

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
Centro de Ciências da Natureza
Programa de Pós-Graduação em Química

Márcia Denise Alves Veras

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Ephedranthus*
pisocarpus R. E. Fries**

Dissertação de Mestrado

TERESINA-PI

2019

Márcia Denise Alves Veras

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Ephedranthus
pisocarpus* R. E. Fries**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestra em Química, área de concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Mariana Helena Chaves

**TERESINA-PI
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA
Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial do CCN

V474i Veras, Márcia Denise Alves.
Investigação química e potencial biológico de
Ephedranthus pisocarpus R. E. Fries / Márcia Denise Alves
Veras – Teresina, 2019.
145f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Piauí,
Centro de Ciências da Natureza, Pós-Graduação em
Química, 2019.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Mariana Helena Chaves

1. Química Orgânica. 2. *Ephedranthus pisocarpus*. 3.
Atividade Citotóxica. I. Título.

CDD 540

Bibliotecária: Caryne Maria da Silva Gomes / CRB 1461

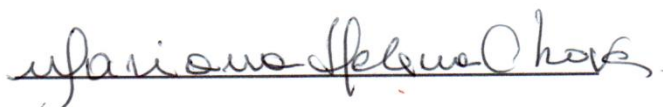
Márcia Denise Alves Veras

**INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL BIOLÓGICO DE *Ephedranthus
pisocarpus* R. E. Fries**

Dissertação de Mestrado submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestra em Química, na área de concentração de Química Orgânica.

Data da aprovação: 06/02/2019

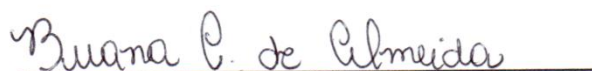
BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Mariana Helena Chaves
Universidade Federal do Piauí
(Orientadora e presidente)



Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó
Universidade Federal do Piauí – UFPI



Profa. Dra. Buana Carvalho de Almeida
Instituto Federal do Piauí - IFPI

TERESINA-PI

2019

Dedico este trabalho aos meus pais, Maria de Jesus Alves Veras e Raimundo Nonato Veras e a minha irmã Marília Alves Veras pelo amor, carinho, paciência, compreensão e incentivo.

“Suba o primeiro degrau com fé. Não é necessário que você veja toda a escada, apenas dê o primeiro passo.”

(Martin Luther King)

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita.”

(Mahatma Gandhi)

“Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim.”

(Chico Xavier)

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua presença em minha vida, pela força, pois sem ele nada seria possível.

Aos meus pais Maria de Jesus Alves Veras e Raimundo Nonato Veras pelo amor dedicado, pelas orações, confiança e compreensão.

A minha irmã e amiga Marília Alves Veras, por suas palavras de incentivo e sua colaboração na construção deste trabalho.

Aos meus avós, tios, primos e a todos os meus familiares pelo carinho constante, ajuda e por sempre acreditarem em mim.

A tia Luíza (minha professora da 1ª série) por fazer parte da minha vida e que desde o início da minha jornada escolar, acreditou em meu potencial enquanto aluna, motivando-me a nunca desistir e realizar meus objetivos.

À Profa. Dra. Mariana Helena Chaves pela orientação, oportunidade, amizade, paciência e pelos valiosos conhecimentos transmitidos ao longo da Iniciação Científica e Mestrado.

Aos amigos do Laboratório de Produtos Naturais (LPN), Jéssica, Armênio, Isabella, Adonias, Lucivânia, Jaelson, Evaldo, Renato, Leonardo, Elcilene, Luanda, Lildes, João Paulo, Jurema, Andréia, Rodrigo Araújo, Rodrigo Santiago, Mariane, Joshua, Erika e Luís Paulo pela amizade e ótima convivência.

Aos colegas do mestrado, especialmente, Maria das Dores, Expedito, Mikael e Rafael pelo apoio e amizade.

À equipe de limpeza, em especial a Dona Domingas e Josélia pela amizade e por sempre manterem nosso ambiente de trabalho (laboratório) limpo e organizado facilitando o desenvolvimento das pesquisas.

À Universidade Federal do Piauí por me acolher durante todos esses anos e pela oportunidade de formação.

A CAPES pela bolsa concedida e ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Biodiversidade e Produtos Naturais (INCT-BioNat) e CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Prof. Dr. Gerardo Magela Vieira Júnior, Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e Profa. Dra. Sâmya Danielle Lima de Freitas (suplente)

por aceitarem o convite para fazerem parte da minha banca de qualificação e por toda colaboração.

À Profa. Dra. Antônia Maria das Graças Lopes Citó e a Profa. Dra. Buana Carvalho de Almeida por aceitarem o convite para fazerem parte da minha banca de dissertação e pelas inúmeras contribuições.

Ao Prof. Dr. Edivan Carvalho Vieira, pela oportunidade de participar do projeto das Olimpíadas de Química durante a graduação.

À Profa. Dra. Ruth Raquel Soares de Farias pesquisadora do Programa de Biodiversidade do Trópico Ecotonal do Nordeste (BioTEN-UFPI) pela disposição na coleta e identificação da espécie em estudo.

A Profa. Dra. Mônica Regina Silva de Araújo (Universidade da Integração Internacional da Lusofônia Afro-Brasileira/Acarape-Ceará), ao Prof. Dr. Alexandre Araújo de Souza do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear (LAUREMN-UFPI) e ao Núcleo de Biensaios, Biossíntese e Ecofisiologia de Produtos Naturais-NuBBE da UNESP/Araraquara pela realização das análises de RMN.

Aos professores Dr. Sidney Gonçalo de Lima e Dr. Bruno Quirino Araújo do Laboratório de Geoquímica Orgânica (LAGO-UFPI) pela realização das análises de CG-EM.

Ao Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM-UFPI) pela realização da atividade citotóxica.

Ao Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho do Laboratório de Atividade Antileishmania (UFPI) pela realização da atividade antileishmania.

Enfim, agradeço a todos aqueles que de alguma maneira, direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho e estiveram comigo ao longo dessa trajetória. Muito obrigada!

RESUMO

VERAS, M. D. A. (2019). Investigação química e potencial biológico de *Ephedranthus pisocarpus* R. E. Fries. Teresina. 145p. Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal do Piauí.

Ephedranthus pisocarpus R. E. Fries (Annonaceae) é conhecida como envira de cocho ou conduru. Este trabalho relata os constituintes químicos isolados e identificados no extrato etanólico das folhas de *E. pisocarpus*, a análise por ESI-ITMS da fração acetato de etila e a investigação das atividades biológicas do extrato etanólico e frações. O estudo fitoquímico das frações hexano e diclorometano da partição do extrato etanólico das folhas de *E. pisocarpus* resultou no isolamento do óxido de cariofileno (**1**), espatulenol (**2**), uma mistura contendo dois sesquiterpenoides: 4 α ,10 β -aromadendranodiol (**3**) e 1 α -hidróxi-espatulenol (**4**), T-muurolol (**5**), 1 β ,6 α -di-hidróxi-4(15)-eudesmeno (**6**), 24-metilenocicloartanol (**7**), 24-metilenocicloartano-3 β ,21-diol (**8**) e uma mistura dos esteroides: colesterol (**9**), campesterol (**10**), campestanol (**11**), estigmasterol (**12**), Δ^{22} -estigmasterol (**13**), sitosterol (**14**) e sitostanol (**15**). As estruturas dos compostos isolados foram identificadas por RMN ^1H e ^{13}C , CG-EM e por comparação com dados da literatura. Na fração acetato de etila foram identificados cinco compostos por ESI-ITMS: ácido quínico (**16**, m/z 191) vitexina (**17**, m/z 431), sulfoquinovosilmonoacilglicerol (**18**, m/z 555), canferol-3-O-rutinosídeo (**19**, m/z 593) e rutina (**20**, m/z 609). Na avaliação da atividade antioxidante pelo método com o DPPH, a fração acetato de etila apresentou percentual de atividade antioxidante de 22,55% na maior concentração testada (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), correlacionando com o maior teor de fenóis totais (155,22 \pm 3,04 EAG g^{-1} amostra). O extrato etanólico e frações apresentaram atividade fotoprotetora, sendo as frações acetato de etila (FPS 3,90) e aquosa (FPS 3,85) as mais ativas. No ensaio de citotoxicidade frente à linhagem B16-F10 o extrato EtOH e frações hexano, diclorometano e acetato de etila apresentaram considerável redução da viabilidade celular, sendo a fração diclorometano a mais ativa. O extrato etanólico apresentou moderada atividade antileishmania com CI_{50} de 82,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As frações hexano (CI_{50} = 45,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e diclorometano (CI_{50} = 23,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram as mais ativas frente as promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Este é o primeiro relato de investigação destas atividades biológicas em *E. pisocarpus*, bem como da ocorrência de todos esses metabólitos no gênero *Ephedranthus* e dos compostos **4** e **18** na família Annonaceae.

Palavras-chave: *Ephedranthus pisocarpus*. Isoprenoides. Polifenóis. Atividade citotóxica. Atividade antileishmania.

ABSTRACT

VERAS, M. D. A. (2019). Chemical research and biological potential of *Ephedranthus pisocarpus* R. E. Fries. Teresina. 145p. Master's thesis-Post Graduate Programme in Chemistry. Federal University of Piauí.

Ephedranthus pisocarpus R. E. Fries (Annonaceae) is known as envira de cocho or conduru. This work reports the chemical constituents isolated and identified in the ethanolic extract of the leaves of *E. pisocarpus*, the analysis by ESI-ITMS of the ethyl acetate fraction and the investigation of the biological activities of the ethanolic extract and fractions. The phytochemical study of the hexane and dichloromethane fractions of the ethanolic extract of *E. pisocarpus* leaves resulted in the isolation of caryophyllene oxide (**1**), spathulenol (**2**), a mixture containing two sesquiterpenoids: aromadendrane-4 α , 10 β -diol (**3**) and 1 α -hidroxy-spathulenol (**4**), T-muurolol (**5**), 1 β ,6 α -di-hydroxy-4(15)-eudesmene (**6**), 24-methylenecycloartanol (**7**), 24-methylenecycloartane-3 β ,21-diol (**8**) and a mixture of steroids: cholesterol (**9**), campesterol (**10**), campestanol (**11**), stigmasterol (**12**), Δ^{22} -stigmastenol(**13**), sitosterol (**14**) and sitostanol (**15**). Structures of the isolated compounds were identified by ^1H and ^{13}C NMR, GC-MS and by comparison to the literature. In the ethyl acetate fraction five compounds were identified by ESI-ITMS: quinic acid (**16**, m/z 191), vitexin (**17**, m/z 431), sulfoquinovosylmonoacylglycerol (**18**, m/z 555), kaempferol-3-O-rutinoside (**19**, m/z 593) and rutin (**20**, m/z 609). In the evaluation of the antioxidant activity by the DPPH method, the ethyl acetate fraction presented a percentage of antioxidant activity of 22.55% in the highest concentration tested (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), correlating with the highest total phenol content (155.22 \pm 3.04 EAG g-1 sample). The ethanolic extract and fractions showed photoprotective activity, with the ethyl acetate (SPF 3,90) and aqueous (SPF 3,85) fractions being the most active. In the cytotoxicity assay against the B16-F10 line the EtOH extract and hexane, dichloromethane and ethyl acetate fractions showed a considerable reduction of cell viability, with the dichloromethane fraction being the most active. The ethanolic extract presented moderate antileishmanial activity with an IC_{50} of 82.0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. The hexane (IC_{50} = 45.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and dichloromethane (IC_{50} = 23.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fractions were the most active against *Leishmania amazonensis* promastigotes. This is the first report of investigation of these biological activities in *E. pisocarpus*, as well as the occurrence of all these metabolites in the genus *Ephedranthus* and of compounds **4** and **18** in the Annonaceae family.

Keywords: *Ephedranthus pisocarpus*. Isoprenoids. Polyphenols. Cytotoxic activity. Antileishmanial activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Biossíntese do difosfato de farnesila (FPP)	7
Figura 2- Esqueletos hidrocarbônicos de sesquiterpenoides de Annonaceae ...	8
Figura 3- Fórmulas estruturais dos sesquiterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae.....	20
Figura 4- Biossíntese do esqualeno e óxido de esqualeno	25
Figura 5- Esqueletos hidrocarbônicos de alguns triterpenoides.....	26
Figura 6- Fórmulas estruturais dos triterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae.....	33
Figura 7- Espectro de RMN ¹ H do composto 1 (CDCl ₃ , 400 MHz).....	59
Figura 8- Espectro de RMN ¹³ C do composto 1 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	60
Figura 9- DEPT 135° do composto 1 (CDCl ₃ , 100 MHz)	61
Figura 10- DEPT 90° do composto 1 (CDCl ₃ , 100 MHz)	61
Figura 11- Espectro de RMN ¹ H do composto 2 (CDCl ₃ , 400 MHz)	64
Figura 12- Espectro de RMN ¹³ C do composto 2 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	65
Figura 13- DEPT 135° do composto 2 (CDCl ₃ , 100 MHz)	66
Figura 14- DEPT 90° do composto 2 (CDCl ₃ , 100 MHz)	66
Figura 15- Espectro de RMN ¹ H dos compostos 3+4 (CDCl ₃ , 400 MHz)	70
Figura 16- Espectro de RMN ¹³ C dos compostos 3+4 (CDCl ₃ , 100 MHz)	71
Figura 17- Expansão (δ 0-90) do espectro de RMN ¹³ C dos compostos 3+4 (CDCl ₃ , 100 MHz)	72
Figura 18- DEPT 135° dos compostos 3+4 (CDCl ₃ , 100 MHz)	73
Figura 19- Expansão (δ 0-60) do DEPT 135° dos compostos 3+4 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	74

Figura 20- DEPT 90° dos compostos 3+4 (CDCl ₃ , 100 MHz)	74
Figura 21- Espectro de RMN ¹ H do composto 5 (CDCl ₃ , 400 MHz)	77
Figura 22- Espectro de RMN ¹³ C do composto 5 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	78
Figura 23- DEPT 135° do composto 5 (CDCl ₃ , 100 MHz)	79
Figura 24- DEPT 90° do composto 5 (CDCl ₃ , 100 MHz)	79
Figura 25- Espectro de RMN ¹ H do composto 6 (CDCl ₃ , 400 MHz)	82
Figura 26- Espectro de RMN ¹³ C do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	83
Figura 27- DEPT 135° do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz)	84
Figura 28- DEPT 90° do composto 6 (CDCl ₃ , 100 MHz)	84
Figura 29- Espectro de RMN ¹ H do composto 7 (CDCl ₃ , 400 MHz)	87
Figura 30- Espectro de RMN ¹³ C do composto 7 (CDCl ₃ , 100 MHz).....	88
Figura 31- DEPT 135° do composto 7 (CDCl ₃ , 100 MHz)	89
Figura 32- DEPT 90° do composto 7 (CDCl ₃ , 100 MHz)	89
Figura 33- Espectro de RMN ¹ H do composto 8 (CDCl ₃ , 600 MHz)	92
Figura 34- Espectro de RMN ¹³ C do composto 8 (CDCl ₃ , 150 MHz).....	93
Figura 35- DEPT 135° do composto 8 (CDCl ₃ , 150 MHz)	94
Figura 36- Espectro de RMN ¹ H dos compostos 12+14 (CDCl ₃ , 400 MHz)	97
Figura 37- Espectro de RMN ¹³ C dos compostos 12+14 (CDCl ₃ , 100 MHz)	98
Figura 38- DEPT 135° dos compostos 12+14 (CDCl ₃ , 100 MHz)	99
Figura 39- DEPT 90° dos compostos 12+14 (CDCl ₃ , 100 MHz)	99
Figura 40- Cromatograma de íons totais dos derivados sililados dos esteroides 9-15	101
Figura 41- Espectro de massas do derivado sililado de 9 (colesterolTMS)- M ⁺⁺ 458	101

Figura 42- Espectro de massas do derivado sililado de 10 (campesterolTMS)- M ⁺ : 472	101
Figura 43- Espectro de massas do derivado sililado de 11 (campestanolTMS)- M ⁺ : 474	102
Figura 44- Espectro de massas do derivado sililado de 12 (estigmasterolTMS)- M ⁺ : 474	102
Figura 45- Espectro de massas do derivado sililado de 13 (stigmasterol- Δ^{22} TMS)- M ⁺ : 486	102
Figura 46- Espectro de massas do derivado sililado de 14 (sitosterolTMS)- M ⁺ 486	103
Figura 47- Espectro de massas do derivado sililado de 15 (sitostanolTMS)- M ⁺ 488	103
Figura 48- <i>Fingerprint</i> da fração AcOEt das folhas de <i>E. pisocarpus</i> obtido por ESI-ITMS.....	104
Figura 49- Estrutura dos constituintes químicos identificados na fração AcOEt das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	104
Figura 50- MS ² do pico <i>m/z</i> 191 (ácido quínico, 16).....	105
Figura 51- Proposta de fragmentação para o ácido quínico (16)	105
Figura 52- MS ² do pico <i>m/z</i> 431 (vitexina, 17).....	106
Figura 53- Proposta de fragmentação para a vitexina (17)	106
Figura 54- MS ² do pico <i>m/z</i> 555 (sulfoquinovosilmonoacilglicerol (16:0), 18)	107
Figura 55- Proposta de fragmentação para o sulfoquinovosilmonoacilglicerol (16:0) (18).....	108
Figura 56- MS ² do pico <i>m/z</i> 593 (canferol-3-O-rutinosídeo, 19).....	109
Figura 57- Proposta de fragmentação para o canferol-3-O-rutinosídeo (19)..	109
Figura 58- MS ² do pico <i>m/z</i> 609 (rutina, 20)	110
Figura 59- Proposta de fragmentação para a rutina (20)	110

Figura 60- Estabilização do radical livre DPPH por uma espécie antioxidante (AH).....	113
Figura 61- Percentual de atividade antioxidante do extrato etanólico e frações hexano, diclorometano (CH ₂ Cl ₂), acetato de etila (AcOEt) e aquosa das folhas de <i>E. pisocarpus</i> e dos controles positivos rutina e BHT. Tempo de reação com DPPH: 30min.....	114
Figura 62- Reação de redução do molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu pelo ácido gálico.....	116
Figura 63- Reação de redução do MTT a cristais de formazano.....	120
Figura 64- Efeito citotóxico do extrato EtOH (a) e frações hexano (b), diclorometano (c), acetato de etila (d) e aquosa (e) das folhas de <i>E. pisocarpus</i> em células B16-F10 (melanoma murino) após 48 horas. Controle negativo: células em meio RPMI	122
Figura 65- Reação de redução da resazurina a resofurina	124
Figura 66- Atividade antileishmania <i>in vitro</i> do extrato EtOH (a) e frações hexano (b), diclorometano (c), acetato de etila (d) e aquosa (e) das folhas de <i>E. pisocarpus</i> frente as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	125

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Massa e rendimento do extrato etanólico e frações das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	39
Tabela 2- Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em gel de sílica da fração hexano das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	42
Tabela 3- Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em gel de sílica da fração diclorometano das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	47
Tabela 4- Função normalizada do produto utilizado no cálculo do FPS.....	53
Tabela 5- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto 1 (400 e 100 MHz, δ/ppm , J/Hz , CDCl_3)	58
Tabela 6- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto 2 (400 e 100 MHz, δ/ppm , J/Hz , CDCl_3)	63
Tabela 7- Dados de RMN ^{13}C dos compostos 3+4 (100 MHz, CDCl_3)	69
Tabela 8- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto 5 (400 e 100 MHz, δ/ppm , J/Hz , CDCl_3)	76
Tabela 9- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto 6 (400 e 100 MHz, δ/ppm , J/Hz , CDCl_3)	81
Tabela 10- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto 7 (400 e 100 MHz, δ/ppm , J/Hz , CDCl_3)	86
Tabela 11- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto 8 (600 e 150 MHz, δ/ppm , J/Hz , CDCl_3)	91
Tabela 12- Dados de RMN ^{13}C dos compostos 12+14 (100 MHz, CDCl_3)	96
Tabela 13- Derivados sililados dos esteroides (9–15) identificados na fração HE32-8 das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	100
Tabela 14- Compostos identificados por ESI–ITMS na fração AcOEt das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	111

Tabela 15- Percentual de atividade antioxidante (%AA) do extrato etanólico e frações das folhas de <i>E. pisocarpus</i> e dos padrões rutina e BHT	115
Tabela 16- Teores de fenóis totais do extrato etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	117
Tabela 17- Fator de proteção solar (FPS) <i>in vitro</i> do extrato etanólico e frações das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	119
Tabela 18- Valores de CI_{50} do extrato etanólico e frações das folhas de <i>E. pisocarpus</i> no ensaio de atividade antileishmania	126

LISTA DE QUADROS E ESQUEMAS

Esquema 1- Biossíntese dos terpenóides a partir do difosfato de isopentenila (IPP) e fosfato de dimetilalila (DMAPP)	6
Esquema 2- Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	40
Esquema 3- Obtenção e fracionamento cromatográficos dos grupos HE13, HE22, HE25, HE32 e HE66 provenientes da fração hexano das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	46
Esquema 4- Obtenção e fracionamento cromatográfico dos grupos DM6, DM20 e DM22 provenientes da fração diclorometano das folhas <i>E. pisocarpus</i>	49
Quadro 1- Atividades biológicas relatadas para sesquiterpenoides isolados de espécies de Annonaceae	10
Quadro 2- Sesquiterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae..	12
Quadro 3- Triterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- ✓ λ - comprimento de onda
- ✓ δ_H - deslocamento químico do hidrogênio
- ✓ δ_C - deslocamento químico do carbono-13
- ✓ %AA - porcentagem de atividade antioxidante
- ✓ AA – atividade antioxidante
- ✓ Abs – absorvância
- ✓ AcOEt – acetato de etila
- ✓ ANOVA – análise de variância
- ✓ BHT – butil-hidroxi-tolueno
- ✓ BSTFA - *N*-O-bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida
- ✓ B16-F10 - melanoma murino
- ✓ CC – cromatografia em coluna
- ✓ CCD - cromatografia em camada delgada
- ✓ CCDC - cromatografia em camada delgada comparativa
- ✓ CE_{50} – concentração eficiente necessária para reduzir a concentração inicial em 50%
- ✓ CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
- ✓ CI_{50} – concentração inibitória média
- ✓ DBO – demanda bioquímica de oxigênio
- ✓ DMAPP – difosfato de dimetilalila
- ✓ DP – desvio padrão
- ✓ DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- ✓ %DPPHrem – percentual de DPPH remanescente
- ✓ DEPT - *Distortionless enhancement by polarization transfer*
- ✓ EE – espectro do efeito eritemal
- ✓ EAG - equivalente de ácido gálico
- ✓ ESI-ITMS – *Eletrospray ionization ion trap mass spectrometry*
- ✓ EtOH – etanol
- ✓ FC – fator de correção
- ✓ FPP – difosfato de farnesila

- ✓ FPS - fator de proteção solar
- ✓ FT - fenóis totais
- ✓ GPP – difosfato de geranila
- ✓ IPP – difosfato de isopentenila
- ✓ J - constante de acoplamento
- ✓ MeOH – metanol
- ✓ MEP – fosfato de metileritritol
- ✓ MTT - brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (sal de tetrazólio)
- ✓ MVA – ácido mevalônico
- ✓ r - coeficiente de correlação linear
- ✓ R_f - fator de retenção
- ✓ RMN – ressonância magnética nuclear
- ✓ RMN ^1H - ressonância magnética nuclear de hidrogênio
- ✓ RMN ^{13}C - ressonância magnética nuclear de carbono-13
- ✓ SBF – soro bovino fetal
- ✓ SPF- *Sun protection factors*
- ✓ SQMG - sulfoquinovosilmonoacilglicerol
- ✓ TMS – tetrametilsilano
- ✓ T_r - tempo de retenção
- ✓ UV-Vis - ultravioleta visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo geral	3
2.2 Objetivos específicos	3
3 REVISÃO DA LITERATURA	4
3.1 Família Annonaceae	4
3.2 Gênero <i>Ephedranthus</i>	5
3.3 Terpenoides	5
3.3.1 Sesquiterpenoides	7
3.3.1.1 Revisão bibliográfica dos sesquiterpenoides da família Annonaceae e suas atividades biológicas	8
3.3.2 Triterpenoides	24
3.3.2.1 Revisão bibliográfica dos triterpenoides da família Annonaceae e suas atividades biológicas	26
3.4 <i>Ephedranthus pisocarpus</i> R. E. Fries	35
4 PARTE EXPERIMENTAL	36
4.1 Reagentes e solventes	36
4.2 Equipamentos	36
4.2.1 Espectroscopia de absorção molecular	37
4.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	37
4.2.3 Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	37
4.2.4 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray com analisador tipo armadilha de íons (ESI-ITMS)	38
4.3 Material vegetal	38
4.4 Obtenção e extração líquido-líquido do extrato etanólico	38
4.5 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) das frações obtidas da extração líquido-líquido do extrato etanólico	41

4.6 Fracionamento cromatográfico da fração hexano	41
4.6.1 Fracionamento do grupo HE13	42
4.6.2 Fracionamento do grupo HE22	43
4.6.3 Fracionamento do grupo HE25	43
4.6.4 Fracionamento do grupo HE32	44
4.6.5 Fracionamento do grupo HE66	45
4.7 Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano	47
4.7.1 Fracionamento do grupo DM6.....	48
4.7.2 Fracionamento do grupo DM20.....	48
4.7.3 Fracionamento do grupo DM22.....	48
4.8 Grupos adicionais obtidos nos fracionamentos cromatográficos das frações hexano e diclorometano das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	49
4.9 Análise da fração acetato de etila das folhas de <i>Ephedranthus pisocarpus</i> por ESI-ITMS.....	50
4.10 Avaliação do potencial biológico do extrato e frações das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	50
4.10.1 Atividade antioxidante	50
4.10.2 Determinação do teor de fenóis totais (FT)	52
4.10.3 Atividade fotoprotetora	52
4.10.4 Atividade citotóxica.....	53
4.10.5 Atividade antileishmania.....	54
4.11 Análise estatística	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 Estruturas dos compostos isolados e/ou identificados nas folhas de <i>E. pisocarpus</i>	56
5.2 Identificação estrutural dos compostos isolados das folhas de <i>Ephedranthus</i>	

<i>pisocarpus</i>	57
5.2.1 Identificação estrutural do composto 1	57
5.2.2 Identificação estrutural do composto 2	62
5.2.3 Identificação estrutural dos compostos 3+4	67
5.2.4 Identificação estrutural do composto 5	75
5.2.5 Identificação estrutural do composto 6	80
5.2.6 Identificação estrutural do composto 7	85
5.2.7 Identificação estrutural do composto 8	90
5.2.8 Identificação estrutural dos compostos 12+14	95
5.3 Constituintes identificados na fração acetato de etila das folhas de <i>E. pisocarpus</i> por ESI-ITMS	103
5.4 Avaliação do potencial biológico do extrato e frações das folhas de <i>E. pisocarpus</i>	112
5.4.1 Atividade antioxidante	112
5.4.2 Determinação do teor de fenóis totais (FT)	116
5.4.3 Atividade fotoprotetora	118
5.4.4 Atividade citotóxica.....	120
5.4.5 Atividade antileishmania.....	123
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	127
REFERÊNCIAS	129

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais há muitos anos são utilizados pelo homem como recursos terapêuticos. O uso de ervas e folhas para prevenção, tratamento e cura de doenças provavelmente tenham sido as primeiras maneiras de utilização dos produtos naturais (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). O conhecimento tradicional sobre a aplicação de plantas para fins medicinais é amplo e em muitos casos, é a única alternativa disponível para comunidades de determinadas regiões, principalmente em países subdesenvolvidos (RODRIGUES et al., 2015).

