

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

**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Onychopetalum amazonicum*  
R.E. Fr. (Annonaceae)**



**BRUNA RIBEIRO DE LIMA**

**MANAUS  
2015**

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

**BRUNA RIBEIRO DE LIMA\***



**ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Onychopetalum amazonicum*  
R.E. Fr. (Annonaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química Orgânica.

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

**Colaborador:** MSc. Felipe Moura Araújo da Silva

\*Bolsista CNPq

**MANAUS  
2015**

### Ficha Catalográfica

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

L732e Lima, Bruna Ribeiro de  
Estudo Fitoquímico de *Onycoptalum amazonicum* R.E.Fr.  
(Anonaceae) / Bruna Ribeiro de Lima. 2015  
123 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Lúcia Belém Pinheiro  
Dissertação (Química) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Anonaceae. 2. *Onycoptalum amazonicum*. 3. alcaloides. 4.  
óleos essenciais. I. Pinheiro, Maria Lúcia Belém II. Universidade  
Federal do Amazonas III. Título

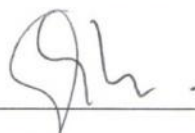
**“ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Onychopetalum  
amazonicum* R.E. Fr. (Annonaceae)”**

Bruna Ribeiro de Lima

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

Aprovada em 14 de Setembro de 2015

COMISSÃO EXAMINADORA



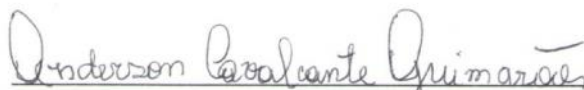
---

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



---

Prof.ª Dr.ª Maria da Paz Lima  
(Membro/INPA)



---

Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães  
(Externo/UFAM Itacoatiara)

Universidade Federal do Amazonas  
Manaus, 14 de Setembro de 2015.

*Aos meus pais Francinete Ribeiro e  
Raimundo Lima, pelo amor, incentivo e  
apoio nas minhas escolhas e decisões ao  
longo desses anos.  
A eles eu dedico.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelo dom da vida, por sempre ter me dado força e coragem para enfrentar os desafios.

À minha família, em especial aos meus pais, Francinete Ribeiro e Raimundo Lima, pela educação, carinho e amor durante todos esses anos. A distância que nos separa só aumenta o amor que sinto por vocês. De uma forma especial agradeço aos meus tios, Agostinho Nunes e Marinalva Raiol, por terem me acolhido em sua casa durante a minha vida acadêmica na UFAM.

Ao meu namorado Thiago Kunast, por todo amor, paciência e acima de tudo pelo grande apoio durante o mestrado.

Um agradecimento a Professora Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro pela orientação, carinho, confiança e conhecimento transmitido durante esses dois anos.

Ao professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza por ter acreditado no meu potencial e pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Espectrometria de Massas.

Ao colaborador desse trabalho MSc. Felipe Moura Araújo da Silva, pela idealização desse projeto, por todo apoio e oportunidade de crescimento profissional.

Ao doutorando Raimundo Junior pelas análises de CG-EM e CG-DIC no Centro de Biotecnologia da Amazônia.

Ao Dr. Marcos Salvador da Universidade Estadual de Campinas, pelas análises biológicas dos óleos essenciais.

Ao Dr. Anderson Barison da Universidade Federal do Paraná, pelas análises de Ressonância Magnética Nuclear.

Ao CNPq pelo apoio financeiro durante o período do mestrado.

Aos professores Maria da Paz Lima e Sérgio Nunomura pelas contribuições no exame de conhecimento.

À Central Analítica pelo espaço e apoio para realização desse trabalho.

Aos meus grandes amigos Richardson Almeida e Elzalina Soares pela amizade, paciência e companheirismo, sempre com uma palavra amiga e me encorajando a seguir em frente.

Aos meus amigos do Laboratório de Espectrometria de Massas pela oportunidade de aprendizado e por proporcionarem um ótimo ambiente de trabalho.

Aos amigos que conquistei durante a minha carreira acadêmica, em especial Paula Paz, Noam Gadelha, Magaly Martins, Adriana Cavalcante, Adriana Spirotto, Francinaldo Araújo, Orlando Amazonas, Jésika Maria, Renan Feitosa, Sidney Azevedo, Fabiana Almeida, Mayane Pereira, Fátima Almeida e Daniele Alencar.

Por fim agradeço a todos que contribuíram direta e indiretamente para realização deste trabalho.

*“Que minha coragem seja maior  
que meu medo e minha força seja  
tão grande quanto minha fé.”*

*(Marisa Pereira)*



## RESUMO

O gênero *Onychopetalum* (Annonaceae) tem sua distribuição na Região Amazônica sendo constituído por duas espécies: *Onychopetalum amazonicum* (R.E. Fr) e *Onychopetalum periquino* (Rusby). O presente trabalho descreve o estudo fitoquímico desta espécie. O material vegetal (folhas, galhos e cascas), coletado na Reserva Florestal Adolpho Ducke (RFAD), foi submetido à hidrodestilação para obtenção de óleos essenciais e tratamento ácido-base para obtenção de frações alcaloídicas. A análise de CG-EM dos óleos essenciais possibilitou identificar 41 constituintes, destacando-se como os majoritários nas folhas, o (*E*) cariofileno (17,0%), enquanto nas cascas e galhos observou-se (*epi*)-*cadinol* (24,1 e 14,0 %, respectivamente). A análise do perfil espectrométrico por APCI-IT-MS<sup>n</sup> em escala analítica possibilitou escolher a fração alcaloídica das folhas para isolamento de alcaloides ainda não descritos no gênero *Onychopetalum*. A análise por CLAE, em escala preparativa, da fração alcaloídica das folhas de *O. amazonicum*, levou ao isolamento dos alcaloides normuciferina, anonaína, assimilobina e *O*-metilisopilina (aporfínicos); isocoripalmina e estefolidina (tetraidroprotoberberínicos) e norjuzifina (benziltetraidroisoquinolínico), cujas estruturas foram caracterizadas por técnicas de EM e RMN (1D e 2D), aliadas à comparação com dados da literatura. Estes alcaloides são relatados pela primeira vez no gênero *Onychopetalum*. Adicionalmente, ensaios antimicrobianos realizados pela primeira vez nos óleos essenciais revelaram atividade moderada para o óleo essencial das cascas o qual inibiu o crescimento das bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Kocuria rhizophila*, observando-se para as três linhagens, CIM = 62,5.

**Palavras-Chave:** Annonaceae, *Onychopetalum amazonicum*, alcaloides, óleos essenciais.

## ABSTRACT

The *Onychopetalum* genus (Annonaceae) has restricted distribution to the Amazon region, being constituted of two species: *Onychopetalum amazonicum* (RE Fr.) and *Onychopetalum periquino* (Rusby). The present work describes the phytochemical study of this species. The plant material (leaves, twigs and bark), collected in the Adolpho Ducke Forest Reserve (RFAD), from previously marked individual was submitted to hydrodistillation to obtain essential oils and acid-base treatment to obtain alkaloid fractions. The GC-MS analysis of the essential oils enabled the identification of 41 constituents, highlighting as majority in the leaves, the (*E*) caryophyllene (17.0%), while in the bark and twigs was observed (*epi*)- $\alpha$ -cadinol (24.1 and 14.0%, respectively). The analysis of the spectrometric profile for APCI-IT-MS<sup>n</sup> of the fractions obtained from analytical scale make possible choose the leaf alkaloidal fraction for the isolation of alkaloids not yet described in *Onychopetalum* genus. The analysis by HPLC, in preparative scale, of the leaf alkaloidal fraction of *O. amazonicum*, led to the isolation of the alkaloids normuciferine, anonaine, asimilobine and O-methylisopiline (aporphine); isocorypalmine and stepholidine (tetrahydrodroprotoberberine) and norjuzifine (benzyl-tetrahydroisoquinoline), whose structures were characterized by MS and NMR (1D and 2D) techniques, together with the comparison with literature data. This is the first report of these alkaloids in *Onychopetalum* genus. In addition, antimicrobial tests performed for the first time with the essential oils showed mild activity for the essential oil from the bark which inhibited the growth of *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* and *Kocuria rhizophila*, being observed a MIC =62,5 for the three strains.

**Keywords:** Annonaceae, *Onychopetalum amazonicum*, alkaloids, essential oil.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

-----	Deslocamento químico.
APCI-----	Atmospheric Pressure Chemical Ionization.
CG -----	Cromatografia Gasosa.
CIM-----	Concentração Inibitória Mínima.
CLAE-----	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
Da-----	Dalton.
DAD-----	Diode Array Detector.
DCM-----	Diclorometano.
DIC-----	Detector de Ionização de Chama.
EM -----	Espectrometria de Massa.
HMBC-----	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HSQC-----	Heteronuclear Single Quantum Coherence.
Hz-----	Hertz.
IT-----	Ion Trap.
<i>J</i> -----	Constante de acoplamento.
LC-----	Liquid Chromatography.
<i>m/z</i> -----	Relação massa/carga.
OaF-----	<i>Onychopetalum amazonicum</i> Folhas.
PFOa-----	Precipitado das Folhas de <i>Onychopetalum amazonicum</i> .
RMN-----	Ressonância Magnética Nuclear.
TFA-----	Trifluoroacetic Acid.
TSQ-----	Triple Stage Quadrupolo.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estruturas de fármacos obtidos de plantas medicinais.....	18
Figura 2: Distribuição geográfica da família Annonaceae.....	19
Figura 3: Espécies da família Annonaceae: (A) <i>A. squamosa</i> ; (B) <i>A. muricata</i> ; (C) <i>X. Aromatica</i> ; (D) <i>X. frutescens</i> .....	21
Figura 4: Representação estrutural de acetogenina de anonáceas.....	22
Figura 5: Acetogeninas isoladas de espécies da família Annonaceae.....	23
Figura 6: Principais alcaloides e seus precursores.....	24
Figura 7: Exemplos de alcaloides encontrados em Annonaceae.....	25
Figura 8: Estrutura básica de alcaloides aporfínicos.....	25
Figura 9: Rota biossintética dos alcaloides aporfínicos.....	27
Figura 10: Unidades de isopreno precursoras.....	28
Figura 11: Exemplos de terpenos encontrados em óleos essenciais na família Annonaceae.....	29
Figura 12: Distribuição geográfica do gênero <i>Onychopetalum</i> .....	31
Figura 13: Alcaloides aporfínicos e derivados encontrados no gênero <i>Unonopsis</i> .....	32
Figura 14: Alcaloide onichina.....	33
Figura 15: Espécie de <i>O. amazonicum</i> coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke.....	38
Figura 16: Extração dos óleos essenciais de <i>O. amazonicum</i> em um aparelho tipo <i>Clevenger</i> modificado.....	39
Figura 17: Constituintes majoritários nos óleos essenciais das folhas de <i>O. amazonicum</i> .....	47
Figura 18: Constituintes majoritários no óleo essencial das cascas de <i>O. amazonicum</i> .....	48
Figura 19: Constituintes majoritários no óleo essencial dos galhos de <i>O. amazonicum</i> .....	49
Figura 20: Espectro de massas das frações alcaloidicas das folhas, cascas e galhos de <i>O. amazonicum</i> .....	52
Figura 21: Espectro de íons totais ( <i>full scan</i> ) da fração alcaloídica das folhas em escala analítica de <i>O. amazonicum</i> .....	52
Figura 22: Espectro de massas em MS <sup>2</sup> para os íons de <i>m/z</i> 328 e 342 ([M+H] <sup>+</sup> ).....	53
Figura 23: Espectro de massas em MS <sup>2</sup> do íon de <i>m/z</i> 330 ([M+H] <sup>+</sup> ).....	54
Figura 24: Proposta de fragmentação para alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos.....	54
Figura 25: Espectro de massas em MS <sup>n</sup> íon de <i>m/z</i> 312 ([M+H] <sup>+</sup> ).....	55
Figura 26: Espectro de massas MS <sup>n</sup> do íon de <i>m/z</i> 298 ([M+H] <sup>+</sup> ).....	56
Figura 27: Estrutura do alcalóide estefarina.....	56
Figura 28: Espectro de massas em MS <sup>n</sup> do íon de <i>m/z</i> 282 ([M+H] <sup>+</sup> ).....	57
Figura 29: Estrutura do alcaloide nornuciferina.....	57
Figura 30: Espectro de massas em MS <sup>n</sup> do íon de <i>m/z</i> 266 ([M+H] <sup>+</sup> ).....	58
Figura 31: Estrutura do alcaloide Anonaína.....	58
Figura 32: Cromatogramas de LC-DAD (1) e LC-APCI-MS (2) da fração alcaloídica das folhas em escala analítica.....	59
Figura 33: Espectro de massa da amostra OaF4.....	61
Figura 34: Espectro de MS <sup>2</sup> para o íon <i>m/z</i> 328 [M+H] <sup>+</sup> .....	61
Figura 35: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra OaF4.....	63
Figura 36: Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra OaF4.....	65
Figura 37: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra OaF4.....	66
Figura 38: Estrutura do alcaloide estefolidina.....	67
Figura 39: Principais correlações observadas para a amostra OaF4.....	67
Figura 40: Espectro de massa da amostra OaF8.....	69

Figura 41: Espectro de MS <sup>2</sup> para o íon $m/z$ 342 [M+H] <sup>+</sup> .....	69
Figura 42: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da amostra OaF8.....	71
Figura 44: Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância OaF8. ....	72
Figura 45: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância OaF8.....	73
Figura 45: Estrutura do alcaloide isocoripalmina.....	74
Figura 46: Principais correlações observadas para amostra OaF8. ....	74
Figura 47: Espectros de massas da amostra OaF9.....	76
Figura 48: Espectro de MS <sup>2</sup> para o íon $m/z$ 286 [M+H] <sup>+</sup> .....	76
Figura 49: Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ) de OaF9.....	78
Figura 50: Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ) da amostra OaF9. ....	79
Figura 51: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ) da amostra OaF9. ....	80
Figura 53: Estrutura do alcaloide norjuzifina. ....	81
Figura 54: Principais correlações observadas para amostra OaF9. ....	82
Figura 55: Espectro de massa da amostra OaF11.....	83
Figura 56: Espectro de MS <sup>n</sup> para o íon $m/z$ 268 [M+H] <sup>+</sup> .....	84
Figura 56: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CD <sub>3</sub> COCD <sub>3</sub> ) amostra OaF11.....	85
Figura 58: Estrutura do alcaloide assimilobina.....	86
Figura 58: Espectro de massa da amostra OaF13.....	87
Figura 59: Espectro de MS <sup>n</sup> para o íon $m/z$ 282 [M+H] <sup>+</sup> .....	88
Figura 60: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amostra OaF13.....	89
Figura 61: Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amostra OaF13.....	90
Figura 62: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância OaF13.....	91
Figura 64: Estrutura do alcaloide normuciferina. ....	92
Figura 65: Principais correlações observadas para a amostra OaF13. ....	92
Figura 65: Espectro de massa da amostra OaF15.....	94
Figura 66: Espectro de MS <sup>n</sup> para o íon $m/z$ 266 [M+H] <sup>+</sup> .....	94
Figura 68: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amostra OaF15.....	96
Figura 69: Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amostra OaF15.....	97
Figura 70: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amostra OaF15.....	98
Figura 71: Estrutura do alcaloide anonaína. ....	99
Figura 72: Principais correlações observadas para amostra OaF15. ....	100
Figura 73: Espectro de massa da amostra OaF17.....	101
Figura 74: Espectro de MS <sup>n</sup> para o íon $m/z$ 312[M+H] <sup>+</sup> .....	102
Figura 75: Espectro de RMN <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amostra OaF17.....	103
Figura 76: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da amostra OaF17.....	104
Figura 77: Estrutura do alcaloide <i>O</i> -metilisopilina. ....	105
Figura 78: Principais correlações observadas para amostra OaF17. ....	105
Figura 78: Cromatograma de LC-DAD e LC-APCI-MS, para o PFOa. ....	107
Figura 79: Espectro de íons totais do PFOa. ....	107
Figura 80: Espectros de MS/MS dos íons de $m/z$ 328 e 342. ....	108

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Rendimentos dos óleos essenciais obtidos de <i>O. amazonicum</i> . ....	45
Tabela 2: Constituintes dos óleos essenciais das folhas, cascas e galhos de <i>O. amazonicum</i> . ....	45
Tabela 3: Atividade antimicrobiana <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>O. amazonicum</i> com os respectivos valores de CIM ( $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ ).....	51
Tabela 4: Frações obtidas pela análise em CLAE em escala preparativa da folhas. ....	60
Tabela 5: Dados de RMN $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF4 .....	68
Tabela 6: Dados de RMN $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF8. ....	75
Tabela 7: Dados de RMN $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF9. ....	82
Tabela 8: Dados de RMN $^1\text{H}$ da amostra OaF11.....	86
Tabela 9: Dados de RMN $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF13 .....	93
Tabela 10: Dados de RMN $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF15. ....	100
Tabela 11: Dados de RMN $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF17. ....	106

## LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Extração alcaloídica em escala analítica.....	41
Esquema 2: Extração de alcaloides em escala preparativa.....	42

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1 A Família Annonaceae .....</b>	<b>19</b>
2.1.1 Etnobotânica da Família Annonaceae .....	20
<b>2.2 Fitoquímica da Família Annonaceae .....</b>	<b>21</b>
2.2.1 Acetogeninas de Annonaceae .....	22
2.2.2 Alcaloides .....	23
<b>2.3 Óleos Essenciais de Annonaceae e atividade antimicrobiana.....</b>	<b>27</b>
<b>2.4 O gênero <i>Onychopetalum</i> .....</b>	<b>31</b>
<b>2.5 A espécie <i>Onychopetalum amazonicum</i>. .....</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1 Geral .....</b>	<b>34</b>
<b>3.2 Específicos .....</b>	<b>34</b>
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>35</b>
<b>4.1 Análises cromatográficas .....</b>	<b>35</b>
4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica-CLAE .....	35
4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ) preparativa.....	35
4.1.4 Cromatografia Gasosa .....	35
<b>4.2 Solventes e reagentes reveladores .....</b>	<b>36</b>
4.2.1 Solventes.....	36
4.2.2 Reagentes reveladores .....	36
<b>4.3 Métodos espectroscópicos/espectrométricos .....</b>	<b>36</b>
<b>4.4 Outros equipamentos .....</b>	<b>37</b>
<b>4.5 Coleta e identificação do material botânico .....</b>	<b>38</b>
<b>4.6 Obtenção dos óleos essenciais .....</b>	<b>38</b>
<b>4.7 Análises por CG-DIC e CG-EM.....</b>	<b>39</b>
<b>4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. ....</b>	<b>40</b>
<b>4.9 Marcha química para obtenção de alcaloides.....</b>	<b>41</b>



<b>4.10 Análises por APCI-IT-MS<sup>n</sup> e LC-DAD-APCI-MS das frações alcalóidicas de <i>O. amazonicum</i> obtidas em escala analítica.....</b>	<b>43</b>
<b>4.11 Fracionamento por CLAE da fração alcalóidica das folhas em escala preparativa.....</b>	<b>43</b>
4.11.1 Análise de precipitado por APCI-IT-MS e LC-DAD-APCI-MS. ....	44
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>45</b>
<b>5.1 Extração dos óleos essenciais de <i>O. amazonicum</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>5.2 Identificação dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial das folhas de <i>O. amazonicum</i> .....</b>	<b>45</b>
<b>5.3 Identificação dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial das cascas de <i>O. amazonicum</i> .....</b>	<b>47</b>
<b>5.4 Identificação dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial dos galhos de <i>O. amazonicum</i>. ....</b>	<b>49</b>
<b>5.5 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de <i>O. amazonicum</i>.....</b>	<b>50</b>
<b>5.6 Análises por APCI-IT-MS<sup>n</sup> das frações alcalóidicas obtidas em escala analítica .....</b>	<b>51</b>
5.6.1 Análise espectrométrica da fração alcalóidica das folhas, cascas e galhos de <i>O. amazonicum</i> . ....	51
5.6.2 Análise espectrométrica da fração alcalóidica das folhas de <i>O. amazonicum</i> ... ..	52
<b>5.7 Resultado do fracionamento por CLAE da fração alcalóidica das folhas, realizado em escala preparativa.....</b>	<b>59</b>
<b>5.8 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração alcalóidica das folhas obtidas em escala preparativa de <i>O. amazonicum</i>.....</b>	<b>61</b>
5.8.1 Determinação estrutural da amostra OaF4 .....	61
5.8.2 Determinação estrutural da amostra OaF8 .....	69
5.8.3 Determinação estrutural da amostra OaF9 .....	76
5.8.4 Determinação estrutural da amostra OaF11 .....	83
5.8.5 Determinação estrutural da amostra OaF13. ....	87
5.8.6 Determinação estrutural da amostra OaF15 .....	94
5.8.7 Determinação estrutural da amostra OaF17. ....	101
<b>5.9 Análise por LC-DAD-APCI-MS do precipitado.....</b>	<b>107</b>
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>109</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>110</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Ao longo dos anos diversas plantas têm sido utilizadas pela humanidade para fins medicinais, visando o tratamento das mais diversas doenças, sendo os princípios ativos e seus modos de ação desconhecidos, na maioria dos casos (CRAGG & NEWMAN, 2013). A exploração adequada destes conhecimentos etnobotânicos, transmitidos com o passar dos anos e o avanço das técnicas de abordagens fitoquímicas culminaram com a descoberta de poderosos fármacos (YUNES & CECHINEL-FILHO, 2001). Como exemplo, pode ser citado o uso medicinal por 4000 anos da espécie *Papaver somniferum* L. (papoula do ópio), da qual foram isolados, no início do século XIX, os alcaloides morfina e codeína, os quais são usados até hoje, respectivamente, como analgésico e antitussígeno. As cascas de *Cinchona* sp, plantas medicinais sul-americanas conhecidas desde o século XVII como febrífugas, forneceram, posteriormente, o alcaloide antimalárico quinina, cuja estrutura inspirou uma série de medicamentos usados há algumas décadas para combater a malária (Figura 1) (VIEGAS-JR et al., 2006; HOSTETTMANN et al., 2003; DEWICK, 2009).

Estima-se que na Região Amazônica existam pelo menos 80.000 espécies vegetais, muitas das quais são comercializadas como plantas medicinais, demonstrando a importância que esta floresta possui como maior reservatório natural da diversidade vegetal do planeta (FONSECA, 2005; MACIEL et al., 2002 ). Em meio a esta grande diversidade, várias espécies pertencentes à família Annonaceae destacam-se por serem empregadas na medicina popular. Suas propriedades farmacológicas vêm sendo confirmadas cientificamente e atribuídas à presença de compostos bioativos, como alcaloides, acetogeninas de anonáceas entre outros (LEBOEUF et al., 1982a; COSTA et al., 2013; ALALI et al., 1999). Apesar dos diversos estudos referentes ao isolamento de

compostos bioativos na família Annonaceae, ainda existem gêneros com pouco ou nenhum estudo fitoquímico, como é o caso do gênero *Onychopetalum*, que até o presente momento apresenta dois trabalhos na literatura (ALMEIDA et al., 1976; SILVA et al., 2015a).

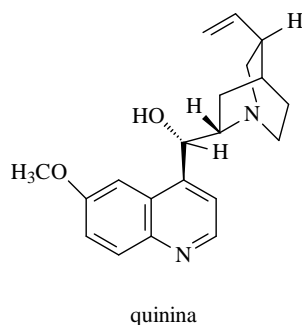
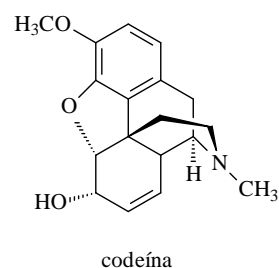
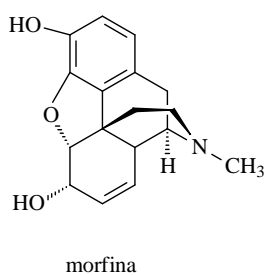


Figura 1: Estruturas de fármacos obtidos de plantas medicinais.

Visando contribuir para o conhecimento químico do gênero *Onychopetalum*, o presente trabalho teve como objetivo, realizar o estudo fitoquímico dos óleos essenciais e frações alcaloídicas das folhas, galhos e cascas de *O. amazonicum*. Em adição, o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais foi avaliado frente a diversas linhagens de micro-organismos.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 A Família Annonaceae

Annonaceae é uma família que tem sua distribuição pantropical (Figura 2) constituída atualmente por cerca de 109 gêneros e 2440 espécies (CHATROU et al., 2012). No Brasil, registram-se 392 espécies (29 gêneros), com cerca 287 espécies distribuídas Região Amazônica (MAAS et al., 2015).

Esta família pode ocorrer como árvores, arvoretas e lianas, sendo a maioria das espécies plantas lenhosa. Suas folhas são alternadas, inteiras e dísticas. As flores podem ser axilares ou não axilares, raramente terminais com seus frutos principalmente apocárpicos. Nas cascas observa-se a presença de fibras longas e resistentes. Seus troncos apresentam no corte transversal marcas de chamuscas e quando cortados exalam um forte odor (RIBEIRO et al., 1999; MAAS et al., 2007a)

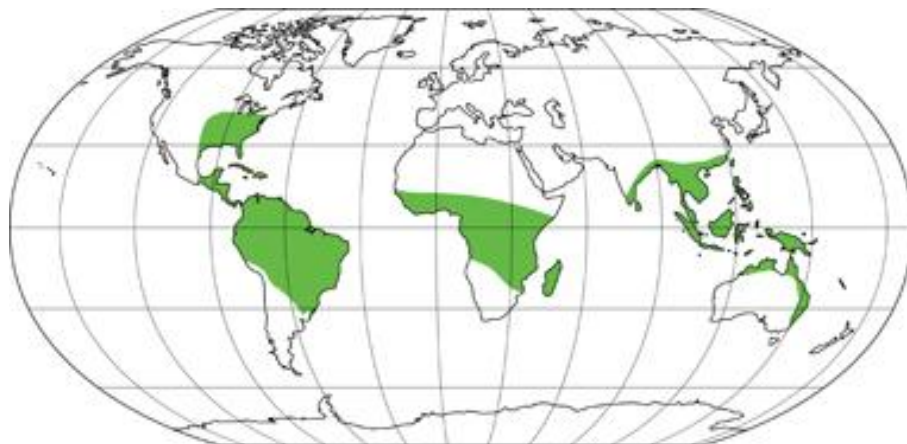


Figura 2: Distribuição geográfica da família Annonaceae.

Fonte: [http://www.thecompositaehut.com/www\\_tch/images/webcurso\\_spv/mapas/annonaceae.jpg](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/images/webcurso_spv/mapas/annonaceae.jpg)

### 2.1.1 Etnobotânica da Família Annonaceae

Além de fornecer frutos comestíveis tais como graviola (*Annona muricata* L.), fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.), cherimóia (*Annona cherimola* Mill.) e a atemoia (híbrido de *A. cherimola* x *A. squamosa*) (Figura 3), algumas espécies desta família, são utilizadas na medicina popular com diversas finalidades (PBMH, 2013; DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002). O chá das cascas da espécie *Rollinia leptopetala* R. E. Fries (recentemente incorporada ao gênero *Annona*) tem sido usado popularmente como digestivo e para tratar tumores (AGRA et al., 2007). As folhas de algumas espécies do gênero *Unonopsis* são utilizadas por povos indígenas na Amazônia para o tratamento de demência e dificuldades na fala (ADAMS et al., 2007a).

A espécie *Annona squamosa* é considerada em algumas comunidades da Índia uma fruta sagrada, devido a resultados significativos da sua utilização para tratamento contra a diabetes (GAJALAKSHMI et al., 2011). As sementes de *Xylopia frutescens* Aubl. (Figura 3) (conhecida popularmente como embira) são empregadas como estimulantes para bexiga e no combate a doenças intestinais (AGRA et al., 2007). O chá das folhas da espécie *Xylopia aromatica* (Lam.) (Figura 3) tem sido usado por índios da Região Amazônica como diurético e para tratamento de edemas na pele (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).



Figura 3: Espécies da família Annonaceae: (A) *A. squamosa*; (B) *A. muricata*; (C) *X. Aromatica*; (D) *X. frutescens*.

Fontes: <http://biogeodb.stri.si.edu/bioinformatics/dfm/metas/view/18154>;  
[http://www.botanicalgarden.ubc.ca/potd/2007/04/annona\\_muricata.php](http://www.botanicalgarden.ubc.ca/potd/2007/04/annona_muricata.php);  
<http://fest2012.greennation.com.br/pt/obra/297/Evando-Ferreira-Lopes/Pimenta-de-macaco-Xylopiya-aromatica>.

## 2.2 Fitoquímica da Família Annonaceae

A família Annonaceae é rica em muitas classes de metabolitos secundários, sendo os alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico os constituintes mais recorrentes (LEBOEUF et al., 1982a).

Dentre os constituintes não alcaloídicos, são encontrados compostos aromáticos, acetogeninas de anonáceas, terpenoides, entre outros (ALALI et al., 1999; ANKISSETTY et al., 2006; ALITONOU et al., 2013). Na classe dos terpenoides, destacam-se os monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e esteróides, sendo o triterpeno policarpol considerado um marcador taxonômico da família (TAVARES et al., 2006; PALAZZO et al., 2009; SILVA et al., 2015a). Também são

marcadores na família as acetogeninas de anonáceas, classe de produtos naturais isolada exclusivamente das espécies de Annonaceae (RUPPRECHT et al., 1990).

### 2.2.1 Acetogeninas de Annonaceae

As acetogeninas de anonáceas são identificadas como derivados de ácidos graxos de cadeia alifática, contendo em sua estrutura 35 a 37 átomos de carbono. São caracterizadas por possuírem uma -lactona terminal, contendo de 1 a 3 anéis tetrahydrofurano (THF) e diversas funções oxigenadas ao longo da cadeia (Figura 4). Existem também acetogeninas que ao invés de apresentar anel THF, apresentam anel tetrahidropirânico (THP). (ALALI et al., 1999; LI et al., 2008; KOJIMA & TANAKA, 2009). Estes compostos são conhecidos por exibirem uma ampla atividade biológica tais como: anticâncer, antiparasitário, inseticida e efeitos imunossupressores (LIAW et al., 2010).

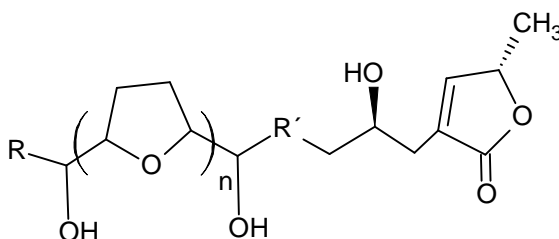


Figura 4: Representação estrutural de acetogenina de anonáceas.

Em estudos realizados por Sun e colaboradores (2014) com o fruto da espécie *Annona muricata*, foram isoladas três acetogeninas, que apresentaram significativas atividades inibidoras contra células cancerosas da próstata. A acetogenina esquamocina, isolada da espécie *Annona squamosa*, apresentou potencial controle contra *Aedes aegypti* (Figura 5) (COSTA et al., 2014). Das sementes de *Annona cornifolia*, foi isolada a acetogenina cornifolina, sendo esta ativa contra linhagens tumorais, principalmente sobre glioma de ratos (Figura 5)(LIMA et al., 2012).

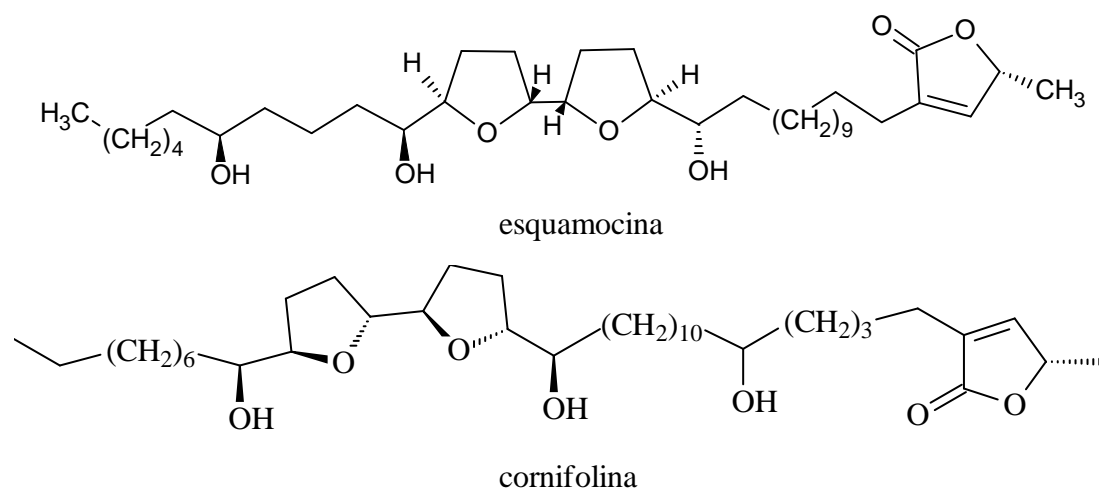


Figura 5: Acetogeninas isoladas de espécies da família Annonaceae.

### 2.2.2 Alcaloides

Os alcaloides são compostos nitrogenados de baixo peso molecular amplamente distribuído no reino vegetal, especialmente entre as angiospermas. Estes metabólitos secundários são conhecidos por possuírem uma basicidade típica, no entanto, o nível de basicidade varia bastante, dependendo da estrutura da molécula e da presença de outros grupos funcionais. São classificados de acordo com a natureza do átomo de nitrogênio contido em sua estrutura e pela sua rota biossintética. Dentre os aminoácidos envolvidos na biossíntese dos alcaloides os principais são: *L*-ornitina, *L*-lisina, *L*-tirosina e o *L*-triptofano, estes são respectivamente precursores de alcaloides do tipo tropânicos, piperidínicos, isoquinolínicos, indólicos (Figura 6), entre outros (DEWICK, 2009).



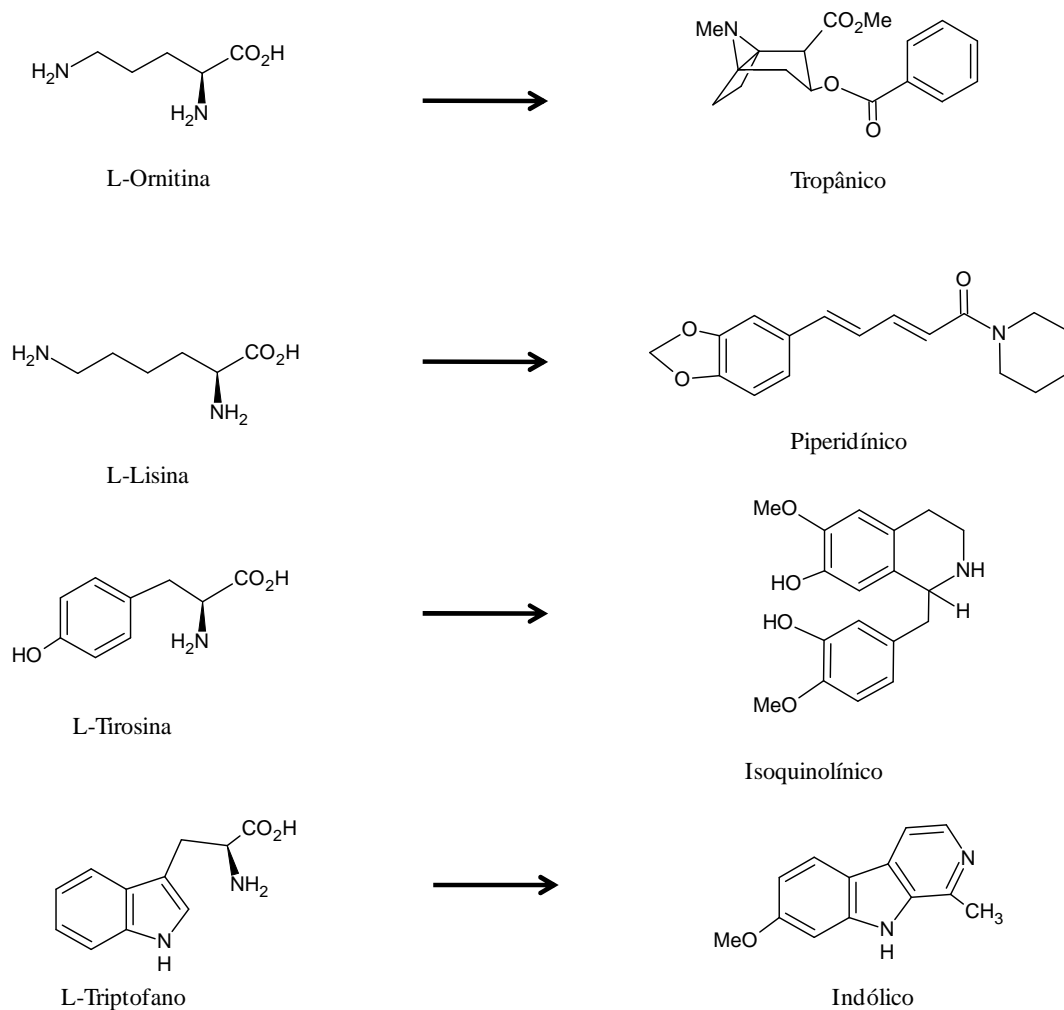


Figura 6: Principais alcaloides e seus precursores.

