

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

PERFIL ALCALOÍDICO DE ANONÁCEAS DO CAMPUS DA  
UFAM E ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Ephedranthus amazonicus* R. E. FRIES (ANNONACEAE)

DANIELLE CARDOSO DE ALENCAR

MANAUS  
2010

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

DANIELLE CARDOSO DE ALENCAR

PERFIL ALCALOÍDICO DE ANONÁCEAS DO CAMPUS DA  
UFAM E ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Ephedranthus amazonicus* R. E. FRIES (ANNONACEAE)

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

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Belém Pinheiro  
Universidade Federal do Amazonas

MANAUS  
2010

Ficha Catalográfica  
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Alencar, Danielle Cardoso de

A368p Perfil alcaloídico de anonáceas do Campus da UFAM e estudo fitoquímico e biológico de *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries (Annonaceae)/ Danielle Cardoso de Alencar. - Manaus: UFAM, 2010.

140 f. : il. color; 30 cm

Dissertação (Mestrado em Química) — Universidade Federal do Amazonas, 2010

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Lúcia Belém Pinheiro

1. Anonacea – Biologia 2. Química vegetal 3. Plantas – Análise  
I. Pinheiro, Maria Lúcia Belém (Orient.) II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU(1997): 582.677.5(811.3)(043.3)

DANIELLE CARDOSO DE ALENCAR

PERFIL ALCALOÍDICO DE ANONÁCEAS DO CAMPUS DA  
UFAM E ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Ephedranthus amazonicus* R. E. FRIES (ANNONACEAE)

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

Aprovada em 09 de Dezembro de 2010

BANCA EXAMINADORA

---

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Lúcia Belém Pinheiro  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

---

Membro: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria da Paz Lima  
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA

---

Membro: Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa  
Universidade Federal de Roraima - UFRR

***Dedico***

Primeiramente a Deus, que sempre esteve presente em minha vida proporcionando-me muitas alegrias e sempre me dando força para superar as dificuldades;

A minha eterna e querida avó  
**Ivanilde Ferreira Cardoso (Laurita),**  
pelo amor e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por iluminar meus caminhos e por esta sempre ao meu lado em todas as horas;

A Universidade Federal do Amazonas (UFAM) pela oportunidade do aprimoramento dos meus conhecimentos;

A Prof. Dr. Maria Lúcia Belém Pinheiro, pelo conhecimento transmitido, apoio, estímulo, paciência, amizade e orientação desde o PIBIC. Minha eterna gratidão e admiração;

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento – CNPq, pelo apoio financeiro concedido através da bolsa de Mestrado.

Aos professores do Departamento de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas pelos conhecimentos adquiridos;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Webber do Departamento de Biologia (UFAM) pela identificação botânica das espécies em estudo e ao Prof. Ayrton Urizzi Martins do Departamento do Desenvolvimento Social pela colaboração nas análises dos dados do GPS;

Aos colegas de laboratório pelo aprendizado mútuo e pelos bons momentos que passamos juntos;

A minha família, meus pais Mario Jorge e Fátima por me empurrarem para buscar o conhecimento sempre mais e por me apoiarem mesmo que à distância. Aos meus irmãos Nuno e Maria de Jesus que me aturam e me escutam mesmo não entendendo o que digo;

Ao meu noivo Poy Jackson, pelo seu companheirismo, por sua amizade intensa e verdadeira, por todos os momentos, difíceis ou não, em que passamos juntos durante esse desafio e por tudo o que ele representa na minha vida;

Agradeço, enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

“Chegará o dia em que os homens conhecerão o íntimo dos animais, e neste dia um crime contra um animal será um crime contra a humanidade”.

Leonardo da Vinci

## RESUMO

Neste trabalho são apresentados os resultados dos estudos do perfil alcalóidico, em cromatografia de camada delgada (CCD), das espécies *Xylopia aromatica*, *X. excellens*, *X. benthamii*, *Annona sericea*, *A. ambotay*, *Anaxagorea brevipes*, *Rollinia exsucca*, *Duguetia ulei* e *Ephedrantus amazonicus* (Annonaceae), encontradas nos arredores do Campus da Universidade Federal do Amazonas e o estudo fitoquímico e biológico da espécie *Ephedrantus amazonicus* R. E. Fries, planta pertencente à família Annonaceae que se encontra distribuída em toda Região Amazônica sendo conhecida popularmente como “envira-dura”.

Pelo perfil cromatográfico das frações alcaloídicas das espécies analisadas pode-se observar a presença dos alcalóides oxoaporfínicos liriodenina e O-metilmoschatolina, considerados como uns dos marcadores da família Annonaceae. Análises preliminares por FIA-ESI-IT-MS das frações alcaloídicas das folhas e galhos finos de *E. amazonicus* indicou a presença dos alcalóides O-metilmoschatolina nas folhas, liriodenina, lisicamina nos galhos finos, isomoschatolina e 9-metoxi-isomoschatolina em ambas partes da planta, em acordo com os dados das análises em CCD. Outras análises de EM/EM e CL/EM são necessários para validação destes resultados.

O estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas e galhos finos de *Ephedranthus amazonicus* conduziu ao isolamento dos alcalóides oxoaporfínicos O-metilmoschatolina, liriodenina e isomoschatolina. A identificação das substâncias isoladas foi realizada por meio de análises espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  e de  $^{13}\text{C}$  1D e 2D) e por comparação com dados da literatura.

Os extratos e frações de *E. amazonicus* foram submetidos a ensaios para avaliar sua atividade biológica. Em teste de citotoxicidade frente à *Artemia salina* todos os extratos e frações apresentaram-se ativos. Os extratos metanólicos, as frações alcaloídicas e os



compostos isolados apresentaram capacidade antioxidante pelo ensaio ORAC<sub>FL</sub>.

Palavras-chaves:

Annonaceae, perfil alcaloídico, *Ephedrantus amazonicus*, atividade citotóxica, capacidade antioxidante.

## ABSTRACT

This paper presents the results of studies of the profile alkaloids in thin layer chromatography (TLC), the species *Xylopia aromatica*, *X. excellens*, *X. benthamii*, *Annona sericea*, *A. ambotay*, *Anaxagorea brevipes*, *rollinia exsucca*, *Duguetia ulei* and *Ephedranthus amazonicus* (Annonaceae), found in the vicinity of the Campus of the Amazon and the phytochemical and biological species *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries, Annonaceae plant belonging to the family that is distributed throughout the Amazon region is known as “envira-dura”.

For the chromatographic profile of the alkaloid fractions of the species studied can be observed the presence of oxoaporphine alkaloids liriodenine and O-metylmoschatoline, regarded as one of the markers of the family Annonaceae. Preliminar analysis by FIA-ESI-IT-MS of alkaloid fractions from leaves and twigs of *E. amazonicus* indicated the presence of alkaloids O-metilmoschatoline and annamontine leaves, liriodenine and lisicamine in twigs, isomoschatoline and 9-metoxo-isomoschatoline in both parts of the plant, in agree with the TLC data. Other MS/MS and LC/MS analyses are necessities for the validation of these results.

Phytochemical study of methanolic extract of leaves and twigs of *Ephedranthus amazonicus* led to the isolation of oxoaporphine alkaloids O-metylmoschatoline, liriodenine and isomoschatoline. The identification of isolated compounds was performed by means of spectroscopic analysis ( $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  1D and 2D) and comparison with literature data.

The extracts and fractions of *E. amazonicus* tests were done to evaluate its biological activity. In cytotoxicity test on *Artemia salina* all extracts and fractions showed themselves active. The methanol extracts, the alkaloid fractions and isolated compounds showed antioxidant active by testing  $\text{ORAC}_{\text{FL}}$ .

Keywords:

Annonaceae, alkaloidal profile, *Ephedrantus amazonicus* cytotoxic activity, antioxidant capacity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Distribuição mundial da família Annonaceae .....	4
<b>Figura 2.</b> Frutos comestíveis pertencente à família Annonaceae .....	6
<b>Figura 3.</b> Espécie <i>E. amazonicus</i> : (a) árvore; (b) frutos e (c) caule. ....	21
<b>Figura 4.</b> Anonáceas encontradas no Campus da UFAM.....	34
<b>Figura 5.</b> CCD das frações alcaloídicas FAL EMXEx, FAL EMXB, FAL EMXA e padrões de (1) liriodenina, (2) lisicamina, (3) O-metilmoschatolina, (4) isomoschatolina e (5) annamontina .....	49
<b>Figura 6.</b> CCD das frações alcaloídicas FAL EMREx, FAL EMEA, FAL EMDU e padrões (1) liriodenina, (2) lisicamina, (3) O-metilmoschatolina, (4) isomoschatolina e (5) annomontina .....	49
<b>Figura 7.</b> CCD das frações alcaloídicas FAL EMAB, FAL EMAA, FAL EMAS e padrões de (1) liriodenina, (2) lisicamina, (3) O-metilmoschatolina, (4) isomoschatolina e (5) annomontina .....	50
<b>Figura 8.</b> Espectro de massas de primeira ordem ( <i>full scan</i> ), em modo positivo da FAL EMEA(F).....	53
<b>Figura 9.</b> Espectro de massas de primeira ordem ( <i>full scan</i> ), em modo positivo da FAL EMEA (GF). ....	54
<b>Figura 10.</b> Espectro de massas de segunda ordem dos íons precursores de $m/z$ 308, 322 e 338 obtidos em modo positivo da FAL EMEA(F).....	55
<b>Figura 11.</b> Espectro de massas de segunda ordem dos íons precursores de $m/z$ 276, 292, 308 e 338 obtidos em modo positivo da FAL EMEA (GF). ....	56
<b>Figura 12.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> e (a) <i>full MS</i> <sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão liriodenina.....	57

<b>Figura 13.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> e (a) <i>full MS</i> <sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão lisicamina.....	58
<b>Figura 14.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> <sup>3</sup> e (c) <i>full MS</i> <sup>4</sup> obtidos em modo positivo do padrão lisicamina.....	59
<b>Figura 15.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> e (a) <i>full MS</i> <sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão isomoschatolina. ....	60
<b>Figura 16.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> <sup>3</sup> e (c) <i>full MS</i> <sup>4</sup> obtidos em modo positivo do padrão isomoschatolina. ....	61
<b>Figura 17.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> <sup>5</sup> e (e) <i>full MS</i> <sup>6</sup> obtidos em modo positivo do padrão isomoschatolina. ....	62
<b>Figura 18.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> e (a) <i>full MS</i> <sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão O-metilmoschatolina. ....	63
<b>Figura 19.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> <sup>3</sup> e (c) <i>full MS</i> <sup>4</sup> obtidos em modo positivo do padrão O-metilmoschatolina. ....	64
<b>Figura 20.</b> Espectros de massas <i>full MS</i> e (a) <i>full MS</i> <sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão 9- metoxi- isomoschatolina. ....	65
<b>Figura 21.</b> Espectro de massas <i>full MS</i> <sup>3</sup> obtidos em modo positivo do padrão 9- metoxi- isomoschatolina. ....	66
<b>Figura 22.</b> CCD da amostra FEA (F) (13-14/38-47) com o padrão do alcalóide O-metilmoschatolina.....	68
<b>Figura 23.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (F) (13-14/38-47) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz). ....	69
<b>Figura 24.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 9,15 a 8,98 do espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (F) (13-14/38-47) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	69
<b>Figura 25.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 8,60 a 8,25 do espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (F) (13-14/38-47) (CDCl <sub>3</sub> , 400 MHz).....	70

<b>Figura 26.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 7,75 a 7,76 do espectro de RMN $^1\text{H}$ de FEA (F) (13-14/38-47) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	70
<b>Figura 27.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 4,20 a 4,06 do espectro de RMN $^1\text{H}$ de FEA (F) (13-14/38-47) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	71
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ a 100 MHz em $\text{CDCl}_3$ de FEA (F) (13-14/38-47). ....	72
<b>Figura 29.</b> Correlações observadas no mapa de contorno HMBC de FEA (F) (13-14/38-47). .....	73
<b>Figura 30.</b> Mapa de contorno HMBC a 400 MHz em $\text{CDCl}_3$ de FEA (F) (13-14/38-47). ..	74
<b>Figura 31.</b> Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em $\text{CDCl}_3$ de FEA (F) (13-14/38-47). ....	75
<b>Figura 32.</b> Mapa de contorno HSQC a 400 MHz em $\text{CDCl}_3$ de FEA (F) (13-14/38-47). ...	76
<b>Figura 33.</b> Ampliação do mapa de contorno HSQC a 400 MHz em $\text{CDCl}_3$ de FEA (F) (13-14/38-47).....	77
<b>Figura 34.</b> Estrutura do alcalóide O-metilmoschatolina.....	78
<b>Figura 35.</b> CCD da amostra FEA (GF) 14 com o padrão do alcalóide liriodenina .....	80
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	81
<b>Figura 37.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 8,80 a 6,45 do espectro de RMN $^1\text{H}$ de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	81
<b>Figura 38.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 8,90 a 8,55 do espectro de RMN $^1\text{H}$ de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	82
<b>Figura 39.</b> Ampliação dos sinais entre $\delta$ 7,80 e 7,55 do espectro de RMN $^1\text{H}$ de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	82
<b>Figura 40.</b> Ampliação dos sinais entre $\delta$ 7,30 e 7,10 do espectro de RMN $^1\text{H}$ de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).....	83
<b>Figura 41.</b> Correlações observadas no mapa de contorno HMBC de FEA (GF) 14. ....	84

<b>Figura 42.</b> Mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CDCl <sub>3</sub> de FEA (GF) 14.....	84
<b>Figura 43.</b> Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CDCl <sub>3</sub> de FEA (GF) 14 .....	85
<b>Figura 44.</b> Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CDCl <sub>3</sub> de FEA (GF) 14. .....	86
<b>Figura 45.</b> Estrutura do alcalóide liriodenina. ....	87
<b>Figura 46.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (GF) 21 (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	89
<b>Figura 47.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 9,10 a 9,06 do espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (GF) 21 (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	90
<b>Figura 48.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 8,75 a 8,58 do espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (GF) 21 (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	90
<b>Figura 49.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 8,44 a 8,39 do espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (GF) 21 (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	91
<b>Figura 50.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 7,71 a 7,66 do espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (GF) 21 (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	91
<b>Figura 51.</b> Ampliação da região entre $\delta$ 7,36 a 7,31 do espectro de RMN <sup>1</sup> H de FEA (GF) 21 (CD <sub>3</sub> OD, 400 MHz).....	92
<b>Figura 52.</b> Espectro de RMN de <sup>13</sup> C a 100 MHz em CD <sub>3</sub> OD de FEA (GF) 21.....	93
<b>Figura 53.</b> Correlações observadas no mapa de contorno HMBC de FEA (GF) 21. ....	94
<b>Figura 54.</b> Mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CD <sub>3</sub> OD de FEA (GF) 21. ....	95
<b>Figura 55.</b> Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CD <sub>3</sub> OD de FEA (GF) 21. .....	95
<b>Figura 56.</b> Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CD <sub>3</sub> OD de FEA (GF) 21. ....	96

**Figura 57.** Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CD<sub>3</sub>OD de FEA (GF) 21.

..... 97

**Figura 58.** Estrutura do alcalóide isomoschatolina..... 97



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Atividade biológica de alcalóides isoquinolínicos.....	9
<b>Tabela 2.</b> Coordenadas geográficas das espécies de Annonaceae.....	35
<b>Tabela 3.</b> Rendimento dos extratos brutos.....	38
<b>Tabela 4.</b> Rendimento da extração ácido-base dos extratos metanólicos.....	40
<b>Tabela 5.</b> Resultado do perfil alcaloídico de espécies pertencente à família Annonaceae...	51
<b>Tabela 6.</b> Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ de FEA (F) (13-14/38-47) com a literatura.....	79
<b>Tabela 7.</b> Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$ de FEA (GF) 14 com a literatura.....	88
<b>Tabela 8.</b> Comparação dos dados de RMN $^1\text{H}$ de FEA (GF) 21 com a literatura.....	98
<b>Tabela 9.</b> Teste de toxicidade para <i>A. salina</i> dos extratos e das frações de <i>E. amazonicus</i> .	99
<b>Tabela 10.</b> Capacidade antioxidante dos extratos e frações de <i>E. amazonicus</i> .....	100
<b>Tabela 11.</b> Capacidade antioxidante das substâncias isoladas de <i>E. amazonicus</i> .....	101

## LISTA DE ESQUEMA

<b>Esquema 1.</b> Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das espécies da família Annonaceae coletadas. ....	37
<b>Esquema 2.</b> Fluxograma do fracionamento dos extratos metanólicos para obtenção de alcalóides. ....	39
<b>Esquema 3.</b> Fluxograma da análise cromatográfica da FAL EMEA (F) .....	42
<b>Esquema 4.</b> Fluxograma da análise cromatográfica da fração 13-14.....	43
<b>Esquema 5.</b> Fluxograma da análise cromatográfica da FAL EMEA (GF).....	45
<b>Esquema 6.</b> Fragmentos mais importantes observados no padrão do alcalóide liriidenina.	66
<b>Esquema 7.</b> Fragmentos mais importantes observados no padrão do alcalóide isomoschatolina. ....	67
<b>Esquema 8.</b> Fragmentos mais importantes observados no padrão do alcalóide O-metilmoschatolina.....	67

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	<i>Annona ambotay</i>
AAPH	2,2'-Azobis (2-amidiopropane) dihydrochloride
AS	<i>Annona sericea</i>
AB	<i>Anaxagorea brevipes</i>
$\delta$	Deslocamento químico
$\mu\text{g}$	Micrograma
$\mu\text{M}$	Micromolar
1D	Uma dimensão
2D	Duas dimensões
DU	<i>Duguetia ulei</i>
CAS	Cascas
CER	Cerne
CC	Coluna cromatográfica
CCD	Cromatografia em camada delgada
$\text{CD}_3\text{OD}$	Metanol deuterado
$\text{CDCl}_3$	Clorofórmio deuterado
$\text{CH}_2\text{Cl}_2$	Diclorometano
$\text{CH}_3\text{OH}$	Metanol
$\text{CHCl}_3$	Clorofórmio
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
<i>ddd</i>	Duplo duplo dubleto
$\text{DL}_{50}$	Dose letal para matar 50%
EA	<i>Ephedranthus amazonicus</i>

EH	Extrato hexânico
EM	Extrato metanólico
F	Folhas
FAL	Fração alcaloídica
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow injection analysis - Electrospray ionization - Ion trap - Mass spectrometry</i> (Espectrometria de massas acoplada a um <i>ion-trap</i> com interface de ionização por electrospray e inserção direta da amostra)
FN	Fração neutra
Fr.	Fração
GF	Galhos finos
HMBC	“Heteronuclear Multiple Bond Correlation”
HSQC	“Heteronuclear Single Quantum Coherence”
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de Acoplamento
<i>m</i>	multiplete
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
NH <sub>4</sub> OH	Hidróxido de Amônio
ORAC	“Oxygen radical absorbance capacity”
Rf	Fator de retenção
RE <sub>x</sub>	<i>Rollinia exsucca</i>
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	singleto
TE	Trolox equivalente
TMS	Tetrametilsilano

UV	Ultravioleta
XA	<i>Xyloia aromatica</i>
XB	<i>Xyloia benthamii</i>
XE <sub>x</sub>	<i>Xyloia excellens</i>

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	4
2.1 Família Annonaceae Juss. ....	4
2.2 Principais Constituintes Químicos da Família Annonaceae.....	7
2.2.1 Alcalóides.....	7
2.2.2 Acetogeninas de Anonáceas.....	13
2.2.3 Outros constituintes químicos.....	16
2.3 O gênero <i>Ephedranthus</i> S. Moore .....	20
2.3.1 <i>Ephedranthus amazonicus</i> R. E. Fries .....	21
2.4 Caracterização geral da área em estudo.....	22
2.5 Considerações gerais sobre os testes de atividade efetuados .....	23
2.5.1 Avaliação da atividade citotóxica frente à <i>Artemia salina</i> Leach.....	23
2.5.2 Avaliação da atividade antioxidante .....	25
3. OBJETIVOS.....	30
3.1 Geral .....	30
3.2 Específicos.....	30
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	31
4.1 Análise cromatográfica.....	31
4.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	31
4.1.2 Cromatografia em coluna (CC).....	31
4.2 Solventes e reagentes reveladores .....	31
4.2.1 Solventes .....	31
4.2.2 Reagentes reveladores.....	32
4.3 Métodos espectrométricos .....	32

4.4	Outros equipamentos.....	33
4.5	Material botânico .....	33
4.5.1	Mapeamento das Anonáceas na área do Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) .....	33
4.5.2	Coleta e identificação botânica .....	35
4.5.3	Secagem e moagem.....	36
4.5.4	Preparação dos extratos.....	36
4.6	Marcha química para obtenção de alcalóides .....	38
4.6.1	Tratamento dos extratos metanólicos.....	38
4.7	Perfil alcaloídico.....	41
4.8	Fracionamento cromatográfico dos extratos metanólicos de <i>E. amazonicus</i> .....	41
4.8.1	Análise cromatográfica da fração alcaloídica das folhas de <i>E. amazonicus</i> (FAL EMEA (F)) .....	41
4.8.1.1	Análise cromatográfica das frações 13-14.....	42
4.8.2	Análise cromatográfica da fração alcaloídica dos galhos finos de <i>E. amazonicus</i> (FAL EMEA (GF)) .....	44
4.9	Bioensaios dos extratos brutos e frações de <i>E. amazonicus</i> .....	46
4.9.1	Teste de letalidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach .....	46
4.9.2	Teste da atividade antioxidante.....	47
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	48
5.1	Perfil alcaloídico por cromatografia em camada delgada (CCD).....	48
5.2	Perfil alcaloídico por espectrometria de massa (IES-EM/EM).....	52
5.2.1	Perfil das frações alcaloídicas das folhas e galhos finos de <i>E. amazonicus</i> (FAL EMEA (F) e (FAL EMEA (GF)) .....	52
5.3	Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas .....	68

5.3.1 Identificação de FEA (F) (13-14/38-47) .....	68
5.3.2 Identificação de FEA (GF) 14.....	80
5.3.3 Identificação de FEA (GF) 21.....	88
5.4 Atividades biológicas .....	99
5.4.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo <i>Artemia salina</i> .....	99
5.4.2 Determinação da capacidade antioxidante.....	100
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	102
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	104



## 1. INTRODUÇÃO

O avanço do uso das plantas para fins medicinais tem provocado renovado interesse pelo conhecimento das características das substâncias delas originadas. Sabe-se que as plantas contêm uma enorme diversidade de metabólitos secundários os quais representam os seus princípios ativos.

Muitas pesquisas com espécies vegetais têm sido realizadas no intuito de isolar e determinar a estrutura de compostos ativos. Estes compostos de origem vegetal constituem uma vertente para a inovação farmacêutica, tendo em vista a sua singularidade estrutural, com aplicação como fármacos, bem como o desenvolvimento de novos medicamentos.

No passado, importantes fármacos foram descobertos e muitos deles ainda são usados na terapêutica atual. Como exemplos podem ser citados o alcalóide antimalárico quinina, isolado de *Cinchona* spp. (Rubiaceae) e os "curares", venenos de flecha dos índios amazônicos, que deram origem ao desenvolvimento de uma linha de relaxantes musculares utilizados como coadjuvantes em anestésias de cirurgias (PINHEIRO, 2000).

A Amazônia possui o maior ecossistema de florestais tropicais do mundo e é considerada a maior reserva de plantas medicinais (DI STASI et al., 2002). Apesar desta potencialidade da flora amazônica, poucos estudos foram desenvolvidos sobre os alcalóides de plantas amazônicas, merecendo registro o trabalho pioneiro de Rocha e colaboradores (1979), sobre a descoberta de um novo esqueleto de alcalóides, os azafluorantenos, isolados de espécies do gênero *Abuta*, da família Menispermaceae. Data de 1968, o primeiro *screening* fitoquímico (ROCHA et al., 1968), realizado em material de herbário, que apontou as famílias Annonaceae, Menispermaceae, Apocynaceae e Loganiaceae, como as mais promissoras em alcalóides na Amazônia.

O Campus da Universidade Federal do Amazonas possui cerca de 600 hectares e representa um dos maiores fragmentos florestais urbanos do País, sendo pouco estudado em relação a sua biodiversidade e seus ecossistemas. Constitui-se em um grande laboratório vivo para estudo da biodiversidade da Amazônia.

Dentro deste contexto, torna-se importante um estudo mais detalhado de algumas espécies nativas popularmente conhecidas, como é o caso de espécies pertencente à família Annonaceae.

Espécies de Annonaceae se destacam por sua importância no fornecimento de frutos comestíveis, produtos para cosméticos, material para perfumes e são usadas na medicina popular para várias finalidades, por exemplo, como antitumoral, antiparasitária, inseticida, e agentes antidiarreica. Muitas espécies apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, acetogeninas, terpenos, lignanas, neolignanas, chalconas, flavonóides e lactonas sesquiterpênicas, compostos descritos na literatura como bioativos.

Pesquisas recentes com a espécie *Annona cornifolia* revelaram o isolamento de doze acetogeninas de anonácea com atividade antioxidante (LIMA et al., 2010). Adicionalmente, foram isolados alcalóides coritenchina, xylopinina, discretamina e xylopina isolados da espécie *Xylopija langsdorffiana* (SILVA et al., 2009). A partir de *Annona foetida*, coletada no campus da UFAM foram isolados os alcalóides liriodenina, O-metilmoschatolina, annomontina e hidroxianonmontina que se revelaram promissora atividade leishmanicida (COSTA et al., 2006).

Estes resultados aliados à potencialidade químico-farmacológica da família Annonaceae referente às atividades biológicas justificam a necessidade de um estudo químico e biológico mais intenso, de espécies dessa família, em especial, das ocorrentes no campus da Universidade Federal do Amazonas. Nesta dissertação, serão apresentados, além do perfil alcaloídico de espécies de anonáceas do Campus Universitário, aspectos botânicos, químicos

e biológicos da espécie *Ephedranthus amazonicus*, para a qual não há registro de estudos na literatura.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Família Annonaceae Juss.

A família Annonaceae pertence à classe Magnoliopsida, subclasse Magnoliidae e ordem Magnoliales. Essa família apresenta uma combinação de caracteres marcantes, sendo uma das mais uniformes tanto do ponto de vista anatômico como estrutural, e é uma das mais primitivas das Angiospermae (CRONQUIST, 1988; FECHINE et al., 2002).

Annonaceae compreende cerca de 135 gêneros e mais de 2.500 espécies, estando distribuída nas regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (CHATROU et al., 2004; DISTASI et al., 2002) (FIGURA 1). No neotrópico está representada por aproximadamente 40 gêneros e 900 espécies (CHATROU et al., 2004) e no Brasil por 26 gêneros e com cerca de 260 espécies (MAAS et al., 2001; MAAS, 2007), ocorrendo em diversos habitats, como florestas, cerrados, caatingas e restingas.



Figura 1. Distribuição mundial da família Annonaceae  
Fonte: [www.mobot.org/.../orders/magnolialesweb.htm](http://www.mobot.org/.../orders/magnolialesweb.htm)

Os gêneros *Anaxagorea*, *Annona*, *Cananga*, *Duguetia* e *Xylopia* são os que possuem distribuição pantropical, enquanto que *Diclinanona*, *Froesiodendron*, *Guatterrella*, *Guatterriopsis*, *Ruizodendron* e *Trigynaea* são amazônicos e os restantes dos gêneros são neotropicais (MURILLO-A et al., 2001).

A maioria dos representantes dessa família é composta por plantas arbóreas, ou muitas vezes arvoretas ou arbustos. Vegetativamente, a família pode ser reconhecida pelas seguintes características particulares: odor forte e característico que exala do tronco cortado ou dos ramos; por apresentar fibras longas e resistentes na casca, conhecidas popularmente como envira; pela filotaxia alterna e dística de suas folhas (exceto em *Tetrameranthus* R.E.Fries, com folhas espiraladas) (RIBEIRO et al., 1999).

Grande parte desta família é polinizada por besouros grandes ou pequenos e moscas, de acordo com o tamanho das flores (GOTTSBERGER, 1999; WEBBER, 1996, MAAS, 2007).

No aspecto econômico, a família apresenta uma diversidade muito grande como fonte de frutos comestíveis, principalmente espécies pertencentes aos gêneros *Annona* e *Rollinia* tais como: *A. cherimolia* (cherimólia), *A. squamosa* (ata, fruta do conde ou pinha), *A. muricata* (guanabana, graviola) e *R. mucosa* (biribá). Essas espécies são cultivadas e comercializadas e, seus frutos são usados *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (FIGURA 2).

Algumas espécies como *Annona glabra* Linn, *Annona crassiflora* Mart., *Bocageopsis* spp, *Fusaea longifolia*, *Oxandra lanceolata*, *Oxandra laurifolia*, *Guatteria megalophylla* e *Guatteria stipitata* são de grande importância econômica em madeiras para confecção de utensílios (LOBÃO et al., 2005; MURILLO-A., 2001; BERNARDI e SPICHIGER, 1980).

Na Ásia as flores de *Canangium odoratum* e *Artobotrys odoratissima* são cultivadas para obter a essência de Ylang-Ylang que serve de base para a fabricação de perfumes. Na

África e Malásia as sementes de *Xylopia sp.* são usadas como um substituto de pimenta (BERNARDI e SPICHIGER, 1980).

Vários membros desta família são usados na medicina popular para tratar os mais diversos males. Na Amazônia foi identificado o uso freqüente de três espécies: *Annona muricata*, no qual o suco do fruto é usado internamente como antitérmico, diurético e no combate a insônias leves, *Annona tenuiflora*, que é usada contra dores de cabeça, tonturas e hipotensão. A infusão das folhas de *Xylopia cf. frutescens*, é usada como analgésico e antiinflamatório, ao passo que a decocção da casca é usada, na forma de inalação, para combater resfriados e dores de cabeça (DI STASI et al., 2002).

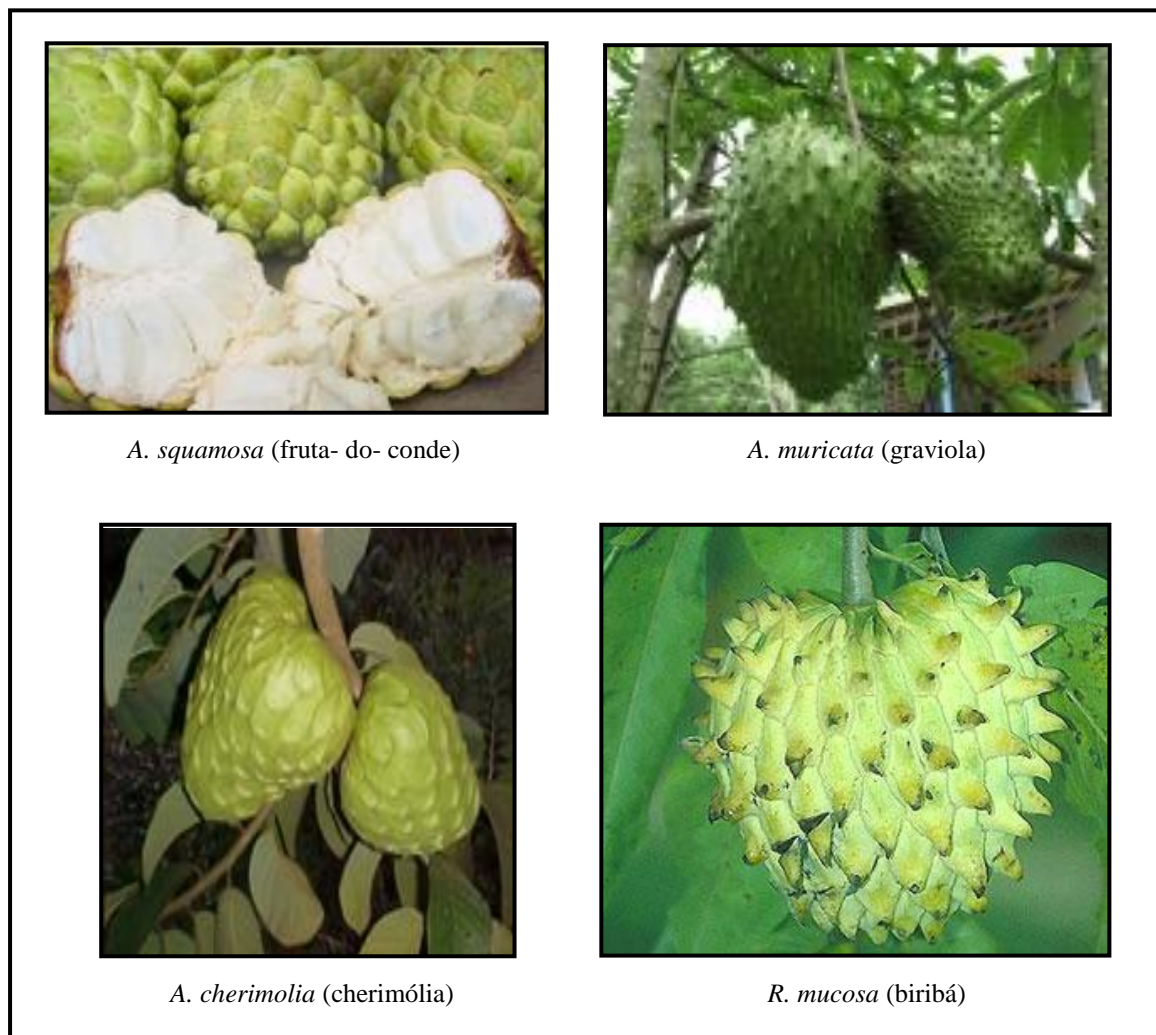


Figura 2. Frutos comestíveis pertencente à família Annonaceae  
 Fonte: <http://minhasfrutas.blogspot.com>

## 2.2 Principais Constituintes Químicos da Família Annonaceae

A família Annonaceae é muito rica em compostos químicos, o que se deve a diversidade biogenética e estrutural de metabólitos secundários que podem ser evidenciados em suas espécies. A família é caracterizada pela ocorrência de alcalóides e acetogeninas de anonáceas. Outras classes de compostos como polifenóis, terpenos, compostos aromáticos, neolignanais, flavonóides, esteróides, lactonas e amidas também podem ser encontrados em espécies desta família (LEBOEUF et al., 1982; DÍAZ, 1997; ALALI et al., 1999; PINTO et al., 2005).

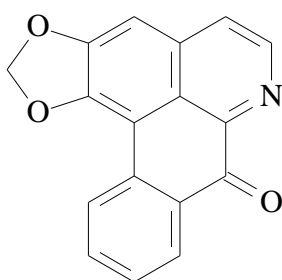
### 2.2.1 Alcalóides

Os alcalóides encontram-se presentes em um grupo restrito de famílias botânicas, sendo as principais Apocynaceae, Rutaceae, Ranunculaceae, Fabaceae, Papaveraceae, Menispermaceae, Annonaceae, Solanaceae, Rubiaceae, Liliaceae e Loganiaceae (KRANE, 1982; MENACHERY et al., 1986; MIN, 1991).

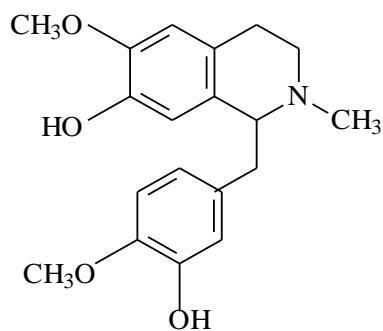
Segundo Leboeuf (1982), a família Annonaceae é caracterizada pela ocorrência de alcalóides do tipo isoquinolínico, tais como os alcalóides isoquinolínicos simples; benziltetraisoquinolínicos; bisbenzilisquinolínicos e bisbenziltetraisoquinolínicos; protoberberínicos e tetrahidroprotoberberínicos; aporfínóides, incluindo todos os alcalóides com o núcleo aporfínico verdadeiro e os alcalóides baseados em seu núcleo, porém com esqueletos modificados (CAVÉ et al., 1987).

Os alcalóides liriodenina [1] (oxoaporfínico) (SIQUEIRA et al., 1998), reticulina [2] (benziltetraidroisoquinolínico) (KANOKMEDHAKUL et al., 2007) e anonaína [3]

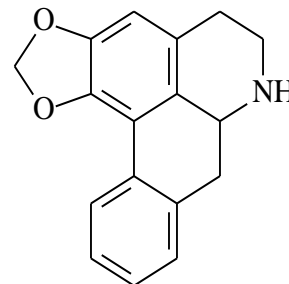
(aporfínico) (COSTA et al., 2008) são frequentemente encontrados em varias espécies da família Annonaceae, sendo considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família (LEBOEUT et al., 1982).



[1]



[2]



[3]

Diversas atividades biológicas têm sido atribuídas à classe dos alcalóides isoquinolínicos, tais como: citotóxica, antiespasmódico, antitumoral, antimicrobiana, antifúngica, antiinflamatório, antiviral, antioxidante e pode atuar como os inibidores da enzima (ANISZEWSKI, 2007).

Na Tabela 1 são apresentados exemplos de alcalóides isolados de diversas espécies pertencentes à família Annonaceae derivados do esqueleto isoquinolínico bem como suas respectivas atividades biológicas.



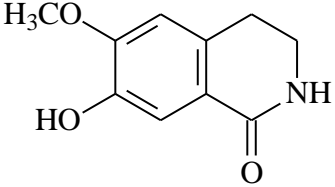
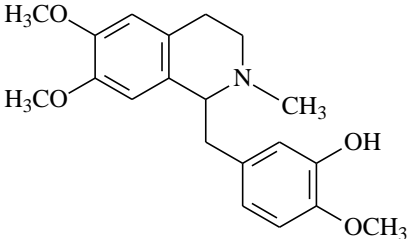
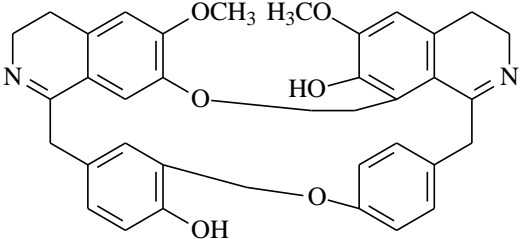
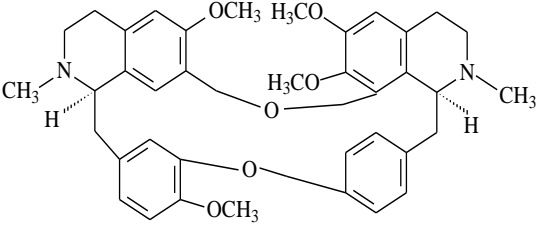
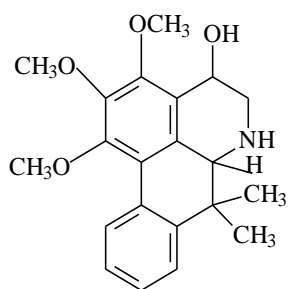
Alcalóides	Atividade biológica	Espécie isolada	Referência
<b>Isoquinolínico simples</b>			
 <p style="text-align: center;">Thalifolina</p>	Antifúngica	<i>Annona squamosa</i>	YANG et al., 2004
<b>Benziltetrahydroisoquinolínico</b>			
 <p style="text-align: center;">(+)-Laudanidina</p>	Atividade antioxidante	<i>Xylopia championii</i>	PUVANENDRAN et al., 2008
<b>Bisbenzilisquinolínico</b>			
 <p style="text-align: center;">Puertogalina A</p>	Antiprotozoário	<i>Guatteria boliviana</i>	MAHIOU et al., 2000; CHAN-BACAB et al., 2001
<b>Bisbenziltetraisoquinolínico</b>			
 <p style="text-align: center;">Obaberina</p>	Leishmanicida	<i>Pseudoxandra sclerocarpa</i>	MISHRA et al., 2008

Tabela 1: Atividade biológica de alcalóides isoquinolínicos.

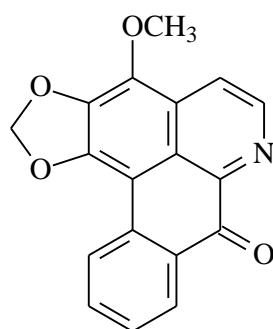
**Aporfínico**

Antimicrobiana

*Guatteriospis  
friesiana*

COSTA, 2009

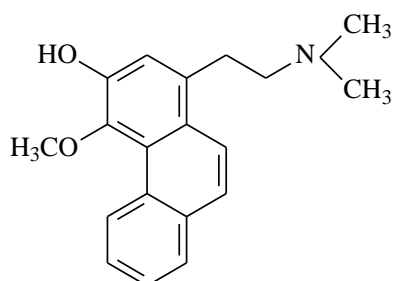
Guatteriosicina

**Oxoaporfínico**

Antitumoral

*Artabotrys  
uncinatus*STÉVIGNY et al.,  
2005

Atherospermidina

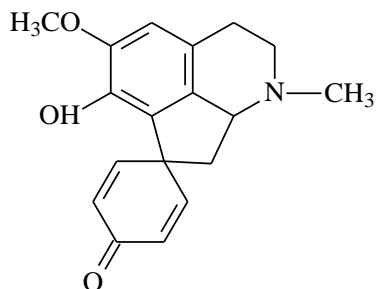
**Fenantreno**

Antitumoral

*Annona  
montana*

WU et al., 1993

Argentinina

**Proaporfínico**

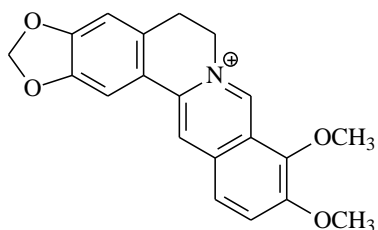
Citotóxica

*Annona  
purpurea*STÉVIGNY et al.,  
2005

S-Glaziovine

Tabela 1: Atividade biológica de alcalóides isoquinolínicos (cont.)

---

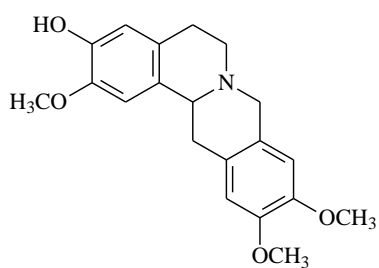
**Protoberberínico**

Leishmanicida

*Annona  
spinescens*QUEIROZ et al.,  
1996

Berberina

---

**Tetrahidroprotoberberínico**

Antimicrobiana

*Guatterriopsis  
friesiana*

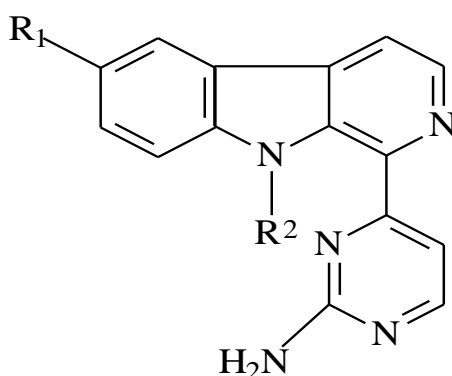
COSTA, 2009

Corypalmina

---

Tabela 1. Atividade biológica de alcalóides isoquinolínicos (cont.).

Alcalóides do tipo não isoquinolínicos têm sido encontrados em algumas espécies de Annonaceae. Das cascas de *Annona impressivenia* foi isolado o alcalóide metoxiannomontina [4] (SANTOS, 2007) e das cascas de *Annona foetida* foram isolados os alcalóides N-hidroxiannomontina [5] e annomontina [6] (COSTA et al., 2006) todos do tipo pirimidino- $\beta$ -carbolíníco. Annomontina foi isolado pela primeira vez da espécie *Annona montana* (LEBOEUF et al., 1982a).



- [4] R<sub>1</sub>= OCH<sub>3</sub>, R<sub>2</sub>= H (Metoxiannomontina)  
 [5] R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= OH (N-hidroxiannomontina)  
 [6] R<sub>1</sub>= H, R<sub>2</sub>= H (Annomontina)

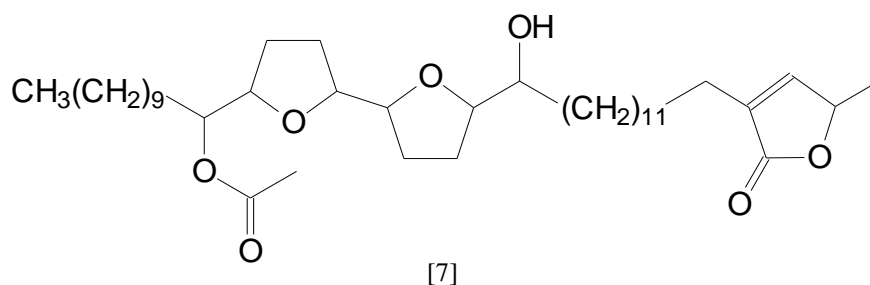
### 2.2.2 Acetogeninas de Anonáceas

As acetogeninas são metabólitos secundários derivados de ácidos graxos de cadeia longa, contendo de 35 a 37 átomos de carbonos, que são combinados com uma unidade de 2-propanol. São usualmente caracterizadas pela presença de uma cadeia alifática longa com grupos funcionais hidroxila, acetila e carbonila conectado a um grupo terminal  $\delta$ -lactona-2,4-dissubstituído, podendo ser saturados ou  $\alpha,\beta$ -insaturado. Podem também conter de 1 a 3 anéis

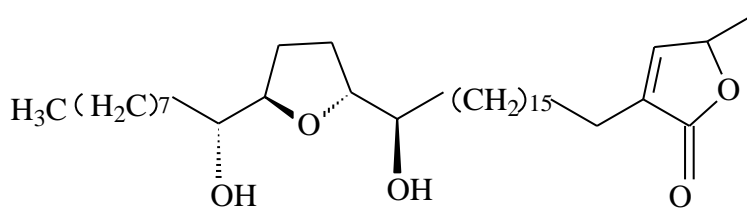
tetraidrofurânicos (THF). Existem acetogeninas que ao invés de apresentar anel THF, apresentam anel tetrahidropirânico (THP) (ALALI et al., 1999).

As acetogeninas constituem uma série de produtos naturais isolado exclusivamente de espécies da família Annonaceae e são encontradas em dez gêneros: *Annona*, *Asimina*, *Anomianthus*, *Disepalum*, *Goniothalamus*, *Rollinia*, *Polyalthia*, *Porcelia*, *Uvaria* e *Xylopia* (ALALI et al., 1999; CUNHA et al., 2009). Estas substâncias são conhecidas por exibir uma variedade de efeitos farmacológicos tais como: antiparasitário, inseticida, citotóxico, antitumoral, imunossupressiva, vermífida, abortiva, antimicrobiana, inibidora do apetite e antimalárica (QUEIROZ et al., 1998; NASCIMENTO et al., 2003).

