. 21, p. 890, 2016.

MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 439–445, 2009.

- MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): A Review of Its Traditional Uses, Isolated Acetogenins and Biological Activities. **Molecular Sciences**, v. 16, p. 15625–15658, 2015.
- MORAIS, L. A. S. Óleos essenciais no controle fitossanitário. *In*: BETTIOL, W.; MORANDI, M. **Biocontrole de doenças de plantas, uso e perspectivas**, p. 139-152, 2009.
- MUNIER, R., *apud* MERCK. 1971. **Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography**. E. Merck, Darmstadt, Germany, 118p, 1953.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.
- NUNES, C. R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; OLIVEIRA, D. B. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Vértices**, v. 14, p. 39–57, 2012.
- O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry**, v.267, p.5421 - 5426, 2000.
- OLIVIER, D. K.; VUUREN, S. F. V.; MOTEETEE, A. N. *Annickia affinis* and *A. chlorantha* (*Enantia chlorantha*) – a review of two closely related medicinal plants from tropical Africa. **J. Ethnopharmacol**, v. 176, p. 438–462, 2015.
- ORTIZ, A. G.; SUAREZ, L. E. C.; PATIÑO, G. S. Aporfinoïdes en hojas de *oxandra longipetala* r. e. fr. (Annonaceae). **Scientia et Technica Año XIII** 33, 19-22, 2007.
- PAES, M. M.; VEGA, M. R. G.; CORTES, D.; KANASHIRO, M. M. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 945 – 980, 2016.
- PALAZZO, M. C.; WRIGHT, H. L.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; MORIARITY, D. M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical Compositions and Biological Activities of Leaf Essential Oils of Six Species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. **Records Natural Products**, vol. 3, p. 153-160, 2009.
- PAREDES, A.; HASEGAWA, M.; PRIETO, F.; MENDEZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 78, n. 2-3, p. 129-132, 2001.
- PELLETIER, S. W. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, vol.5; **John Wiley & Sons: New York**, Chapter 3, 1987.
- PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário das Plantas. Disponível em: <<http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>. Acesso em: 09 julho de 2019.
- PHOEBE, Jr., C.H.; SCHIFF, JR., P.L.; KNAPP, J.E.; SLATKIN, D.J. Oxoanolobine, a new oxoaporphine alkaloid from *Guatteria melosma*. **Heterocycles**, v. 14, n. 12, p. 1977-19978, 1980.

PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SOUZA, A. D. L. de; RABELO, D. de M.; BATISTA, C. L.; BATISTA, R. L.; COSTA, E. V.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 20, n. 6, p. 1095-1102, 2009.

PINTO, A.C.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; LOPES, N.P.; EPIFANIO, R.A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PORTICH, J. P.; GIACOMAZZI, J.; MORELLE, A. M.; ROSA, D. D.; ROSSARI, J. R. F.; AZAMBUJA, E. Brazilian medical oncologists: current and future perspectives for 2020. **Braz J Oncol**. v. 13, n. 43, p. 1-8, 2017.

PRATA, J. N.; CAES, A. L. **O uso de plantas medicinais na cidade de Caldas Novas: as práticas de cura tradicional no contexto da expansão do mercado de fitoterápicos**. Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão, 3, 2016, Goiás. **Anais**. Goiás: UEG, 2016. p. 1-10.

PREEDY, V. R. **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Academic Press, p. 791–802, 2016.

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

RABELO, D. M. **Estudo Fitoquímico e Biológico de *Guatteria Citriodora* Ducke**. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2008.

RABELO, D. M.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; SALOMÉ, K. COSTA, E. V.; SILVA, F. M. A.; CHAVES, Y. O.; BASTOS, I. S. Alcaloides Isoquinolínicos e Investigação das Atividades Antiplasmódica e Antibacteriana de *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, vol. 37, n. 9, p. 1453-1458, 2014.

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

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

RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacees LXXII, alcaloides du *Guatteria sagotiana*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 6, p. 1078-1085, 1986.

RIBEIRO, S. S.; JESUS, A. M.; ANJOS, C. S.; SILVA, T. B.; SANTOS, A. D. C.; JESUS, J. R.; ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; GOMES, W. F.; ALVES, P. B. CARVALHO, A. A.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; PINHEIRO, M. L. B.; PRATA, A. P. N.; BLANK, A. F.; SILVA-MANN, R.; MORAES, V. R. S.; COSTA, E. V.; NOGUEIRA, P. C. L. BEZERRA, D. P. Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. **Planta Medica**, v. 78, p. 1601–1606, 2012.

RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** – Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Insumos Farmacêuticos, Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos, Universidade de São Paulo, São Paulo, 125 p., 2007.

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

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

RODRIGUES, C. M. S. C.; DUTRA, L. M.; BARISON, A.; COSTA, E. V.; ALMEIDA, J. R. G. S. Isoquinoline alkaloids from the leaves of *Annona leptopetala* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 69, p. 222-225, 2016.

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

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

RODRÍGUEZ, M.; HASEGAWA, M.; MENDEZ, J.; PEREIRA, G.; ARVELO, F. Bioactive oxoaporphine alkaloids from *Gutteria calva*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 74-76, 1999.

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

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

SANTOS, A.R.; BENGHI, T.G.S.; NEPEL, A.; MARQUES, F.A.; LOBÃO, A.Q.; DUARTE, M.C.T.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; MAIA, B.H.L.N.S. *In vitro* antiproliferative and antibacterial activities of essential oils from four species of *Gutteria*. **Chem. Biodivers**, v. 14, e1700097, 2017b.

SANTOS, M. F. C.; DUTRA, L. M.; MORAES, V. R. S.; BARISON, A.; COSTA, E. V. Aporphine alkaloids from the stem bark of *Gutteria pogonopus* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 60, p. 106-109, 2015.

SANTOS, M. F. C.; FONTES, J. E. N.; DUTRA, L. M.; BOMFIM, L. M.; COSTA, C. O. D.; MORAES, V. R. S.; BARISON, A.; SOARES, M. B.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, J. R. G. S.; KOOLEN, H. H. F.; BEZERRA, D. P.; COSTA, E. V. Alkaloids from leaves of *Guatteria Pogonopus* (ANNONACEAE) and their cytotoxicities. **Química Nova**, v. 41, n. 8, p. 884-890, 2018a.