As espécies vegetais usadas na medicina tradicional podem ser empregadas no tratamento de diversas enfermidades, tais como, doenças circulatórias, digestivas, respiratórias e neurológicas. Essas plantas são utilizadas nas formas de infusões, xaropes e banhos (RODRIGUES et al., 2015). Algumas destas espécies com indicação popular tiveram suas propriedades farmacológicas comprovadas, dentre elas se destacam, o alecrim (*Rosmarinus officinalis*; Lamiaceae) usado para tosse, bronquite e dor de dente; mastrus (*Chenopodium ambrosioides*; Chenopodiaceae) indicado para tosse, coqueluche, verminose e luxações; erva-cidreira (*Lippia alba*; Verbenaceae) que apresenta propriedades antitérmica, anti-inflamatória e sedativa, e hortelã (*Mentha piperita*; Lamiaceae), que tem ação analgésica, antiviral, anti-inflamatória e expectorante (CARTAXO et al., 2010; FÉLIX-SILVA et al., 2012; GOIS et al., 2016).

As pesquisas na área de produtos naturais têm se intensificado em especial pela busca de novos fármacos capazes de tratar doenças, como câncer (HERMAWAN; PUTRI, 2018; CAO et al., 2019), diabetes (ZHANG et al., 2018), leishmaniose (ARRUDA et al., 2009), malária (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006), dentre outras. O estudo de plantas medicinais tem resultado no isolamento de diversos metabólitos ativos que possibilitam a obtenção de novos fármacos como, os alcaloides vimblastina e vincristina, obtidos da espécie *Catharanthus roseus* (Apocynaceae), utilizados no tratamento de câncer. Outro exemplo de molécula bioativa de origem vegetal é a artemisinina, uma lactona sesquiterpênica, obtida da espécie *Artemisia annua*

(Asteraceae), empregada no tratamento de malária (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Nos últimos anos as plantas de uso tradicional têm despertado o interesse de grupos de pesquisa em todo o mundo, tendo o Brasil nesse caso um grande destaque por apresentar uma flora bastante diversificada. O estudo dos produtos naturais é de fundamental importância para análise da composição química, atividades biológicas e do potencial toxicológico, pois permite que essas substâncias sejam utilizadas futuramente na produção de fármacos e fitoterápicos (RITTER et al., 2002).

Nesse contexto, buscando contribuir para o conhecimento do potencial de plantas do cerrado piauiense, a espécie *Ephedranthus pisocarpus* (Annonaceae) foi selecionada para investigação química e farmacológica, incluindo a avaliação das atividades antioxidante, fotoprotetora, citotóxica e antileishmania. A escolha dessa planta foi em função da carência de estudos químico e/ou biológico com esta espécie, bem como a riqueza de constituintes químicos e as inúmeras atividades farmacológicas relatados em plantas da família Annonaceae.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química e o potencial biológico das folhas de *Ephedranthus pisocarpus* R. E. Fries (Annonaceae)

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Preparar o extrato etanólico das folhas da espécie *Ephedranthus pisocarpus*
- ✓ Submeter o extrato etanólico a extração líquido-líquido com solventes de diferentes polaridades
- ✓ Isolar por métodos cromatográficos convencionais e identificar espectroscopicamente (RMN ^1H e ^{13}C) as fórmulas estruturais de constituintes químicos das frações hexano e diclorometano
- ✓ Identificar os principais constituintes da fração acetato de etila por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e inserção direta em espectrômetro de massas com analisador tipo armadilha de íons (ESI-ITMS)
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante pelo método com o radical livre DPPH e o potencial fotoprotetor do extrato etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa das folhas de *E. pisocarpus*
- ✓ Determinar o teor de fenóis totais do extrato etanólico e frações
- ✓ Investigar as atividades antileishmania frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e citotóxica em linhagem B16-F10 do extrato etanólico e frações

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae é constituída por mais de 135 gêneros com aproximadamente 2500 espécies (CHATROU et al., 2012), distribuídas nos continentes africano, asiático e americano, regiões com predominância de clima tropical e subtropical (LEBOEUF et al., 1982). No Brasil, ocorrem aproximadamente 260 espécies que estão distribuídas em 26 gêneros. Estas plantas podem ser encontradas em diferentes habitats, como florestas, cerrado e caatinga (MAAS, 2007).

Muitas espécies da família Annonaceae são frutíferas e apresentam grande importância econômica, principalmente na indústria alimentícia para produção de sucos e sorvetes. Algumas das espécies mais cultivadas e comercializadas no Brasil pertencem aos gêneros *Annona* e *Rollinia*, dentre elas: *Annona cherimolia* (cherimoia), *Annona squamosa* (ata, fruta do conde ou pinha), *Annona muricata* (graviola) e *Rollinia mucosa* (biribá) (OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2014).

Espécies dessa família são comumente utilizadas na medicina tradicional, principalmente para o tratamento de doenças de pele, resfriados, problemas gástricos, dores de cabeça e inflamações, por exemplo, *Annona tenuiflora*, *Xylopiá frutescens* e *Annona muricata* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; AMINIMOGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI; WIART, 2011).

Estudos farmacológicos realizados com espécies da família Annonaceae têm relatado as atividades: larvicida de *Annona muricata*, antinociceptiva de *Duguetia lanceolata*, citotóxica de *Annona vepretorum*, anti-inflamatória e antimicrobiana de *Xylopiá parviflora* antitripanossômica e antifúngica de *Porcelia macrocarpa* (LUNA et al., 2005; SOUSA et al., 2004; DUTRA et al., 2014; WOGUEM et al., 2014; LAGO et al., 2007; LONDERO et al., 2018).

As espécies pertencentes à família Annonaceae apresentam várias classes de metabólitos secundários, como alcalóides, principalmente isoquinolínicos, benziltetraisoquinolínicos, protoberberínicos e aporfínicos, polifenóis, acetogeninas, esteroides e terpenoides, especialmente

monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (LEBOEUF et al., 1982; DERBRÉ et al., 2008; MOREIRA et al., 2007).

3.2 Gênero *Ephedranthus*

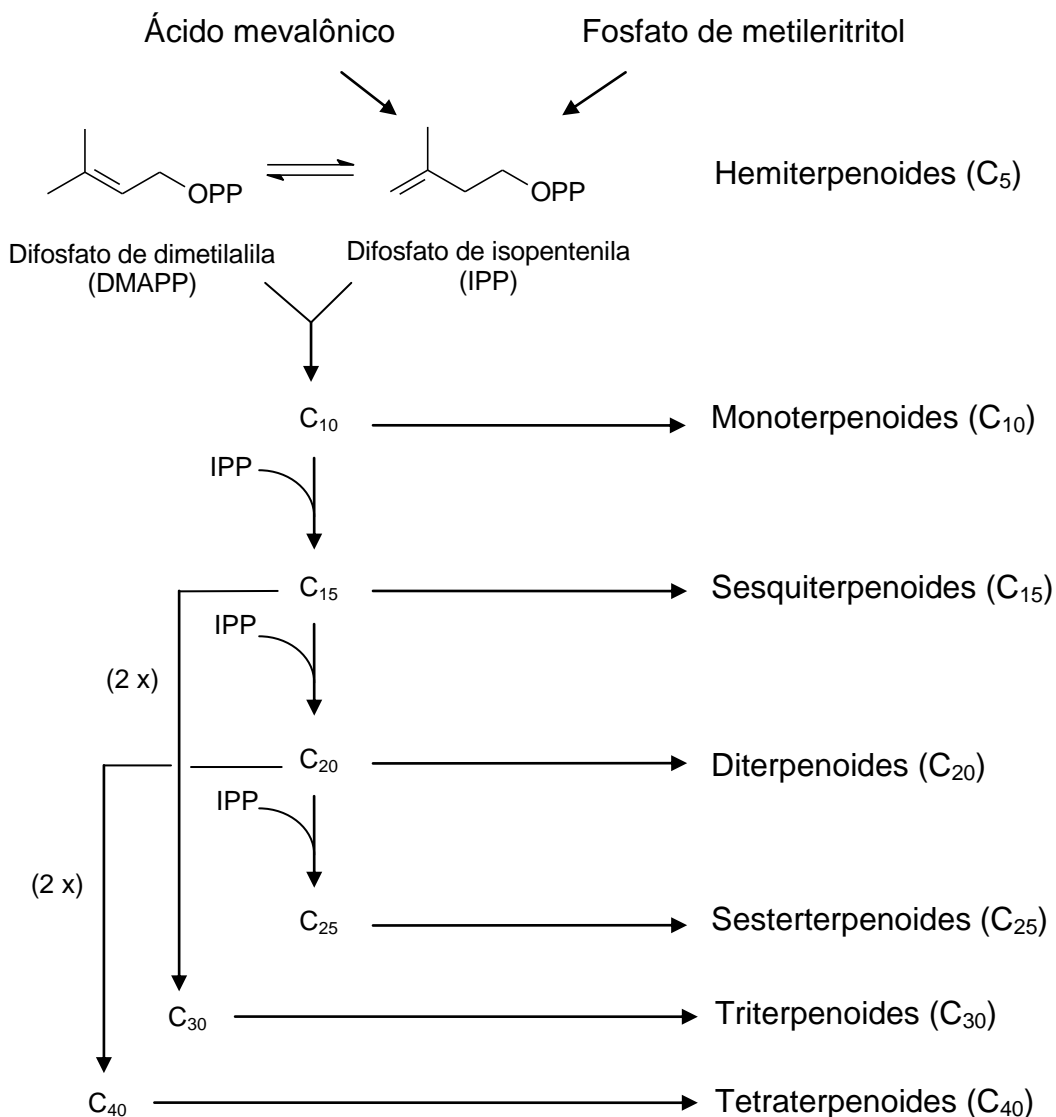
O gênero *Ephedranthus* é exclusivamente sulamericano e no Brasil pode ser encontrado nas regiões Norte (Acre, Amazonas, Pará, Rondônia e Tocantins) Nordeste (Maranhão, Ceará e Piauí) e Centro-Oeste (Mato Grosso). Este gênero é constituído por cinco espécies: *E. amazonicus*, *E. columbianus*, *E. guianensis*, *E. parviflorus* e *E. pisocarpus* (OLIVEIRA; SALES, 1999).

Pesquisas realizadas na literatura demonstraram uma carência de estudos com o gênero *Ephedranthus*, sendo encontrados apenas dois relatos sobre a espécie *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries, no qual o primeiro estudo, realizado por Alencar (2010), descreve a atividade antioxidante dos alcalóides oxoaporfínicos isolados das folhas e galhos de *E. amazonicus* pelo método ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*). Outro estudo relata a composição química do óleo essencial das folhas de *E. amazonicus* que tem como constituintes majoritários os ésteres, (*E*)-cinamato de metila (85,6%) e (*Z*)-cinamato de metila (7,4%) (ANDRADE; OLIVEIRA; MAIA, 2007).

3.3 Terpenoides

Os terpenoides constituem uma classe de metabólitos secundários formados pela condensação das unidades de isopreno ativadas, difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP) (DEWICK, 2009). As unidades de IPP e DMAPP podem ser biossintetizadas por meio de duas rotas biossintéticas, a do ácido mevalônico (MVA) e a do fosfato de metileritritol (MEP). Os terpenoides de acordo com o número de unidades isoprênicas (C_5)_n que compõem seu esqueleto carbônico podem ser classificados em: hemiterpenoides (C_5), monoterpenoides (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}), sesterterpenoides (C_{25}), triterpenoides (C_{30}) e tetraterpenoides (C_{40}), conforme demonstrado no Esquema 1.

Esquema 1- Biossíntese dos terpenoides a partir do difosfato de isopentenila (IPP) e difosfato de dimetilalila (DMAPP)



Nos animais a biossíntese do IPP/DMAPP ocorre somente a partir do ácido mevalônico. Entretanto, nas plantas a biossíntese do IPP/DMAPP pode ocorrer por meio das duas rotas: a rota do fosfato de metileritritol (MEP), responsável pela biossíntese de monoterpênicos, diterpenoides, sesterterpenoides, tetraterpenoides e alguns sesquiterpenoides, e a rota do ácido mevalônico (MVA) envolvida na formação de triterpenoides e alguns sesquiterpenoides (KIRBY; KEASLING, 2009).

No estudo fitoquímico com a espécie *Ephedranthus pisocarpus* (Annonaceae) foram isolados e identificados principalmente sesquiterpenoides

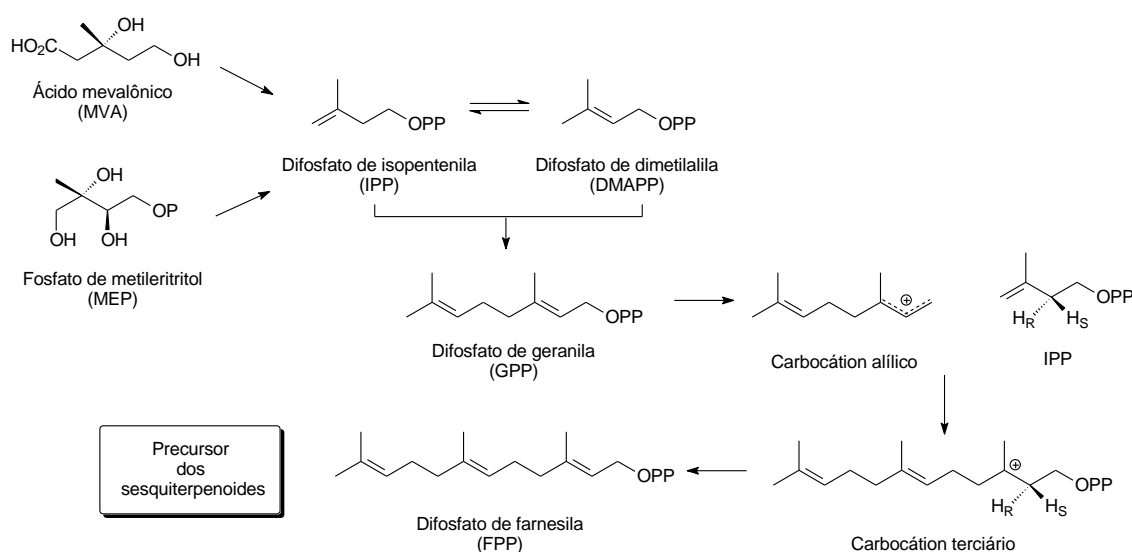
e triterpenoides, desta forma fez-se uma revisão bibliográfica destas classes de metabólitos na família Annonaceae.

3.3.1 Sesquiterpenoides

Os sesquiterpenoides são um grupo de metabólitos geralmente constituídos por quinze átomos de carbono que podem ser encontrados em plantas, fungos e algas. Em plantas, estes constituintes desempenham uma importante função ecológica atuando na polinização e proteção contra microorganismos. Além disso, são componentes de óleos essenciais extraídos de diversas espécies vegetais, sendo amplamente utilizados pela indústria na fabricação de cosméticos, produtos de limpeza e medicamentos (SIMÕES et al., 2010).

Biossinteticamente, os sesquiterpenoides podem ser provenientes das rotas do MEP ou do MVA. Nessa reação, as unidades de IPP e DMAPP se combinam formando o difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenoides, que após perda do grupo fosfato origina um carbocátion alílico. Esse carbocátion se combina com uma unidade de IPP por meio de uma reação de adição eletrofílica e forma o difosfato de farnesila (FPP) precursor dos sesquiterpenoides, como apresentado na Figura 1 (DEWICK, 2009).

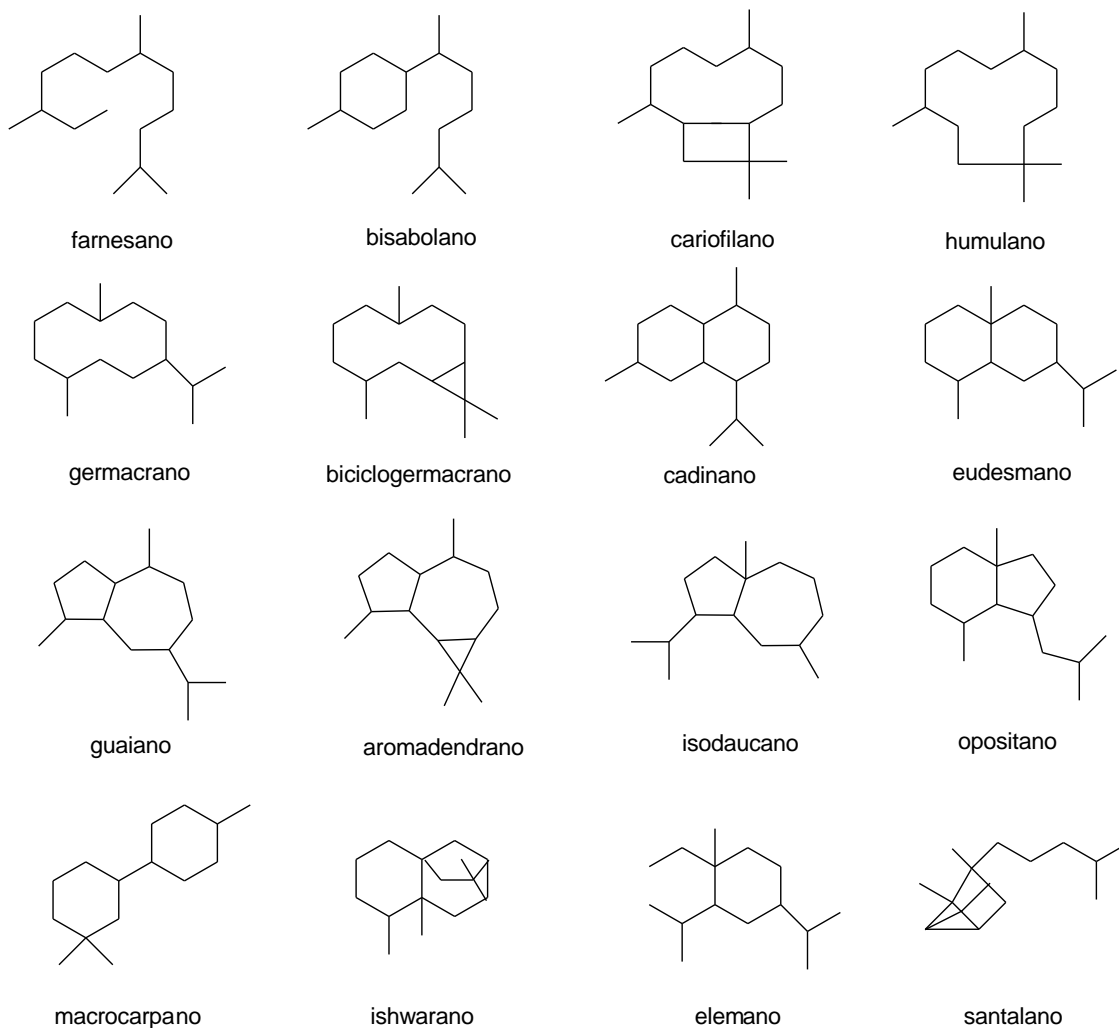
Figura 1- Biossíntese do difosfato de farnesila (FPP)



Fonte: Adaptado de Dewick (2009)

Os sesquiterpenoides formam uma classe bastante diversificada estruturalmente, isso se deve aos diferentes rearranjos dos carbocátions formados que dão origem a uma variedade de esqueletos. A Figura 2 apresenta os esqueletos de sesquiterpenoides encontrados em plantas da família Annonaceae (PROSSER et al., 2002).

Figura 2- Esqueletos hidrocarbônicos de sesquiterpenoides de Annonaceae



3.3.1.1 Revisão bibliográfica dos sesquiterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae e suas atividades biológicas

Os resultados obtidos na revisão dos sesquiterpenoides da família Annonaceae apresentaram um total de 63 compostos isolados em 26 espécies, que estão distribuídas em 17 gêneros. As espécies *Artabotrys hexalopetalus* e

Xylopi *brasiliensis* apresentaram os maiores números de sesquiterpenoides, com 9 e 11, respectivamente. Em *Lettowianthus stellatus*, *Annona bullata*, *Monodora brevipes*, *Oxandra asbeckii*, *Piptostigma fasciculata*, *Annona amazonica*, *Guatteria blepharophylla* e *Isolona hexaloba* foi relatado um sesquiterpenoide em cada.

Os sesquiterpenoides de Anonaceae foram obtidos a partir de diferentes partes da planta, tais como, folhas, frutos, sementes, galhos, caule e raízes, sendo as folhas mais frequentemente estudadas.

Os esqueletos hidrocarbônicos de sesquiterpenoides relatados em plantas da família Anonaceae são guaiano, isodaucano, bisabolano, eudesmano, farnesano, aromadendrano, santalano, humulano, germacrano, biciclogermacrano, cadinano, cariofilano, opositano, ishwarano, elemano e macrocarpano. Os esqueletos guaiano e aromadendrano são os mais frequentes em espécies de Anonaceae com 12 e 8 compostos, respectivamente.

Um estudo realizado com as cascas do caule de *Artabotrys stenopetalus* resultou no isolamento dos sesquiterpenoides: pogostol-O-metil éter (**1**) e artabotrol (**7**) com esqueletos guaiano e isodaucano, respectivamente (FLEISCHER; WAIGH; WATERMAN, 1997a). O sesquiterpenoide 11-hidroxi-guaia-4,6-dieno (**2**), de esqueleto guaiano, foi obtido do extrato etanólico das cascas das raízes de *Lettowianthus stellatus* (NKUNYA et al., 2000).

O alismol (**3**) é um sesquiterpenoide de esqueleto guaiano e foi obtido a partir dos extratos hexano das folhas *Xylopi* *emarginata* e diclorometano dos galhos de *Xylopi* *brasiliensis*. Também, foram obtidos das folhas de *Xylopi* *emarginata*, o espatulenol (**28**), 1 β ,6 α -di-hidroxi-4(15)-eudesmeno (**20**) e o óxido de cariofileno (**46**) (MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2003a).

O espatulenol (**28**) é comumente relatado em espécies da família Anonaceae, tais como, *Annona salzmannii*, *Guatteria poeppigiana*, *Oxandra sessiliflora* e *Xylopi* *brasiliensis*, sendo considerado um marcador quimiotaxômico da família Anonaceae (CRUZ et al., 2011; LIMA et al. 2004; SOUSA et al., 2014a; MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2005; COSTA et al., 2009).

O 4 β ,10 α -alloaromadendranodiol (**29**), 4 α ,10 β -aromadendranodiol (**32**) e 4 α ,10 α -aromadendranodiol (**33**) foram isolados das folhas de *X. brasiliensis* e

apresentaram atividade antifúngica no ensaio realizado com fungos da espécie *Cladosporium cladosporioides* (MOREIRA; LAGO; ROQUE, 2003b).

As vielaninas A-C (**4-6**) foram isoladas das folhas de *Xylopia vielana*. Em outro estudo, também realizado com as folhas de *X. vielana* foram obtidos os sesquiterpenoides de esqueleto guaiano dimérico vielaninor A (**62**) e vielaninor B (**63**) (ZHANG et al., 2019). Em um estudo realizado com as cascas do caule de *Friesodielsia enghiana* foram isolados os sesquiterpenoides de esqueleto bisabolano: β -bisabodol (**14**) e gossonorol (**15**) (FLEISCHER; WAIGH; WATERMAN, 1997b).

Os sesquiterpenoides de esqueleto eudesmano criptomeridiol 11- α -L-raminosídeo (**17**) e γ -eudsmol (**19**) obtidos a partir dos frutos de *Cananga odorata* exibiram atividade citotóxica frente às linhagens celulares Hep G₂ e Hep 2,2,15 (hepatocarcinoma humano) (HSIEH et al., 2001).

O óleo essencial das folhas de *Guatteria blepharophylla* que tem como constituinte majoritário o óxido de cariofileno (**46**) apresentou significativa atividade antibacteriana contra *Rhodococcus equi* com concentração inibitória mínima de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (COSTA et al., 2008).

O Quadro 1 apresenta as atividades biológicas relatadas para os sesquiterpenoides isolados de plantas da família Annonaceae, inclusive quando estes metabólitos foram isolados de plantas de outras famílias. Foi observado que as atividades mais frequentes foram antifúngica e citotóxica, enquanto os sesquiterpenoides espatulenol e alismol apresentam o maior número de atividades.

Quadro 1- Atividades biológicas relatadas para sesquiterpenoides isolados de espécies de Annonaceae

Composto	Atividade biológica	Referência
Alismol	Vasorelaxante	Matsuada et al. (1987)
	Atividade inibidora de lipase pancreática	Cang et al. (2017)
	Efeito inibidor na produção de óxido nítrico em macrófagos murinos	Xu et al. (2011)

Quadro 1- Continuação

Yingzhaosu A	Antimalárica	Borstnik et al. (2002)
Gossonorol	Algicida contra o crescimento de microalgas da maré vermelha	Sun et al. (2018)
Criptomeridiol 11- α -L-raminosídeo	Citotóxica frente as linhagens celulares Hep G ₂ e Hep 2,2,15	Hsieh et al. (2001)
γ -Eudesmol	Citotóxica frente as linhagens celulares Hep G ₂ e Hep 2,2,15	Hsieh et al. (2001)
(+)-10 β ,14 α -Alloaromadendr anodiol	Antimicrobiana	Siqueira et al. (2001)
Espatuleno	Anti-inflamatória	Nascimento et al. (2018)
	Repelente	Cantrell et al. (2005)
	Citotóxica frente a linhagem celular KB	Limberger et al. (2004)
4 β ,10 α -Alloaromadendr anodiol	Antifúngica	Moreira et al. (2003b)
4 α ,10 β -Aromadendrano diol	Antifúngica	Moreira et al. (2003b)
4 α ,10 α -Aromadendrano diol	Antifúngica	Moreira et al. (2003b)
Óxido de cariofileno	Antibacteriana	Costa et al. (2008)
Dysodensiol I	Efeito inibidor sobre a proliferação de sinoviócitos	Zhou et al. (2016)
Yingzhaosu L	Antiviral	Xi et al. (2017)

O Quadro 2 apresenta os sesquiterpenoides, a parte da planta e as espécies da família Annonaceae das quais estes metabólitos foram isolados e identificados e a Figura 3 apresenta as fórmulas estruturais destes compostos.