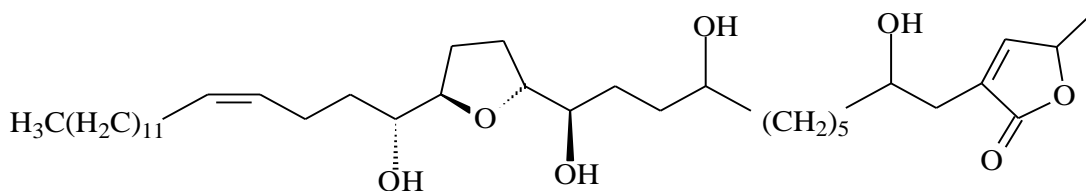
Desde uvaricina [7], a primeira acetogenina bioativa encontrada a partir das raízes de *Uvaria accuminata* em 1982, mais de 400 membros desta família de composto foram isolados de 51 espécies diferentes (LI et al., 2008).



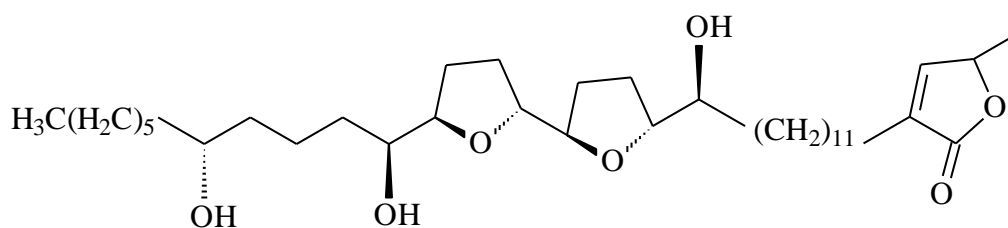
Das folhas da espécie *Rollinia laurifolia*, uma planta nativa do cerrado brasileiro, foram isolados as acetogeninas laurifolina [8], gonionenina [9], annonina I [10], uvariamicina I [11] e solamina [12], sendo que as três primeiras apresentaram considerável atividade citotóxica (CUNHA et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2003).



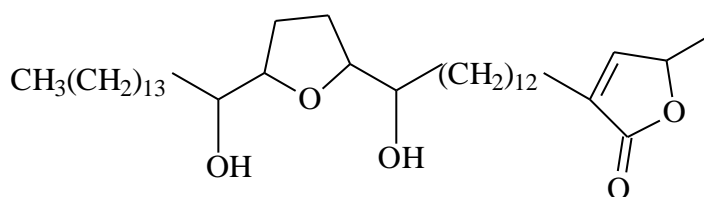
[8]



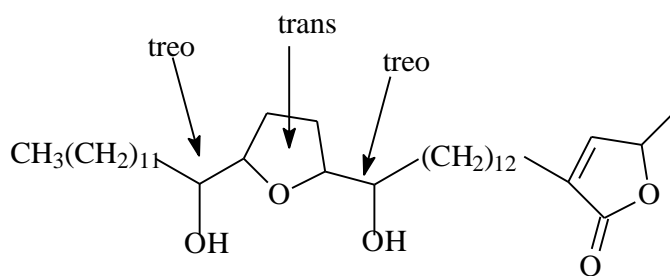
[9]



[10]

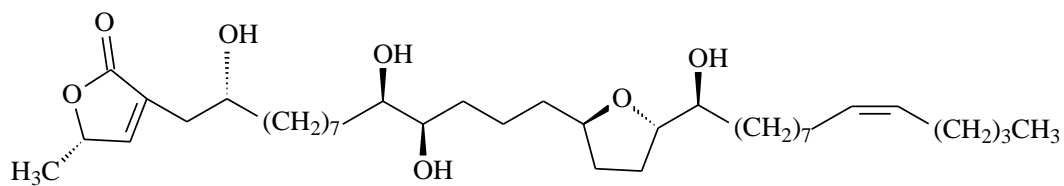


[11]

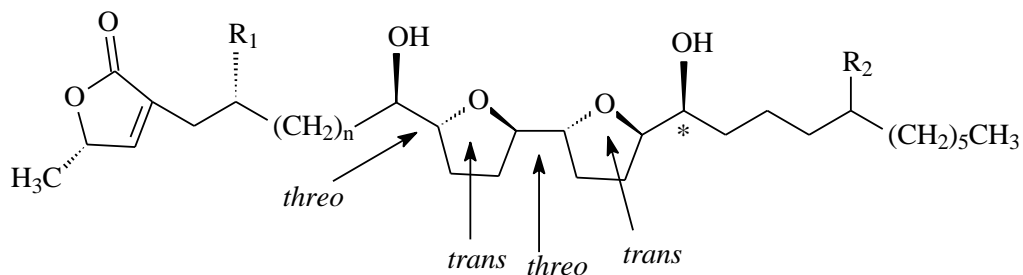


[12]

Das sementes de *Annona senegalensis* foram isoladas as acetogeninas senegalena [13], esquamocina [14], asimicina [15] e molvizarina [16] que apresentaram atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania major* e *L. donovani* em concentrações entre 25-100  $\mu\text{g/mL}$  (CHAN-BACAB et al., 2001).



[13]



[14]  $R_1 = H$ ,  $R_2 = OH$ ,  $n = 10$ , \* = *erythro* (Esquamocina)

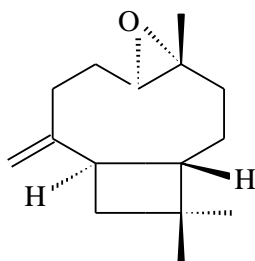
[15]  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$ ,  $n = 10$ , \* = *threo* (Asimicina)

[16]  $R_1 = OH$ ,  $R_2 = H$ ,  $n = 8$ , \* = *erythro* (Molvizarina)

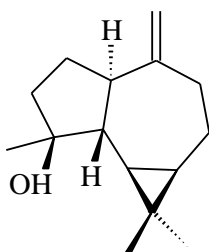
### 2.2.3 Outros constituintes químicos

Embora menos frequentes, outras importantes classes de compostos também foram isolados da família Annonaceae, tais como:

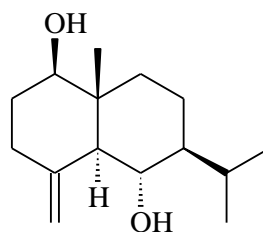
- **Terpenos:** óxido de cariofileno [17], espatulenol [18], 1 $\beta$ ,6 $\alpha$ -diidroxi-4(15)-eudesmeno [19] e 4-hidroxi-1-15-peróxieuodesmano [20], isolados dos ramos de *Xylopia emarginata* (MOREIRA et al., 2007).



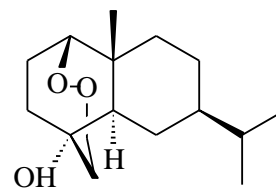
[17]



[18]

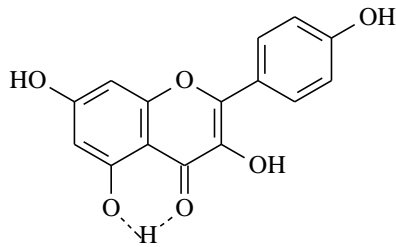


[19]

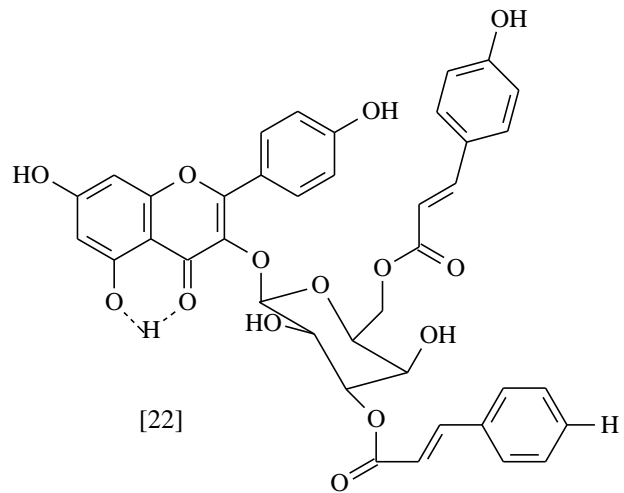


[20]

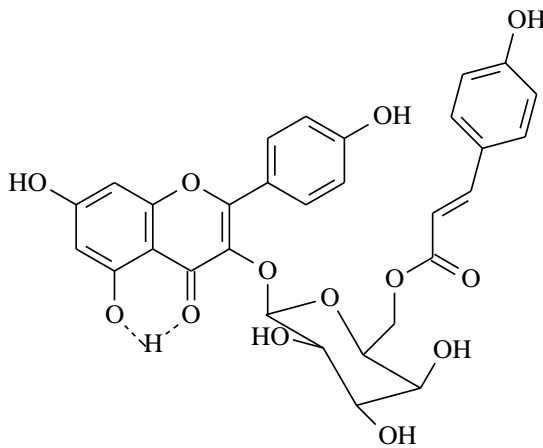
- **Flavonóides:** kaempferol [21], 3-*O*-[3",6"-di-*O*-*p*-hidroxicinamoil]- $\beta$ -galactopiranosil-kaempferol [22], 6"-*O*-*p*-hidroxicinamoil- $\beta$ -galactopiranosil-kaempferol [23], 3-*O*- $\beta$ -galactopiranosil-kaempferol [24], isolados das folhas de *Annona dioica* (VEGA et al., 2007).



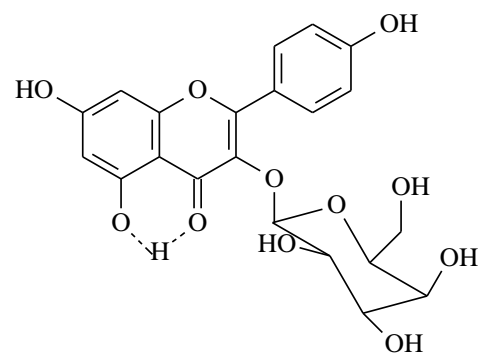
[21]



[22]



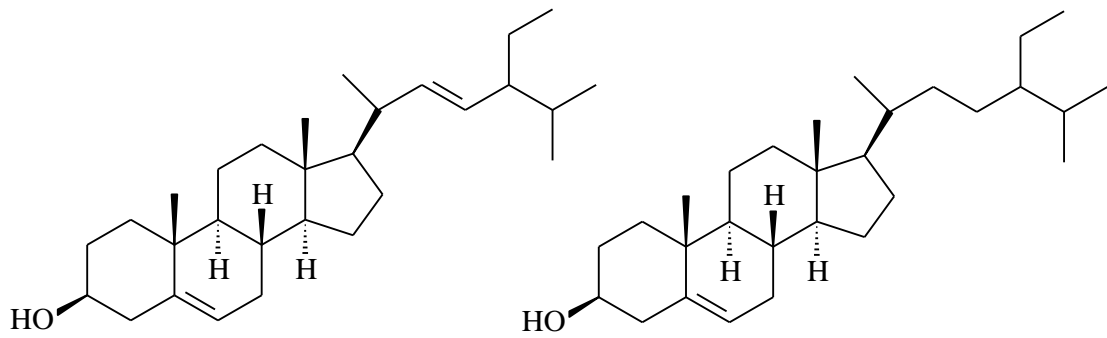
[23]



[24]

- **Esteróides:** estigmasterol [25] e  $\beta$ -sitosterol [26], isolados dos galhos finos de *Annona pulchra* (OLIVEIRA, 2007).

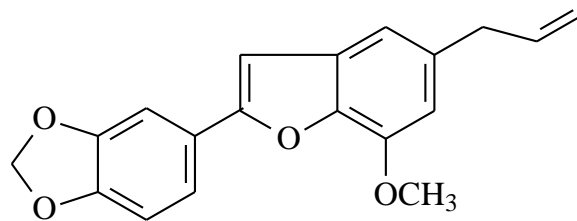




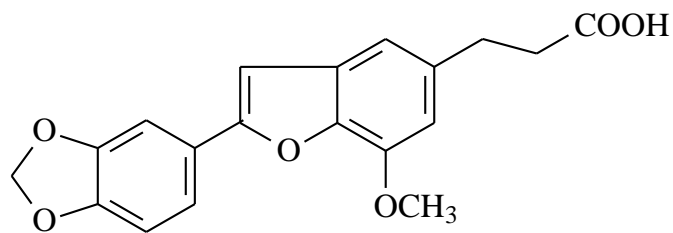
[25]

[26]

- **Neolignanas:** 3`-metoxi-3,4-metilenodioxi-4`7-epoxi-9-nor-8,5`-neolignana-7,8`-dieno [27] e ácido 3`-metoxi-3,4-metilenodioxi-4`7-epoxi-9-nor-8,5`-neolignana-7-em-9`-oico [28], isoladas do cerne de *Anaxagorea clavata* (DÍAZ, 1997).

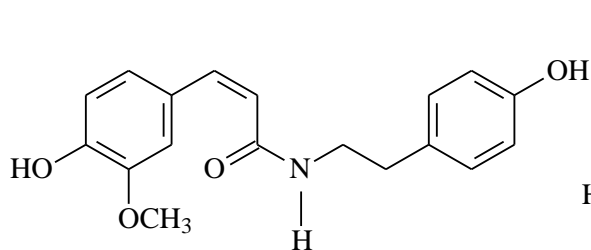


[27]

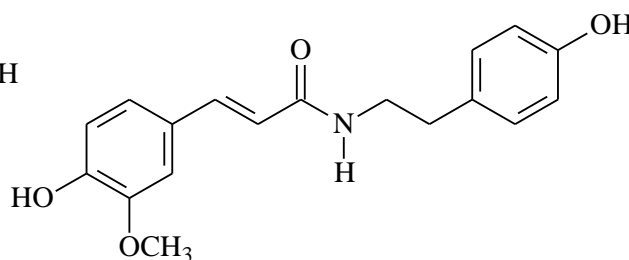


[28]

- **Amidas:** N-*trans*- [29] e N-*cis*-feruloiltiramina [30], isoladas da madeira de *Xylopia benthamii* (PIMENTA et al., 2009).

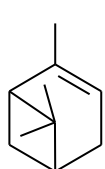


[29]

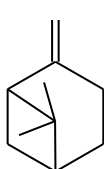


[30]

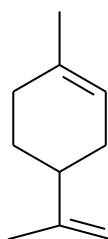
- **Óleos essenciais:**  $\alpha$ -pineno [31],  $\beta$ -pineno [32], limoneno [33], tem sido encontrado nos óleos essenciais das folhas de *Xylopia aromática* (LAGO et al., 2003); biciclogermacreno [34], (*E*)-cariofileno [35] e  $\alpha$ -copaeno [36] foram isolados das folhas de *Annona foetida* (COSTA et al., 2009);  $\alpha$ -eudesmol [37],  $\beta$ -eudesmol [38] e o  $\gamma$ -eudesmol [39] foram obtido das folhas de *Guatterriopsis friesiana* (COSTA et al., 2008).



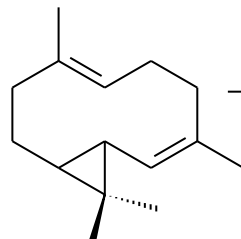
[31]



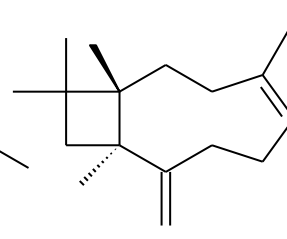
[32]



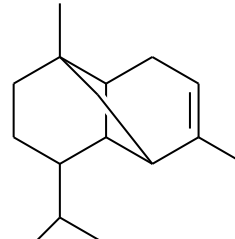
[33]



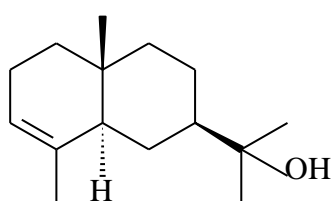
[34]



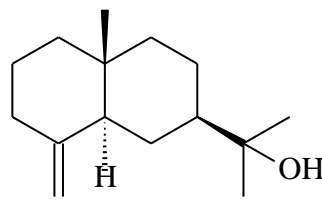
[35]



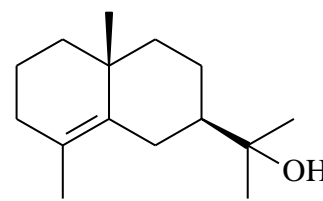
[36]



[37]

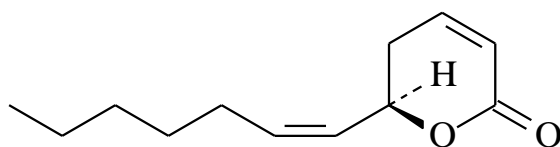


[38]

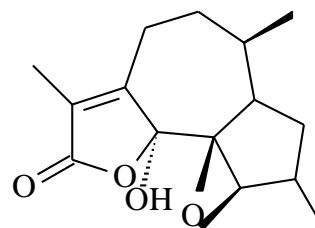


[39]

- **Lactonas:** argentilactona [40], isolada do cerne de *Annona ambotay* (BRAVO et al., 2002); uma lactona sesquiterpênica denominada *guatteriolida* [41] foi isolada das cascas *Guatteriopsis friesiana* (COSTA, 2009).

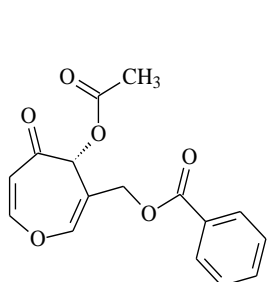


[40]

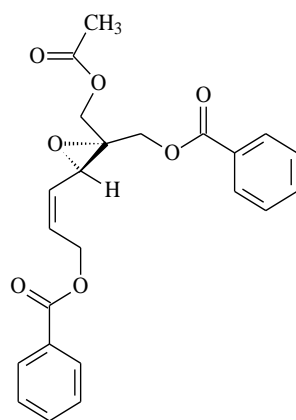


[41]

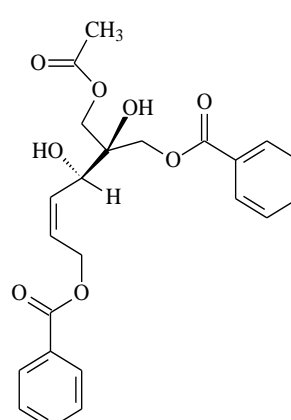
- **Compostos aromáticos:** grandiuvarona A [42], grandiuvarinas A, B e C [43, 44 e 45], isoladas das cascas de *Uvaria grandiflora* (ANKISETTY et al., 2006).



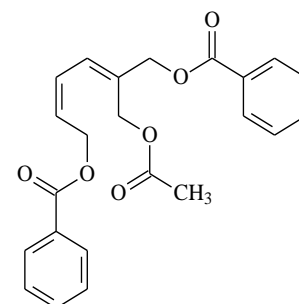
[42]



[43]



[44]



[45]

### 2.3 O gênero *Ephedranthus* S. Moore

O gênero *Ephedranthus* S. Moore corresponde cerca de 10 espécies, sendo caracterizadas pela presença de folhas com nervura principal impressa no lado superior com indumento de pêlos simples. Suas flores são solitárias com sépalas livres e pétalas e os frutos

são apocárpicos ou monocárpicos. As espécies desse gênero podem ser encontradas na América do Sul, principalmente no Nordeste do Brasil (MAAS et al.,2001; MAAS et al., 2007).

### 2.3.1 *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries

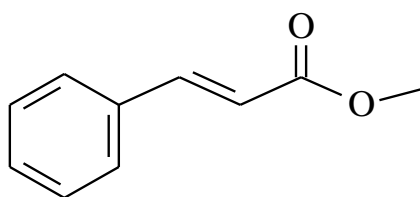
A espécie *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries é uma árvore vulgarmente conhecida como envira-dura, envira-surucucu, envireira, envira-taia e envira-preta, com ocorrência em solo argiloso a areno-argiloso. Apresenta folhas disticadas com nervuras secundárias impressa na face superior. As flores são amarelo-creme e seus frutos são apocárpicos, de coloração verde quando imaturos e amarelos quando maduros. A espécie pode ser encontrada na Amazônia venezuelana, Peru, Brasil e Bolívia (MAAS et al., 2001; MAAS et al., 2007; RIBEIRO et al., 1999) (FIGURA 3).



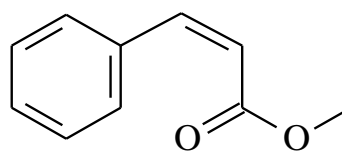
Figura 3. Espécie *E. amazonicus*: (a) árvore; (b) frutos e (c) caule.  
Fonte: ALENCAR, D. C.; [www.plantes-botanique.org](http://www.plantes-botanique.org)

Essa espécie não apresenta registros na literatura de estudos etnofarmacológicos e biológicos e de seus constituintes químicos fixos, entretanto, o potencial químico-farmacológico da família Annonaceae estimula o estudo da espécie *E. amazonicus*.

Estudos da composição química do óleo essencial das folhas de *E. amazonicus* revelaram a presença de (*E*)-cinamato de metila (85.6%) [46] e (*Z*)-cinamato de metila (7.4%) [47], representando cerca de 93% do óleo total (ANDRADE et al., 2007).



[46]



[47]

## 2.4 Caracterização geral da área em estudo

O Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) está situado na zona leste da cidade de Manaus e possui cerca de 600 hectares de florestas primárias e secundárias.

A área selecionada para o desenvolvimento dessa pesquisa é limitada pelos bairros do Coroado, Aquariquara, Zumbi dos Palmares, Armando Mendes, Conj. Nova República, Conj. Atílio Andreaza e Japiinlândia.

A proximidade com bairros habitados por populações carentes tem levado algumas áreas do Campus Universitário a um estado de degradação preocupante devido ao uso desordenado, tornando difícil a manutenção das essências florestais adaptadas nesse ecossistema.

A vegetação do Campus da UFAM é constituída por floresta tropical úmida de terra firme, mata primária, capoeira, campinarana, floresta de crescimento secundário e áreas

antrópicas (NERY et al., 2004), recortada por uma rede de igarapés. O relevo dessa área verde é formado por platôs, vertentes e baixios.

A área em estudo apresenta características de clima equatorial úmido, com temperatura e precipitação média anual de 26 °C e 2100 mm, respectivamente (SILVA-FORSBERG, 1999), elevada umidade do ar e baixas velocidades de ventos (NIMER, 1979).

O Campus da UFAM representa um dos maiores fragmentos florestais urbanos do País, sendo pouco estudado em relação a sua biodiversidade e seus ecossistemas. Constitui-se em um grande laboratório vivo para estudo da biodiversidade da Amazônia.

Atualmente, existem poucos estudos relacionados à flora do campus da UFAM, sobretudo ao levantamento e a identificação de espécies pertencente à família Annonaceae promissoras em compostos bioativos. Esse tipo de estudo contribui ao mesmo tempo para a preservação e conservação da área do Campus.

## **2.5 Considerações gerais sobre os testes de atividade efetuados**

### **2.5.1 Avaliação da atividade citotóxica frente à *Artemia salina* Leach**

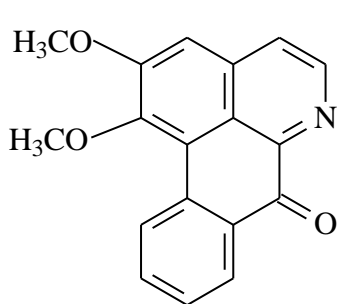
A *Artemia salina* Leach, comumente conhecida como “larva de camarão” é um crustáceo da ordem Anostraca (sem carapaça) que vive em água salgada encontrado em todo o mundo, e é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de animais.

Como a *A. salina* é um organismo simples que pode sentir o efeito de qualquer substância biologicamente ativa e apresenta facilidade na obtenção de suas larvas e estocagem de seus ovos mesmo em ambientes diversos, a mortalidade desse microcrustáceo é considerada o bioensaio ideal. Esse bioensaio detecta compostos bioativos em extratos de

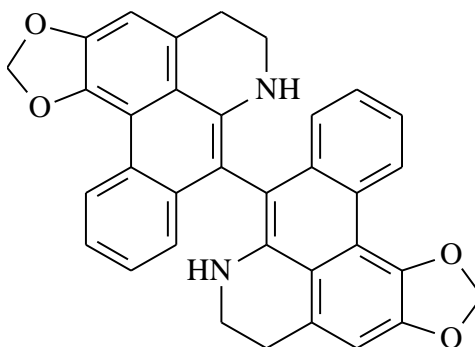
plantas e a letalidade desse crustáceo tem demonstrado correlação com atividades antitumoral, pesticida (McLAUGHLIN et al., 1993), anti-plasmodica (SOLIS et al., 1993) e tripanossomicida (DOLABELA, 1997). Inúmeros constituintes bioativos têm sido obtidos de vegetais fazendo-se o isolamento guiado pelo bioensaio de toxicidade sobre a *A. salina*.

A letalidade desses organismos simples tem sido utilizada para monitoramento rápido e simples da resposta biológica, onde a razão entre o número de larvas mortas e o número de larvas vivas em comparação a um controle positivo é utilizado para estimar a toxicidade das soluções testes. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica.

Pesquisas com o extrato diclorometano das cascas do caule de *U. lindmanii* revelaram significativa citotoxicidade frente a *Artemia salina*. O fracionamento biomonitorado desse extrato levou à identificação dos alcalóides liriodenina [1], lisicamina [48] e unonopsina [49] como compostos ativos (SIQUEIRA et al., 1998).

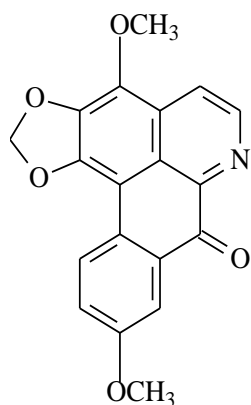


[48]

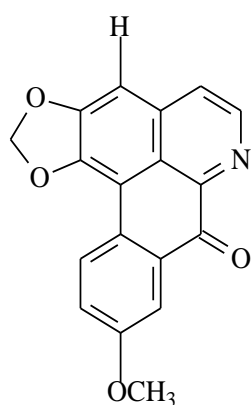


[49]

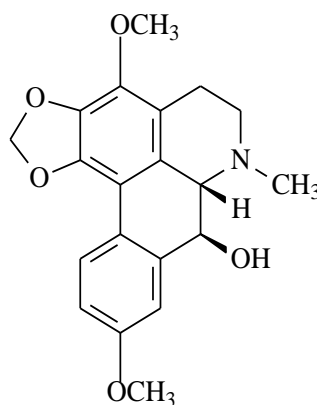
Do estudo fitoquímico biomonitorado pelo bioensaio com *Artemia salina* do extrato etanólico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* foram isolados os alcalóides oxobuxifolina [50], lanuginosina [51], polialtina [52], oliveridina [53] (SIQUEIRA et al., 2001).



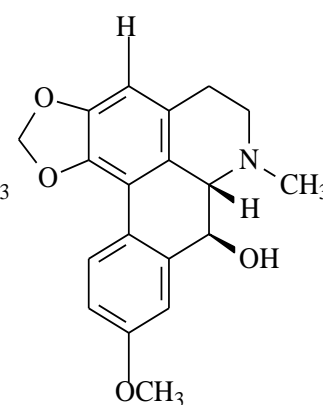
[50]



[51]



[52]



[53]

### 2.5.2 Avaliação da atividade antioxidante

Danos oxidativos irreversíveis de biomoléculas são alguns dos fatores que causam a ocorrência e desenvolvimento de numerosas doenças tais como: arteriosclerose, câncer, envelhecimento, diabetes, inflamação, mal de Parkison, mal de Alzheimer, doenças cardiovasculares, etc. (LODYATO et al., 2004).

A atividade antioxidante está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos de processos ou reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de (nitrogênio) oxigênio (ARNÃO, 2000).

Os efeitos protetores dos produtos naturais de origem vegetal são devidos à presença de vários componentes que possuem diferentes mecanismos de ação. Os compostos responsáveis pela atividade captadora de radicais livres são enzimas, proteínas e substâncias como vitaminas, carotenóides, flavonóides, antocianinas, alcalóides e outros compostos fenólicos (SÁNCHEZ-MORENO et al., 1998; BOSCOLO et al., 2007).

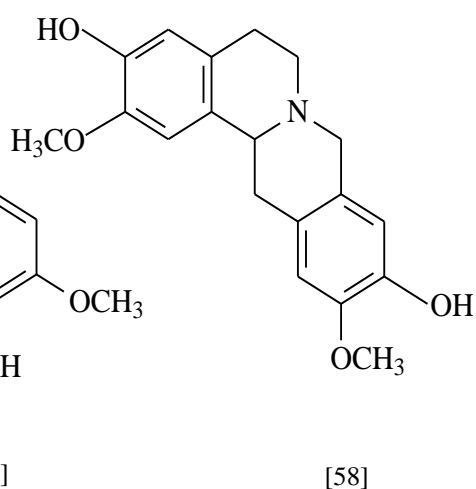
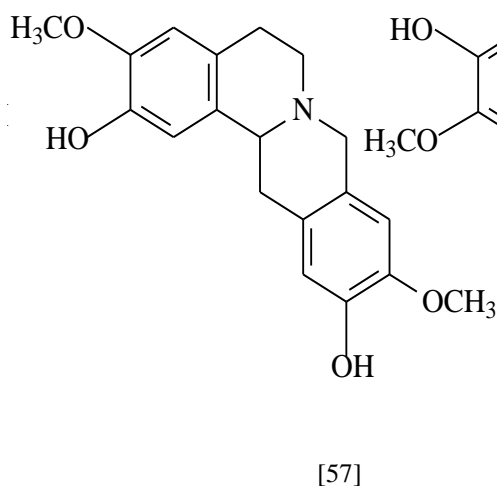
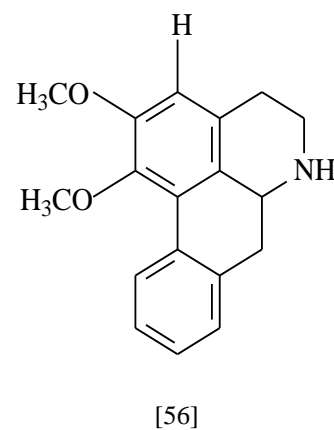
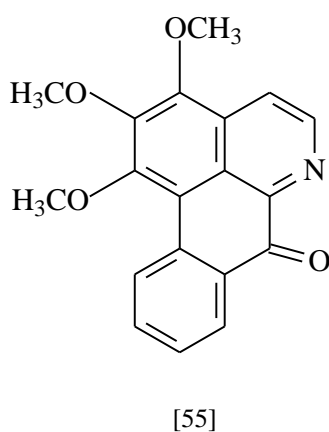
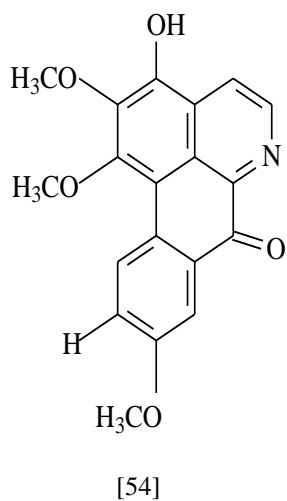
Vários métodos têm sido desenvolvidos para determinar a capacidade antioxidante de substâncias puras e extratos de plantas. Esses métodos podem ser divididos em duas categorias: (1) baseados na reação de transferência de elétrons, representados pelo método de



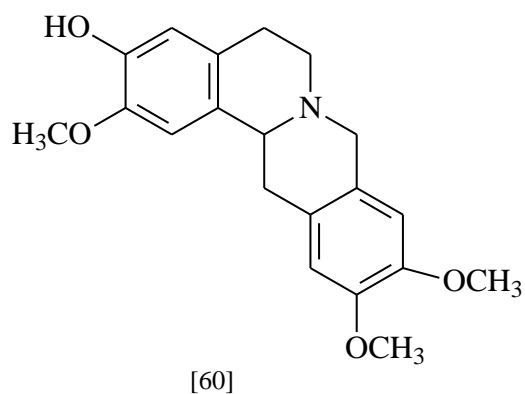
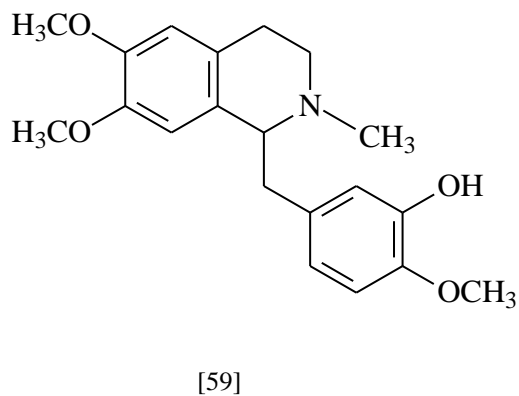
Folin-Ciocalteu e seqüestro de radicais livres, tais como o DPPH e (2) baseados na reação de transferência de átomos de hidrogênio, representado pelo ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoléico (HUANG et al., 2005).

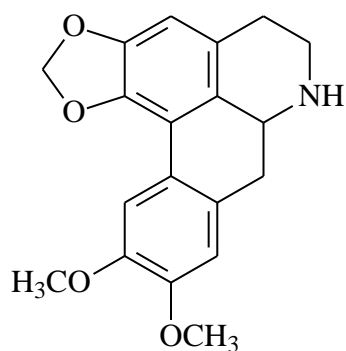
Nesse trabalho foi empregado o método ORAC que verifica a capacidade seqüestradora de um antioxidante frente à formação de um radical peroxila induzido pelo 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidroclorato (AAPH) a 37°C. Nesse ensaio, o radical peroxila reage com um composto fluorescente formando um produto não fluorescente. O efeito protetor de um antioxidante é verificado calculando-se a área formada abaixo da curva de decaimento da fluorescência da amostra versus tempo, quando comparada ao branco, que não apresenta antioxidantes. Inicialmente, o composto fluorescente utilizado para reagir com o radical peroxila formado era a  $\beta$ -ficoeritrina. Entretanto, foi observado que a  $\beta$ -ficoeritrina interagia com os compostos fenólicos levando a erros neste método. Considerando esta desvantagem, OU et al. (2001) desenvolveram e validaram uma modificação do ORAC usando fluoresceína como composto fluorescente, que perde a fluorescência indicando reação com o radical peroxila. Além disso, a fluoresceína mostrou excelente fotoestabilidade, redução dos custos deste experimento e não interage com antioxidantes.

Muitos compostos isolados de plantas pertencentes à família Annonaceae têm mostrado significativa capacidade antioxidante. Os alcalóides 9-metoxi-isomoschatolina [54], *O*-metilmoschatolina [55], lisicamina [48], liriodenina [1], nornuciferina [56], coreximina [57], e isocoreximina [58] isolados das cascas de *Guatteria hispida* exibiram capacidade antioxidante no ensaio ORAC<sub>FL</sub> (COSTA et al.; 2010).

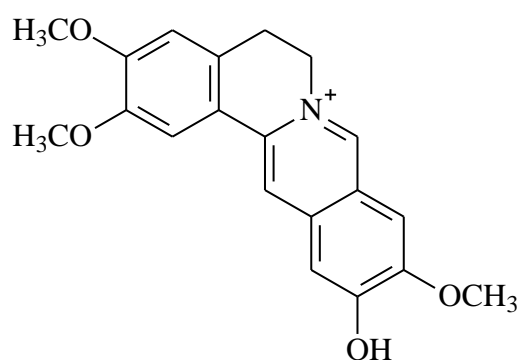


Das cascas do caule e do caule de *Xylopiya championii* foram isolados os alcalóides (+)-laudanidina [59], (-)-discretina [60], nordicentrina [61] e dehidrocoritenchina [62] que mostraram significativa atividade antioxidante no ensaio DPPH (PUVANENDRAN et al.; 2008).



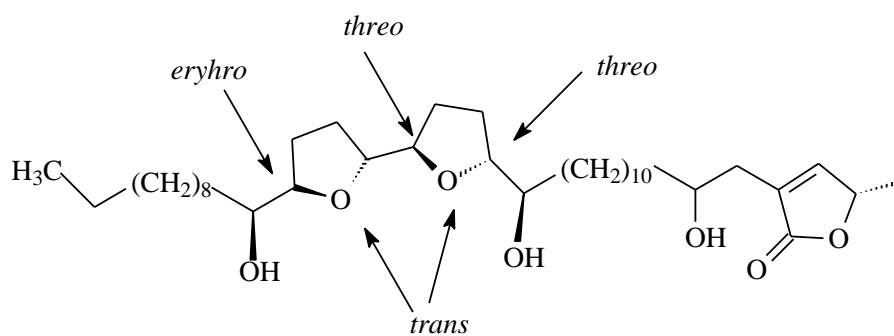


[61]

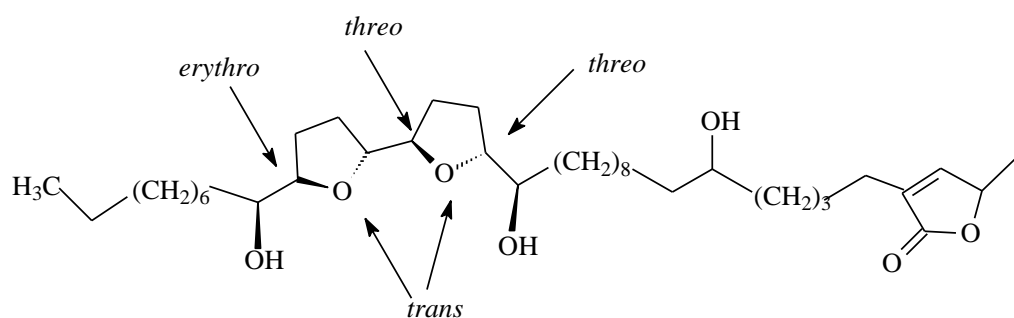


[62]

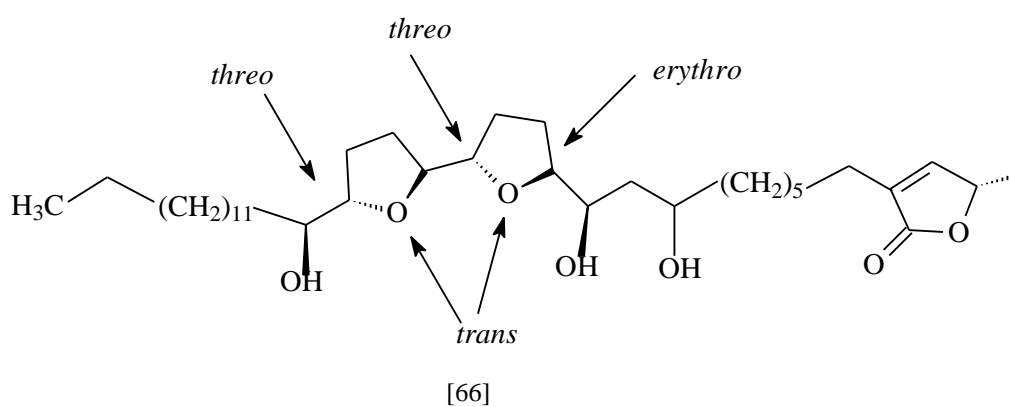
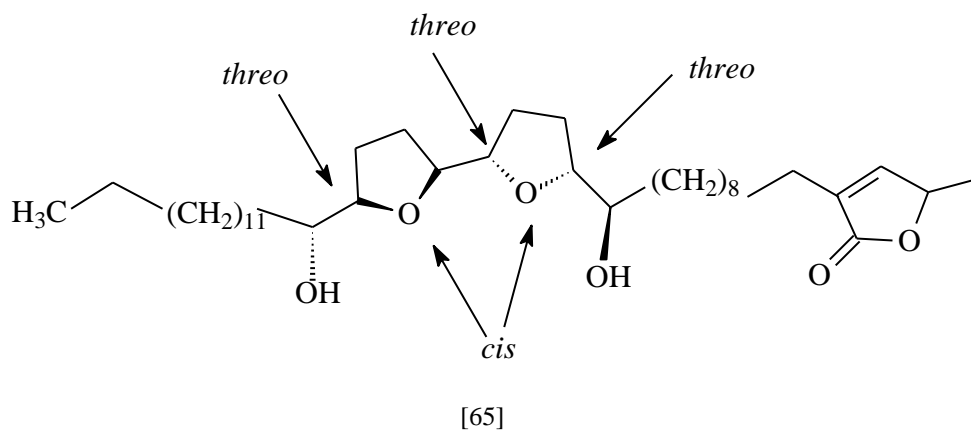
As acetogeninas bulatacina [63], cornifolina [64], folianina B [65] e annonfolina [66] obtida das sementes de *Annona cornifolia* apresentaram pronunciada capacidade capturadora de radicais livres (LIMA et al.; 2010).



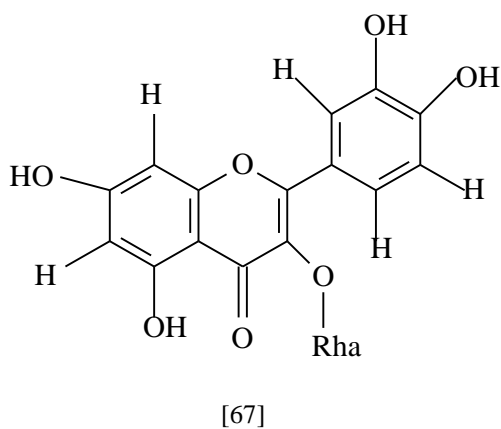
[63]



[64]



O flavonóide 5,7,3',4'-tetrahidroxi-3-O-rhamnosil-2-fenilcromona [67] isolado das folhas de *Rollinia pittieri* apresentou grande capacidade antioxidante nos ensaios DPPH e ABTS (TORRES et al., 2007).



### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

- Contribuir para o conhecimento da flora do Campus da Universidade Federal do Amazonas investigando seu potencial alcaloídico, visando identificar espécies da família Annonaceae promissoras em compostos bioativos, contribuindo simultaneamente para sua preservação e conservação.

#### 3.2 Específicos

- Realizar o mapeamento das espécies de Annonaceae nos arredores do Campus da Universidade Federal do Amazonas;
- Estudar o perfil alcaloídico das espécies encontradas no Campus;
- Estudar a composição química das folhas e galhos finos da espécie *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries, determinando as estruturas moleculares dos metabólitos isolados através de métodos cromatográficos e espectrométricos;
- Realizar testes biológicos dos extratos hexânico e metanólicos e nas frações alcaloídicas e neutra da espécie selecionada.

## **4. PARTE EXPERIMENTAL**

### **4.1 Análise cromatográfica**

#### **4.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)**

As análises foram realizadas em cromatoplasmas pré-fabricadas de sílica gel TLC de 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência F<sub>254</sub>, da Sorbent Technologies. A detecção dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada ultravioleta (UV) (264 e 365 nm) e posterior revelação com reagente de Dragendorff.

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

Foram utilizadas colunas de vidro, cujo comprimento e diâmetro variam de acordo com a quantidade de amostras a serem analisadas. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se como suporte sílica gel 60 de 0,060-0,200 mm, da Acros Organics tratada previamente com bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) a 10 %. As fases móveis usadas foram hexano, diclorometano e metanol.

### **4.2 Solventes e reagentes reveladores**

#### **4.2.1 Solventes**

Foram utilizados solventes PA da Nuclear. Para a obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados.

### 4.2.2 Reagentes reveladores

**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: 16,0g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das cromatoplas, adicionou-se 10,0 g de ácido tartárico, dissolvidos em 50 mL de água destilada. Após borrifação das placas cromatográficas os *spots* das substâncias apresentaram coloração laranja.

### 4.3 Métodos espectrométricos

Os espectros de ressonância magnética nuclear 1D foram registrados em aparelhos Bruker ARX-200, operando a 4,7, 9,4 e 11,7 Tesla (T), respectivamente, observando  $^1\text{H}$  a 400 MHz. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ ) e metanol deuterado ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). Os experimentos obtidos no aparelho Bruker foram realizados no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro Íon-trap modelo LCQ FLEET (Thermo scientific) através da técnica de “Electron Spray Ionization” (ESI), operando com íon no modo positivo no Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas (UFAM).

#### **4.4 Outros equipamentos**

- Evaporador rotatório: Heidolph, tipo Heizbad OB;
- Moinho: Modelo Willey com quatro facas;
- Estufa de circulação de ar: Deleo, tipo A6 sefaf;
- Ultravioleta (UV): Lâmpada de 264-365 nm, da Solab;
- Balança analítica: Tecnal, classe 1 (máx. 210 g – mín. 100 mg);
- Pipeta automática: Gilson, P 5000, P 1000 e P 100;
- Ultrason: Unique, modelo USC-2800.

#### **4.5 Material botânico**

##### **4.5.1 Mapeamento das Anonáceas na área do Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM)**

O Campus da UFAM foi dividido em três áreas de estudo: área 1, próximo ao bairro do Coroado e ao mini-campus com solo areno-argiloso; área 2, próximo ao ICHL e ao bairro Nova República com solo arenoso a areno-argiloso; área 3, próximo ao bairro Ouro verde solo arenoso (FIGURA 4).

O mapeamento das Anonáceas do Campus da UFAM foi realizado no período de fevereiro a junho de 2009, com o acompanhamento do botânico Dr. Antonio Carlos Webber para a identificação das espécies. As coordenadas geográficas das espécies encontradas foram obtidas no aparelho de GPS (Global Position System) Modelo Garmim e Trex Vista HCx shown (TABELA 2).