Como descrito anteriormente, alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico são recorrentes nesta família (LEBOEUF et al., 1982a). Na figura 7 estão reportados alguns exemplos destes alcaloides. Das folhas de *Annona sericea* foram isolados alcaloides dos tipos aporfínicos (normuciferina) e benziltetraidroisoquinolínico (3-hidroxinormuciferina) (CAMPOS et al., 2008). Alcaloides do tipo bisbenzilisquinolínico tais como filogalina foram isolados das cascas de *Gutteria boliviana* (MAHIOU et al., 2000). Estudos realizados por Granell e colaboradores (2004) com a espécie *Xylopi colombiana* reportam o isolamento de alcaloides bisbenziltetraidroisoquinolínico como a medelina e antioquina. Os alcaloides palmatina e jatrorrhizina do tipo

protoberberínicos, foram isolados da espécie *Annickia kummeriae* (MALEBO et al., 2013).

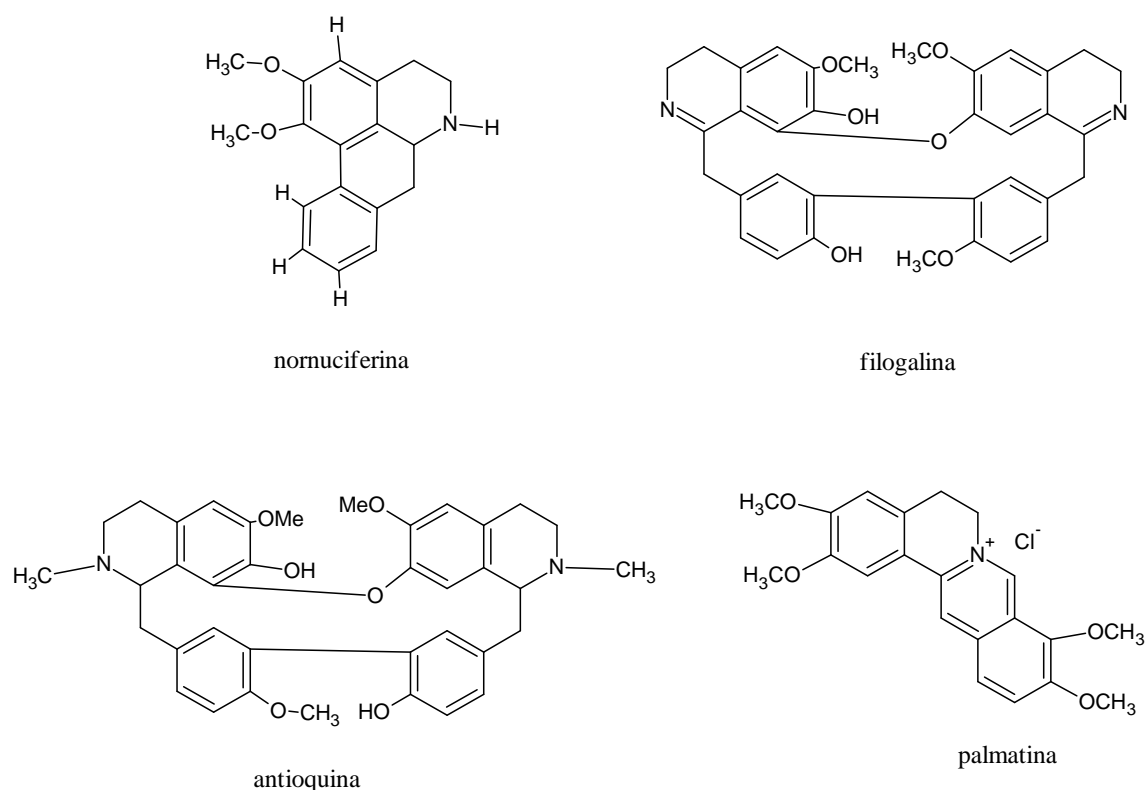


Figura 7: Exemplos de alcaloides encontrados em Annonaceae

Alcaloides aporfínicos e derivados são bastante encontrados em diferentes espécies da família Annonaceae (SILVA et al., 2007; DUTRA et al., 2012; SILVA et al., 2014). Quimicamente estes alcalóides são caracterizados como bases tetracíclicas formadas pelo acoplamento oxidativo direto entre anéis aromático A e D de núcleos típicos benzilisoquinolínicos (Figura 8) (STÉVIGNY et al., 2004).

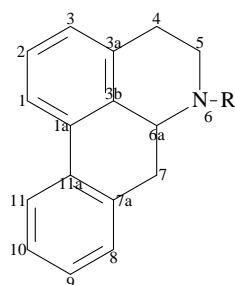


Figura 8: Estrutura básica de alcaloides aporfínicos.

A rota biossintética para os alcaloides aporfínicos (Figura 9) inicia-se a partir do aminoácido *L*-tirosina. Duas moléculas de *L*-tirosina paralelamente sofrem reação, uma é descarboxilada para formar a dopamina e a outra sofre uma reação de transaminação dando origem ao ácido 4-hidroxifenilpirúvico. Posteriormente, os produtos das duas reações sofrem condensação através da reação de Mannich, formando (*S*)-Norcoclaurina. Reações seguintes de metilação e oxidação levam a formação de (*S*)-Reticulina. Sendo a (*S*)-Reticulina precursora dos alcaloides aporfínicos, formados posteriormente em acoplamento oxidativo (DEWICK, 2009). Diversas atividades biológicas são descritas na literatura para estes tipos de alcaloides e derivados, tais como: citotóxica, antimicrobiana e antiprotozoários (PAULO et al., 1992; SILVA et al., 2007; SILVA et al., 2012a; COSTA et al., 2013).

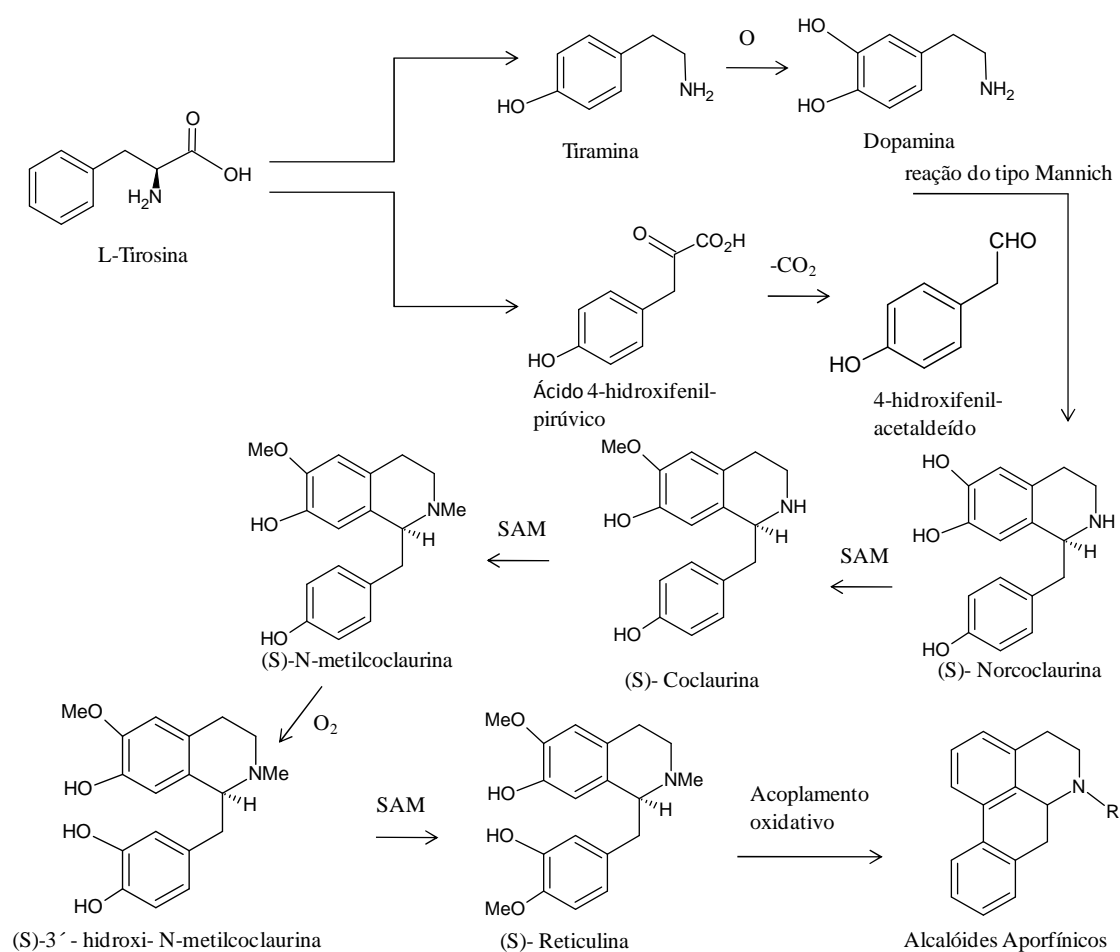


Figura 9: Rota biossintética dos alcalóides aporfínicos.

Fonte: DEWICK, 2009

### 2.3 Óleos Essenciais de Annonaceae e atividade antimicrobiana

Óleos essenciais são misturas complexas constituídas por terpenoides (mono e sesquiterpenos) e fenilpropanoides, sendo estes metabólitos responsáveis por suas características organolépticas. Podem ser obtidos a partir de folhas, cascas, caule, flores, frutos e sementes (BIZZO et al., 2009; BAKKALI et al., 2008).

Os terpenoides formam uma grande e diversificada família de produtos naturais, constituídos de unidades de isopreno  $C_5$ , envolvendo diretamente na sua formação as unidades biologicamente ativas: Dimetilalil difosfato (DMAPP) e Isopentenil difosfato (IPP) (Figura 10). Sua origem pode ser a partir de duas vias biossintéticas: via do

mevalonato e a via desoxi-xilulose fosfato. São classificados de acordo com o número de unidades de isopreno: hemiterpenos (C<sub>5</sub>), monoterpenos (C<sub>10</sub>), sesquiterpenos (C<sub>15</sub>), diterpenos (C<sub>20</sub>), sesterterpenos (C<sub>25</sub>), triterpenos (C<sub>30</sub>) e tetraterpenos (C<sub>40</sub>) (DEWICK, 2009).



Figura 10: Unidades de isopreno precursoras.

Os óleos essenciais da família Annonaceae são constituídos por mono e sesquiterpenos, observando-se que os monoterpenos são comumente encontrados em frutos e sementes e sesquiterpenos em folhas, cascas e raízes (FOURNIER et al., 1999).

De acordo com Fontes e colaboradores (2013) os óleos essenciais da espécie *Guatteria pogonopus* tem como constituintes majoritários -patchouleno, (*E*)-cariofileno e -pineno. Estudos realizados por Costa e colaboradores (2011a), com as espécies *Annona salzmanii* e *A. pickelii*, constatou-se que os óleos de ambas espécies eram constituídos predominantemente de sesquiterpenos e que os compostos majoritários eram o biciclogermacreno e (*E*)-cariofileno. O óleo essencial da espécie *Xylopiia frutescens* tem como principais constituintes (*E*)-cariofileno, biciclogermacreno, germacreno D e -copaeno (FERRAZ et al., 2013). Para a espécie *Annona foetida*, o biciclogermacreno (35,12%), (*E*)-cariofileno (14,19%) e -copaeno (8,19%) foram identificados como os compostos majoritários (COSTA et al., 2009). A espécie *Bocageopsis pleiosperma* Maas apresentou na composição dos óleos essenciais o sesquiterpeno -bisaboleno como constituinte majoritário. (SOARES et al., 2015a). Trabalho de Silva e colaboradores (2015b) sobre óleo essencial de espécies *Unonopsis*

*guatterioides*, *U. stipitata*, *U. floribunda*, *U. rufescens* e *U. duckei*, revelou como constituintes majoritários os sequiterpenos óxido de cariofileno e espatulenol com exceção de *U. guatterioides* e *U. stipitata* (Figura 11).

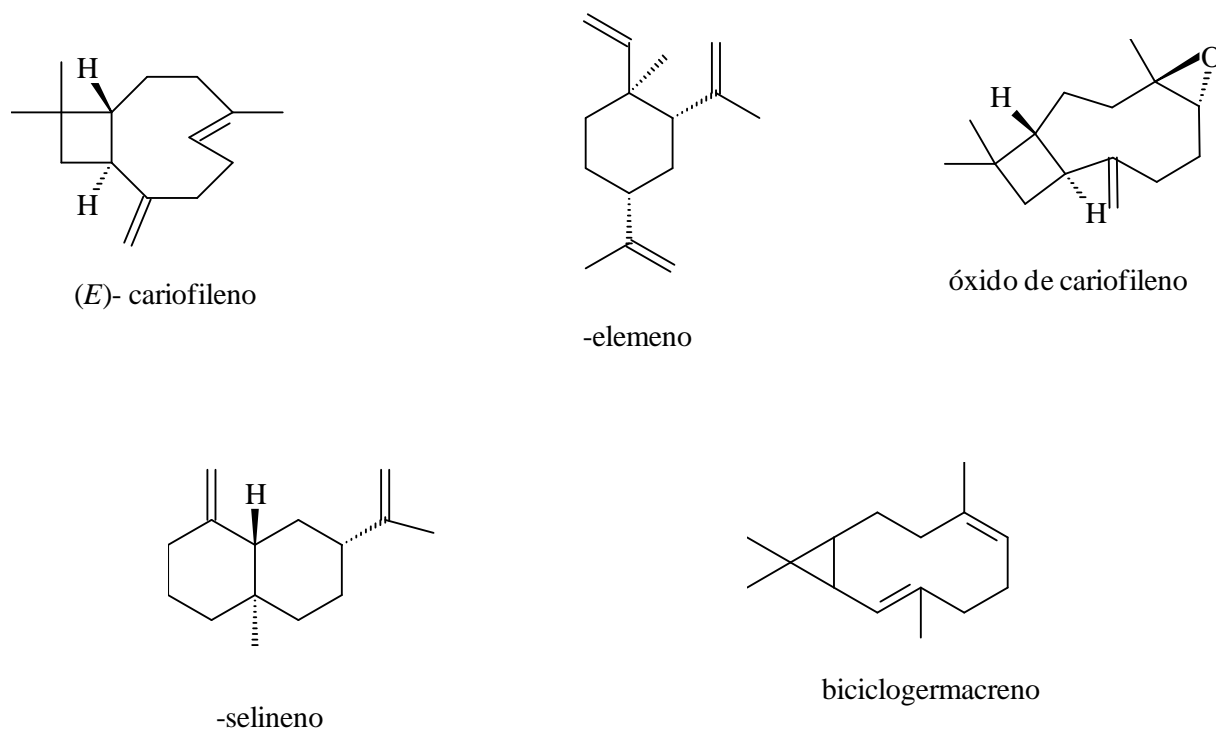


Figura 11: Exemplos de terpenos encontrados em óleos essenciais na família Annonaceae.

A resistência de micro-organismos contra os medicamentos disponíveis no mercado constitui-se em um sério problema de saúde pública, gerando a necessidade de busca de novos compostos bioativos para o combate às graves enfermidades por eles produzidas. Os óleos essenciais tem chamado atenção como fontes naturais seguras, cujos estudos têm revelado inúmeras atividades medicinais, como anti-oxidante, anti-inflamatória, anti-vira, anticarcinogênica e antimicrobiana (SHAABAN et al., 2012).

Várias espécies de Annonaceae da Amazônia têm revelado atividade antimicrobiana como pode ser constatado em alguns relatos citados a seguir. A espécie *Guatterioipsis blepharophylla* teve óxido de cariofileno como composto majoritário, sendo relatada uma potente atividade contra a bactéria *Rhodococcus equi* exibindo um

CIM de  $50\mu\text{g mL}^{-1}$  (COSTA et al., 2008). A espécie *B. pleiosperma* Maas apresentou na composição dos óleos essenciais o sesquiterpeno  $\alpha$ -bisaboleno como constituinte majoritário, sendo a ele atribuída a moderada atividade contra *Staphylococcus epidermidis*. Os óleos de *Duguetia lanceolata*, constituídos principalmente de  $\alpha$ -elemeno, óxido de cariofileno e  $\alpha$ -selineno apresentaram significativa atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli* e *Candida albicans* (SOUSA et al., 2012).

## 2.4 O gênero *Onychopetalum*

O gênero *Onychopetalum* tem sua distribuição restrita a Região Amazônica, sendo as espécies encontradas frequentemente em florestas não inundadas. Este gênero é constituído por 2 espécies: *O. amazonicum* (R.E. Fr) e *O. periquino* (Rusby) (Figura 12), tendo sido incorporado desde 1959 ao informal “Grupo-*Unonopsis*”, que inclui os gêneros *Bocageopsis* e *Unonopsis* (MAAS et al., 2007b; CHATROU et al., 2012).

Neste grupo informal “Grupo-*Unonopsis*”, o gênero *Onychopetalum* apresenta apenas dois estudos fitoquímicos referentes à espécie *O. amazonicum* (ALMEIDA et al., 1976; SILVA et al., 2015a). Já no gênero *Bocageopsis* poucos relatos fitoquímicos são descritos na literatura. A espécie *B. pleiosperma* Maas apresentou na composição dos óleos essenciais o sesquiterpeno -bisaboleno como constituinte majoritário, enquanto que das folhas foram isolados alcaloides dos tipos: aporfínicos, oxoaporfínico, benziltetraidroisoquinilínico e -carbolínico (SOARES et al., 2015a; 2015b).



Figura 12: Distribuição geográfica do gênero *Onychopetalum*.

Fonte: MAAS et al., 2007b



O gênero *Unonopsis* é de longe o mais estudado, principalmente com relação à prospecção de alcaloides, destacando-se os do tipo aporfínico e derivados (Figura 13) (SILVA et al., 2014; YOSHIDA et al., 2013; SIQUEIRA et al., 1998). Estudos realizados por Waechter e colaboradores (1999) com *U. buchtienii* identificaram alcaloides oxoaporfínicos, tais como liriodenina, enquanto que de *U. guatteroides* foram reportados alcaloides aporfínicos, oxoaporfínicos e azafluorenona (SILVA et al., 2012b). Das cascas do caule de *U. lindimani* foi isolado o alcaloide do tipo oxoaporfínico lisicamina (SILVA et al., 2007).

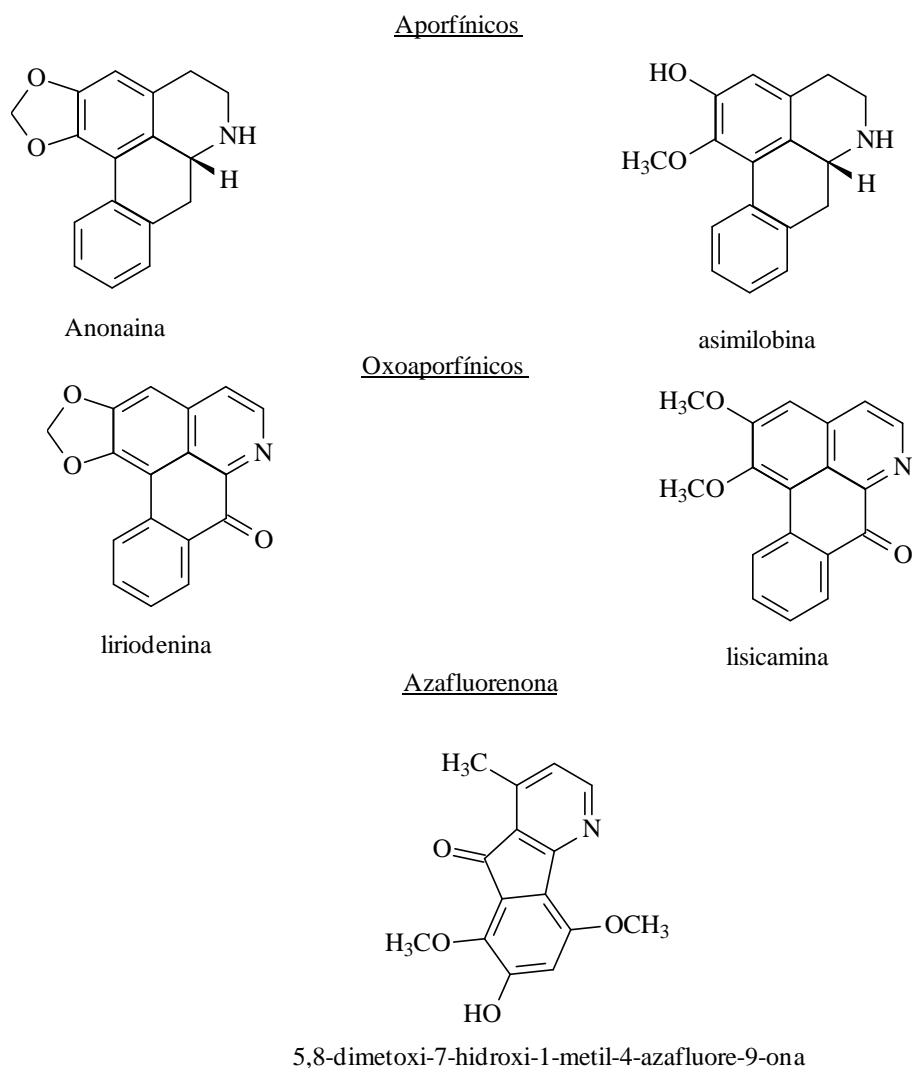


Figura 13: Alcaloides aporfínicos e derivados encontrados no gênero *Unonopsis*.

## 2.5 A espécie *Onychopetalum amazonicum*.

A espécie *O. amazonicum*, conhecida popularmente como envira preta e envira caju, tem sua distribuição na Região Amazônica brasileira (Amazonas, Mato Grosso, Pará e Rondônia) e na Venezuela (Amazonas). Suas árvores tem cerca de 10 a 30 metros de altura, chegando a 90 cm de diâmetro. Frequentemente são encontradas em florestas não inundadas, com um período de frutificação de setembro a janeiro e o de floração em janeiro, junho e setembro (MAAS et al., 2007b).

Na literatura há apenas dois relatos de estudo químico. No primeiro trabalho foram reportados nas cascas do tronco os esteróides, sitosterol e estigmasterol, além do alcaloide onichina (Figura 14) (ALMEIDA et al., 1976). O segundo trabalho envolve a extração de policarpol das cascas (SILVA et al., 2015a).

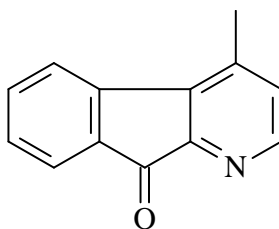


Figura 14: Alcaloide onichina.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Contribuir para o conhecimento químico e biológico do gênero *Onychopetalum* (Annonaceae) por meio de estudos fitoquímicos e pela investigação do potencial antimicrobiano dos óleos essenciais da espécie *O. amazonicum*.

#### 3.2 Específicos

- ✓ Avaliar as frações alcaloídicas das folhas, cascas e galhos utilizando técnicas APCI-IT-MS<sup>n</sup> e LC-DAD-APCI-MS, a fim de selecionar as mais promissoras para estudo fitoquímico;
- ✓ Isolar constituintes das frações alcaloídicas e caracterizá-los através de técnicas de RMN 1D/2D e EM;
- ✓ Caracterizar os compostos presentes nos óleos essenciais das folhas, cascas e galhos de *O. amazonicum*, através de análises cromatográficas por CG-EM e CG-DIC;
- ✓ Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas, cascas e galhos de *O. amazonicum*.

## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Análises cromatográficas**

#### **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. Para detecção dos compostos usou-se irradiação com lâmpada ultravioleta (UV) (264 e 365 nm) e revelação com reagente Dragendorff.

#### **4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica-CLAE**

Utilizou-se um cromatógrafo Acella<sup>®</sup> (Thermo Scientific), operando simultaneamente com um detector PDA e um detector de espectrometria de massas (TSQ Quantum Access). Foi utilizada uma coluna Luna C18 (5µm, 150 x 4,60 mm) Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol e água acidificada (0,01% TFA).

#### **4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE ) preparativa**

O isolamento em escala preparativa foi realizado em um cromatógrafo modelo Shimadzu<sup>®</sup>, CBM-20A, equipado com detector de UV SPD-20A, degaseificador DGU-20A e sistema binário de solventes LC-6AD. Utilizou-se uma coluna Luna C18 (5µm, 250 x 15.00 mm) Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol e água acidificada (0,01% TFA).

#### **4.1.4 Cromatografia Gasosa**

Os óleos essenciais foram analisados em um cromatógrafo gasoso acoplado aos detectores de ionização de chama (DIC) e espectrometria de massas (EM), modelo CG2010/ QP2010 Plus (Shimadzu©). As análises foram realizadas no Centro de

Biotecnologia da Amazônia (CBA), sob responsabilidade do MSc. Raimundo Carlos Pereira Junior.

## **4.2 Solventes e reagentes reveladores**

### **4.2.1 Solventes**

Para o preparo dos extratos foram utilizados solventes grau PA (Nuclear<sup>®</sup>). Utilizaram-se solventes grau HPLC para as análises cromatográficas analítica e preparativa, bem como para as análises por espectrometria de massas. Os espectros de RMN foram obtidos em solventes deuterados.

### **4.2.2 Reagentes reveladores**

Reagente de Dragendorff (modificação de Munier) (MUNIER, 1953 apud Merck, 1971): Solução A: 1,7 g de nitrato de bismuto III e 20,0 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada. Solução B: 16,0 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das cromatoplasmas, adicionou-se 10,0 g de ácido tartárico, dissolvidos em 50 mL de água destilada. Após borrifação das placas cromatográficas os *spots* das substâncias alcaloídicas apresentaram coloração laranja.

## **4.3 Métodos espectroscópicos/espectrométricos**

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetro do tipo *Íon-trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo scientific), operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI); e espectrômetro do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Acess, operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI). As análises de espectrometria de massas foram realizadas no laboratório de espectrometria de massas da Universidade Federal do Amazonas - UFAM.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  e 2D foram obtidos em equipamento modelo Bruker Avance 600 (600 MHz), do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná-UFPR, sob responsabilidade do professor Dr. Anderson Barison. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio, acetona e metanol deuterados ( $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Tetrametilsilano (TMS) foi utilizado como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (  $\delta$  ) e as constantes de acoplamento ( $J$ ) foram registradas em Hertz (Hz).

#### 4.4 Outros equipamentos

- Liquidificador Industrial: Modelo JBM35 - Motor: 1/2 CV - 50/60 Hz;
- Balança analítica: MARK classe 1 (máx. 220 g – mín.10 mg);
- Pipeta automática: Gilson<sup>®</sup>, P 1000 e P 200 ;
- Ultrasson: Unique, modelo USC-2800;
- Evaporador rotatório: Heidolph, tipo Heizbad OB.

#### 4.5 Coleta e identificação do material botânico

As folhas, galhos e cascas de *O. amazonicum* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, no dia 11 de março de 2014 (Figura 15), de indivíduo previamente marcado (nº 163). Sua exsicata encontra-se depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) sob o N °218341.

Após a coleta, as diferentes partes da planta foram separadas, limpas e secas a temperatura ambiente por 20 dias. Posteriormente o material foi triturado separadamente e pesado.



Figura 15: Espécie de *O. amazonicum* coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke.

Fonte: Lima, 2014

#### 4.6 Obtenção dos óleos essenciais

Aproximadamente 100 g das folhas, cascas e galhos foram submetidas à extração dos óleos essenciais pelo processo de hidrodestilação em aparelho tipo *Clevenger* modificado (Figura 16). Utilizou-se 2L de água destilada durante 4 horas de extração. Os óleos essenciais foram coletados em um frasco pequeno de vidro, sendo adicionado sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) para retirar a água do meio. Seu rendimento foi calculado dividindo-se a massa do óleo pela massa do material inicial e o resultado multiplicado por 100. Os óleos obtidos foram acondicionados em frascos âmbar, fechados e armazenados na temperatura de  $-15^\circ\text{C}$  até as análises.



Figura 16: Extração dos óleos essenciais de *O. amazonicum* em um aparelho tipo *Clevenger* modificado.

Fonte: Lima, 2014

#### 4.7 Análises por CG-DIC e CG-EM

As amostras foram diluídas em diclorometano (1mg/mL) e analisadas por CG-DIC e CG-EM. Para a análise em CG-DIC foi utilizada uma coluna DB-5 (30m x 0,25mm x 0,25  $\mu$ m) temperatura programada de 60 a 240 °C com um gradiente 3°C/min. Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 0,80 mL / min. O modo de injeção foi *split* com razão 1:50, com o injetor a 250°C e o volume de injeção 1 $\mu$ L.

Na análise por CG-EM os espectros de massas foram obtidos em uma faixa de detecção de  $m/z$  40-600, as condições da análise foram as mesmas utilizadas para CG-DIC. Para obtenção do índice de retenção foi injetada uma série homóloga de hidrocarbonetos (C8-C30). Os índices de retenção foram calculados utilizando a equação de Van der Dool-Kratz (Dool & Kratz, 1963). Os constituintes foram identificados com base na comparação dos espectros obtidos com aqueles armazenados



na biblioteca Wiley, 7ª edição do equipamento e comparação dos índices de retenção calculados com os da literatura (ADAMS, 2007).

#### **4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.**

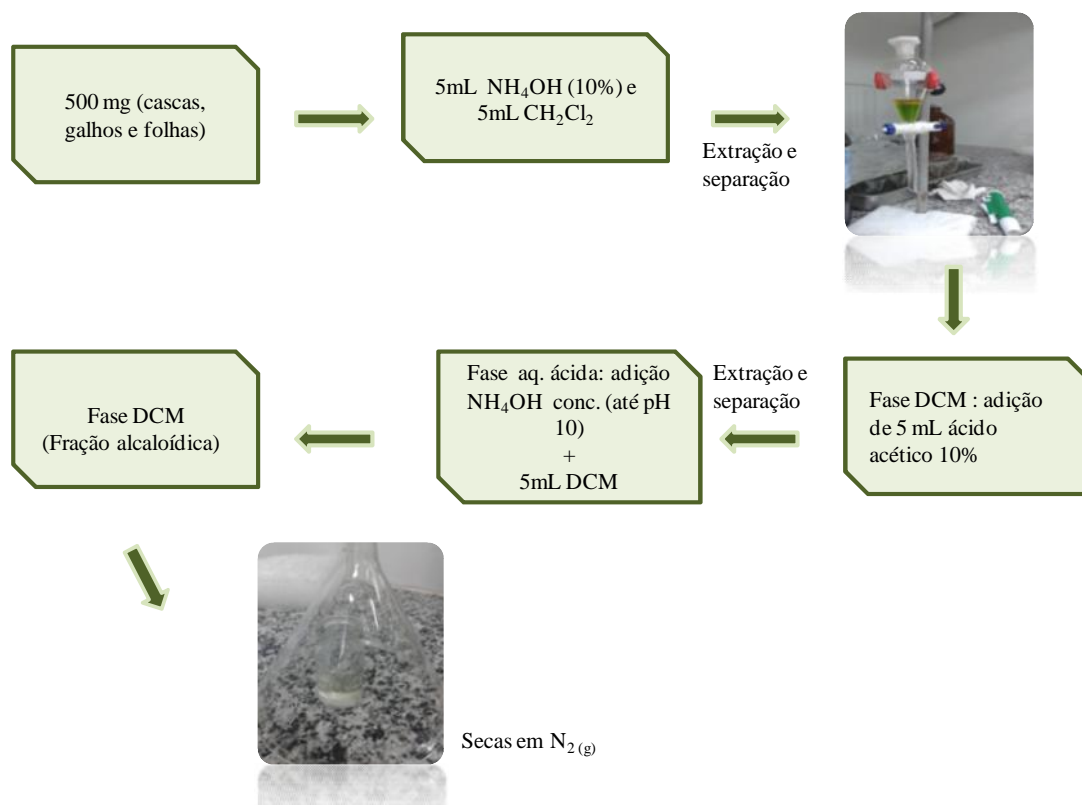
Os experimentos para a avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das cascas do tronco, folhas e galhos de *O. amazonicum* foram realizados no Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas-UNICAMP, sob responsabilidade do Dr. Marcos José Salvador.

Os óleos essenciais foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana, utilizando o método de micro diluição em caldo (placas de 96 poços), como descrito anteriormente (SALVADOR et al., 2002; COSTA et al., 2010). Vinte microlitros de soluções de amostra-teste e de soluções-controle (positivo e negativo) foram aplicadas em poços de 5 mm de diâmetro para dar uma concentração entre 10 a 500 µg/ml. As soluções foram preparadas em DMSO, em concentração de 5000 µg/mL. Como controles positivos foram utilizados discos de cloranfenicol (100 µg/mL) e cetoconazol (100 µg/mL) e como controle negativo foi usada uma solução de dimetilsulfóxido (DMSO)-esterilizado e água destilada (5:95, v / v). A concentração inibitória mínima (CIM) foi calculada como a concentração mais baixa que mostra completa inibição de uma estirpe testada (SALVADOR et al., 2002). Cada teste de sensibilidade foi realizado em duplicata para cada micro-organismo avaliado e repetido três vezes. As estirpes de micro-organismos utilizados foram *Kocuria rhizophila* (ATCC 9341), *Staphylococcus aureus* (ATCC14458), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Escherichia coli* (ATCC 10538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans*(ATCC 10231), *Candida parapsilosis* (ATCC 22019), *Candida tropicalis* (ATCC 157), *Candida glabrata* (ATCC 30070) e *Candida dubliniensis* (ATCC 778157).

#### 4.9 Marcha química para obtenção de alcaloides.

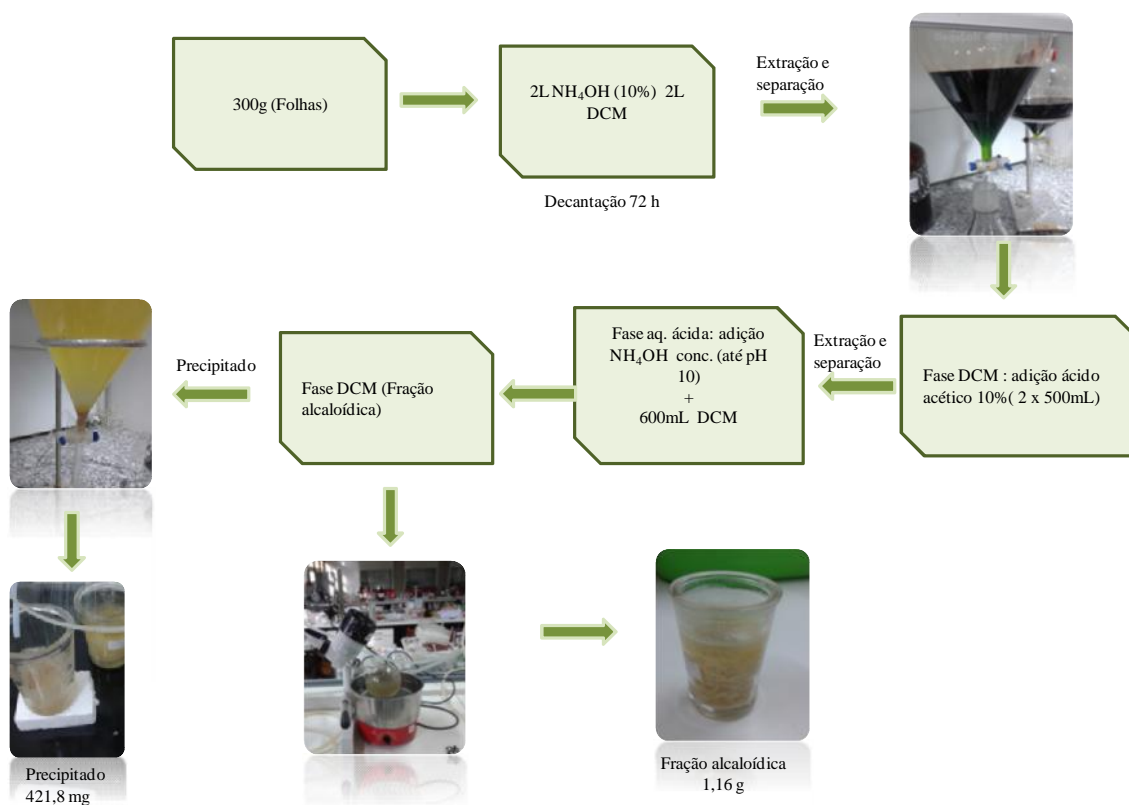
O material vegetal triturado (folhas, cascas e galhos) foi submetido à extração alcaloídica em escala analítica e preparativa, de acordo com metodologia adaptada descrita previamente na literatura (SOARES et al., 2015b).

As frações alcaloídicas em escala analítica (Esquema 1) foram obtidas conforme descrita a seguir: 500 mg de material vegetal (folhas, galhos e cascas) foram transferidos para um recipiente de vidro, adicionando-se 5 mL de hidróxido de amônio a 10% ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) e 5 mL de diclorometano (DCM), agitando-se em seguida. Após extração, a fase DCM foi transferida para um funil de separação, acrescentando-se 5 mL de ácido acético a 10%. A fração aquosa ácida, foi tratada com hidróxido de amônio concentrado, até alcançar o pH 10, acrescentando-se em seguida 5 mL de DCM. Após a extração, a fase orgânica foi separada e seca sob uma corrente de nitrogênio.



Esquema 1: Extração alcaloídica em escala analítica.

Quanto à extração em escala preparativa (Esquema 2), cerca 300 g de folhas trituradas foram maceradas com 2L de  $\text{NH}_4\text{OH}$  10% e 2L de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$  por 72h. Em seguida a fase orgânica foi transferida para um funil de separação e extraída com solução de ácido acético 10% (2x 500mL). Posteriormente, a camada aquosa ácida obtida foi ajustada com  $\text{NH}_4\text{OH}$  (concentrado) até pH 10 e extraída com 600 mL de DCM. Durante a etapa final de extração, observou-se a formação de um precipitado, com teste positivo para alcaloides ao reagente de Dragendorff, sendo separado, seco sob uma corrente de nitrogênio, pesado (421,8 mg) e codificado como PFOa. A fase DCM final, contendo a fração alcaloídica, foi concentrada em um evaporador rotativo, seca em um dessecador e pesada (1,16 g).



