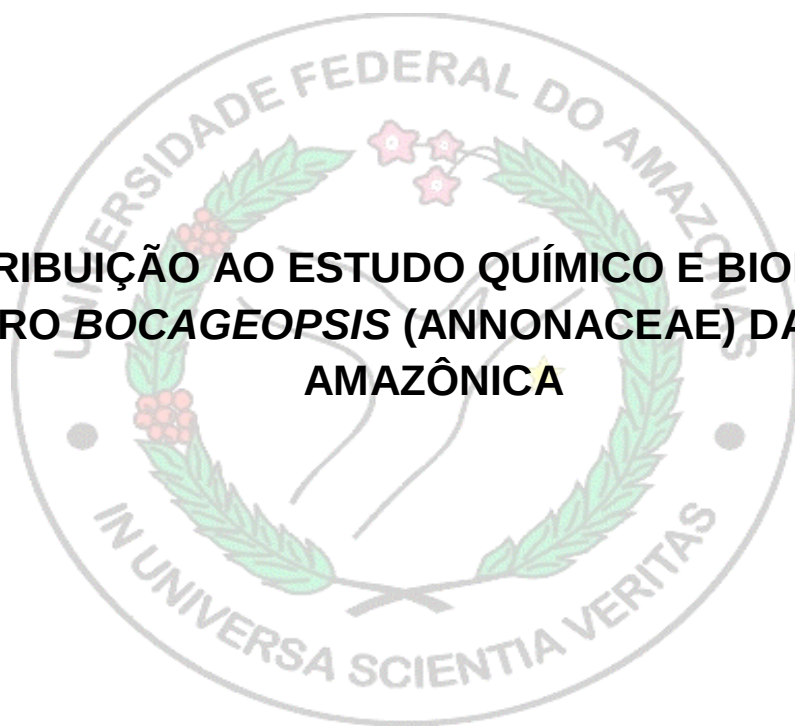


**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO
GÊNERO *BOCAGEOPSIS* (ANNONACEAE) DA REGIÃO
AMAZÔNICA**



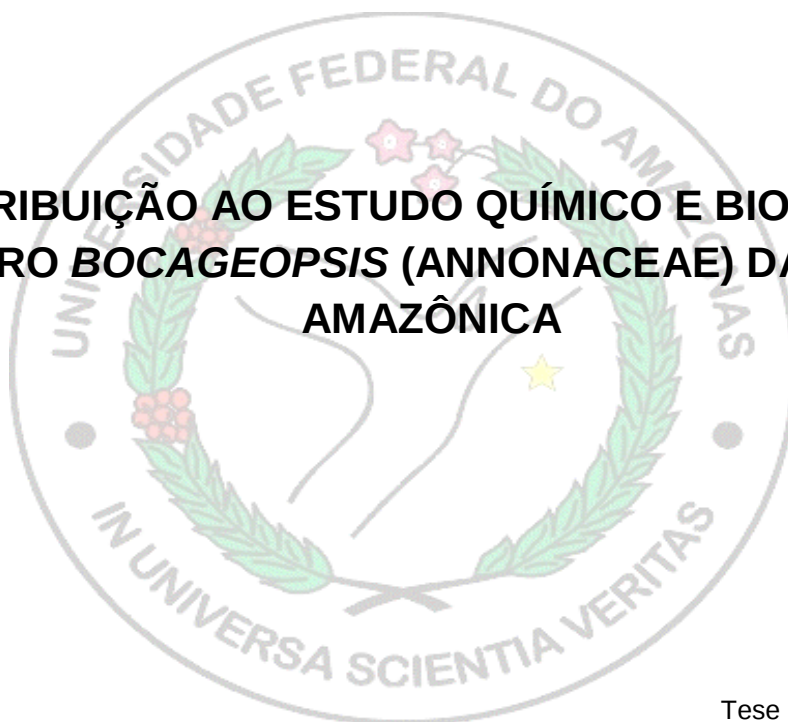
ELZALINA RIBEIRO SOARES

**MANAUS
2019**

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

ELZALINA RIBEIRO SOARES*

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO
GÊNERO *BOCAGEOPSIS* (ANNONACEAE) DA REGIÃO
AMAZÔNICA**



Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisitos para obtenção do Título de Doutora em Química, na área de concentração Química Orgânica.

ORIENTADORA: Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro
COORIENTADOR: Dr. Felipe Moura Araújo Da Silva

*Bolsista CAPES

**MANAUS
2019**

Ficha Catalográfica

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

S676c Soares, Elzalina Ribeiro
Contribuição ao estudo químico e biológico do gênero
Bocageopsis (Annonaceae) da Região Amazônica / Elzalina Ribeiro
Soares. 2019
342 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Lúcia Belém Pinheiro
Coorientador: Felipe Moura Araújo Da Silva
Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Annonaceae. 2. Bocageopsis. 3. Técnicas Hifenadas. 4.
Alcaloides isoquinolínicos. 5. Flavonoides Glicosilados. I. Pinheiro,
Maria Lúcia Belém II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

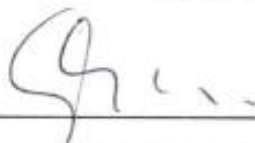
**“CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO QUÍMICO e
BIOLÓGICO DO GÊNERO BOCAGEOPSIS
(ANNONACEAE) DA REGIÃO AMAZÔNICA”**

Elzalina Ribeiro Soares

Tese de Doutorado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal do Amazonas como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor(a) em Química.

Aprovado, em 05 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA



Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro
Universidade Federal do Amazonas
Orientador



Dra. Rita de Cássia Saraiva Nunomura
Membro UFAM



Dr. Emmanoel Vilaça Costa
Membro UFAM



Dr. Raimundo Carlos Pereira Júnior
Membro Externo/UEA



Dra. Lyege Magalhães Oliveira
Membro Externo/UFAM

Universidade Federal do Amazonas
Manaus, 05 de julho de 2019.

*Aos meus primeiros professores Maria
Paula Aquino Moraes (Mãe), Joaquim
Batista Soares (Pai) e Jaqueline Ribeiro
Soares (Irmã), pelos ensinamentos, amor,
alicerce, exemplo de vida e todo esforço para
me proporcionar uma educação digna.
A minha avó Maria Rosa Azevedo, pelo
companheirismo, carinho e motivação.
A eles eu dedico.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida, por me guiar, iluminar e me dar paciência para seguir em frente nesta jornada cheia de percalços, no entanto, prazerosa e compensadora ao ver o conhecimento adquirido e o trabalho realizado.

Alguém já disse que “Deus não une pessoas, ele une propósitos” e ao longo de nossas vidas esses anjos vão aparecendo e tornando o caminho mais simples e prazeroso de se percorrer, e aqui expresso meus sinceros agradecimentos as pessoas que tornaram essa jornada possível.

Agradeço aos meus pais, Maria Paula Ribeiro de Aquino Moraes, Joaquim Batista Soares e a minha avó Maria Rosa Ribeiro, de uma forma especial por todo amor, carinho e valores ensinados, pela motivação nos momentos difíceis, por entenderem as minhas faltas e momentos de reclusão, e por me mostrarem o quanto era importante estudar, mesmo eles não tendo a mesma oportunidade. Através do incentivo de vocês durante todos esses anos que hoje posso celebrar esse marco na minha vida, muito obrigada.

O reconhecimento sincero e de todo coração ao meu namorado Dr. Richardson Alves de Almeida pela grande ajuda, enorme paciência e compreensão. Agradeço as palavras de conforto, carinho e motivação nos momentos difíceis durante esses quatro anos de doutorado e por ser meu ponto de equilíbrio.

Um agradecimento justo a Professora Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro pela orientação. Poucos são privilegiados de conviver com uma pessoa generosa, eficiente e objetiva. À você professora meu muito obrigada pelo aprendizado, paciência, compreensão, pelas palavras amigas e por toda motivação repassadas a mim. Com certeza esses quatro anos de ensinamentos mudaram a minha vida para melhor.

Ao coorientador desse trabalho Dr. Felipe Moura Araújo da Silva, por ter idealizado esse projeto, pelos ensinamentos e pela paciência.

Aos professores Rita de Cássia Saraiva Nunomura, Túlio de Orleans Gadelha Costa e Emmanoel Vilaça Costa pelas colaborações e esclarecimentos passados durante a qualificação da tese.

Ao professor Dr. Afonso Duarte Leão de Souza pelo apoio durante a pesquisa e principalmente pela oportunidade de fazer parte do Laboratório de Cromatografia e Espectrometria de Massas – LABCEM.

Ao Dr. Antônio Carlos Webber pelos ensinamentos e por ter ajudado na identificação das espécies de *Bocageopsis*.

A MSc. Ivanete Ferreira de Souza pelos ensaios antimicrobianos realizados no Laboratório de Microbiologia Geral do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA.

Ao MSc. Kidney Gomes pelas análises de RMN realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear – LABNMR da Universidade Federal do Amazonas.

Meus sinceros agradecimentos a amiga e companheira de trabalho Dra. Bruna Ribeiro de Lima, uma irmã que ganhei durante essa minha trajetória na UFAM. Uma pessoa que me faz refletir muito sobre a vida e que com certeza devido seus ensinamentos repassados eu venho me tornando uma pessoa melhor a cada dia.

Aos meus amigos e irmãos MSc. Gilmar Prado de Souza e MSc. Gilmara Prado de Souza pela amizade e por não medirem esforços se fazendo sempre presentes.

A Jéssica Burlamaque Maciel, Luana Leão Hanna Mafra e Natalie Araújo pela ajuda no início do doutorado e por tornarem os dias no moinho e HPLC menos dolorosos.

Aos meus monitores Thainá Borges e Geovanni da Costa Vieira pelo auxílio durante as aulas de química orgânica experimental.

Aos amigos que passaram durante essa trajetória na UFAM, por suas palavras de incentivo eu agradeço: Arianne Máximo, Leylane Araújo, Bruno Amorim, Caroline Mathias, Milena Campelo, Renyer Costa, Fabiana Almeida, Adriana Cavalcante, Sidney Azevedo, Igor Medeiros, Renan Feitosa, Orlando Amazonas, Jessica Maria, Daniele Alencar, Aimee Oliveira, Mayane Pereira, Fátima Almeida, Paula Suelem, Thaís Nobre, Ingridy Suellem, Luana Monteiro, Priscila Aquino, Sarah Raquel, Paulo Santiago, Magaly Brandão e Noam Gadelha.

A todos que acreditaram em mim e tinham certeza que eu era capaz, até quando eu mesmo duvidava, a vocês muito obrigada.

RESUMO

A família Annonaceae é conhecida por suas espécies possuírem uma quantidade variada de compostos e sua importância econômica. As substâncias que se destacam são os alcaloides, terpenos e acetogeninas, uma vez que são relevantes para as atividades biológicas e farmacológicas relatadas na literatura. Embora muitos gêneros tenham sido explorados fitoquimicamente, há alguns com menos estudos, como *Bocageopsis*, que consiste em quatro espécies (*B. mattogrossensis*, *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*), todas restritas à América do Sul tropical e a leste da Cordilheira dos Andes. Abordagens fitoquímicas recentes realizadas com óleos essenciais - OEs de *B. multiflora* e *B. pleiosperma* e frações alcaloides de *B. pleiosperma* demonstraram o potencial químico desse gênero. O presente trabalho apresenta os dados fitoquímicos e biológicos de três espécies do gênero *Bocageopsis* (*B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*) comumente encontradas na Região Amazônica. Diferentes partes das plantas foram submetidas à hidrodestilação, tratamento ácido-base e infusão para obtenção das substâncias e posteriormente submetidas a abordagens integrativas, como espectrometria de massa por ionização ambiental (LS-MS), técnicas cromatográficas hifenizadas por espectrometria de massa (CG-EM, CLAE-EM e CLAE-EM/EM) e RMN 1D e 2D. As análises por CG/EM dos OEs das três espécies, permitiu a identificação de 63 constituintes, além de revelar a presença exclusiva de sesquiterpenos e seus derivados e a ausência de monoterpenos. Os ensaios antimicrobianos dos OEs revelaram atividade bacteriológica dos OEs dos galhos finos e grossos de *B. multiflora*, e das folhas de *B. canescens* e *B. pleiosperma* contra as linhagens de *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Mycobacterium smegmatis*, além da atividade fungicida dos OEs das folhas de *B. canescens* e galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora* contra o patógeno *Candida albicans*. As abordagens integrativas das frações alcaloides das folhas e galhos finos de *B. canescens* e dos galhos grossos de *B. multiflora* permitem a identificação provisória de cinco alcaloides (anonaina, estefarina, isoboldina, asimilobina e norushinsunina). O fracionamento cromatográfico das folhas de *B. canescens* resultou no isolamento de dois isômeros alcaloides da classe das isoquinolinas simples, salsolina e isosalsolina, além dos alcaloides liriodenina, atherolina, nornuciferina e laurotetanina. O fracionamento da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora* resultou no isolamento dos alcaloides salsolina,

isosalsolina, pronuciferina e *N*-formil-estefarina. O fracionamento do extrato aquoso das folhas de *B. canescens* permitiu a obtenção dos flavonóides kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnosídeo (kaempferitrina) e o novo flavonóide kaempferol-3-O- [α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -L-ramnopiranosil]-7-O- α -L-ramnopyranosídeo, pouco frequente na família Annonaceae, denominado canescentina. Todas as substâncias identificadas e isoladas são inéditas nas espécies estudadas, sendo os alcaloides norushinsunina, atherolina, pronuciferina e *N*-formil-estefarina, inédita no gênero *Bocageopsis*. Os alcaloides salsolina e isosalsolina foram publicados pela primeira vez na ordem Magnoliales. Portanto, nossos resultados fitoquímicos e biológicos para o gênero *Bocageopsis* reforçam a importância do gênero para a família Annonaceae.

Palavras-chave: Annonaceae, *Bocageopsis*, Técnicas Hifenadas, Cromatografia, Espectrometria de Massas, Ressonância Magnética Nuclear, Alcaloides isoquinolínicos, Flavonoides Glicosilados, Óleos essenciais.

ABSTRACT

The Annonaceae family is known for its species possess a varied amount of compounds and their economic importance. The substances that stand out are the alkaloids, terpenes and acetogenins, since they are relevant for the biological and pharmacological activities reported in the literature. Although many genus have been phytochemically explored, there are some with less studies such as *Bocageopsis* that consists of four species (*B. mattogrossensis*, *B. canescens*, *B. multiflora* and *B. pleiosperma*), all restricted to tropical South America and eastern of the Andes Cordillera. Recent phytochemical approaches carried out with *B. multiflora* and *B. pleiosperma* essential oils - EOs and *B. pleiosperma* alkaloid fractions have demonstrated the chemical potential of this genus. The present work presents the phytochemical and biological data of three species of the genus *Bocageopsis* (*B. canescens*, *B. multiflora* and *B. pleiosperma*) commonly found in the Amazon Region. Different parts of the plants were submitted to hydrodistillation, acid-base treatment and infusion to obtain the substances and later they were submitted to integrative approaches such as environmental ionization mass spectrometry (LS-MS), chromatographic techniques hyphenated to mass spectrometry (GC-MS, HPLC-MS and HPLC-MS/MS) and 1D and 2D NMR. GC-MS analysis of the EOs of the three species, allowed the identification of 63 constituents, besides revealing the exclusive presence of sesquiterpenes and their derivatives and absence of monoterpenes. The antimicrobial essays of the EOs revealed bacteriological activity of the EOs of the fine branches and thick branches of *B. multiflora*, and of the leaves of *B. canescens* and *B. pleiosperma* against the strains of *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* and *Mycobacterium smegmatis*, in addition to fungicidal activity of EOs from leaves of *B. canescens* and thin branches and thick branches of *B. multiflora* against the pathogen *Candida albicans*. The integrative approaches of alkaloid fractions of leaves and thin branches of *B. canescens* and the thick branches of *B. multiflora* the allowed identification tentatively of five alkaloids (anonaine, stepharine, isoboldine, asimilobine and norushinsunin). The chromatographic fractionation of the leaves of *B. canescens* resulted in the isolation of two alkaloids isomers of the class of simple isoquinolines, salsolina and isosalsolina, besides the alkaloids liriodenina, atherolina, nornuciferina and laurotetanina. Fractionation of the alkaloid fraction of the thick branches of *B. multiflora* resulted in the isolation of the alkaloids salsolina, isosalsolin, pronuciferine

and *N*-formyl-stepharine. The fractionation of the aqueous extract of the leaves of *B. canescens* allowed the obtention of the flavonoids kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnoside (kaempferitrine) and the novel flavonoid kaempferol-3-O-[α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -L-rhamnopyranosyl]-7-O- α -L-rhamnopyranoside, uncommun in Annonaceae family, named canescentine. All the substances identified and isolated are unpublished in the species studied, being the alkaloids norushinsunine, atheroline, pronuciferine and *N*-formyl-stepharine ineditis in the genus *Bocageopsis*. The alkaloids salsolina and isosalsolina were published for the first time in the order Magnoliales. Therefore, our phytochemical and biological results for the genus *Bocageopsis* reinforce the importance of the genus for the Annonaceae family.

Keywords: Annonaceae, *Bocageopsis*, Hyphenated Techniques, Chromatography, Mass Spectrometry, Nuclear Magnetic Resonance, Isoquinoline alkaloids, Flavonoid Glycosides, Essential oil.

LISTA DE SIGLAS

APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
ATCC	American Type Culture Collection
Bc	<i>Bocageopsis canescens</i>
BcFFr	Fração alcalóidica das folhas de <i>Bocageopsis canescens</i>
Bmu	<i>Bocageopsis multiflora</i>
BOD	Biological Oxygen Demand
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DAD	Diode Array Detector
Da	Dalton
DMAPP	Dimethylallyl Diphosphate
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DCM	Diclorometano
EI	Electron Ionization
EM	Espectrometria Massa
ESI	Electrospray Ionisation
G	Gravidade
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HCl	Ácido Clorídrico
IPP	Isopentenyl Diphosphate
IT	Ion Trap
IR	Índice de Retenção
ISQ	Single Quadrupole MS
INPA	Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia
LC	Liquid chromatography
LS	Leaf Spray
MS	Mass Spectrometry
MHz	MegaHertz
MEP	Metil eritritol fosfato
nm	Nanômetros
OE	Óleo essencial

OMS	-----	Organização Mundial de Saúde
PPM	-----	Parte por Milhão
RMN	-----	Ressonância Magnética Nuclear
RFAD	-----	Reserva Florestal Adolpho Ducke
sp	-----	Espécie
TR	-----	Tempo de Retenção
TSQ	-----	Triple-Stage Quadrupole
TIC	-----	Chromatogram of total ions
µg	-----	Micrograma

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Medicamentos aprovados entre 1981-2014.	35
Figura 2. Distribuição geográfica da família Annonaceae.	40
Figura 3. Flores de diferentes espécies da família Annonaceae.	41
Figura 4. Ilustração de um fruto de alguns gêneros da família Annonaceae.	41
Figura 5. Frutas comestíveis pertencentes à família Annonaceae.	44
Figura 6. Esqueletos básicos dos isoquinolínicos simples.	51
Figura 7. Biossíntese dos alcaloides benzilisoquinolínicos e tetrahydroisoquinolínico.	54
Figura 8. Estrutura dos alcaloides aporfínicos.	55
Figura 9. Alcaloides aporfínicos isolados de espécies da família Annonaceae.	56
Figura 10. Estrutura básica dos flavonoides.	57
Figura 11. Rota biossintética dos flavonoides.	59
Figura 12. Ocorrência de flavonoides isolados a partir de espécies de Annonaceae.	60
Figura 13. Via biossintética para formação de terpenos.	63
Figura 14. Distribuição geográfica do gênero <i>Bocageopsis</i>	70
Figura 15. Substâncias isolados da espécie <i>B. pleiosperma</i> Maas.	72
Figura 16. Terpenos identificados em espécies do gênero <i>Bocageopsis</i>	74
Figura 17. Exsicata da espécie <i>B. canescens</i> (Benth.) R.E. Fr. e distribuição geográfica no Brasil.	75
Figura 18. Exsicata da espécie <i>B. multiflora</i> (Mart.) R.E. Fr. e distribuição geográfica no Brasil.	76
Figura 19. Exsicata da espécie <i>B. pleiosperma</i> Maas e Distribuição geográfica no Brasil. ..	77
Figura 20. Fonte de leaf spray conectada ao espectrômetro de massas.	84
Figura 21. Obtenção dos extratos aquosos.	89
Figura 22. Esquema da extração alcaloídica em pequena escala.	90
Figura 23. Esquema da extração alcaloídica em maior escala.	91
Figura 24. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de Bc01.	102
Figura 25. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de Bc02.	103
Figura 26. Principais constituintes do óleo essencial dos galhos finos de Bc01.	103
Figura 27. Comparativo dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de <i>B. canescens</i>	105
Figura 28. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de <i>B. multiflora</i>	109
Figura 29. Principais constituintes do óleo essencial dos galhos finos de <i>B. multiflora</i>	110
Figura 30. Principais constituintes do óleo essencial dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i>	110
Figura 31. Comparativo dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das folhas, galhos finos e galhos grossos de <i>B. multiflora</i>	110
Figura 32. Principais constituintes do óleo essencial das folhas e galhos finos de <i>B. pleiosperma</i>	113

Figura 33. Comparativo dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de <i>B. pleiosperma</i>	113
Figura 34. Reação de oxirredução da resazurina em organismos vivos.	117
Figura 35. Resultado da atividade antimicrobiana dos OE das espécies de <i>Bocageopsis</i> pelo método de diluição seriada em placa de Elisa.	118
Figura 36. Espectros de íons totais dos extratos aquosos das folhas e galhos finos de <i>B. canescens</i>	123
Figura 37. Espectros de íons totais dos extratos aquosos das folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco de <i>B. multiflora</i>	124
Figura 38. Espectros de íons totais dos extratos aquosos das folhas e galhos finos de <i>B. pleiosperma</i>	125
Figura 39. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos de <i>B. canescens</i>	126
Figura 40. Estrutura do ácido mícico.	127
Figura 41. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos de <i>B. multiflora</i>	128
Figura 42. Estrutura do ácido clorogênico.	129
Figura 43. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos de <i>B. pleiosperma</i>	130
Figura 44. Cromatograma de CLAE-UV do extrato aquosa obtido das folhas de <i>B. canescens</i> em escala semi-preparativa.	131
Figura 45. Espectro de massas em modo positivo de LS-MS das folhas (Bc02) de <i>B. canescens</i>	132
Figura 46. Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 266 ([M+H] ⁺), obtido das folhas de <i>B. canescens</i>	133
Figura 47. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 328 ([M+H] ⁺), obtido das folhas de <i>B. canescens</i>	134
Figura 48. Proposta de fragmentação para os alcaloides tetrahidroprotoberberínicos.	134
Figura 49. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 312 ([M+H] ⁺), obtido das folhas de <i>B. canescens</i>	135
Figura 50. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 282 ([M+H] ⁺), obtido das folhas de <i>B. canescens</i>	136
Figura 51. Espectro de massas em MS ⁵ do íon de <i>m/z</i> 342 ([M+H] ⁺), obtido das folhas de <i>B. canescens</i>	137
Figura 52. Espectro de massas em modo positivo de LS-MS das folhas de <i>B. multiflora</i>	138
Figura 53. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 328 ([M+H] ⁺), obtido das folhas de <i>B. multiflora</i>	138
Figura 54. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 342 ([M+H] ⁺), obtido das folhas de <i>B. multiflora</i>	139
Figura 55. Espectro de massas das frações alcaloides das folhas, galhos finos e cascas de <i>B. canescens</i> (Bc01).	140
Figura 56. Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 342 ([M+H] ⁺).	141
Figura 57. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 342 ([M+H] ⁺).	142

Figura 58. Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 328 ([M+H] ⁺).....	143
Figura 59. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 328 ([M+H] ⁺), para alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos.	143
Figura 60. Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 298 ([M+H] ⁺).....	144
Figura 61. Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 266 ([M+H] ⁺).....	145
Figura 62. Espectro de massas das frações alcaloides das folhas, galhos finos e cascas de <i>B. multiflora</i>	146
Figura 63. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 298 ([M+H] ⁺).....	147
Figura 64. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 328 ([M+H] ⁺).....	148
Figura 65. Espectro de massas em MS ² do íon de <i>m/z</i> 268 ([M+H] ⁺).....	149
Figura 66. Espectro de massas em MS ³ do íon de <i>m/z</i> 266 ([M+H] ⁺).....	149
Figura 67. Estruturas de substâncias sugeridas referente a análise por CLAE-EM/EM da espécie <i>B. canescens</i> (Bc01).....	152
Figura 68. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) das frações alcaloidicas de <i>B. canescens</i>	154
Figura 69. Proposta de fragmentação para alcaloides benzilisoquinolínicos.	157
Figura 70. Estruturas de substâncias sugeridas referente a análise por CLAE-EM/EM da espécie <i>B. multiflora</i>	159
Figura 71. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) das frações alcaloídicas de <i>B. multiflora</i>	159
Figura 72. Cromatograma de CLAE-UV da fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i> em escala semi-preparativa.	161
Figura 73. Cromatograma de CLAE-UV da fração alcaloídica das folhas de <i>B. multiflora</i> em escala semi-preparativa.	162
Figura 74. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 266 presente na fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i>	164
Figura 75. Espectro de massas em MS ⁿ do íon de <i>m/z</i> 266 ([M+H] ⁺).....	165
Figura 76. Espectro de RMN de ¹ H (500,13 MHz em CDCl ₃) da fração alcaloidica das folhas de <i>B. canescens</i>	165
Figura 77. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl ₃) da fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i>	166
Figura 78. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl ₃) da fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i>	166
Figura 79. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (A) (500,13 MHz em CDCl ₃), mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl ₃) referente região dos hidrogênios da ponte metilenodioxí.....	167
Figura 80. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (A) (500,13 MHz em CDCl ₃), mapas de contornos HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl ₃) referente região do simpleto em δ 6,57.....	168
Figura 81. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (A) (500,13 MHz em CDCl ₃), mapas de contornos HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl ₃) referente região com um dubleto em δ 8,06.....	168
Figura 82. Estrutura e principais correlações do alcaloide anonaina.....	169

Figura 83. Proposta de fragmentação para o alcaloide anonaina.....	170
Figura 84. Espectro de massas do íon de m/z 328 e cromatograma obtido da análise de LC-EM da fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i>	171
Figura 85. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$).....	172
Figura 86. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, $CDCl_3$) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i> . ..	173
Figura 87. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, $CDCl_3$) referente região com um duplete em δ 2,67, 3,82 e 3,81 respectivamente.	173
Figura 88. Estrutura do alcaloide isoboldina.	174
Figura 89. Espectro de massas do íon de m/z 298 e cromatograma obtido da análise de LC-EM da fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i>	175
Figura 90. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 298 ($[M+H]^+$).....	176
Figura 91. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, $CDCl_3$) referente a região dos sinais de hidrogênios da fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i>	177
Figura 92. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, $CDCl_3$) referente a região dos sinais de hidrogênios metoxílicos da fração alcaloídica das folhas de <i>B. canescens</i> ...	177
Figura 93. Estrutura do alcaloide estefarina.	178
Figura 94. Proposta de fragmentação para o alcaloide estefarina.....	178
Figura 95. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).....	180
Figura 96. Espectro de RMN de 1H (500,13 MHz em $CDCl_3$) da fração alcaloídica dos galhos finos de <i>B. canescens</i>	181
Figura 97. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em $CDCl_3$) da fração alcaloídica dos galhos finos de <i>B. canescens</i>	181
Figura 98. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em $CDCl_3$) da fração alcaloídica dos galhos finos de <i>B. canescens</i>	182
Figura 99. Estrutura e correlações do alcaloide anonaina.	182
Figura 100. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).	185
Figura 101. Espectro de massas em MS^4 do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).....	186
Figura 102. Estrutura do alcaloide anonaina.	186
Figura 103. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$).	188
Figura 104. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$).....	189
Figura 105. Estrutura do alcaloide isoboldina.	189
Figura 106. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 298 ($[M+H]^+$).	191
Figura 107. Espectro de massas em MS^3 do íon de m/z 298 ($[M+H]^+$).....	192
Figura 108. Estrutura do alcaloide estefarina.	192
Figura 109. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 276 ($[M+H]^+$).	194
Figura 110. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 276 ($[M+H]^+$).....	195

Figura 111. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) na região dos aromáticos da amostra BcFFr4.....	196
Figura 112. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) na região dos aromáticos referente ao sistema oxoaporfínico da amostra BcFFr4.	197
Figura 113. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente ao grupo metilenodioxí da amostra BcFFr4.	197
Figura 114. Estrutura do alcaloide liriodenina.....	198
Figura 115. Proposta de fragmentação do alcaloide liriodenina.	198
Figura 116. Espectro de massas do íon de m/z 282 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) da amostra BcFFr5.	200
Figura 117. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 286 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).....	201
Figura 118. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente a região dos aromáticos da amostra BcFFr5.....	202
Figura 119. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente a região das metoxilas da amostra BcFFr5.	202
Figura 120. Estrutura do alcaloide nornuciferina.	203
Figura 121. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 328 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) da amostra BcFFr6.....	205
Figura 122. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 328 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) da amostra BcFFr6.	206
Figura 123. A ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) da região dos aromáticos da amostra BcFFr6.....	207
Figura 124. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente a região das metoxilas da amostra BcFFr6.	207
Figura 125. Ampliação do mapa de correlação HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios de metoxilas da amostra BcFFr6.	208
Figura 126. Ampliação do mapa de correlação HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios de metoxilas da amostra BcFFr6.	208
Figura 127. Estrutura do alcaloide laurotetanina.	209
Figura 128. Principais correlações observadas para o alcaloide laurotetanina.....	209
Figura 129. Espectro de massas do íon de m/z 338 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) da amostra BcFFr7.	211
Figura 130. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 338 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) da amostra BcFFr7.	212
Figura 131. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) na região dos aromáticos da amostra BcFFr7.....	213
Figura 132. Estrutura do anel piridínico.	213
Figura 133. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3), mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 8,74 e δ 8,02...214	214
Figura 134. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3), mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) do simpleto em δ 7,51.	215
Figura 135. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 4,12, δ 4,09 e δ 4,08.....	216
Figura 136. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 4,12, δ 4,09 e δ 4,08.....	216

Figura 137. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl ₃) do sinal em δ 7,83.	217
Figura 138. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl ₃) do sinal em δ 8,86.	218
Figura 139. Estrutura do alcaloide atherolina.	218
Figura 140. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 194 e cromatograma obtido da análise de LC-EM da fração alcaloídica BcFFr5 das folhas de <i>B. canescens</i>	220
Figura 141. Espectro de MS ² do íon <i>m/z</i> 194 ([M+H] ⁺) da fração alcaloídica BcFFr1.	221
Figura 142. Espectro de RMN de ¹ H (500,13 MHz, CDCl ₃) e ampliação da região dos hidrogênios aromáticos da amostra BcFFr1.	222
Figura 143. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração BcFFr1. Em preto correlação majoritário e em azul minoritário.	222
Figura 144. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente região referente aos hidrogênios aromáticos da fração BcFFr1. Em preto correlação majoritário e em azul minoritário.	223
Figura 145. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente região do carbono metínico e metoxilas da fração BcFFr1.	224
Figura 146. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente região do carbono metínico e metoxilas da fração BcFFr8.1 e BcFFr8.2. Em preto correlação majoritário e em azul minoritário.	225
Figura 147. Ampliação do mapa de correlações de HSQC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente região do carbono metílico.	225
Figura 148. Ampliação do mapa de correlações de HMBC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente região do carbono metílico.	226
Figura 149. Rota metabólica da dopamina para formação da salsolina e isosalsolina no cérebro.	227
Figura 150. Principais correlações observadas na fração BcFFr8.1 e BcFFr8.2.	228
Figura 151. Componente majoritário Isosalsolina <i>m/z</i> 194 Da.	229
Figura 152. Componente minoritário salsolina <i>m/z</i> 194 Da.	230
Figura 153. Proposta de fragmentação para o alcaloide isosalsolina.	231
Figura 154. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 268 e cromatograma obtido da análise de LC-EM da fração alcaloídica dos galhos grossos da espécie <i>B. multiflora</i>	232
Figura 155. Espectro de MS ² do íon <i>m/z</i> 268 ([M+H] ⁺) da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i>	233
Figura 156. Espectro de RMN de ¹ H (500,13 MHz, CDCl ₃) e ampliação da região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i>	234
Figura 157. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i>	235
Figura 158. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i>	235

Figura 159. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente a região do hidrogênio aromático em δ 6,71 da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	236
Figura 160. Ampliação do RMN de ¹ H (A) (500 MHz, CDCl ₃) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl ₃) referente a região da metoxila em δ 3,58 da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	236
Figura 161. Estrutura do alcaloide assimilobina.	237
Figura 162. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de <i>m/z</i> 268 ([M+H] ⁺).	239
Figura 163. Estrutura do alcaloide estefarina.	239
Figura 164. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de <i>m/z</i> 282 ([M+H] ⁺).	241
Figura 165. Espectro de MS ² do íon <i>m/z</i> 282 ([M+H] ⁺) da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	241
Figura 166. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (A) (500,13 MHz, CDCl ₃) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl ₃) na região dos hidrogênios em δ 6,11 e δ 5,95 da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	242
Figura 167. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500,13 MHz, CDCl ₃) na região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	243
Figura 168. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	243
Figura 169. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl ₃) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	244
Figura 170. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (A) (500,13 MHz, CDCl ₃) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl ₃) na região do hidrogênio carbinólico em δ 4,92 da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	244
Figura 171. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (A) (500,13 MHz, CDCl ₃) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl ₃) na região do hidrogênio carbinólico em δ 6,58 da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	245
Figura 172. Correlações observadas para o alcaloide norushinsunina.	245
Figura 173. Estrutura do alcaloide norushinsunina.	246
Figura 174. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 194 ([M+H] ⁺) da amostra BmuGGFr1.1 e BmuGGFr1.2.	248
Figura 175. Espectro de massas em MS ₂ do íon de <i>m/z</i> 194 ([M+H] ⁺) da amostra BmuGGFr1.1 e BmuGGFr1.2.	249
Figura 176. Estrutura dos alcaloides salsolina e isosalsolina	250
Figura 177. Espectro de massas do íon de <i>m/z</i> 312 ([M+H] ⁺) da amostra BmuGGFr2.	251
Figura 178. Espectro de massas em MS ₂ do íon de <i>m/z</i> 312 ([M+H] ⁺).	252
Figura 179. Ampliação do espectro de RMN de ¹ H (500,13 MHz, CDCl ₃) das regiões dos aromáticos da amostra BmuGGFr2.	253
Figura 180. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl ₃) da região dos aromáticos da amostra BmuGGFr2.	253
Figura 181. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl ₃) da região dos aromáticos da amostra BmuGGFr2.	254

Figura 182. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região de hidrogênios de metoxilas da amostra BmuFr2.	255
Figura 183. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500, 13 MHz, CD_3OD), RMN de ^1H (B) (500,13 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (C) e HMBC (D) (125,76 MHz, CDCl_3) referente ao sinal em δ 2,94 da amostra BmuGGFr2.	256
Figura 184. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) referente ao sinal em δ 6,71 da amostra BmuGGFr2.	257
Figura 185. Estrutura do alcaloide pronuciferina.	257
Figura 186. Proposta de fragmentação do alcaloide pronuciferina.	258
Figura 187. Espectro de massas do íon de m/z 326 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) da amostra BmuGGFr2.	260
Figura 188. Espectro de MS^2 do íon de m/z 326 da amostra BmuGGFr3.	261
Figura 189. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) da região dos hidrogênios aromáticos da amostra BmuGGFr3.	262
Figura 190. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) da região das metoxilas e do sinal em δ 5,12 e δ 5,02 da amostra BmuGGFr3.	262
Figura 191. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 8,35 e δ 8,32 da amostra BmuGGFr3.	263
Figura 192. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 6,73 e δ 6,71 da amostra BmuGGFr3.	264
Figura 193. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e dos mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais de metoxilas da amostra BmuGGFr3.	265
Figura 194. Na ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) foi possível observar sinais de hidrogênios metilênicos em H-4 na amostra BmuGGFr3.	266
Figura 195. Na ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais de hidrogênios metilênicos em H-4 da amostra BmuGGFr3.	266
Figura 196. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 4,2, δ 4,17, δ 3,93 e δ 3,90.	267
Figura 197. Ampliações dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 4,2, δ 4,17, δ 3,93 e δ 3,90 da amostra BmuGGFr3.	267
Figura 198. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos do anel D do esqueleto proaporfínico da amostra BmuGGFr3.	268
Figura 199. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos do anel D do esqueleto proaporfínico da amostra BmuGGFr3.	269
Figura 200. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos do anel D do esqueleto proaporfínico da amostra BmuGGFr3.	269
Figura 201. Estruturas dos alcaloides <i>N</i> -formil-estefarina.	270
Figura 202. Proposta de fragmentação para o alcaloide <i>N</i> -formil-estefarina.	270
Figura 203. Espectro de massas do íon de m/z 579 da fração BcEAF1.	274

Figura 204. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) do íon de m/z 579 da fração BcEAFr1.....	275
Figura 205. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) da região dos hidrogênios aromáticos e fenóis da fração BcEAFr1	276
Figura 206. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e ampliação na região dos hidrogênios em δ 6,46, δ 6,79, δ 6,93 e δ 7,80 da fração BcEAFr1.	276
Figura 207. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) da fração BcEAFr1.	278
Figura 208. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e ampliação da região dos hidrogênios em δ 6,46, δ 6,79, δ 6,93 e δ 7,80 da fração BcEAFr1.	278
Figura 209. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) referente a região dos hidrogênios fenólicos em δ 10,25 e δ 12,61 da fração BcEAFr1.	279
Figura 210. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) referente a região dos hidrogênios anoméricos da fração BcEAFr1.	280
Figura 211. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e mapa de correlações HSQC (B) (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) dos sinais em δ 1,13 e δ 0,81 da fração BcEAFr1.....	281
Figura 212. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) referente a região dos hidrogênios das hidroxilas das ramnoses da fração BcEAFr1.....	282
Figura 213. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) referente a região dos hidrogênios das hidroxilas das ramnoses da fração BcEAFr1.....	282
Figura 214. Estrutura do flavonoide kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnoside.....	283
Figura 215. Espectro de massas do íon de m/z 725 da fração BcEAFr2.	285
Figura 216. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e mapas de correlações HSQC e HMBC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) do sinal em δ 4,19 referente a terceira unidade de Ramnose.	286
Figura 217. Estrutura do flavonoide canescentina.	287
Figura 218. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr1 - Anonaina.	323
Figura 219. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr2 - Isoboldina.	323
Figura 220. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr3 - estefarina.	324
Figura 221. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr4 - Liriodenina.	324
Figura 222. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr5 - Nornuciferina.	325
Figura 223. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr6 - Laurotetanina.....	325
Figura 224. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr6 - Laurotetanina.....	326
Figura 225. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr6 - Laurotetanina.....	326

Figura 226. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr7 - Atherolina.	327
Figura 227. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr7 - Atherolina.	327
Figura 228. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr7 - Atherolina.	328
Figura 229. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr8.1 e BcFFr8.2.	328
Figura 230. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr8.1 e BcFFr8.2.	329
Figura 231. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr8.1 e BcFFr8.2.	329
Figura 232. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	330
Figura 233. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	330
Figura 234. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da fração alcaloídica dos galhos grossos de <i>B. multiflora</i> .	331
Figura 235. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr1.1 e BmuGGFr1.2 - Isosalsolina e salsolina.	331
Figura 236. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr2 - Pronuciferina.	332
Figura 237. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr2 - Pronuciferina.	332
Figura 238. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr2 - Pronuciferina.	333
Figura 239. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr3.1 e BmuGGFr3.2 - Rotâmeros de <i>N</i> -formil-estefarina.	333
Figura 240. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr3.1 e BmuGGFr3.2 - Rotâmeros de <i>N</i> -formil-estefarina.	334
Figura 241. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr3.1 e BmuGGFr3.2 - Rotâmeros de <i>N</i> -formil-estefarina.	334
Figura 242. Espectro de RMN de ^{13}C (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para a fração do extrato aquoso BcEAFr1 - kaempferol-3,7-O- β -dirhamnosideo.	335
Figura 243. Espectro de COSY (500,13 MHz em $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para a fração do extrato aquoso BcEAFr1 - kaempferol-3,7-O- β -dirhamnosideo.	335
Figura 244. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para a fração do extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.	336
Figura 245. Espectro de ^{13}C (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.	336
Figura 246. Espectro de COSY (500,13 MHz) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.	337
Figura 247. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.	337

Figura 248. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em C ₂ D ₆ OS) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.....	337
Figura 249. Espectro de massas 725.2309 ([M+H] ⁺) e 747.2123 ([M+Na] ⁺) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.....	338
Figura 250. Espectro de MS/MS para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.....	338

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Usos populares, atividades antimicrobianas e farmacológicas comprovadas de algumas espécies da família Annonaceae.	45
Quadro 2. Alcaloides isoquinolínicos simples encontrados na família Annonaceae.	53
Quadro 3. Estruturas das principais classes de flavonoides.	58
Quadro 4. Flavonoides isolados a partir do extrato das folhas de <i>Annona coriacea</i>	61
Quadro 5. Antibióticos controles e microorganismos utilizados no ensaio antimicrobiano. ..	94
Quadro 6. Resultados dos testes antimicrobianos pelo método de difusão em ágar dos OE.	116

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições operacionais dos Espectrômetros de Massas Triplo-quadrupolo TSQ Quantum Acess e Ion Trap LCQ Fleet.	83
Tabela 2. Dados de coleta e identificação do material botânico de <i>Bocageopsis</i>	86
Tabela 3. Aspectos físicos-químicos e rendimento obtidos dos óleos essenciais das espécies de <i>Bocageopsis</i>	100
Tabela 4. Principais constituintes dos óleos essenciais das folhas e galhos finos <i>B. canescens</i> determinados por CG-EM.	101
Tabela 5. Principais constituintes dos óleos essenciais das folhas, galhos finos e galhos grossos de <i>B. multiflora</i> determinados por CG-EM.	108
Tabela 6. Principais constituintes dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de <i>B. pleiosperma</i> determinados por CG-EM.	112
Tabela 7. Resultados do método de difusão em ágar dos OEs.	115
Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos OEs das espécies de <i>Bocageopsis</i> pelo método de diluição seriada.	118
Tabela 9. Massa dos extratos aquosos das espécies de <i>Bocageopsis</i>	122
Tabela 10. Perfil de fragmentação dos íons identificados nos extratos aquosos da espécie <i>B. canescens</i> por CLAE-EM/EM.	127
Tabela 11. Perfil de fragmentação dos íons identificados nos extratos aquosos da espécie <i>B. multiflora</i> por CLAE-EM/EM.	128
Tabela 12. Perfil de fragmentação dos íons identificados nos extratos aquosos da espécie <i>B. pleiosperma</i> por CLAE-EM/EM.	130
Tabela 13. Perfil de fragmentação dos íons identificados na espécie <i>B. canescens</i> por CLAE-EM/EM.	155
Tabela 14. Perfil de fragmentação dos íons identificados na espécie <i>B. multiflora</i> por CLAE-EM/EM.	160
Tabela 15. Frações obtidas pelas análises em CLAE-UV em escala semi-preparativa e perfil de fragmentação dos íons identificados na espécie <i>Bocageopsis</i>	163
Tabela 16. Dados de RMN de ¹ H, HSQC e HMBC para o alcaloide anonaina.	170
Tabela 17. Dados de RMN de ¹ H, HSQC e HMBC para o alcaloide isoboldina.	174
Tabela 18. Dados de RMN de ¹ H, HSQC e HMBC para o alcaloide estefarina.	179
Tabela 19. Dados de RMN de ¹ H, HSQC e HMBC para o alcaloide anonaina.	183
Tabela 20. Dados de RMN de ¹ H para o alcaloide anonaina.	187
Tabela 21. Dados de RMN de ¹ H para o alcaloide isoboldina.	190
Tabela 22. Dados de RMN de ¹ H para o alcaloide estefarina.	193
Tabela 23. Dados de RMN de ¹ H para o alcaloide liriodenina.	199
Tabela 24. Dados de RMN de ¹ H para o alcaloide nornuciferina.	204
Tabela 25. Dados de RMN de ¹ H, HSQC e HMBC para o alcaloide laurotetanina.	210
Tabela 26. Dados de RMN de ¹ H, HSQC e HMBC para o alcaloide atherolina.	219
Tabela 27. Dados de RMN de ¹ H, HSQC e HMBC da substância majoritária presente na fração alcaloídica BcFFr8.1.	229

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC da substância minoritária presente na fração alcaloídica BcFFr8.2.	230
Tabela 29. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide assimilobina.	237
Tabela 30. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide estefarina.	240
Tabela 31. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide norushinsunina.	246
Tabela 32. Dados de RMN de ^1H dos alcaloides isosalsolina e salsolina.	250
Tabela 33. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide pronuciferina.	259
Tabela 34. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide <i>N</i> -formil-estefarina (<i>Z</i>).	271
Tabela 35. Dados de RMN de ^1H , <i>g</i> HSQC e <i>g</i> HMBC do alcaloide <i>N</i> -formil-estefarina (<i>E</i>).	272
Tabela 36. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do flavonoide kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnoside.	283
Tabela 37. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e COSY do flavonoide canescentina.	288

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	33
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	38
2.1. A família Annonaceae	39
2.1.1. Aspectos econômicos, etnobotânicos e farmacológicos	42
2.1.2. Fitoquímica da Família Annonaceae	49
2.1.2.1. Alcaloides isoquinolínicos	50
2.1.2.1.1. Alcaloides isoquinolínicos simples e alcaloides benzilisoquinolínicos	50
2.1.2.2. Alcaloides aporfínicos	55
2.1.3. Flavonoides	57
2.1.4. Óleos essenciais da Família Annonaceae	62
2.2. O Gênero <i>Bocageopsis</i>	69
2.2.1. Constituintes Químicos do gênero <i>Bocageopsis</i>	71
2.2.2. Atividades Biológicas do Gênero <i>Bocageopsis</i>	73
2.2.3. Espécies do Gênero <i>Bocageopsis</i>	75
2.2.3.1. <i>Bocageopsis canescens</i> (Benth.) R.E. Fr.	75
2.2.3.2. <i>Bocageopsis multiflora</i> (Mart.) R.E. Fr.	76
2.2.3.3. <i>Bocageopsis pleiosperma</i> Maas	77
3. OBJETIVOS	78
3.1. Geral:	79
3.2. Específicos:	79
4. MATERIAIS E MÉTODOS	80
4.1. Solventes e reagentes reveladores	81
4.1.1. Solventes	81
4.1.2 Reagente revelador	81
4.2. Métodos cromatográficos	81
4.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)	81
4.2.2. Sistema cromatográfico de alta eficiência analítico acoplado a espectrometria de massas (CLAE-EM e CLAE-EM/EM)	82
4.2.3. Sistema cromatográfico de alta eficiência semi-preparativo (CLAE-semiprep.)	82
4.2.4. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	82
4.3. Métodos espectrométricos e espectroscópicos	83
4.3.1. Espectrometria de massas	83
4.3.2. Espectrometria de massas em alta resolução	84
4.3.3. Espectrometria de massas ambiente – <i>Leaf spray</i> (LS-MS)	84
4.3.4. Ressonância Magnética Nuclear	85
4.4. Outros Equipamentos	85
4.5. Material botânico	86

4.5.1. Coleta e identificação do material botânico	86
4.5.2. Processamento do material Botânico	87
4.6. Obtenção dos óleos essenciais de <i>B. canescens</i> , <i>B. multiflora</i> e <i>B. pleiosperma</i>	87
4.7. Análises por CG-EM dos óleos essenciais de <i>B. canescens</i> , <i>B. multiflora</i> e <i>B. pleiosperma</i>	87
4.8. Obtenção dos extratos aquosos de <i>B. canescens</i> , <i>B. multiflora</i> e <i>B. pleiosperma</i>	88
4.9. Análises em fonte de ionização ambiente – <i>Leaf spray</i> (LS-MS) das espécies de <i>Bocageopsis</i>	89
4.10. Marcha alcaloídica (Pequena Escala e Maior Escala)	89
4.11. Análises espectrométricas das frações alcaloídicas e não alcaloídicas das espécies de <i>Bocageopsis</i>	91
4.12. Análises usando CLAE-PDA-EM/EM.....	92
4.13. Purificação das frações alcaloídicas e não alcaloídicas por CLAE-semipreparativo.	92
4.14. Avaliação das atividades biológicas dos óleos essenciais das espécies de <i>Bocageopsis</i>	93
4.14.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das espécies de <i>Bocageopsis</i>	93
4.14.1.1. Preparo dos meios de cultura.	93
4.14.1.2. Preparo do material biológico.....	94
4.14.1.3. Preparo das amostras e microorganismos para inóculo.	94
4.14.1.4. Teste de difusão em ágar.....	94
4.14.1.5. Teste da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).	95
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	97
5.1. Análises dos óleos essenciais de <i>B. canescens</i> , <i>B. multiflora</i> e <i>B. pleiosperma</i>	98
5.1.1. Extração dos óleos essenciais.	98
5.1.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de <i>B. canescens</i>	101
5.1.3. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos óleos essenciais das folhas, galhos finos e galhos grossos de <i>B. multiflora</i>	108
5.1.4. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de <i>B. pleiosperma</i>	112
5.2. Ensaios biológicos dos óleos essenciais das espécies de <i>Bocageopsis</i>	115
5.2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método de difusão em ágar.	115
5.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método de diluição seriada.	117
5.3. Estudo dos Extratos Aquosos obtidos das Espécies de <i>B. canescens</i> , <i>B. multiflora</i> e <i>B. pleiosperma</i>	122
5.3.1. Obtenção dos extratos aquosos.....	122
5.3.2. Análise do Perfil Químico dos Extratos Aquosos Obtidos por Espectrometria de Massas das espécies de <i>Bocageopsis</i>	123
5.3.2.1. Perfil Químico Obtido por Espectrometria de Massas da Espécie <i>B. canescens</i>	123

5.3.2.2. Perfil Químico Obtido por Espectrometria de Massas da Espécie <i>B. multiflora</i>	124
5.3.2.3. Perfil Químico Obtido por Espectrometria de Massas da Espécie <i>B. pleiosperma</i>	125
5.3.3. Análises por CLAE-EM dos Extratos Aquosos das espécies de <i>Bocageopsis</i>	126
5.3.4. Análises por CLAE semi-preparativo do Extrato Aquoso da espécie <i>B. canescens</i>	131
5.4. Estudo do Perfil Alcaloídico por LS-MS das Espécies <i>B. canescens</i> e <i>B. multiflora</i>	132
5.5. Análises por ESI-IT-MS ⁿ das frações obtidas em pequena escala das espécies de <i>Bocageopsis</i>	140
5.5.1. Análises espectrométricas das frações alcaloídicas das folhas, galhos finos e cascas do tronco da espécie de <i>B. canescens</i> (Bc01).	140
5.5.2. Análises espectrométricas das frações alcaloídicas das folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco das espécies de <i>B. multiflora</i>	146
5.6. Análises por CLAE-EM/EM das frações alcaloídicas obtidas em pequena escala e maior escala das espécies de <i>Bocageopsis</i>	150
5.6.1. Análises por CLAE-EM/EM da espécie <i>B. canescens</i> (Bc01).	150
5.6.2 Análises por CLAE-EM/EM da espécie <i>B. multiflora</i>	156
5.7. Fracionamento das frações alcaloídicas das espécies de <i>Bocageopsis</i>	161
5.7.1. Fracionamento por CLAE-UV das frações alcaloídicas das folhas da espécie <i>B. canescens</i> e <i>B. multiflora</i>	161
5.8. Determinação estrutural das substâncias obtidas das frações alcaloídicas do gênero <i>Bocageopsis</i>	164
5.8.1. Determinação estrutural das frações alcaloídicas da espécie <i>B. canescens</i>	164
5.8.1.1. Determinação estrutural dos alcaloides identificados na fração alcaloídica obtida das folhas da espécie <i>B. canescens</i> (Bc01-F).	164
5.8.1.2. Determinação estrutural dos alcaloides identificados na fração alcaloídica obtida dos galhos finos da espécie <i>B. canescens</i>	180
5.8.2. Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração alcaloídica das folhas da espécie <i>B. canescens</i>	185
5.8.2.1. Determinação estrutural da amostra BcFFr1.	185
5.8.2.2. Determinação estrutural da amostra BcFFr2.	188
5.8.2.3. Determinação estrutural da amostra BcFFr3.	191
5.8.2.4. Determinação estrutural da amostra BcFFr4.	194
5.8.2.5. Determinação estrutural da amostra BcFFr5.	200
5.8.2.6. Determinação estrutural da amostra BcFFr6.	205
5.8.2.7. Determinação estrutural da amostra BcFFr7.	211
5.8.2.8. Determinação estrutural da amostra BcFFr8.1 e BcFFr8.2.	220
5.8.3. Determinação estrutural das frações alcaloídicas da espécie <i>B. multiflora</i>	232
5.9.3.1. Determinação estrutural dos alcaloides identificados na fração alcaloídica obtida dos galhos grossos da espécie <i>B. multiflora</i>	232
5.8.4. Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração alcaloídica dos galhos grossos da espécie <i>B. multiflora</i>	248
5.8.4.1. Determinação estrutural da amostra BmuGGFr1.1 e BmuGGFr1.2.	248

5.8.4.2. Determinação estrutural da amostra BmuGGFr2.	251
5.8.4.3. Determinação estrutural da amostra BmuGGFr3.1 e BmuGGFr3.2.	260
5.9. Determinação estrutural das substâncias isoladas do extrato aquoso de <i>B. canescens</i>	274
5.9.1. Determinação estrutural da fração BcEAFr1.	274
5.9.2. Determinação estrutural da fração BcEAFr2.	285
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	290
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	294
8. ANEXOS - 1.....	322
9. ANEXOS - 2.....	339

1. INTRODUÇÃO



O uso das plantas como insumo para a fabricação de medicamentos está intrinsecamente ligado à história da evolução do ser humano (FLOR & BARBOSA, 2015). No decorrer dos anos as plantas vêm sendo utilizadas pela humanidade para fins medicinais, visando o tratamento de diversas doenças, buscando sempre melhor qualidade de vida. No entanto os princípios ativos e modos de ação das mesmas na maioria dos casos não são conhecidos (CRAGG & NEWMAN, 2013).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) de 65% a 80% da população mundial, principalmente em países que estão em desenvolvimento, utilizam os medicamentos oriundos de plantas medicinais como fonte de tratamento (SILVEIRA et al., 2008).

No Brasil, a busca por medicamentos fitoterápicos e aqueles oriundos de plantas no Sistema Único de Saúde – SUS teve um aumento de 161% entre os anos de 2013-2015, segundo o Ministério da Saúde (BRASIL, 2016).

A exploração adequada destes conhecimentos etnobotânicos, transmitidos com o passar dos anos, somado com o avanço das técnicas de abordagens fitoquímicas e da etnofarmacologia, culminou com a descoberta de poderosos fármacos, como: o taxol (anticâncer), a quinina (antimalárico), a morfina (analgésica) e a papaverina (soporífera). Além da morfina, outros alcaloides produzidos pelo ópio são conhecidos - a codeína, a tebaína, a narcotina e a papaverina (HOSTETTMANN et al., 2003; HARVEY, 2000; VIEGAS JR. et al., 2006; HASSAN, 2015).

Com o avanço das pesquisas envolvendo produtos naturais, as descobertas de novas substâncias a partir de fontes naturais vêm aumentando, porém apenas 4% dos produtos comercializados como fármacos são totalmente naturais, sendo 52% dos fármacos comercializados de origem sintética (Figura 1). Em contraste com esta realidade, observa-se que em países que estão em desenvolvimento, grande parte da

população usa extratos ou porções oriundas de plantas para fins medicinais (NODARI et al., 2000; MONTANARI & BOLZANI, 2001; HOSTETTMANN et al., 2003; KIATKOSKI, 2011; NEWMAN & CRAGG, 2016).

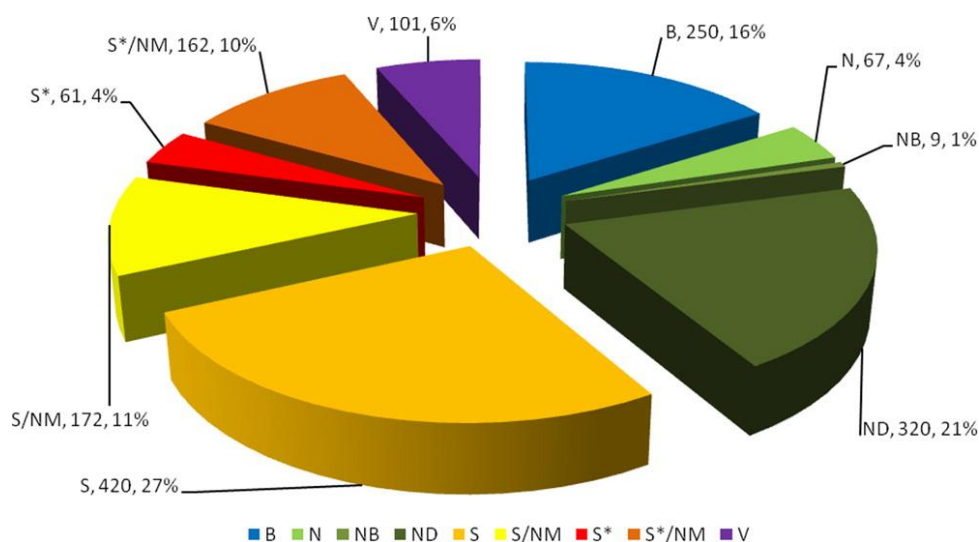


Figura 1. Medicamentos aprovados entre 1981-2014.

Macromolécula biológica (B); Produto Natural Inalterado (N); Droga Botânica – mistura definida (NB); Produto Natural Derivado (ND); Droga Sintética (S); Droga Sintética – farmacóforo (S*); Vacina (V); Imitação de Produto Natural (S*/NM).

Fonte: NEWMAN & CRAGG, 2016.

O conhecimento tradicional de plantas medicinais transmitido entre gerações, somado à crescente busca pela compreensão da química de produtos naturais, é classificado como um fator essencial na descoberta de substâncias novas, sejam elas produtoras de efeito tóxico ou terapêutico (MACIEL et al. 2002; VIEGAS JR. et al., 2006; KIATKOSKI, 2011).

A Região Amazônica representa cerca de 30% de todas as florestas tropicais existentes no mundo. Tem sua importância reconhecida no âmbito nacional e internacional. Isso se deve principalmente à sua larga extensão (4,2 milhões de km²), enorme biodiversidade de ambientes e mais de 600 tipos diferentes de *habitat* terrestre e de água doce, resultando em um amplo ecossistema, com cerca de 45.000 espécies de plantas e vertebrados (SERVIÇO FLORESTAL BRASILEIRO, 2010).

Na grande diversidade encontrada na Região Amazônica, os estudos fitoquímicos com espécies da família Annonaceae tiveram início há algum tempo, porém as investigações sobre a química com ênfase na atividade farmacológica intensificaram na última década, principalmente no que diz respeito ao isolamento de alcaloides (STÉVIGNY et al., 2005; DE MESQUITA et al., 2007; COSTA et al., 2013a; SILVA et al., 2016a; CORIA-TÉLLEZ et al., 2018).

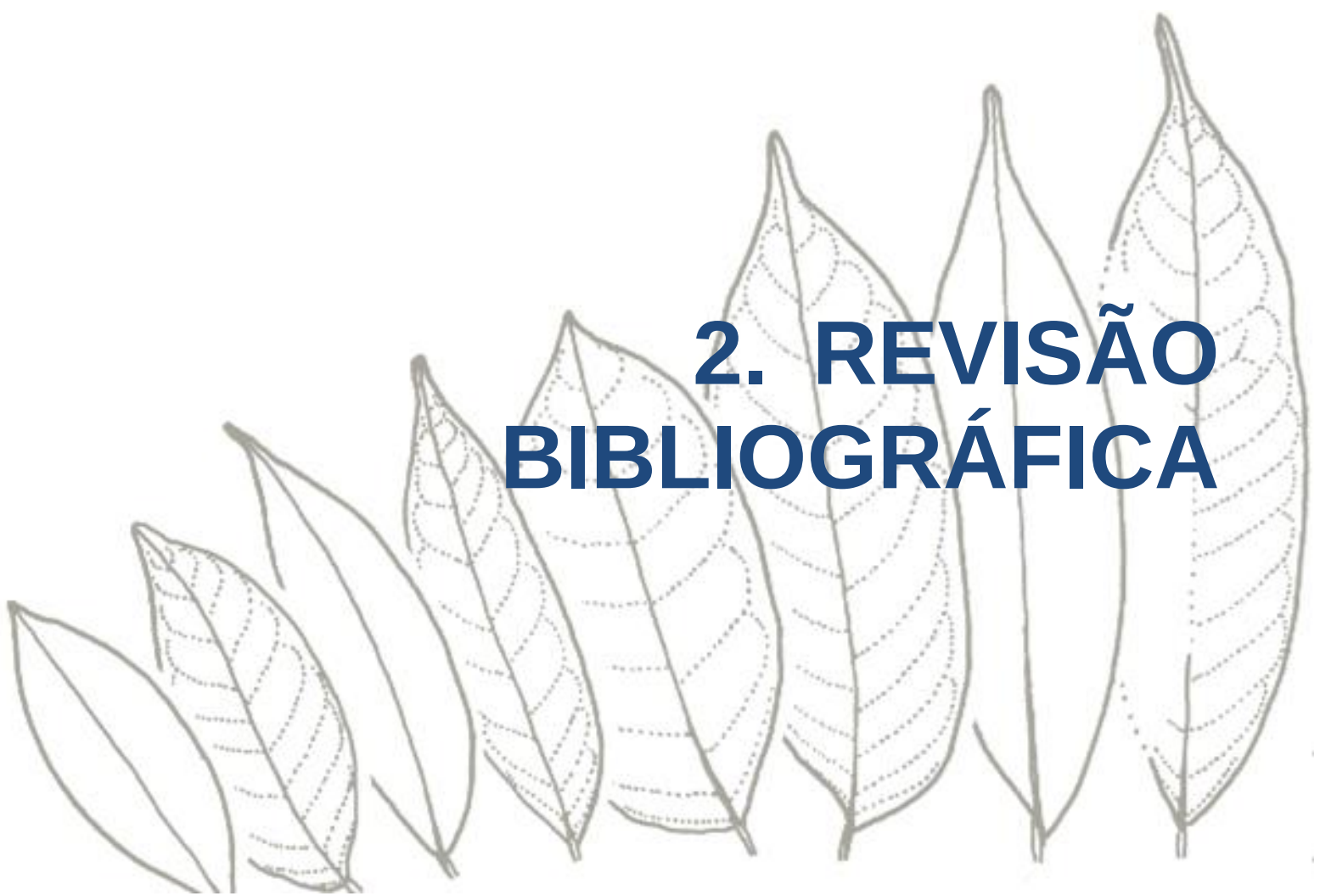
Nos estudos sobre fitoquímica e atividade biológica das espécies da família Annonaceae, ao lado de alcaloides destaca-se a presença de acetogeninas, terpenos, chalconas, lignanas, neolignanas, lactonas terpenicas e flavonoides. Compostos com ampla atividade biológica, tais como citotóxica, antiparasitária, anticâncer, antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória (SIQUEIRA et al., 1998; DE MESQUITA et al., 2007; LIMA et al., 2012; FERRAZ et al., 2013; FERRAZ et al., 2014; SINGH et al., 2014; SOARES et al., 2015b; QAYED et al., 2015; LI et al., 2015).

Embora poucos gêneros de Annonaceae tenham sido explorados do ponto de vista fitoquímico, há alguns com pouco ou nenhum estudo como o gênero *Bocageopsis* que é constituído por quatro espécies (*B. canescens*, *B. mattogrossensis*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*), todas restritas à América do Sul tropical e ao leste da Cordilheira dos Andes, sendo que, apenas as espécies *B. multiflora* e *B. pleiosperma* foram submetidas à alguma investigação fitoquímica (OLIVEIRA et al., 2014; SILVA et al., 2015a; SOARES et al., 2015a e 2015b; ALCÂNTARA et al., 2017; ARÉVALO-LOPÉZ et al., 2018).

Recentes abordagens fitoquímicas realizadas com os óleos essenciais de *B. multiflora* e *B. pleiosperma*, e frações alcaloídicas de *B. pleiosperma* demonstraram a potencialidade química deste gênero (OLIVEIRA et al., 2014; SILVA et al., 2015a; SOARES et al., 2015a e 2015b; ALCÂNTARA et al., 2017).

Considerando o potencial químico e biológico apresentado para a família Annonaceae, o presente trabalho visou contribuir com o conhecimento químico e biológico do Gênero *Bocageopsis*. Foi realizada uma abordagem integrativa de técnicas cromatográficas, espectrométricas, espectroscópicas e ionização ambiente, descrito como *leaf spray* utilizado para análises direta de plantas (LIU et al.,2011), acrescida de ensaios antimicrobianos dos óleos essenciais de *B. pleiosperma* Maas, *B. multiflora* e *B. canescens*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA



2.1. A família Annonaceae

A família Annonaceae, catalogada em 1789 por Jussieu (HUTCHINSON, 1974), é pertencente ao grupo das Eudicotiledôneas, clado das Magnoliídeas (arbóreas), este é constituído por quatro ordens (Canellales, Laurales, Magnoliales e Piperales) (SOUZA & LORENZI, 2005).

Annonaceae é descrita como a mais ampla família da ordem das Magnoliales, composta por mais cinco famílias: Degeneriaceae, Eupomatiaceae, Himantandraceae, Magnoliaceae e Myristicaceae (APG III, 2009; CHATROU et al., 2012a). De acordo com relatos existem 160 gêneros e mais de 3000 espécies na ordem Magnoliales podendo ser encontradas como árvores, arvoretas e lianas, com cascas fibrosas e madeira com amplos raios (CHATROU et al., 2004; BREMER et al., 2009; MAAS et al., 2011 e 2009; MASSONI et al., 2014; GUO et al., 2017).

A família Annonaceae é pantropical e composta de cerca de 2400 espécies, distribuídas em 107 gêneros (GUO et al., 2017), possuem distribuição geográfica do tipo pantropical, com aproximadamente 900 espécies (40 gêneros) na região dos neotrópicos (Figura 2) (RICHARDSON et al., 2004; CHATROU et al., 2004; LOBÃO et al., 2018). No Brasil, dentre as 32 mil espécies de angiospermas catalogadas, aproximadamente 372 espécies são Annonaceae, constituídas de 29 gêneros, que estão amplamente dispersos em todo território nacional (MAAS et al., 2015; LOBÃO et al., 2018). Na Região Amazônica habitam 27 gêneros e cerca de 265 espécies de Annonaceae e 158 são endêmicas (MAAS et al., 2015; LOBÃO et al., 2018). Uma característica marcante da família Annonaceae é o forte odor exalado quando seu tronco ou ramos são cortados; possui ainda fibras longas e resistentes nas cascas, além das marcas de chamuscas quando feito um corte transversal no tronco (RIBEIRO et al., 1999).

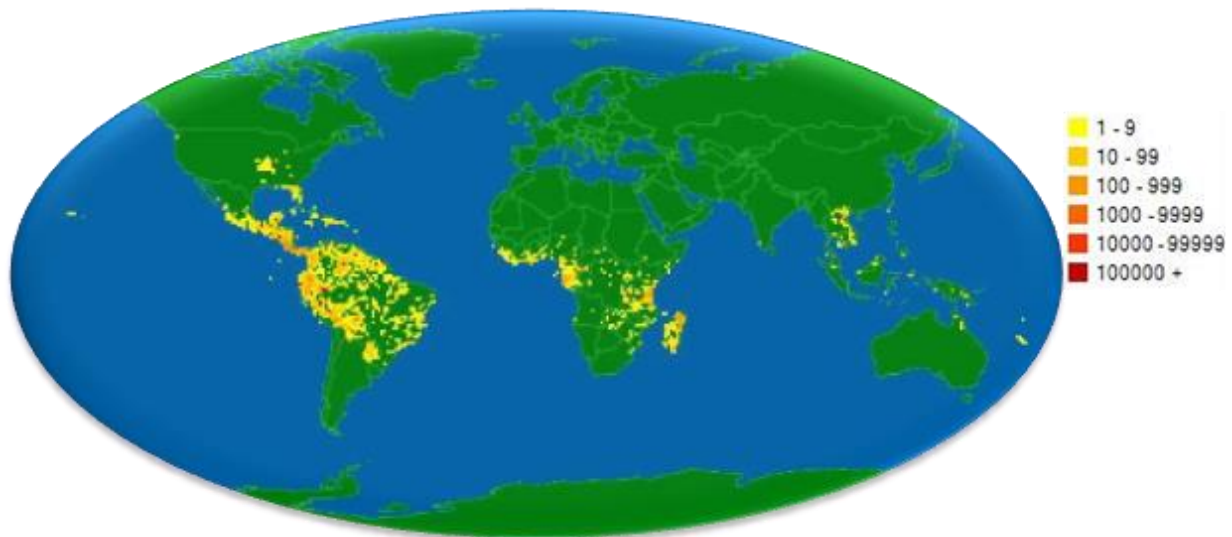


Figura 2. Distribuição geográfica da família Annonaceae.

Fonte: <http://www.tropicos.org/Name/42000007?tab=maps>. Acessado em: 19/06/2018.

Suas folhas são simples, alternadas e dísticas, com pecíolo reduzido e sem estípulas (JUDD et al., 1999; MURILLO-A, 2001; SOUZA & LORENZI, 2005). As flores variam em tamanho e podem ser: esbranquiçadas, creme-amareladas, esverdeadas, alaranjadas e até vinho (Figura 3) (RIBEIRO et al., 1999). No que diz respeito ao fruto, são geralmente comestíveis, encontrados na forma de um sincarpo, gerado pela fusão de numerosos carpelos sobre um receptáculo carnosos. Os carpelos são bem individualizados, especialmente na parte superior do fruto. A polpa é branca, doce, saborosa e ligeiramente ácida (Figura 4) (MANICA, 1997; FERREIRA et al., 2002; CEAGESP, 2013).

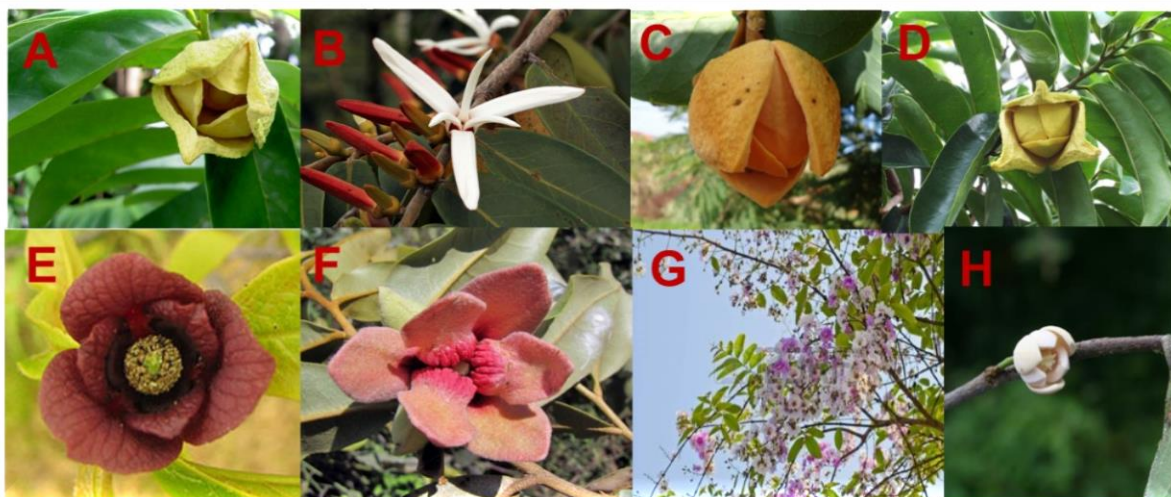


Figura 3. Flores de diferentes espécies da família Annonaceae.

(A) *Annona muricata*¹, (B) *A. dioica*², (C) *Xylopia aromática*², (D) *A. muricata*², (E) *Asimina triloba*³, (F) *Duguetia furfuracea*⁴, (G) *Cananga odorata*⁵, (H) *Unonopsis guatterioides*⁶.

Fonte: www.commonswiki.org¹, www.flickr.com², www.wikipedia.org³, www.flores-do-cerrado.eco.br⁴, www.es.123rf.com⁵, www.kew.org⁶.

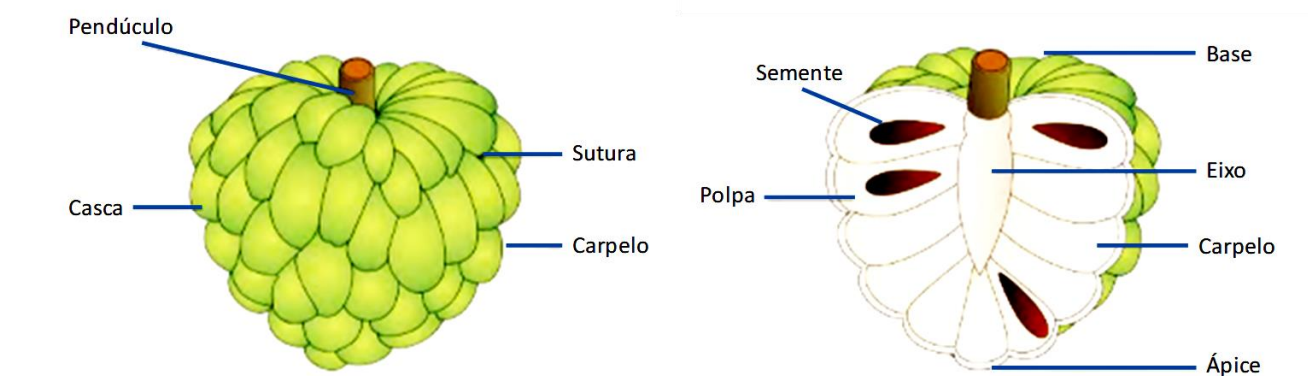


Figura 4. Ilustração de um fruto de alguns gêneros da família Annonaceae.

Fonte: Adaptado de CEAGESP, 2013.

2.1.1. Aspectos econômicos, etnobotânicos e farmacológicos

A família Annonaceae possui um relevante papel na economia de vários países (SOBRINHO, 2014). Este avanço está relacionado com a comercialização de seus frutos comestíveis e produtos derivados, atividade farmacológica de algumas espécies, a aplicabilidade como matéria-prima para fabricação de cosméticos, na indústria de perfumes e aromatizantes como as flores da *Cananga odorata*, sendo também utilizadas em ornamentação como é o caso das flores de *Xylopia aromatica* (NASCIMENTO & BOAVENTURA, 2003; ISMAN, 2006; SOBRINHO, 2014; PADMANABHAN & PALIYATH, 2016).

Como exemplo de frutos comestíveis (Figura 5) e comercialmente importantes, temos espécies dos gêneros *Annona* (graviola, pinha e cherimolia) e *Asimina* (pawpaw) (MURILLO-A, 2001; SOBRINHO, 2010; CHATROU et al., 2012b; PADMANABHAN & PALIYATH, 2016), cujos frutos são consumidos *in natura* ou como ingrediente na fabricação de sucos e sobremesa (BRANDÃO & SANTOS, 2016). Os frutos de Annonaceae são climatéricos com uma vida útil curta pós-colheita, todavia são geralmente ricos em carboidratos e açúcares, além de fontes de algumas vitaminas e minerais (PADMANABHAN & PALIYATH, 2016).

A comercialização de polpas e frutos de Annonaceae, especificamente o gênero *Annona*, está concentrada nos estados da Bahia e São Paulo. O híbrido das espécies *A. cherimolia* e *A. squamosa*, conhecido popularmente como atemoia, surgiu na década de 1980, e seu cultivo está centrado nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste do Brasil. Por ser uma mistura de duas espécies houve a necessidade de implementação de tecnologias para difundir o fruto no país. Em relação à comercialização esta fruta possui algumas vantagens, pois apresenta um menor número de sementes e consequentemente mais polpa, tem um melhor tempo de prateleira pós-colheita, não

possui rachaduras, além de ter um mecanismo melhor de defesa (LOBÃO et al., 2006; NOGUEIRA et al., 2006; SOBRINHO, 2014).

Brandão e Santos (2016) relatam que a polpa de *A. squamosa* (Figura 5) é considerada rica em teor calórico, com altos níveis de açúcares totais, vitamina C, complexo de vitamina B e alguns minerais.

O fruto ilama (*A. diversifolia*), como é conhecido popularmente no México, chama muita atenção devido a coloração vermelha da sua polpa, sendo este uma exceção aos padrões conhecidos sobre os frutos provenientes de espécies da família Annonaceae no Brasil (Figura 5). Este fruto possui alto potencial de comercialização, porém limitado, pois sua vida útil é curta devido os produtos serem colhidos quando se atinge a maturidade comestível (SOBRINHO, 2010; VALLE-GUADARRAMA et al., 2012).

Registros bibliográficos apontam a utilização de madeiras da família Annonaceae para produção de papel, além de possuírem bastante utilidade na construção civil, no paisagismo e arborização urbana como é o caso da espécie *Xylopia brasiliensis* (LORENZI, 1992; LEBOEUF et al., 1982a; JUSTO, 2003; PAULINHO-NETO & OLIVEIRA, 2006; BENINI et al., 2012; CHATROU et al., 2012b).

Diversas espécies da família Annonaceae são utilizadas na medicina tradicional, dentre estas se destacam as espécies dos gêneros *Annona* por seu uso frequente na Região Amazônica. Como exemplo, a espécie *A. squamosa* (fruta-do-conde) cujas folhas são pulverizadas e empregadas no tratamento de úlceras e feridas, além de suas cascas fornecerem um tônico contra diarreia (YANG et al., 2002). A espécie *A. mucosa* (biribá), além de atividade antileishmania reportada (DE LIMA et al., 2012), tem várias partes usadas no tratamento de tumores (KUO et al., 2001), e relatos populares de uso dos extratos de suas folhas contra piolhos e outros insetos (DE LIMA et al., 2012). O suco do fruto de *A. muricata* é utilizado como diurético e o pó desses frutos quando

triturados, possui aplicabilidade no tratamento de disenterias (RAGASA et al., 2012). *A. foetida* que tem suas folhas e cascas usadas popularmente para tratamento de febre, reumatismo e úlceras (CORRÊA, 1984), e pesquisas relatam potencial antimicrobiano e antileishmania significativo (COSTA et al., 2009b). A espécie *A. salzmannii* tem suas folhas e cascas empregadas no alívio de diabetes, inflamação, úlceras, verminoses e disenterias (CORRÊA, 1984), e relatos descritos em literatura mostram atividades tripanocida e antitumoral promissoras (COSTA et al., 2013b).

Arévalo-Lopéz e colaboradores (2018) realizaram uma abordagem bioguiada com 38 espécies de plantas medicinais usadas para tratamento de pele, úlceras de leishmania, inflamação e cicatrização. As folhas da espécie *Bocageopsis* spp. estava entre as selecionadas e apresentou significativa atividade antileishmania.



Figura 5. Frutas comestíveis pertencentes à família Annonaceae.

(A) *A. muricata* (graviola)¹; (B) *A. cherimoia* Mill (cherimóia)²; (C) Híbrido de *A. squamosa* e *A. squamosa* (atemoia)³; (D) *Asimina* (pawpaw)⁴; (E) *A. squamosa* (fruta do conde)¹; (F) *A. mucosa* (biribá)⁴; (G) *A. diversifolia* (ilama)⁵; (H) *A. deliciosa* (biribá)¹; (I) *A. glabra* (araticum do brejo)⁶.

Fonte: <http://www.flipper.diff.org/app/items/3958>¹; <http://www.prota4u.info>²; <http://www2.zaffari.com.br>³; <http://www.nature.org>⁴; frutalestropicales.com⁵; www.coleccionandofrutas.org⁶. Acessado em: 18/12/2017.

Em uma abordagem fitoquímica realizada para espécies de *Unonopsis*, *Bocageopsis* e *Onychopetalum* realizado por Silva e colaboradores (2015a), foi apresentada uma significativa (CIM 25 e 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$) atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Escherichia coli*, quando comparado com o controle positivo (cloranfenicol e cetoconazol, CIM 10 e 500 $\mu\text{g ml}^{-1}$).

No quadro 1 são apresentados alguns exemplos de espécies da família Annonaceae usadas na medicina popular e algumas atividades biológicas e farmacológicas comprovadas.

Quadro 1. Usos populares, atividades antimicrobianas e farmacológicas comprovadas de algumas espécies da família Annonaceae.

Espécie	Nome Popular	Uso Popular	Atividade Comprovada
<i>Annona cherimola</i> Miller	Grabiola, Graveola, Graviola	As sementes são esmagadas e usadas como inseticidas, principalmente para matar piolhos e curar distúrbios da pele parasitária (VAREA, 1992). As frutas possuem atividade antimicrobiana e inseticida e como um tratamento eficaz para distúrbios digestivos, como dor de estômago e úlceras pancreáticas (AMOO et al., 2008).	Foram atribuídas às sementes atividades antiparasitas e citotóxicas (SAHPAZ et al., 1996), antimicrobianas, antitumorais, cardiotônicas, antidepressivo (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2012) e inseticidas (SANEWSKI, 1991).
<i>A. glabra</i>	Araticum-paná, Araticum do Brejo,	As folhas e a casca desta planta são usadas como inseticida e parasitária em hortas orgânicas (PADMAJA et al., 1995).	Inseticida e parasiticida (CHEN et al., 2004); inibidor da replicação do vírus HIV em linfócitos (CHANG et al., 1998); larvicida (SLIMESTARD et al., 1995).
<i>A. foetida</i>	araticum caatinga, envira-ata ou graviola do mato	As folhas e cascas são utilizadas contra o reumatismo, febres intermitentes e úlceras (CORRÊA, 1984).	Atividades antibacteriana (RAHMAN et al., 2001), antiparasitária e antileishmania (COSTA et al., 2009b).
<i>A. mucosa</i>	Biribá	Várias partes são usadas no tratamento de tumores (KUO et al., 2001) e em relatos populares encontram-se o uso de extratos de suas folhas contra piolhos e outros insetos (DE LIMA et al., 2012).	Atividade antiplaquetária (KUO et al., 2001), Atividade antileishmania (DE LIMA et al., 2012).
<i>A. muricata</i>	Graviola, Guanabana, Paw-paw	Para abscessos, bronquite, problemas de tórax, tosse, diabetes, diarreia, disenteria, edema, febre, cólica intestinal, parasitas intestinais, problemas hepáticos, nevralgias, nervosismo, dor, parasitas,	Antiviral (PADMA et al., 1998), antiparasita, adstringente, antireumático (SANTOS & SANT'ANA, 2001),

		reumatismo, espasmos (PATEL & PATEL, 2016).	antileishmania (JARAMILLO, et al., 2000). Extrato das folhas apresenta atividade eficiente no controle de células tumorais (OBERLIES et al., 1997).
<i>A. salzmannii</i>	Araticum-da-mata, araticum-apé	Folhas e cascas são usadas para inflamação, diabetes, úlceras, verminoses e disenterias (CORRÊA, 1984).	Atividade tripanocidal e antitumoral (COSTA et al., 2013b). Atividade antimicrobiana (COSTA et al., 2011).
<i>A. squamosa</i>	Fruta-do-conde, ata no Brasil	As cascas são empregadas em tratamento de reumatismo e dor no baço (SINGH et al., 2014).	Inseticida e antiplasmodico (SINGH et al., 2014), analgésico e antiinflamatório (DASH et al., 2001), efeito antihelmíntico (FERNANDES et al., 2009), antileishmania (FIGUÊIREDO et al., 2016).
<i>A. vepretorum</i>	Araticum, bruteira	As raízes são utilizadas para suavizar picadas de abelhas e cobras. As folhas são usadas em alergias, doenças de pele e infecções bacterianas (DUTRA et al., 2014).	Atividade citotóxica e antitumoral (DUTRA et al., 2014; ALMEIDA et al., 2014; BOMFIM et al., 2016).
<i>Bocageopsis sp.</i>	Djipicu	Infecção de pele (ARÉVALO-LOPÉZ et al., 2018)	Atividade antileishmania (ARÉVALO-LOPÉZ et al., 2018).
<i>B. pleiosperma</i>	Envira-preta, jurueira sangue	ND	Atividade antimicrobiana (SOARES et al., 2015b).
<i>B. multiflora</i>	Envira, Envira-preta, Envira-surucucú,	ND	Atividade leishmanicida (OLIVEIRA et al., 2014).
<i>Desmopsis bibracteata</i>	ND	ND	Apresentaram citotoxicidade notável em células MDA-MB-231 e Hs 578T; atividade antibacteriana contra <i>Bacillus cereus</i> (PALAZZO et al., 2009).
<i>Guatteria blepharophylla</i>	Envira	ND	Atividade antimicrobiana (KHAN et al., 2002; ANDREAZZA et al., 2016), atividade citotóxica (FERRAZ et al., 2014).
<i>G. diospyroides</i>	Envira	ND	Apresentaram citotoxicidade notável em células MDA-MB-231; atividade antibacteriana contra <i>Bacillus cereus</i> (PALAZZO et al., 2009).
<i>G. friesiana</i>	Envira, envireira	ND	Atividade citotóxica (BRITO et al., 2012), antimicrobiana (COSTA et al., 2008), antitumoral (COSTA et al., 2013a), antioxidante e antiparasitária (MAHIOU et al., 2000; MONTENEGRO et al., 2003).

<i>G. gaumeri</i>	Envira	Uso do chá das cascas para tratamento de hipercolesterolemia e colelitíase (SÁNCHEZ-RESÉNDIZ & TEJADA, 1982; CHAMORRO et al., 1993).	Testes <i>in vivo</i> apresentaram efeito hipercolesterolêmico, hipolipidêmico, efeito genotóxico (SÁNCHEZ-RESÉNDIZ & TEJADA 1982; CHAMORRO et al., 1993).
<i>G. leiophylla</i>	Envira	Tratamento de gonorréia e leucorréia (MORTON, 1981).	ND
<i>G. oliviformis</i>	Envira	ND	Apresentaram citotoxicidade notável em células MDA-MB-231; atividade antibacteriana contra <i>Bacillus cereus</i> (PALAZZO et al., 2009).
<i>G. ouregou</i>	Envira	Tratamento de disepsia, dores estomacais (ANDREAZZA et al., 2016).	Anticorrosivo (LECANTE et al., 2011).
<i>G. pteropus</i>	Envira fofa, envira preta	Uso como tônico (JOWEL et al., 1996).	ND
<i>Onychopetalum amazonicum</i>	Envira preta, envira caju, envira casca rocha	ND	Atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2015a; LIMA et al., 2016).
<i>O. periquino</i>	Envira caju e inuira	ND	Atividade larvicida contra <i>Aedes aegypti</i> (LIMA et al., 2019).
<i>Unonopsis costaricensis</i>	Anonillo	ND	Apresentaram citotoxicidade notável em células MDA-MB-231 e atividade antibacteriana contra <i>Bacillus cereus</i> (PALAZZO et al., 2009).
<i>U. duckei</i> R. E. Fr.	Envira, Envira cascuda,	ND	Atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2015a).
<i>U. floribunda</i>	Chocolatillo, Chocolatillo blanco.	Uso para tratamento de artrite e reumatismo.	Atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2015a).
<i>U. lindmanii</i>	Pindaíva preta, envira preta.	ND	Atividade anticâncer e citotóxica (SIQUEIRA et al., 1998); Atividade tóxica e alelopática (YOSHIDA, 2007).
<i>U. stipitata</i> Diels	Envira cascuda, Pindaíba preta	Folhas pulverizadas para curar dificuldades na fala de idosos (SCHULTES, 1993; ADAMS et al., 2007a).	Atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2015a).
<i>U. guaterioides</i>	Araticum, Ata do igapó, Atinha,	Tratamento de demência senil, como veneno para ponta de setas e são, também utilizadas como antifertilizante (SCHULTES, 1993).	ND
<i>U. rufescens</i> (Baill.) R.E. Fr	ND	ND	Atividade antimicrobiana (SILVA et al., 2015a).
<i>U. veneficiorum</i>	Bara, Moncapatahue (Huaorani), Palo de anzuelo	Usada por índios - Folhas secas usadas em comida de idosos para curar demência (SCHULTES, 1993; ADAMS et al., 2007a) e ainda como veneno em ponta de flechas (SIQUEIRA et al.,	ND

		1998), além do uso dos frutos como adstringentes (MARTIUS, 1831).	
<i>Xylopia frutescens</i>	Envira, envira vermelha, vassourinha	Estimulante da bexiga e no tratamento do reumatismo (CORRÊA, 1926).	Estimulante de bexiga e tratamento de reumatismo (CORRÊA, 1926); Efeito antitumoral (FERRAZ et al., 2013).
<i>X. emarginata</i>	Cupuzinho, vassourinha	Utilizada para combater a malária (DE MESQUITA et al., 2007).	Atividade antiplasmodial encontrada nas cascas da raiz (DE MESQUITA et al., 2007).
<i>X. parviflora</i>	Pimenta africana	Utilizada como aromatizante em molhos e bebidas (WOGUEM et al., 2014).	A raiz cozida é usada para curar distúrbios estomacais. As cascas têm aplicabilidade analgésica e antiespasmódica e suas folhas são aplicadas no tratamento da malária (WOGUEM et al., 2014).
<i>X. sericea</i>	Embiriba	A infusão dos frutos é utilizada para tratar perfurações gástricas (CORRÊA, 1987).	Potencial acaricida (PONTES et al., 2007).

ND: não descrito.

Algumas espécies da família Annonaceae (*Bocageopsis* spp., *Fusae longifolia*, *Guatteria megalophylla*, *G. stipitata*, *Oxandra polyanthia*, *O. lanceolata*, *Xylopia aethiopia* e *X. villosa*) são conhecidas popularmente como “cargueiros” na Região Amazônica, pois suas cascas são resistentes. Essas madeiras são utilizadas como suporte no transporte de cargas, atividade bastante comum nessa região devido à atividade agrícola e madeireira em vilas distantes dos centros comerciais (KESSLER, 1993; MURILLO-A & RESTREPO, 2000; MURILLO-A, 2001). Trabalhos relatam o uso da espécie *Annona glabra* principalmente como fonte de madeira para carpintaria, caixotarias, ripas, mastros e remos para pequenas embarcações (FONSECA-KRUEL & PEIXOTO, 2004).

A madeira da espécie *X. amazonica* é usada na confecção de caibros que em linhas de construção são bastante comuns (REVILLA, 2002). Com as madeiras de *X. aromática* são confeccionados forros e caixas leves; para as madeiras de *X. sericea* são realizadas a produzidos cabos de ferramentas e de cepas para tamancos e escovas (FELFILI, 2010).

A espécie *A. coriacea* é bastante utilizada na fabricação de vigas, caibros, batentes de portas, janelas, molduras, lâminas, postes, mourões e linhas ferroviárias. *A. crassiflora* tem a aplicação da sua madeira na produção de caixotarias, miolo de portas e painéis (FELFILI, 2010).

2.1.2. Fitoquímica da Família Annonaceae

A família Annonaceae é quimicamente caracterizada pela presença de alcaloides, principalmente derivados isoquinolínicos, terpenóides como monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos presentes na composição de óleos essenciais, além da presença de flavonoides (LEBOEUF et al., 1982a; TELES et al., 2015; NOVAES et al., 2018). Outra característica marcante quanto à sua composição química é a presença de acetogeninas, uma classe química encontrada exclusivamente na família Annonaceae, e que tem atraído grande interesse devido a sua crescente lista de atividades biológicas e estruturas peculiares descritas na literatura. Foram principalmente encontradas em espécies dos gêneros *Annona*, *Asimina*, *Uvaria* e *Goniothalamus*, em mais de 30 anos de estudo. O número de acetogeninas isoladas nesta família já ultrapassa de 500 (CUNHA et al., 2009; CHANG et al., 1999; PAES et al., 2016).

Os alcaloides que representam uma das mais difundidas classes de substâncias dotadas de múltiplas e variadas propriedades farmacológicas, são metabólitos secundários, biossinteticamente derivados de aminoácidos. Tratam-se de bases orgânicas nitrogenadas produzidas principalmente em plantas, porém podem ser encontrados em microorganismos e animais em quantidades inferiores. São classificados de acordo com o aminoácido precursor (ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, histidina, ácido antranílico e triptofano), sendo alguns obtidos através de

reações de transaminação (STÉVIGNY et al., 2005; SILVA et al., 2007a; DEWICK, 2009; ZANIN et al., 2011).

Outra classe de compostos identificados e isolados que vem crescendo na família Annonaceae são os fenólicos, considerados uma classe ampla de substâncias de origem natural. Dentre esses compostos fenólicos destacam-se: os ácidos fenólicos, fenóis simples, flavonoides, cumarinas, taninos hidrolisáveis, ligninas e tocoferóis, estes compostos possuem atividades biológicas comprovadas em literatura (OLIVEIRA et al., 1994; SPÍNOLA et al., 2015; NOVAES et al., 2018).

2.1.2.1. Alcaloides isoquinolínicos

A variedade de alcaloides com o esqueleto isoquinolínicos é bastante extensa e continua em ampliação. De acordo com a origem biossintética os tipos de alcaloides principais encontrados na família Annonaceae são: isoquinolínicos simples, benzilisoquinolínicos, aporfinicos, proaporfinicos, protoberberínicos e fenantrênos (LEBOEUF et al., 1982b; CAVÉ, 1985; COSTA et al., 2013a; ANDREAZZA et al., 2016).

Na literatura existem relatos de diversas atividades biológicas e farmacológicas para a classe dos alcaloides isoquinolínicos, tais como: antifúngica, anti-inflamatória, antiviral, antioxidante, antimicrobiana, antileishmania e citotóxica (SILVA et al., 2007a; ANISZEWSKI, 2007; COSTA, 2009; COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2013a; RABELO et al., 2014; ANDREAZZA et al., 2016; LIMA et al., 2016; LIMA et al., 2020).

2.1.2.1.1. Alcaloides isoquinolínicos simples e alcaloides benzilisoquinolínicos.

Os alcaloides isoquinolínicos simples (os mais simples alcaloides de isoquinolina) são geralmente bicíclicos, embora possam ocorrer esqueletos com três anéis. Podem ser definidos como aqueles contendo apenas um núcleo aromático, anel A, sendo que esse anel pode sofrer substituições por hidroxilas, metilas e ponte

metilenodioxi. O nitrogênio do anel B é frequentemente terciário (*N*-metilado), mas também pode ser secundário, *N*-formilado, *N*-acetilado, *N*-etilado ou oxidado para o estágio de imina (MENACHERY et al., 1986).

Várias substâncias são incluídas neste grupo de alcaloides, porém as tetrahydroisoquinolinas constituem o grupo principal (Figura 6), podendo conter cerca de 50 estruturas diferentes que podem ocorrer na natureza (LUNDSTRÖM, 1985; PHILLIPSON et al., 1985; MENACHERY et al., 1986).

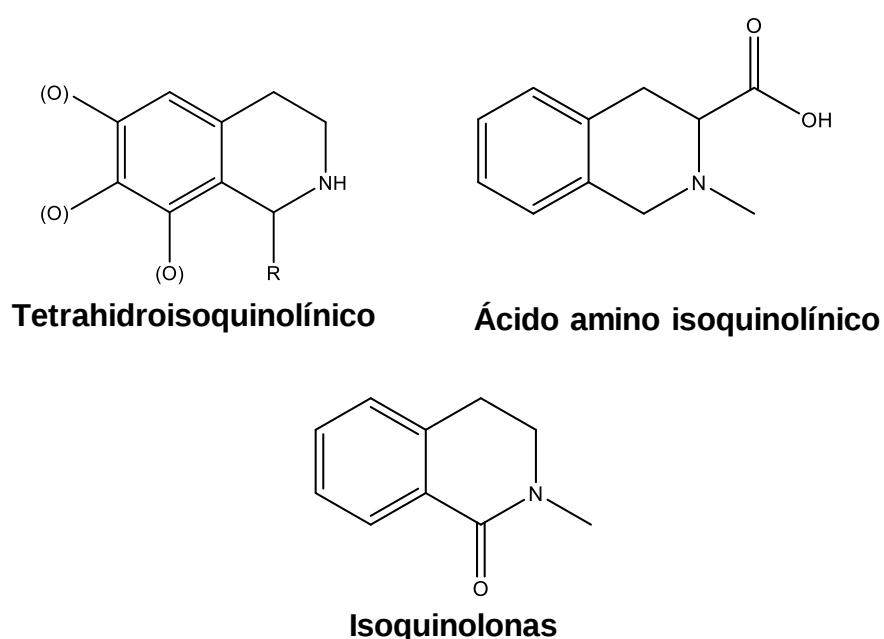


Figura 6. Esqueletos básicos dos isoquinolínicos simples.
Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009.

Uma das vias biossintéticas para formação de alcaloides isoquinolínicos simples, os tetrahydroisoquinolínicos simples, dá-se a partir do aminoácido *L*-tirosina reagindo com ceto ácidos (RCOCO_2H , $\text{R}=\text{H}$ ou CH_3) (Figura 7) (DEWICK, 2009). Porém, uma rota, alternativa, usando *L*-leucina como precursora dos ceto ácidos, também tem sido demonstrada (DEWICK, 2009).

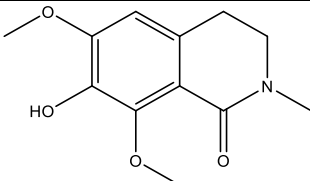
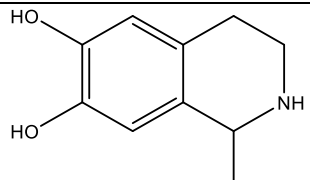
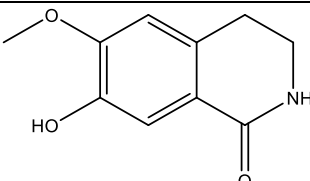
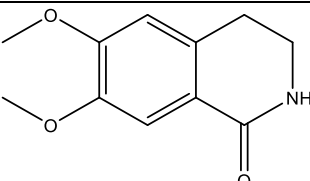
A via biossintética dos alcaloides benzilisoquinolínicos (Figura 7) dá-se, a partir do aminoácido *L*-tirosina. Ocorrem inicialmente na *L*-tirosina duas reações paralelas: a descarboxilação, seguida de oxidação para formação de dopamina e a transaminação

seguida de descarboxilação, que dá origem ao 4-hidroxifenil acetaldeído. Posteriormente, ocorre a condensação dos dois produtos da descarboxilação através da reação de Mannich, originando o alcaloide benzilisoquinolínico (S)-norcocclaurina (DEWICK, 2009; SANTOS et al., 2017a).

Em seguida ocorre a O-metilação da (S)-norcocclaurina resultando na formação da (S)-cocclaurina. A (S)-cocclaurina sofre uma N-metilação e ocorre a formação da (S)-N-metilcocclaurina. Após essas etapas, o anel D sofre uma oxidação formando a (S)-3'-hidroxi-N-metilcocclaurina, esta sofre uma O-metilação formando a (S)-reticulina. A (S)-reticulina é a precursora dos alcaloides aporfínicos, protoberberínicos e benzofenantridinas, que são formados por acoplamentos oxidativos (STÉVIGNY et al., 2005; DEWICK, 2009; LÚCIO, 2011; SANTOS et al. 2017a).

Espécies contendo isoquinolinas simples são encontradas principalmente nas Cactaceae, Chenopodiaceae e na Fabaceae, mas também podem ser encontradas em Langiaceae, Annonaceae, Berberidaceae, Euphorbiaceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Musaceae, Nymphaeaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae, Rhamnaceae e Sterculiaceae (LUNDSTRÖM, 1985; MENACHERY et al., 1986). Na família Annonaceae foram relatadas apenas quatro estruturas de isoquinolinas simples (Quadro 2).

Quadro 2. Alcaloides isoquinolínicos simples encontrados na família Annonaceae.

Espécies	Alcaloides	Parte vegetal	Referências
<i>Anona cherimola</i>	 cherianoina	caule	CHEN et al., 2001.
<i>Annona reticulata</i>	 salsolinol	Caule e folha	FORGACS et al., 1981.
<i>Annona squamosa</i>	 talifolina	caule	YANG et al., 2004.
<i>Enantia polycarpa</i>	 coridaldina	tronco	JOSSANG et al., 1977.

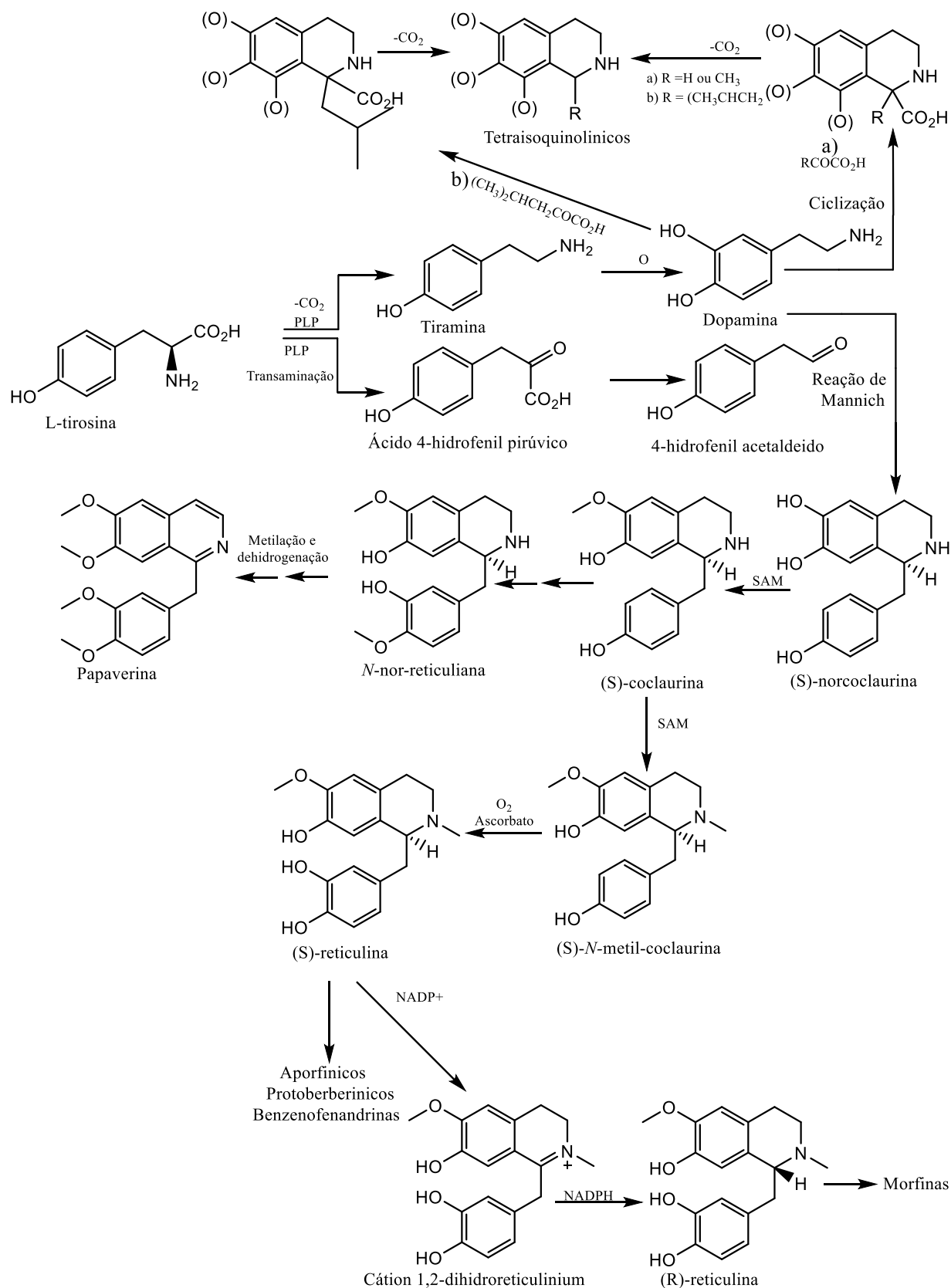


Figura 7. Biossíntese dos alcaloides benzilisoquinolínicos e tetrahidroisoquinolínico.
Fonte: Adaptado de Dewick, 2009.

2.1.2.2. Alcaloides aporfínicos

Uma classe de alcaloides muito encontrada na família Annonaceae é a dos alcaloides aporfínicos ou aporfinoides, que possuem algumas atividades antitumorais e antimicrobianas já descritas em literatura (ANISZEWSKI, 2007; COSTA et al., 2011; COSTA et al., 2013b e 2013c; SILVA et al., 2012).

Os aporfínicos são um grupo de grande representação dentro da classe dos alcaloides isoquinolínicos (ZANIN & LORDELLO, 2007), sendo constituídos de bases tetracíclicas (Figura 8), formada pelo acoplamento direto dos anéis aromáticos A e C (ZANIN et al., 2011). São encontrados em plantas da família Annonaceae, porém também podem ser encontrados nas famílias Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae e Rhamnaceae. Muitas das atividades farmacológicas apresentadas em extratos ou frações dessas famílias são atribuídas a este tipo de alcaloide (GUINAUDEAU et al., 1975; STÉVIGNY et al., 2005; RINALDI, 2007).

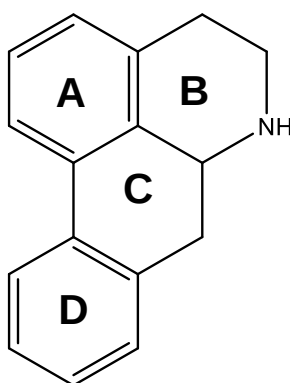
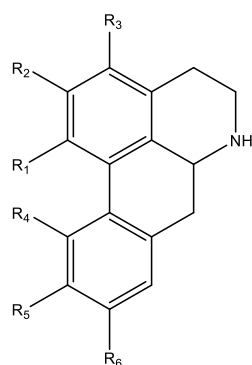


Figura 8. Estrutura dos alcaloides aporfínicos.
Fonte: Adaptado de ZANIN et al., 2011.

Para exemplificar citamos aqui, algumas estruturas aporfínicas e oxoaporfínicas, isoladas recentemente de espécies dos gêneros *Annona*, *Guatteria*, *Unonopsis*, *Onychopetalum* e *Bocageopsis* (Figura 9) (SANTOS et al., 2015; SILVA et al., 2015a; RABELO et al., 2014; SOARES et al., 2015a; TELES et al., 2015; SILVA et al., 2018a; LIMA et al., 2020). Outros alcaloides derivados do esqueleto benzilisoquinolínico, foram descritos em várias espécies da família Annonaceae (CAVÉ, 1985).



Puterina: $R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$; $R_3 = R_5 = R_6 = \text{H}$; $R_4 = \text{OCH}_3$

Anonaina: $R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$; $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$

Isopilina: $R_1 = \text{OH}$; $R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$

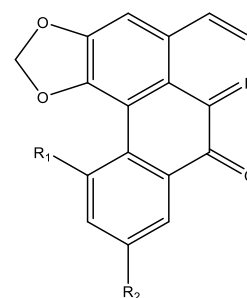
O-metilisopilina: $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$; $R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$

Launobina: $R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$; $R_3 = R_6 = \text{H}$; $R_4 = \text{OH}$; $R_5 = \text{OCH}_3$

Obovanina: $R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$; $R_3 = R_5 = R_6 = \text{H}$; $R_4 = \text{OH}$

Xylopina: $R_1 = R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$; $R_3 = R_4 = R_5 = \text{H}$; $R_6 = \text{OCH}_3$

Nornuciferina: $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$; $R_3 = R_4 = R_5 = R_6 = \text{H}$



Oxoputerina: $R_1 = \text{OCH}_3$; $R_2 = \text{H}$

Lanuginosina: $R_1 = \text{H}$; $R_2 = \text{OCH}_3$

Laurotetanina: $R_1 = R_2 = \text{H}$

Figura 9. Alcaloides aporfínicos isolados de espécies da família Annonaceae.

Fonte: Adaptado de SANTOS et al., 2015.

2.1.3. Flavonoides

Pertencentes ao grupo dos fenólicos, os flavonoides são metabólitos secundários aromáticos sintetizados pelas plantas (ROBARDS et al., 1999; HARBORNE, 1999; AHERNE et al., 2002; DORNAS et al., 2007; DEWICK, 2009), podem ser encontrados nas folhas, pétalas, frutas, raízes e etc. (HARBORNE, 1999). Possuem função de fornecer cor em flores e frutas, para atrair insetos e outros animais com o intuito de polinização e dispersão de sementes, podendo variar de forma qualitativa e quantitativa entre as espécies (HARBORNE, 1977; CROZIER et al., 1997; HARBORNE, 1999).

Os flavonoides apresentam uma estrutura básica, denominada núcleo flavan, constituída por 15 átomos de carbono, que representam um núcleo tricíclico (C6-C3-C6), ou seja, são compostos por dois anéis aromáticos (A e B), sendo conectados por um anel de três carbonos contendo oxigênio (anel C) (Figura 10). O anel C pode ter forma cíclica piranóica (núcleo flavonóide básico) ou ainda conter um grupo carbonila na posição 4 (OTAKI et al., 2009; NUNES et al., 2012).

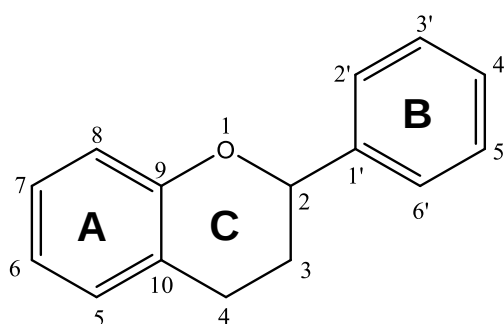
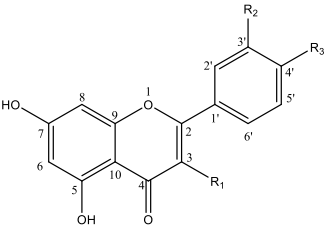
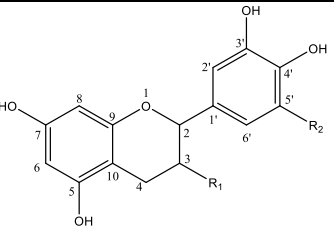
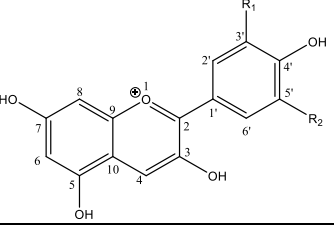
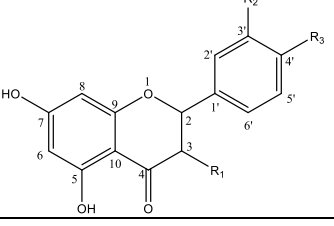
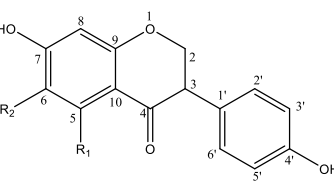


Figura 10. Estrutura básica dos flavonoides.
Fonte: Adaptado de NUNES et al., 2012.

De acordo com a variação estrutural no anel C, estas moléculas são divididas em seis subclasses (Quadro 3): flavonóis (quercetina, kaempferol e miricetina), caracterizadas por possuírem uma hidroxila na posição 3 e carbonila na posição 4 do

anel C; flavonas (luteolina e apigenina), que contém somente carbonila na posição 4; flavanóis (catequina) com apenas a hidroxila no C-3, porém sem a dupla ligação entre o C-2 e C-3; antocianidinas (cianidina e pelargonidina) contendo um oxônio em C-1 ligado ao C-2 e uma hidroxila no C-3; flavanonas com apenas a carbonila no C-4, também sem a dupla ligação entre o C-2 e C-3 (hesperetina); e isoflavonas (genisteína, daidzeína), na qual o anel B está localizado na posição C-3 do anel C (HARBORNE, 1994; DORNAS et al., 2007; OTAKI et al., 2009; DEWICK, 2009; NUNES et al., 2012).

Quadro 3. Estruturas das principais classes de flavonoides.

Classes	Exemplos	R ₁	R ₂	R ₃	Estruturas
Flavonóis	Quercetina	OH	OH	OH	
	Kaempferol	OH	H	OH	
Flavonas	Luteolina	H	OH	OH	
	Apigenina	H	H	OH	
Flavanóis	Catequina	OH	H		
	Epicatequina	OH	H		
Antocianidina	Cianidina	OH	H		
	Malvidina	OCH ₃	HCH ₃		
Flavanonas	Hesperetina	H	OH	OCH ₃	
	Narigenina	H	H	OH	
Isoflavonas	Daidzeína	H	H		
	Genisteína	OH	H		
	Gliciteína	H	OCH ₃		

Os flavonoides possuem uma rota biossintética mista (Figura 11) proveniente do ácido chiquímico e do acetato-malonato. Um precursor cinamoil-CoA C6C3 da via do chiquimato que atua como grupo iniciador, em seguida a cadeia 4-hidroxicinamoil-CoA é estendida com três unidades de malonil-CoA. A cadeia poli- β -ceto pode ser disposta de duas maneiras, uma levando a uma reação aldol que formaria estilbenos e outra levando a uma reação tipo-Claisen, favorecendo a formação do anel A de uma chalcona, primeira estrutura de flavonoides. O anel heterocíclico (Anel B) de seis membros, característico da maioria dos flavonoides, é formado por ataque nucleofílico de um grupo fenol do anel derivado do acetato-malonato à cetona α,β -insaturada da unidade cinamoil, portadora do anel C (DEWICK, 2009).

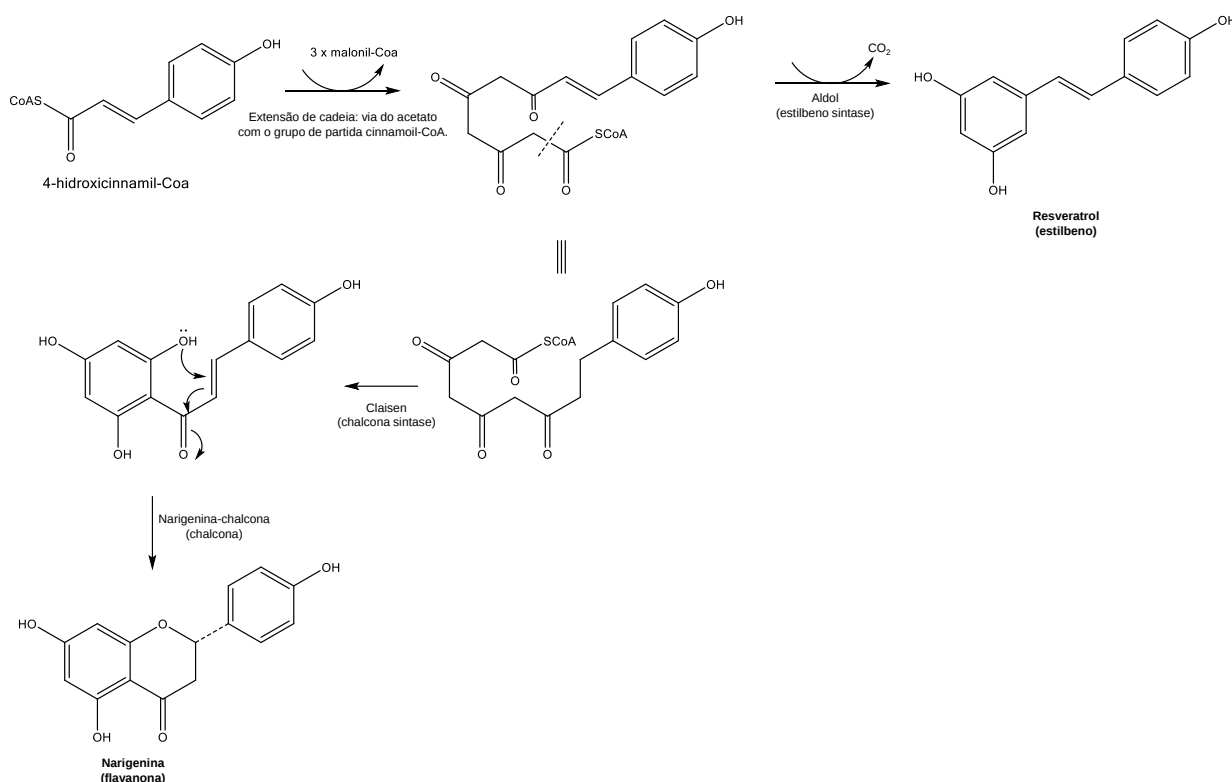


Figura 11. Rota biossintética dos flavonoides.

Fonte: Adaptado de DEWICK, 2009.

Essas substâncias destacam-se, por apresentarem atividades biológicas como: antioxidante, anticarcinogênica, antiinflamatórias, antimicrobiana, antiviral, dentre outras (BEIL et al., 1995; CRITCHFIELD et al., 1996; SATO et al., 1996; KOTKAR et

al., 2001; CORDEIRO et al., 2006; VISKUPICOVA et al., 2010; AGRAWAL, 2011; CARVALHO et al., 2013; BRITO et al., 2015; LI et al., 2015; SANTOS et al., 2017b).

Para a família Annonaceae existem relatos da presença de compostos flavonoídicos (Quadro 4) (NOVAES et al., 2018). Santos & Salatino (2000) relataram o isolamento de 76 flavonas e flavonóis provenientes das folhas de espécies de Annonaceae nativas do Brasil, sendo a maior parte glicosídeos, dentre eles as substâncias com baixa ocorrência são as hispidulinas (1%) e os que se sobressaem são as quercetinas (37%) (Figura 12). No gênero *Annona* já foram relatados os glicosídeos quercetina, kaempferol e isorhamnetina, além de outros flavonóis (DE OLIVEIRA et al., 1987; SILVA et al., 2007b; RAJU et al., 2015; SPÍNOLA et al., 2015; NOVAES et al., 2018).

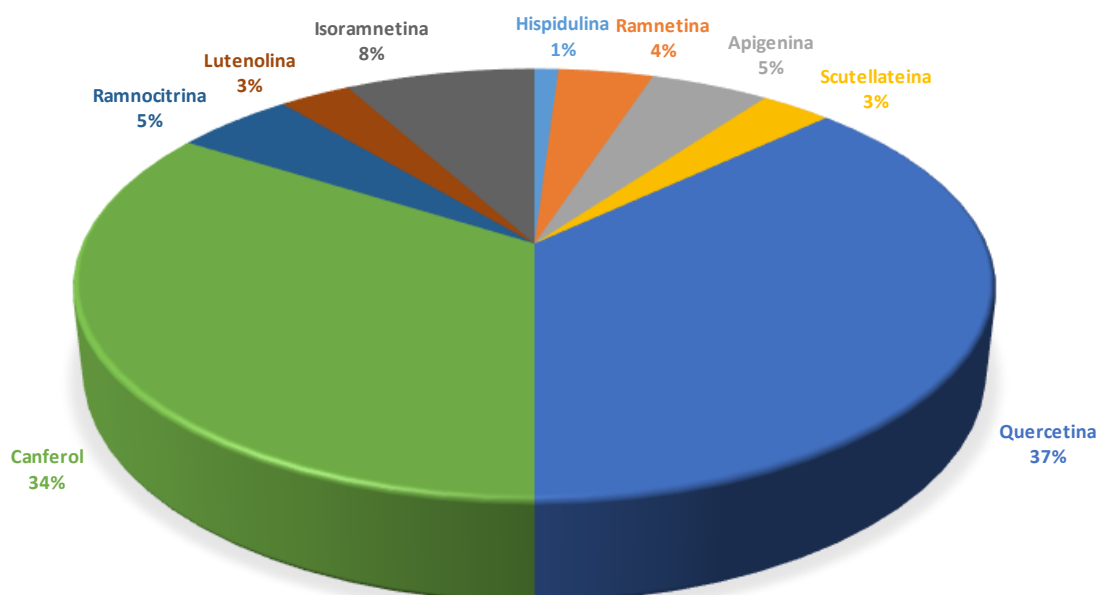
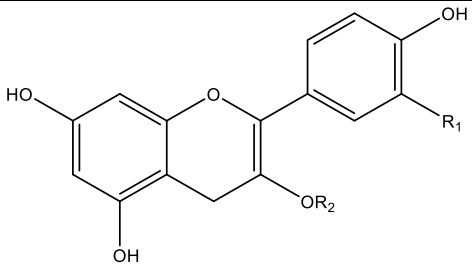


Figura 12. Ocorrência de flavonoides isolados a partir de espécies de Annonaceae.
Fonte: Adaptado de SANTOS & SATATINO (2000).

Quadro 4. Flavonoides isolados a partir do extrato das folhas de *Annona coriacea*.

		
Substâncias	R ₁	R ₂
Quercetina-3-O-β-(6''-O-β-glucosil)-glucosideo	OH	Glc-(1→6)-Glc
Quercetina-3-O-β-(6''-O-α-ramnosil)-galactosideo	OH	Rha-(1→6)-Gal
Quercetina-3-O-β-(6''-O-α-ramnosil)-glucosideo (Rutina)	OH	Rha-(1→6)-Glc
Quercetina-3-O-β-galactosideo (Hiperina)	OH	Gal
Quercetina-3-O-β-glucosideo (Isoquercitrina)	OH	Glc
Kaempferol-3-O-β-(6''-O-α-ramnosil)-galactosideo (Biorobina)	H	Rha-(1→6)-Gal
Kaempferol-3-O-β-(6''-O-α-ramnosil)-glucosideo (Nicotiflorina)	H	Rha-(1→6)-Glc
Isorhamnetina-3-O-β-(6''-O-α-ramnosil)-galactosideo (Keiosideo)	OCH ₃	Rha-(1→6)-Gal
Isorhamnetina-3-O-β-(6''-O-α-ramnosil)-glucosideo (Narcissina)	OCH ₃	Rha-(1→6)-Glc
Isorhamnetina-3-O-β-galactosideo (Cacticina)	OCH ₃	Gal
Isorhamnetina-3-O-β-glucosideo	OCH ₃	Glc

2.1.4. Óleos essenciais da Família Annonaceae

Os óleos essenciais são considerados misturas complexas de substâncias voláteis, lipossolúveis, líquidas e viscosas, na maioria das vezes incolores ou com um tom amarelado e podem ou não exalar odor. Apresentam baixa estabilidade principalmente na presença de ar, luz, calor, umidade e metais, podem apresentar oxidação, escurecendo e transformando-se em resina. São componentes responsáveis pelo aroma e fragrância das plantas, e podem ser extraídos das suas cascas, caule, flores, folhas, frutos, rizomas e sementes. Os constituintes principais dessas misturas de substâncias são de natureza terpênica, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, arilpropanoide e derivados de ácidos graxos, incluindo, algumas vezes, constituintes específicos contendo enxofre ou nitrogênio. Na indústria possuem aplicabilidade nas áreas de farmácia, cosméticos e inseticidas (SIMÕES et al., 1999; SIMÕES & SPITZER 2000; BOYOM et al., 2003; SARTORATTO et al., 2004; SHAALAN et al., 2005).

Na biossíntese dos compostos terpenoides eles são oriundos de unidades de isopreno e são classificados de acordo com o número dessas unidades (Figura 13): hemiterpenos (C₅), monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), sesterterpenos (C₂₅), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀) (DEWICK, 2009).

Os terpenóides tem sua origem a partir de duas vias biossintéticas denominadas, via do mevalonato e via desoxixilulose fosfato, que por conversão enzimática utilizam a condensação do difosfato de isopentenil (IPP) com o difosfato de dimetilalil (DMAPP), ambos com cinco unidades de carbonos. A biossíntese do IPP e do DMAPP pode ocorrer por duas vias diferentes, a via clássica denominada via do mevalonato (única via nos animais) e a via do metil eritritol fosfato (MEP) (principal via nos vegetais) (Figura 13) (DEWICK, 2009). A via do mevalonato ocorre no citosol e do metilritritol fosfato nos plastídios (CAISSARD et al., 2004).

