

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



## LEOCILEY ROCHA ALENCAR MENEZES

# ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO CAULE DE *Xylopia laevigata* (ANNONACEAE)

São Cristóvão – Sergipe Fevereiro de 2015 LEOCILEY ROCHA ALENCAR MENEZES

# ESTUDO FITOQUÍMICO E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE CITOTÓXICA DO CAULE DE *Xylopia laevigata* (ANNONACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química.

ORIENTADOR: PROF. DR. EMMANOEL VILAÇA COSTA

São Cristóvão – Sergipe Fevereiro de 2015

#### FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M543e	Menezes, Leociley Rocha Alencar Estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica do caule de <i>Xylopia laevigata</i> (Annonaceae) / Leociley Rocha Alencar Menezes; orientador Emmanoel Vilaça Costa. – São Cristóvão, 2015. 176 f. : il.
	Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, 2015.
	<ol> <li>Química vegetal. 2. Quimiotaxonomia vegetal. 3. Alcaloides.</li> <li>Plantas - toxicologia. 5. <i>Xylopia laevigata</i>. I. Costa, Emmanoel Vilaça, Orient. II. Título.</li> </ol>
	CDU 581.19:582.677.5



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE Programa de Pós-graduação em Química - PPGQ



## FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Dissertação de Mestrado de Leociley Rocha Alencar Menezes apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Sergipe em 11/02/2015.

 Ammanoil Vilace Costs	
Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa DQI, UFS	****
leturaes	
Profa. Dra. Valéria Regina de Souza Moraes DOI, UFS	
Prof. Dr. Andersson Barison DQ, UFPR	

## DEDICATÓRIA

A Deus, aos meus pais Elmar da Cruz Menezes e Nivalda Rocha Alencar, ao meu irmão Luciano Alencar Menezes, a minha irmã Pollyanne Rocha Menezes e ao meu sobrinho Arthur Santana pelo apoio durante todo o período de realização deste trabalho.

#### AGRADECIMENTOS

Agradeço a Universidade Federal de Sergipe e ao Departamento de Química pela oportunidade realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) e Fundação de Apoio à Pesquisa e Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC/SE) pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

Ao meu orientador, Dr. Emmanoel Vilaça Costa, pela valiosa orientação, pela paciência e pelos grandiosos ensinamentos.

Ao Dr. Andersson Barison e a todos os seus alunos, principalmente Angelita Nepel e Lívia Macedo Dutra, do Centro de Ressonância Magnética da Universidade Federal do Paraná pela eficiência e rapidez na obtenção dos espectros de RMN e nas medidas de rotação ótica, além de terem me recebido tão bem em seu laboratório.

Ao Dr. Daniel Pereira Bezerra e a toda sua equipe de trabalho do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz-BA) pelos ensaios citotóxicos realizados e por terem aberto as portas de seu laboratório para que eu pudesse esclarecer minhas dúvidas.

À Dra. Ana Paula Nascimento Prata do Departamento de Biologia e curadora do Herbário da Universidade Federal de Sergipe pela identificação da espécie, possibilitando assim o estudo da mesma.

Ao doutorando Felipe Moura Araújo da Silva do Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) do Departamento de Química (DQ) da Universidade Federal do Amazonas pelas análises de massas de baixa resolução.

Aos professores doutores Péricles Alves Barreto, Sócrates Cabral de Holanda, Andesson Barison e Valéria Regina de Souza Moraes por todas as valorosas contribuições para este trabalho.

Ao professor Dr Marco Aurélio Mostardeiro por sua orientação quando fiz a minha primeira iniciação científica, que contribuiu assim para o meu ingresso como pesquisador.

Aos funcionários da secretaria da pós-graduação, em especial, Matheus e Luana, pela disponibilidade me receber, ouvir e esclarecer minhas dúvidas.

Aos meus professores da Pós-graduação, Graduação, Ensino Médio, Ensino Fundamental pela contribuição em minha formação. A vocês o meu respeito e admiração!

As minhas amigas Charlene Anjos (Chay) e Rafaely Lima (Rafa), pelo apoio e incentivo, pela paciência, por me ouvir, pelas nossas conversas, pelos estudos juntos, pelos puxões de orelha e principalmente, pela amizade sincera de valor incalculável. Muito obrigado de coração por tudo!

Aos amigos do LPPN (Darlisson Alexandria, Iara Lisboa e Pedro), do LABORGANICS (Marília Fernanda, Cibele Miranda, Maria de Fátima, Maria de Nazaré, Thannany Brasil e Eraldo Fontes) e do METABIO (Ramon Alves) pelas conversas, resenhas e companheirismo.

Aos amigos e colegas do mestrado, Valéria Oliveira, Bruno Araújo, Fabricio Santana, Tarciane Grayci, Ruyane, Mônica Cardoso, Renan Lira, Danilo Silva, Ewerton Santos, Jany Hellen, Nicaellen Roberta, Tassia Taysa pelo companheirismo e incentivo.

Aos meus avós maternos Manoel e Plácida (*in memorian*) e aos meus avós paternos Rita e Ernesto pelo apoio, palavras de sabedoria e exemplo de vida.

À família Martins, Gilma e Fabiana pela acolhida, por sempre estar de braços abertos para mim, ao meu amigo-irmão Uanderson pela amizade, conselhos, paciência e pelas conversas infindáveis. Por mais que escreva aqui, não conseguirei expressar o que esta família significa para mim.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	x
LISTA DE ESQUEMAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE TABELAS	xviii
1. INTRODUÇÃO	
2. REVISÃO DA LITERATURA	
2.1. Generalidades sobre a família Annonaceae	
2.2. O gênero Xylopia L.	
2.2.1. Alcaloides isolados de Xylopia L.	6
2.3. Xylopia laevigata (Mart.) R. E. Fries	
2.3.1. Estudos Fitoquímicos e Biológicos com X. laevigata	
3. BIOSSÍNTESE DE ALCALOIDES	
3.1. Biossíntese dos Alcaloides Aporfinoides	
3.2. Biossíntese dos Alcaloides Protoberberinos e Tetraidroprotoberberínicos	
3.3. Biossíntese dos Alcaloides Morfinanodienonas	
4. OBJETIVOS	
4.1. Geral	
4.2. Específicos	
5. METODOLOGIA	
5.1. Suportes para Cromatografia	
5.2. Reagentes e Testes de Identificação	
5.3. Equipamentos	
5.4. Outros Equipamentos	
5.5. Coleta e Identificação Botânica	
5.6. Obtenção dos Extratos	
5.7. Estudo Fitoquímico do Extrato Metanólico (XLEM)	
5.8. Fracionamento Cromatográfico da Fração Clorofórmica Alcaloídica (XLFCA) extrato metanólico (XLEM)	proveniente do
5.8.1. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G2	
5.8.2. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G3	

## SUMÁRIO

	5.8.2.1. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G3.3	34
	5.8.2.2. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G3.4	34
	5.8.3. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G4	35
	5.8.4. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G5	35
	5.8.5. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G7	36
	5.8.6. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G9	37
	5.9. Investigação da Atividade Citotóxica in vitro	37
	5.9.1. Preparo das Amostras	37
	5.9.2. Células	37
	5.9.3. Ensaio de Citotoxicidade	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
	6.1. Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas de X. laevigata	44
	6.1.1. Identificação Estrutural dos Alcaloides do Tipo Aporfinos	44
	6.1.1.1. Identificação estrutural de XL1	44
	6.1.1.2. Identificação estrutural de XL2	49
	6.1.1.3. Identificação estrutural de XL4	54
	6.1.1.4. Identificação estrutural de XL5	60
	6.1.1.5. Identificação estrutural de XL7	65
	6.1.1.6. Identificação estrutural de XL9	69
	6.1.1.7. Identificação estrutural de XL10	72
	6.1.1.8. Identificação estrutural de XL11	77
	6.1.1.9. Identificação estrutural de XL12	82
	6.1.1.10. Identificação estrutural de XL14	87
	6.1.1.11. Identificação estrutural de XL15	91
	6.1.2. Identificação dos Alcaloides do Tipo Oxoaporfinos	96
	6.1.2.1. Identificação estrutural de XL3	96
	6.1.2.2. Identificação estrutural de XL6	99
	6.1.3. Identificação dos Alcaloides do Tipo Tetraidroproberberínicos	104
	6.1.3.1. Identificação estrutural de XL8	104
	6.1.3.2. Identificação estrutural de XL13	109
	6.1.3.3. Identificação estrutural de XL17	114

6.1.3.4. Identificação estrutural de XL18	118
6.1.4. Identificação do Alcaloide do Tipo Benzilisoquinolínico	123
6.1.4.1. Identificação estrutural de XL16	123
6.1.5. Identificação do Alcaloide do Tipo Morfinanodienona	128
6.1.5.1. Identificação estrutural de XL19	128
6.5. Importância Quimiotaxonômica	133
6.6. Investigação da Atividade Citotóxica in vitro	135
7. CONCLUSÕES	139
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	141

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ASE	Herbário da Universidade Federal de Sergipe
B16-F10	Melanoma Murino
CoA	Coenzima A
ConA	Concanavalina A
FAA	Fração Aquosa Ácida
FAB	Fração Aquosa Básica
Fiocruz	Fundação Oswaldo Cruz
G	Grupo de Frações
HepG2	Carcinoma Hepatocelular Humano
HL-60	Leucemia Promielocítica Humana
K562	Leucemia Mielocítica Crônica Humana
LETI	Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia
TMS	Tetrametilsilano
UFAM	Universidade Federal do Amazonas
UFPR	Universidade Federal do Paraná
UFS	Universidade Federal de Sergipe
XL	Xylopia laevigata
XLEM	Extrato Metanólico
XLEH	Extrato Hexânico
XLFCA	Fração Clorofórmica Alcaloídica
XLFCN	Fração Clorofórmica Neutra

## LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1 – Formação de iminas e reação de Mannich	
ESQUEMA 2 – Formação de metabólitos secundários a partir dos metabólitos primários	
ESQUEMA 3 – Biossíntese dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos	
ESQUEMA 4 – Biossíntese dos alcaloides aporfínicos	
ESQUEMA 5 – Biossíntese dos alcaloides aporfínicos a partir de um intermediário j (glaziovina).	proaporfíno 22
ESQUEMA 6 – Biossíntese dos alcaloides aporfínicos a partir de um intermediário j (orientalinona).	proaprofíno
ESQUEMA 7 – Biossíntese dos alcaloides oxoaporfínicos	
ESQUEMA 8 – Biossíntese geral para os alcaloides fenantreno	
ESQUEMA 9 – Biossíntese dos alcaloides protoberberinos e tetraidroprotoberberinos	
ESQUEMA 10 – Biossíntese do alcaloide ( <i>R</i> )-reticulina.	
ESQUEMA 11 – Biossíntese dos alcaloides morfinanodienonas	
ESQUEMA 12 – Fluxograma de obtenção dos extratos	
ESQUEMA 13 – Fluxograma do tratamento ácido-base do extrato metanólico (XLEM)	
ESQUEMA 14 – Fluxograma do fracionamento cromatográfico de (XLFCA).	
ESQUEMA 15 – Fluxograma do fracionamento cromatográfico de G3	
ESQUEMA 16 – Isolamento de XL2, XL3, XL4 e XL5.	
ESQUEMA 17 – Isolamento de XL3, XL6, XL7 e XL8.	
ESQUEMA 18 – Isolamento de XL9, XL10 e XL11	
ESQUEMA 19 – Isolamento de XL12 e XL13	
ESQUEMA 20 – Isolamento de XL14, XL15, XL16 e XL17	
ESQUEMA 21 – Isolamento de XL18 e XL19	
ESQUEMA 22 – Reação de oxi-redução da resazurina	
ESQUEMA 23 – Ensaio de citotoxicidade.	

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Distribuição geográfica das espécies da família Annonaceae no mundo
FIGURA 2 – Estruturas dos alcaloides benziltetraisoquinolínicos de espécies de Xylopia
FIGURA 3 – Estruturas dos alcaloides protoberberínicos e tetraidroprotoberberínicos isolados de espécies de <i>Xylopia</i>
FIGURA 4 – Estruturas dos alcaloides aporfínicos isolados de espécies de <i>Xylopia</i>
FIGURA 5 – Estruturas dos alcaloides oxoaporfínicos isolados de espécies de Xylopia 10
FIGURA 6 – Imagens da espécie <i>X. laevigata.</i> (a) árvore; (b) detalhe das folhas e botões florais; (c) detalhe da inflorescência; e (d) detalhe do botão floral e frutos
FIGURA 7 – Alcaloides isolados de X. laevigata
FIGURA 8 – Terpenoides isolados de X. laevigata
FIGURA 9 – Constituintes químicos majoritários do óleo essencial de X. laevigata
FIGURA 10 – Exemplos de núcleos de alcaloides 15
FIGURA 11 – Esqueleto básico dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos18
FIGURA 12 – Esqueletos básicos dos aporfinoides 19
FIGURA 13 – Estereoquímica dos alcaloides aporfinos
FIGURA 14 – Esqueletos básicos dos alcaloides isolados de X. laevigata
FIGURA 15 – Substâncias isoladas pertencentes à classe dos alcaloides do tipo aporfinos
FIGURA 16 – Substâncias isoladas pertencentes à classe dos alcaloides do tipo oxoaporfinos
FIGURA 17 – Substâncias isoladas pertencentes à classe dos alcaloides do tipo tetraidroprotoberberínicos
FIGURA 18 – Substância isolada pertencente à classe dos alcaloides do tipo benziltetraidroisoquinolínicos
FIGURA 19 – Substância isolada pertencente à classe dos alcaloides do tipo morfinanodienonas 43
FIGURA 20 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, $CDCl_3$ + gotas de $CD_3OD$ ) de XL1
FIGURA 21 – Ampliação da região aromática do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL1
FIGURA 22 – Ampliação da região alifática entre $\delta$ 3,23-2,58 do mapa de correlação HSQC (CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL1
FIGURA 23 – Ampliação da região alifática entre $\delta$ 3,26-2,46 do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL1
FIGURA 24 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL1
FIGURA 25 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL1

FIGURA 26 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL1
FIGURA 27 – Espectro de massas de XL1 49
FIGURA 28 – Estrutura da ( <i>R</i> )-roemerina
FIGURA 29 – Espectro de RMN de $^{1}$ H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de XL2
FIGURA 30 – Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (150 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de XL2
FIGURA 31 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 600 MHz; <sup>13</sup> C: 150 MHz; $CDCl_3$ ) de XL2 51
FIGURA 32 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 600 MHz; <sup>13</sup> C: 150 MHz; $CDCl_3$ ) de XL2 52
FIGURA 33 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL2 52
FIGURA 34 – Espectro de massas de XL2 54
FIGURA 35 – Estrutura da (S)-anonaina
FIGURA 36 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, $CDCl_3$ + gotas de $CD_3OD$ ) de XL4
FIGURA 37 – Ampliação da região alifática $\delta$ 3,95-2,60 do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL4
FIGURA 38 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL4
FIGURA 39 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL4
FIGURA 40 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL4 58
FIGURA 41 – Espectro de massas de XL4 59
FIGURA 42 – Estrutura da (S)-glaucina
FIGURA 43 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, $CDCl_3$ + gotas de $CD_3OD$ ) de XL560
FIGURA 44 – Ampliação da região aromática do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, $CDCl_3$ + gotas de $CD_3OD$ ) de XL5 mostrando os sinais dos hidrogênios H-10, H-8 e H-3
FIGURA 45 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL5
FIGURA 46 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL5
FIGURA 47 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL5 62
FIGURA 48 – Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL563
FIGURA 49 – Espectro de massas de XL5 64
FIGURA 50 – Estrutura da (S)-xylopina
FIGURA 51 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, $CDCl_3$ + gotas de $CD_3OD$ ) de XL7
FIGURA 52 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL7

FIGURA 79 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CD <sub>3</sub> OD + gotas de CDCl <sub>3</sub> ) de XL12
FIGURA 80 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CD <sub>3</sub> OD + gotas de CDCl <sub>3</sub> ) de XL12 mostrando o hidrogênio aromáticos H-11, H-8 e H-3
FIGURA 81 – Principais correlações observadas no mapa de correlação HMBC de XL12 85
FIGURA 82 – Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD + gotas de CDCl <sub>3</sub> ) de XL12 86
FIGURA 83 – Espectro de massas de XL12
FIGURA 84 – Estrutura da (S)-norpredicentrina
FIGURA 85 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (600 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de XL14
FIGURA 86 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 600 MHz; <sup>13</sup> C: 150 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) de XL14
FIGURA 87 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 600 MHz; <sup>13</sup> C: 150 MHz; CDCl <sub>3</sub> ) de XL14 89
FIGURA 88 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL14 90
FIGURA 89 – Espectro de massas de XL1491
FIGURA 90 - Estrutura da (S)-calicinina
FIGURA 91 – Espectro de RMN de ${}^{1}$ H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL15 92
FIGURA 92 – Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL15
FIGURA 93 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL15
FIGURA 94 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL15
FIGURA 95 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL15
FIGURA 96 – Espectro de massas de XL15 96
FIGURA 97 – Estrutura da (S)-laurotetanina
FIGURA 98 – Espectro de RMN de ${}^{1}$ H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL3
FIGURA 99 – Espectro de massas de XL3 98
FIGURA 100 – Estrutura da lanuginosina
FIGURA 101 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, $CDCl_3$ + gotas de $CD_3OD$ ) de XL6 100
FIGURA 102 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL6
FIGURA 103 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL6
FIGURA 104 – Ampliação da região aromática no mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL6
FIGURA 105 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL6 102

FIGURA 106 – Espectro de massas de XL6
FIGURA 107 – Estrutura da oxoglaucina 104
FIGURA 108 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, $CDCl_3$ + gotas de $CD_3OD$ ) de XL8 105
FIGURA 109 – Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL8 105
FIGURA 110 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL8
FIGURA 111 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL8
FIGURA 112 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL8 107
FIGURA 113 – Espectro de massas de XL8 109
FIGURA 114 – Estrutura da (-)-xylopinina 109
FIGURA 115 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD + gotas de CDCl <sub>3</sub> ) de XL13 110
FIGURA 116 – Ampliação na região alifática entre $\delta$ 4,10-2,66 do espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD + gotas de CDCl <sub>3</sub> ) de XL13 110
FIGURA 117 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CD <sub>3</sub> OD + gotas de CDCl <sub>3</sub> ) de XL13
FIGURA 118 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CD <sub>3</sub> OD + gotas de CDCl <sub>3</sub> ) de XL13
FIGURA 119 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL13 112
FIGURA 120 – Espectro de RMN de <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD + gotas de CDCl <sub>3</sub> ) de XL13 112
FIGURA 121 – Espectro de massas de XL13 113
FIGURA 122 – Estrutura da (+)-discretina
FIGURA 123 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, $CDCl_3$ + gotas de $CD_3OD$ ) de XL17 115
FIGURA 124 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL17
FIGURA 125 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL17
FIGURA 126 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL17 117
FIGURA 127 – Espectro de massas de XL17 118
FIGURA 128 – Estrutura da (-)-coritenchina 118
FIGURA 129 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL18 119
FIGURA 130 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL18
FIGURA 131 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL18

FIGURA 132 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL18 121
FIGURA 133 – Espectro de massas de XL18
FIGURA 134 – Estrutura da (+)-discretamina
FIGURA 135 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL16 124
FIGURA 136 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL16
FIGURA 137 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL16
FIGURA 138 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL16 mostrando a região aromática
FIGURA 139 – Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (100 de MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas CD <sub>3</sub> OD) de XL16 126
FIGURA 140 – Espectro de massas de XL16 127
FIGURA 141 – Estrutura da (+)-reticulina 127
FIGURA 142 – Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL19 129
FIGURA 143 – Mapa de correlação HSQC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL19
FIGURA 144 – Mapa de correlação HMBC ( <sup>1</sup> H: 400 MHz; <sup>13</sup> C: 100 MHz; CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL19
FIGURA 145 – Principais correlações observadas no mapa de correlação HMBC de XL19 131
FIGURA 146 – Espectro de RMN de ${}^{13}$ C (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> + gotas de CD <sub>3</sub> OD) de XL19 131
FIGURA 147 – Espectro de massas de XL19
FIGURA 148 – Estrutura da (+)-flavinantina

## LISTA DE TABELAS

ΓABELA 1 – Alcaloides benziltetraisoquinolínicos isolados de espécies de Xylopia	6
ΓABELA 2 – Alcaloides protoberberínicos isolados de espécies de Xylopia	. 7
ΓABELA 3 – Alcaloides tetraidroprotoberberínicos isolados de espécies de Xylopia	. 7
ΓABELA 4 – Alcaloides aporfínicos isolados de espécies de <i>Xylopia</i>	. 8
ΓABELA 5 – Alcaloides oxoaporfínicos isolados de espécies de Xylopia	. 9
ΓABELA 6 – Reunião das frações obtidas do fracionamento de XLFCA	32
ΓABELA 7 – Reunião das frações obtidas do fracionamento de G3	34
ΓABELA 8 – Classe de alcaloides isolados de X. laevigata	41
$\Gamma ABELA 9 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL1 \dots A^{2}$	48
$\Gamma ABELA 10 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL2 \dots$	53
$\Gamma ABELA 11 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL4 \dots$	58
$\Gamma ABELA 12 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL5 \dots e {}^{1}C$	53
$\Gamma ABELA 13 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL7 \dots e^{1}$	58
ΓABELA 14 – Dados de RMN de <sup>1</sup> H de XL9	72
$\Gamma ABELA 15 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C XL107$	76
$\Gamma ABELA 16 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL11 \dots E E E E E E E E E E E E E E E E E E$	81
$\Gamma ABELA 17 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C XL1268$	87
$\Gamma ABELA 18 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL149$	90
$\Gamma ABELA 19 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL159$	95
ΓABELA 20 - Dados de RMN de <sup>1</sup> H de XL3	98
$\Gamma ABELA 21 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL6 \dots 10$	03
$\Gamma ABELA 22 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C XL810$	38
$\Gamma ABELA 23 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C XL1311$	14
$\Gamma ABELA 24 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C de XL17 \dots 11$	17
$\Gamma ABELA 25 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C XL1812$	22
$\Gamma ABELA 26 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C XL1612$	28
$\Gamma ABELA 27 - Dados de RMN de {}^{1}H e {}^{13}C XL1913$	33
ΓABELA 28 – Importância quimiotaxonômica dos alcaloides isolados de X. laevigata	34
ΓABELA 29 – Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais pa extratos e frações de X. laevigata	ıra 36

**TÍTULO:** Estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica do caule de *Xylopia laevigata* (ANNONACEAE)

**RESUMO:** *Xylopia laevigata* é uma espécie de Annonaceae, popularmente conhecida como "meiú" e "pindaíba". É uma árvore endêmica do Brasil encontrada nos estados da Bahia, Paraíba, Piauí, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo. O presente trabalho descreve os resultados obtidos a partir do estudo fitoquímico biomonitorado do caule de X. laevigata, frente a atividade citotóxica in vitro, o qual resultou no isolamento de 19 substâncias pertencentes à classe dos alcaloides que foram identificadas com base nas análises de RMN de<sup>-1</sup>H e<sup>-13</sup>C 1D/2D e EM, bem como por comparação com os dados da literatura. Os alcaloides foram identificados como sendo: onze alcaloides do tipo aporfino sensu stricto, (R)-roemerina, (S)-anonaina, (S)-glaucina, (S)-xylopina, (S)-norglaucina, asimilobina, (S)norpurpureina, (S)-N-metillaurotetanina, (S)-norpredicentrina, (S)-calicinina e (S)laurotetanina; dois oxoaporfínicos: lanuginosina oxoglaucina; e quatro tetraidroprotoberberínicos: (-)-xylopinina, (+)-discretina, (-)-coritenchina e (+)-discretamina; um benziltetraidroisoquinolínico: (+)-reticulina; e um morfinanofienona: (+)-flavinantina. Os alcaloides isolados são descritos pela primeira vez no caule de X. laevigata, além disso esse é o primeiro relato do isolamento de um alcaloide do tipo morfinandienona (flavinantina), no gênero Xylopia. Dentre todos os extratos e frações, provenientes do caule de X. laevigata, submetidos ao ensaio de atividade citotóxica in vitro, a fração alcaloídica proveniente do extrato metanólico foi a que apresentou maior atividade contra as linhagens de células tumorais avaliadas com porcentagem de inibição igual a  $83,60 \pm 1,32\%$  e  $89,48 \pm 0,79\%$  para HepG2 e HL60. Dentre os alcaloides isolados que foram avaliados, lanuginosina e xylopina foram os que apresentaram os melhores resultados com forte atividade contra linhagens de K562 – leucemia mielocítica crônica humana ( $CI_{50} = 6.61 \ \mu g \ mL^{-1} \ e \ 3.12 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), HL-60 – leucemia promielocítica humana ( $CI_{50} = 7.81 \ \mu g \ mL^{-1} e \ 1.87 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), HepG2 – carcinoma hepatocelular humano ( $CI_{50} = 3,89 \ \mu g \ mL^{-1} \ e \ 1,87 \ \mu g \ mL^{-1}$ ) e B16-F10 – melanoma murino  $(CI_{50} = 8,46 \ \mu g \ mL^{-1} \ e \ 3,77 \ \mu g \ mL^{-1})$ , respectivamente, com valores de  $CI_{50}$  mais próximos do controle positivo (Doxorrubicina). Entretanto, comparando-se com a doxorrubicina, a lanuginosina apresentou índice de seletividade mais elevado para linhagem B16-F10. Os resultados obtidos confirmam que X. laevigata é quimicamente uma espécie característica da família Annonaceae e uma fonte promissora de substâncias com potencial atividade citotóxica.

**PALAVRAS-CHAVES**: *Xylopia laevigata*; Annonaceae; alcaloides; atividade citotóxica.

**TITLE:** Phytochemical study and investigation of the cytotoxic activity of stem of *Xylopia laevigata* (ANNONACEAE)

**ABSTRACT:** *Xylopia laevigata* is a species of Annonaceae, popularly known as "meiu" and "pindaíba". It is an endemic tree of Brazil found in the states of Bahia, Paraíba, Piauí, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro and São Paulo. The presente work describes the results obtained from the phytochemical studies bioguided from the stem of X. laevigata, front to the in vitro cytotoxic activity, which resulted in the isolation of 19 substances belonging to the class of alkaloids, which were elucidated on the basis of NMR analysis of <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C 1D/2D and MS as well as by comparison with the data of the literature. The isolated alkaloids were identified as: eleven alkaloids aporphine type, (R)-roemerine, (S)-anonaine, (S)-glaucine. (S)-xylopine, (S)-norglaucine, asimilobine, (S)-norpurpureine, (S)-N-(S)-laurotetanine: methyllaurotetanine, (S)-norpredicentrine, (S)-calycinine and two oxoaporphines: lanuginosine and oxoglaucine; four tetrahydroprotoberberine: (-)-xylopinine, (+)-discretine, (-)-corvtenchine and (+)-discretamine; one benziltetrahydroisoquinoline: (+)reticuline; and morphinandienone: (+)- flavinantine. The isolated alkaloids were described for the first time in the stem of X. laevigata, besides this is the first report of the isolation of an alkaloid of morphinandienone type (flavinantine) in the Xylopia genus. Of all the extracts and fractions, from the stem of X. laevigata, undergoing in vitro cytotoxic activity assay, the alkaloidal fraction from the methanol extract showed the highest activity against tumor cell lines evaluated with equal percentage inhibition of the 83.60  $\pm$  1.32% and 89.48  $\pm$  0.79% for HepG2 and HL60, respectively. Among the isolated alkaloids evaluated lanuginosine and xylopine showed the best results with strong activity against strains of K562 - human chronic myelocytic leukemia (IC<sub>50</sub> = 6.61  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> and 3.12  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), HL-60 - human promyelocytic leukemia (IC<sub>50</sub> = 7.81  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> and 1.87  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), HepG2 - human hepatocellular carcinoma  $(IC_{50} = 3.89 \ \mu gmL^{-1} \text{ and } 1.87 \ \mu g \ mL^{-1})$  and B16-F10 - murine melanoma  $(IC_{50} = 8.46 \ \mu g \ mL^{-1})$ and 3.77  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>), respectively, with IC<sub>50</sub> values closest the positive control (doxorubicin). However, comparing with doxorubicin, lanuginosine showed a higher selectivity index for strain B16-F10. The results confirm that X. laevigata is chemically a native species of the family Annonaceae and a promising source of substances with potential cytotoxic activity.

KEY-WORDS: Xylopia laevigata; Annonaceae; alkaloids; citotoxic activity.

## 1. INTRODUÇÃO

O uso terapêutico das plantas medicinais na saúde humana é uma prática milenar, construída na sabedoria do senso comum que articula cultura e saúde. Apesar dos expressivos avanços científicos da fitoterapia, as plantas medicinais ainda continuam sendo muitas vezes usadas apenas com base na cultura popular para a promoção e recuperação da saúde das pessoas (VAN POSER & MENTZ, 2003).

O estudo fitoquímico das plantas é extremamente importante, pois além de servir como base na construção do conhecimento químico e farmacológico, serve como uma barreira invencível para plantas inertes que pela ignorância ou fanatismo tenham seu uso vulgarizado. Uma planta medicinal sem identificação de sua composição química é um medicamento duvidoso e perigoso que não deve ser utilizado. Além disso, faz-se necessário conhecer qual(is) parte(s) da planta e principalmente o princípio ativo que serve para explicar a sua ação biológica (PECKOLT & PECKOLT, 1888; Di STATI & HIRUMA-LIMA, 2002).