Esquema 2: Extração de alcaloides em escala preparativa

#### **4.10 Análises por APCI-IT-MS<sup>n</sup> e LC-DAD-APCI-MS das frações alcaloídicas de *O. amazonicum* obtidas em escala analítica.**

As frações alcaloídicas obtidas em escala analítica (casca, galhos e folhas) foram diluídas a concentração de 10 ppm em metanol grau HPLC, sendo os espectros de *full scan* obtidos por inserção direta em espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (LCQ Fleet), equipado com fonte de APCI e operando em modo positivo de aquisição. Os espectros de MS<sup>n</sup> foram obtidos por inserção direta em espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (LCQ Fleet) equipado com fonte de APCI (modo positivo - energias de colisão entre 15 e 20 %). A faixa de massa analisada foi de  $m/z$  100-1000.

Para a análise de LC-DAD-APCI-MS da fração alcaloídica das folhas utilizou-se um sistema UHPLC, modelo Acella® (Thermo Scientific), acoplado a um espectrômetro de massas do tipo triplo-quadrupolo, modelo TSQ Quantum Acess (Thermo scientific), dotado de uma fonte de APCI (modo positivo) e monitorando a faixa de  $m/z$  100-1000. Utilizou-se uma coluna Luna C18 (5 $\mu$ m, 150 x 4,60 mm) Phenomenex com fluxo de 1 mL/min. As fases móveis utilizadas foram metanol (B) e água acidificada (A) (0,01% TFA), com gradiente B de 20-80% durante 14 minutos, seguido de 80% por 10 min. O detector DAD foi ajustado para o monitoramento entre 200-600 nm.

#### **4.11 Fracionamento por CLAE da fração alcaloídica das folhas em escala preparativa.**

Após escalonamento adequado do método utilizado em escala analítica, cerca de 100 mg da fração alcaloídica das folhas foram solubilizados em 500 $\mu$ L de metanol/diclorometano (1:1) e submetidos a fracionamento em escala preparativa em cromatógrafo modelo Shimadzu® (CBM-20A), equipado com detector de UV (SPD-20A), degaseificador (DGU-20A), sistema binário de solventes (LC-6AD) e *looping* de

500 $\mu$ L. Foi utilizada uma coluna Luna C18 (5 $\mu$ m, 250 x 15.00mm) Phenomenex com fluxo de 8 mL/min. As fases móveis utilizadas foram metanol (B) e água acidificada (A) (0,01% TFA), com gradiente de B de 20-80% durante 14 minutos, seguido de 80% por 10 min, o que resultou em 17 frações. As frações foram analisadas por espectrometria de massas, sendo posteriormente encaminhadas as mais promissoras para análises de RMN 1D e 2D.

#### **4.11.1 Análise de precipitado por APCI-IT-MS e LC-DAD-APCI-MS.**

O precipitado codificada como PFOa, obtido na marcha alcaloídica em escala preparativa, foi analisado por APCI-IT-MS e LC-DAD-APCI-MS, nas mesmas condições utilizadas para a fração alcaloídica das folhas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Extração dos óleos essenciais de *O. amazonicum*.

As amostras obtidas de óleos essenciais de *O. amazonicum* apresentaram uma coloração amarelo claro e rendimentos que variaram de 0,16 a 0,34% (Tabela 1). Observou-se o elevado rendimento das cascas em relação às demais partes da planta analisada. Os rendimentos obtidos são coerentes com aqueles existentes na literatura para outras espécies da família Annonaceae (FOURNIER et al., 1999; ALITONOU et al., 2013; KARIOTI et al., 2004).

Tabela 1: Rendimentos dos óleos essenciais obtidos de *O. amazonicum*.

Amostra	Rendimento %
Folhas	0,18
Cascas	0,34
Galhos	0,16

### 5.2 Identificação dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial das folhas de *O. amazonicum*.

Através da análise de CG-EM e CG-DIC dos óleos essenciais obtidos das folhas de *O. amazonicum* foi possível caracterizar 87,8% da composição química (Tabela 2). Os principais compostos identificados nas folhas foram (*E*)-cariofileno (17,0%), óxido de cariofileno (11,9%), espatulenol (10,4%) -copaeno (8,4%) e biciclogermacreno (5,8%) (Figura 17).

Tabela 2: Constituintes dos óleos essenciais das folhas, cascas e galhos de *O. amazonicum*.

Compostos	Folhas	Cascas	Galhos	I.R <sup>a</sup>	I.R <sup>b,f</sup>	I.R <sup>b,c</sup>	I.R <sup>b,g</sup>
-Elemeno	0,7	-	-	1335	1338	-	-
-Cubebeno	0,7	1,3	-	1348	1350	1350	-
-Copaeno	8,4	3,4	0,2	1374	1377	1377	1374
-Bourboneno	0,6	-	-	1387	1386	-	-
-Elemeno	2,7	2,9	4,2	1389	1393	1393	1393
-Gurjuneno	3,6	14,9	10,6	1409	1406	1406	1406
( <i>E</i> )-Cariofileno	17,0	3,7	-	1417	1421	1421	-
Aromadendreno	1,6	-	-	1439	1440	-	-
-Humuleno	3,1	0,9	-	1452	1455	1455	-
<i>allo</i> -Aromadendreno	-	21,2	2,4	1458	-	1463	1462
-Gurjuneno	-	1,3	-	1475	-	1476	-

-Muroleno	2,9	-	-	1478	1478	-	-
Germacreno D	1,7	-	-	1480	1482	-	-
-Selineno	0,7	0,7	1,4	1489	1487	1487	1487
Biciclogermacreno	5,8	-	-	1500	1497	-	-
-Murolene	1,2	0,7	-	1500	1501	1501	-
( <i>E,E</i> )-Farneseno	-	-	0,4	1505	-	-	1500
-Cadineno	-	1,9	1,8	1513	-	1515	1515
( <i>E</i> )-Calameno	-	-	1,9	1521	-	-	1528
-Cadineno	5,4	3,9	2,4	1522	1524	1524	1524
-Calacoreno	2,7	-	1,3	1544	1544	-	1543
Elemol	-	-	2,5	1548	-	-	1550
Germacreno B	1,0	-	-	1559	1558	-	-
-Calacoreno	0,8	-	-	1564	1564	-	-
( <i>E</i> )-Hidrato sesquisabineno	-	-	0,5	1577	-	-	1578
Espatuleno	10,4	-	-	1577	1579	-	-
Óxido de cariofileno	11,9	3,8	4,9	1582	1584	1584	1584
Viridiflorol	0,7	0,9	1,4	1592	1593	1592	1593
Guaiol	1,1	-	-	1600	1598	-	-
Sesquiterferol	-	-	0,7	1604	-	-	1604
Epóxido humuleno II	1,1	-	3,4	1608	1610	-	1608
1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol	-	-	3,2	1618	-	-	1615
Isolongifolan-7-alfa-ol	-	-	2,4	1618	-	-	1621
1- <i>epi</i> -Cubenol	-	3,2	2,8	1627	-	1629	1629
<i>epi</i> -( )-Cadinol	-	24,1	14,0	1638	-	1643	1642
Cubenol	1,4	0,8	-	1645	1642	1647	-
-Cadinol	0,5	1,3	0,7	1652	1655	1655	1651
Cadeleno	-	-	0,9	1675	-	-	1675
Mustakona	-	-	1,1	1676	-	-	1678
Eudesma-4(15),7-dien-1 -ol	-	-	1,8	1687	-	-	1687
Ciperotundona	-	1,3	8,1	1695	-	1695	1695
Sesquiterpenos não oxigenados (%)	60,7	56,9	27,5				
Sesquiterpenos oxigenados (%)	27,1	35,3	47,5				
Total identificados (%)	87,8	92,2	75,0				

<sup>a</sup> Índice de retenção de acordo com Adams (2007); <sup>b</sup> Índice de retenção calculado de acordo com Van der Dool-Kratz (1963) para os componentes da folhas <sup>f</sup>, cascas <sup>c</sup> e galhos <sup>g</sup>.

Estes compostos majoritários foram anteriormente observados em espécies da família Annonaceae. O óleo essencial da espécie *Xylopiia frutescens* tem como principais compostos (*E*)-cariofileno (31,48%), biciclogermacreno (15,13%), germacreno D (9,66%) e -copaeno (4,55%) (FERRAZ et al., 2013). Segundo Maia e colaboradores (2005), o espatuleno e óxido de cariofileno foram identificados como constituintes principais nas espécies *Guatteria juruensis* (77,5%) e *Guatteria microcalyx* (44,2%), respectivamente. Para a espécie *Annona foetida*, o biciclogermacreno (35,12%), (*E*)-cariofileno (14,19%) e -copaeno (8,19%) foram identificados como os compostos majoritários (COSTA et al., 2009).

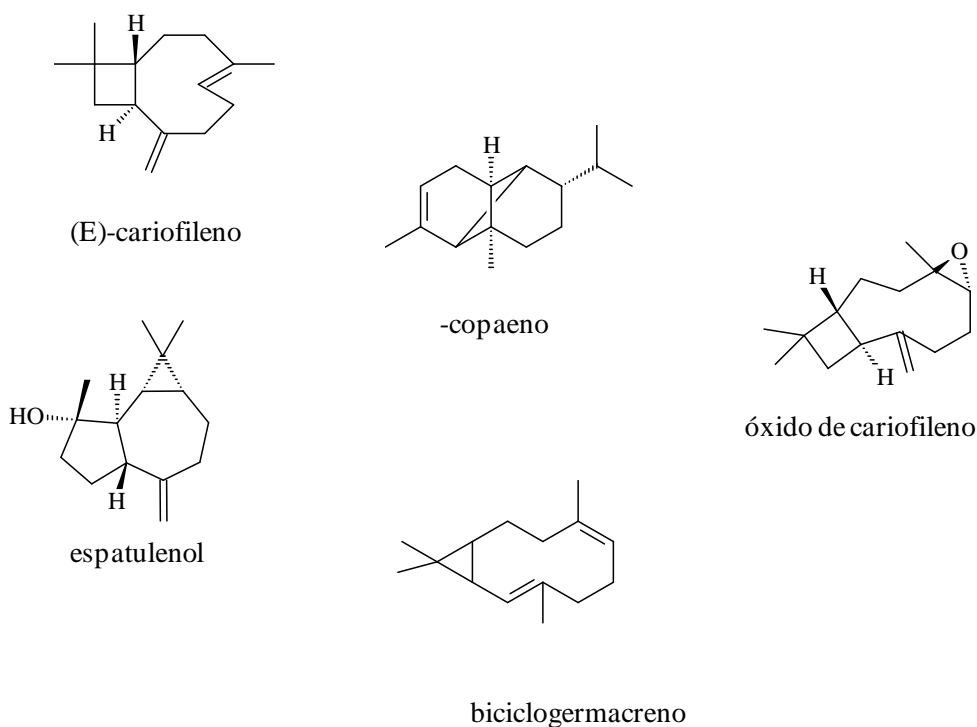


Figura 17: Constituintes majoritários nos óleos essenciais das folhas de *O. amazonicum*.

Em estudos realizados por Owolabi e colaboradores (2013) com óleo essencial de *Annona muricata*, o (*E*) cariofileno (38,9%) foi identificado como composto majoritário, demonstrando uma notável atividade citotóxica. O óleo essencial da espécie *Guatteria pogonopus* apresentou significativa atividade antitumoral, estando presente (*E*)-cariofileno (11,36%) como um dos principais constituintes (FONTES et al., 2013).

### 5.3 Identificação dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial das cascas de *O. amazonicum*

Através dos dados de CG-EM e CG-DIC do óleo essencial das cascas obtido de *O. amazonicum* foi possível caracterizar 92,2% dos constituintes do óleo (Tabela 2). Foi observada a predominância dos compostos (*epi*) -cadinol (24,1%), *allo*-aromadendreno (21,2%), -gurjuneno (14,9%), -cadineno (3,9%) e óxido de cariofileno (3,8%) (Figura 18), sendo estes compostos já identificados em espécies da família Annonaceae, como as espécies *Annona muricata*, *Polyalthia longifolia*, *Duguetia lanceolata*,



*Artabotrys pallens* (KOSSOUOH et al., 2007; OGUNBINU et al., 2007; SOUSA et al., 2012; THANG et al., 2013).

Para o composto (*epi*) -cadinol, tem sido relatado na literatura sua atividade antimicrobiana. O óleo essencial de *Piper amalago*, constituído por 12,70% de (*epi*) -cadinol, apresentou atividade antifúngica satisfatória contra *Candida albicans*, *Candida parapsilosis* e *Candida tropicalis* (CARRARA et al., 2010). Em um estudo realizado com a espécie *Ocimum basilicum* L., o composto (*epi*) -cadinol foi um dos constituintes principais (11,4%, 12,4%, 8,6% e 10%, respectivamente, no verão, outono, inverno e primavera), onde foi observada atividade antimicrobiana contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (HUSSAIN et al., 2008).

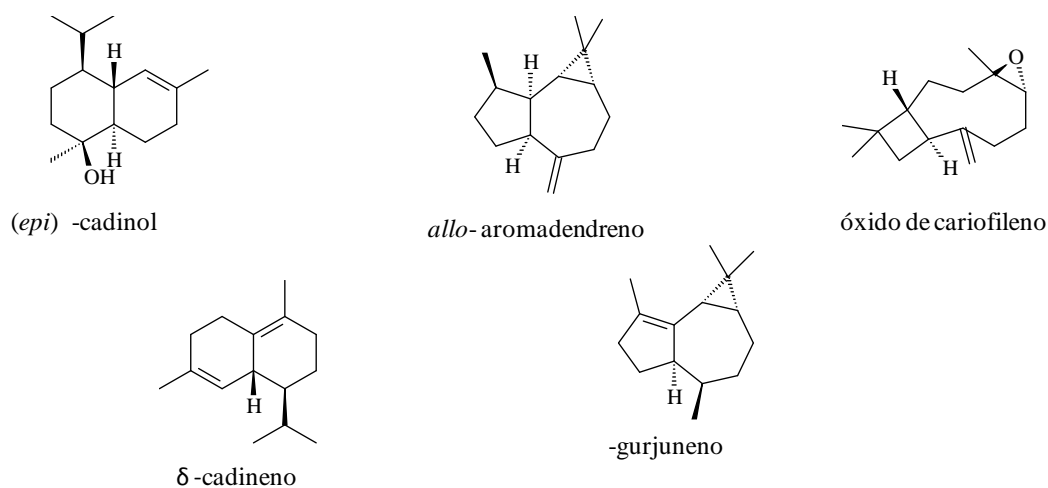


Figura 18: Constituintes majoritários no óleo essencial das cascas de *O. amazonicum*.

#### 5.4 Identificação dos constituintes voláteis presentes no óleo essencial dos galhos de *O. amazonicum*.

Através dos dados de CG-EM e CG-DIC do óleo essencial dos galhos obtido de *O. amazonicum* foi possível caracterizar 75,0% da sua composição química (Tabela 2), tendo como constituintes majoritários (*epi*)-cadinol (14,0%),  $\alpha$ -gurjuneno (10,6%), ciperotundona (8,1%), óxido de cariofileno (4,9%) e  $\beta$ -elemeno (4,2 %) (Figura 19).

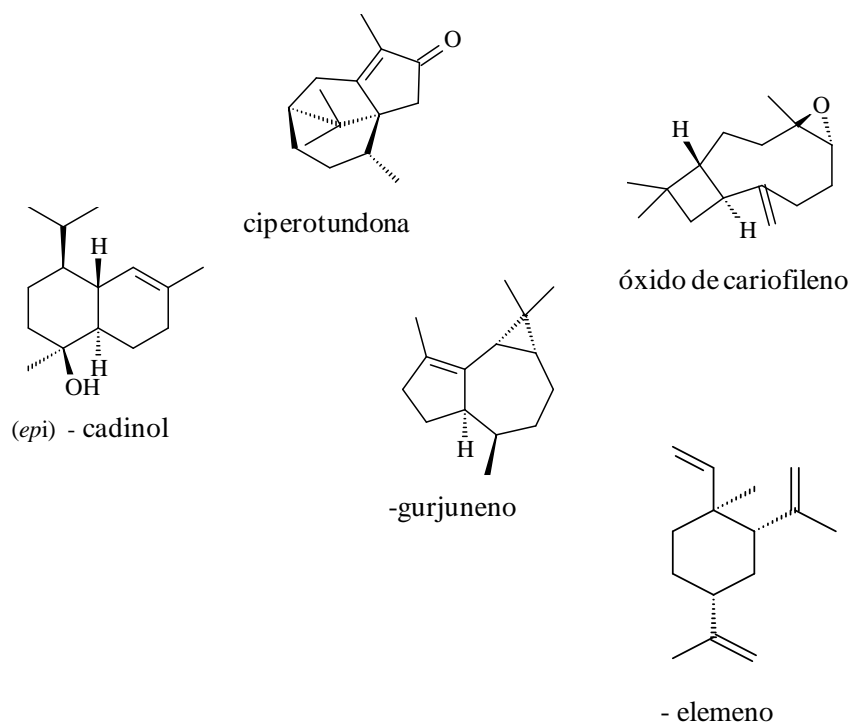


Figura 19: Constituintes majoritários no óleo essencial dos galhos de *O. amazonicum*.

Com relação aos compostos majoritários encontrados nos galhos pôde-se observar uma semelhança com os presentes nas cascas, principalmente pelo alto teor de (*epi*)-cadinol.

Quando comparados os constituintes principais presentes nas folhas, cascas e galhos de *O. amazonicum*, o composto óxido de cariofileno foi o único que esteve presente em todas as amostras com teores 11,9, 3,8 e 4,9% respectivamente. A espécie *Guatteriaopsis blepharophylla* teve óxido de cariofileno (69,25%) como composto

majoritário, sendo relatada uma potente atividade contra a bactéria *Rhodococcus equi* exibindo um CIM de  $50\mu\text{g mL}^{-1}$  (COSTA et al., 2008).

No total, 41 constituintes foram identificados nos óleos essenciais de *O. amazonicum*, destacando-se a presença de sesquiterpenos e a ausência de monoterpenos, o que está em acordo com estudos anteriores com espécies de Annonaceae, onde é comumente observado monoterpenos em frutos e sementes e sesquiterpenos em folhas, cascas e raízes (FOURNIER et al., 1998).

### **5.5 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *O. amazonicum*.**

O óleo essencial das cascas de *O. amazonicum* (CIM  $62,5\ \mu\text{g/ml}$ ) demonstrou atividade contra as bactérias gram-positivas *K. rhizophila* ATCC 9341 e *S. epidermidis* ATCC 12228, e a bactéria gram-negativa *E. coli* ATCC 10538 (Tabela 3). Nenhum efeito contra *S. aureus* ATCC 14458, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans* ATCC 10231, *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. tropicalis* ATCC 157, *C. glabrata* ATCC 30070 e *C. dubliniensis* ATCC 778157 foi observado para os três óleos essenciais.

Esta atividade pode estar associada à presença do composto de um dos compostos majoritários *allo*-aromadendreno (21, 1%), uma vez que (epi) -cadinol (24, 1%) e -gurjuneno (14, 9%) são os principais compostos no óleo essencial dos galhos, parte da planta que não exibiu qualquer atividade. Estudos realizados por Parmena e colaboradores (2012) com a espécie *Monanthes discolor* (Annonaceae) demonstraram atividade antimicrobiana associada à presença do composto *allo*-aromadendreno (11,7 – 12,8%).

Tabela 3: Atividade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de *O. amazonicum* com os respectivos valores de CIM ( $\mu\text{g/mL}^{-1}$ )

<b>Microrganismo</b>	<b>Folhas</b>	<b>Cascas</b>	<b>Galhos</b>	<b>Controle Positivo<sup>b</sup></b>
	CIM <sup>a</sup>	CIM	CIM	CIM
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 14458) <sup>c</sup>	- <sup>a</sup>	-	-	25
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) <sup>c</sup>	-	62,5	-	50
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 10538) <sup>c</sup>	-	62,5	-	50
<i>Kocuria rhizophila</i> (ATCC 9341) <sup>c</sup>	-	62,5	-	50
<i>Candida albicans</i> (ATCC 10231) <sup>c</sup>	-	-	-	12,5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	-	-	>500
<i>Candida parapsilosis</i> (ATCC 22019) <sup>c</sup>	-	-	-	12,5
<i>Candida tropicalis</i> (ATCC 157) <sup>c</sup>	-	-	-	12,5
<i>Candida glabrata</i> (ATCC 30070) <sup>c</sup>	-	-	-	12,5
<i>Candida dubliniensis</i> (ATCC 778157) <sup>c</sup>	-	-	-	12,5

<sup>a</sup>CIM– Concentração inibitória mínima em  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ ; <sup>b</sup>Controle positivo: cloranfenicol para as estirpes de bactérias e cetoconazol para cepas de leveduras; <sup>c</sup> cepa padrão; <sup>d</sup>(-)não apresentou inibição. As amostras avaliadas na gama de 12,5 e 500  $\mu\text{g/mL}^{-1}$ .

## 5.6 Análises por APCI-IT-MS<sup>n</sup> das frações alcaloídicas obtidas em escala analítica

### 5.6.1 Análise espectrométrica da fração alcaloídica das folhas, cascas e galhos de *O. amazonicum*.

Nos espectros de íons totais da fração alcaloídica de *O. amazonicum* (Figura 20), para as cascas e galhos foram observados perfis complexos com diversos sinais sendo registrados na região de  $m/z$  100-800 a ausência de sinais majoritários de  $m/z$  par, apontando para menor abundância de alcaloides se comparado ao perfil alcaloídico das folhas. Tendo em vista a complexidade observada, as amostras de cascas e de galhos foram reservadas para estudos posteriores.

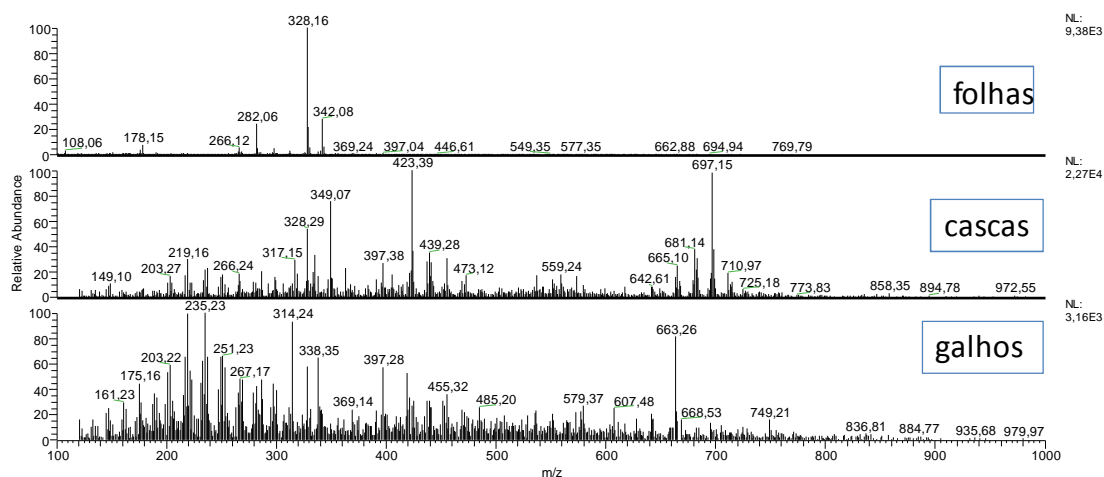


Figura 20: Espectro de massas das frações alcaloidicas das folhas, cascas e galhos de *O. amazonicum*.

### 5.6.2 Análise espectrométrica da fração alcaloídica das folhas de *O. amazonicum*.

No espectro de íons totais da fração alcaloídica das folhas (Figura 21) foram observados diversos picos de  $m/z$  par, indicando possíveis alcaloides, destacando-se os de  $m/z$  342, 330, 328, 312, 298, 282, e 266 ( $[M+H]^+$ ). Estes foram submetidos ao processo de fragmentação em sequência (*tandem* ou  $MS^n$ ).

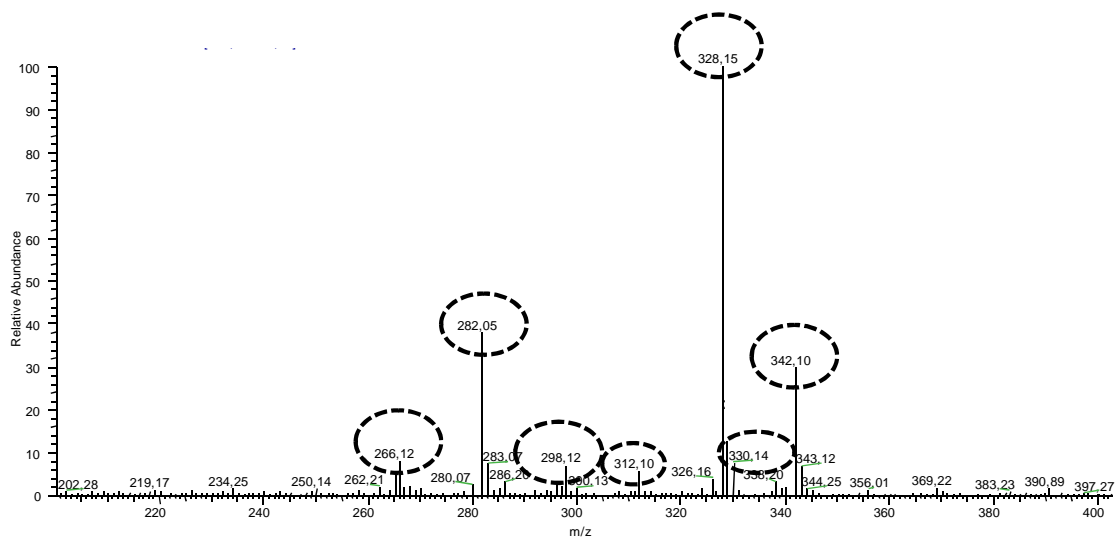


Figura 21: Espectro de íons totais (*full scan*) da fração alcaloídica das folhas em escala analítica de *O. amazonicum*

No espectro de  $MS^2$  dos íons de  $m/z$  342 e 328, observaram-se perdas de elevada massa, resultando no pico base de  $m/z$  178 (Figura 22). Perdas de elevada massa são

incomuns em esqueletos aporfínicos, porém são comumente observados em esqueletos do tipo benziltetraidroisoquinolínicos (SCHMIDT et al., 2005) e tetraidroprotoberberínicos (JEONG et al., 2012). O pico base de  $m/z$  178 foi previamente descrito como um fragmento chave para tetraidroprotoberberínicos contendo grupos metoxila e hidroxila ligados ao anel A (SOARES et al., 2015b). Embora seja possível prever o padrão de substituição destes compostos, não é possível garantir a exata posição de substituição, uma vez que substituições em diferentes posições irão fornecer os mesmos fragmentos de massa.

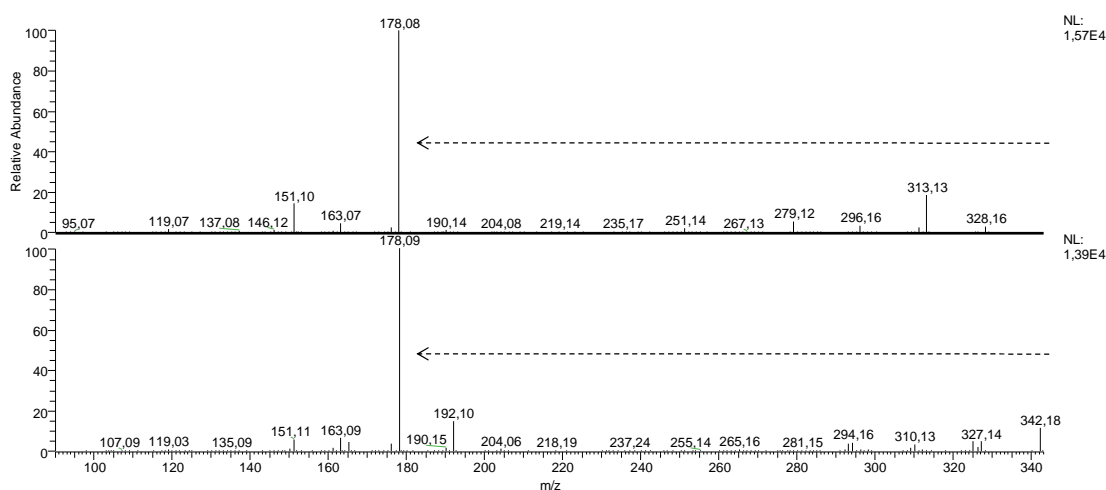


Figura 22: Espectro de massas em  $MS^2$  para os íons de  $m/z$  328 e 342 ( $[M+H]^+$ ).

Analisando o espectro  $MS^2$  do íon de  $m/z$  330 (Figura 23) foi observada uma perda de 138 Da, resultando em um íon fragmento  $m/z$  192. Em estudo de fragmentação realizado com alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos foi sugerido um conjunto de fragmentações chave (a-e) (Figura 24), através das quais é possível determinar o sítio de substituição em duas partes essenciais do esqueleto benziltetraidroisoquinolínico, a parte tetraidroisoquinolínica e a parte benzílica. O íon observado de  $m/z$  192 tem sido descrito como fragmento chave do tipo b, observado em isoquinolínicos contendo N-metila e metoxila adjacente à hidroxila, conforme observado para alcaloides N-metil-3-hidroxicoclaurina, reticulina e N-metilcoclaurina (SCHMIDT et al., 2005).

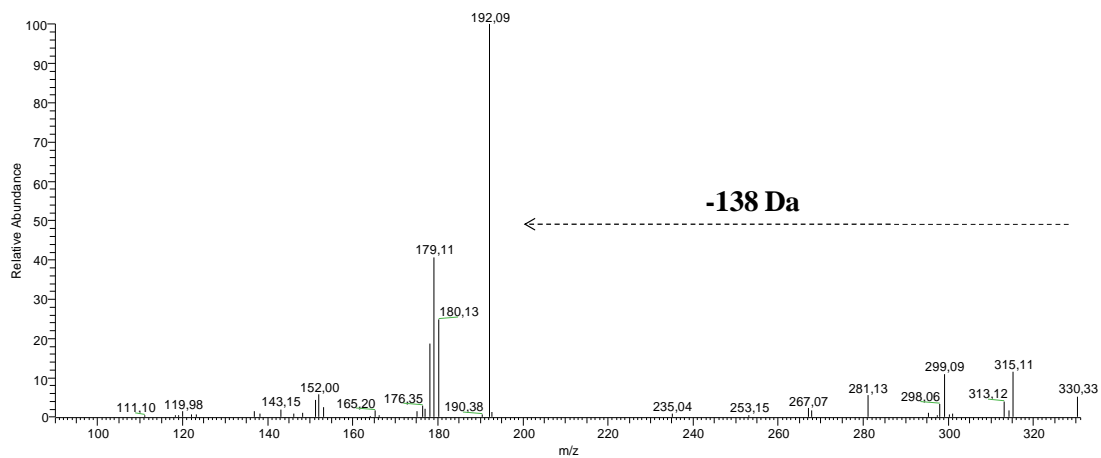


Figura 23: Espectro de massas em MS<sup>2</sup> do íon de  $m/z$  330 ( $[M+H]^+$ ).

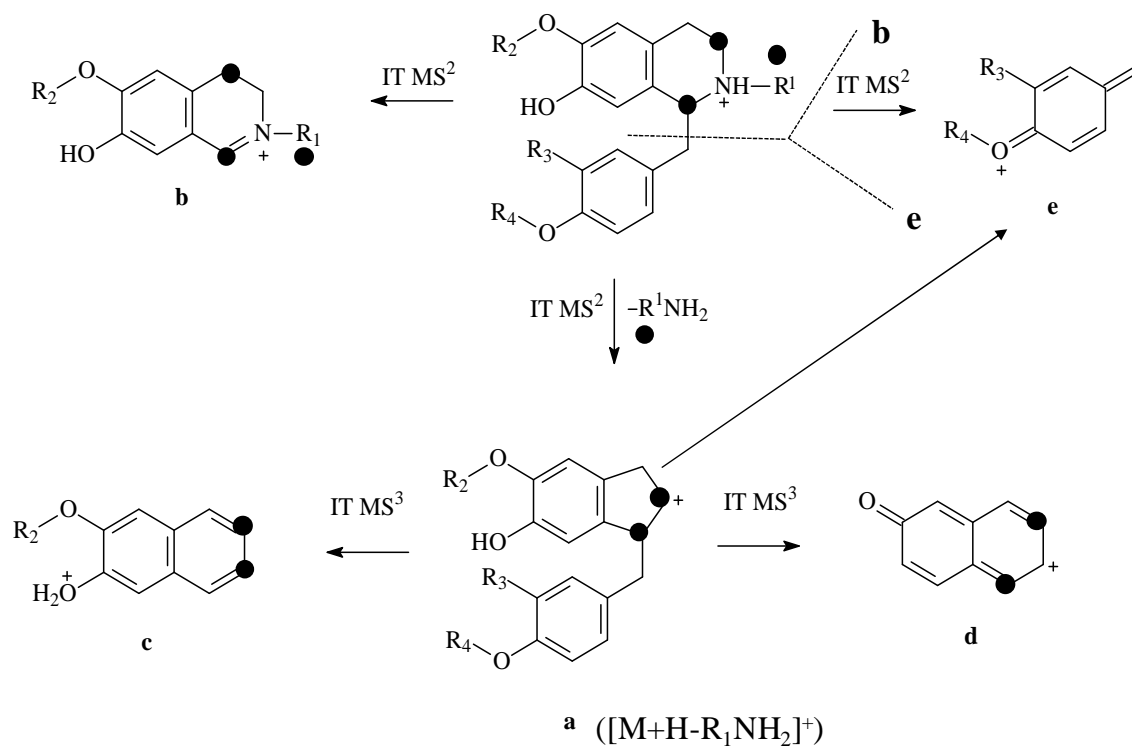


Figura 24: Proposta de fragmentação para alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos.

Fonte: SCHIMIDT et al., 2005.

Nos espectros MS<sup>n</sup> do íon de  $m/z$  312 (Figura 25), foram observadas perdas sequenciais de 17, 15 e 15 Da. Segundo as fragmentações chave propostas por Stévigny e colaboradores (2004), esta sequência está de acordo com um esqueleto aporfínico. A perda inicial sugere ausência de *N*-metilação, enquanto as perdas sucessivas sugerem a presença de metoxilas adjacentes na estrutura.

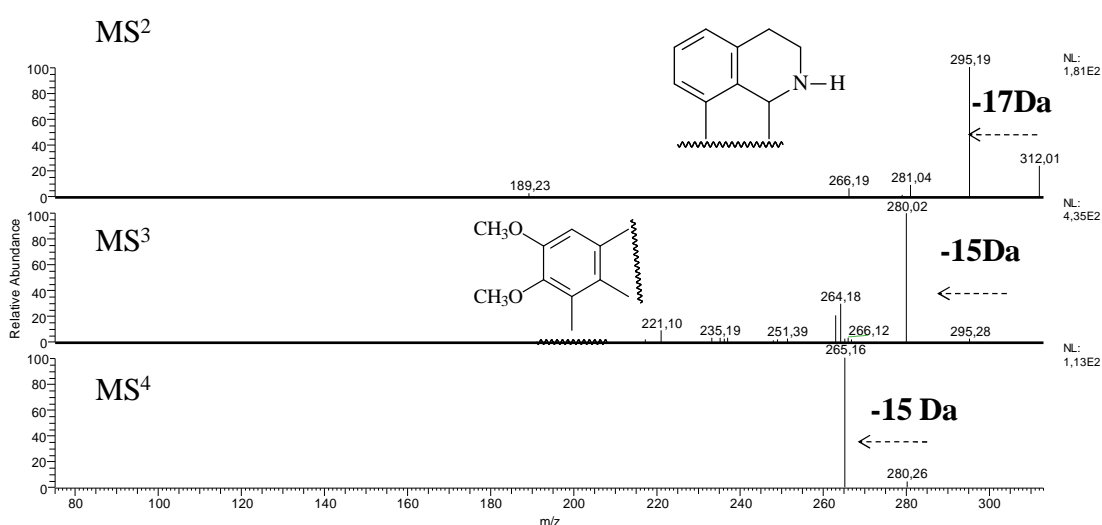


Figura 25: Espectro de massas em MS<sup>n</sup> íon de  $m/z$  312 ( $[M+H]^+$ ).

Analisando o espectro de MS<sup>n</sup> do íon de  $m/z$  298 (Figura 26), observa-se também uma perda inicial de 17 Da. As perdas competitivas de 15 e 31 Da são também consideradas como chave para caracterizar metoxilas adjacentes. De acordo com estudos de fragmentações realizados por Soares e colaboradores (2015b) o íon de  $m/z$  298 com perdas de 17, 15 e 31 Da foi descrito como sendo o alcaloide proaporfínico estefarina (Figura 27).