Em ambas as vias ocorre combinações dos precursores IPP e DMAPP (intermediários hemiterpênicos) para formação de monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e tetraterpenos. A partir desses ocorre a combinação de unidades de isopreno (C5) formando as moléculas mais simples: geraniol (C10), farnesol (C15) e geranylgeraniol (C20) e as mais complexas, esqualeno (C30) e fitoeno (C40). Nas moléculas mais simples as ligações entre as unidades de isoprenos são descritas como cabeça-cauda e as mais complexas tem no centro de uma das moléculas ligações do tipo cauda-cauda (Figura 13) (DEWICK, 2009).

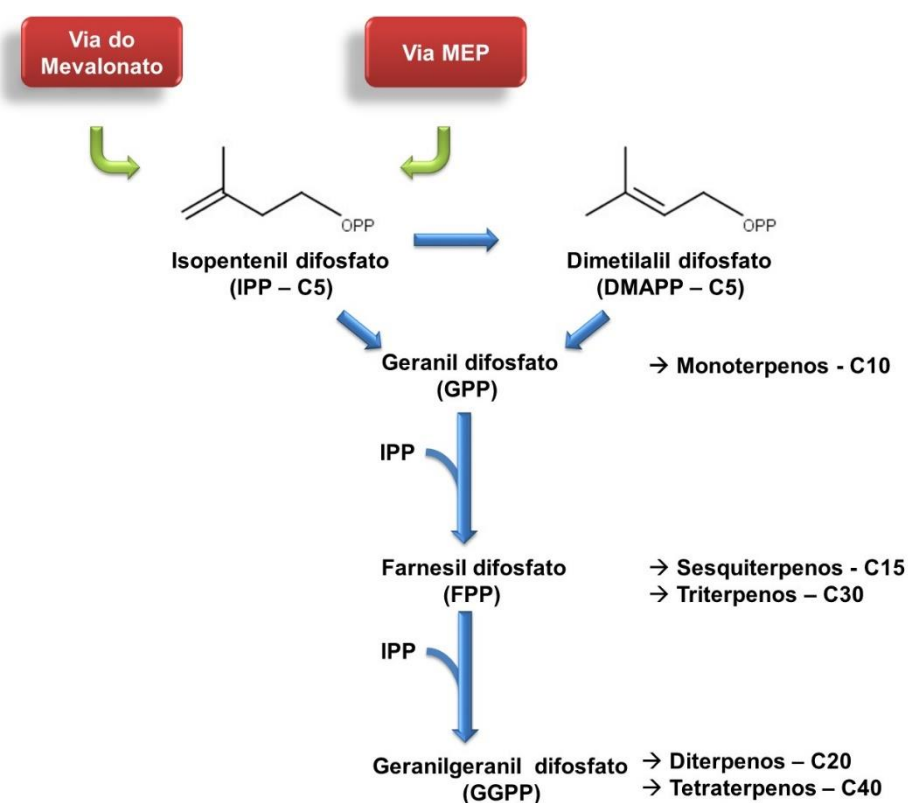


Figura 13. Via biossintética para formação de terpenos.

Fonte: Adaptado de Dewick, 2009.

Muitas espécies em Annonaceae são odoríferas em consequência da presença de óleos essenciais, principalmente contendo constituintes terpênicos. Poucos são os estudos de óleos essenciais de Annonaceae em comparação com as investigações de alcaloides e acetogeninas (FOURNIER et al., 1999). Além da existência de numerosos trabalhos com flores de *Cananga odorata*. Pesquisas com diversas partes de 50

espécies distribuídas em 20 gêneros, principalmente nos gêneros *Xylopia* e *Annona*, evidenciaram que em Annonaceae os principais constituintes de óleos essenciais de frutos e sementes são hidrocarbonetos monoterpênicos, enquanto hidrocarbonetos sesquiterpênicos predominam em folhas e hidrocarbonetos sesquiterpenos oxigenados (sesquiterpenoides), em cascas e raízes. Os mais comuns constituintes identificados foram: α -pineno, limoneno, β -pineno, β -cariofileno, *p*-cimeno e óxido de cariofileno (FOURNIER et al.,1999).

Maia e colaboradores (2005b) descrevendo os óleos voláteis das folhas de quatro espécies de *Xylopia*, registraram para *X. aromatica*, biciclogermacreno (36,5%), espatulenol (20,5 %) e limoneno (4,6%); *X. cayennensis*, α -pineno (29,2%), β -pineno (16,5%), óxido de cariofileno (14,5 %), biciclogermacreno (14,5 %), germacreno D (4,7%) e 1,8-cineol (4,5%); *X. emarginata*, espatulenol (73%); *X. nítida*, γ -terpineno (44,1%), *p*-cimeno (13,7%), α -terpineno (12,6%) e limoneno (11,3%). Eles destacaram que trabalhos anteriores revelaram espatulenol e óxido de cariofileno como importantes constituintes em óleos de folhas de *Duguetia*, *Guatteria* e outras *Xylopia*, sugerindo por isso, que esses sesquiterpenos poderiam ser marcadores quimiotaxonômicos desses gêneros de Annonaceae.

Kossouh e colaboradores (2007) caracterizaram os constituintes dos óleos essenciais das folhas de *A. muricata*, apresentando oitenta compostos, sendo os constituintes mais abundantes β -cariofileno (13,6%), δ -cadineno (9,1%), epi- α -cadinol (8,4%), α -cadinol (8,3%).

Santos (2011) relatou em trabalhos realizados com o óleo essencial extraído das raízes da espécie *Xylopia langsdorffiana* a caracterização de 89,39% dos constituintes químicos, apresentando como constituinte majoritário o *trans*-isolimoneno (56,63%) e registrando também a presença do espatulenol (0,11%), considerado

marcador no gênero *Xylopi*a. Valter e colaboradores (2008) revelaram a composição química em óleos essenciais presentes nas folhas de alguns indivíduos de *Duguetia furfuracea*, os quais apresentaram como constituintes majoritários o β -felandreno (42,2%), o sabineno (25,1%) e o biciclogermacreno (29,1%).

Para os óleos essenciais extraídos folhas das espécies *Guatteria hispida*, *G. blepharophylla* e *G. friesiana* foram realizadas pesquisas e constatou-se que essas espécies possuíam mais de 90% de sesquiterpenos, e os principais constituintes encontrados foram: óxido de cariofileno (69,25%) para *G. blepharophylla*; β -eudesmol (51,60%), γ -eudesmol (23,70%) e α -eudesmol (14,56%) para a *G. friesiana*; β -pineno (38,18%), α -pineno (30,77%) e *E*-cariofileno (20,59%) para a *G. hispida* (COSTA, 2009; FERRAZ et al., 2014).

Siqueira e colaboradores (2011) conseguiram caracterizar sessenta constituintes no óleo essencial da espécie *Annona coriacea*, como uma mistura complexa de sesquiterpenos (76,7%), monoterpenos (20,0%) e outros constituintes (3,3%). Biciclogermacreno foi o composto majoritário (39,8%) seguido de outros sesquiterpenos. A maioria dos monoterpenos estava em baixa concentração (<1%).

Fontes e colaboradores (2013) fizeram a caracterização química do óleo essencial das folhas da espécie *Guatteria pogonopus* Martius, no qual vinte e nove compostos foram identificados e os compostos majoritários foram: γ -patchouleno (13,55%), (*E*)-cariofileno (11,36%), β -pineno (10,37%), germacreno-D (6,72%), biciclogermacreno (5,97%), β -pineno (5,33%), e germacreno-B (4,69%).

Em estudos recentes utilizando o óleo essencial dos frutos de *Xylopi*a *aethiopica*, Tegang e colaboradores (2017), verificaram como constituintes majoritários, β -pineno (32,16 $\pm$ 3,69%), β -felandreno (10,71 $\pm$ 3,05%), *Z*- γ -bisaboleno (10,07 $\pm$ 2,61%) e α -pineno (7,39 $\pm$ 1,69%).

Costa e colaboradores (2013b) realizaram um trabalho para a caracterização dos constituintes dos óleos essenciais extraídos das folhas de *Annona pickelii* e *A. salzmannii*. Foi possível identificar um total de vinte e um compostos a partir do óleo essencial de *A. pickelii*, destacando-se o biciclogermacreno (38,0%), (*E*)-cariofileno (27,8%), α -copaeno (6,9%) e α -humuleno (4,0%), enquanto para a *A. salzmannii* foram identificados vinte e três substâncias e os que se destacaram foram o β -cadineno (22,6%), (*E*)-cariofileno (21,4%), β -copaeno (13,3%), biciclogermacreno (11,3%) e germacreno-D (6,9%).

Ferraz e colaboradores (2013) apresentaram uma investigação química a fim de caracterizar os componentes do óleo essencial de *Xylopia frutescens* e os constituintes majoritários identificados foram: (*E*)-cariofileno (31,48%), biciclogermacreno (15,13%), germacreno-D (9,66%), δ -cadineno (5,44%), viridifloreno (5,09%) e α -copaeno (4,35%).

Os constituintes do óleo essencial das folhas da espécie *Anaxagorea brevipes* foram caracterizados por Alencar e colaboradores (2015), sendo possível a identificação de trinta e um compostos, representando um total de 75,7% do óleo essencial, dentre esses componentes os majoritários foram: β -eudesmol (13,16%), α -eudesmol (13,05%), γ -eudesmol (7,54%), guaíol (5,12%), óxido de cariofileno (4,18%) e β -bisaboleno (4,10%).

Meira e colaboradores (2016) caracterizaram os sesquiterpenóides mais abundantes nos óleos essenciais das folhas de *G. friesiana* (β -eudesmol, γ -eudesmol e α -eudesmol com 51,9%, 18,9% e 12,6% respectivamente) e *G. pogonopus* (espatulenol, γ -amorfeno e germacreno-D com 24,8%, 14,7% e 11,8% respectivamente).

Siti e colaboradores (2016) em suas pesquisas relatam a composição dos óleos essenciais dos galhos de três espécies de *Xylopia*: a espécie *X. fusca* apresentou como

constituente majoritário o espatulenol (11,8%) e α -cadinol (8,2%), além de outros constituintes minoritários como o 1-epi-cubenol (3,6%), vulgarona-B (4,8%) e óxido de cariofileno (2,0%); a espécie *X. elliptica* se mostrou rico em 4-terpinenol (11,9%), p-cimeno (7,4%), espatulenol (6,3%), α -cadinol (6,8%), guaíol (4,5%) e linalool (4,2%); e a espécie *X. malayana* possui os constituintes espatulenol (12,9%), ciperotundona (4,9%), elemol (8,3%) e α -eudesmol (5,9%).

Pesquisas realizadas por Ferreira e colaboradores (2017) com os óleos essenciais das folhas de duas espécies de *Guatteria elliptica* R. E. Fries, coletadas em áreas diferentes foi possível caracterizar trinta e sete constituintes, sendo apresentado para o indivíduo 1 o espatulenol (53,9%) e para o indivíduo 2 o óxido de cariofileno (40,9%) como constituintes majoritários.

Yoshida e colaboradores (2018) realizaram a caracterização química dos óleos essenciais das folhas de *Unonopsis guatterioides* (A.DC.), sendo possível identificar sessenta compostos sendo eles: α -copaeno, biciclogermacreno e *trans*-cariofileno representando 15,7% dos componentes majoritários, além do α -humuleno, alloaromadendreno e (+)-espatulenol (9,0, 8,4 e 7,3%, respectivamente), representando 99,5% do total do óleo essencial.

Deve ser considerado, que nos óleos estudados há uma grande variabilidade de constituintes, os quais possuem distribuição generalizada para as diversas espécies, sendo, entretanto, alguns mais frequentes ou específicos de algumas espécies, como visto acima. Esses dados dificultam conclusões sobre a importância quimiotaxômica, de alguns marcadores (espatulenol e óxido de cariofileno, por exemplo) da família ou gêneros e sinalizam para a necessidade de estudos mais aprofundados.

Para a obtenção de óleos essenciais existem inúmeras técnicas de extração: destilação a vapor, hidrodestilação, extração com solvente orgânico, destilação

assistida por microondas, hidrodifusão de microondas e gravidade, extração de solvente a alta pressão, extração supercrítica com CO₂, extração ultra-sônica e extração de microondas sem solvente. Essas técnicas devem estar de acordo com os conhecimentos químicos sobre a matéria-prima utilizada, pois suas propriedades físico-químicas podem sofrer alterações de acordo com o método utilizado (SANTOS et al., 2004; OKOH et al., 2010). No entanto, os métodos de extração variam de acordo com a parte da planta que se deseja extrair o óleo essencial e com a finalidade de utilização do mesmo. Aspectos como qualidade e composição dos óleos essenciais são muito influenciados pela metodologia de extração utilizada (SIMÕES et al., 1999).

2.2. O Gênero *Bocageopsis*

O nome deste gênero é derivado de *Bocagea* (Annonaceae) e 'opsis' (do grego antigo que significa "face"), devido à semelhança superficial com o gênero localizado no sudeste do Brasil. *Bocagea* A. St.-Hil. (Saint-Hilaire, 1825:41) foi batizado em homenagem ao poeta Josephi Mariae de Souza du Bocage, que escreveu o poema sobre flores de Casteii em versos portugueses, de forma exemplar elucidando com breves comentários botânicos (MAAS et al., 2007).

O gênero *Bocageopsis* pertence à subfamília Malmeoideae, representada no Brasil pela tribo Malmeeae (PIRIE et al., 2006; GUO et al., 2017). Fazem parte desta tribo os gêneros *Bocageopsis*, *Crematosperma*, *Ephedranthus*, *Klarobelia*, *Malmea*, *Mosannona*, *Onychopetalum*, *Oxandra*, *Pseudephedranthus*, *Pseudomalmea*, *Pseudoxandra*, *Ruizodendron*, *Unonopsis*, *Oxandra* (MAAS et al., 2003; LOPES & MELLO-SILVA, 2014; GUO et al., 2017).

O gênero neotropical *Bocageopsis* é constituído por 4 espécies: *B. canescens* (Benth.) R.E. Fr., *B. multiflora* (Mart.) R.E. Fr., *B. mattogrossensis* (R.E. Fr.) R.E. Fr. e *B. pleiosperma* Maas. As espécies que apresentam ampla distribuição na Região Amazônica são às espécies *B. multiflora*, *B. pleiosperma* e *B. canescens* (Figura 14) (MAAS et al., 2001 e 2007; CHATROU et al., 2012a; LOPES & MELLO-SILVA et al., 2014; GUO et al., 2017).



Figura 14. Distribuição geográfica do gênero *Bocageopsis*.
Fonte: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Bocageopsis>.

As similaridades morfológicas entre os gêneros *Bocageopsis*, *Onychopetalum* e *Unonopsis* tornaram possível o agrupamento em um único grupo, denominado “Grupo-*Unonopsis*”, que também incluía cinco gêneros da África (*Dennettia*, *Dielsiothamnus*, *Polyceratocarpus*, *Uvariastrum* e *Uvariadendron*) e um da Ásia (*Neouvaria*) (MAAS et al., 2007). Contudo, avaliações mais recentes colocaram em questão a autenticidade da semelhança entre esses gêneros (RICHARDSON et al., 2004; KOEK-NORMAN & WESTRA, 2012).

Richardson e colaboradores (2004), analisando a biogeografia histórica da família Annonaceae através de procedimentos filogenéticos e sequenciamento de DNA, ajudaram taxonomistas a obterem a conclusão de que o gênero *Unonopsis* é monofilético, ou seja, é um grupo que descende de um único ancestral, e que os demais gêneros do chamado “Grupo-*Unonopsis*” possuem uma insuficiência de informações capazes de possibilitar distinções ou seu possível agrupamento (MAAS et al., 2007).

Koek-Norman & Westra (2012), aprofundaram as investigações sobre a anatomia microscópica da madeira dos gêneros da família Annonaceae, proporcionando um melhor entendimento da classificação filogenética dos gêneros

dessa família. Os autores realçam que os três gêneros *Bocageopsis*, *Onychopetalum* e *Unonopsis* estão intimamente relacionados e pertencem ao mesmo clado. No trabalho são descritos os raios largos e grandes vasos, como sendo característica em comum aos três gêneros. No entanto, é necessário um estudo aprofundado relacionando fatores filogenéticos e determinações por DNA para que se tenha certeza da proximidade dos três gêneros. Por isso, análises fitoquímicas podem dar importantes contribuições, uma vez que das quatro espécies de *Bocageopsis* apenas as espécies *B. multiflora* (OLIVEIRA et al., 2014; ALCÂNTARA, 2015) e *B. pleiosperma* (SOARES et al., 2015a e 2015b; SILVA et al., 2015a) foram submetidas a algum estudo fitoquímico, relacionado a constituição química dos óleos essenciais e frações alcaloídicas.

2.2.1. Constituintes Químicos do gênero *Bocageopsis*

Soares e colaboradores (2015a) realizaram uma investigação fitoquímica da espécie *B. pleiosperma* Maas, na qual foi relatada a presença de um alcaloide β -carbolínico e uma variedade significativa de alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínicos (aporfínico e proaporfínico) (Figura 15), obtidos através do fracionamento da fração alcaloídica das folhas de *B. pleiosperma*, utilizando a metodologia de extração ácido-base (extração alcaloídica em maior escala). A caracterização e identificação foi realizada por métodos de ressonância magnética nuclear uni e bidimensionais (RMN 1D/2D) e espectrometria de massas (EM). Todos os alcaloides foram descritos pela primeira vez no gênero *Bocageopsis*, sendo o alcaloide tetrahidroharmano descrito pela primeira vez na ordem Magnoliales.

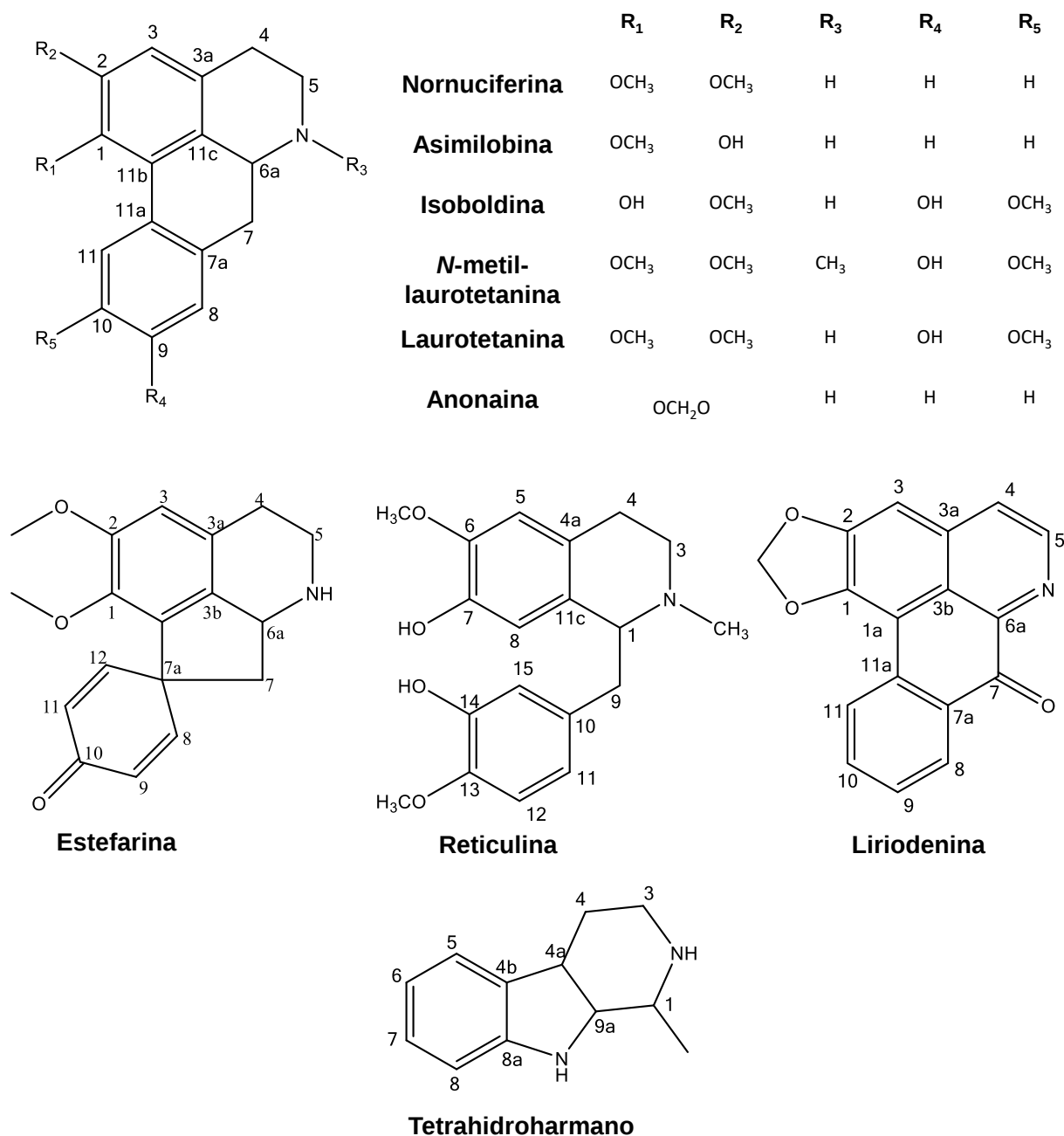


Figura 15. Substâncias isolados da espécie *B. pleiosperma* Maas.
Fonte: Adaptado de SOARES et al, 2015a.

Silva e colaboradores (2015a) relataram a presença do triterpeno tipo lanostano policarpol nos galhos e cascas do tronco de *B. pleiosperma* Maas (Figura 16). Soares e colaboradores (2015b) reportaram os sesquiterpenos e monoterpenos caracterizados dos óleos essenciais das folhas, galhos e cascas do tronco de *B. pleiosperma* Maas, destacando o sesquiterpeno β -bisaboleno como constituinte majoritário (Figura 16).

Oliveira e colaboradores (2014) relatam para a espécie *B. multiflora* através da caracterização química dos óleos essenciais das folhas frescas o sesquiterpeno bisaboleno (13,2%) como constituinte majoritário. Alcântara e colaboradores (2017) além da presença das substâncias majoritárias β -bisaboleno (11,9%) e espatulenol (20,3%) nas folhas, apresentam também a presença significativa dos compostos acetato de exo-2-norborneol e α -curcumeno nos galhos de *B. multiflora* (Figura 16).

2.2.2. Atividades Biológicas do Gênero *Bocageopsis*

Os ensaios biológicos com as espécies do gênero *Bocageopsis* ainda estão iniciando, sendo relatados somente dois estudos para as espécies *B. multiflora* e *B. pleiosperma* Maas (OLIVEIRA et al., 2014; SOARES et al., 2015b; ARÉVALO-LOPÉZ et al., 2018).

Oliveira e colaboradores (2014) mostraram que o óleo essencial de *B. multiflora* como a substância majoritária bisaboleno (13,2%) (Figura 16) testado contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, exibiu atividade significativa (CI₅₀ de 14,6 μ g/mL), quando comparado com o medicamento de referência (isetionato de pentamidina 3,2 μ g/mL).

Soares e colaboradores (2015b) relatam para a espécie *B. pleiosperma* atividades antimicrobianas avaliadas contra os microorganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterobacter aerogenes*, *Candida tropicalis*, *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata* e *Candida albicans*. O óleo essencial obtido das cascas do tronco apresentou efeito moderado contra *S. epidermidis* ATCC 12228 (CIM = 250 μ g/mL). Estes resultados representaram a primeira exposição sobre a composição química de *B. pleiosperma* e a primeira avaliação antimicrobiana com uma espécie *Bocageopsis*.

Silva e colaboradores (2015a) testaram a atividade biológica do sesquiterpeno policarpol (Figura 16) encontrado em diversas espécies da família Annonaceae, dentre elas a espécie *B. pleiosperma* Maas (SOARES et al., 2015b). A atividade antimicrobiana contra várias cepas de microorganismos foram avaliadas pela primeira vez para o composto policarpol, e foi observado atividade antibacteriana significativa contra *S. aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 1228) e *Escherichia coli* (ATCC 10538 e ATCC 10799) com valores mínimos de concentração inibitória entre 25 e 50 µg/mL.

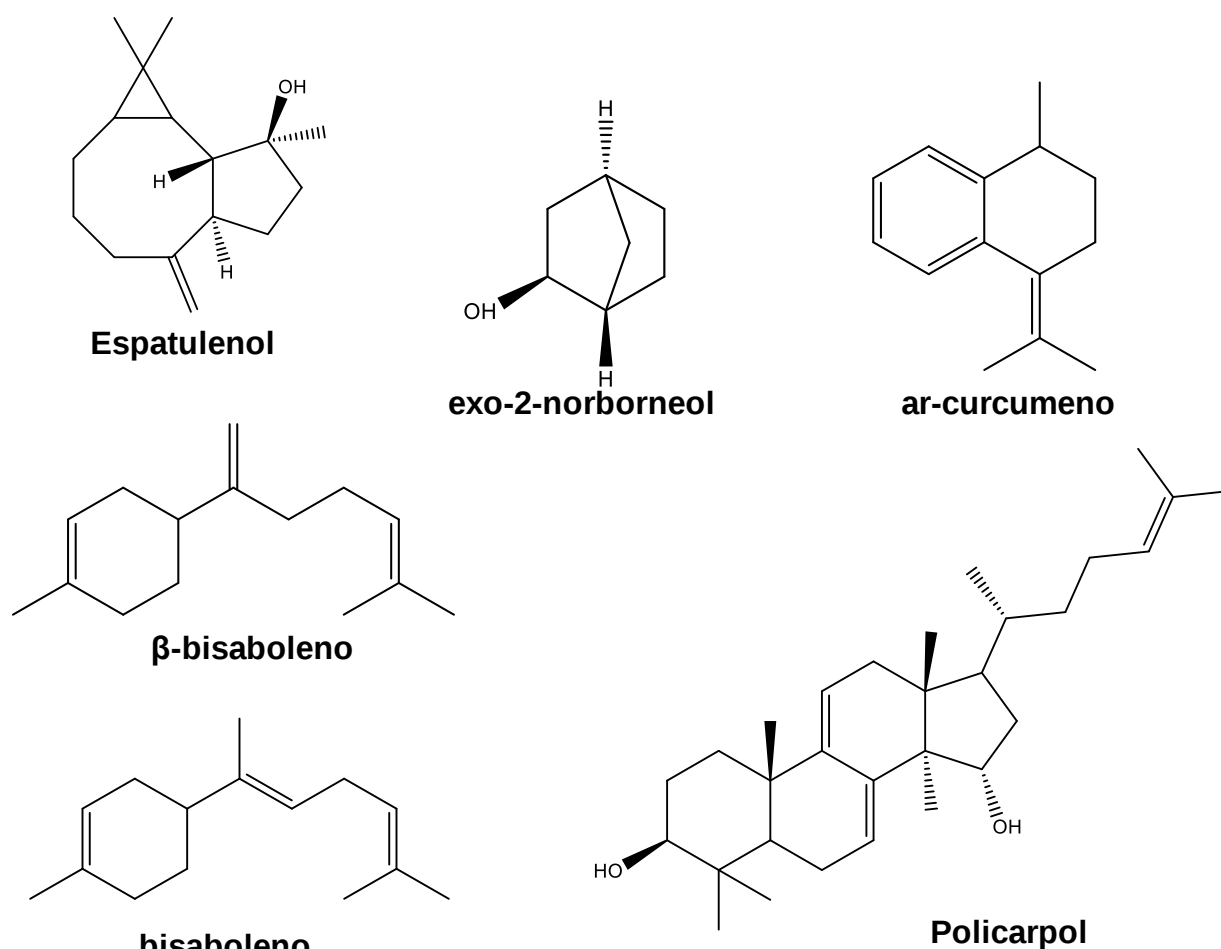


Figura 16. Terpenos identificados em espécies do gênero *Bocageopsis*.

Fonte: OLIVEIRA et al., 2014; SILVA et al., 2015a; SOARES et al., 2015b; ALCÂNTARA, 2015; ALCÂNTARA et al., 2017.

2.2.3. Espécies do Gênero *Bocageopsis*

2.2.3.1. *Bocageopsis canescens* (Benth.) R.E. Fr.

A espécie *B. canescens*, se apresenta como uma árvore ou arbusto, podendo chegar a 36 metros de altura, sendo considerada a espécie que atinge maior altura dentro do gênero. No Brasil é encontrada nos estados do Acre, Amazonas e Rondônia (Figura 17). Não é uma espécie com distribuição restrita à Região Amazônica brasileira, podendo ser encontrada ainda na Colômbia (Amazonas e Vaupés), Peru (Loreto) e Venezuela (Amazonas). Essa espécie é conhecida como “envireira” (MAAS et al., 2007). Na literatura não existem dados sobre a sua composição fitoquímica.



Figura 17. Exsicata da espécie *B. canescens* (Benth.) R.E. Fr. e distribuição geográfica no Brasil.

Fonte: MAAS et al., 2015; <http://inct.florabrasil.net> <acessado em 10/10/2018>

2.2.3.2. *Bocageopsis multiflora* (Mart.) R.E. Fr.

B. multiflora é uma árvore que pode chegar a 27 metros de altura. É considerada a espécie mais comum do gênero *Bocageopsis*. Sua ocorrência é relatada nos estados do Amazonas, Mato-Grosso, Pará, Rondônia e Roraima (Figura 18) e pode ser encontrada em partes amazônicas nas regiões da Bolívia (Beni, Pando), Colômbia (Amazonas), Venezuela (Amazonas, Bolívia), além da Guiana e Suriname (MAAS et al., 2007). Existem relatos na literatura sobre a composição química dos óleos essenciais das folhas frescas desta espécie coletadas em diferentes épocas do ano, os quais ressaltam a caracterização fitoquímica apontando o constituinte bisaboleno como majoritário (OLIVEIRA et al., 2014). Um outro trabalho realizado com *B. multiflora* apresentou como substâncias majoritárias o β -bisaboleno e o espatulenol para as folhas, e os compostos acetato de exo-2-norborneol e ar-curcumeno para os galhos (ALCÂNTARA et al., 2017).



Figura 18. Exsicata da espécie *B. multiflora* (Mart.) R.E. Fr. e distribuição geográfica no Brasil.
Fonte: MAAS et al., 2015; <http://inct.florabrasil.net> <acessado em 10/10/2018>.

2.2.3.3. *Bocageopsis pleiosperma* Maas

A espécie *B. pleiosperma* Maas ocorre como uma árvore, cuja altura pode atingir 28 metros. Sua distribuição é restrita à Região Amazônica - Amazonas e Pará (Figura 19), sendo comumente encontrada em florestas não inundadas. No Brasil é conhecida popularmente como “envira preta” e “jurueira sangue”. Suas frutificações ocorrem entre os meses de agosto a novembro e floração entre os meses de julho a novembro. Esta espécie se diferencia das outras espécies do seu gênero pelo maior número de sementes do monocarpo (RIBEIRO et al., 1999; MAAS et al., 2007). Estudos recentes revelaram a presença de alcaloides isoquinolínicos, tetrahidroprotoberberínicos, proaporfínicos, aporfínicos, oxoaporfínicos e β -carbolínicos nas frações alcaloídicas desta espécie. Na fração hexânica foi relatado a presença do triterpeno policarpol, bem como a presença majoritária do sesquiterpeno β -bisaboleno em seus óleos essenciais (SOARES et al., 2015a e 2015b; SILVA et al., 2015a).



Figura 19. Exsicata da espécie *B. pleiosperma* Maas e Distribuição geográfica no Brasil.
Fonte: MAAS et al., 2015, <http://inct.florabrasil.net> <acessado em 10/10/2018>.

3. OBJETIVOS



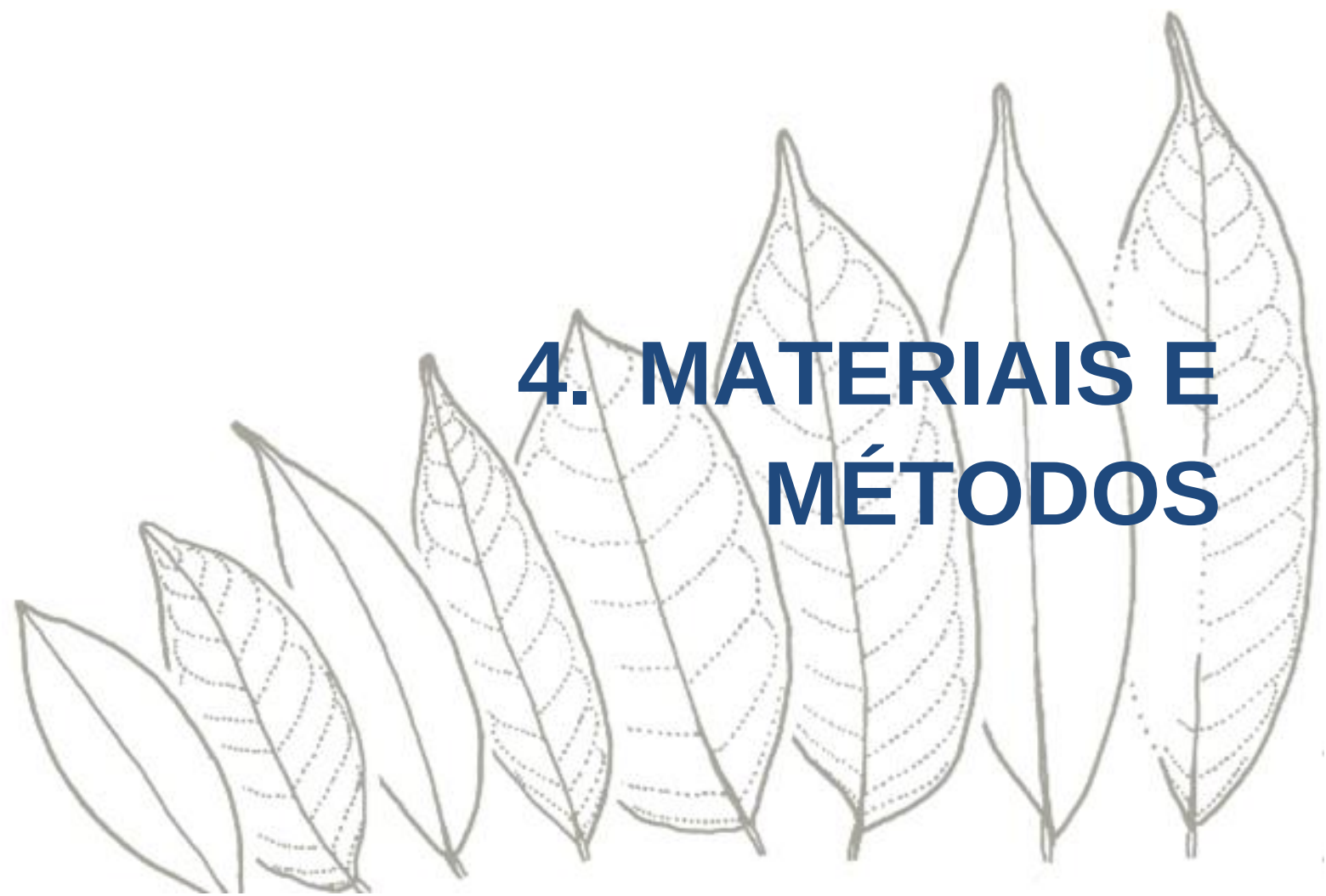
3.1. Geral:

Contribuir com o conhecimento do gênero *Bocageopsis* através de análises químicas e biológicas dos óleos essenciais e fitoquímica das frações alcaloídicas e não alcaloídicas de *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*.

3.2. Específicos:

- Caracterizar os principais constituintes dos óleos essenciais (folhas e galhos) de *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*;
- Avaliar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais extraídos;
- Obter o perfil por *Leaf spray* (LS-MS) do material vegetal (folhas) de *B. canescens* e *B. multiflora*;
- Obtenção do extrato aquoso do material vegetal (folhas, galhos e cascas do tronco) das espécies *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*;
- Obter as frações ricas em alcaloides (pequena escala) do material vegetal (folhas, galhos e cascas do tronco) de *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma* (galhos);
- Determinar o perfil químico por ESI-IT-MS das frações alcaloídicas e não alcaloídicas das folhas, galhos e cascas do tronco de *B. canescens* e *B. multiflora*, além das frações oriundas dos galhos de *B. pleiosperma*;
- Obter as frações ricas em alcaloides (marcha alcaloídica em maior escala) das frações promissoras para o fornecimento de substâncias ainda não descritas no gênero *Bocageopsis*;
- Isolar através de técnicas cromatográficas e caracterizar através de técnicas de RMN 1D/2D e EM substâncias obtidas a partir das frações alcaloídica e não alcaloídicas investigadas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS



4.1. Solventes e reagentes reveladores

4.1.1. Solventes

Para as análises em CCD, bem como para o preparo dos extratos e frações, foram utilizados solventes grau P.A. (Nuclear®). Nas análises de CLAE, EM e CG, foram utilizados solventes grau HPLC (Tedia®) e para a obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados (Sigma-Aldrich®).

4.1.2 Reagente revelador

Reagente de Dragendorff (modificação de Munier) (Munier, 1953 apud Merck, 1971). Foram preparadas duas soluções A e B. Na solução A foram acrescentados 1,7 g de nitrato de bismuto III ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$) e 20,0 g de ácido tartárico ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$) dissolvidos em 80 mL de água destilada. Para solução B foram dissolvidos 16,0 g de iodeto de potássio (KI) dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das cromatoplas, adicionou-se 10,0 g de ácido tartárico, dissolvidos em 50 mL de água destilada. Após borrifação das placas cromatográficas os *spots* das substâncias alcaloídicas apresentaram coloração laranja.

4.2. Métodos cromatográficos

As análises cromatográficas foram realizadas nas dependências do Centro de Apoio Multidisciplinar – Central Analítica – CAM, localizado no Setor Norte da Universidade Federal do Amazonas.

4.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para eventuais abordagens preliminares, foram utilizadas cromatoplasas pré-fabricadas de sílica gel TLC de 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência F_{254} , da Sorbent Technologies. A detecção preliminar das substâncias foi realizada por

irradiação com lâmpada ultravioleta (UV) (254 e 365 nm) e revelação com reagente de Dragendorff.

4.2.2. Sistema cromatográfico de alta eficiência analítico acoplado a espectrometria de massas (CLAE-EM e CLAE-EM/EM)

Para a realização das análises exploratórias, foi utilizado um cromatógrafo analítico Acella® (Thermo Scientific), operando simultaneamente com um detector PDA acoplado a um espectrômetro de massas (TSQ Quantum acess - Thermo Scientific) com fonte de ionização química a pressão ambiente (APCI). As análises foram realizadas em uma coluna analítica C18 de 150 x 4,6 mm (100A, 5u) - Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol e água acidificada (1% de ácido fórmico).

4.2.3. Sistema cromatográfico de alta eficiência semi-preparativo (CLAE-semiprep.)

O isolamento em escala semi-preparativa foi realizado em cromatógrafo modelo Shimadzu®, CBM – 20A, equipado com detector de UV SPD-20A, degaseificador DGU-20A e sistema binário de solventes LC-6AD. As análises foram realizadas em uma coluna analítica C-18 (150 x 4,6 mm - 100A, 5u) e semi-preparativa C18 (250 x 10,0 mm - 100A, 5u) - Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol e água acidificada (1% de ácido fórmico).

4.2.4. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

As análises de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas foram realizadas em um equipamento Trace GC Ultra, acoplado ao espectrômetro ISQ Single Quadrupole MS (Thermo Scientific), usando coluna capilar DB5/MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm).

4.3. Métodos espectrométricos e espectroscópicos

As análises espectrométricas, espectroscópicas e de ionização ambiente foram realizadas nas dependências do Centro de Apoio Multidisciplinar – Central Analítica – CAM, localizado no Setor Norte da Universidade Federal do Amazonas. E as análises de alta resolução foram realizadas sob supervisão do professor Dr. Sérgio Nunomura no Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) – Central Analítica, do Instituto de Pesquisa do Amazonas – INPA.

4.3.1. Espectrometria de massas

Os espectros de massas foram obtidos por meio das análises realizadas em espectrômetros de massas do tipo triplo-Quadrupolo, modelo TSQ *Quantum Access* (Thermo scientific) e *Ion trap*, modelo LCQ *Fleet* (Thermo scientific), equipados com fonte de ionização por *eletronspray* (ESI) e atmospheric pressure chemical ionization (APCI). As amostras foram administradas via inserção direta (Tabela 1).

Tabela 1. Condições operacionais dos Espectrômetros de Massas Triplo-quadrupolo TSQ *Quantum Access* e *Ion Trap LCQ Fleet*.

Parâmetros		
	TSQ <i>Quantum Access</i>	LCQ <i>Fleet</i>
Corrente de descarga	5 μ A	5 μ A
Temperatura do vaporizador	350 °C	0 °C
Pressão do sheath gas	35 (arb)	10 (arb)
Pressão do sweep gas	0 (arb)	0 (arb)
Pressão de gás auxiliar	15 (arb)	5 (arb)
Temperatura capilar	250 °C	200 °C
Tubo lens offset	112 V	120 V
Skimmer offset	0 V	0 V
Intervalo de massa	m/z 100-1000	m/z 100-1000
Energia de colisão	30 eV	30 eV

4.3.2. Espectrometria de massas em alta resolução

As análises foram realizadas em espectrômetro de massas do tipo micrOTOF Q-II (Bruker®), com processador DATA analysis 4.1, equipado com fonte de ionização por *eletronspray* (ESI). As amostras foram administradas via inserção direta.

4.3.3. Espectrometria de massas ambiente – *Leaf spray* (LS-MS)

A montagem do protótipo da fonte de LS (Figura 20) foi realizada de acordo com Yang e colaboradores (2012). Para essa análise foi utilizado um material vegetal foliar, cortado com geometria triangular (base e altura de 1 cm), esse triângulo foi preso a uma garra, do tipo jacaré, conectada a um fio de 0,5 mm ligado ao espectrômetro de massas (LIU et al., 2010 e 2011). Posteriormente foi aplicado uma pequena quantidade de metanol-HPLC ao material foliar. O equipamento foi programado para ser utilizado operando nos modos de ionização positivo e negativo, sobre o material vegetal e em seguida aplicou-se a voltagem (4 kV) (YANG, et al., 2012).

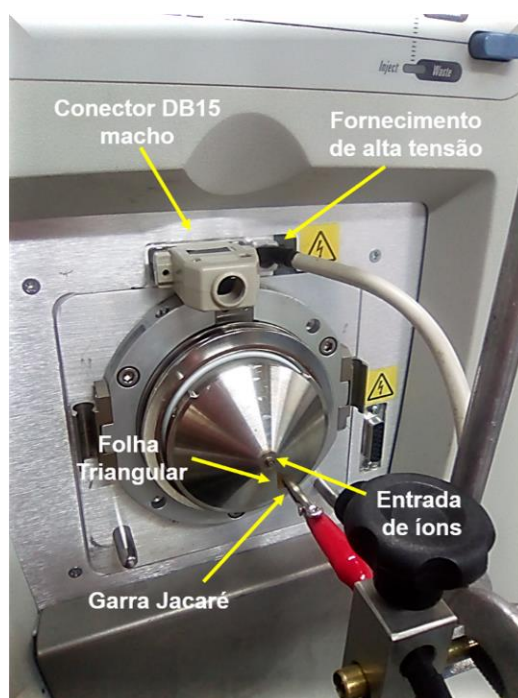


Figura 20. Fonte de leaf spray conectada ao espectrômetro de massas.
Fonte: próprio autor.

4.3.4. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram registrados em aparelho modelo Bruker Avance III 500 operando a 11,75 Teslas (500,13 MHz para RMN de ^1H e 125,76 MHz para RMN de ^{13}C). As amostras foram solubilizadas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e dimetilsulfóxido deuterado ($\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$), e os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplo duplete), t (triplete) e m (multiplete). Os dados obtidos foram processados através dos programas TopSpin 3.5 e ACD Lab, e posteriormente comparados com os dados da literatura para elucidação estrutural das substâncias.

4.4. Outros Equipamentos

- Evaporador rotatório: Heidolph, tipo Heizbad OB;
- Liquidificador Industrial: Modelo JBM35 - Motor: 1/2 CV - 50/60 Hz;
- Ultravioleta (UV): Lâmpada de 264-365 nm, da Solab;
- Balança analítica: Bel engineering, classe 1 (máx. 220 g – mín. 10 mg);
- Pipeta automática: Gilson®, P 1000 e P 100;
- Ultrassom: Unique, modelo USC-2800;
- Liofilizador: Christ, modelo Alpha 1-2 LD;
- Centrífuga: Eppendorf AG, modelo 22331 Hamburg.

4.5. Material botânico

4.5.1. Coleta e identificação do material botânico

A coleta do material botânico foi realizada mediante aprovação do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN (AA42598 e AF4CFA7).

O material botânico (folhas, galhos e cascas do tronco) de *Bocageopsis multiflora* foram coletadas no Campus da Universidade Federal do Amazonas, de indivíduo previamente marcado e identificado, estando sua exsicata depositada no Herbário da UFAM. A espécie *Bocageopsis pleiosperma* foi coletada na Reserva Florestal Adolpho Ducke (localizada no Km 26 da estrada AM-010 (Manaus-Itacoatiara), de indivíduo previamente marcado e identificado, estando a sua respectiva exsicata depositada no Herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). Os indivíduos de *Bocageopsis canescens* foram coletados no Sítio Bons Amigos, localizado no Km 19 da rodovia Br 174, este material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Webber e sua exsicata foi depositado no herbário da UFAM (Tabela 2).

Tabela 2. Dados de coleta e identificação do material botânico de *Bocageopsis*.

Espécie	Partes da planta	Quantidade	Data da Coleta	Local de Coleta	Registro nº	Herbário
<i>B. canescens</i>	Folhas, galhos finos e cascas do tronco	500 g, 200 g e 10 g	28/01/2016	Sítio Bons Amigos - Br 174, Km 19	10234	UFAM
<i>B. multiflora</i>	Folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco	1 Kg, 700 g, 1 kg e 200 g	20/01/2017	Campus UFAM	5987	UFAM

<i>B. pleiosperma</i>	Folhas, galhos finos e cascas do tronco	500 g, 200 g e 15 g	06/02/2018	Reserva Florestal Adolpho Ducke	183127	INPA
------------------------------	---	---------------------	------------	---------------------------------	--------	------

4.5.2. Processamento do material Botânico

O material botânico (folhas, galhos e cascas do tronco) após seco em temperatura ambiente durante 20 dias, foi pulverizado em moinho de 4 facas para posterior obtenção das frações e óleos essenciais.

4.6. Obtenção dos óleos essenciais de *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*.

Aproximadamente 100 g de material botânico triturado (folhas, cascas do tronco e galhos) foram submetidos ao processo de hidrodestilação em aparelho do tipo *Clevenger*. As amostras foram colocadas em um balão de destilação de 4 L e imersas em 2 L de água destilada. Os óleos essenciais foram coletados em um frasco pequeno de vidro (tipo âmbar), o material foi filtrado e lavado com diclorometano (CH_2Cl_2) e posteriormente adicionado sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para retirar a água do meio. Após evaporação do solvente, os óleos essenciais foram pesados, o rendimento calculado e armazenados a -15°C até o dia das análises.

4.7. Análises por CG-EM dos óleos essenciais de *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*.

Para as análises dos óleos essenciais foi utilizado hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min. A solução de injeção foi preparada dissolvendo-se aproximadamente 15 mg de cada óleo em 1 mL de acetato de etila. Foi injetado 1 μL da solução estoque, usando um split de 1:30. A temperatura da coluna foi programada de 60 a 280°C com gradiente de $3^\circ\text{C}/\text{min}$. A temperatura do injetor e da fonte foi configurada para 220°C e 260°C , respectivamente. Para obtenção do índice de

retenção foi injetada uma série homóloga de hidrocarbonetos (C₇-C₃₀). O cálculo do índice de retenção (IR) foi feito de acordo com a equação de Van der Dool e Kratz (Dool & Kratz, 1963) e as identificações dos constituintes foram baseadas na comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles armazenados na biblioteca Wiley 8ª edição do equipamento e comparação dos índices de retenção com dados da literatura (ADAMS, 2007b).

$$IR = 100i \left[\frac{Tr(X) - Tr(HA)}{Tr(HD) - Tr(HA)} \right] + 100N$$

Onde: IR = índice de retenção; Tr (X) = tempo de retenção do composto problema; Tr (HA) = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui antes do composto (x); Tr (HD) = tempo de retenção do hidrocarboneto que elui depois do composto (x); i = diferença do número de carbonos entre os hidrocarbonetos que eluem depois e antes; N = número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes do composto (x).

4.8. Obtenção dos extratos aquosos de *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*.

Os extratos aquosos do material vegetal (folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco) foram obtidos por infusão de acordo com metodologia adaptada (AGRA et al., 2013; SILVA et al., 2019). Foram pesados 1 g de material vegetal e transferido para um frasco de Erlenmeyer, neste foram adicionados 100 mL de água destilada a 100°C durante 15 minutos. Posteriormente foi realizado uma filtração simples e o material foi liofilizado, e encaminhado para análises de EM, CLAE-EM, CLAE semi-preparativo e RMN 1D/2D (Figura 21).

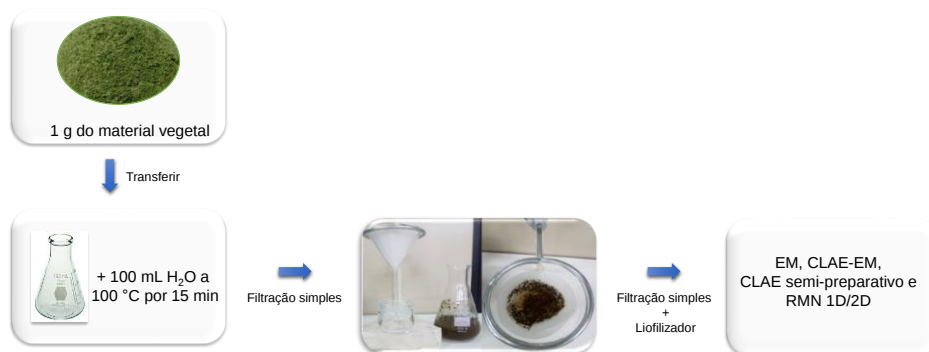


Figura 21. Obtenção dos extratos aquosos.

4.9. Análises em fonte de ionização ambiente – *Leaf spray* (LS-MS) das espécies de *Bocageopsis*.

Com a fonte de ionização ambiente (LS-MS) foi possível obter os íons e seus fragmentos diretamente da folha. Essas análises foram realizadas em um espectrômetro de massas tipo *ion trap* (LCQ Fleet). As folhas secas de cada espécie de *Bocageopsis* foram cortadas em pedaços na forma de triângulo (base e altura de 10 mm cada) e mantida por um grampo de metal a uma distância de 10 mm da entrada do espectrômetro de massas (Figura 20). Uma alta tensão (4,5 kV, positivo) foi aplicada diretamente ao tecido vegetal e posteriormente 10 µL de MeOH grau HPLC foram colocados em cima desse tecido, visando gerar um *spray* de gotículas carregadas que transportam produtos químicos endógenos para a entrada no espectrômetro de massas. A temperatura da entrada do capilar para o espectrômetro foi de 150°C e a tensão da lente do tubo foi de 85 V. Os espectros de massas foram adquiridos em um modo de monitoramento contínuo. Para experimentos EM/EM, o hélio (He) foi usado como gás de colisão com energias de colisão variando de 20 a 30 eV.

4.10. Marcha alcaloídica (Pequena Escala e Maior Escala)

Para a obtenção das frações alcaloídicas em pequena escala, foi utilizada a metodologia previamente relatada por SOARES e colaboradores (2015a): aproximadamente 500 mg de cada parte da planta, pulverizada, foram transferidos para tubos de ensaio, sendo em seguida submetidos a maceração com 5 mL de hidróxido de amônio - NH₄OH a 10% e 5 mL diclorometano - DCM (CH₂Cl₂). Após agitação

vigorosa, a fase DCM foi transferida para outro tubo de ensaio, onde foi adicionado 5 mL de uma solução 10% de ácido acético. Em seguida, o tubo foi submetido à agitação vigorosa, a fase aquosa foi transferida para outro tubo de ensaio, sendo acrescentado NH_4OH até atingir pH 10. Finalmente, foi adicionado 5 mL de DCM ao tubo e novamente os tubos foram submetidos a agitação vigorosa. A fase DCM foi recolhida, seca sob uma corrente de nitrogênio gasoso e submetida a análises de EM (Figura 22).

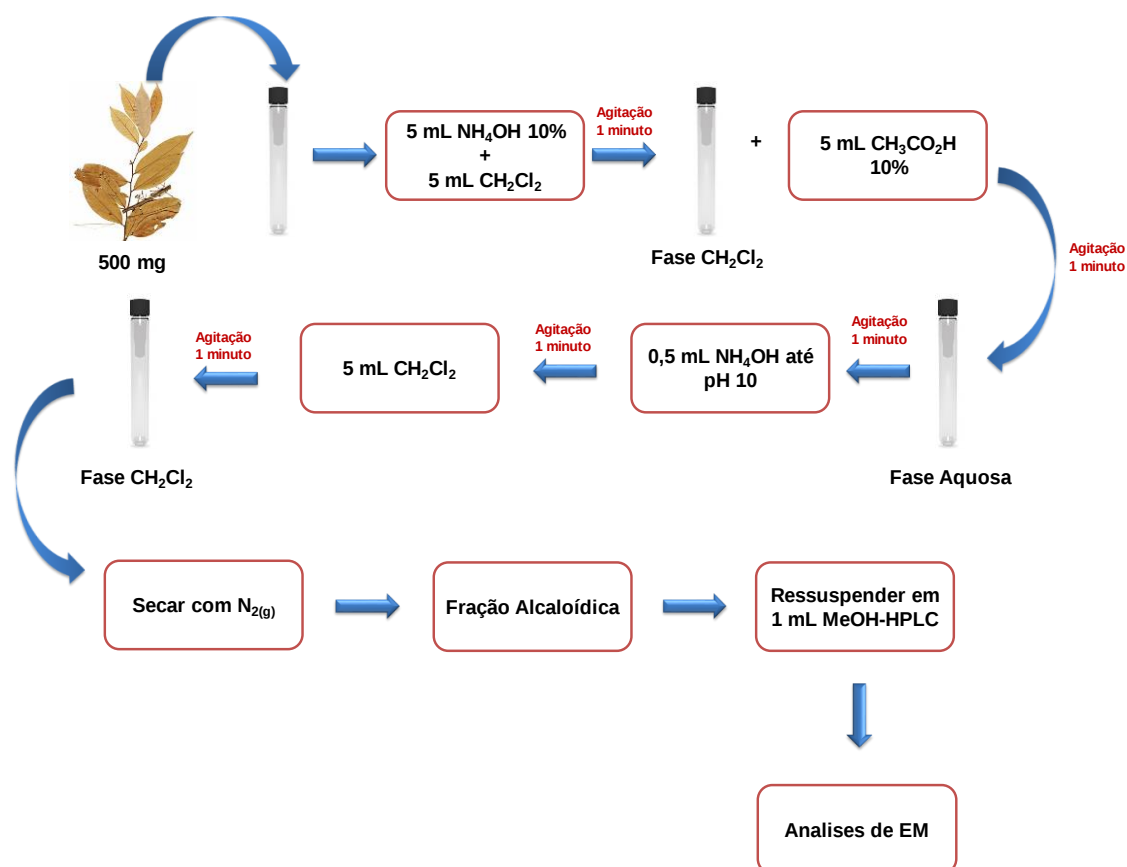


Figura 22. Esquema da extração alcaloídica em pequena escala.

Fonte: Adaptado de SOARES, 2014.

Para a obtenção das frações alcaloídicas em maior escala, foi utilizada a metodologia previamente relatada por SOARES e colaboradores (2015a), conforme descrito a seguir: 400 g do material vegetal foram submetidos à maceração com 2 L de NH_4OH a 10%, seguida da adição de 2 L de DCM e mantido em repouso por 72 hs. A fase DCM foi transferida para um novo recipiente onde a extração foi realizada com 1 L de solução de ácido acético 10%. Posteriormente a camada ácida foi transferida para

outro recipiente e acrescentado volume de NH_4OH suficiente para elevação do pH até 10. Em seguida, foi feita a extração com 300 mL (2x) de DCM e este material foi concentrado em evaporador rotatório para a obtenção da fração alcaloídica, que foi submetida a análises de EM, CLAE-EM, CLAE semi-preparativo e RMN 1D/2D (Figura 23).

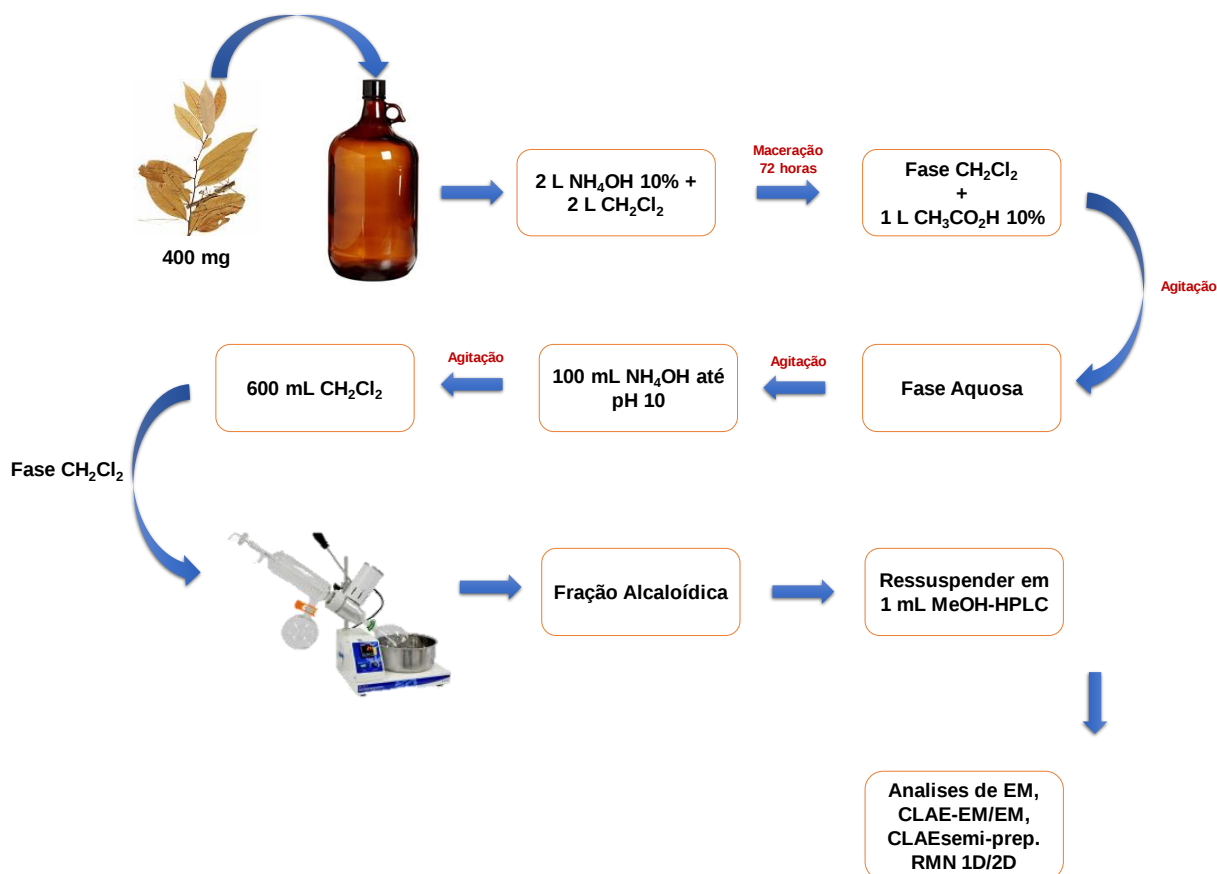


Figura 23. Esquema da extração alcaloídica em maior escala.
Fonte: Adaptado de SOARES, 2014.

4.11. Análises espectrométricas das frações alcaloídicas e não alcaloídicas das espécies de *Bocageopsis*.

Foi pesado 1 mg de cada fração alcaloídica para o preparo da solução estoque (1mg/mL). A partir da solução estoque foram preparadas soluções de 10 ppm em MeOH grau HPLC e analisadas por inserção direta em espectrômetro de massas do tipo *ion trap* (LCQ Fleet) equipado com fonte de ionização química a pressão atmosférica (APCI) e operando em modo positivo de aquisição. Para a obtenção dos espectros foram utilizadas energias de colisão entre 15 e 20% da capacidade do equipamento.

4.12. Análises usando CLAE-PDA-EM/EM

Preparou-se uma solução estoque na proporção de 1 mg/mL em MeOH grau HPLC de cada fração alcaloídica e não alcaloídica, sendo injetado automaticamente 10 µL, de cada fração em um sistema CLAE Accela (Thermo Scientific, CA, EUA) usando uma Coluna Phenomenex Luna C18 (5 µm, 150 mm x 4,6 mm i.d.) (Torrance, CA, EUA). Foram usadas duas fases móveis, solução aquosa a 1% de ácido fórmico (A) e MeOH (B). O sistema consistiu em um fluxo de 1 mL/min, com um gradiente inicial de 80% de A a 20% de B durante 14 minutos, seguido de 10 minutos a 80% de B com duração total de 24 minutos para cada corrida, desconsiderando o tempo de gradiente de volta. Os espectros da região do UV foram registrados com varredura de 200 nm a 400 nm com detector de PDA. A saída do detector foi conectada por meio de uma válvula de divisão com fluxo de 300 µL, sendo essa conectada diretamente a fonte do espectrômetro de massas TSQ Quantum triplo quadripolo Access (Thermo Científico). A ionização foi realizada com fonte APCI operando em modo positivo de aquisição [(M+H)⁺].

4.13. Purificação das frações alcaloídicas e não alcaloídicas por CLAE-semipreparativo.

Foram desenvolvidos métodos de isolamento em cromatógrafo líquido de alta eficiência analítico (CLAE-PDA-EM), com posterior ajuste das condições para a escala semi-preparativa (CLAE-UV-semi-preparativo), para purificação das frações que se apresentaram promissoras no sentido de fornecer substâncias ainda não identificadas no gênero *Bocageopsis*. Aproximadamente 50 mg de cada fração foram dissolvidas em 100 µL de metanol grau HPLC, usando um loop de 100 µL, observados em dois comprimentos de onda (280 nm e 354 nm), que foram escolhidos após a análise dos resultados obtidos na corrida analítica. A coluna usada foi C18 (semi-preparativa).

As análises foram feitas com fluxo de 3,5 mL/min com gradiente inicial de 20% de A a 80% de B durante 14 minutos, seguido de 10 minutos a 80% de B com duração total de 24 minutos para cada corrida, desconsiderando o tempo de gradiente de volta. As frações foram coletadas manualmente em tubos falcon de 5 mL previamente pesados.

4.14. Avaliação das atividades biológicas dos óleos essenciais das espécies de *Bocageopsis*.

4.14.1. Avaliação da atividade antimicrobiana das espécies de *Bocageopsis*.

Os experimentos para a avaliação da atividade antimicrobiana das amostras obtidas das espécies de *Bocageopsis* foram realizados no Laboratório de Microbiologia Geral do Centro de Biotecnologia da Amazônia – CBA, sob supervisão da MSc. Ivanete Ferreira de Souza. Os experimentos foram realizados sob as recomendações estabelecidas na norma do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) /ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) com pequenas modificações.

4.14.1.1. Preparo dos meios de cultura.

O meio de cultura Lúria Bertani – LB foi preparado utilizando triptona (10 g/L), extrato de levedura (5 g/L), cloreto de sódio (10 g/L) e ágar 20 g/L. Primeiramente foi avolumada uma quantidade necessária de água desionizada em um balão volumétrico. Posteriormente foram pesados o extrato de levedura, a triptona e o cloreto de sódio. Na sequência o material pesado foi adicionado ao balão volumétrico e agitado até dissolver.

Após o material ser solubilizado, foi adicionado o ágar e submetido a agitação até homogeneização total. O volume foi completado com água até o volume final desejado (1 L) e submetido a agitação manual. Por fim, o meio de cultura foi esterilizado na autoclave a 120 °C durante 20 minutos.

4.14.1.2. Preparo do material biológico.

A reativação das culturas foi realizada em caldo LB, a 37 °C ±1, sob rotação de 2,38 g em incubadora microbiológica. Desse cultivo foram retiradas alíquotas para ajuste da densidade de crescimento do inóculo entre 0,08 a 0,1UFC (Unidade Formadora de Colônia)/mL, correspondendo ao número de turvação 0,5 (1,5x10⁸ UFC/mL) da escala de McFaland conforme norma regulamentadora (M2-A8-Vol. 23, no1). Para cada patógeno foram utilizados controles positivos específicos conforme descrito no quadro 5.

Quadro 5. Antibióticos controles e microorganismos utilizados no ensaio antimicrobiano.

Antibiótico	Microorganismos
Amoxilina	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923
Ciclohexamida	<i>Candida albicans</i> ATCC 10231
Estreptomicina	<i>Serratia marcescens</i> ATCC14756
	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883
	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778
	<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 19433
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922
	<i>Burkholderia cepacia</i>
	<i>Mycobacterium smegmatis</i>

4.14.1.3. Preparo das amostras e microorganismos para inóculo.

4.14.1.4. Teste de difusão em ágar.

Para a avaliação do potencial antimicrobiano por difusão em ágar foi utilizado a técnica descrita por Bauer & Kirby (1966). Foram utilizadas placas de Petri de 14 cm de diâmetro contendo o meio de cultura, nestas foram espalhados 100 µL do patógeno com uma alça de *Drigalski*. Posteriormente foram feitos poços no meio de cultura (5 mm de diâmetro), nos quais 100 µL do extrato bacteriano e controles positivos diluídos

a 2mg/mL, além de controle negativo, uma solução contendo 10% de DMSO e H₂O destilada. A incubação ocorreu a 37°C ±1 e foi acompanhada por 24 e 48 horas, após estes períodos foram medidos os halos de inibição formados em torno da cavidade. Os diâmetros das zonas de inibição foram medidos em centímetros-cm com auxílio de régua. Esse teste foi realizado em triplicata, calculando-se ao final a média do diâmetro dos halos.

4.14.1.5. Teste da avaliação da concentração inibitória mínima (CIM).

Após efetivação do ensaio antimicrobiano foi realizada a reativação dos microrganismos teste em placas contendo os meios sólidos adequados através da técnica de esgotamento em estrias cruzadas que foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C ±1. Foram retiradas dessas placas com o auxílio de uma alça de platina uma colônia do patógeno, posteriormente ocorreu a transferência para um tubo com tampa enroscável contendo 5 mL do meio líquido LB a ser incubado a 37 °C ±1 sob rotação de 2,38 g por 24 horas. A partir desse cultivo, fez-se a diluição correspondente ao nível 1 da escala de McFaland para bactérias e para as leveduras foi utilizado o nível 5, esses níveis foram medidos de acordo com a densidade de crescimento dos microorganismos em espectrofotômetro.

Para montagem do experimento utilizou-se microplacas estéreis do tipo Elisa e em cada poço designado para o teste com o óleo adicionou-se 100 µL de LB e 100 µL da amostra, procedeu-se a diluição seriada, e posteriormente adicionou-se 10 µL da solução de microrganismo.

Para o controle negativo adicionou-se 100 µL de LB, 100 µL da solução utilizada (DMSO e H₂O) e 10 µL da suspensão de patógeno. Para o controle positivo foram adicionados 100 µL de LB, 100 µL de antibiótico e 10 µL da suspensão de patógeno.

Após o preenchimento, as placas foram vedadas e incubadas em BOD (Biological Oxygen Demand) a $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ por 24 horas. Após esse período de incubação adicionou-se 10 μL do reagente revelador (resazurina a 10 $\mu\text{g/mL}$) em cada poço e reincubou-se. A resazurina é um corante azul usado como indicador de oxirredução em ensaios de atividade antimicrobiana, a mudança de coloração durante os ensaios representa a ausência (cor azul) ou a presença (vermelho) do crescimento microbiano.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO



5.1. Análises dos óleos essenciais de *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*.

5.1.1. Extração dos óleos essenciais.

A partir de 100 g de material vegetal (folhas, galhos finos e galhos grossos) foram obtidos por técnica de hidrodestilação os óleos essenciais das 3 espécies de *Bocageopsis*, e posteriormente os rendimentos e a densidade foram calculados (Tabela 3).

Da espécie *B. canescens* foram coletados material botânico de 2 indivíduos na mesma época (janeiro de 2016) e no mesmo local sendo codificados como Bc01 e Bc02. Tais indivíduos possuíam altura e diâmetros de tronco diferentes, sendo que o Bc01 possuía o maior porte e estava com frutos.

Devido a espécie Bc02 ser de pequeno porte e aparentemente mais jovem quando comparado ao Bc01, foram coletados apenas folhas para obtenção do óleo essencial, e do Bc01 foram coletados folhas e galhos finos. Os rendimentos do óleo essencial das folhas de Bc01 e Bc02, foram respectivamente 0,28% e 0,15%, enquanto dos galhos finos de Bc01 foi de 0,20%, tais óleos essenciais apresentam coloração amarelo-esverdeado (Tabela 3).

A espécie *B. multiflora* apresentou o rendimento de 0,25% para folhas, 0,22% para os galhos finos e 0,23% para os galhos grossos. Os óleos essenciais de *B. multiflora* apresentaram coloração verde escuro (Tabela 3). Ao se avaliar os constituintes principais e rendimentos observa-se que são semelhantes aos dados já descritos para esta espécie (OLIVEIRA et al., 2014; ALCÂNTARA, 2015).

Os óleos essenciais das folhas e dos galhos finos de *B. pleiosperma* apresentaram o rendimento de 0,26% e 0,24% respectivamente, um forte odor e uma coloração amarelo esverdeado-claro (Tabela 3). Esses dados estão condizentes com os já relatados por Soares e colaboradores (2015b), onde tais rendimentos foram de

0,28% e 0,25% respectivamente. Também foram comparados com os obtidos em literatura referente às espécies da família Annonaceae (CAROLLO et al., 2005; COSTA, 2009; PALAZZO et al., 2009; OLIVEIRA, 2012; ALCÂNTARA, 2015).

Em estudos realizado por Palazzo e colaboradores (2009) apresentam dados relacionados a seis espécies (*Desmopsis bibracteata*, *D. microcarpa*, *Guatteria costaricensis*, *G. diospyroides*, *G. oliviformis*, and *Unonopsis costaricensis*) da família Annonaceae, que foram submetidas a estudos e os rendimentos dos óleos essenciais foram de 0,21%, 0,03%, 0,07%, 0,15%, 0,30% e 0,20%, respectivamente.

Estudos com as folhas *Xylopia frutescens* revelaram $1,00 \pm 0,09\%$ de rendimento de óleo essencial com uma coloração incolor (FERRAZ et al., 2013).

Oliveira e colaboradores (2014) relatam a diferença nos rendimentos para os óleos essenciais das folhas de *B. multiflora* de acordo com as estações do ano, os quais no período chuvoso foi de 0,3% e durante a época de seca o resultado foi de 0,04%. Alcântara (2015) também menciona o rendimento dos óleos essenciais das folhas e dos galhos finos de *B. multiflora*, os quais foram de 0,34% e 0,11% respectivamente.

Lima e colaboradores (2016) investigaram fitoquimicamente os óleos essenciais de *Onychopetalum amazonicum*, e após a extração seus rendimentos foram calculados: as folhas tiveram 0,18%, os galhos finos 0,34% e as cascas do tronco 0,37%.

Meira e colaboradores (2016) descreveram na literatura a composição química do óleo essencial (folhas) das espécies *Guatteria friesiana* e *G. pogonopus*, os quais apresentaram rendimentos de 1,17% e 0,22% respectivamente. Ferreira e colaboradores (2017) relataram para o óleo essencial das folhas de dois indivíduos de *G. elliptica* R. E. Fries rendimentos de 0,11% e 0,21%, respectivamente. O óleo

essencial obtido das folhas da espécie *Anaxagorea brevipes* extraído por hidrodestilação apresentou um rendimento de 0,52% (ALENCAR et al., 2015).

Para a espécie *Onychopetalum periquino* estudada por Lima e colaboradores (2019b), foi observado para o óleo essencial das folhas um rendimento de 0,24%.

As folhas da espécie *Duguetia gardneriana* foram submetidas a extração para obtenção do óleo essencial e seu rendimento foi de 0,13% (RODRIGUES et al., 2015). O óleo essencial das folhas de *Duguetia furfuraceae* foram extraídos através de hidrodestilação e o rendimento apresentado foi de 0,73% (CAROLLO et al., 2005).

Os dados acima mostram que o rendimento das espécies de *Bocageopsis* (tabela 3) estão em um intervalo compatível com relatos descritos na literatura para espécies da família Annonaceae.

Tabela 3. Aspectos físicos-químicos e rendimento obtidos dos óleos essenciais das espécies de *Bocageopsis*.

Espécies	Amostra	Aspecto Físico-Químico	Rendimentos (%)	Densidade g/mL
<i>Bocageopsis canescens</i>	Bc01-Folhas	Amarelo esverdeado	0,28	0,430
	Bc02-Folhas		0,15	0,923
	Bc01-Galhos finos		0,20	1,275
<i>Bocageopsis multiflora</i>	Bmu- Folhas	Verde escuro	0,25	0,842
	Bmu-Galhos grossos		0,23	1,244
	Bmu-Galhos Finos		0,22	1,112
<i>Bocageopsis pleiosperma</i>	Bp-Folhas	Amarelo esverdeado claro	0,26	0,770
	Bp-Galhos Finos		0,24	0,902

5.1.2. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de *B. canescens*.

A partir das análises por CG-EM dos óleos essenciais obtidos das folhas de Bc01 e Bc02 e dos galhos finos de Bc01, foi possível caracterizar 98,80%, 96,5% e 96,0%, respectivamente, dos constituintes dos óleos essenciais de *B. canescens* (Tabela 4). Observou-se a predominância de hidrocarbonetos sesquiterpenicos e hidrocarbonetos sesquiterpenicos oxigenados, e ausência de monoterpenos, em acordo com relatos da literatura (FOURNIER et al., 1999).

Tabela 4. Principais constituintes dos óleos essenciais das folhas e galhos finos *B. canescens* determinados por CG-EM.

I.A ^a	I.A ^b	Compostos	Bc01-F (%)	Bc02-F (%)	Bc01-GF (%)
1335	1333	δ-elemeno	8,5	4,0	1,6
1348	1345	α-cubebeno	0,8	1,0	-
1374	1377	α-copaeno	1,5	2,2	0,3
1387	1387	β-bourboneno	3,1	4,5	2,2
1389	1393	β-elemeno	8,3	2,5	2,0
1417	1421	<i>E</i> -cariofileno	14,8	13,6	3,4
1430	1434	β-copaeno	0,5	-	0,2
1434	1435	γ-elemeno	1,9	-	-
1437	1446	α-guaieno	0,2	-	-
1439	1441	aromadendreno	-	0,6	-
1452	1456	α-cariofileno	4,1	2,9	1,3
1458	1451	<i>allo</i> -aromadendreno	0,5	-	0,1
1480	1479	germacreno-D	19,5	4,5	0,4
1489	1488	β-selineno	-	-	-
1495	1497	γ-amorfeno	0,5	-	0,5
1500	1499	biciclogermacreno	9,7	4,8	3,2
1500	1502	α-muuroleno	-	0,4	-
1511	1510	δ-amorfeno	0,4	0,1	0,2
1522	1526	δ-cadineno	3,8	5,2	1,8
1533	1535	<i>trans</i> -cadina1,4-dieno	0,1	-	-
1548	1553	elemol	-	-	1,4
1559	1560	germacreno-B	6,0	3,3	1,2
1577	1581	espatulenol	5,2	24,1	2,7
1582	1586	óxido de cariofileno	1,9	9,8	4,6
1590	1588	globulol	0,3	-	0,2
1592	1595	viridiflorol	-	0,3	2,8
1600	1595	guaiol	-	-	0,1

1607	1600	5- <i>epi</i> -7- <i>epi</i> - α -eudesmol	3,0	4,0	2,0
1608	1612	epoxido de humuleno II	-	1,2	2,5
1618	1618	1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	-	-	-
1630	1627	γ -eudesmol	-	-	-
1636	1634	β -acorenol	-	-	16,0
1633	1627	isoespatulenol	3,7	8,5	2,0
1644	1646	α -muurolol	-	1,0	40,0
1645	1645	cubenol	-	0,6	-
1649	1654	β -eudesmol	-	-	0,5
1652	1659	α -cadinol	0,5	0,1	1,8
1666	1666	14-hidroxi-(<i>Z</i>)-cariofileno	-	0,3	0,7
1668	1662	14-hidroxi-9- <i>epi</i> -(<i>E</i>)-cariofileno	-	-	0,1
1775	1771	2- α -hidroxi-amorfa-4,7(11)-dieno	-	-	0,1
1913	1910	<(5 <i>E</i> ,9 <i>E</i>)>farnesil acetona	-	-	0,1
Total identificado			98,80	96,5%	96,0%

I.A^a: índice de retenção encontrado em literatura (Adams, 2007b); I.A^b: índice de retenção calculado; (-) substância não identificada.

Das folhas Bc01, foi possível identificar como constituintes principais germacreno-D, *E*-cariofileno, biciclogermacreno e δ -elemeno com teores de 19,5%, 14,8%, 9,7% e 8,5% respectivamente, o que representa 52,5% dos constituintes do óleo essencial (Figura 24).

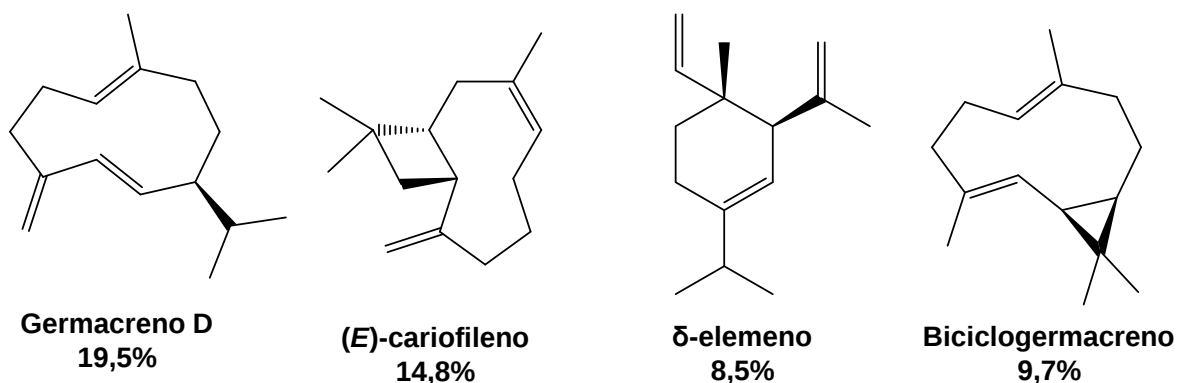


Figura 24. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de Bc01.

Das folhas Bc02, foi possível identificar como constituintes principais espatulenol, *E*-cariofileno, óxido de cariofileno e isoespatulenol com teores de 24,1%,

13,6%, 9,8% e 8,5% respectivamente, o que representa 56,0% dos constituintes do óleo essencial (Figura 25).

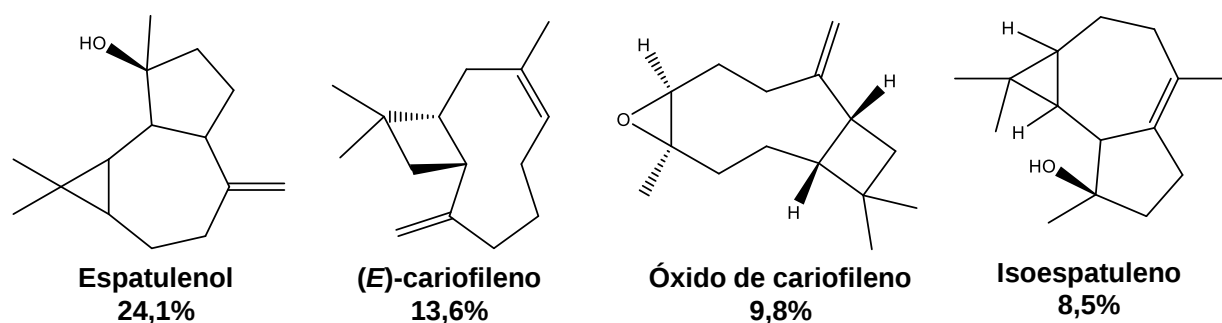


Figura 25. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de Bc02.

Em relação aos galhos finos de Bc01 os constituintes principais foram α -muurolol com 40% e o β -acorenol com 16,0%, o que representa 56,0% dos constituintes do óleo essencial (Figura 26).

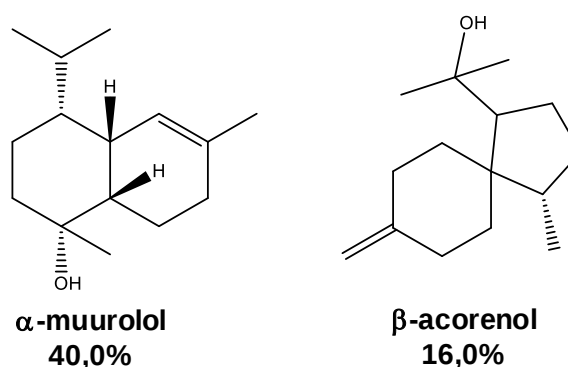


Figura 26. Principais constituintes do óleo essencial dos galhos finos de Bc01.

Esse é o primeiro relato sobre os constituintes terpênicos da espécie *B. canescens*, onde ao comparar os componentes dos óleos essenciais dos dois indivíduos estudados, destaca-se a presença de três componentes sesquiterpenos (espatulenol, cariofileno e óxido de cariofileno) predominantes nas folhas de *B. canescens* do indivíduo Bc02, e minoritários em Bc01 (Figura 27). Os sesquiterpenos oxigenados espatulenol e óxido de cariofileno têm sido considerados como marcadores taxonômicos em alguns gêneros de Annonaceae, como *Xylopia*, *Annona*, *Duguetia* e *Guatteria* (MAIA et al., 2005a e 2005b; SIQUEIRA et al., 2011; ARAÚJO et al., 2015).

O (*E*)-cariofileno foi identificado nas folhas dos dois indivíduos, tendo se apresentado em concentrações ligeiramente diferentes em Bc01 (14,8%) e Bc02 (13,6%), e nos Bc01-Galhos finos (3,4%). Os outros três componentes sesquiterpênicos identificados principalmente nas folhas de Bc01, foram: germacreno D, em maior concentração com 19,5%, seguido do biciclogermacreno (9,7%), δ -elemeno (8,5%) e β -elemeno (8,3%). Essa diferença de teores sesquiterpênicos pode estar relacionada à idade e o período frutífero de Bc01, mas para confirmação faz-se necessário estudos mais aprofundados.

Em relação aos galhos finos de Bc01 (Figuras 26 e 27), foi possível identificar dois sesquiterpenos em altas concentrações, o α -muurolol com 40% e o β -acorenol com 16%, constituintes ausentes nas folhas. Este fato revela uma grande diferença dos constituintes presentes nas folhas e nos galhos finos. O constituinte β -acorenol já foi relatado no óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Xylopia sericea* St. Hill por Pontes e colaboradores (2007).

Ao comparar esses resultados com os relatados em literatura fica evidente o potencial da planta em relação a atividade biológica. A composição química do óleo essencial das folhas de Bc01-F está de acordo com revisão da literatura realizada por Fournier e colaboradores (1999) e trabalhos mais recentes, para óleos essenciais de Annonaceae (MAIA et al., 2005a e 2005b; SIQUEIRA et al., 2011; SOARES et al., 2015b; SITI et al., 2016), diferentemente de Bc02-F, onde se destacam os sesquiterpenos oxigenados. Verificou-se a co-ocorrência do espatulenol e seus supostos precursores biogênicos (CHAVES et al., 2003), germacreno-D e biciclogermacreno nos 2 indivíduos. Foi observada a diminuição da concentração dos dois sesquiterpenos no indivíduo mais jovem (Bc02-F), em relação ao de maior porte (Bc01-F), em paralelo, a uma correspondente variação do espatulenol em ambos.

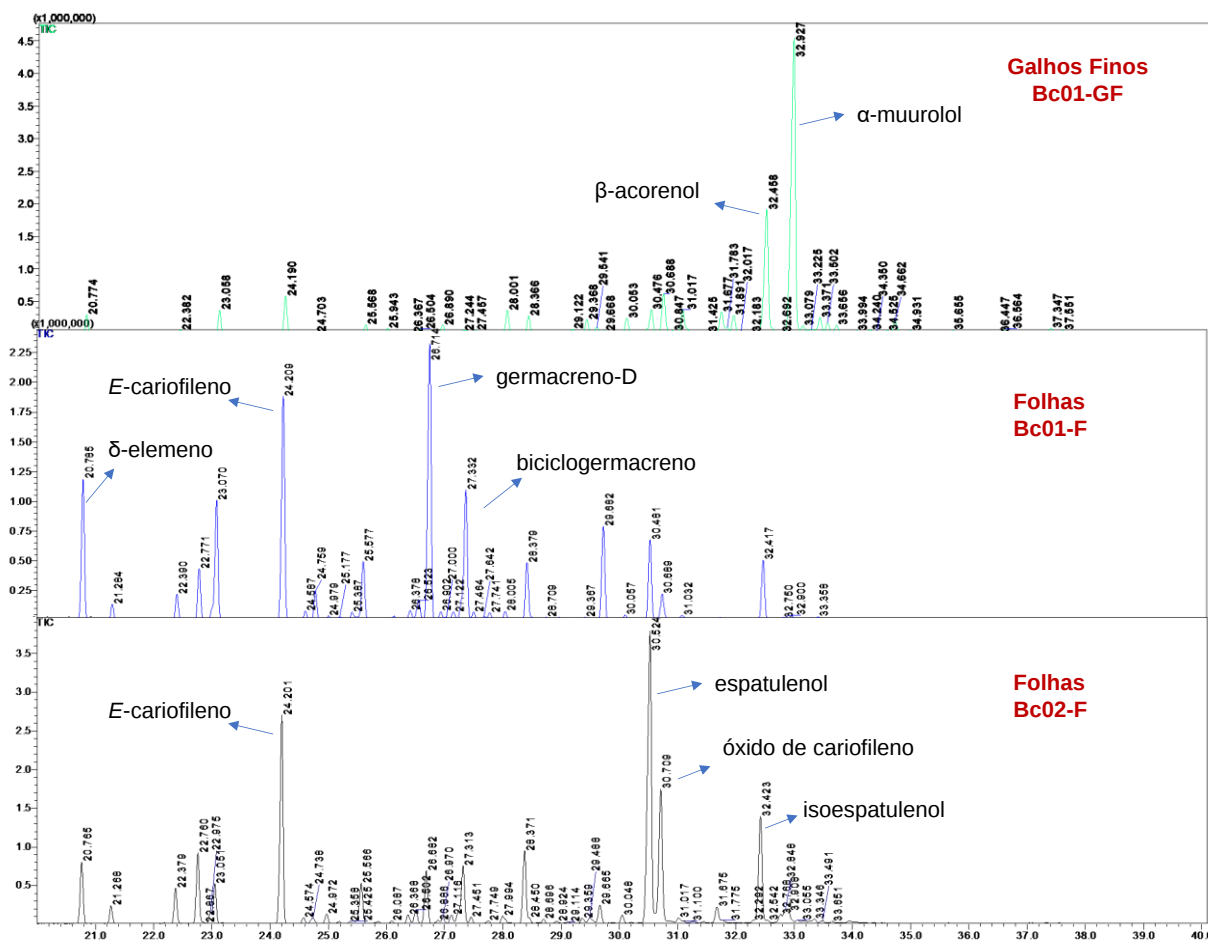


Figura 27. Comparativo dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de *B. canescens*.

É conhecido que os óleos essenciais têm uma grande diversidade de constituintes, de ocorrência generalizada em várias espécies, muitos dos quais são característicos de determinados táxons. O espatulenol, considerado um dos marcadores quimiotaxonômicos de alguns gêneros de Annonaceae (MAIA et al., 2005a e 2005b; SITI et al., 2016) tem presença marcante em *B. multiflora*, como um dos principais compostos encontrados no óleo essencial das folhas (16,2-13,0%) (OLIVEIRA et al., 2014), contudo, estando ausente em *B. pleiosperma* (SOARES et al., 2015b). Em estudos realizados com as folhas de espécies de *Unonopsis* e *Onychopetalum*, gêneros próximos ao *Bocageopsis*, foi reportado uma concentração do composto espatulenol de 4,80 % a 40,2% (SILVA et al., 2015b), no primeiro, e 10,4% no segundo (LIMA et al., 2016). No presente trabalho, o espatulenol foi detectado, em

concentração de 24,1 e 5,2%, ratificando a frequência desse sesquiterpenóide em Annonaceae.

Na espécie *Guatteria pogonopus* o óleo essencial (folhas) apresentou como principais constituintes o espatulenol com 24,8%, (*E*)-cariofileno com 4,8% e óxido de cariofileno com 3,97%, e ao ser submetido a testes biológicos conseguiu inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum* com 6,8 µg/mL, contra epimastigota 28,0 µg/mL e tripomastigota 41,3 µg/mL (MEIRA et al., 2016).

O sequiterpeno (*E*)-cariofileno foi identificado em concentração de 31,48% no óleo essencial (folhas) da espécie *Xylopia frutescens*, que apresentou atividade contra células cancerígenas, sendo também encontrado como maior constituinte nos óleos essenciais das folhas em *Annona pickelii* (27,8%) e *A. salzmannii* (21,4%) apresentando atividade antitumoral (FERRAZ et al., 2013; COSTA et al., 2013c e 2013d).

O sequisterpeno germacreno-D demonstrou propriedades antimicrobianas (YANG et al., 1999; PETRAKIS et al., 2005). O composto óxido de cariofileno apresentou atividade sedativa em concentração de 40 mg/L⁻¹ e o espatulenol 51,2 mg/L⁻¹ promovendo anestesia profunda sem efeitos adversos em Jundiás (BENOVIT et al., 2012). O óxido de cariofileno também revelou atividade inibidora de Protein tyrosine phosphatase 1B (PTP1B) com concentração de 31,32 ± 0,38 µM, sendo esta enzima relacionada a obesidade e diabetes (WANG et al., 2017).

A composição química dos óleos essenciais é afetada por vários fatores, como sazonalidade, ritmo circadiano, altitude, disponibilidade de água e nutrientes no solo, temperatura, estágio de desenvolvimento dos órgãos, fenologia, genética e idade da planta (GOBBO-NETO & LOPES, 2007; LAMIEN-MEDA et al., 2010; LEE & DING et al., 2016). Nesse contexto, a variação no teor dos óleos essenciais, superior no de

maior biomassa, e nas respectivas concentrações dos constituintes majoritários, pode ser associada à diferença de idade dos indivíduos estudados. O arsenal enzimático de defesa e desenvolvimento das plantas as habilita a realizar a rota biossintética germacreno-biciclogermacreno-espatulenol, como ocorre na fase vegetativa, nos indivíduos mais jovens, porém, a fase final dessa rota pareceu menos ativada no indivíduo mais maduro, o qual se encontrava no período de frutificação, observando-se o acúmulo de sesquiterpenos em detrimento da produção de sesquiterpenos oxigenados biossinteticamente a eles relacionados.

A composição química dos óleos essenciais de folhas de *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae) (SILVA et al., 2013), verificada em coletas, realizadas durante um ano, em períodos estéreis e no fim do evento de frutificação, ilustra a oscilação da sua produção em vários estágios da vida do vegetal. Observaram-se no último período, a emergência de espatulenol e o declínio da produção dos precursores germacreno-D e biciclogermacreno, comparada à concentração dos últimos, no período estéril. A discrepância com os nossos dados pode ser atribuída a numerosas variáveis envolvidas no processo, realçadas pelas diferenças nas condições experimentais. Assim, estudos mais aprofundados e integrados, com a espécie *B. canescens*, são necessários para melhor compreender e explicar os resultados obtidos.

5.1.3. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos óleos essenciais das folhas, galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora*.

De acordo com as análises por CG-EM dos óleos essenciais obtidos das folhas, galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora*, foi possível caracterizar 86,22%, 85,46% e 92,19%, respectivamente, dos constituintes dos óleos essenciais. O perfil químico apresentou predominância de sesquiterpenos hidrogenados para esses óleos essenciais, destacando-se, entretanto, o sesquiterpenoide espatulenol como majoritário nas folhas (tabela 5).

Tabela 5. Principais constituintes dos óleos essenciais das folhas, galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora* determinados por CG-EM.

I.A ^a	I.A ^b	Compostos	Bmu-F (%)	Bmu-GF (%)	Bmu-GG (%)
1335	1333	δ-elemeno	0,34	-	-
1387	1379	β-bourboneno	2,23	-	-
1389	1387	β-elemeno	-	1,00	2,07
1390	1387	7- <i>epi</i> -sesquithujeno	1,29	-	-
1409	1404	α-gurjuneno	-	3,00	15,42
1417	1414	(<i>E</i>)-cariofileno	2,69	1,47	0,43
1432	1431	α- <i>trans</i> -bergamoteno	31,23	21,92	25,32
1449	1440	α-himachaleno	0,38	-	-
1458	1455	<i>allo</i> -aromadendreno	-	-	1,23
1479	1471	ar-curcumeno	0,62	-	-
1490	1490	β-selineno	1,00	28,16	19,57
1495	1490	γ-amorfenol	-	-	8,15
1505	1504	β-bisaboleno	1,00	1,63	1,17
1511	1519	δ-amorfenol	-	-	0,67
1513	1509	γ-cadineno	-	0,62	1,43
1528	1523	(<i>E</i>)- <i>iso</i> -γ-bisaboleno	-	-	1,57
1532	1540	γ-cupreneno	-	1,02	-
1544	1543	α-calacoreno	-	1,00	1,02
1546	1541	hedicariol	1,21	1,00	-
1548	1546	elemol	-	2,88	-
1561	1559	(<i>E</i>)-nerolidol	1,09	1,00	-
1577	1571	espatulenol	35,14	4,33	-
1582	1576	óxido de cariofileno	2,00	3,00	1,94
1599	1595	widdrol	1,00	2,00	2,44

1638	1635	<i>epi</i> - α -cadinol	3,00	4,22	6,60
1639	1647	<i>allo</i> -epóxido de aromadendreno	2,00	3,61	-
1733	1742	isobicyclogermacrenal	-	3,60	3,16
Total identificado			86,22%	85,46%	92,19%

I.A^a: índice de retenção encontrado em literatura (Adams, 2007b); I.A^b: índice de retenção calculado; (-) substância não identificada.

Para o óleo essencial das folhas de *B. multiflora* os constituintes que se destacaram foram o α -*trans*-bergamoteno e o espatulenol (Figuras 28 e 31) com teores de 31,23% e 35,14%, respectivamente, o que representa 66,37% dos constituintes do óleo essencial. Em estudos realizados por Oliveira e colaboradores (2014) foram apresentados resultados, onde o óleo essencial das folhas coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Manaus – AM), durante a estação seca (setembro de 2010), apresentou o espatulenol (16,2%) como composto majoritário.

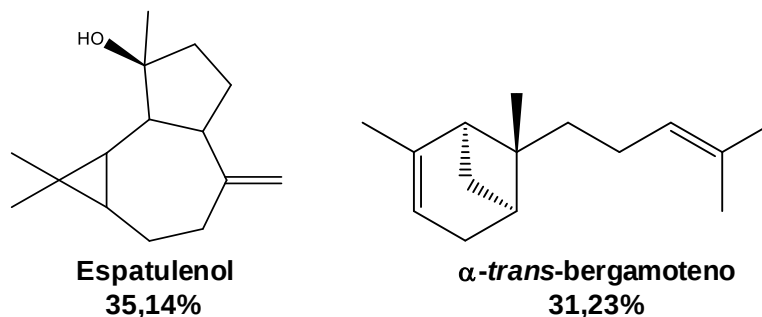


Figura 28. Principais constituintes do óleo essencial das folhas de *B. multiflora*.

O óleo essencial dos galhos finos evidenciou a predominância dos constituintes α -*trans*-bergamoteno e β -selineno (Figuras 29 e 31) com teores de 21,92% e 28,16%, respectivamente, representando 50,08% dos constituintes do óleo essencial. Tais resultados são diferentes dos trabalhos realizados anteriormente por Alcantâra (2015), onde o óleo essencial extraído de galhos finos coletados no campus do Instituto de Pesquisas da Amazônia, durante a estação chuvosa mostrou diferença na composição dos seus óleos, onde os compostos acetato de *exo*-2-norborneol (10,3%) e ar-curcumenol (10,2%) foram identificados como majoritários.

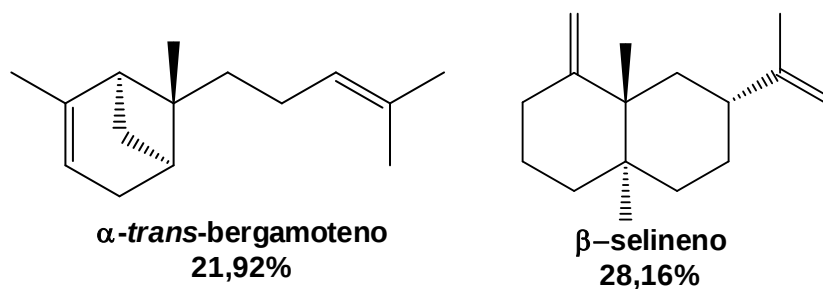


Figura 29. Principais constituintes do óleo essencial dos galhos finos de *B. multiflora*.

Esse é o primeiro relato sobre os constituintes terpênicos presentes no óleo essencial dos galhos grossos de *B. multiflora*. Foi possível caracterizar como constituintes principais os compostos α-gurjuneno, α-trans-bergamoteno e β-selineno (Figuras 30 e 31) com teores de 15,42%, 25,32% e 19,57% respectivamente, totalizando 60,31% dos constituintes do óleo essencial.

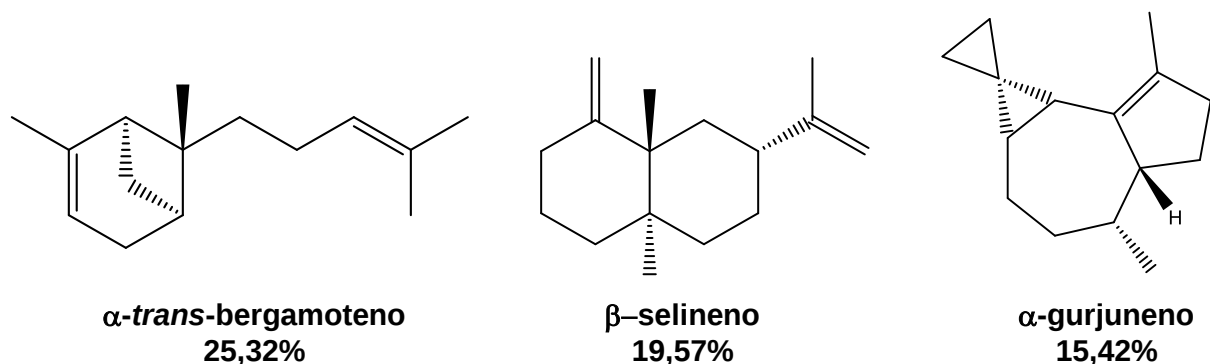


Figura 30. Principais constituintes do óleo essencial dos galhos grossos de *B. multiflora*.

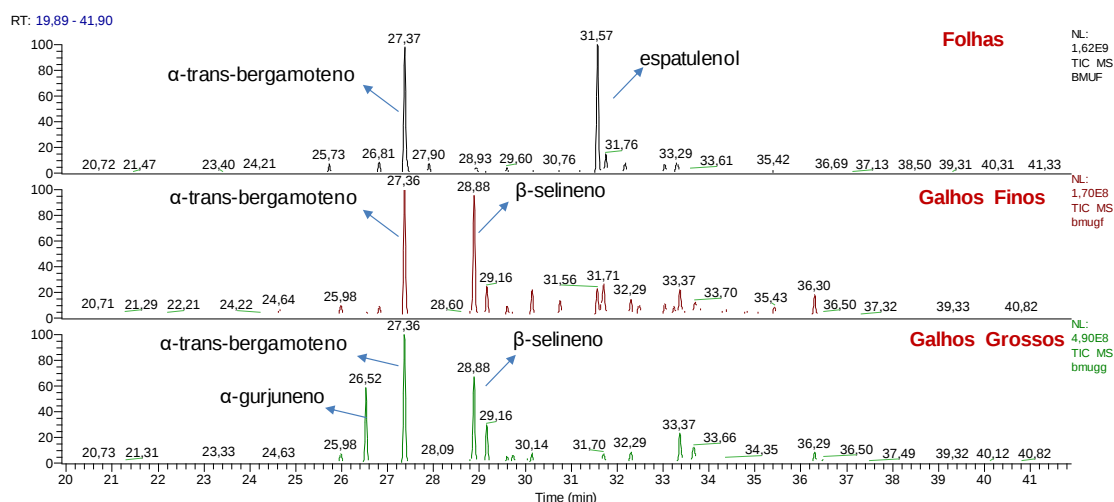


Figura 31. Comparativo dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das folhas, galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora*.

Muitos desses compostos identificados em óleos essenciais de espécies da família Annonaceae já foram relatados (FOURNIER et al., 1999), incluindo espécies de *Onychopetalum amazonicum*, *O. periquino*, *Unonopsis guatterioides* e *U. stipitata* que são consideradas espécies próximas à estudada (LIMA et al., 2016; SILVA et al., 2015a; LIMA et al., 2019). A alta concentração dos compostos α -*trans*-bergamoteno, espatulol, β -selineno e α -gurjuneno é de grande importância, pois o óleo essencial rico nesses compostos possui atividades já descritas na literatura como: antioxidante, antimicrobiano, antitumoral, larvicida e farmacológico (TAN et al., 2007; CHANDRA et al., 2017; ARAÚJO et al., 2015; BOMFIM et al., 2016; MAGALHÃES et al., 2010).

5.1.4. Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de *B. pleiosperma*.

Através das análises por CG-EM dos óleos essenciais obtidos das folhas e galhos finos de *B. pleiosperma*, foi possível caracterizar 95,70% e 86,16%, respectivamente, dos constituintes dos óleos essenciais. O sesquiterpeno β -bisaboleno foi o constituinte majoritário, com concentrações de 89,64% nas folhas e 33,75% nos galhos finos. O óleo essencial extraído dos galhos finos apresentou os sesquiterpenoides (2Z,6Z)-farnesol (11,89%) e criptomeriona (25,76%) em concentrações significativas (Figuras 32 e 33), estando, o primeiro ausente nas folhas e o segundo em menor concentração nesta parte da planta (Tabela 6). É interessante observar o decréscimo na concentração do bisaboleno nos galhos finos, paralelo ao aparecimento do (2Z,6Z)-farnesol e aumento da concentração da criptomeriona, sesquiterpenoides estruturalmente a ele relacionados (DEWICK, 2009).

Tabela 6. Principais constituintes dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de *B. pleiosperma* determinados por CG-EM.

I.A ^a	I.A ^b	Compostos	Bp-F (%)	Bp-GF (%)
1373	1371	α -ylangeno	0,27	-
1432	1432	α -trans-bergamoteno	2,50	-
1440	1439	(Z)- β -farneseno	0,58	-
1453	1448	geranil acetona	0,13	-
1454	1454	(E)- β -farneseno	1,26	-
1505	1505	β -bisaboleno	89,64	33,75
1608	1607	β -atlantol	-	3,97
1639	1630	epóxido de allo-aromadendrene	-	0,93
1649	1648	β -eudesmol	-	0,74
1651	1652	pogostol	-	4,25
1666	1675	14-hidroxi-Z-cariofileno	-	2,76
1698	1691	(2Z, 6Z) - farnesol	-	11,89
1724	1722	criptomeriona	1,32	25,76
1742	1740	(2E- 6E)-farnesol	-	2,11
Total identificado			95,70%	86,16%

I.A^a: índice de retenção encontrado em literatura (Adams, 2007b); I.A^b: índice de retenção calculado; (-) substância não identificada.

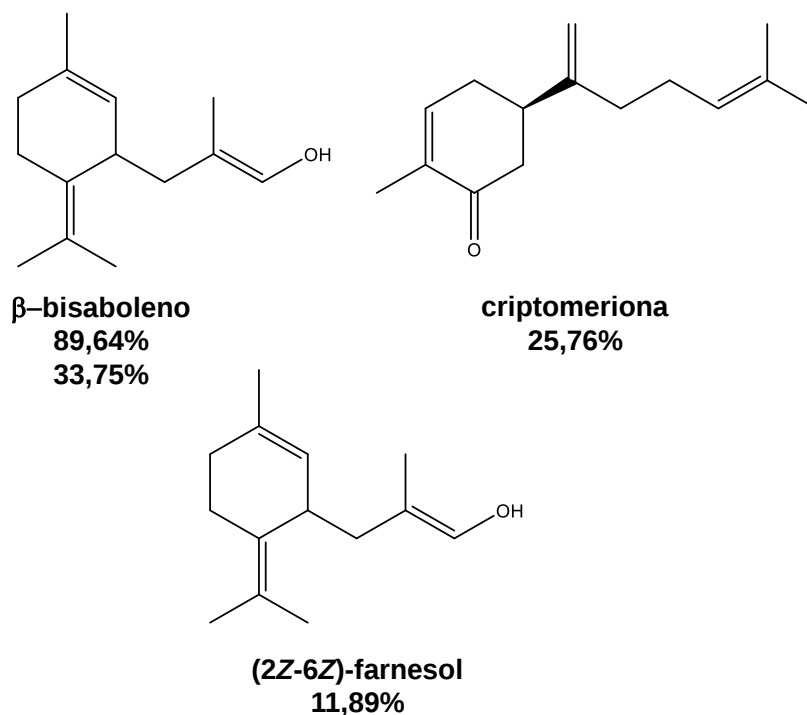


Figura 32. Principais constituintes do óleo essencial das folhas e galhos finos de *B. pleiosperma*.

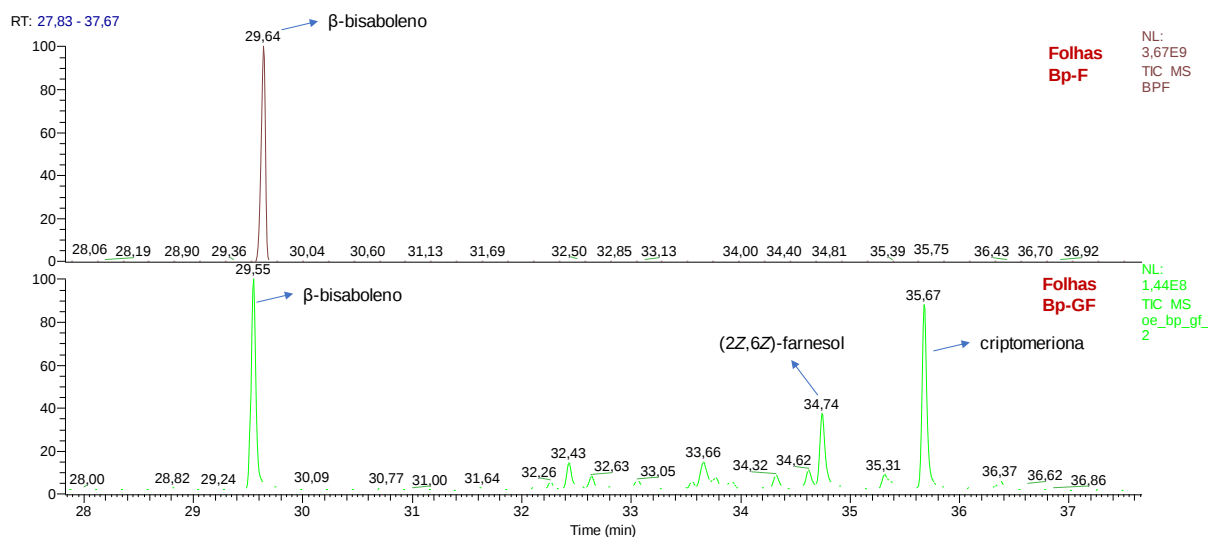


Figura 33. Comparativo dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das folhas e galhos finos de *B. pleiosperma*.

Os dados descritos estão coerentes com os já relatados em espécies da família Annonaceae, onde em investigações fitoquímicas já foi observado um teor considerável e atividades biológicas de óleos essenciais que possuem o sesquiterpeno β-bisaboleno em sua composição. Soares e colaboradores (2015b) apresentaram o β-bisaboleno

como constituinte majoritário para o óleo essencial de *B. pleiosperma*, com concentrações de 55,77% para as folhas, 34,37% para os galhos e 38,53% para as cascas do tronco.

Rodrigues e colaboradores (2015) identificaram o composto β -bisaboleno em uma concentração equivalente a 80,99% no óleo essencial extraído das folhas de *Duguetia gardneriana*.

Outras espécies da família Annonaceae apresentaram menores teores em relação aos sesquiterpenos em questão, como: a espécie *Guatteria blepharophylla* onde foram identificados 0,6% e 0,4% de β -bisaboleno no óleo essencial das folhas e galhos, respectivamente (ALCÂNTARA, 2015). Alencar e colaboradores (2015) fizeram o estudo fitoquímico do óleo essencial das folhas da espécie *Anaxagorea brevipes* e dentre os compostos caracterizados está o β -bisaboleno com 4,10% e para a espécie *Uvariastrum pierreanum* foi identificado 28,20% de β -bisaboleno nas cascas e 4,30% nas folhas (BOYOM et al., 2011).

5.2. Ensaios biológicos dos óleos essenciais das espécies de *Bocageopsis*.

5.2.1. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método de difusão em ágar.

Na avaliação antimicrobiana pelo método de difusão em ágar foram observados pequenos halos de inibição (Tabela 7 e Quadro 6).

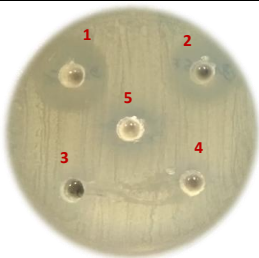
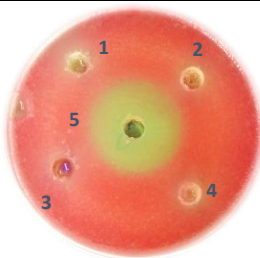
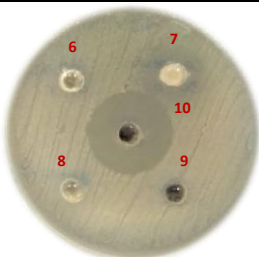
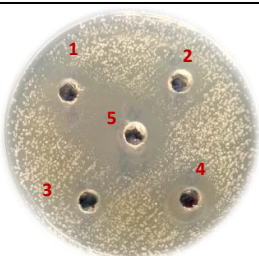
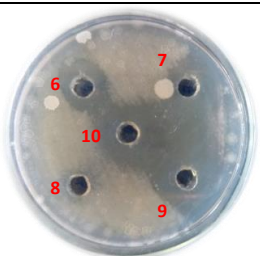
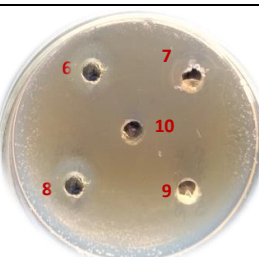
Tabela 7. Resultados do método de difusão em ágar dos OEs.

Microorganismos	Amostras	Poço	Leitura 24 hs (cm)	Leitura 48 hs (cm)
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bmu-GF	1	1,4	1,4
	Bmu-GG	2	2,0	2,0
	Bc01-F	5	1,3	1,3
	Bc02-F	6	1,3	1,3
	Controle	10	3,0	3,0
<i>Serratia marcescens</i>	Bmu-F	9	1,3	1,3
	Bmu-GF	6	1,3	1,3
	Bmu-GG	7	1,3	1,3
	Bc01-F	10	1,3	1,3
	Bc02-F	1	1,3	1,3
	Bc02-GF	4	1,3	1,3
	Bp-F	8	1,3	1,3
<i>Candida albicans</i>	Controle	5	3,0	3,0
	Bmu-F	4	1,3	1,3
	Bmu-GF	1	1,3	1,3
	Bmu-GG	2	1,3	1,3
	Bc01-F	5	1,5	1,5
	Bc02-F	6	1,5	1,5
	Controle	10	3,0	3,0
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	Bc02-F	6	2,0	2,0
	Bmu-GF	9	1,3	1,3
	Bmu-GG	7	1,5	1,5
	Bp-F	8	0,5	0,5
	Controle	10	3,0	3,0

Os resultados dos testes antimicrobianos pelo método de difusão em ágar (Tabela 7 e Quadro 6) apresentaram uma atividade inferior quando comparado com os antibióticos usados como controle (amoxicilina - 3,0 cm, estreptomicina - 3,0 cm e ciclohexamida – 3,0 cm, respectivamente). O óleo essencial referente aos galhos grossos da espécie *B. multiflora* (Bmu-GG) foi o que apresentou o maior halo de inibição (2,0 cm) para *Staphylococcus aureus*. Todos os óleos essenciais testados para *Serratia*

marcens apresentaram um halo de inibição de 1,3 cm. Para o fungo *Candida albicans* os óleos essenciais que apresentaram maior halo de inibição (1,5 cm) foram os referentes aos óleos essenciais das folhas da espécie *B. canescens* (Bc01-F e Bc02-F). E o óleo essencial de Bc02-F apresentou o maior halo de inibição (2,0 cm) e o Bp-F o menor halo de inibição (0,5 cm) para *Mycobacterium smegmatis*.

Quadro 6. Resultados dos testes antimicrobianos pelo método de difusão em ágar dos OE.

Microorganismos	Placas de Petri	Microorganismos	Placas de Petri
<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Serratia marcens</i>	
			
<i>Candida albicans</i>		<i>Micobacterium smegmatis</i>	
			

5.2.2. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pelo método de diluição seriada.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das espécies de *Bocageopsis* que deram atividade contra *S. aureus* (Bmu-GF, Bmu-GG, Bc02-F), *Serratia marcescens* (Bmu-GF, Bmu-GG, Bc02-F), *C. albicans* (Bmu-GF, Bmu-GG e Bc01-F) e *Mycobacterium smegmatis* (Bc01-F, Bmu-GF, Bmu-GG e Bp-F) foram avaliadas para determinação da concentração inibitória mínima – CIM, obtida através da realização do método de diluição seriada em microplaca tipo Elisa (Tabela 8). Esse método é bastante utilizado em pesquisas de novos antimicrobianos, devido apresentar boa sensibilidade, ser um teste de baixo custo, possuir maior reprodutibilidade, além de apresentar com isso maior confiabilidade dos resultados (OSTROSKY et al, 2008).

A mudança de coloração quando acrescentado o revelador resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido), um corante que indica o crescimento microbiano, sendo um indicador de oxidorredução, onde a cor azul indica ausência de crescimento microbiano (Figuras 34 e 35), enquanto as colorações rosa e amarelo indicam a presença de células viáveis em crescimento, dessa maneira, na concentração indicada o óleo não foi eficaz ao ponto de matar as bactérias e o fungo (O'BRIEN et al., 2000; BONAN et al., 2010; ARAÚJO & LONGO, 2016).

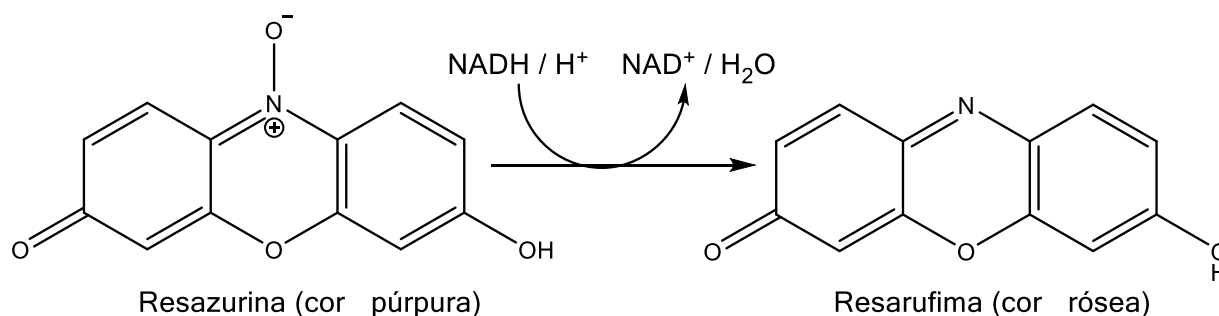


Figura 34. Reação de oxirredução da resazurina em organismos vivos.

Fonte: O'BRIEN et al., 2000.

A figura 35 apresenta, por meio da coloração, o efeito antimicrobiano diante das cepas distintas. Na tabela 8 estão os resultados da leitura da microdiluição seriada,

evidenciando assim, o efeito bactericida e fungicida que cada óleo essencial desempenha.

Tabela 8. Atividade antimicrobiana dos OEs das espécies de *Bocageopsis* pelo método de diluição seriada.

Cepas	Atividades antimicrobianas dos óleos essenciais (CIM, µg/mL)					
	Bc01-F	Bc02-F	Bmu-GG	Bmu-GF	Bp-F	Controle
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	500	500	500	-	15,62
<i>Candida albicans</i>	250	-	250	250	-	31,25
<i>Serratia marcescens</i>	-	500	500	500	-	250
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	62,5	-	62,5	31,25	62,5	15,62

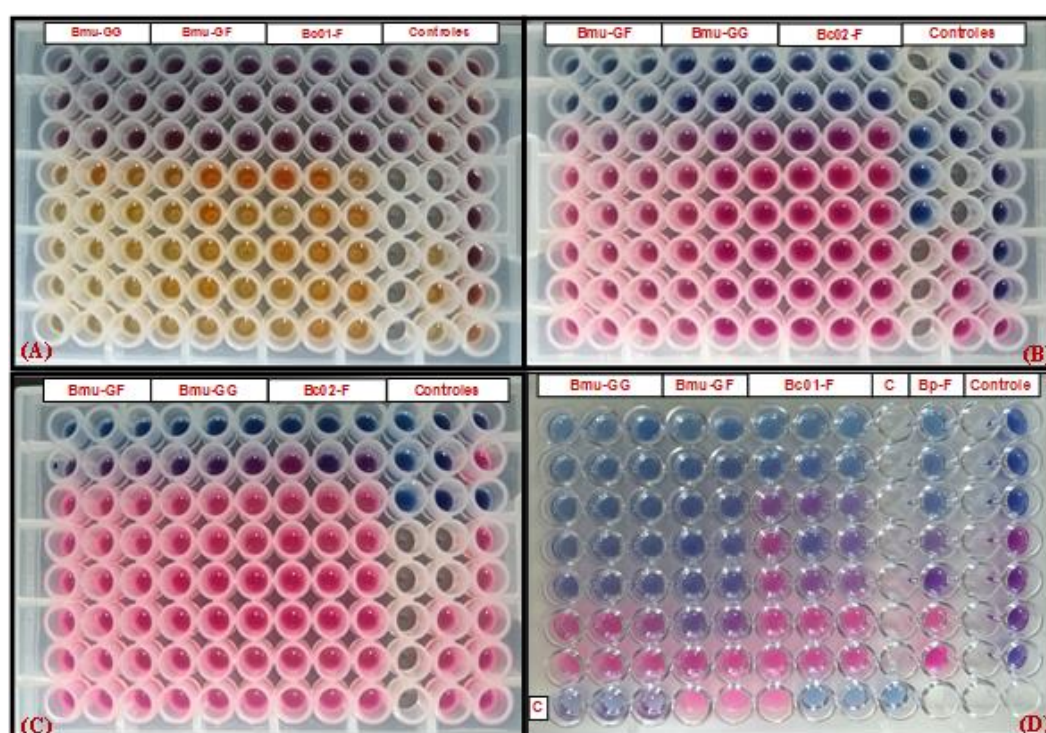


Figura 35. Resultado da atividade antimicrobiana dos OE das espécies de *Bocageopsis* pelo método de diluição seriada em placa de Elisa.

(A) *Candida albicans*; (B) *Staphylococcus aureus*; (C) *Serratia marcescens*; (D) *Mycobacterium smegmatis*.

Fonte: Ivanete Ferreira de Souza.

Os resultados para as CIM mostram que as amostras dos óleos essenciais de *B. canescens* (Bc01-F) e *B. multiflora* (Bmu-GG e Bmu-GF) inibiram o crescimento do fungo *C. albicans* até a terceira diluição (250 µg/mL). E para a bactéria gram-positiva *Mycobacterium smegmatis* os óleos essenciais que apresentaram inibição para o crescimento até a quinta diluição (62,5 µg/mL) foram Bc01-F, Bmu-GG e Bp-F (*B. pleiosperma*), além de uma inibição até a sexta diluição (31,25 µg/mL) para o óleo essencial de Bmu-GF.

Os óleos essenciais possuem compostos lipofílicos, tornando as bactérias gram-positivas mais susceptíveis a ação antimicrobiana do que as bactérias gram-negativas, devido a dificuldade dos óleos essenciais em difundir a membrana externa, por conta da existência da barreira hidrofílica que impede a passagem de macromoléculas e combinações hidrofóbicas. Embora não sejam totalmente impermeáveis, tornam as bactérias gram-negativas relativamente resistentes a combinações de antibióticos hidrofóbicos e drogas tóxicas (MARQUES et al., 2012).

Os óleos essenciais das espécies de *Bocageopsis* exibiram um efeito antibacteriano relevante e fungicida moderado (BARDAJÍ et al., 2016) (Tabela 8), respectivamente, contra a bactéria Gram-positiva *M. smegmatis* (CIM = 125 µg/mL) e a levedura *C. albicans* ATCC 10231 (CIM = 250 µg/mL). A *M. smegmatis* tem sido usada com sucesso para *screens* de atividade antimicobactéria de extratos de plantas, devido a características de rápido crescimento e fácil manuseio sendo considerada um provável previsor de atividade contra a patogênica *M. tuberculosis*, ressaltando-se que mais pesquisas são necessárias para sua validação como modelo para tais *screens* (BOLIGON et al, 2012). A atividade antimicrobiana observada para OEs das folhas de *B. canescens*, restrita a BC01-F, pode ser associada a mais alta concentração de espatulenol (24,1%) neste espécime, estando de acordo com pesquisas envolvendo

OE que possuem este composto majoritário como agente antimicrobiano (MONTANARI et al., 2011; SITI et al., 2016; MONGGOOT & PRIPDEEVECH, 2017), destacando-se que em ensaios antimicobactéria, o espatulenol revelou, moderada ação contra *M. tuberculosis* (NASCIMENTO et al, 2018). A presença deste álcool sesquiterpenico e de óxido de cariofileno, ambos de reconhecida ação anti-fúngica, em proporção significativa em BC02-F, e relativamente menor no outro indivíduo, pode justificar a moderada ação contra *C. albicans*. Adicionalmente, a presença de outros compostos terpenicos minoritários, podem ter contribuído sinergisticamente para a atividade antimicrobiana apresentada (NAIGRE et al., 1996; NASCIMENTO et al., 2018).

A significativa atividade antimicrobiana dos óleos essenciais extraídos de *B. multiflora* (Bmu-GG e Bmu-GF) podem ser atribuídas ao alto teor de sesquiterpenos (85,46% e 94,26%, respectivamente). A presença do composto α -*trans*-bergamoteno e do β -selineno em grande quantidade influenciam, uma vez que estudos relatam que óleos essenciais ricos nesses compostos possuem atividade biológica (SINGH et al., 2006; TAN et al., 2007; MAGALHÃES et al. al., 2010; YAVARI et al., 2011; WEI et al., 2016).

Para a espécie *B. pleiosperma* a alta atividade antimicrobiana é atribuída ao sesquiterpeno β -bisaboleno encontrado em concentração elevada no óleo essencial das folhas (89,64%), devido relatos já descritos em literatura que comprovam atividades biológicas para óleos essenciais que possuem esse composto em alta concentração (COSTA et al., 2008; RODRIGUES et al., 2015; ALENCAR et al., 2015; SILVA et al., 2017a; SENE et al., 2017; SILVA et al., 2018b). Trabalhos de Soares e colaboradores (2015b) apresentaram atividade antimicrobiana considerável contra *S. epidermidis* ATCC 1228 (CIM = 250 μ g/mL) para o óleo essencial extraído das cascas do tronco de *B. pleiosperma*.