Quadro 2- Sesquiterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae

Composto	Nome do composto	Parte da planta	Espécie	Referência
1	Pogostol-O-metil éter	Cascas de caule	<i>Artabotrys stenopetalus</i>	Fleischer; Waigh; Waterman (1997a)
2	11-hidroxi-guaia-4,6-dieno	Cascas das raízes	<i>Lettowianthus stellatus</i>	Nkunya et al. (2000)
3	Alismol	Folhas	<i>Xylopiya emarginata</i>	Moreira; Lago; Roque (2003a)
		Galhos	<i>Xylopiya brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2005)
4	Vielanina A	Folhas	<i>Xylopiya vielana</i>	Kamperdick et al. (2001)
5	Vielanina B	Folhas	<i>Xylopiya vielana</i>	Kamperdick et al. (2001)
6	Vielanina C	Folhas	<i>Xylopiya vielana</i>	Kamperdick et al. (2001)
7	Artabotrol	Cascas de caule	<i>Artabotrys stenopetalus</i>	Fleischer; Waigh; Waterman (1997a)
8	Ácido (-)-10-oxo-isodauc-3-en-15-óico	Raízes	<i>Uvaria lucida</i>	Moriyasu et al. (2012)
9	(-)-10-oxo-isodauc-3-en-15-al	Raízes	<i>Uvaria lucida</i>	Moriyasu et al. (2012)
10	Yingzhaosu A	Raízes	<i>Artabotrys unciatus</i>	Zhang; Zhou; Xu (1988)

Quadro 2- Continuação

11	Yingzhaosu B	Raízes	<i>Artabotrys unciatus</i>	Zhang; Zhou; Xu (1988)
12	Yingzhaosu C	Raízes	<i>Artabotrys unciatus</i>	Zhang; Zhou; Xu (1988)
13	Yingzhaosu D	Raízes	<i>Artabotrys unciatus</i>	Zhang; Zhou; Xu (1988)
14	β -bisabodol	Cascas do caule	<i>Friesodielsia enghiana</i>	Fleischer; Waigh; Waterman (1997b)
15	Gossonorol	Cascas do caule	<i>Friesodielsia enghiana</i>	Fleischer; Waigh; Waterman (1997b)
16	Selin-11-en-4 α -ol	Cascas do caule	<i>Annona salzmanii</i>	Cruz et al. (2011)
17	Criptomeridiol 11- α -L-raminosídeo	Frutos	<i>Cananga odorata</i>	Hsieh et al. (2001)
18	γ -eudesmol 11- α -L-raminosídeo	Frutos	<i>Cananga odorata</i>	Hsieh et al. (2001)
19	γ -eudesmol	Frutos	<i>Cananga odorata</i>	Hsieh et al. (2001)
20	1 β ,6 α -di-hidróxi-4(15)-eudesmeno	Galhos	<i>Xylopiia brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2005)
		Frutos	<i>Xylopiia emarginata</i>	Moreira et al. (2007)
		Folhas	<i>Oxandra sessiliflora</i>	Sousa et al. (2014a)

Quadro 2- Continuação

21	4-hidroxi-1,15-peróxieu-desmano	Frutos	<i>Xylopi</i> <i>emarginata</i>	Moreira et al. (2007)
22	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i>)-10-oxo-3,7,11-dodecano-2,6-dienoato de metila	Cascas do caule	<i>Cleistopholis glauca</i>	Seidel; Bailleul; Waterman (2000a)
23	(2 <i>E</i> ,6 <i>E</i> ,10 <i>ξ</i>)-10-hidroxi-3,4,11-trimetildodeca-2,6,11-trienoato de metila	Cascas do caule	<i>Cleistopholis glauca</i>	Seidel; Bailleul; Waterman (2000a)
24	(-)-(<i>E</i>)-(<i>E</i>)-10,11-dihidroxi-farnesoato de metila	Cascas do caule	<i>Cleistopholis glauca</i>	Seidel; Bailleul; Waterman (2000a)
		Cascas das raízes	<i>Cleistopholis patens</i>	Waterman; Muhammad (1985)
25	(+)-10-hidroxi-6,1-ciclofarnes-7(14)-enoato de metila	Cascas das raízes	<i>Cleistopholis patens</i>	Waterman; Muhammad (1985)
26	Cazolobina	Raízes	<i>Isolona hexaloba</i>	Mathouet et al. (2004)
27	(+)-10 β ,14 α -alloaromadendranodiol	Cascas do caule	<i>Duguetia glabriuscula</i>	Siqueira et al. (2001)

Quadro 2- Continuação

28	Espatulanol	Cascas do caule	<i>Annona salzmanii</i>	Cruz et al. (2011)
		Folhas	<i>Oxandra asbeckii</i> <i>Porcelia macrocarpa</i> <i>Rollinia leptopetala</i> <i>Xylopiã brasiliensis</i> <i>Oxandra sessiliflora</i>	Tinto et al. (1992) Chaves et al. (2003) Costa et al. (2012) Moreira; Lago; Roque (2003b) Sousa et al. (2014a)
		Frutos	<i>Xylopiã emarginata</i>	Moreira et al. (2007)
		Galhos	<i>Xylopiã brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2005)
29	4 β ,10 α -alloaromadendranodiol	Folhas	<i>Xylopiã brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2003b)
30	4 α ,10 β -alloaromadendranodiol	Galhos	<i>Xylopiã brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2005)
31	4 β ,10 α -aromadendranodiol	Galhos	<i>Xylopiã brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2005)
		Folhas	<i>Oxandra sessiliflora</i>	Sousa et al. (2014a)

Quadro 2- Continuação

32	4 α ,10 β -aromadendranodiol	Folhas	<i>Xylopi</i> <i>brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2003b)
33	4 α ,10 α -aromadendranodiol	Folhas	<i>Xylopi</i> <i>brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2003b)
		Galhos	<i>Xylopi</i> <i>brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2005)
34	4 β ,10 α ,15-aromadendranotriol	Folhas	<i>Xylopi</i> <i>brasiliensis</i>	Moreira; Lago; Roque (2003b)
35	(+)- α -santal-10-en-9-ol	Cascas do caule	<i>Duguetia glabriuscula</i>	Pereira et al. (2003)
36	(+)- α -santalan-10,11-epóxi-9-ol	Cascas do caule	<i>Duguetia glabriuscula</i>	Pereira et al. (2003)
37	α -satal-11-en-9,10-diol	Cascas do caule	<i>Duguetia glabriuscula</i>	Pereira et al. (2003)
38	(+)- α -santalan-9,10,11-triol	Cascas do caule	<i>Duguetia glabriuscula</i>	Pereira et al. (2003)
39	(+)- α -santalan-9,11-epoxi-10-ol	Cascas do caule	<i>Duguetia glabriuscula</i>	Pereira et al. (2003)
40	Guaterina A	Raízes	<i>Guatteria multivenia</i>	Zhang et al. (2002)
41	Madolina W	Raízes	<i>Guatteria multivenia</i>	Zhang et al. (2002)

Quadro 2- Continuação

42	Madolina K	Raízes	<i>Guatteria multivenia</i>	Zhang et al. (2002)
43	Di-hidromadolina K	Raízes	<i>Guatteria multivenia</i>	Zhang et al. (2002)
44	α - cadinol	Sementes	<i>Monodora brevipes</i>	Etse et al. (1989)
45	(+)-15-oxo- α -cadinol	Raízes	<i>Uvaria lucida</i>	Moriyasu et al. (2012)
46	Óxido de cariofileno	Cascas do caule	<i>Artabotrys stenopetalus</i> <i>Annona salzmanii</i> <i>Annona amazonica</i> <i>Guatteria blepharophylla</i>	Fleischer; Waigh; Waterman (1997a) Cruz et al. (2011) Pinheiro et al. (2009) Costa et al. (2011)
		Frutos	<i>Xylopia emarginata</i>	Moreira et al. (2007)
		Folhas	<i>Piptostigma fasciculata</i> <i>Rollinia leptopetala</i> <i>Xylopia emarginata</i>	Seidel; Bailleul; Waterman (1999) Costa et al. (2012) Moreira; Lago; Roque (2003a)
47	Bullatantriol	Folhas	<i>Annona bullata</i>	Kutschabsky; Sandoval; Ripperger (1985)
48	Macrocarp-11(15)-en-8-ol	Folhas	<i>Porcelia macrocarpa</i>	Chaves et al. (2003)

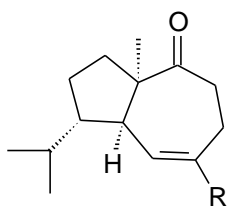
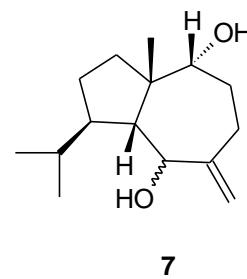
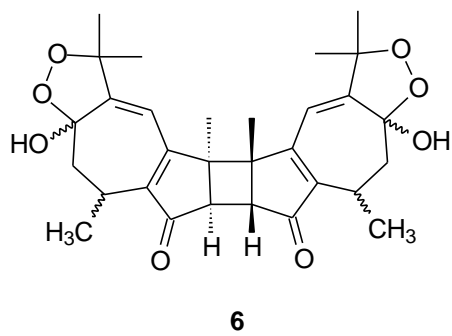
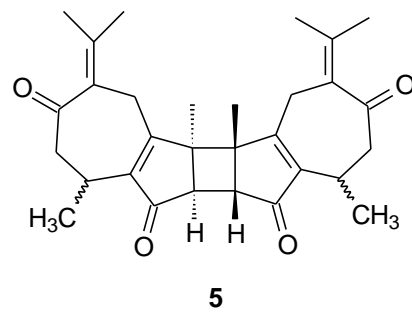
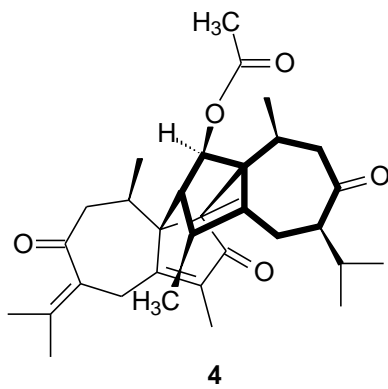
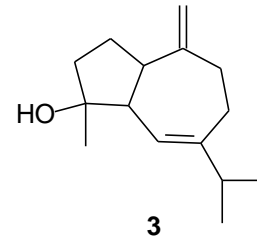
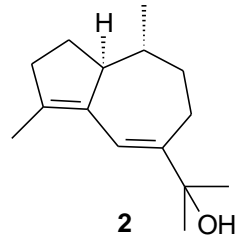
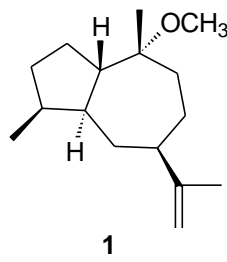
Quadro 2- Continuação

49	Dysodensiol G	Caule	<i>Fissistigma oldhamii</i>	Zhou et al. (2016)
50	Dysodensiol H	Caule	<i>Fissistigma oldhamii</i>	Zhou et al. (2016)
51	Dysodensiol I	Caule	<i>Fissistigma oldhamii</i>	Zhou et al. (2016)
52	Yingzhaosu E	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)
53	Yingzhaosu F	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)
54	Yingzhaosu G	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)
55	Yingzhaosu H	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)
56	Yingzhaosu I	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)
57	Yingzhaosu J	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)
58	Yingzhaosu K	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)

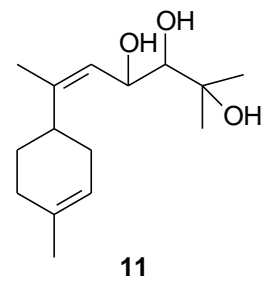
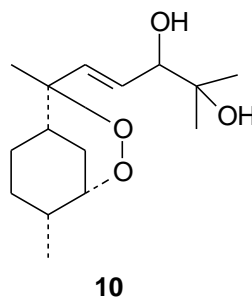
Quadro 2- Continuação

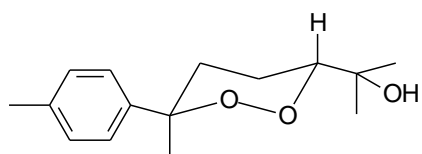
59	Yingzhaosu L	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)
60	Yingzhaosu M	Raízes	<i>Artabotrys hexalopetalus</i>	Xi et al. (2017)
61	4 α ,7 β ,10 α -tri-hidroxi-guai-5-eno	Folhas	<i>Oxandra sessiliflora</i>	Sousa et al. (2014a)
62	Vielaninor A	Folhas	<i>Xylopiá vielana</i>	Zhang et al. (2019)
63	Vielaninor B	Folhas	<i>Xylopiá vielana</i>	Zhang et al. (2019)

Figura 3- Fórmulas estruturais dos sesquiterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae

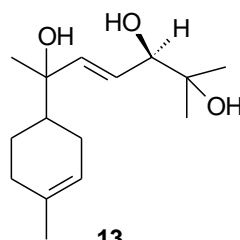


9: R = CHO

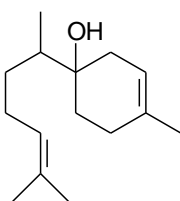




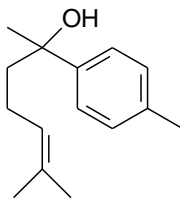
12



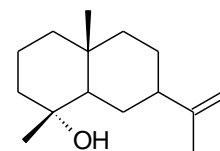
13



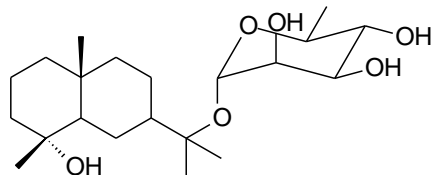
14



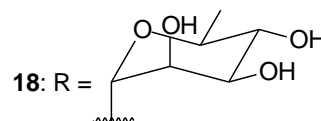
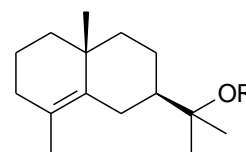
15



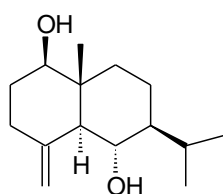
16



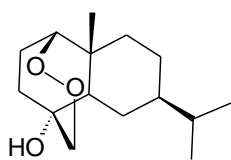
17



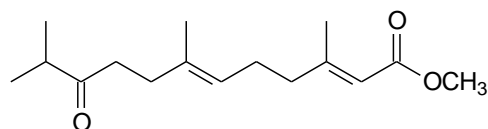
19: R = H



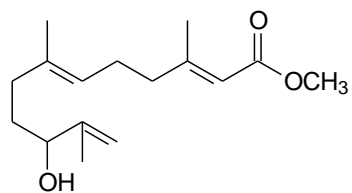
20



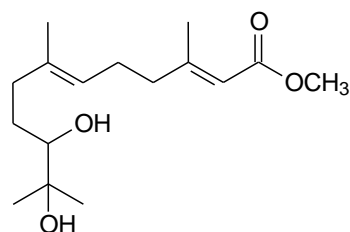
21



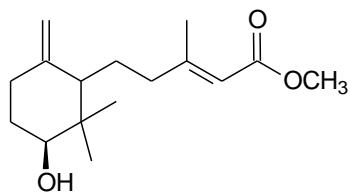
22



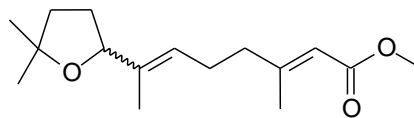
23



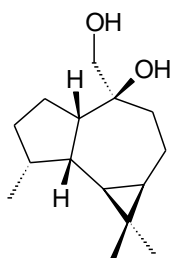
24



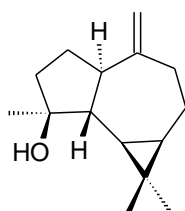
25



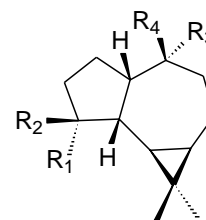
26



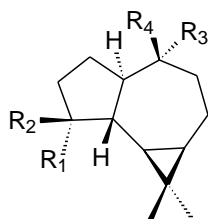
27



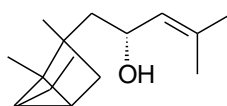
28



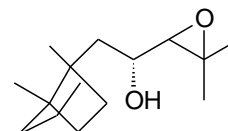
29: $R_1 = R_4 = \text{CH}_3$ $R_2 = R_3 = \text{OH}$
 30: $R_1 = R_4 = \text{OH}$ $R_2 = R_3 = \text{CH}_3$



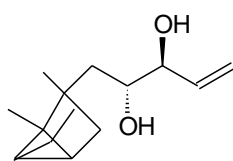
31: $R_1 = R_4 = \text{CH}_3$ $R_2 = R_3 = \text{OH}$
 32: $R_1 = R_4 = \text{OH}$ $R_2 = R_3 = \text{CH}_3$
 33: $R_1 = R_3 = \text{OH}$ $R_2 = R_4 = \text{CH}_3$
 34: $R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = R_3 = \text{OH}$ $R_4 = \text{CH}_2\text{OH}$



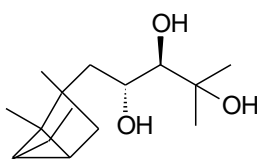
35



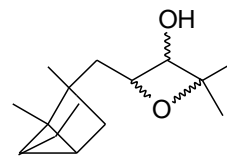
36



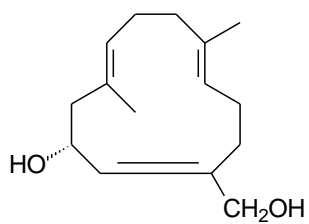
37



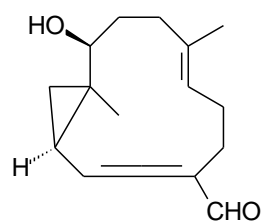
38



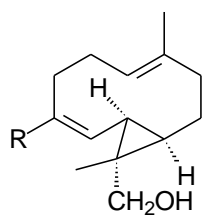
39



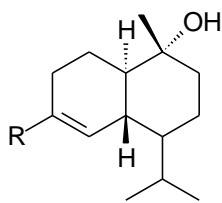
40



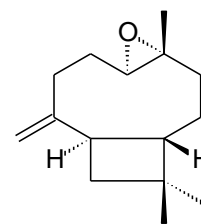
41



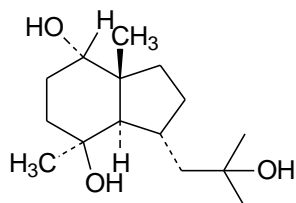
42: R = CHO
43: R = CH₂OH



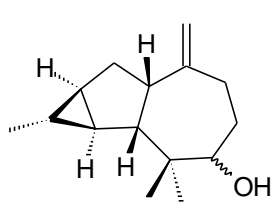
44: R = CH₃
45: R = CHO



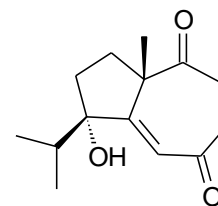
46



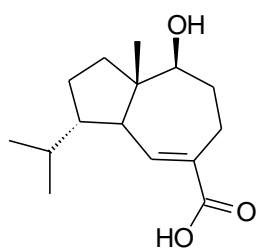
47



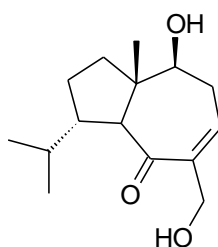
48



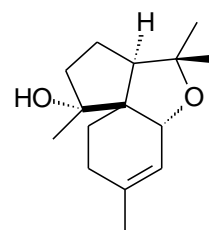
49



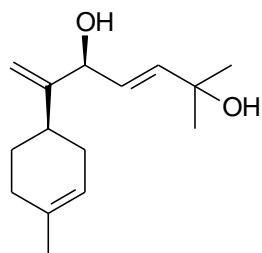
50



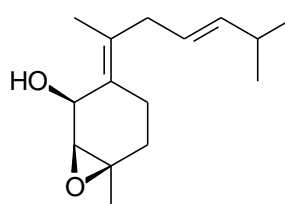
51



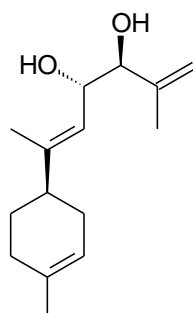
52



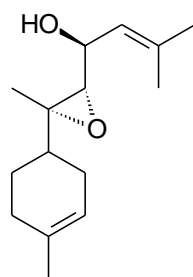
53



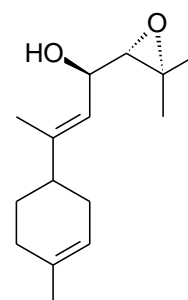
54



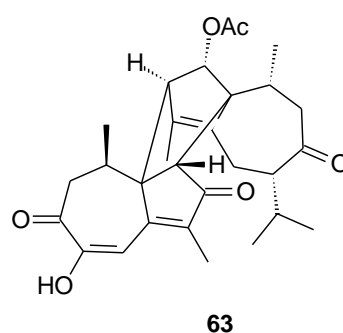
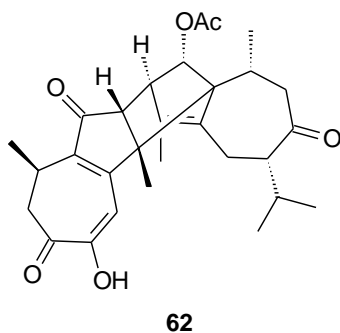
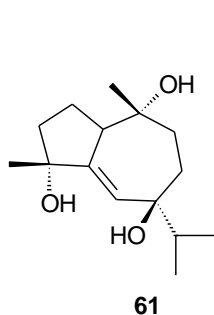
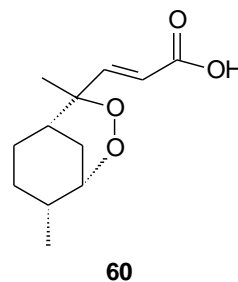
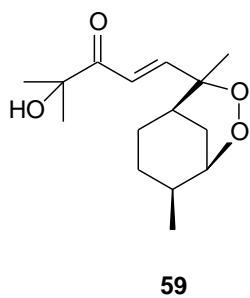
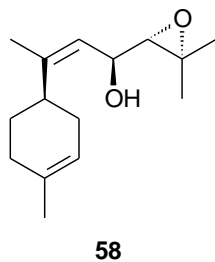
55



56



57

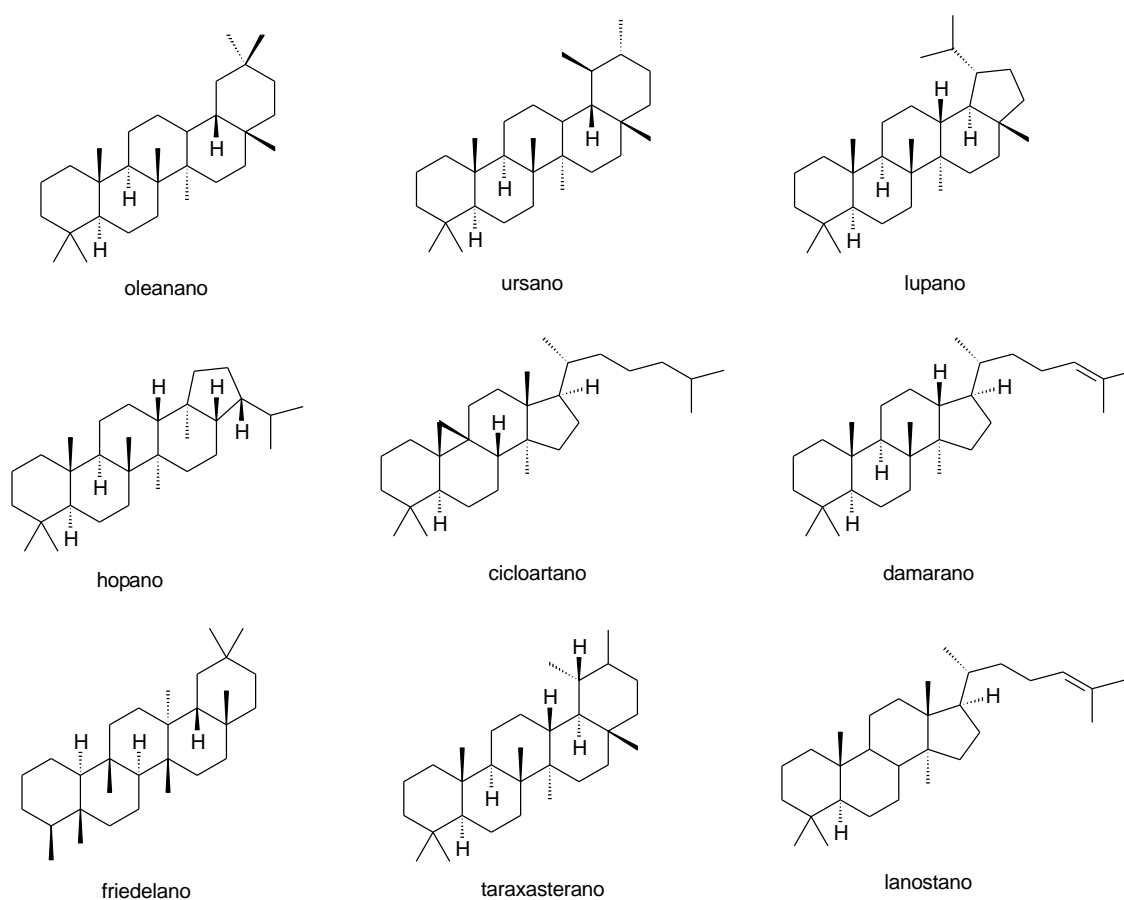


3.3.2 Triterpenoides

Os triterpenoides são metabólitos secundários que, geralmente, apresentam trinta átomos de carbono que podem ser encontrados na forma livre e também como éteres, ésteres e glicosídeos. Diferentemente de outros terpenoides que são mais comumente formados por uniões do tipo cabeça-cauda, nos triterpenoides ocorre também a junção do tipo cauda-cauda pela adição de duas unidades de difosfato de farnesila (FPP) conduzindo a formação do esqualeno, considerado o precursor dos triterpenoides e esteroides, conforme apresentado na Figura 4 (DEWICK, 2009).

Estruturalmente, os triterpenoides podem ser divididos em lineares, tetracíclico (comuns em animais) e pentacíclicos (comuns em vegetais) (MAHATO; SEN, 1997; CANO-FLORES, 2013). A Figura 5 apresenta alguns esqueletos básicos de triterpenoides pentacíclicos tais como, ursano, oleanano, lupano, hopano e cicloartano. Além do esqueleto damarano característico de triterpenoides tetracíclicos (DEWICK, 2009; PATOCKA, 2003).

Figura 5- Esqueletos hidrocarbônicos de alguns triterpenoides



3.3.2.1 Revisão bibliográfica dos triterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae e suas atividades biológicas

Os resultados obtidos na revisão mostraram um total de 29 triterpenoides isolados e identificados em dezessete espécies da família Annonaceae: *Artabotrys odoratissimus*, *Desmos cochinchinensis*, *Dasymaschalon dasymaschalum*, *Desmos longiflorus*, *Duguetia glabriuscula*, *Duguetia staudtii*, *Goniothalamus thwaitesii*, *Monocarpia marginalis*,

Monocyclanthus vignei, *Oxandra asbeckii*, *Oxandra xylopioides*, *Piptostigma fugax*, *Piptostigma preussi*, *Polyalthia oliveri*, *Polyalthia lancilimba*, *Polyalthia suaveolens* e *Uvariastrum zenkeri*. As espécies *M. vignei* e *A. odoratissima* apresentaram os maiores números destes compostos com 5 e 6, respectivamente. Enquanto, que em *D. dasymaschalum*, *D. glabriuscula*, *D. staudtii*, *M. marginalis*, *U. zenkeri*, *P. oliveri*, *P. suaveolens*, *P. preussi*, *O. xylopioides* e *P. fugax* foram relatados um triterpenoide em cada.

Os triterpenoides isolados em Annonaceae apresentam esqueleto hidrocarbônico dos tipos: lanostano (**4-8**, **14-19**, **27-29**), cicloartano (**1-3**, **9**, **20-26**), friedelano (**10** e **11**) e lupano (**12**). O esqueleto lanostano foi o predominante com 14 compostos, seguido pelo cicloartano com 11 compostos (Figura 6). Na espécie *Goniothalamus thwaitesii* foram isolados os triterpenoides friedelinol (**10**), friedelina (**11**) e ácido betulínico (**12**) que apresentam esqueletos friedelano e lupano, respectivamente (CONNOLLY et al., 1994; GUPTA et al., 2010).