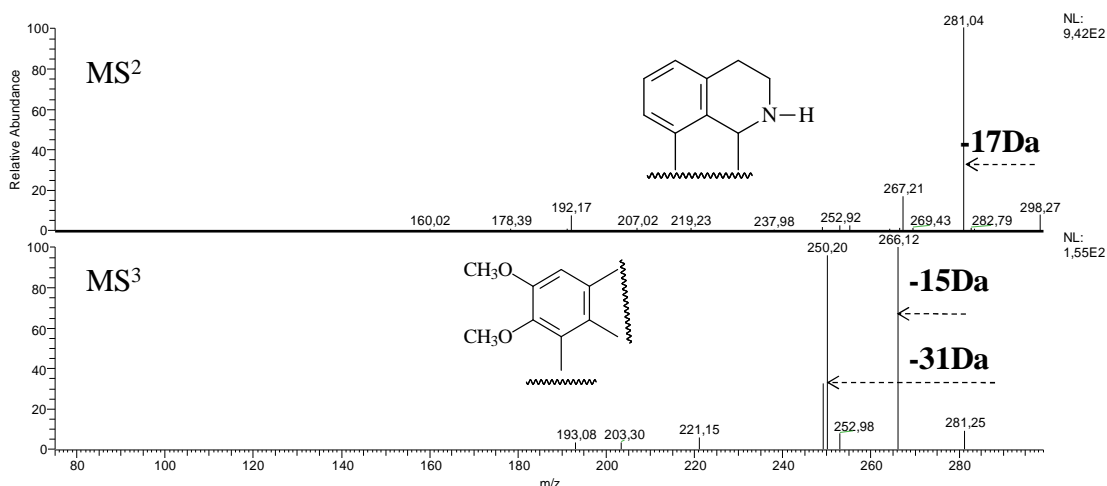


Figura 26: Espectro de massas MS<sup>n</sup> do íon de  $m/z$  298 ( $[M+H]^+$ ).

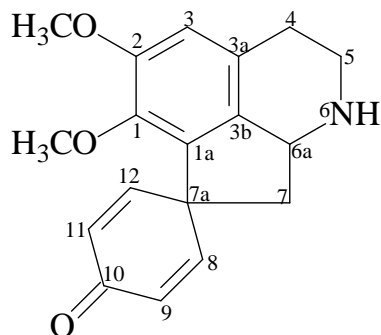


Figura 27: Estrutura do alcalóide estefarina.

Analisando o espectro de MS<sup>n</sup> do íon de  $m/z$  282 (Figura 28) foi observada perda inicial 17 Da, seguido de perdas sequenciais de 15 e 15 Da, sugerindo a presença de metoxilas adjacentes no anel A e ausência de *N*-metilação. Esta mesma seqüência de fragmentação foi anteriormente descrita para o alcaloide aporfínico nornuciferina (Figura 29) (SILVA et al., 2012b).

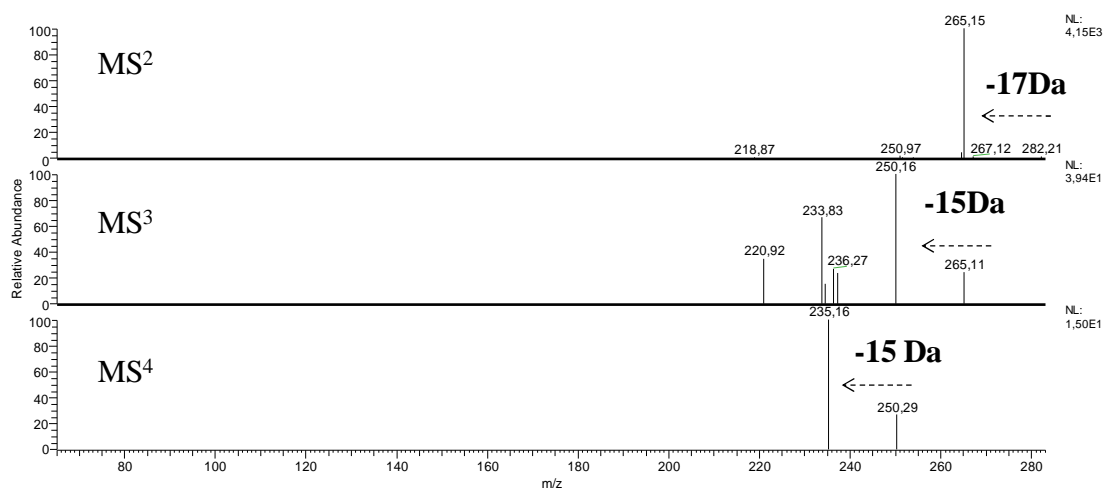


Figura 28: Espectro de massas em  $MS^n$  do íon de  $m/z$  282 ( $[M+H]^+$ ).

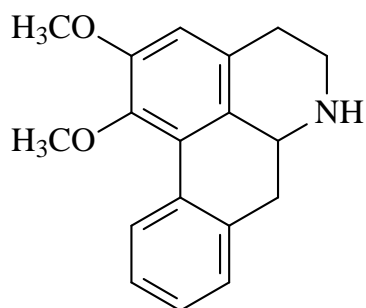


Figura 29: Estrutura do alcaloide nornuciferina.

A análise do espectro  $MS^n$  do íon de  $m/z$  266 (Figura 30) também evidenciou um perfil de fragmentação típico de alcaloides aporfínicos, com perdas sequenciais de 17, 30 e 28 Da (STÉVIGNY et al., 2004). Estas perdas são coerentes com o alcaloide anonaína (Figura 31), já descrito em diversas espécies da família Annonaceae (VENDRAMIN et al., 2013; YOSHIDA et al., 2013; TELES et al., 2015; RABÊLO et al., 2015).

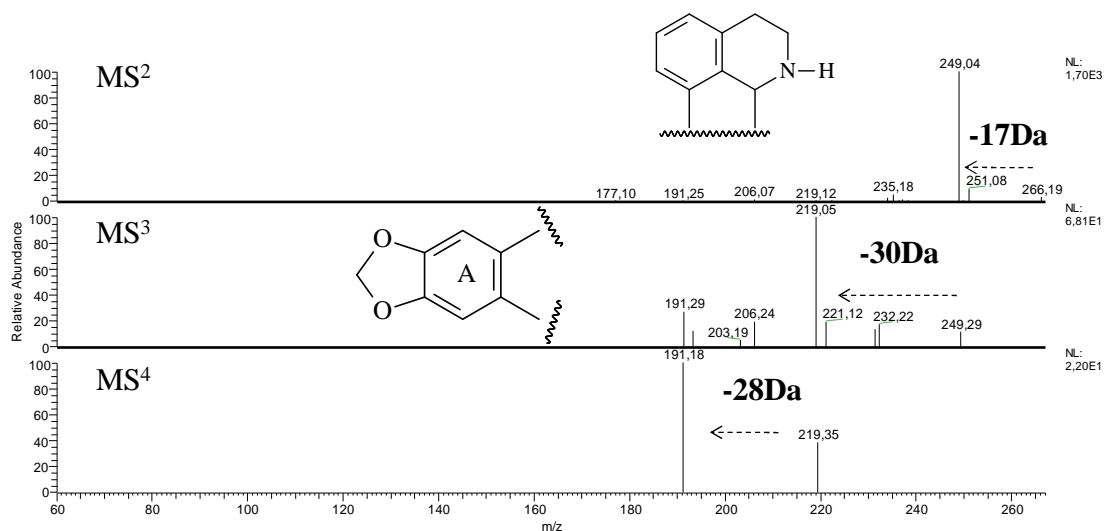


Figura 30: Espectro de massas em MS<sup>n</sup> do íon de  $m/z$  266 ( $[M+H]^+$ ).

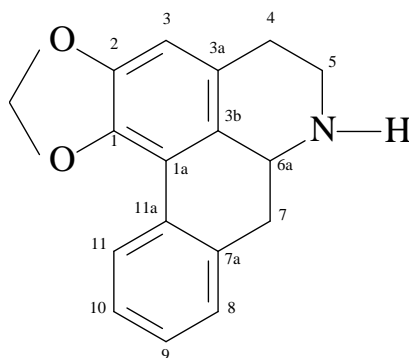


Figura 31: Estrutura do alcaloide Anonaína.

## 5.7 Resultado do fracionamento por CLAE da fração alcaloídica das folhas, realizado em escala preparativa.

No cromatograma obtido através de LC-APCI-MS (Figura 32) foi possível observar a presença de diversos alcaloides, sendo os majoritários os de  $m/z$  342, 328 e 282, e os minoritários os de  $m/z$  296, 326, 312, 280 e 266. Através do perfil de DAD (Figura 32) foi possível confirmar a similaridade estrutural entre os dois principais compostos majoritários ( $m/z$  342, 328), sendo o perfil observado característico de esqueleto tetraidroprotoberberínico.

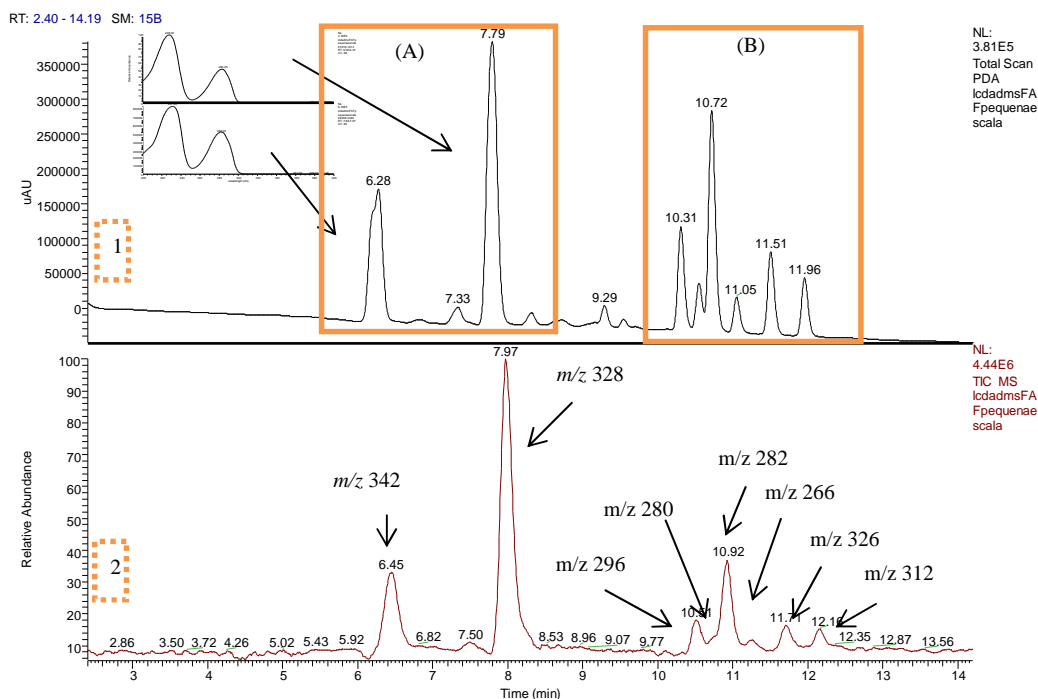


Figura 32: Cromatogramas de LC-DAD (1) e LC-APCI-MS (2) da fração alcaloídica das folhas em escala analítica.

A análise dos cromatogramas (Figura 32) permitiu ainda observar nítida separação entre os alcaloides de natureza distinta tetraidroprotoberberínicos (A) e aporfínicos (B), sendo o método cromatográfico utilizado em escala analítica, ajustado para escala preparativa. O fracionamento resultou em 17 frações, cujas codificações são apresentadas na tabela 4. Após analisadas por CCD e espectrometria de massas, as

frações codificadas como OaF4 (32,2 mg), OaF8 (15,4 mg), OaF9 (1,0 mg), OaF11(0,5 mg), OaF13(2,2 mg), OaF15 (2,9 mg) e OaF17 (2,7 mg) foram submetidas a análises de MS<sup>n</sup> e RMN 1D e 2D para determinação estrutural.

Tabela 4: Frações obtidas pela análise em CLAE em escala preparativa da folhas.

Amostra	Massa (mg)
OaF1	0,3
OaF2	0,4
OaF3	0,9
OaF4	32,2
OaF5	19,8
OaF6	0,8
OaF7	3,5
OaF8	15,4
OaF9	1,0
OaF10	0,2
OaF11	0,5
OaF12	0,7
OaF13	2,2
OaF14	1,2
OaF15	2,9
OaF16	0,1
OaF17	2,7
Total	84,8

## 5.8 Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração alcalóidica das folhas obtidas em escala preparativa de *O. amazonicum*.

### 5.8.1 Determinação estrutural da amostra OaF4

A amostra codificada como OaF4 (32,2 mg) apresentou-se como um sólido amorfo. A análise de massas de OaF4 (Figura 33) evidenciou a presença de uma íon base em  $m/z$  328  $[M+H]^+$ . Este íon foi submetido à análise de  $MS^n$  (Figura 34), onde foi observado uma elevada perda de massa (150 Da) resultando no pico de  $m/z$  178. Como descrito anteriormente este tipo de fragmentação chave tem sido observada em estruturas tetraidroprotoberberínicas contendo metoxila e hidroxila no anel A.

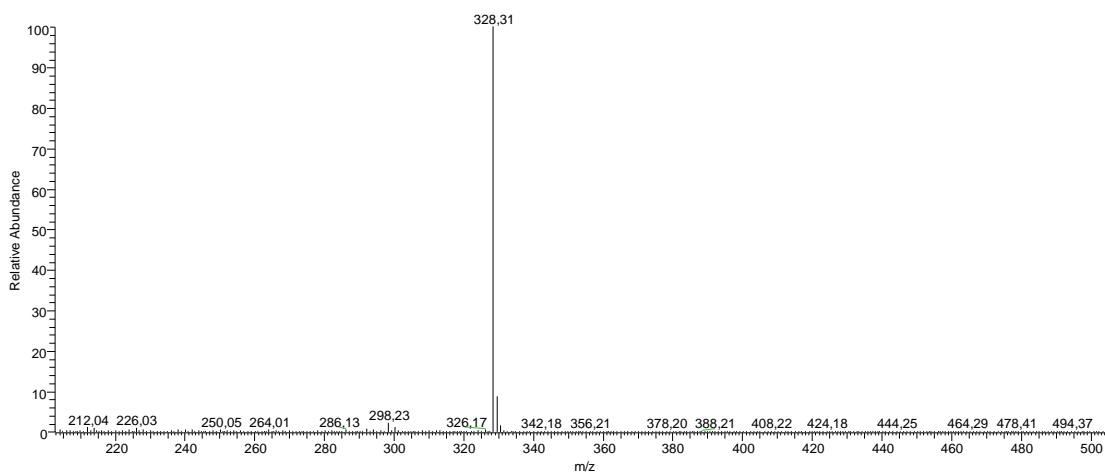


Figura 33: Espectro de massa da amostra OaF4.

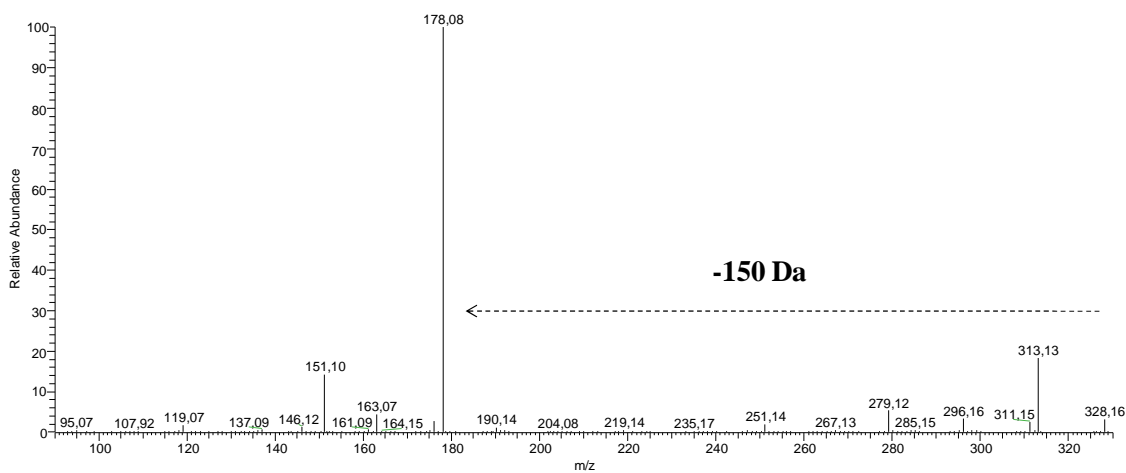


Figura 34: Espectro de  $MS^2$  para o íon  $m/z$  328  $[M+H]^+$

O íon base em  $m/z$  328  $[M+H]^+$ , correspondendo à molécula protonada, indicou a fórmula molecular  $C_{19}H_{21}NO_4$  para o composto. Na região aromática do espectro de RMN de  $^1H$  foi possível observar quatro sinais, constituindo dois grupos distintos: o primeiro, com dois hidrogênios em 6,84 (1H, s) e 6,81 (1H, s), caracterizando um anel aromático 1, 2, 4, 5, tetrassubstituído, contendo hidrogênios com relação *para*; e o segundo, com dois dubletos em 6,87 (1H, d,  $J=8,4$  Hz) e 6,92 (1H, d,  $J=8,4$  Hz), sugerindo a presença de um anel benzênico 1, 2, 3, 4, tetrassubstituído, estando os dois hidrogênios *orto* acoplados (Figura 35).

Na região alifática do espectro de RMN de  $^1H$ , observou-se um par de dubletos em 4,73 (1 H, d,  $J=15,9$  Hz) e 4,43 (1 H, d,  $J=15,9$  Hz) correlacionado, em experimento HSQC, a um carbono em 53,4, evidenciando a presença de um grupo metileno desprotegido, compatível com o C-8 da ponte berberínica de alcaloides protoberberínicos (BLANCHFIELD et al., 2003). No espectro de RMN de  $^1H$  foram observados dois singletos em 3,87 (3H, s) e 3,88 (3H, s), com deslocamentos característicos de metoxilas. No mapa de contorno HSQC observou-se que os sinais em 3,87 (3H, s) e 3,88 (3H, s) estavam correlacionados, respectivamente, a sinais de carbono em 56,6 e 60,7, confirmando a presença das metoxilas. Tais hidrogênios correlacionam-se no mapa de contorno HMBC com os carbonos em 148,5 e 144,2 (Figura 35, 36 e 37). O espectro RMN de  $^1H$  revelou também a presença de um metino em 4,67 (1H, dd; 11,7 e 4,2 Hz), que pela desblindagem foi associado ao átomo C-14 ligado ao N.

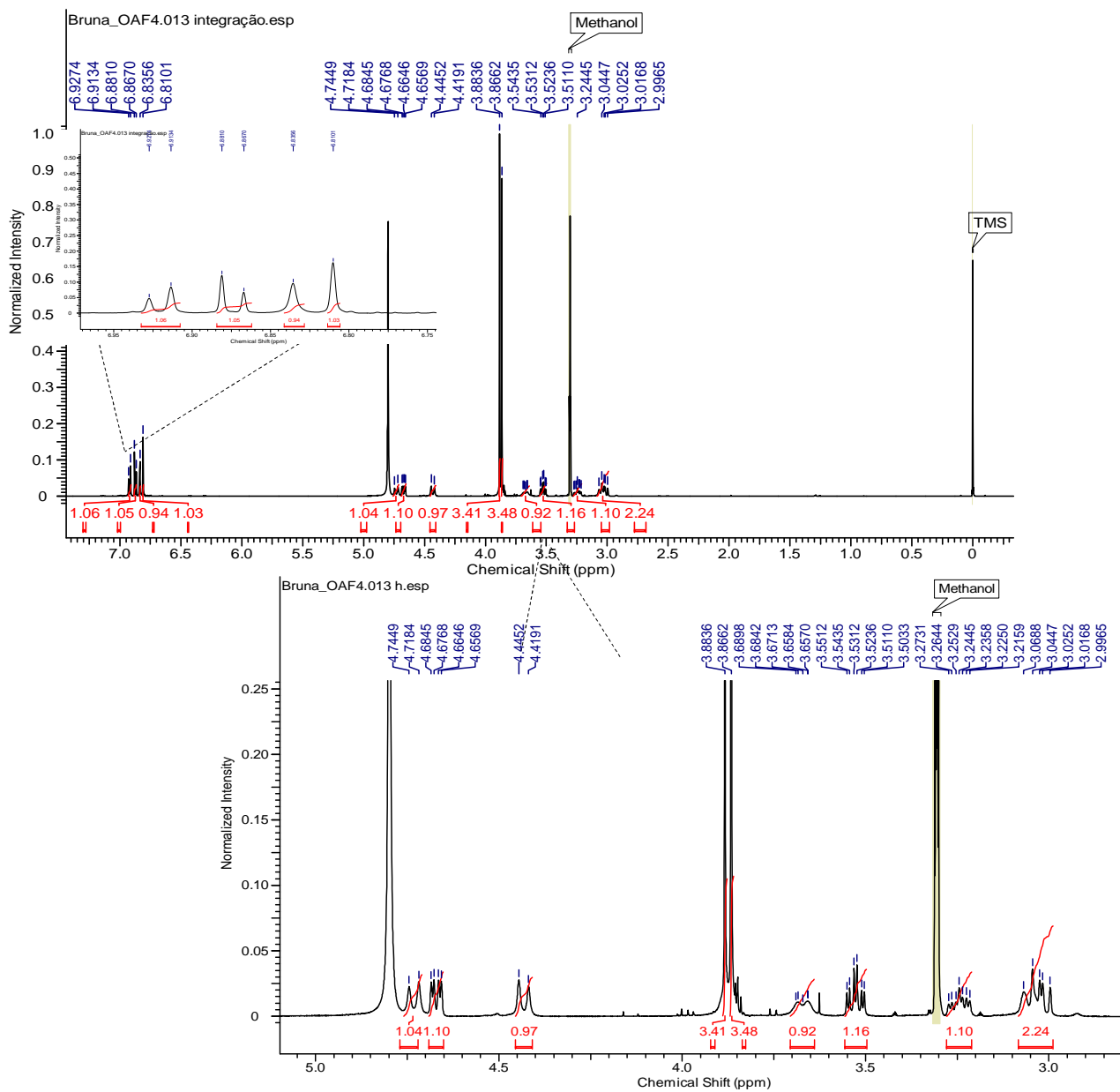


Figura 35: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra OaF4.



Na região alifática foram observados sinais de três metilenos, um dos quais com hidrogênios em 3,03 (1H, m) e 3,24 (1H,ddd 17,0;12,0; 5,2), correlacionados no HSQC com o carbono em 26,9, compatível com o átomo de carbono C-5. Outro metileno apresentou hidrogênios em 3,53 (1H, td 12(x2); 4,6) e 3,84 (1H, m) correlacionados a um carbono desprotegido em 52,2, foi atribuído ao C-6 ligado ao nitrogênio. Estes dados são compatíveis com o segmento C-5-C-6-N, do anel B. O metileno remanescente foi atribuído C-13, pelas correlações ( $J^1$ ) entre os sinais em 3,03(1H, m) e 3,67 (1H, m) / 33,8 (Figura 36 e 37).

Através dos dados de HSQC e HMBC foi possível definir as posições dos hidrogênios aromáticos (Figura 36 e 37). Aos sinais 6,84 e 6,81 ligados aos carbonos 113,0 e 112,5, respectivamente, foram atribuídos as posições H-1 e H-4 do anel A. Essa atribuição foi confirmada pelas correlações a longa distância existentes entre o hidrogênio em 6,84 (H-1) com o sinal do carbono em 60,9 (C-14), e do hidrogênio em 6,81 (H-4) com o sinal do carbono em 26,9 (C-5). Aos hidrogênios em 6,87 e 6,92 ligados aos carbonos em 118,4 e 125,5, respectivamente, foram atribuídos as posições H-11 e H-12. Pelo mapa de HMBC ainda foi possível determinar as posições das metoxilas (Figura 37). O hidrogênio em 6,84 (H-1) apresentou correlação a longa distancia com o carbono em 148,5, estabelecendo a posição C-3 para uma das metoxila, enquanto o sinal em 6,87 (H-11) apresentou uma forte correlação com o carbono em 144,2, evidenciando o segundo grupo metoxila na posição C-9. O sinal em 6,81 (H-4) apresentou uma forte correlação com um carbono oxigenado em 146,5, justificando a localização de um grupo hidroxila na posição C-2, confirmando assim, a presença de uma metoxila e uma hidroxila no anel A. Do mesmo modo o sinal em 6,92 (H-12) apresentou correlação com o carbono oxigenado em 148,9, indicando a existência do segundo grupo hidroxila na posição C-10.

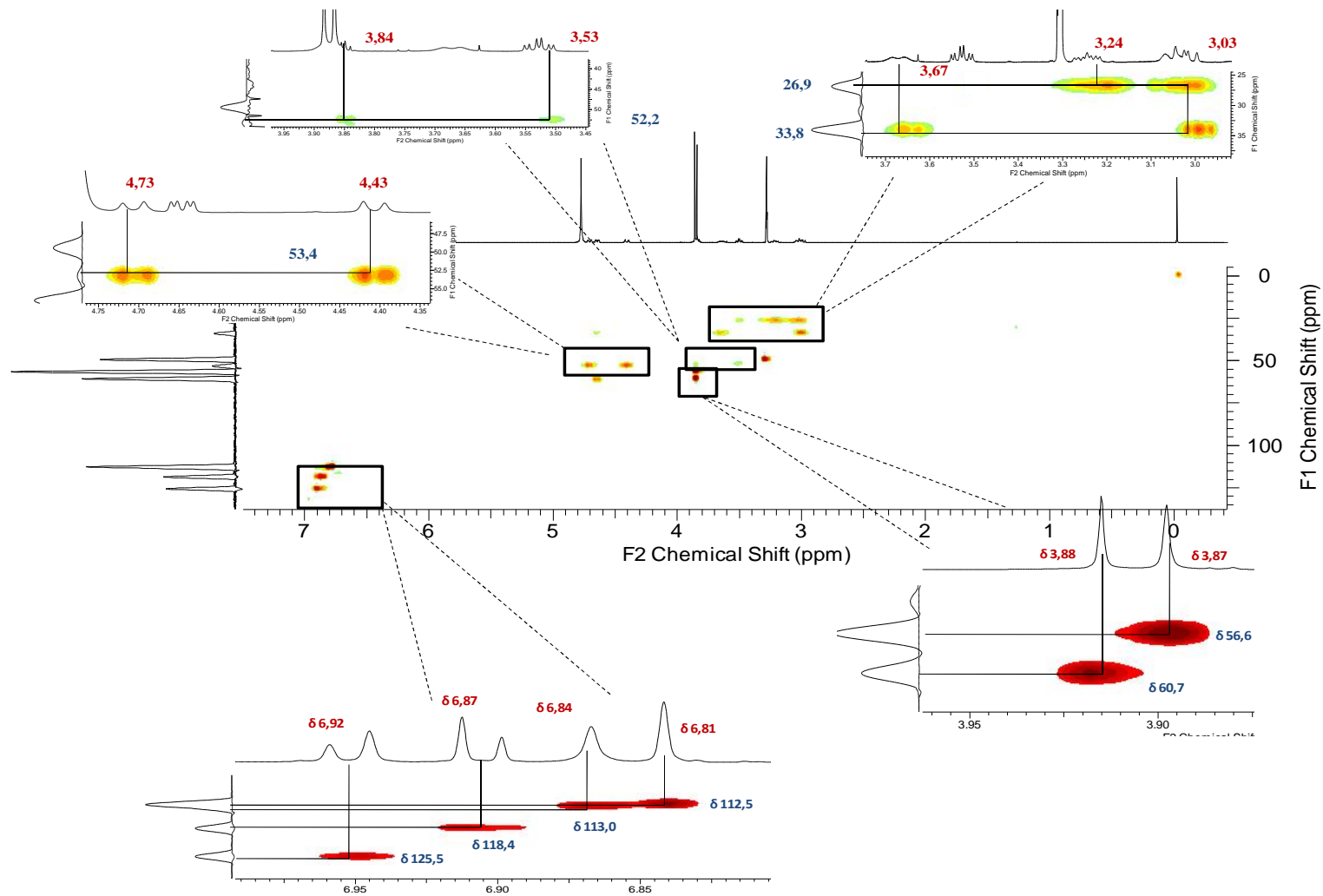


Figura 36: Mapa de contorno HSQC (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra OaF4

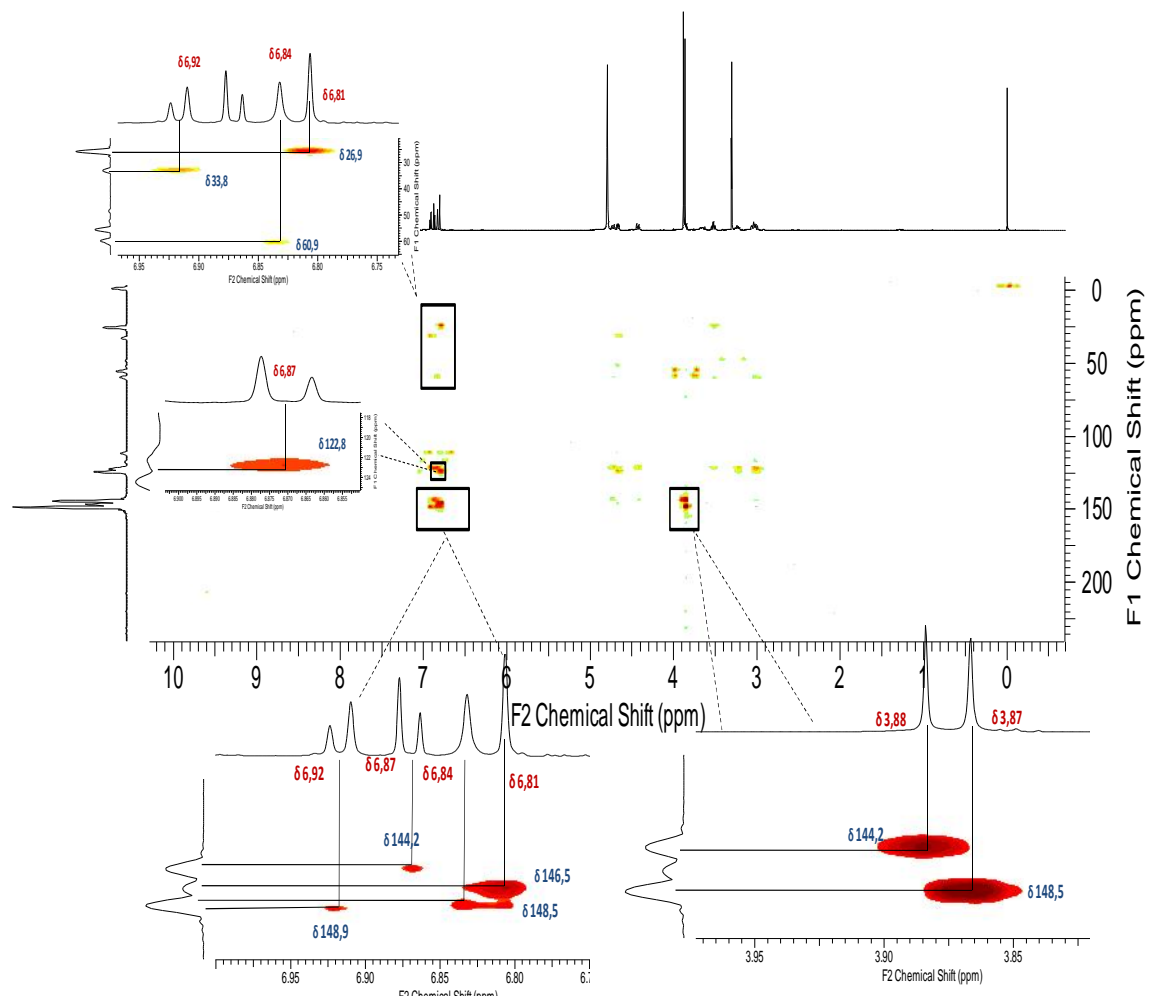


Figura 37: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da amostra OaF4.

Na tabela 5 são apresentados os dados completos de RMN<sup>1</sup>H e dos mapas de contorno HSQC e HMBC. A partir da comparação dos dados obtidos, com os existentes na literatura (COSTA et al., 2015) foi possível identificar a amostra OaF4 como sendo o alcaloide tetraidroprotoberberínico estefolidina (Figura 38). Este alcaloide já foi anteriormente descrito em espécies da família Annonaceae como *Annona cherimolia*, *Fusaea longifolia* e *Alphonsea sclerocarpa* (VILLAR et al., 1984; TADIC et al., 1987; TAVARES et al., 2005).

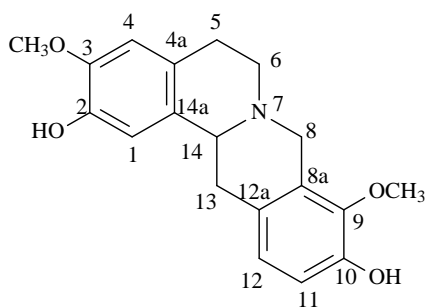


Figura 38: Estrutura do alcaloide estefolidina

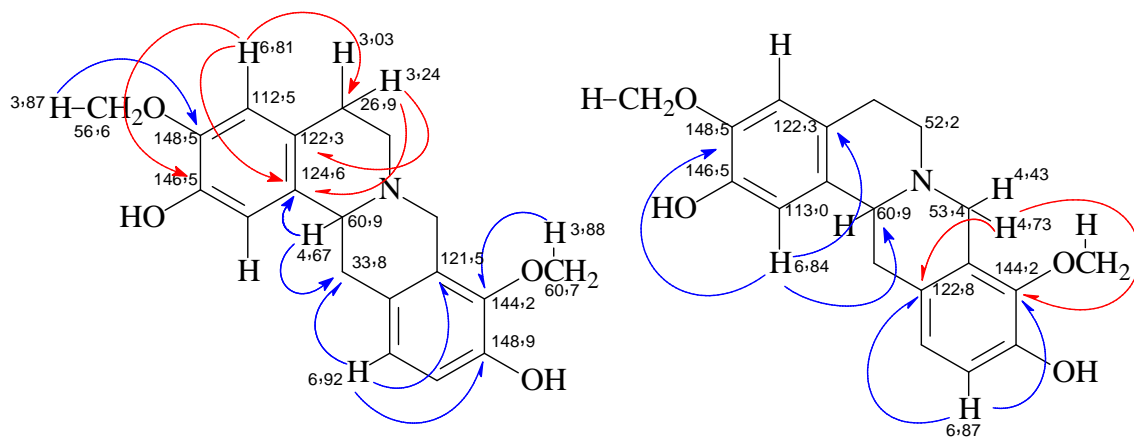


Figura 39: Principais correlações observadas para a amostra OaF4

Tabela 5: Dados de RMN <sup>1</sup>H, HSQC e HMBC da amostra OaF4

OAF4 (Estefolidina)						
Posição	<sup>1</sup> H (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H (mult., J em Hz) <sup>b</sup>	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>c</sup>	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>b</sup>	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)	
1	6,84 (1H, s)	6,77 (1H, s)	113,0	112,0	60,9; 122,3; 148,5	
2	-	-	146,5	144,6	-	
3	-	-	148,5	146,3	-	
4	6,81 (1H, s)	6,61(1H, s)	112,5	111,4	26,9; 124,6; 146,5	
4a	-	-	122,3	125,5	-	
5	3,03 (1H, m)	2,69 (1H, m)	26,9	28,7	-	
5	3,24 (1H, ddd, 17; 12; 5,2)	3,11 (1H, m)	26,9	28,7	122,3; 124,6	
6	3,53 (1H, dt, 12(x2); 4,2)	2,67 (1H, m)	52,2	52,0	-	
6	3,84 (1H, m)	3,21 (1H, m)	52,2	52,0	-	
8	4,43 (1H, d, 15,9)	3,55 (1H, d, 15,6)	53,4	54,1	122,8; 144,2	
8	4,73 (1H, d, 15,9)	4,20 (1H, d, 15,6)	53,4	54,1	122,8; 144,2	
8a	-	-	121,5	127,9	-	
9	-	-	144,2	143,8	-	
10	-	-	148,9	147,5	-	
11	6,87 (1H, d, 8,4)	6,76 (1H, d, 8,3)	118,4	115,4	122,8; 144,2	
12	6,92 (1H, d, 8,4)	6,80 (1H, d, 8,3)	125,5	124,7	33,8; 121,5; 148,9	
12a	-	-	122,8	126,4	-	
13	3,03 (1H, m)	2,78(1H, dd,16,0;11,4)	33,8	35,8	60,9; 124,6	
13	3,67 (1H, m)	3,28 (1H, dd, 16,0; 3,9)	33,8	35,8	-	
14	4,67 (1H, dd, 11,7; 4,2)	3,57(1H, dd, 11,4; 3,9)	60,9	59,6	33,8; 124,6	
14a	-	-	124,6	129,9	-	
3-OCH <sub>3</sub>	3,87 (3H, s)	3,86 (3H, s)	56,6	56,0	148,5	
9-OCH <sub>3</sub>	3,88 (3H, s)	3,83(3H, s)	60,7	60,2	144,2	

<sup>a</sup> O experimento foi realizado a 600MHz para <sup>1</sup>H em CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno.

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Costa et al., 2015 (<sup>1</sup>H em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD 400 MHz)

<sup>c</sup> Para os carbonos protonados foram usados os dados de HSQC e carbonos quaternários foram usados dados de HMBC.

### 5.8.2 Determinação estrutural da amostra OaF8

A fração codificada como OaF8 (15,4 mg) apresentou-se como um sólido amorfo. A análise de massas de OaF8 (Figura 40) evidenciou a presença do íon base em  $m/z$  342  $[M+H]^+$ , correspondendo à molécula protonada, indicando a fórmula molecular  $C_{20}H_{23}NO_4$  para o composto. O íon base foi submetido à análise de  $MS^2$  (Figura 41), sendo observada uma elevada perda de massa (164 Da), resultando no pico de  $m/z$  178. Esse mesmo padrão foi anteriormente observado para o alcaloide estefolidina (OAF4; Figura 38). Foi possível propor, pela diferença de massa observada entre estas substâncias, a presença de duas metoxilas no anel D, para a amostra de  $m/z$  342.