A maior parte dos princípios ativos de importância farmacológica encontrada nos extratos vegetais, de modo geral, é oriunda de uma variedade metabólitos secundários que conferem às plantas, entre outras funções, a ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles associados com mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à UV e deficiência de nutrientes minerais. A atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e alelopatia, proteção a herbivoria e a infecções por microrganismos, também são exemplos das funções destes metabólitos. Dentre as diversas classes de metabólitos secundários podemos destacar os alcaloides que se encontram distribuídos nas Angiospermas (PERES, 2014; RINALDI, 2007).

O interesse no estudo dessa classe de metabólitos secundários tem se destacado devido a sua múltipla atividade farmacológica. No sistema nervoso central os alcaloides podem ter atividade depressiva (morfina, escopolamina) e estimulante (estricnina, cafeína); no sistema autônomo parassimpático (pilocarpina), simpático (efedrina), anticolinérgico (atropina, hiosciamina) e o ganglionar (nicotina). Os alcaloides também têm atividade anestésica (cocaína), antitumoral (vimblastina, vincristina), antimalárica (quinina), antibacteriana (berberina) e muitas outras (BRUNETON, 2001).

A primeira estrutura de um alcaloide foi elucidada em 1870, a coniina, e, mais tarde, foi também o primeiro a ser sintetizado com sucesso. Cerca de 1000 alcaloides foram caracterizados em plantas em 1950, e em 1973 cerca de 3300 foram elucidadas (CORDELL;

QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001). Pode-se observar nitidamente um crescente aumento do interesse por parte da comunidade científica nesta classe de composto.

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2014), o Brasil possui uma grande variedade plantas, detendo em seu território entre 15 e 20% do número total de espécies do planeta. Apresenta a mais diversa flora do mundo, número superior a 55 mil espécies descritas (22% do total mundial) das quais cerca de 10 mil são de interesse farmacológico ou cosmético. Todas essas espécies estão distribuídas em seus diversos biomas (Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Amazônia, Pantanal, etc.).

O estado de Sergipe é caracterizado não só por vegetação típica de caatinga, mas também por vegetação remanescente de mata atlântica (incluindo os mangues e as restingas), com muitos elementos do cerrado do Brasil Central e vegetação de campos rupestres ainda pouco explorados. Nestes ambientes, encontram-se plantas usadas na medicina popular, bem como espécies de ocorrência endêmica, algumas ainda desconhecidas pela ciência, tanto do ponto de vista botânico, químico, farmacológico e econômico (DRUMOND et al., 2000).

Dentre as várias espécies presentes na vegetação do Estado Sergipe têm-se aquelas pertencentes à família Annonaceae, que se destacam pelo crescimento considerável de sua importância econômica nas últimas décadas, principalmente como fonte de frutos comestíveis, em particular espécies do gênero *Annona*, tais como *Annona squamosa* L. (pinha), *A. reticulata* L. (ata, pinha ou fruta do conde), *A. muricata* L. (graviola), e *A. cherimola* Mill. (cherimóia). Além de sua grande importância econômica, muitas espécies de Annonaceae possuem indicação popular e têm sido estudadas quanto às suas atividades farmacológicas como, por exemplo, *Annona foetida* Mart. que possui atividades contra leishmaniose e diferentes tipos de microorganismos (COSTA et al., 2006 e 2009a), *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hill.) Benth & Hook F. que possui atividade antitumoral, leishmanicida e tripanocida (Da SILVA et al., 2009a) e *Guatteria hispida* (R. E. Fr.) Erkens e Maas que apresenta propriedades antioxidante e antimicrobiana (COSTA et al., 2010).

Apesar da grande importância nas últimas décadas dos membros dessa família na medicina popular, o número de espécies que têm sido investigadas é extremamente reduzido. Dentre as mais de 2400 espécies distribuídas em 108 gêneros, apenas 10% das espécies (cerca de 240 espécies) têm sido investigadas quimicamente e/ou biologicamente, mostrando que muito ainda tem que ser feito a fim de se conhecer o potencial químico e farmacológico das espécies dessa família (COSTA et al., 2010).

Atualmente, o câncer, que pode ser definido como uma enfermidade multicausal crônica caracterizada pelo crescimento descontrolado das células, é considerado como uma

das grandes preocupações da era moderna. Sendo assim, estudos de novos compostos com atividade antineoplásica, oriundos de produtos naturais, mostram-se cada vez mais como uma importante ferramenta no combate a essa enfermidade (SOUZA et al., 2007). Nesta perspectiva, o presente trabalho teve como objetivo o estudo químico e biológico do caule de *Xylopia laevigata* (Mart.) R. E. Fries (Annonaceae), direcionado para o isolamento de metabólitos secundários com possível atividade citotóxica.

### 2. REVISÃO DA LITERATURA

#### 2.1. Generalidades sobre a família Annonaceae

A família Annonaceae compreende cerca de 2400 espécies distribuídas em 108 gêneros (CHATROU et al., 2012) com distribuição pantropical (entre os trópicos) (FIGURA 1). Seus representantes são geralmente árvores e arvoretas, encontradas principalmente nas regiões tropical e subtropical (CHATROU et al., 2004). No Brasil são encontrados 29 gêneros e cerca de 390 espécies, sendo 160 endêmicas (MAAS et al., 2014). A Amazônia abriga três quartos da diversidade Annonaceae, com 27 gêneros e 280 espécies, e a Mata Atlântica, a maior parte restante: 15 gêneros e 91 espécies.

Na Mata Atlântica, também são encontrados dois gêneros e cerca de 40 espécies endêmicas. No Cerrado, são encontrados 10 gêneros, nenhum dos quais endêmico deste domínio, e 47 espécies de Annonaceae, algumas de ampla distribuição e bastante comuns, como *Annona crassiflora* Mart., *Duguetia furfuracea* (A.St.-Hil.) Saff. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart (MAAS et al. 2013 apud LOPES & MELLO-SILVA, 2014).



FIGURA 1 – Distribuição geográfica das espécies da família Annonaceae no mundo.

#### FONTE: ASE, 2014a.

Algumas características botânicas relevantes para a identificação de Annonaceae são o odor forte do corte do tronco ou ramos, presença de fibras longas e resistentes na casca do caule, conhecida popularmente como "envira ou imbira" e pela aparência de marcas de chamas no corte transversal do tronco. As folhas são dísticas (exceto em *Tetrameranthus*, com folhas espiraladas) alternas, simples, sem estípulas e margem inteira. Flores isoladas ou reunidas em inflorescências, hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado no cálice e corola, em geral são trímeras e carnosas; estames numerosos, dispostos de forma espiralada; ovário súpero com numerosos carpelos apocárpicos com um ou muitos óvulos (JOLY, 2005).

As Annonaceae têm flores de tamanhos que variam de pequeno, como em *Bocageopsis multiflora* e *Xylopia amazônica*, a grande como em *Cymbopetalum euneurum* e *Duguetia ulei*. As cores variam, podendo ser esbranquiçadas, creme-amareladas, esverdeadas, alaranjadas e até cor-de-vinho. As flores que estão em funcionamento emitem um odor que varia muito nas espécies e muitas delas imitam o odor de frutos maduros. Os frutos podem ser apocárpicos e sincárpicos, carnosos e indeiscentes ou deiscentes. A dispersão das sementes na família se dá principalmente por meio de animais, como, pássaros, peixes, répteis e mamíferos (JOLY, 2005).

O principal valor econômico desta família é o fornecimento de frutos comestíveis, que são muito apreciados, principalmente os frutos das espécies do gênero *Annona*, tais como: *Annona squamosa* (ata, fruta do conde ou pinha), *A. montana* Macfad. (graviola da montanha), *A. muricata* (graviola), *A. mucosa* Jacq. (biriba, pinha) e *A. sylvatica* A.St.-Hil. (araticum). Outras espécies com frutos poucos conhecidos de valor alimentício encontram-se nos gêneros *Artabotrys*, *Asimina*, *Duguetia*, *Polyalthia* e *Uvaria* (KESSLER, 1993; SÁNCHEZ, 1997; MURILO & RESTREPO, 2000).

Diversas atividades biológicas têm sido demonstradas pelos extratos brutos de suas espécies tais como, antitumoral (WU et al., 1993; ALALI et al., 1999 e QUINTANS et al., 2012), leishmanicida (QUEIROZ et al., 1996; COSTA et al., 2006 e Da SILVA et al., 2009a), antiviral (PAREDES et al., 2001), antimalárica (BOYOM et al., 2003), antiprotozoário (TEMPONE et al., 2005; OSORIO et al., 2007; PINHEIRO et al., 2009 e SILVA et al., 2013), moluscicida (NASCIMENTO, 2008) e antimicrobiana (SILVA et al., 2012 e COSTA et al., 2013b), levando ao isolamento de compostos biologicamente ativas pertencentes a diferentes classes de metabólitos.

Fitoquimicamente as espécies pertencentes a esta família são caracterizadas pela ocorrência principalmente de alcaloides contendo a estrutura isoquinolínica (LEBOEUF et al., 1982), entretanto outras classes de compostos podem ser encontradas nas espécies que compõem esta família, tais como: acetogeninas, esteroides, flavonoides, lactonas, amidas, cetonas, compostos aromáticos e terpenoides (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos) (LEBOEUF et al., 1982; ALALI et al., 1999; DUTRA et al., 2012).

#### 2.2. O gênero Xylopia L.

O gênero *Xylopia* L. possui aproximadamente 150 espécies com distribuição pantropical, das quais 40 espécies são encontradas na América Tropical (MAAS et al., 2007). No Brasil, é típico do cerrado, embora ocorra em ambientes com estratos arbustivos e arbóreos mais densos, sendo reconhecido por apresentar propriedades medicinais dentre as quais se destacam as atividades antimicrobiana (TATSADJIEU et al., 2003) e citotóxica (BAKARNGA-VIA et al., 2014).

Muitas espécies de *Xylopia* têm sido estudadas quanto à caracterização de sua composição química, identificando-se acetogeninas (ALFONSO et al.,1996), alcaloides MARTINS et al., 1998), flavonoides (SANTOS & SALATINO, 2000), sesquiterpenos (MOREIRA et al., 2007) e diterpenos do tipo labdano e caurano (VILEGAS et al., 1991; MARTINS et al., 1999; MELO et al., 2001; ANDRADE et al., 2004; SILVA et al., 2012).

#### 2.2.1. Alcaloides isolados de *Xylopia* L.

O gênero *Xylopia* tem sido caracterizado pela presença de diversas classes de metabólitos secundários, dentre estas, de acordo com a literatura uma das classes mais relatadas para suas espécies são os alcaloides contendo a estrutura isoquinolínica. As TABELAS 1-5 juntamente com as FIGURAS 2-7 apresentam as principais classes de alcaloides contendo a estrutura isoquinolínica encontradas nas espécies de *Xylopia* estudadas fitoquimicamente até o presente momento.

**TABELA 1** – Alcaloides benziltetraisoquinolínicos isolados de espécies de Xylopia

Alcaloides Benziltetraisoquinolínicos	Espécie	Referências
armepavina [1]	X. pancheri	NIETO, 1976
coclaurina [2]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2010
laudanina [3]	X. championii	PUVANENDRAN et al., 2008
N-desmetilcoletina [4]	X. pancheri	NIETO, 1976
<i>N</i> -metilcoclaurina <b>[5]</b>	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
<i>N</i> -nor- <i>O</i> -metilarmepavina [6]	X. pancheri	NIETO, 1976
	X. bruxifolia	HOCQUEMILLER, 1981
O-metilarmepavina [7]	X. pancheri	NIETO, 1976
	X. aromatica	MARTINS et al., 1995
reticulina [8]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2010
	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
parvinina <b>[9]</b>	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006
xylopinidina [10]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2004
dimetilanomurina [11]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2004

FIGURA 2 – Estruturas dos alcaloides benziltetraisoquinolínicos de espécies de Xylopia.



Alcaloides Protoberberínicos	Espécie	Referências
berberina [12]	X. policarpa	LEBOEUF et al., 1982
deidrocoritenchina [13]	X. championii	PUVANENDRAN et al., 2008
deidrodiscretina [14]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
pseudopalmatina [15]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
palmatina [16]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2004
deidrocoreximina [17]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2004

TABELA 2 – Alcaloides protoberberínicos isolados de espécies de Xylopia

TABELA 3 - Alcaloides tetraidroprotoberberínicos isolados de espécies de Xylopia

Alcaloides Tetraidroprotoberberínicos	Espécie	Referências
coreximina [18]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
coridalmina [19]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
coripalmina [20]	X. discreta	SCHMUTZ, 1959
coritenchina [21]	X. langsdorffiana	Da SILVA et al., 2009b
11-desmetildiscretina [22]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
discretina [23]	X. championii	PUVANENDRAN et al., 2008
discretamina [24]	X. langsdorffiana	Da SILVA et al., 2009b
tetraidropalmatina [25]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
xylopinina [26]	X. langsdorffiana	Da SILVA et al., 2009b

**FIGURA 3** – Estruturas dos alcaloides protoberberínicos e tetraidroprotoberberínicos isolados de espécies de *Xylopia*.



Alcaloides Aporfínicos	Espécie	Referências
anonaina [ <b>27</b> ]	X. frutescens	LEBOEUF et al., 1982
anolobina [28]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
buxifolina [29]	X. bruxifolia	HOCQUEMILLER et al., 1981
calicinina [30]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
estefalagina [31]	X. aromatica	MARTINS et al., 1995
nordicentrina [32]	X. championii	PUVANENDRAN et al., 2008
norestefalagina [33]	X. aromatica	MARTINS et al., 1995
norglaucina [34]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
roemerina [35]	X. aromatica	NIETO, 1976
xylopina [36]	X. langsdosffiana	Da SILVA et al., 2009b
nantenina [37]	X. aromatica	MARTINS et al., 1995
norisodomesticina [38]	X. danguyella	HOCQUEMILLER et al., 1981
nornantenina [39]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
norfoebina [40]	X. aromatica	MARTINS et al., 1995
xyloguielina [41]	X. danguyella	HOCQUEMILLER et al., 1981
coridina [42]	X. danguyella	HOCQUEMILLER et al., 1981
corituberina [43]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2010
danguielina [44]	X. danguyella	HOCQUEMILLER et al., 1981
glaucina [45]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2010
isoboldina [46]	X. aromatica	MARTINS et al., 1995
laurotetanina [47]	X. amazonica	MARTINS et al., 1995
laurolitsina [48]	Х. рариапа	JOHNS, 1968
purpureina [49]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006
lirioferina [50]	X. aromatica	MARTINS et al., 1995
norcoridina [51]	X. danguyella	HOCQUEMILLER et al., 1981
norisocoridina [52]	X. danguyella	HOCQUEMILLER et al., 1981
nornuciferina [53]	X. bruxifolia	HOCQUEMILLER et al., 1981
(S)-10,11-dihidróxi-1,2-dimetóxinoraporfina [54]	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006

TABELA 4 – Alcaloides aporfínicos isolados de espécies de Xylopia





	$\mathbf{R}_{1}$	$\mathbf{R}_2$	$\mathbf{R}_3$	$\mathbf{R}_4$	$\mathbf{R}_{5}$	$\mathbf{R}_{6}$	$\mathbf{R}_{7}$		$\mathbf{R}_1$	$\mathbf{R}_2$	$\mathbf{R}_3$	$\mathbf{R}_4$	$\mathbf{R}_{5}$	$\mathbf{R}_{6}$	$\mathbf{R}_7$
[27]	Н	Н	OC	$H_2O$	Н	Н	Н	[41]	Н	Н	OC	$H_2O$	Н	Н	OCH <sub>3</sub>
[28]	Н	Н	OC	$H_2O$	Н	Η	OH	[42]	$CH_3$	Н	$OCH_3$	OH	$OCH_3$	$OCH_3$	Н
[29]	Н	$OCH_3$	OC	$H_2O$	Н	Н	$OCH_3$	[43]	$CH_3$	Н	$OCH_3$	OH	OH	$OCH_3$	Н
[30]	Н	Н	OC	$H_2O$	OH	Η	$OCH_3$	[44]	Н	$OCH_3$	OH	$OCH_3$	OH	$OCH_3$	Η
[31]	$CH_3$	$OCH_3$	OC	$H_2O$	Н	Η	Η	[45]	$CH_3$	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	Η	$OCH_3$	OCH <sub>3</sub>
[32]	Н	Н	OC	$H_2O$	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	[46]	$CH_3$	Н	$OCH_3$	OH	Н	$OCH_3$	OH
[33]	Н	$OCH_3$	OC	$H_2O$	Н	Н	Н	[47]	Н	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	Н	$OCH_3$	OH
[34]	Н	Н	$OCH_3$	OCH <sub>3</sub>	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	[48]	Н	Н	OH	$OCH_3$	Η	$OCH_3$	OH
[35]	$CH_3$	Н	OC	$H_2O$	Н	Η	Η	[49]	$CH_3$	$OCH_3$	$OCH_3$	$OCH_3$	Η	$OCH_3$	OCH <sub>3</sub>
[36]	Н	Н	OC	$H_2O$	Н	Η	$OCH_3$	[50]	$CH_3$	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	Η	OH	OCH <sub>3</sub>
[37]	$CH_3$	Н	$OCH_3$	OCH <sub>3</sub>	Н	OC	$H_2O$	[51]	Н	Н	$OCH_3$	OH	$OCH_3$	$OCH_3$	Η
[38]	Н	Н	OH	OCH <sub>3</sub>	Н	OC	$H_2O$	[52]	Н	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	OH	$OCH_3$	Η
[39]	Н	Н	$OCH_3$	OCH <sub>3</sub>	Н	OC	$H_2O$	[53]	Н	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	Н	Н	Η
[40]	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	OCH <sub>3</sub>	Н	OC	$H_2O$	[54]	Н	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	OH	OH	Н

 TABELA 5 – Alcaloides oxoaporfínicos isolados de espécies de Xylopia

Alcaloides Oxoaporfínicos	Espécie	Referências
atherospermidina [55]	X. ferruginea	ZAWAWI et al., 2012
dicentrinona [56]	X. championii	WIJERATNE, 1996
lanuginosina [ <b>57</b> ]	X. vieillardii	JOSSANG, 1991
liriodenina [58]	X. ferruginea	ZAWAWI et al., 2012
lisicamina [59]	X. ferruginea	ZAWAWI et al., 2012
O-metilmoscatolina [60]	X. ferruginea	ZAWAWI et al., 2012
oxopurpureina [61]	X. championii	PUVANENDRAN et al., 2008
oxoestefanina [62]	X. ferruginea	ZAWAWI et al., 2012



	$\mathbf{R}_1$	$\mathbf{R}_2$	$\mathbf{R}_3$	$\mathbf{R}_4$	$\mathbf{R}_{5}$	$\mathbf{R}_{6}$
[55]	$OCH_3$	OCI	$H_2O$	Н	Н	Η
[56]	Н	OCI	$H_2O$	$OCH_3$	$OCH_3$	Η
[57]	Н	OCI	$H_2O$	Н	OCH <sub>3</sub>	Η
[58]	Н	OCI	$H_2O$	Н	Н	Η
[59]	Н	$OCH_3$	$OCH_3$	Н	Н	Η
[60]	$OCH_3$	$OCH_3$	$OCH_3$	Н	Н	Η
[61]	$OCH_3$	OCH <sub>3</sub>	OCH <sub>3</sub>	$OCH_3$	OCH <sub>3</sub>	Η
[62]	Н	OCI	$H_2O$	Н	Н	OCH <sub>3</sub>

#### 2.3. Xylopia laevigata (Mart.) R. E. Fries

*Xylopia laevigata* (Martius) Robert Elias Fries é uma espécie pertencente à família Annonaceae, popularmente conhecida como "meiú" e "pindaíba". De acordo com a população local, suas folhas e flores são utilizadas para dores em geral, doença do coração e contra condições inflamatórias (COSTA et al., 2013a). É uma árvore ou arbusto variando de 2-15 m de altura (FIGURA 6) com ramos castanhos quando herborizados, glabros, lenticelados. Folhas com pecíolo sulcado, 0,2-0,5 cm comprimento, glabro; lâmina oblonga ou ovadolanceolada, 3,5-9,5 x 1,5-4 cm, coriácea, base obtusa, ápice acuminado, 5-11 pares de nervuras secundárias, glabra em ambas as faces. Possui flores isoladas, axilares, com cerca 1,3 x 0,8 cm; pedicelo com cerca de 0,1 cm comprimento, pubescente. Sépalas levemente concrescidas na base, ovadas, com cerca de 0,2 x 0,5 cm, hialino-pubescentes. Seu fruto é apocárpico, com sementes 1-5 por carpídio, ovoides, com cerca de 0,6 x 0,4 cm, castanhas, nítidas, glabras, ariladas (PONTES et al., 2004; MAAS et al., 2001).

No Brasil esta espécie é encontrada nos Estados da Bahia, Paraíba, Piauí, Sergipe, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro e São Paulo (PONTES et al., 2004; MAAS et al., 2001). Em Sergipe é encontrada em áreas remanescentes de Mata Atlântica, Matas de Restinga e Tabuleiros Costeiros, principalmente nos municípios de Santa Luzia do Itanhi, Areia Branca, Japaratuba, Pirambu, Itaporanga d'Ajuda, Pacatuba, Aracaju, São Cristóvão, Estância, Neopólis, Salgado, Barra dos Coqueiros e Ilha das Flores (ASE, 2014b).

**FIGURA 6** – Imagens da espécie *X. laevigata.* (a) árvore; (b) detalhe das folhas e botões florais; (c) detalhe da inflorescência; e (d) detalhe do botão floral e frutos.



FOTOS: COSTA, E. V. 2010.

#### 2.3.1. Estudos Fitoquímicos e Biológicos com X. laevigata

De acordo com o nosso levantamento bibliográfico utilizando-se bases de pesquisas (*Web of Science*; *SciFinder Scholar* e Google Acadêmico) sobre *X. laevigata*, encontramos seis estudos fitoquímicos para esta espécie, todos provenientes do nosso grupo de pesquisa (LABORGANICS), os quais relatam o isolamento de alcaloides isoquinolínicos, diterpenos e óleos essenciais, bem como suas respectivas atividades biológicas (COSTA et al., 2013a; SILVA et al., 2012; QUINTANS et al., 2012; SILVA et al., 2013; COSTA et al., 2013b; QUEIROZ et al., 2014).

Das folhas de *X. laevigata* foram isolados os alcaloides oxoaporfínicos, liriodenina [63] e lanuginosina [64]; aporfinos, laurelliptina [65], laurotetanina [66], laurolitsina [67]; benzilisoquinolínico, reticulina [68]; proaporfino, estefarina [69] e tetraidroprotoberberínicos discretina [70] e coreximina [71] (COSTA et al., 2013a) (FIGURA 7).



Silva et al. (2012) isolaram do caule desta espécie o sesquiterpeno: espatulenol [72]; uma mistura de esteroides:  $\beta$ -sitosterol [73], estigmasterol [74] e campesterol [75] e os diterpenos do tipo caurano pertencentes a série *ent*: ácido *ent*-caur-16-en-19-oico [76], ácido *ent*-3 $\beta$ -hidroxi-caur-16-en-19-oico [77], ácido 4-*epi*-caurênico [78], *ent*-16 $\beta$ -hidroxi-17acetoxi-cauran-19-al [79], e ácido *ent*-16 $\beta$ ,17-dihidroxi-cauran-19-oico [80] (FIGURA 8). Os compostos isolados tiveram ainda suas atividades tripanocida, larvicida e antimicrobiana avaliadas.



FIGURA 8 – Terpenoides isolados de X. laevigata.

Quintans et al. (2013) relatam a identificação por CG-EM dos constituintes químicos presentes no óleo essencial das folhas de três espécimens de X. laevigata coletadas em diferentes localidades de Sergipe e suas respectivas atividades citotóxicas in vitro e in vivo. constituintes químicos majoritários identificados foram Os os sesquiterpernos biciclogermacreno (7,00-14,63%) [81], (E)-cariofileno (5,43-7,98%) [82], germacreno B (3,22-7,31%) [83], germacreno D (9,09-60,44%) [84], γ-muuroleno (0,60-17,99%) [85], δcadineno (1,15-13,45%) [86] e α-copaeno (3,33-5,98%) [87], (FIGURA 9). Além disso, os trabalhos de Costa et al., 2013b, Silva et al., 2013, e Queiroz et al., 2014, corroboram com esses resultados e ainda relatam outras atividades para o óleo essencial de X. laevigata, tais como: antimicrobiana, tripanocida, larvicida, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva.



FIGURA 9 – Constituintes químicos majoritários do óleo essencial de X. laevigata.

Existem poucos relatos na literatura que evidenciam o quanto é rica a composição fitoquímica dessa espécie, justificando a necessidade um estudo mais aprofundado sobre os compostos biologicamente ativos presentes em *X. laevigata*.

### **3. BIOSSÍNTESE DE ALCALOIDES**

Os alcaloides são compostos de baixa massa molecular que contém um ou mais átomos de nitrogênio, os quais são encontrados principalmente em plantas. Sabe-se que mais de 27 mil estruturas diferentes de alcaloides já foram caracterizadas (DEWICK, 2009).

A presença do nitrogênio confere aos alcaloides caráter básico, o que favorece o isolamento e a purificação, desde que seja possível gerar sais solúveis em água. No entanto, essa basicidade varia grandemente, dependendo da estrutura da molécula (DEWICK, 2009).

Uma definição clara para essa classe de substâncias apresenta certas dificuldades devido à ausência de uma separação precisa entre alcaloides propriamente ditos e aminas complexas de ocorrência natural. Várias definições foram lançadas, porém até o momento nenhuma se apresentou completamente abrangente (HENRIQUES et al., 2006).

Na natureza são encontrados alcaloides com nitrogênio primário, secundário, terciário e até mesmo quaternário. Os alcaloides são frequentemente classificados de acordo com a natureza da estrutura que contém o nitrogênio. Sabe-se que os átomos de nitrogênio são oriundos de aminoácidos e, em geral, o esqueleto carbônico do aminoácido precursor é mantido intacto na estrutura do alcaloide, embora o carbono do ácido carboxílico seja frequentemente perdido através de descarboxilação (DEWICK, 2009).
Os alcaloides são subdivididos em grupos de acordo com o aminoácido precursor. Relativamente, poucos aminoácidos estão envolvidos na biossíntese de alcaloides, sendo os principais L-ornitina, L-lisina, ácido nicotínico, L-tirosina, L-triptofano, ácido antranílico e Lhistidina. Partes de moléculas, a partir da rota do acetato, do chiquimato, ou 4-fosfato de metileritritol são também frequentemente incorporadas às estruturas dos alcaloides. No entanto, um grande grupo de alcaloides é encontrado cujo átomo de nitrogênio é incorporado através de reação de transaminação, e esse átomo de "*N*" vem também de um aminoácido. Algumas vezes esse grupo de alcaloides é chamado pseudoalcaloides (DEWICK, 2009).

Os alcaloides também podem ser classificados de acordo com a natureza da estrutura que contem o átomo de nitrogênio (por exemplo: pirrolidina, piperidina, quinolina, isoquinolina, indol) (FIGURA 10), embora a complexidade estrutural de alguns exemplos expanda rapidamente o número de subdivisões.

FIGURA 10 – Exemplos de núcleos de alcaloides.



A biossíntese dos alcaloides vem sendo extensivamente estudada e atualmente, podese traçar um esquema para a rota biossintética de vários deles. Contudo, essas rotas metabólicas não foram ainda completamente delineadas em termos bioquímicos, pois muitas enzimas envolvidas nas diversas etapas ainda não foram isoladas e caracterizadas (DEWICK, 2009).

Os alcaloides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcaloides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula. As substâncias com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são denominadas de protoalcaloides. Compostos nitrogenados com e sem anéis heterocíclicos que não são derivados de aminoácidos são chamados de pseudoalcaloides (SIMÕES et al., 2007).

Normalmente, a formação do sistema heterocíclico dos alcaloides ocorre através de reações inter ou intramoleculares, através de dois mecanismos gerais: formação de iminas e reações de Mannich (ESQUEMA 1) (DEWICK, 2009).



ESQUEMA 1 – Formação de iminas e reação de Mannich.

FONTE: Adaptado de DEWICK (2009).

Os aminoácidos protéicos comumente utilizados na biossíntese dos alcaloides são: ácido L-aspártico (piridinas, isoquinoleínas), L-lisina (piperidinas, quinolizidinas), L-tirosina (isoquinolinas, benzilisoquinolinas, betalaínas), L-triptofano (derivados da tripanamida,  $\beta$ carbolinas, indóis complexos) e L-histidina (imidazóis). O aminoácido não-protéico Lornitina dá origem aos alcaloides com núcleo pirrolidínico, pirrolizidínico e tropânico (LUCKNER, 1990; MANN, 1994). O aminoácido L-fenilalanina não dá origem a muitos alcaloides, contudo é normalmente a origem dos anéis aromáticos em alcaloides complexos e pode também contribuir como fonte de agrupamento alfa-amino em muitas estruturas (HASLAM, 1993).

Os esqueletos carbônicos dos aminoácidos são originários de intermediários da glicólise, via das pentoses-fosfato e do Ciclo de Krebs (ESQUEMA 2).



ESQUEMA 2 – Formação de metabólitos secundários a partir dos metabólitos primários.

FONTE: Adaptado de DEWICK (2009).

#### 3.1. Biossíntese dos Alcaloides Aporfinoides

Os aporfinoides representam um grande grupo e ainda em expansão de alcaloides isoquinolínicos com mais de 500 compostos isolados e identificados até o momento. São bases tetracíclicas formadas pelo acoplamento direto dos anéis aromáticos A e C do típico

núcleo benziltetraidroisoquinolino. Além de serem encontrados como principais produtos biossintéticos de espécies de Annonaceae, os aporfinoides também são encontrados em espécies pertencentes às famílias Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae (todas anteriores pertencentes à ordem Magnoliales), Ranunculaceae (ordem Ranales), Papaveraceae (ordem Rhoedales) e Rhamnaceae (ordem Rhamnales) (STÉVIGNY et al., 2005).

