UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CÉSAR AUGUSTO SILVA DE SOUZA

CONSTITUINTES QUÍMICOS E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CASCAS E FOLHAS DE *Duguetia pycnastera* (ANNONACEAE)

Manaus – AM
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

CÉSAR AUGUSTO SILVA DE SOUZA

CONSTITUINTES QUÍMICOS E INVESTIGAÇÃO DO EFEITO CITOTÓXICO DAS CASCAS E FOLHAS DE DUGUETIA PYCNASTERA (ANNONACEAE)

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa 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. Dr. Emmanoel Vilaça Costa
CO-ORIENTADOR: Dr. Felipe Moura Araújo da Silva

Manaus – AM
2020

Constituintes químicos e investigação do efeito citotóxico das cascas e folhas de *Duguetia pycnastera* (Annonaceae)

CÉSAR AUGUSTO SILVA DE SOUZA

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós Graduação em Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como Requisito parcial para obtenção do titulo de Mestre em Química

Aprovada em 23 de Janeiro de 2020

Prof. Dr. EMMANOEL VILAÇA COSTA
Presidente/Orientador - DQ/UFAM

Prof. Dr. ANDREY MOACIR DO ROSÁRIO MARINHO
Membro Externo - FQ/UFPA

Prof. Dr. MARCOS BATISTA MACHADO
Membro Interno - DQ/UFAM

Ficha Catalográfica

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

S729c

Souza, Cesar Augusto Silva de
Constituintes Químicos e Investigação do Efeito cCitotóxico das Cascas e Folhas de Duguetia pycnastera (Annonaceae) / Cesar Augusto Silva de Souza . 2020
137 f.: 31 cm.

Orientador: Emmanoel Vilaça Costa
Coorientador: Felipe Moura Araújo da Silva
Dissertação (Mestrado em Química de Prod. Naturais) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Duguetia pycnastera. 2. Annonaceae. 3. Alcaloides. 4. Asaronas. 5. Citotoxicidade. I. Costa, Emmanoel Vilaça. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

Dedicatória

Dedico este trabalho em especial a minha amada e sempre presente esposa a quem meu amor sempre se manteve constante durante esses anos todos em que estamos juntos, também aos meus pais José Luiz e Raimunda que foram meu alicerce nessa caminhada que iniciou com a educação simples a qual os dois me submeteram e sempre me apoiaram nessa joranada de estudos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial ao Criado, Eterno e Santo Deus que me proporcionou esse momento o qual sempre sonhei desde o final da minha graduação.

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, cuja paciência e dedicação e ensino me proporcionaram um aprendizado sem par.

Ao meu Grande amigo e Co-orientador Dr. Felipe Moura Araújo da Silva que sempre me apoiou e incentivou-me a adentrar nesse mundo de pesquisa.

Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra e a 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.

A 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 todos os professores do PPGQ.

Aos meus colegas do Grupo GEQBiom, Nathalya Dorzani, Albert Santos, Natalie Araujo, Rodolfo Oliveira, Alberto Nascimento, Weider Paz, Brina Silva, Thayline Menezes, Morgana Araújo, Liviane Soares, Camila Ruzo, Thiago Damasceno e Richelly Andrade.

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

Aos meus colegas do LAEQ, Rochely Mesquita, Ingrity e Lilian.

Aos meus Familiares, meus Irmãos Márcio e Tereza, aos meus pais que me deram forças e apoio nos momentos mais difíceis, Raimunda e Luiz, aos meus sobrinhos que são alegria da minha vida, Ézio Luiz e Alice Andrade, ao meus sogros Nelson e Gláucia, minha cunhada Taís e a minha amada e querida Esposa Talita que foi meu alicerce e meu porto

seguro quando pensei em desistir, á todos os meus irmãos em Cristo que oraram por mim durante esses dois anos.

Ao meu melhor amigo Francisco Roger pelo apoio e pela alegria com que sempre me tratou em nossas conversas cotidianas.

Em especial as minhas avós Dona Tereza e Dona Benedita, cujas enfermidades não permitiram estar pessoalmente, no entanto tenho certeza que estiveram comigo em orações, ao meu tio Roberto (*in memoriam*) amado e querido que não pôde acompanhar esse momento no qual ele tanto me apoiou.

Porquanto, ainda que a figueira não floresça, nem haja fruto na vide; o produto da oliveira minta, e os campos não produzam mantimento; as ovelhas da malhada sejam arrebatadas, e nos currais não haja vacas, [1]todavia, eu me alegrarei no SENHOR, exultarei no Deus da minha salvação. O Senhor é minha força, e fará os meus pés como os das cervas, e me fará andar sobre as minhas alturas.

Habacuque 3:17-19

RESUMO

Duguetia pycnastera é uma espécie da família Annonaceae conhecida popularmente como "envira-preta" com distribuição no norte da América do sul. No Brasil é bastante comum no Amazonas e Amapá. Com base nos dados da literatura, essa espécie apresenta somente dois estudos fotoquímicos, sendo relatados os componentes voláteis do óleo essencial (dados publicados) e o isolamento de alcaloides (dados não publicados). Com isso, no presente trabalho foi realizado o estudo fitoquímico e a investigação da atividade citotoxicidade *in vitro* dos extratos brutos, frações e substâncias isoladas das cascas do caule de *D. pycnastera*. O estudo fitoquímico das cascas resultou no isolamento e na caracterização de sete substâncias, sendo cinco pertencentes à classe dos alcaloides e duas de caráter benzênico (fenilpropanoides). Para o isolamento dos constituintes químicos foram empregadas técnicas cromatográficas clássicas (CC, CCDA e CCDP), enquanto que para a identificação foram empregadas técnicas espectroscópicas (RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D/2D) e espectrométricas (EM e CG-EM). O estudo do perfil pela técnica EM com fonte de *leaf spray* mediante chaves de fragmentação permitiu identificar possíveis esqueletos de alcaloides presentes na fração alcaloídica. Foram isolados sete (7) alcaloides isoquinolinos (*N*-oxiguaterina, nornuciferidina, lisicamina, *O*-metilmoschatolina e reticulina). Os fenilpropanoides identificados pertencem a classe das asaronas (1-allil-2,4,5-trimetoxibenzeno e 2,4,5-trimetoxi-estireno). Todos os alcaloides identificados neste trabalho possuem relato no gênero, entretanto, são inéditos na espécie, sendo os alcaloides oxoaporfinos de maior ocorrência. Entre os extratos e frações das cascas submetidos ao ensaio de atividade citotóxica *in vitro*, a fração alcaloídica proveniente do extrato metanólico apresentou maior atividade contra as linhagens de células tumorais avaliadas, com valores de CI_{50} iguais a 14,09 $\mu g.mL^{-1}$ para MCF-7 e 11.58 $\mu g.mL^{-1}$ para HepG2. Entre os alcaloides isolados e avaliados, a lisicamina e *O*-metilmoschatolina foram as substâncias que apresentam melhores resultados citotóxicos, em particular contra as linhagens celulares HepG2 e HL-60 (CI_{50} 29,08 e 24,68 $\mu mol.L^{-1}$, respectivamente) para a lisicamina e para a *O*-metilmoschatolina apresentou atividade citotóxica promissora para a célula HL-60 (34,85 $\mu mol.L^{-1}$). Por meio da análise por CG-EM do óleo essencial foram identificados 24 constituintes, destacando-se como constituintes majoritários, os sesquiterpenos α-gurjuneno (26,83%), biciclogermacreno (24,90%), germacreno D (15,35%) e espatulenol (12,97%). Os resultados obtidos neste estudo confirmam o potencial químico e citotóxico das espécies de Annonaceaes brasileiras, em particular, as espécies de ocorrência no Amazonas. Desta forma, é valido ressaltar a importância da continuidade dos estudos desta espécie em futuros projetos na busca de substâncias com propriedades citotóxicas.

Palavras-chaves: *Duguetia pycnastera*; Annonaceae; Alcaloides; Asaronas; Citotoxicidade.

ABSTRACT

Duguetia pycnastera is a species of the family Annonaceae popularly known as “envira-preta” with distribution in northern South America. In Brazil it is quite common in Amazonas and Amapá. Based on literature data, this species has only two photochemical studies, with the volatile components of essential oil (published data) and the isolation of alkaloids (unpublished data) being reported. Thus, in the present work, a phytochemical study and investigation of the in vitro cytotoxicity activity of crude extracts, fractions and substances isolated from the bark of D. pycnastera stem was carried out. The phytochemical study of the shells resulted in the isolation and characterization of seven substances, five belonging to the class of alkaloids and two of benzene character (phenylpropanoids). Classical chromatographic techniques (CC, CCDA and CCDP) were used for the isolation of chemical constituents, while spectroscopic (1H and 13C 1D / 2D NMR) and spectrometric (EM and CG-EM) techniques were used for identification. The study of the profile by the EM technique with leaf spray source using fragmentation keys allowed to identify possible skeletons of alkaloids present in the alkaloid fraction. Seven (7) isoquinoline alkaloids (N-oxyiguaterine, nornuciferidine, lysicamine, O-methylmoschatoline and reticulin) were isolated. The identified phenylpropanoids belong to the asarone class (1-allyl-2,4,5-trimethoxybenzene and 2,4,5-trimethoxy-styrene). All alkaloids identified in this work are reported in the genus, however, they are unprecedented in the species, with oxoaporphine alkaloids being the most common. Among the extracts and fractions of the shells submitted to the in vitro cytotoxic activity test, the alkaloid fraction from the methanolic extract showed greater activity against the tumor cell lines evaluated, with IC50 values equal to 14.09 µg.mL-1 for MCF -7 and 11.58 µg.mL-1 for HepG2. Among the isolated and evaluated alkaloids, lysicamine and O-methylmoschatoline were the substances that present the best cytotoxic results, in particular against the cell lines HepG2 and HL-60 (IC50 29.08 and 24.68 µmol.L-1, respectively) for lysicamine and for O-methylmoschatoline it showed promising cytotoxic activity for the HL-60 cell (34.85 µmol.L-1). Through the GC-MS analysis of the essential oil, 24 constituents were identified, with sesquiterpenes α-gurjunene (26.83%), bicyclogermacrene (24.90%), germacrene D (15.35%), standing out as major constituents.) and spatulenol (12.97%). The results obtained in this study confirm the chemical and cytotoxic potential of Brazilian Annonaceaes species, in particular, species occurring in Amazonas. Thus, it is worth emphasizing the importance of continuing studies of this species in future projects in the search for substances with cytotoxic properties.

Keywords: *Duguetia pycnastera*; Annonaceae; Alkaloids; Asarones; Cytotoxicity

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

δ	Deslocamento químico
µg	Micrograma
AcOEt	Acetato de Etila
CC	Cromatografia em coluna
CCDA	Cromatografia em camada delgada analítica
CCDP	Cromatografia em camada delgada preparativa
CD_3OD	Metanol deuterado
$CDC\ell_3$	Clorofórmio deuterado
CI_{50}	Concentração inibitória média
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	*Correlated Spectroscopy*
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
dt	Duplo tripleto
Da	Dalton
DMSO	Dimetilsulfóxido
Dox	Doxorrubicina
EM	Espectrometria de Massas
EMDPC	Extrato Metanólico *Duguetia pycnastera* casca
EMDPF	Extrato Metanólico *Duguetia pycnastera* folhas
FADPF	Fração alcaloídica *Duguetia pycnastera* folhas
FADPC	Fração alcaloídica *Duguetia pycnastera* cascas
FNDPC	Fração Neutra *Duguetia pycnastera* cascas
FNDPF	Fração Neutra *Duguetia pycnastera* folhas
EHCDP	Fração extrato hexânico
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
$HC\ell$	Ácido clorídrico
HepG2	Carcinoma Hepatocelular Humano
HL-60	Leucemia Promielocítica Humana
HMBC	*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*
HSQC	*Heteronuclear Single Quantum Correlation*

Hz	Hertz
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
J	Constante de acoplamento
LS-MS	Leaf Spray – Mass Spectrometry
M	Metro
M	Multipleto
m/z	Relação massa/carga
MCF-7	Carcinoma de mama humano
MeOH	Metanol
MHz	Megahertz
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MRC-5	Fibroblasto de pulmão humano
NH_4OH	Hidróxido de amônio
nm	Nanômetro
pH	Potencial de hidrogênio
R*f*	Fator de retenção
RMN de ^{1}H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
Rpm	Rotações por minuto
s	Singleto
t	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
v/v	Volume/volume

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: Exemplos de produtos naturais com diferentes utilizações clínicas.....23

FIGURA 2: Fármacos obtidos a partir de produtos naturais utilizados na terapia contra o câncer. ..24

FIGURA 3: Distribuição geográfica de espécies da família Annonaceae no mundo. 27

FIGURA 4: Frutos e flores característicos de algumas espécies da família Annonaceae.....28

FIGURA 5: Frutos provenientes das espécies do gênero *Duguetia*.....30

FIGURA 6: Componentes voláteis encontrados em espécies do gênero *Duguetia*. 36

FIGURA 7: Substâncias voláteis isoladas da espécie *Duguetia furfuraceae*.....37

FIGURA 8: Derivados benzênicos encontrados em espécies do gênero *Duguetia*. 37

FIGURA 9: *D. pycnastera*: caule da árvore (A); folhas verdes (B); frutos em processo de amadurecimento (C).....40

FIGURA 10: Esqueleto geral dos alcaloides aporfinoides.....41

FIGURA 11: Rota biossintética de alcaloides aporfino 42

FIGURA 12: Rota biossintética de alcaloides fenantrenos.....42

FIGURA 13: Biossíntese dos alcaloides oxoaporfínicos. 43

FIGURA 14: Fonte de ionização ambiente Leaf Spray. (A) substituição da caixa por um conector Db15, (B) folha cortada em formato triangular (base e altura de 10 mm) mantida por um conector de alta voltagem.....47

FIGURA 15: Perfil LS-MS das cascas de *D. pycnastera* 58

FIGURA 16: Fragmentação em MS^n dos íons *m/z* 342, 328 e 358. 59

FIGURA 17: Fragmentação em MS^n dos íons *m/z* 356 e 330.....59

FIGURA 18: Espectro de fragmentação em MS^n referente aos íons *m/z* 338 e 352.....60

FIGURA 19: Espectro de fragmentação em MS^n referente aos íons *m/z* 322 e 292.....61

FIGURA 20: Espectro de fragmentação em MS^n referente aos íons *m/z* 326e 298.....62

FIGURA 21: Espectro de íons totais do extrato metanólico obtido das cascas de *Duguetia pycnastera*. 63

FIGURA 22: Espectro de íons totais obtidos da fração alcaloídica das cascas de *Duguetia pycnastera*. 63

FIGURA 23: Espectro da fração neutra obtida do tratamento ácido base das cascas da *Duguetia pycnastera* 64

FIGURA 24: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.....65

FIGURA 25: Ampliação (δ 7.26 – 5.03) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.....66

FIGURA 26: Ampliação (δ 6.00 – 5.92) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.....66

FIGURA 27: Ampliação (δ 5.05 – 5.01) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.....66

FIGURA 28: Ampliação (δ 3.87 – 3.31) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.....67

FIGURA 29: Ampliação (δ 3.34 – 3.31) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.....67

FIGURA 30: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de S1 68

FIGURA 31: Espectro de DEPT 135° (125 MHz, $CDCl_3$) de S1 68

FIGURA 32: Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S1. 69

FIGURA 33: Correlações em COSY (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S1. 69

FIGURA 34: Hidrogênios olefinicos HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S1.....70

FIGURA 35: Hidrogênios metoxilicos e aromáticos em HMBC (1H: 500 MHz; 13C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S1. 70

FIGURA 36: Principais correlações observadas no experimento HMBC de S1 71

FIGURA 37: Estrutura de S1, 1-alilo- 2, 4,5-trimetoxibenzeno (γ-asarona). 72

FIGURA 38: Formas isoméricas (A) α-asarona, (B) β-asarona, (C) γ-asarona. 72

FIGURA 39: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S2.....73

FIGURA 40: Região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S2. 73

FIGURA 41: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S2, ampliação da região de 5.61 a 3,82 ppm. 73

FIGURA 42: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) para substância S2.....74

FIGURA 43: Espectro de RMN de DEPT 135° (125 MHz, $CDCl_3$) para substância S2. 74

FIGURA 44: Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2. 75

FIGURA 45: Ampliação do Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2 na região das metoxilas. 75

FIGURA 46: Ampliação do Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2. 76

FIGURA 47: Mapa de correção HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2.....76

FIGURA 48: Ampliação da região metoxilica e aromática no Mapa de correção HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2 77

FIGURA 49: Região dos Hidrogênios alifáticos no Mapa de correção HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2 77

FIGURA 50: Correlações observadas no mapa HMBC (^{1}H: 500 MHz;^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) da substância S2 79

FIGURA 51: Estrutura da substância S2 (2,4,5-trimetoxi-estireno) 79

FIGURA 52: Espectro de massas da substância S1. 80

FIGURA 53: Espectro de massas da substância S2. 80

FIGURA 54: Espectro de fragmentação em MS^4 da substância S1 81

FIGURA 55: Espectro de fragmentação em MS^4 da substância S2 81

FIGURA 56: Espectro de fragmentação em MS^4 da substância S1 a partir do íon *m/z* 168 82

FIGURA 57: Proposta de Fragmentação para S1: 1-alilo- 2,4,5-trimetoxibenzeno (γ-asarona). 82

FIGURA 58: Proposta de fragmentação de S2 (2,4,5-trimetoxi-estireno) 83

FIGURA 59: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S3 84

FIGURA 60: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) na região (δ4.20 – 4.08) de S3. 84

FIGURA 61: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) na região(δ 9.12 – 7.52) de S3 84

FIGURA 62: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H na região(δ 9.12 – 8.96) de S3 85

FIGURA 63: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H na região (δ 9.12 – 8.96) de S3 85

FIGURA 64: Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC de S3. 85

FIGURA 65: Estrutura da substância S3 (*O*-metilmoschatolina). 87

FIGURA 66: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4 87

FIGURA 67: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4, região de (δ7,23 a 9,20 ppm). 88

FIGURA 68: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4, região de (δ8,58 a 9,20 ppm). 88

FIGURA 69: Ampliação do espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4, região de (δ7.23 a 7.81 ppm). 88

FIGURA 70: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4 região δ 4,11 a 4,02 89

FIGURA 71: Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC de S4. 91

FIGURA 72: Estrutura da substância S4, alcaloide oxoaporfínico lisicamina. 91

FIGURA 73: Espectro de massas (ESI-EM modo positivo) de S3 92

FIGURA 74: Espectro de massas (ESI-EM modo positivo) de S4 92

FIGURA 75: Estruturas propostas com base nas fragmentações dos íons *m/z* 292 e 322 93

FIGURA 76: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S5 94

FIGURA 77: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S5 (δ7.83-7.98) 94

FIGURA 78: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S5 (δ 7.41 7.29) 95

FIGURA 79: Ampliação da região do anel piridínico do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S5 95

FIGURA 80: Ampliação da região aromática (Anel A e C) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$). 96

FIGURA 81: Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S5. 96

FIGURA 82: Ampliações do mapa (A e B) de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) 97

FIGURA 83: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de S5 98

FIGURA 84: Espectro de DEPT 135 (125 MHz, $CDCl_3$) de S5 98

FIGURA 85: Correlação ^{1}H-^{1}H COSY (1H: 500 MHz; 13C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S5. 99

FIGURA 86: Ampliação da região metoxilica e aromática no Mapa de correção HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S5 99

FIGURA 87: Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC de S5. 100

FIGURA 88: Estrutura da substância S5, alcaloide *N*-oxido *N*-oxiguaterina. 101

FIGURA 89: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S6 101

FIGURA 90: Ampliação das regiões aromáticas do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S6. 102

FIGURA 91: Ampliação da região aromática do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$). 102

FIGURA 92: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S6. 103

FIGURA 93: Ampliações do mapa (A e B) de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S6 103

FIGURA 94- Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de S6 104

FIGURA 95: Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC de S6. 104

FIGURA 96: Estrutura da substância S6, nornuciferidina. 106

FIGURA 97: Espectro de massas da substância da molécula S5, modo positivo. 106

FIGURA 98: Espectro de massas da substância de S6 no modo positivo. 107

FIGURA 99: Espectro de fragmentação da molécula S5.....107

FIGURA 100: Espectro de fragmentação em MS^3 de S6. 108

FIGURA 101: Proposta de Fragmentação para as substâncias S5 e S6. 108

FIGURA 102: Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) de S7.....109

FIGURA 103: Ampliação da região aromática do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) S7.....109

FIGURA 104: Ampliação da região dos hidrogênios diasterotópicos do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) S7. 110

FIGURA 105: Ampliação da região (δ 3.79 – 3.09) do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) S7.....110

FIGURA 106: Ampliações do mapa (A e B) de correlações HSQC (^1H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S7.....111

FIGURA 107: Estrutura da substância S7, reticulina. 111

FIGURA 108: Espectro de massas da substância S7, modo positivo. 112

FIGURA 109: Espectro de fragmentação de S7. 112

FIGURA 110: Estrutura proposta com base na fragmentação do íon *m/z* 330, reticulina. 112

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1: Fluxograma geral de preparação dos extratos orgânicos das folhas e cascas de *Duguetia pycnastera*. 49

ESQUEMA 2: Fluxograma geral do tratamento ácido-base das cascas de *D. pycnastera*. 52

ESQUEMA 3: Ensaio para verificação de atividade citotóxica. 57

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Fracionamento cromatográfico do Extrato Hexânico das cascas de *D. pycnastera* (EHCDP). 50

TABELA 2: Reunião das frações obtidas do fracionamento em coluna aberta do EHCDP 50

TABELA 3: Grupo de frações obtidas por cromatografia em camada delgada preparativa da fração EHCDP-7. 51

TABELA 4: Fracionamento cromatográfico da Fração Alcaloídica de *D. pycnastera* (FADP) 53

TABELA 5: Frações obtidas do fracionamento em coluna aberta da fração FADP. 53

TABELA 6: Fracionamento do grupo FADP-1. 2. 54

TABELA 7: Fracionamento do grupo FADP-4. 5. 54

TABELA 8: Fracionamento do grupo FADP-7. 55

TABELA 9: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 328, 342 e 358. 59

TABELA 10: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 330 e 356 60

TABELA 11: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 338 e 352. 60

TABELA 12: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 292 e 322 61

TABELA 13: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 326 e 298 62

TABELA 14: Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C de S1 71

TABELA 15: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S2. 78

TABELA 16: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S3. 86

TABELA 17: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S4. 90

TABELA 18: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S5. 100

TABELA 19: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S6. 105

TABELA 20: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S7. 113

TABELA 21: Composição química do óleo essencial das folhas de *D. pycnastera* 114

TABELA 22: Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais. 116

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1: Alcaloides benziltetrahidroisoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*. 30

QUADRO 2: Estruturas dos alcaloides benziltetrahidroisoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia* 30

QUADRO 3: Alcaloides tetrahidroprotoberberínicos e protoberberínico isolados de espécies do gênero *Duguetia.* 31

QUADRO 4: Estruturas dos alcaloides tetraidroprotoberberínicos e protoberberínico isolados de espécies do gênero *Duguetia*. 31

QUADRO 5: Alcaloides aporfinos isolados de espécies do gênero *Duguetia*..... 32

QUADRO 6: Estruturas dos alcaloides aporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*. 32

QUADRO 7: Alcaloides aporfinos isolados de espécies do gênero *Duguetia*..... 33

QUADRO 8: Estrutura dos alcaloides aporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*..... 33

QUADRO 9: Alcaloides oxoaporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*..... 34

QUADRO 10: Estruturas dos alcaloides oxaporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*... 34

QUADRO 11: Alcaloides fenantrenos isolados de espécies do gênero *Duguetia.* 35

QUADRO 12: Estruturas dos alcaloides fenantrenos isolados do gênero *Duguetia* 35

QUADRO 13: Alcaloides isoquinolínicos sem subclasse definida isolados de espécies do gênero *Duguetia.* 35

QUADRO 14: Alcaloides isoquinolínicos de subclasses pouco observadas em de espécies do gênero *Duguetia.* 35

QUADRO 15: Alcaloides não isoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia.* 35

QUADRO 16: Estrutura dos alcaloides não isoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*. 36

QUADRO 17: Alcaloides isolados de espécies do gênero *Duguetia* que apresentam atividade biológica. 39

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO 23

2. OBJETIVOS 26

2.1. Objetivo Geral 26
2.2. Objetivos específicos 26

3.0 REVISÃO DA LITERATURA 27

3.2 O gênero *duguetia* **29**

3.3 A espécie *Duguetia pycnastera* Sandwith. **39**

3.4 Alcaloides: Definição **41**

3.4.2 Alcaloides oxoaporfínicos 43

3.5 Ensaios citotóxicos **43**

4.0. METODOLOGIA 45

4.1 Cromatografia em Coluna (CC) 45
4.2 Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) 45
4.3. Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) 45
4.4. Reveladores 45
4.5. Solventes 46
4.6. Equipamentos 46
4.7. Coleta do Material Vegetal 48
4.8. Preparo dos extratos 48
4.9 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Hexânico da Casca (EHCDP) 49
4.10 Isolamento 50
4.11 Tratamento ácido-base do extrato metanólico 51
4.12. Fracionamento cromatográfico da Fração Alcaloídica de *D. pycnastera* (FADP) 52
4.12.1 Isolamento dos constituintes químicos 53
4.12.2 Grupo de Frações FADP-1.2 54
4.12.3 Grupo de frações FADP-4.5 54
4.12.4 Grupo de frações FADP-7 55

4.13. Extração do óleo essencial 55

4.14 Estudo da atividade citotóxica *in vitro* 55
4.14.1 Preparo das Amostras 56
4.14.2 Células 56
4.14.3 Ensaio de citotoxicidade 56

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS 58

5.1. Estudo do perfil por *leaf spray* (LS-MS) de *D. pycnastera* 58
5.2 Análise do perfil espectrométrico do extrato metanólico e da fração alcaloídica das cascas de *Duguetia pycnastera*. 62
5.3. Determinação estrutural das substâncias isoladas 65
5.3.1. Determinação estrutural das substâncias codificadas como (S1) e (S2) 65
5.3.2. Determinação estrutural das substâncias codificadas como S3 e S4 83

5.3.3. Determinação estrutural das substâncias codificadas como S5 e S6 93
5.3.4. Determinação estrutural da substância codificada como S7 109
5.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) do óleo essencial das folhas de *Duguetia pycnastera* 114
5.5 Investigação da atividade citotóxica *in vitro* pelo método alamar blue 115
5.5 Investigação da atividade citotóxica dos extratos, frações e substâncias isoladas de *Duguetia pycnastera* 115

6. CONCLUSÃO 118

REFERÊNCIAS 119

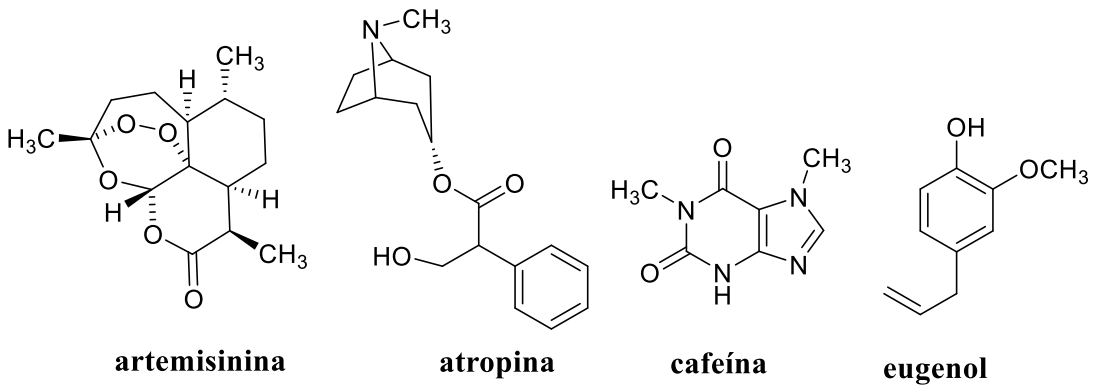
1.0 INTRODUÇÃO

A busca por novas substâncias com diversas aplicações, com destaque os fármacos, é um processo que requer otimização contínua. Os produtos naturais representam uma alternativa de grande sucesso para a descoberta de novos medicamentos (STROBEL, DAISY & CASTILHO, 2005). Em comparação com várias outras fontes de compostos de interesse farmacológico como, por exemplo, as obtidas por síntese orgânica, a maior diversidade química é proveniente de substâncias oriundas de fontes naturais (KOEHN & CARTER, 2005; HARVEY, 2000).

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde os tempos antigos. A busca por alívio e cura de doenças, por meio destes, talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização desses produtos. Intuitivamente, o homem primitivo buscava descobrir soluções para suas necessidades básicas de sobrevivência, como alimentação, moradia, proteção e reprodução. Suas experiências e observações resultaram em descobertas importantes para soluções de tratamentos de injúrias ou doenças através do uso das plantas e ervas (VIEGAS Jr. *et al*., 2006).

A importância dos produtos naturais no combate a diferentes enfermidades adquiridas pela espécie humana pode ser vista pelo grande número de fármacos que estão disponíveis no mercado. Como exemplo: a artemisinina, antimalárico obtido da planta *Artemisia annua* L, a atropina, anticolinérgico extraído de *Atropa beladona* L; a cafeína, estimulante extraído de diferentes plantas, como *Coffea arabica* L. (café), *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil (erva-mate) e *Paullinia cupana* Kunth (guaraná); e o eugenol, anestésico local, recomendado em casos de dor de dente, extraído de *Syzygium aromaticum* ((L.) MERR & PERRY (cravo-da-índia) (FIGURA 1) (ROCHA *et al*., 2001).

FIGURA 1: Exemplos de produtos naturais com diferentes utilizações clínicas.

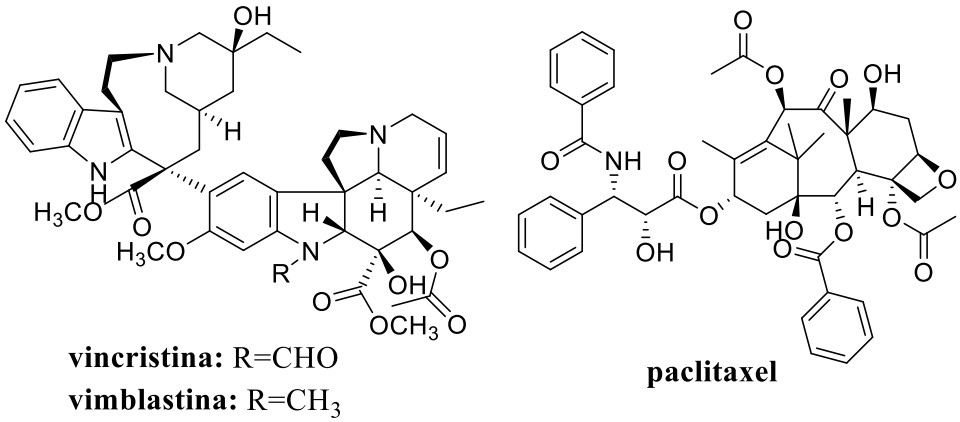


Fonte: ROCHA *et al*., 2001

Nas últimas décadas, tem se observado a proliferação de novas enfermidades associadas ao envelhecimento populacional e à adoção de novos padrões de vida e de consumo adotados pela sociedade moderna, como por exemplo, as doenças degenerativas e o câncer. Este último configura-se como uma das principais causas de preocupação global, devido às dificuldades encontradas em seu tratamento e os alarmantes dados estatísticos apresentados. Os índices mostram que para o Brasil biênio 2018-2019, a ocorrência de 600 mil casos novos de câncer, para cada ano. Excetuando-se o câncer de pele não melanoma (cerca de 170 mil casos novos), ocorrerão 420 mil casos novos de câncer. O cálculo global corrigido para o sub-registro segundo Mathers *et al*., (2018), aponta para a ocorrência de 640 mil casos novos. Essas estimativas refletem o perfil de um país que possui os cânceres de próstata, pulmão, mama feminina, cólon e reto entre os mais incidentes, entretanto ainda apresenta altas taxas para os cânceres do cólon do útero, estômago e esôfago (INCA, 2018).

Neste contexto, a descoberta de anticancerígenos de origem vegetal tem incentivado as pesquisas nessa área. Um dos exemplos mais importantes é o da *Catharanthus roseus* L., conhecida também como vinca, da qual foram extraídos os alcaloides vimblastina e vincristina que são usados no tratamento contra o câncer a mais de 40 anos. Entre outras amostras vegetais, o mais importante foi a descoberta do paclitaxel, isolado da casca do teixo (*Taxus baccata* L. e *Taxus brevifolia* Nutt) (BRANDÃO *et al*., 2010). Com o sucesso do paclitaxel, a busca por novos produtos naturais recebeu especial atenção de diferentes grupos de pesquisas.

FIGURA 2: Fármacos obtidos a partir de produtos naturais utilizados na terapia contra o câncer.



Fonte: BRANDÃO *et al*., 2010.

Dessa forma, dentre as muitas famílias estudadas com a finalidade de **isolar** seus componentes para fins medicinais na flora amazônica, a família Annonaceae se destaca por apresentar uma grande aplicação na medicina tradicional devido à atividade oriunda de seus

metabólitos secundários, principalmente os alcaloides, os terpenoides e as acetogeninas (SOARES, 2014). Estudos recentes com espécies da família Annonaceae, têm destacado particularmente o seu potencial no combate às células tumorais cancerígenas (COSTA *et al*., 2018; MOGHADAMTOUSI *et al*., 2015; FERRAZ *et al*., 2014). Sendo considerado como uma das grandes preocupações da era moderna, o tratamento do câncer, na maioria dos casos, se dá por meio da utilização de agentes quimioterápicos que atuam nas células neoplásicas inibindo a sua ação no organismo. No entanto, para a maioria das drogas utilizadas atualmente, a sua seletividade não se restringe apenas às células cancerígenas o que faz com que atuem também nas células sadias causando os conhecidos efeitos colaterais, além de causar a redução no crescimento do tumor, mas não sua completa inatividade/destruição (INCA, 2018; LI *et al.*, 2011). Outras falhas dos fármacos atuais são a resistência adquirida pelo tumor com o tempo de uso do medicamento (ZHAO *et al.*, 2013) e o reaparecimento da doença após um longo período de remissão (LUKIANOVA-HLEB *et al.*, 2012).

Sendo assim, subentende-se que a realização de estudos com substâncias oriundas de produtos naturais que sejam mais eficientes e seletivas no tratamento e, consequentemente na cura do câncer são cada vez mais importantes, pois se mostram como uma importante ferramenta no combate a essa enfermidade (SOUZA *et al*., 2007).

A família Anonnaceae embora bastante conhecida possui poucos estudos químicos com ênfase em seus constituintes biologicamente ativos. Dentre as espécies dessa família, encontra-se a *Duguetia pycnastera* Sandwith, uma espécie endêmica da região amazônica e particularmente desconhecida tanto pela população, quanto em termos de investigação fitoquímica e de suas propriedades biológicas (citotoxidade, pesticida, antiparasitária e antimicrobiana entre outras).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Ampliar o conhecimento acerca da composição química das folhas e cascas da espécie *Duguetia pycnastera*, assim como investigar o seu potencial citotóxico em busca de substâncias biologicamente ativas.

2.2. Objetivos específicos

- Analisar o perfil químico dos extratos das cascas e folhas de *Duguetia pycnastera* por Espectrometria de Massas (EM) e desreplicar os principais alcaloides presentes nas cascas de *Duguetia pycnastera* por meio da técnica de *leaf spray* acoplado a Espectrometria de Massas (LS-EM);
- Isolar por técnicas cromatográficas clássicas e identificar por técnicas espectroscópicas (RMN 1D/2D) e espectrométrica (EM) os constituintes químicos do extrato hexânico e metanólico das cascas e folhas de *D. pycnastera*;
- Caracterizar e identificar quimicamente os constituintes do óleo essencial extraído das folhas de *D. pycnastera* utilizando a técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM);
- Avaliar a atividade citotóxica *in vitro* dos extratos das cascas e folhas, frações, óleo essencial e substâncias isoladas de *D. pycnastera* contra células tumorais e normais.

3.0 REVISÃO DA LITERATURA

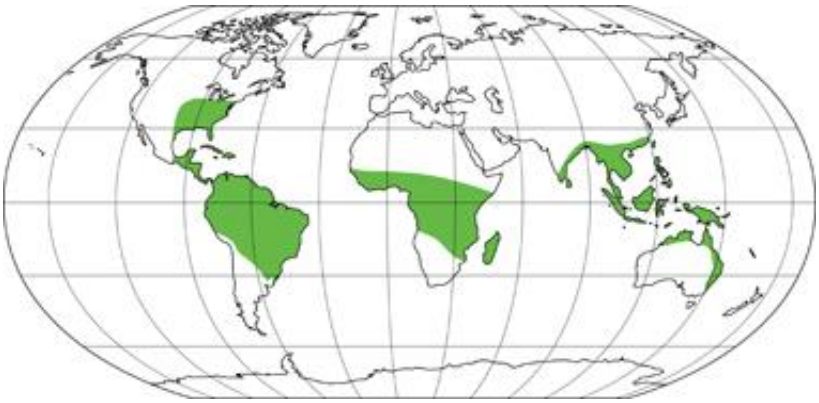
3.1 A família Annonaceae Juss.

3.1.1 Aspectos Gerais

Annonaceae é uma família pantropical de árvores, arbustos e cipós, está incluída entre as linhagens mais ricas em espécies de plantas de florestas tropicais (CHATROU *et al*., 2012). Até o momento, essa família contém 110 gêneros e cerca de 2.430 espécies (CHATROU *et al*., 2012; XUE *et al*., 2018) que estão classificadas em quatro subfamílias: *Ambavioideae*, *Anaxagoreoideae*, *Annonoideae* e *Malmeoideae* (CHATROU *et al*., 2012). Estas subfamílias correspondem aos principais grupos revelados em filogenias recentes da família. *Anaxagoreoideae* aparece como o grupo-irmão de todas as Annonaceae e, por isso, forma uma subfamília à parte (RICHARDSON *et al*., 2004).

A família Annonaceae apresenta distribuição pantropical, sendo a América Central e a do Sul, a África e a Ásia os principais centros de diversidade desse grupo (MAAS *et al*., 2013; CHATROU *et al*., 2012; CHATROU *et al*., 2004), conforme indicado na figura 3.

FIGURA 3: Distribuição geográfica de espécies da família Annonaceae no mundo.



Fonte: THECOMPOSITAEHUT, 2020.

Todas as subfamílias da atual classificação estão representadas no Brasil com 386 espécies distribuídas em 29 gêneros (MAAS *et al*., 2013). Na região neotropical são relatados 34 gêneros (COUVREUR *et al.*, 2012), sendo que a Amazônia abriga três quartos da diversidade de Annonaceae com 27 gêneros e 280 espécies, e a mata Atlântica, a maior parte restante, 15 gêneros e 91 espécies (MAAS *et al*., 2013).

Diversas espécies da família Annonaceae possuem destacado valor econômico, principalmente por fornecerem frutos comestíveis de sabor bastante apreciado (Figura 4), como as espécies do gênero *Annona*: *A. cherimola* Mill. (cherimola), *A. squamosa* L. (ata, fruta do conde ou pinha), *A. montana* Macfad. (graviola da montanha), *A. mucosa* Jacq. (biribá) e *A.*

muricata L. (graviola). Apesar da notoriedade dos frutos de *Annona*, também se encontram frutos comestíveis igualmente comercializados em outros gêneros, como *Artabotrys*, *Asimina*, *Polyalthia*, *Uvaria* e *Duguetia*, esse último representado principalmente pelos frutos conhecidos popularmente como pindaíba (*Duguetia lanceolata* A.St.-Hil.) (LOPES E MELLO-SILVA, 2014; FORMAGIO *et al.*, 2010).

FIGURA 4: Frutos e flores característicos de algumas espécies da família Annonaceae.

Guatteria macropus Mart. *Xylopia ochrantha* Mart. *Unonopsis renati* Maas & Westra *Oxandra nitida* R.E.Fr.

Fonte: FIELDGUIDES, 2019.

3.1.2 Aspectos químicos e farmacológicos

A pesar de possuir uma grande quantidade de espécies conhecidas (mais de 2400), até 2012 apenas 150 delas (pouco mais de 6%) possuíam investigação química, taxonômica e farmacológica (LÚCIO *et al* 2015). Quimicamente, a família Annonaceae é caracterizada por possuir como principais metabólitos secundários, tais como os terpenos, os alcaloides e as acetogeninas. Esta última classe é encontrada somente em espécies dessa família e por isso são também chamadas de acetogeninas de Annonáceas (OLIVEIRA, 2013). No entanto, outras classes de metabólitos secundários podem ser encontradas, como substâncias aromáticas, ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, catequinas, esteroides, lactonas, dentre outras (LÚCIO *et al*., 2015; NUNES *et al*., 2012).

Em virtude de suas características químicas ricas em substâncias bioativas, as espécies da família Annonaceae têm apresentado resultados satisfatórios quando submetidas a ensaios farmacológicos, tais como as propriedades antitumorais, inseticidas, larvicidas, antiparasitarios e antimicrobianos. Foi constatado que o extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora* Mart., apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, e *Candida albicans* (LAGE, 2011).

Por meio do trabalho de Santos e colaboradores (2007)**,** foram isolados acetogeni-nas do extrato etanólico das sementes de *A. cornifolia* que apresentaram atividade larvicida

quando testadas contra o microcustácio *Artemia salinas*. Os extratos metanólicos de folhas e caules de *A. crassiflora*, *Annona coriacea* Mart., *Annona dioica* A St. Hil. e *Annona sylvatica* A. St.-Hil. apresentaram caráter alopático, reduzindo a porcentagem de germinação e vigor da semente de alface, afetando negativamente o tempo médio de germinação (FORMAGIO *et al*., 2010).

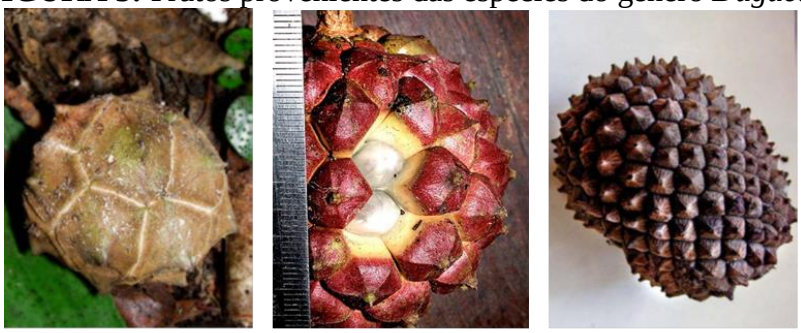
Somando-se as propriedades já elencadas, os extratos brutos obtidos dos exemplares dessa família, seus óleos essenciais e as substâncias isoladas a partir destes, têm apresentado excelentes resultados frente a diversas linhagens de células tumorais. Os extratos brutos das espécies *Annona pickelii* (Diels)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

3.2 O gênero *duguetia*

3.2.1 Aspectos gerais

O gênero *Duguetia* pertence à tribo *Duguetiae* e é representado por aproximadamente 90 espécies com ocorrência de 66 delas no Brasil, sendo 29 endêmicas. Seus exemplares podem ser encontrados também da Nicarágua ao Paraguai e 4 espécies foram observadas na costa oeste da África. As espécies desse gênero podem ser árvores ou arbustos, e são reconhecidas por seus tricomas que se diferenciam dos demais gêneros da família por serem estrelados ou escamiformes. Seus frutos podem ser carnosos ou lenhosos (Figura 5), e assim como os frutos do gênero *Annona*, têm cardípios agregados. A espécie mais comum no Brasil é a *Duguetia furfuracea* (A.St.-Hil.) Saff. encontrada no Cerrado e na Caatinga (LOPES & MELLO-SILVA, 2014).

FIGURA 5: Frutos provenientes das espécies do gênero *Duguetia*



Duguetia spixiana Mart *Duguetia quitarensis* Benth. *Duguetia flagellaris* Huber

Fonte: FIELDGUIDES, 2019.

3.2.2 Aspectos químicos

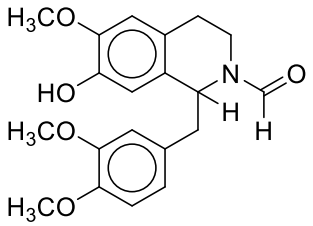
O gênero *Duguetia* não está entre os gêneros mais estudados fitoquimicamente, sendo precedidos pelos gêneros *Annona, Goniothalamus, Monodora, Uvaria* e *Xylopia* (CUNHA, 2009). No entanto diversas substâncias, principalmente alcaloides, já foram isolados das suas espécies (GONÇALVES *et al*., 2017, OLIVEIRA, 2017; SIQUEIRA *et al*., 2001).

Entre os alcaloides mais comuns encontrados em *Duguetia* destacam-se aqueles de esqueleto isoquinolínicos, no entanto outras estruturas também foram identificadas. No estudo elaborado por Lúcio e colaboradores (2015) foram listados por ordem de classe e subclasse todos os esqueletos encontrados na família Anonnaceae, podendo-se observar a maior ocorrência de oxoaporfínicos, e baixa ocorrência de tetraidroisoquinolínicos e fenantrenos, conforme mostrado nos quadros 1 a 16 .

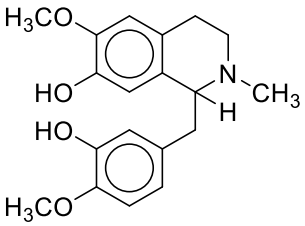
QUADRO 1: Alcaloides benziltetrahidroisoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie
Codamina *N*-óxido	**1**	*D. spixiana*
Reticulina	**2**	*D. trunciflora*

QUADRO 2: Estruturas dos alcaloides benziltetrahidroisoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*



1

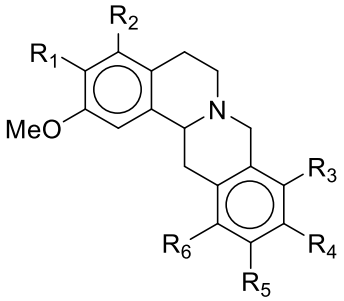


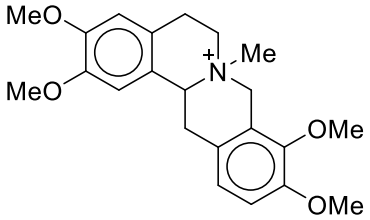
2

QUADRO 3: Alcaloides tetrahidroprotoberberínicos e protoberberínico isolados de espécies do gênero *Duguetia.*

Alcaloide	Nº	Espécie	Alcaloide	Nº	Espécie
10-Demetilxylopinina	**3**	*D. calycina*	Tetraidrojatrorrizina	**9**	*D.gardneriana*
Discretamina	**4**	*D. gardneriana*	Tetraidropalmatina	**10**	*D.gardneriana*
Discretina	**5**	*D. obovata*	(–)-Tetraidropalmatina	**11**	*D. spixiana*
(–)-Discretina	**6**	*D. obovata*	Thaicanina	**12**	*D. trunciflora*
3-Hidroxi-2,9,10-trimetoxitetraidroprotoberberina	**7**	*D. stelichantha*	*N*-metiltetraidropalmatina	**13**	*D.furfuracea*
Spiduxina	**8**	*D. spixiana*	Jatrorrhizina	**14**	*D. trunciflora*

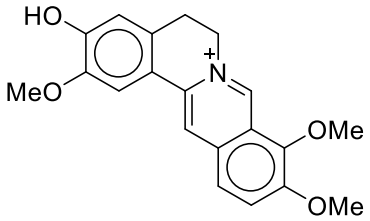
QUADRO 4: Estruturas dos alcaloides tetraidroprotoberberínicos e protoberberínico isolados de espécies do gênero *Duguetia*.





13

	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6
3	OCH_3	H	H	OH	OCH_3	H
4	OH	H	OCH_3	OH	H	H
5	OH	H	H	OCH_3	OCH_3	H
6	OH	H	H	OCH_3	OCH_3	H
7	OH	H	OCH_3	OCH_3	H	H
8	OCH_3	H	H	OCH_3	OH	CHO
9	OH	H	OCH_3	OCH_3	H	H
10	OCH_3	H	OCH_3	OCH_3	H	H
11	OCH_3	H	OCH_3	OCH_3	H	H
12	OCH_3	OH	OCH_3	OCH_3	H	H



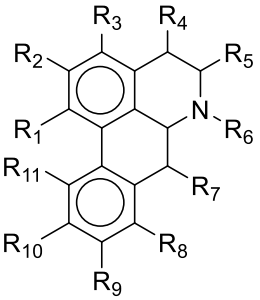
14
(protoberberínico)

QUADRO 5: Alcaloides aporfinos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie	Alcaloide	Nº	Espécie
(–)-Anolobina	**15**	*D. obovata*	(–)-*N*-metilbuxifolina	**28**	*D. obovata*
(–)-Anonaina	**16**	*D. spixiana*	(–)-*N*-metilcalycinina	**29**	*D. obovata*
(–)-Buxifolina	**17**	*D. obovata*	(–)-*N*-metiduguevanina	**30**	*D. obovata*
Calycinina	**18**	*D. flagellaris*	*O*-metilisopilina	**31**	*D. spixiana*
Duguevanina	**19**	*D. flagellaris*	(–)-*O*-metilisopilina	**32**	*D. flagellaris*
(–)-Duguevanina	**20**	*D. flagellaris*	*N*-metilputerina	**33**	*D. calycina*
(–)-*N*-formilbuxifolina	**21**	*D. obovata*	*N*-nitrosoanonaina	**34**	*D. furfuracea*
(–)-*N*-formilduguevanina	**22**	*D. obovata*	*N*-nitrosoxylopina	**35**	*D. furfuracea*
(–)-*N*-formilxylopina	**23**	*D. obovata*	Nornuciferina	**36**	*D. flagellaris*
(–)-3-Hidroxinornuciferina	**24**	*D. spixiana*	(–)-Nornuciferina	**37**	*D. flagellaris*
(–)-Isolaurelina	**25**	*D. obovata*	Obovanina	**38**	*D. calycina*
Isopilina	**26**	*D. flagellaris*	Puterina	**39**	*D. calycina*
N-metilasimilobina	**27**	*D. spixiana*	Xylopina	**40**	*D. calycina*

QUADRO 6: Estruturas dos alcaloides aporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

	R_1	R_2	R_3	R_4	R5	R_6	R_7	R_8	R_9	R_{10}	R_{11}
15	OCH_2O		H	H	H	H	OH	H	H	H	H
16	OCH_2O		H	H	H	H	H	H	H	H	H
17	OCH_2O		OCH_3	H	H	H	OCH_3	H	H	H	H
18	OCH_2O		H	H	H	H	OCH_3	H	H	H	OH
19	OCH_2O		OCH_3	H	H	H	OCH_3	H	H	H	OH
20	OCH_2O		OCH_3	H	H	H	OCH_3	H	H	H	OH
21	OCH_2O		OCH_3	H	H	CHO	OCH_3	H	H	H	H
22	OCH_2O		OCH_3	H	H	CHO	OCH_3	H	H	H	OH
23	OCH_2O		H	H	H	CHO	OCH_3	H	H	H	H
24	OCH_3	OCH_3	OH	H	H	H	H	H	H	H	H
25	OCH_2O		H	H	H	CH_3	OCH_3	H	H	H	H
26	OH	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	H	H	H	H
27	OCH_3	OH	H	H	H	CH_3	H	H	H	H	H
28	OCH_2O		OCH_3	H	H	CH_3	OCH_3	H	H	H	H
29	OCH_2O		H	H	H	CH_3	OCH_3	H	H	H	OH
30	OCH_2O		OCH_3	H	H	CH_3	OCH_3	H	H	H	OH
31	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	H	H	H	H
32	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	H	H	H	H
33	OCH_2O		H	H	H	CH_3	H	H	H	H	OCH_3
34	OCH_2O		H	H	H	NO	H	H	H	H	H
35	OCH_2O		H	H	H	NO	OCH_3	H	H	H	H
36	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	H	H	H	H	H
37	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	H	H	H	H	H
38	OCH_2O		H	H	H	H	H	H	H	H	OH
39	OCH_2O		H	H	H	H	H	H	H	H	OCH_3
40	OCH_2O		H	H	H	H	OCH_3	H	H	H	H

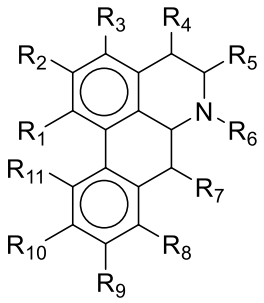


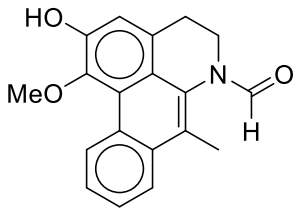
QUADRO 7: Alcaloides aporfinos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie	Alcaloide	Nº	Espécie
Duguenaina	**43**	*D. calycina*	Oliveridina *N*-óxido	**56**	*D. spixiana*
Duguetina	**44**	*D. flagellaris*	Oliverolina	**57**	*D. flagellaris*
(–)-Duguetina	**45**	*D. furfuracea*	(–)-Oliverolina	**58**	*D. flagellaris*
(–)-Duguetina *N*-óxido	**46**	*D. furfuracea*	Oliverolina *N*-óxido	**59**	*D. flagellaris*
Duguexina	**47**	*D. spixiana*	Pachyconfina	**60**	*D. spixiana*
(–)-Duguexina	**48**	*D. spixiana*	Pachyconfina *N*-óxido	**61**	*D. spixiana*
Duguexina *N*-óxido	**49**	*D. spixiana*	(+)-Pachypodanthina	**62**	*D. flagellaris*
Nornuciferidina	**50**	*D. spixiana*	Polyalthina	**63**	*D. glabriuscula*
Noroliveridina	**51**	*D. spixiana*	Roemerolidina	**64**	*D. spixiana*
(–)-Noroliveridina	**52**	*D. spixiana*	Rurrebanidina	**65**	*D. spixiana*
Norpachyconfina	**53**	*D. spixiana*	Rurrebanina	**66**	*D. spixiana*
Oliveridina	**54**	*D. flagellaris*	Spixianina	**67**	*D. spixiana*
(–)-Oliveridina	**55**	*D. spixiana*	Spixianina *N*-óxido	**68**	*D. spixiana*
Duguenaina	**43**	*D. calycina*	Duguespixina	**69**	D. spixiana
Duguetina	**44**	*D. flagellaris*			

QUADRO 8: Estrutura dos alcaloides aporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

	R_1	R_2	R_3	R_4	R5	R_6	R_7	R_8	R_9	R_{10}	R_{11}
42	OCH_2O		H	H	H	OAc	β- OCH_3	H	H	H	H
43	OCH_3	OH	H	H	H	H	α-OH	H	H	H	H
44	OCH_2O		H	H	H	CH_3	β-OH	H	OCH_3	OCH_3	H
45	OCH_2O		H	H	H	Me	β-OH	H	OCH_3	OCH_3	H
46	OCH_2O		H	H	H	*N*-óxido	β-OH	H	OCH_3	OCH_3	H
47	OCH_2O		H	H	H	CH_3	H	H	H	H	OH
48	OCH_2O		H	H	H	CH_3	H	H	H	H	OH
49	OCH_2O		H	H	H	*N*-óxido	H	H	H	H	OH
50	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	OH	H	H	H	H
51	OCH_2O		H	H	H	H	β-OH	H	OCH_3	H	OH
52	OCH_2O		H	H	H	H	β-OH	H	OCH_3	H	OH
53	OCH_3	OH	H	H	H	H	OH	H	H	H	H
54	OCH_2O		H	H	H	CH_3	β-OH	H	OCH_3	H	H
55	OCH_2O		H	H	H	CH_3	β-OH	H	OCH_3	H	H
56	OCH_2O		H	H	H	*N*-óxido	β-OH	H	OCH_3	H	H
57	OCH_2O		H	H	H	CH_3	β-OH	H	OCH_3	OCH_3	H
58	OCH_2O		H	H	H	CH_3	β-OH	H	OCH_3	OCH_3	H
59	OCH_2O		H	H	H	*N*-óxido	β-OH	H	H	H	H
60	OCH_3	OH	H	H	H	CH_3	β-OH	H	H	H	H
61	OCH_3	OH	H	H	H	*N*-óxido	β-OH	H	H	H	H
62	OCH_2O		H	H	H	H	β- OCH_3	H	H	H	H
63	OCH_2O		OCH_3	H	H	CH_3	β-OH	H	OCH_3	H	H
64	OCH_2O		H	H	H	CH_3	OH	H	OH	H	H
65	OCH_3	OCH_3	OH	H	H	H	OH	H	H	H	H
66	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	H	H	OH	H	H	H	H
67	OCH_2O		H	H	H	CH_3	OH	H	OCH_3	H	OH
68	OCH_2O		H	H	H	*N*-óxido	OH	H	OCH_3	H	OH



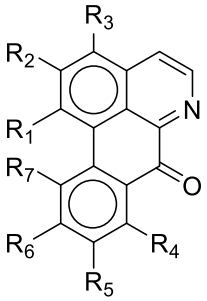


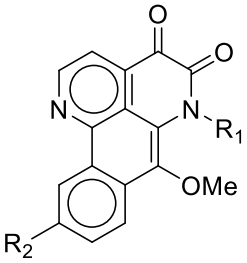
Esqueleto básico de N-óxido

QUADRO 9: Alcaloides oxoaporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.

Alcaloide	Nº	Espécie	Alcaloide	Nº	Espécie
Atherospermidina	**70**	*D. obovata*	11-Metoxi-1,2-metilenedioxioxoaporfina	**79**	*D. eximia*
Dicentrinona	**71**	*D. furfuracea*	*O*-metilmoschatolina	**80**	*D. eximia*
Duguevallina	**72**	*D. vallicola*	Oxobuxifolina	**81**	*D. glabriúscula*
11-Hidroxiliriodenina	**73**	*D. eximia*	Oxopukateina	**82**	*D. eximia*
11-Hidroxi-1,2-metilenedioxioxoaporfina	**74**	*D. eximia*	Oxoputerina	**83**	*D. calycina*
Lanuginosina	**75**	*D. glabriuscula*	Hadranthina A	**84**	*D. hadrantha*
(+)-Lanuginosina	**76**	*D. glabriúscula*	Hadranthina B	**85**	*D. hadrantha*
Liriodenina	**77**	*D. riparia*	Imbilina 1	**86**	*D. hadrantha*
Lysicamina	**76**	*D. spixiana*	1,2,3-trimetoxioxoaporfina	**87**	*D. stelechantha*

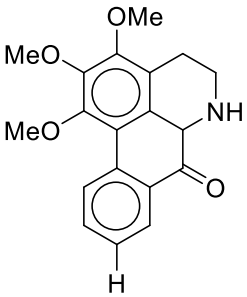
QUADRO 10: Estruturas dos alcaloides oxaporfínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.





	R_1	R_2	R_3	R_4	R_5	R_6	R_7
70	OCH_2O		OCH_3	H	H	H	H
71	OCH_2O		H	H	OCH_3	OCH_3	H
72	OCH_2O		OCH_3	H	OCH_3	H	OH
73	OCH_2O		H	H	H	H	OH
74	OCH_2O		H	H	H	H	OH
75	OCH_2O		H	H	OCH_3	H	H
76	OCH_2O		H	H	OCH_3	H	H
77	OCH_2O		H	H	H	H	H
78	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H	H
79	OCH_2O		H	H	H	H	OCH_3
80	OCH_3	OCH_3	OCH_3	H	H	H	H
81	OCH_2O		OCH_3	H	OCH_3	H	H
82	OH	OCH_3	H	OCH_3	OCH_3	H	H
83	OCH_2O		H	H	H	H	OCH_3

	R_1	R_2
84	CH_3	OCH_3
85	H	H
86	CH_3	H

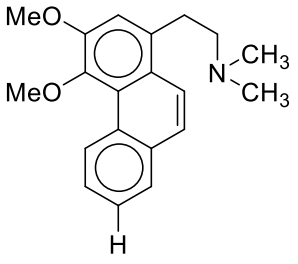


87

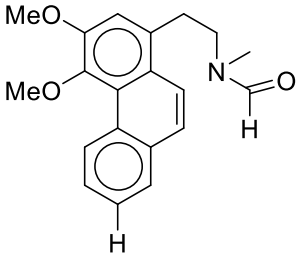
QUADRO 11: Alcaloides fenantrenos isolados de espécies do gênero *Duguetia.*

Alcaloide	Nº	Espécie
Atherospeminina	88	*D. spixiana*
Atherospeminina *N*-óxido	89	*D. spixiana*
Metoxiatherospeminina	90	*D. spixiana*

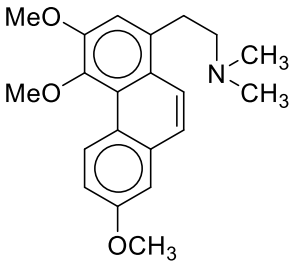
QUADRO 12: Estruturas dos alcaloides fenantrenos isolados do gênero *Duguetia*



88



89

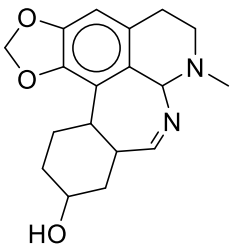


90

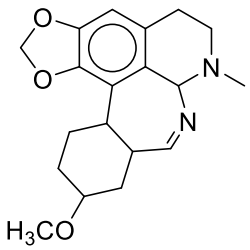
QUADRO 13: Alcaloides isoquinolínicos sem subclasse definida isolados de espécies do gênero *Duguetia.*

Alcaloide	Nº	Espécie
Spiguetidina	91	*D. spixiana*
Spiguetina	92	*D. spixiana*
Probovatina	93	*D.obovata*

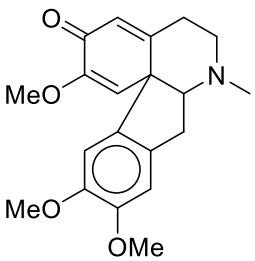
QUADRO 14: Alcaloides isoquinolínicos de subclasses pouco observadas em de espécies do gênero *Duguetia.*



91



92

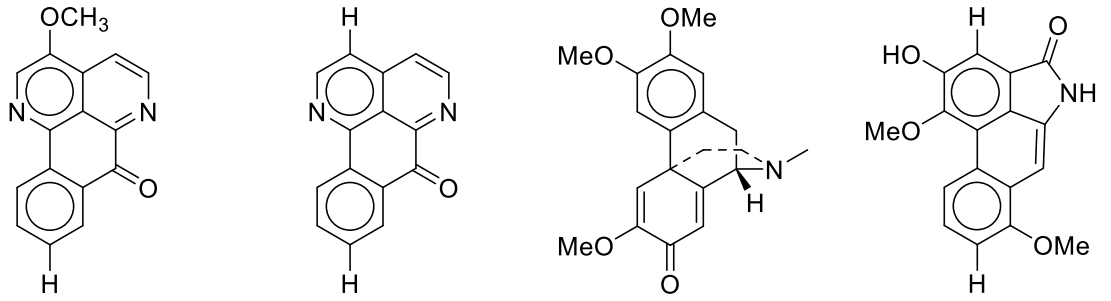


93

QUADRO 15: Alcaloides não isoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia.*

Alcaloide	N°	Espécie
3-Metoxisampangina	94	*D. hadrantha*
Sampangine	95	*D. hadrantha*
(9*S*)-Sebiferine	96	*D. obovata*
Cleistopholine	97	*D. vallicola*

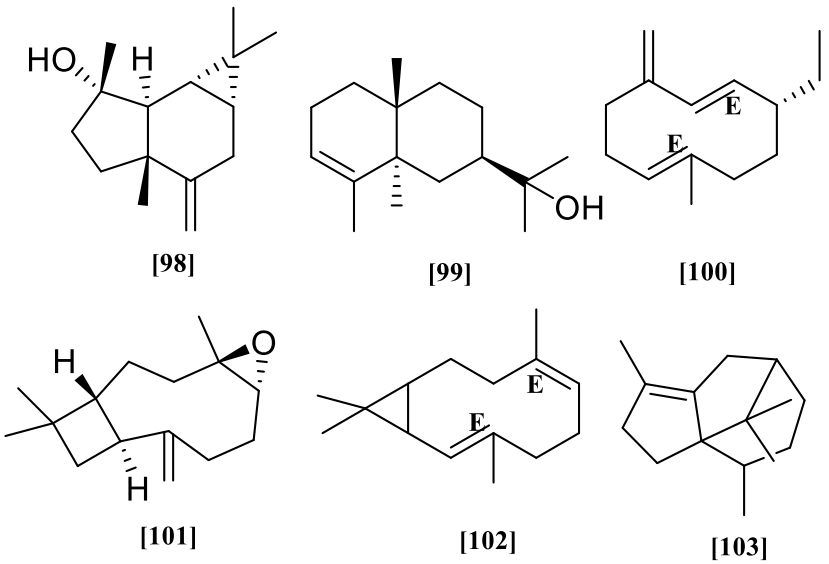
QUADRO 16: Estrutura dos alcaloides não isoquinolínicos isolados de espécies do gênero *Duguetia*.