Os triterpenoides foram isolados principalmente a partir das frações hexano, diclorometano e clorofórmica de diversas partes da planta, tais como, folhas, cascas do caule e sementes. Não tendo sido encontrados relatos de isolamento e identificação de triterpenoides nos frutos de espécies da família Annonaceae.

Nas cascas do caule das espécies *Duguetia staudtii*, *Duguetia glabriuscula*, *Polyalthia suaveolens*, *Polyalthia oliveri*, *Polyalthia lancilimba* e *Piptostigma preussi* foi isolado o policarpol (**8**), um dos triterpenoide mais frequente na família Annonaceae, e ao qual estão associadas diversas atividades biológicas como antitripanossômica, antifilarial e citotóxica (LUE; ZHENG; LI, 1998; KOUAM et al., 2014). O estudo com as cascas do caule de *Monocarpia marginalis* possibilitou o isolamento do monocarpin (**9**), um triterpenoide de esqueleto cicloartano (MAHMOOD et al., 1992).

O estudo fitoquímico das folhas de *Oxandra asbeckii* resultou no isolamento e identificação de três triterpenoides derivados do 24-metil-lanostano: 3-oxo-oxandra-1,9(11)-dien-2-ol (**27**), oxandra-9-en-3-ol (**28**) e 2-oxo-oxandra-9-en-3-ol (**29**). O uvariastrol (**22**) com esqueleto cicloartano contendo um anel furano e uma γ -lactona α,β -insaturada foi obtido a partir do

extrato hexano das cascas do caule de *Uvariastrum zenkeri* (TINTO et al., 1992; WATERMAN; MOHAMMAD, 1984).

Alguns dos triterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae foram testados quanto ao potencial biológico e exibiram atividades citotóxica, anti-inflamatória, antitripanossômica e antibacteriana. O ácido heínico (**2**) obtido a partir do extrato etanólico das cascas do caule de *Demos cochinchinensis* exibiu atividade citotóxica frente às linhagens A549 (carcinoma pulmonar), MCF7 (adenocarcinoma de mama) e HT29 (adenocarcinoma de cólon). Nesse estudo também foi isolado o 24-metileno-cicloartano-3 β ,21-diol (**3**) que apresentou citotoxicidade contra as linhagens HT29 e RPMI7951 (melanoma) (SUN et al., 1992).

O triterpenoide berenjenol (**13**), isolado na fração diclorometano das folhas de *Oxandra xylopioides*, apresentou significativa atividade anti-inflamatória (ROJANO et al., 2007). O policarpol (**8**) obtido a partir das cascas do caule de *Piptostigma preussi* exibiu atividade antitripanossômica frente a espécie *Trypanosoma brucei* com DE₅₀ (dose efetiva) de 5,11 μ M (NGANTCHOU et al., 2009). Em outros estudos, o policarpol (**8**) também obtido das cascas do caule de *Polyalthia suaveolens* e folhas de *Duguetia glabriuscula* apresentou atividades antifilarial contra parasitas (filárias) da espécie *Onchocerca gutturosa* e citotóxica frente à linhagem celular Hep₂ (carcinoma de laringe) (NYASSE et al., 2006; MATOS et al., 2006).

Vale ressaltar que nem todos os triterpenoides isolados em espécies da família Annonaceae foram avaliados quanto a suas atividades farmacológicas, e para alguns desses metabólitos esse potencial biológico somente foi relatado em espécies pertencentes a outras famílias, tais como, a friedelina (**11**) que apresenta atividades antibacteriana e anti-inflamatória e o ácido betulínico (**12**) com ação antiviral, antitripanossômica e antibacteriana (RAMESH et al., 2002; PAVLOVA et al., 2003; DOMÍNGUEZ-CARMONA et al., 2010; OLOYEDE et al., 2017).

O Quadro 3 apresenta os triterpenoides, a parte da planta e as espécies da família Annonaceae das quais estes metabólitos foram isolados e identificados e na Figura 6 são apresentadas as fórmulas estruturais destes compostos.

Quadro 3- Triterpenoides isolados de espécies da família Annonaceae

Composto	Nome do composto	Parte da planta	Espécie	Referência
1	Desmosinol	Caule	<i>Desmos cochinchinensis</i>	Sun et al. (1992)
2	Ácido heínico	Caule	<i>Desmos cochinchinensis</i>	Sun et al. (1992)
3	24-metileno-cicloartano-3 β ,21-diol	Caule	<i>Desmos cochinchinensis</i>	Sun et al. (1992)
		Folhas	<i>Dasymaschalon dasymaschalum</i>	Prawat et al. (2013)
4	15 α -hidroxi-24 metilenolanosta-7,9(11)-dien-3-ona	Cascas do caule	<i>Desmos longiflorus</i>	Connolly et al. (1994)
5	24- metilenolanosta-7,9(11)-dien-3 β -ol	Cascas do caule	<i>Desmos longiflorus</i> <i>Polyalthia lancilimbra</i>	Connolly et al. (1994) Lue; Zheng; Li (1998)
6	Suberosol	Cascas do caule	<i>Desmos longiflorus</i> <i>Polyalthia lancilimbra</i>	Connolly et al. (1994) Lue; Zheng; Li (1998)
7	24- metilenolanosta-8-en-2 β ,3 β ,21-triol	Cascas do caule	<i>Polyalthia lancilimbra</i>	Lue; Zheng; Li (1998)

Quadro 3- Continuação

8	Policarpol	Casca do caule	<i>Polyalthia lancilimbra</i> <i>Polyalthia oliveri</i> <i>Polyalthia suaveolens</i> <i>Duguetia staudtii</i> <i>Piptostigma preussi</i> <i>Duguetia glabriuscula</i>	Lue; Zheng; Li (1998) Kouam et al. (2014) Nyasse et al. (2006) Ngouonpe et al. (2019) Ngantchou et al. (2009) Pereira et al. (2003)
9	Monocarpin	Folhas	<i>Duguetia glabriuscula</i>	Matos et al. (2006)
		Casca do caule	<i>Monocarpia marginalis</i>	Mahmood et al. (1992)
10	Friedelinol	Folhas	<i>Goniothalamus thwaitesii</i>	Seidel; Bailleul; Waterman (2000b)
11	Friedelina	Folhas	<i>Goniothalamus thwaitesii</i>	Seidel; Bailleul; Waterman (2000b)
12	Ácido betulínico	Folhas	<i>Goniothalamus thwaitesii</i>	Seidel; Bailleul; Waterman (2000b)

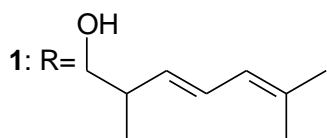
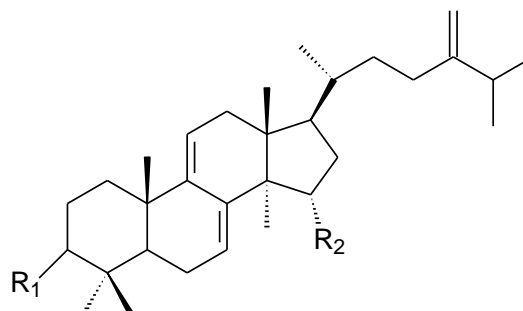
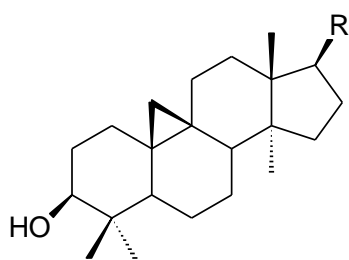
Quadro 3- Continuação

13	Berenjenol	Folhas	<i>Oxandra xylopioides</i>	Rojano et al. (2007)
14	Artabotriol A	Sementes	<i>Artabotrys odoratissimus</i>	Gupta et al. (2010)
15	Artabotriol B	Sementes	<i>Artabotrys odoratissimus</i>	Gupta et al. (2010)
16	Artabotriol C1	Sementes	<i>Artabotrys odoratissimus</i>	Gupta et al. (2010)
17	Artabotriol C2	Sementes	<i>Artabotrys odoratissimus</i>	Gupta et al. (2010)
18	Artabotriol E	Sementes	<i>Artabotrys odoratissimus</i>	Gupta et al. (2010)
19	Artabotriol D	Sementes	<i>Artabotrys odoratissimus</i>	Gupta et al. (2010)
20	(20 <i>R</i>)-3 β -hidroxi-24,25,26,27-tetranor-5 α -cicloartan-23,21-olídeo	Cascas do caule	<i>Monocyclanthus vignei</i>	Achenbach; Frey (1992)
21	3-oxo-5 α -cicloart-24-en-21-al	Cascas do caule	<i>Monocyclanthus vignei</i>	Achenbach; Frey (1992)
22	Uvariastrol	Cascas do caule	<i>Uvariastrum zenkeri</i>	Waterman; Mohammad (1984)

Quadro 3- Continuação

23	5 α -cicloart-24-en-3,23-diona	Cascas do caule	<i>Monocyclanthus vignei</i>	Achenbach; Frey (1992)
24	5 α -cicloart-24-en-3 β ,21-diol	Cascas do caule	<i>Monocyclanthus vignei</i>	Achenbach; Frey (1992)
25	5 α -cicloart-24-en-3 β ,16 β ,21-triol	Cascas do caule	<i>Piptostigma fugax</i>	Achenbach; Schwinn (1995)
26	5 α -cicloart-24-en-3 β , 21,23-triol	Cascas do caule	<i>Monocyclanthus vignei</i>	Achenbach; Frey (1992)
27	3-oxo-oxandra-1,9(11)-dien-2-ol	Folhas	<i>Oxandra asbeckii</i>	Tinto et al. (1992)
28	oxandra-9-en-3-ol	Folhas	<i>Oxandra asbeckii</i>	Tinto et al. (1992)
29	2-oxo-oxandra-9- en-3-ol	Folhas	<i>Oxandra asbeckii</i>	Tinto et al. (1992)

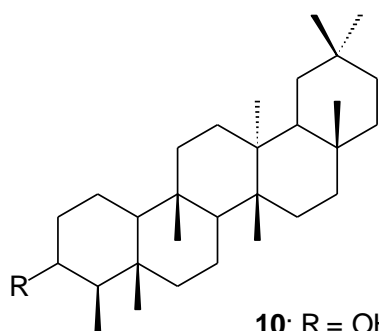
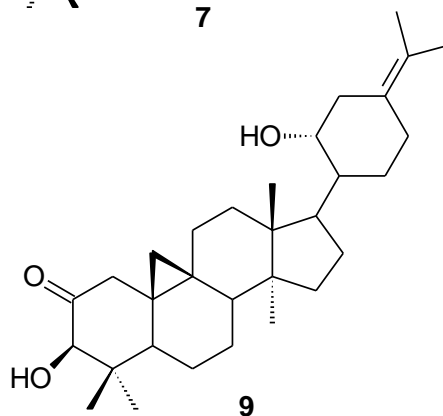
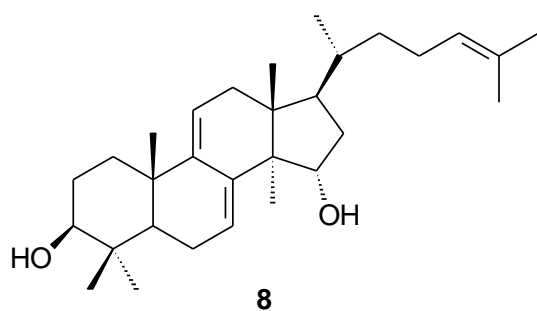
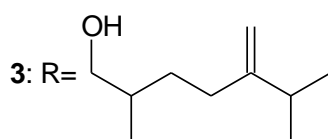
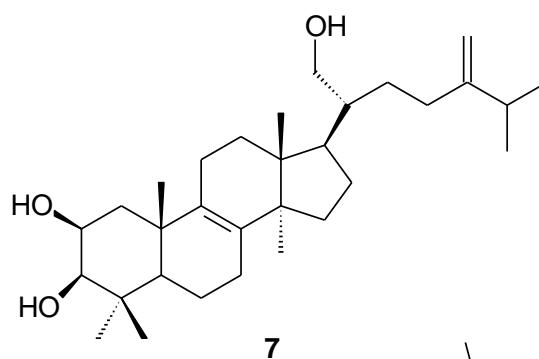
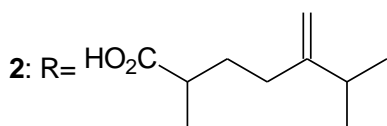
Figura 6- Fórmulas estruturais dos triterpenoides isolados de espécies da família Annonaceae



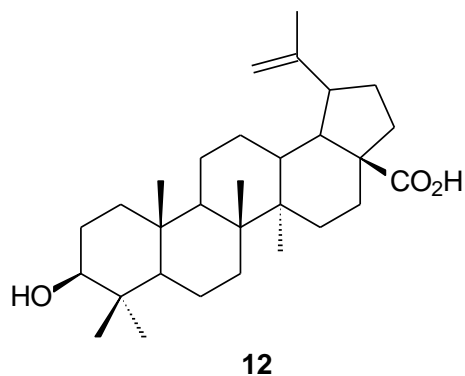
4: R₁ = O, R₂ = OH

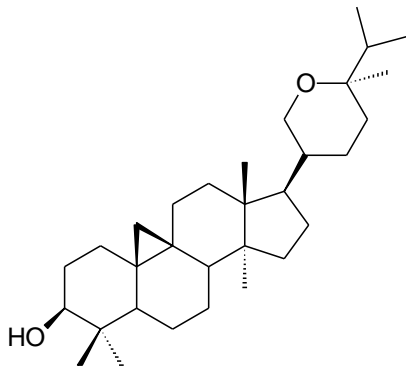
5: R₁ = β-OH, R₂ = H

6: R₁ = β-OH, R₂ = OH

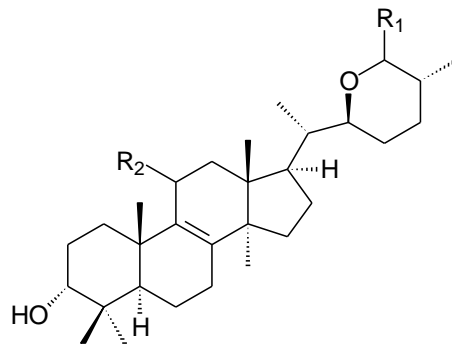
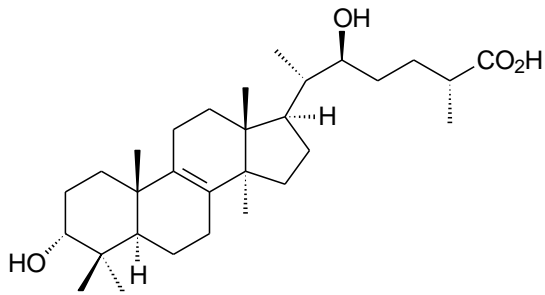


11: R = H

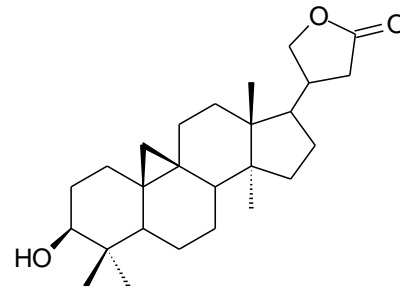




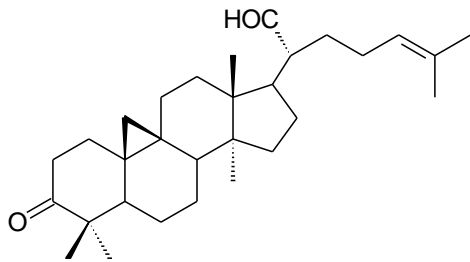
13

14: $R_1 = O, R_2 = H$ 15: $R_1 = OH, R_2 = H$ 16 (26R): $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ 17 (26S): $R_1 = OCH_3, R_2 = H$ 18: $R_1 = O, R_2 = OH$ 

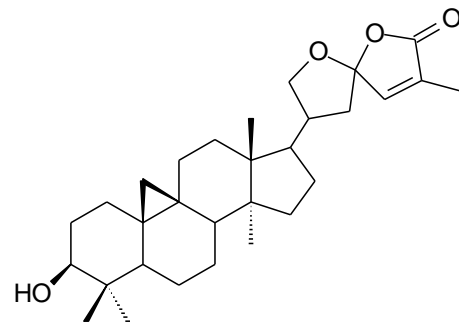
19



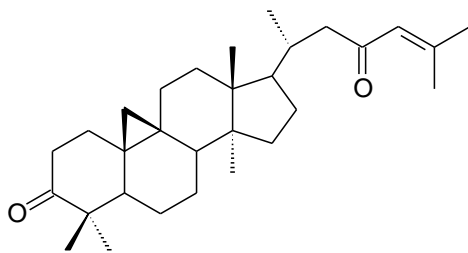
20



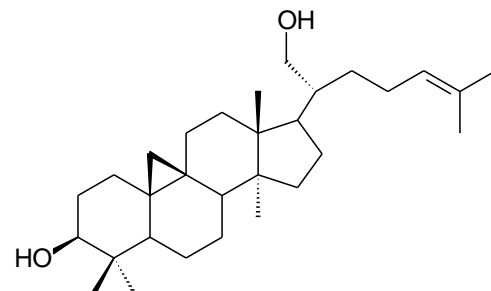
21



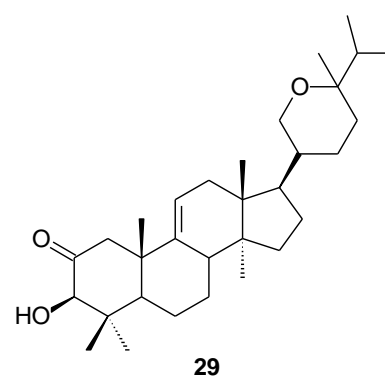
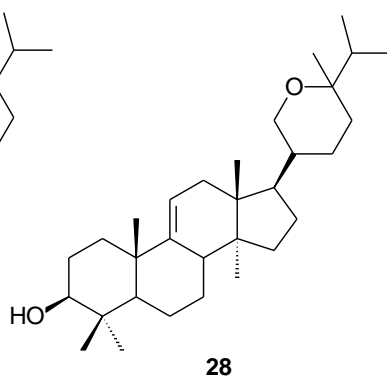
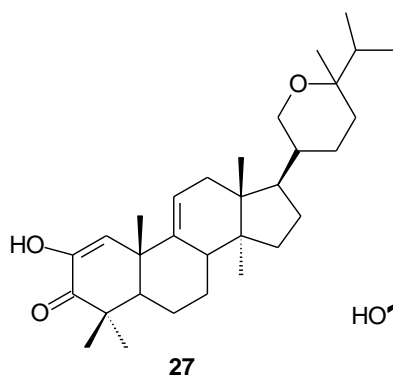
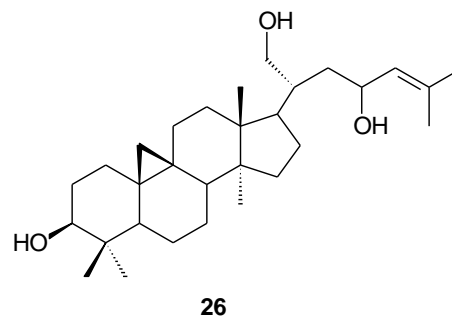
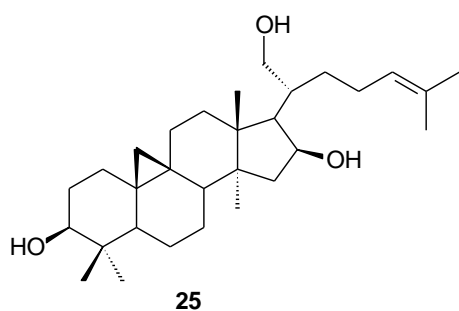
22



23



24



3.4 *Ephedranthus pisocarpus* R. E. Fries

Ephedranthus pisocarpus R. E. Fries, popularmente conhecida como envira de cocho e conduru, é uma planta arbórea e de grande porte, que se diferencia das demais pela maior pilosidade das folhas e dos ramos terminais e por apresentar folhas menores. Estas características se devem ao ambiente onde vive que, em geral, são regiões de clima seco, como o cerrado e caatinga (OLIVEIRA; SALES, 1999).

Em levantamento bibliográfico realizado nas bases de periódicos *online*, tais como: *Science Direct*, *Web of Science*, *Pubmed* e *ScinFider* não foram encontradas indicações de uso popular, estudos fitoquímicos e/ou farmacológicos para a espécie *Ephedranthus pisocarpus*. Entretanto, considerando os potenciais químico e farmacológico de plantas da família Annonaceae, o presente trabalho teve como objetivos realizar o estudo químico e investigar o potencial biológico do extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus*.

4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Reagentes e solventes

Os solventes utilizados na preparação do extrato etanólico, partição e fracionamentos foram todos de grau analítico (Synth).

As placas para cromatografia em camada delgada (CCD) foram preparadas manualmente por aplicação da suspensão de gel de sílica (Macherey-Nagel), em água destilada, sobre lâminas de vidro (9,5 x 5,9 cm). Posteriormente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C por um período de 1 hora.

Os fracionamentos cromatográficos em coluna foram realizados utilizando gel de sílica (0,060-0,200 mm) da Acros Organics e Sephadex LH-20 (GE Healthcare). Na revelação das substâncias, as cromatoplasmas foram submetidas à nebulização com solução de sulfato cérico ($\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) preparada pela dissolução de 2,1 g de sulfato cérico (Vetec) em 15 mL de H_2SO_4 concentrado (Chemco) e adicionado a 800 mL de água destilada. Também foi utilizado como revelador, o reagente de Dragendorff preparado pela dissolução de 0,85 g de nitrato de bismuto [$\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$] em 40 mL de água destilada e 10 mL de ácido acético glacial, seguido da adição de 8 g de iodeto de potássio (KI) dissolvido em 20 mL de água destilada.

Nas análises de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) as amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) e como referência interna foi utilizado tetrametilsilano (TMS)

Na avaliação da atividade antioxidante e teor de fenóis totais foram utilizados DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e BHT (butil-hidroxi-tolueno) (Sigma), reagente de Folin-Ciocalteu (Merck) e carbonato de sódio (Synth).

4.2 Equipamentos

As folhas de *Ephedranthus pisocarpus* foram moídas em moinho de facas (Marconi). O extrato e frações foram concentrados em evaporador rotativo (Laborota 4000) e a água residual foi retirada em liofilizador (Micro Modulyo Edwards) acoplado a bomba de vácuo modelo VLP80 (Savant).

As massas das amostras foram obtidas em balanças modelos KN 400 (Knwaagen) e 210A (Bel Mark) e para auxiliar na solubilização foi utilizado um banho ultrassom Cleanner Thournton (Marconi). As placas cromatográficas foram ativadas em estufa EL-1.3 (Odontobrás). O aquecimento das cromatoplasmas reveladas com $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ foi realizado em placa aquecedora 509T (Fisaton) a aproximadamente 100 °C por 5-10 minutos.

4.2.1 Espectroscopia de absorção molecular

A determinação do teor de fenóis totais e as atividades antioxidante e fotoprotetora do extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus* foram realizadas em espectrofotômetro UV-Vis Lambda 25 (PerkinElmer) utilizando cubetas de vidro e quartzo com 1,0 cm de caminho óptico.

4.2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C dos compostos isolados das folhas de *E. pisocarpus* foram obtidos em espectrômetros Varian INOVA-modelo 400, operando a 400 MHz (^1H) e 100 MHz (^{13}C) e Varian INOVA-modelo 600, operando a 600 MHz (^1H) e 150 MHz (^{13}C).

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

A análise por CG-EM foi realizada em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas modelo QP2010 SE (Shimadzu), equipado com coluna capilar SLBTM-5ms (Supelco, 30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). O tipo de ionização utilizada no espectrômetro de massas foi por impacto de elétrons a 70 eV com analisador de massas por quadrupolo.

4.2.4 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray com analisador tipo armadilha de íons (ESI-ITMS)

Os experimentos foram realizados por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e inserção direta em espectrômetro de massas com analisador tipo armadilha de íons (ITMS, AmaZon X, Bruker Daltonics).

4.3 Material vegetal

As folhas de *Ephedranthus piscocarpus* R. E. Fries foram coletadas em fevereiro de 2012, no município de Jatobá do Piauí (latitude sul = 04° 51' 47,1", longitude oeste = 42° 03' 06,6"). A espécie foi identificada pela bióloga Dra. Ruth Raquel Soares de Farias (Pesquisadora- bioTEN/UFPI). Uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí – UFPI, com o número TEPB 16940. Esta espécie encontra-se registrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen), sendo o número de cadastro AAB530D.

4.4 Obtenção e extração líquido-líquido do extrato etanólico

As folhas foram secas a temperatura ambiente e trituradas em moinho de facas. O material vegetal obtido (1,560 kg) foi submetido à maceração exaustiva com etanol e o sobrenadante filtrado a cada cinco dias. Os filtrados foram concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida. A água residual foi removida por liofilização, fornecendo o extrato etanólico (160 g).

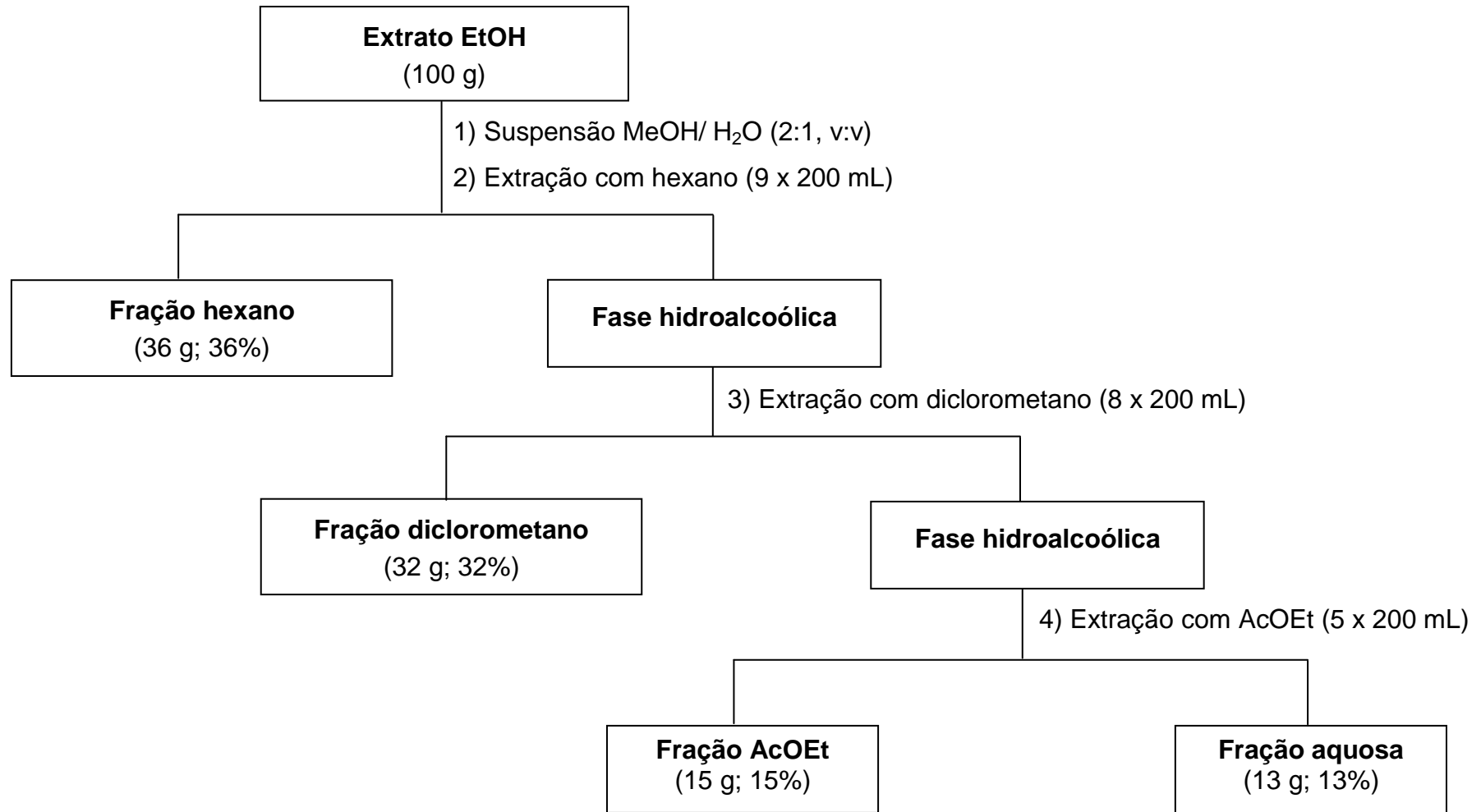
Uma alíquota de 100 g do extrato EtOH foi suspensa em uma mistura de MeOH/H₂O (2:1) e submetida a extração líquido-líquido utilizando como solventes hexano (9 x 200 mL), diclorometano (8 x 200 mL) e acetato de etila (5 x 200 mL). Os solventes foram removidos em evaporador rotativo à pressão reduzida e a água foi removida por liofilização. Esse procedimento resultou nas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa (Esquema 2).

