



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ – UFPR
SETOR DE CIÊNCIAS EXATAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ANDERSON ROGÉRIO DOS SANTOS

ALCALOIDES E CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE TRÊS ESPÉCIES DE
GUATTERIA, AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIPROLIFERATIVA E
ANTIMICROBIANA E ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE UM ALCALOIDE
OXOAPORFÍNICO E SEUS PRECURSORES SINTÉTICOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

CURITIBA 2014

ANDERSON ROGÉRIO DOS SANTOS

ALCALOIDES E CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE TRÊS ESPÉCIES DE
GUATTERIA, AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIPROLIFERATIVA E
ANTIMICROBIANA E ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE UM ALCALOIDE
OXOAPORFÍNICO E SEUS PRECURSORES SINTÉTICOS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração em Química Orgânica, Setor de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia

Co-Orientador: Prof. Dr. Francisco de Assis Marques.

CURITIBA 2014

S237a

Santos, Anderson Rogério dos

Alcalóides e constituintes voláteis de três espécies de *Guatteria*, avaliação das atividades atiproliferativa e antimicrobiana e estudos de biotransformação de um alcalóide oxoaporfínico e seus precursores sintéticos/ Anderson Rogério dos Santos. – Curitiba, 2014.

131 f. : il. color. ; 30 cm.

Tese - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Exatas, Programa de Pós-graduação em Química, 2014.

Orientador: Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia – Co-orientador: Francisco de Assis Marques.

Bibliografia: p. 91-98.

1. Anonaceas. 2. Fitoquímica. 3. Agentes anti-infecciosos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Maia, Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales. III. Marques, Francisco de Assis. IV. Título.

CDD: 583.22

TERMO DE APROVAÇÃO

ALCALÓIDES E CONSTITUINTES VOLÁTEIS DE TRÊS ESPÉCIES DE GUATTERIA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA E ANTIMICROBIANA, ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO DE UM ALCALÓIDE OXOAPORFÍNICO E SEUS PRECURSORES SINTÉTICOS

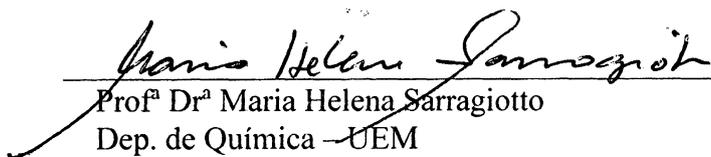
por

ANDERSON ROGÉRIO DOS SANTOS

Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Química, pela Comissão Examinadora composta por:



Orientadora: Prof^a Dr^a Beatriz Helena Lameiro Noronha Sales Maia
Dep. de Química – UFPR



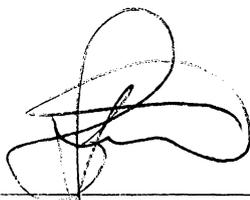
Prof^a Dr^a Maria Helena Sarragiotto
Dep. de Química – UEM



Prof. Dr. João Henrique Ghilardi Lago
Dep. de Ciências Exatas e da Terra – UNIFESP



Prof^a Dr^a Ana Luísa Lacava Lordello
Dep. de Química – UFPR



Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira
Dep. de Química – UFPR

Curitiba, 26 de março de 2014.

CORAGEM

*“Se o que você está percorrendo é o caminho dos seus verdadeiros sonhos,
comprometa-se com ele.*

*Não deixe a porta de saída aberta, através da desculpa: “Ainda não é bem isto que
eu queria”.*

Esta frase guarda dentro dela a semente da derrota.

*Assuma o seu caminho mesmo que precise dar passos incertos, mesmo que saiba
que pode fazer melhor o que está fazendo.*

*Se você aceitar suas possibilidades no presente, vai melhorar no futuro, mas se
negar suas limitações, jamais se verá livre delas.*

Enfrente seu caminho com coragem, não tenha medo da crítica dos outros.

E, sobretudo, não se deixe paralisar por sua própria crítica.

*Deus estará sempre com você nas noites insones, e enxugará com seu amor as
lágrimas ocultas”.*

Paulo Coelho

Dedico este trabalho à minha família, especialmente, a minha mãe Aparecida pelo amor, apoio e compreensão e aos meus irmãos Cleusa, João Luiz, Nelson e Cleunice pelo amor e constante apoio nesta etapa de minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por estar comigo em todos os instantes da minha vida,

A Profa. Dra. Beatriz Helena Lameiro de Noronha Sales Maia (Bia Helena) pela oportunidade concedida em trabalhar sob sua orientação, pelas valiosas discussões sobre o trabalho, pela amizade e por todos os bons momentos vividos junto ao seu grupo de pesquisa,

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Francisco de Assis Marques pela contribuição nas discussões relativas à síntese do alcaloide, empréstimo de reagentes, amizade e apoio na realização deste trabalho,

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Paraná por ter me dado à oportunidade de me aperfeiçoar na área de Química Orgânica,

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa de doutorado, a qual foi imprescindível para que me dedicasse, exclusivamente, à conclusão deste trabalho,

Ao Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira pelas discussões sobre os ensaios de biotransformação e por ter cedido o seu laboratório para realização dos mesmos,

À Profa. Dra. Ana Luísa Lacava Lordello pela amizade e pelas valiosas discussões que contribuíram muito para minha formação acadêmica,

Ao Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA)-Unicamp, em especial, os pesquisadores Dr. João Ernesto de Carvalho e Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte pelos ensaios de atividade antiproliferativa e antimicrobiana,

À Profa. Dra. Adriana Quintella Lobão da Universidade Federal Fluminense e ao Prof. Dr. Renato Mello-Silva da Universidade de São Paulo pela identificação e coleta do material vegetal utilizado neste estudo,

Aos meus sobrinhos e co-sobrinhos, sem nenhuma distinção, pelo apoio, amizade e credibilidade,

Aos meus pequenos Isabelly, Maria Clara, Davi, Maria Fernanda, Isadora e Enzo (que está por vir), pelo simples sorriso cada vez que me encontram,

Ao Sr. João Franciscatti pelo apoio, amizade e por acreditar na conclusão deste trabalho,

Ao meu amigo Evandro Lemos Brasileiro (Avril) pela amizade, companheirismo, apoio e por não ter surtado após 3 anos de convivência (acredito que foi uma honra conviver comigo),

Ao meu amigo João Ricardo Costa pela amizade, parceria e pela colaboração na formatação dos meus trabalhos acadêmicos,

Ao meu amigo Prof. Dr. Carlos Humberto Martins por ter sempre me incentivado a realizar o doutorado e por ter acreditado no meu potencial,

Aos meus amigos Marcos Vinicius, Renata, Lilian, Keila, Delise, Junior, Juliana, Fábio Machado e Alex pela valiosa amizade e pelas visitas à minha casa,

Aos meus amigos “Curitibanos” Wagner, Adriano Diel, Jonathan, Daniel Sellmer, Carioca, Chrystiane, Daniel Del Conte, Mahyra, Carina, Débora e tantos outros, pela amizade, carinho e receptividade,

Aos acadêmicos Cassiano Pires e Angelita Nepel pela amizade e por ter contribuído para a conclusão deste trabalho,

À Keylla pela amizade, ajuda e presteza nos ensaios de biotransformação,

Aos meus amigos do Lapneq Nelissa (Nell Pacheco), Thalita, Edione (Edi Canzi), Carol, Marineli, Renata, Kahlil, Regiane, Maria Helena e Dilamara pelos anos de convivência, amizade, diversão e gargalhadas, sem vocês o lab. não seria o mesmo,

Aos funcionários do Departamento de Química Marcelino, Diel, Mirian, Denis e Selma por todo auxílio durante a realização deste trabalho,

Aos professores doutores Luiz Pereira Ramos, Francisco de Assis Marques, Giovana Gioppo Nunes, Paulo Henrique Gorgatti Zarbin, Leandro Piovan e Bruno José Gonçalves pelos cursos ministrados que contribuíram para minha formação,

Enfim, agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a minha formação acadêmica e para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	6
2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ANNONACEAE E O GÊNERO <i>GUATTERIA</i>	6
2.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E USOS POPULARES	6
2.3. PRINCIPAIS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ANNONACEAE	8
2.4. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DOS APORFINOIDES	11
2.5. BIOSÍNTESE DE ALCALOIDES APORFINOIDES	13
2.6. ESPÉCIES QUIMICAMENTE ESTUDADAS	17
2.7. SÍNTESE DE ALCALOIDES OXOAPORFÍNICOS	22
2.8. BIOTRANSFORMAÇÃO	26
3. OBJETIVOS	32
3.1. GERAL	32
3.2. ESPECÍFICOS	32
4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS	33
4.1. SUPORTES PARA CROMATOGRAFIA	33
4.2. EQUIPAMENTOS	34
5. COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA	36
5.1. EXTRAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS	36
5.2. ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS POR CG-EM	37
5.3. ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>G. latifolia</i>	37
5.3.1. ESTUDO DA FRAÇÃO D	40
5.3.2. ESTUDO DA FRAÇÃO D4	40
5.3.3. ESTUDO DA FRAÇÃO B	41
5.3.4. ESTUDO DA FRAÇÃO B6	41
5.3.5. ESTUDO DA FRAÇÃO B6.2	42

5.3.6. ESTUDO DA FRAÇÃO B6.2.4.....	42
5.3.7. ESTUDO DA FRAÇÃO B6.2.3.....	43
5.3.8. ESTUDO DA FRAÇÃO B6.2.3.8.....	43
5.4. ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>G. ferruginea</i>	44
5.4.1. ESTUDO DA FRAÇÃO F.....	45
5.4.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO F2	46
5.4.3. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO F2.5	47
5.4.4. ESTUDO DA FRAÇÃO G	47
5.4.5. ESTUDO DA FRAÇÃO G4	48
5.5. ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>G. sellowiana</i>	48
5.5.1. ESTUDO DA COLEÇÃO A.....	49
5.5.2. ESTUDO DA FRAÇÃO H	49
5.5.3. ESTUDO DA FRAÇÃO H6	50
5.5.4. ESTUDO DA COLEÇÃO C.....	50
5.5.5. ESTUDO DA FRAÇÃO L.....	51
5.5.6. ESTUDO DA FRAÇÃO L6.....	51
5.5.7. ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>G. sellowiana</i> COLETADA NO PARQUE NACIONAL DE ITATIAIA/RJ.....	52
5.5.8. ESTUDO DA FRAÇÃO P.....	52
5.5.9. ESTUDO DA FRAÇÃO P2.....	53
5.6. SÍNTESE DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO 7-OXO-7H-DIBENZO-QUINOLINA-4,5-DICARBOXILATO DE DIMETILA.....	54
5.6.1. SÍNTESE DA (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA-9-OXIMA	54
5.6.2. PREPARAÇÃO DO DERIVADO (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA-9-METILOXIMA (30)	55
5.6.3. SÍNTESE DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO 7-OXO-7H-DIBENZO-QUINOLINA-4,5-DICARBOXILATO DE DIMETILA (31).....	55
5.7. ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO (EM ESCALA ANALÍTICA).....	56

5.7.1. MANUTENÇÃO DAS CEPAS.....	56
5.7.2. FUNGOS	56
5.7.3. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA.....	56
5.7.4. ENSAIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DA (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA (48).....	57
5.7.5. ENSAIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DA (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA-9-OXIMA (49).....	57
5.7.6. ENSAIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA ANALÍTICA DOS COMPOSTOS (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA-9-METIL-OXIMA (30) E DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO 7-OXO-7H-DIBENZO-QUINOLINA-4,5-DICARBOXILATO DE DIMETILA (31).....	58
5.8. TESTES BIOLÓGICOS.....	59
5.8.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	60
5.8.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA (ATIVIDADE ANTITUMORAL <i>IN VITRO</i>).....	60
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	62
6.1. DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS	62
6.2. ALCALOIDES ISOLADOS DAS ESPÉCIES DE <i>GUATTERIA</i>	68
6.3. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS	69
6.4. SÍNTESE DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO 7-OXO-7H-DIBENZO-QUINOLINA-4,5-DICARBOXILATO DE DIMETILA.....	75
6.5. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS PRECURSORES SINTÉTICOS E DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO.....	81
6.6. TESTES BIOLÓGICOS.....	83
6.6.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	83
6.6.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA.....	86
7. CONCLUSÃO.....	89
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista das espécies de Annonaceae com suas potencialidades de uso das espécies.....	7
Tabela 2: Alguns exemplos de atividades biológicas e farmacológicas descritas na literatura para alcaloides aporfínicos.....	13
Tabela 3: Classificação taxonômica das espécies em estudo.....	22
Tabela 4: Concentração das soluções dos constituintes voláteis das espécies de <i>Guatteria</i>	37
Tabela 5: Valores das massas obtidas após a extração ácido-base	40
Tabela 6: Fracionamento resultante da fração orgânica alcaloídica (diclorometano)	40
Tabela 7: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração B41	41
Tabela 8: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração B6	42
Tabela 9: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica modificada com bicarbonato de sódio da fração B6.2.....	42
Tabela 10: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica modificada com bicarbonato de sódio da fração B6.2.3	43
Tabela 11: Valores das massas obtidas após a extração ácido-base	45
Tabela 12: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da Fração F... ..	46
Tabela 13: Purificação da Fração F2 por cromatografia centrífuga em camada delgada	47
Tabela 14: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica da Fração G	48
Tabela 15: Frações resultantes da extração ácido-base da coleção A.....	49
Tabela 16: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração H....	50
Tabela 17: Frações resultantes da extração ácido-base da coleção C.....	50
Tabela 18: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração L.	51
Tabela 19: Particionamento do extrato bruto metanólico de <i>G. sellowiana</i>	52
Tabela 20: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração P....	53
Tabela 21: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração P2..	53

Tabela 22: Tempo de crescimento dos fungos após inoculação	56
Tabela 23: Constituintes voláteis das partes aéreas de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	64
Tabela 24: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ , ppm) obtidos para (50) presente no óleo essencial de <i>G. australis</i> e comparação com dados da literatura.....	67
Tabela 25: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para (48).....	75
Tabela 26: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para (49).....	77
Tabela 27: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para (30).....	79
Tabela 28: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para (31).....	81
Tabela 29: Atividade antimicrobiana dos extratos e frações das espécies de <i>Guatteria</i>	84
Tabela 30: Atividade antimicrobiana para os constituintes voláteis das espécies de <i>Guatteria</i>	84
Tabela 31: Atividade antimicrobiana dos precursores sintéticos do alcaloide oxoaporfínico (31).	85
Tabela 32: Atividade antiproliferativa dos extratos brutos das espécies de <i>Guatteria</i>	86
Tabela 33: Atividade antiproliferativa dos constituintes voláteis das espécies de <i>Guatteria</i>	87
Tabela 34: Atividade antiproliferativa para os precursores sintéticos e para o alcaloide oxoaporfínico (31).	88
Tabela 35: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância GL-1 e dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da literatura para a 3-hidroxi-nornuciferina.....	126
Tabela 36: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a mistura GL-4 e dados de RMN de ^{13}C da literatura para a nornuciferina e anonaína	127
Tabela 37: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância GL-2 e dados de RMN de ^1H da literatura para a lisicamina.....	128
Tabela 38: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância GL-3 e dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da literatura para a isomoscatolina.....	129
Tabela 39: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância GF-1 e dados de RMN de ^1H da literatura para a liriodenina	130
Tabela 40: Dados de RMN de ^1H para a substância GS-1 isolado de <i>G. sellowiana</i> e dados de RMN de ^1H da literatura para a O-metilmoscatolina	131

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Alguns fármacos derivados de plantas medicinais	4
Figura 2: Distribuição de metabólitos secundários isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i>	9
Figura 3: Alcaloides encontrados na família Annonaceae	10
Figura 4: Esqueletos básicos dos aporfinoídeos	11
Figura 5: Estrutura química dos aporfinoídeos empregados na indústria farmacêutica	12
Figura 6: Esqueleto básico dos alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos.....	14
Figura 7: Imagem dos frutos da espécie <i>Guatteria australis</i>	18
Figura 8: Imagem da espécie <i>Guatteria ferruginea</i>	19
Figura 9: Imagem da espécie <i>Guatteria latifolia</i>	20
Figura 10: Imagem da espécie <i>Guatteria sellowiana</i>	21
Figura 11: Estrutura dos alcaloides oxoglaucina (10) e liriodenina (11)	23
Figura 12: Produtos de biotransformação da sampangina por fungos em diversos estágios.	31
Figura 13: Controle e teste frente ao fungo <i>R. orizae</i>	58
Figura 14: Substratos submetidos à reação de biotransformação.....	82

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Biossíntese dos alcaloides benzilisoquinolínicos.....	15
Esquema 2: Biossíntese dos alcaloides aporfínicos.....	15
Esquema 3: Biossíntese dos alcaloides aporfínicos a partir de um intermediário proaporfino	16
Esquema 4: Biossíntese dos alcaloides oxoaporfínicos	17
Esquema 5: Metodologia para a síntese do alcaloide oxoaporfínico atherolina (17)	23
Esquema 6: Metodologia empregada para a síntese do alcaloide oxodiscoguattina	24
Esquema 7: Síntese de derivados oxoaporfínicos (35a-h).....	25
Esquema 8: Biotransformação da dictioflebina (36) pelo fungo <i>Rhizopus stolonifer</i>	29
Esquema 9: Biotransformação da papaveraldina (40) pelo fungo <i>Mucor ramannianus</i>	30
Esquema 10: Biotransformação da morfina (43) pelo fungo <i>C. didymum</i>	30
Esquema 11: Procedimento empregado para obtenção das frações de diferentes polaridades.....	38
Esquema 12: Procedimento empregado para obtenção das frações neutra e alcaloídica.	39
Esquema 13: Procedimento geral da extração ácido-base	45
Esquema 14: Rota sintética empregada para a obtenção do alcaloide 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila.....	54
Esquema 15: Mecanismo de reação envolvido na formação de (49).....	76
Esquema 16: Mecanismo de reação envolvido na formação de (31).....	80

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do óleo essencial de <i>G. australis</i> para identificação do espatulenol (50).....	66
Espectro 2: RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do óleo essencial de <i>G. australis</i> para identificação do espatulenol (50).....	67
Espectro 3: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GL-1	100
Espectro 3a: Ampliação da região alifática do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GL-1.	1001
Espectro 4: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de GL-1	102
Espectro 5: Experimento de NOE (irradiação do sinal em δ 3,72 ppm) de GL-1	103
Espectro 6: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GL-4	104
Espectro 7: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de GL-4	105
Espectro 8: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GL-2	106
Espectro 9: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de GL-2	107
Espectro 10: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de GL-2	108
Espectro 11: RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de GL-3	109
Espectro 12: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CD_3OD) de GL-3	110
Espectro 13: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GF-1	111
Espectro 14: Mapa de contornos HSQC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de GF-1	112
Espectro 15: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de GF-1	113
Espectro 16: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GS-1	114
Espectro 17: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de GS-1	115
Espectro 18: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de (48).....	118
Espectro 19: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de (48).....	119
Espectro 20: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de (49).....	118

Espectro 21: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de (49)	119
Espectro 22: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz – ^{13}C 100 MHz) de (49)	120
Espectro 23: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de (30)	121
Espectro 24: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de (30)	122
Espectro 25: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de (31)	123
Espectro 26: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de (31)	124
Espectro 27: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz – ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de (31)	125

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μg	Micrograma
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CCDP	Cromatografia em Camada Delgada Preparativa
CCT	Coleção de Culturas Tropical
CD_3OD	Metanol deuterado
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia de fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CMI	Concentração Mínima Inibitória
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
ddd	Duplo duplo dupleto
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMAD	Acetilenodicarboxilato de dimetila
EBGF	Extrato Bruto de <i>Guatteria ferruginea</i>
EBGL	Extrato Bruto de <i>Guatteria latifolia</i>
EBGS	Extrato Bruto de <i>Guatteria sellowiana</i>
eV	Elétronvolt
FAGS	Fração Alcaloídica de <i>Guatteria sellowiana</i>
g	Gramma
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamento
L	Litro
m	multiplete
mg	Miligrama
MHz	Megahertz
mL	Mililitro

nm	Nanômetro
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
ppb	Parte por bilhão
ppm	Parte por milhão
Pseudoax.	Pseudoaxial
Pseudoeq.	Pseudoequatorial
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
rpm	Rotações por minuto
s	Simpleto
TGI	<i>Total Growth Inhibition</i>
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento químico

Palavras-chave: *Guatteria australis*, *Guatteria ferruginea*, *Guatteria latifolia*, *Guatteria sellowiana*, constituintes voláteis, síntese do alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila, biotransformação, atividade antimicrobiana e atividade antiproliferativa.

RESUMO

O gênero Neotropical *Guatteria* Ruiz & Pav. é representado por cerca de 265 espécies o que corresponde a aproximadamente 10% das espécies pertencentes a família Annonaceae. No presente trabalho é descrito o estudo fitoquímico, o estudo dos constituintes voláteis, avaliação da atividade antiproliferativa e antimicrobiana de quatro espécies de *Guatteria* nativas da Mata Atlântica, são elas: *Guatteria australis*, *Guatteria ferruginea*, *Guatteria latifolia* e *Guatteria sellowiana*. Além do estudo com as espécies vegetais realizou-se a síntese do alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila, avaliou-se atividade antimicrobiana e antiproliferativa, assim como de seus precursores sintéticos, além da utilização do alcaloide sintético e precursores como substratos para reações de biotransformação empregando os fungos *Aspergillus flavus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus orizae*, *Chaetomium* 56 e *Bipolaris sorokiniana*. As partes aéreas das espécies *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana* foram submetidas à extração em temperatura ambiente com metanol. Os extratos obtidos foram submetidos à extração ácido-base para a obtenção dos alcaloides. Os extratos brutos foram avaliados quanto à atividade antimicrobiana e antiproliferativa. O estudo fitoquímico de *G. latifolia* resultou na identificação de seis alcaloides, sendo três aporfínicos 3-hidroxinornuciferina e a mistura de anonaína e nornuciferina, e três oxoaporfínicos isomoscatolina e a mistura de lisicamina e liriodenina. O estudo fitoquímico de *G. ferruginea* resultou no isolamento do alcaloide oxoaporfínico liriodenina. Para a espécie *G. sellowiana* foram isolados o alcaloide aporfínico nornuciferina e os alcaloides oxoaporfínicos lisicamina e 3-O-metilmoscatolina. As estruturas das substâncias isoladas foram definidas com base na análise dos dados espectroscópicos de RMN de ^1H e de ^{13}C , DEPT, incluindo técnicas bidimensionais como HSQC e HMBC. Para a espécie *G. australis* foi realizado apenas o estudo dos constituintes voláteis e sua atividade antimicrobiana e antiproliferativa. Quanto à composição química dos constituintes voláteis foram identificados 25, 27, 22 e 19 componentes majoritários para as espécies *G. australis*, *G. latifolia*, *G. ferruginea* e *G. sellowiana*, respectivamente. Os sesquiterpenos oxigenados foram encontrados em maior concentração nas quatro espécies seguidos pelos monoterpenos oxigenados. O sesquiterpeno espatulenol foi o constituinte majoritário nos óleos essenciais de *G. australis* com 40,29% e foi encontrado em alta concentração nos óleos de *G. latifolia* (22,21%), *G. ferruginea* (11,04%) e *G. sellowiana* (23,0%). A síntese do alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila foi realizada em três etapas com rendimento global de 28,5%. A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos das espécies *G. ferruginea*, *G. latifolia*, *G. sellowiana* e fração alcaloídica de *G. sellowiana* mostrou que somente o extrato bruto de *G. ferruginea* foi ativo frente à bactéria *Staphylococcus aureus*. A fração alcaloídica de *G. sellowiana* foi ativa frente às bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e contra a levedura *Candida albicans*. A avaliação da atividade antimicrobiana dos constituintes voláteis mostrou que as quatro espécies de *Guatteria* foram ativas frente a diversas linhagens de bactérias. O alcaloide

oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila e seus precursores quando testada a atividade antimicrobiana verificou-se ser ativo frente a diversas linhagens de bactérias e para a levedura *C. albicans*. A atividade antiproliferativa dos extratos brutos metanólicos das espécies *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana* foi testada e mostrou fraca atividade para os extratos de *G. latifolia* sendo os demais extratos inativos. Os constituintes voláteis das quatro espécies de *Guatteria* apresentaram forte atividade frente à linhagem tumoral OVCAR-3 (ovário), além da forte atividade apresentada para os constituintes voláteis de *G. sellowiana* frente a linhagem K562 (leucemia). A avaliação da atividade antiproliferativa para o alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila e seus precursores sintéticos mostraram que o alcaloide não foi ativo frente às linhagens tumorais humanas testadas e que os precursores sintéticos apresentaram expressivas atividades frente a diversas linhagens tumorais humanas.

Key-words: *Guatteria australis*, *Guatteria ferruginea*, *Guatteria latifolia*, *Guatteria sellowiana*, volatile constituents, synthesis of oxoaporphine alkaloid dimethyl-7-oxo-7H-dibenzo-quinoline-4,5-dicarboxylate, biotransformation, antimicrobial activity, antiproliferative activity.

ABSTRACT

The Neotropical genus *Guatteria* Ruiz & Pav. is represented by about 265 species corresponding to approximately 10% of species belonging to the family Annonaceae. In this work is described the phytochemical study, the study of volatile constituents, evaluation of antiproliferative and antimicrobial activities of four species of *Guatteria* native of Atlantic Forest, they are described: *Guatteria australis*, *Guatteria ferruginea*, *Guatteria latifolia* and *Guatteria sellowiana*. Further in the study of plant species we have proposed to perform the synthesis of the oxoaporphine alkaloid dimethyl-7-oxo-7H-dibenzo-quinoline-4,5-dicarboxylate assess the antiproliferative and antimicrobial activities, as well as their synthetic precursors, plus the use of the alkaloid and synthetic precursors as substrates for biotransformation reactions using the fungi *Aspergillus flavus*, *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus oryzae*, *Chaetomium 56* and *Bipolaris sorokiniana*. The aerial parts of the species *G. ferruginea*, *G. latifolia* and *G. sellowiana* were extracted with methanol at room temperature. The extracts were subjected to acid-base extraction to obtain the alkaloids. The extracts were evaluated for antimicrobial and antiproliferative activities. The phytochemical study of *G. latifolia* resulted in the isolation of six alkaloids being three aporphine alkaloids 3-hydroxynornuciferine and the mixture of alkaloids anonaine and nornuciferine and three oxoaporphine alkaloids isomoschatoline and the mixture of alkaloids liriodenine and lysicamine. The phytochemical study of *G. ferruginea* resulted in the isolation of the oxoaporphine alkaloid liriodenine. For the species *G. sellowiana* were isolated oxoaporphine alkaloids lysicamine and 3-O-methylmoschatoline. The structures of the compounds were elucidated based on the analysis of spectral data ¹H NMR and ¹³C, DEPT, including techniques such as two-dimensional HSQC and HMBC. For *G. australis* species was done just the study of volatile constituents and their antimicrobial and antiproliferative activities. Regarding the chemical composition of the volatile constituents were identified 25, 27, 22 and 19 major components for the species *G. australis*, *G. latifolia*, *G. ferruginea* and *G. sellowiana* respectively. Oxygenated sesquiterpenes were found in higher concentrations in four species followed by oxygenated monoterpenes. The spathulenol sesquiterpene was the major constituent in the essential oils of *G. australis* with 40.29% and has been found in significant concentrations in oils from *G. latifolia* (22.21%), *G. ferruginea* (11.04%) and *G. sellowiana* (23.0%). The synthesis of the oxoaporphine alkaloid dimethyl-7-oxo-7H-dibenzo-quinoline-4,5-dicarboxylate was performed in three steps with an overall yield of 28.5%. Evaluation of the antimicrobial activity of crude extracts from *G. ferruginea*, *G. latifolia*, *G. sellowiana* and alkaloidal fraction of *G. sellowiana* showed that only the crude extract of *G. ferruginea* was active against the bacteria *Staphylococcus aureus*. The alkaloidal fraction of *G. sellowiana* was active on the bacteria *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and against the yeast *Candida albicans*. Evaluation of the antimicrobial activity of volatile constituents showed that the four species of *Guatteria* were active against several strains of bacteria. The oxoaporphine alkaloid dimethyl-7-oxo-7H-dibenzo-quinoline-4,5-dicarboxylate and its precursors were active against several

strains of bacteria and the yeast *C. albicans*. The antiproliferative activity of methanolic crude extracts of the species *G. ferruginea*, *G. latifolia* and *G. sellowiana* was evaluated and the extracts of *G. latifolia* showed weak activity and the other extracts were inactive. The volatile constituents of the four species of *Guatteria* showed strong activity against the tumor cell line OVCAR-3 (ovarian), in addition to strong activity presented to the volatile constituents of *G. sellowiana* against K562 (leukemia). Evaluation of antiproliferative activity for oxoaporphine alkaloid dimethyl-7-oxo-7H-dibenzo-quinoline-4,5-dicarboxylate and their synthetic precursors have shown that the alkaloid was not active of human tumor cell lines tested and synthetic precursors showed significant activity against several tumor cell lines.

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (Barreiro *et. al.*; 2006).

Os produtos naturais de origem vegetal são provenientes do metabolismo das plantas como um conjunto total das transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorre nas células vivas, suprindo o organismo de energia, renovando suas moléculas e garantindo a continuidade do estado organizado. Essas reações possuem certa direção devido à presença de enzimas específicas, estabelecendo, assim, as rotas metabólicas, visando o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário. Os especiais metabólitos, geralmente de estrutura complexa, baixa massa molecular, possuem atividades biológicas marcantes e, diferentemente dos metabólitos primários, apresentam-se em baixas concentrações em determinados grupos de plantas (Pereira *et. al.*; 2012).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal. Atualmente, sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas nos mecanismos que permitem a adequação do produtor a seu meio. São reconhecidas como funções de várias substâncias pertencentes a essa classe de metabólitos, por exemplo, a defesa contra herbívoros e microrganismos, a proteção contra raios ultravioleta, a atração de polinizadores ou animais dispersores de semente e em alelopatias. Outra característica dos vegetais em relação ao metabolismo secundário é a elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto a sua diversidade numa mesma espécie (Simões *et. al.*; 1999).

As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem remontam às sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Esse papiro foi descoberto e

publicado por Georg Ebers, sendo traduzido pela primeira vez, em 1890, por H. Joachin. Foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, porém pertence à época da XVIII dinastia. Enumera mais ou menos 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal. Anteriormente a era cristã que ficou conhecido como civilização grega, vários filósofos podem ser destacados por suas obras sobre história natural. Dentre esses, sobressaem-se Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios (*Natura medicatrix*) e Teofrasto (372 aC), discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas (Bolzani, *et. al.*; 2002)

Na idade antiga, além de técnicas medicinais, muitos venenos foram descobertos na natureza e utilizados para fins de defesa, caça e mesmo ilícitos, como a utilização do veneno de Hemlock (*Conium maculatum*) na execução de prisioneiros, inclusive Sócrates, durante o império Grego. A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado (Barreiro *et. al.*; 2006).

As plantas, em especial, têm sido à base de sistemas de medicina tradicional, que tem sido empregada por milhares de anos em países como China e Índia. Esses tratamentos à base de plantas continuam a ter um papel essencial no cuidado à saúde, sendo estimado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) que aproximadamente 80% dos habitantes mundiais confiam na medicina tradicional para o cuidado primário de sua saúde. Os produtos de plantas medicinais também exercem um importante papel nos sistemas de saúde dos 20% restantes da população, principalmente, em países desenvolvidos. A análise de dados de receitas prescritas em farmácias comunitárias dos Estados Unidos, entre 1959 e 1980, indica que aproximadamente 25% continha extratos de plantas ou princípios ativos obtidos de plantas medicinais superiores, e pelo menos 119 substâncias químicas, derivadas de 90 espécies de plantas, podem ser consideradas como importantes fontes de fármacos comumente em uso em um ou mais países. Desses 119 fármacos, 74% foram descobertos como resultado de estudos químicos direcionados ao isolamento de substâncias ativas de plantas utilizadas na medicina tradicional (Yunes & Cechinel Filho, 2012).

O isolamento do fármaco antimalárico quinina (Figura 1), das cascas da espécie *Cinchona officinalis*, foi descrito em 1820 pelos farmacêuticos franceses, Caventou e Pelletier. As cascas há muito eram utilizadas por grupos indígenas na região da Amazônia para o tratamento de febre, e foi introduzido na Europa no começo do século XVII para o tratamento da malária. A quinina constituiu a base para a síntese de fármacos antimaláricos comumente utilizados como a cloroquina e mefloquina. Com o aparecimento de resistência a esses fármacos em muitas regiões tropicais, outra planta há muito empregada para o tratamento de febre na medicina tradicional chinesa, *Artemisia annua* produziu os agentes artemisina (Figura 1) e seus derivados, artemeter e arteter, eficientes contra parasitas resistentes. O analgésico morfina (Figura 1), isolado em 1816 pelo farmacêutico alemão Serturner, do ópio da papoula, *Papaver somniferum*, usada na antiga Mesopotâmia, foi a base para a química de alcaloides e desenvolvimento de uma variedade de agentes analgésicos altamente eficientes, como a codeína e buprenorfina. Em 1785, o físico inglês, Willian Withering, publicou suas observações sobre o uso dos digitálicos, *Digitalis purpurea*, para o tratamento de hidropisia, o que levou eventualmente ao isolamento do agente cardiotônico, digoxina. Um outro exemplo é a pilocarpina (Figura 1), isolada das folhas de espécies de *Pilocarpus*, principalmente *P. microphyllus* e *P. jaborandi*, pequenas árvores e arbustos nativos do Brasil. Comumente conhecida como jaborandi, essas plantas eram utilizadas pelos índios brasileiros para induzir profunda sudorese e salivação, e foi introduzida na Europa em 1873 com este propósito. O principal uso medicinal da pilocarpina, entretanto, é no tratamento de certas formas de glaucoma em que o tratamento tópico com gotas contendo de 2-4% de pilocarpina resulta em significativa redução da pressão intraocular (Yunes & Cechinel Filho, 2012).

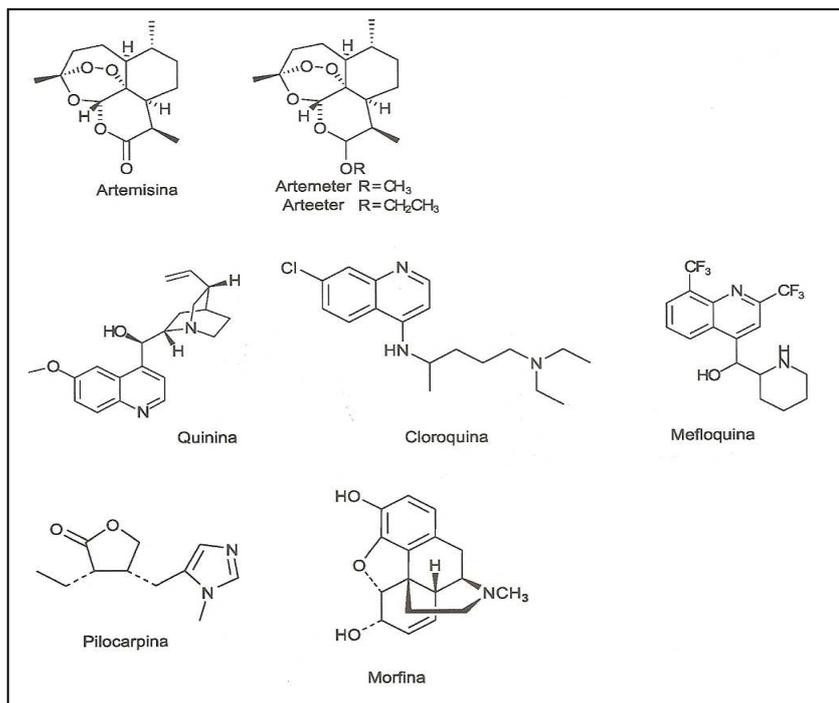


Figura 1: Alguns fármacos derivados de plantas medicinais

Fonte: Yunes & Cechinel Filho, 2012

Alguns países como Brasil, México, Equador, Colômbia, Peru, China, Malásia, Índia, Indonésia, Zaire, Madagascar e Austrália são considerados países detentores de megadiversidade (Simões *et. al.*; 1999).

A Mata Atlântica brasileira é um dos 34 *hotspots* mundiais, sendo uma área prioritária para conservação. Essas áreas que são compostas por um mosaico de biodiversidade, abrigam mais de 60% de todas as espécies terrestres do planeta. A Mata Atlântica é representada por vários tipos de vegetação, distribuídos ao longo de três países: Brasil, Argentina e Paraguai. No Brasil, a Mata Atlântica tem níveis excepcionais de biodiversidade, que estão sob enorme pressão. Um grande número da população brasileira vive nesse *hotspot*, desenvolvendo muitas atividades econômicas que necessitam desses ecossistemas saudáveis, mediante a exploração de plantas e animais silvestres para alimentação, combustível, vestuário, remédio e abrigo. Infelizmente, a Mata Atlântica é provavelmente o ecossistema mais devastado e mais seriamente ameaçado do planeta (Muller *et. al.*; 2007).

Dentre essa enorme biodiversidade encontrada na Mata Atlântica algumas espécies da família Annonaceae destacam-se do ponto de vista econômico por apresentarem frutos comestíveis, por exemplo, o mamão (*Asimina*), graviola e pinha

(*Annona*). Algumas espécies desse gênero têm sido empregadas para a produção de óleo comestível, sabão, produção de álcool e matéria-prima importante para a indústria de perfumaria, além de diversas atividades biológicas comprovadas descritas na literatura, por exemplo, atividade antinociceptiva e antiinflamatória (Sousa *et. al.*; 2004), citotóxica (Siqueira *et. al.*; 2007), antiprotozoária (Osorio, *et. al.*; 2007) e antifúngica (Lima, *et.al.*; 2011). O estudo químico de espécies vegetais pertencentes a família Annonaceae têm se intensificado nos últimos anos, mas pode ser considerada uma das famílias menos estudadas quimicamente. Esse fato leva a uma investigação química minuciosa de gêneros dessa família assim como seu perfil farmacológico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE A FAMÍLIA ANNONACEAE E O GÊNERO *GUATTERIA*

A família Annonaceae é a principal família de magnoliídeas, com 2.440 espécies e 130 gêneros. No Brasil são encontradas 385 espécies das quais 158 são endêmicas, com a maioria, aproximadamente, 260 ocorrendo no domínio amazônico. Dentre os gêneros de Annonaceae encontrados na Mata Atlântica, segundo bioma mais diverso do Brasil, bastante ameaçado, *Guatteria* é um dos mais representativos. Em listas de espécies da Mata Atlântica e do Brasil são registradas 15 espécies de *Guatteria* na Mata Atlântica, das quais 14 endêmicas do país e oito do bioma. Dentre os gêneros que constituem a família Annonaceae, o gênero *Guatteria* é o maior, com 307 espécies encontradas desde o sudeste do México até a Bolívia e sul do Brasil, com maior diversidade na Amazônia. No Brasil são registradas 88 espécies, sendo 47 endêmicas. O gênero *Guatteria* é monofilético e facilmente reconhecido pela nervura primária impressa na face adaxial, pedicelo com articulação suprabasal, sépalas valvares, pétalas imbricadas e carpelos numerosos, com um óvulo basal. Entretanto, suas espécies são de difícil delimitação porque o gênero possui caracteres vegetativos variáveis intraespecificamente e reprodutivos constantes interespecificamente e diversas espécies fazem parte de complexos taxonômicos. Essa dificuldade de delimitação é refletida no elevado número de espécies de *Guatteria* não identificadas nos levantamentos vegetais e herbários (Lobão, *et. al.*; 2012).

2.2. IMPORTÂNCIA ECONÔMICA E USOS POPULARES

A família Annonaceae destaca-se quanto ao número de espécies produtoras de frutos comestíveis (Vieira, *et. al.*; 2012). Estudos realizados com espécies da família Annonaceae realizados em Foz do Cedro, município de Lucas do Rio Verde/MT mostram o uso potencial de algumas espécies dessa família (Koppe *et. al.*; 2010) conforme mostrado na Tabela 1.

Tabela 1: Lista das espécies de Annonaceae com suas potencialidades de uso das espécies.

Espécie	Nome vulgar	Potencial de Uso					
		Co	Ma	Me	Ap	Fs	Or
<i>Annona coriacea</i> Mart.	Cabeça-de-negro	x	x	x		x	x
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	Araticum	x	x	x	x	x	
<i>Annona dioica</i> A. St.-Hil.		x		x		x	
<i>Annona tomentosa</i> R.E. Fr.		x				x	
<i>Duguetia furfuraceae</i> A. St.-Hil.		x		x	x		x
<i>Duguetia marcgraviana</i> Mart.				x			
<i>Duguetia</i> sp.		x				x	
<i>Guatteria schomburgkiana</i> Mart.				x			
<i>Unonopsis</i> sp.						x	
<i>Xylopia amazonica</i> R.E. Fr.	Pindaíba-da-mata		x				
<i>Xylopia aromatica</i> (Lam.) Mart.	Pimenta de macaco	x	x	x	x	x	x
<i>Xylopia emarginata</i> Mart.			x			x	x
<i>Xylopia sericea</i> A. St.-Hil.	Pindaíba-vermelha	x	x	x	x	x	x

Potencial de uso das espécies (Co = Comestível, Ma = Madeira, Me = Medicinal, Ap = Apícola, Fs = Fauna Silvestre e Or = Ornamental).

Quanto ao uso popular de espécies pertencentes à família Annonaceae há relatos que descrevem o emprego de algumas espécies no tratamento de sintomas relacionados à malária e no combate a outros sintomas. Esses tratamentos são realizados, na maioria, pelo emprego das infusões das cascas do caule, preparadas por decocção e administradas via oral. *Annickia chlorantha* é empregado no tratamento de dores, feridas, furúnculos, vômitos, febre, calafrios e dores no baço em crianças com hepatite, *Annona muricata* é usada no tratamento de dores nas costas, *Annona senegalensis* é usada no tratamento de vômitos, dores musculares, cansaço, icterícia, febre, convulsões, infecções respiratórias e no tratamento de mordida de cobra. A espécie *Uvaria* sp. é aplicada no tratamento de febre amarela, dores de cabeça e epilepsia. *Duguetia staudtii* é empregada no tratamento de astenia, artrite, dor de cabeça e tosse. *Annonidium mannii* é indicada no tratamento de doenças da infância como assaduras, sarampo, diarreia e aumento do baço, além de outras doenças como candidíase e gonorreia. *Xylopia parviflora* é usada no tratamento de sintomas como febre, dores no corpo, dores de cabeça e infecções pulmonares. A espécie *Hexalobus crispiflorus* é aplicada no tratamento de convulsão, febre, dores musculares, artrite, feridas e bolhas (Boyom *et. al.*; 2012).

A respeito da distribuição das espécies de Annonaceae nas restingas do Rio de Janeiro encontramos a família representada por seis gêneros sendo eles: *Anaxagorea*, *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria*, *Oxandra* e *Xylopia* (Lobão *et. al.*; 2005). Do gênero *Guatteria* são encontradas na Mata Atlântica quinze espécies, sendo elas: *G. australis*, *G. campestris*, *G. candolleana*, *G. emarginata*, *G. ferruginea*, *G. latifolia*, *G. macropus*, *G. oligocarpa*, *G. pogonopus*, *G. pohliana*, *G. sellowiana*, *G. schomburgkiana*, *G. stenocarpa*, *G. tomentosa* e *G. villosissima*. Sete dessas espécies, *G. australis*, *G. campestris*, *G. pogonopus*, *G. schomburgkiana*, *G. sellowiana*, *G. tomentosa* e *G. villosissima* não são endêmicas da Floresta Atlântica e somente a espécie *G. schomburgkiana* não ocorre na costa leste brasileira, nos Estados da Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro e Minas Gerais. Esses estados são o centro da diversidade das espécies de *Guatteria* da Floresta Atlântica, assim como de outros grupos vegetais como, por exemplo, Bromeliaceae. Oito espécies possuem baixo grau de ameaça, *Guatteria candolleana*, *G. macropus*, *G. pohliana* e *G. tomentosa* são vulneráveis, *G. latifolia* e *G. stenocarpa* encontram-se em perigo de extinção, e *G. emarginata* possui dados deficientes (Lobão *et. al.*; 2012).