94 **95** **96** **97**

A análise de compostos voláteis de espécies de *Duguetia* tem demonstrado a presença de sesquiterpenos e substâncias aromáticas nos óleos essenciais tanto das folhas quanto dos galhos finos. No estudo realizado por Maia *et al.* (2006) seis espécies de *Duguetia* foram avaliadas quanto aos seus constituintes voláteis. Nas espécies *Duguetia pycnastera*, *D. flagelaris* e *D. riparia* foi observado a ocorrência do sesquiterpeno oxigenado espatulenol **[98]** como constituinte majoritário. Já em *D. eximia* foi verificado a ocorrência de α-eusdesmol **[99]** com 80% da composição do óleo. Outras substâncias como germacreno D **[100]**, óxido de carofileno **[101]**, biclogermacreno **[102]** e cipereno **[103]** também descritas nas espécies descritas acima.

FIGURA 6: Componentes voláteis encontrados em espécies do gênero *Duguetia*.



[98] **[99]** **[100]**

[101] **[102]** **[103]**

Do estudo dos componentes volateis dos galhos finos de *D. furfuraceae* (SILVA *et al*., 2007) foram isolados as substâncias 2,4,5-trimetoxiestireno, *α*-gurjuneno **[109]**, aromadendreno **[110]**, biciclogermacreno **[102]**, (*E*)-metil-isoeugenol **[111]**, e *α*-asarona **[105]**. Outras substâncias como policarpol **[112]** e oxido de (*E*)-carofileno **[107]**, e asaraldeido **[108]**, foram descritas no extrato em éter de petroleo. Há também a ocorrência das substâncias 1,2,4-trimetoxibenzeno **[106]** (OLIVEIRA, 2018; ALVES *et al*., 2009) e 2,4,5-trimetoxies-tireno **[104]** (SILVA, 2007; NAGASHI-MA *et. al*., 1999; WATERMAN, 1976) no gênero em questão.

FIGURA 7: Substâncias voláteis isoladas da espécie *Duguetia furfuraceae*

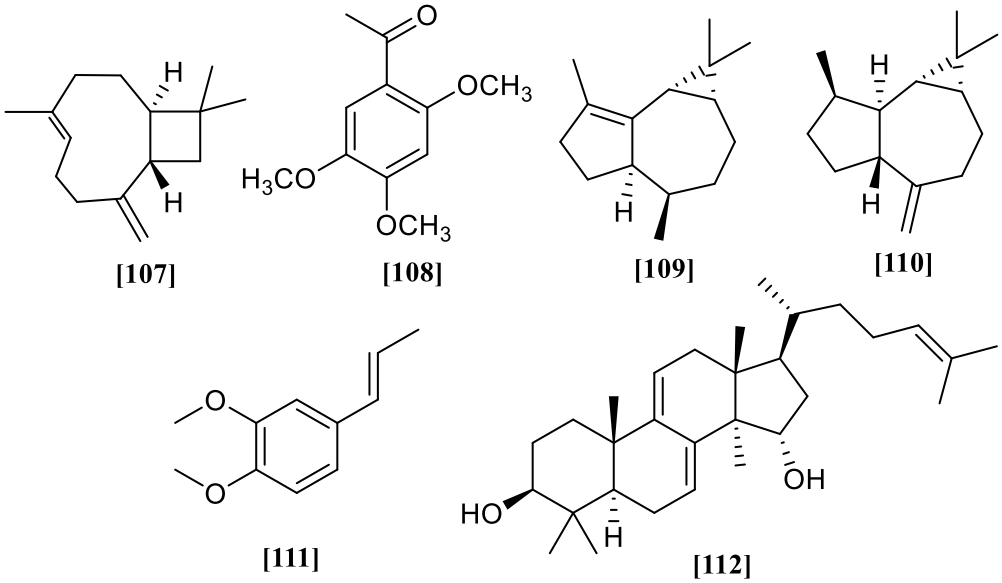
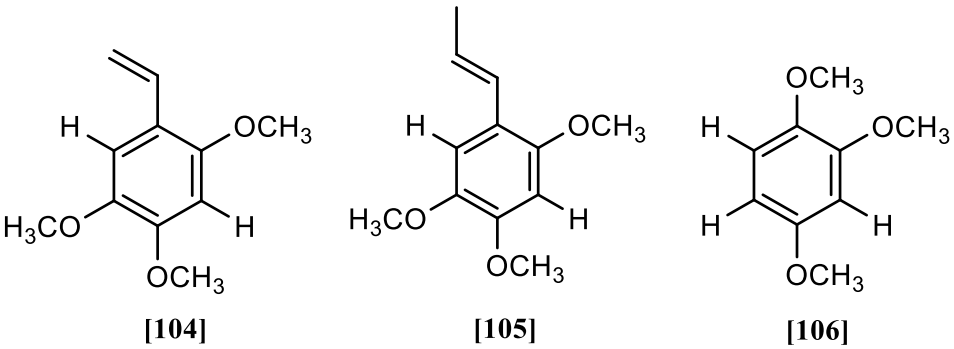


FIGURA 8: Derivados benzênicos encontrados em espécies do gênero *Duguetia.*



3.2.3 Aspectos farmacológicos

Semelhantemente aos demais gêneros da família Annonaceae, o gênero *Duguetia* tem apresentado bons resultados quando submetidos a testes de atividade biológica. O extrato hexânico de *D. riparia*, apresentou atividade antioxidante, antitumoral e leishimanicida

quando testado contra *Leishimania amazonensis*. Seu extrato metanólico e sua fração alcaloídica apresentaram atividade leishimanicida e antioxidante (CUNHA, 2009).

Os alcaloides isolados do caule de *D. vallicola* foram testados contra *Plasmodium falciparum* e apresentaram boa atividade, sendo a cleistopholina e a (–)-oliverolina, os que apresentaram melhor resultado, CI_{50} 17,8 µg/mL e 14,9 µg/mL, respectivamente (PÉREZ *et al*., 2004).

O óleo essencial das folhas de *D. gardneriana*, apresentou atividade citotóxica *in vitro* promissora quando testado contra células tumorais de B16-F10, HepG2, HL-60 e K562 com CI_{50} igual a 16,89, 19,16, 13,08 e 19,33µg/mL, respectivamente. O mesmo óleo apresentou também atividade antitumoral *in vivo*, inibindo células tumorais em ratos (RODRIGUES *et al*., 2015).

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

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

Além das atividades verificadas em extratos e óleos de espécies de *Duguetia*, uma ampla faixa de propriedades biológicas foi observada para os alcaloides isolados no gênero, conforme o quadro 17.

QUADRO 17: Alcaloides isolados de espécies do gênero *Duguetia* que apresentam atividade biológica.

Alcaloide	Efeitos Biológicos	Referência
(–)-Asimilobina	Tripanocida	(CAROLLO *et al.*, 2006)
Cleistopholina (–) -Oliverina	Antiplasmódico	(PÉREZ *et al.*, 2004)
S-(+)-Dicentrina	Analgésica	(MIGUEL *et al.*, 2016)
Dicentrinona	Anti-reumática Antiinflamatória	CLAUDINO *et al.*, 2017
Discretamina	Antinocicetive	(LÚCIO *et al.*, 2015b)
Duguetina	Antileshimania	(SILVA *et al.*, 2009)
	Citotóxico	
	Tripanocida	
Hadranthina A	Antimalárico	(MUHAMMAD *et al.*, 2001)
Hadranthina B	Citotóxico	(MUHAMMAD *et al.*, 2001)
(–)-3-Hidroxinornuciferina	Tripanocida	(LÚCIO *et al.*, 2015b)
Liriodenina	Analgésico	(LÚCIO *et al.*, 2015b)
	Antibactéria	
	Sedativa	
	citotóxico	
	antileshimania	(LÚCIO *et al.*, 2015b)
	tripanocida	(LÚCIO *et al.*, 2015b)
	antiploriferato	(LÚCIO *et al.*, 2015b)
3-Metoxisampangina	antifúngico, antimalárico	(MUHAMMAD *et al.*, 2001)
N- metiltetrahidropalmatina	antileshimania	(SILVA *et al.*, 2009)
(–)-Nornuciferina	antileshimania	(MONTENEGRO *et al.*, 2003)
	inibidor de CD45 tirosine fosfatase	(LÚCIO *et al.*, 2015b)
Reticulina	analgésico	(LÚCIO *et al.*, 2015b)
	antimcrobiano	
	bloqueador de receptor de dopamina	
	espasmolítico	
	estimulante de CNS	
Sampangina	antifungico	(MUHAMMAD *et al.*, 2001)
	antimalárico	
	citotóxico	
	antitumoral	(PÉREZ *et al.*, 2004)
Xylopina	antileshimania	(MONTENEGRO *et al.*, 2003)

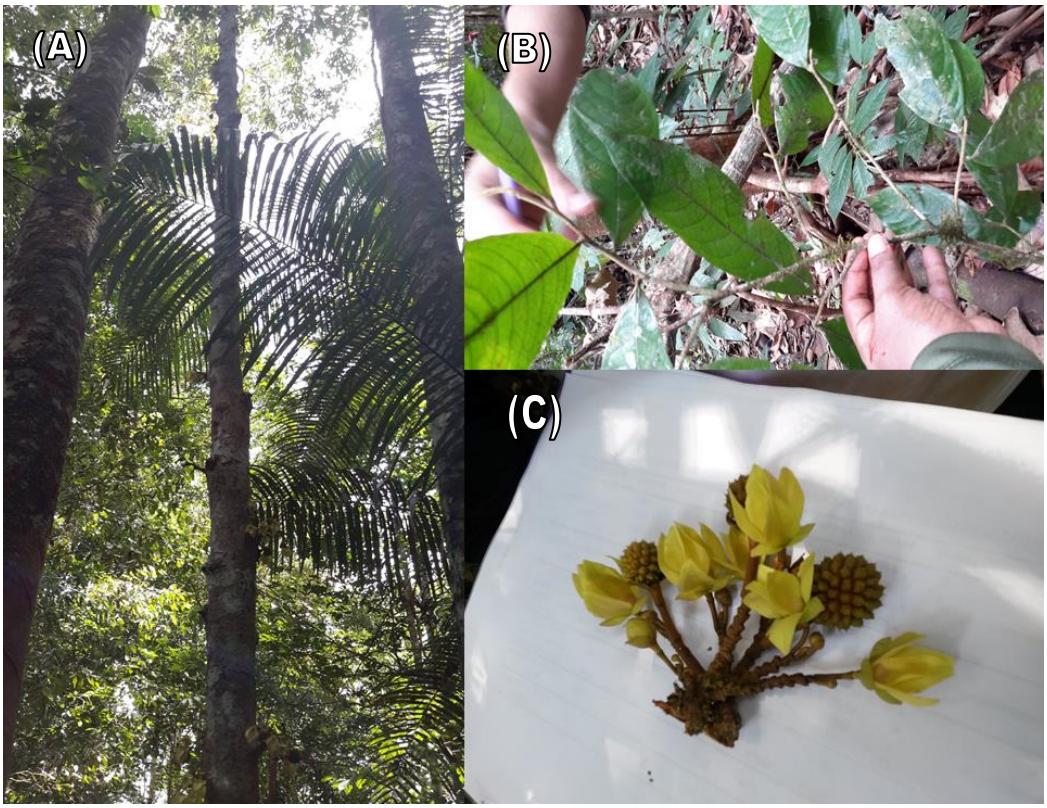
3.3 A espécie *Duguetia pycnastera* Sandwith.

Duguetia pycnastera é conhecida como “envira-preta” com distribuição nas Guianas, Bolívia e Brasil. No Brasil é comumente encontrada no estado do Amazonas, Amapá e Pará,

particularmente em florestas pantanosas e úmidas, e ao longo de pequenos riachos com elevação até 150 m (Figura 9). A floração acontece principalmente de abril a outubro e frutificação de maio a janeiro (MAAS *et al*., 2003). A árvore densamente jovem pode atingir até 20 m, é densamente coberta por pelos estrelados com folhas grafosas de ápice longo e culminado, estreitamente oblovada e elíptica com 10-30 × 5-12,5 cm com a superfície coberta de pelos estrelados. Seus frutos são cobertos de pelos estrelados com 1,5-2,5cm de diâmetro e com 10 a 20 carpelos (MAAS *et al*., 2003).

Com base nos dados da literatura (*Scifinder, Scopus e Web of Science*) apenas um estudo fitoquímico foi descrito, este direcionado para os constituintes voláteis presente no óleo essencial das folhas (MAIA *et al*., 2006). Também é relatado o isolamento dos alcaloides *O*-metilmoschatolina, lisicamina, liriodenina e oxoputerina das folhas (SILVEIRA, 1994), porém esses dados não foram publicados em periódicos científicos.

FIGURA 9: *D. pycnastera*: caule da árvore (A)**;** folhas verdes (B); frutos em processo de amadurecimento (C)



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

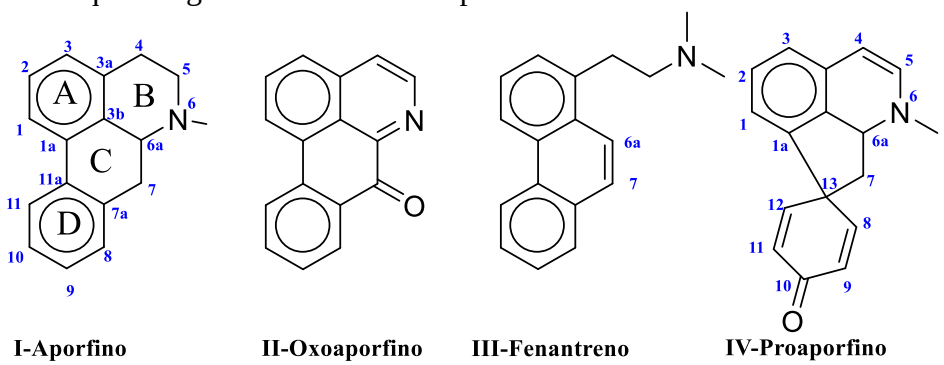
3.4 Alcaloides: Definição

Os alcaloides representam um grupo estruturalmente diversificado de metabolitos secundários contendo nitrogênio heterocíclicos, muitos deles com atividades farmacológicas pronunciadas e, portanto, importantes para a medicina e a biotecnologia. A maioria dos alcaloides provêm de um aminoácido como um precursor, como a L-ornitina, L-arginina, L-lisina, L-fenilalanina, L-tirosina ou L-triptofano. As vias biossintéticas dos principais grupos de alcaloides já foram elucidadas nos níveis de enzima e gene. Em alguns casos, foi possível obter alcaloides (por exemplo, alcaloides benzilisoquinolínicos) produzidos por microorganismos transgênicos que foram transformados com os respectivos genes da biossíntese de alcaloides (ROBERTS *et al*., 2010).

3.4.1. Alcaloides aporfinos

Os aporfinoides constituem um amplo subgrupo de substâncias benzilisoquinolínicas com mais de 500 alcaloides isolados e identificados (STÉVIGNY, *et. al*., 2005). Eles são distribuídos em um pequeno número de famílias de plantas, incluindo Annonaceae, Lauraceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Hernandiaceae e Ranunculaceae (STÉVIGNY, *et. al*., 2005). Os aporfinoides (Figura 10) são subdivididos em aporfino (I), oxoaporfino (II), fenantreno (II) e proaporfino (IV).

FIGURA 10: Esqueleto geral dos alcaloides aporfinoides.

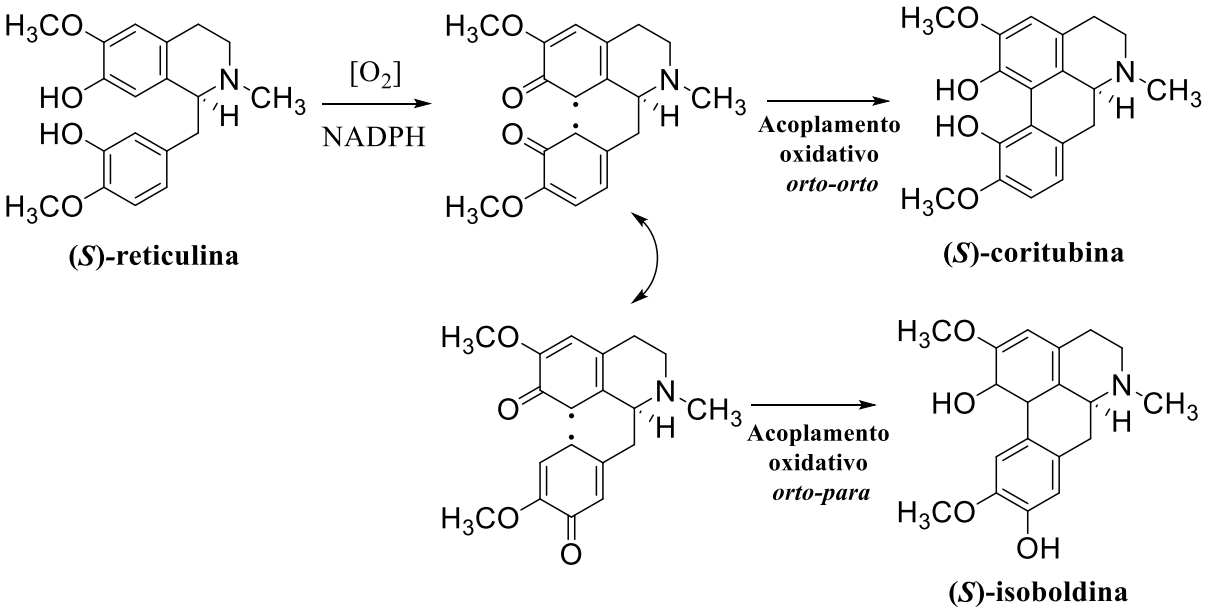


Quimicamente, aporfinoides (*sensu stricto*) são bases tetracíclicas formadas pela ligação direta dos anéis aromáticos A e C do núcleo benzilisoquinolínico. O átomo de nitrogênio na posição 6 é usualmente terciário na forma básica mas pode ser quaternário, menos frequentemente acetilado ou formilado. Compostos *N*-óxido também tem sido descritos. Em aporfinodes naturais, as posições 1 e 2 são sempre substituídas por grupos hidroxila, metoxila ou metilenodióxi.

Grupos tetracíclicos podem ser substituídos em diferentes locais, na posição 9, 10, 11 e menos frequentemente nas posições 3 e 8 e em alguns casos a posição 7 ou 4 é oxigenada (SANTOS, 2014).

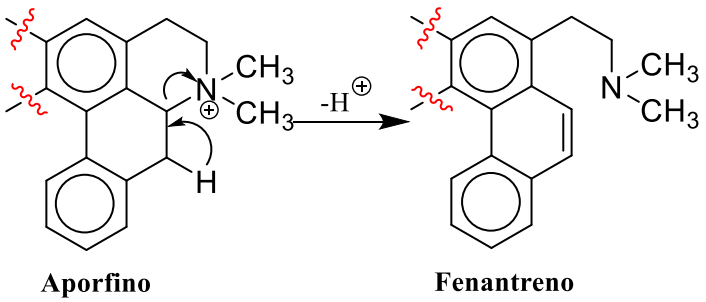
A rota biossintética dos alcaloides aporfinos envolve o acoplamento oxidativo direto (radicais *orto-orto* ou *orto-para*) da (*S*)-reticulina na forma do radical *bis*-dienona (STÉVIGNY *et.al*., 2005), conforme mostrado na figura 11. Em decorrência da clivagem entre N-6 e C-6, surge uma nova classe de alcaloides denominada fenantrenos, um grupo de ocorrência moderada, cujo núcleo possui uma cadeia etilamina com grupos metílicos ligados diretamente ao nitrogênio (Figura 12).

FIGURA 11: Rota biossintética de alcaloides aporfino



Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009.

FIGURA 12: Rota biossintética de alcaloides fenantrenos

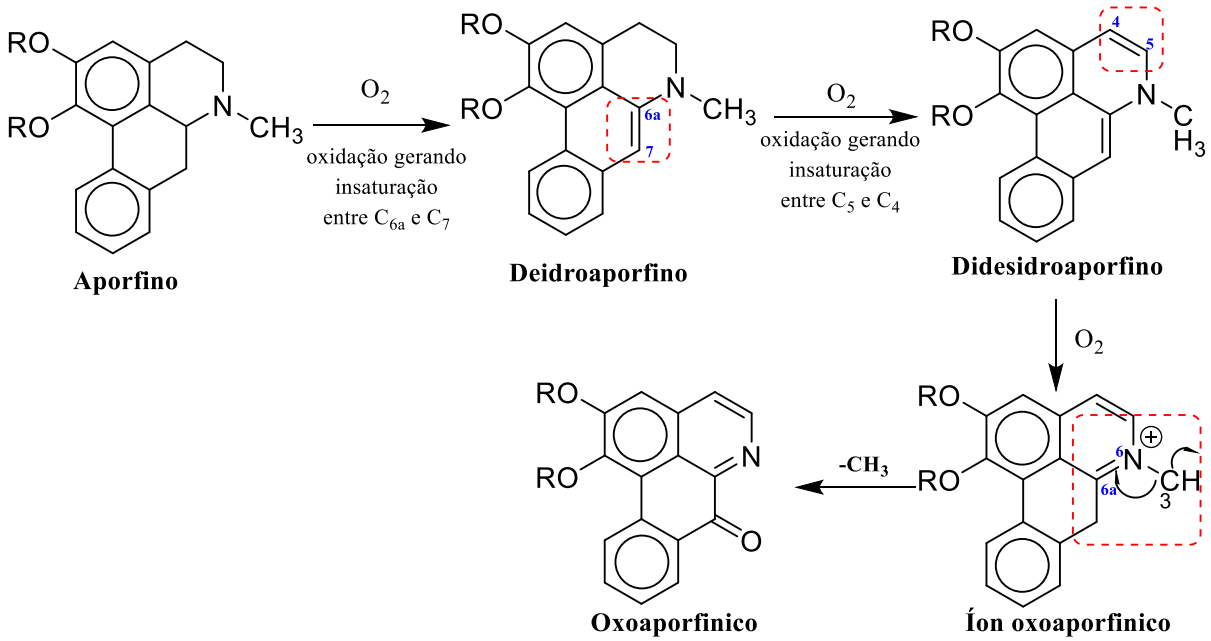


Fonte: GUINAUDEAU *et al*., 1984.

3.4.2 Alcaloides oxoaporfínicos

Os alcaloides oxoaporfínicos representam uma subclasse dos aporfinoides onde seu núcleo estrutural apresenta uma carbonila em C-7 e um esqueleto aporfínicos aromático, o que resulta no seu alto grau de instauração conferindo uma coloração amarela, laranja ou laranja avermelhada as suas moléculas. Uma sequência racional de transformações *in vivo* leva um aporfino ao seu oxoaporfino correspondente através do intermediário desidro e didesidroaporfinos (GUINAUDEAU *et al*,. 1984).

FIGURA 13: Biossíntese dos alcaloides oxoaporfínicos.



Fonte: Adaptado de Guinaudeau *et al*. 1984.

3.5 Ensaios citotóxicos

A denominação câncer é feita a um grupo de mais de 100 doenças, que tem por similaridade a multiplicação desordenada de células que adentram em tecidos e órgãos, podendo ser disseminadas para outros órgãos e outras regiões do corpo. Esse crescimento muito acelerado e desordenado provoca a formação de tumores malignos, também chamados de neoplastia maligna (INCA, 2018).

De acordo com a estimativa do INCA (2018), mais de 500 mil novos casos até o ano de 2019, sendo estimados 5,8 mil novos casos no Amazonas. Os quais justificam ser causados na maioria das vezes, aos hábitos e estilo de vida que as pessoas levam. As variações de tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células no corpo, ou seja, dependendo da sua região no organismo terá um desenvolvimento diferenciado para cada grupo de célula, e a velocidade que as mesmas se multiplicam tende a determinar o tipo do câncer (INCA, 2018).

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. Esta última, é 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. Dessa forma, justifica-se o interesse no estudo em fontes de produtos naturais que vise o desenvolvimento de novas formas de terapias menos agressivas buscando o bem-estar dos pacientes (RODRIGUES & POLIDORI, 2012).

Os metabólitos característicos da família Anonnaceae (alcaloides, terpenos e acetogeninas), mencionados anteriormente, em meio as diversas classes de produtos naturais têm evidenciado atividade citotóxica promissora (KRINSKI *et al*., 2014b). Uma variedade de testes já foi desenvolvida com essa finalidade, dentre eles, os colorimétricos utilizando o método Alamar Blue, que se destacam pela sua confiabilidade, baixo custo e velocidade na obtenção de resultados frente a capacidade citotóxica apresentada por determinada amostra (ESCOBAR, ALFONSO, & ARISTIZÁBAL, 2009).

Os ensaios colorimétricos utilizados, avaliam a diminuição da proliferação celular ou citotoxidade (CI_{50}) frente a amostra. O teste colorimétrico do Alamar Blue é bastante difundido, pois é realizado num processo relativamente simples e permitem a análise de um grande número de amostras. O Alamar blue, identificado como resazurina (QUINTANS *et al*., 2013), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Em seu estado fundamental, a resazurina apresenta coloração azul não fluorescente, indicando a presença de células não viáveis, enquanto a forma reduzida é rósea fluorescente, indicando célula viável. Por muitos anos, esse ensaio com resazurina, foi utilizado para monitorar a contaminação do leite por bactéria ou levedura, sendo posteriormente utilizado também para quantificação da proliferação celular e de citotoxicidade em diversas células (ESCOBAR *et al*., 2009).

4.0. METODOLOGIA

4.1 Cromatografia em Coluna (CC)

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna devidro aberta, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) da Macherey-Nagel. Para as frações alcaloídicas esse suporte foi tratado previamente com solução de bicarbonato de sódio a 10% ($NaHCO_3$) (COSTA *et al.*, 2006). 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 20-30 vezes a massa do produto bruto a ser purificado, e a das pastilhas, 2 vezes (MATTOS, 2009).

4.2 Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

As análises por cromatografia em camada delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas Fluka, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F_{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 cromatoplacas de vidro impregnada com sílica gel, com tamanho 20 x 20 cm com espessura de sílica de 1,0 mm. As placas foram preparadas usando 22 g de sílica gel 60 para preparativa com fluorescência F_{254} da marca Macherey-Nagel e 60 mL de água destilada. Após a evaporação da água a temperatura ambiente foram ativadas em estufa a 100 ºC por uma hora. A recuperação das amostras foi efetuada utilizando como solventes, acetato de etila (AcOEt), diclorometano (CH_2Cl_2), metanol (MeOH) e/ou misturas destes.

4.4. Reveladores

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

- Solução de Anisaldeído: A solução foi preparada pela adição de 5 mL de anisaldeído em 90 mL de álcool etílico contendo 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de ácido acético glacial.
- Reagente de Dragendorff com modificação de Munier: (MUNIER, 1953 apud MERCK, 1971). Solução A: 1,7 g de nitrato de bismuto III e 20,0 g de ácido tartárico

dissolvidos em 80 mL de água destilada. Solução B: 16,0 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais (1:1) destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das placas, 5,0 mL da solução estoque é adicionado a 10,0 g de ácido tartárico dissolvido em 50 mL de água destilada.

4.5. Solventes

Para todas as técnicas cromatográficas foram utilizados solventes das marcas Hexis, J. T. Baker e Qhemis. Para obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados da marca Tédia Brasil. Para obtenção dos espectros de massas foram utilizados solventes grau HPLC marca Tedia Brasil. Os solventes utilizados durante o processo de maceração são reaproveitados e destilados para seu posterior uso, os contaminados são devidamente acondicionados e descartados pela Universidade.

4.6. Equipamentos

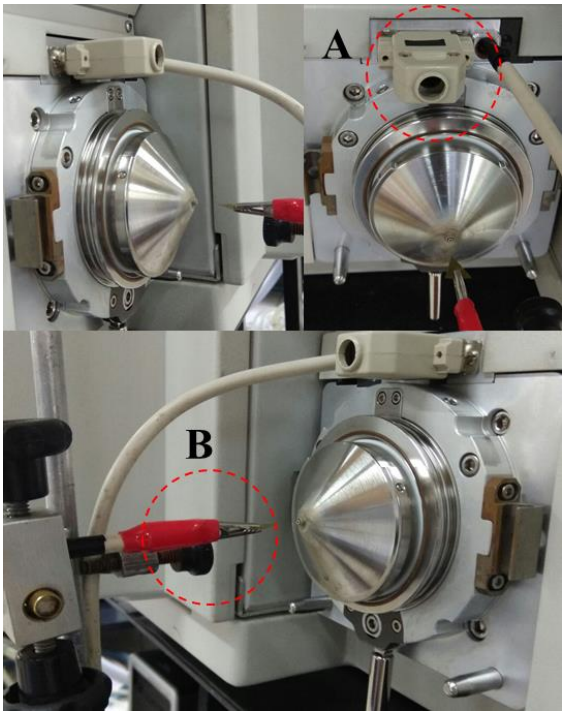
Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bi-dimensionais (RMN 1D/2D) foram registrados em um aparelho Bruker Avance III 500, operando a 11,75 Teslas, (500,13 MHz para RMN de ^{1}H e 125,76 MHz para RMN de ^{13}C), da Central Analítica, do Centro de Apoio Multidisciplinar da Universidade Federal do Amazonas (CA/CAM/UFAM). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ($CDCl_3$), metanol deuterado (CD_3OD) e/ou mistura destes. O Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interno. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *d* (dupleto), *dd* (duplo dupleto), *ddd* (duplo duplo dupleto), *t* (tripleto), *dt* (duplo tripleto), *m* (multipleto). As constantes de acoplamento (*J*) foram registradas em Hertz (Hz);

Os espectros de massas das substâncias isoladas foram adquiridos em um espectrometro LQC Fleet (Thermo Scientific) também pertencente a CA/CAM/UFAM, com analisador de massas do tipo *ion trap* e equipado com uma fonte de eletrospray (ESI) programada para operar no modo positivo de aquisição. As informações foram registradas através do modo de aquisição contínua, disponível no LCQ Fleet Tune. As amostras foram diluídas a 10 ppm em metanol grau HPLC e injetadas no *looping* de 5 µL do Espectrômetro de Massas. Utilizou-se uma bomba ACELA 600 (Fluxo de 200 µL min^{-1} de metanol grau HPLC) para levar as amostras do *looping* até a fonte de ionização.

O sistema de ionização por *leaf spray* (LS) foi desenvolvido no LABCEM de acordo com metodologia já descrita por Sneha e colaboradores (2017). A fonte por ionização ambien-

te foi construída através da substituição da caixa da fonte por um conector padrão Db15. O reconhecimento foi realizado através do bloqueio das entradas 9 e 10 e a conexão de um resistor diretamente nas entradas 7 e 8 (Figura 14). As análises de *full scan* (MS) e os estudos de fragmentação (MS/MS) foram realizados no espectrômetro de massas TSQ.

FIGURA 14: Fonte de ionização ambiente Leaf Spray. (**A**) substituição da caixa por um conector Db15, (**B**) folha cortada em formato triangular (base e altura de 10 mm) mantida por um conector de alta voltagem.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

As análises por CG-EM foram realizadas em um cromatógrafo Trace GC Ultra (Thermo-Scientific) acoplado com um espectrômetro de massas ISQ com amostrador automático modelo Tri Plus RSH. Utilizou-se como fase estacionária, uma coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm espessura do filme) revestida com 5%-fenil-arileno-95%-dimetilpolisiloxano. Os espectros de massas (EM) foram alcançados a 70 eV com intervalos de varredura de 0,5s e fragmentos de 40-550 Da 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 ºC por 4 min., a uma taxa de 4 ºC por min. até 240 ºC, com posterior aumento de 10 °C / min. até 280 °C, seguido por 280 °C/ 2 min **.** As temperaturas do injetor e dos detectores foram de 250 ºC e 280 ºC, respectivamente. As amostras (10 $mg.mL^{-1}$ em CH_2Cl_2) foram injetadas com uma razão de *split* de 1:50. Os índices de retenção foram gerados com uma solução padrão de *n*-alcanos (C_8-C_{20}). As áreas dos picos e os tempos de retenção foram medidos de modo eletrônico com um integrador. Para o cálculo do índice de a IR foi utilizada

a equação de Van Den Doll & Kratz (1963) em relação a série homóloga de *n*-alcanos (C_8-C_{20}). A percentagem de cada componente foi determinada pela área do componente dividida pela área total de todos os componentes presentes na mistura.

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

Onde: Trx = Tempo de retenção do composto problema;

TrHA = Tempo de retenção do hidrocarboneto anterior;

TrHP = Tempo de retenção do hidrocarboneto posterior;

N = Número de carbonos do hidrocarboneto anterior;

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, 2017).

4.7. Coleta do Material Vegetal

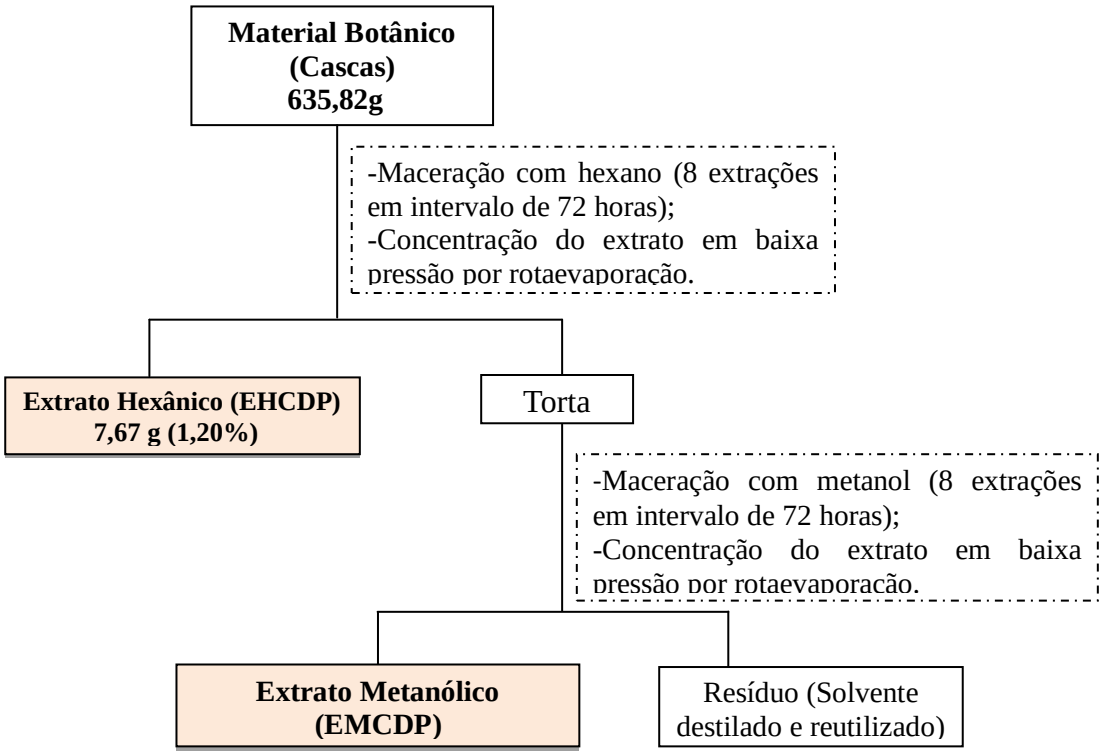
As folhas e cascas de *D. pycnastera* foram coletadas no dia 09 de agosto de 2017 na Reserva Florestal Adolpho Ducke ("Coordenadas S 02o 55' 37.4" e W 059° 58' 36.0"), próxima à cidade de Manaus, Amazonas, uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário do Departamento de Biologia da própria UFAM sob o número 10812. 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.

4.8. Preparo dos extratos

O material botânico da espécie em estudo (cascas), foi seco em local aberto à temperatura ambiente, sendo posteriormente, transferido para uma estufa com circulação de ar a 40 ^oC. Em seguida, a amostra vegetal seca foi moída em moinho de facas e teve sua massa determinada em uma balança semi-analítica, resultando em 635,82 g de casca. Com o peso obtido, a amostra vegetal foi submetida à extração a frio pelo método de maceração (Esquema 1), onde foi transferida para um frasco Mariotte com adição de solventes em ordem crescente de polaridade, com renovação de solvente 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 ^{o}C, sendo posteriormente secos em dessecador.

ESQUEMA 1: Fluxograma geral de preparação dos extratos orgânicos das folhas e cascas de *Duguetia pycnastera.*



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

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 7,67 g e o extrato metanólico apresentou massa igual a 21,73 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 Osvaldo Cruz (Fiocruz) do estado da Bahia (Fiocruz-BA), sob a coordenação do Dr. Daniel Pereira Bezerra.

4.9 Fracionamento Cromatográfico do Extrato Hexânico da Casca (EHCDP)

Uma parte do EHCDP (3,52 g) foi submetida ao fracionamento cromatográfico em coluna aberta (CC; Φ x h de 2,8 × 51 cm), eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas binárias de polaridade crescente, obtendo-se 346 frações (30 mL cada).

TABELA 1: Fracionamento cromatográfico do Extrato Hexânico das cascas de *D. pycnastera* (EHCDP).

Extrato hexânico (EHCDP - 3,52g)								
Solventes	**Gradiente**	**Frações**	**Solventes**	**Gradiente**	**Frações**	**Solventes**	**Gradiente**	**Frações**
C_6H_{14}	100%	01-24	CH_2Cl_2	100%	216-233	AcOEt: CH_3OH	95:5	324-328
C_6H_{14} : CH_2Cl_2	90:10	25-48	CH_2Cl_2: AcOEt	90:10	234-242		90:10	329-331
	80:20	49-74		80:20	243-251		85:15	332-335
	70:30	75-97		70:30	252-261		80:20	336-346
	60:40	98-125		60:40	262-272	**C_6H_{14}** - hexano **CH_2Cl_2** -diclorometano **AcOEt($C_4H_8O_2$)** - acetato de Etila **CH_3OH** - metanol **Coluna de sílica (70-230 mesh)** **CC; Φ x h de 2,8 x 51 cm**		
	50:50	126-139		50:50	273-279			
	40:60	140-154		40:60	280-289			
	30:70	155-179		30:70	290-299			
	20:80	180-205		20:80	300-309			
	10:90	206-215		10:90	310-323			

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

As frações foram secas e reunidas com base na comparação dos seus respectivos Rf´s obtidos por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando como eluente hexano/acetato de etila em proporção de 7:3. A tabela 10 mostra os grupos de frações obtidas de acordo com as análises realizadas por CCDA.

4.10 Isolamento

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

TABELA 2: Reunião das frações obtidas do fracionamento em coluna aberta do EHCDP

Frações EHCDP	Agrupamento	Massa (mg)	Frações	Agrupamento	Massa (mg)
1-7	1	18,4	212-217	15	61,1
8-38	2	3,6	218-221	16	32,4
39-50	3	36,6	222-231	17	53,4
51-70	4	103,8	232-241	18	30,4
71-97	5	108,7	242-252	19	25,6
98-110	6	98,1	253-265	20	24,1
111-154	**7**	**752,7**	266-272	21	7,5
155-164	8	43,1	273-282	22	9,5
165-174	9	54,4	283-285	23	4,5
175-191	10	512,1	286-293	24	8,2
192-196	11	99,4	294-303	25	10,3
197-201	12	129,6	304-312	26	7,3
202-206	13	109,8	313-322	27	127,2
207-211	14	80,0	323-346	28	64,6
Total		**2150,3**			**466,1**

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

4.10.1 Grupo de frações EHCDP-7

O grupo de frações EHCDP-7 (752,7 mg), dividido em quatro placas de 30 g cada) foi submetido à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP). As placas cromatográficas foram submetidas à cinco eluições consecutivas utilizando como gradiente a mistura dos solventes hexano:AcOEt na proporção (90:10) e como único revelador a luz UV (254 nm). As substâncias foram separadas, extraídas da sílica com uma mistura dos solventes CH_2Cl_2/ AcOEt (90:10), sendo posteriormente filtradas a vácuo em funil com placa porosa, evaporadas e pesadas.

TABELA 3: Grupo de frações obtidas por cromatografia em camada delgada preparativa da fração EHCDP-7.

Grupamento de Frações EHCDP-7 (752,7 mg)	
EHCDP-7.1 **(S1)** 94,9 mg	EHCDP-7.2 **(S2)** 318, mg
Fase Estacionária: Placas de vidro com 20x20 com espessura de siliica de 1mm, com 30 gramas de silica gel 60 diluidas em 60 ml de água. **Gradiente ulizado:** CH_2Cl_2: AcOEt (90:10) **Revelador:** UV 254 nm	

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

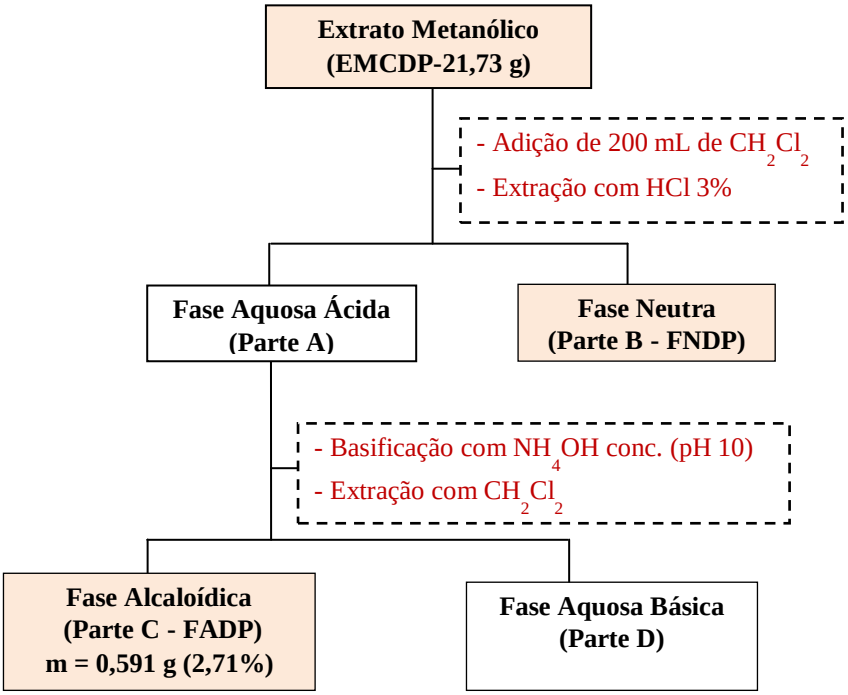
Verificou-se a presença de duas substâncias isoladas (Tabela 3) que codificadas como (S1) e (S2), e enviadas para as análises por EM e RMN.

4.11 Tratamento ácido-base do extrato metanólico

O extrato metanólico das cascas (21,43 g) foi submetido ao tratamento ácido-base convencional, conforme a metodologia descrita por Costa *et al*. (2006).

Inicialmente o extrato da casca foi transferido para um erlenmeyer de 1 L e suspenso em 300 mL de $CHCl_3$ com auxílio de ultrassom. Adicionou-se 300 mL de HCl a 3% e observou-se a formação de duas fases (orgânica neutra e aquosa ácida), além de uma emulsão de coloração vermelho tijolo e de um material pastoso de coloração castanho escura. A fase aquosa ácida foi cuidadosamente transferida com o auxílio de uma pipeta Pasteur para outro erlenmeyer de 3 L. Foram realizadas mais cinco adições de 300 mL de HCl a 3%, e na última adição foi verificado que a fase aquosa já possuía coloração mais clara, quase incolor. A fase aquosa apresentou pH igual a 3,4 e foi basificada com NH_4OH (800 mL), acrescentado gradativamente até que não houvesse variação significativa de pH (10,16) (Esquema 2). A cada adição de NH_4OH (100 mL), observou-se a formação de um precipitado amarelo.

ESQUEMA 2: Fluxograma geral do tratamento ácido-base das cascas de *D. pycnastera*.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Utilizando um funil de separação, a fase aquosa foi particionada com $CHCl_3$ (8x), gerando uma fase aquosa básica e uma fase orgânica alcaloídica. Após a partição, adicionou-se mais 1 L de $CHCl_3$ à fase aquosa básica, que foi extraída no dia seguinte e unida a fase orgânica. A fase orgânica alcaloídica apresentou coloração vermelho intensa e foi concentrada com evaporador rotativo, enquanto a fase aquosa foi descartada. Todo clorofórmio utilizado no tratamento ácido-base foi recuperado, tratado e redestilado para posterior uso.

Concluído o procedimento citado acima, confirmou-se a presença de alcaloides por cromatografia em camada delgada, tendo como eluente a mistura de CH_2Cl_2/MeOH (95:05) e como reveladores a luz UV (254 nm) e o reagente de Dragendorff. Após secagem em dessecador, a massa de fração alcaloídica obtida foi igual a 590,2 mg para casca, apresentando rendimento de 2,71% (Esquema 2). Cerca de 30 mg das frações neutra e alcaloídica foram retirados e enviado para os ensaios de citotoxidade.

4.12. Fracionamento cromatográfico da Fração Alcaloídica de *D. pycnastera* (FADP)

Toda FADP restante (0,560 g) foi submetida ao fracionamento por cromatografia em coluna aberta (CC; Φ x h de 2,8 × 51 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 151 frações de 20 mL cada (Tabela 4). As frações foram secas e reunidas com base na comparação dos seus respectivos Rf´s obtidos por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), utilizando como eluente CH_2Cl_2:MeOH na proporção de 9,5:0,5.

TABELA 4: Fracionamento cromatográfico da Fração Alcaloídica de *D. pycnastera* (FADP)

Fração Alcaloídica das Cascas (FADP - 0,560g)								
Solventes	**Gradiente**	**Frações**	**Solventes**	**Gradiente**	**Frações**	**Solventes**	**Gradiente**	**Frações**
C_6H_{14}	100%	01-09	CH_2Cl_2	100%	80-85	AcOEt	100%	142-145
C_6H_{14} : CH_2Cl_2	90:10	10-21	CH_2Cl_2: AcOEt	90:10	86-82	AcOEt: CH_3OH	90:10	146-148
	80:20	22-29		80:20	93-103		80-20	149-151
	70:30	30-37		70:30	104-109	**C_6H_{14}** - Hexano **CH_2Cl_2** -Diclorometano **AcOEt($C_4H_8O_2$)** - Acetato de Etila **CH_3OH** - Metanol **Coluna de Sílica (70-230 mesh)** **CC; Φ x h de 2,8 x 51 cm**		
	60:40	38-49		60:40	110-113			
	50:50	50-57		50:50	114-120			
	40:60	58-63		40:60	121-123			
	30:70	64-68		30:70	124-129			
	20:80	69-73		20:80	130-137			
	10:90	74-79		10:90	138-141			

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Na tabela 5 são apresentados os grupos de frações obtidos de acordo com as análises por CCDA. Os grupos de frações FADP-01 e FADP-02 foram reunidos gerando o grupo FADP-1.2, assim como os grupos FADP-04 e FADP-05 originando a fração FADP-4.5, os grupos FADP-03, FADP-06 e FADP-07 permaneceram com seus códigos inalterados.

TABELA 5: Frações obtidas do fracionamento em coluna aberta da fração FADP.

Frações FADP	**Grupamento**	**Massa (mg)**
1-14	01	30,8
15-22	02	28,7
35-73	03	89,0
74-84	04	11,5
85-105	05	22,1
106-112	06	278,3
113-151	07	78,4
Total		**538,8**

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

4.12.1 Isolamento dos constituintes químicos

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

4.12.2 Grupo de Frações FADP-1.2

O grupo de frações FADP-1.2 (59,5 mg) foi submetido à CCDP utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2:MeOH (95:05), conforme a representação na tabela 6, resultando no isolamento de uma substância codificada como S3. A substância foi analisada 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. Posteriormente foi encaminhada para análise por EM e RMN.

TABELA 6: Fracionamento do grupo FADP-1. 2**.**

FADP-1.2 (59,5 mg)			
FADP-1.2-1 (S3)	FADP-1.2-2	FADP-1.2-3	FADP-1.2-4
5,8 mg	13,2 mg	4,5mg	12,4 mg

Fase Estacionária: Placas de vidro com 20x20 com espessura de sílica de 1mm. com 20 gramas de silica gel 60 e diluidas em 40 ml de água.
Gradiente ulizado: CH_2Cl_2: CH_3OH (95:5)
Reveladores: UV 254 nm, reagente de Dragendorff e anisaldeído.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

4.12.3 Grupo de frações FADP-4.5

O grupo de frações FADP-4.5 (33,5 mg) foi submetido à CCDP utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2:MeOH (95:05), conforme a representação no tabela **7**, resultando no isolamento de duas substâncias codificadas como S3 e S4.

As amostras foram analisadas 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. As amostras foram então encaminhadas para análises por EM e RMN.

TABELA 7: Fracionamento do grupo FADP-4. 5.

FADP-4.5 (33,6 mg)						
FADP-4.5 -1	FADP-4.5-2	**FADP-4.5-3(S4)**	**FADP-4.5-4(S5)**	FADP-4.5-5	FADP-4.5-6	FADP-4.5-7
1,0 mg	1,7 mg	**3,8 mg**	**6,2 mg**	2,0 mg	2,9 mg	5,9 mg

Fase Estacionária: Placas de vidro com 20x20 com espessura de siliica de 1mm. com 20 gramas de silica gel 60 e diluidas em 40 ml de água.
Gradiente ulizado: CH_2Cl_2: CH_3OH (95:5)
Reveladores: UV 254 nm, reagente de Dragendorff e anisaldeído.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

4.12.4 Grupo de frações FADP-7

O grupo de frações FADP-7 (70.8 mg) foi submetido à CCDP utilizando como eluente a mistura de CH_2Cl_2:MeOH (95:05), conforme tabela 8, resultando no isolamento de duas substâncias S6 e S7. As amostras foram analisadas 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. As amostras foram encaminhadas para análise por EM e RMN.

TABELA 8: Fracionamento do grupo FADP-7.

FADP-7 (70,8 mg)						
FADP-7-1(S6)	FADP-7-2	FADP-7-3	FADP-7-4	FADP-7-5	**FADP-7-6(S7)**	FADP-7-7
8,1 mg	1,7 mg	1,3 mg	1,0 mg	1,0 mg	**6,4 mg**	1,1 mg

Fase Estacionária: Placas de vidro com 20x20 com espessura de sílica de 1 mm, com 20 gramas de silica gel 60 e diluidas em 40 ml de água.
Gradiente ulizado: CH_2Cl_2: CH_3OH (95:5)
Reveladores: UV 254 nm, reagente de Dragendorff e anisaldeído.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

4.13. 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 ºC) de *D. pycnastera* foi extraído por hidrodestilação utilizando um sistema do tipo Clevenger, acoplado a um balão de fundo redondo de 4 L, com uma manta elétrica aquecedora mantendo-se a temperatura em 100 ºC. Para cada extração adicionou-se 300 g 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. Após quatro horas e encerrada a destilação, recolheu-se o óleo essencial que foi seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), 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.

4.14 Estudo da atividade citotóxica *in vitro*

Este ensaio foi realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, localizado na fundação Oswaldo Cruz em Salvador-BA em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra e sua equipe (Drª. Milena Botelho Pereira Soares, Valdenizia Rodrigues Silva Luciano de Souza Santos).

4.14.1 Preparo das Amostras

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 10 $mg.mL^{-1}$ (para extratos) ou $5mg.mL^{-1}$ (para compostos puros). As amostras foram testadas em concentrações que variaram de 0,19-50 $\mu g.mL^{-1}$.

4.14.2 Células

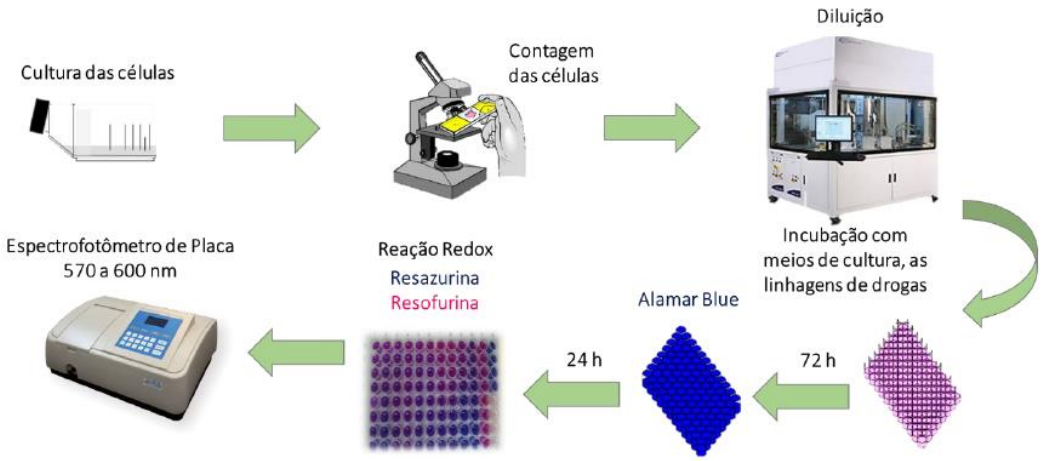
Foram utilizadas células MCF-7 (carcinoma de mama humano), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), HCT116 (carcinoma de colón de útero), HL-60 (leucemia promielocítica) e MRC-5 (fibroblasto de pulmão humano) obtidas da ATCC. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm^3, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5 % de CO_2 a 37 ºC. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células se despregassem das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para microplasma, conforme avaliado pela colocação com Hoechst (Mycoplasma Stain Kit, Cat. MYC1, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

4.14.3 Ensaio de citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade das substâncias, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com as substâncias teste. O alamar blue, identificado como resazurina (O'BRIEN *et al.,* 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como com os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorecente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED *et al.,* 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/poço de uma solução de 0,3 x 10^6 células/mL para células em suspensão e 0,7 x 10^5 células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as substâncias testes dissolvidas em DMSO foram adicionadas em cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo.

ESQUEMA 3: Ensaio para verificação de atividade citotóxica.



Fonte: MENEZES, 2015.

O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas (vinte e quatro horas para o PBMC) antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque (0,312 mg/mL) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED *et al.*, 1994). A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas IC_{50} realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). A proliferação celular foi calculada utilizando a fórmula:

Equação 1. $\% \text{ proliferação} = ALW - (AHW \times R_0) \times 100$

Onde, *ALW* e *AHW* são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente.

O R_0 foi calculado utilizando a fórmula:

Equação 2. $R_0 = AOLW/AOHW$

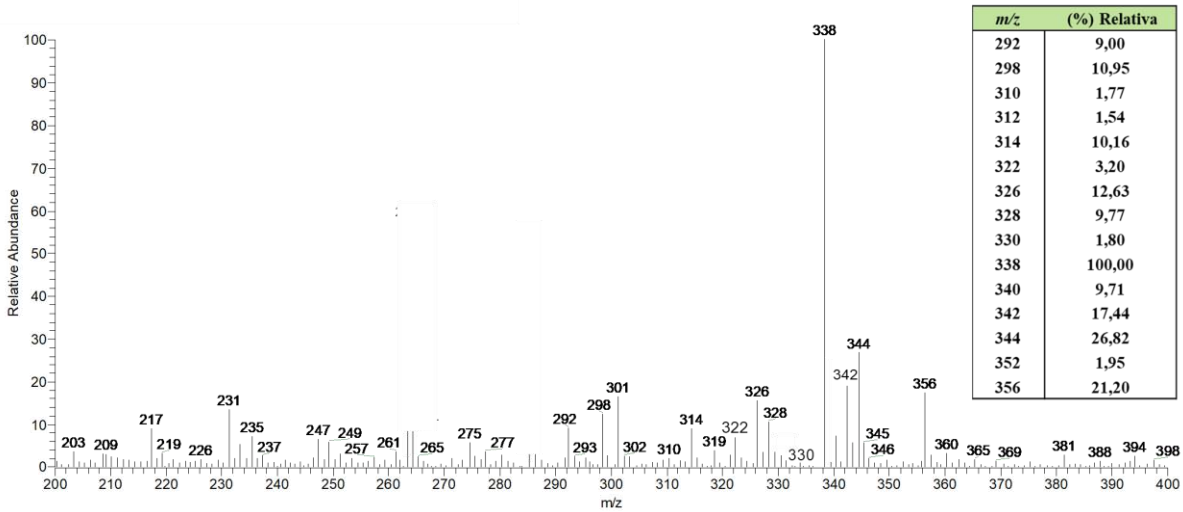
Onde *AOLW* e *AOHW* são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue, subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. Utiliza-se o parâmetro R0 para eliminar a absorção característica do meio puro, que possui uma coloração levemente rósea. A amostra foi testada em diluição seriada, em triplicata (dependendo da quantidade de amostra). A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI_{50} realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

5.1. Estudo do perfil por *leaf spray* (LS-MS) de *D. pycnastera*

O espectro de íons de massas LS-MS (Figura 15) da amostra *in nature* da casca de *D. pycnastera* exibiu 15 íons com valores de *m/z* par indicando substâncias nitrogenadas (por exemplo, alcaloide protonado), os quais alguns foram selecionados e submetidos à fragmentação em MSn para possível identificação dos alcaloides presentes matriz.

FIGURA 15: Perfil LS-MS das cascas de *D. pycnastera*



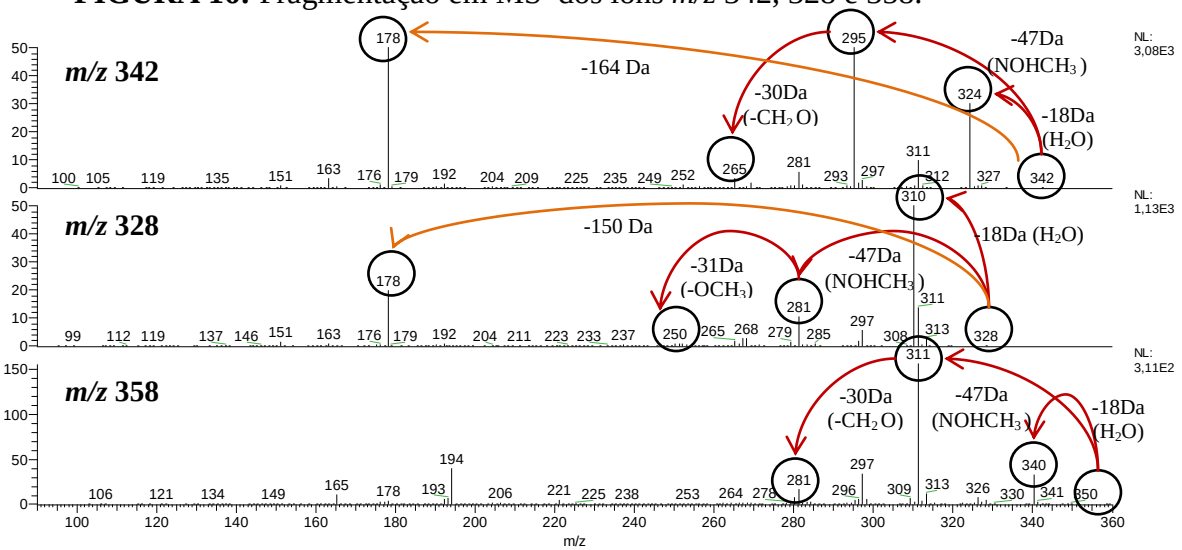
m/z	(%) Relativa
292	9,00
298	10,95
310	1,77
312	1,54
314	10,16
322	3,20
326	12,63
328	9,77
330	1,80
338	100,00
340	9,71
342	17,44
344	26,82
352	1,95
356	21,20

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A presença do fragmento de *m/z* 178 (Figura 16) mostra que os íons em *m/z* 328 e 342 pode tratar-se de uma mistura de alcaloides de mesma massa molecular. Essa alta perda está associada a alcaloides tetrahidroprotoberberínicos (SOARES *et al*., 2015a; LIMA, 2015) no qual o íon de *m/z* 178 consiste no produto formado da abertura do anel C via retro- Diels-Alder (RDA) dos alcaloides tetraidroprotoberberínicos contendo grupos metoxilas e hidroxilas no anel A (JEONG *et al*., 2012; DEMARQUE *et al*., 2016).

Os íons de massas carga com *m/z* 328 (DP-1), 342 (DP-2) e 358 (DP-3) apresentaram padrões de fragmentações similares com perdas iniciais competitivas de –18 Da (328→310, 342→324 e 358→340) e –47 Da (328→281, 342→295 e 358→311) FIGURA 16. Essas perdas estão associadas a existências de grupos *N*-óxidos do anel B e também a presença de grupos OH em sistemas aporfinos. A saída perda inicial de –47 Da é associada ao grupo $NHOCH_3$ (PAZ, 2019).

FIGURA 16: Fragmentação em MS^n dos íons *m/z* 342, 328 e 358.



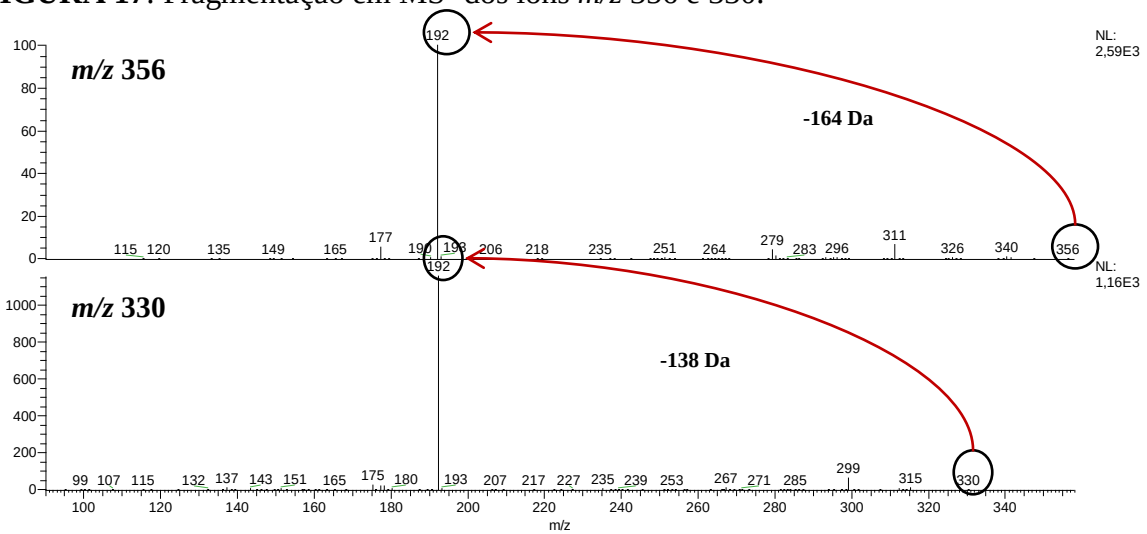
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

TABELA 9: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 328, 342 e 358.

Substância	$[M+H]^+$	MS/MS	Classe proposta	Referência
D1	342*	178	Tetrahidroprotoberberínico	SOARES *et al.*, 2015a; LIMA, 2015
D2	328*	178, 151		
D3	328	310, 281, 250		
D4	342	324, 295, 265	Aporfinos *N*-oxidos-7-Hidroxi	PAZ, 2019
D5	358	340, 311, 281		

Os íons *m/z* 356 (D6) e 330 (D7) apresentaram altas perdas gerando o íon diagnóstico *m/z* 192 Da, essa perda associado a D7 está relacionada segundo a literatura (SCHMIDT *et al.*, 2005) ao um esqueleto do tipo tetrahidroisoquinilinico, no entanto embora D6 apresente o mesmo íon diagnostico essa perda sugere que seja um esqueleto tipo tetraidroprotoberberínico semelhantemente aos íons de *m/z* 328 e *m/z* 342 (Figura 17).

FIGURA 17: Fragmentação em MS^n dos íons *m/z* 356 e 330.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

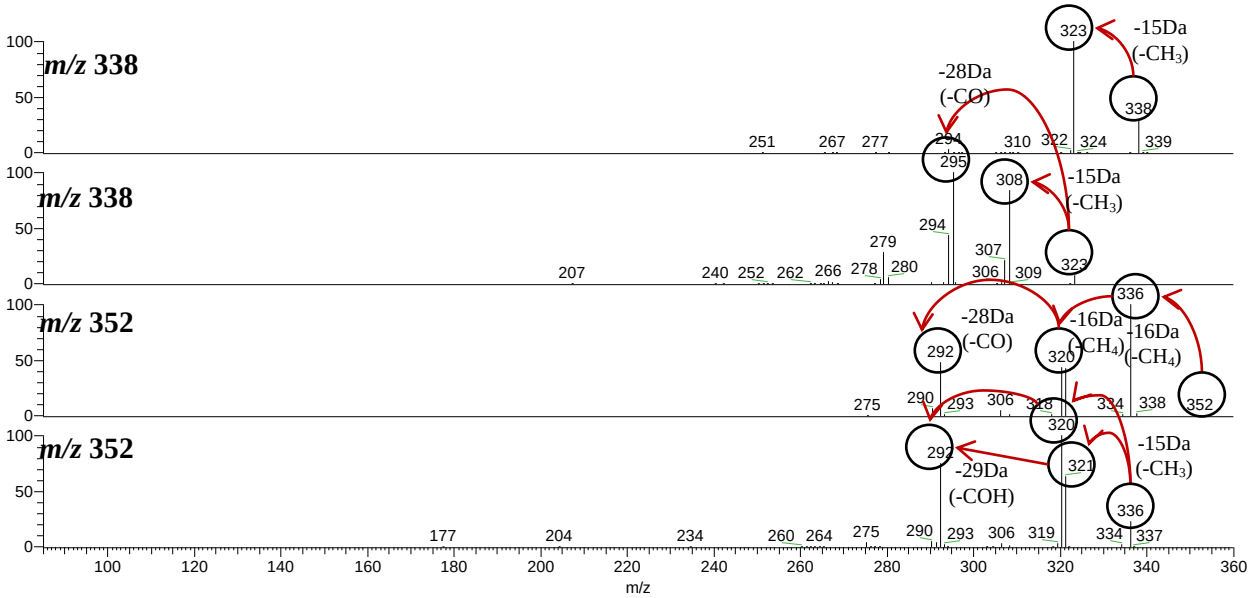
TABELA 10: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 330 e 356

Substância	$[M+H]^+$	MS/MS	Classe proposta	Referência
D6	356	192 ,177	Tetrahidroprotoberberínico	SCHMIDT *et al.*, 2005
D7	330	192,174,143	Tetrahidroisoquinilinico	

O íon de *m/z* 192 tem sido descrito como fragmento chave observado em isoquinolínicos contendo grupos *N*-metila e metoxila adjacente à hidroxila no anel A, sendo o perfil do íon D7 similar com o perfil de fragmentação do alcaloide reticulina (SOARES *et al.*, 2015a).