A Tabela 1 apresenta a massa e o rendimento obtidos para o extrato e frações provenientes da extração líquido-líquido do extrato EtOH das folhas de *E. pisocarpus*.

Tabela 1- Massa e rendimento do extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus*

Extrato/frações	Massa (g)	Rendimento (%)
Extrato EtOH	160	10
Fração hexano	36	36*
Fração diclorometano	32	32*
Fração acetato de etila	15	15*
Fração aquosa	13	13*

*Rendimento obtido a partir de 100 g do extrato EtOH

Esquema 2- Fluxograma da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *E. piscarpus*

4.5 Cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) das frações obtidas da extração líquido-líquido do extrato etanólico

As frações provenientes da partição do extrato EtOH das folhas de *E. pisocarpus* foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa de gel de sílica. Alíquotas de 2 μL das soluções (20 mg mL⁻¹) foram aplicadas em placas cromatográficas eluídas em hexano/AcOEt (8:2), CHCl₃/MeOH (9:1) e CHCl₃/MeOH/H₂O (65:30:5). As cromatoplas das frações hexano e diclorometano, reveladas com solução de sulfato cérico, apresentaram perfil cromatográfico característico de isoprenoides devido a presença de manchas de coloração rósea, roxa e alaranjadas. Com base na análise por CCDC, essas duas frações foram submetidas a fracionamento cromatográfico em coluna para isolamento de constituintes químicos. Adicionalmente, a cromatoplas do extrato EtOH e frações, quando revelada com reagente de Dragendorff, não apresentou manchas alaranjadas características de compostos da classe dos alcaloides.

4.6 Fracionamento cromatográfico da fração hexano

A fração hexano (10 g) obtida na extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *E. pisocarpus* foi submetida a fracionamento em coluna de gel de sílica (50 cm x 5 cm, 270 g), eluída com uma mistura dos solventes hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 103 frações de 240 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotativo, analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas em 15 grupos (Tabela 2), de acordo com a coloração e fator de retenção (R_f). Os grupos HE13, HE22, HE25, HE32 e HE66 mostraram-se promissores para dar continuidade ao fracionamento, sendo purificados em coluna de Sephadex LH-20 e coluna de gel de sílica.

Tabela 2- Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em gel de sílica da fração hexano das folhas de *E. pisocarpus*

Grupo	Frações reunidas	Eluente	Massa (mg)
HE1	1-4	Hexano (100%)	33
HE5	5-11	Hexano/AcOEt (98:2)	690
HE13	12-14	Hexano/AcOEt (98:2)	175
HE15	15-18	Hexano/AcOEt (98:2)	114
HE22	19-24	Hexano/AcOEt (95:5)	1564
HE25	25-28	Hexano/AcOEt (95:5)	291
HE32	29-45	Hexano/AcOEt (95:5)	675
HE46	46-65	Hexano/AcOEt (9:1)	1223
HE66	66-68	Hexano/AcOEt (8:2)	405
HE69	69-70	Hexano/AcOEt (8:2)	235
HE71	71-73	Hexano/AcOEt (8:2)	273
HE74	74-76	Hexano/AcOEt (7:3)	863
HE77	77-91	Hexano/AcOEt (6:4)	1923
HE92	92-94	Hexano/AcOEt (1:1)	394
HE95	95-103	MeOH (100%)	245
			Total: 9,10 g

4.6.1 Fracionamento do grupo HE13

O grupo HE13 (12-14, 38 mg) obtido do fracionamento cromatográfico da fração hexano em coluna de gel de sílica, eluído com hexano/AcOEt (98:2), foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20, utilizando como eluente hexano/CH₂Cl₂ (1:4) e forneceu a fração HE13-8 (17,7 mg).

A análise por CCD utilizando como eluente hexano/AcOEt (9:1) e solução de Ce(SO₄)₂ como revelador originou uma mancha roxa de bordas

azuis. A análise de HE13-8 por RMN ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura permitiu a identificação do composto **1** (Esquema 3).

4.6.2 Fracionamento do grupo HE22

O grupo HE22 (19-24, 480 mg) apresentou manchas de coloração roxa e alaranjada características de terpenoides na cromatoplaça eluída com hexano/AcOEt (8:2) e revelada com solução de sulfato cérico. Este grupo de frações foi submetido à cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano/ CH_2Cl_2 (1:4), fornecendo 30 frações que foram reunidas em oito subgrupos.

O subgrupo HE22-5 (23,3 mg) apresentou aspecto de um sólido branco amorfo (Esquema 3). A análise por CCD, utilizando como eluente hexano/AcOEt (85:15) e solução de sulfato cérico para revelação da cromatoplaça, mostrou uma mancha de coloração laranja que durante o aquecimento se tornava gradativamente roxa, que forneceu o composto **7**.

O subgrupo HE22-9 (33,0 mg) foi obtido como um óleo incolor e ao ser analisado por CCD, usando hexano/AcOEt (8:2) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador, apresentou uma mancha de coloração roxa indicando tratar-se do composto **2** (Esquema 3).

4.6.3 Fracionamento do grupo HE25

O grupo HE25 (25-28, 291 mg), eluído com hexano/AcOEt (95:5) da coluna de gel de sílica da fração hexano, foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 utilizando com o eluente hexano/ CH_2Cl_2 (1:4), fornecendo a fração HE25-9 (11,2 mg), conforme demonstrado no Esquema 3.

A análise desta fração por CCD, usando como eluente hexano/AcOEt (8:2) e solução de $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$ como revelador, apresentou uma mancha de coloração roxa, que após análise por RMN ^1H e ^{13}C e comparação com a literatura resultou na identificação do composto **5**.

4.6.4 Fracionamento do grupo HE32

O grupo HE32 (29-45, 234 mg), resultante da cromatografia em coluna de gel de sílica da fração hexano, eluído com hexano/AcOEt (95:5), foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 com o eluente hexano/CH₂Cl₂ (1:4), resultando na fração HE32-8 (26,6 mg) (Esquema 3). A análise por CCD usando como eluente hexano/AcOEt (8:2) e solução de sulfato cérico como revelador, originou uma mancha azul que se tornou rosa durante o aquecimento e posteriormente, desbotou para cinza. A fração foi analisada por RMN ¹H e ¹³C e por comparação com a literatura permitindo identificar uma mistura contendo os compostos **12** e **14**.

Uma alíquota da fração HE32-8 foi solubilizada em diclorometano com concentração de 1 mg mL⁻¹. A solução foi transferida para um frasco de 2 mL e o solvente evaporado. Posteriormente, foram adicionados 250 µL de piridina tratada e 50 µL de BSTFA (*N*-O-bis-(trimetilsilil)trifluoroacetamida). O frasco foi lacrado e a mistura submetida a aquecimento entre 40 e 50 °C durante 1 hora. Este procedimento forneceu os derivados sililados que foram solubilizados em acetato de etila.

Os derivados sililados obtidos pela derivatização da fração HE32-8 foram analisados por CG-EM nas seguintes condições: programação do forno foi inicialmente de 130 °C durante 2min com taxa de aquecimento de 15 °C min⁻¹ até 315 °C, permanecendo nessa temperatura por 30min. As temperaturas do injetor e interface foram de 300 °C e 310 °C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o hélio com fluxo de 1 mL min⁻¹ e injeção de 1 µL no modo *split* (10:1). A temperatura da fonte de íons no espectrômetro de massas foi de 260 °C, com tempo total de análise de 44,33min e corte do solvente em 5min, operando na faixa de 40 a 680 Da.

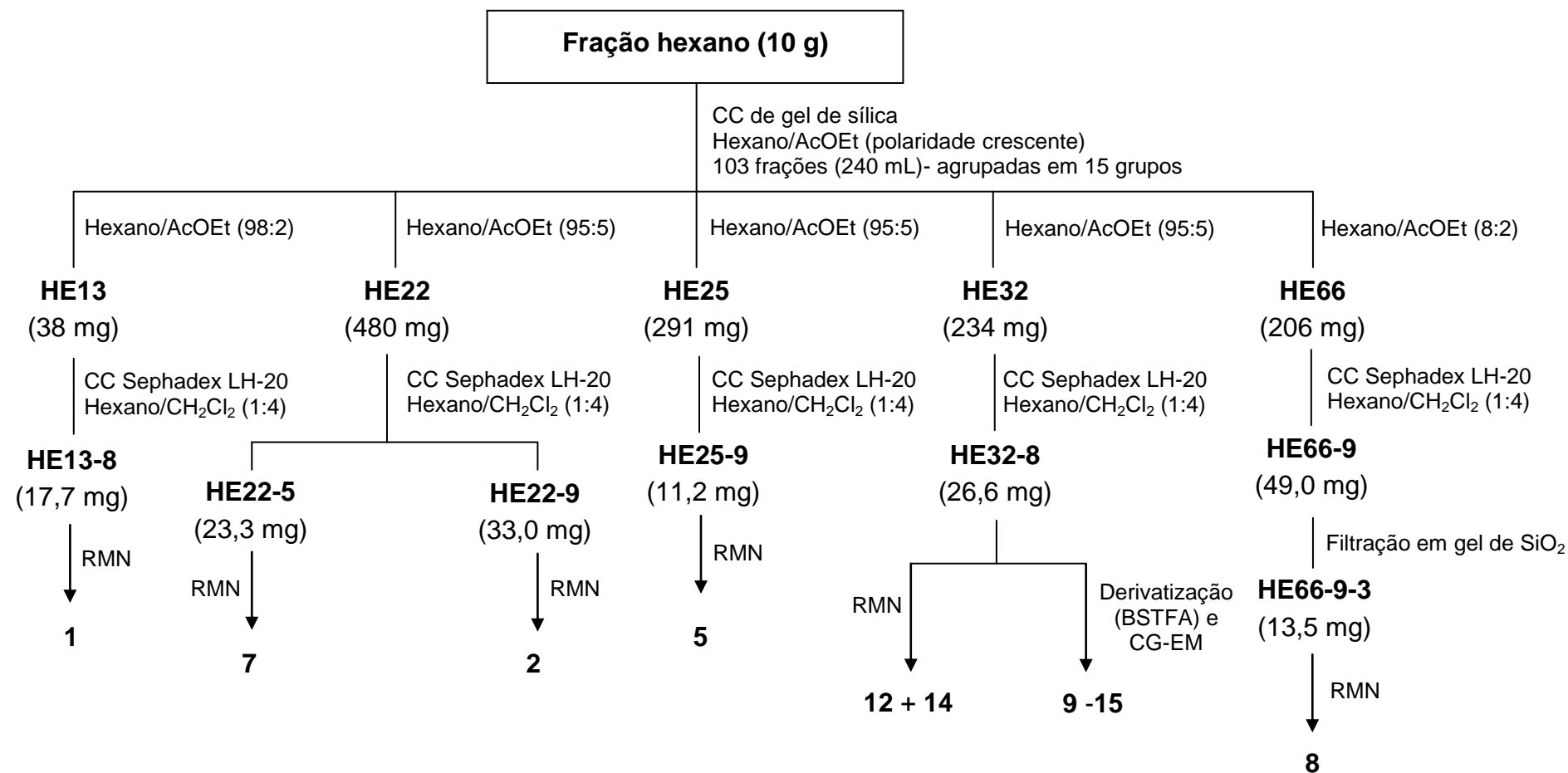
O cromatograma de íons totais apresentou sete bandas e a identificação dos compostos foi realizada com base nos espectros de massas e por comparação com dados da biblioteca NIST08 do equipamento. A análise confirmou a presença dos compostos **12** e **14** e permitiu a identificação de mais cinco esteroides (**9-11**, **13** e **15**).

4.6.5 Fracionamento do grupo HE66

O grupo HE66 (66-68, 206 mg) obtido do fracionamento cromatográfico da fração hexano em coluna de gel de sílica, eluído com hexano/AcOEt (8:2), foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20, utilizando como eluente hexano/CH₂Cl₂ (1:4), fornecendo 25 frações que foram reunidas em sete subgrupos.

A cromatoplaça do subgrupo HE66-9 (49,0 mg) eluída com hexano/AcOEt (6:4) apresentou uma mancha de coloração alaranjada que se tornou roxa durante o aquecimento, sendo posteriormente, submetido a filtração em pipeta de Pasteur com gel de sílica eluída com hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade, fornecendo 23 frações que foram reunidas em seis subgrupos após análise por CCD (Esquema 3). O subgrupo HE66-9-3 (13,5 mg) obtido como um sólido com aspecto de agulhas incolores apresentou coloração roxa na cromatoplaça e permitiu a obtenção do composto **8**.

Esquema 3- Obtenção e fracionamento cromatográficos dos grupos HE13, HE22, HE25, HE32 e HE66 provenientes da fração hexano das folhas *E. pisocarpus*



4.7 Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano

A fração diclorometano (10 g) proveniente da partição do extrato etanólico das folhas de *E. pisocarpus* foi fracionada por cromatografia em coluna de gel de sílica (50 cm x 5 cm, 270 g) utilizando a mistura de hexano e acetato de etila, em ordem crescente de polaridade como eluente. Foram coletadas 66 frações de 240 mL. As frações foram concentradas em evaporador rotativo, analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas em 13 grupos (Tabela 3), de acordo com a cor e fator de retenção (R_f). Os grupos DM6, DM20 e DM22 foram purificados por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 e gel de sílica.

Tabela 3- Frações obtidas no fracionamento cromatográfico em gel de sílica da fração diclorometano das folhas de *E. pisocarpus*

Grupo	Frações reunidas	Eluente	Massa (mg)
DM1	1-5	Hexano (100%)	37
DM6	6-7	Hexano/AcOEt (95:5)	118
DM8	8-11	Hexano/AcOEt (95:5)	623
DM12	12-19	Hexano/AcOEt (9:1)	245
DM20	20-21	Hexano/AcOEt (8:2)	102
DM22	22-24	Hexano/AcOEt (8:2)	215
DM25	25-30	Hexano/AcOEt (8:2)	341
DM31	31-34	Hexano/AcOEt (8:2)	233
DM35	35-38	Hexano/AcOEt (8:2)	225
DM39	39-41	Hexano/AcOEt (7:3)	360
DM42	42-44	Hexano/AcOEt (7:3)	281
DM45	45-51	AcOEt (100%)	2720
DM52	52-66	MeOH (100%)	3176
			Total: 8,67 g

4.7.1 Fracionamento do grupo DM6

O grupo DM6 (6-7, 118 mg), obtido da cromatografia em coluna de gel de sílica da fração diclorometano, eluído com hexano/AcOEt (95:5), ao ser analisado por CCD utilizando hexano/AcOEt (8:2) como eluente e solução de sulfato cérico como revelador apresentou manchas de coloração roxa. Este grupo foi submetido à filtração em uma bureta (50 mL) com gel de sílica, eluída com hexano/AcOEt em ordem crescente de polaridade, fornecendo 20 frações que foram reunidas em seis subgrupos (Esquema 4).

O subgrupo DM6-9 (6,7 mg) foi obtido como um óleo incolor e a análise por RMN ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura permitiu identificar o composto **2**.

4.7.2 Fracionamento do grupo DM20

O grupo DM20 (20-21, 102 mg), resultante do fracionamento cromatográfico da fração diclorometano, apresentou uma mancha de coloração roxa na cromatoplaça eluída com hexano/AcOEt (7:3) e revelada com solução de sulfato cérico. Este grupo foi submetido a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 utilizando hexano/ CH_2Cl_2 (1:4) como eluente e forneceu 23 frações que foram reunidas em nove subgrupos.

O subgrupo DM20-10 (17,0 mg) foi filtrado em pipeta de Pasteur com gel de sílica, eluída com CHCl_3 , rendendo quinze frações que foram reunidas em seis subgrupos após análise por CCD (Esquema 4).

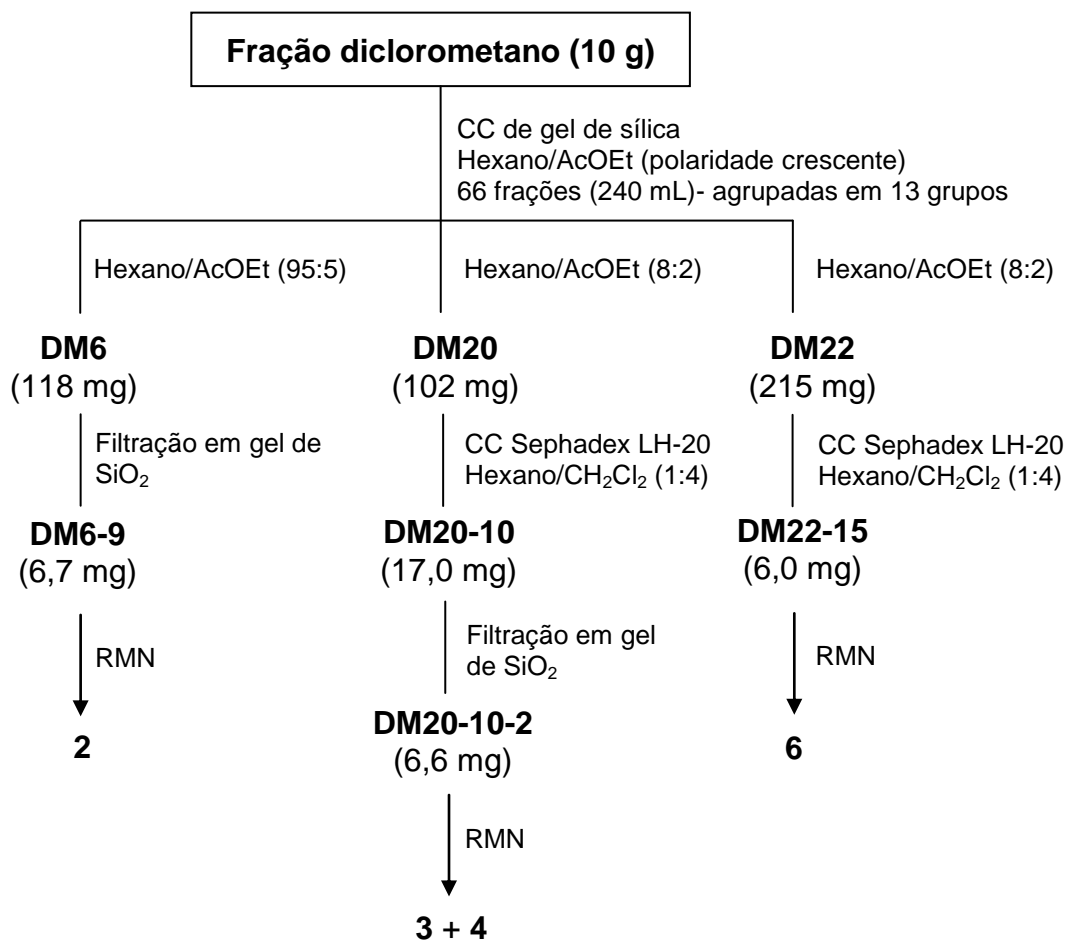
O subgrupo DM20-10-2 (6,6 mg) foi obtido como um óleo incolor contendo uma mistura dos compostos **3** e **4**.

4.7.3 Fracionamento do grupo DM22

O grupo DM22 (22-24, 215 mg), proveniente da cromatografia em coluna de gel de sílica da fração diclorometano, eluído com hexano/AcOEt (8:2) foi purificado por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluente hexano/ CH_2Cl_2 (1:4) resultando em 25 frações que foram reunidas em nove subgrupos.

A cromatoplaça do subgrupo DM22-15 (6,0 mg), eluída com hexano/AcOEt (7:3) e revelada com solução de sulfato cérico apresentou manchas de coloração roxa (Esquema 4), que resultaram na obtenção do composto **6**.

Esquema 4- Obtenção e fracionamento cromatográficos dos grupos DM6, DM20 e DM22 provenientes da fração diclorometano das folhas *E. pisocarpus*



4.8 Grupos adicionais obtidos nos fracionamentos cromatográficos das frações hexano e diclorometano das folhas de *E. pisocarpus*

Os grupos HE71, HE92, DM15, DM29 e DM35, provenientes das frações hexano (Tabela 2) e diclorometano (Tabela 3), forneceram os subgrupos HE71-8 (5,5 mg), HE92-10 (10,3 mg), DM15-5 (5,9 mg), DM29-7 (14,8 mg), DM29-14 (9,5 mg), DM35-11 (9,5 mg) e DM35-13 (7,5 mg), respectivamente. Os cinco grupos foram purificados por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 utilizando como eluentes hexano/CH₂Cl₂ (1:4) ou CH₂Cl₂/acetona (3:2).

Os perfis cromatográficos dos subgrupos isolados foram obtidos por CCD. Posteriormente, essas amostras serão analisadas por RMN ^1H e ^{13}C para identificação de seus constituintes químicos. Os demais grupos não se demonstraram promissores para realização de fracionamento cromatográfico.

4.9 Análise da fração acetato de etila das folhas de *Ephedranthus pisocarpus* por ESI-ITMS

A fração acetato de etila foi analisada por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e analisador tipo armadilha de íons. A análise foi realizada no modo negativo ($[\text{M-H}]^-$) na faixa de m/z 100-1300 Da com os seguintes parâmetros: voltagem do capilar de 4,5 kV, o nebulizador de nitrogênio com fluxo de $8,0 \text{ L min}^{-1}$ e pressão de 8 psi. O fluxo da seringa foi $3,0 \mu\text{L min}^{-1}$ e a temperatura da fonte de $220 \text{ }^\circ\text{C}$. O tratamento dos dados foi realizado em *software* Compass 1.3 Data Analysis (versão 4.0, Bruker Daltonics).

4.10 Avaliação do potencial biológico do extrato e frações das folhas de *E. pisocarpus*

4.10.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do extrato etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa foi determinada pelo método espectrofotométrico baseado no sequestro do radical DPPH (SOUSA et al., 2007).

As soluções estoque do extrato e frações ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$) foram preparadas solubilizando-se 12,5 mg das amostras em 10 mL de MeOH e posteriormente, diluídas nas concentrações de 200, 150, 100, 50 e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. A solução estoque de DPPH foi preparada em MeOH, com concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$.

As medidas da absorbância das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra e 2,7 mL da solução estoque de DPPH) foram realizadas em triplicata a 516 nm, no 1° , 5° , 10° , 20° e 30° minutos. A mistura de 2,7 mL de

metanol e 0,3 mL da solução das amostras foi utilizada como branco. A rotina foi utilizada como controle positivo e avaliada nas mesmas concentrações.

A determinação da concentração de DPPH das amostras foi realizada pela equação da curva analítica $A = 33,227c + 1,0607$, construída com o DPPH, onde “A” é a absorbância no comprimento de onda de 516 nm e “c” é a concentração do DPPH. O coeficiente de correlação linear (r) da curva foi de 0,9997.

Os percentuais de atividade antioxidante (%AA) e DPPH remanescente (%DPPHrem) das amostras foram determinados a partir dos valores de absorbâncias nas diferentes concentrações testadas, no tempo de 30min. A %AA foi obtida, utilizando a Equação 1:

$$\%AA = \frac{Abs_{DPPH} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{Abs_{DPPH}} \times 100 \quad \text{Equação 1}$$

Onde, Abs_{DPPH} , é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH; $Abs_{amostra}$ é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra) e Abs_{branco} é a absorbância do branco (MeOH + amostra).

O percentual de DPPH remanescente ou residual (%DPPHrem) foi determinado conforme a Equação 2:

$$\%DPPH_{rem} = \frac{DPPH_{t=30}}{DPPH_{t=0}} \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde, $(DPPH)_{t=30}$ é a absorbância da mistura reacional de DPPH e amostra após 30min de reação, e $(DPPH)_{t=0}$ é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH.

A concentração eficiente (CE_{50}) foi calculada a partir da curva exponencial de primeira ordem das concentrações das amostras *versus* o percentual de DPPH remanescente (%DPPHrem). A CE_{50} é a concentração capaz de reduzir em 50% a concentração do radical DPPH (SOUSA et al., 2007).

4.10.2 Determinação do teor de fenóis totais (FT)

O teor de fenóis totais do extrato etanólico e frações das folhas de *E. piscocarpus* foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu conforme descrito por Sousa et al. (2007).

Soluções metanólicas das amostras foram preparadas na concentração de 1000 µg mL⁻¹. Uma alíquota de 100 µL dessa solução foi transferida para um balão volumétrico de 10 mL e adicionados 500 µL do reagente de Folin-Ciocalteu, 5 mL de água destilada e agitada por 1 minuto. Em seguida, acrescentou-se 2 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 15% (m/v) e agitou-se por 30 segundos. O volume foi completado com água destilada.

O branco foi preparado seguindo o mesmo procedimento, contudo a amostra foi substituída por 100 µL de MeOH. O tempo reacional foi de duas horas e a leitura da absorbância das amostras feita em espectrofotômetro UV-Vis, no comprimento de onda de 750 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com o padrão ácido gálico (10 a 350 µg mL⁻¹) e expressa por: $A = 0,1185C - 0,0453$, onde “A” é a absorbância e “C” é a concentração, com coeficiente de correlação linear igual a 0,999. O teor de FT foi expresso em miligrama de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g⁻¹ de amostra).

4.10.3 Atividade fotoprotetora

A atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato etanólico e frações foi avaliada por espectrofotometria na região do UV-Vis. Na análise foram preparadas soluções etanólicas do extrato e das frações nas concentrações de 100, 50, 25 e 5 mg mL⁻¹. A varredura espectrofotométrica das amostras foi realizada na faixa de comprimento de onda entre 200 e 450 nm, com intervalos de 5 nm, utilizando-se cubetas de quartzo. As análises foram realizadas em triplicata (OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013).