Estudos fitoquímicos com espécies de famílias distintas de plantas evidenciam a presença e atividades biológicas para óleos essenciais que possuem o β -bisaboleno na sua composição (SNENE et al., 2017; SILVA et al., 2017a). Yeo e colaboradores (2015) isolaram os isômeros do sesquiterpeno bisaboleno (α , β e γ) do óleo essencial de Opoponax (*Commiphora guidottii*), esses compostos representam mais de um terço do óleo essencial e o constituinte β -bisaboleno exibiu atividade citotóxica considerável para células cancerígenas.

5.3. Estudo dos Extratos Aquosos obtidos das Espécies de *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*.

5.3.1. Obtenção dos extratos aquosos

Após a extração por infusão seguida de liofilização do material vegetal (folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco) foi possível obter uma biomassa em pó. Sendo observado que os extratos aquosos das folhas das espécies de *Bocageopsis* tiveram os rendimentos mais elevados, variando de 124,2 mg a 146,68 mg e o extrato aquoso obtido dos galhos grossos de *B. multiflora* obteve o menor rendimento com 32,2 mg (Tabela 9).

Tabela 9. Massa dos extratos aquosos das espécies de *Bocageopsis*.

Espécies	Partes da Planta	Código	Massa obtida (mg)
<i>Bocageopsis canescens</i> – Bc01	Folhas	CH-BcF	146,68
	Galhos Finos	CH-BcGF	84,2
<i>Bocageopsis multiflora</i>	Folhas	CH-BmuF	124,2
	Galhos Finos	CH-BmuGF	64,1
	Galhos Grossos	CH-BmuGG	32,2
	Tronco	CH-BmuT	98,7
<i>Bocageopsis pleiosperma</i>	Folhas	CH-BpF	138,9
	Galhos Finos	CH-BpGF	70,9

5.3.2. Análise do Perfil Químico dos Extratos Aquosos Obtidos por Espectrometria de Massas das espécies de *Bocageopsis*.

5.3.2.1. Perfil Químico Obtido por Espectrometria de Massas da Espécie *B. canescens*.

Analisando os espectros de íons totais das frações aquosas das folhas e galhos finos de *B. canescens* (Figura 36), foi observado um padrão de íons diferentes da fração alcaloídica para esta espécie. Foram destacados devido sua intensidade os íons de m/z 391, 433 e 579 Da ($[M+H]^+$) para as folhas e os íons de m/z 289, 433, 579 e 725 Da ($[M+H]^+$) para os galhos finos. Essas frações foram submetidas a análises por CLAE-EM analítico para verificar o perfil de pureza da fração aquosa.

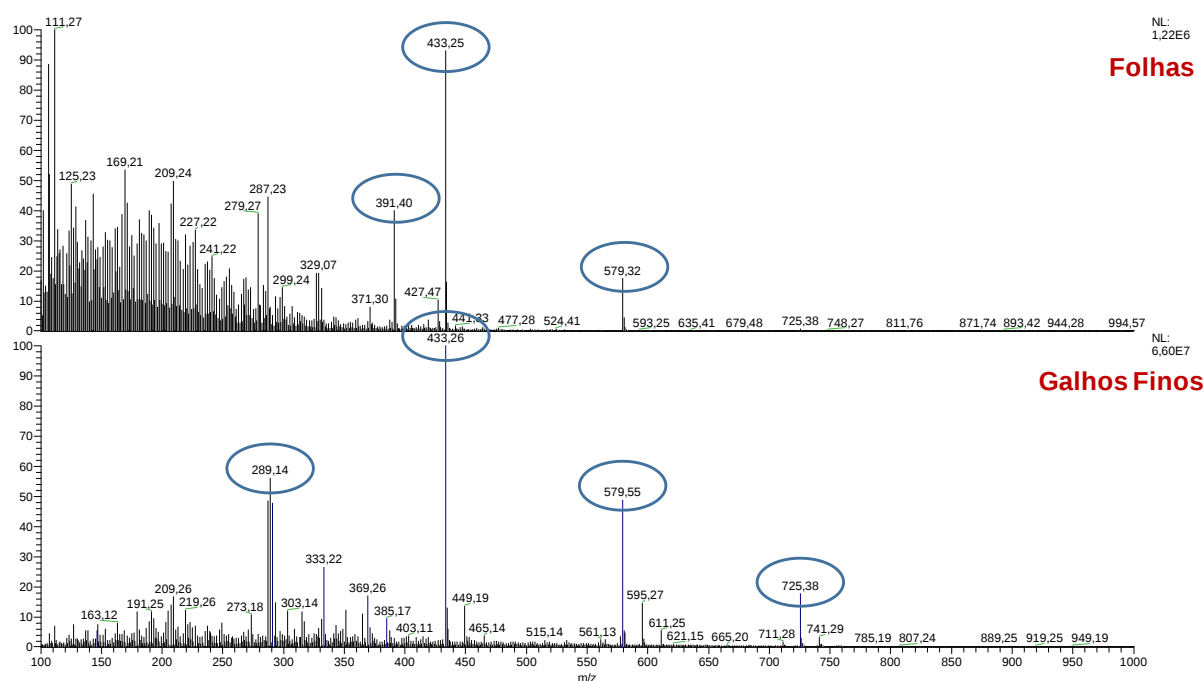


Figura 36. Espectros de íons totais dos extratos aquosos das folhas e galhos finos de *B. canescens*.

5.3.2.2. Perfil Químico Obtido por Espectrometria de Massas da Espécie *B. multiflora*.

Nos espectros de íons totais das frações aquosas das folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco de *B. multiflora* (Figura 37), foi observado um padrão de íons diferentes aos da fração alcaloídica para esta espécie, também foi destacado devido sua intensidade os íons de m/z 113, 191 e 351 Da ($[M+H]^+$) para as folhas, os íons de m/z 113, 129, 179, 191, 209 e 239 Da ($[M+H]^+$) para os galhos finos, os íons de m/z 127, 153, 187, 223 e 255 Da para os galhos grossos e os íons de m/z 179, 191, 221, 239, 275 e 285 Da ($[M+H]^+$) para s cascas do tronco. Essas frações foram submetidas a análises por CLAE-EM analítico para verificar o perfil de pureza da fração aquosa.

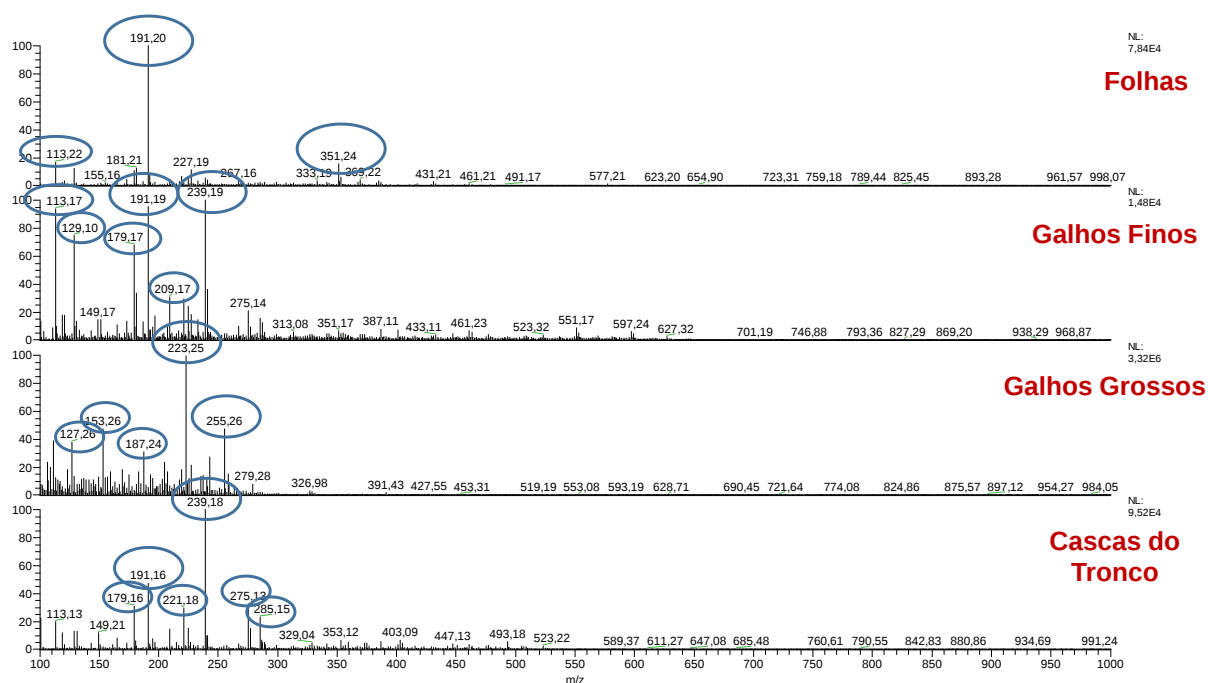


Figura 37. Espectros de íons totais dos extratos aquosos das folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco de *B. multiflora*.

5.3.2.3. Perfil Químico Obtido por Espectrometria de Massas da Espécie *B. pleiosperma*.

Para os espectros de íons totais das frações aquosas das folhas e galhos finos de *B. pleiosperma* (Figura 38), do mesmo modo foi observado um padrão de íons diferentes aos da fração alcaloídica para esta espécie. Foram destacados devido sua intensidade os íons de m/z 111, 146, 187, 223, 255, 279, 329, 355, 391 e 427 Da ($[M+H]^+$) para as folhas e os íons de m/z 111, 146, 193, 223, 255, 279, 329, 391 e 427 Da ($[M+H]^+$) para os galhos finos. Essas frações foram submetidas a análises por CLAE-EM analítico para verificar o perfil de pureza da fração aquosa.

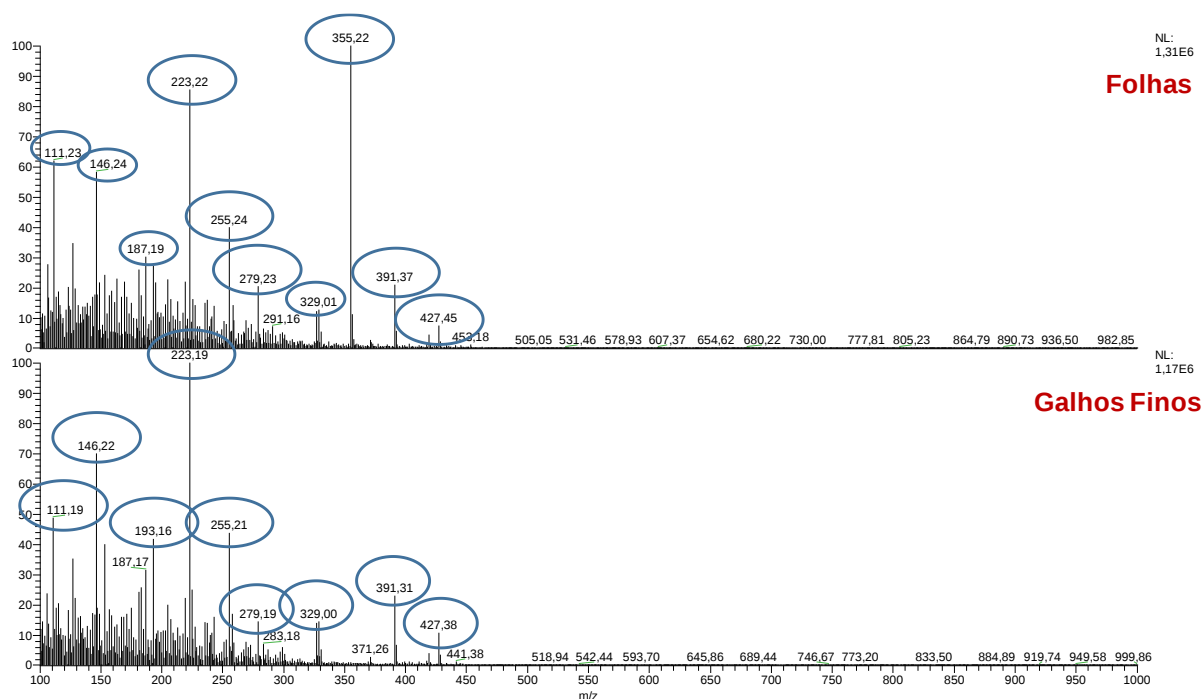


Figura 38. Espectros de íons totais dos extratos aquosos das folhas e galhos finos de *B. pleiosperma*.

5.3.3. Análises por CLAE-EM dos Extratos Aquosos das espécies de *Bocageopsis*.

Os cromatogramas de íons totais obtidos pela CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos referentes a extração das folhas e galhos finos da espécie *B. canescens* (Bc01) (Figura 39 e Tabela 10), são compatíveis com os resultados obtidos através das análises do perfil químico por ESI-IT-EM (Figuras 36).

Ao analisar os cromatogramas e os espectros de massas dos extratos aquosos das folhas foi possível destacar como o componente mais abundante o íon de ***m/z* 579** com tempos de retenção (T_R) de 10,34 minutos, seguido do pico de ***m/z* 725** com T_R 10,67 minutos, ambos apresentaram perdas sucessivas de 146 Da características de uma ramnose, gerando o íon com ***m/z* 287**, o que caracteriza duas substâncias glicosiladas, a primeira com duas unidades de açúcar e a segunda com três unidades (LI et al., 2015).

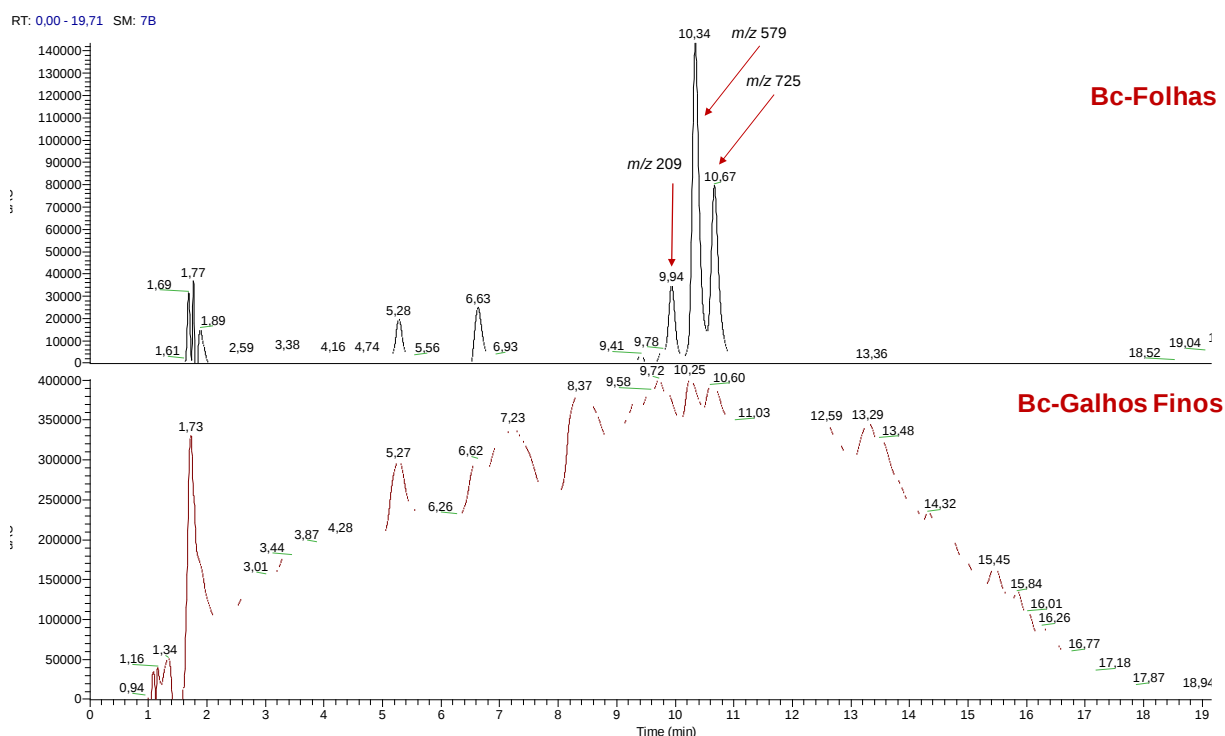


Figura 39. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos de *B. canescens*.

Gradiente de eluição: 20-80% de Metanol/solução aquosa ácida (1% ácido fórmico) em 14 minutos (1 mL/min.). DAD: 200-400 nm. Coluna: C-18 (5 μ , 150 x 4,60 mm).

Tabela 10. Perfil de fragmentação dos íons identificados nos extratos aquosos da espécie *B. canescens* por CLAE-EM/EM.

	Tempo de retenção (TR)	Comprimento de onda máximo (λ max)	m/z (intensidade relativa)	MS [MS ² (intensidade relativa)]
Folhas	9,94	264 e 340	209 (100)	191 (100)
	10,34	264 e 334	579 (100)	287 (25) e 433 (100)
	10,67	264 e 334	725 (100)	287 (25), 433 (100) e 579 (25)

O íon com m/z 209 presente na amostra com T_R 9,94 minutos ao ser submetido a fragmentação teve uma perda de 18 Da gerando o íon com m/z 191 o que supostamente pode caracterizar um ácido orgânico característico com o perfil do ácido mícico (Figura 40) (NUENGCHAMNONG et al., 2011).

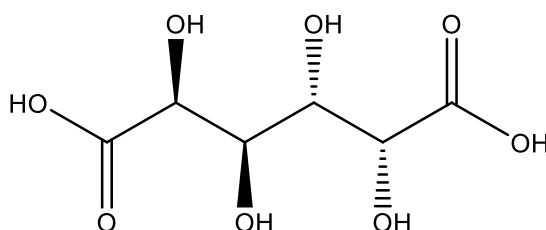


Figura 40. Estrutura do ácido mícico.

Os íons presentes nos picos T_R 5,28 e 6,63 minutos, também observados no extrato aquoso das folhas estavam com baixa intensidade não podendo diferenciá-los dos ruídos do equipamento. Em relação galhos finos, não foi obtido uma boa separação em seus constituintes o que impossibilitou a atribuição dos íons devido aos picos não estarem definidos.

Os cromatogramas de íons totais obtidos pela CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos referente a extração das folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco da espécie *B. multiflora* (Figura 41 e Tabela 11), estão de acordo com os resultados obtidos através das análises do perfil químico por ESI-IT-EM (Figuras 37). Nos extratos das folhas, galhos finos e cascas do tronco com T_R 5,66, 5,60 e 5,57 minutos, respectivamente, foi possível identificar o íon com m/z 353 com perda de 162

Da gerando o íon com m/z 191 o que se assemelha ao composto ácido clorogênico (Figura 42) (MARIA & MOREIRA, 2004).

Nas cascas do tronco também foi possível observar o mesmo íon com m/z 353 com T_R 5,19 minutos o que pode se tratar de um isômero do ácido clorogênico. Para o extrato aquoso obtido dos galhos grossos não foi possível identificar substâncias, devido o cromatograma ter apresentado indícios de uma extração não eficiente.

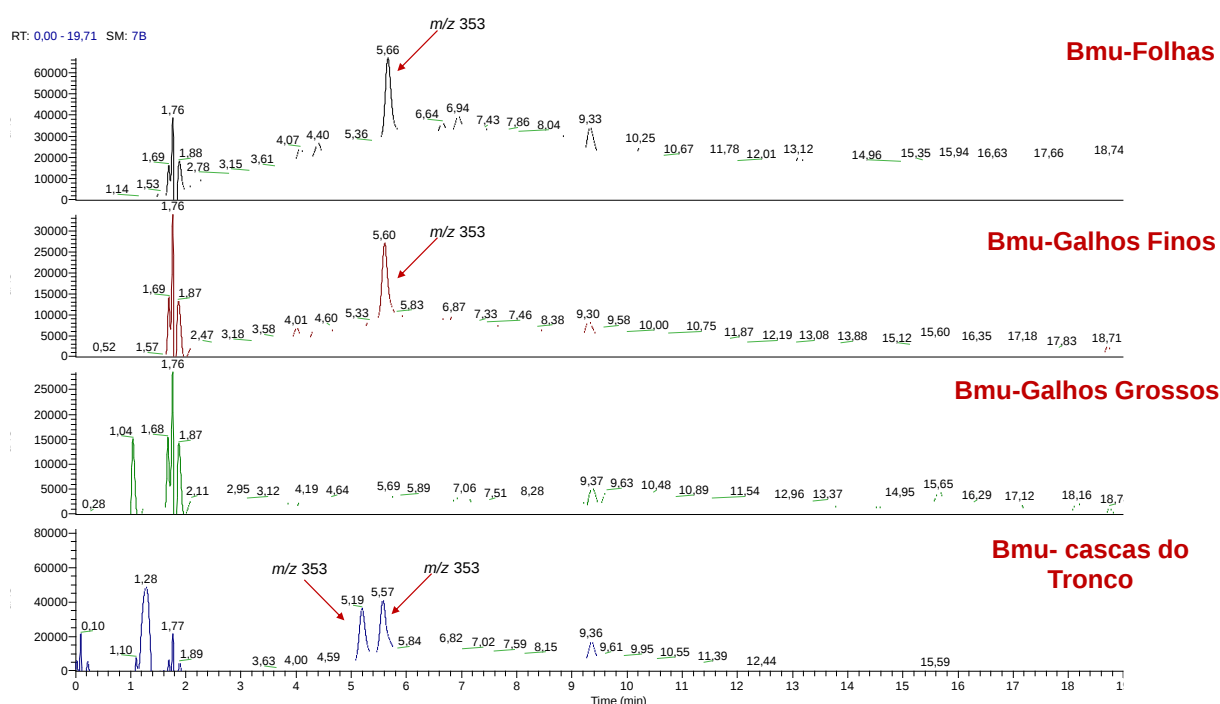


Figura 41. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos de *B. multiflora*.

Gradiente de eluição: 20-80% de Metanol/solução aquosa ácida (1% ácido fórmico) em 14 minutos (1 mL/min.). DAD: 200-400 nm. Coluna: C-18 (5 μ , 150 x 4,60 mm).

Tabela 11. Perfil de fragmentação dos íons identificados nos extratos aquosos da espécie *B. multiflora* por CLAE-EM/EM.

	Tempo de retenção (T_R)	Comprimento de onda máximo (λ max)	m/z (intensidade relativa)	MS [MS^2 (intensidade relativa)]
Folhas	5,66	246 e 324	353 (100)	191 (100)
Galhos Finos	5,60	246 e 324	353 (100)	191 (100)
Cascas do Tronco	5,19	246 e 324	353 (100)	191 (100)
	5,57	246 e 324	353 (100)	191 (100)

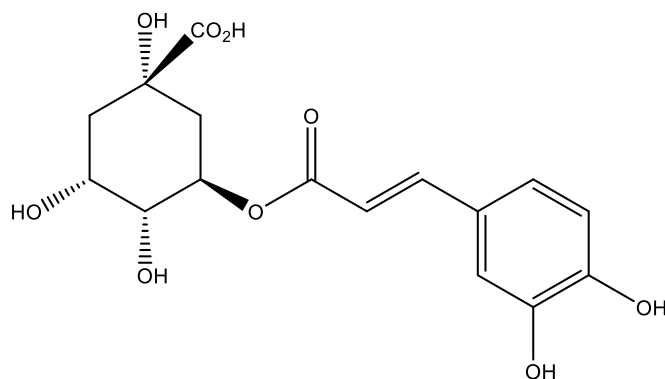


Figura 42. Estrutura do ácido clorogênico.

Os cromatogramas de íons totais obtidos pela CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos referente a extração das folhas e galhos finos da espécie *B. pleiosperma* (Bp) (Figura 43 e Tabela 12), estão de acordo com os resultados obtidos através das análises do perfil químico por ESI-IT-EM (Figura 38).

Nos extratos aquosos referente as folhas e galhos finos de *B. pleiosperma* foram observados picos com T_R de 5,60 e 5,53 minutos, respectivamente. Foi possível identificar o íon com ***m/z* 353** com perda de 162 Da gerando o íon ***m/z* 191** já reportado anteriormente nas folhas galhos finos e cascas do tronco de *B. multiflora* e tentativamente identificado como o ácido clorogênico.

Os íons com T_R 8,68, 8,88 e 9,32 minutos observados no extrato aquoso das folhas, apresentaram perdas semelhantes todas gerando como menor fragmento o íon ***m/z* 311**, o que pode caracterizar moléculas com o mesmo esqueleto principal.

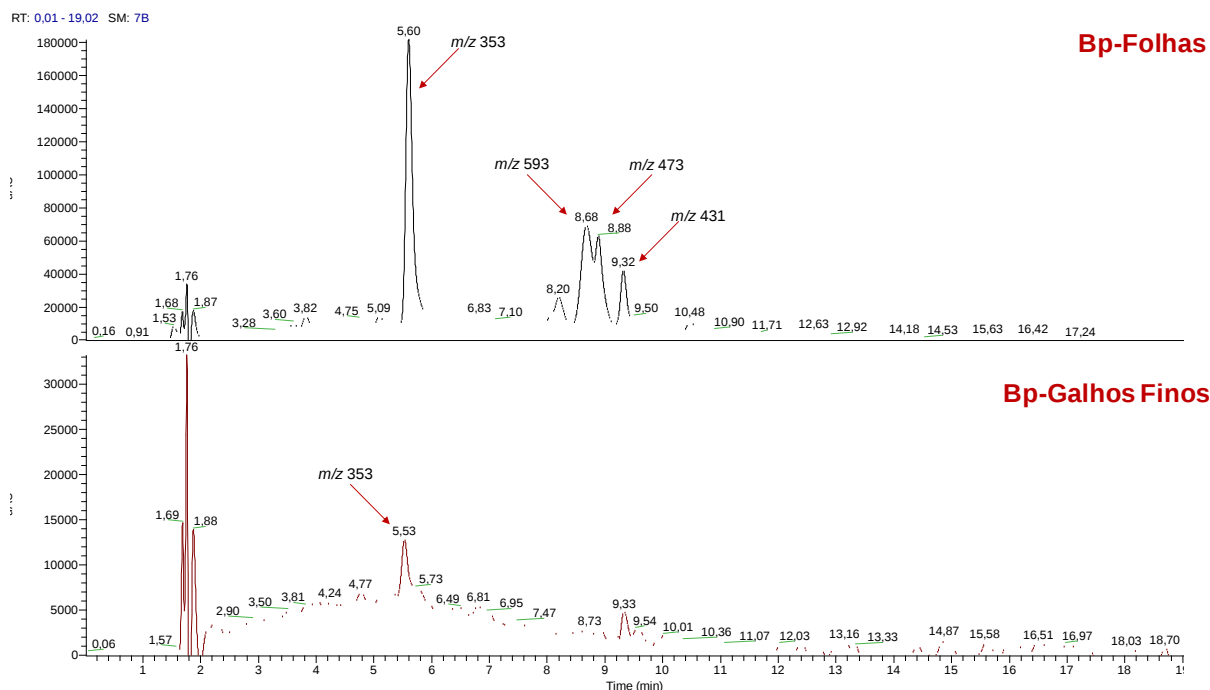


Figura 43. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) dos extratos aquosos de *B. pleiosperma*.

Gradiente de eluição: 20-80% de Metanol/solução aquosa ácida (1% ácido fórmico) em 14 minutos (1 mL/min.). DAD: 200-400 nm. Coluna: C-18 (5 μ , 150 x 4,60 mm).

Tabela 12. Perfil de fragmentação dos íons identificados nos extratos aquosos da espécie *B. pleiosperma* por CLAE-EM/EM.

	Tempo de retenção (T _R)	Comprimento de onda máximo (λ max)	m/z (intensidade relativa)	MS [MS ² (intensidade relativa)]
Folhas	5,60	246 e 324	353 (100)	191 (100)
	8,68	268 e 332	593 (100)	473 (100) e 311 (80)
	8,88	268 e 332	473 (100)	311 (100)
	9,32	268 e 332	431 (100)	311 (100)
Galhos Finos	5,53	246 e 324	353 (100)	191 (100)

5.3.4. Análises por CLAE semi-preparativo do Extrato Aquoso da espécie *B. canescens*.

O extrato aquoso das folhas de *B. canescens* foi submetida às análises em CLAE-UV semi-preparativa (Figura 44), devido ter apresentado melhor resultado em relação a separação, intensidade e pureza dos íons. No cromatograma obtido foi possível observar a presença dos íons de m/z 209, 579 e 725 Da ($[M+H]^+$), nos T_R 14,435, 15,010 e 15,255 minutos, respectivamente. O método em escala semi-preparativa proporcionou uma separação entre as substâncias, resultando em 3 frações, com rendimentos de 3,0 mg, 25 mg e 15 mg, respectivamente. Após o cálculo dos rendimentos as frações foram submetidas a análises de MS^n , na qual obtiveram o mesmo perfil apresentado anteriormente nas análises de CLAE-EM (Tabela 10) e posteriormente, as que tiveram melhor perfil e rendimento foram submetidas a análises de RMN 1D/2D para determinação estrutural.

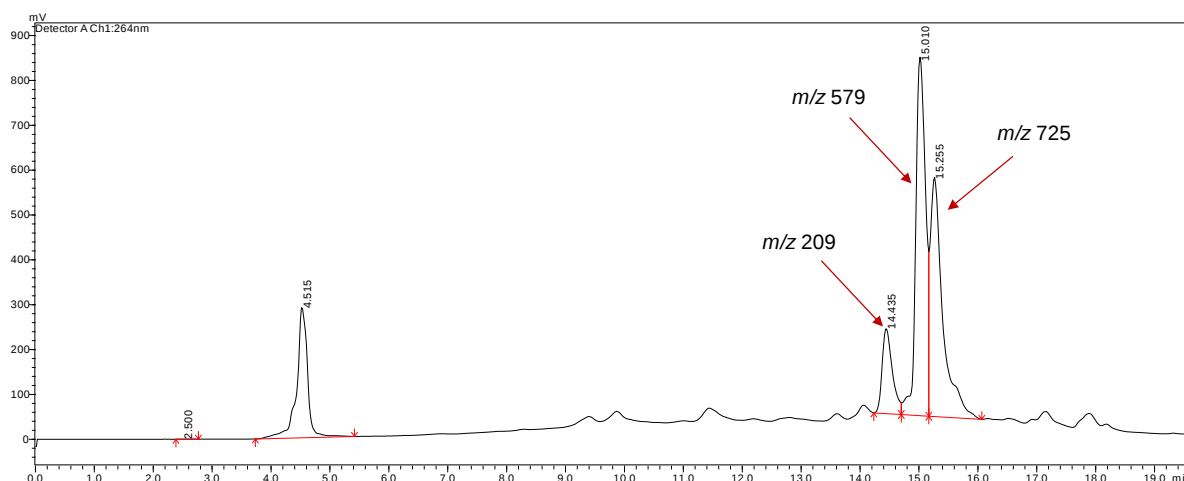


Figura 44. Cromatograma de CLAE-UV do extrato aquosa obtido das folhas de *B. canescens* em escala semi-preparativa.

5.4. Estudo do Perfil Alcaloídico por LS-MS das Espécies *B. canescens* e *B. multiflora*.

Para a espécie *B. canescens* foi selecionado para o estudo o indivíduo de maior porte, codificado como Bc01. O espectro de massas em modo positivo de LS-MS das suas folhas (Figura 45), apresentou os íons de m/z 266, 328, 282, 312 e 342 Da ($[M+H]^+$) com abundância relativa de 100%, 50%, 30%, 35% e 20% respectivamente, característicos de alcaloides protonados. O espectro de MS^n apresentou para o íon de m/z 266 perdas de 17 Da (m/z 266 $\rightarrow$ 249), seguidas por perdas de 30 Da (m/z 249 $\rightarrow$ 219) e 28 Da (m/z 219 $\rightarrow$ 191) (Figura 46), típicas de substâncias aporfínicas contendo uma ponte metilenodioxo no anel A, e ausência de *N*-metila, em acordo com o perfil de fragmentação, onde sugere-se que seja o alcaloide aporfínico anonaina (Figura 46) (STÉVIGNY et al., 2004; SOARES et al., 2015a).

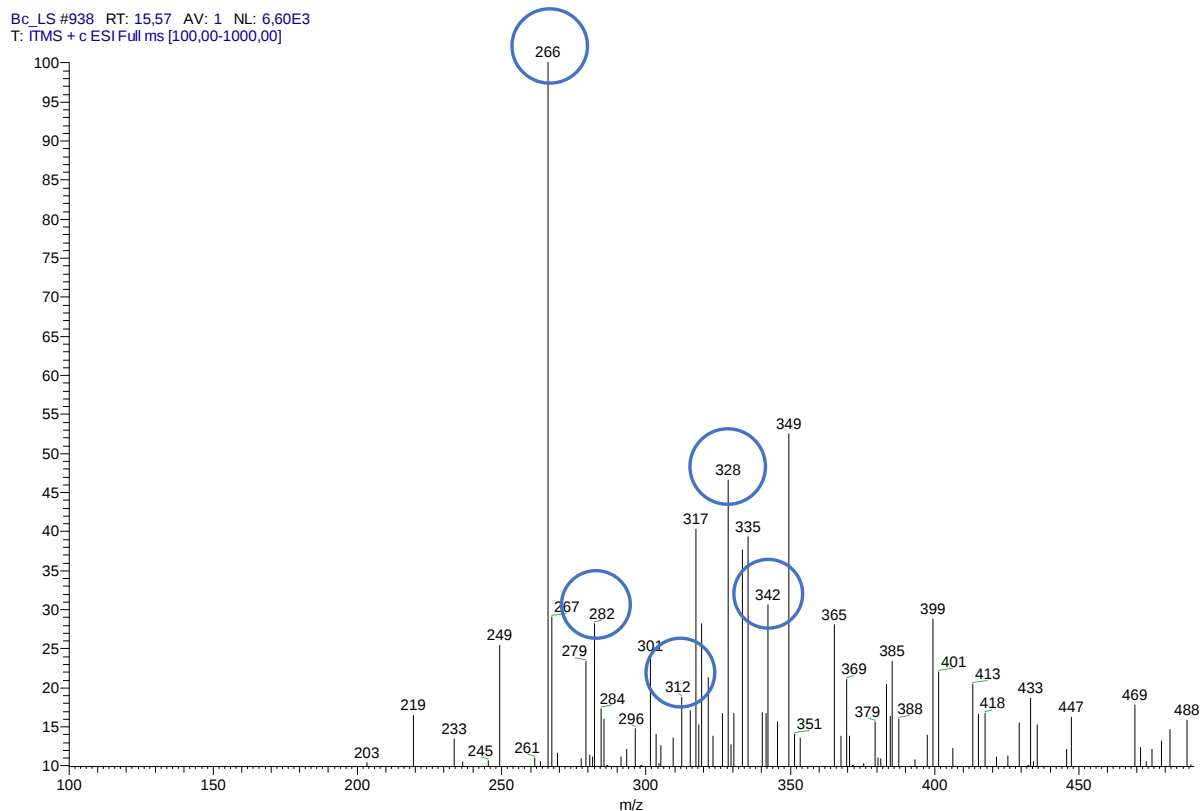


Figura 45. Espectro de massas em modo positivo de LS-MS das folhas (Bc02) de *B. canescens*.

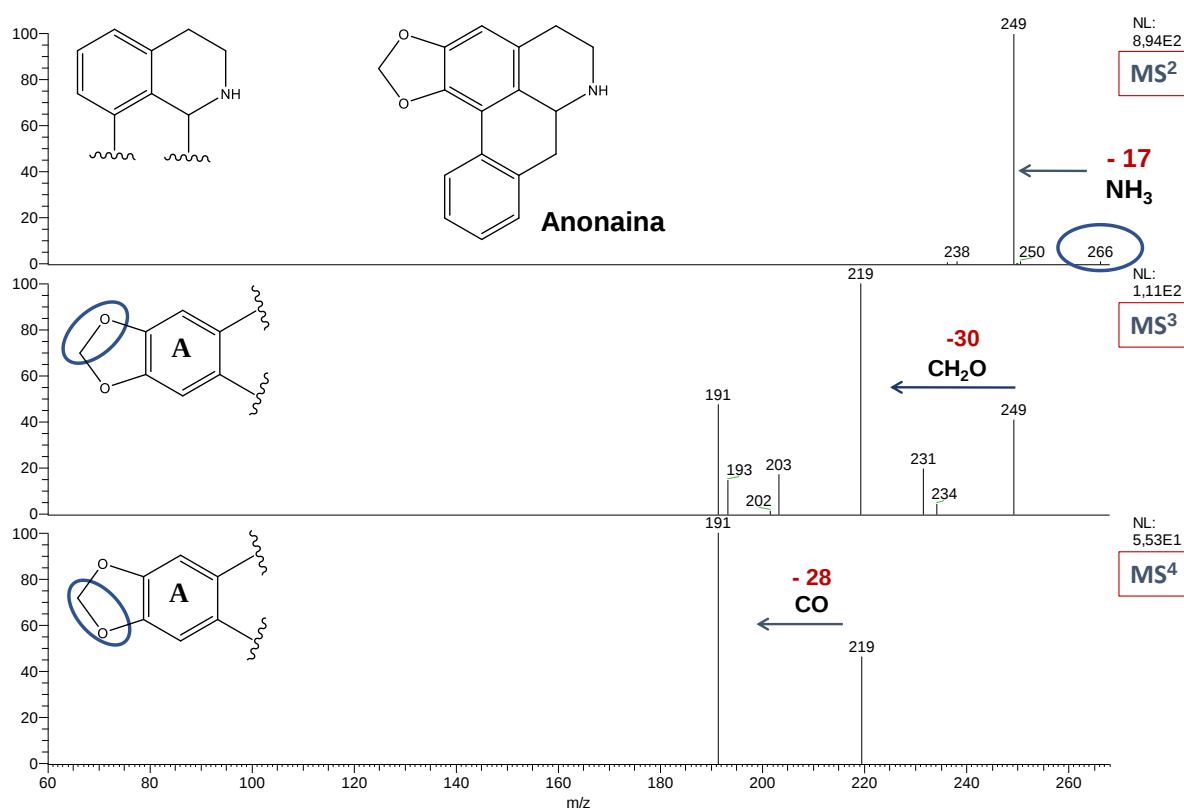


Figura 46. Espectro de massas em MSⁿ do íon de m/z 266 ([M+H]⁺), obtido das folhas de *B. canescens*.

Para o espectro de MS² do íon de m/z 328 foi observado uma perda inicial com massa elevada de 150 Da (m/z 328 → 178), sugerindo se tratar de um alcaloide do tipo tetrahidroprotoberberínico (Figura 47) (SCHMIDT et al., 2005; SOARES et al., 2015a; LIMA et al., 2020). A formação do íon de m/z 178 é o fragmento chave para esse tipo de esqueleto, e está de acordo com o produto formado na reação via retro-Diels-Alder no anel C, onde são observados íons diagnósticos (a, b, c e d) (Figura 48) (CHEN & MACLEAN, 1968). De acordo com esse perfil o alcaloide tetrahidroprotoberberínicos apresenta grupo metoxila e hidroxila no anel A. Tal perfil de fragmentação é similar ao relatado por Lima e colaboradores (2019a) para o alcaloide estefolidina (Figura 47), isolado da espécie *Onychopetalum amazonicum*.

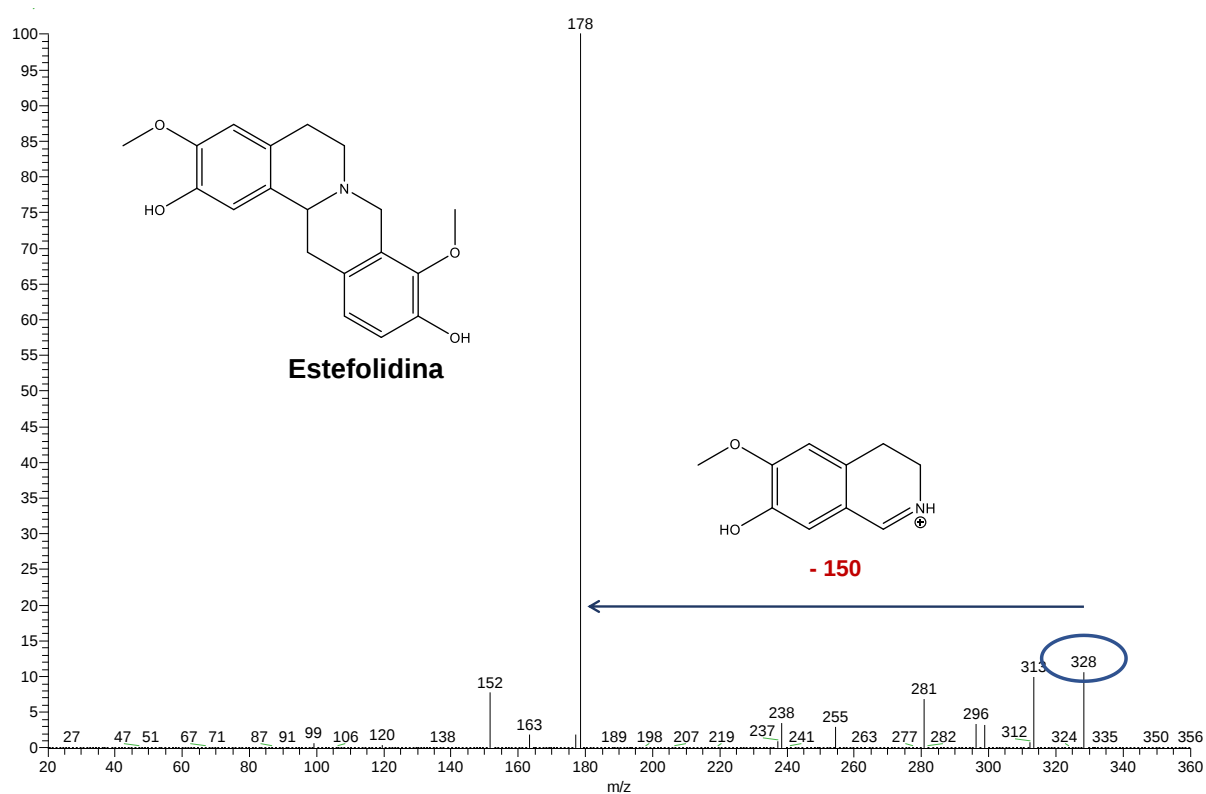


Figura 47. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$), obtido das folhas de *B. canescens*.

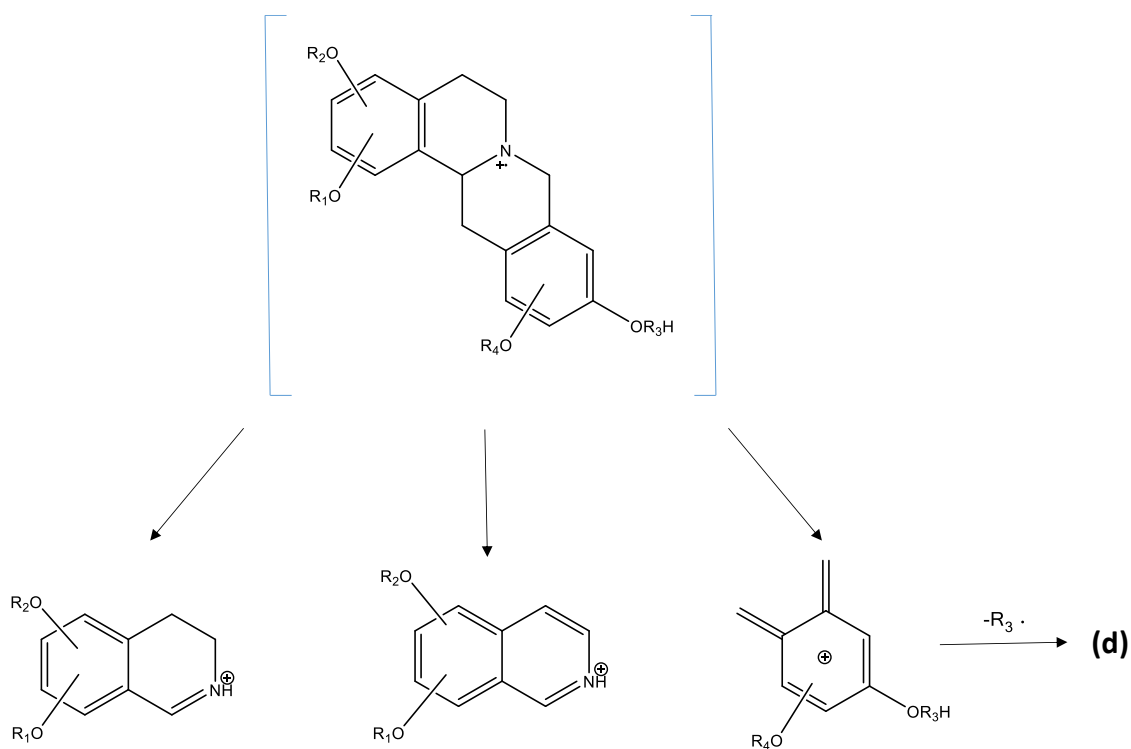


Figura 48. Proposta de fragmentação para os alcaloides tetrahidroprotoberberínicos.
Fonte: Adaptado de CHEN & MACLEAN, 1968.

No espectro de MS² do íon de m/z 312 foi observado uma perda inicial de 15 Da (m/z 312 $\rightarrow$ 297), não reportado anteriormente para alcaloides aporfínicos, perdas de elevada massa (124 e 109 Da, m/z 312 $\rightarrow$ 188 e m/z 297 $\rightarrow$ 188), além de uma perda de 32 Da (m/z 188 $\rightarrow$ 156) (Figura 49).

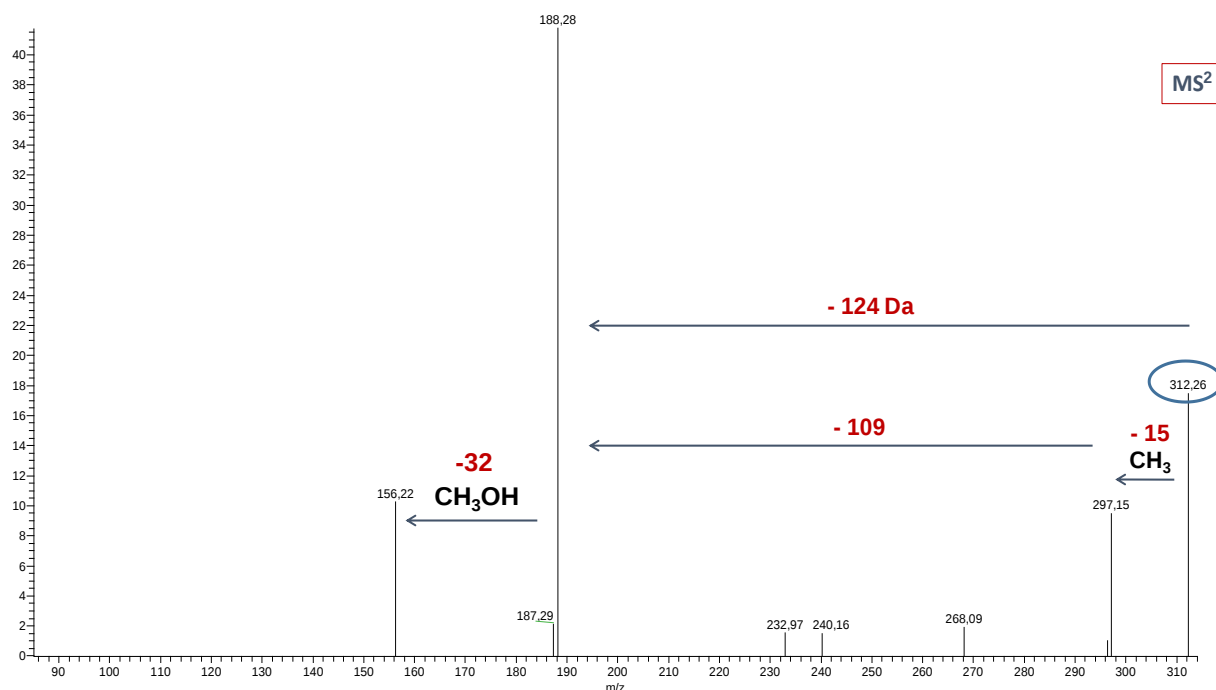


Figura 49. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 312 ([M+H]⁺), obtido das folhas de *B. canescens*.

Para o espectro de MS² do íon *quasi-molecular* de m/z 282 foi observado uma perda inicial de 18 Da (m/z 282 $\rightarrow$ 264) e uma perda de 42 Da (m/z 282 $\rightarrow$ 240) (Figura 50). A presença desses fragmentos nos evidencia a possível presença de dois isômeros com m/z 282, onde a perda de 18 Da é caracterizada como uma perda incomum para esqueletos do tipo aporfínicos, evidenciando presença de hidroxila na molécula, essa perda já foi relatada para o alcaloide norushinsunina (Figura 50). Para a segunda perda de 42 Da pode-se sugerir a presença do fragmento CH₃CHN na estrutura (STÉVIGNY et al., 2004, SILVA et al., 2012, SOARES et al., 2015a).

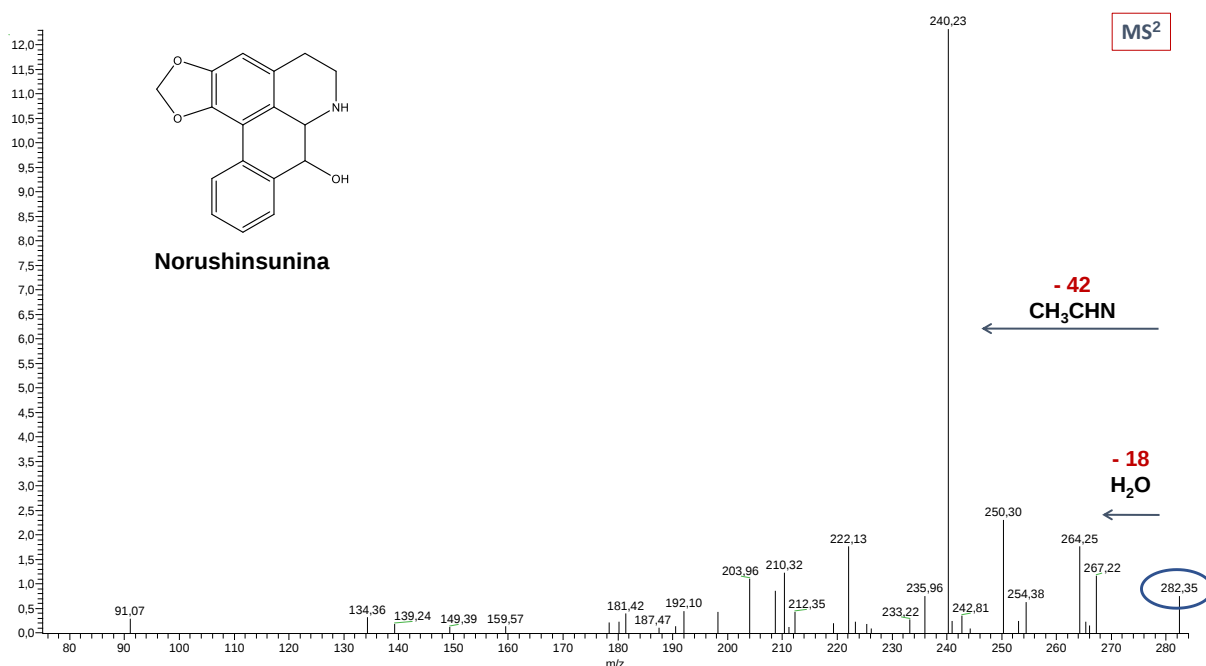


Figura 50. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 282 ($[M+H]^+$), obtido das folhas de *B. canescens*.

O íon *quasi-molecular* de m/z 342 apresentou uma perda inicial de 31 Da (m/z 342 $\rightarrow$ 311), seguida de perdas de 15 e 31 Da (m/z 311 $\rightarrow$ 296 e m/z 311 $\rightarrow$ 280) e perdas sequenciais de 15 e 28 Da (m/z 296 $\rightarrow$ 281 $\rightarrow$ 253) (Figura 51). Portanto, foi sugerido tratar-se de uma substância com uma *N*-metila e metoxilas adjacentes no anel A, encontradas em estruturas aporfínicas do alcaloide *N*-metil-laurotetanina (LEBOEUF et al., 1982c; SOARES, 2014).

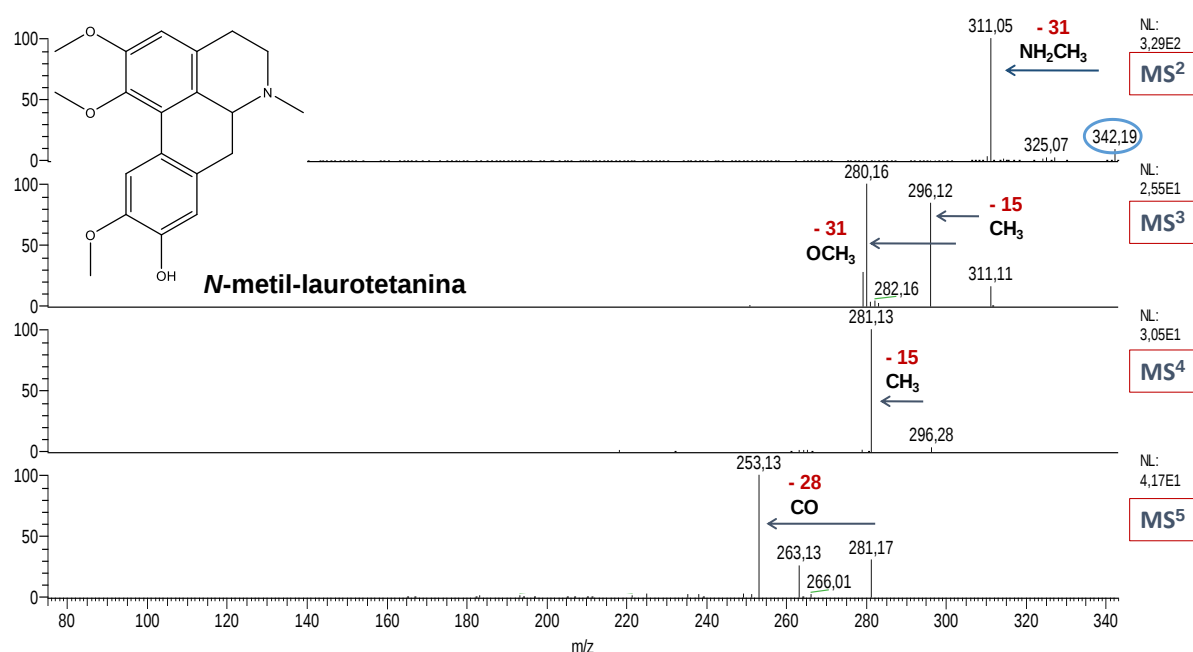


Figura 51. Espectro de massas em MS⁵ do íon de m/z 342 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), obtido das folhas de *B. canescens*.

O espectro de massas em modo positivo de LS-MS das folhas de *B. multiflora* (Figura 52) apresentou os íons de m/z 266, 328 e 342 Da ($[\text{M}+\text{H}]^+$) com abundância relativa de 100%, 73% e 55% respectivamente. O espectro de MS² apresentou para o íon de m/z 266 perdas de 17 Da (m/z 266 $\rightarrow$ 249), seguidas por perdas de 30 Da (m/z 249 $\rightarrow$ 219) e 28 Da (m/z 219 $\rightarrow$ 191) (Figura 46), estas perdas são semelhantes as apresentadas para o alcaloide anonaina também observado na espécie *B. canescens* anteriormente (Figura 46).

Bmu_LS #851 RT: 16,48 AV: 1 NL: 2,05E3
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

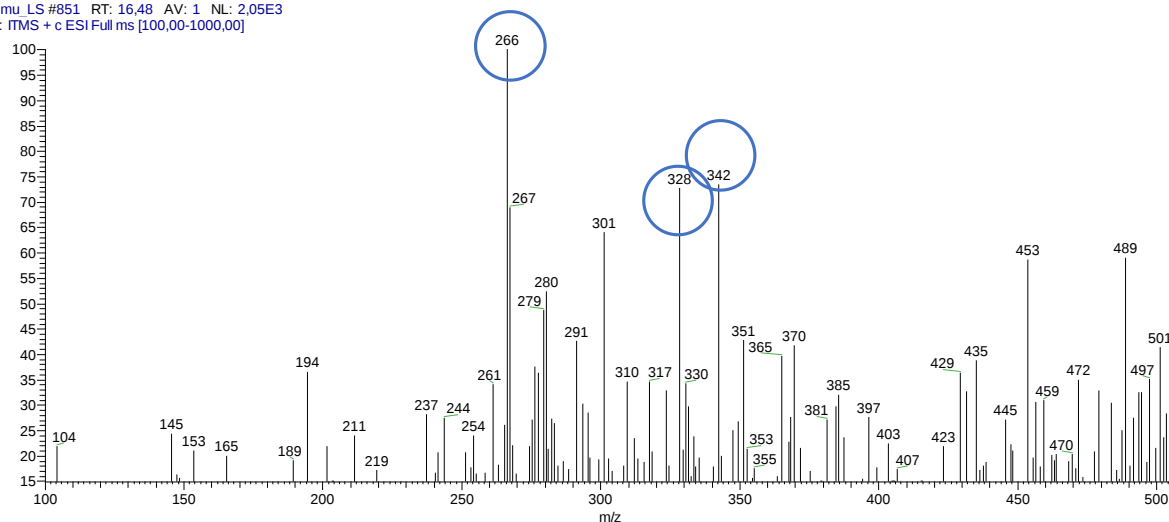


Figura 52. Espectro de massas em modo positivo de LS-MS das folhas de *B. multiflora*.

Para o espectro de MS² do íon de m/z 328 o mesmo apresentou uma perda inicial de 150 Da (m/z 328 $\rightarrow$ 178) (Figura 53), sugerindo se tratar de um alcaloide tetrahidroprotoberberínico estefolidina, observado também na espécie *B. canescens* (Figura 47).

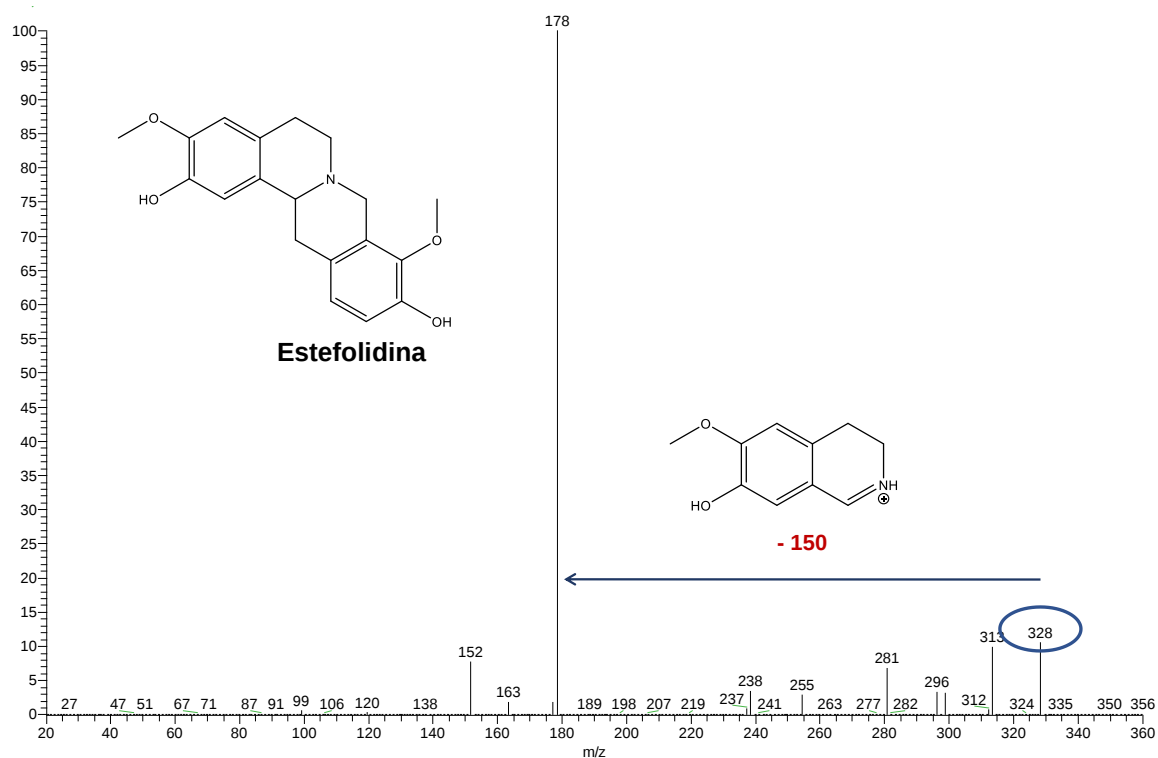


Figura 53. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$), obtido das folhas de *B. multiflora*.

O íon de m/z 342 quando submetido à análise de fragmentação, evidenciou perdas sequenciais de 16 Da (m/z 342 $\rightarrow$ 326), 31 Da (m/z 342 $\rightarrow$ 311), 31 Da (m/z 311 $\rightarrow$ 280) (Figura 54), sugerindo uma estrutura aporfínica contendo uma *N*-metila e metoxila adjacente no anel A, o mesmo perfil de fragmentação foi relatado por Soares (2014) para o alcaloide *N*-metil-laurotetanina (Figura 54), isolado da espécie *Bocageopsis pleiosperma* (SOARES et al., 2015a). E anteriormente relatado para a espécie *B. canescens* (Figuras 51).

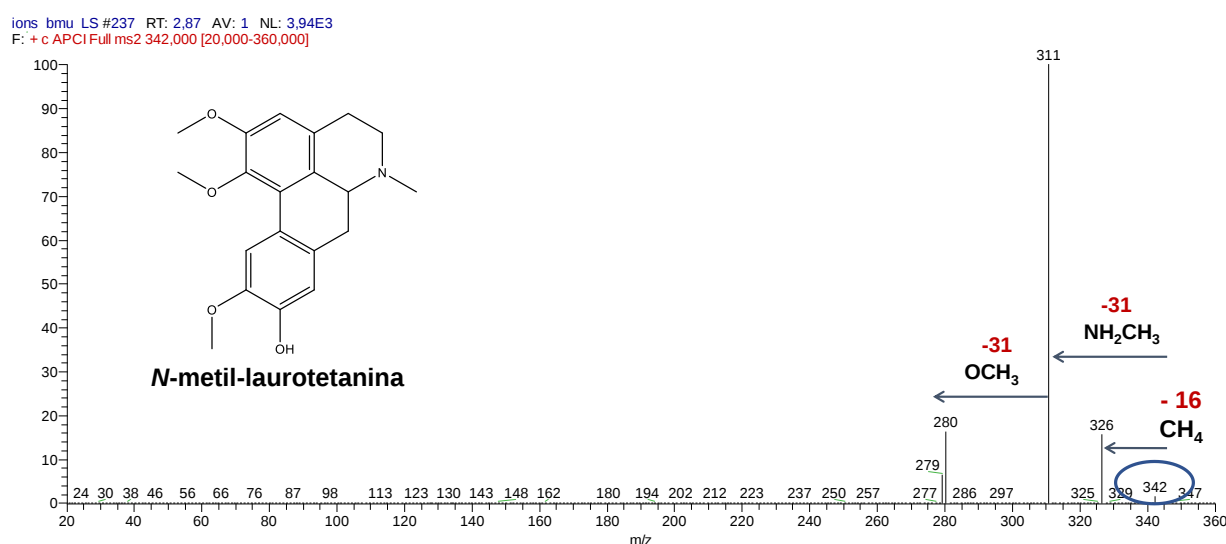


Figura 54. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 342 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), obtido das folhas de *B. multiflora*.

Essas análises preliminares são importantes para observar o perfil *in vivo* do material vegetal a ser estudado. Entretanto, é importante ressaltar que a análise direta desse material vegetal pode ser comprometida pelo efeito da matriz, dificultando o reconhecimento dos isômeros e compostos minoritários, tornando necessária análises posteriores por técnicas como CLAE-EM ou CLAE-EM/EM (LIN et al., 2010).

5.5. Análises por ESI-IT-MSⁿ das frações obtidas em pequena escala das espécies de *Bocageopsis*.

5.5.1. Análises espectrométricas das frações alcaloídicas das folhas, galhos finos e cascas do tronco da espécie de *B. canescens* (Bc01).

Comparando os espectros de íons totais das frações alcaloídicas das folhas, galhos finos e cascas do tronco da espécie *B. canescens* (Bc01) obtidas em pequena escala (Figura 55), foi possível observar diversos íons com m/z par, indicando possíveis alcaloides. Destacou-se por sua intensidade e repetibilidade, nas três frações alcaloídicas, os íons de m/z 342, 328, 298 e 266 Da ($[M+H]^+$). Estes foram submetidos ao processo de fragmentação em sequência (*tandem* ou MSⁿ).

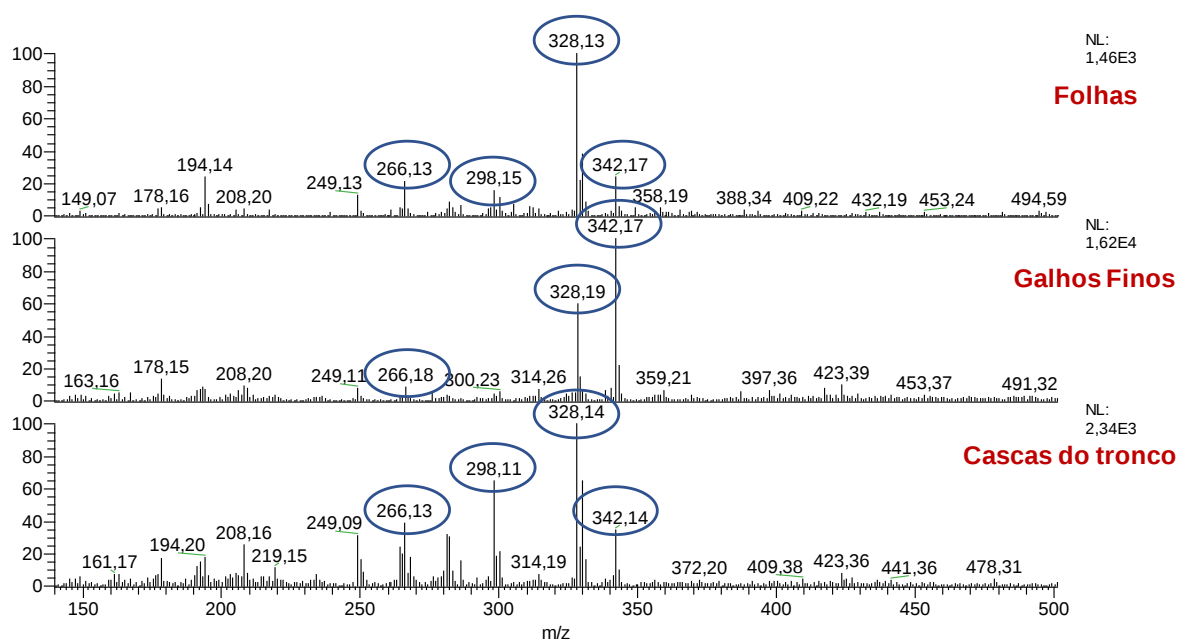


Figura 55. Espectro de massas das frações alcaloides das folhas, galhos finos e cascas de *B. canescens* (Bc01).

Analisando o espectro de MSⁿ do íon de m/z 342 (Figura 56) das frações alcaloídicas das folhas, galhos finos e cascas do tronco, observa-se uma diferença no perfil de fragmentação. Na fração alcaloídica das folhas o perfil apresenta perdas sequenciais de 31 Da (m/z 342 $\rightarrow$ 311), 15 Da (m/z 311 $\rightarrow$ 296), 31 Da (m/z 311 $\rightarrow$ 280), 15 Da (m/z 296 $\rightarrow$ 281) e 28 Da (m/z 281 $\rightarrow$ 253), o que sugere a presença de uma *N*-metila e metoxilas. Estas metoxilas estão presentes no anel A de uma estrutura

aporfínica, sugerindo tratar-se do alcaloide *N*-metil-laurotetanina (Figura 56) (LEBOEUF et al., 1982c; SOARES, 2014).

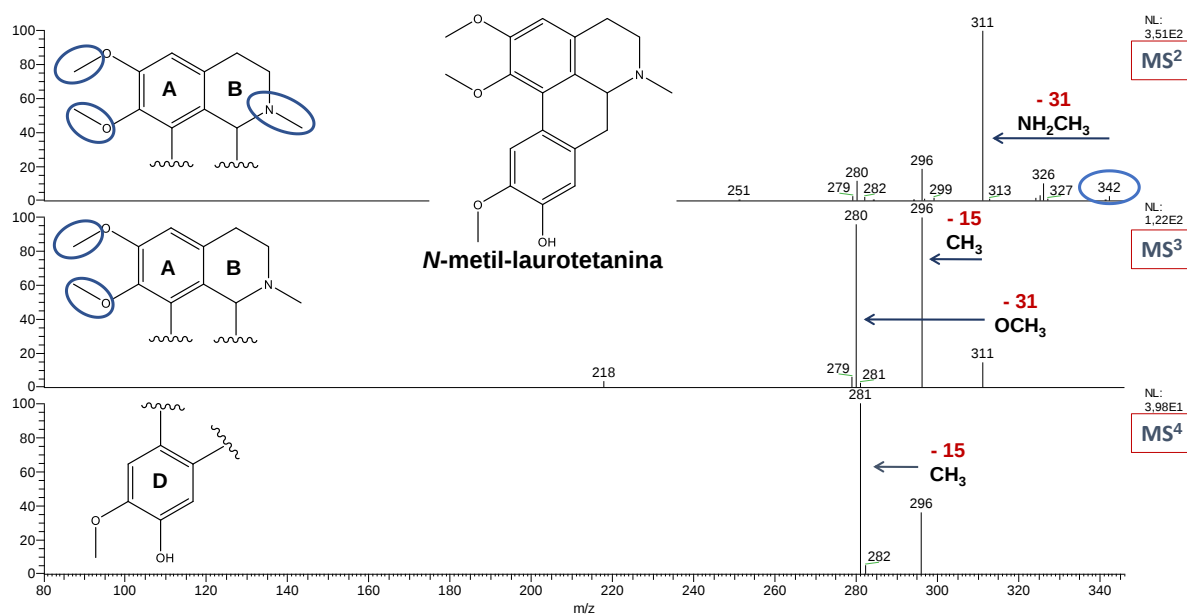


Figura 56. Espectro de massas em MS^n do íon de m/z 342 ($[M+H]^+$).

As frações alcaloídicas dos galhos finos e cascas do tronco apresentaram para o íon de m/z 342, um padrão de fragmentação diferente do íon detectado nas folhas, com perda inicial de 164 Da, m/z 342 $\rightarrow$ 178 (Figura 57), comuns em alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos, que apresentam perdas elevadas de massa durante o processo de fragmentação (Figura 47 e 48). Perdas semelhantes já foram relatadas por Lima e colaboradores (2019a) para o alcaloide tetrahidroprotoberberínico isocoripalmina (Figura 55).

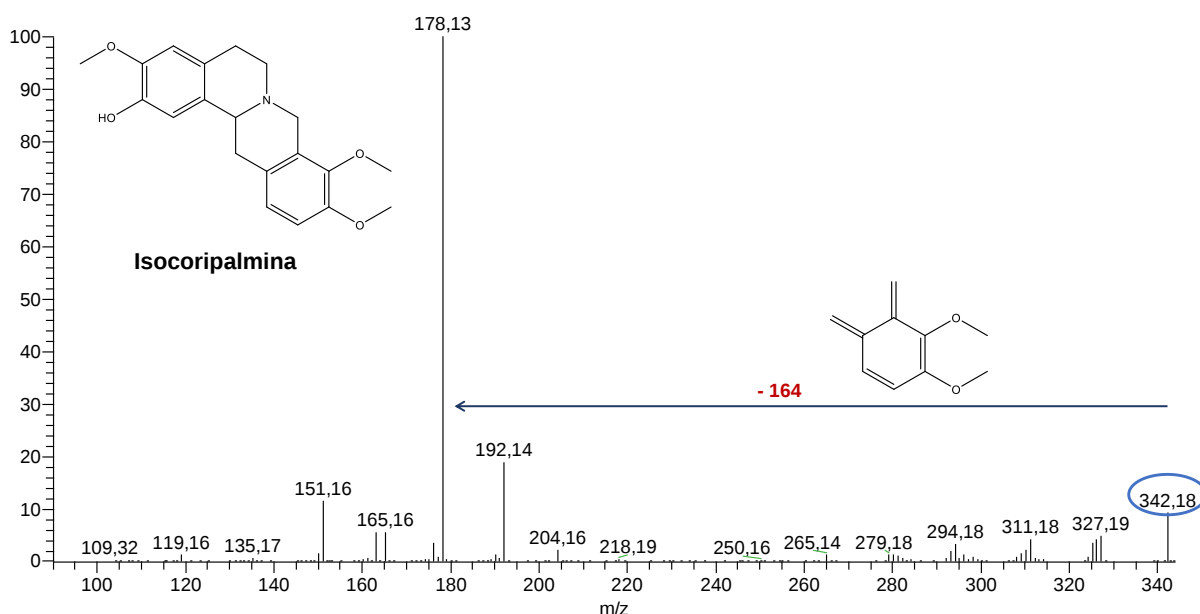


Figura 57. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 342 ($[M+H]^+$).

Analizando o espectro de MSⁿ do íon de m/z 328 (Figura 58) para a fração alcaloídica das folhas, observa-se uma perda inicial de 17 Da (m/z 328 → 311), além de uma perda de 31 Da (m/z 328 → 297), seguida de 32 Da (m/z 297 → 265) (estruturas aporfínicas não *N*-metiladas e *N*-metiladas) e uma perda de elevada massa, gerando o íon de m/z 178 (150 Da), anteriormente observado em alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos (Figura 48). Neste caso, constata-se que na fração alcaloídica para o íon com m/z 328, existam pelo menos 3 substâncias, sendo elas: dois alcaloides aporfínicos contendo ou não uma *N*-metila e uma acrescida de hidroxila adjacente à uma metoxila, junto a um alcaloide do tipo tetrahidroprotoberberínico como já relatado por Soares (2014) para a espécie *B. pleiosperma*.

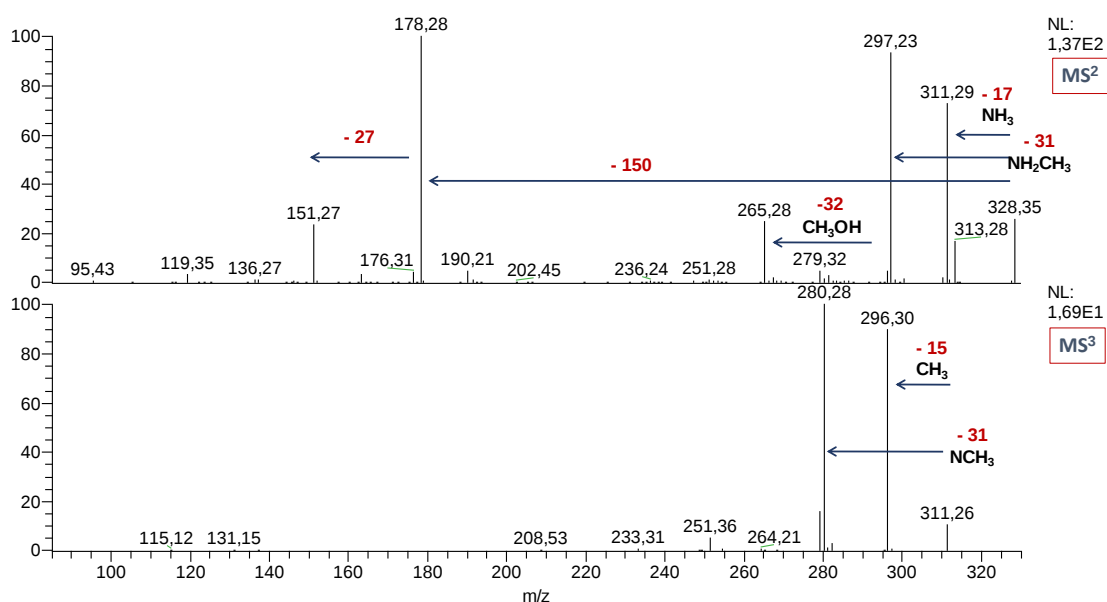


Figura 58. Espectro de massas em MSⁿ do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$).

Para a fração alcaloídica dos galhos finos e cascas do tronco foi observado o mesmo padrão de fragmentação para o íon de m/z 328 (Figura 59), observado para alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos, o qual tem uma perda elevada de massa gerando o íon de m/z 178 (Figura 47 e 48), sendo possível sugerir se tratar do alcaloide estefolidina.

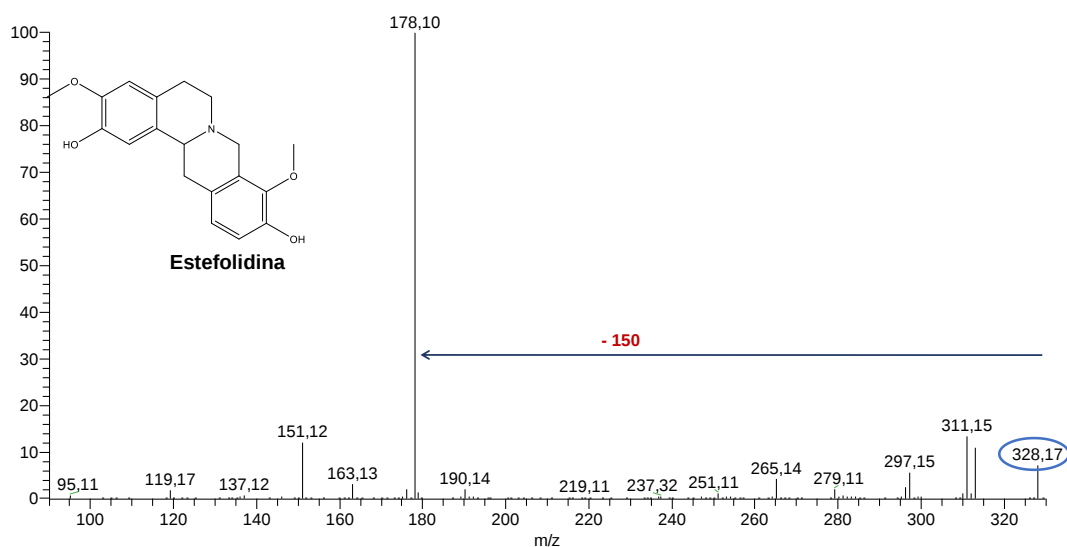


Figura 59. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$), para alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos.

No espectro de MSⁿ do íon de m/z 298 (Figura 60) presente nas frações alcaloídicas das folhas e cascas do tronco de Bc01, foram observadas perdas sequenciais de 17 Da (m/z 298 $\rightarrow$ 281), 15 Da (m/z 281 $\rightarrow$ 266), 31 Da (m/z 281 $\rightarrow$ 250) e 15 Da (m/z 266 $\rightarrow$ 251), sugerindo a presença de hidrogênio ligado ao nitrogênio (N-H) e metoxilas adjacentes ao anel A. Este tipo de fragmentação está de acordo com a proposta por Soares e colaboradores (2015a) para o alcaloide proaporfínico estefarina (Figura 61).

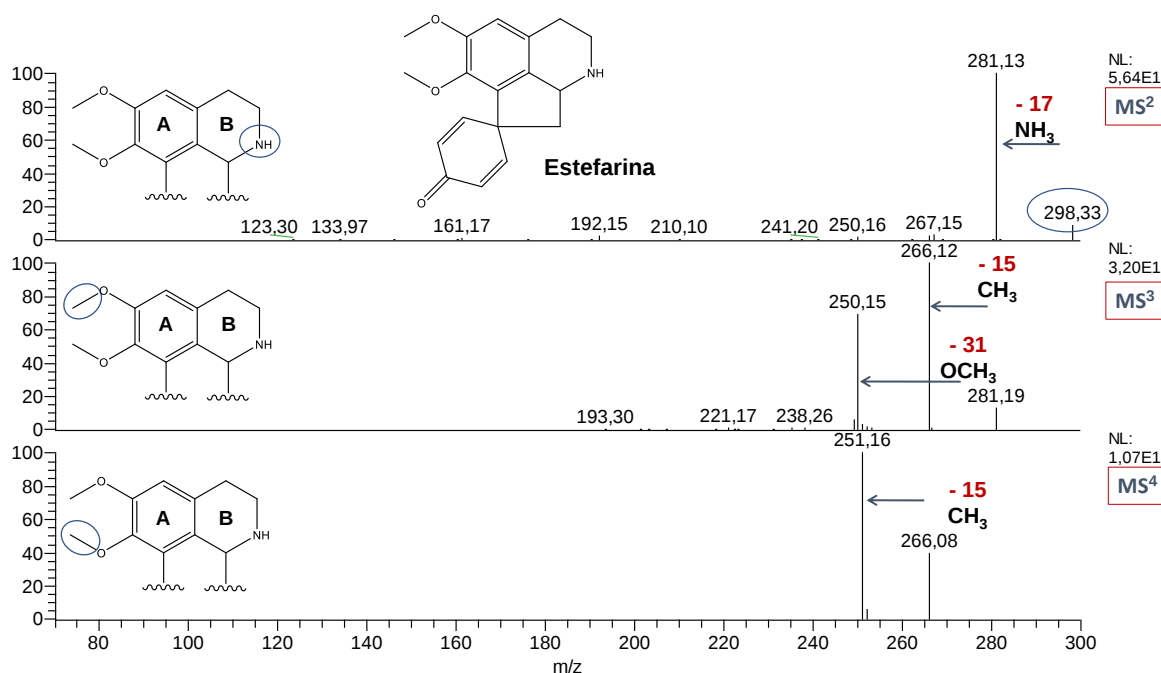


Figura 60. Espectro de massas em MSⁿ do íon de m/z 298 ([M+H]⁺).

Para as três frações alcaloídicas (folhas, galhos finos e cascas do tronco) submetidas a análises de MSⁿ, foi observado para o íon de m/z 266 perdas de 17 Da (m/z 266 $\rightarrow$ 249), seguidas por perdas de 30 Da (m/z 249 $\rightarrow$ 219) e 28 Da (m/z 219 $\rightarrow$ 191) (Figura 61). Essas perdas estão de acordo com as propostas por Soares (2014), e sugere tratar-se da substância aporfínica anonaina que possui uma ponte metilenodioxio no anel A, e ausência de N-metila (Figura 61).

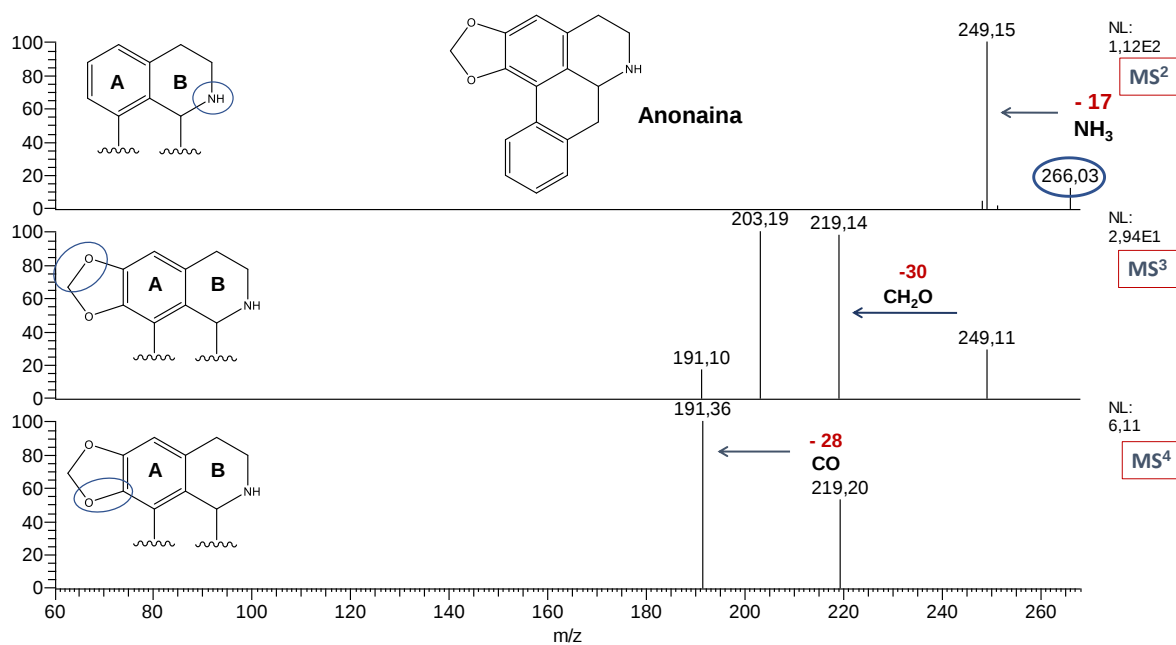


Figura 61. Espectro de massas em MS^n do íon de m/z 266 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

5.5.2. Análises espectrométricas das frações alcaloídicas das folhas, galhos finos, galhos grossos e cascas do tronco das espécies de *B. multiflora*.

Comparando os espectros de íons totais (Figura 62) das frações alcaloídicas obtidas em pequena escala das folhas, galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora* foi possível observar os íons m/z 330, 328, 324, 300, 298, 292, 282, 264, 268 e 266 Da ($[M+H]^+$) com m/z par, o que seria o indicativo de possíveis alcaloides. Os íons mais frequentes nas quatro frações foram submetidos ao processo de fragmentação em sequência (*tandem* ou MS^n).

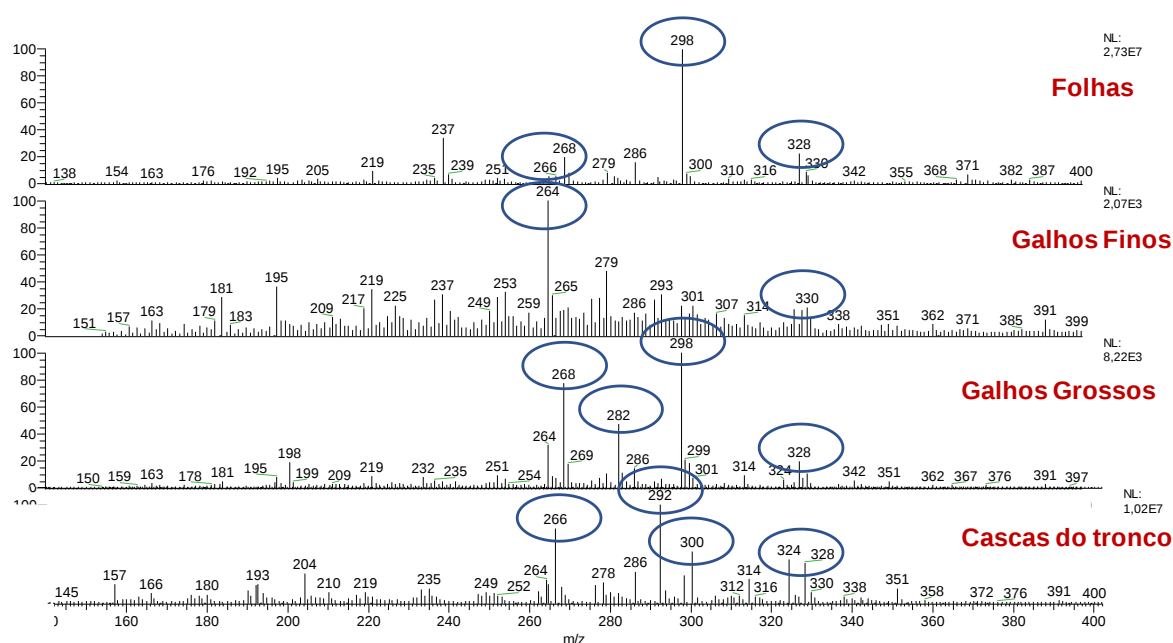


Figura 62. Espectro de massas das frações alcaloides das folhas, galhos finos e cascas de *B. multiflora*.

Fazendo a comparação dos espectros de MS^n dos íons de m/z 298 das frações alcaloídicas das folhas e dos galhos grossos, observa-se que ambos possuem uma perda inicial de 17 Da (m/z 298 $\rightarrow$ 281), 15 Da (m/z 281 $\rightarrow$ 266), além de uma perda de 31 Da (m/z 281 $\rightarrow$ 250) nas folhas (Figura 63). Tal perfil é coerente com alcaloides de natureza aporfínica, que possuem hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio no anel B, como foi observado anteriormente nas frações das folhas e cascas do tronco

de *B. canescens* para o alcaloide proaporfínico estefarina (Figura 61) (SOARES et al., 2015a).

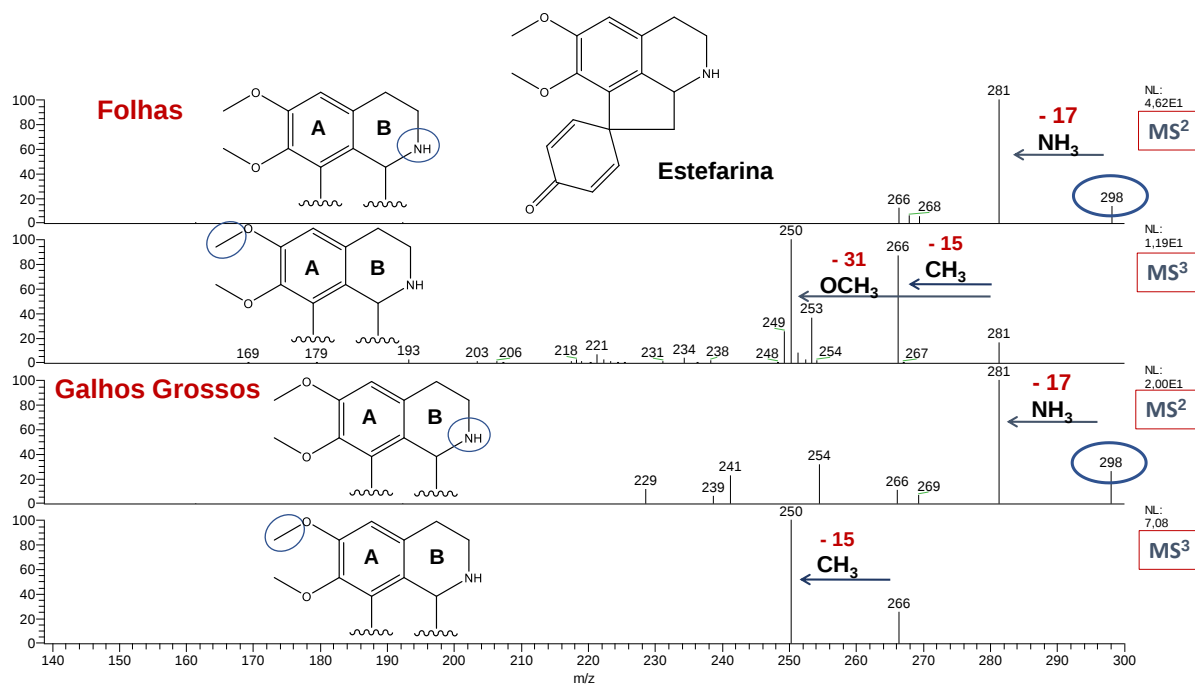


Figura 63. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 298 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Analisando o espectro de MSⁿ do íon de m/z 328 das frações alcaloídicas das folhas, galhos grossos e cascas do tronco (Figura 64), observou-se perdas de 150 Da (m/z 328 $\rightarrow$ 178), anteriormente observado nas análises de LS-MS das frações alcaloídicas das folhas de *B. canescens* (Figura 47) e *B. multiflora* (Figura 53), relacionando a alcaloides do tipo tetrahidroprotoberberínicos (Figura 48), análogo à estefolidina.

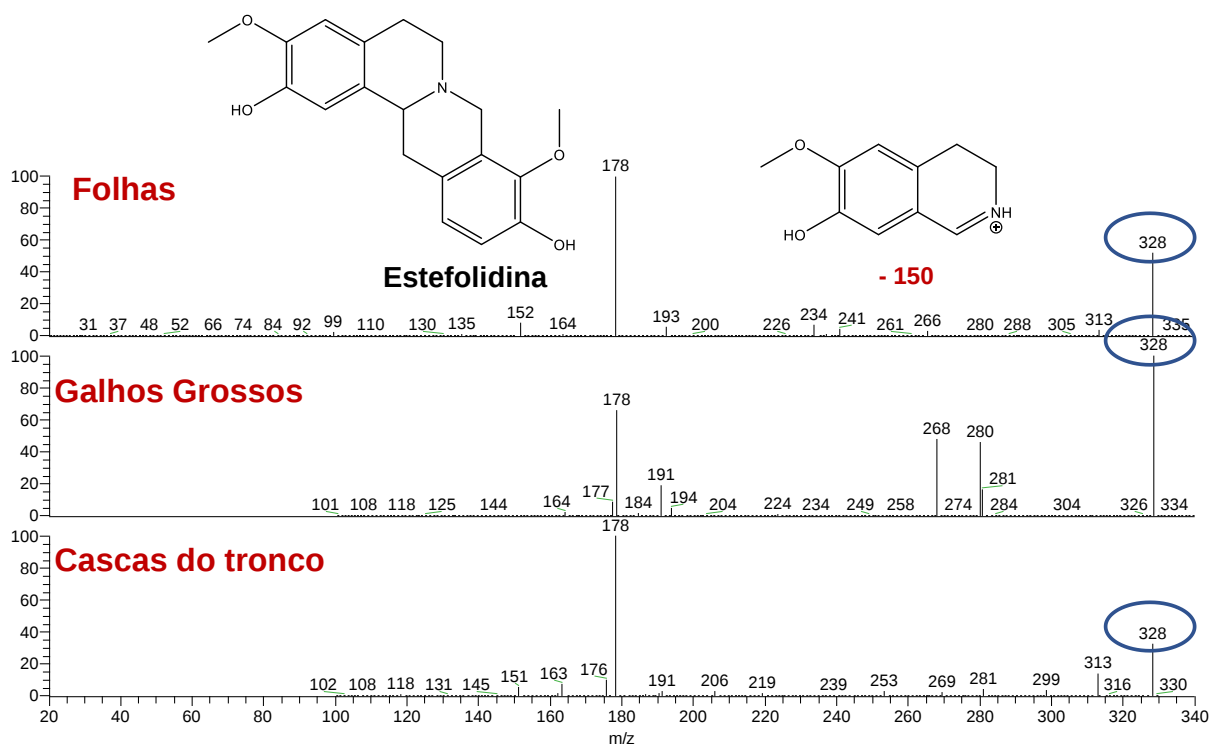


Figura 64. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$).

Ao analisar os espectros de MS² referente o íon de m/z 268 (Figura 65) das frações alcaloídicas das folhas e galhos grossos, foi observado o mesmo padrão de fragmentação para alcaloides do tipo aporfinicos, a qual tem uma perda inicial de 17 Da (m/z 268 $\rightarrow$ 251), seguida de perda de 32 Da (m/z 251 $\rightarrow$ 219). Tais estudos de fragmentação apontam que essas perdas estão associadas ao hidrogênio ligado diretamente ao nitrogênio do anel B e a presença de uma metoxila no anel A, sugerindo tratar-se do alcaloide assimilobina (Figura 65) (SILVA et al., 2012; SOARES et al., 2015a; SILVA et al., 2016a; LIMA et al., 2020).

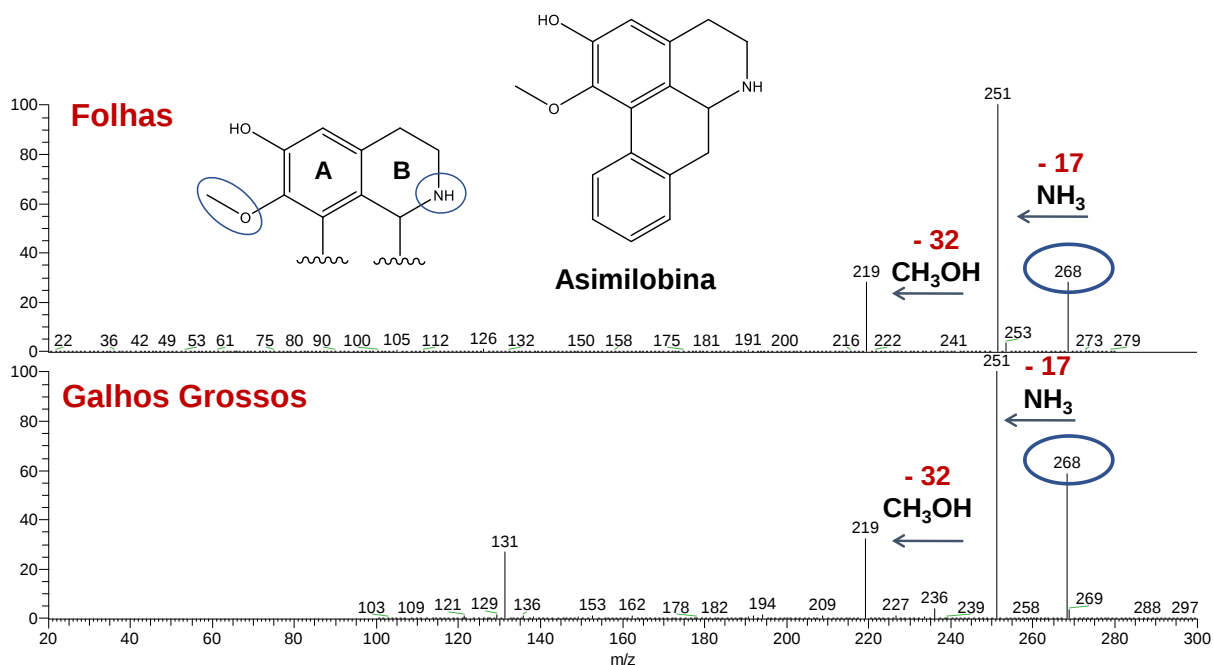


Figura 65. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 268 ($[M+H]^+$).

O espectro de MS^3 referente o íon de m/z 266 (Figura 66), observado na fração alcaloídica das cascas do tronco, apresentou um padrão de fragmentação (m/z 266 $\rightarrow$ 249 $\rightarrow$ 219) característico do alcaloide aporfínico anonaina destacado anteriormente nas análises por LS-MS nas folhas (Figura 46) e por ESI-IT-EMⁿ das folhas, galhos finos e cascas do tronco (Figura 61) nas frações alcaloídicas da espécie *B. canescens*.

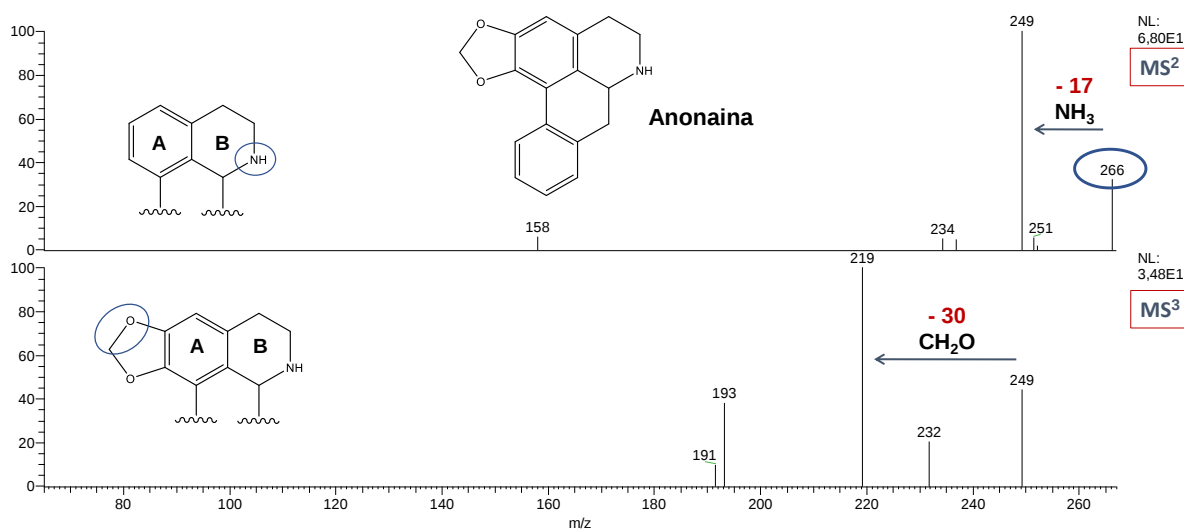


Figura 66. Espectro de massas em MS^3 do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).

5.6. Análises por CLAE-EM/EM das frações alcaloídicas obtidas em pequena escala e maior escala das espécies de *Bocageopsis*.

5.6.1. Análises por CLAE-EM/EM da espécie *B. canescens* (Bc01).

Os cromatogramas de íons totais obtidos pela CLAE-EM/EM (TIC) das frações alcaloídicas referente a extração em maior escala das folhas, galhos finos e em pequena escala das cascas do tronco da espécie *B. canescens* (Bc01) (Figura 68 e Tabela 13), estão de acordo com os resultados obtidos através das análises de LS-MS e o perfil químico observado na extração em pequena escala por ESI-IT-EMⁿ (Figuras 45 e 55), contudo apresentando algumas diferenças, certamente também devidas às diferenças de matrizes.

Ao analisar os cromatogramas e os espectros de massas das frações foi possível destacar como o componente mais abundante o íon de ***m/z* 266** com tempos de retenção (*T_R*) de 9,89 minutos (folhas), 9,77 minutos (galhos finos) e 9,89 minutos (cascas do tronco), sendo que esse apresentou um perfil de fragmentação (***m/z* 266 → 249**) com perda de -17 Da que está de acordo com o alcaloide aporfínico não *N*-metilado anonaina (Figura 67), amplamente descrito em espécies da família Annonaceae (STÉVIGNY et al., 2004; SILVA et al., 2016a; SOARES et al., 2015a; RINALDI et al., 2017; SANTOS et al., 2018; LIMA et al., 2020), já descrito anteriormente nas análises da fração alcaloídica em pequena escala (Figura 61) e nas análises de LS-MS (Figura 46).

Também vale destacar os outros íons mais abundantes: O íon ***m/z* 328** com *T_R* de 5,71 e 7,41 minutos (folhas), 5,05 minutos (galhos finos) e 5,06 (cascas do tronco). No *T_R* 5,71 minutos foi observado perda inicial de 31 Da, seguida de perda de 32 Da (***m/z* 328 → 297 → 265**) típica de alcaloides aporfinicos *N*-metilados (STÉVIGNY et al., 2004) e condizente com o alcaloide isoboldina (Figura 67), descrito anteriormente em *B. pleiosperma* (SOARES et al., 2015a).

A análise do pico com T_R 7,41 minutos indicou um alcaloide com esqueleto aporfínico não *N*-metilado apresentando um padrão de fragmentação com perda inicial de 17 Da, seguida de perdas de 15 Da (m/z 328 $\rightarrow$ 311 $\rightarrow$ 296 $\rightarrow$ 281), cuja sequência de fragmentação está de acordo com o alcaloide laurotetatina (Figura 67) (SOARES et al., 2015a).

O íon m/z 328, eluindo nos T_R 5,05 minutos (galhos finos) e 5,06 minutos (galhos grossos), apresentou perfil de fragmentação, respectivamente, característico de alcaloides com esqueleto tetrahidroprotoberberínico e aporfínico *N*-metilado, o que indica que nesse pico existe uma mistura de duas substâncias isoméricas. Para o esqueleto do alcaloide tetrahidroprotoberberínico é observado um padrão de fragmentação que resulta em uma perda de elevada massa gerando um íon de m/z 178 (m/z 328 $\rightarrow$ 178). O íon de m/z 178 gerado é descrito como fragmento chave para compostos tetrahidroprotoberberínicos que possuem metoxilas e grupos hidroxilas adjacentes no anel A (STÉVIGNY et al., 2004; SOARES et al., 2015a; SILVA et al., 2016a; LIMA et al., 2020). E a substância *N*-metilada apresentou perdas de 31 Da e 45 Da (m/z 328 $\rightarrow$ 297 $\rightarrow$ 252), a primeira perda é característica de alcaloides aporfínicos, porém a segunda é incomum para esse tipo de alcaloides.

Foram observados outros alcaloides aporfínicos minoritários que não possuem *N*-metila protonados, como no caso do alcaloide com **m/z 298** que foi identificado nos T_R de 8,46 minutos (folhas), 8,34 minutos (galhos finos) e 5,06 (cascas do tronco). O padrão de fragmentação do íon de **m/z 298** (m/z 298 $\rightarrow$ 281) nas folhas e galhos finos apresentou perda inicial de 17 Da, sendo que essa fragmentação já tinha sido observado na análise de ESI-IT-EM para a fração alcaloídica em pequena escala, sendo confirmado nas análises de CLAE-EM/EM, o que nos possibilitou atribuir esse padrão ao alcaloide proaporfínico estefarina (Figura 67), já relatado em outra espécie

do gênero *Bocageopsis* e em espécies da família Annonaceae (LEBOEUF et al., 1981; SOARES et al., 2015a; MAJRASHI et al., 2018). O íon ***m/z* 298** com *T_R* 5,06 minutos presente nas cascas do tronco, apresenta perda inicial de 18 Da, caracterizando uma substância hidroxilada, o que não condiz com a estrutura da estefarina, além de ter tempo de retenção diferente das demais estruturas, reforçando a ideia de que seja um alcaloide ainda não descrito neste trabalho, necessitando de mais análises espectrométricas e espectroscópicas para sua identificação.

Para o íon de ***m/z* 282** detectado em *T_R* 5,06 minutos, nas cascas do tronco, observa-se o padrão de fragmentação característico do alcaloide aporfínico nornuciferina (Figura 67) com perda de 17 Da (*m/z* 282 → 265), relatado anteriormente em espécies da família Annonaceae (SOARES et al., 2015a; LIMA et al., 2020).

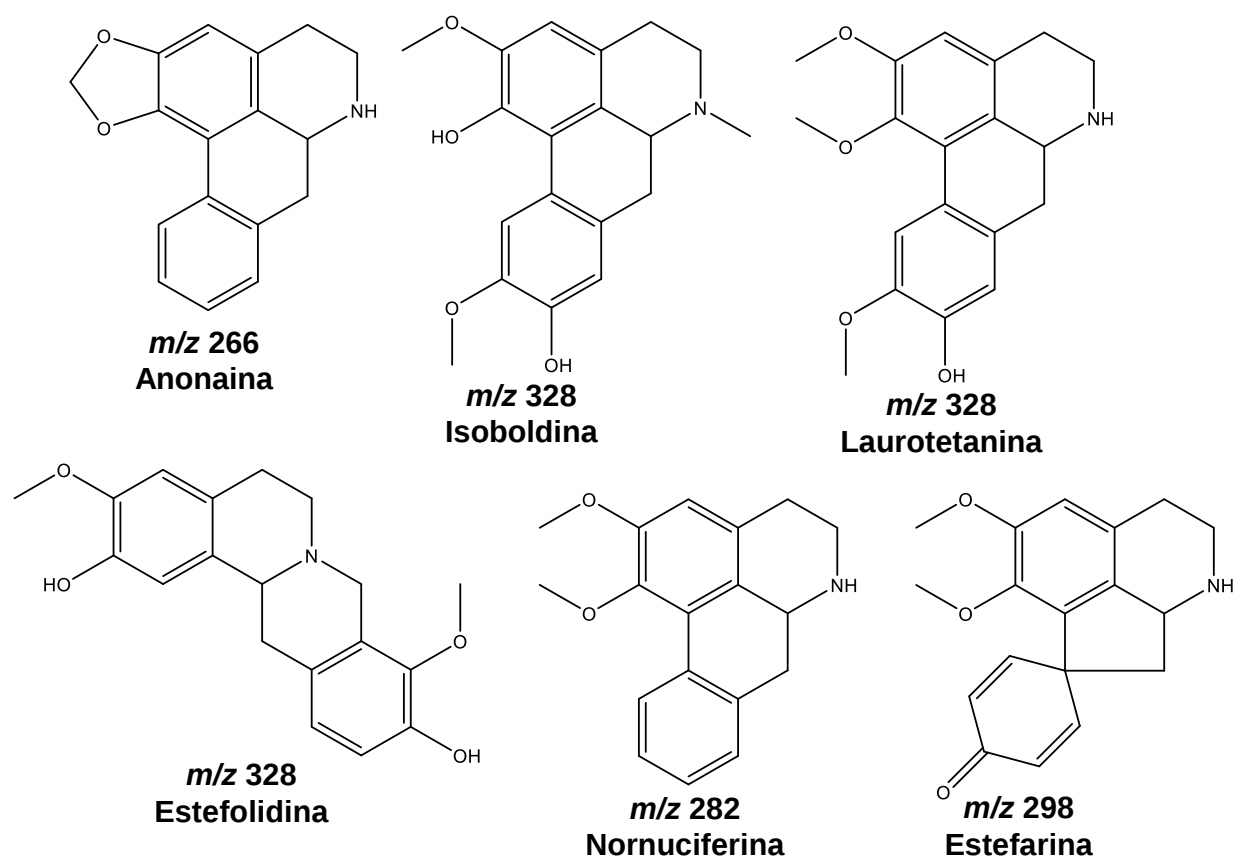


Figura 67. Estruturas de substâncias sugeridas referente a análise por CLAE-EM/EM da espécie *B. canescens* (Bc01).

Nessas análises é possível observar íons não relatados anteriormente nos estudos por EM/EM na pequena escala, os quais foram reunidos em dois grupos: o primeiro grupo é dos alcaloides não *N*-metilados, e o segundo, de alcaloides, que no lugar de metoxilas ou hidroxilas, os quais são representados pelos alcaloides com perdas iniciais de 15 Da ($-\text{CH}_3$) e 18 Da ($-\text{H}_2\text{O}$), ou seja, esses alcaloides são, *N*-metoxilados e *N*-hidroxilados respectivamente.

Assim, os alcaloides não *N*-metilados são caracterizados pela perda inicial de 17 Da (NH_3). Nesse grupo está o íon ***m/z* 194** com T_R 1,93 minutos (folhas) que apresentou padrão com perda de 17 Da (m/z 194 $\rightarrow$ 177), além de uma outra perda inicial de 43 Da (m/z 194 $\rightarrow$ 151), correspondente a CH_3CHNH . As outras perdas subsequentes são de 32 Da e 28 Da respectivamente (m/z 177 $\rightarrow$ 145 $\rightarrow$ 117), característico de CH_3OH e CO , o que sugere uma estrutura de um alcaloide derivado do esqueleto isoquinolínico, substituído com hidroxila e metoxila vicinais (WU & HUANG, 2006).

Os íons de ***m/z* 418** com T_R 8,98 (folhas), ***m/z* 314** T_R 5,60 minutos (galhos finos), ***m/z* 300** T_R 6,84 (cascas do tronco) possuem perda inicial de 17 Da (NH_3), e até o momento não puderam ser identificados. Em situação semelhante estão os íons que possuem perdas iniciais de 15 Da, como: ***m/z* 316**, T_R 3,52 minutos (folhas); ***m/z* 324**, T_R 7,41 minutos e 8,56 minutos (folhas) e 7,57 minutos (cascas do tronco). O íon ***m/z* 352**, T_R 8,98 minutos (folhas) apresenta perda de 16 Da (CH_4), o que similarmente, ocorre com o íon ***m/z* 338** nos T_R 8,46 minutos e 10,13 minutos (folhas), T_R 8,21 minutos (galhos finos), T_R 8,26 minutos, (cascas do tronco); ***m/z* 292** nos T_R 12,51 minutos (folhas) e T_R 13,46 minutos (galhos grossos); ***m/z* 306** com T_R 13,53 minutos (folhas). Esses compostos até o momento não foram identificados.

Do mesmo modo, os íons com ***m/z* 288**, T_R 8,15 minutos (folhas); ***m/z* 358**, T_R 7,44 minutos (galhos finos), ***m/z* 276**, T_R 9,77 minutos (galhos finos) e ***m/z* 268**, T_R 7,57

minutos (cascas do tronco) apresentando perdas iniciais de 18 Da não foram identificados até o momento.

O íon m/z 300 com T_R 8,15 minutos (folhas) que apresenta uma perda de 78 Da gerando íon m/z 222, sugere a presença de um anel benzênico, característica de fragmentação de alcaloide benzilisoquinolínico, com anel C não substituído, porém será necessária purificação da fração para sua confirmação.

As frações alcaloídicas das folhas e dos galhos finos foram encaminhadas para análises de RMN 1D/2D, visando eluição das substâncias majoritárias.

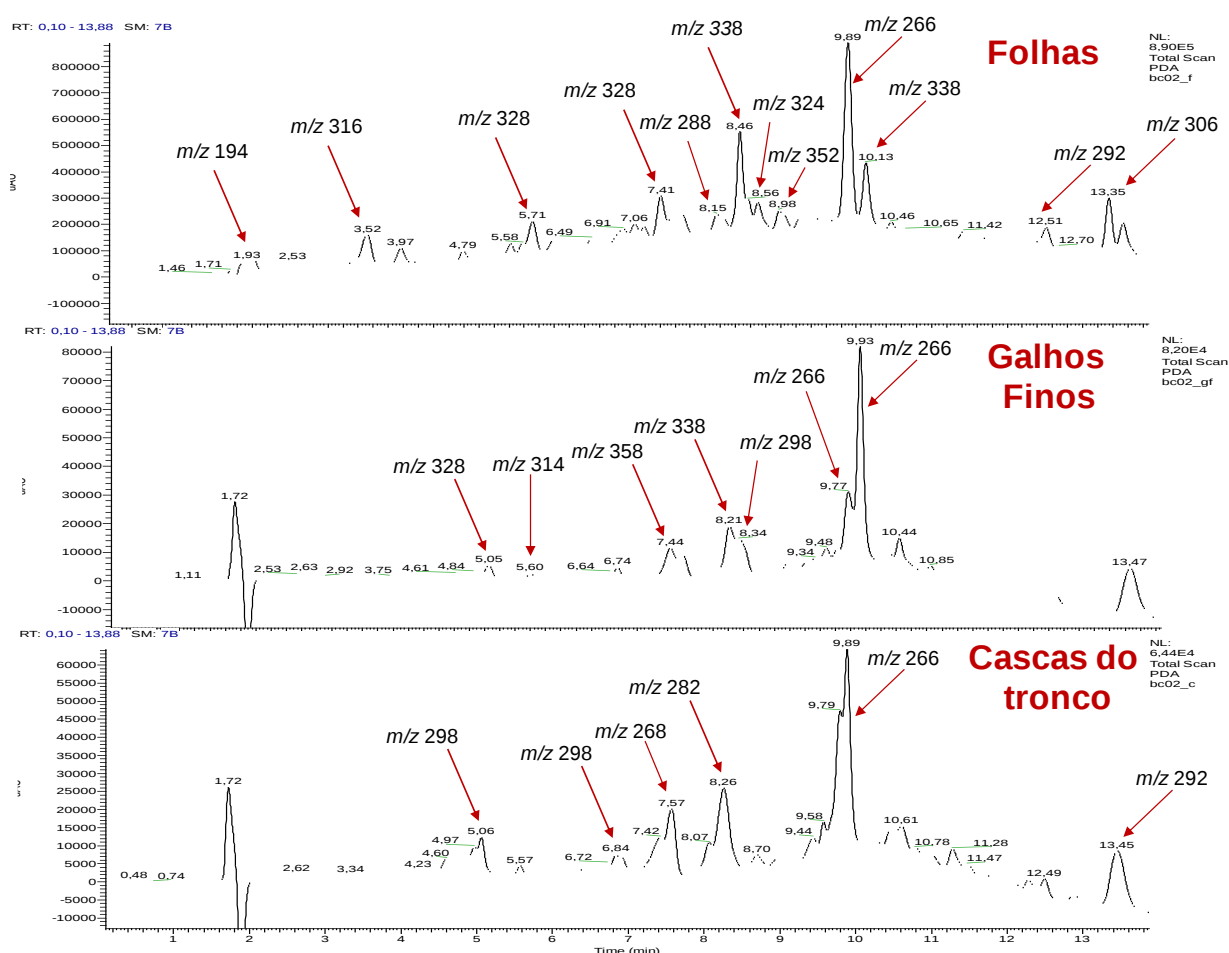


Figura 68. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) das frações alcaloidicas de *B. canescens*.

Gradiente de eluição: 20-80% de Metanol/solução aquosa ácida (1% ácido fórmico) em 14 minutos (1 mL/min.). DAD: 200-400 nm. Coluna: C-18 (5 μ , 150 x 4,60 mm).

Tabela 13. Perfil de fragmentação dos íons identificados na espécie *B. canescens* por CLAE-EM/EM.

	Tempo de retenção (TR)	Comprimento de onda máximo (λ max)	m/z (intensidade relativa)	MS [MS ² (intensidade relativa)]
Folhas	1,93	245	194 (100)	194 [177 (50), 162 (30), 145 (100), 117 (55)]
	3,52	245	316 (100)	316 [301 (20), 272 (100), 257 (87) e 238 (60)]
	5,71	246 e 230	328 (100)	328 [297 (100) e 265 (30)]
	7,41	247 e 230	328(100) e 324 (50)	328 [311 (100), 297 (30)] e 281 (20)] 324 (309 (100) e 280 (80)]
	8,15	246 e 230	288 (100) e 300 (45)	288 [270 (100) e 210 (40)] 300 [222 (100)]
	8,46	246, 271 e 339	338 (100) e 298 (30)	338 [(323 (100) e 294 (30)] 298 [281 (100)]
	8,56	246 e 274	324 (100)	324 [(309 (100) e 280 (80)]
	8,98	246 e 275	352 (100) e 418 (30)	352 [336 (100) e 308 (20)] 418 [401 (10) e 339 (100)]
	9,89	255 e 275	266 (100)	266 [249 (100)]
	10,13	247 e 272	338 (100)	338 (323 (100), 308 (20) e 292 (30)]
	12,51	237, 249 e 272	292 (100)	292 [277 (100) e 260 (15)]
	13,53	237, 253 e 278	306 (100)	306 [291 (100)]
Galhos Finos	5,05	282	328 (100)	328 [297 (30), 252 (30) e 178 (100)]
	5,60	282	314 (100)	314 [297 (15), 283 (100) e 189 (20)]
	7,44	274	358 (100)	358 [340 (100) e 194 (30)]
	8,21	237 e 254	338 (100)	338 [323 (100)]
	8,34	237 e 254	298 (100)	298 [280 (100)]
	9,77	260 e 274	266 (100) e 276 (30)	266 [249 (100)] 276 [258 (100) e 248 (100)]
	9,93	238 e 271	266 (100)	266 [249 (100)]
Cascas do tronco	5,06	236, 250 e 280	298 (100) e 328 (31)	298 [280 (100)] 328 [297 (30), 252 (30) e 178 (100)]
	6,84	238 e 269	300 (100)	300 [283 (100)]
	7,57	238 e 273	268 (100) e 324 (28,75)	268 [250 (100), 91 (44)], 324 [309 (100)]
	8,26	258 e 272	282 (100) e 338 (88,05)	282 [265 (100)] 338 [323 (100)]
	9,89	238, 271 e 306	266 (100)	266 [249 (100)]
	13,46	236 e 262	292 (100)	292 [277(100), 219 (73)]

5.6.2 Análises por CLAE-EM/EM da espécie *B. multiflora*.

Os cromatogramas de íons totais obtidos pela CLAE-EM/EM (TIC) das frações alcaloídicas referente a extração em maior escala das folhas, galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora* (Figura 71 e Tabela 14), estão de acordo com os resultados obtidos através das análises de LS-MS e o perfil químico observado na extração em pequena escala por ESI-IT-EM (Figuras 55 e 62), com pequenas diferenças peculiares às matrizes analisadas.

Ao analisar os espectros das frações foi possível destacar os íons mais abundantes com ***m/z* 298, 282, 268 e 266** presentes nas folhas, galhos finos e galhos grossos.

O íon ***m/z* 298** apresentou três isômeros com tempos de retenção e perfil de fragmentação diferentes. O íon de ***m/z* 298** com T_R 5,03 minutos (folhas) e galhos finos e 5,00 minutos (galhos grossos), apresentou perfil de fragmentação que indica duas substâncias, uma com perda inicial de 17 Da (***m/z* 298 → 281 → 269**), já descrito, e outra com uma perda de elevada massa (***m/z* 298 → 192 → 161**) característica de alcaloides benzilisoquinilicos (Figura 69).

Alcaloides benzilisoquinolínicos possuem uma perda de massa característica gerando o íon de *m/z* 192, essa perda de massa acontece quando o anel isoquinolínico contém uma *N*-Metila (SCHMIDT et al., 2005; SOARES et al., 2015a; LIMA et al., 2020).

Schmidt e colaboradores (2005) realizaram estudos de fragmentação com vários alcaloides benzilisoquinolínicos, o qual foi possível sugerir padrões característicos (a, b, c, e), sendo possível determinar sítios de substituição na parte isoquinolínica e benzílica (Figura 69).

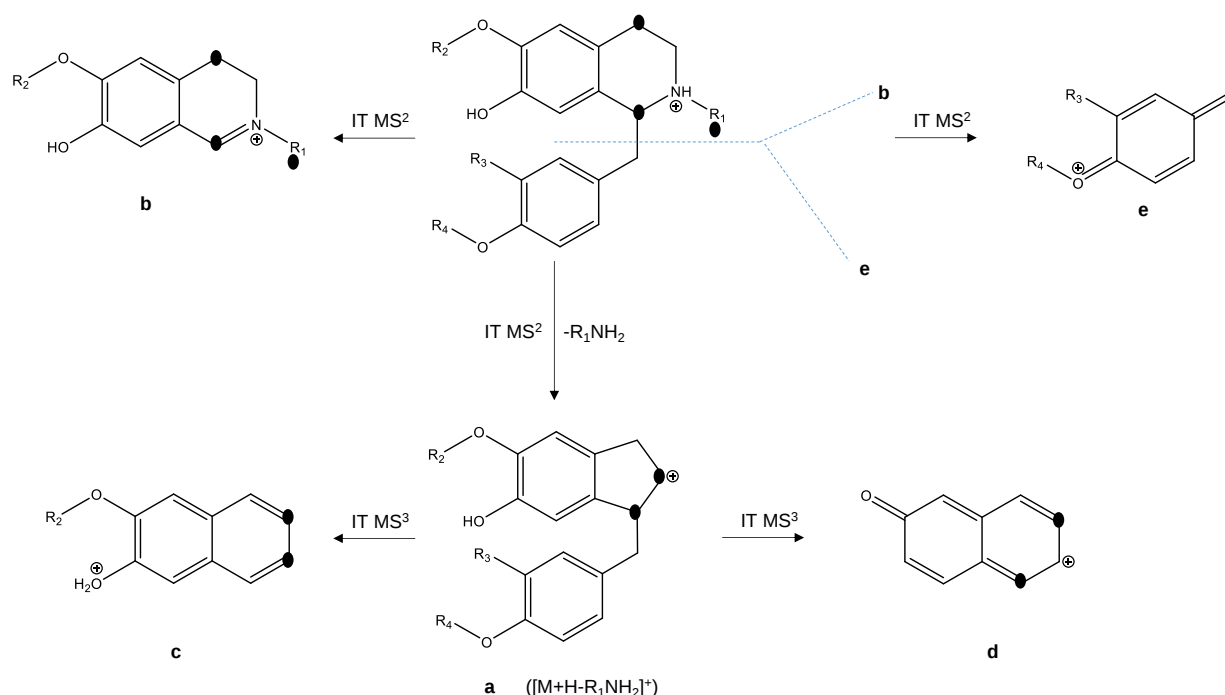


Figura 69. Proposta de fragmentação para alcaloides benzilisoquinólicos.

Fonte: Adaptado de SCHMIDT et al., 2005.

O outro isômero com ***m/z* 298** foi observado apenas nos galhos finos com T_R 8,69 minutos e apresentou perda de 18 Da (***m/z* 298 → 280**) o que pode indicar eliminação de água. Para uma proposta de identificação será necessário o isolamento da substância e posteriores análises em espectrometria de massas e RMN 1D/2D.