Os precursores do esqueleto aporfino são claramente estabelecidos como sendo 1benziltetraidroisoquinolinos (FIGURA 11) (PELLETIER, 1987). A biossíntese dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos nas plantas começa com uma matriz de reações que gera o primeiro alcaloide benziltetraidroisoquinolino, (*S*)-norcoclaurina (COSTA, 2009) (ESQUEMA 3).

FIGURA 11 - Esqueleto básico dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos.



O caminho biossintético começa com duas moléculas de L-tirosina. Uma é descarboxilada para a forma tiramina e pode sofrer ação da enzima fenol oxidase formando a L-dopamina. O esqueleto benzil da (*S*)-norcoclaurina é formado pela transaminação da segunda molécula de L-tirosina formando o ácido 4-hidroxifenilpirúvico, que é em seguida descarboxilado para 4-hidroxifenilacetaldeído.

Dopamina e 4-hidroxifenilacetaldeído são depois estereoseletivamente condensados formando (S)-norcoclaurina. Uma série de reações de metilação e oxidação dá origem ao intermediário benziltetraidroisoquinolino (S)-reticulina alcaloides precursor dos isoquinolínicos e benziltetraidroisoquinolínicos incluindo os derivados bisbenziltetraidroisoquinolinos, benzilisoquinolinos, bisbenzilisoquinolinos, aporfinos, protoberberinos e tetraidroprotoberberinos (ESQUEMA 3) (CROTEAU et al., 2000; DEWICK, 2009; STÉVIGNY et al., 2005).



ESQUEMA 3 – Biossíntese dos alcaloides benziltetraidroisoquinolinos.

FONTE: Adaptado de DEWICK (2009) e COSTA (2009).

Os aporfinoides incluem os alcaloides aporfinos, proaporfínos, oxoaporfinos e fenantrenos (FIGURA 12), e têm sido encontrados praticamente em todos os gêneros desta família, com destaque para os gêneros *Annona*, *Xylopia*, *Isolona*, *Enantia*, *Duguetia*, *Polyalthia*, *Artabotrys*, *Pachypodanthium* e *Guatteria* (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988 e 1994; LEBOEUF et al., 1982).

FIGURA 12 – Esqueletos básicos dos aporfinoides.



Os **aporfinos** (FIGURA 12) representam o maior grupo dos aporfinoides dividido em quatro subgrupos: os aporfínicos *sensu stricto* com esqueleto típico da estrutura que exibem *O*-substituição apenas no anel A ou nos anéis A e D, geralmente grupos -OH, -OCH<sub>3</sub> ou -OCH<sub>2</sub>O-. Os aporfínicos são também frequentemente compostos opticamente ativos; os desidroaporfínicos que são um subgrupo pequeno distinto dos aporfínicos pela adição de uma insaturação entre C-6a e C-7; 7-alquilaporfínicos em que o grupo alquil sempre se origina como uma metila substituinte, também invariavelmente contém um centro de insaturação, algumas vezes como um desidroaporfínico, ou como um 6,6a-desidroaporfínico, ou em alguns casos como um 4,5,6,6a-tetradesidroaporfínico com uma aromaticidade total no anel B; e finalmente os aporfínicos 7-oxigenados ou ocasionalmente 4,7-dioxigenados que incluem alguns alcaloides com substituintes metilas geminais ou hidroxilas no C-7 (SHAMA & GUINAUDEAU, 1984; PELLETIER, 1987; COSTA, 2009).

A rota mais simples para a biossíntese dos aporfinos envolve o acoplamento oxidativo direto da (*S*)-reticulina na forma do radical *bis*-dienona. Consequentemente, os dois radicais podem ser *orto-orto* a ser iniciado nos anéis A e C contendo o grupamento fenol, em que nesse caso resultaria em um padrão de substituição nas posições 1,2,10,11, ou *orto-para* resultando em um aporfino com substituição nas posições 1,2,9,10 (ESQUEMA 4) (PELLETIER, 1987; COSTA, 2009).

ESQUEMA 4 – Biossíntese dos alcaloides aporfínicos.



#### FONTE: Adaptado de PELLETIER (1987) e COSTA (2009).

Em um estudo realizado por RINGDAHL et al., 1981 sobre os alcaloides aporfinos foi observado que estes demonstravam possuir o "Efeito Cotton" (EC) centrado em 235-245 nm nas curvas dispersão rotatória óptica (DRO), a partir do qual a configuração absoluta do centro quiral poderia ser deduzida.

Os alcaloides aporfinos contém um cromóforo bifenil torcido possuindo atividade óptica, devido à inerente dissimetria. A característica especial desse tipo de alcaloide é devido à correlação entre a configuração absoluta do centro quiral e o sentido de torção do grupo bifenil em ponte, resultando nas configurações absolutas (R) ou (S) (FIGURA 13). Assim, para um composto possuindo a configuração (S), o dicroísmo circular a 240 nm é positivo. O

sinal do Efeito Cotton intenso na região de 234-242 nm, característica do sentido absoluto de torção do sistema bifenil dissimétrico, domina a região do visível e fornece uma explicação física para a generalização de que os aporfinos de configuração (*S*) têm uma rotação positiva na linha D do sódio, enquanto que os aporfinos de configuração (*R*) têm uma rotação negativa na linha D nos experimentos de rotação especifica (RINGDAHL et al., 1981; CRAIG e ROY, 1965; BENTLEY e CARDWELL, 1955).





FONTE: Adaptado de RINGDAHL et al., (1981).

Os **proaporfinos** (FIGURA 12) são numericamente um grupo minoritário dentro da família Annonaceae, mas com um papel importante como intermediário numa rota alternativa para a formação dos aporfinos. (SHAMA & GUINAUDEAU, 1984; PELLETIER, 1987).

Um exemplo desta biossíntese é verificado para 0 trissubstituído benziltetraidroisoquinolino N-metilcoclaurina precursor da roemerina, em que no anel D falta oxigenação e mecambrolina em que o anel D retém a substituição em C-10 (ESQUEMA 5). Esta conversão é explicada pela formação do dirradical de 5a e sua ciclização para o proaporfino conhecido glaziovina 5b. Protonação da carbonila dienona (C-10) de 5b com consequente rearranjo fenol-dienona conduz diretamente para o padrão de substituição-1,2,10 de 5c, requerendo apenas uma subsequente formação do anel metilenodióxi originando mecambrolina (5c). Num outro sentido, uma redução inicial da carbonila dienona para o correspondente proaporfinol 5d pode então levar, via protonação, para desidratação através de um rearranjo benzeno-dienol levando a formação de um aporfino 1,2-substituído que novamente precisa apenas da formação do anel metilenodióxi resultando no aporfino roemerina 5e (ESQUEMA 5) (SHAMA & GUINAUDEAU, 1984; PELLETIER, 1987).

O mesmo pode ser feito para os alcaloides benziltetraidroisoquinolino tetrassubstituídos, como por exemplo, para a (*S*)-orientalina precursor da isotebaina através do intermediário orientalinona, e depois através do intermediário orientalinol e um rearranjo do

benzeno-dienol (ESQUEMA 6) (SHAMA & GUINAUDEAU, 1984; PELLETIER, 1987; DEWICK, 2009; COSTA, 2009).

**ESQUEMA 5** – Biossíntese dos alcaloides aporfínicos a partir de um intermediário proaporfíno (glaziovina).



FONTE: Adaptado de PELLETIER (1987).

**ESQUEMA 6** – Biossíntese dos alcaloides aporfínicos a partir de um intermediário proaprofíno (orientalinona).



FONTE: Adaptado de DEWICK (2009) e COSTA (2009).

Os alcaloides **oxoaporfínicos** (FIGURA 12) apresentam uma carbonila em C-7 e um esqueleto aporfínico aromático. Consequentemente, são compostos coloridos apresentando coloração amarelada, alaranjada e/ou avermelhada. Alguns alcaloides oxoaporfínicos estão, entre a maioria, distribuídos na família Annonaceae. Um pequeno grupo de alcaloides

apresenta a substituição oxo no anel B em C-5 ou em C-4 e C-5, sendo estes chamados de dioxoaporfínicos e também são bastante encontrados em espécies da família Annonaceae (SHAMA & GUINAUDEAU, 1984; PELLETIER, 1987; COSTA, 2009).

A biossíntese dos alcaloides oxoaporfínos envolve provavelmente os alcaloides desidroaporfinos como intermediários, estes por sua vez são biossintetizados a partir dos correspondentes aporfinos pela oxidação em C-6a e C-7 (ESQUEMA 7). Embora alguns alcaloides desidroaporfinos sejam conhecidos naturalmente, eles são geralmente muito instáveis para serem caracterizados completamente (SHAMA & GUINAUDEAU, 1984; PELLETIER, 1987; COSTA, 2009).

ESQUEMA 7 – Biossíntese dos alcaloides oxoaporfínicos.





Não há estudos *in vivo* sobre a biossíntese dos alcaloides oxoaporfinos, mas uma sequência racional dos eventos envolveria a oxidação passo a passo de um idêntico aporfino substituído através dos desidroaporfínicos e depois 4,5,6a,7-tetradesidroaporfino que seria suscetível à oxidação em C-7 conduzindo geralmente à formação do íon oxoaporfínio instável 7-oxo-*N*-metoquaternário, cujo o grupo *N*-metil sofre rapidamente uma conversão em um íon imínio via NADP<sup>+</sup> e NAPH e enzima dependente citocroma P-450, seguida de hidrólise e oxidação originando o esqueleto oxoaporfino (ESQUEMA 7) (SHAMA & GUINAUDEAU, 1984; PELLETIER, 1987; COSTA, 2009).

O último grupo de alcaloides a ser considerado são os **fenantrenos** (FIGURA 12). Estes alcaloides são originados a partir dos aporfínicos devido a uma clivagem entre N-6 e C-6a levando à formação do núcleo fenantreno com uma cadeia etilamina, e uma ou duas metilas ligadas ao nitrogênio (SHAMA & GUINAUDEAU, 1984; PELLETIER, 1987) (ESQUEMA 8).

#### ESQUEMA 8 – Biossíntese geral para os alcaloides fenantreno.



FONTE: Adaptado de PELLETIER (1987).

## 3.2. Biossíntese dos Alcaloides Protoberberinos e Tetraidroprotoberberínicos

Assim como observado para os alcaloides aporfinoides, o precursor dos tetraidroprotoberberinos e protoberberinos é o alcaloide benziltetraidroisoquinolino (*S*)-reticulina. O esqueleto tetracíclico dos alcaloides tetraidroprotoberberinos e protoberberinos é derivado do sistema benziltetraidroisoquinolino com a incorporação de um átomo de carbono proveniente da (*S*)-adenosilmetionina via um grupo *N*-metil (ESQUEMA 9). Este esqueleto carbônico extra é chamado de ponte berberina ("*berberine bridge*"). A formação da ponte berberina é racionalizada como um processo oxidativo em que o grupo *N*-metil é oxidado a um íon imínio, e ocorre uma ciclização do anel aromático por virtude do grupo fenólico (DEWICK, 2009).

O processo oxidativo de ciclização é análogo ao da formação do grupo metilenodióxi, o mecanismo de ciclização é ainda exatamente o mesmo como aquele envolvido na formação do anel tetraidroisoquinolino (reação de Mannich). O produto da transformação enzimática da (*S*)-reticulina é o alcaloide tetraidroprotoberberino (*S*)- esculerina, a enzima ponte berberina requer oxigênio molecular como oxidante liberando água como produto. Seu papel na reação de ciclização completa, o grupo fenol na esculerina é depois metilado, e tetraidrocolumbamina é oxidado adicionalmente dando o sistema isoquinolino quaternário na columbamina (ESQUEMA 9).

Este processo parece envolver dois passos separados de oxidação, ambos requerem oxigênio molecular, embora peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e água (H<sub>2</sub>O) sejam produzidos nos processos sucessivos. A sequência do mecanismo através de íon imínio tem sido levada em conta para estas observações. Finalmente, a berberina (ESQUEMA 9) é produzida pela transformação do grupo orto-metoxifenílico a metilenodióxi via o  $O_2^-$ , NADPH, e enzima dependente citocroma P-450 (ESQUEMA 9) (DEWICK, 2009).



ESQUEMA 9 - Biossíntese dos alcaloides protoberberinos e tetraidroprotoberberinos.

FONTE: Adaptado de DEWICK (2009).

# 3.3. Biossíntese dos Alcaloides Morfinanodienonas

O precursor dos alcaloides morfinanodienonas já foi confirmado como sendo a (R)reticulina (DEWICK, 2009). Sua biossíntese ocorre a partir da (S)-reticulina que passa por uma oxidação via NADP<sup>+</sup> e enzima 1,2-deidroreticulina sintase, gerando o íon 1,2deidroreticulina, que posteriormente sofre redução via NADPH e a enzima íon deidroreticulina redutase obtendo-se a (R)-reticulina (ESQUEMA 10) (PELLETIER, 1987; DEWICK, 2009).

ESQUEMA 10 – Biossíntese do alcaloide (R)-reticulina.



FONTE: Adaptado de DEWICK (2009).

A rota mais simples para a biossíntese dos morfinanodienonas envolve um rearranjo cuidadoso, seguido do acoplamento oxidativo da (*R*)-reticulina na forma do radical *bis*dienona. Consequentemente, os dois radicais podem ser *para-orto* a ser iniciado nos anéis A e C contendo o grupamento fenol, em que nesse caso resultaria em um padrão de substituição nas posições 3,4,6,7, ou *para-para* resultando em um morfinanodienona com substituição nas posições 2,3,6,7 (ESQUEMA 11) (PELLETIER, 1987; DEWICK, 2009).



ESQUEMA 11 - Biossíntese dos alcaloides morfinanodienonas.

FONTE: Adaptado de PELLETIER (1987) e DEWICK (2009).

#### **4. OBJETIVOS**

#### 4.1. Geral

Ampliar o conhecimento acerca da composição química e atividade citotóxica das espécies de Annonaceae brasileiras principalmente das espécies de ocorrência no Estado de Sergipe, tendo em vista a importância do seu potencial químico e biológico para o aproveitamento racional e a preservação da biodiversidade brasileira.

#### 4.2. Específicos

• Estudar fitoquimicamente o caule de *Xylopia laevigata*;

• Realizar o ensaio de atividade citotóxica *in vitro* nos extratos, bem como frações provenientes destes, direcionando para o isolamento das substâncias bioativas;

• Isolar e identificar as substâncias presentes nos extratos e/ou frações bioativas, através de métodos cromatográficos e espectrométricos;

• Submeter as substâncias isoladas ao ensaio de atividade citotóxica.

## **5. METODOLOGIA**

## 5.1. Suportes para Cromatografia

**Cromatografia em coluna (CC).** Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro aberta, utilizando como fase estacionária sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) da Macherey-Nagel tratada previamente com solução de bicarbonato de sódio 10% (NaHCO<sub>3</sub>) (COSTA et al., 2006). O comprimento e o diâmetro das colunas variaram de acordo com as quantidades das amostras a serem fracionadas. A proporção de sílica utilizada nas separações foi cerca de 20 vezes a massa do produto bruto a ser purificado (MATTOS, 1997).

**Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).** As análises em camada delgada analítica foram realizadas em cromatofolhas Macherey-Nagel, sílica gel 60, com indicador de fluorescência  $F_{254}$ , com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura.

**Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP).** As análises em escala preparativa foram desenvolvidas em cromatoplacas de tamanho 20 x 20 cm com espessura de 1,0 mm. As placas foram preparadas usando cerca de 20g de sílica gel 60 da Macherey-Nagel

e 50 mL de água destilada. Após a evaporação da água à temperatura ambiente foram ativadas em estufa a 110°C. A recuperação das amostras foi efetuada utilizando como solventes diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>), metanol (CH<sub>3</sub>OH) e/ou misturas destes.

**Reveladores.** A revelação das faixas e "*spots*" nas CCDA e CCDP foi feita sob luz ultravioleta 254 e 365 nm, solução de anisaldeído e reagente de Dragendorff.

**Solventes.** Para cromatografia foram utilizados solventes das marcas F. Maia, Synth e Nuclear. Para obtenção de espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados das marcas Merck e Aldrich. Para obtenção de espectros de massas foram utilizados solventes grau HPLC.

## 5.2. Reagentes e Testes de Identificação

**Solução de Anisaldeído**. A solução de anisaldeído foi preparada pela adição de 5 mL de anisaldeído ( $C_8H_8O_2$ ) em 90 mL de álcool etílico, 5 mL de ácido sulfúrico concentrado e 1 mL de ácido acético glacial.

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

## 5.3. Equipamentos

• Os espectros de ressonância magnética nuclear uni- e bi-dimensionais (RMN 1D/2D) foram registrados em aparelhos Bruker Avance III-400 operando a 9,4 Tesla (400 MHz para RMN de <sup>1</sup>H e 100 MHz para RMN de <sup>13</sup>C) e Avance III-600 operando a 14,1 Tesla, (600 MHz para RMN de <sup>1</sup>H e 150 MHz para RMN de <sup>13</sup>C), ambos do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná (DQ/UFPR). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl<sub>3</sub>) e/ou CDCl<sub>3</sub> + gotas de metanol deuterado (CD<sub>3</sub>OD). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm ( $\delta$ ) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: *s* (simpleto), *sl* (simpleto largo), *d* (dupleto), *dd* (duplo

dupleto), ddd (duplo duplo dupleto), t (tripleto), dt (duplo tripleto), m (multipleto). As constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz);

• Os espectros de massas (EM) das substâncias isoladas foram adquiridos em um espectrômetro TSQ Quantum Acess (Thermo Scientific) pertencente à Universidade Federal do Amazonas (UFAM), com analisador de massas do tipo *ion trap* e equipado com uma fonte de APCI programada para operar no modo positivo de aquisição e também em um espectrômetro do tipo *ion trap* (Thermo Scientific-LCQ Fleet) pertencente à Universidade Federal do Paraná (UFPR), equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI) programada para operar no modo positivo de aquisição. As informações foram registradas através do modo de aquisição contínua, disponível no LCQ Fleet Tune. As amostras foram diluídas a 10 ppm em metanol grau HPLC e injetadas no *looping* de 5  $\mu$ L do espectrômetro de massas. Utilizou-se uma bomba ACELA 600 (Fluxo de 200  $\mu$ L min<sup>-1</sup> de metanol grau HPLC) para levar as amostras do *looping* até a fonte de ionização. A faixa monitorada foi de *m/z* 120-800 Da.

• As rotações óticas foram registradas em CHCl<sub>3</sub> e/ou CH<sub>3</sub>OH em um polarímetro Jasco P-2000 pertencente a Universidade Federal do Paraná.

## 5.4. Outros Equipamentos

Evaporador rotatório – Heidolph em banho-maria com temperatura controlada; Moinho – modelo Marconi com quatro facas; Estufa incubadora – Fabbe e Olidef cz Linea; Balança analítica modelo APX 200 da marca Denver Instrumet Company.

#### 5.5. Coleta e Identificação Botânica

O material botânico de *X. laevigata* (caule) foi coletado no dia 19 de fevereiro de 2013 às 10 horas da manhã no Parque Nacional Serra de Itabaiana (PARNA), Município de Itabaiana, Sergipe. O material botânico foi identificado pela Professora Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, taxonomista botânica do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Sergipe (UFS). Uma exsicata da espécie em estudo foi depositada no Herbário ASE/UFS sob o número de registro 26805.

#### 5.6. Obtenção dos Extratos

Após a coleta, o material botânico em estudo (caule) foi seco em estufa de ar circulante a 45 °C por cinco dias, sendo em seguida triturado em um moinho de quatro facas.

O caule de *X. laevigata*, após seco, moído e pesado (1400 g), foi submetido à extração a frio (maceração) inicialmente com hexano e posteriormente com metanol, com renovação de solvente em intervalo de 72 horas. O resíduo remanescente foi desprezado conforme ESQUEMA 12. Os extratos obtidos foram concentrados em um evaporador rotativo à pressão reduzida, à temperatura de 40-50 °C, e em seguida secos em dessecador. Após a completa secagem e cálculo dos rendimentos obtidos, pequenas quantidades (aproximadamente 500 mg) dos extratos foram retirados e submetidos à realização do ensaio de atividade citotóxica.

ESQUEMA 12 – Fluxograma de obtenção dos extratos.



## 5.7. Estudo Fitoquímico do Extrato Metanólico (XLEM)

A análise fitoquímica do extrato metanólico (**XLEM**) do caule de *X. laevigata* por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA), utilizando diferentes sistemas de solvente e revelando com o reagente de Dragendorff, indicativo de alcaloides, evidenciou a presença de constituintes alcaloídicos. Baseado neste indício, o **XLEM** foi submetido à extração ácido-base de acordo com a metodologia de Costa et al. (2006). Assim, ao **XLEM**  (84,0 g) foi adicionado 250 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>) e extraído sucessivamente com solução de ácido clorídrico a 3% v/v, obtendo-se duas frações: a fração aquosa ácida (FAA) e a fração clorofórmica neutra (**XLFCN**). A FAA foi basificada com hidróxido de amônio concentrado (NH<sub>4</sub>OH) até pH 12 e extraída sucessivamente com CHCl<sub>3</sub>, levando a duas novas frações: a fração clorofórmica alcaloídica (**XLFCA**) e a fração aquosa básica (FAB) que foi desprezada (ESQUEMA 13). As frações clorofórmica neutra (**XLFCA**) e alcaloídica (**XLFCA**) foram submetidas ao ensaio de atividade citotóxica.

ESQUEMA 13 – Fluxograma do tratamento ácido-base do extrato metanólico (XLEM).



# 5.8. Fracionamento Cromatográfico da Fração Clorofórmica Alcaloídica (XLFCA) proveniente do extrato metanólico (XLEM)

Uma parte da **XLFCA** (730,0 mg) foi inicialmente submetida ao fracionamento cromatográfico por meio de uma coluna cromatográfica (CC;  $\Phi$  x h de 2,5 x 50,0 cm) de sílica gel com 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) previamente tratada com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 10% (COSTA et al., 2006), eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 218 frações (ESQUEMA 14).



#### ESQUEMA 14 – Fluxograma do fracionamento cromatográfico de (XLFCA).

As frações obtidas foram analisadas por CCDA e as que apresentaram o mesmo  $R_{\rm f}$  foram reunidas (TABELA 6).

TABELA 6	6 – Reunião	das frações	obtidas do	fracionamento	de XLFCA.
----------	-------------	-------------	------------	---------------	-----------

Grupo de		Rendimento	Grupo de		Rendimento
Frações (G)	Frações	( <b>mg</b> )	Frações (G)	Frações	( <b>mg</b> )
1	1-5	34,1	14	141-143	9,3
2	6-7	3,8	15	144	2,6
3	8-14	117,4	16	145-149	84,1
4	15-20	44,0	17	150-154	63,0
5	21-31	58,2	18	155-158	22,7
6	32-38	16,5	19	159-160	8,5
7	39-57	44,1	20	161-169	25,7
8	58-75	58,5	21	170-174	10,0
9	76-93	25,2	22	175-178	25,9
10	94-98	6,5	23	179-186	43,7
11	99-106	36,4	24	187-194	112,6
12	107-110	7,3	25	195-198	87,8
13	111-140	10,5	26	199-218	191,0

#### 5.8.1. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G2

O grupo de frações **G2** (3,8 mg) foi submetido a análise por CCDA utilizando como eluente  $CH_2Cl_2$ :MeOH (95:05), e observou-se a presença de apenas um *spot* quando revelada com reagente de Dragendorff e Anisaldeido, bem como quando submetido a irradiação de luz ultravioleta em 254 nm, sendo codificada como **XL1** (3,8 mg). Posteriormente, esse sólido foi submetido às análises de EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D.

## 5.8.2. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G3

O grupo de frações **G3** (117,4 mg) foi inicialmente submetida ao fracionamento cromatográfico por meio de uma coluna cromatográfica (CC;  $\Phi$  x h de 2,5 x 40,0 cm) de sílica gel com 0,063-0,200 mm (70-230 mesh) previamente tratada com solução de NaHCO<sub>3</sub> a 10%, eluída com hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol em misturas de polaridades crescentes, obtendo-se 51 frações (ESQUEMA 15).

ESQUEMA 15 – Fluxograma do fracionamento cromatográfico de G3.



As frações obtidas foram analisadas por CCDA e as que apresentaram o mesmo  $R_{\rm f}$  foram reunidas (TABELA 7).

Grupo de	<b>F</b> ~	Rendimento	Grupo de	<b>F</b> ~	Rendimento
Frações (G3)	Frações	(mg)	Frações (G)	Frações	(mg)
1	1-3	4,1	7	21-25	1,4
2	4-5	11,9	8	26-27	5,0
3	6-8	41,3	9	28-30	1,0
4	9-14	37,5	10	31-40	2,6
5	15	1,9	11	41-51	6,5
6	16-20	2,5	-	-	-

TABELA 7 – Reunião das frações obtidas do fracionamento de G3

## 5.8.2.1. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G3.3

No ESQUEMA 16 é representado o resultado do estudo de G3.3 (41,3 mg). O grupo de frações G3.3, obtido a partir do fracionamento do grupo de frações G3, foi submetido à CCDP utilizando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (95:05) resultando no isolamento de três substâncias, codificadas como XL2, XL3, XL4 e XL5. A análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes e reagentes, conforme citado no item 5.8.1., de cada substância isolada revelou apenas um *spot*. As substâncias isoladas foram submetidas às análises de EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D.

ESQUEMA 16 – Isolamento de XL2, XL3, XL4 e XL5.



5.8.2.2. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G3.4

No ESQUEMA 17 é representado o resultado do estudo de G3.4 (37,5 mg). O grupo de frações G3.4, obtido a partir do fracionamento do grupo de frações G3, foi submetido à CCDP utilizando como eluente CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:MeOH (95:05) resultando no isolamento de quatro substâncias, codificadas como XL3, XL6, XL7 e XL8. A análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes e reagentes, conforme citado no item 5.8.1. de cada substância isolada revelou apenas um *spot*. As substâncias isoladas foram submetidas às análises de EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D.

#### ESQUEMA 17 – Isolamento de XL3, XL6, XL7 e XL8.



## 5.8.3. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G4

No ESQUEMA 18 é representado o resultado do estudo de **G4** (44,0 mg). O grupo de frações **G4** foi submetido à CCDP utilizando como eluente  $CH_2Cl_2$ :MeOH (95:05) resultando no isolamento de cinco substâncias, codificadas como **XL9**, **XL10** e **XL11**. A análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes e reagentes de cada substância isolada revelou apenas um *spot*, conforme citado no item **5.8.1**. As substâncias isoladas foram submetidas às análises de EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D.

ESQUEMA 18 – Isolamento de XL9, XL10 e XL11.



# 5.8.4. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G5

No ESQUEMA 19 é representado o resultado do estudo de G5 (58,2 mg). O grupo de frações G5 foi submetido à CCDP utilizando como eluente  $CH_2Cl_2$ :MeOH (95:05) resultando no isolamento de duas substâncias, codificadas como XL12 e XL13. A análise por

CCDA em diferentes sistemas de solventes e reagentes de cada substância isolada revelou apenas um *spot*. As substâncias isoladas foram submetidas às análises de EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D.

ESQUEMA 19 – Isolamento de XL12 e XL13.



5.8.5. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G7

No ESQUEMA 20 é representado o resultado do estudo de **G7** (44,1 mg). O grupo de frações **G7** foi submetido à CCDP utilizando como eluente  $CH_2Cl_2$ :MeOH (95:05) resultando no isolamento de quatro substâncias, codificadas como **XL14**, **XL15**, **XL16** e **XL17**. A análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes e reagentes, conforme citado no item **5.8.1.**, de cada substância isolada revelou apenas um *spot*. As substâncias isoladas foram submetidas às análises de EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D.

ESQUEMA 20 – Isolamento de XL14, XL15, XL16 e XL17.



#### 5.8.6. Estudo Cromatográfico do grupo de frações G9

No ESQUEMA 21 é representado o resultado do estudo de **G9** (25,2 mg). O grupo de frações **G9** foi submetido à CCDP utilizando como eluente  $CH_2Cl_2$ :MeOH (95:05) resultando no isolamento de uma substância, codificadas como **XL18** e **XL19**. A análise por CCDA em diferentes sistemas de solventes e reagentes, conforme citado no item **5.8.1.**, de cada substância isolada revelou apenas um *spot*. As substâncias isoladas foram submetidas às análises de EM e RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D.

ESQUEMA 21 – Isolamento de XL18 e XL19.



## 5.9. Investigação da Atividade Citotóxica in vitro

A análise de citoxicidade *in vitro* em células tumorais faz parte de um *screening* inicial para Identificação do potencial antitumoral de extratos e substâncias isoladas.

#### 5.9.1. Preparo das Amostras

As amostras foram diluídas em DMSO puro estéril na concentração de 5 mg mL<sup>-1</sup> para substâncias puras e 10 mg mL<sup>-1</sup> para extratos, sendo testadas em concentrações que variaram de  $0,19-50 \ \mu g \ mL^{-1}$ .