Os cálculos para determinação do Fator de Proteção Solar (FPS) foram realizados de acordo com os intervalos de comprimento de onda apresentados na Tabela 4 e pela substituição das absorvâncias encontradas na Equação 3.

$$FPS \text{ espectrofotométrico} = FC \times \sum_{290}^{320} EE(\lambda) \times I(\lambda) \times Abs(\lambda) \quad \text{Equação 3}$$

Onde, EE (λ)= espectro do efeito eritemal; I(λ) = espectro de intensidade solar; Abs(λ)= absorvância do produto da proteção solar; FC= fator de correção que é igual a 10. Os valores de EE x I são constantes, tendo sido determinados por Sayre et al. (1979).

Tabela 4- Função normalizada do produto utilizado no cálculo do FPS

Comprimento de onda (nm)	EE x I
290	0,0150
295	0,0817
300	0,2874
305	0,3278
310	0,1864
315	0,0839
320	0,0180
Total: 1,0000	

4.10.4 Atividade citotóxica

A atividade citotóxica *in vitro* do extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus* foi avaliada pelo método MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] frente a linhagem B16-F10 (melanoma murino). Às soluções estoque das amostras (80 mg mL⁻¹) foram acrescentados 1 mL de DMSO e, posteriormente, diluídas nas concentrações de 5, 50 e 500 μ L mL⁻¹.

As células da linhagem B16-F10 foram adquiridas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ, Brasil) e cultivadas em frascos de cultivo celular contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de SBF (soro bovino fetal) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina). As células foram mantidas em

incubadora com 5% de CO₂ a 37 °C e os meios de cultura foram trocados a cada 48 h (MOSMAN, 1983).

As células foram incubadas em placas de 96 poços por 48h a 37 °C com 5% de CO₂, numa densidade de 2x10⁴ células/poço. Em seguida, as placas foram centrifugadas para remoção do sobrenadante. Adicionou-se a solução de MTT (5 mg mL⁻¹) e as placas foram incubadas por 4h (MOSMAN, 1983).

A absorbância das amostras foi determinada em espectrofotômetro do tipo leitor de ELISA a 550, após a solubilização do precipitado em DMSO. A doxorrubicina (10 µM) foi utilizada como controle positivo. O grupo controle foi considerado com 100% de viabilidade celular. A análise foi realizada no Núcleo de Plantas Mediciniais (NPPM - UFPI) sob supervisão do Prof. Dr. Juan Carlos Ramos Gonçalves.

4.10.5 Atividade antileishmania

A atividade antileishmania do extrato etanólico e frações das folhas de *E. piscocarpus* foi avaliada nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em fase logarítmica de crescimento.

Os parasitas foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider's suplementado, na quantidade de 1x10⁶ leishmania para 100 µL de meio. Em seguida, as amostras foram adicionadas aos poços e posteriormente diluídas em oito concentrações (6,25-800 µg mL⁻¹), sendo cada concentração analisada em triplicata. A placa foi incubada em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (D.B.O.) a temperatura de 26 °C durante 48h e quando restavam 6h para o término deste período foram adicionados 20 µL de resazurina 1x10⁻³ mol L⁻¹ e a placa foi novamente incubada (SOARES et al., 2007; VALADARES et al., 2011).

A leitura da absorbância das amostras foi realizada em leitor de placas modelo ELX800 (Biotek) a 550 nm e os resultados expressos em percentuais de inibição do crescimento. O controle positivo utilizado foi a anfotericina B (2,0 µg mL⁻¹) (SOARES et al., 2007; VALADARES et al., 2011). Esta análise foi realizada no Laboratório de Atividade Antileishmania (UFPI) sob a supervisão do Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho.

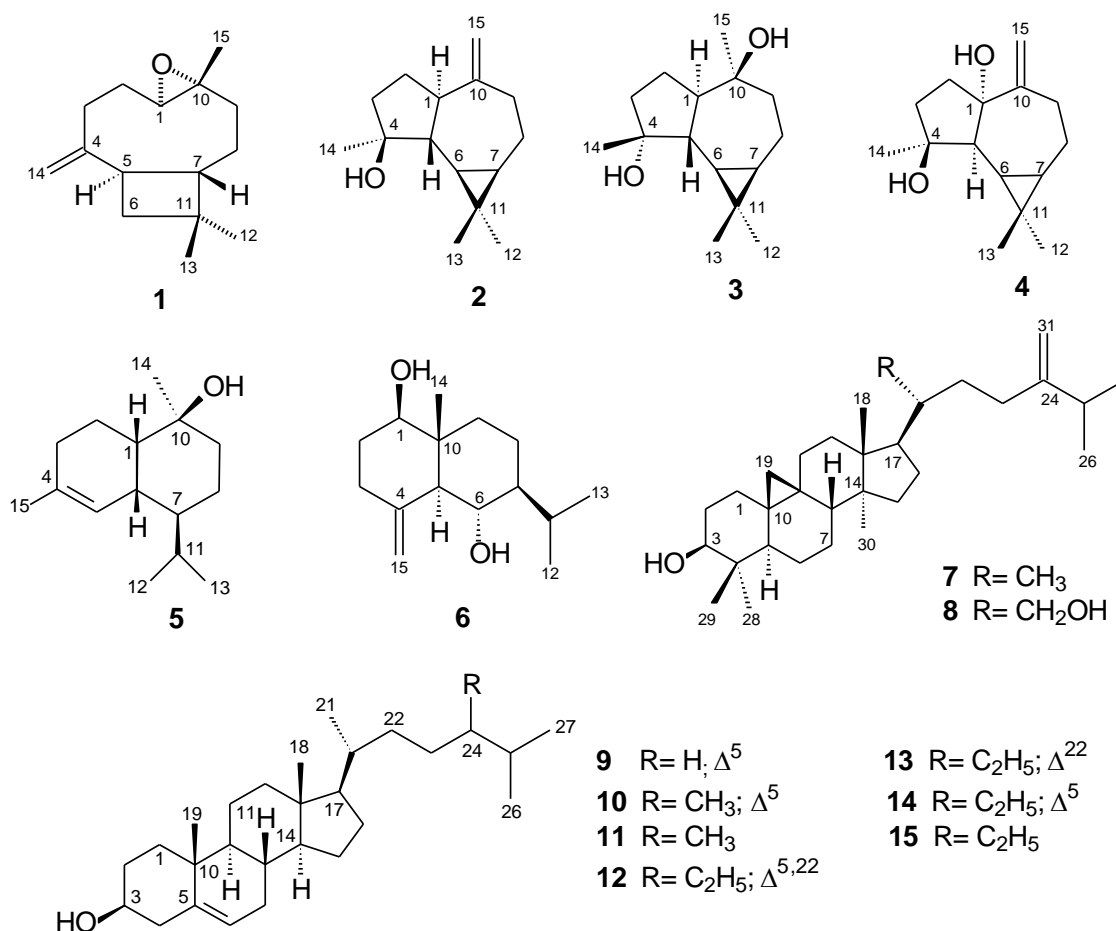
4.11 Análise estatística

Os resultados obtidos nas atividades antioxidante, fotoprotetora, citotóxica e antileishmania foram apresentados como a média de três repetições ($n=3$) \pm desvio padrão da média (DP). As diferenças encontradas foram estatisticamente significativas quando $p < 0,05$. O tratamento dos dados do potencial antioxidante e fotoprotetor foi realizado utilizando os programas *Excel* e *Microcal Origin 8*. Os experimentos de citotoxicidade *in vitro* frente à linhagem de células de melanoma foram analisados usando o programa *GraphPad Prism*.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

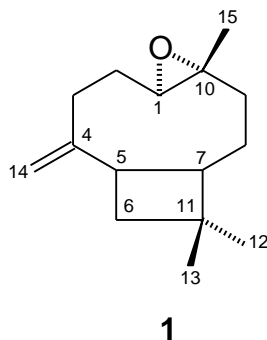
5.1 Estruturas dos compostos isolados e/ou identificados nas folhas de *E. piscarpus*

O fracionamento cromatográfico das frações hexano e diclorometano por técnicas convencionais (Esquemas 2 e 3), seguido de análise por métodos espectroscópicos de RMN de ^1H e ^{13}C e comparação com dados da literatura permitiram o isolamento e identificação de quinze compostos. As estruturas desses metabólitos incluem os sesquiterpenoides: óxido de cariofileno (**1**), espatulenol (**2**), $4\alpha,10\beta$ -aromadendranodiol (**3**), 1α -hidróxi-espatulenol (**4**), T-muurolol (**5**) e $1\beta,6\alpha$ -di-hidróxi-4(15)-eudesmeno (**6**), os triterpenoides: 24-metilenocicloartanol (**7**) e 24-metilenocicloartano- $3\beta,21$ -diol (**8**) e os esteroides: colesterol (**9**), campesterol (**10**), campestanol (**11**), estigmasterol (**12**), Δ^{22} -estigmasterol (**13**), sitosterol (**14**) e sitostanol (**15**).



5.2 Identificação estrutural dos compostos isolados das folhas de *Ephedranthus pisocarpus*

5.2.1 Identificação estrutural do composto 1



O composto **1** (17,7 mg) foi isolado como um óleo incolor solúvel em clorofórmio obtido do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo HE13 proveniente da fração hexano das folhas de *E. pisocarpus* (Esquema 3, p. 46).

O espectro de RMN ^1H (Figura 7, Tabela 5) apresentou três simpletos em δ 0,98, 1,00 e 1,19 característicos de hidrogênios metílicos ligados a carbono não hidrogenado. Os dois simpletos largos em δ 4,97 (H-14') e 4,85 (H-14'') foram atribuídos a hidrogênios geminais de ligação dupla exocíclica. Adicionalmente, foi observado um sinal em δ 2,87 (dd, $J=10,6$ e $4,2$ Hz) atribuído ao hidrogênio oximetínico H-1 de epóxido (MOREIRA et al., 2007).

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 8, Tabela 5) apresentou quinze sinais mais intensos. As análises dos espectros DEPT 135° e 90° (Figuras 9 e 10) possibilitaram afirmar a existência de três sinais de carbonos metílicos (3 CH_3), seis metilênicos (6 CH_2), três metínicos (3 CH) e três de carbonos não hidrogenados. Os sinais em δ 151,9 (C-4) e 112,8 (C-14) confirmam a presença da ligação dupla exocíclica, e os dois sinais em δ 63,9 (C-1) e 59,9 (C-10) são referentes a carbonos ligados a oxigênio de epóxido. Esta análise sugere uma fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 4, sendo uma delas atribuídas a ligação dupla e as demais correspondentes a uma estrutura tricíclica.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para o composto **1** com os relatados por Moreira et al. (2007) permitiram identificar o óxido de cariofileno. Este

sesquiterpenoide apresenta atividades analgésica, anti-inflamatória, antifúngica e antimicrobiana (CHAVAN; WARTE; SHINDE, 2010; COSTA et al., 2011).

Tabela 5- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **1** (400 e 100 MHz, δ /ppm, J/Hz, CDCl_3)

Deslocamento Químico δ (ppm)			
C/H	δ_{C}	δ_{H}	Óxido de cariofileno*
1	63,9 (CH)	2,87 (dd, $J= 10,6$ e $4,2$ Hz)	64,0
2	30,3 (CH_2)		30,4
3	29,9 (CH_2)		30,0
4	151,9 (C)		152,1
5	48,8 (CH)		49,0
6	39,9 (CH_2)		40,0
7	50,9 (CH)		50,9
8	27,3 (CH_2)		27,4
9	39,3 (CH_2)		39,4
10	59,9 (C)		60,0
11	34,1 (C)		34,2
12	21,7 (CH_3)	1,00 (s)	21,8
13	30,0 (CH_3)	0,98 (s)	30,2
14	112,8 (CH_2)	4,97 e 4,85 (sl)	113,0
15	17,1 (CH_3)	1,19 (s)	17,2

*Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Moreira et al. (2007)

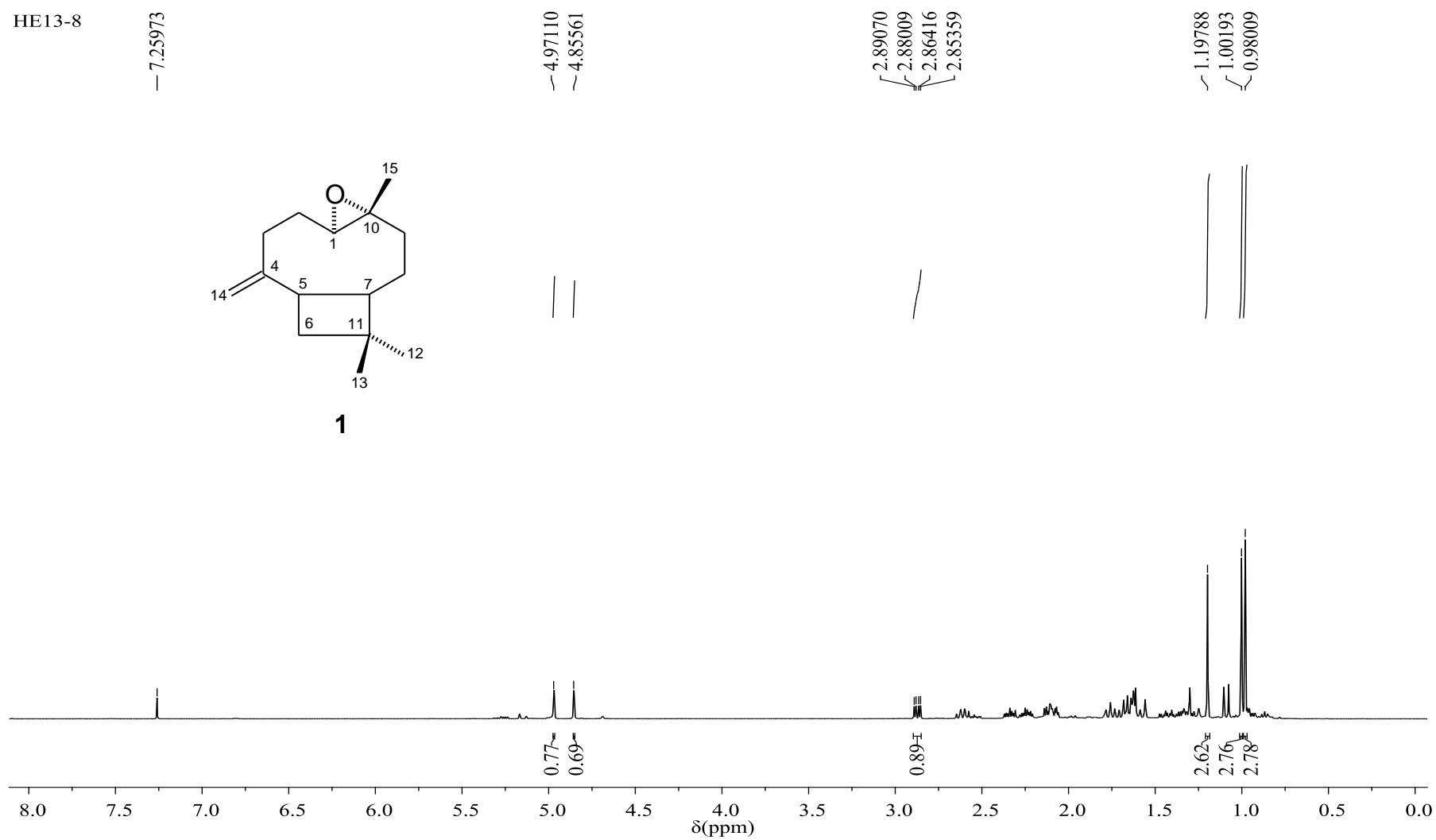
Figura 7- Espectro de RMN ^1H do composto **1** (CDCl_3 , 400 MHz)

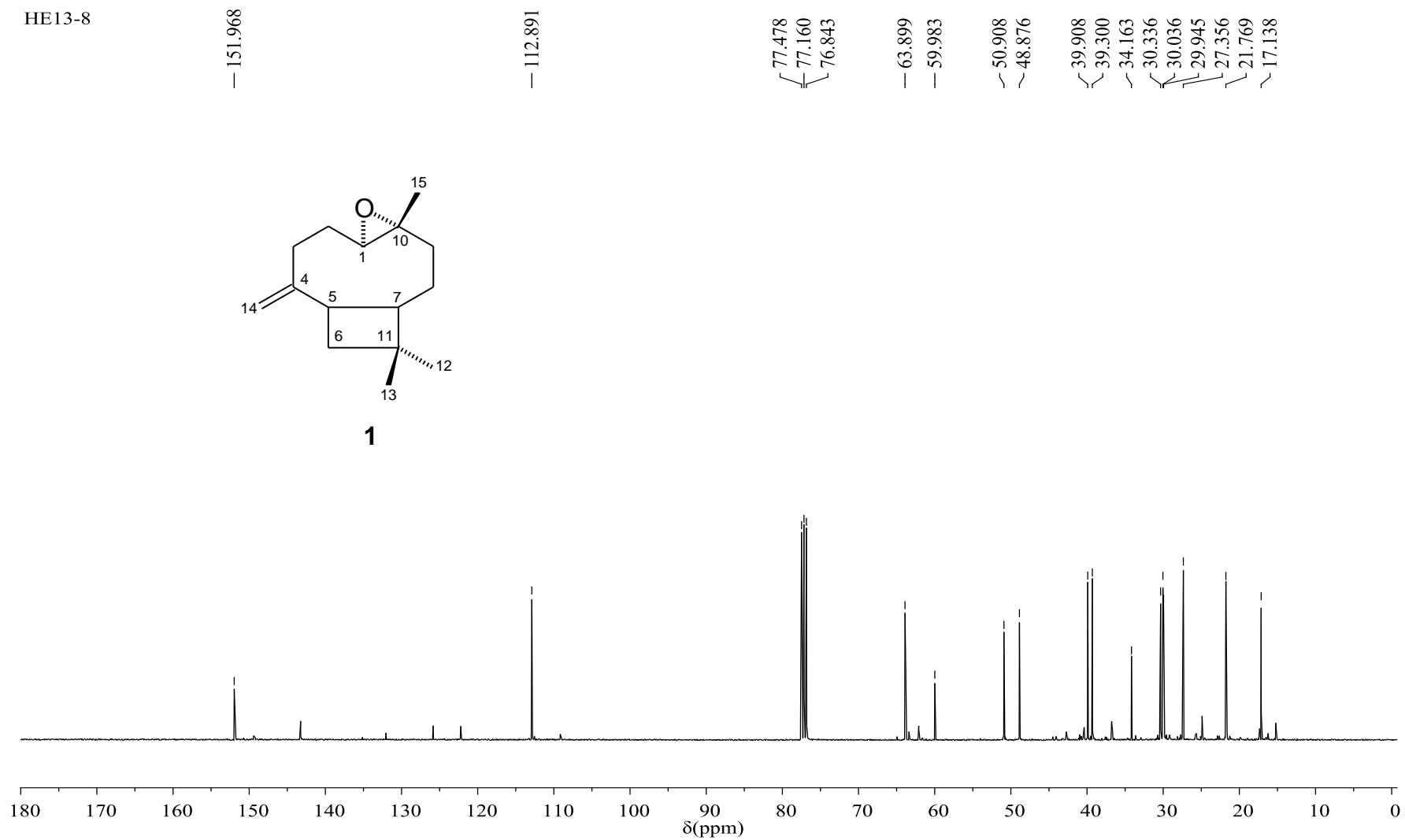
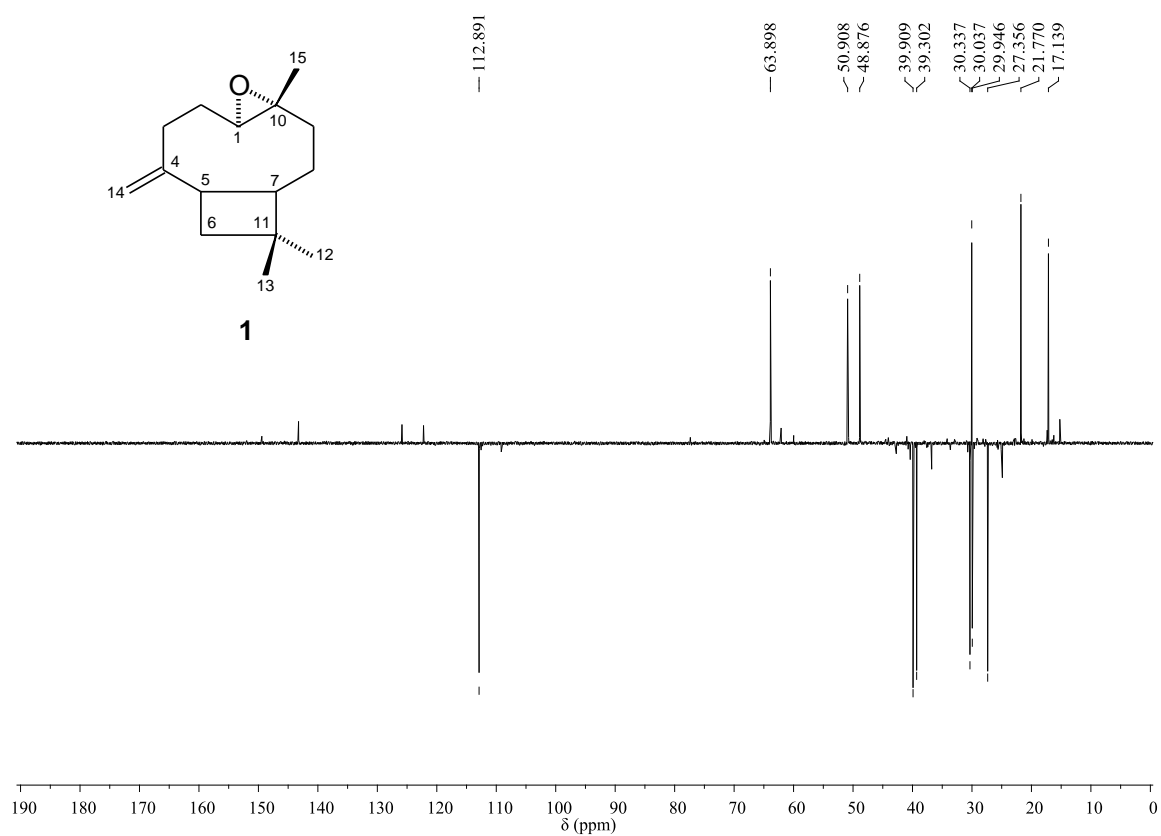
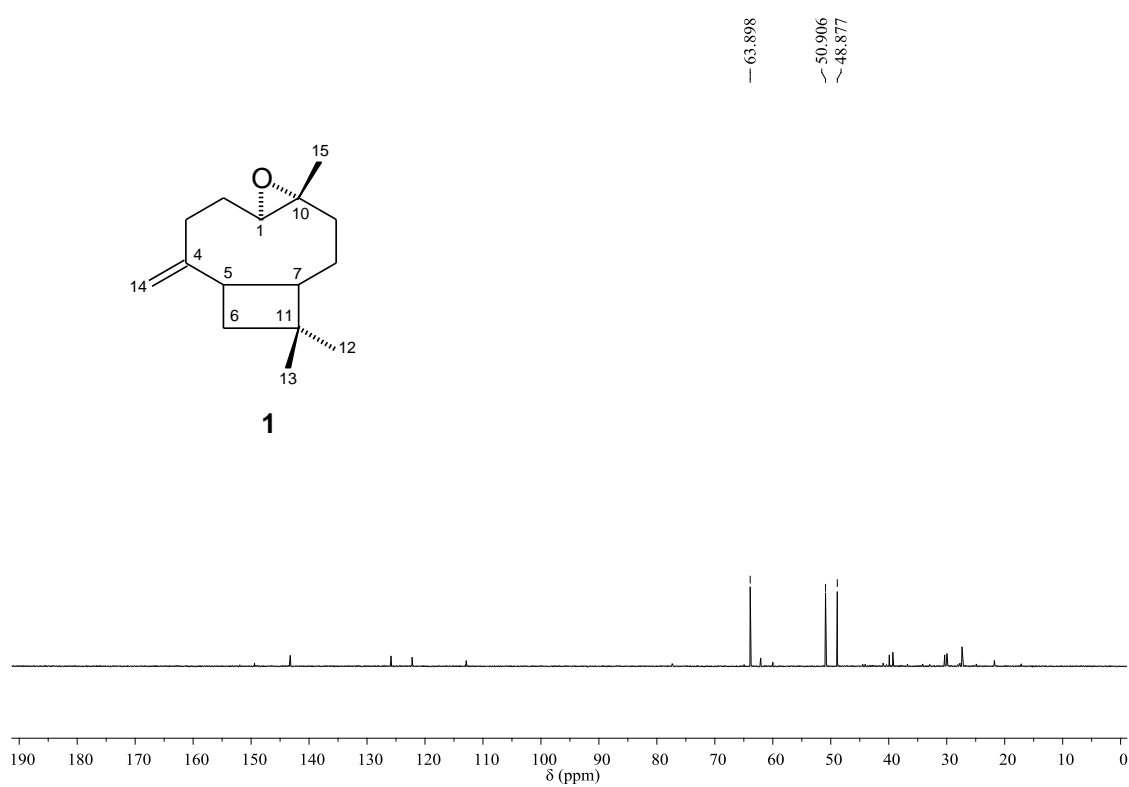
Figura 8- Espectro de RMN ^{13}C do composto **1** (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 9- DEPT 135° do composto 1 (CDCl₃, 100 MHz)Figura 10- DEPT 90° do composto 1 (CDCl₃, 100 MHz)

(2) apresenta atividades anti-inflamatória (NASCIMENTO et al., 2018), repelente contra *Aedes aegypti* e *Anopheles stephensi* (CANTRELL et al., 2005) e moderada citotoxicidade frente a linhagem celular KB (carcinoma epidermóide oral humano) (LIMBERGER et al., 2004).