O íon ***m/z* 268** apresenta dois isômeros com tempos de retenção diferentes: um com T_R 7,57 minutos (folhas), T_R 7,53 minutos (galhos finos) e T_R 7,51 minutos (galhos grossos), que já foi descrito, neste trabalho, anteriormente como o alcaloide assimilobina (Figuras 65 e 70); o outro íon em ***m/z* 268** com T_R 12,51 (galhos finos) apresenta uma perda de massa elevada de 137 Da gerando o fragmento em ***m/z* 131**, sendo por isso descartada a possibilidade de ser alcaloide aporfínico.

O íon com ***m/z* 282** também apresenta dois isômeros um com T_R 8,26 minutos (folhas), T_R 9,35 minutos (galhos finos) apresentando perda inicial de 17 Da, descrito na etapa anterior (CLAE-EM) como o alcaloide nornuciferina (Figuras 67 e 70), para *B*.

canescens; e o outro, T_R 8,20 (galhos grossos) apresentando perda inicial de 18 Da, própria de uma substância hidroxilada, ainda não identificada.

O íon ***m/z* 266** identificado com T_R 9,87 minutos (folhas), T_R 9,83 minutos (galhos finos) apresentam o perfil de fragmentação que se assemelha ao descrito anteriormente para a anonaina; no T_R 9,71 minutos e 9,83 minutos (galhos grossos) existe a possibilidade de duas formas isoméricas do íon ***m/z* 266**, devido aparecerem em T_R diferentes, sendo uma a anonaina (Figura 70) e a outra ainda não identificada.

Os íons minoritários ***m/z* 324**, T_R 7,57 minutos (folhas), T_R 7,53 minutos (galhos finos) e T_R 7,51 minutos (galhos grossos); ***m/z* 338**, T_R 8,26 minutos (folhas), T_R 8,20 minutos (galhos finos); ***m/z* 300**, T_R 6,18 minutos (galhos finos); ***m/z* 328**, T_R 5,00 minutos (galhos grossos); ***m/z* 276**, T_R 9,71 minutos (galhos grossos) apresentaram perfis de fragmentação que são semelhantes os íons identificados na espécie *B. canescens*.

Existem íons que não foram observados anteriormente que, dentre esses vale destacar um dos quatro íons majoritários identificados na fração alcaloídica dos galhos grossos, com T_R 4,31 e ***m/z* 198**, esse apresenta perdas sequenciais de 15 Da (198 → 183), 17 Da (198 → 181) e 18 Da (198 → 180), indicando que essa pequena estrutura possua metoxilas, hidrogênio ligado ao nitrogênio e hidroxila. Tendo em vista que a substância não foi relatada em trabalhos anteriores, será necessário isolamento da substância para sua identificação.

As frações de folhas, galhos finos e dos galhos grossos que possuem maior concentração de moléculas não identificadas foram encaminhadas para análises de RMN 1D/2D e elucidação das substâncias majoritárias.

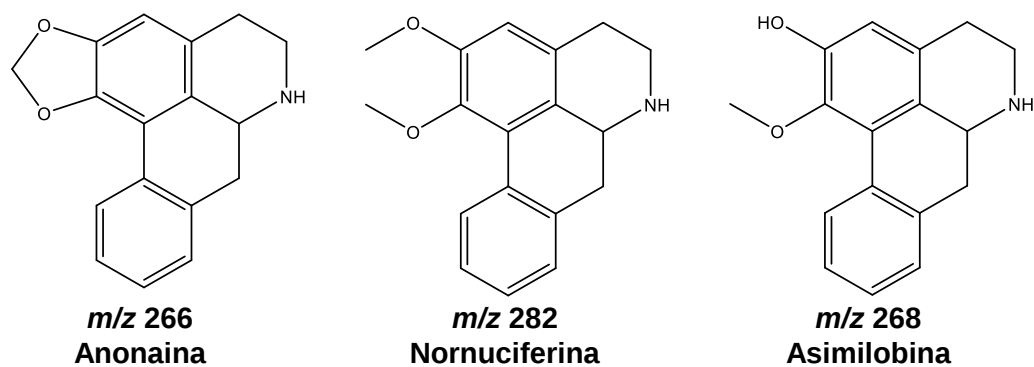


Figura 70. Estruturas de substâncias sugeridas referente a análise por CLAE-EM/EM da espécie *B. multiflora*.

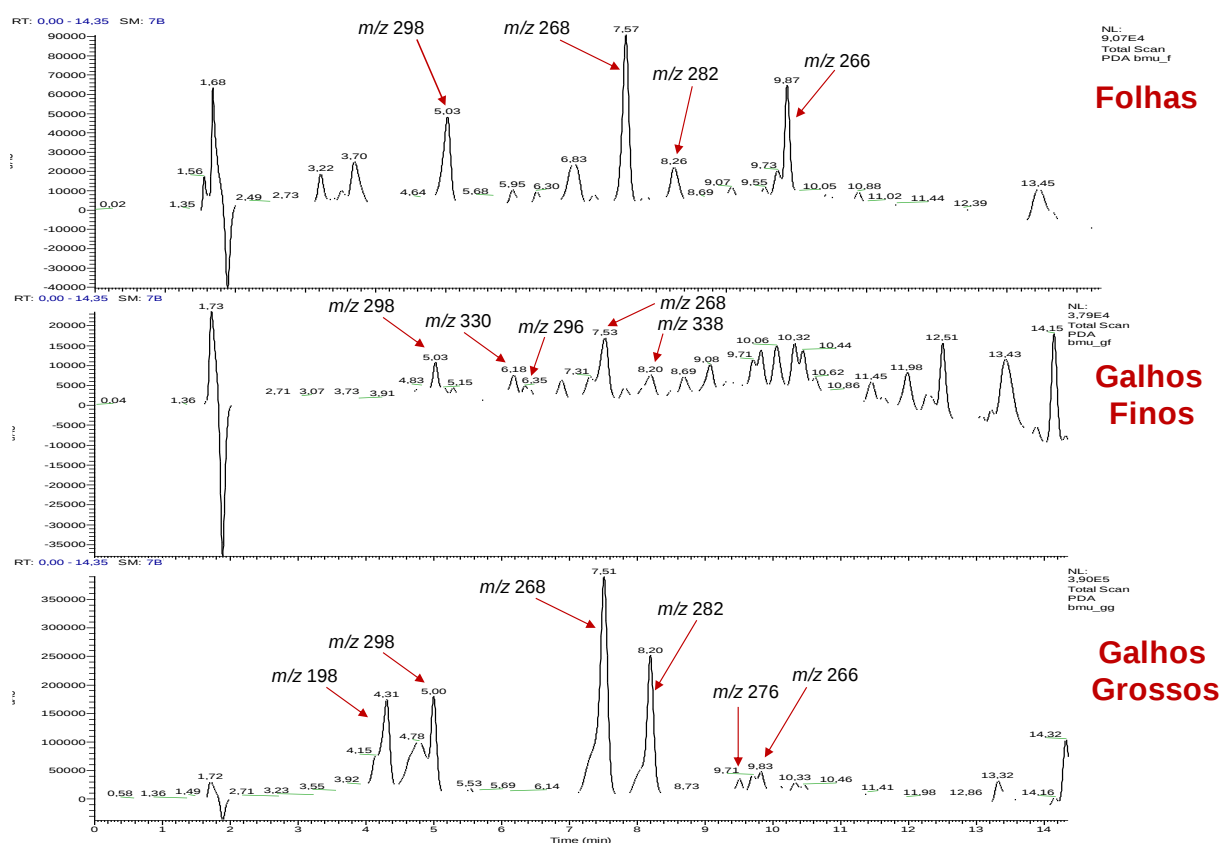


Figura 71. Cromatogramas obtido por CLAE-EM/EM (TIC) das frações alcalóidicas de *B. multiflora*.

Gradiente de eluição: 20-80% de Metanol/solução aquosa ácida (1% ácido fórmico) em 14 minutos (1 mL/min.). DAD: 200-400 nm. Coluna: C-18 (5 μ , 150 x 4,60 mm).

Tabela 14. Perfil de fragmentação dos íons identificados na espécie *B. multiflora* por CLAE-EM/EM.

	Tempo de retenção (TR)	Comprimento de onda máximo (λ max)	m/z (intensidade relativa)	MS [MS^2 (intensidade relativa)]
Folhas	5,03	235, 248 e 281	298 (100) e 328 (30)	298 [281 (30), 269 (35), 192 (100) e 161 (40)] 328 [310 (100)]
	7,57	239 e 272	268 (100) e 324 (20)	268 [251 (100)] 324 [309 (100)]
	8,26	238 e 272	282 (100) e 338 (100)	282 [265 (100)] 338 [323 (100) e 294(10)]
	9,87	238 e 272	266 (100)	266 [249 (100)]
Galhos Finos	5,03	235, 250 e 280	298 (100), 312(10) e 330 (30)	298 [281 (30), 269 (35), 192 (100) e 161 (40)] 330 [313 (20) e 283(100)]
	6,18	238, 256 e 275	300 (80), 330 (100) e 344 (20)	300 [283 (100)] 330 [313 (20) e 283(100)] 344 [326 (100)]
	6,35	254	296 (100)	296 [280 (10) e 202 (100)]
	7,53	238 e 272	268 (100) e 324 (30)	268 [251 (100)] 324 [309 (100) e 280 (10)]
	8,20	258	338 (100)	338 [323 (100)]
	8,69	258	298 (100)	298 [280 (100)]
	9,35	238 e 272	282 (100)	282 [265 (100)]
	9,83	258	266 (100)	266 [249 (100)]
	11,98	258	302 (100)	302 [287 (40), 272 (100), 269 (50)]
	12,51	274	268 (100)	268 [131 (100)]
Galhos Grossos	4,31	295 e 321	198 (100)	198 [183 (30), 181 (100) e 180 (100)]
	5,00	235, 248 e 281	298 (100) e 328 (20)	298 [281 (30), 269 (35), 192 (100) e 161 (40)] 328 [311 (15) e 178 (100)]
	7,51	240 e 271	268 (100) e 324 (10)	268 [251 (100) e 219 (10)] 324 [309 (100)]
	8,20	240 e 271	282 (100)	282 [264 (100)]
	9,71	238 e 271	266 (30) e 276 (100)	266 [249 (100) e 190 (30)] 276 [258 (100)]
	9,83	238 e 271	266 (100)	266 [249 (100)]

5.7. Fracionamento das frações alcalóidicas das espécies de *Bocageopsis*.

5.7.1. Fracionamento por CLAE-UV das frações alcalóidicas das folhas da espécie *B. canescens* e *B. multiflora*.

A fração alcalóidica das folhas de *B. canescens* (Bc01) foi submetida às análises em CLAE-UV semi-preparativa (Figura 72). No cromatograma obtido foi possível observar a presença de diversos alcaloides, sendo os majoritários com m/z 266 e 264 Da (T_R 14,892 e 12,852 respectivamente). O método em escala semi-preparativa proporcionou uma separação entre os alcaloides, resultando em 13 frações (Tabela 15). Essas frações tiveram seus rendimentos calculados e foram submetidas a análises de MSⁿ e RMN 1D/2D para determinação estrutural.

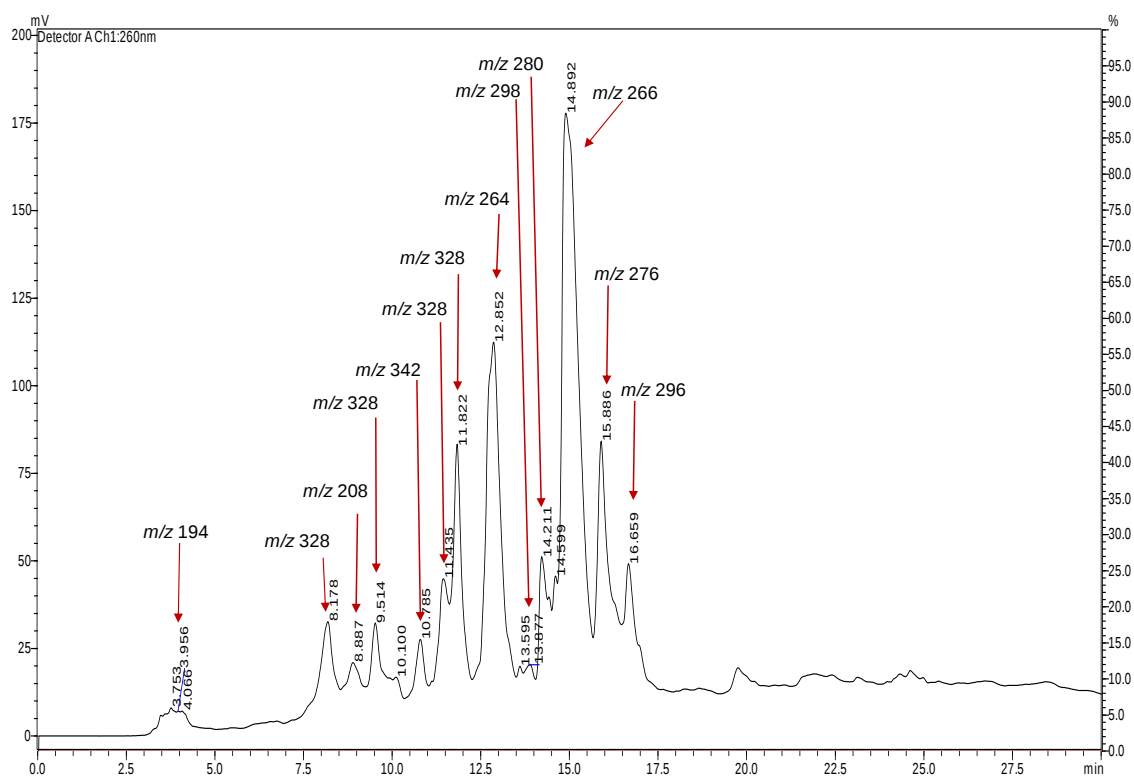


Figura 72. Cromatograma de CLAE-UV da fração alcalóidica das folhas de *B. canescens* em escala semi-preparativa.

A fração alcalóidica das Galhos Grossos de *B. multiflora* foi submetida às análises em CLAE-UV semi-preparativa (Figura 73). No cromatograma obtido foi possível observar a presença de diversos alcaloides, sendo os majoritários com m/z 268 e 328 (T_R 11,851 e 5,097 respectivamente). O método em escala semi-preparativa

proporcionou uma separação entre os alcaloides, resultando em 12 frações (Tabela 15). Essas frações tiveram seus rendimentos calculados e foram submetidas a análises de MSⁿ e posteriormente, as que tiveram melhor perfil e rendimento foram submetidas a análises de RMN 1D/2D para determinação estrutural. Na tabela 15, são apresentados os resultados das análises realizadas em CLAE-UV em escala semi-preparativa e EM.

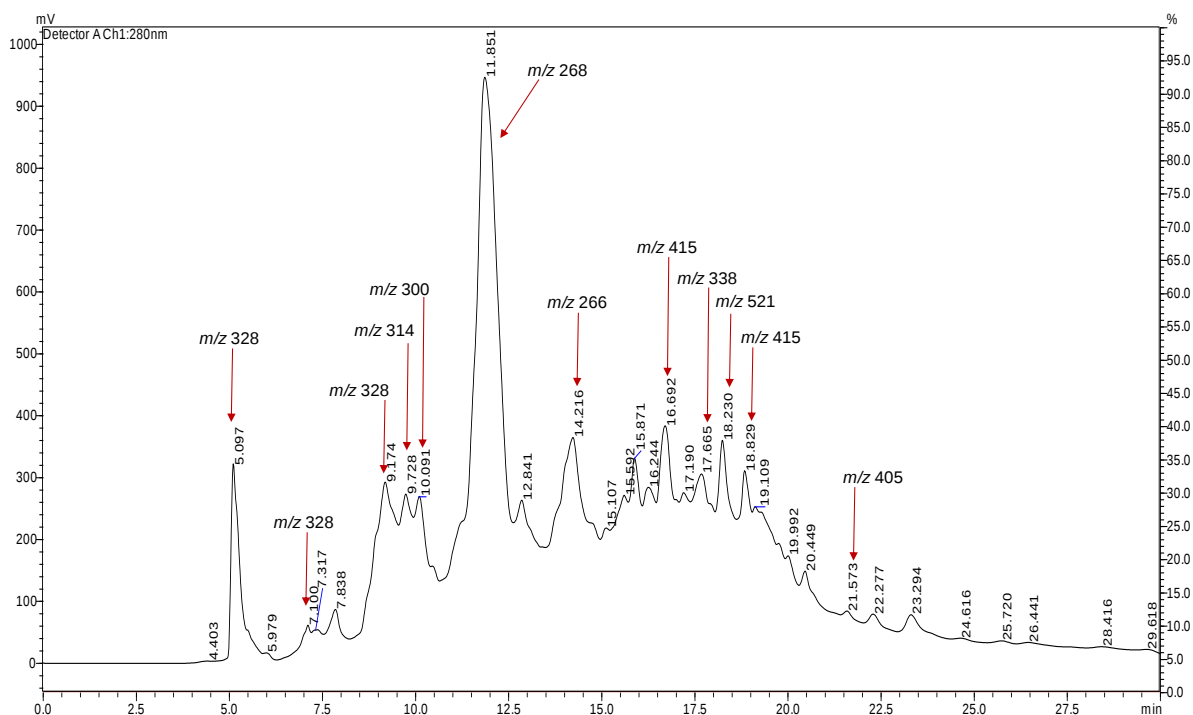


Figura 73. Cromatograma de CLAE-UV da fração alcaloídica das folhas de *B. multiflora* em escala semi-preparativa.

Tabela 15. Frações obtidas pelas análises em CLAE-UV em escala semi-preparativa e perfil de fragmentação dos íons identificados na espécie *Bocageopsis*.

Espécies	Tempo de retenção (T _R)	Código	m/z	MS [MS ² (intensidade relativa)]	Rendimento (mg)
B. canescens (Folhas)	3,753	BcFFr1	194	194 [177 (50), 145 (100), 151 (50), 117 (55)]	2,7
	8,178	BcFFr2	328	328 [311 (100), 297 (30)] e 280 (20)]	2,5
	8,887	BcFFr3	208	208 [191 (100), 176 (50) e 161 (90)]	1,0
	9,514	BcFFr4	328	328 [313 (20), 297 (40), 266 (35) e 178 (100)]	2,2
	10,100	BcFFr5	342	342 [311 (100), 296 (50), 280 (100)]	1,0
	11,435	BcFFr6	328	328 [(297 (50) e 265 (100)]	0,8
	11,822	BcFFr7	328	328 [(310)]	3,5
	12,852	BcFFr8	264	264 [240 (30), 235 (50) e 208 (100)]	4,2
	13,595	BcFFr9	298	298 [281 (100), 266 (55) e 251 (40)]	0,5
	14,211	BcFFr10	280	280 [248 (50), 216 (50) e 202 (100)]	1,8
	14,892	BcFFr11	266	266 [249 (100) e 190 (30)]	6,5
	15,886	BcFFr12	276	276 [261 (80) e 232 (100)]	3,7
	16,659	BcFFr13	296	296 [278 (20), 264 (100) e 236 (50)]	1,3
	TOTAL				30,0
B. multiflora (Galhos Grossos)	5,097	BmuFFr1	328	328 [178 (100)]	2,0
	7,100	BmuFFr2	328	328 [178 (100) e 151 (20)]	0,8
	9,174	BmuFFr3	328	328 [178 (100) e 151 (10)]	1,2
	9,728	BmuFFr4	314	314 [297 (100), 270 (70), 239 (50)]	0,8
	10,091	BmuFFr5	300	300 [283 (70), 268 (40), 192 (50), 107 (100)]	0,6
	11,851	BmuFFr6	268	268 [251 (100), 219 (80) e 191 (50)]	7,2
	14,216	BmuFFr7	266	266 [249 (100), 219 (50) e 191 (20)]	3,1
	16,692	BmuFFr8	415	415 [119 (100)]	2,0
	17,665	BmuFFr9	338	338 [321 (50), 115 (100)]	1,0
	18,230	BmuFFr10	521	521 [298 (100)]	1,3
	18,829	BmuFFr11	415	415 [119 (100)]	0,9
	21,573	BmuFFr12	445	445 [414 (50), 369 (20), 353 (60), 323 (100)]	0,5
	TOTAL				21,4

5.8. Determinação estrutural das substâncias obtidas das frações alcaloídicas do gênero *Bocageopsis*.

5.8.1. Determinação estrutural das frações alcaloídicas da espécie *B. canescens*.

5.8.1.1. Determinação estrutural dos alcaloides identificados na fração alcaloídica obtida das folhas da espécie *B. canescens* (Bc01-F).

De acordo com a tabela 13, o componente principal da fração alcaloídica das folhas é a substância com T_R 9,89 minutos referente ao íon de m/z 266 $[M+H]^+$, correspondente à molécula protonada (Figura 74). Esse íon foi submetido à análise de MS^n (Figura 75), sendo observado um padrão de fragmentação, com perdas de 17, 30 e 28 Da (m/z 266 $\rightarrow$ 249 $\rightarrow$ 219 $\rightarrow$ 191), esse perfil de fragmentação é característico de alcaloides aporfínicos, não *N*-metilado, que possuem uma ponte metilenodioxí no anel A. O perfil de fragmentação é compatível com o alcaloide aporfínico anonaina (STÉVIGNY et al., 2004; SOARES et al., 2015a). Essa afirmação foi comprovada a partir dos dados de RMN de 1H (Figura 76) e mapas de correlações HSQC (Figura 77) e HMBC (Figura 78)

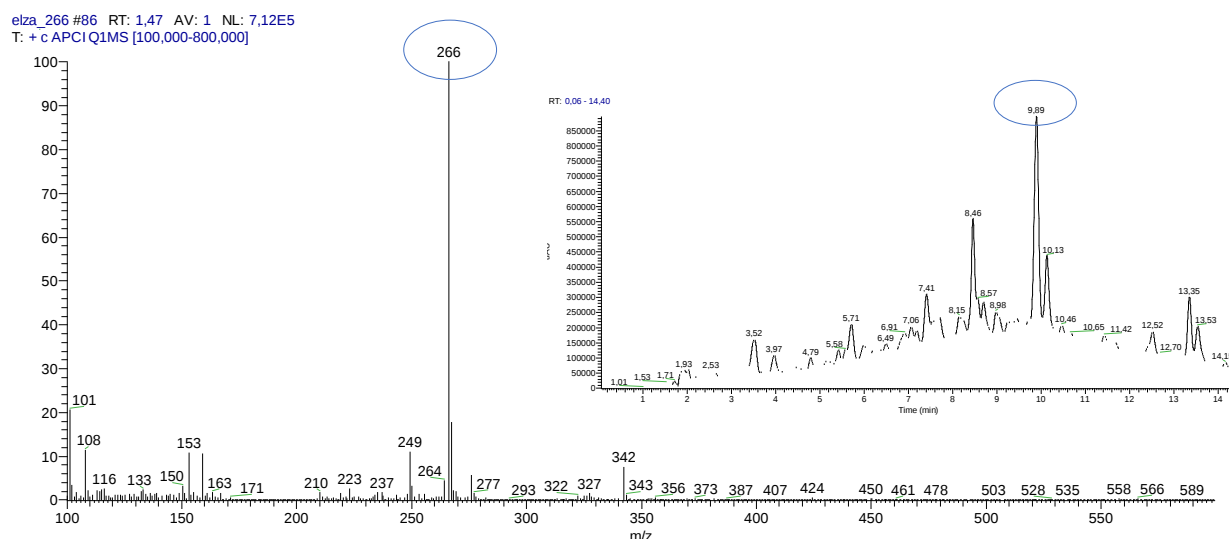


Figura 74. Espectro de massas do íon de m/z 266 presente na fração alcaloídica das folhas de *B. canescens*.

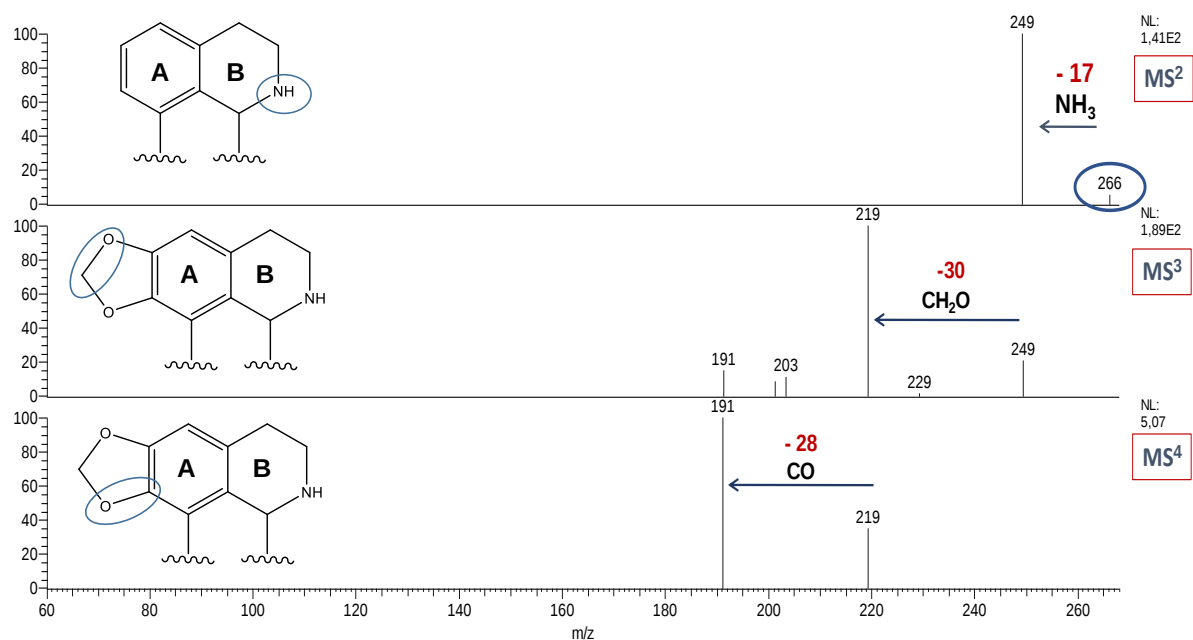


Figura 75. Espectro de massas em MSⁿ do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).

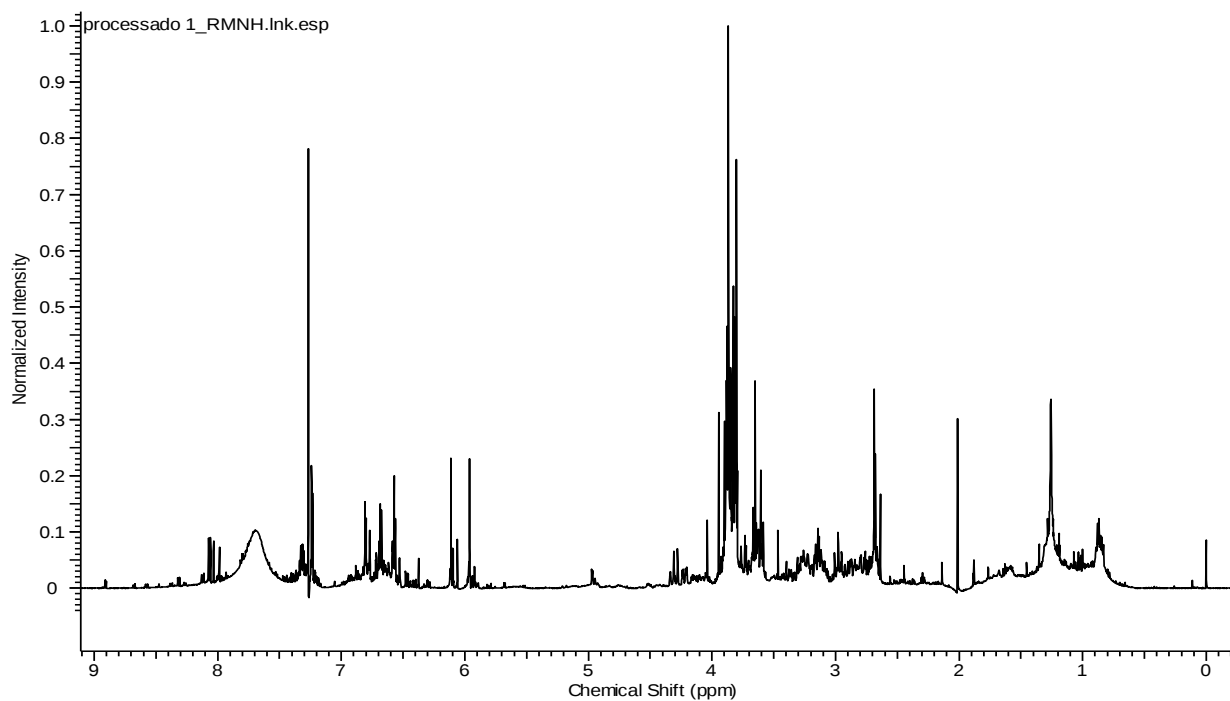


Figura 76. Espectro de RMN de ¹H (500,13 MHz em CDCl₃) da fração alcaloídica das folhas de *B. canescens*.

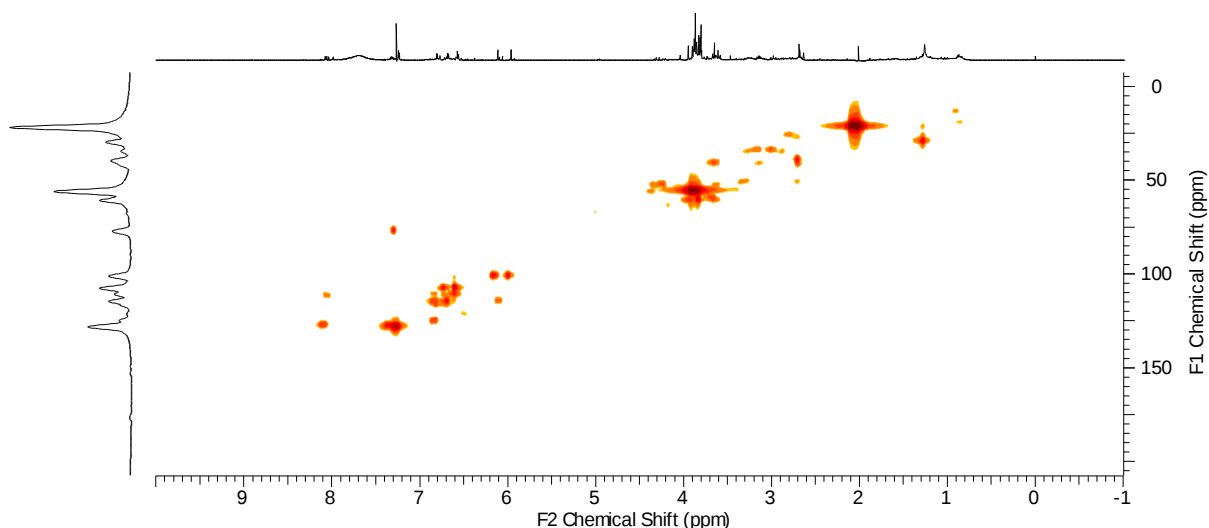


Figura 77. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da fração alcalóidica das folhas de *B. canescens*.

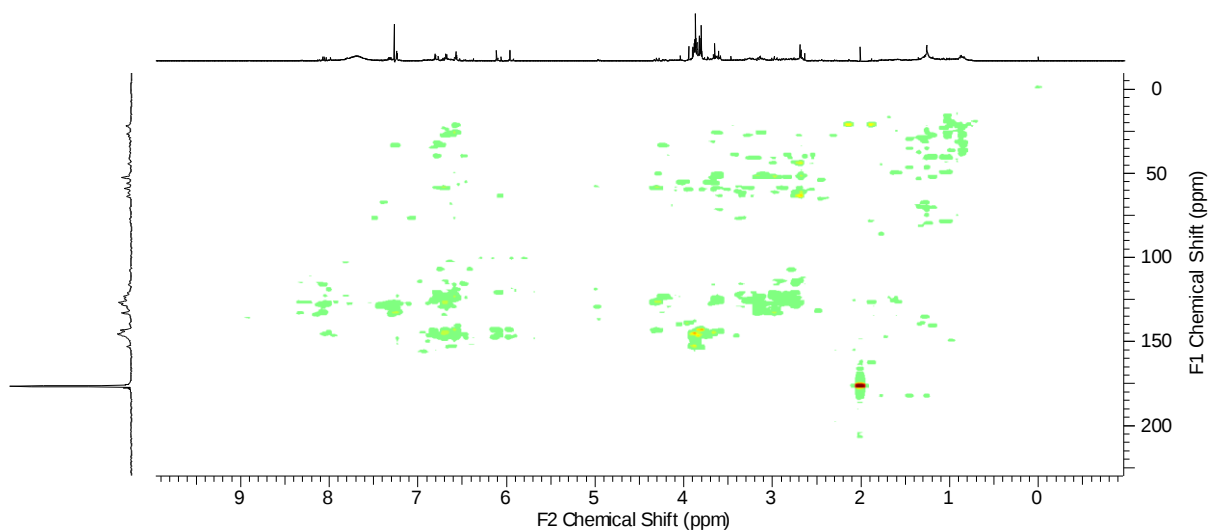


Figura 78. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da fração alcalóidica das folhas de *B. canescens*.

Na ampliação do espectro de RMN de ^1H e mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 79) foi possível verificar os sinais característicos dos hidrogênios da ponte metilenodioxí em δ 6,11 (1H, d, 1,3 Hz) e δ 5,96 (1H, d, 1,3 Hz), ligados ao carbono em δ 101,2. No mapa de correlações HMBC, verificou-se a correlação desses hidrogênios com os carbonos em δ 143,32 (C-1) e δ 147,73 (C-2), caracterizando a presença de uma ponte metilenodioxí e a não planaridade da molécula (Figura 79).

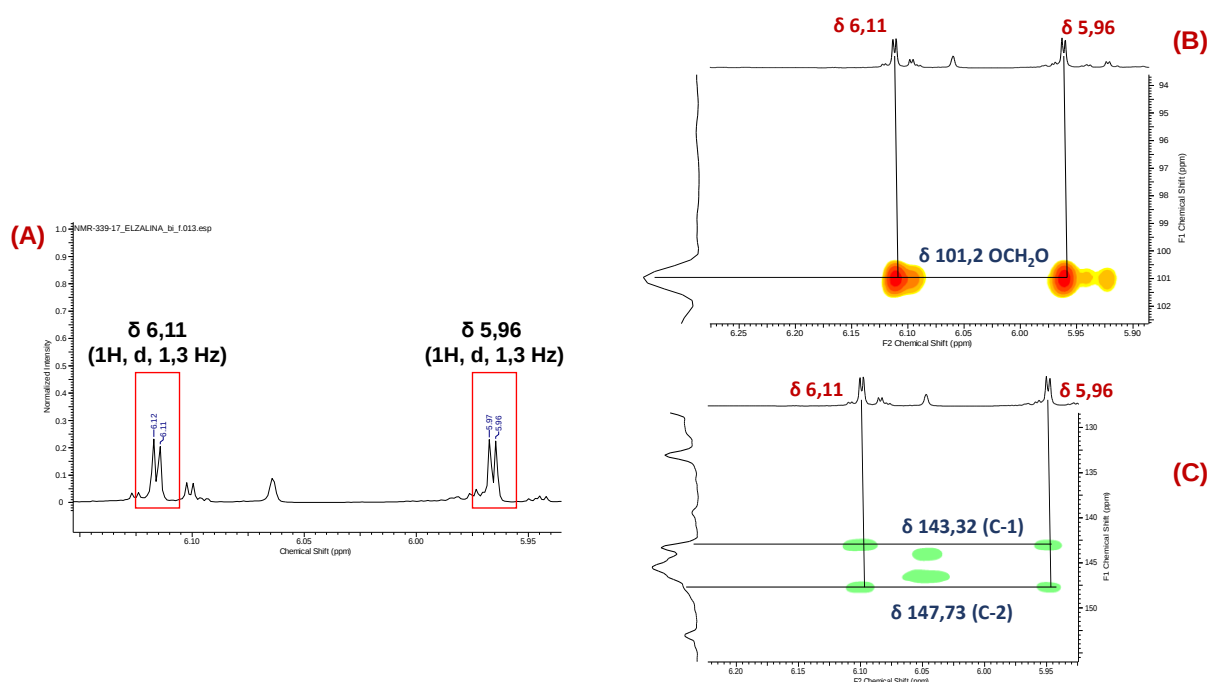


Figura 79. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz em CDCl_3), mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) referente região dos hidrogênios da ponte metilenodioxí.

O simpleto em δ 6,57 (1H, s), ligado ao carbono na posição 3 em δ 107,66, confirma a presença e localização da ponte metilenodioxí, pelas suas correlações no HMBC aos carbonos aromáticos em δ 143,32 (C-1), δ 147,73 (C-2) e δ 123,19 (C-3b), completando a estrutura do anel A, e ao carbono metilênico em δ 26,57 (C-4), pertencente ao anel B (Figura 80).

Também foi possível observar um duplete na região aromática em δ 8,06 (1H, d, 8,0 Hz), ligado ao C-11 em δ 127,15, no HSQC (Figura 81), e correlacionado aos carbonos C-7a, C-9 e C-1a (δ 133,03, δ 128,11 e δ 116,12, respectivamente), no HMBC (Figura 81).

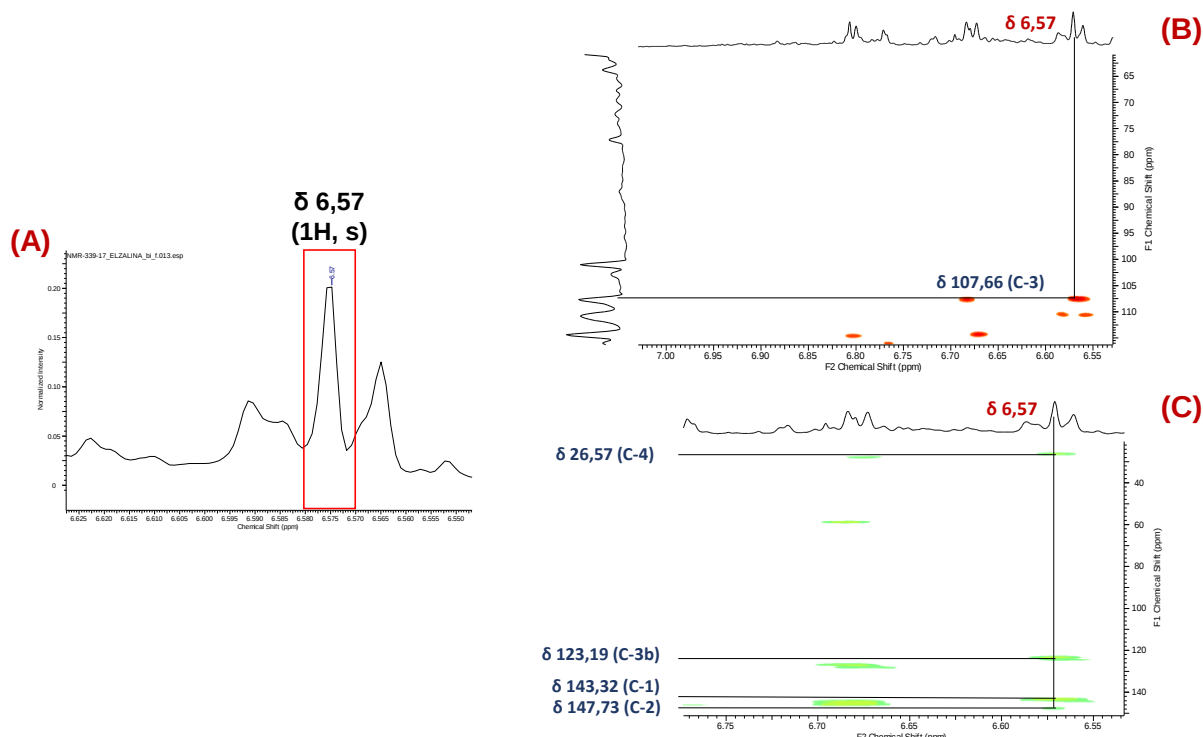


Figura 80. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz em CDCl_3), mapas de contornos HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) referente região do simpleto em δ 6,57.

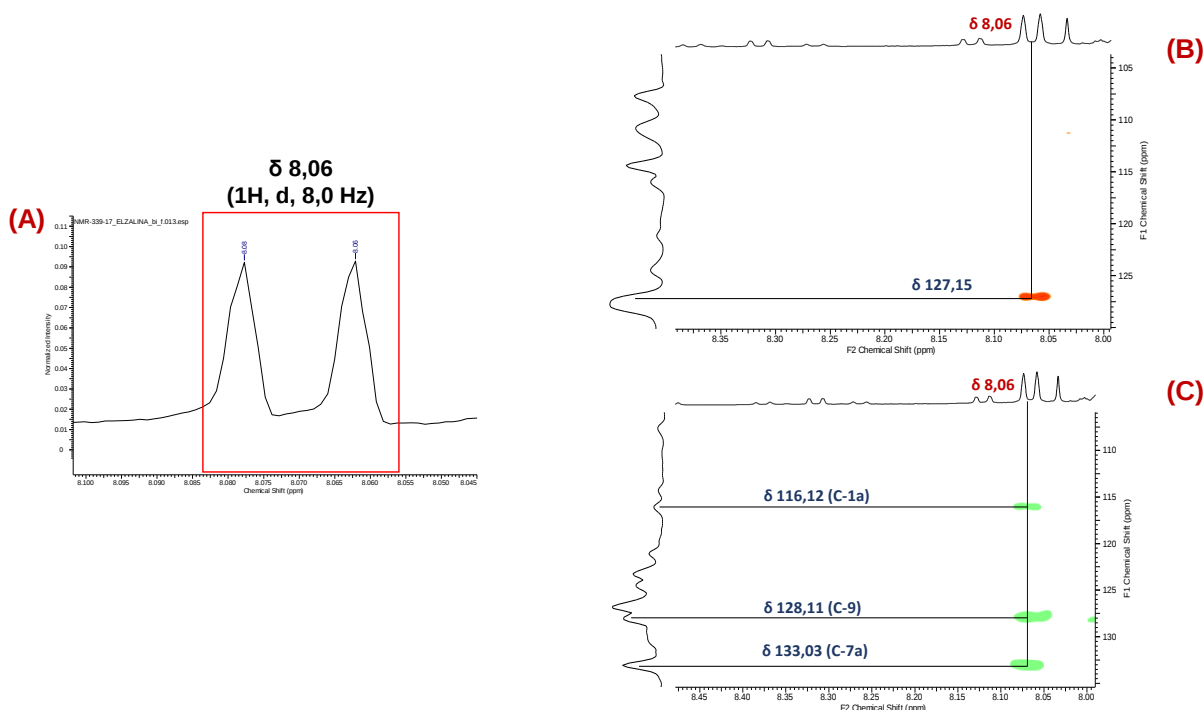


Figura 81. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz em CDCl_3), mapas de contornos HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) referente região com um dubleto em δ 8,06.

Os dados de RMN de ^1H e os mapas de correlações HSQC e HMBC (Figuras 76, 77 e 78) foram confrontados com dados da literatura e estão descritos na tabela 16, confirmando a identificação da substância como o alcaloide aporfínico anonaina (Figura 82). A proposta de fragmentação (Figura 83) está de acordo com a apresentada no espectro de MS^4 (Figura 75).

Anonaina tem sido amplamente reportados em espécies da família Annonaceae, sendo apontado como um dos seus marcadores quimiotaxonômico (LEBOEUF et al., 1981; PAULO et al., 1992; ORTIZ et al., 2007; COSTA et al., 2013d; SOARES et al., 2015a; SANTOS et al., 2018; LIMA et al., 2020).

Li e colaboradores (2013) relatam em um artigo de revisão os efeitos farmacológicos para esse alcaloide como: atividades antioxidante, antidepressiva, anticâncer, vasorelaxante, antiplasmódica, antibacteriana e antifúngica.

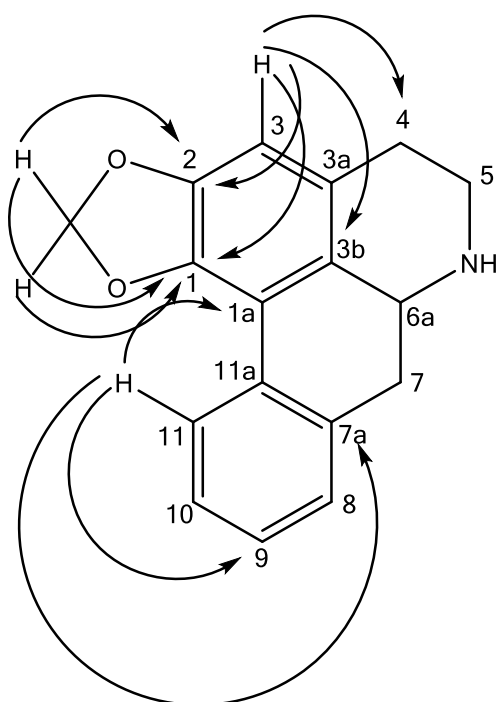


Figura 82. Estrutura e principais correlações do alcaloide anonaina.

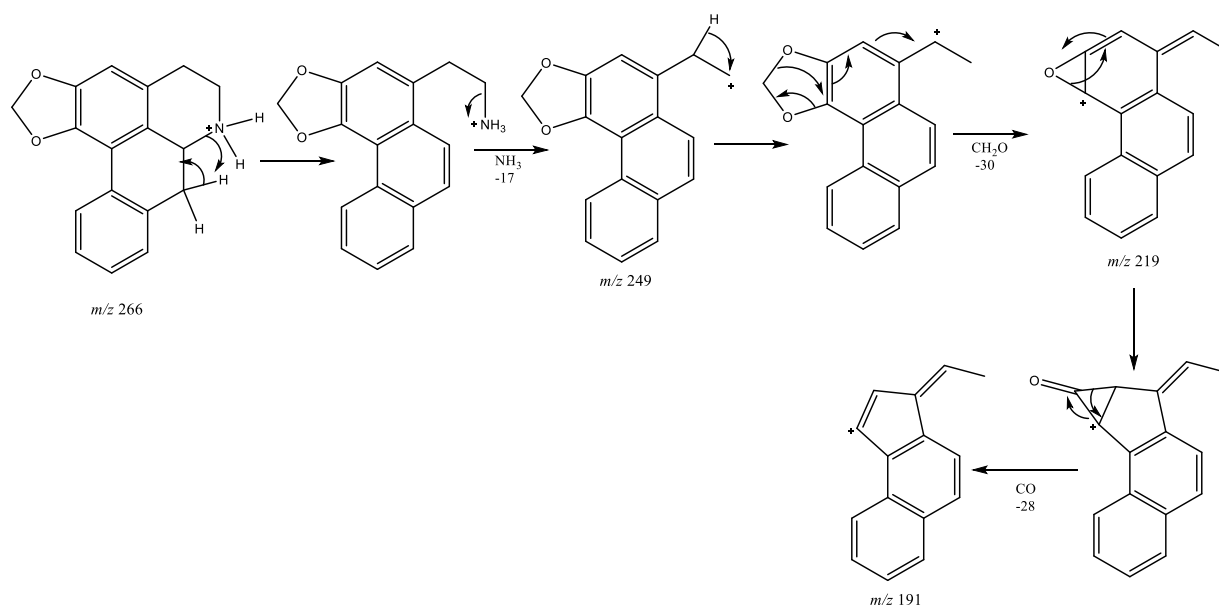


Figura 83. Proposta de fragmentação para o alcaloide anonaina.

Tabela 16. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC para o alcaloide anonaina.

Anonaina (m/z 266)						
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HMBC ^b
1	-	-	143,32	143,34	-	-
1a	-	-	116,12	116,82	-	-
2	-	-	147,73	147,86	-	-
3	6,57 (1H, s)	6,57 (1H, s)	107,66	107,87	26,57; 123,19; 143,32 e 147,73	29,50; 126,71; 143,34 e 147,86
3a	-	-	-	128,76	-	-
3b	-	-	123,19	126,71	-	-
4_{pseudoax}	-	2,81 (1H, m)	26,57	29,50	-	-
4_{pseudoeq}	2,76 (1H, m)	2,74 (1H, m)	26,57	29,50	-	126,71 e 107,87
5_{pseudoax}	-	3,10 (1H, m)	-	42,91	-	-
5_{pseudoeq}	-	3,52 (1H, m)	-	42,91	-	53,72; 128,76
6a	-	3,83 (1H, dd, 4,7 e 12,0)	52,98	53,72	-	116,82; 128,76
7_{pseudoax}	-	2,81 (1H, m)	34,13	35,59	-	53,72; 126,71; 134,77
7_{pseudoeq}	2,97 (1H, s)	2,97 (1H, m)	34,29	35,59	52,98, 123,19 e 133,03	-
7a	-	-	133,03	134,77	-	-
8	7,24 (1H, d, 3,9)	7,24 (1H, m)	128,11	128,12	34,13	-
9	7,24 (1H, d, 3,9)	7,24 (1H, m)	128,11	128,12	127,15 e 133,03	-
10	7,32 (1H, dd, 8,1 e 4,0)	7,32 (1H, m)	127,46	127,10	128,11	128,12 e 131,38
11	8,06 (1H, d, 8,0)	8,08 (1H, d, 8,1)	127,15	127,10	116,12; 128,11 e 133,03	116,82; 128,12 e 134,77

11a	-	-	-	131,38	-	-
O-CH₂-O	6,11 (1H, d, 1,3)	6,11 (1H, d, 1,3)	101,02	100,97	143,32; 147,73	143,34
	5,96 (1H, d, 1,3)	5,96 (1H, d, 1,3)	101,02	100,97	143,32; 147,73	143,34

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Soares, 2014 (¹H 600 MHz, CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

Dando continuidade ao estudo da fração alcaloídica das folhas, foi observado o íon correspondente à molécula protonada em m/z 328 [M+H]⁺, (Figura 84), cuja análise de MS² (Figura 85), apresentou um padrão distinto de fragmentação com perdas 31 e 32 Da (m/z 328 → 297 → 265), correspondendo as perdas sequenciais de CH₃NH₂ e CH₃OH, na molécula, características de alcaloides aporfinicos que possuem *N*-metila no anel B e uma metoxila no anel A (STÉVIGNY et al., 2004), sugerindo a presença do alcaloide aporfínico isoboldina (Figura 88), isolado anteriormente da espécie *B. pleiosperma* (SOARES et al., 2015a).

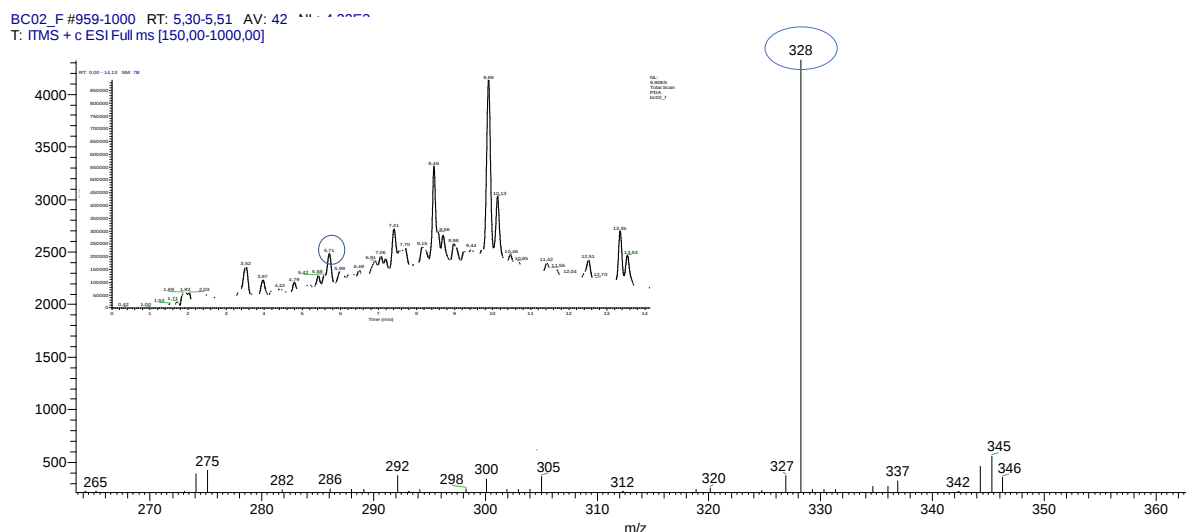


Figura 84. Espectro de massas do íon de m/z 328 e cromatograma obtido da análise de LC-EM da fração alcaloídica das folhas de *B. canescens*.

BC02_F_LC_MSMS #422 RT: 5,97 AV: 1 NL: 6,87E2
F: ITMS + c ESI Full ms2 328,00@cid25,00 [90,00-330,00]

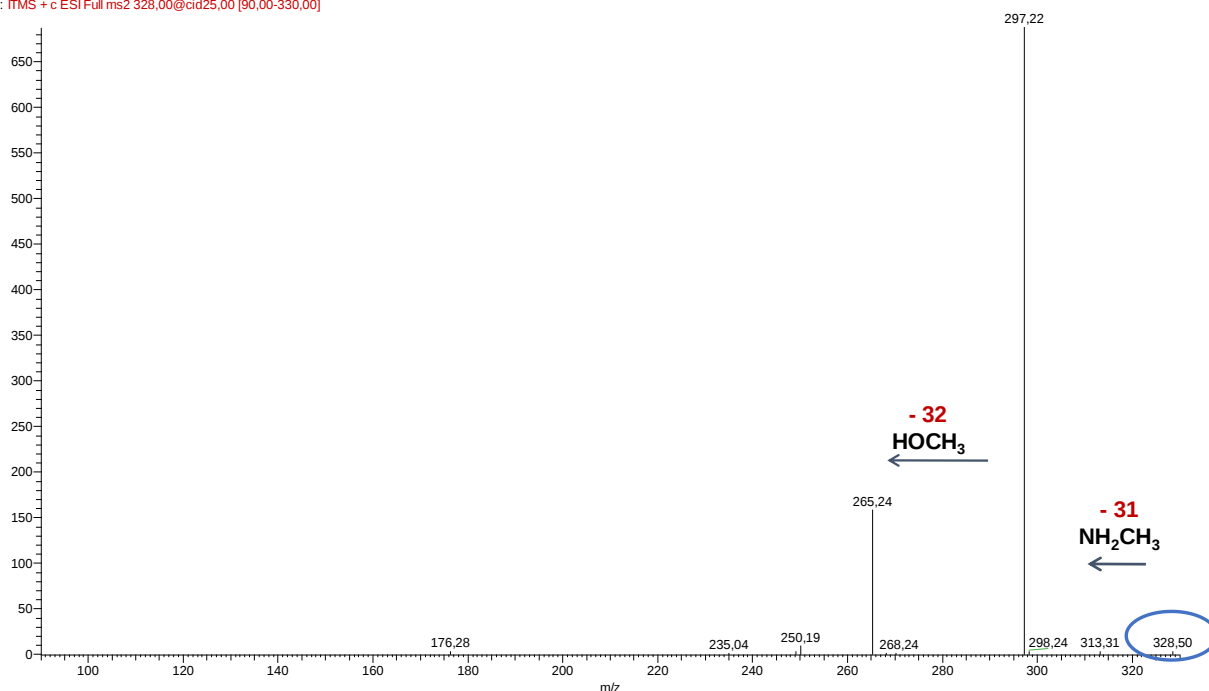


Figura 85. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$).

No espectro de RMN de ^1H (Figura 76) e mapa de correlações HSQC (Figura 77) foi possível observar alguns sinais característicos dos hidrogênios aromáticos, com deslocamentos em δ 6,53 (1H, s), δ 6,80 (1H, s) e δ 8,03 (1H, s), ligados aos carbonos em δ 108,40, δ 114,40 e δ 111,38 (Figura 86), atribuídos, por comparação com a literatura, ao C-3, C-8 e C-11 da isoboldina. Adicionalmente, a presença do sinal em δ 2,67 (3H, s) ligado ao carbono em δ 41,36, no HSQC, confirmou a presença de nitrogênio *N*-metilado, enquanto dois sinais observados em δ 3,81 (3H, s) e 3,82 (3H, s), ligados a carbonos em δ 56,0, evidenciaram as duas metoxilas (Figura 87 e Tabela 17), em acordo com a literatura (STÉVIGNY et al., 2004; SOARES et al., 2015a). Estes dados corroboram com a identificação da isoboldina (Figura 88) na fração alcaloídica de Bc01-F.

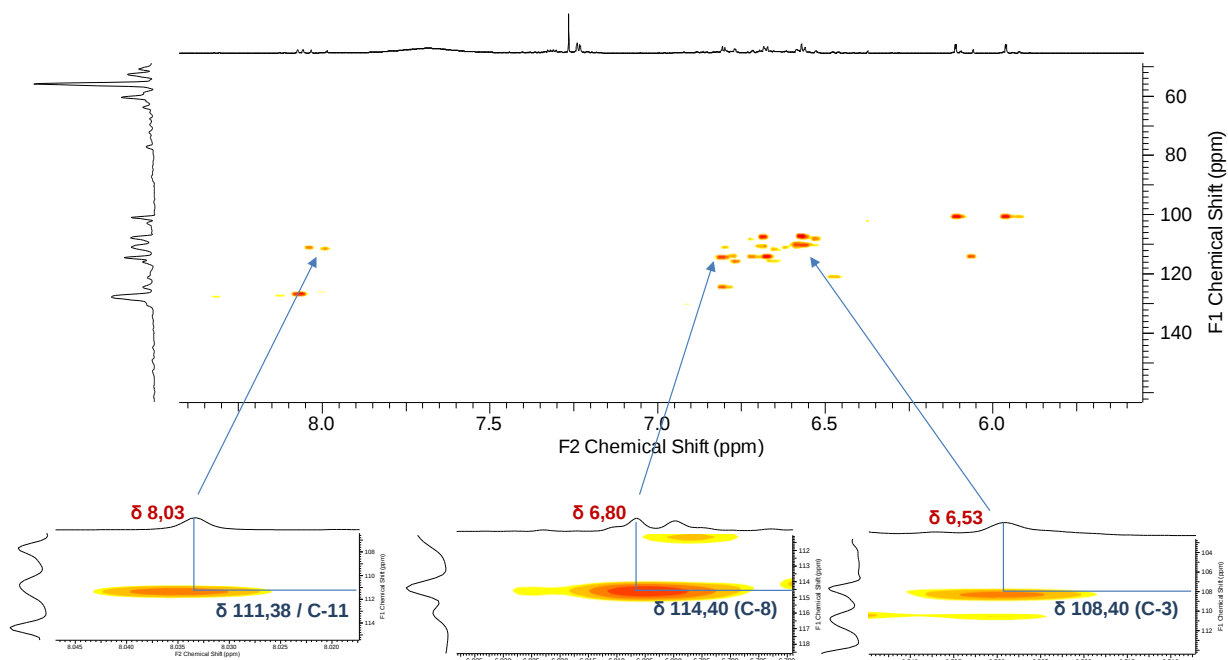


Figura 86. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica das folhas de *B. canescens*.

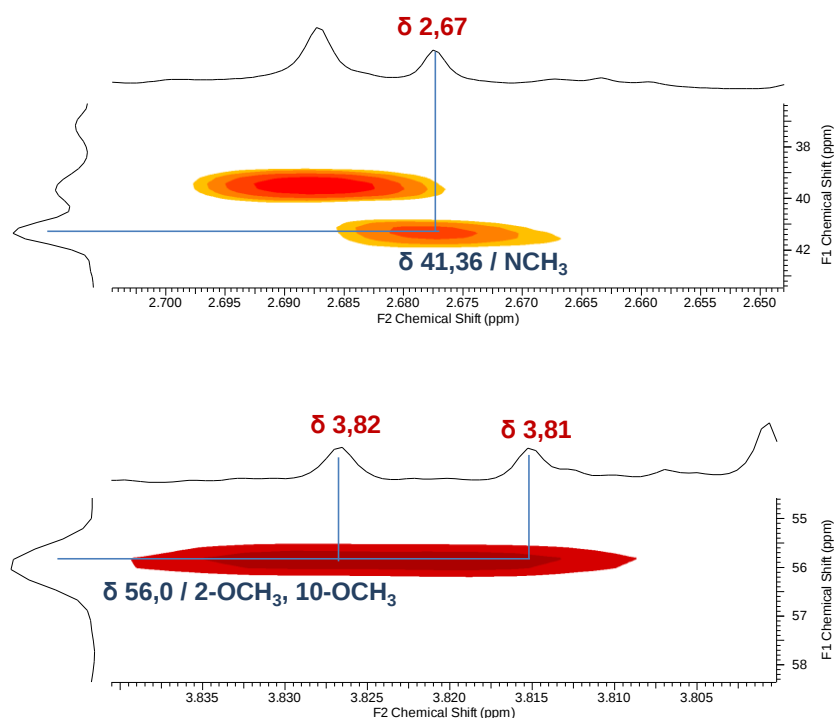


Figura 87. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente região com um dubleto em δ 2,67, 3,82 e 3,81 respectivamente.

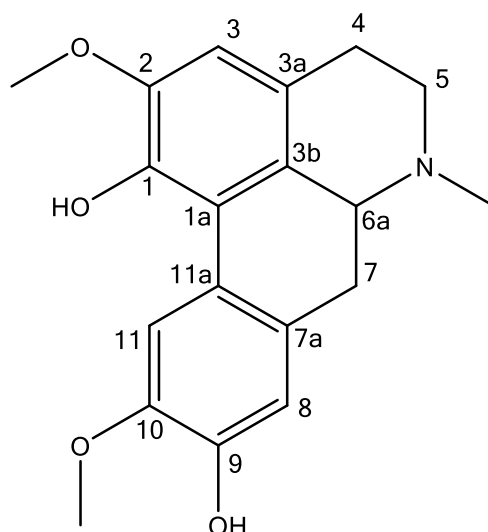


Figura 88. Estrutura do alcaloide isoboldina.

Tabela 17. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC para o alcaloide isoboldina.

Isoboldina (m/z 328)				
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC ^a	HSQC ^b
1	-	-	-	140,5
1a	-	-	-	119,4
2	-	-	-	145,8
3	6,53 (1H, s)	6,55 (1H, s)	108,40	108,9
3a	-	-	-	-
3b	-	-	-	127,5
4 _{pseudoax}	2,95 (1H, m)	2,64 (1H, dd, 15,9 e 3,4)	34,22	28,9
4 _{pseudoeq}	3,17 (1H, m)	3,15 (1H, m)	34,22	28,9
5 _{pseudoax}	-	2,53 (1H, m)	-	53,6
5 _{pseudoeq}	-	3,05 (1H, m)	-	53,6
6a	-	3,05 (1H, m)	-	62,7
7 _{pseudoax}	-	2,57 (1H, m)	-	34,5
7 _{pseudoeq}	-	3,00 (1H, dd, 13,8 e 4,2)	-	34,5
7a	-	-	-	130,0
8	6,80 (1H, s)	6,83 (1H, s)	114,40	114,0
9	-	-	-	144,5
10	-	-	-	145,2
11	8,03 (1H, s)	8,02 (1H, s)	111,38	111,7
11a	-	-	-	124,3

N-CH₃	2,67 (3H, s)	2,55 (3H, s)	41,36	44,0
2-OCH₃	3,81 (3H, s)	3,92 (3H, s)	56,00	56,3
10-OCH₃	3,82 (3H, s)	3,94 (3H, s)	56,00	56,3

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para HSQC em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Soares et al., 2015a (H; 600 MHz, CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

Nas análises realizadas, foi possível identificar com base no espectro de RMN de ¹H (Figura 76) e mapa de correlações HSQC (Figura 77) para a substância com T_R 8,46 minutos (Tabela 18) com o íon de *m/z* 298 ([M+H]⁺), correspondente a molécula protonada (Figura 89). Este íon foi submetido à análise de MS² (Figura 90), sendo observado um padrão de fragmentação com perdas 17 Da (*m/z* 298 → 281) e 15 Da (*m/z* 281 → 266).

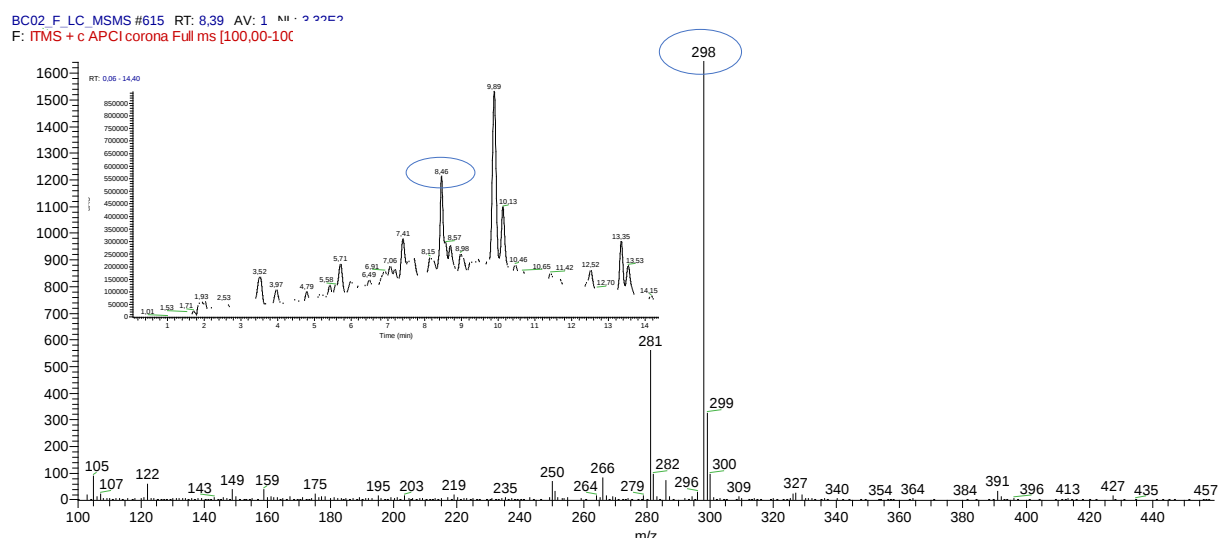


Figura 89. Espectro de massas do íon de *m/z* 298 e cromatograma obtido da análise de LC-EM da fração alcaloídica das folhas de *B. canescens*.

BC02 F.LC.MSMS #615 RT: 8.39 AV: 1 AB: 2 22E2
 F: ITMS + c ESI Full ms2 298,00@cid25,00 [i

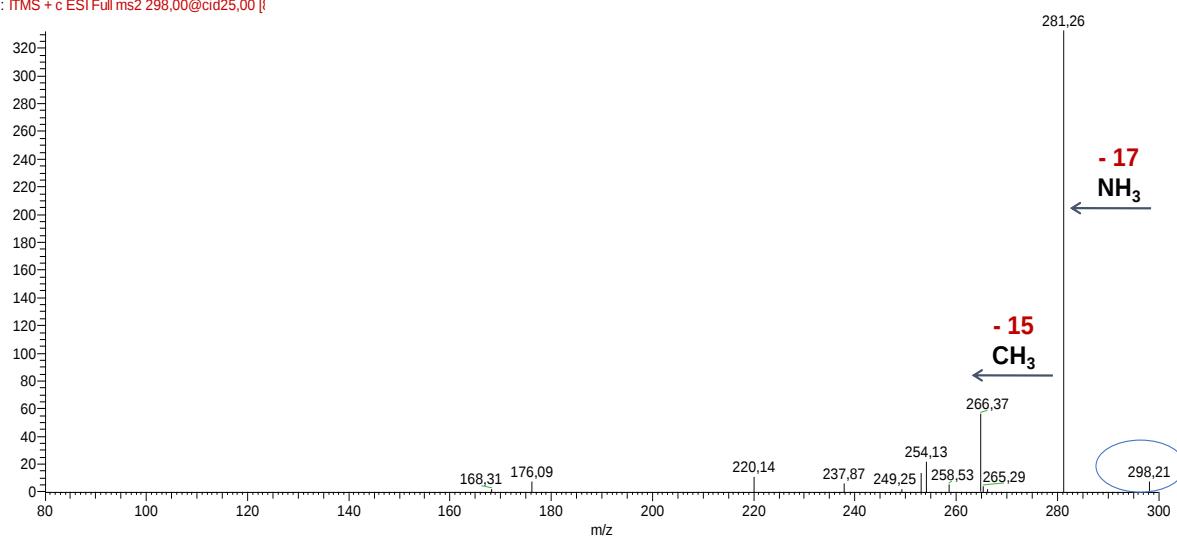


Figura 90. Espectro de massas em MS^2 do íon de m/z 298 ($[\text{M}+\text{H}]^+$).

Na região dos hidrogênios aromáticos no espectro de RMN de ^1H (Figura 76) foi possível observar sinais com deslocamentos de δ 6,41, δ 6,29 e δ 6,87, correlacionados no mapa de correlações HSQC (Figura 91) com os carbonos em δ 128,45 (C-9), δ 127,66 (C-11) e δ 152,68 (C-12) respectivamente, sistema característico de sinais localizados no anel D de um esqueleto proaporfínico (SILVA et al., 2014a). O hidrogênio com deslocamento em δ 6,67 é compatível com o H-3 do anel A dissubstituído, e está acoplado ao carbono δ 114,4 (C-3) (Figura 91).

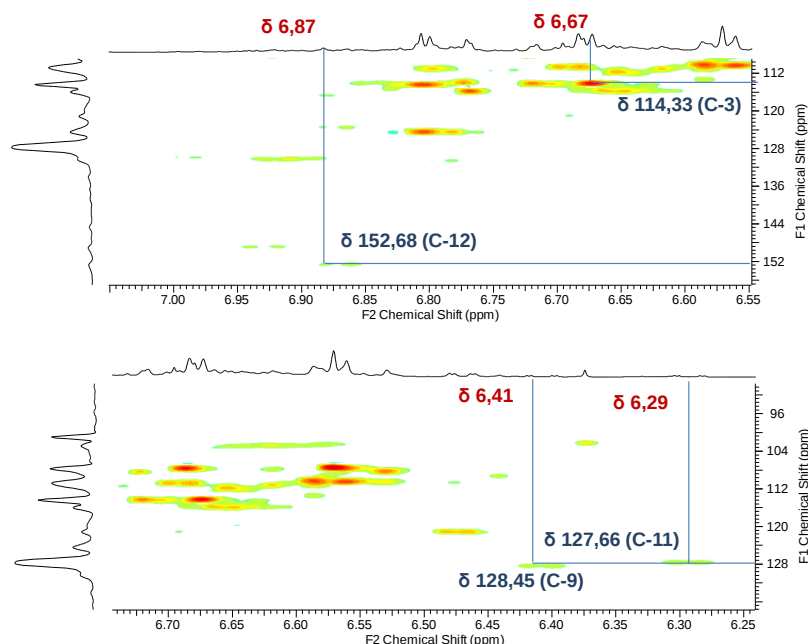


Figura 91. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios da fração alcaloídica das folhas de *B. canescens*.

Através do espectro de RMN de ^1H foi possível observar ainda os sinais em δ 3,81 (3H, s) e δ 3,65 (3H, s), referentes aos hidrogênios metoxílicos, e de acordo com o mapa de correlações HSQC estes hidrogênios estão acoplados aos carbonos em δ 56,0 (2-OCH₃) e 60,0 (1-OCH₃), respectivamente (Figura 92), confirmando a presença de duas metoxilas.

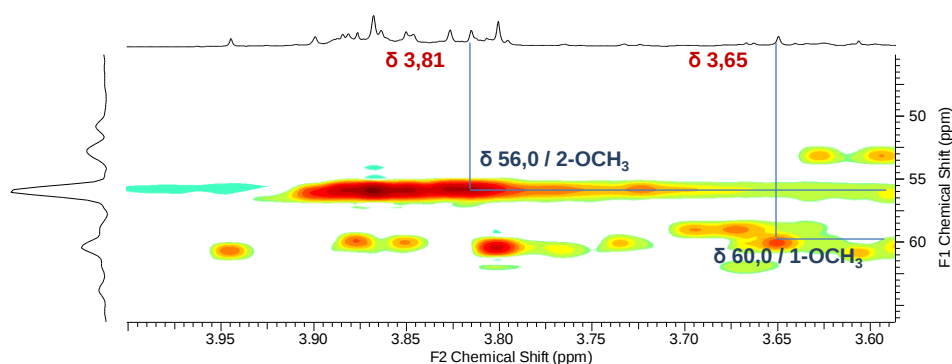


Figura 92. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos sinais de hidrogênios metoxílicos da fração alcaloídica das folhas de *B. canescens*.

O perfil de fragmentação (Figura 90 e 94) é semelhante aos alcaloides aporfinicos que possuem hidrogênio ligado ao nitrogênio do anel B e metoxilas adjacentes no anel A. Esse mesmo perfil de fragmentação foi descrito na espécie *B.*

pleiosperma (SOARES et al., 2015a) e identificado como o alcaloide proaporfínico estefarina (Figura 93 e tabela 18) (STÉVIGNY et al., 2004).

O alcaloide estefarina vem sendo relatado em literatura em várias espécies da família Annonaceae como: *Xylopi laevigata* (COSTA et al., 2013e), *Asimina triloba* (MAJRASHI et al., 2018).

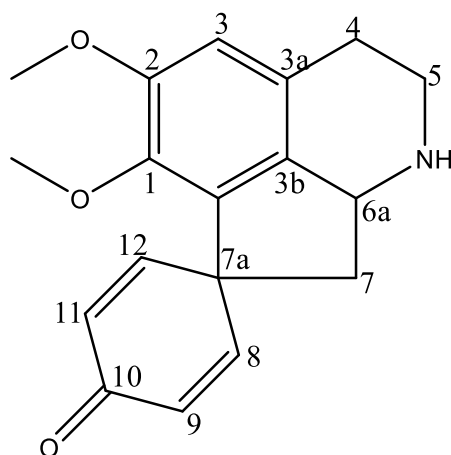


Figura 93. Estrutura do alcaloide estefarina.

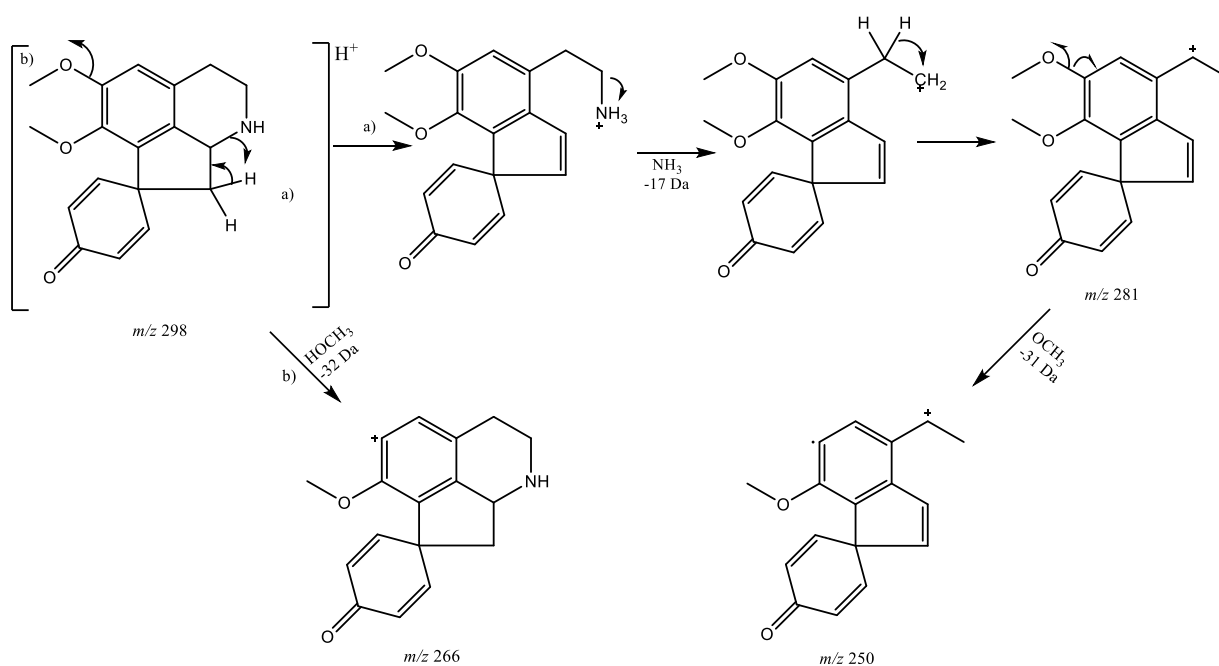


Figura 94. Proposta de fragmentação para o alcaloide estefarina.

Tabela 18. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC para o alcaloide estefarina.

Estefarina (m/z 298)				
Posição	^1H δ (mult., J em Hz)^a	^1H δ (mult., J em Hz)^b	HSQC (^1H-^{13}C)^a	HSQC (^1H-^{13}C)^c
1	-	-	-	145,20
1a	-	-	-	133,13
2	-	-	-	154,20
3	6,67 (1H, s)	6,64 (1H, s)	114,4	112,63
3a	-	-	-	128,63
3b	-	-	-	135,67
4	2,78 (2H, m)	2,80 (2H, m)	26,46	26,76
5	-	3,46 (1H, dd, 6,6 e 1,2) 3,16 (1H, dd 5,4 e 1,8)	-	45,40
6a	4,33 (1H, m)	4,31 (1H, dd 10,5 e 6,6)	56,56	58,22
7	-	2,41 (2H, dd 12,0 e 6,6)	-	48,53
7a	-	-	-	51,82
8	-	7,03 (1H, dd, 3,0 e 10,0)	-	150,30
9	6,41 (1H, dd, 10,00 e 1,8)	6,42 (1H, dd, 10,0 e 1,8)	128,45	128,97
10	-	-	-	186,88
11	6,29 (1H, dd, 10,0 e 1,8)	6,30 (1H, dd, 9,6 e 1,8)	127,66	127,80
12	6,87 (1H, m)	6,89 (1H, dd, 10,0 e 3,0)	152,68	153,70
2-OCH₃	3,81 (3H, s)	3,82 (3H, s)	56,0	56,74
1-OCH₃	3,65 (3H, s)	3,61 (3H, s)	60,0	61,39

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Soares, 2014 (H; 600 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.1.2. Determinação estrutural dos alcaloides identificados na fração alcaloídica obtida dos galhos finos da espécie *B. canescens*.

Para a fração alcaloídica dos galhos finos da espécie *B. canescens* foi possível somente identificar a substância com T_R 9,93 minutos, referente ao íon de m/z 266 ($[M+H]^+$) (Tabela 13 e Figura 95), correspondente à molécula protonada. Este íon foi submetido à análise de MS^2 , sendo observado um padrão de fragmentação visto anteriormente na fração alcaloídica das folhas de *B. canescens* (Figuras 74 e 75). O perfil de fragmentação já foi descrito na espécie *B. pleiosperma* e identificado como o alcaloide aporfínico anonaina (Figura 99), essa afirmação foi comprovada a partir da comparação dos dados de RMN 1D (Figura 96) e 2D (Figuras 97 e 98) com os já descritos em literatura (Tabela 19) (STÉVIGNY et al., 2004; SOARES et al., 2015a; RINALDI et al., 2017).

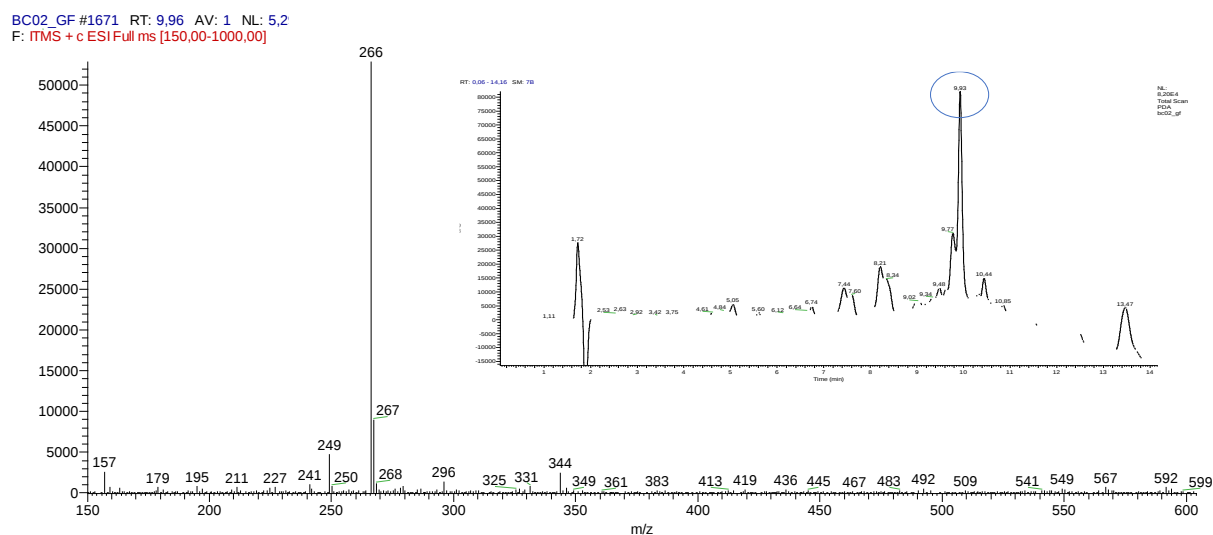


Figura 95. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).

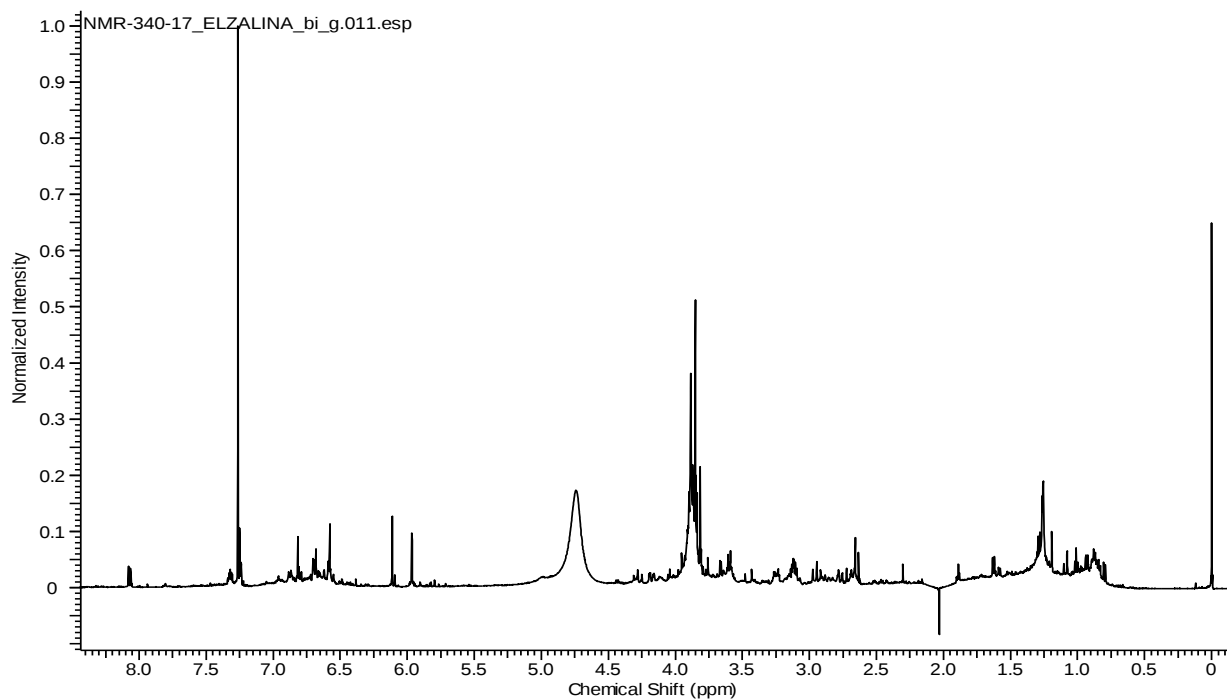


Figura 96. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da fração alcalóidica dos galhos finos de *B. canescens*.

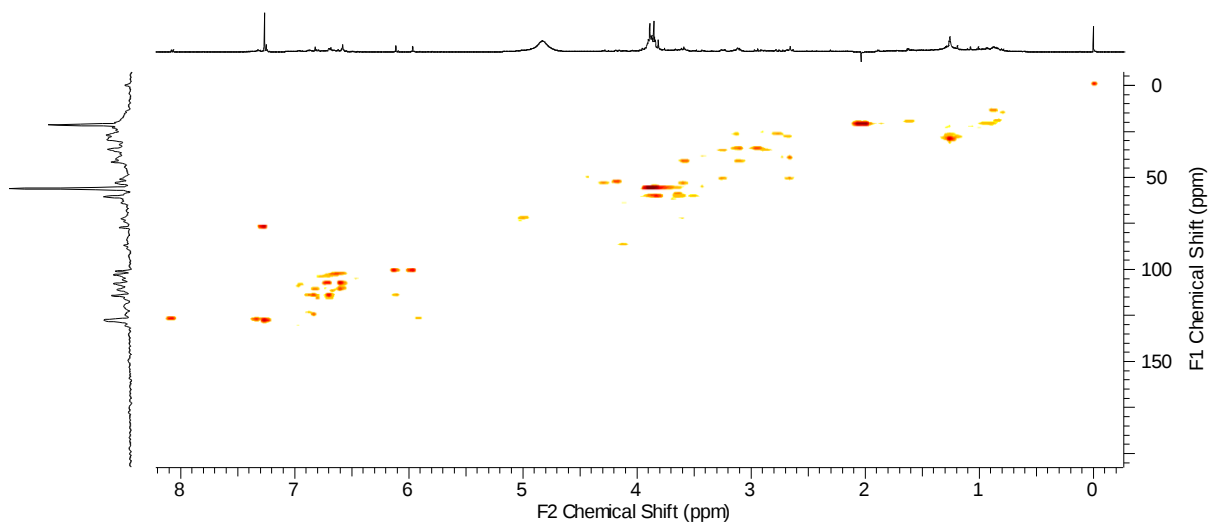


Figura 97. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da fração alcalóidica dos galhos finos de *B. canescens*.

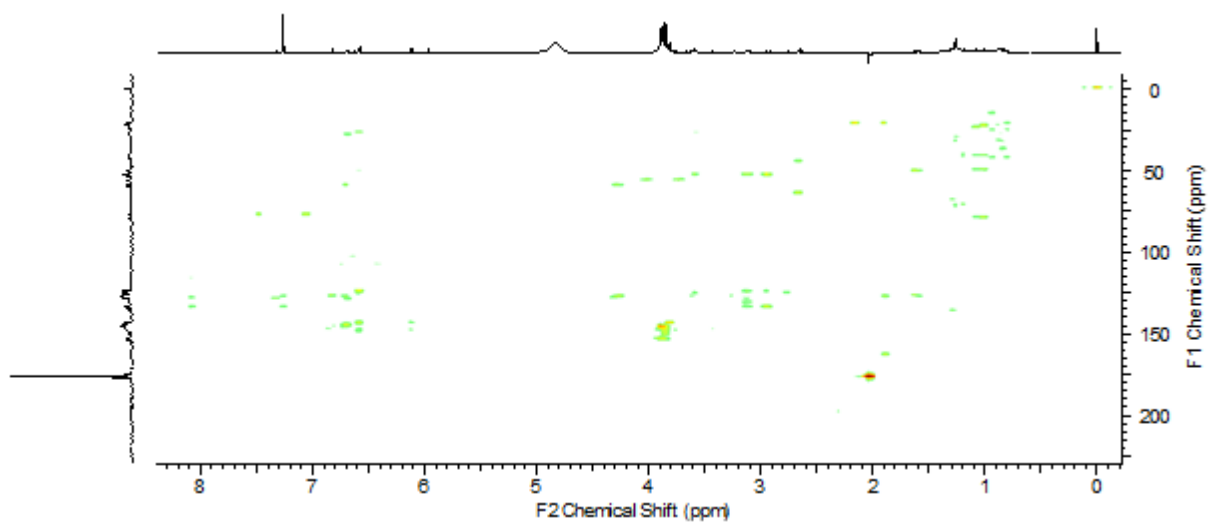


Figura 98. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da fração alcaloídica dos galhos finos de *B. canescens*.

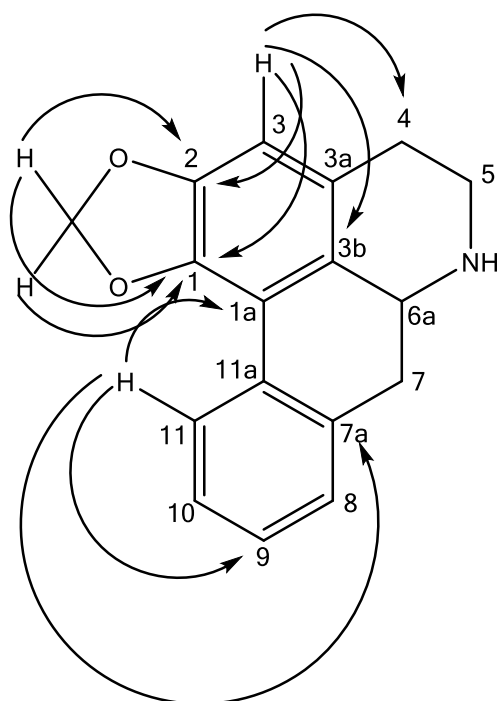


Figura 99. Estrutura e correlações do alcaloide anonaina.

Tabela 19. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC para o alcaloide anonaina.

Anonaina (m/z 266)						
Posição	^1H δ (mult., J em Hz)^a	^1H δ (mult., J em Hz)^b	HSQC^a	HSQC^b	HMBC (^1H-^{13}C)^a	HMBC (^1H-^{13}C)^b
1	-	-	143,16	143,34	-	-
1a	-	-	116,23	116,82	-	-
2	-	-	148,21	147,86	-	-
3	6,57 (1H,s)	6,57 (1H, s)	107,68	107,87	26,98; 123,98; 143,16 e 148,21	29,50; 126,71; 143,34 e 147,86
3a	-	-	128,26	128,76	-	-
3b	-	-	124,80	126,71	-	-
4_{Pseudoax}	-	2,81 (1H, m)	26,98	29,50	-	-
4_{Pseudoeq}	2,77 (1H, m)	2,74 (1H, m)	26,98	29,50	107,68 e 124,80	107,87 e 126,71
5_{Pseudoax}	3,11 (1H, m)	3,10 (1H, m)	41,63	42,91	52,81, 124,80 e 128,26	-
5_{Pseudoeq}	3,59 (1H, m)	3,52 (1H, m)	41,63	42,91	52,81 e 124,80	53,72; 128,76
6a	-	3,83 (1H, dd, 4,7 e 12,0)	52,81	53,72	-	116,82; 128,76
7_{Pseudoax}	-	2,81 (1H, m)	-	35,59	-	-
7_{Pseudoeq}	-	2,97 (1H, m)	-	35,59	-	53,72; 126,71; 134,77
7a	-	-	133,48	134,77	-	-
8	7,24 (1H, m)	7,24(1H, m)	128,13	128,12	-	-
9	7,24 (1H, m)	7,24(1H, m)	128,13	128,12	127,10 e 133,48	-
10	7,31 (1H, m)	7,32 (1H, m)	127,45	127,13	128,13	128,12 e 131,38
11	8,07 (1H, d, 7,94)	8,08 (1H, d, 8,1)	127,12	127,10	116,23; 128,13 e 133,48	116,82; 128,12 e 134,77
11a	-	-	-	131,38	-	-

O-CH₂-O	6,11 (1H, d, 1,3)	6,11 (1H, d, 1,3)	101,02	100,97	143,32; 148,0	143,34
	5,96 (1H, d, 1,3)	5,96 (1H, d, 1,3)	101,02	100,97	143,32	143,34

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Soares, 2014 (H; 600 MHz, CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.2. Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração alcaloídica das folhas da espécie *B. canescens*.

5.8.2.1. Determinação estrutural da amostra BcFFr1.

A amostra codificada como BcFFr1 (2,5 mg) apresentou-se com característica de sólido amorfo. A análise por espectrometria de massas (Figura 100) desta amostra apontou para a presença de uma substância pura, sendo observado majoritariamente o íon *quasi*-molecular com m/z 266 ($[M+H]^+$). Esse íon foi submetido à análises de MSⁿ (Figura 101), sendo observados padrões distintos de fragmentação do alcaloide aporfínico anonaina, com perda inicial de 17 Da (m/z 266 $\rightarrow$ 249), seguida de perdas sequenciais de 30 e 28 Da (m/z 249 $\rightarrow$ 219 $\rightarrow$ 191) identificado como majoritário anteriormente na fração alcaloídica das folhas de *B. canescens* (Figuras 74 e 75).

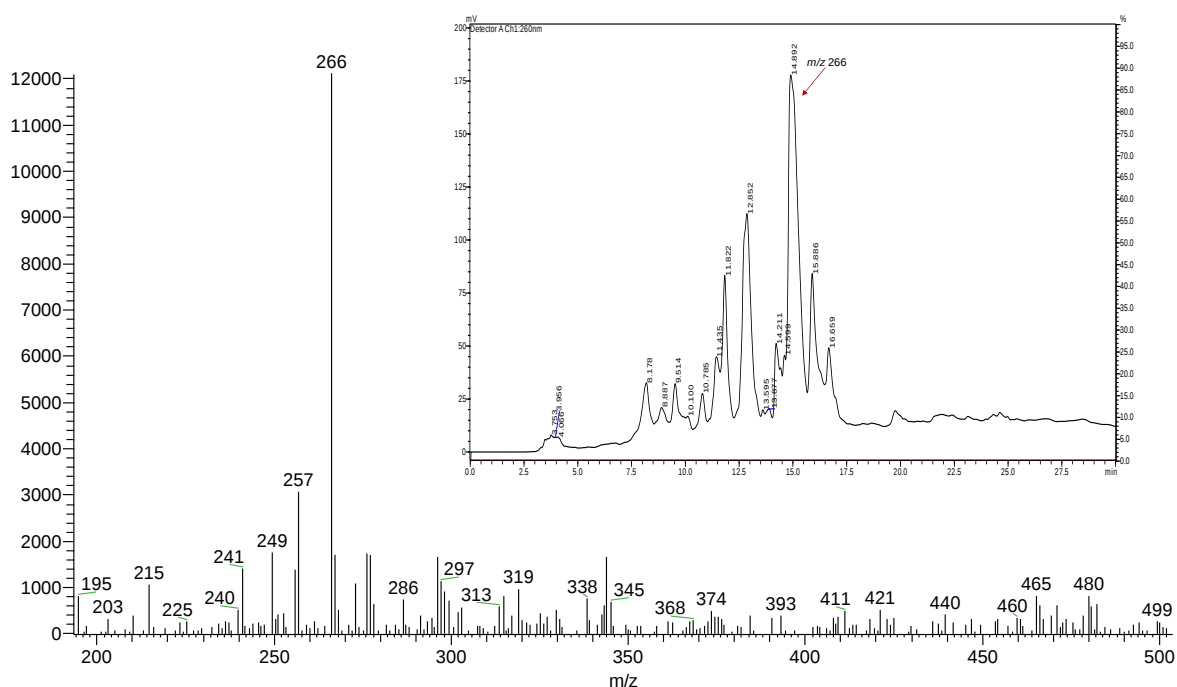


Figura 100. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).

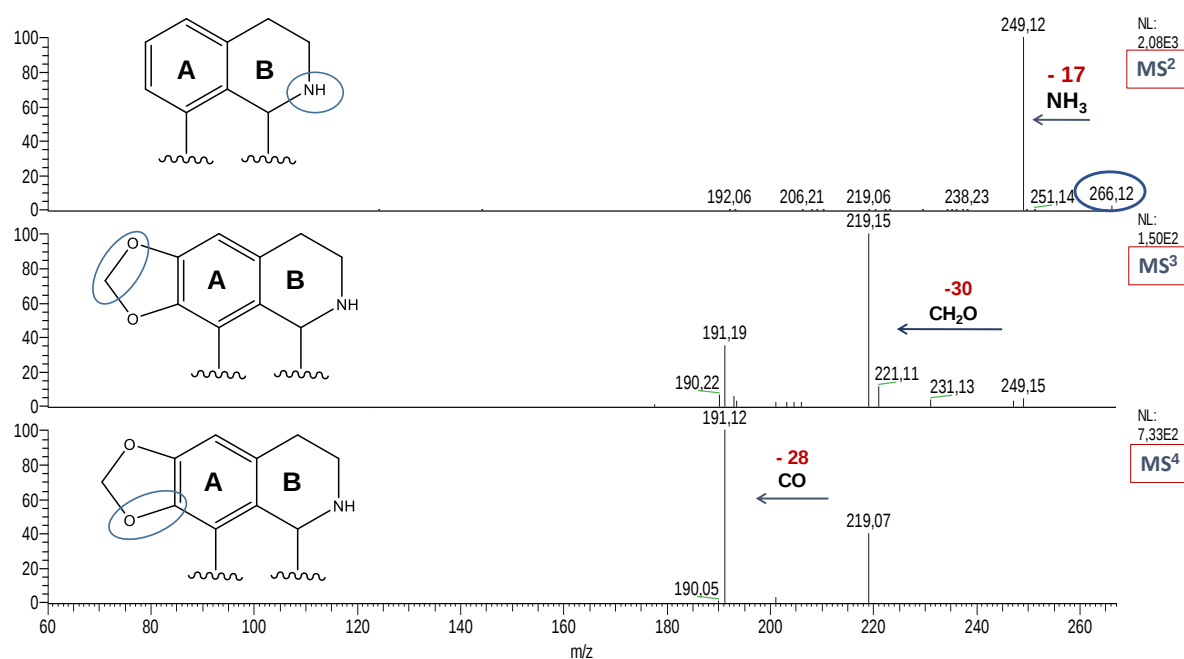


Figura 101. Espectro de massas em MS⁴ do íon de m/z 266 ($[M+H]^+$).

Após uma comparação dos espectros de RMN de ^1H , referentes a substância isolada de *B. canescens* (BcFFr1) e a identificada na fração alcaloídica das folhas de *B. canescens* (Tabelas 16 e 20), foi possível confirmar o alcaloide aporfinico anonaina (Figura 102). O espectro de RMN de ^1H está disposto no anexo 1 (Figura 218).

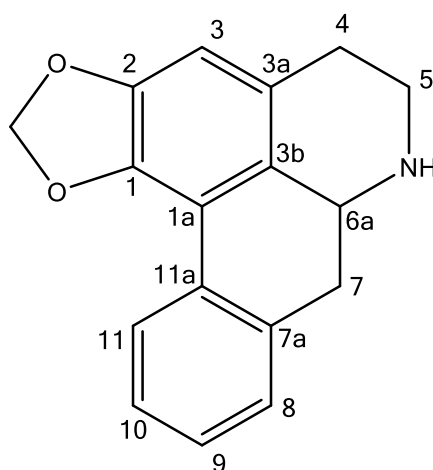


Figura 102. Estrutura do alcaloide anonaina.

Tabela 20. Dados de RMN de ^1H para o alcaloide anonaina.

Anonaina (m/z 266)		
Posição	^1H δ (mult., J em Hz)^a	^1H δ (mult., J em Hz)^b
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	6,56 (1H,s)	6,57 (1H, s)
3a	-	-
3b	-	-
4_{Pseudoax}	-	2,81 (1H, m)
4_{Pseudoeq}	2,79 (1H, m)	2,74 (1H, m)
5_{Pseudoax}	3,14 (1H, m)	3,10 (1H, m)
5_{Pseudoeq}	3,56 (1H, m)	3,52 (1H, m)
6a	3,80 (1H, dd, 4,5 e 10,0)	3,83 (1H, dd, 4,7 e 12,0)
7_{Pseudoax}	-	2,81 (1H, m)
7_{Pseudoeq}	-	2,97 (1H, m)
7a	-	-
8	7,22 (1H, m)	7,24(1H, m)
9	7,22 (1H, m)	7,24(1H, m)
10	7,30 (1H, m)	7,32 (1H, m)
11	8,09 (1H, d, 7,94)	8,08 (1H, d, 8,1)
11a	-	-
O-CH₂-O	6,10 (1H, d, 1,3)	6,11 (1H, d, 1,3)
	5,94 (1H, d, 1,3)	5,96 (1H, d, 1,3)

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H , em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno.

^bDados da literatura de acordo com Soares, 2014 (600 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.2.2. Determinação estrutural da amostra BcFFr2.

O íon de m/z 328 (3,0 mg) observado na amostra BcFFr2 (Figura 103), quando submetido à análise de fragmentação, evidenciou perdas de 31, 32 e 28 Da (m/z 328 $\rightarrow$ 297 $\rightarrow$ 265 $\rightarrow$ 237) (Figura 104), perdas semelhantes às observadas anteriormente na fração alcaloídica das folhas de *B. canescens* para o alcaloide aporfínico identificado como isoboldina (Figuras 84 e 85). Uma comparação dos dados de RMN de ^1H (Tabela 17 e 21) entre as amostras confirmou a presença do alcaloide isoboldina como substância isolada (Figura 105). O espectro de RMN de ^1H está apresentado no Anexo 1 (Figura 219).

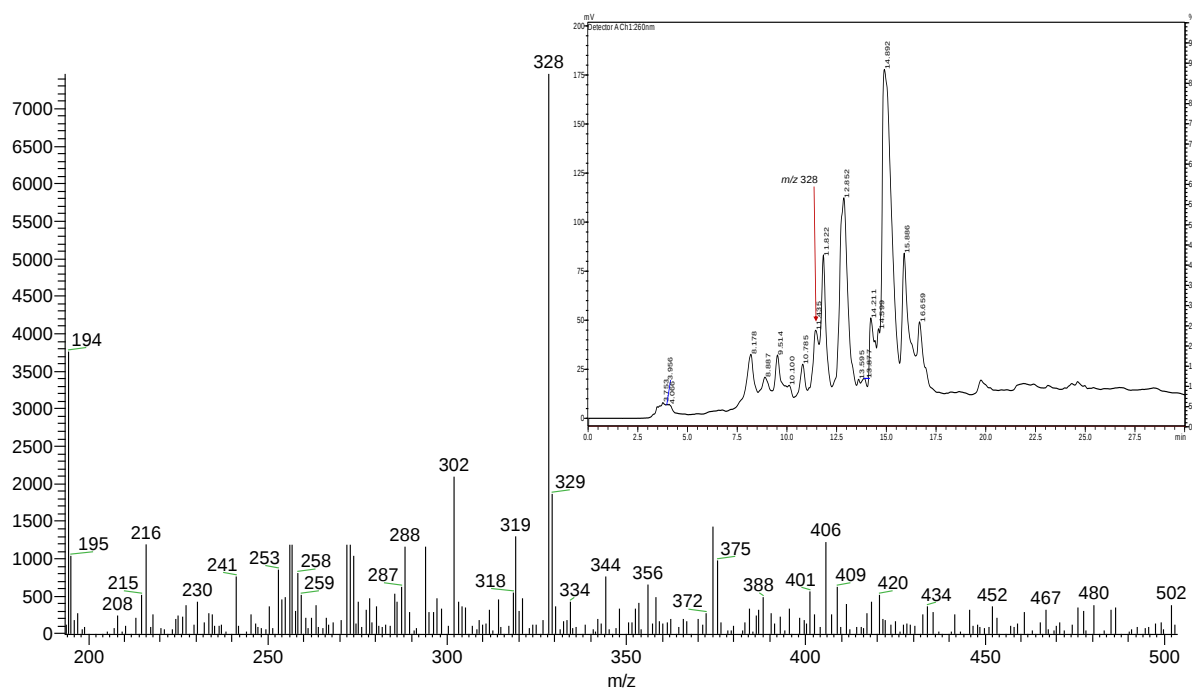


Figura 103. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$).

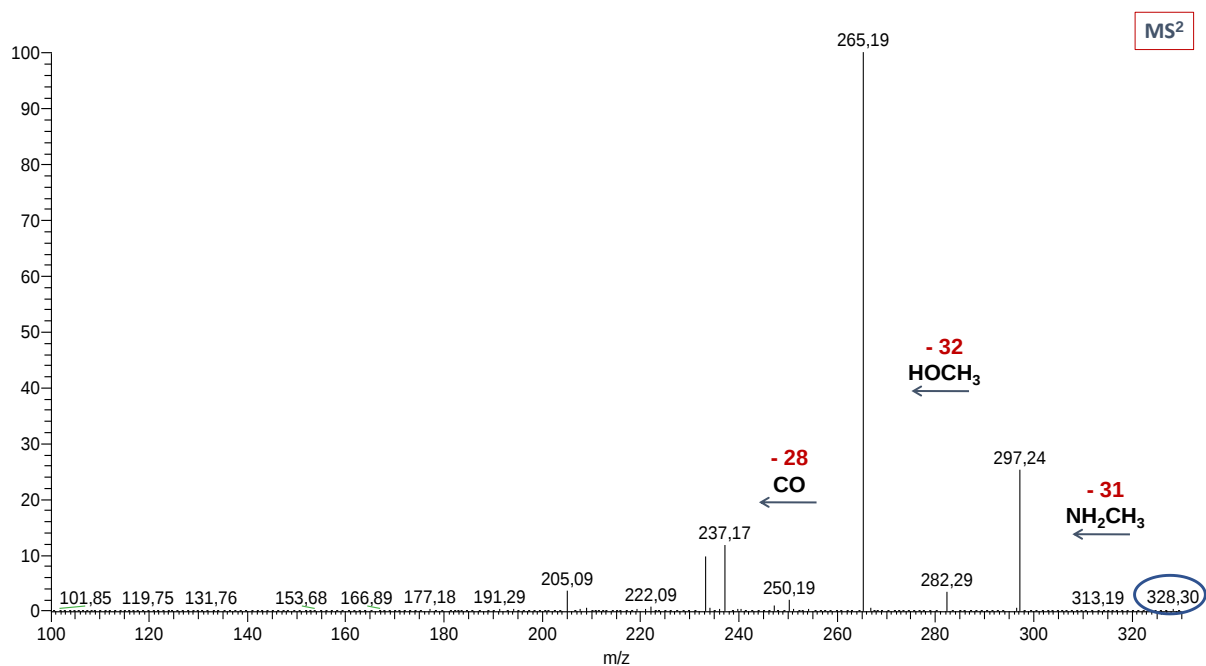


Figura 104. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 328 ([M+H]⁺).

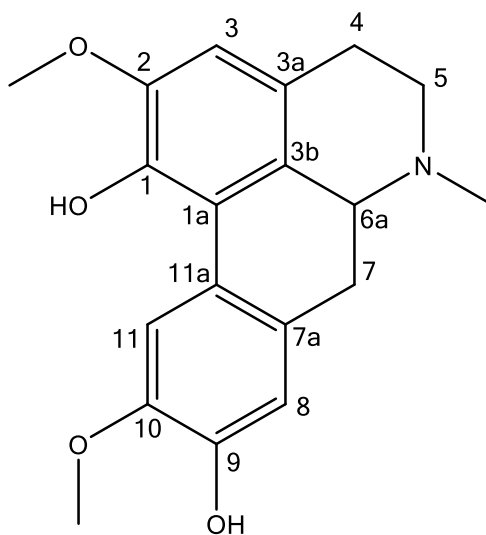


Figura 105. Estrutura do alcaloide isoboldina.

Tabela 21. Dados de RMN de ^1H para o alcaloide isoboldina.

Isoboldina (<i>m/z</i> 328)		
Posição	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz)^a	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz)^b
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	6,52 (1H, s)	6,55 (1H, s)
3a	-	-
3b	-	-
4_{pseudoax}	2,97 (1H, m)	2,64 (1H, dd, 15,9 e 3,4)
4_{pseudoeq}	3,19 (1H, m)	3,15 (1H, m)
5_{pseudoax}		2,53 (1H, m)
5_{pseudoeq}	-	3,05 (1H, m)
6a	-	3,05 (1H, m)
7_{pseudoax}		2,57 (1H, m)
7_{pseudoeq}	-	3,0 (1H, dd, 13,8 e 4,2)
7a	-	-
8	6,84 (1H, s)	6,83 (1H, s)
9	-	-
10	-	-
11	8,04 (1H, s)	8,02 (1H, s)
11a	-	-
N-CH₃	2,60 (3H, s)	2,55 (3H, s)
2-OCH₃	3,85 (3H, s)	3,92 (3H, s)
10-OCH₃	3,90 (3H, s)	3,94 (3H, s)

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para RMN de ^1H em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com SOARES et al., 2015a (600 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.2.3. Determinação estrutural da amostra BcFFr3.

A fração codificada como BcFFr3 (3,3 mg) apresentou-se como um sólido amorfo de coloração marrom. Através da análise por espectrometria de massas, foi possível observar o íon *quasi-molecular* de m/z 298 ($[M+H]^+$) (Figura 106). Esse íon foi submetido a análises de MS^n (Figura 107), na qual observou-se um padrão de fragmentação distinto com perdas de 17 e 31 Da (m/z 298 $\rightarrow$ 281 $\rightarrow$ 250), além de uma perda de 15 Da (m/z 281 $\rightarrow$ 266). Esse mesmo perfil de fragmentação foi encontrado nas análises da fração alcaloídica das folhas de *B. canescens* (Figura 90), sendo sugerido pertencer ao alcaloide proaporfínico estefarina (Figura 108). Após a comparação dados de RMN de 1H (Tabelas 18 e 22) foi confirmado o isolamento desse alcaloide. O espectro de RMN de 1H está disposto no Anexo 1 (Figura 220).

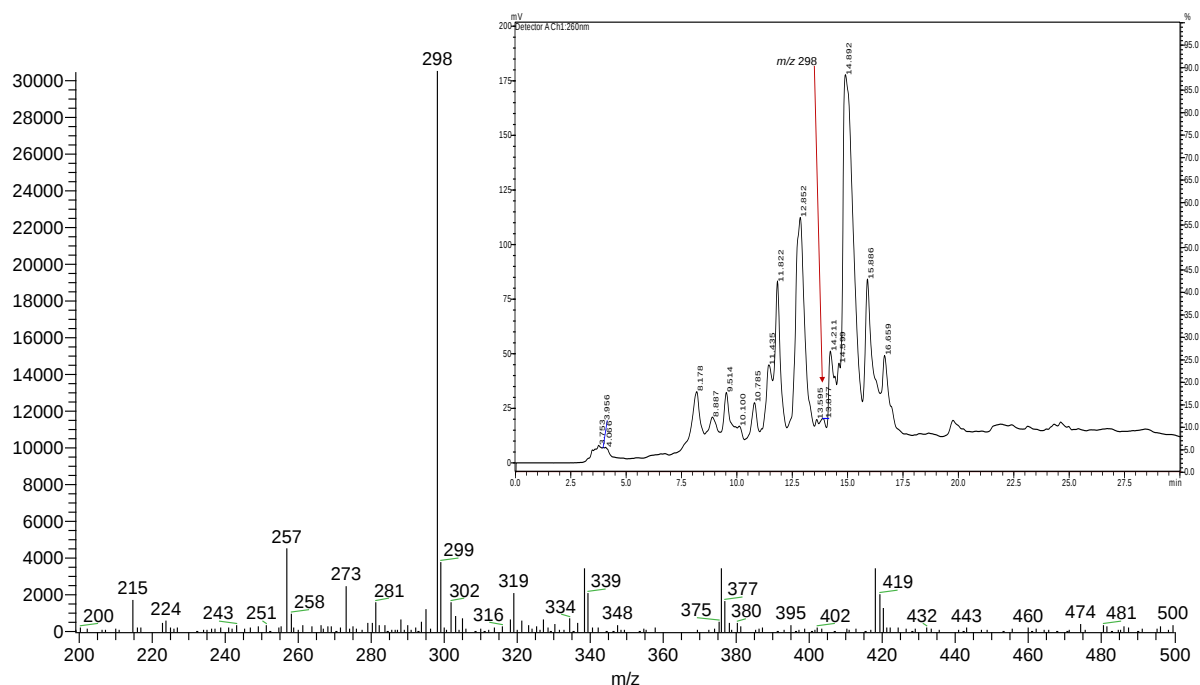


Figura 106. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 298 ($[M+H]^+$).

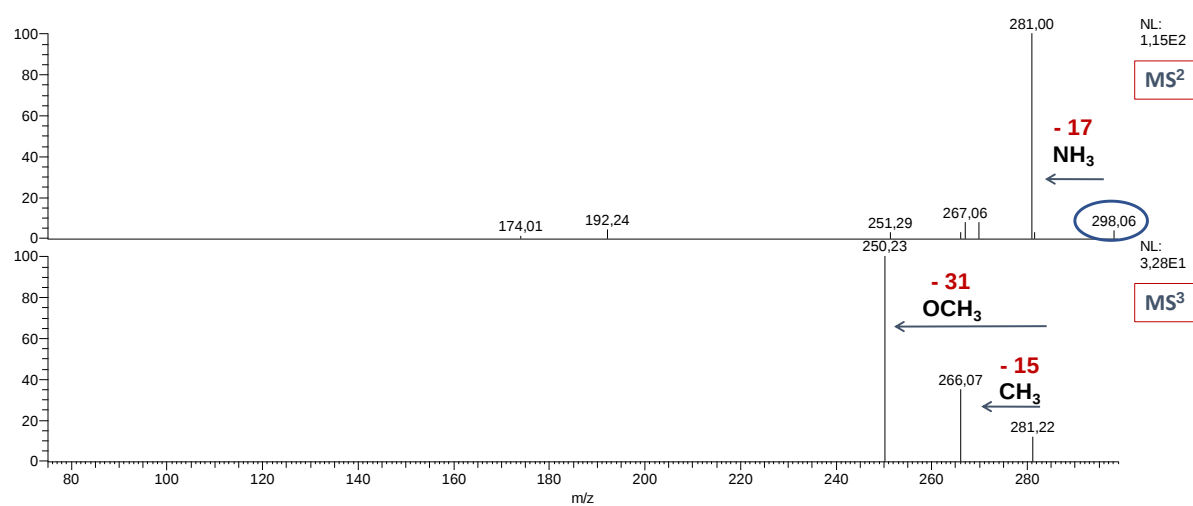


Figura 107. Espectro de massas em MS^3 do íon de m/z 298 ($[M+H]^+$).

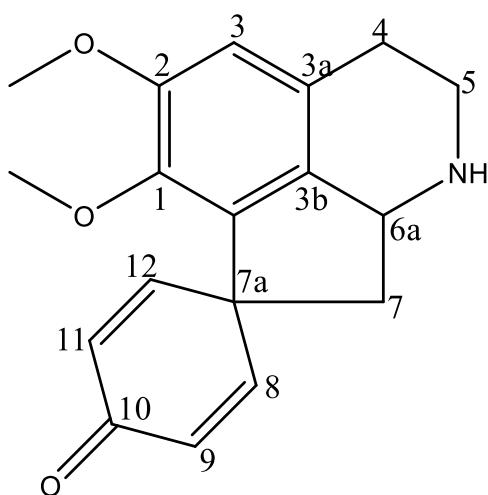


Figura 108. Estrutura do alcaloide estefarina.

Tabela 22. Dados de RMN de ^1H para o alcaloide estefarina.

Estefarina (<i>m/z</i> 298)		
Posição	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz)^a	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz)^b
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	6,67 (1H, s)	6,64 (1H, s)
3a	-	-
3b	-	-
4	2,78 (2H, m)	2,80 (2H, m)
5	-	3,46 (1H, dd, 6,6 e 1,2) 3,16 (1H, dd 5,4 e 1,8)
6a	4,33 (1H, m)	4,31 (1H, dd 10,5 e 6,6)
7	-	2,41 (2H, dd 12,0 e 6,6)
7a	-	-
8	-	7,03 (1H, dd, 3,0 e 10,0)
9	6,41 (1H, dd, 10,00 e 1,8)	6,42 (1H, dd, 10,0 e 1,8)
10	-	-
11	6,29 (1H, dd, 10,0 e 1,8)	6,30 (1H, dd, 9,6 e 1,8)
12	6,87 (1H, m)	6,89 (1H, dd, 10,0 e 3,0)
2-OCH₃	3,81 (3H, s)	3,82 (3H, s)
1-OCH₃	3,65 (3H, s)	3,61 (3H, s)

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com SOARES, 2014 (600 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.2.4. Determinação estrutural da amostra BcFFr4.

Para a amostra com o código BcFFr4 (3,0 mg) com características de sólido amorfo, após a análise por espectrometria de massas (Figura 109), foi observado o íon *quasi-molecular* de m/z 276 ($[M+H]^+$). Posteriormente esse íon foi submetido a análises de MS^2 (Figura 110), sendo observado padrões de fragmentação semelhantes para alcaloides oxaporfínicos (SILVA et al., 2012), com perda inicial de 28 Da (m/z 276 $\rightarrow$ 247).

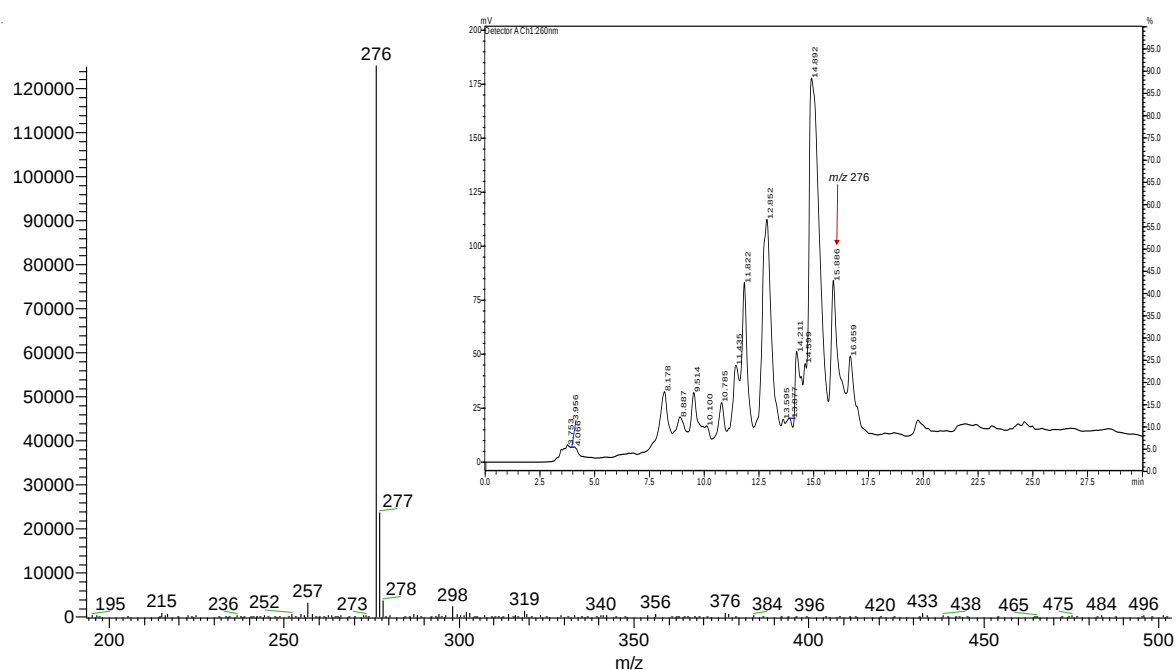


Figura 109. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 276 ($[M+H]^+$).

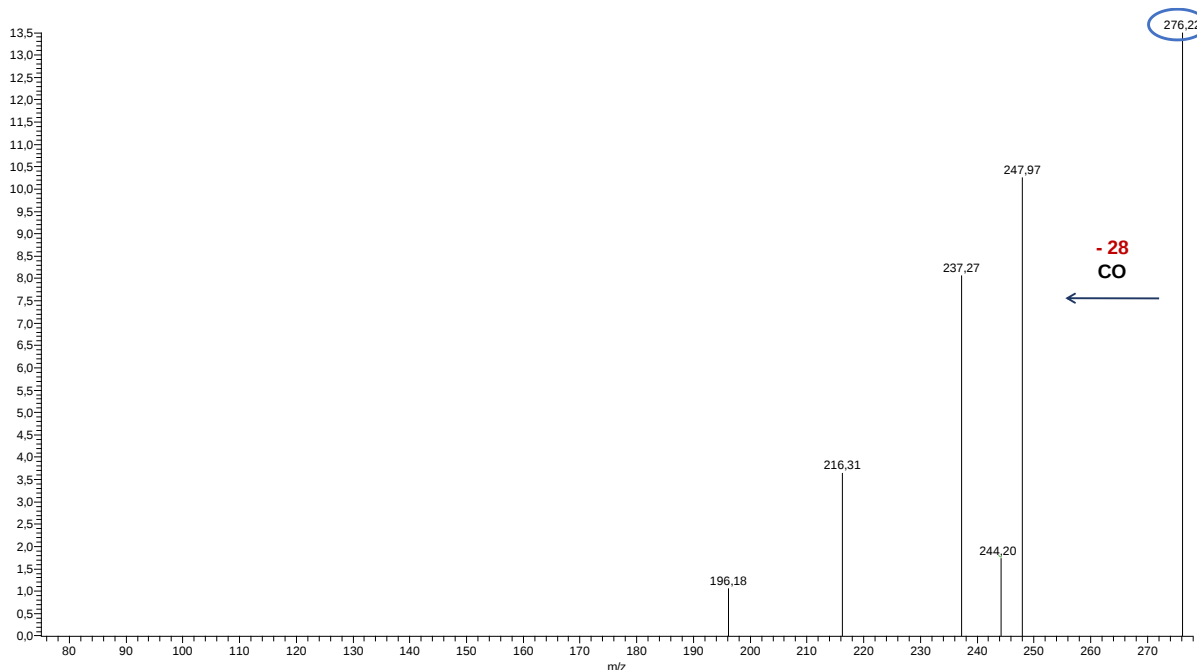


Figura 110. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 276 ($[M+H]^+$).

A ampliação do espectro de RMN de 1H (Figura 111) apresenta sete sinais na região dos hidrogênios aromáticos, quatro atribuídos aos hidrogênios característicos do anel D do sistema aromático não substituído em δ 8,68 (1H, d 8,3 Hz), δ 7,81 (1H, ddd, 8,4, 7,2 e 1,5), δ 7,60 (1H, m) e δ 8,42 (1H, dd, 7,8 e 1,0), relacionados aos hidrogênios H-11, H-10, H-9 e H-8, respectivamente. O sinal do hidrogênio H-3 do anel A, foi observado em δ 7,34 (1H, s), indicando a presença desse sistema oxaporfínico dissustituído.

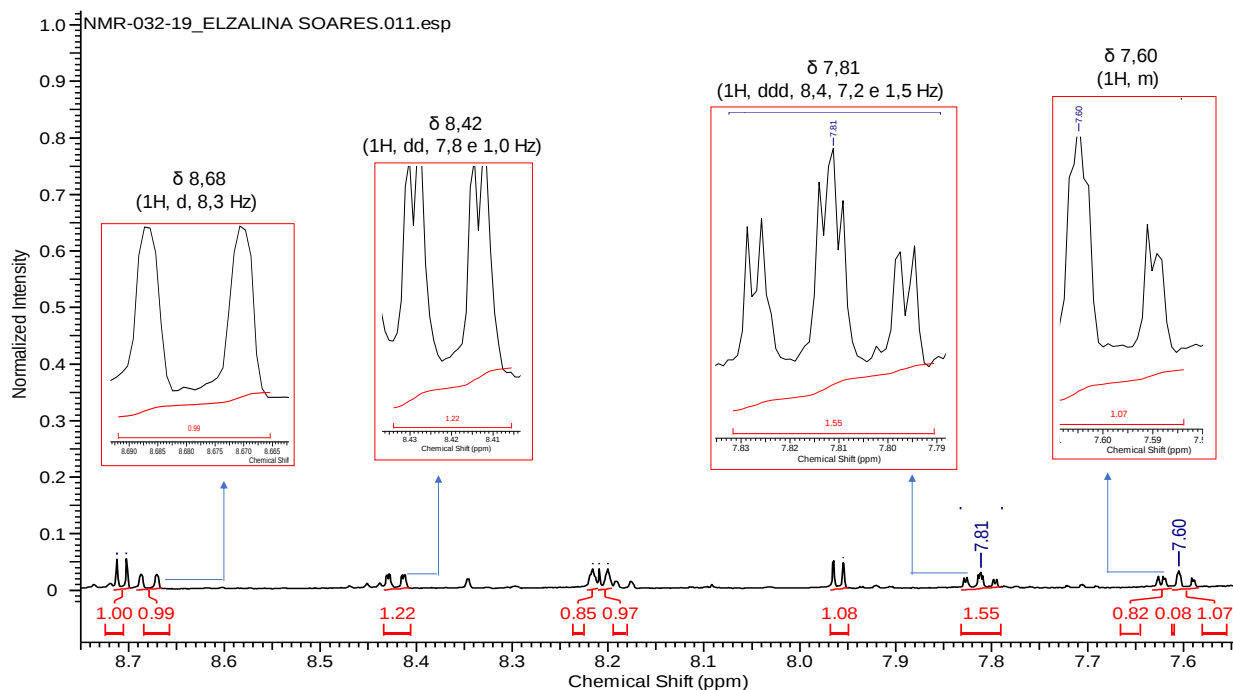


Figura 111. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) na região dos aromáticos da amostra BcFFr4.