SANTOS, R. C.; DE SOUZA A. V.; ANDRADE-SILVA, M.; CRUZ, K. C. V.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. D. C.; FORMAGIO, A. S. 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, p. 9–16, 2018b.

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

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

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

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

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

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E. V. Desreplificação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatteroides* por ESI-IT-MS. **Quím. Nova**, v. 35, p. 944-947, 2012.

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

SILVA, S. R. Plantas do Cerrado utilizadas pelas comunidades da região do Grande Sertão Veredas. Brasília: **Fundação Pró-Natureza Funatura**, p. 79, 1998.

SILVA, T. B.; MENEZES, L. R. A.; SAMPAIO, M. F. C.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SOARES, M. B. P.; PRATA, A. P. N.; NOGUEIRA, P. C. L.; COSTA, E. V. Chemical composition, and Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of essential oils obtained from leaves of *Xylopia frutescens* and *X. laevigata* (Annonaceae). **Natural Product Communication**, v. 8, p. 403-406, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 2007.

SIQUEIRA, C. A. T.; SERAINA, A. F.; PASCOALA, A. C. R. F.; ANDREAZZA, N. L.; LOURENÇO, C. C.; RUIZB, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; SOUZA, A. C. O.; MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; SALVADOR, M. J. Bioactivity and chemical composition of the essential oil from the leaves of *Guatteria australis* A.St.-Hil. **Natural Product Research**, vol. 29, n. 20, p. 1966-1969, 2015.

SOARES, E. R. **ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae)**. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Química, Universidade Federal do Amazonas, Amazonas, 2014.

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

SOBRINHO, R. B. Produção integrada de Anonáceas no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**. Jaboticabal, v. 36, n. spe1, p. 102-107, 2014.

SOONWERA M. Efficacy of essential oil from *Cananga odorata* (Lamk.) Hook.f. and Thomson (Annonaceae) against three mosquito species *Aedes aegypti* (L.), *Anopheles dirus* (Peyton and Harrison), and *Culex quinquefasciatus* (Say). **Parasitol Res**, v. 114, n. 12, p. 4531-4543, 2015

SOUSA, A.; ALVIANO, D.; BLANK, A.; ALVES, P.; ALVIANO, C.; GATTASS, C. Melissa officinalis L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, p. 677–681, 2004.

SOUSA, O. V.; VIEIRA, G. D. V.; ALVES, M.; ARAÚJO, A. A. L.; PINTO, M. A. O.; AMARAL, M. O. H.; RODARTE, M. P.; KAPLA, M. A. C. Chemical composition and biological activities of the essential oils from *Duguetia lanceolata* St. Hil. Barks. **Molecules**, v.17, p.11056-11066, 2012.

SOUZA, A. V. M. **Atividade Anti-inflamatória do Extrato, de Frações e do Alcaloide Dicentrinona, obtidos de *Duguetia furfuracea* (St. Hil) em Camundongos**. Dissertação (Mestrado) – Mestrado em Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, 2013.

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

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

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

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

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

TSABANG, N.; FOKOU, P. V. T.; TCHOKOUAHA, L. R. Y.; NOGUEM, B.; BAKARNGAVIA, Y.; NGUEPI, M. S. D.; NKONGMENECK, B. A.; BOYOM, F. F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. **J. Ethnopharmacol**, v. 139, n.1, p. 171–180, 2012.

TZORTZAKIS, N. G.; ECONOMAKIS, C. D. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 8, p. 253-258, 2007.

VAN DEN DOOL, H., KRATZ, P.D., A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 11, p. 463-471, 1963.

VOLLHARDT, K. P. C. S.; SCHORE, N. E. Química Orgânica: estrutura e função. **Bookman**, Porto Alegre, 50-53 p., 2004.

WENIGER, B.; ARAGON, R.; DEHARO, E.; BASTIDO, J.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON. R. Antimalarial constituents from *Guatteria amplifolia*. **Fuer Medizin Pharmazi**, v. 55, n. 11, p. 867-868, 2000.

WOLFENDER, J-L.; RUDAZ, S.; CHOI, J. H.; KIM, H, K. Plant Metabolomics: From Holistic Data to Relevant Biomarkers. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 8, p. 1056-1090, 2013.

WU, W-N.; HUANG, C-H. Structural Elucidation of Isoquinoline, Isoquinolone, Benzylisoquinoline, Aporphine, and Phenanthrene Alkaloids Using API-ionspray Tandem Mass Spectrometry. **The Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 58, p. 41-55, 2006.

WU, Y-C.; CHANG, G-Y.; DUH, C-Y.; WANG, S-K. Cytotoxic Alkaloids of *Annona Montana*. **Phytochemistry**, vol. 33, p 497-500, 1993.

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

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

YAO, Y.; DING, X.; JIA, Y. C.; HUANG, C. X.; WANG, Y. Z.; XU, Y. H. Anti-tumor effect of β -elemene in glioblastoma cells depends on p38 MAPK activation. *Cancer Letters*, v. 264, n. 1, p. 127-134, 2008.

ZHANG, Z; ELSOHLY, H.N.; JACOB, M.R.; PASCO, D.S; WALKER, L.A; CLARK , A.M. New sesquiterpenoids from the root of *Guatteria multivenia*. *Journal of Natural Products*, v. 65, n. 6, p. 856-859, 2002.

ZHAO, J.; LI, Q. Q.; WANG, G.; LI, X.; KIM, J. E.; CUFF, C. F.; HUANG, L.; REED, E.; GARDNER, K. *In vitro* combination characterization of the news anticancer plant drug betaelemene with takanes against human lung carcinoma. *Internacional Journal of Oncology*, v. 31, n. 2, p. 241-252, 2007.

8. ANEXOS

FIGURA E1: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **GO8**.