Tabela 6- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto 2 (400 e 100 MHz, δ /ppm, J/Hz CDCl_3)

Deslocamento Químico δ (ppm)			
C/H	δ_{C}	δ_{H}	EspatulenoI*
1	54,4 (CH)	2,42 (dd, $J= 13,4$ e $5,6$ Hz)	54,3
2	26,8 (CH_2)		26,7
3	41,8 (CH_2)		41,7
4	81,1 (C)		80,9
5	53,5 (CH)		53,3
6	30,0 (CH)	0,46 (dd, $J= 11,3$ e $9,5$ Hz)	29,9
7	27,6 (CH)	0,72 (m)	27,4
8	24,9 (CH_2)		24,8
9	39,0 (CH_2)		38,8
10	153,5 (C)		153,4
11	20,4 (C)		20,2
12	28,8 (CH_3)	1,03 (s)	28,6
13	16,4 (CH_3)	1,05 (s)	16,2
14	26,2 (CH_3)	1,28 (s)	26,0
15	106,4 (CH_2)	4,69 e 4,66 (s)	106,2

*Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Moreira et al. (2007)

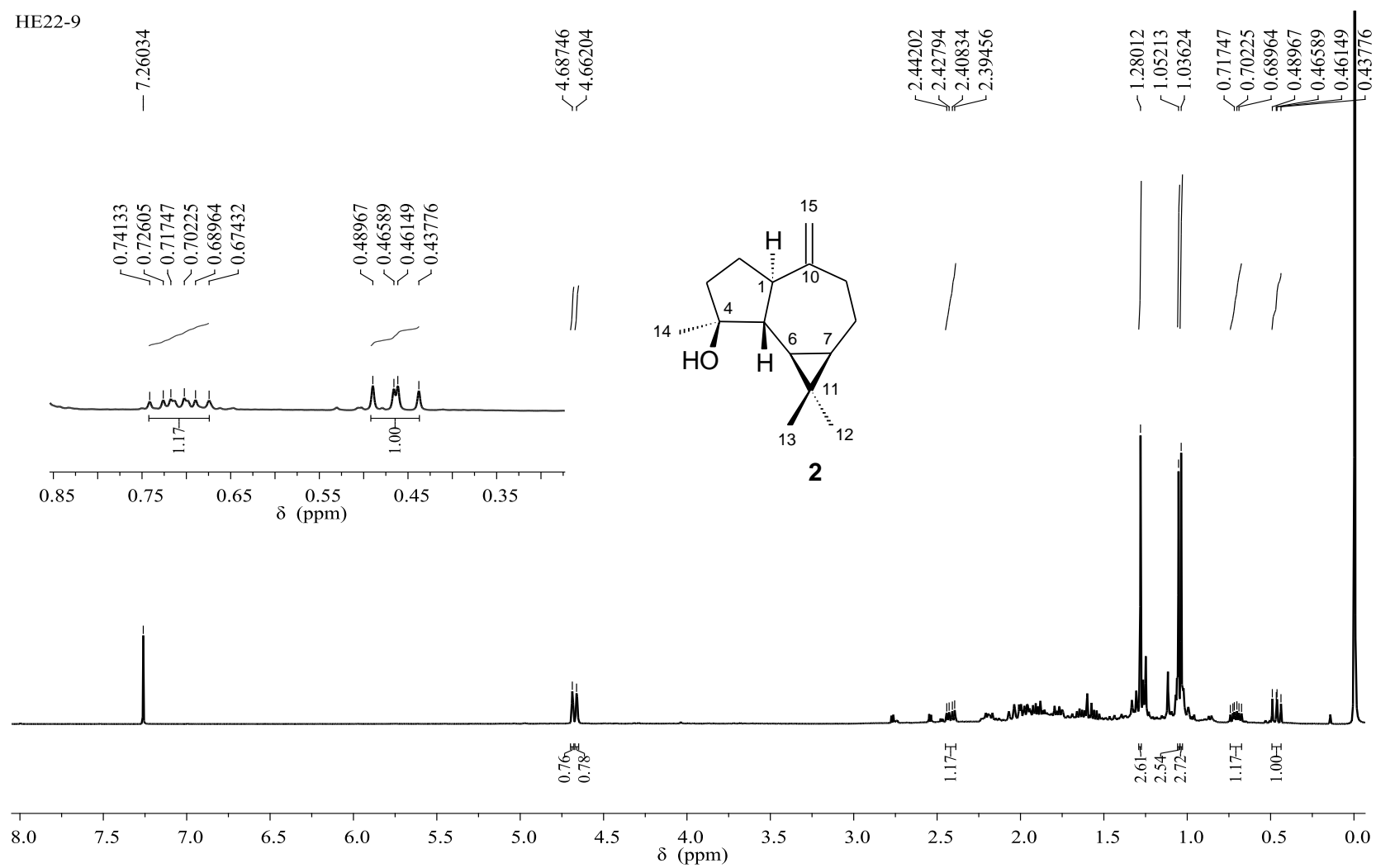
Figura 11- Espectro de RMN ^1H do composto **2** (CDCl_3 , 400 MHz)

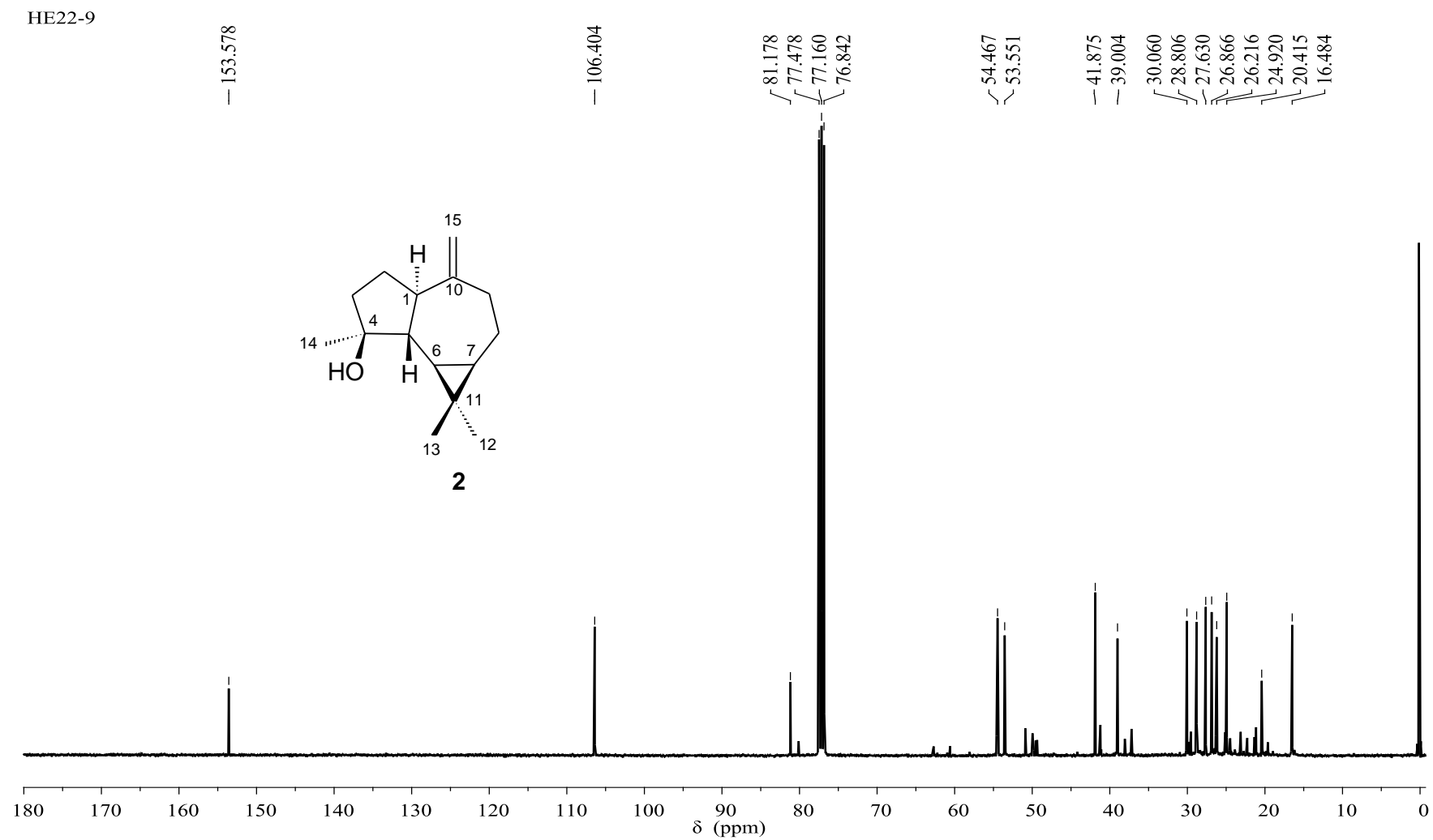
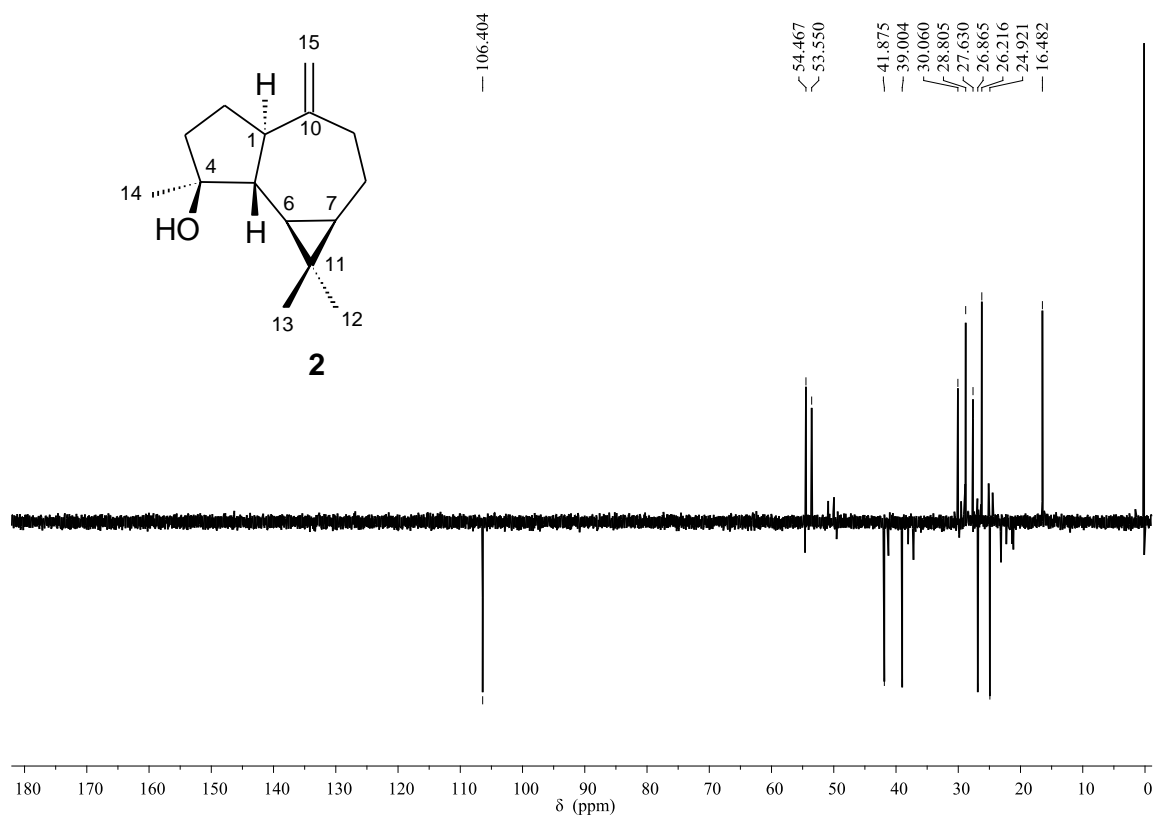
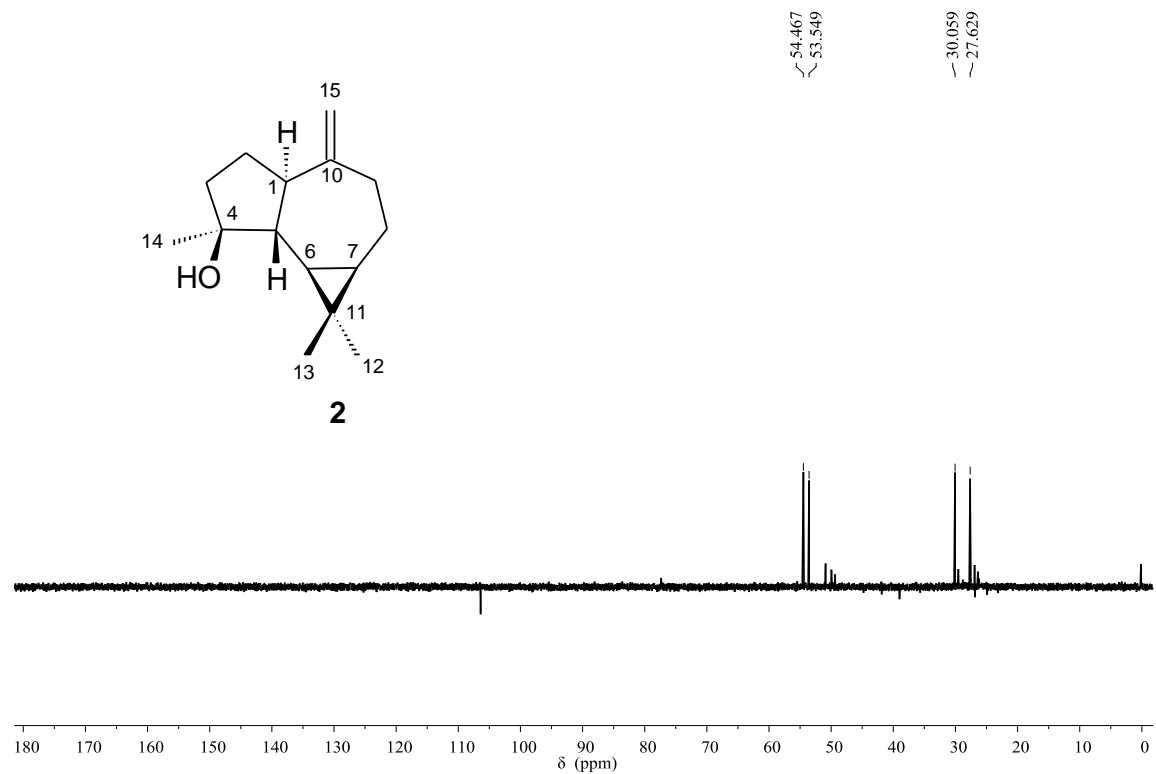
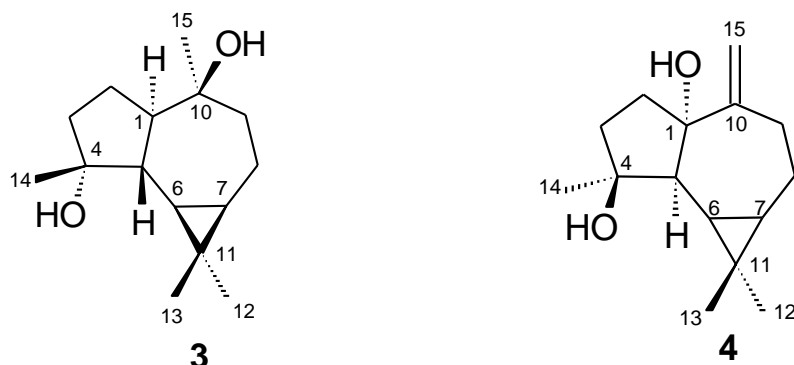
Figura 12- Espectro de RMN ^{13}C do composto **2** (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 13- DEPT 135° do composto **2** (CDCl₃, 100 MHz)Figura 14- DEPT 90° do composto **2** (CDCl₃, 100 MHz)

5.2.3 Identificação estrutural dos compostos 3+4



Os compostos **3** e **4** (6,6 mg) foram obtidos em mistura, como um óleo incolor, solúvel em clorofórmio. Esta mistura foi isolada do subgrupo DM20-10, obtido do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DM20 proveniente do fracionamento cromatográfico da fração diclorometano das folhas de *E. pisocarpus* (Esquema 4, p. 49).

O espectro de RMN ^1H (Figura 15) apresentou perfil característico de sesquiterpenoides de esqueleto aromadendrano, evidenciado pela presença de sinais em δ 0,67 (m, H-7) (composto **3**), 0,52 (dd, $J=11,3$ e $9,3$ Hz, H-6) e 0,84 (m, H-7) (composto **4**) (GOLDSBY; BURKE, 1987; MOREIRA et al., 2003b; CHEN et al., 2016). Adicionalmente foram observados simpletos entre δ 1,03-1,34 atribuídos a hidrogênios metílicos.

O espectro de RMN ^{13}C (Figuras 16 e 17, Tabela 7) apresentou trinta sinais, 15 mais intensos, que em comparação com os espectros DEPT 135° e 90° (Figuras 18-20) foram classificados em sete carbonos metílicos, nove metilênicos, sete metínicos e sete não hidrogenados. Estes dados permitiram atribuir para os compostos **3** e **4** as fórmulas moleculares $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$ e $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_2$, respectivamente. Os sinais em δ 20,3 (composto **3**) e 20,0 (composto **4**) foram atribuídos a C-11 confirmando a presença do anel ciclopropânico. Além dos sinais em δ 80,8 (C-4) e 73,0 (C-10) (composto **3**) atribuídos a carbonos carbinólicos. Adicionalmente foram observados sinais em δ 154,2 e 108,9 (composto **4**) referentes aos carbonos olefínicos C-10 e C-15, respectivamente.

A estereoquímica em C-4 do composto **3** foi determinada pelo valor de deslocamento químico de C-6, pois quando a orientação é $4\alpha\text{-OH}$ o sinal de C-

6 ocorre em δ 24,9 ou 25,0, enquanto que na orientação 4β -OH o sinal de C-6 ocorre entre δ 28,3 e 30,1 (GOLDSBY; BURKE, 1987). No composto **3** o deslocamento químico de C-6 foi δ 25,0, portanto, a estereoquímica de C-4 é 4α -OH. Entretanto, no composto **4** a estereoquímica de C-4 é 4β -OH e embora o descolamento químico de C-6 esteja abaixo da faixa esperada para esta configuração, o sinal de C-6 em δ 22,5 encontra-se mais blindado devido ao efeito “ γ gauche” da hidroxila em C-1. A orientação da hidroxila em C-10 (composto **3**) é determinada pela observação do sinal de C-15, pois quando a estereoquímica é 10α -OH ocorre blindagem de 10 ppm causada por dois efeitos “ γ gauche” de C-2 e C-8 sobre C-15. Contudo, quando a orientação é 10β -OH observa-se a ausência desse efeito e C-15 apresenta deslocamento químico em δ 31,4. Dessa forma, a estereoquímica de C-10 no composto **3** é 10β -OH.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C (Tabela 7) obtidos para estes compostos são consistentes com os relatados por Goldsby; Burke (1987) e Moreira et al., (2003b) (Composto **3**) e CHEN et al. (2016) (composto **4**), portanto sugeriram que a mistura é constituída por 4α - 10β -aromadendranodiol (**3**) e 1α -hidróxi-espátulenol (**4**), sendo o sesquiterpenoide **3**, majoritário na mistura.

O sesquiterpenoide 4α - 10β -aromadendranodiol (**3**) foi anteriormente isolado no extrato diclorometano das folhas de *Xylopi* *brasiliensis* (Annonaceae) e apresentou atividade antifúngica contra a espécie *Cladosporium cladosporioides* (MOREIRA et al., 2003b).

O composto **4** também denominado volvalerenal I foi anteriormente isolado e identificado somente na fração clorofórmica das raízes de *Valeriana officinalis* (Valerianaceae) (CHEN et al., 2016), sendo este o primeiro relato do isolamento de 1α -hidróxi-espátulenol em plantas da família Annonaceae.

Tabela 7- Dados de RMN ^{13}C dos compostos **3+4** (100 MHz, CDCl_3)

Deslocamento Químico δ (ppm)				
C	3	4 α -10 β - aromadendranodiol*	4	1 α -hidróxi- espatulenol**
1	52,6 (CH)	52,5	85,3 (C)	85,2
2	23,8 (CH ₂)	23,7	34,8 (CH ₂)	34,7
3	39,7 (CH ₂)	39,6	40,4(CH ₂)	40,3
4	80,8 (C)	80,5	81,3 (C)	81,2
5	45,9 (CH)	45,8	57,0 (CH)	56,8
6	25,0 (CH)	24,9	22,5 (CH)	22,3
7	27,1 (CH)	27,0	27,4 (CH)	27,3
8	19,2 (CH ₂)	19,1	25,1 (CH ₂)	25,0
9	42,5 (CH ₂)	42,4	33,9 (CH ₂)	33,7
10	73,0 (C)	72,8	154,2 (C)	154,1
11	20,3 (C)	20,1	20,0 (C)	19,9
12	29,1 (CH ₃)	29,0	16,3 (CH ₃)	16,2
13	16,5 (CH ₃)	16,4	28,9 (CH ₃)	28,7
14	26,0 (CH ₃)	25,8	27,8 (CH ₃)	27,6
15	31,4 (CH ₃)	31,2	108,9 (CH ₂)	108,9

*Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Moreira et al. (2003b)**Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Chen et al. (2016)

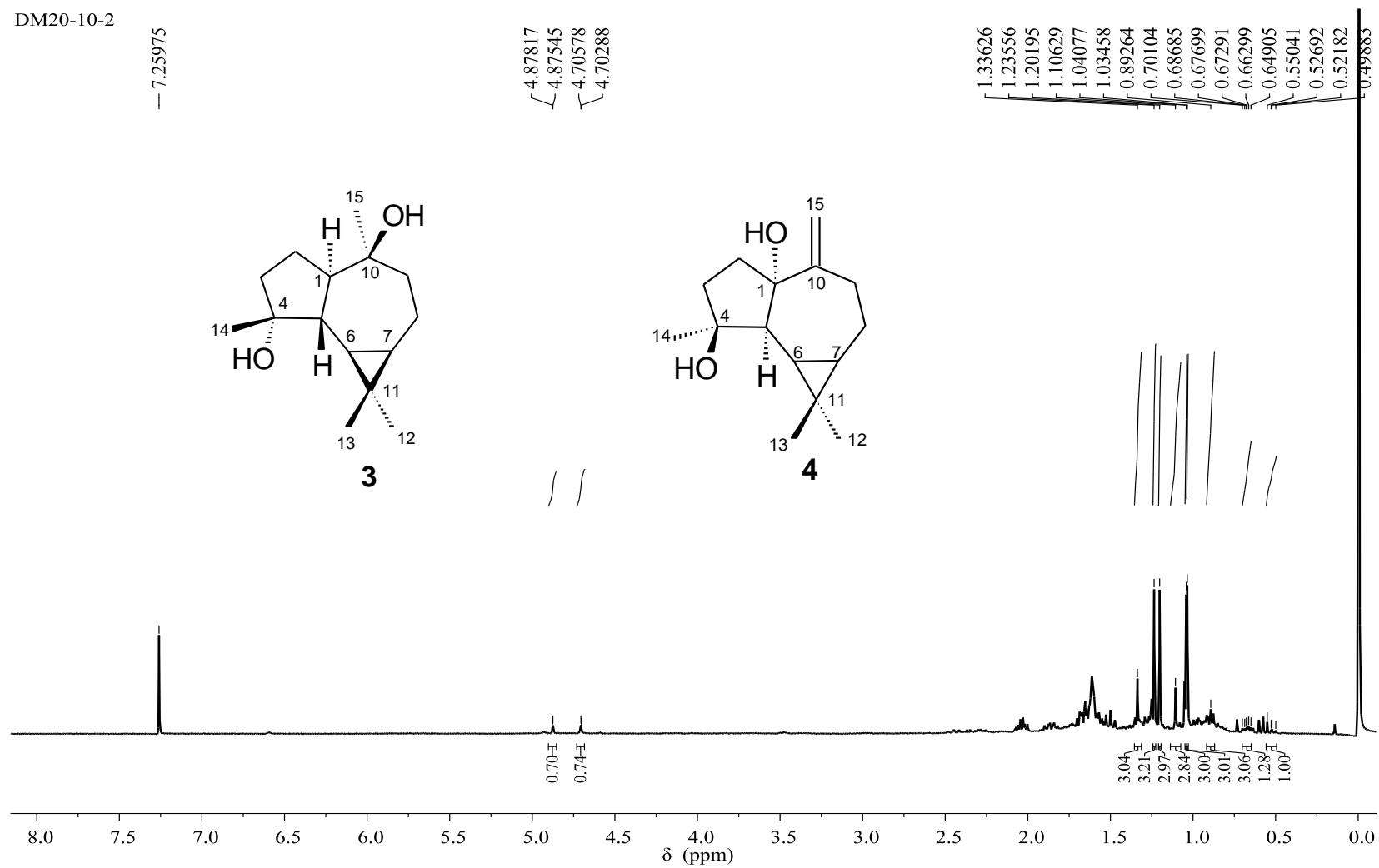
Figura 15- Espectro de RMN ^1H dos compostos **3+4** (CDCl_3 , 400 MHz)

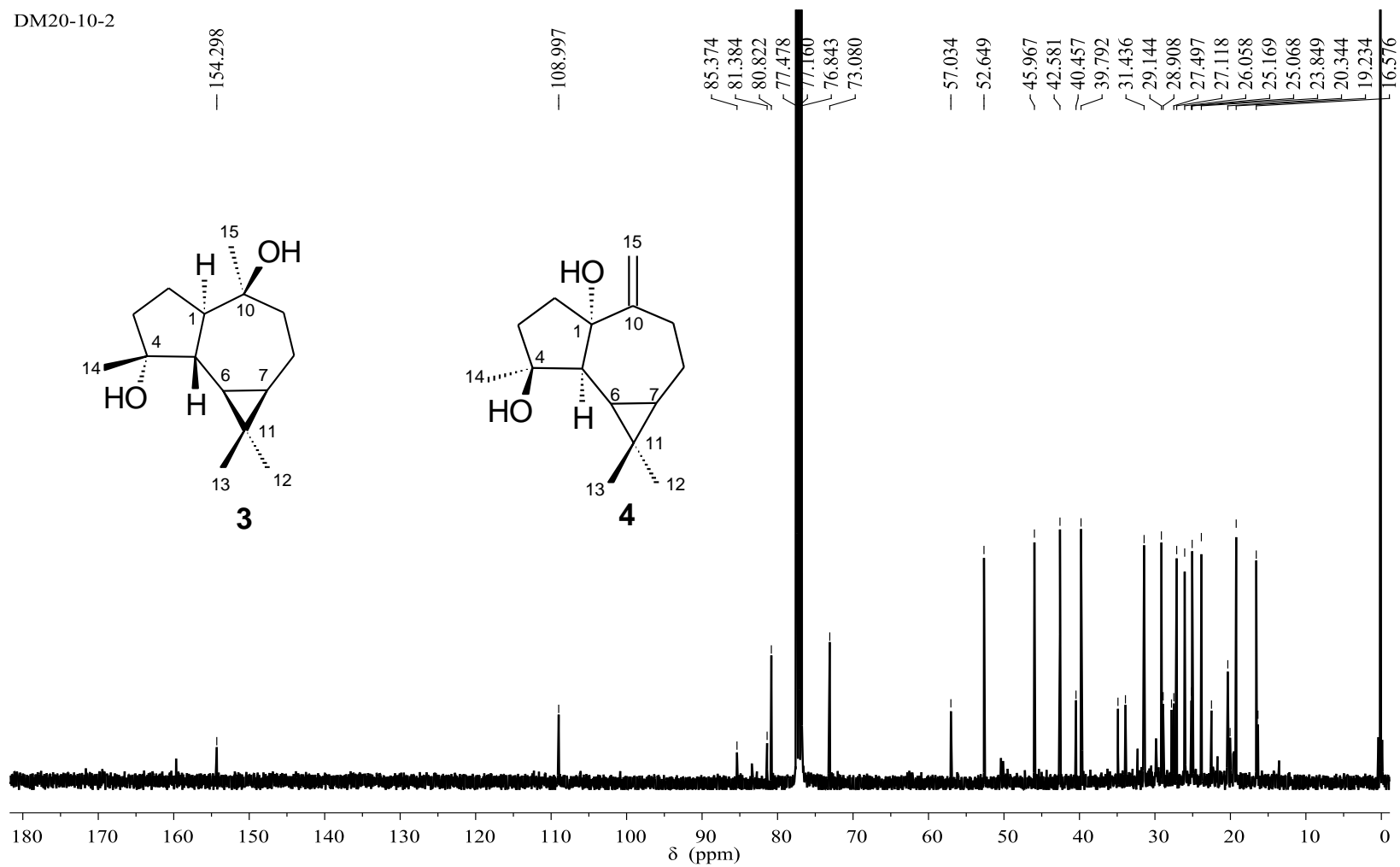
Figura 16- Espectro de RMN ^{13}C dos compostos **3+4** (CDCl_3 , 100 MHz)