Os sinais aromáticos observados no espectro de RMN de ^1H (Figura 112) em δ 7,76 (1H, d, 4,9) e δ 8,71 (1H, d 4,9), são compatíveis com o anel B do sistema oxaporfínico para os hidrogênios H-4 e H-5 respectivamente, onde indicam semelhanças com um sistema piridínico (CHANG et al., 2004). A presença de um grupo metilenodióxi substituído nos carbonos C-1 e C-2, foi confirmada pelo sinal em δ 6,44 (2H, s), observado no RMN de ^1H (Figura 113).

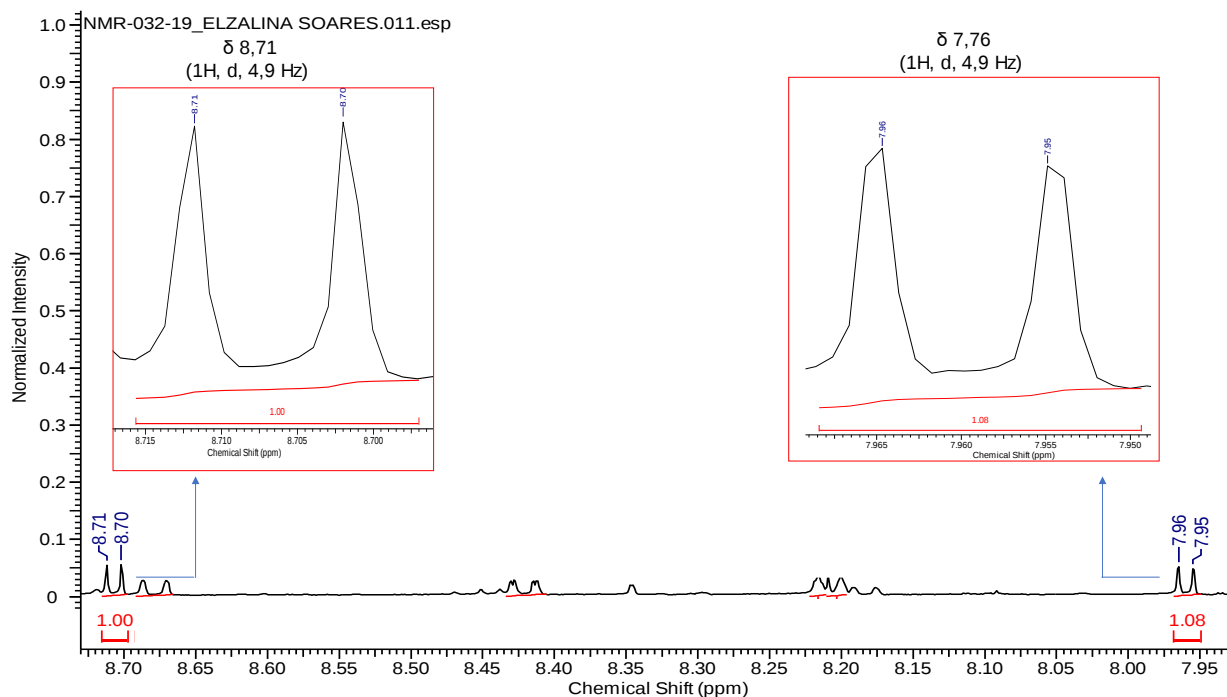


Figura 112. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) na região dos aromáticos referente ao sistema oxoaporfínico da amostra BcFFr4.

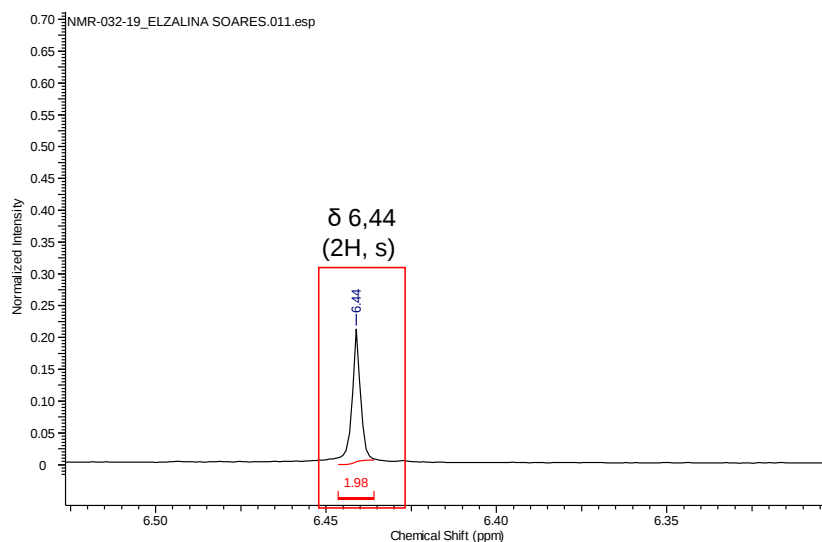


Figura 113. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente ao grupo metilenodioxí da amostra BcFFr4.

Após as análises do espectro de RMN de ^1H (Anexo 1 – Figura 221), foi realizada a comparação com os dados relatados em literatura (Tabela 23), sendo possível a confirmação da amostra BcFFr4 como o alcaloide oxoaporfínico liriodenina (Figura 114) e sua proposta de fragmentação está disposta na figura 115. Alcaloide comum em espécies da família Annonaceae (TADIĆ, et al., 1987; SILVA et al., 2007a; SURESH et

al., 2012; ZAWAWI, et al., 2012; EGYDIO et al., 2013; RABELO et al., 2014; SOARES et al., 2015a; BAKRI et al., 2017; SILVA et al., 2017b; SANTOS et al., 2018; MAJRASHI et al., 2018), o qual é considerado um marcador quimiotaxonômico dessa família (DA CRUZ et al., 2011; DUTRA et al., 2012; COSTA et al., 2013d).

O alcaloide liriodenina possui várias atividades relacionadas como antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antiplaquetária, antiplasmodica e antiproliferativa (SURESH et al., 2012; CHEN et al., 2013; COSTA et al., 2013d; RABELO et al., 2014; SANTOS et al., 2018).

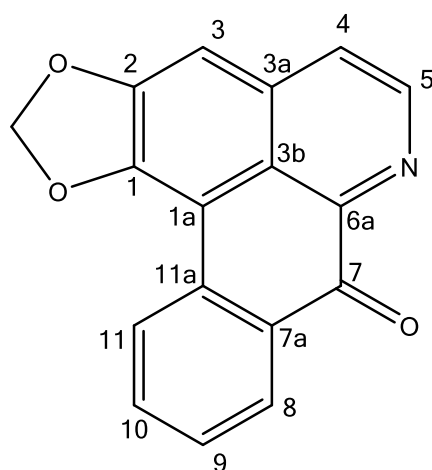


Figura 114. Estrutura do alcaloide liriodenina.

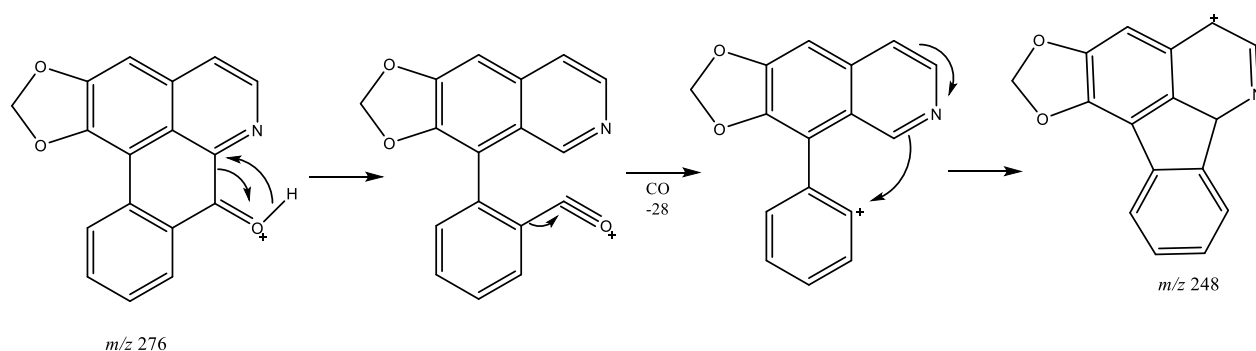


Figura 115. Proposta de fragmentação do alcaloide liriodenina.

Tabela 23. Dados de RMN de ^1H para o alcaloide liriidenina.

Liriodenina (<i>m/z</i> 276)		
Posição	^1H δ (mult., J em Hz)^a	^1H δ (mult., J em Hz)^b
1	–	–
1a	–	–
2	–	–
3	7,34 (1H, s)	7,22(1H, s)
3a		
3b		
4	7,96 (1H, d, 4,9)	7,80 (1H, d 4,8)
5	8,71 (1H, d 4,9)	8,90 (1H, d 4,8)
6a		
7		
7a		
8	8,42 (1H, dd, 7,8 e 1)	8,59 (1H, dd, 7,8 e 1,2)
9	7,60 (1H, m)	7,59 (1H, t, 7,8 3x (2)
10	7,81 (1H, ddd, 8,4, 7,2 e 1,5)	7,78 (1H, dd, 8,4 e 1,2)
11	8,68 (1H, d 8,3)	8,69 (1H, d, 8,4)
11a		
(1-2)-OCH₃	6,44 (2H, s)	6,38 (2H, s)

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H MHz em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com SOARES, 2014 (600 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.2.5. Determinação estrutural da amostra BcFFr5.

A substância codificada como BcFFr5 (1,2 mg), é um sólido de coloração marrom. A análise usando espectrometria de massas evidenciou um íon *quasi-molecular* de m/z 282 ($[M+H]^+$) (Figura 116), o qual foi submetido a análise de MS^2 (Figura 117). Nos espectros de MS^n foi possível a observação da perda inicial de 17 Da (m/z 282 $\rightarrow$ 265), sugerindo a ausência da metila ligada ao nitrogênio do anel B do esqueleto aporfínico, seguida de perdas sequenciais de 15 Da que indicam a presença de metoxilas adjacentes no anel A. O mesmo padrão foi observado nas análises CLAE-EM/EM para a espécie *B. canescens* (Tabela 13). Tal padrão de fragmentação evidencia uma estrutura aporfínica sem *N*-metilação, com duas metoxilas adjacentes, além de um anel D não substituído.

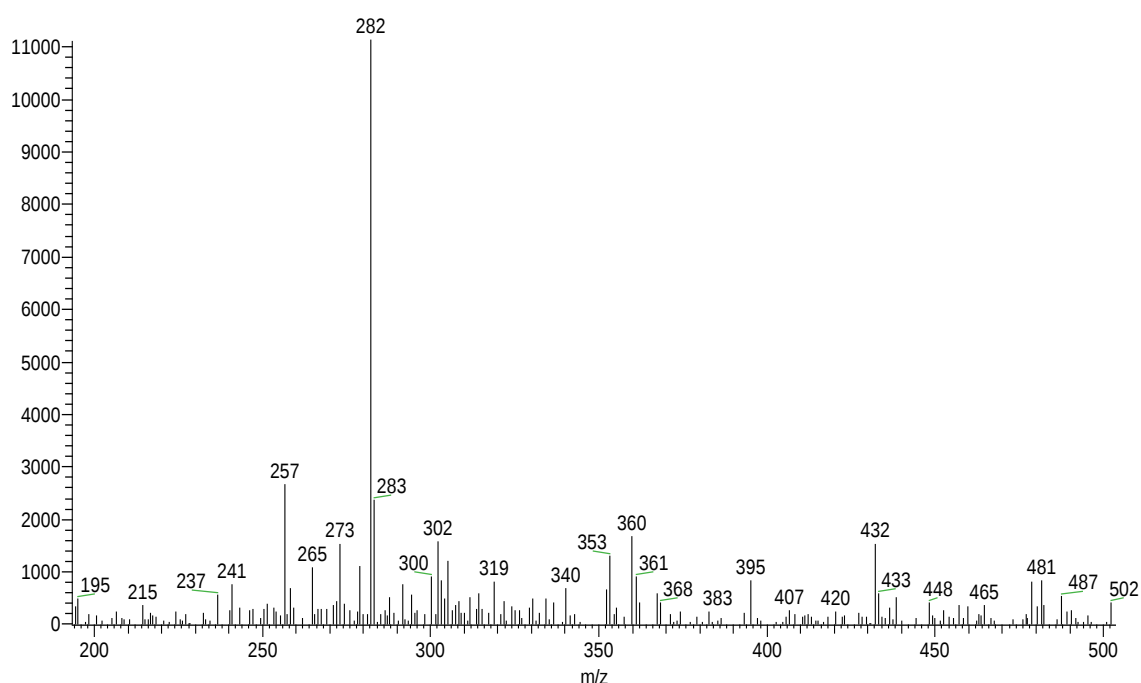


Figura 116. Espectro de massas do íon de m/z 282 ($[M+H]^+$) da amostra BcFFr5.

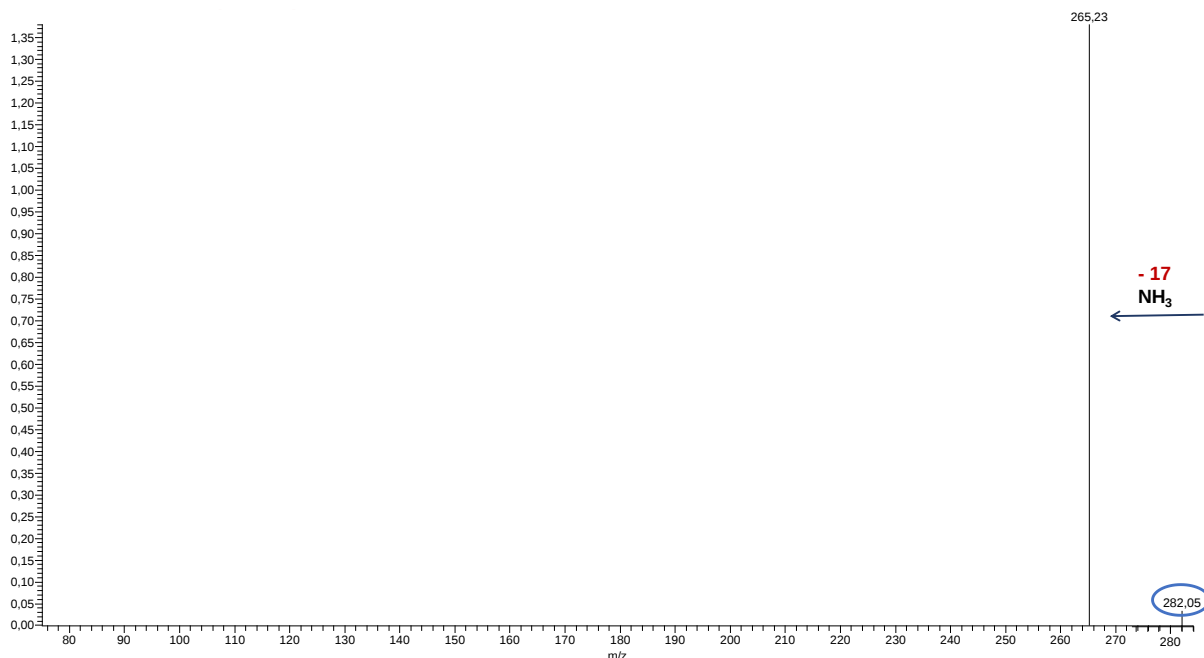


Figura 117. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 286 ($[M+H]^+$).

Na ampliação do espectro de RMN de ^1H (Figura 118) foram observados sinais referentes a hidrogênios aromáticos em δ 7,34 (1H, m), δ 7,36 (1H, m) e δ 8,41 (1H, d, 7,9 Hz), sinais estes característicos de um esqueleto aporfínico não substituído, além de um simpleto em δ 6,68 (1H, s) que foi atribuído ao hidrogênio na posição H-3 do anel A substituído, de um esqueleto aporfínico. Foram observados simpletos integrando para três hidrogênios em δ 3,68 (3H, s) e δ 3,91 (3H, s), característicos de metoxilas ligadas aos carbonos C-1 e C-2 do anel A do esqueleto aporfínico (Figura 119). Outras correlações são apresentadas na tabela 24 e o espectro total de RMN de ^1H está no Anexo 1 (Figura 222).

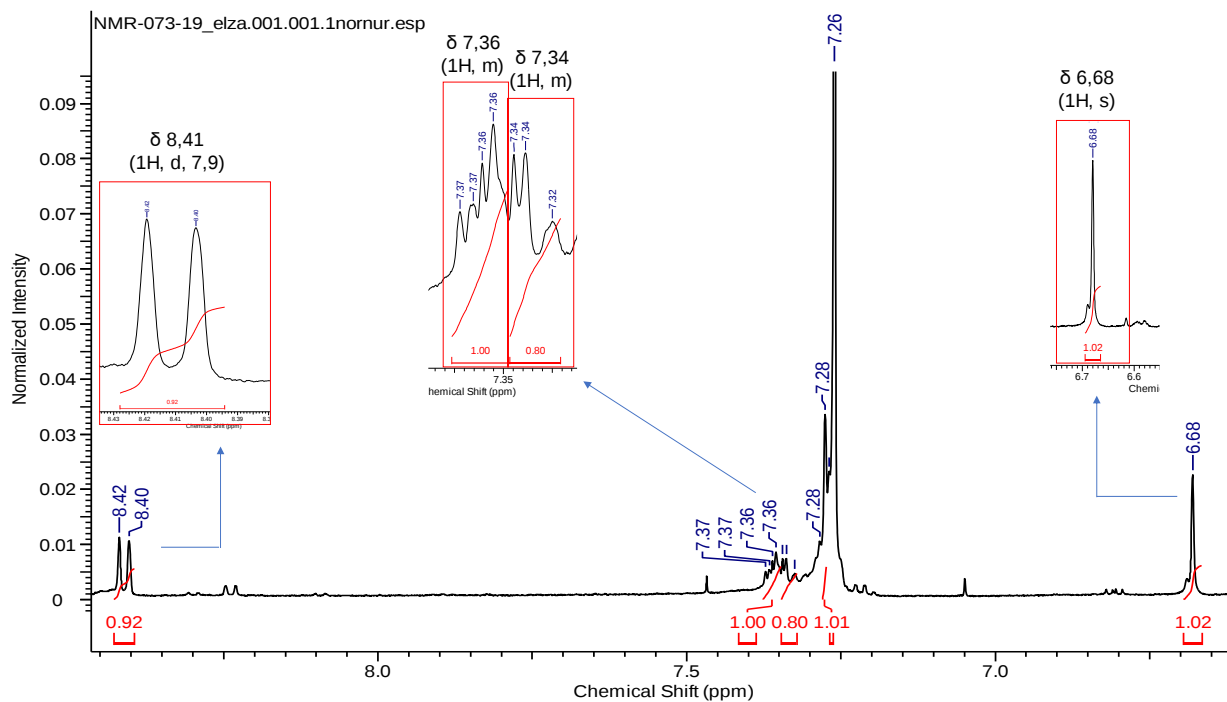


Figura 118. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente a região dos aromáticos da amostra BcFFr5.

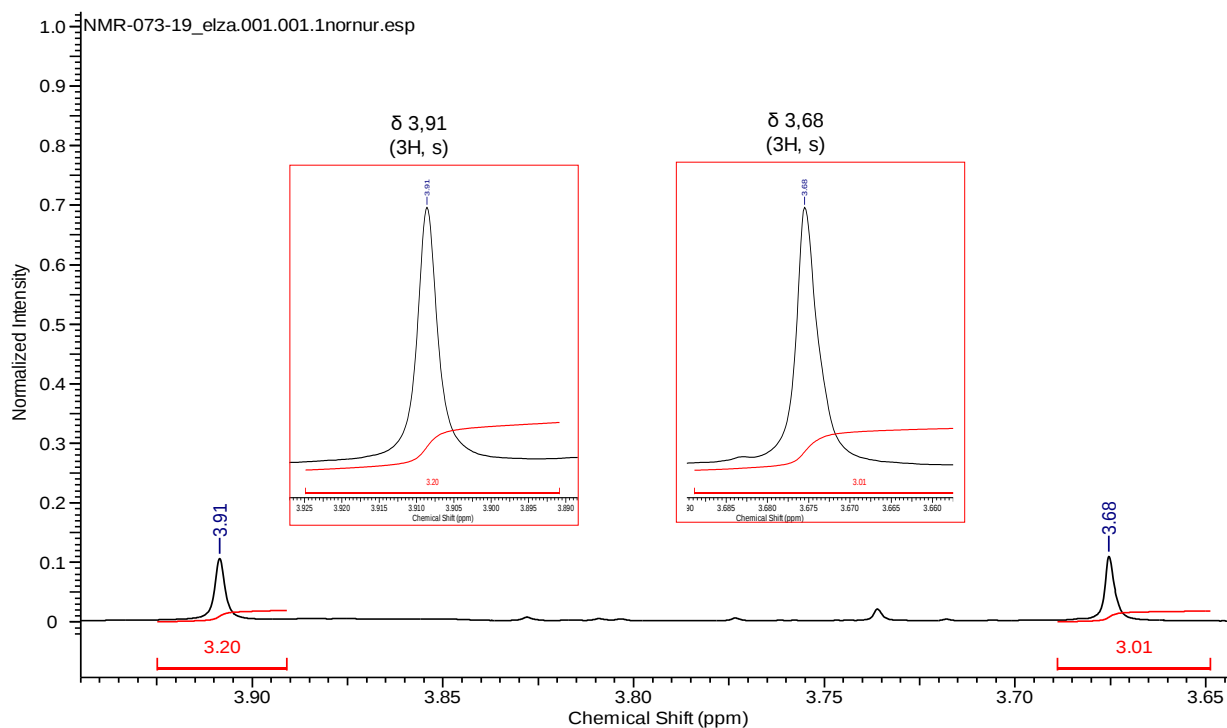


Figura 119. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente a região das metoxilas da amostra BcFFr5.

Com base nas análises espectrométricas e espectroscópicas, identificou-se a substância BcFFr5, como sendo o alcaloide aporfínico nornuciferina (Figura 120). Os

dados obtidos foram confirmados com relatos descritos em literatura (SOARES et al., 2015a).

O alcaloide aporfínico nornuciferina, é comum em espécies da família Annonaceae, como: *Bocageopsis pleiosperma* (SOARES et al., 2015a), *Annona leptopetala* (DE CASTRO RODRIGUES et al., 2016), *Asimina triloba* (MAJRASHI et al., 2018), *Guatteria pogonopus* (SANTOS et al., 2018), *Unonopsis floribunda* (SILVA et al., 2018a). Este alcaloide possui atividades citotóxica (SANTOS et al., 2018) e antidepressiva (MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2012) já descritas em literatura.

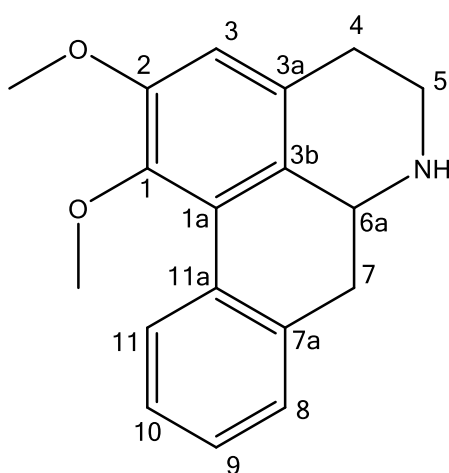


Figura 120. Estrutura do alcaloide nornuciferina.

Tabela 24. Dados de RMN de ^1H para o alcaloide nornuciferina.

Nornuciferina (<i>m/z</i> 282)		
Posição	^1H δ (mult., J em Hz)^a	^1H δ (mult., J em Hz)^b
1	—	—
1a	—	—
2	—	—
3	6,68 (1H, s)	6,67 (1H, s)
3a	-	-
3b	-	-
4	2,97 (1H, dd 17,0 e 3,5)	2,78 (1H, dd, 16,1 e 3,4) e 3,20 (1H, m)
5	3,26 (1H, m) e 3,40 (1H, m)	3,10 (1H, m) e 3,54 (1H, m)
6a	4,29 (1H, m)	3,98 (1H, m)
7	-	2,92 (1H, m) e 3,06 (1H, m)
7a	-	-
8	-	7,25 (1H, m)
9	7,34 (1H, m)	7,25 (1H, m)
10	7,36 (1H, m)	7,33 (1H, m)
11	8,41 (1H, d, 7,9)	8,40 (1H, d, 7,8)
11a	-	-
1-OCH₃	3,68 (3H, s)	3,68 (3H, s)
2-OCH₃	3,91 (3H, s)	3,90 (3H, s)

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com SOARES et al., 2015a (600 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.2.6. Determinação estrutural da amostra BcFFr6.

A fração purificada codificada BcFFr6 (3,5 mg) trata-se de um sólido amorfo, cuja análise por espectrometria de massas (Figura 121) evidenciou um íon *quasi-molecular* de m/z 328 ($[M+H]^+$). Na análise de MS^2 (Figura 122) foi observado uma perda inicial de 17 Da (m/z 328 $\rightarrow$ 311), coerente com um padrão observado para esqueletos aporfínicos (STÉVIGNY et al., 2004; SOARES et al., 2015a; LIMA et al., 2020).

No estudo de fragmentação verificou-se ser a amostra BcFFr6 um alcaloide aporfínico com ausência de *N*-metilação. Foi proposta a localização de duas metoxilas adjacentes no anel A, e com base na diferença de massas, foi sugerida a presença de um anel D substituído com uma metoxila e uma hidroxila, adjacentes ou não (STÉVIGNY et al., 2004).

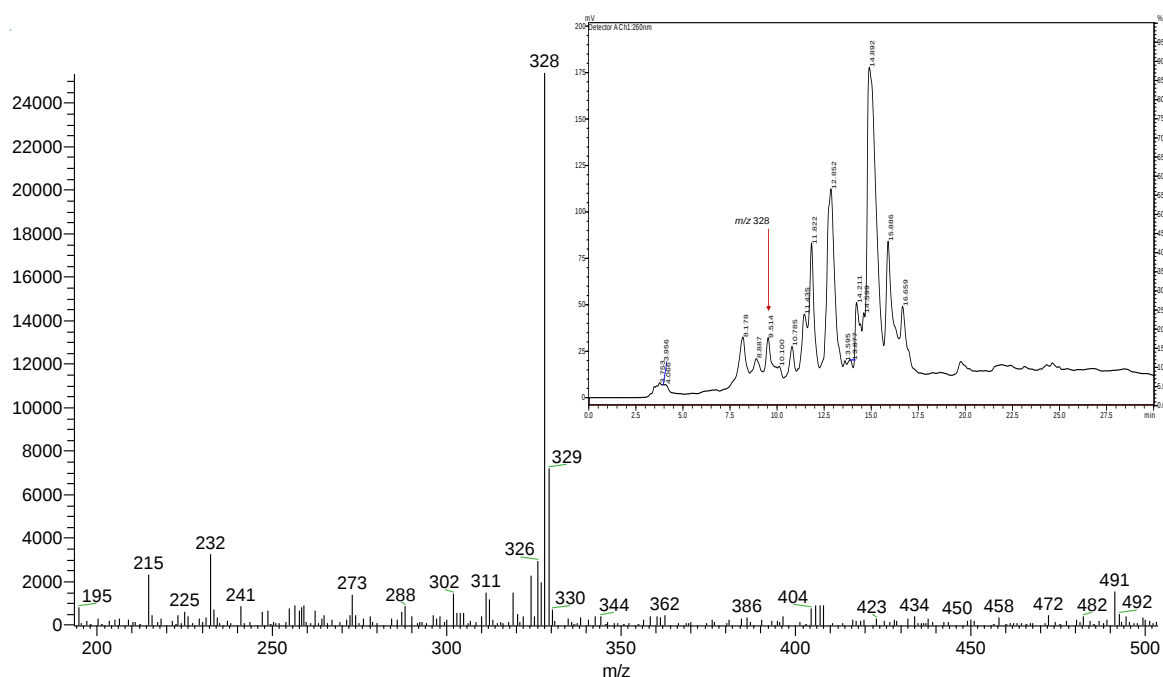


Figura 121. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$) da amostra BcFFr6.

MSMS_amostras_4_frac7_BC_RMN #192 RT: 2,45 AV: 1 NL: 4,86E3
F: ITMS + c ESI Full ms2 328,00@cid25,00 [90,00-330,00]

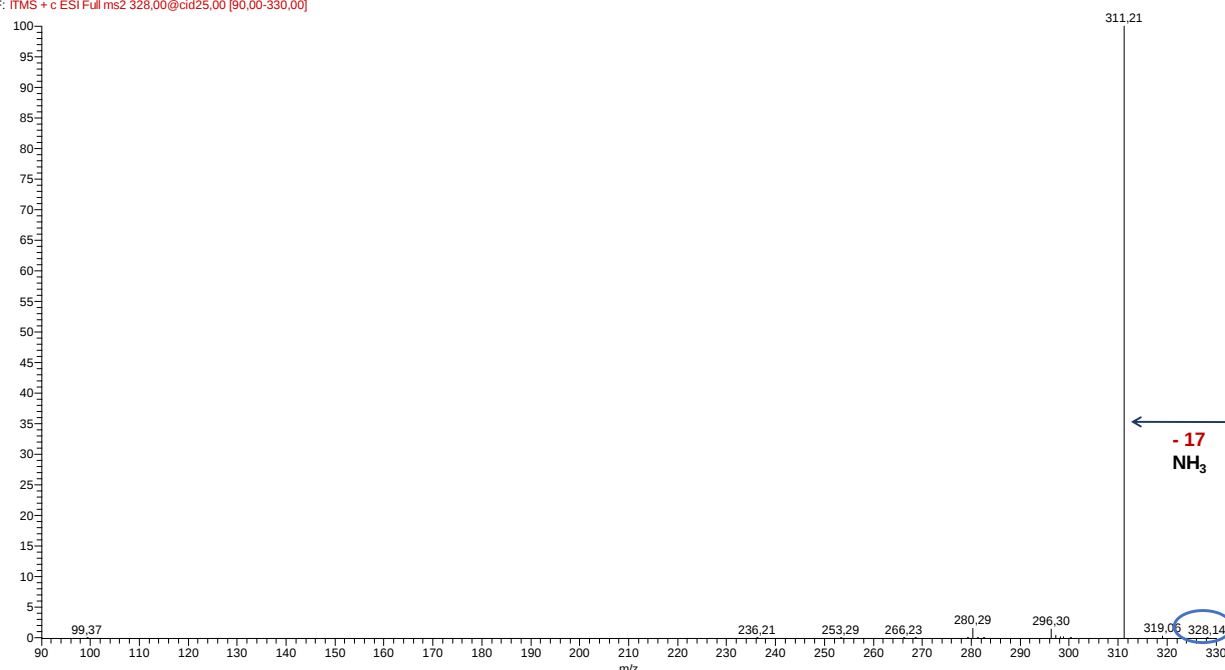


Figura 122. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 328 ($[M+H]^+$) da amostra BcFFr6.

Na ampliação do espectro de RMN de ^1H da região dos aromáticos (Figura 123) são observados três simpletos em δ 8,06 (1H, s), δ 6,79 (1H, s) e δ 6,59 (1H, s), compatíveis a presença dos substituintes nas posições C-1, C-2, C-9 e C10, do esqueleto aporfínico proposto. Foram observados três sinais de metoxilas (Figura 124) em δ 3,66 (3H, s), δ 3,88 (3H, s) e δ 3,89 (3H, s) e de acordo com o mapa de correlação HSQC (Figura 125) esses hidrogênios estão ligados aos carbonos δ 60,30 (1-OCH₃), δ 56,11 (2-OCH₃) e δ 56,11 (10-OCH₃), respectivamente e se correlacionando de acordo com o mapa de correlação HMBC (Figura 126) com os carbonos em δ 145,59 (C-1), δ 152,65 (C-2) e δ 144,48 (C-10), respectivamente. Outras correlações são apresentadas na tabela 25.

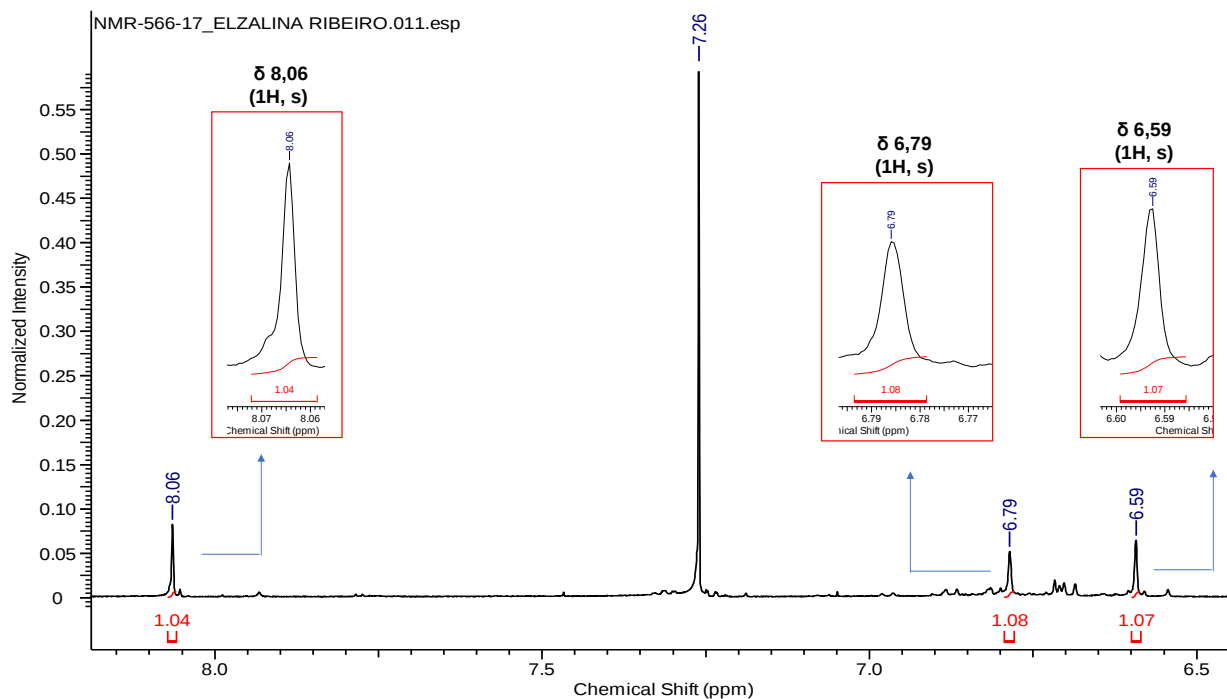


Figura 123. A ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) da região dos aromáticos da amostra BcFFr6.

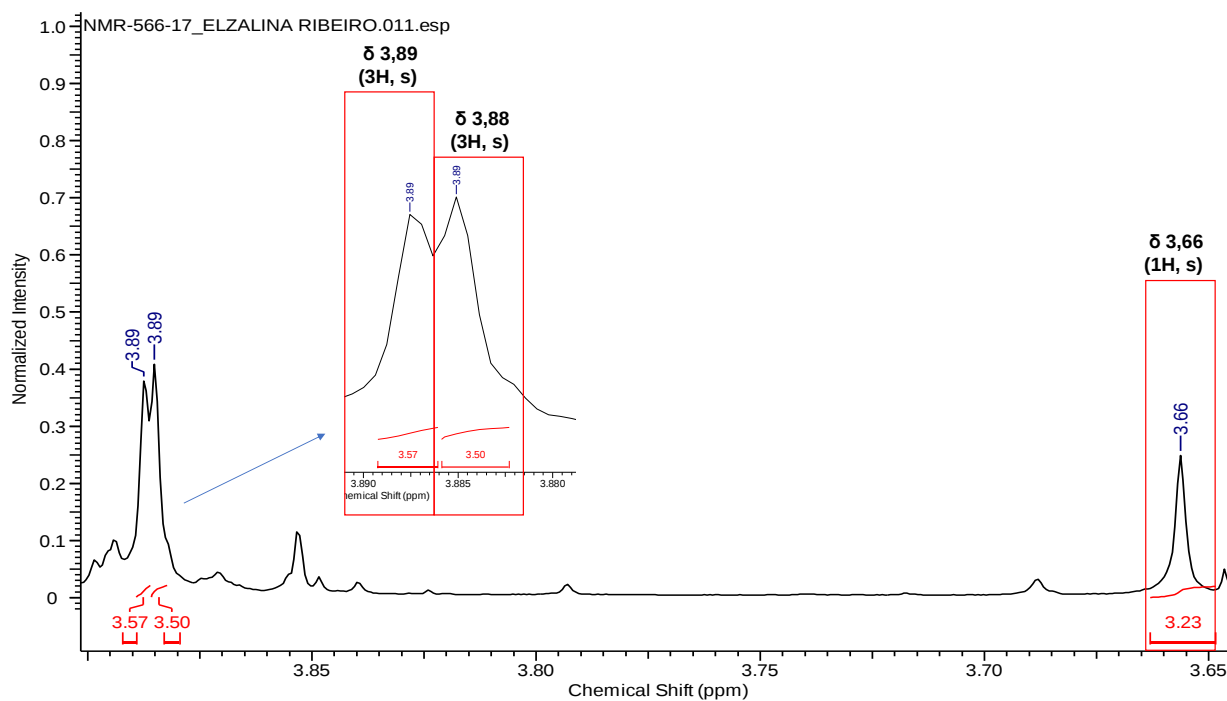


Figura 124. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente a região das metoxilas da amostra BcFFr6.

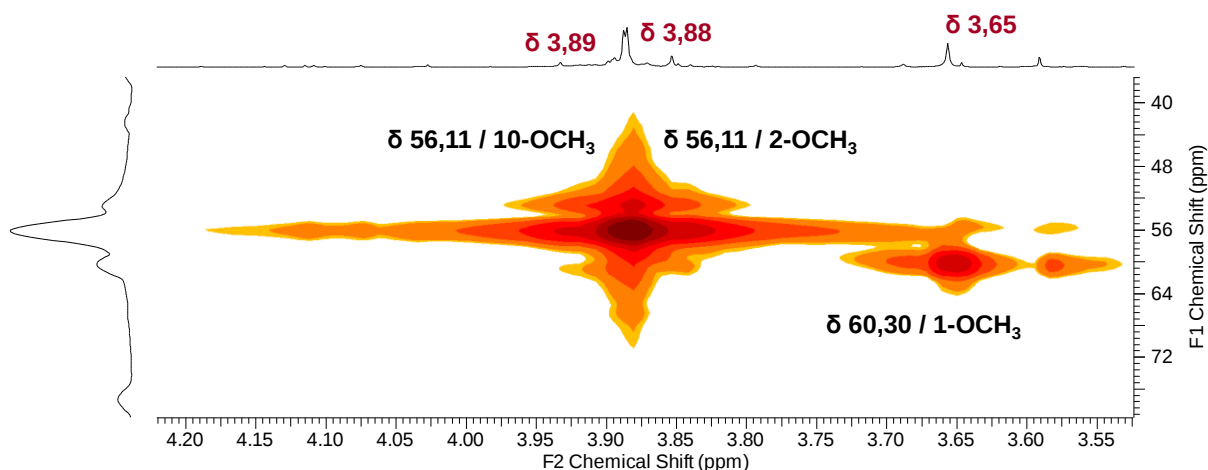


Figura 125. Ampliação do mapa de correlação HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios de metoxilas da amostra BcFFr6.

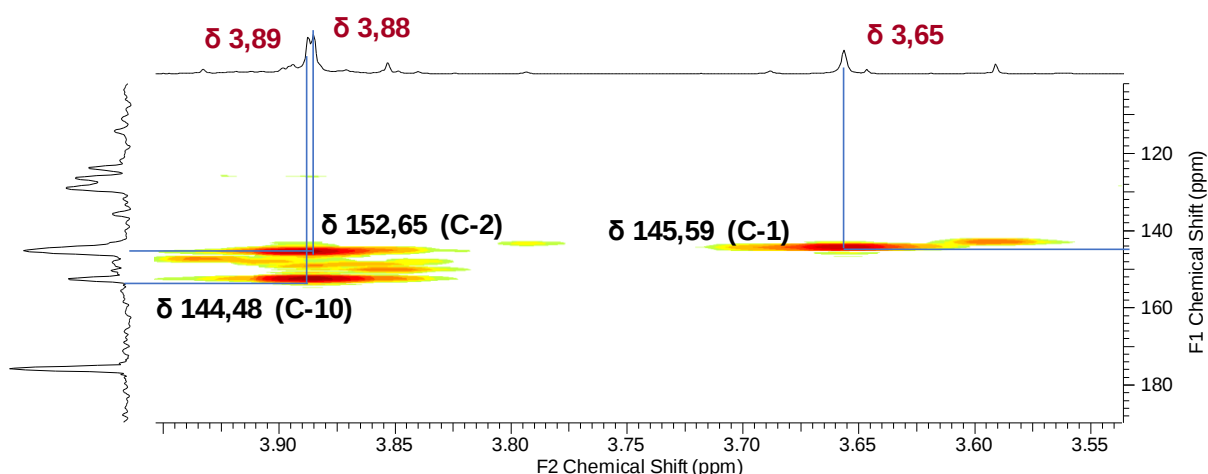


Figura 126. Ampliação do mapa de correlação HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios de metoxilas da amostra BcFFr6.

Após as análises dos espectros de massas, RMN 1D e 2D e comparação com dados relatados em literatura (Tabela 25), foi proposto o alcaloide aporfínico laurotetanina (Figuras 127 e 128) com m/z 328. O espectro total de RMN de ^1H e mapas de correlações HSQC e HMBC são apresentados no Anexo 1 (Figuras 223, 224 e 225).

Este alcaloide já foi reportado em diversas espécies da família Annonaceae, como: *Xylopia laevigata* (COSTA et al., 2013e), *Bocageopsis pleiosperma* (SOARES et al., 2015a), *Annona leptopelata* (DE CASTRO RODRIGUES et al., 2016), *Alphonsea* (TADIĆ et al., 1985; BAKRI et al., 2017), bem como suas atividades biológicas vem

sendo reportadas em literatura: atividade antimalária (FADAEINASAB et al., 2015; ZAHARI et al., 2016) e leishmanicida (FOURNET et al., 2007).

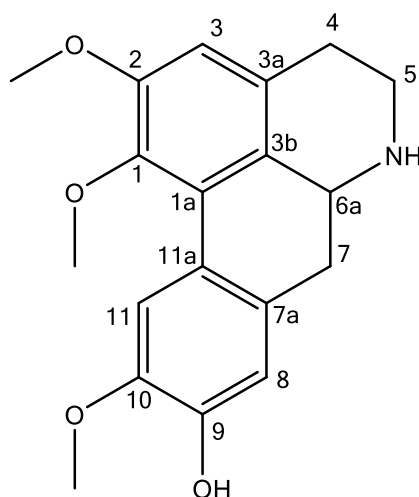


Figura 127. Estrutura do alcaloide laurotetanina.

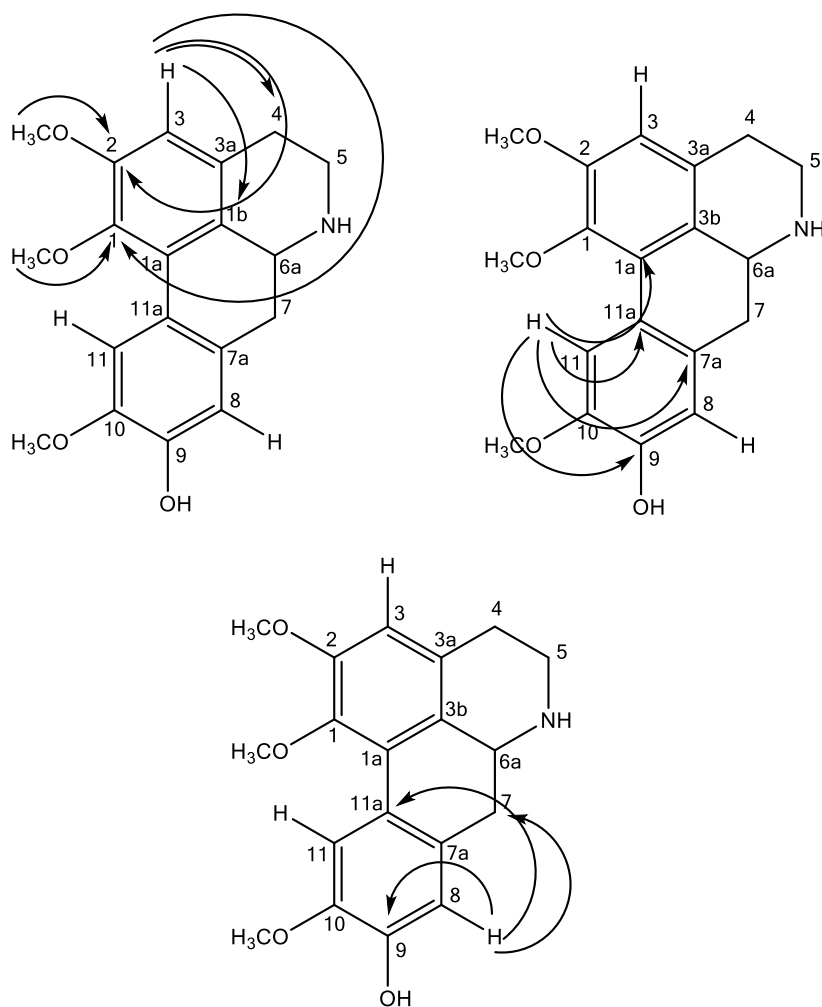


Figura 128. Principais correlações observadas para o alcaloide laurotetanina.

Tabela 25. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC para o alcaloide laurotetanina.

Laurotetanina (m/z 328)						
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC (mult., J em Hz) ^a	HSQC (mult., J em Hz) ^b	HMBC (mult., J em Hz) ^a	HMBC (mult., J em Hz) ^b
1	-	-	145,59	144,66	-	-
1a	-	-	126,84	127,19	-	-
1b	-	-	126,24	126,10	-	-
2	-	-	152,65	152,70	-	-
3	6,59 (s, 1H)	6,60 (s, 1H)	110,85	110,60	27,94; 126,24; 145,59; 152,65	28,17; 126,10; 144,66; 152,70
3a	-	-	-	128,80	-	-
4_{pseu}	-	-	27,94	28,17	-	-
5_{pseu}	-	3,90 (m, 1H)	-	53,10	-	-
6a	-	-	-	61,00	-	-
7_{pseu}	-	-	35,80	35,30	-	-
7a	-	-	129,11	129,10	-	-
8	6,79 (s, 1H)	6,80 (s, 1H)	114,16	114,07	35,80; 123,58; 145,36	35,34; 123,68; 145,28
9	-	-	145,36	145,28	-	-
10	-	-	144,48	144,60	-	-
11	8,06 (s, 1H)	8,07 (s, 1H)	111,50	111,60	123,58; 126,84; 129,11; 145,36	-
11a	-	-	123,58	123,68	-	-
1-OCH3	3,66 (s, 3H)	3,67 (s, 3H)	60,30	60,00	145,59	144,66
2-OCH3	3,88 (s, 3H)	3,89 (s, 3H)	56,11	55,75	152,65	152,70
10-OCH3	3,89 (s, 3H)	3,91 (s, 3H)	56,11	55,92	144,48	144,60

^aO

experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com SOARES, 2014 (^1H 600 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.2.7. Determinação estrutural da amostra BcFFr7.

A amostra codificada como BcFFr7 (3,5 g) é um sólido amorfo. Através da espectrometria de massas (Figura 129) foi observado um íon *quasi-molecular* com m/z 338 ($[M+H]^+$). Esse íon foi submetido a análises de MS^2 e apresentou perda inicial de 15 Da (m/z 338 $\rightarrow$ 323) seguida de perda de 28 Da (m/z 323 $\rightarrow$ 294) (Figura 130), apontando para uma estrutura sem características aporfínicas. Um padrão de fragmentação similar observado foi relatado em estudos anteriores de alcaloides contendo o nitrogênio na forma imino, como os observados em alcaloides oxoaporfínicos (SILVA et al., 2012; SILVA et al., 2014a; SOARES et al., 2015a; LIMA et al., 2020).

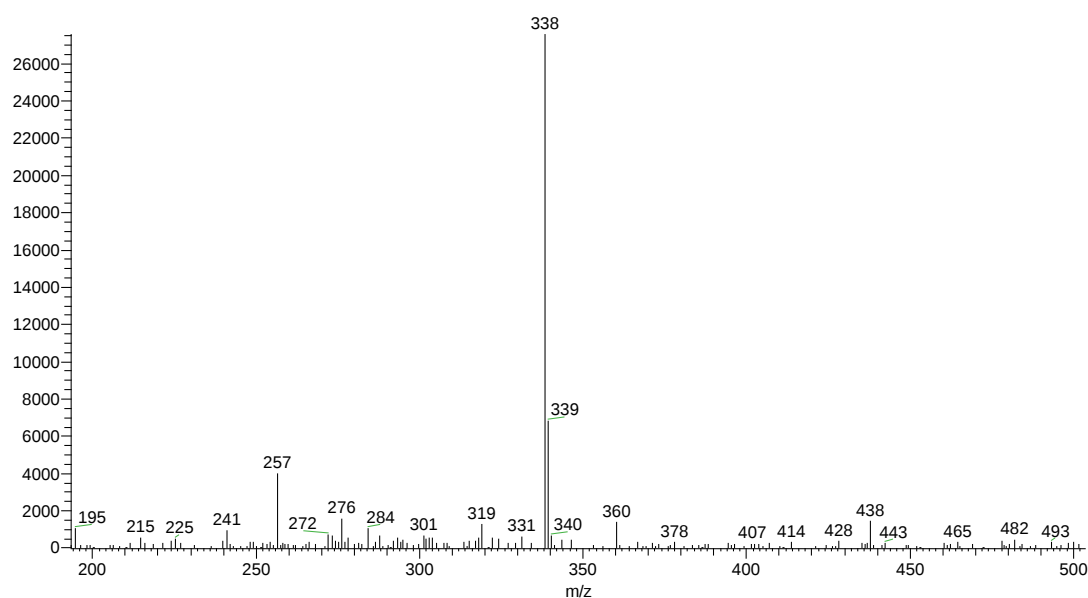


Figura 129. Espectro de massas do íon de m/z 338 ($[M+H]^+$) da amostra BcFFr7.

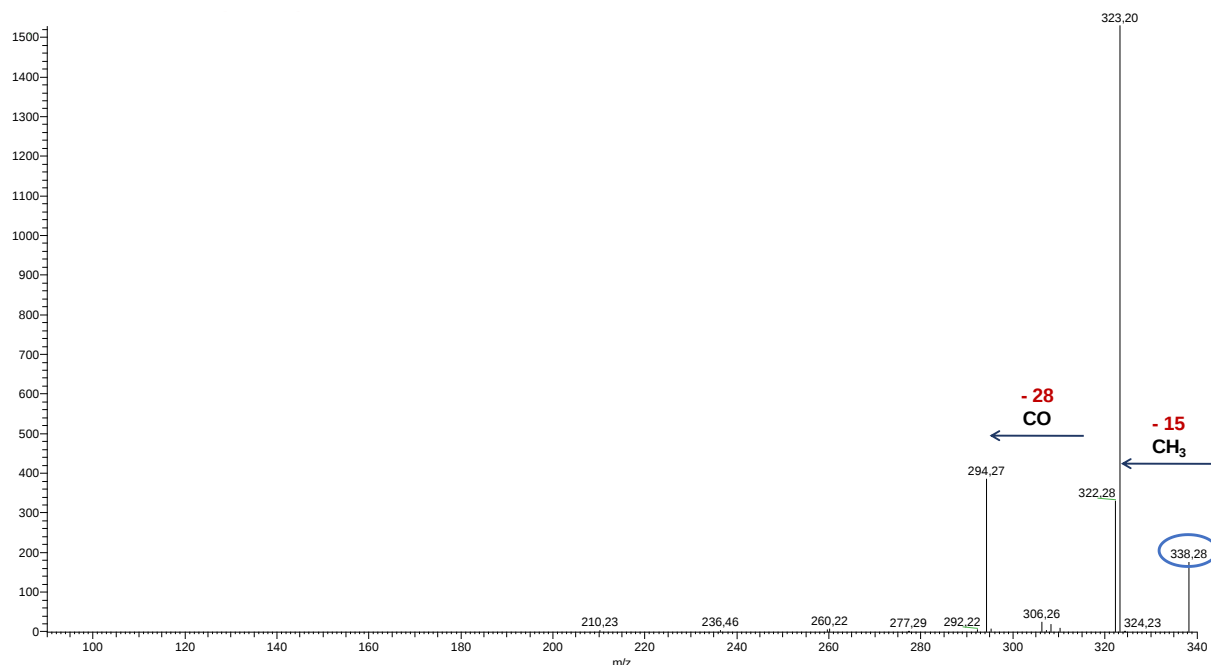


Figura 130. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 338 ($[M+H]^+$) da amostra BcFFr7.

Na ampliação do espectro de RMN de 1H (Figura 131), foram observados cinco sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,51 (1H, s), δ 8,02 (1H, d, 5,4 Hz), δ 8,74 (1H, d, 5,0 Hz), δ 7,83 (1H, s) e δ 8,86 (1H, s), atribuídos aos hidrogênios H-3, H-4, H-5, H-8 e H-11, respectivamente. Tais sinais são compatíveis com o padrão de multiplicidade de estruturas oxoaporfínicas tetrasubstituídas nas posições C-1, C-2, C-9 e C-10 (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994). De acordo com as características apresentadas os hidrogênios orto acoplados em δ 8,02 e δ 8,74, com constantes de acoplamento de 5,0 Hz-5,4 Hz, foram atribuídos aos hidrogênios α e β respectivamente, do anel piridínico do esqueleto oxoaporfínico (Figura 132) (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988, 1994).

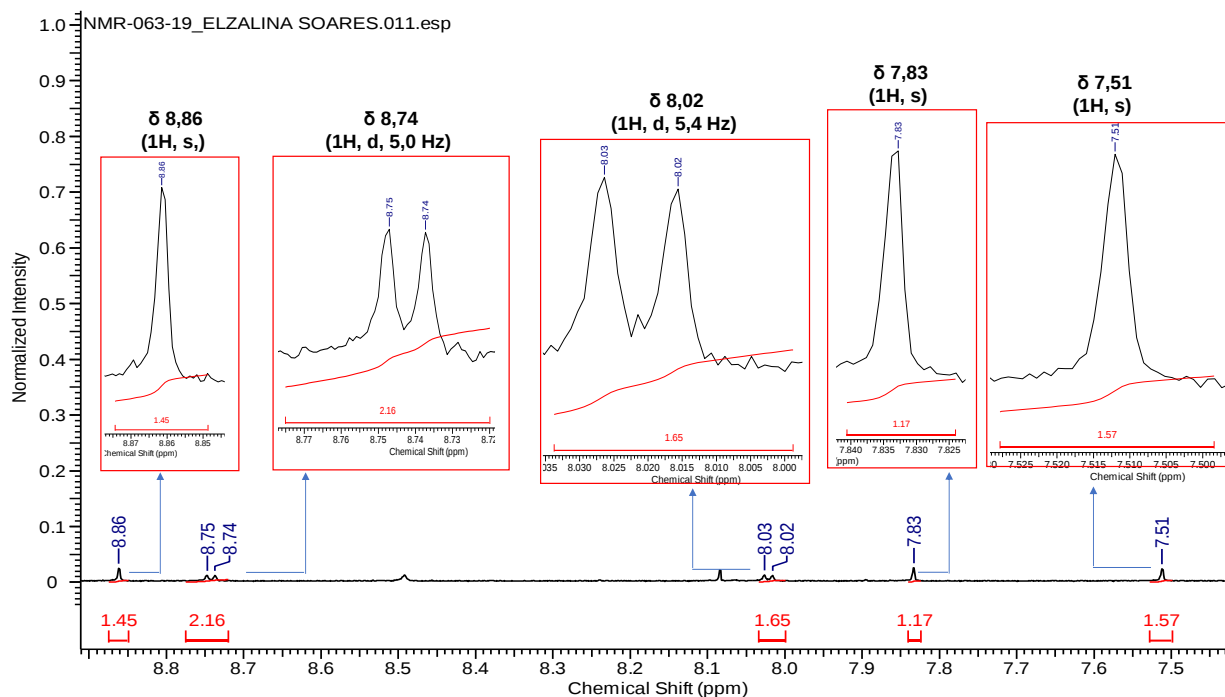


Figura 131. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) na região dos aromáticos da amostra BcFFr7.

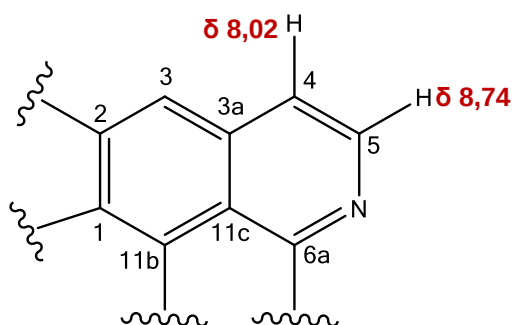


Figura 132. Estrutura do anel piridínico.

Na ampliação do mapa de correlações HSQC (Figura 133) foi possível observar que os hidrogênios em δ 8,02 e δ 8,74, estão acoplados aos carbonos δ 124,31 (C-4) e δ 143,85 (C-5) respectivamente, sendo o carbono C-5 atribuído como o mais desblindado, por causa da presença do nitrogênio adjacente. Através da ampliação do mapa de correlações HMBC (Figura 133) foi possível observar as correlções dos hidrogênios do anel piridínico. O hidrogênio em δ 8,02 está se correlacionando a J^3 com os carbonos em δ 106,38 (C-3) e δ 121,31 (C-11c) e o hidrogênio em δ 8,74 está se

correlacionando a J^2 com o carbono em δ 124,31 e a J^3 com os carbonos δ 144,71 (C-6a) e δ 136,23 (C-3a).

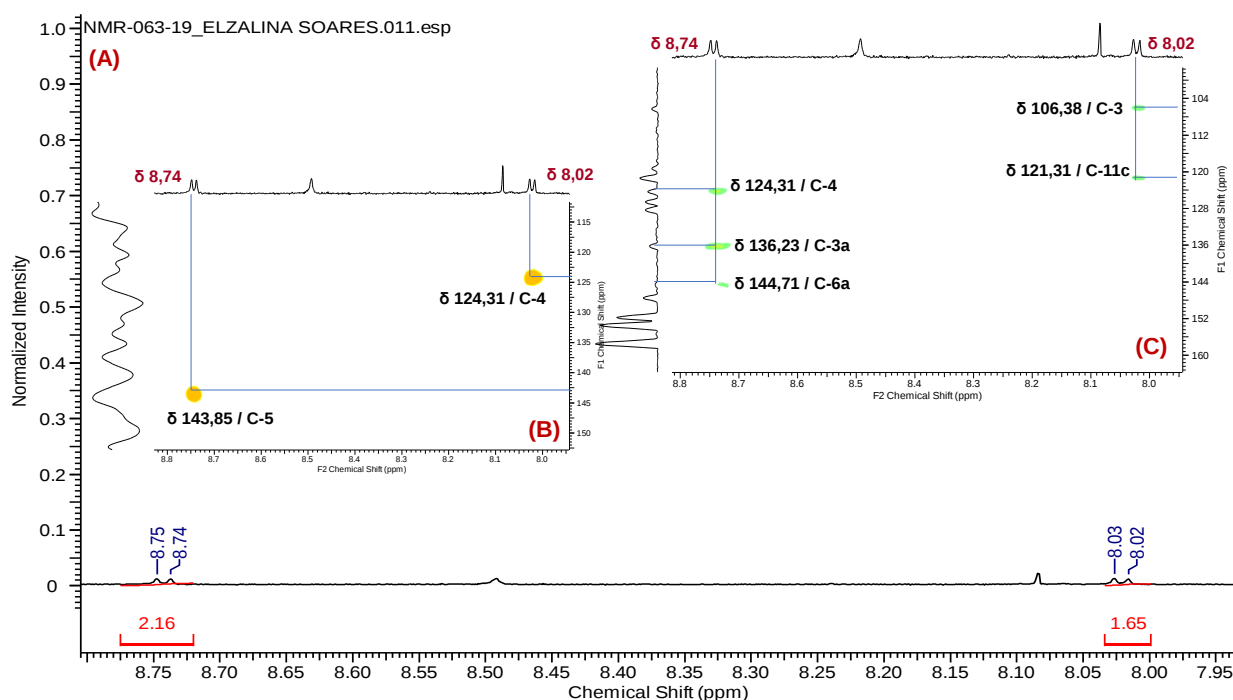


Figura 133. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3), mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 8,74 e δ 8,02.

Para o hidrogênio mais blindado na posição H-3 em δ 7,51 (1H, s), foi possível através da ampliação do mapa de correlações HSQC (Figura 134) atribuir que esse hidrogênio possui uma correlação a J^1 com o carbono δ 106,38 (C-3) e com o mapa de correlações HMBC (Figura 134), foi possível atribuir correlação a J^2 com o carbono δ 157,46 (C-2) e a J^3 com os carbonos δ 124,31 (C-4), δ 121,31 (C-11c), δ 151,78 (C-1).

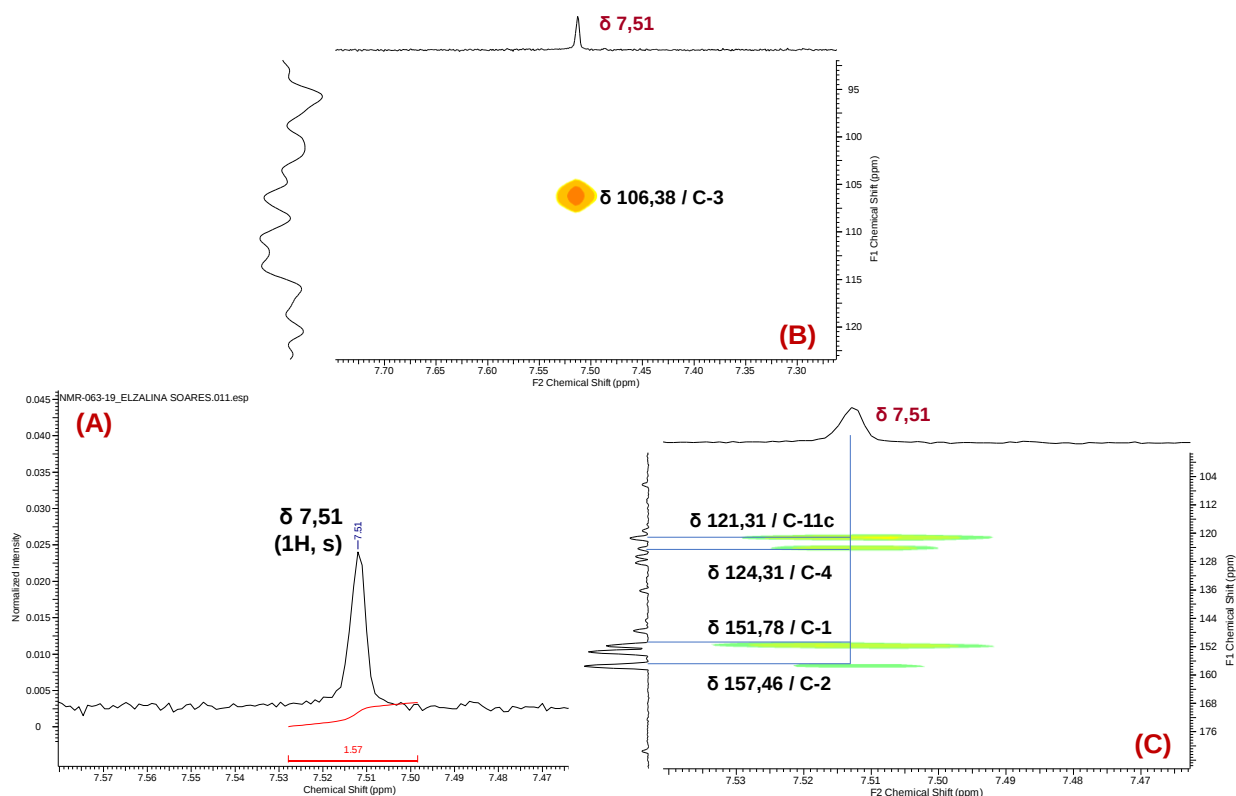


Figura 134. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3), mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) do simpleto em δ 7,51.

Na ampliação do espectro de RMN de ^1H (Figura 135) apresentou sinais de hidrogênios metoxílicos em δ 4,08 (3H, s), δ 4,12 (3H, s) e δ 4,09 (3H, s) e através dos mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 136) foi possível observar os acoplamentos desses hidrogênios com os carbonos δ 60,05 (1- OCH_3), δ 55,53 (2- OCH_3) e δ 55,14 (10- OCH_3), respectivamente, e as correlações a longa distância com os carbonos em δ 151,78 (C-1), δ 157,46 (C-2) e δ 153,39 (C-10), respectivamente, confirmando assim a presença de substituição no anel A e no anel D.

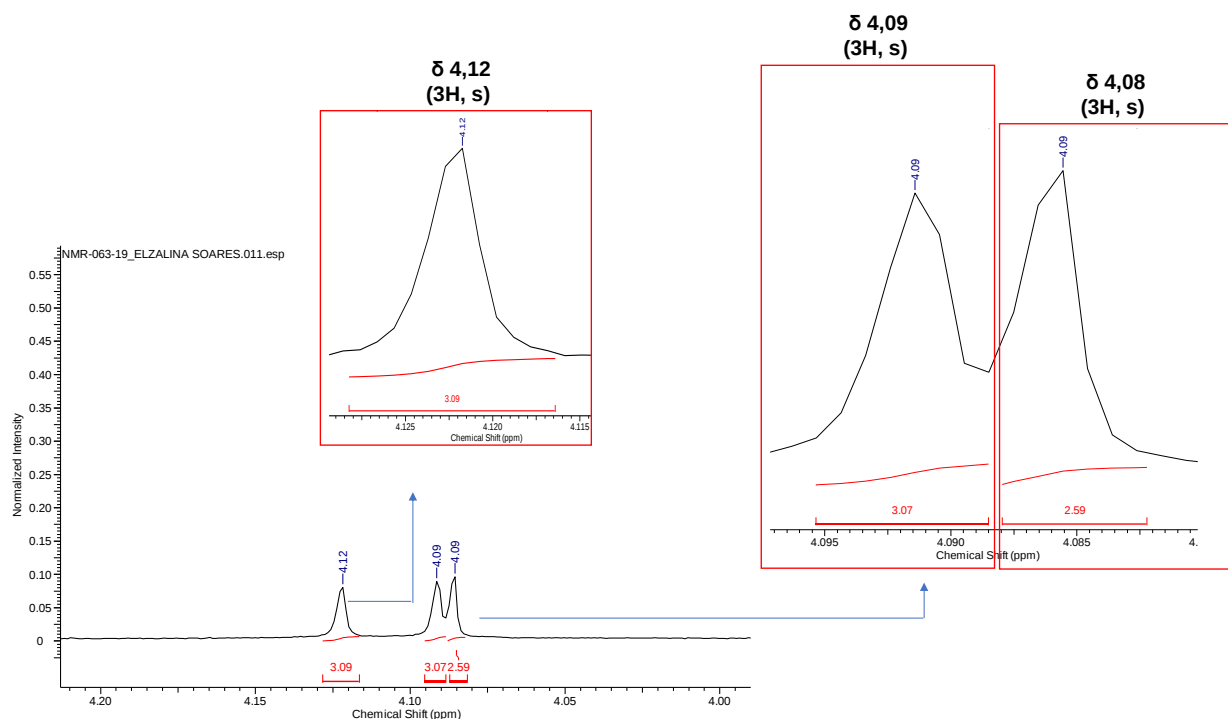


Figura 135. Ampliação dos espectros de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 4,12, δ 4,09 e δ 4,08.

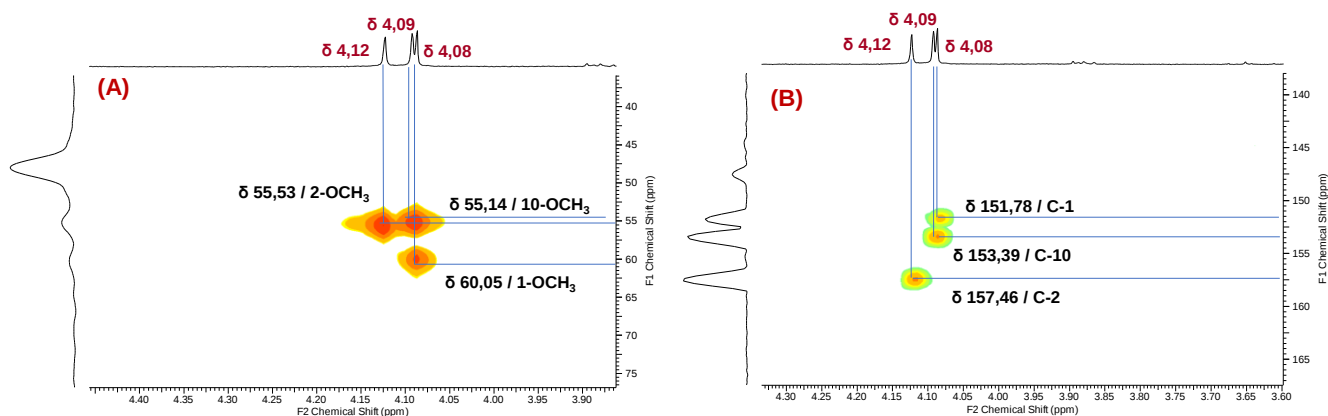


Figura 136. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 4,12, δ 4,09 e δ 4,08.

Para o hidrogênio em δ 7,83 (1H, s), posição H-8, através do mapa de correlações HSQC (Figura 137) foi possível verificar o acoplamento ao carbono em δ 113,53 (C-8) e confirmar essa posição através do mapa de correlações HMBC (Figura 137), no qual apresentou correlação a longa distância com os carbonos em δ 181,30 (C-7), δ 153,39 (C-10) e δ 128,22 (C-11a) e a J^2 com o carbono em δ 147,51 (C-9).

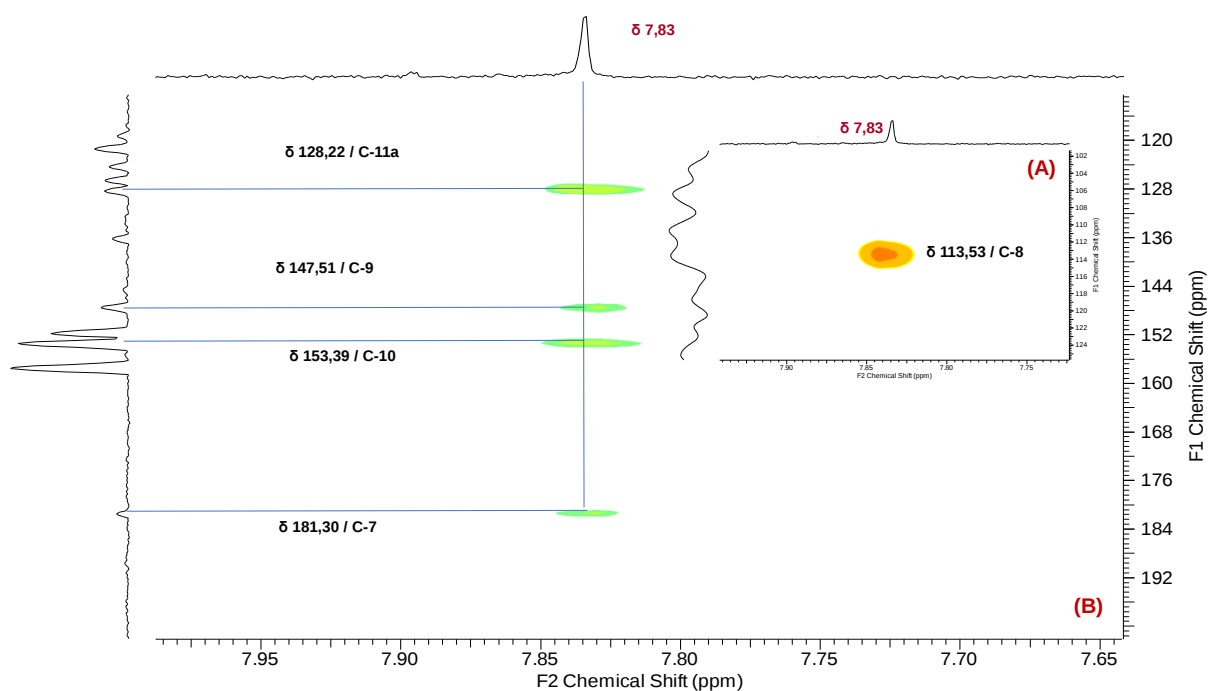


Figura 137. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) do sinal em δ 7,83.

Para o hidrogênio em δ 8,86 (1H, s), posição H-11, foi possível através do mapa de correlações HSQC (Figura 138), observar o acoplamento com o carbono em δ 110,51 (C-11), bem como no HMBC (Figura 138) apresentou as correlações a J^2 com os carbonos em δ 128,22 (C-11a) e δ 153,39 (C-10) (confirmando a presença da metoxila no C-10) e a J^3 com os carbonos em δ 147,51 (C-9) e δ 126,64 (C-7a). Os dados foram tabelados (Tabela 26) e confrontados com dados já existentes em literaturas (FIENENA et al., 2016), e a amostra BcF7 foi identificada como o alcaloide oxaporfínico atherolina (Figuras 139), sendo este o primeiro relato do alcaloide oxaporfínico tetrasubstituído nas posições 1,2, 9 e 10 no gênero *Bocageopsis*. Os dados espectrais de RMN de ^1H , HSQC e HMBC estão dispostos no anexo 1 (Figuras 226, 227 e 228)

Esse alcaloide oxaporfínico já foi relatado nas cascas da espécie *Atherosperma moschatum* (BICK & DOUGLAS, 1965), nas cascas de *Hernandia sonora* (CHEN et al., 1995) e nas cascas da espécie *Colubrina decipiens* da família Rhamnaceae (FIENENA

et al., 2016), além de isolado na em espécies da família Hernandiaceae e tendo sua atividade antiplaquetária testada (LAKSHMI et al., 2009).

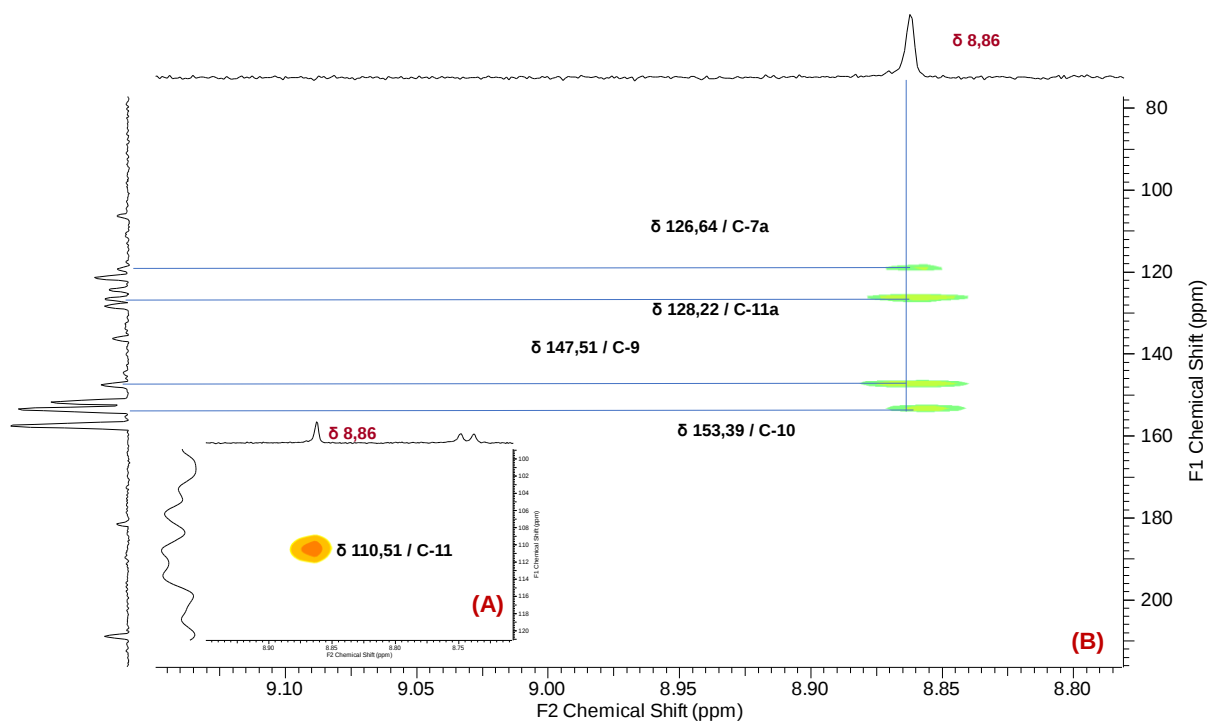


Figura 138. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) do sinal em δ 8,86.

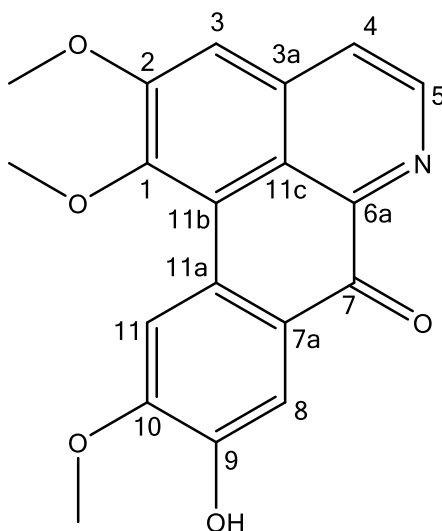


Figura 139. Estrutura do alcaloide atherolina.

Tabela 26. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC para o alcaloide atherolina.

Atherolina (m/z 338)						
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC (mult., J em Hz) ^a	HSQC (mult., J em Hz) ^b	HMBC (mult., J em Hz) ^a	HMBC (mult., J em Hz) ^b
1	-	-	151,78	152,5	-	-
2	-	-	157,46	158,5	-	-
3	7,51 (1H, s)	7,23 (1H, s)	106,38	107,4	121,31; 124,31; 151,78; 157,46	122,3; 125,5; 152,5
3a	-	-	136,23	137,0		
4	8,02 (1H, d, 5,4)	7,79 (1H, d, 8)	124,31	125,5	106,38; 121,31	107,4; 122,3
5	8,74 (1H, d, 5,0)	8,55 (1H, d, 8)	143,85	144,1	124,31; 136,23; 144,71	137,0; 144,4
6a	-	-	144,71	144,4	-	-
7	-	-	181,30	182,0	-	-
7a	-	-	126,64	127,5	-	-
8	7,83 (1H, s)	7,57 (1H, s)	113,53	114,5	128,22; 147,51; 153,39; 181,30	129,2; 153,5
9	-	-	147,51	148,0	-	-
10	-	-	153,39	153,5	-	-
11	8,86 (1H, s)	8,49 (1H, s)	110,51	111,8	119,16; 126,64; 128,22; 147,51; 153,39	119,8; 127,5; 129,2; 148,0; 153,5;
11a	-	-	128,22	129,2	-	-
11b	-	-	119,16	119,8	-	-
11c	-	-	121,31	122,3	-	-
1-OCH₃	4,08 (3H, s)	3,96 (3H, s)	60,05	60,9	151,78	152,5
2-OCH₃	4,12 (3H, s)	4,03 (3H, s)	55,53	56,7	157,46	158,5
10-OCH₃	4,09 (3H, s)	4,00 (3H, s)	55,14	56,6	153,39	153,5

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com FIENENA et al., 2016 (^1H 500,19 MHz e ^{13}C 125,78 MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.2.8. Determinação estrutural da amostra BcFFr8.1 e BcFFr8.2.

As frações purificadas que apresentaram massa e íons não identificados no espectro de RMN de ^1H da fração alcaloídica foram enviadas para análises de RMN 1D e 2D. A amostra codificada como BcFFr8 (4,0 mg), com característica de substância pura, evidenciou na análise por espectrometria de massas um íon com m/z 194 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), correspondendo à molécula protonada (Figura 140), sendo este, submetido à análise de MS^2 (Figura 141). Ao analisar o espectro de MS^2 foi possível observar uma perda inicial de 17 Da (NH_3), seguida de perdas sequenciais de 43 Da (CH_3CHNH), 32 Da (CH_3OH) e 28 Da (CO) (m/z 194 $\rightarrow$ 177 / 194 $\rightarrow$ 151 / 177 $\rightarrow$ 145 $\rightarrow$ 117). Como visto anteriormente perdas iniciais de 17 Da sugerem a ausência da *N*-metila no anel B, similarmente ao que acontece com um esqueleto aporfínico. Tal esqueleto foi descartado com base na massa molecular da amostra. Adicionalmente a esses dados, os íons resultantes da fragmentação MS^2 , sugeriram tratar-se de um alcaloide isoquinolinico simples substituído, com grupos hidroxila ou metoxila vicinais (WU & HUANG, 2006).

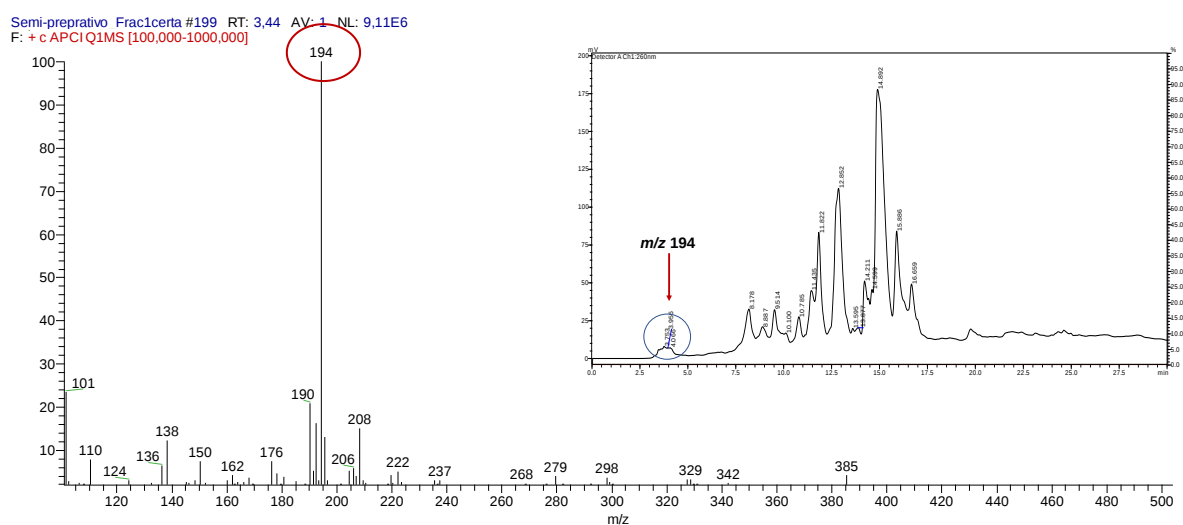


Figura 140. Espectro de massas do íon de m/z 194 e cromatograma obtido da análise de LC-EM da fração alcaloídica BcFFr5 das folhas de *B. canescens*.

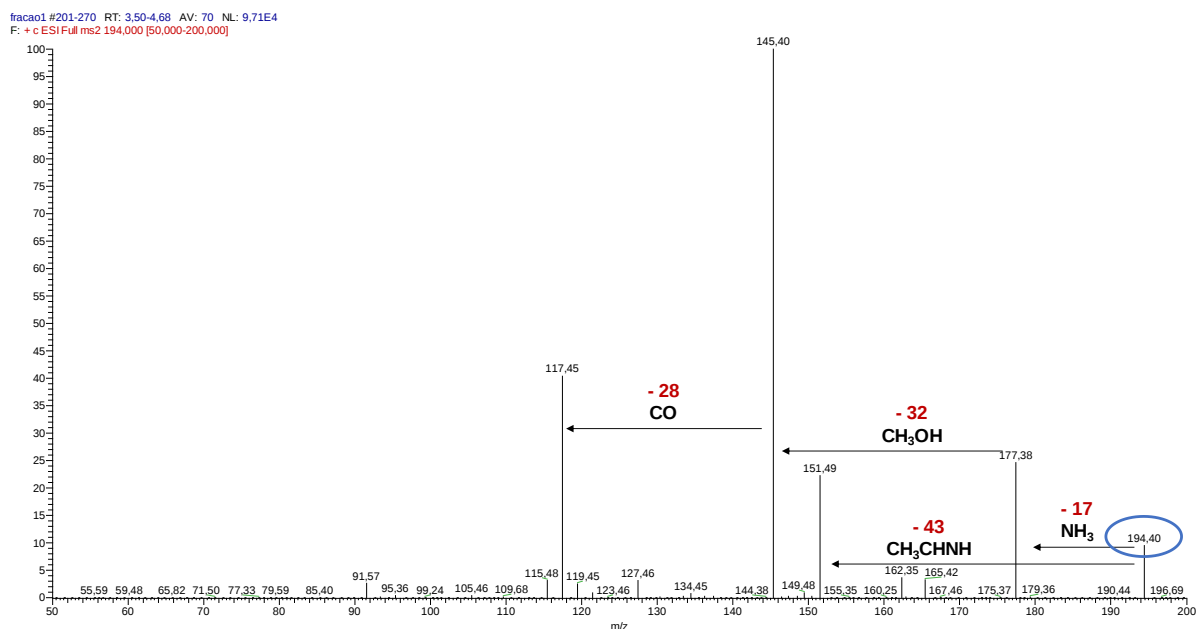


Figura 141. Espectro de MS² do íon m/z 194 ($[M+H]^+$) da fração alcaloídica BcFFr1.

Ao observar o RMN de ^1H da fração BcFFr5 (Anexo 1 – Figura 229) ficou evidente que essa amostra possuía duas substâncias devido a presença de 4 sinais nas regiões de hidrogênios aromáticos na proporção de 2:1, logo estes compostos foram codificados como BcFFr8.1 e BcFFr8.2. No espectro de RMN de ^1H foi possível observar o sinal referente a substância majoritária (BcFFr8.1), que possui os hidrogênios aromáticos em δ 6,69 (1H, s) e δ 6,56 (1H, s) (Figura 142) e no mapa de correlações HSQC verificou-se que esses hidrogênios estão ligados aos carbonos em δ 111,76 e δ 110,90, atribuídos, respectivamente, ao C-8 e C-5 do núcleo isoquinolínico (Figura 143). A substância minoritária (BcFFr8.2) possui hidrogênios aromáticos em δ 6,57 (1H, s) e δ 6,65 (1H, s) e no mapa de correlações HSQC foi observado a ligação direta com os carbonos em δ 108,09 (C-8) e δ 114,45 (C-5) respectivamente (Figura 142 e 143).

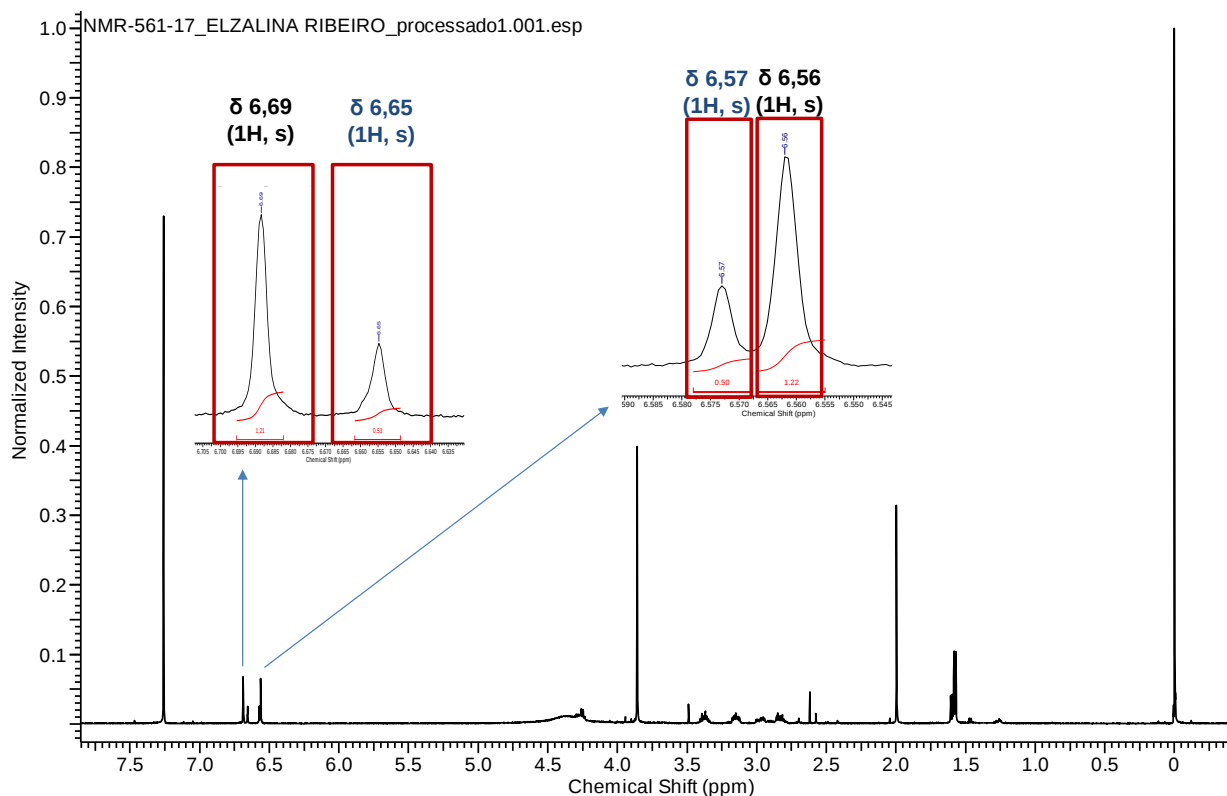


Figura 142. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) e ampliação da região dos hidrogênios aromáticos da amostra BcFFr1.

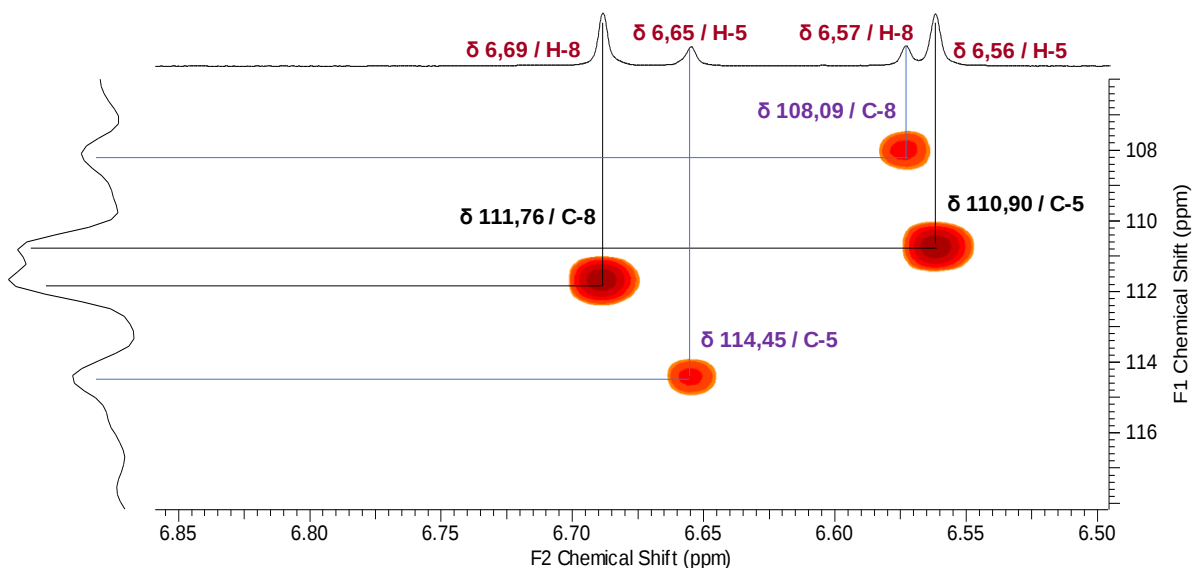


Figura 143. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração BcFFr1. Em preto correlação majoritário e em azul minoritário.

O mapa de correlações HMBC evidenciou que o ^1H aromático (H-8) do composto majoritário BcFFr1 com deslocamento em δ 6,69, está se correlacionando com os carbonos em δ 50,60 (C-1), δ 124,15 (C-4a), δ 144,40 (C-7) e δ 145,40 (C-6), e que o

^1H em δ 6,56 está correlacionando com os carbonos em δ 27,10 (C-4), δ 128,94 (C-8a) e δ 144,40 (C-7) (Figura 144). O hidrogênio aromático do composto minoritário BcFFr8.2 com deslocamento em δ 6,65 se correlaciona com os carbonos em δ 27,10 (C-4), δ 127,80 (C-8a), δ 145,28 (C-6), e o ^1H em δ 6,57 se correlaciona com os carbonos em δ 50,50 (C-1) e δ 124,04 (C-4a) (Figura 144).

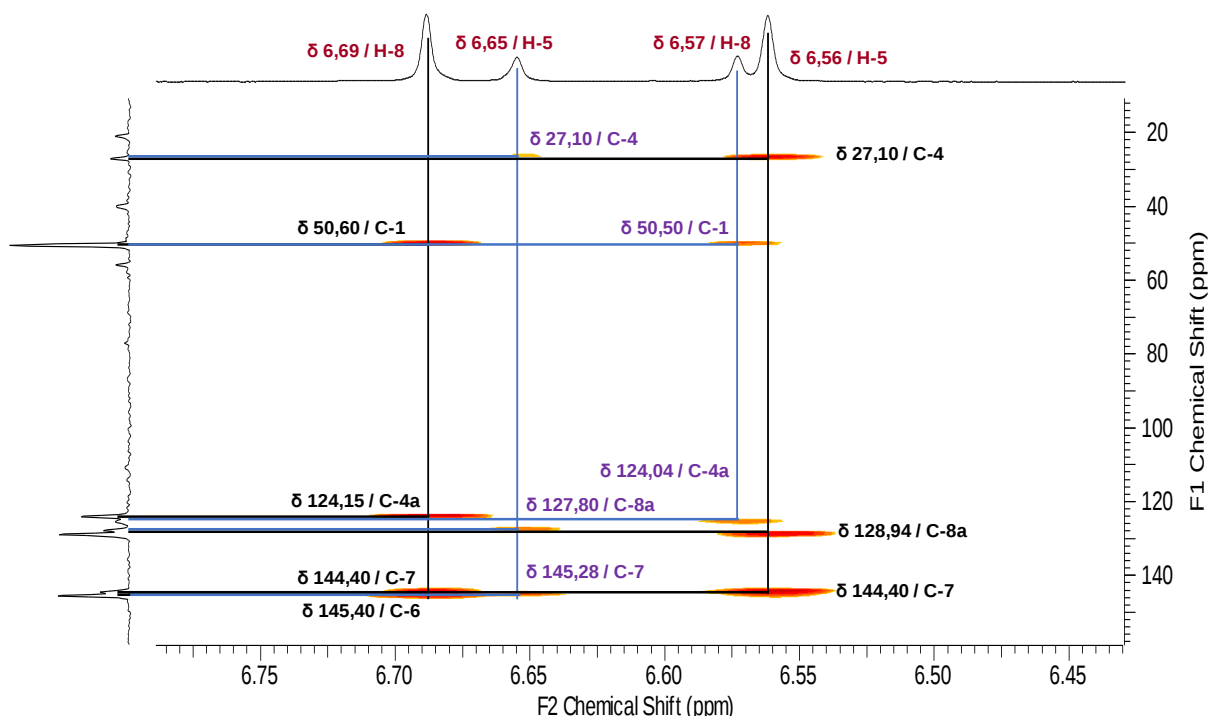


Figura 144. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) referente região referente aos hidrogênios aromáticos da fração BcFFr1. Em preto correlação majoritário e em azul minoritário.

Na região em δ 4,25 (1H, q, 6,7 Hz) (Figura 145) é possível observar um quarteto referente ao composto majoritário e um multipletto em δ 4,30 (m) referente ao composto minoritário, ambos ligados ao carbono metínico em δ 50,60 (C-1). Além de um simpleto em δ 3,85 (s) ligado ao carbono em δ 55,90, que é o indicativo da presença de metoxilas

referente as duas substâncias, devido a relação ser de 2:1 (Figura 145).

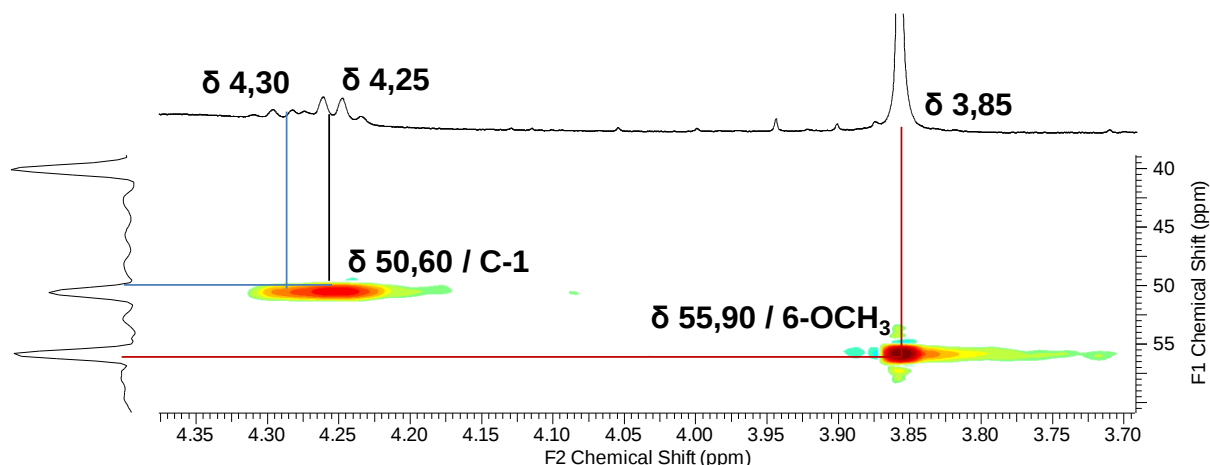


Figura 145. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl₃) referente região do carbono metínico e metoxilas da fração BcFFr1.

Na ampliação do mapa de correlações HMBC, o sinal de ¹H em δ 4,25 da substância majoritária BcFFr8.1 (Figura 146) se correlaciona com os carbonos em δ 21,00 (CH₃-C1), δ 40,00(C-3), δ 124,15 (C-4a), δ 111,76 (C-8) e δ 128,94 (C-8a). Enquanto o sinal de ¹H em δ 4,30 se correlaciona com os carbonos em δ 21,00 (CH₃-C1) e δ 127,80 (C-8a) (Figura 146). Ainda foi possível observar o sinal em δ 3,85 se correlacionando com o carbono em δ 145,40 (H₃CO-6) e em δ 146,34 (H₃CO-7) referentes aos constituintes BcFFr8.1 (majoritário) e a BcFFr8.2 (minoritário) respectivamente (Figura 146).

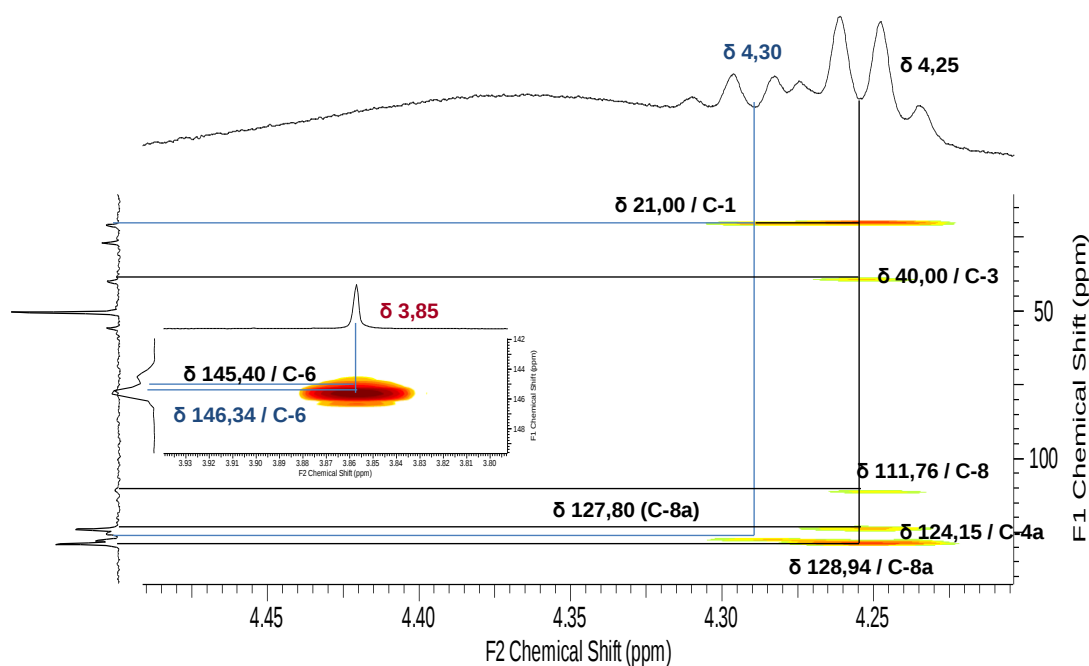


Figura 146. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) referente região do carbono metínico e metoxilas da fração BcFFr8.1 e BcFFr8.2. Em preto correlação majoritário e em azul minoritário.

Na região de δ 1,58 (3H, d, J = 6,7) e δ 1,60 (3,0 H, d, J = 6,7) do espectro de RMN de ^1H foram observados sinais de dois dupletos, ambos ligados ao carbono metílico em δ 21,00 (CH_3 -1) no HSQC, pertencentes respectivamente ao BcFFr8.1 e a BcFFr8.2 (Figura 147). Esses sinais se correlacionam no HMBC com os carbonos em δ 50,60 (C-1) e δ 128,94 (C-8a) para a substância majoritária, e em δ 50,50 (C-1) e δ 127,80 (C-8a) para a substância minoritária (Figura 148).

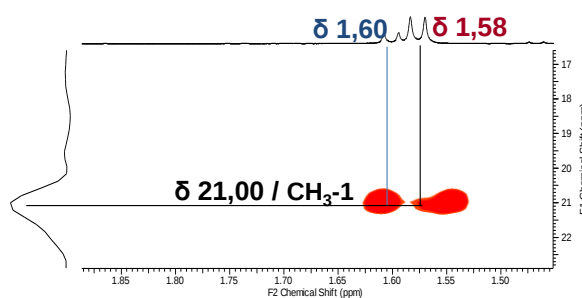


Figura 147. Ampliação do mapa de correlações de HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente região do carbono metílico.

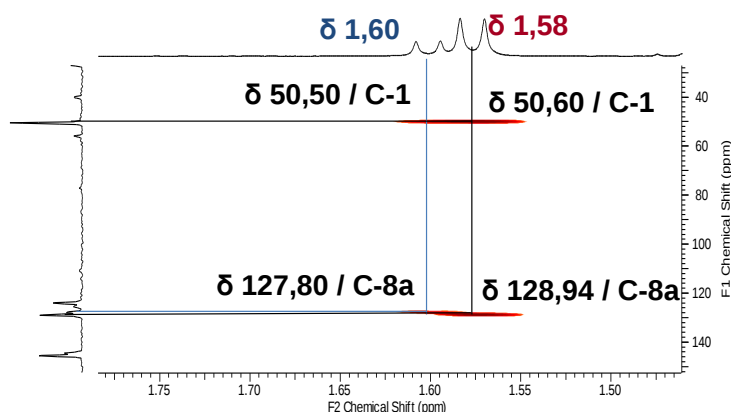


Figura 148. Ampliação do mapa de correlações de HMBC (125,76 MHz, CDCl₃) referente região do carbono metílico.

Com as análises do espectro de RMN de ¹H, dos mapas de correlações HSQC e HMBC (Anexo 1 – Figuras 229, 230 e 231), além de comparações com dados presentes na literatura (Tabela 27 e 28), as substâncias codificadas como BcFFr8.1 e BcFFr8.2 foram identificadas como os alcaloides, isosalsolina (BcFFr8.1) e salsolina (BcFFr8.2), portadores de esqueleto isoquinolínicos e pertencente à classe das isoquinolinas simples. São derivadas do salsolinol, um alcaloide tetrahydroisoquinolina que é conhecido como uma substância indutora do Parkinsonismo e indicativo, em humanos, do consumo crônico de álcool (IWASA et al., 1991; KURNIK-LUCKA et al., 2017). Salsolina e isosalsolina ocorrem após metilações nas hidroxilas presentes nos carbonos 6 e 7, gerando os dois isômeros constitucionais o 6-metoxi-(R)-salsolinol (Isosalsolina) e o 7-metoxi-(R)-salsolinol (salsolina) (Figura 149) (KURNIK-LUCKA et al., 2017).

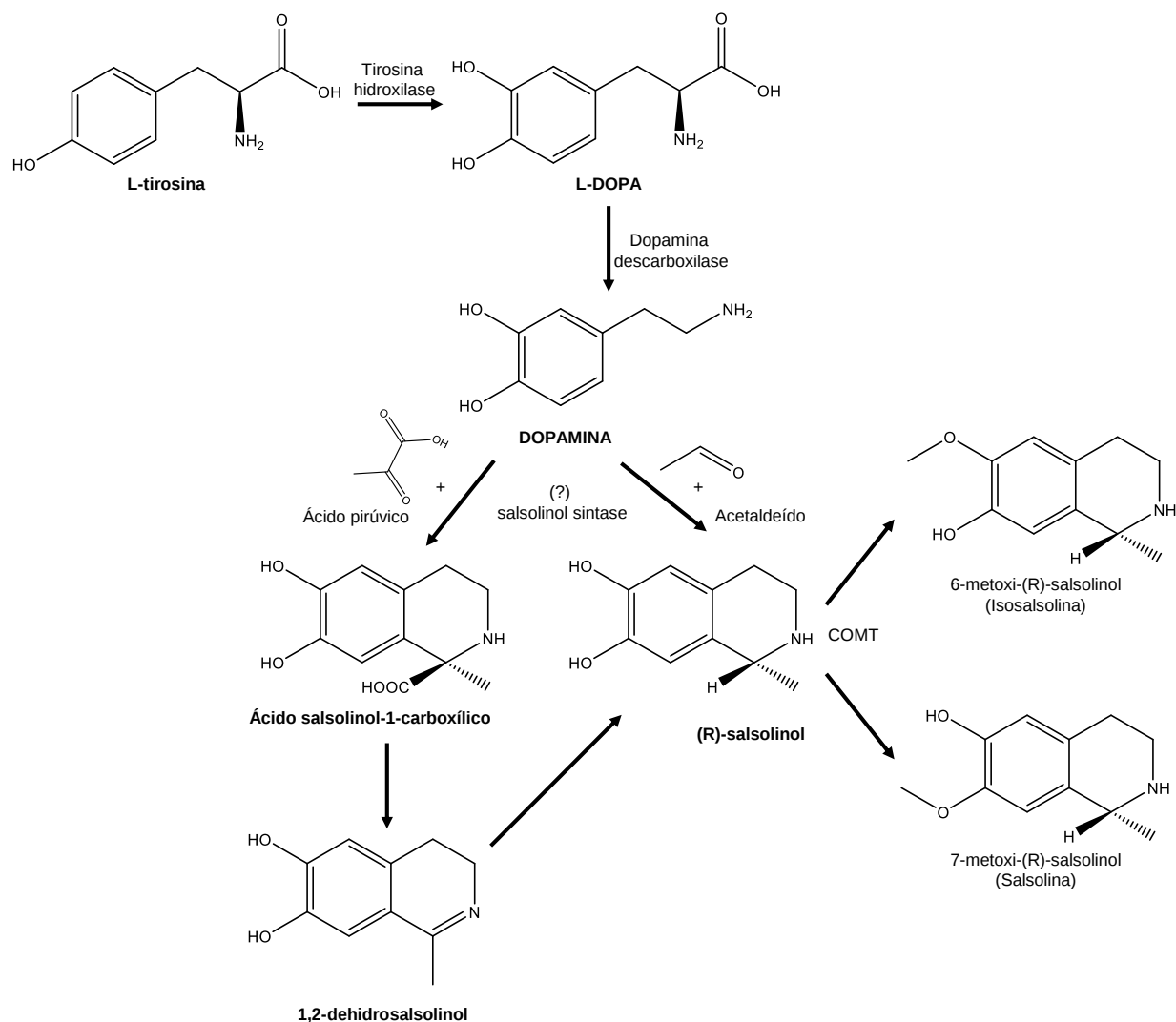


Figura 149. Rota metabólica da dopamina para formação da salsolina e isosalsolina no cérebro.
Fonte: Baseado em KURNIK-LUCKA et al., 2017.

O salsolinol já foi reportado na espécie *Annona reticulata* (FORGACS et al., 1981), todavia este é o primeiro relato de seus derivados, isosalsolina e salsolina (Figura 151 e 152) na família Annonaceae e aparentemente na ordem Magnoliales (MENACHERY et al., 1986). Na literatura é relatado para esses alcaloides estudos sobre sua toxicidade, os quais foram testados *in vivo*, e ambos alcaloides se apresentaram 10-20 vezes menos tóxicos pela via oral do que pela via intravenosa. Foi observada atividade anti-hipertensiva em ratos espontaneamente hipertensos, e ainda tremores, convulsões e diminuição da atividade motora durante os testes

As principais correlações são apresentadas na figura 150 e os dados espectrométricos estão dispostos nas tabelas 27 e 28 para composto majoritário (Figura 151) e para o composto minoritário (Figura 152) respectivamente, além da proposta de fragmentação que está apresentada na figura 153.

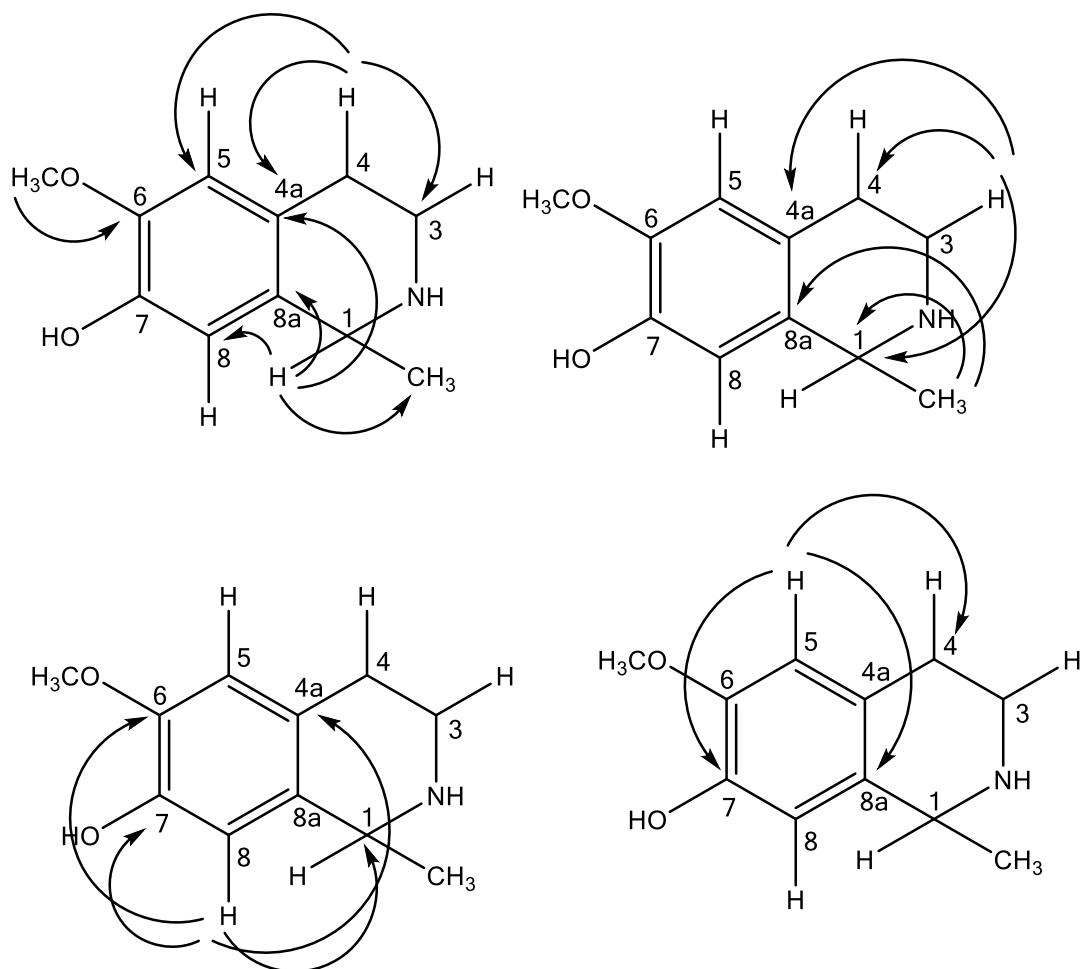


Figura 150. Principais correlações observadas na fração BcFFr8.1 e BcFFr8.2.

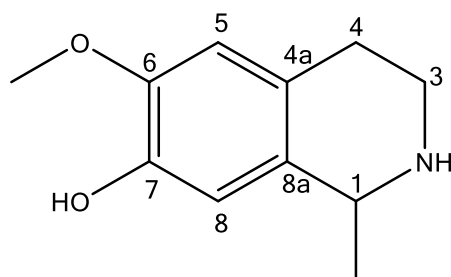


Figura 151. Componente majoritário Isosalsolina m/z 194 Da.

Tabela 27. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC da substância majoritária presente na fração alcaloídica BcFFr8.1.

Isosalsolina (m/z 194)						
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	COSY ^a	HSQC ^a	^{13}C ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^a
1	4,25 (1H, q, 6,7)	4,04 (1H, q, 6.7)	1,58	50,60	51,18	21,00, 40,00, 111,76, 124,15, e 128,94
2	-	-	-	-	-	-
3 α	3,38 (1 H, m)	-	-	40,00	41,92	27,10, 50,60 e 124,15
3 β	3,15 (1 H, m)	-	-	40,00	41,92	27,10, 50,60 e 124,15
4	2,85 (2H, m)	-	-	27,10	29,48	40,02, 110,90 e 124,15
4a	-	-	-	124,15	125,2	-
5	6,56 (1H, s)	6,59 (1H, s)	-	110,90	111,11	27,10, 128,94 e 144,40
6	-	-	-	145,40	145,0	-
7	-	-	-	144,40	143,8	-
8	6,69 (1H, s)	6,74 (1H, s)	-	111,76	111,90	50,60, 124,15, 144,40 e 145,40
8a	-	-	-	128,94	132,4	-
1-CH ₃	1,58 (3H, d, 6.7)	1,41 (3H, d, 6.7)	4,25	21,00	22,62	50,60 e 128,94
6-OCH ₃	3,85 (3H, s)	3,88 (3H, s)	-	55,90	55,93	145,40

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com IWASA et al., 1991 (200 MHz e 125 MHz em CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

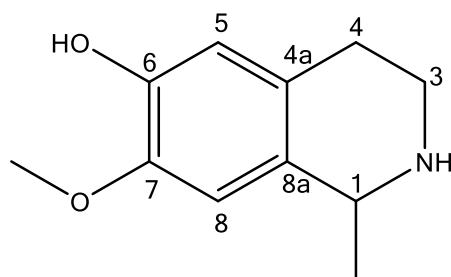


Figura 152. Componente minoritário salsolina m/z 194 Da.

Tabela 28. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC da substância minoritária presente na fração alcaloídica BcFFr8.2.

Salsolina (m/z 194)					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^1H δ (mult., J em Hz) ^c	HSQC ^b	^{13}C ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^b
1	4,30 (1 H, m)	4,07 (1H, d, J = 6.7)	50,50	51,30	21,00 e 127,80
2	-	-	-	-	-
3 α	3,38 (1H, m)	-	40,00	41,72	-
3 β	3,15 (1 H, m)	-	40,00	41,72	-
4	2,96 (1H, m)	-	27,10	29,21	40,00 e 124,04
4a	-	-	124,04	-	-
5	6,65 (1H, s)	6,61 (1H, s)	114,45	114,73	27,10, 127,80 e 145,28
6	-	-	145,28	144,03	-
7	-	-	146,34	145,12	-
8	6,57 (1H, s)	6,64 (1H, s)	108,09	108,31	50,50 e 124,04
8a	-	-	127,80	-	-
1-CH ₃	1,60 (3.0 H, d, 6.7)	1,47 (3H, d, J = 6.7)	21,00	22,84	50,50 e 127,80
6-OCH ₃	3,85 (3,0 H, s)	3,86 (3H, s)	55,90	56,03	146,34

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com Iwasa et al., 1991 (200 MHz e 125 MHz em CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

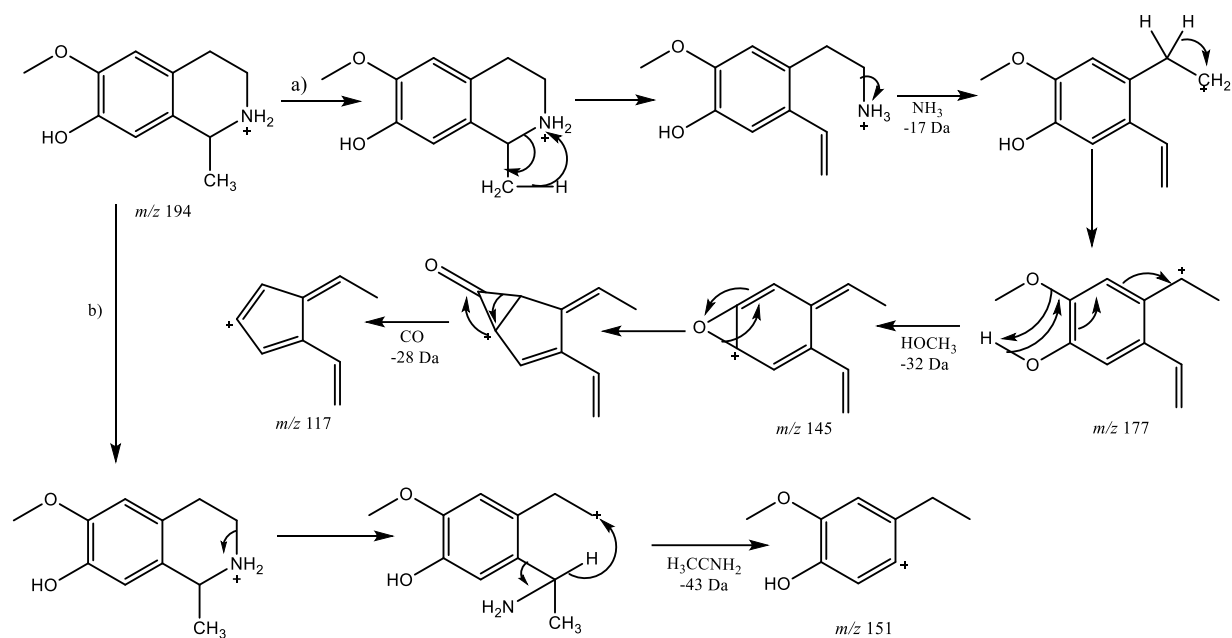


Figura 153. Proposta de fragmentação para o alcaloide isosalsolina.

5.8.3. Determinação estrutural das frações alcaloídicas da espécie *B. multiflora*.

5.9.3.1. Determinação estrutural dos alcaloides identificados na fração alcaloídica obtida dos galhos grossos da espécie *B. multiflora*.

De acordo com a tabela 14, o componente principal da fração alcaloídica dos galhos grossos é a substância com T_R 7,51 minutos com íon de m/z 268 $[M+H]^+$, correspondente à molécula protonada (Figura 154). Esse íon foi submetido à análise de MS^2 (Figura 155), sendo observado um padrão de fragmentação, com perdas de 17 e 32 Da (m/z 268 $\rightarrow$ 251 $\rightarrow$ 219), esse perfil de fragmentação é característico de alcaloides aporfinicos não *N*-metilado e com a presença de metoxila no anel A. O perfil de fragmentação é compatível com o alcaloide assimilobina. Essa afirmação foi comprovada a partir dos dados do espectro RMN de 1H e mapas de correlações HSQC e HMBC, comparados aos da literatura (STÉVIGNY et al., 2004; SOARES et al., 2015a; LIMA et al., 2020).

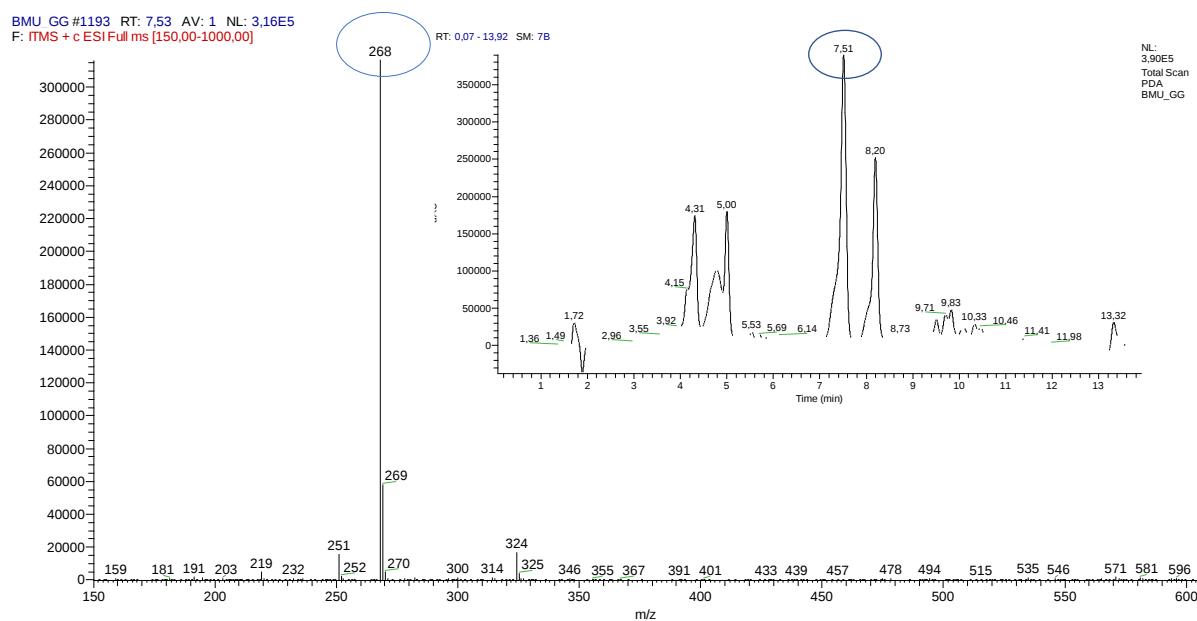


Figura 154. Espectro de massas do íon de m/z 268 e cromatograma obtido da análise de LC-EM da fração alcaloídica dos galhos grossos da espécie *B. multiflora*.