## 5.9.2. Células

Foram utilizadas células tumorais B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana) e HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL), os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de  $CO_2$  a 37 °C. Vale ressaltar

que para os extratos e frações os mesmos são avaliados apenas frente as células tumorais HepG2 e HL-60 em concentração única de 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>, pois é realizado apenas um '*screening*'. Diariamente acompanhava-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) para que as células despregassem-se das paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para microplasma, conforme avaliado pela técnica de qPCR (Lookout® Mycoplasma qPCR detection kit, Cat. MP0040, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos sobre a proliferação de células normais, PBMC (*peripheral blood mononuclear cells* – linfócitos e monócitos) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. A coleta do sangue foi realizada em frasco heparinizados por profissionais capacitados, nas dependências do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI-Fiocruz-Bahia), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 4 mL. As PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de cerca de 3 mL de sangue, acrescida de 5 mL de salina. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 15 minutos de centrifugação a 1500 rpm, e feita a aspiração dos PBMC, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. A suspensão de PBMC foi transferida para outro tubo o qual foi acrescido com salina até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 5 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de PBMC foi ressuspendido em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino e  $10 \,\mu g \,mL^{-1}$  de concanavalina A, ConA) e contado em câmera de Newbauer para posterior diluição e plaqueamento.

## 5.9.3. Ensaio de Citotoxicidade

Para avaliar a citotoxicidade das amostras, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com os compostos em teste. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina (O'BRIEN et al., 2000), é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Assim como, os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação. A forma oxidada é azul (não fluorecente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável) (ESQUEMA 22). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos (AHMED et al., 1994) e atualmente apresenta várias aplicações.



#### ESQUEMA 22 – Reação de oxi-redução da resazurina.

## FONTE: Adaptado de RODRIGUES (2012).

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100  $\mu$ L/poço de uma solução de 0,3 x 10<sup>6</sup> células mL<sup>-1</sup> para células em suspensão e 0,7 x 10<sup>5</sup> células mL<sup>-1</sup> para células aderidas). Após 24 horas de incubação, os compostos testes dissolvidos em DMSO foram adicionados em cada poço e incubados por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade DMSO. Quatro horas (vinte e quatro horas para o PBMC) antes do final do período de incubação, 20  $\mu$ L da solução estoque (0,312 mg mL<sup>-1</sup>) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa (AHMED et al., 1994)(ESQUEMA 23).





A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula:

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

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

O R<sub>0</sub> foi calculado utilizando a seguinte fórmula:

## $R_0 = AO_{LW} / AO_{HW}$

Onde,  $AO_{LW}$  e  $AO_{HW}$  são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. Utiliza-se o parametro  $R_0$  para eliminar a absorção característica do meio puro, que possui uma coloração levemente rósea.

A amostra foi testada em diluição seriada, em triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a percentagem de inibição x log da concentração e determinado suas CI<sub>50</sub> realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software).

Este ensaio foi realizado no Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, localizado na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) no estado da Bahia em colaboração com o Prof. Dr. Daniel Pereira Bezerra.

# 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Do estudo fitoquímico do caule de *X. laevigata* utilizando os métodos cromatográficos usuais (CC, CCDA, CCDP) foi possível o isolamento de 19 substâncias conhecidas, pertencentes a classe dos alcaloides. As substâncias isoladas foram identificadas utilizando as técnicas modernas de elucidação estrutural tais como, RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D e EM, bem como por comparação com os dados descritos na literatura.

Dentre os alcaloides isolados observou-se a presença de quatro subclasses, os benzilisoquinolínicos, os aporfinoides, os tetraidroprotoberberínicos e os morfinanodienonas (FIGURA 14, TABELA 8). Os aporfinoides de acordo com PELLETIER (1987) podem ser subdivididos em sete subclasses: proaporfinos, aporfinos, oxoaporfinos, oxoaporfinos no anel B, aporfinoides diméricos, fenantrenos e aporfinoides degradados. Neste trabalho foi possível o isolamento de duas subclasses dentre as oito classificadas, os aporfinos e os oxoaporfinos. (TABELA 8).



## FIGURA 14 – Esqueletos básicos dos alcaloides isolados de X. laevigata.

Oxoaporfinos Tetraidroprotoberberínicos Morfinanodienonas

TABELA 8 – Classe de alcaloides isolados de X. laevigata

Aporfino	oides			
Aporfinos Oxoaporfinos		Tetraidro	Benziltetraidro	Morfinano
		protoberberínicos	isoquinolínicos	dienonas
XL1; XL2; XL4;	XL3	XL8	XL16	XL19
XL5; XL7; XL9;	XL6	XL13		
XL10;XL11; XL12;		XL17		
XL14; XL15		XL18		

A seguir nas FIGURAS 15-19, são mostradas as estruturas das substâncias isoladas e identificadas de acordo com a sua respectiva classe de alcaloide.



FIGURA 15 – Substâncias isoladas pertencentes à classe dos alcaloides do tipo aporfinos.

FIGURA 16 – Substâncias isoladas pertencentes à classe dos alcaloides do tipo oxoaporfinos.





**FIGURA 17** – Substâncias isoladas pertencentes à classe dos alcaloides do tipo tetraidroprotoberberínicos.

**FIGURA 18** – Substância isolada pertencente à classe dos alcaloides do tipo benziltetraidroisoquinolínicos.



FIGURA 19 – Substância isolada pertencente à classe dos alcaloides do tipo morfinanodienonas.



### 6.1. Identificação Estrutural das Substâncias Isoladas de X. laevigata

## 6.1.1. Identificação Estrutural dos Alcaloides do Tipo Aporfinos

## 6.1.1.1. Identificação estrutural de XL1

A substância **XL1** (3,8 mg) apresentou-se como sólido marrom, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20} = -11,0^{\circ}$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>). Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) (FIGURA 20) observou-se características de um alcaloide do tipo aporfínico *sensu stricto* (GUINAUDEAU et al., 1983).

Na região dos hidrogênios aromáticos verificou-se a presença de cinco sinais, sendo quatro em  $\delta$  8,07 (1H, *d*, *J* = 8,0 Hz),  $\delta$  7,25 (2H, *m*) e  $\delta$  7,32 (1H, *m*) típicos dos hidrogênios aromáticos H-11, H-8/H-9 e H-10, respectivamente, do anel D não substituído do sistema aporfínico, e um em  $\delta$  6,57 (1H, *s*), característico de H-3 do anel A do sistema aporfínico dissubstituído (FIGURA 21, TABELA 9).







**FIGURA 21** – Ampliação da região aromática do espectro de RMN de  ${}^{1}$ H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL1**.

A presença de dois sinais em  $\delta$  6,10 e 5,95 ambos dupletos (J = 1,4 Hz) correlacionado com o sinal do carbono em  $\delta$  101,0 no mapa de correlação HSQC evidenciou a presença de um grupo metilenodióxi na estrutura. Uma das razões para a não equivalência dos hidrogênios do grupo metilenodióxi se deve a torsão do sistema bifenil, fazendo com que ambos possuam ambientes químicos diferentes.

Na região entre  $\delta$  3,26-2,46 observou-se os sinais referentes aos hidrogênios metilênicos diastereotópicos H-4, H-5 e H-7, bem como o sinal do hidrogênio metínico H-6a. Os seus carbonos foram determinados com base na análise do mapa de correlação HSQC (FIGURA 22). Os sinais para os hidrogênios H-7<sub>pax</sub> e H-7<sub>peq</sub> foram verificados em  $\delta$  2,69 (1H, t, J = 13,7 Hz) e  $\delta$  3,17 (1H, dd, J = 13,7 e 4,1 Hz), respectivamente (FIGURA 23, TABELA 9).





**FIGURA 23** – Ampliação da região alifática entre  $\delta$  3,26-2,46 do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL1**.



3.267 3.233 3.200 3.167 3.133 3.100 3.067 3.033 3.000 2.967 2.933 2.900 2.867 2.833 2.800 2.767 2.733 2.700 2.667 2.633 2.600 2.567 2.533 2.500 2.467 ppm (t1)

A análise conjunta dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 24 e FIGURA 25) corroborou com as informações obtidas no espectro de RMN de <sup>1</sup>H confirmando a presença de um alcaloide aporfínico *sensu stricto*.

Pelas análises dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 24 e FIGURA 25) observou-se a presença de 18 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  147,2 e  $\delta$  116,5, quatro metilênicos, sendo um em  $\delta$  101,0, característico de grupo metilenodióxi substituído em C-1/C2, e três em  $\delta$  53,5,  $\delta$  34,5 e  $\delta$  28,9 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  62,2, típico de C-6a, e um em  $\delta$  43,6, típico de metila ligada ao nitrogênio (*N*-CH<sub>3</sub>). A presença do grupo metila ligada ao nitrogênio foi confirmada pela correlação do sinal em  $\delta$  2,56 (3H, *s*) a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  53,5 (C-5) e com o sinal do carbono em  $\delta$  62,2 (C-6a). A presença do grupo metilenodióxi substituído em C-1/C2 foi confirmada pela correlação do sinal em  $\delta$  6,57 (H-3) a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  142,9 (C-1) e a <sup>2</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  147,2 (C-2) (FIGURA 26, TABELA 9).

**FIGURA 24** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL1.** 



**FIGURA 25** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL1**.





FIGURA 26 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL1.

**TABELA 9** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **XL1** 

Posição	XL1			Roemerina		
	$^{1}\mathrm{H}$	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC	$^{1}\mathrm{H}$	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{c}$	
	$\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>		( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup><i>a</i>,<i>c</i></sup>	$\delta$ (mult., J em Hz) <sup>c</sup>		
1		142,9, C			142,6	
1a		116,5, C			116,4	
2		147,2, C			146,7	
3	6,57 (1H, <i>s</i> )	107,6, CH	1, 2, 3a e 4	6,66 (1H, <i>s</i> )	107,5	
3a		126,5, C			128,2	
3b		126,7, C				
4	2,67 (1H, <i>m</i> )	28,9, CH <sub>2</sub>	3b		29,2	
	3,14 (1H, <i>m</i> )		3b			
5	2,57 (1H, <i>m</i> )	53,5, CH <sub>2</sub>	4		53,6	
	3,07 (1H, <i>m</i> )		3b, 4 e 7a			
6a	3,23 (1H, <i>m</i> )	62,2, CH	3b e 7a		62,1	
7	3,17 (1H, <i>dd</i> , 13,7 e 4,1)	34,5, CH <sub>2</sub>	3b, 6a, 7a, 8b e 11a		34,7	
	2,69 (1H, <i>t</i> , 13,7)		6a e 7a			
7a		134,9, C			135,4	
8	7,25 (1H, <i>m</i> )	128,5, CH	9 e 11a		127,0	
9	7,25 (1H, <i>m</i> )	127,7, CH	7a e 9	7,22–7,33 (3H, <i>m</i> )	126,9	
10	7,32 (1H, <i>m</i> )	127,4, CH	8 e 11a		126,6	
11	8,07 (1H, <i>d</i> , 8,0)	127,2, C	1a, 7a e 9	8,06 (1H, <i>d</i> , 7,8)	127,5	
11a		131,1, C			131,1	
N-CH <sub>3</sub>	2,56 (3H, <i>s</i> )	43,6, CH <sub>3</sub>	5 e 6a		44,0	
(1,2)-	6,10 (1H, <i>d</i> , 1,4)	101,0,CH <sub>2</sub>	1 e 2	6,09 (1H, <i>d</i> , 1,2)	100,7	
O <u>C</u> H <sub>2</sub> O	5,95 (1H, <i>d</i> , 1,4)		1 e 2	5,94 (1H, d, 1,8)		

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>ZHENJIA et al., 2010 (<sup>1</sup>H: 600 MHz; <sup>13</sup>C: 150 MHz; CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

Através da análise por espectrometria de massas (FIGURA 27), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), foi possível evidenciar a presença de uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 280,11 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>2</sub> (calculado 279,12 Da) confirmando assim os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 27 – Espectro de massas de XL1.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H, HSQC, HMBC, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos a concluir que a substância **XL1** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*R*)-roemerina (FIGURA 28, TABELA 9).





## 6.1.1.2. Identificação estrutural de XL2

A substância **XL2** (7,0 mg) apresentou-se como sólido marrom, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20} = +12,9^\circ$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 29) e <sup>13</sup>C (FIGURA 30), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 31 e FIGURA 32) de **XL2** evidenciou características comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL1**, diferenciando de **XL1** pela ausência do sinal em  $\delta$  2,56 (3H, *s*) referente aos hidrogênios do grupo metila ligado ao nitrogênio. Na região dos hidrogênios aromáticos verificou-se a presença de cinco sinais com integração para 5 hidrogênios aromáticos sendo quatro em  $\delta$  8,07 (1H, *dm*, *J* = 7,9 Hz),  $\delta$  7,23 (2H, *m*) e  $\delta$  7,31 (1H, *m*) típicos dos hidrogênios aromáticos H-11, H-8/H-9 e H-10, respectivamente do anel D não substituído do sistema aporfínico, e um em  $\delta$  6,57 (1H, *s*), característico de H-3 do anel A do sistema aporfínico dissubstituído (FIGURA 29, TABELA 10).



**FIGURA 29** – Espectro de RMN de  ${}^{1}$ H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **XL2**.

Pela análise do espectro de <sup>13</sup>C (FIGURA 30) e dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 31 e FIGURA 32) de **XL2** observou-se a presença de 17 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  147,2 e  $\delta$  107,8, quatro metilênicos sendo três em  $\delta$  42,9,  $\delta$  36,3 e  $\delta$  28,5 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um em  $\delta$  100,8 típico de grupo metilenodióxi (O-CH<sub>2</sub>-O) e um metínico em  $\delta$  53,3 típico de C-6a (FIGURA 33, TABELA 10).


**FIGURA 30** – Espectro de RMN de  ${}^{13}$ C (150 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de **XL2**.

FIGURA 31 – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 600 MHz; <sup>13</sup>C: 150 MHz; CDCl<sub>3</sub>) de XL2.





FIGURA 32 – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 600 MHz; <sup>13</sup>C: 150 MHz; CDCl<sub>3</sub>) de XL2.

FIGURA 33 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL2.



Posição		XL2		Anonaina	
5	$^{1}\mathrm{H}$	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC	$^{1}\mathrm{H}$	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{c}$
	$\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz) <sup><i>a</i></sup>		$(^{1}\text{H-}^{13}\text{C})^{a,c}$	$\delta$ (mult., J em Hz) <sup>c</sup>	
1		142,7, C			142,5
1a		116,3, C			116,1
2		147,2, C			146,9
3	6,57 (1H, <i>s</i> )	107,8, CH	1, 2, 3b e 4	6,56 (1H, <i>s</i> )	107,8
<b>3</b> a		126,1, C			126,3
3b		126,7, C			127,3
4	2,69 (1H, <i>m</i> )	$28,5, CH_2$	3 e 3b	2,67 (1H, <i>m</i> )	28,8
	3,00 (1H, <i>m</i> )		5	3,03 (1H, <i>m</i> )	
5	3,45 (1H, <i>m</i> )	42,9, CH <sub>2</sub>	3a, 4 e 6a	3,42 (1H, <i>m</i> )	43,0
	3,00 (1H, <i>m</i> )		3a, 4 e 6a	3,03 (1H, <i>m</i> )	
6a	4,03 (1H, <i>dd</i> , 14,0 e 4,5)	53,3, CH	3a, 5, 7 e 7a	4,00 (1H, <i>dd</i> , 14,1 e 4,7)	53,2
7	2,84 (1H, <i>m</i> )	36,3, CH <sub>2</sub>	3b, 7a e 11a	2,84 (1H, pst, 14,0)	36,6
	2,95 (1H, <i>dd</i> , 15,2 e 5,1)		3b, 7a e 11a	2,97 (1H, <i>dd</i> , 14,2 e 4,8)	
7a		134,6, C			134,8
8	7,23 (1H, <i>m</i> )	128,2, CH	7, 10 e 11a	7,23 (1H, <i>pst</i> , 7,9 e 0,7)	128,1
9	7,23 (1H, <i>m</i> )	127,7, CH	7a e 11	7,23 (1H, <i>pst</i> , 7,7 e 7,4)	127,5
10	7,31 (1H, <i>m</i> )	127,2, CH	8 e 11a	7,31 (1H, <i>dt</i> , 8,2 e 1,2)	127,0
11	8,07 (1H, <i>dm</i> , 7,9)	127,1, CH	1a, 7a e 9	8,07 (1H, <i>d</i> , 8,1)	127,0
11a		131,0, C			131,0
(1,2)-	6,08 (1H, <i>d</i> , 1,4)	100,8, CH <sub>2</sub>	1 e 2	6,08 (1H, <i>d</i> , 1,2)	100,7
0 <u>C</u> H <sub>2</sub> O	5,94 (1H, <i>d</i> , 1,4)		1 e 2	5,93 (1H, <i>d</i> , 1,2)	

**TABELA 10** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **XL2** 

<sup>*a*</sup>Experimento a 600 MHz para <sup>1</sup>H e 150 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub>, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>ORTIZ et al., 2007 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, <sup>13</sup>C: 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 34), utilizando a técnica de ionização por eletrospray operando no modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 266,08 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>NO<sub>2</sub> (calculado 265,31 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

#### FIGURA 34 – Espectro de massas de XL2.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL2** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-anonaina (FIGURA 35, TABELA 10).

FIGURA 35 – Estrutura da (S)-anonaina.



## 6.1.1.3. Identificação estrutural de XL4

A substância **XL4** (1,5 mg) apresentou-se como sólido marrom, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20}$  = +16,9° (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 36 e FIGURA 37), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 38 e FIGURA 39) de **XL4** evidenciou características comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL1**, diferenciando desta, pela ausência dos dois sinais referentes aos hidrogênios do grupo metilenodióxi e a presença de dois sinais na forma de simpletos em  $\delta$  3,65 (3H, *s*) e 3,89 (3H, *s*) correlacionados

aos carbonos em  $\delta$  60,2 (1-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta$  55,7 (2-OCH<sub>3</sub>) no mapa de correlação HSQC (FIGURA 38) característicos de grupos metoxílicos substituídos no anel A do sistema aporfínico.



**FIGURA 36** – Espectro de RMN de  ${}^{1}$ H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL4**.



**FIGURA 37** – Ampliação da região alifática  $\delta$  3,95-2,60 do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL4**.

Além disso, **XL4** se diferencia de **XL1** pela ausência de dois sinais de hidrogênios aromáticos substituídos por dois simpletos, integrando para 3H cada, em  $\delta$  3,90 e  $\delta$  3,93 característicos de grupos metoxílicos substituídos em um anel aromático. A comparação direta com os dados de **XL1** indicam dois grupos metoxílicos presentes no anel D de **XL4**. A presença de dois simpletos em  $\delta$  6,78 (H-8) e 8,08 (H-11) integrando para 1H cada, indicou que eles estão em posição *para*, entre si, sugerindo que os dois grupos metoxílicos estão em posição *orto* entre si. A correta substituição dos grupos metoxílicos no anel D foi estabelecida de acordo com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 38 e FIGURA 39).



**FIGURA 38** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL4**.

**FIGURA 39** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL4**.



O sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,08 (1H, *s*, H-11) apresentou correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  148,1 (C-9) portador do grupo metoxílico  $\delta$  3,93 (carbono  $\delta$  52,9) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, enquanto que o sinal em  $\delta$  6,79 (1H, *s*, H-8) mostrou correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono <sup>1</sup>H em  $\delta$  147,6 (C-10) portador do grupo metoxílico em  $\delta$  3,90 (carbono  $\delta$  55,9) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, estabelecendo assim os grupos metoxílicos substituídos em C-9 e C-10, respectivamente (FIGURA 40).





Pela análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 38 e FIGURA 39) de **XL4** observou-se a presença de 21 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  152,3 e 110,4, três metilênicos em  $\delta$  52,8, 33,7 e 28,1 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  62,2 típico de C-6a, quatro metoxílicos em  $\delta$  60,2, 55,9, 55,9 e 55,7 e um em  $\delta$  42,9 típico de metila ligada a nitrogênio (*N*-CH<sub>3</sub>) (TABELA 11).

Posição	XL4			Glaucina		
3	<sup>1</sup> Η δ	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC	<sup>1</sup> Η δ	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{e}$	
	$($ mult., $J $ em $Hz)^{a}$		$(^{1}\text{H-}^{13}\text{C})^{a,c}$	$($ mult., $J $ em Hz $)^{d}$		
1		144,9, C			145,2	
1a		127,1, C			127,7	
2		152,3, C			153,6	
3	6,59 (1H, <i>s</i> )	110,4, CH	1, 2, 3a, 3b e 4	6,59 (1H, s)	110,2	
<b>3</b> a		125,5, C			120,2	
3b		125,4, C			129,8	
4	2,72 (1H, <i>m</i> )	28,1, CH <sub>2</sub>		3,25 (2H, <i>m</i> )	26,1	
	3,26 (1H, <i>m</i> )					
5	3,19 (1H, <i>m</i> )	52,8, CH <sub>2</sub>		2,95 (2H, <i>m</i> )	52,8	
	2,68 (1H, <i>m</i> )					
6a	3,22 (1H, <i>m</i> )	62,2, CH	5 e 6a	2,50 (1H, <i>m</i> )	63,0	
7	2,73 (1H, <i>m</i> )	33,7, CH <sub>2</sub>		2,71 (2H, <i>m</i> )	31,8	
	3,04 (1H, <i>dd</i> , 13,7 e		8 e 11a			
_	3,6)					
7a		128,4, C			123,7	
8	6,78 (1H, <i>s</i> )	110,9, CH	7, 9, 10 e 11a	6,78 (1H, <i>s</i> )	110,8	
9		148,1, C			148,7	
10		147,6, C			148,0	
11	8,08 (1H, s)	111,6, CH	1a, 7a, 9, 10 e	8,09 (1H, <i>s</i> )	111,6	
			11a			
<b>11a</b>		124,2, C			125,8	
1-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,65 (3H, s)	60,2, CH <sub>3</sub>	1	3,65 (3H, s)	60,2	
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,89 (3H, s)	55,7 CH <sub>3</sub>	2	3,89 (3H, <i>s</i> )	55,8	
9-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,93 (3H, s)	55,9, CH <sub>3</sub>	9	3,93 (3H, s)	55,9	
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,90 (3H, s)	55,9, CH <sub>3</sub>	10	3,90 (3H, <i>s</i> )	55,9	
<i>N</i> - <u>С</u> H <sub>3</sub>	2,66 (3H, s)	42,9, CH <sub>3</sub>	5 e 6a	2,57 (3H, s)	42,3	

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Atomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. <sup>*d*</sup>COMINS et al., 1997 (<sup>1</sup>H: 300 MHz). <sup>*e*</sup>Da SILVA et al., 2013 (<sup>13</sup>C: 150 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 41), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 356,33 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 355,17 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 41 – Espectro de massas de XL4.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H, HSQC, HMBC, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL4** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-glaucina (FIGURA 42, TABELA 11).





### 6.1.1.4. Identificação estrutural de XL5

A substância **XL5** (13,9 mg) apresentou-se como sólido amarelo, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20} = +42,9^\circ$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 43 e FIGURA 44), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 45 e FIGURA 46) de **XL5** evidenciou sinais característicos comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL1**, diferenciando desta, pela ausência de um sinal de hidrogênio aromático e o surgimento de um simpleto em  $\delta$  3,84 (3H) característico de grupo metoxílico, além da ausência do sinal do grupo metila ligado ao nitrogênio que deveria aparecer entre  $\delta$  2,40-2,60. A comparação direta com os dados de **XL1** indica a presença de um grupo metoxila presente no anel D de **XL5**. A presença deste grupo foi evidenciada pelos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  8,01 (1H, *d*, *J* = 8,6, H-11),  $\delta$  6,81 (1H, *dd*, *J* = 2,7 e 0,7, H-8) e  $\delta$  6,86 (1H, *ddd*, *J* = 8,6, 2,7 e 0,7, H-10) correlacionados aos carbonos  $\delta$  128,6,  $\delta$  113,7 e  $\delta$  112,5 no mapa de correlação HSQC, atribuídos respectivamente a H-11/C-11, H-8/C-8 e H-10/C-10, indicando uma substituição no C-9 do anel D (TABELA 12).





**FIGURA 44** – Ampliação da região aromática do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL5** mostrando os sinais dos hidrogênios H-10, H-8 e H-3.



A correta substituição do grupo metoxílico no anel D foi estabelecida de acordo com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 45 e FIGURA 46). O sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,01 (H-11) apresentou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  159,1 (C-9) portador do grupo metoxílico em  $\delta$  3,84 (carbono  $\delta$  55,4, HSQC) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H. O sinal em  $\delta$  6,81 (H-8) mostrou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono C-7 ( $\delta$  36,5) e a <sup>2</sup>J com C-9 ( $\delta$  159,1), e o sinal de H-10 ( $\delta$  6,86) evidenciou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal de C-8 ( $\delta$ 113,7) e a <sup>2</sup>J com C-9 ( $\delta$  159,1), confirmando assim a substituição em C-9 (FIGURA 47).

**FIGURA 45** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL5**.





**FIGURA 46** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3 + gotas de CD_3OD$ ) de **XL5**.

FIGURA 47 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL5.



Pela análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 48) e dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 45 e FIGURA 46) de **XL5** observou-se a presença de 18 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  147,3 e 107,1, quatro metilênicos sendo um em  $\delta$  100,8, característico de grupo metilenodióxi substituído em C-1/C2, e três em  $\delta$  42,9, 36,5 e 28,3 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  53,3, típico de C-6a e um metoxílico em  $\delta$  55,4. A ausência do sinal do carbono relativo à metila ligada ao nitrogênio (TABELA 12) também foi verificada no espectro de RMN de <sup>13</sup>C, estando de acordo com as informações obtidas no espectro de RMN de <sup>1</sup>H.



**FIGURA 48** – Espectro de RMN de  $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL5**.

**TABELA 12** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **XL5** 

Posição	XL5		Xylopina		
	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup><i>a</i></sup>	$^{13}\mathrm{C}~(\delta)^{a,b}$	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>c</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{c}$	
1		142,2, C		144,2	
<b>1</b> a		116,3, C		117,3	
2		147,3, C		144,9	
3	6,54 (1H, <i>s</i> )	107,1, CH	6,67 (1H, <i>s</i> )	107,8	
<b>3</b> a		125,7, C		125,3	
3b		125,9, C		121,2	
4	2,71 (1H, <i>m</i> )	28,3, CH <sub>2</sub>	2,99 (1H, <i>m</i> )	26,4	
	3,03 (1H, <i>m</i> )		*		
5	3,40 (1H, <i>m</i> )	42,9, CH <sub>2</sub>	3,69 (1H, <i>m</i> )	42,8	
	3,02 (1H, <i>m</i> )		3,20 (1H, <i>m</i> )		
6a	4,00 (1H, <i>dd</i> , 14,1 e 5,0)	53,3, CH	4,38 (1H, dd, 14,2 e 5,0)	54,2	
7	2,81 (1H, <i>t</i> , 14,1)	36,5, CH <sub>2</sub>	*	34,6	
	2,95 (1H, <i>dd</i> , 14,1 e 5,0)		3,10 (1H, <i>dd</i> , 5,0)		
7a		136,2, C		139,9	
8	6,81 (1H, <i>dd</i> , 2,7 e 0,7)	113,7, CH	6,92 (1H, <i>s</i> )	114,8	
9		159,1, C		161,0	
10	6,86 (1H, <i>ddd</i> , 8,6, 2,7 e 0,7)	112,5, CH	6,94 (1H, <i>d</i> , 7,0)	114,1	
11	8,01 (1H, <i>d</i> , 8,6)	128,6, CH	8,05 (1H, <i>d</i> , 7,0)	129,9	
11a		133,8, C		124,1	
9-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,84 (3H, <i>s</i> )	55,4, CH <sub>3</sub>	3,83 (3H, <i>s</i> )	55,9	
(1,2)-O <u>C</u> H <sub>2</sub> O	5,94 (1H, <i>d</i> , 1,4)	100,8, CH <sub>2</sub>	5,99 (1H, <i>d</i> , 1,0)	102,7	
	6,08 (1H, <i>d</i> , 1,4)		6,13 (1H, <i>d</i> , 1,0)		

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Da SILVA et al., 2009b (<sup>1</sup>H: 200 MHz; <sup>13</sup>C: 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm. \*Valores não descritos no artigo.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 49), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 296,25 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>3</sub> (calculado 295,12 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.





Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL5** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-**xylopina** (FIGURA 50, TABELA 12).





### 6.1.1.5. Identificação estrutural de XL7

A substância **XL7** (8,2 mg) apresentou-se como sólido marrom, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20}$  = +181,7° (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 51), juntamente com os mapas de correlação HSQC (FIGURA 52) e HMBC (FIGURA 53) de **XL7** evidenciou sinais característicos comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL4**, diferenciando desta, pela ausência do sinal do grupo metila ligado ao nitrogênio.

**FIGURA 51** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL7**.



**FIGURA 52** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL7**.





**FIGURA 53** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3 + gotas de CD_3OD$ ) de **XL7**.

Assim como observado em **XL4**, foi possível evidenciar a presença de dois sinais na forma de simpletos em  $\delta$  3,66 (3H, *s*) e  $\delta$  3,89 (3H, *s*) correlacionados aos carbonos em  $\delta$  60,3 e  $\delta$  55,9 no mapa de correlação HSQC (FIGURA 54) característicos de grupos metoxílicos substituídos no anel A do sistema aporfínico. Também foi possível evidenciar a presença de dois simpletos em  $\delta$  3,90 (3H) e  $\delta$  3,91 (3H) correlacionados aos carbonos em  $\delta$  55,9 e  $\delta$  55,9 no mapa de correlação HSQC (FIGURA 54) sugerindo a presença de dois grupos metoxilícos no anel D do sistema aporfínico.

**FIGURA 54** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL7** mostrando os sinais dos hidrogênios e carbonos dos grupos metoxilas.