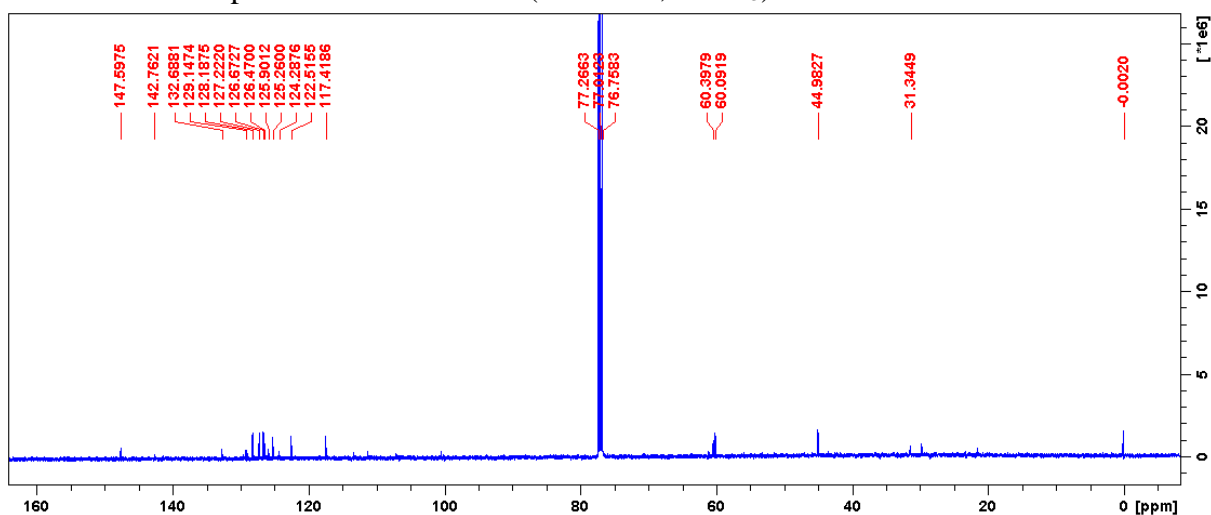


FIGURA E2: Espectro de RMN de DEPT135 (125 MHz, CDCl_3) de **GO8**.

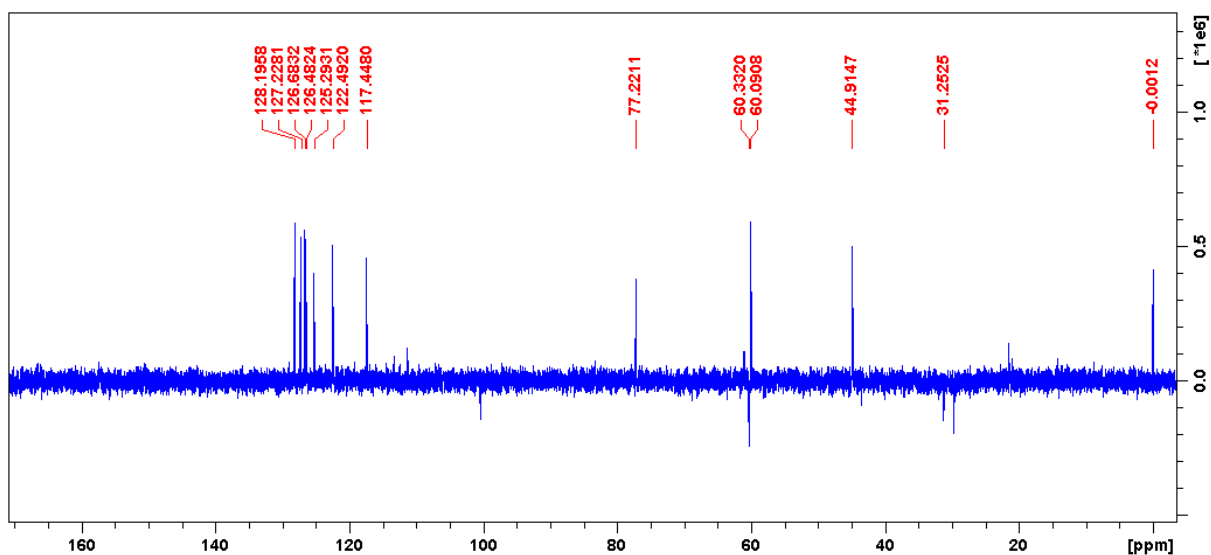


FIGURA E3: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **GO9**.

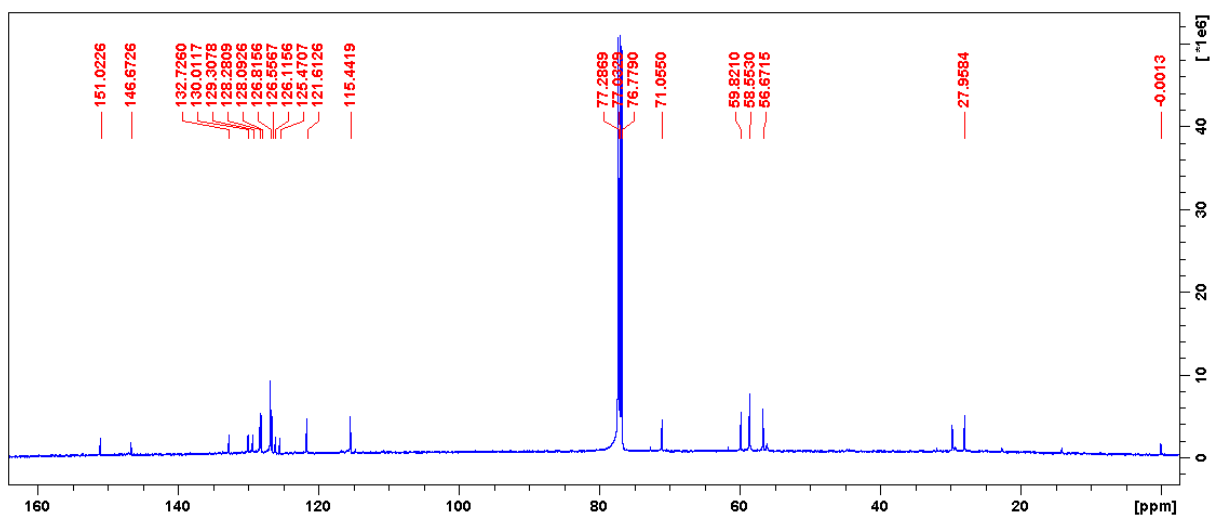


FIGURA E4: Espectro de RMN de DEPT135 (125 MHz, CDCl₃) de GO9.