BMU GG LC MSMS #710 RT: 9,68 AV: 1 NL: 6,77
F: ITMS + c ESI Full ms2 268,00@cid25,00 [70,00-270]

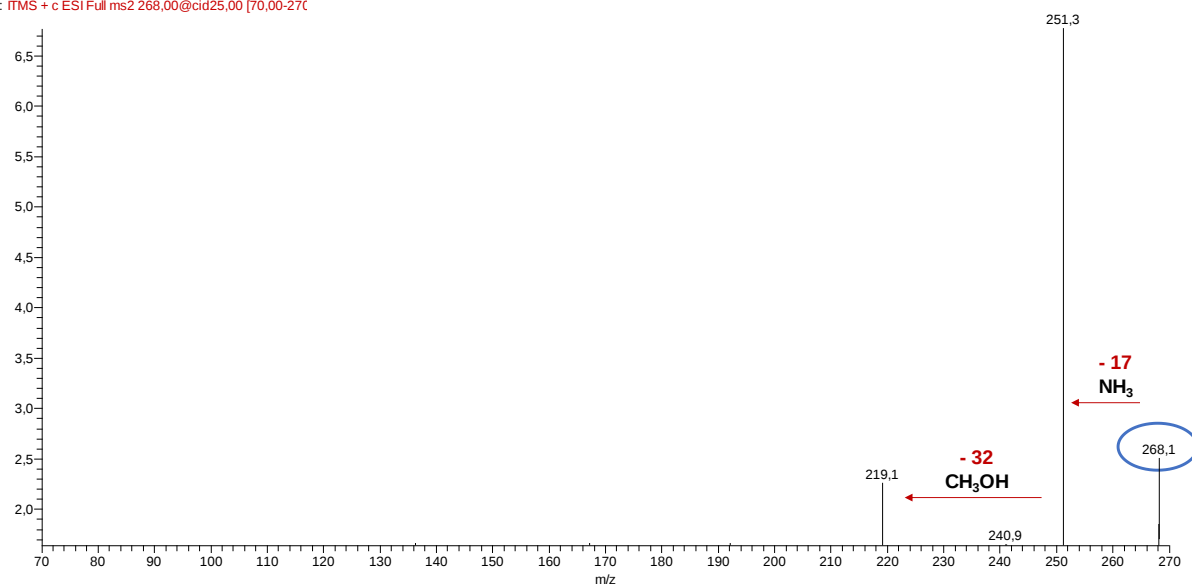


Figura 155. Espectro de MS² do íon m/z 268 ($[M+H]^+$) da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

Na ampliação do espectro de RMN de ¹H (Figura 156) é possível observar na região dos aromáticos 3 sinais em δ 7,25 (1H, d, 1,2 Hz), δ 7,32 (1H, m) e δ 8,27 (1H, d, 7,8 Hz), característicos do anel D do esqueleto aporfínico não substituído. Esses hidrogênios de acordo com o mapa de correlações HSQC estão acoplados aos carbonos com δ 128,06 (C-9), δ 127,73 (C-10) e δ 127,42 (C-11) respectivamente (Figura 157). No mapa de correlações HMBC pode-se observar as correlações desses hidrogênios aromáticos com os carbonos adjacentes (Figura 158).

O espectro de RMN de ¹H evidencia também um simpleto em δ 6,71, com deslocamento característico de H-3 do anel A dissustituído (Figura 156). Nos mapas de correlações HMBC (Figura 159) observa-se que tal hidrogênio, acoplado ao carbono com δ 114,49 (C-3), no HSQC (Figura 157), está se correlacionando com os carbonos em δ 26,04 (C-4), δ 123,89 (C-3b), δ 143,42 (C-1) e δ 149,31 (C-2). Em adição, a metoxila com hidrogênio em δ 3,58 (3H, s), acoplada ao carbono em δ 60,30, no HSQC, está se correlacionando com o carbono em δ 143,42 (C-1), no HMBC, confirmando assim a sua conectividade no anel A (Figura 160).

Os dados estão descritos na tabela 29 e foram confrontados com os existentes em literatura, sendo possível caracterizar a substância como o alcaloide aporfínico asimilobina (Figura 161). Os dados espectrais estão dispostos no anexo 1 (Figuras 232, 233 e 234). Esse alcaloide já foi relatado em várias espécies da família Annonaceae como: *Annona salzmännii* (DA CRUZ et al., 2011; COSTA et al., 2013d), *Annona pickelii* (DUTRA et al., 2012), *Annona vepretorum* (TELES et al., 2015), *Bocageopsis pleiosperma* (SOARES et al., 2015a), *Unonopsis floribunda* (SILVA et al., 2018a) e *Onychopetalum amazonicum* (LIMA et al., 2020). Além de possuir atividades biológicas como antioxidante e antimicrobiana relatada em literatura (COSTA et al., 2013d).

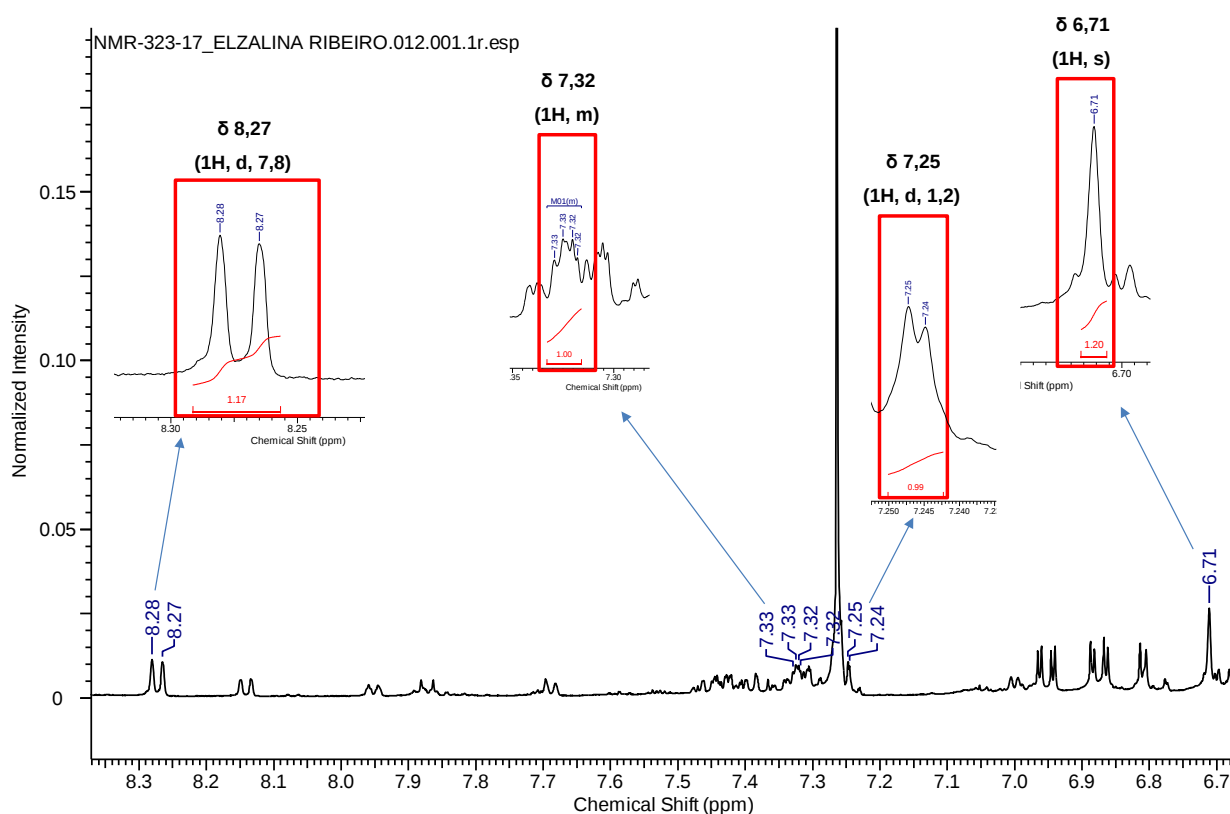


Figura 156. Espectro de RMN de ¹H (500,13 MHz, CDCl₃) e ampliação da região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

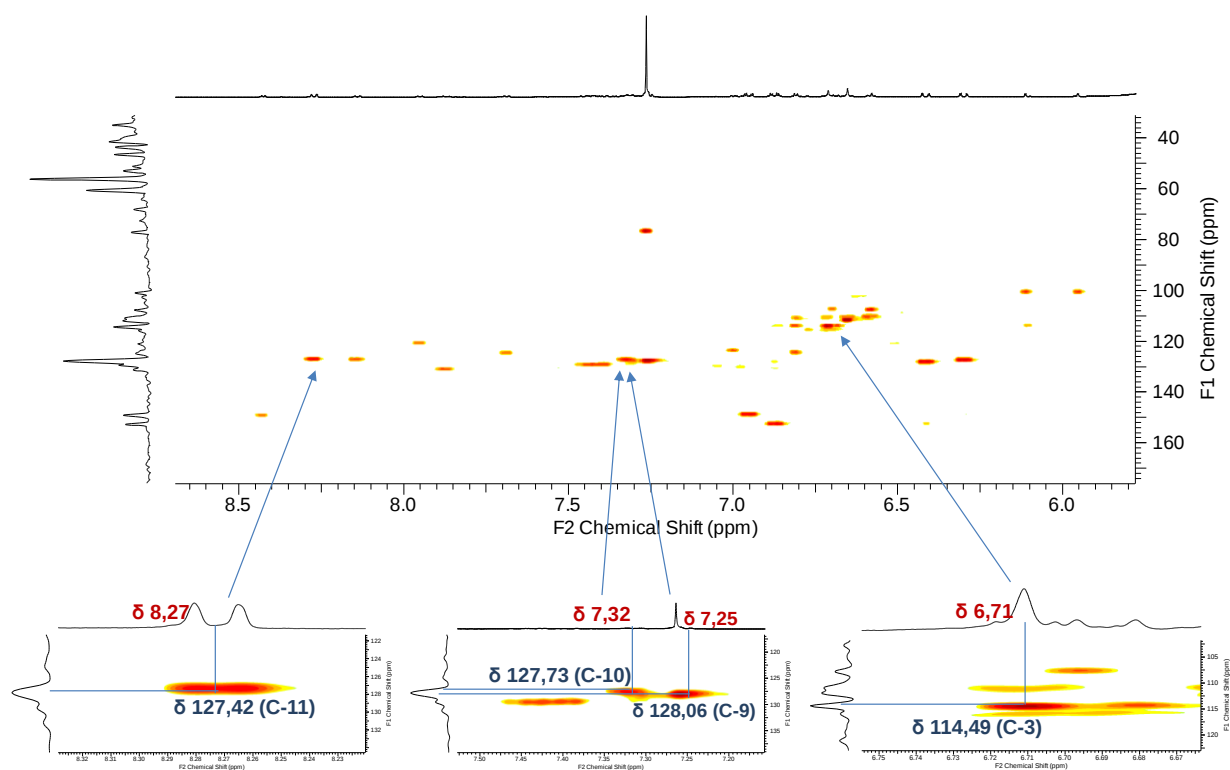


Figura 157. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

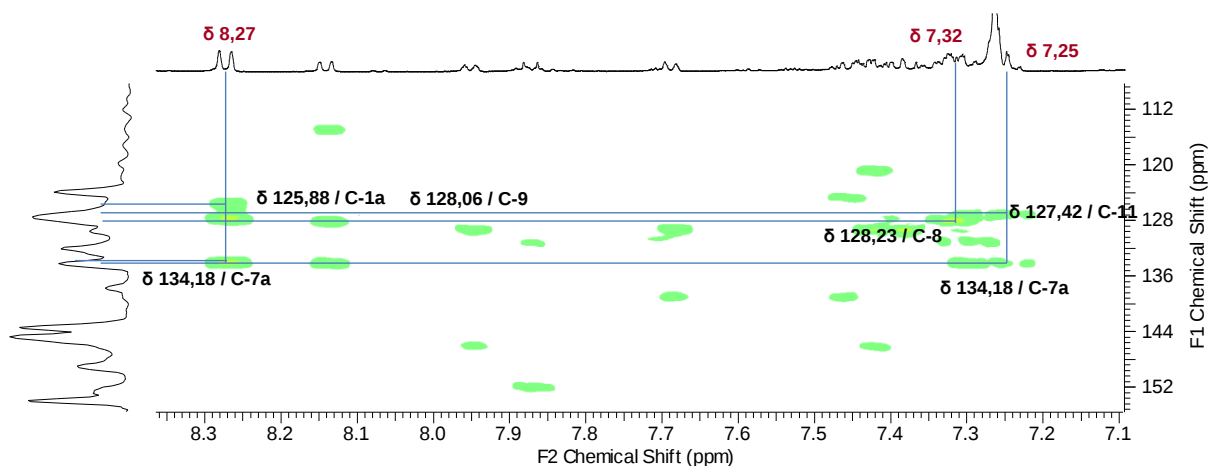


Figura 158. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

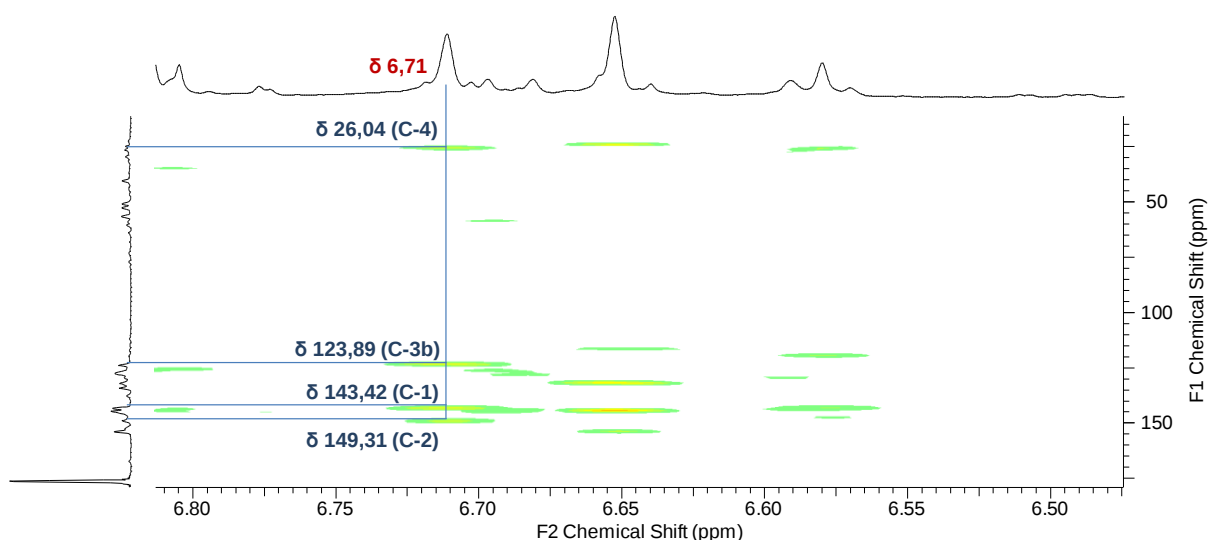


Figura 159. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região do hidrogênio aromático em δ 6,71 da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

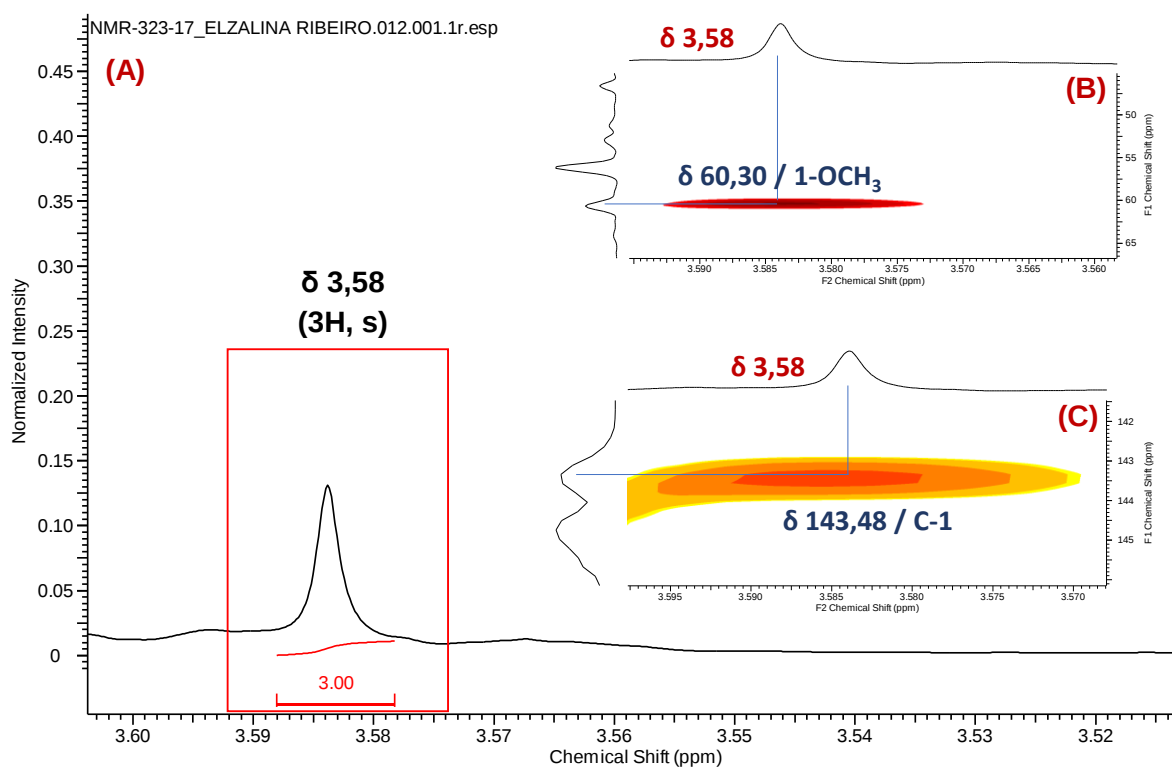


Figura 160. Ampliação do RMN de ^1H (A) (500 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região da metoxila em δ 3,58 da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

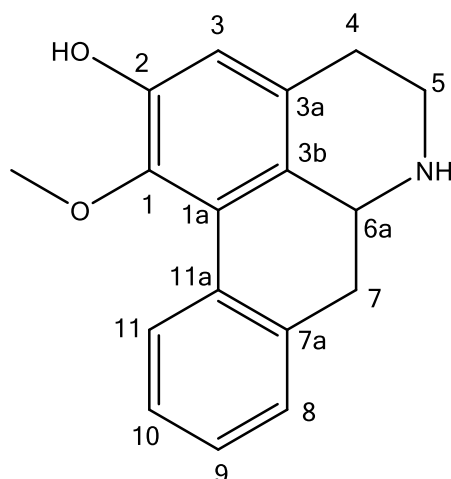


Figura 161. Estrutura do alcaloide asimilobina.

Tabela 29. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide asimilobina.

Asimilobina (m/z 268)						
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	$g\text{HSQC}^a$	$g\text{HSQC}^b$	$g\text{HMBC}$ (^1H - ^{13}C) ^a	$g\text{HMBC}$ (^1H - ^{13}C) ^b
1a	-	-	125,88	125,9	-	-
1	-	-	143,42	143,4	-	-
2	-	-	149,31	149,1	-	-
3	6,71 (1H, s)	6,73 (1H, s)	114,49	114,5	26,04; 123,89; 143,42 e 149,31	28,04; 126,61; 143,45 e 149,97
3a	-	-	-	129,3	-	-
3b	-	-	123,89	126,6	-	-
4_{pseudoeq}	-	2,75 (1H, m)	26,04	28,1	-	42,49; 114,61; 129,30 e 126,61
4_{pseudoax}	-	3,04 (1H, m)	26,04	28,1	-	42,49; 114,61; 129,30 e 126,61
5_{pseudoeq}	-	3,04 (1H, m)	-	42,4	-	28,04; 53,21 e 129,30
5_{pseudoax}	-	3,49 (1H, m)	-	42,4	-	28,04; 53,21 e 129,30
6a	-	3,93 (1H, m)	-	53,2	-	36,28; 42,49; 126,61; 129,30 e 135,61
7_{pseudoeq}	-	2,97 (1H, dd, 13,8 e 4,4)	-	36,2	-	53,15; 126,61; 128,32; 131,92 e 135,61
7_{pseudoax}	-	2,85 (1H, m)	-	36,2	-	53,15; 126,61; 128,32; 131,92 e 135,61
7a	-	-	134,18	135,5	-	-
8	-	7,28 (1H, m)	128,23	128,3	-	36,28; 127,81 e 131,91

9	7,25 (1H, d, 1,2)	7,25 (1H, m)	128,06	128,0	127,42 e 134,18	127,44 e 135,61
10	7,32 (1H, m)	7,33 (1H, m)	127,73	127,5	128,23	128,32 e 131,91
11	8,27 (1H, d, 7,8)	8,29 (1H, d, 7,4)	127,42	127,4	125,88; 127,74 e 134,18	135,61; 125,86 e 128,08
11a	-	-	-	131,9	-	-
1-CH₃O	3,58 (3H, s)	3,59 (3H, s)	60,30	60,6	143,42	143,45

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para gHSQC e gHMBC em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com SOARES, 2014 e SOARES et al., 2015a (600 MHz e 125 MHz em CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

Dando continuidade ao estudo da fração alcaloídica dos galhos grossos, também foi possível identificar regiões no espectro de RMN de ¹H e mapa de correlações HSQC (Anexo 1 – Figuras 232, 233 e 234) para a substância com T_R 5,00 minutos (Tabela 14), referente ao íon de *m/z* 298 ([M+H]⁺), correspondente à molécula protonada (Figura 162). Esse íon foi submetido à análise de MS², sendo observado uma perda inicial de 17 Da (*m/z* 298 → 281), tal perfil de fragmentação já foi observado neste trabalho na fração alcaloídica das folhas de *B. canescens* (Figura 63) e descrito também na espécie *B. pleiosperma* (SOARES et al., 2015a) para o alcaloide aporfínico estefarina (Figura 163). A afirmação foi comprovada a partir da comparação dos dados de RMN 1D e 2D com os obtidos na fração das folhas de *B. canescens* e com os já relatados em literatura (Tabela 22 e 30), necessitando, entretanto, do isolamento da substância, para confirmação desta identificação.

BMU_GG #749 RT: 4.99 AV: 1 NL: 2.66E5
T: ITMS + c ESI Full ms [150,00-1000,00]

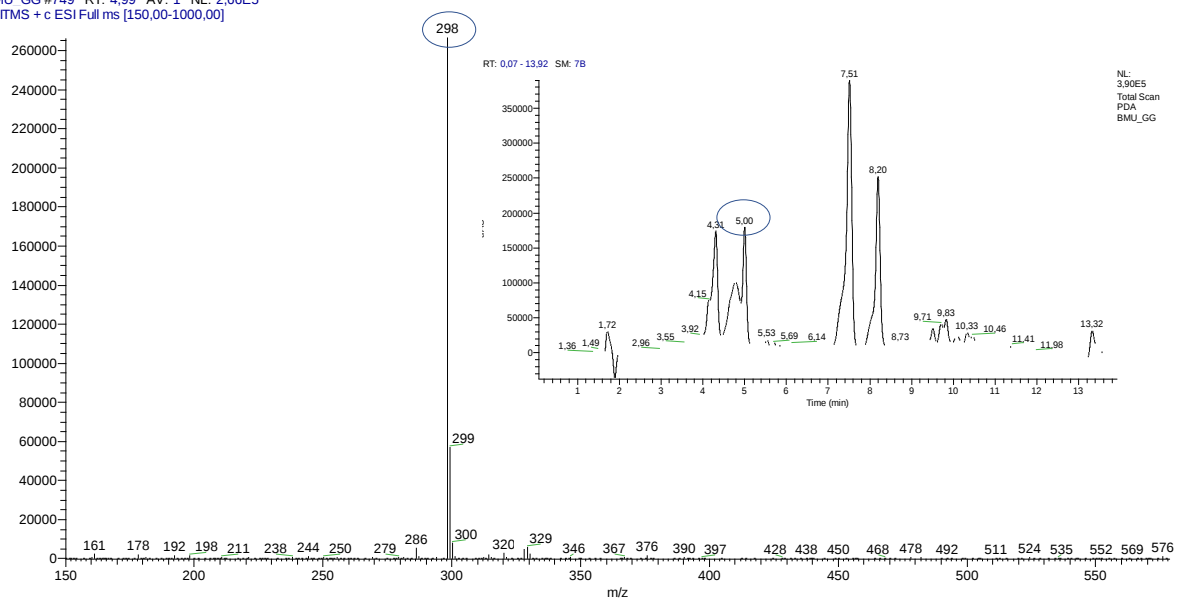


Figura 162. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 268 ($[M+H]^+$).

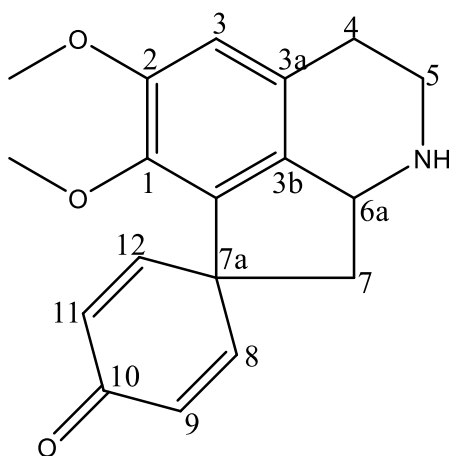


Figura 163. Estrutura do alcaloide estefarina.

Tabela 30. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide estefarina.

Estefarina (<i>m/z</i> 298)				
Posição	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz)^a	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz)^b	HSQC (^1H-^{13}C)^a	HSQC (^1H-^{13}C)^c
1	-	-	-	145,20
1a	-	-	-	133,13
2	-	-	-	154,20
3	6,65 (1H, s)	6,64 (1H, s)	112,05	112,63
3a	-	-	-	128,63
3b	-	-	-	135,67
4	-	2,80 (2H, m)	-	26,76
5	-	3,46 (1H, dd, 6,6 e 1,2) 3,16 (1H, dd 5,4 e 1,8)	-	45,40
6a	-	4,31 (1H, dd 10,5 e 6,6)	-	58,22
7	-	2,41 (2H, dd 12,0 e 6,6)	-	48,53
7a	-	-	-	51,82
8	6,95 (1H, dd, 10,0 e 3,0)	7,03 (1H, dd, 10,0 e 3,0)	149,13	150,30
9	6,42 (1H, dd, 10,0 e 1,8)	6,42 (1H, dd, 10,0 e 1,8)	128,46	128,97
10	-	-	-	186,88
11	6,30 (1H, dd, 10,0 e 1,8)	6,30 (1H, dd, 9,6 e 1,8)	127,69	127,80
12	6,87 (1H, dd, 10,0 e 3,0)	6,89 (1H, dd, 10,0 e 3,0)	153,71	153,70
2-OCH₃	3,82 (3H, s)	3,82 (3H, s)	56,24	56,74
1-OCH₃	3,61 (3H, s)	3,61 (3H, s)	61,0	61,39

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para gHSQC e gHMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com IWASA et al., 1991 (200 MHz e 125 MHz em CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

Ainda na análise do espectro de RMN de ^1H e mapas de correlações HSQC e HMBC (Figuras 232, 233 e 234) da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*, foi possível identificar a substância com T_R 8,20 minutos (Tabela 14), referente ao íon de m/z 282 ($[\text{M}+\text{H}]^+$), referente a molécula protonada (Figura 164). Esse

íon, quando submetido à análise de MS² apresentou uma perda inicial de 18 Da (m/z 282 → 264) (Figura 165), uma perda incomum para esqueletos do tipo aporfinicos, evidenciando presença de hidroxila na molécula (STÉVIGNY et al., 2004, SILVA et al., 2012, SOARES et al., 2015a).

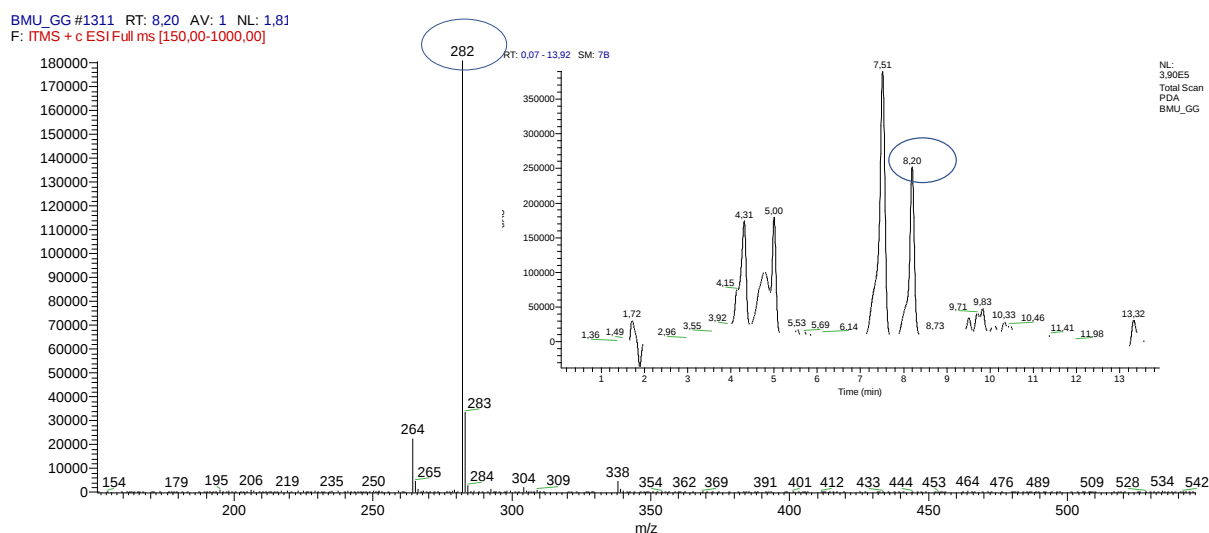


Figura 164. Espectro de massas e cromatograma obtido da análise em LC-EM do íon de m/z 282 ($[M+H]^+$).

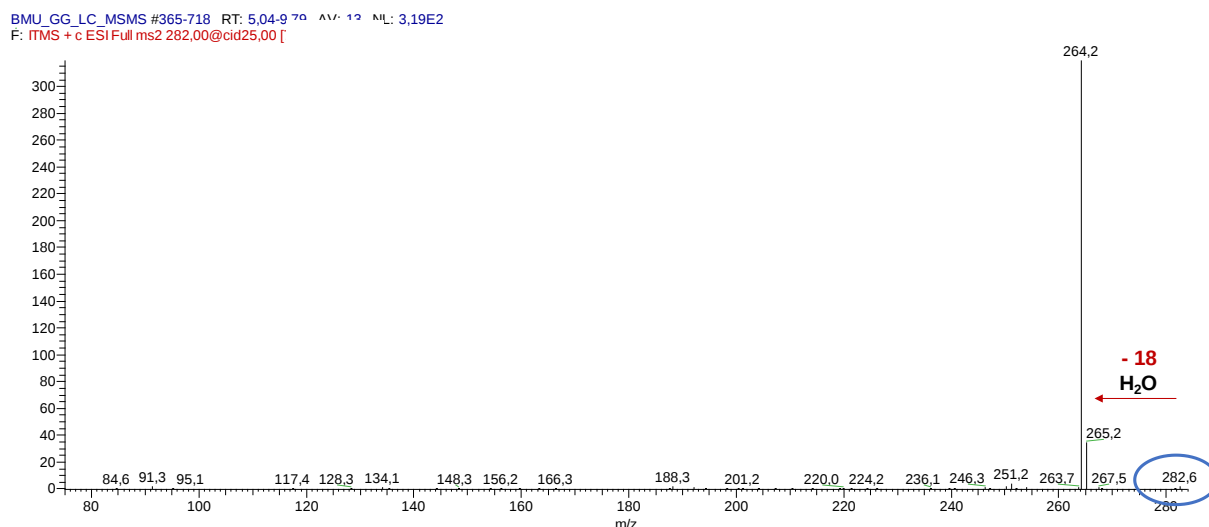


Figura 165. Espectro de MS² do íon m/z 282 ($[M+H]^+$) da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

Na ampliação do espectro de RMN de ¹H e mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 166), inicialmente foram observados sinais referentes a ponte metilenodioxí em δ 6,11 (1H, d, 1,4) e δ 5,95 (1H, d, 1,4) acoplados ao carbono em δ 101,00, e correlacionados com os carbonos em δ 143,37 (C-1) e δ 147,85 (C-2).

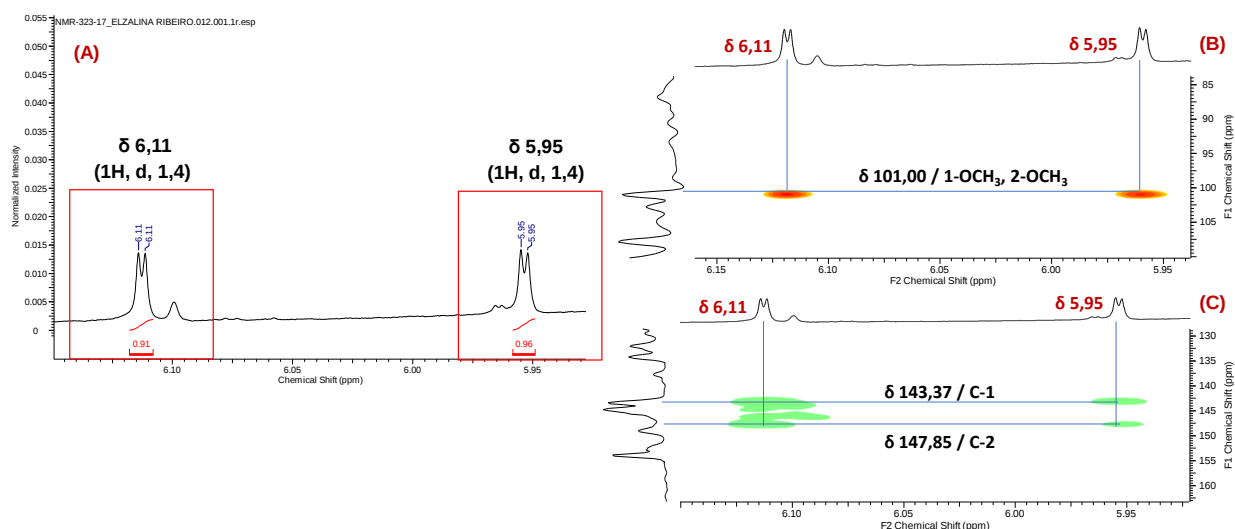


Figura 166. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) na região dos hidrogênios em δ 6,11 e δ 5,95 da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

Na ampliação do espectro de RMN de ^1H (Figura 167) e mapa de correlações HSQC (Figuras 168) observou-se um sistema de hidrogênios aromáticos em δ 8,14 (1H, d, 7,2 Hz), 7,44 (1H, m), 7,40 (1H, m) e 7,32 (1H, m), cujos hidrogênios estão acoplados aos carbonos δ 127,52 (C-11), δ 129,55 (C-10), δ 129,46 (C-8) e 127,80 (C-9) respectivamente, indicando uma estrutura com o anel D do esqueleto aporfínico não substituído. No mapa de correlações HMBC foi observado que o hidrogênio em δ 8,14 está correlacionando com os carbonos δ 115,08 (C-11a), δ 127,80 (C-9) e δ 134,33 (C-7a) e o hidrogênio em δ 7,32 está se correlacionando ao carbono em δ 127,52 (C-11) (Figura 169).

Um sinal de hidrogênio metínico alifático mais desblindado foi observado em δ 4,92 (1H, d, 3,3 Hz), com deslocamento característico de hidrogênio carbinólico, confirmado pelo acoplamento com o carbono em δ 68,19. De acordo com o mapa de correlações HMBC o hidrogênio em δ 4,92 está se correlacionando com os carbonos em δ 56,68 (C-6a), δ 119,81 (C-3b) e δ 129,46 (C-8) (Figura 170). Esses dados estão de acordo com Guinaudeau e colaboradores (1988) que relatam hidroxilas não

fenólicas normalmente nas posições C-4 ou C-7 em esqueletos aporfinicos, e na estrutura atual foi localizada no C-7.

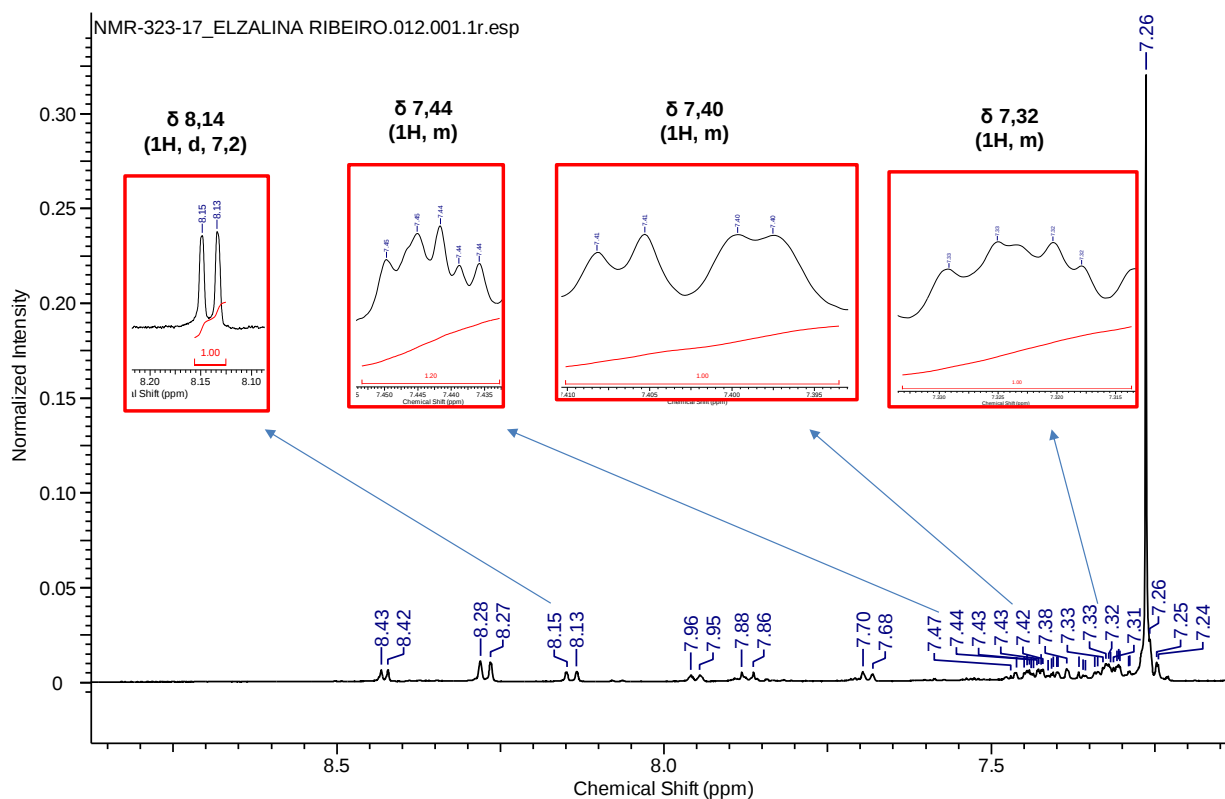


Figura 167. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) na região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

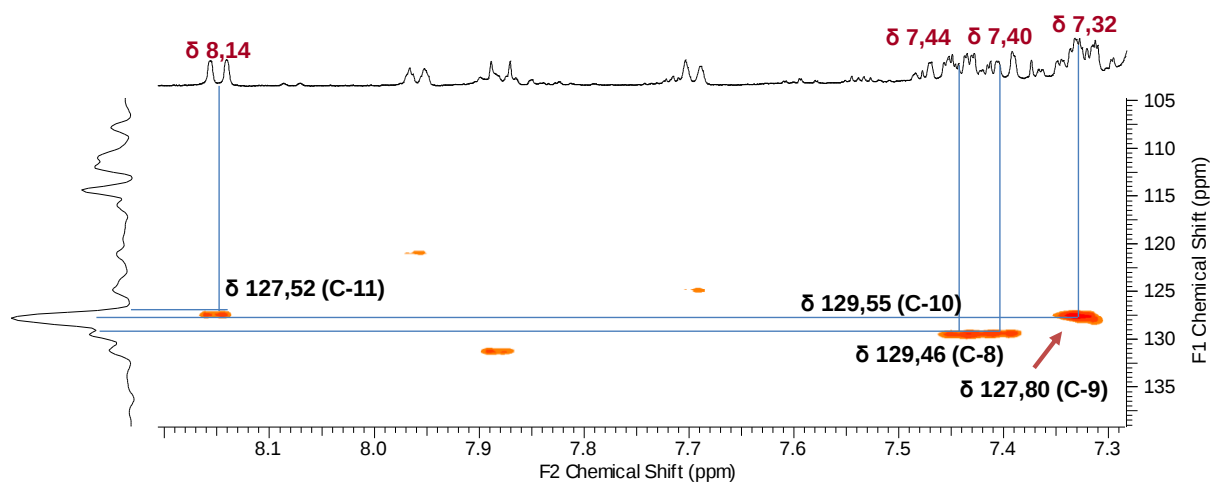


Figura 168. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

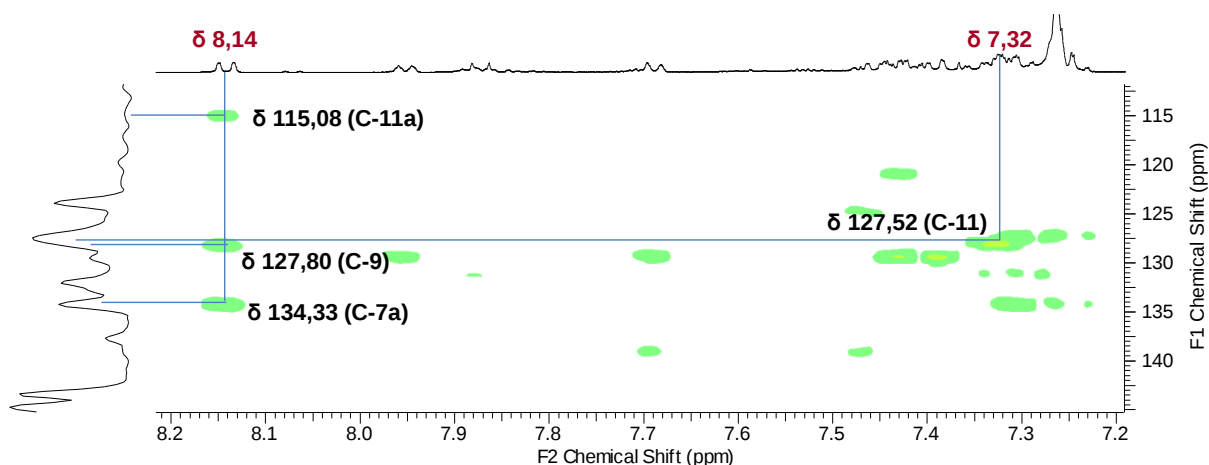


Figura 169. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

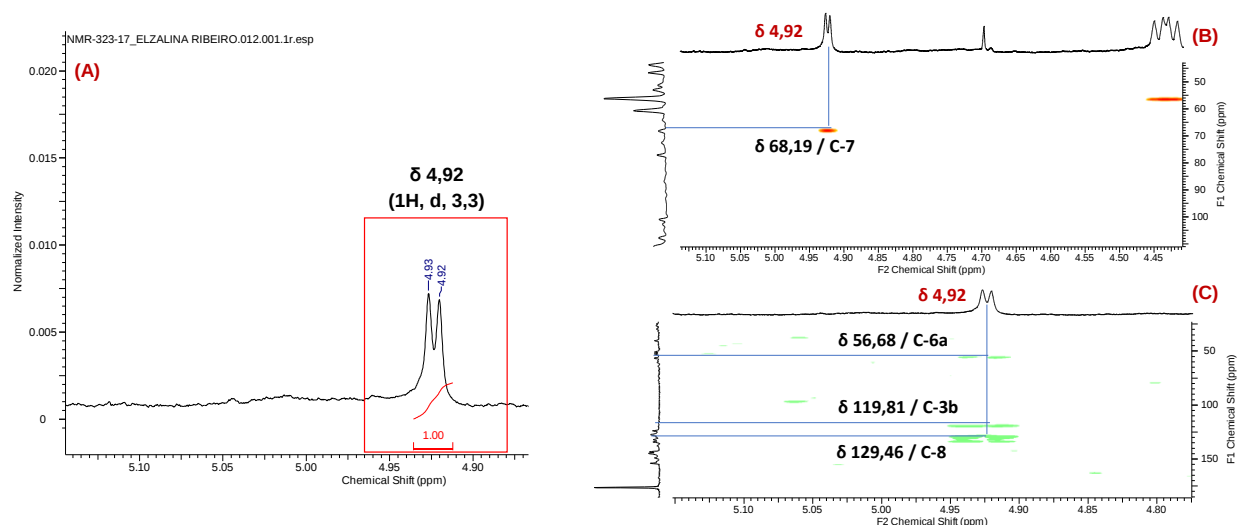


Figura 170. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) na região do hidrogênio carbinólico em δ 4,92 da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

Nos mapas de correlações foi possível observar o sinal do hidrogênio aromático H-3 em δ 6,58 (1H, s), em correlação a J^1 com o carbono em δ 107,82, e a longa distância com os carbonos em δ 26,54 (C-4), δ 119,81 (C-3b), 143,37 (C-1) e δ 147,85 (C-2) (Figura 171). Esses dados sugerem a similaridade desta estrutura com o alcaloide anonaina observado na fração alcaloídica das folhas de *B. canescens* (Tabela 18).

A partir da comparação das análises espectrométricas e espectroscópicas (Anexo 1 – Figuras 232, 233 e 234) com dados da literatura (Tabela 31) (ISMAIL et al., 2012) foi possível confirmar a estrutura do alcaloide norushinsunina (Figura 172 e 173),

sendo este alcaloide reportado anteriormente nas espécies *Alphonsea sclerocarpa* (TADIĆ et al., 1987), *Unonopsis guatterioides* (GUINAUDEAU et al., 1988), *U. pacifica* (ARANGO et al., 1988), *Annona reticulata* (SURESH et al., 2012) e *U. floribunda* (SILVA et al., 2018a), porém este é o primeiro relato no gênero *Bocageopsis*. Suresh e colaboradores (2012) relatam um potencial citotóxico para este alcaloide.

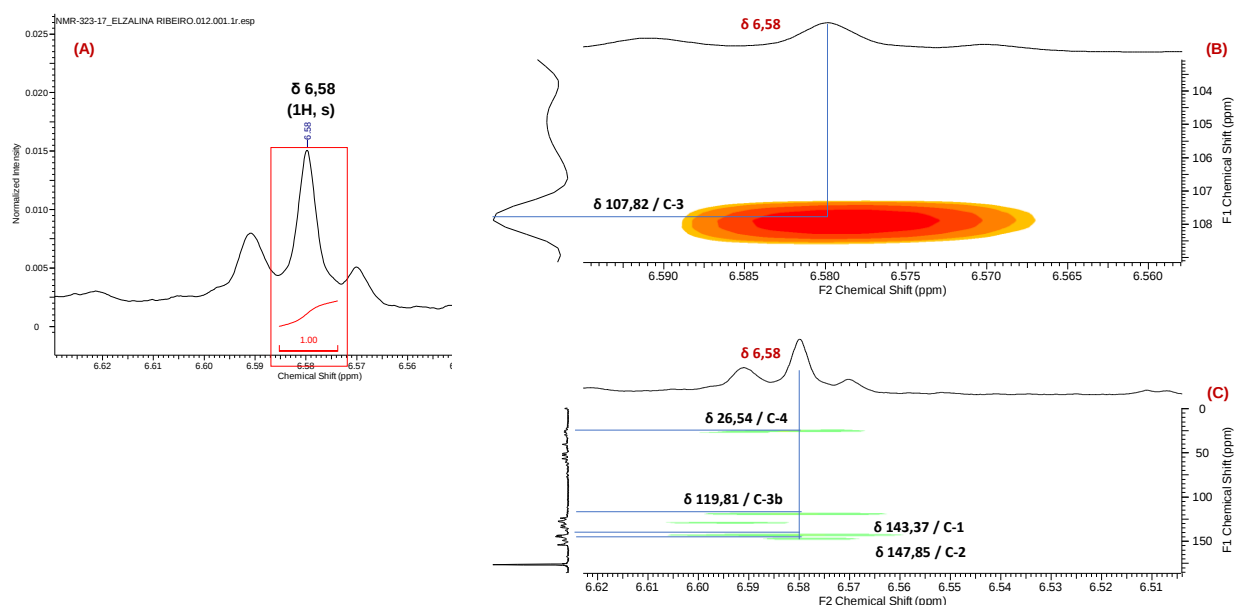


Figura 171. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) na região do hidrogênio carbinólico em δ 6,58 da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

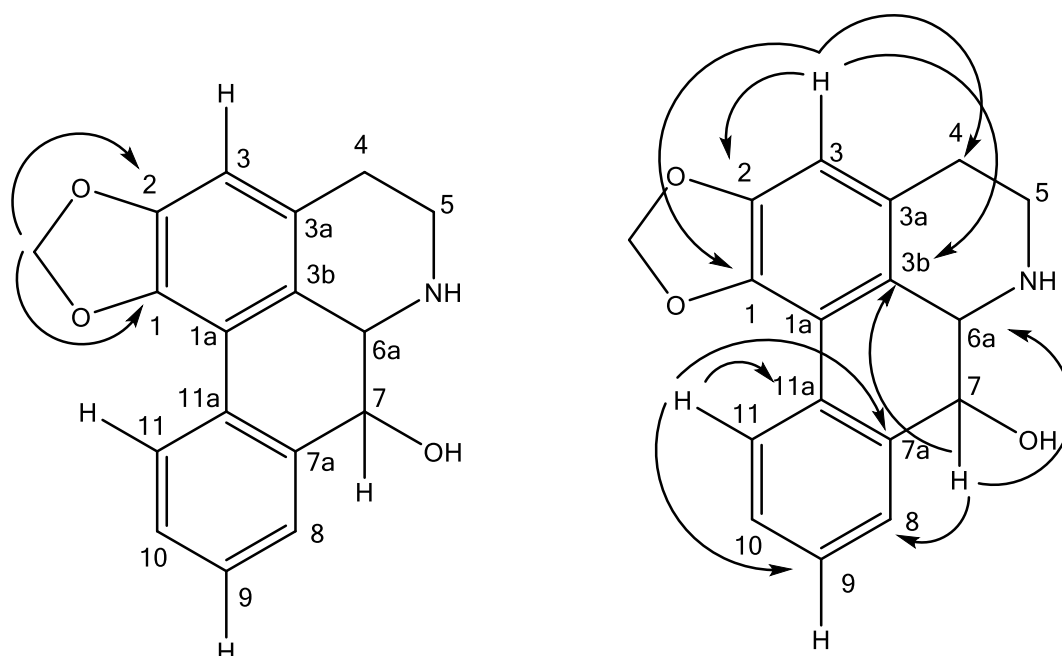


Figura 172. Correlações observadas para o alcaloide norushinsunina.

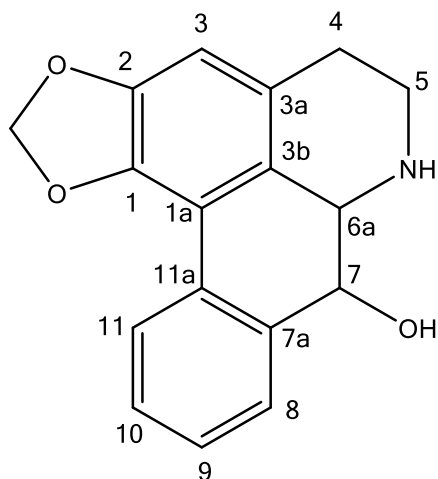


Figura 173. Estrutura do alcaloide norushinsunina.

Tabela 31. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide norushinsunina.

Norushinsunina (m/z 282)						
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC ^a	^{13}C ^b	HMBC ^a	HMBC ^b
1	-	-	143,37	143,8	-	-
1a	-	-	-	-	-	-
2	-	-	147,85	148,7	-	-
3	6,58 (1H, s)	6,59 (1H,s)	107,82	107,7	26,54, 119,81, 143,37 e 147,85	25,4, 117,3, 143,8 e 148,7
3a	-	-	-	125,3	-	-
3b	-	-	119,81	117,3	-	-
4	-	3,27 (1H, m) e 2,92 (1H, dd, 17,0 e 4,3)	26,54	25,4	-	41,3, 107,7, 117,3 e 125,3
5	-	3,74 (1H, m) e 3,40 (1H, m)	-	41,3	-	25,4, 56,5 e 125,3
6a	-	4,47 (1H, sl)	56,68	56,5	-	117,3
7	4,92 (1H, d, 3,3)	4,94 (1H, d, 3,3)	68,19	66,7	119, 81, 129,62, 56,68	56,5, 117,3, 129,4 e 133,7
7a	-	-	134,33	133,7	-	-
8	7,40 (1H, m)	7,41 (1H, m)	129,46	129,4	-	66,7 e 129,9
9	7,32 (1H, m)	7,35 (1H, m)	127,80	128,9	127,52	127,7 e 133,7

10	7,44 (1H, m)	7,45 (1H, td, 7,6 e 1,5)	129,55	129,9	-	129,4
11	8,14 (1H, d, 7,2)	8,16 (1H, d, 7,2)	127,52	127,7	115,08, 127,80 e 134,33	115,3, 128,9 e 133,7
11a	-	-	115,08	115,3	-	-
OCH₂O	6,11 (1H, d, 1,4) e 5,95 (1H, d, 1,4)	6,11 (1H, d, 1,5) e 5,95 (1H, d, 1,2)	101,00	101,5	143,37 e 147,85	143,8 e 148,7

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com ISMAIL et al., 2012 (300 MHz em CDCl₃) (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.4. Determinação estrutural das substâncias isoladas da fração alcaloídica dos galhos grossos da espécie *B. multiflora*.

5.8.4.1. Determinação estrutural da amostra BmuGGFr1.1 e BmuGGFr1.2.

A amostra codificada como BmuGGFr1 (3,3 mg), com característica de substância pura, evidenciou na análise por espectrometria de massas um íon com m/z 194 ($[M+H]^+$), correspondendo à molécula protonada (Figura 174), sendo este íon, submetido à análise de MS² (Figura 175) e ao analisar os espectros de fragmentação foi possível observar uma perda inicial de 17 Da (NH₃), seguida de perdas sequenciais de 43 Da (CH₃CHNH), 32 Da (CH₃OH) e 28 Da (CO) (m/z 194 → 177 / 194 → 151 / 177 → 145 → 117). Sendo essas perdas observadas para as substâncias salsolina e isosalsolina isoladas das folhas de *B. canescens* (Figura 141).

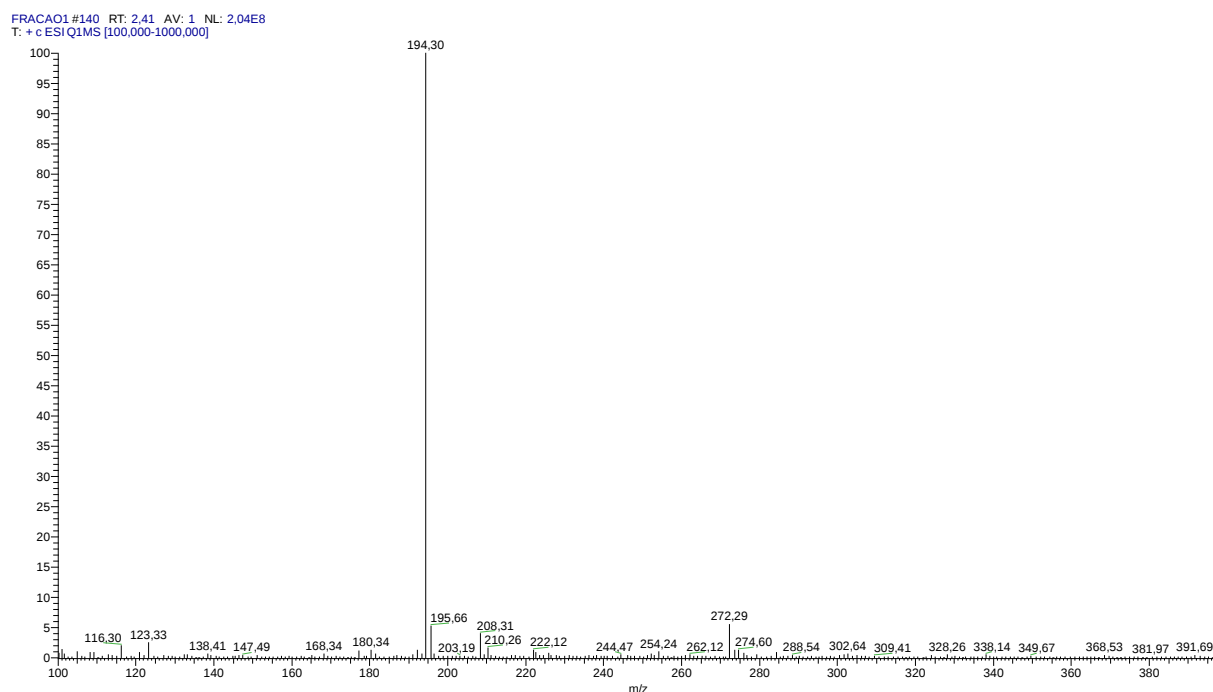


Figura 174. Espectro de massas do íon de m/z 194 ($[M+H]^+$) da amostra BmuGGFr1.1 e BmuGGFr1.2.

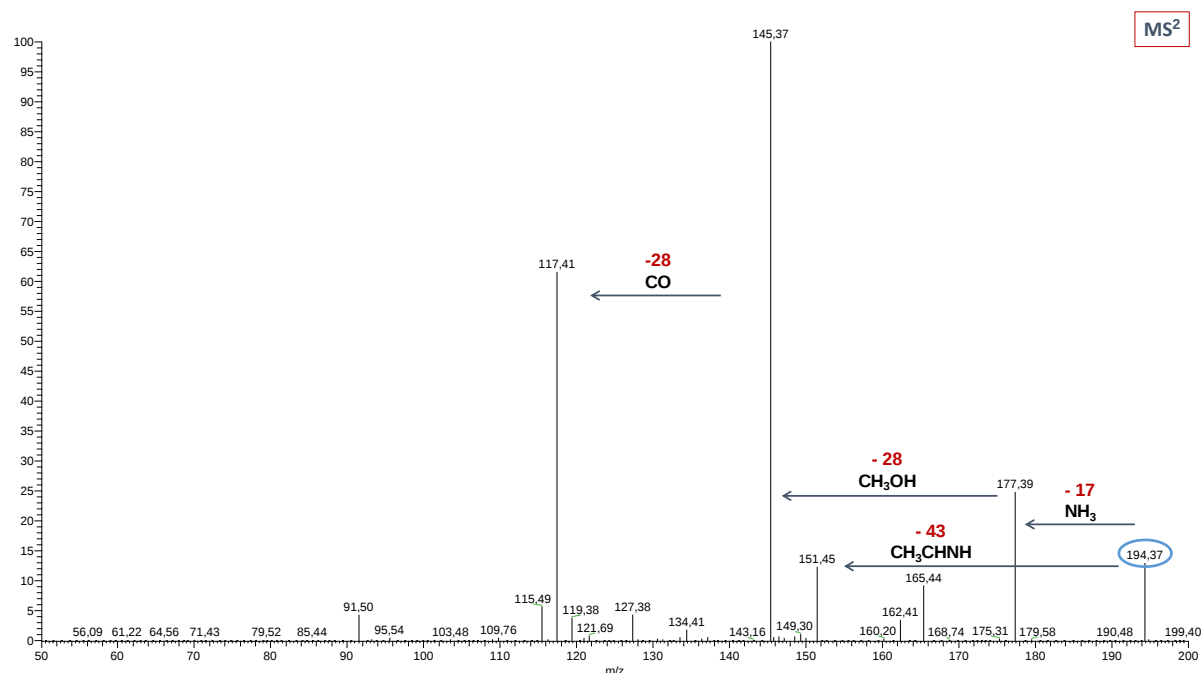
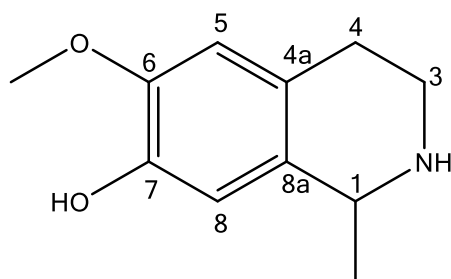
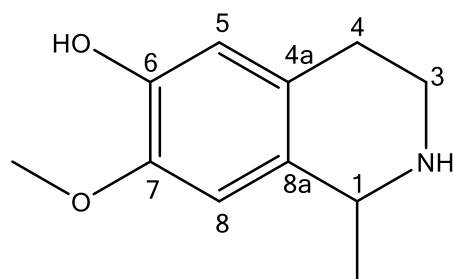


Figura 175. Espectro de massas em MS² do íon de m/z 194 ($[M+H]^+$) da amostra BmuGGFr1.1 e BmuGGFr1.2.

Ao observar o RMN de ^1H (Anexo – Figura 235) da fração BmuGGFr1 ficou evidente que essa possuía dois compostos devido a presença de 4 sinais nas regiões de hidrogênios aromáticos na proporção de 1:1, logo estes compostos foram codificados como BmuGGFr1.1 (substância majoritária) e BmuGGFr1.2 (substância minoritária). Após uma comparação dos espectros de RMN de ^1H (Tabela 32), com os referentes as substâncias isoladas (BcFFr8.1 e BcFFr8.2) das folhas de *B. canescens* (Tabela 27 e 28), foi possível identificar as substâncias como sendo os alcaloides isosalsolina e salsolina (Figura 176) também nos galhos grossos de *B. multiflora*.



BmuGGFr1.1 = BcFFr8.1
Isosalsolina



BmuGGFr1.2 = BcFFr8.2
salsolina

Figura 176. Estrutura dos alcaloides salsolina e isosalsolina

Tabela 32. Dados de RMN de ^1H dos alcaloides isosalsolina e salsolina.

Isosalsolina e salsolina (m/z 194)				
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^{a'}	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	^1H δ (mult., J em Hz) ^{a''}	^1H δ (mult., J em Hz) ^b
1	4,45 (1H, q, 6,4)	4,25 (1H, q, 6,7)	4,50 (1H, q, 6,6)	4,30 (1 H, m)
2	-	-	-	-
3α	3,48 (1H, m)	3,38 (1 H, m)	3,48 (1H, m)	3,38 (1H, m)
3β	3,30 (1H, m)	3,15 (1 H, m)	3,30 (1H, m)	3,15 (1 H, m)
4	-	2,85 (2H, m)	-	2,96 (2H, m)
4a	-	-	-	-
5	6,56 (1H, s)	6,56 (1H, s)	6,67 (1H, s)	6,65 (1H, s)
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-
8	6,68 (1H, s)	6,69 (1H, s)	6,58 (1H, s)	6,57 (1H, s)
8a	-	-	-	-
1-CH₃	1,66 (3H, d 6,8)	1,58 (3H, d, 6,7)	1,68 (3H, d 6,8)	1,60 (3H, d 6,7)
6-OCH₃	3,85 (3H, s)	3,85 (3H, s)	3,85 (3H, s)	3,85 (3 H, s)

^{a'}, ^{a''}O experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com IWASA et al., 1991 (200 MHz e 125 MHz em CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.8.4.2. Determinação estrutural da amostra BmuGGFr2.

A fração codificada como BmuGGFr2 (3,0 mg) apresentou-se como um sólido amorfo. As análises por espectrometria de massas apontaram a presença do íon *quasi-molecular* de m/z 312 ($[M+H]^+$) (Figura 177). Esse íon foi submetido a análise de MS^2 e foram observadas perdas de 29 Da e perdas sequenciais de 15 Da (m/z 312 $\rightarrow$ 283 $\rightarrow$ 269 $\rightarrow$ 254) (Figura 178). A perda inicial de 29 Da é incomum, mas foi atribuída a presença de uma metila ligada diretamente no nitrogênio do anel B e as sequenciais a metoxila adjacentes, no anel A.

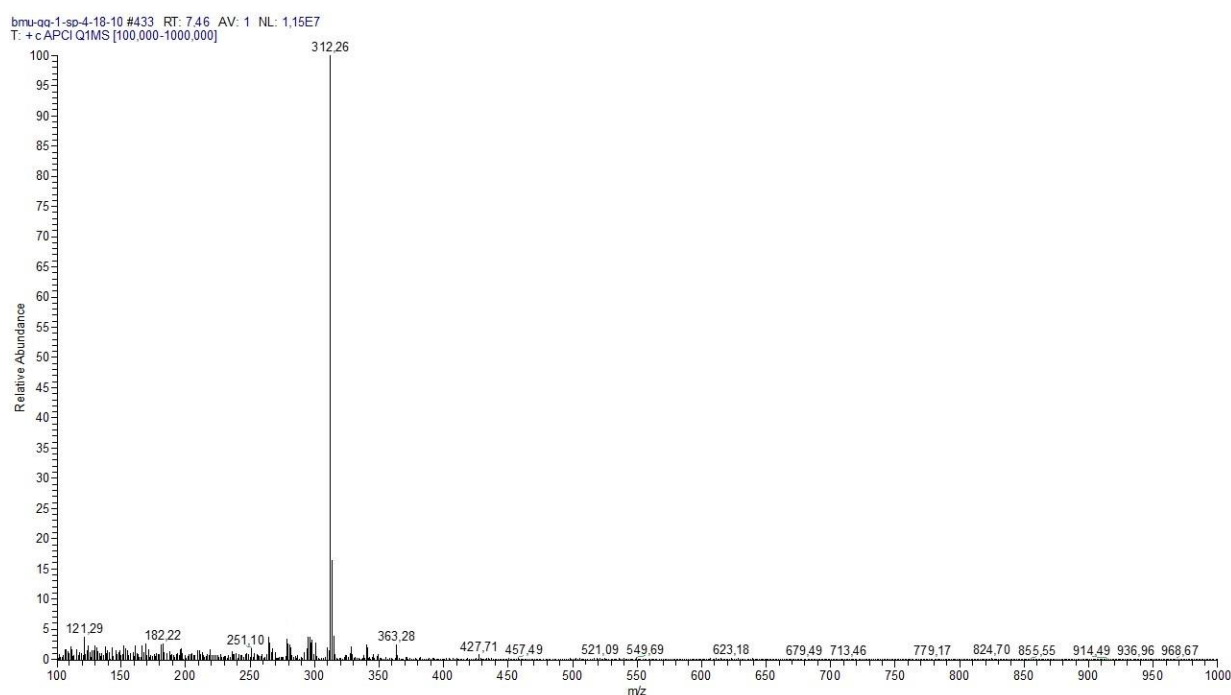


Figura 177. Espectro de massas do íon de m/z 312 ($[M+H]^+$) da amostra BmuGGFr2.

amostras_purificadasbmugg_4,5,6(7-2) FRAGMENTRAW #88 RT: 1,57 AV: 1 NL: 7,99E2
F: + c ESI Full ms2 312,000 [50,000-315,000]

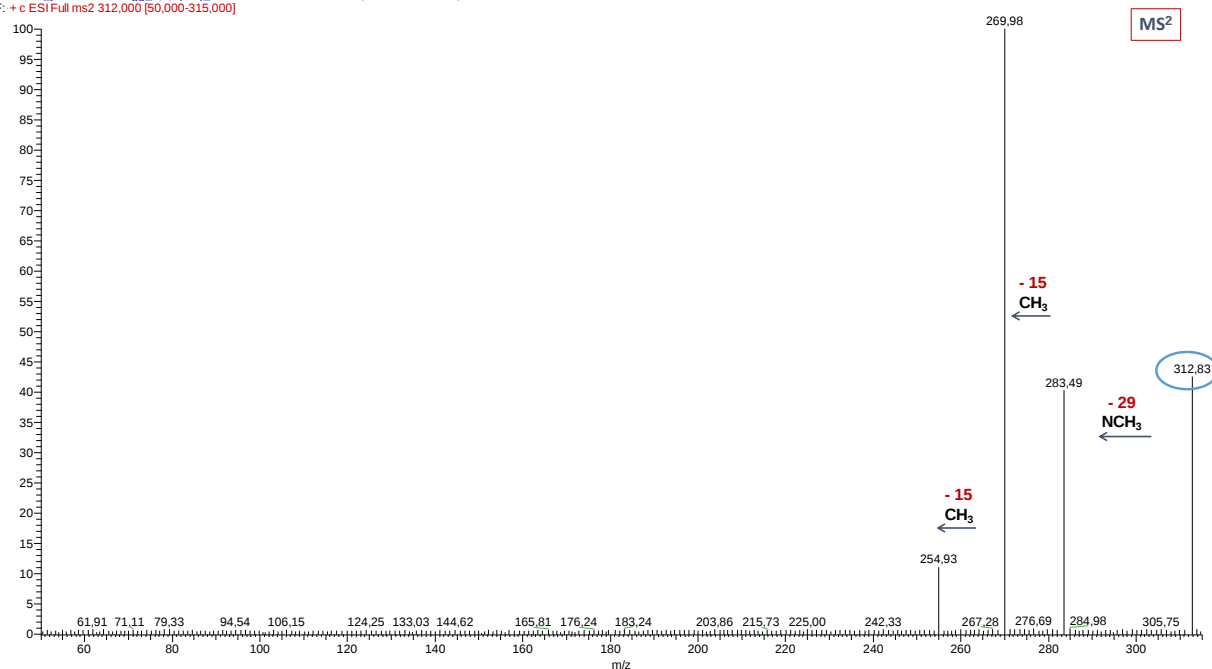


Figura 178. Espectro de massas em MS₂ do íon de m/z 312 ($[M+H]^+$)

Através da ampliação do espectro de RMN de ^1H (Figura 179) foi possível observar na região dos hidrogênios aromáticos a presença de quatro duplodupletos (dd) em δ 7,0 (1H, dd, 10,1 e 3,1 Hz), δ 6,32 (1H, dd, 10,1 e 1,8 Hz), δ 6,45 (1H, dd, 9,8 e 1,8 Hz) e δ 6,81 (1H, dd, 9,9, 2,9 Hz), sistema esse relatado por Silva e colaboradores (2014a) como sendo uma característica do anel D de um esqueleto proaporfínico. No mapa de correlações HSQC (Figura 180), foi observado as correlações a J^1 desses hidrogênios com os carbonos δ 151,60 (C-8), δ 128,55 (C-9), δ 129,34 (C-11) e δ 147,23 (C-12), respectivamente.

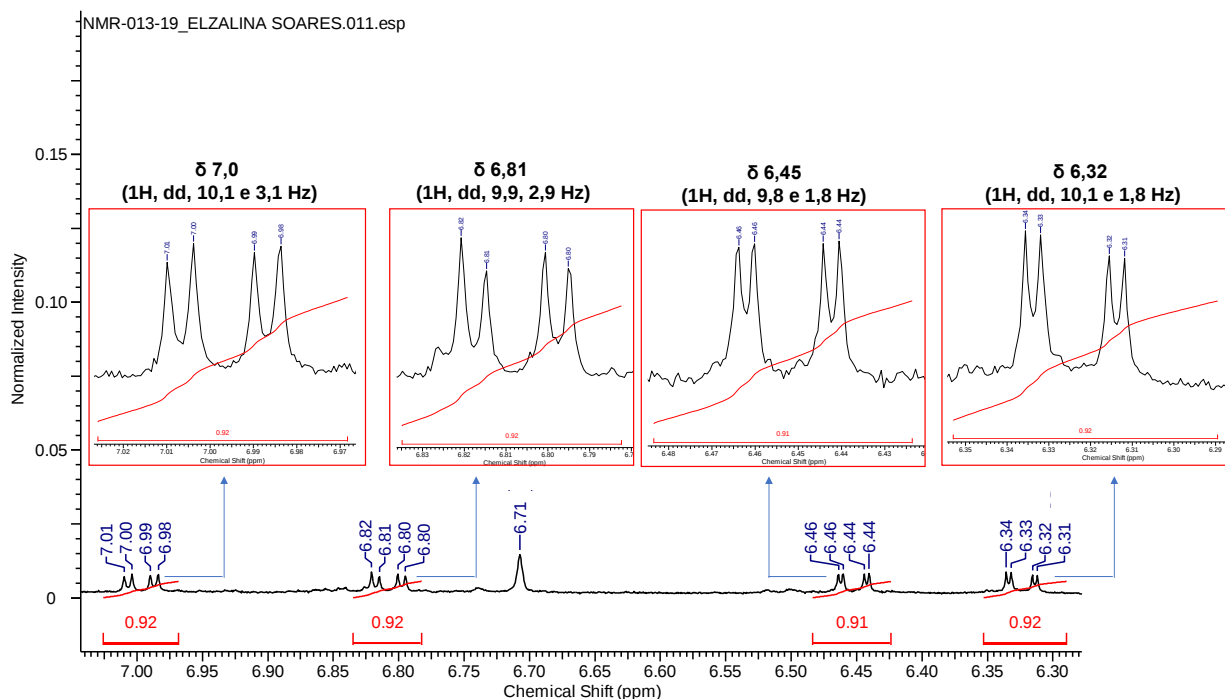


Figura 179. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) das regiões dos aromáticos da amostra BmuGGFr2.

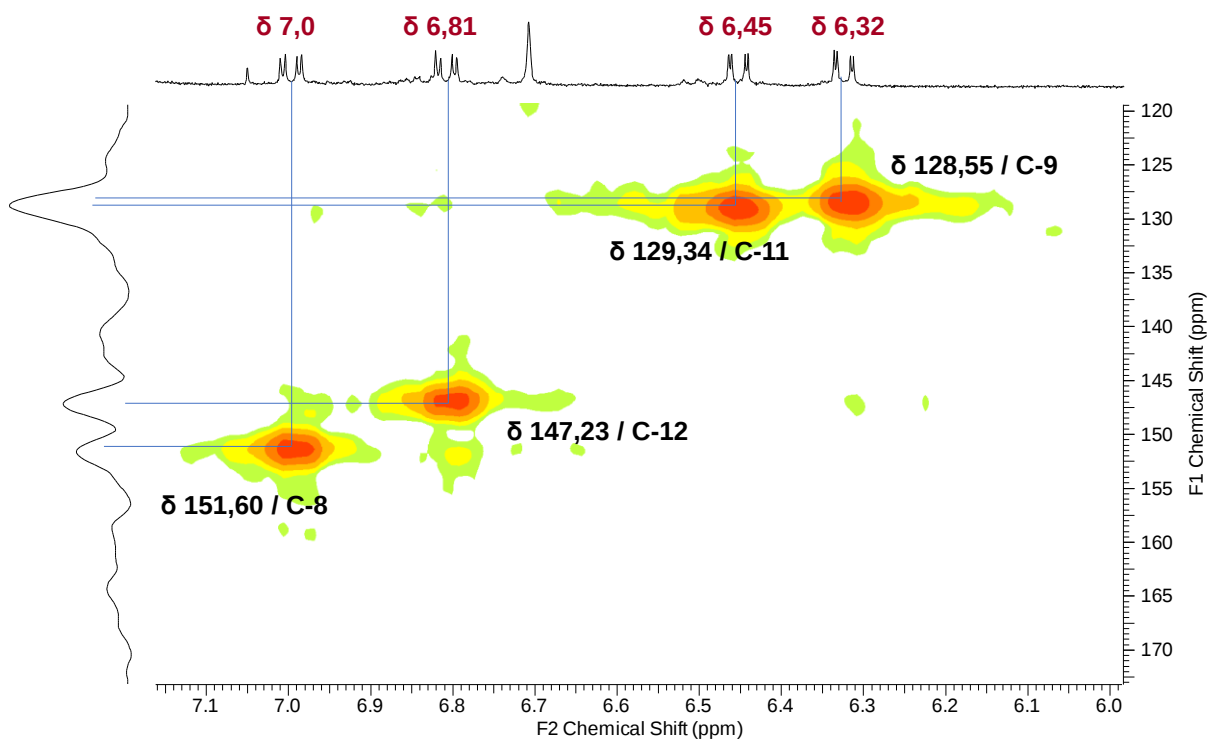


Figura 180. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) da região dos aromáticos da amostra BmuGGFr2.

A ampliação do mapa de correlações HMBC (Figura 181) possibilitou a observação das correlações a J^3 dos hidrogênios em δ 7,0 com os carbonos em δ 147,23 (C-12) e δ 185,53 (C-10, carbonila), os hidrogênios δ 6,32 e δ 6,45 com o

carbono spiro em δ 50,52 (C-7a) e o hidrogênio em δ 6,81 com os carbonos em δ 151,60 e δ 185,53 (C-10, carbonila), confirmando assim a presença de um anel D de uma estrutura proaporfínica.

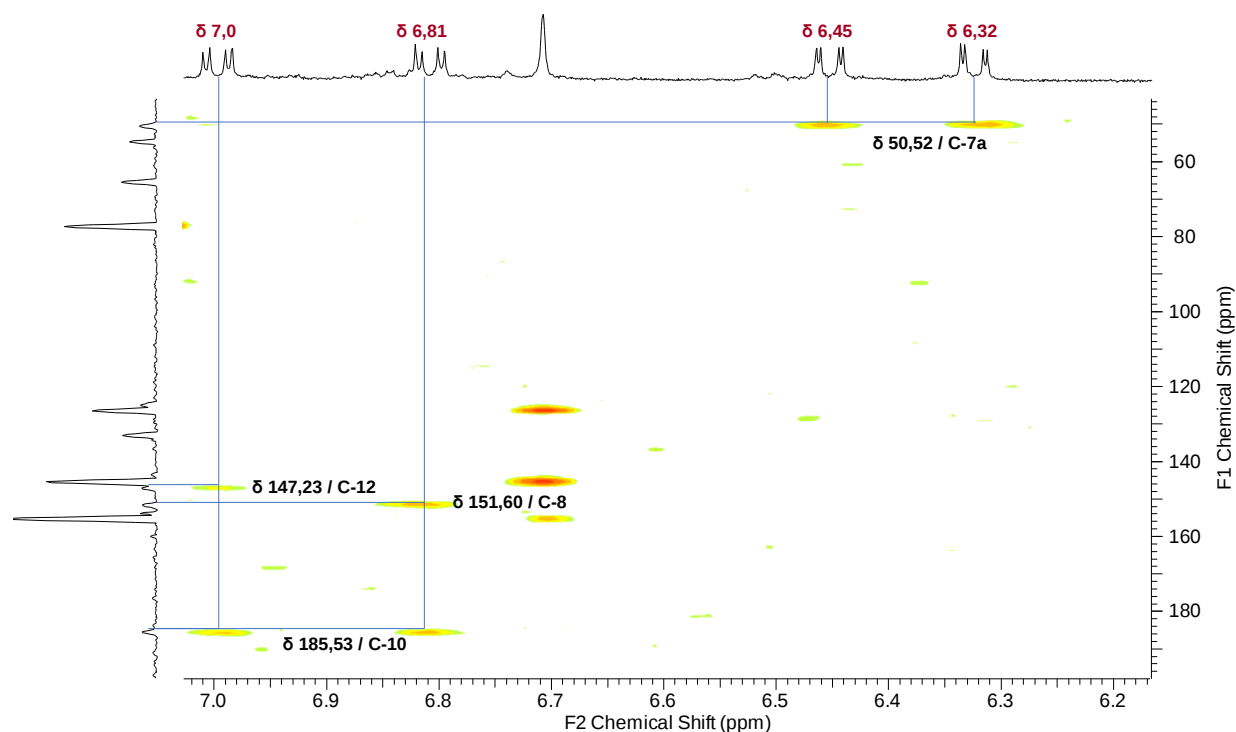


Figura 181. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) da região dos aromáticos da amostra BmuGGFr2.

Com a ampliação do espectro de RMN de ^1H (Figura 182), foi constatado a presença de sinais nas regiões de hidrogênios de metoxilas em δ 3,84 (3H, s) e δ 3,66 (3H, s). Através do mapa de correlações HSQC (Figura 182) foi observado correlações a J^1 com os carbonos em δ 56,34 (2- OCH_3) e δ 61,13 (1- OCH_3), respectivamente. E com o mapa de correlações HMBC (Figura 182) foi possível atribuir as correlações a longa distância com os carbonos em δ 154,78 (C-2) e δ 145,26 (C-1), respectivamente.

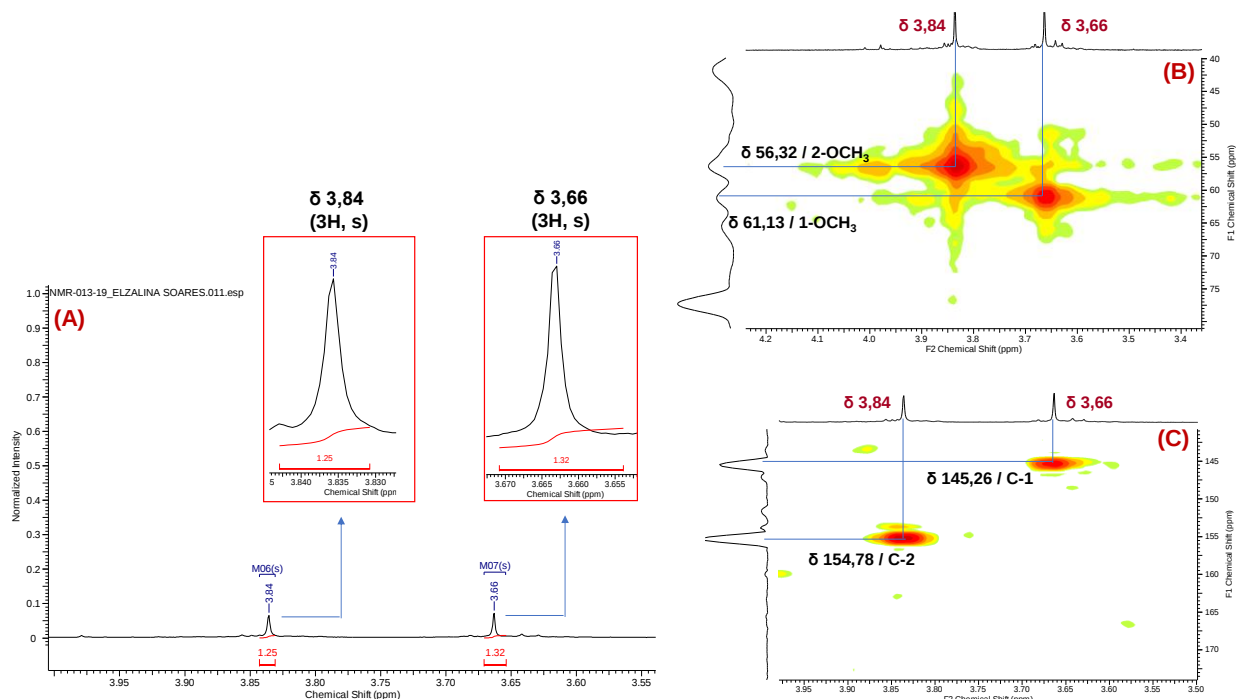


Figura 182. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região de hidrogênios de metoxilas da amostra BmuFr2.

Através das análises de RMN de ^1H e mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 183), realizadas em CDCl_3 , observou-se um duplete em δ 2,94 (3H, d, 4,9 Hz), correlacionando-se a J^1 com o carbono em δ 41,46 e a longa distância com os carbonos δ 54,60 (C-5) e δ 65,42 (C-6a). Espectro preliminar de RMN de ^1H , em metanol deuterado – CD_3OD (Figura 183), apresentou simpleto em δ 3,04 (3H, s), corroborando com presença de um grupo metila ligado ao nitrogênio, em acordo com o HSQC, HMBC e espectro MS^2 . Ainda por intermédio de análises de RMN de ^1H e mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 184) foi possível observar um simpleto em δ 6,71 (1H, s), característico da presença do hidrogênio na posição H-3 de um anel A dissustituído, se correlacionando a J^1 com o carbono em δ 111,85 (C-3), e a longa distância com os carbonos em δ 154,78 (C-2), δ 25,13 (C-4), δ 126,32 (C-7c) e δ 145,26 (C-1), confirmando a proposta inicial sugerida pelas análises de fragmentação (Figura 178 e 186). Os demais sinais e correlações estão dispostos na tabela 33, e os dados espectrais completos estão dispostos no anexo 1 (Figuras 236, 237 e 238).

Com base nesses dados a amostra BmuGGFr2 foi identificada como o alcaloide proaporfínico pronuciferina (Figura 185). A proposta de fragmentação (Figura 186) está de acordo com a apresentada no espectro de MS² na figura 178. Esse alcaloide possui relatos na família Annonaceae como nas espécies *Xylopia bruxifolia* (HOCQUEMILLER et al., 1981), no híbrido atemoya (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) (RABÊLO et al., 2015), além de estar presente no gênero *Papaver* (NOVÁK & PREININGER, 1987) e na espécie *Nelumbo nucifera* da família Nelumbonaceae (CHAICHOMPOO et al., 2018).

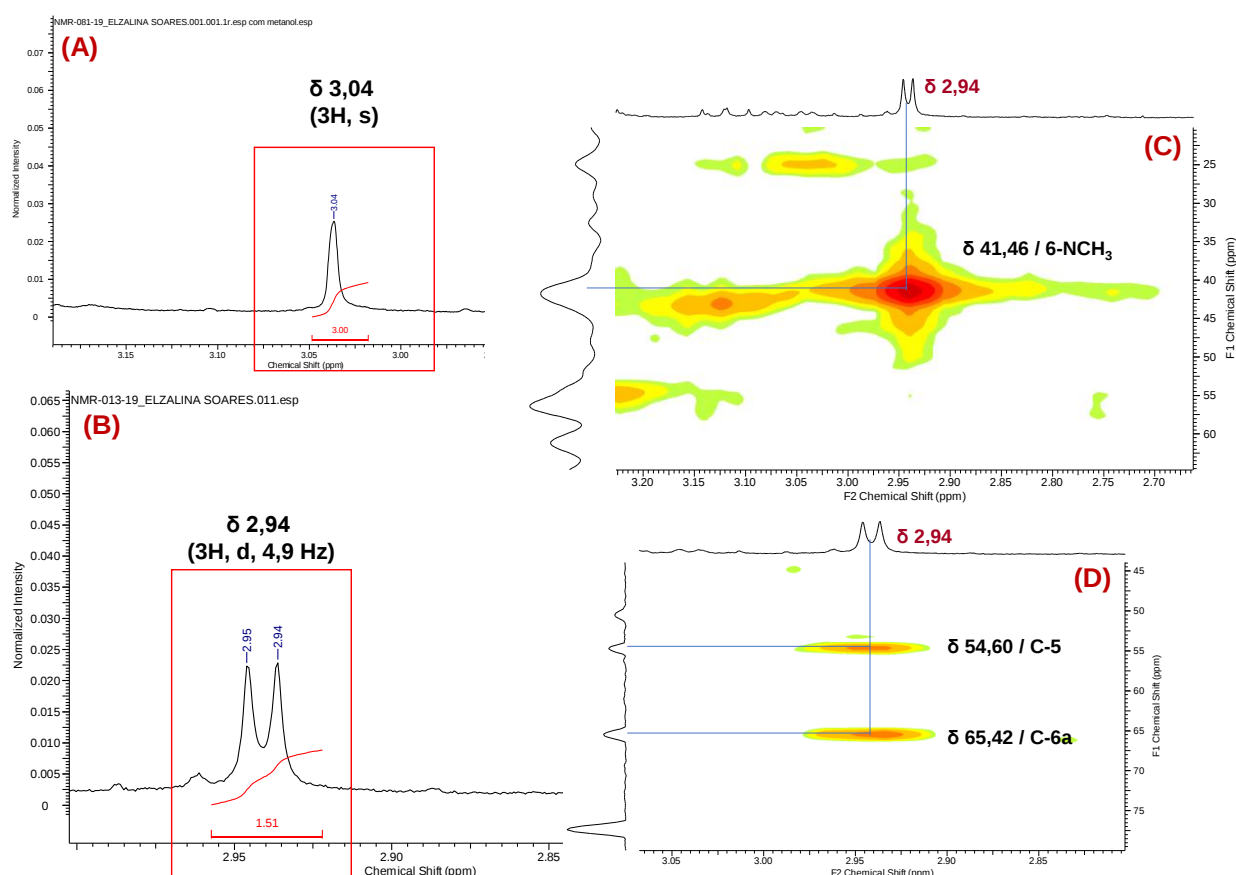


Figura 183. Ampliação do espectro de RMN de ¹H (A) (500, 13 MHz, CD₃OD), RMN de ¹H (B) (500,13 MHz, CDCl₃) e mapas de correlações HSQC (C) e HMBC (D) (125,76 MHz, CDCl₃) referente ao sinal em δ 2,94 da amostra BmuGGFr2.

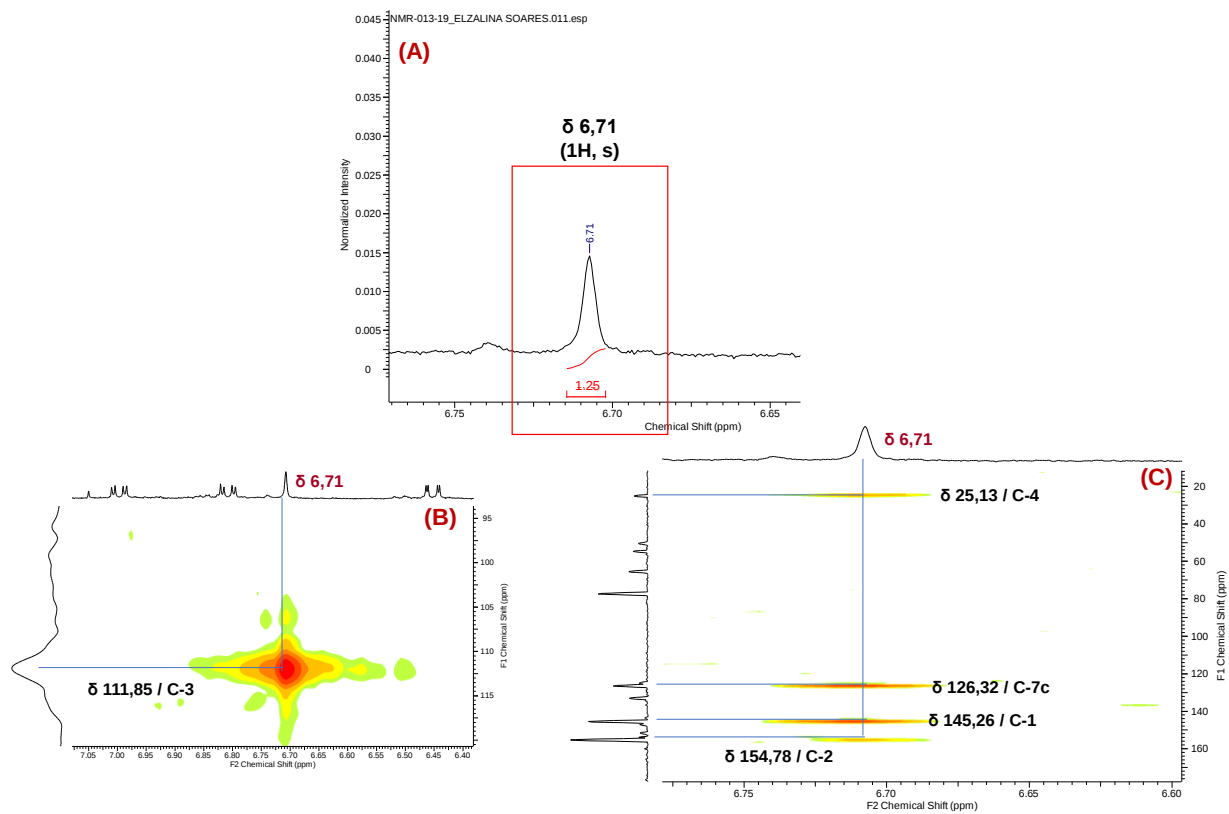


Figura 184. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) referente ao sinal em δ 6,71 da amostra BmuGGFr2.

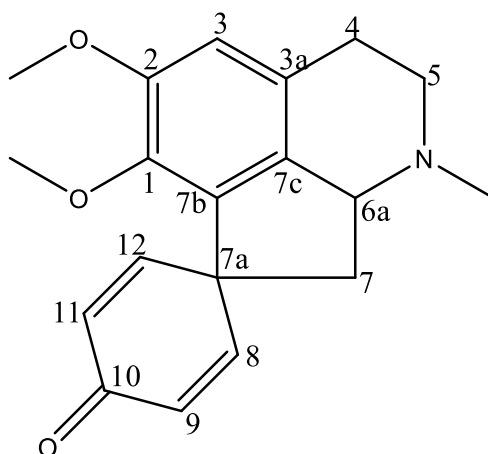


Figura 185. Estrutura do alcaloide pronuciferina.

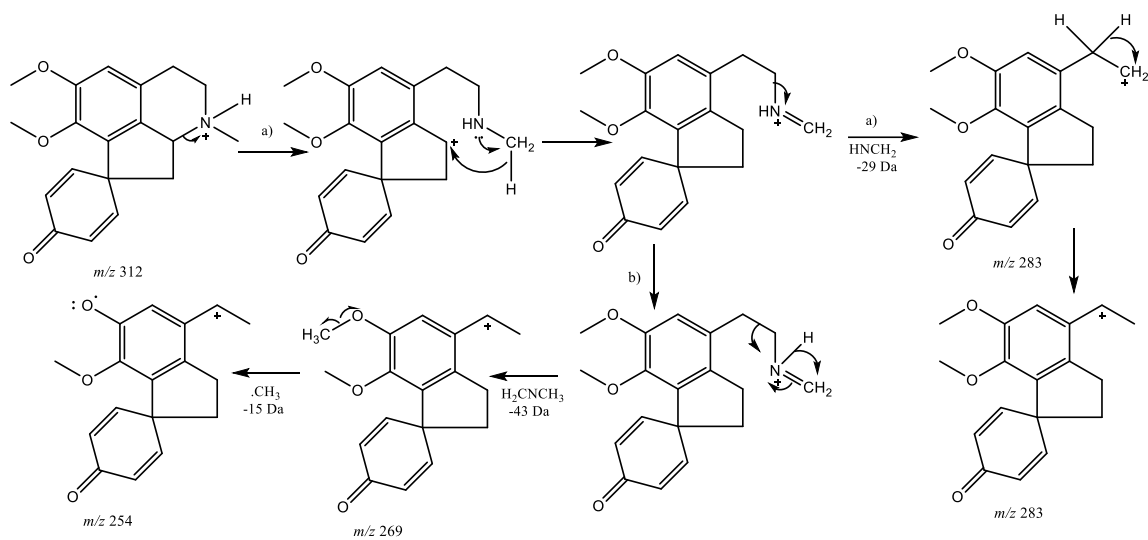


Figura 186. Proposta de fragmentação do alcaloide pronuciferina.

Tabela 33. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide pronuciferina.

Pronuciferina (m/z 312)					
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC ^a	HSQC ^b	HMBC
1	-	-	145,26	144,40	-
2	-	-	154,78	153,70	-
3	6,71 (s, 1H,)	6,61 (1H, s)	111,85	111,70	25,13, 126,32, 145,26 e 154,78
3a	-	-	-	127,60	-
4 pseudoaxial	-	2,95 (1H, m)	25,13	27,40	-
4 pseudoequatorial	-	2,80 (1H, dd, 17,0, 4,8)	25,13	27,40	-
5	-	2,50 (1H, ddd, 17,4, 11,7, 5,2)	54,60	54,80	-
6a	4,39 (1H, m)	3,47 (1H, t, 7,4)	65,42	65,60	-
7 pseudoaxial	2,51 (2H, dd, 12,1 e 6,3)	-	43,02	47,10	64,93, 126,34, 132,28 e 147,14
7 pseudoequatorial	-	2,24 (1H, dd, 11,3, 10,6)	43,02	47,10	-
7a	-	-	50,52	51,40	-
7b	-	-	132,60	133,90	-
7c	-	-	126,32	126,34	-
8	7,0 (1H, dd, 10,1 e 3,1)	6,87 (1H, dd, 9,9, 2,8)	151,60	153,50	147,23 e 185,53
9	6,32 (dd, 10,1 e 1,8)	6,38 (1H, dd, 9,9, 2,8)	128,55	128,20	50,52
10	-	-	185,53	186,40	-
11	6,45 (1H, dd, 9,8 e 1,8)	6,27 (1H, 9,9, 2,2)	129,34	126,60	50,52
12	6,81 (1H, dd, 9,9, 2,9)	7,01 (1H, dd, 9,9, 2,2)	147,23	150,20	151,60 e 185,53
2-OCH₃	3,84 (3H, s)	3,78 (3H, s)	56,34	56,20	154,78
1-OCH₃	3,66 (3H, s)	3,56 (3H, s)	61,13	60,90	145,26
6-NCH₃	2,94 (3H, d, 4,9) *3,04 (3H, s), em CD ₃ OD	2,37 (3H, s)	41,46	43,20	54,60 e 65,42

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ^1H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com CHAICHOMPOO et al., 2018 (400 MHz em CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado. *Experimento preliminar de RMN de ^1H , 500 MHz em CD_3OD .

5.8.4.3. Determinação estrutural da amostra BmuGGFr3.1 e BmuGGFr3.2.

A amostra codificada como BmuGGFr3 (3,5 mg) foi obtida como um sólido amorfo com coloração amarela. As análises por espectrometria de massas (Figura 187) evidenciaram um íon *quasi-molecular* de m/z 326 ($[M+H]^+$). Quando este íon foi submetido as análises por MS² apresentou perdas iniciais de 32 e 45 Da (m/z 326 → 294) e (m/z 326 → 281), seguida de perdas sequenciais de 15 e 17 Da (m/z 281 → 266 → 249) (Figura 188).

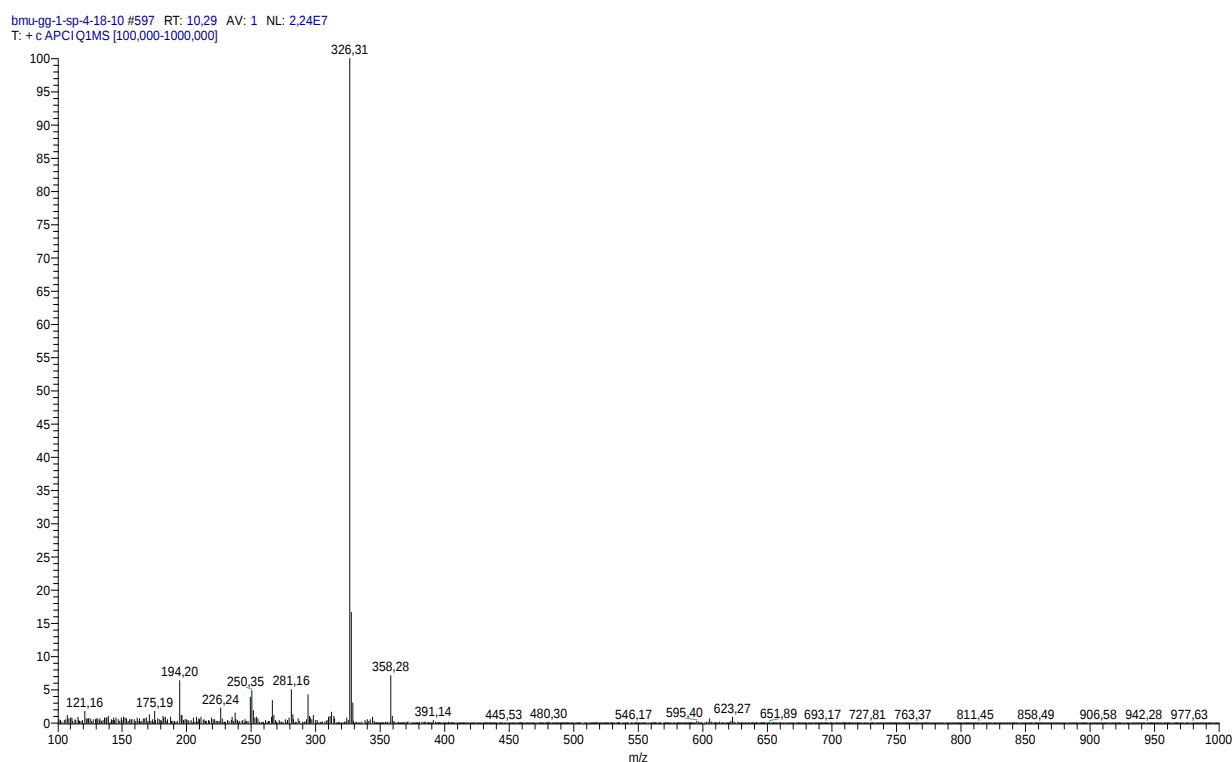


Figura 187. Espectro de massas do íon de m/z 326 ($[M+H]^+$) da amostra BmuGGFr2.

amostras_purificadasbmugg_4,5,6(7-2) FRAGMENTRAW #789 RT: 13,86 AV: 1 NL: 3,36E7
F: + c ESI Full ms2 326,000 [50,000-330,000]

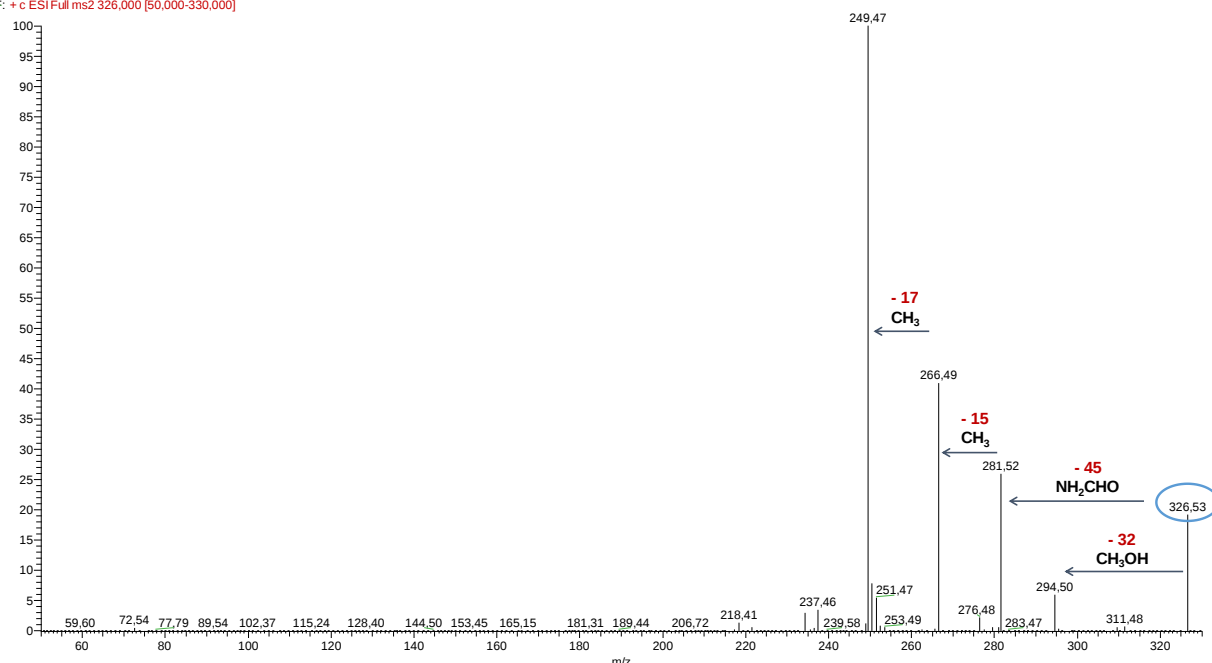


Figura 188. Espectro de MS² do íon de m/z 326 da amostra BmuGGFr3.

Nas análises dos espectros de RMN de ^1H foram observados sinais de quatro hidrogênios duplicados na região dos aromáticos na proporção 3:1 (Figura 189). Os sinais em δ 6,71 (1H, s), δ 7,04 (1H, dd 9,9 e 2,9), δ 6,33 (1H, dd, 10,1 e 1,8) e δ 8,35 (1H, d, 1,2) foram atribuídos a substância majoritária. E os sinais δ 6,73 (1H, s), δ 6,98 (1H, dd 9,9 e 2,9), δ 6,34 (1H, dd, 9,8 e 1,8) e δ 8,32 (1H, s) a substância minoritária.

Na ampliação do espectro de RMN de ^1H (Figura 190) também foram observados sinais duplicados na região dos hidrogênios das metoxilas: os sinais em δ 3,84 (3H, s) e δ 3,62 (3H, s) foram atribuídos à substância majoritária, e em δ 3,85 (1H, s) e δ 3,64 (1H, s) à substância minoritária. Foram ainda observados sinais em δ 5,12 (1H, dd, 10,4 e 6,1) acoplados com os hidrogênios em δ 2,22 (1H, dd, 12,4 e 10,4) e δ 3,04 (1H, dd, 12,4 e 6,1), para o majoritário; e δ 5,02 (1H, dd, 10,1 e 6,1), acoplados com os hidrogênios em δ 2,46 (1H, dd 11,9 e 10,1) e 2,70 (1H, dd, 11,9 e 6,1) para o minoritário, compatíveis com as posições C-6A e C-7 de estruturas proaporfínicas.

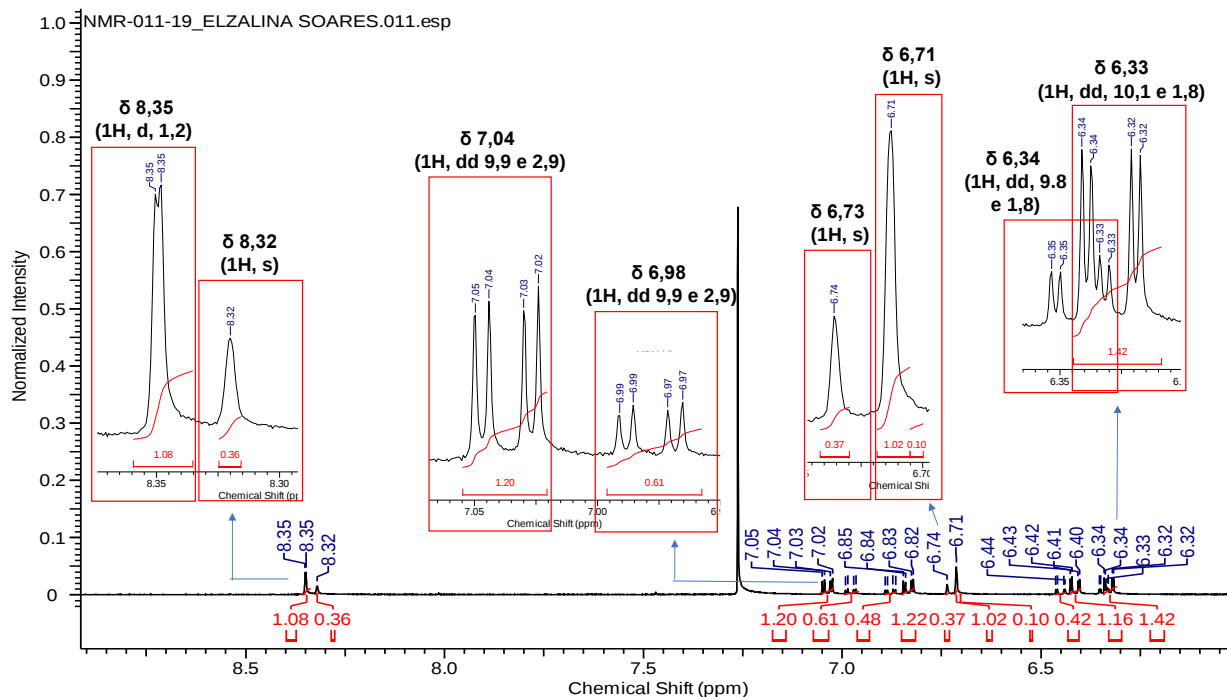


Figura 189. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) da região dos hidrogênios aromáticos da amostra BmuGGFr3.

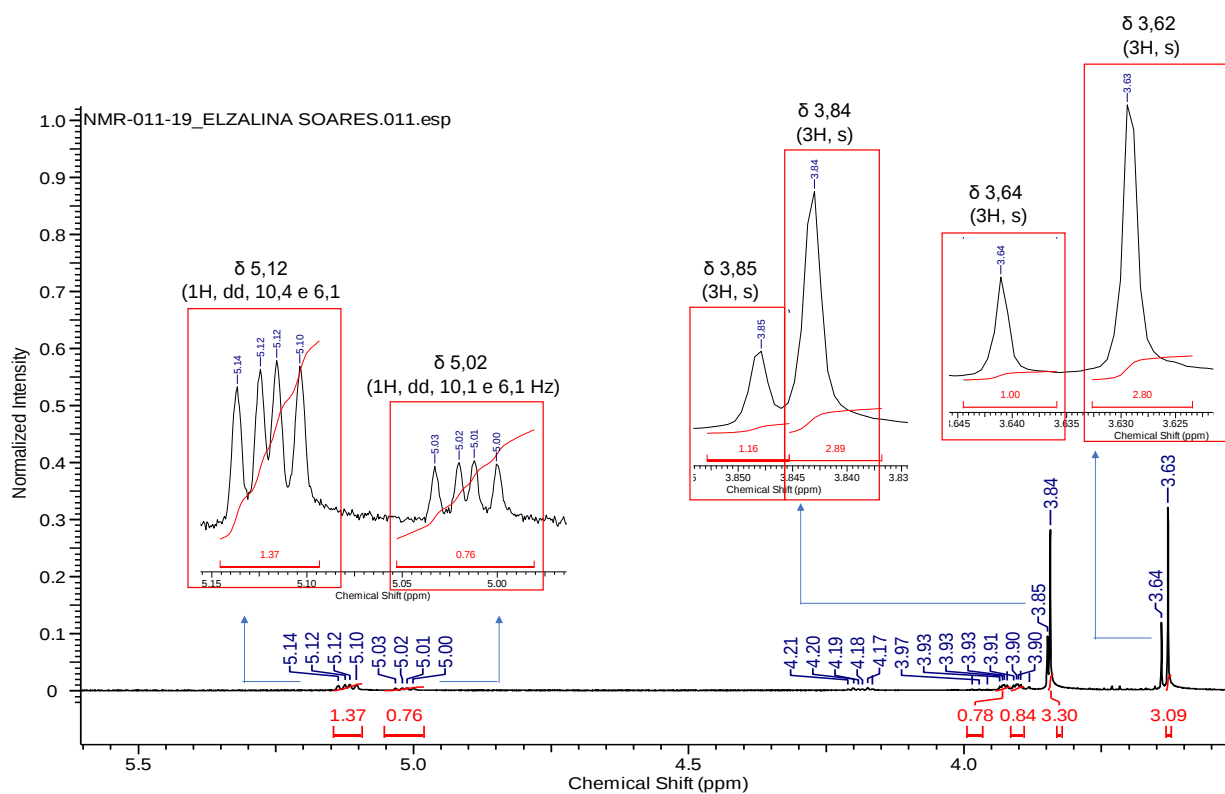


Figura 190. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) da região das metoxilas e do sinal em δ 5,12 e δ 5,02 da amostra BmuGGFr3.

Os mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 191) possibilitaram observar que os hidrogênios em δ 8,35 (1H, d, 1,2) e δ 8,32 (1H, s), estavam se correlacionando a J^1 com o carbono em δ 163,47 e a longa distância com os carbonos δ 54,05 e δ 44,65 para a substância majoritária; e δ 39,60 para minoritária. Estas observações são análogas ao descrito para esqueletos aporfínicos que possuem um grupo formil ligado diretamente ao nitrogênio, o qual permite a formação de rotâmeros (*Z*) e (*E*) na proporção 2:1 (GUINAUDEAU et al., 1983; 1988; 1994; SILVA et al., 2016b).

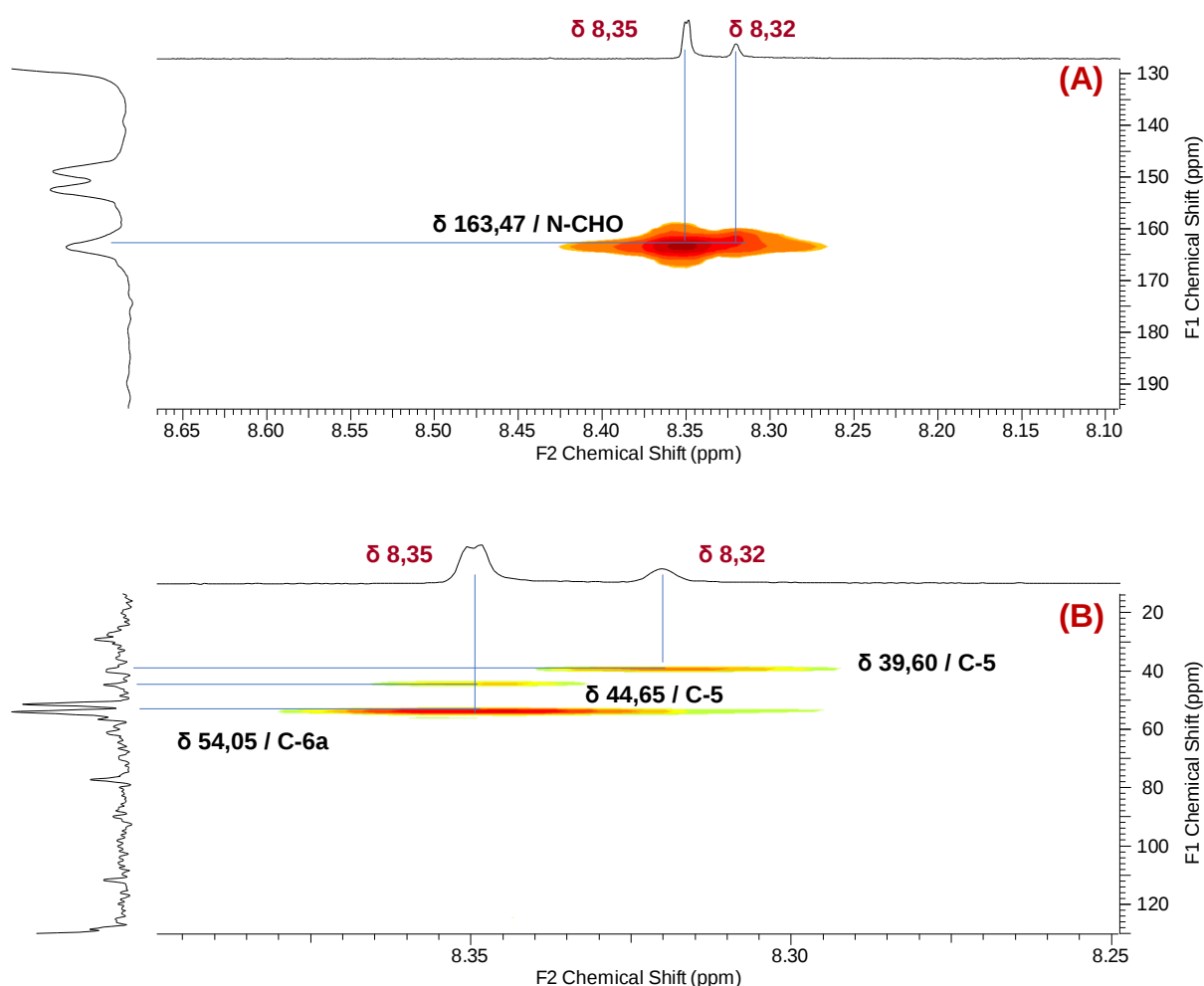


Figura 191. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl₃) dos sinais em δ 8,35 e δ 8,32 da amostra BmuGGFr3.

Através das análises dos mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 192) para os hidrogênios referente ao composto majoritário em δ 6,71 (H-3) e para o composto minoritário em δ 6,73 (H-3) observou-se a correlação a J^1 com o carbono em

δ 111,87 (C-3). Para o composto majoritário foi possível observar correlações a longa distância com os carbonos em δ 131,60 (C-1a), δ 145,39 (C-1), δ 153,62 (C-2) e δ 29,19 (C-4). Para a substância minoritária foi possível observar correlação a J^3 , com o carbono em δ 29,19 (C-4).

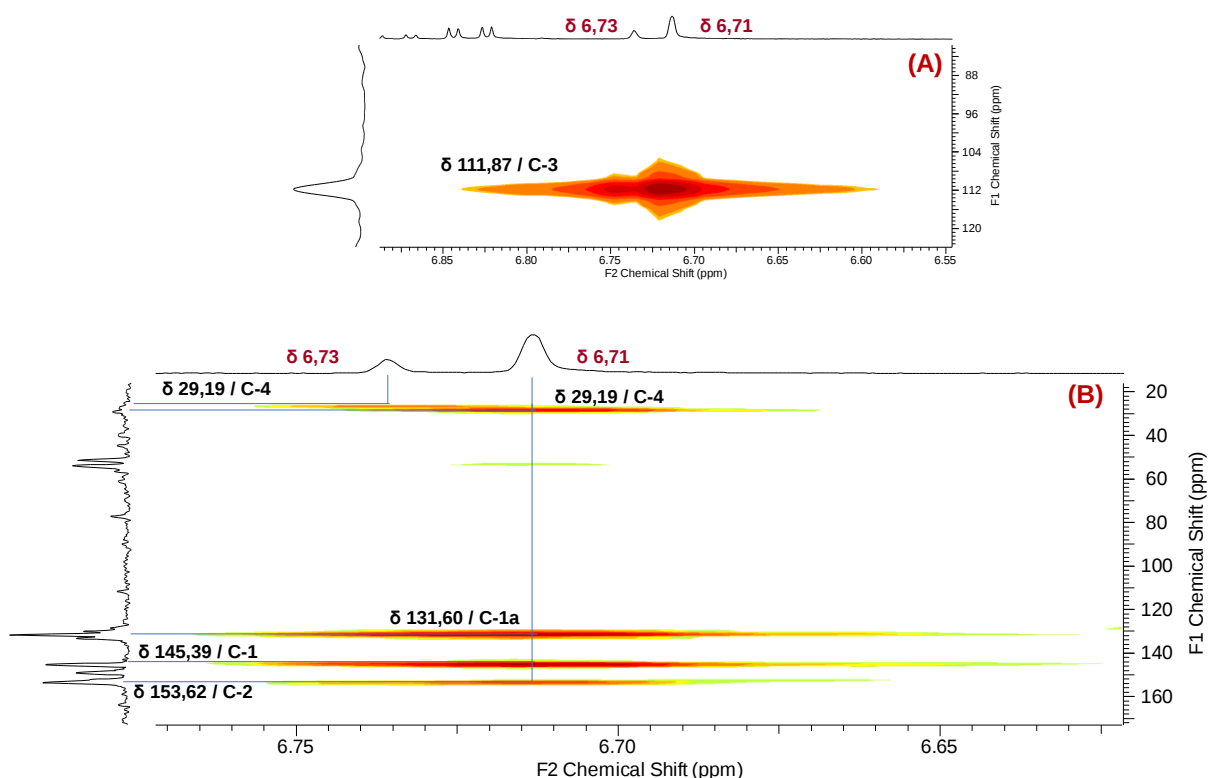


Figura 192. Ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 6,73 e δ 6,71 da amostra BmuGGFr3.

No espectro de RMN de ^1H e nos mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 193) foram observados para os hidrogênios em δ 3,84 (3H, s) e δ 3,62 (3H, s) da estrutura majoritária, e para a estrutura minoritária sinais de hidrogênios em δ 3,85 (3H, s) e δ 3,64 (3H, s), suas correlações a J^1 com os carbonos em δ 56,57 e δ 61,25, respectivamente, e a longa distância com os carbonos em δ 153,57 e δ 145,38, respectivamente, confirmando a presença de substituintes metoxílicos em C-2 e C-1 do anel A de alcaloides aporfínicos e proaporfínicos.

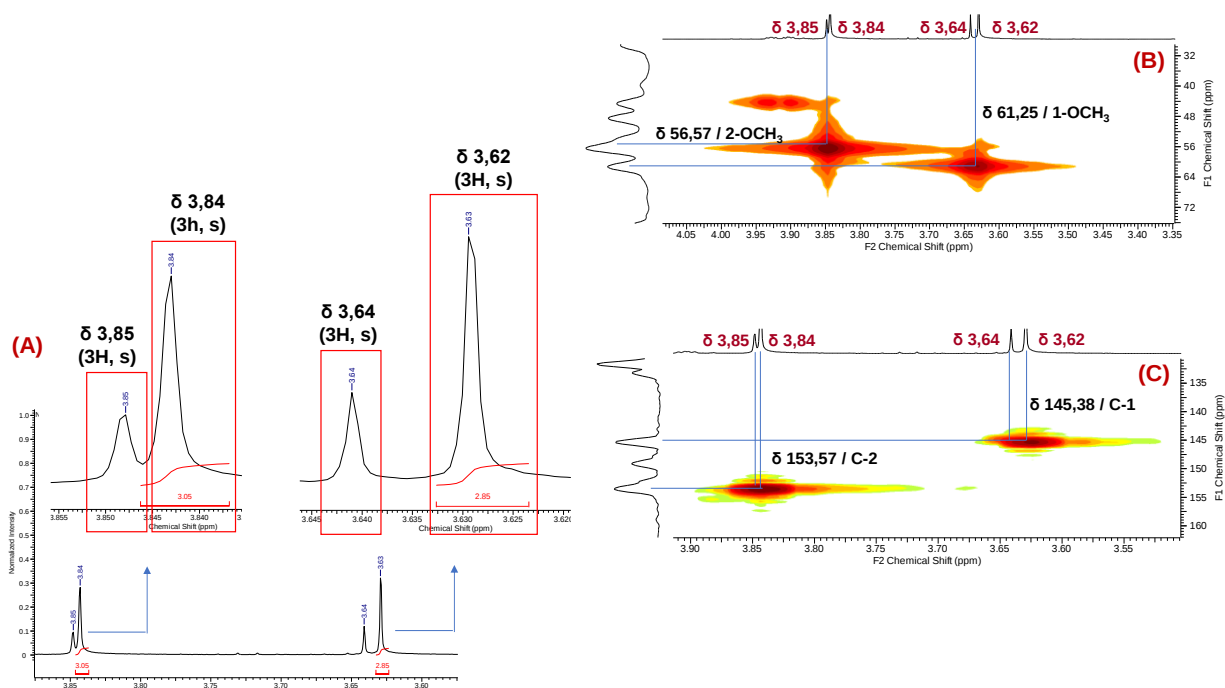


Figura 193. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, CDCl_3) e dos mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais de metoxilas da amostra BmuGGFr3.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 194) para a substância majoritária foram verificados sinais de hidrogênios em δ 2,83 (1H, m) e δ 2,78 (1H, t, 2,7 Hz), atribuídos aos hidrogênios metilênicos em H-4. Com os mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 195) foi constatado correlações a J^1 com o carbono em δ 29,19 (C-4) e a J^3 com os carbonos em δ 111,87 (C-3), δ 130,04 (C-3a) e δ 131,62 (C-3b). Ainda no espectro de RMN de ^1H e mapas de correlações HSQC e HMBC (Figura 196 e 197) foram observados os sinais de hidrogênios em δ 3,93 (1H, dd, 4,1 e 2,6) e δ 3,90 (1H, dd, 4,0 e 2,4), correlacionando-se a J^1 com o carbono em δ 44,65 (C-5) e a longa distância com os carbonos δ 29,19 (C-4), δ 54,05 (C-6a), δ 130,04 (C-3a) e δ 163,47 (CHO).

Para a substância minoritária no espectro de RMN de ^1H (Figura 194) foi observado sinais de hidrogênios metilênicos em δ 2,75 (1H, t, 2,7) e δ 2,86 (1H, m), atribuídos aos hidrogênios na posição H-4, e através do mapa de correlação HSQC (Figura 195) foi atribuído uma correlação a J^1 com o carbono δ 29,19 (C-4). No espectro de RMN de ^1H (Figura 196) também foram observados sinais em δ 4,2 (1H, t, 4,6) e δ

4,17 (1H, t, 4,6), correlacionando-se a J^1 com o carbono δ 39,60 (C-5) e a J^3 com os carbonos em δ 29,19 (C-4), δ 54,92 (C-6a), δ 130,01 (C-3a) e δ 163,47 (CHO) (Figura 197).