Além disso, a presença de dois simpletos em  $\delta$  6,76 (H-8) e  $\delta$  8,11 (H-11) indica que os mesmos estão em posição *para*, sugerindo que os dois grupos metoxílicos estão em posição *orto* no anel D do sistema aporfínico. A correta substituição desses grupos foi

estabelecida de acordo com os mapas de correlação HSQC (FIGURA 52) e HMBC (FIGURA 53). O sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,11 (1H, s, H-11) apresentou correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  148,2, portador do grupo metoxílico em  $\delta$  3,91 (carbono  $\delta$  55,9) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, enquanto que o sinal em  $\delta$  6,76 (1H, s, H-8) mostrou correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  147,6, portador do grupo metoxílico  $\delta$  3,90 (carbono  $\delta$  55,9) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, estabelecendo assim os grupos metoxílicos substituídos em C-9 e C-10, respectivamente (FIGURA 55).





Pela análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 56 ) e dos mapas de correlação HSQC (FIGURA 52) e HMBC (FIGURA 53) de **XL7** observou-se a presença de 20 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  152,4 e 110,9 três metilênicos em  $\delta$  42,8, 36,3 e 28,5 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  53,6 típico de C-6a, quatro metoxílicos em  $\delta$  60,3 e três em  $\delta$  55,9 com estes dados podemos confirmar a estrutura proposta pela ausência do sinal relativo ao carbono do grupo metila ligado a nitrogênio (*N*-CH<sub>3</sub>) (TABELA 13).



**FIGURA 56** – Espectro de RMN de  $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL7**.

**TABELA 13** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **XL7** 

Posição	XL7			Norglaucina
	$^{1}\mathrm{H}$	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC	$^{1}\mathrm{H}$
	$\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>		$(^{1}\text{H-}^{13}\text{C})^{a,c}$	$\delta$ (mult., J em Hz) <sup>d</sup>
1		144,6, C		
1a		126,7, C		
2		152,4, C		
3	6,61 (1H, <i>s</i> )	110,9, CH	1, 3b e 4	6,58 (1H, <i>s</i> )
<b>3</b> a		128,5, C		
3b		126,8, C		
4	3,06 (1H, <i>m</i> )	$28,5, CH_2$		
	2,73 (1H, <i>m</i> )			
5	3,45 (1H, <i>m</i> )	42,8, CH <sub>2</sub>	4, 3a e 6a	
	2,06 (1H, <i>m</i> )		4	
6a	3,90 (1H, sobreposto)	53,6, CH		3,81 (1H, <i>dd</i> , 13,9 e 4,2)
7	2,86 (1H, <i>m</i> )	36,3, CH <sub>2</sub>	3b, 6a, 7a, 8 e 11a	
	2,79 (1H, <i>m</i> )		3b, 6a, 7a e 8	
7a		128,6, C		
8	6,76 (1H, <i>s</i> )	110,9, CH	7, 9, 10 e 11a	6,73 (1H, <i>s</i> )
9		148,2, C		
10		147,6, C		
11	8,11 (1H, <i>s</i> )	111,8, CH	1a, 7a, 9, 10 e 11a	8,09 (1H, <i>s</i> )
11a		124,5, C		
1-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,66 (3H, s)	60,3, CH <sub>3</sub>	1	3,65 (3H, <i>s</i> )
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,89 (3H, s)	55,9 CH <sub>3</sub>	2	3,86 (3H, <i>s</i> )
9-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,91 (3H, s)	55,9, CH <sub>3</sub>	9	3,90 (3H, <i>s</i> )
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,90 (3H, <i>s</i> )	55,9, CH <sub>3</sub>	10	3,88 (3H, <i>s</i> )

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Atomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. <sup>*d*</sup>CHIOU et al., 2013 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 57), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 342,31Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 341,16 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 57 – Espectro de massas de XL7.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL7** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-norglaucina (FIGURA 58, TABELA 13).

FIGURA 58 – Estrutura da (S)-norglaucina.



# 6.1.1.6. Identificação estrutural de XL9

A substância **XL9** (0,7 mg) apresentou-se como sólido marrom e teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 59) de **XL9** evidenciou sinais característicos comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL2**. Assim como em

**XL2**, verificou-se em **XL9** na região dos hidrogênios aromáticos a presença de cinco sinais com integração para um hidrogênio cada, sendo quatro em  $\delta$  8,32 (1H, *dd*, *J* = 8,0 e 0,6 Hz), 7,24 (2H, *m*) e 7,31 (1H, *m*) típicos dos hidrogênios aromáticos H-11, H-9/H-10 e H-8, respectivamente do anel D não substituído do sistema aporfínico, e um em  $\delta$  6,68 (1H, *s*), característico de H-3 do anel A do sistema aporfínico dissubstituído (FIGURA 59, TABELA 14).



FIGURA 59 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de XL9.

A amostra **XL9** diferencia-se de **XL2**, pela ausência dos sinais característicos do grupo metilenodióxi. No entanto, observou-se a presença de um sinal em  $\delta$  3,60 (3H, *s*) característico de grupo metoxílico, nos fazendo sugerir que temos uma estrutura em que o anel A é dissubstituído, sendo o outro provável substituinte oxigenado, um grupo hidroxila, o qual foi confirmado com base nos dados da literatura.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 60), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 268,23 Daltons compatível

com a fórmula molecular  $C_{17}H_{17}NO_2$  (calculado 267,17 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.



FIGURA 60 – Espectro de massas de XL9.

Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e EM bem como comparação com os dados da literatura permitiu-nos concluir que a substância **XL9** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* **asimilobina** (FIGURA 61, TABELA 14).

FIGURA 61 – Estrutura da asimilobina.



Posição	XL9	Asimilobina		
	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>b</sup>		
3	6,68 (1H, <i>s</i> )	6,69 (1H, <i>s</i> )		
4	2,68 (1H, <i>m</i> )	2,90-3,00 (4H, <i>m</i> )		
	2,95 (1H, <i>m</i> )			
5	3,34 (1H, <i>m</i> )	2,90-3,00 (4H, <i>m</i> )		
	2,92 (1H, <i>m</i> )			
6a	3,81 (1H, <i>dd</i> , 13,8 e 4,6)	3,83 (1H, <i>dd</i> , 13,0 e 5,4)		
7	2,76 (1H, <i>dd</i> , 13,8)	2,69 (1H, <i>t</i> , 13,0)		
	2,86 (1H, dd, 13,8 e 4,6)	2,86 (1H, dd, 13,0 e 5,4)		
8	7,31 (1H, <i>ddd</i> , 6,7, 2,0 e 0,5)			
9	7,24 (1H, <i>m</i> )	7,20-7,34 (3H, <i>m</i> )		
10	7,24 (1H, <i>m</i> )			
11	8,32 (1H, dd, 8,1 e 0,6)	8,29 (1H, <i>d</i> , 7,5)		
<b>1-OCH</b> <sub>3</sub>	3.60(3H, s)	3.59 (3H. s)		

**TABELA 14** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H de **XL9** 

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>CHANG et al., 2000 (<sup>1</sup>H: 400 MHz, CDCl<sub>3</sub>). ( $\delta$ ) Deslocamentos em ppm.

### 6.1.1.7. Identificação estrutural de XL10

A substância **XL10** (4,3 mg) apresentou-se como sólido marrom, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20} = +91,2^\circ$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 62), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 63 e FIGURA 64) de **XL10** evidenciou sinais característicos comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL7**, diferenciando deste, pela ausência do sinal de H-3, o qual foi substituído, provavelmente, por um grupo metoxílico, cujo sinal foi observado em  $\delta$  3,91 (3H, *s*, 3-OCH<sub>3</sub>).



**FIGURA 62** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL10**.

**FIGURA 63** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3 + gotas de CD_3OD$ ) de **XL10**.





**FIGURA 64** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3 + gotas de CD_3OD$ ) de **XL10**.

A presença do grupo metoxílico substituído em C-3 foi confirmada pela correlação a  ${}^{3}J$  do sinal dos hidrogênios metilênicos em  $\delta$  2,83 (2H, *m*, H-4) com o sinal do carbono em  $\delta$  150,1, portador do grupo metoxílico em  $\delta$  3,91 (3H, *s*, 3-OCH<sub>3</sub>) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e  $\delta$  60,5 no espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 65, TABELA 15).

FIGURA 65 – Espectro de RMN de  $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de XL10.



Assim como observado em **XL7**, foi possível evidenciar a presença de dois simpletos em  $\delta$  3,73 (3H, *s*) e 3,96 (3H, *s*) correlacionados aos carbonos em  $\delta$  60,7 e 61,1 no mapa de correlação HSQC (FIGURA 63) característicos de grupos metoxílicos substituídos nos

carbonos 1 e 2 no anel A do sistema aporfínico. Também foi possível evidenciar a presença de um simpleto em  $\delta$  3,92 (6H) correlacionado aos carbonos em  $\delta$  55,9 e  $\delta$  56,1 no mapa de correlação HSQC (FIGURA 63) sugerindo a presença de dois grupos metoxilícos no anel D do sistema aporfínico.

Além disso, verificou-se a presença de dois simpletos em  $\delta$  6,78 e 7,97 indicando que os mesmo estão em posição *para* entre si, sugerindo que os dois grupos metoxílicos estão em posição *orto* no anel D do sistema aporfínico. A correta substituição destes grupos foi estabelecida de acordo com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 63 e FIGURA 64). O sinal do hidrogênio em  $\delta$  7,97 (1H, *s*, H-11) apresentou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  147,6, portador do grupo metoxílico em  $\delta$  3,92 (carbono  $\delta$  55,9) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, enquanto que o sinal em  $\delta$  6,78 (1H, *s*, H-8) mostrou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  147,6 portador do grupo metoxílico  $\delta$  3,92 (carbono  $\delta$  56,1) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, estabelecendo assim os grupos metoxílicos substituídos em C-9 e C-10, respectivamente (FIGURA 66).

FIGURA 66 - Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL10.



Através da análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 63 e FIGURA 64) e RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 65) de **XL10** observou-se a presença de 21 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  150,1 e 111,0, três metilênicos em  $\delta$  42,4, 36,1 e 23,2 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  53,9, típico de C-6a, cinco metoxílicos em  $\delta$  61,1, 60,7, 60,5, 56,1 e 55,9 (TABELA 15).

Posição		XL10		Norpurp	oureina
-	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup><i>a</i>,<i>c</i></sup>	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>d</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{e}$
1		149,5, C			149,9
<b>1</b> a		122,6, C			122,1
2		145,7, C			145,3
3		150,1, C			149,9
<b>3</b> a		122,8, C			122,8
3b		130,5, C			130,6
4	2,83 (2H, <i>m</i> )	23,2, CH <sub>2</sub>	3, 3a, 3b e 5		25,7
5	3,41 (1H, <i>m</i> )	42,4, CH <sub>2</sub>	3a, 4 e 6a		36,4
(	2,94 (1H, m)	52.0 CH	4		
6a	3,83 (1H, <i>m</i> )	53,9, CH			22.0
7	2.70(111)	$36,1, CH_2$	$2h$ $C_{2}$ = $7a$		33,8
	2,70(1H,m)		30, 0a e / a		
7	2,78(1H,m)	129.2 C	50, 0a, 7a e 8		100.1
/a	6 79 (1H s)	120,2, C	7 0 110	671(111  s)	120,1
0	0,78 (111, 5)	147.6 С	/ e 11a	$0,74(1\Pi,3)$	147.5
<del>9</del> 10		147,0, C			147,3
10	7 07 (1H s)	147,0, C	12 72 0	708(1H s)	147,3
119	7,77 (111, 3)	124.5 C	14, 74 0 9	7,70 (111, 3)	124.4
1.0CH	3 73 (3H s)	60 7 CH <sub>2</sub>	1	3.72 (3H s)	60.5
2.0CH	3.96 (3H, s)	61 1 CH <sub>2</sub>	2	3 94 (3H s)	61.9
3-OCH <sub>2</sub>	3.91 (3H, s)	60.5. CH <sub>2</sub>	3	3.90 (3H, s)	60.3
9-OCH	3.92 (3H, s)	55.9. CH <sub>2</sub>	9	3.90 (3H, s)	54.0
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,92 (3H, s)	56,1, CH <sub>3</sub>	10	3,90 (3H, <i>s</i> )	56,0

TABELA 15 – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C XL10

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. <sup>*d*</sup>SONNET & JACOBSON, 1971. <sup>*e*</sup>STERMITZ & CASTRO, 1983 (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 67), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 372,37 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>5</sub> (calculado 371,17 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.





Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL10** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-norpurpureina (FIGURA 68, TABELA 15).





# 6.1.1.8. Identificação estrutural de XL11

A substância **XL11** (5,4 mg) apresentou-se como sólido marrom, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20}$  = +28,3° (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 69), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 70 e FIGURA 71) evidenciou sinais característicos

comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL4**, diferenciando desta, pela ausência de um grupo metoxílico.



**FIGURA 69** – Espectro de RMN de  $^{1}$ H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL11**.

ppm (t1)

**FIGURA 70** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL11** mostrando os sinais dos hidrogênios dos grupos metoxilas.





**FIGURA 71** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3 + gotas de CD_3OD$ ) de **XL11**.

No entanto, a presença de um grupo hidroxila na molécula foi evidenciada com base na análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 72) com o sinal de carbono em  $\delta$  145,3, típico de carbono aromático oxigenado que não apresentou correlação com os hidrogênios dos grupos metoxílicos presentes.

**FIGURA 72** – Ampliação da região dos sinais dos hidrogênios dos grupos metoxílicos no mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL11**.



Através da análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 73) e dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 71 e FIGURA 72) de **XL11** observou-se a presença de 20 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  152,3 e 110,5, três metilênicos em  $\delta$  53,3, 33,8 e 28,7 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  62,8, típico de C-6a, três metoxílicos em  $\delta$  60,2, 56,2 e 56,0 e um em  $\delta$  43,6, típico de metila ligada a nitrogênio (*N*-CH<sub>3</sub>) (TABELA 16).



FIGURA 73 – Espectro de RMN de  $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de XL11.

Determinou-se a correta posição dos grupos metoxilas e hidroxila com base na análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 71). O sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,03 (1H, *s*, H-11) mostrou uma correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  145,3 (C-9) portador do grupo hidroxila, enquanto que o sinal em  $\delta$  6,78 (1H, *s*, H-8) mostrou uma correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  146,1 (C-10), portador do grupo metoxila, definindo assim a metoxila em C-10 e a hidroxila em C-9 no anel D do sistema aporfínico (FIGURA 74).

Além disso, foi possível verificar no mapa de correlação HMBC (FIGURA 71) que todos os hidrogênios dos grupos metoxílicos correlacionaram com os carbonos do anel aromático onde estão ligados.

FIGURA 74 – Principais correlações observadas no mapa de correlação HMBC de XL11.



Posição	XL11					
	<sup>1</sup> H δ (mult., $J$ em Hz) <sup><i>a</i></sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC $(^{1}\text{H-}^{13}\text{C})^{a,c}$			
1		144,3, C				
<b>1</b> a		127,4, C				
2		152,3, C				
3	6,59 (1H, <i>s</i> )	110,5, CH	1, 2, 3b e 4			
<b>3</b> a		128,7, C				
3b		126,5, C				
4	2,70 (1H, <i>dd</i> , 16,3 e 3,6)	28,7, CH <sub>2</sub>	3a			
	3,15 (1H, <i>m</i> )		5			
5	3,06 (1H, <i>m</i> )	53,3, CH <sub>2</sub>	3a, 4 e 6a			
	2,55 (1H, <i>m</i> )		3b e 4			
6a	3,07 (1H, <i>d</i> , 13,6)	62,6, CH	3a			
7	2,54 (1H, sobreposto)	33,8, CH <sub>2</sub>	7a			
	2,97 (1H, <i>dd</i> , 13,6 e 4,0)		3b, 6a, 7a, 8 e 11a			
7a		129,6, C				
8	6,78 (1H, <i>s</i> )	114,5, CH	7, 10 e 11a			
9		145,3, C				
10		146,1, C				
11	8,03 (1H, <i>s</i> )	111,9, CH	1a, 7a e 9			
11a		123,7, C				
1-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,64 (3H, <i>s</i> )	60,2, CH <sub>3</sub>	1			
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,88 (3H, <i>s</i> )	56,0 CH <sub>3</sub>	2			
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,89 (3H, <i>s</i> )	56,2, CH <sub>3</sub>	10			
<i>N</i> - <u>C</u> H <sub>3</sub>	2,54 (3H, <i>s</i> )	43,6, CH <sub>3</sub>	5 e 6a			

**TABELA 16** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **XL11** 

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 75), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 342,31 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 341,16 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 75 – Espectro de massas de XL11.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL11** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-*N*-**metillaurotetanina** (FIGURA 76, TABELA 16).





# 6.1.1.9. Identificação estrutural de XL12

A substância **XL12** (8,5 mg) apresentou-se como sólido marrom, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20}$  = +81,4° (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 77), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 78, FIGURA 79 e FIGURA 80) de **XL12** evidenciou sinais característicos comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL7**, diferenciando desta, pela ausência de um sinal típico de grupo metoxílico. A comparação direta com os dados de **XL7** indica a presença, provavelmente, de um grupo hidroxila presente no anel A de **XL12**.



FIGURA 77 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  $CD_3OD$  + gotas de  $CDCl_3$ ) de XL12.

A correta substituição dos grupos metoxila e hidroxila no anel A foi estabelecida de acordo com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 78, FIGURA 79 e FIGURA 80). O sinal do hidrogênio em  $\delta$  6,66 (1H, *s*, H-3) apresentou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  144,8, portador do grupo metoxílico em  $\delta$  3,62 (carbono  $\delta$  60,3) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H e a <sup>2</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  151,6, o qual não apresentou nenhuma correlação com grupos metoxílicos, sendo atribuído a este a substituição por um grupo hidroxila, estabelecendo assim os grupos metoxila e hidroxila substituídos em C-1 e C-2, respectivamente (FIGURA 81).





**FIGURA 79** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CD<sub>3</sub>OD + gotas de CDCl<sub>3</sub>) de **XL12**.



**FIGURA 80** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CD<sub>3</sub>OD + gotas de CDCl<sub>3</sub>) de **XL12** mostrando o hidrogênio aromáticos H-11, H-8 e H-3.



FIGURA 81 – Principais correlações observadas no mapa de correlação HMBC de XL12.



Pela análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 82) e dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 78, FIGURA 79 e FIGURA 80) de **XL12** observou-se a presença de 19 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  151,6 e 112,1, três metilênicos em  $\delta$  42,8, 34,9 e 26,7 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  54,3, típico de C-6a e três metoxílicos em  $\delta$  60,3, 56,5 e 56,3 (TABELA 17).



FIGURA 82 – Espectro de RMN de <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD + gotas de CDCl<sub>3</sub>) de XL12.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 83), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com *m/z* 328,09 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 327,14 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 83 – Espectro de massas de XL12.


Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL12** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-norpredicentrina (FIGURA 84, TABELA 17).

FIGURA 84 – Estrutura da (S)-norpredicentrina.



Dociaão		VI 12		Normadicontrino
1 USIÇAU	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult I om Hz) <sup><i>a</i></sup>	$\frac{\Lambda L I 2}{^{13} C (\delta)^{a,b}}$	<b>HMBC</b> $({}^{1}\mathbf{H}_{-}{}^{13}\mathbf{C})^{a,c}$	$\frac{13}{13}C(\delta)^c$
1	11 0 (muit., <i>J</i> em 112)			
1		144,8 C		143,1
la		125,5 C		128,4
2		151,6 C		152,1
3	6,66 (1H, <i>s</i> )	115,5 CH	1, 2, 3b e 4	114,1
<b>3</b> a		127,9 C		129,1
3b		122,3 C		126,7
4	3,16 (1H, <i>m</i> )	26,7 CH <sub>2</sub>		29,3
	2,86(1H, m)	, <u> </u>	3 e 3b	
5	3,59 (1H, <i>m</i> )	42,8 CH <sub>2</sub>		43,1
	3,19 (1H, <i>m</i> )			
6a	4,10 (1H, <i>d</i> , 13,8)	54,3 CH		53,7
7	3,00 (1H, <i>m</i> )	34,9 CH <sub>2</sub>	3b, 8 e 11a	36,7
	2,85 (1H, <i>m</i> )		3b, 6a e 8	
7a		127,9 C		129,9
8	6,90 (1H, <i>s</i> )	112,1 CH	7, 10 e 11a	111,5
9		149,6 C		144,3
10		149,0 C		145,5
11	8,05 (1H, <i>s</i> )	112,6 CH	1a, 7a e 9	110,9
11a		125,2 C		123,9
1-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,62 (3H, s)	60,3 CH <sub>3</sub>		60,1
9-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,90 (3H, s)	56,3 CH <sub>3</sub>		55,9
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,88 (3H, s)	56,5 CH <sub>3</sub>		56,0

TABELA 17 – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C XL12

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>RASOANAIVO et al., 1998 (<sup>13</sup>C: CDCl<sub>3</sub>, 75,5 MHz). (δ) Deslocamentos em ppm.

# 6.1.1.10. Identificação estrutural de XL14

A substância **XL14** (1,5 mg) apresentou-se como sólido amarelo, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20} = +98,0^\circ$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 85), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 86 e FIGURA 87) de **XL14** evidenciou sinais característicos comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL5**, diferenciando desta, pela ausência de um sinal de hidrogênio aromático indicando uma provável presença de um grupo hidroxila na molécula, localizado no anel D, uma vez que não observamos sinais de qualquer outro grupo que possa estar substituindo este anel.



FIGURA 85 – Espectro de RMN de  $^{1}$ H (600 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de XL14.

Através da análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 86 e FIGURA 87) de **XL14** observou-se a presença de 18 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  160,8 e  $\delta$  107,5, três metilênicos em  $\delta$  42,7, 38,2 e 28,9 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  53,5, típico de C-6a, um metoxílico em  $\delta$  55,3 e um metilênico típico de um grupo metilenodióxi em  $\delta$  100,2 (O-CH<sub>2</sub>-O). A presença de um grupo hidroxila na molécula foi confirmada pelo sinal do carbono em  $\delta$  154,9 o qual não apresentou correlação com hidrogênios de grupos metoxílicos (TABELA 18).



FIGURA 86 – Mapa de correlação HSQC ( $^{1}$ H: 600 MHz;  $^{13}$ C: 150 MHz; CDCl<sub>3</sub>) de XL14.

Determinou-se a correta posição dos grupos metoxilas e hidroxila com base na análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 87). O sinal do hidrogênio em δ 6,50 (1H, *dd*, H-10) mostrou correlação a <sup>2</sup>J com os sinais dos carbonos em  $\delta$  154,9 e 160,8 portadores dos grupos hidroxila e metoxila, respectivamente. Já o sinal do hidrogênio em  $\delta$  6,47 (1H, dd, H-8) mostrou correlação a  $^{2}J$  com o sinal do carbono em  $\delta$  160,8, portador do grupo metoxila, confirmando assim que a metoxila encontra-se em C-9 e a hidroxila em C-11 no anel D do sistema aporfínico (FIGURA 88).



FIGURA 88 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL14.



TABELA 18 – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de XL14

Posição	XL1		Calicinina	
2	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC $(^{1}\text{H-}^{13}\text{C})^{a,b}$	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{c}$
1		138,9, C		138,6
<b>1</b> a		114,0, C		113,5
2		146,0, C		145,8
3	6,61 (1H, <i>s</i> )	107,5, CH	1, 2, 3b e 4	106,4
<b>3</b> a		127,6, C		127,4
3b		128,3, C		128,2
4	2,70 (1H, <i>ddd</i> , 16,0; 4,0 e 1,1)	28,9, CH <sub>2</sub>	5	28,4
	3,07 (1H, <i>ddd</i> , 16,0; 12,3 e 5,8)		3 e 5	
5	3,41 (1H, <i>ddd</i> ,12,1; 5,8 e 1,1)	42,7, CH <sub>2</sub>	3a, 4 e 6a	41,8
	3,00 (1H, <i>ddd</i> , 12,3; 12,1 e 4,0)		3a, 4 e 6a	
6a	3,85 (1H, <i>dd</i> , 13,6 e 4,1)	53,5, CH	1a	53,1
7	2,76 (1H, <i>dddd</i> , 13,7; 13,6; 1,2 e 0,9)	38,2, CH <sub>2</sub>	3b, 6a e 7a	38,8
	2,89 (1H, <i>dd</i> , 13,7; 4,1 e 0,5)		3b, 6a e 7a	
7a		138,5, C		138,7
8	6,41 (1H, <i>ddd</i> , 2,7; 1,2 e 0,7)	107,8, CH	7, 9, 10 e 11a	106,7
9		160,8, C		160,9
10	6,50 (1H, <i>dd</i> , 2,7 e 0,9)	102,7, CH	8, 9, 11 e 11a	101,1
11		154,9, C		154,6
<b>11a</b>		110,9, C		110,7
9-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,81 (3H, <i>s</i> )	55,3, CH <sub>3</sub>	9	54,9
(1,2)-	5,96 (1H, <i>d</i> , 1,4)	100,2, CH <sub>2</sub>	1 e 2	99,9
O <u>C</u> H <sub>2</sub> O	6,09 (1H, <i>d</i> , 1,4)		1 e 2	

<sup>*a*</sup>Experimento a 600 MHz para <sup>1</sup>H e 150 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>NAVARRO et al., 2001 (<sup>13</sup>C: 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 89), utilizando a técnica de ionização por eletrospray operando no modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 312,12 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 311,12 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.





Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H, HSQC, HMBC, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL14** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-calicinina (FIGURA 90, TABELA 18).





## 6.1.1.11. Identificação estrutural de XL15

A substância **XL15** (8,2 mg) apresentou-se como sólido amarelo, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20}$  = +54,6° (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C (FIGURA 91 e FIGURA 92), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 93 e FIGURA 94) de **XL15** 

evidenciou sinais característicos comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL11**, diferenciando desta, pela ausência do sinal do grupo metila ligado ao nitrogênio.

Assim como observado em **XL11**, verificou-se em **XL15** na região dos hidrogênios aromáticos a presença de três sinais com integração para 3 hidrogênios aromáticos sendo dois em  $\delta$  8,06 (1H, s) e 6,77 (1H, s) típicos dos hidrogênios aromáticos H-11 e H-8, respectivamente do anel D dissubstituído do sistema aporfínico, e um em  $\delta$  6,61 (1H, s), característico de H-3 do anel A dissubstituído (FIGURA 91).





Pela análise do RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 92) de **XL15** observou-se a presença de 19 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  152,5 e 110,7, três metilênicos em  $\delta$  42,5, 35,7 e 28,2 característicos de C-5, C-7 e C-4, respectivamente, um metínico em  $\delta$  53,5, típico de C-6a, três metoxílicos em  $\delta$  60,2, 56,1 e 55,9 com estes dados pôde-se confirmar a estrutura proposta pela ausência do sinal relativo ao carbono do grupo metila ligado ao nitrogênio.



FIGURA 92 – Espectro de RMN de  $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de XL15.

As corretas posições dos grupos metoxilas e hidroxila foram determinadas com base na análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 94). O sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,06 (1H, *s*, H-11) mostrou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  145,4 (C-9) portador do grupo hidroxila, enquanto que o sinal do hidrogênio em  $\delta$  6,77 (1H, *s*, H-8) apresentou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  146,0 (C-10) portador do grupo metoxila, definindo assim a metoxila em C-10 e a hidroxila em C-9 no anel D do sistema aporfínico (FIGURA 95).

**FIGURA 93** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3 + \text{gotas de } CD_3OD$ ) de **XL15**.





**FIGURA 94** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL15**.

FIGURA 95 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL15.



Posição		XL15		Laurotet	anina
2	$^{1}\mathrm{H}$	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC	$^{1}\mathrm{H}$	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^d$
	$\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz) <sup><i>a</i></sup>		$(^{1}\text{H-}^{13}\text{C})^{a,c}$	$\delta$ (mult., J em Hz) <sup>d</sup>	
1		144,4, C			144,3
1a		126,9, C			126,8
2		152,5, C			152,2
3	6,61 (1H, <i>s</i> )	110,7, CH	1, 2, 3b e 4	6,69 (1H, <i>s</i> )	110,8
<b>3</b> a		128,3, C			128,9
<b>3</b> b		126,4, C			127,4
4	2,74 (1H, <i>m</i> ) 3,04 (1H, <i>m</i> )	28,2, CH <sub>2</sub>		3,02 (2H, <i>m</i> )	29,1
5	3,02 (1H, <i>m</i> ) 3,41 (1H, <i>m</i> )	42,5, CH <sub>2</sub>		3,39 (2H, <i>s</i> )	43,1
6a	3,84 (1H, <i>dd</i> , 13,7 e 4,7)	53,5, CH		3,81 (1H, <i>m</i> )	53,8
7	2,67 (1H, <i>dd</i> , 13,7 e 13,7) 2,78 (1H, <i>dd</i> , 13,7 e 4,7)	35,7, CH <sub>2</sub>		2,71 (2H, <i>m</i> )	35,6
7a		129,0, C			129,8
8	6,77 (1H, <i>s</i> )	114,3, CH	7, 10 e 11a	6,82 (1H, <i>s</i> )	113,9
9		145,4, C			145,3
10		146,0, C			145,6
11	8,06 (1H, <i>s</i> )	111,6, CH	1a, 7a, 9	8,08 (1H, s)	111,4
11a		123,6, C			124,0
1-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,66 (3H, <i>s</i> )	60,2, CH <sub>3</sub>	1	3,65 (3H, s)	60,3
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,89 (3H, s)	56,1, CH <sub>3</sub>	2	3,89 (3H, <i>s</i> )	56,1
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,90 (3H, <i>s</i> )	55,9, CH <sub>3</sub>	10	3,87 (3H, s)	55,9

**TABELA 19** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **XL15** 

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. <sup>*d*</sup>SULAIMAN, 2011 (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 96), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 328,29 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 327,14 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 96 – Espectro de massas de XL15.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura RINGDAHL et al. (1981), permitiu-nos concluir que a substância **XL15** trata-se do alcaloide aporfínico *sensu stricto* (*S*)-laurotetanina (FIGURA 97, TABELA 19).