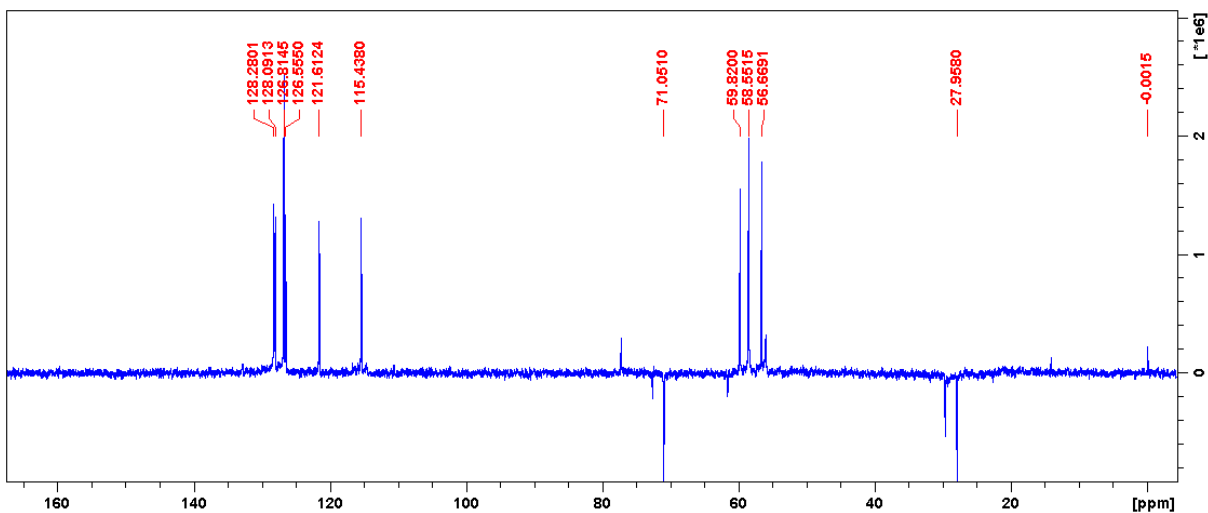


FIGURA E5: Espectro de RMN de ¹³C (150 MHz, CDCl₃) de GO2.

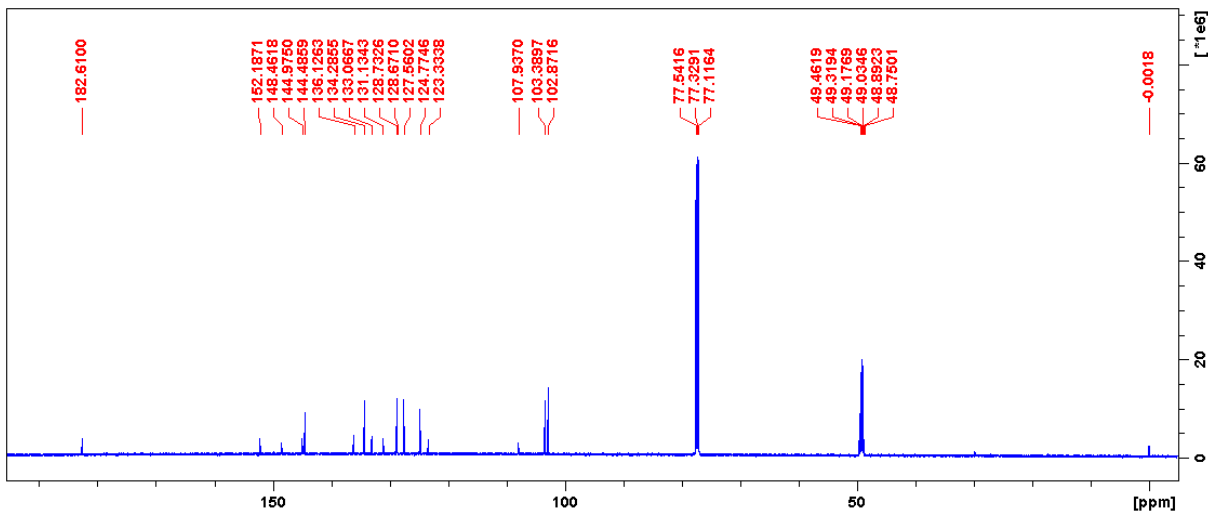


FIGURA E6: Espectro de RMN de DEPT135 (150 MHz, CDCl₃) de GO2.