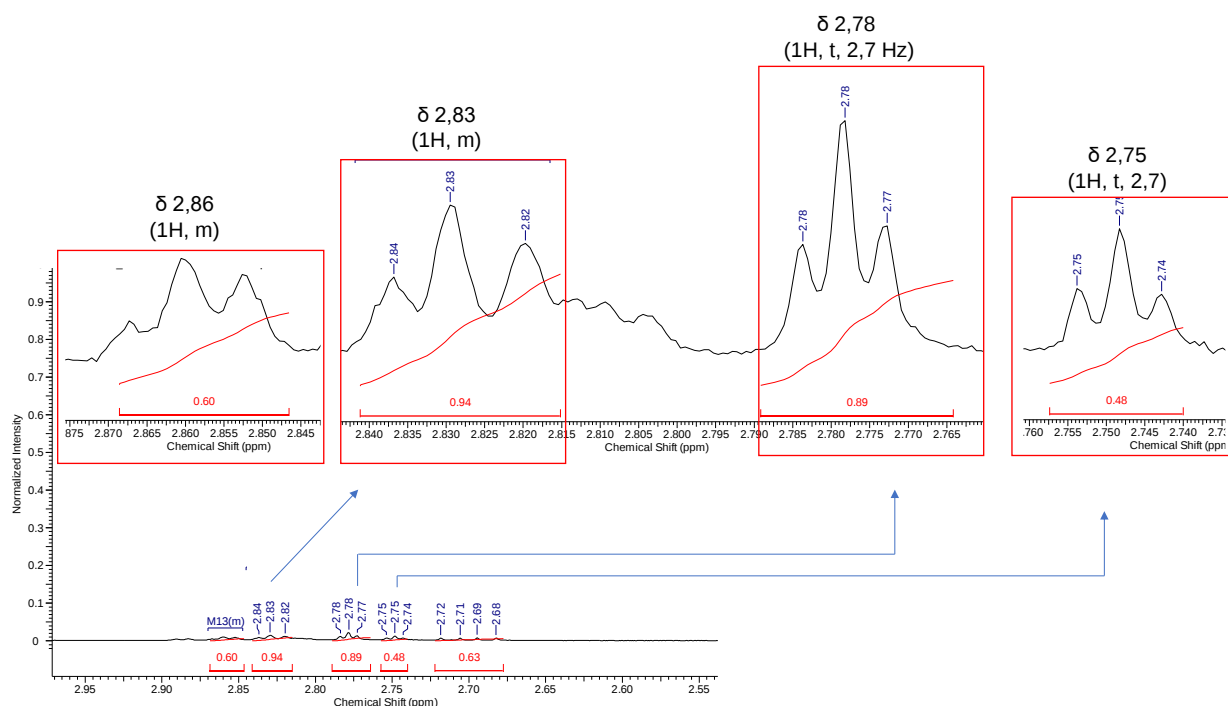


Figura 194. Na ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) foi possível observar sinais de hidrogênios metilênicos em H-4 na amostra BmuGGFr3.

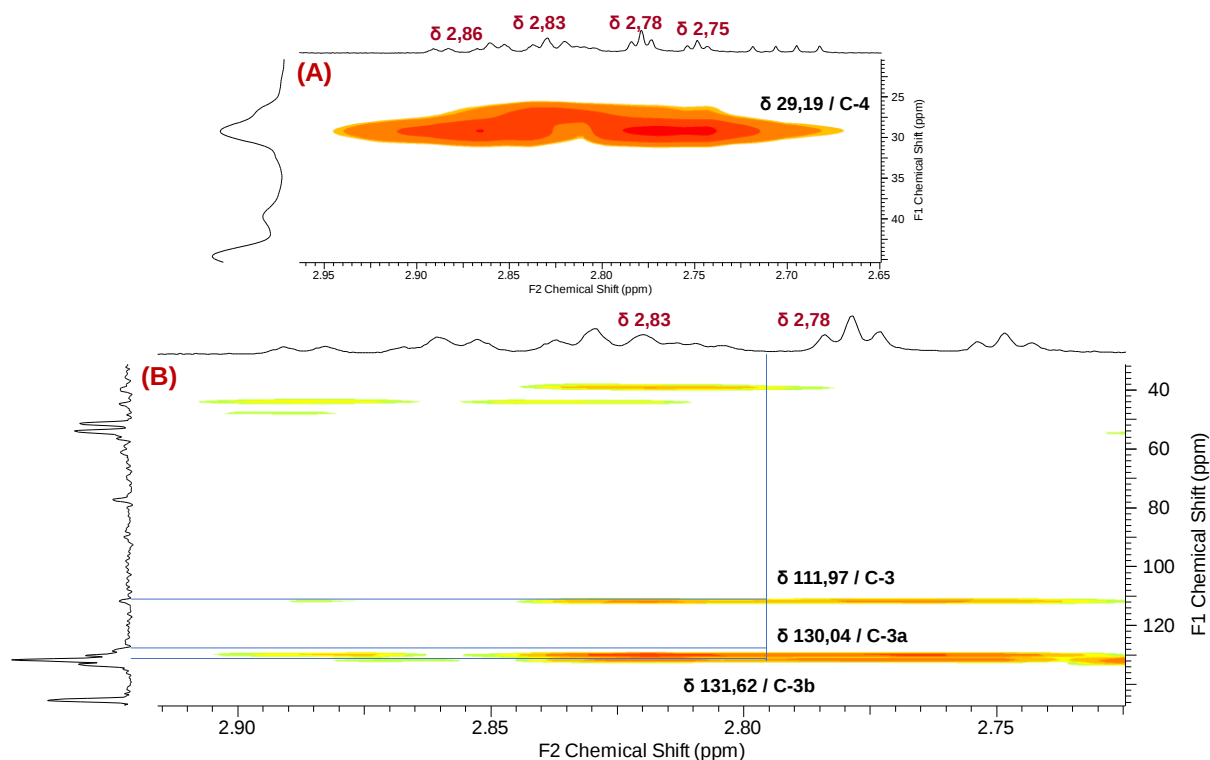


Figura 195. Na ampliação dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais de hidrogênios metilênicos em H-4 da amostra BmuGGFr3.

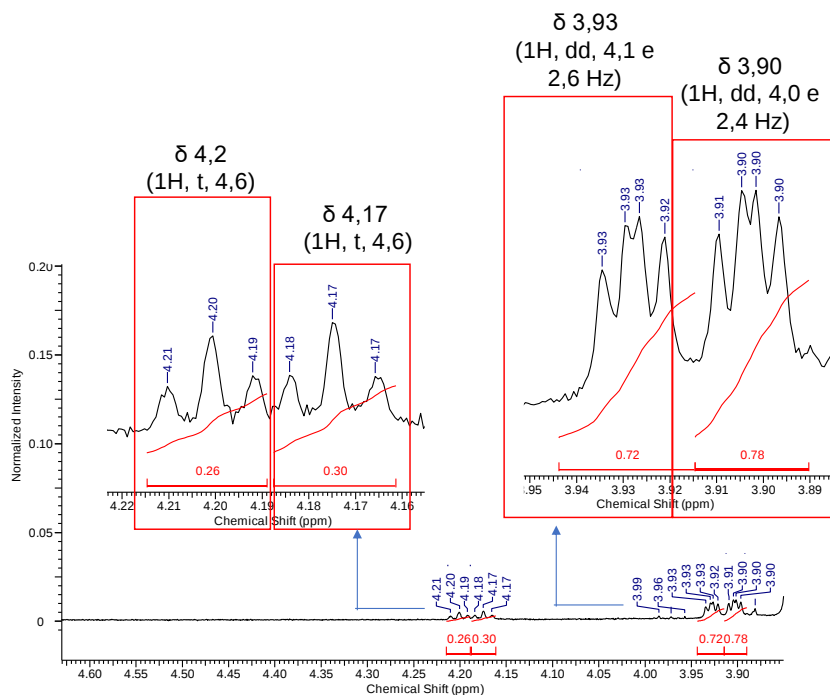


Figura 196. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 4,2, δ 4,17, δ 3,93 e δ 3,90.

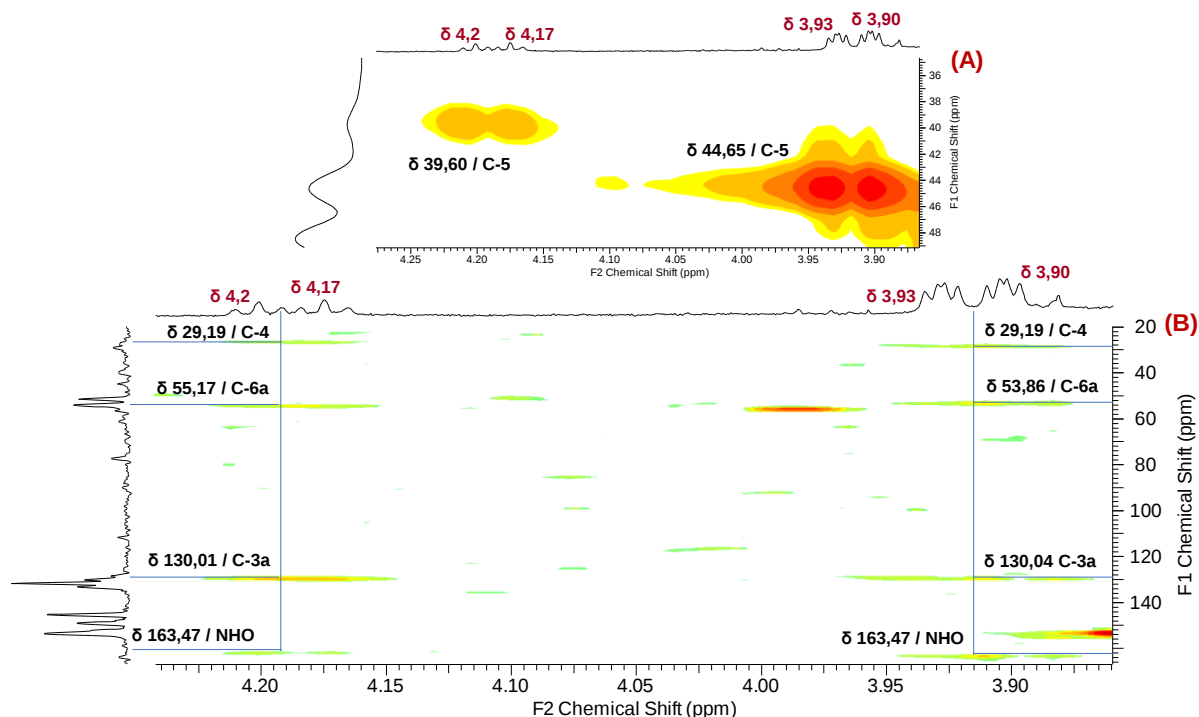


Figura 197. Ampliações dos mapas de correlações HSQC (A) e HMBC (B) (125,76 MHz, CDCl_3) dos sinais em δ 4,2, δ 4,17, δ 3,93 e δ 3,90 da amostra BmuGGFr3.

A presença de quatro duplodupletos (dd) observados na ampliação do espectro de RMN de ^1H (Figura 198) em δ 7,04 (1H, dd 9,9 e 2,9), δ 6,41 (1H, dd, 9,9 e 2,0), δ 6,33 (1H, dd, 10,1 e 1,8 Hz) e δ 6,83 (1H, dd, 10,1 e 2,7) para a estrutura majoritária, e

para a estrutura minoritária δ 6,98 (1H, dd, 9,9 e 2,9), δ 6,45 (1H, dd, 10,1 e 1,8), δ 6,34 (1H, dd, 9,8 e 1,8 Hz) e δ 6,88 (1H, dd, 10,1 e 3,1 Hz), justificam as estruturas com características proaporfínicas referente a um anel D como relatado por Silva e colaboradores (2014a), como visto anteriormente neste estudo para as substâncias pronuciferina e estefarina (Tabelas 18 e 33).

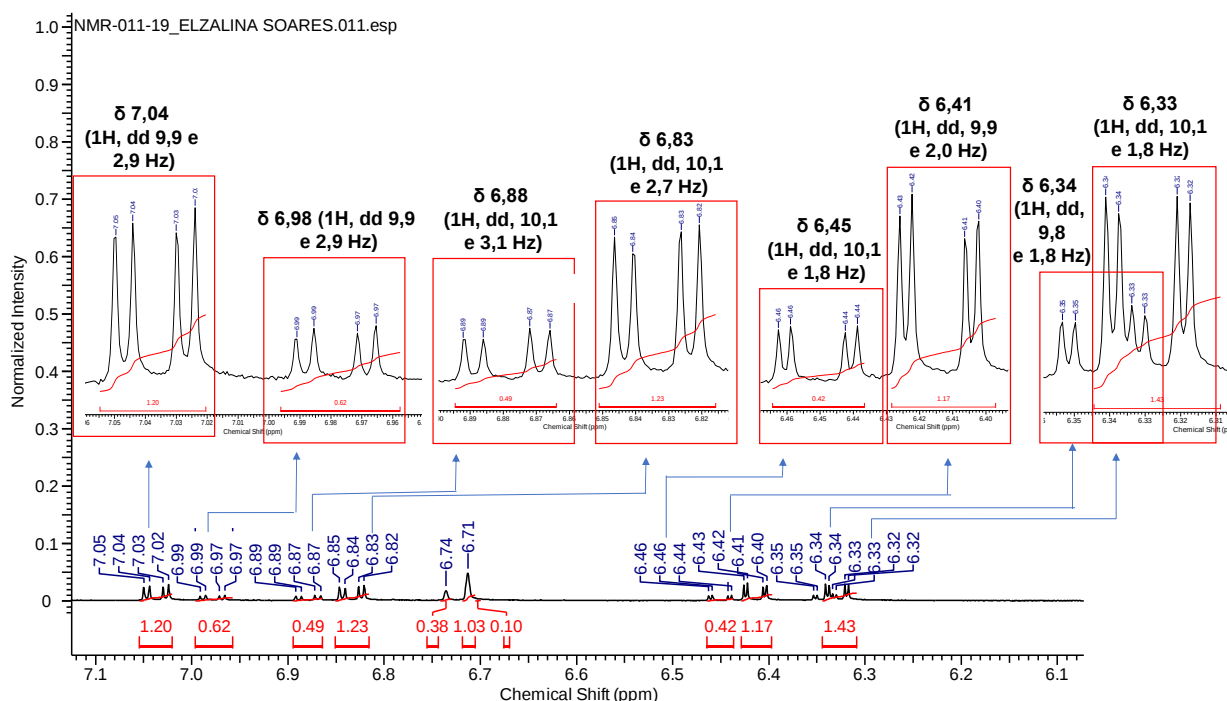


Figura 198. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos do anel D do esqueleto proaporfínico da amostra BmuGGFr3.

O mapa de correlação HSQC (Figura 199) para as substâncias majoritária e minoritária, apresentou correlações a J^1 dos hidrogênios δ 7,04, δ 6,41, δ 6,33 e δ 6,83 com os carbonos δ 149,08 (C-8), δ 128,62 (C-9), δ 128,06 (C-11) e δ 152,46 (C-12), respectivamente.

Correlações a longa distância foram observados através do mapa de correlações HMBC (Figura 200) para a substância majoritária, para os hidrogênios em δ 7,04 com os carbonos em δ 51,34 (C-7a) (carbono spiro), δ 186,09 (C-10, carbonila) e δ 152,46 (C-12); o hidrogênio δ 6,41 com o carbono em δ 51,34 (C-7a) (carbono spiro); o hidrogênios em δ 6,33 com o carbono spiro em δ 51,34 (C-7a) e δ 128,62 (C-9); e o

hidrogênio em δ 6,83 com os carbonos em δ 149,08 (C-8), δ 51,34 (C-7a, carbono spiro) e δ 186,09 (C-10, carbonila). Para a substância minoritária foram observadas correlações a longa distância dos hidrogênios em δ 6,98 com os carbonos δ 51,65, δ 152,15 e δ 186,09; do hidrogênio em δ 6,45 com o carbono em δ 51,65; do hidrogênio em δ 6,34 com os carbonos em δ 51,65 e δ 128,72 e do hidrogênio em δ 6,88 com os carbonos em δ 149,08 e δ 186,09. Estes dados ratificam a presença do anel D do alcaloide proaporfínico.

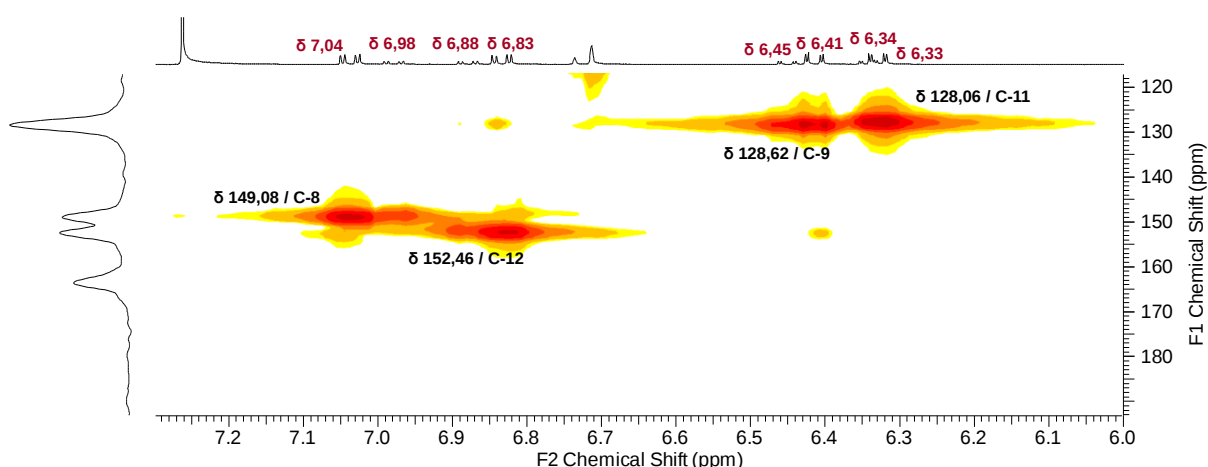


Figura 199. Ampliação do mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos do anel D do esqueleto proaporfínico da amostra BmuGGFr3.

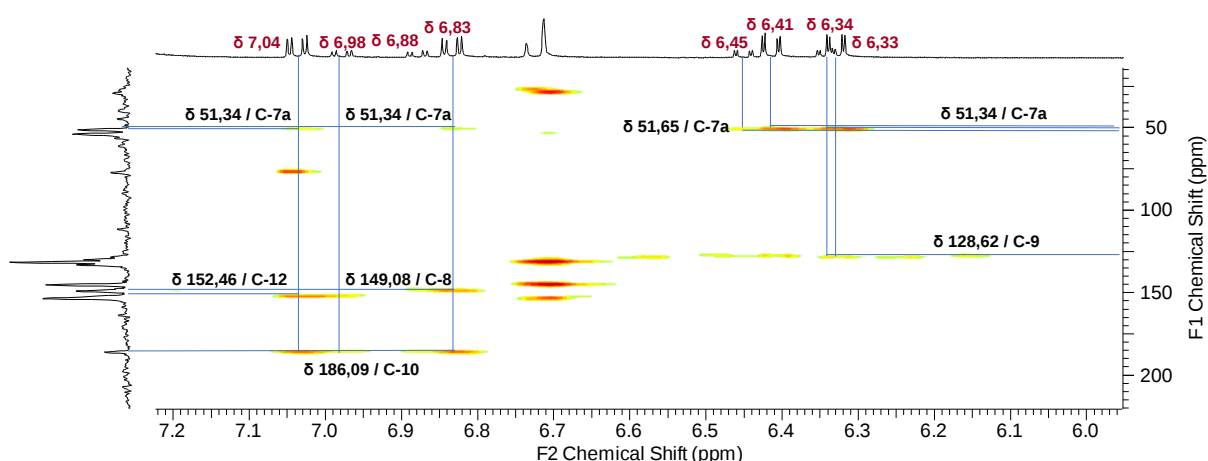


Figura 200. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, CDCl_3) referente a região dos hidrogênios aromáticos do anel D do esqueleto proaporfínico da amostra BmuGGFr3.

A partir da comparação dos dados obtidos (Tabelas 34 e 35) com os dados reportados em literatura (IWASA et al., 1991; SHANGGUAN et al., 2018) foi identificado como uma mistura de rotâmeros do alcaloide *N*-formil-estefarina (Figura 201), sendo o

rotâmero (*Z*) o constituinte majoritário. A proposta de fragmentação (Figura 202) está de acordo com o perfil de fragmentação apresentado no espectro de MS² (Figura 188) para a substância, e os dados espectrais completos estão no anexo 1 (Figuras 239, 240 e 241).

O alcaloide proaporfínico *N*-formil-estefarina já foi relatado nas folhas e raízes da espécie *Stephania kwangsiensis* da família Menispermaceae, utilizada com frequência na medicina popular chinesa (SHANGGUAN et al., 2018), porém nunca reportada em espécies da família Annonaceae.

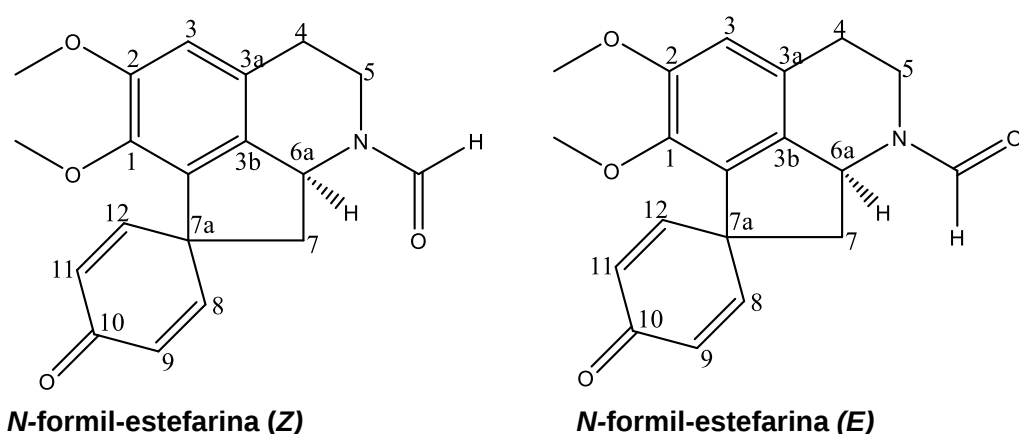


Figura 201. Estruturas dos alcaloides *N*-formil-estefarina.

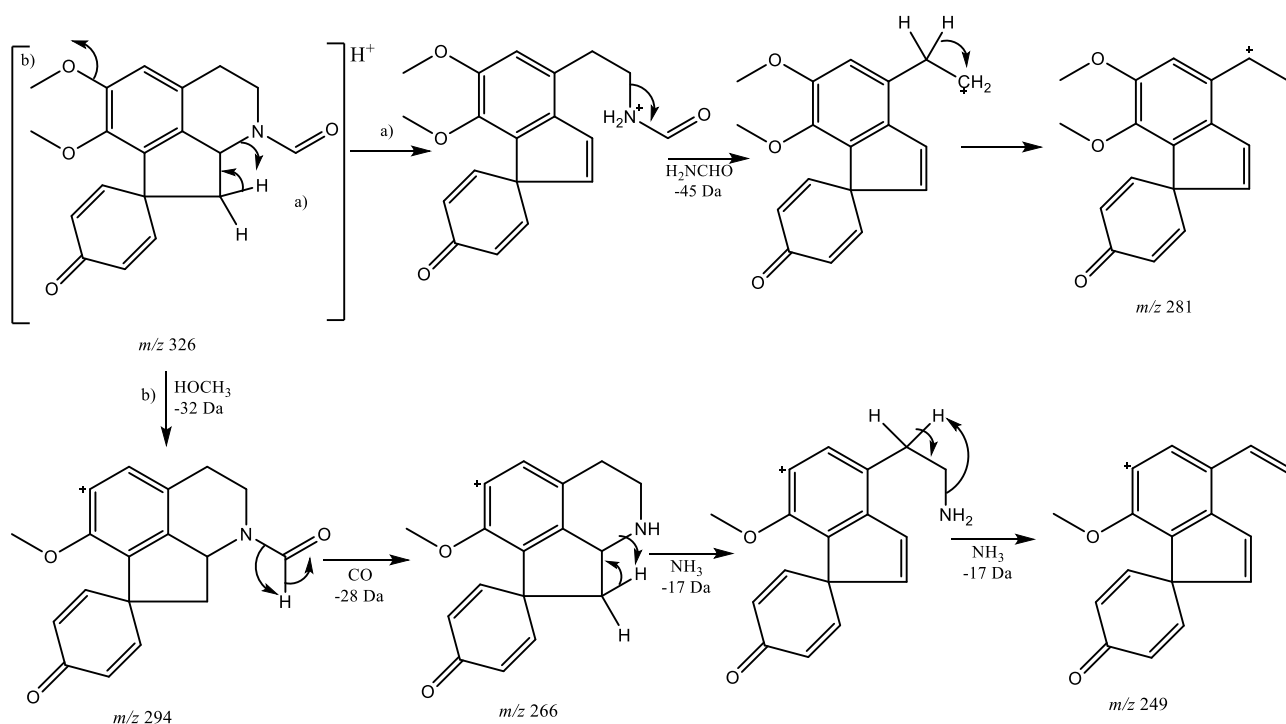


Tabela 34. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do alcaloide *N*-formil-estefarina (*Z*).

<i>N</i> -formil-estefarina (<i>Z</i>) (<i>m/z</i> 326)						
Posição	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	^1H δ (mult., <i>J</i> em Hz) ^b	HSQC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HMBC ^b
1		-	145,38	145,20		-
1a	-	-	131,60	133,13	-	-
2	-	-	153,57	154,20	-	-
3	6,71 (1H, s)	6,65 (1H, s)	111,87	110,63	29,19, 131,60, 145,39, 153,62	26,76; 128,63; 135,67; 145,20 e 154,20
3a	-	-	130,04	128,63		-
3b	-	-	131,62	135,67	-	-
4	2,78 (1H, t 2,7) 2,83 (1H, m)	2,81 (2H, m)	29,19	26,76	111,87, 130,04, 131,62	45,40; 128,63 e 135,67
5	3,93 (1H, dd, 4,1 e 2,6) 3,90 (1H, dd 4,0 e 2,4)	3,46 (1H, m) 3,15 (1H, m)	44,65	45,40	29,19; 54,05; 130,04 e 163,47	26,76; 58,22 e 128,63
6a	5,12 (1H, dd, 10,4 e 6,1)	4,38 (1H, dd 10,3 6,50)	54,05	58,02	48,36, 131,62	135,67
7	2,22 (1H, dd 12,4 e 10,4) 3,04 (1H, dd, 12,4 e 6,1)	2,28 (1H, dd, 12,0 e 10,05) 2,39 (1H, dd, 12,2 e 6,5)	48,42	48,53	54,06, 131,60, 133,26, 149,24 51,34; 54,06; 149,20; 152,45	58,22; 133,13 e 135,67
7a	-	-	51,34	51,82	-	-
8	7,04 (1H, dd 9,9 e 2,9)	7,03 (1H, dd, 9,9 e 2,9)	149,08	150,30	51,34; 152,46, 186,09	153,70 e 186,88
9	6,41 (1H, dd, 9,9 e 2)	6,38 (1H, dd, 9,9 e 1,9)	128,62	128,97	51,34	51,82 e 127,80
10	-	-	186,09	186,88	-	-
11	6,33 (1H, dd, 10,1 e 1,8)	6,26 (1H, dd, 9,9 e 1,9)	128,06	127,80	51,34; 128,62	51,82 e 128,97
12	6,83 (1H, dd, 10,1 e 2,7)	6,90 (1H, dd, 9,9, e 2,9)	152,46	153,70	51,34, 149,08, 186,09	150,30 e 186,88
2-OCH₃	3,84 (3H, s)	3,79 (3H,s)	56,57	56,74	153,57	154,20
1-OCH₃	3,62 (3H, s)	3,61 (3H, s)	61,25	61,39	145,38	145,20

N-CHO	8,35 (1H, d, 1,2)	8,35 (1H, s)	163,47	162,30	44,65, 54,05	-
--------------	-------------------	--------------	--------	--------	--------------	---

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com IWASA et al., 1991 (200 MHz e 125 MHz em CDCl₃) e SHANGGUAN et al., 2018 (600 MHz em CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

Tabela 35. Dados de RMN de ¹H, gHSQC e gHMBC do alcaloide *N*-formil-estefarina (*E*).

N-formil-estefarina (E) (m/z 326)						
Posição	¹ H δ (mult., J em Hz) ^a	¹ H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC ^a	HSQC ^b	HMBC ^a	HMBC ^b
1	-	-	145,39	145,20	-	-
1a	-	-	132,04	133,13	-	-
2	-	-	153,62	154,20	-	-
3	6,73 (1H, s)	6,65 (1H, s)	111,87	110,63	29,19	26,76; 128,63; 135,67; 145,20 e 154,20
3a	-	-	130,01	128,63	-	-
3b	-	-	131,46	135,67	-	-
4	2,75 (1H, t 2,7) 2,86 (1H, m)	2,81 (2H, m)	29,19	26,76	-	45,40; 128,63 e 135,67
5	4,2 (1H, t, 4,6) 4,17 (1H, t, 4,6)	3,46 (1H, m) 3,15 (1H, m)	39,60	45,40	29,19; 54,92; 130,01 e 163,47	26,76; 58,22 e 128,63
6a	5,02 (1H, dd, 10,1 e 6,1)	4,38 (1H, dd 10 3 6,50)	54,92	58,02	131,46	135,67
7	2,46 (1H, dd 11,9 e 10,1) 2,70 (1H, dd, 11,9 e 6,1)	2,28 (1H, dd, 12,0 e 10,05) 2,39 (1H, dd, 12,2 e 6,5)	48,68	48,53	51,65; 54,92;148,3 8 e 152,11 54,92; 132,04 e 148,38;	58,22; 133,13 e 135,67
7a	-	-	51,65	51,82	-	-
8	6,98 (1H, dd 9,9 e 2,9)	7,03 (1H, dd, 9,9 e 2,9)	149,08	150,30	51,65; 152,15; 186,09	153,70 e 186,88
9	6,45 (1H, dd, 10,1 e 1,8)	6,38 (1H, dd, 9,9 e 1,9)	128,62	128,97	51,65	51,82 e 127,80
10	-	-	186,09	186,88	-	-
11	6,34 (1H, dd, 9,8 e 1,8)	6,26 (1H, dd, 9,9 e 1,9)	128,06	127,80	51,65, 128,72	51,82 e 128,97
12	6,88 (1H, dd, 10,1 e 3,1)	6,90 (1H, dd, 9,9, e 2,9)	152,46	153,70	149,08; 186,09	150,30 e 186,88

2-OCH₃	3,85 (3H, s)	3,79 (3H,s)	56,57	56,74	153,57	154,20
1-OCH₃	3,64 (3H, s)	3,61 (3H, s)	61,25	61,39	145,38	145,20
N-CHO	8,32 (1H, s)	8,35 (1H, s)	163,47	162,30	39,60	-

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em CDCl₃, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com IWASA et al., 1991 (200 MHz e 125 MHz em CDCl₃) e SHANGGUAN et al., 2018 (600 MHz em CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.9. Determinação estrutural das substâncias isoladas do extrato aquoso de *B. canescens*.

5.9.1. Determinação estrutural da fração BcEAFr1.

A fração BcEAFr1 obtida do extrato aquoso (25 mg) apresentou-se como sólido amorfo amarelo, com máximo de absorção no UV de 264-340 (Figura 203). As análises por espectrometria de massas em modo positivo usando fonte APCI apontaram a presença do íon *quasi-molecular* de m/z 579 ($[M+H]^+$). Esse íon apresentou duas quebras sequenciais de 146 Da, (m/z 579 $\rightarrow$ 433 $\rightarrow$ 287) (Figura 203), sendo esta quebra compatível com moléculas de flavonoides glicosilados ligadas a duas unidades de ramnose. Como observado anteriormente nas análises de perfil químico (Figura 36) e CLAE semi-preparativo (Figura 39 e tabela 10) do extrato aquoso das folhas de *B. canescens*.

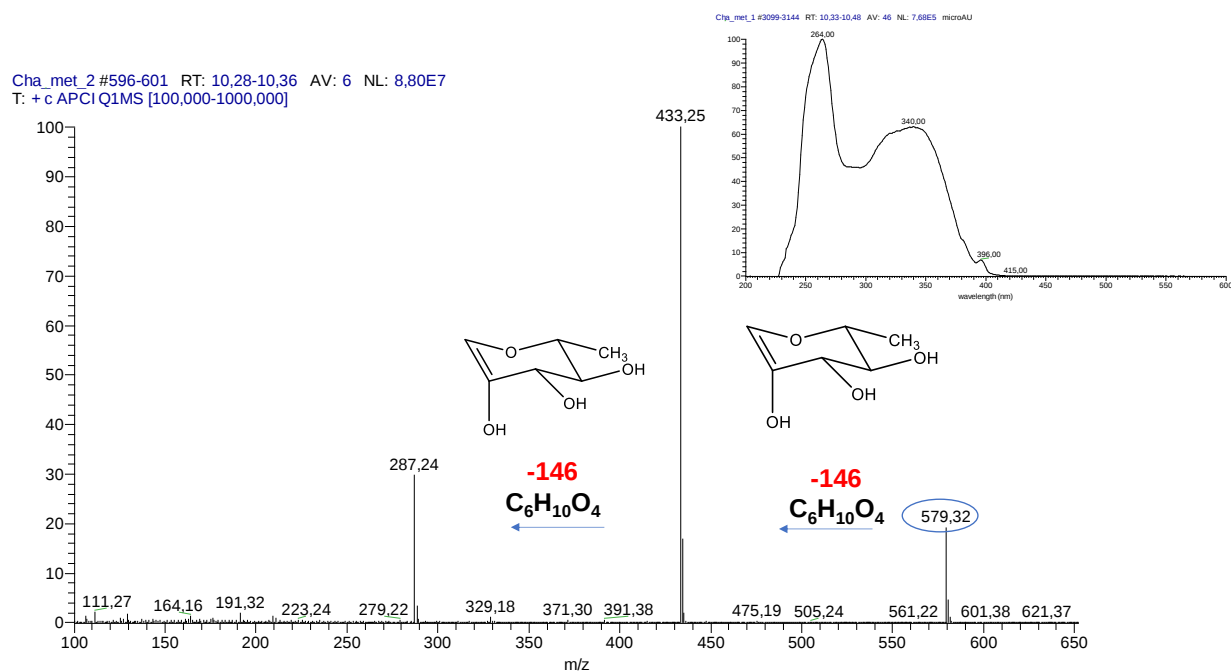


Figura 203. Espectro de massas do íon de m/z 579 da fração BcEAFr1.

Por meio do espectro de RMN de ^1H (Figura 204) foi possível observar a presença de quatro dupletos em δ 6,46 (1H, d, 2,1 Hz), δ 6,79 (1H, d, 2,1 Hz), δ 6,93 (2H, d, 8,9 Hz) e δ 7,80 (2H, d, 8,9 Hz), caracterizando um sistema simétrico, encontrado comumente em anel B de flavonoides (Figura 205). Adicionalmente dois simpletos em δ 10,25 (1H, s) e δ 12,61 (1H, s) característico de hidrogênios fenólicos, o mais desblindado em ponte de hidrogênio intramolecular com o átomo de oxigênio da cetona (SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000).

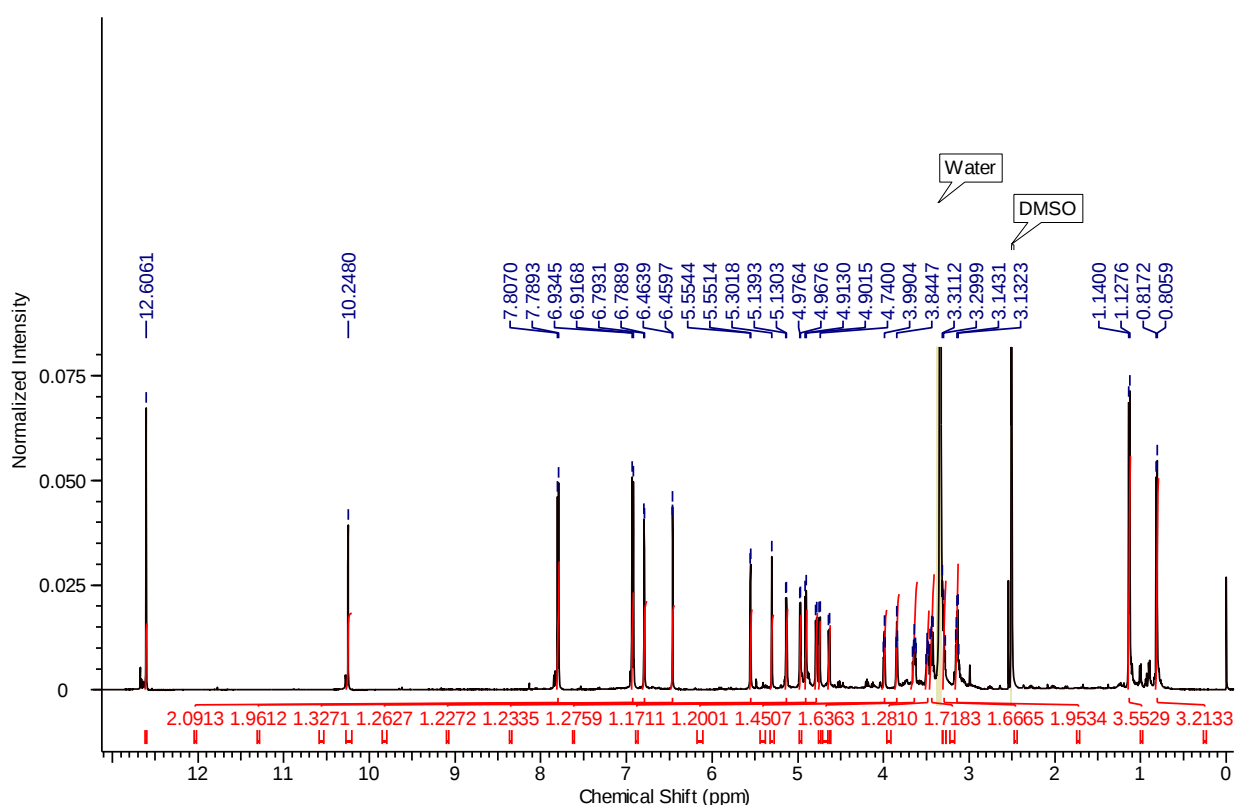


Figura 204. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) do íon de m/z 579 da fração BcEAFr1.

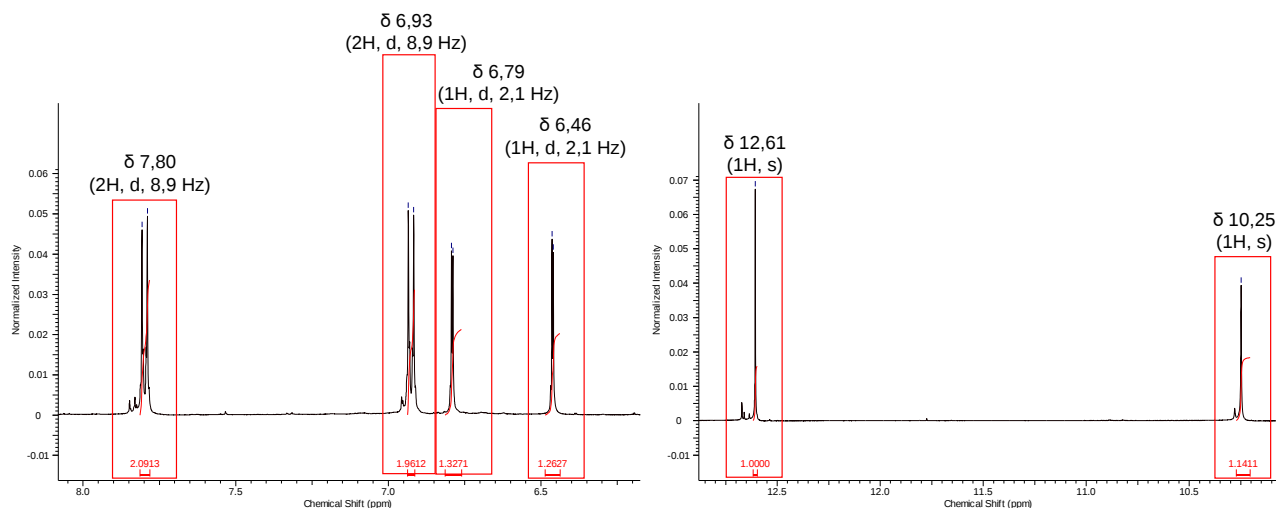


Figura 205. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) da região dos hidrogênios aromáticos e fenóis da fração BcEAFr1

No mapa de correlações HSQC (Figura 206), foram observadas as correlações dos quatro hidrogênios aromáticos δ 6,46 (1H, d, 2,1 Hz), δ 6,79 (1H, d, 2,1 Hz), δ 6,93 (2H, d, 8,9 Hz) e δ 7,80 (2H, d, 8,9 Hz) com os carbonos em δ 99,45 (C-6), δ 94,59 (C-8), δ 115,41 (C-3', C-5') e δ 130,70 (C-2', C-6'), respectivamente. Em relação aos dois simpletos dos hidrogênios fenólicos, não foi observado correlações em HSQC o que confirma que esses hidrogênios não estão ligados a carbonos.

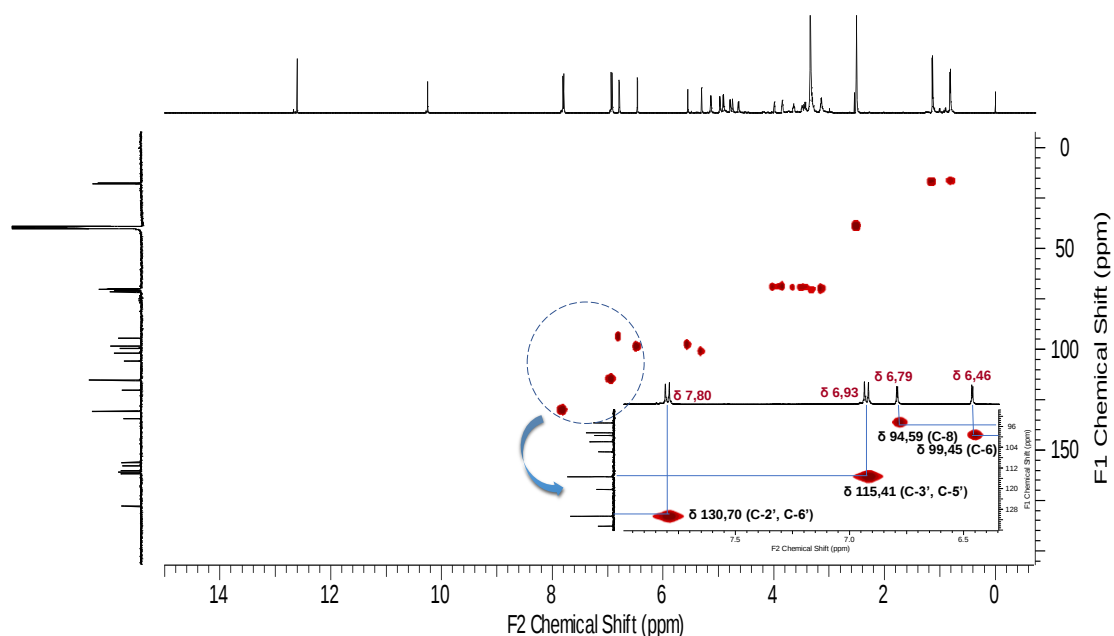


Figura 206. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e ampliação na região dos hidrogênios em δ 6,46, δ 6,79, δ 6,93 e δ 7,80 da fração BcEAFr1.

No mapa de correlações HMBC (Figura 207 e 208) foi observado que o hidrogênio em δ 6,46 (C-6) do anel aromático está se correlacionando com os carbonos em δ 94,59 (C-8) e δ 105,78 (C-10) e δ 161,69 (C-7), e o hidrogênio em δ 6,79 (C-8) está se correlacionando com os carbonos δ 99,45 (C-6), δ 105,78 (C-10), δ 156,09 (C-9) e δ 161,69 (C-7), sendo os carbonos C-7 e C-9 são característicos de carbonos ligados diretamente a átomos de oxigênio.

Os hidrogênios em δ 6,93 (C-3', C-5') estão se correlacionando com os carbonos δ 115,41 (C-3', C-5'), δ 120,34 (C-1') e δ 160,15 (C-4'), enquanto os hidrogênios em δ 7,80 (C-2',C-6') estão se correlacionam-se com os carbonos em δ 130,70 (C-2',C-6'), δ 157,78 (C-2) e δ 160,15 (C-4') os carbonos C-2 e C-4 são característicos de carbonos ligados diretamente a átomos de oxigênio (Figura 208).

O hidrogênio em δ 10,25 (H-O) está correlacionado aos carbonos em δ 115,41 (C-3', C-5') e δ 160,15 (C-4') reforçando a presença na estrutura do grupo fenol na molécula simétrica, o sinal do hidrogênio em δ 12,61 (H-O), além de correlacionar-se aos carbonos em δ 99,45 (C-6), δ 105,78 (C-10), δ 160,92 (C-5) e o grupo ceto δ 177,93 (C-4), justificando sua desblindagem pela formação de uma ponte de hidrogênio com a carbonila em C-4 (Figura 209).

Esses dados quando comparados na literatura confirmam o esqueleto do flavonol kaempferol como aglicona na estrutura (LI et al., 2015).

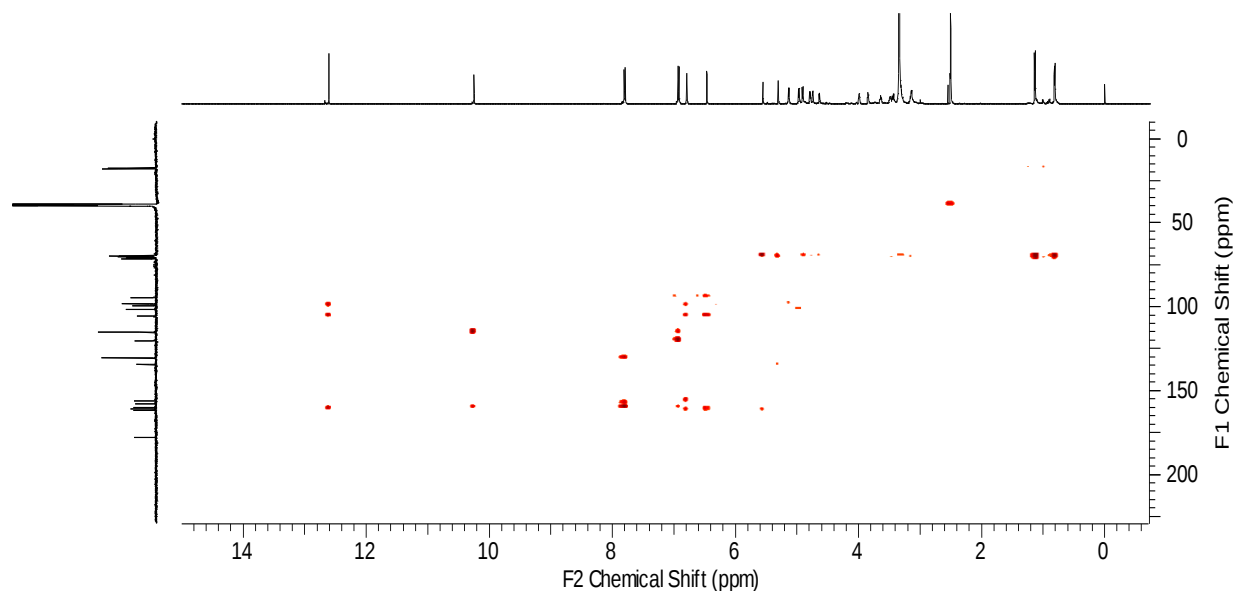


Figura 207. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, C_2D_6OS) da fração BcEAFr1.

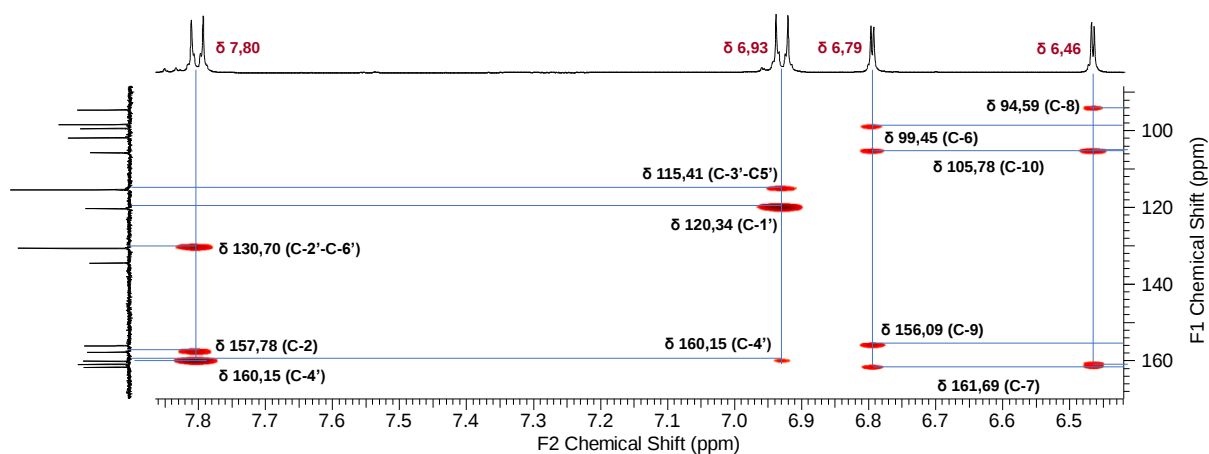


Figura 208. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, C_2D_6OS) e ampliação da região dos hidrogênios em δ 6,46, δ 6,79, δ 6,93 e δ 7,80 da fração BcEAFr1.

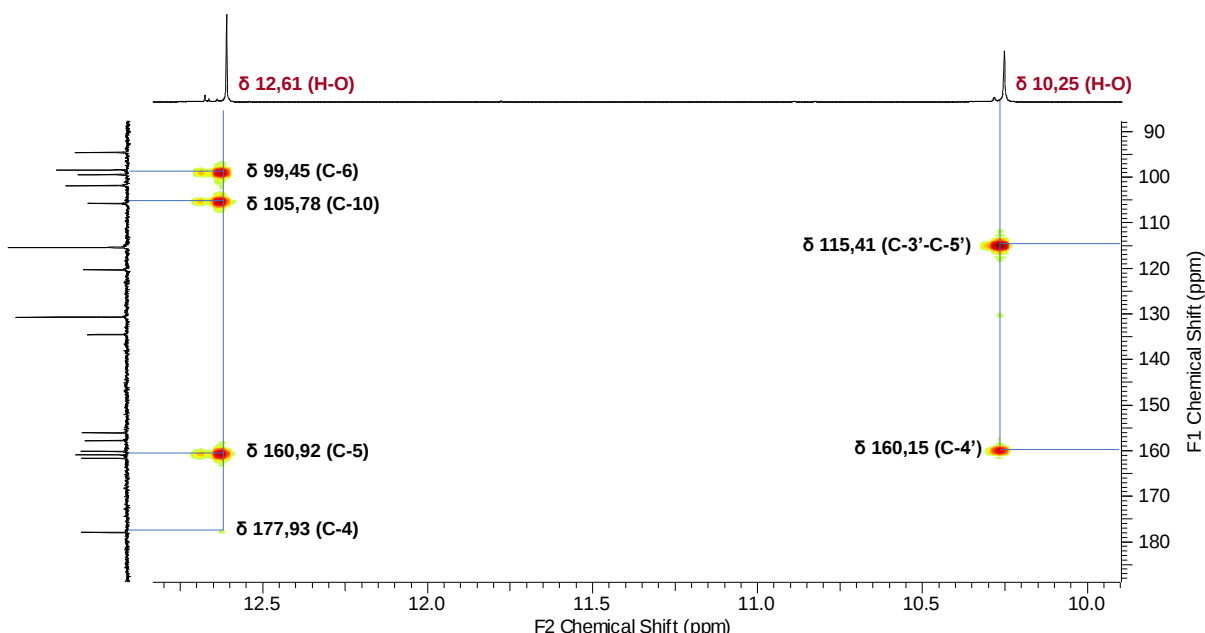


Figura 209. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, C₂D₆OS) referente a região dos hidrogênios fenólicos em δ 10,25 e δ 12,61 da fração BcEAFr1.

Na parte glicosídica da molécula foram feitas as seguintes observações. Os dupletos em δ 5,30 (1H, d, 1,5 Hz) e δ 5,55 (1H, d, 1,5 Hz) (Figura 210), indicam a presença de duas unidades de açúcar referentes aos hidrogênios anoméricos. Os dupletos com valor baixo de constante de acoplamento indicam que esses hidrogênios estão na configuração alfa (GURST, 1991; CHATURVEDULA & PRAKASH, 2011).

Os mapas de contorno HSQC e HMBC (Figura 210) indicam que o hidrogênio anomérico em δ 5,30 está correlacionado a J^1 com carbono em δ 101,87 (C-1''), J^2 δ 70,06 (C-2'') e J^3 em δ 134,53 (C-3) confirmando a posição da ramnose em C-3 do kaempferol. O hidrogênio em δ 5,55 está se correlacionando a J^1 com o carbono em δ 98,42 (C-1'''), J^2 em δ 70,08 (C-5''') e a J^3 com o carbono em δ 161,69 (C-7) confirmando a posição da outra ramnose em C-7 do kaempferol.

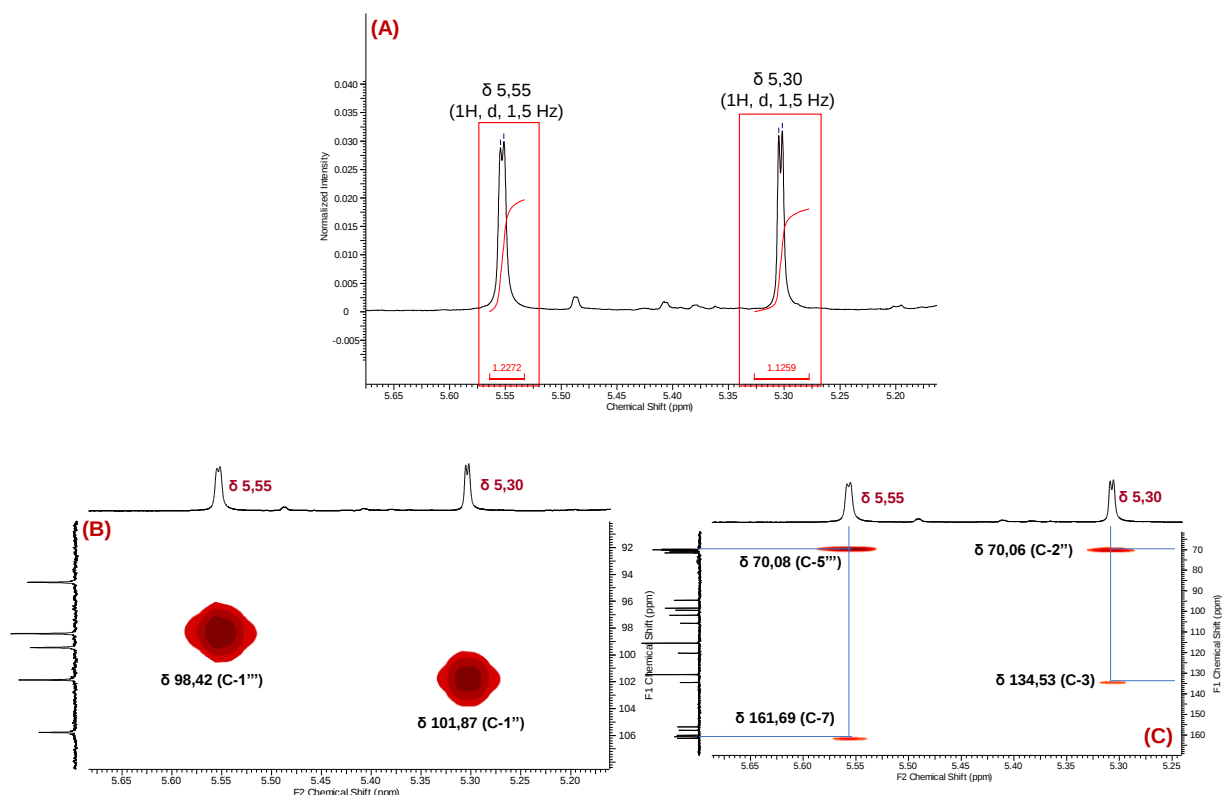


Figura 210. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e mapas de correlações HSQC (B) e HMBC (C) (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) referente a região dos hidrogênios anoméricos da fração BcEAFr1.

Os dupletos em δ 0,81 (3H, d, 5,6 Hz) e δ 1,13 (3H, d, 6,2 Hz) de hidrogênios metilênicos associados ao mapa de correlações de HSQC com deslocamento em δ 17,46 (C-6'') e δ 17,90 (C-6'''), respectivamente (Figura 211), confirmam a proposta avaliada pelo perfil de fragmentação de que as unidades de açúcar fossem a ramnoses (Figura 203).

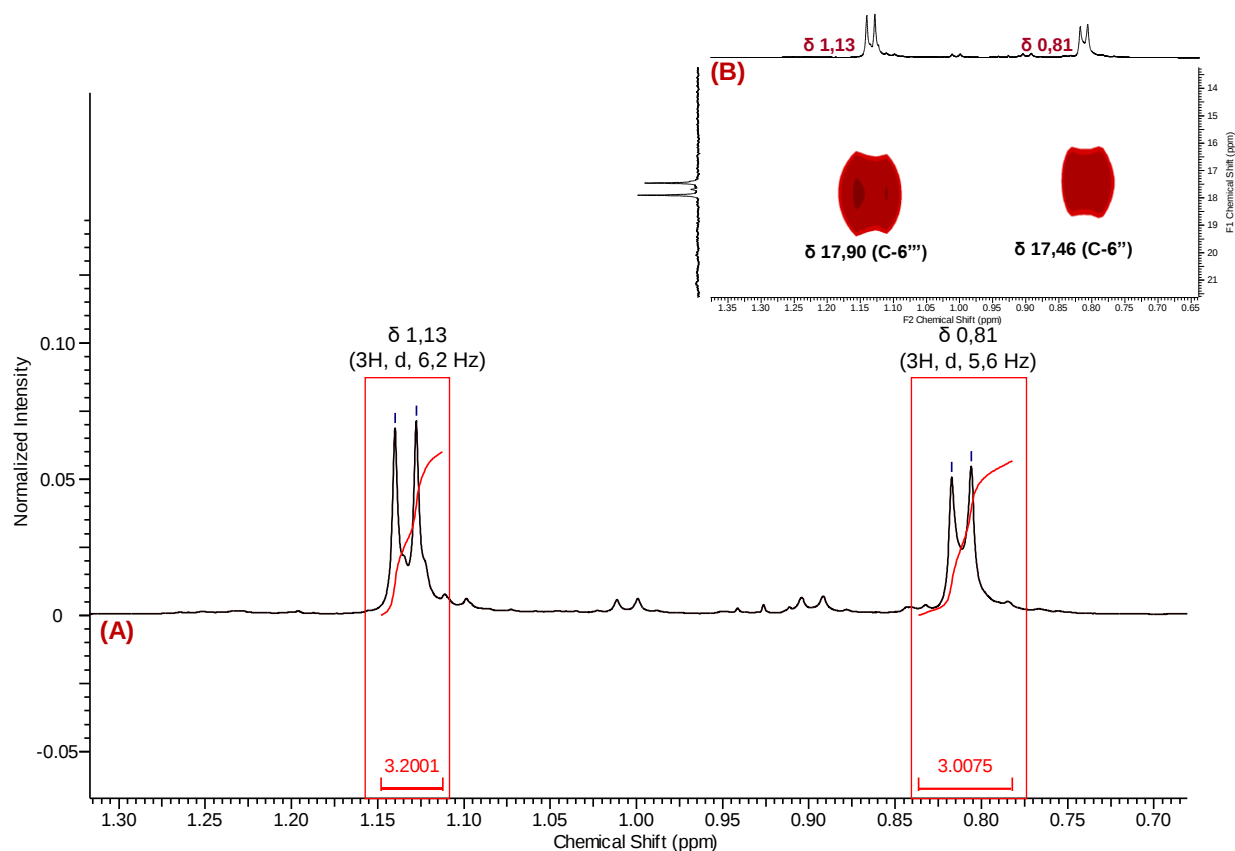


Figura 211. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (A) (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e mapa de correlações HSQC (B) (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) dos sinais em δ 1,13 e δ 0,81 da fração BcEAFr1.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 212) também observou-se seis dupletos entre 4,60 e 5,20 ppm com constantes de acoplamento em torno de δ 4,5 Hz e δ 5,7 Hz, que não apresentaram correlação em J^1 com nenhum carbono, mas apresentaram correlações a J^2 , J^3 e COSY que são referentes aos hidrogênios das hidroxilas das duas ramnoses (Figura 213).

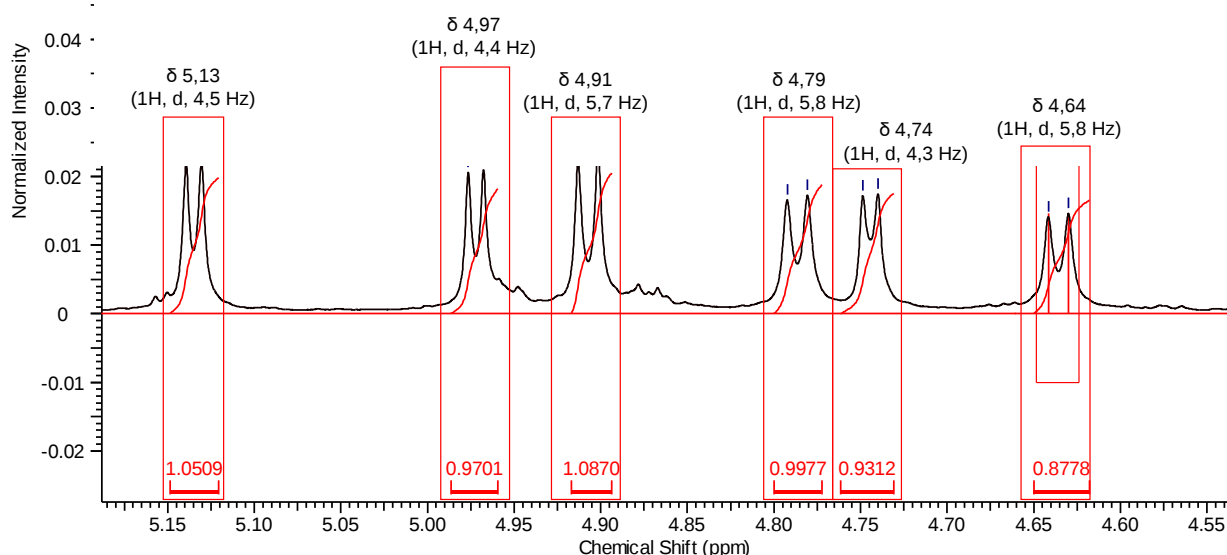


Figura 212. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) referente a região dos hidrogênios das hidroxilas das ramnosas da fração BcEAFr1.

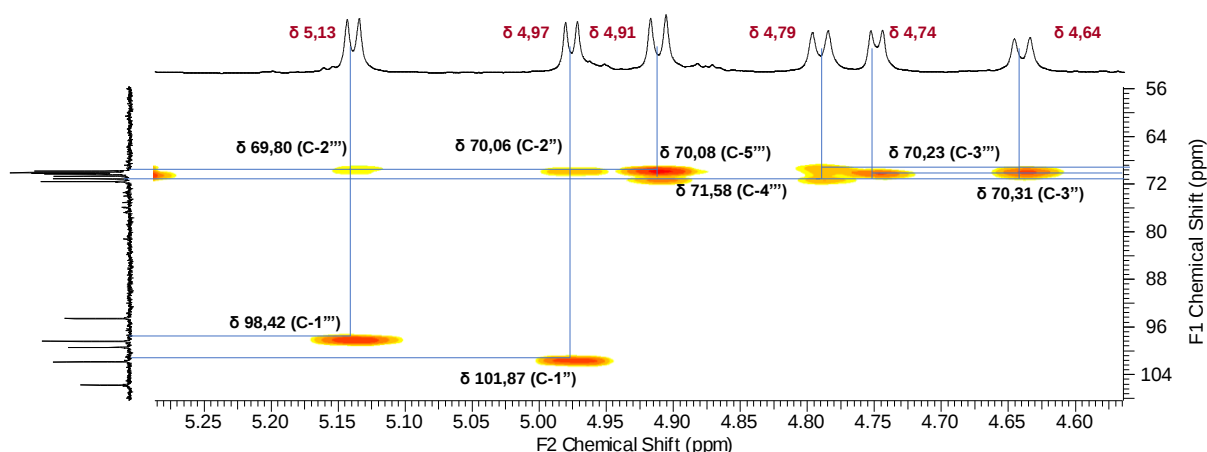


Figura 213. Ampliação do mapa de correlações HMBC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) referente a região dos hidrogênios das hidroxilas das ramnosas da fração BcEAFr1.

A associação dos mapas de correlações de HSQC, HMBC (Figuras 206 e 207), e COSY $^1\text{H} \times ^1\text{H}$, (Anexo 1 – Figura 243) permitiu assinalar todos os deslocamentos químicos dos RMN de ^1H (Figura 204) e RMN de ^{13}C (Anexo 1 – Figura 242) da aglicona e das ramnosas que são apresentados na Tabela 36, permitindo identificar a fração BcEAFr1 como o composto kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnoside conhecido como kaempferitina (Figura 214).

O flavonoide kaempferitrina possui relatos de identificação em várias espécies de plantas como *Aralia chinensis* (Araliaceae), *Ixora coccínea* (Rubiaceae), *Epimedium*

brevicornum (Berberidaceae), *Sedum dendroideum* (Crassulaceae), *Hibiscus cannabinus* (Malvaceae) e *Cleome viscosa* (Cleomaceae) (QI et al., 2010; IDOWU et al., 2010; RHO et al., 2011; SILVA et al., 2014b; LI et al., 2015; NGUYEN et al., 2017). Nguyen e colaboradores (2005) reportaram a presença desse flavonoide na espécie *Fissistigma capitatum*, tornando este segundo relato desse flavonoide na família Annonaceae.

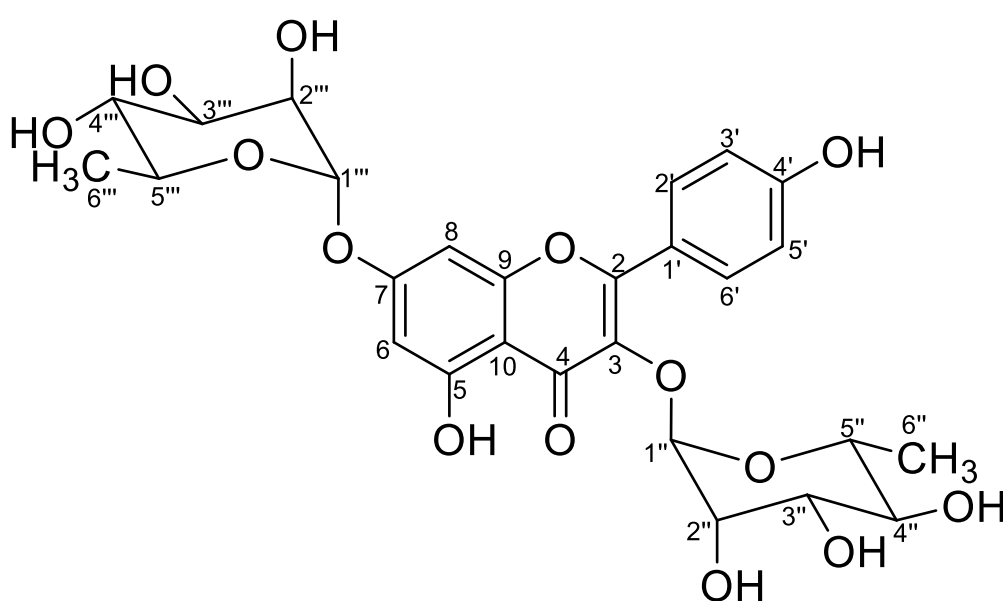


Figura 214. Estrutura do flavonoide kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnoside.

Tabela 36. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC do flavonoide kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnoside.

Kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnoside (m/z 579)						
Posição	^1H δ (mult., J em Hz) ^a	^1H δ (mult., J em Hz) ^b	HSQC ^a / ^{13}C	^{13}C ^b	COSY ^a	HMBC ^a
2	—	—	157,78	157,5	—	—
3	—	—	134,53	134,8	—	—
4	—	—	177,93	177,9	—	—
5 (OH)	12,61 (1H, s)	12,67 (1H, s)	160,92	160,9	—	99,45; 105,78; 160,92; 177,93
6	6,46 (1H, d, 2,1)	6,46 (1H, d, 2,0)	99,45	99,4	—	94,59; 105,78;

						161,69
7	—	—	161,69	161,7	—	—
8	6,79 (1H, d, 2,1)	6,78 (1H, d, 2,0)	94,59	94,6	—	99,45; 105,78; 156,09; 161,69
9	—	—	156,09	156,0	—	—
10	—	—	105,78	105,6	—	—
1'	—	—	120,34	120,2	—	—
2', 6'	7,80 (1H, d, 8,9)	7,83 (1H, d, 8,8)	130,70	130,6	6,93	130,70; 157,78; 160,15
3', 5'	6,93 (1H, d, 8,9)	6,95 (1H, d, 8,8)	115,41	115,5	7,80	115,41; 120,34; 160,15
4' (OH)	10,25 (1H, s)	10,27 (1H, s)	160,15	160,3	—	115,41; 160,15
(3-O-Rha)1''	5,30 (1H, d, 1,5)	5,50 (1H, br, s)	101,87	101,1	3,99	70,67; 134,53
2'' (H)	3,99 (1H, t, 4,5)	4,01 (1H, d, 2,4)	70,06	81,3	4,97; 3,49	—
2'' (OH)	4,97 (1H, d, 4,4)	—	70,06	—	3,99	70,06; 101,87
3'' (H)	3,49 (1H, m)	3,54–3,58 (1H, m)	70,31	70,1	—	—
3'' (OH)	4,64 (1H, d, 5,8)	—	70,31	—	3,49	70,31
4'' (H)	3,14 (1H, m)	3,13 (1H, br, s)	71,58	71,7	—	71,06
4'' (OH)	4,79 (1H, d, 5,8)	—	71,58	—	3,14	71,58
5''	3,14 (1H, m)	3,42–3,48 (1H, m)	71,58	70,2	0,81	—
6''	0,81 (3H, d, 5,6)	0,89 (3H, d, 6,4)	17,46	17,3	3,14	70,23; 71,10
(7-O-Rha)1'''	5,55 (1H, d, 1,5)	5,55 (1H, br s)	98,42	98,5	3,84	70,08; 161,69
2''' (H)	3,84 (1H, t, 4,6)	3,84 (1H, s)	69,80	69,8	5,13	—
2''' (OH)	5,13 (1H, d, 4,5)	—	69,80	—	3,84	69,80; 98,42
3''' (H)	3,64 (1H, ddd, 9,2, 5,6, 3,5)	3,62 (1H, m)	70,23	70,2	—	—
3''' (OH)	4,74 (1H, d, 4,3)	—	70,23	—	3,13	70,23
4''' (H)	3,30 (1H, m)	3,26–3,30 (1H, m)	71,58	71,6	—	17,90; 70,08
4''' (OH)	4,91 (1H, d, 5,7)	—	71,58	—	3,30	70,08; 71,58
5'''	3,44 (1H, dd, 9,3, 6,1)	3,40–3,45 (1H, m)	70,08	70,0	1,13	71,58
6'''	1,13 (3H, d, 6,2)	1,12 (3H, d, 6,0)	17,90	17,8	3,44	70,08; 71,58

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em C₂D₆OS, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com LI et al., 2015 (400 MHz em CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

5.9.2. Determinação estrutural da fração BcEAFr2.

A fração BcEAFr2 obtida do extrato aquoso (15 mg) apresentou-se como sólido amorfo amarelo, com máximo de absorção no UV de 264-340 (Figura 215). As análises por espectrometria de massas (Figura 215) apontaram semelhanças com o perfil de BcEAFr1 sugerindo que as substâncias possuem semelhança estrutural, a diferença foi a adição de mais uma unidade de ramnose com 146 Da, sendo observado o íon *quasi-molecular* de m/z 725 ($[M+H]^+$). Esse íon apresentou três quebras sequenciais de 146 Da, (m/z 725 $\rightarrow$ 579 $\rightarrow$ 433 $\rightarrow$ 287) (Figura 215) sendo esta quebra semelhante de moléculas de flavonoides glicosilados ligadas a três unidade de ramnose. Como observado anteriormente nas análises de perfil químico (Figura 36) e CLAE semi-preparativo (Figura 39 e tabela 10) do extrato aquoso das folhas de *B. canescens*.

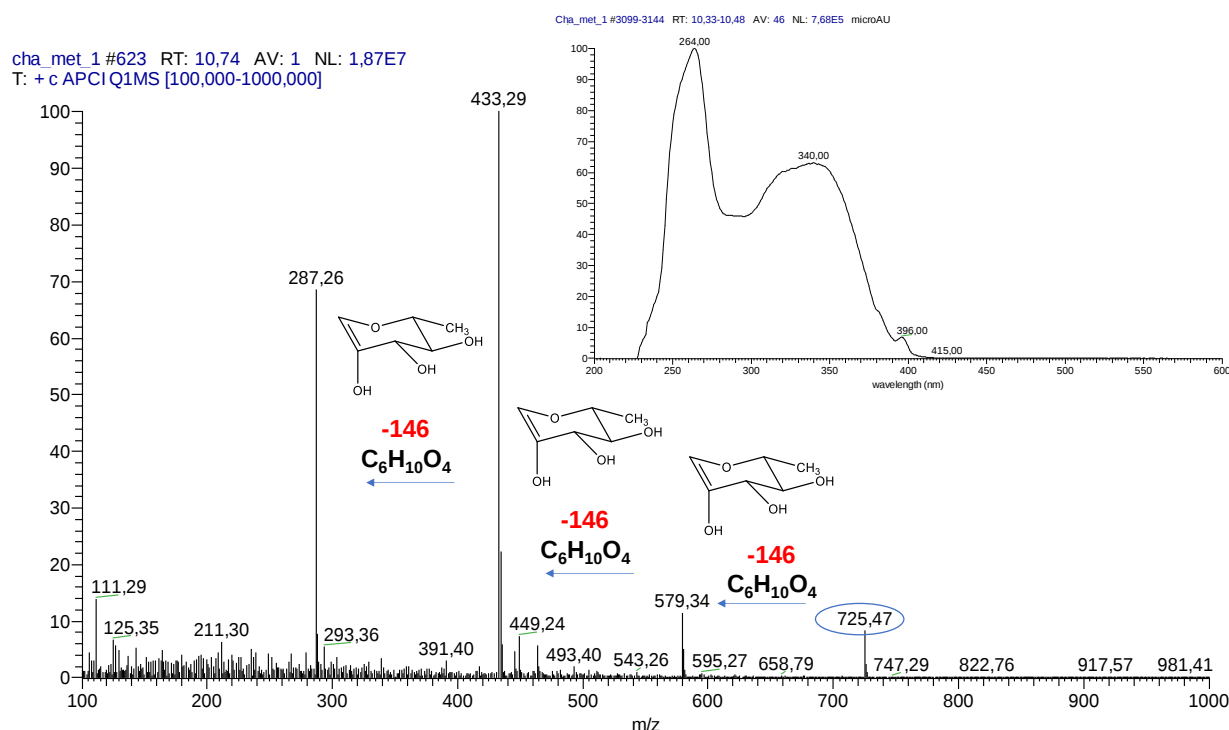


Figura 215. Espectro de massas do íon de m/z 725 da fração BcEAFr2.

A associação dos espectros massas, RMN de 1H , RMN de ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY $^1H \times ^1H$, (Anexo 1 – Figuras 244 - 248) demonstrados na tabela 37 permitiu associar a estrutura de BcEAFr2 ao substância kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnosidio

identificada na fração BcEAFr1, com a adição de um duplete em δ 4,19 (1H, d, 7,8 Hz) que está correlacionado a J^1 com carbono em δ 105,9 (C-1'') e se correlaciona a J^3 com o δ 71,6 (C-5'') e com o δ 81,23 (C-2'') (Figura 216) confirmando que essa terceira unidade de ramnose está ligada ao carbono 2 (C-2'') da ramnose ligada ao C-3 do kaempferol.

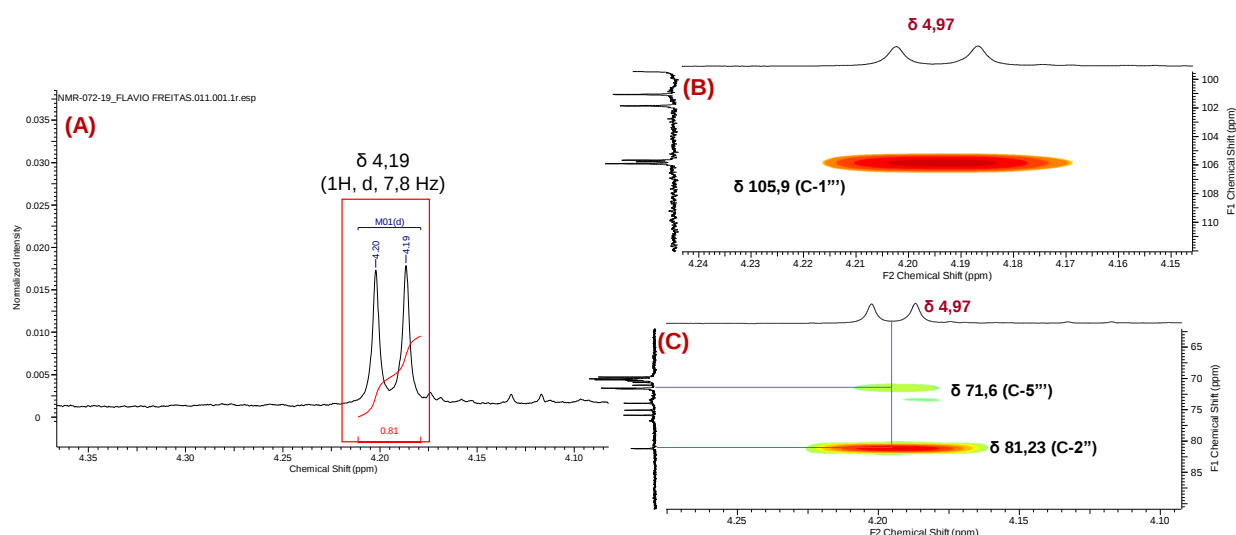


Figura 216. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) e mapas de correlações HSQC e HMBC (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) do sinal em δ 4,19 referente a terceira unidade de Ramnose.

Ao comparar esses dados com os já descritos em literatura foi possível correlacionar o flavonoide identificado na fração BcEAFr2 com o flavonoide kaempferol-3-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhámnopiranosil-7-O- α -rham-nopiranosideo (Mateflavosi- deo A), possuindo uma única diferença na configuração do hidrogênio anomérico referente a terceira unidade de ramnose H-1''' (δ 4,19 - 1H, d, 7,8 Hz), que apresentou uma constante de acoplamento característica de hidrogênios anomérico de glicosídeos de configuração β . Baseado nessas evidências o flavonoide identificado na fração BcEAFr2 foi considerado uma nova molécula como kaempferol-3-O- α -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -L-rhamnopiranosil-7-O- α -L-rhamnopiranosideo nomeado canescentina (Figura 217). Para confirmar a massa molecular da nova substância foi

realizado análise de MS e MS² em alta resolução em equipamento Q-TOF-II que consta no anexo 1 (Figuras 249 e 250).

Os flavonoides glicosídeos são recorrentes em Annonaceae, sendo a quercetina e kaempferol mono- e diglicosídeos o principal representante dentro desta família. Estes compostos foram previamente relatados em *Xylopiia emarginata* (MOREIRA et al., 2003), *X. ferruginea* (ZAWAWI et al., 2012), *Piptostigma fasciculata* (SEIDEL et al., 1999), *Oxandra sessiliflora* (SOUSA et al., 2014), *Artabotrys hexapetalus* (SOMANAWAT et al., 2012), e de várias espécies de *Annona* (NOVAES et al., 2018). Os triglicósidos de Kaempferol, em especial os triraminosídeos, como a canescentina, são incomuns em Annonaceae. A ocorrência destes compostos foi previamente reportada em *Matteuccia struthiopteris* (Onocleaceae) (LI et al., 2015), *Cassinopsis madagascariensis* (Icacinaceae) (RASOANAIVO et al., 1990) e *Justicia spicigera* (Acanthaceae) (EULER & ALAM, 1982).

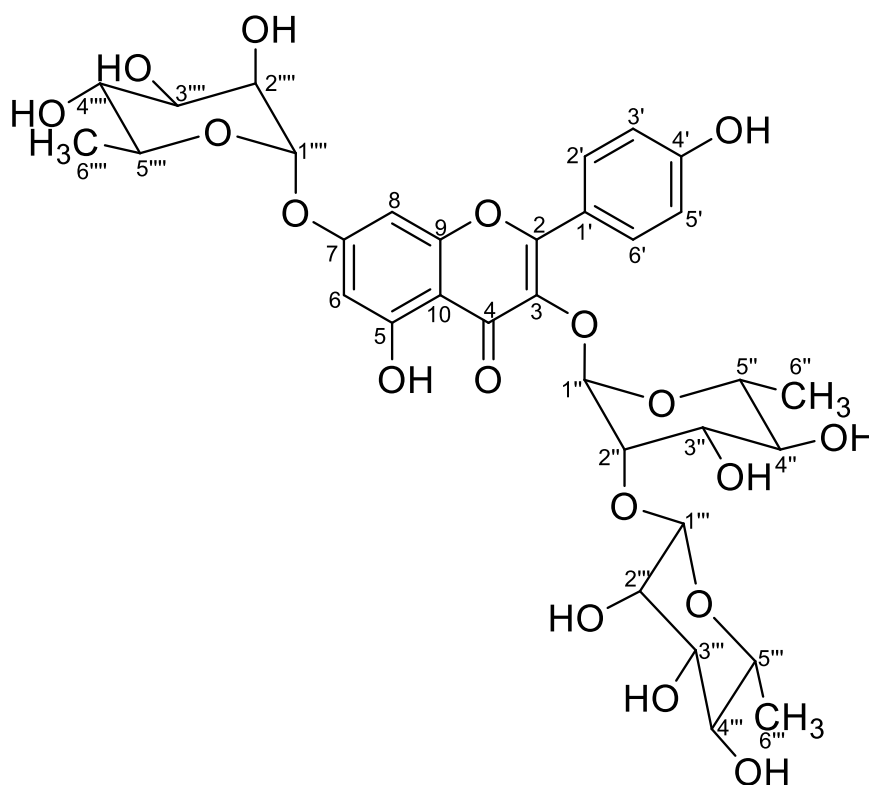


Figura 217. Estrutura do flavonoide canescentina.

Tabela 37. Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e COSY do flavonoide canescentina.

Canescentina (m/z 725)						
Position	^1H δ (mult. J in Hz)	^1H δ (mult. J em Hz) ^b	^{13}C δ (mult. J in ppm)	$^{13}\text{C}^b$	COSY	HMBC
2	—	—	157,5	157,5	—	—
3	—	—	134,8	134,8	—	—
4	—	—	178,0	177,9	—	—
5 (OH)	12,66 (1H, s)	12,67 (1H, s)	161,0	160,9	—	99,4; 105,7; 161,0
6	6,46 (1H, d, 2,1)	6,46 (1H, d, 2,0)	99,4	99,4	—	94,7; 105,7; 161,7
7	—	—	161,7	161,7	—	—
8	6,79 (1H, d, 2,1)	6,78 (1H, d, 2,0)	94,7	94,6	—	99,4; 105,7; 156,1; 161,7
9	—	—	156,1	156,0	—	—
10	—	—	105,7	105,6	—	—
1'	—	—	120,2	120,2	—	—
2'. 6'	7,83 (1H, d, 8,8)	7,83 (1H, d, 8,8)	130,7	130,6	6,94	115,5; 130,7; 157,5; 160,4
3'. 5'	6,94 (1H, d, 8,9)	6,95 (1H, d, 8,8)	115,5	115,5	7,83	115,5; 120,2; 160,4
4' (OH)	10,27 (1H, s)	10,27 (1H, s)	160,4	160,3	—	115,5; 160,4
(3-O-Rha)1''	5,48 (1H, d, 1,2)	5,50 (1H, br, s)	101,1	101,1	4,04	134,8
2'' (H)	4,04 (1H, d, 2,4)	4,01 (1H, d, 2,4)	81,2	81,3	3,55	—
3'' (H)	3,55 (1H td 9,6x(2). 3,3)	3,54–3,58 (1H, m)	70,1	70,1	—	—
4'' (H)	3,14 (1H, m)	3,13 (1H, br, s)	71,6	71,7	—	—
5''	3,46 (1H, m)	3,42–3,48 (1H, m)	70,2	70,2	0,89	71,6
6''	0,89 (3H, d, 5,6)	0,89 (3H, d, 6,4)	17,4	17,3	3,43	70,2; 71,6
(2''-ORha)1'''	4,19 (1H, d, 7,8)	4,12 (1H, m)	105,9	106,6	2,98	81,2; 71,6
2''' (H)	2,98 (1H, m)	3,26 –3,30 (1H, m)	74,0	70,9	4,19	75,9; 105,9
3''' (H)	3,30 (1H, m)	3,26 –3,30 (1H, m)	75,9	73,1	—	—

4''' (H)	2,75 (1H, td, 9,1x(2). 5)	3,35 –3,40 (1H, m)	75,1	70,4	3,07	71,6; 75,9
5'''	3,07 (1H m)	3,35 –3,40 (1H, m)	71,6	70,7	–	–
6'''	1,0 (3H d 6,2)	0,98 (3H, d, 6,4)	17,7	16,2	3,07	71,6 75,1
(7-O-Rha)1'''	5,55 (1H d 1.4)	5,55 (1H, br s)	98,4	98,5	3,84	70,2; 161,7
2'''	3,84 (1H s)	3,84 (1H, s)	69,8	69,8	3,63	–
3'''	3,63 (1H m)	3,62 (1H, m)	70,2	70,2	3,30	–
4'''	3,30 (1H m)	3,26–3,30 (1H, m)	71,6	71,6	–	70,2
5'''	3,45 (1H m)	3,40–3,45 (1H, m)	70,1	70,0	1,12	71,6
6'''	1,12 (3H d 6,4)	1,12 (3H, d, 6,0)	17,9	17,8	3,43	71,6; 70,1

^aO experimento foi realizado a 500,13 MHz para ¹H e 125,76 MHz para HSQC e HMBC em C₂D₆OS, utilizando o TMS como padrão interno. ^bDados da literatura de acordo com LI et al., 2015 (400 MHz em CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm. (-) não identificado.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS



Os estudos realizados neste trabalho nos forneceram importantes resultados e levaram às considerações e conclusões abaixo descritas:

As análises dos óleos essenciais possibilitaram a caracterização de um total de 63 substâncias para a espécie *B. canescens*, *B. multiflora* e *B. pleiosperma*. Muitas das estruturas já foram relatados na literatura para o gênero *Bocageopsis* e para espécies do gênero *Unonopsis* e *Onychopetalum*, que são considerados taxonomicamente gêneros próximos ao estudado.

A análise por CG/EM dos óleos essenciais das três espécies revelou presença exclusiva de sesquiterpenos e seus derivados e ausência de monoterpenos.

O espatulenol e o óxido de cariofileno, considerados marcadores de vários gêneros de Annonaceae, foram confirmados em todas as partes da espécie *B. canescens*, e folhas e galhos finos de *B. multiflora* e ausentes em *B. pleiosperma*. Esses dados dificultam conclusões sobre o significado quimiotaxônomico desses marcadores para o gênero *Bocageopsis* e sinalizam para a necessidade de estudos mais aprofundados.

Os ensaios antimicrobianos dos óleos essenciais revelaram atividade bacteriológica dos óleos dos galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora*, e das folhas de *B. canescens* e *B. pleiosperma* frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* e *Mycobacterium smegmatis*, além da atividade fungicida dos óleos essenciais das folhas de *B. canescens*, galhos finos e galhos grossos de *B. multiflora* frente ao patógeno *Candida albicans*.

O resultado da atividade biológica do óleo essencial de *B. canescens*, em relação à *M. smegmatis* é importante por se tratar de micobactéria não patogênica associada ao estudo de *M. tuberculosis*, causadora de tuberculose, que ainda é um dos mais graves problemas de saúde do mundo.

As abordagens integrativas como a espectrometria de massas de ionização ambiente (LS-MS), as técnicas de cromatografia hifenada à espectrometria de massas (CG-EM, CLAE-EM e CLAE-EM/EM) e RMN 1D e 2D, foram importantes no reconhecimento das espécies, parte da plantas, extratos e frações portadoras de estruturas alcaloídicas conhecidas e/ou com potencial para isolamento e identificação de novas substâncias de natureza alcaloídicas ou não.

As análises exploratórias espectrométricas e espectroscópicas preliminares da fração alcaloídica das folhas do indivíduo maduro de *B. canescens* (Bc01) permitiram a identificação de três alcaloides oriundos do esqueleto isoquinolínico, anonaina, estefarina e isoboldina, e nos galhos finos foi identificado apenas o alcaloide anonaina. Para a fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora* foi possível identificar os alcaloides asimilobina, estefarina e norushinsunina.

A purificação da fração alcaloídica das folhas de *B. canescens* resultou no isolamento de dois alcaloides isômeros da classe dos isoquinolínicos simples, isosalsolina e salsolina, além dos alcaloides anonaina, liriodenina, atherolina, norruciferina e laurotetanina. O fracionamento da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora* resultou no isolamento dos alcaloides salsolina, isosalsolina, prunuciferina e dos rotâmeros de *N*-formil-estefarina.

A partir do fracionamento do extrato aquoso das folhas de *B. canescens* foi possível o isolamento dos flavonoides kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnosideo (kaempfertrina) e do novo flavonoide kaempferol-3-O-[α -L-rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -L-rhamnopiranosil]-7-O- α -L-rhamnopiranoside, nomeado canescentina, incomum em Annonaceae.

Todas as substâncias identificadas e isoladas são inéditas nas espécies estudadas, sendo os alcaloides norushinsunina, atherolina, prunuciferina e *N*-formil-

estefarina, além do flavonoide kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnosideo, inéditos no gênero *Bocageopsis*, enquanto os alcaloides salsolina e isosalsolina, foram isolados pela primeira vez na ordem Magnoliales.

Portanto, os resultados obtidos neste trabalho, reforçam a importância do gênero *Bocageopsis* para a família Annonaceae e para o conhecimento químico e biológico de espécies botânicas da flora amazônica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS



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

ADAMS, R.P. Review of Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. **American Society for Mass**, v.1, 2007b.

AGRA, I. K. R.; PIRES, L. L. S.; CARVALHO, P. S. M.; SILVA-FILHO, E. A.; SMANIOTTO, S.; BARRETO, E. Evaluation of wound healing and antimicrobial properties of aqueous extract from *Bowdichia virgilioides* stem barks in mice. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 85, p. 945-954, 2013.

AGRAWAL, A. D. Pharmacological activities of flavonoids: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciencies and Nano-technology**, v. 4, p. 1394-1398, 2011.

AHERNE, S.A.; O'BRIEN, N. Review Article, Dietary Flavonols: Chemistry, food content, and metabolism. **Nutrition**, v. 18, p. 75-81, 2002.

ALCÂNTARA, J. M. Composição Química e Potencial Biológico dos Óleos Essenciais De Annonaceae dos Campi Inpa e Ufam. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM, Manaus, 2015.

ALCÂNTARA, J. M.; LUCENA, J. M. V. M.; FACANALI, R.; MARQUES, M. O. M.; LIMA, M. P. Chemical Composition and Bactericidal Activity of the Essential Oils of Four Species of Annonaceae Growing in Brazilian Amazon. **Natural Product Communication**, v. 12, p. 619-622, 2017.

ALENCAR, D. C.; PINHEIRO, M. L. B.; PEREIRA, J. L. S.; CARVALHO, J. E.; CAMPOS, F. R.; SERAIN, A. F.; TIRICO, R. B.; TASCO, A. J. H.; COSTA, E. V.; SALVADOR, M. J. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Anaxagorea brevipes* (Annonaceae) and evaluation of its bioactivity. **Natural products Research**, v. 30, p. 1088-1092, 2015.

ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, C. S.; PESSOA, C. Ó.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 258-264, 2014.

AMOO, I. A.; EMENIKE, A. E.; AKPAMBANG, V.O.E. Compositional evaluation of *Annona cherimola* (custard apple) fruit. **Trends in Applied Sciences Research**, v. 2, p. 216-220, 2008.

ANDREAZZA, N. L.; LOURENÇO, C. C.; HERNANDEZ-TASCO, A. J.; PINHEIRO, M. L. B.; STEFANELLO, M. E. A.; COSTA, E. V.; SALVADOR, M. J. Antimicrobial photodynamic effect of extracts and oxoaporphine alkaloid isomoschatoline from *Guatteria blepharophylla*. **Journal of Photochemistry and Photobiology B**, v. 160, p. 154-162, 2016.

ANISZEWSKI, T. Alkaloids - Secrets of life (Alkaloid chemistry, biological, significance, applications and ecological role). **Elsevier's Science & Technology Rights Department in Oxford**, 5 ed., p. 61-139, 2007.

APG III, 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal Linnean Society**, v. 161, p. 105-121, 2009.

ARANGO, G. J.; CORTES, D.; CAVÉ, A.; D'OCON, M. 7-7'-bisdeshidroaporfins de *Unonopsis pacifica*. **Anales de Química, Serie C: Química Organica y Bioquímica**, v. 84, 124-127, 1988.

ARAÚJO, C. S.; OLIVEIRA, A. P.; LIMA, R. N.; ALVES, P. B.; DINIZ, T. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Chemical constituents and antioxidant activity of the essential oil from leaves of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Pharmacognosy Magazine**, v. 11, p. 615-618, 2015.

ARAÚJO, M. M.; LONGO, P. L. Teste de ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, p. 1-7, 2016.

ARÉVALO-LOPÉZ, D.; NINA, N.; TICONA, J. C.; LIMACHI, I.; SALAMANCA, E.; UDAETA, E.; PAREDES, C.; ESPINOZA, B.; SERATO, A.; GARNICA, D.; LIMACHI, A.; COAQUIRA, D.; SALAZAR, S.; FLORES, N.; STERNER, O.; GIMÉNEZ, A. Leishmanicidal and cytotoxic activity from plants used in Tacana traditional medicine (Bolivia). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 216, p. 120-133, 2018.

BAKRI, Y. M.; TALIP, M. A.; AZZIZ, S. S. A. Amini review on *Alphonse* sp. (Annonaceae): Traditional uses, biological activities and phytochemistry. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, p. 200-203, 2017.

BARDAJÍ, D. K. R.; REIS, E. B.; MEDEIROS, T. C. T.; LUCARINI, R.; CROTTI, A. E. M.; MARTINS, C. H. G. Antibacterial activity of commercially available plant-derives essential oils against oral pathogenic bacteria. **Natural Product Research**, v. 30, p.1178, 2016.

BAUER, A. W.; KIRBY, W. M. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, p. 493-496, 1966.

BEIL, W.; BIRKHOLZ, C.; SEWING, K. F. Effects of flavonoids on parietal cell acid secretion, gastric mucosal prostaglandin production and *Helicobacter pylori* growth. **Arzneimittelforschung**, v. 45, n. 6, p. 697- 700, 1995.

BENINI, C.; MAHY, G.; BIZOUX, J.P.; WATHELETC, J.P.; JARDINA, P.; BROSTAUXD, Y.; FAUCONNIERA, M.L. Comparative Chemical and Molecular Variability of *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson forma genuina (Ylang-Ylang) in the Western Indian Ocean Islands: Implication for Valorization. **Chemistry & Biodiversity**, v.9, p. 1389-402. 2012.

BENOVIT, S. C.; GRESSLER, L. T.; SILVA, L. L. GARCIA, O. L.; OKAMOTO, M. H.; PEDRON J. S.; SAMPAIO, L. A.; RODRIGUES, R. V.; HEINZMANN, B. M.; BALDISSEROTTO, B. Anesthesia and transport of Brazilian Flounder, *Paralichthys*

orbignyanus, with essential oil of *Aloisia gratissima* and *Ocimum gratissimum*. **Journal of the Aquaculture Society**, v. 43, 2012.

BICK, I. R. C.; DOUGLAS, G. K. Atheroline, a yellow phenolic alkaloid from *Atherosperma*. **Tetrahedron Letters**, v. 28, p. 2399-2403, 1965.

BRASIL. Ministério da Saúde. Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS. Brasília, 2016. Disponível em: <http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>. Acessado em: 20/07/2018.

BRANDÃO, A.P.M. E.; SANTOS, D.Y.A.C. Chapter 9 – Nutritional Value of the pulp of different sugar apple cultivars (*Annona squamosa* L.). **Nutritional Composition of The Fruit Cultivars**, p.195-214, 2016.

BREMER, B. K.; BREMER, M. W. CHASE, M. F.; FAY, J. L.; REVEAL, D. E.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. **Botanical Journal Linnean Society**, v. 161, p. 105–121, 2009.

BRITO, A. C. S.; OLIVEIRA, A. C.; HENRIQUES, R. M.; CARDOSO, G. M. B.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. In vitro and in vivo antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v 78, p. 409-414, 2012.

BRITO, A. F. *et al.* Ação anti-cancerígena da quercetina no carcinoma hepatocelular: o papel do GLUT-1”. **Revista Portuguesa de Cirurgia**, v. 25, p. 798-806, 2015.

BOLIGON, A. A.; AGERTT, V.; JANOVIK, V.; CRUZ, R. C.; CAMPOS, M. M. A.; GUILLAUME, D.; ATHAYDE, M. L.; SANTOS, A. R. S. Antimycobacterial activity of the fractions and compounds from *Scutia buxifolia*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 45-52, 2012.

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

BONAN, P.R.F.; CACIQUE, A.P.; BOTELHO, B.L.; FARIA, A.K.S.; NOBRE, S.A.M.; PRATA, E.R.B.A. Avaliação do estresse térmico de *Candida albicans* utilizando microplacas e resazurina como indicador de oxidação. In: FÓRUM – DESENVOLVIMENTO REGIONAL: COMPROMISSO DA UNIMONTES, 4. Montes Claros: Unimontes, 2010.

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**, v.64, p. 1269-1275, 2003.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; KEMGNE, A. M.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J.; Antiplasmodial volatile extracts from

Cleistopholis patens Engler & Diels and *Uvariastrum pierreanum* Engl. (Engl. & Diels) (Annonaceae) growing in Cameroon. **Parasitol Research**, v. 108, p. 1211-1217, 2011.

CAISSARD, J. C.; JOLY, C.; BERGOUGNOUX, V.; HUGUENEY, P.; MAURIAT, M.; BUDINO, S. Secretion mechanisms of volatile organic compounds in specialized cells of aromatic plants. **Review Recent Research Developments in Cell Biology**, v. 2, p. 1-15, 2004

CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; SIQUEIRA, J. M. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 647-649, 2005.

CARVALHO, O. V.; Oliveira, F. S.; Saraiva, G. L.; Botelho, C. V.; Ferreira, H. C. C.; Santos, M. R.; Almeida, M. R. Potencial antiviral da quercetina sobre o parvovírus canino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. v.65, p. 353- 358, 2013.

CAVÉ, A. Annonaceae Alkaloids. In: PHILLIPSON, J.D.; ROBERTS, M.F.; ZENK, M.H. The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. **Berlin, New York: Springer-Verlag**, p. 79-101, 1985.

CEAGESP. Normas de classificação de Anonáceas, v, 11. N1, 2013, disponível em <<http://www.ceagesp.gov.br/wp-content/uploads/2015/07/anonaceas.pdf>> acesso 22/01/2017.

CHAICHOMPOO, W.; CHOKCHASIRI, R.; APIRATIKUL, N.; CHAIROUNGDU, A.; YINGYONGNARONGKUL, B.; CHUNGLOK, W.; TOCHARUS, C.; SUKSAMRARN, A. Cytotoxic alkaloids against human colon adenocarcinoma cell line (HT-29) from the seed embryos of *Nelumbo nucifera*. **Medicinal Chemistry Research**, v. 27, p. 393-943, 2018.

CHAMORRO, G.; SALAZAR, M.; MENDOZA, T. Pharmacology and toxicology of *Guatteria gaumeri* and alpha-asarone. **Revista de Investigacion Clinica**, v. 45, p. 597-604, 1993.

CHANDRA, M.; PRAKASH, O.; KUMAR, R.; BACHHETI, R. K.; BHUSHAN, B.; KUMAR, M.; PAN, A. K. β -Selinene-Rich Essential Oils from the Parts of *Callicarpa macrophylla* and Their Antioxidant and Pharmacological Activities. **Medicines**, v. 2, p. 52, 2017.

CHANG, F. R.; YANG, P. Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, E. Y. C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 437-439, 1998.

CHANG, F. R.; CHEN, J. L.; LIN, C. Y.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. C. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 883-889, 1999.

CHANG, H. C.; CHANG, F. R.; WU, Y. C.; LAI, Y. H. Anti-cancer effect of liriodenine on human lung cancer cells. **Kaohsiung Journal of medical Sciences**, v. 20, p. 365-31, 2004.

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

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

CHATURVEDULA, V. S.; PRAKASH, I. Kaempferol glycosides from *Siraitia grosvenorii*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 6, 2011.

CHAVES, M. H.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. macrocarpane, a new sesquiterpene skeleton from the leaves de *Pocelia macrocarpa*. **Journal Brazilian of Chemical Society**, v. 14, p. 16-19, 2003.

CHEN, A. Y.; MACLEAN, D. B. Mass spectra and proton magnetic resonance spectra of some tetrahydroprotoberberine alkaloids. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 46, p. 2501, 1968.

CHEN, I. S.; CHEN, J. J.; TSAI, I. L. Alkaloids from *Hernandia sonora*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 983-986, 1995.

CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; PAN, W. B.; WU, Y. C. Four alkaloids from *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 753-757, 2001.

CHEN, C. H.; HSIEH, T. J.; LIU T. Z.; CHERN, C. L.; HSIEH, P. Y.; CHEN, E. C. Y. Annoglabin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annonontacin from the fruits of *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**, v. 67, p. 1942-1946, 2004.

CHEN, C. Y.; WU, H. M.; CHAO, W. Y.; LEE, C. H. Review oh pharmacological activities of liriodenine. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 7, p. 1067-1070, 2013.

CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO L. V. S.; CORRÊA, M. A.; PIZZOLITO, A. C.; LARA, E. H. G.; MORAES, H. P. Avaliação farmacognóstica antibacteriana de extratos vegetais empregados em gel dentrífcio. **Revista Brasileira Planta Médica**, v. 8, p. 173-182, 2006.

CORIA-TÉLLEZ, A. V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E. M.; OBLEDO-VÁZQUEZ, E. N. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, p. 622-691, 2018.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 1, p.154, 1984.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil, Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v. 5, 1987.

CORRÊA, M. P. Dicionário das Plantas úteis do Brasil, Rio de Janeiro: Imprensa nacional, p. 321, 1926.

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

COSTA, E. V. Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatteriopsis blepharophylla*, *Guatteriopsis friesiana* e *Guatteriopsis hispida* (Annonaceae). Tese de Doutorado, Universidade Federal do Paraná – UFPR. Curitiba, 2009a.

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

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

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

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

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

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

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; NEPEL, A.; BARISON, A. Isoquinoline alkaloids from the of *Xylopia laevigata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, p. 331-334, 2013e.

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

CRITCHFIELD, J. W.; BUTERA, S. T.; FOLKS, T. M. Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. **AIDS Research Human Retroviruses**, v. 12, p. 39-46, 1996.

CROZIER, A.; LEAN, M. E. J.; MCDONALD, M. S.; BLACK, C. Quantitative analysis of the flavonoid content of commercial tomatoes, onions, lettuce and celery. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 45, p. 590- 595, 1997.

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

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 bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, p. 872-875, 2011.

DASH, G. K.; GANAPATHY, S.; SURESH, P.; PANDA, S. K.; SAHU, S. K. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Annona squamosa* leaves. **Indian Journal Natural Products**, v. 17, p. 32-35, 2001.

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

DE LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA-JARDIM, I.; COSTA, E. V. In Vitro Atilishmanial and Cytotoxic Activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 4, p. 692-702, 2012.

DE MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 110, p. 165-170, 2007.

DE OLIVEIRA, A. B.; DE OLIVEIRA, G. G.; CARAZZA, F.; MAIA, J. G. S. Geovanine, a new azaanthracene alkaloid from *Annona ambotay* aubl. **Phytochemistry**, 26, 2650-2651, 1987.

DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic approach. **Wiley & Sons**, v.3, p. 187-192, 2009.

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

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 241- 249, 2007.

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

DUTRA, L. M.; BOMFIM, L. M.; ROCHA, S. L. A.; NEPEL, A.; SOARES, M. B. P.; BARISON, A.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. ent-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3315-3320, 2014.

EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTPS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Chemical Systematic of Ecology**, v. 46, p. 145-151, 2013.

EULER, K. L.; ALAM, M. Isolation of Kaempferitrin from *Justicia spicigera*. **Journal Natural Products**, v. 45, p. 220-221, 1982.

FADAEINASAB, M.; TAHA, H.; FAUZI, P. N. M.; ALI, H. M.; WIDYAWARUYANTI, A. Anti-malarial activity of isoquinoline alkaloids from the stem bark of *Actinodaphne macrophylla*. **Natural Product Communications**, v. 10, p. 1541-1542, 2015.

FELFILI, J. M. Estudos de vegetação para subsidiar a criação das Reservas Extrativistas Barra do Pacuí e Buritizeiro - MG. Brasília: MMA, p.109, 2010.

FERNANDES, M. Z. L. C. M.; FERNANDES, R. M.; BORBA, H. R. Efeito anti-helmíntico dos extratos aquosos e etanólicos da *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde) sobre o nematóide *Ascaridia galli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, p. 124-129, 2009.

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

FERRAZ, R. P. C.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, N. C.; SOARES, M. B. P.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Cytotoxic properties of the leaf essential oils of *Guatteria blepharophylla* and *Guatteria hispida* (Annonaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, p. 228-232, 2014.

FERREIRA, G. et al. Caracterización de los frutos de atemoya (*Annona cherimoia* Mill. x *Annona squamosa* L.) cv. Thompson In: CONGRESSO INTERNACIONAL DE

ANONÁCEAS, 3, 2002, Quilhota, Chile. Anais da Sociedade Internacional de Anonáceas, Universidade Católica de Val Paraíso, p. 29-31, 2002.

FERREIRA, A. K. R.; LOURENÇO, F. R.; YOUNG, M. C. M.; LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; SUFFREDINIC, I. B.; LOPES, P. S.; MORENO, P. R. H. Chemical composition and biological activities of *Guatteria elliptica* R. E. Fries (Annonaceae) essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 30, p. 1-9, 2017.

FIENENA, R. F.; RASOANAIVO, L. H.; WADOUACHI, A.; RAJEMIARIMIRAHLO, M.; RAMAHAMBIMANANA, J. K.; RAHARISOLOLALAO, A. Isoquinoline alkaloids from stem bark of *Colubrina decipiens* (Baill.) Copuron. **International Journal of Chemical Studies**, v. 4, p. 117, 2016.

FIGUÊIREDO, F. R. S. D. N.; DELMONDES, G. A. ; CRUZ, L. P.; NASCIMENTO, E. A.; SAULO, R. T.; LEMOS, I. C. S.; CUNHA, F. A. B.; GOMEZ, M. C. V.; CATHIA, C.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; FELIPE, C. F. B.; MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M. R. Evaluation of the anti-leishmania and anti-trypanosoma activity of ethanolic extract from the leaves of *Annona squamosa* L. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 24, p. 173-179, 2016.

FLOR, A. S. S. O.; BARBOSA, W. L. R. Sabedoria popular no uso de plantas medicinais pelos moradores do bairro do sossego no distrito de Marudá-PA. **Revista Brasileira Planta Medica**, v. 17, p. 757-768, 2015.

FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A, L. Etnobotânica na reserva extrativista Marinha de Arraial do Cabo, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, p. 177-190, 2004.

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

FORGACS, P.; DESCONCLOIS, J. F.; MANSARD, D.; PROVOST, J.; TIBERGHIE, R.; TOCQUER, S.; TOUCH, A. Dopamine and tetrahydroisoquinoline alkaloids of *Annona reticulata*. **Planta Medicinal Phytotherapy**, v. 10, 1981.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ARIAS, A. R.; GUY, I.; GUINAUDEAU, H.; HEINZEN, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382-384, 2007.

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae Essential Oils: A Review. **Journal of Essential oil Research**, v. 11, p. 131-142, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, p. 374, 2007.

GURST, E. J. NMR and Structure of D-glucose. **Journal of Chemical Education**, v. 68, 1991.

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

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, II. **Journal of Natural Products**, v. 42, p. 325-360, 1979.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, III. **Journal of Natural Products**, v. 46, p. 761-835, 1983.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids IV. **Journal of Natural Products**, v. 51, p. 389-474, 1988.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, V. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1033-1135, 1994.

GUO, X.; TANG, C. C.; THOMAS, D. C.; COUVREUR, T. L. P.; SAUNDERS, R. M. K. A mega-phylogeny of the Annonaceae: taxonomic placement of five enigmatic genera and support for a new tribe, Phoeniciantheae. **Scientific Reports**, v. 7, p. 7323, 2017.

HARBORNE, J. B. Flavonoids and the evolution of the Angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 5, p. 7-22, 1977.

HARBORNE, J. B. Phenolics. In: MANN, J.; DAVIDSON, R. S.; HOBBS, J. B.; BANTHORPE, D. V. Natural Products. Their chemistry and biological significance. 1. ed. New York: **Longman scientific & Technical**, p. 361-388, 1994.

HARBORNE, J. B. Classes and function of secondary products. In: Walton NJ, Brown DE, editores. Chemicals from Plants, Perspectives off Secondary Plant Product. London: **Imperial College Press**, 1999.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today**, v. 5(7), p. 294-300, 2000.

HASSAN, H. M. A. A Short History of the Use of Plants as Medicines from Ancient Times. **Chimia**, v. 69, p. 622-623, 2015.

HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; RAHARISOLOLALAO, A. Annonaceae alkaloids. 30. Alkaloids from *Xylopi bruxifolia* and *Xylopi danguyella*. **Journal of Natural Products**, v. 44, p. 551-556, 1981.

HOSTETTMANN, K.; QUEIROZ, E. F.; VIEIRA, P. C. Princípios Ativos de Plantas Superiores. **Editora UFSCar**, São Paulo, 2003.

HUTCHINSON, J. The Genera of Flowering Plants. **Oxford: University Press**, v. 1, 1974.

IDOWU, T. O.; OGUNDAINI, A. O.; SALAU, A. O.; OBUOTOR, E. M.; BEZABIH, M.; ABEGAZ, B. M. Doubly linked, A-type proanthocyanidin trimer and other constituents of *Ixora coccinea* leaves and their antioxidant and antibacterial proprieties. **Phytochemistry**, v. 71, p. 2092-2098, 2010.

IWASA, K.; KAMIGAUCHI, M.; TAKAO, N. Metabolism of salsolinol by tissue cultures of some papaveraceae. **Phytochemistry**, v. 30, p. 2973-2975, 1991.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, v. 51, p. 45-46, 2006.

ISMAIL, N. H.; ALIAS, A.; OSMAN, C. P. Alkaloids and anthraquinones from Malaysian flora, In: Phytochemicals – A global perspective of their role in nutrition and health, Dr Venketeshwer Rao (Ed.), In Tech, Rijeka, p. 287-306, 2012.

JARAMILLO, M. C.; Arango, G. J; González, M. C.; Robledo, S. M.; Velez, I. D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v. 71, p. 183-186, 2000.

JOSSANG, A.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Alcaloïdes des Annonacées XVII1: Alcaloides Del' *Enantia polycarpa* ENGL. et DIELS. **Planta Medica**, v. 32, p. 249-257, 1977.

JOWEL, E. M.; CABANILLAS, J.; TOWERS, G. H. N. An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Mestizo people of Suni Miraño, Loreto, Peru. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 53, p. 149-156, 1996.

JUDD, W.S. et al. Plant Systematics: a phylogenetic approach. **Massachusetts: Sinauer Associates**, p. 598, 1999.

JUSTO, C. F. Aspectos ecofisiológicos de plantas jovens de *Xylopia brasiliensis* Sprengel em sub-bosque de mata e de eucaliptal. Dissertação de Mestrado em agronomia. Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

KHAN, M. R.; KIHARA, M.; OMOLOSO, A. D. Antimicrobial activity of *Michelia champaca*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 744-748, 2002.

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

KIATKOSKI, E. C. Estudo Fitoquímico dos Frutos e Sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel e *Pterodon polygalaeflorus* Benth. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná-UFPR, Curitiba, 2011.

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

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

KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; SADAN, S. V. G. S.; JHA, S. R.; UPASANI, S. M.; MAHESHWARI, V. L. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids os *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v. 58, p. 33-37, 2001.

KURNIK-LUCKA, M.; PANULA, P.; BUGAJSKI, A.; GIL, K. Salsolinol: na Unintelligible and Double-Faced Molecule-Lessons Learned from In Vivo and In Vitro Experiments. **Neurotox Research**, v. 33, p. 485-514, 2017.

KUO, R. Y.; CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; TENG, C. M.; YEN, H. F.; WU, Y. C. Antiplatlet activity of *N*-methoxy carbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, p. 421-425, 2001.

LAKSHMI, V.; PANDEY, K.; MISHRA, S.; SRIVASTAVA, S.; MISHRA, M.; AGARWAL, S. K. An overview of family Hernandiaceae. **Records of Natural Products**, v. 3, p. 1-22, 2009.

LAMIEN-MEDA, A.; SCHMIDERER, C.; LOHWASSER, U.; BÖRNER, A.; FRANZ, C.; NOVAK, J. Variability of the essential oil composition in the sage collection of the Genebank Gatersleben: a new viridiflorol chemotype. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, p. 75-82, 2010.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVÉ, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of Annonaceae XXIX. Alkaloids of *Annona muricata* L. **Planta Medica**, v. 42, p.37-44, 1981.

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

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

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; TOHAMI, M. E. Alkaloids of Annonaceae. XXXV. Alkaloids of *Desmos Tiebaghiensis*. **Journal of Natural Products**, v. 45, p. 617-623, 1982c.

LECANTE, A.; ROBERT, F.; BLANDINIÈRES, P. A.; ROOS, C. Anti-corrosive properties of *S. tinctoria* and *G. ouregou* alkaloid extracts on low carbon steel. **Current Applied Physics**, v. 11, p. 714-724, 2011.

LEE, Y. L.; DING, P. Production of Essential Oil in Plants: Ontogeny, Secretory Structures and Seasonal Variations. **Pertanika Journal of Scholarly Research Reviews**, v. 2, p. 1, 2016.

LI, H. T.; WU, H. M.; CHEN, H. L.; LIU, C. M.; CHEN, C. Y. The Pharmacological Activities of (-)-Anonaine. **Molecules**, v. 18, p. 8257-8263, 2013.

LI, B.; ZHU, L. J.; WU, F. B.; YAN, F.; ZHANG, X.; Y, X. S. Flavonoids from *Matteuccia struthiopteris* and Their Anti-influenza (H1N1) activity. **Journal of Natural products**, v. 78, p. 987-995, 2015.

LIMA, L. A. R. S.; LOPES, M. T. P.; CUNHA, M. M.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Evaluation of the cytotoxic activity of seeds of *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 629-634, 2012.

LIMA, B. R.; SILVA, F. M. A.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA-FILHO, F. A.; PEREIRA-JUNIOR, R. C.; TASCO, A. H.; SALVADOR, M. J.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Onychopetalum amazonicum* R.E.Fr. **Natural products Research**, p. 1-4, 2016.

LIMA, B. R.; SILVA, F. M. A.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; MACIEL, J. B.; FERNANDES, C. C.; OLIVEIRA, A. C.; TADEI, W. P.; KOOLEN, H. H.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil from the leaves of *Onychopetalum periquino* (Rusby) D. M. Johnson & N. A. Murray. **Natural product Research**, p. 1-5, 2019.

LIMA, B. R.; SILVA, F. M. A.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A.; SILVA-FILHO, F. A.; BARISON, A.; COSTA, E. V.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Integrative Approach Based on Leaf Spray Mass Spectrometry, HPLC-DAD-MS/MS, and NMR for Comprehensive Characterization of Isoquinoline-Derived Alkaloids in Leaves of *Onychopetalum amazonicum* R. E. Fr. **Journal Brazilian the Chemistry Society**, v. 31, p. 1-11, 2020.

LIN, L.; YU, Q.; YAN, X.; HANG, W.; ZHENG, J.; XING, J.; HUANG, B. Direct infusion mass spectrometry or liquid chromatography mass spectrometry for human metabonomics? A serum metabonomic study of kidney cancer. **Analyst**, v. 135, p. 2970-2978, 2010.

LIU, J.; WANG, H.; MANICKE, N.E.; LIN, J-M.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Development, Characterization, and Application of Paper Spray Ionization. **Analytical Chemistry**, v. 82, p. 2463–2471, 2010.

LIU, J.; WANG, H.; COOKS, R. G.; OUYANG, Z. Leaf spray: direct chemical analysis of plant material and living plants by mass spectrometry. **Analytical Chemistry**, v.83, p. 7608-7613, 2011.

LOBÃO, A. Q.; FORZZA, R. C.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae da Reserva Biológica da Represa do Grama, Descoberto, Minas Gerais, Brasil, com uma Nova Espécie, *Unonopsis bauxitae*. **Rodriguésia**, v. 57, p. 137-147, 2006.

LOBÃO, A. Q.; LOPES, J. C.; MELLO-SILVA, R. *Check-list* das Annonaceae do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia**, Série Botânica, v. 73, p. 123-126, 2018.

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

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Plantarum**, p. 352, 1992.

LÚCIO, A. S. S. C. Alcaloides Azafenantrenos Isolados de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, 2011.

LUNDSTRÖM, J. The Occurrence of Simple Isoquinolines in Plants. In: PHILLIPSON, J. D.; ROBERTS, M. F.; ZENK, M. H. (eds). The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. Proceedings in Life Sciences. **Springer**, Berlin, Heidelberg, 1985.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v.52, p. 61-94, 2001.

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

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

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. TH.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q.; ERKENS, R. H. J. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. **Nordic Journal of Botany**, v.29, p. 257-356, 2011.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110271>>. Acessado em: 12/06/2018.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219>>. Acessado em: 14/09/2018.

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

MAGALHÃES, L. A. M.; LIMA, M. P.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R.; PINTO, A. C. S.; TADEI, W. P. Chemical Composition and Larvicidal Activity against *Aedes aegypti* Larvae of Essential Oils from Four *Guarea* Species. **Molecules**, v. 15, p. 5734-5741, 2010.

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

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

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, A. C. M.; CARREIRA, L. M. M.; OLIVEIRA, J.; ARAÚJO, J. S. Leaf volatile oils from four Brazilian *Xylopia* species. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 20, p. 478-480, 2005b.

MAJRASHI, T. A.; ZULFIQAR, F.; CHITTIBOYINA, A. G.; ALI, Z.; KHAN, I. A. Isoquinoline alkaloids from *Asimina triloba*. **Natural product Research**, p. 1-7, 2018.

MANICA, I. Taxonomia, morfologia e anatomia. In: SÃO JOSÉ, A. R.; SOUZA, I. V. B.; MORAIS, O. M.; REBOLÇAS, T. N. H. Anonáceas, produção e mercado (Pinha, Graviola, Atemóia e cherimlia). **Vitória da conquista: DZF/ EUSB**, p. 2035, 1997.

MARIA, C. A. B.; MOREIRA, R. F. A. Métodos para análises de ácido clorogênico. *Química Nova*, v. 27, p. 586-592, 2004.

MARQUES, J. L.; VOLCÃO, L. M.; RIBEIRO, G. A. Potencial antibacteriano do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. frente a cepas bacterianas patogênicas e deteriorantes. Anais do XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Bento Gonçalves-RS, 2012.

MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, A. M.; ESTRADA-REYESB, R.; ESCALONA, A. G. A.; VELÁZQUEZ, I. L.; MARTÍNEZ-MOTA, L.; MORENOD, J.; HEINZE, G. Antidepressant-like effects of an alkaloid extract of the aerial parts of *Annona cherimolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.139, p. 164-170, 2012.

MARTIUS, C. F. Reise in Brasilien in den Jahren 1817 bis 1820 gemacht von weiland Dr. Joh. Bapt. von Spix und Dr. Carl Friedr. Phil. von Martius 3: 1237. **Reprint ed. K. Magdefrau**. 1966. Brockhaus, Stuttgart, 1831.

MASSONI, J.; FOREST, F.; SAUQUET, H. Increased sampling of both genes and taxa improves resolution of phylogenetic relationships within Magnoliidae, a large and early-diverging clade of angiosperms. **Molecular Phylogenetic Evolution**, v. 42, p. 1-15, 2014.

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

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

MONGGOOT, S.; PRIPDEEVECH, P. Chemical Composition and Antibacterial Activities of *Goniothalamus marcanii* Flower Essential Oil. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 7, p. 144, 2017.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p.105-111, 2001.

MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; CARVALHO, L. S.; ANDRADE, N. J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from verbenaceae species: alternative sources of (*E*)-caryophyllene and germacrene-D. **Química Nova**, v. 34, p. 1550, 2011.

MONTENEGRO, H., GUTIERREZ, M., ROMERO, L.I., ORTEGA-BARRÍA, E., CAPSON, T.L., RIOS, L.C. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with leishmanicidal activity. **Planta Medica**, v. 69, p. 677-679, 2003.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Biochemical Systematic Ecology**, v. 31, p. 535-537, 2003.

MORTON, J. F. Atlas of Medicinal Plants of Middle America, Charles C. Thomas, Publisher, **Springfield**, Illinois, USA, v. 1, 1981.

MURILLO-A, J.; RESTREPO, D. As anonáceas da região de Araracuara Estudos na Amazônia Amazônica-biana. **XX Suporte Editorial, Bogotá**, p. 218, 2000.

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

NAIGRE, R.; KALCK, P.; ROQUES, C.; ROUX, I.; MICHEL, G. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. **Planta Medica**, v. 62, p. 275, 1996.

NASCIMENTO, F.C.; BOAVENTURA, M.A.D.; Assunção, A.C.S.; Pimenta, L.P.S. Acetogeninas de Anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, v.26, p. 319-322, 2003.

NASCIMENTO, M. N. G.; JUNQUEIRA, J. G. M.; TEREZAN, A. P.; SEVERINO, R. P.; SILVA, T. S.; MARTINS, H. G.; SEVERINO, V. G. P. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Xylopia aromatica* (Annonaceae) Flowers and Leaves. **Revista Virtual de Química**, v. 10, p. 1578, 2018.

NEWMAN, D. J.; & CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal Natural Product**, v. 79 (3), p. 629-661, 2016.

NGUYEN, T. H. A.; NGUYEN, T. H. V.; LE, T. H. N.; TRAN, V. S.; Chemical study of constituents of *Fissistigma capitatum* Merr. **Tap Chi Hoa Hoc**, v. 43, 475-478, 2005.

NGUYEN, T. P.; TRAN, C. L.; VUONG, C. H.; DO, T. H. T.; LE, T. D.; MAI, D.T.; PHAN, N. M. Flavonoids with hepatoprotective activity from the leaves of *Cleome viscosa* L. **Natural Product Research**, v. 31, p. 2587-2592, 2017.

NODARI, R. O e GUERRA, M. P. Biodiversidade: Aspectos Biológicos, Geográficos, Legais e Éticos. In: Farmacognosia: da planta ao Medicamento. Eds SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. D.; MENTZ, L. A. E.; PETRICK, P. R. Porto Alegre/Florianópolis: **Editora da Universidade UFRGS/Editora da UFSC**, p. 11-24, 2000.