2.3. PRINCIPAIS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS EM ANNONACEAE

A família Annonaceae apresenta um espectro diversificado no que se refere a metabólitos secundários. Diferentes classes de compostos foram relatadas nos diferentes gêneros e espécies. Notadamente, os alcaloides são a classe de compostos mais comumente relatados em espécies do gênero *Guatteria* e outros gêneros da família Annonaceae. Um levantamento bibliográfico realizado em julho de 2013 no Scifinder[®] a respeito das espécies de *Guatteria* estudadas quimicamente, encontraram-se estudos de 35 espécies relatando a presença de alcaloides de diferentes classes assim como a presença de outras classes de metabólitos secundários conforme mostrado na Figura 2.

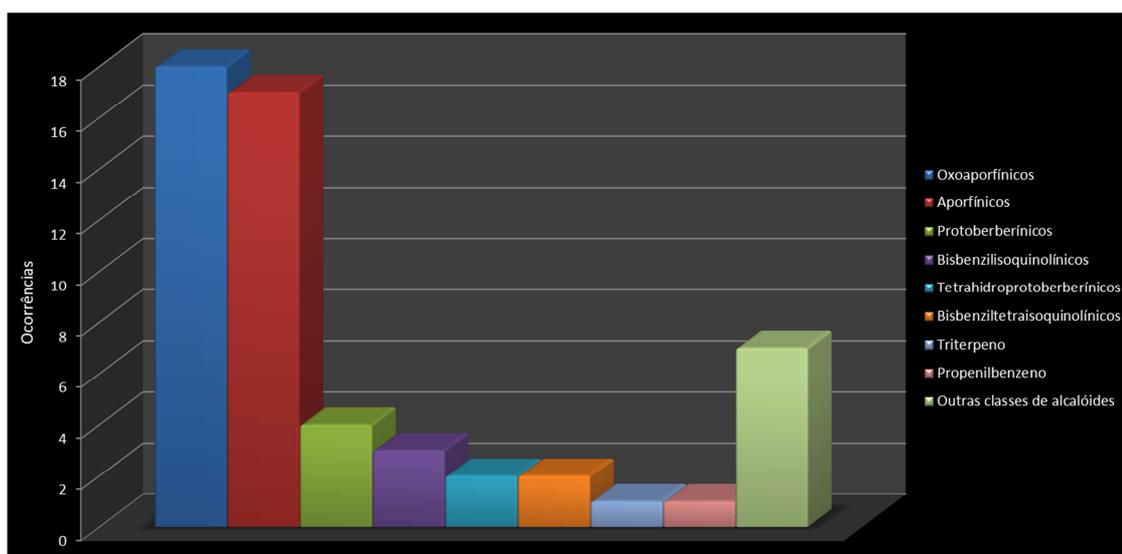


Figura 2: Distribuição de metabólitos secundários isolados de espécies do gênero *Guatteria*

Embora os alcaloides sejam seus principais produtos biossintéticos outras classes de substâncias podem ser encontradas nesta família.

Segundo Leboeuf *et al.*; 1982 e Funasaki *et al.*; 2013 outras classes de substâncias podem ser encontradas na família Annonaceae, por exemplo, terpenos (monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, esteroides, lactonas sesquiterpênicas), flavonoides, compostos aromáticos, compostos poliacetilênicos, vitaminas, carotenos, glicosídeos cianogênicos e amidas. Dentre os alcaloides, as principais classes encontradas são: isoquinolínicos, exemplos, solsolinol (1) e coridaidina (2), benziltetraidroisoquinolínicos, exemplo, policarpina (3), bisbenzilisquinolínicos, exemplo, phaeantharina (4), bisbenziltetraisoquinolínicos, exemplo, chondrofolina (5), protoberberínicos, exemplo, oxipalmatina (6) e tetraidroprotoberberínicos, exemplo, aequalina (7).

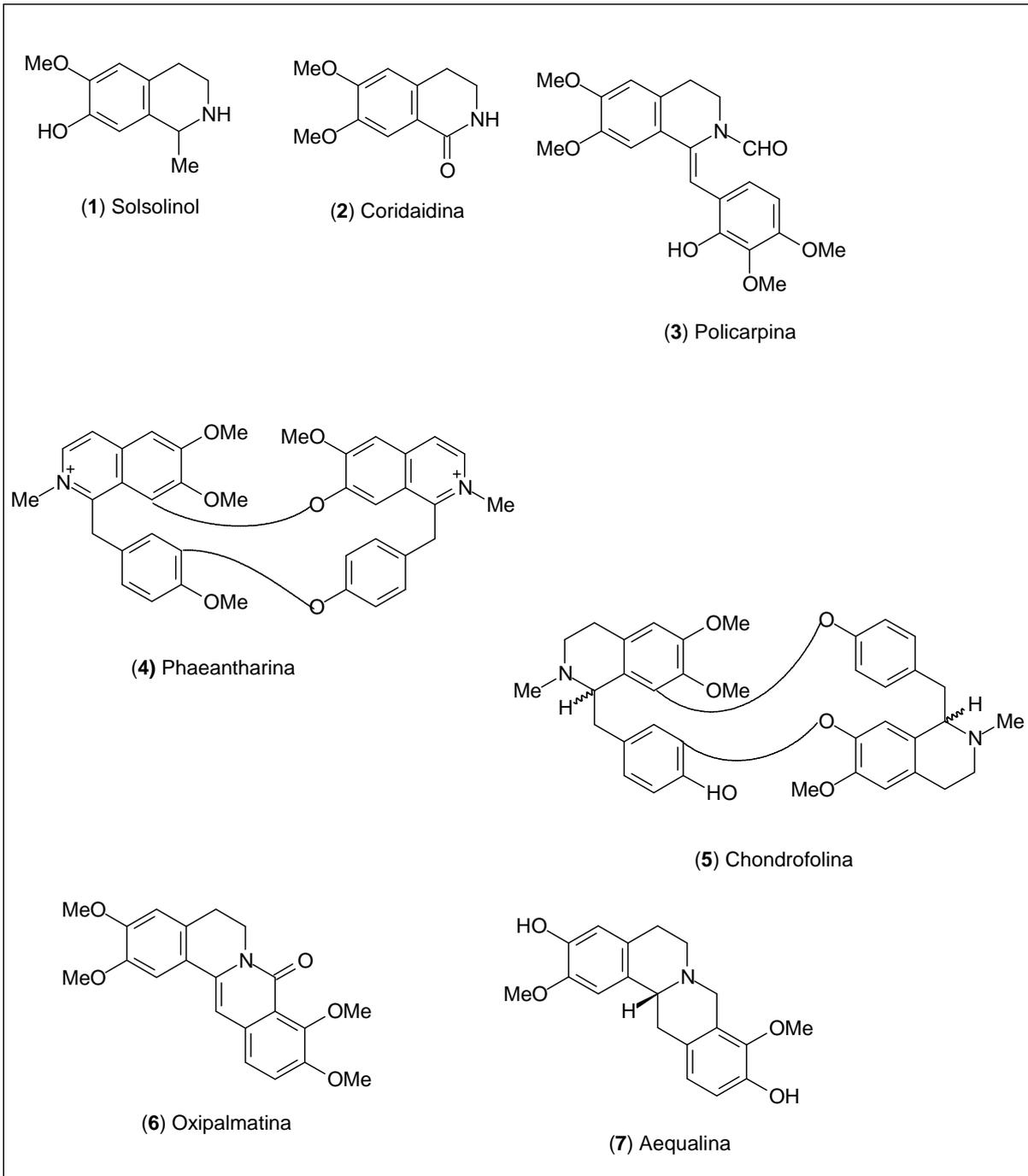


Figura 3: Alcaloides encontrados na família Annonaceae

Os aporfinoídes constituem um amplo subgrupo de compostos benzilisoquinolínicos com mais de 500 alcaloides isolados e identificados. Eles são largamente distribuídos em um grande número de famílias de plantas, incluindo Annonaceae, Lauraceae, Monimiaceae, Menispermaceae, Hernandiaceae e Ranunculaceae (Stévigny, *et. al.*; 2005).

Os aporfinoídes (Figura 4) são subdivididos em aporfino (a), oxoaporfino (b), fenantreno (c) e proaporfino (d).

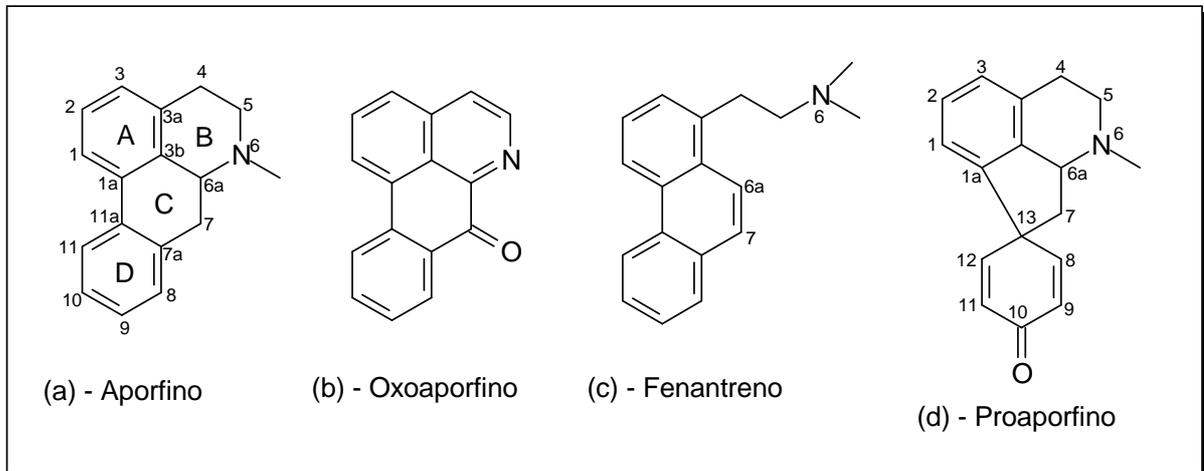


Figura 4: Esqueletos básicos dos aporfinoídes

Quimicamente, aporfinoídes (*sensu stricto*) são bases tetracíclicas formadas pela ligação direta dos anéis aromáticos A e D do núcleo benzilisoquinolínico. O átomo de nitrogênio na posição 6 é usualmente terciário na forma básica mas pode ser quaternário, menos frequentemente acetilado ou formilado. Compostos N-óxido também tem sido descritos. Em aporfinoídes naturais, posições 1 e 2 são sempre substituídas por grupos hidroxila, metoxila ou metilenodióxi. Grupos tetracíclicos podem ser substituídos em diferentes locais, na posição 9, 10, 11 e menos frequentemente nas posições 3 e 8 e em alguns casos a posição 7 ou 4 é oxigenada.

Aporfinoídes incluem alcaloides aporfinos, proaporfinos e derivados catabólicos como oxoaporfinos e fenantrenos. Formas diméricas e deidroaporfinas caracterizadas por uma instauração adicional em C6a estão inclusos no presente grupo.

2.4. PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DOS APORFINOÍDES

Dois alcaloides aporfínicos estão disponíveis no mercado como produtos farmacêuticos. Um é a boldina (**8**) isolado das folhas e da casca da espécie *Peumus boldus* que possui propriedade bem estabelecida como sequestradores de radicais

livres. As indicações na medicina humana são no tratamento da disfunção hepatobiliar, tratamento sintomático de distúrbios digestivos leves e como adjuvante na prisão de ventre. O outro é a apomorfina (9) um alcaloide sintético que tem sido empregado no tratamento da doença de Parkinson e, mais recentemente, para o tratamento da disfunção erétil.

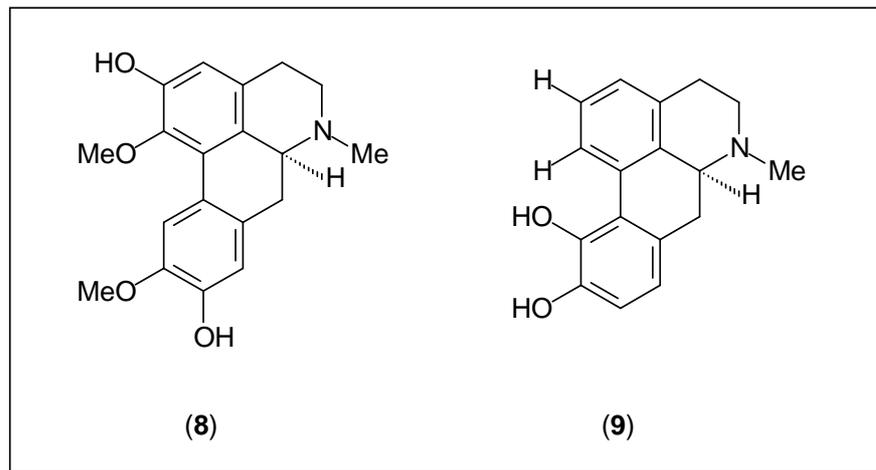


Figura 5: Estrutura química dos aporfinoídes empregados na indústria farmacêutica

Os aporfinoídes exibem uma vasta gama de propriedades biológicas. Alguns deles são bons agentes dopaminérgicos e possuem atividade em transmissões dopaminérgicas e serotoninérgicas. Alguns aporfinoídes também possuem efeito vasodilatador (por inibição da entrada de cálcio extracelular e modificações específicas do tecido), atividade antiplaquetária, antioxidante, antimicrobiana, antiviral e citotóxica (Stévigny *et. al.*; 2005).

Na tabela 2 são apresentadas algumas das atividades descritas na literatura para essa classe de metabólitos secundários.

Tabela 2: Alguns exemplos de atividades biológicas e farmacológicas descritas na literatura para alcaloides aporfínicos.

Espécie	Família	Atividade farmacológica e/ou biológica	Referência
<i>Lindera angustifolia</i>	Lauraceae	Antinociceptiva e sequestradora de radicais livres	Zhao <i>et. al.</i> ; 2006
<i>Duguetia furfuraceae</i>	Annonaceae	Antitumoral, tripanocida, antileishmania	Silva <i>et. al.</i> ; 2009
<i>Mahonia aquifolium</i>	Berberidaceae	Antiradical e antioxidante	Racková <i>et. al.</i> ; 2004
<i>Lindera chunii</i>	Lauraceae	Inibidora contra HIV-1 integrase	Hattori, <i>et. al.</i> ; 2002
<i>Coptidis rhizoma</i>	Ranunculaceae	Inibidora contra Aldose redutase	Choi, <i>et. al.</i> ; 2008
		Anti-Alzheimer e antioxidante	Choi, <i>et. al.</i> ; 2009
<i>Zizyphus vulgaris</i>	Rhamnaceae	Sedativa	Park, <i>et. al.</i> ; 1987
<i>Liriodendron tulipifera</i>	Magnoliaceae	Antiplasmódica	Raskin, <i>et. al.</i> ; 2011
<i>Illigera luzonensis</i>	Hernandiaceae	Citotóxica	Chen, <i>et. al.</i> ; 2011
<i>Stephania zippeliana</i>	Menispermaceae	Antitripanossômica e Antiplasmódica	Avery, <i>et. al.</i> ; 2010
<i>Corydalis</i>	Papaveraceae	Inibidora da colinesterase e Antiaminéica	Bae, <i>et. al.</i> ; 2008
<i>turtschaninovii</i>			
<i>Nelumbo nucifera</i>	Nelumbonaceae	Antimalárica e Antifúngica	Khan, <i>et. al.</i> ; 2008
<i>Polyalthia cerasoide</i>	Annonaceae	Antimicobacteriana	Tiwari, <i>et. al.</i> ; 2009

2.5. BIOSÍNTESE DE ALCALOIDES APORFINOIDES

Alcaloides são uma classe de metabólitos secundários de baixa massa molecular. São compostos azo derivados, principalmente, de ácidos aminados. Estão presentes em cerca de 20% das plantas e desempenham um papel importante na defesa contra herbívoros e organismos patógenos. Devido à potente atividade biológica apresentada por essa classe de compostos, muitos dos compostos já isolados são explorados pelas suas propriedades estimulantes e narcóticos. As diversas classes de alcaloides têm origem biossintética única. Apesar da diversidade das vias metabólicas, várias técnicas descobertas recentemente contribuíram de maneira significativa para a compreensão da biossíntese de alcaloides. As tecnologias baseadas em genoma, tais como, etiquetas de sequências expressas, micro arranjo de DNA e análise proteômica tem acelerado a descoberta de novos componentes e mecanismos envolvidos na formação dos alcaloides em plantas (Facchini, *et. al.*; 2008)

O precursor do esqueleto aporfino é estabelecido como 1-benziltetraidroisoquinolino (Figura 6).

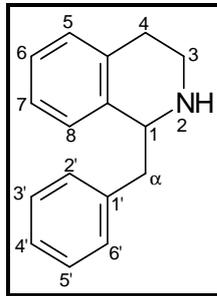
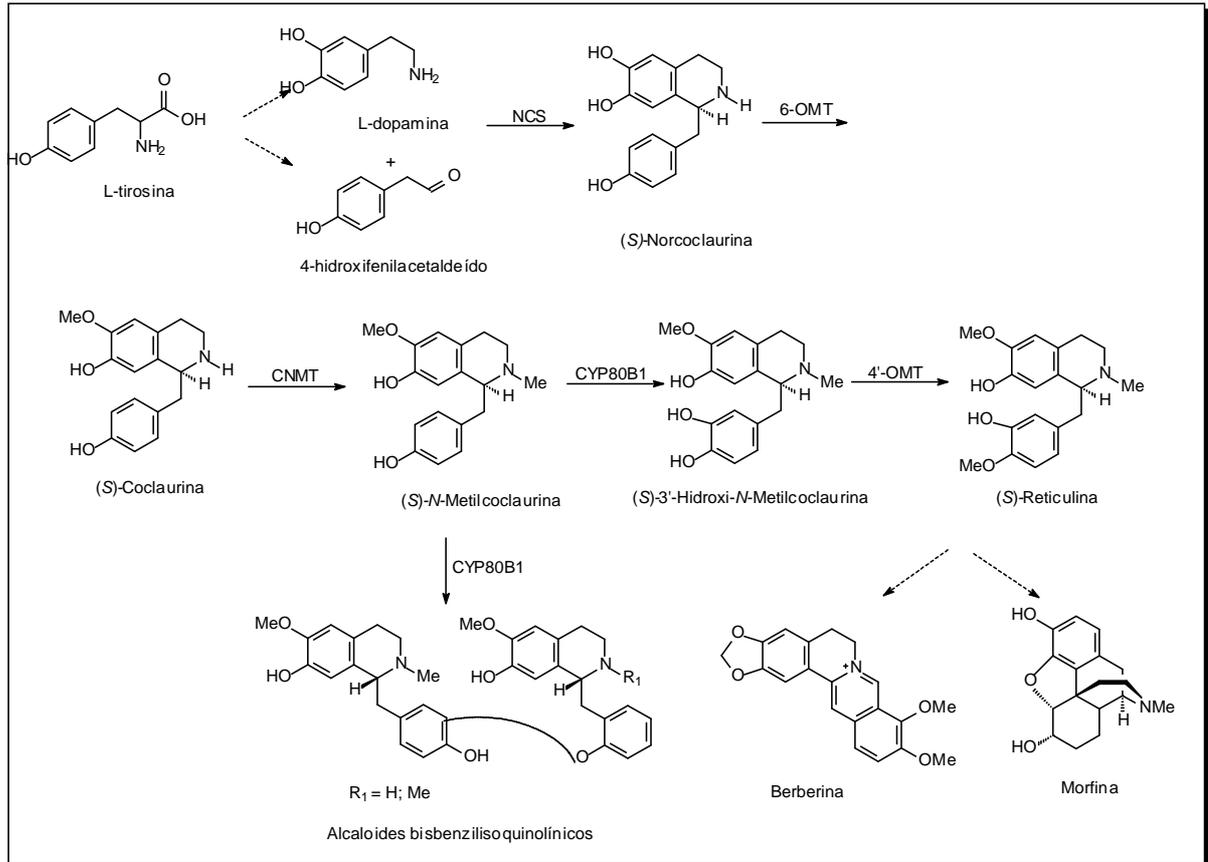


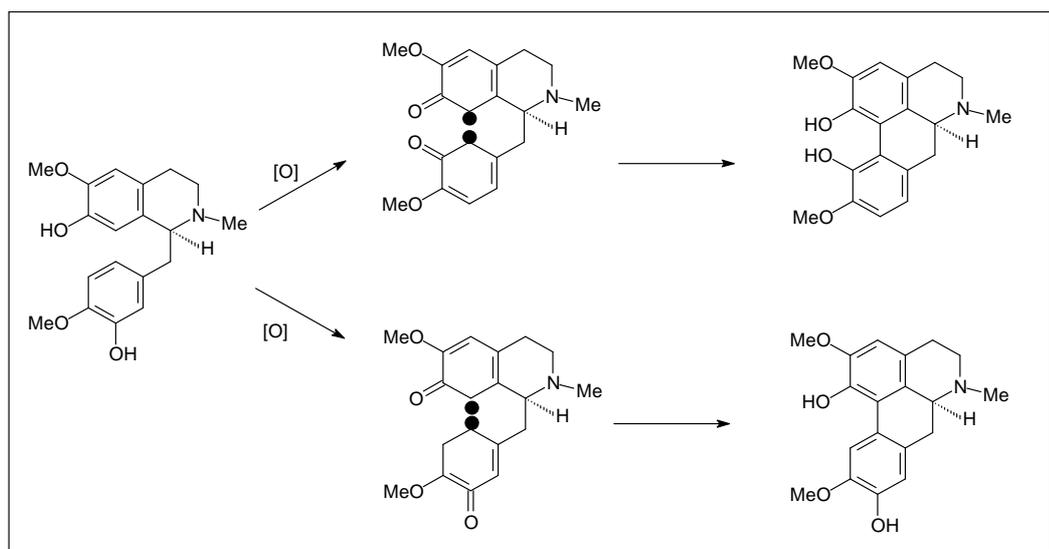
Figura 6: Esqueleto básico dos alcaloides benziltetraidroisoquinolínicos

A biossíntese de todos os alcaloides isoquinolínicos, benzilisoquinolínicos, benziltetraidroisoquinolínicos, inicia com duas moléculas de L-tirosina, sendo que uma das moléculas é descarboxilada para a forma tiramina e pode sofrer a ação da enzima fenol oxidase formando a L-dopamina. O esqueleto benzil da (S)-norcoclaurina é formado pela transaminação da segunda molécula de L-tirosina formando o ácido 4-hidroxifenilpirúvico que é, em seguida, descarboxilado para 4-hidroxifenilacetaldeído. A condensação da dopamina e 4-hidroxifenilacetaldeído pela norcoclaurina sintase (NCS) leva a formação da (S)-norcoclaurina (Esquema 1). Uma série de enzimas norcoclaurina 6-O-metiltransferase (6-OMT), coclaurina N-metiltransferase (CNMT), (S)-N-metilcoclaurina-3-hidroxilase (NMCH) e 3-hidroxi-N-metilcoclaurina-4'-O-metiltransferase (4'OMT) produz (S)-reticulina de (S)-norcoclaurina. Diversas reações de acoplamento intramolecular na (S)-reticulina resulta na formação de vários esqueletos como protoberberinos, benzofenantridina e morfinano (Facchini *et. al.*; 2008).



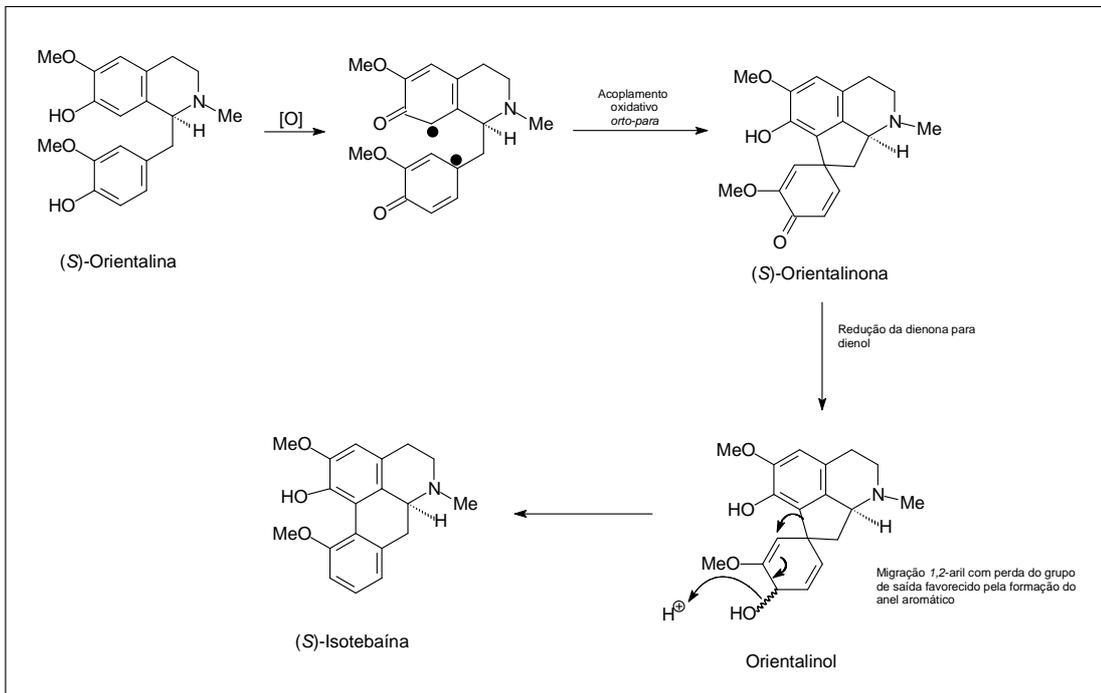
Esquema 1: Biossíntese dos alcaloides benzilisquinolínicos

Alcaloides aporfínicos são formados em plantas pelo acoplamento oxidativo intramolecular direto (*orto-orto* ou *orto-para*) da (S)-(+)-reticulina na forma do radical *bis*-dienona (Stévigny *et.al.*; 2005) mostrado no Esquema 2.



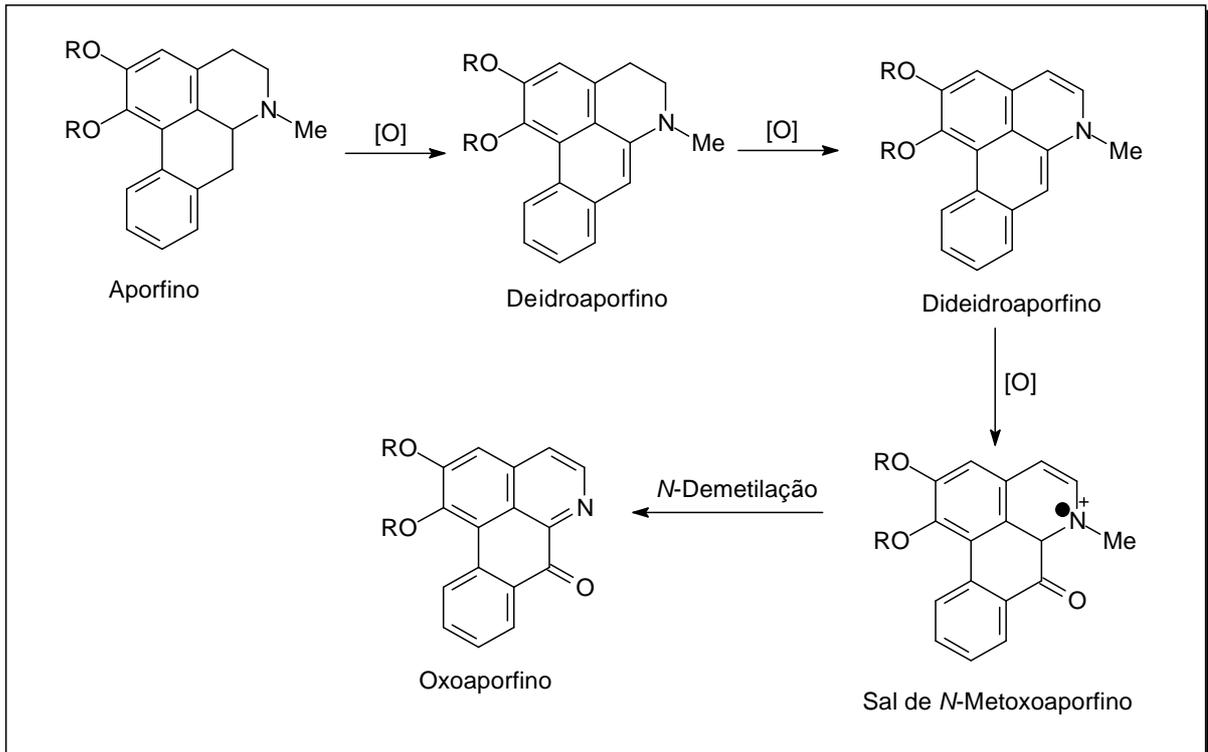
Esquema 2: Biossíntese dos alcaloides aporfínicos

O padrão de substituição de precursores benziltetraidroisoquinolínicos dá origem aos alcaloides aporfínicos correspondentes apesar de certas posições de *O*-substituição, tais como C-3 ou C-7 surgir por oxidação do núcleo aporfinoide. A metilação na posição C-7 pode ser induzida pela ação metionina-*S*-adenosil. Alternativamente, os alcaloides aporfínicos podem ser originados de um intermediário proaporfino através da ciclização *orto-para* de um di-radical tetraidroisoquinolínico, protonação direta e subsequente rearranjo dienona-fenol (Esquema 3).



Esquema 3: Biossíntese dos alcaloides aporfínicos a partir de um intermediário proaporfino

Outra classe de aporfinos que merecem destaque são os alcaloides oxoaporfínicos. Eles usualmente apresentam coloração amarela, laranja ou laranja avermelhada devido ao alto grau de insaturação. Uma sequência racional de transformações *in vivo* leva um aporfino ao seu oxoaporfino correspondente através do intermediário deidro e dideidroaporfinos (Guinaudeau, *et. al.*; 1984), Esquema 4.



Esquema 4: Biossíntese dos alcaloides oxoaporfínicos

2.6. ESPÉCIES QUIMICAMENTE ESTUDADAS

Neste trabalho foram estudadas quatro espécies pertencentes ao gênero *Guatteria*. São elas: *G. australis*, *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana*.

Para a espécie *G. australis* (Figura 7) o estudo foi direcionado para a composição dos óleos essenciais obtidos das partes aéreas (galhos, caule e folhas) e avaliação de atividades antimicrobiana e antiproliferativa.

- ***Guatteria australis*** A. St.-Hil.: É conhecida como pindaíba-negra, pindaíba, imbiú, embuí e cortiça (Neto *et. al.*; 2012; Oliveira Filho *et. al.*; 2008) é endêmica do Brasil e ocorre desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, e ao oeste até Goiás. Em Minas Gerais, ocorre no Vale do Rio Doce, Vale do Paraíba do Sul, Alto Rio Grande, Serra da Mantiqueira, Planalto de Poços de Caldas, Serra do Espinhaço e Noroeste do estado. Na Serra Negra é comumente encontrada nas áreas alagadas ou próximo a cursos d'água, no interior da mata ciliar, locais típicos de ocorrência da espécie, que ocupa preferencialmente o sub-bosque. *G. australis* pertence a um complexo de resolução taxonômica incerto, sendo comumente identificada como *G. nigrescens*

Mart. A espécie *G. australis* é uma árvore, 2-10 m de altura, ramos jovens vilosos, ramos adultos glabros. Folha com pecíolo 3-7 mm de comprimento, levemente canaliculado, coberto por tricomas adpressos; lâmina foliar estreitamente elíptica, 10-17 x 2,5-4,1 cm, verde-escura, discolor, *in sicco* esverdeada a castanha, cartácea, face adaxial glabra, face abaxial esparsamente serícea, nervação broquidródroma, 12-17 pares de nervuras secundárias proeminentes em ambas as faces, base atenuada, margem plana, ápice cuspidado, cúspide 10-20 mm de comprimento. Flor 1, axilar, pedicelo 20-27 mm de comprimento, 11 mm da base à articulação, seríceo, brácteas caducas, sépalas triangulares com aproximadamente 5 x 5 mm, ápice agudo, vináceas a atrovináceas no botão e nigrescentes na flor madura, *in sicco* nigrescentes, livres, pétalas ovais a elípticas, as externas 10-12 x 3-6 mm, as internas 12-23 x 6-12 mm, ápice agudo a cuspidado, verde clara a amarelas quando maduras, às vezes maculadas de vináceo, *in sicco* castanha a nigrescentes, face baxial vilosa, densamente na base, face adaxial glabra, *in sicco* amarelo-acastanhados, estames amarelos, *in sicco* castanhos, com aproximadamente 2 mm de comprimento, carpelos de aproximadamente 3 mm de comprimento, seríceos, castanhos, *in sicco* nigrescentes carpídios 20-22, elipsoides, 8-11 x 5 mm, atrovináceos quando maduro, estipitados, estipe de aproximadamente 9 mm de comprimento, sementes elipsoides de aproximadamente 10 x 5 mm (Neto, *et. al.*; 2012).



Figura 7: Imagem dos frutos da espécie *Guatteria australis*

Fonte: <http://praticasembotanica.com/biblioteca/herbario-digital>

- ***Guatteria ferruginea*** A. St.-Hil.: É conhecida popularmente como imbiú-amarela e embuí-amarela (Oliveira Filho *et. al.*; 2008) e possui distribuição disjunta, sendo

encontrada na costa brasileira, da Bahia (Ilhéus) ao Rio de Janeiro, no Mato Grosso e na região amazônica, onde ocorre em floresta de terra firme. No domínio da Floresta Atlântica, vegeta em floresta de restinga, de tabuleiro, higrófila, submontana e montana, chegando até 1000 m de altitude em Santa Maria Madalena, RJ. Coletada em flor e fruto durante todo o ano. A presença de flor e fruto em um mesmo indivíduo é comum. Quando cauliflora, a inflorescência é bastante vistosa. Seu status de conservação é Baixo Risco por ser de ampla distribuição. Entretanto, na Amazônia, encontra-se em populações escassas e fora de unidades de conservação, podendo tornar-se localmente mais ameaçada. Na Floresta Atlântica ocorre em diversas unidades de conservação e não está ameaçada. Essa espécie caracteriza-se pelas folhas de grandes dimensões (17-37,5 x 6,5-15,5 cm), geralmente densamente cobertas por tricomas ferrugíneos na face abaxial, ápice acuminado, sépalas e pétalas cobertas por tricomas ferrugíneos na face abaxial e pétalas com ápice obtuso. *G. ferruginea* assemelha-se a *G. pogonopus* por possuir folhas com até 30 cm de comprimento, flores com sépalas livres no botão floral e pedicelo floral curto. Quando glabras os espécimes são caulifloros. *G. burchellii* diferenciava-se de *G. ferruginea* somente pela cauliflora. Entretanto, *G. ferruginea* (Figura 8) possui às vezes flores axilares e caulinares (Lobão *et. al.*; 2012)



Figura 8: Imagem da espécie *Guatteria ferruginea*

Fonte: <http://vidanamataatlantica.blogspot.com.br/>

- ***Guatteria latifolia*** Mart.: É popularmente conhecida como embira dura (Oliveira Filho *et. al.*; 2008) e ocorre no estado de Minas Gerais, principalmente na cidade de Ouro Preto e no Rio de Janeiro. É frequente no Parque Nacional de Itatiaia, onde ocorre em orla de floresta submontana e ao longo de rios. Foi encontrada também

em floresta montana e altomontana, chegando a 1800 m de altitude. Seu status de conservação é em perigo. *G. latifolia* (Figura 9) são árvores ou arbustos 4-10 m de altura, pecíolo 5-8 mm de comprimento, lâmina foliar 10-17 x 4-7 cm, estreitamente elíptica a elíptica, glabra a esparsamente coberta por tricomas na face abaxial, base aguda a cuneada, margem às vezes, ondulada, ápice agudo a acuminado, acúmen de aproximadamente 1 cm de comprimento, Flor 1, axilar. Pedicelo 2,5-4,5 cm de comprimento, botões florais de aproximadamente 10-12 mm, triangular obovóides, com sépalas conatas em toda a extensão, sem linha de conação. Sépalas de 10-20 x 10 mm, às vezes conatas na base. Pétalas estreitamente elípticas, ápice acuminado, 15-35 x 6-20 mm. Fruto com receptáculo 8-10 x 15-17 mm, cálice às vezes persistente, carpódios 15-45, 6-15 x 5-7 mm, elipsoides, estipes 20-30 mm de comprimento (Lobão *et. al.*; 2012).



Figura 9: Imagem da espécie *Guatteria latifolia*

Fonte: Imagem cedida pela profa. Dra. Adriana Quintella Lobão

- ***Guatteria sellowiana*** Schldl.: A espécie *G. sellowiana* (Figura 10) é endêmica do Brasil e ocorre na Bahia, Distrito Federal, Goiás, Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Popularmente é conhecida como pindaíba-verdadeira e pindaíba-de-mata (Oliveira Filho *et. al.*; 2008) e seu status de conservação é Baixo Risco, uma vez que é frequente em diversas áreas de conservação (Neto *et.al.*; 2012). Essa espécie caracteriza-se pelas folhas estreitamente elípticas, densamente cobertas por tricomas eretos, retos na face abaxial, ápice agudo e pedicelos geralmente curtos. Dentre as espécies de *Guatteria* presentes na Floresta Atlântica, é bem característica pelo denso indumento. É semelhante aos indivíduos com ramos e

folhas cobertos por tricomas de *G. australis*, entretanto diferencia-se pelo pedicelo curto. Árvores 2–25 m de altura, pecíolo 2–8 mm de comprimento. Lâmina foliar 5,5–14 × 1,5–4 cm, estreitamente elíptica a elíptica, glabra a densamente coberta por tricomas na face adaxial, densamente coberta por tricomas na abaxial; base aguda; ápice agudo. Flor 1, axilar. Pedicelo 0,5–2,5 cm compr., frequentemente densamente coberto por tricomas. Botões florais 4–8 × 5–10 mm, triangular-ovoides. Sépala 2–5 × 3–4 mm. Pétala estreitamente elíptica a elíptica, ápice obtuso, 6–20 × 4–10 mm. Fruto com receptáculo 4–7 × 5–11 mm, largamente depresso-obovoide; carpídios 16–42, 5–8 × 4–5 mm, elipsoides; estipes 5–10 mm de comprimento (Lobão *et. al.*; 2012).



Figura 10: Imagem da espécie *Guatteria sellowiana*

Fonte: <http://www.ufjf.br/floraserranegra/herbario-virtual/angiospermas/annonaceae/guatteria-sellowiana-schldl>

Na tabela 3 é apresentada a classificação taxonômica das espécies estudadas segundo Arthur Cronquist, 1981.

Tabela 3: Classificação taxonômica das espécies em estudo.

Táxon	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Sub-Classe	Magnoliidae
Ordem	Magnoliales
Família	Annonaceae
Gênero	<i>Guatteria</i>
Espécies	<i>G. australis</i> , <i>G. ferruginea</i> , <i>G. latifolia</i> e <i>G. sellowiana</i>

2.7. SÍNTESE DE ALCALOIDES OXOAPORFÍNICOS

Métodos de Síntese

Alcaloides oxoaporfínicos são uma subclasse de alcaloides benzilisoquinolínicos e são amplamente distribuídos em plantas das famílias: Annonaceae, Araceae, Hernandiaceae, Lauraceae, Papaveraceae, Rannunculaceae, Menispermaceae entre outras (Lee *et al.*; 2007). Estes são, muito provavelmente, derivados da oxidação de alcaloides aporfínicos presentes nas plantas. Esses alcaloides são, geralmente, coloridos de amarelo a alaranjado e que podem variar a coloração quando na presença de ácidos minerais. Os alcaloides oxoaporfínicos possuem um amplo espectro de atividades biológicas tais como: antimicrobiana, antiviral, citotóxica e inibição da agregação plaquetária. Oxoglucina (**10**) e liriodenina (**11**) são os comumente encontrados. A oxoglucina tem atividade imunomoduladora enquanto a liriodenina apresenta atividade inibidora da topoisomerase II, bem como, atividade antiarrítmica pela influência da produção de óxido nítrico nas células (Lee *et. al.*; 2007).

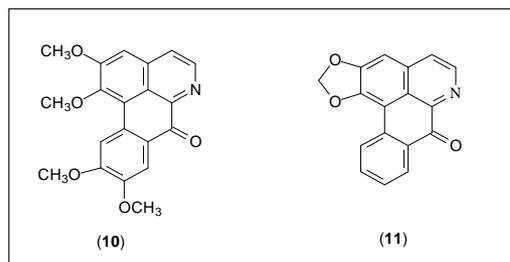
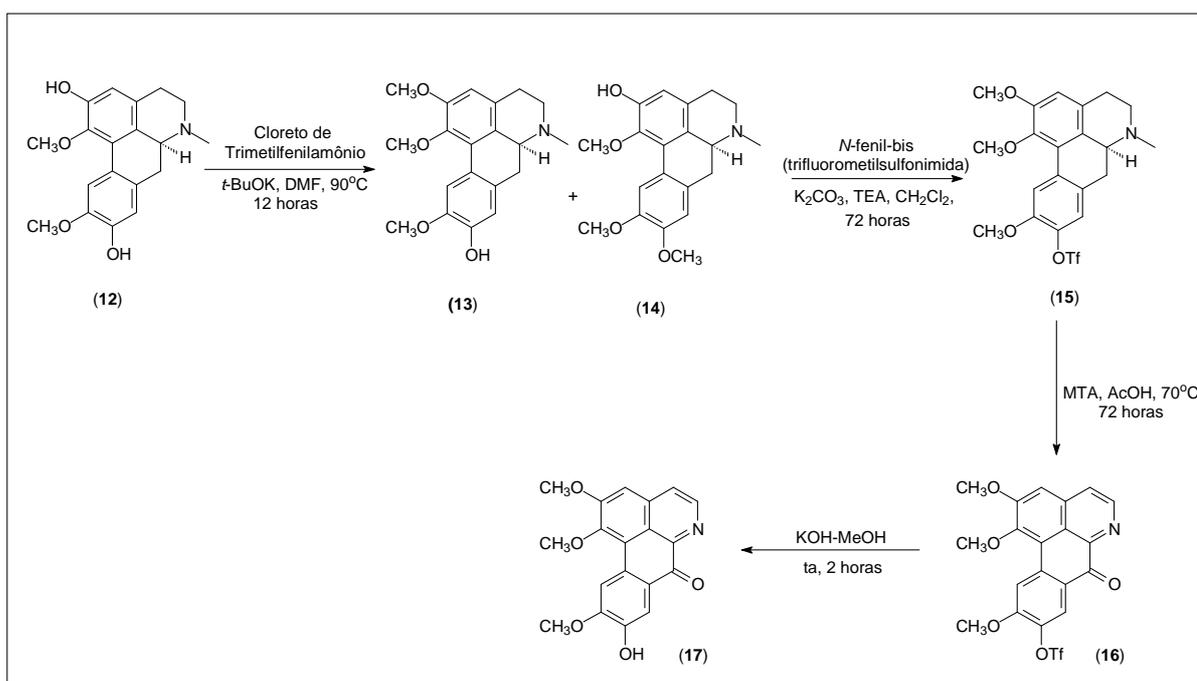


Figura 11: Estrutura dos alcaloides oxoglaucaína (10) e lirioidenina (11)

Em função das diversas atividades biológicas descritas para os alcaloides oxoaporfínicos diversas metodologias sintéticas têm sido desenvolvidas.