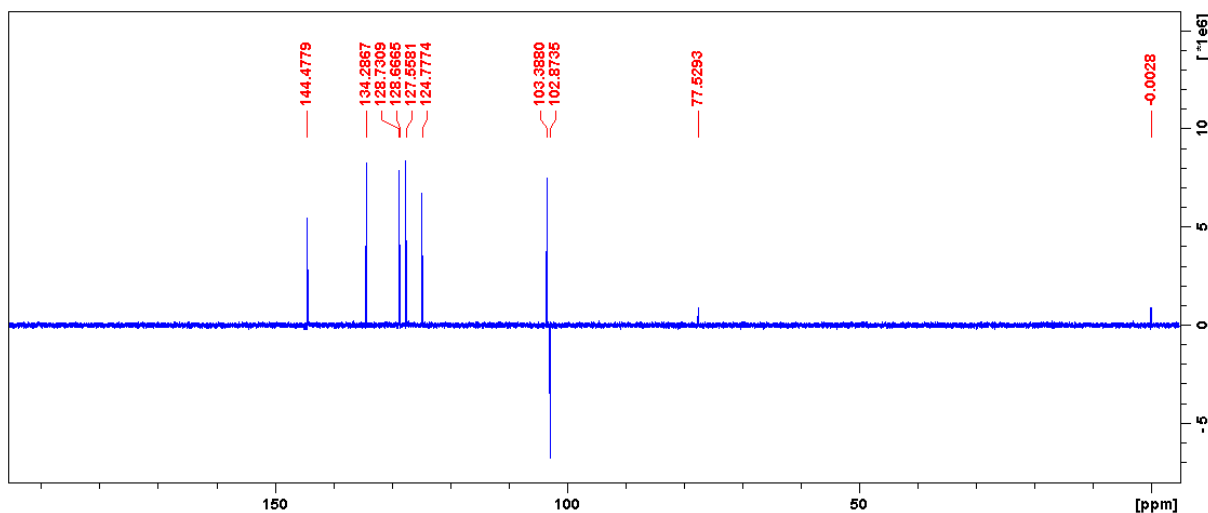


FIGURA E7: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **GO3**.

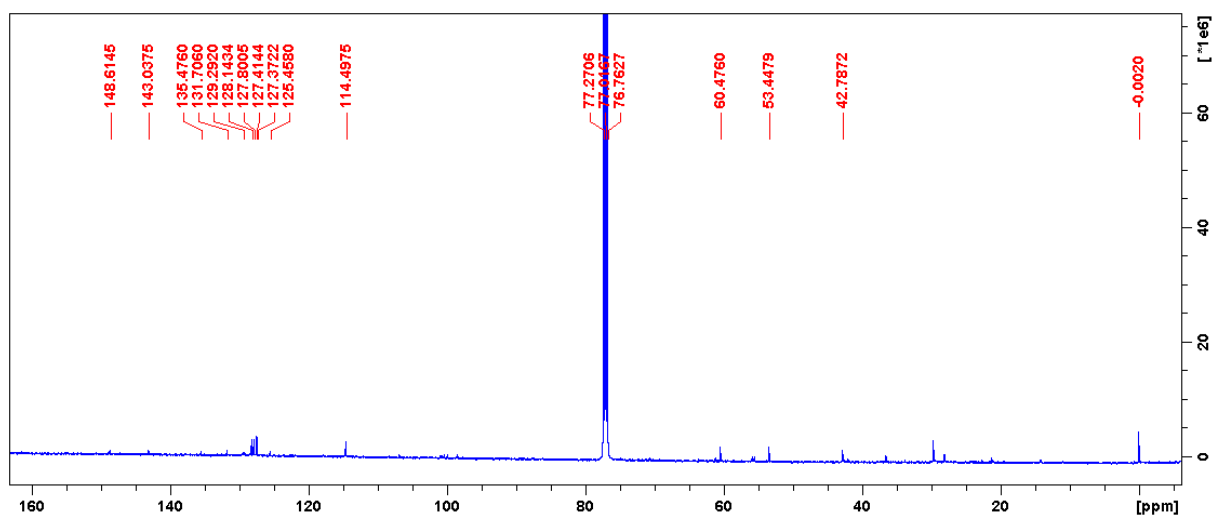


FIGURA E8: Espectro de RMN de DEPT135 (125 MHz, CDCl_3) de **GO3**.

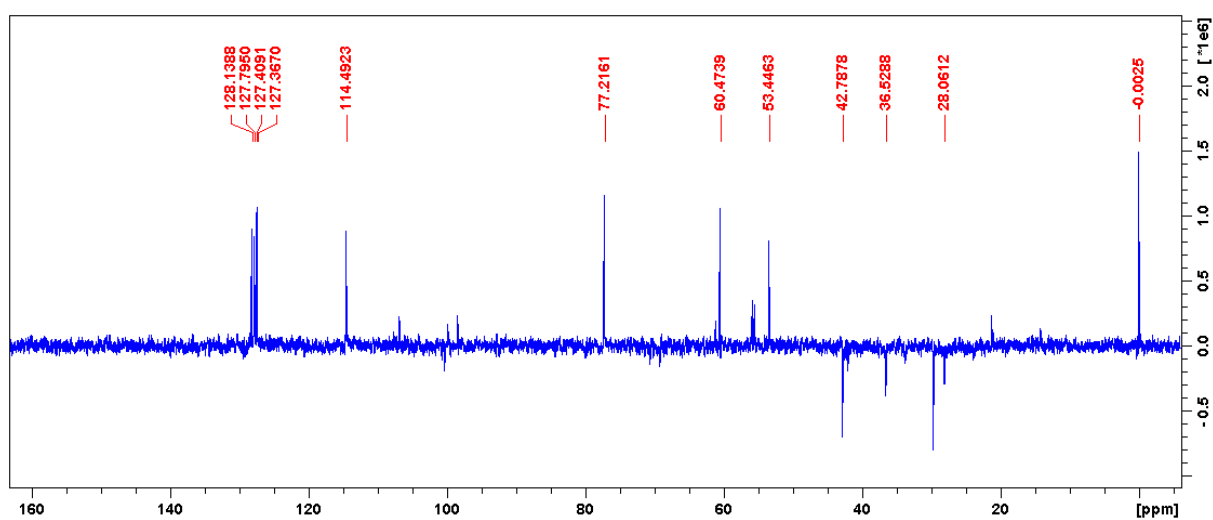


FIGURA E9: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de **GO6**.