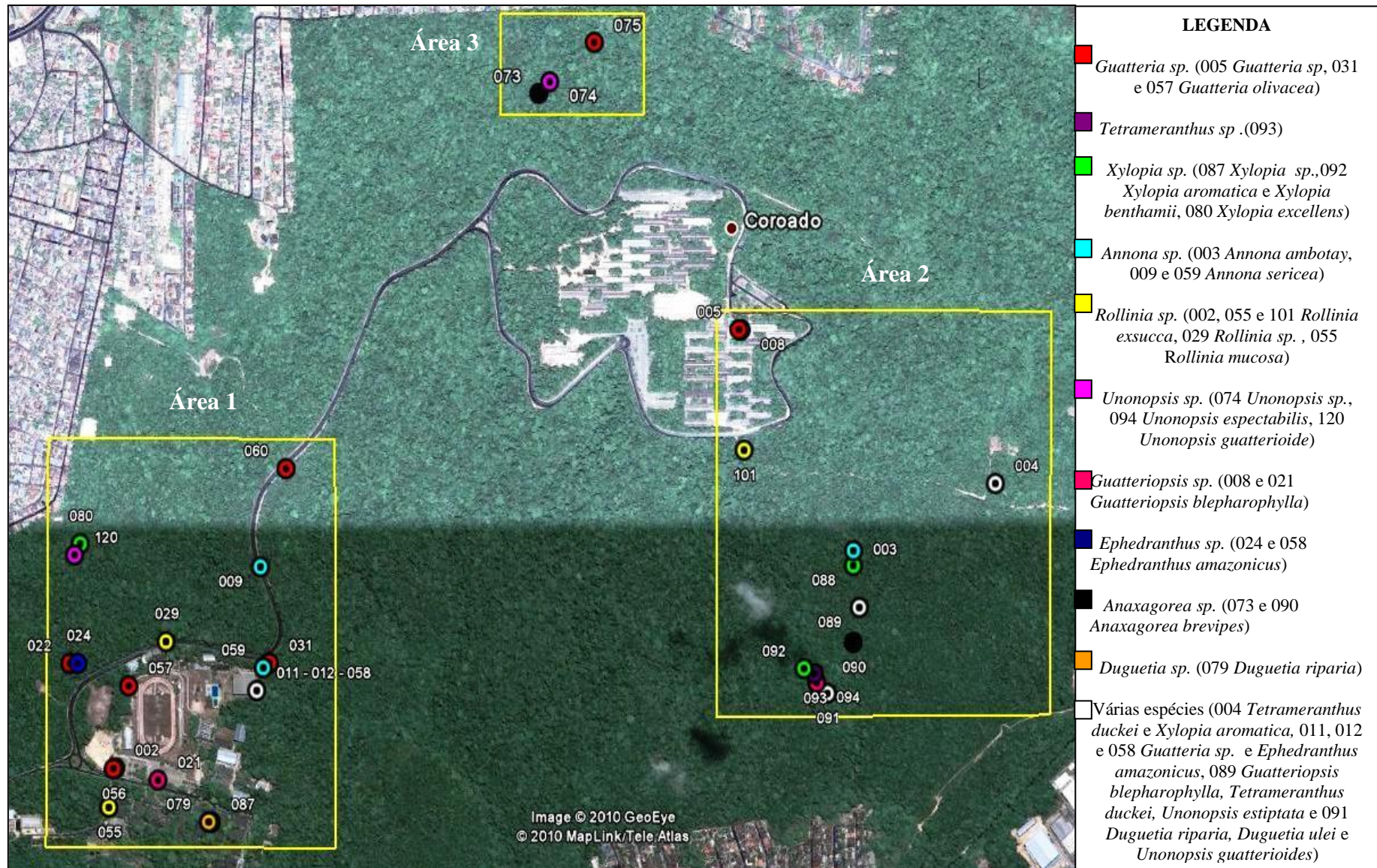


Figura 4. Anonáceas encontradas no Campus da UFAM  
Fonte: Google Earth

<b>Legenda das coordenadas geográficas dos pontos</b>	
<b>002:</b> S 03°05'58.5"; W 059°58' 30.4"	<b>003:</b> S 03°05'40.2"; W 059°57'32.4"
<b>004:</b> S 03°05'34.1"; W 059°57'20.7"	<b>005:</b> S 03°05'23.5"; W 059°57'42.0"
<b>008:</b> S 03°05'41.4"; W 059°58'22.9"	<b>009:</b> S 03°05'48.5"; W 059°58'22.1"
<b>011:</b> S 03°05'50.7"; W 059°58'23.2"	<b>012:</b> S 03°05'49.5"; W 059°58'33.0"
<b>021:</b> S 03°05'57.5"; W 059°58'31.6"	<b>022:</b> S 03°05'48.7"; W 059°58'39.1"
<b>024:</b> S 03°05'48.7"; W 059°58'38.4"	<b>029:</b> S 03°05'47.1"; W 059°58'30.9"
<b>031:</b> S 03°05'48.7"; W 059°58'22.1"	<b>055:</b> S 03°05'59.6"; W 059°58'35.8"
<b>056:</b> S 03°05'56.7"; W 059°58'35.4"	<b>057:</b> S 03°05'50.4"; W 059°58'34.1"
<b>058:</b> S 03°05'50.7"; W 059°58'23.0"	<b>059:</b> S 03°05'49.0"; W 059°58'22.6"
<b>060:</b> S 03°05'34.0"; W 059°58' 20.7"	<b>073:</b> S 03°05'05.5"; W 059°57'59.3"
<b>074:</b> S 03°05'04.6"; W 059°57'58.3"	<b>075:</b> S 03°05'01.6"; W 059°57'54.5"
<b>079:</b> S 03°06'00.7"; W 059°58'27.2"	<b>080:</b> S 03°05'39.7"; W 059°58'38.5"
<b>087:</b> S 03°06'00.7"; W 059°58'27.0"	<b>088:</b> S 03°05'41.4"; W 059°57'32.4"
<b>089:</b> S 03°05'44.6"; W 059°57'31.8"	<b>090:</b> S 03°05'47.3"; W 059°57'32.3"
<b>091:</b> S 03°05'51.2"; W 059°57'34.5"	<b>092:</b> S 03°05'49.3"; W 059°57'36.5"
<b>093:</b> S 03°05'49.6"; W 059°57'35.6"	<b>094:</b> S 03°05'50.4"; W 059°57'35.4"
<b>101:</b> S 03°05'32.6"; W 059°57'41.8"	<b>120:</b> S 03°05'40.6"; W 059°58'39.0"

Tabela 2. Coordenadas geográficas das espécies de Annonaceae

#### 4.5.2 Coleta e identificação botânica

O material botânico das espécies da família Annonaceae encontradas dentro do Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) foram coletados entre os meses de fevereiro a junho de 2009. O material botânico foi identificado pelo Dr. Antonio Carlos Webber do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFAM e a exsicata das espécies com material fértil foi depositado no herbário da UFAM sob os

seguintes números: *Annona sericea* (8160), *Rollinia mucosa* (8148), *R. exsucca* (8147), *Xylopia aromatica* (8150), *X. excellens* (8279), *Tetrameranthus duckei* (8149), *Anaxagorea brevipes* (8280), *Duguetia riparia* (8278), *Unonopsis stipitata* (8250) e *U. guatterioides* (8249).

De acordo com MAAS (2007) o período de floração da espécie *E. amazonicus* é de março a maio e o de frutificação é de maio a setembro. Essa espécie foi acompanhada durante o andamento das pesquisas, mas por estar em uma área antrópica sua fertilização não pôde ser observada.

As espécies *A. ambotay*, *X. benthamii*, *Guatteria olivacea*, *Guatterioipsis blepharophylla*, *D. ulei*, *U. spectabilis*, e *E. amazonicus* não estavam férteis, com isso não poderão ser depositadas no Herbário da UFAM, porém, todos os indivíduos foram identificados a campo pelo Botânico Dr. Antonio Carlos Webber do ICB da UFAM.

### **4.5.3 Secagem e moagem**

Depois de coletadas, as diferentes partes das plantas, foram secas na estufa de circulação de ar a 50 °C sendo em seguida trituradas em moinho de quatro facas.

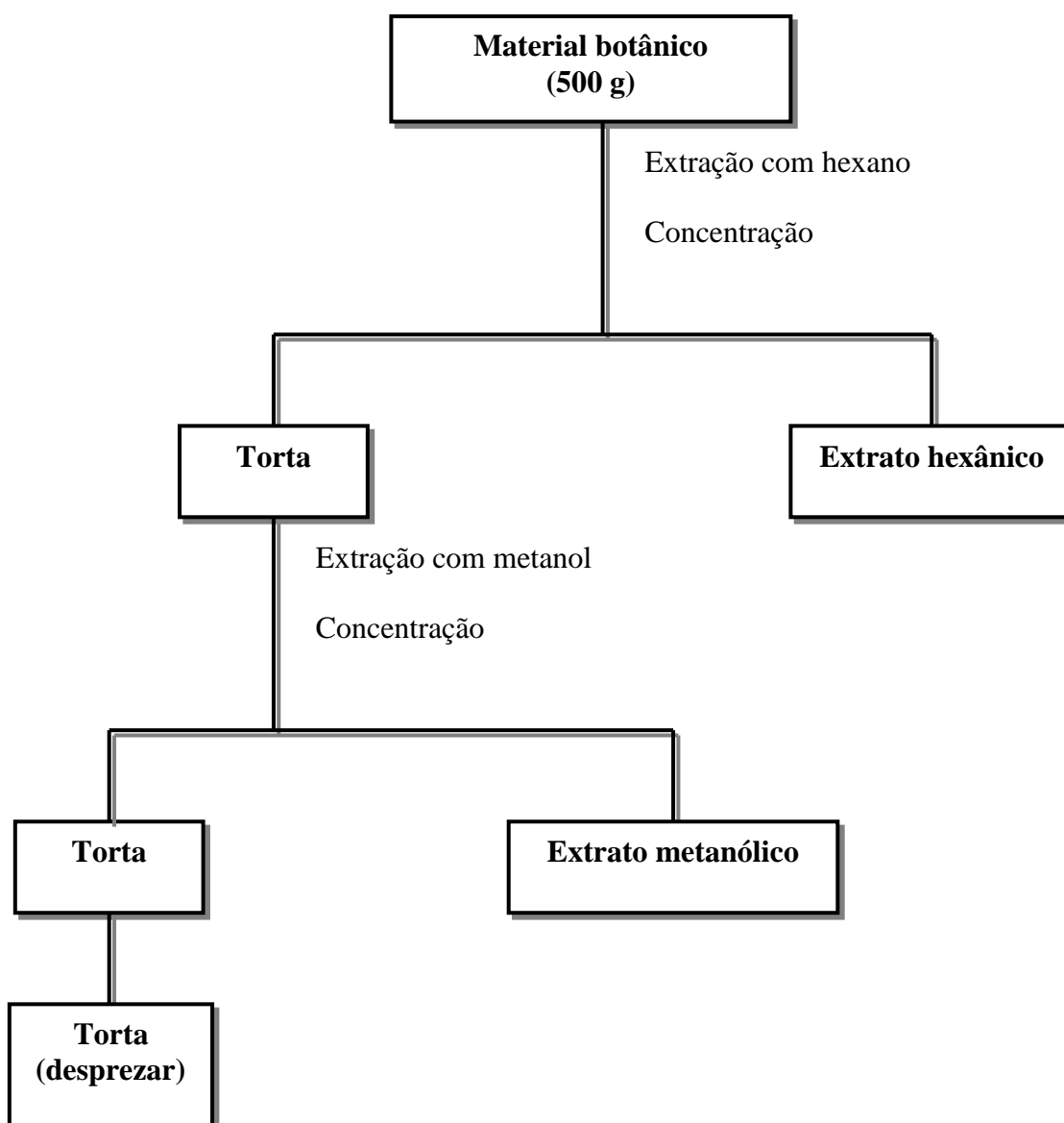
### **4.5.4 Preparação dos extratos**

O material botânico das espécies *A. ambotay*, *A. sericea*, *R. exsucca*, *X. aromatica*, *X. benthamii*, *X. excellens*, *E. amazonicus*, *A. brevipes* e *D. ulei* foram pulverizados e submetidos à extração.

Todo material depois de pulverizado (500 g) foi submetido à extração por maceração com solvente em ordem crescente de polaridade hexano e metanol, com remoção em intervalo de 3 dias, totalizando 28 dias. O material remanescente foi desprezado, de acordo com o Esquema 1.

Os extratos obtidos foram filtrados e evaporados sob pressão reduzida em temperatura de 50 °C e, em seguida, secos em dessecador.

Após completa secagem foi calculado o rendimento de cada extrato das espécies (TABELA 3) e, em seguida, retirada uma pequena quantidade dos extratos (2 mg) para a realização dos testes biológicos.



Esquema 1. Fluxograma da obtenção dos extratos brutos das espécies da família Annonaceae coletadas.

Espécies	Parte da planta	Extratos hexânicos	Rendimento g (%)	Extratos metanólicos	Rendimento g (%)
<i>Annona ambotay</i>	Folha	EHAA (F)	1,21 (1,0)	EMAA (F)	12,53 (10,3)
	Galhos finos	EHAA (GF)	1,67 (0,5)	EMAA (GF)	3,74 (1,1)
	Casca	EHAA (CAS)	1,21 (0,4)	EMAA (CAS)	3,98 (1,4)
	Cerne	EHAA (CER)	2,39 (0,3)	EMAA (CER)	7,42 (0,9)
<i>Annona sericea</i>	Folha	EHAS (F)	5,52 (1,6)	EMAS (F)	20,30 (4,28)
	Galhos finos	EHAS (GF)	2,95 (1,3)	EMAS (GF)	4,00 (1,7)
<i>Rollinia exsucca</i>	Folha	EHREx (F)	7,06 (2,1)	EMREx (F)	38,90 (11,3)
	Galhos finos	EHREx (GF)	0,23 (0,1)	EMREx (GF)	2,04 (0,9)
	Casca	EHREx (CAS)	0,37 (0,4)	EMREx (CAS)	5,52 (5,4)
	Cerne	EHREx (CER)	0,45 (0,1)	EMREx (CER)	6,70 (1,6)
<i>Xylopiya aromatica</i>	Folha	EHXA (F)	0,48 (0,2)	EMXA (F)	8,08 (2,6)
	Galhos finos	EHXA (GF)	2,24 (0,7)	EMXA (GF)	42,28 (13,2)
	Casca	EHXA (CAS)	1,01 (0,9)	EMXA (CAS)	12,99 (11,0)
	Cerne	EHXA (CER)	0,42 (0,1)	EMXA (CER)	7,00 (1,0)
<i>Xylopiya benthamii</i>	Folha	EHXB (F)	33,00 (7,0)	EMXB (F)	51,50 (10,7)
	Galhos finos	EHXB (GF)	2,09 (0,2)	EMXB (GF)	34,60 (3,2)
	Casca	EHXB (CAS)	0,71 (0,5)	EMXB (CAS)	12,30 (8,2)
	Cerne	EHXB (CER)	0,83 (0,1)	EMXB (CER)	8,00 (0,8)
<i>Xylopiya excellens</i>	Folha	EHXEx (F)	6,21 (3,0)	EMXEx (F)	20,20 (9,6)
	Galhos finos	EHXEx (GF)	0,53 (0,5)	EMXEx (GF)	5,40 (5,1)
	Casca	EHXEx (CAS)	0,38 (0,6)	EMXEx (CAS)	7,17 (11,8)
	Cerne	EHXEx (CER)	0,46 (0,2)	EMXEx (CER)	5,90 (2,8)
<i>Ephedranthus amazonicus</i>	Folha	EHEA (F)	1,19 (1,1)	EMEA (F)	6,09 (5,5)
	Galhos finos	EHEA (GF)	0,40 (0,8)	EMEA (GF)	2,25 (4,3)
<i>Anaxagorea brevipes</i>	Folha	EHAB (F)	4,42 (2,1)	EMAB (F)	27,70 (13,1)
	Galhos finos	EHAB (GF)	1,25 (0,13)	EMAB (GF)	7,50 (0,8)
	Casca	EHAB (CAS)	0,27 (0,23)	EMAB (CAS)	2,01 (1,7)
	Cerne	EHAB (CER)	0,23 (0,08)	EMAB (CER)	4,50 (1,7)
<i>Duguetia ulei</i>	Folha	EHDU (F)	2,95 (3,0)	EMDU (F)	11,95 (12,2)
	Galhos finos	EHDU (GF)	0,95 (0,5)	EMDU (GF)	7,31 (3,6)

Tabela 3. Rendimento dos extratos brutos

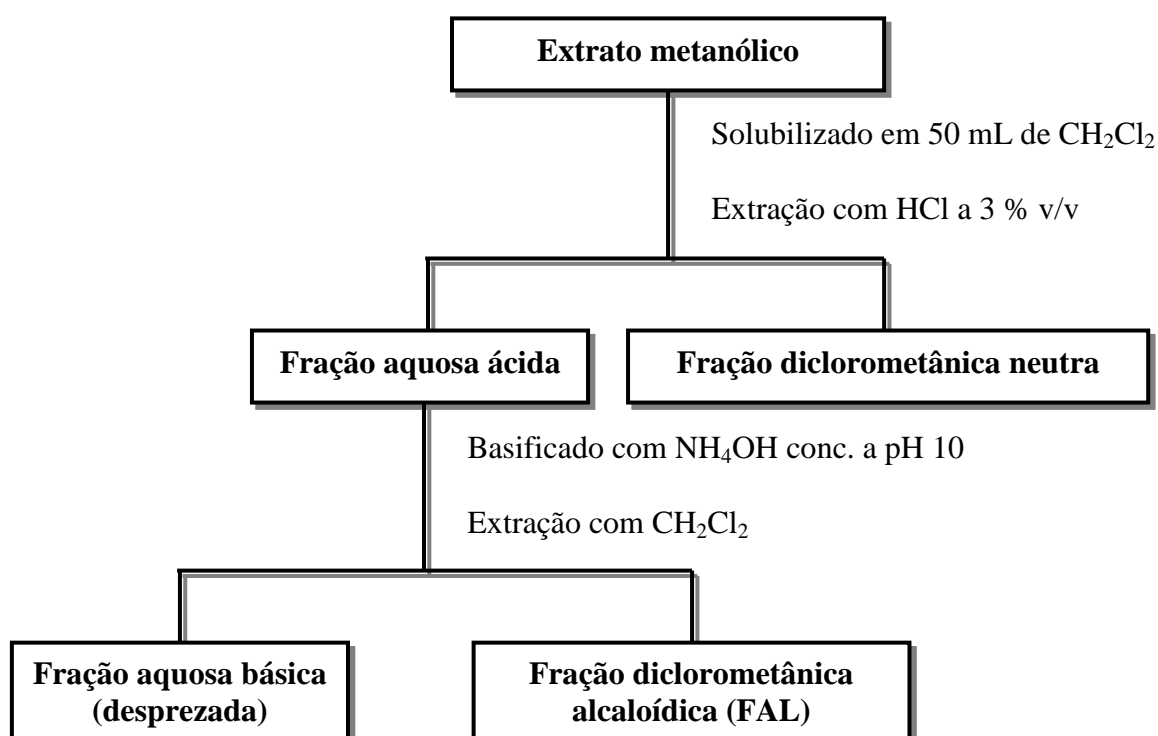
## 4.6 Marcha química para obtenção de alcalóides

### 4.6.1 Tratamento dos extratos metanólicos

Por meio de CCD, foi observado que os extratos metanólicos das espécies coletadas evidenciaram a presença de alcalóides quando revelado com o reagente Dragendorff

(indicativo de alcalóide). Então, esses extratos foram submetidos à extração ácido-base (COSTA, 2004).

Para cada extrato metanólico procedeu-se da seguinte forma: o extrato bruto foi solubilizado em diclorometano e extraído três vezes com solução de ácido clorídrico a 3% v/v, obtendo-se duas frações de cada extrato: a fração aquosa ácida e a fração diclorometânica neutra. A fração aquosa ácida foi basificada com hidróxido de amônio concentrado ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) até pH 10, em seguida, foi extraído sucessivamente com diclorometano, levando a duas novas frações: a fração diclorometânica alcaloídica, que foi concentrada em evaporador rotatório à pressão reduzida, e a fração aquosa básica que foi desprezada (ESQUEMA 2).



Esquema 2. Fluxograma do fracionamento dos extratos metanólicos para obtenção de alcalóides.

Todas as frações alcaloídicas foram evaporadas sob pressão reduzida em temperatura inferior a 40 °C, e após secas foi obtido rendimento em gramas (TABELA 4).

Espécies	Extratos metanólicos	Frações Alcaloídicas	Rendimento em g	Frações neutras	Rendimento em g
<i>Annona ambotay</i>	EMAA (F)	FALEMAA (F)	0,33	FNEMAA (F)	4,63
	EMAA (GF)	FALEMAA (GF)	0,18	FNEMAA (GF)	1,73
	EMAA (CAS)	FALEMAA (CAS)	0,16	FNEMAA (CAS)	3,17
	EMAA (CER)	FALEMAA (CER)	0,40	FNEMAA (CER)	2,03
<i>Annona sericea</i>	EMAS (F)	FALEMAS (F)	0,15	FNEMAS (F)	7,24
	EMAS (GF)	FALEMAS (GF)	0,05	FNEMAS (GF)	0,54
<i>Xylopi benthamii</i>	EMXB (F)	FALEMXB (F)	0,46	FNEMXB (F)	27,40
	EMXB (GF)	FALEMXB (GF)	0,64	FNEMXB (GF)	13,80
	EMXB (CAS)	FALEMXB (CAS)	0,30	FNEMXB (CAS)	3,90
	EMXB (CER)	FALEMXB (CER)	0,23	FNEMXB (CER)	4,70
<i>Xylopi excellens</i>	EMXEx (F)	FALEMXEx (F)	0,42	FNEMXEx (F)	11,50
	EMXEx (GF)	FALEMXEx (GF)	0,19	FNEMXEx (GF)	2,10
	EMXEx (CAS)	FALEMXEx (CAS)	0,19	FNEMXEx (CAS)	3,60
	EMXEx (CER)	FALEMXEx (CER)	0,14	FNEMXEx (CER)	3,50
<i>Xylopi aromatica</i>	EHXA (F)	FALEMXA (F)	0,14	FNEHXA (F)	4,10
	EHXA (GF)	FALEMXA (GF)	0,16	FNEHXA (GF)	16,70
	EHXA (CAS)	FALEMXA (CAS)	0,24	FNEHXA (CAS)	6,75
	EHXA (CER)	FALEMXA (CER)	0,29	FNEHXA (CER)	3,22
<i>Rollinia exsucca</i>	EMREx (F)	FALEMREx (F)	0,37	FNEMREx (F)	10,58
	EMREx (GF)	FALEMREx (GF)	0,16	FNEMREx (GF)	2,11
	EMREx (CAS)	FALEMREx (CAS)	0,15	FNEMREx (CAS)	3,05
	EMREx (CER)	FALEMREx (CER)	0,37	FNEMREx (CER)	3,06
<i>Ephedranthus amazonicus</i>	EMEA (F)	FALEMEA (F)	0,17	FNEMEA (F)	3,48
	EMEA (GF)	FALEMEA (GF)	0,23	FNEMEA (GF)	2,50
<i>Anaxagorea brevipes</i>	EMAB (F)	FALEMAB (F)	0,21	FNEMAB (F)	21,80
	EMAB (GF)	FALEMAB (GF)	0,28	FNEMAB (GF)	5,10
	EMAB (CAS)	FALEMAB (CAS)	0,10	FNEMAB (CAS)	0,78
	EMAB (CER)	FALEMAB (CER)	0,24	FNEMAB (CER)	1,20
<i>Duguetia ulei</i>	EMDU (F)	FALEMDU (F)	0,32	FNEMDU (F)	5,01
	EMDU (GF)	FALEMDU (GF)	0,60	FNEMDU (GF)	2,07

Tabela 4. Rendimento da extração ácido-base dos extratos metanólicos

## 4.7 Perfil alcaloídico

Todas as frações alcaloídicas foram submetidas à análise por CCD, comparadas entre si e com padrões de liriodenina, lisicamina, O-metilmoschatolina, isomoschatolina, annamontina, alcalóides isolados de anonáceas em trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa. As cromatoplasmas foram eluídas em mistura de clorofórmio/metanol, na proporção de 9:1, e reveladas com reagente Dragendorff para a observação do perfil alcaloídico de cada espécie.

As frações alcaloídicas de *E. amazonicus* foram também submetidas à análises por espectrometria de massa com técnica de “Electron Spray Ionization” (ESI) e operando com íon no modo positivo.

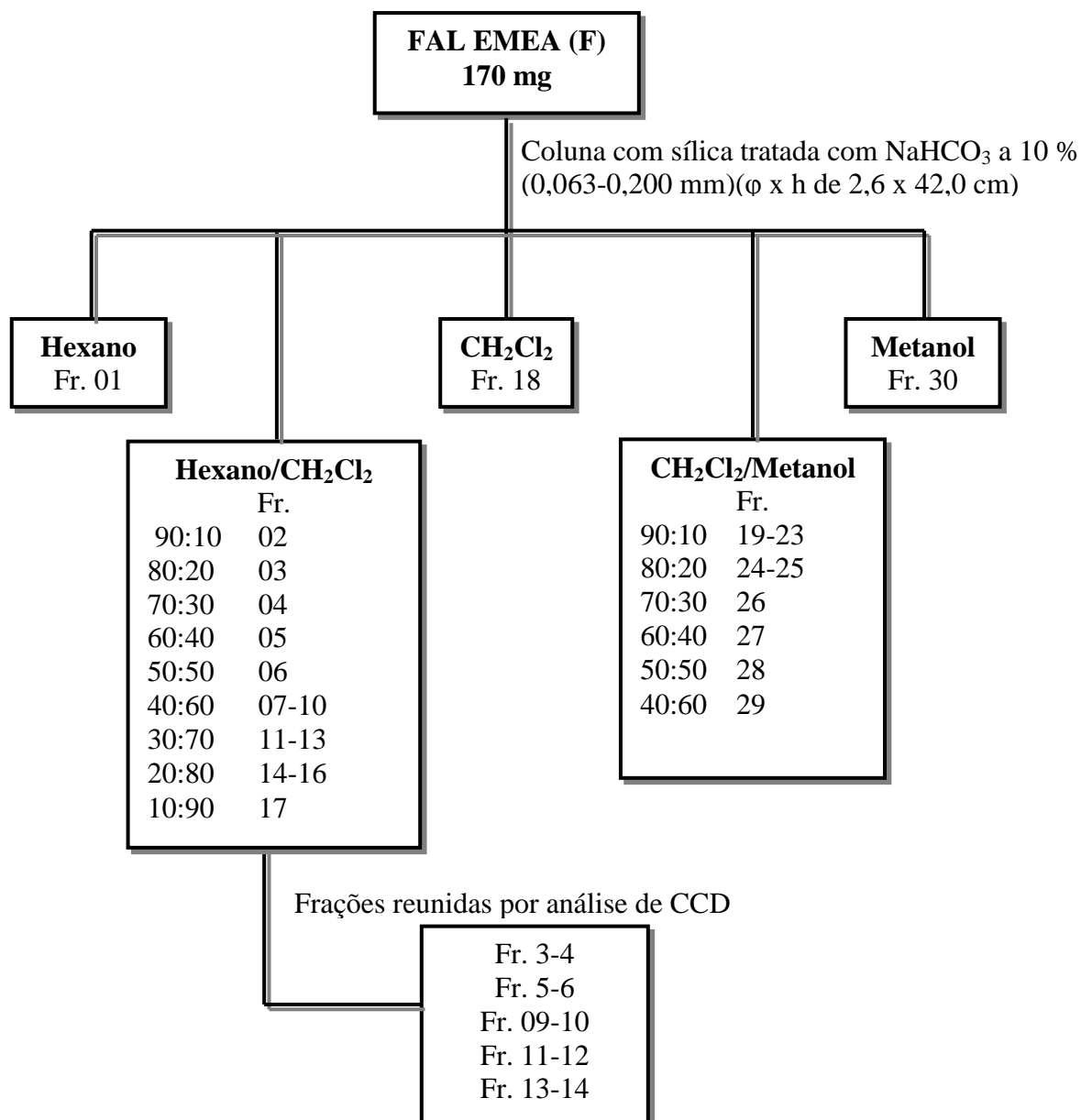
## 4.8 Fracionamento cromatográfico dos extratos metanólicos de *E. amazonicus*

### 4.8.1 Análise cromatográfica da fração alcaloídica das folhas de *E. amazonicus* (FAL EMEA (F))

A FAL EMEA (F) foi submetida ao fracionamento por meio de coluna cromatográfica em sílica gel tratada previamente com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 10 % e eluída com hexano, diclorometano e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 30 frações (ESQUEMA 3).

Estas frações foram analisadas por CCD e as que apresentaram o mesmo R<sub>f</sub> foram reunidas e recodificadas.



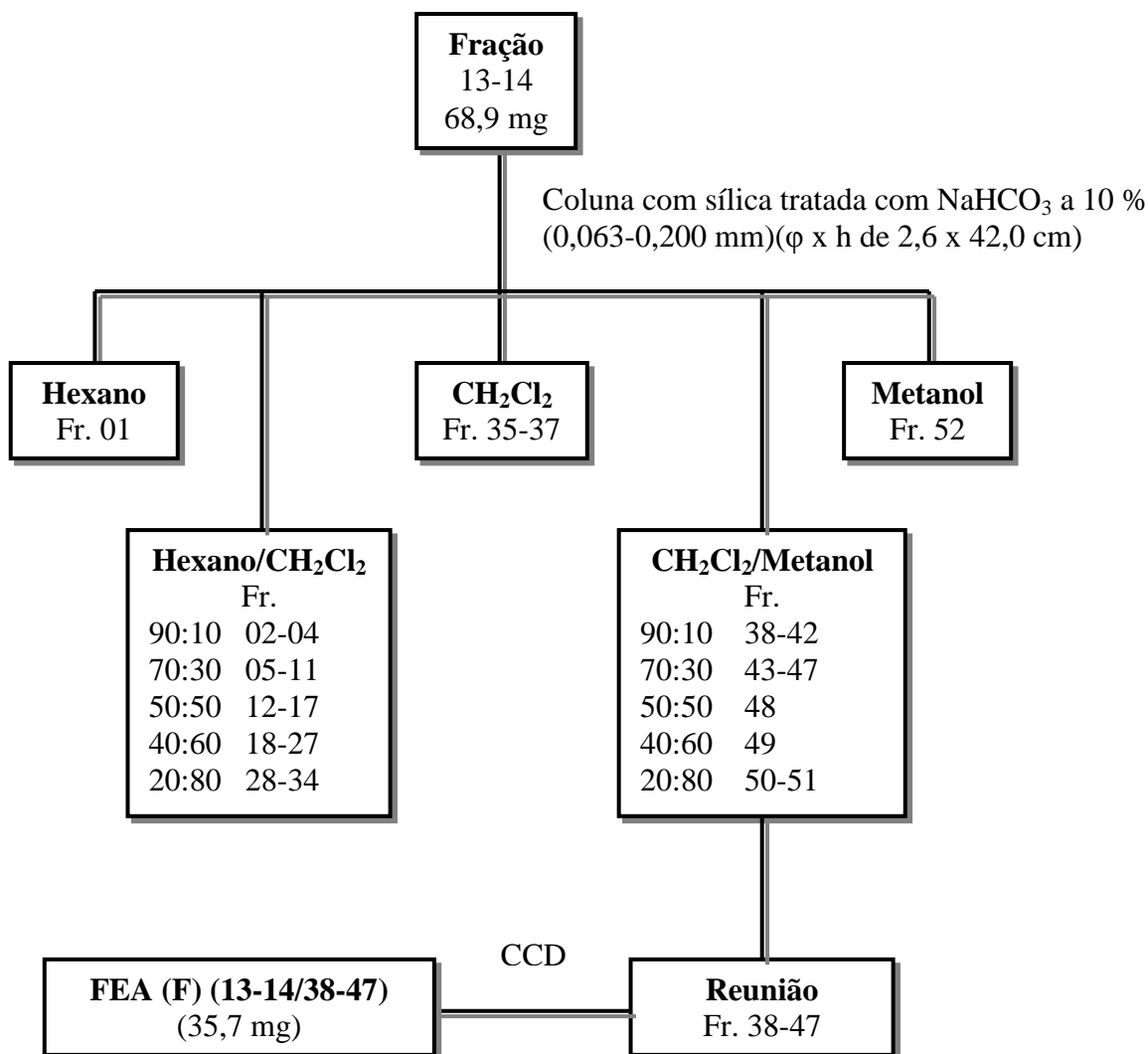


Esquema 3. Fluxograma da análise cromatográfica da FAL EMEA (F)

#### 4.8.1.1 Análise cromatográfica das frações 13-14

Após comparações através de CCD, usando diferentes sistemas de eluentes e o reagente de Dragendorff como revelador para a detecção de alcalóide, as frações 13-14 foram reunidas e recromatografadas em coluna cromatográfica em sílica gel tratada previamente com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 10 % e eluída com hexano, diclorometano e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 52 frações (ESQUEMA 4).

Mediante análise comparativa das frações por CCD e pela utilização de reveladores como a luz UV (254 e 365 nm) e do reagente de Dragendorff, as frações foram reunidas.



Esquema 4. Fluxograma da análise cromatográfica da fração 13-14

Depois de avaliadas, as frações foram reunidas em uma fração 38-47 (35,7 mg) que foi analisada novamente por meio de CCD utilizando a mistura clorofórmio/metanol, na proporção de 9:1, como fase móvel. A análise em CCD apresentou um único *spot* de coloração laranja quando revelado com reagente Dragendorff. Esta substância, codificada como FEA (F) (13-14/38-47) foi submetida às análises espectrométricas.

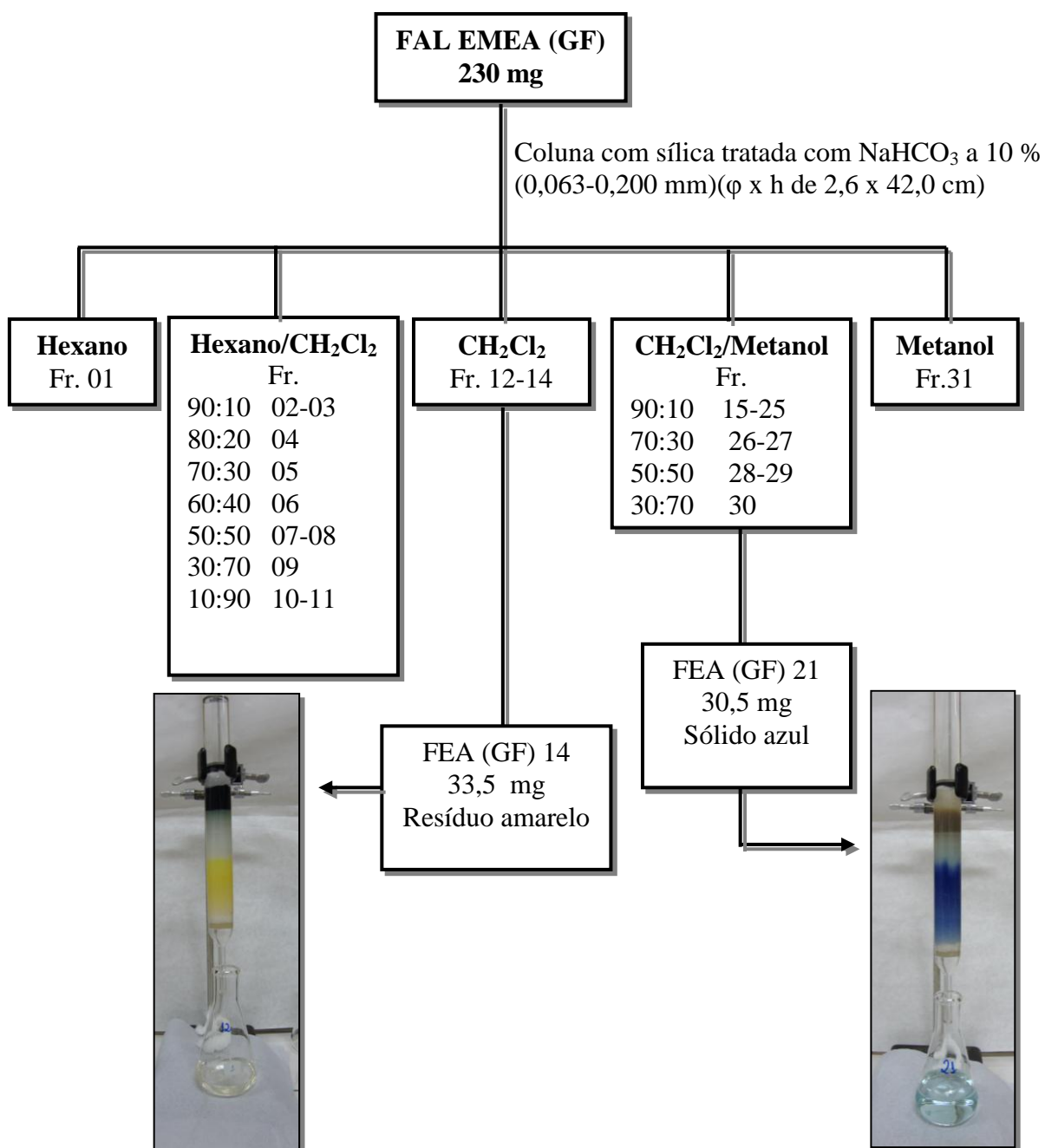
#### **4.8.2 Análise cromatográfica da fração alcaloídica dos galhos finos de *E. amazonicus* (FAL EMEA (GF))**

A fração FAL EMEA (GF) foi inicialmente submetida à análise cromatográfica em coluna usando sílica gel tratada previamente com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 10 % e eluída com hexano, diclorometano e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 31 frações (ESQUEMA 5).

As frações obtidas foram analisadas por meio de CCD, utilizando luz UV (365 nm) e reagente Dragendorff como revelador.

A fração 14 após evaporação do solvente resultou no isolamento de um resíduo amarelo codificado como FEA (GF) 14 (33,5 mg). A análise por CCD apresentou um único mancha de coloração laranja quando revelado com reagente Dragendorff. A substância foi submetida às análises espectrométricas.

A fração 21 foi obtida como um sólido azul codificado como FEA (GF) 21 (30,5 mg). A análise por CCD apresentou um único mancha de coloração roxa quando revelado com reagente Dragendorff. A substância foi submetida às análises espectrométricas.



Esquema 5. Fluxograma da análise cromatográfica da FAL EMEA (GF)

## 4.9 Bioensaios dos extratos brutos e frações de *E. amazonicus*

### 4.9.1 Teste de letalidade frente à *Artemia salina* Leach

Os bioensaios com as larvas da *A. salina* foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas.

Para esse teste utilizou-se a metodologia de Meyer adaptada. Em um aquário de vidro, os cistos de *A. salina* foram incubados na solução salina a 37 ‰, sob iluminação artificial a 28 °C. Após 24 horas foram transferidos o primeiro estágio de náuplio para outro aquário que continha solução salina, e mantida em nova incubação por mais 24 horas, sob as mesmas condições. Após essa incubação, ocorre o estágio de metanúplios do microcrustáceo.

Foram preparadas soluções, em triplicata, dos extratos brutos (EHEA (F), EHEA (GF), EMEA (F) e EMEA (GF)) e das frações (FAL EMEA (F), FAL EMEA (GF), FNEMEA (F) e FNEMEA (GF)) nas concentrações de 10, 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{L}/5\text{ mL}$  em dimetilsulfóxido (DMSO), utilizou-se como controle positivo o Lapachol. Um volume de 4,5 mL de solução salina foram transferidos para tubos de ensaio, sendo ainda adicionados os metanúplios em 0,5 mL (10/tubo), em volume final de 5 mL. Após 24 horas, os microcrustáceos o número de sobreviventes foi contado.

Utilizou-se o método Probitos de análise para obtenção das  $DL_{50}$  e respectivos intervalos de confiança. Os extratos foram considerados ativos quando  $DL_{50} < 1000\ \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

#### 4.9.2 Teste da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos, frações e substâncias isoladas de *E. amazonicus* foi mensurada utilizando-se o ensaio ORAC<sub>FL</sub> (Oxygen radical absorbance capacity) com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (2,2'-Azobis (2-amidopropane) dihydrochloride) como fonte de radical livre.

Os experimentos foram realizados em placas de microtitulação de 96 poços de acordo com metodologia descrita por PRIOR et al. (2003) e OU et al. (2001) com modificações (SALVADOR et al., 2006). Para tanto foram preparadas soluções estoques dos extratos (50 mg/mL), frações (5 mg/mL) em tampão fosfato/DMSO (99:1) e diluídas 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão fosfato. As substâncias isoladas e o Trolox (substância de referência (6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) - análogo da vitamina E) foram analisados nas concentrações de 3,125; 6,25; 12,5; 25 e 50  $\mu\text{M}$ , empregando-se o mesmo sistema diluente.

A leitura foi realizada utilizando-se filtro fluorescente (excitação  $\lambda = 485\text{nm}$  e emissão  $\lambda = 528\text{nm}$ ) em leitor de microplaca monitorando a cinética de reação a cada 2 min. por um período de 70 min. (temperatura =  $37^{\circ}\text{C}$ ). Os valores foram obtidos através de uma planilha que calcula a área sob a curva de decaimento da fluorescência da fluoresceína de cada amostra e correlaciona com uma curva analítica do trolox. Os resultados foram expressos como  $\mu\text{mol}$  de Trolox equivalente (TE) por grama de extrato ou fração em base seca ( $\mu\text{M}$  de TE/g) e como Trolox equivalente relativo para as substâncias isoladas. Como controle positivo foi utilizado ácido caféico, ácido clorogênico e quercetina e como controle negativo a solução diluente. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.



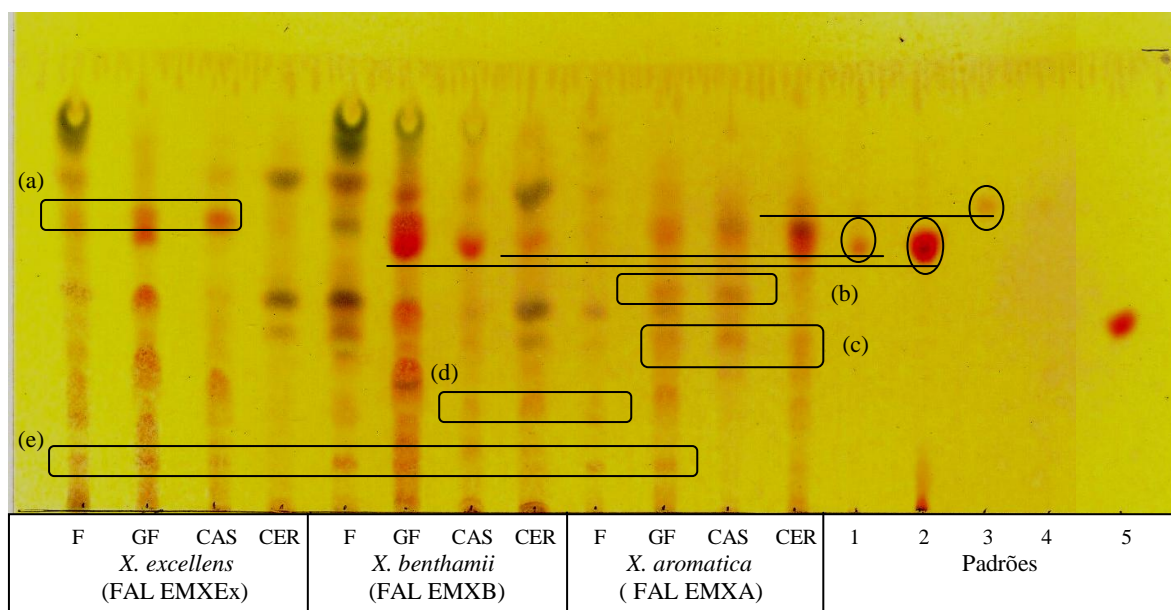


Figura 5. CCD das frações alcalóidicas FAL EMXEx, FAL EMXB, FAL EMXA e padrões de (1) lirioidenina, (2) lisicamina, (3) O-metilmoschatolina, (4) isomoschatolina e (5) annamontina, eluída em clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 e revelada com reagente Dragendorff.

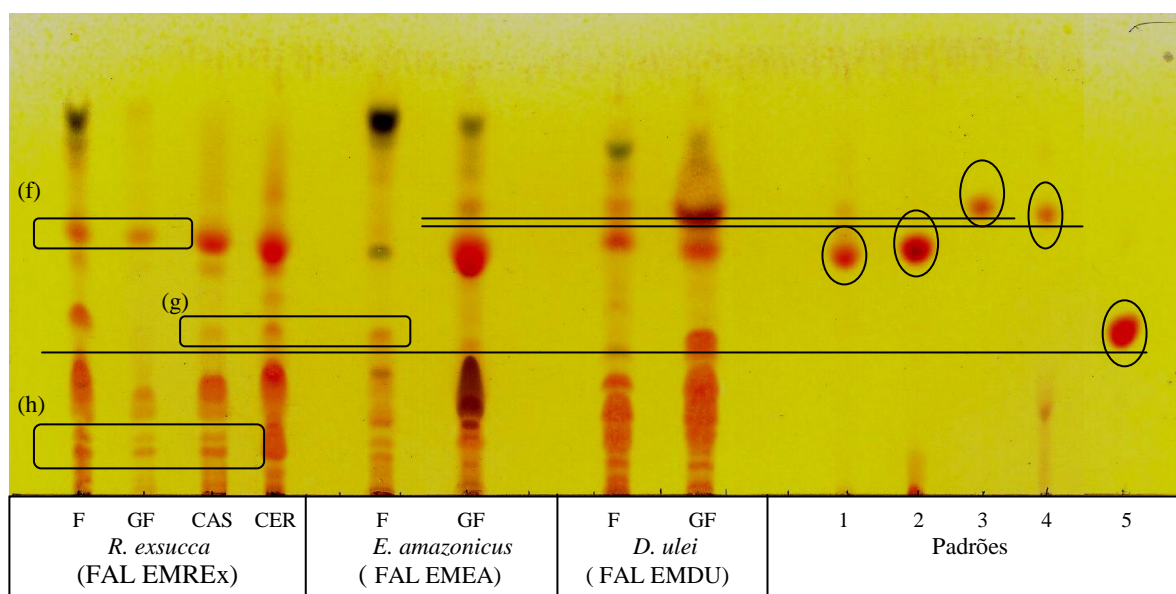


Figura 6. CCD das frações alcalóidicas FAL EMREx, FAL EMEA, FAL EMDU e padrões (1) lirioidenina, (2) lisicamina, (3) O-metilmoschatolina, (4) isomoschatolina e (5) annomontina, eluída em clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 e revelada com reagente Dragendorff.



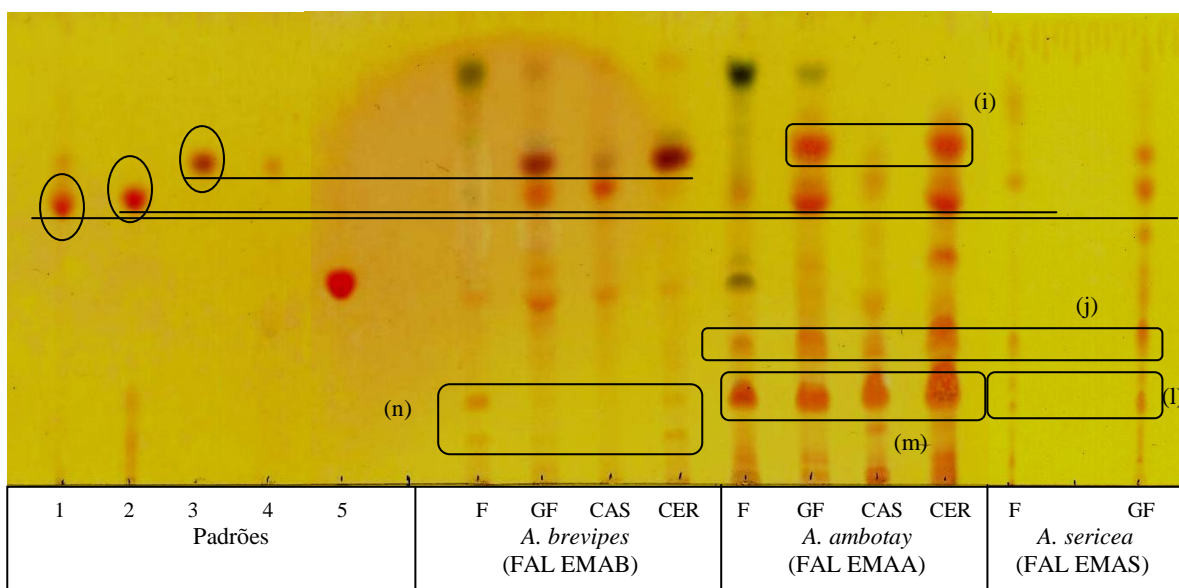


Figura 7. CCD das frações alcalóidicas FAL EMAB, FAL EMAA, FAL EMAS e padrões de (1) liriodenina, (2) lisicamina, (3) O-metilmoschatolina, (4) isomoschatolina e (5) annomontina, eluída em clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 e revelada com reagente Dragendorff.