Nos espectros MS/MS dos íons em *m/z* 338 e 352 (Figura 18) pode-se observar a perda sequencial de radicais metilas ($\bullet CH_3$) e CO, notando-se também a saída de grupos $\bullet CH_4$ (-16Da) e –COH (-29Da) fragmentações condizentes com estruturas berberinas sendo o íon em *m/z* em 352 similar a fragmentação da palmatina (LIU, 2014), enquanto que o íon em *m/z* 338 apresenta perfil similar ao alcaloide jatrorrhizine (SINGH, 2017).

FIGURA 18: Espectro de fragmentação em MS^n referente aos íons *m/z* 338 e 352.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

TABELA 11: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 338 e 352.

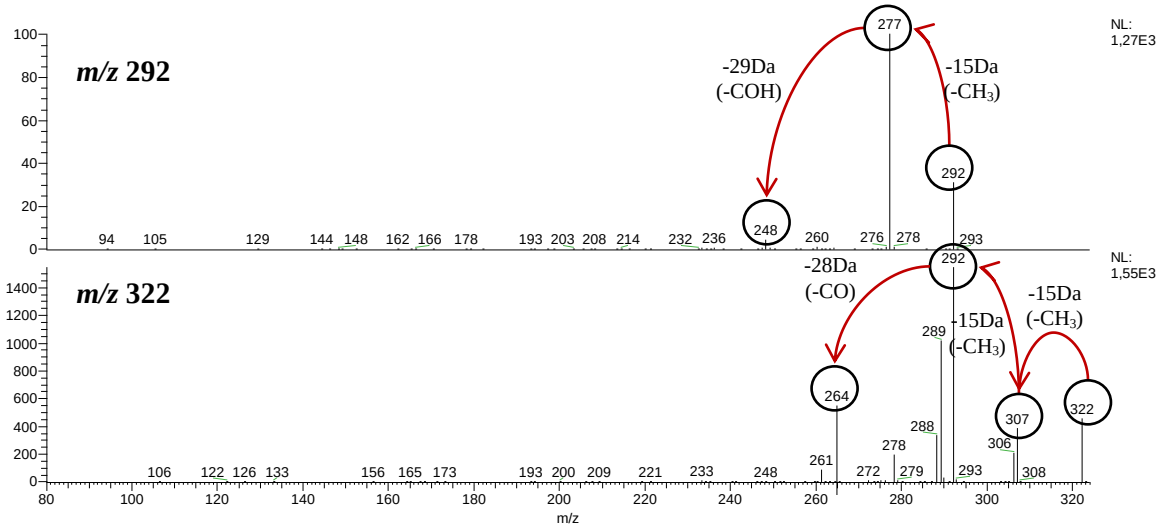
Substância	$[M+H]^+$	MS/MS	Classe proposta	Referência
D8	338	323,308 e 295	Berberínicos	LIU, 2014 e SINGH, 2017.
D9	352	336,320,321 e 292		

O estudo das fragmentações dos íons moleculares protonados em *m/z* 322 e 292 através do espectro em MS^n (Figura 19) demonstraram características de estruturas oxoaporfinas, sendo observado para o primeiro (*m/z* 322) duas perdas inicial de –15Da ($-CH_3$) seguida da

perda de –28 Da em MS^n. Em um estudo realizado por SILVA *et al*. (2016), o padrão de fragmentação em alcaloides oxoaporfínicos é dado preferencialmente pela clivagem dos grupos periféricos ao invés da perda remota de CO.

Com relação ao segundo (*m/z* 292) observou-se a perda inicial de –15 Da referente ao grupo metila ($–CH_3$) e ausência de uma perda inicial de –17 Da (NH_3) que sugere que esse grupo metila faça parte da metoxila ligada ao anel A, confirmado pela perda de –29 Da (COH) referente à carbonila, sugerindo assim uma estrutura oxaporfínica.

FIGURA 19: Espectro de fragmentação em MS^n referente aos íons *m/z* 322 e 292.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

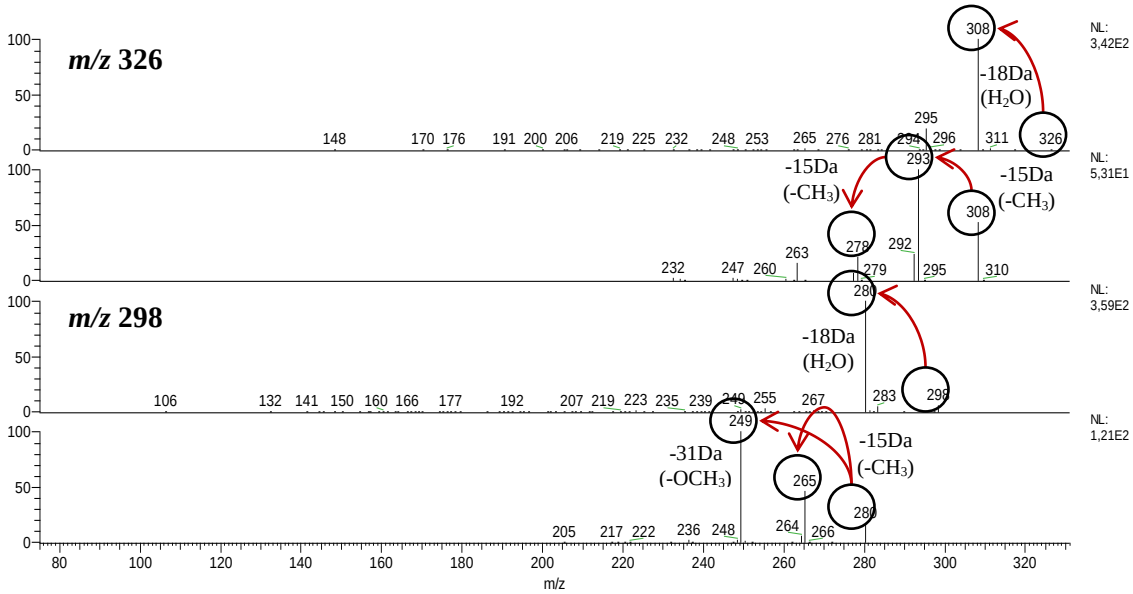
TABELA 12: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 292 e 322

Substância	$[M+H]^+$	MS/MS	Classe proposta	Referência
D10	292	277,248	Aporfinos	NASCIMENTO, 2008
D11	322	307, 292,264	(Oxoaporfinicos)	SILVA *et al.* (2016)

Os íons protonados em *m/z* 326 e 298 apresentaram padrões de fragmentações iniciais similares (Figura 20) com as perdas observáveis de -18 Da (H_2O) e -15 Da ($-CH_3$), essa fragmentação incomum está associada a esqueletos derivados 7-hidroxiaporfinos (LIMA, 2020).

O fragmento observável de -31Da (-COH) em *m/z* 280 (280→249) está relacionado a existência de um grupo metilenodioxi ,onde a saída do grupo –COH está associada a ruptura do grupo ($-OCH_2O-$) (STÉVIGNY, 2004).

FIGURA 20: Espectro de fragmentação em MS^n referente aos íons *m/z* 326e 298.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

TABELA 13: Fragmentos observados em MS/MS para os íons *m/z* 326 e 298

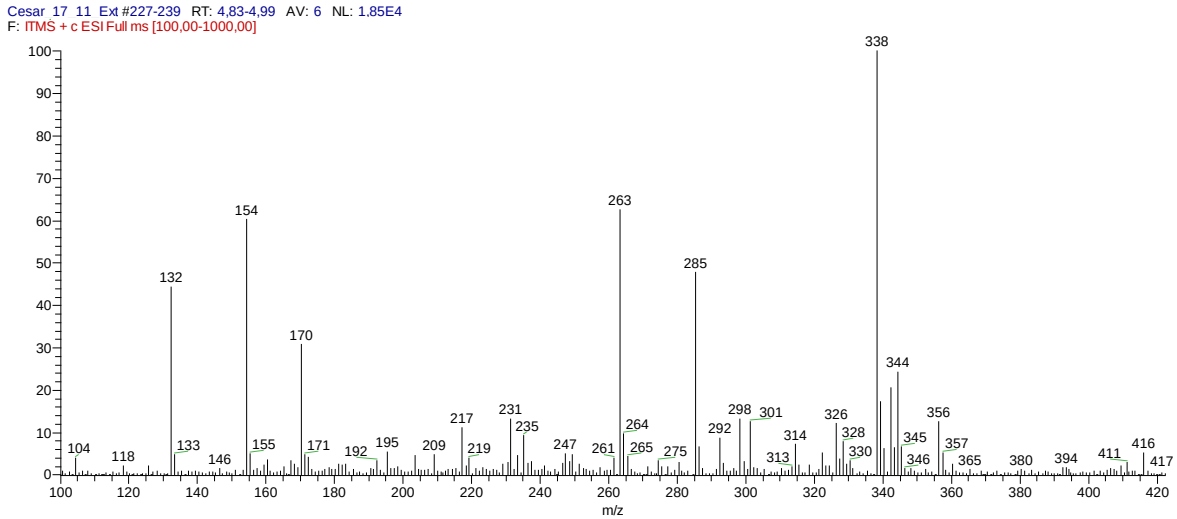
Substância	$[M+H]^+$	MS/MS	Classe proposta	Referência
D12	326	308,293,263	Aporfinos (7-hidroxi-aporfínos)	LIMA *et al* ,2020
D13	298	280,265,249		

Assim, o perfil por LS-MS, permitiu sugerir por tentativa a identificação de 13 derivados de esqueleto isoquinolínico como: tetraidroprotoberberínicos, protoberberínicos e os aporfinos (*N*-óxidos-aporfínicos e 7-hidroxi-aporfínicos) como sendo os principais compostos, no entanto essas estruturas são apenas sugestões uma vez que o reconhecimento de menores intensidades na análise direta de MS pode ter sido comprometido pelo efeito de matriz (LIN *et al*., 2010).

5.2 Análise do perfil espectrométrico do extrato metanólico e da fração alcaloídica das cascas de *Duguetia pycnastera*.

O extrato obtido da partição metanólica foi analisado por espectrometria de massas utilizando-se uma fonte ESI-MS em modo positivo onde se observou a ocorrência de íons com razão massa-carga (*m/z*) par, indicativo de prováveis alcaloides conforme mostrado na figura 21.

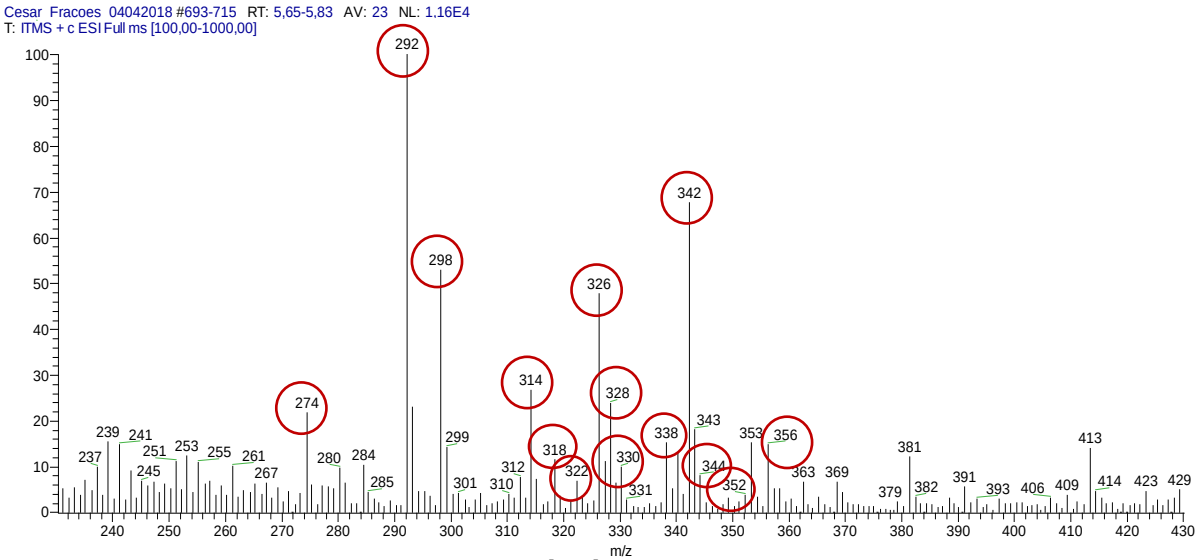
FIGURA 21: Espectro de íons totais do extrato metanólico obtido das cascas de *Duguetia pycnastera.*



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O espectro de íons totais do extrato metanólico mostrou similaridade com aquele analisado em fonte de *Leaf Spray* onde se observa a alta intensidade do *quasi-molecular m/z* 338, e a ocorrência dos íons *m/z* 344 e 356, no entanto após o tratamento ácido-base foi possível notar diferenças significativas nas intensidades dos íons analisados conforme a figura 22.

FIGURA 22: Espectro de íons totais obtidos da fração alcaloídica das cascas de *Duguetia pycnastera.*



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

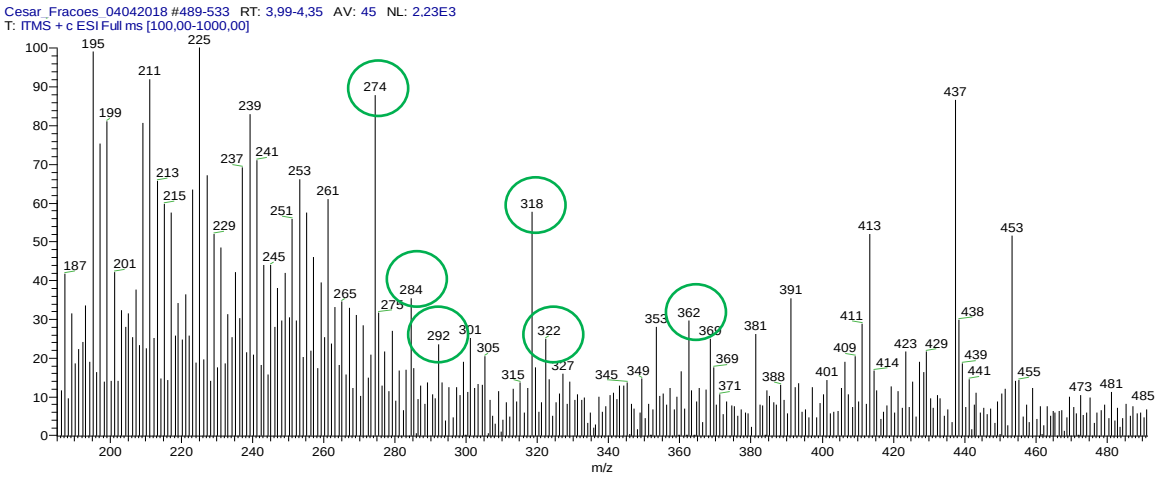
Verificou-se a diminuição da intensidade relativa de m/z 338 (cerca de 20%), bem como o aumento da intensidade dos íons *m/z* 292 (100%), 342 (70 %), 298 (60%), 326 (50%)

e 314 (40%), e outros menor intensidade , 274, 280, 284, 310, 318, 330, 356, 322, 344, 352 e 356, com intensidade relativa abaixo de 20%.

Essa diferença nas intensidades bem como a presença de outros íons na fração alcaloídica pode denotar uma diminuição do efeito matriz ao longo dos tratamentos utilizados até a obtenção da fração alcaloídica uma vez que a analise de LS-MS é feita em natura (material vegetal *in natura*) e sem tratamento, isso pode implicar um efeito matriz significante durante o processo de ionização das substancias presentes nessa amostra.

Nota-se na análise do Espectro de Íons totais da Fação neutra (Figura 23) retirada do tratamento ácido base nas cascas da *Duguetia Pycnastera* que picos com razão massa/carga (*m/z*) par foram observados, o que não denota por si só a ineficiência do tratamento, os íons assinalados na figura 23, podem representar íons de fácil ionização que ficaram retidos durante o processo, a técnica de espectrometria de massas é sensível a baixas concentrações podendo detectar íons nas concentrações mínimas.

FIGURA 23: Espectro da fração neutra obtida do tratamento ácido base das cascas da *Duguetia pycnastera*



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os íons observados na fração alcaloídica foram fragmentados e os padrões observados foram similares àqueles preditos no estudo de desreplicação por LS-MS, os íons encontrados e os principais fragmentos observados nessas análises encontram-se no apêndice **F.**

5.3. Determinação estrutural das substâncias isoladas

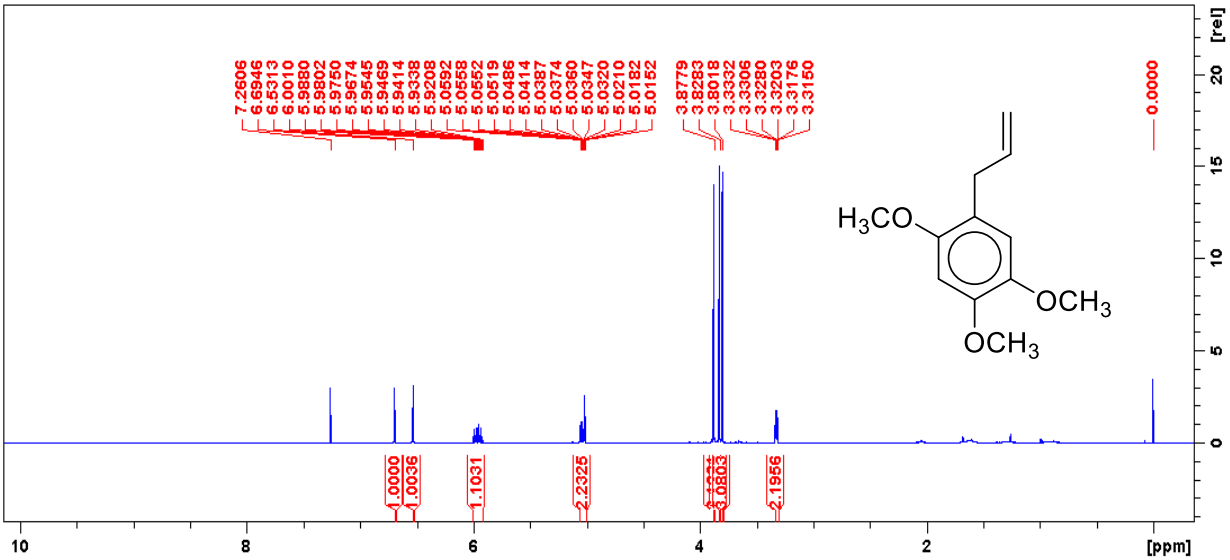
A partir do estudo fitoquímico das cascas do caule *D. pycnastera* utilizando os métodos cromatográficos clássicos (CC e CCDP) foi possível o isolamento e a caracterização de sete (7) substâncias conhecidas. Na caracterização das substâncias foram utilizadas as técnicas modernas de elucidação estrutural como EM e RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D/2D. Os dados dos espectros obtidos foram interpretados e comparados com os dados descritos na literatura.

5.3.1. Determinação estrutural das substâncias codificadas como (S1) e (S2)

A substância codificada como S1 (94,8 mg) foi caracterizada como um sólido de cor amarelo claro quando submetido à baixa temperatura e um óleo amarelado e viscoso em temperatura ambiente, solúvel em CHCl3, apresentando coloração roxa quando revelado com reagente vanilina sulfúrica e não reagente para o Dragendorff indicando a ausência de nitrogênio .

Analisando o espectro de RMN de ^{1}H (500M Hz, $CDCl_3$) de S1 foi possível observar o caráter aromático da molécula a partir da integração dos dezesseis (16) sinais de H (Figura 24).

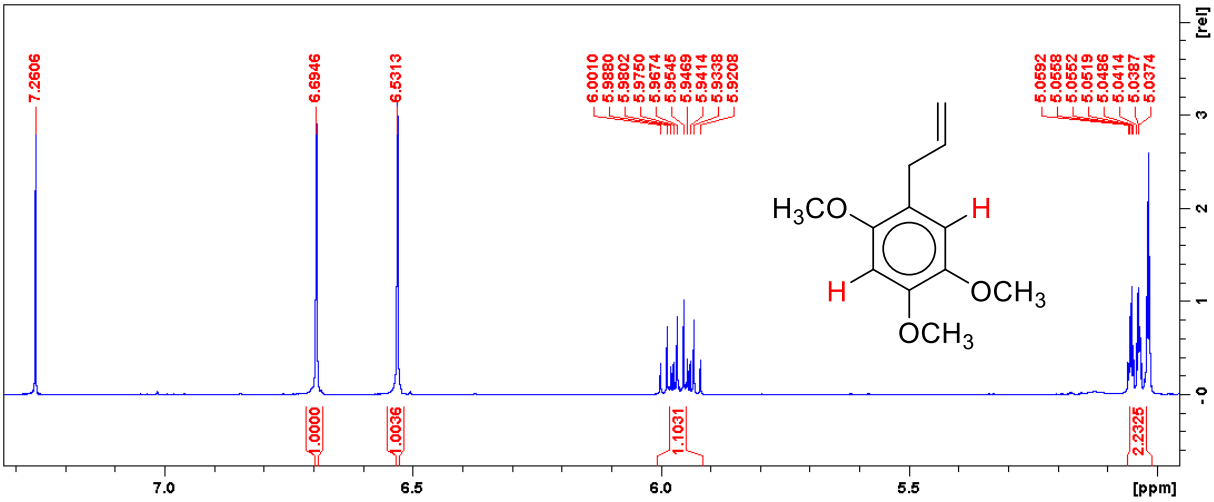
FIGURA 24: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

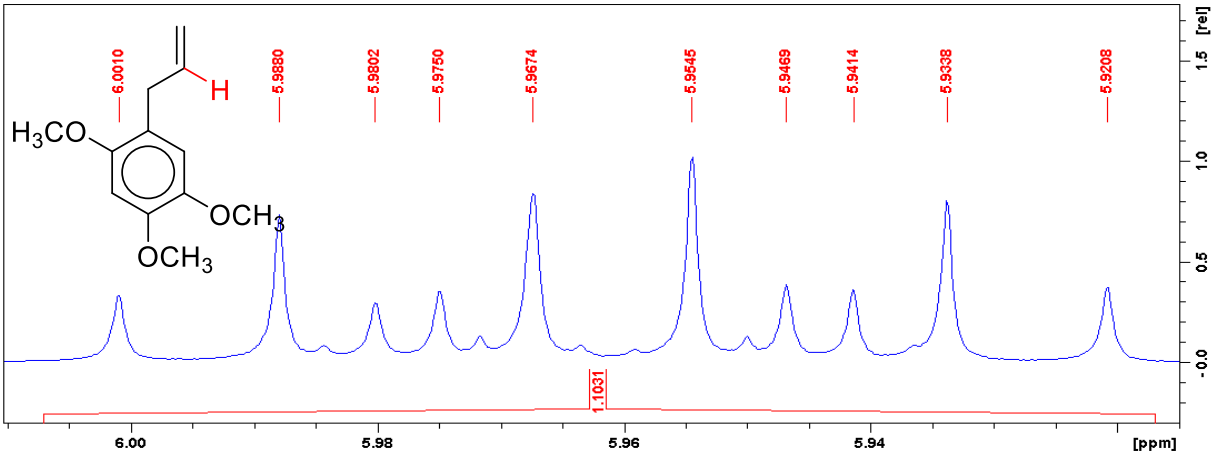
Na ampliação dos sinais na região (δ 7.26 – 5.03) observam-se dois simpletos em δ 6,69 (1H, *s*) e δ 6,53 (1H, *s*) característicos de hidrogênios aromáticos em posição *para*, juntamente com os sinais δ 5,02 (1H, *t*, *J* = 3,0 e 1,5); δ 5,03 (1H,*m*) e um sinal em δ 5,96 (1H, *ddt*, *J* = 13,0,10,4 e 6,5Hz) característicos de hidrogênios olefinicos indicando a presença de uma substituição alílica (Figuras 26 e 27).

FIGURA 25: Ampliação (δ 7.26 – 5.03) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.



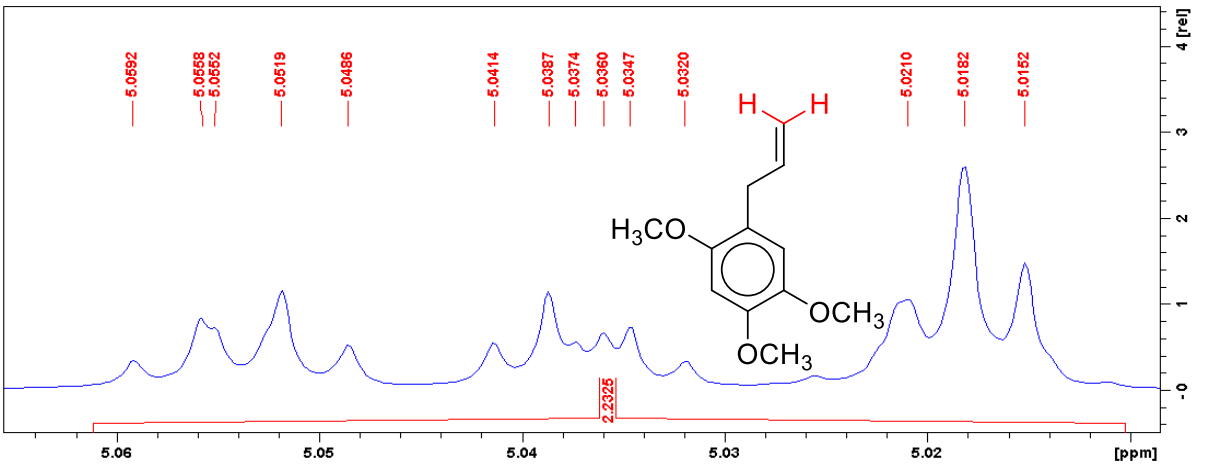
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 26: Ampliação (δ 6.00 – 5.92) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

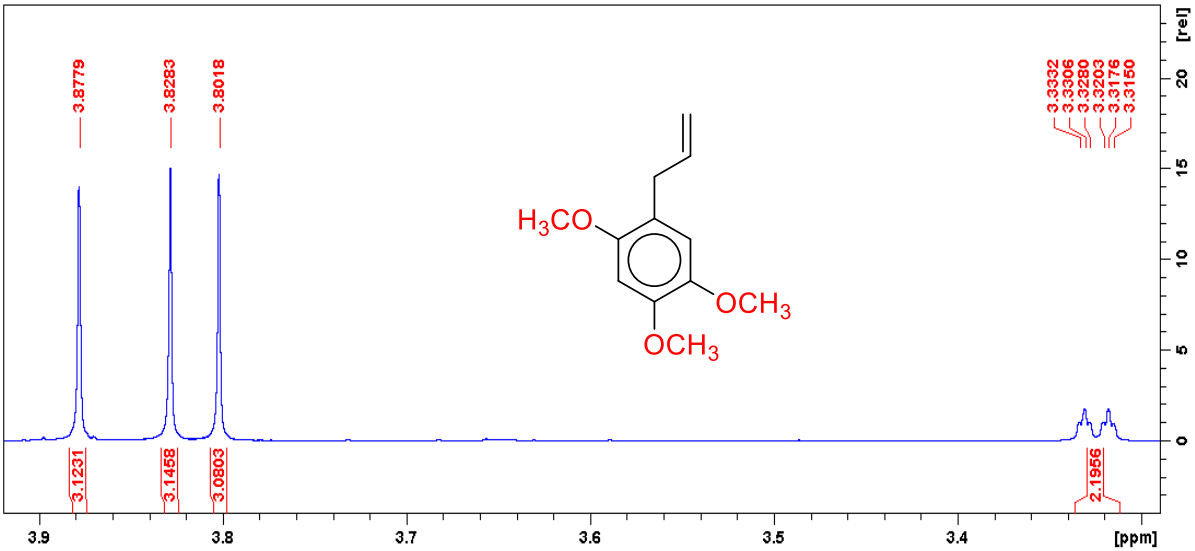
FIGURA 27: Ampliação (δ 5.05 – 5.01) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

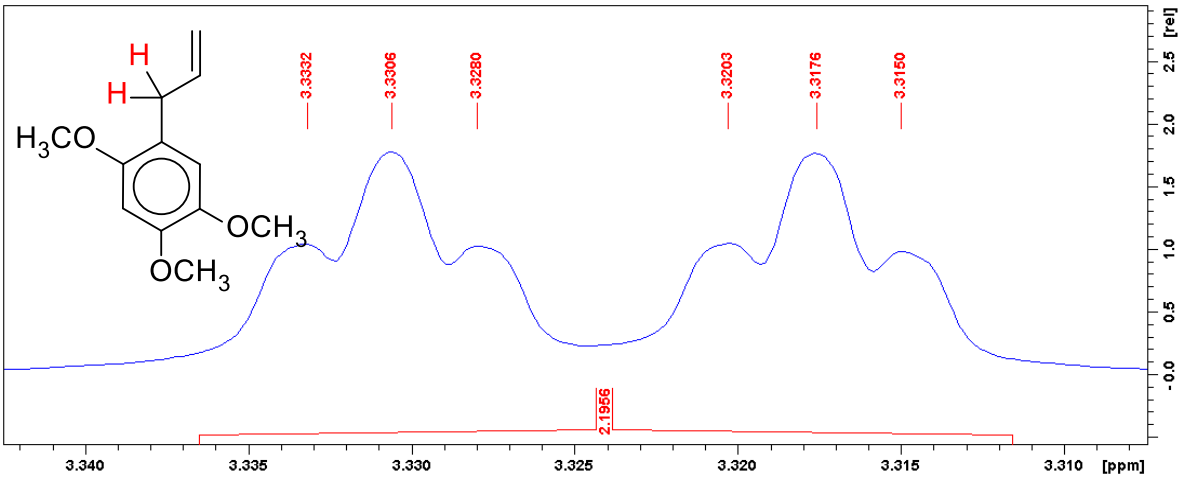
Na ampliação da região em (δ 3.87 – 3.31) (Figura 28) observam-se os sinais δ 3,80 (3H, *s*), 3,83 (3H, *s*) e 3,88 (3H, *s*) característicos de grupos metoxilas que juntamente com os sinais aromáticos e o alílico indicam uma estrutura tetrasubstituida, o sinal em δ 3,32 (2H, *dt*, J = 6,5 e 1,4 Hz) observado indica um hidrogênio alifático parte integrante da ramificação alilíca (Figura 29).

FIGURA 28: Ampliação (*δ* 3.87 – 3.31) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 29: Ampliação (δ 3.34 – 3.31) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S1.

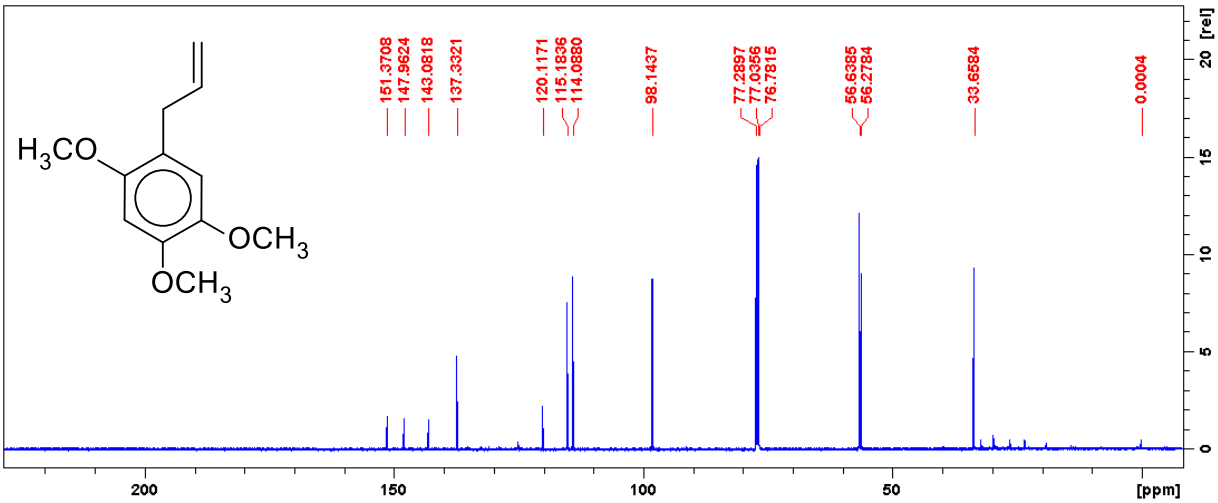


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C juntamente com DEPT 135° (Figuras 30 e 31) foram observados dois sinais em δ 56,6 e 56,2 relativos aos carbonos dos grupos metoxilas assim como seis sinais de carbonos aromáticos, sendo dois referente aos carbonos metínicos

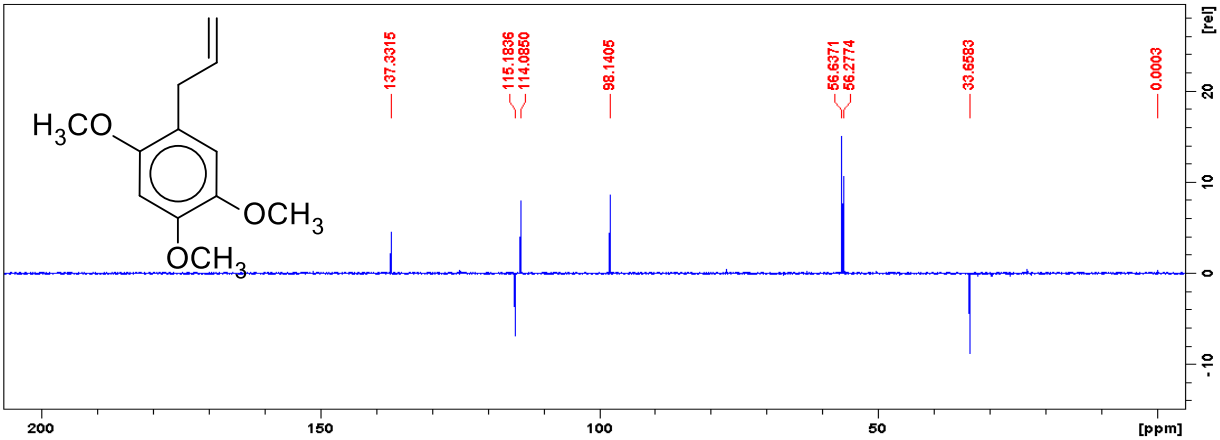
C-3 (δ 98,1, CH) e C-6 (δ 114,0,CH) e quatro sinais relativos a carbonos substituídos a δ120,1 (C-1), 151,3 (C-2), 143,0 (C-5) e 147,9 (C-4).

FIGURA 30: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de S1



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 31: Espectro de DEPT 135° (125 MHz, $CDCl_3$) de S1

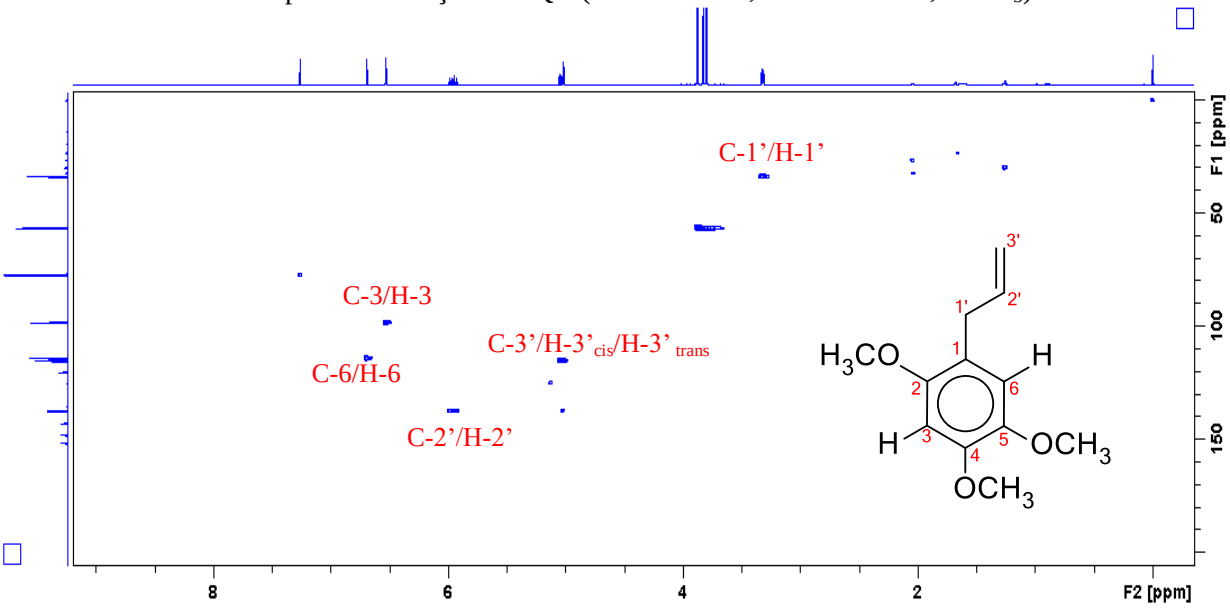


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A presença do grupo alila ligado ao carbono C-1 do anel aromático foi confirmada pelos sinais de carbonos metilênicos em δ 33,6 (C-1', CH_2) e 115,1 (C-3', CH_2) e de um carbono metínico em 137,3 (C-2', CH).

Pela análise do mapa de correlação HSQC (Figura 32) observou-se que os sinais em δ 115,1 e δ 137,3 correlacionam-se diretamente com os sinais dos hidrogênios em δ 5,02 e 5,04 bem como em δ 5,95, respectivamente, enquanto que o sinal em δ 33,6 correlaciona-se com o sinal do hidrogênio em δ 3,32, confirmando a presença do grupo propenil ($-C_3H_5$) na estrutura.

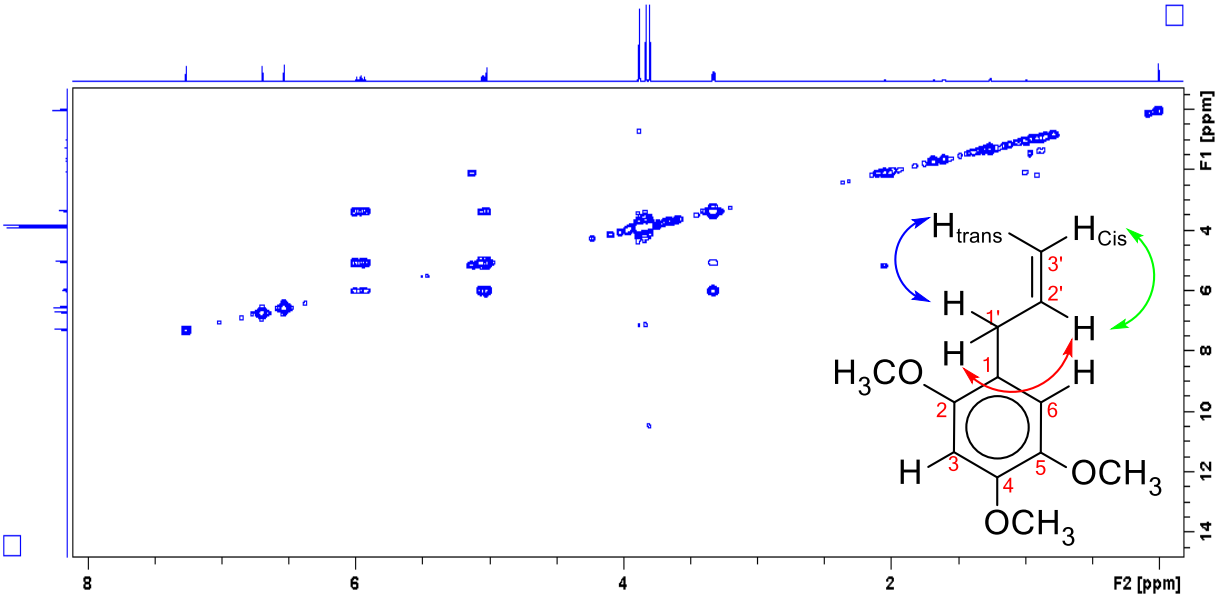
FIGURA 32: Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Todas as correlações H-H da ramificação alílica foram observadas mediante experimento COSY (Figura 33) onde se observa a correlação direta do H-3'$_{cis}$ com H-2' bem como H-3'$_{trans}$ com H-1' e H-1' com H-2' confirmando assim as posições corretas do radical propenil.

FIGURA 33: Correlações em COSY (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S1.

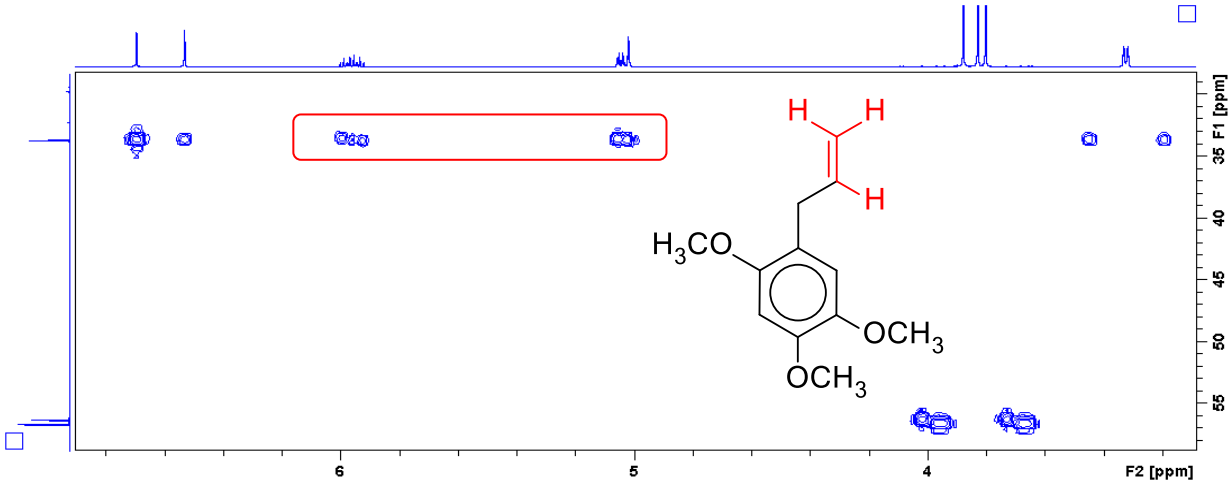


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Analisando o mapa de correlação HMBC (Figura 35), observou-se que os hidrogênios metílicos em δ 3,80, δ 3,82 e δ 3,87 correlacionam-se a J^3 com os carbonos em δ 151,3 (C-2), 143,0 (C-5) e 147,9 (C-4), respectivamente, e o sinal referente ao hidrogênio alifático da

ramificação em δ 3,32 (Figura 34) correlaciona-se a J^2 com δ 120,1 (C-1) e 137,3 (C-8) e J^3 com δ 114,0 (C-6) e 115,1 (C-9). Os sinais dos hidrogênios em δ 5,02 e 5,04 correlacionam-se a J^2 com o sinal do carbono em δ 137,3 (C-2') e a J^3 com δ 33,6 (C-1'), enquanto que o sinal em δ 5,96 (H-2') correlaciona-se a J^2 com o sinal do carbono em δ 33,6 (C-1') e a J^3 com o sinal do carbono em δ 120,1 (C-1), todas as correlações estão descritas na tabela 14 e mostradas na figura 36.

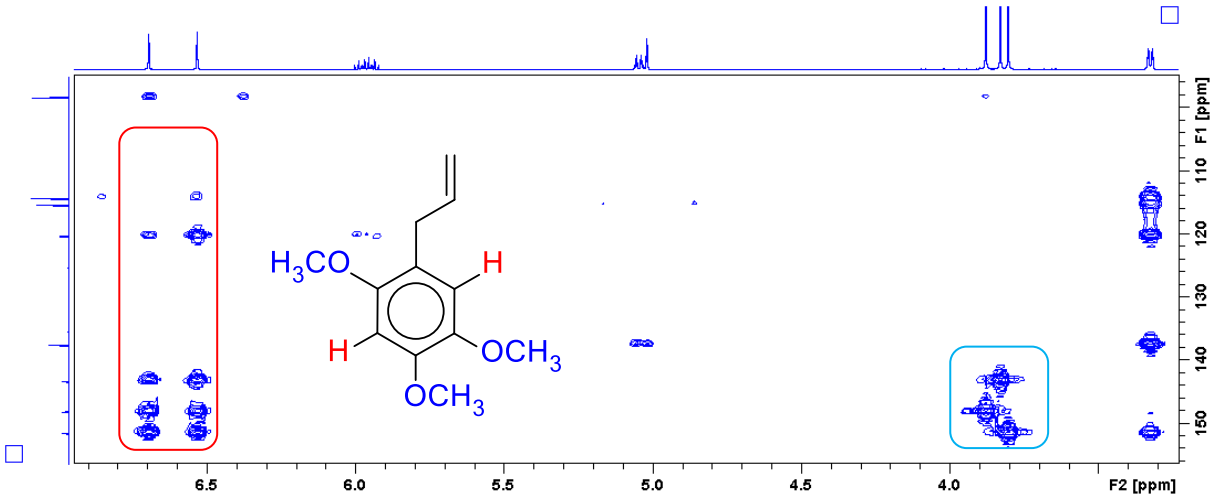
FIGURA 34: Hidrogênios olefinicos HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S1**.**



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

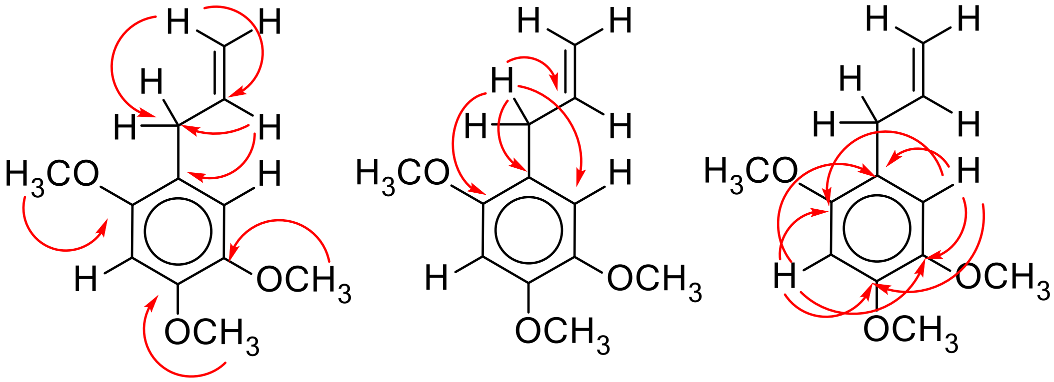
O sinal do hidrogênio aromático em δ 6,69 correlaciona-se a J^2 com o carbono em δ 143,0 (C-5) e a J^3 δ 33,6 (C-7), 147,9 (C-4) e 151,3 (C-2), enquanto que o outro sinal em δ 6,53 correlaciona-se a J^2 com os sinais em δ 151,3 (C-2) e 147,9 (C-4) (Figura 35).

FIGURA 35: Hidrogênios metoxilicos e aromáticos em HMBC (1H: 500 MHz; 13C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 36: Principais correlações observadas no experimento HMBC de S1



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

TABELA 14: Dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C de S1

Posição	**S1**			**γ-asarona**	
	^{1}H δ (mult., *J* em Hz)[a]	**^{13}C (δ)[a,b]**	**HMBC (^{1}H-^{13}C)[c]**	**^{1}H δ (mult., *J* em Hz)[d]**	**^{13}C (δ)[d]**
1	-	120,1	-	-	120,4
2	-	151,3	-	-	151,7
3	6,53 (1H, *s*)	98,1	1,2,4,5,6 e 7	6,53 (1H, *s*)	98,4
4	-	147,9	-	-	148,3
5	-	143,0	-	-	143,4
6	6,69 (1H, *s*)	114,0	1,2,3,4,5 e 7	6,70 (1H, *s*)	114,3
1’	3,32 (2H, *dt*, 6,5 e 1,4)	33,6	1,2,6,8	3,32 (2H, *d*, 6,6)	34,0
2’	5,96 (1H, *ddt*, 16,8;10,4 e 6,5)	137,3	1,7	5,95 (1H, *m*)	137,0
$3’_{Cis}$ **$3’_{trans}$**	5,04 (1H, *ddt*, 10,4;1,4e 1,4) 5,02 (1H, *ddt*, 16,8;1,4e 1,4)	115,1	8,7	5,04 (2H, *m*)	115,5
2-OCH3	3,80 (3H, *s*)	56,6	2	3,80 (3H, *s*)	56,9
4-OCH_3	3,87 (3H, *s*)	56,2	4	3,88 (3H, *s*)	56,6
5-OCH_3	3,82 (3H, *s*)	56,6	5	3,83 (3H, *s*)	56,9

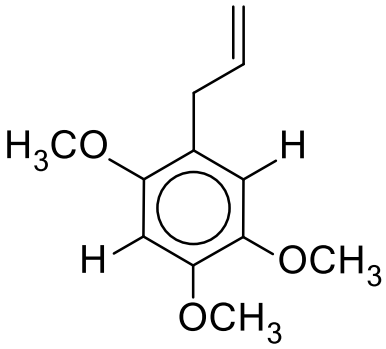
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

[a]Experimento realizado a 500 MHz para ^{1}H e 125 MHz para ^{13}C em $CDCl_3$, utilizando o TMS como padrão interno; [b]Multiplicidades determinadas mapas de correlação HSQC e HMBC; [c]Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios; [d]SINHA *et al.*, 2002 (^{1}H: 300 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$); (δ) Deslocamentos em ppm.

Os dados fornecidos pelas análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D/2D, assim como a comparação com os dados da literatura (Tabela 14), permitiu-nos concluir que a substância S1 trata-se da substância aromática 1-alilo- 2,4,5-trimethoxybenzeno (γ-asarona), (Figura 37).

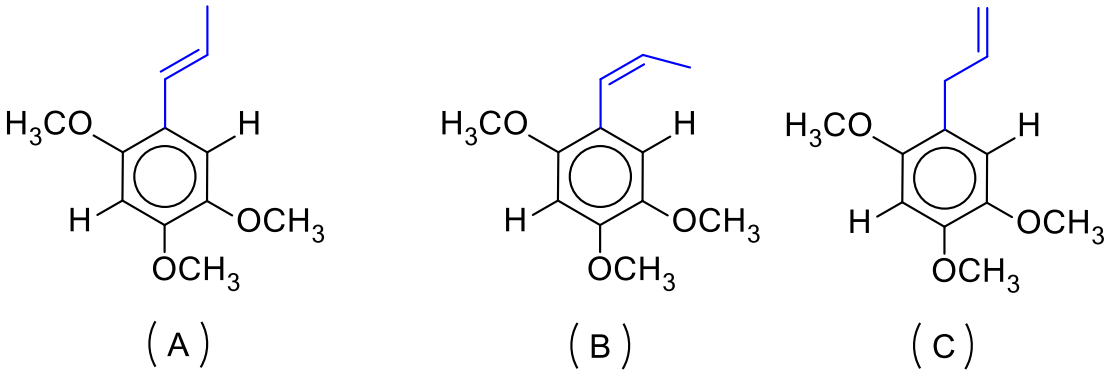
A substância faz parte de uma classe de fenilpropanoides denominada asaronas que por sua vez existem na natureza em suas três formas isoméricas (Figura 38), *α*-asarona (*trans*-2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno), *β*-asarona (*cis*-2,4,5-trimetoxi-1-propenilbenzeno e *γ*-asarona (1-alilo- 2,4,5-trimetoxibenzeno).

FIGURA 37: Estrutura de **S1**, 1-alilo- 2, 4,5-trimetoxibenzeno (γ-asarona).



As *α*-, *β*- e *γ*-asaronas são fenilpropenos que ocorrem naturalmente em diferentes famílias de plantas, principalmente em Aristolochiaceae, Acoraceae e Lauraceae. Embora *α*- e *β*-asarona apresentem potencial no tratamento de diversas doenças, estudos prévios mostraram carcinogenicidade em roedores (duodeno, fígado). No entanto, o mecanismo de ação permaneceu obscuro. Os estudos sobre a mutagenicidade das *α*- e *β*-asaronas propenílicas são inconsistentes e os dados sobre a carcinogenicidade e a genotoxicidade da *γ*-asarona alílica estão completamente ausentes (BERG, 2016).

FIGURA 38: Formas isoméricas (A) *α*-asarona, (B) *β*-asarona, (C) *γ*-asarona.

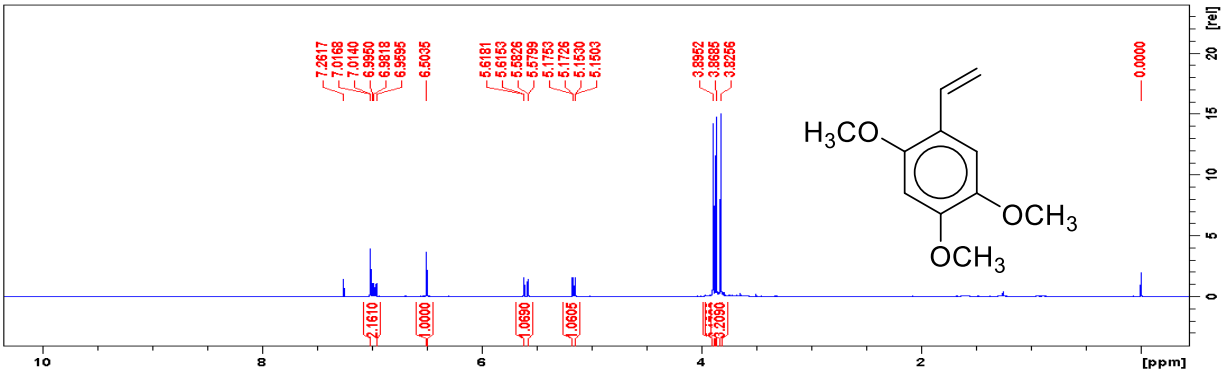


Fonte: PELKONEN, 2017

A substância codificada como S2 (318,0 mg) possui caraterísticas de um sólido amorfo branco, solúvel em $CHCl_3$ com coloração roxa quando revelado com vanilina sulfúrica e teste negativo frente ao reagente de Dragendorff. Semelhante a S1 a estrutura

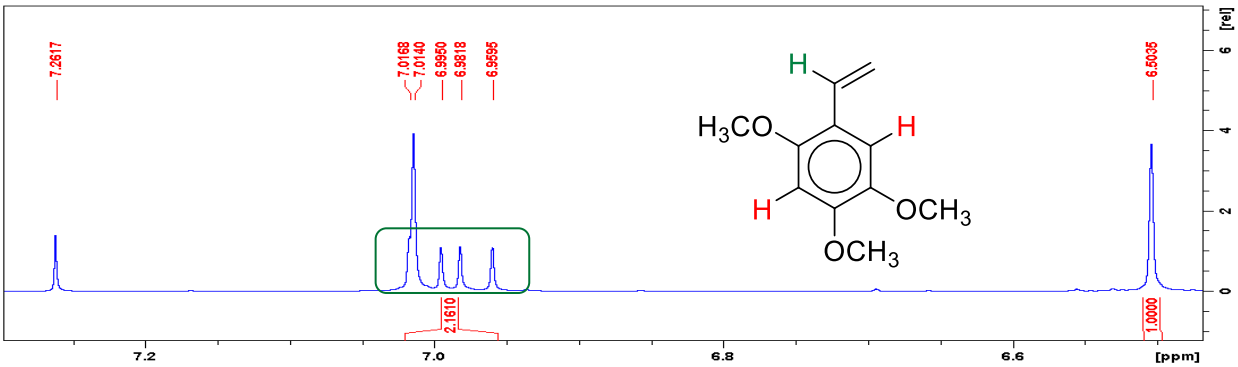
apresentou caracteriticas aromáticas (Figura 39) com observado no espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) com sinais em δ 7,01 (*s*) e 6,51 (*s*) (Figura 40) característicos de hidrogênios aromáticos, em posição *para*, juntamente com três sinais integrando para 3H cada, em δ 3,83 (*s*), δ 3,88 (*s*) e δ 3,90 (*s*), típicos de grupos metoxilas (Figura 41), indicando também uma estrutura tetrassubsituída semelhante a S1.

FIGURA 39: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S2



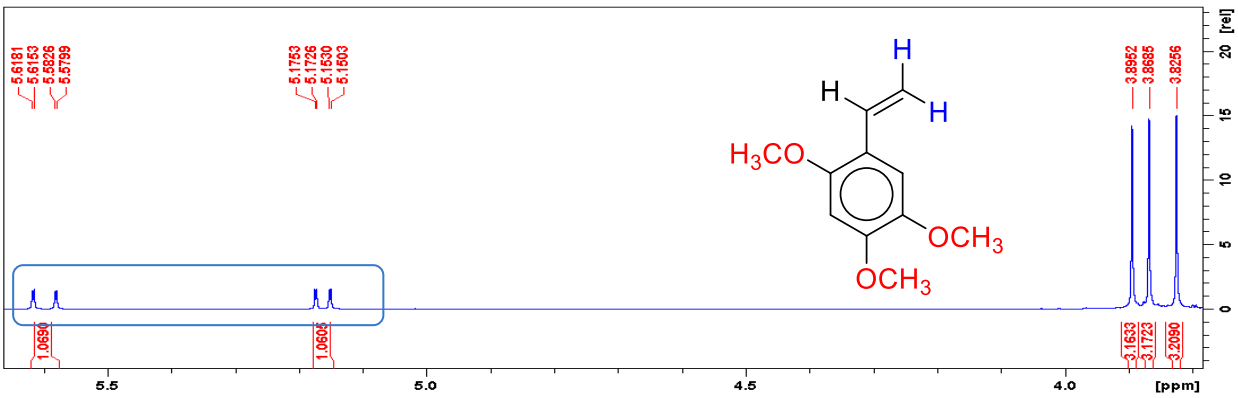
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 40: Região dos hidrogênios aromáticos do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 41: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S2, ampliação da região de 5.61 a 3,82 ppm.

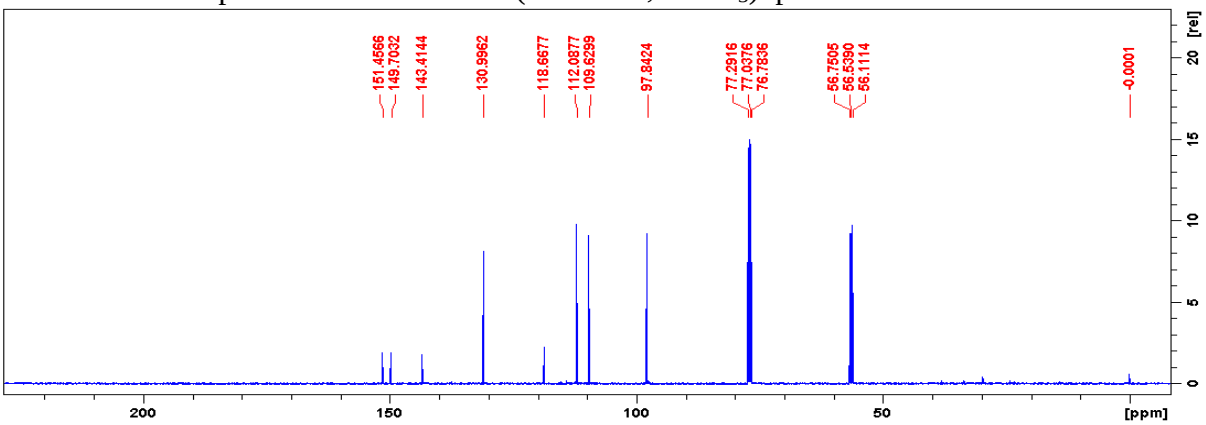


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A ausência do sinal em δ 3,32 demonstra um padrão de substituição em C-1 diferente do grupo alila elucidado em S1 sugerindo que a substância não possua um carbono alifático saturado metilênico (CH_2) atrelado a sua ramificação. O padrão observado nos sinais em δ 5,16 (1H, *dd*, *J* = 11,4 e 1,4 Hz), δ 5,59 (1H, *dd*, *J* = 17,9 e 1,4 Hz) e δ 6,98 (1H, *dd*, *J* = 17,5 e 11,1 Hz) possui constante de acoplamento característicos de uma ramificação contendo o sistema *cis–trans* e germinal.

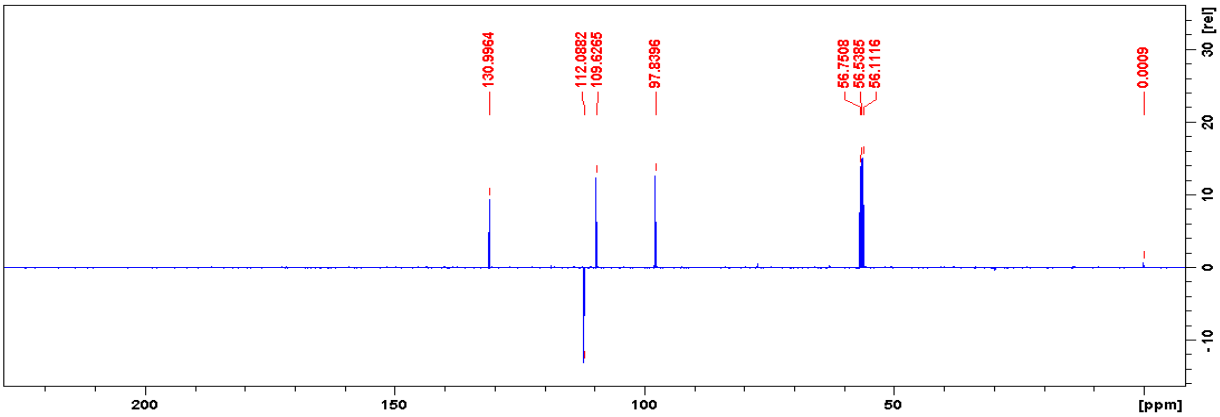
Pela análise do espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° (Figura 42 e 43) foi observado sinais intensos relativos às metoxilas aromáticas com deslocamentos químicos em δ 56,1, δ 56,5 e δ 56,7, além de seis sinais referentes a carbonos aromáticos em δ 97,8, δ 109,5, δ 118,6, δ 143,3, δ 149,6 e δ 151,4, sendo estes três últimos deslocamentos referentes a carbonos aromáticos ligados diretamente a metoxilas, com os sinais em δ 131,0 (CH) e 112,0 (CH_2) confirmando a ramificação olefinica referente ao sistema *cis–trans* e germinal.