NOGUEIRA, E. A.; MELO, N. D. C.; CASER, D. V. Anonáceas: do Brasil império a atemóia. Frutas e Derivados. p. 45-47, 2006. Disponível em: <http://www.ibraf.org.br/x-re/f-revista.html>. Acesso em 29/03/2017.

Normas de desempenho para Testes de Sensibilidade Antimicrobiana: 28º Suplemento Informativo. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute), 2018.

NOVAES, P.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, D. Y. A. C. Flavonols from *Annona coriácea* Mart. (Annonaceae). **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 78, p. 77-80, 2018.

NOVÁK, J.; PREININGER, V. Chemotaxonomic review of the genus *Papaver*. **Preslia**, v. 59, p. 1-13, 1987.

NUENGCHAMNONG, N.; BOONPATHANASAK, S.; TEPWITUKKIJ, P. Rapid Screening of Antioxidant Compounds in Homemade Fruit Fermented Juice Using an On Line LC-ESI-MS/MS and DPPH Assay. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 38, p. 430-438, 2011.

NUNES, C. R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; OLIVEIRA, D. B. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **VÉRTICES, Campos dos Goytacazes/ RJ**, v.14, p. 39-57, 2012.

OBERLIES, N. H.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Structure activity relationships of diverse Annonaceous acetogenins against multidrug resistant human mammary adenocarcinoma (MCF-7/Adr) cells. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 40, p. 2102-2106, 1997.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

ORTIZ, A. A.; SUAREZ, L. E. C.; PATIÑO, G. S. Aporfinoídes en hojas de *Oxandra longipetala* R. E. FR. (Annonaceae). **Scientia et Technica**, v. 13, p. 19-22, 2007.

OKOH, O. O.; SADIMENKO, A. P.; AFOLAYAN, A. J. Comparative evaluation of the antibacterial activities of the essential oils of *Rosmarinus officinalis* L. obtained by hydrodistillation and solvent free microwave extraction methods. **Food Chemistry**, v. 120, p. 308-312, 2010.

OLIVEIRA, S. L.; GUERRA, N. B.; MACIEL, M. I. S.; LIVERA, A. V. S. Polyphenoloxidase activity, polyphenols concentration and Browning intensity during soursop (*Annona muricata*, L.) maturation. **Journal of Food Science**, v. 59, p. 1050-1052, 1994.

OLIVEIRA, E. S. C. Investigação química e farmacológica de Espécies vegetais contra a leishmaniose. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas – UFAM. Manaus, 2012.

OLIVEIRA, E. S. C.; AMARAL, A. C. F.; LIMA, E. S.; SILVA, J. R. A. Chemical composition and biological activities of *Bocageopsis multiflora* oil essential. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, p.161-165, 2014.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO T. M.; NISHIKAWA S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p. 301-307, 2008.

OTAKI, N.; KIMIRA, M.; KATSUMATA, S.; UEHARA, M.; WATANABE, S.; SUZUKI, K. Distribution and major sources of flavonoids intakes in the middle-aged Japanese womem. **Journal of Clinical Biochemistry Nutrition**, v. 44, p. 231–238, 2009.

PADMANABHAN, P.; PALIYATH, G. Annonaceous Fruits. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 169-173, 2016.

PADMA, P.; PRAMOD, N. P.; THYAGARAJAN, S. P.; KHOSA, R. L. Effect of the extract of *Annona muricata* and *Petunia nyctaginiflora* on Herpes simplex virus. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 61, p. 81-83, 1998.

PADMAJA, V.; THANKAMANY, V.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; HISHAM, A. Biological activities of *Annona glabra*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p. 21-24, 1995.

PAES, M. M.; VEJA, M. R. G.; CORTES, D.; KANASHIRO, M. M. Cytotoxic Potencial Acetogenins of *Annona Genus*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, p. 945-980, 2016.

PALAZZO, M.C.; WRIGHT, H. L.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; MORIARITY, D. M.; HABER, W. A.; SETZER, W. N. Chemical Compositions and Biological Activities of Leaf Essential Oils of Six Species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. **Records Natural Products**, v. 3, p. 153-160, 2009.

PATEL, S.; PATEL, J. K. A review on a miracle fruits of *Annona muricata*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 5, p. 137-148, 2016.

PAULINHO-NETO, H. F.; OLIVEIRA, P. E. A.M. As Anonáceas e os besouros. **Revista Ciência Hoje**, v.38, p. 59-61, 2006.

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

PETRAKIS, V. P.; ROUSSIS, V.; PAPADIMITRIOU, D.; VAGIAS, C.; TSITSIMPIKOU, C. The effect of terpenoid extracts from 15 pine species on the feeding behavioural sequence of the late instars of the pine processionary caterpillar *Thaumetopoea pityocampa*. **Behavioural Processes**, v. 69, p. 303-322, 2005.

PHILLIPSON, J. D.; ROBERTS, M. F.; ZENK, M. H. The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids. **Springer-Verlag**, Berlin Heidelberg, 1985.

PIRIE, M. D.; CHATROU, L. W.; MOLS, J. B.; ERKENS, R. H. J.; OOSTERHOF, J. 'Andeancentred' genera in the short-branch clade of Annonaceae: testing biogeographical hypotheses using phylogeny reconstruction and molecular dating. **Journal of Biogeography**, Oxford, v. 33, p. 31-46, 2006.

PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; GONDIM-JÚNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). **Química Nova**, v. 30, p. 838-841, 2007.

QAYED, W. S.; ABORAIA, A. S.; ABDEL-RAHMAN, H. M.; YOUSSEF, A. F. Annonaceous Acetogenins as a new anticancer agente. **Der Pharma Chemica**, v. 7, p. 24-35, 2015.

QI, H.; CHEM, W.; SHI, Y. Chemical composition of *Aralia chinesis* L. and antibacterial activity. **Zhongcaoyao**, v. 41, p. 1948-1950, 2010.

RABELO, D. M.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CHAVES, Y. O.; BASTOS, I. S.; SALOMÉ, K. S. Isoquinoline alkaloids and investigation of the antibacterial and antiplasmodial activities of *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, p. 1453-1458, 2014.

RABÊLO, S. V.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; DUTRA, L. M.; NUNES, P. X.; TOMAZ, J. C.; OLIVEIRA, G. G.; LOPÉS, N. P.; SANTOS, M. F. C.; ALMEIDA, J. R. S. Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimola* X *Annona squamosa*). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, 419-421, 2015.

RAGASA, Y. R.; GENEVEVE, S.; OSCAR B. T.; MING-JAW, D.; SHEN CHIEN-CHANG. Acetogenins from *Annona muricata*. **Pharmacognosy Journal**, v. 4, p.32-37, 2012.

RAHMAN, M. M.; WAHED, M. I. I.; BISWAS, M. H. U.; SADIK, G. M. G.; HAQUE, M. E. In vitro antibacterial activity of the compounds of *Trapa bispinosa* Roxb. **The Science**, v. 1, p. 214-216, 2001.

RHO, H. S.; GHIMERAY, A. K.; YOO, D. S.; AHN, S. M.; KWON, S. S.; LEE, K. H.; CHO, D. H.; CHO, J. Y. Kaempferol and Kaempferol Rhamnosides with Depigmenting and Anti-Inflammatory Properties. **Molecules**, v. 16, p. 3338-3344, 2011.

RAJU, D.U., BABU, K.S., RAVADA, S.C.R., GOLAKOTI, T. Isoquinoline alkaloid, flavonoids and a triol from leaves of *Annona cherimola*. **Journal of Applicable Chemical**, v. 4, p. 120-126, 2015.

RASOANAIVO, P.; RATSIMAMANGA-URVERG, S.; MESSANA, I.; DE VICENTE, Y.; GALEFFI, C. Cassinopin, a kaempferol trirhamnoside from *Cassinopsis madagascariensis*. **Phytochemistry**, v. 29, p. 2040-2043, 1990.

REVILLA, J. Plantas úteis da Bacia Amazônica. Manaus: **INPA/SEBRAE**, 2002.

RIBEIRO, J. E. L. S.; MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J. M.; WEBBER, A. Annonaceae. In: RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. (Eds.). Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central, p.121-135.

DFID (Departamento for International Development), INPA, Manaus – Amazonas, p. 121-135, 1999.

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

RINALDI, M. V. N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo-USP, São Paulo, 2007.

RINALDI, M. V. N.; DÍAZ, I. C. E.; SUFFREDINI, I. B.; MORENO, P. R. H. Alkaloids and biological activity of biribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 77-83, 2017.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, p. 401-436, 1999.

RODRIGUES, A. C. B. C.; BOMFIM, LARISSA M.; NEVES, S. P.; MENEZES, L. R. A.; DIAS, R. B.; SOARES, M. B. P.; PRATA, A.P.N.; ROCHA, C. A. G.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumor properties of the essential oil from the leaves of *Duguetia gardneriana*. **Planta Medica**, v. 81, p. 798-803, 2015.

SAHPAZ, S.; GONZALEZ, M. C.; HOCQUEMILLER, R.; ZAFRA-POLO, M. C.; CORTES, D. Annosenegalin and anagalene: two cytotoxic monotetrahydrofuran acetogenins from *Annona senegalensis* and *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 42(1), p. 103-107, 1996.

SÁNCHEZ-RESÉNDIZ, J.; TEJADA, A. L. L. Cholesterol lowering effect of *Guatteria gaumeri* (preliminary report). **Journal of Ethnopharmacol**, v. 6, p. 239-242, 1982.

SANEWSKI, G. Custard apples, cultivation and crop protection. Queensland Department of Primary Industries, Brisbane, Australia, p. 103, 1991.

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

SANTOS, A.F.; SANT'ANA, A.E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, p. 115-120, 2001.

SANTOS, A. S.; ALVES, S. M.; FIGUEIRÊDO, F. J. C.; ROCHA NETO, O. G. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. **EMBRAPA: BELÉM-Pará**, 2004.

SANTOS, P. F. Novos diterpenos isolados das raízes de *Xylopia langsdorffiana* St-Hil & Tul. (Annonaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, 2011.

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

SANTOS, C. A. M.; REICHERT, C. L.; SANTOS, T. G. Alcaloides Isoquinolínicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. **Porto Alegre: Artmed**, 2017a.

SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação científica (UNIFAP)**, v. 7, p. 29-35, 2017b.

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

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, M. G.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p. 275-280, 2004.

SATO, M.; TSUCHIYA, H.; TAKASE, I. Antibacterial activity of plant flavonoid (sophoraflavanone G) against periodontopathic and opportunist bacteria. **Shika Yakubutsu Ryoho**, v. 15, p 33-39, 1996.

SCHULTES, R. E. Plants in treating senile dementia in the northwest Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 18, p. 129-135, 1993.

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

SEIDEL, V.; BAILLEUL, F.; WATERMAN, P. G. A diterpene, a sesquiterpene and a flavonolglycoside from *Piptostigma fasciculate* (Annonaceae). **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 27, p. 543-545, 1999.

Serviço Florestal Brasileiro. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento Florestas do Brasil em resumo, 2010.

SHAALAN, E. A. S.; CANYON, D.; YOUNES, M. W. F.; ABDEL- WAHAB, H. & MANSOUR, A. H. A review of botanical phytochemicals with mosquitocidal potential. **Environonment International**, v.31, p. 1149-1166, 2005.

SHANGGUAN, Y.; HE, J.; KANG, Y.; WANG, Y.; YANG, P.; GUO, J.; HUANG, J. Strutural characterisation of alkaloids in leaves and roots of *Stephania kwangsiensis* by LC-QTOF-MS. **Phytochemical Analysis**, v. 29, p. 101-111, 2018.

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

SILVA, N. L., ZOBIOLE, N.N., SILVA, D.B., SARTORI, A.L.B., OLIVEIRA, R.J., OLIVEIRA, R.J., PINTO, M.E.A., SANTOS, F.J.L., SIQUEIRA, J.M. Chemical constituents and phytotoxic activity of leaves of *Annona nutans*. **Química Nova**, v. 38, p. 640-644, 2007b.

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

SILVA, E. B. P.; SOARES, M. G.; MARIANE, B.; VALLIM, M. A.; PASCOU, R. C.; SARTORELLI, P.; LAGO, J. H. G. The Seasonal Variation of the Chemical Composition of Essential Oils from *Porcelia macrocarpa* R.E. Fries (Annonaceae) and Their Antimicrobial Activity. **Molecules**, v. 18, 13574-13587, 2013.

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

SILVA, D.; CASANOVA, L. M.; MARCONDES, M. C.; ESPINDOLA-NETTO, J. M.; PAIXÃO, L. P.; MELO, G. O.; COSTA, S. S. Antidiabetic Activity of *Sedum dendroideum*: Metabolic Enzymes as Putative Targets for the Bioactive Flavonoid Kaempferitrin. **IUBMB Life**, v. 66, p. 361, 2014b.

SILVA, F. M. A.; RIBEIRO, B. R.; SOARES, E. R.; ALMEIDA, R. A., SILVA-FILHO, F. A., CORRÊA, W. R., SALVADOR, M. J., SOUZA, A. Q. L., KOOLEN, H. H. F., SOUZA, A. D. L., PINHEIRO, M. L. B. Polycarpol in *Unonopsis*, *Bocageopsis* and *Onychopetalum* Amazonian species: chemosystematical implications and antimicrobial evaluation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, p. 11-15, 2015a.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; PEREIRA, J. L. S.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemotaxonomy of the Amazonian *Unonopsis* species based on GC-MS and chemometric analysis of the leaf essential oil. **Records of Natural Products**, v. 9, p. 530-537, 2015b.

SILVA, F. M. A.; SILVA-FILHO, F. A.; LIMA, B. R.; ALMEIDA, R.A.; SOARES, E. R.; KOOLEN H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Chemotaxonomy of the Amazonian *Unonopsis* species based on leaf alkaloid fingerprint direct infusion ESI-MS and chemometric analysis. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 27, p. 599-604, 2016a.

SILVA, F. M. A.; SILVA-FILHO, F. A.; LIMA, B. R.; ALMEIDA, R. A.; MENDONÇA, D. M.; PEREIRA-JUNIOR, R. C.; DUTRA, L. M.; BARISON, A.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. (N)-formyl-norglaucine rotamers from *Unonopsis stipitata* Diels. **Helvetica Chimica Acta**, v. 99, p. 494-498, 2016b.

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

SILVA, F. M. A.; SILVA-FILHO, F. A.; SOUZA, C. A. S.; MACIEL, J. B.; COSTA, E. V.; BARISON, A.; KOOLEN, H. H. F.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B. Morphinadienone and other isoquinoline-derived alkaloids from the trunk bark of *Unonopsis floribunda* Diels (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 79, p. 12-14, 2018a.

SILVA, F. M. A.; HANNA, A. C. S.; SOUZA, A. A.; SILVA-FILHO, F.A.; CANHOTO, O. M. F.; MAGALHÃES, A.; BENEVIDES, P. J. C; AZEVEDO, M. B. M.; SIANI, A. C.; POHLIT, A. M.; SOUZA, A. D. L.; KOOLEN, H. H. F. Integrative Analysis Based on HPLC-DAD-MS/MS and NMR of *Bertholletia excelsa* Bark Biomass Residues: Determination of Ellagic Acid Derivatives. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.00, p. 1-7, 2019.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Brazilian Journal of pharmacognosy**, v. 18, p. 618-626, 2008.

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, F. X., Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos, 6ª. ed. **LTC Livros Técnicos e Científicos**, Rio de Janeiro, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. **Editora da Universidade Federal de Santa Catarina**, 1999.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. ÓLEOS VOLÁTEIS. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. & PETROVICK, P. R. (ed.) Farmacognosia. **Editora da Universidade Federal de Santa Catarina**, p. 387-416, 2000.

SINGH, G.; MARIMUTHU, P.; HELUANI, C. S.; CATALAN, C. A. N. Antioxidant and Biocidal Activities of *Carum nigrum* (Seed) Essential Oil, Oleoresin, and Their Selected Components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, 174-181, 2006.

SINGH, T. P.; SINGH, R. K.; MALIK, P. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Annona squamosa* Linn bark. **Journal of Scientific and Innovative Research**, v. 3, p. 60-64, 2014.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILLO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD-ESI-MSn and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14-30, 2015.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* leach. **Química Nova**, v. 21, p. 557-550, 1998.

SIQUEIRA, C. A. T.; OLIANI, J.; SARTORATTO, A.; QUEIROGA, C. L.; MORENO, P. R. H.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; FISCHER, D. C. H. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 33-40, 2011.

SITI, H. A. G.; NOR, A. M. A.; MAILINA, J. M. M.; SAIFUL, A. J.; MAZURAH, M. I.; MOHD, F. Z. P. Chemical compositions and antimicrobial activity of twig essential oils from three *Xylopi*a (Annonaceae) species. **African Journal of Biotechnology**, v. 15, p. 356-362, 2016.

SNENE, A.; MOKNI, R. E.; JMII, H.; Jlassi, I.; JAIDANE, H.; FALCONIERI, D.; PIRAS, A.; DHAOUADI, H.; PORCEDDA, S.; HAMMAMI, S. *In vitro* antimicrobial, antioxidant and antiviral activities of the essential oil and various extracts of wild (*Daucus virgatus* (Poir.) Maire) from Tunisia. **Industrial Crops and products**, v.102, p. 109-115, 2017.

SLIMESTARD, R.; MARSTON, A.; MAVI, S.; HOSTETTMANN, K. Larvicidal constituents of *Melantheria albinervia*. **Planta Medica**, v. 61, p. 562-563, 1995.

SOARES, E. R. Estudo Químico e Biológico de *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae). Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas - UFAM, Manaus, 2014.

SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDA, R. A.; LIMA, B. R.; FILHO, F. A. S.; BARISSON, A.; KOOLEN, H. H. F.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L. Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloid profile of isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 26, p. 339-345, 2015a.

SOARES, E. R.; SILVA, F. M. A.; ALMEIDAA, R. A.; LIMA, B. R.; KOOLEN, H. H. F.; LOURENÇO, C. C.; SALVADO, M. J.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.; SOUZA, A. Q. L.; PINHEIRO, M. L.B.; SOUZA, A. D. L. Chemical composition and antimicrobial evaluation of the essential oils of *Bocageopsis pleiosperma* Maas. **Natural Product Research**, p. 1-4, 2015b.

SOBRINHO, R. B. Potencial de Exploração de Anonáceas no Nordeste do Brasil. **Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical. XII Agroflores**, 2010.

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

SOUZA, E. A. D.; SILVA, A. A.; CAVALHEIRO, A. J.; LAGO, J. H. G.; CHAVES, M. H. A New Flavonoid Derivative from Leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 704-708, 2014.

SOMANAWAT, J.; TALANGSRI, N.; DEEPOONGAM, S.; KAEWAMATAWONG, R. Flavonoid and megastigmane glycosides from *Artabotrys hexapetalus* leaves. **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 44, p. 124-127, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, p. 82-85, 2005.

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

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUERTIN-LECLERCQ. Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. **Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents**, v. 5, p. 173-182, 2005.

SURESH, H. M.; SHIVAKUMAR, B.; SHIVAKUMAR, S. I. Phytochemical Potential of *Annona reticulata* Roots for Antiproliferative Activity on Human Cancer Cell Lines. **Advances in Life Sciences**, v. 2, p. 1-4, 2012.

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

TAN, M.; ZHOU, L.; QIN, M.; LI, D.; JIANG, W.; WANG, Y.; HAO, X. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Flower Oil of *Russowia sogdiana* (Bunge) B. Fedtsch. (Asteraceae) from China. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, 197-200, 2007.

TEGANG, A. S.; BEUMO, T. M. N.; DONGMO, P. M. J.; NGOUNE, L. T. Essential oil of *Xylopia aethiopica* from Cameroon: Chemical composition, antiradical and in vitro antifungal activity against some mycotoxigenic fungi. **Journal of King Saud University – Science**, 2017.

TEITEL, S.; O'BRIEN, J.; POOL, W.; BROSSI, A. Alkaloids in mammalian tissues.4. Synthesis of (+) and (-)-salsoline and isosalsoline. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 134-137, 1974.

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

VALLE-GUADARRAMA, S.; RUIZ-SÁNCHEZ, X. G.; SAUCEDO-VELOZ, C.; GÓMEZ-CRUZ, A.; MARROQUÍN-ANDRADE, L. M. Comportamiento postcosecha de frutos de ilama (*Annona diversifolia*) en madurez comestible almacenados en atmósfera modificada. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 35, p. 75-81, 2012.

VALTER, J. L.; ALENCAR, K. M. C.; SARTORI, A. L. B.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; LAURA, V. A. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18(3), p. 373-378, 2008.

VAREA, M. T. Botanica medica nacional. Tipografica Vicente Leon, Latacunga, Ecuador, p.162, 1992.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os Produtos naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, v.29, p. 326-337, 2006.

VISKUPICOVA, J.; DANIHELOVA, M.; ONDREJOVIC, M.; LIPTAJ, T.; STURDIK, E. Lipophilic rutin derivatives for antioxidant protection of oil-based foods. **Food Chemistry**, v. 123, p. 45- 50, 2010.

WANG, S.; CHEN, X.; NAIR, S.; SUN, D.; WANG, X.; REN. Deletion of Protein Tyrosine Phosphatase 1B Obliterates Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Myocardial Dysfunction through Regulation of Autophagy. **Biochem Biophys Acta Mol Basis Dis**, v.12, p. 3060-3074, 2017.

WEI, G.; KONG, L.; ZHANG, J.; MA, C.; WU, X.; LI, X.; JIANG, H. Essential oil composition and antibacterial activity of *Lindera nacusua* (D. Don) Merr. **Natural Products Research**, v. 30, p. 2704-2706, 2016.

WOGUEM, V.; FOGANG, H. P. D.; MAGGI, F.; TAPONDJOU, L. A.; WOMENI, H. M.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D.; LUPIDI, G.; PAPA, F.; VITTORI, S.; BARBONI, L. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopia parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemo preventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. **Food Chemistry**, p. 183-189, 2014.

WU, W. N.; HUANG, C. H. Structural elucidation of isoquinoline, isoquinolone, benzylisoquinoline, aporphine, and phenanthrene alkaloids using API-ionspray tandem mass spectrometry. **The Chinese pharmaceutical**, v. 58, p. 41-55, 2006.

YANG, M. D.; CHAUMONT, J. P.; MILLET-CLERC, J. Use of caryophylleneoxide as an antifungal agent in an in vitro experimental model of onychomycosis. **Mycopathologia**, v. 149, p. 79-82, 1999.

YANG, Y. L.; CHANG, F.-R.; WU, C. C.; WANG, W. Y.; WU, Y. C. New ent-Kaurane Diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v.65, p. 1462-1467, 2002.

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

YANG, Q.; WANG, H.; MAAS, J.D.; CHAPPELL, W.J.; MANICKE, N.E.; COOKS, R.G.; OUYANG, Z. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. **International Journal of Mass Spectrometry**, 312: 201-207, 2012.

YAVARI, M.; MIRDAMADI, S.; MASOUDI, S.; TABATABAEI-ANARAKI, M.; LARIJANI, K.; RUSTAIYAN, A. Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of a Green Type and a Purple Type of *Ocimum basilicum* L. from Iran. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 1-4, 2011.

YEO, S. K.; ALI, A. Y.; HAYWARD, O. A.; TURNHAM, D.; JACKSON, T.; BOWEN, I. D.; CLARKSON, R. β -Bisabolene, a Sesquiterpene from the Essential Oil Extract of *Opoponax* (*Commiphora guidottii*), Exhibits Cytotoxicity in Breast Cancer Cell Lines. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 418-425, 2015.

YOSHIDA, N. C. Estudo fitoquímico das partes aéreas (folhas e cerne do caule) de *Unonopsis lindmanii* R. E. Fries (R. E. Fries) Annonaceae, e avaliação da atividade biológica por bioensaios simples. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul – Mato Grosso do Sul, 2007.

YOSHIDA, N. C.; SAFFRAN, F. P.; LIMA, W. G.; FREIRE, T. V.; SIQUEIRA, J. M.; GARCEZ, W. S. Chemical characterization and bioherbicidal potential of the essential oil from the leaves of *Unonopsis guatteroides* (A.DC.) R.E.Fr. (Annonaceae). **Natural Product Research**, p. 1-5, 2018.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcaloides aporfínicos do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v.30, p. 92-98, 2007.

ZANIN, S. M. W.; Miguel, O. G.; Montrucchio, D. P.; Costa, C. K.; Lagos, J. B.; Lordello, A. L. L. Seedlings of *Ocotea puberula* (Lauraceae): identification and monitoring of aporphinoid alkaloids. **Química Nova**, v. 34, p. 743-747, 2011.

ZAHARI, A.; ABLAT, A.; SIVASOTHY, Y.; MOHAMAD, J.; CHOUDHARY, M. I.; AWANG, K. In vitro antiplasmodial and antioxidant activities of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Alseodaphne corneri* Kosterm. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, p. 328-332, 2016.

ZAWAWI, N. K. N. A.; AHMAT, N.; AHMAD, R.; JAAFAR, F. M.; AB GHANI, N. Oxoaporphine alkaloids and flavonols from *Xylopiia ferruginea* (Annonaceae). **Biochemical Systematic and Ecology**, v. 43, p. 7-9, 2012.

8. ANEXOS - 1



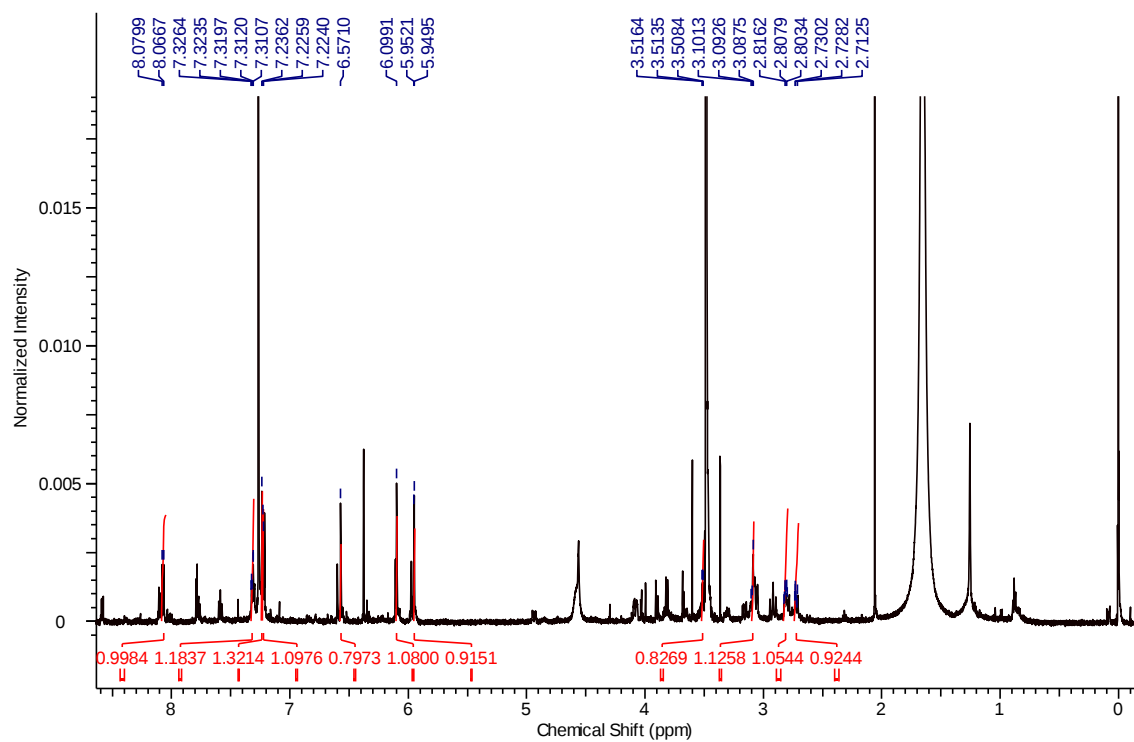


Figura 218. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr1 - Anonaina.

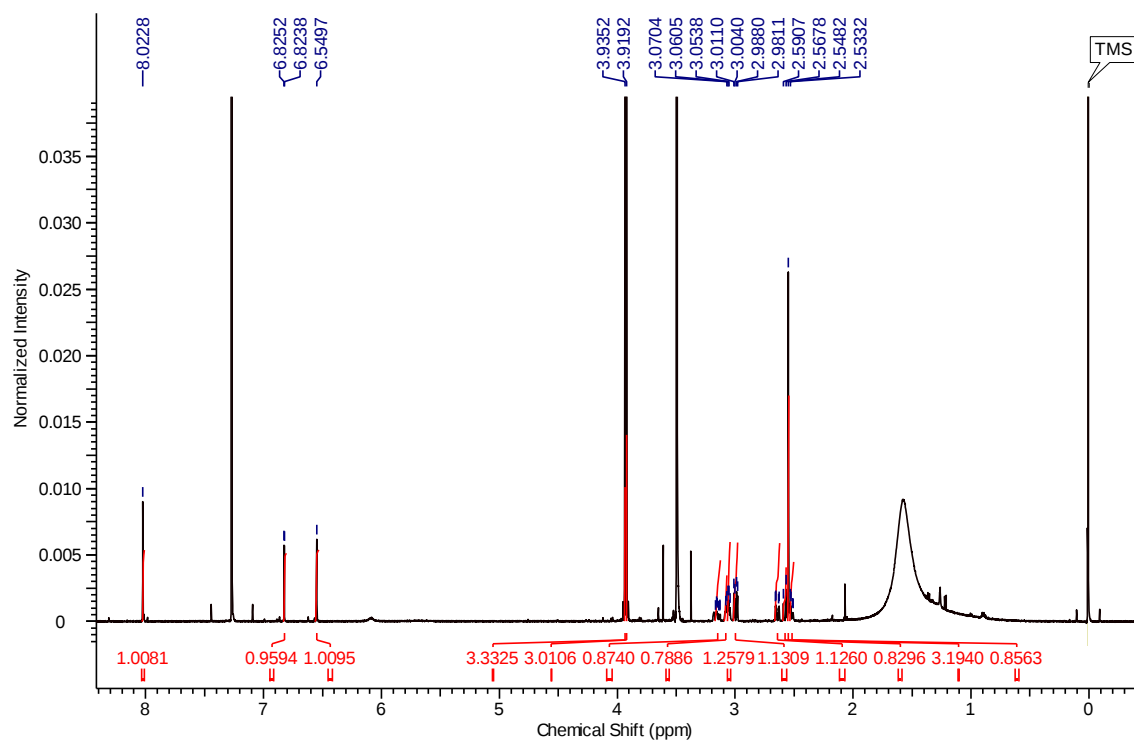


Figura 219. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr2 - Isoboldina.

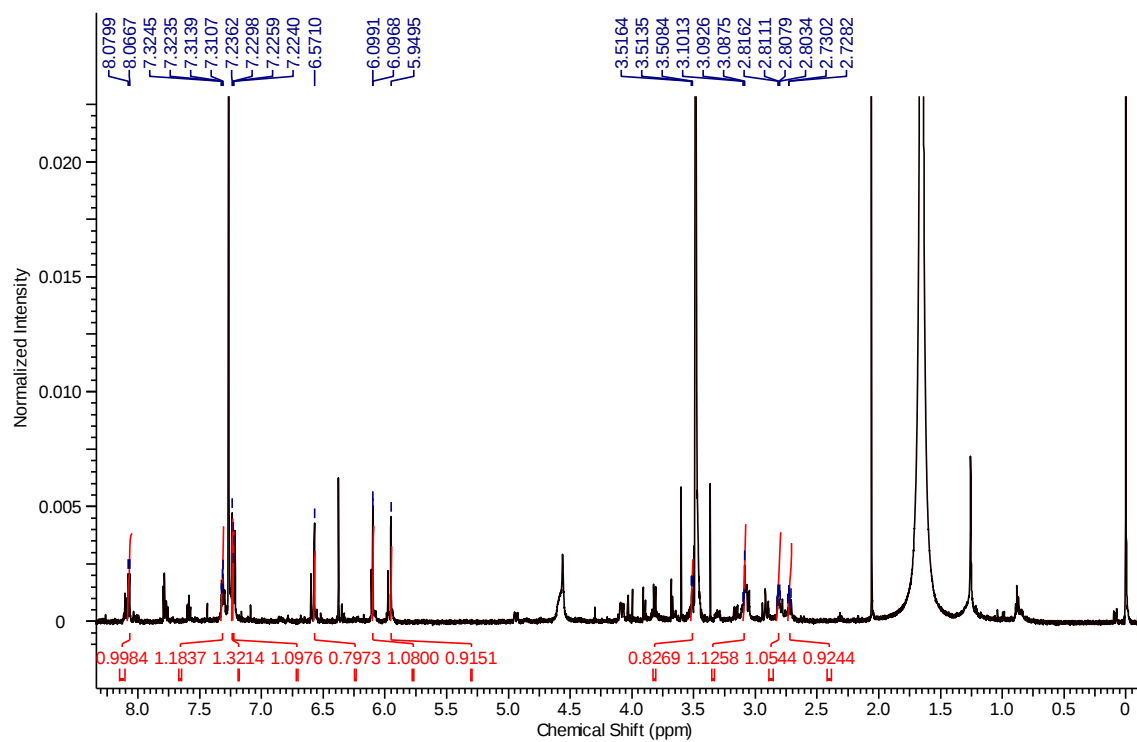


Figura 220. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr3 - estefarina.

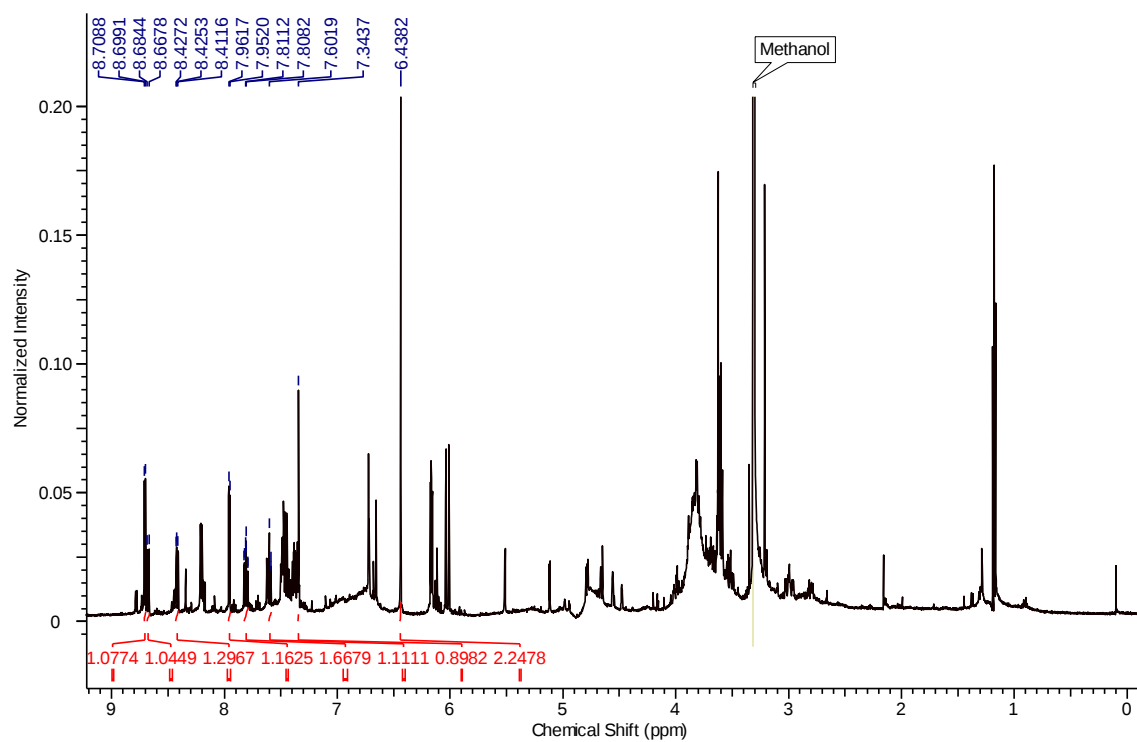


Figura 221. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr4 - Liriodenina.

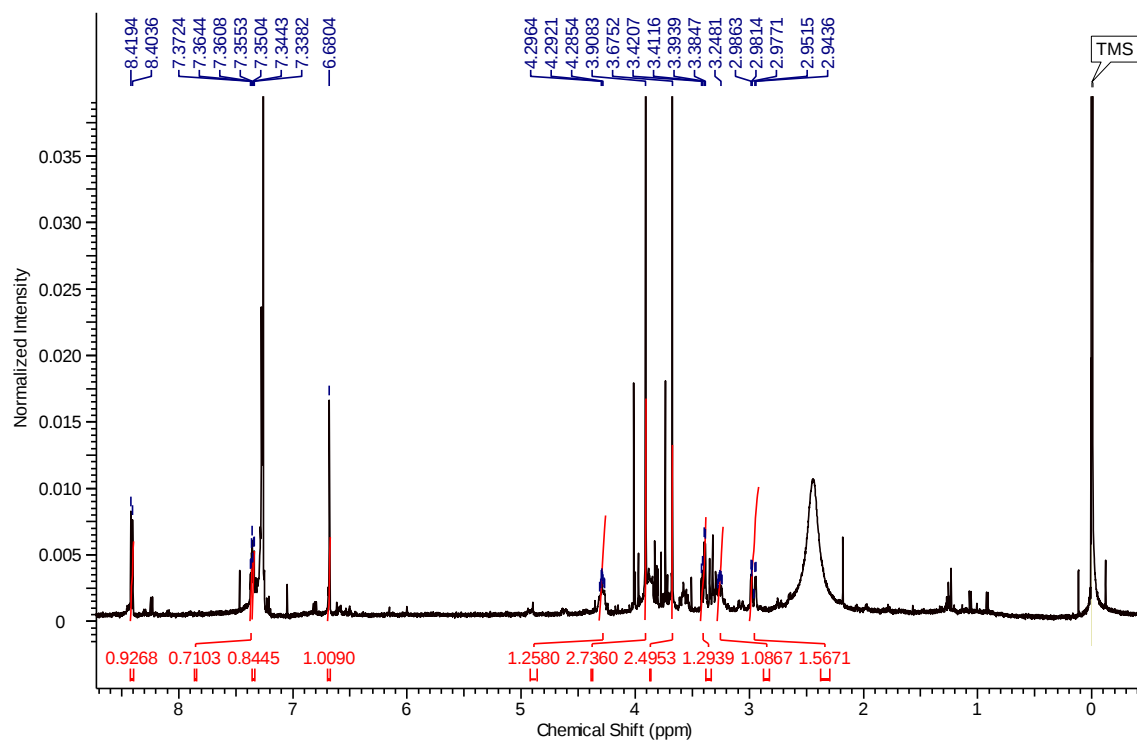


Figura 222. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr5 - Nornuciferina.

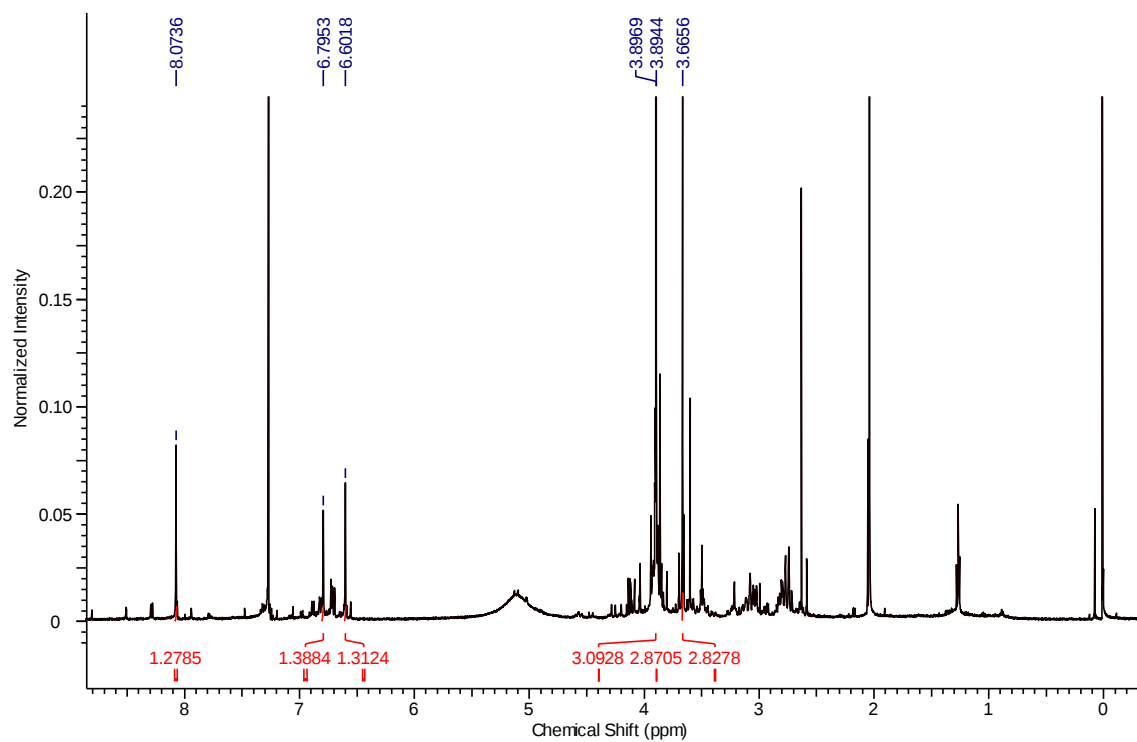


Figura 223. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr6 - Laurotetanina.

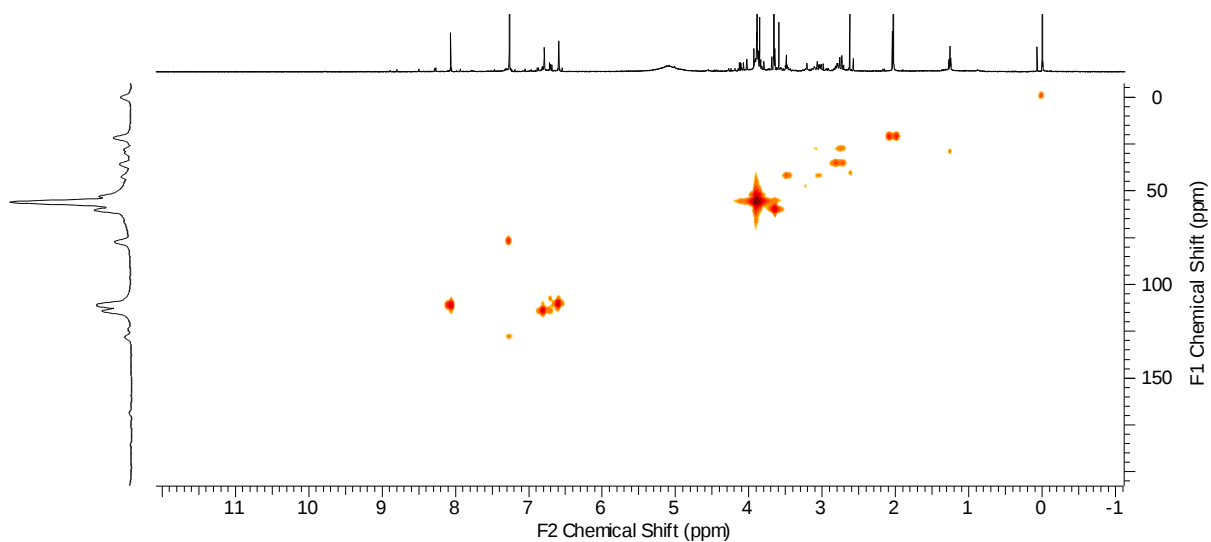


Figura 224. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr6 - Laurotetanina.

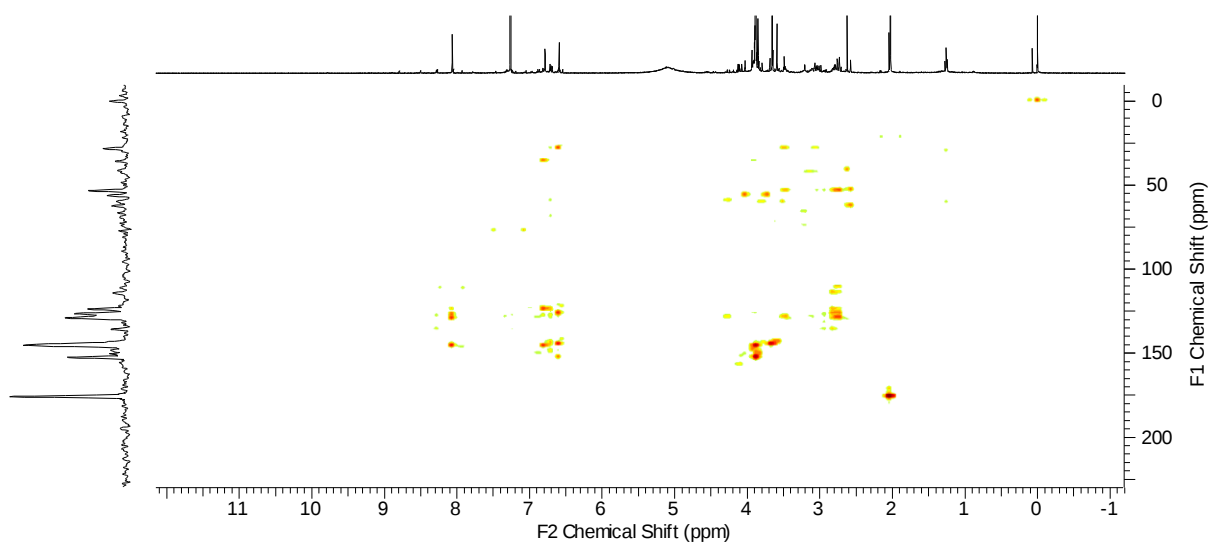


Figura 225. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr6 - Laurotetanina.

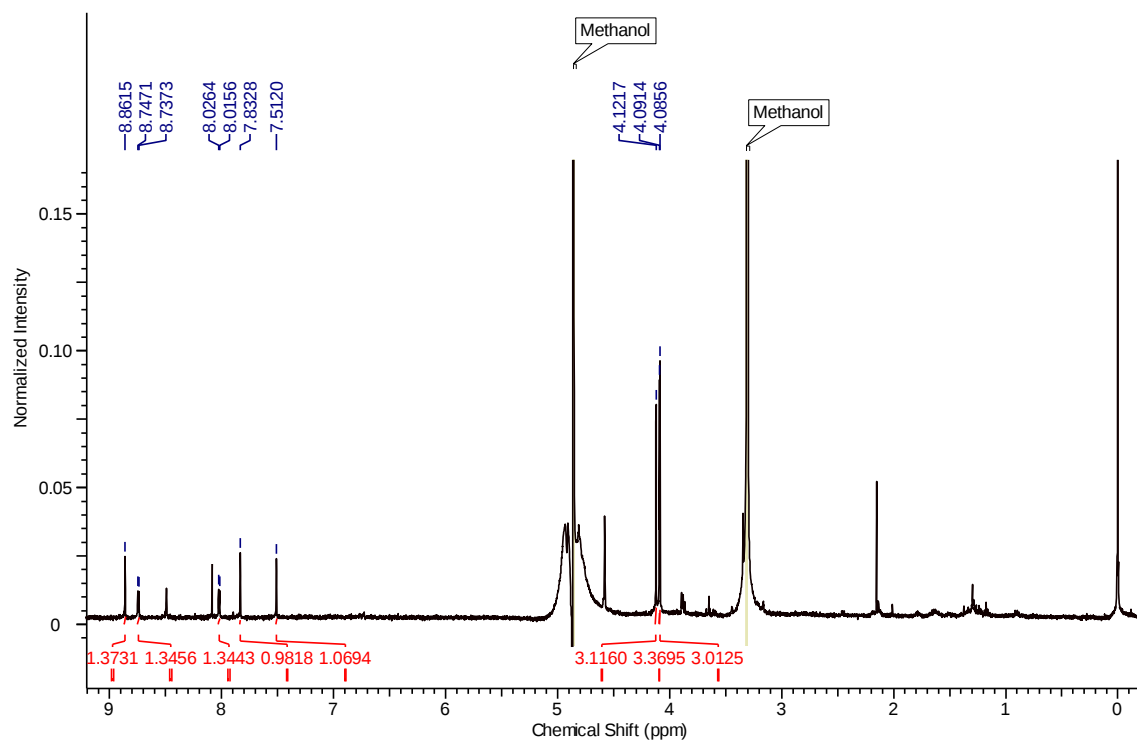


Figura 226. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr7 - Atherolina.

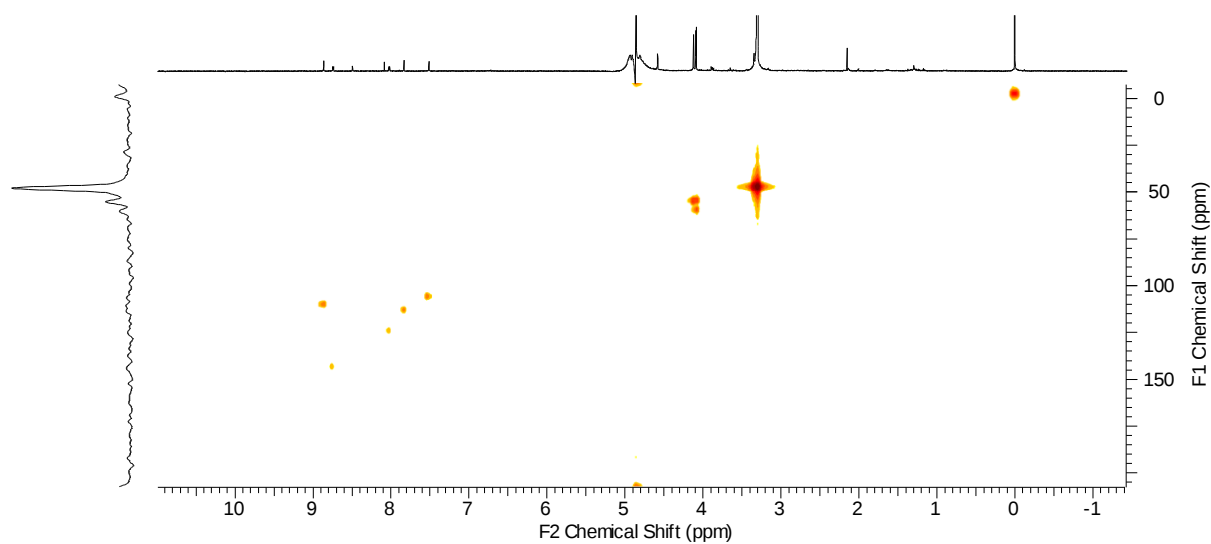


Figura 227. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr7 - Atherolina.

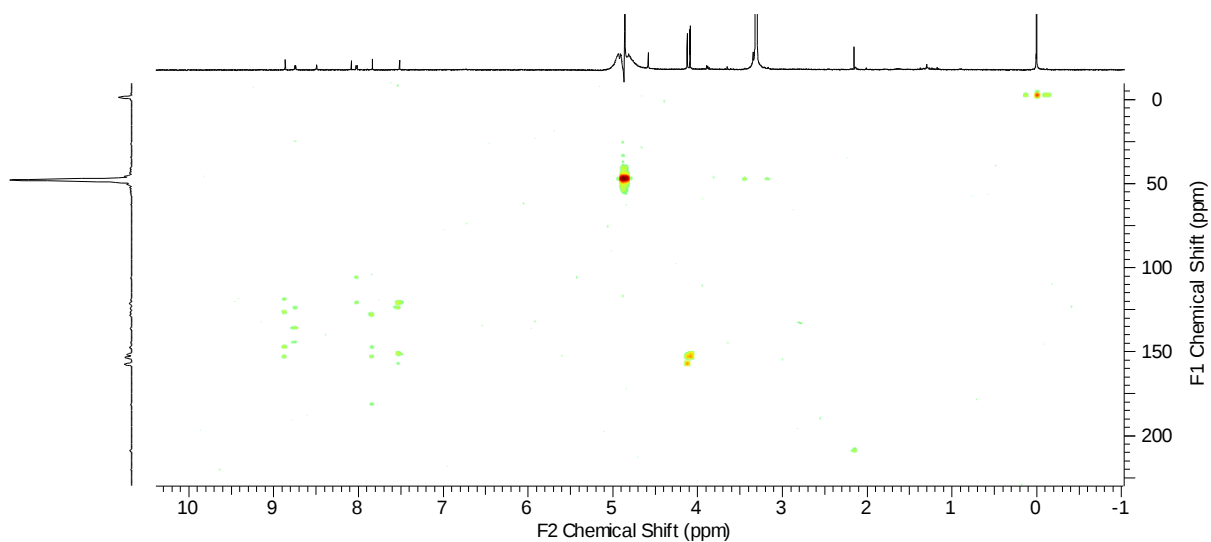


Figura 228. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr7 - Atherolina.

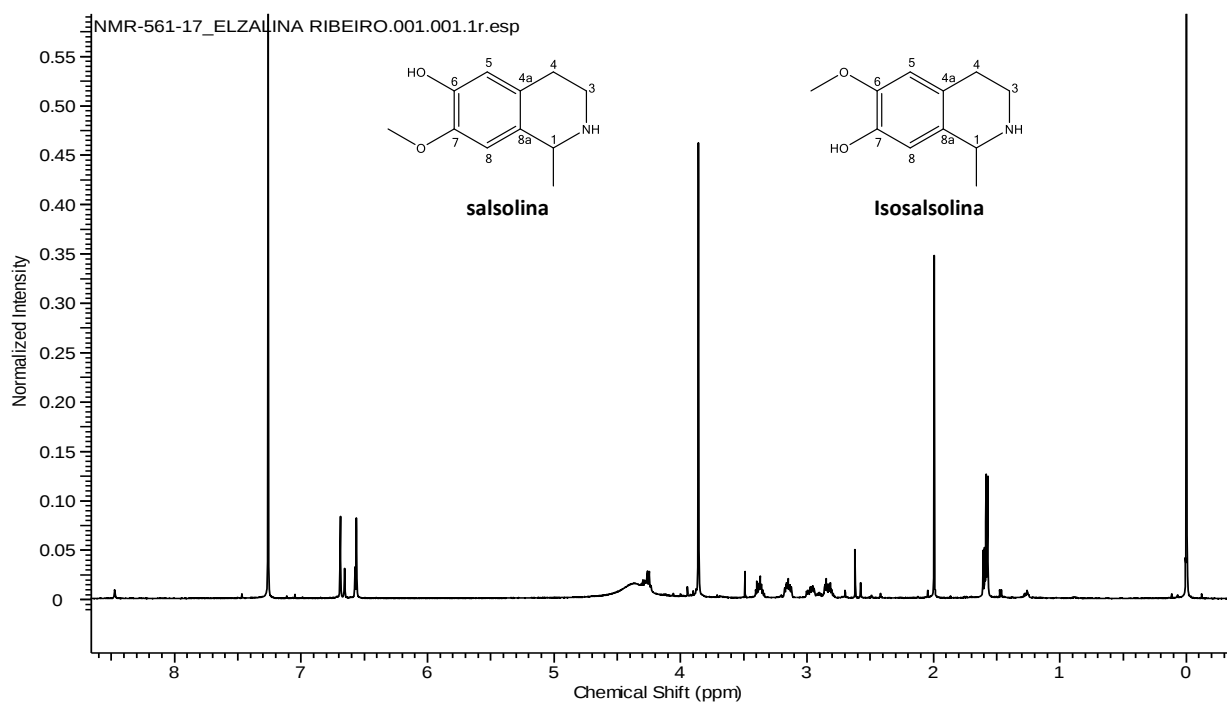


Figura 229. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr8.1 e BcFFr8.2.

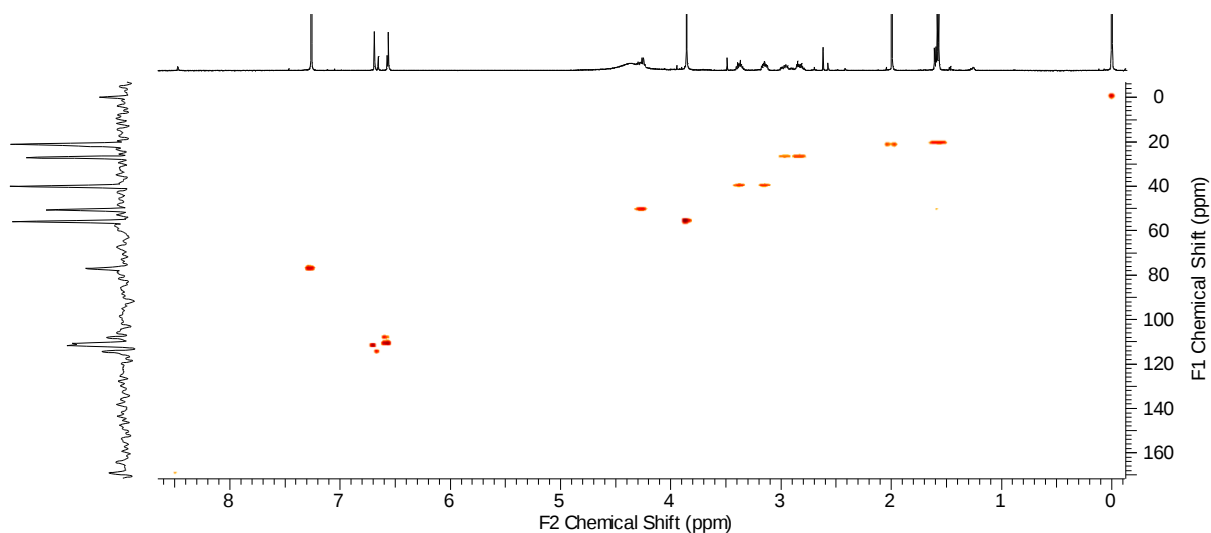


Figura 230. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr8.1 e BcFFr8.2.

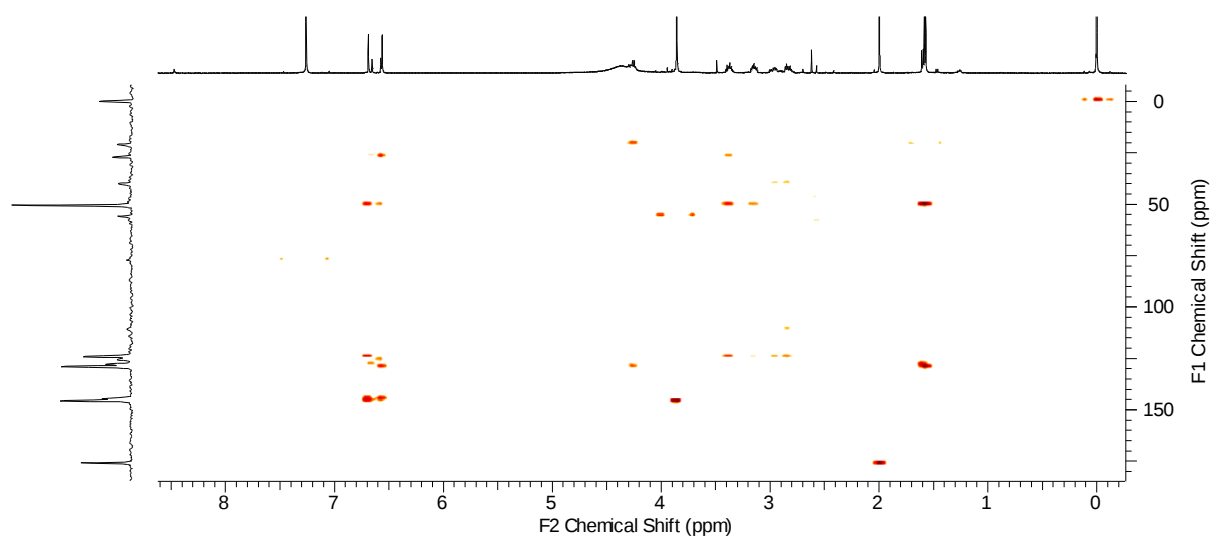


Figura 231. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BcFFr8.1 e BcFFr8.2.

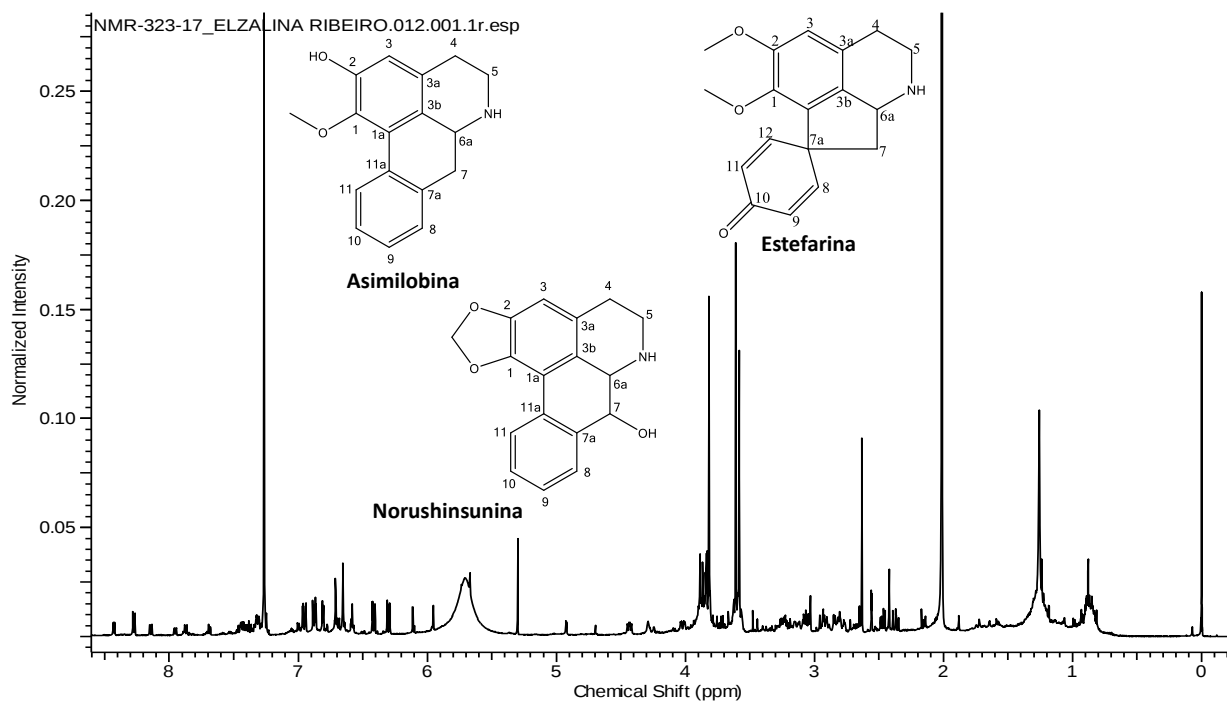


Figura 232. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

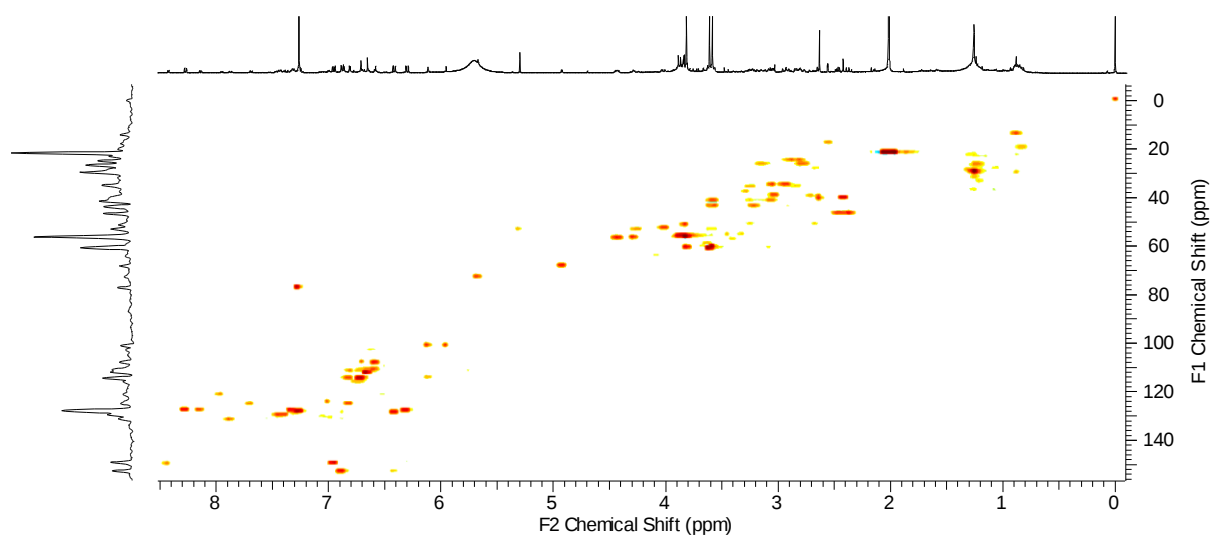


Figura 233. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da fração alcaloídica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

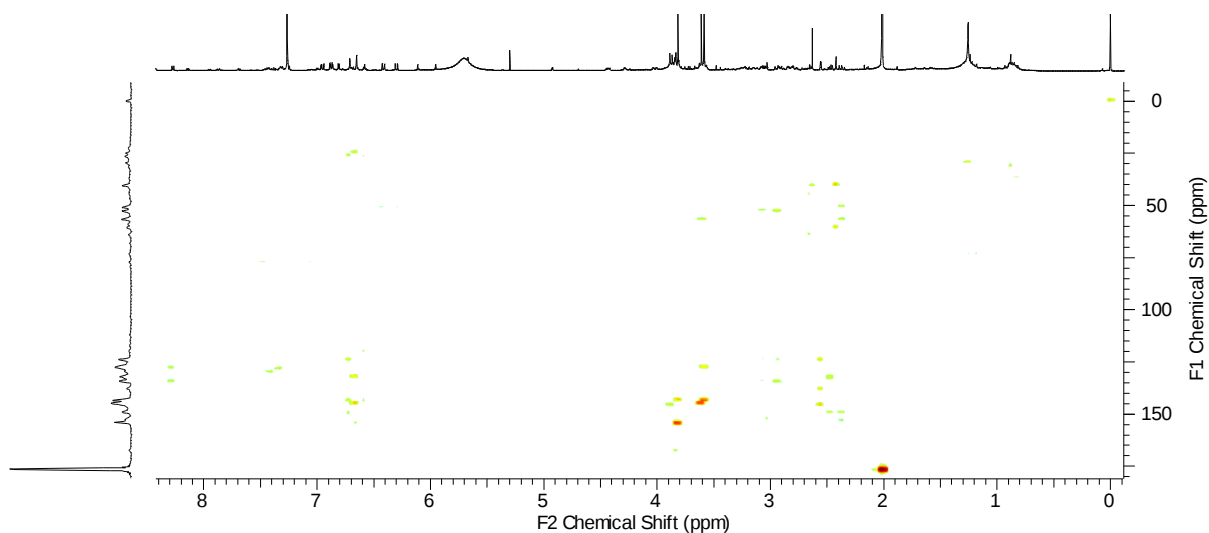


Figura 234. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da fração alcalóidica dos galhos grossos de *B. multiflora*.

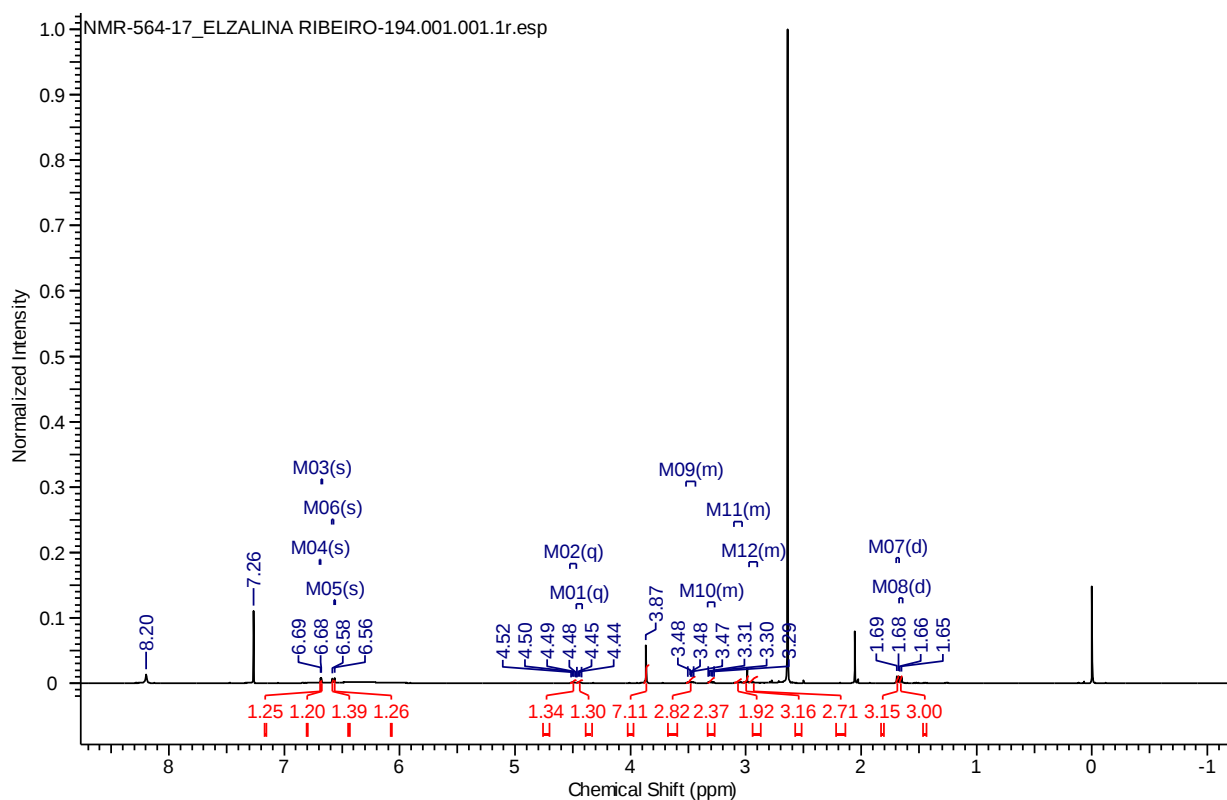


Figura 235. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr1.1 e BmuGGFr1.2 - Isosalsolina e salsolina.

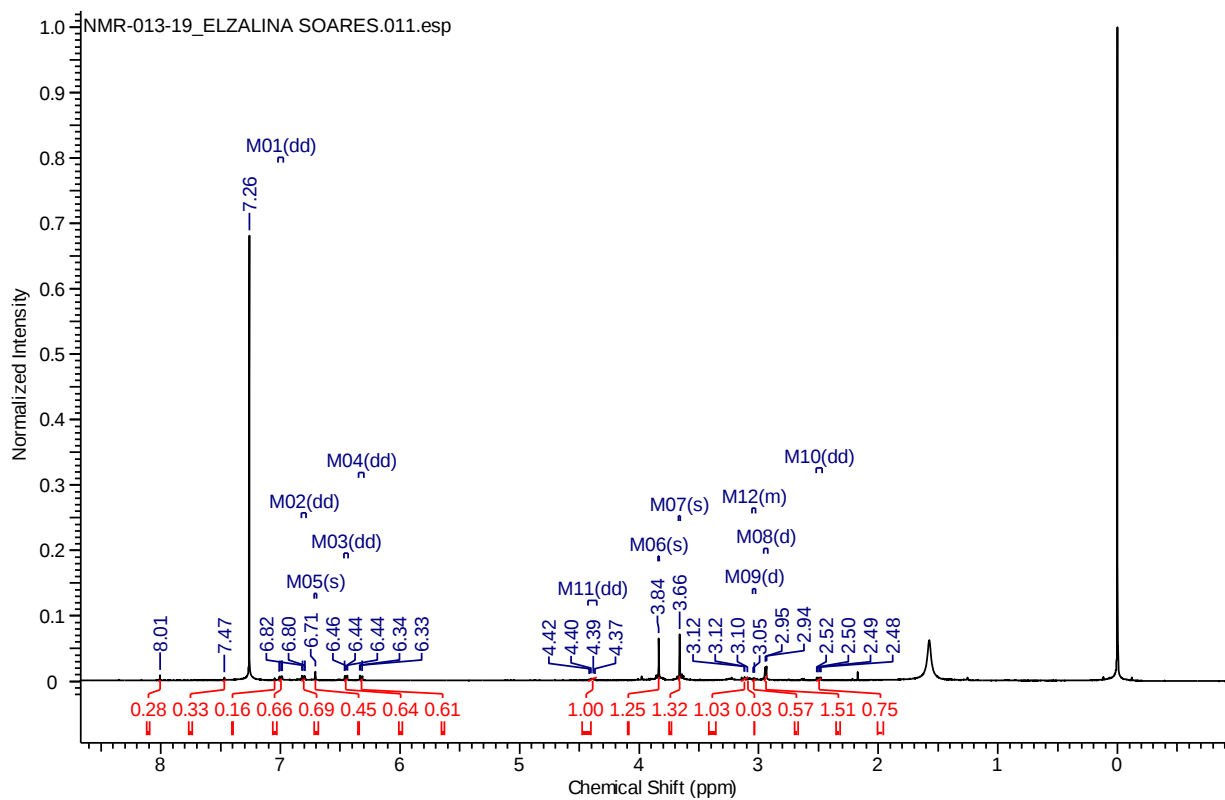


Figura 236. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr2 - Pronuciferina.

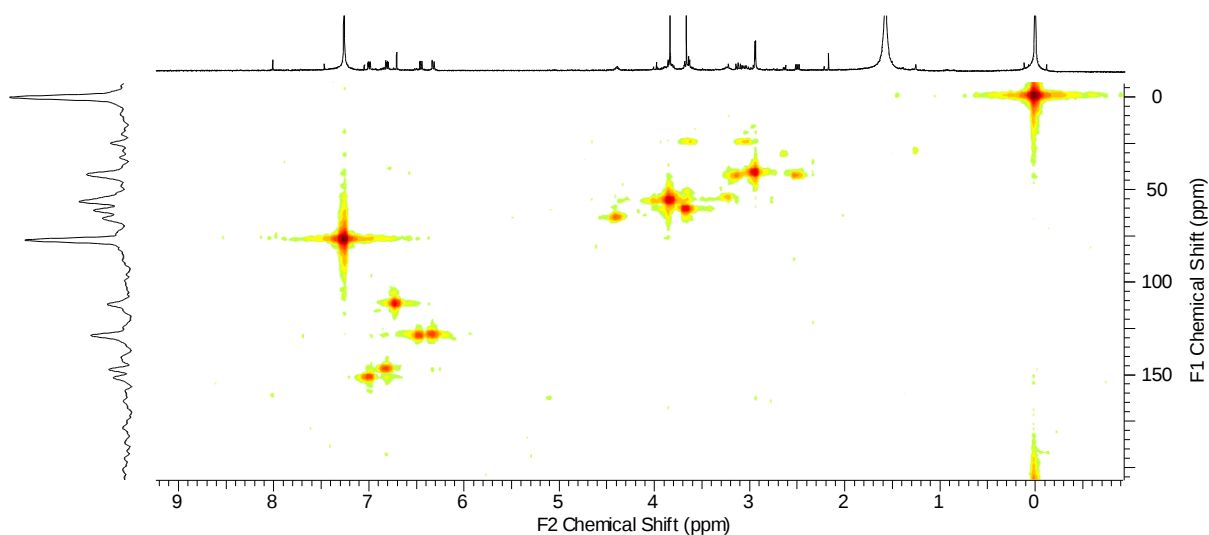


Figura 237. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr2 - Pronuciferina.

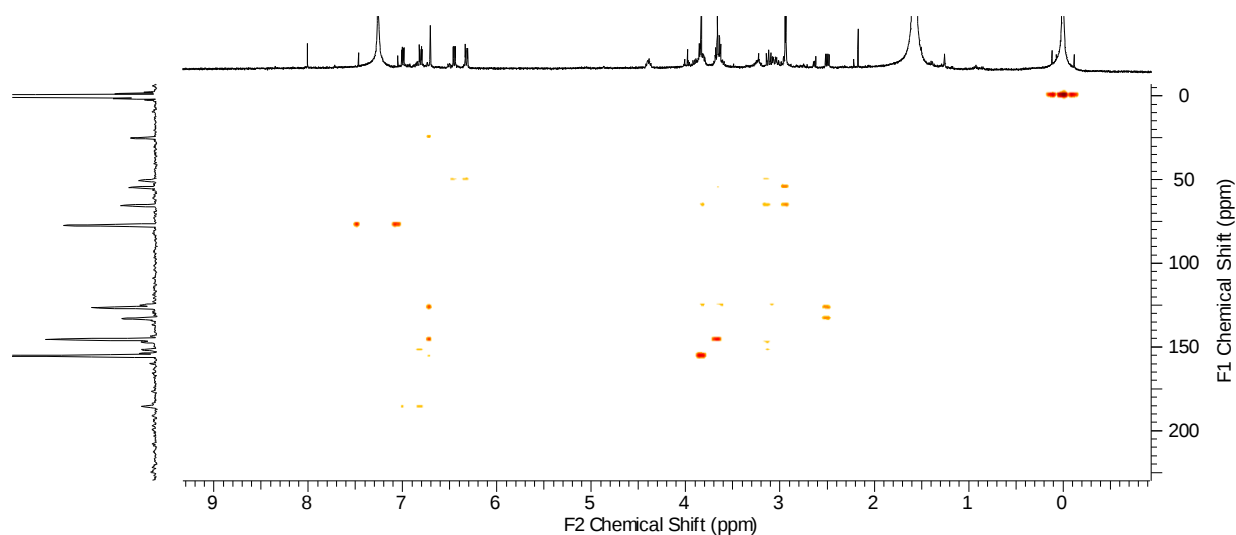


Figura 238. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr2 - Pronuciferina.

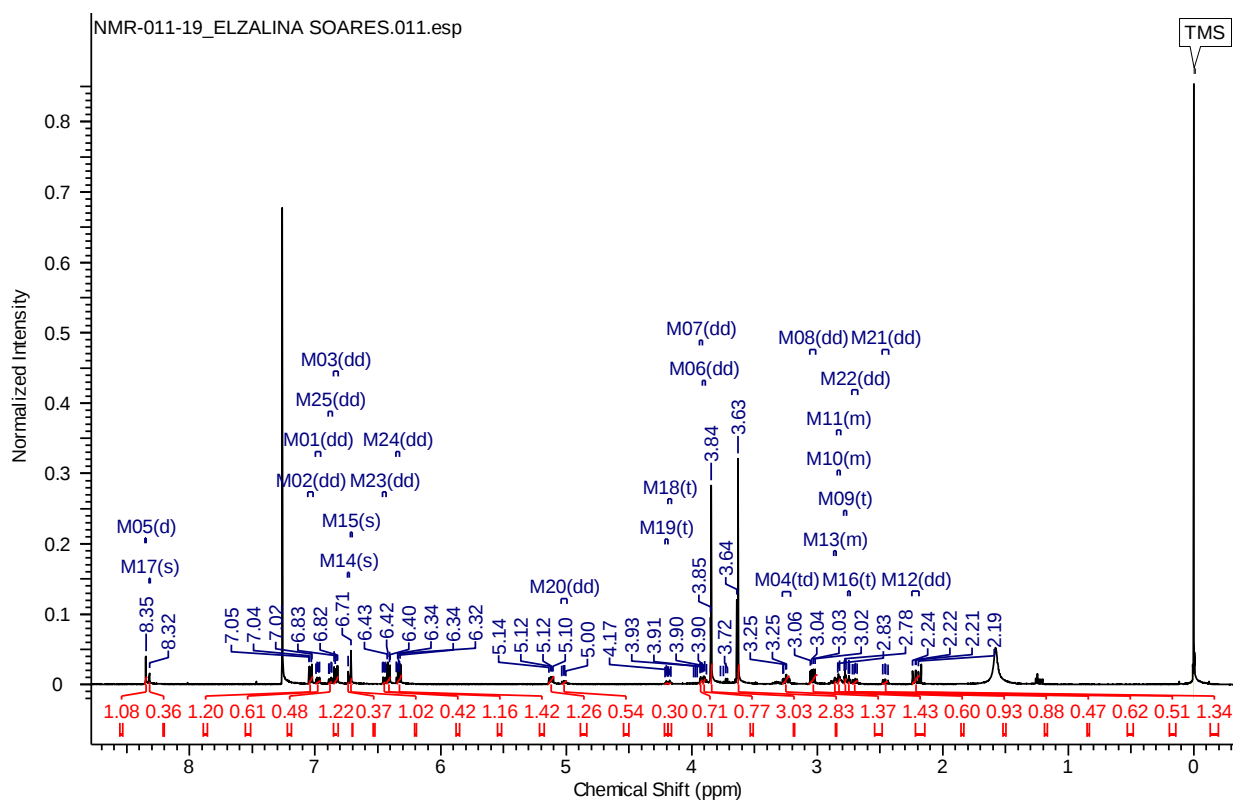


Figura 239. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr3.1 e BmuGGFr3.2 - Rotâmeros de *N*-formil-estefarina.

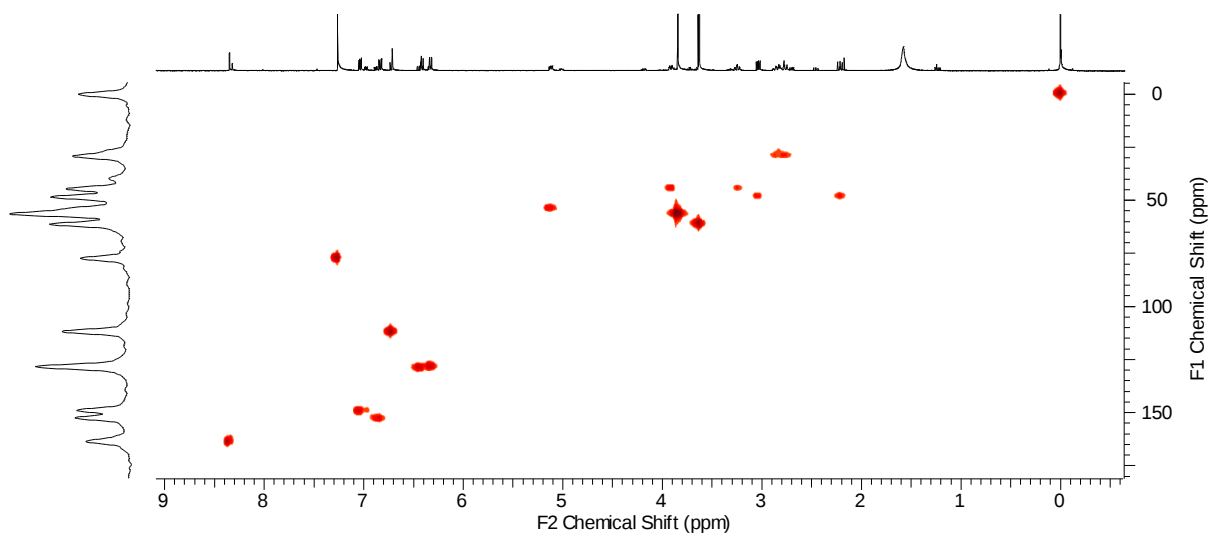


Figura 240. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr3.1 e BmuGGFr3.2 - Rotâmeros de *N*-formil-estefarina.

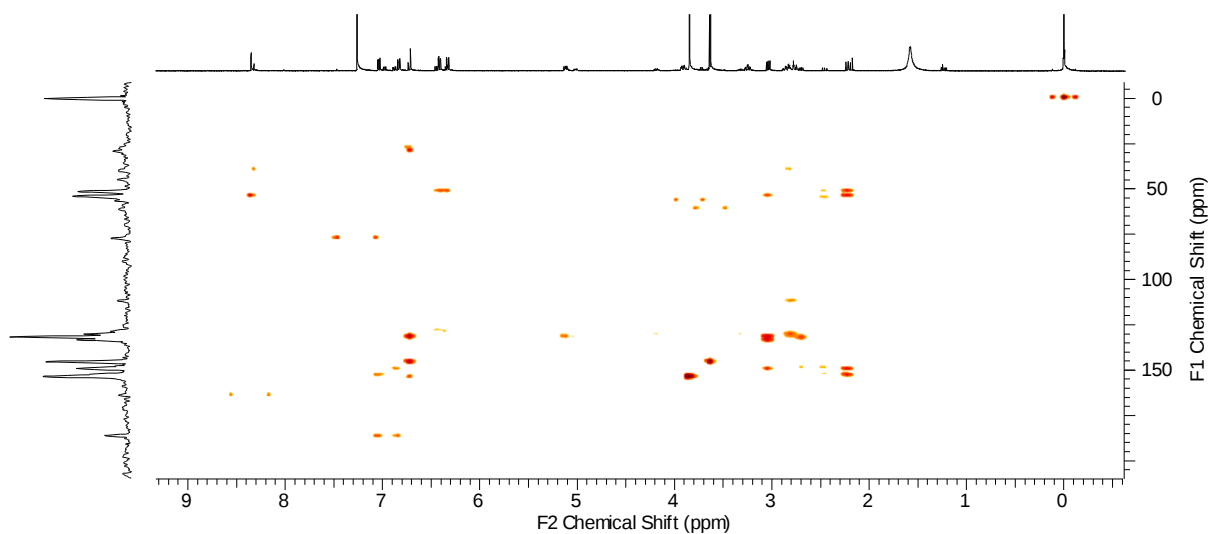


Figura 241. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em CDCl_3) da amostra BmuGGFr3.1 e BmuGGFr3.2 - Rotâmeros de *N*-formil-estefarina.

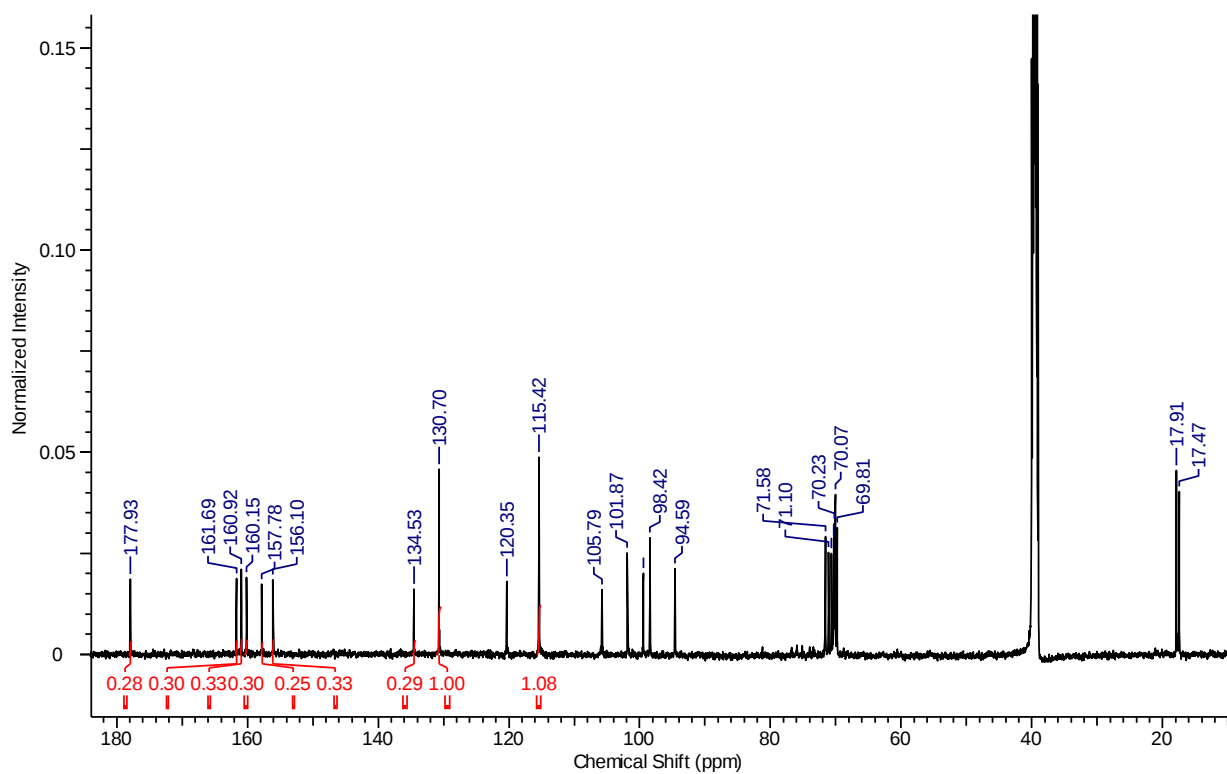


Figura 242. Espectro de RMN de ^{13}C (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para a fração do extrato aquoso BcEAFr1 - kaempferol-3,7-O- α -dirhamnosídeo.

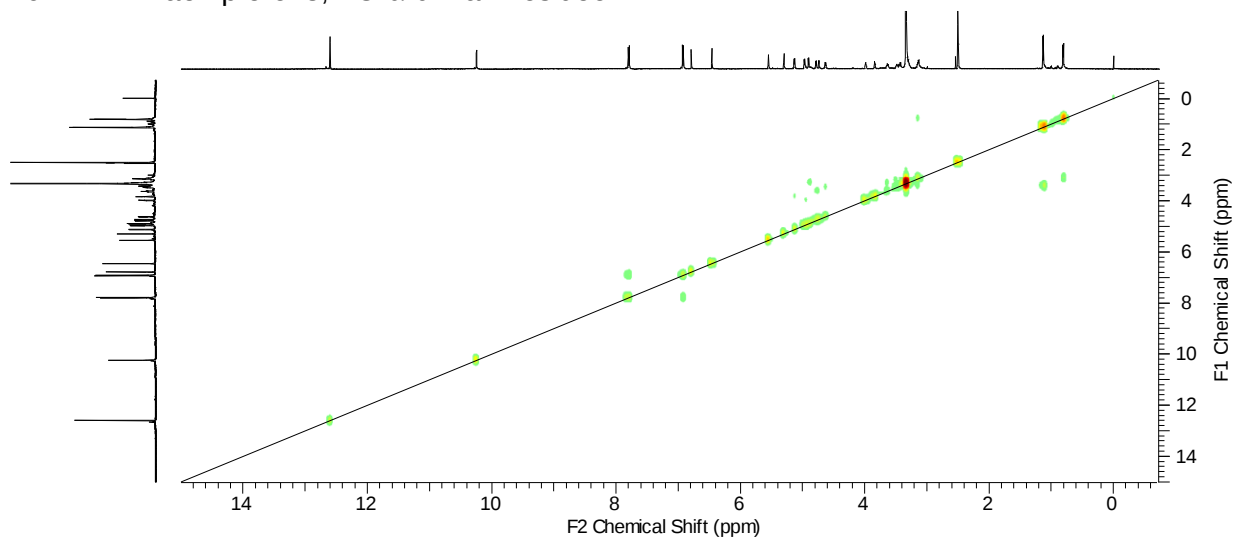


Figura 243. Espectro de COSY (500,13 MHz em $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para a fração do extrato aquoso BcEAFr1- kaempferol-3,7-O- α -dirhamnosídeo.

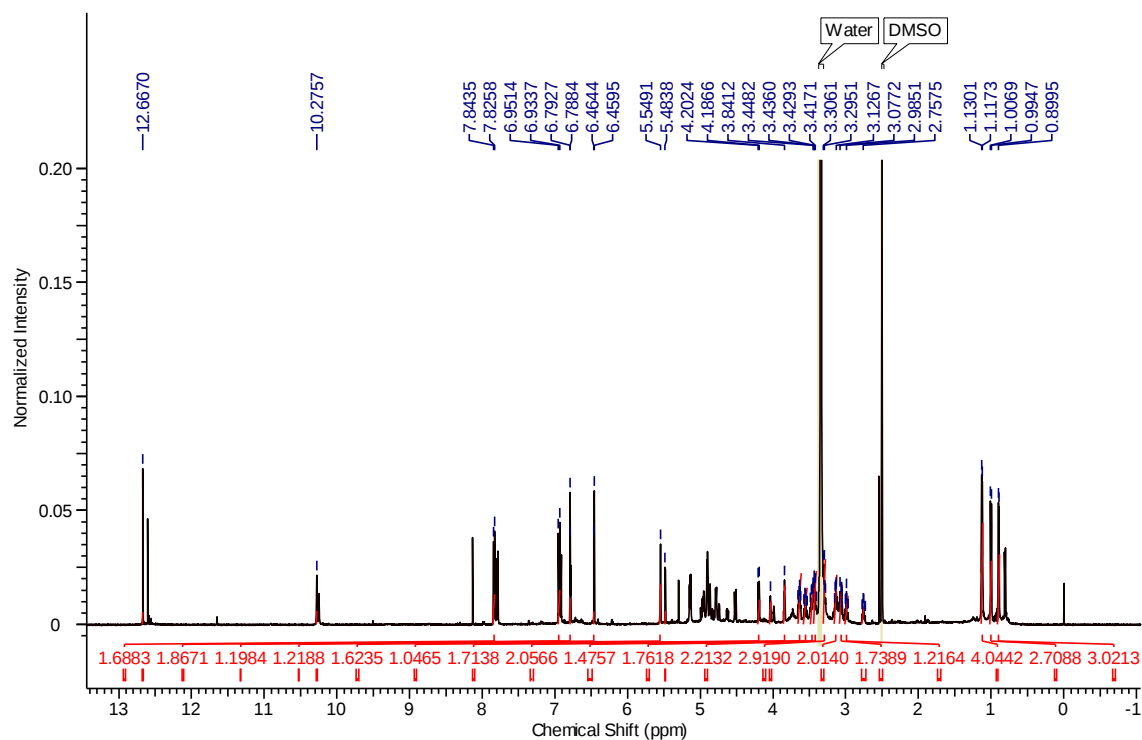


Figura 244. Espectro de RMN de ^1H (500,13 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para a fração do extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.

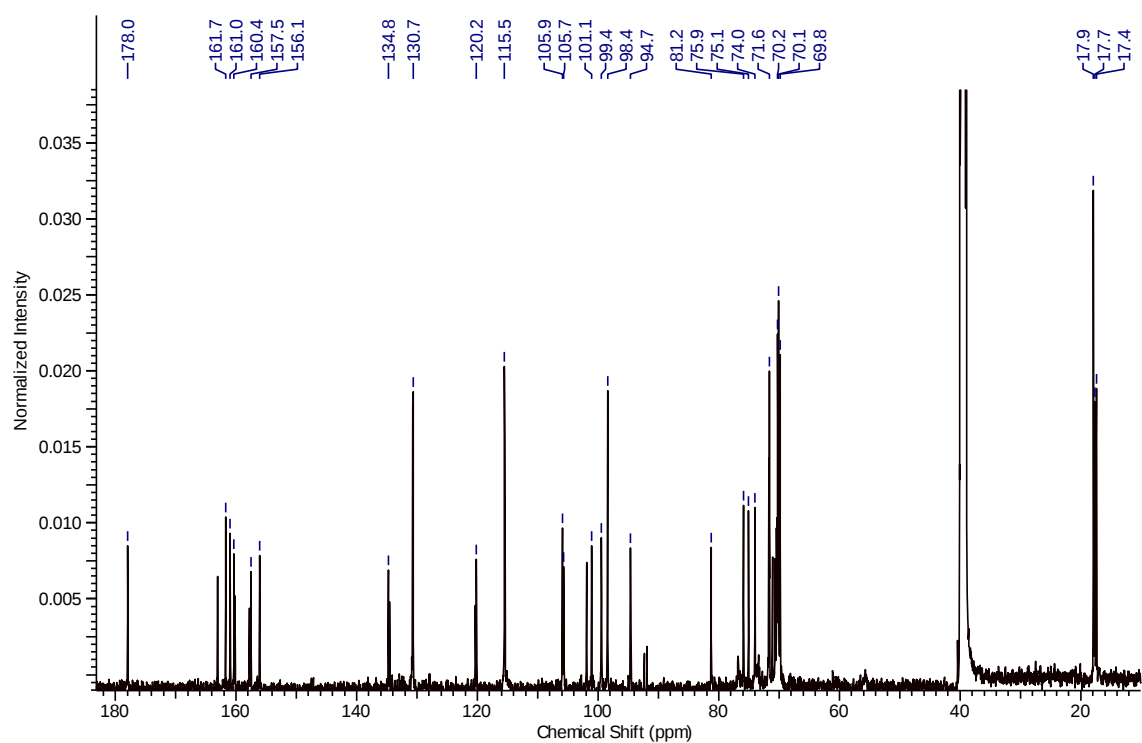


Figura 245. Espectro de ^{13}C (125,76 MHz, $\text{C}_2\text{D}_6\text{OS}$) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.

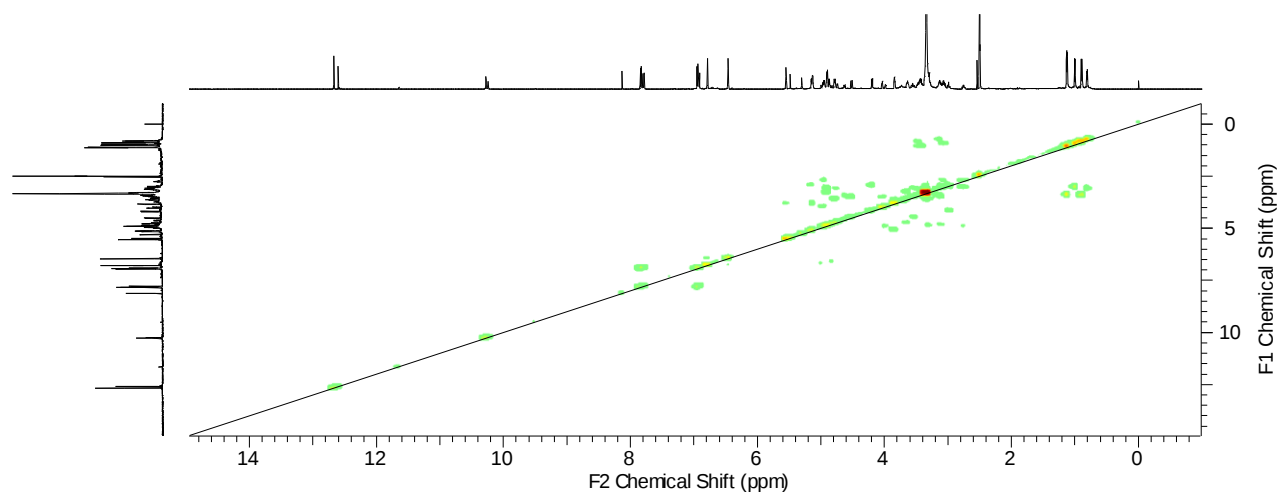


Figura 246. Espectro de COSY (500,13 MHz) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.

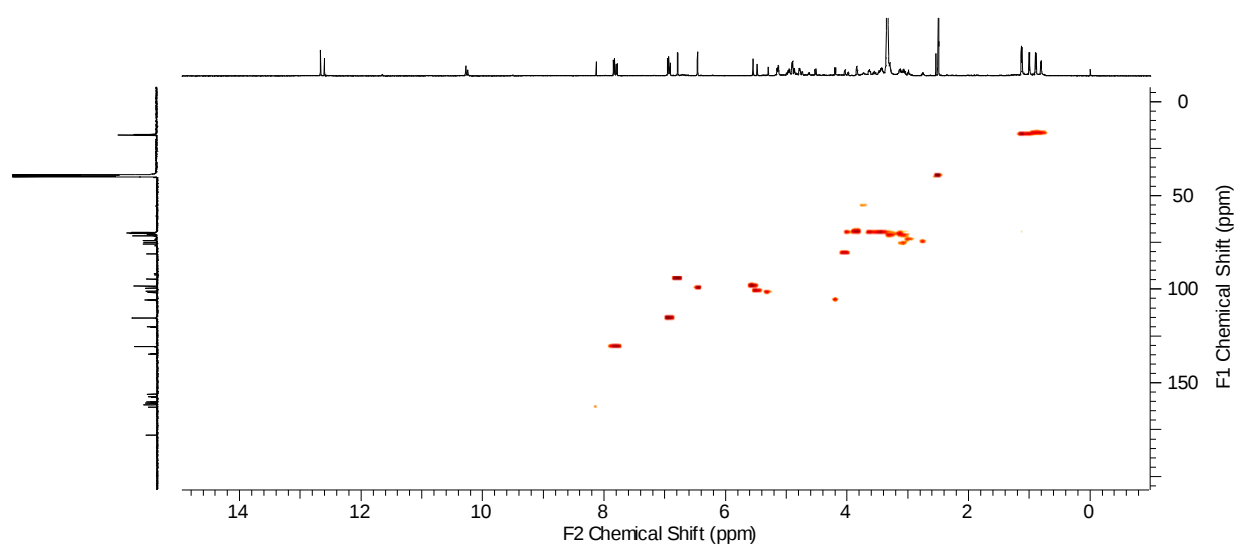


Figura 247. Mapa de correlações HSQC (125,76 MHz em C₂D₆OS) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.

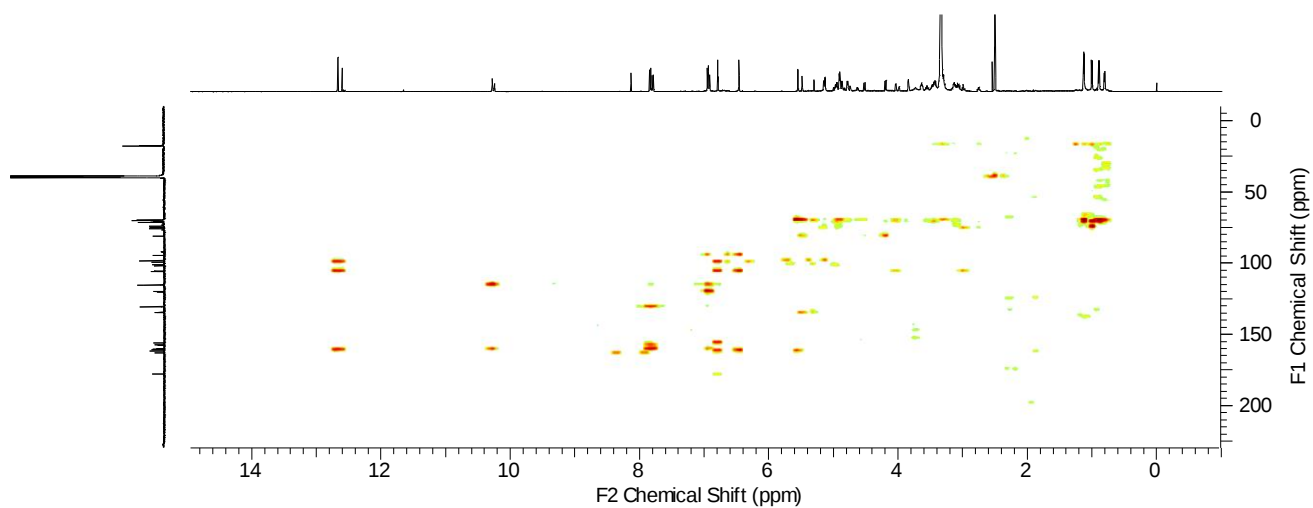


Figura 248. Mapa de correlações HMBC (125,76 MHz em C₂D₆OS) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.

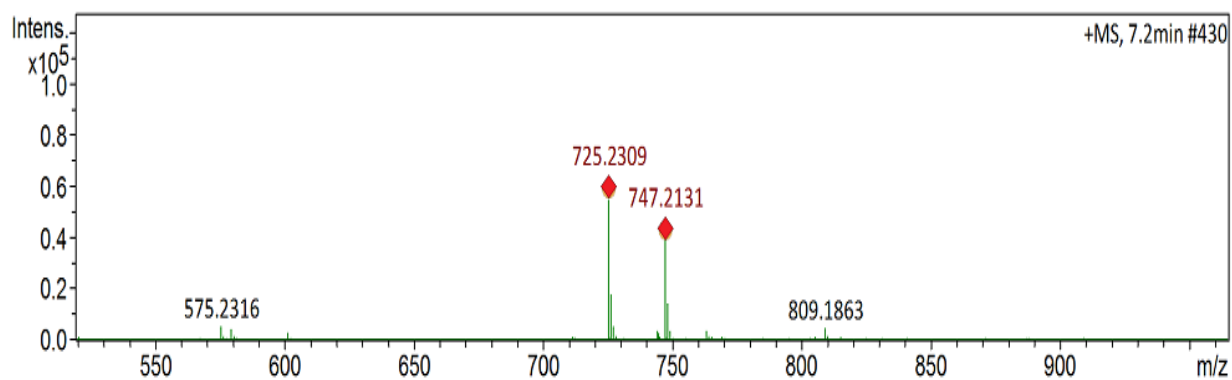


Figura 249. Espectro de massas 725.2309 ($[M+H]^+$) e 747.2123 ($[M+Na]^+$) para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.

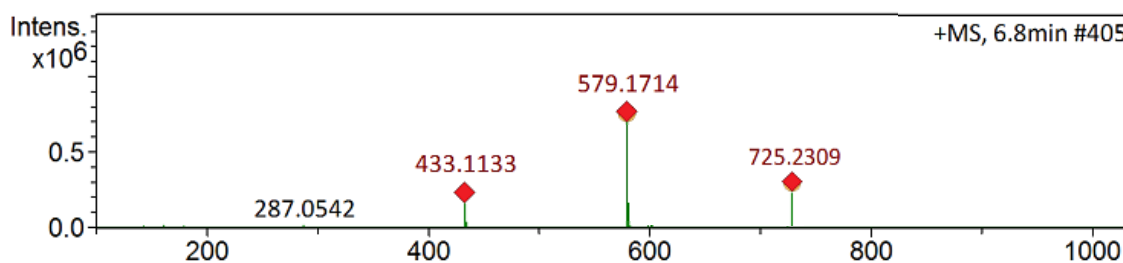


Figura 250. Espectro de MS/MS para o extrato aquoso BcEAFr2 - canescentina.

9. ANEXOS - 2





A new flavonoid glycoside and other compounds from the leaves of *Bocageopsis canescens* (Benth.) R.E.Fr

Elzalina Ribeiro Soares^{a,*}, Richardson Alves de Almeida^b, Bruna Ribeiro de Lima^a, Hanna Rocha Mafra^a, Luana Quadros de Souza Leão^a, Jessica Burlamaque Maciel^a, Afonso Duarte Leão de Souza^{a,c}, Felipe Moura Araujo da Silva^{a,c}, Maria Lúcia Belém Pinheiro^{a,c}

^a Central Analítica - Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM), Universidade Federal do Amazonas, 69077-000, Manaus, AM, Brazil

^b Centro de Biotecnologia da Amazônia, 69075-351, Manaus, AM, Brazil

^c Departamento de Química, Universidade Federal do Amazonas, 69077-000, Manaus, AM, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Annonaceae
Canescens
Flavonoid glycosides
Isoquinoline alkaloids
Kaempferol trihamnoside
Salsoline
Isosalsoline

1. Subject and source

Bocageopsis is a Neotropical genus constituted by four species, *B. pletosperma* Maas, *B. multiflora* (Mart.) R.E.Fr., *B. mattogrossensis* (R.E.Fr.) R.E.Fr., and *B. canescens* (Benth.) R.E.Fr., all restricted to tropical South America and to the East of the Andes (Maas et al., 2007). *Bocageopsis* presents morphological, phylogenetic and phytochemical similarities with *Onychopetalum* and *Unonopsis*, therefore being considered closely related genera (Maas et al., 2007; Silva et al., 2015). Although some *Unonopsis* species are used in traditional medicine, such as *U. venefictorum* and *U. stipitata* (Adams et al., 2007), there are no reports about medicinal uses of *Bocageopsis* species.

In the present study, the leaves of *B. canescens* were collected in January 2018 at the Ranch good friends (19 km along the BR-174 highway, in the city of Manaus, Amazonas state, Brazil, 6°05'13.1"W 2°49'55.2"S), and identified by Prof. Antonio Carlos Webber from the Department of Biology from Federal University of Amazon (UFAM). The plant was identified by comparison of their morphology and taxonomy characteristics with that described in Flora of Brazil (Maas et al., 2007, 2015). A voucher specimen (# 10234) was deposited in the Herbarium of UFAM.

2. Previous work

Previous phytochemical investigations point out *Bocageopsis* species as a promising source of alkaloids, particularly isoquinoline-derived (Soares et al., 2015), and terpenoids (Silva et al., 2015; Oliveira et al., 2014; Alcântara et al., 2017). There are no previous phytochemical investigations on *B. canescens*.

3. Present study

The dried and powdered leaves of *B. canescens* (300 g) were directly subjected to an acid-base extraction (Soares et al., 2015) to give an alkaloid-rich fraction (300 mg), and it was also extracted with distilled water (1 g) (Silva et al., 2019) to give a flavonoid glycosides-rich extract (120 mg). Therefore, a part of the alkaloidal fraction (100 mg) was subjected to fractionation by semi-preparative HPLC, model UFLC (Shimadzu - Columbia, MD, USA), using a formic acid aqueous solution (2.0%, v/v) (A) and methanol (B) as mobile phases. The gradient elution was as follows: 0–14 min, 20–100% B (v/v), at a flow rate of 3.5 mL/min. A C18 column (250 mm × 15 mm, 5 μm) (Phenomenex - Torrance, CA, USA), was employed on the fractionation being monitored the UV channels at 280 and 354 nm. Four injections were carried into the column in MeOH (100 μL) affording compounds 1 (3.5 mg), 2 (3.0 mg),

* Corresponding author.

E-mail address: elzalina.ufam@gmail.com (E.R. Soares).

<https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.05.007>

Received 8 April 2019; Received in revised form 10 May 2019; Accepted 15 May 2019

Available online 04 June 2019

0305-1978/ © 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

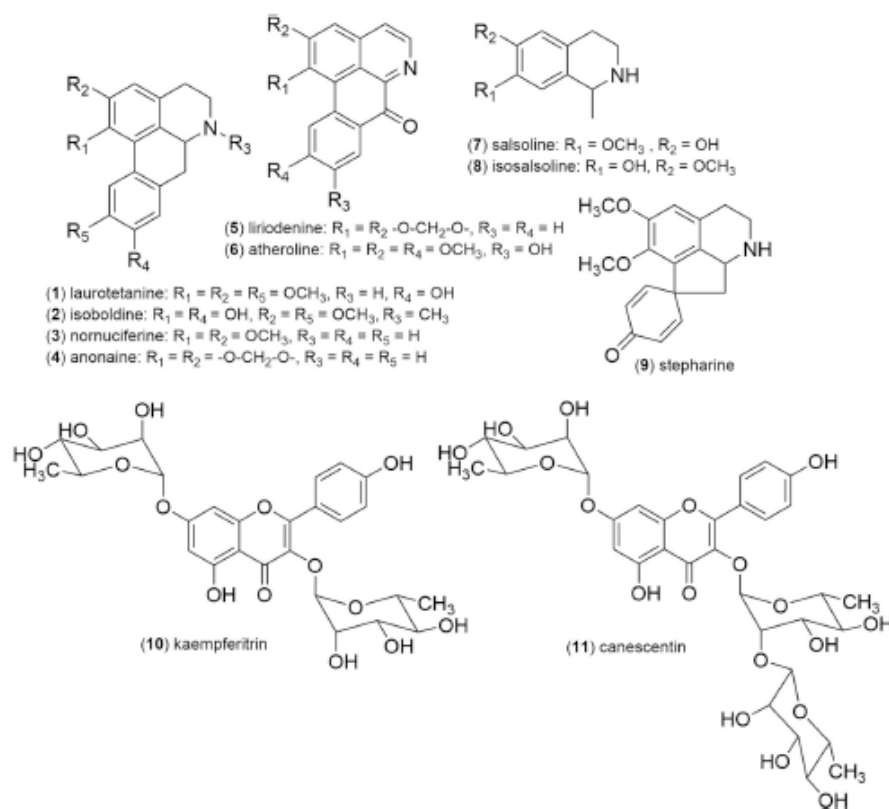


Fig. 1. Chemical structures of isoquinoline-derived alkaloids and flavonoid glycosides isolated from the leaves of *B. canescens*.

3 (1.2 mg), 4 (2.5 mg), 5 (3.0 mg), 6 (3.5 mg), a mixture of 7 and 8 (4.0 mg), and 9 (3.3 mg). The aqueous extract was submitted to the same chromatographic protocol, being monitored the UV channels at 260 and 345 nm, affording compounds 10 (10 mg) and 11 (15 mg).

In this study, one new flavonoid glycoside (11), one known flavonoid glycoside (10), and nine isoquinoline-derived alkaloids (1–9) (Fig. 1) were isolated from the leaves of *B. canescens*. The known compounds were identified as laurotetanine (1) (Soares et al., 2015), isoboldine (2) (Soares et al., 2015), normuciferine (3) (Silva et al., 2018a), anonaline (4) (Soares et al., 2015), liriodenine (5) (Silva et al., 2018a), atheroline (6) (Fienena et al., 2016), salsoline (7), isosalsoline (8) (Kurnik-Lucka et al., 2017), stepharine (9) (Soares et al., 2015), and kaempferol-3,7-O- α -L-rhamnoside (kaempferitrin) (10) (Chaturvedula and Prakash, 2011), based on their NMR and MS data (Supplementary Material), as well as comparison with data previously reported in the literature.

Compound 11 was obtained as a yellowish, amorphous powder. Its molecular formula was determined as $\text{C}_{35}\text{H}_{40}\text{O}_{18}$ by ^{13}C -NMR and HRESIMS, afford a protonated molecule at m/z 725.2309 $[\text{M} + \text{H}]^+$ (calcd. 725.2293). In addition, the MS/MS spectra of compound 11 showed fragment ions at m/z 579.1714, 433.1133, and 287.0542 $[\text{Ag}]^+$, suggesting the presence of three deoxyhexose units in 11. The ^1H -NMR, ^{13}C -NMR, HSQC, and HMBC spectra of 11 exhibited similar signals to the previously reported kaempferol glycoside named kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- α -L-rhamnopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranoside (Li et al., 2015), presenting as unique

difference the configuration of the anomeric proton $\text{H}-1'''$ (δ_{H} 4.19, 1H, d, 7.8 Hz). This configuration was attributed as β through the characteristic chemical shift and large coupling constant expected for β anomeric hydrogens (Gurst, 1991). Based on the above evidence, compound 11 was determined as kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- β -L-rhamnopyranosyl-7-O- α -L-rhamnopyranoside, named canescentin (Fig. 1).

4. Chemotaxonomic significance

The aporphine alkaloids laurotetanine, isoboldine, normuciferine, and anonaline, along with the proaporphine alkaloid stepharine, were previously reported in *B. pletosperma* (Soares et al., 2015). Normuciferine, anonaline and stepharine were also reported in several species from the close related genus *Unonopsis* (Rocha et al., 2018; Silva et al., 2012; 2014a; 2018a; 2018b). The oxoaporphine alkaloid atheroline was previously identified in *Guatteria scandens* (Hocquemiller et al., 1983) and more recently in *Colubrina decipiens* (Baill.) Capuron (Rhamnaceae) (Fienena et al., 2016). This is the second report in the Annonaceae family. The simple isoquinoline alkaloids salsoline and isosalsoline are derived from salsolinol, a tetrahydroisoquinoline alkaloid known as inductor of parkinsonism and indicative, in humans, of chronic alcohol consumption (Iwasa et al., 1991). These alkaloids are synthesized from the methylations of the C-6 and C-7 hydroxyl groups of salsolinol, generating the two constitutional isomers (Kurnik-Lucka et al., 2017). The precursor salsolinol has been reported in *Annona reticulata* (Forgacs

et al., 1981), however, this is the first report of salsoline and isosalsoline in the Annonaceae family. The flavonoid kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnoside, also known as kaempferitrin, is quite reported in several species of plants, such as *Sedum dendroideum* (Crassulaceae) (Silva et al., 2014b) *Vicia faba* (Fabaceae) (Tselepi et al., 2011), *Cleome viscosa* (Cleomaceae) (Nguyen et al., 2017), *Hibiscus cannabinus* (Malvaceae) (Rho et al., 2011), *Dryopteris crassirhizoma* (Dryopteridaceae) (Jiang et al., 2013), and *Ixora coccinea* (Rubiaceae) (Idowu et al., 2010). Nonetheless, this is the second report of kaempferitrin in the Annonaceae family, being this compound previously identified in *Pistia capitatum* (Nguyen et al., 2005). Flavonoid glycosides are recurrent in Annonaceae, being quercetin and kaempferol mono- and diglycosides the main representative within this family. These compounds were previously reported from *Xylopleura emarginata* (Moreira et al., 2003), *X. ferruginea* (Zawawi et al., 2012), *Piptostigma fasciculata* (Seidel et al., 1999), *Oxandra sessiliflora* (Sousa et al., 2014), *Artabotrys hexapetalus* (Somanawat et al., 2012), and from several *Annona* species (Novaes et al., 2018). Kaempferol triglycosides, in special trirhamnosides, such as canescetin, are unusual in Annonaceae. The occurrence of these compounds was previously reported in *Matteuccia struthiopteris* (Onocleaceae) (Li et al., 2015), *Cashtopstis madagascariensis* (Icacinaceae) (Rasoaivalo et al., 1990), and *Justicia spicigera* (Acanthaceae) (Euler and Alam, 1982). Our findings in the phytochemical study of *B. canescens* reinforce the chemotaxonomic significance of flavonoid glycosides and isoquinoline-derived alkaloids for Annonaceae family, particularly, to the *Bocageopsis* and close-related genera.

Acknowledgements

The authors are grateful to Central Analítica (UFAM and INPA) for instrumental analysis, CAPES, CNPq, FINEP, and FAPEAM for the financial support.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.bse.2019.05.007>.

References

- Adams, M., Gmunder, F., Hamburger, M., 2007. *J. Ethnopharmacol.* 113, 363.
- Alcántara, J.M., Lucena, J.M.V.M., Facanali, R., Marques, M.O.M., Lima, M.P., 2017. *Nat. Prod. Commun.* 12, 622.
- Chaturvedi, V.S.P., Prakash, I., 2011. *J. Chem. Pharm. Res.* 3, 804.
- Euler, K.L., Alam, M., 1982. *J. Nat. Prod.* 45, 220.
- Fleena, R.F., Rasoaivalo, L.H., Wadouchi, A., Rajemlarimimho, M., Ramahambimanana, J.K., Raharisoalalao, A., 2016. *Int. J. Chem. Stud.* 4, 117.
- Forgacs, P., Desconclots, J.F., Mansard, D., Provost, J., Tiberghien, R., Tocquer, J., Touché, A., 1981. *Plantes Med. Phytotherap.* 15, 10.
- Gurst, J.E., 1991. *J. Chem. Educ.* 68, 1003.
- Hocquemiller, R., Rasamizafy, S., Cave, A., Moretti, C., 1983. *J. Nat. Prod.* 46, 341.
- Idowu, T.O., Ogundaini, A.O., Salau, A.O., Obuotor, E.M., Bezabih, M., Abegaz, B.M., 2010. *Phytochemistry* 71, 2098.
- Iwasa, K., Kamiguchi, M., Takao, N., 1991. *Phytochemistry* 30, 2975.
- Jiang, B., Chi, C., Fu, Y.W., Zhang, Q.Z., Wang, G.X., 2013. *Parasitol. Res.* 112, 4097.
- Kuruk-Lucka, M., Pamula, P., Bugajski, A., Gil, K., 2017. *Neurotox. Res.* 33, 514.
- Li, B., Ni, Y., Zhu, L.J., Wu, F.B., Yan, F., Zhang, X., Yao, X.S., 2015. *J. Nat. Prod.* 78, 995.
- Maas, P.J.M., Westra, L.Y.T., Vermeer, M., 2007. *Blumea* 52, 413.
- Maas, P., Lobbo, A., Ratner, H., 2015. accessed April 2018. <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110271>.
- Moreira, I.C., Lago, J.H.G., Roque, N.F., 2003. *Biochem. Syst. Ecol.* 5, 535.
- Nguyen, T.H.A., Nguyen, T.H.V., Le, T.H.N., Tran, V.S., 2005. *Tap Chi Hoa Hoc* 43, 478.
- Nguyen, T.P., Tran, C.L., Vuong, C.H., Do, T.H.T., Le, T.D., Mai, D.T., Phan, N.M., 2017. *Nat. Prod. Res.* 31, 2587.
- Novaes, P., Ferreira, M.J.F., Santos, D.Y.A.C., 2018. *Biochem. Syst. Ecol.* 78, 77.
- Oliveira, E.S.C., Amaral, A.C.F., Lima, E.S., Silva, J.R.A., 2014. *J. Essent. Oil Res.* 26, 165.
- Rasoaivalo, P., Ratsimamanga-Urverg, S., Messana, I., De Vicente, Y., Galeffi, C., 1990. *Phytochemistry* 29, 2040.
- Rho, H.S., Ghimeray, A.K., Yoo, D.S., Ahn, S.M., Kwon, S.S., Lee, K.H., Cho, J.Y., 2011. *Molecules* 16, 3338.
- Rocha, P.R.N., Freitas, F.A., Angolini, C.F.F., Vasconcelos, F.L.S., Silva, A.L.B., Costa, E.V., Silva, F.M.A., Eberlin, M.N., Bataglion, G.A., Soares, P.K., Koolen, H.H.F., 2018. *Phytochem. Anal.* 1, 8.
- Seidel, V., Bulleuf, F., Waterman, P.G., 1999. *Biochem. Syst. Ecol.* 27, 543.
- Silva, F.M.A., Koolen, H.H.F., Almeida, R.A., Souza, A.D.L., Pinheiro, M.L.B., Costa, E.V.C., 2012. *Quim. Nova* 35, 944.
- Silva, F.M.A., Souza, A.D.L., Koolen, H.H.F., Barison, A., Vendramin, M.E., Costa, E.V., Ferreira, A.G., Pinheiro, M.L.B., 2014a. *Phytochem. Anal.* 25, 45.
- Silva, D., Casanova, L.M., Marcondes, M.C., Espindola-Netto, J.M., Fakhro, L.P., Melo, G.O., Costa, S.S., 2014. *IUBMB Life* 66, 361.
- Silva, F.M.A., Lima, B.R., Soares, E.R., Almeida, R.A., Silva-Filho, F.A., Correa, W.R., Salvador, M.J., Souza, A.Q.L., Koolen, H.H.F., Souza, A.D.L., Pinheiro, M.L.B., 2015. *Rev. Bras. Farmacogn.* 25, 11.
- Silva, F.M.A., Silva-Filho, F.A., Souza, C.A.S., Maciel, J.B., Costa, E.V., Barison, A., Koolen, H.H.F., Souza, A.D.L., Pinheiro, M.L.B., 2018a. *Biochem. Syst. Ecol.* 79, 14.
- Silva, F.M.A., Silva-Filho, F.A., Souza, C.A.S., Maciel, J.B., Costa, E.V., Barison, A., Koolen, H.H.F., Souza, A.D.L., Pinheiro, M.L.B., 2018b. *Biochem. Syst. Ecol.* 79, 71.
- Silva, F.M.A., Hanna, A.C.S., Souza, A.A., Silva-Filho, F.A., Canhoto, O.M.F., Magalhães, A., Benevides, P.J.C., Azevedo, M.B.M., Stani, A.C., Pohlt, A.M., Souza, A.D.L., Koolen, H.H.F., 2019. *J. Braz. Chem. Soc.* 30, 830.
- Soares, E.R., Silva, F.M.A., Almeida, R.A., Lima, B.R., Silva-Filho, F.A., Koolen, H.H.F., Pinheiro, M.L.B., Souza, A.D.L., 2015. *Phytochem. Anal.* 26, 339.
- Somanawat, J., Talangst, N., Deepolngam, S., Kaewamatawong, R., 2012. *Biochem. Syst. Ecol.* 44, 124.
- Sousa, E.A.D., Silva, A.A., Cavalcete, A.J., Lago, J.H.G., Chaves, M.H., 2014. *J. Braz. Chem. Soc.* 25, 704.
- Tselepi, M., Papachristou, E., Emmanouilidi, A., Angelis, A., Alligianis, N., Skaltsounis, A.L., Liadaki, K., 2011. *J. Nat. Prod.* 74, 2362.
- Zawawi, N.K.N.A., Ahmat, N., Ahmad, R., Jaafar, F.M., Ab Ghani, N., 2012. *Biochem. Syst. Ecol.* 43, 7.