Na Tabela 5 são apresentados os resultados do perfil alcalóidico por CCD das espécies de Annonaceae analisadas.

O alcalóide O-metilmoschatolina não foi evidenciado nas folhas de *E. amazonicus*, no entanto, através dos estudos fitoquímicos realizados foi isolado esse alcalóide desta parte da planta.

No perfil alcalóidico das espécies pôde-se perceber a existência de manchas em comum entre si e entre as espécies. Manchas de alcalóides com baixa polaridade foi verificado entre todas as partes de *X. excellens* (a), folhas e galhos finos de *R. exsucca* (f) e galhos finos e cerne de *A. ambotay* (i).

Outros alcalóides em comum com media polaridade foram verificados nos galhos finos e casca de *X. aromatica* (b); galhos finos, casca e cerne de *X. aromatica* (c) e em todas as partes de *A. ambotay* e nas partes analisadas de *A. sericea* (j).

Manchas em comum de alcalóides com alta polaridade podem ser verificadas nas folhas, galhos finos e casca de *X. excellens*, folhas, galhos finos e cerne de *X. benthamii*, folha e galhos finos de *X. aromatica* (e); folhas, galhos finos e casca de *R. exsucca* (h);

folhas e galhos finos de *A. sericea* (l); em todas as partes de *A. ambotay* (m); e folhas, e cerne de *A. brevipes* (n).

O perfil alcaloídico das espécies, além de evidenciar a presença dos alcalóides pirimidina- $\beta$ -carbolina e oxoaporfínicos, evidência a existência de outros alcalóides, não identificados com a metodologia empregada.

Espécies	Parte da planta	Alcalóides				
		Liriodenina	Lisicamina	O-metilmoschatolina	Isomoschatolina	Annomontina
<i>X. excellens</i>	F	-	-	-	-	-
	GF	+	-	-	-	-
	CAS	-	-	-	-	-
	CER	-	-	-	-	-
<i>X. benthamii</i>	F	-	-	-	-	-
	GF	-	+	-	-	-
	CAS	-	+	-	-	-
	CER	+	-	-	-	-
<i>X. aromatica</i>	F	-	-	-	-	-
	GF	+	-	-	-	-
	CAS	+	-	-	-	-
	CER	-	-	+	-	-
<i>R. exsucca</i>	F	+	-	-	-	-
	GF	-	-	-	-	-
	CAS	-	-	-	-	S
	CER	+	+	-	-	S
<i>E. amazonicus</i>	F	-	-	-	-	S
	GF	+	+	-	+	-
<i>D. ulei</i>	F	-	-	+	-	S
	GF	-	+	+	-	-
<i>A. brevipes</i>	F	-	-	-	-	-
	GF	-	+	+	-	-
	CAS	-	-	-	-	-
	CER	-	-	+	-	-
<i>A. ambotay</i>	F	-	-	-	-	-
	GF	+	-	-	-	-
	CAS	-	-	-	-	-
	CER	+	-	-	-	-
<i>A. sericea</i>	F	-	-	-	-	-
	GF	-	-	-	-	-

Tabela 5. Resultado do perfil alcaloídico de espécies pertencente à família Annonaceae  
Convenção: (-) negativo, (+) positivo e (S) mancha semelhante

## 5.2 Perfil alcaloídico por espectrometria de massa (IES–EM/EM)

### 5.2.1 Perfil das frações alcaloídicas das folhas e galhos finos de *E. amazonicus* (FAL EMEA (F) e (FAL EMEA (GF))

Os espectros de massa das FAL EMEA (F) e FAL EMEA (GF) foram avaliados por FIA-ESI-IT-MS, ou seja, por injeção direta das amostras em espectrômetro de massa com interface *electrospray* e analisador de *ion-trap*. Foram preparadas soluções de 20 ppm da FAL EMEA (F) e FAL EMEA (GF), introduzidas diretamente na fonte de *ESI* por meio de uma seringa infusora, com um loop de 5  $\mu\text{L}$  e um sistema de bombeamento em fluxo de 25  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Os parâmetros de operação utilizados foram os seguintes: a tensão da agulha *spray* foi fixada em 5 kV e o *spray* foi estabilizado com uma vazão de gás nitrogênio de 30 arb, a voltagem do capilar foi de 35 V e a temperatura do capilar 200 °C.

Foram obtidos espectros de massa em *full-scan* apresentando os íons precursores das moléculas protonadas  $[\text{M}+\text{H}]^+$ . Foram observados íons com  $m/z$  correspondentes aos íons moleculares protonados dos alcalóides lirioidenina, lisicamina, O-metilmoschatolina, isomoschatolina e 9-metoxi-isomoschatolina. A análise do espectro de massa da FAL EMEA (F) (FIGURA 8) evidenciou a presença dos íons  $m/z$  322, 308 e 338, os quais foram fragmentados ( $\text{MS}^2$ ) (FIGURA 10). O monitoramento desses íons forneceu os perfis de fragmentação semelhante aos dos padrões dos alcalóides O-metilmoschatolina, isomoschatolina e 9-metoxi-isomoschatolina, respectivamente (FIGURA 12, 13, 14, 15, 16, 17, 20 e 21). Nos Esquemas de 6 a 8 são mostrados os fragmentos mais importantes dos padrões dos alcalóides lirioidenina, isomoschatolina e O-metilmoschatolina.

O espectro de massa da FAL EMEA (GF) (FIGURA 9) mostrou a presença dos íons  $m/z$  176, 292, 308 e 338, que após a fragmentação  $\text{MS}^2$  para cada um desses íons (FIGURA 11) permitiu identificar a presença dos alcalóides lirioidenina, lisicamina,

isomoschatolina e 9-metoxi-isomoschatolina nos galhos finos de *E. amazonicus*. Estes resultados são compatíveis com as análises cromatográficas em CCD e o isolamento dos alcalóides liriodenina, O-metilmoschatolina e isomoschatolina da planta em estudo. Contudo, tendo em vista pequenas diferenças na intensidade dos íons selecionados em relação aos padrões, e a não padronização das energias empregadas para fragmentação, estes resultados são considerados não conclusivos requerendo análises padronizadas, inclusive em CLAE/EM, para sua validação.

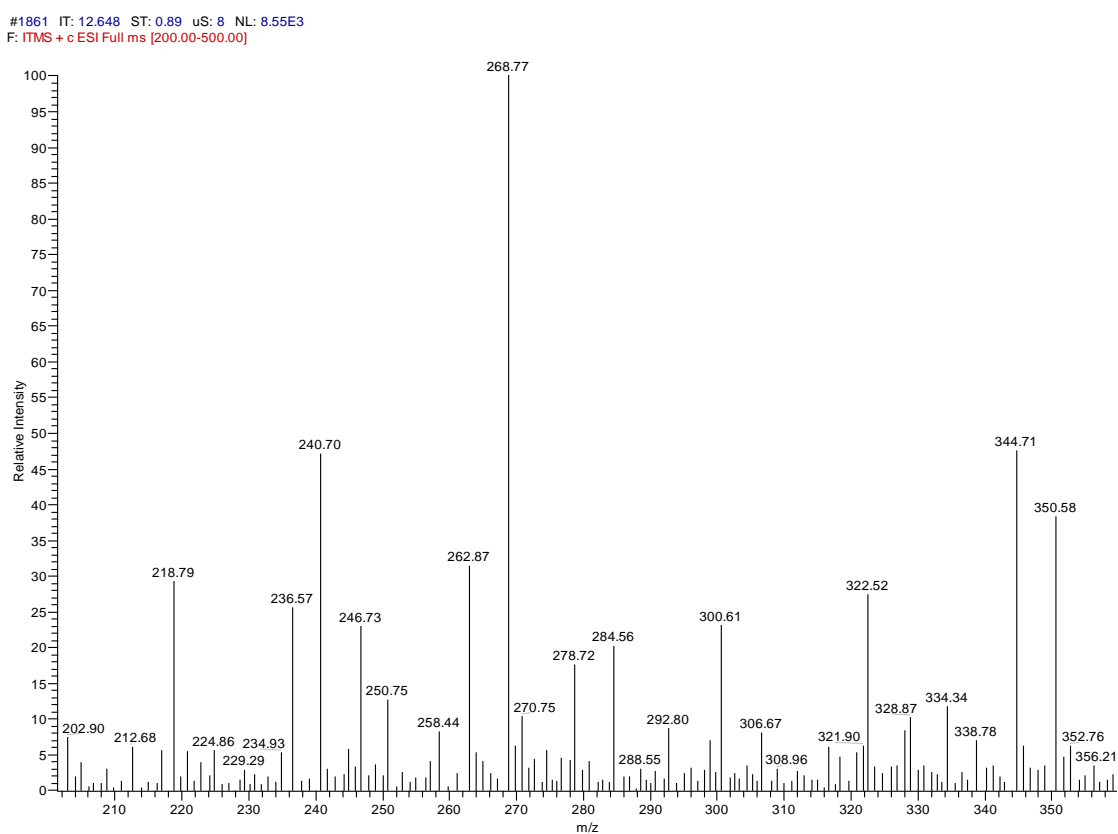


Figura 8. Espectro de massas de primeira ordem (*full scan*), em modo positivo da FAL EMEA(F)

#1567 IT: 48.176 ST: 0.73 uS: 5 NL: 1.48E3  
F: ITMS + c ESI Full ms [200.00-500.00]

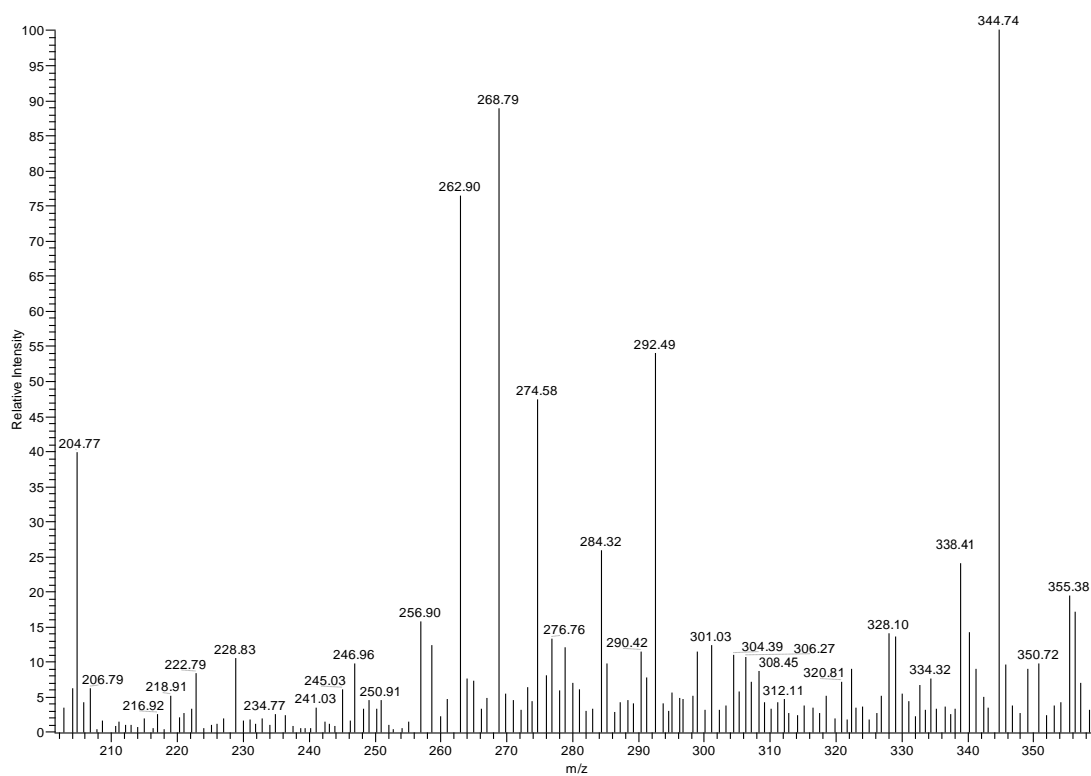


Figura 9. Espectro de massas de primeira ordem (*full scan*), em modo positivo da FAL EMEA (GF).

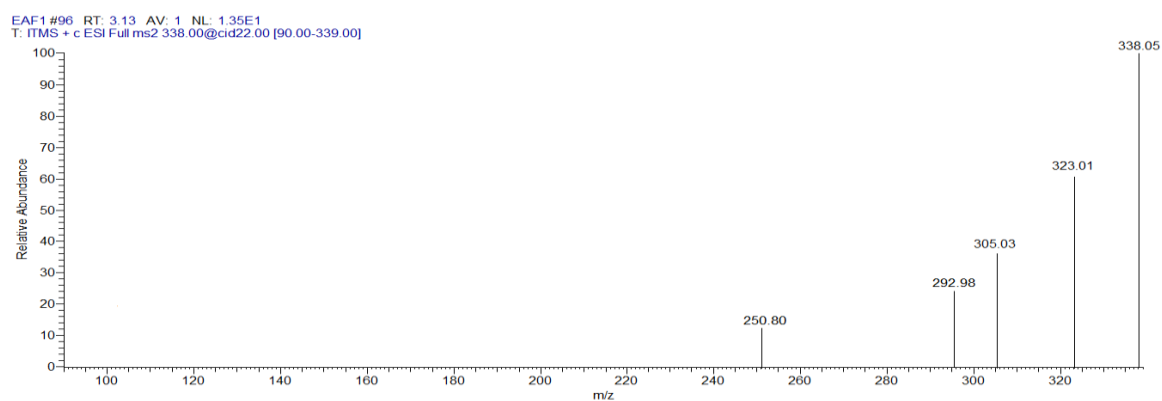
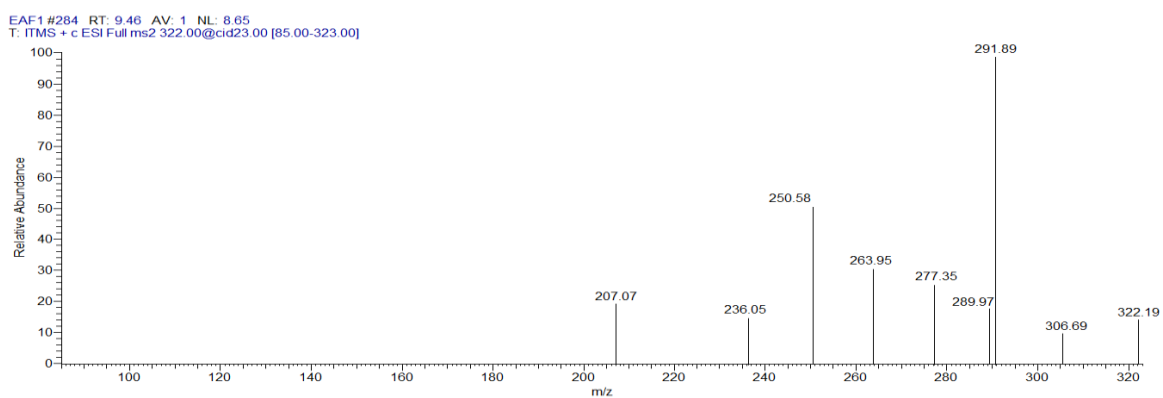
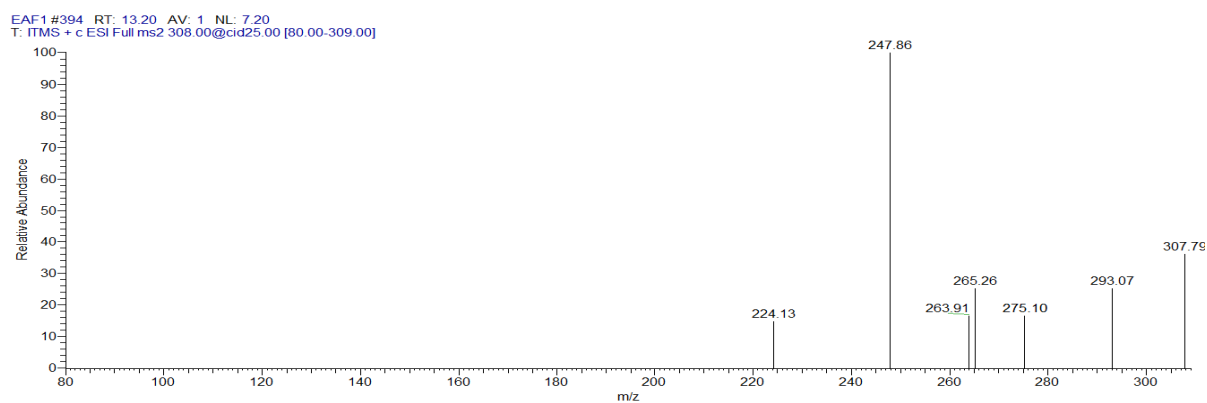
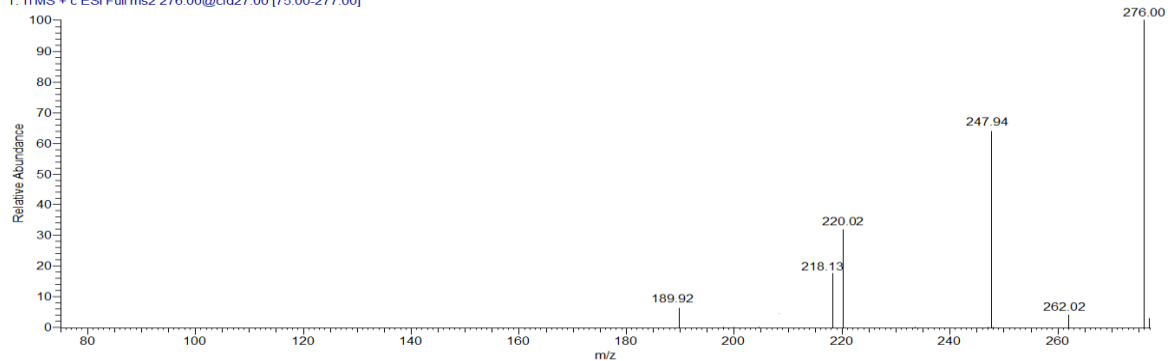
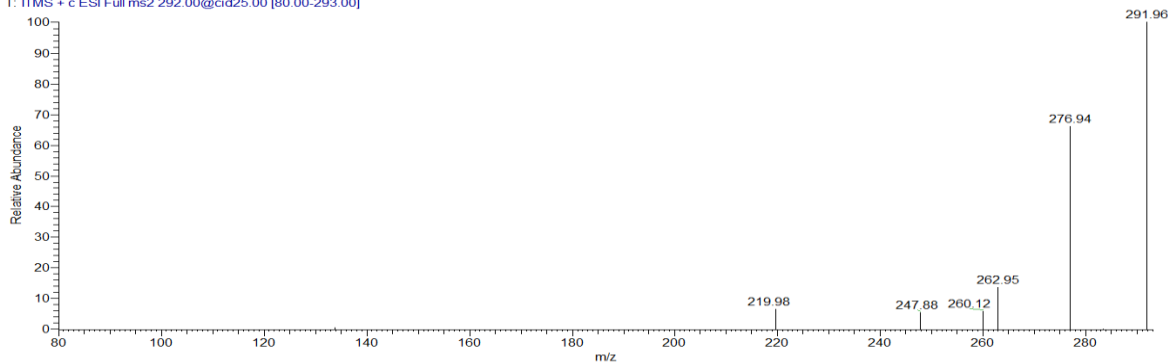


Figura 10. Espectro de massas de segunda ordem dos íons precursores de  $m/z$  308, 322 e 338 obtidos em modo positivo da FAL EMEA(F).

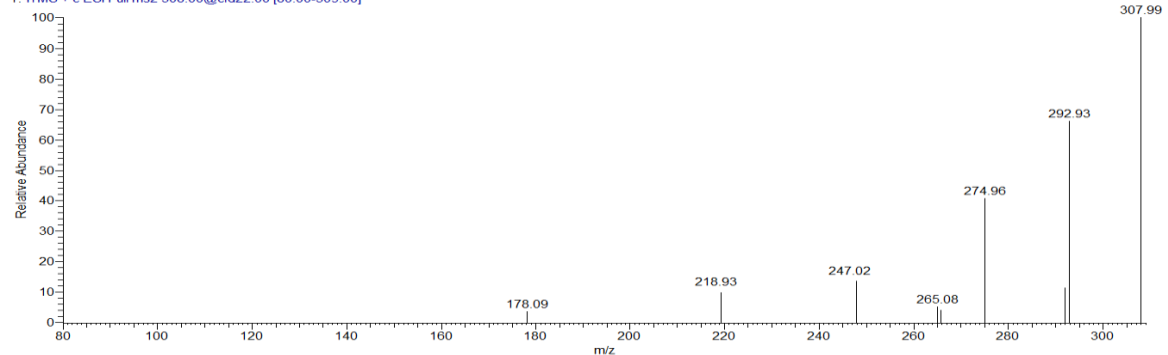
298282276266262gf2 #138 RT: 4.51 AV: 1 NL: 5.10E1  
T: ITMS + c ESI Full ms2 276.00@cid27.00 [75.00-277.00]



308322292 gf #288 RT: 9.00 AV: 1 NL: 2.58E1  
T: ITMS + c ESI Full ms2 292.00@cid25.00 [80.00-293.00]



338328308322292gf1 #144 RT: 4.76 AV: 1 NL: 3.60E1  
T: ITMS + c ESI Full ms2 308.00@cid22.00 [80.00-309.00]



338328308322292gf1 #32 RT: 1.03 AV: 1 NL: 1.59E1  
T: ITMS + c ESI Full ms2 338.00@cid22.00 [90.00-339.00]

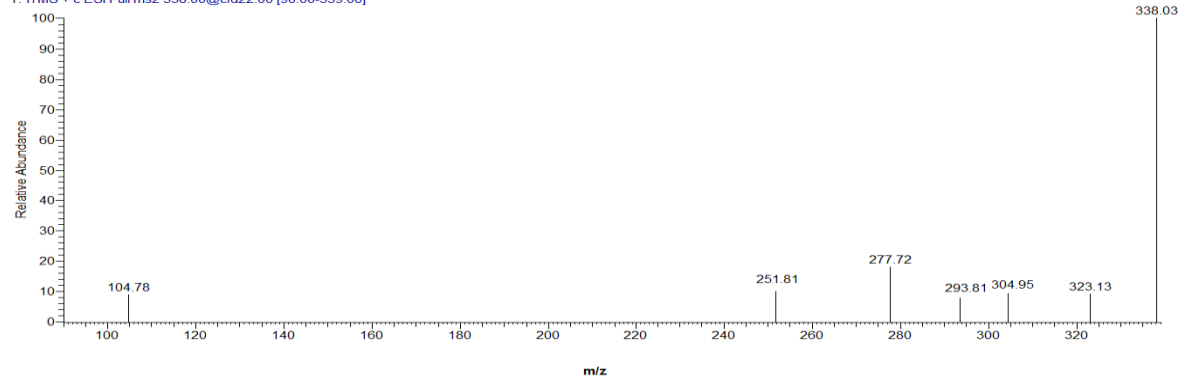
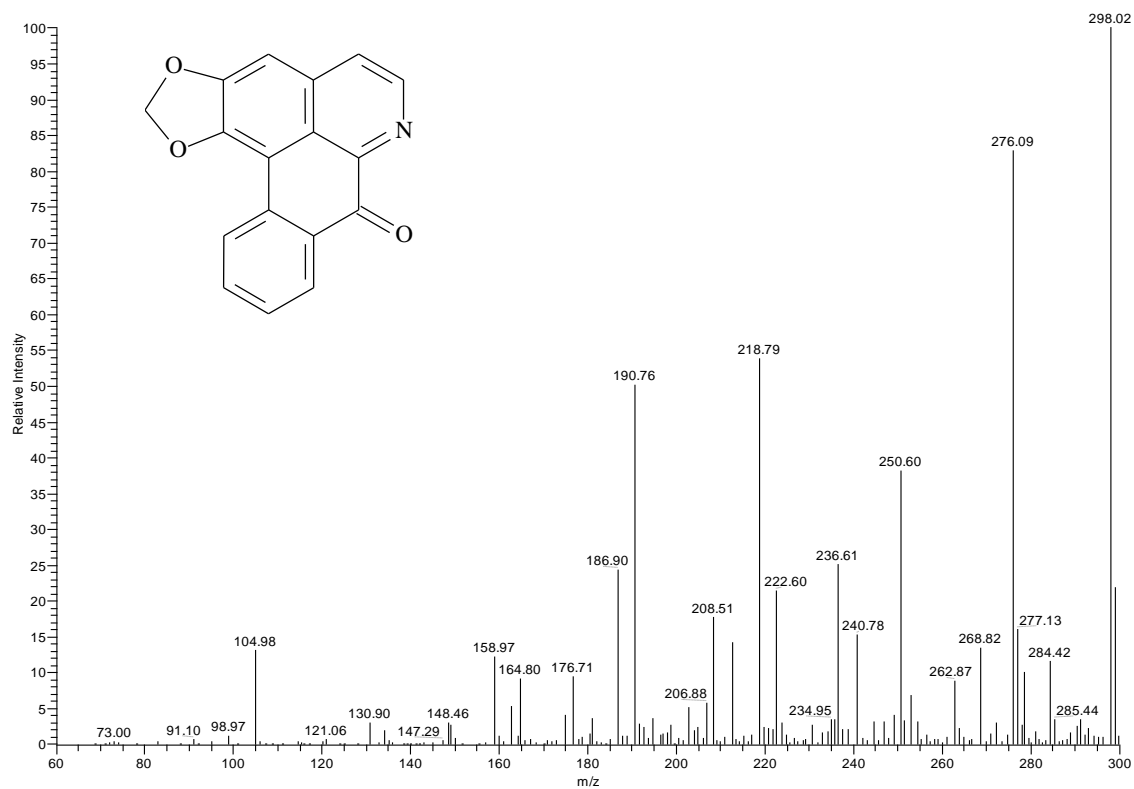


Figura 11. Espectro de massas de segunda ordem dos íons precursores de  $m/z$  276, 292, 308 e 338 obtidos em modo positivo da FAL EMEA (GF).

#19806 IT: 8.566 ST: 0.52 uS: 5 NL: 1.67E4  
F: ITMS + c ESI Full ms [60.00-300.00]



#19608 IT: 21.036 ST: 0.96 uS: 5 NL: 4.66E2  
F: ITMS + c ESI Full ms2 276.00@cid35.00 [75.00-276.00]

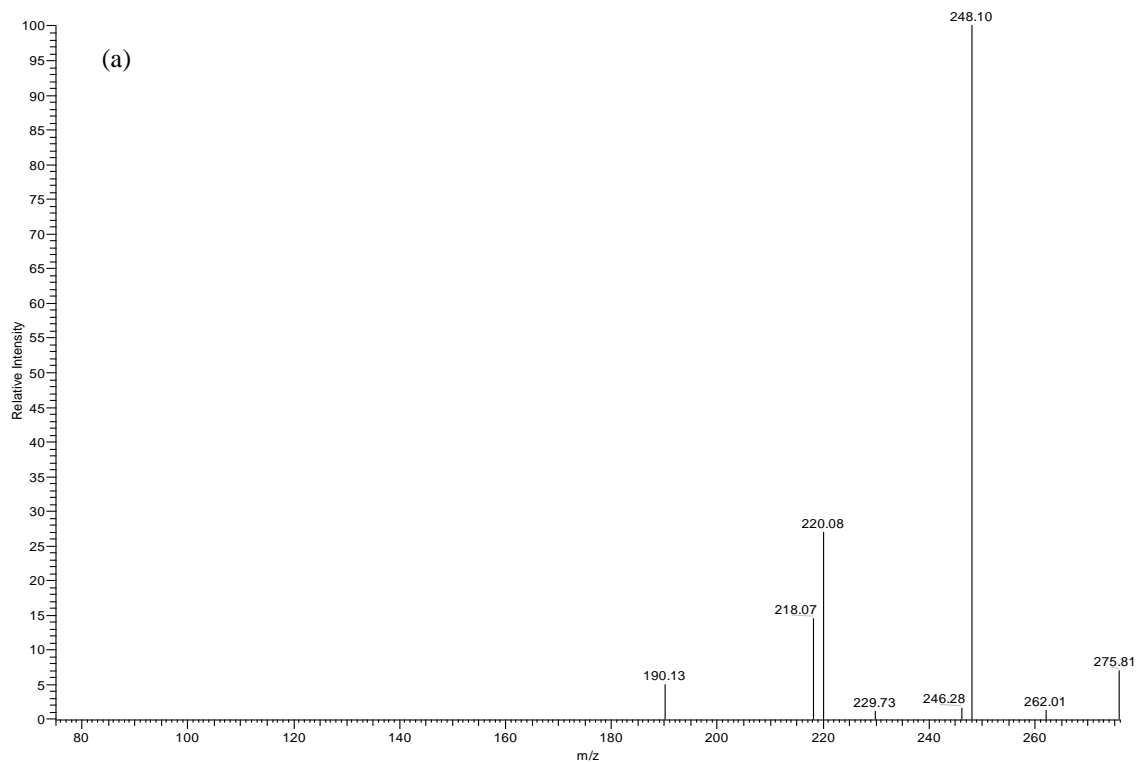
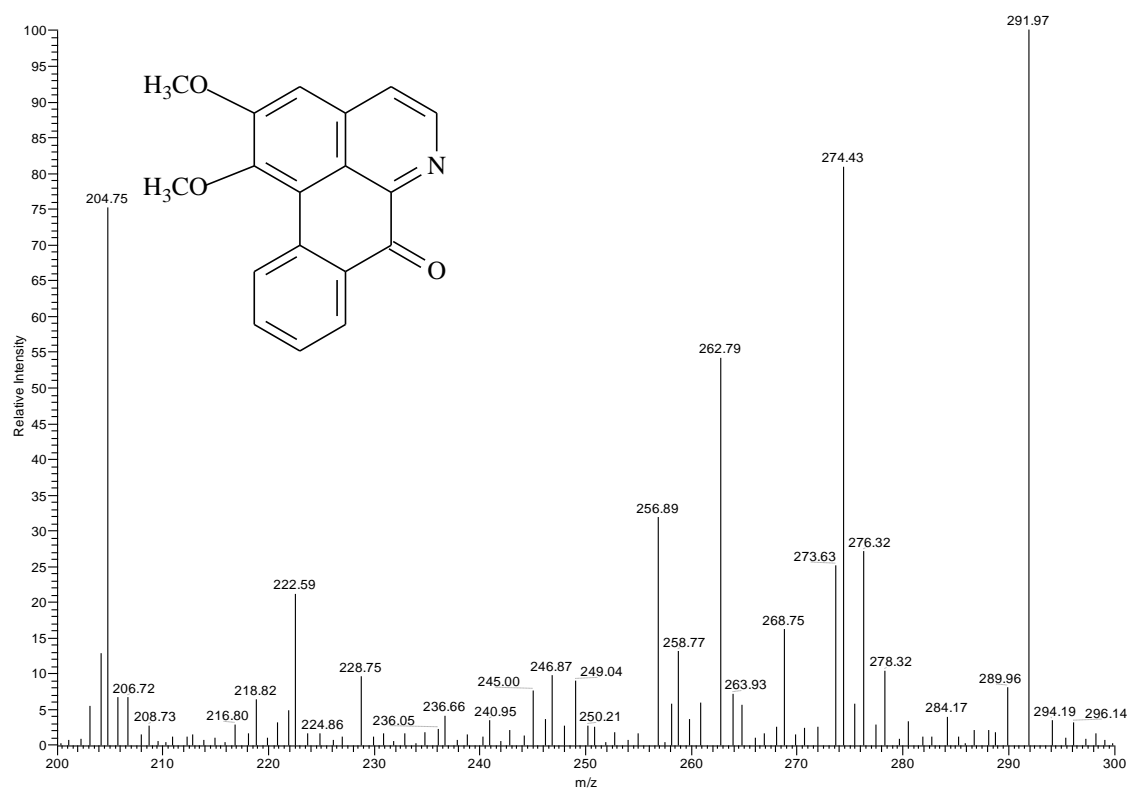


Figura 12. Espectros de massas *full MS* e (a) *full MS*<sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão liriodenina.



#2522 IT: 100.000 ST: 1.44 uS: 8 NL: 2.52E3  
F: ITMS + c ESI Full ms [200.00-300.00]



#2795 IT: 100.000 ST: 0.81 uS: 3 NL: 8.52E1  
F: ITMS + c ESI Full ms2 292.00@cid25.00 [80.00-293.00]

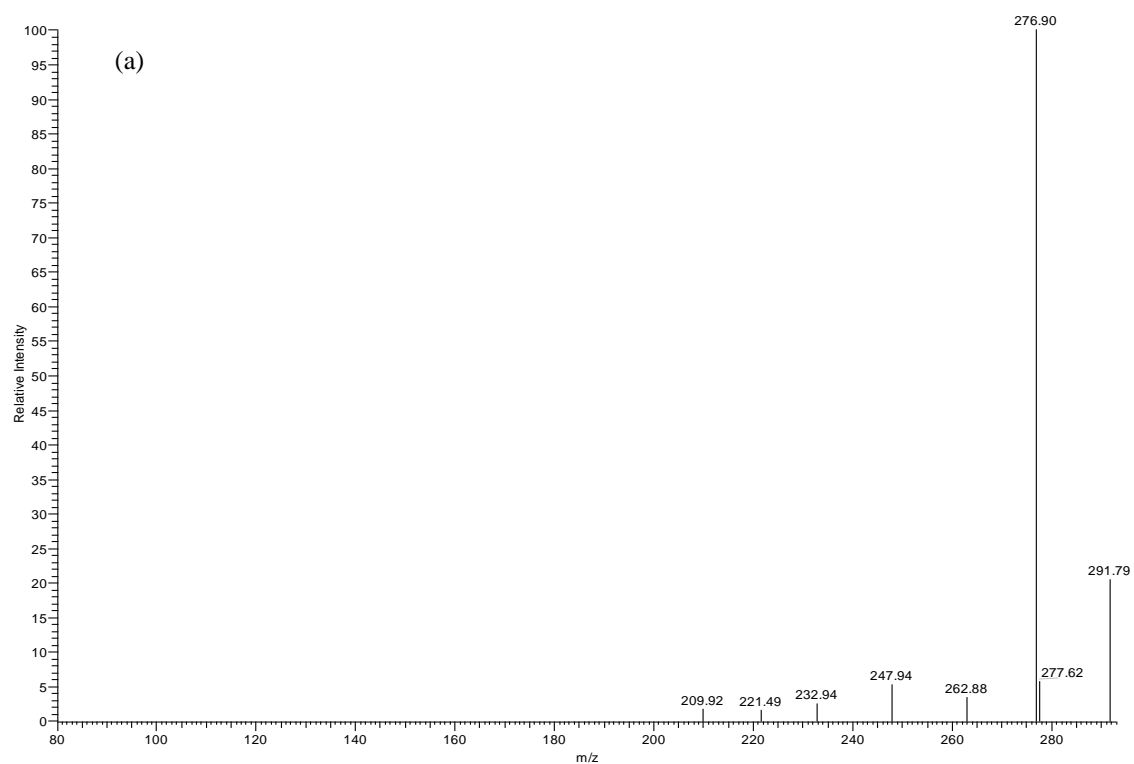
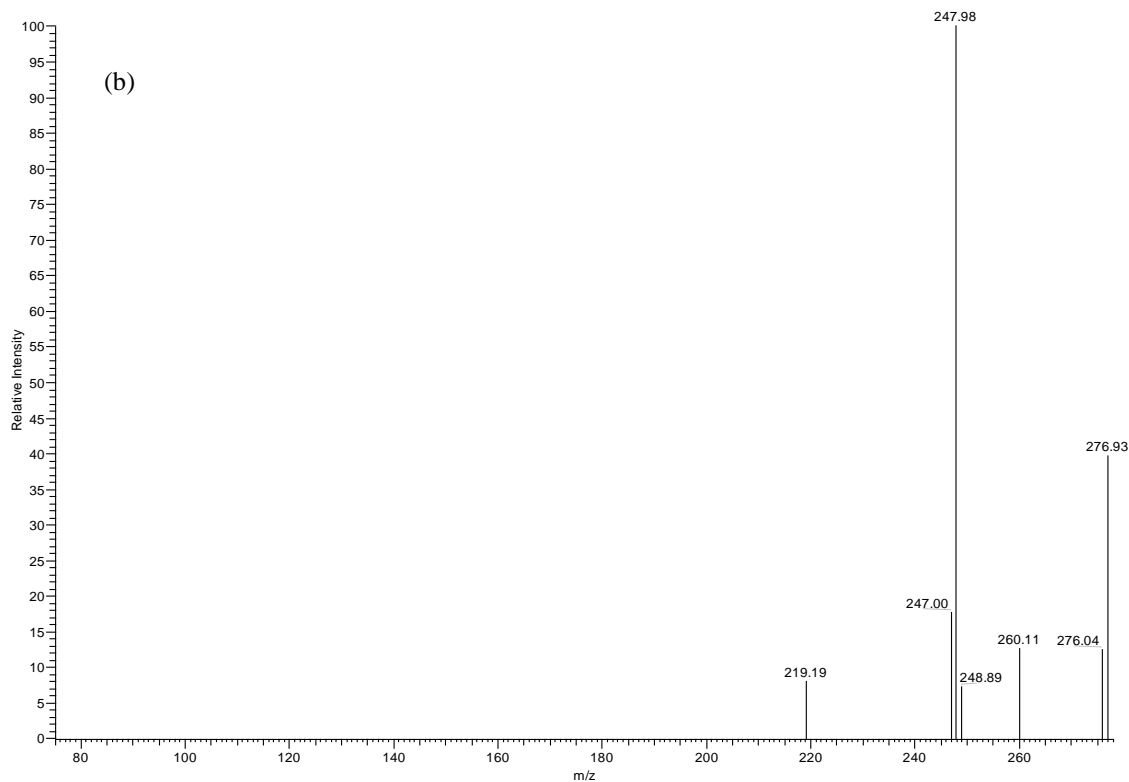


Figura 13. Espectros de massas *full MS* e (a) *full MS*<sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão lisicamina.

#2962 IT: 100.000 ST: 0.99 uS: 3 NL: 2.16E1  
F: ITMS + c ESI Full ms3 292.00@cid25.00 277.00@cid26.00 [75.00-278.00]



#3250 IT: 100.000 ST: 1.15 uS: 3 NL: 4.35  
F: ITMS + c ESI Full ms4 292.00@cid25.00 277.00@cid26.00 248.00@cid26.00 [65.00-249.00]

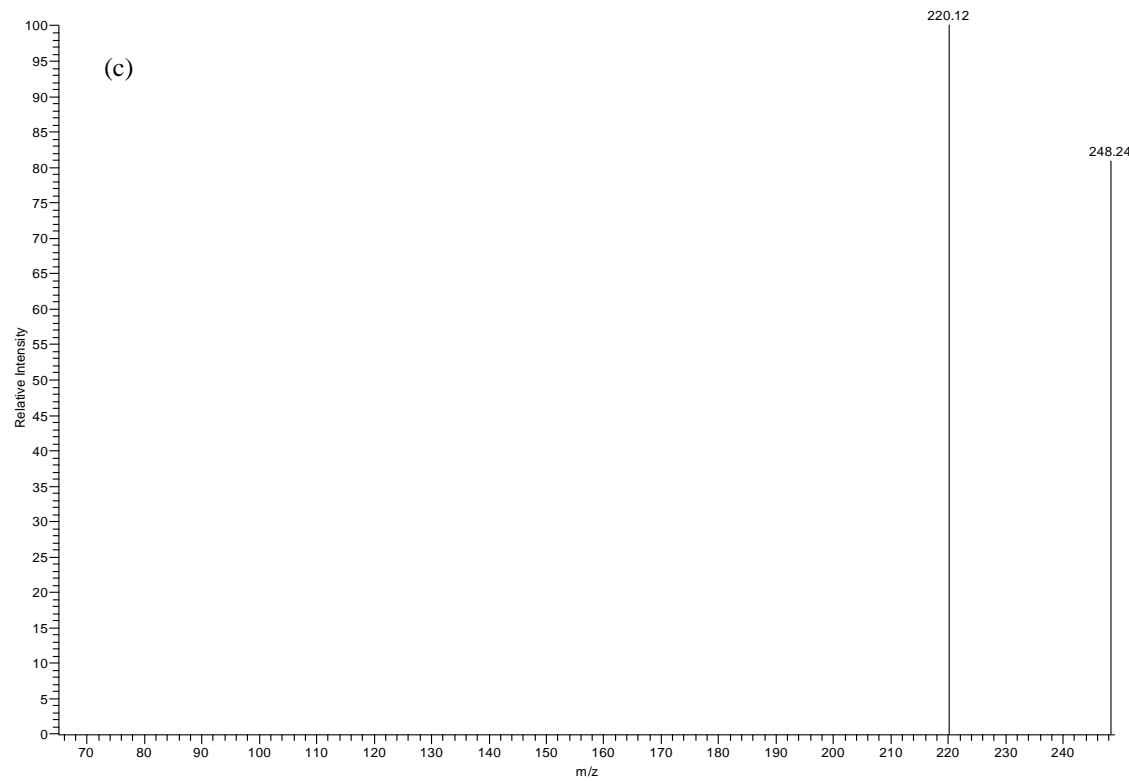
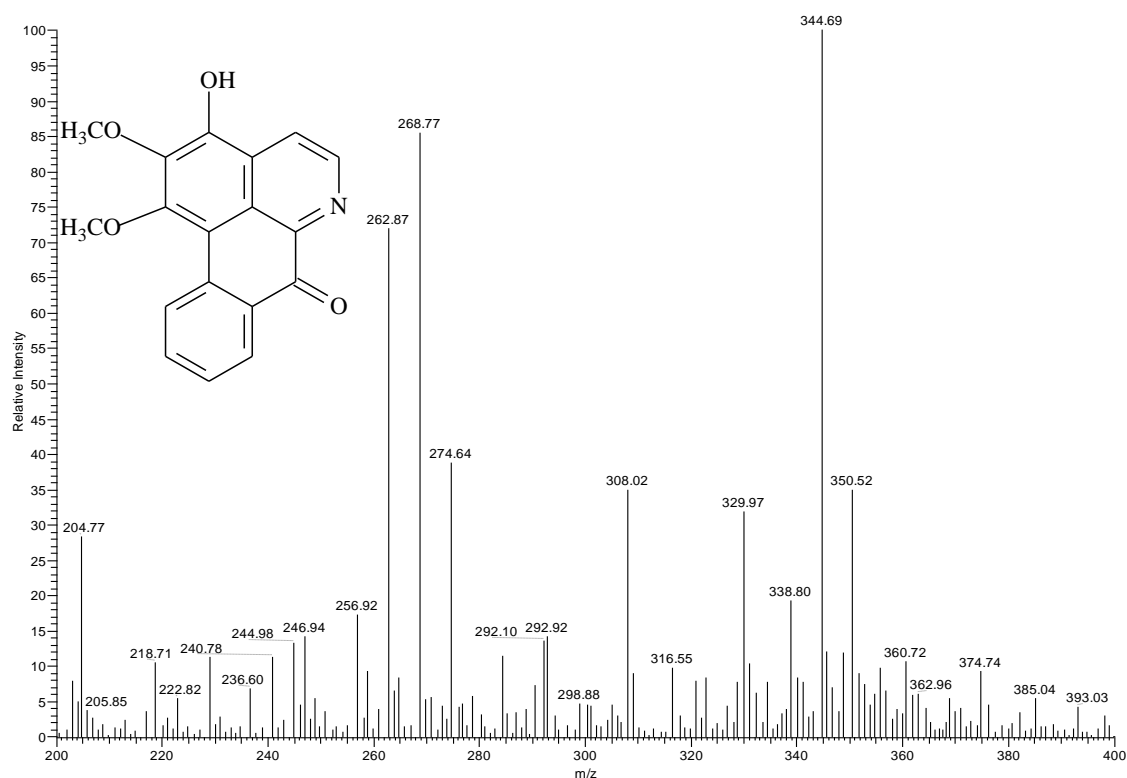


Figura 14. (b) Espectros de massas *full MS*<sup>3</sup> e (c) *full MS*<sup>4</sup> obtidos em modo positivo do padrão lisicamina.