FIGURA 42: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) para substância S2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

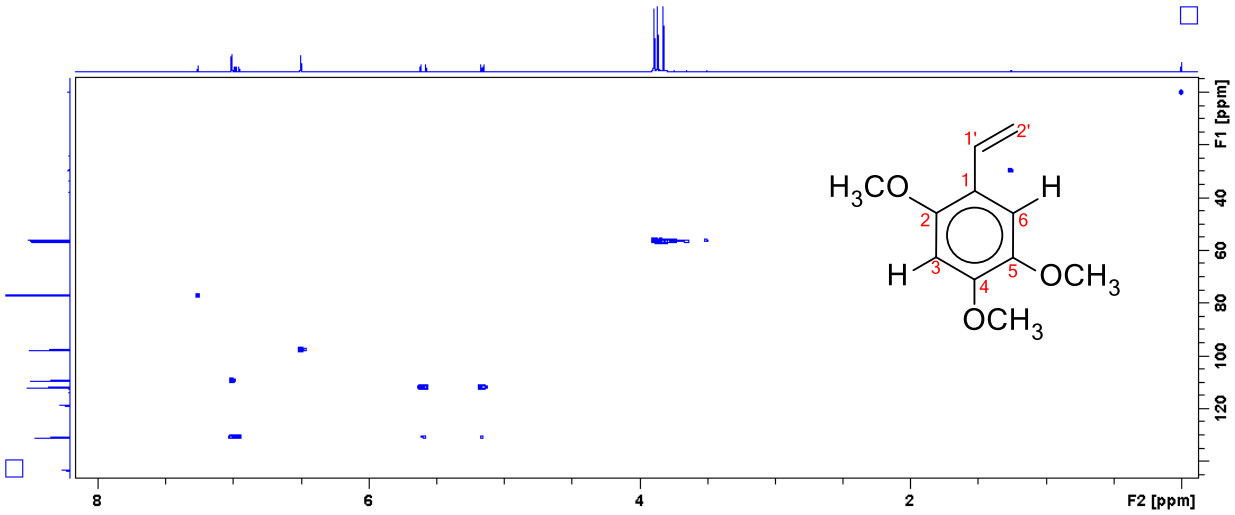
FIGURA 43: Espectro de RMN de DEPT 135° (125 MHz, $CDCl_3$) para substância S2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

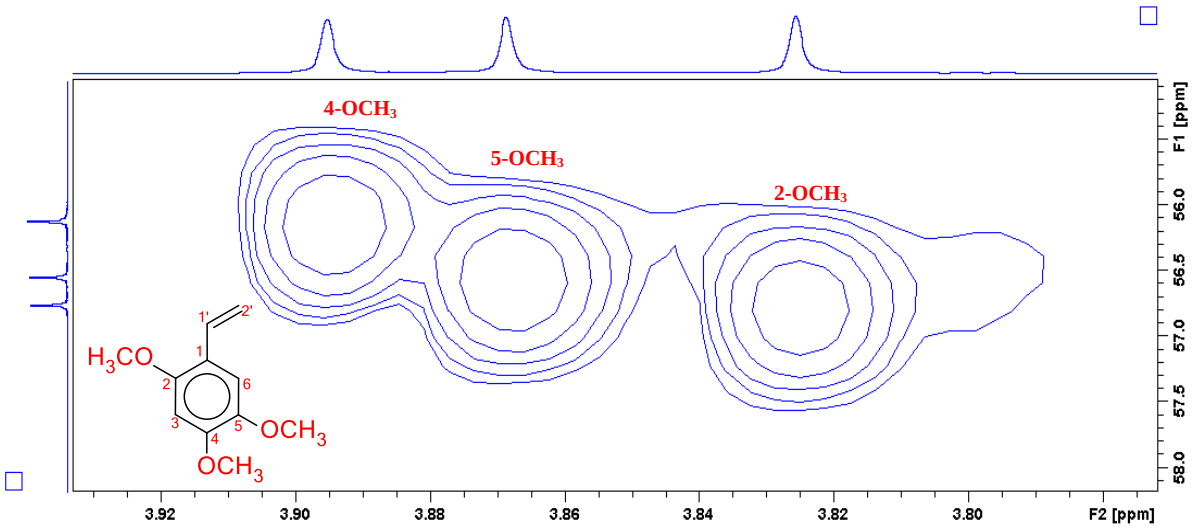
A correlação direta a (J^1) de cada carbono com seu respectivo hidrogênio foi confirmada pelo experimento HSCQ (Figura 44) onde foi possível observar a correlação direta dos sinais dos carbonos em δ 56,7, δ 56,5 e δ 56,1 com os hidrogênios em δ 3,83, δ 3,88 e δ 3,90, respectivamente, confirmando a presença de grupos metoxilas já observada no espectro de RMN de ^{1}H(Figura 45).

FIGURA 44: Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 45: Ampliação do Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2 na região das metoxilas.

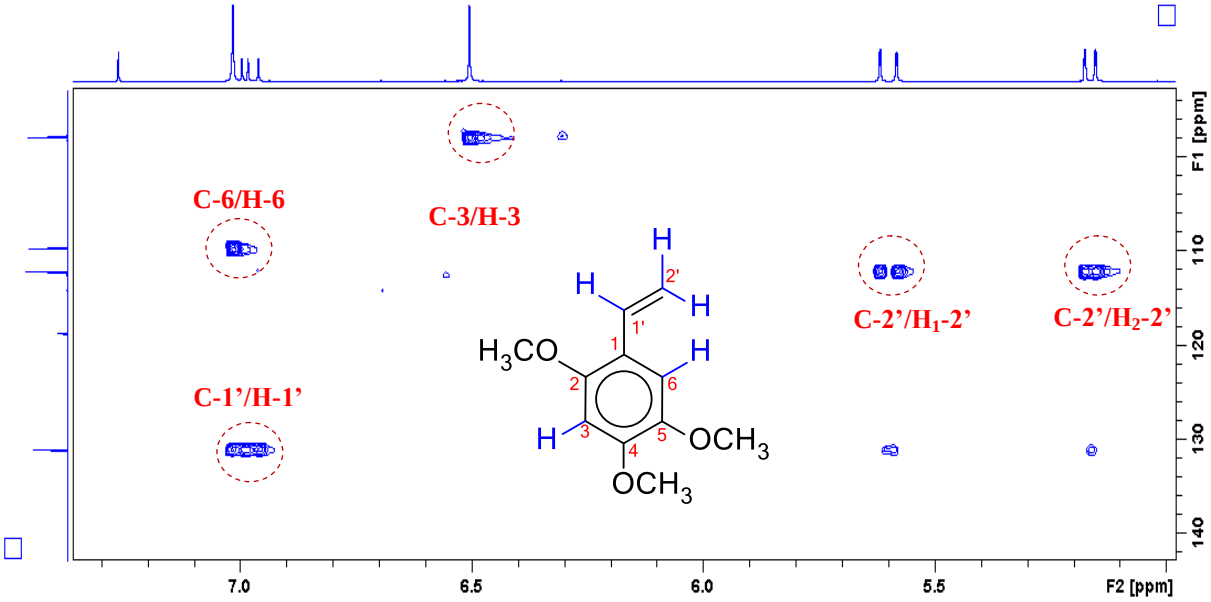


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Verificou-se que o sinal do carbono em δ 112,0 correlaciona-se diretamente (J^1) com os sinais dos hidrogênios em δ 5,16 e 5,59, indicando um grupo CH_2 de carbono sp^2, enquanto

os sinais dos carbonos em δ 131,0 e 109,6 apresentaram correlação a J^1 com os sinais dos hidrogênios em δ 6,98 e 7,01, respectivamente conforme figura 46.

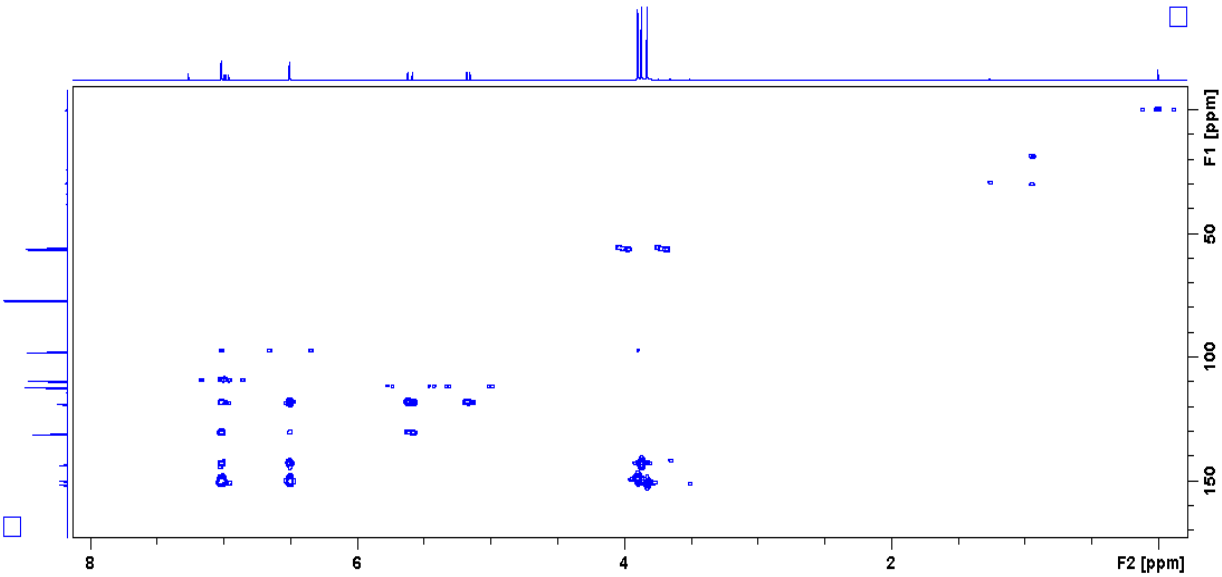
FIGURA 46: Ampliação do Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

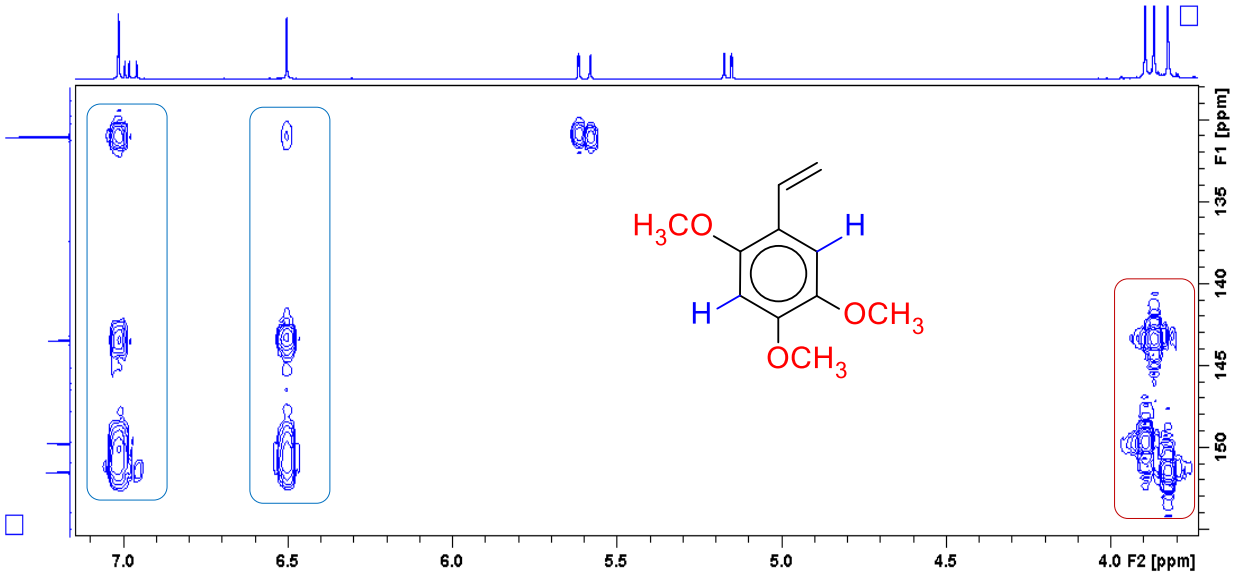
Pela análise do mapa de correlação HMBC (Figura 47) observou-se que os hidrogênios metílicos em δ 3,83, δ 3,90 e δ 3,88 correlacionam-se, respectivamente, a J^3 com os carbonos em δ 151,4, δ 149,7 e δ 143,4.

FIGURA 47: Mapa de correção HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2.



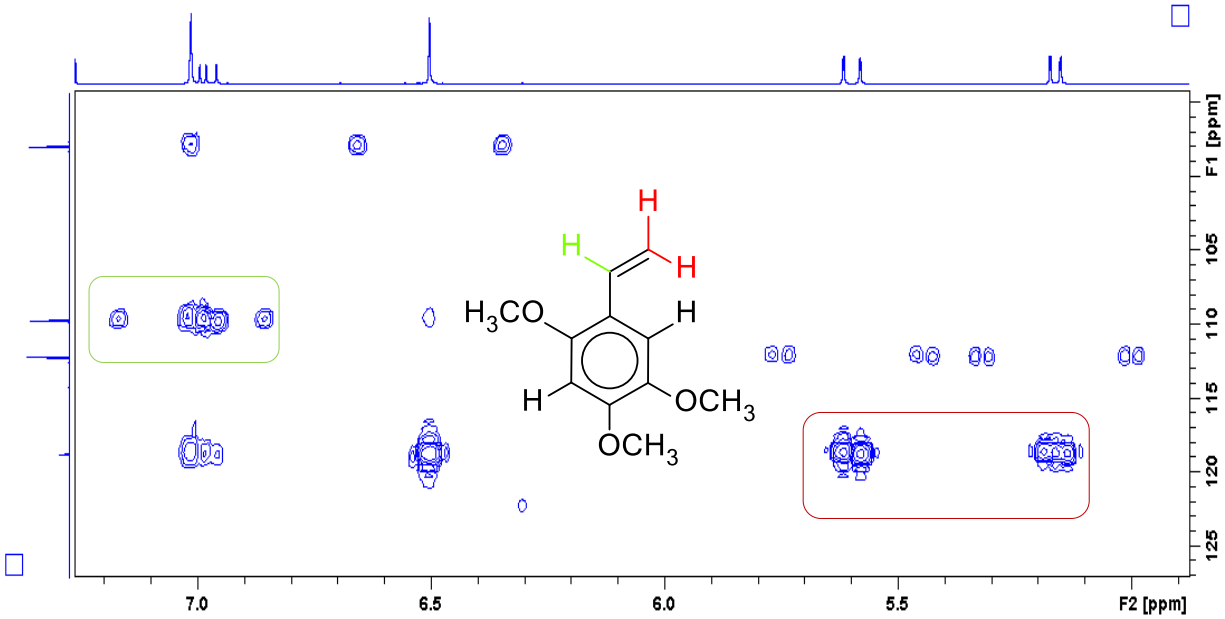
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 48: Ampliação da região metoxilica e aromática no Mapa de correção HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 49: Região dos Hidrogênios alifáticos no Mapa de correção HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S2



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Observou-se ainda que o hidrogênio em δ 6,51 (C-3) correlacionava-se a J^2 com os sinais dos carbonos em δ 149,7 (C-4) e δ 143,4 (C-2) e a J^3 com os sinais em δ 151,4(C-5) e δ 118,6 (C-1), notando-se ainda uma correlação a J^4 com o carbono em δ 131,0 (C-7).

Para o sinal do hidrogênio em δ 7,01 (C-6) verificou-se correlação a J^2 com os sinais dos carbonos em δ 118,6 (C-1) e δ 151,4 (C-2) e a J^3 com os sinais dos carbonos em δ 131,0 (C-1'), 143,4 (C-5) e 149,7 (C-4), assim como uma correlação a J^4 com o sinal do carbono em δ 97,8 (C-3), as demais correlações estão apresentadas na tabela 15.

TABELA 15: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S2.

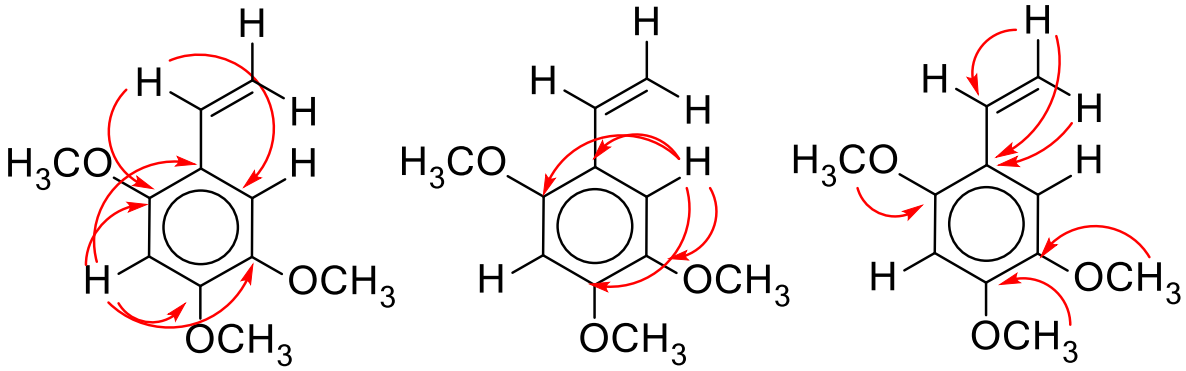
Posição	S2			2,4,5-trimetoxi-estireno [c]	
	^{1}H δ (mult., *J* em Hz)[a]	**^{13}C (δ)**	**HMBC (^{1}H-^{13}C)[b]**	**^{1}H[d] δ (mult., *J* em Hz)[d]**	**^{13}C (δ)**
1	-	118,6 C		-	119,3
2	-	151,4 C		-	152,1
3	6,50 (1H, *s*)	97,8 CH	1,2,4,5,7	6,24 (1H, *s*)	98,9
4	-	149,7 C		-	151,0
5	-	143,4 C		-	144,7
6	7,01 (1H, *s*)	109,6 C	1,3,4,5,6,7	7,10 (1H, *s*)	111,4
1'	6,98 (1H, *dd*,17,7 e 11,1)	131,0 C	1,6	7,36 (1H, *dd*, 17.9, 11.3)	131,8
2'cis	5,16 (1H, *dd*,11,1 e 1,4)	112,0 CH_2	1 (5,16) 1,7 (5,59)	5,20(1H, *dd*, 11.3, 1.6)	111,8
2'trans	5,59 (1H, *dd*,17,7 e 1,4			5,68 (1H, *dd*, 17.9, 1.4)	
2-OCH_3	3,82 (3H, *s*)	56,7 C	2	3,32 (3H, *s*, **2-OCH_3**),	56,0
4-OCH_3	3,89 (3H, *s*)	56,1 C	4	3,39 (3H, *s*, **4-OCH_3**)	55,8
5-OCH_3	3,86 (3H, *s*)	56,5 C	5	3.45 (3H, *s*, **5-OCH_3**)	56,5

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Experimento realizado a 500 MHz para 1H e 125 MHz para 13C em $CDCl_3$, utilizando o TMS como padrão interno; [b]Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios ;[c]NAGASHIMA *et al*,1999; [d] ^{1}H NMR(C_6D_6) e ^{13}C NMR(C_6D_6)

Pela ampliação do mapa de correlação HMBC (Figura 49) da região olefínica verificou-se que o hidrogênio identificado como $H_{2'trans}$ em δ 5,59 correlaciona-se a J^2 com o sinal do carbono em δ 131,0 (C-1') e a J^3 com o sinal em δ 118,6 (C-1); o hidrogênio nomeado como $H_{2'cis}$ em δ 5,16 correlaciona-se a J^3 com o sinal em δ 118,6 (C-1); e o hidrogênio em δ 6,98 correlaciona-se a J^2 com o sinal em δ 118,6 (C-1) e a J^3 com os sinais em δ 109,0 (C-6) e 143,4 (C-5) demais correlações são mostradas na figura 50.

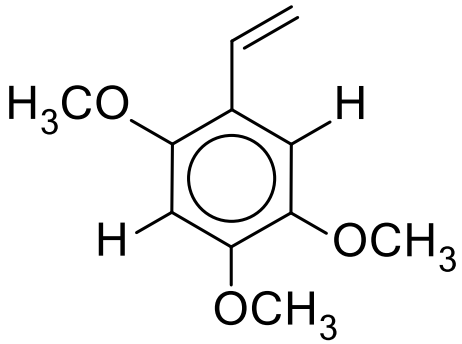
FIGURA 50: Correlações observadas no mapa HMBC (^{1}H: 500 MHz;^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) da substância S2



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os dados fornecidos pelas análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D/2D, e comparação com os dados descrito na literatura permitiu-nos concluir que a substâncias S2 trata-se da substância 2,4,5-trimetoxi-estireno (Figura 39). Essa substância foi descrita no gênero *Duguetia* particularmente em *D. furfuracea*, *D. eximia* e *D. panamensis*, (SILVA, 2007; NAGASHIMA *et al.*, 1999; WATERMAN, 1967 porém é descrita pela primeira vez em *D. pycnastera*.

FIGURA 51: Estrutura da substância S2 (2,4,5-trimetoxi-estireno)

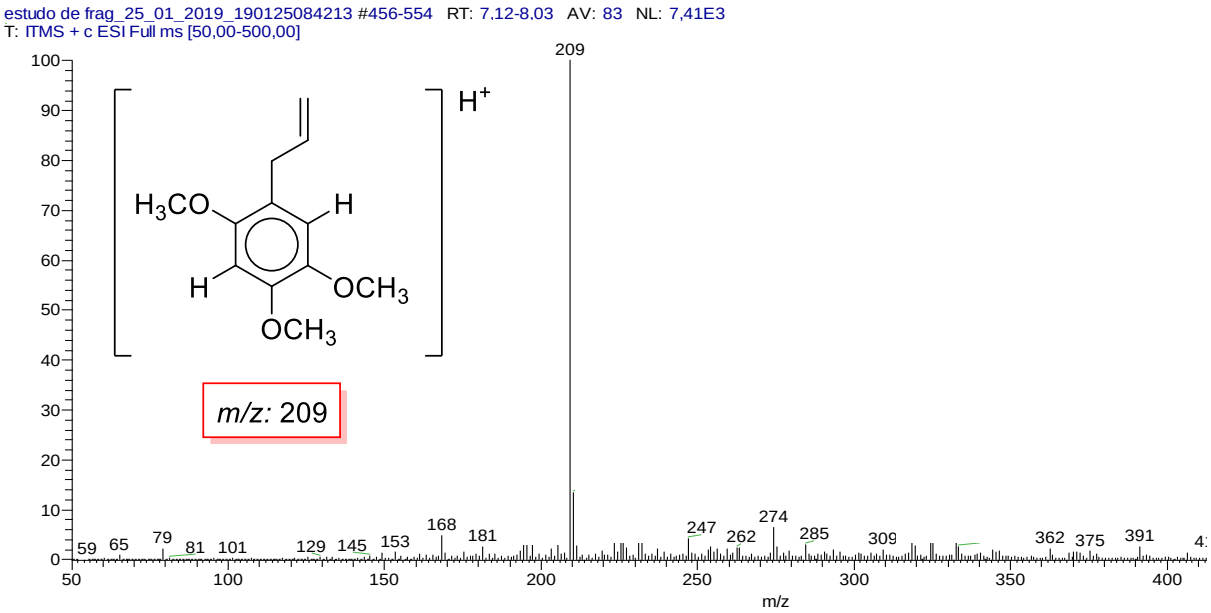


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

As substâncias S1 e S2 foram submetidas á analise espectrométrica por ionização em electrospray (EM-ESI) operando no modo positivo de aquisição (ESI^{+}) onde foram evidenciados íons moleculares protonados em *m/z* 209 $[M+H]^{+}$ (Figura 51) para S1 e *m/z* 195 $[M+H]^{+}$ (Figura 52) para S2.

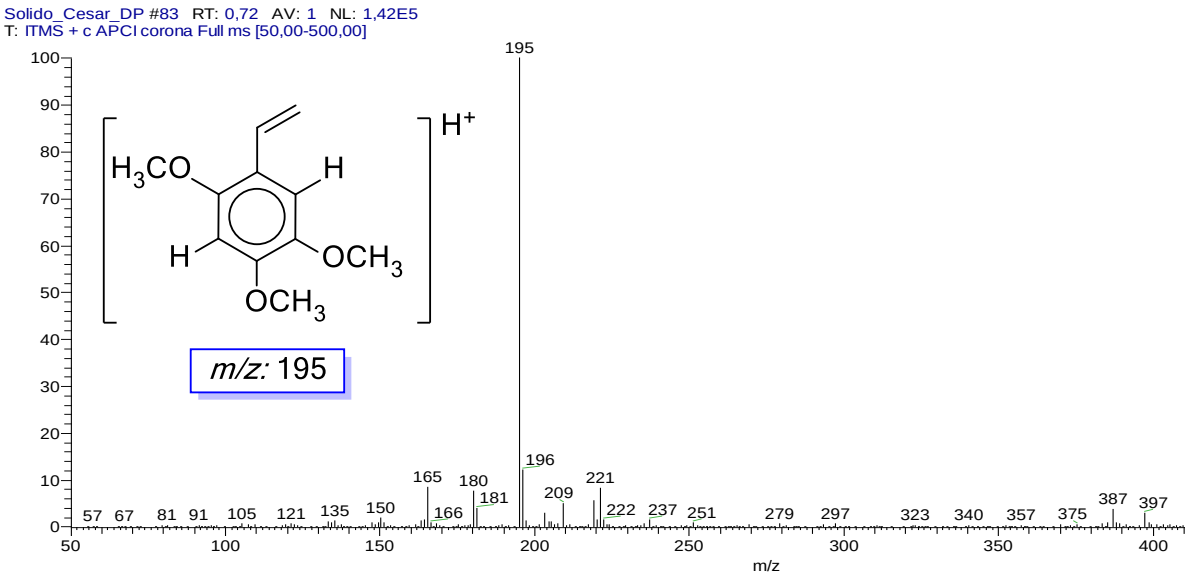
As substâncias S1 e S2 foram submetidas à fragmentação sequencial em espectrofotômetro de Massas utilizando-se uma energia de 20 a 30eV, sendo cada fragmento posteriormente fragmentado novamente mediante a analise das perdas observadas em cada etapa do processo, a analise permitiu quebras em MS^{4} para ambas as moléculas.

FIGURA 52: Espectro de massas da substância S1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

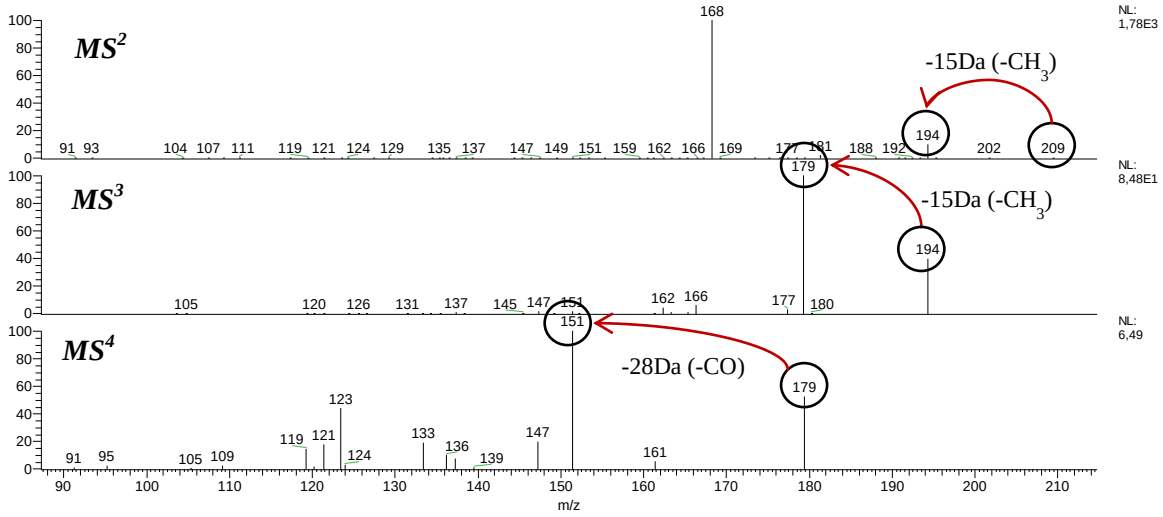
FIGURA 53: Espectro de massas da substância S2.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

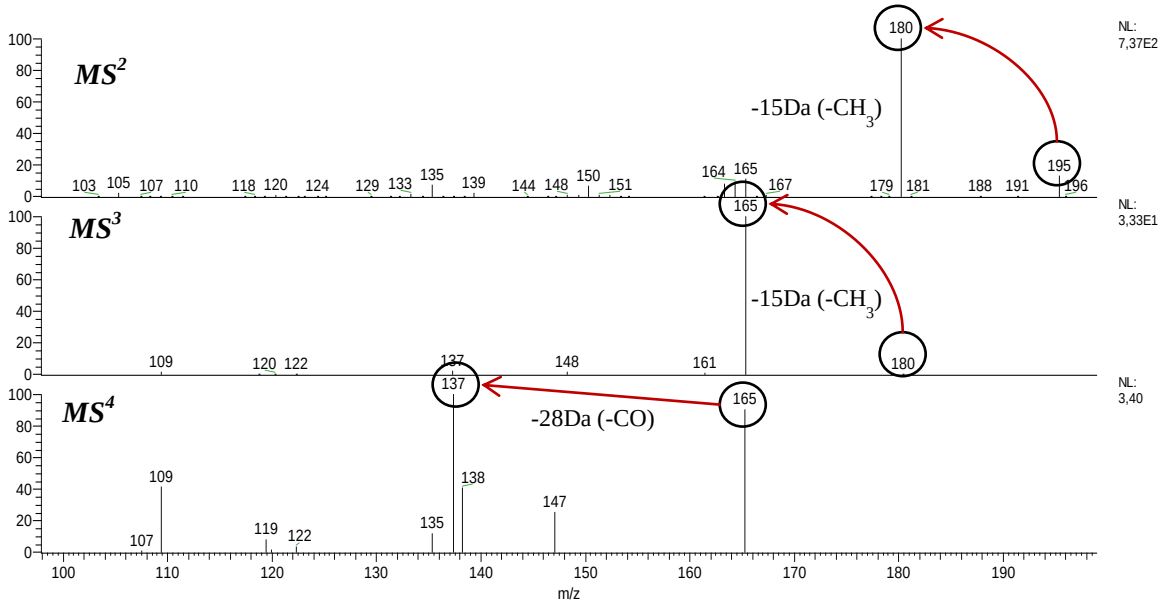
O estudo da fragmentação dos íons moleculares protonados em *m/z* 195 e 209 através do espectro em MS^n (Figuras 54 e 55) demonstrou que ambas as moléculas apresentaram um padrão de fragmentação similar com perda inicial de –15 Da, que sugere a saída de um grupo $-CH_3$, seguida de duas perdas consecutivas de –15 (CH_3) e –28 Da(CO), conforme estruturado a partir do espectro de ^1H RMN e ^{13}C a fragmentação confirmou a presença dos grupos meto-xilicos, esse padrão característicos, também denota a similaridade entre as substâncias visto que as substituições no anel aromático de ambas estão nas mesmas posições.

FIGURA 54: Espectro de fragmentação em MS^4 da substância S1.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 55: Espectro de fragmentação em MS^4 da substância S2



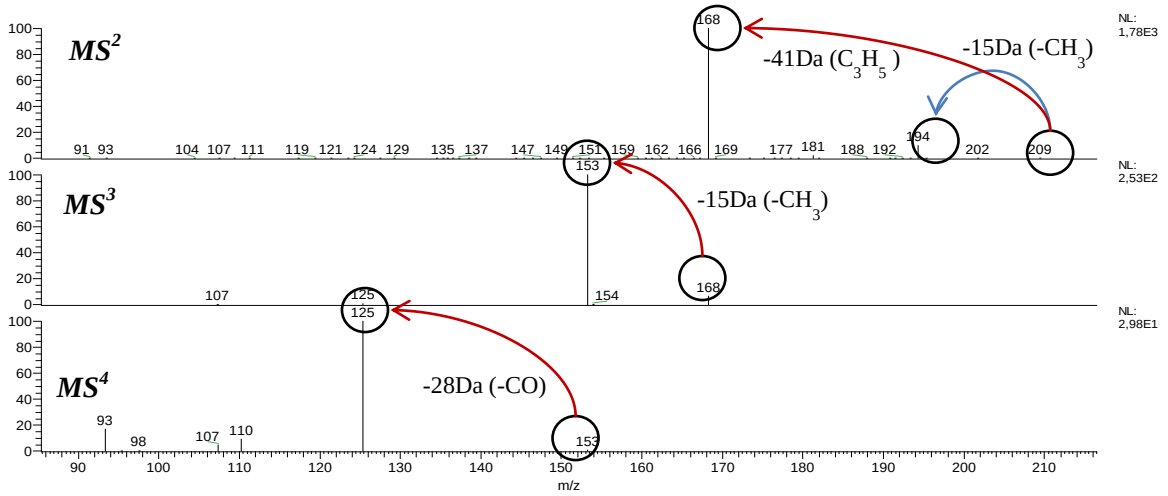
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Embora ambas as substâncias possuam padrões similares, foi possível observar que o íon molecular protonado em *m/z* 209 (Figura 56) revelou dois padrões de fragmentação competitiva em MS^2 gerando os íons *m/z* 194 e 168 (perdas -15 e -41 Da). A perda menor já foi demonstrada como a saída de um grupo metílico, no entanto a saída do grupo -41Da sugere a quebra da ramificação em C-1, o que é condizente com a massa do grupo C_3H_5 ($CH_2CH{=}CH_2$).

Prosseguindo com o processo em MS/MS o íon em *m/z* 168 foi fragmentado onde se observou uma perda de –15 Da gerando o *m/z* 153 que, por conseguinte foi fragmentado

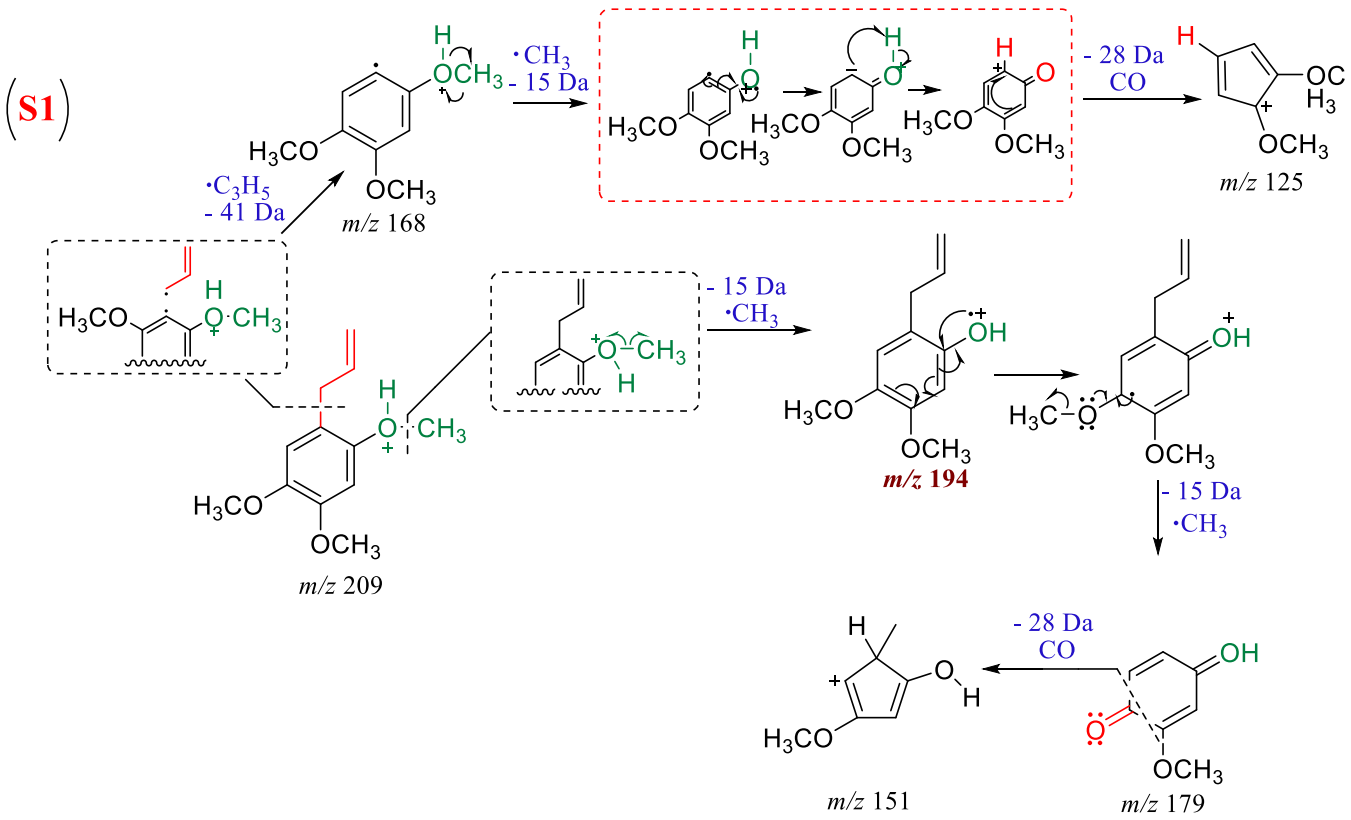
sofrendo uma perda de −28 Da sugerindo a saída de um grupo CO o que sugere um caminho diferente de fragmentação para substância S1 conforme figura 57.

FIGURA 56: Espectro de fragmentação em MS^4 da substância S1 a partir do íon *m/z* 168.



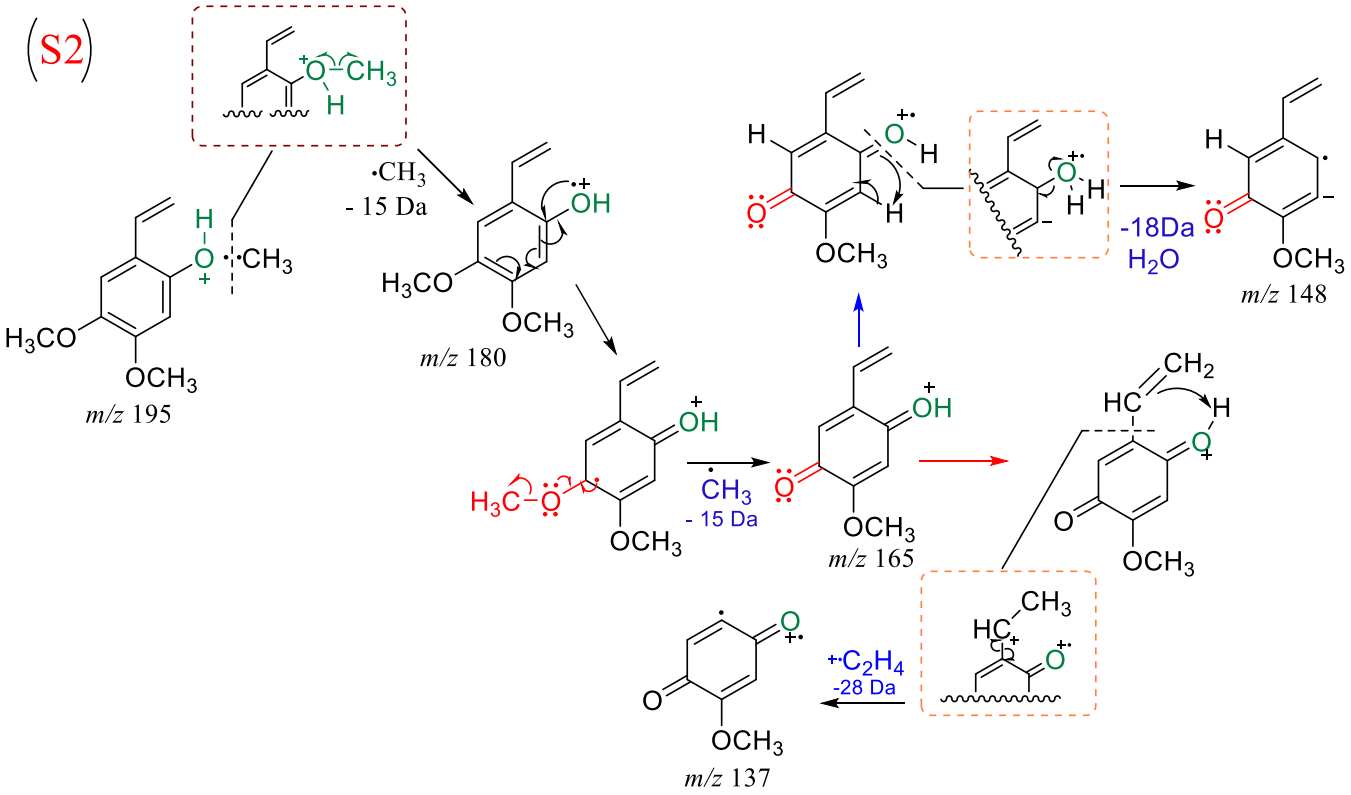
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 57: Proposta de Fragmentação para S1: 1-alilo- 2,4,5-trimetoxibenzeno (γ-asarona).



Fonte: Adaptado de STÉVIGNY, 2004

FIGURA 58: Proposta de fragmentação de S2 (2,4,5-trimetoxi-estireno)



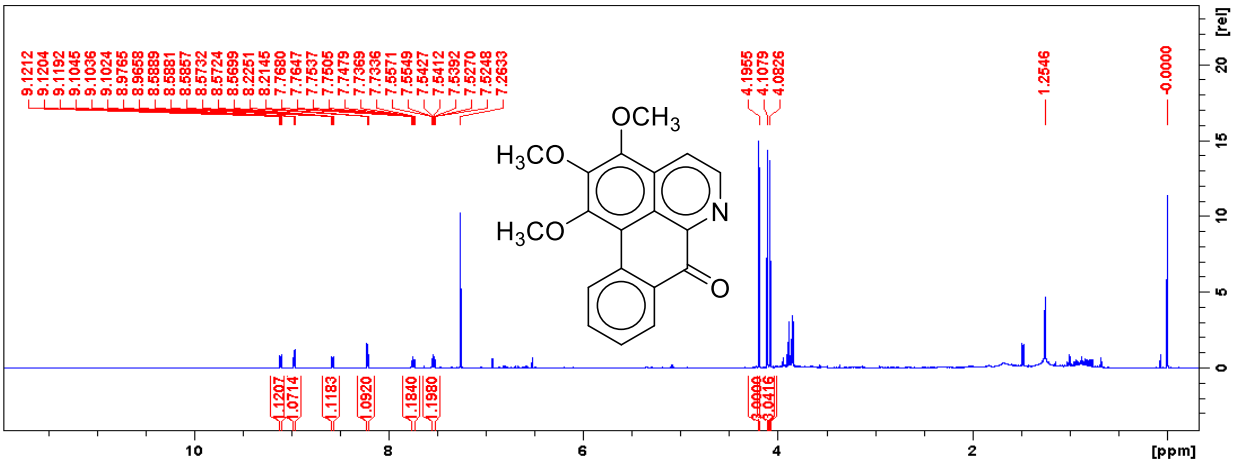
Fonte: Adaptado de STÉVIGNY, 2004.

5.3.2. Determinação estrutural das substâncias codificadas como S3 e S4

A substância codificada como S3 (5,8 mg) apresentou-se como sólido amorfo alaranjado, com teste positivo frente ao reagente de Dragendorff, indicativo da presença de nitrogênio na molécula. A partir da análise do espectro de RMN de ^{1}H (500M Hz, $CDCl_3$)(Figura 59) foi observado a presença de três simpletos em δ 4,19, 4,10 e 4,08 todos integrando para 3H, característicos de grupos metoxílicos (Figura 60).

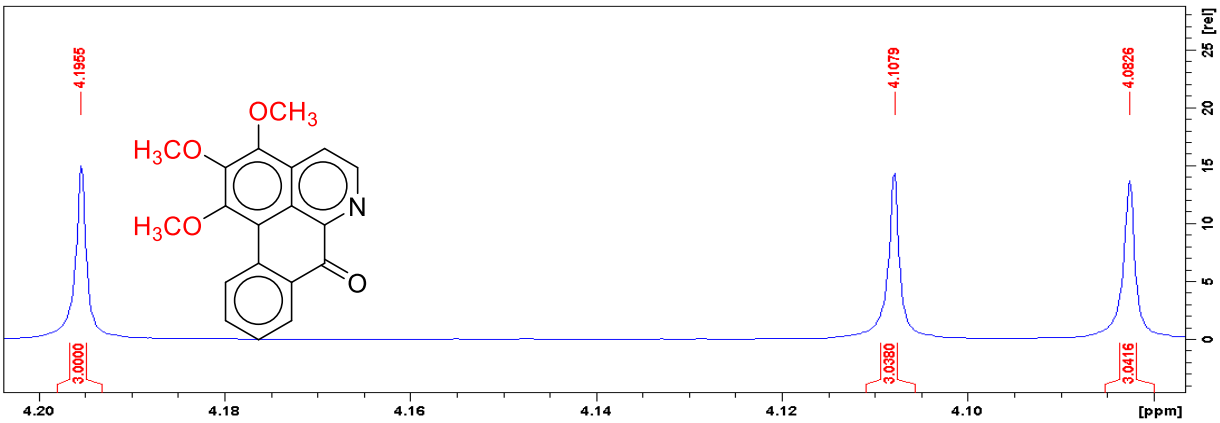
Observou-se também dois sinais em δ 8,22 (1H, *d*, *J* = 5,2 Hz) e 8,97 (1H, *d*, *J* = 5,2 Hz) característicos de hidrogênios do núcleo piridínico, juntamente com a presença de quatro sinais de natureza aromáticas em δ 8,58 (1H, *dd*, *J* = 7,5 e 1,5 Hz), δ 7,54 (1H, *ddd*, *J* = 8,0, 7,1 e 1,1 Hz), δ 7,75(1H, *ddd*, *J* = 8,5, 7,1 e 1,5) e δ 9,12 (1H, *dd*, 8,5 e 0,6 Hz) típicos dos hidrogênios do anel D não substituído (Figuras 61).

FIGURA 59: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S3.



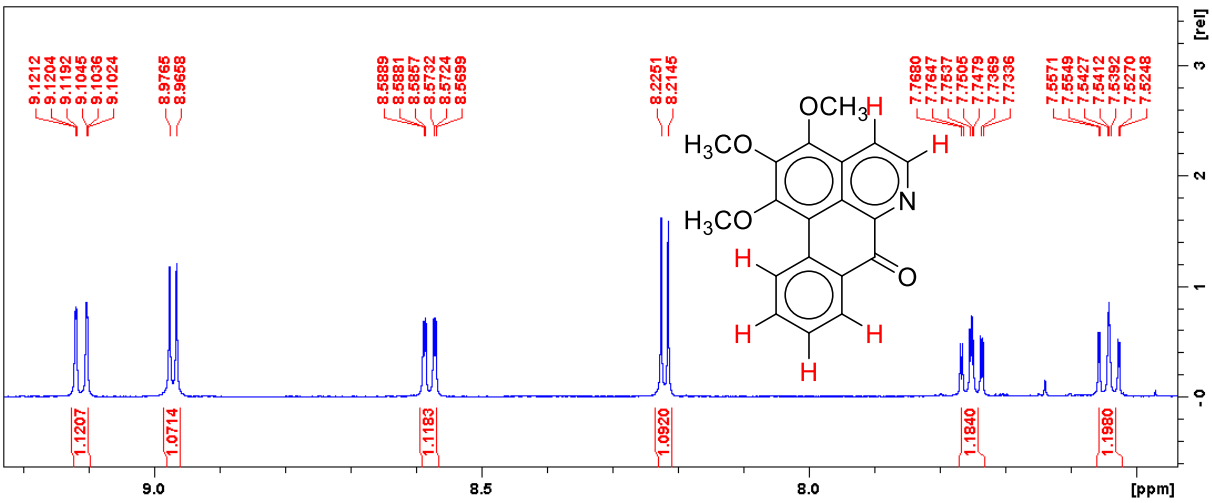
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 60: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) na região (δ4.20 – 4.08) de S3.



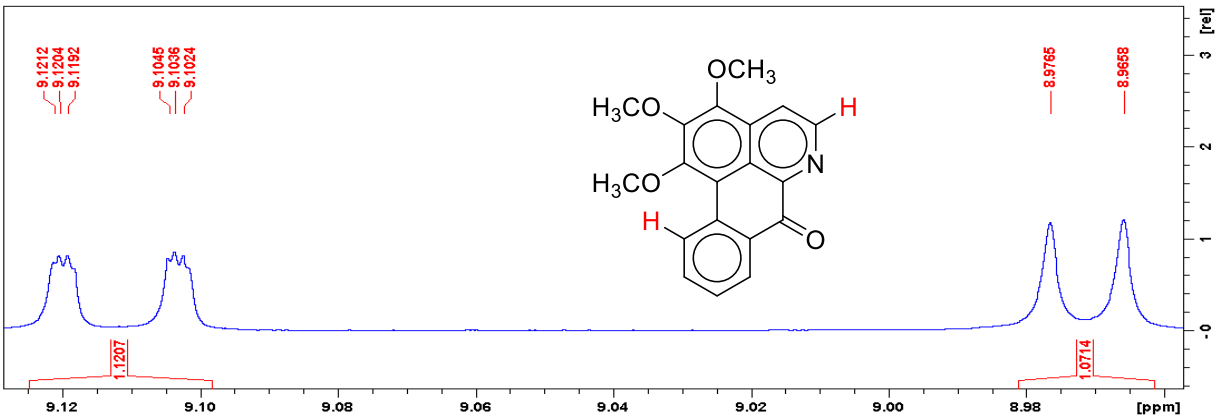
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 61: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) na região(δ 9.12 – 7.52) de S3



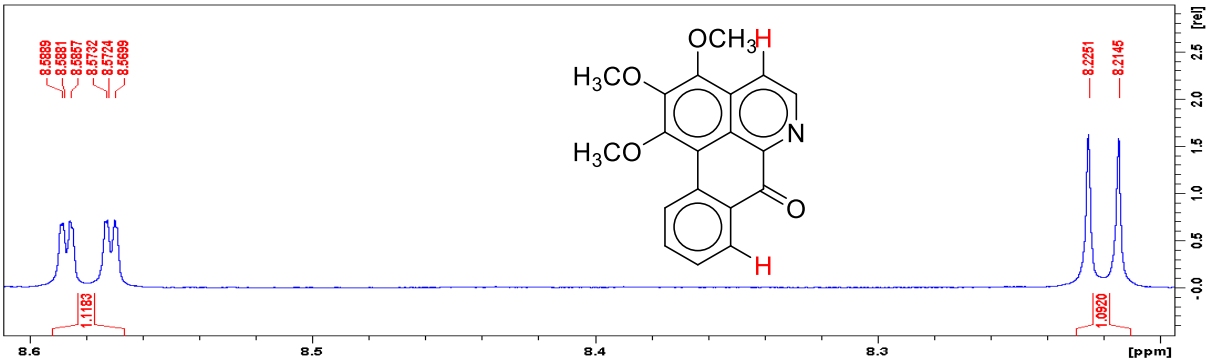
Fonte: Dados da pesquisa, 2020

FIGURA 62: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H na região(δ 9.12 – 8.96) de S3



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

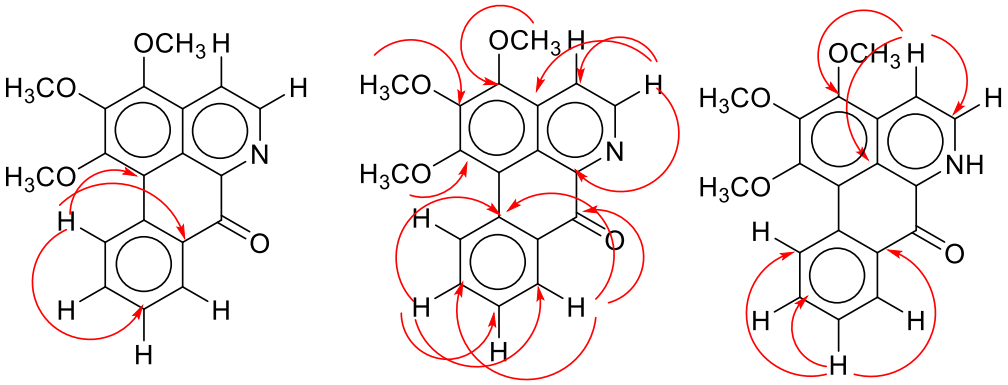
FIGURA 63: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H na região (δ 9.12 – 8.96) de S3



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Na tabela 16 são apresentados os corretos valores de RMN de ^{1}H e ^{13}C de S3 atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC (**Apêndice**), e comparações com os dados da literatura (COSTA *et al.*, 2011), elucidando-o como sendo o alcaloide oxoaporfínico conhecido como *O*-metilmoschatolina (Figura 65) encontrando também com frequência em espécies da família Anonnaceae sendo descrita pela primeira vez em *D. pycnastera.*

FIGURA 64: Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC de **S3**.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

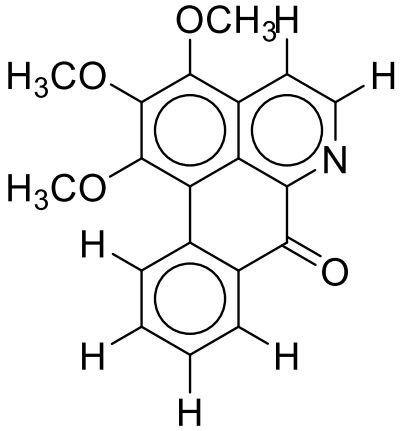
TABELA 16: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S3.

Posição	S3			*O*-Metilmoschatolina	
	$^{1}H^{a}$ δ (mult., *J* em Hz)^{a}	^{13}C (δ)^{a}	HMBC^{b} (^{1}H-^{13}C)^{c}	$^{1}H^{c,d}$ δ (mult., *J* em Hz)^{d}	^{13}C (δ)^{c,d}
1	-	156,4 C	-	-	156,4
1a		115,7 C	-	-	115,6
2	-	147,3 C	-	-	147,3
3		148,4 C	-	-	148,4
3a	-	131,0 C	-	-	131,1
3b	-	122,8 C	-	-	122,8
4	8,22 (1H, *d*, 5,2)	119,1 CH	3,3b e 5	8,24 (1H, *d*, 5,3)	119,1
5	8,97 (1H, *d*, 5,2)	144,6 CH	3a,4 e 6a	9,00 (1H, *d*, 5,3)	144,5
6a	-	145,5 C	-	-	145,4
7	-	182,6 C	-	-	182,6
7a	-	131,5 C	-	-	131,4
8	8,58 (1H, *dd*, 7,6 e 1,5)	128,9 C	7,10 e 11a	8,57 (1H, *dd*, 7,9 e 1,4)	128,9
9	7,54 (1H, *ddd*, 8,0, 7,1 e 1,1)	128,1 C	7a, 10 e 11	7,54 (1H, *ddd*, 7,9, 7,2 e 1,1)	128,1
10	7,75 (1H, *ddd*, 8,5, 7,1 e 1,5)	134,3 C	8,9 e 11a	7,75 (1H, *ddd*, 8,4, 7,2 e 1,5)	134,3
11	9,12 (1H, *dd*, 8,5 e 0,6)	127,6 C	1a,7a e 9	9,11 (1H, *ddd*, 8,4, 1,1 e 0,6)	127,6
11a	-	134,5 C	-	-	134,5
1-OCH_3	4,08 (3H, *s*)	60,9 C	1	4,08 (3H, s)	61,0
2-OCH_3	4,113H, *s*)	61,4 C	2	4,11 (3H, s)	61,4
3-OCH_3	4,20 (3H, *s*)	61,8 C	3	4,20 (3H, s)	61,8

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

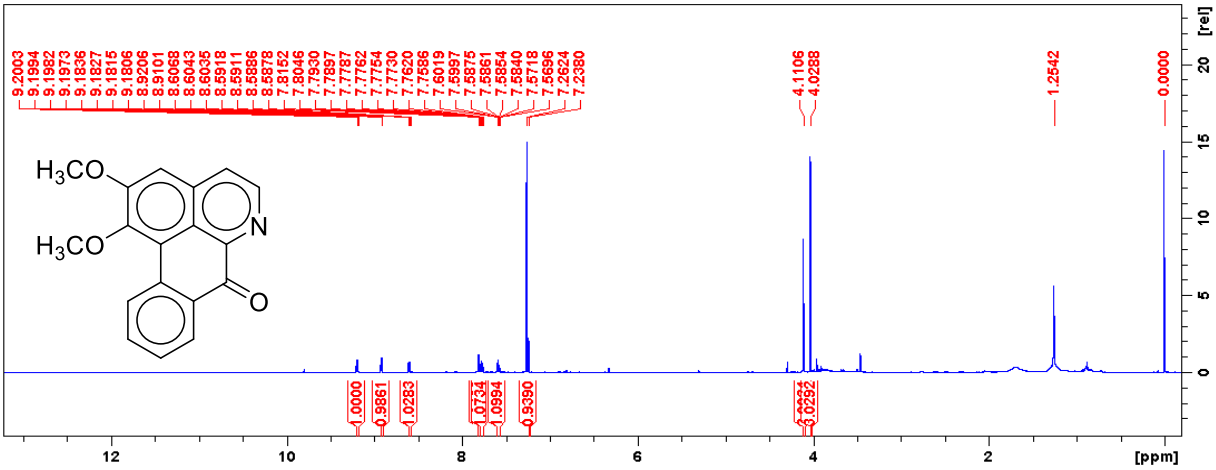
[a] Experimento realizado a 500 MHz para RMN de ^{1}H e 125 MHz para RMN de ^{13}C com $CDCl_3$ utilizado como solvente e TMS como padrão interno.[b] Correlação direta dos carbonos com seus respectivos hidrogênios. [c] COSTA *et al*. (2011). [d] Experimento realizado a 400 MHz para RMN de ^{1}H e 100 MHz para RMN de ^{13}C utilizando o TMS como padrão interno e $CDCl_3$ como solvente.

FIGURA 65: Estrutura da substância **S3** (*O*-metilmoschatolina).



A substância S4 apresenta características de sólido amarelado em forma de agulhas, teste positivo para alcaloides frente ao reagente de Dragendorff. A partir da análise do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) (Figura 66) observou-se características de um alcaloide do tipo oxoaporfínico dissubstituído.

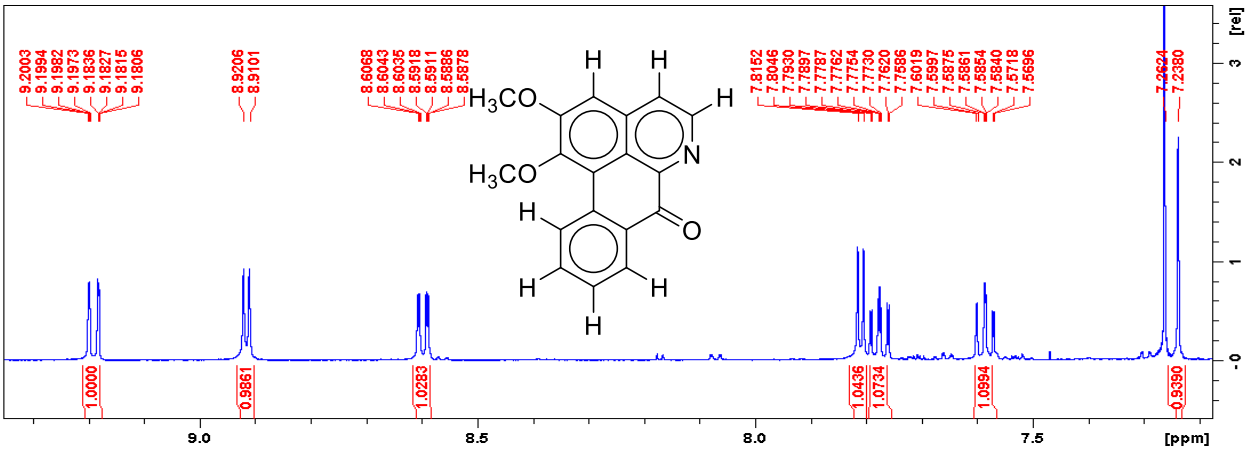
FIGURA 66: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

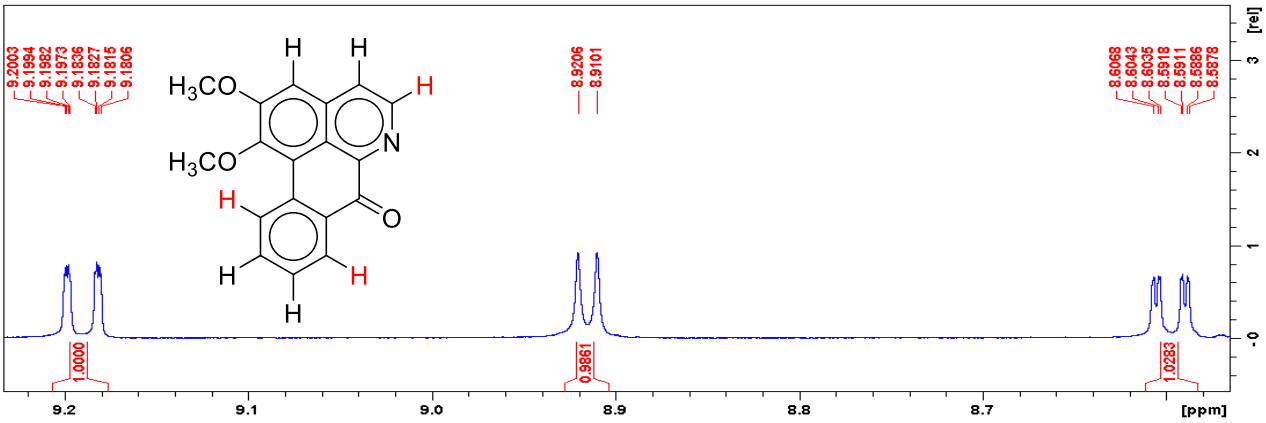
Verificou-se a presença de sete sinais aromáticos (Figura 67) com integração para sete (7) hidrogênios aromáticos, sendo quatro em δ 9,20 (1H, *dd*, *J* = 8,5 e 0,6 Hz),), δ 8,60 (1H, *dd*, *J* = 7,6 e 1,5), δ 7,78(1H, *ddd*, *J* = 8,4, 7,0 e 1,7 Hz)e δ 7,59 (1H, *ddd*, *J* = 8,0, 7,1 e 1,1), atribuídos a H- 11, H-8, H-10 e H-9, respectivamente, típicos dos hidrogênios aromáticos do anel D não substituído, e um em δ 7,24 (1H, *s*) típico de H-3 do anel A do sistema oxo-aporfínico dissubstituído. Os dois sinais restantes observados em δ 8,92 e δ 7,81 ambos dubletos (*J* = 5,2 Hz) mostraram características de um sistema piridínico compatível com o anel B do sistema oxoaporfíno, referentes aos hidrogênios H-5 e H-4, respectivamente (CHANG e*t al*., 2000).

FIGURA 67: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4, região de (δ7,23 a 9,20 ppm).



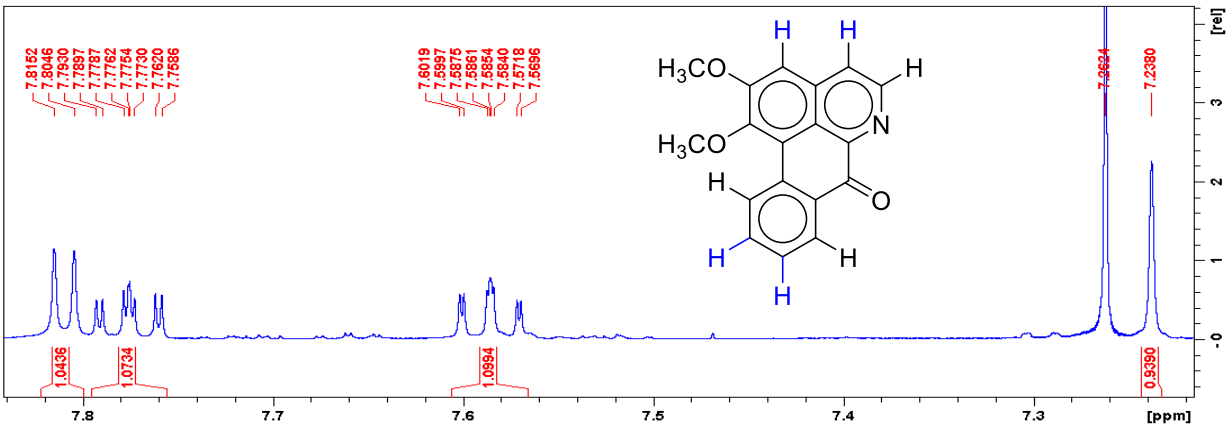
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 68: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4, região de (δ8,58 a 9,20 ppm).



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

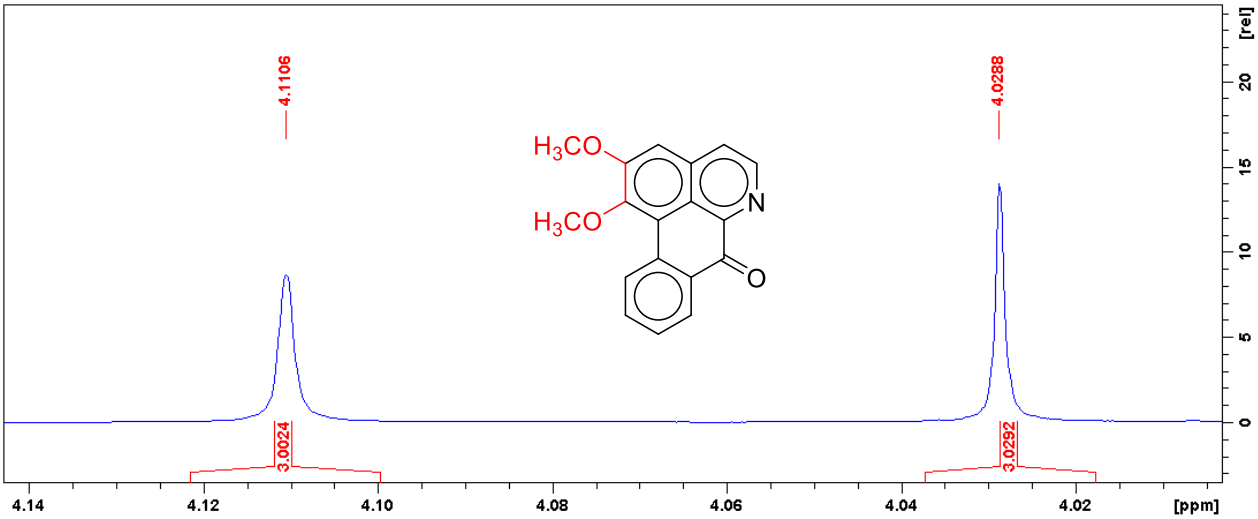
FIGURA 69: Ampliação do espectro de RMN de 1H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4, região de (δ7.23 a 7.81 ppm).