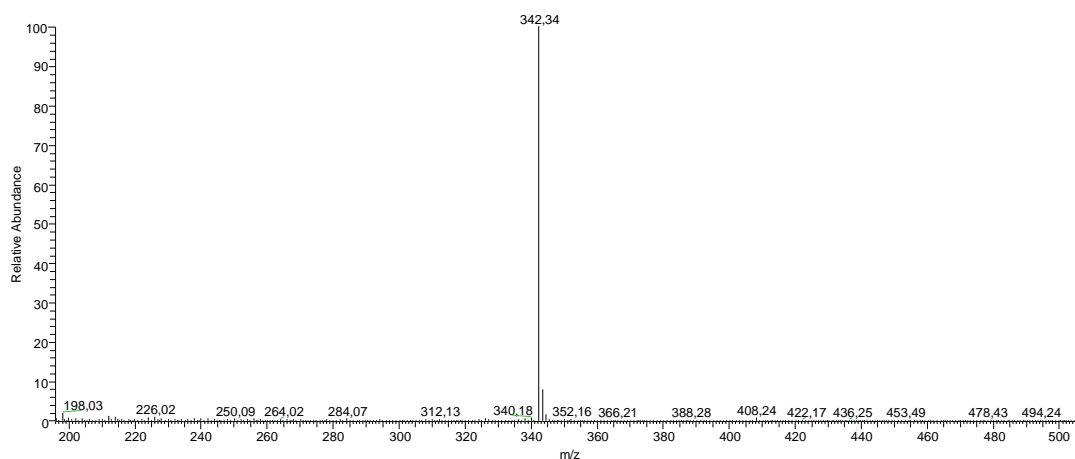


Figura 40: Espectro de massa da amostra OaF8.

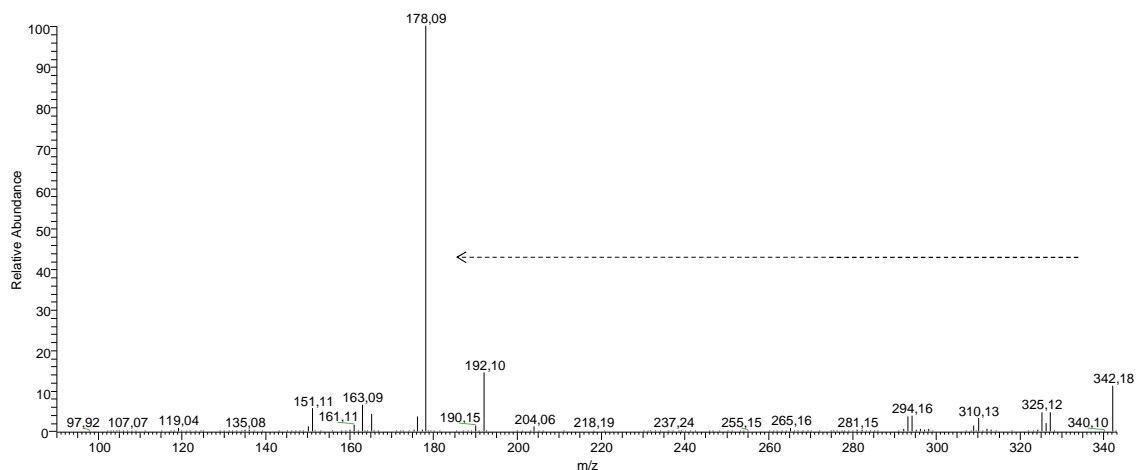


Figura 41: Espectro de  $MS^2$  para o íon  $m/z$  342  $[M+H]^+$

No espectro RMN de  $^1\text{H}$  na região dos aromáticos (Figura 42) observou-se quatro sinais em 6,84 (1H, s), 6,81 (1H, s), 7,05 (1H, d, 8,6 Hz) e 7,07 (1H, d, 8,6 Hz), reforçando a similaridade com o alcaloide anteriormente determinado (OAF4). Através dos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC foi constatado que as três metoxilas, em 3,86 (3H, s), 3,89 (3H, s) e 3,87 (3H, s) se ligavam ( $J^1$ ) aos carbonos em 56,7, 60,4 e 56,7, e acoplavam a longa distância com os carbonos em 147,6, 145,6 e 151,8, respectivamente (Figura 42, 43 e 44).

O mapa de contorno HMBC permitiu a determinação da posição de tais grupos. O hidrogênio em 6,84 (H-1) correlacionado a longa distância com o carbono em 147,6, localizou uma metoxila em C-3. Do mesmo modo, os hidrogênios em 7,05 (H-11) e 7,07 (H-12) correlacionados a longa distância com os carbonos em 145,6 e 151,8 indicaram, respectivamente, as posições das duas outras metoxilas, em C-9 e C-10, no anel D. A correlação do sinal em 6,81 (H-4) com o carbono em 146,7 definiu a posição da hidroxila na posição C-2, adjacente à metoxila, no anel A (Figura 44).

Como na estrutura anterior (OaF4) foi observado na região alifática do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , um par de dubletos em 4,73 (1 H, d, 15,8 Hz) e 4,39 (1 H, d, 15,8 Hz) correlacionado, em experimento HSQC, a um carbono em 53,2, evidenciando a presença de um grupo metileno desprotegido, compatível com o C-8 da ponte berberínica de alcaloides protoberberínicos (BLANCHFIELD et al., 2003) (Figura 42 e 43). Os demais grupamentos alifáticos (metino e metilenos) revelaram deslocamentos químicos similares ao estefolidina (OaF4).

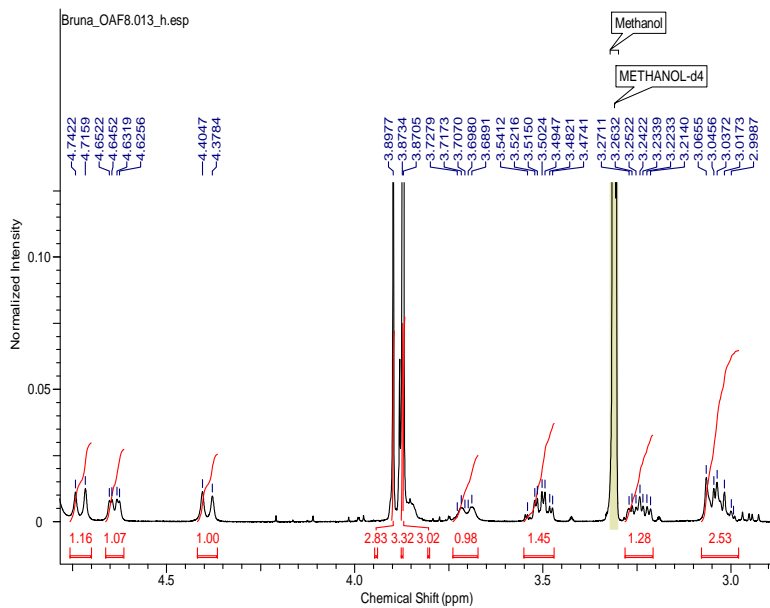
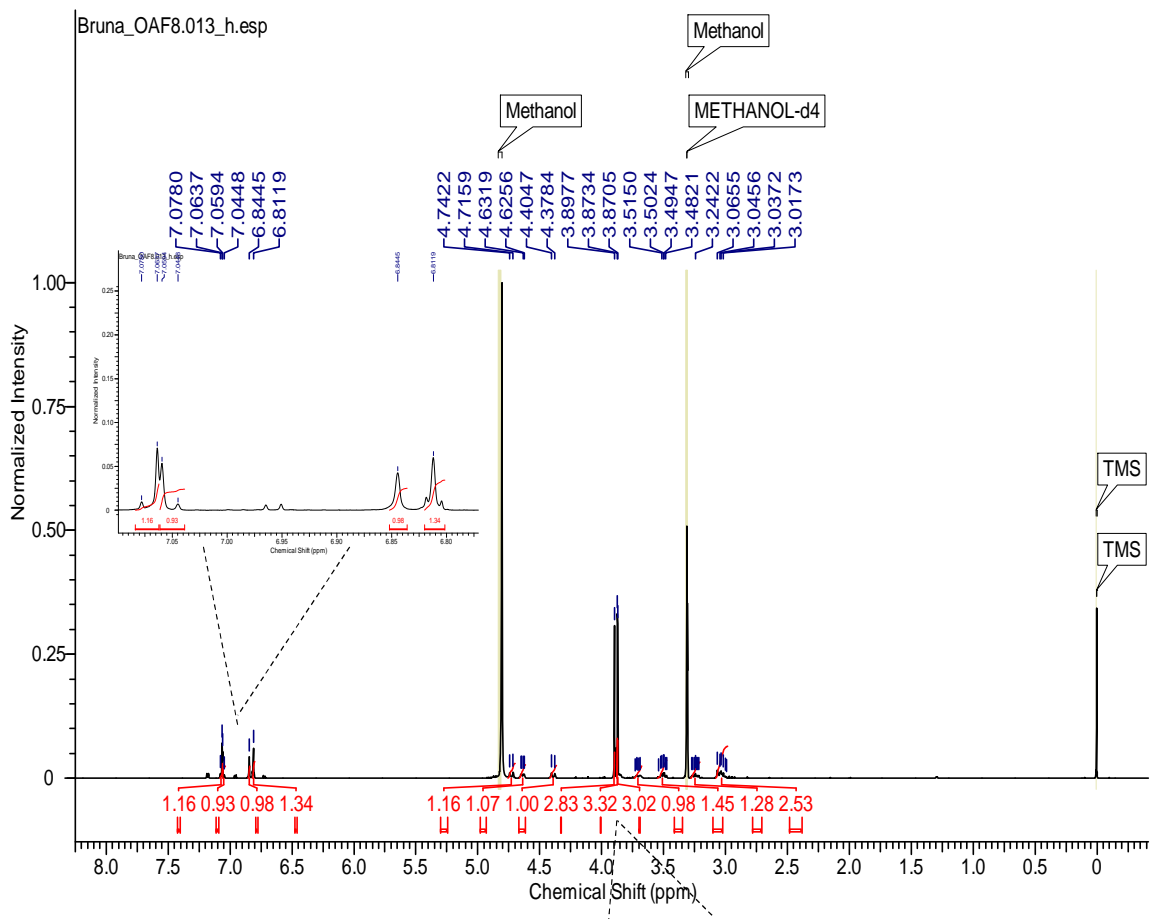


Figura 42: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra OaF8.



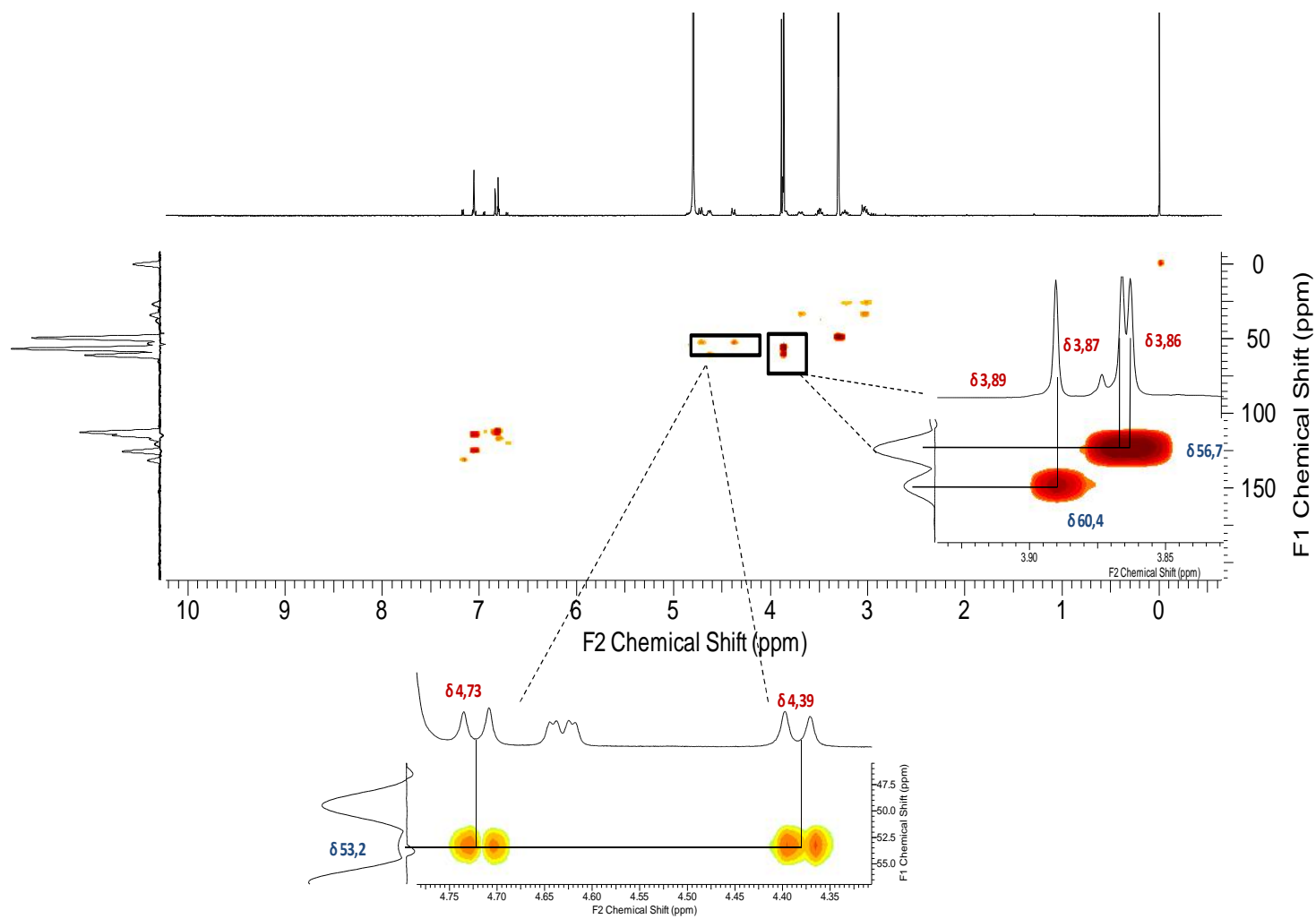


Figura 43: Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância OaF8.

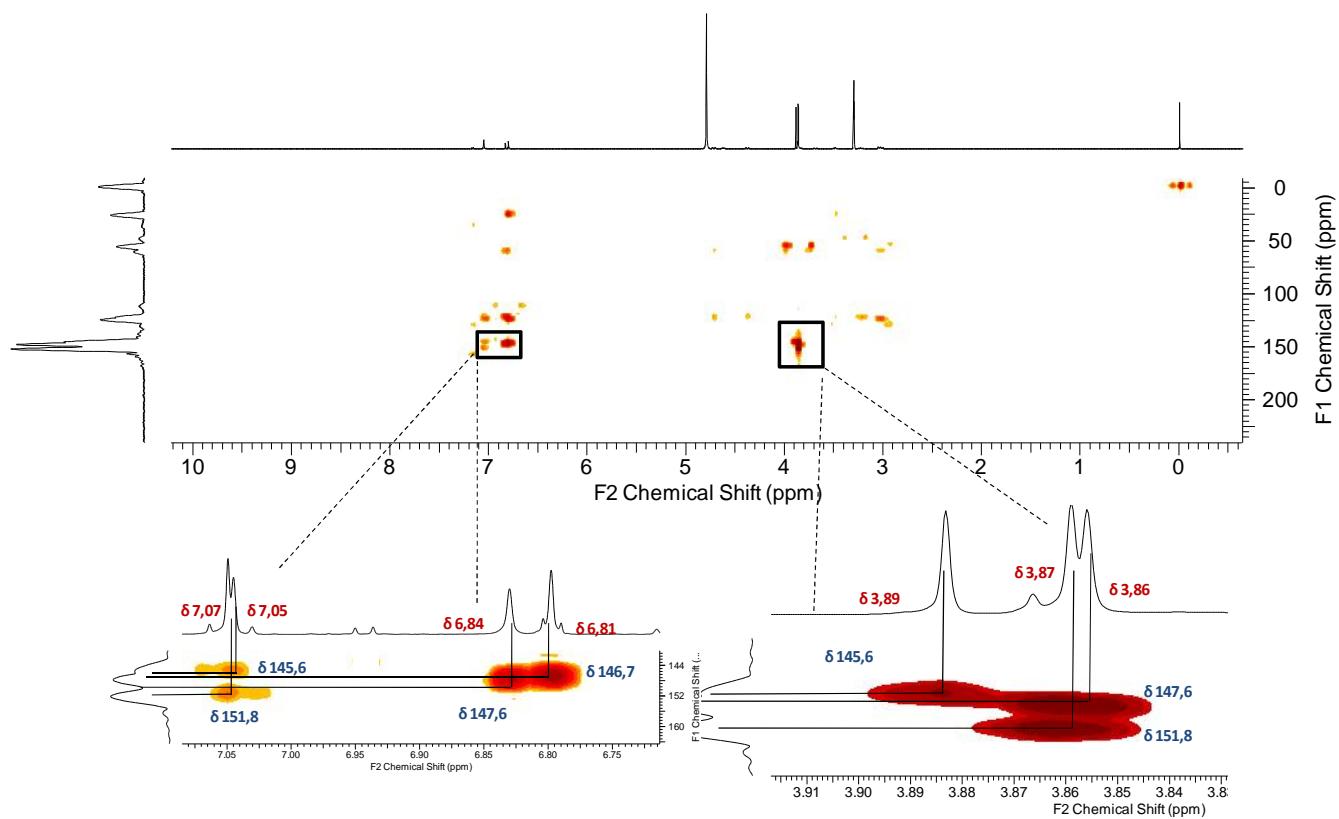


Figura 44: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da substância OaF8.

Na tabela 6 são apresentados os dados completos RMN  $^1\text{H}$  e dos mapas de contorno HSQC e HMBC. A partir da comparação dos dados obtidos, com os existentes na literatura (PARK et al., 2011) foi possível identificar a amostra OaF8 como o alcaloide tetraidroprotoberberínico isocoripalmina (Figura 45). O alcaloide isocoripalmina, também denominado tetraidrocolumbamina (JEONG et al., 2012), já foi anteriormente descrito em espécies da família Annonaceae (LEBOEUF et al., 1982a; LÓPEZ et al., 2002).

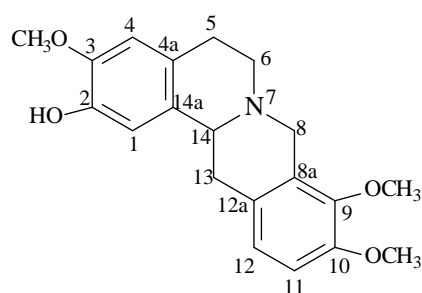


Figura 45: Estrutura do alcaloide isocoripalmina.

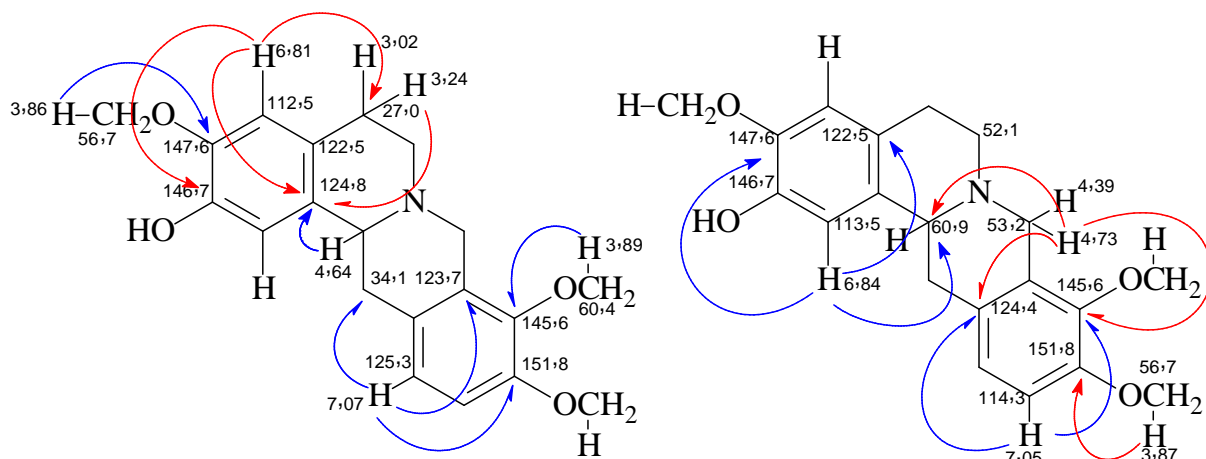


Figura 46: Principais correlações observadas para amostra OaF8.

Tabela 6: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF8.

OAF8 (Isocoripalmina)					
Posição	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>b</sup>	HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) <sup>c</sup>	HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) <sup>b</sup>	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
1	6,84 (1H, s)	7,24 (1H, s)	113, 5	113,8	60,9; 122,5; 147,6
2	-	-	146,7	146,4	
3	-	-	147,6	147,1	
4	6,81(1H, s)	6,75 (1H, s)	112, 5	112,2	27,0; 124,8; 146,7
4a	-	-	122,5	125,5	
5	3,02 (1H, m)	2,58 (1H, m)	27,0	29,5	124,8
5	3,24 (1H, m)	3,18 (1H, m)	27,0	29,5	124,8
6	3,50 (1H, m)	2,58 (1H, m)	52,1	52,1	-
6	3,84 (1H, m)	3,11 (1H, m)	52,1	52,1	-
8	4,73 (1H, d, 15,8)	4,40 (1H, d, 16,0)	53,2	54,6	60,9; 124,4; 145,6
8	4,39 (1H, d,15,8)	3,47 (1H, m)	53,2	54,6	-
8a	-	-	123,7	128,6	-
9	-	-	145,5	145,5	-
10	-	-	151,8	150,6	-
11	7,05 (1H, d, 8,6)	6,84 (1H, d, 8,4)	114, 3	111,5	124,4; 145,6
12	7,07 (1H, d, 8,6)	6,90 (1H, d, 8,4)	125, 3	124,2	34,1; 123,7; 151,8
12a	-	-	124,4	129,3	-
13	3,70 (1H, m)	3,52 (1H, m)	34,1	37,0	-
13	3,02 (1H, m)	2,96 (1H, dd,15,6;11,12)	34,1	37,0	-
14	4,64 (1H, dd 12,2 e 4,2)	3,34 (1H, dd, 15,6;3,2)	60, 9	59,7	124,8
14 <sup>a</sup>	-	-	124,8	131,1	-
3-OCH <sub>3</sub>	3,86 (3H, s)	3,74 (3H, s)	56, 7	55,9	147,6
9-OCH <sub>3</sub>	3,89 (3H, s)	3,86 (3H, s)	60, 4	60,0	145,6
10-OCH <sub>3</sub>	3,87 (3H, s)	3,71 (3H, s)	56, 7	55,9	151,8

<sup>a</sup> O experimento foi realizado a 600MHz para  $^1\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{OD}$  utilizando o TMS como padrão interno.

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Park et al., 2011 ( $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz)

<sup>c</sup> Para os carbonos protonados foram usados os dados de HSQC e carbonos quaternários foram usados dados de HMBC.

### 5.8.3 Determinação estrutural da amostra OaF9

A fração codificada como OaF9 (1,0 mg) apresentou-se como um sólido amorfo amarelado. No espectro de íons totais observou-se a presença de um pico base de  $m/z$  286 (Figura 47), correspondendo à molécula protonada, indicando a fórmula molecular  $C_{17}H_{19}NO_3$  para o composto. Através do espectro de  $MS^2$  foi possível observar perda inicial de 17 Da ( $-NH_3$ ) (Figura 48), anteriormente descrita em estruturas com ausência de *N*-metila, além do íon em  $m/z$  107 que indica elevada perda de massa, sugerindo tratar-se de uma estrutura benziltetraidroisoquinólica.

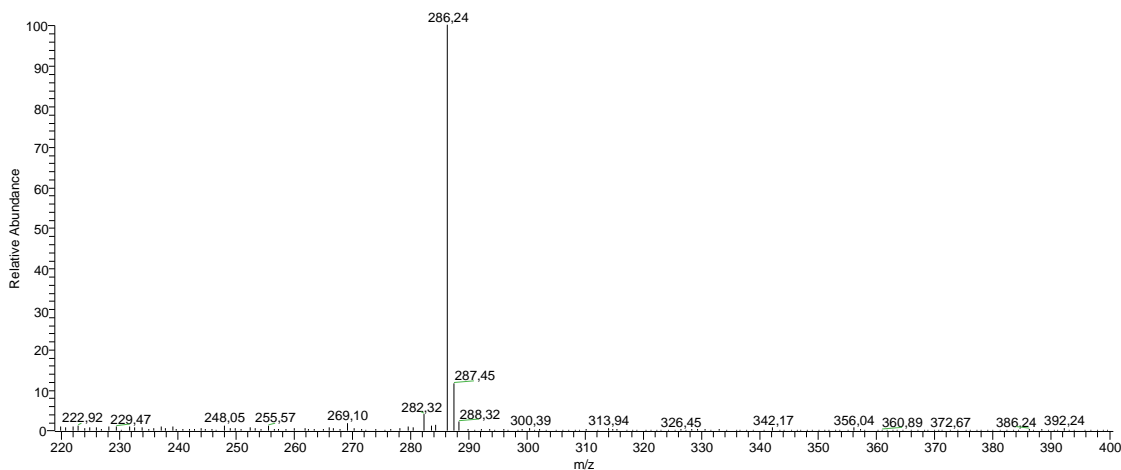


Figura 47: Espectros de massas da amostra OaF9.

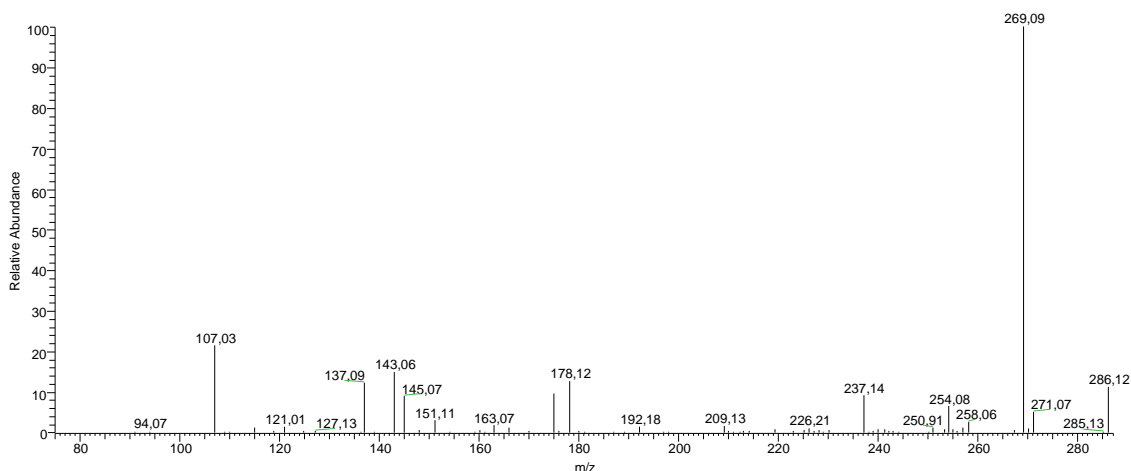


Figura 48: Espectro de  $MS^2$  para o íon  $m/z$  286  $[M+H]^+$

No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (Figura 49) foram observados 6 sinais de hidrogênios aromáticos, constituindo dois sistemas de spins, situado em anéis benzênicos diferentes. O primeiro evidenciou a presença de dois dubletos distorcidos, típicos de sistemas AA'BB', apresentando dois pares de hidrogênios quimicamente equivalentes, mas não magneticamente equivalentes, em 7,20 (2H, m) e 6,79 (2H, m), caracterizando um anel benzênico para-dissubstituído; e o segundo apresentou um sistema AB, exibindo dois dupletos *orto*-acoplados em 6,95 (1H, d, 8,2 Hz), e 6,71 (1H, d, 8,2 Hz).

O sinal de um duplo duplete de um hidrogênio metínico em 5,00 (1H, dd, 10 e 3,2), indicou a presença do segmento  $\text{H}_2\text{C}-\text{C}-\text{N}$ , característico de alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos. Estes dados aliados à presença do íon  $m/z$  107 evidenciado no espectro de massas, confirmaram a existência de um grupo benzílico substituído com uma hidroxila no anel aromático. Verificou-se ainda, o sinal em 3,87 (3H) típico de metoxila, enquanto os hidrogênios metilênicos concentraram-se na região 3,57-2,96.

No mapa de contorno HSQC (Figura 50) observou-se as correlações dos hidrogênios em 6,95 e 6,71, com os carbonos em 112,1, e 119,7, respectivamente. Foi também observada a correlação de hidrogênios metilênicos em 3,10 (1H) e 2,96 (1H) com o sinal carbono 25,7; e em 3,42 (1H) 3,55 (1H), com o sinal do carbono em 38,5. Tais metilenos são compatíveis, respectivamente, com o segmento C-4-C-3-N, do anel B.

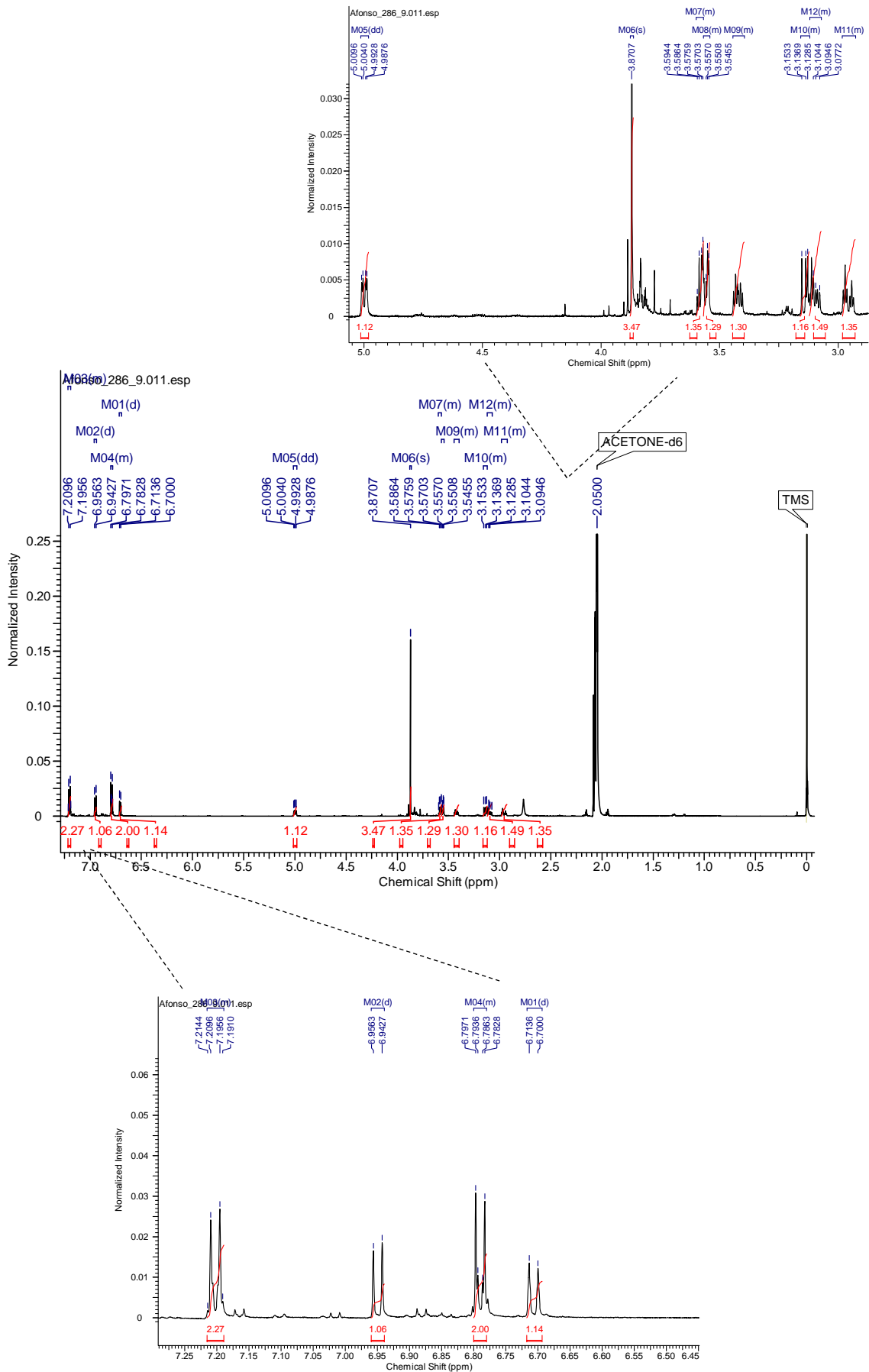


Figura 49: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) de OaF9.

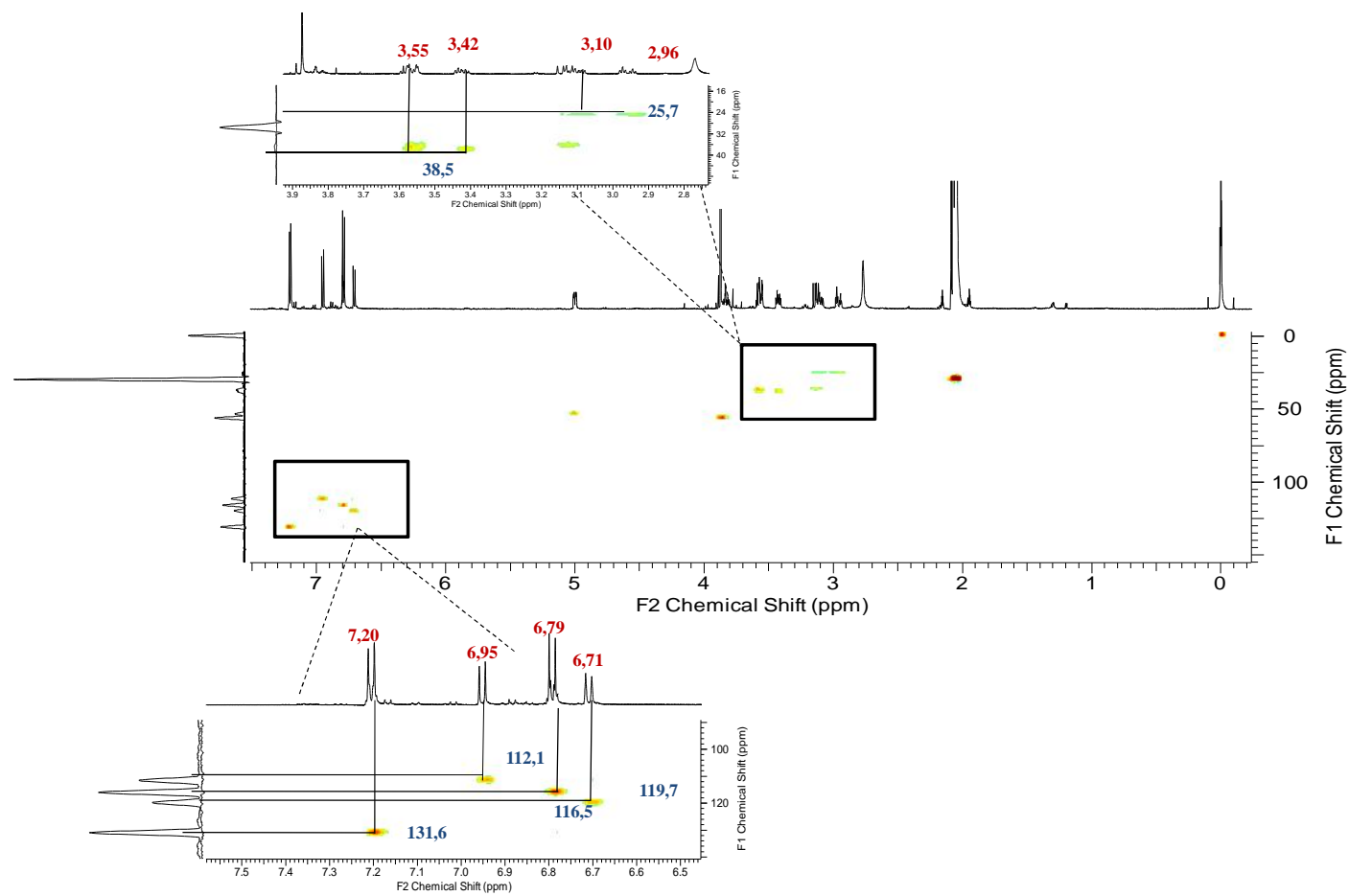


Figura 50: Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) da amostra OaF9.