#6275 IT: 44.667 ST: 0.68 uS: 5 NL: 3.31E3  
F: ITMS + c ESI Full ms [200.00-400.00]



#6483 IT: 100.000 ST: 0.83 uS: 3 NL: 6.55E2  
F: ITMS + c ESI Full ms2 308.00@cid25.00 [80.00-309.00]

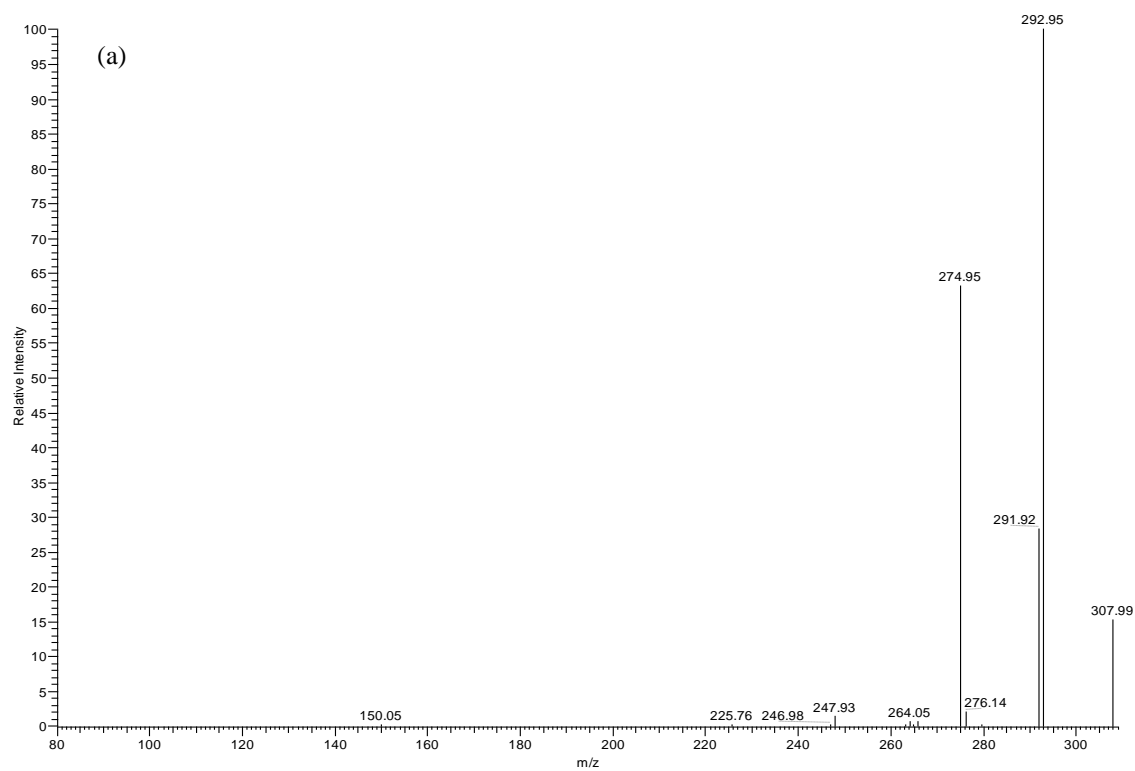
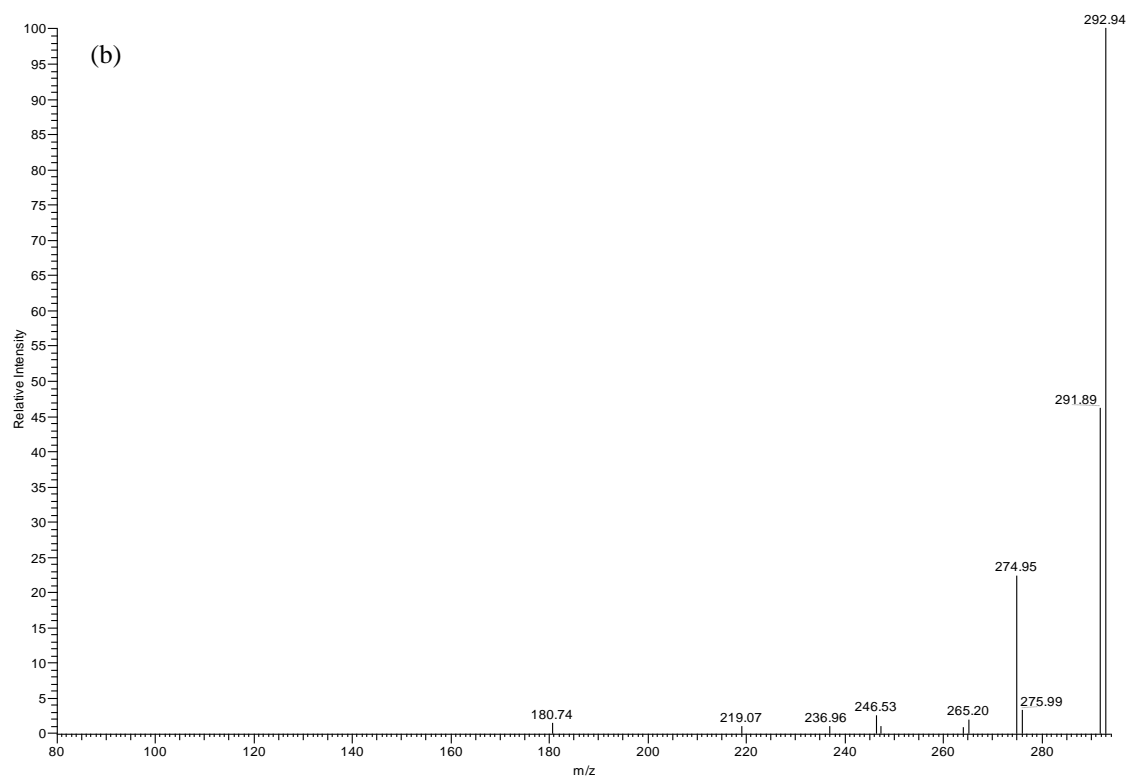


Figura 15. Espectros de massas *full MS* e (a) *full MS*<sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão isoschatoiline.

#6802 IT: 100.000 ST: 0.99 uS: 3 NL: 2.81E2  
F: ITMS + c ESI Full ms3 308.00@cid25.00 293.00@cid23.00 [80.00-294.00]



#7069 IT: 100.000 ST: 1.18 uS: 3 NL: 2.52E1  
F: ITMS + c ESI Full ms4 308.00@cid25.00 293.00@cid23.00 275.00@cid26.00 [75.00-276.00]

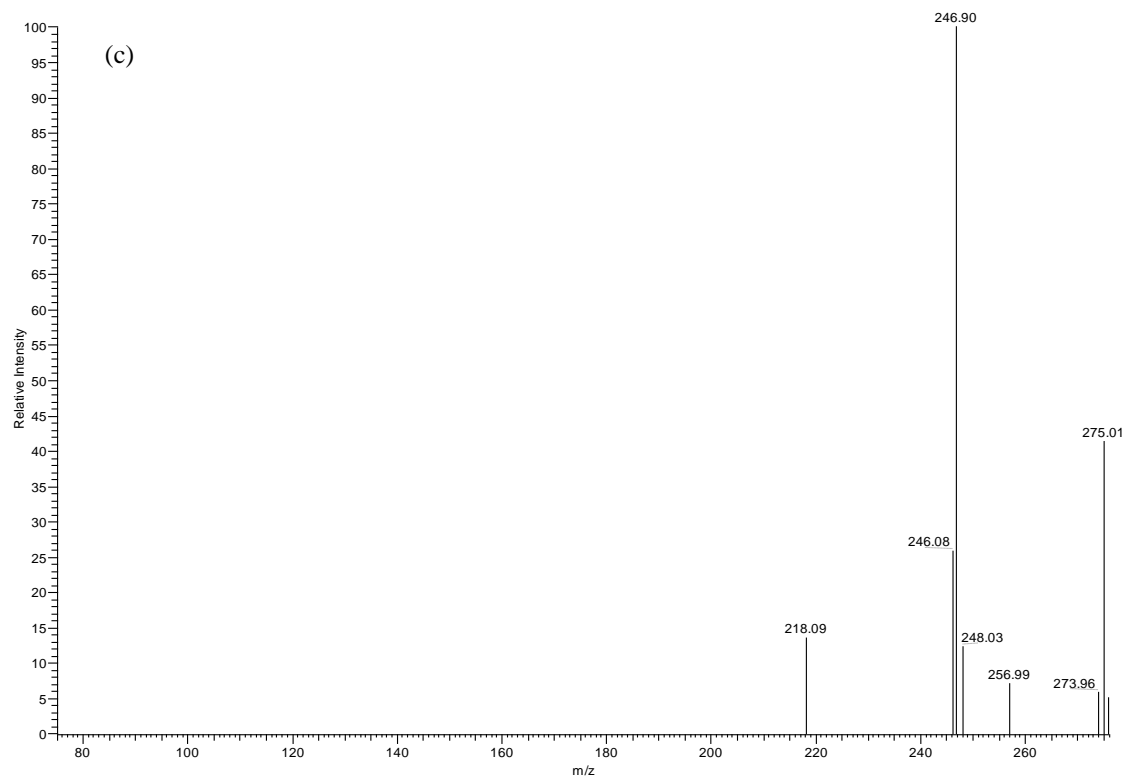
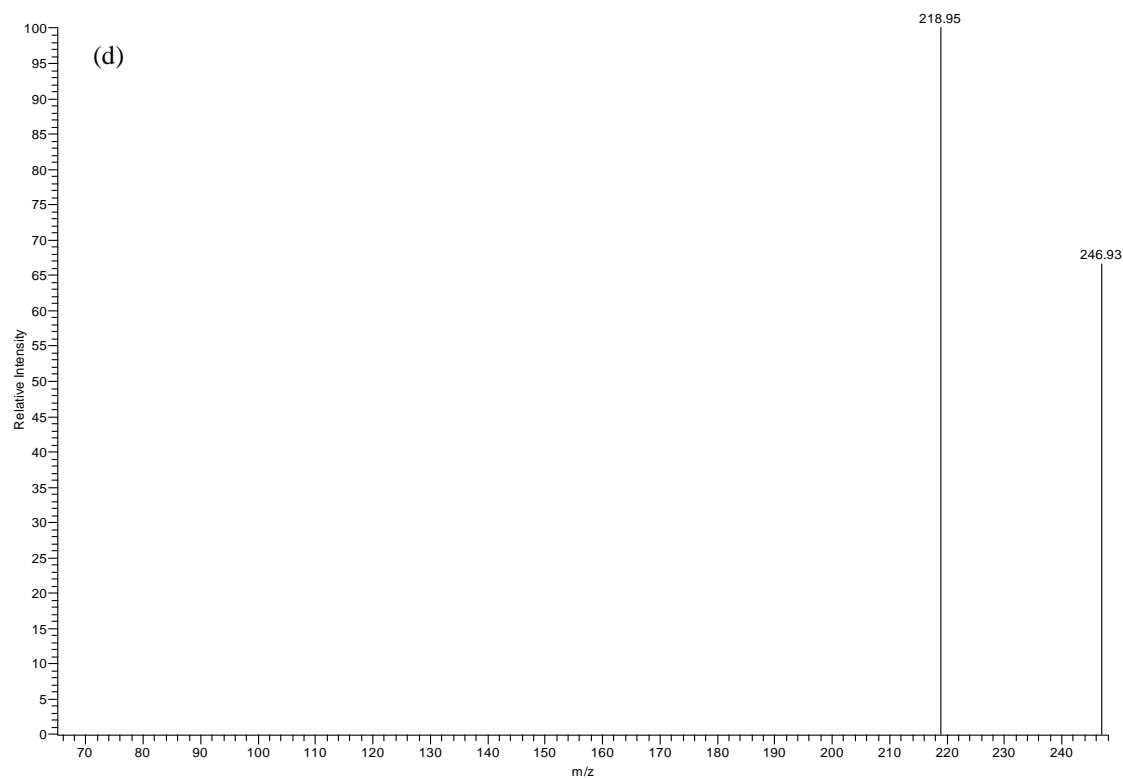


Figura 16. (b) Espectros de massas *full MS*<sup>3</sup> e (c) *full MS*<sup>4</sup> obtidos em modo positivo do padrão isomoschatolina.

#7195 IT: 100.000 ST: 1.34 uS: 3 NL: 1.10E1  
F: ITMS + c ESI Full ms5 308.00@cid25.00 293.00@cid23.00 275.00@cid26.00 247.00@cid23.00 [65.00-248.00]



#7315 IT: 100.000 ST: 1.53 uS: 3 NL: 2.23  
F: ITMS + c ESI Full ms6 308.00@cid25.00 293.00@cid23.00 275.00@cid26.00 247.00@cid23.00 219.00@cid28.00 [60.00-220.00]

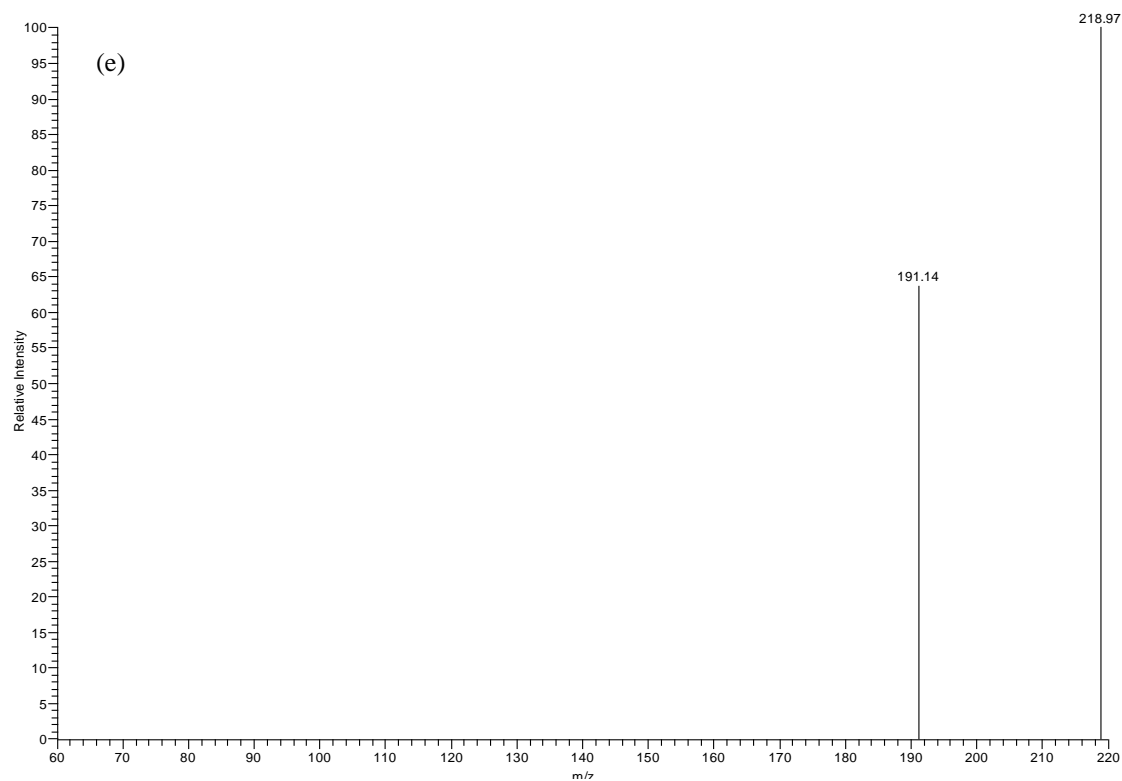
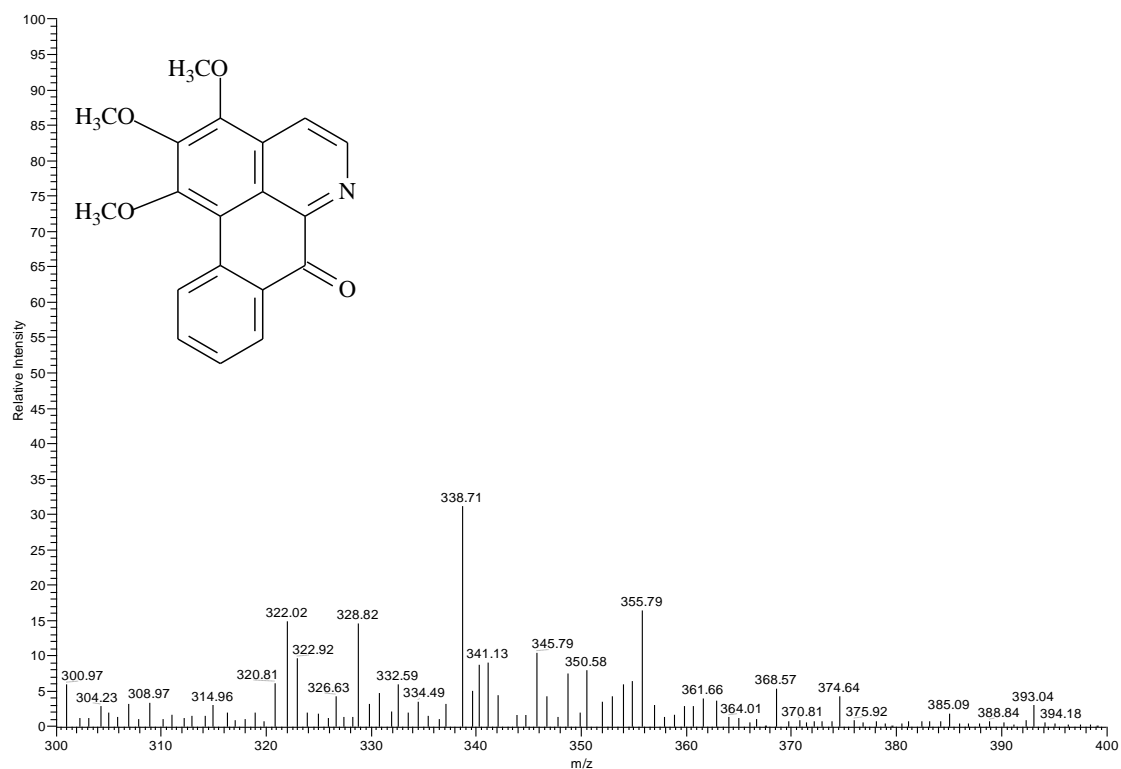


Figura 17. (d) Espectros de massas *full MS*<sup>5</sup> e (e) *full MS*<sup>6</sup> obtidos em modo positivo do padrão isomoschatolina.

#2104 IT: 99.011 ST: 1.25 uS: 7 NL: 1.85E3  
F: ITMS + c ESI Full ms [300.00-400.00]



#1449 IT: 100.000 ST: 0.82 uS: 3 NL: 6.87E1  
F: ITMS + c ESI Full ms2 322.00@cid23.00 [85.00-323.00]

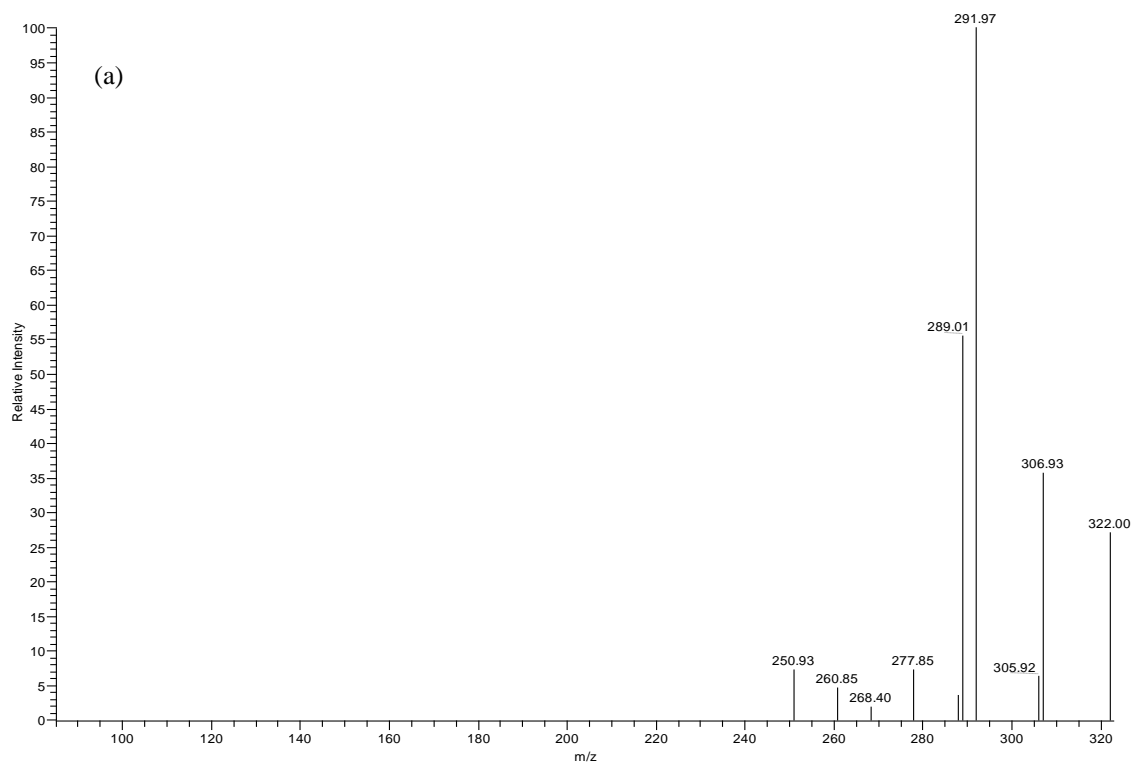
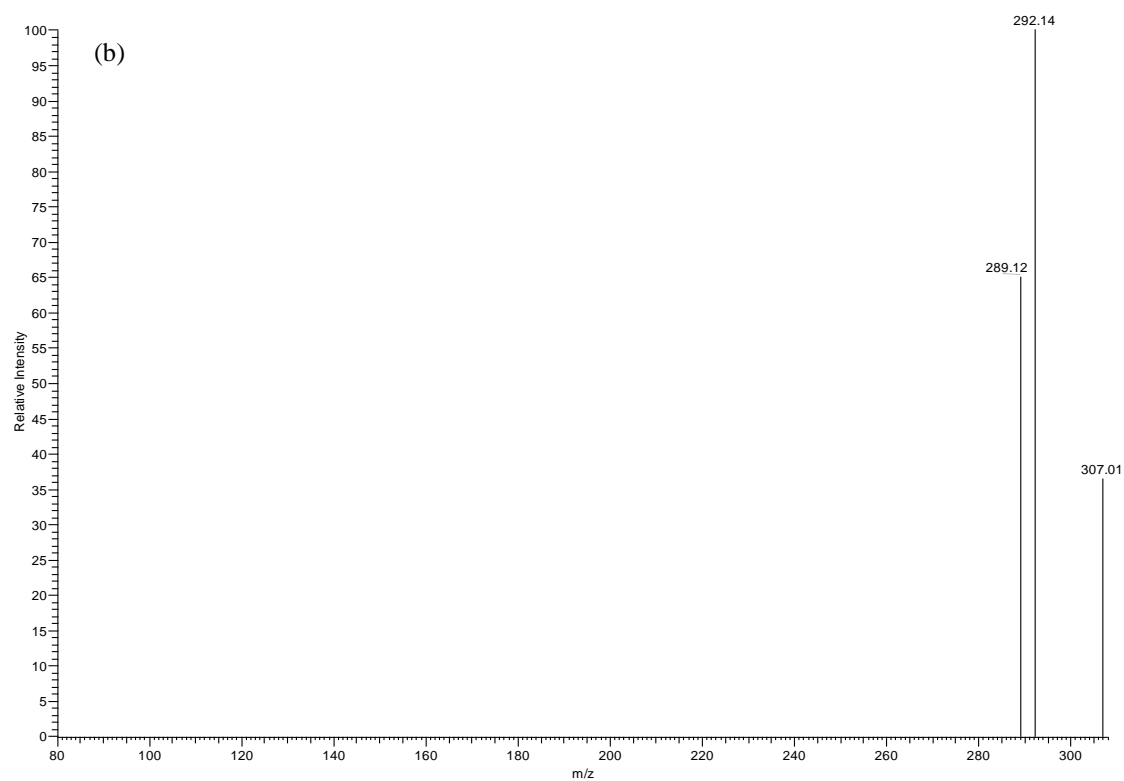


Figura 18. Espectros de massas *full MS* e (a) *full MS*<sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão O-metilmoschatolina.

#1781 IT: 100.000 ST: 1.00 uS: 3 NL: 4.06  
F: ITMS + c ESI Full ms3 322.00@cid23.00 307.00@cid20.00 [80.00-308.00]



#2033 IT: 100.000 ST: 1.18 uS: 3 NL: 5.22  
F: ITMS + c ESI Full ms4 322.00@cid23.00 307.00@cid20.00 292.00@cid30.00 [80.00-293.00]

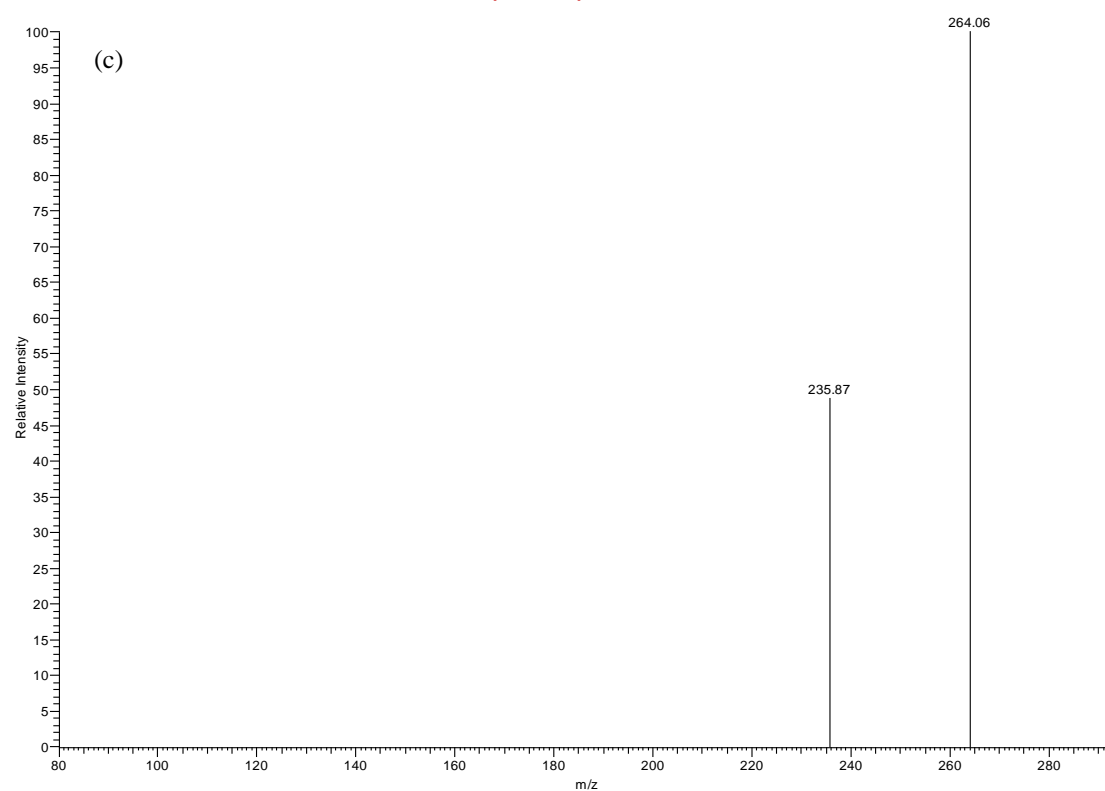
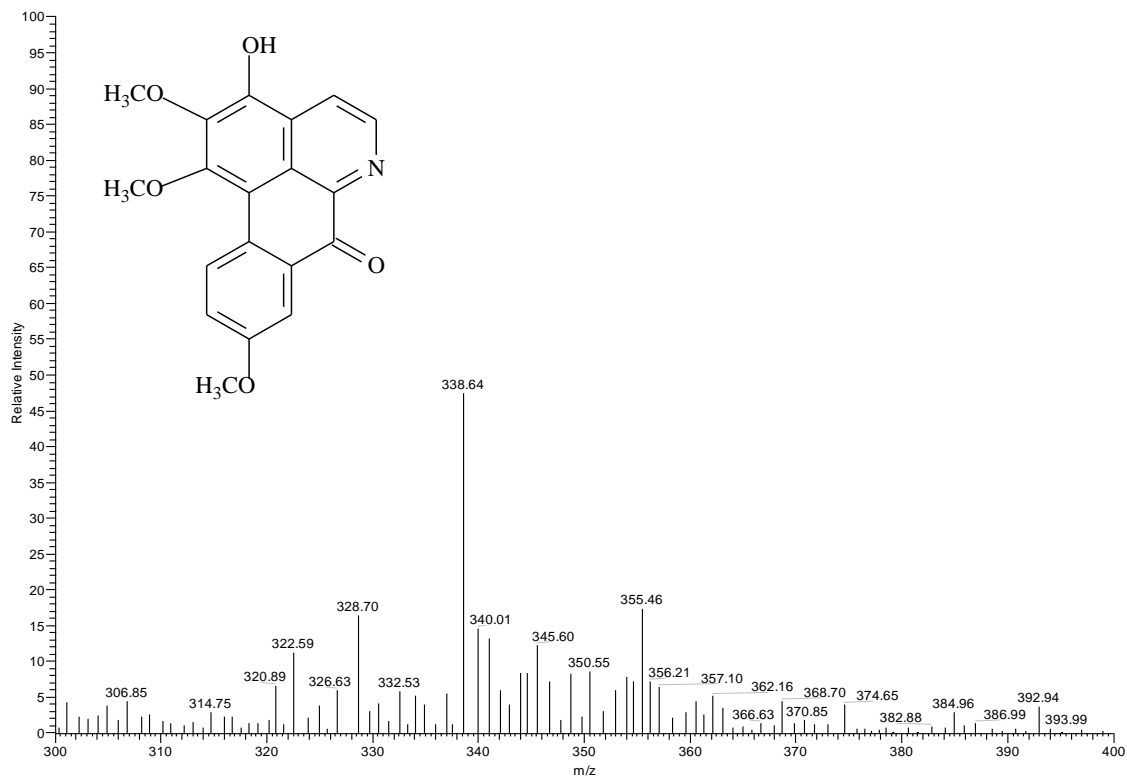


Figura 19. (b) Espectros de massas *full MS*<sup>3</sup> e (c) *full MS*<sup>4</sup> obtidos em modo positivo do padrão O-metilmoschatolina.

#2505 IT: 100.000 ST: 0.89 uS: 5 NL: 1.44E3  
F: ITMS + c ESI Full ms [300.00-400.00]



#2666 IT: 100.000 ST: 0.83 uS: 3 NL: 7.47  
F: ITMS + c ESI Full ms2 338.00@cid22.00 [90.00-339.00]

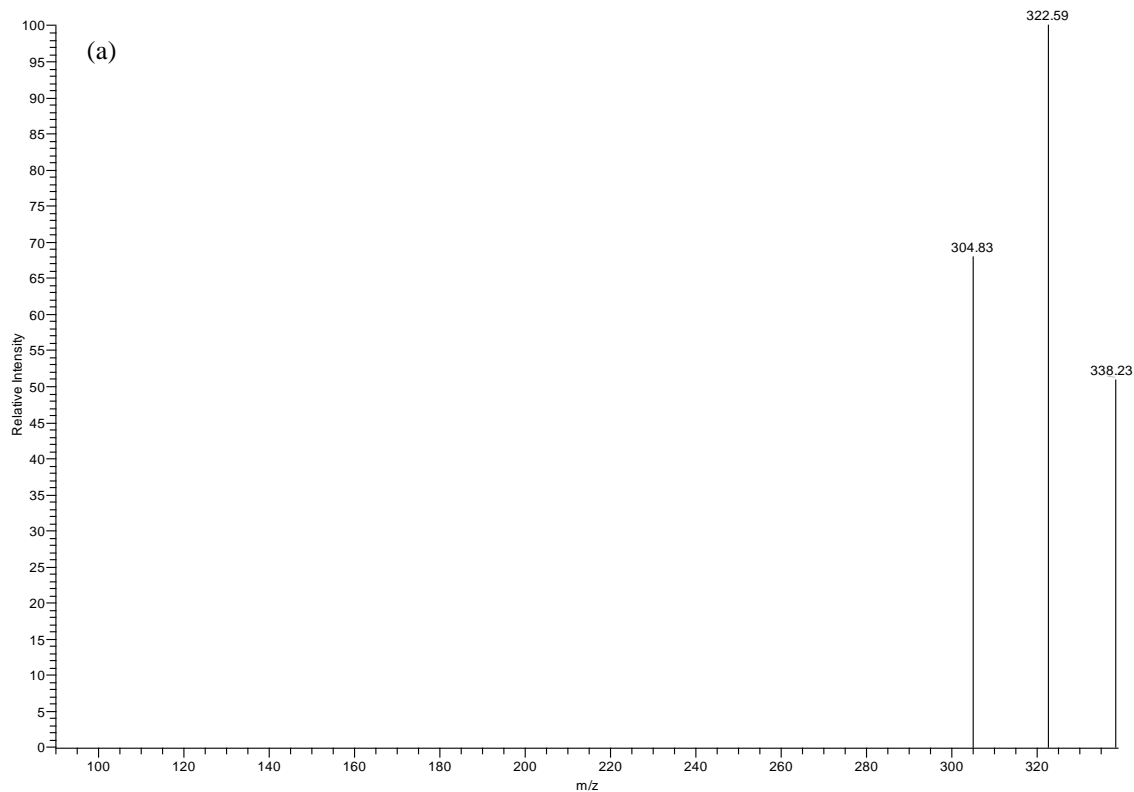


Figura 20. Espectros de massas *full MS* e (a) *full MS*<sup>2</sup> obtidos em modo positivo do padrão 9- metoxi- isoschatochina.



#2821 IT: 100.000 ST: 0.99 uS: 3 NL: 4.06  
 F: ITMS + c ESI Full ms3 338.00@cid22.00 323.00@cid17.00 [85.00-324.00]

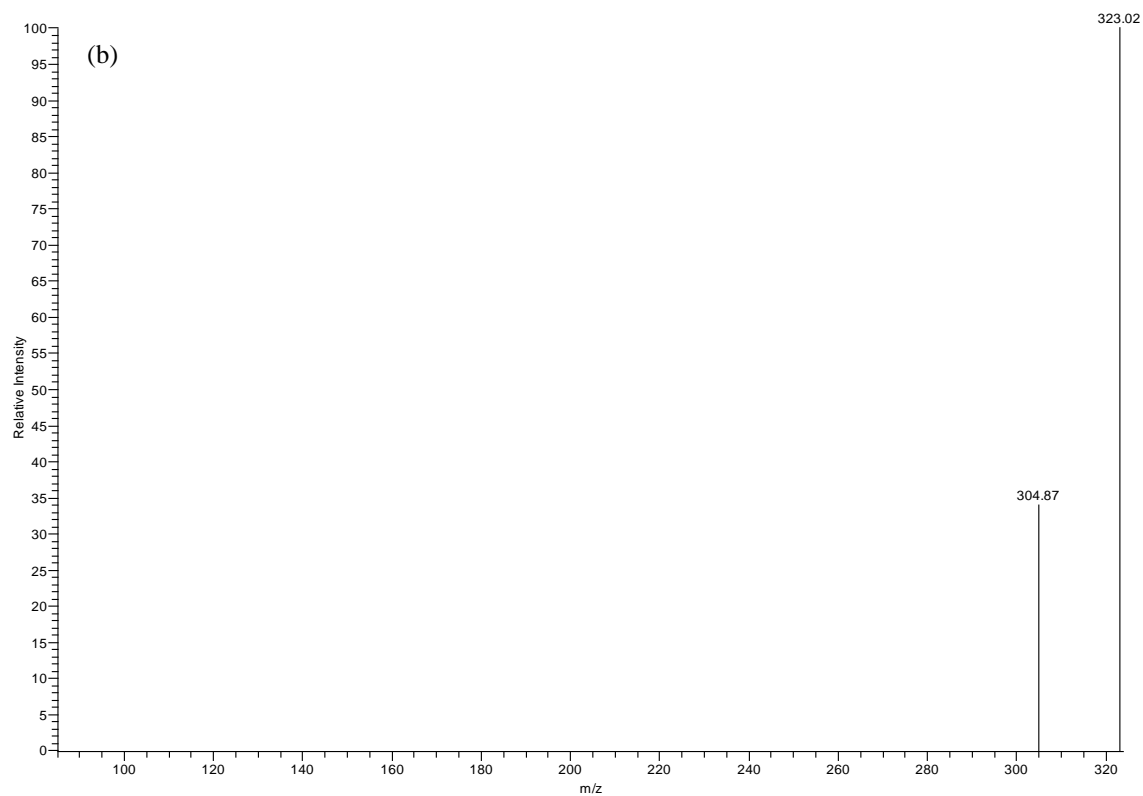
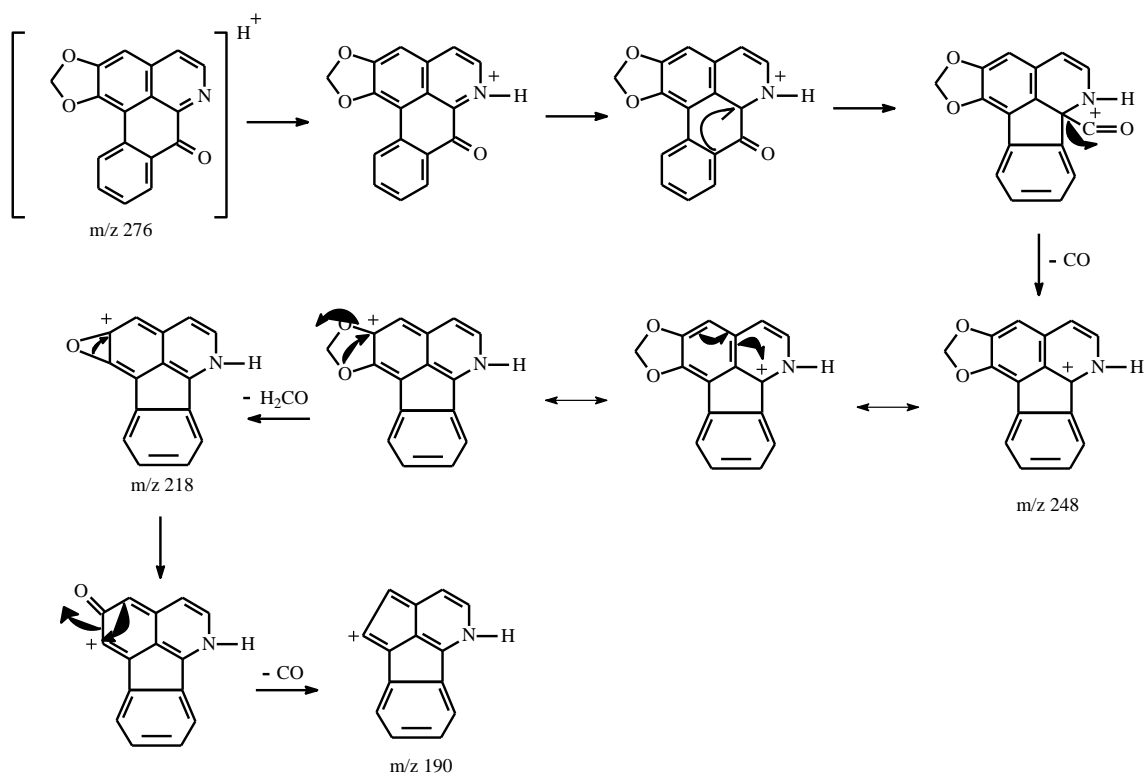
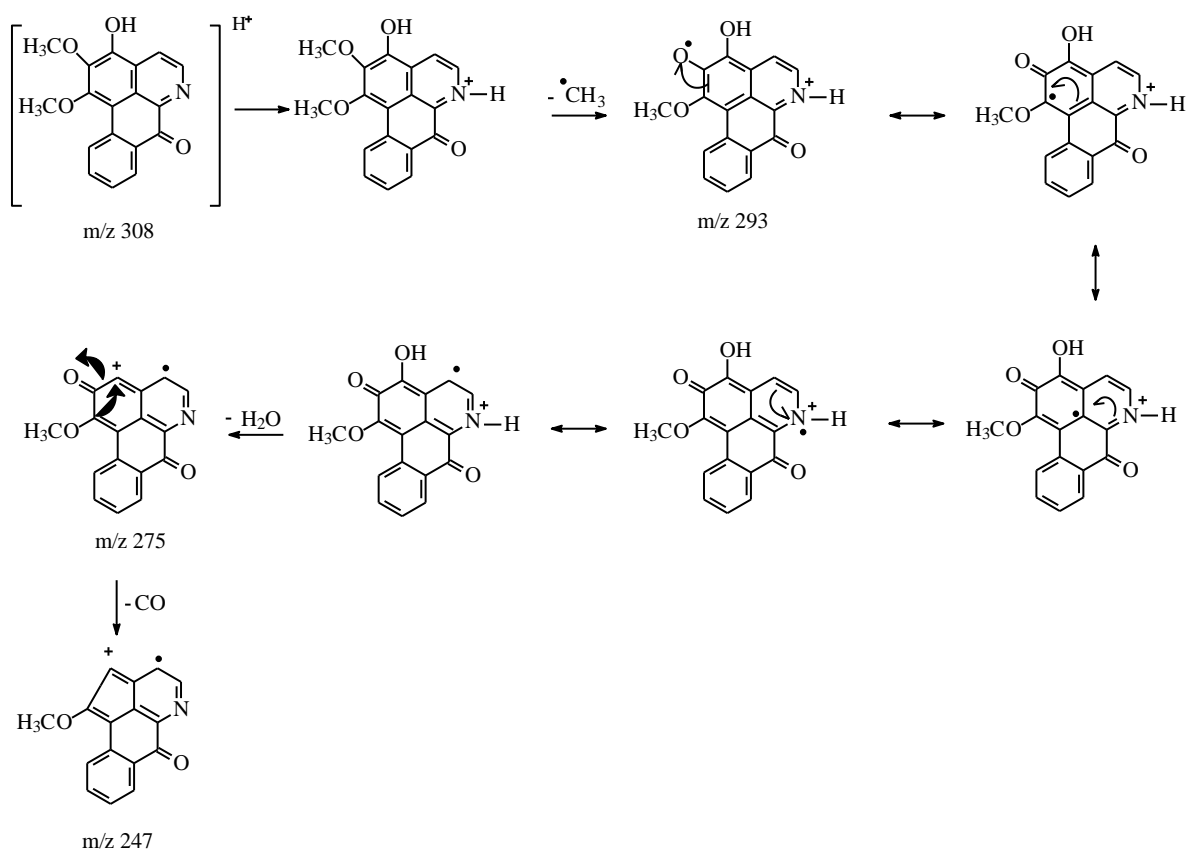


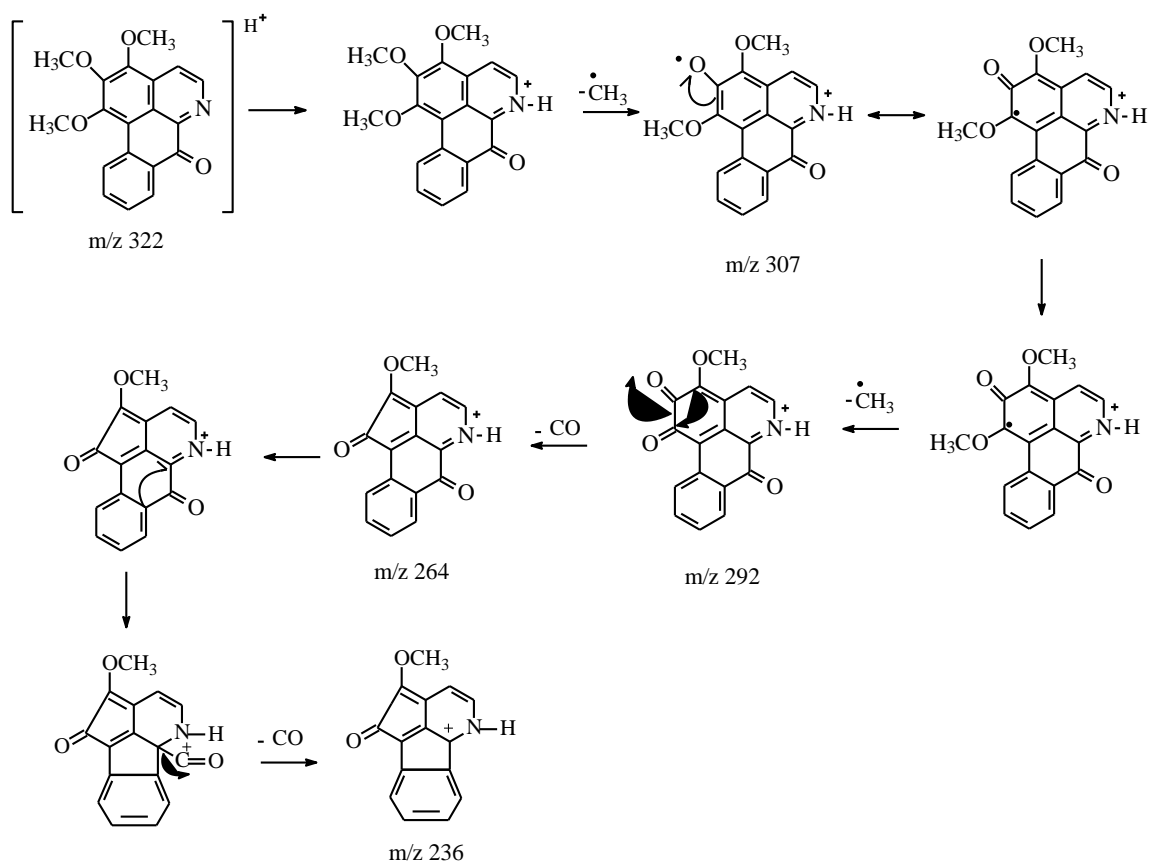
Figura 21. (b) Espectro de massas *full MS<sup>3</sup>* obtidos em modo positivo do padrão 9- metoxi- isoschatolina.



Esquema 6. Fragmentos mais importantes observados no padrão do alcalóide liriodenina.



Esquema 7. Fragmentos mais importantes observados no padrão do alcalóide isoschatoilina.



Esquema 8. Fragmentos mais importantes observados no padrão do alcalóide O- metilmoschatoilina

## 5.3 Identificação e determinação estrutural das substâncias isoladas

### 5.3.1 Identificação de FEA (F) (13-14/38-47)

O composto codificado como FEA (F) (13-14/38-47) foi isolado na forma de um resíduo amarelo, apresentando teste positivo para alcalóide frente ao reagente de Dragendorff.

Análise comparativa através de CCD, utilizando clorofórmio/metanol na proporção de 9:1 como eluente, com uma amostra padrão do alcalóide O- metilmoschatolina [55] pôde-se evidenciar a semelhança do composto isolado com o respectivo padrão (FIGURA 22).

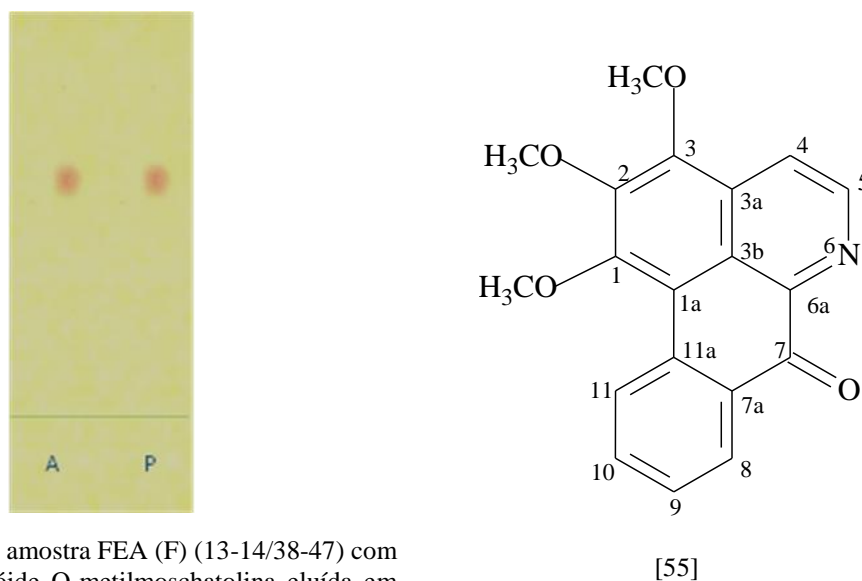


Figura 22. CCD da amostra FEA (F) (13-14/38-47) com o padrão do alcalóide O-metilmoschatolina eluída em  $\text{CHCl}_3/\text{MEOH}$  9:1.