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Observou-se ainda dois sinais em δ 4,03 (3H,*s*) e δ 4,11 (3H,*s*) ambos os simpletos com integração para três hidrogênios (3H) referente aos grupos metoxílicos substituídos em C-1 e C-2, respectivamente do anel A do sistema oxoaporfíno conforme observado na figura 52.

FIGURA 70: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S4 região δ 4,11 a 4,02



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Pela análise dos espectros de RMN de ^{13}C (100 MHz, $CDCl_3$) , HSQC e HMBC (**Apêndices**) observou-se a presença de 18 carbonos sendo 15 aromáticos entre δ 156,9 e δ 106,4, um carbonílico em δ 182,6 (C-7) e dois metoxílicos em δ 60,6 (1-OCH_3) e δ 56,2 (2-OCH_3), consistente com a estrutura oxoaporfina.

Pelo mapa de contorno HBMC pôde-se confirmar a presença do grupo carbonílico na molécula devido à correlação do sinal em δ 8,58 (H-8) a J^3 com o sinal do carbono em δ 182,6 (C-7), bem como a correta localização do sinal de H-3 (δ 7,23) devido sua correlação a J^3 com o sinal do carbono em δ 123,6 (C-4).

Ainda pelo mapa de contorno HMBC pode-se determinar os corretos valores de C-1 e C-2 devido à correlação a J^3 do sinal em δ 7,23 (H-3) com o sinal do carbono em δ 152,1 (C-1) onde está localizado o grupo metoxílico em δ 4,02 (1-OCH3) e a J^2 com o sinal do carbono em δ 156,9 substituído pelo grupo metoxílico em δ 4,10 (2-OCH3), respectivamente (Figura 53, Tabela 17).

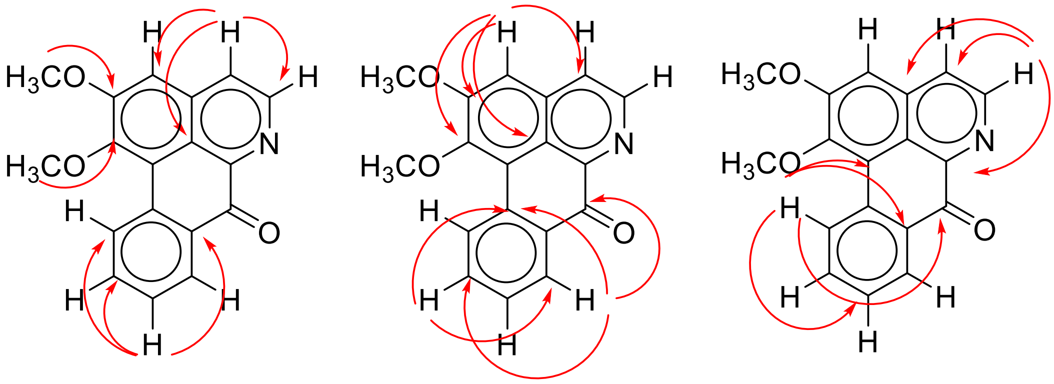
TABELA 17: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S4.

Posição	S4			Lisicamina[c]	
	^{1}H δ (mult., *J* em Hz)[a]	^{13}C (δ)[a]	HMBC (^{1}H-^{13}C)[b]	^{1}H δ (mult., *J* em Hz)	^{13}C (δ)[d]
1	-	152,10	-		152,1
1a	-	119,9	-		119,8
2	-	156,9	-		156,9
3	7,24 (1H, *s*)	106,5	1, 2, 3b e 4	7,23 (1H, *s*)	106,4
3a	-	135,5	-		135,5
3b	-	122,2	-		122,2
4	7,81 (1H, *d*, 5,2)	123,5	3, 3b e 5	7,81 (1H, *d*, 5,2)	123,6
5	8,92 (1H, *d*, 5,2)	145,1	3a, 4 e 6a	8,91 (1H, *d*, 5,2)	145,0
6a	-	145,5	-		145,3
7	-	182,7	-		182,6
7a	-	132,2	-		132,1
8	8,60 (1H, *dd*, 7,6 e 1,5)	128,9	7, 10 e 11a	8,58 (1H, *ddd*, 7,9, 1,6 e 0,5)	128,9
9	7,54 (1H, *ddd*, 8,0, 7,0 e 1,1)	128,8 CH	7a, 10, 11	7,58 (1H, *ddd*, 7,9, 7,2 e 1,1)	128,8
10	7,78 (1H, *ddd*, 8,4; 7,0 e 1,7)	134,3	8 e 11a	7,77 (1H, *ddd*, 8,4, 7,2 e 1,6)	134,3
11	9,20 (1H, *dd*, 8,5 e 0,6)	128,4	1a, 7*f*, 7a e 9	9,18 (1H, *ddd*, 8,4, 1,1 e 0,5)	128,4
11a	-	134,3	-		134,3
1-OCH3	4,03 (3H, *s*)	60,67	1	4,02 (3H,*s*)	60,67
2-OCH_3	4,11 (3H, *s*)	56,23	2	4,10 (3H,*s*)	56,23

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Experimento realizado a 500 MHz para RMN de ^{1}H e 125 MHz para RMN de ^{13}C com $CDCl_3$ utilizado como solvente e TMS como padrão interno. [b]Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. [c] COSTA *et al*. 2009. [d] Experimento realizado a 400 MHz para ^{1}H e 100 MHz para ^{13}C em $CDCl_3$, utilizando o TMS como padrão interno.

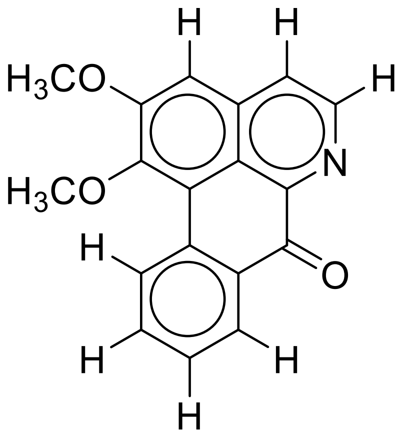
FIGURA 71: Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC de S4.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Pela análise dos dados de RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D/2D, espectrometria de massas, bem como comparação com os dados descrito na literatura foi possível concluir que a substância S3 trata-se do alcaloide oxoaporfino lisicamina (Figura 54) (COSTA *et al*., 2009; OBAID *et al*., 2018). Lisicamina foi relatado em *D. spixiana* (PEREZ, 2010) e *D. riparia* (CUNHA, 2009) sendo reportado como componente em maior abundância na espécie estudada.

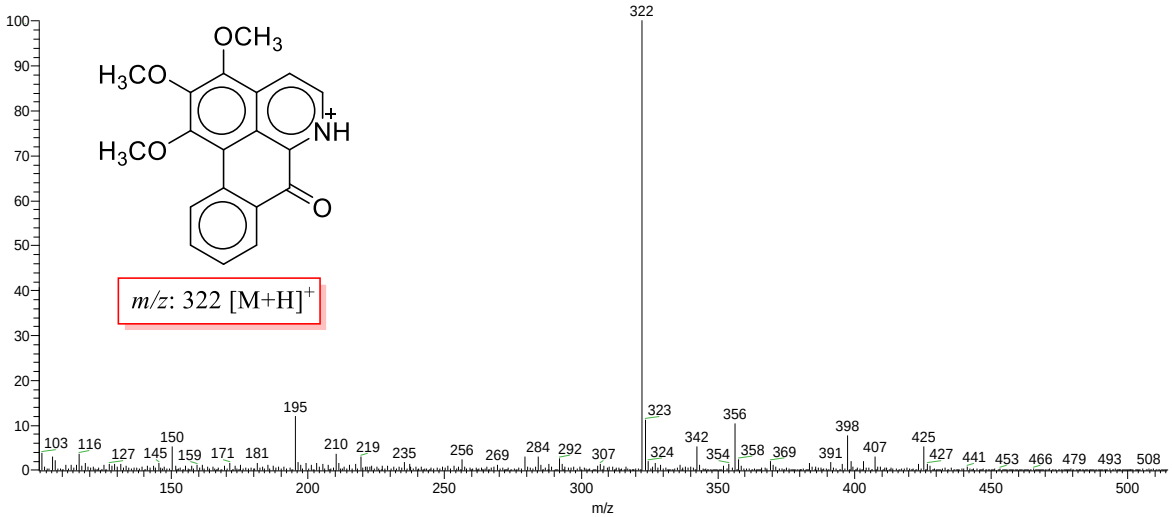
FIGURA 72: Estrutura da substância S4**,** alcaloide oxoaporfínico lisicamina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

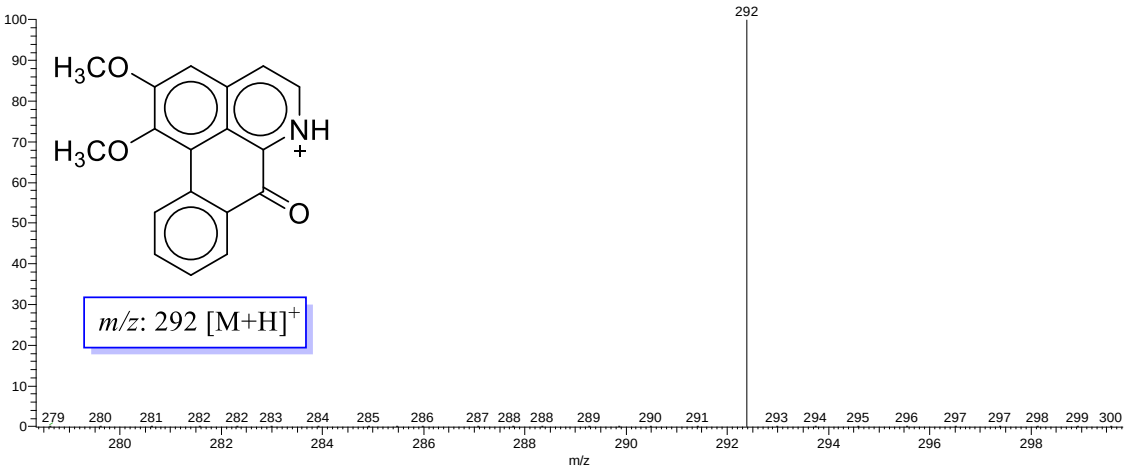
As substâncias S3 e S4 foram submetidas a análise espectrométrica por ionização em *electrospray* (EM-ESI) operando no modo positivo de aquisição (ESI+) onde foram evidenciados íons moleculares protonados $[M+H]^+$ em *m/z* 322 e 292 (Figura 73 e 74) sendo submetidos a fragmentação sequencial com energia de 20 a 30 eV.

FIGURA 73: Espectro de massas (ESI-EM modo positivo) de S3



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 74: Espectro de massas (ESI-EM modo positivo) de S4

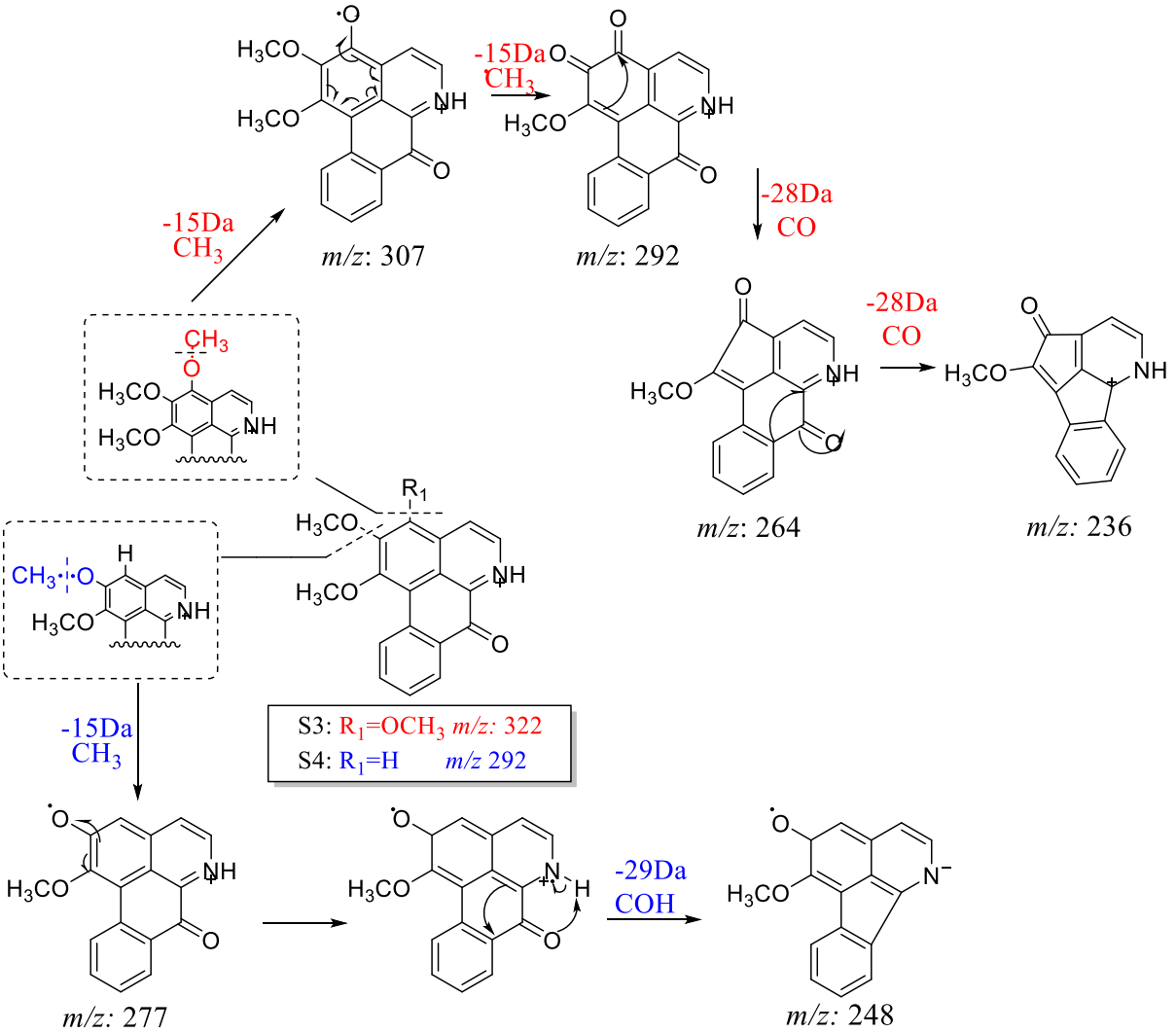


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O padrão observado na fragmentação dos íons foi aquele similar as substancias D10 e D11 conforme mostrado na analise do perfil de fragmentação por LS-MS (Figura 19), com perdas inicias e sequenciais de -15 Da seguidas de -28Da para S3 caracterizando assim o padrão do alcaloide *O*-metilmoschatolina (SILVA et al. 2016), bem como a saída do fragmento -29Da (-COH) condizente com o oxoaporfínico Lisicamina (NASCIMENTO, 2008) confirmando os esqueletos sugeridos no estudo de desreplicação.

Baseado nas perdas encontradas no estudo em LS-MS e dados da Literatura foi possível propor mecanismos para as moléculas S3 e S4 conforme mostrado na figura 75.

FIGURA 75: Estruturas propostas com base nas fragmentações dos íons *m/z* 292 e 322



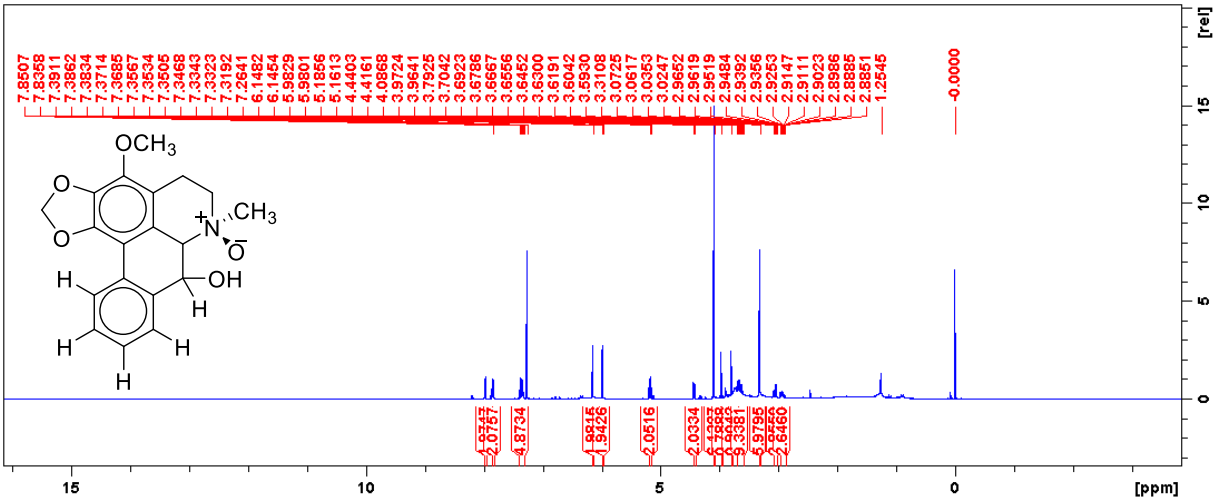
Fonte: Adaptado de STÉVIGNY, 2004.

5.3.3. Determinação estrutural das substâncias codificadas como S5 e S6

A substância codificada como S5 (8,1 mg) apresenta características de um sólido amorfo marrom escuro, com teste positivo frente ao reagente de Dragendorff, indicativo da presença de nitrogênio na molécula.

Através da análise do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) (Figura 76) foi possível observar sinais característicos de um alcaloide do tipo aporfino *sensu stricto* devido a presença dos sinais dos hidrogênios aromáticos entre δ 7,97 - δ 7,33, metilênicos entre δ 3,67 - δ 2,92 (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

FIGURA 76: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S5.

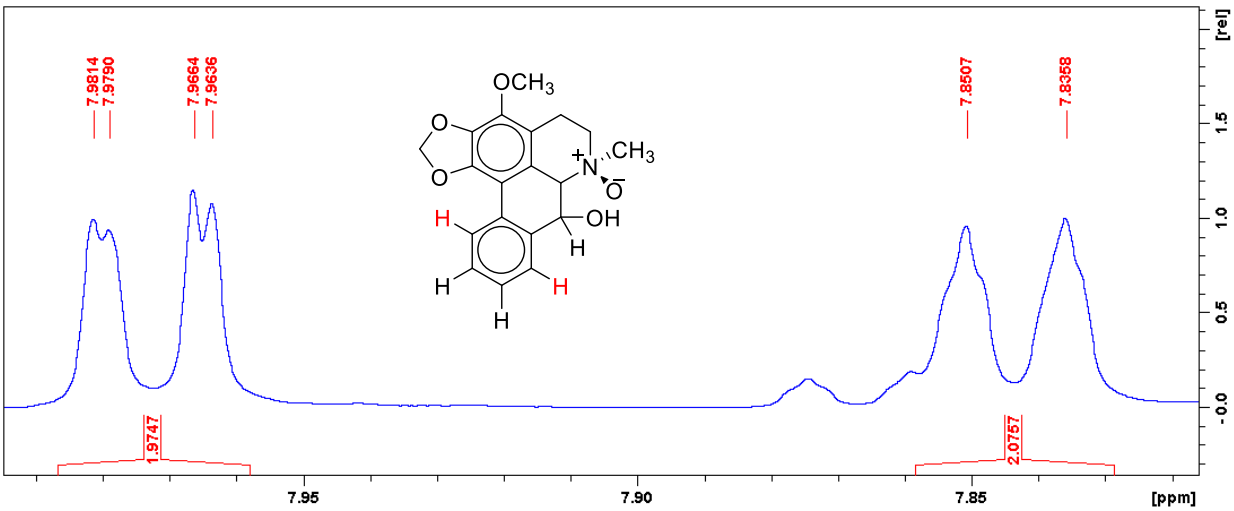


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Na região dos hidrogênios aromáticos (Figuras 77 e 78) verificou-se a presença de quatro sinais em δ 7,84 (1H, *dt*, *J* = 7,4 e 1,3 Hz), δ 7,37 (1H, *td*, 7,4 e 1,4 Hz), δ 7,33 (1H, *td*, 7,4 e 1,3 Hz) e 7,98 (1H,*dd*, *J* = 7,4 e 1,4 Hz) típicos dos hidrogênios H-8, H-9, H-10 e H-11, respectivamente, correlacionados a J^1 com os sinais dos carbonos em δ 124,5 δ 128,0, δ 127,5 e δ 125,6 atribuídos a (C-8), (C-9), (C-10) e (C-11) no anel D, confirmados pelo experimento de HSQC (Figura 81).

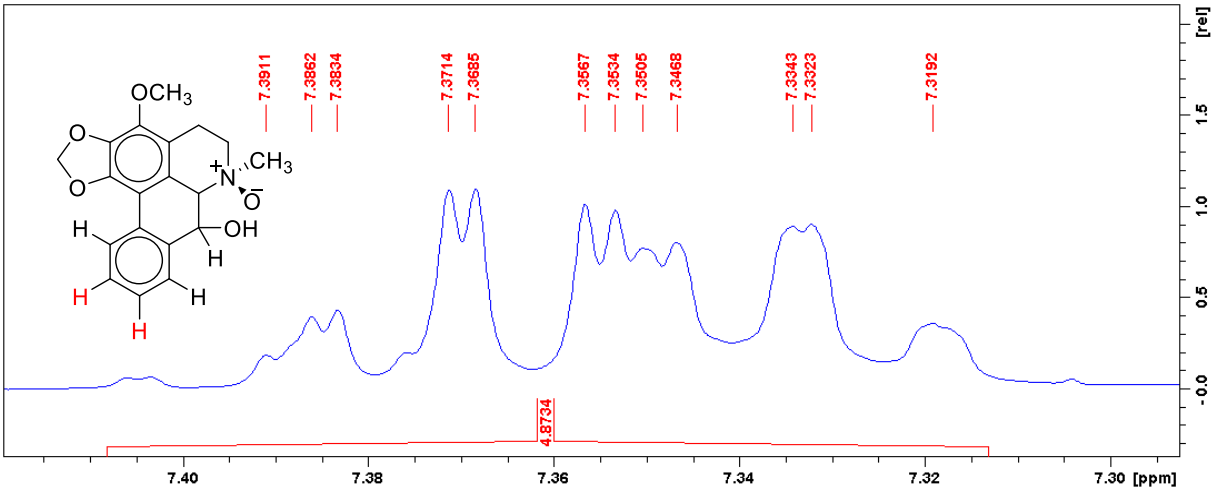
Pôde-se observar também a presença de hidrogênios diastereotópicos para dois grupos metilênicos em δ 3,04 (1H, *dd*, *J* = 18,6 e 5,5 Hz) e δ 2,92 (1H, *dddd* ,J=18.6; 13.0; 6.6; 1.9) e δ 3,63 (1H, *m*) e 3,67 (1H, *m*), típicos dos hidrogênios H-4 e H-5 do anel B do esqueleto aporfino, correlacionados a J^1 com os sinais de carbonos em δ 22,6 (C-4), δ 66,9 (C-5).

FIGURA 77: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S5 (δ7.83-7.98)



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

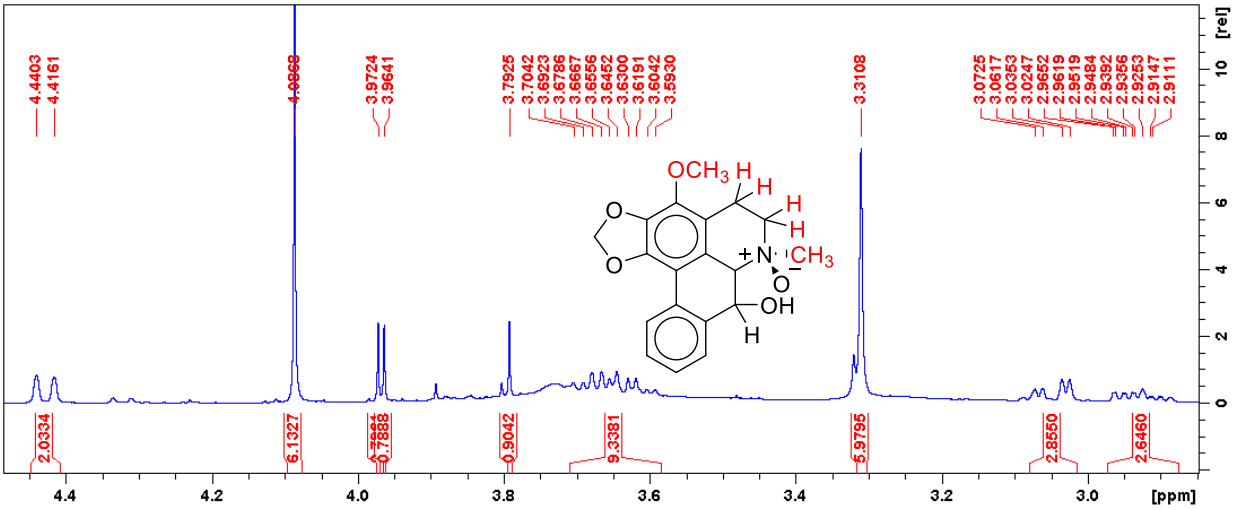
FIGURA 78: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S5 (δ 7.41 7.29)



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O sinal observado em δ 3,31 (3H, *s*) (Figura 79) está associado a metila ligada na posição 6, que se correlaciona direto com o carbono em δ 48,7 no mapa de correlação HSQC(Figura 82B) . O sinal para o hidrogênio H-$7_{pseudoequatorial}$ foi verificado em δ 5,17 (1H, *d*, *J* = 12,2 Hz), esse deslocamento e a presença apenas de um sinal para H, indica uma substituição em C-7 do sistema aporfino, o qual se correlaciona a diretamente com o carbono δ 68,8, sinal característico de carbono ligado a hidroxila.

FIGURA 79: Ampliação da região do anel piridínico do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de **S5**



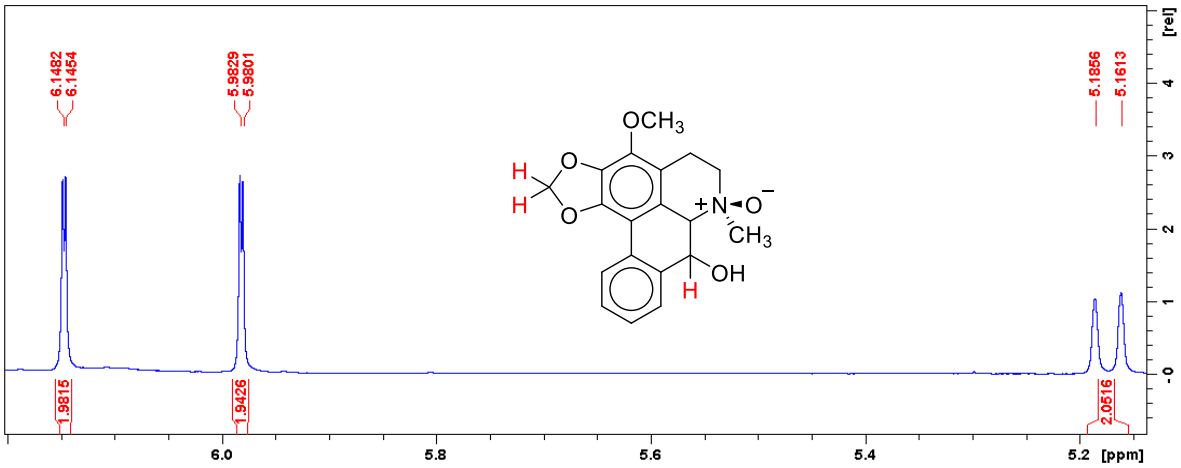
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A presença de um simpleto em δ 4,08 (3H,s) é denota um grupo metoxílico que por sua vez está ligado a J^1 com o carbono em δ 59,5, a presença do grupo (-OCH_3) foi confirma-

da pela correlação a J^3 com o carbono C-3(δ 139,8), indicando a sua posição correta, os sinais em δ 6,15 (1H,*d*,1,4Hz) e 5,98 (1H, *d*, 1,4Hz) diasterotópicos, indicam uma ponte metilenodióxi em C-1 e C-2 (ORTIZ; SUAREZ; PATIÑO, 2007), estando correlacionados diretamente ao carbono de sinal δ 101,3 (Figura 82A).

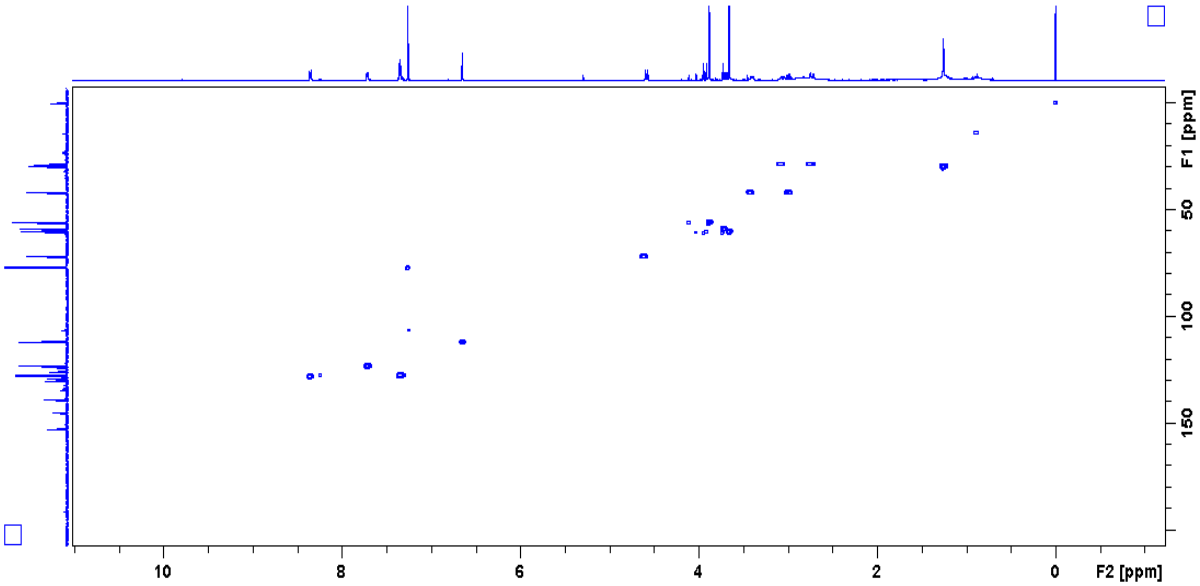
Observou-se ainda o sinal de hidrogênio metínico em δ 4,42 (1H, *d*, *J* = 12,2 Hz) referente a posição H-6a correlacionando-se diretamente com o sinal de carbono em δ 76,1.

FIGURA 80: Ampliação da região aromática (Anel A e C) do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$).



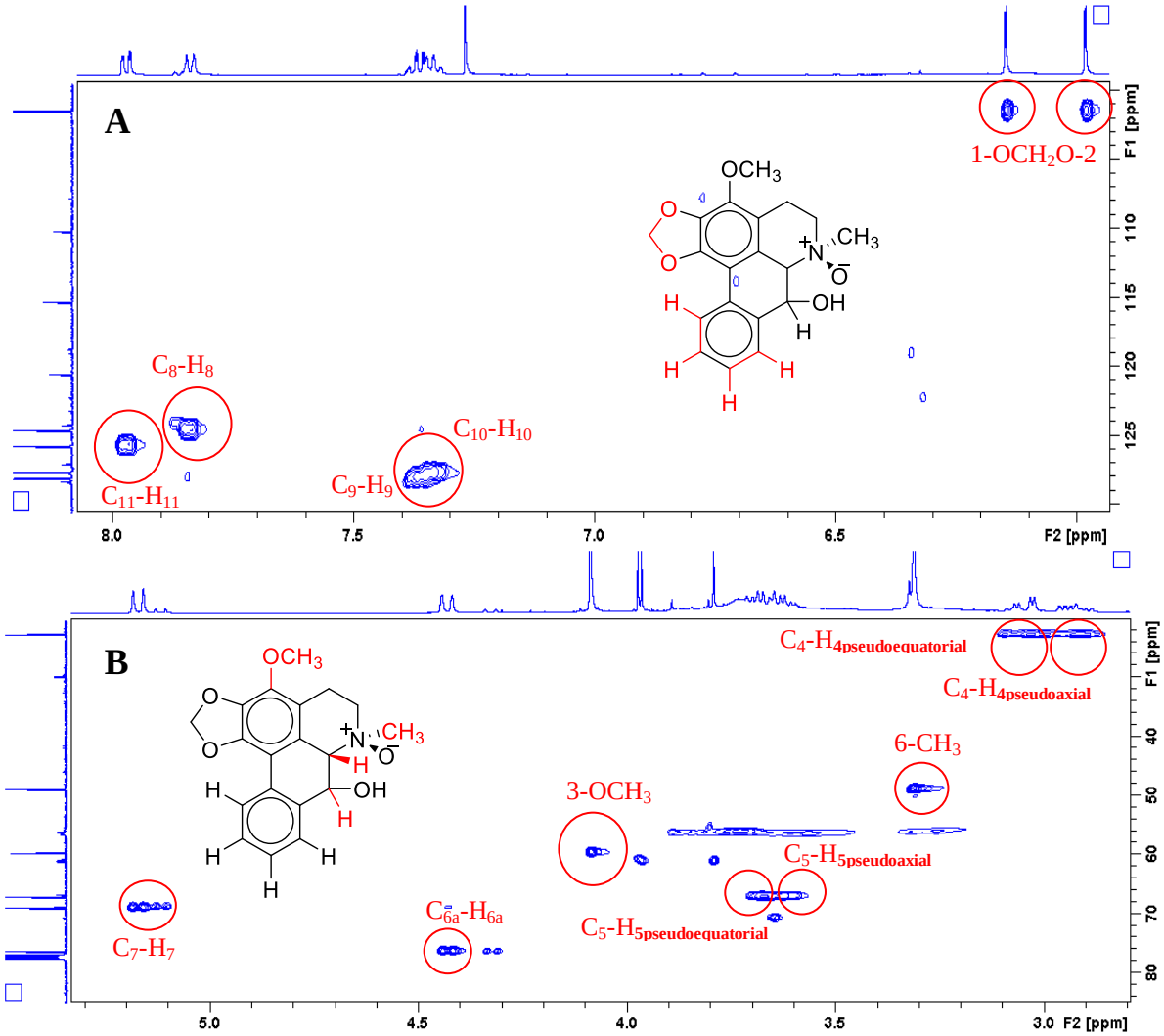
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 81: Mapa de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S5.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

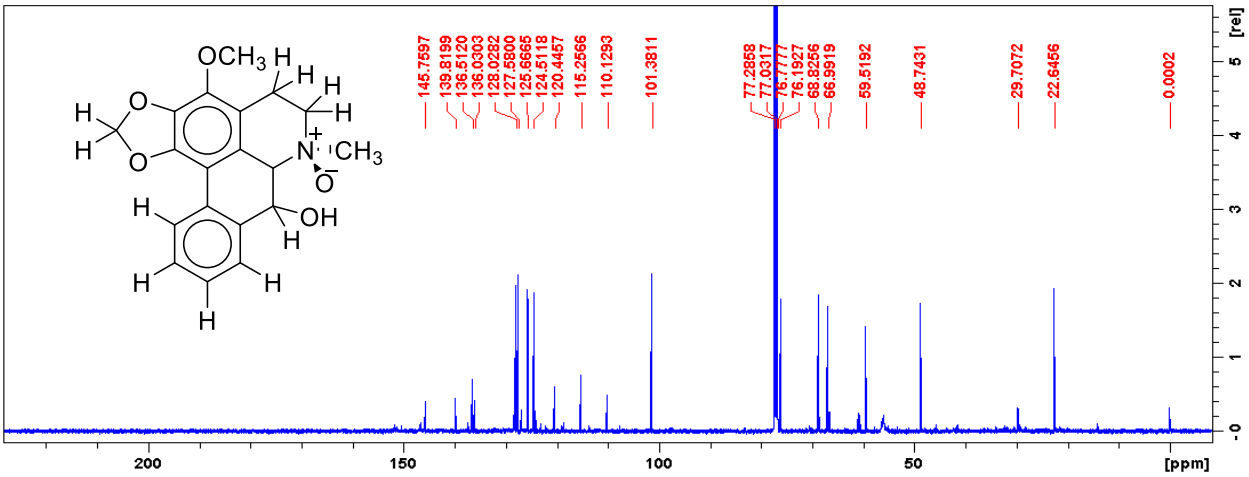
FIGURA 82: Ampliações do mapa (A e B) de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$)



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

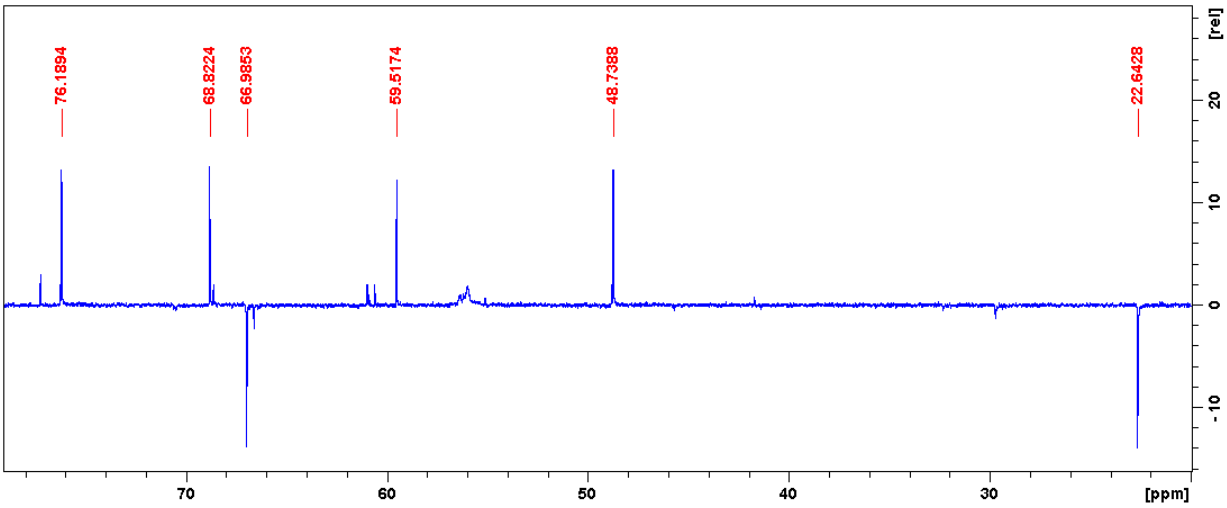
Analisando os espectros de RMN de ^{13}C juntamente com DEPT 135° (Figura 83 e 84), foi possível observar 19 sinais de carbonos dos quais quatro aromáticos entre δ 125,6 e 145,7 e dois metínicos em δ 22,6 e 66,9 sendo atribuído a C-4 e C-5, um sinal em 48,7 foi atribuído ao grupo metila ligado ao nitrogênio do anel B do sistema sendo sua posição confirmada pelo MAPA de correlações HMBC (Figura 86).

FIGURA 83: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de S5



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 84: Espectro de DEPT 135 (125 MHz, $CDCl_3$) de S5

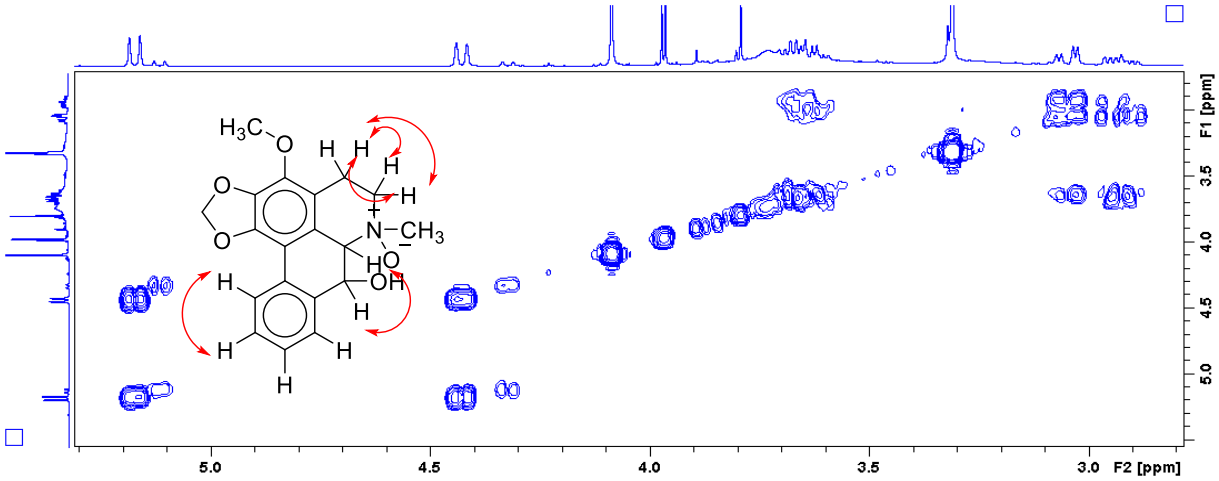


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O sinal em 48,7 apresentou correlação a J^3 com C-5 e C-6 e a J^4 com C-4, o sinal em δ 101,39 foi correlacionado a J^1 com os hidrogênios em 6,14 e 5,98 característico de um grupo -OCH_2O-, sendo posteriormente confirmado pelas correlações a J^3 dos hidrogênios diasterotópicos com C-1 e C-2 fato comprovando a correta posição do grupo metilenodioxi.

O carbono em 59,53 correlaciona-se a J^1 com os hidrogênios em 4,08 do grupo -OCH_3, a posição deste foi confirmada pela correlação a J^3 com o carbono C-3 as correlações entre os hidrogênios metinicos e aromáticos foram confirmadas pelo mapa de Correlação COSY (Figura 85).

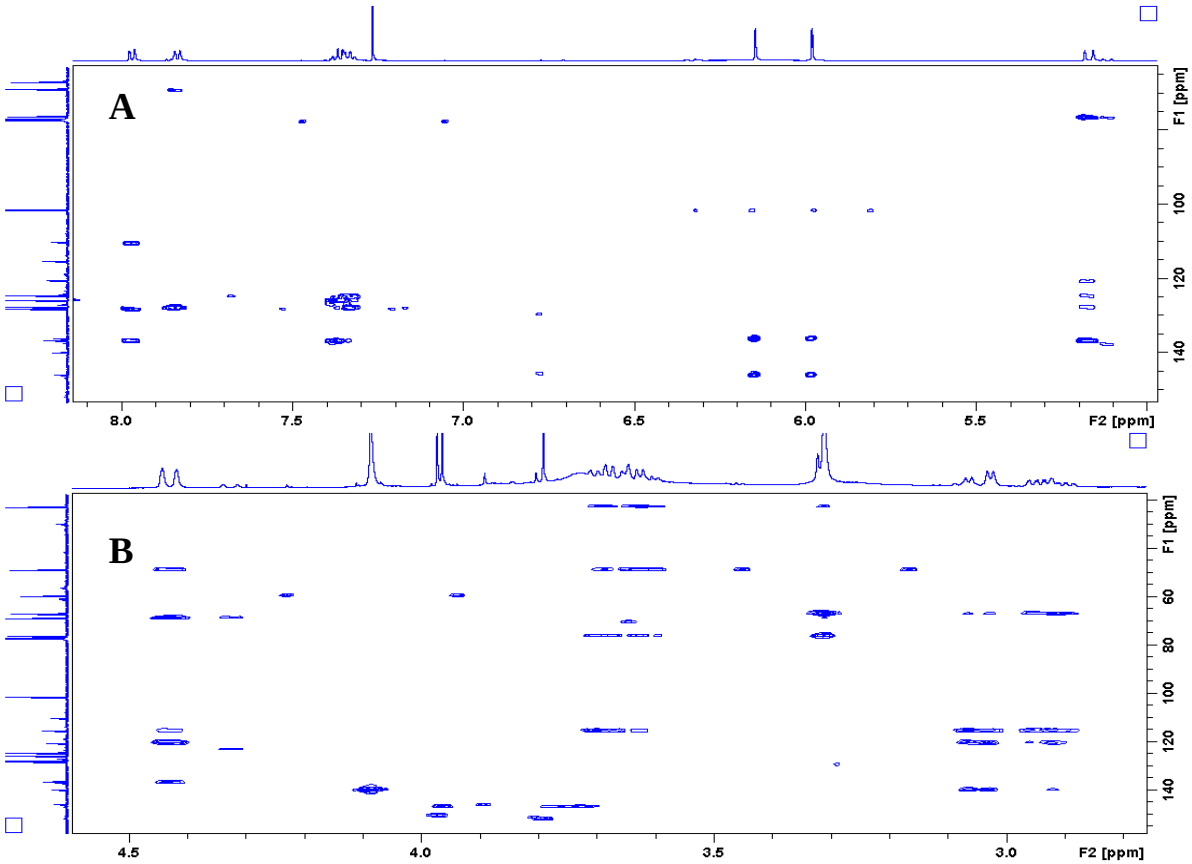
FIGURA 85: Correlação ^{1}H-^{1}H COSY (1H: 500 MHz; 13C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S5.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

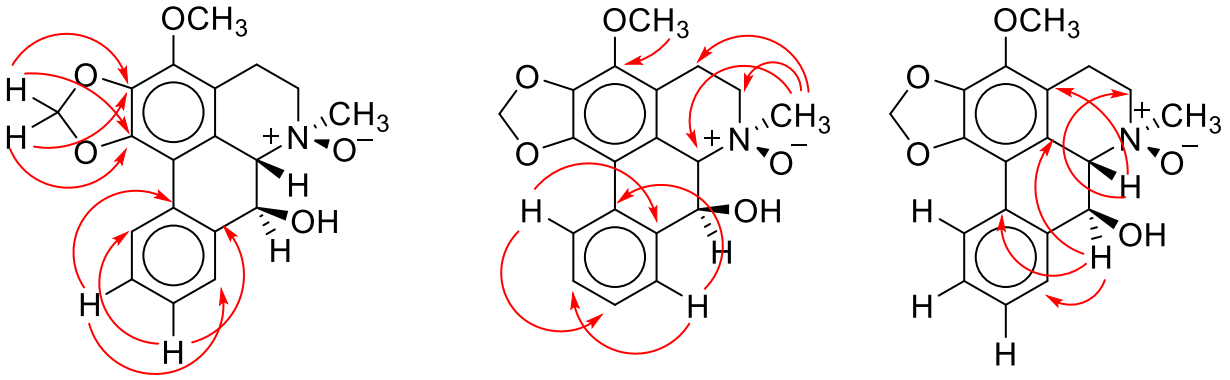
Na tabela 18 são apresentados os corretos valores de RMN de ^{1}H e ^{13}C de S5, a figura 86 mostra todas as correlações encontradas na análise em HMBC, dessa forma sendo elucidada como um alcaloide do tipo 7-hidroxi-*N*-óxido-aporfino conhecido com *N*-oxiguaterina (Figura 64) (RASAMIZAF, 1986).

FIGURA 86: Ampliação da região metoxilica e aromática no Mapa de correção HMBC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S5



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 87: Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC de S5.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

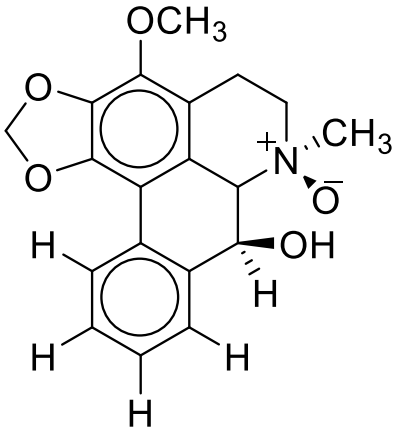
TABELA 18: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S5.

Posição	S5			
	^{1}H δ (mult., *J* em Hz)	**^{13}C (δ)**	**^{b}HSQC**	**HMBC**
1	-	145,7	-	-
1a	-	110,1	-	-
2	-	136,0	-	-
3	-	139,8	-	-
3a	-	115,2	-	-
3b	-	120,4	-	-
$4_{pseudoaxial}$	2.92 (1H, *dddd* ,18.6; 13.0; 6.6; 1.9)	22,6	(C-4)	3,3a, 3b e 5
$4_{pseudoequatorial}$	3.04 (1H, *dd*, 18.6; 5.5)			
$5_{pseudoequatorial}$	3.67 (1H ,*m*)	66,9	(C-5)	4,6a e 6 -N-CH_3/ 4,3a,6a e 6 -N-CH3
$5_{pseudoaxial}$	3.63 (1H ,*m*)			
6a	4,42 (1H,*d*,12,2)	76,1	(C6a)	1,1a ,3,3a ,3b,5,7,7a e 6 -N-CH_3
$7_{pseudoaxial}$	5,17 (1H, *d*, 12,2)	68,8	(C-7)	3b, 7a, 8,11 e 11a
7a	-	136,5	-	
8	7,84 (1H, *dt*, 7,4 e 1,3),	124,5	7,84 (C-8)	7,10 e 11a
9	7,37 (1H, *td*,7,4 e 1,4)	128,0	7,37	11 e 7a
10	7,33 (1H, *td*,7,4 e 1,3)	127,5	(C10)	8 e 11a
11	7,97 (1H,*dd*,7,4 e 1,4)	125,6	(C11)	1a,7a e 9
11a	-	127,5	-	-
3-OCH_3	4,08 (3H,*s*)	59,5	4,08	3
6-CH_3	3,31 (3H,*s*)	48,7	3,31	4,5 e 6a
1-OCH_2O-2	5,98 (1H,*d*, 1,4)	101,3	6,15 e 5,98	1 e 2
	6,15 (1H,*d*,1,4)			

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Experimento realizado a 500 MHz para RMN de ^{1}H e 125 MHz para RMN de ^{13}C com $CDCl_3$ utilizado como solvente e TMS como padrão interno. ^{b}Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios.

FIGURA 88: Estrutura da substância S5, alcaloide *N*-oxido *N*-oxiguaterina.

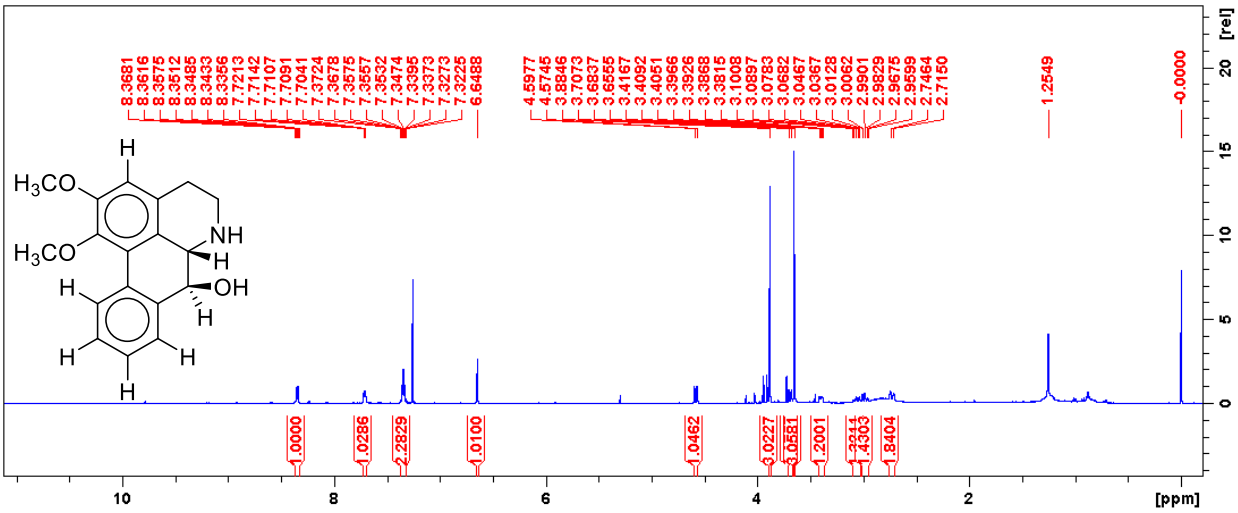


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

A substância S6 apresenta características de um sólido amorfo de coloração amarela escura de massa igual a 6,2 mg. A análise por CCDA evidenciou teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

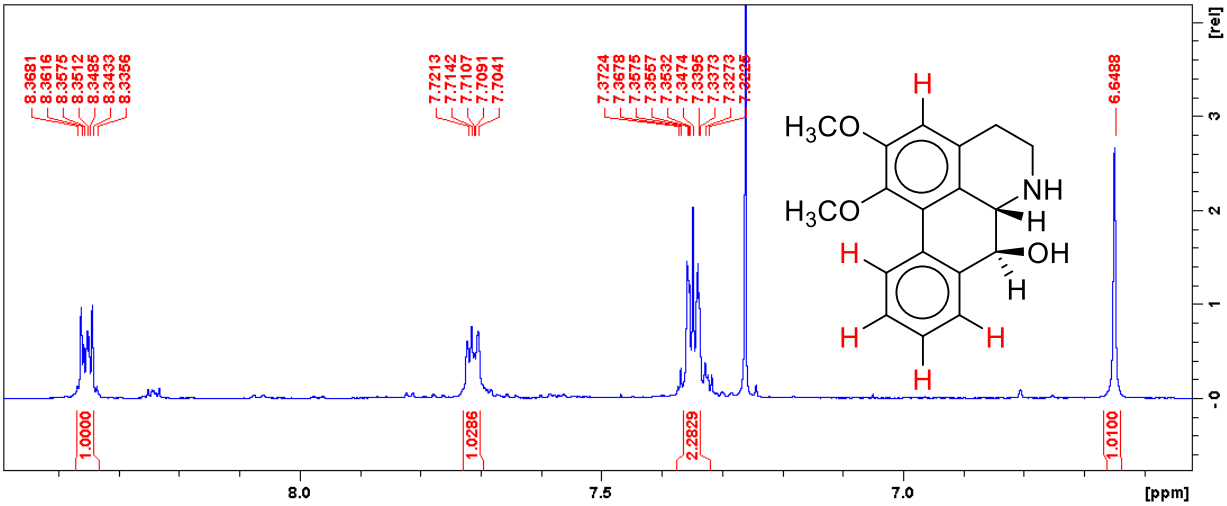
De forma similar à S5 a substancia S6 apresentou sinais de hidrogênios aromáticos (Figura 92) em δ 8,35 (1H, *m*), 7,34 (2H, *m*) e 7,71 (1H, *m*) típicos das posições H-11, H-10, H-9 e H-8 respectivamente do anel D de um esqueleto aporfino não substituído correlacionados a J^1 com os carbonos em δ 128,1, 127,4, 127,8 e 123,1 mediante experimento de HSQC foi possível observar também um simpleto em δ 6,65 correlacionado ao carbono em δ 111,9 característicos do hidrogênio da posição H-3 do anel A do sistema aporfino (Figura 93).

FIGURA 89: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S6.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

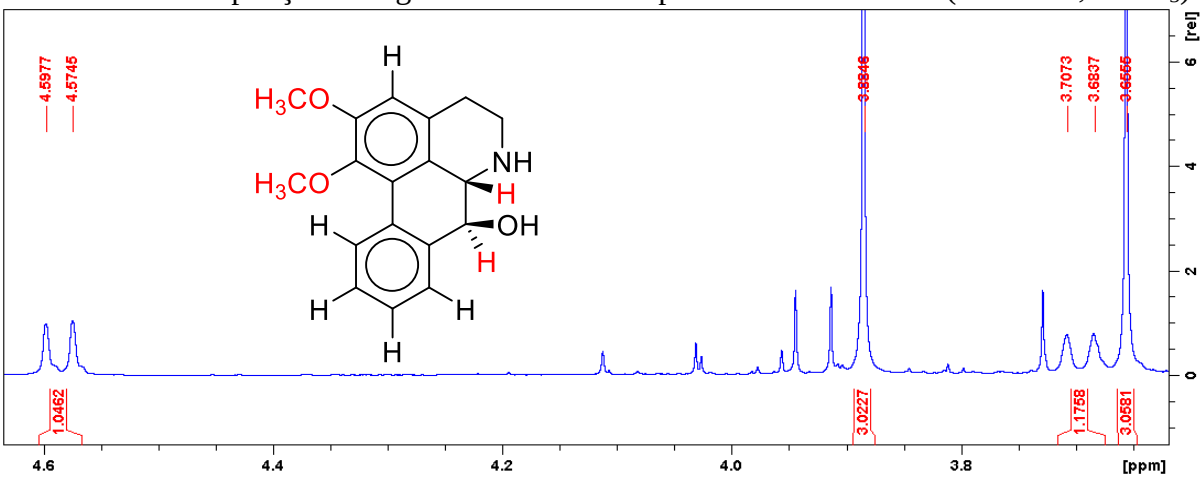
FIGURA 90: Ampliação das regiões aromáticas do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S6.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Novamente observa-se a ocorrência de hidrogênios diastereotópicos para dois grupos metilênicos em δ 3,06 (1H, *m*) e δ 2,73 (1H, *dt*, *J* = 15,8 Hz) e δ 3,40 (1H, *ddd*, *J* = 11,9, 5,6 e 2,7 Hz) e 2,98 (1H, *td*, *J* =11,7 e 3,9 Hz), típicos dos hidrogênios H-4 e H-5 do anel B do esqueleto aporfino (Figura 94), correlacionados respectivamente a J^1 com os sinais de carbonos em δ 28,7 (C-4), δ 42,0 (C-5) confirmados a partir da análise do experimento de HSQC .

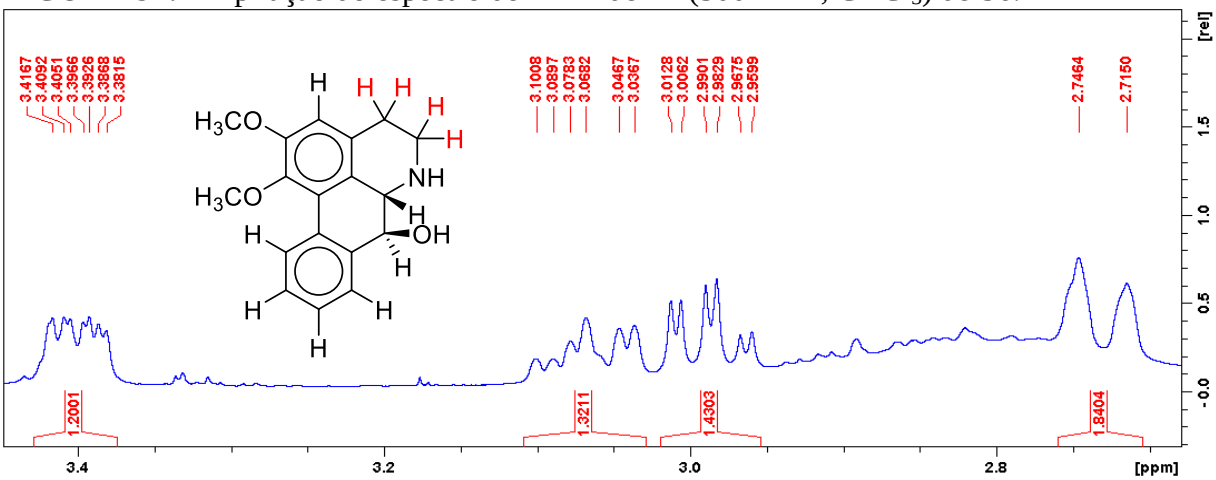
FIGURA 91: Ampliação da região aromática do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$).



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Os sinais em δ 3,89 (3H, *s*) e δ 3,66 (3H, *s*) são característicos das metoxilas ligadas em C-2 e C-1, fato comprovado pois o sinal em e δ 6,65 indica a posição desse hidrogênio em C-3. Os hidrogênios dos grupos $-OCH_3$ correlacionam-se a J^1 com os carbonos em δ 55,9 e 60,2, que são exatamente os carbonos C-2 e C-1 observados a partir do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 94) e DEPT 135° (**Apêndices**).

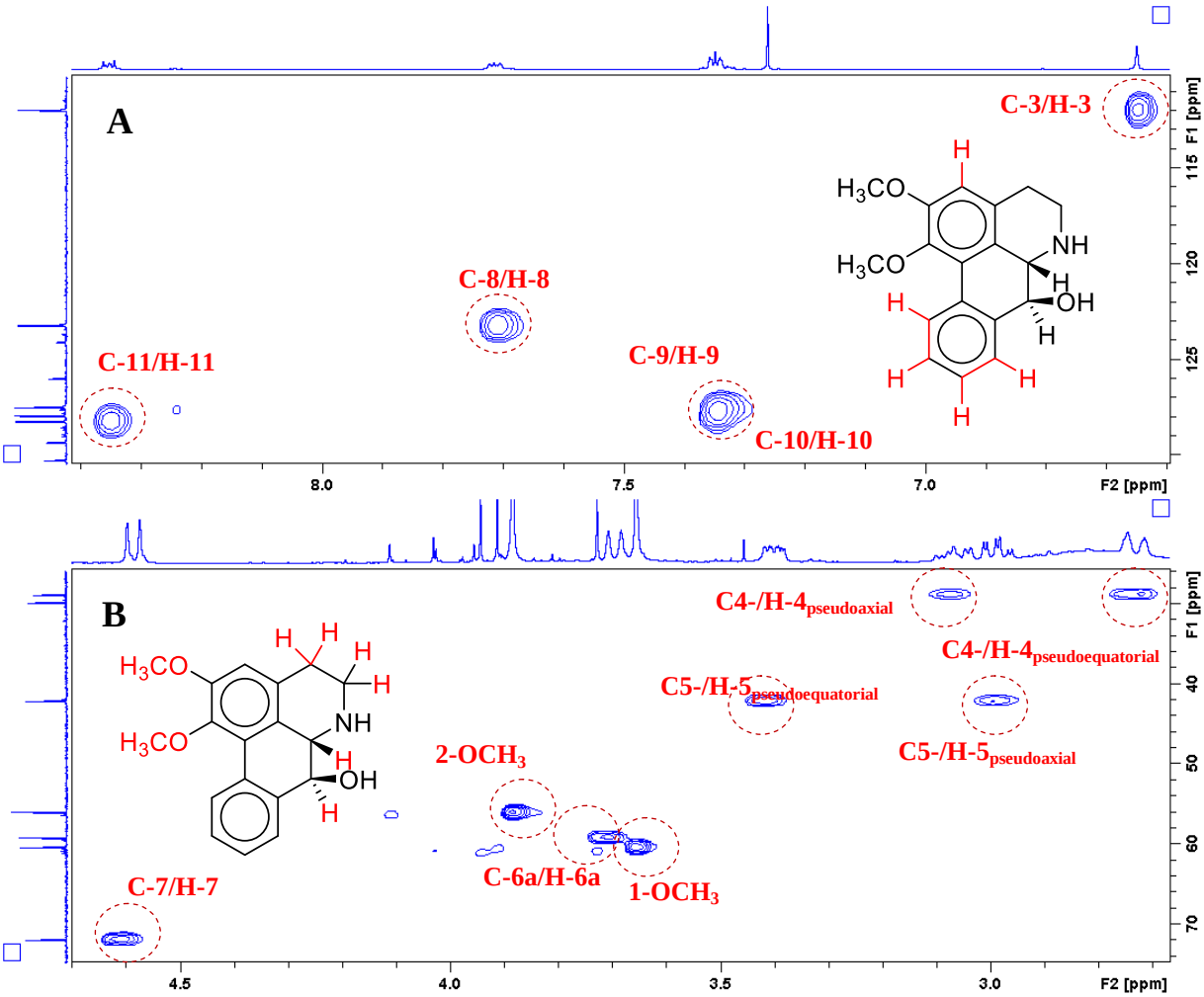
FIGURA 92: Ampliação do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de S6.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Assim como relatado para S5 o sinal em δ 4,60 (1H, *d*, *J* = 11,7 Hz) foi atribuído, de acordo com HSCQ, ao carbono em δ 71,8 (C-7) sendo um simpleto indicando uma substituição nessa posição.

FIGURA 93: Ampliações do mapa (A e B) de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S6

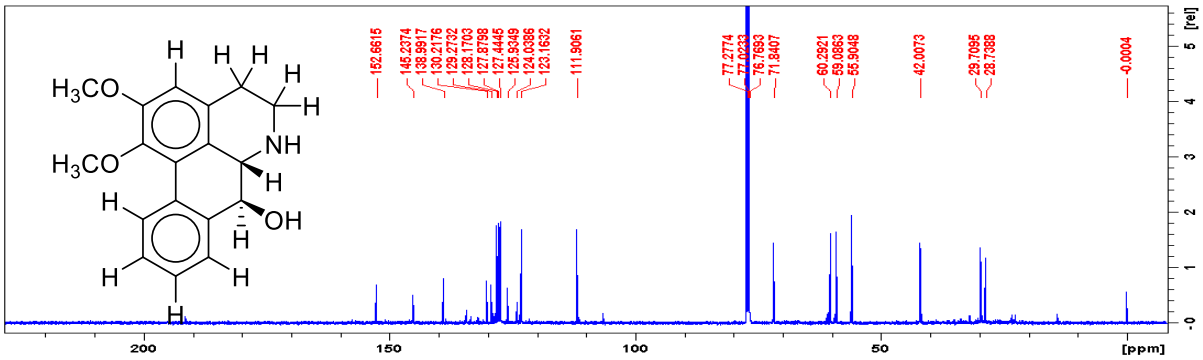


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O deslocamento do carbono em C-7 é maior que em C-6 (δ 59,0) indicando que esse átomo esteja ligado diretamente a um átomo mais eletronegativo, nesse caso o deslocamento previsto em δ 71,8 é típico de C-OH. O sinal observado em δ 3,70 (1H, d, J = 11,7Hz) foi atribuído a H-6a o qual está correlacionado diretamente a J^1 com o sinal de carbono em 59,0 (C-6a).