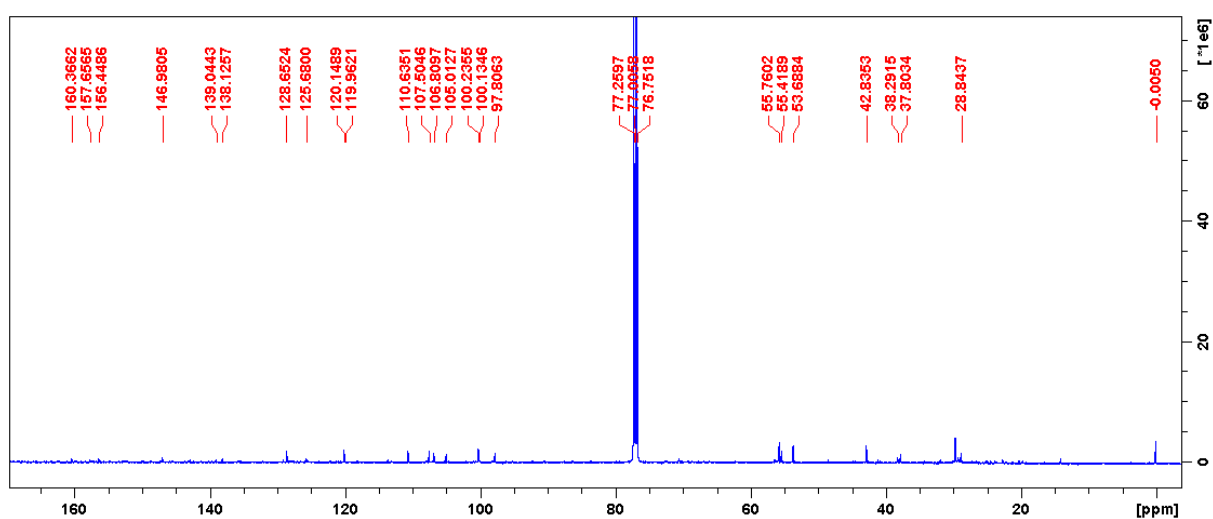


FIGURA E10: Espectro de RMN de DEPT135 (125 MHz, CDCl₃) de GO6.

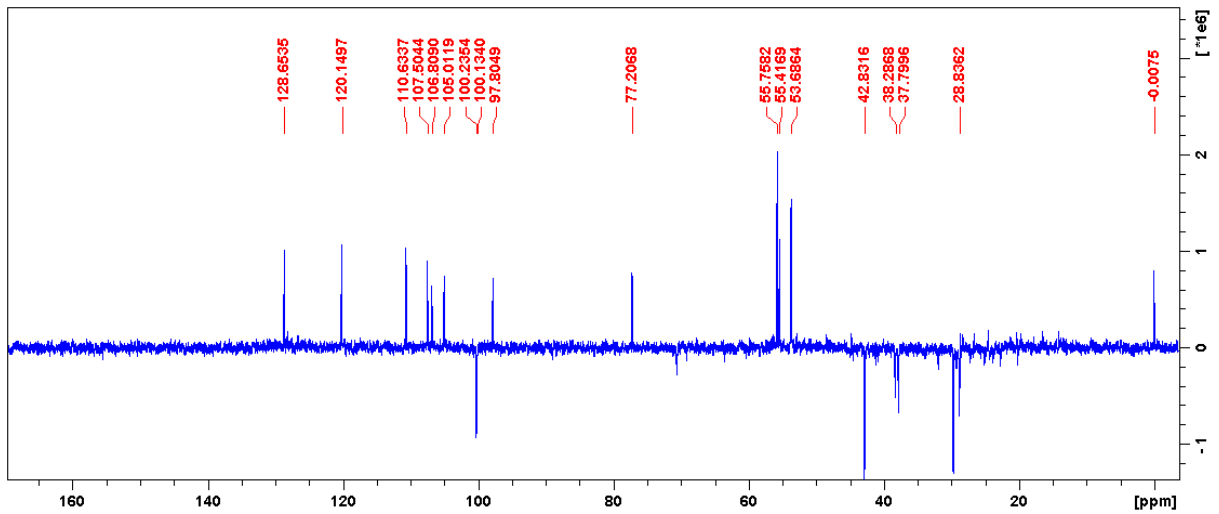


FIGURA E11: Espectro de RMN de ¹³C (125 MHz, CDCl₃) de GO4.

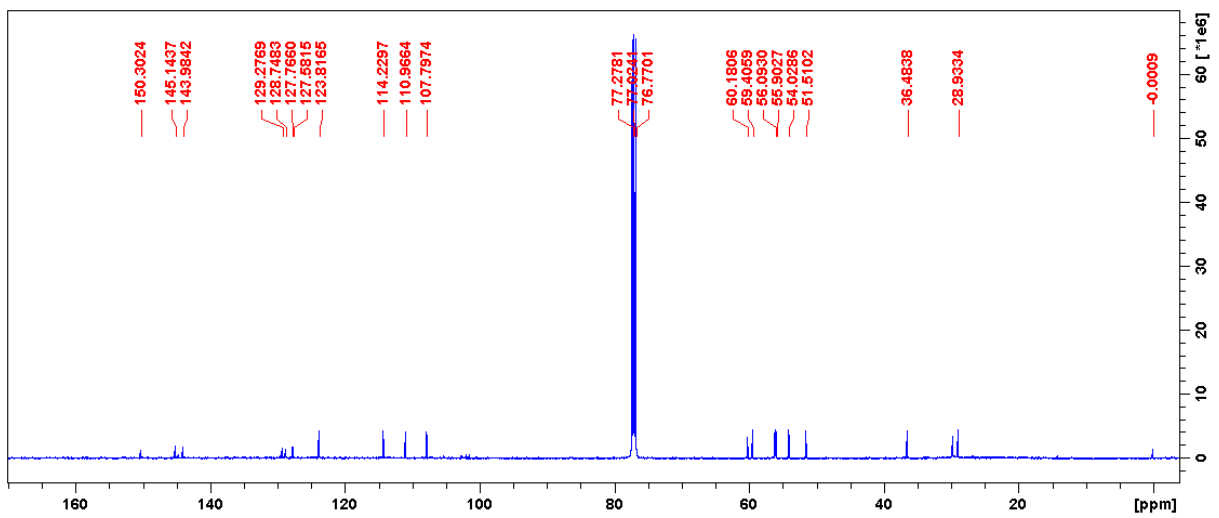


FIGURA E12: Espectro de RMN de DEPT135 (125 MHz, CDCl₃) de GO4.