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz do composto FEA (F) (13-14/38-47), em  $\text{CDCl}_3$ , mostrou a presença de quatro sinais relativos aos hidrogênios aromáticos em  $\delta$  9,11 (1H, *ddd*,  $J = 8,4, 1,1$  e  $0,6$  Hz, H-11),  $\delta$  7,75 (1H, *ddd*,  $J = 8,4, 7,0$  e  $1,6$  Hz, H-10),  $\delta$  7,54 (1H, *ddd*,  $J = 7,9, 7,2$  e  $1,1$  Hz, H-9) e  $\delta$  8,57 (1H, *dd*,  $J = 7,9$  e  $1,4$  Hz, H-8) o que caracteriza a presença do anel benzênico dissustituído do núcleo aporfínico. Os sinais em  $\delta$  8,24 (1H, *d*, H-4) e  $\delta$  9,00 (1H, *d*, H-5) com constante de acoplamento,  $J$ , igual a 5,3 Hz são

atribuídos aos hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  do anel piridínico. A presença dos sinais em  $\delta$  4,08, 4,11 e 4,20 são referentes às substituições dos hidrogênios em C-1, C-2 e C-3 por grupos metoxilas (FIGURAS 23 a 27).

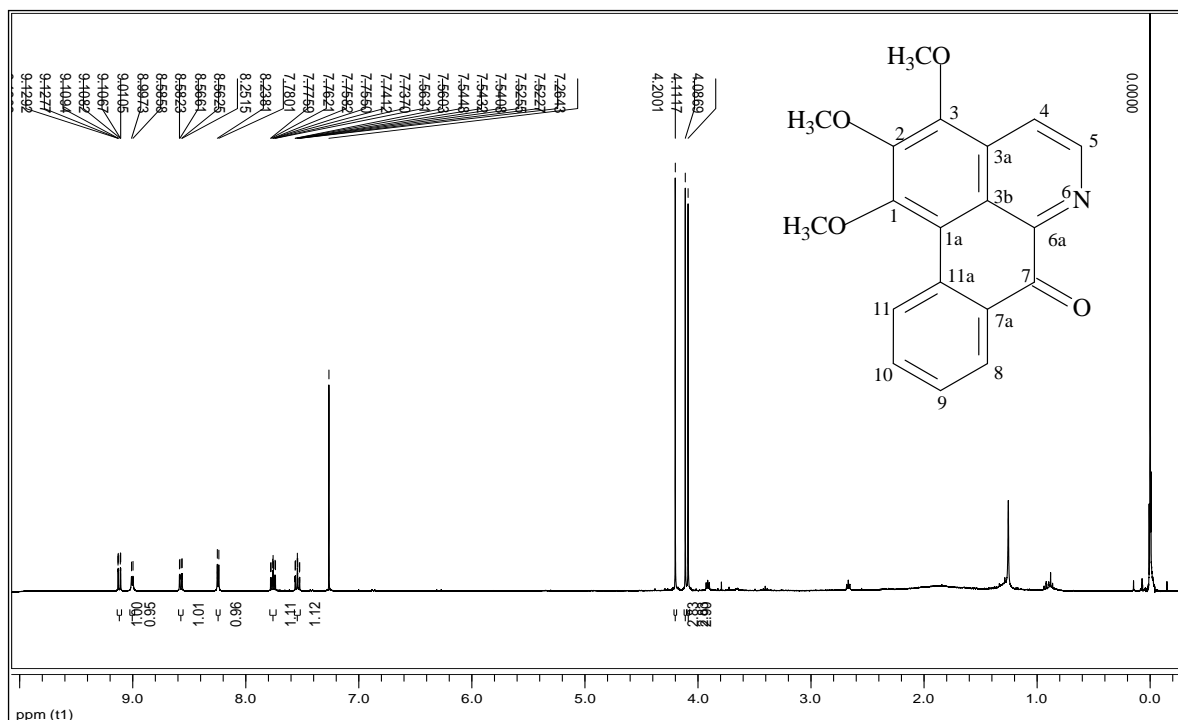


Figura 23. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (F) (13-14/38-47) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

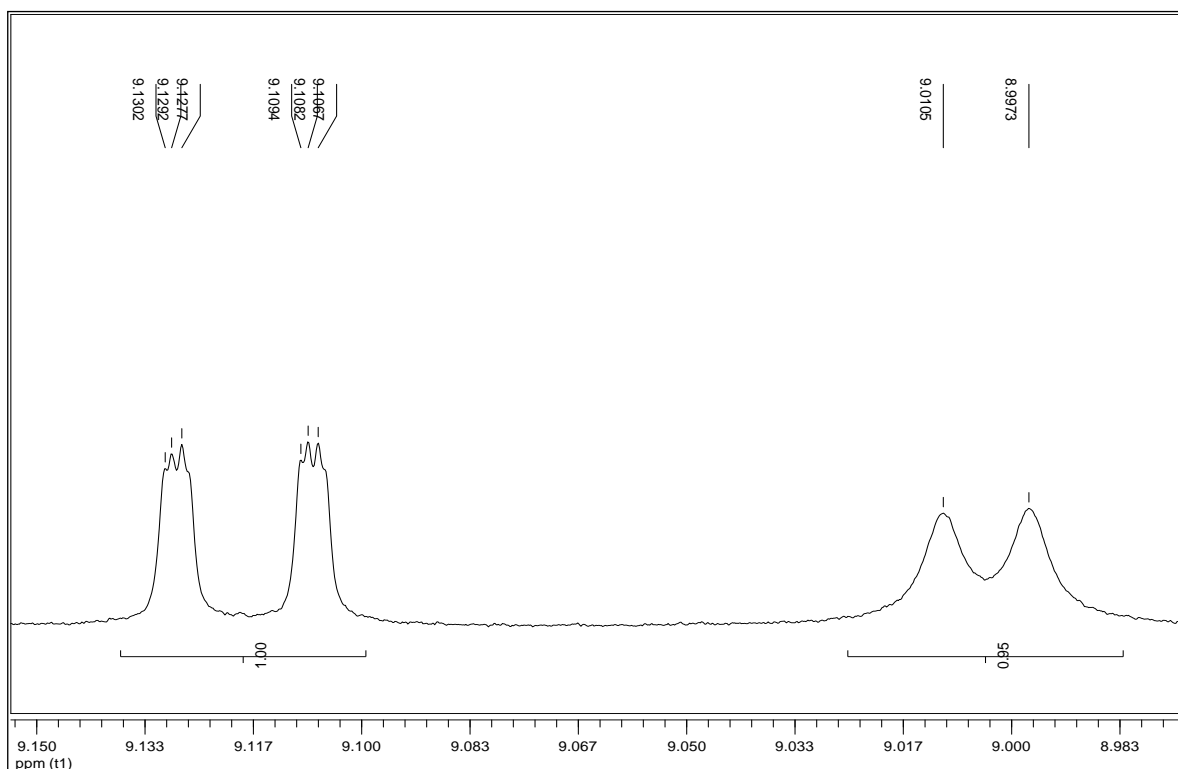


Figura 24. Ampliação da região entre  $\delta$  9,15 a 8,98 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (F) (13-14/38-47) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

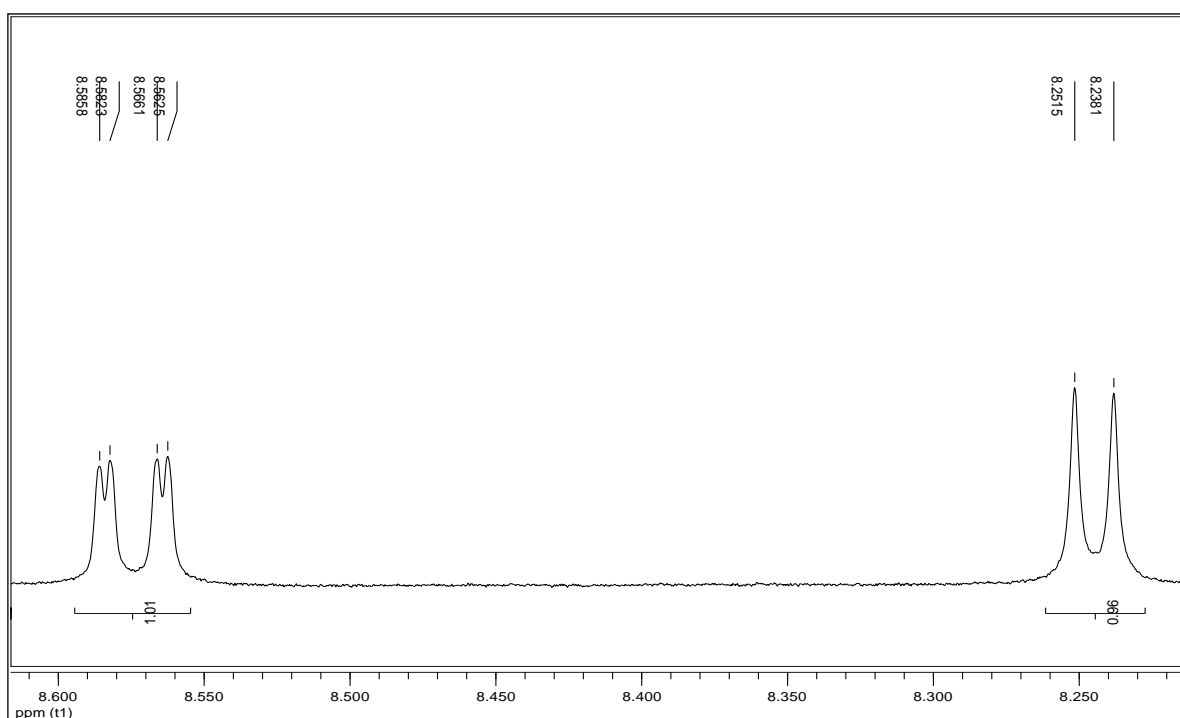


Figura 25. Ampliação da região entre  $\delta$  8,60 a 8,25 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (F) (13-14/38-47) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

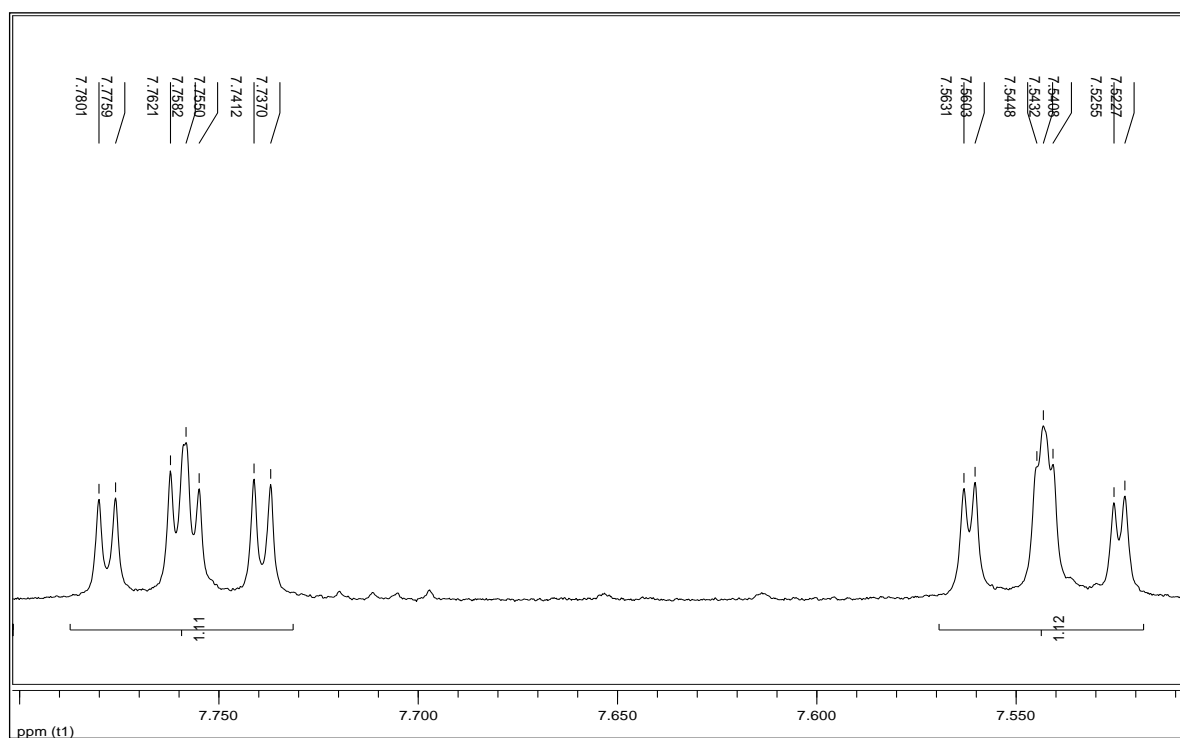


Figura 26. Ampliação da região entre  $\delta$  7,75 a 7,76 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (F) (13-14/38-47) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

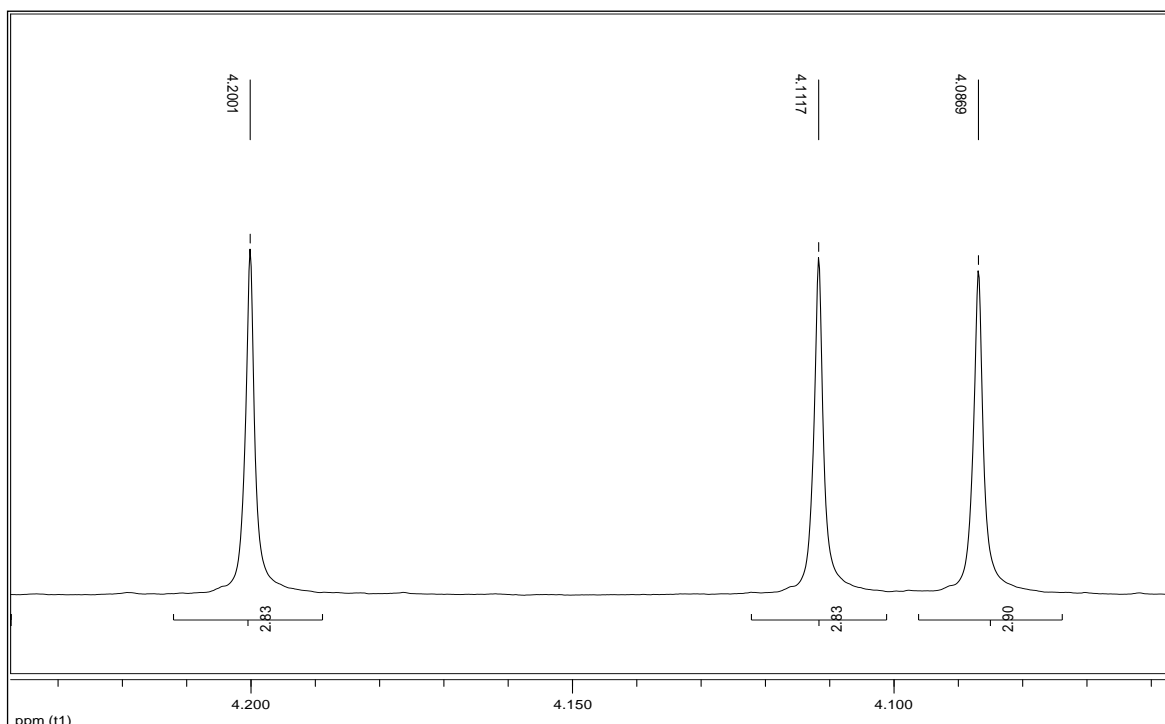


Figura 27. Ampliação da região entre  $\delta$  4,20 a 4,06 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (F) (13-14/38-47) ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) permitiu verificar a presença de 19 carbonos na molécula. A presença das três metoxilas foi confirmada pelos sinais em  $\delta$  61,01, 61,48 e 61,81 em acordo com a indicação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 27 e FIGURA 28). Foi verificada também a presença de linhas espectrais correspondentes a carbonos de grupos metínicos  $sp^2$  devido os sinais em  $\delta$  119,18 e 144,52 atribuídos aos carbonos do anel piridínico C-4 e C-5, respectivamente. Os sinais observados em  $\delta$  128,92, 128,16, 134,38 e 127,66 são referentes aos carbonos  $sp^2$  C-8, C-9, C-10 e C-11. A presença do grupo carbonila foi verificada através do sinal em  $\delta$  182,63. Foi possível verificar a presença dos carbonos quaternários pelos sinais em  $\delta$  156,49, 115,66, 147,35, 148,45, 131,10, 122,82, 145,47, 131,43 e 134,54 que foram determinados pelo o espectro HMQC e comparados com dados da literatura (FIGURA 29 e TABELA 6).

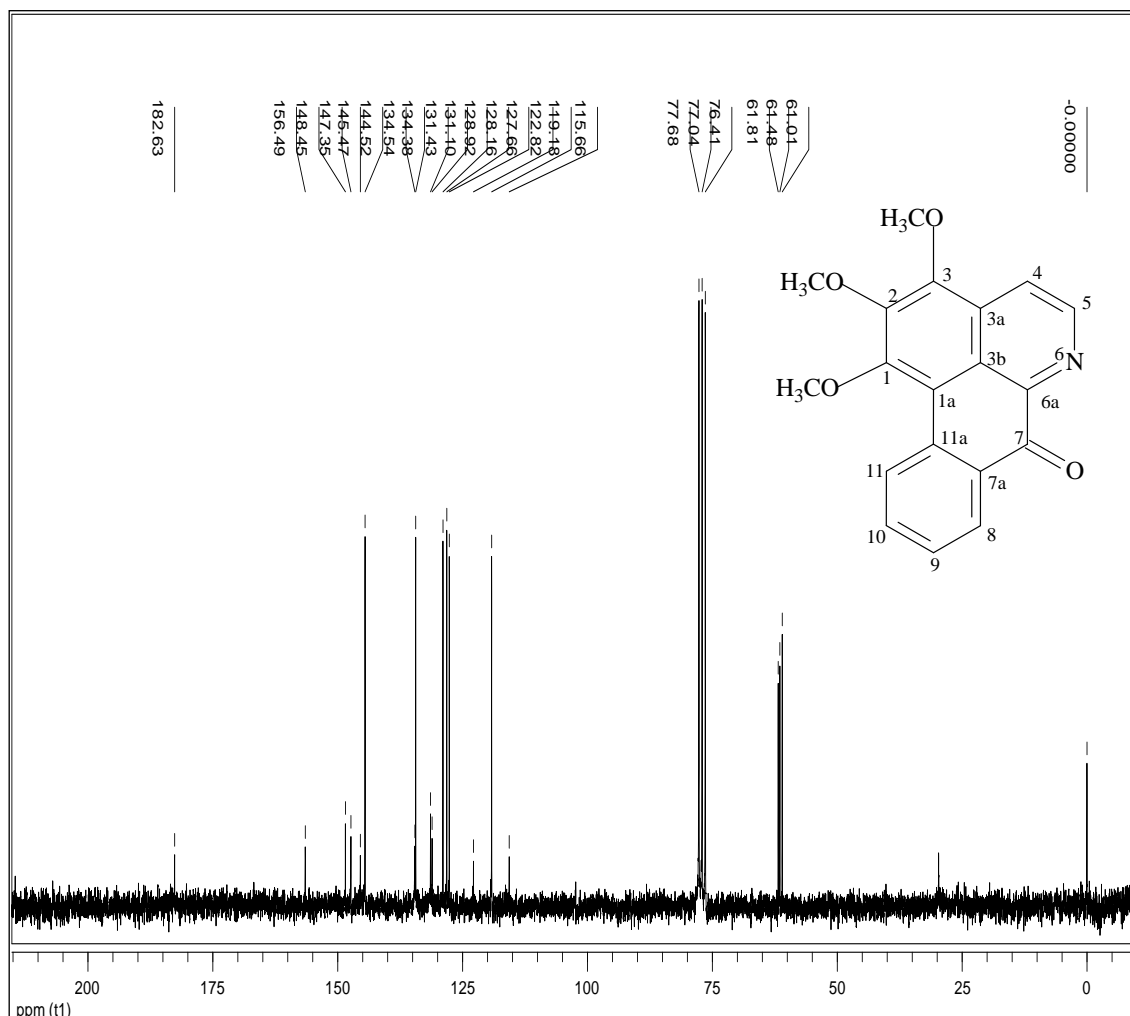


Figura 28. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz em  $\text{CDCl}_3$  de FEA (F) (13-14/38-47).

As correlações dos carbonos quaternários foram determinados por intermédio dos acoplamentos  $^nJ_{\text{C-H}}$  apresentados no mapa de correlação heteronuclear de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ - HMBC (FIGURA 30 e TABELA 6). No mapa de contorno HMBC foi observado que o sinal em  $\delta$  8,24 (1H, *d*), pertencente ao hidrogênio  $\alpha$  do anel piridínico, estava correlacionado com o sinal em  $\delta$  148,45 relativo ao carbono C-3 portador do grupo metoxílico e os sinais em  $\delta$  122,82 e 144,52. Do mesmo modo foram observadas as correlações dos sinais em  $\delta$  9,00 (1H, *d*), relativo ao hidrogênio  $\beta$  do anel piridínico com os sinais em  $\delta$  119,18, 131,10 e 145,47 referentes aos respectivos carbonos C-4, C-3a e C-6a (FIGURA 29).

Pelo mapa de contorno HBMC pôde-se verificar a presença do grupo carbonílico na molécula devido à correlação do sinal em  $\delta$  8,57 (1H, *dd*) atribuído ao H-8 com o sinal em  $\delta$  182,63 (C-7) (FIGURA 29).

Os grupos metoxílicos substituído em C-1 e C-2 foram observados no mapa de contorno de HSQC com a correlação dos sinais em  $\delta$  4,08 e 4,11 com os sinais dos carbonos em  $\delta$  61,01 (C-1) e 61,48 (C-2), respectivamente (FIGURA 28, FIGURA 29 e TABELA 6).

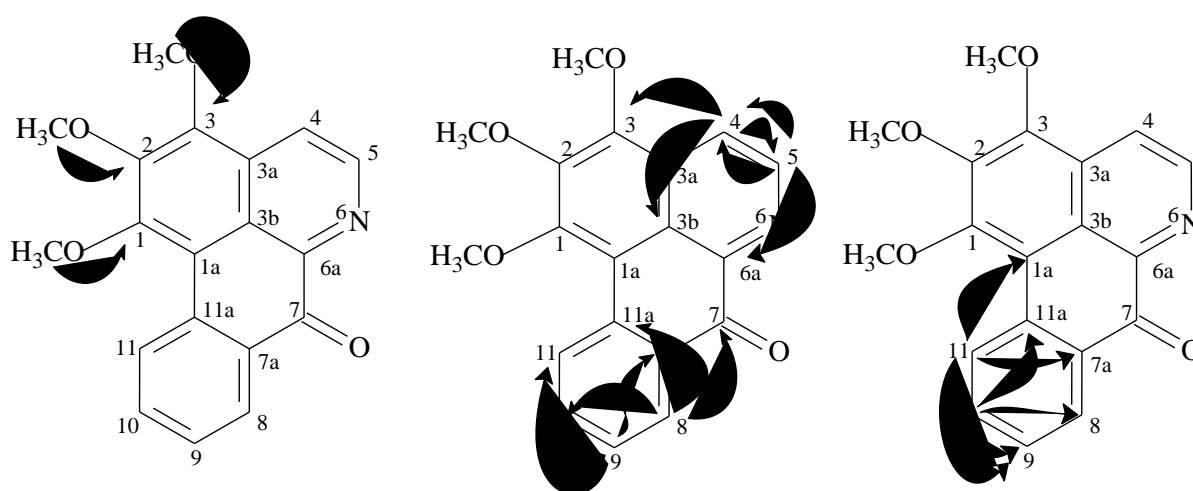


Figura 29. Correlações observadas no mapa de contorno HMBC de FEA (F) (13-14/38-47).



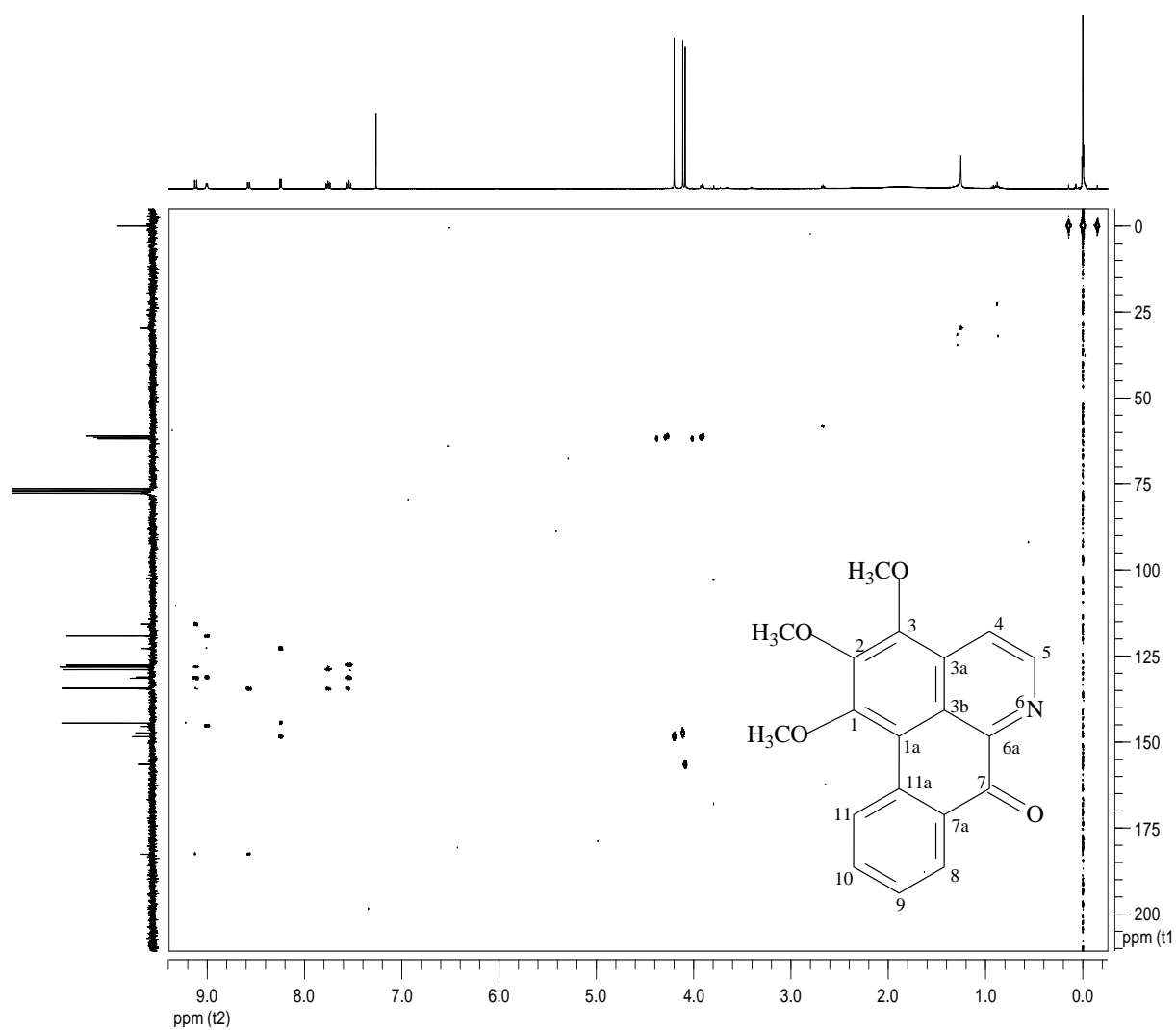


Figura 30. Mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CDCl<sub>3</sub> de FEA (F) (13-14/38-47).

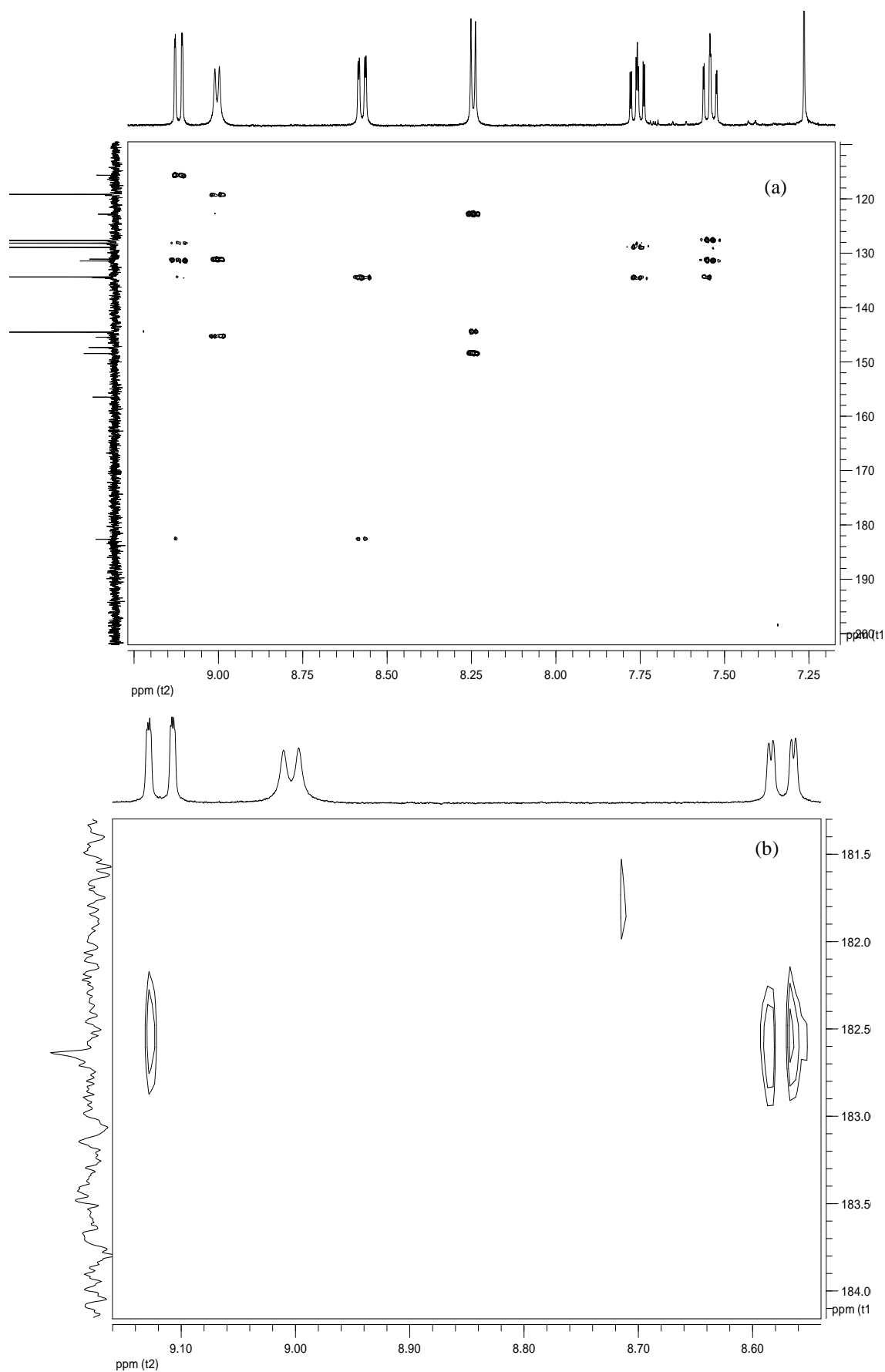


Figura 31. (a e b) Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em  $\text{CDCl}_3$  de FEA (F) (13-14/38-47).

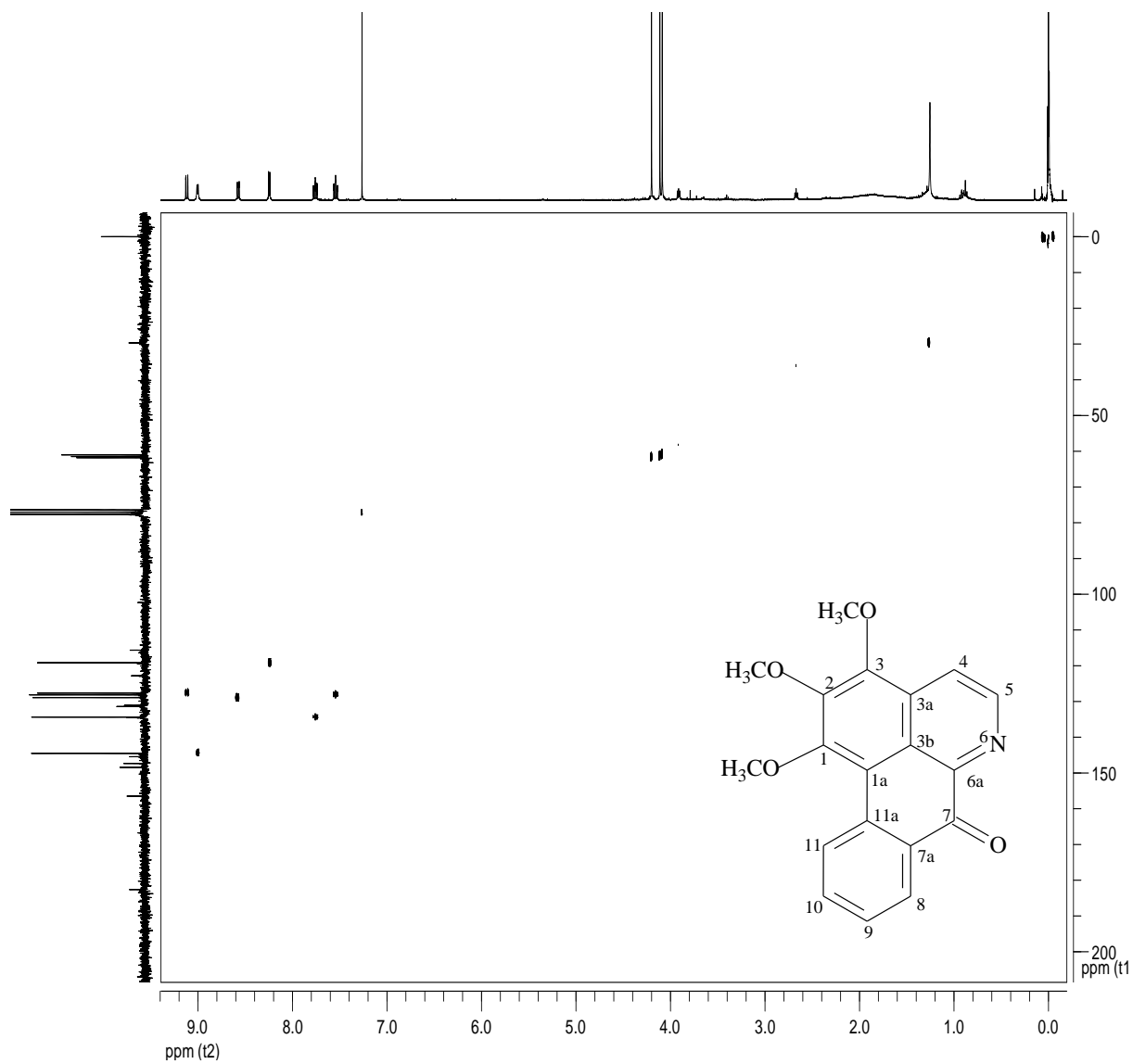


Figura 32. Mapa de contorno HSQC a 400 MHz em CDCl<sub>3</sub> de FEA (F) (13-14/38-47).

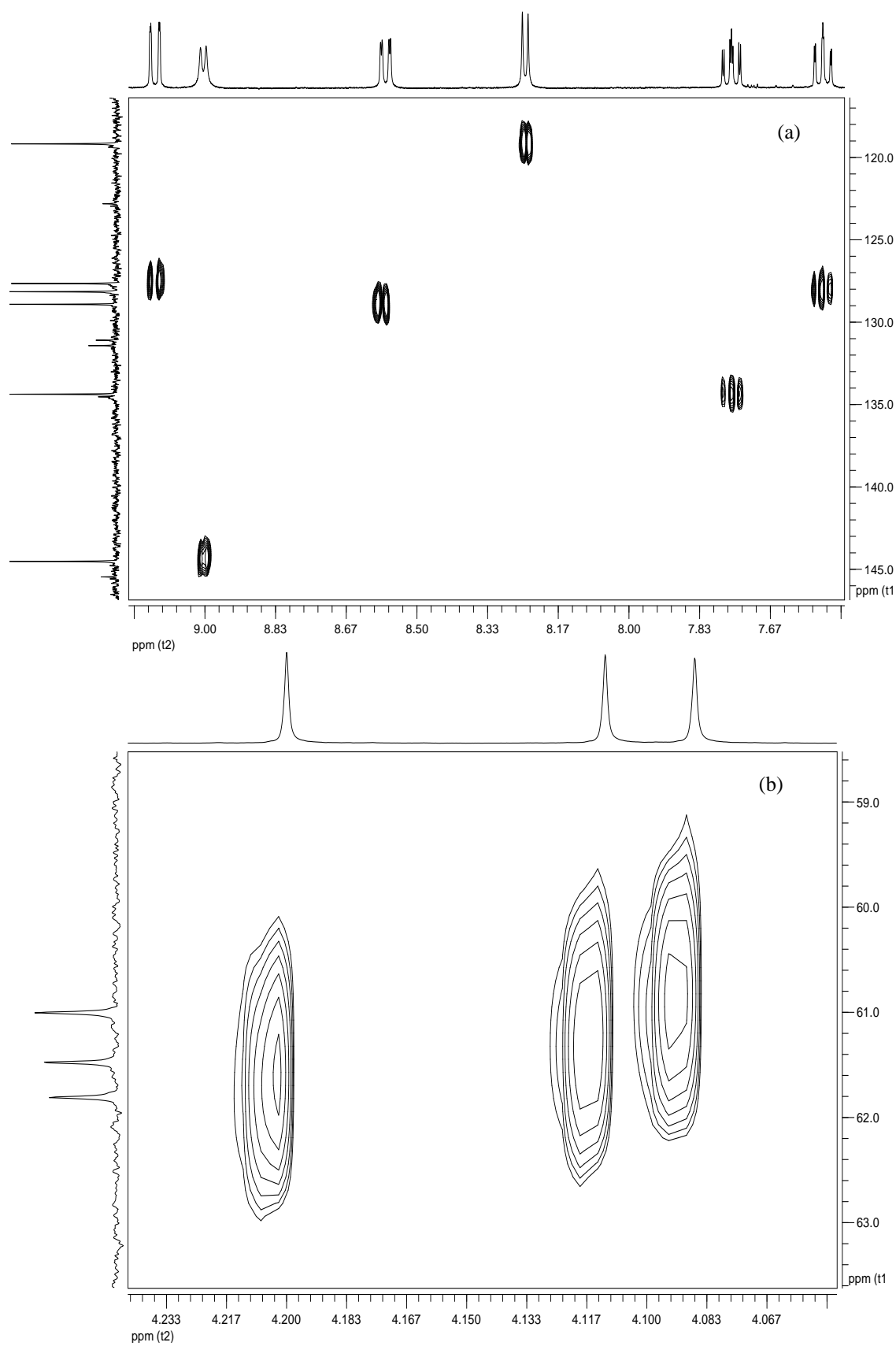


Figura 33. (a e b) Ampliação do mapa de contorno HSQC a 400 MHz em  $\text{CDCl}_3$  de FEA (F) (13-14/38-47).

Comparando os dados obtidos de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  RMN de 1D e 2D com os da literatura verificou-se que FEA (F) (13-14/38-47) trata-se do alcalóide oxoaporfínico O-metilmoschatolina (FIGURA 34), substância isolada das espécies *A. ambotay* (BRAVO et al., 2002), *A. foetida* (COSTA, 2004), *Oxandra longipetala* (ORTIZ et al., 2007), *Rollinia pittieri* (TORRES et al., 2007) e *G. blepharophylla* (COSTA, 2009).

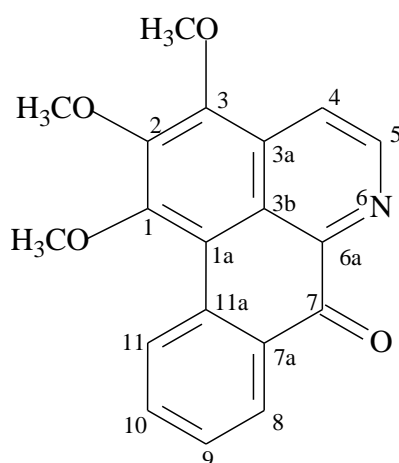


Figura 34. Estrutura do alcalóide O-metilmoschatolina.

Posição	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) <sup>a,b</sup>	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) <sup>c</sup>	$^1\text{H}$ ( $\delta$ ) (mult., <i>J</i> em Hz) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ ( $\delta$ ) (mult., <i>J</i> em Hz) <sup>d</sup>
1	156,49	156,4		
1a	115,66	115,8		
2	147,35	147,2		
3	148,45	148,4		
3a	131,10	130,8		
3b	122,82	122,8		
4	119,18	119,1	8,24 (1H, <i>d</i> , 5,3)	8,22 (1H, <i>d</i> , 5,3)
5	144,52	144,6	9,00 (1H, <i>d</i> , 5,3)	8,97 (1H, <i>d</i> , 5,3)
6a	145,47	145,6		
7	182,63	182,6		
7a	131,43	131,1		
8	128,92	129,0	8,57 (1H, <i>dd</i> , 7,9 e 1,4)	8,58 (1H, <i>dd</i> , 7,8 e 1,4)
9	128,16	128,2	7,54 (1H, <i>ddd</i> , 7,9, 7,2 e 1,1)	7,55 (1H, <i>ddd</i> , 7,8, 7,1 e 1,0)
10	134,38	134,3	9,11 (1H, <i>ddd</i> , 8,4, 1,1 e 0,6)	7,76 (1H, <i>ddd</i> , 7,8, 7,1 e 1,4)
11	127,66	127,5	9,11 (1H, <i>ddd</i> , 8,4, 1,1 e 0,6)	9,11 (1H, <i>d</i> , 8,3)
11a	134,54	131,5		
1-OCH <sub>3</sub>	61,01	61,0	4,08 ( <i>s</i> )	4,8 ( <i>s</i> )
2-OCH <sub>3</sub>	61,48	61,4	4,11 ( <i>s</i> )	4,10 ( <i>s</i> )
3-OCH <sub>3</sub>	61,81	61,7	4,20 ( <i>s</i> )	4,18 ( <i>s</i> )

Tabela 6. Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de FEA (F) (13-14/38-47) com a literatura.

<sup>a</sup> Experimento realizado a 400 MHz para  $^1\text{H}$  e 100 MHz para  $^{13}\text{C}$  em  $\text{CDCl}_3$ , utilizando o TMS como referência interna. <sup>b</sup> Multiplicidades determinadas pelos espectros de  $^{13}\text{C}$  e HSQC. <sup>c</sup> Dados da literatura de acordo com ORTIZ et al., 2007. <sup>d</sup> Dados da literatura de acordo com TORRES et al., 2007.

### 5.3.2 Identificação de FEA (GF) 14

O composto FEA (GF) 14 caracterizou-se como um resíduo amarelo e teste positivo para alcalóide frente ao reagente de Dragendorff. A substância foi submetida à CCD em clorofórmio/metanol, na proporção de 9:1, com o padrão do alcalóide liriodenina [1], observando-se que a amostra analisada apresentava o mesmo  $R_f$  do padrão (FIGURA 35).

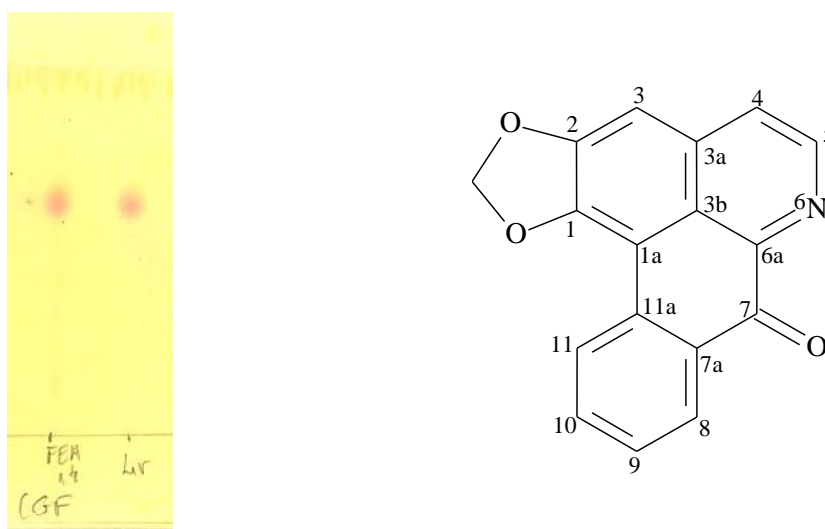


Figura 35. CCD da amostra FEA (GF) 14 com o padrão do alcalóide liriodenina eluída em  $\text{CHCl}_3/\text{MEOH}$  9:1.