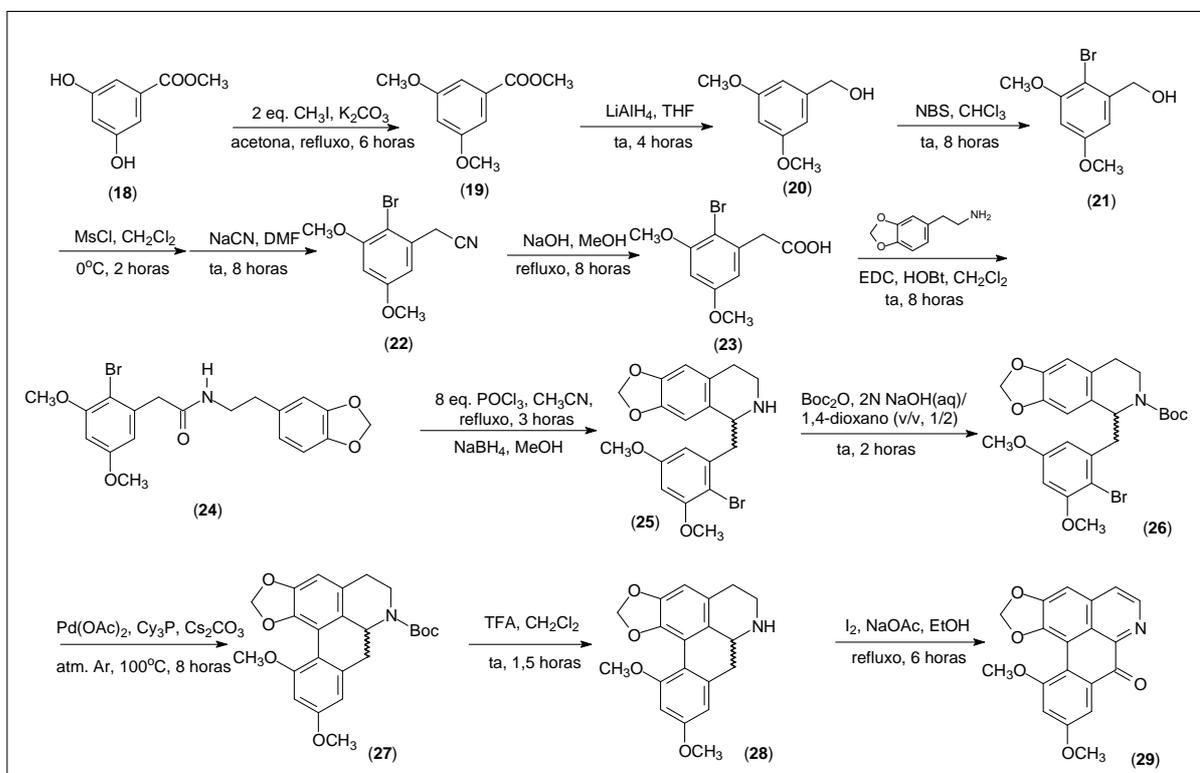
O alcaloide atherolina (17) foi sintetizado por Lee *et. al.*; 2007 a partir da (+)-boldina comercial (Esquema 5). A monometilação da boldina com cloreto de trimetilfenilamônio em dimetilformamida (DMF) sob alta diluição forneceu uma mistura de 2- e 9-éter-metil-boldina que foram separados pela conversão em seus respectivos derivados triflato (triflato de *N*-metil-laurotetanina e triflato de predicentrina) pelo tratamento com *N*-fenil-bis(trifluorometil-sulfonimida). A oxidação do triflato de *N*-metil-laurotetanina com acetato de manganês III (MTA) em ácido acético forneceu o triflato de atherolina que com a desproteção do grupo triflato pelo tratamento com KOH-MeOH produziu a atherolina em quatro etapas e rendimento global de 20%.



Esquema 5: Metodologia para a síntese do alcaloide oxoaporfínico atherolina (17)

Outro trabalho descrito por Hu, *et. al.*; 2007 relata que alcaloides oxoaporfínicos são agentes imunossupressores e podem ser empregados no tratamento da artrite reumatoide. Nesse trabalho é relatado a síntese da oxodiscoguattina (**29**), mostrada no Esquema 6.

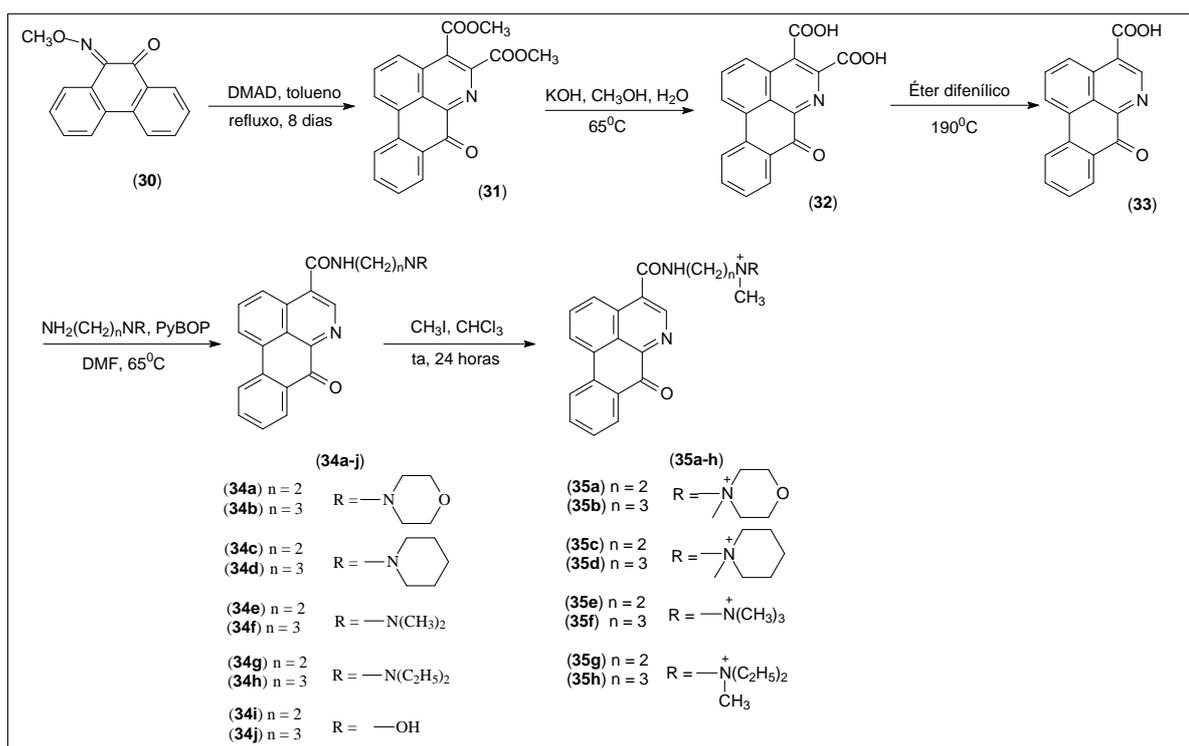
A síntese inicia-se pela metilação do 3,5-diidróxi benzoato de metila para a forma 3,5-dimetóxi benzoato de metila, seguido pela redução do grupo benzoato e substituição por *N*-bromosuccinimida. Posteriormente leva ao ácido 2-bromo-3,5-dimetóxi fenilacético (**23**), através da hidrólise da nitrila correspondente que acoplada com 3,4-metilenodióxi-feniletilamina catalisada por cloridrato de *N*-etil-*N'*-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) e 1-hidroxibenzotriazol (HOBT). A amida (**24**) é então submetida a ciclização de Bischler-Napieralski pelo tratamento com oxicloreto de fósforo, redução com boroidreto de sódio e proteção com dicarbonato de di-*t*-butil (Boc_2O) para dar a amina (**27**). A síntese da oxodiscoguattina (**29**) foi, finalmente, realizada com 6,7% de rendimento global através da *ortho*-arilação intramolecular usando paládio como catalisador, seguido pela oxidação por iodo em refluxo com etanol.



Esquema 6: Metodologia empregada para a síntese do alcaloide oxodiscoguattina

Além das atividades biológicas apresentadas, Gu *et al.*; 2009 relata a síntese de derivados oxoaporfínicos que apresentaram potente atividade inibidora de acetilcolinesterase (AChE).

A síntese do 4-carboxílico amida-7-oxo-7H-dibenzo[*de,g*]quinolina (**35a-h**) foi realizada como mostrada no Esquema 7. A preparação 7-oxo-7H-dibenzo[*de,g*]quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila (**31**) foi realizada pelo método descrito por Gu *et al.*; 2009. A hidrólise do composto (**31**) usando hidróxido de potássio resultou na obtenção do composto (**32**) com 92% de rendimento. A descarboxilação do composto (**32**) levou a formação do composto (**33**) com rendimento de 73%. A amidificação do composto (**33**) usando as aminas apropriadas e diversos agentes de acoplamento como cloroformato de etila, DCC-DMAP levou aos derivados (**34a-j**) em bons rendimentos (51-68%). Os derivados quaternários (**35a-h**) foram obtidos pelo tratamento com iodeto de metila em clorofórmio.



Esquema 7: Síntese de derivados oxoaporfínicos (**35a-h**)

2.8. BIOTRANSFORMAÇÃO

Aspectos Gerais

Historicamente, o potencial metabólico dos microrganismos inseriu-se naturalmente em aspectos fundamentais da vida humana. Assim, fungos unicelulares, as leveduras, apresentam peculiaridades metabólicas que permitiram o seu uso de forma empírica na produção do pão e do vinho, alimentos simbólicos na história da humanidade. Os antigos egípcios, no preparo do seu pão, mantinham a massa, uma simples mistura de farinha e água, aquecida até a formação de bolhas, indicativo, hoje sabemos, da liberação de CO₂ em consequência da sua fermentação. Assim, a contaminação natural, não apenas da massa do pão, mas também de uvas e grãos de cevada, com a levedura *Saccharomyces cerevisiae* e a sua subsequente fermentação originaram o vinho e a cerveja que até os dias de hoje fazem parte dos nossos hábitos alimentares. São produzidas por ano centenas de toneladas de leveduras utilizadas para produção de pão, vinho, cerveja, bebidas destiladas, cidra, saquê e licores. Outro importante produto industrial derivado de *S. cerevisiae*, cujas células são ricas em proteínas, ácidos nucléicos, vitaminas e sais minerais e apresentam níveis negligenciáveis de triglicerídeos, é o extrato de levedura que tem importantes aplicações na indústria alimentícia e na de fermentações industriais, servindo como componente do meio de fermentação (Pereira Junior, 2008).

Outras leveduras dos gêneros *Torulopsis* e *Candida*, capazes de crescer em melaço ou em licor sulfítico, subprodutos da fabricação de açúcar e da indústria de papel, respectivamente, são utilizadas para o tratamento destes resíduos industriais. A biomassa microbiana formada pode ser, subsequentemente, utilizada como fonte de proteína para alimentação animal (Pereira Junior, 2008).

A diversidade microbiana dos fungos é grande, estimando-se um número de espécies entre 100.000 e 250.000. A comercialização de produtos terapêuticos microbianos iniciou-se há mais de 50 anos com a penicilina. O uso de manipulações genéticas, basicamente técnicas de mutação associadas à otimização do processo fermentativo, incluindo o desenvolvimento de meios, permitiram a melhoria do

processo de produção do antibiótico, cuja concentração passou de 0,06 para 26 g/L (Pereira Junior, 2008).

Os processos levados a cabo por agentes biológicos são denominados de **Bioprocessos** e definidos como um conjunto de operações que efetuam o tratamento da matéria-prima/resíduo, o preparo dos meios, a esterilização (quando o processo demandar) e a transformação do substrato em produto(s) por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação de produto(s). São consideradas expressões sinônimas: processos fermentativos com microrganismos naturalmente ocorrentes ou recombinantes, processos biotecnológicos, processos com células animais ou vegetais, processos enzimáticos ou os tratamentos biológicos de resíduos e efluentes. A distinção entre Bioprocessos e Processos Químicos está calcada na natureza dos catalisadores utilizados em suas reações. Os Bioprocessos são conduzidos mediante ação de agentes biológicos, sendo, portanto, as transformações catalisadas enzimaticamente (Pereira Junior, 2008).

As reações de biotransformação consideradas também de transformação biotecnológica incluem uma variedade de processos, ordenados de acordo com o número de etapas biologicamente realizadas e a complexidade dos substratos: (i)- *Fermentações* – transformam materiais brutos tais como açúcares, metanol, misturas industriais como fontes de carbono com células em crescimento para produtos alvos mais complexos; (ii)- *Fermentação precursora* – utiliza-se substratos de partida definidos, os quais transformados no produto alvo desejado com o uso de células em crescimento; (iii)- *Biotransformações* – transformação de precursores definidos em uma série de etapas definidas (porém nem todas conhecidas) para o produto alvo desejado, com o uso de enzimas ou células totais; (iv)- *Enzimas purificadas* – são pouco utilizadas para a produção de produtos químicos, mas são muito importantes na química fina para a obtenção de compostos ativos úteis para a área farmacêutica (Marsaioli, 2010).

A exposição diária a uma variedade de compostos estranhos (xenobióticos) é capaz de levar à absorção deles através dos pulmões, da pele ou ingeridos, não intencionalmente, como contaminantes nos alimentos e na água ou, deliberadamente, na forma de medicamentos com fins terapêuticos ou não. A exposição à xenobióticos pode ser inadvertida e acidental, às vezes inevitável.

Alguns são inofensivos; outros, porém, podem provocar respostas biológicas de natureza farmacológica ou tóxica. Essas respostas biológicas geralmente dependem da conversão da substância absorvida em um metabólito ativo ou não, com a finalidade principal de ser eliminada (Oshima-Franco *et. al.*; 2003).

Neste contexto, a biotransformação é a alteração química ocorrida no xenobiótico no organismo, comumente sob a ação de enzimas específicas e/ou inespecíficas. Juntamente com os fenômenos de absorção, distribuição e excreção, ela participa da regulação de níveis plasmáticos de drogas. A biotransformação, portanto, é um processo alternativo, em que os metabólitos formados possuem propriedades diferentes das drogas originais, com características mais hidrofílicas, tendo por objetivo facilitar a excreção pelo organismo (Oshima-Franco *et. al.*; 2003).

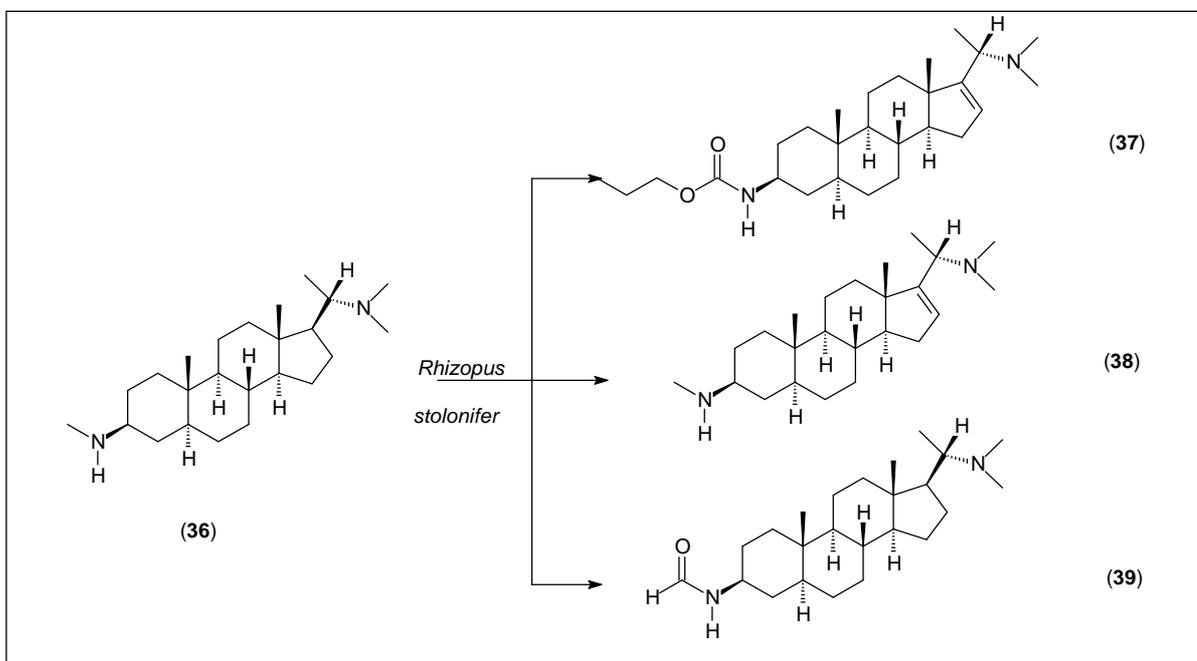
As enzimas podem ser obtidas de diversas fontes animais e vegetais, porém os microrganismos se apresentam como fontes muito promissoras devido a seu pequeno ciclo de vida e à facilidade de manipulação e manutenção. Fungos, leveduras e bactérias têm sido submetidos a intensos programas de triagens, muitas vezes aleatórias, na pesquisa de enzimas úteis. A demanda por novos produtos de uso veterinário, agroquímico, farmacêuticos e qualquer outro que seja usado para mediar ou controlar interações entre sistemas vivos, é cada dia maior, infelizmente para a humanidade, e principalmente para os povos nos países em desenvolvimento econômico (Marsaioli, 2010)

As principais características das biotransformações são a regio, quimio, estereosseletividade e a sua capacidade de realizar a reação em meios menos agressivos, reduzindo os impactos ambientais quando comparados com sínteses químicas por emitirem menor carga de resíduos industriais, produzirem resíduos e produtos biodegradáveis (Marsaioli, 2010).

Particularmente, em relação aos alcaloides, muitos esforços têm sido direcionados para a identificação de novos catalisadores biológicos para a transformação de alcaloides. Sistemas de transformações microbianas têm a vantagem sobre sistemas vegetais em que a produção de biomassa pode ser alcançada rapidamente e sistemas genéticos microbianos são geralmente bem entendidos. Transformações microbianas podem mimetizar catabolismo dos mamíferos, e por isso pode permitir a produção de intermediários úteis ou

metabolitos em grandes quantidades sendo suficientes para permitir a identificação e utilização de toxicidade da droga em estudo. A expressão individual das enzimas envolvidas na biossíntese de alcaloide em hospedeiros heterólogos, tais como bactérias, permite a análise detalhada dos mecanismos catalíticos que pode ser desconhecido na química orgânica sintética. A natureza policíclica complexa de muitos alcaloides e a presença de grupos funcionais podem efetuar modificações químicas de um processo difícil e demorado que muitas vezes resulta em baixos rendimentos. Transformações microbianas oferecem a utilização de enzimas com elevada estereo-especificidade, eliminando a necessidade de proteger e de desproteger grupos funcionais. Como tal, eles são uma alternativa atraente para o químico sintético, dado que, em geral, eles operam em níveis de pH e de temperatura reduzidos (Bruce, *et. al.*; 2002).

Na literatura são encontrados diversos relatos de transformações microbianas para alcaloides. Exemplo disso, é a transformação do alcaloide esteroidal dictioflebina (**36**) pelo fungo *Rhizopus stolonifer* após 12 dias de incubação, Esquema 8.

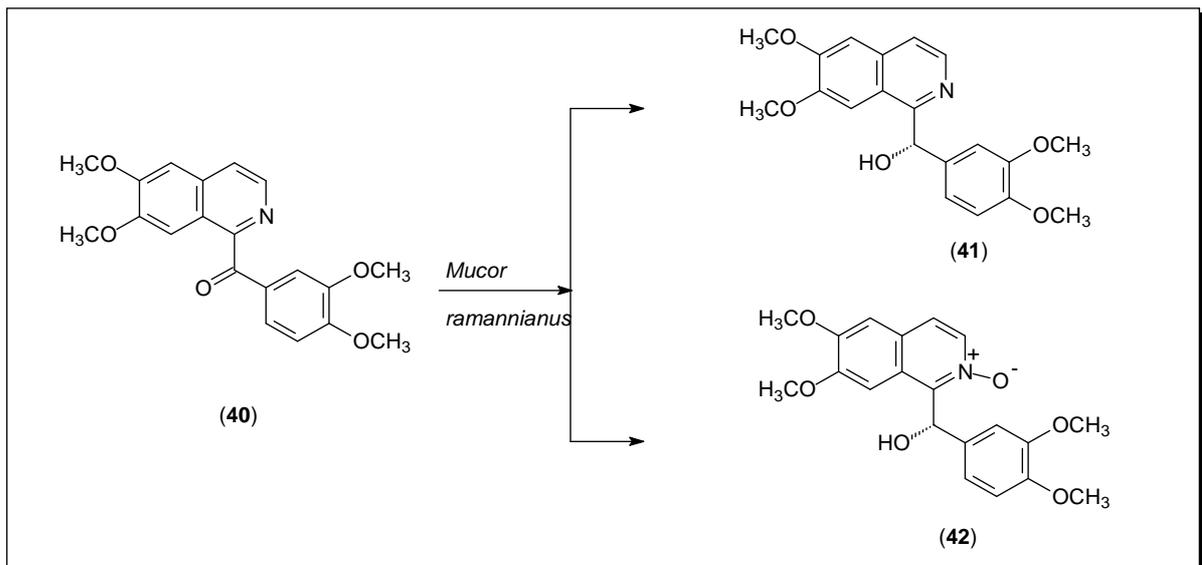


Esquema 8: Biotransformação da dictioflebina (**36**) pelo fungo *Rhizopus stolonifer*

A transformação microbiana levou a formação de três produtos de oxidação (**37-39**), sendo que o composto (**37**) foi considerado inédito. As atividades inibidoras da acetil e butirilcolinesterase foram avaliadas e verificou-se que a atividade do

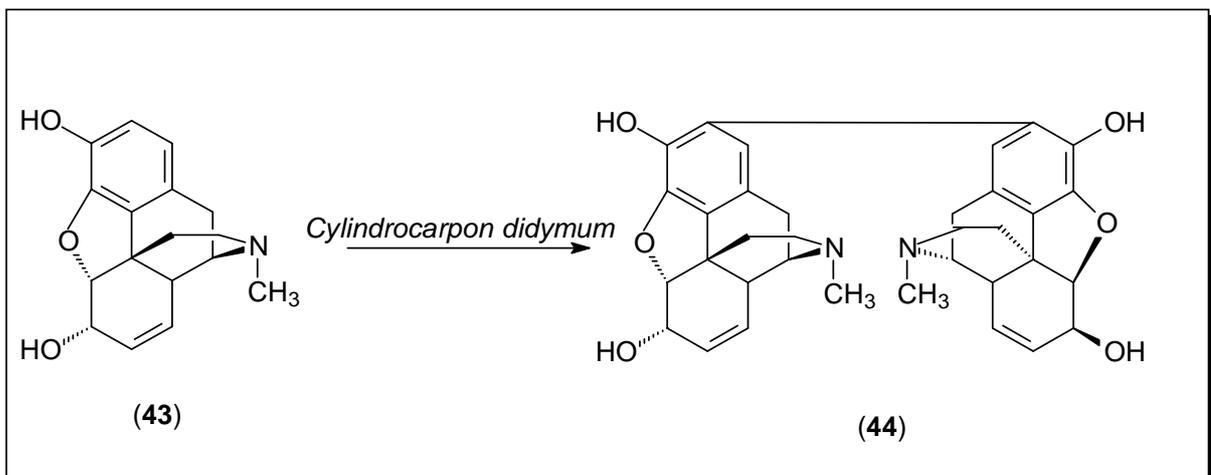
produto biotransformado (**37**) foi mais potente que a do composto (**36**) (Devkota, *et. al.*; 2007).

Em outro relato, El Sayed, 2000, descreve a biotransformação do alcaloide benzilisoquinólico papaveraldina (**40**) pelo fungo *Mucor ramannianus* através da redução estereoseletiva do grupamento cetona e o isolamento do S-papaverinol (**41**) e S-papaverinol N-óxido (**42**), Esquema 9.



Esquema 9: Biotransformação da papaveraldina (**40**) pelo fungo *Mucor ramannianus*

A reação de biotransformação descrita por Bruce *et. al.*; 1998 relata a oxidação da morfina (**43**) pelo fungo *Cylindrocarpon didymum* levando ao produto 2, 2'-bimorfina (**44**), Esquema 10.



Esquema 10: Biotransformação da morfina (**43**) pelo fungo *C. didymum*

O estudo descrito por Hufford *et. al.*; 1999 relata que o alcaloide aza-oxoaporfínico sampagina (**45**) é metabolizado por um série de fungos. Usando a técnica de fermentação padrão em dois estágios com os fungos *Beauveria bassiana*, *Doratomyces microsporus* e *Filobasidiella neoformans* produziu-se o conjugado 4'-O-metil- β -glicopirranose (**46**), enquanto que com os fungos *Absidia glauca*, *Cunninghamella elegans*, *Rhizopus arrhizus* produziram o conjugado β -glicopirranose (**47**). Ambos os compostos (**46**) e (**47**) (Figura 12) tiveram significativa atividade *in vitro* contra o fungo *Cryptococcus neoformans*.

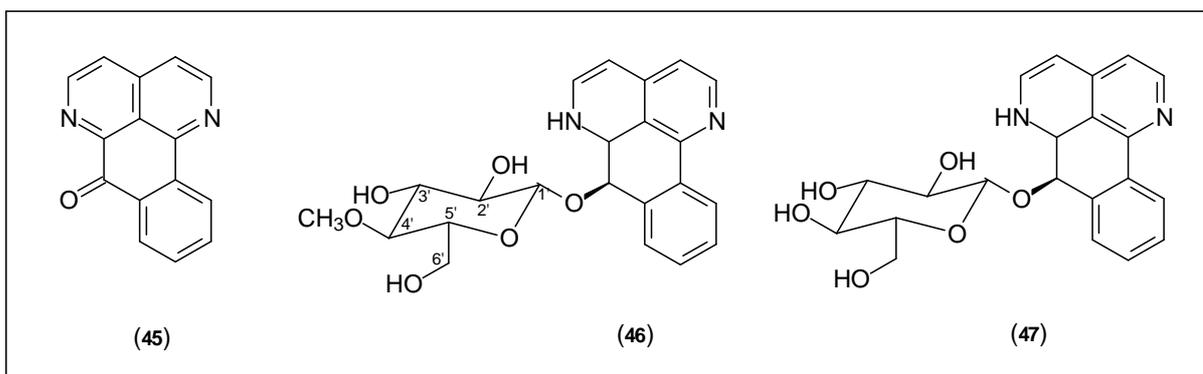


Figura 12: Produtos de biotransformação da sampagina por fungos em diversos estágios.

Neste contexto da transformação microbiológica de alcaloides por fungos, nos propusemos verificar a biotransformação do alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila e seus precursores sintéticos com os fungos *Aspergillus flavus* e *Rhizopus orizae*.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

- Este trabalho tem como principal objetivo realizar o isolamento e identificação dos alcaloides presentes nas espécies, avaliar as atividades antimicrobiana e antiproliferativa de espécies de *Guatteria*, assim como, a síntese de um alcaloide oxoaporfínico e seu comportamento frente a reações de biotransformação.

3.2. ESPECÍFICOS

- Isolamento e identificação dos alcaloides presentes nas partes aéreas das espécies vegetais, *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana*;

- Extração e caracterização dos constituintes voláteis presentes nas espécies *G. australis*, *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana*;

- Realização de ensaios de atividade antimicrobiana e antiproliferativa dos extratos e frações das espécies *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana* e dos óleos essenciais das espécies *G. australis*, *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana*;

- Síntese do alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila;

- Avaliação do potencial antimicrobiano e antiproliferativo do alcaloide oxoaporfínico sintetizado, bem como dos precursores e intermediários sintéticos;

- Realização de ensaios de biotransformação com o alcaloide sintetizado, precursores e intermediários sintéticos.

4. MATERIAIS E EQUIPAMENTOS

4.1. SUPORTES PARA CROMATOGRAFIA

• **Cromatografia em coluna (CC):** As quantidades de amostras a serem submetidas a cromatografia foi um fator determinante para a escolha do comprimento e diâmetro das colunas de vidro. Para os fracionamentos cromatográficos foram utilizados as seguintes fases estacionárias.

- Gel de sílica 60 para cromatografia em coluna com 0,063 – 0,200 mm (70 – 230 mesh ASTM), Merck, Darmstadt, Alemanha. A quantidade de sílica foi de aproximadamente 20 vezes a massa da amostra a ser purificada;

- Alumina Neutra: Óxido de alumínio 90 ativo neutro (grau de atividade I), para cromatografia em coluna, 0,063 – 0,200 mm (70 – 230 Mesh ASTM), Merck KGaA, Darmstadt, Alemanha.

- Gel de sílica 60 impregnada com NaHCO_3 : Cerca de 1000 mL de uma solução de bicarbonato de sódio 10% foi adicionado a 300 g de gel de sílica para coluna 0,063 – 0,200 mm (70 – 230 Mesh ASTM). Após completa adição a solução foi agitada para que bolhas existentes fossem eliminadas. Posteriormente, a sílica foi mantida em repouso por 24 horas. Após esse período a sílica foi filtrada em funil de Büchner para tirar o excesso de solução de bicarbonato de sódio. Em seguida foi armazenada em uma cápsula de porcelana e mantida em estufa à 180°C até secagem completa.

• **Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA):** As cromatografias em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas de alumínio contendo gel de sílica 60 e indicador de fluorescência F_{254} (0,2 mm de espessura), Merck, Darmstadt, Alemanha.

• **Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP):** As análises em escala preparativa foram realizadas em placas de vidro tamanho 20 x 20 cm, espessura de 1,0 mm de gel de sílica 60 da Merck, com indicador de fluorescência F_{254} . As faixas foram reveladas sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de

254 e 366 nm. As amostras foram extraídas utilizando solventes como clorofórmio, acetona ou metanol.

- **Reveladores:** A revelação das substâncias foi feita sob luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 366 nm, solução de aldeído anísico (anisaldeído) e reagente de Dragendorff.

- **Solventes:** Nas análises cromatográficas foram usados solventes das marcas Merck, Synth, Vetec e Sigma Aldrich P.A. Para a obtenção de espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados das marcas Merck e Aldrich.

4.2. EQUIPAMENTOS

- As análises de Ressonância Magnética Nuclear foram realizadas em Espectrômetro de RMN Bruker DPX 200 operando em 200 MHz para núcleos de hidrogênio e 50 MHz para núcleos de carbono-13. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno de referência. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) e são dados em relação ao TMS com $\delta = 0$ ppm.

- As análises de Ressonância Magnética Nuclear em duas dimensões foram realizadas em um Espectrômetro Avance 400 operando a 400 MHz para núcleos de hidrogênio e 100 MHz para núcleos de carbono-13. As amostras foram solubilizadas em solventes deuterados, utilizando tetrametilsilano (TMS) como padrão interno de referência. Os deslocamentos químicos (δ) estão expressos em parte por milhão (ppm) e são dados em relação ao TMS com $\delta = 0$ ppm.

- As análises de espectrometria de massas foram realizadas em equipamento micrOTOF-QII, da Bruker Daltonics (Billerica, MA, EUA) pelo Prof. Dr. Norberto Peoporini Lopes (Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo). A técnica utilizada para a obtenção dos espectros de massas foi a ionização por *electrospray* (IES-EM).

- As análises dos constituintes voláteis foram realizadas em um cromatógrafo a gás de alta performance Shimadzu GC-2010 com GCMS-QP2010

Plus equipado com um auto amostrador Shimadzu AOC-20i com uma coluna capilar Rtx-5MS nas dimensões (30m x 0,25mm x 0,25 μm), operando sob condições de temperatura programada de 60° C a 250° C a 3° C por minuto e temperatura do injetor de 250° C, com um volume de injeção de 1 μL , no modo Split (razão de 1:10). A fonte de íons foi ajustada a 300° C analisando massas entre 40 e 350 m/z, usando como gás de arraste hélio a uma pressão de 59 kPa com fluxo de 1,02 mL.min⁻¹ e velocidade linear de 36,8 cm.s⁻¹, modo de ionização por impacto de elétrons a 70 eV.

- Nos experimentos de biotransformação foram utilizados: Autoclave vertical para esterilização dos materiais e meios de cultura, marca Phoenix, Câmara de Fluxo Laminar (Trox technic M536-AD4), Agitador incubador orbital Tecnal TE-421 a 28° C, 150 rpm e ultrassom ultrassônica Cleaner Unique USC700.

5. COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

A espécie *G. sellowiana* foi coletada em dois locais: A primeira coleta foi realizada em dezembro de 2010 na Reserva Natural do Vale (19°14'45"S, 40°5'22"O), localizado na cidade de Linhares/ES. A Identificação da espécie foi feita pelo botânico Prof. Dr. Renato Mello-Silva (USP-SP). A segunda coleta de *G. sellowiana* foi realizada em fevereiro de 2011 no Parque Nacional de Itatiaia (22°23'17"S, 44°40'29"O) localizado na cidade de Itatiaia/RJ, juntamente com a espécie *G. latifolia*.

A espécie *G. ferruginea* foi coletada em fevereiro de 2011 no Parque Nacional da Serra dos Órgãos (22°26'54"S, 42°59'0"O) localizado na cidade de Teresópolis/RJ.

A espécie *G. australis* foi coletada em fevereiro de 2011 no Parque Nacional da Tijuca (22°57'47"S, 43°15'58") localizado no Rio de Janeiro/RJ.

As espécies *G. sellowiana*, *G. latifolia*, *G. ferruginea* e *G. australis* coletadas no estado do Rio de Janeiro foram identificadas pela botânica Prof^a. Dr^a. Adriana Quintella Lobão da Universidade Federal Fluminense (UFF-RJ). Uma amostra de cada espécie coletada foi depositada no herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro e estão registradas sob os números *G. australis* (RB 517129), *G. ferruginea* (RB 444448), *G. sellowiana* (RB, 415016) e *G. latifolia* (RB 518836).

5.1. EXTRAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS

O estudo visando à extração e caracterização dos constituintes voláteis das partes aéreas foi realizado com as espécies *G. australis*, *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana*.

Aproximadamente 25 g das partes aéreas, devidamente secas e trituradas de cada espécie foram submetidas à hidrodestilação por 4 horas utilizando-se extrator do tipo Clevenger. Após o término das hidrodestilações, o óleo obtido foi recolhido em um frasco e o extrator foi lavado com hexano ultra puro para remoção

de qualquer traço de óleo retido no aparelho. O hidrolato foi extraído com hexano ultra puro (3 x 1,0 mL) e a fase hexânica foi secada com sulfato de sódio anidro. As extrações foram realizadas em duplicata para cada uma das espécies em estudo.

5.2. ANÁLISE DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS POR CG-EM

Foram preparadas soluções dos óleos essenciais de cada uma das espécies de acordo com a Tabela 4 e analisadas em cromatógrafo à gás, cujas especificações encontram-se detalhadas no item 4.2.

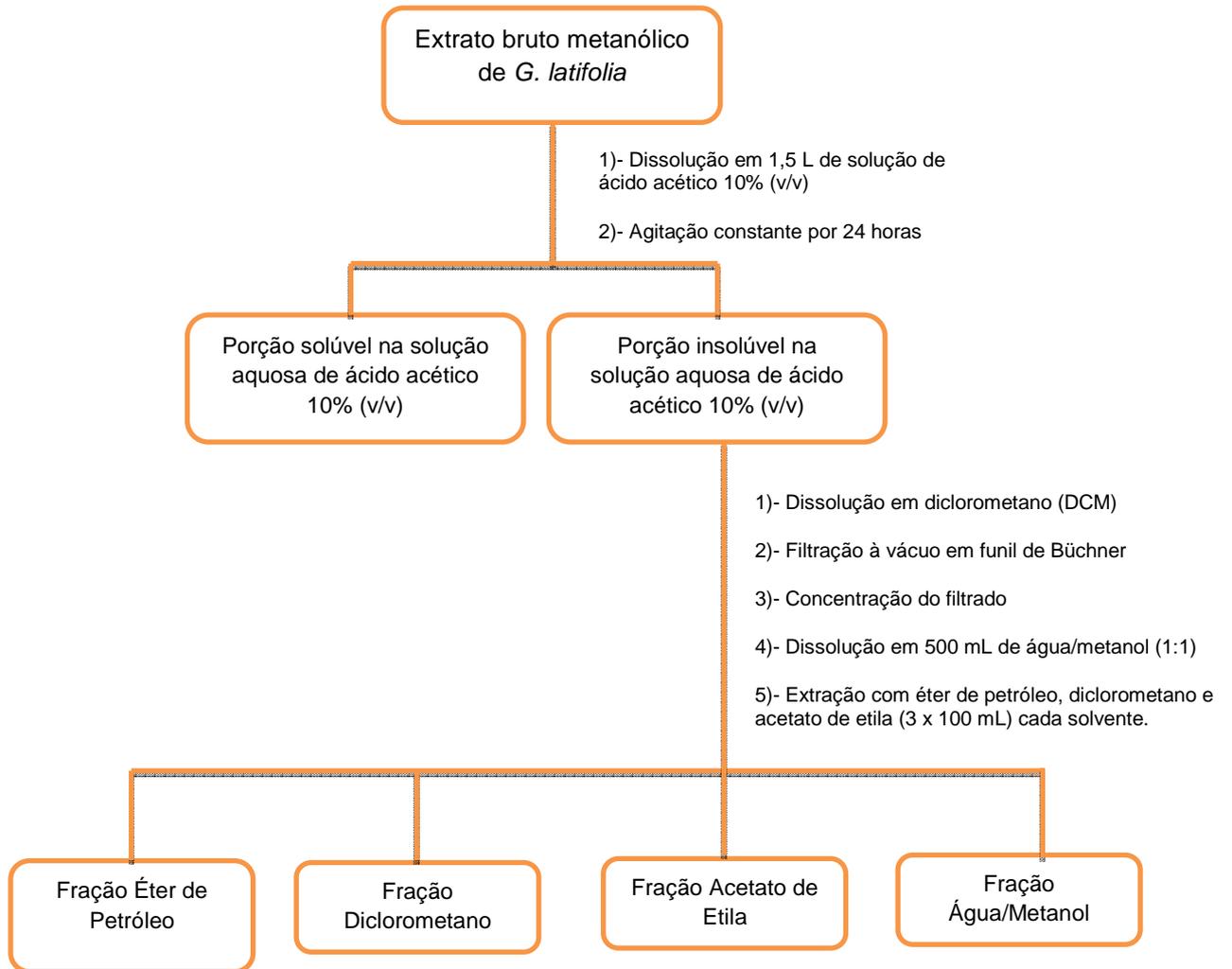
Tabela 4: Concentração das soluções dos constituintes voláteis das espécies de *Guatteria*.

Espécie	Replicata (mg.mL ⁻¹)	
	1	2
<i>G. australis</i>	1,0	1,9
<i>G. ferruginea</i>	1,0	1,0
<i>G. latifolia</i>	1,1	1,1
<i>G. sellowiana</i>	1,8	1,9

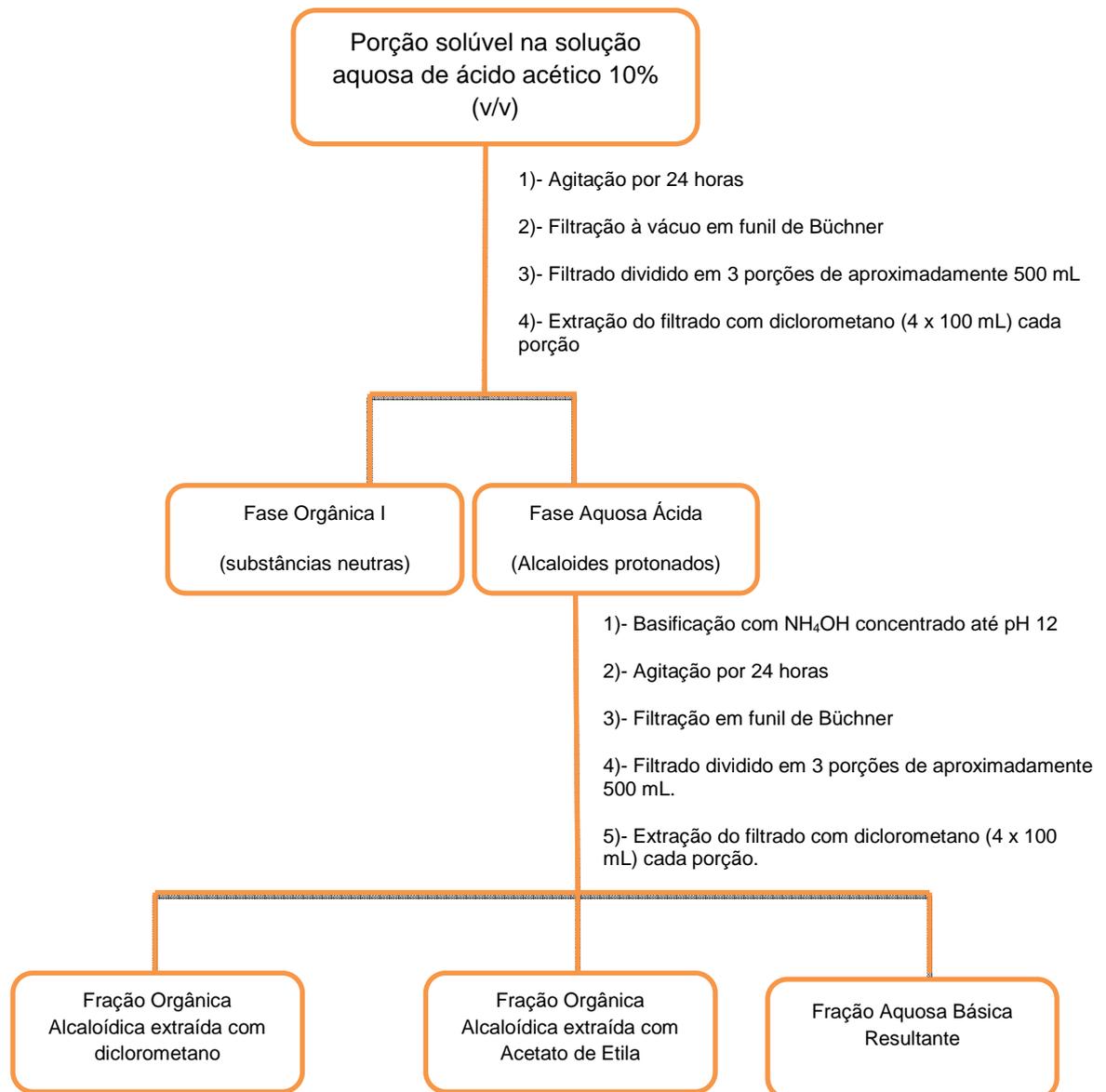
5.3. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *G. latifolia*

As partes aéreas, secas e moídas de *G. latifolia* (1,3 Kg) foram submetidas a remaceração em metanol à frio para obtenção do extrato bruto (101,46 g - 7,8 % de rendimento).

Com o objetivo de isolar, prioritariamente, os alcaloides, o extrato bruto metanólico foi submetido ao procedimento de extração ácido-base que é típico para essa classe de compostos e as placas cromatográficas foram reveladas com reagente de Dragendorff. O procedimento empregado segue de acordo com o Esquema 11.



Esquema 11: Procedimento empregado para obtenção das frações de diferentes polaridades



Esquema 12: Procedimento empregado para obtenção das frações neutra e alcaloídica.

Após a extração da porção insolúvel na solução aquosa de ácido acético 10% (v/v) foi obtidas as frações Éter de Petróleo, Diclorometano, Acetato de Etila e Água/Metanol. A fração Água/Metanol após análise por cromatografia em camada delgada verificou-se a ausência de alcaloides e então foi descartada. A porção solúvel na solução ácido acético 10% (v/v) foi submetida a agitação por 24 horas, filtrada à vácuo e extraída com diclorometano. Dessa forma, obtiveram-se duas fases, sendo elas: a Fase Orgânica I, onde encontrava as substâncias neutras e, alcaloides com menor basicidade e a Fase Aquosa Ácida onde se encontrava os alcaloides com maior basicidade na forma protonada. A Fase Aquosa Ácida foi basificada com hidróxido de amônio até pH 12 mantida em agitação por 24 horas, filtrado à vácuo e extraído com diclorometano. Esse procedimento resultou na

obtenção de três novas frações que foram denominadas de Fração Alcaloídica extraída com diclorometano, Fração Alcaloídica extraída com Acetato de Etila e Fração Aquosa Básica Resultante. Na tabela 5 encontram-se os valores das massas obtidas após a extração ácido-base.

Tabela 5: Valores das massas obtidas após a extração ácido-base

Código	Fração	Massa (g)
A	Fração Éter de Petróleo	3,175
B	Fração Diclorometano	10,481
C	Fração Acetato de Etila	0,821
D	Fração Orgânica Alcaloídica em Diclorometano	0,374
E	Fração Orgânica Alcaloídica em Acetato de Etila	0.169

5.3.1. ESTUDO DA FRAÇÃO D

A fração D (0,374 g) foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica utilizando como eluentes heptano/acetato de etila 90%, acetato de etila, acetato de etila e metanol combinados em ordem crescente de polaridade. Dessa coluna foram obtidas 110 frações de aproximadamente 25 mL cada. Após análise dessas frações por cromatografia em camada delgada elas foram agrupadas resultando em 7 novas frações, conforme mostrado na Tabela 6.

Tabela 6: Fracionamento resultante da fração orgânica alcaloídica (diclorometano)

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
D1	01-12	46,3
D2	13-23	28,2
D3	24-43	55,1
D4	44-53	45,0
D5	54-70	35,5
D6	71-83	32,8
D7	84-110	71,3

5.3.2. ESTUDO DA FRAÇÃO D4

A fração D4 (45 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa e eluída com acetato de etila/acetona/hidróxido de amônio (75:65:10). A

placa quando analisada sob luz ultravioleta revelou a presença de quatro faixas distintas que foram separadas e extraídas com acetona. Tal procedimento resultou no isolamento de uma substância denominada de **GL-1** (5,2 mg).