Analisando os espectros de RMN de ^{13}C juntamente com DEPT 135, foi possível observar 18 sinais de carbonos dos quais quatro aromáticos entre δ 127,4 e 138,9 e dois metínicos em δ 28,7 e 42,0, sendo atribuídos a C-4 e C-5.

FIGURA 94- Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de S6

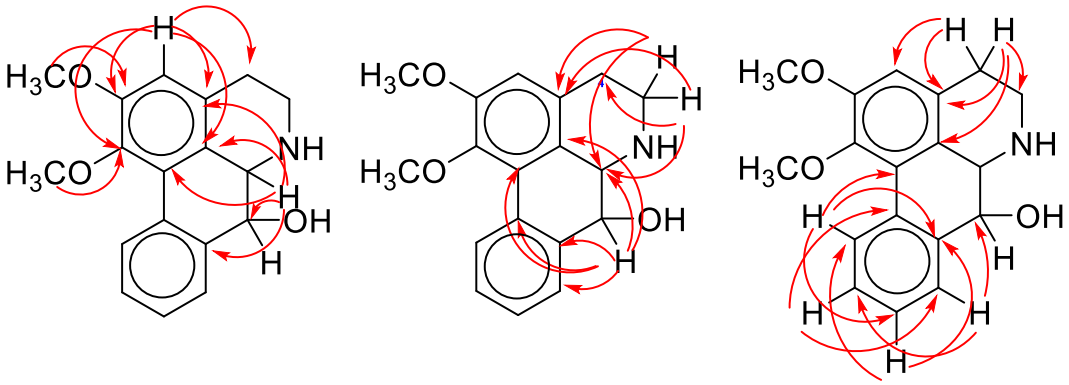


Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

As posições dos grupos metoxilicos foram confirmadas pelo mapa de contorno HMBC (**Apêndices**) no qual o sinal em δ 3,89 correlaciona-se a J^3 com o carbono C-2 em δ 152,6 enquanto δ 3,66 correlaciona-se a J^3 com C-1 em δ 146,2 confirmando assim a substituição.

A posição de H-3 (δ 6,65) ligado a C-3 foi confirmada por suas correlações a J^3 com C-1, C-3b e C-4 e a J^2 com os carbonos C-2 e C-3a. Na TABELA 19 são apresentados os corretos valores de ^{1}H e ^{13}C de S6 atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC.

FIGURA 95: Principais correlações observadas no mapa de contorno HMBC de S6.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

TABELA 19: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S6.

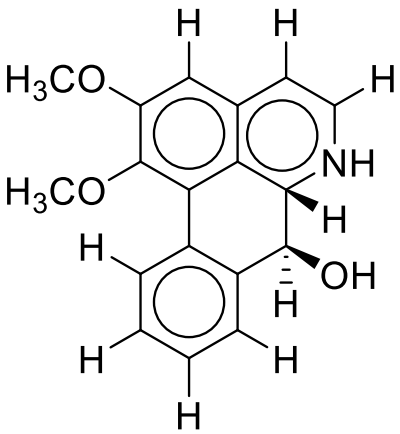
Posição	S6				Nornuciferidina[c]
	$^{1}H^{a}$ δ (mult., *J* em Hz)[a]	**^{13}C (δ)[a]**	**HMBC (^{1}H-^{13}C)[b]**	**HSCQ[b]**	**^{1}H δ (mult., *J* em Hz)**
1	-	145.2	-		-
1a	-	125.9	-		-
2	-	152.6	-		-
3	6,64 (1H,s)	111.9	1,2,3a,3b e 4	111,9 (C-3)	6,68(1H,s)
3a	-	129.2	-		-
3b	-	124.0	-		-
$4_{pseudoaxial}$	3.06 (1H,*ddd*, 15.7; 11.5; 5.6)	28,7	3,3b e 5 3,3b,3a e 5	28,7 (C-4)	-
$4_{pseudoequatorial}$	2,73 (1H,*dt*,15,8)				
$5_{pseudoequatorial}$	3,40 (1H,*ddd*,11,5;5,6 e 2,6)	42,0	4,6a ,3a 4,6a e 3a	42,0 (C-5)	-
$5_{pseudoaxial}$	2,98 (1H,*td*,11,5 e 3,9)				
6a	3,69 (1H,*d*,11,7)	59,0	1a ,3a,3b,7 e 8	59,0(C-6a)	3,78 (1H,*d*,12)
7 $_{pseudoaxial}$	4,58 (1H,*d*,11,7)	71,8	1a,3a ,3b,6a ,7a 9 e 11a	71,8 (C-7)	4,87 (1H,d,12)
7a	-	138,9	-	-	
8	7,71 (1H,*m*)	123,1	7,10	123,1 (C-8)	7,72 (1H,*m*)
9	7,34(2H,*m*)	127,2	11,7a	127,8 (C-9)	7,30 (2H,*m*)
10		127,4 CH_2	8,11a	127,4 (C-10)	
11	8,35 (1H,*m*)	128,1	-	128,1(C-11)	8,33(1H,*m*)
11a	-	130,2	-	-	
1-OCH_3	3,66 (3H,*s)*	60,2	1	60,2 (1-OCH_3)	3,66 (3H,s)
2-OCH_3	3,89 (3H,*s*)	55,9	2	55,9 (2-OCH_3)	3,90 (3H,*s*)

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Experimento realizado a 500 MHz para RMN de ^{1}H e 125 MHz para RMN de ^{13}C com $CDCl_3$ utilizado como solvente e TMS como padrão interno. [b]Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios.[c] RASAMIZAFY *et al* 1987, solvente utilizado foi $CDCl_3$, os valores referentes aos sinais de hidrogênios ligados aos carbonos em C-4 e C-5 não foram especificados na referência, assim como os valores do RMN de ^{13}C, a potencia do equipamento também não foi especificada.

Pelas análises de RMN de ^{1}H e ^{13}C 1D/2D, EM e comparação com os dados descritos na literatura (RASAMIZAFY *et al.*, 1989), foi possível identificar S6 como sendo o alcaloide conhecido como nornuciferidina (Figura 76) sendo seu primeiro relato no gênero *D. pycnastera*.

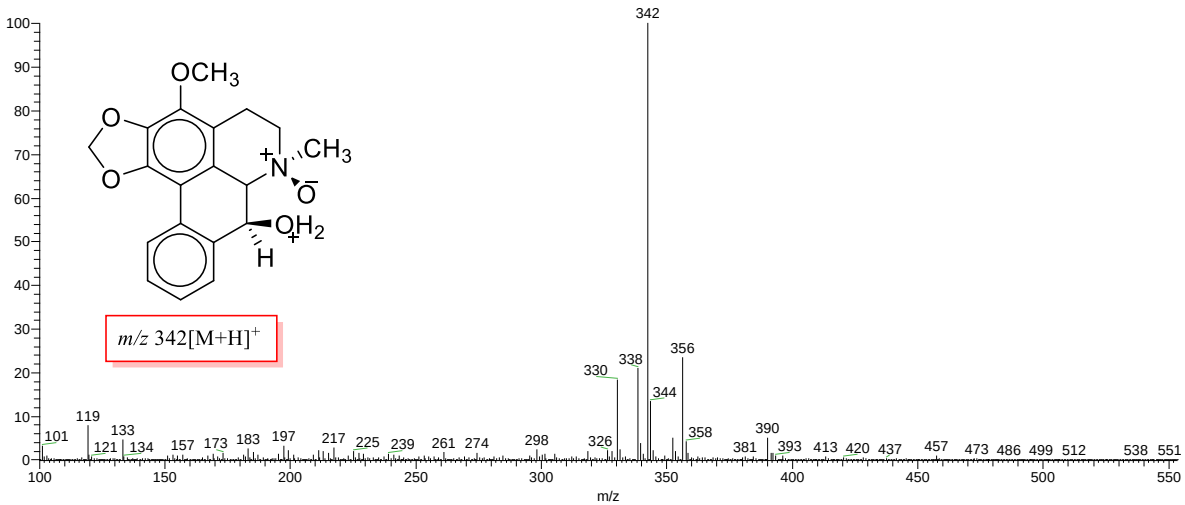
FIGURA 96: Estrutura da substância S6, nornuciferidina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

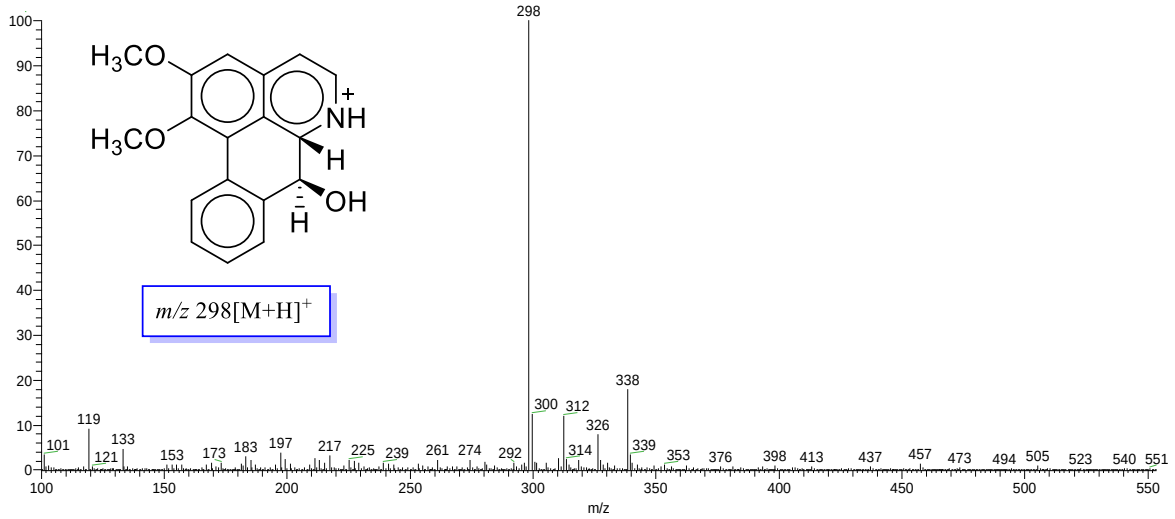
As substâncias S5 e S6 foram submetidas à análise espectrométrica por ionização em electrospray (EM-ESI) operando no modo positivo de aquisição (ESI+) onde foram evidenciados um íons moleculares protonados [M+H]+ em m/z 342 e 298 (Figuras 95 e 96).

FIGURA 97: Espectro de massas da substância da molécula S5, modo positivo.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

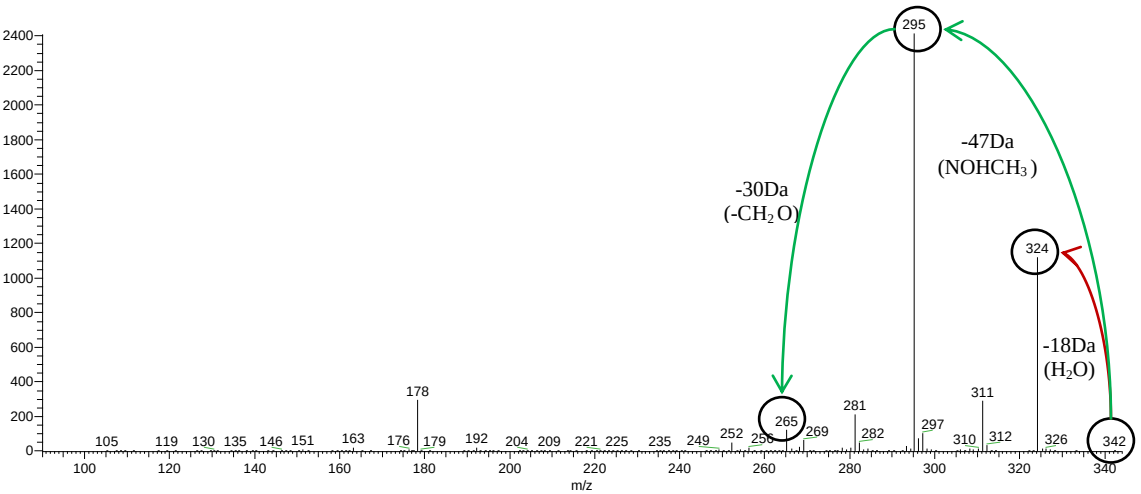
FIGURA 98: Espectro de massas da substância de S6 no modo positivo.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

O espectro de fragmentação de S5 é condizente com a estrutura DP-4 prevista na análise de LS-MS (Figura 26), as perdas de –47 Da e –18 Da são competitivas e denotam a saída de um grupo (–$NHOCH_3$) e uma molécula de H_2O, comuns em alcaloides com estrutura *N*-óxido com substituição em C-7 típicas de estruturas do tipo 7-hidroxi-aporfino (Figura 97).

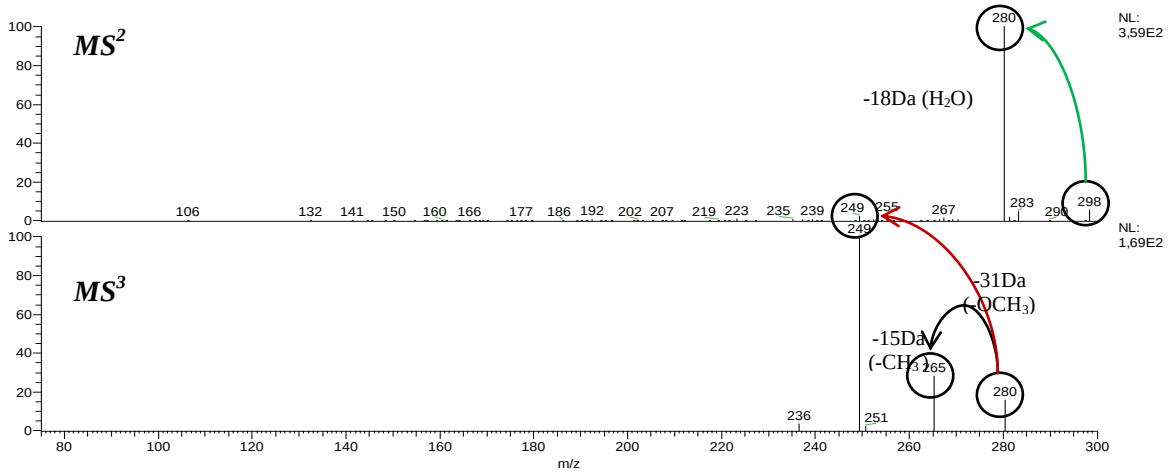
FIGURA 99: Espectro de fragmentação da molécula S5.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

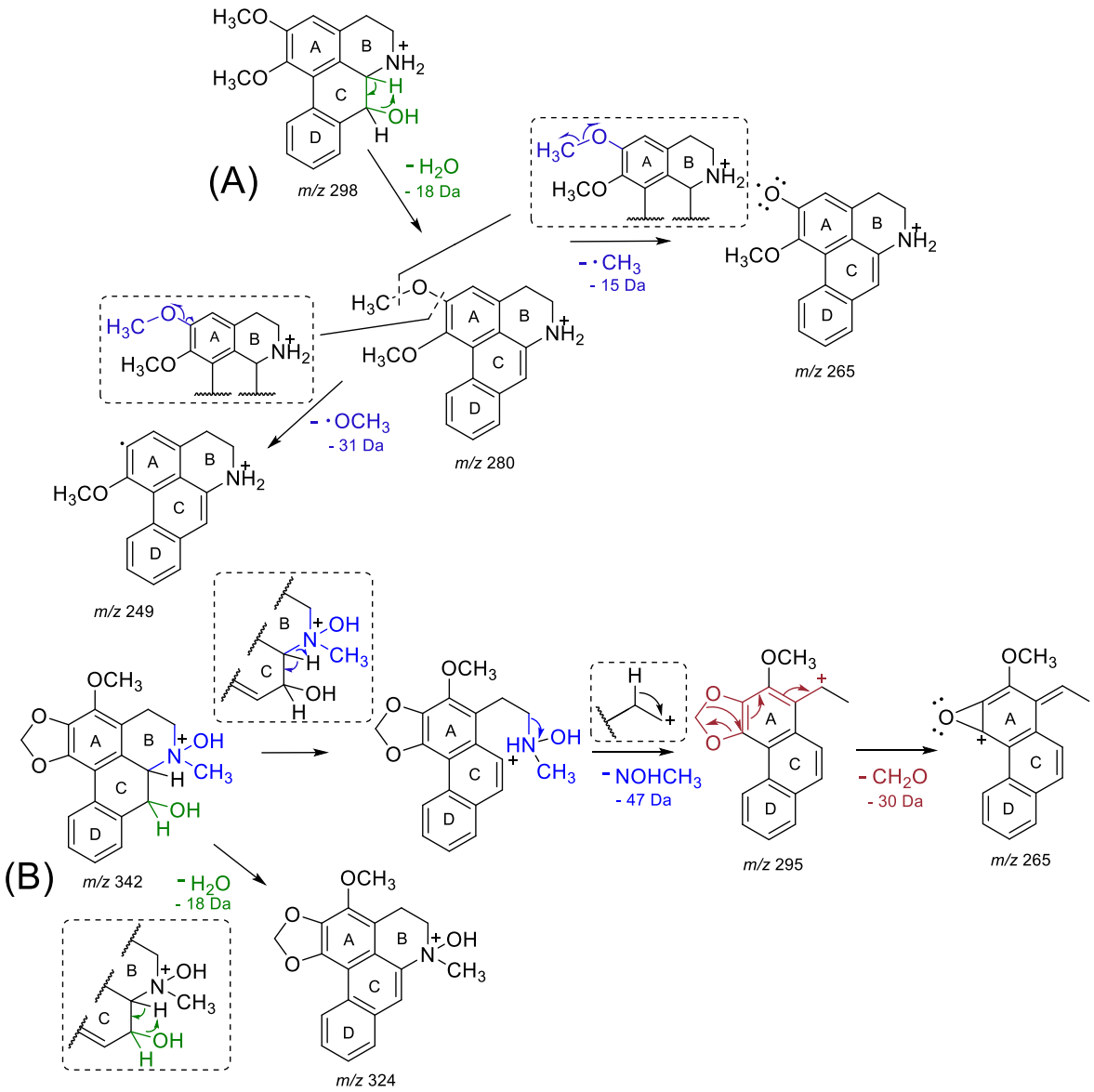
A analise do espectro de fragmentação de S6 (Figura 98) é condizente com a estrutura DP 13 observada no perfil de LS-MS com perda inicial de -18 Da que sugere a saída de uma molécula de agua proveniente da protonação do grupo OH em C-7 com conseguintes rearranjos ocasionado a perdas consecutivas de -15Da e -31Da condizente com a estrutura prevista no espectro de RMN. A partir da analise da fragmentação foi possível propor o mecanismo para ambas as substâncias conforme figura 99.

FIGURA 100: Espectro de fragmentação em MS^3 de S6.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 101: Proposta de Fragmentação para as substâncias S5 e S6.

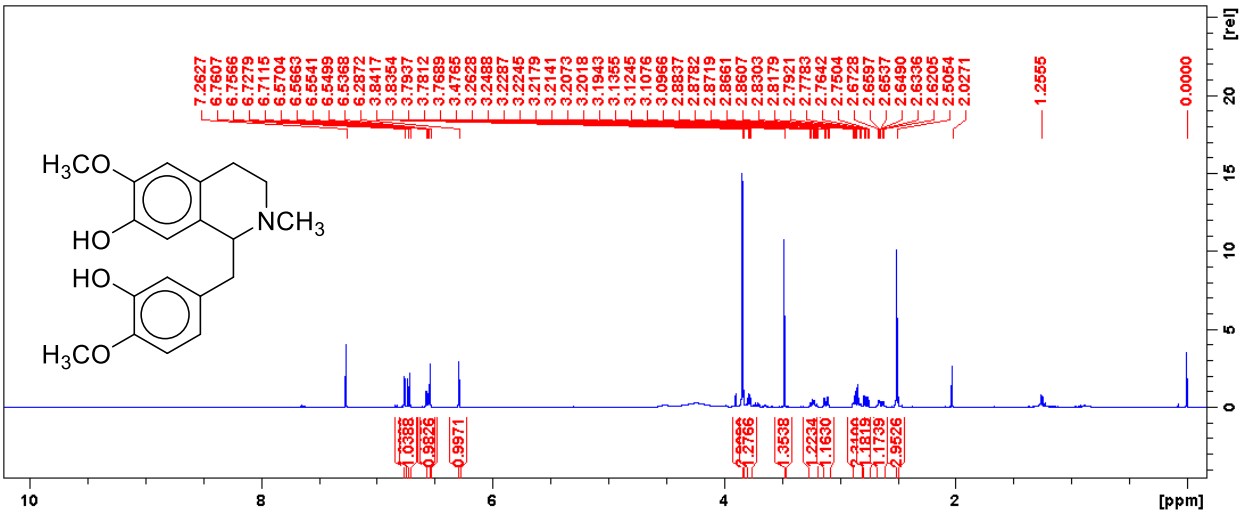


Fonte: Adaptado de STÉVIGNY, 2004.

5.3.4. Determinação estrutural da substância codificada como S7

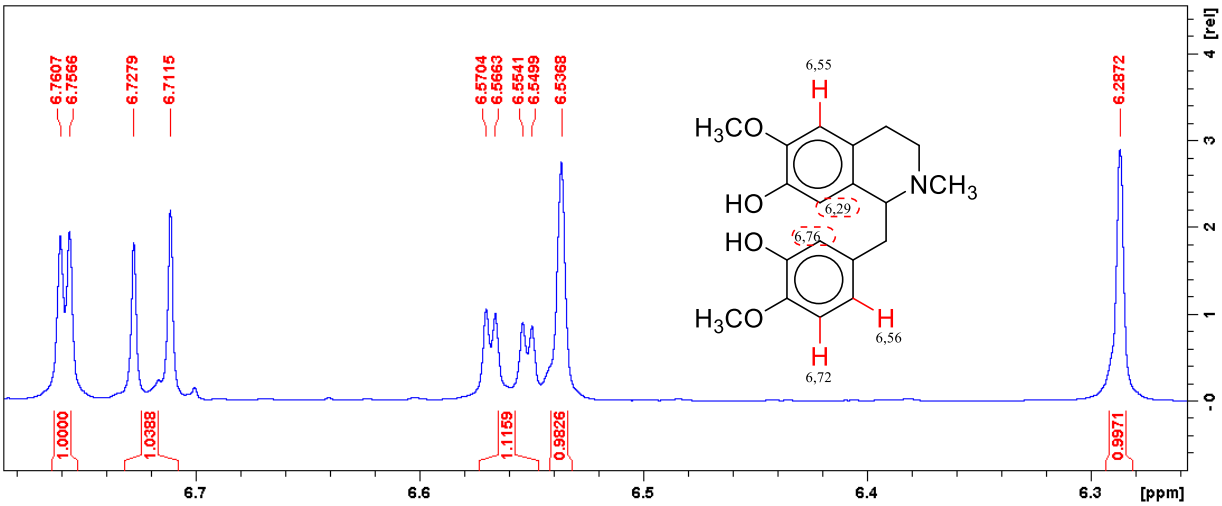
A substância codificada como S7 caracteriza-se como um sólido amorfo amarelado igual a 7,6 mg. A análise por CCDA evidenciou teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada). Analisando o espectro de RMN de ^{1}H (Figura 77) é possível destacar a ocorrência de cinco sinais na região de aromáticos em δ 6,76 (1H, *d*, *J* = 2,1 , H-2'), δ 6,72 (1H, *d*, *J* = 8,2Hz, H-5') e δ 6,56 (1H, *dd*, *J* = 8,2 e 2,1 Hz, H-6'), cujas constantes de acoplamento estão de acordo com o anel C de uma estrutura isoquinolínica dissubstituida nas posições C-3' e C-4' (Figura 78).

FIGURA 102: Espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) de **S7**.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

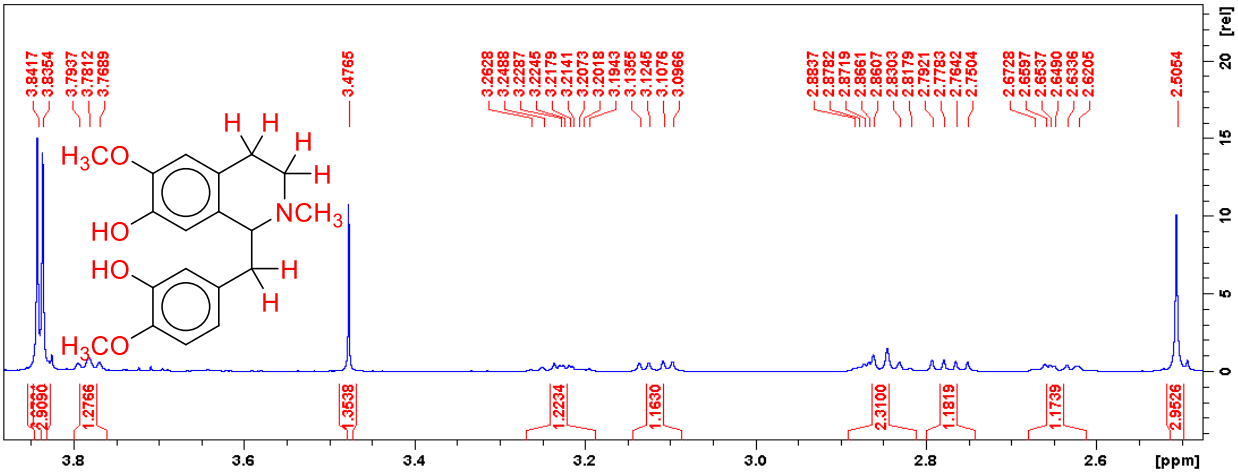
FIGURA 103: Ampliação da região aromática do espectro de RMN de ^{1}H (500 MHz, $CDCl_3$) **S7**.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Observam-se também dois singletos em δ 6,54 e δ 6,29, indicando que a metoxila esteja adjacente à hidroxila nas posições C-6 ou C-7 do anel A isoquinolínico. Através do experimento de ^{13}C e DEPT 135° (Apêndice-E11) foi possível observar a ocorrência de três sinais de carbonos metínicos (CH_2) em δ 2,85 (2H,*m*) e 3,22 (1H,*m*), δ2,65 (1H,*m*) e δ 2,77 (1H,*dd*,13,9 e 6,9Hz) e 3,12 (1H,*dd*, 14,0 e 5,5 Hz) , sendo estes atribuídos diretamente a J^1 aos carbonos em δ 46,18 (C-3),24,40 (C-4) e 40,73 (C-9)

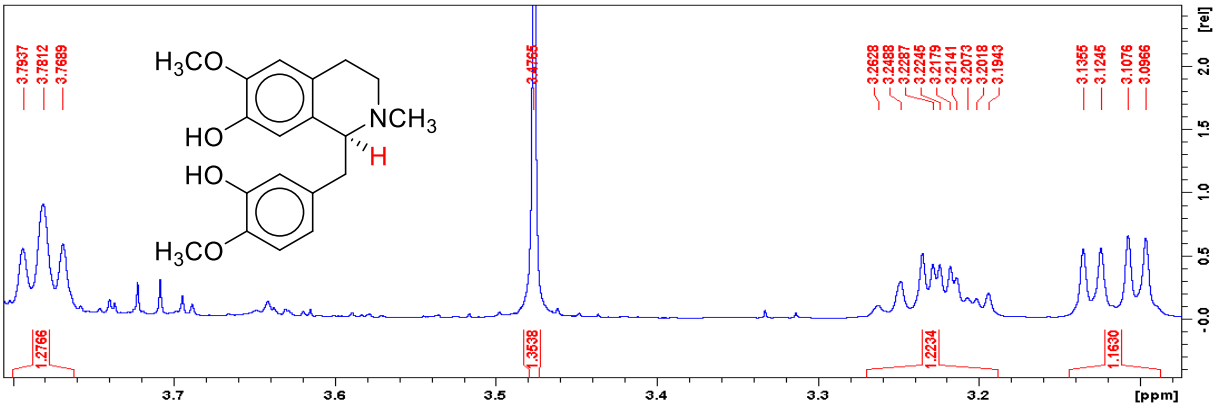
FIGURA 104: Ampliação da região dos hidrogênios diasterotópicos do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) **S7.**



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

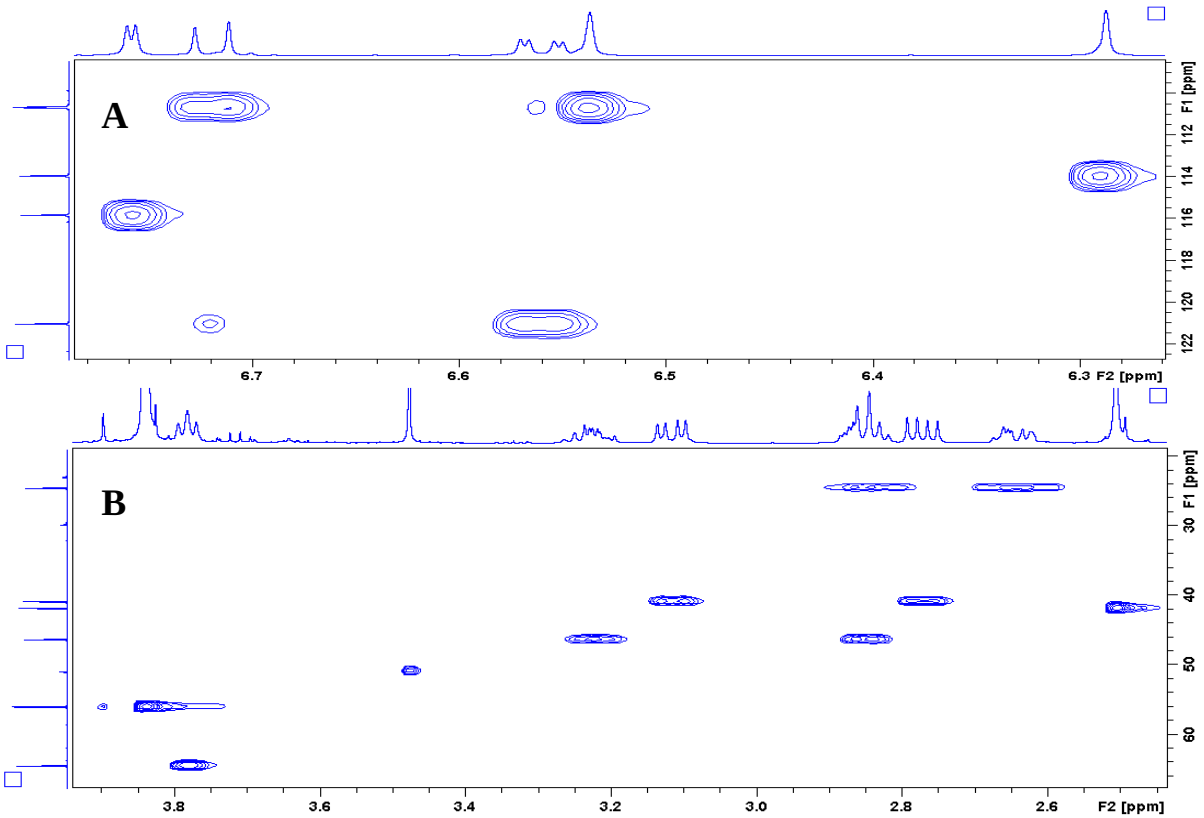
Dois sinais próximos são observados em δ 3,84 (3H, *s*) característicos dos grupos metoxílicos, assim como um sinal em δ3,78 (1H, *t*, 6,3 e 12,6) atribuído a C-1em δ 64,37 mediante experimento HSQC (Figura 105).

FIGURA 105: Ampliação da região (δ 3.79 – 3.09) do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $CDCl_3$) S7.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

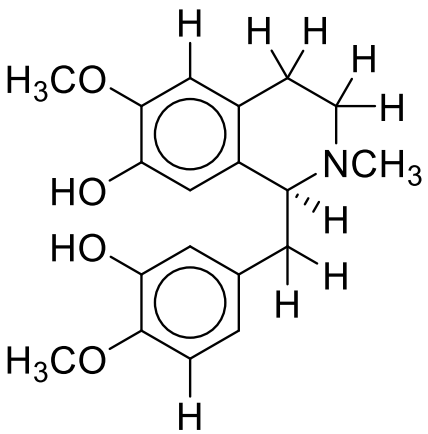
FIGURA 106: Ampliações do mapa (A e B) de correlações HSQC (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) de S7



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Estas informações estruturais apontam para o alcaloide reticulina (FIGURA 83), um alcaloide isoquinolínico comumente descrito na família Annonaceae, sendo conhecido como precursor dos alcaloides aporfínicos em geral (LEBOEUF *et al*., 1981; ICHIMARU *et al*. 1997; DEWICK, 2009). Na tabela 7 são apresentadas as comparações com dados da literatura com os sinais atribuídos para a estrutura da reticulina.

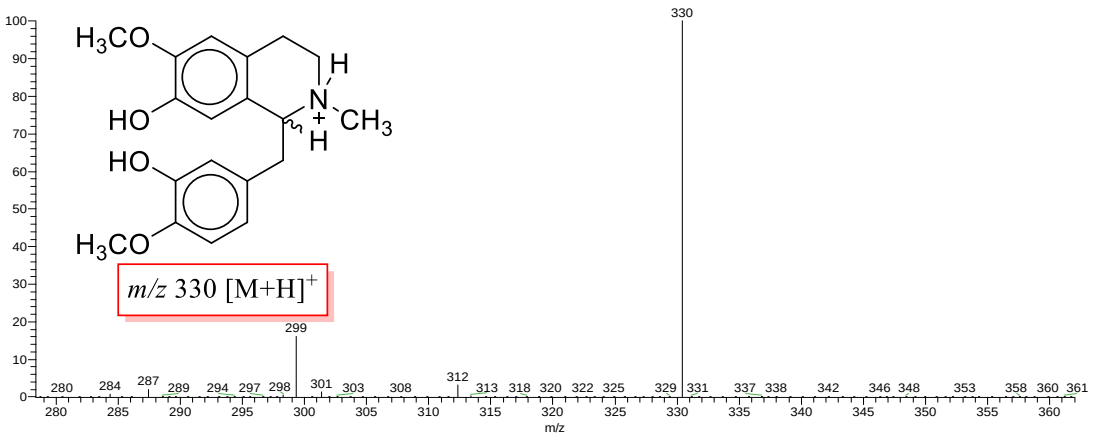
FIGURA 107: Estrutura da substância **S7**, reticulina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

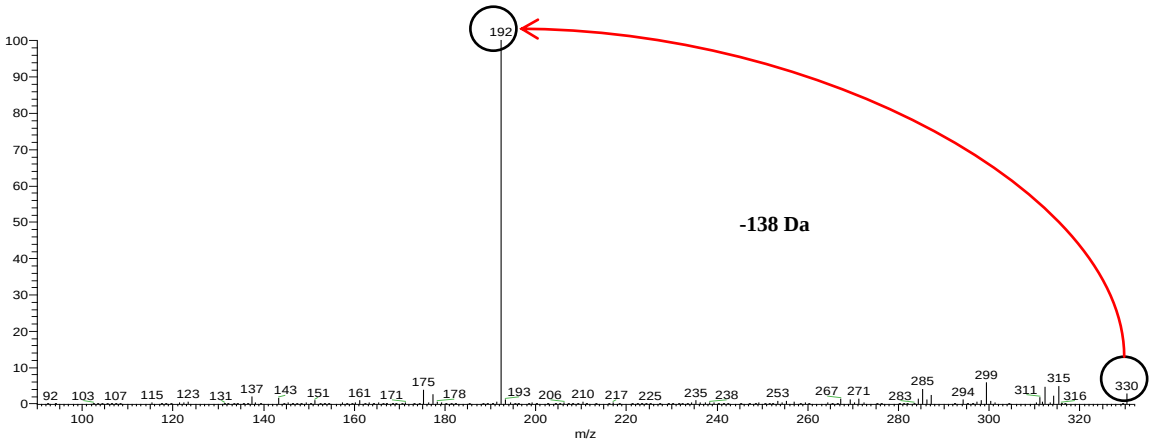
A análise por EM no modo positivo apontou um íon molecular protonado em *m/z* 330, condizente com a estrutura DP7 inferida a partir do espectro de LS-MS, a molécula apresentou uma fragmentação com alta perda gerando o íon *m/z* 192 associada a alcaloides benzil-tetraidroisoquinolínicos.

FIGURA 108: Espectro de massas da substância S7, modo positivo.



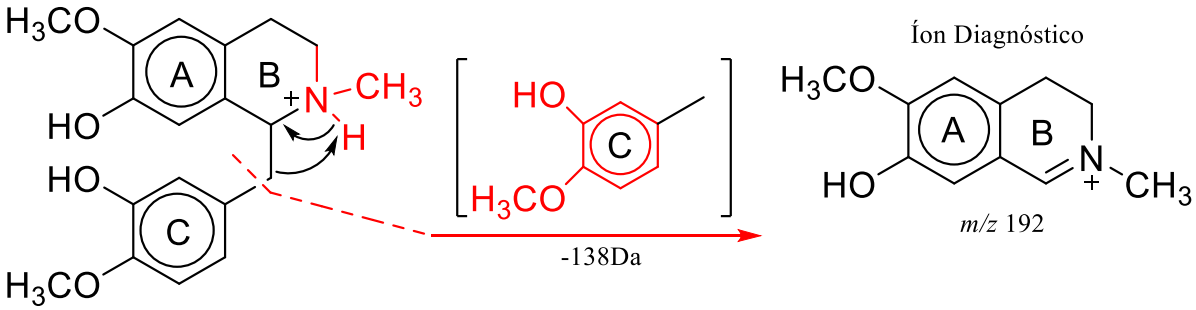
Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 109: Espectro de fragmentação de S7.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

FIGURA 110: Estrutura proposta com base na fragmentação do íon *m/z* 330, reticulina.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

TABELA 20: Dados espectrométricos de RMN (^{1}H: 500 MHz; ^{13}C: 125 MHz; $CDCl_3$) S7.

Posição	S7			Reticulina[c]	
	$^{1}H^{a}$ δ (mult., *J* em Hz)[a]	^{13}C (δ)[a]	HSQC (^{1}H-^{13}C)[b]	^{1}H δ (mult., J em Hz)[b]	^{13}C (δ)[a]
1	3,78 (1H,*t*,6,3x2)	64,3 C	64,3 C-1	3,72(1H,*dd*,7,0 e 5,2)	64,6
2	-	-	-	-	-
3	3,22(1H,*m*,H-3 pseudoeq) 2,87(1H,*m*,H-3 pseudoax)	46,1 CH_2	46,1-C3	3,17 (1H,*m*,H-3 pseudoeq) 2,80 (1H,*m*,H-3 pseudoax)	46,4
4	2,65 (1H,*m*,H-4 pseudoeq) 2,87(1H,*m*,H-4 pseudoax)	24,4 CH_2	24,4 C-4	2,64 (1H,*m*,H-4 pseudoeq) 2,86 (1H,*m*,H-4 pseudoax)	24,6
4a	-	124,2 C	-	-	124,1
5	6,55(1H,*s*)	110,6 CH	110,6 C-5	6,55 (1H,*s*)	111,0
6	-	145,4 C	-	-	146,0
7	-	143,5 C	-	-	143,5
8	6,29 (1H,*s*)	113,9 CH	113,9 C-8	6,20 (1H,*s*)	114,2
9	2,77(1H,*dd*,13,9 e 6,9 H-9a) 3,12(1H,*dd*,14,0 e 5,5 H-9b)	40,7 CH_2	40,7 C-9	2,74 (1H,*dd*,13,8 e 7,0 H-9a) 3,07 (1H,*dd*,13,8 e 5,2 H-9b)	40,6
10	-	132,3 C	-	-	132,5
11	6,56(1H,*dd*,8,2 e 2,1)	121,0 CH	121,0 C-11	6,54 (1H,*dd*,8,2 e 2,0)	121,0
12	6,72 (1H,*d*, 8,2)	110,6 CH	110,6 C-12	6,74 (1H,*d*, 8,2)	111,1
13	-	145,49 C	-	-	145,7
14	-	145,28 C	-	-	145,6
15	6,76 ((1H,*d*,2,0)	115,8 CH	115,8 C-15	6,70 (1H,*d*,2,0)	116,1
6-OCH_3	3,84 (3H,*s*)	55,6 C	-	3,83 (3H,*s*)	55,8
13OCH_3	3,84 (3H,*s*)	55,8 C	-	3,84 (3H,*s*)	55,9
N-CH_3	2,51(3H,*s*)	41,7 C	-	2,47 (3H,*s*)	42,0

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

Experimento realizado a 500 MHz para RMN de ^{1}H e 125 MHz para RMN de ^{13}C com $CDCl_3$ utilizado como solvente e TMS como padrão interno. [b]Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios.[c] Dados coletados da literatura (CRUZ, 2011), experimento realizado em equipamento de 400 MHz para RMN de ^{1}H e 100 MHz para RMN de ^{13}C, solvente utilizado $CDCl_3$, com gotas de CD_3OD e TMS como padrão interno.

5.4 Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) do óleo essen-cial das folhas de *Duguetia pycnastera*

Através da análise de CG-EM (**Apêndices**) do óleo essencial obtido das folhas de *D. pycnastera*, foi possível identificar 96,17% dos constituintes do óleo essencial (Tabela 21), além de observar a predominância dos constituintes *α*-gurjuneno (26,73%), germacreno D (15,34%) biciclogermacreno (24,93%) e espatulenol (12,95%), respectivamente (**Apêndices**), o que representa 79,95% destes constituintes do óleo essencial.

TABELA 21: Composição química do óleo essencial das folhas de *D. pycnastera*.

N°	IA[a]	IA[b]	Composição	R_1 Teor %	R_2 Teor %	Média	Desvio
1	1334	1335	*δ*-elemeno	1,51	1,57	1,54	±0,03
2	1347	1348	*α*-cubebeno	1,78	1,82	1,8	±0,02
3	1364	1369	ciclosativeno	0,3	0,41	0,355	±0,055
4	1373	1373	*α*-ylangeno	0,88	0,93	0,905	±0,025
5	1381	1387	*β*-bourboneno	0,13	0,15	0,14	±0,01
6	1387	1387	*β*-cubebeno	0,23	0,25	0,24	±0,01
7	1389	1389	*β*-elemeno	0,43	0.44	0,43	0,00
8	**1406**	**1409**	***α*-gurjuneno**	**26,73**	**26,93**	**26,83**	**±0,1**
9	1415	1417	(*E*)-cariofileno	1,26	1,27	1,265	±0,005
10	1425	1430	*β*-copaeno	0,71	0,73	0,72	±0,01
11	1436	1437	*α*-guaieno	0,4	0,45	0,425	±0,025
12	1447	NA	NA	0,32	0,43	0,375	±0,055
13	1450	1452	*α*-Humuleno	0,4	0,44	0,42	±0,02
14	1457	1458	Allo-aromadendreno	2,19	2,23	2,21	±0,02
15	1474	1475	γ-gurjuneno	0,39	0,51	0,45	±0,06
16	**1478**	**1480**	**germacreno D**	**15,34**	**15,36**	**15,35**	**±0,01**
17	**1493**	**1500**	**biciclogermacreno**	**24,93**	**24,88**	**24,90**	**±0,025**
18	1498	1500	*α*-muuroleno	1,26	1,25	1,255	±0,005
19	1503	1496	viridifloreno	0,53	0,54	0,535	±0,005
20	1511	1513	*γ*-cadineno	0,43	0,44	0,435	±0,005
21	1520	1522	*δ*-cadineno	1,1	1,3	1,2	±0,1
22	1562	1567	palustrol	1,37	1,42	1,395	±0,025
23	**1572**	**1577**	**espatulenol**	**12,95**	**12,99**	**12,97**	**±0,02**
24	1596	1592	viridiflorol	0,92	0,96	0,94	±0,02
	81% Sesquiterpenos não oxigenados						
	15 % Oxigenados						

Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

IR[a]- Índice de retenção calculado; **IR[b]-** Índice de retenção de acordo com a literatura (Adams, 2007).
N.A. – Não identificado

No estudo realizado por Maia (2006), o componente majoritário encontrado em *D. pycnastera*, foi o espatulenol com composição percentual de 52%, no entanto, 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).

5.5 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 $CI_{50} < 30,0$ μg.mL^{-1}. Da mesma forma, para substâncias puras, são consideradas drogas promissoras os compostos com valores de $CI_{50} < 4,0$ μg.mL^{-1} ou 10 μmol.L^{-1} (SUFFNES; PELUZO, 1990; BOIK, 2001).

5.5 Investigação da atividade citotóxica dos extratos, frações e substâncias isoladas de *Duguetia pycnastera*

Na tabela 22 são apresentados os resultados obtidos no ensaio de citotoxidade dos extratos, frações e substâncias isoladas com seus respectivos valores de IC_{50}. Dentre os extratos obtidos apenas o metanólico apresentou maior potencial de inibição frente às linhagens tumorais testadas. Com base no resultado obtido da concentração única o extrato metanólico das cascas (EMDPC) teve sua citotoxidade avaliada contra quatro células tumorais, MCF-7,

HCT116, HepG2 e HL-60, e uma célula normal, MRC5. Conforme observado na tabela 20, o EMDPC apresentou resultado promissor frente a HepG2 e HL-60 com valores de CI_{50} iguais a 9,08 e 6,15 µg.mL^{-1}, respectivamente. Para a célula normal MRC5 o EMDPC não apresentou citotoxicidade o que é ideal para um produto natural.

Com base nesse resultado e em busca das substâncias bioativas, o EMDPC foi submetido ao tratamento ácido-base, rendendo as frações, neutra (FNCDP) e alcaloídica (FACDP) que foram submetidas também ao ensaio de citotoxicidade. Entretanto, apenas a fração alcaloídica FACDP foi ativa contra as duas células cancerígenas testadas MCF-7 e HepG2 com valores de CI_{50} iguais a 14,09 e 11,58 µg/mL, respectivamente, indicando provavelmente que os alcaloides são responsáveis pela atividade apresentada tanto em EMDPC quanto em FACDP. Por outro lado, também se apresentou tóxico em células normais, mais tóxico do que observado para as células tumorais.

TABELA 22: Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais.

	CI_{50} µg.mL^{-1} (µmol L^{-1})				
Extratos	**MCF-7**	**HCT116**	**HepG2**	**HL-60**	**MRC5**
extrato hexânico	>50	>50	>50	>50	>50
extrato metanólico	29.80 15.31 – 38.01	>50	9.08 4,50 – 18,31	6.15 2,94 – 12,86	>50
fração alcaloídica	14.09 9.73 – 20.39	-	11.58 9.37 – 14,30	-	7.14 5.56 – 9.16
Substâncias isoladas	**CI_{50} µg.mL^{-1} (µmol L^{-1})**				
N-oxiguaterina **(1)**	N.D.	21.26 (102.09) 13.20 – 34,26	13.49 (64.78) 9.90 – 18.37	N.D.	19.75 (94.84) 5.24 – 18.16
O-metilmoschatolina **(2)**	N.D.	N.D.	(>77.80)	11.20 (34.85) 7.62-16,41	(>77.80)
lisicamina **(3)**	N.D.	N.D.	8.47 (29.08) 4.80-14.71	7.19 (24.68) 4.43-11.39	(>85.82)
reticulina **(4)**	N.D.	(>75.90)	22.54 (68.43) 7.39 – 29.21)	N.D.	(>75.90)
2,4,5-trimetoxi-estireno **(5)**	(>128.71)	(>128.71)	(>128.71)	(>128.71)	(>128.71)
1-allil-2,4,5-trimetoxibenzen**o (6)**	(>128.71)	(>128.71)	(>128.71)	(>128.71)	(>128.71)
doxorubicina	0.28 (0.515) 0.20 – 0.39	0.13 (0.239) 0.08 – 0.21	0.03 (0.055) 0.01 – 0.19	0.04 (0.073) 0.02 – 0.08	1.77 (3.26) 0.77 – 4.09

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Os dados são apresentados como valores de IC_{50} em µg / mL (µmol L^{-1}) e seu intervalo de confiança de 95% obtido por regressão não linear de três experimentos independentes realizados em duplicado, medidos usando um ensaio Alamar Blue após 72 h de incubação. N.D .: Não determinado.

Entre as substâncias isoladas apenas os alcaloides (2) e (3) apresentaram atividade citotóxica promissora com valores de IC_{50} entre 29,08 e 34,85 µmol L^{-1}, respectivamente. Para as células tumorais testadas, as substâncias (1) e (4) apresentaram valores que variam entre médio e moderado com CI_{50} entre 68,43 a 102,09 µmol.L^{-1}, respectivamente. Para as substâncias (5) e (6) não obteve resultados consideráveis, e o alcaloide nornuciferidina foi enviado para testes e ainda não houve retorno do laboratório responsável. Vale ressaltar que os alcaloides (2) e (3) são estruturas oxoaporfinas o que sugere 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 o grupo 1,2-metilenodioxi, mostraram 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).

Desta forma, novas investigações devem ser realizadas com o intuito de estabelecer sua verdadeira eficácia, assim como a toxidade desses e de outros alcaloides presentes identificados neste trabalho. Vale ressaltar 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.

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico do extrato hexânico (EHCDP) das cascas de *D. pycnastera* levou ao isolamento de duas (2) substâncias; 2,4,5-trimetoxi-estireno e 1-alilo-2,4,5-trimetoxibenzeno (γ-asarona), pertencentes a classe dos fenilpropanoides denominados asaronas, sendo inéditas na espécie em estudo. Já o estudo fitoquímico da fração alcaloídica (FADPC) proveniente do extrato metanólico (EMDPC) resultou no isolamento de cinco (5) substâncias pertencentes a classe dos alcaloides sendo dois oxoaporfinos, sendo a lisicamina e *O*-metilmoschatolina; dois (2) aporfinos sensu stricto; *N*-oxiguaterina e nornuciferidina e um (01) benziltetraidroisoquinolínico.; reticulina. A análise das chaves de fragmentação das cascas *in natura* utilizando uma fonte ambiente LS-MS permitiu identificar 13 possíveis substâncias por tentativa, sendo 4 (quatro) confirmadas por RMN 1D/2D.

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* dos extratos revelou a capacidade antitumoral da espécie estudada. Dentre as amostras avaliadas, a fração alcaloídica (FADP) foi a mais promissora, apresentando atividade para as linhagens tumorais MCF7 (29,80 $\mu g.mL^{-1}$) e HL60 (6,15 μg/mL), no entanto com alta toxicidade para células normais. Dentre os alcaloides isolados, a lisicamina apresentou resultado promissor para células HepG2 e HL-60 com CI_{50} 29,08 e 24,68 $\mu mol.L^{-1}$, respectivamente. Além disso, a *O*-metilmoschatolina apresentou atividade citotóxica promissora para a célula HL-60 (34,85 $\mu mol.L^{-1}$).

A análise por CG-EM do óleo essencial permitiu a identificação de 24 constituintes, destacando-se como majoritários, os sesquiterpenos germacreno D (15,35%), α-gurjuneno (26,83%), biciclogermacreno (24,90%), espatulenol (12,97%) e germacreno D (15,35%). A avaliação larvicida do óleo foi considerável apresentando mortalidade em todas as concentrações utilizadas com CL_{50} =85,195%.

As substâncias 2,4,5-trimetoxi-estireno e 1-alilo-2,4,5-trimetoxibenzeno (γ-asaronas) apresentaram baixa porcentagem de inibição frente as linhagens de células tumorais testadas, no entanto, a atividade antifúngica já foi relatada para a substância γ-asarona, indicando novas alternativas de ensaios biológicos a serem realizados.

Os resultados obtidos neste trabalho confirmam que *D. pycnastera* é quimicamente uma espécie típica da família *Annonaceae*, além de uma fonte promissora de substâncias biologicamente ativas quando testadas com células tumorais. Esses dados corroboram com o estudo fitoquímico e biológico do gênero, tornando promissora a continuidade do estudo da espécie *Duguetia pycnastera*, bem como as demais espécies desse gênero.

REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectroscopy. 4.1Ed. Carol Stream: Allured Publishing, Corp, 2017. 803p.

AWANTIKA Singh, Vikas Bajpai, Sunil Kumar, Ajay Kumar Singh Rawat, and Brijesh Kumar. "Analysis of isoquinoline alkaloids from Mahonia leschenaultia and Mahonia napaulensis roots using UHPLC-Orbitrap-MSn and UHPLC-QqQLIT-MS/MS" **Journal of Pharmaceutical Analysis, vol. 7, no. 2, 2016. doi:10.1016/j.jpha.2016.10.002**

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

ALMEIDA J.R.G.S., J.T. de Lima, H.R. de Oliveira, M.R. de Oliveira, P.R.M. Meira, A.S.S.C. Lúcio, J.M. Barbosa Filho & L.J. Quintans Júnior. Antinociceptive activity of discretamine isolated from Duguetia moricandiana. From **Natural Product Research, v. 25, n. 20, p. 1908-1915, 2011.**

ALMEIDA, J. R. G. S;RIBEIRO,M.A; P.R.M. Meira, Composition and antimicrobial activity of the leaf essential oils of Duguetia gardneriana Mart. And Duguetia moricandiana Mart. (*Annonaceae*). **From Journal of Essential Oil Research, v. 22, n. 3, p. 275-278, 2010.**

ALMEIDA et al., Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (*Annonaceae*). **International Journal of Pharma and Bio Sciences, v. 2, p. 367-374, 2011.**

ARAÚJO DE ALMEIDA-APOLONIO, ADRIANA & GOMES DA SILVA DANTAS, FABIANA & BELARMINO RODRIGUES, ALLAN & ANDRÉA LIMA CARDOSO, CLAUDIA & NEGRI, MELYSSA & OLIVEIRA, KELLY & RODRIGUES CHANG, MARILENE. (2018). Antifungal activity of Annona coriacea Mart. ethanol extracts against the aetiological agents of cryptococcosis. **Natural Product Research. 1-5. 10.1080/14786419.2018.1440221.**

ARUN K. SINHA,*, RUCHI ACHARYA, AND, AND BHUPENDRA P. JOSHI,J**ournal of Natural Products** 2002 65 (5), 764-765 DOI: 10.1021/np010559s, A Mild and Convenient Procedure for the Conversion of Toxic β-Asarone into Rare Phenylpropanoids: 2,4,5-Trimethoxycinnamaldehyde and γ-Asarone

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.]**

AMARENDRA PATRA AND ALOK K. MITRA .Constituents of Acorus calamus: Structure of Acoramone. Carbon-13 NMR Spectra of Cis- and Trans-Asarone, **Journal of Natural Products 1981 44 (6), 668-669,DOI: 10.1021/np50018a007**

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

BASTOS, J. S. Q. and PEREIRA, M. J. B. and COSTA, M. S. and Turchen, L. M. and Pinheiro, D. O. and Cremonez, P. S. G.", "Effect toxic and behavioral of Annona

mucosa(*Annonaceae*)on the tomato leaf miner., **Journal of Agricltural Science (Toronto); 2018, volume 10 number 8pages 362-371.**

BERG K, BISCHOFF R, STEGMÜLLER S, CARTUS AT, SCHRENK D. Comparative Investigation of the Mutagenicity of Propenylic and Allylic Asarone Isomers in the Ames Fluctuation Assay”**, Mutagenesis, 2016, 31, 4, 443–451. doi: 10.1093/mutage/gew007.**

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

BRANDÃO, HUGO N., DAVID, Juceni P., Couto, RICARDO D., NASCIMENTO, Jorge A. P., & DAVID, Jorge M.. (2010). Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. ***Química Nova, 33*(6), 1359-1369.** https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000600026

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

CAMPOS, FRANCINETE & L. BATISTA, REGIANE & L. BATISTA, CRISTIANE & COSTA, EMMANOEL & BARISON, ANDERSSON & G. DOS SANTOS, ADRIANE & BELEM PINHEIRO, MARIA. (2008). Isoquinoline alkaloids from leaves of Annona sericea (*Annonaceae*). Biochemical Systematics and Ecology - **Biochemical Systematics and Ecology 36. 804-806. 10.1016/j.bse.2008.07.005.**

CAROLLO, Carlos Alexandre et al . ALKALOIDS AND A FLAVONOID FROM AERIAL PARTS (LEAVES AND TWIGS) OF DUGUETIA FURFURACEA - *ANNONACEAE*. J. Chil. Chem. Soc., Concepción , v. 51, n. 2, p. 837-841, jun. 2006 . **Dispon. em <https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-97072006000200001&lng=es&nrm=iso>. acessado en 03 abr. 2019. http://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072006000200001**

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. **Journal of Ethnopharmacology, v. 122, p. 402–405, 2009.**

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

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

CLAUDINO DOS SANTOS, RAFAEL & VILLAMAIOR DE SOUZA, ALEXSANDRA & SILVA, MAGAIVER & CARDOSO VERA CRUZ, KAROLINY & APARECIDA LEITE KASSUYA, CANDIDA & ANDRÉA LIMA CARDOSO, CLAÚDIA & VIEIRA, MARIA & SAMARA NAZARI FORMAGIO, ANELISE. (2017). Antioxidant, anti-rheumatic and anti-inflammatory investigation of extract and dicentrinone from Duguetia furfuracea (A. St.-Hil.) Benth. & Hook. f. **Journal of Ethnopharmacology. 211. 10.1016/j.jep.2017.09.019.**

COUVREUR, T.L.P.; MAAS, P.J.M.; MEINKE, S.; JOHNSON, D.M.; KESSLER, P.J.A. Keys to the genera of *Annonaceae*. **Botanical Journal of the Linnean Society, London, v. 169, n. 1, p.74-83, 2012.**

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

COSTA, 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.; 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-dimetilaporphine alkaloids from the stem of *Guatteria friesiana*. **Journal of Natural Products, v. 72, p. 1516-1519, 2009.**

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, p. 9714–9720, 2011.**

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

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

CUNHA, Livia Melo Arruda. Estudo Fitoquímico e Biológico de Duguetia riparia (*Annonaceae*). 2**009. 156 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.**

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approuch. [s.l: s.n.]. v. Único

DEBOURGES, D.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Alcaloïdes des Annonacees, 77 ’. Alcaloïdes de *Duguetia spixiana*. Journal of Natural Products, v. 50, n. 4, p. 664–673, 1987.

DEBOURGES, D.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. *N*-oxycodamine, alcaloide de *Duguetia spixiana*, synthese et RMN H de N-oxides de benzyltétrahydroisoquinoléines. J**ournal of Natural Products, v. 50, n. 5, p. 852–859, 1987.**

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: Assessing two staining methods for cytotoxicity tests on tumor cell lines. **Revista Colombiana de Biotecnologia, v. 11, n. 2, p. 49–56, 2009.**

FACCHINI, P. J.; LISCOMBE, D. K. Evolutionary and cellular webs in benzylisoquinoline 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.**

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

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

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 Fragance Journal, v. 29, p. 228–232, 2014.**

FERREIRA, AGNIESZKA & LOURENÇO, FELIPE & MARX YOUNG, MARIA CLÁUDIA & LIMA, MARCOS & CORDEIRO, INÊS & SUFFREDINI, IVANA & LOPES, PATRICIA & MORENO, PAULO. (2017). Chemical composition and biological activities of Guatteria elliptica R. E. Fries (*Annonaceae*) essential oils. **Journal of Essential Oil Research. 1-8. 10.1080/10412905.2017.1371086.**

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.**

F. ROBERTS, MARGARET & STRACK, DIETER & WINK, MICHAEL. (2010). Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. **Annual Plant Reviews book series, Volume 40: Biochemistry of Plant Secondary Metabolism 20 - 91. 10.1002/9781444320503.**

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**.

GONÇALVES et al., Compounds from *Duguetia lanceolata* St.- Hil. (*Annonaceae*) bioactive against Zabrotes subfasciatus (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). **Industrial Crops and Products, v. 97, p. 360–367, 2017.**

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; MAIA, J. G. S.; MARSAIOLI, A. J. Oxoaporphine alkaloids from Duguetia eximia. **Phytochemistry, v. 17, p. 837–838, 1978.**

GUINAUDEAU, H.; SHAMA, M. Biogenetic pathways for the aporphinoid alkaloids.**Tetrahedron, v. 40, n. 23, p. 4795-4822, 1984.**

HASHIMOTO, K.; YANAGISAWA, T.; OKUI, Y.; IKEYA, Y.; MARUNO, M.; FUJITA, T. Studies on anti-allergic components in the roots of Asiasarum sieboldi. **Planta Med. 1994, 60, 124–127.**

ISIOGUGU, OGECHUKWU & EZIKE, ADAOBI & PETER, IKECHUKWU & ONWUKA, MARY & OBI, BONAVENTURE & ABONYI, UCHENNA. (2018). Effects of Monodora myristica (Gaertn, Dunal.) (*Annonaceae*) root bark on acute and chronic inflammation.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSE ALENCAR GOMES DA SILVA. Tipos de câncer. Rio de Janeiro, 2017b. Disponivel em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home>. Acesso em: 14 Março. 2019.

JURGENS et al., Floral scent compounds of Amazonian *Annonaceae* species pollinated by small beetles and thrips. **Phytochemistry, v. 55, p. 551-558, 2000.**

LIMA, Bruna R. de et al . Integrative Approach Based on Leaf Spray Mass Spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for Comprehensive Characterization of Isoquinoline-Derived Alkaloids in Leaves of Onychopetalum amazonicum R. E. Fr. **J. Braz. Chem. Soc.**, São Paulo , v. 31, n. 1, p. 79-89, Jan. 2020 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-50532020000100079&lng=en&nrm=iso>. access on 17 Feb. 2020. Epub Jan 10, 2020. https://doi.org/10.21577/0103-5053.20190125.

LAGE, G. A. Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. [s.l.] **Universidade Federal de MInas Gerais, 2011.**

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the *annonaceae*. **Phytochemistry, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1980.**

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

LOPES, J. D. E. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e Caracterização das *Annonaceae* do Brasil. V **Congresso Internacional e Encontro Brasileiro sobre *Annonaceae*: do gene à exportação. Anais...2014**

LÚCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. 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, 2015b.**

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

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

MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y. T.; CHATROU, L.W. *Duguetia*. Flora Neotropica Monograph, New York, v. 88, p. 1-274, 2003.

MAAS, P.J.M.; RAINER, H.; LOBÃO, A.Q. *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. **Disponível em: <http://floradobrasil. jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110572>. Acesso em: 8 mar. 2019.**

MATHERS, C. D. et al. Global burden of disease in 2002: data sources, methods and results. Geneva: WHO, 2003. (Global programme on evidence for health policy discussion paper, v. 54).

MAIA JGS, ANDRADE EHA, CARREIRA LMM, OLIVEIRA J 2006. Essential oil composition from *Duguetia* species (*Annonaceae*). ***J Essent Oil Res 18*: 60-63.**

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.**

MENEZES, L. R. A. Estudo Fitoquímico e Investigação da Atividade Citotóxica do Caule de *Xylopia laevigata* (*Annonaceae*). **[s.l.] Universidade Federal de Sergipe, 2015.**

MIGUEL, O. G.; MONTUCCHIO, D. P.; SANTOS, A. R. S. DOS; DIAS, J. DE F. G.; MIGUEL, M. D.; ZANIN, S. M. W.; MELO, C. F. DE; ZANIN, P. Identificação da propriedade antinoceptiva (analgésica) do alcaloide aporfínico S- (+) -dicentrina e usos do mesmo **Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Brasil, 2016.**

MONTENEGRO, H.; GUTIÉRREZ, M.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; CAPSON, T. L.; RIOS, L. C. Aporphine Alkaloids from *Guatteria* spp . with Leishmanicidal Activity. **Planta Medica, v. 69, p. 677–679, 2003.**

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**.