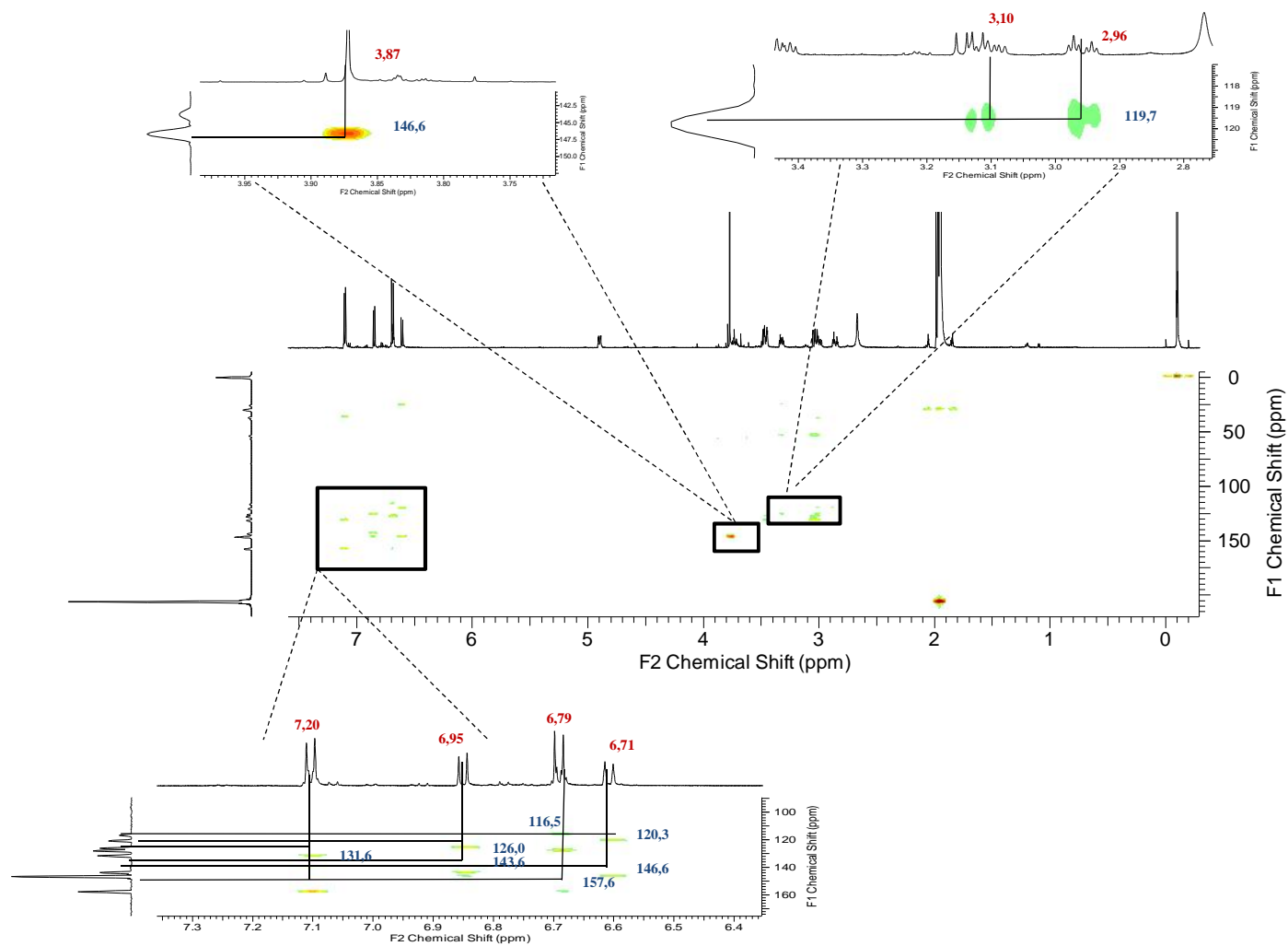


Figura 51: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD<sub>3</sub>COCD<sub>3</sub>) da amostra OaF9.

Através do mapa de contorno HMBC (Figura 51) foi observada a correlação a longa distância dos hidrogênios metilênicos em 3,10 (1H, m) e 2,96 (1H, m) com o carbono em 119,7, atribuído ao C-5. No mesmo mapa, as correlações do hidrogênio em 6,95 e o carbono não hidrogenado em 126,0 foram compatíveis com o H-6 e o C-4a, respectivamente. Em adição, as correlações dos hidrogênios metoxílicos em 3,87 (3H) e o hidrogênio aromático em 6,71 (H-5) com o carbono em 146,6, definiram a posição da metoxila no carbono C-7 do anel A. A correlação entre o hidrogênio H-6 e o sinal do carbono oxigenado em 143,3, posicionaram uma das hidroxilas em C-8.

Na tabela 7 são apresentados os dados completos de RMN. No mapa de HSQC foram observadas correlações entre os hidrogênios aromáticos em 7,20 (2H) e 6,79 (2H) e os carbonos em 131,6 e 116,5, respectivamente, confirmando tratar-se de um sistema simétrico, correspondendo aos carbonos C-2', C-6', C-5' e C-3' respectivamente. Ainda no mapa de HMBC foi possível observar correlação destes hidrogênios com o carbono oxigenado em 157,6 (Tabela 7), atribuído ao C-4', confirmando a presença do grupo *para*-hidroxibenzil na molécula.

A partir destas observações foi possível caracterizar a amostra codificada como OaF9 como o alcaloide benziltetraidroisoquinolínico norjuzifina (Figura 52), sendo este alcaloide anteriormente isolado de *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae) (CHAVES et al., 2001).

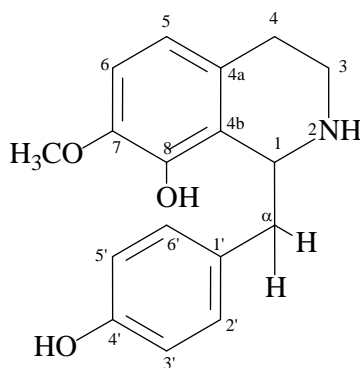


Figura 52: Estrutura do alcaloide norjuzifina.

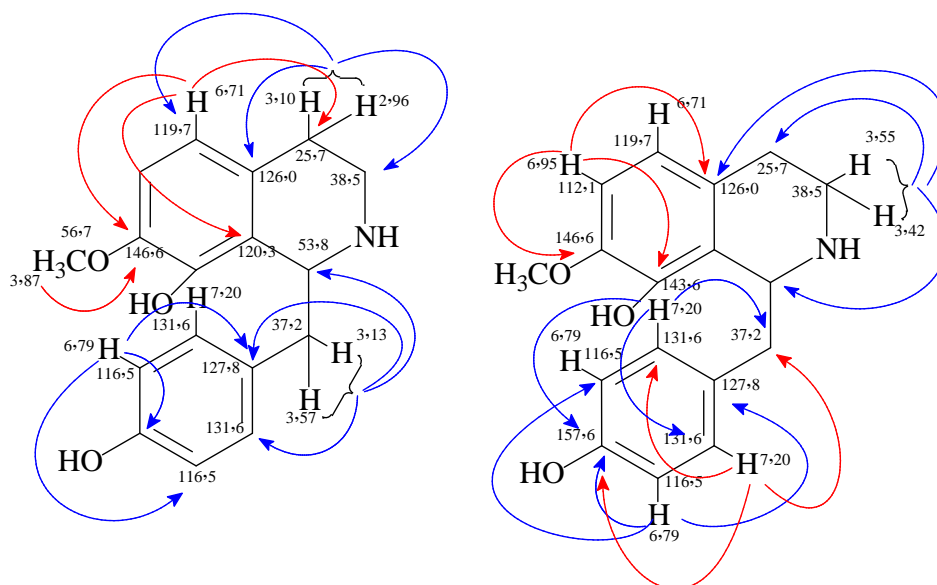


Figura 53: Principais correlações observadas para amostra OaF9.

Tabela 7: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF9.

OaF9 (Norjuzifina)				
Posição	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>b</sup>	$^{13}\text{C}$ <sup>c</sup>	HMBC <sup>c</sup>
1	5,00 (1H, dd, 10 e 3,2)	-	53,8	-
3	3,42 (1H, dt, 12,4; 5,2(x2))	2,94 (1H, m)	38,5	25, 7, 53,8 e 126,0
3	3,55 (1H, m)	3,28 (1H, m)	38,5	-
4	2,96 (1H, dt, 16,7; 4,6 (x2))	2,71 (1H, m)	25,7	38,5, 120,3; 119,7 e 126,0
4	3,10 (1H, m)	2,86 (1H, m)	25,7	-
4a	-	-	126,0	-
4b	-	-	120,3	-
5	6,71 (1H, d, 8,2)	6,61 (1H, d, 8,2)	119,7	25,7, 120,3 e 146,6
6	6,95 (1H, d, 8,2)	6,83 (1H, d, 8,2)	112,1	126,0, 143,6 e 146,6
7-OCH <sub>3</sub>	3,87 (3H, s)	3,85 (3H, s)	56,7	146,6
8	-	-	143,6	-
'	3,13 (1H, dd, 14,9 e 9,9)	2,82 (1H, dd, 14,2 e 10,2)	37,2	53,8, 127,8 e 131,6
'	3,57 (1H, m)	3,28 (1H, dd, 14,8 e 3)	37,2	-
1'	-	-	127,8	-
2'	7,20 (1H, m)	7,13 (1H, dd, 8,4 e 2,8)	131,6	37,2, 131,6 e 157,6
3'	6,79(1H, m)	6,77 (1H, dd, 8,4 e 2,8)	116,5	116,5, 127,8 e 157,6
4'	-	-	157,6	-
5'	6,79(1H, m)	6,77 (1H, dd, 8,4 e 2,8)	116,5	116,5, 127,8 e 157,6
6'	7,20 (1H, m)	7,13 (1H, dd, 8,4 e 2,8)	131,6	37,2, 131,6 e 157,6

<sup>a</sup> O experimento foi realizado a 600MHz para  $^1\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{COD}_3$ , utilizando o TMS como padrão interno.

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Chen et al., 2001 (  $\text{CD}_3\text{OD}$ , 400 MHz)

<sup>c</sup> Para os carbonos protonados foram usados os dados de HSQC e carbonos quaternários foram usados dados de HMBC

#### 5.8.4 Determinação estrutural da amostra OaF11.

A fração codificada como OaF11 (0,5 mg) apresentou-se como um sólido amorfo. A análise de massas revelou a presença do pico base de  $m/z$  268 (Figura 54), correspondente à molécula protonada, indicando a fórmula molecular  $C_{17}H_{17}NO_2$  para o composto. Através da fragmentação em  $MS^n$  (Figura 55), o mesmo apresentou uma perda inicial de 17 Da seguida de perdas sequencias de 32 e 28 Da. De acordo com Stévigny e colaboradores (2004) em alcaloides aporfínicos perda 32 Da seguida de 28 Da é referente ao grupo  $CH_3O$  e  $OH$  nas posições vicinais, podendo-se sugerir a presença de um alcaloide aporfínico sem metilação no nitrogênio e com metoxila e hidroxila adjacente no anel A, não apresentando substituição no anel D.

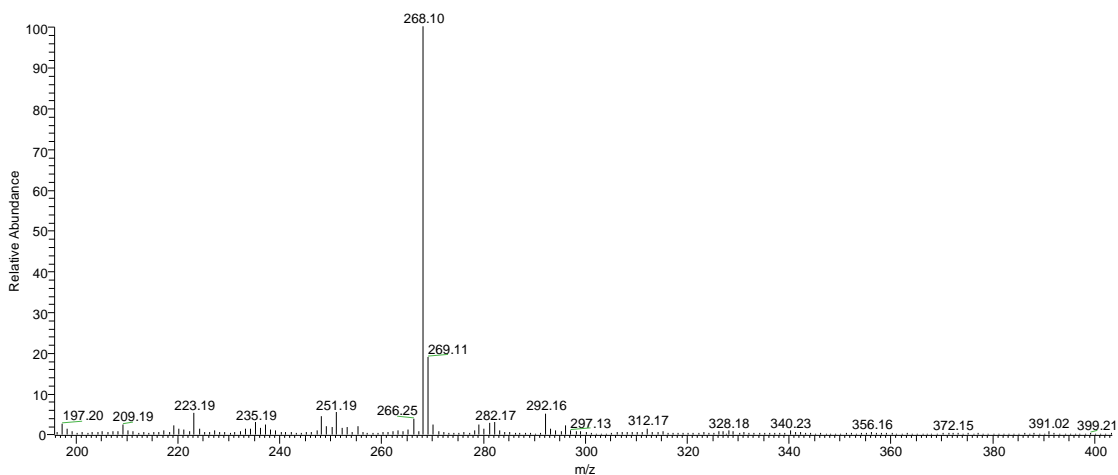


Figura 54: Espectro de massa da amostra OaF11.

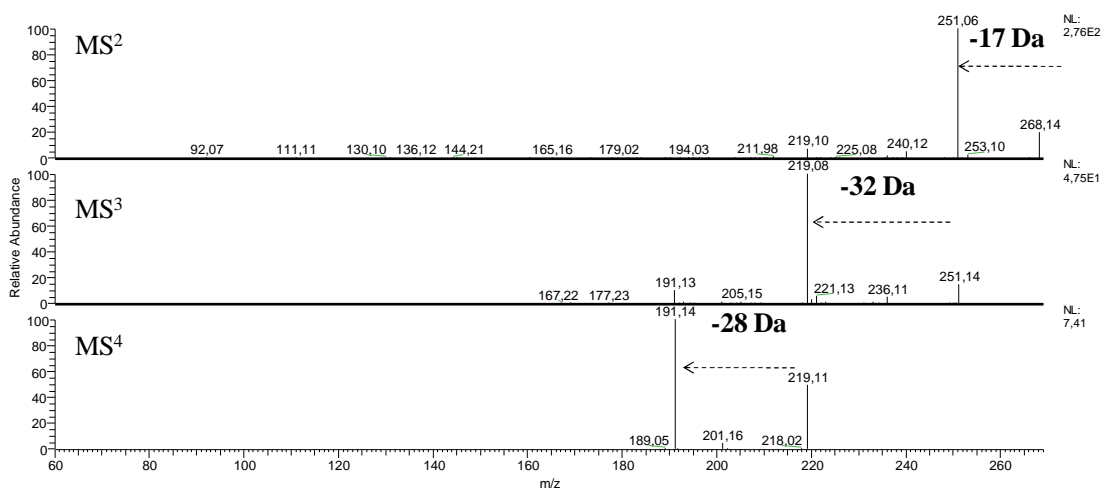


Figura 55: Espectro de  $MS^n$  para o íon  $m/z$  268  $[M+H]^+$

No espectro de RMN de  $^1H$  foi possível observar na região de aromáticos (Figura 56) sinais em 7,35 (2H, m), 7,29 (1H, m) e 8,36 (1H, d, 7,5), característicos do anel D de esqueletos aporfínicos não substituídos, além da presença de um singlete em 6,79 (1H, s) característico de H-3 do anel A, dissubstituído. A presença de sinais de dois hidrogênios em 3,01 (m) e 3,21 (dd, 13,8 e 4,3 Hz), atribuídos aos hidrogênios do C-7, ratificaram a natureza aporfínica do composto.

No espectro de RMN de  $^1H$  (Figura 56) ainda foi observado um sinal em 3,61 (3H, s) sinal característico de metoxila, confirmando as informações obtidas pela investigação de fragmentação (Figura 55) do espectro de massas, que ainda indicou a presença de uma hidroxila adjacente à mencionada metoxila. A estrutura foi confirmada através da comparação dos dados de RMN de  $^1H$  com os dados existentes na literatura, permitindo identificar a amostra OaF11 como o alcaloide assimilobina (Figura 57). Os sinais completos de RMN da molécula são apresentados na tabela 8.

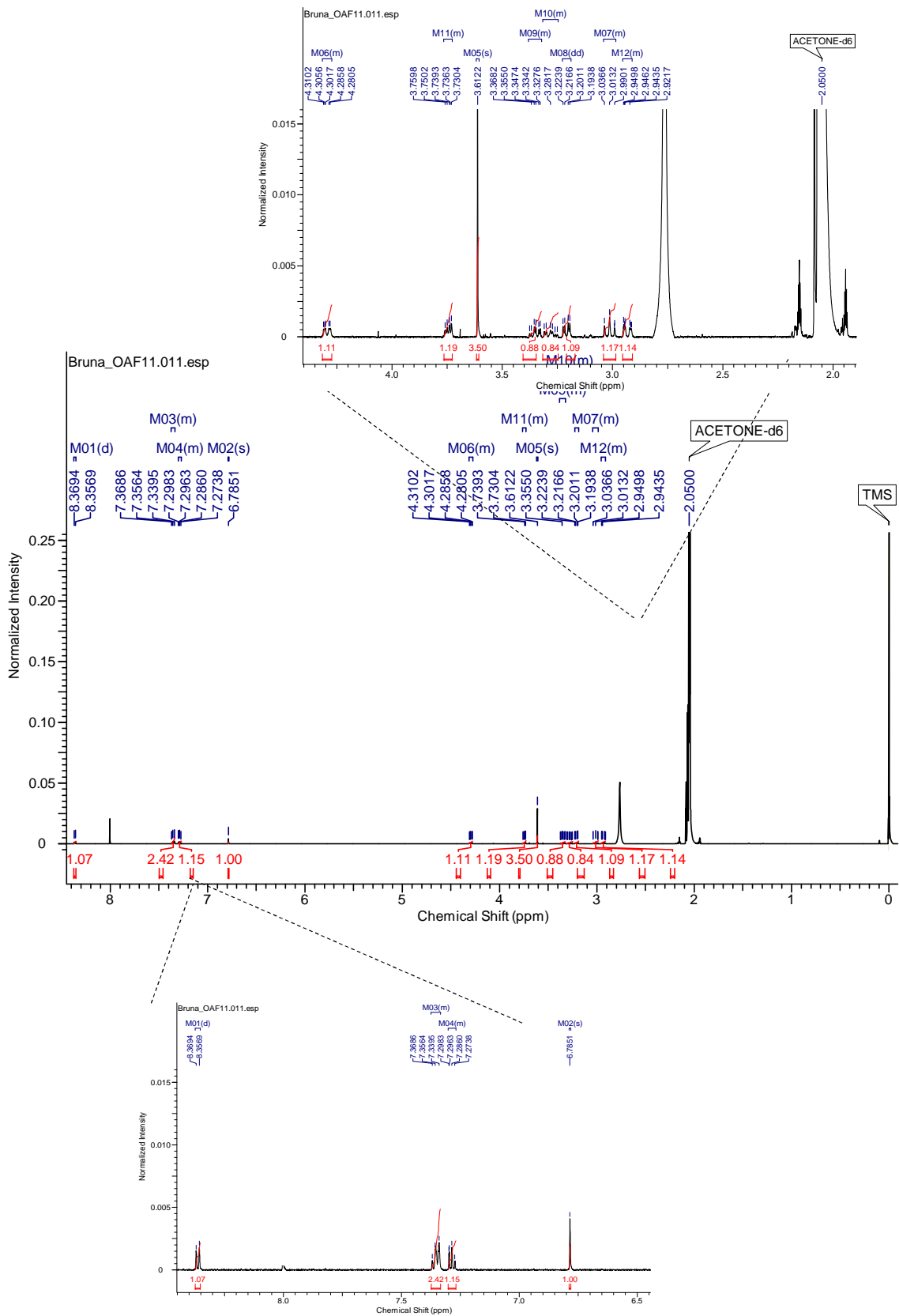


Figura 56: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ ) amostra OaF11.

O alcaloide assimilobina é frequentemente encontrado em gêneros da família Annonaceae, como *Annona*, *Unonopsis* e *Xylopia* (LEBOEUF et al., 1982b; DA CRUZ et al., 2011; YOSHIDA et al., 2013; RABÊLO et al., 2015). Estudos realizados por Costa e colaboradores (2013; 2015), com as espécies *Annona salzmannii* e *Annona pickelii*, evidenciaram resultados satisfatórios, relacionado à atividade antioxidante para o alcaloide assimilobina.

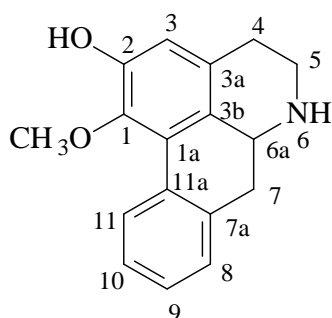


Figura 57: Estrutura do alcaloide assimilobina

Tabela 8: Dados de RMN  $^1\text{H}$  da amostra OaF11.

OAF11 (Asimilobina)		
Posição	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>b</sup>
<b>1</b>	-	
<b>1a</b>	-	
<b>2</b>	-	
<b>3</b>	6,79 (1H, s)	6,73 (1H, s)
<b>3a</b>	-	
<b>3b</b>	-	
<b>4</b>		
	2,93 (1H, m)	2,75 (1H, m)
<b>4</b>	3,28 (1H, m)	3,04 (1H, m)
<b>5</b>	3,35 (1H, m)	3,04 (1H, m)
<b>5</b>	3,74 (1H, m)	3,49 (1H, m)
<b>6a</b>	4,30 (1H, m)	3,93 (1H, m)
<b>7</b>	3,01 (1H, m)	2,85 (1H, m)
<b>7</b>	3,21 (1H, dd, 13,8 e 4,3)	2,97 (1H, dd, 13,8 e 4,4)
<b>7a</b>	-	-
<b>8</b>	7,35 (1H, m)	7,28 (1H, m)
<b>9</b>	7,29 (1H, m)	7,25 (1H, m)
<b>10</b>	7,35 (1H, m)	7,33 (1H, m)
<b>11</b>	8,36 (1H, d, 7,5)	8,29 (1H, 7,4)
<b>11a</b>	-	
<b>1-OCH3</b>	3,61 (3H, s)	3,59 (3H, s)

<sup>a</sup> O experimento foi realizado a 600MHz para  $^1\text{H}$  em  $\text{CD}_3\text{COCD}_3$ , utilizando o TMS como padrão interno.

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Soares et al., 2015b ( $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ ; 6000 MHz).

### 5.8.5 Determinação estrutural da amostra OaF13.

A amostra codificada como OaF13 (2,2 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. O espectro de íons totais desta amostra (Figura 58) evidenciou um pico base de  $m/z$  282  $[M+H]^+$ , correspondente à molécula protonada, indicando a fórmula molecular  $C_{18}H_{19}NO_2$  para o composto. No espectro de  $MS^n$  (Figura 59) foi possível observar uma perda inicial de 17 Da, seguida de perdas sequenciais de 15 Da. A perda inicial de 17 Da sugere a presença de hidrogênio ligado ao nitrogênio no anel B do esqueleto aporfínico, enquanto que as perdas sequenciais de 15 Da indicam a presença de metoxilas adjacentes no anel A (STÉVIGNY et al., 2004). Estas evidências apontam para uma estrutura aporfínica sem N-metilação, com metoxilas adjacentes e sem substituição no anel D.

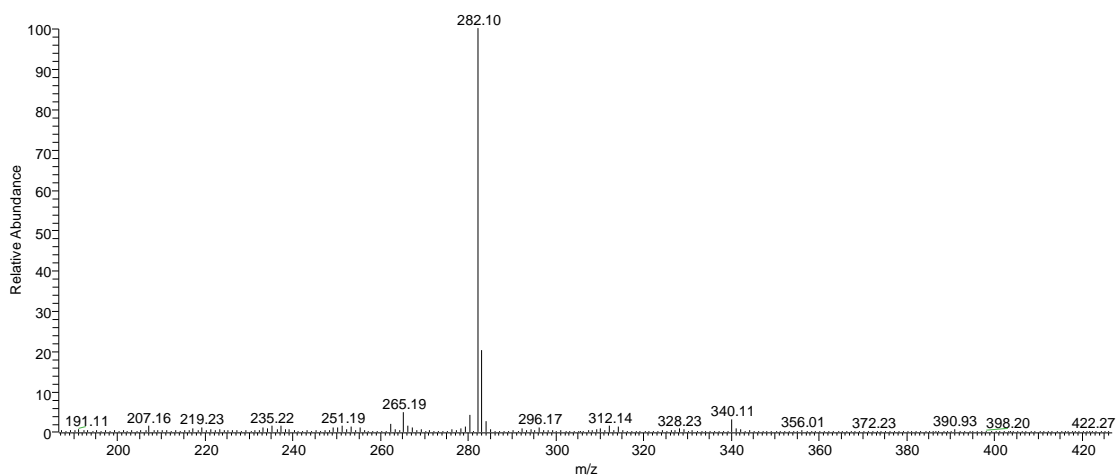


Figura 58: Espectro de massa da amostra OaF13.



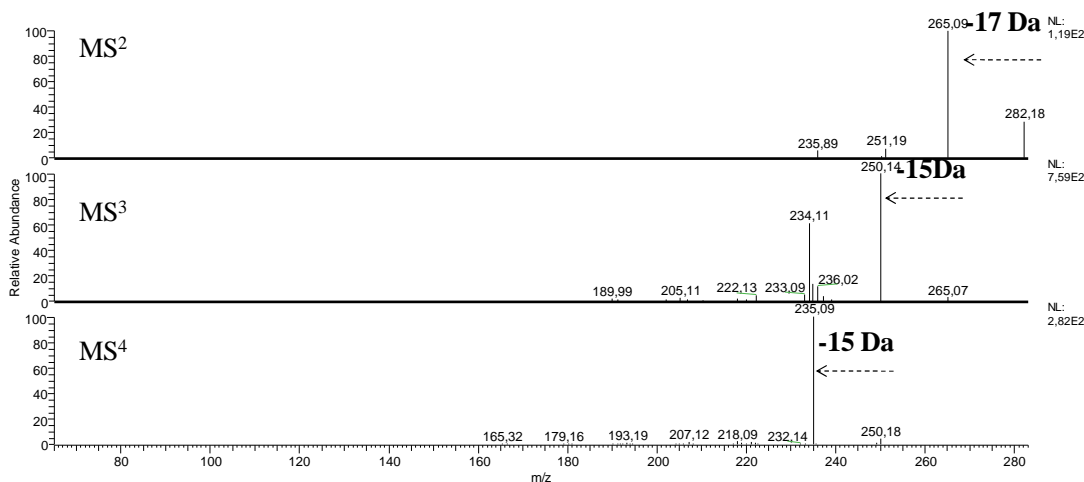


Figura 59: Espectro de MS<sup>n</sup> para o íon  $m/z$  282 [M+H]<sup>+</sup>

O espectro de RMN de <sup>1</sup>H apresentou-se muito similar ao de OaF11, exceto pela presença de mais uma metoxila, sugerida pelos espectros de massas. Foram observados sinais referentes aos hidrogênios aromáticos (Figura 60) em 7,23 (2H, m), 7,35 (1H, m) e 8,40 (1H, d,  $J=7,8$  Hz), característicos do anel D de esqueletos aporfínicos não substituídos. O singlete em 6,68 (1H, s) possui deslocamento característico da posição H-3 do esqueleto aporfínico com duas substituições no anel A. A presença de sinais de dois hidrogênios em 3,13 (m) e 3,18 (m), atribuídos aos hidrogênios do C-7, ratificaram a natureza aporfínica do composto. No espectro de RMN de <sup>1</sup>H são ainda observados dois singletos (Figura 60) em 3,68 (3H, s) e 3,91(3H, s) cada um integrando para três hidrogênios, sinal característico de metoxilas.

Nos mapas de contorno de HSQC e HMBC (Figura 61 e 62) verifica-se que o hidrogênio em 6,68 ligado ao carbono em 111,7 (C-3), se correlaciona com os carbonos em 145,8, 153,7 e 25,6, confirmando a existência de uma dissubstituição no anel A. Este fato é também ratificado nos mapas de contorno de HSQC e HMBC (Figura 61 e 62), onde os sinais das metoxilas em 3,68 e 3,91, ligadas aos carbonos em 60,2 e 55,9 (HSQC), apresentam correlações  $J^3$  com os carbonos em 145,8 (C-1) e 153,7 (C-2) respectivamente. Outras correlações para a amostra OaF13 estão descritas na tabela 9.

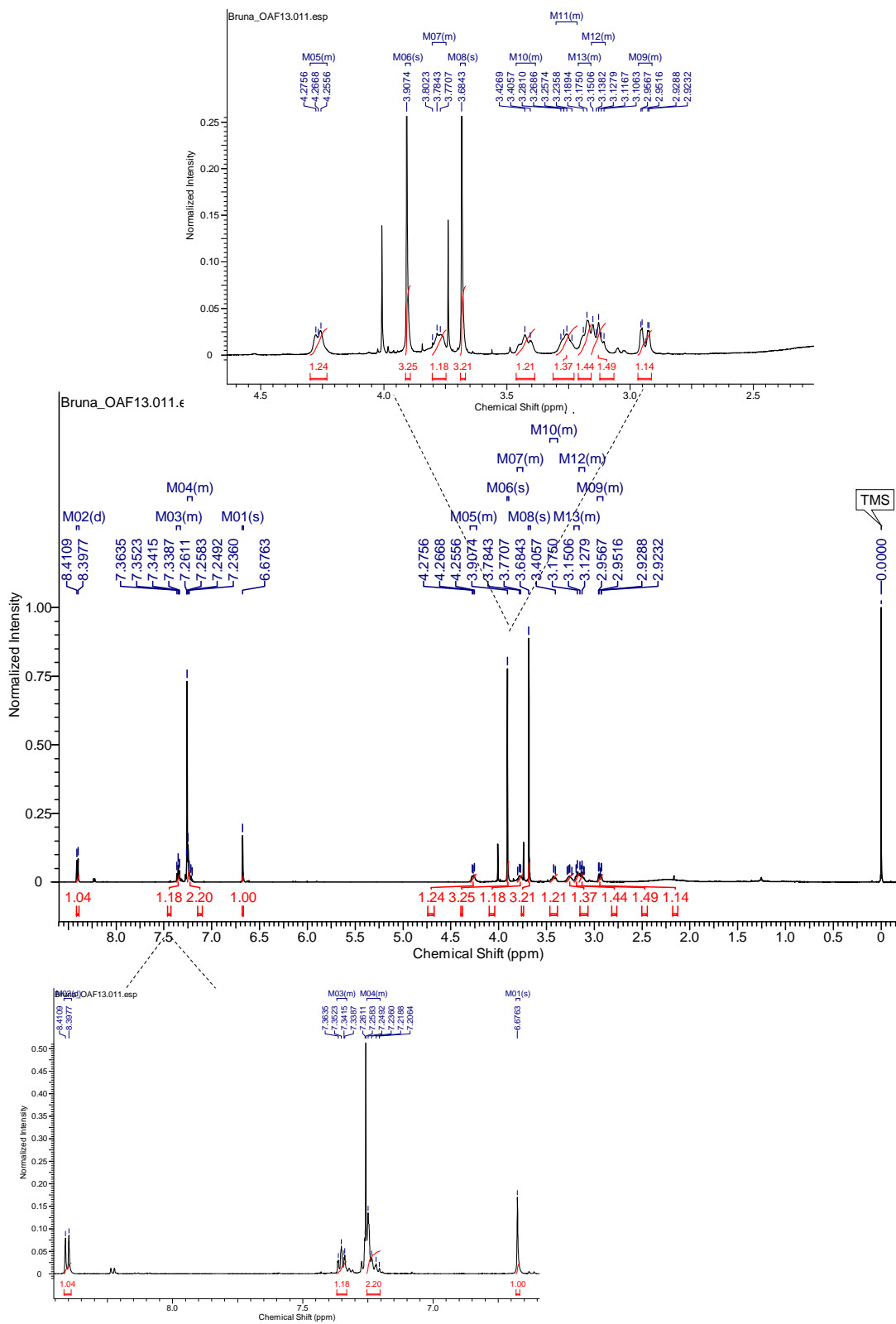


Figura 60: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra OaF13.

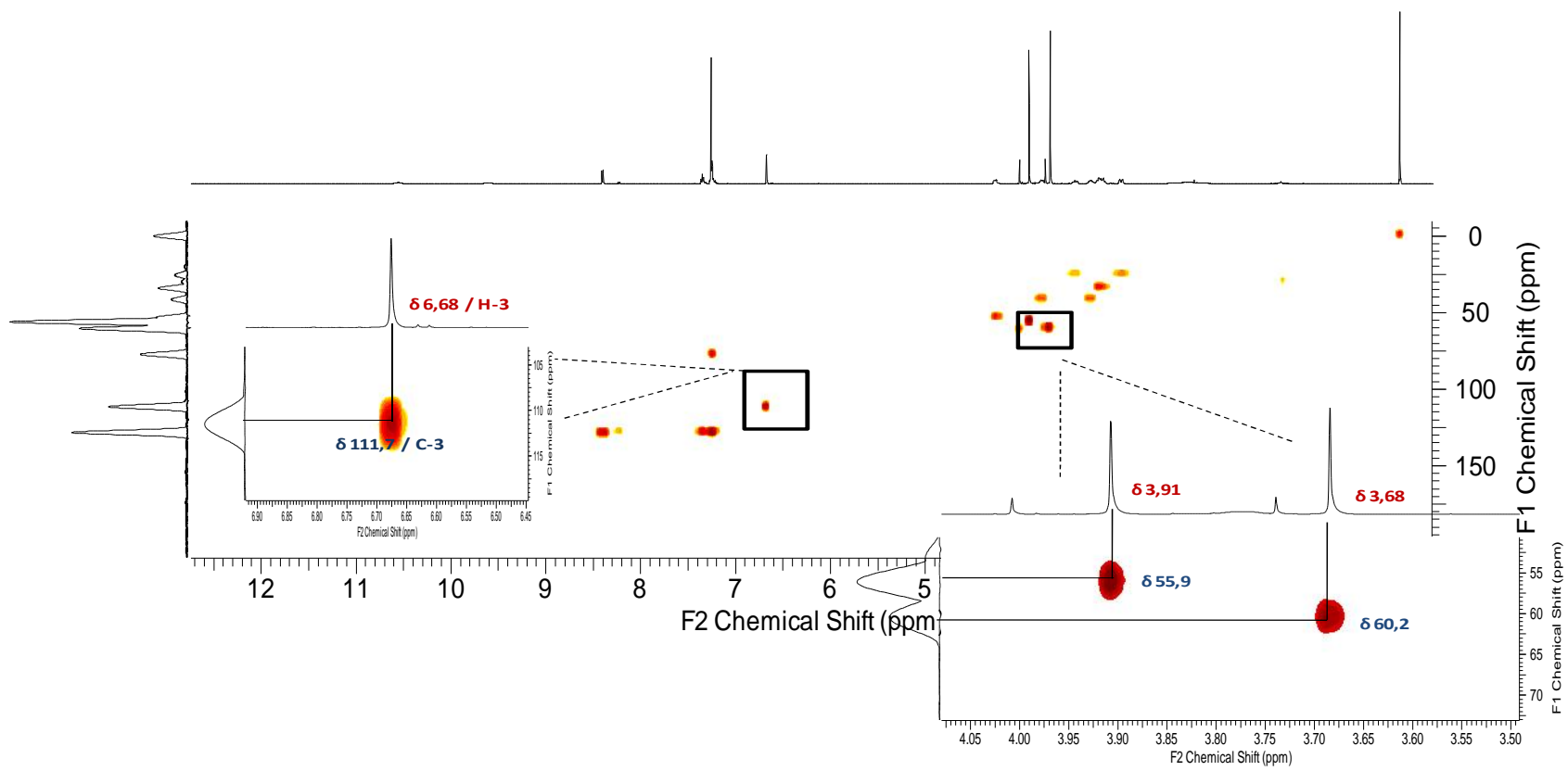


Figura 61: Mapa de contorno HSQC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra OaF13.

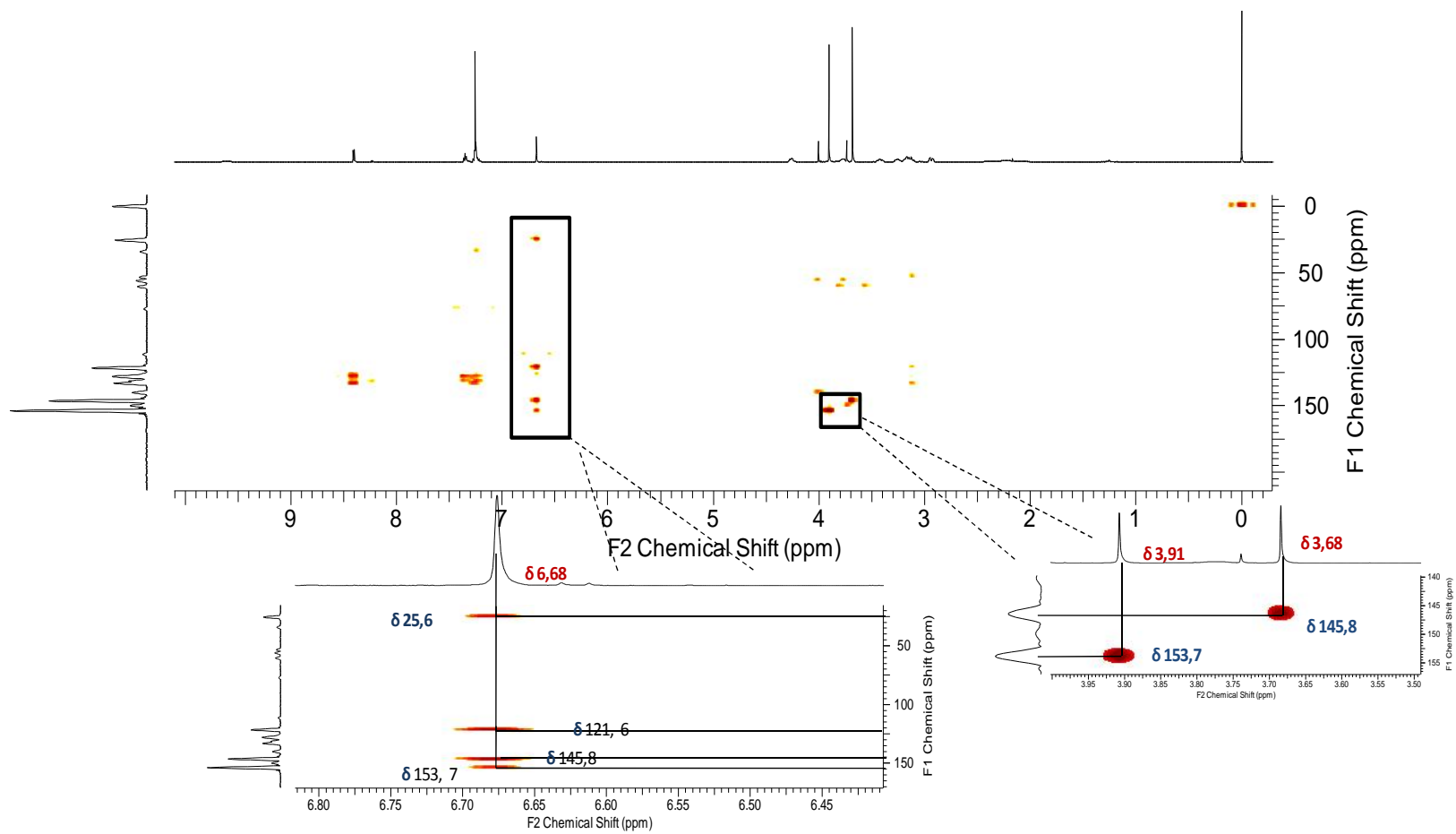


Figura 62: Mapa de contorno HMBC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância OaF13.