5.3.3. ESTUDO DA FRAÇÃO B

A fração B (10,481 g) foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica, utilizando como eluentes heptano, heptano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/metanol em combinações crescentes de polaridade, conforme mostrado na Tabela 7.

Tabela 7: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração B

Código	Fração	Massa (g)
B1	Heptano	0,0298
B2	Heptano/Acetato de Etila 25%	2,3033
B3	Heptano/Acetato de Etila 50%	1,7121
B4	Heptano/Acetato de Etila 75%	1,1449
B5	Acetato de Etila	0,3834
B6	Acetato de Etila/Metanol 25%	1,9771
B7	Acetato de Etila/Metanol 50%	0,6920
B8	Acetato de Etila/Metanol 75%	0,2127
B9	Metanol	0,1021

Das frações obtidas a fração B6 foi a, inicialmente, escolhida para estudo, pois ao analisá-la por CCD verificou-se a presença de alcaloides.

5.3.4. ESTUDO DA FRAÇÃO B6

A fração B6 (1,9771 g) foi submetida a fracionamento por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica utilizando como eluentes heptano, heptano/acetato de etila 50%, acetato de etila, acetato de etila metanol 50% e metanol, conforme mostrado na Tabela 8.

Tabela 8: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração B6

Código	Fração	Massa (g)
B6.1	Heptano	0,00
B6.2	Heptano/Acetato de Etila 50%	0,7055
B6.3	Acetato de Etila	0,0860
B6.4	Acetato de Etila/Metanol 50%	0,3154
B6.5	Metanol	0,5681

5.3.5. ESTUDO DA FRAÇÃO B6.2

A fração B6.2 (0,7055 g) foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica modificada com bicarbonato de sódio utilizando como eluentes heptano/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/metanol em combinações crescentes de polaridade. Dessa coluna foram obtidas 144 frações de aproximadamente 25 mL cada que após análise por CCD foram agrupadas em 11 novas frações, conforme mostrado na Tabela 9.

Tabela 9: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica modificada com bicarbonato de sódio da fração B6.2.

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
B6.2.1	01-02	11,5
B6.2.2	03-07	28,4
B6.2.3	08-53	84,6
B6.2.4	54-64	14,4
B6.2.5	65-77	66,1
B6.2.6	78-84	66,7
B6.2.7	85-95	61,2
B6.2.8	96-100	37,9
B6.2.9	101-110	101,0
B6.2.10	111-126	123,1
B6.2.11	126-144	103,2

5.3.6. ESTUDO DA FRAÇÃO B6.2.4

A fração B6.2.4 (14,4 mg) foi submetida a cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) e eluída com diclorometano/acetona 90%. A placa quando

analisada sob luz ultravioleta revelou a presença de três faixas distintas que foram separadas e extraídas com acetona. Tal procedimento resultou no isolamento de um alcaloide denominada de **GL-2** (3,8 mg).

5.3.7. ESTUDO DA FRAÇÃO B6.2.3

A fração B6.2.3 (84,6 mg) foi submetida a cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica modificada com bicarbonato de sódio e utilizou-se como eluentes heptano/diclorometano, diclorometano e diclorometano/metanol em combinações crescentes de polaridade. Dessa coluna foram obtidas 61 frações de aproximadamente 25 mL cada. Após análise por CCD essas frações foram agrupadas em 8 novas frações de acordo com a Tabela 10.

Tabela 10: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica modificada com bicarbonato de sódio da fração B6.2.3

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
B6.2.3.1	01-07	8,1
B6.2.3.2	08-14	10,2
B6.2.3.3	15-29	6,3
B6.2.3.4	30-33	2,5
B6.2.3.5	34-38	3,2
B6.2.3.6	39-48	12,5
B6.2.3.7	49-53	17,3
B6.2.3.8	56-61	13,5

A fração B6.2.3.3 resultou no isolamento de um alcaloide que após análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C verificou-se tratar substância já isolada denominada de **GL-2** (6,3 mg). A fração B6.2.3.7 resultou no isolamento de outro alcaloide denominado de **GL-3** (17,3 mg).

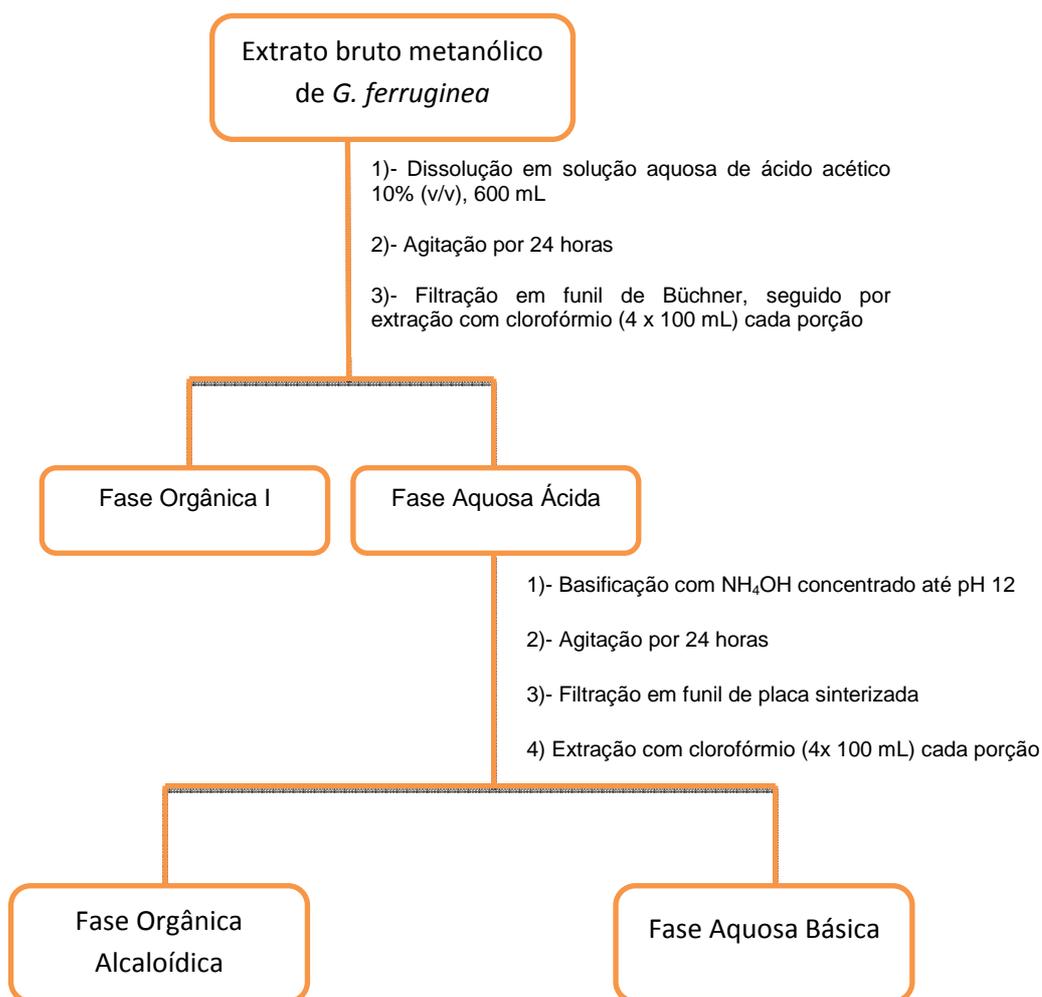
5.3.8. ESTUDO DA FRAÇÃO B6.2.3.8

A fração B6.2.3.8 (13,5 mg) quando analisada por CCD apresentou-se com uma única mancha com teste positivo frente ao reagente de Dragendorff. Após

análise por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C verificou-se que tratava-se de uma mistura de alcaloides denominada de **GL-4** (13,5 mg).

5.4. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *G. ferruginea*

As partes aéreas secas e moídas (590,80 g) de *G. ferruginea* foi submetida a remaceração em metanol à frio. Dessa extração obteve-se o extrato bruto metanólico (38,98 g - 6,50% de rendimento). O extrato bruto metanólico (38,98 g) foi solubilizado em 600 mL de uma solução aquosa de ácido acético 10% (v/v) e mantido sob agitação por 24 horas. Após esse período, a solução foi filtrada à vácuo em funil de Büchner e o filtrado foi dividido em duas porções de 300 mL e extraído com clorofórmio (4 x 100 mL) cada porção. Para eliminar qualquer traço de água, fez-se a secagem com sulfato de sódio anidro, fornecendo a Fase Orgânica I (contendo compostos neutros) e a Fase Aquosa Ácida (contendo alcaloides protonados). Posteriormente, a Fase Aquosa Ácida foi basificada com hidróxido de amônio concentrado até pH 12 e mantida, novamente, em agitação por 24 horas. Após esse período a solução foi filtrada em funil de placa sinterizada e o filtrado foi, novamente, dividido em duas porções de aproximadamente 350 mL cada. As porções foram extraídas com clorofórmio (4 x 100 mL). Finalmente, a Fase Orgânica Alcaloídica foi secada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotativo à pressão reduzida. A Fase Aquosa Básica após ser analisada por CCD e verificar a ausência de alcaloides a mesma foi descartada. No esquema 13 é mostrado o procedimento geral para a extração ácido-base.



Esquema 13: Procedimento geral da extração ácido-base

Os dados referentes a extração ácido-base do extrato metanólico de *G. ferruginea* são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11: Valores das massas obtidas após a extração ácido-base

Código	Fração	Massa (g)
F	Fase Orgânica Alcaloídica	0,343
G	Fase Orgânica I	3,982

5.4.1. ESTUDO DA FRAÇÃO F

A fração F (0,343 g) foi submetida à purificação por cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica utilizando como eluentes clorofórmio, clorofórmio/metanol em gradiente crescente de polaridade. Dessa coluna foram

obtidas 67 frações de aproximadamente 25 mL cada. Após analisadas por CCD foram reagrupadas em 8 novas frações, conforme mostrado na Tabela 12.

Tabela 12: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da Fração F

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
F1	01-11	13,2
F2	12-19	45,1
F3	20-21	12,1
F4	22-32	56,2
F5	33-40	29,2
F6	41-43	13,3
F7	44-53	24,0
F8	54-67	17,7

Após a análise em CCD das 8 novas frações verificou-se que a fração F2 continha alcaloides e outras substâncias com forte absorção sob luz ultravioleta. Dessa forma, optamos por utilizar a técnica de cromatografia centrífuga em camada delgada (Cromatotron) para purificação de F2.

5.4.2. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO F2

A fração F2 (45,1 mg) foi solubilizada em acetona e submetida a cromatografia centrífuga em camada delgada. A placa utilizada foi lavada com acetona e, então, a fração foi aplicada utilizando como eluentes éter de petróleo/acetona 50%, acetona, acetona/metanol 50% e metanol. Desse processo cromatográfico foram obtidas 33 frações de aproximadamente 50 mL cada. As frações foram analisadas por CCD e as frações semelhantes foram agrupadas resultando em 6 novas frações conforme mostrado na Tabela 13.

Tabela 13: Purificação da Fração F2 por cromatografia centrífuga em camada delgada

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
F2.1	01-03	2,5
F2.2	04-08	3,1
F2.3	09-11	0,9
F2.4	12-16	2,1
F2.5	17-29	32,4
F2.6	30-33	1,1

5.4.3. PURIFICAÇÃO DA FRAÇÃO F2.5

A fração F2.5 (32,4 mg) foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando como eluente acetona/metanol 10%. Após visualização da placa sob luz ultravioleta e revelação parcial com reagente de Dragendorff observou-se a presença de quatro faixas distintas que foram separadas e extraídas com acetona/metanol 50%. As faixas quando analisadas por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H mostraram que as mesmas encontravam-se em misturas e pelo fato de apresentarem baixas quantidades, tal procedimento não resultou no isolamento de substâncias.

5.4.4. ESTUDO DA FRAÇÃO G

A fração G (3,982 g) foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica utilizando como eluentes clorofórmio, clorofórmio/acetona, acetona, acetona/metanol 10% e metanol. Dessa coluna foram obtidas 124 frações de aproximadamente 25 mL cada que após analisadas por CCD foram agrupadas em 14 novas frações conforme mostrado na Tabela 14.

Tabela 14: Fracionamento por cromatografia em coluna de gel de sílica da Fração G

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
G1	01-09	253,7
G2	10	46,2
G3	11-18	60,5
G4	19-22	40,2
G5	23-28	137,9
G6	29-47	340,7
G7	48-51	45,8
G8	52-66	156,5
G9	67-76	84,9
G10	77-86	103,4
G11	87-92	120,2
G13	93-104	98,4
G13	105-108	53,3
G14	109-124	602,8

5.4.5. ESTUDO DA FRAÇÃO G4

A fração G4 (40,2 mg) foi submetida a cristalização utilizando como solvente éter de petróleo à frio. Os cristais obtidos quando analisados por CCD mostraram tratar-se de uma única substância que foi denominada de **GF-1** (40,2 mg).

5.5. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *G. sellowiana*

No início do estudo fitoquímico dessa espécie não sabíamos que se tratava de *G. sellowiana*. Quatro coleções nos foram enviadas pelo Prof. Dr. Renato Mello-Filho (Instituto de Biologia – Universidade de São Paulo) e em nenhuma das coleções as espécies haviam sido identificadas. As únicas informações que tínhamos era que se tratava de espécies de *Guatteria* e o local onde haviam sido coletadas. Dessa forma com base nas fichas enviadas por ele, denominamos as quatro coleções de A, B, C e D. Todas as quatro coleções apresentavam massas de material seco, relativamente baixo e, por tal motivo, deixamos de realizar estudos a respeito dos constituintes voláteis e focamos o estudo, exclusivamente, no

isolamento e caracterização dos metabólitos presentes em cada coleção. Recentemente, as quatro coleções foram identificadas pelo prof. Dr. Renato de Mello-Filho sendo a coleção A e C a espécie *G. sellowiana*, a coleção B a espécie *G. villosissima* e a coleção D a espécie *G. australis*. Todas as coleções foram estudadas separadamente e aqui serão mostrados os procedimentos experimentais empregados no estudo das coleções A e C que resultaram no isolamento de substâncias.

5.5.1. ESTUDO DA COLEÇÃO A

As partes aéreas (79,83 g) de *G. sellowiana* (Coleção A) foram submetidas à remaceração em metanol à frio. Após a concentração dos extratos em evaporador rotativo foi obtido (19,95 g - 24,99% de rendimento) do extrato bruto metanólico. O extrato bruto metanólico quando analisado por CCD e após revelação com reagente de Dragendorff revelou a presença de alcaloides. Diante disso, 19 g do extrato bruto metanólico foi submetido à extração ácido-base conforme mostrado no Esquema 13. As frações orgânica alcaloídica foram obtidas após a extração da fase aquosa básica com diclorometano (3 x 100 mL) e com acetato de etila (3 x 100 mL). Após esse procedimento obteve-se as frações e suas massas conforme mostrado na Tabela 15.

Tabela 15: Frações resultantes da extração ácido-base da coleção A

Código	Fração	Massa (g)
H	Fase Orgânica I	0,4047
I	Fase Orgânica Alcaloídica (diclorometano)	0,2771
J	Fase Orgânica Alcaloídica (acetato de etila)	0,0387

5.5.2. ESTUDO DA FRAÇÃO H

Aproximadamente 400 mg da fração H foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica utilizando como eluentes acetato de etila, acetato de etila/metanol e metanol em combinações crescentes de polaridade. Dessa coluna foram obtidas 50 frações de aproximadamente 25 mL cada. Através de análise por CCD foi possível agrupá-las em 10 novas frações, conforme mostrado na Tabela 16.

Tabela 16: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração H

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
H1	01-03	101,8
H2	04-05	8,3
H3	06-07	10,6
H4	08-16	4,9
H5	17-21	33,5
H6	22-28	14,7
H7	29-35	14,3
H8	37-41	1,2
H9	42-45	13,5
H10	46-50	2,7

5.5.3. ESTUDO DA FRAÇÃO H6

A fração H6 (14,7 mg) apresentou-se como um sólido amorfo que após diversas lavagens com acetona resultou no isolamento da substância denominada de **GL-4A** (14,7 mg).

5.5.4. ESTUDO DA COLEÇÃO C

As partes aéreas (137,57 g) de *G. sellowiana* (Coleção C) foram submetidas à remaceração em metanol à frio. Após a concentração em evaporador rotativo dos extratos obteve-se (16,34 g – 11,88% de rendimento) do extrato bruto metanólico. O extrato bruto metanólico quando analisado por CCD e após revelação com reagente de Dragendorff revelou a presença de alcaloides. Diante disso, cerca de 16 g do extrato bruto metanólico foi submetido à extração ácido-base conforme mostrado no Esquema 13. Após esse procedimento obteve-se as frações e suas massas conforme mostrado na Tabela 17.

Tabela 17: Frações resultantes da extração ácido-base da coleção C

Código	Fração	Massa (g)
K	Precipitado da Fase Orgânica I	3,8522
L	Fase Orgânica I	7,3605
M	Precipitado da Fase Orgânica Alcaloídica	4,2522
N	Fase Orgânica Alcaloídica (diclorometano)	0,4404

5.5.5. ESTUDO DA FRAÇÃO L

A fração L (7,3605 g) foi submetida à cromatografia em coluna empacotada com gel de sílica utilizando como eluentes éter de petróleo/clorofórmio, clorofórmio, clorofórmio/acetato de etila, acetato de etila, acetato de etila/metanol em combinações crescentes de polaridade. Dessa coluna foram obtidas 141 frações de aproximadamente 25 mL cada que ao serem analisadas por CCD foi possível reagrupá-las em 15 novas frações, conforme mostrado na Tabela 18.

Tabela 18: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração L.

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
L1	01-25	158,3
L2	26-36	202,3
L3	37-55	155,1
L4	56-62	251,2
L5	63-73	125,3
L6	74-79	21,5
L7	80-91	125,7
L8	92-94	251,8
L9	95-99	201,3
L10	100-106	125,3
L11	107-111	75,2
L12	112-114	165,4
L13	115-119	398,5
L14	120-126	251,8
L15	127-141	452,1

5.5.6. ESTUDO DA FRAÇÃO L6

A fração L6 (21,5 mg) apresentou-se como cristais amarelos que foram lavados sucessivas vezes com acetona e separado do sobrenadante. A substância quando analisada por CCD apresentou-se como uma única mancha que ao ser revelada com reagente de Dragendorff deu resultado positivo para alcaloides. Dessa fração obteve um alcaloide puro denominado de **GL-2** (21,5 mg).

5.5.7. ESTUDO FITOQUÍMICO DE *G. sellowiana* COLETADA NO PARQUE NACIONAL DE ITATIAIA/RJ.

A espécie *G. sellowiana* coletada e identificada pela prof^a. Dr^a. Adriana Quintella Lobão, coletada no Parque Nacional de Itatiaia/RJ.

As partes aéreas de *G. sellowiana* secas e moídas (399,012 g) foram submetidas à remaceração em metanol à frio. O extrato bruto metanólico foi concentrado em evaporador rotativo fornecendo 22,64 g – 5,67% de rendimento.

Tendo em vista os baixos rendimentos obtidos quando empregado o procedimento de extração ácido-base optamos por realizar com parte do extrato bruto metanólico, o particionamento com solventes de diferentes polaridades.

Cerca de 10 g do extrato bruto metanólico de *G. sellowiana* foi solubilizado em uma mistura de água/metanol 1:1 e mantido sob agitação até completa solubilização. Posteriormente, o extrato hidroalcolico foi particionado com éter de petróleo, clorofórmio e acetato de etila. Os valores das massas obtidas são mostrados na Tabela 19.

Tabela 19: Particionamento do extrato bruto metanólico de *G. sellowiana*

Código	Fração	Massa (g)
O	Éter de Petróleo	0,547
P	Clorofórmio	1,972
Q	Acetato de Etila	2,327

5.5.8. ESTUDO DA FRAÇÃO P

A fração P (1,972 g) foi submetida à cromatografia em coluna de gel de sílica modificada com bicarbonato de sódio e eluída com éter de petróleo/diclorometano, diclorometano/acetato de etila e acetato/metanol em combinações crescentes de polaridade. Dessa coluna foram obtidas 131 frações de aproximadamente 25 mL cada que foram agrupadas em 7 novas frações conforme mostrado na Tabela 20.

Tabela 20: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração P

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
P1	01-24	51,2
P2	25-35	14,7
P3	36-67	74,1
P4	68-85	37,5
P5	86-105	108,9
P6	106-125	95,4
P7	126-131	33,4

5.5.9. ESTUDO DA FRAÇÃO P2

A fração P2 (14,7 mg) foi submetida à cromatografia em uma pipeta de Pasteur empacotada com gel de sílica modificada com bicarbonato de sódio e eluída com éter de petróleo/diclorometano em combinações crescentes de polaridade. Dessa coluna foram obtidas 16 frações que após análise por CCD foram agrupadas em 6 novas frações, conforme mostrado na Tabela 21.

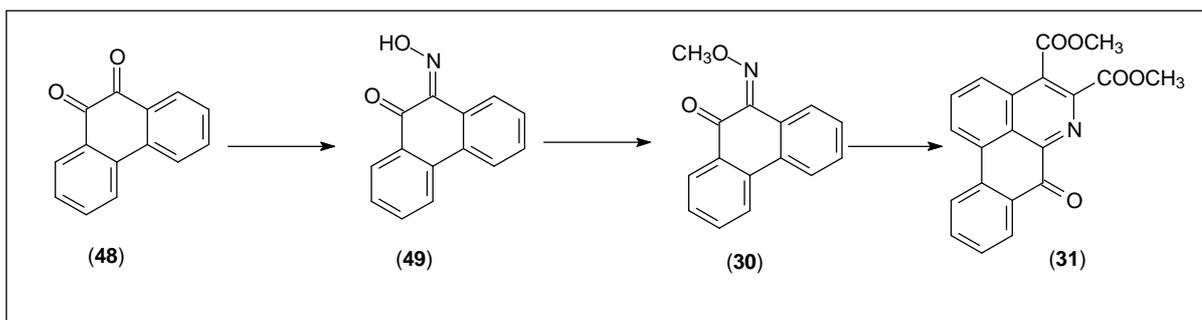
Tabela 21: Purificação por cromatografia em coluna de gel de sílica da fração P2

Código	Frações Agrupadas	Massa (mg)
P2.1	01-03	3,3
P2.2	04-06	1,9
P2.3	07-09	0,8
P2.4	10-12	0,5
P2.5	13	2,3
P2.6	14-16	0,2

A fração P2.2 apresentou-se com um sólido amarelo, teste positivo para o reagente de Dragendorff, que após analisada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H mostrou-se como uma substância pura denominada **GS-1** (1,9 mg).

5.6. SÍNTESE DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO 7-OXO-7H-DIBENZO-QUINOLINA-4,5-DICARBOXILATO DE DIMETILA

A síntese do alcaloide oxoaporfínico foi realizada em três etapas conforme mostrado no Esquema 14.



Esquema 14: Rota sintética empregada para a obtenção do alcaloide 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila

Os reagentes empregados nessa rota foram 9,10-fenantrenoquinona (**48**) (Aldrich, 95%), acetilendicarboxilato de dimetila (DMAD) (Aldrich, 99%), cloridrato de hidroxilamina, acetato de sódio e iodeto de metila (Aldrich, 99%).

5.6.1. SÍNTESE DA (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA-9-OXIMA

Em um balão de fundo redondo foi adicionado à 9,10-fenantrenoquinona (**48**) (2 g; 9,6 mmol), etanol (16 mL) e uma solução de cloridrato de hidroxilamina (0,934 g; 13,4 mmol) e acetato de sódio (1,1 g; 13,4 mmol) dissolvidos em aproximadamente 30 mL de água destilada. A mistura reacional foi mantida sob agitação e refluxo por 4 horas. Ao término da reação o produto reacional foi concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida. Posteriormente, foi adicionado água ao produto obtido e filtrou-se. A mistura reacional foi purificada por cromatografia em coluna, empacotada com gel de sílica utilizando como eluente éter de petróleo/clorofórmio 80%. Dessa coluna obteve-se a substância (**49**) pura com rendimento de 95%. A síntese da substância (**49**) está de acordo com a metodologia proposta por Katritzky *et. al.*; 2003 com pequenas modificações.

5.6.2. PREPARAÇÃO DO DERIVADO (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA-9-METILOXIMA (30)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados a substância (49) (1,8 g; 8,1 mmol), iodeto de metila (15 mL; 239 mmol) e óxido de prata (2,8 g; 12,0 mmol). A reação foi mantida em agitação e refluxo por 4 horas. Após esse período a reação foi interrompida pela adição de água destilada. O produto reacional foi filtrado em funil de placa sinterizada e, posteriormente, concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida. Dessa forma foi obtida a substância (30) com rendimento de 96%. O óxido de prata utilizado nessa etapa foi obtido pela reação de uma solução diluída de hidróxido de sódio (0,2 mol.L⁻¹) que foi gradualmente adicionada a uma solução aquosa de nitrato de prata 10% conforme descrito por Kubmarawa *et. al.*; 2011.

5.6.3. SÍNTESE DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO 7-OXO-7H-DIBENZO-QUINOLINA-4,5-DICARBOXILATO DE DIMETILA (31)

Em um balão de fundo redondo foram adicionados à substância (30) (1,7 g; 7,2 mmol) e o acetilendicarboxilato de dimetila (2,0 mL; 16,3 mmol) em 10 mL de tolueno. A mistura foi mantida sob agitação e refluxo por 4 horas. Durante o refluxo observou-se a precipitação de um sólido amarelo que foi separado do sobrenadante por filtração em funil de placa sinterizada. O sólido quando analisado por CCD apresentou-se como uma única mancha que ao ser revelado com reagente de Dragendorff foi positivo para alcaloides. Essa substância ao ser analisada por RMN de ¹H e ¹³C mostrou que se tratava da substância (31). Foram obtidos 532 mg de (31), correspondendo a um rendimento de 31,3%. A metodologia para obtenção do alcaloide oxoaporfínico segue de acordo com Gu *et. al.*; 2009. O rendimento global para a síntese de (31) foi de 28,5%.

5.7. ESTUDOS DE BIOTRANSFORMAÇÃO (EM ESCALA ANALÍTICA)

5.7.1. MANUTENÇÃO DAS CEPAS

Os fungos foram mantidos sob refrigeração em meio de cultura BDA (batata, dextrose, ágar). Para que os fungos se mantivessem metabolicamente ativados, a cada 15 dias, novo meio de cultura foi preparado e nova inoculação foi realizada. Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Biotransformação sob responsabilidade do Prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira.

5.7.2. FUNGOS

Nos experimentos em escala analítica, cinco cepas de diferentes fungos foram usadas, sendo eles *Rhizopus microsporus*, *Rhizopus orizae*, *Aspergillus flavus*, *Chaetomium 56* e *Bipolaris sorokiniana*.

5.7.3. PREPARAÇÃO DO MEIO DE CULTURA

Inicialmente, foram preparados 500 mL do meio de cultura, constituído de glicose anidra (20 g.L^{-1} – Biotec), extrato de malte (8 g.L^{-1}) e extrato de levedura (4 g.L^{-1}). O meio de cultura foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos, a 122°C e 1 Kg.F/cm^2 de pressão. Sob condições estéreis cada fungo foi inoculado em dois frascos contendo 50 mL de meio, sendo um como controle e o outro como teste. Os frascos foram mantidos em agitação constante em agitador orbital sob rotação constante de 150 rpm (rotações por minuto) a 30°C por 48 horas.

Tabela 22: Tempo de crescimento dos fungos após inoculação

Fungo	Tempo de crescimento (horas)
<i>Rhizopus microsporus</i>	48
<i>Rhizopus orizae</i>	48
<i>Aspergillus flavus</i>	48
<i>Chaetomium 56</i>	Não houve crescimento
<i>Bipolaris sorokiniana</i>	Não houve crescimento

5.7.4. ENSAIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DA (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA (48).

Após o ensaio em escala analítica da substância (48) com os fungos descritos na Tabela 22, verificou-se por cromatografia em camada delgada e sob luz ultravioleta que somente o fungo *Aspergillus flavus* havia provocado modificações quando comparado ao padrão e o teste. Assim o fungo *A. flavus* foi pré-inoculado individualmente em frascos contendo 50 mL de meio de cultura que foi mantido em agitação constante por 48 horas a 28°C, a 150 rpm. Após esse período foram transferidos para frascos contendo 200 mL de meio de cultura e incubados por 48 horas, em seguida, 1 mL da solução de (48) dissolvido em acetona (60 mg.mL⁻¹) foi adicionado em cada frasco, totalizando cinco frascos, sendo que um frasco foi mantido como controle negativo. Após sete dias, os extratos foram filtrados, o micélio foi lavado com água destilada (2 x 50 mL) e o filtrado foi extraído com diclorometano (2 x 100 mL) e para garantir que todo produto fosse extraído fez-se também a extração com acetato de etila (3 x 100 mL). As fases orgânicas foram agrupadas e o extrato foi concentrado em evaporador rotativo. O extrato obtido (225 mg) foi então submetido a uma filtração à vácuo em gel de sílica utilizando como eluentes diclorometano (300 mL), diclorometano/acetato de etila 15% (300 mL), diclorometano/acetato de etila 30% (200 mL), diclorometano/acetato de etila 50% e metanol (200 mL). Após a concentração dessas frações em evaporador rotativo à pressão reduzida e análise das mesmas por CCD, verificou-se que a substância biotransformada encontrava-se na fração diclorometano sendo purificada por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) resultando na substância denominada **BIO-2** (60 mg).

5.7.5. ENSAIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO DA (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA-9-OXIMA (49).

Após a triagem analítica de biotransformação verificou-se que a substância (49) havia sofrido modificações em seu perfil cromatográfico quando comparado ao teste e ao padrão pela influência do fungo *Rhizopus orizae*. Dessa forma optamos efetuar o ensaio de biotransformação utilizando a escala preparativa onde se emprega maiores quantidades da substância a ser testada. Assim o fungo *R. orizae*

foi pré-inoculado, individualmente, em frascos contendo 50 mL de meio de cultura que foi mantido em agitação constante por 48 horas a 28°C, a 150 rpm. Após esse período foram transferidos para frascos contendo 200 mL de meio de cultura incubados por horas; e em seguida, 1 mL da solução de (49) dissolvidos em acetona (60 mg. mL⁻¹) foi adicionado em cada frasco, totalizando cinco frascos, sendo que um frasco foi mantido como controle negativo. Após sete dias, os extratos foram filtrados, o micélio foi lavado com água destilada (2 x 50 mL) e o filtrado foi extraído com diclorometano (2 x 100 mL) e acetato de etila (3 x 100 mL). As fases orgânicas foram agrupadas e o extrato foi concentrado em evaporador rotativo. O produto obtido (125 mg) foi submetido a diversas purificações por cromatografia em camada delgada preparativa eluída com éter de petróleo/diclorometano 80%, resultando na substância biotransformada denominada de **BIO-1** (45 mg). Na Figura 13 é mostrada a mistura reacional antes da extração.



Figura 13: Controle e teste frente ao fungo *R. orizae*

5.7.6. ENSAIO DE BIOTRANSFORMAÇÃO EM ESCALA ANALÍTICA DOS COMPOSTOS (Z)-9,10-FENANTRENOQUINONA-9-METIL-OXIMA (30) E DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO 7-OXO-7H-DIBENZO-QUINOLINA-4,5-DICARBOXILATO DE DIMETILA (31).

Levando-se em consideração a disponibilidade do fungo *A. flavus* no laboratório de biotransformação do prof. Dr. Brás Heleno de Oliveira optamos por verificar a reação de biotransformação dos compostos (30) e (31) frente a esse fungo. Os ensaios foram realizados em escala analítica onde, inicialmente, foram

preparados 150 mL do meio de cultura, constituído de glicose anidra, extrato de malte e extrato de levedura. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave durante 15 minutos, a 122°C e 1 Kg.F/cm² de pressão. Sob condições estéreis, cada fungo foi inoculado em três frascos contendo 50 mL de meio, sendo um como controle e os outros dois como teste. Os frascos foram mantidos em agitação constante em agitador orbital sob rotação constante de 150 rpm (rotações por minuto) a 30°C por 48 horas. Após esse período as substâncias (30) e (31) foram adicionadas separadamente, em seus respectivos frascos e 1 mL da solução de (30) e (31) dissolvidos em acetona (30 mg. mL⁻¹) foram adicionados em seus respectivos frascos, sendo que um frasco foi mantido como controle negativo e os outros dois como testes para as substâncias (30) e (31). Após a extração dos frascos teste e análise por CCD comparando ao controle verificou-se que nenhuma mudança no perfil cromatográfico havia ocorrido. Tal evidência mostrou que não houve reação de biotransformação para as substâncias (30) e (31).

5.8. TESTES BIOLÓGICOS

Os constituintes voláteis, extratos vegetais e produtos sintéticos foram avaliados quanto à sua atividade antifúngica e antibacteriana. Os ensaios foram realizados na Divisão de Microbiologia do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Química, Biológica e Agrícola (CPQBA) – Universidade Estadual de Campinas tendo como colaboradora a Dr^a. Marta Cristina Teixeira Duarte.

Para os constituintes voláteis, os microrganismos testados foram: *Escherichia coli* (ATCC 11775), *Bacillus subtilis* (ATCC 6051), *Enterococcus faecium* (CCT 5079), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella choleraesuis* (ATCC, 13388), *Enterococcus hirae* (ATCC 10541) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

O meio utilizado para as bactérias foi o Nutriente Ágar e para a levedura *C. albicans* foi utilizado o meio Agar Sabouraud Dextrose.

5.8.1. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana foi avaliada através da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) dos extratos, de acordo com o método de microdiluição (Eloff, 1998), conforme descrito à seguir.

Em uma microplaca esterilizada de 96 orifícios ou poços foram depositados 100 μL de caldo Mueller-Hinton, com exceção da coluna 12, que foi utilizada para os controles. Na coluna 1 – linha A, foram acrescentados 50 μL da fração, do material a ser testado, de concentração conhecida (uma substância diferente para cada número ou coluna), até a concentração de 1,0 mg. mL^{-1} . Em seguida, 100 μL do conteúdo do orifício foram homogeneizados com o meio e transferidos para o orifício da linha seguinte (B), repetindo-se este procedimento até a linha H, de modo a obter uma concentração decrescente do material testado. Os 100 μL finais foram desprezados e, em seguida, 100 μL de uma suspensão dos microrganismos, de crescimento recente (24 horas), cuja turvação foi comparada à escala de McFarland n^o. 0,5 e diluídos para concentração final de 10^4 células mL^{-1} foram adicionados. As placas foram seladas com parafilme e incubadas por 24 horas até a 37 °C. Após esse período foram acrescentados 50 μL de uma solução aquosa de TTC (cloreto de trifeniltetrazolium) a 0,5%, e a placa re-incubada por 3 horas na referida temperatura. A CMI foi definida como a menor concentração do material testado capaz de impedir o aparecimento de coloração vermelha. Também foram incluídos nos testes, controles dos antibióticos nistatina e cloranfenicol para confirmação da esterilidade do meio de cultura e do crescimento dos microrganismos.

5.8.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA (ATIVIDADE ANTITUMORAL *IN VITRO*)

A avaliação da atividade antiproliferativa dos materiais a serem testados foi realizada de acordo com a metodologia desenvolvida pelo Nacional Câncer Institute dos Estados Unidos (NCI-USA), utilizando dez linhagens tumorais humanas: linhagens UACC-62 (melanoma), U251 (Sistema Nervoso Central, SNC, glioma), MCF-7 (mama), PC-3 (próstata), NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos), 786-0 (rim), NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células), OVCAR-3 (ovário), HT-29 (colorectal), K562 (leucemia), HaCat (queratinócito humano

imortalizado, linhagem não tumoral). Estes ensaios foram realizados na Divisão de Farmacologia e Toxicidade do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) – Unicamp, sob a colaboração do Dr. João Ernesto de Carvalho.

Os materiais testados nas concentrações de 0,25; 2,5; 25 e 250 μL foram adicionados em placas de 96 divisões contendo quatro linhagens por placa. Após um período de incubação de 48 horas, as células foram fixadas através da adição de ácido tricloroacético 50%. Após 60 minutos, o ácido tricloroacético foi removido por aspiração e a seguir as placas foram lavadas com água corrente para, após secagem, serem coradas com a sulforrodamina B (SRB). O excesso de SRB foi removido das placas após 10 minutos através de lavagem com ácido acético a 1%. Finalmente, o corante foi solubilizado por adição de tampão tris base. A leitura óptica foi realizada por leitor de microplacas (elisa) em 560 nm de acordo com (Shoemaker, 2006).

Com os dados obtidos, foram construídos gráficos relacionando a porcentagem de inibição de crescimento com a concentração da substância teste.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Guatteria é um dos maiores gêneros da família Annonaceae e este trabalho envolveu quatro espécies vegetais (*G. australis*, *G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana*) para o estudo dos óleos essenciais e três espécies (*G. ferruginea*, *G. latifolia* e *G. sellowiana*) para o isolamento e identificação estrutural de alcaloides. Também realizou-se a síntese de um alcaloide oxoaporfínico e estudos de biotransformação foram avaliados. Extratos brutos, óleos essenciais, alcaloide sintético e intermediários de reação foram avaliados em relação a atividade antimicrobiana e antiproliferativa.

6.1. DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES VOLÁTEIS

O estudo dos constituintes voláteis das espécies de *Guatteria* resultou na identificação de 25, 27, 22 e 19 componentes majoritários para as espécies *G. australis*, *G. latifolia*, *G. ferruginea* e *G. sellowiana*, respectivamente. Os constituintes presentes nos óleos essenciais das quatro espécies foram comparados com índices de retenção disponíveis na biblioteca do software do cromatógrafo de fase gasosa e dados da literatura (Adams, 2007). Na Tabela 23, encontram-se relacionados os índices de retenção, componentes identificados e o percentual de cada constituinte identificado.

Nos óleos das quatro espécies analisadas os sesquiterpenos oxigenados foram encontrados em maior concentração seguidos pelos monoterpenos oxigenados. O sesquiterpeno espatulenol foi o constituinte majoritário nos óleos essenciais de *G. australis* com 40,29% em relação a composição total e foi encontrado em altas concentrações nos óleos essenciais de *G. latifolia* (22,21%), *G. ferruginea* (11,04%) e *G. sellowiana* (23,0%). Teores elevados de espatulenol têm sido relatados em espécies de *Guatteria*, por exemplo, no óleo das partes aéreas de *G. juruensis* (77,1%) (Lima *et. al.*; 2003), no óleo essencial das folhas e caules finos de *G. poeppigiana* (52,9%) (Lima *et. al.*; 2004) e no óleo das folhas de *G. wachenheimi* (11,4%) (Fournier, *et. al.*; 1997). A presença do espatulenol como constituinte majoritário de *G. australis* foi confirmada por RMN de ^1H e de ^{13}C . O

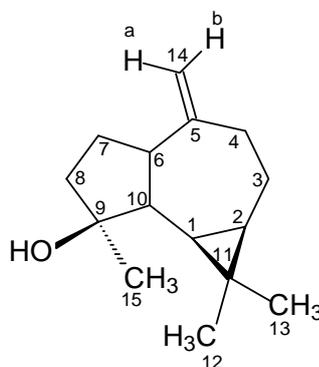
óxido de cariofileno foi considerado o constituinte majoritário nas espécies *G. latifolia* (31,45%) e *G. ferruginea* (40,13%) e encontrado como um dos constituintes majoritários de *G. sellowiana* (13,36%). Elevado teor de óxido de cariofileno foi detectado no óleo da casca da raiz de *G. blepharophylla* (Costa, *et. al.*; 2008). Os rendimentos obtidos na extração dos óleos essenciais foram de 0,1% para todas as espécies estudadas.

Tabela 23: Constituintes voláteis das partes aéreas de espécies do gênero *Guatteria*

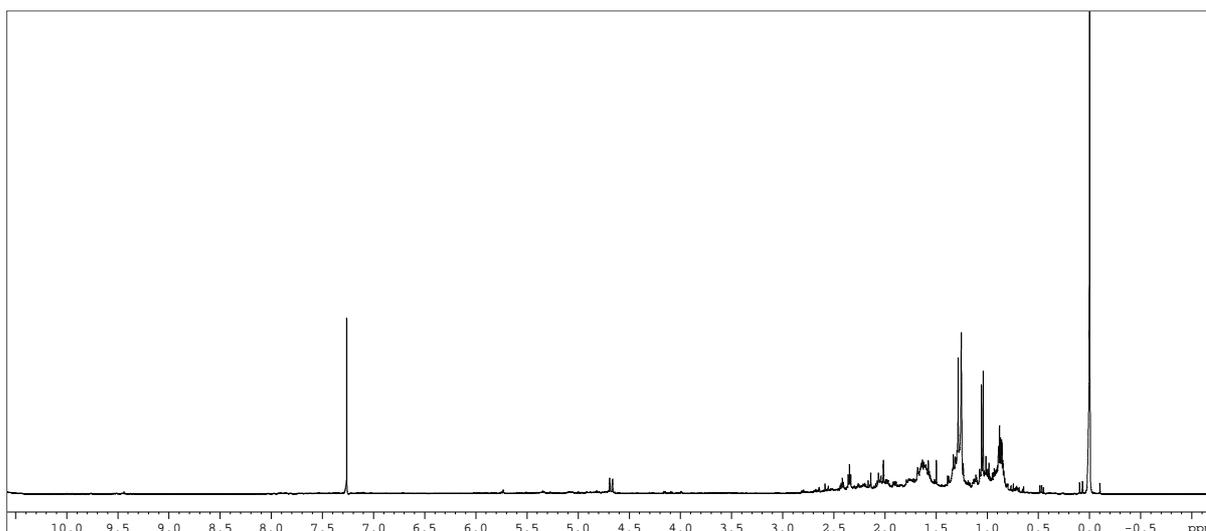
Constituintes	IR ^a	<i>G. australis</i> (%)	<i>G. latifolia</i> (%)	<i>G. ferruginea</i> (%)	<i>G. sellowiana</i> (%)
α -Pinoeno	934	4,62			
β -Pinoeno	978	9,36		0,76	
Hepten-2-ona (6-metil-5)	986			0,71	
Limoneno	1028	0,47			
<i>cis</i> -Óxido de linalol	1072			0,33	
Linalol	1100	0,45	0,31		
α -Canfolenal	1127	0,59		0,66	0,22
<i>cis</i> -óxido de limoneno	1132				1,47
<i>trans</i> -Pinocarveol	1140	6,16	0,96	7,83	0,67
<i>cis</i> -Verbenol	1142	0,81		0,49	
<i>trans</i> -Verbenol	1146	6,67	1,55	4,60	1,49
Pinocarvona	1164	1,76	0,45	1,42	0,18
<i>p</i> -Menta-1,5-dien-8-ol	1167	0,44		0,12	
Terpinen-4-ol	1178				0,18
<i>p</i> -Cimen-8-ol	1186	0,50			
Criptona	1188		0,91		
α -Terpineol	1192	0,24		0,19	
Mirtenol	1198	5,40	1,17	7,46	0,69
Verbenona	1211	3,79	0,20	0,74	0,26
<i>cis-p</i> -Menta-1(7),8-dien-2-ol	1220	0,45	0,52	0,54	
Pulegona	1223		0,31		
Carvona	1245		0,33		
<i>trans</i> -Acetato óxido de linalol	1287	0,21	0,23		
Álcool Perílico	1300			0,16	
β -Bourboneno	1387	0,76	2,58		
<i>E</i> -Cariofileno	1423			1,51	
<i>Z</i> - β -Farneseno	1437				5,87
Acetona de Geranila	1453		0,27		
<i>E</i> - β -Farneseno	1457				0,39
Germacreno D	1484		0,50	0,40	0,29

<i>trans-Z-α</i> -Epóxido de bisaboleno	1497	0,31	1,31		
<i>E-E-α</i> -Farneseno	1509			7,26	
<i>β</i> -Bisaboleno	1510				7,97
<i>Z</i> - Nerolidol	1541	0,36			
<i>cis-α</i> -Bisaboleno	1545				28,96
Hediciariol	1553		0,74		
Espatuleno	1583	40,29	22,21	11,04	23,00
Óxido de Cariofileno	1588	7,74	31,45	40,13	13,36
Isomentona	1633		1,29		3,45
<i>allo</i> -Epóxido de Aromadendreno	1642	1,37			
Sellin-11-en-4- <i>α</i> -ol	1651	0,87	0,52	0,39	
<i>neo</i> -Intermedol	1660		2,16		
14-hidroxi-9- <i>epi-E</i> -Cariofileno	1675	0,15	1,04	1,22	1,06
Khusinol	1684		2,03	0,37	0,26
Germacra-4(15), 5,10(14)-trien-1- <i>α</i> -ol	1691	0,80	0,26		
Epóxido de Longipineno	1750		0,20		
Aristoleno	1757				0,22
<i>iso</i> -Acetato de Longifolol	1823		0,88		
<i>Z,Z</i> -Acetona de Farnesila	1861		0,37		
Monoterpenos		14,45	0	1,47	0
Monoterpenos oxigenados		27,47	6,94	24,54	5,16
Sesquiterpenos		0,76	3,35	1,91	6,55
Sesquiterpenos oxigenados		51,89	64,46	60,41	78,28
Total		94,57	74,75	88,33	89,99

Através da análise do óleo essencial da espécie *G. australis* por RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) - (Espectro 1) e de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) - (Espectro 2) foi possível atribuir entre os diversos sinais a presença de sinais referentes ao sesquiterpeno oxigenado espatulenol (**50**)

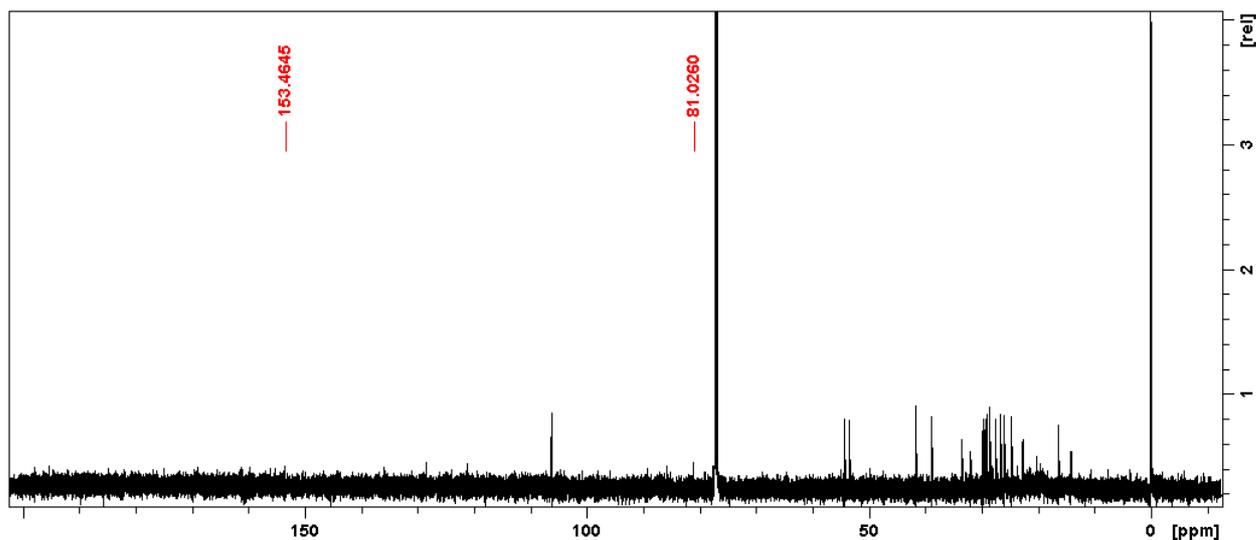


(50)



Espectro 1: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do óleo essencial de *G. australis* para identificação do espatulenol (**50**)

Com base no espectro de RMN de ^1H foi possível verificar a presença de três grupos de hidrogênio metílicos em δ 1,06; 1,03 e 1,29 ppm atribuídos aos hidrogênios H-12, H-13 e H-14, respectivamente. Dois hidrogênios ligados ao C- sp^2 metilênico C-14 foram observados em δ 4,66 e δ 4,69 ppm como multipletos atribuídos a H-14a e H-14b, respectivamente.