## 6.1.2. Identificação dos Alcaloides do Tipo Oxoaporfinos

#### 6.1.2.1. Identificação estrutural de XL3

A substância **XL3** (5,0 mg) apresentou-se como sólido alaranjado e teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 98) foram observadas características de um alcaloide do tipo oxoaporfínico trisubstituído. Verificou-se a presença de seis sinais na região de hidrogênios aromáticos com integração para um hidrogênio cada, sendo três em  $\delta$  8,57 (1H, *d*, *J* = 8,9 Hz), 8,03 (1H, *d*, *J* = 2,9 Hz) e 7,30 (1H, *dd*, *J* = 8,9 e 2,9

Hz) atribuídos a H-11, H-8 e H-10, respectivamente, típicos dos hidrogênios aromáticos do anel D monossubstituído, e um em  $\delta$  7,15 (1H, *s*) típico de H-3 do anel A do sistema oxoaporfínico dissubstituído. Os dois sinais restantes observados em  $\delta$  8,89 e 7,77 ambos dupletos (J = 5,2 Hz) mostraram características de um sistema piridínico compatível com o anel B do sistema oxoaporfínico, referentes aos hidrogênios H-5 e H-4, respectivamente (FIGURA 98, TABELA 20). Observou-se ainda um simpleto em  $\delta$  6,34, com integração para dois hidrogênios típicos de grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 do anel A do sistema oxoaporfínico e a presença de um sinal em  $\delta$  3,99 (3H, *s*) típico de grupo metoxílico substituído em C-9 (TABELA 20).

**FIGURA 98** – Espectro de RMN de  ${}^{1}$ H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL3**.



A análise por espectrometria de massas (FIGURA 99), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 306,20 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>18</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 305,06 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e EM, bem como comparações com dados descritos na literatura, permitiu-nos concluir que o composto **XL3** trata-se do alcaloide oxoaporfínico **lanuginosina** (FIGURA 100, TABELA 20).

Posição	XL3	Lanuginosina
	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup><i>a</i></sup>	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>b</sup>
3	7,15 (1H, s)	7,15 (1H, <i>s</i> )
4	7,77 (1H, <i>d</i> , 5,2)	7,78 (1H, <i>d</i> , 5,2)
5	8,89 (1H, <i>d</i> , 5,2)	8,89 (1H, <i>d</i> , 5,2)
8	8,03 (1H, <i>d</i> , 2,9)	8,02 (1H, <i>d</i> , 2,9)
10	7,30 (1H, <i>dd</i> , 8,9 e 2,9)	7,31 (1H, <i>dd</i> , 8,9 e 2,9)
11	8,57 (1H, <i>d</i> , 8,9)	8,57 (1H, <i>d</i> , 8,9)
9-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,99 (3H, <i>s</i> )	3,99 (3H, s)
(1,2)-O <u>C</u> H <sub>2</sub> O	6,34 (2H, <i>s</i> )	6,35 (2H, <i>s</i> )

TABELA 20 - Dados de RMN de <sup>1</sup>H de XL3

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H em  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ , utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>COSTA, 2009 (<sup>1</sup>H: CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz). ( $\delta$ ) Deslocamentos em ppm.

FIGURA 100 – Estrutura da lanuginosina.



## 6.1.2.2. Identificação estrutural de XL6

A substância **XL6** (8,3 mg) apresentou-se como sólido marrom e teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

A análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 101), juntamente com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 102 e FIGURA 103) de **XL6** evidenciou características comuns quando comparado com os dados espectrais de **XL3**, diferenciando de **XL3**, pela ausência do sinal referente aos hidrogênios do grupo metilenodióxi sendo substituído por dois sinais na forma de simpletos em  $\delta$  4,11 (3H) e 4,03 (3H) característicos de grupos metoxílicos. Além disso, **XL6** se diferencia de **XL3** pela ausência de um sinal de hidrogênio aromático, o qual deve estar substituído por uma metoxila, pois observa-se um sinal em  $\delta$  4,08 (3H, *s*) característico de grupo metoxílico. A comparação direta com os dados de **XL3** indicam dois grupos metoxílicos presentes no anel D de **XL6**. A presença dos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  8,03 e 8,82 na forma de simpletos indica que os mesmo estão em posição *para* entre si, sugerindo que os dois grupos metoxílicos estão em posição *orto* entre si.

A correta substituição dos grupos metoxílicos no anel D foi estabelecida de acordo com os mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 102 e FIGURA 103). O sinal do hidrogênio em  $\delta$  8,82 (1H, *s*, H-11) apresentou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$ 149,5, portador do grupo metoxílico em  $\delta$  4,08 (carbono  $\delta$  56,1) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, enquanto que o sinal em  $\delta$  8,03 (1H, *s*, H-8) mostrou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  153,7, portador do grupo metoxílico  $\delta$  4,08 (carbono  $\delta$  56,1) no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, estabelecendo assim, os grupos metoxílicos substituídos em C-9 e C-10, respectivamente.



**FIGURA 101** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL6**.

Pela análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 102 e FIGURA 103), observou-se a presença de 20 carbonos sendo 15 aromáticos entre  $\delta$  156,7 e 106,2, um carbonílico em  $\delta$ 181,3 e quatro metoxílicos em  $\delta$  60,7 (1-OCH<sub>3</sub>),  $\delta$  56,2 (2-OCH<sub>3</sub>),  $\delta$  56,1 (9-OCH<sub>3</sub>) e  $\delta$  56,1 (10-OCH<sub>3</sub>) consistente com a estrutura de **XL6** (TABELA 21). O sinal do carbono carbonílico em  $\delta$ 181,3 (C-7) evidenciou a presença do esqueleto oxoaporfínico na molécula.





**FIGURA 103** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL6**.



Pelo mapa de correlação HBMC (FIGURA 104) pôde-se confirmar a presença do grupo carbonílico na molécula devido à correlação do sinal em  $\delta$  8,03 (H-8) a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$ 181,3 (C-7), bem como a correta localização do sinal de H-3 ( $\delta$  7,20) devido sua correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$ 123,6 (C-4).



**FIGURA 104** – Ampliação da região aromática no mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3 + gotas de CD_3OD$ ) de **XL6**.

Ainda pelo mapa de correlação HMBC pode-se determinar os corretos valores de C-1 e C-2 devido à correlação a  ${}^{3}J$  do sinal em  $\delta$  7,20 (H-3) com o sinal do carbono em  $\delta$ 151,0 (C-1) onde está localizado o grupo metoxílico em  $\delta$  4,03 (1-OCH<sub>3</sub>) e a  ${}^{2}J$  com o sinal do carbono em  $\delta$ 156,7 substituído pelo grupo metoxílico em  $\delta$  4,11 (2-OCH<sub>3</sub>), respectivamente (FIGURA 105, TABELA 21).

FIGURA 105 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL6.



A análise por espectrometria de massas (FIGURA 106), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 352,07 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>17</sub>NO<sub>5</sub> (calculado 351,11 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN.

FIGURA 106 – Espectro de massas de XL6.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H, HSQC, HMBC e EM bem como a comparação com os dados da literatura, permitiu-nos concluir que a substância **XL6** trata-se do alcaloide oxoaporfínico **oxoglaucina** (FIGURA 107, TABELA 21).

Posicão	XL6			Oxoglaucina		
- 05-940	<sup>1</sup> H	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC	<sup>1</sup> H	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^d$	
	$\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	0 (0)	$(^{1}\text{H-}^{13}\text{C})^{a,c}$	$\delta$ (mult., J em Hz) <sup>d</sup>	0 (0)	
1		151,0, C	. ,		151,3	
<b>1</b> a		120,0, C			118,9	
2		156,7, C			157,2	
3	7,20 (1H, s)	106,2, CH	1, 2, 3b e 4	7,15 (1H, s)	105,3	
<b>3</b> a		135,3, C			136,2	
3b		121,6, C			120,5	
4	7,78 (1H, s)	123,6, CH	3, 3b e 5	7,72 (1H, <i>d</i> , 5,2)	123,7	
5	8,91 (1H, <i>d</i> , 5,2)	145,1, CH	3a, 4 e 6a	8,86 (1H, <i>d</i> , 5,2)	145,0	
6a		145,5, C			145,6	
7		181,3, C			181,2	
7a		126,8, C			126,4	
8	8,03 (1H, s)	110,1, CH	7, 10 e 11a	7,99 (1H, s)	109,5	
9		149,5, C			148,5	
10		153,7, C			152,7	
11	8,82 (1H, <i>s</i> )	110,4, CH	1a, 7a e 9	8,76 (1H, <i>s</i> )	110,2	
11a		129,1, C			128,8	
1-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	4,03 (3H, s)	60,7, CH <sub>3</sub>	1	4,00 (3H, s)	60,5	
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	4,11 (3H, <i>s</i> )	56,2, CH <sub>3</sub>	2	4,02 (3H, <i>s</i> )	56,7	
9-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	4,08 (3H, s)	56,1, CH <sub>3</sub>	9	4,06 (3H, s)	56,7	
10-OCH <sub>3</sub>	4,08 (3H, s)	56,1, CH <sub>3</sub>	10	4,06 (3H, <i>s</i> )	56,7	

**TABELA 21** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de **XL6** 

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Atomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. <sup>*d*</sup>CHEN et al., 2012 (<sup>1</sup>H: 500 MHz; <sup>13</sup>C: 125 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

FIGURA 107 – Estrutura da oxoglaucina.



# 6.1.3. Identificação dos Alcaloides do Tipo Tetraidroproberberínicos

## 6.1.3.1. Identificação estrutural de XL8

A substância **XL8** (8,0 mg) apresentou-se como sólido amarelo e  $[\alpha]_D^{20} = -207,9^\circ$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>), teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

Através da análise preliminar dos espectros de RMN de <sup>1</sup>H (FIGURA 108) e <sup>13</sup>C (FIGURA 109) observou-se características de um alcaloide do tipo tetraidroprotoberberínico. Analisando-se o espectro de RMN de <sup>1</sup>H juntamente com o mapa de correlação HSQC (FIGURA 110) verificou-se a presença de sinais de hidrogênios diastereotópicos para quatro grupos metilênicos em  $\delta$  3,15 (1H, *m*)/ 2,67 (1H, *m*),  $\delta$  3,14 (1H, *m*)/ 2,62 (1H, *m*),  $\delta$  3,95 (1H, *d*, *J* = 14,6 Hz)/ 3,68 (1H, *d*, *J* = 14,6 Hz) e  $\delta$  3,25 (1H, *dd*, *J* = 15,8 e 3,7 Hz)/ 2,84 (1H, *dd*, *J* = 15,8 e 11,2 Hz) típicos dos hidrogênios, H-5<sub>Peq</sub>/H-5<sub>Pax</sub>, H-6<sub>Peq</sub>/H-6<sub>Pax</sub>, H-8<sub>Peq</sub>/H-8<sub>Pax</sub>, e H-13<sub>Peq</sub>/H-13<sub>Pax</sub>, correlacionados aos sinais dos carbonos em  $\delta$  29,0, 51,3, 58,2 e 36,3, respectivamente, bem como um sinal de um hidrogênio metínico em  $\delta$  3,60 (1H, *dd*, *J* = 11,2 e 3,7 Hz) correlacionado ao sinal do carbono em  $\delta$  59,5 característico de H-13a. Estes hidrogênios metilênicos juntamente com o sinal do hidrogênio metínico em  $\delta$  3,60 confirmaram o sistema tetraidroprotoberberínico da molécula (TABELA 22).





Observaram-se também quatro sinais em  $\delta$  3,89, 3,87, 3,86 e 3,85 todos simpletos com integração para três hidrogênios, típicos de grupos metoxílicos. Pelo espectro de RMN de <sup>1</sup>H observou-se ainda quatro sinais típicos de hidrogênios aromáticos situados em posição *para* de anel benzênico 1,2,4,5-tetrassubstituído, sendo dois em  $\delta$  6,66 (1H, *s*) e 6,58 (1H, *s*) típico de H-12 e H-9, e dois em  $\delta$  6,74 (1H, *s*) e 6,62 (1H, *s*) característicos de H-1 e H-4, respectivamente.

Através da análise dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 109), e mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 110 e FIGURA 111) observou-se a presença de 21 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  147,6 e 108,5, quatro metoxílicos em  $\delta$  56,0, 55,9, 55,8 e 55,8, um metínico em  $\delta$  59,5 típico de C-13a, e quatro metilênicos em  $\delta$  58,2 (C-8), 51,3 (C-6), 36,3 (C-13) e 29,0 (C-5) confirmando a presença do esqueleto tetraidroprotoberberínico estando de acordo com as informações contidas no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, consistente com a estrutura proposta para **XL8** (TABELA 22).

**FIGURA 110** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL8**.





**FIGURA 111** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL8**.

As corretas posições dos hidrogênios aromáticos com os carbonos aromáticos vicinais e alifáticos foram determinadas pelas análises dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 110 e 111, TABELA 22). A existência da correlação do sinal em  $\delta$  6,62 (H-4) com o sinal a <sup>3</sup>*J* do carbono em  $\delta$  29,0 (C-5), e  $\delta$  6,74 (H-1) com o sinal a <sup>3</sup>*J* do carbono em  $\delta$  59,5 (C-13a) indicou a posição de ambos os hidrogênios aromáticos sem ambiguidades. Consequentemente, a posição dos hidrogênios aromáticos no anel D foi definida pela correlação do sinal em  $\delta$  6,90 (H-12) ligado ao carbono em  $\delta$ 111,3, a <sup>3</sup>*J* com os sinais dos carbonos em  $\delta$  36,3 (C-13) e  $\delta$  126,3 (C-8a), e do sinal em  $\delta$  6,58 (H-9) ligado ao carbono  $\delta$  109,0, com os sinais dos carbonos em  $\delta$  126,2 (C-12a) e  $\delta$  58,2 (C-8) (FIGURA 112, TABELA 22).

FIGURA 112 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL8.



Posição		XL8		Xylopinina		
2	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC $({}^{1}\text{H}-{}^{13}\text{C})^{a,d}$	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>b</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{b}$	
1	6,74 (1H, s)	108,5, CH	3, 4a, 13a	6,72 (1H, s)	108,3	
2		147,4, C			147,3	
3		147,3, C			147,3	
4	6,62 (1H, <i>s</i> )	111,3, CH	2, 5, 13b	6,59 (1H, <i>s</i> )	112,2	
<b>4</b> a		126,7, C			126,6	
5	3,15 (1H, <i>m</i> ) 2,67 (1H, <i>m</i> )	29,0, CH <sub>2</sub>	13b 4 e 13b	2,62 (1H, <i>m</i> ) 2,60 (1H, <i>m</i> )	28,6	
6	3,14 (1H, <i>m</i> ) 2,62 (1H, <i>m</i> )	51,3, CH <sub>2</sub>	4a, 5 e 13a 4a e 13a	3,14, (1H, <i>m</i> ) 2,67 (1H, <i>m</i> )	51,3	
8	3,95 (1H, <i>d</i> , 14,6) 3,68 (1H, <i>d</i> , 14,6)	58,2, CH <sub>2</sub>	8a, 9, 12a e 13a 8a, 12a e 13a	3,61 (1H, <i>m</i> ) 3,61 (1H, <i>m</i> )	58,2	
<b>8</b> a		126,3, C			126,2	
9	6,58 (1H, <i>s</i> )	109,0, CH	8, 11 e 12a	6,55 (1H, <i>s</i> )	108,8	
10		147,4, C			147,2	
11		147,6, C			147,5	
12	6,66 (1H, <i>s</i> )	111,3, CH	8a, 10 e 13	6,64 (1H, <i>s</i> )	112,2	
12a		126,2, C			126,2	
13	3,25 (1H, <i>dd</i> , 15,8 e 3,7)	36,3, CH <sub>2</sub>	8a e 12	3,28 (1H, <i>m</i> )	36,4	
	2,84 (1H, <i>dd</i> , 15,8 e 11,2)		8a, 12 e 13a	2,87 (1H, <i>m</i> )		
13a	3,60 (1H, <i>dd</i> , 11,2 e 3,7)	59,5, CH	13b	3,56 (1H, <i>m</i> )	59,5	
13b		129,7, C			129,7	
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,87 (3H, s)	56,0, CH <sub>3</sub>	2	3,87 (3H, s)	55,9	
3-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,89 (3H, s)	55,9, CH <sub>3</sub>	3	3,82 (3H, s)	55,8	
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,85 (3H, <i>s</i> )	55,8, CH <sub>3</sub>	10	3,83 (3H, <i>s</i> )	55,8	
11-OCH <sub>2</sub>	3.86 (3H, s)	55.8. CH <sub>3</sub>	11	3.84 (3H. s)	55.7	

**TABELA 22** – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C **XL8** 

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Da SILVA et al., 2009b (<sup>1</sup>H: 200 MHz; <sup>13</sup>C: 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>). <sup>*d*</sup>Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 113), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com *m/z* 356,32 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>21</sub>H<sub>25</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 355,17 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN 1D/2D.





Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como a comparação com os dados da literatura, permitiu-nos concluir que a substância **XL8** trata-se do alcaloide tetraidroprotoberberínico (-)-**xylopinina** (FIGURA 114, TABELA 22).

FIGURA 114 - Estrutura da (-)-xylopinina.



## 6.1.3.2. Identificação estrutural de XL13

A substância **XL13** (21,9 mg) apresentou-se como sólido amarelo, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20}$  = +45,2° (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz;  $CD_3OD$  + gotas de  $CDCl_3$ ) (FIGURA 115 e FIGURA 116) juntamente com a análise do mapa de correlação HSQC de **XL13** (FIGURA 117), observou-se algumas similaridades quando comparados com os espectros de RMN de **XL8**, diferindo desta pela ausência de um grupo metoxílico e a provável presença de um grupo hidroxila na molécula.











**FIGURA 115 –** Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD + gotas de CDCl<sub>3</sub>) de XL13.

A presença de um grupo hidroxila na molécula foi evidenciada com base na análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 118) com o sinal de carbono em  $\delta$  144,8, típico de carbono aromático oxigenado e que não apresentou correlação com os hidrogênios dos grupos metoxílicos.

**FIGURA 117** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CD_3OD + gotas de CDCl_3$ ) de **XL13**.



**FIGURA 118** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CD<sub>3</sub>OD + gotas de CDCl<sub>3</sub>) de **XL13**.



Assim como observado em **XL8**, foi evidenciada a presença de sinais de hidrogênios diastereotópicos para quatro grupos metilênicos em  $\delta$  2,65 (1H, *m*)/ 3,05 (1H, *ddd*, *J* = 17,4, 12,5 e 5,0 Hz),  $\delta$  3,19 (1H, *m*)/ 2,65 (1H, *m*),  $\delta$  3,98 (1H, *d*, *J* = 14,8 Hz)/ 3,70 (1H, *d*, *J* = 14,8 Hz) e  $\delta$  3,43 (1H, *dd*, *J* = 16,2 e 3,9 Hz)/ 2,80 (1H, *dd*, *J* = 16,2 e 11,4) típicos dos hidrogênios, H-5, H-6, H-8 e H-13 correlacionados aos sinais dos carbonos em  $\delta$  28,8, 52,4, 58,8 e 36,5, respectivamente, bem como um sinal de um hidrogênio metínico em  $\delta$  3,66 (1H,

dd, J = 11,4 e 3,9 Hz) correlacionado ao sinal do carbono em  $\delta$  61,0 característico de H-13a. Estes hidrogênios metilênicos juntamente com o sinal do hidrogênio metínico em  $\delta$  3,66 confirmaram o sistema tetraidroprotoberberínico da molécula (FIGURA 119).

FIGURA 119 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL13.



Pela análise dos espectros de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 110) e mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 117 e FIGURA 118, respectivamente) observou-se a presença de 20 carbonos, sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  149,2 e 110,4, três metoxilícos em  $\delta$  56,5, 56,5 e 56,4, um metínico em  $\delta$  61,0, típico de C-13a, e quatro metilênicos em  $\delta$  28,8 (C-5), 36,5 (C-13), 52,4 (C-6) e 58,8 (C-8), confirmando a presença do esqueleto tetraidroprotoberberínico, consistente com a estrutura de **XL13**.





A análise por espectrometria de massas (FIGURA 121), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 342,15 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 341,16 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN 1D/2D.

FIGURA 121 – Espectro de massas de XL13.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como a comparação com os dados da literatura, permitiu-nos concluir que a substância **XL13** trata-se do alcaloide tetraidroprotoberberínico (+)-**discretina** (FIGURA 122, TABELA 23).

FIGURA 122 – Estrutura da (+)-discretina.



Posição	XL13			Discretina		
-	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup><i>a</i>,<i>c</i></sup>	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>d</sup>	$^{13}\mathrm{C}~(\delta)^d$	
1	6,83 (1H, s)	109,8, CH	2, 3, 4a e 13a	6,83 (1H, s)	109,8, CH	
2		147,8, C			147,7, C	
3		146,2, C			146,2, C	
4	6,57 (1H, <i>s</i> )	115,9, CH	2, 3, 5 e 13b	6,57 (1H, s)	115,8, CH	
<b>4</b> a		127,4, C			127,3, C	
5	2,65 (1H, <i>m</i> ) 3,05 (1H, <i>ddd</i> , 17,4, 12,5 e 5.0)	28,8, CH <sub>2</sub>	4, 6 e 13b 4a, 6 e 13b	2,67 (1H, <i>m</i> ) 3,05 (1H, <i>ddd</i> , 17,4, 12,5 e 5,0)	28,4, CH <sub>2</sub>	
6	3,19 (1H, <i>m</i> ) 2,65 (1H, <i>m</i> )	52,4, CH <sub>2</sub>	4a, 5, 8 e 13a 5, 4a e 13a	3,19 (1H, <i>m</i> ) 2,65 (1H, <i>m</i> )	51,6, CH <sub>2</sub>	
8	3,98 (1H, <i>d</i> , 14,8) 3,70 (1H, <i>d</i> , 14,8)	58,8, CH <sub>2</sub>	6, 8a, 9, 12a, 13a e 13b 6, 8a, 12a e13a	3,98 (1H, <i>d</i> , 14,8) 3,70 (1H, <i>d</i> , 14,8)	58,7, CH <sub>2</sub>	
<b>8</b> a		126,5, C			126,5, C	
9	6,69 (1H, <i>s</i> )	110,4, CH	8, 11 e 12a	6,69 (1H, <i>s</i> )	110,4, CH	
10		148,9, C			148,9, C	
11		149,2, C			149,2, C	
12	6,78 (1H, <i>s</i> )	112,9, CH	8a, 10 e 13	6,78 (1H, <i>s</i> )	112,8, CH	
12a		127,3, C			127,2, C	
13	3,43 (1H, <i>dd</i> , 16,2 e 3,9) 2,80 (1H, <i>dd</i> , 16,2	36,5, CH <sub>2</sub>	8a, 12, 12a e 13a 8a, 12a, 13a e 13b	3,43 (1H, <i>dd</i> , 16,2 e 3,9) 2,80 (1H, <i>dd</i> , 16,2	36,5, CH <sub>2</sub>	
120	e 11,4) 2 66 (111 <i>dd</i> 11 <i>d</i>	61 0 CH		$e_{11,4}$	610 CH	
158	e 3,9)	01,0, CH		e 3,9)	01,0, СП	
13b		129,0, C			129,0, C	
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,85 (3H, s)	56,6, CH <sub>3</sub>	2	3,85 (3H, <i>s</i> )	56,6, CH <sub>3</sub>	
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,81 (3H, <i>s</i> )	56,4, CH <sub>3</sub>	10	3,81 (3H, <i>s</i> )	56,4, CH <sub>3</sub>	
11-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,82 (3H, <i>s</i> )	56,5, CH <sub>3</sub>	11	3,82 (3H, s)	56,5, CH <sub>3</sub>	

TABELA 23 – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C XL13

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. <sup>*d*</sup>COSTA et al., 2013a (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) (δ) Deslocamentos em ppm.

### 6.1.3.3. Identificação estrutural de XL17

A substância **XL17** (1,8 mg) apresentou-se como sólido amarelo, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20} = -3,7^\circ$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) (FIGURA 123) juntamente com a análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC de **XL17** (FIGURA 124 e FIGURA 125), observou-se algumas similaridades quando comparados com os espectros de RMN de **XL13**, diferindo-se desta, apenas na posição onde está localizado o substituinte hidroxila na molécula. A correta posição deste grupo na molécula foi evidenciada com base na análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 125), em que o sinal do hidrogênio  $\delta$  6,57 (1H, *s*, H-9) apresentou correlação a <sup>3</sup>J com o sinal do carbono em  $\delta$  144,7

(C-11) deslocamento típico de carbono aromático oxigenado, e que não apresentou correlação com os grupos metoxílicos, sendo então determinado que o grupo hidroxila esteja localizado no anel D do sistema tetraidroprotoberberínico (FIGURA 126).





**FIGURA 124** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL17**.





**FIGURA 125** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL17**.

Assim como observado em **XL8**, foi evidenciada a presença de sinais de hidrogênios diastereotópicos para quatro grupos metilênicos em  $\delta$  3,14 (1H, *m*)/ 2,69 (1H, *m*),  $\delta$  3,15 (1H, *m*) / 2,64 (1H, *m*),  $\delta$  3,92 (1H, sobreposto)/ 3,69 (1H, sobreposto) e  $\delta$  3,25 (1H, *dd*, *J* = 16,2 e 3,8 Hz)/ 2,79 (1H, *dd*, *J* = 16,2 e 11,6) típicos dos hidrogênios, H-5, H-6, H-8 e H-13 correlacionados aos sinais dos carbonos em  $\delta$  28,5, 51,6, 58,2 e 35,5, respectivamente, bem como um sinal de um hidrogênio metínico em  $\delta$  3,63 (1H, sobreposto) correlacionado ao sinal do carbono em  $\delta$  59,7 característico de H-13a. Estes hidrogênios metilênicos juntamente com o sinal do hidrogênio metínico em  $\delta$  3,63 confirmaram o sistema tetraidroprotoberberínico da molécula (FIGURA 126, TABELA 24).

Pela análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 124 e FIGURA 125) observou-se a presença de 20 carbonos sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  147,5 e 108,5, três metoxilícos ambos em  $\delta$  56,0, um metínico em  $\delta$  59,7, típico de C-13a, e quatro metilênicos em  $\delta$  28,5 (C-5), 35,5 (C-13), 51,6 (C-6) e 58,2 (C-8), confirmando a presença do esqueleto tetraidroprotoberberínico, consistente com a estrutura de **XL17**.



FIGURA 126 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL17.

TABELA 24 – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C de XL17

Posição	<u>XL17</u>			Coritench	lina
	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup><i>a,c</i></sup>	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>d</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^d$
1	6,74 (1H, <i>s</i> )	108,5, CH	3, 4a e 13a	6,68 (1H, <i>s</i> )	108,4
2		147,4, C			146,1
3		147,5, C			144,8
4	6,63 (1H, <i>s</i> )	111,7, CH	2 e 5	6,61 (1H, <i>s</i> )	114,9
<b>4</b> a		126,4, C			126,9
5	3,14 (1H, <i>m</i> )	28,5, CH <sub>2</sub>		3,09 (1H, <i>m</i> )	28,3
	2,69 (1H, <i>m</i> )			2,62 (1H, <i>m</i> )	
6	3,15 (1H, <i>m</i> )	51,6, CH <sub>2</sub>		3,18 (1H, <i>m</i> )	51,4
	2,64 (1H, <i>m</i> )			2,64 (1H, <i>m</i> )	
8	3,92 (1H, sobreposto)	58,2, CH <sub>2</sub>	8a e 9	3,73 (1H, <i>d</i> , 14,6)	58,0
	3,69 (1H, sobreposto)			3,97 (1H, <i>d</i> ,14,6)	
8a		125,0, C			126,0
9	6,57 (1H, <i>s</i> )	109,1, CH	8, 11 e 12a	6,55 (1H, <i>s</i> )	109,3
10		146,0, C			148,2
11		144,7, C			147,9
12	6,70 (1H, <i>s</i> )	114,9, CH	8a, 10 e 13	6,64 (1H, <i>s</i> )	111,7
12a		126,5, C			125,4
13	3,25 (1H, <i>dd</i> , 16,2 e 3,8)	35,5, CH <sub>2</sub>		3,20 (1H, <i>m</i> )	36,0
	2,96 (1H, dd, 16,2 e 11,6)			2,84 (1H, <i>m</i> )	
<b>13</b> a	3,63 (1H, sobreposto)	59,7, CH		3,56 (1H, <i>m</i> )	59,9
13b		128,7, C			128,3
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,89 (3H, <i>s</i> )	56,0, CH <sub>3</sub>	2	3,84 (3H, s)	56,0
3-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,87 (3H, <i>s</i> )	56,0, CH <sub>3</sub>	3	3,81 (3H, s)	55,9
10-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,86 (3H, <i>s</i> )	56,0, CH <sub>3</sub>	10	3,82 (3H, <i>s</i> )	55,8

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CD<sub>3</sub>OD + gotas de CD<sub>3</sub>Cl, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup> Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. <sup>*d*</sup>Da SILVA et al., 2009b (<sup>1</sup>H: 200 MHz; <sup>13</sup>C: 50 MHz, CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 127), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 342,31 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>20</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 341,16 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN 1D/2D.

FIGURA 127 – Espectro de massas de XL17.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$ , bem como comparação com os dados da literatura permitiu-nos concluir que a substância **XL17** trata-se do alcaloide tetraidroprotoberberínico (-)-**coritenchina** (FIGURA 128, TABELA 24).

FIGURA 128 – Estrutura da (-)-coritenchina.