A partir da análise dos dados espectrométricos e espectroscópicos, foi possível propor que esta substância se trata do alcaloide aporfínico nornuciferina (Figura 63), sendo a estrutura confirmada por comparação com os dados existentes em literatura (DUTRA et al., 2012) (Tabela 9).

O alcaloide nornuciferina é amplamente encontrado em várias espécies da família Annonaceae, tais como *Annona glabra*, *Annona pickelii*, *Guatteria blepharophylla*, *Unonopsis duckei* e *Duguetia flagellaris* (CHANG et al., 2000; DUTRA et al., 2012; COSTA et al., 2011b; SILVA et al., 2014; FECHINE et al., 2002). Na literatura foi relatado o efeito antidepressivo deste alcaloide presente em *Annona cherimolia*, devido a sua ação agonista no receptor 5HT<sub>1A</sub> (MARTÍNEZ-VÁSQUEZ et al., 2012).

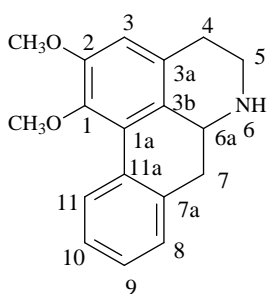


Figura 63: Estrutura do alcaloide nornuciferina.

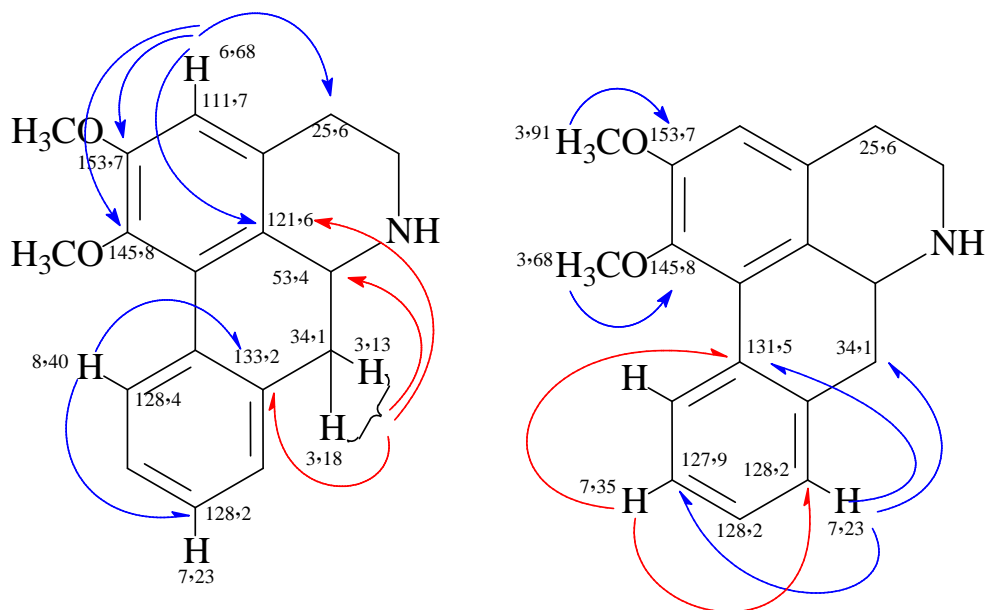


Figura 64: Principais correlações observadas para a amostra OaF13.

Tabela 9: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF13

OAF13 (Nornuciferina)					
Posição	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>b</sup>	HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) <sup>c</sup>	HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) <sup>b</sup>	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>1</b>	-	-	145, 8	145,5	-
<b>1a</b>	-	-	-	126,7	-
<b>2</b>	-	-	153, 7	152,5	-
<b>3</b>	6,68 (1H, s)	6,65 (1H, s)	111, 7	111,7	25,6; 121, 6; 145,8; 153, 7
<b>3a</b>	-	-	-	128,1	-
<b>3b</b>	-	-	121, 6	127,0	-
<b>4</b>	2,94 (1H,dd, 16,9 e 3,1)	2,76 (1H, dd,15,8 e 2,6)	25, 6	28,3	-
<b>4</b>	3,43 (1H, m)	3,12 (1H, m)	25, 6	28,3	-
<b>5</b>	3,26 (1H, m)	3,06 (1H, dd, 12,0 e 2,6)	41, 5	42,6	-
<b>5</b>	3,79 (1H, m)	3,49 (1H, dd, 12,0 e 5,0)	41, 5	42,6	-
<b>6a</b>	4,27 (1H, m)	3,93 (1H, dd, 13,7 e 4,8)	53, 4	53,4	-
<b>7</b>	3,13 (1H, m)	2,86 (1H, t, 13,7)	34, 1	36, 7	53, 4; 121,6; 133,2
<b>7</b>	3,18 (1H, m)	2,97 (1H, dd, 13,7 e 4,8)	34, 1	36, 7	-
<b>7a</b>	-	-	133, 2	135, 4	-
<b>8</b>	7,23 (1H, m)	7,23 (1H, m)	128,2	127, 9	34, 1; 127,9; 131, 5
<b>9</b>	7,23 (1H, m)	7,23 (1H, m)	128,2	127, 5	-
<b>10</b>	7,35 (1H, m)	7,31 (1H, m)	127, 9	127, 2	128, 2; 131, 5
<b>11</b>	8,40 (1H, d, 7,8)	8,39 (1H, d, 7,7)	128, 4	128, 4	128, 2; 133, 2
<b>11<sup>a</sup></b>	-	-	131, 5	132,0	-
<b>1-OCH3</b>	3,68 (3H, s)	3,66 (3H, s)	60, 2	60, 2	145,8
<b>2-OCH3</b>	3,91 (3H, s)	3,89 (3H, s)	55,9	55, 9	153, 7

<sup>a</sup> O experimento foi realizado a 600MHz para  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ , utilizando o TMS como padrão interno.

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Dutra et al., 2012 ( $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ ;400 MHz)

<sup>c</sup> Para os carbonos protonados foram usados os dados de HSQC e carbonos quaternários foram usados dados de HMBC.

### 5.8.6 Determinação estrutural da amostra OaF15

A fração amostra como OaF15 (2,9 mg) apresentou-se como um sólido amorfo. A análise de massas de OaF15 (Figura 65) evidenciou a presença do pico base de  $m/z$  266  $[M+H]^+$ . Este íon foi submetido à análise de  $MS^n$  (Figura 66) onde foi observado perdas sequencias de 17, 30 e 28 Da, característico de alcaloides aporfínicos com a ausência de N-metila e contendo uma ponte metilenodioxí (STÉVIGNY et al., 2004).

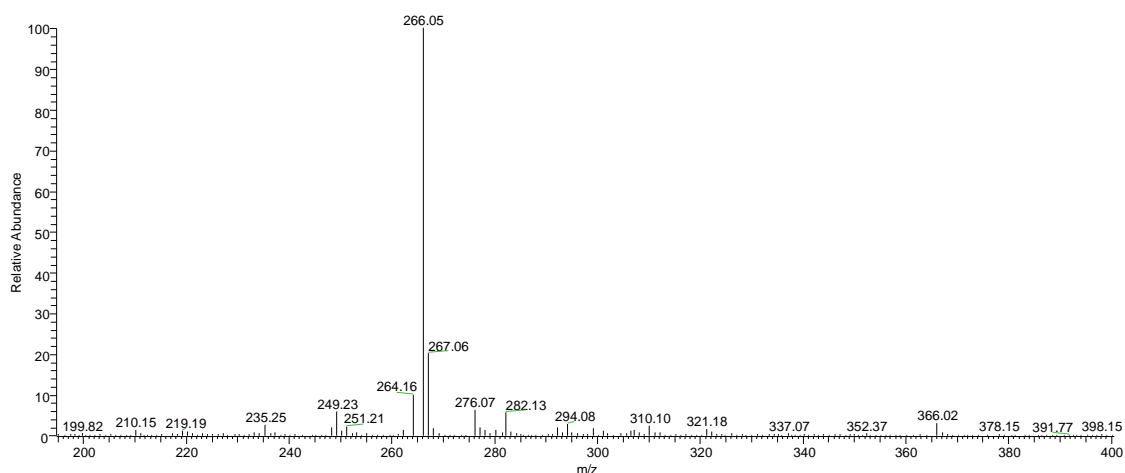


Figura 65: Espectro de massa da amostra OaF15.

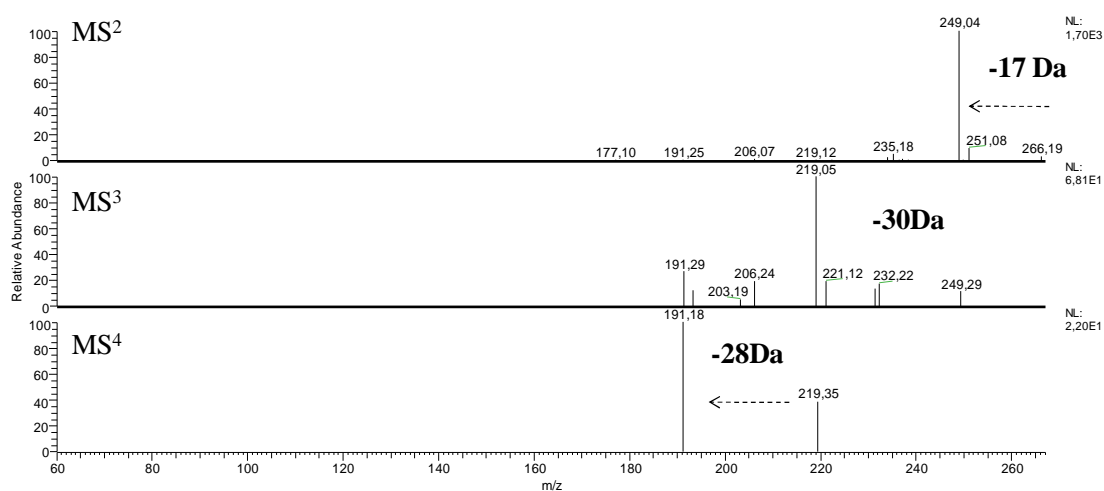


Figura 66: Espectro de  $MS^n$  para o íon  $m/z$  266  $[M+H]^+$

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  apresentou-se muito similar ao de OaF13, exceto pela ausência das duas metoxilas, substituídas por um grupo metilenodioxí, como sugerido pelo espectro de massas.

Na análise de RMN de  $^1\text{H}$  na região aromática, foram observados deslocamentos em 8,09 (1H, d, 7,8), 7,36 (1H, m) e 7,24 (2H, m), atribuídos às posições H-11, H-10, H-9 e H-8 respectivamente, sinais característicos do anel D do sistema aporfínico não substituído (Figura 67). Os sinais de dois hidrogênios em 3,18 (dd, 13,9; 13,9) e 3,26 (dd, 13,9; 4,7), atribuídos aos hidrogênios do C-7, ratificaram a natureza aporfínica do composto.

Nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$  e HSQC verificou-se que hidrogênios em 6,15 (1H, d, 1,5) e 6,00 (1H, d, 1,5), se correlacionavam com o carbono em 101,4. Adicionalmente, no mapa de contorno HMBC, verificou-se que estes hidrogênios se correlacionavam com os carbonos em 143,7 e 148,6, caracterizando a presença de uma ponte metilenodioxí, e evidenciando a não planaridade da molécula (Figura 68 e 69). A localização da ponte metilenodioxí pôde ser confirmada pela correlação do hidrogênio 6,61 (1H, s), ligado ao carbono em 107,9 (C-3), com os carbonos aromáticos em 143,7 (C-1), 148,6 (C-2) e 121,2(C-3b) e ao carbono metilênico em 25,9 (C-4) confirmando a estrutura do anel A (Figura 68 e 69).



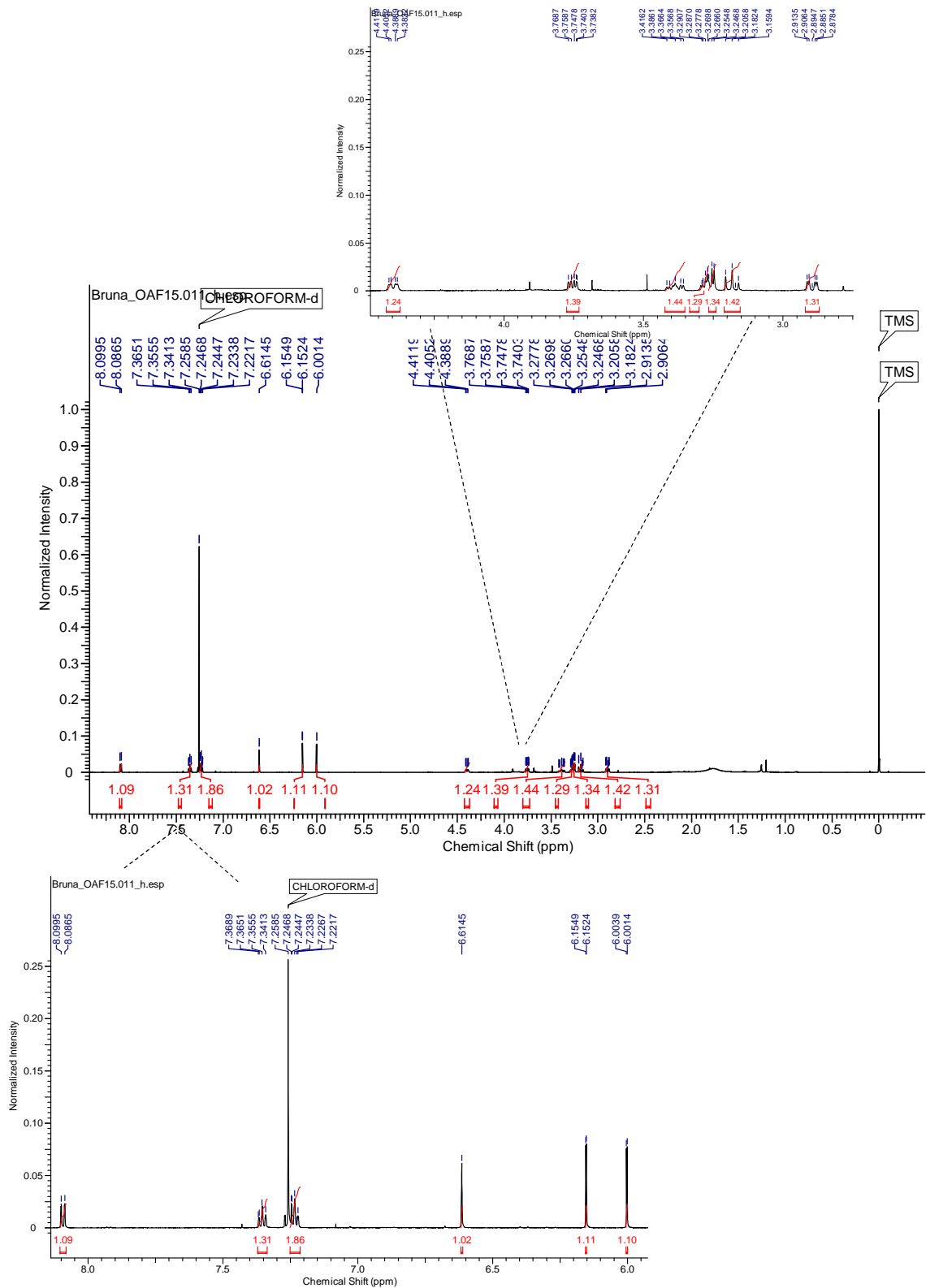


Figura 67: Espectro de RMN <sup>1</sup>H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amostra OaF15.

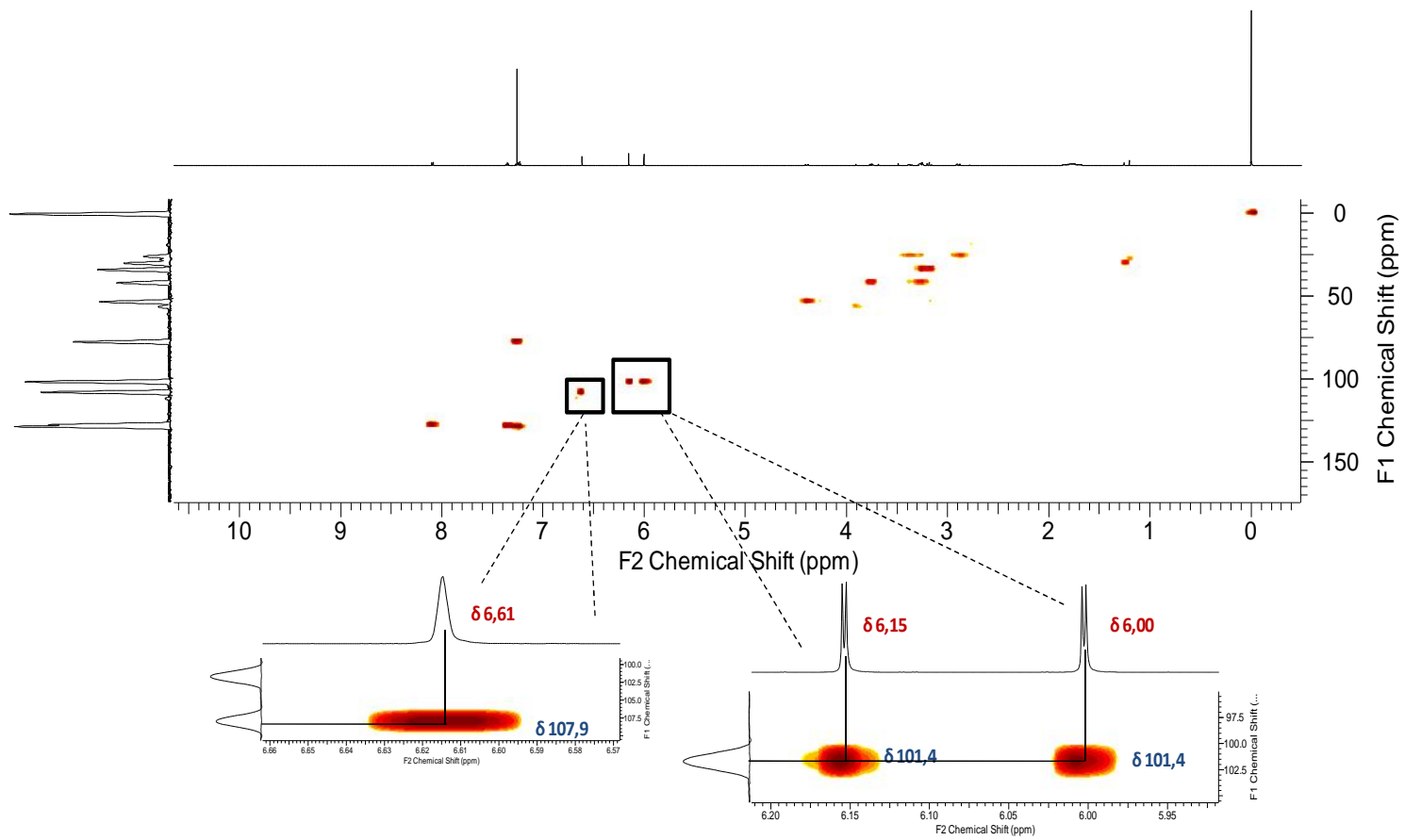


Figura 68: Mapa de contorno HSQC (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra OaF15.

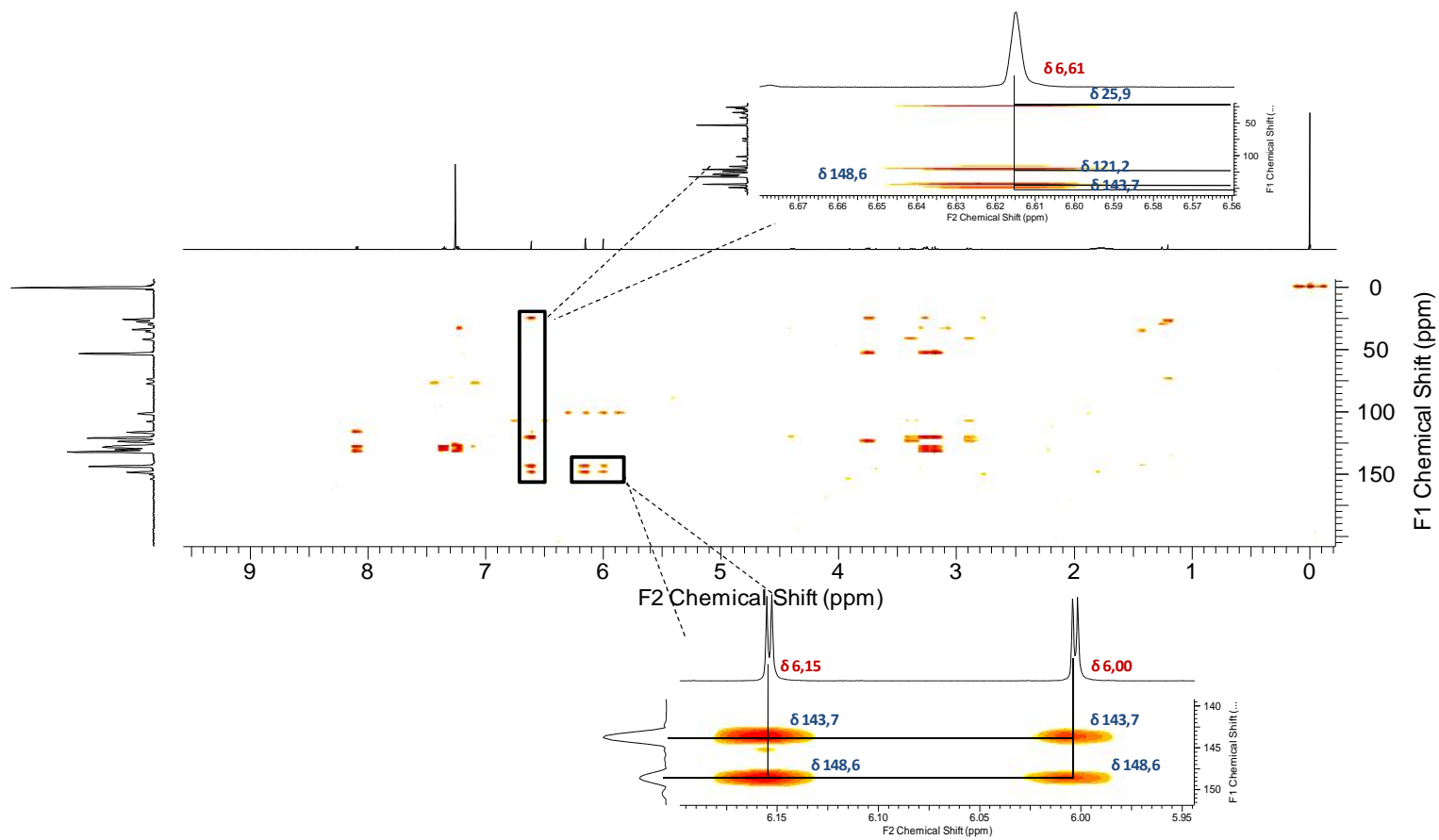


Figura 69: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amostra OaF15.

Através das análises dos dados de RMN e por comparação com a literatura, foi possível confirmar a substância OaF15 como o alcaloide anonaína (Figura 70), comumente encontrado em espécies da família Annonaceae (ORTIZ et al., 2007; COSTA et al., 2010; VENDRAMIN et al., 2013; TELES et al., 2015; COSTA et al., 2015 ). Os demais dados de RMN de  $^1\text{H}$  e dos mapas de contorno HSQC e HMBC encontrados para a substância anonaína estão na tabela 10.

O efeito antimicrobiano deste alcaloide foi evidenciado por Paulo e colaboradores (1992), demonstrando atividade contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Estudos realizados por Chen e colaboradores (2011) com este alcaloide, demonstraram o efeito antiproliferativo e antimigratório em células de câncer de pulmão humano (H1299).

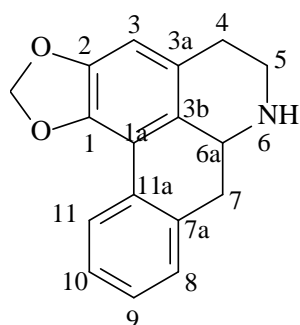


Figura 70: Estrutura do alcaloide anonaína.

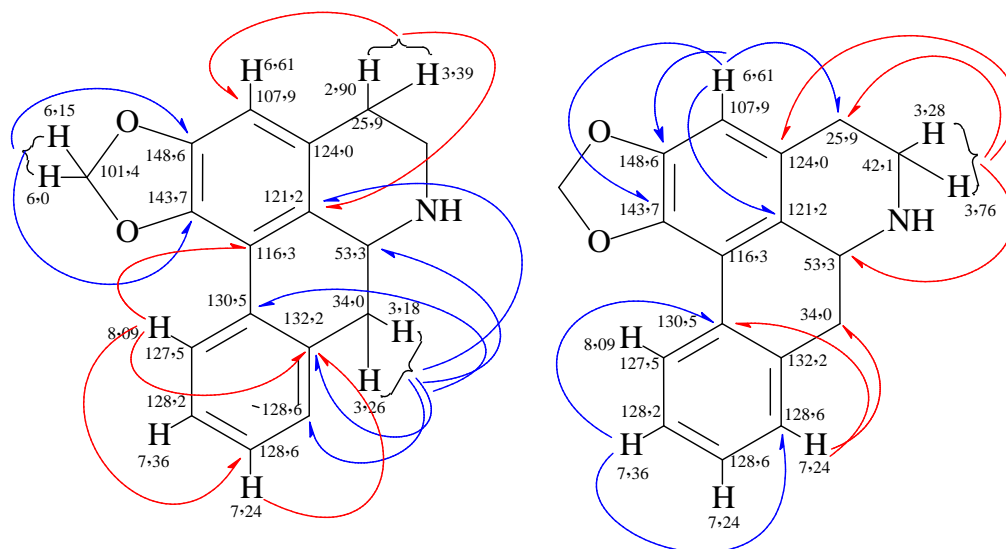


Figura 71: Principais correlações observadas para amostra OaF15.

Tabela 10: Dados de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da amostra OaF15.

OaF15( Anonaína )					
Posição	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^1\text{H}$ (mult., J em Hz) <sup>b</sup>	HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) <sup>c</sup>	HSQC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ ) <sup>b</sup>	HMBC ( $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ )
<b>1</b>	-	-	143, 7	142,5	-
<b>1a</b>	-	-	116, 3	116,1	-
<b>2</b>	-	-	148, 6	146,8	-
<b>3</b>	6,61 (1H, s)	6,57 (1H, s)	107,9	107,9	25,9; 121, 2; 143, 7; 148,6
<b>3a</b>	-	-	124,0	126,4	-
<b>3b</b>	-	-	121, 2	128,1	-
<b>4</b>	-	-	25,9	29,0	107,9; 121, 2
<b>4</b>	2,90 (1H, m)	2,67 (1H, m)	-	-	-
<b>4</b>	3,39 (1H, m)	3,01 (1H, m)	25,9	29,0	-
<b>5</b>	3,28 (1H, m)	3,02 (1H, m)	42, 1	43,1	25, 9; 53,3
<b>5</b>	3,76 (1H,ddd12,1; 5,7; 1,2)	3,41 (1H, m)	42, 1	43,1	25,9; 53, 3; 124,0
<b>6a</b>	4,40 (1H, dd, 13,8; 4,0)	3,99 (1H, dd,14,2; 4,9)	53, 3	53,3	-
<b>7</b>	3,18 (1H, dd,13,9; 13,9)	2,83 (1H, dd,14,2; 14,2)	34, 0	36,8	53,3; 121,2; 128,6; 130,5; 132,2
<b>7</b>	3,26 (1H,dd,13,9; 4,7)	2,96 (1H, dd,14,2; 4,9)	34, 0	36,8	121,2; 128,6; 130,5; 132,2
<b>7a</b>	-	-	132, 2	134,9	-
<b>8</b>	7,24 (1H, m)	7,25 (1H, m)	128,6	128,1	34,0; 130,5
<b>9</b>	7,24 (1H, m)	7,22 (1H, m)	128, 6	127,5	132,2
<b>10</b>	7,36 (1H, m)	7,31 (1H, m)	128, 2	127,0	128, 6; 130, 5
<b>11</b>	8,09 (1H, d, 7,8)	8,07 (1H, d, 7,7)	127, 5	127,0	116, 3; 128, 6; 132, 2
<b>11a</b>	-	-	130, 5	131,1	-
<b>O-CH<sub>2</sub>-O</b>	6,15 (1H, d, 1,5)	6,09 (1H, d, 1,4)	101, 4	100,6	143, 7; 148, 6
	6,00 (1H, d, 1,5)	5,94 (1H, d, 1,4)	101, 4	100,6	143, 7; 148, 6

<sup>a</sup> O experimento foi realizado a 600MHz para  $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ , utilizando o TMS como padrão interno.

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Costa et al., 2015 ( $^1\text{H}$  em  $\text{CDCl}_3$ ; 400 MHz).

<sup>c</sup> Para os carbonos protonados foram usados os dados de HSQC e carbonos quaternários foram usados dados de HMBC.

### 5.8.7 Determinação estrutural da amostra OaF17.

A amostra codificada como OaF17 (2,7 mg) apresentou-se como um sólido amorfo. A análise de massas de OaF17 (Figura 72) evidenciou a presença do pico base de  $m/z$  312  $[M+H]^+$ , correspondente à molécula protonada, indicando a fórmula molecular  $C_{19}H_{21}NO_3$  para o composto. Na análise de  $MS^n$  (Figura 73) foi notada uma perda inicial de 17 Da, seguida de perdas sequenciais de 15 Da, sendo observado o mesmo padrão de fragmentação descrito anteriormente para o alcaloide nornuciferina (Figura 63). Através da diferença de massas entre essas substâncias, foi possível propor a existência de um terceiro grupo metoxila para o alcaloide de  $m/z$  312.

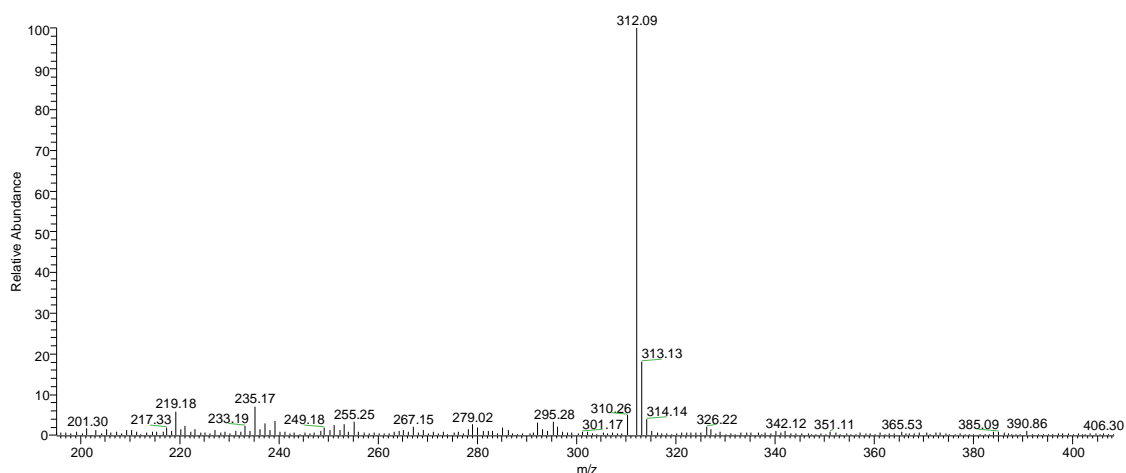


Figura 72: Espectro de massa da amostra OaF17.

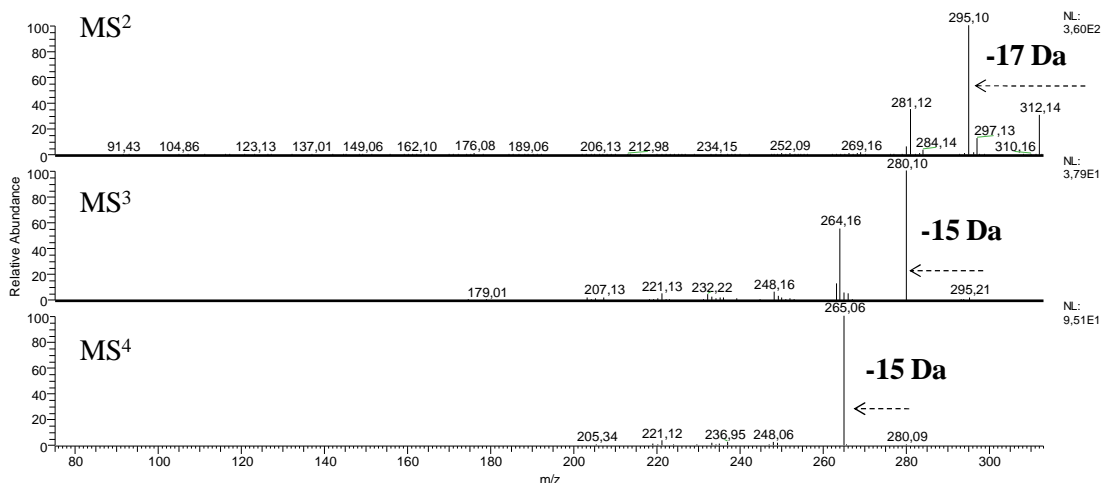


Figura 73: Espectro de  $MS^n$  para o íon  $m/z$  312 $[M+H]^+$

O espectro de RMN de  $^1H$  apresentou-se muito similar ao de OaF13, exceto pela presença de mais uma metoxila, evidenciada no espectro de massas. Foram observados sinais referentes a hidrogênios aromáticos (Figura 74) em 7,24 (2H, m), 7,34 (1H, m) e 8,30 (1H, d, 7,9), característicos do anel D de esqueletos aporfínicos não substituídos. Outros sinais de hidrogênios aromáticos não foram encontrados, sugerindo que o carbono C-3 do anel A esteja substituído. A presença de sinais de hidrogênios em 3,12 (m) e 3,17 (m), atribuídos aos hidrogênios do C-7, confirmaram a natureza aporfínica do composto.

No espectro de RMN de  $^1H$  são ainda observados três singletos em 3,76 (3H, s), 3,96 (3H, s) e 3,94 (3H, s), sinais característicos de metoxilas, confirmando a existência de três metoxilas na estrutura (Figura 74). No mapa de contorno HMBC (Figura 75) verifica-se que estas se correlacionam com os carbonos em 151,5, 146,7 e 150,8 respectivamente. A posição da terceira metoxila pode ser observada através do mapa HMBC do sinal de hidrogênio em 3,08 (H-4) (Figura 75), que se correlaciona com o carbono em 150,8, atribuído à presença da metoxila na posição C-3.