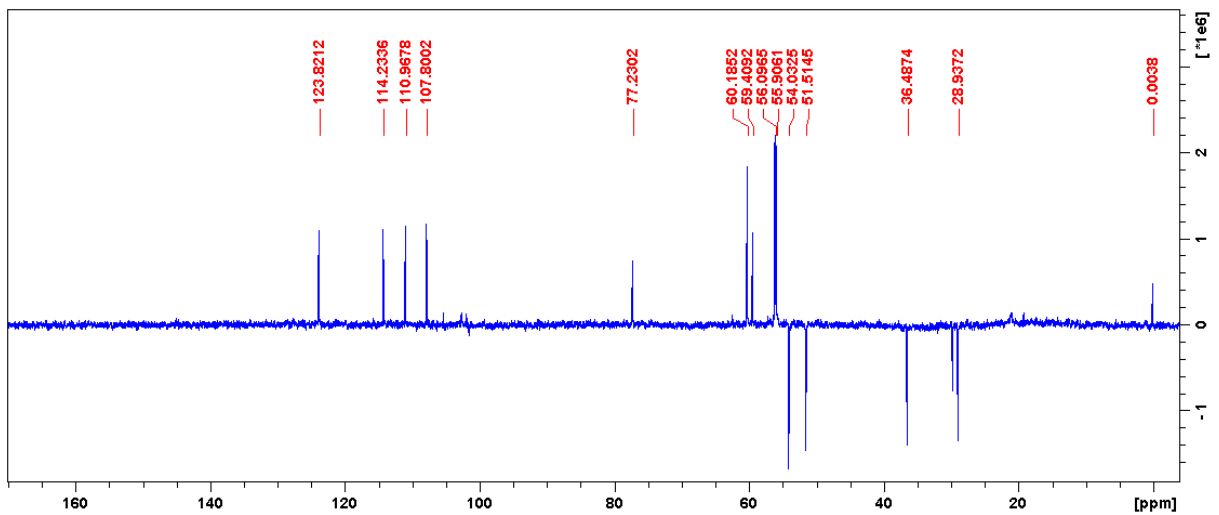


FIGURA E13: Espectro de massa referente ao pico com $t_r = 28,67$ min. correspondente ao germacreno D.

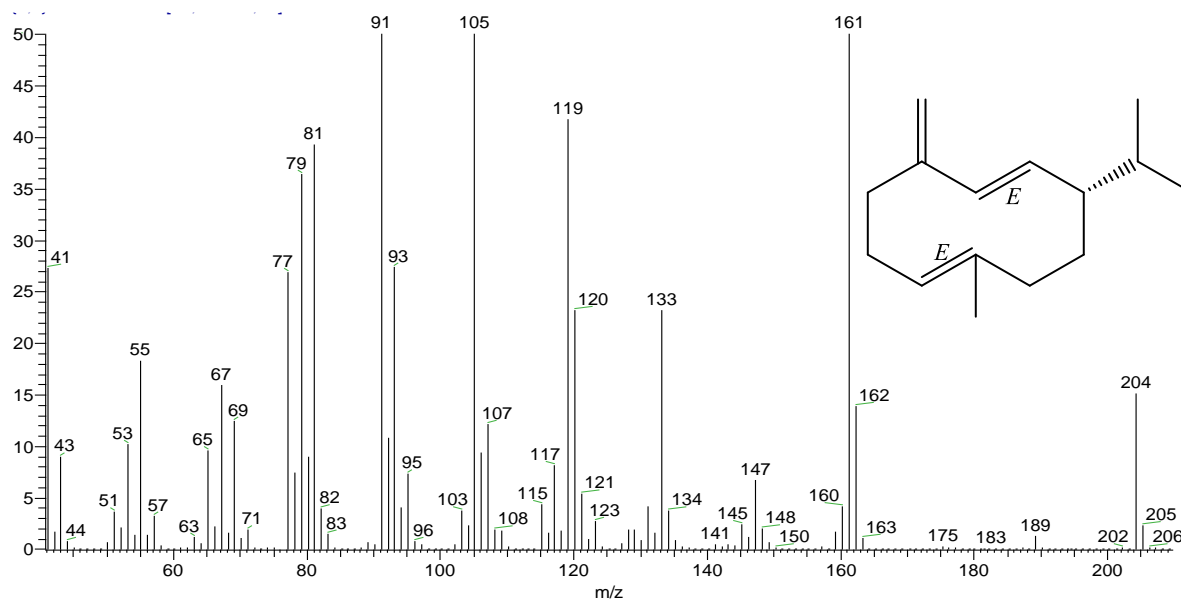


FIGURA E14: Espectro de massa referente ao pico com $t_r = 31,64$ min. correspondente ao óxido de cariofileno.

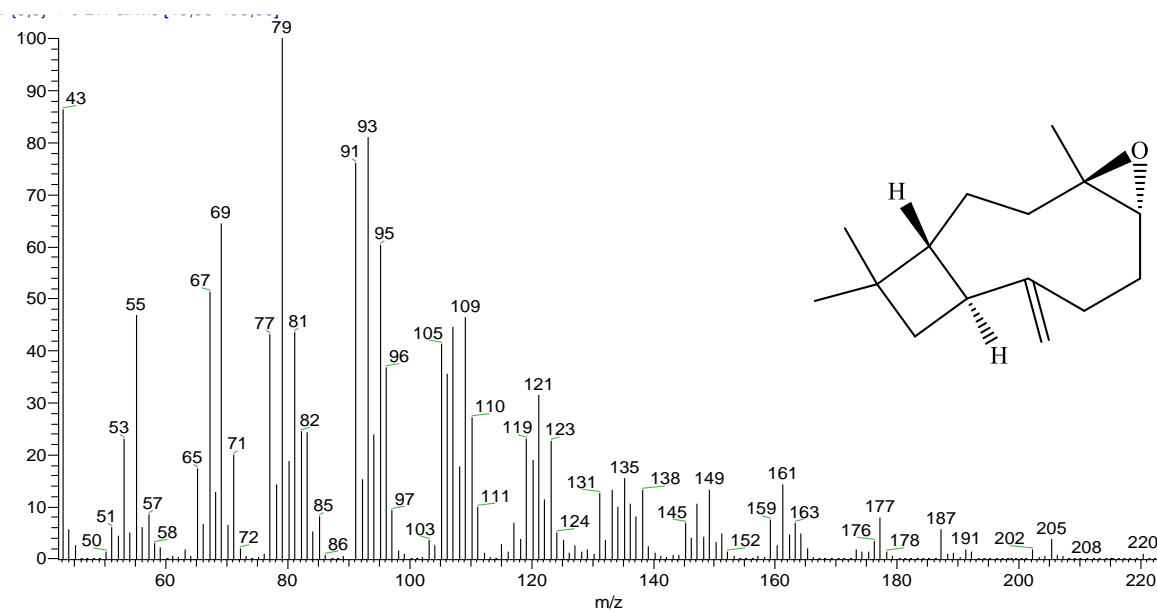


FIGURA E15: Espectro de massa referente ao pico tr = 31,51 min. correspondente ao espatulenol.