Espectro 2: RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do óleo essencial de *G. australis* para identificação do espatulenol (**50**)

Através do espectro de RMN de ^{13}C foi possível confirmar a presença do carbono carbinólico em δ 81,0 ppm além do sinal do carbono sp^2 da ligação dupla em δ 153,5 ppm. Os dados obtidos foram comparados aos da literatura, conforme mostrado na Tabela 24.

Tabela 24: Dados de RMN de ^{13}C (CDCl_3 , δ , ppm) obtidos para (**50**) presente no óleo essencial de *G. australis* e comparação com dados da literatura.

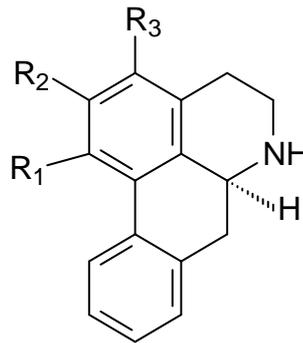
Posição	(50)	Espatulenol
1	29,9	29,9
2	27,5	27,5
3	24,3	24,8
4	38,9	38,9
5	153,5	153,5
6	53,4	53,4
7	26,7	26,7
8	41,8	41,8
9	81,0	81,0
10	54,3	54,4
11	20,3	20,3
12	28,7	28,7
13	16,3	16,3
14	106,3	106,3
15	26,1	26,1

^aRagasa, *et. al.*; 2003.

6.2. ALCALOIDES ISOLADOS DAS ESPÉCIES DE *GUATTERIA*

As identificações estruturais dos alcaloides isolados estão divididas nas classes aporfínicos e oxoaporfínicos.

Alcaloides aporfínicos

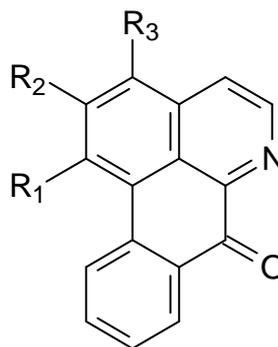


(GL-1) $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{OH}$ → *G. latifolia*

(GL-4A) → $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{H}$ *G. latifolia* e *G. sellowiana*

(GL-4B) $R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$, $R_3 = \text{H}$ → *G. latifolia*

Alcaloides oxoaporfínicos



(GL-2) $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{H}$ → *G. latifolia* e *G. sellowiana*

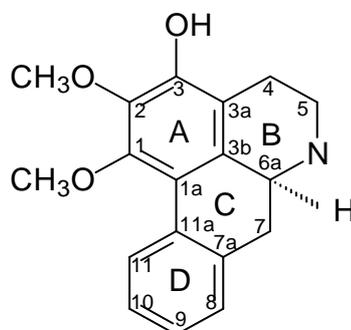
(GL-3) $R_1 = R_2 = \text{OCH}_3$, $R_3 = \text{OH}$ → *G. latifolia*

(GF-1) $R_1 + R_2 = \text{OCH}_2\text{O}$, $R_3 = \text{H}$ → *G. ferruginea*

(GS-1) $R_1 = R_2 = R_3 = \text{OCH}_3$, → *G. sellowiana*

6.3. IDENTIFICAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

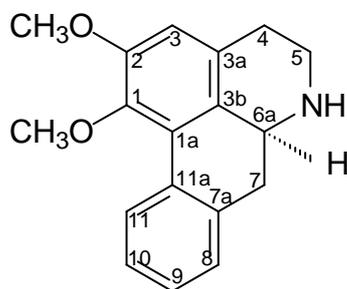
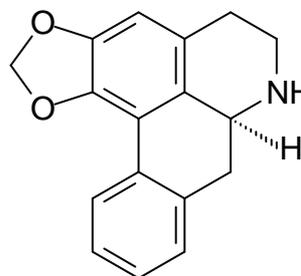
Substância **GL-1**



(GL-1)

A substância **GL-1** (5,2 mg) foi isolada da espécie *G. latifolia* na forma de um sólido amorfo de coloração marrom que ao ser analisada por RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) – (Espectro 3) apresentou quatro sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,22; 7,16; 7,27 e 8,21 compatíveis com o anel D orto dissubstituído. A presença do sinal em δ 3,81 (dd, $J = 13,8; 4,7$ Hz) é típico de hidrogênio metínico ligado a nitrogênio. Sinais relativos aos hidrogênios metilênicos H-4 e H-5 foram observados em δ 2,76 (1H, m) e δ 2,96 – 3,43 (1H, m), respectivamente. A presença de dois grupos de hidrogênios metoxílicos foi observada pelos sinais em δ 3,72 e δ 3,98 ppm.

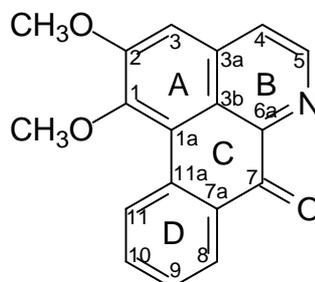
O duplo duplete observado em δ 2,84 atribuído a H-7 aliado aos demais sinais reforçam a proposta de um alcaloide do tipo aporfínico. Através da análise do mapa de contornos HMBC (Espectro 4) foi possível determinar a posição dos grupos metoxílicos, pelas correlações dos sinais em δ 3,72 com δ 148,5 (C-1) e pela correlação do sinal em δ 3,98 com δ 138,5 (C-2). A posição da hidroxila ligada em C-3 foi confirmada pelo experimento de NOE onde a irradiação do sinal em δ 3,72 provocou um incremento do sinal em δ 3,98 (Espectro 5). Os dados referentes a substância **GL-1** foram comparados aos da literatura (Costa, *et. al.*; 2012) mostrados na Tabela 35 identificando como 3-hidroxinornuciferina já isolada da espécie *Rollinia leptopetala* (Annonaceae).

Substância **GL-4****(GL-4A)****(GL-4B)**

A substância **GL-4** (13,5 mg) foi isolada da espécie *G. latifolia* como um sólido marrom, teste positivo para alcaloides frente ao reagente de Dragendorff. Pela análise preliminar do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) – (Espectro 6) verificou tratar-se de uma mistura de alcaloides. Através da análise dos dados de RMN de ^1H foram observados sinais na região entre δ 2,63 – 3,52 típicos de hidrogênios metilênicos. Tal evidência como mostrado para **GL-1** nos levou a proposta de um alcaloide aporfínico. Aliado a este dado foi observado dois sinais em δ 6,09 (1H) e 5,94 (1H) na forma de dupletos ($J = 1,4$ Hz) característicos de hidrogênios metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 para **GL-4B**. Foram observados também dois sinais típicos de hidrogênios metoxílicos em δ 3,66 e δ 3,89. Os sinais de hidrogênios aromáticos H-11 e H-3 de ambas as substâncias (**GL-4A** e **GL-4B**) foram definidos por apresentarem deslocamentos químicos distintos e fundamentais para a diferenciação dos dois compostos na mistura. Assim os sinais de hidrogênios aromáticos H-3 e H-11 para **GL-4A** foram observados em δ 6,65 (1H, s) e 8,39 (1H, d, $J = 7,6$ Hz), respectivamente. Já para **GL-4B** os sinais referentes a H-3 e H-11 foram observados em δ 6,57 (1H, s) e δ 8,07 (1H, d, $J = 7,6$ Hz). Através do espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) – (Espectro 7) foi possível verificar a presença do sinal em δ 100,74 típico de carbono do sistema metilenodióxi confirmando sua presença em **GL-4B**. Para a substância **GL-4A** foi observada a presença dos sinais de carbonos metoxílicos em δ 60,2 e δ 55,9 ligados em C-1 e C-2, respectivamente. Os dados obtidos foram comparados aos da literatura para nornuciferina (**GL-4A**) (Dutra, *et. al.*; 2012) e para a anonaína (**GL-4B**) conforme apresentado na Tabela 36.

A substância (**GL-4A**) identificada como nornuciferina também foi isolada da espécie *G. sellowiana*.

Substância **GL-2**



(**GL-2**)

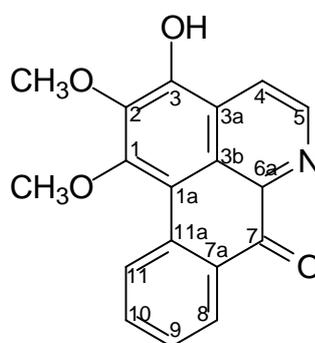
A substância **GL-2** (21,5 mg) foi isolada das espécies *G. latifolia* e *G. sellowiana* como um sólido amarelo, teste positivo para alcaloides frente ao reagente de Dragendorff.

Pelo espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) – (Espectro 8) foram observados sinais característicos de alcaloide oxoaporfínico dissustituído. Foi verificado a presença de sete hidrogênios aromáticos, sendo quatro em δ 9,12 (1H, dd, $J = 8,3; 0,7$ Hz), δ 8,55 (1H, dd, $J = 8,3; 1,5$ Hz), δ 7,75 (1H, dd, $J = 8,3$ Hz; 1,5 Hz) e δ 7,54 (1H, dd, $J = 8,3; 1,5$ Hz) atribuídos aos hidrogênios H-11, H-8, H-10 e H-9, respectivamente, típicos de hidrogênios aromáticos do anel D dissustituído. Outro sinal é observado como um simpleto em δ 7,13 ppm atribuído ao hidrogênio H-3 do anel A do sistema oxoaporfínico dissustituído. Dois sinais foram observados em δ 8,83 (1H, d, $J = 5,2$ Hz) e δ 7,71 (1H, d, $J = 5,2$ Hz) característicos de sistema piridínico compatível com o anel B do sistema oxoaporfínico, referentes aos hidrogênios H-5 e H-4, respectivamente. Dois simpletos com integração para três hidrogênios cada foram observados em δ 3,98 e δ 4,05 ppm típicos de hidrogênios metoxílicos substituídos em C-1 e C-2, respectivamente, do anel A do sistema oxoaporfínico.

Pela análise dos espectros de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) – (Espectro 9) observou-se a presença de dezoito carbonos sendo quinze aromáticos entre δ 156,8 e δ 106,4 ppm, um carbonílico em δ 182,6 e dois metoxílicos em δ 60,6 (1- OCH_3) e δ 56,1 (2- OCH_3), consistente com a estrutura de **GL-2**, determinada como lisicamina e

considerada, juntamente com a liriodenina, marcadores taxonômicos da família Annonaceae (Khairunissa, *et. al.*; 2012). A presença do sinal do carbono carbonílico em δ 182,6 ppm evidencia a presença do esqueleto oxoaporfínico. Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 10) verificou-se as correlações J^3 dos hidrogênios metoxílicos em δ 3,98 e δ 4,05 ppm com os sinais em δ 152,0 (C-1) e δ 156,8 (C-2), respectivamente, confirmando o padrão de substituição para o anel A. Os dados obtidos para **GL-2** foram comparados aos da literatura (Siqueira *et. al.*; 1998) para lisicamina conforme mostrado na Tabela 37.

Substância **GL-3**

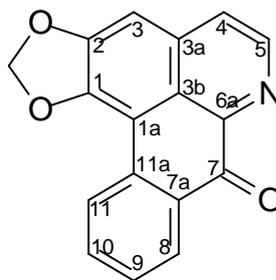


(**GL-3**)

A substância **GL-3** (17,3 mg) foi isolada da espécie *G. latifolia* como um sólido azul, teste positivo para alcaloides frente ao reagente de Dragendorff. Pela análise do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) (Espectro 11) verificou-se a presença de quatro sinais de hidrogênios aromáticos em δ 9,10; δ 8,43; δ 7,68 e δ 7,34 ppm atribuídos aos hidrogênios H-11, H-8, H-10 e H-9, respectivamente. Além desses sinais foram observados dois dupletos com integração para um hidrogênio cada em δ 8,72 (1H, d, $J = 5,2$ Hz) e δ 8,59 (1H, d, $J = 5,2$) característicos de sistema piridínico. Observou-se ainda dois sinais em δ 4,08 e δ 3,96 ppm típicos de hidrogênios metoxílicos. A ausência de um simpleto na região de 7,00 ppm sugere substituição de um grupo hidroxila nessa posição. Pelo mapa de contornos HMBC (Espectro 12) pode-se confirmar a presença do grupo carbonílico na molécula devido a correlação do sinal em δ 8,43 (H-8) com o sinal do carbono em δ 184,5 ppm, tal evidência, mostrou tratar-se de um alcaloide do tipo oxoaporfínico. A

presença do grupo hidroxila em C-3 foi confirmada pela correlação do sinal em δ 8,59 (H-4) com o sinal em δ 165,3 (C-3). As posições dos grupos metoxílicos foram confirmadas pela correlação do sinal em δ 4,08 com o sinal em δ 162,7 (C-1) e pela correlação do sinal em δ 3,96 com o sinal em δ 143,8 (C-2). Dessa forma, verificou-se que os grupos metoxílicos encontram-se ligados no C-1 e C-2 do anel A. Essa substância foi comparada com dados da literatura (Costa, *et. al.*; 2011) e identificada como isomoscatolina já isolada da espécie *G. dielsiana* (Goulart, *et. al.*; 1986). Seus dados espectroscópicos estão mostrados na Tabela 38.

Substância **GF-1**

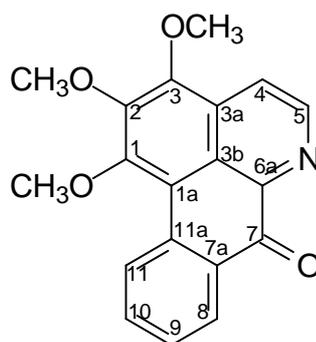


(**GF-1**)

A substância **GF-1** (40,2 mg) foi isolada da espécie *G. ferruginea* como um sólido cristalino de coloração amarela, teste positivo frente ao reagente de Dragendorff. Através do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) (Espectro 13) observou-se um sinal em δ 6,38 (2H, s) o qual encontra-se correlacionado ao sinal do carbono em δ 102,7 ppm no mapa de contornos HSQC (Espectro 14) típico de grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2. A confirmação do grupo metilenodióxi substituído em C-1 e C-2 foi confirmado devido à correlação no mapa de contornos HMBC (Espectro 15) do seu respectivo sinal em δ 6,38 com os sinais dos carbonos em δ 147,9 e 151,8. A presença da carbonila caracterizando a substância **GF-1** como um alcaloide oxoaporfínico foi evidenciada pela correlação no mapa de contornos HMBC, do sinal em δ 8,59 (H-8) com o sinal em δ 182,7 (C-7). Através das análises de RMN de ^1H e pelos mapas de contornos HSQC e HMBC, pode-se definir a substância como liriodenina. Na Tabela 39 são apresentados os valores de deslocamentos químicos de RMN de ^1H e ^{13}C , as principais correlações observadas

no mapa de contornos HMBC para **GF-1** e dados da literatura (Siqueira, *et. al.*; 1998) para a liriodenina.

Substância **GS-1**



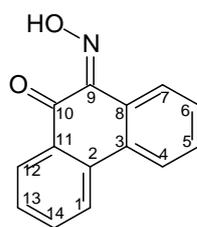
(**GS-1**)

A substância **GS-1** (1,9 mg) foi isolada da espécie *G. sellowiana* como um sólido marrom, teste positivo para alcaloides frente ao reagente de Dragendorff.

Através da análise dos dados de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Espectro 16) verificou-se a presença de três simpletos com integração para três hidrogênios cada em δ 4,19 (3H, s), δ 4,10 (3H, s) e δ 4,08 (3H, s) característicos de hidrogênios metoxílicos. Quatro hidrogênios foram observados na região de hidrogênios aromáticos em δ 9,11 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ 8,58 (1H, d, $J = 8,0$ Hz), δ 7,75 (1H, td, $J = 8,0; 1,1$ Hz) e 7,54 (1H, m) típicos de anel D dissustituído, atribuídos aos hidrogênios H-11, H-8, H-10 e H-9, respectivamente. Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 17) foi possível observar as correlações dos hidrogênios metoxílicos em δ 4,19, δ 4,10 e δ 4,08 com os carbonos em δ 147,7; δ 148,1 e δ 156,9 ppm comprovando o padrão de substituição para o anel A. Na Tabela 40 são apresentados os dados de RMN de ^1H para a substância **GS-1** e por comparação com os dados da literatura (Siqueira *et. al.*, 2007) foi identificada como O-metilmoscatoлина. Essa substância já foi isolada da espécie *G. blepharophylla* (Annonaceae).

6.4. SÍNTESE DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO 7-OXO-7H-DIBENZO-QUINOLINA-4,5-DICARBOXILATO DE DIMETILA

Para a síntese do alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila foi usada a rota sintética mostrada no Esquema 14. A primeira etapa da reação envolve a preparação da substância Z-9,10-fenantrenoquinona-9-oxima (**49**).



(49)

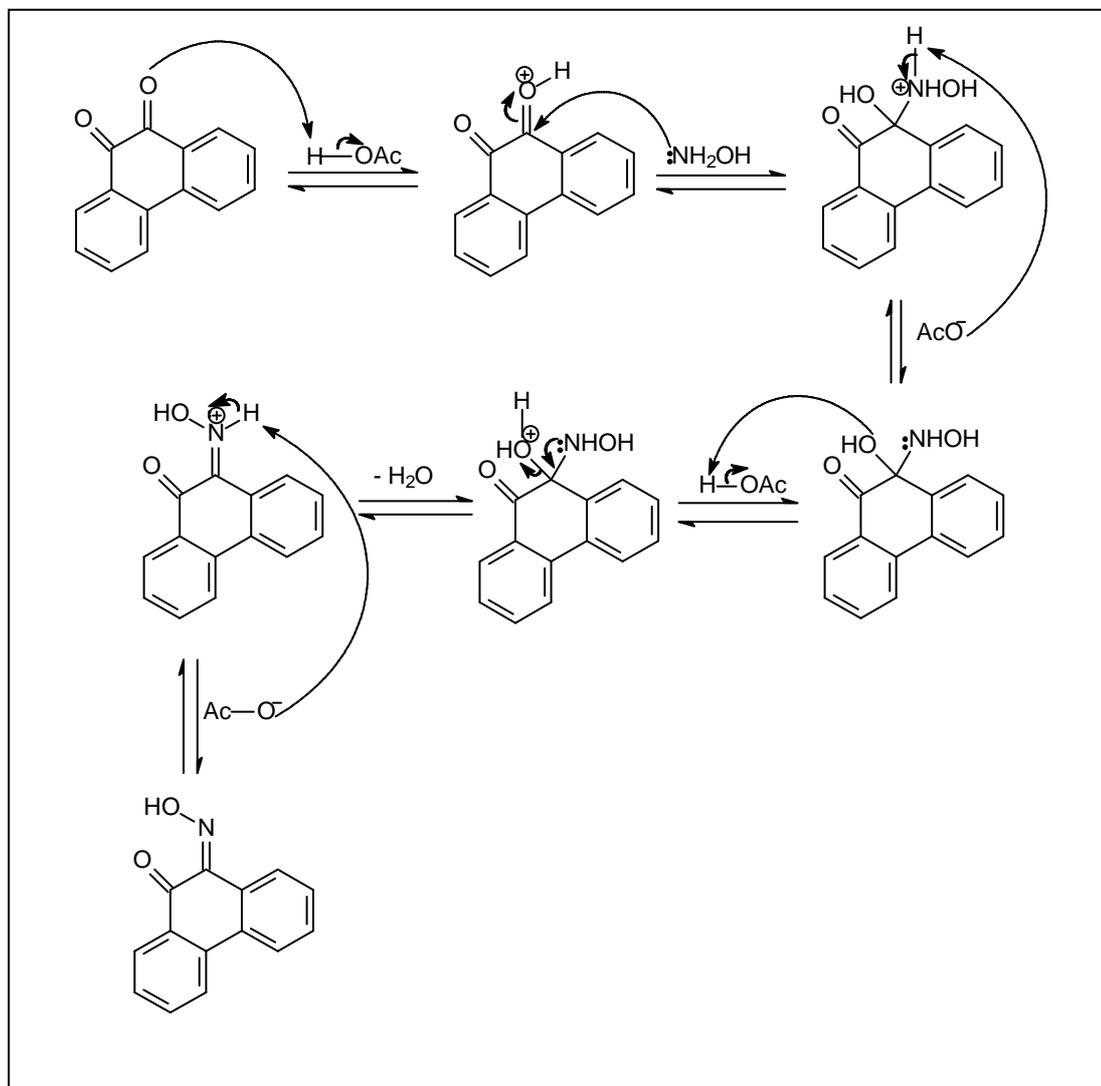
Para a reação de preparação de (**49**) utilizou-se como reagente de partida a 9,10-fenantrenoquinona (**48**) (Espectros 18 e 19) comercial cujos dados de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) e de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) estão apresentados na Tabela 25.

Tabela 25: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para (**48**).

Posição	^1H (δ , mult.) ^a	^{13}C (δ) ^a
1	8,13 ddd ($J = 7,9; 1,3; 0,5$ Hz)	123,9
2		131,0
3		131,0
4	8,13 ddd ($J = 7,9; 1,3; 0,5$ Hz)	123,9
5	7,44 ddd ($J = 8,3; 7,9; 1,1$ Hz)	136,0
6	7,69 ddd ($J = 8,3; 8,3; 1,3$ Hz)	130,4
7	7,96 ddd ($J = 8,3; 1,1; 0,5$ Hz)	129,5
8		135,8
9		180,3
10		180,3
11		135,8
12	7,96 ddd ($J = 8,3; 1,1; 0,5$ Hz)	129,5
13	7,69 ddd ($J = 8,3; 8,3; 1,3$ Hz)	130,4
14	7,44 ddd ($J = 8,3; 7,9; 1,1$ Hz)	136,0

^a Experimento realizado a 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno.

O mecanismo de reação envolvido para a formação do produto (**49**) é o de adição/eliminação conforme mostrado no Esquema 15.



Esquema 15: Mecanismo de reação envolvido na formação de (**49**)

Neste mecanismo de reação, inicialmente, ocorre a protonação de uma carbonila, tornando-a mais susceptível ao ataque nucleofílico da hidroxilamina. Durante as diversas tentativas de síntese da substância (**49**) pode constatar que o controle do tempo de reação e a temperatura são fatores importantes na obtenção do produto desejado. Foi observado que após 4 horas de reação inicia-se a formação do isômero *E*-9,10-fenantrenoquinona-9-oxima. Dessa forma, buscou-se otimizar a temperatura ideal para que fosse obtido o isômero desejado, neste caso o isômero *Z*, em bom rendimento e eliminar a necessidade de sucessivas purificações do produto reacional obtido. A confirmação de que o produto (**49**) teria sido formado

foi realizada pela análise dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C (Espectros 20 e 21) tanto para o produto (**49**) quanto para o reagente de partida (**48**). Os dados obtidos para a substância (**49**) são mostrados na Tabela 26.

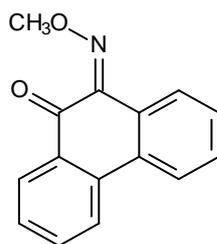
Tabela 26: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para (**49**)

Posição	^1H (δ , mult.)	^{13}C (δ)	HMBC (^1H - ^{13}C) ^b
1	8,11 ddd ($J = 8,3; 1,3; 0,5$ Hz)	123,4	127,3; 129,3
2		137,5	
3		129,5	
4	8,04 ddd ($J = 8,3; 1,5; 0,5$ Hz)	123,3	127,3; 129,9; 137,5
5	7,48 ddd ($J = 8,3; 7,2; 1,5$ Hz)	128,3	123,9; 129,5
6	7,50 ddd ($J = 8,3; 7,2; 1,5$ Hz)	129,9	123,9; 128,3
7	8,29 ddd ($J = 7,2; 1,5; 0,5$ Hz)	123,9	128,3; 129,5; 144,0
8		127,3	
9		144,0	
10		182,3	
11		130,9	
12	8,35 ddd ($J = 8,0; 1,5; 0,5$ Hz)	129,1	136,2; 137,5; 182,3
13	7,43 ddd ($J = 8,0; 7,7; 1,2$ Hz)	129,3	123,4; 129,1; 130,9
14	7,75 ddd ($J = 8,3; 7,7; 1,5$ Hz)	136,2	129,1; 137,5
N-OH	17,0 s		

^a Experimento realizado a 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Experimento HMBC realizado a 400 MHz em CDCl_3 utilizando o TMS como padrão interno.

A primeira evidência de que (**49**) havia sido formado foi observada no espectro de RMN de ^1H (Espectro 18) pela presença de um simpleto intenso em δ 17,0 ppm atribuído à hidroxila quelatada. A análise do espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 19) reforçou essa evidência por apresentar um único sinal em δ 182,3 ppm típico de carbonila de cetona e pelo surgimento de um sinal em δ 144,0 ppm típico de carbono sp^2 ligado a nitrogênio de oximas. Uma outra evidência sobre a formação de (**49**) foi observada no mapa de contornos HMBC (Espectro 22) onde verificou-se a correlação a J^3 do sinal em δ 8,29 (H-7) com o sinal em δ 144,0 ppm. Diante de todas as evidências demonstradas obteve-se o produto Z-9,10-fenantrenoquinona-9-oxima (**49**) com rendimento de 95%.

A segunda etapa da rota sintética envolve a preparação da substância (**30**).

**(30)**

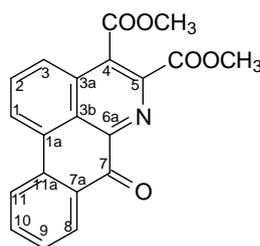
Ao sintetizar o composto **(49)** foram realizadas diversas tentativas de reação com o acetileno dicarboxilato de dimetila (DMAD) para obter o alcaloide oxoaporfínico **(31)**, mas a reação não ocorreu. Dessa forma, procurou-se realizar a reação de metilação de **(49)** e à partir de **(30)** realizar a reação com o DMAD. Ao analisar os dados de RMN de ^1H (Espectro 23) do derivado formado **(30)** verificou-se o desaparecimento do sinal em δ 17,0 ppm referente a hidroxila quelada e observou-se o surgimento de um sinal em δ 4,28 (3H, s) típico de hidrogênios metoxílicos. A confirmação do derivado metilado foi evidenciada pelo espectro de RMN de ^{13}C (Espectro 24) onde se observou o aparecimento de um sinal em δ 64,7 ppm, típico de carbono metoxílico. Os dados referentes à formação do derivado **(30)** podem ser visualizados na Tabela 27.

Tabela 27: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para (30)

Posição	^1H (δ , mult.) ^a	^{13}C (δ) ^a	HMBC (^1H - ^{13}C) ^b
1	7,95 ddd ($J = 8,1; 1,3; 0,5$ Hz)	123,4	128,6; 131,2
2		136,7	
3		131,2	
4	7,98 ddd ($J = 8,1; 1,5; 0,5$ Hz)	124,1	125,5; 128,5; 136,7
5	7,48 ddd ($J = 8,1; 7,3; 1,5$ Hz)	131,0	131,2; 131,6
6	7,37 ddd ($J = 8,1; 7,3; 1,5$ Hz)	128,5	124,1; 125,5
7	8,56 ddd ($J = 8,1; 1,5; 0,5$ Hz)	131,6	131,0; 146,8
8		125,5	
9		146,8	
10		184,4	
11		130,4	
12	8,15 ddd ($J = 7,7; 1,5; 0,5$ Hz)	128,1	134,8; 136,7; 184,4
13	7,40 ddd ($J = 7,7; 7,3; 1,3$ Hz)	128,6	123,4; 130,4
14	7,64 ddd ($J = 8,1; 7,3; 1,5$ Hz)	134,8	128,1; 136,7
O-CH ₃	4,28 s	64,7	

^a Experimento realizado a 100 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Experimento HMBC realizado a 400 MHz em CDCl_3 utilizando o TMS como padrão interno.

A terceira etapa da reação envolveu a reação de (30) com o DMAD para obtenção o alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzo-quinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila (31).

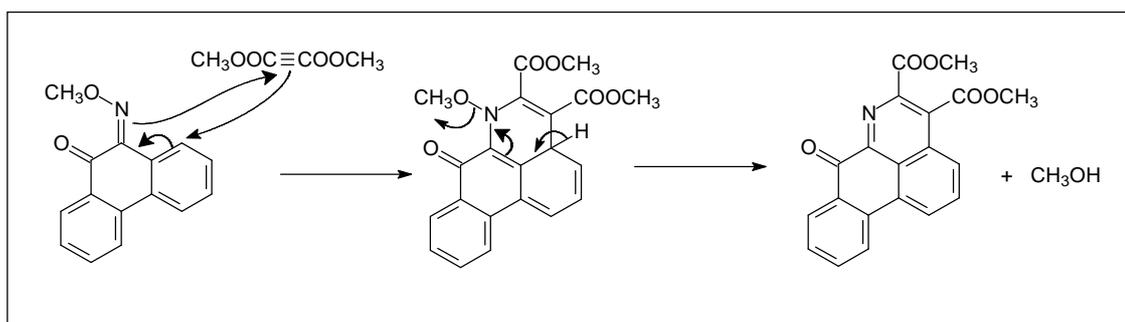


(31)

O principal objetivo da síntese de um alcaloide oxoaporfínico partiu do interesse em realizar ensaios de biotransformação. Alcaloides oxoaporfínicos são abundantes em espécies pertencentes à família Annonaceae e foi uma das classes de alcaloides encontradas nas espécies vegetais estudadas. Devida a pequena quantidade isolada desses alcaloides em plantas, tornou-se inviável realizar os

ensaios de biotransformação com os produtos de origem natural, assim buscou-se um método de síntese com reduzido número de etapas para a obtenção do alcaloide oxoaporfínico, afim de obter tal produto em quantidade suficiente para os ensaios de biotransformação.

Para a obtenção do alcaloide oxoaporfínico (**31**) realizou-se a reação de cicloadição [4+2] do derivado metilado (**30**) com o DMAD. A reação é dita de cicloadição [4+2] pois envolve 4 elétrons da ligação π do dieno e 2 elétrons da ligação π do dienófilo. Nas reações de cicloadição fatores como temperatura e a presença de grupos doadores de elétrons no dieno e retiradores de elétrons no dienófilo são fundamentais para o aumento na velocidade da reação. Na reação de (**30**) com o DMAD, a substância (**30**) atua como dieno onde há a presença do grupo doador C=N-OH e o DMAD atua como o dienófilo com grupos retiradores COOCH₃. A reação onde o dieno contém grupos doadores de elétrons e o dienófilo contém grupos retiradores de elétrons é denominada de reação de demanda direta. No caso onde o dieno possui grupos retiradores de elétrons e o dienófilo grupos doadores de elétrons a reação é denominada de demanda inversa. Uma proposta a respeito do mecanismo da reação de cicloadição [4+2] para a substância (**31**) é mostrada no Esquema 16.



Esquema 16: Mecanismo de reação envolvido na formação de (**31**)

O alcaloide oxoaporfínico (**31**) foi sintetizado e seus dados foram confirmados por RMN de ¹H e de ¹³C. A primeira evidência observada sobre a formação de (**31**) foi observada no espectro de RMN de ¹H (Espectro 25) pela presença de dois simples em δ 4,09 (3H, s) e δ 4,14 (3H, s) atribuídos aos hidrogênios metoxílicos. A confirmação da presença desses grupos foi observada no espectro de RMN de ¹³C (Espectro 26) pelos sinais em δ 53,4 (4-OCH₃) e δ 53,5 (5-OCH₃). Através do mapa de contornos HMBC (Espectro 27) foi possível observar a correlação J^2 dos

hidrogênios em δ 4,09 e δ 4,14 ppm com os sinais em δ 165,3 e δ 167,0 ppm, respectivamente. Os dados referentes a substância (31) são mostrados na Tabela 28.

Tabela 28: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C para (31)

Posição	^1H (δ , mult.) ^a	^{13}C (δ) ^a	HMBC (^1H - ^{13}C) ^b
1	8,05 dd ($J = 8,5; 1,0$ Hz)	126,7	125,0; 131,4
1a		129,4	
2	7,97 dd ($J = 8,5; 7,4$ Hz)	132,6	126,4; 129,4
3	8,55 dd ($J = 7,4; 1,0$ Hz)	126,4	125,0; 126,7
3a		131,3	
3b		125,0	
4		134,6	
5		140,7	
6a		146,7	
7		181,1	
7a		131,4	
8	8,51 ddd ($J = 8,2; 1,1; 0,5$ Hz)	129,3	134,4; 181,1
9	7,62 ddd ($J = 8,2; 7,7; 1,1$ Hz)	129,9	123,3; 131,4
10	7,80 ddd ($J = 8,6; 7,7; 1,1$ Hz)	134,5	129,3; 134,4
11	8,27 ddd ($J = 8,6; 1,1; 0,5$ Hz)	123,3	129,4; 131,4
11a		134,4	
4-C=O		165,3	
5-C=O		167,0	
4-O-CH ₃	4,09 s	53,4	165,3
5-O-CH ₃	4,14 s	53,5	167,0

^a Experimento realizado a 200 MHz para ^1H e 50 MHz para ^{13}C em CDCl_3 , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Experimento HMBC realizado a 400 MHz em CDCl_3 utilizando o TMS como padrão interno.

6.5. BIOTRANSFORMAÇÃO DOS PRECURSORES SINTÉTICOS E DO ALCALOIDE OXOAPORFÍNICO

As tentativas de reação de biotransformação foram realizadas com os precursores sintéticos (48), (49), (30) e com o alcaloide oxoaporfínico (31).

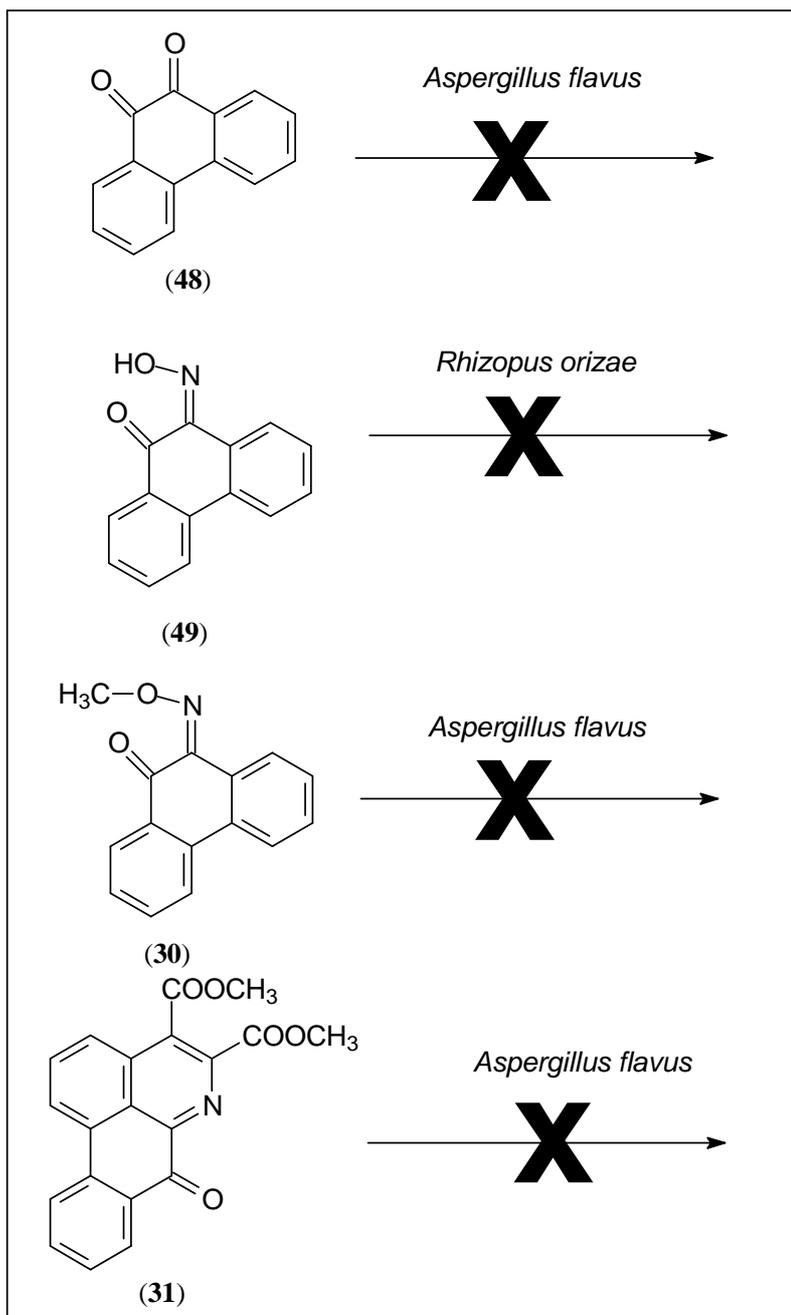


Figura 14: Substratos submetidos à reação de biotransformação

Após submeter cada uma das substâncias a uma triagem envolvendo reações de biotransformação e analisá-las por cromatografia em camada delgada analítica (CCDP), observou-se que apenas as substâncias (48) e (49) apresentaram diferenças em seus *spots* quando comparadas ao controle (meio de cultura + fungo utilizado). Diante disso, as substâncias (48) e (49) foram submetidas à reações de biotransformação e, em seguida, foi realizada a purificação do produto reacional na tentativa de se obter os produtos biotransformados. Após obter os produtos purificados analisou-se por RMN de ^1H e de ^{13}C e verificou-se que as substâncias

obtidas não poderiam ser produtos de biotransformação por não apresentar nenhuma similaridade com os substratos de partida. A adição de substratos em meios de cultura de fungos pode, em alguns casos, ativar a liberação de determinadas substâncias produzidas pelos fungos no meio reacional. Acredita-se que os *spots* diferentes dos observados para o controle seja resultado da liberação dessas substâncias pelos fungos. A escolha do fungo ideal para uma determinada reação de biotransformação é considerada a etapa mais crítica do procedimento global. Inicialmente, analisam-se os resultados semelhantes já disponíveis na literatura em relação à reação de interesse, na tentativa de se obter dados no que diz respeito às possíveis enzimas envolvidas no processo. Atualmente, estudos envolvendo reações de biotransformação têm sido direcionados em busca de atividade específica de uma determinada enzima com o objetivo de se obter o composto de interesse em alto rendimento, de fácil purificação e, principalmente, à baixos custos.

Após a reação de biotransformação realizada com a substância (49) verificou-se uma diferença na morfologia do fungo *A. flavus* quando comparado com o controle. O fungo *A. flavus* presente no controle apresentava um aspecto em formato de bolhas já o fungo *A. flavus* presente no frasco teste apresentava um aspecto granuloso. Tal evidência nos leva a concluir que a substância (49) tenha provocado a inativação do sistema enzimático do fungo *A. flavus*. Tal evidência sugere que o alcaloide seja tóxico ao microrganismo testado. Na literatura há poucos relatos de reações de biotransformação com alcaloides e esse foi um dos motivos que nos levou a investigar tal reação de biotransformação.

6.6. TESTES BIOLÓGICOS

6.6.1. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Foram avaliados quanto a sua atividade antimicrobiana, os extratos brutos das espécies *G. ferruginea* (EBGF), *G. latifolia* (EBGL), *G. sellowiana* (EBGS), a fração alcaloídica de *G. sellowiana* (FAGS) – (Tabela 29) os constituintes voláteis das espécies *G. sellowiana*, *G. latifolia*, *G. ferruginea*, *G. australis* (Tabela 30) e

também os precursores sintéticos (48), (49), (30) e o alcaloide oxoaporfínico (31) mostrados na (Tabela 31).

Tabela 29: Atividade antimicrobiana dos extratos e frações das espécies de *Guatteria*.

Extratos/Frações	Concentração Mínima Inibitória (CMI) em (mg.mL ⁻¹)					
	Linhagem de bactérias e fungo					
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
EBGF	*	*	0,50	*	*	
EBGL	*	*	*	*	*	
EBGS	*	NT	*	*	*	
FAGS	0,70	NT	0,70	NT	*	0,25
Cloranfenicol	0,04	0,02	0,02	0,06	0,85	
Nistatina						0,05

*CMI > 1 mg.mL⁻¹, ^aControle positivo para bactérias e ^bControle positivo para fungos, NT – não testado

Analisando os dados obtidos para atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações das espécies de *Guatteria* observou-se que a fração alcaloídica de *G. sellowiana* (FAGS) foi ativa frente às bactérias *E. coli* e *S. aureus* na concentração de 0,70 mg.mL⁻¹ para ambas e também foi ativa quando testada frente a levedura *C. albicans* na concentração de 0,25 mg.mL⁻¹. O extrato bruto de *G. ferruginea* foi ativo frente a bactéria *S. aureus* na concentração de 0,50 mg.mL⁻¹. O extrato bruto das espécies *G. latifolia* e *G. sellowiana* não foram ativas frente aos microrganismos testados.

Na Tabela 30 são mostrados os resultados obtidos para atividade dos constituintes voláteis das quatro espécies de *Guatteria* testadas.

Tabela 30: Atividade antimicrobiana para os constituintes voláteis das espécies de *Guatteria*.