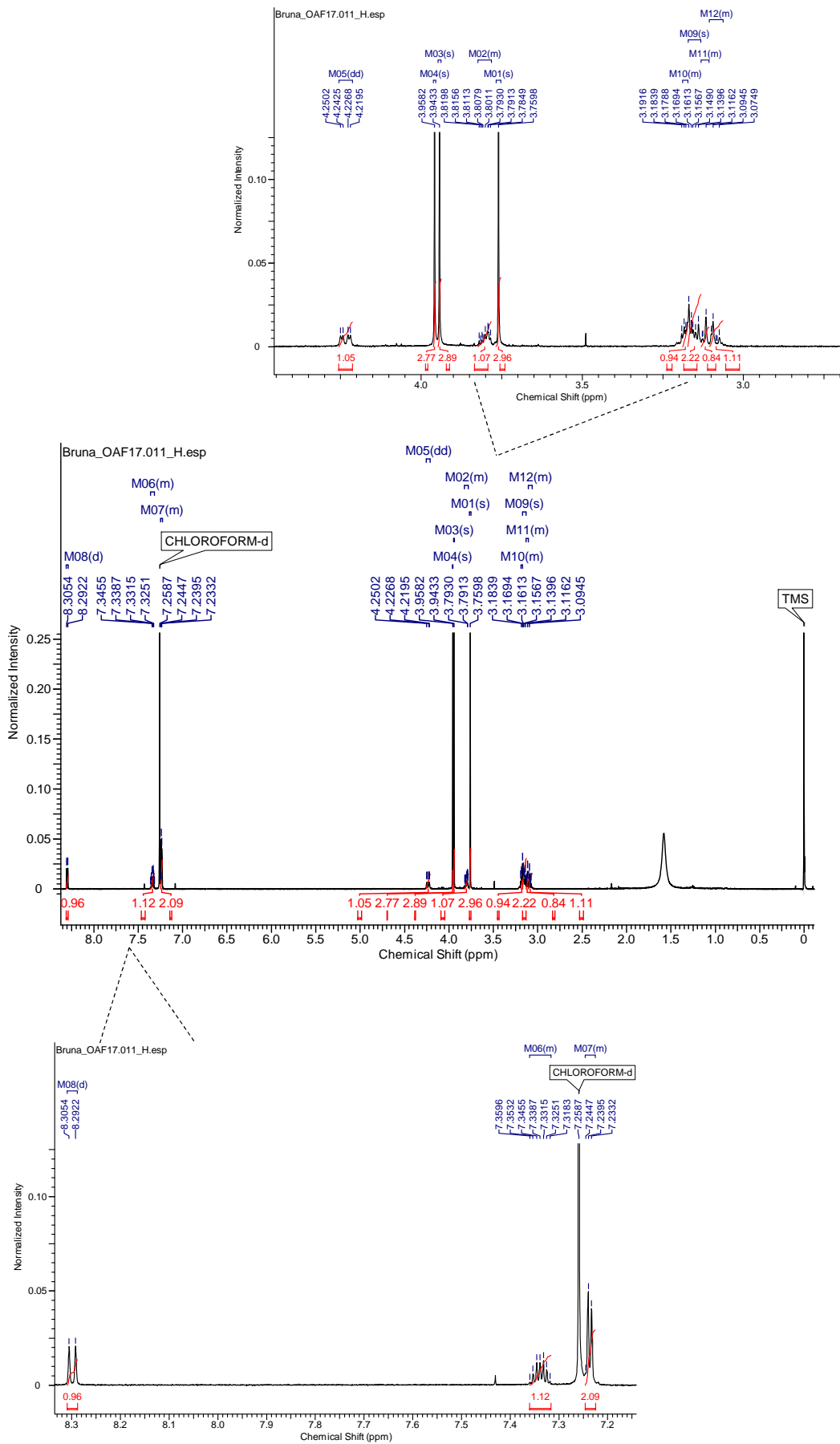


Figura 74: Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da amostra OaF17.



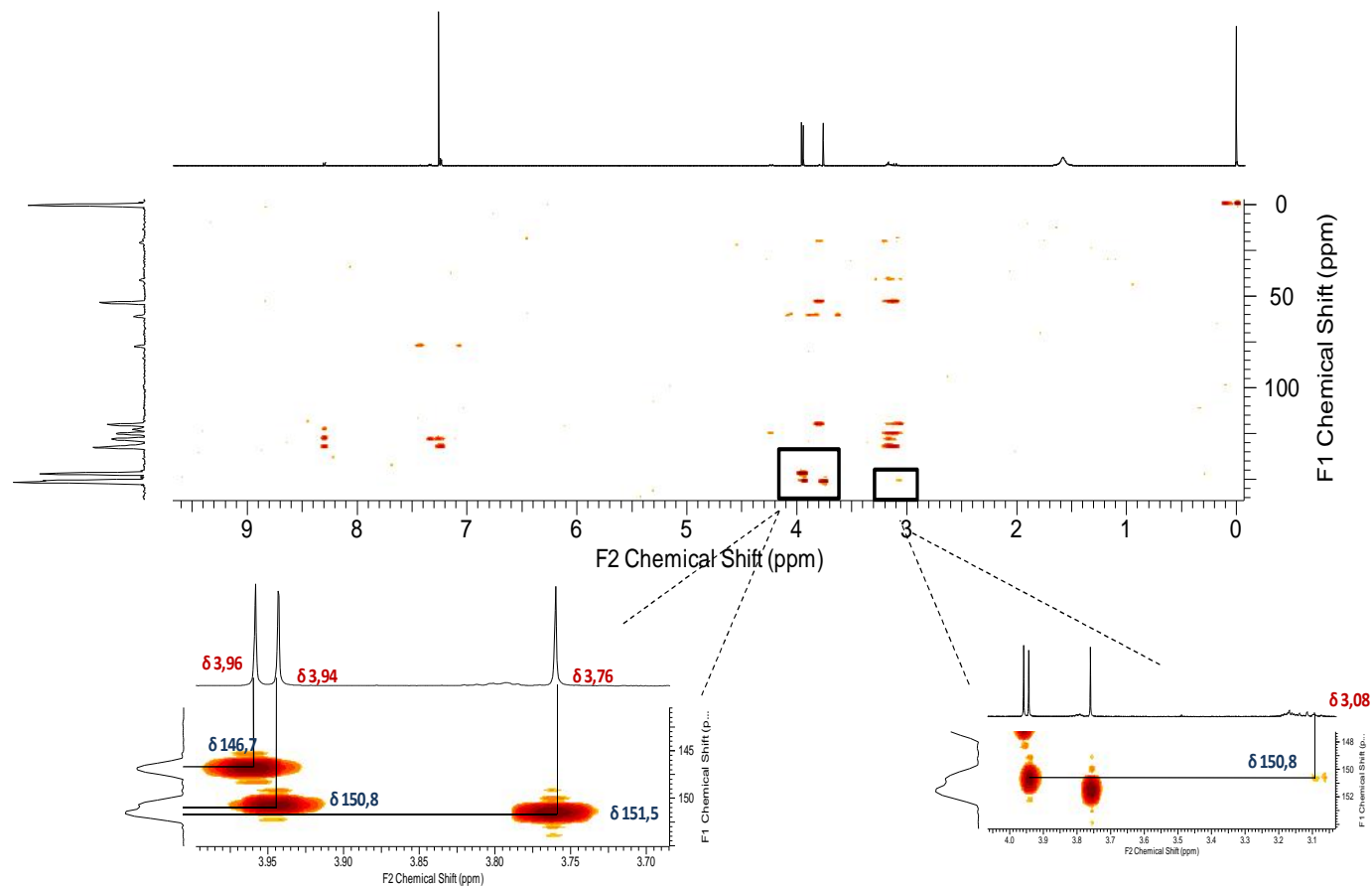


Figura 75: Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da amostra OaF17.

As demais correlações são apresentadas na tabela 11. A partir desses dados pode-se concluir que a substância de  $m/z$  312 trata-se do alcaloide aporfínico *O*-metilisopilina (Figura 76). Este alcaloide já foi relatado em espécies da família Annonaceae como em *Duguetia flagellaris*, *Guatteria scandens* e *Guatteria pogonopus* (HOCQUEMILLER et al., 1983; NAVARRO et al., 2001; FECHINE et al., 2002; SANTOS et al., 2015).

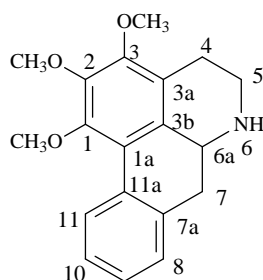


Figura 76: Estrutura do alcaloide *O*-metilisopilina.

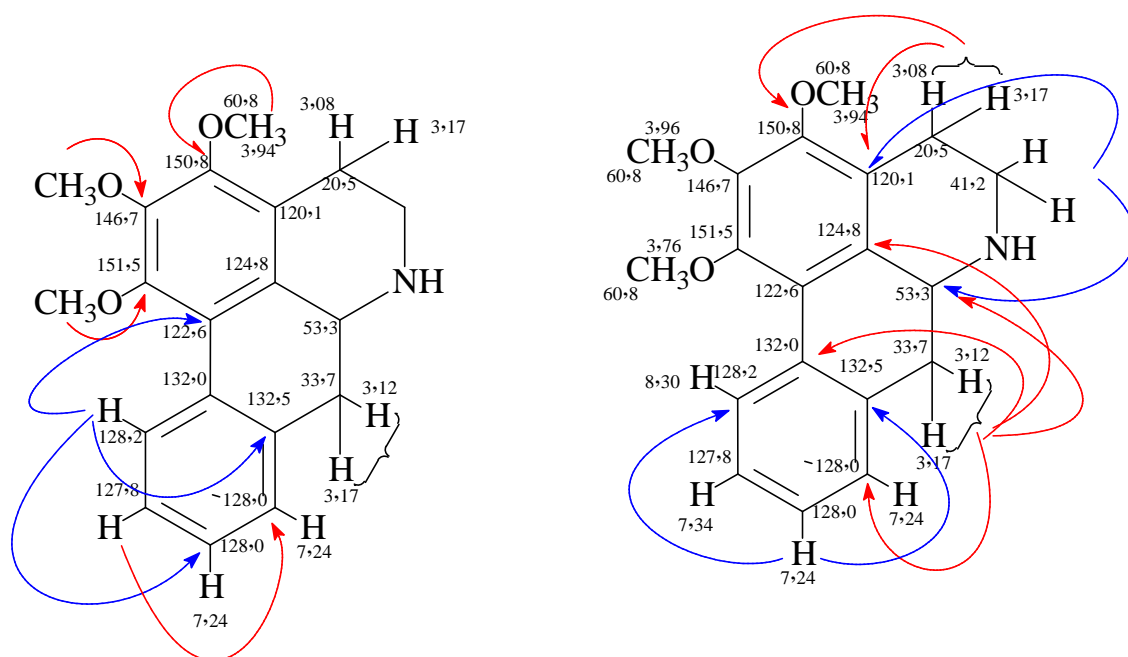


Figura 77: Principais correlações observadas para amostra OaF17.

Tabela 11: Dados de RMN <sup>1</sup>H, HSQC e HMBC da amostra OaF17.

OAF17( <i>O</i> -metilisopilina)						
Posição	<sup>1</sup> H (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H (mult., J em Hz) <sup>b</sup>	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>c</sup>	HSQC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>b</sup>	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C)	
<b>1</b>	-	-	151,5	150,8	-	
<b>1<sup>a</sup></b>	-	-	122,6	122,2	-	
<b>2</b>	-	-	146,7	144,5	-	
<b>3</b>	-	-	150,8	150,8	-	
<b>3<sup>a</sup></b>	-	-	120,1	124,4	-	
<b>3b</b>	-	-	124,8	131,2	-	
<b>4</b>	3,08 (1H, m)	-	20,5	23,7	120,1; 150,8	
<b>4</b>	3,17 (1H, m)	-	20,5	23,7	120,1	
<b>5</b>	3,18 (1H, m)	-	41,2	42,8	53,3	
<b>5</b>	3,80 (1H, m)	-	41,2	42,8	53,3; 120,1	
<b>6<sup>a</sup></b>	4,23 (1H, dd, 13,8; 4,2)	-	53,3	53,4	-	
<b>7</b>	3,12 (1H, m)	-	33,7	36,8	53,3; 124,8; 128,0; 132,0	
<b>7</b>	3,17 (1H, m)	-	33,7	36,8	132,0	
<b>7<sup>a</sup></b>	-	-	132,5	-	-	
<b>8</b>	7,24 (1H, m)	7,18	128,0	127,8	-	
<b>9</b>	7,24 (1H, m)	7,18	128,0	127,8	128,2; 132,5	
<b>10</b>	7,34 (1H, m)	7,18	127,8	126,7	128,0	
<b>11</b>	8,30 (1H, d, 7,9)	8,22	128,2	126,7	122,6; 128,0; 132,5	
<b>11a</b>	-	-	132,0	132,0	-	
<b>1-OCH3</b>	3,76 (3H, s)	3,73	60,8	60,2	151,5	
<b>2-OCH3</b>	3,96 (3H, s)	3,94	60,8	60,6	146,7	
<b>3-OCH3</b>	3,94 (3H, s)	3,90	60,8	61,2	150,8	

<sup>a</sup> O experimento foi realizado a 600MHz para <sup>1</sup>H em CDCl<sub>3</sub>, utilizando o TMS como padrão interno.

<sup>b</sup> Dados da literatura de acordo com Navarro et al., 2001 (<sup>1</sup>H em CDCl<sub>3</sub>; 200 MHz )

<sup>c</sup> Para carbonos protonados foram usados os dados de HSQC e carbonos quaternários foram usados dados de HMBC.

## 5.9 Análise por LC-DAD-APCI-MS do precipitado

O precipitado codificada como PFOa apresentou-se como um sólido amarelo claro. Quando analisada por LC-DAD-APCI-MS (Figura 78) revelou um pico majoritário, correspondendo a aproximadamente 87% da amostra e um minoritário, correspondendo a aproximadamente 13% da amostra.

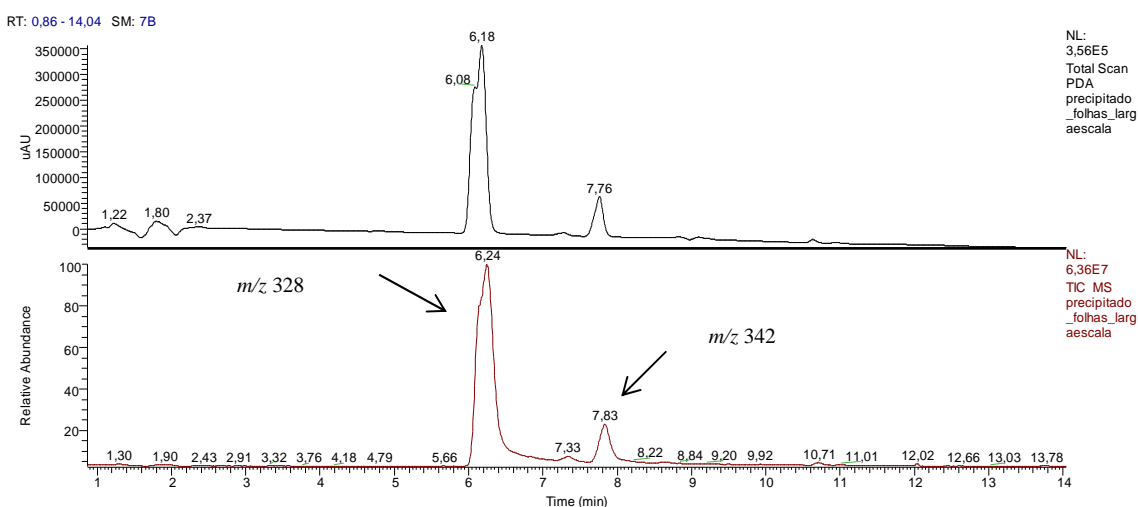


Figura 78: Cromatograma de LC-DAD e LC-APCI-MS, para o PFOa.

No espectro de massas em *full scan* (Figura 79) foi possível observar um sinal intenso de  $m/z$  328, além de um sinal discreto de  $m/z$  342, coerente com o perfil observado por LC-DAD-APCI-MS.

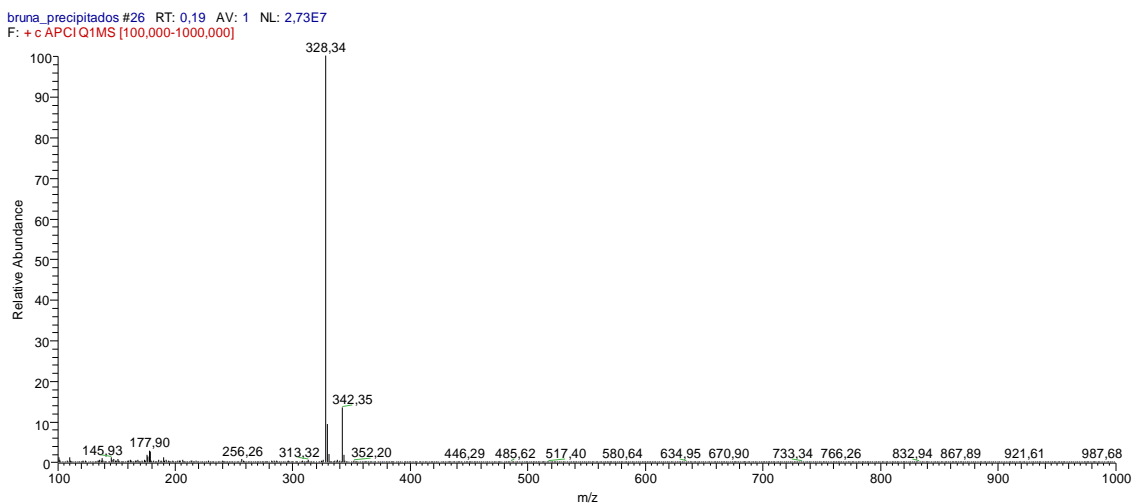


Figura 79: Espectro de íons totais do PFOa.

Quando submetidos a experimentos de MS/MS, ambos apresentaram elevadas perdas de massa, resultando no íon base de  $m/z$  178, mesmo perfil observado para as substâncias majoritárias estefolidina e isocoripalmina, sugerindo que o precipitado é uma mistura de ambas as substâncias.

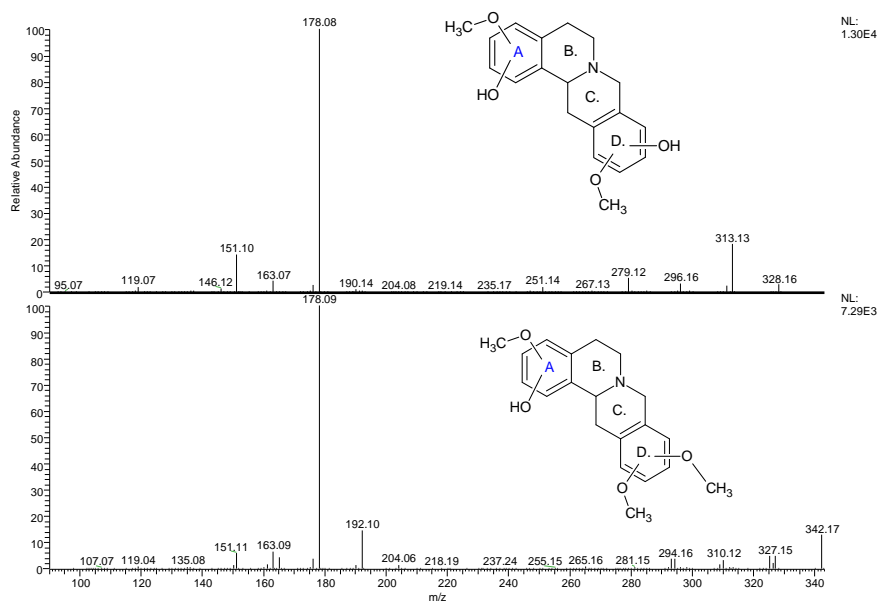


Figura 80: Espectros de MS/MS dos íons de  $m/z$  328 e 342.

## 6. CONCLUSÕES

A análise do perfil alcaloídico por APCI-IT-MS<sup>n</sup> das frações obtidas em escala analítica possibilitou escolher a fração alcaloídica das folhas para o isolamento de alcaloides ainda não descritos no gênero *Onychopetalum*. O fracionamento da fração alcaloídica das folhas por intermédio de cromatografia preparativa levou ao isolamento dos alcaloides aporfínicos, nornuciferina, anonaína, assimilobina e *O*-metilisopilina, dos alcaloides tetraidroprotoberberínicos isocoripalmina e estefolidina, e do alcaloide benziltetraidroisoquinolínico norjuzifina, sendo todos relatados pela primeira vez no gênero *Onychopetalum*. Tais resultados evidenciam que a espécie *Onychopetalum amazonicum* é uma fonte promissora de alcaloides isoquinolínicos, apresentando diversidade de estruturas, que incluem alcaloides precursores, como do tipo tetraidrobenzilisquinolínico e derivados, como os aporfínicos e tetraidroprotoberberínicos

Através das análises por CG-EM e CG-DIC foram caracterizados 41 compostos nos óleos essenciais de *O. amazonicum*, com predominância de sesquiterpenos, sendo identificados os sesquiterpenos (*E*) cariofileno e (*epi*)-*cadinol* como constituintes majoritários nas folhas, cascas e galhos, respectivamente.

A análise antimicrobiana dos óleos essenciais apontou atividade moderada no óleo essencial das cascas, inibindo o crescimento das bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli* e *Kocuria rhizophila*, atribuída a presença do sesquiterpeno *allo*-aromadendreno, para o qual há relato anterior de atividade antimicrobiana. Esta conclusão é baseada no fato de que é um dos principais compostos da parte ativa (casca) da espécie, estando ausente ou minoritário nas demais partes analisadas, as quais foram inativas. Ambas as análises, químicas e biológicas, com óleos essenciais ainda não foram descritas para espécies do gênero *Onychopetalum*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, M.; GMUNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders-a survey of ethnobotanical literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v.113, p. 363-381, 2007.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gás chromatography/quadrupole mass spectroscopy, Allured, Card Stream IL, 2007.

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.17, p.114-140, 2007.

ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*, v.62, p.504-540, 1999.

ALITONOU, G. A.; TCHOBO, F. P.; SESSOU, P.; AVLESSI, F.; MENUT, C.; SOHOUNHLOUE, D. C. K. Chemical composition, antiradical and anti-inflammatory activities of four Annonaceae from benin. *International Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences*, v.3, p.914-923, 2013.

ALMEIDA, M. E. L.; BRAZ, R.; BULLOW, M. V.; GOTTLIEB, O. R.; MAIA, G. S. Onychine, an alkaloid from *Onychopetalum amazonicum*. *Phytochemistry*, v.15, p.1186-1187, 1976.

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

BAKKALI, F.; AVERBECK, F.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, D. Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p.446-475, 2008.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. *Química Nova*, v.10, p.1-7, 2009.

BLANCHFIELD, J. T.; SANDS, D. P. A.; KERNAD, C. H. L.; BYREL, K. A.; KITCHING, W. Characterisation of alkaloids from some Australian *Stephania* (Menispermaceae) species. *Phytochemistry*, v.63, p.711-720, 2003.

CAMPOS, F. R.; BATISTA, R. L.; BATISTA, C. L.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; SANTOS, A. G.; PINHEIRO, M. L. B. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sericea* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.36, p.804-806, 2008.

CARRARA, V. S.; SOUZA, A.; DIAS FILHO, B.; NAKAMURA, C. V.; PAULO, L. F.; YONG, M. C. M.; SVIDZINSKI, T. I. E.; CORTEZ, D. G. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil from *Piper amalago* L. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.29, p.1459-1462, 2010.

CHANG, F.; CHEN, C.; HSIEH, T.; CHO, C.; WU, Y. Chemical constituents from *Annona glabra* III. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v.47, p.913-920, 2000.

CHAMORRO, E. R.; ZAMBÓN, S. N.; MARALES, W. G.; SEQUEIRA, A. F.; VELASCO, G. A. Study of the chemical composition of essential oils by gas chromatography. *Wine Technology, Toxicology and Some Specific Applications*, p.307-324, 2012.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.169, p. 5-40, 2012.

CHAVES, M. H.; SANTOS, L. A.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F.; Alkaloids from *Porcelia macrocarpa*. *Journal of Natural Products*, v.64, p.240-242, 2001.



CHEN, B.; CHANG, H.; HUANG, H.; CHONG, I.; CHEN, J.; CHEN, C.; WANG, H. (-) Anonaine induces DNA damage and inhibits growth and migration of human lung carcinoma H1299 cells. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v.59, p. 2284-2290, 2011.

CHEN, J.; CHANG, Y.; TENG, C.; LIN, W.; CHEN, Y.; CHEN, I. A new tetrahydroprotoberberine n-oxide alkaloids and anti-platelet aggregation constituents of *Corydalis tashiroi*. *Planta Medica*, v.67, p.423-427, 2001.

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. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Guatterriopsis* species. *Phytochemistry*, v. 69, p.1895-1899, 2008.

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

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

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; JESUS, H. C. R.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S.; SALVADOR, M. J.; CALVALCANTI, S. C. H.; SANTOS, R. L. C.; PRATA, A. P. N. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial, and larvicidal activities of the essential oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). *Natural Product Communications*, v.6, p.907-912, 2011a.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; BRAGA, R. M.; DELARMELINA, C.; DUARTE, M. C.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical constituents isolated from the bark *Guatteria*

*blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. Journal of Brazilian Chemical Society, v.22, p. 1111-1117, 2011b.

COSTA, E. V.; DA CRUZ, P. E. O.; LOURENÇO, C. C.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmanii* A. DC. (Annonaceae). Natural Product Research, v.27, p. 1002-1006, 2013.

COSTA, M. S.; COSSOLIN, J. F. S.; PEREIRA, M. J. B.; Sant'Ana, A. E. G.; LIMA, M. D.; ZANUNCIO, J. C.; JOSÉ C.; SERRÃO, J. E. Larvicidal and cytotoxic potential of squamocin on the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). Toxins, v.6, p.1169-1176, 2014.

COSTA, E. V.; SAMPAIO, M. F. C.; SALVADOR, M. J.; NEPEL, A.; BARRISON, A. Chemical constituents from the stem bark of *Annona pickelii* (Annonaceae). Química Nova, v.38, p.769-776, 2015.

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. Biochimica et Biophysica Acta, v.1830, p.3670-3695, 2013.

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

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. Chichester, New York: John Wiley, v.3, p.187,311,346, 2009.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica. ed. UNESP, São Paulo, p. 605, 2002.

DOOL, H.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas - liquid partition chromatography. Journal of Chromatography, v.11, p. 463-471, 1963.

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

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

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

FONSECA, O. J. M. "Amazônia: olhar o passado, entender o presente, pensar o futuro". In: *Hiléia: Revista de Direito Ambiental da Amazônia*, v.3, p.104, 2005.

FONTES, J. E. N.; FERRAZ, R. P. C.; BRITO, A. C. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumor effect of the essential oil from leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). *Chemistry & Biodiversity*, v.10, p.722-729, 2013.

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae essential oils: a review. *Journal of Essential Oil Research*, v.11, p.131-142, 1999.

GAJALAKSHMI, S.; DIVYA, R.; DEEPIKA, V. D; MYTHILI, S.; SATHIAVELU, A. Pharmacological activities of *Annona squamosa*: a review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, v.10, p. 24-29, 2011.

GRANELL, S.; ANDREU, I.; MARTÍ, D.; CAVÉ, A.; ARAGÓN, R.; ESTORNELL, E.; CORTES, D.; ZAFRA-POLO, C. Bisbenzyltetrahydroisoquinolines, a new class of inhibitors of the mitochondrial respiratory chain complex I. *Planta Medica*, v.70, p.266-268, 2004.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; CAVÉ, A.; MORETTI, C. Alcaloides des Annonaceae XXXVII: alcaloides du *Guatteria scandens*. Journal of Natural Products, v.46, p.335-341, 1983.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios ativos de plantas superiores. São Carlos: EDUFSCar, p.9-15, 2003.

HUSSAIN, A. I.; ANWAR, F.; SHERAZI, S. T. H.; PRZYBYLSKI, R. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. Food Chemistry, v.108, p.986-995, 2008.

JEONG, E.; LEE, S.; YU, S. M.; PARK, N. H.; LEE, H.; YIM, Y.; HWANG, G.; CHEONG, C.; JUNG, J. H.; HONG, JONGKI, H. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/ electrospray ionization tandem mass spectrometry. Rapid Communications in Mass Spectrometry, v.26, p.1661-1674, 2012.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. Current Medicinal Chemistry, v.10, p.813-829, 2003.

KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L. K.; FLEISCHER, T. C. F.; SKAL TSA, A. Composition and antioxidant activity of the essential oils of *Xylopi aethiopica* (Dun) A. Rich. (Annonaceae) leaves, stem bark, root bark, and fresh and dried fruits, growing in Ghana. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.52, p.8094-8098, 2004.

KOJIMA, N.; TANAKA, T. Medicinal chemistry of *Annonaceous* acetogenins: design, synthesis and biological evaluation of novel analogues. Molecules, v.14, p.3621-3661, 2009.

KOSSOOH, C.; MOUDACHIROU, M.; ADJAKIDJE, V.; CHALCHAT, J.; FIGUÉRÉDO, G. Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin. Journal of Essential Oil Research, v.19, p.307-309, 2007.

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

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; PROVOST, J.; FORGAS, P.; JACQUEMIN, E. Alcaloides des Annonaceae, 43: Alcaloides du *Xylopiia frutescens* aubl. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, v.16, p. 253-259, 1982b.

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, p.01-62, 2008.

LIAW, C.; WU, T.; CHANG, F.; WU, Y. Historic perspectives on Annonaceous acetogenins from the chemical bench to preclinical trials. *Planta Medica*, v.76, p.1390-1404, 2010.

LIMA, L. A. R. S.; LOPES, M. T. P.; CUNHA, M. M.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil.(Annonaceae). *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, v.14, p.629-634, 2012.

LOPÉZ, D, S.; HILL, A. P.; CASTRO, H. V. Estudio químico em espécies cubanas Del gênero *Annona* II. *Annona sclerophylla* safford. *Revista Cubana de Farmacia*, v.36, p.107-111, 2002.

MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J.M. S.; JUNIKKA, L. Flora da reserva ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. *Rodriguésia*, v.58, p. 617-662, 2007a.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. T.; VERMEER, M. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum* and *Unonopsis* (Annonaceae). *BLUMEA*, v.52, p. 413-554, 2007b.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. *Annonaceae* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim botânico do Rio de Janeiro. Disponível em

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 20 Out. 2015.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; CRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, p.429-438, 2002.

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

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

MALEBO, H. M.; WENZLER, T.; CAL, M.; SWALEH, S. M.; OMOLO, M. O.; HASSANALI, A.; SÉQUIN, U.; HAUSSINGER, D.; DALSGAARD, P.; HAMBURGER, M.; BRUN, R.; NDIEGE, I. O. Anti-protozoal activity of aporphine and protoberberine alkaloids from *Annickia kummeriae* (Engl. & Diels) Setten & Maas (Annonaceae). *Complementary and Alternative Medicine*, v.13, p.2-10, 2013.

MARTÍNEZ-VÁSQUEZ, M.; ESTRADA-REYES, R.; ESCALONA, A. G. A.; VELÁZQUEZ, L.; MATÍNEZ-MOTA, L.; MORENO, J.; HEINZE, G. Antidepressant-like effects of an alkaloids extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, v.139, p.164-170, 2012.

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

OGUNBINU, A. O.; OGUNWANDE, I.A.; ESSEIN, E.; CIONI, P. L.; FLAMINI, G. Sesquiterpenes-rich essential oils of *Polyalthia longifolia* Thw. (Annonaceae) from Nigeria. *Journal of Essential Oil Research*, v.19, p.419-421, 2007.

NAVARRO, V. R.; SETE, I. M. F.; DA-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcalóides de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae). Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.3, p.23-29, 2001.

ORTIZ, A. A.; SUAREZ, L. E. C.; PATIÑO, G. S.; Aporfinoides em folhas de *Oxandra longipétala* R.E.FR (Annonaceae). Scientia Et Technica, v.13, p.19-22, 2007.

OWOLABI, M. S.; OGUNDAJO, A. L.; DOSOKY, N. S.; STZER, W. N. The cytotoxic activity of *Annona muricata* leaf oil from Badagary, Nigeria. American Journal of Essential Oil and Natural Product, v.1, p.1-3, 2013.

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

PARK, H.; BAEK, M.; CHO, J.; SEO, K.; LEE, G.; MOON, S.; AHN, E.; BAEK, N. Insecticidal alkaloids oh aphids from *Corydalis turtschaninovii* tubers. Journal oh the Korean Society for Applied Biological Chemistry, v.54, p.345-352, 2011.

PARMENA, D. S.; MGINA, C. A.; JOSEPH, C. C. Composition of non volatile oils and antimicrobial activities of extracts from *Monanthotaxis discolor* and na Undescribed *Uvariondedron* species. Tanzania Journal of Science, v.38, p.221-231, 2012.

PAULO, M. Q.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; BARBOSA, R. C. B. B. C.; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. Journal of Ethnopharmacology, v.36, p.39-41, 1992.

PBMH. Normas de classificação programa brasileiro para a modernização da horticultura, v.11, São Paulo, 2013.

RABÊLO, S. V.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; DUTRA, L. M.; NUNES, P. X.; TOMAZ, J. C.; OLIVEIRA, G. G.; LOPÉS, N. P.; SANTOS, M. F. C.; ALMEIDA, J.

R. S. Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimola* X *Annona squamosa*). Brazilian Journal of Pharmacognosy DOI: doi.org /10.1016/j.bjp.2015.07.006, 2015.

RIBEIRO, J. E. L. S.; MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J. M.; WEBBER, A. Annonaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Eds.). Flora da reserva ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central, p.121-135. DFID (Departamento for International Development), INPA, Manaus-Amazonas, p. 121-135, 1999.

ROCHA, A. I.; LUZ, A. I. R.; RODRIGUES, W. A. A presença de alcaloides em espécies botânicas da Amazônia. III-Annonaceae. Acta Amazônica, v.11, p.537-546, 1981.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLI, J. L.; Annonaceous acetogenins: a review. Journal of Natural Products, v.53, p.237-278, 1990.

SCHMIDT, J.; RAITH, K.; BOETTCHER, C.; ZENK, M. Analysis of benzylisoquinoline - type alkaloids by electrospray tandem mass spectrometry and atmospheric pressure photoionization. European Journal of Mass Spectrometry, v.11, p. 325 - 333, 2005.

SALVADOR, M. J.; FERREIRA, E. O.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S.; ITO, I. Y.; DIAS, D. A. Bioactivity of crude extracts and some constituents of *Blutaparon portulacoides* (Amaranthaceae). Phytomedicine, v.9, p.566-571, 2002.

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



SHAABAN, H. A. E.; EL-GHORAB, A. H.; SHIBAMOTO, T. Bioactivity of essential oils and their volatile aroma components: Review. *The Journal of Essential Oils Research*, v.24, p.203-212, 2012.

SILVA, D. B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. *Química Nova*, v.30, p. 1809-1812, 2007.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; LIMA, J. P. S.; SANTOS, D. M. F.; JARDIM, I. S.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Leishmanicidal activity of fractions rich in aporphine alkaloids from amazonian *Unonopsis* species. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.22, p. 1368-1371, 2012a.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Desreplificação de alcaloides aporfínicos e oxaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. *Química Nova*, v.35, p.944-947, 2012b.

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

SILVA, F. M. A.; LIMA, B. R.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA-FILHO, F. A.; CORREA, W. R.; SALVADOR, M. J.; SOUZA, A. Q. L.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Polycarpol in *Unonopsis*, *Bocageopsis* and *Onychopetalum* amazonian species: cheymosystematical implications and antimicrobial evaluation, *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.25, p.11-15, 2015a.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; PEREIRA, J. L. S.; FLACH, A.; COSTA, L. M. A. C.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemotaxonomy of the Amazônia *Unonopsis* species based on GC-MS and analysis of the leaf essential oils. *Records of Natural Products*, v.9, p.539-537, 2015b.

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

SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R.; SILVA-FILHO, F. A.; KOOLEN, H. H. F.; LOURENÇO, C. C.; SALVADOR, M. J.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.; SOUZA, A. Q.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L. Chemical composition and antimicrobial evaluation of the essential oils of *Bocageopsis pleiosperma* maas. Natural Product Research, Doi: 10.1080/ 14786419.2014.996148, 2015a.

SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R.; SILVA-FILHO, F. A.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L. Direct infusion ESI-IT-MS<sup>n</sup> alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma maas* (Annonaceae). Phytochemical Analysis, v.26, p. 339-345, 2015b.

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

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. L. H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E. LECLERCQ, J. Q. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. Rapid Communication in Mass Spectrometry, v.18, p.523-528, 2004.

SUN, S.; LIU, J.; KADOUH, H.; SUN, X.; ZHOU, K. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona Muricata*). Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v.24, p.2773-2776, 2014.

TADIC, D.; WANNIGAMA, G. P.; CASSELS, B. K.; CAVÉ, A. Alkaloids of *Alphonsea sclerocarpa*. Journal of Natural Products, v.50, p. 518-519, 1987.

TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; CUNHA, E. V. L. Alkaloids and volatile constituents from stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff (Annonaceae). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v.15, p.115-118, 2005.

TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; SILVA, M. V. B.; DINIZ, M. F. F.; FILHO, J. M. B.; DA-CUNHA, E. V. L.; SIMONE, C. A.; JUNIOR, J. A.; MELO, P. S.; HAUN, M.; SILVA, M. S. *ent*-trachylobane diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. *Journal of Natural Products*, v.69, p.960-962, 2006.

TELES, M. N. O.; DUTRA, L. M.; BARISON, A.; COSTA, E. V. Alkaloids from leaves of *Annona salzmanii* and *Annona vepretorum*, v.61, p.465-469, 2015.

THANG, T. D.; DAI, D. N.; HOI, T. M.; OGUNWANDE, I. A. Chemical compositions of the leaf essential oils of some Annonaceae from Vietnam. *The Journal of Essential Oil Research*, v.25, p.85-91, 2013.

VENDRAMIM, M. E.; COSTA, E. V.; SANTOS, E. P.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R. Chemical constituents from the leaves of *Annona rugulosa* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.49, p. 152-155, 2013.

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

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J. L.; CORTES, D. Alkaloids from *Annona cherimolia* leaves. *Journal of Natural Products*, v.48, p.151-152, 1984.

WAECHTER, A. I.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; BORIES, C.; MUÑOZ, V.; FOURNET, A. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytotherapy Research*, v.13, p.175-177, 1999.

YOSHIDA, N. C.; SIQUEIRA, J. M.; RODRIGUES, R. P.; CORREIA, R. P.; GARCEZ, W. S. An azafluorenone alkaloid and a megastigmane from *Unonopsis*

*lindmanii* (Annonaceae). Journal of the Brazilian Chemical Society, v.24, p.529-533, 2013.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Breve análise histórica da química das plantas medicinais. In: YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Argos, p.18-42, 2001.