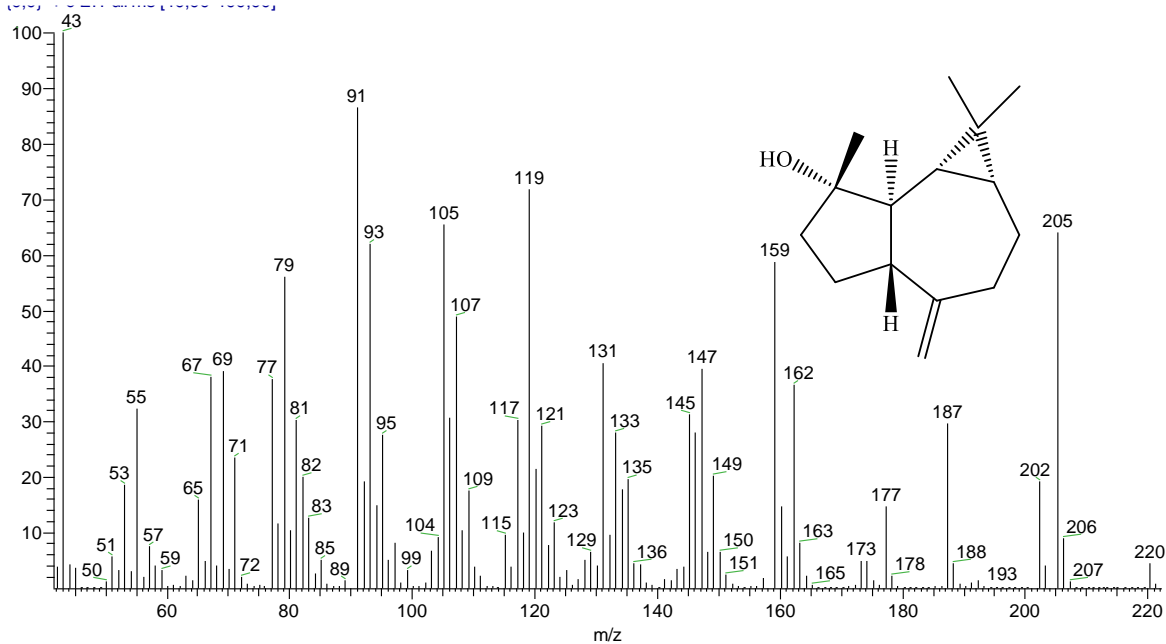


FIGURA E16: Espectro de massa referente ao pico tr = 26,75 min. correspondente ao (E)-cariofileno.

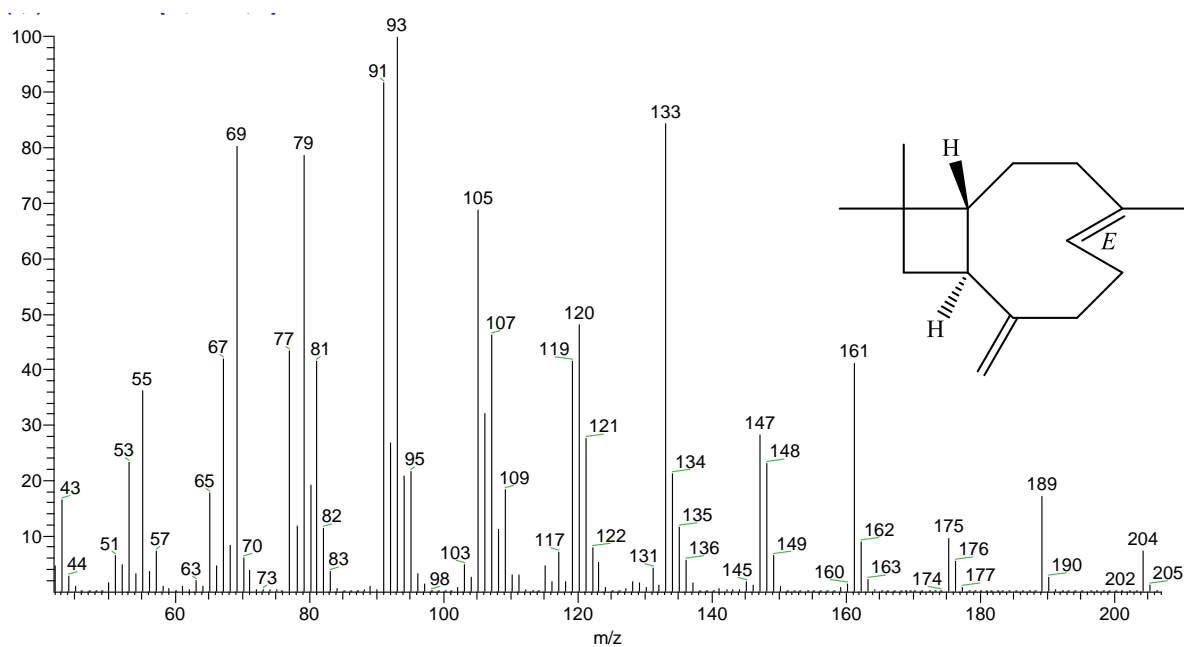


FIGURA E17: Espectro de massa referente ao pico tr = 32,98 min. correspondente ao β -atlantol.