Espécies	Concentração Mínima Inibitória (CMI) em (mg.mL ⁻¹)						
	Linhagem de bactérias e fungo						
	<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>E. faecium</i>	<i>S. choleraesuis</i>	<i>R. equi</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>E. hirae</i>
<i>G. sellowiana</i>	0,6	0,35	*	*	0,062	*	0,7
<i>G. latifolia</i>	0,6	0,25	*	*	0,062	*	1,0
<i>G. ferruginea</i>	0,8	0,5	*	*	0,062	*	0,5
<i>G. australis</i>	*	0,6	*	*	0,25	*	*
Cloranfenicol ^a	0,04	0,02	0,07	0,06	0,04	0,85	0,12

*CMI > 1 mg.mL⁻¹, ^aControle positivo para bactérias.

Através dos resultados obtidos para a atividade antimicrobiana dos constituintes voláteis nota-se que três espécies de *Guatteria* foram ativas frente à

bactéria *E. coli*. As espécies *G. sellowiana* e *G. latifolia* foram mais ativas com CMI de 0,6 mg.mL⁻¹, seguido pela atividade apresentada para *G. ferruginea* com CMI de 0,8 mg.mL⁻¹. A espécie *G. australis* foi inativa frente à *E. coli*. As quatro espécies foram ativas frente à *B. subtilis* sendo a espécie *G. latifolia* a mais ativa dentre elas com CMI de 0,25 mg.mL⁻¹. As quatro espécies quando testadas frente à bactéria *R. equi* mostraram-se ativas com CMI de 0,062 mg.mL⁻¹ para as espécies *G. sellowiana*, *G. latifolia* e *G. ferruginea* e CMI de 0,25 mg.mL⁻¹ para a espécie *G. australis*. Para a bactéria *E. hirae* somente a espécie *G. australis* foi inativa. As espécies *G. sellowiana*, *G. latifolia* e *G. ferruginea* mostraram-se ativas, sendo que a atividade apresentada para *G. ferruginea* com CMI de 0,5 mg.mL⁻¹ foi a mais potente entre elas. Bactérias como *E. coli*, *B. subtilis*, *R. equi* e *hirae* são responsáveis por uma série de patogenias desde infecções do sistema sanguíneo no caso de *E. coli* (Silva, *et. al.*, 2009) e broncopneumonias em potros no caso de *R. equi* (Vargas, *et. al.*; 2008). Portanto o desenvolvimento de substâncias que sejam capazes de inibir o crescimento ou provocar a letalidade de tais microrganismos são fundamentais para o controle e combate dos mesmos.

Os resultados obtidos para os precursores sintéticos e para o alcaloide oxoaporfínico (**31**) são mostrados na Tabela 31.

Tabela 31: Atividade antimicrobiana dos precursores sintéticos do alcaloide oxoaporfínico (**31**).

Substância	Concentração Mínima Inibitória (CMI) em (µmol.L ⁻¹)				
	Linhagem de bactérias e fungo				
	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. choleraesius</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
(48)	0,009	*	0,600	0,721	0,038
(49)	0,134	*	0,358	0,313	0,001
(30)	0,137	*	*	1,111	*
(31)	*	*	*	*	*
Cloranfenicol ^a	0,123	2,630	0,185	0,061	
Nistatina ^b					0,053

*CMI > 3,094 µmol.L⁻¹ para bactérias, CMI > 1,079 µmol.L⁻¹ para fungos, ^aControle positivo para bactérias e ^bControle positivo para fungos.

A análise dos resultados de atividade antimicrobiana para os precursores sintéticos (**48**), (**49**) e (**30**) e para o alcaloide oxoaporfínico (**31**) mostrou que as substâncias (**48**), (**49**) e (**30**) quando comparadas ao padrão cloranfenicol foram ativas frente à bactéria *E. coli* destacando a forte atividade apresentada para a substância (**48**) com CMI de 0,009 µmol.L⁻¹. Os precursores sintéticos (**48**) e (**49**)

foram ativos também frente à bactéria *S. choleraesius* destacando-se a atividade apresentada para a substância (49). Quando testadas frente à bactéria *S. aureus* novamente observou-se a atividade dos precursores sintéticos destacando-se a substância (49) com concentração mínima de 0,313 $\mu\text{mol.L}^{-1}$. As substâncias (48) e (49) quando testadas frente à levedura *C. albicans* apresentaram forte atividade quando comparadas ao padrão Nistatina com CMI de 0,038 e 0,001 $\mu\text{mol.L}^{-1}$, respectivamente. Ao comparar a forte atividade observada frente à levedura *C. albicans* para a substância (49) com a inatividade do derivado O-metilado (30) foi observado que a presença do grupamento -OH presente em (49) pode ser responsável pela forte atividade observada frente a levedura *C. albicans*. O alcaloide oxoaporfínico (31) não foi ativo frente às linhagens e concentrações testadas.

6.6.2. ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA

Foram avaliados quanto a sua atividade antiproliferativa, os extratos brutos das espécies *G. ferruginea* (EBGF), *G. latifolia* (EBGL) e *G. sellowiana* (EBGS), os constituintes voláteis das espécies *G. sellowiana*, *G. latifolia*, *G. ferruginea*, *G. australis*, os precursores sintéticos (48), (49), (30) e o alcaloide oxoaporfínico (31).

Na Tabela 32 são mostrados os dados de atividade antiproliferativa para os extratos brutos das espécies de *Guatteria*.

Tabela 32: Atividade antiproliferativa dos extratos brutos das espécies de *Guatteria*.

Extratos	TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)								
	Linhagem de células tumorais								
	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	OVCAR-3	HT-29	K562	HaCat
EBGF	200	149,8	159,0	>250	>250	145,1	>250	180	73,5
EBGL	62,0	90,3	106,7	232,6	>250	126,8	134,8	38,3	176,3
EBGS	>250	>250	NT	NT	>250	NT	NT	NT	NT
Doxorrubicina^a	1,4	2,5	4,3	0,31	9,1	0,92	8,5	0,26	0,45

^aControle positivo; U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); NCI-H460 (pulmão tipo não pequenas células); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (colorectal); K562 (leucemia) e HaCat (queratinócito humano imortalizado linhagem não tumoral; NT – Não testado.

Analisando os dados de atividade antiproliferativa para os extratos brutos das espécies de *Guatteria* nota-se que apenas o extrato bruto de *G. latifolia*

apresentou fraca atividade frente à linhagem tumoral K562 (leucemia) com TGI de 38,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados obtidos para a atividade antiproliferativa dos constituintes voláteis são mostrados na Tabela 33.

Tabela 33: Atividade antiproliferativa dos constituintes voláteis das espécies de *Guatteria*.

Extratos	TGI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)								
	Linhagem de células tumorais								
	U251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	OVCAR-3	HT-29	K562	HaCat
<i>G. sellowiana</i>	89,1	95,5	250	107,8	82,8	4,1	143,1	1,1	75,6
<i>G. latifolia</i>	36,6	47,2	10,0	63,9	44,9	1,1	39,7	15,6	41,0
<i>G. ferruginea</i>	36,3	37,6	34,6	50,9	69,4	1,8	52,7	18,6	63,4
<i>G. australis</i>	40,4	37,8	15,2	45,6	49,5	3,2	38,6	86,2	48,0
Doxorrubicina ^a	2,7	0,88	>25	3,1	>25	11,7	3,6	0,031	1,0

^aControle positivo; U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); HCl-H460 (pulmão tipo não pequenas células); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (colorectal); K562 (leucemia) e HaCat (queratinócito humano imortalizado linhagem não tumoral).

Analisando os dados obtidos para a atividade antiproliferativa dos constituintes voláteis das quatro espécies de *Guatteria*, verifica-se que todas as espécies apresentaram seletividade e forte atividade frente às células tumorais humanas de ovário (OVCAR-3) destacando-se entre elas a maior atividade apresentada para a espécie *G. latifolia* com TGI de 1,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Outro fator interessante é que todas as espécies foram ativas em concentrações inferiores ao padrão doxorrubicina TGI de 11,7 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para essa linhagem tumoral. Nota-se também a forte atividade dos constituintes voláteis da espécie *G. sellowiana* frente à linhagem K562 (leucemia) com TGI de 1,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Dentre os resultados obtidos, os constituintes voláteis de *G. sellowiana* foram ativos frente a duas linhagens tumorais humanas.

Para os precursores sintéticos (48), (49), (30) e para o alcaloide oxoaporfínico (31) os resultados obtidos são mostrados na Tabela 34.

Tabela 34: Atividade antiproliferativa para os precursores sintéticos e para o alcaloide oxoaporfínico (31).

Substância	TGI ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)										
	Linhagem de células tumorais										
	UACC-62	U-251	MCF-7	NCI-ADR/RES	786-0	NCI-H460	PC-3	OVC-AR-3	HT-29	K562	HaCat
(48)	0,004	NT	0,006	1,201	0,035	0,183	NT	0,011	0,121	>1,201	>1,201
(49)	0,002	NT	0,01	0,839	0,223	0,044	0,024	0,024	0,05	>1,121	>1,121
(30)	NT	0,005	0,529	NT	0,03	NT	NT	NT	0,118	NT	0,054
(31)	>0,72	>0,72	>0,72	>0,72	>0,72	>0,72	>0,72	NT	>0,72	>0,72	>0,72
Doxorrubicina ^a	0,001	0,001	>0,046	>0,046	0,002	>0,046	0,001	0,009	>0,046	>0,046	>0,046

^aControle positivo; UACC-62 (melanoma); U251 (glioma); MCF-7 (mama); NCI-ADR/RES (ovário com fenótipo de resistência a múltiplos fármacos); 786-0 (rim); HCl-H460 (pulmão tipo não pequenas células); PC-3 (próstata); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (colorectal); K562 (leucemia) e HaCat (queratinócito humano imortalizado linhagem não tumoral).

Através dos dados de atividade antiproliferativa para os precursores sintéticos (48), (49), (30) e para o alcaloide oxoaporfínico (31) verificou-se que o alcaloide oxoaporfínico (31) foi inativo frente a todas as linhagens tumorais testadas. A substância (48) apresentou forte atividade frente às células tumorais UACC-62 (melanoma), MCF-7 (mama), 786-0 (rim), OVCAR-3 e atividade moderada frente à linhagem tumoral HT-29 (colorectal). Dentre as atividades observadas para (48) destaca-se a atividades frente à célula tumoral MCF-7 cuja concentração necessária para inibir totalmente o crescimento das células foi inferior ao padrão doxorrubicina. No caso das células MCF-7 (mama) foi necessário a concentração de $0,006 \mu\text{mol.L}^{-1}$ para inibir o crescimento de 100% das células tumorais enquanto o padrão necessitou de concentração superior a $0,046 \mu\text{mol.mL}^{-1}$ para inibir o crescimento em 100%. A substância (49) apresentou forte atividade frente às linhagens tumorais humanas UACC-62, MCF-7, NCI-H460, PC-3 e OVCAR-3 e HT-29, destacando se as atividades apresentadas para MCF-7 e NCI-H460 por apresentarem concentrações citostáticas inferiores ao padrão doxorrubicina. Para a substância (30) foi observada forte atividade frente à linhagem tumoral U-251 com TGI de $0,005 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Outro dado observado para a substância (30) é que a mesma não foi seletiva apenas para células tumorais. Tal evidência é observada pela inibição da linhagem não tumoral HaCat com TGI de $0,054 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

7. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *G. latifolia*, *G. ferruginea* e *G. sellowiana* resultou no isolamento de 7 alcaloides das classes aporfínicos e oxoaporfínicos, estando de acordo com a química da família Annonaceae, incluindo o isolamento de liriodenina e lisicamina, considerados marcadores quimiotaxonômicos.

O estudo de *G. latifolia* resultou no isolamento dos alcaloides aporfínicos 3-hidroxinornuciferina (**GL-1**) e da mistura nornuciferina (**GL-4A**) e anonaína (**GL-4B**) e dos alcaloides oxoaporfínicos lisicamina (**GL-2**) e isomoscatolina (**GL-3**). Da espécie *G. ferruginea*, o estudo fitoquímico resultou no isolamento do alcaloide oxoaporfínico liriodenina (**GF-1**). A investigação fitoquímica da espécie *G. sellowiana* resultou no isolamento do alcaloide aporfínico nornuciferina (**GL-4A**) também isolado de *G. latifolia* e dos alcaloides oxoaporfínicos lisicamina (**GL-2**) também isolado de *G. latifolia* e 3-O-metilmoscatolina (**GS-1**).

Do estudo dos óleos essenciais das espécies *G. australis*, *G. latifolia*, *G. ferruginea* e *G. sellowiana* foi possível a identificação de 25, 27, 22 e 19 substâncias, respectivamente. O principal constituinte encontrado no óleo essencial de *G. australis* foi o espatulenol (40,29%) também encontrado nas espécies *G. latifolia*, *G. ferruginea* e *G. sellowiana* em altas concentrações. O óxido de cariofileno também foi o constituinte majoritário encontrado na espécie *G. ferruginea* (31,45%) e em altas concentrações nas demais espécies de *Guatteria*. A presença do espatulenol como constituinte majoritário no óleo essencial de *G. australis* foi confirmada pela identificação do mesmo através de RMN de ^1H e de ^{13}C .

Tendo os alcaloides oxoaporfínicos como os principais constituintes isolados realizou-se a síntese em três etapas do alcaloide oxoaporfínico 7-oxo-7H-dibenzoquinolina-4,5-dicarboxilato de dimetila (**31**) e avaliou-se a potencialidade como substrato para reação de biotransformação frente ao fungo *A. flavus*. Da mesma forma avaliou-se a potencialidade dos precursores sintéticos 9,10-fenantrenoquinona (**48**), 9,10-fenantrenoquinona-9-metiloxima (**30**) frente os fungos *A. flavus* e 9,10-fenantrenoquinona-9-oxima (**49**) frente ao fungo *R. orizae*. Os resultados mostraram que o alcaloide sintético (**31**) e os precursores sintéticos (**48**), (**49**) e (**30**) não sofreram reações de biotransformação.

Quanto a atividade antimicrobiana dos extratos brutos e frações das espécies de *Guatteria* não se observou significativa atividade frente aos microrganismos testados. Os resultados obtidos para a atividade antimicrobiana dos constituintes voláteis mostraram, de forma geral, boa atividade frente a *E. coli*, *B. subtilis* e *E. hirae*. E apresentaram forte atividade frente a *R. equi* comparado ao padrão, sendo os extratos promissores antimicrobianos.

A análise dos resultados de atividade antimicrobiana para os precursores sintéticos (48), (49) e (30) e para o alcaloide oxoaporfínico (31) mostrou que o alcaloide oxoaporfínico (31) não foi ativo enquanto os precursores (48), (49) e (30) foram fortemente ativas frente à bactéria *E. coli* e à levedura *C. albicans*, apresentando resultados iguais ou melhores que os padrões utilizados. Diante desses resultados promissores, estudos do mecanismos de ação são necessários para uma utilização como antimicrobianos.

A atividade antiproliferativa para os extratos brutos das espécies de *Guatteria* mostrou que apenas o extrato bruto de *G. latifolia* apresentou fraca atividade frente à linhagem tumoral K562 (leucemia) com TGI de 38,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Os resultados obtidos para a atividade antiproliferativa dos constituintes voláteis das quatro espécies de *Guatteria*, mostraram que todas as espécies apresentaram seletividade e forte atividade frente às células tumorais humanas de ovário (OVCAR-3), com valores inferiores ao padrão doxorrubicina.

Para os precursores sintéticos (48), (49), (30) e para o alcaloide oxoaporfínico (31) a avaliação da atividade antiproliferativa mostrou que o alcaloide oxoaporfínico (31) foi inativo frente a todas as linhagens tumorais testadas. A substância (48) foi a mais ativa em relação às outras. De forma geral. Os precursores (48), (49), (30) apresentaram forte atividade principalmente frente às células tumorais UACC-62 (melanoma) e MCF-7 (mama), e em alguns casos com valores inferiores ao padrão. Testes *in vivo* estão programados para serem realizados.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential oil componentes by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy. Illinois, Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

AVERY, V. M.; FERNANDEZ, L. S.; SYKES, M. L.; ANDREWS, K. T. Antiparasitic activity of alkaloids from plant species of Papua New Guinea and Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 36, n. 3, p. 275-279, 2010.

BAE, K.; HUNG, T. M.; NA, M.; DAT, N. T.; NGOC, T. M.; YOUN, U.; KIM, H. J.; MIN, BYUNG-SUN, LEE, J. Cholinesterase inhibitory and anti-amnesic activity of alkaloids from *Corydalis turtschaninovii*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 1, p. 74-80, 2008.

BARREIRO, E. J.; VIEGAS-JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S. Os produtos Naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

BOLZANI, V. S.; SILVA, D. H. S.; PINTO, A. C.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.; Produtos Naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25. Supl. 1, p. 45-61, 2002.

BOYOM, F. F.; TSABANG, N.; FOKOU, P. V. T.; TCHOKOUAHA, L. R. Y.; NOGUEM, B.; BAKARNGA-VIA, I.; NGUEPI, M. S. D.; NKONGMENECK, B. A. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four áreas of Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 171-180, 2012.

BRUCE, N. C.; RATHBONE, D. A. Microbial transformation of alkaloids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 5, n. 3, p. 274-281, 2002.

BRUCE, N. C.; STABLER, P. J. Oxidation of Morphine to 2,2'-Bimorphine by *Cylindrocarpon didymum*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 64, n. 10, p. 4106-4108, 1998.

CHEN, JIH-JUNG, HUNG, HSIN-CHIH, SUNG, PING-JYUN, CHEN, IH-SHENG, KUO, WEN-LUNG. Aporphine alkaloids and cytotoxic lignans from the roots of *Illigera luzonensis*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 523-532, 2011.

CHOI, J. S.; JUNG, H. A.; MIN, BYUNG-SUN; YOKOZAWA, T.; LEE, JE-HYUN; KIM, Y. S. Anti-Alzheimer and antioxidant activities of *Coptidis rhizoma* alkaloids. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, n. 8, p. 1433-1438, 2009.

CHOI, J. S.; JUNG, H. A.; YOON, N. Y.; BAE, H. J.; MIN, BYUNG-SUN. Inhibitory activities of the alkaloids from *Coptidis rhizoma* against aldose reductase. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, n. 11, p. 1404-1412, 2008.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; BRAGA, R. M.; DELARMELINA, C.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical constituents isolated from the bark of *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their antiproliferative and antimicrobial activities. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 6, p. 1111-1117, 2011.

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

COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, C. S.; CASTELO-BRANCO, M. V. S.; DINIZ, M. F. F. M.; LIMA, C. U. G. B.; SANTOS, B. V. O.; PITA, J. C. L. R.; SILVA, M. S.; SETTE, I. M. F. Constituintes químicos das folhas de *Rollinia leptopetala*. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 138-142, 2012.

CRONQUIST, A. An Integrated system of classification of flowering plants. New York. Columbia University Press, 1981.

DEVKOTA, K. P.; CHOUDHARY, M. I.; NAWAZ, S. A.; LANNANG, A. M.; LENTA, B. N.; FOKOU, P. A.; SEWALD, N. Microbial transformation of the steroidal alkaloid dictyophlebine by *Rhizopus stolonifer*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 55, n. 4, p. 682-684, 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*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 115-118, 2012.

EL SAYED, K. A. Microbial transformation of papaveraldine. **Phytochemistry**, v. 53, n. 6, p. 675-678, 2000.

ELLOF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FACCHINI, P. J.; LISCOMBE, D. K. Evolutionary and cellular webs in benzyloisoquinoline alkaloid biosynthesis. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 19, n. 2, p. 173-180, 2008.

FACCHINI, P. J.; ZIEGLER, J. Alkaloid Biosynthesis: Metabolism and Trafficking. **The Annual Review of Plant Biology**, v. 59, p. 735-769, 2008.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; CHARLES, B. Essential oils of Annonaceae: Volatile constituents of the essential oils from three *Guatteria* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 3, p. 275-278, 1997.

GOULART, M. O. F.; SANTANA, A. E. G.; OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G.; MAIA, J. G. S. Azafluorenones and Azaanthraquinone from *Guatteria dielsiana*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1691-1695, 1986.

GU, LIAN-QUAN.; HUANG, ZHI-SHU.; TANG, H.; WEI, YONG-BIAO.; ZHANG, C.; NING, FANG-XIAN.; QIAO, W.; HUANG, SHI-LIANG.; MA, L. Synthesis biological evaluation and molecular modeling of oxoisoaporphine and oxoaporphine derivatives as new dual inhibitors of acetylcholinesterase/butyrylcholinesterase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.44, n. 6, p. 2523-2532, 2009.

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

HATTORI, M.; ZHANG, CHAO-FENG; NAKAMURA, N.; TEWTRAKUL, S.; SUN, QI-SHI; WANG, ZHENG-TAO; FUJIWARA, T. Sesquiterpenes and Alkaloids from *Lindera chunii* and their inhibitory activities against HIV-1 Integrase. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 50, n. 9, p. 1195-1200, 2002.

HU, LI-HONG; ZHANG, YI-NAN; ZHONG, XIANG-GEN; ZHENG, ZONG-PING; HU, XU-DONG; ZUO, JIAN-PING. Discovery and synthesis of new immunosuppressive alkaloids from the stem of *Fissistigma oldhamii* (Hemsl.) Merr. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 2, p. 988-996, 2007.

HUFFORD, C. D.; ORABI, K. Y.; LI, E.; CLARK, A. M. Microbial transformation of sampangine. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 988-992, 1999.

KATRITZKY, A. R.; WANG, Z.; HALL, C. D.; AKHMEDOV, N. G.; SHESTOPALOV, A. A.; STEEL, P. J. Cyclization of α -oxo-oximes to 2-substituted benzoxazoles. **Journal of Organic Chemistry**, v. 68, n. 23, p. 9093-9099, 2003.

KHAIRUNISSA, N.; ZAWAWI, N. A.; AHMAT, N.; AHMAD, R.; JAAFAR, F. M.; GHANI, N. A. Oxoaporphine alkaloids and flavonols from *Xylopiia ferruginea*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 43, p. 7-9, 2012.

KHAN, I. A.; WALKER, L. A.; AGNIHOTRI, V. K.; ELSOHLY, H. N.; KHAN, S. I.; JACOB, M. R.; JOSHI, V. C.; SMILLIE, T. Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity. **Phytochemistry Letters**, v. 1, n. 2, p. 89-93, 2008.

KOPPE, V. C.; NETO, R, M. R.; SANTOS, J. S.; SILVA, M. A. Potencialidades de uso de espécies arbustivas e arbóreas em diferentes fisionomias de cerrado, em Lucas do Rio Verde/MT. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 10, n. 2, p. 113-126, 2010.

KUBMARAWA, D.; BARMINAS, J. T.; ALIYU, A. O. C. Silver oxide-mediated oxime ether synthesis. **Archives of Applied Science Research**, v. 3, n. 1, p. 126-130, 2011.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LEE, SHOEI-SHENG, SINGH, O. V. HUANG, WEI-JAN, CHEN, CHUNG-HSIUNG. Manganese (III) acetate mediated oxidation of aporphines: a convenient and useful synthesis of oxoaporphines. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 46, p. 8166-8169, 2007.

LIMA, L. A. R. S.; JOHANN, S.; CISALPINO, P. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Antifungal activity of 9-hydroxy-folianin and sucrose octaacetate from the seeds of *Annona cornifolia* A. St. Hill. (Annonaceae). **Food Research International**. V. 44, n. 7, p. 2283-2288, 2011.

LIMA, M. A.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MERLIC, C. A.; DOROH, B. C.; MAIA, J. G. S.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria poeppigiana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 3, p. 347-349, 2004.

LIMA, M. A.; FECHINE, I. M.; SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria juruensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 4, p. 423-425, 2003.

LOBÃO, A. Q.; ARAÚJO, D. S. D.; KURTS, B. C. Annonaceae das Restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 85-96, 2005.

LOBÃO, A. Q.; MELLO-SILVA, R.; FORZZA, R. C.; *Guatteria* (Annonaceae) da Floresta Atlântica brasileira. **Rodriguésia**, v. 63, n. 4, p. 1039-1064, 2012.

MAAS, P. J. M.; ERKENS, R. H. J.; CHATROU, L. W.; KOEK-NOORMAN, J.; MAAS, J. W. Classification of a large and widespread genus of Neotropical trees, *Guatteria* (Annonaceae) and its three satellite genera *Guatteriella*, *Guatteriopsis* and *Heteropetalum*. **Taxon**, v. 56, n. 3, p. 757-774, 2007.

MARSAIOLI, A.; *Biocatálise e Biotransformação – Fundamentos e aplicações*, Salto, São Paulo, Ed. Schoba, 2010.

MULLER, B. L. A.; LAGOS, A. R. Hotspot brasileiro – Mata Atlântica. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 2, n. 2, p. 35-45, 2007.

NETO, L. M.; DUTRA, S. M.; SALIMENA, F. R. G. Annonaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 4, p. 785-793, 2012.

OLIVEIRA FILHO, A. T. Espécies de ocorrência no domínio atlântico do cerrado e da caatinga, Lavras, UFLA, cap. 6, p. 421-539, 2008.

OLIVEIRA FILHO, A. T. Espécies de ocorrência no domínio atlântico e do cerrado. Lavras, UFLA, cap. 5, p. 217-418, 2008.

OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L. M. Biotransformação: importância e toxicidade. **Saúde em Revista**, v. 5, n. 9, p. 69-76, 2003.

OSÓRIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630-635, 2007.

PARK, M. H.; HAN, B. H. Alkaloids are the sedative principles of the seeds of *Zizyphus vulgaris* var. *spinousus*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 10, n. 4, p. 203-207, 1987.

PEREIRA JUNIOR, N. Tecnologia de bioprocessos. Rio de Janeiro, Escola de Química/UFRJ, 2008.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

RACKOVÁ, L.; MÁJEKOVÁ, M.; KOSTALOVÁ, D.; STEFEK, M. Antiradical and antioxidant activities of alkaloids isolated from *Mahonia aquifolium*. Structural aspects. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 12, n. 17, p. 4709-4715, 2004.

RAGASA, C. Y.; GANZON, J.; HOFILÉÑA, J.; TAMBOONG, B.; RIDEOUT, J. A. A new furanoid diterpene from *Caesalpinia pulcherrima*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 51, n. 10, p. 1208-1210, 2003.

RASKIN, I.; GRAZIOSE, R.; RATHINASABAPATHY, T.; LATEGAN, C.; POULEV, A.; SMITH, P. J.; GRACE, M.; LILA, M. A. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 26-30, 2011.

SHOEMAKER, R. H. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, n. 10, p. 813-823, 2006.

SILVA, D. B.; TULLI, E. C. O.; MILITÃO, G. C. G.; COSTA-LOTUFO, L. V.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALBUQUERQUE, S.; SIQUEIRA, J. M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11, p. 1059-1063, 2009.

SILVA, R. M.; PIGNATARI, A. C. C.; SANTOS, A. C. M.; ZIDKO, A. C. M.; GALES, A. C. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O mundo da saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.

SIMÕES, M. O. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis. Ed. Universidade/UFRGS, 1999.

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

SIQUEIRA, J. M.; 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. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcaloides oxoaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v.30, n.8, p. 1809-1812, 2007.

SOUZA, O. V.; SOARES JUNIOR, D. T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOS, R. G.; GATTASS, C. R.; KAPLAN, M. A. C. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, n. 1, p. 11-14, 2004.

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

TIWARI, V. K.; KISHORE, N.; MISHRA, B. B.; TRIPATHI, V. Alkaloids as potential anti-tubercular agents. **Fitoterapia**, v. 80, n. 3, p. 149-163, 2009.

VARGAS, A. C.; KREWER, C. C.; COSTA, M. M.; SCHRANK, I. *Rhodococcus equi*. **Arquivos Instituto de Biologia**, São Paulo, v. 75, n. 4, p. 533-545, 2008.

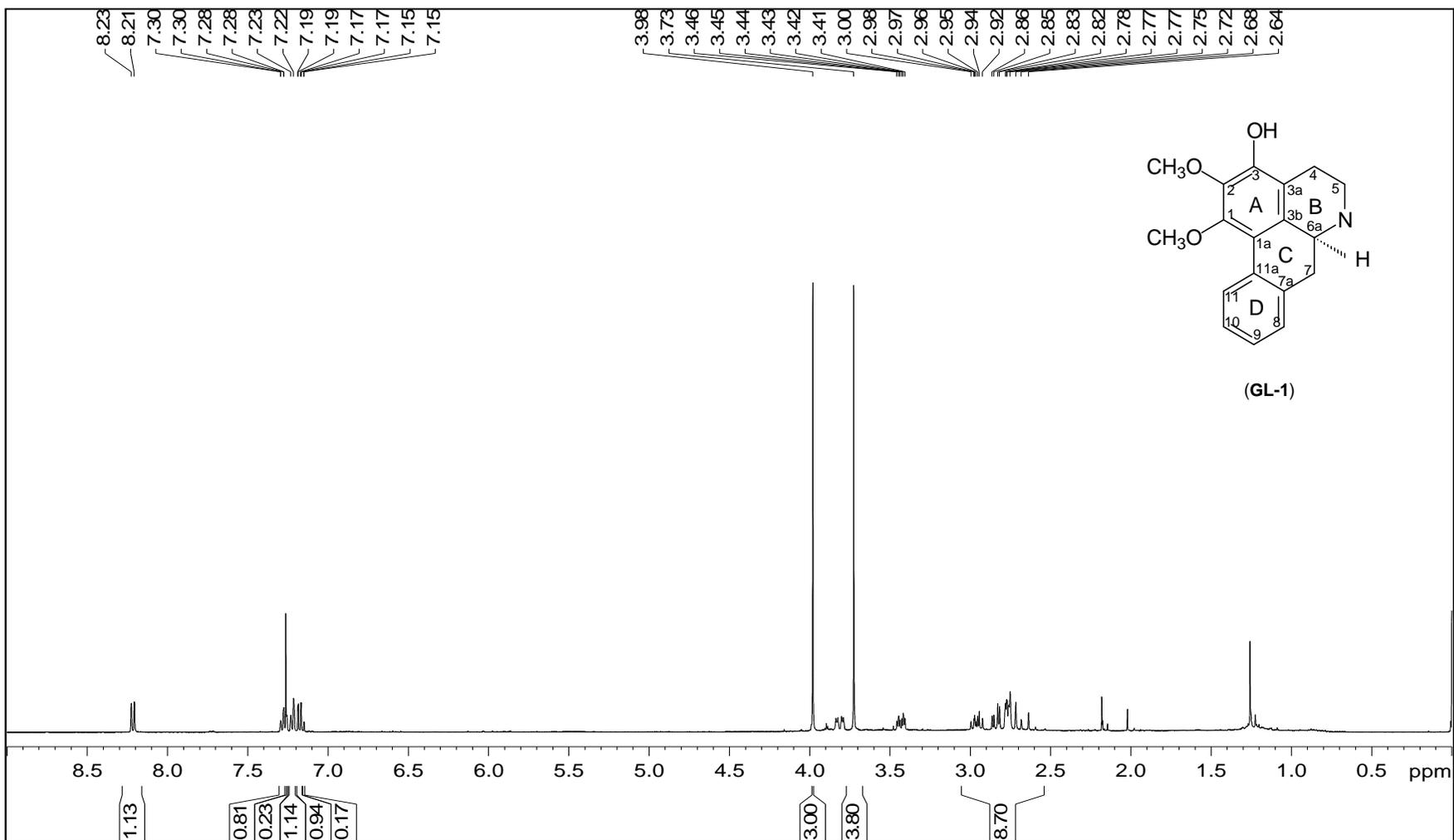
VIEIRA, T. A.; ROSA, L. S.; SANTOS, M. M. L. S. Agrobiodiversidade de quintais agroflorestais do município de Bonito, estado do Pará. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 55, n. 3, p. 159-166, 2012.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Química de Produtos Naturais e a moderna farmacognosia. 3a. Ed. Universidade do Vale do Itajaí, 2012.

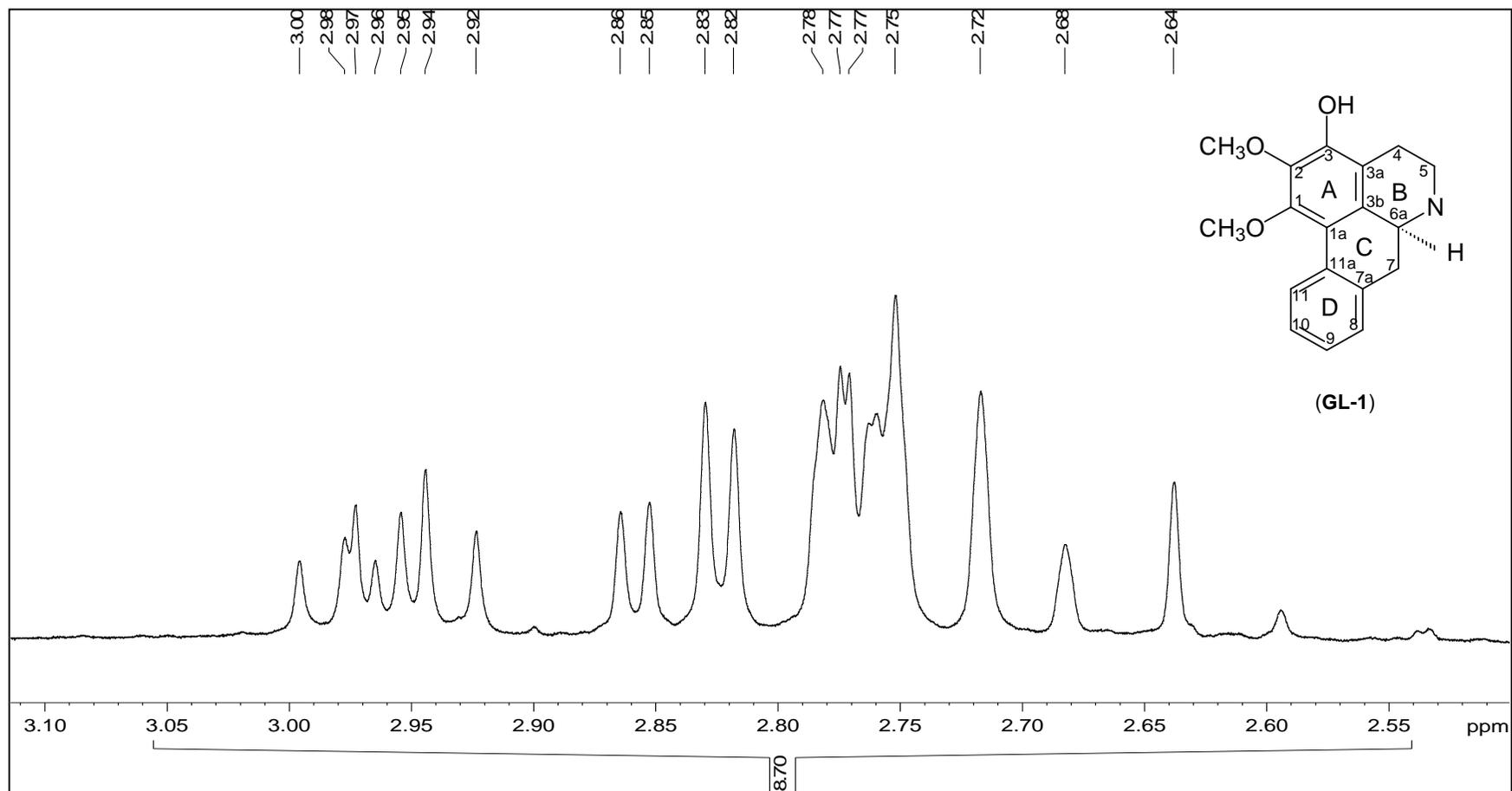
ZHAO, Y.; ZHAO, Q.; WANG, K. Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106 n. 3, 2006.

ANEXOS

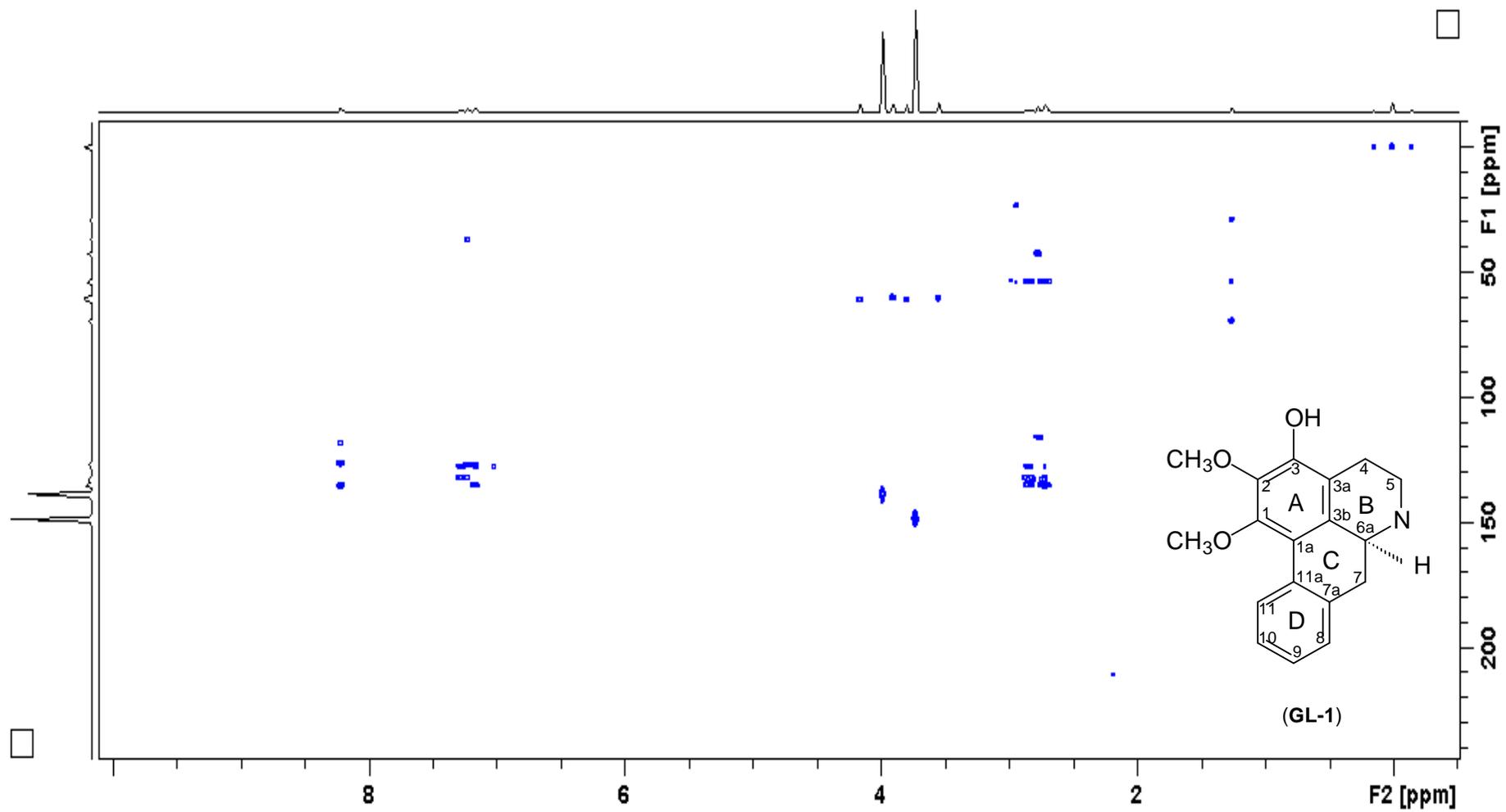
Tabelas e Espectros



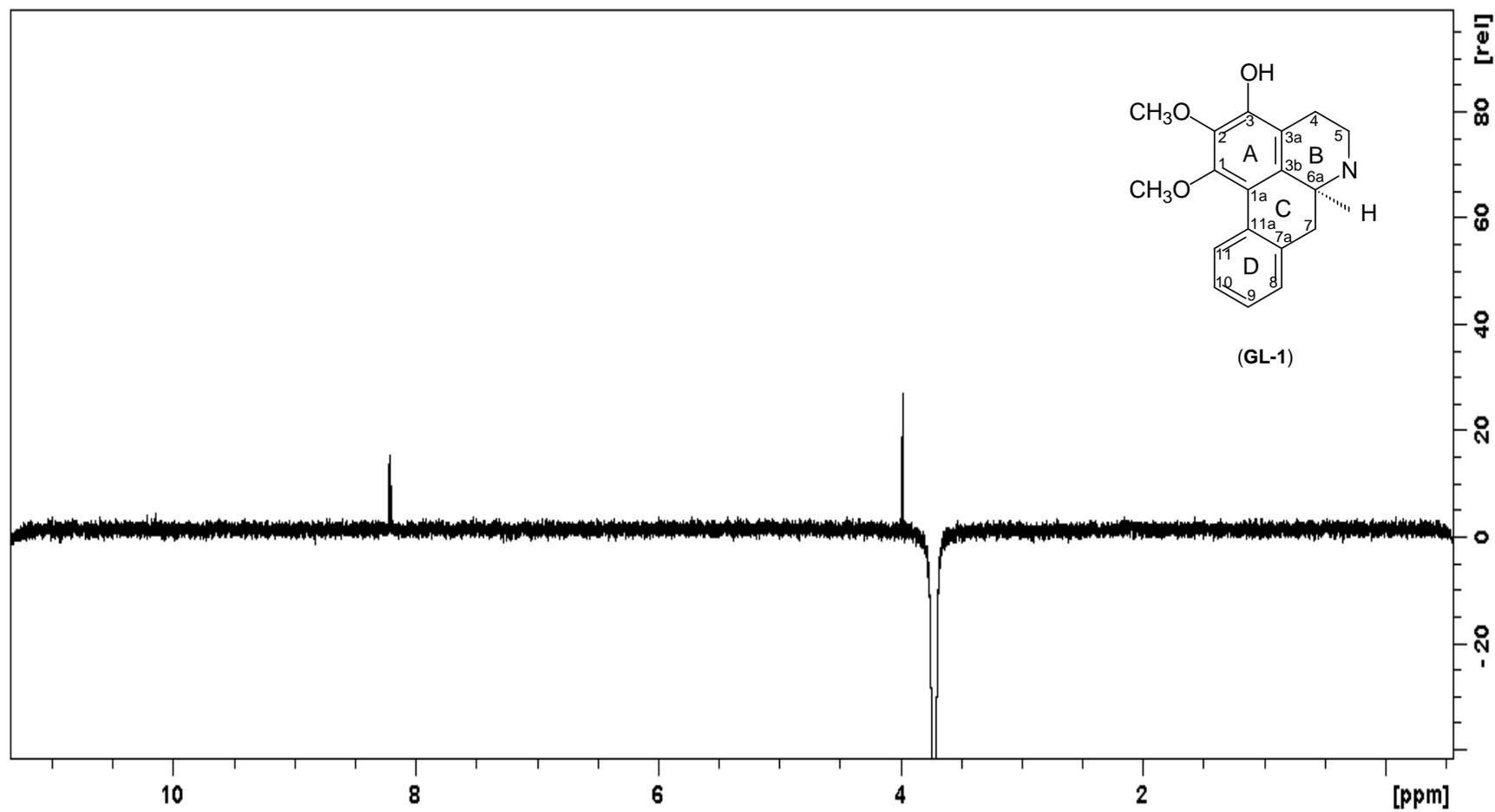
Espectro 3: RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) de **GL-1**.