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; TAKAMATSU, S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antimalarial , Cytotoxic , and Antifungal Alkaloids from Duguetia hadrantha. **Journal of Natural Products, v. 64, p. 559–562, 2001.**

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

NAGASHIMA, F.; MURAKAMI, Y.; ASAKAWA, Y. Aromatic compounds from the Ecuadorian liverwort *Marchesinia brachiata*: a revision, **Phytochemistry, v. 51, p. 1101-1104, 1999.**

NASCIMENTO,M.N.G.; MICHELLE & GABRIEL M. JUNQUEIRA, JOÃO & TEREZAN, ANA & PRISCILA SEVERINO, RICHELE & de SOUZA SILVA, THAYNÁ & MARTINS, CARLOS HENRIQUE & SEVERINO, VANESSA. (2018). Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Xylopia aromatica (*Annonaceae*) Flowers and Leaves. **Revista Virtual de Química. 10. 1578-1590. 10.21577/1984-6835.20180105.**

NASCIMENTO, M. C. B. S. Tese de Doutorado. Constituintes Bioorgânicos Isolados de *Annona cacans* Warming (*Annonaceae*) e Avaliações de Bioatividades. **Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Fevereiro de 2008, 197p.**

NEGBENEBOR, H. E. and MAKANJUOLA, W. A and DENLOYE, A. A. and NURA, S., Toxicity of powdered and ethanolic extracts of Uvaria chamae (*Annonaceae*) Bark on selected

stored product insect pests. **African Journal of Biotechnology,n °11, doi :10.5897/ajb2017.16257},pages;350-355, volume 17, year 2018, url = {https://app.dimensions.ai/details/publication/pub.1101816545 and http://academicjournals.org/journal/AJB/article-full-text-pdf/56574AE56324.**

NGOUONPE, W. ALAIN & SYLVAIN W. MBOBDA, ALEXIS & MOUTHÉ, GERVAIS & MBIANTCHA, MARIUS & K. TATUEDOM, OSTEND & S. ALI, MUHAMMAD & LATEEF, MEHR & CLAUDE TCHOUANKEU, JEAN & KOUAM, SIMEON. (2019). Natural products from the medicinal plant Duguetia staudtii (*Annonaceae*). **Biochemical Systematics and Ecology. 83. 22-25. 10.1016/j.bse.2018.12.015.**

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.**

OBAID, AHMED & HASHIM, YUMI & MHD BAKRI, YUHANIS & AOWDA, SAADON & SARIPAH, SALBIAH & NAFIAH, MOHD & AWANG, KHALIJAH & MOHD HASSAN, NORAZIAN & ABDULLAH, FAUZIAH. (2018). Antioxidative and cytotoxic activities of crude and isolated compounds of P. lateriflora (Bl.) King. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research. 10(11). 2718-2721.**

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European journal of biochemistry, v.267, p.5421 - 5426, 2000.**

OLIVEIRA, J. G. S. Estudo da Biodiversidade de Fungos Endofíticos, Potencial Citotóxico e Antimicrobiano de *Duguetia flagellaris* Huber. [s.l.] **Universidade Estadual do Amazonas, 2013.**

OLIVEIRA, Rodolfo Nascimento de. Estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica das cascas do caule de Duguetia surinamensis (*Annonaceae*). **2017. 125 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2017.**

OLIVEIRA, J. G. DE S. Estudo da Biodiversidade de Fungos Endofíticos, Potencial Citotóxico e Antimicrobiano de Duguetia flagellaris Huber. **[s.l.] Universidade Estadual do Amazonas, 2013.**

OSHIDA, NÍDIA & PAES SAFFRAN, FRANCIS & LIMA, WILLIAM & VILALVA FREIRE, TALITA & MÁXIMO de SIQUEIRA, JOÃO & GARCEZ, WALMIR. (2018). Chemical characterization and bioherbicidal potential of the essential oil from the leaves of Unonopsis guatterioides (A.DC.) R.E.Fr. (*Annonaceae*). **Natural Product Research. 1-5. 10.1080/14786419.2018.1472595.**

PAZ, Weider H P; de Oliveira, Rodolfo N; Heerdt, Gabriel; Angolini, Célio F F; S de Medeiros, Lívia; Silva, Valdenizia R; Santos, Luciano S; Soares, Milena B P; Bezerra, Daniel P; Morgon, Nelson H; Almeida, Jackson R G S; da Silva, Felipe M A; Costa, Emmanoel V; Koolen, Hector H F.: Structure-Based Molecular Networking for the Target Discovery of Oxahomoaporphine and 8-Oxohomoaporphine Alkaloids from Duguetia surinamensis; ***Journal of Natural Products*** **2019** ***82*** **(8), 2220-2228 DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b00287**

PELKONEN, OLAVI & DUEZ, P & VUORELA, P.M. & VUORELA, H. (2017). **Toxicology of herbal products. 10.1007/978-3-319-43806-1.**

PÉREZ, EDWIN & CASSELS, BRUCE. (2010). Alkaloids from the Genus Duguetia. The Alkaloids. C**hemistry and biology. 68. 83-156. 10.1016/S1099-4831(10)06803-3**.

PÉREZ, E.; SÁEZ, J.; BLAIR, S.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B. Isoquinoline Alkaloids from *Duguetia Vallicola* Stem Bark with Antiplasmodial Activity. **Letters in Orgânic Chemistry, v. 1, p. 102–104, 2004.**

PINHEIRO et al., Phytochemical screening and evaluation of cytotoxicity of stem bark extracts of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (*Annonaceae*). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research April, v. 4, p. 793-798, 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.**

GONTIJO, DOUGLAS & BRANDÃO, GERALDO & NASCIMENTO, MARIA & DE OLIVEIRA, ALAIDE. (2018). Antiplasmodial activity and cytotoxicity, isolation of active alkaloids, and dereplication of Xylopia sericea leaves ethanol extract by UPLC-DAD-ESI-MS/MS. **Journal of Pharmacy and Pharmacology. 10.1111/jphp.13029.**

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.**

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

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

RABELO, Diego de M. et al . Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de Guatteria citriodora (*Annonaceae*). Quím. Nova, São Paulo , v. 37, n. 9, p. 1453-1458, 2014 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422014000900005&lng=en&nrm=iso>. access on 20 Feb. 2019. http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20140233

RABÊLO, S. V. Revisão de Alcaloides do Gênero Annona, Estudo Fitoquímico e Avaliação da Atividade Biológica de Atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). **[s.l.] Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2014.**

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

RICHARDSON, J.E.; CHATROU, L.W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H.J; PIRIE, M.D. Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: *Annonaceae* and Rhamnaceae. **Philosophical Transactions of the Royal Society B, London, v. 359, p. 1495-1508, 2004.**

ROBERTS F., MARGARET & STRACK, DIETER & WINK, MICHAEL. (2010). Biosynthesis of Alkaloids and Betalains. 20 - 91. 10.1002/9781444320503.ch2. ***Annual Plant Reviews (2010) 40, 20–91 http:doi: 10.1002/9781119312994.apr0424***

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

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

SANTOS, A.R. M.V.N. Alcaloides e constituintes voláteis de três espécies de *Guatteria*, avaliação das atividades antiproliferativa e antimicrobiana e estudos de biotransformação de um alcaloide oxoaporfínico e seus precursores sintéticos. **Curitiba, 131 p. Tese de Doutorado, Departamento De Química - Universidade Federal Do Paraná, 2014.**

SAXENA, B.P. & KOUL, O. 1982 Essential oils and insect control. In Cultivation and Utilization of Aromatic Plants eds. Atal, C.K. & Kapoor, B.M. pp. 766–775. **New Delhi: Publication and Information Directorate (CSIR).**

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

SNEHA, M.; DULAY, M.; ZARE, R. **N.Introducing mass spectrometry to first-year undergraduates: analysis of caffeine and other components in energy drinks using paper-spray mass spectrometry. International Journal of Mass Spectrometry, v.418, p.156-161, 2017.**

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.**

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

SILVEIRA, A. J. de A. Alcalóides isoquinolínicos de Duguetia pycnastera. 1994. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – **Curso de Pós-Graduação em Química, UniversidadeFederal do Pará, Belém.**

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 J.L.H. Jiwan, R. Rozenberg, E. Hoffmann, J.Q. Leclercq, Keyfragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization withmultistage mass spectrometry, Rapid Commun. **Mass Spectrom. 18 (2004)523–528.**

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

SANTOS, Maria de Fátima C. et al . ALKALOIDS FROM LEAVES OF GUATTERIA POGONOPUS (*ANNONACEAE*) AND THEIR CYTOTOXICITIES. **Química Nova,** São Paulo , v.41, n.8, p.884-890, Aug. 2018 Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010040422018000800884&lng=en&nrm=iso>. access on 01 Apr. 2019. http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170258

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 ESIIT- MSn alkaloids from Bocageopsis pleiosperma maas (Annonaceae). **Phytochemical Analysis, v.26, p. 339-345, 2015a.**

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.

SOUSA et al., In- vivo and vitro bioactivities of the essential oil of Duguetia lanceolata branches. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology, v. 10, n. 14), p. 298-310, 2016.**

SIQUEIRA, J. M. DE; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula - Annonaceae*, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia Salina* Leach. **Quimica Nova,** v. 24, n. 2, p. 185–187, 2001. 106

SILVA, FELIPE & A. BATAGLION, GIOVANA & A. DE ALMEIDA, RICHARDSON & HEERDT, GABRIEL & L. SOUSA, IRAN & A. DA SILVA FILHO, FRANCINALDO & C. DE ALENCAR, DANIELLE & COSTA, EMMANOEL & SOUZA, AFONSO & BELEM PINHEIRO, MARIA & MORGON, NELSON & KOOLEN, HECTOR. (2016). 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**. 418. 10.1016/j.ijms.2016.12.004.

SILVA, Denise B. da et al . Chemical constituents of the underground stem bark of Duguetia furfuracea (*Annonaceae*). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo , v. 18, n. 8, p. 1560-1565, 2007 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-

50532007000800017&lng=en&nrm=iso>. access on 22 Jan. 2019. http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000800017.

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

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

TEICHERT et al., A novel pollination mode, saprocantharophily, in *Duguetia cadavérica* (*Annonaceae*): **Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants**, v. 207, p. 522-529, 2012.

TAVARES, J.F. et al . Alkaloids and volatile constituents from the stem of Fusaea longifolia (Aubl.) Saff. (*Annonaceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**., João Pessoa , v. 15, n. 2, p. 115-118, jun. 2005 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2005000200008&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 22 mar. 2019. http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200008.

TING KAN S, Syahrizal AHMAD M, ABDUL SYED Salbiah AZZIZ S, AWANG K, MHD BAKRI Y, Azlan NAFIAH M, ABBAS P, Has-Yun Zuhanis HASHIM Y. Oxoaporphine alkaloids from the barks of Platymitra siamensis Craib (*Annonaceae*) and their cytotoxicity against MCF-7 cancer cell line. **Journal of Research in Pharmacy** 2019; 23(2): 217-223. http://dx.doi.org/10.12991/jrp.2019.127

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.

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

VARMA, JAYA & TRIPATHI, MANJU & RAM, V.J. & PANDEY, V.B. & DUBEY, N.K.. (2002). γ-Asarone – the fungitoxic principle of the essential oil of Caesulia axillaris. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**. 18. 277-279. 10.1023/A:1014905111973.

VIEGAS Jr, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. (2006), Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova,** 29,326-337.

WANG et al., 2,4,5-trimethoxystyrene, A bioactlve component of the bark of Duguetia panamensis, J**ournal of Natural Produrts, v. 51, n. 2, p. 382-384, 1988.**

WATERMAN GP (1976) 2,4,5-Trimethoxystyrene from *Pachypodanthium staudtii*. **Phytochemistry 15: 231–234.**

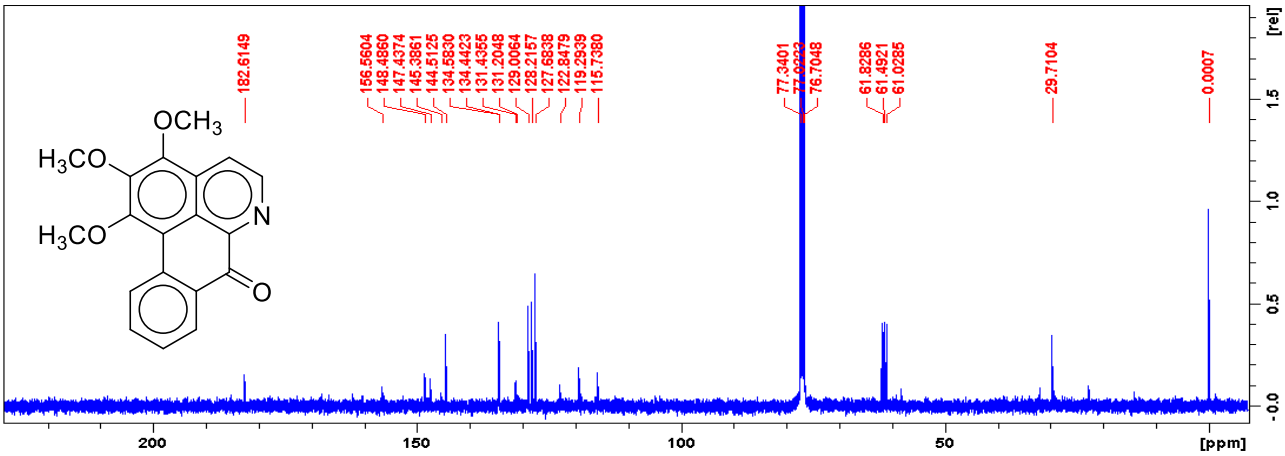
XUE, BINE & TAN, YUNHONG & THOMAS, DANIEL & CHAOWASKU, TANAWAT & HOU, XUE-LIANG & SAUNDERS, RICHARD. (2018). A new *Annonaceae* genus, Wuodendron , provides support for a post-boreotropical origin of the Asian-Neotropical disjunction in the tribe Miliuseae. **Taxon. 67. 250-266. 10.12705/672.2.**

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 beta-elemene with takanes against human lung carcinoma. **Internacional Journal of Oncology**, v. 31, n. 2, p. 241-252, 2007.

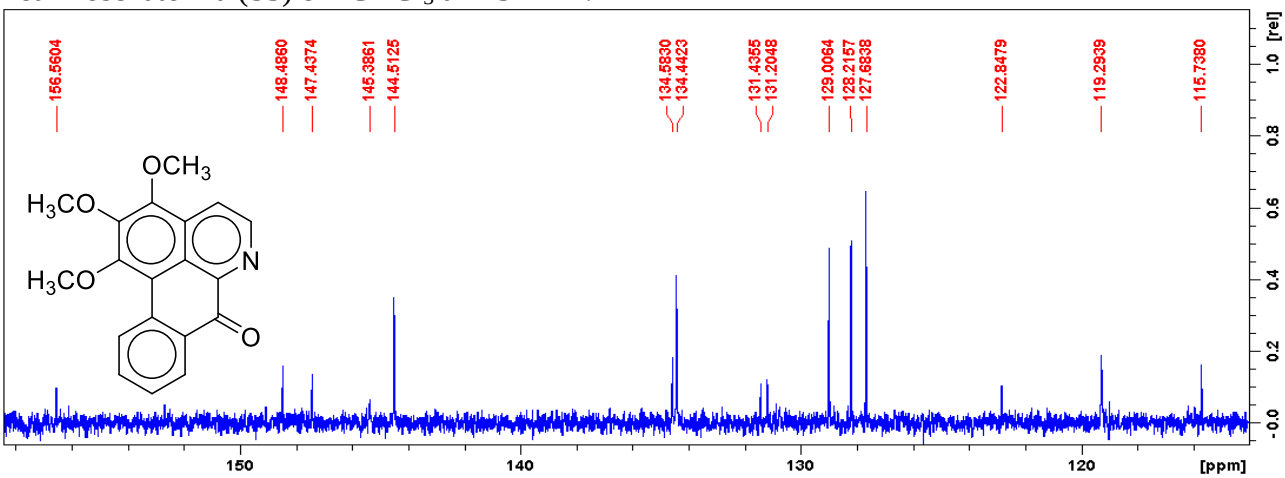
ZHAO, Y.; BUTLER, E. B.; TAN, M. Targeting cellular metabolism to improve cancer therapeutics. **Cell Death & Disease**, v. 4, n. 3, p. e532, 2013.

APÊNDICES

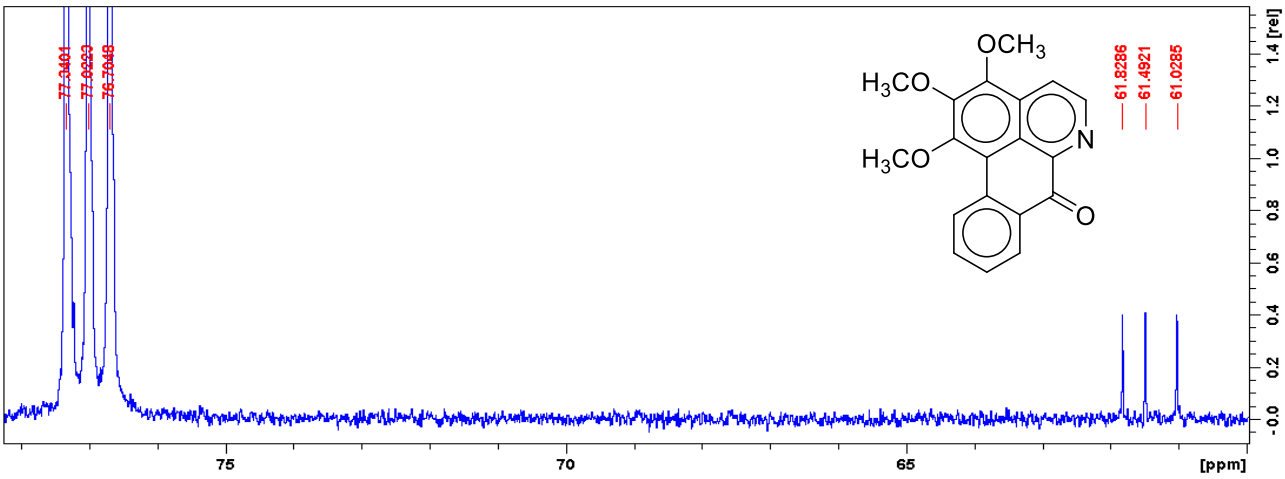
APÊNDICE 1: Espectro de ^{13}C RMN de O-metilmoschatolina (S3) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



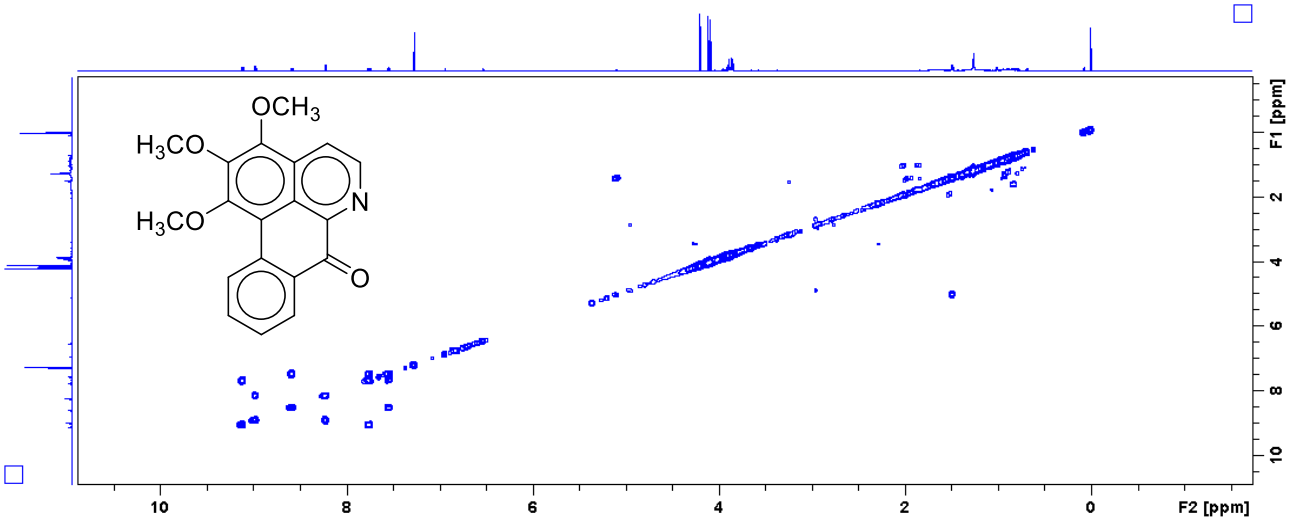
APÊNDICE 2: Ampliação da Região (δ 156,5 - 115,7) do espectro de ^{13}C RMN de O-metilmoschatolina (S3) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



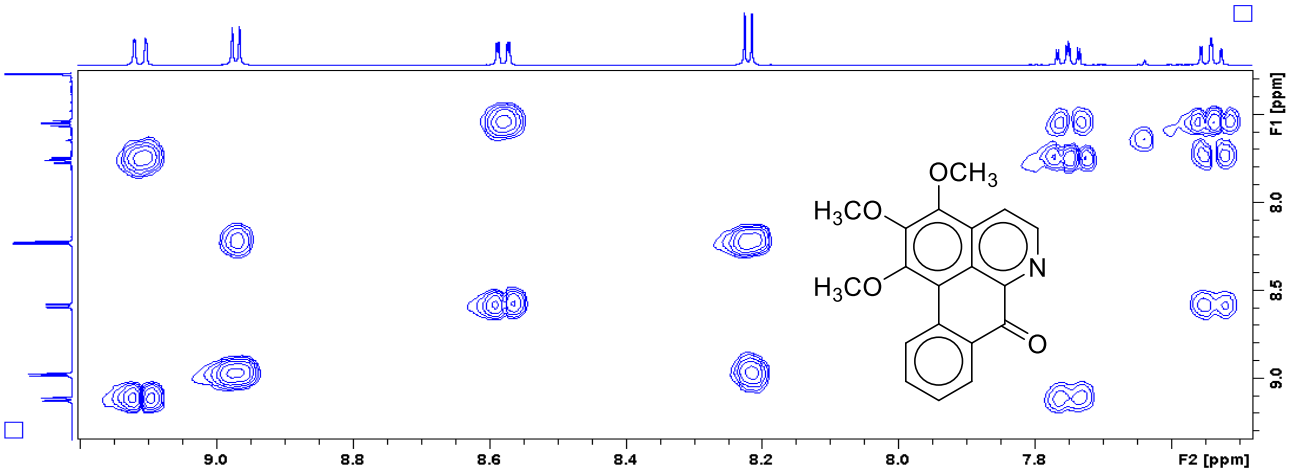
APÊNDICE 3: Ampliação da Região (δ 73,3 – 61,0) do espectro de 13C RMN de O-metilmoschatolina (S3) em CDCl3 a 125 MHz.



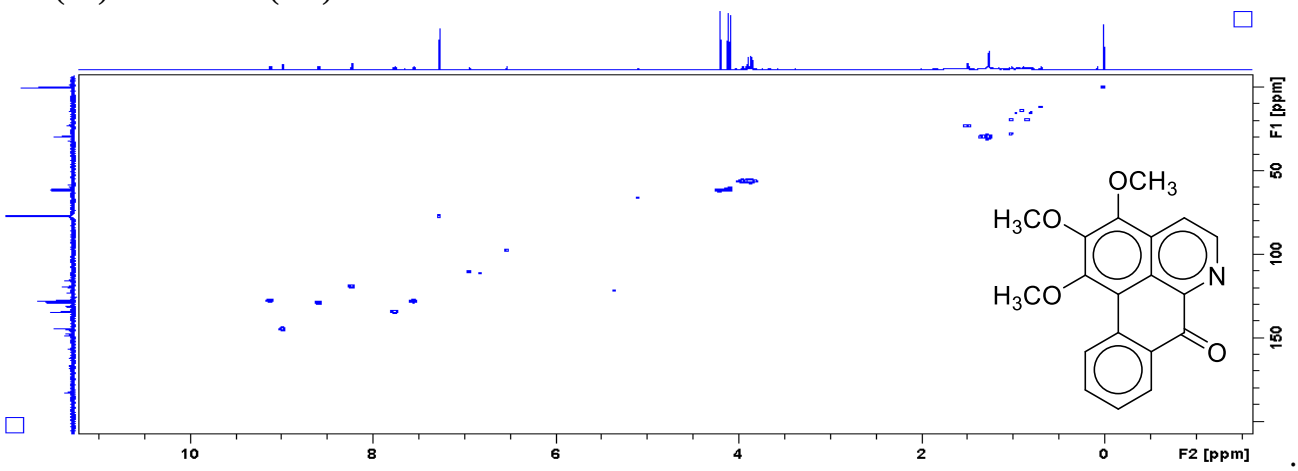
APÊNDICE 4: Mapa de correlação de ^{1}H-^{1}H do experimento COSY RMN de O-metilmoschatolina (S3) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



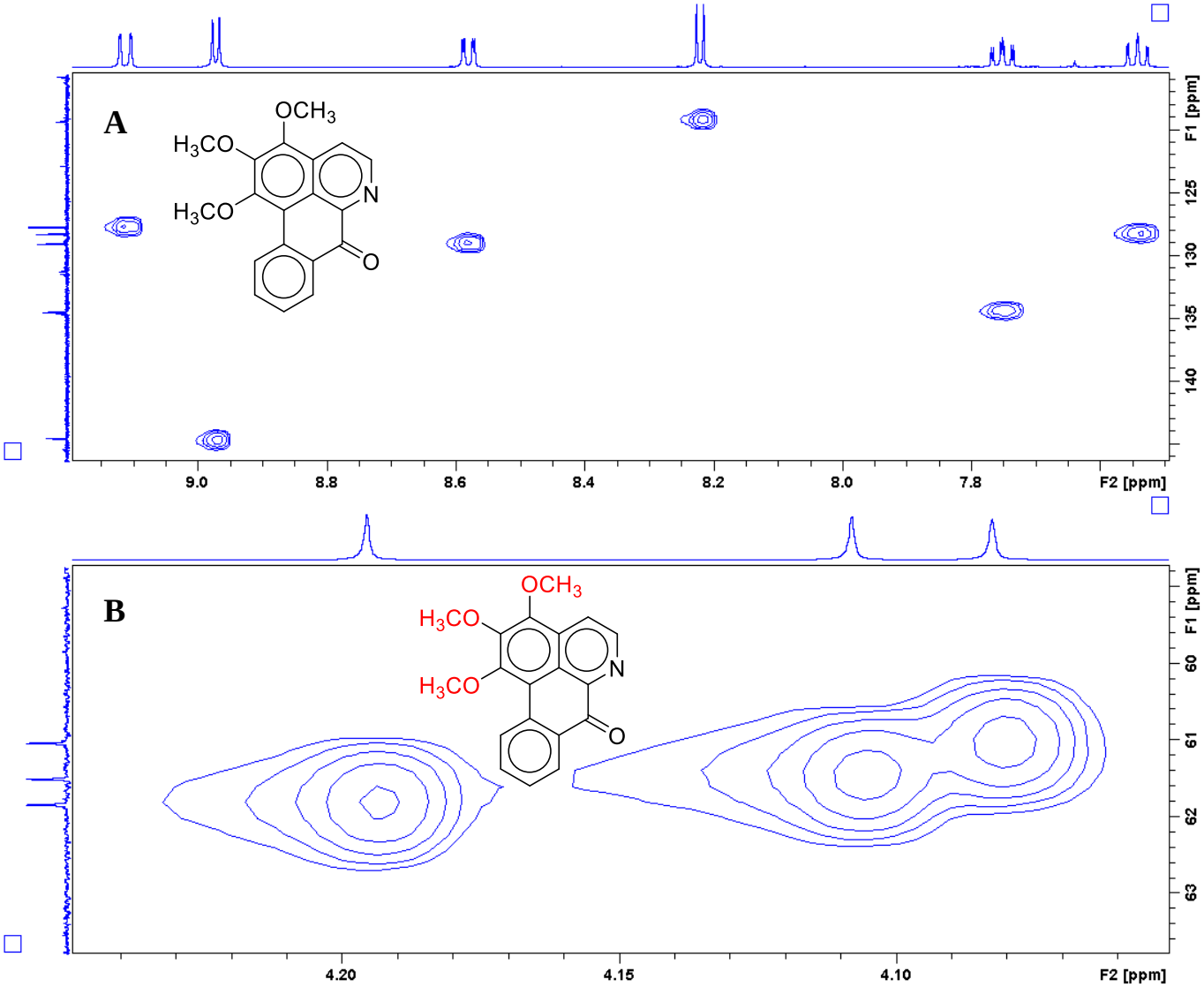
APÊNDICE 5: Ampliação (δ 9,19 - 7,44) do mapa de correlação de ^{1}H-^{1}H do experimento COSY RMN de O-metilmoschatolina (S3) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



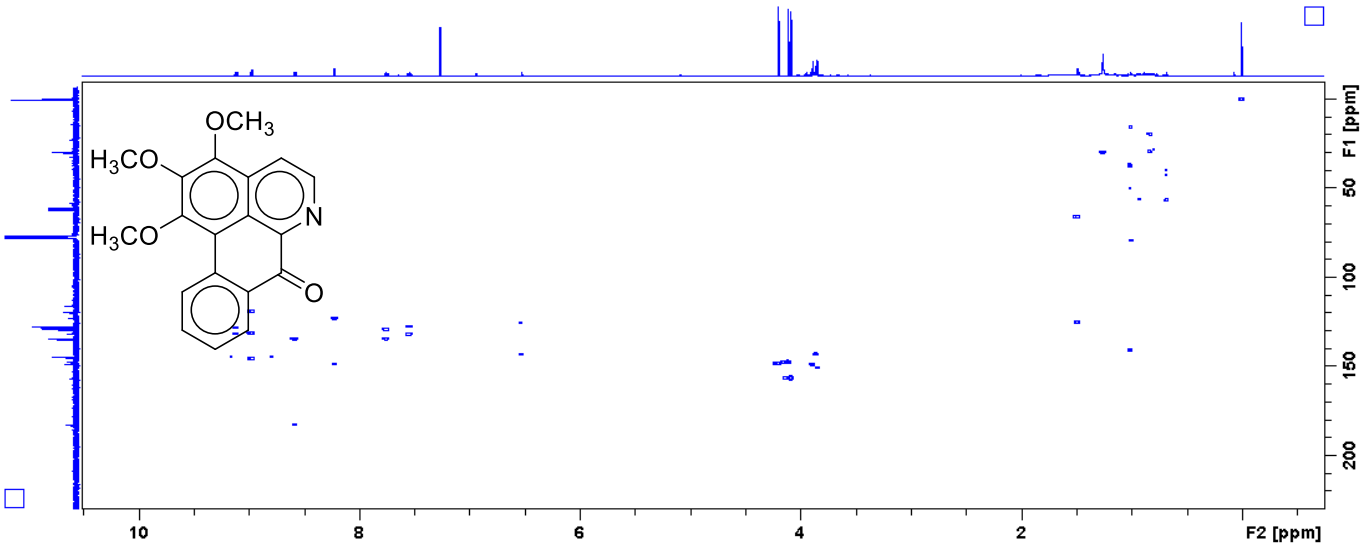
APÊNDICE 6: Mapa de correlação HSQC ^{1}H-^{13}C RMN de O-metilmoschatolina (S3) em $CDCl_3$ a 500 (^{1}H) e 125 MHz (^{13}C).



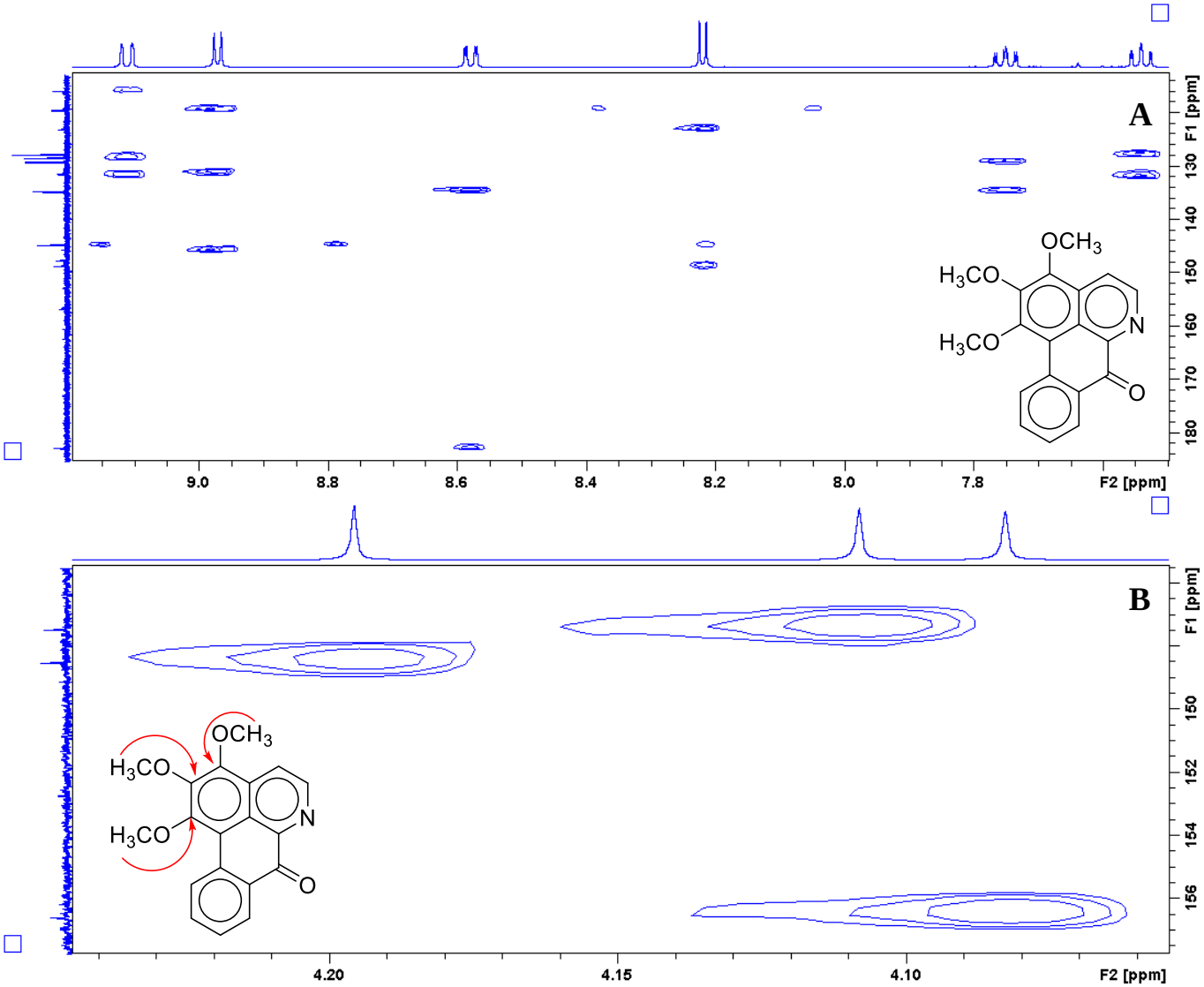
APÊNDICE 7: Ampliação (A e B) do mapa de correlação HSQC RMN de O-metilmoschatolina (S3) em $CDCl_3$ a 500 (1H) e 125 MHz (^{13}C), respectivamente.



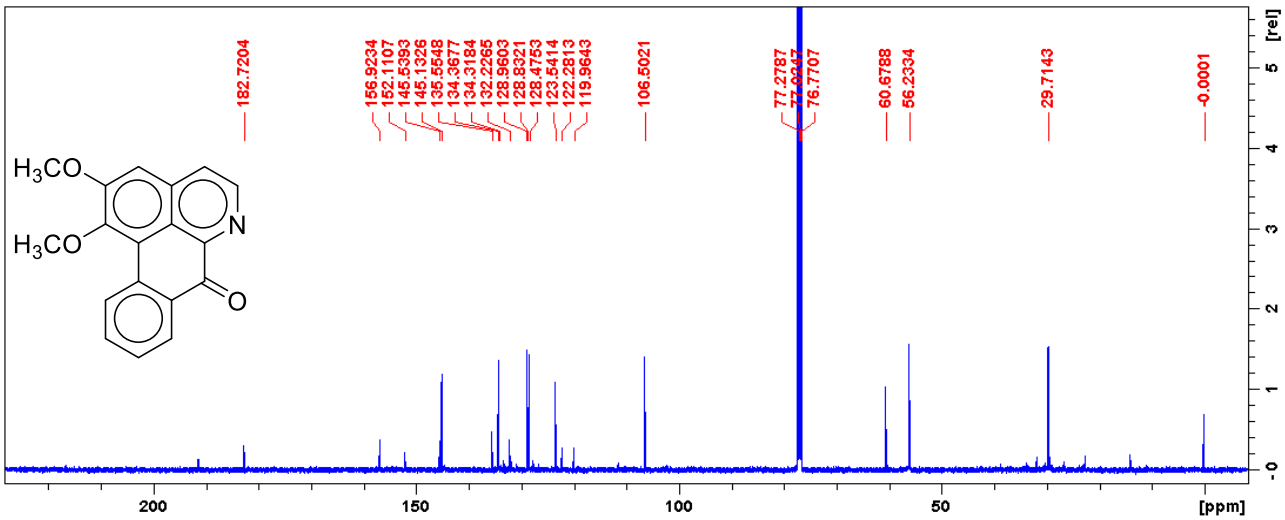
APÊNDICE 8: Mapa de correlação de longo alcance de ^{1}H-^{13}C do experimento HMBC de O-metilmoschatolina (S3) em $CDCl_3$ a 500 (^{1}H) e 125 MHz (^{13}C).



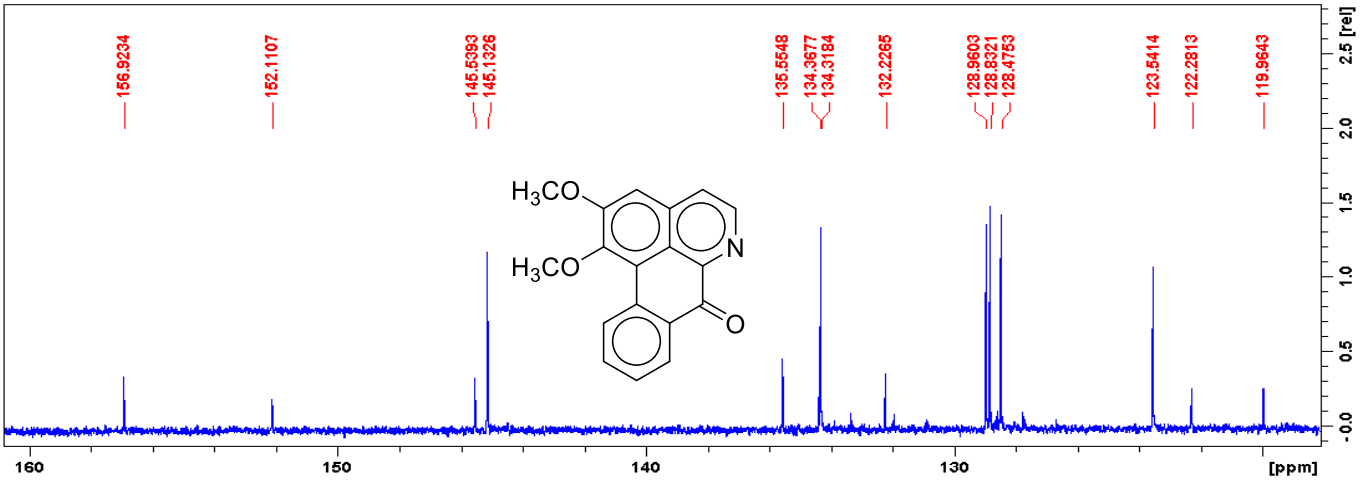
APÊNDICE 9: Ampliação (A e B) do mapa de correlação de longo alcance ^{1}H-^{13}C do experimento HMBC de O-metilmoschatolina (S3) em $CDCl_3$ a 500 (^{1}H) e 125 MHz (^{13}C).



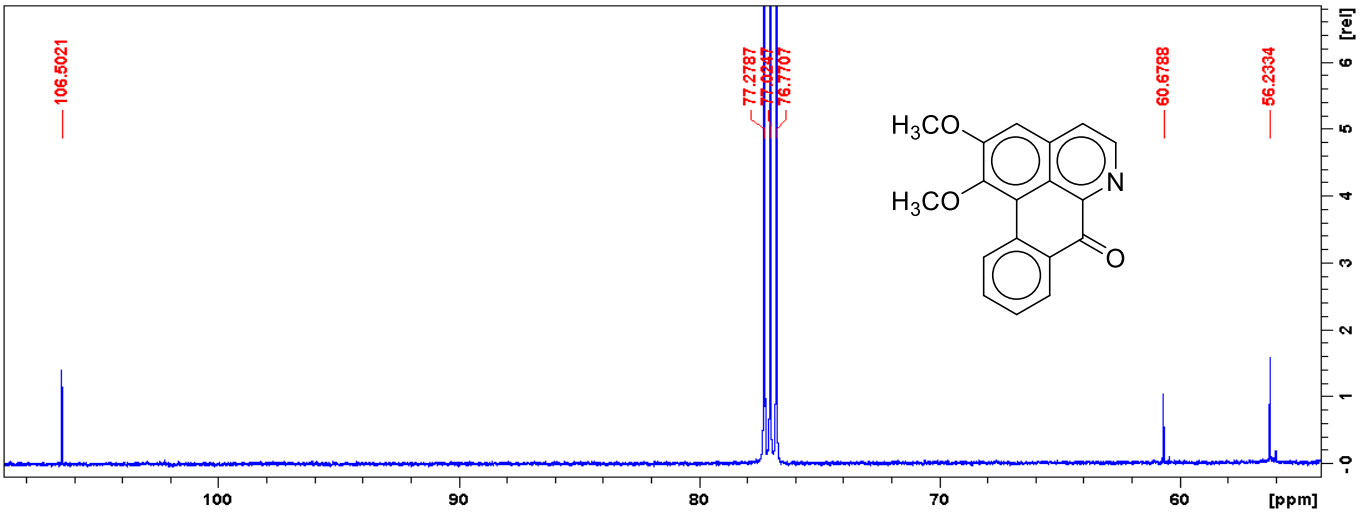
APÊNDICE 10: Espectro de ^{13}C RMN de lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



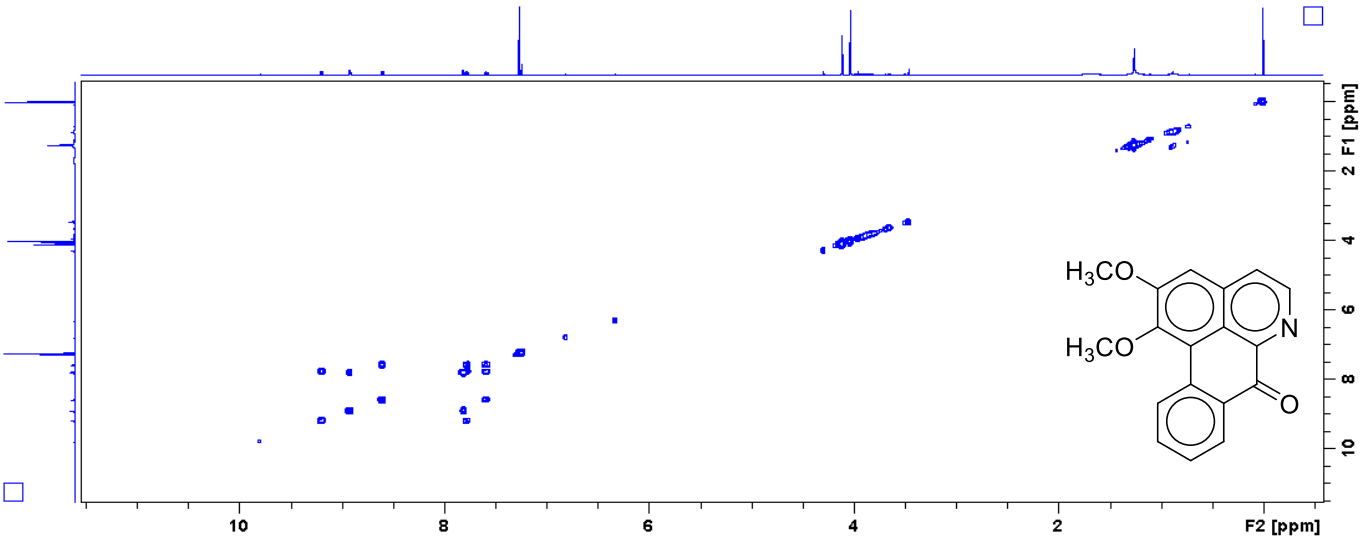
APÊNDICE 11: Ampliação (δ 156,9 - 119,9) do espectro ^{13}C RMN da lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



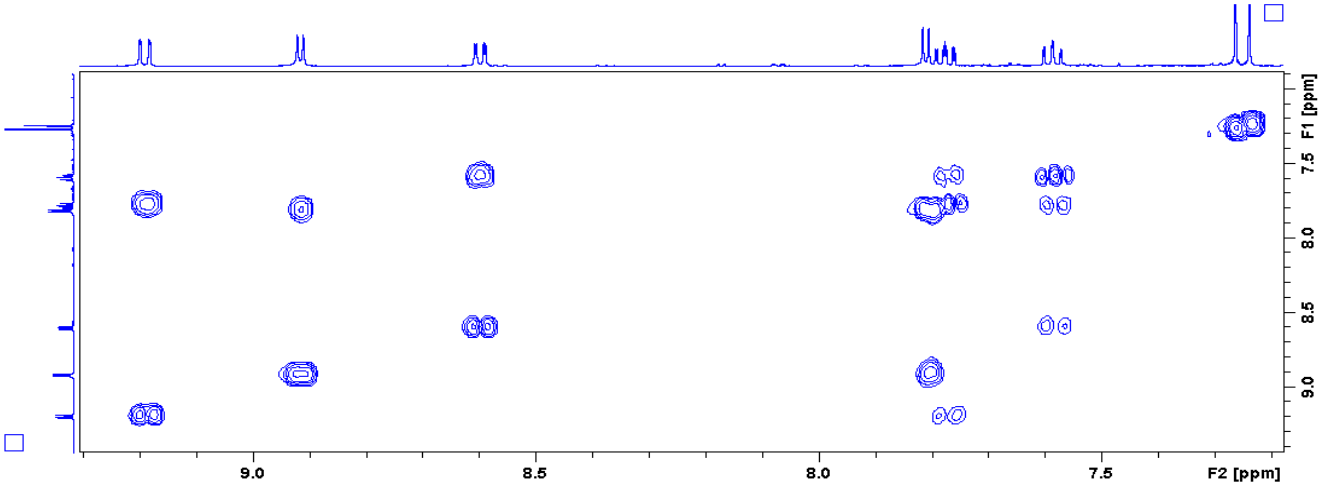
APÊNDICE 12: Ampliação (δ 106,5 – 56,2) do espectro ^{13}C RMN da lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



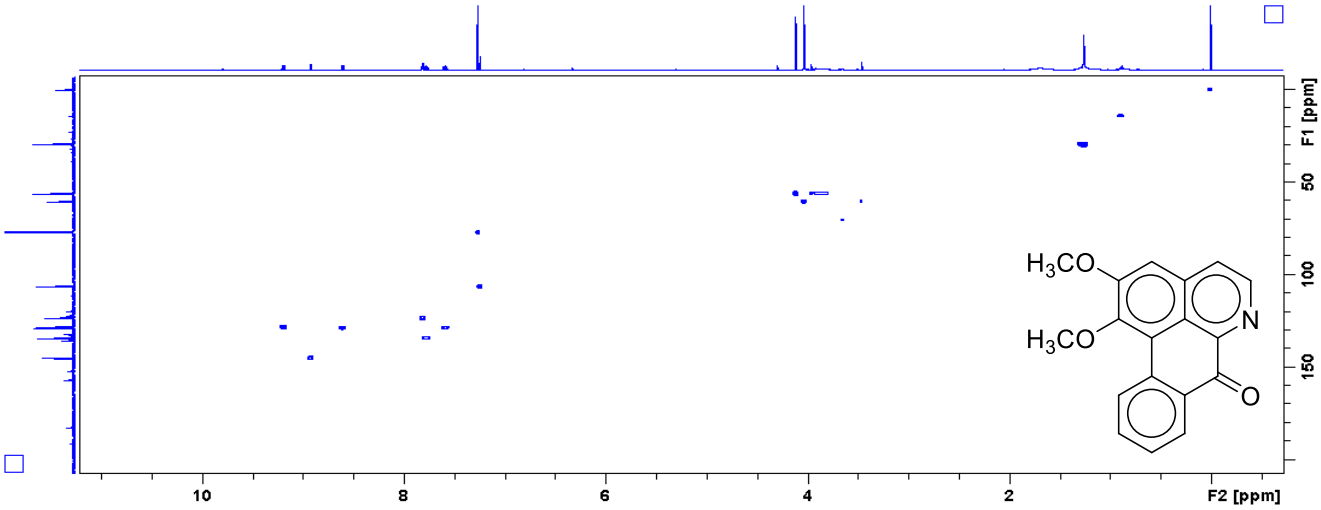
APÊNDICE 13: Mapa de correlação ^{1}H-^{1}H do experimento COSY RMN de lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



APÊNDICE 14: Ampliação (δ 9,28 - 7,20) do mapa de correlação de ^{1}H-^{1}H do experimento COSY RMN de lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 500 MHz.

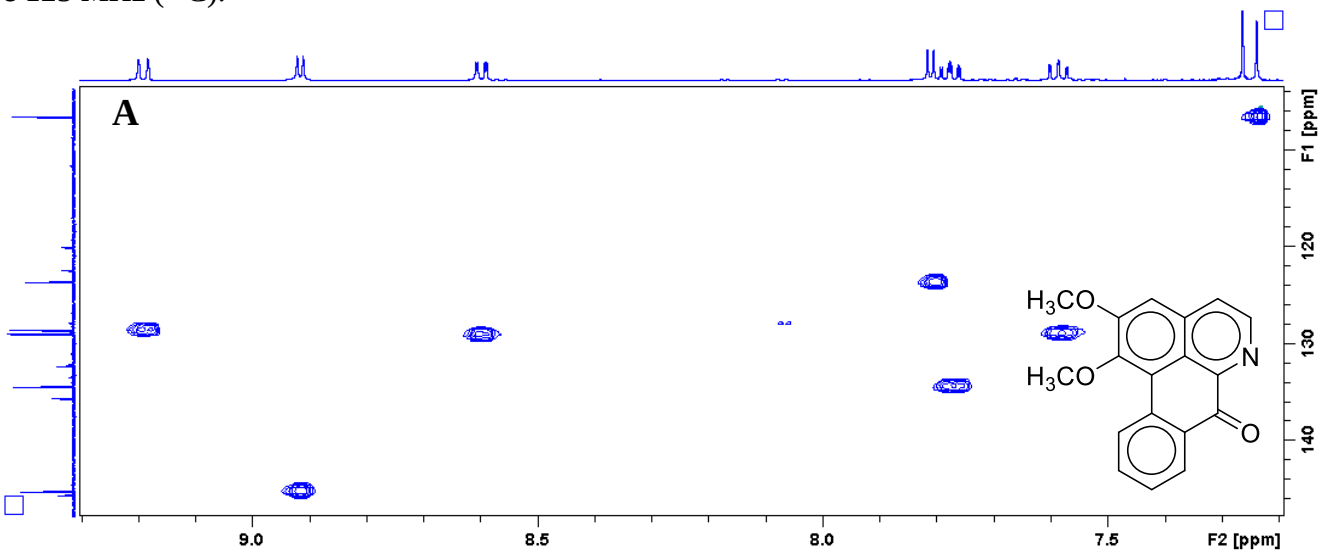


APÊNDICE 15: Mapa de correlação ^{1}H-^{13}C do experimento HSQC RMN de lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 500 (1H) e 125 MHz (13C).

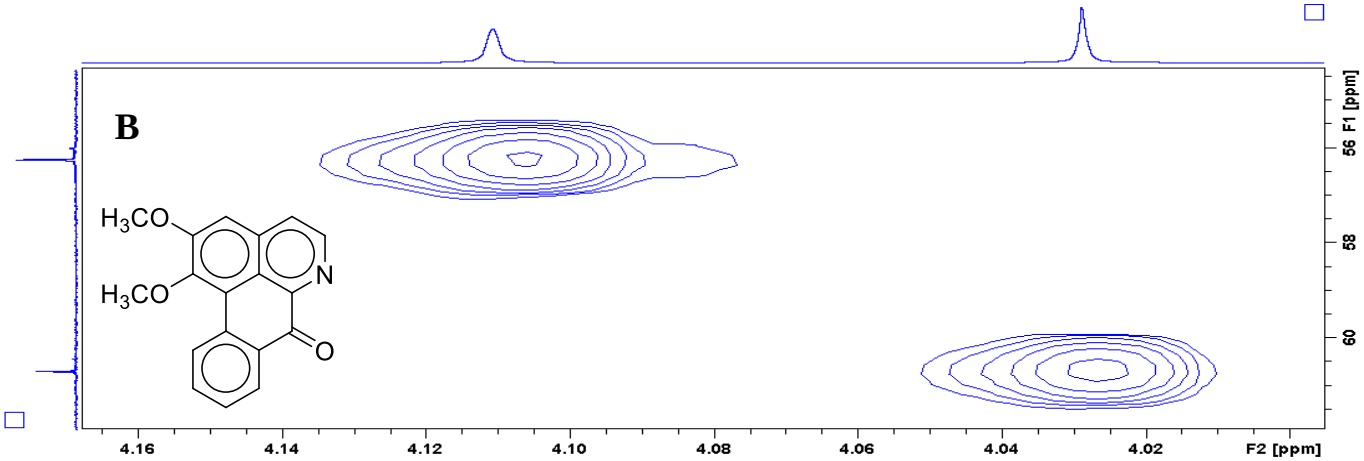


.

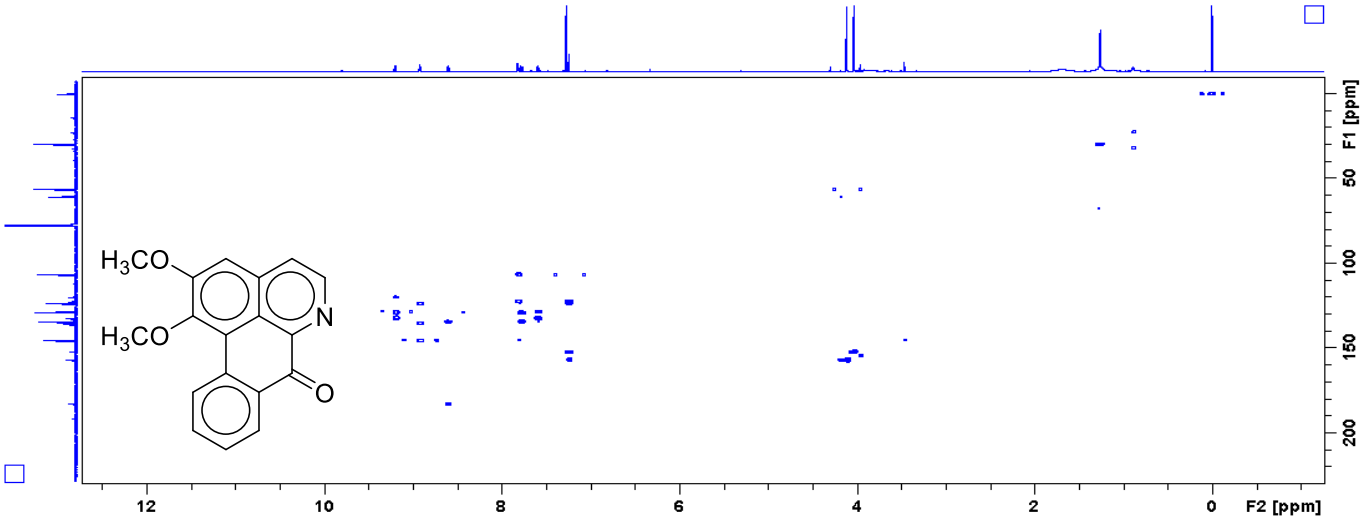
APÊNDICE 16: Ampliação (A) mapa de correlação HSQC de lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 500 (^{1}H) e 125 MHz (^{13}C).



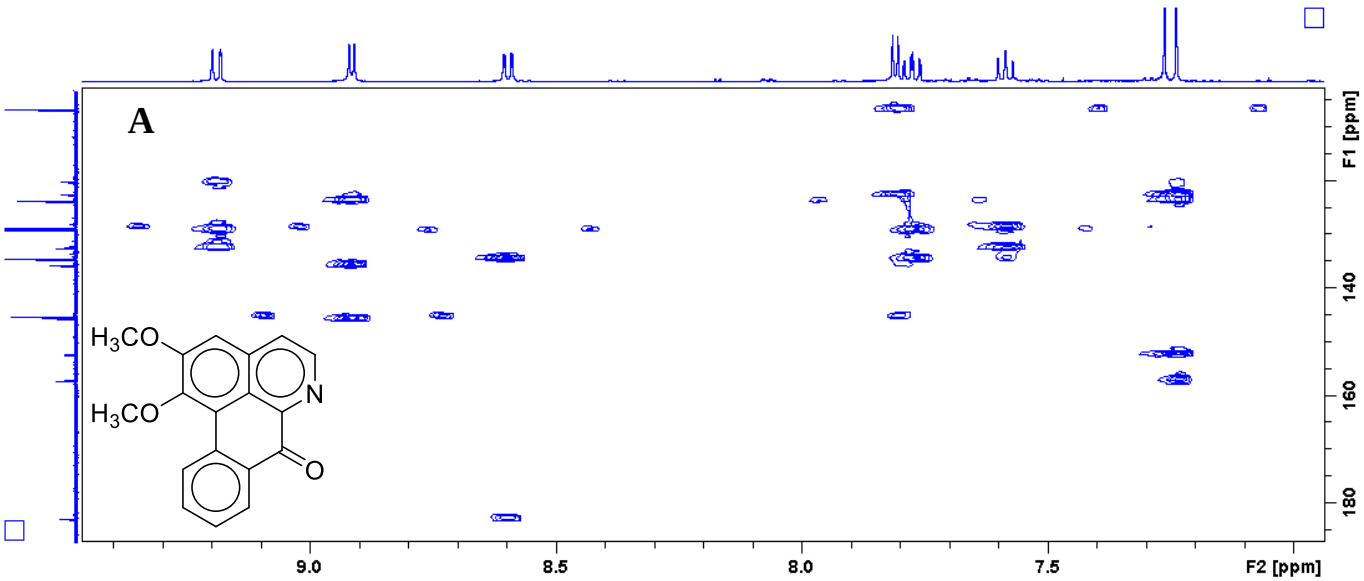
APÊNDICE 17: Ampliação (B) mapa de correlação HSQC de lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 500 (^1H) e 125 MHz (^{13}C).



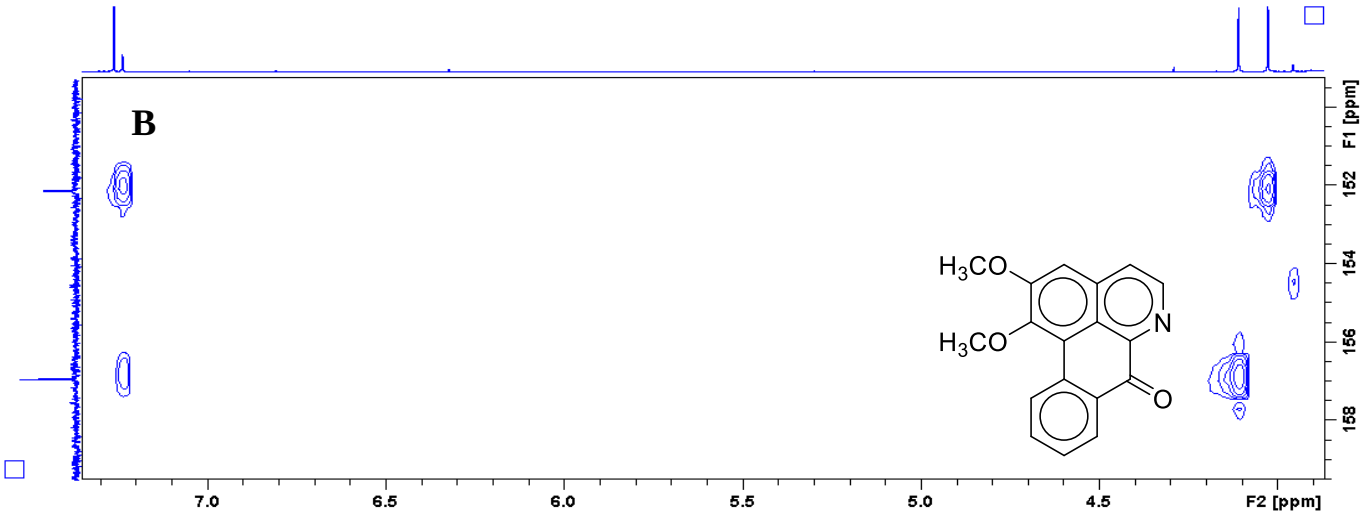
APÊNDICE 18: Mapa de correlação de longo alcance (^1H-^{13}C) do experimento HMBC da lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 500 (^1H) e 125 MHz (^{13}C).



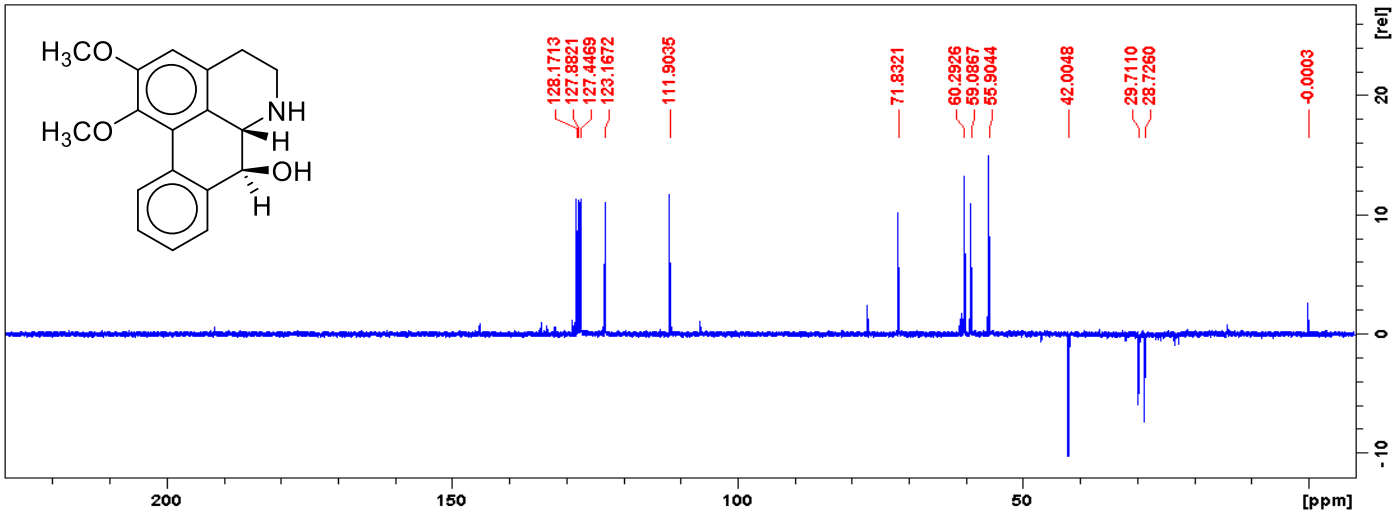
APÊNDICE 19: Ampliação (A) do mapa de correlação HMBC RMN da lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 500 (^1H) e 125 MHz (^{13}C).



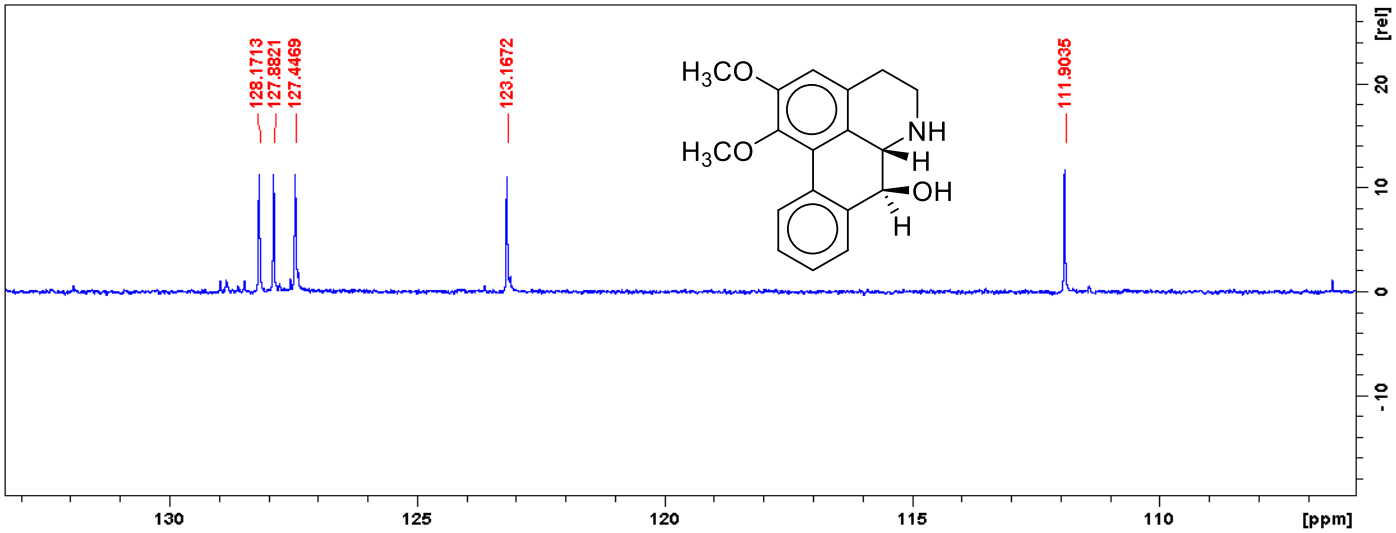
APÊNDICE 20: Ampliação (B) do mapa de correlação HMBC RMN da lisicamina (S4) em $CDCl_3$ a 500 (^1H) e 125 MHz (^{13}C).