#### 6.1.3.4. Identificação estrutural de XL18

A substância **XL18** (3,5 mg) apresentou-se como sólido marrom, teste positivo para alcaloide quando revelada com solução de Dragendorff (coloração alaranjada) e  $[\alpha]_D^{20}$  = +192,4° (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>).

Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) (FIGURA 129) juntamente com a análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC de **XL18** (FIGURA 130 e FIGURA 131), observou-se algumas similaridades quando comparados com os espectros de RMN de **XL8**, **XL13** e **XL17**, diferindo de **XL13** e **XL17** pela ausência de um grupo metoxílico e a provável presença de um grupo hidroxila a mais na molécula. Observou-se também a ausência do sistema *para* em um dos anéis e a presença de um sistema *orto* 

através de dois sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,81 (1H) e 6,77 (1H) ambos dupletos com constante de acoplamento *orto* em torno de 8,2 Hz.



FIGURA 129 – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de XL18.

A presença de dois grupos hidroxilas na molécula foi evidenciada com base na análise do mapa de correlação HMBC (FIGURA 131) com o sinal de carbono em  $\delta$  147,2 e  $\delta$  144,6 típicos de carbonos aromáticos oxigenados e que não apresentaram correlação com os grupos metoxílicos.

Pelo mapa de correlação HMBC (FIGURA 131) pôde-se definir as corretas posições dos grupos hidroxilas e metoxílicos. Assim observou-se que o sinal em  $\delta$  6,72 (H-1) mostrou uma forte correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal em  $\delta$  144,6, atribuindo assim o grupo hidroxila em C-3, e o sinal em  $\delta$  6,63 (H-4) apresentou uma forte correlação com o sinal em  $\delta$  146,0, atribuindo um dos grupos metoxílicos em C-2. Já o sinal em  $\delta$  6,81 (H-12) mostrou uma forte correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal em  $\delta$  6,81 (H-11) uma forte correlação a <sup>3</sup>*J* com o sinal em  $\delta$  143,7 estabelecendo assim o segundo grupo metoxílico em C-9 (FIGURA 132). Estas atribuições foram corroboradas, pois

todos os hidrogênios das metoxilas correlacionaram a  ${}^{3}J$  com os carbonos aromáticos a quem estavam ligados (FIGURA 132).

**FIGURA 130** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3 + gotas de CD_3OD$ ) de **XL18**.



**FIGURA 131** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL18**.





FIGURA 132 – Principais correlações observadas no mapa de correlações HMBC de XL18.

Através da análise dos mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 130 e FIGURA 131) observou-se a presença de 19 carbonos sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  147,2 e 108,5, dois metoxílicos um em  $\delta$  60,3 e em o outro em 56,9, um metínico em  $\delta$  59,7 típico de C-13a, e quatro metilênicos em  $\delta$  28,3 (C-5), 36,0 (C-13), 51,7 (C-6) e 54,1 (C-8), confirmando a presença do esqueleto tetraidroprotoberberínico, consistente com a estrutura de **XL18**.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 133), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 328,14 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>21</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 327,14 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN 1D/2D.

FIGURA 133 – Espectro de massas de XL18.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H, EM e  $[\alpha]_D^{20}$  permitiu-nos concluir que a substância **XL18** trata-se do alcaloide tetraidroprotoberberínico (+)-**discretamina** (FIGURA 134, TABELA 25).

	TABELA	25 – Dados	de RMN de	<sup>1</sup> H e	<sup>13</sup> C XL18
--	--------	------------	-----------	------------------	----------------------

Posição		XL18	
-	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup><i>a,c</i></sup>
1	6,72 (1H, <i>s</i> )	108,59, CH	2, 3, 4a, 13a
2		146,01, C	
3		144,61, C	
4	6,63 (1H, <i>s</i> )	116,05, CH	2, 3, 5 e 13b
<b>4</b> a		126,97, C	
5	2,66 (1H, <i>m</i> )	28,36, CH <sub>2</sub>	4 e 13b
	3,07 (1H, <i>m</i> )		6
6	3,17 (1H, <i>m</i> )	51,73, CH <sub>2</sub>	4a e13a
	2,64 (1H, <i>m</i> )		4a e13a
8	4,20 (1H, <i>d</i> , 15,6)	54,10, CH <sub>2</sub>	8a, 12a e13a
	3,55 (1H, <i>d</i> , 15,6)		6 e 8a
8a		127,94, C	
9		143,73, C	
10		147,28, C	
11	6,77 (1H, <i>d</i> , 8,2)	115,21, CH	9 e 12a
12	6,81 (1H, <i>d</i> , 8,2)	124,77, CH	8a, 10 e 13
12a		126,41, C	
13	2,81 (1H, <i>dd</i> , 16,2 e 3,8)	36,04, CH <sub>2</sub>	12a e 13a
	3,29 (1H, <i>dd</i> , 16,2 e 11,5)		8a, 12 e 12a
13a	3,58 (1H, <i>dd</i> , 11,5 e 3,8)	59,78, CH	
13b		128,71, C	
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,89 (3H, <i>s</i> )	56,90, CH <sub>3</sub>	2
9-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,83 (3H, <i>s</i> )	60,32, CH <sub>3</sub>	9

<sup>*a*</sup>Experimento a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos mapas de correlação HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Átomos de carbono que mostraram correlação com os respectivos hidrogênios. ( $\delta$ ) Deslocamentos em ppm.
FIGURA 134 – Estrutura da (+)-discretamina.



## 6.1.4. Identificação do Alcaloide do Tipo Benzilisoquinolínico

## 6.1.4.1. Identificação estrutural de XL16

A substância **XL16** (10,3 mg) apresentou-se como sólido marrom e  $[\alpha]_D^{20} = +74,1^\circ$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>), teste positivo para alcaloide quando revelado com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) (FIGURA 135) juntamente com a análise do mapa de correlação HSQC (FIGURA 136), verificou-se a presença de cinco sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,75 (1H, *d*, *J* = 8,2 Hz), 6,70 (1H, *d*, *J* = 2,0 Hz), 6,56 (1H, *s*), 6,54 (1H, *dd*, *J* = 8,2 e 2,0 Hz) e 6,19 (1H, *s*), correlacionados aos sinais de carbonos em  $\delta$  111,3, 116,2, 111,2, 121,0 e 114,4, respectivamente. Observou-se ainda a presença de dois grupos metoxílicos em  $\delta$  3,84 e 3,85, assim como um grupo metila em  $\delta$  2,48, tipicamente ligado ao nitrogênio (*N*-CH<sub>3</sub>).



**FIGURA 135** – Espectro de RMN de  ${}^{1}$ H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL16**.

A presença dos grupos hidroxilas em **XL16** foi evidenciada devido aos sinais dos carbonos em  $\delta$  143,6 (C-7) e  $\delta$  145,9 (C-13) típicos de carbonos aromáticos oxigenados, os quais não apresentaram nenhuma correlação com os hidrogênios aromáticos no mapa de correlação HSQC (FIGURA 136), bem como nenhuma correlação com os grupos metoxílicos no mapa de correlação HMBC (FIGURA 137).

**FIGURA 136** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL16**.





**FIGURA 137** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL16**.

A correta posição dos grupos metoxílicos em **XL16** foram definidas pelas correlações no mapa de correlação HMBC (FIGURA 137) do sinal em  $\delta$  6,56 (H-5) a <sup>2</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  146,2 (C-6) e do sinal em  $\delta$  6,19 (H-8) a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  146,2 (C-6), no anel A, bem como correlações do sinal em 6,70 (H-14) a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  145,7 (C-12) e do sinal em  $\delta$  6,75 (H-11) a <sup>2</sup>*J* com este mesmo carbono (FIGURA 138).

**FIGURA 138** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL16** mostrando a região aromática.



Pela análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 139) e mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 136, FIGURA 137 e FIGURA 138) observou-se a presença de 19 carbonos sendo 12 aromáticos entre  $\delta$  146,2 e 111,2, três metilênicos em  $\delta$  46,3, 41,9 e 24,6 característicos de C-3, C-1a e C-4, respectivamente do núcleo benziltetraidroisoquinolínico, um metínico em  $\delta$  64,6 (C-1), dois metoxílicos em  $\delta$  55,9 (12-OCH<sub>3</sub>) e 56,0 (6-OCH<sub>3</sub>) e um grupo metila em  $\delta$  41,9 (*N*-CH<sub>3</sub>), típico de carbono ligado a nitrogênio conforme indicado também no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, consistente com a estrutura de **XL16**.

FIGURA 139 – Espectro de RMN de  $^{13}$ C (100 de MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas CD<sub>3</sub>OD) de XL16.



A análise por espectrometria de massas (FIGURA 140), utilizando a técnica de ionização química a pressão atmosférica operando no modo positivo de aquisição de dados (APCI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com *m/z* 330,30 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 329,39 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN 1D/2D.

### FIGURA 140 – Espectro de massas de XL16.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$  bem como comparação com os dados da literatura permitiu-nos concluir que a substância **XL16** trata-se do alcaloide benziltetraidroisoquinolínico (+)-**reticulina** (FIGURA 141, TABELA 26).





Posição	XL16		Reticulina		
1 0019400	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^{13}C(\delta)^{a,b}$	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>c</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{c}$	
1	3,75 (1H, <i>dd</i> , 7,0 e 5,0)	64,6, CH	3,72 (1H, <i>dd</i> , 7,0 e 5,2)	64,6	
<b>1</b> a	3,08 (1H, dd, 13,8 e 5,0)	40,6, CH <sub>2</sub>	3,07 (1H, dd, 13,8 e 5,2)	40,6	
	2,74 (1H, <i>dd</i> , 13,8 e 7,0)		2,74 (1H, <i>dd</i> , 13,8 e 7,0)		
3	3,19 (1H, <i>m</i> )	46,3, CH <sub>2</sub>	3,17 (1H, <i>m</i> )	46,4	
	2,79 (1H, <i>m</i> )		2,80 (1H, <i>m</i> )		
4	2,87 (1H, <i>m</i> )	24,6, CH <sub>2</sub>	2,86 (1H, <i>m</i> )	24,6	
	2,66 (1H, <i>m</i> )		2,64 (1H, <i>m</i> )		
<b>4</b> a		124,0, C		124,1	
5	6,56 (1H, <i>s</i> )	111,2, CH	6,55 (1H, <i>s</i> )	111,0	
6		146,2, C		146,0	
7		143,6, C		143,5	
8	6,19 (1H, <i>s</i> )	114,4, CH	6,20 (1H, <i>s</i> )	114,2	
8a		129,0, C		129,1	
9		132,4, C		132,5	
10	6,54 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 2,0)	121,0, CH	6,54 (1H, <i>dd</i> , 8,2 e 2,0)	121,0	
11	6,75 (1H, <i>d</i> , 8,2)	111,3, CH	6,74 (1H, <i>d</i> , 8,2)	111,1	
12		145,9, C		145,7	
13		145,7, C		145,6	
14	6,70 (1H, <i>d</i> , 2,0)	116,2, CH	6,70 (1H, <i>d</i> , 2,0)	116,1	
6-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,84 (3H, <i>s</i> )	55,9, CH <sub>3</sub>	3,83 (3H, <i>s</i> )	55,8	
12-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,85 (3H, <i>s</i> )	56,0, CH <sub>3</sub>	3,84 (3H, <i>s</i> )	55,9	
<i>N-<u>С</u>Н<sub>3</sub></i>	2,48 (3H, <i>s</i> )	41,9, CH <sub>3</sub>	2,47 (3H, <i>s</i> )	42,0	

TABELA 26 – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C XL16

<sup>*a*</sup>Experimento realizado a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos espectros de <sup>13</sup>C, DEPT 135, HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>Da CRUZ, 2011 (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz; CDCl<sub>3</sub>). (δ) Deslocamentos em ppm.

#### 6.1.5. Identificação do Alcaloide do Tipo Morfinanodienona

#### 6.1.5.1. Identificação estrutural de XL19

A substância **XL19** (2,4 mg) apresentou-se como sólido marrom e  $[\alpha]_D^{20} = +45,5^{\circ}$  (*c* 0,5 g/100 mL, CHCl<sub>3</sub>), teste positivo para alcaloide quando revelado com solução de Dragendorff (coloração alaranjada).

Pela análise do espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) (FIGURA 142) juntamente com a análise do mapa de correlação HSQC (FIGURA 143), verificou-se a presença de dois sinais de hidrogênios aromáticos em  $\delta$  6,71 (1H, *s*), 6,78 (1H, *s*), correlacionados aos sinais de carbonos em  $\delta$  113,5 e 107,4, bem como a presença de dois sinais de hidrogênios vinílicos em  $\delta$  6,34 (1H, *s*) e 6,33 (1H, *s*), correlacionados aos sinais de carbonos em  $\delta$  118,9 e 122,3, respectivamente, característicos do sistema morfinanodienona (SUAU et al., 1991). Observou-se ainda a presença de dois grupos metoxílicos em  $\delta$  3,81 (3H, s) e 3,91 (3H, s), assim como um grupo metila em  $\delta$  2,46 (3H, s), característico de grupo metila ligado a nitrogênio (*N*-CH<sub>3</sub>).



**FIGURA 142** – Espectro de RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz,  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL19**.

A presença do grupo hidroxila em **XL19** foi evidenciada devido ao sinal do carbono em  $\delta$  146,0 (C-3) típico de carbono aromático oxigenado, o qual não apresentou correlação com os hidrogênios aromáticos no mapa de correlação HSQC (FIGURA 143), bem como nenhuma correlação com os grupos metoxílicos no mapa de correlação HMBC (FIGURA 144).

**FIGURA 143** – Mapa de correlação HSQC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL19**.



**FIGURA 144** – Mapa de correlação HMBC (<sup>1</sup>H: 400 MHz; <sup>13</sup>C: 100 MHz;  $CDCl_3$  + gotas de  $CD_3OD$ ) de **XL19**.



A correta posição dos grupos metoxílicos em **XL19** foram definidas pelas correlações no mapa de correlação HMBC (FIGURA 144) do sinal em  $\delta$  6,78 (H-4) a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  144,8 (C-2), no anel A, bem como a correlação do sinal em  $\delta$  6,33 (H-8) a <sup>3</sup>*J* com o sinal do carbono em  $\delta$  151,6 (C-6) no anel D (FIGURA 145).



FIGURA 145 – Principais correlações observadas no mapa de correlação HMBC de XL19.

Pela análise do espectro de RMN de <sup>13</sup>C (FIGURA 146) e mapas de correlação HSQC e HMBC (FIGURA 143 e FIGURA 144) observou-se a presença de 19 carbonos sendo seis aromáticos entre  $\delta$  146,0 e 107,4, três metilênicos em  $\delta$  45,7, 41,4 e 32,4 característicos de C-16, C-15 e C-10, respectivamente, do núcleo morfinanodienona, três metínicos em  $\delta$  122,3 (C-8), 118,9 (C-5) e 60,8 (C-9), dois metoxílicos em  $\delta$  56,1 (2-OCH<sub>3</sub>) e 55,1 (6-OCH<sub>3</sub>), quatro carbonos quaternários, sendo um em  $\delta$  181,3 (C-7), típico de grupo carbonila, um em  $\delta$  42,3 (C-13) e dois carbonos  $\alpha$ - $\beta$ -insaturados em  $\delta$  151,6 (C-6) e 161,5 (C-14). Além disso, foi possível perceber a presença de um sinal referente a um grupo metila em  $\delta$  41,7 (*N*-CH<sub>3</sub>), típico de carbono ligado a nitrogênio conforme indicado também no espectro de RMN de <sup>1</sup>H, consistente com a estrutura de **XL19**.



**FIGURA 146** – Espectro de RMN de  $^{13}$ C (100 MHz, CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD) de **XL19**.

A análise por espectrometria de massas (FIGURA 147), utilizando a técnica de ionização por eletrospray operando no modo positivo de aquisição de dados (ESI+), evidenciou uma molécula protonada  $[M+H]^+$  com m/z 328,22 Daltons compatível com a fórmula molecular C<sub>19</sub>H<sub>23</sub>NO<sub>4</sub> (calculado 327,15 Da) corroborando com os dados obtidos pelas análises de RMN 1D/2D.

FIGURA 147 – Espectro de massas de XL19.



Os dados fornecidos pelas análises de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C 1D/2D, EM e  $[\alpha]_D^{20}$  bem como comparação com os dados da literatura permitiu-nos concluir que a substância **XL19** trata-se do alcaloide benziltetraidroisoquinolínico (+)-flavinantina (FIGURA 148, TABELA 27).

FIGURA 148 – Estrutura da (+)-flavinantina.



Posição	XL19			Flavinantina	
- 05-340	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., J em Hz) <sup>a</sup>	$^{13}\mathrm{C}(\delta)^{a,b}$	HMBC ( <sup>1</sup> H- <sup>13</sup> C) <sup>ab</sup>	<sup>1</sup> H $\delta$ (mult., <i>J</i> em Hz) <sup><i>c</i></sup>	
1	6,71 (1H, <i>s</i> )	113,5, CH	2, 3, 10 e 12	6,62 (1H, <i>s</i> )	
2		144,8, C			
3		146,0, C			
4	6,78 (1H, <i>s</i> )	107,4, CH	2, 3, 11 e 12	6,93 (1H, <i>s</i> )	
5	6,34 (1H, <i>s</i> )	118,9, CH	7 e 14	6,35 (1H, <i>s</i> )	
6		151,6, C			
7		181,3, C			
8	6,33 (1H, <i>s</i> )	122,3, CH	6, 9 e 13	6,32 (1H, <i>s</i> )	
9	3,68 (1H, <i>d</i> , 6,2)	60,8, CH	8, 11, 13, 14 e 16	3,69 (1H, <i>d</i> , 5,6)	
10	3,00 (1H, <i>ddd</i> ,17,9; 6,2 e	32,4, CH <sub>2</sub>	9 e 11	3,04 (1H, <i>dd</i> ,17,8 e 5,6)	
	0,8)		1, 9, 11 e 14	3,34 (1H, <i>d</i> ,17,8)	
	3,32 (1H, <i>d</i> ,17,9)				
11		128,3, C			
12		129,4, C			
13		42,3, C			
14		161,5, C			
15	1,82 (1H, <i>ddd</i> ,12,7; 3,1 e	41,4, CH <sub>2</sub>		1,84 (1H, <i>m</i> )	
	2,1)			1,93 (1H, <i>m</i> )	
	1,95 (1H, <i>ddd</i> ,12,7; 12,7 e				
	6,3)				
16	2,56 (1H, <i>m</i> )	45,7, CH <sub>2</sub>		2,57 (1H, <i>m</i> )	
	2,59 (1H, <i>m</i> )			2,57 (1H, <i>m</i> )	
2-O <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,91 (3H, <i>s</i> )	56,1, CH <sub>3</sub>	2	3,88 (3H, <i>s</i> )	
6-0 <u>C</u> H <sub>3</sub>	3,81 (3H, <i>s</i> )	55,1, CH <sub>3</sub>	6	3,80 (3H, <i>s</i> )	
<u>N-С</u> Н <sub>3</sub>	2,46 (3H, <i>s</i> )	41,7, CH <sub>3</sub>	9 e 16	2,47 (3H, <i>s</i> )	

TABELA 27 – Dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C XL19

<sup>*a*</sup>Experimento realizado a 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C em CDCl<sub>3</sub> + gotas de CD<sub>3</sub>OD, utilizando o TMS como padrão interno. <sup>*b*</sup>Multiplicidades determinadas pelos espectros de <sup>13</sup>C, DEPT 135, HSQC e HMBC. <sup>*c*</sup>GOZLER et al., 1990. (δ) Deslocamentos em ppm.

#### 6.5. Importância Quimiotaxonômica

Através das técnicas cromatográficas usuais, bem como das técnicas espectrométricas modernas foi possível o isolamento e a Identificação estrutural de 19 substâncias pertencentes à classe dos alcaloides isolados a partir do caule de *X. laevigata*. Destes, 15 são considerados inéditos para a espécie, exceto os alcaloides lanuginosina (**XL3**), discretina (**XL13**), laurotetanina (**XL15**) e reticulina (**XL16**) que já foram isolados por COSTA et al. (2013a) das folhas de *X. laevigata*.

No entanto, a maior parte das substâncias isoladas está presente em outras espécies de Annonaceae, principalmente nas espécies dos gêneros *Annona, Artabotrys, Duguetia, Guatteria, Polyalthia* e *Xylopia* (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994; LEBOEUF et al., 1982; CAMPOS et al., 2008; PINHEIRO et al., 2009; COSTA et al., 2009b, 2010, 2011a, b; DA CRUZ et al., 2011; DUTRA et al., 2012; ZAWAWI et al., 2012;

VENDRAMIN et al., 2013). Portanto, elas podem ser consideradas como marcadores quimiotaxonômicos da família Annonaceae.

Em espécies de *Xylopia* alguns dos alcaloides isolados têm uma grande relevância quimiotaxonômica como pode ser observado na TABELA 28.

Alcaloides	Espécies de Xylopia	Referências		
	X. discreta	LEBOEUF et al., 1982		
Discretina	X. championii	PUVANENDRAN et al., 2008		
	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006;		
	X. lemurica	NIÉTO et al., 1976		
Lanuginosina	X. nigricans	PUVANENDRAN et al., 2010		
	X. frutescens	LEBOEUF et al., 1982		
	X. buxifolia	HOCQUEMILLER et al., 1981		
	X. langsdorffiana	Da SILVA, 2009b		
Xylopinina	X. vieillardi	JOSSANG et al., 1991		
	X. discreta	SCHMUTZ, 1959		
	X. buxifolia	HOCQUEMILLER et al., 1981		
Coritenchina	X. langsdorffiana	Da SILVA, 2009b		
	X. vieillardi	JOSSANG et al., 1991		
	X. amazonica	MARTINS et al., 1995		
Laurotetanina	X. benthamii	PIMENTA & MENDONÇA, 2012		
	X. danguyella	LEBOEUF et al., 1982		
	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006		
	X. pancherii	LEBOEUF et al., 1982		
Reticulina	X. papuana	JOHNS et al., 1968; LEBOEUF et al., 1982		
	X. nigricans	PUVANENDRAN et al., 2010		
	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006		
	X. papuana	JOHNS et al., 1968		
	X. langsdorffiana	Da SILVA, 2009b		
	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006		
Xylopina	X. frutescens	LEBOEUF et al., 1982		
	X. vieillardi	JOSSANG et al., 1991		
	X. discreta	SCHMUTZ, 1959		
	X. buxifolia	HOCQUEMILLER et al., 1981		
	X. papuana	JOHNS et al., 1968		
Roemerina	X. aromatic	MARTINS et al., 1995		
	X. pancheri	NIÉTO et al., 1976		
	X. aethiopica	HARRIGAN et al., 1994		
Oxoglaucina	X. amazonica	MARTINS et al., 1995		
	X. vieillardi	JOSSANG et al., 1991		
N-metillaurotetanina	X. frutescens	LEBOEUF et al., 1982		
	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006		
	X. aromatica	LEBOEUF et al., 1982		
Glaucina	X. amazonica	LEBOEUF et al., 1982		
	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006		
Norglaucina	X. vieillardi	JOSSANG et al., 1991		
	X. parviflora	NISHIYAMA et al., 2006		

TABELA 28 – Importância quimiotaxonômica dos alcaloides isolados de X. laevigata

Estudos realizados por ERKENS et al., 2007; RAINER, 2007 e CHATROU et al., 2009, sobre as relações filogenéticas entre as espécies que compõem os gêneros de Annonaceae, têm demonstrado que determinados metabólitos secundários podem ser utilizados como um importante caractere para diferenciação de uma determinada espécie ou gênero, ressaltando a importância do conhecimento fitoquímico desta família.

Estes estudos ressaltam a importância da quimiotaxonomia para a classificação dos seres vivos (DOMINGUEZ, 1973), que pode ser utilizada de forma significativa na diferenciação de espécies, gêneros e famílias, principalmente do Reino Plantae.

#### 6.6. Investigação da Atividade Citotóxica in vitro

A inibição do crescimento celular corresponde a um indicador da citotoxicidade causada pelas substâncias e extratos que estão sendo avaliados quanto à atividade antitumoral. Foi avaliado pelo método Alamar Blue [7-hydroxy-10-oxidophenoxazin-10-ium-3-one] (O'BRIEN et al., 2000). Somente células vivas são capazes de reduzir este sal solúvel a um produto insolúvel colorido que pode ser avaliado após dissolução com DMSO (AHMED et al., 1994).

Os extratos e frações foram avaliados inicialmente frente às linhagens tumorais HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e HL-60 (leucemia promielocítica humana), testados na dose máxima de 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. Os experimentos foram realizados em triplicata.

O critério empregando uma escala de intensidade foi utilizado para avaliar o potencial citotóxico das amostras testadas, onde amostras sem atividade (SA), com pouca atividade (PA) apresentam inibição de crescimento celular variando de 1 a 50%, amostras com atividade moderada (MO) a inibição de crescimento celular varia de 50 a 75% e com muita atividade (MA) possuem inibição de crescimento variando de 75 a 100%.

Os resultados do ensaio da atividade citotóxica do extrato hexânico (XLEH), extrato metanólico (XLEM), fração clorofórmica neutra (XLFCN) e fração clorofórmica alcaloídica (XLFCA) do caule de *X. laevigata* estão apresentados na TABELA 29, com suas respectivas percentagens de inibição da proliferação celular.

Conforme apresentado, entre os extratos avaliados, a amostra XLEH foi a mais ativa frente às duas linhagens testadas com inibição superior a 55%, com destaque para HL60 com inibição superior a 80%. A amostra XLEM apresentou-se ativo somente frente a HL60 com inibição de 59,08%. Entretanto, após o seu tratamento ácido-base que gerou as frações XLFCA e XLFCN, observou-se que a atividade citotóxica apresentou uma mudança

significativa. A fração XLFCA passou a ser a mais ativa dentre todas avaliadas incluindo extratos e frações, indicando que os compostos bioativos estão presentes nessa fração (TABELA 29).

Amostras	Porcentagem de inibição da proliferação celular (%)			
	HepG2	HL60		
XLCH	59,49 ± 1,75 (MO)	82,47 ± 1,25 (MA)		
XLEM	$9,45 \pm 0,53$ (PA)	59,08 ± 4,01 (MO)		
XLFCA	83,60 ± 1,32 (MA)	$89,48 \pm 0,79 \;(\text{MA})$		
XLFCN	$38,54 \pm 0,20$ (PA)	25,64 ± 7,88 (PA)		
Doxorrubicina <sup>a</sup>	$94,06 \pm 0,33$	94,06 ± 0,33		
<sup>a</sup> Controle positivo				

**TABELA 29** – Porcentagem de inibição da proliferação celular em linhagens de células tumorais para extratos e frações de *X. laevigata* 

Com base nesses resultados, o estudo fitoquímico concentrou-se na fração clorofórmica alcaloídica levando ao isolamento de substâncias pertencentes à classe dos alcaloides descritas anteriormente.

Sendo assim, considerando o estudo biomonitorado de XLEM e em busca do(s) provável ou prováveis alcalóide(s) responsável ou responsáveis pela atividade citotóxica de XLFCA, os alcaloides isolados foram submetidos ao ensaio de atividade citotóxica com as linhagens tumorais, B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HL-60 (leucemia promielocítica humana) e PBMC (células mononucleares do sangue periférico humano ativado com concanavalina A – linfoblastos humanos), testadas na dose máxima de 25  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>.

Na TABELA 30 são apresentados os resultados da atividade citotóxica das substâncias isoladas de *X. laevigata*.

Compostos	СІ <sub>50</sub> µg mL <sup>-1</sup> (µmol L <sup>-1</sup> ) <sup>a</sup>				
	B16-F10	HepG2	HL60	K562	PBMC
Roemerina	>25	>25	>25	>25	>25
(XL1)	(89,50)	(89,50)	(89,50)	(89,50)	(89,50)
Anonaina	18.80	14.04	10.09	10.62	>25
(XL2)	(70,86)	(52,92)	(38,03)	(40,03)	(106,24)
<b>.</b>	15,53 – 22,76	12,19 – 16,16	7,94 – 12,82	8,96 - 12,58	-
Lanuginosina (XI 3)	8,46 (27,73)	3,89	(25,60)	6,61 (21.67)	24,53
(113)	7,40 – 9,68	3,23 – 4,69	7,32 – 8,33	5,69 - 7,68	16,98 – 35,43
Glaucina	>25	>25	>25	>25	>25
(XL4)	(70,34)	(70,34)	(70,34)	(70,34)	(70,34)
Xylopina	3,77	1,87	1,87	3,12	4,08
(XL5)	(12,77)	(6,34)	(6,34)	(10,57)	(13,82)
Orragionaina	3,39 - 4,19	1,56 – 2,23	1,67 – 2,10	2,85 - 3,41	2,17 – 7,66
(XL6)	(54.48)	(71.15)	(16.79)	(35.52)	(29.17)
()	15,19 – 24,11	-	4,09 - 8,52	8,84 – 17,61	7,96 – 13,20
Norglaucina	8,48	3,78	6,84	7,84	6,70
(XL7)	(24,86)	(11,08)	(20,05)	(22,98)	(19,64)
Xylopinina	>25	>25	>25	>25	>25
(XL8)	(70,39)	(70,39)	(70,39)	(70,39)	(70,39)
N	-	-	-	-	-
Norpurpureina (XL10)	21,08	>25	(27, 22)	(45.02)	17,94
(1110)	16,74 – 26,53	-	5,75 – 17,81	11,73 – 23,84	13,23 – 24,33
<i>N</i> -metil	>25	>25	>25	>25	>25
laurotetanina	(73,28)	(73,28)	(73,28)	(73,28)	(73,28)
Norpredicetrina	>25	>25	>25	>25	>25
(XL12)	(76,41)	(76,41)	(76,41)	(76,41)	(76,41)
Discusting	-	- 7.80	-	-	-
(XL13)	(47.34)	(23.13)	(30.02)	(43.53)	>25 (73.28)
()	14,35 – 18,17	5,83 - 10,68	10,75 – 15,66	11,89 – 18,54	-
Laurotetanina	>25	>25	>25	>25	>25
(XL15)	(76,41)	(76,41)	(76,41)	(76,41)	(76,41)
Reticulina	>25	15,35	23,81	>25	>25
(XL16)	(75,90)	(46,60)	(72,28)	(75,90)	(75,90)
Discustorius		12,45 - 18,92	21,44 - 26,45	-	-
Uiscretamina (XL19)	>25 (70.36)	>25 (70,36)	(24,13)	>25 (70,36)	>25 (70,36)
(1117)	-	-	4,39 – 14,21	-	-
<b>Doxorrubicina</b> <sup>b</sup>	2,30	0,23	0,83	0,68	5,09
	(4,23) 1.12 - 2.72	(0,42) 0.18 - 0.30	(1,52) 0.30 - 1.24	(1,25) 0.45 - 1.04	(9,36) 1,17 – 13,97

TABELA 30 – Atividade citotóxica dos alcaloides isolados de X. laevigata

<sup>a</sup>Dados apresentados como valores de  $CI_{50}$  em µg mL<sup>-1</sup> (µmol L<sup>-1</sup>) e o seu intervalo de confiança de 95% obtido por meio de regressão não linear a partir de três experiências independentes realizadas em duplicata , medido pelo ensaio Alamar blue depois de 72 h de incubação. <sup>b</sup>Doxorubicina foi utilizado como controle positivo. Conforme observado na TABELA 30, as substâncias isoladas mostraram atividades significativas, com exceção da roemerina, glaucina, xylopinina, *N*-metillaurotetanina, norpredicentrina e laurotetanina que não exibiram citotoxidade nas linhagens avaliadas, com valor de  $CI_{50}$  excedendo a concentração experimental utilizada (25 µg mL<sup>-1</sup>). Além disso, discretamina apresentou atividade citotóxica moderada apenas para a linhagem de células HL-60 com  $CI_{50}$  igual a 7,90 µg mL<sup>-1</sup>.