[1]

Pela análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz do composto FEA (GF) 14, em  $\text{CDCl}_3$ , puderam ser evidenciados sinais de hidrogênios em sistema aromático em  $\delta$  8,61 (1H, *ddd*,  $J = 8,1, 1,0$  e  $0,5$  Hz, H-11),  $\delta$  7,73 (1H, *ddd*,  $J = 8,1, 7,4$  e  $1,4$  Hz, H-10),  $\delta$  7,56 (1H, *ddd*,  $J = 7,9, 7,4$  e  $1,0$  Hz, H-9) e  $\delta$  8,57 (1H, *ddd*,  $J = 7,9, 1,4$  e  $0,5$  Hz, H-8) e um hidrogênio aromático em  $\delta$  7,16 (1H, *s*, H-3) o que caracterizou a presença do anel benzênico dissubstituído do núcleo aporfínico e do anel pentassubstituído portador do grupo metilenodioxí. O grupo metilenodioxí pode ser comprovado pela presença do sinal em  $\delta$  6,37 (2H, *s*) referentes às substituições dos hidrogênios em C-1 e C-2 do anel aromático. Os

sinais em  $\delta$  7,75 e 8,87 (1H, *d* e  $J = 5,1$  Hz) são correspondentes aos hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  do anel piridínico em H-4 e H-5 respectivamente (FIGURAS 36 a 40)

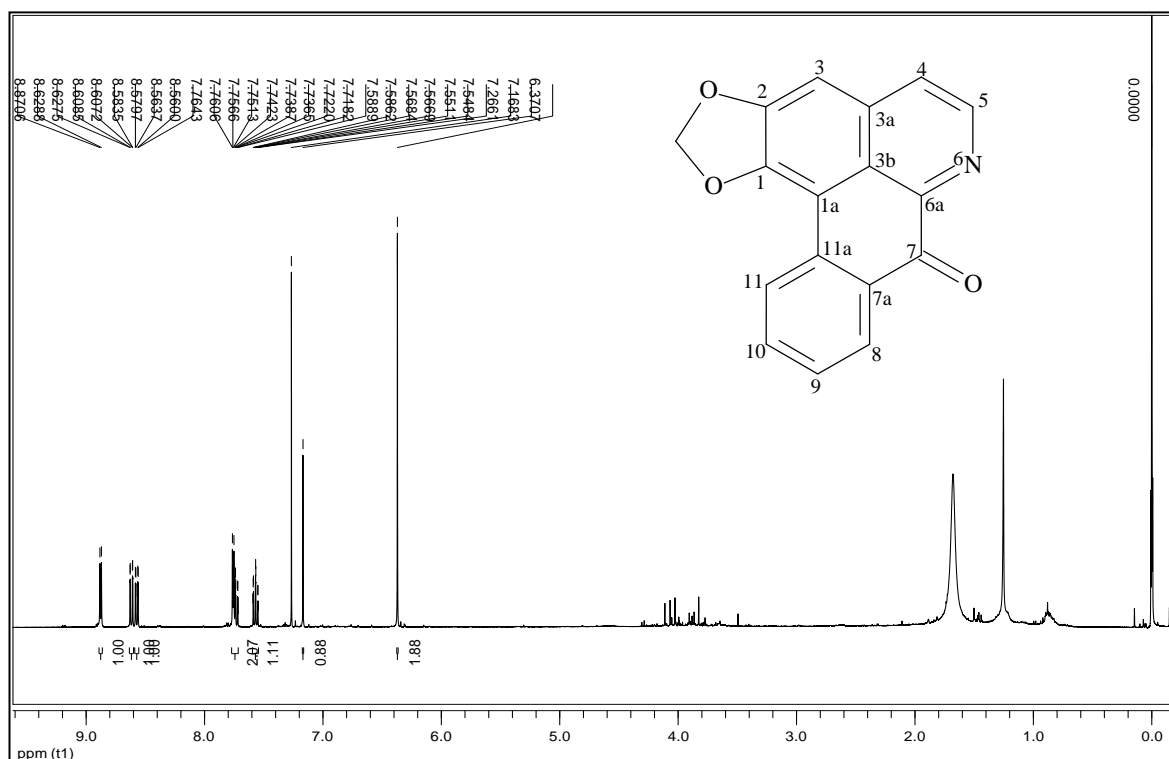


Figura 36. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

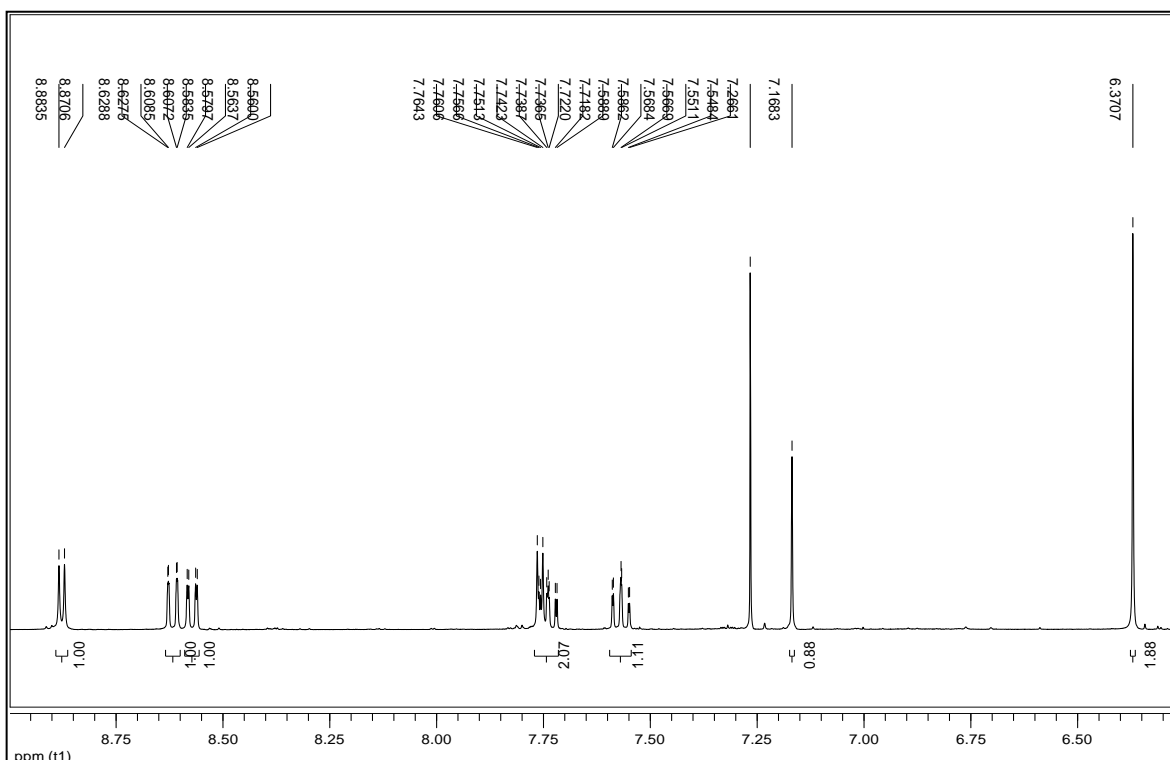


Figura 37. Ampliação da região entre  $\delta$  8,80 a 6,45 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).



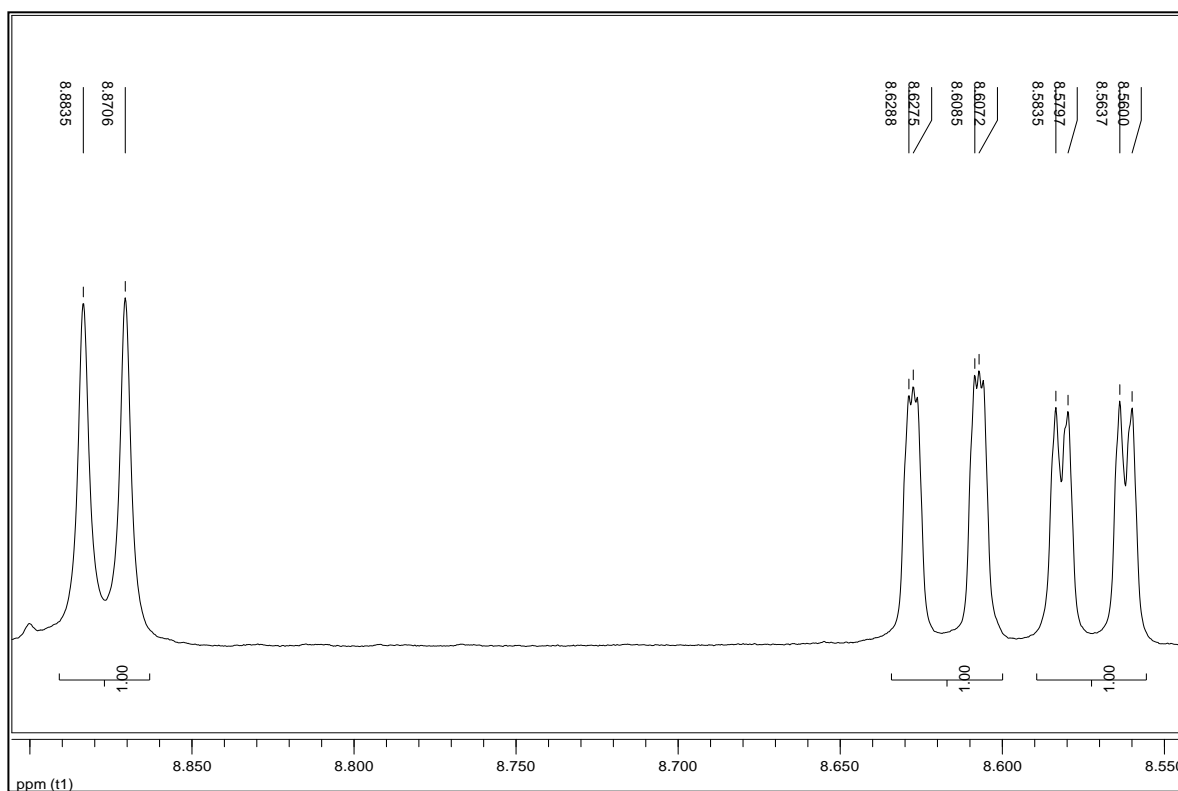


Figura 38. Ampliação da região entre  $\delta$  8,90 a 8,55 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

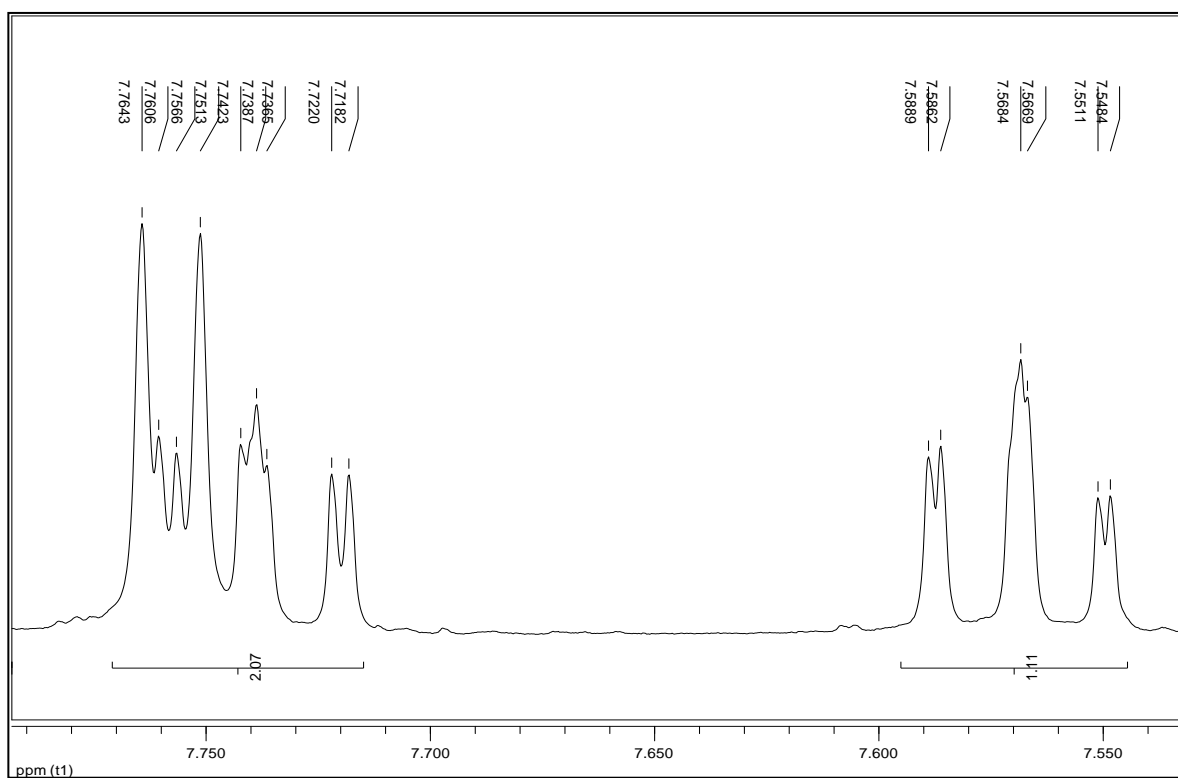


Figura 39. Ampliação dos sinais entre  $\delta$  7,80 e 7,55 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

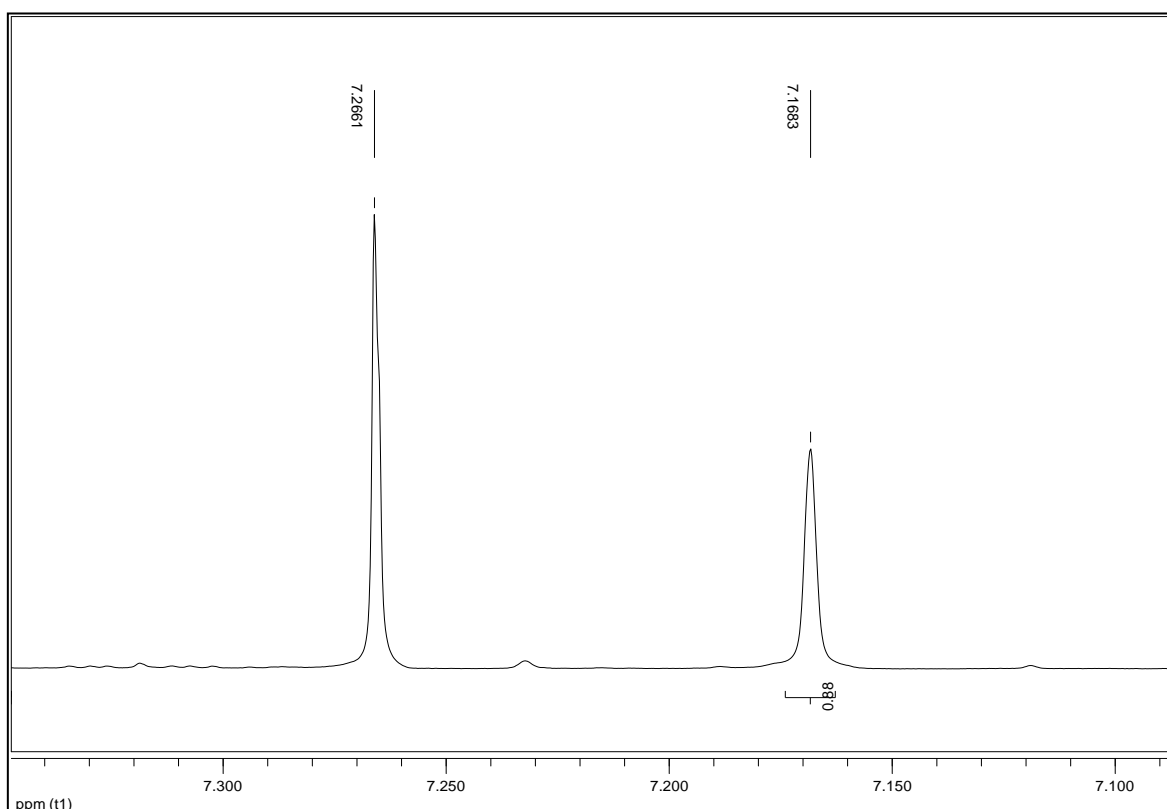


Figura 40. Ampliação dos sinais entre  $\delta$  7,30 e 7,10 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (GF) 14 ( $\text{CDCl}_3$ , 400 MHz).

Os dados obtidos para os átomos de carbonos que mostravam correlação com os respectivos hidrogênios no mapa de contorno de HMBC foram comparados com os da literatura para o composto liriodenina (COSTA et al., 2009).

Pelo mapa de contorno HMBC a 400 MHz em  $\text{CDCl}_3$  (FIGURA 42) foi possível ratificar a presença do grupo metilenodioxí pelas correlações dos sinais em  $\delta$  6,37 (2H, s), relativo aos hidrogênios metilênicos, com os sinais em  $\delta$  147,9 (C-1) e 151,9 (C-2) (FIGURA 41 e FIGURA 43b). Pode-se ainda verificar que o sinal em  $\delta$  7,16 (1H, s), referente ao H-3, está correlacionados tanto com os sinais dos carbonos metínicos C-1 e C-2 quanto com os sinais em  $\delta$  108,1, 123,1 e 124,3 atribuídos respectivamente a C-1a, C-3b e C-4. Foram observados acoplamentos entre o hidrogênio  $\beta$  do anel piridínico  $\delta$  8,87 (1H, d) com os sinais em  $\delta$  123,1 (C-3b), 124,3 (C-4), 135,7 (C-3a) e 145,3 (C-6a) (FIGURA 41 e

FIGURA 44c). Na Tabela 7 estão reunidas todas as correlações dos respectivos sinais  $\delta$  8,57 (H-8),  $\delta$  7,56 (H-9),  $\delta$  7,73 (H-10) e  $\delta$  8,61 (H-11).

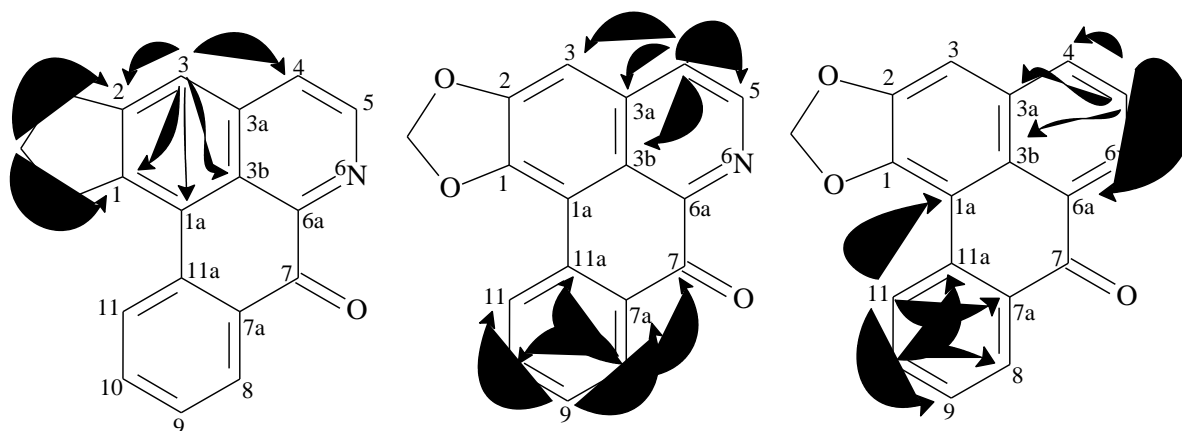


Figura 41. Correlações observadas no mapa de contorno HMBC de FEA (GF) 14.

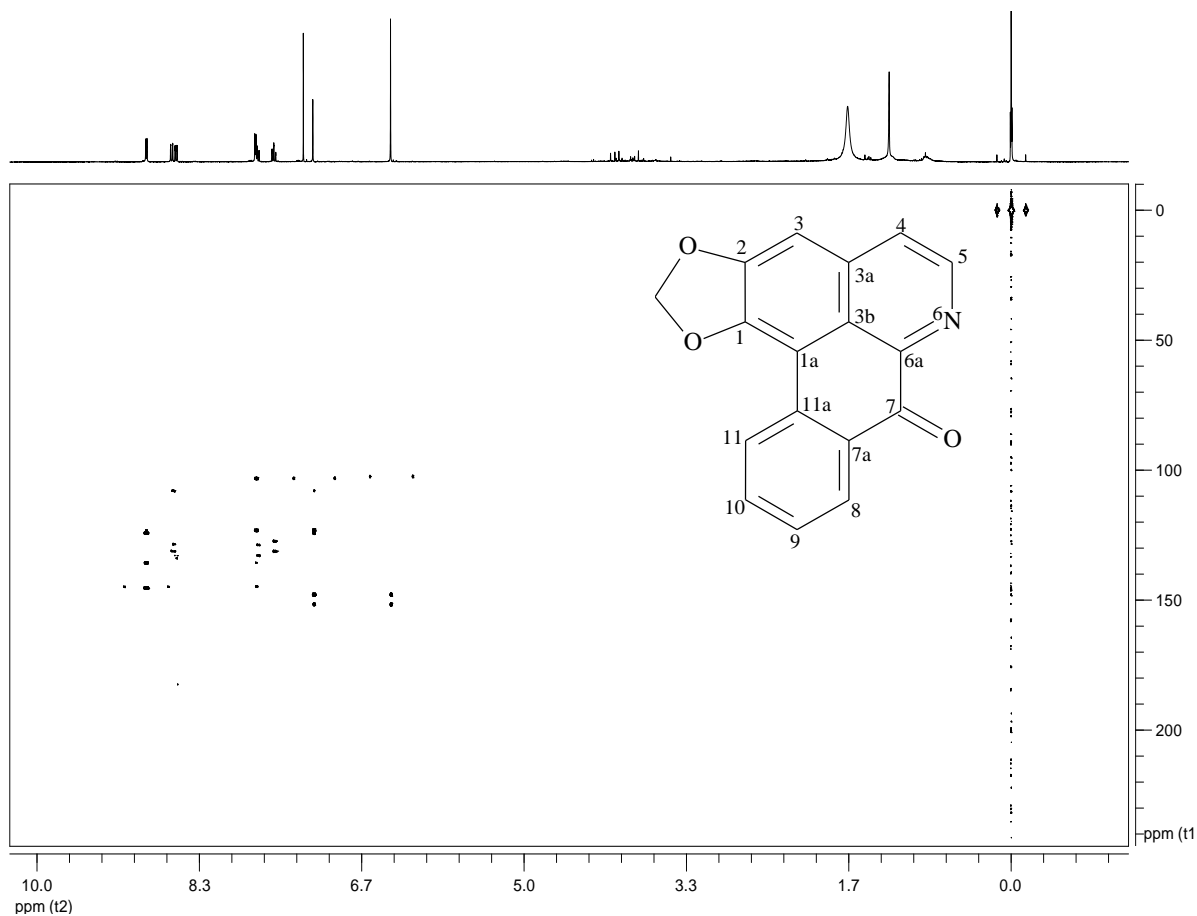


Figura 42. Mapa de contorno HMBC a 400 MHz em  $\text{CDCl}_3$  de FEA (GF) 14.

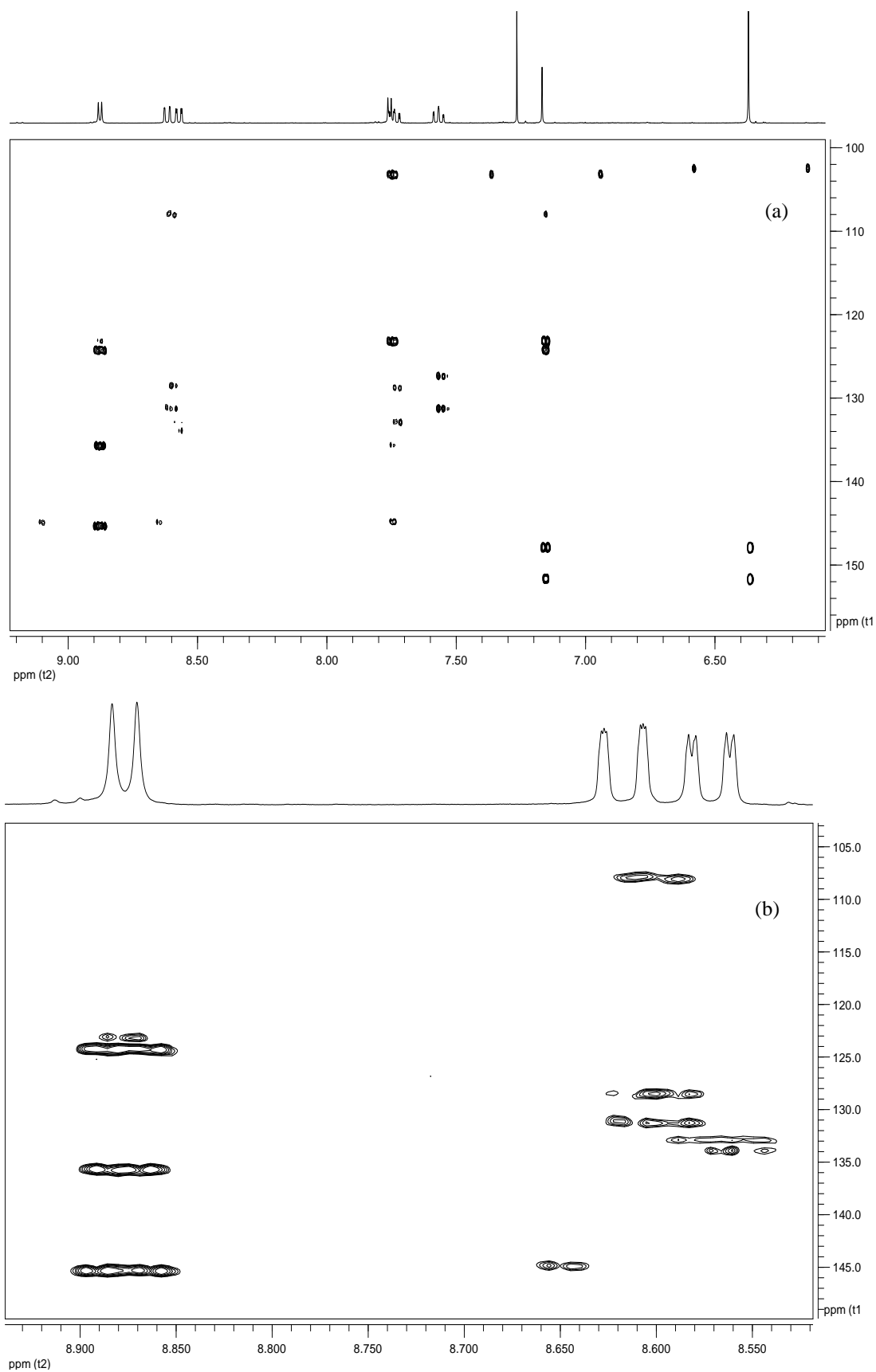


Figura 43. (a e b) Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em  $\text{CDCl}_3$  de FEA (GF) 14.

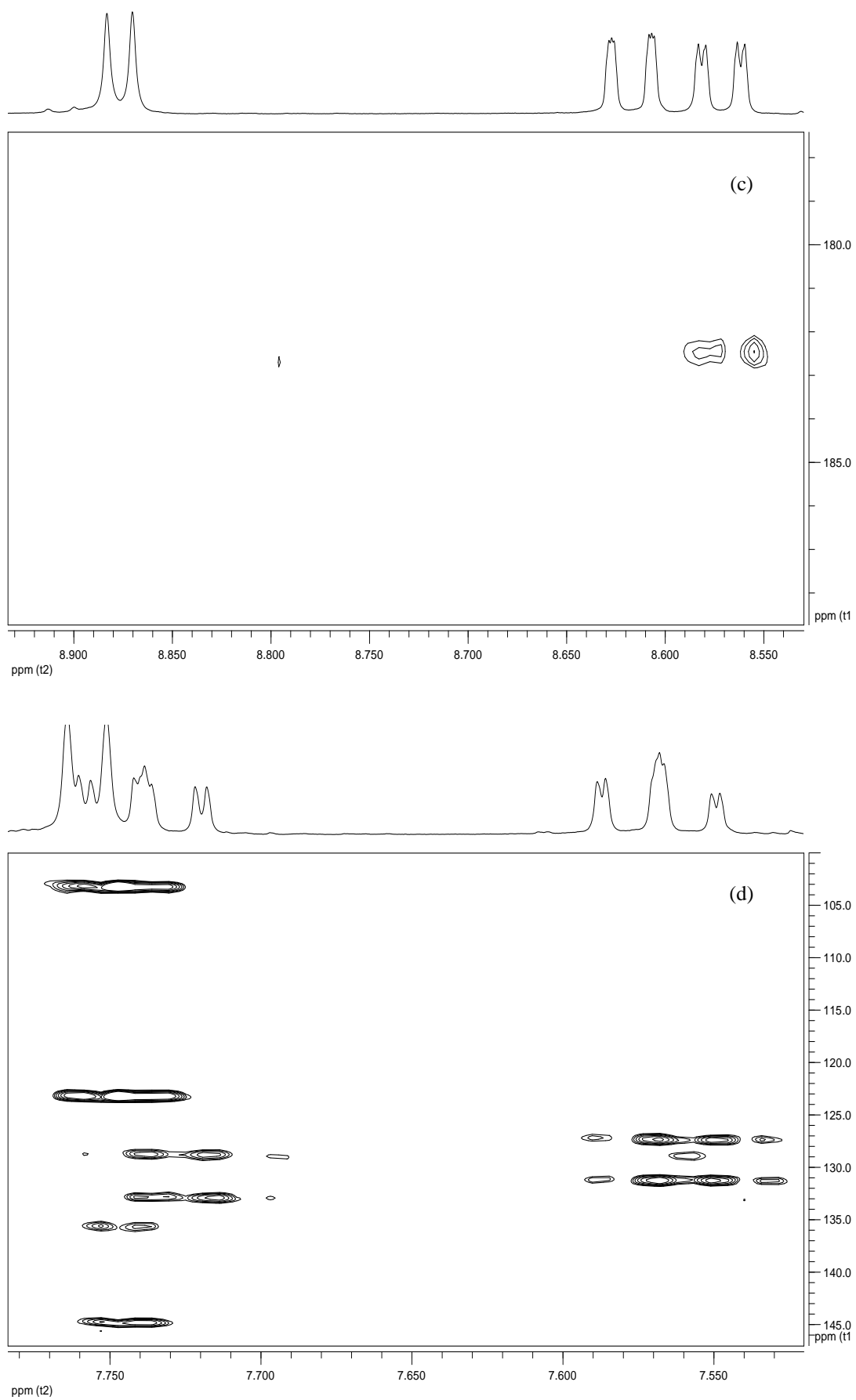


Figura 44. (c e d) Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em  $\text{CDCl}_3$  de FEA (GF) 14.

A partir dos dados obtidos dos espectros de RMN  $^1\text{H}$  de 1D e 2D comparados com os da literatura (ORTIZ et al., 2007; COSTA et al., 2009) (TABELA 7) foi possível identificar o composto FEA (GF) 14 como sendo o alcalóide oxoaporfínico lirioidenina (FIGURA 45). Como mencionado anteriormente, esta substância é amplamente encontrada na família Annonaceae.

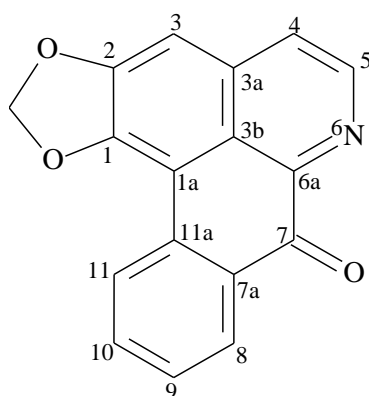


Figura 45. Estrutura do alcalóide lirioidenina.

Posição	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) <sup>b</sup>	$^1\text{H}$ ( $\delta$ ) (mult., <i>J</i> em Hz) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ ( $\delta$ ) (mult., <i>J</i> em Hz) <sup>c</sup>
1	147,9		
1a	107,9		
2	151,6		
3	103,2	7,16 (1H, <i>s</i> )	7,15 (1H, <i>s</i> )
3a	135,7		
3b	123,1		
4	124,3	7,75 (1H, <i>d</i> , 5,1)	7,74 (1H, <i>d</i> , 5,0)
5	144,7	8,87 (1H, <i>d</i> , 5,1)	8,88 (1H, <i>d</i> , 5,1)
6a	145,3		
7	182,5		
7a	131,2		
8	128,8	8,57 (1H, <i>ddd</i> , 7,9, 1,4 e 0,5)	8,56 (1H, <i>dd</i> , 7,9 e 0,7)
9	128,5	7,56 (1H, <i>ddd</i> , 7,9, 7,4 e 1,0)	7,55 (1H, <i>dd</i> , 7,7 e 7,4)
10	133,8	7,73 (1H, <i>ddd</i> , 8,1, 7,4 e 1,4)	7,71 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 1,2)
11	127,3	8,61 (1H, <i>ddd</i> , 8,1, 1,0 e 0,5)	8,59 (1H, <i>d</i> , 8,1)
11a	132,8		
OCH <sub>2</sub> O	102,4	6,37 (2H, <i>s</i> )	6,36 (2H, <i>s</i> )

Tabela 7. Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (GF) 14 com a literatura.

<sup>a</sup> Experimento realizado a 400 MHz para  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ , utilizando o TMS como referência interna. <sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com COSTA et al., 2009. <sup>c</sup> Dados da literatura de acordo com ORTIZ et al., 2007.

### 5.3.3 Identificação de FEA (GF) 21

O composto FEA (GF) 21 (30,5 mg) foi isolado como um sólido azul com teste positivo para alcalóide frente ao reagente de Dragendorff. O espectro de RMN  $^1\text{H}$  a 400 MHz desse composto, em  $\text{CD}_3\text{OD}$ , apresentou sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  9,08





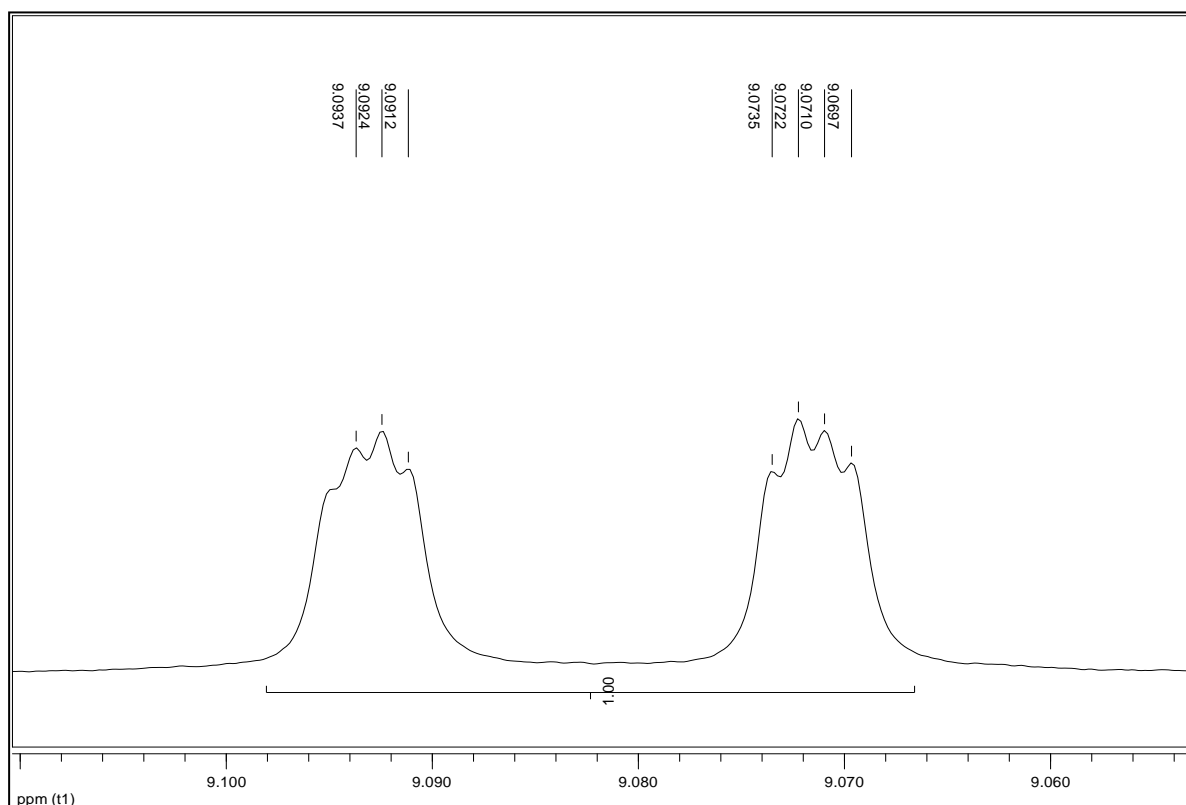


Figura 47. Ampliação da região entre  $\delta$  9,10 a 9,06 do espectro de RMN <sup>1</sup>H de FEA (GF) 21 (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

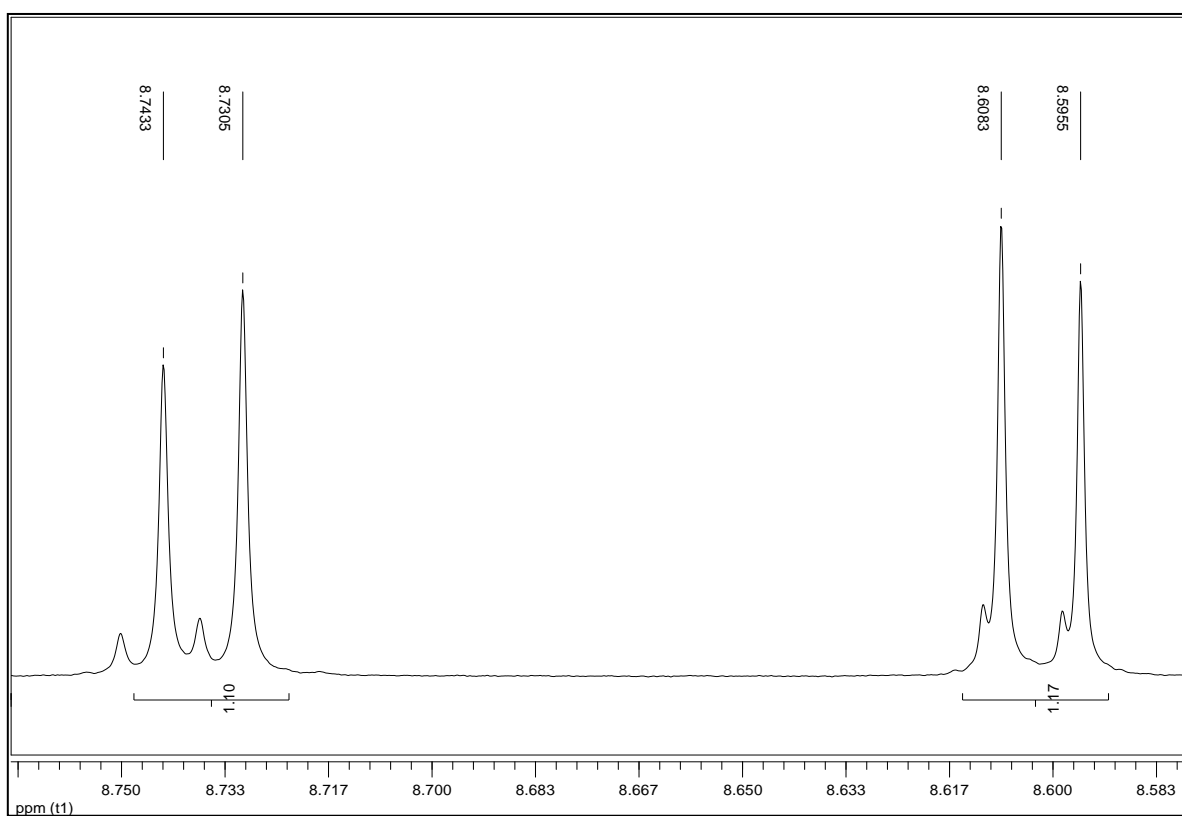


Figura 48. Ampliação da região entre  $\delta$  8,75 a 8,58 do espectro de RMN <sup>1</sup>H de FEA (GF) 21 (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

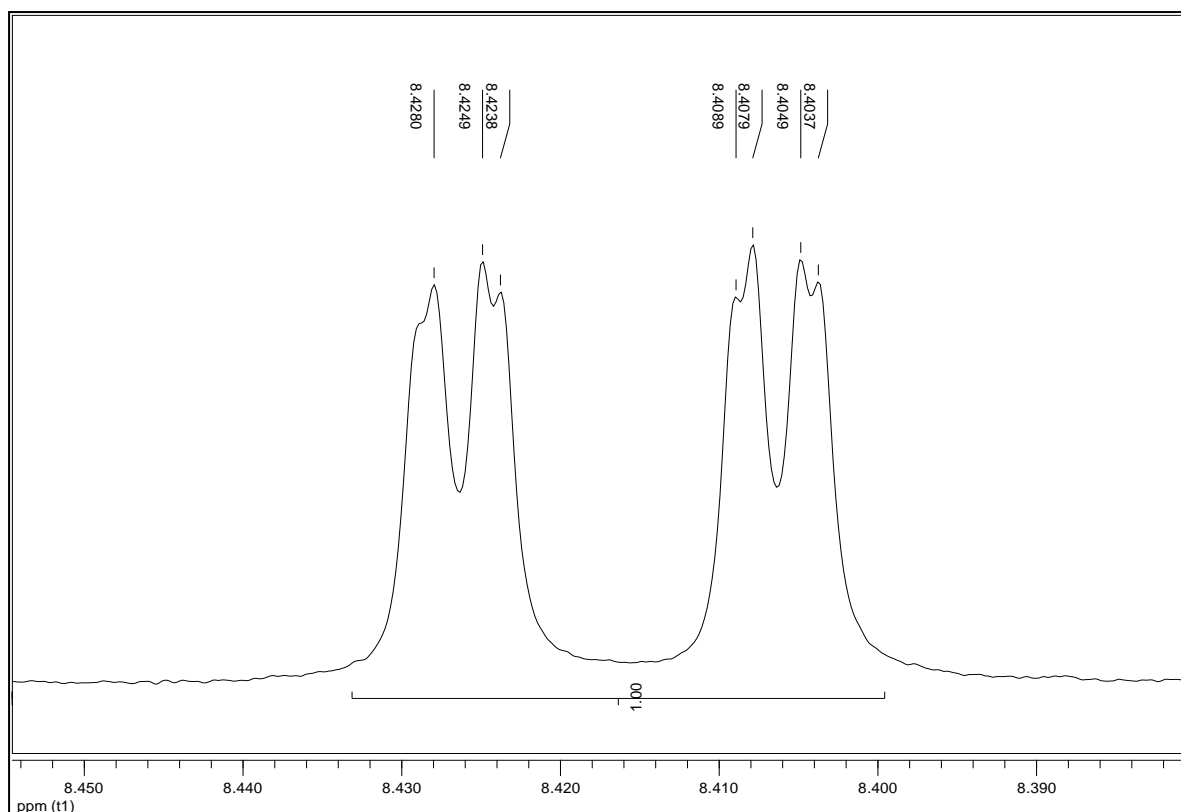


Figura 49. Ampliação da região entre  $\delta$  8,44 a 8,39 do espectro de RMN <sup>1</sup>H de FEA (GF) 21 (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

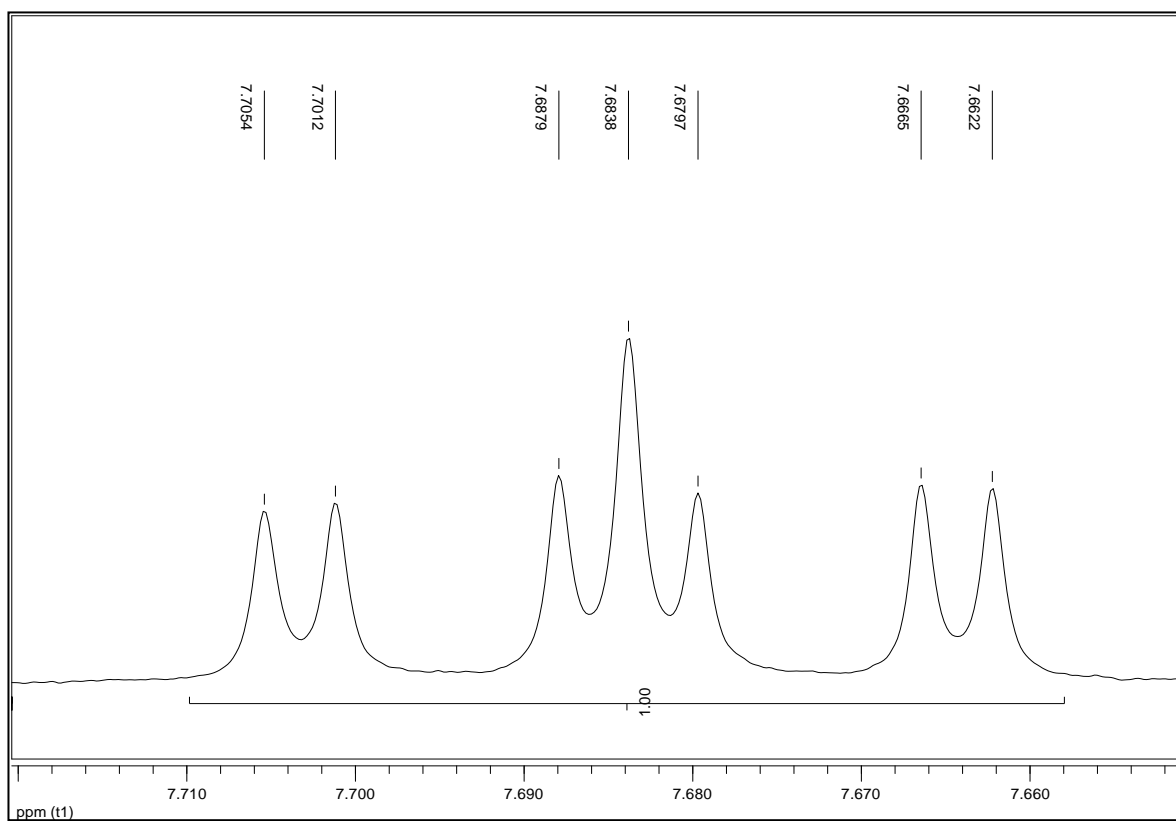


Figura 50. Ampliação da região entre  $\delta$  7,71 a 7,66 do espectro de RMN <sup>1</sup>H de FEA (GF) 21 (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz).