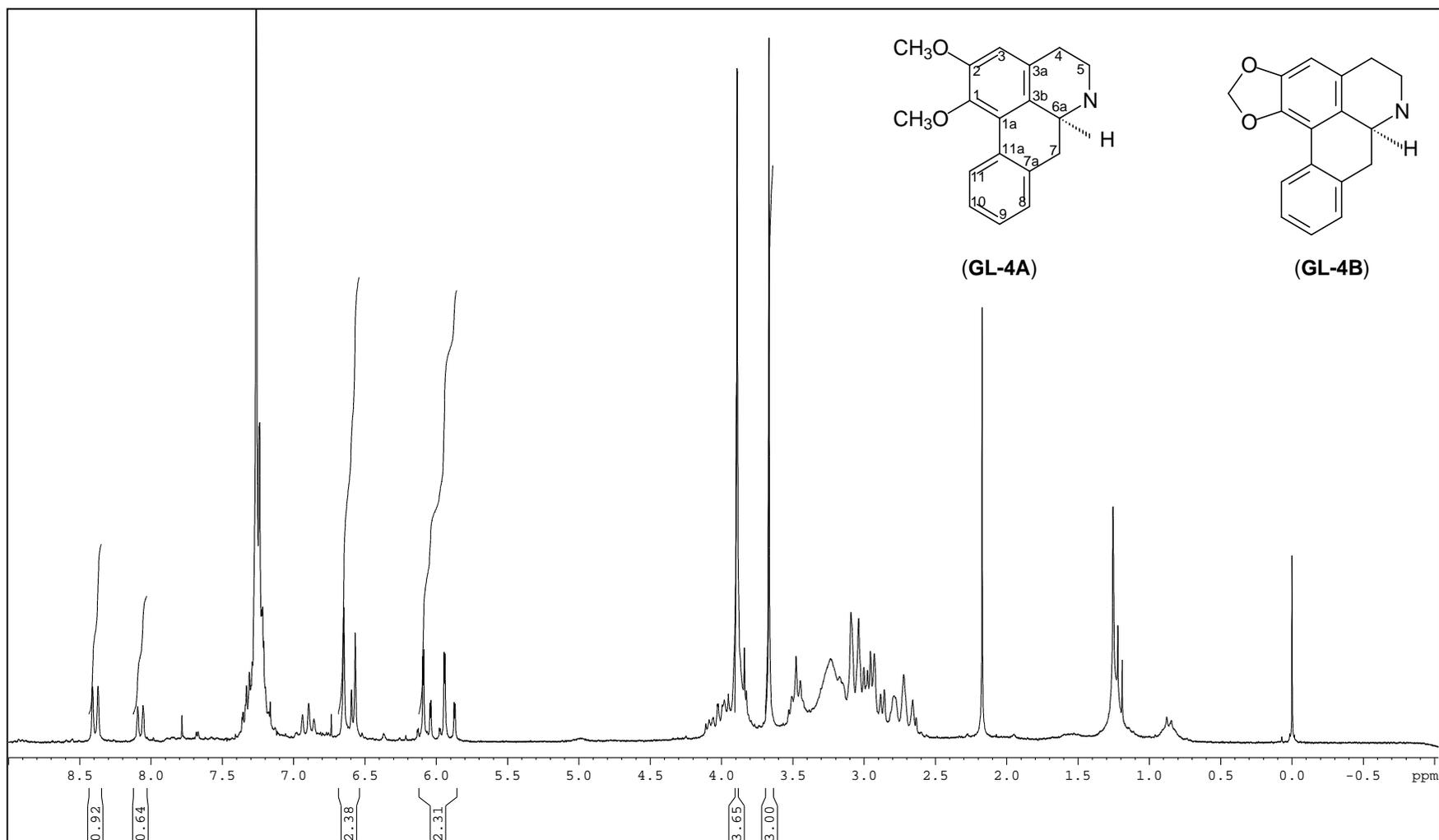
Espectro 3a: Ampliação da região alifática do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **GL-1**.



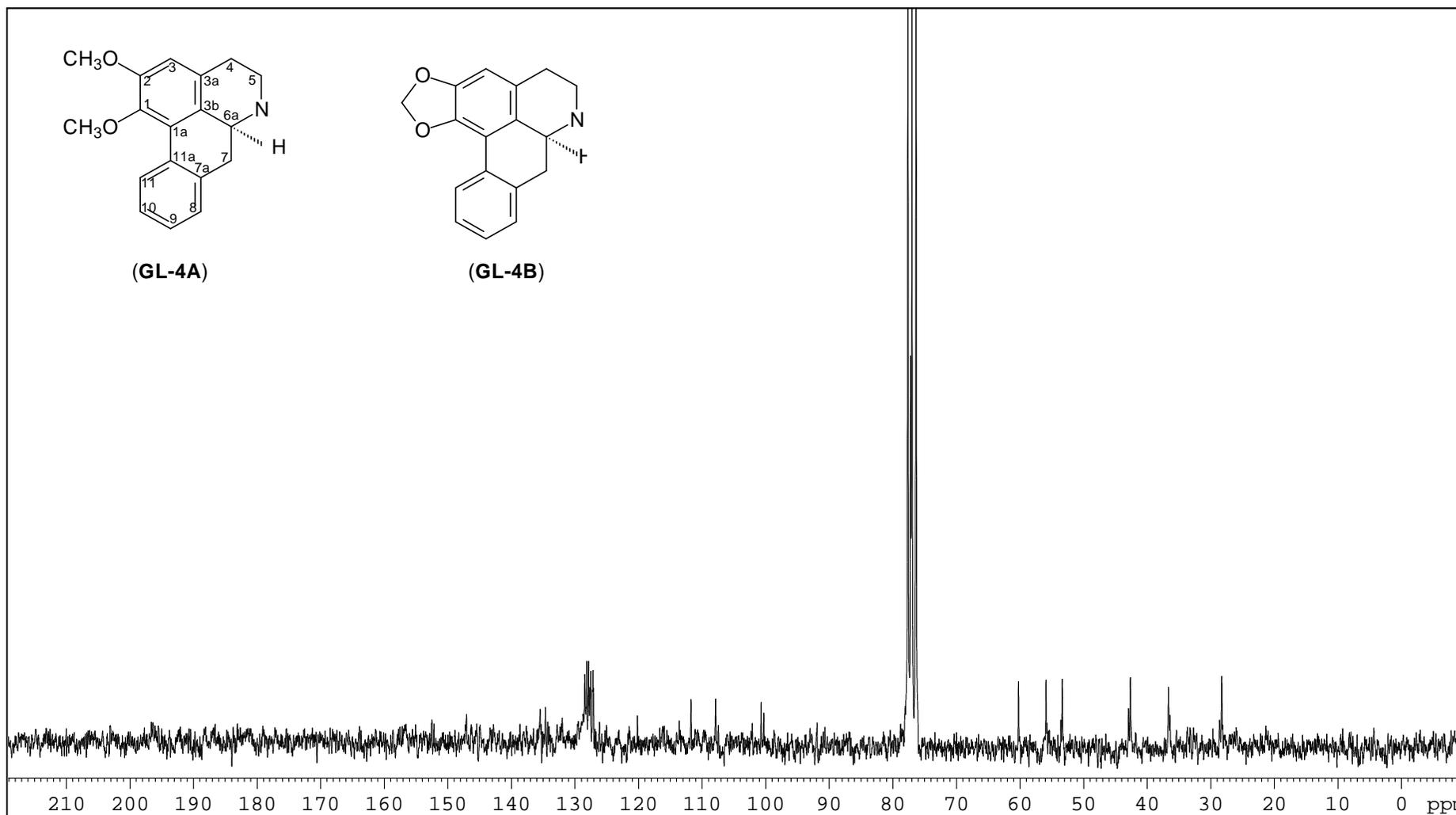
Espectro 4: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de **GL-1**.



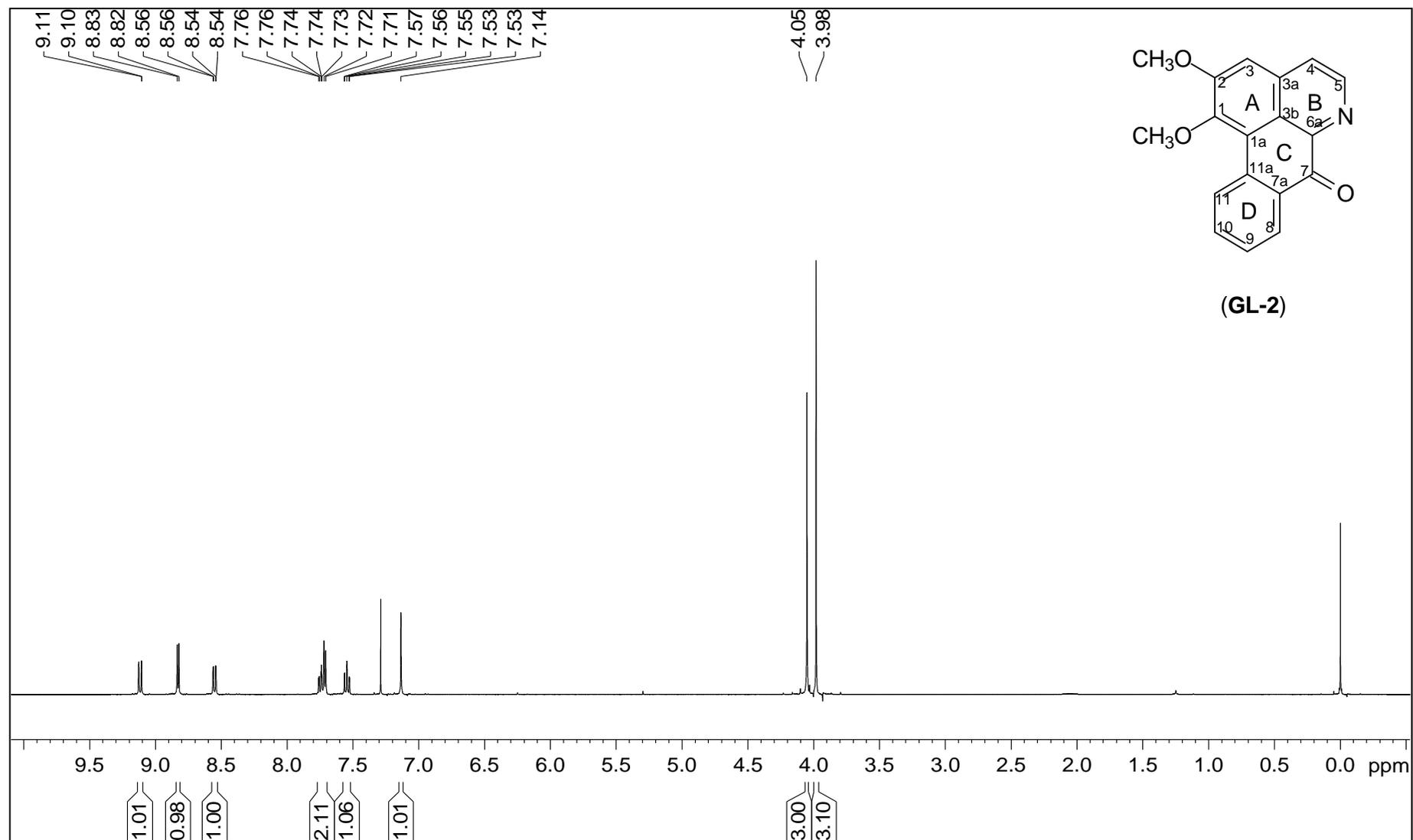
Espectro 5: Experimento de NOE (irradiação do sinal em δ 3,72 ppm) de **GL-1**.



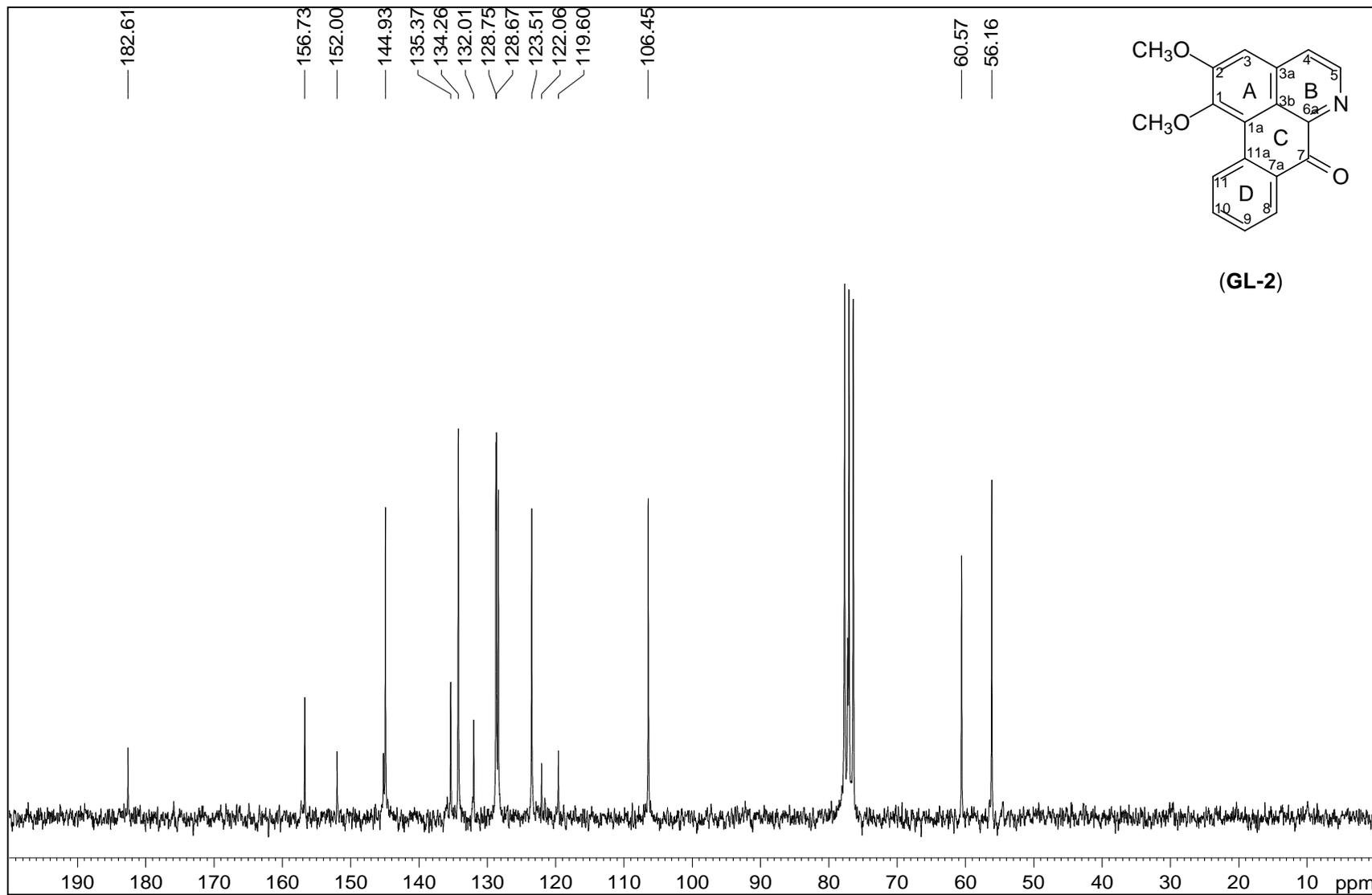
Espectro 6: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **GL-4**.



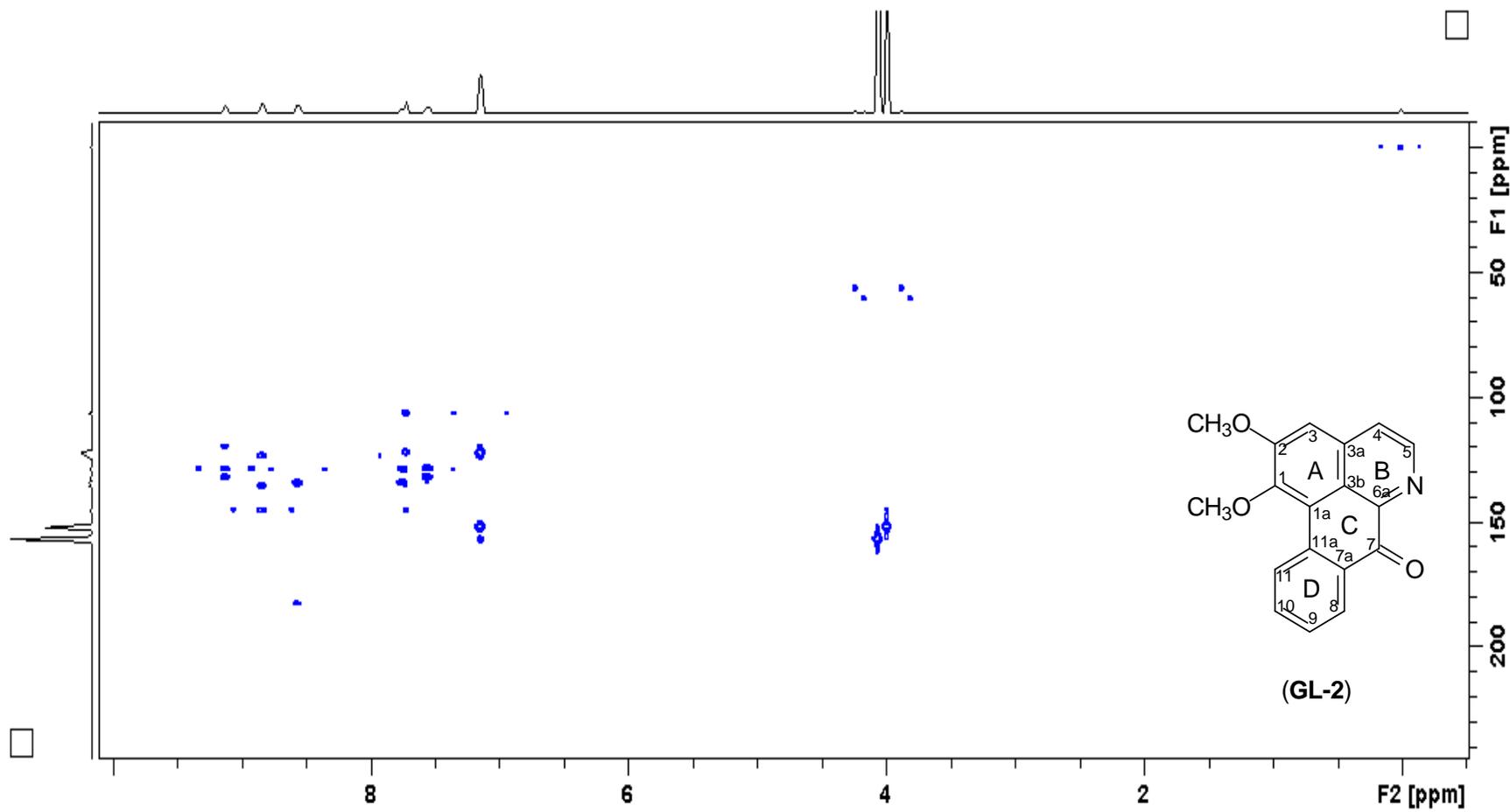
Espectro 7: RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de GL-4.



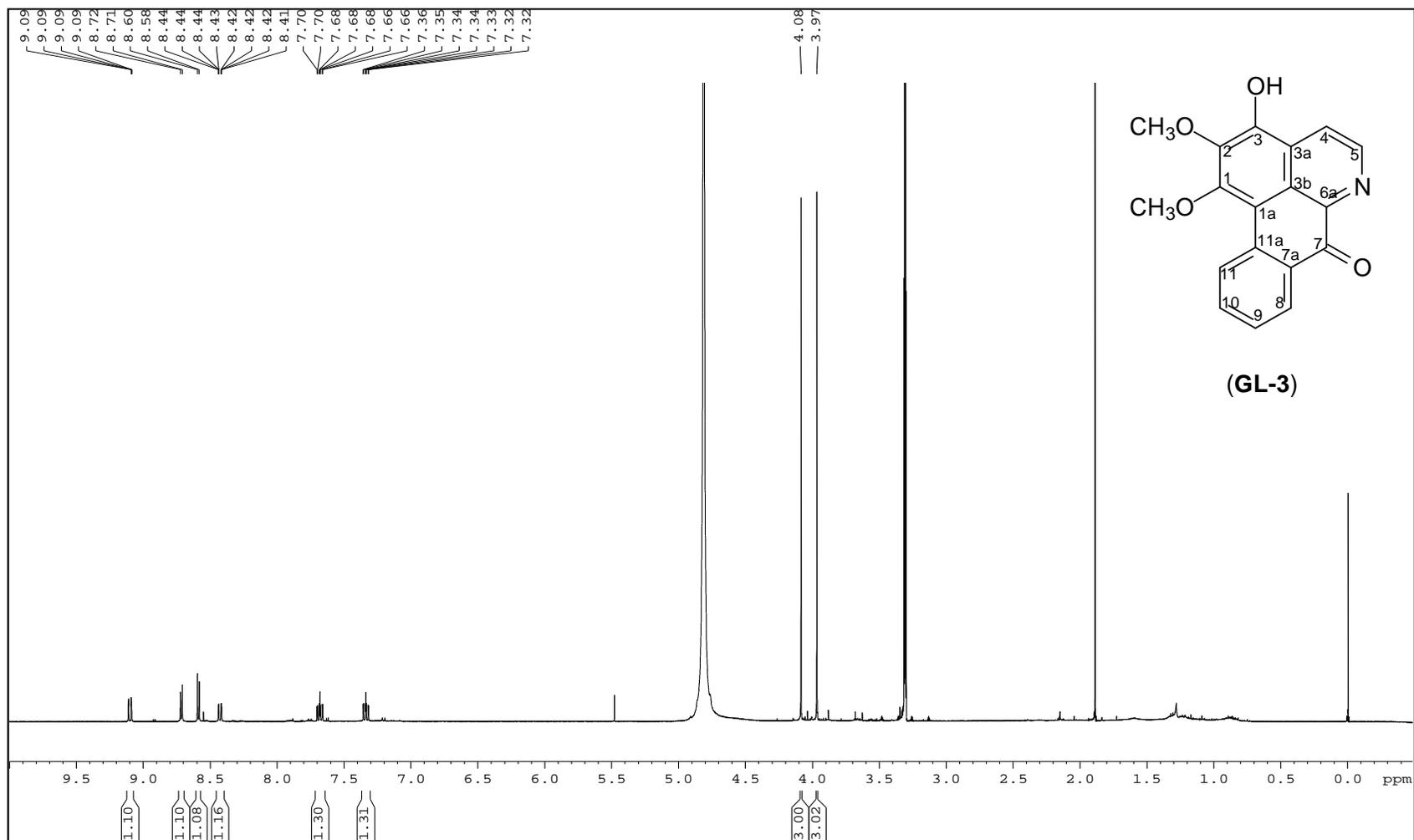
Espectro 8: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de GL-2.



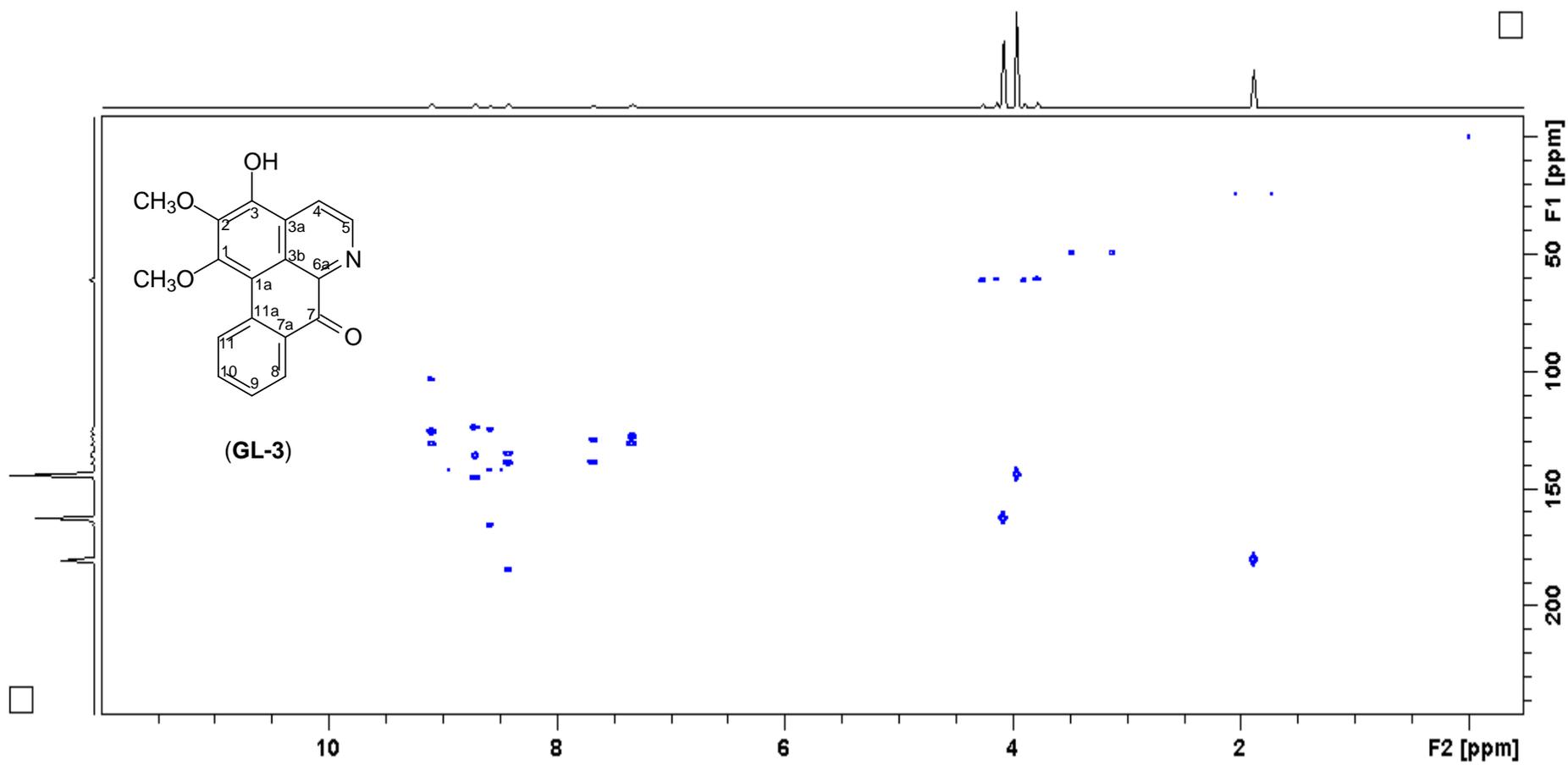
Espectro 9: RMN de ¹³C (50 MHz, CDCl₃) de **GL-2**.



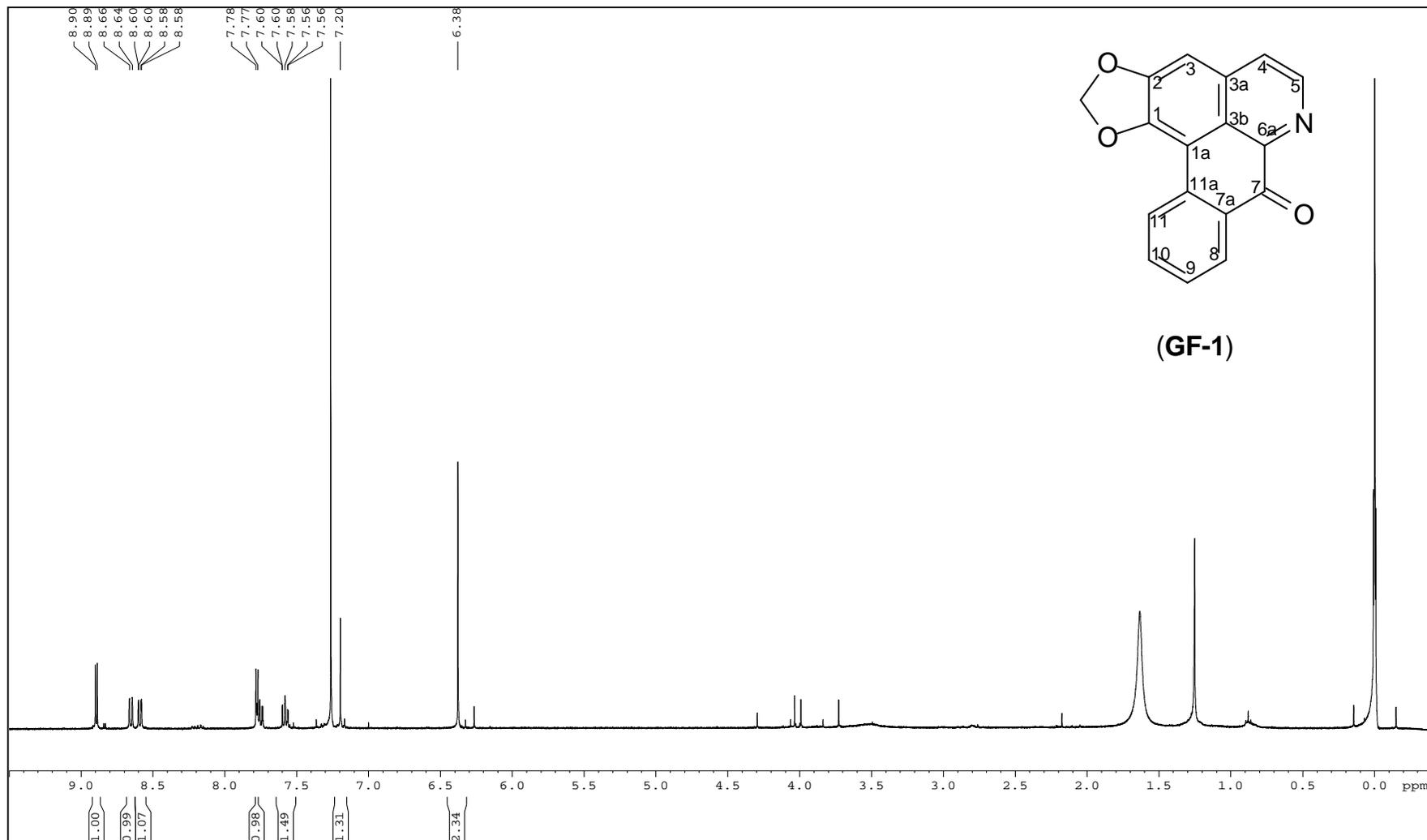
Espectro 10: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de **GL-2**.



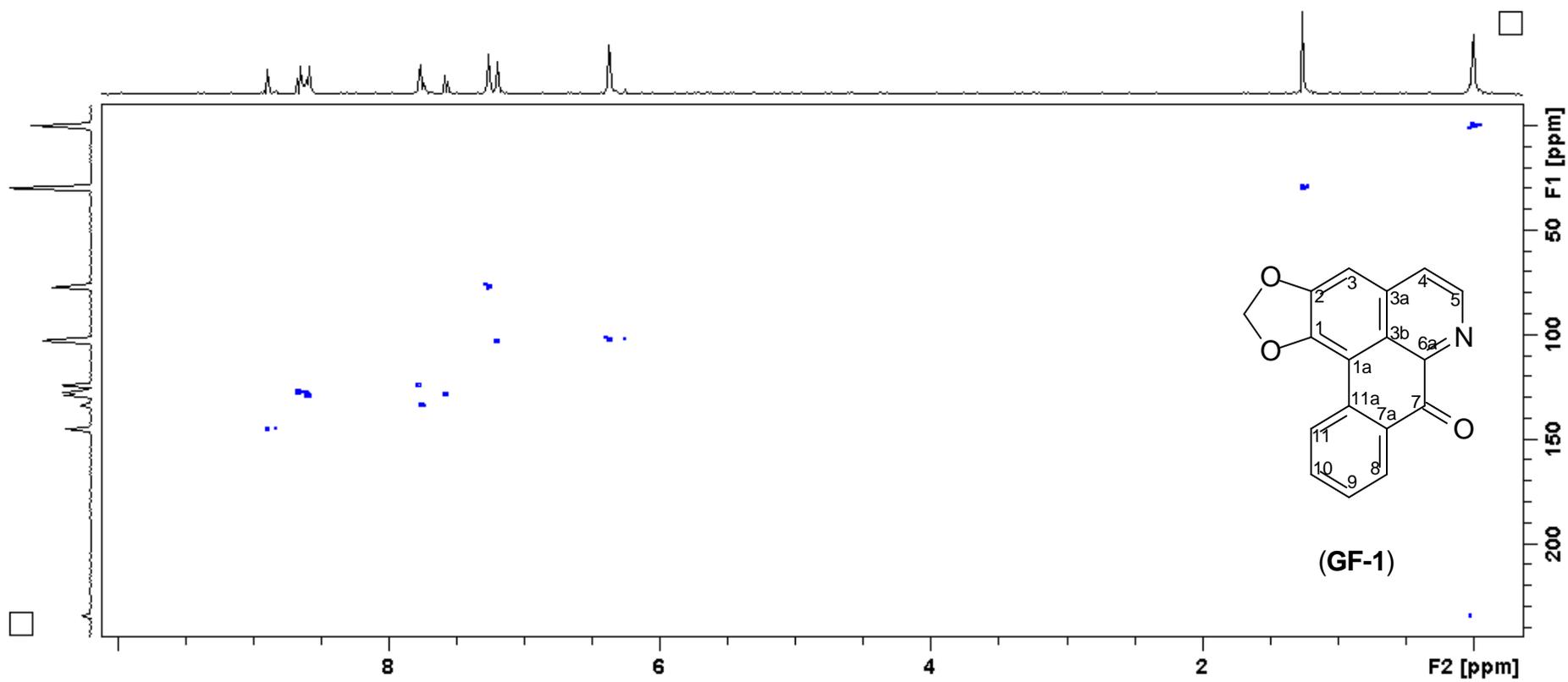
Espectro 11: RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de **GL-3**.



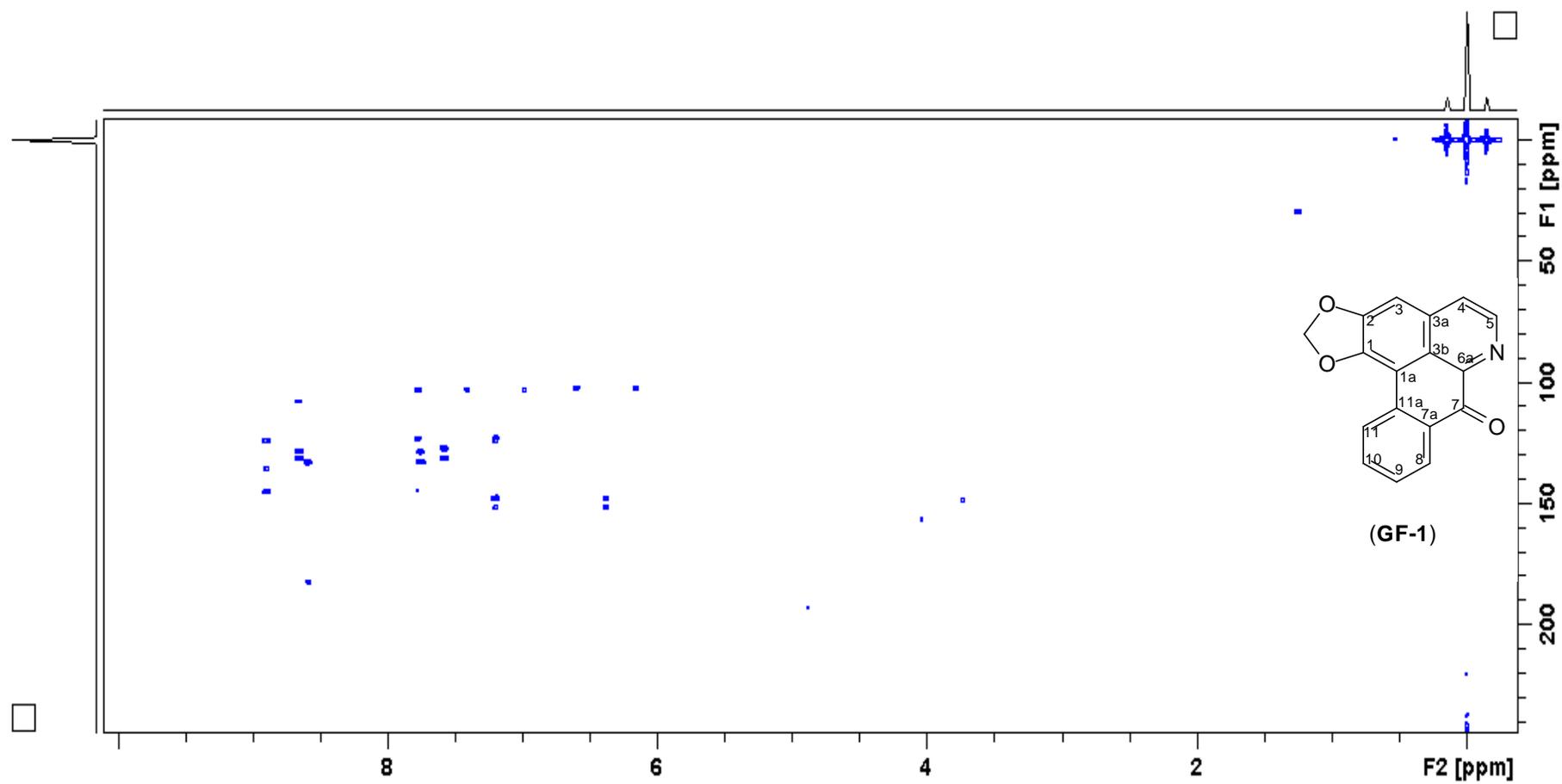
Espectro 12: Mapa de contornos HMBC (¹H 400 MHz - ¹³C 100 MHz, CD₃OD) de **GL-3**.



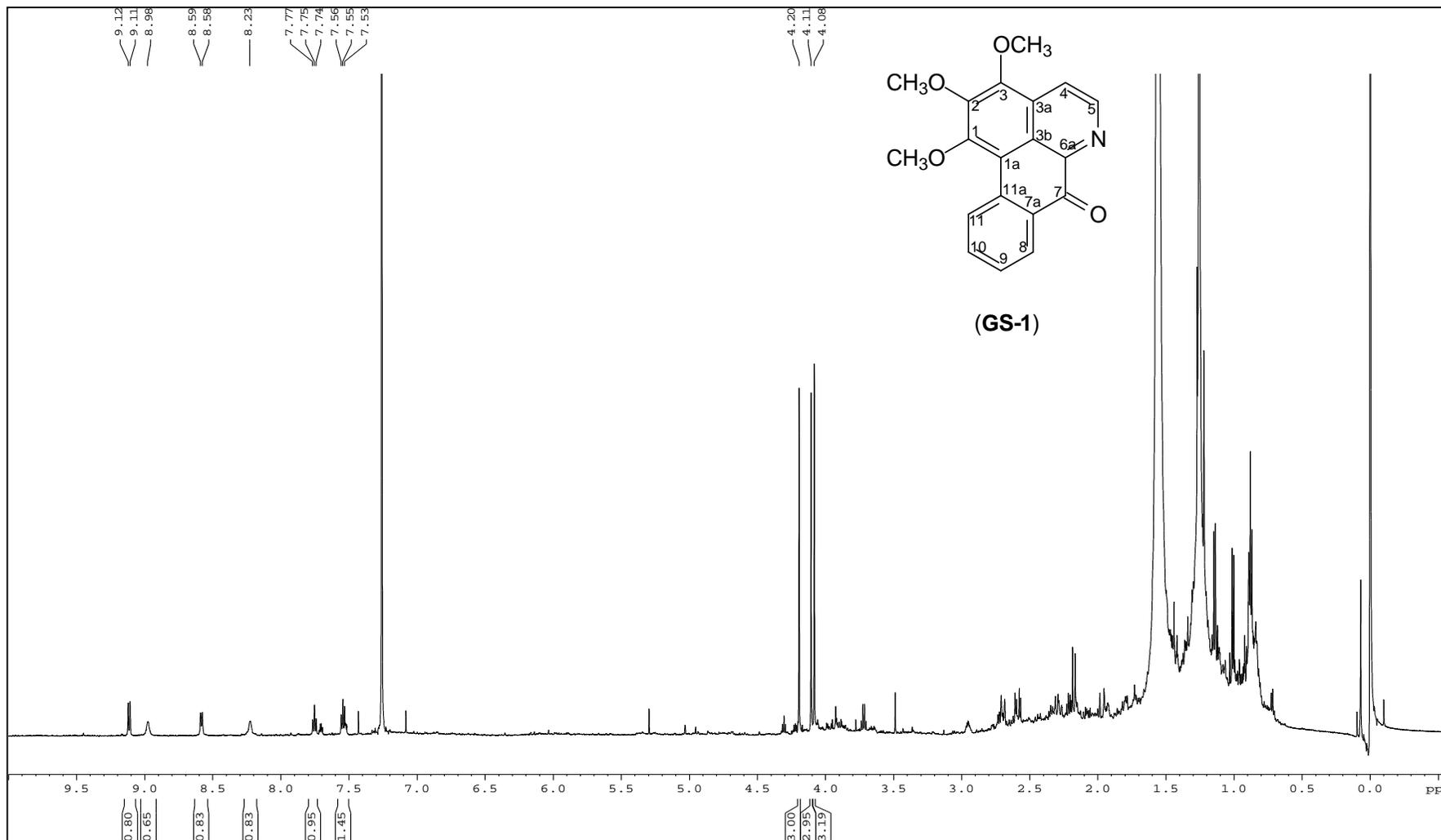
Espectro 13: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **GF-1**.



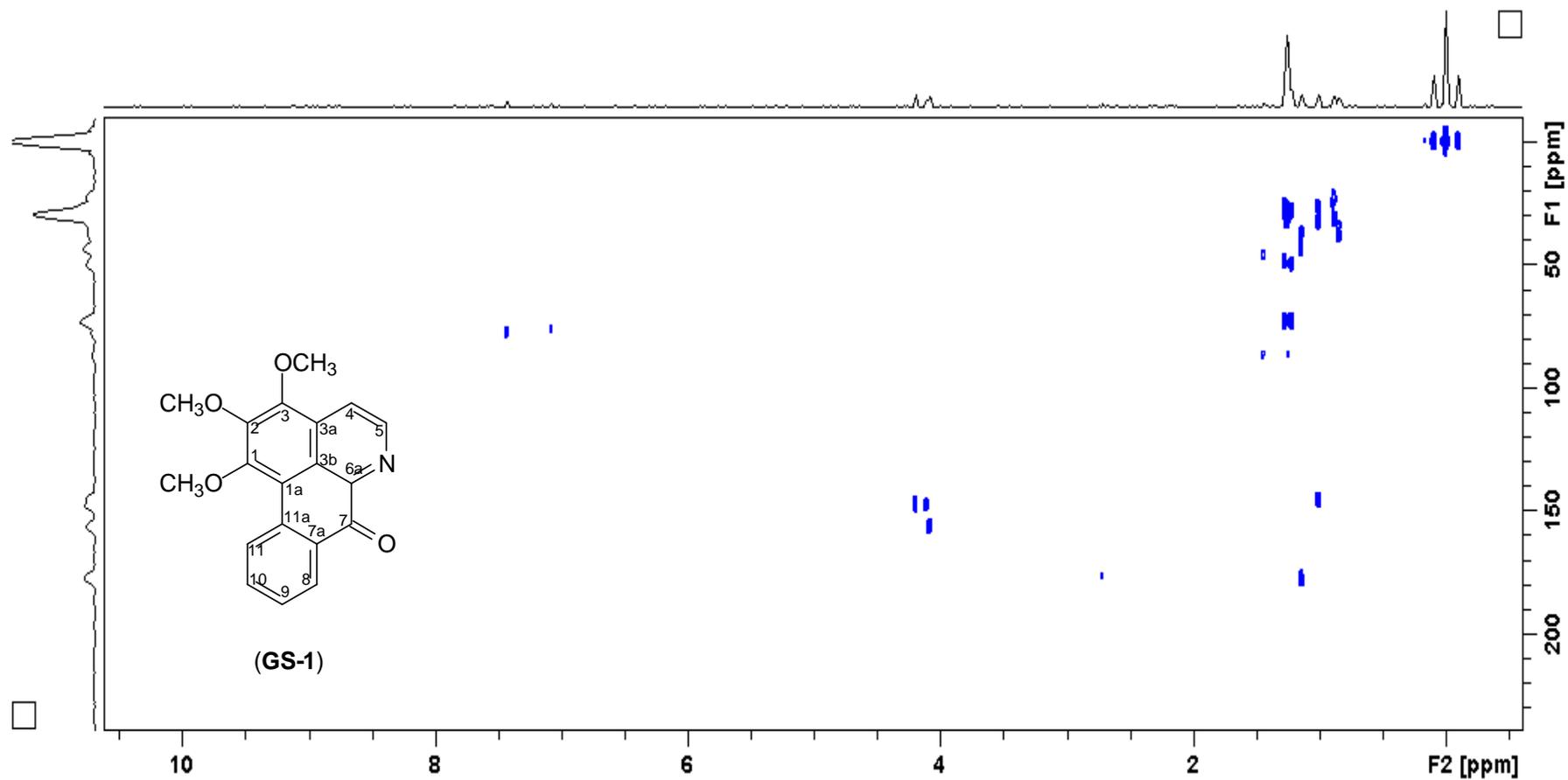
Espectro 14: Mapa de contornos HSQC (^1H 400 MHz – ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de **GF-1**.