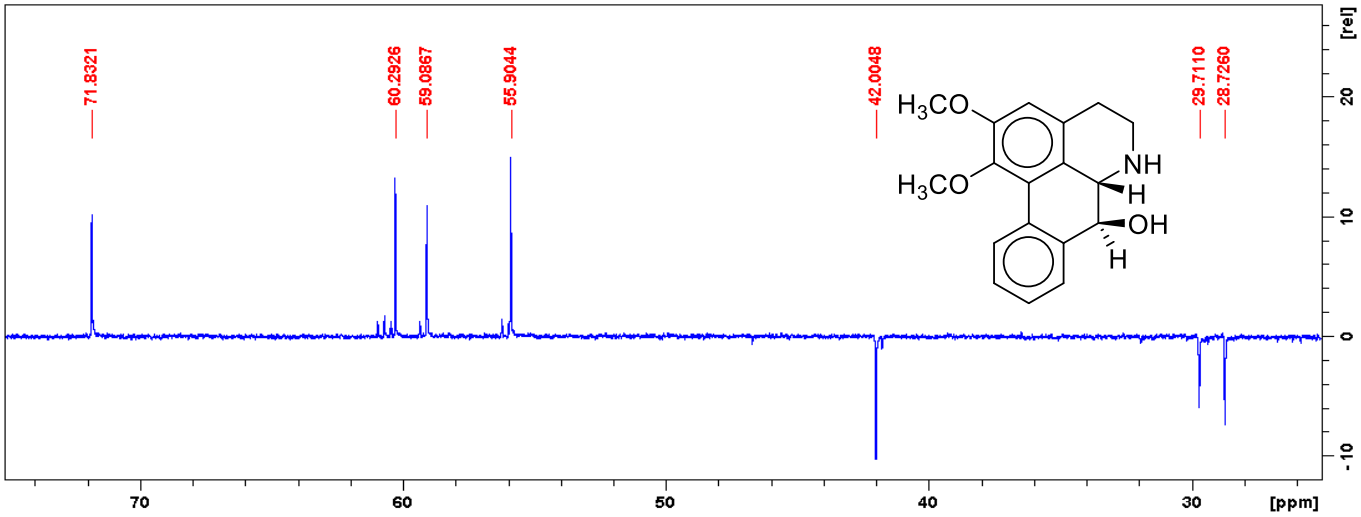
APÊNDICE 21: DEPT 135 espectro de nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



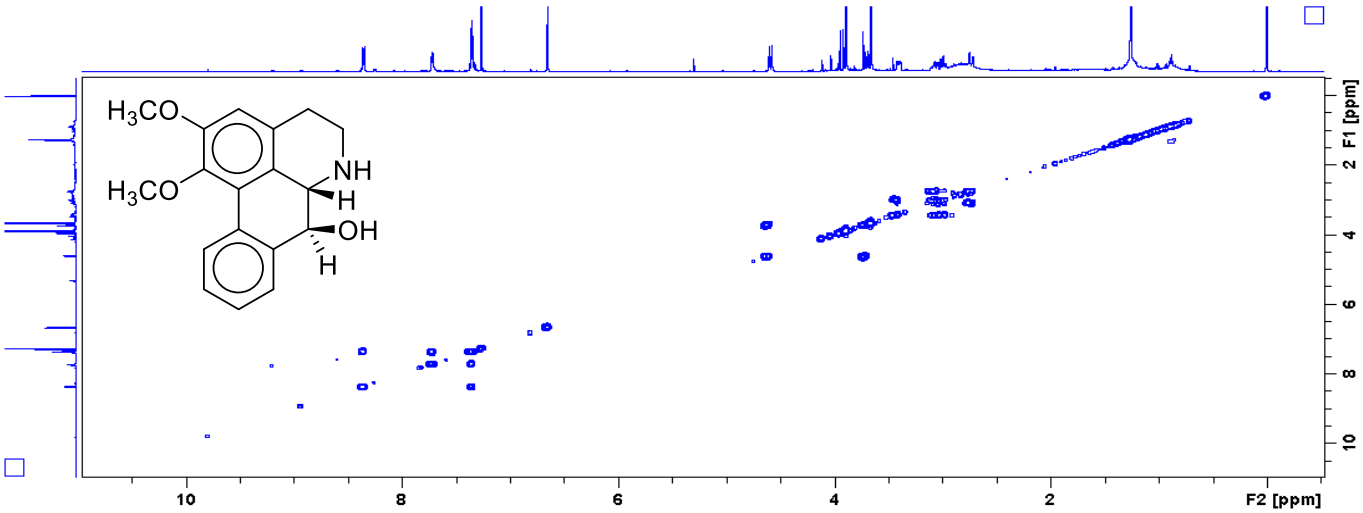
APÊNDICE 22: Ampliação (δ 133,0 - 107,0) do espectro DEPT 135 da nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



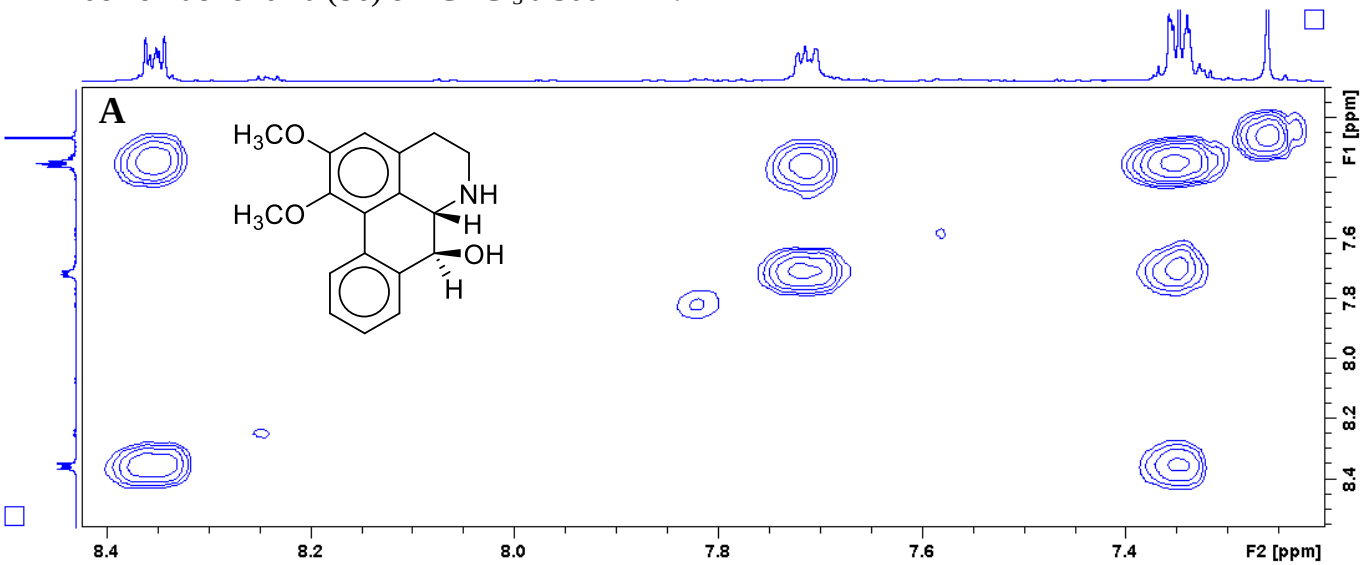
APÊNDICE 23: Ampliação (δ 74,0 – 26,0) do espectro DEPT 135 da nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



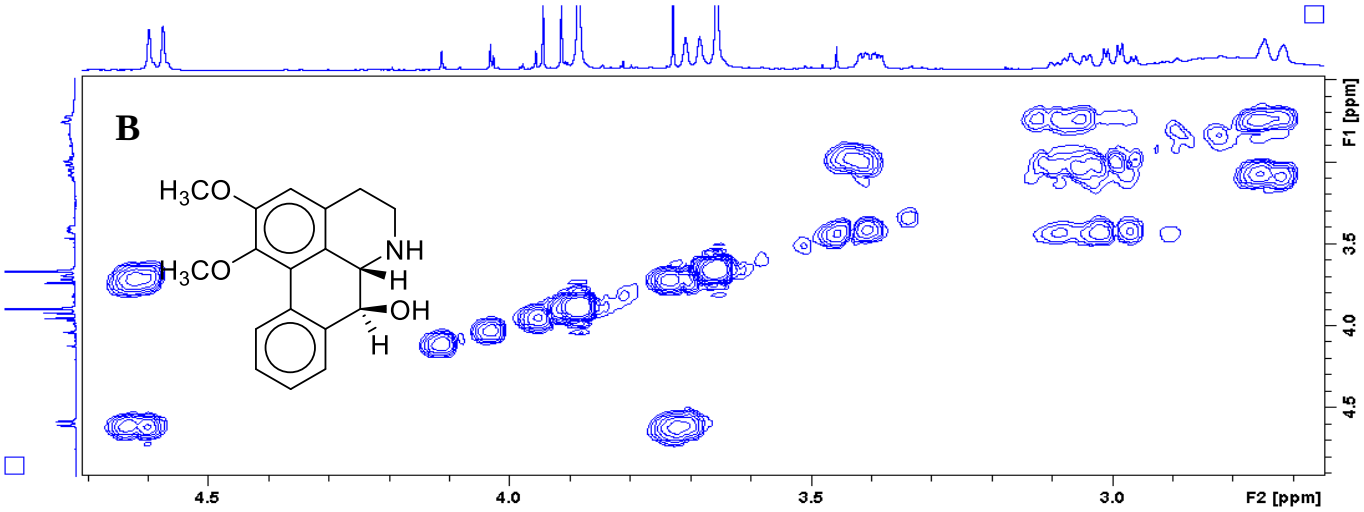
APÊNDICE 24: Mapa de correlação ^1H-^1H do experimento COSY RMN de nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



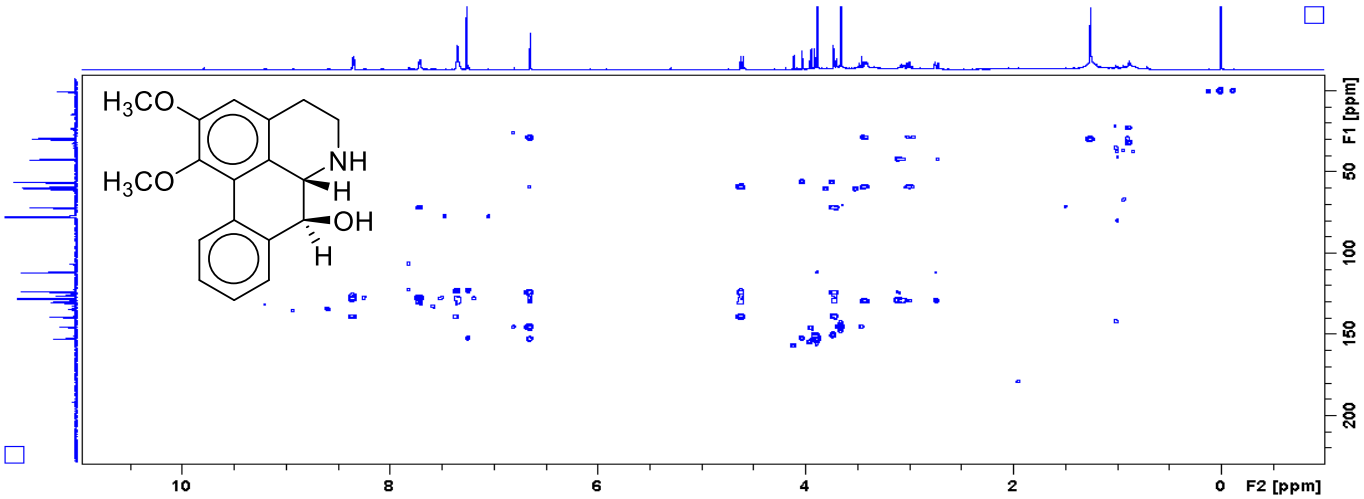
APÊNDICE 25: Ampliação (δ 8,44 - 7,21) do mapa de correlação de ^1H-^1H do experimento COSY RMN de nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



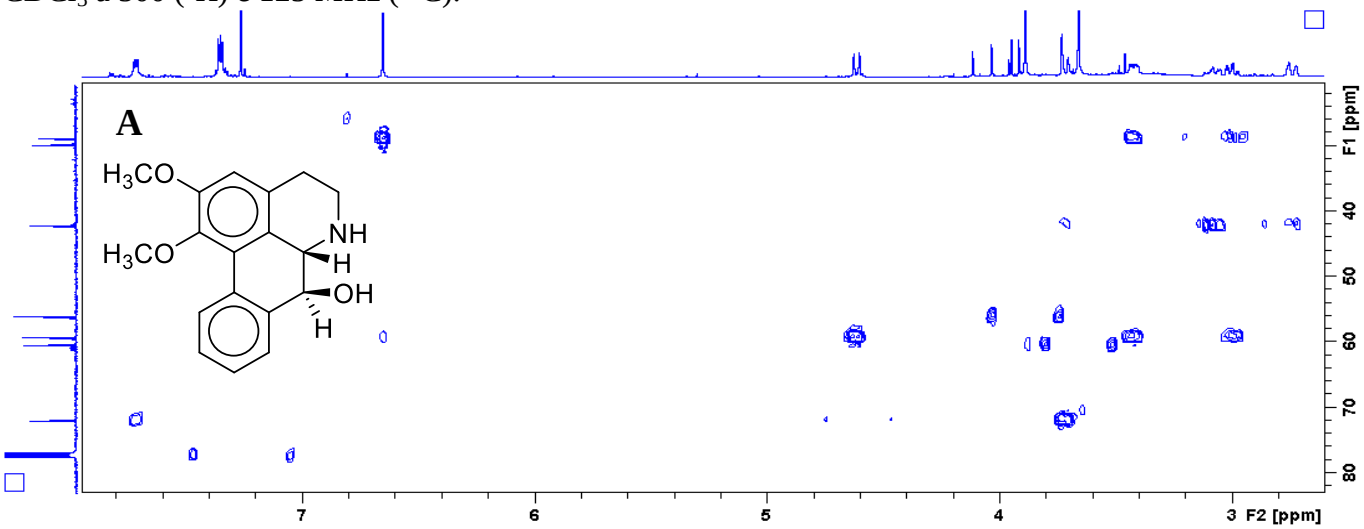
APÊNDICE 26: APÊNDICE 25: Ampliação (δ 4,68 – 2,66) do mapa de correlação de ^{1}H-^{1}H do experimento COSY RMN da nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



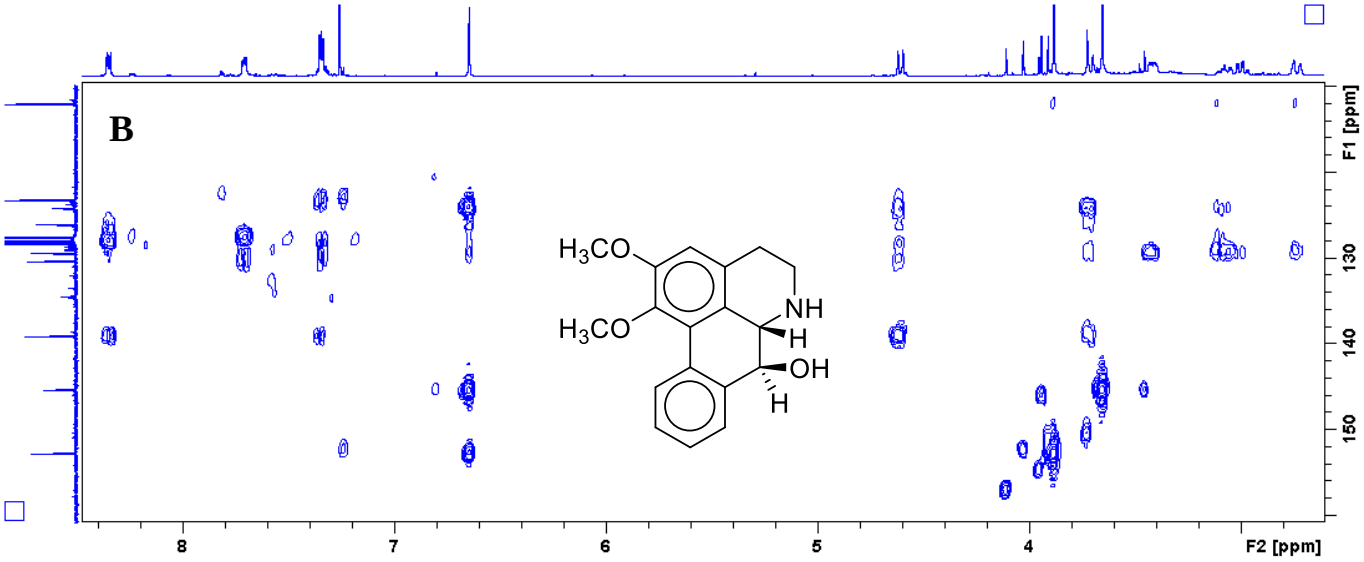
APÊNDICE 27: Mapa de correlação de longo alcance (^{1}H-^{13}C) do experimento HMBC da nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 500 (^{1}H) e 125 MHz (^{13}C).



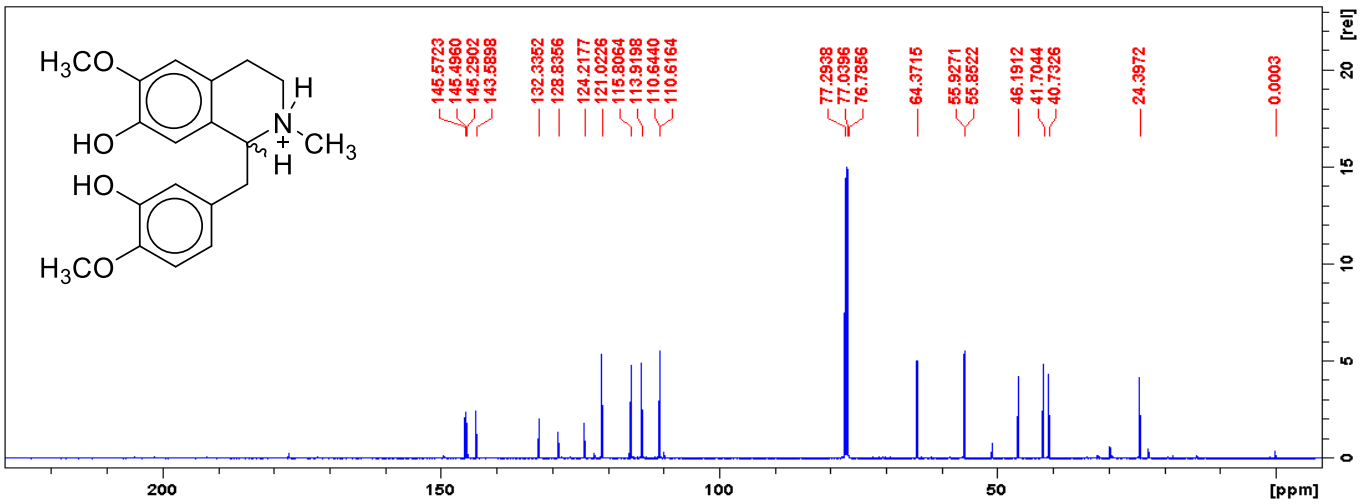
APÊNDICE 28: Ampliação (A) do mapa de correlação HMBC RMN da nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 500 (^{1}H) e 125 MHz (^{13}C).



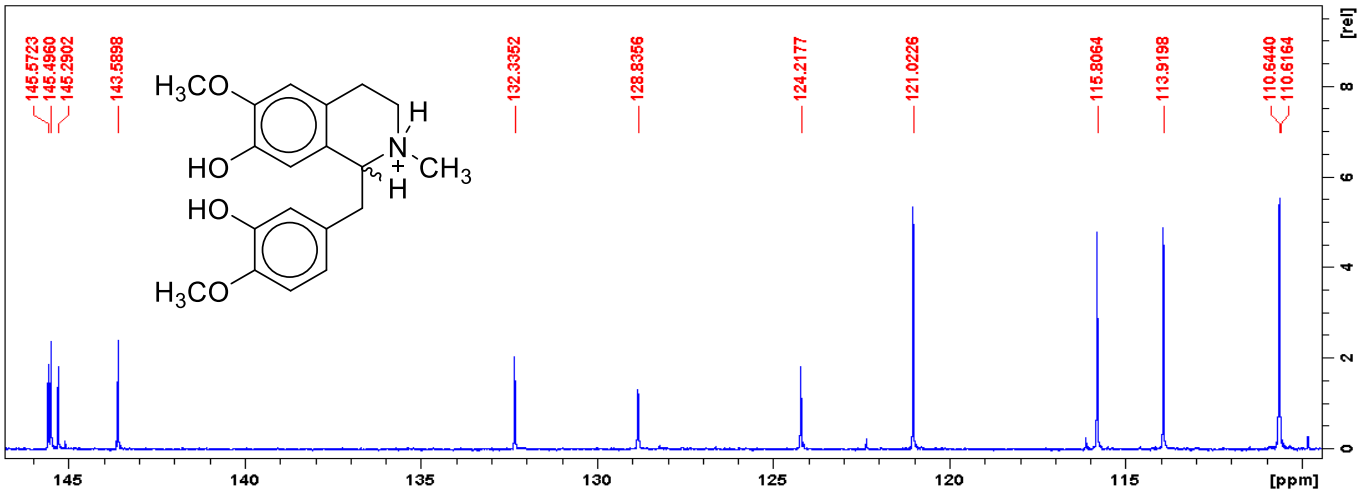
APÊNDICE 29: Ampliação (B) do mapa de correlação HMBC RMN da nornuciferidina (S6) em $CDCl_3$ a 500 (1H) e 125 MHz (13C).



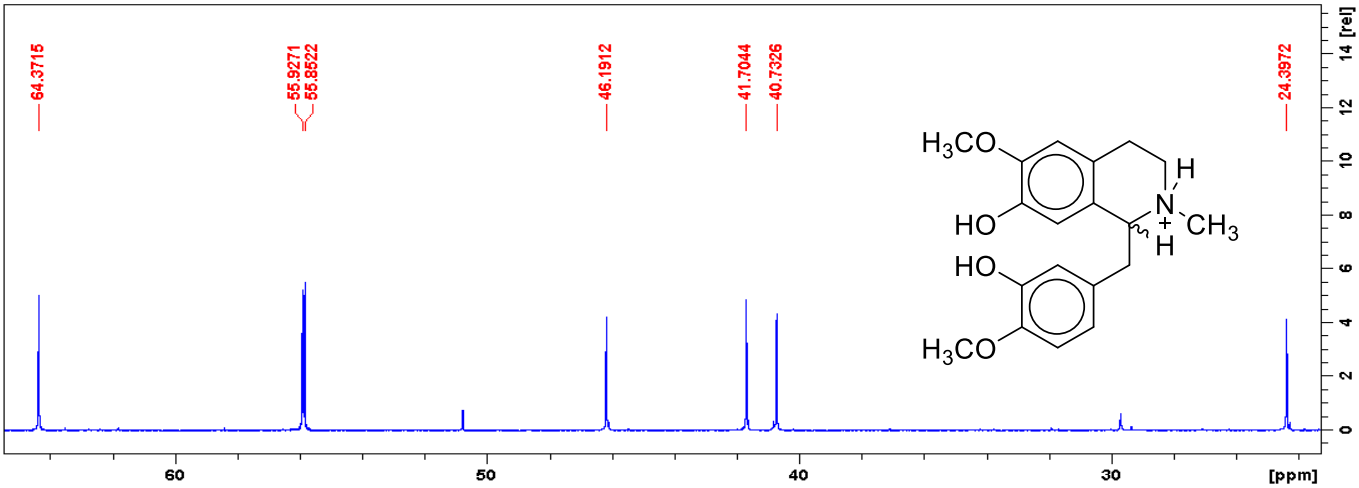
APÊNDICE 30: Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) d (S) - reticulina (S7)



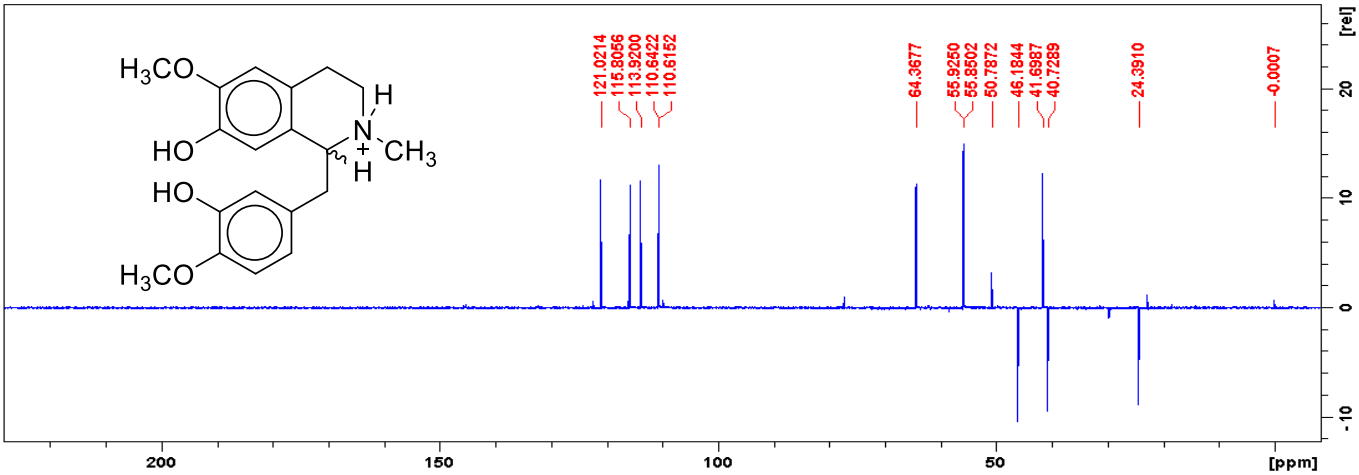
APÊNDICE 31: Ampliação (δ 145,5 - 110,6) do espectro de ^{13}C RMN de (S) - reticulina (S7) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



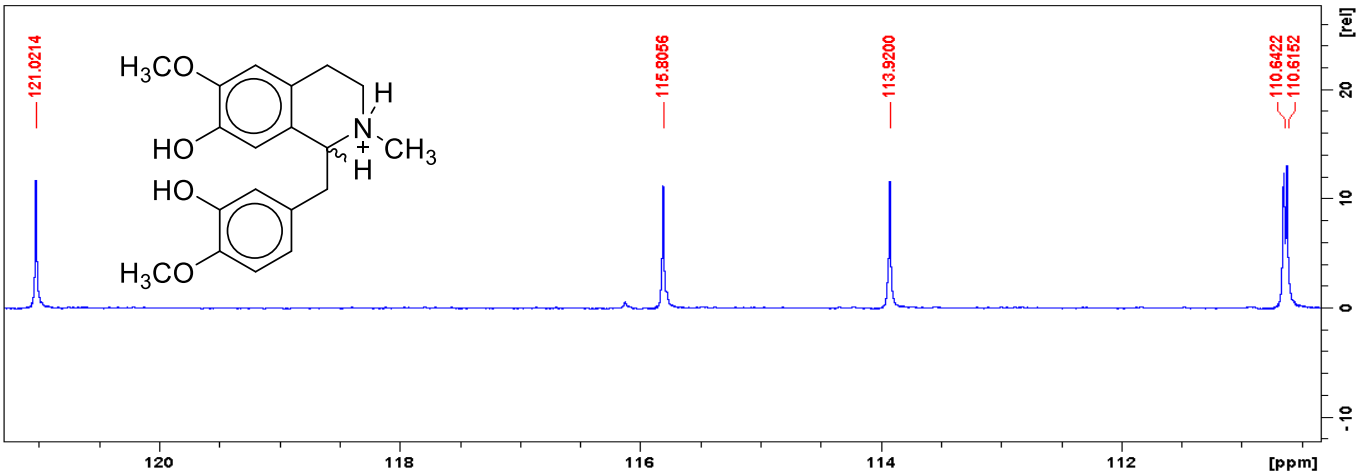
APÊNDICE 32: Ampliação (δ 64,3 – 24,3) do espectro de ^{13}C RMN de (S) - reticulina (S7) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



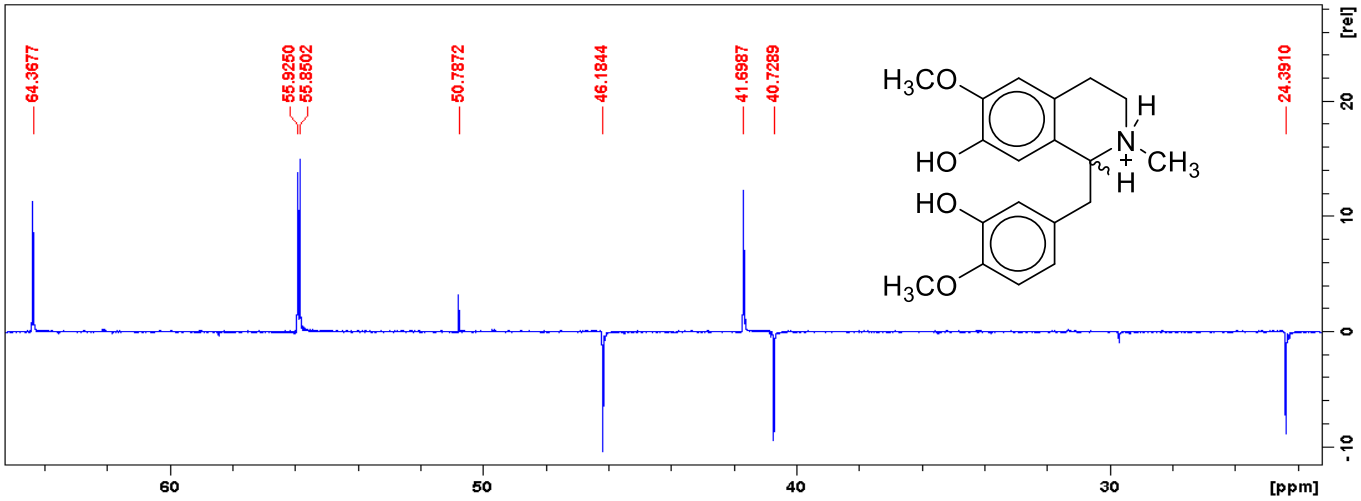
APÊNDICE 33: Espectro de DEPT 135 (S) - reticulina (7) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



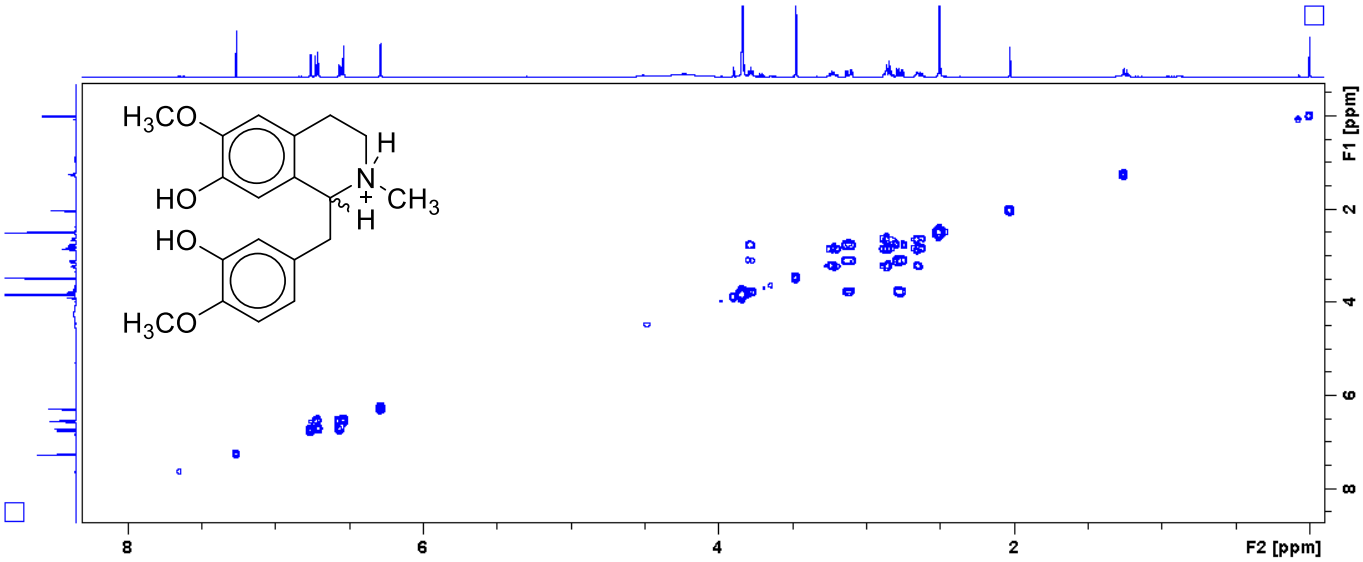
APÊNDICE 34: Ampliação (δ121,0 - 110,6) do espectro DEPT 135 de (S) - reticulina (S7) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



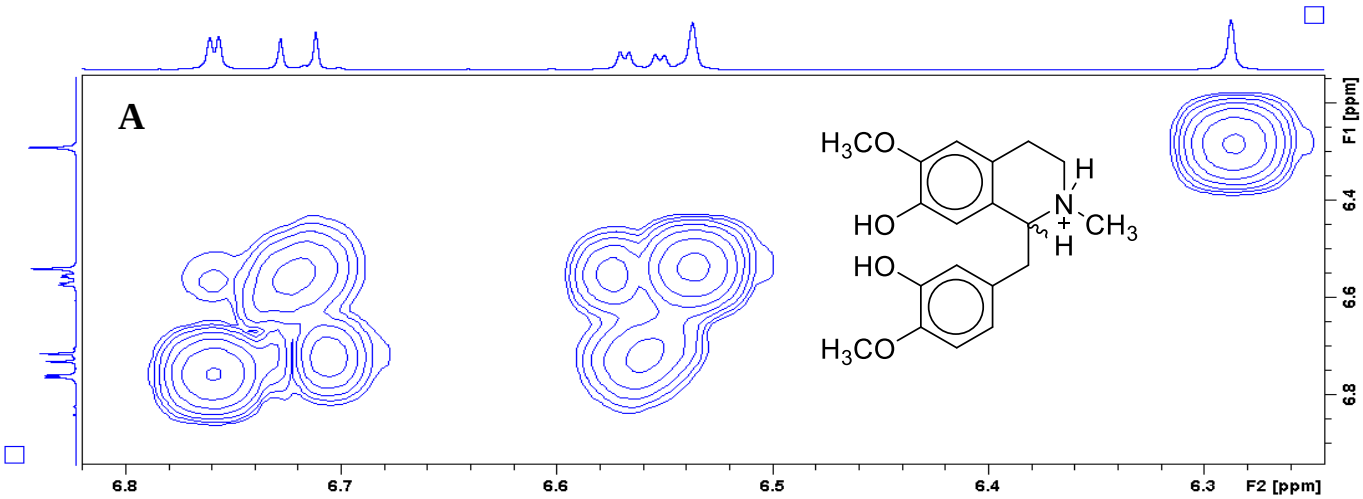
APÊNDICE 35: Ampliação (δ64,3 – 24,3) do espectro DEPT 135 de (S) - reticulina (S7) em $CDCl_3$ a 125 MHz.



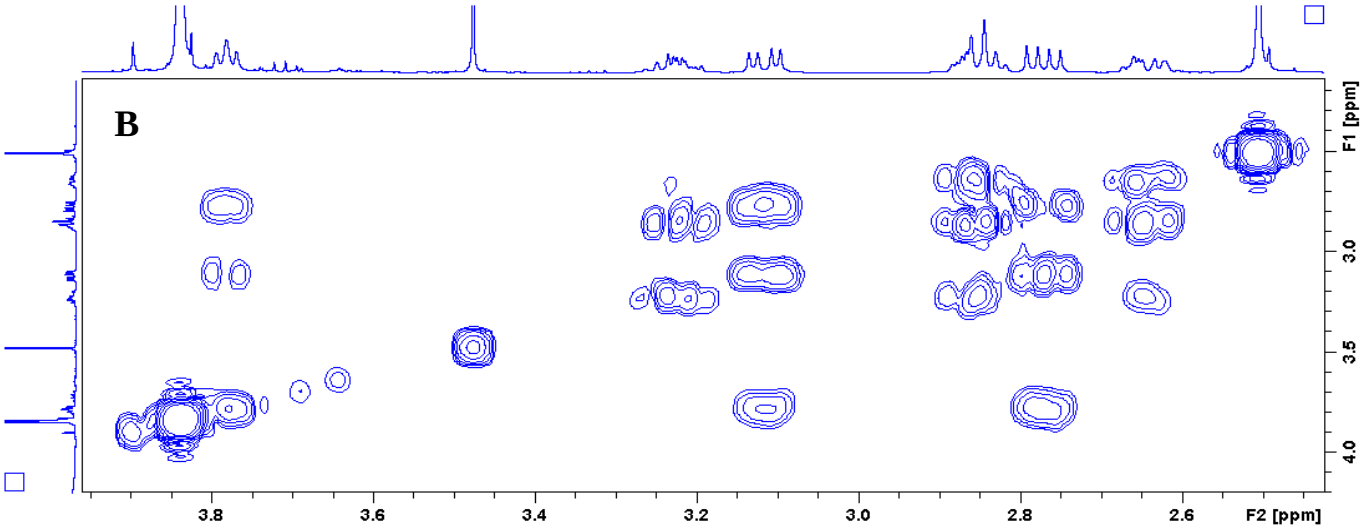
APÊNDICE 36: Mapa de correlação de ^1H-^1H do experimento COSY RMN da (S) - reticulina (S7) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



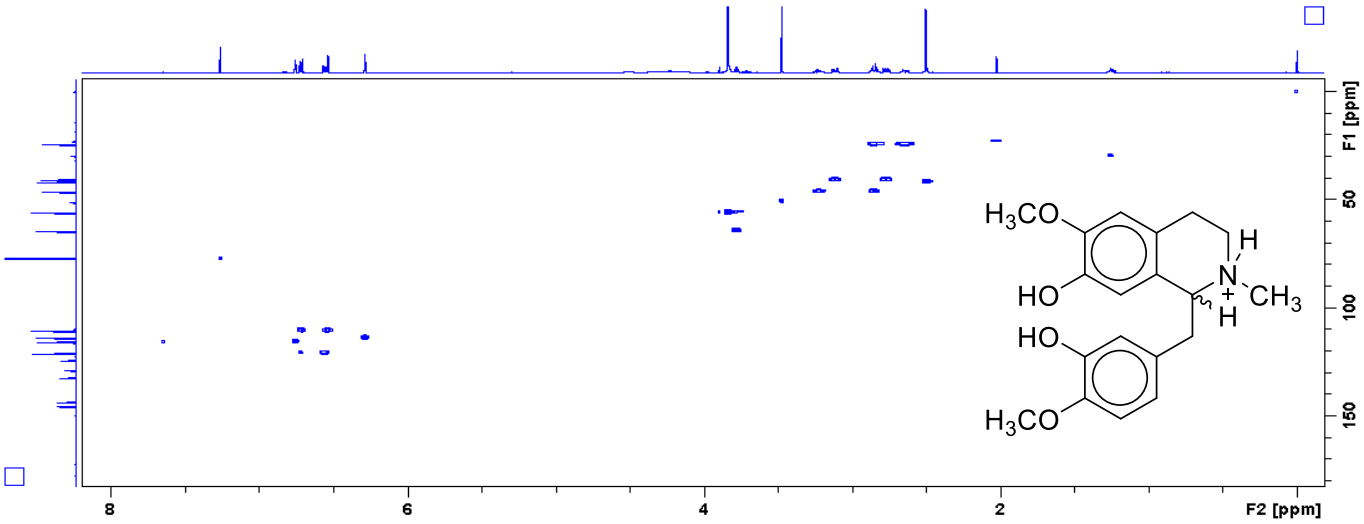
APÊNDICE 37: Ampliação (A) (δ 6,81 - 6,24) do mapa de correlação de ^1H-^1H do experimento COSY RMN da (S) - reticulina (S7) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



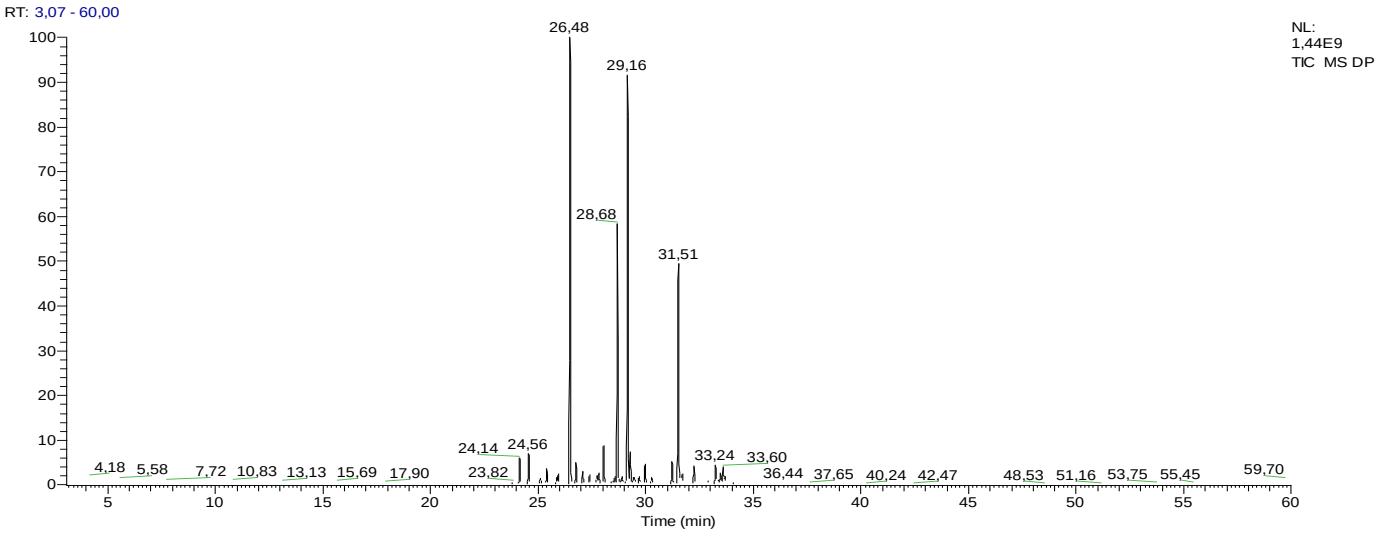
APÊNDICE 38: Ampliação (B) (δ 3,95 - 2,43) do mapa de correlação de ^{1}H-^{1}H do experimento COSY RMN da (S) - reticulina (S7) em $CDCl_3$ a 500 MHz.



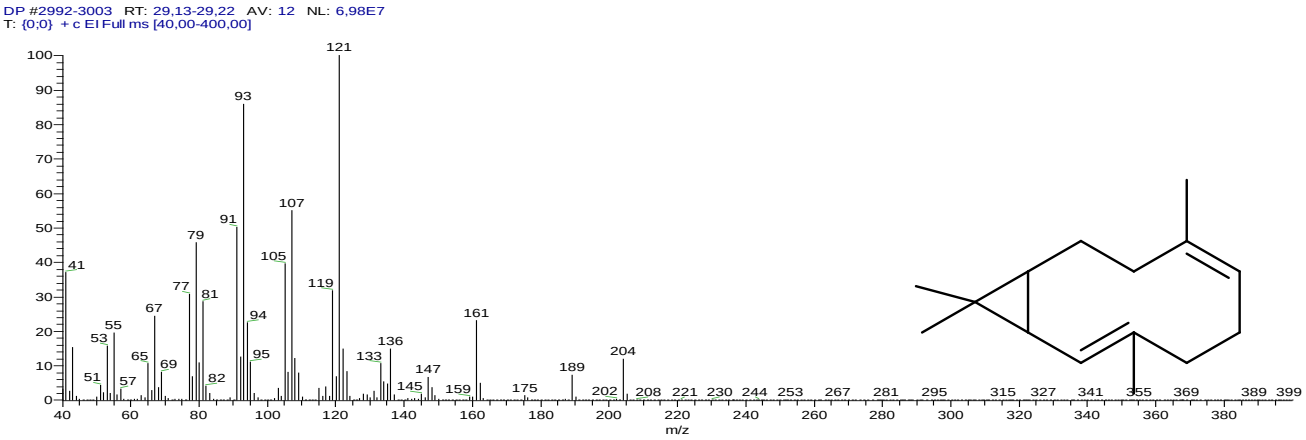
APÊNDICE 39: Mapa de correlação do experimento HSQC RMN ^{1}H-^{13}C de (S) - reticulina (S7) em $CDCl_3$ a 500 (^{1}H) e 125 MHz (^{13}C).



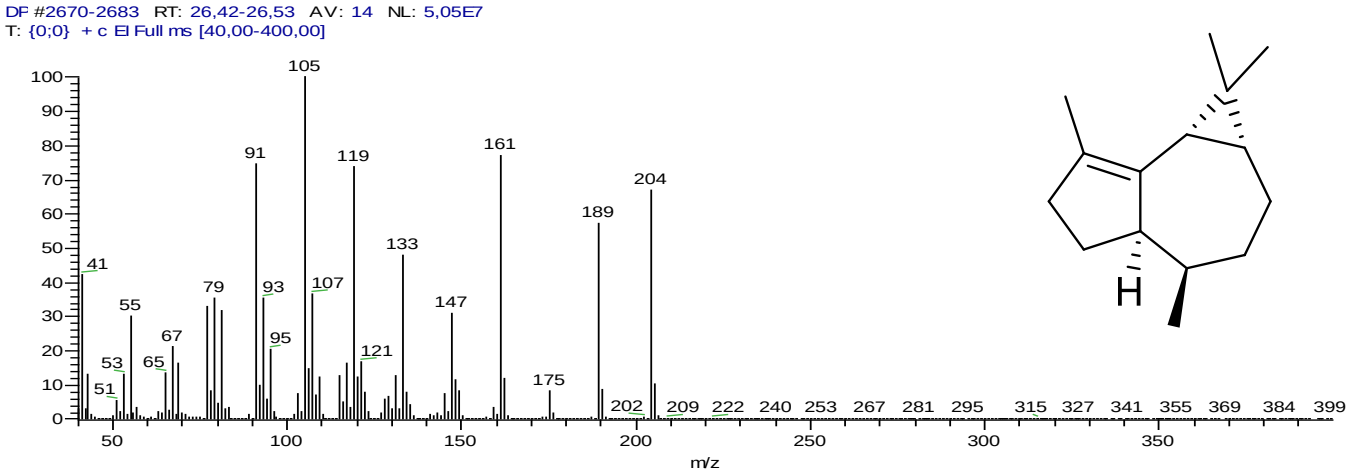
APÊNDICE 40: Cromatograma dos íons totais do óleo essencial das folhas de *D. pycnastera*.



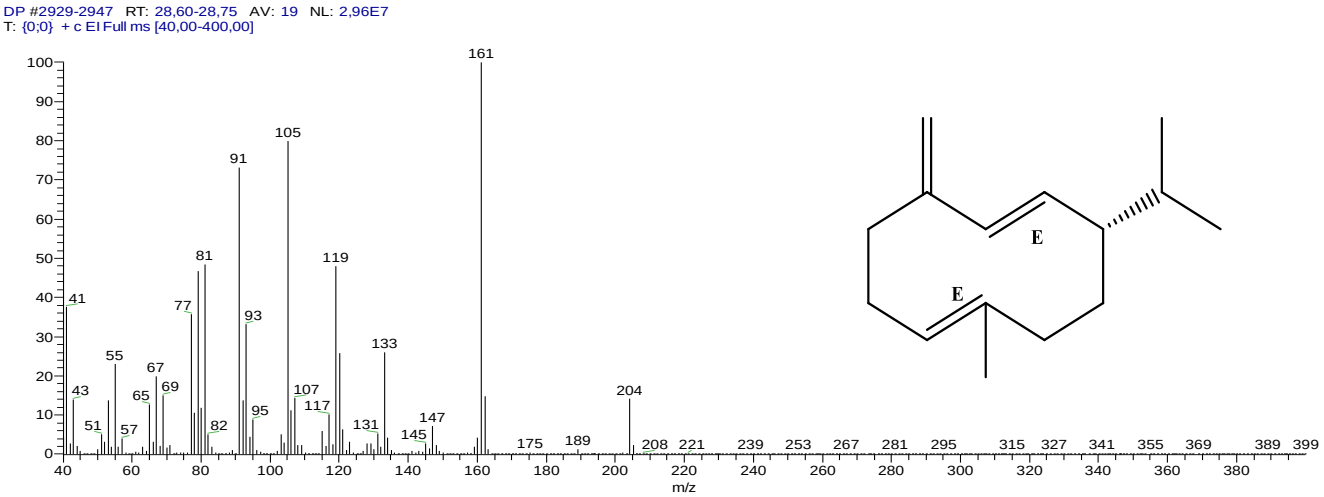
APÊNDICE 41: Espectro de massas do biciclogermacreno (24,90%) encontrados no óleo essencial das folhas de *D. pycnastera*.



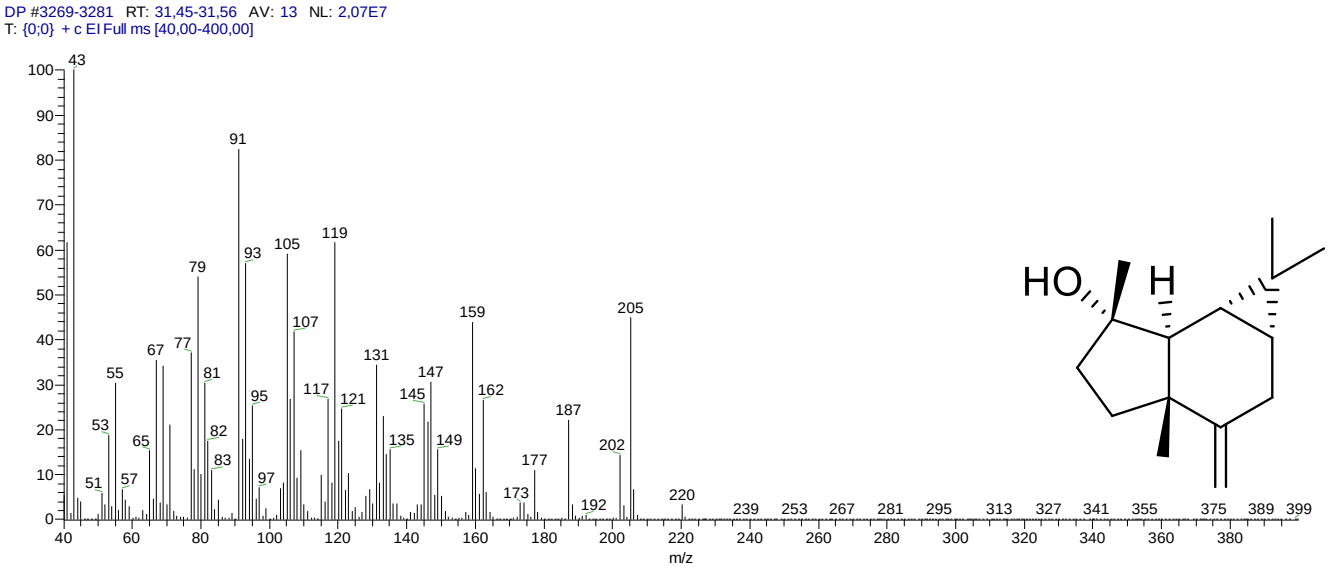
APÊNDICE 42: Espectro de massas do α-gurjuneno(26,83%) encontrados no óleo essencial das folhas de *D. pycnastera*.



APÊNDICE 43: Espectro de massas do germacreno D (15,35%) encontrados no óleo essencial das folhas de *D. pycnastera*.

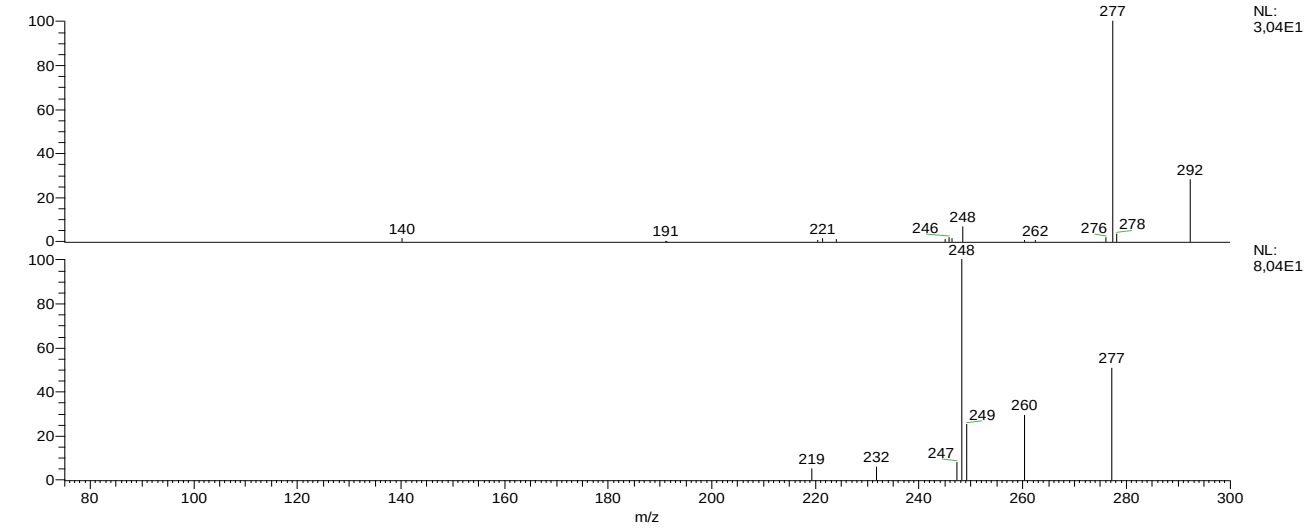


APÊNDICE 44: Espectro de massas do espatulenol (12,97%) encontrados no óleo essencial das folhas de D. pycnastera.

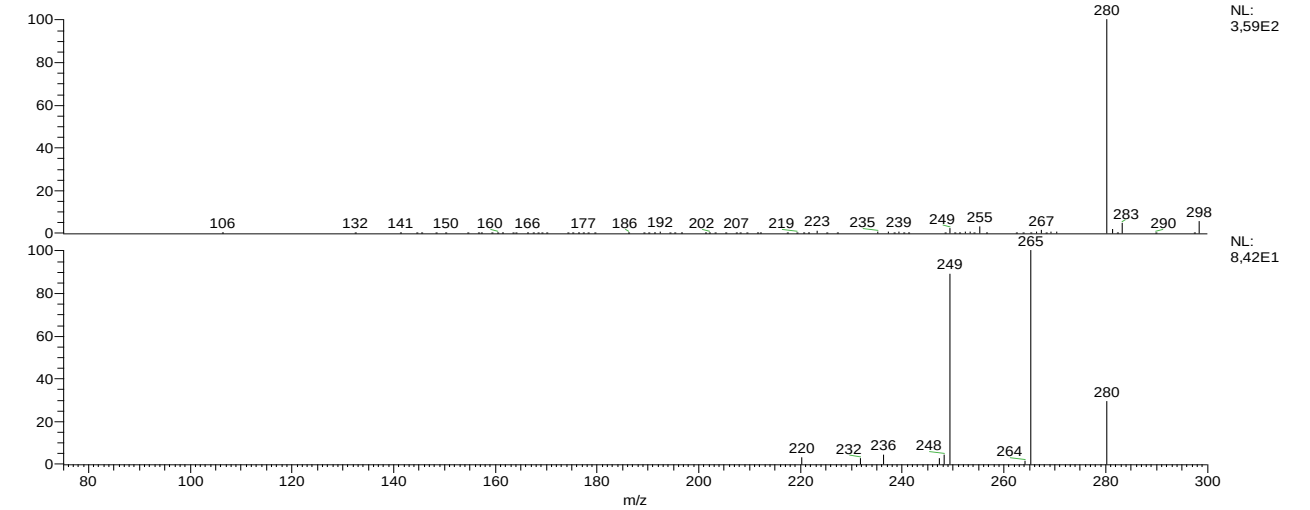


.

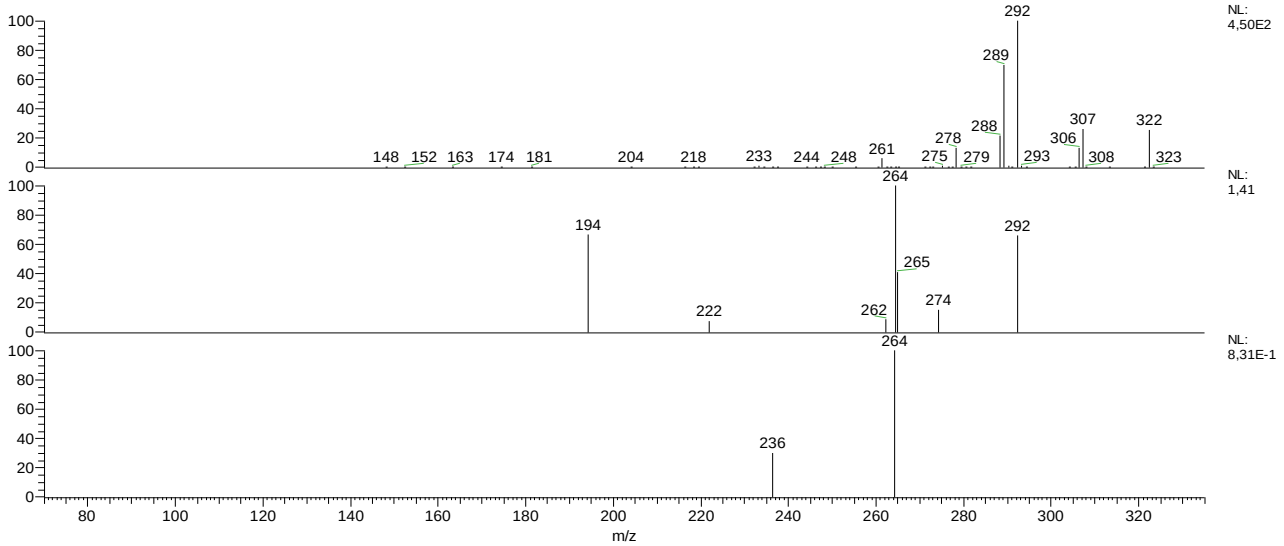
APÊNDICE 45: Espectro de Fragmentação em MSn do íon m/z 292 obtido da Lisicamina (S4).



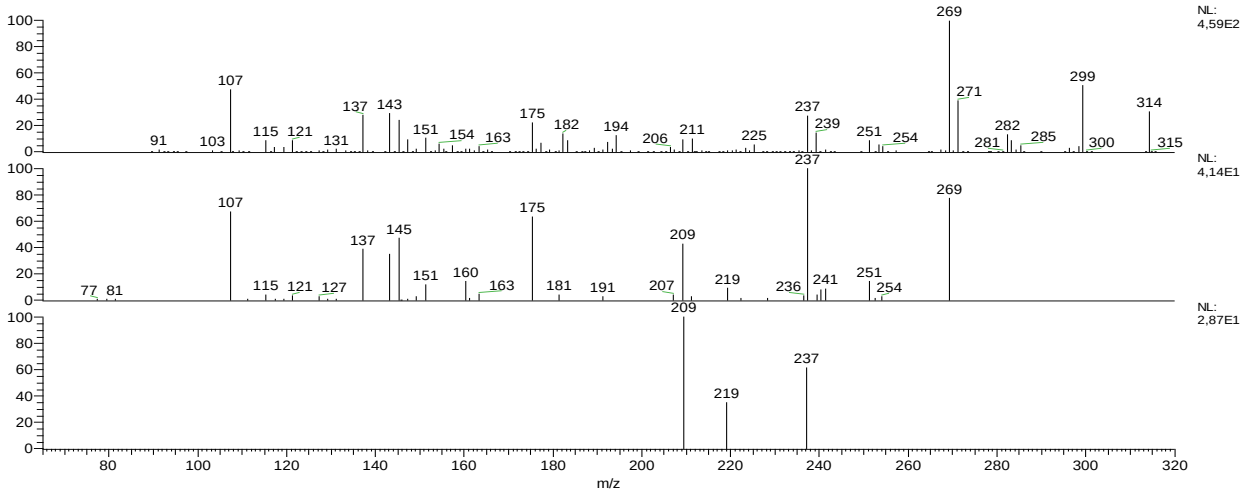
APÊNDICE 46: Espectro de Fragmentação em MSn do íon m/z 298 obtido da Nornuciferidina (S6).



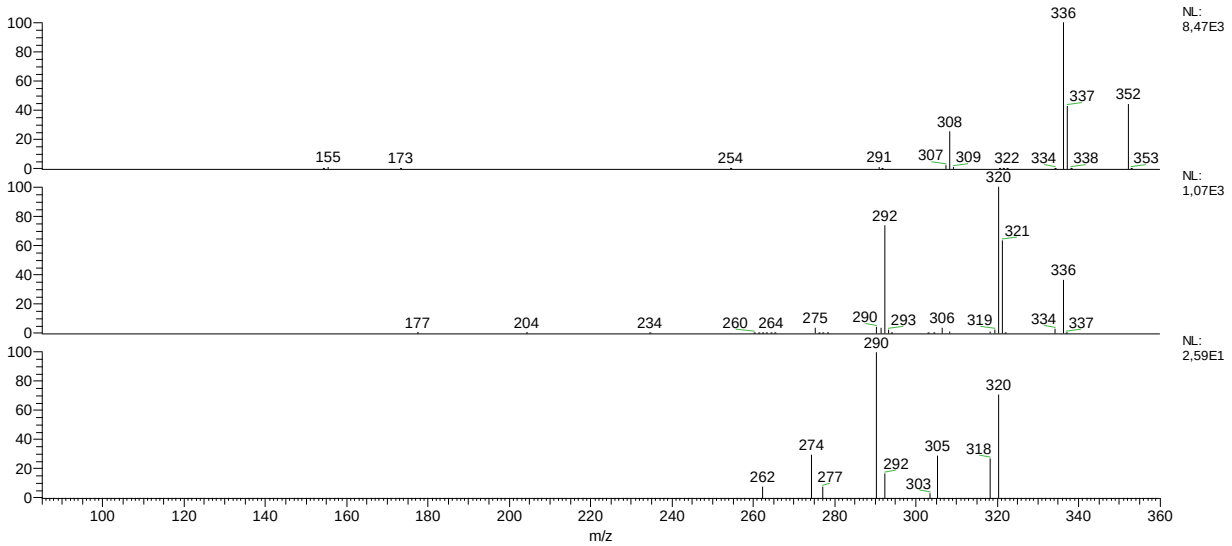
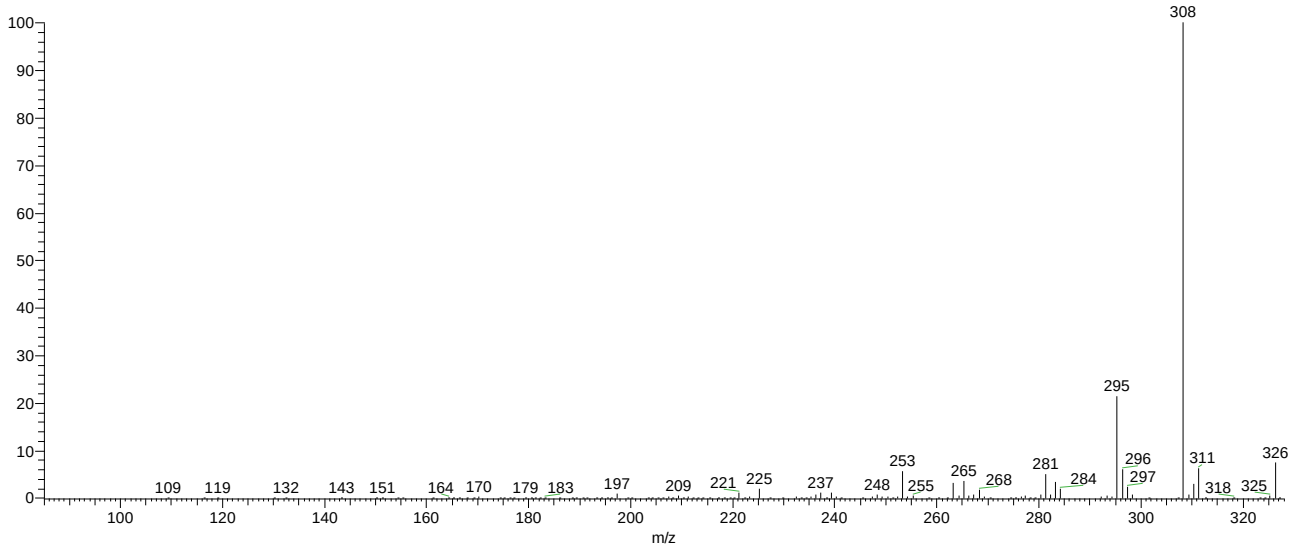
APÊNDICE 47: Espectro de Fragmentação em MSn do íon m/z 322 obtido da O-metilmoschatolina (S3).



APÊNDICE 48: Espectro de Fragmentação em MSn da substância de íon m/z 314 obtido de FADP



APÊNDICE 49: Espectro de Fragmentação em MSn do íon m/z 352 obtido de FADP.



APÊNDICE 50: Espectro de Fragmentação em MSn do íon m/z 326 obtido de FADP