A substância reticulina mostrou fraca atividade citotóxica contra a linhagem das células HepG2 ( $CI_{50} = 15,35 \ \mu g \ mL^{-1}$ ) e HL-60 ( $CI_{50} = 23,81 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), sendo inativa contra linhagens das células B16-F10 e K562 ( $CI_{50} > 25 \ \mu g \ mL^{-1}$ ).

O alcaloide discretina revelou fraca atividade antiproliferativa contra células tumorais, das linhagens B16-F10 ( $CI_{50} = 16,15 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), HL-60 ( $CI_{50} = 12,97 \ \mu g \ mL^{-1}$ ) e K562 ( $CI_{50} = 14,85 \ \mu g \ mL^{-1}$ ) sendo que o melhor resultado foi observado para linhagem HepG2 com CI<sub>50</sub> igual a 7,89  $\mu g \ mL^{-1}$ . O alcaloide anonaina demonstrou moderada atividade citotóxica contra as linhagens das células, HepG2 e K562 ( $10,09 \ \mu g \ mL^{-1} \ e \ 10,62 \ \mu g \ mL^{-1}$ ) e fraca atividade contra a linhagem das células HL-60 e B16-F10 ( $CI_{50} = 14,04 \ \mu g \ mL^{-1} \ e \ CI_{50} = 18,80 \ \mu g \ mL^{-1}$ ). A subtância oxoglaucina mostrou atividade citotóxica moderada contra a linhagem das células HL60 ( $CI_{50} = 5,90 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), fraca atividade contra a linhagem das células HL60 ( $CI_{50} = 12,48 \ \mu g \ mL^{-1}$ ) e B16-F10 ( $CI_{50} = 19,14 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), sendo inativa contra linhagens das células HepG2 ( $CI_{50} > 25 \ \mu g \ mL^{-1}$ ).

A norpurpureina mostrou moderada atividade citotóxica contra a linhagem das células HepG2 ( $CI_{50} = 10,11 \ \mu g \ mL^{-1}$ ) e fraca atividade contra a linhagem das células K562 e B16-F10 ( $CI_{50} = 16,72 \ \mu g m L^{-1}$  e 21,08  $\mu g m L^{-1}$ ), sendo inativa contra linhagens das células HL-60 ( $CI_{50} > 25 \ \mu g m L^{-1}$ ).

Para as substâncias isoladas, os melhores resultados foram obtidos para lanuginosina, xylopina e norglaucina contra as linhagens de B16-F10 ( $CI_{50} = 8,46, 3,77 e 8,48 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), HepG2 ( $CI_{50} = 3,89, 1,89 e 3,87 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), HL-60 ( $CI_{50} = 7,81, 1,87 e 6,84 \ \mu g \ mL^{-1}$ ) e K562 ( $CI_{50} = 6,61, 3,12 e 7,84 \ \mu g \ mL^{-1}$ ), com valores de  $CI_{50}$  mais próximos do controle positivo, 2,30, 0,23, 0,83 e 0,68 \ \mu g \ mL^{-1}, respectivamente. Recentemente, TRAN et al. (2010), relataram que os alcaloides aporfinoides, que contêm um grupo 1,2-metilenodióxi , foram os mais potentes contra as linhagens de células tumorais, o que sugere que esse grupo é um dos elementos-chave para a bioatividade. Além disso, a oxidação que leva a formação dos oxoaporfínicos aumenta a conjugação do núcleo aromático, a qual é eficaz para que as moléculas orgânicas possam adotar uma conformação planar, consequentemente, os

oxoaporfínicos exibem relativamente uma melhor atividade citotóxica (LIU et al., 2013) corroborando com os dados aqui descritos para lanuginosina e xylopina.

Essa atividade citotóxica pode ser atribuída a presença do grupo 1,2-metilenodióxi associado ao grupo metoxila na posição 9 do anel D do sistema aporfino, entretanto, somente a presença do grupo 1,2-metilenodióxi não confere a molécula propriedade citotóxica como foi possível observar para roemerina e anonaina. Indicando que o substituinte na posição 9 do anel D pode ser um elemento chave na atividade citotóxica dos alcaloides aporfinos.

Todas essas observações sugerem que a atividade citotóxica de determinado alcaloide é dependente de um conjunto de fatores que quando agregados em uma mesma molécula confere-lhes tal propriedade antitumoral.

Provavelmente, a forte atividade antitumoral demonstrada pela fração clorofórmica alcaloídica (XLFCA) deve ser atribuída à presença dessas substâncias (lanuginosina, xylopina e norglaucina), uma vez que os resultados obtidos podem confirmar o potencial citotóxico da espécie em produzir substâncias bioativas.

Os compostos avaliados que apresentaram atividade citotóxica contra as linhagens testadas também foram citotóxicos para as linhagens normais de células PBMC, apresentando baixa seletividade (TABELA 16). Porém, o alcaloide lanuginosina foi a que apresentou os resultados mais promissores com o índice de seletividade (IS) igual a 2,9 para o melanoma murino (B16-F10) (IS foi calculada com a seguinte equação:  $IS = CI_{50}$  [PBMC]/  $CI_{50}$  [B16-F10]), sendo o resultado maior que o controle positivo (doxorrubicina), onde exibiu um IS igual a 2,2 para a mesma linhagem celular tumoral.

Os resultados da atividade citotóxica obtidos para as substâncias isoladas de *X*. *laevigata* são considerados bastante promissores, e indicam que novas investigações são necessárias com o intuito de estabelecer sua verdadeira eficácia, assim como sua toxidade, visando a procura por novos fármacos com ação antitumoral provenientes de origem vegetal.

## 7. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico da fração clorofórmica alcaloídica (XLFCA) proveniente do extrato metanólico (XLEM) do caule de *X. laevigata* resultou no isolamento de 19 substâncias pertencentes à classe dos alcaloides, sendo quinze delas inéditas na espécie em estudo. As substâncias isoladas foram identificadas como sendo: onze alcaloides do tipo aporfino *sensu stricto*, (*R*)-roemerina, (*S*)-anonaina, (*S*)-glaucina, (*S*)-xylopina, (*S*)-norglaucina, asimilobina, (*S*)-norpurpureina, (*S*)-*N*-metillaurotetanina, (*S*)-norpredicentrina, (*S*)-calicinina e (*S*)-

laurotetanina; dois oxoaporfínicos: lanuginosina e oxoglaucina; quatro tetraidroprotoberberínicos: (-)-xylopinina, (+)-discretina, (-)-coritenchina e (+)-discretamina; um benziltetraidroisoquinolínico: (+)-reticulina; e um morfinanofienona: (+)-flavinantina. Vale ressaltar que essa é a primeira vez que é relatado o isolamento de um alcaloide do tipo morfinandienona, flavinantina, no gênero *Xylopia*.

O ensaio de citotoxidade *in vitro* dos extratos e frações revelou a capacidade antitumoral da espécie estudada. Dentre as amostras avaliadas, a fração clorofórmica alcaloídica (XLFCA) foi a que apresentou os melhores resultados diante das duas linhagens tumorais avaliadas com  $83,60 \pm 1,32\%$  de inibição para as células HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) e  $89,48 \pm 0,79\%$  de inibição para as células HL-60 (leucemia promielocítica humana), justificando assim o seu estudo fitoquímico, em busca da(s) substância(s) responsável(eis) pela atividade antitumoral *in vitro* apresentada.

Dentre os alcaloides testados provenientes da fração clorofórmica alcaloídica, lanuginosina, xylopina e (*S*)-norglaucina foram os que apresentaram atividade citotóxica mais significativa em todas as linhagens avaliadas. Apesar da xylopina apresentar maior atividade citotóxica contra as linhagens de células avaliadas, a lanuginosina apresentou maior seletividade dentre os alcaloides testados, justificando assim a continuidade do estudo dessas duas substâncias, para podermos conhecer o mecanismo de ação que explica a atividade citotóxica destes alcaloides.

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

# 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, S.A.; GOGAL, R.M.; WALSH, J.E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, vol.170, p.211-224, 1994.

ALALI, F.Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN. J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. Journal of Natural Products, vol.62, p.504-540, 1999.

ALFONSO, D.; SAIZARBITORIA, T.C.; ZHAO, G.X.; SHI, G.; YE, Q.; SCHWEDLER, J.T.; MCLAUGHLIN, J.L. Aromin and aromicin, two new bioactive annonaceous acetogenins, prossessing an unusual bis-thf ring structure, from *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Tetrahedron**, vol.52, p.4215-4224, 1996.

ANDRADE, N. C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; MAIA, J.G. S. Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopia cayennensis* Maas.Biochemical Systematics and Ecology, vol.32, p.1055-1058, 2004.

# ASE. HERBÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA. Disponível em:

<http://www.splink.org.br/showGoogle?ts\_any=annonaceae&extra=&profile=&session\_id=2 014052114160623271&search\_id=3&search\_seq=17&group=&lang=pt&synonyms=&nocac he=0.06211510975845158&map=global&width=1366&height=643&mode=maps> Acesso em: 21 maio de 2014a.

ASE. HERBÁRIO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE, DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA. Disponível em: <a href="http://splink.cria.org.br/centralized\_search">http://splink.cria.org.br/centralized\_search</a>> Acesso em: 15 abril 2014b.

BAKARNGA-VIA, I.; HZOUNDA, J. B., FOKOU, P.V. T.; TCHOKOUAHA, L. R. Y.; GARY-BOBO, M.; GALLUD, A.; GARCIA, M.; WALBADET, L; SECKA, Y.; DONGMO, P.M.J.; BOYOM, F. F.; MENUT, C. Composition and cytotoxic activity of essential oils from *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich, *Xylopia parviflora* (A. Rich) Benth.) and *Monodora myristica* (Gaertn) growing in Chad and Cameroon. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, vol.14, p.1-8, 2014. BENTLEY, K. W. & CARDWELL, H. M. E. The Morphine-Thebaine Group of Alkaloids. Part V. The Absolute Stereochemistry of the Morphine, Benzylisoquinoline, Aporphine, and Tetrahydroberberine Alkaloids. **Journal Chemical Society**, p.3252-3260, 1955.

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

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

BRUNETON, J. Farmacognosia : fitoquímica, plantas medicinales. 2ª edição. Editora Acribia, 1098 p., 2001.

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

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

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

CHATROU, L. W.; ESCRIBANO, M. P.; VIRUEL, M. A.; MAAS, J. W.; RICHARDSON, J. E.; HORMAZA, J. I. Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new source of data for plant species-level phylogenetics. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, vol.53, p.726-733, 2009.

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

CHEN, Z. F.; SHI, Y. F; LIU, Y. C.; HONG, X.; GENG, B.; PENG, Y.; LIANG, H. TCM Active Ingredient Oxoglaucine Metal Complexes: Crystal Structure, Cytotoxicity, and Interaction with DNA. **Inorganic Chemistry**, vol.51, p.1998-2009, 2012.

CHIOU, C-M.; LIN, C-T.; HUANG, W-J.; CHANG, Y-M.; HO, Y-J.; SU, M-J. & LEE, S-S. Semisynthesis and Myocardial Activity of Thaliporphine *N*-Homologues. **Journal Natural Products**, vol.22, p.405-412, 2013.

COMINS, D. L.; THAKKER, P.M.; BAEVSKY, M. F. and BADAWI, M. M. Chiral Auxiliary Mediated Pictet-Spengler Reactions: Asymmetric Syntheses of (-)-Laudanosine, (+)-Glaucine and (-)-Xylopinine. **Tetrahedron**, vol.53, p.16327-16340, 1997.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. L.; FARNSWORTH, N. R. The potencial of alkaloids in drugs discovery. **Phytotherapy Research**, vol.15, p.183-205, 2001.

CORRÊA, M. P.Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas. **IBDF**, Rio de Janeiro, RJ, 1984.

COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriopsis blepharophylla*, *Guatteriopsis friesiana* e *Guatteriopsis híspida* (Annonaceae) – Tese (Doutorado) – Doutorado em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Ciências, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 380 p., 2009.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; VAZ, N. P.; DUARTE, M. C. T.; DELARMINA, C.; BRAGA, R. M.; MAIA, B. L. N. S. 7,7-dimethylaporphine alkaloids from the stems os *Guatteriopsis friesiana*. Journal of Natural Products, vol.72, p.1516-1519, 2009b.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; NAKAMURA, T. U.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine-β-Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules** (Basel. Online), vol.16, p.9714-9720, 2011b.

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

antiproliferative and antimicrobial activies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol.22, p.1111-1117, 2011a.

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

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

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

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

COSTA, E. V. ; SILVA, T. B. ; MENEZES, L. R. A. ; RIBEIRO, L. H. G. ; GADELHA, F. R. ; CARVALHO, J. E. de; SOUZA, L. M. B. ; SILVA, M. A. N. ; SIQUEIRA, C. A. T. ; SALVADOR, M. J. . Biological activities of the essential oil from the leaves of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). Journal of Essential Oil Research, vol.25, p.179-185, 2013b.

CRAIG, J. C.; ROY, S. K. Optical Rotatory Dispersion and Absolute Configuration II. **Tetrahedron**, v. 21, p.395-399, 1965.

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

Da CRUZ, P.E. O.; COSTA, E.V.; MORAES, V.R.S.; NOGUEIRA, P.C.L.; VENDRAMIN, M.E. BARISON, A.; FERREIRA, A. G.; PRATA, A. P.N. Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, vol.39, p.872-875, 2011.

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

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

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

DEWICK, P.M. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. Chichester: 3<sup>a</sup> edição. **Editora John Wiley & Sons**, LTD, 509 p., 2009.

Di STASI, L. C. AND HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. São Paulo: 2ª edição, **Editora UNESP**, 603 p., 2002.

DOMÍNGUEZ, X. A. Métodos de Investigacion Fitoquimica. Editorial Limusa, 1973.

DRUMOND, M.A.; Kill, L.H.P.; LIMA, P.C.F.; OLIVEIRA, M.C.; OLIVEIRA, V.R.; ALBUQUERQUE, S.G.; NASCIMENTO, C.E.S. & CAVALCANTE, J. Estratégias para o uso sustentável da biodiversidade da caatinga. In: Workshop de avaliação e identificação de ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade do bioma caatinga. Petrolina, Embrapa/Cpatsa, UFPE e Conservation International do Brasil, 2000.

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

ERKENS, R. H. J.; CHATROU, L. W.; KOEK-NOORMAN, J.; MAAS, J. W.; MAAS, P.J. M. Classification of a large and widespread genus of Neotropical trees, *Guatteria* (Annonaceae) and its three satellite genera *Guatteriella*, *Guatteriopsis* and *Heteropetalum*. **Taxon**, vol.56, p.757-774, 2007.

GOZLER, B.; OZIC, P.; FREYER, A. J. and SHAMMA, M. Morphinandienone alkaloids from *Roemeria refracta*. Journal of Natural Produtcs, vol.53, p.986-988, 1990.

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

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids II. Journal of Natural **Produtcs**, vol.42, p.325-360, 1979.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids III. Journal of Natural **Produtcs**, vol.46, p.761-835, 1983.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids IV. Journal of Natural **Produtcs**, vol.51, p.389-474, 1988.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids V. Journal of Natural **Produtcs**, vol.57, p.1033-1135, 1994.

HARRIGAN, G. G.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; CHAN, G. W.; JOHNSON, R. K. Isolation of Bioactive and Other Oxoaporphine Alkaloids from Two Annonaceous Plants, *Xylopia aethiopica* and *Miliusa cf. banacea*. Journal Natural Products. vol.57, p.68-73, 1994.

HASLAM, E. Shikimic Acid Metabolism and Metabolites. Chichester: Editora John Wiley, 387p, 1993.

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

HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; RAHARISOLOLALAO, A. Alcaloïdes des Annonacees. XXX. Alcaloïdes de *Xylopia buxifolia* et de *Xylopia danguyella*, **Journal Natural Products**, vol.44, p.551-556, 1981.

HOCQUEMILLER, R.; DEBITUS, C.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Alcaloïdes des Annonacees. XLVIII. Alcaloïdes des écorces de *Guatteria discolor*, **Journal Natural Products**, vol.47, p.353-362, 1984.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A.; SIOUMIS, A. A. Alkaloids of *Xylopia papuana*. **Australian Journal of Chemistry**, vol.21, p.1383–1386, 1968.

JOLY, A. B. Botânica: introdução à taxonomia vegetal. 13<sup>a</sup> edição. Editora São Paulo: Companhia Editora Nacional, 777 p, 2005.

JOSSANG, A., LEBEOUF, M., CAVE, A. and PUSSET, J. Alkaloids of the Annonaceae. 96. Dehydroxylopine and dehydrocorytenchine, novel isoquinoline alkaloids from *Xylopia vieillardi*. Journal Natural Products, vol.54, p.466–472, 1991.

KESSLER, P.J. A. Annonaceae. *In*: Kubitski, K., Rohwer, J. C., Bittrich, V. (eds.). The families and genera of vascular plants II: Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families, p.93-129, Springer-Verlag, Berlin, 1993.

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

LIU, Y.; LIU, J.; DI, D.; LI, M.; FEN, Y. Structural and Mechanistic Bases of the Anticancer Activity of Natural Aporphinoid Alkaloids. **Current Topics in Medicinal Chemistry**,v. 13, p.2116-2126, 2013.

LOPES, J. C. and MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol.36, p.125-131, 2014.

LUCKNER, M. Secondary Metabolism in Microorganisms, Plants, and Animals. 3<sup>rd</sup>. edition. Jena: **Gustav Fischer**, 562p, 1990

MANN, J. Chemical Aspects of Biosynthesis. Oxoford University Press, 92p, 1994.

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

MAAS, P.J.M.; KAMER, H. M. DE; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. DE; RAINER, H. Annonaceae from central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, vol.52, p.60-94, 2001.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.
Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:
<a href="http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219">http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219</a>>. Acesso em: 21 Jun. 2014

MARTINS, D.; HAMARSKI, L.; ALVARENGA, S. A. V.; ROQUE, N. F. Labdane dimers from *Xylopia aromatica*. **Phytochemistry**, vol.51, p.813-817, 1999.

MARTINS, D.; OSSHIRO, E.; ROQUE, N. F.; MARKS, V., GOTTLIEB, H. E. A sesquiterpene dimer from *Xylopia aromatica*. **Phytochemistry**, vol.48, p.677-680, 1998.

MARTINS, D.; ALVARENGA, M. A.; ROQUE, N. F.; FELÍCIO, J. D. Diterpenes and alkaloids from brazilian *Xylopia* Species. **Química Nova**, vol.18, p.14-16, 1995.

MATTOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2<sup>a</sup> Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 141p, 1997.

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

MMA, Ministério do Meio Ambiente do Brasil. Disponível em: <a href="http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-e-promo%C3%A7%C3%A3o-do-uso-da-diversidade-gen%C3%A9tica/plantas-para-o-futuro">http://www.mma.gov.br/biodiversidade/conserva%C3%A7%C3%A3o-e-promo%C3%A7%C3%A3o-do-uso-da-diversidade-gen%C3%A9tica/plantas-para-o-futuro</a> Acesso em: 16 junho de 2014.

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

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

MURILO, J.; RESTREPO, D. Las Anonáceas de la Región de Araracuara. Serie Estudios en la Amazonía Colombiana XX. **Soporte Editorial**, Bogotá, 218p, 2000.

NASCIMENTO, M. C. B. do. **Constituintes bioorgânicos isolados de** *Annona cacans* **Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades**. Tese (Doutorado) – Doutorado em Química, Departamento de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 197p., 2008.

NAVARRO, R. V.; SETTE, I. M. F.; Da-CUNHA, E. V. L.; SILVA, M.S.; BARBOSA-FILHO, J. M. and MAIA, J. G. S. Alcaloides de *Duguettia flagellaris* Huber (Annonaceae). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, vol.3, p.23-29, 2001. NIÉTO, M.; LEBOEUF, M. and CAVÉ, A. Isolement de la lanuginosine à partir d'une annonacée malgache, *Xylopia lemurica*. **Phytochemistry**, vol.14, p.2508-2509, 1975.

NIÉTO, M.; SEVÉNET, T.; LEBOEUF, M; CAVÉ, A. Plantes de Nouvelle Caledonie XL. Alcaloides des Annonacees: Alcaloides du *Xylopia Pancheri*. **Planta Medica**, vol.30, p.48-58, 1976.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; CHALO MUTISO, P.B.; JUMA, F. D. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. **Phytochemistry**, vol.65, p.939-944, 2004.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; CHALO MUTISO, P.B.; JUMA, F. D. Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. **Phytochemistry**, vol.67, p.2671-2675, 2006.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; MUTISO, P.B. C.; JUMA, F. D. Antinociceptive effects of the extracts of *Xylopia parviflora* bark and its alkaloidal components in experimental animals. **Journal of Natural Medicines**, vol.64, p.9-15, 2010.

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

ORTIZ, A. A.; SUAREZ, L. E. C.; PATIÑO, G. S. Aporfinoides en hojas de *Oxandra longipetala* R. E. FR. (Annonaceae). Scientia et Technica, vol.XIII, n. 33, p.19-22, 2007.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G. GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. Journal of Ethnopharmacology, vol.111, p.630-635, 2007.

PAREDES, A.; HASEGAWA, M.; PRIETO, F.; MENDEZ, J.; RODRÍGUEZ, M.; RODRÍGUEZ-ORTEGA, M. Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions. Journal of Ethnopharmacology, vol.78, p.129-132, 2001.

PECKOLT, T and PECKOLT, G. Historia das Plantas Medicinaes e Uteis do Brazil. Typografia Laemmert & C., p.10-11, 1888. PELLETIER, S. W. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives, vol.5; John Wiley & Sons: New York, Chapter 3, 1987.

PERES, L. E. P.Metabolismo Secundário das Plantas. Disponível em: < http://www.oleosessenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/> Acesso em: 20 maio de 2014.

PIMENTA, L. P.S.; MENDONÇA, D. D. Aporphine alkaloids and feruloylamides from the bark of *Xylopia benthamii* R.E. Fries (Annonaceae). **Natural Product Research**. vol.26, p.1948-1950, 2012.

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

PONTES, A.F.; BARBOSA, M.R. DE V.; MAAS, P.J.M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. Acta Botanica Brasilica, vol.18, p.281-293, 2004.

PUVANENDRAN, S.; MANORANJAN, T.; WICKRAMASINGHE, A.; KARUNARATNE, D. N.; KUMAR, V.; WIJESUNDARA, D. S. A.; CARR, G.; ANDERSEN, R. J. & KARUNARATNE, V. Alkaloids from *Xylopia parvifolia* and *Xylopia nigricans* (Annonaceae). Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka, vol.38, p.75-76, 2010.

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

QUEIROZ, J. C. C.; ANTONIOLLI, A. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BRITO, R. G.; BARRETO, R. S. S.; COSTA, E. V.; DA SILVA, T. B.; PRATA, A. N. P.; DE LUCCA JUNIOR, W.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T. and QUINTANS, J. S. S. Evaluation of the Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of the Essential Oil from Leaves of *Xylopia laevigata* in Experimental Models. **The Scientific World Journal**, vol.2014, p.1-11, 2014.

QUEIROZ, E. F.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A.; PAULO, M. Q.; FOURNET, A. Pessoine and Spinosine, Two Catecholic Berbines from *Annona spinescens*. Journal of Natural Products, vol.59, p.438-440, 1996.

QUINTANS, J. S. S.; SOARES, B. M.; FERRAZ, R. P.C.; OLIVEIRA, A. C. A.; SILVA, T. B.; MENEZES, L. R. A.; SAMPAIO, M. F. C.; PRATA, A. P.N.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; ANTONIOLLI, A. R.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P.Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopia laevigata*. **Planta Medica**, vol.79, p.123-130, 2013.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A. St.-Hil. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien**, vol.108B, p.191-205, 2007

RASOANAIVO, P.; RATSIMAMANGA-URVERG', S.; RAFATRO, H.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; PALAZZINO, G.; GALEFFI, C. and NICOLETTI, M. Alkaloids of *Hernandia voyronhi*: Chloroquine-Potentiating Activity and Structure Elucidation of Herveline D. **Planta Medica**, vol.64, p.58-62, 1998.

RINGDAHL, B.; ROSALIND, P.K.; CHAN, J.; CRAIG, C.; CAVA, M. P.; SHAMMA, M. Circular Dichroism of Aporphines. Journal of Natural Products, v. 44, p.80-85, 1981.

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

SÁNCHEZ, M. Catálogo Preliminar Comentado de la Flora del Medio Coquetá. Estudios en la Amazônia Colombiana XII. **Impreandes Presencia**, Bogotá, 557p, 1997.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavanoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, vol.55, p.567-573, 2000.

SCHMUTZ, J. The alkaloids of *Xylopia discreta*. Helvetica Chimica Acta, vol.42, p.335-343, 1959.

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

SILVA, D. M.; COSTA, E. V.; NOGUEIRA, P.C. L.; MORAES, V. R. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; SALVADOR, M. J.; RIBEIRO, L. H. G.; GADELHA, F. R.; BARISON, A.; FERREIRA, A. G. Ent-kaurane diterpenoids and other constituents from the stem of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). **Química Nova**, vol.35, p.1570-1576, 2012.

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

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

SONNET, P.E.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors II. Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. Journal of Pharmaceutical Sciences, vol.60, p.1254-1256, 1971.

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

STERMITZ, F. R.; CASTRO, O. Pentasubstituted Aporphine Alkaloids from *Phoebe molicella*. Journal Natural Products, vol.46, p.913–916, 1983.

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

SUAU, R.; CUEVAS, A.; GARCIA, A. I.; RICO, R. and CABEZUDO, B. Isoquinoline alkaloids from *Platycapnos*. **Phytochemistry**, vol.30, p.3315-3317, 1991.

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

SULAIMAN, S. N. B. Alkaloids isolated from *Litsea grandis* and *Litsea lancifolia* (Lauraceae) – Dissertation (Master) – Master of Scince, Faculty of Scince, University of Malaya, Kuala Lumpur, 184 p., 2011.

TATSADJIEU, L. N.; ESSIA-NGANG, J. J.; NGASSOUM, M. B.; ETOA, F. X. Antibacterial and antifungical activity of *Xylopia aethiopica, Monodora myristica, Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, vol.74, p.374-469, 2003.

TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; ANDRADE J. R. H. F.; GUALDA, N. C. A.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N. BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, vol.12, p.382-390, 2005.

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

VAN POSER, G. L.; MENTZ, L. A. Diversidade biológica e sistemas de classificação. In. SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 5<sup>a</sup> edição. **Editora da UFSC**, 2003.

VENDRAMIN, 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.

VILEGAS, W.; FELICIO, J. D.; ROQUE, N. F.; GOTTLIEB, H. E. Diterpenic adducts from *Xylopia* species. **Phytochemistry**, vol.30, p.1869-1872, 1991.

WIJERATNE, E. M. K.; HATANAKA, Y.; KIKUCHI, T.; TEZUKA, Y.; GUNATILAKA, A. A. L. A. Dioxoaporphine and other alkaloids of two Annonaceous plants of Sri Lanka. **Phytochemistry**, vol.42, p.1703-1705, 1996.

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

ZAWAWI, N. K. N. A.; AHMAT, N.; AHMAD, R.; JAAFAR, F. M.; GHANI, N. A. Oxoaporphine alkaloids and flavonols from *Xylopia ferrugínea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, vol.43, p.7-9. 2012.

ZHENJIA, Z.; MINGLIN, W.; DAIJIE, W.; WENJUAN, D.; XIAO, W. and CHENGCHAO, Z. Preparative separation of alkaloids from *Nelumbo nucifera* leaves by conventional and pH-zone-refining counter-current chromatography. **Journal of Chromatography B**, vol.878, p.1647-1651, 2010.