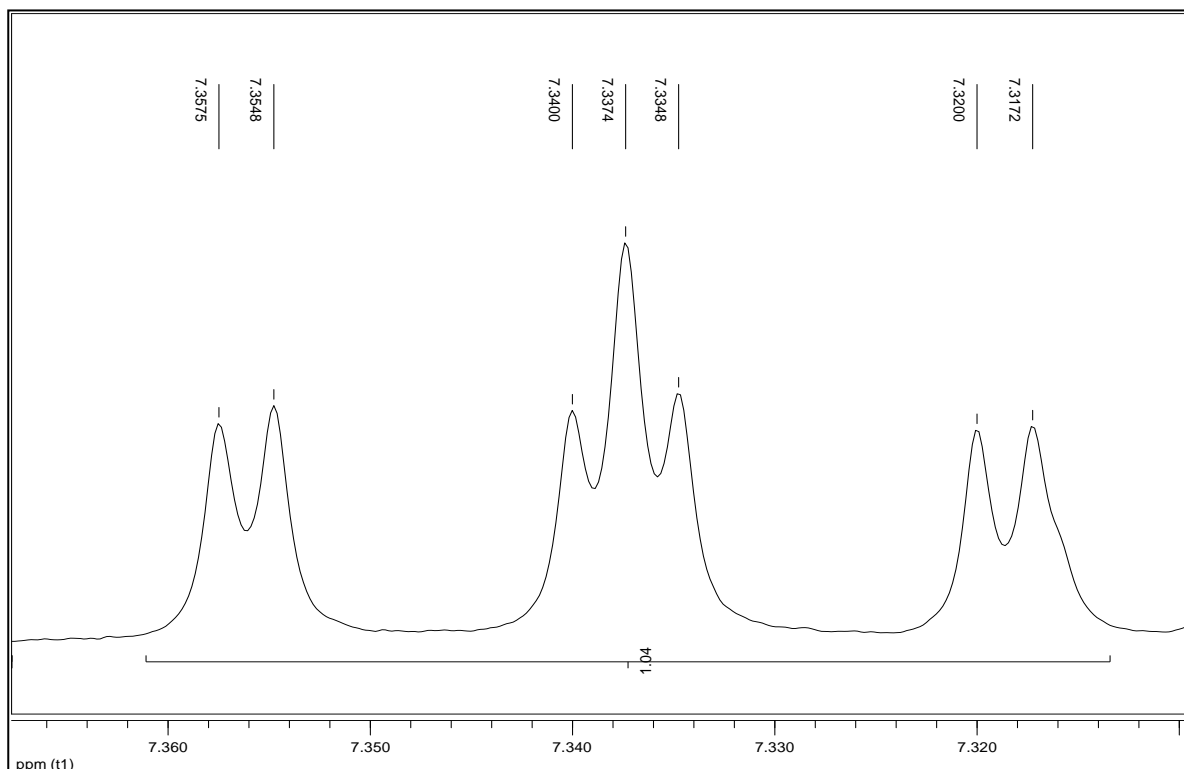


Figura 51. Ampliação da região entre  $\delta$  7,36 a 7,31 do espectro de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (GF) 21 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz).

A análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  permitiu verificar a presença de 18 carbonos na molécula (FIGURA 52 e TABELA 8). A presença de duas metoxilas foi ratificada pelos sinais em  $\delta$  61,26 e 60,67 estando de acordo com a indicação do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ . Os sinais observados em  $\delta$  124,01 e 141,96 foram atribuídos aos dois carbonos metínicos do anel piridínico C-4 e C-5 respectivamente. Foi verificado um sinal em  $\delta$  166,07 indicando a existência de um carbono aromático oxigenado. Observou-se ainda a presença de um grupo carbonila conjugado através do sinal em  $\delta$  184,58 o que tornou possível identificar a presença do esqueleto oxoaporfínico. Os valores de deslocamentos químicos dos demais carbonos foram determinados com base nas correlações obtidas no mapa de contorno de HMBC (TABELA 8).

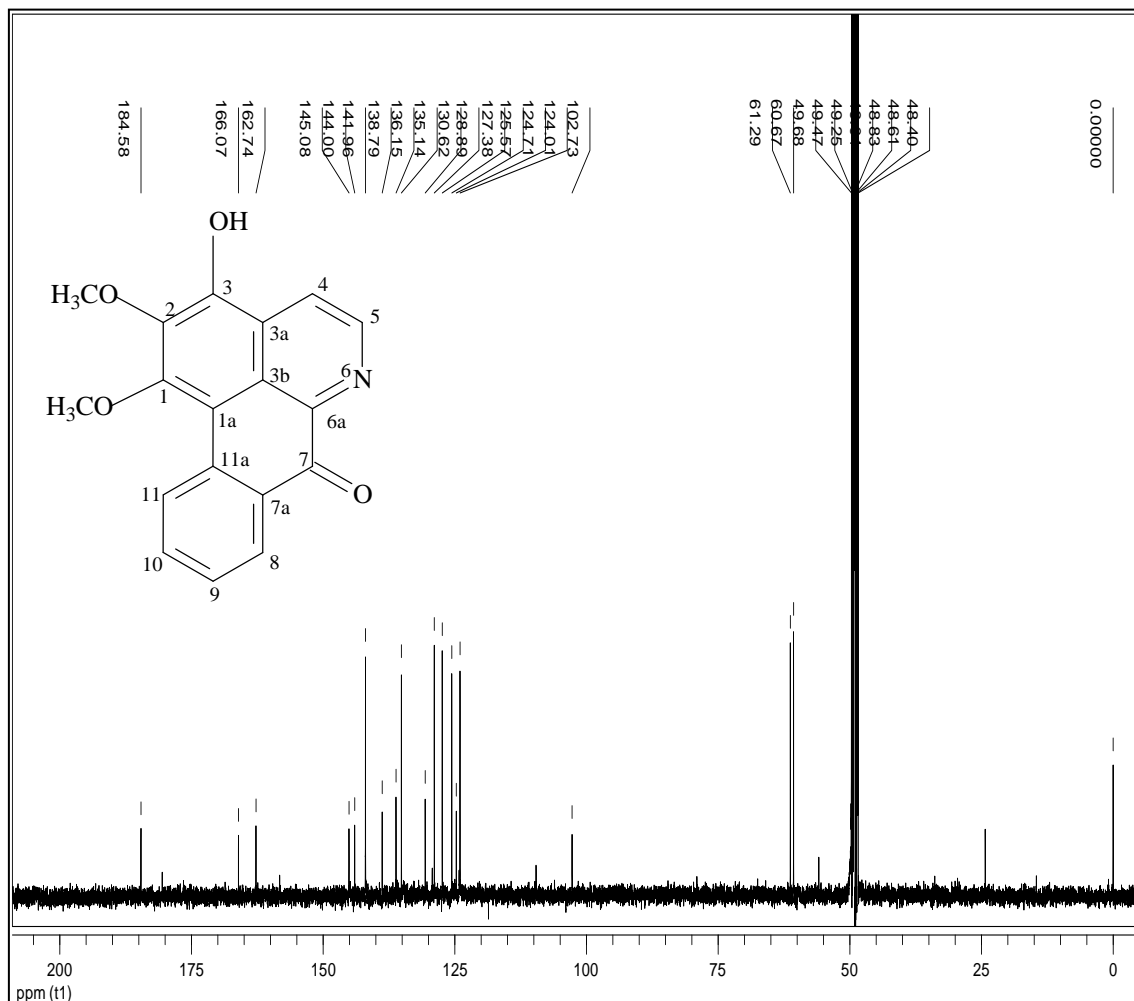


Figura 52. Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  a 100 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  de FEA (GF) 21.

O mapa de contorno heteronuclear  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ -HMBC a 400 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  (FIGURA 54) apresentou correlação do sinal de carbono em  $\delta$  166,07 com o de hidrogênio em  $\delta$  8,60 (H-4) indicando a presença do grupo hidroxila na posição C-3 (FIGURA 56c). Por sua vez, esse sinal de hidrogênio estava correlacionado com os sinais em  $\delta$  124,71 e 141,96 atribuídos aos carbonos C-3b e C-5, respectivamente. Foi verificada também a correlação do sinal em  $\delta$  8,73 (H-5) com os sinais em  $\delta$  136,15 e 124,71 pertencentes respectivamente aos carbonos C-3a e C-3b. Observa-se ainda o acoplamento dos carbonos quaternários C-1 e C-2 em  $\delta$  162,74 e 144,00 com os respectivos sinais dos hidrogênios metílico das metoxilas em  $\delta$  4,08 e 3,97. Pôde-se confirmar a presença do grupo carbonílico devido à correlação do sinal em  $\delta$

8,41 referente ao H-8 com o sinal do carbono em  $\delta 184,58$  (C-7) (FIGURA 53 e FIGURA 57).

Na Tabela 8 são mostrados todos os sinais de carbono e hidrogênio do composto FEA (GF) 21, baseados nas análises dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e nos experimentos bidimensionais HMBC.

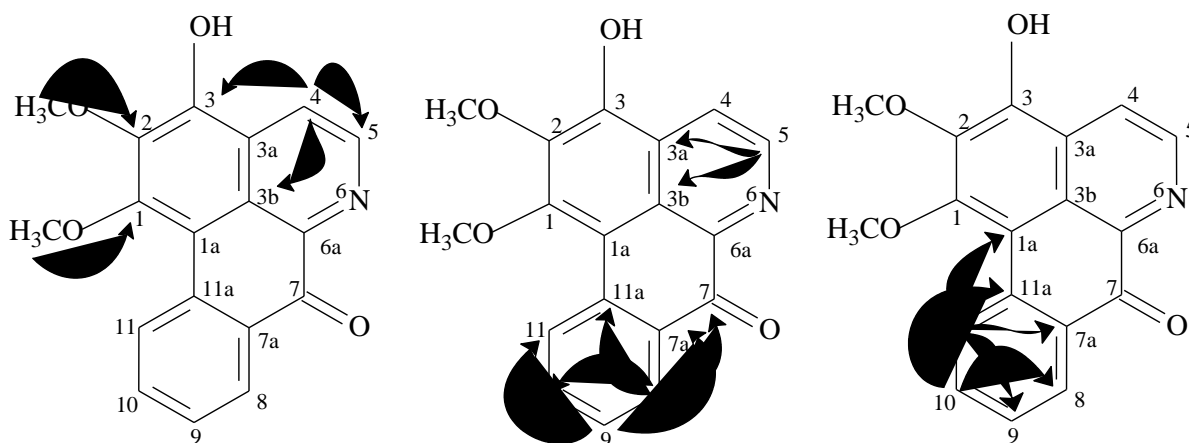


Figura 53. Correlações observadas no mapa de contorno HMBC de FEA (GF) 21.

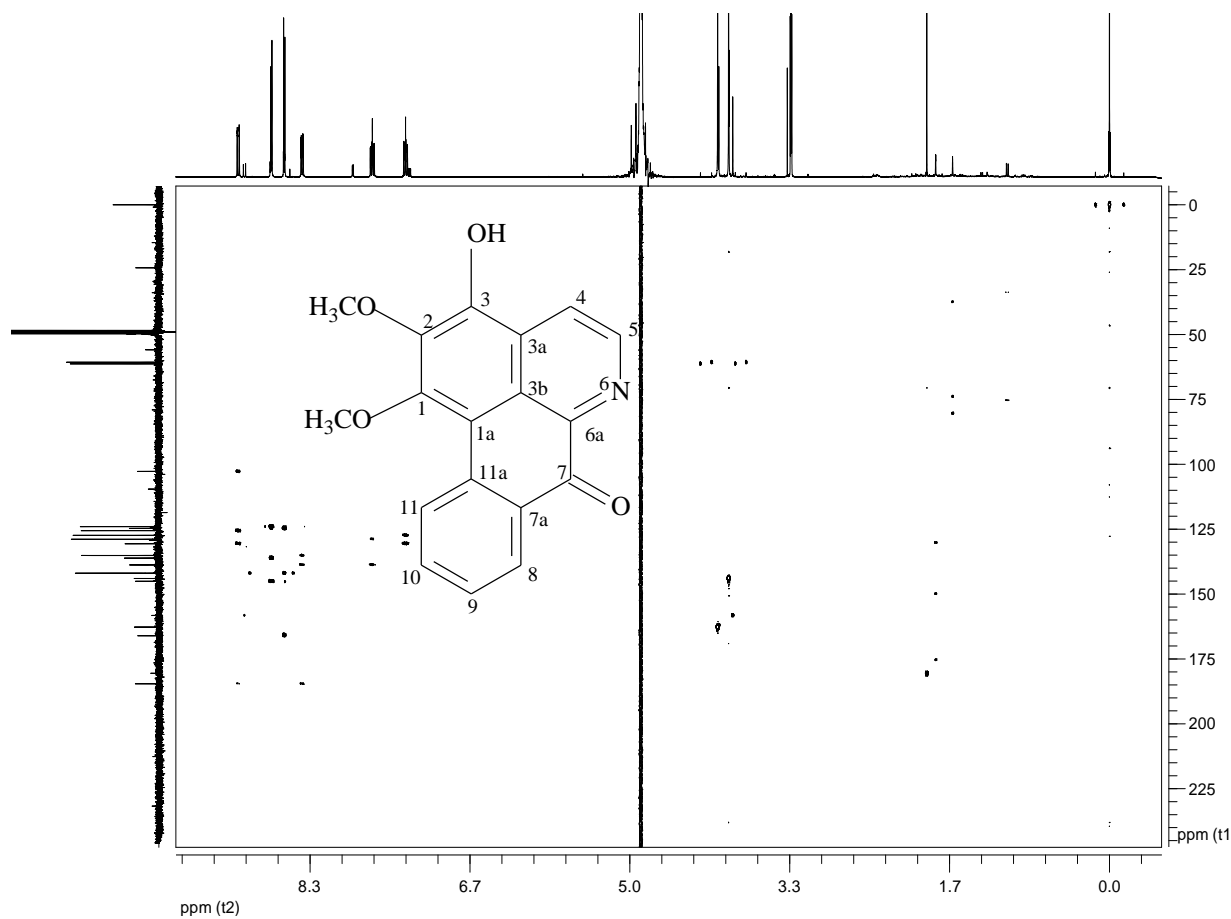


Figura 54. Mapa de contorno HMBC a 400 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  de FEA (GF) 21.

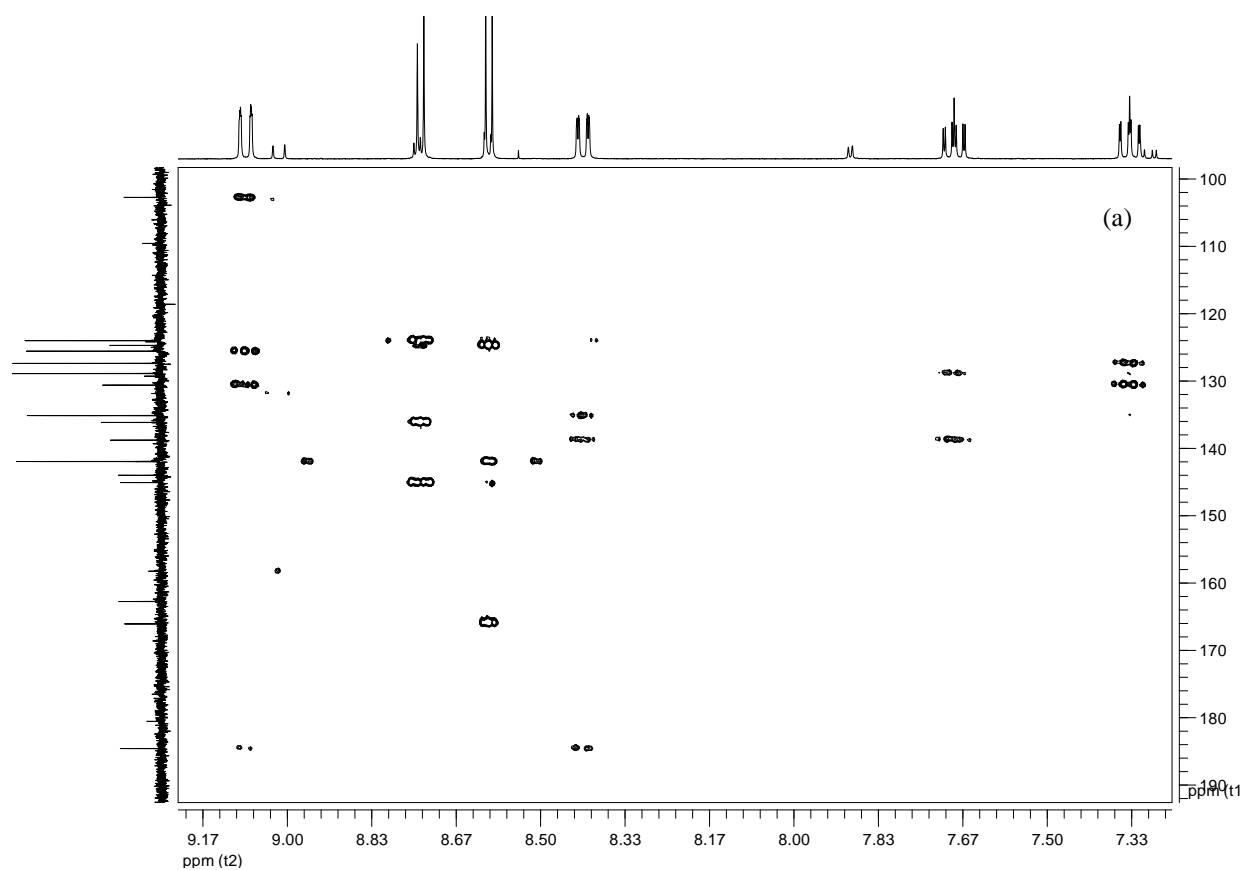


Figura 55. (a) Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  de FEA (GF) 21.

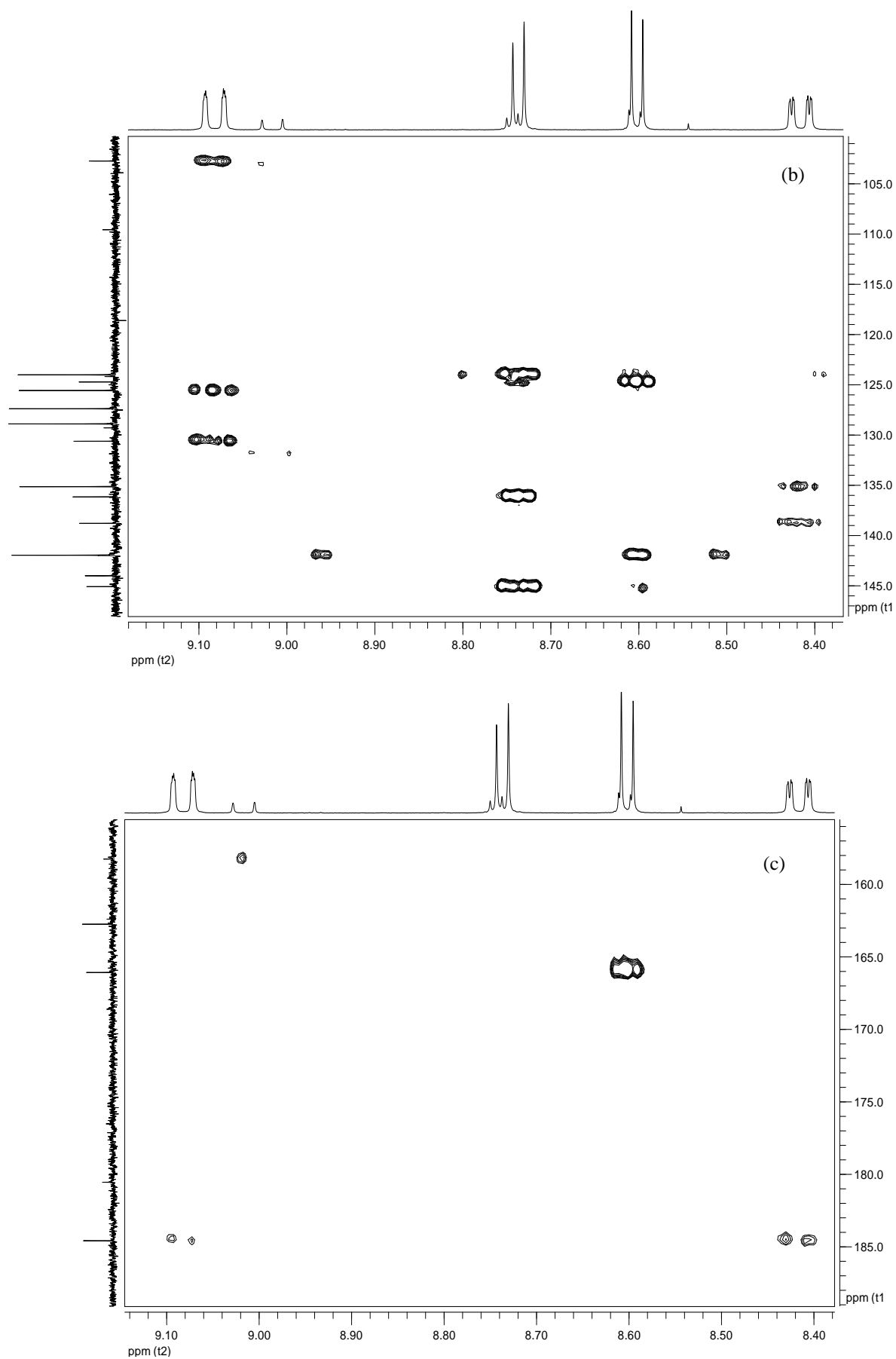


Figura 56. (b e c) Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em CD<sub>3</sub>OD de FEA (GF) 21.

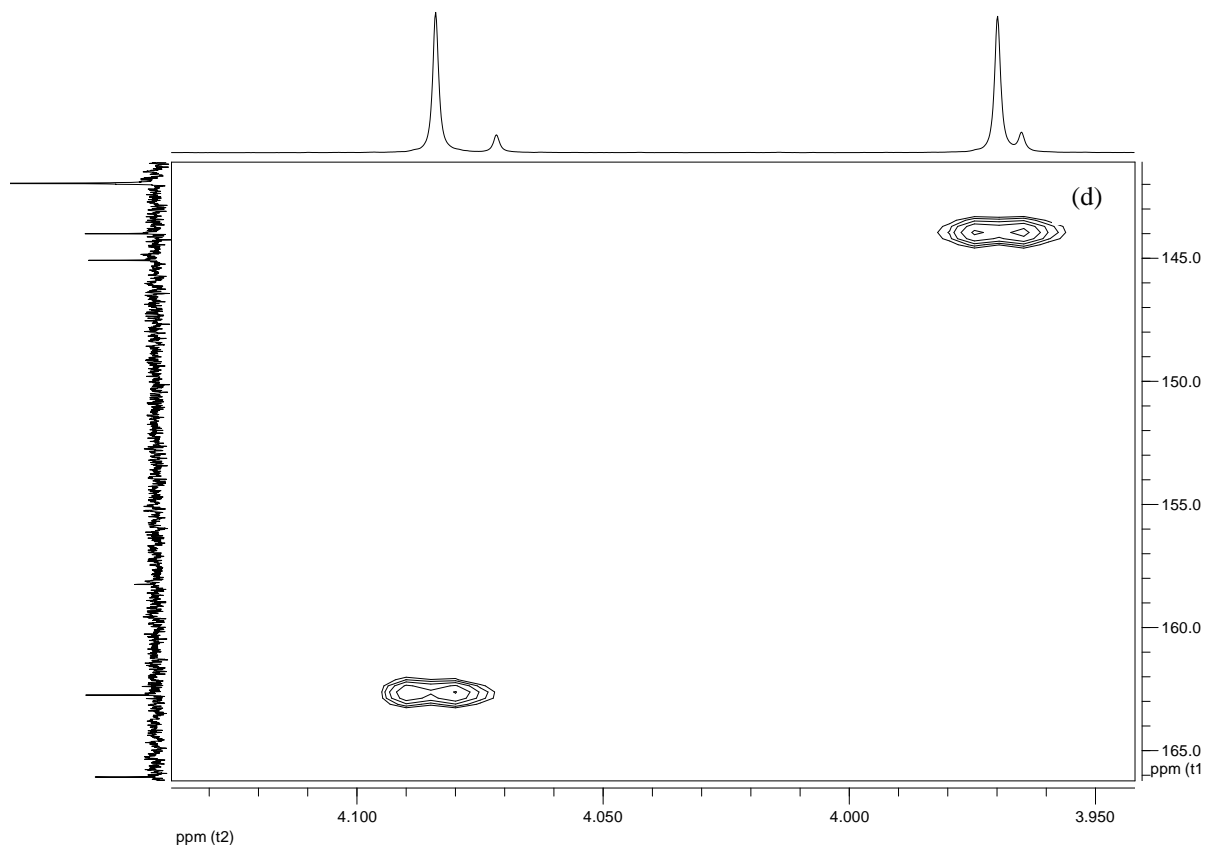


Figura 57. (d) Ampliação do mapa de contorno HMBC a 400 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  de FEA (GF) 21.

Os dados obtidos dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de 1D e 2D e comparados com dados da literatura (ATTI et al., 1982) (TABELA 8) confirmaram a estrutura do alcalóide oxoaporfínico isomoschatolina (FIGURA 58). Este alcalóide foi isolado, inicialmente, da espécie *Guatteria melosma* (ATTI et al., 1982).

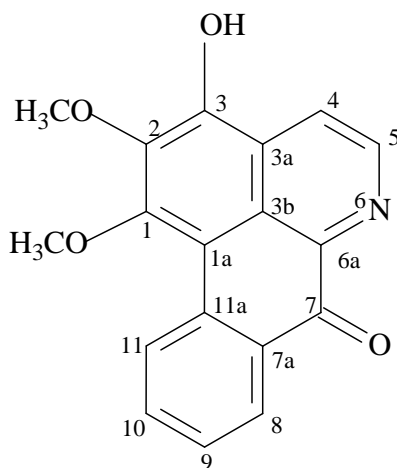


Figura 58. Estrutura do alcalóide isomoschatolina.



Posição	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ ) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ ( $\delta$ ) (mult., <i>J</i> em Hz) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ ( $\delta$ ) (mult., <i>J</i> em Hz) <sup>b</sup>
1	162,74		
1a	102,73		
2	144,00		
3	166,07		
3a	136,15		
3b	124,71		
4	124,01	8,60 (1H, <i>d</i> , 5,1)	8,88 (1H, <i>d</i> , 6,0)
5	141,96	8,73 (1H, <i>d</i> , 5,1)	9,12 (1H, <i>d</i> , 6,0)
6a	145,08		
7	184,58		
7a	130,62		
8	128,89	8,41 (1H, <i>ddd</i> , 8,0, 1,6 e 0,5)	8,60 (1H, <i>d</i> , 8,0)
9	125,57	7,33 (1H, <i>ddd</i> , 8,0, 7,0 e 1,0)	8,07 (1H, <i>m</i> )
10	135,14	7,68 (1H, <i>ddd</i> , 8,6, 7,0 e 1,6)	7,72 (1H, <i>m</i> )
11	127,38	9,08 (1H, <i>ddd</i> , 8,6, 1,0 e 0,5)	9,33 (1H, <i>d</i> , 8,0)
11a	138,79		
1-OCH <sub>3</sub>	61,29	4,08 (3H, <i>s</i> )	4,03 (3H, <i>s</i> )
2-OCH <sub>3</sub>	60,67	3,97(3H, <i>s</i> )	4,11 (3H, <i>s</i> )
3-OH			

Tabela 8. Comparação dos dados de RMN  $^1\text{H}$  de FEA (GF) 21 com a literatura.

<sup>a</sup> Experimento realizado a 400 MHz para  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$  e 100 MHz em  $\text{CD}_3\text{OD}$  para  $^{13}\text{C}$ , utilizando o TMS como referência interna. <sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com ATTI et al., 1982.

## 5.4 Atividades biológicas

### 5.4.1 Avaliação da toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina*

A Tabela 9 mostra o resultado do *screening* da atividade citotóxica dos extratos brutos e das frações provenientes desses extratos obtidos do estudo da espécie *E. amazonicus*. De acordo com MEYER *et al.* (1982) os valores de toxicidade são considerados ativos até a concentração de  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (1000 ppm).

Extratos e frações	DL <sub>50</sub> ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Intervalo de confiança 95 % ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
EHEA (F)	31,76	20,00 – 50,43
EHEA (GF)	25,38	23,04 – 32,36
EMEA (F)	14,70	11,30 – 19,14
EMEA (GF)	13,94	11,05 – 17,58
FAL EMEA (F)	10,22	8,31 - 12,86
FAL EMEA (GF)	9,95	7,71 – 11,09
FNEMEA (F)	23,47	20,92 – 26,53
FNEMEA (GF)	19,98	16,12 - 24,81
Lapachol	68,09	57,25 – 79,17

Tabela 9. Teste de toxicidade para *A. salina* dos extratos e das frações de *E. amazonicus*.

Todos os extratos e frações foram considerados ativos, uma vez que apresentaram  $DL_{50} < 1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Dentre os extratos analisados o que apresentou maior toxicidade foi o extrato metanólico dos galhos finos. Esse resultado é indicativo da presença de importantes componentes citotóxicos no extrato, tais como alcalóide. Isso pôde ser ratificado pela maior atividade concentrada na fração alcaloídica obtido desse extrato (FAL EMEA (GF) =  $9,95 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

### 5.4.2 Determinação da capacidade antioxidante

Os resultados do teste da capacidade antioxidante pelo método ORAC<sub>FL</sub> dos extratos, frações e substâncias isoladas de *E. amazonicus* estão apresentados na Tabela 10 e 11. Os valores estão expressos como micromols de Trolox equivalente por grama ( $\mu\text{mol}$  de TE  $\text{g}^{-1}$ ) de extrato ou fração em base seca e em Trolox equivalente relativo para as substâncias isoladas. Conforme observado na Tabela 10 para os extratos e frações, verificou-se que dentre os extratos avaliados somente os metanólicos apresentaram capacidade antioxidante, isso provavelmente é devido à presença de uma elevada concentração de alcalóides. Isso pôde ser ratificado pelos valores obtidos das frações alcaloídicas. Verifica-se ainda que a fração alcaloídica dos galhos finos foi a que obteve a maior capacidade antioxidante. Os extratos hexânicos e frações neutras foram inativos.

Amostra	Ensaio ORAC <sup>a</sup> ( $\mu\text{mol}$ of TE $\text{g}^{-1}$ de extrato ou fração) <sup>b</sup>
EHEA (F)	782.10 (2.92)
EMEA (F)	3105.54 (5.59)
FNEMEA (F)	479.45 (0.73)
FALEMEA (F)	2853.83 (8.08)
EHEA (GF)	437.68 (15.15)
EMEA (GF)	2279.63 (6.98)
FNEMEA (GF)	459.94 (3.19)
FALEMEA (GF)	4159.98 (2.92)

Tabela 10. Capacidade antioxidante dos extratos e frações de *E. amazonicus*.

<sup>a</sup>Dados apresentados como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata. <sup>b</sup>Os resultados estão expressos como micromols de Trolox equivalente por grama de extrato ou fração em base seca. Valores maiores que 1000  $\mu\text{mol}$  de TE  $\text{g}^{-1}$  são considerados ativos.

Para os compostos isolados (TABELA 11) observou-se que todos apresentaram atividade antioxidante, com destaque para o alcalóide isomoschatolina que apresentou uma significativa capacidade antioxidante. Vale ressaltar que esse alcalóide foi isolado da fração alcaloídica dos galhos finos de *E. amazonicus*.

Substâncias isoladas	Ensaio ORAC <sup>a</sup>
O-metilmoschatolina	0.50 (2.67)
Liriodenina	0.30 (1.38)
Isomoschatolina	1.86 (2.35)
Quercetina <sup>b</sup>	5.60 (1.20)
Isoquercitrina <sup>b</sup>	5.10 (1.40)
Ácido cafeico <sup>b</sup>	2.85 (1.15)
Ácido clorogênico <sup>b</sup>	2.65 (1.30)

Tabela 11. Capacidade antioxidante das substâncias isoladas de *E. amazonicus*.

<sup>a</sup>Dados apresentados como média (coeficiente de variação) do ensaio em triplicata. Os resultados estão expressos como Trolox equivalente relativo, média (coeficiente de variação) dos ensaios em triplicata. <sup>b</sup> Controles positivos.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os dados obtidos no levantamento das Anonáceas no Campus da UFAM foram satisfatórios, levando em consideração o número de espécies encontradas na área selecionada para estudo. A espécie mais frequentemente encontrada foi *Annona sericea*, enquanto a maior concentração de espécies foi observada em terreno areno-argiloso.

Estes dados contribuem para o conhecimento e compreensão da flora do Campus e conseqüentemente são importantes para o planejamento e tomada de decisões sobre estratégias de conservação da diversidade biológica existente no Campus da UFAM.

Pela análise em CCD das frações alcaloídicas das espécies *A. ambotay*, *A. sericea*, *X. aromatica*, *X. benthamii*, *X. excellens*, *R. exsucca*, *D. ulei*, *A. brevipes* e *E. amazonicus* encontradas nos arredores do Campus da UFAM pôde-se confirmar o potencial em alcalóides isoquinolínicos da família Annonaceae, sendo ratificada a presença do alcalóide liriodenina como marcador desta família.

A técnica de cromatografia em camada delgada revelou-se eficiente para análise de perfis químicos, evidenciando similaridades entre a composição alcaloídica de partes da mesma planta, ou entre espécies do mesmo gênero da família.

O uso da técnica FIA-ESI-IT-MS forneceu dados preliminares sobre o perfil químico das frações alcaloídicas das folhas e galhos finos de *E. amazonicus*, que deverá ser investigado por análises subseqüentes de EM/EM e CLAE/EM, para validação.

O estudo fitoquímico dos extratos metanólicos das folhas e dos galhos finos da espécie *E. amazonicus* conduziu ao isolamento dos alcalóides oxoaporfínicos: O-metilmoschatolina FEA (F) (13-14/38-47), isomoschatolina (FEA (GF) 21) e liriodenina (FEA (GF) 14). Suas estruturas moleculares foram determinadas por métodos espectrométricos (RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  de 1D e 2D) e comparação com dados da literatura.

Todos os extratos e frações de *E. amazonicus* avaliados frente às larvas de *Artemia salina* foram tóxicos, apresentando valores de  $CL_{50} < 1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ . O extrato que apresentou maior toxicidade foi o extrato metanólico dos galhos finos ( $CL_{50} = 13,94 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). As frações foram mais ativas que os respectivos extratos.

Entre os extratos e frações avaliados pelo ensaio  $ORAC_{FL}$  somente os extratos metanólicos e as frações alcaloídicas apresentaram capacidade antioxidante, sendo que a fração alcaloídica dos galhos finos apresentou maior atividade antioxidante com valor de  $4159,98 \mu\text{mol de TE g}^{-1}$ . Com relação aos compostos isolados, todos apresentaram significativa capacidade capturadora de radicais livres, com destaque para o alcalóide isomoschatolina que apresentou maior valor de capacidade antioxidante através do método de  $ORAC_{FL}$ .

Este trabalho constitui-se no primeiro estudo químico-biológico da espécie *E. amazonicus*. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam a identidade da espécie com a família Annonaceae, uma vez que os seus compostos isolados são encontrados em diversos gêneros dessa família, tais como, *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Guatteriopsis*, *Rollinia*, *Uvaria*, *Xylopi*a, entre outros. Assim, os resultados dos estudos químicos e biológicos da espécie *Ephedranthus amazonicus* contribuem para o conhecimento quimiotaxonômico da família Annonaceae.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceus acetogenins: Recent progress. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.

ANDRADE, E. H. A.; OLIVEIRA, J.; MAIA, J. G. S. Leaf essential oil composition of *Ephedranthus amazonicus* R. E. FR. *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, v. 10, n. 3, p. 194-197, 2007.

ANISZEWSKI, T. Alkaloids- Secrets of life (Alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological role). 5 ed. Elsevier's Science & Technology Rights Department in Oxford, 2007.

ANKISETTY, S.; ELSOHLY, H. N.; LI, X.-C.; KHAN, S. I.; TEKWANI, B. L.; SMILLIE, T.; WALKER, L. Aromatic constituents of *Uvaria grandiflora*. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 4, p. 692-694, 2006.

ARNÃO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radical: a practical case. *Trends in Food Science & Technology*, v.11, n. 11, p. 419-421, 2000.

ATTI, S. A.-E.; AMMAR, H. A.; PHOEBE, C. H.; SCHIFF, P. L.; SLATKIN, D. J. Alkaloids of *Guatteria melosma* and *Cleistopholis patens*. *Journal of Natural Products*, v. 45, n. 4, p. 476-480, 1982.

BERNARDI, L.; SPICHIGER, R. Las Anonáceas del Arbo­rétum Jenaro Herrera (Conservatore et Jardins Botaniques de Genere, Provincial de Requena, Departamento de Loreto, Péru). *Candollea*, v. 35, n. 2, p. 341-383, 1980.

BOSCOLO, O. H.; MENDONÇA-FILHO, R. F. W.; MENEZES, F. S.; SENNA-VALLE, L. Potencial antioxidante de algumas plantas de restinga citadas como medicinais. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v. 9, n. 1, p. 8-12, 2007.

BRAVO, J. A.; CHANTRAINE, J-M.; SAAVEDRA, G.; SAUVAIN, M. Argentilactone from *Annona ambotay*. *The Bolivian Journal of Chemistry*, v. 19, n. 1, p. 6-11, 2002.

CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; WATERMAN, P. G. The Aporphinoids of the Annonaceae, in *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*. 5 ed. S.W Pelletier Editor, 1987. 133-269 p.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Products Reports*, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. *In: Annonaceae (Soursop Family): Smith N. et al. (eds.). Flowering Plants of the Geotropism*, New York Botanical Garden, New York, 2004. 18-20 p.

COSTA, E. V. Contribuição ao Estudo Químico e Biológico de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). 2004. 166p. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.



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- $\beta$ -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products*, v. 69, n. 2, p. 292-294, 2006.

COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; TRIGO, J. R.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatteria* species. *Phytochemistry*, v. 69, n. 9, p. 1895-1899, 2008.

COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteria blepharophylla*, *Guatteria friesiana* e *Guatteria hispida* (Annonaceae). 2009. 354 p. Tese (Doutorado em Química Orgânica) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; MARQUES, F. A.; BRAGA, R. M.; MAIA, B. H. L. N. S. First report of alkaloids in the genus *Guatteria* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.37, n. 1, p. 43-45, 2009.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; VAZ, N. P.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; BRAGA, R. M.; MAIA, B. H. L. N. S. 7,7-Dimethylaporphine alkaloids from the stem of *Guatteria friesiana*. *Journal of Natural Product*, v. 72, n.8, p. 1516-1519, 2009.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.; SALVADOR, M.J.; MAIA, B.H.; CABRAL, E.; EBERLIN, M. N. Alkaloids from the Bark of *Guatteria hispida* and their Evaluation as Antioxidant and Antimicrobial Agents. *Journal of Natural Products*, v.73, n. 6, p. 1180-1183, 2010.

CRONQUIST, A. *The Evolution and Classification of Flowering Plants*. New York Botanical Garden, New York, 1988. 555 p.

CUNHA, M. M.; NASCIMENTO, F. C.; SANTOS PIMENTA, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; SALAS, C. E.; LOPES, M. T. P. Screening of cytotoxic activity in hexanic and ethanolic extracts of *Rollinia laurifolia*. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.28, n. 2, p. 234-240, 2009.

DÍAZ, A. M. P. Neolignans from *Anaxagorea clavata*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 2, p. 345-346, 1997.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C.A. *As plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. Ed. Unesp. São Paulo, 2002. 89-102 p.

DOLABELA M. F. *Triagem in vitro para a atividade antitumoral e anti-T.cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas*. 1997. 128p. Dissertação (Mestrado em ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte.

FECHINE, I. M.; LIMA, M. A.; NAVARRO, V. R.; DA CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 12, p. 17-19, 2002.

GOTTSBERGER, G. Pollination and evolution in neotropical Annonaceae. *Plant Species Biology*, v. 14, n. 2, p. 143-152, 1999.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.53, n. 6, p.1841-1856, 2005.

KANOKMEDHKUL, S. KANOKMEDHAKUL, K. LEKPHROM, R. Bioactive constituents of the roots of *Polyalthia cerasoides*. *Journal of Natural Products*, v. 70, n. 9, p. 1536-1538, 2007.

KRANE, B. D.; SHAMMA, M. The isoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, v. 45, n. 4, p. 377-384, 1982.

LAGO, J. H. G.; DE ÁVILA Jr, P.; MORENO, P. R. H.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopia aromatica* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 31, n. 6, p. 669-672, 2003.

LEBOEUF, M; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of Annonaceae. *Phytochemistry*, v. 21, n.12, p. 2873-2813, 1982.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; FORGACS, A.; PROVOST, J.; CHIARONI, A.; RICHE, C. Alkaloids of the Annoanceae. Part 33. annomontine and methoxyannomontine, two new pyrimidine- $\beta$ -carboline-type alkaloids from *Annona montana*. Journal of the Chemical Society. Perkin Trans 1, p 1205-1208, 1982a.

LI, N.; SHI, Z.; TANG, Y.; CHEN, J.; LI, X. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. Beilstein Journal of Organic Chemistry, v. 4, n. 48, 2008.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. Food Chemistry, v. 122, n. 4, p. 1129-1138, 2010.

LOBÃO, A. Q.; DE ARAUJO, D. S. D.; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. Rodriguésia, v. 56, n. 87, p. 85-96, 2005.

LODYATO, V. I.; YURKOVA, I. L.; SOROKIN, V. L.; SHADYDO, O. I.; DOLGOPALETS & KISEL, A. M. Novel (3,5-di-tert-butyl-2-hydroxy-phenylcarbamoyl)-alkanoic acids as potent antioxidants. Biorganic & Medicinal Chemistry Letters. v.14, n. 16, p. 4253-4256, 2004.

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

MAAS, P. J. M.; DE KAMER, H. M.- V.; JUNIKKA, L.; DE MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.

MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J. M. S.; JUNIKKA, L. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. *Rodriguésia*, v. 58, n. 3, p. 617-662, 2007.

McLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. L., SNITH, D. L., Simple bench-top Biossays (brine shrimp and potato disk) for the Discovery of Plant Anti tumor compounds in Human Medicinal Agents from plants; Ed.Kinghorn, ACS 534, p.113-117, 1993.

MENACHERY, M. D.; LAVANIER, G. L.; WETHERLY, M. L.; GUINAUDEAU, H.; SHAMMA, M. Simple isoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, v. 49, n. 5, p. 745-778, 1986.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: A convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Médica*, v. 45, n. 1, p. 31-34, 1982.

MIN, Z.; PEI-GEN, X. Distribution of benzyloisoquinolines in magnoliidae and other taxa. *Acta Phytotaxonomica Sinica*, v. 29, n. 2, p. 142-155, 1991.

MISHRA, B. B.; KALE, R.R.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, v. 79, n.8, p. 598-601, 2008.

MOREIRA, I. C.; ROQUE, N. F.; CONTINI, K.; LAGO, J. H. G. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 1, p. 55-58, 2007.

MUNIER, R., *apud* MERCK, 1971. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. *E. Merck*, Darmstadt, Germany, p. 118, 1953.

MURILLO-A, J. Las Annonaceae de Colombia. *Biota Colombiana*, v.2, n. 1, p. 49-58, 2001.

NASCIMENTO, F. DAS C.; BOAVENTURA, M. A. D.; ASSUNÇÃO, A. C. S.; PIMENTA, L. P. S. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p. 319-322, 2003.

NERY, L. C. ; LOROSA, E. S. ; FRANCO, A. M. Feeding Preference of the Sand Flies *Lutzomyia umbratilis* and *L. spathotrichia* (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in an Urban Forest Patch in the City of Manaus, Amazonas, Brazil. 2004. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 6, p.571 – 574, 2004.

NIMER, E. *Climatologia do Brasil*. Rio de Janeiro: IBGE. 1979.

OLIVEIRA, V. M. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Annona pulchra* H. Rainer. 2007. 112p. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

ORTIZ, A. A.; SUAREZ, L. E. C.; PATIÑO, G. S.; AYAZO, O. T. Azafluorenonas en corteza de *Oxandra longipetala* R. E. FR. (Annonaceae). *Scientia et Technica*, v. 8, n. 33, p. 333-336, 2007.

OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 49, n. 10, p. 4619-4626, 2001.

PIMENTA, L. P. S.; TAKAHASHI, J. A.; MENDONÇA, D. D.; SILVA, M. X. N-*trans*- e N-*cis*-feruloiltiramina isolada da madeira de *Xylopia benthamii* R.E. Fries. 32<sup>a</sup> Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2009.

PINHEIRO, M. L. B. Contribuição ao estudo fitoquímico do gênero *Strychnos* da Flora Amazônica. 2000. 260p. Tese (Doutorado em Química de Produtos Naturais). Universidade Federal do Ceará - UFC.

PINTO, A. C. DE Q.; CORDEIRO, M. C. R.; DE ANDRADE, S. R. M.; FERREIRA, F. R.; FILGUEIRAS, H. A. DE C.; ALVES, R. E.; KINPARA, D. I. *Annona* species. International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, UK. 2005.

PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC<sub>FL</sub>)) of plasma

and other biological and food samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, n. 11, p. 3273-3279, 2003.

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

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; PAULO, M. Q.; FOURNET, A. Pseudo and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*, v. 59, n. 4, p. 438-440, 1996.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; FIGADÈRE, B.; LAURENS, A.; DURET, P.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Three new bistetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*, v. 61, n. 1, p. 34-39, 1998.

RIBEIRO, J. E. L. DA S.; MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J. M.; WEBBER, A. Annonaceae In: *Flora da Reserva Ducke Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central*. DFID (Departamento for International Development), Manaus – AM. 1999. 121-130 p.

ROCHA, A. I. DA; SILVA, M. L.; MOURÃO, A. P., CAVA, M. P. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. *Botânica, Série Química*, n.12, INPA Manaus. 1968.



ROCHA, A. I. A presença de alcalóides em espécies botânicas da Amazônia. II- 31ª Reunião da SBPC, Fortaleza – CE, 1979

SALVADOR, M.J.; FERREIRA, E.O.; MERTENS-TALCOTT, S.U.; CASTRO, W.V.; BUTTERWECK, V.; DERENDORF, H.; DIAS, D.A. Isolation and HPLC quantitative analysis of antioxidant flavonoids from *Alternanthera tenella* Colla. Zeitschrift Fur Naturforschung C, v. 61c, p. 19-25, 2006.

SÁNCHEZ-MORENO, C.; LARRAURI, J. A.; SAURA-CALIXTO, F. A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. Journal of the Science of Food and Agriculture, v.76, n. 2, p.270-276. 1998.

SANTOS, A. G.; Contribuição ao estudo químico e biológico de *Annona impressivenia*. 2007. 101p. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

SILVA-FORSBERG, M.C. 1999. Protecting an urban forest reserve in the Amazon. A multi-scale analysis of edge effects population pressure, and institutions. Dissertação – (Mestrado em População e Ambiente) – Universidade Indiana, Índia.

SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. DA S.; DA SILVA, S.A.S. Alcalóides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). Química Nova, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre *Artemia salina* leach. Química Nova, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

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

SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILIPSON, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). Planta Medicinal, v. 59, p. 250-252, 1993.

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

TORRES, O.; SANTAFE, G.; ÂNGULO, A.; VILLA, H.; ROJANO, B.; SAEZ, J.; MONTAÑO, M.; GALEANO, P. Estudio químico y obtencion de principios activos de la especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae) del alto sinu. Scientia et Technica, v. 13, n. 33, p. 55-58, 2007.

VEGA, M. R. G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FOLHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dióica* leaves and their effects in

ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, v. 18, n. 8, 2007.

WEBBER, A. C. *Biologia floral, polinização e fenologia de algumas Annonaceae na região de Manaus AM*. 1996. Tese (Doutorado em Botânica) - Instituto Nacional de Pesquisas do Amazonas, INPA, Brasil.

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

YANG, Y. L.; CHANG, F. R.; WU, Y. C. Annosqualine: a novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 87, n. 6, p. 1392-1399, 2004.