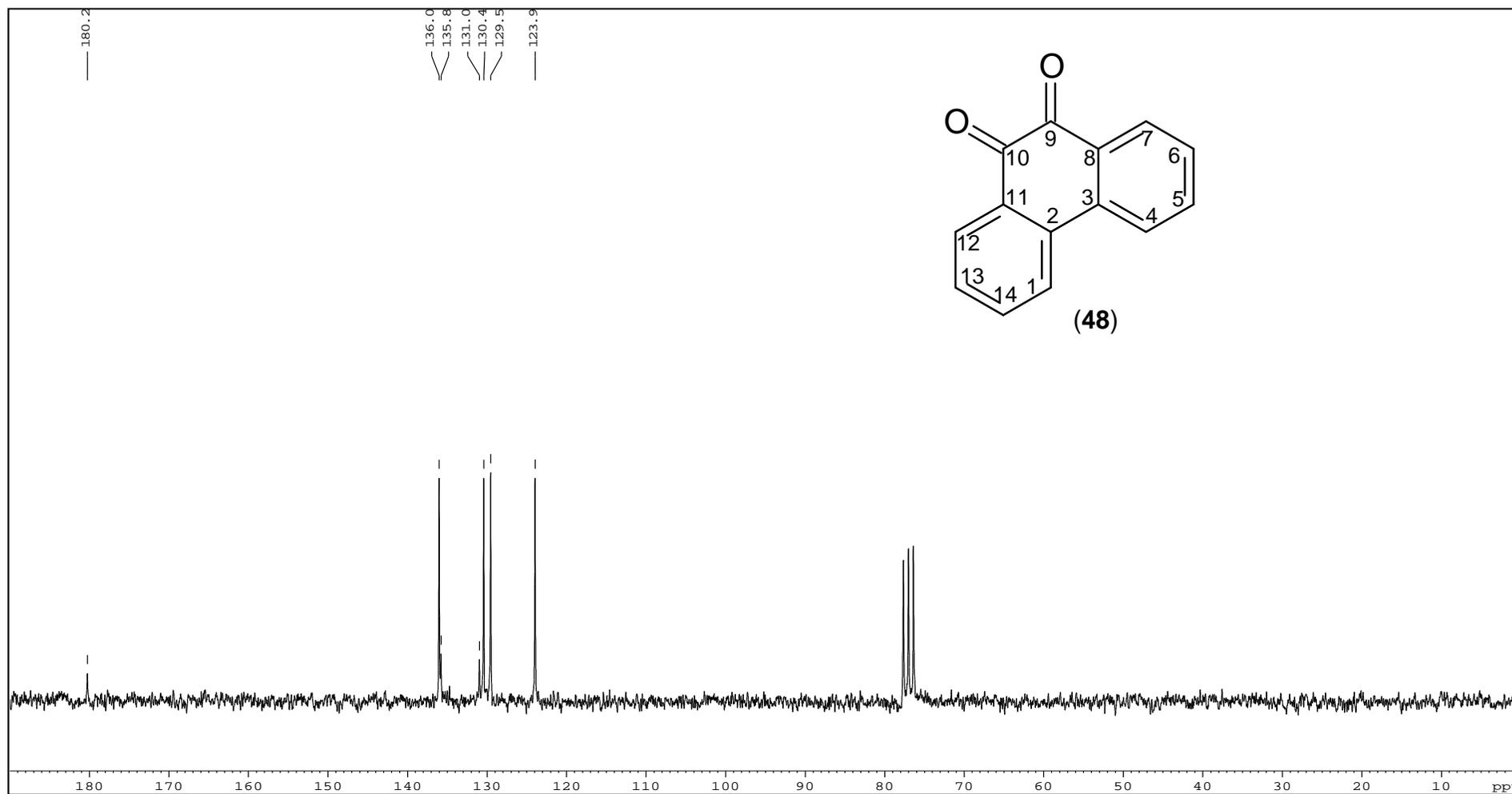
Espectro 15: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz – ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de **GF-1**.



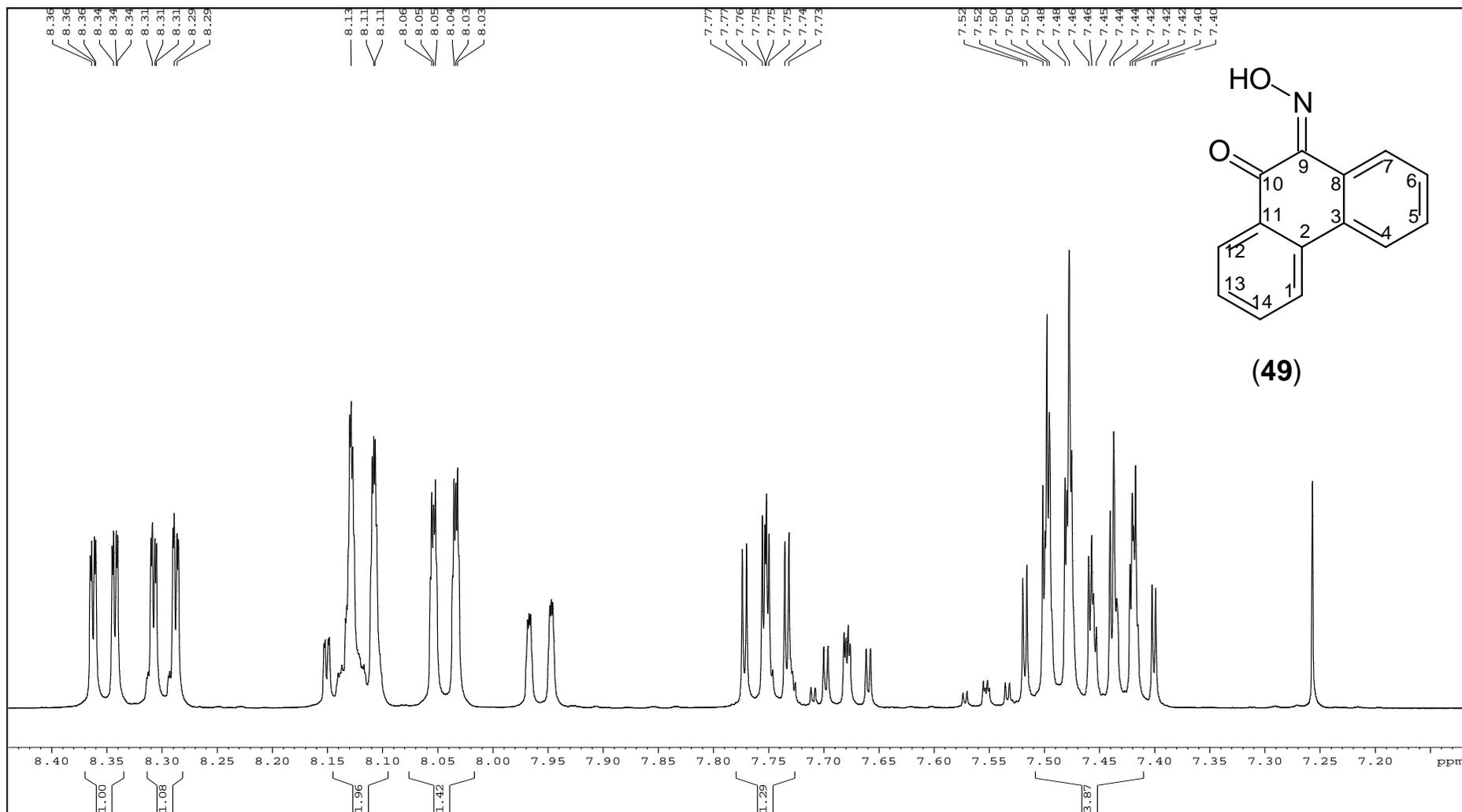
Espectro 16: RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de **GS-1**.



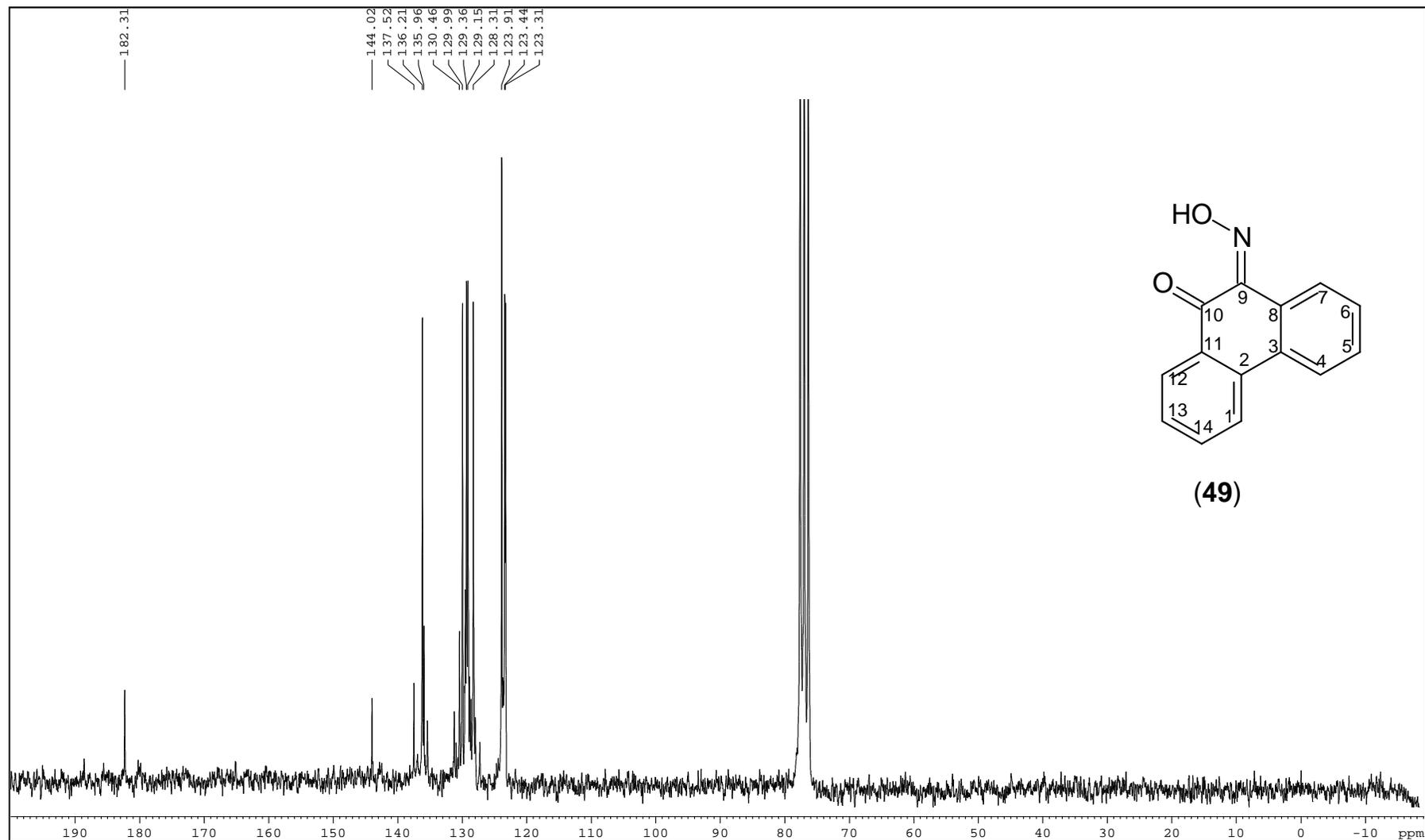
Espectro 17: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz - ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de **GS-1**.



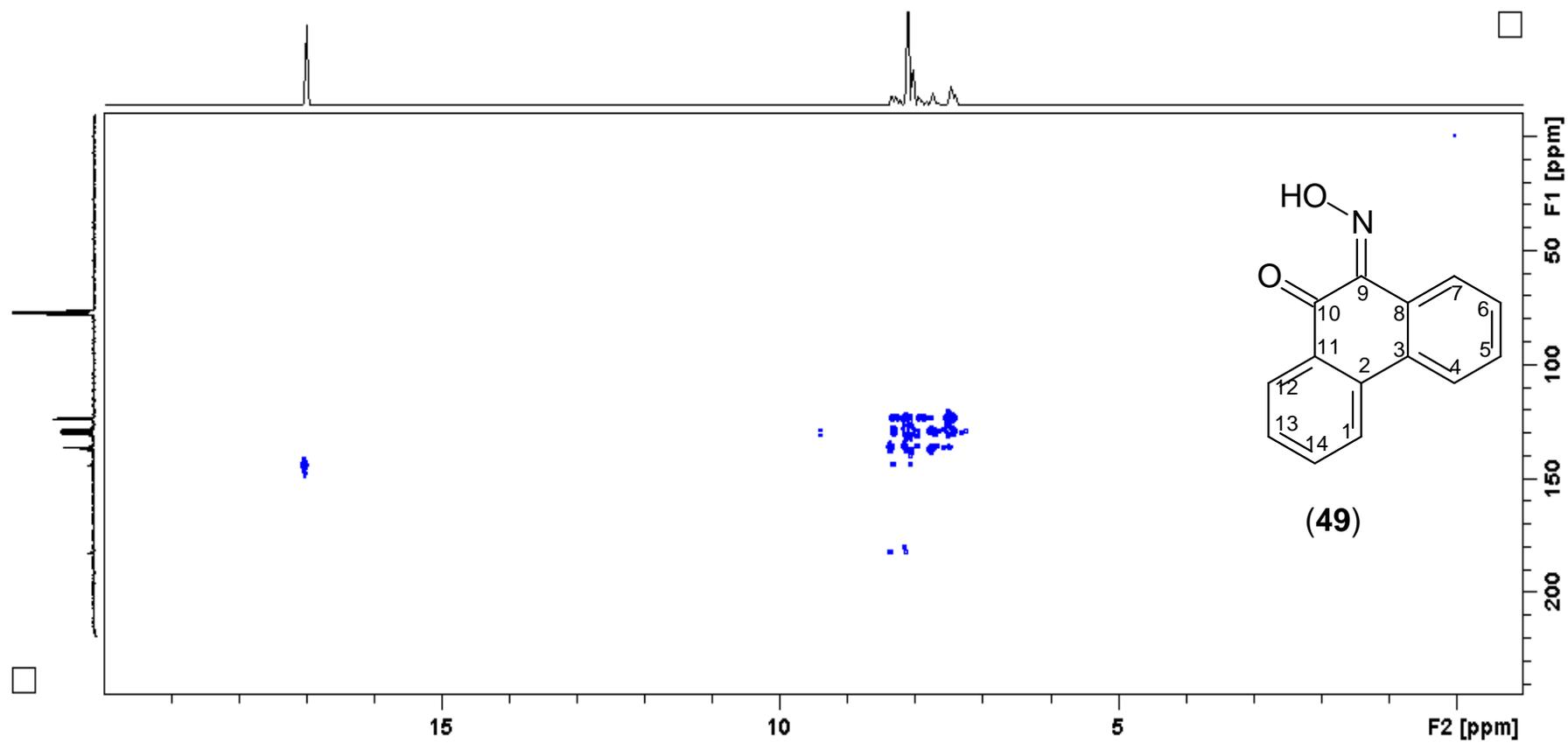
Espectro 19: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de (48)



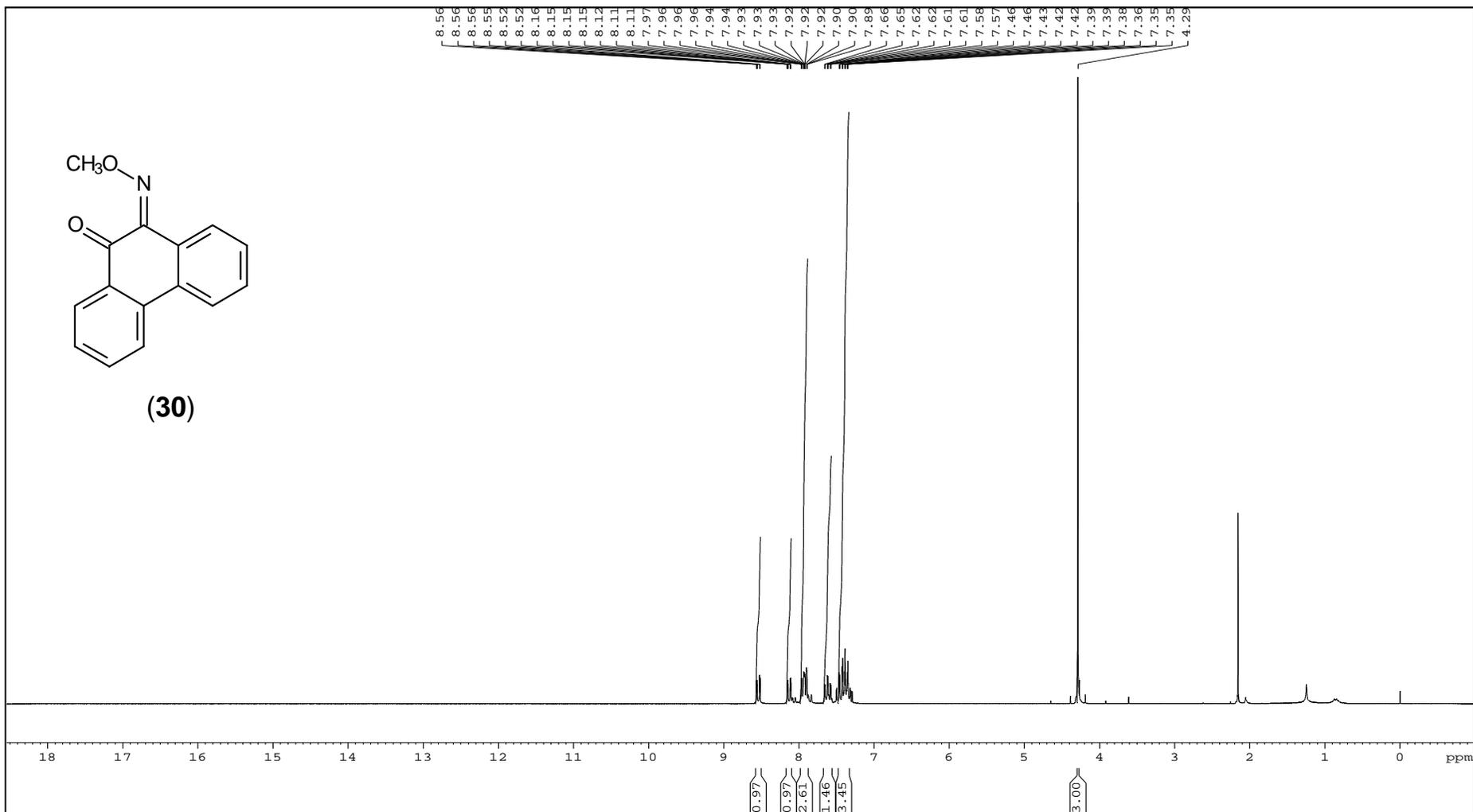
Espectro 20: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de (49)



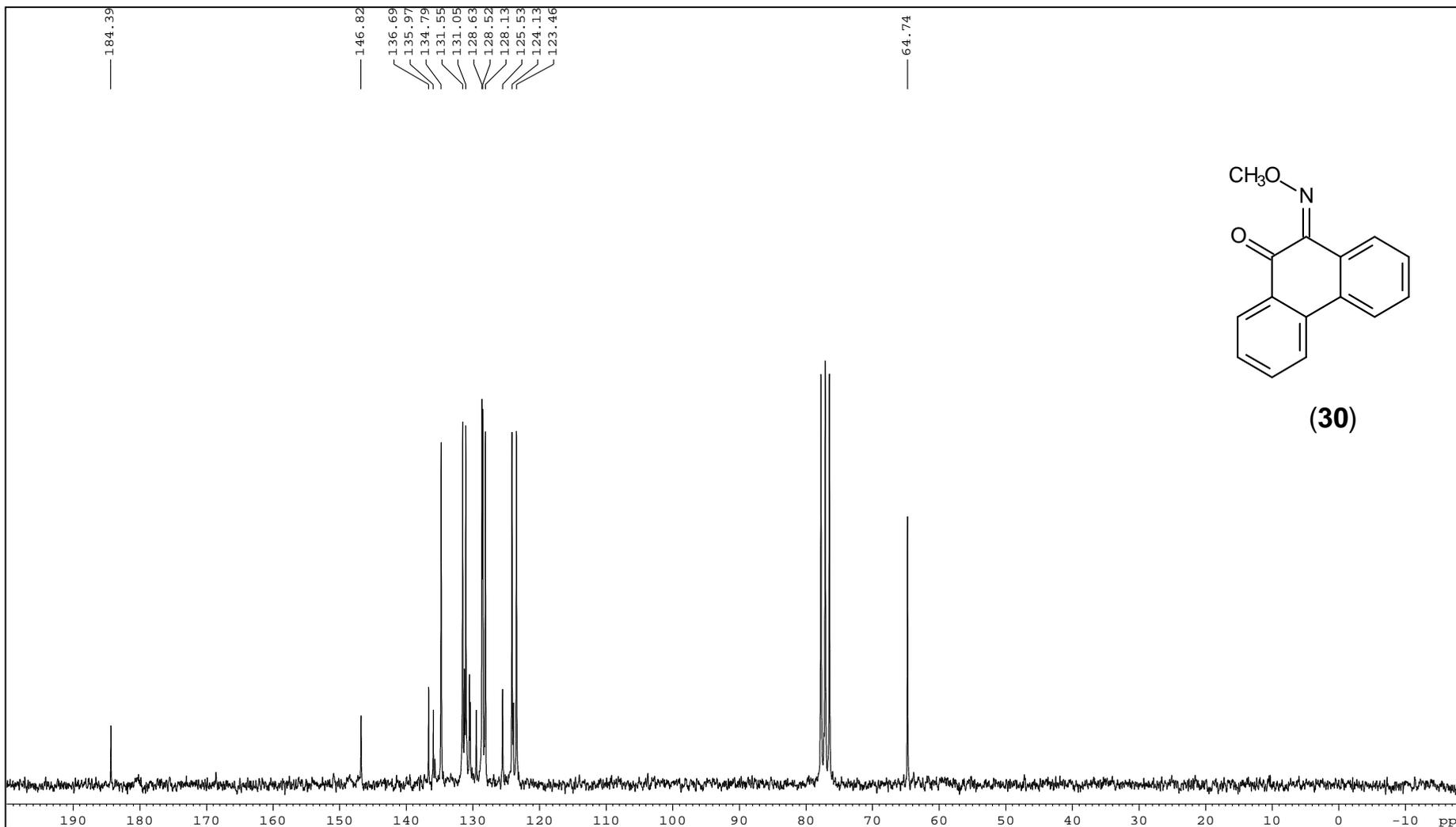
Espectro 21: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de (49)



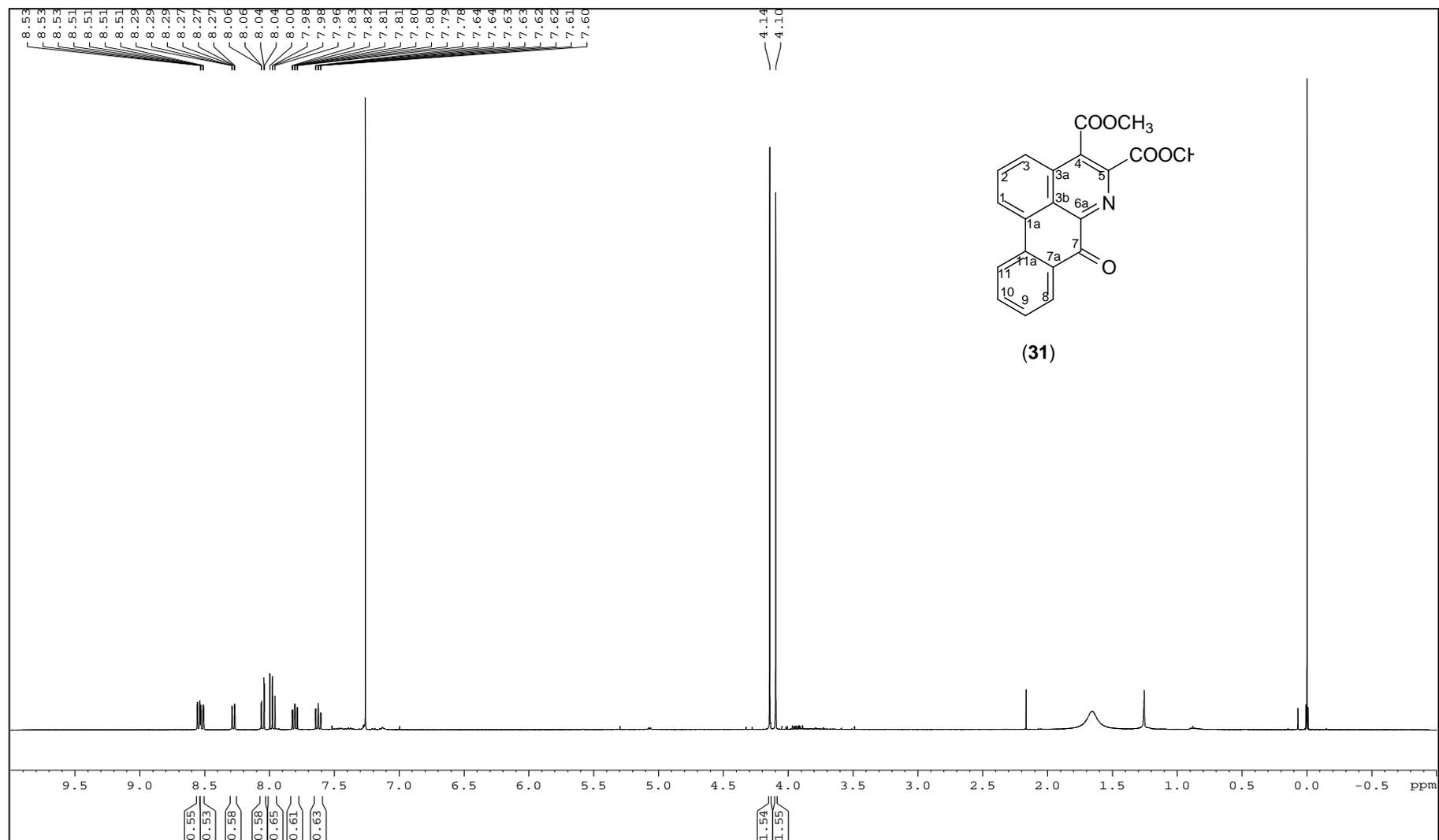
Espectro 22: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz – ^{13}C 100 MHz) de (49)



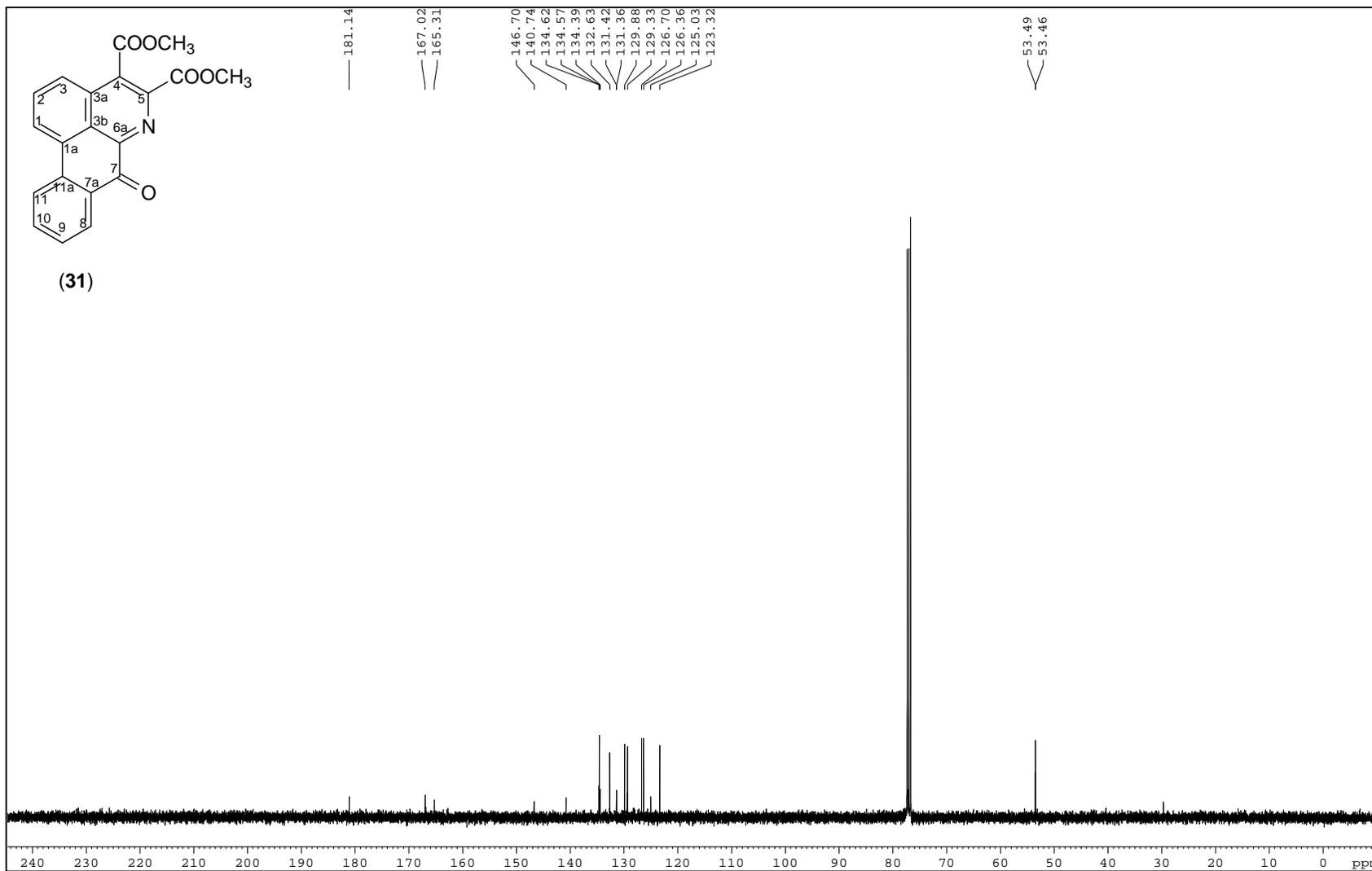
Espectro 23: RMN de ¹H (200 MHz, CDCl₃) de **(30)**.



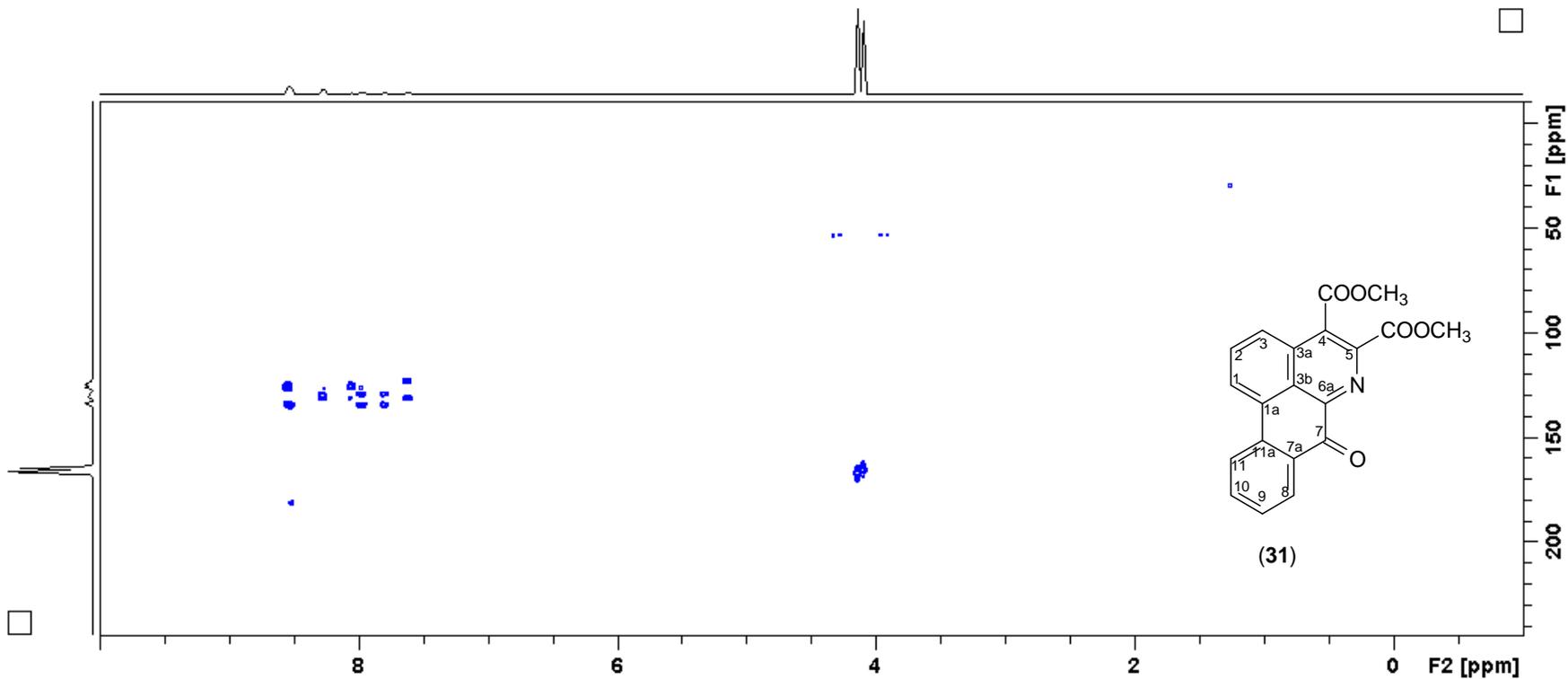
Espectro 24: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de (30)



Espectro 25: RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de (31).



Espectro 26: RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de (31).



Espectro 27: Mapa de contornos HMBC (^1H 400 MHz – ^{13}C 100 MHz, CDCl_3) de (31).

Tabela 35: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância **GL-1** e dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da literatura para a 3-hidroxi-nornuciferina

Posição	RMN de ^1H de GL-1	RMN de ^{13}C de GL-1	Correlações HMBC (^1H - ^{13}C) ^b	RMN de ^1H da 3-hidroxi-nornuciferina	RMN de ^{13}C da 3-hidroxi-nornuciferina
1		148,5			149,9
1a		115,9			115,9
2		138,5			138,9
3		146,3			146,8
3a		118,2			118,3
3b		132,0			131,2
4	2,76 (1H, m)	23,2	42,4; 115,9	2,80 – 3,00 (1H, m)	22,7
5	2,96 – 3,43 (1H, m)	42,4	53,6	3,50 – 3,52 (1H, m)	42,0
6a	3,81 (1H, dd, J = 13,8; 4,7 Hz)	53,6		3,85 (1H, m)	53,5
7	2,84 (1H, dd, J = 13,8; 4,7 Hz)	36,9	53,6; 127,5; 132,0; 135,1	2,60 – 2,90 (1H, m)	36,4
7a		135,1			134,6
8	7,22 (1H, m)	127,5	126,7; 132,5	7,20 (1H, m)	127,8
9	7,16 (1H, ddd, J = 8,4; 7,2; 1,2 Hz)	126,2	127,1; 135,1	7,15 (1H, m)	126,6
10	7,27 (1H, m)	126,7	127,5; 132,5	7,28 (1H, m)	127,0
11	8,21 (1H, dd, J = 7,9; 1,2 Hz)	127,1	126,2; 135,1	8,20 (1H, dd, J = 7,5; 1,0 Hz)	127,3
11a		132,5			132,2
1-OCH₃	3,72 (3H, s)	60,0	148,5	3,69 (3H, s)	60,2
2-OCH₃	3,98 (3H, s)	60,8	138,5	3,69 (3H, s)	61,2

^aCosta, *et. al.*; 2012, ^bPrincipais correlações observadas no mapa de contronos HMBC

Tabela 36: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a mistura **GL-4** e dados de RMN de ^{13}C da literatura para a nornuciferina e anonaína

Posição	RMN de ^1H de GL-4A	RMN de ^{13}C de GL-4A	Nornuciferina ^a	RMN de ^1H de GL-4B	RMN de ^{13}C de GL-4B	Anonaína ^b
1		145,5	145,5		142,8	143,6
1a		126,7	126,7		116,7	115,9
2		152,5	152,7		147,1	148,4
3	6,65 (1H, s)	111,7	111,7	6,57 (1H, s)	107,9	108,4
3a		128,1	127,3		128,4	129,2
3b		126,8	126,3		126,7	128,9
4	2,63 – 3,52 (1H, m)	23,2	27,7	2,63 – 3,52 (1H, m)	28,3	25,6
5	2,63 – 3,52 (1H, m)	42,6	42,2	2,63 – 3,52 (1H, m)	42,6	41,0
6a	3,97 (1H, m)	53,4	53,1	3,97 (1H, m)	53,4	52,3
7	2,63 – 3,52 (1H, m)	36,6	36,1	2,63 – 3,52 (1H, m)	36,7	33,1
7a		135,4	135,1		134,6	133,2
8	7,23 (1H, m)	127,9	127,8	7,23 (1H, m)	127,6	128,3
9	7,23 (1H, m)	127,9	127,9	7,23 (1H, m)	127,6	128,3
10	7,33 (1H, m)	127,5	127,6	7,33 (1H, m)	127,2	125,4
11	8,39 (1H, d, J = 7,6 Hz)	128,7	128,4	8,07 (1H, d, J = 7,6 Hz)	127,2	127,4
11a		132,0	131,9		132,0	130,6
1-OCH₃	3,66 (3H, s)	60,3	60,2			
2-OCH₃	3,89 (3H, s)	55,9	55,9			
(1-2)-OCH₂O				6,09 (1H, d, J = 1,4 Hz) 5,94 (1H, d, J = 1,4 Hz)	100,7	102,0

^aDutra, *et. al.*; 2012, ^bHu, *et. al.*; 2010

Tabela 37: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância **GL-2** e dados de RMN de ^1H da literatura para a lisicamina

Posição	RMN de ^1H de GL-2	RMN de ^{13}C de GL-2	Correlação HMBC (^1H - ^{13}C) ^b	RMN de ^1H da lisicamina
1		152,1		
1a		119,9		
2		157,0		
3	7,22 (1H, s)	106,5	122,2; 123,6; 152,1; 157,0	7,20 (1H, sl)
3a		135,5		
3b		122,2		
4	7,79 (1H, d, J = 5,2 Hz)	123,6	106,5; 122,2	7,78 (1H, dl, J = 5,2 Hz)
5	8,91 (1H, d, J = 5,2 Hz)	145,1	123,6; 135,5; 145,5	8,88 (1H, d, J = 5,2 Hz)
6a		145,5		
7		182,7		
7a		132,2		
8	8,59 (1H, ddd, J = 7,9; 1,6; 0,5 Hz)	129,5	134,4; 182,7	8,56 (1H, dd, J = 7,9; 1,2 Hz)
9	7,57 (1H, ddd, J = 7,9; 7,2; 1,1 Hz)	128,8	128,4; 132,2	7,56 (1H, td, J = 7,9; 1,2 Hz)
10	7,75 (1H, ddd, J = 8,3; 7,2; 1,6 Hz)	134,4	129,5; 134,3	7,76 (1H, td, J = 7,9; 1,2 Hz)
11	9,18 (1H, ddd, J = 8,3; 1,1; 0,5 Hz)	128,4	119,9; 128,8; 132,2	9,16 (1H, dl, J = 7,9 Hz)
11a		134,3		
1-OCH₃	4,02 (3H, s)	60,6	152,1; 157,0	4,08 (3H, s)
2-OCH₃	4,10 (3H, s)	56,2	157,0	4,00 (3H, s)

^aSiqueira, *et. al.*; 1998, ^bPrincipais correlações observadas no mapa de contronos HMBC

Tabela 38: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância **GL-3** e dados de RMN de ^1H e de ^{13}C da literatura para a isomoscatolina

Posição	RMN de ^1H de GL-3	RMN de ^{13}C de GL-3	Correlações HMBC (^1H - ^{13}C) ^b	RMN de ^1H da isomoscatolina	RMN de ^{13}C da isomoscatolina
1		162,7			162,7
1a		103,6			102,7
2		143,8			144,0
3		165,3			166,0
3a		135,9			136,1
3b		124,8			124,7
4	8,59 (1H, d, J = 5,2 Hz)	123,7	124,8; 142,1; 165,3	8,60 (1H, d, J = 5,1 Hz)	124,0
5	8,72 (1H, d, J = 5,2 Hz)	142,1	123,7; 135,9; 145,2	8,73 (1H, d, J = 5,1 Hz)	141,9
6a		145,2			145,0
7		184,5			184,5
7a		130,7			130,6
8	8,43 (1H, ddd, J = 8,0; 1,6; 0,5 Hz)	128,9	135,0; 138,9; 184,5	8,41 (1H, ddd, J = 8,0; 1,6; 0,5 Hz)	128,8
9	7,34 (1H, ddd, 8,0; 7,0; 1,0 Hz)	125,6	127,6; 130,7	7,33 (1H, ddd, J = 8,0; 7,0; 1,0 Hz)	125,5
10	7,68 (1H, ddd, 8,6; 7,0; 1,6 Hz)	135,0	128,9; 138,9	7,68 (1H, ddd, J = 8,6; 7,0; 1,6 Hz)	135,1
11	9,10 (1H, ddd, J = 8,6; 1,0; 0,5 Hz)	127,6	103,6; 125,6; 130,7	9,08 (1H, ddd, J = 8,6; 1,0; 0,5 Hz)	127,3
11a		138,9			138,7
1-OCH₃	4,08 (3H, s)	61,0	162,7	4,08 (3H, s)	61,2
2-OCH₃	3,96 (3H, s)	60,4	143,8	3,97 (3H, s)	60,6

^aCosta, *et. al.*; 2011, ^bPrincipais correlações observadas no mapa de contronos HMBC

Tabela 39: Dados de RMN de ^1H e de ^{13}C para a substância **GF-1** e dados de RMN de ^1H da literatura para a liriodenina

Posição	RMN de ^1H de GF-1	RMN de ^{13}C de GF-1	Correlação HMBC (^1H - ^{13}C) ^b	RMN de ^1H da liriodenina
1		147,9		
1a		107,8		
2		151,8		
3	7,19 (1H, s)	103,3	123,2; 124,4; 147,9; 151,8	7,18 (1H, s)
3a		134,8		
3b		123,2		
4	7,78 (1H, d, J = 5,2 Hz)	124,4	103,3; 123,2	7,76 (1H, d, J = 5,3 Hz)
5	8,89 (1H, d, J = 5,2 Hz)	145,0	124,4; 134,8; 145,4	8,87 (1H, d, J = 5,3 Hz)
6a		145,4		
7		182,7		
7a		131,2		
8	8,59 (1H, dd, J = 7,9; 1,4 Hz)	128,9	133,1; 182,7	8,57 (1H, dl, J = 8,0 Hz)
9	7,58 (1H, ddd, J = 8,1; 7,9; 1,1 Hz)	128,5	127,5; 131,2	7,56 (1H, td, J = 7,8; 2,0 Hz)
10	7,76 (1H, m)	133,9	128,9; 133,1	7,73 (1H, td, J = 7,8; 2,0 Hz)
11	8,65 (1H, d, J = 8,1 Hz)	127,5	107,8; 128,5; 131,2	8,64 (1H, dl, J = 8,0 Hz)
11a		133,1		
(1-2)-OCH₂O	6,38 (2H, s)	102,7	147,9; 151,8	6,38 (2H, s)

^aSiqueira, *et. al.*; 1998, ^bPrincipais correlações observadas no mapa de contronos HMBC

Tabela 40: Dados de RMN de ^1H para a substância **GS-1** isolado de *G. sellowiana* e dados de RMN de ^1H da literatura para a O-metilmoscatolina

Posição	RMN de ^1H de GS-1	RMN de ^1H da O-metilmoscatolina
1		
1a		
2		
3		
3a		
3b		
4	8,22 (1H, sl)	8,20 (1H, d, J = 5,3 Hz)
5	8,97 (1H, sl)	8,95 (1H, d, J = 5,3 Hz)
6a		
7		
7a		
8	8,58 (1H, d, J = 8,0 Hz)	8,56 (1H, d, J = 8,0 Hz)
9	7,54 (1H, m)	7,53 (1H, m)
10	7,75 (1H, td, J = 8,0; 1,1 Hz)	7,73 (1H, m)
11	9,11 (1H, d, J = 8,0 Hz)	9,09 (1H, d, J = 8,0 Hz)
11a		
1-OCH ₃	4,10 (3H, s)	4,09 (3H, s)
2-OCH ₃	4,08 (3H, s)	4,00 (3H, s)
3-OCH ₃	4,19 (3H, s)	4,18 (3H, s)

^aSiqueira, *et. al.*; 2007