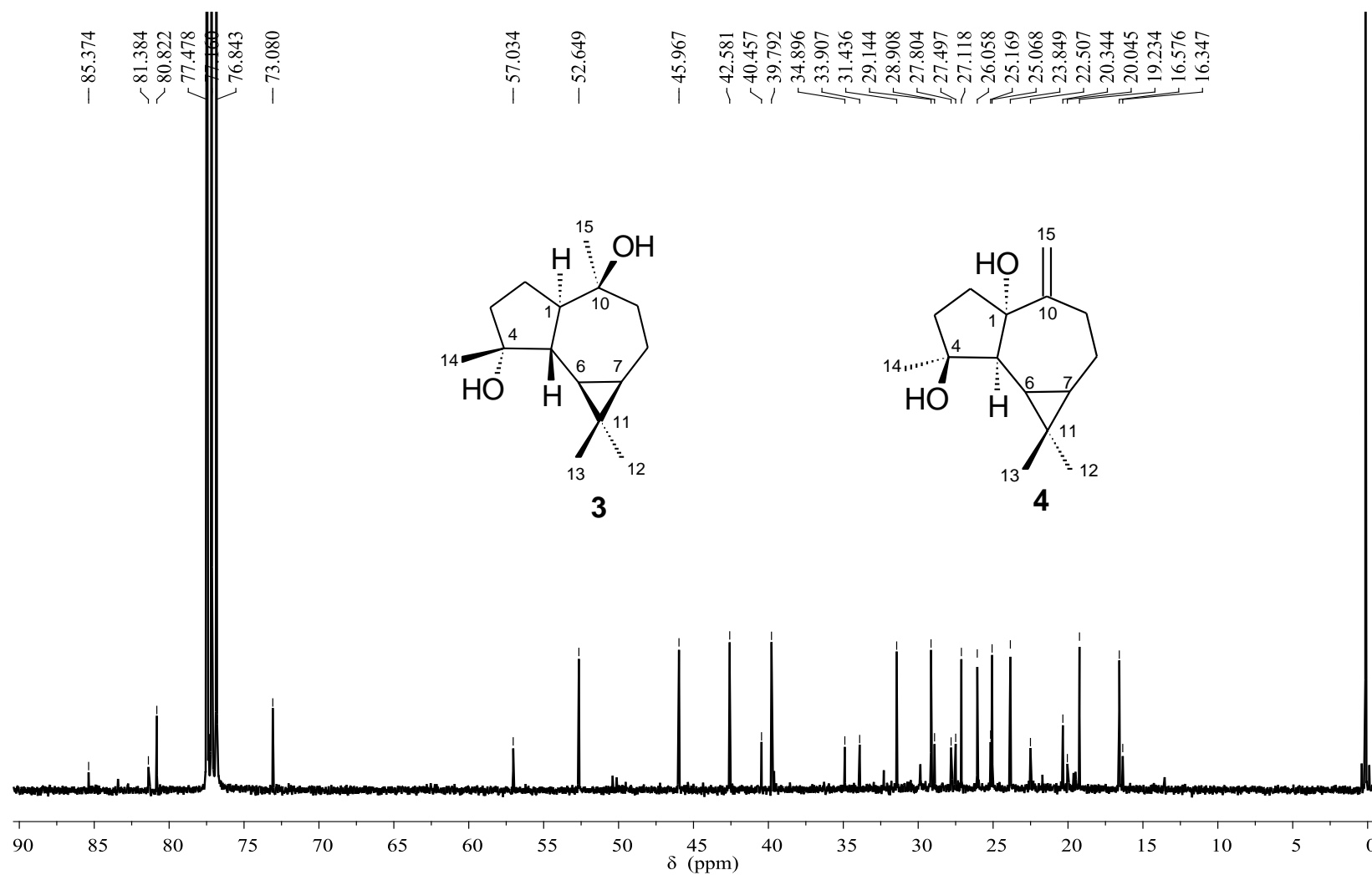
Figura 17- Expansão (δ 0-90) do espectro de RMN ^{13}C dos compostos **3+4** (CDCl_3 , 100 MHz)

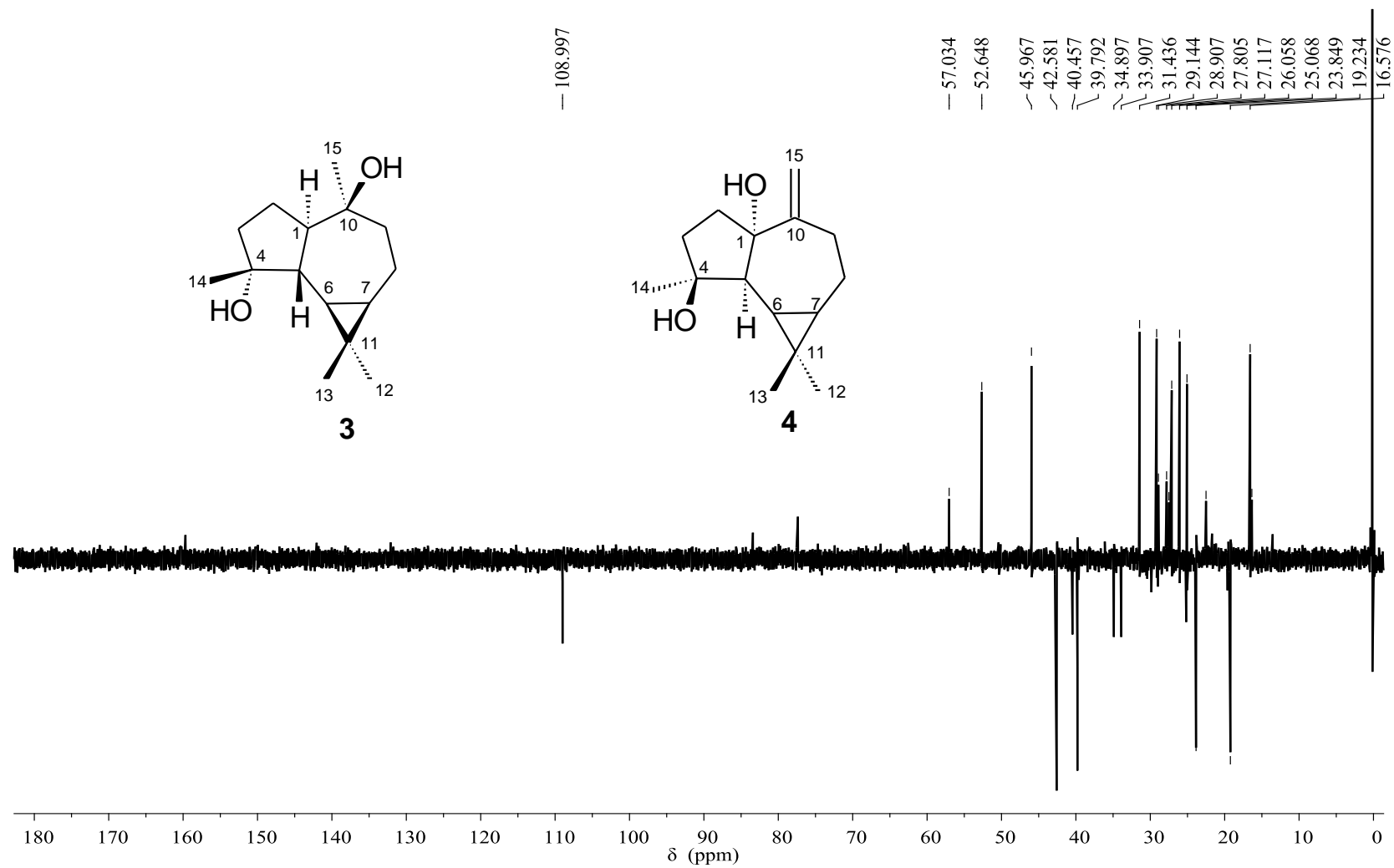
Figura 18- DEPT 135° dos compostos **3+4** (CDCl₃, 100 MHz)

Figura 19- Expansão (δ 0-60) do DEPT 135° dos compostos **3+4** (CDCl_3 , 100 MHz)

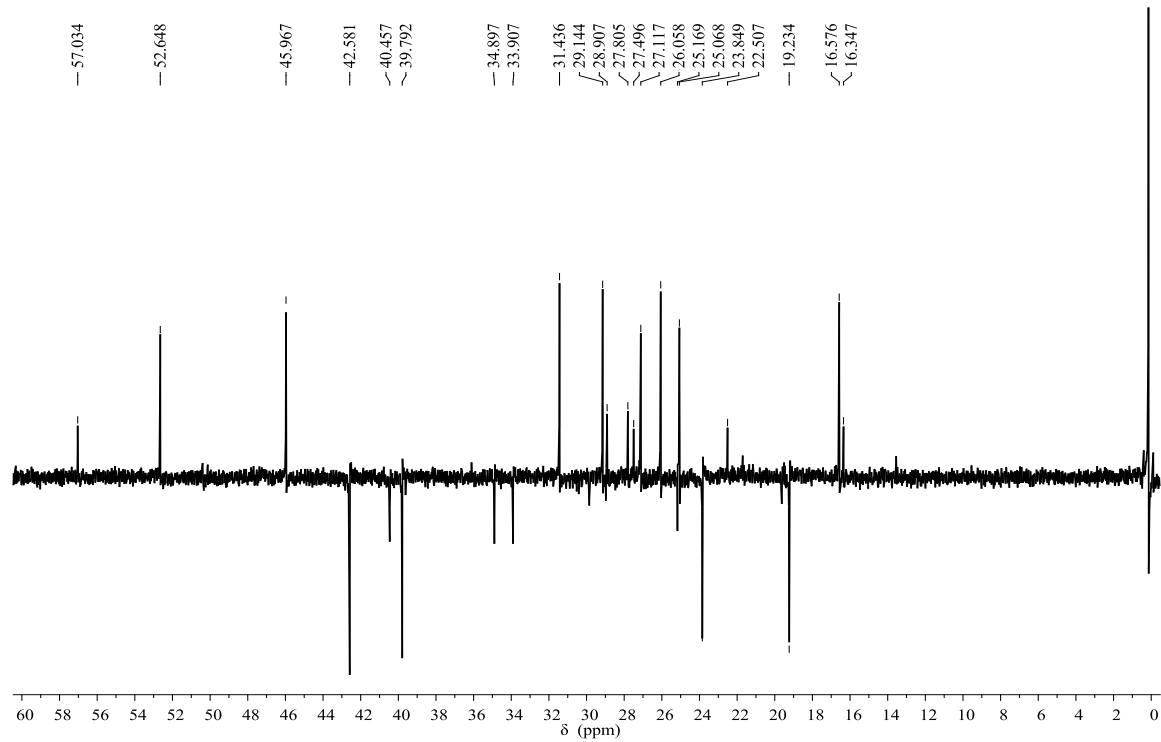
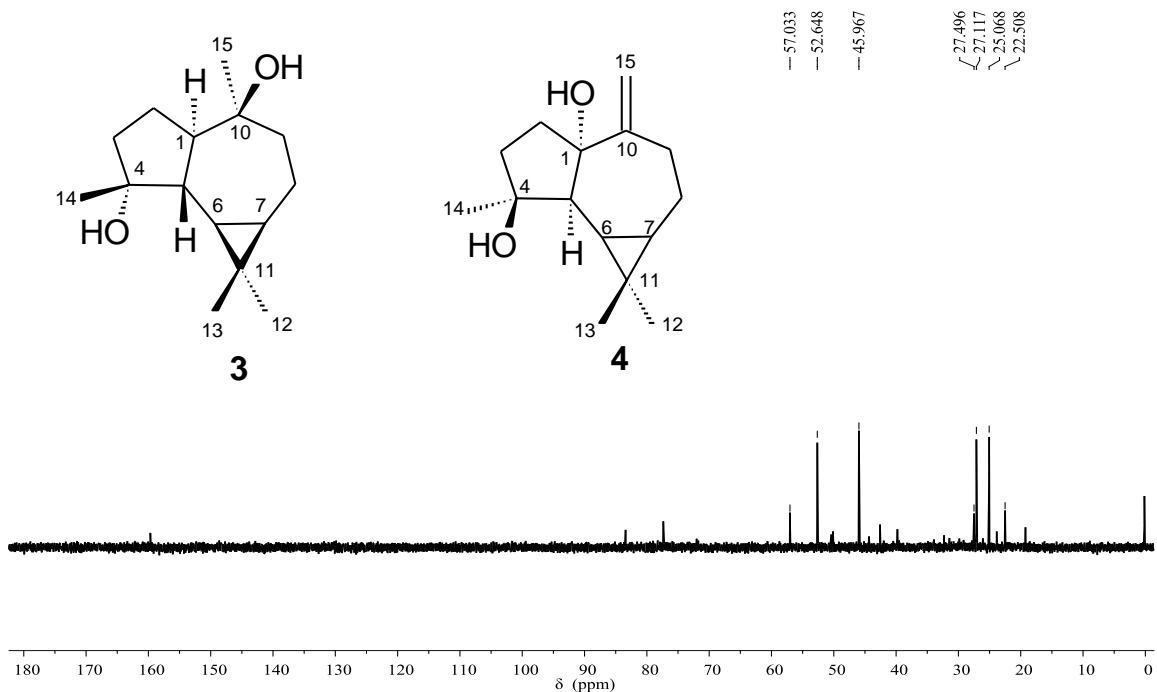
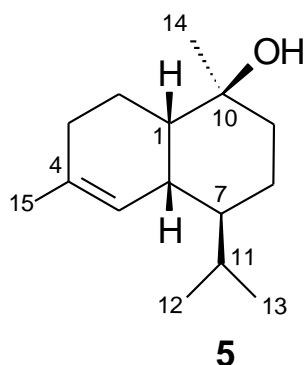


Figura 20- DEPT 90° dos compostos **3+4** (CDCl_3 , 100 MHz)



5.2.4 Identificação estrutural do composto 5



O composto **5** (11,2 mg) foi isolado como um sólido amorfo branco solúvel em clorofórmio obtido do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo HE25 proveniente da fração hexano das folhas de *E. piscarpus* (Esquema 3, p. 46).

O espectro de RMN ^1H (Figura 21, Tabela 8) deste composto apresentou um duplete em δ 5,52 ($J=4,2$ Hz) atribuído ao hidrogênio metínico olefínico H-5, além de simpletos em δ 1,29 e 1,65 atribuídos aos hidrogênios metílicos H-14 e H-15, respectivamente. Adicionalmente foram observados dois dupletos em δ 0,89 e 0,81 ($J=7,0$ Hz) atribuídos aos hidrogênios metílicos H-12 e H-13.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 22, Tabela 8) apresentou quinze sinais, indicando tratar-se de um sesquiterpenoide. Os sinais em δ 134,4 (C-4) e 124,7 (C-5) confirmam a presença da ligação dupla trissubstituída e o sinal em δ 72,7 foi atribuído ao carbono carbinólico C-10. Os espectros DEPT 135° e 90° (Figuras 23 e 24) permitiram a identificação de quatro sinais de carbonos metílicos, quatro metilênicos, cinco metínicos e dois de carbonos não hidrogenados. Estes dados sugerem para o composto uma fórmula molecular $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 3, uma delas indicando a presença da ligação dupla e as demais referentes a uma estrutura bicíclica.

As informações obtidas por meio dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C do composto **5**, em comparação com os dados relatados por Sung et al. (1992), conforme mostra a Tabela 8, permitiram identificá-lo como T-muurolol, que apresenta esqueleto cadinano. Este sesquiterpenoide já foi anteriormente

identificado no óleo essencial das folhas de *Desmos chinensis*, espécie também pertencente à família Annonaceae (DAI; THANG, 2012).

Tabela 8- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **5** (400 e 100 MHz, δ /ppm, J/Hz, CDCl_3)

Deslocamento Químico δ (ppm)			
C/H	δ_{C}	δ_{H}	T-muuroloi*
1	44,2 (CH)		44,0
2	31,2 (CH_2)		31,3
3	21,7 (CH_2)		21,0
4	134,4 (C)		133,5
5	124,7 (CH)	5,52 (d, $J= 4,2$ Hz)	124,9
6	45,7 (CH)		46,1
7	35,4 (CH_2)		34,5
8	18,6 (CH_2)		19,2
9	36,9 (CH)		34,6
10	72,7 (C)		72,4
11	26,5 (CH)		26,7
12	23,7 (CH_3)	0,89 (d, $J= 7,0$ Hz)	23,7
13	21,8 (CH_3)	0,81 (d, $J= 7,0$ Hz)	21,6
14	28,1 (CH_3)	1,29 (s)	29,3
15	15,4 (CH_3)	1,65 (s)	15,4

*Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Sung et al. (1992)

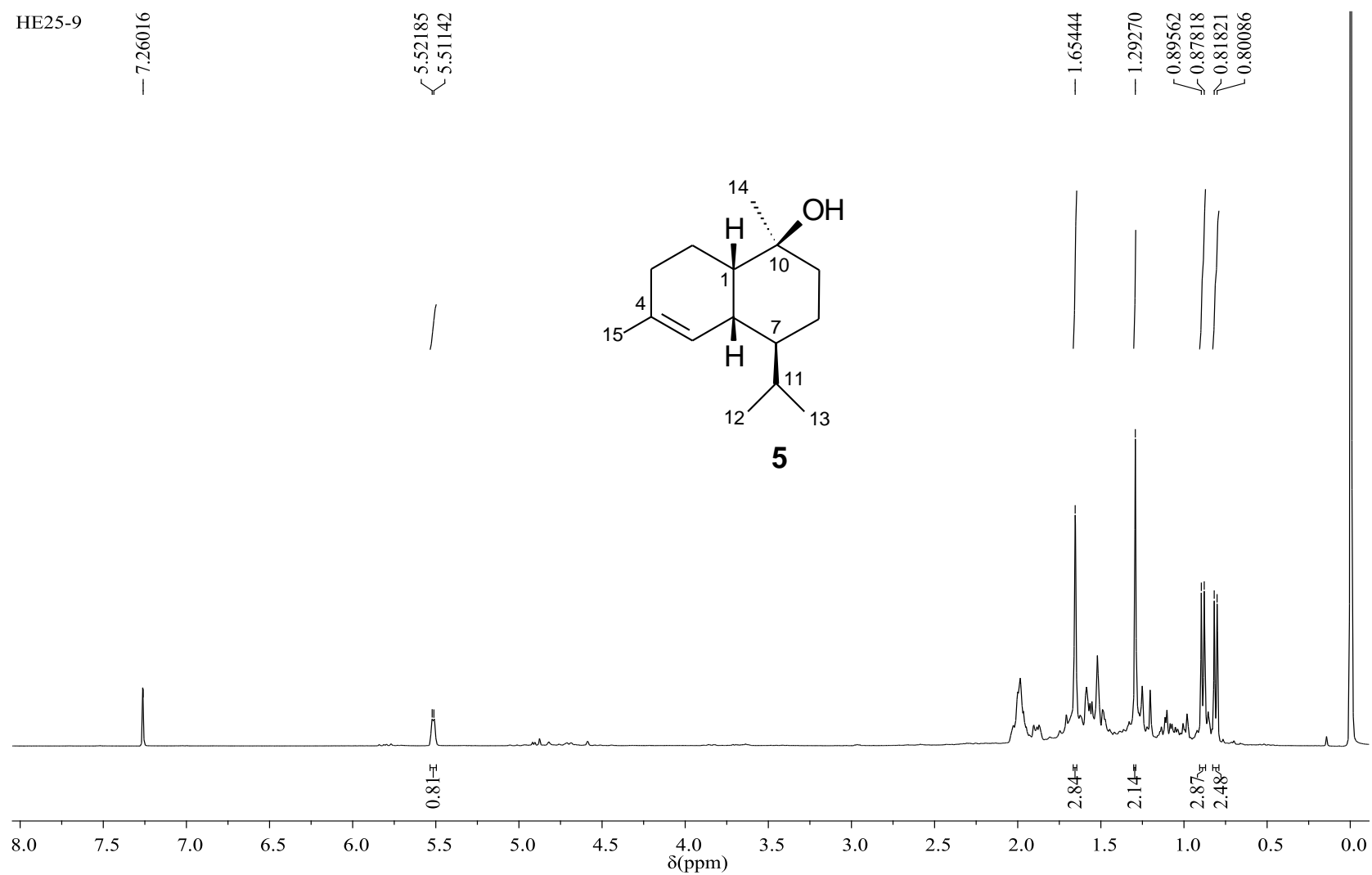
Figura 21- Espectro de RMN ^1H do composto **5** (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 22- Espectro de RMN ^{13}C do composto **5** (CDCl_3 , 100 MHz)

HE25-9

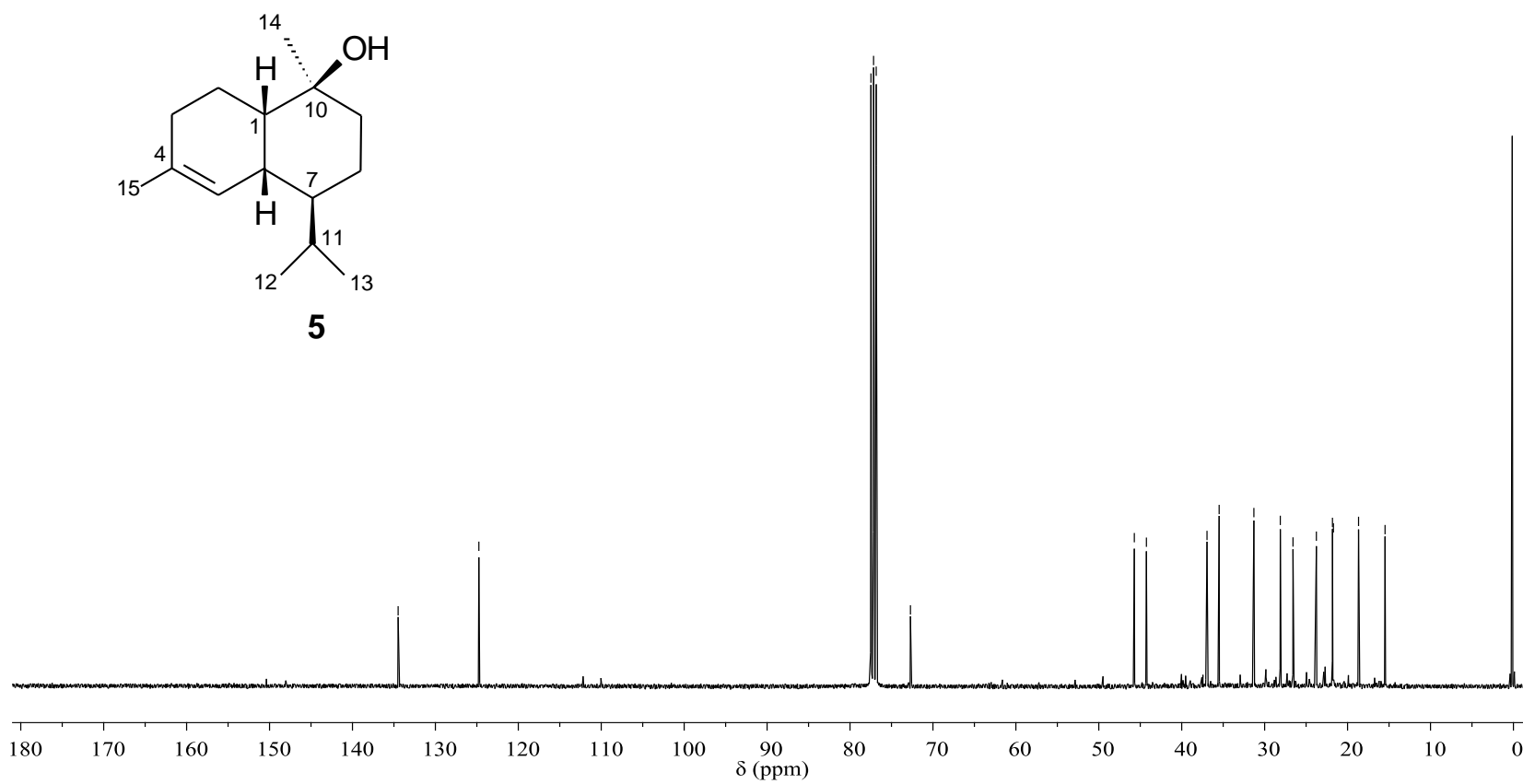
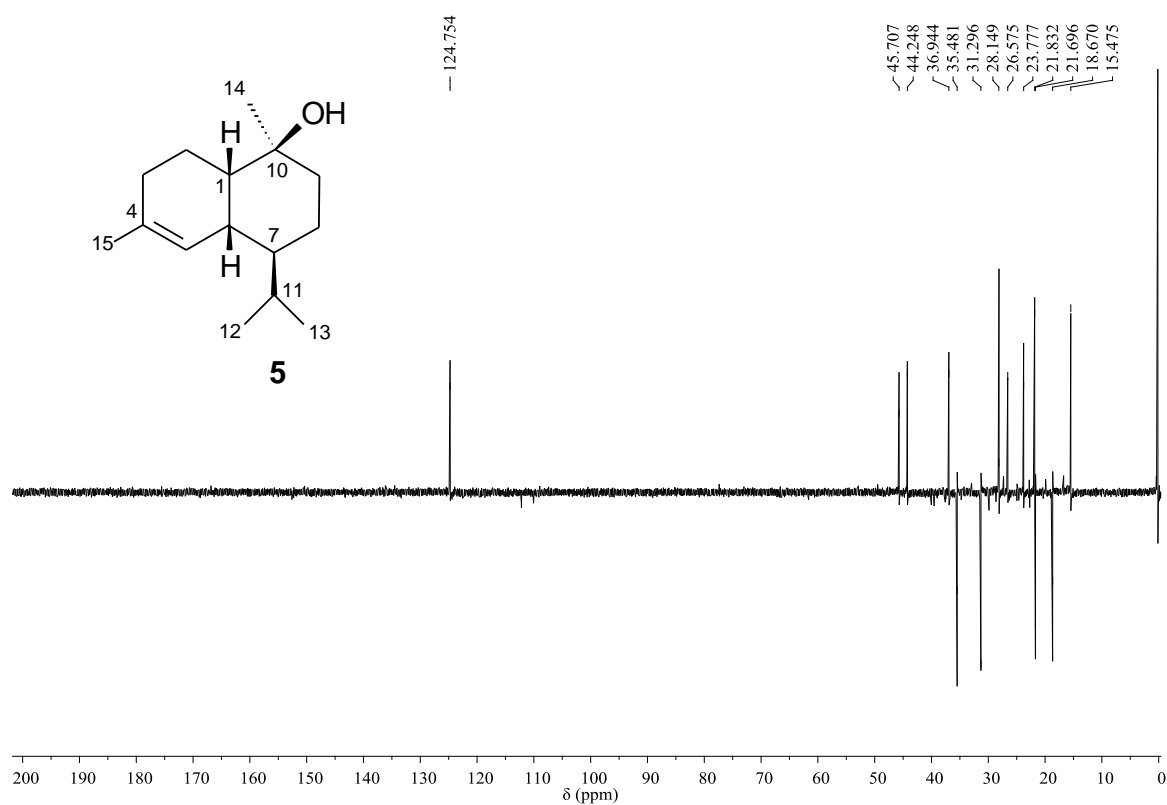
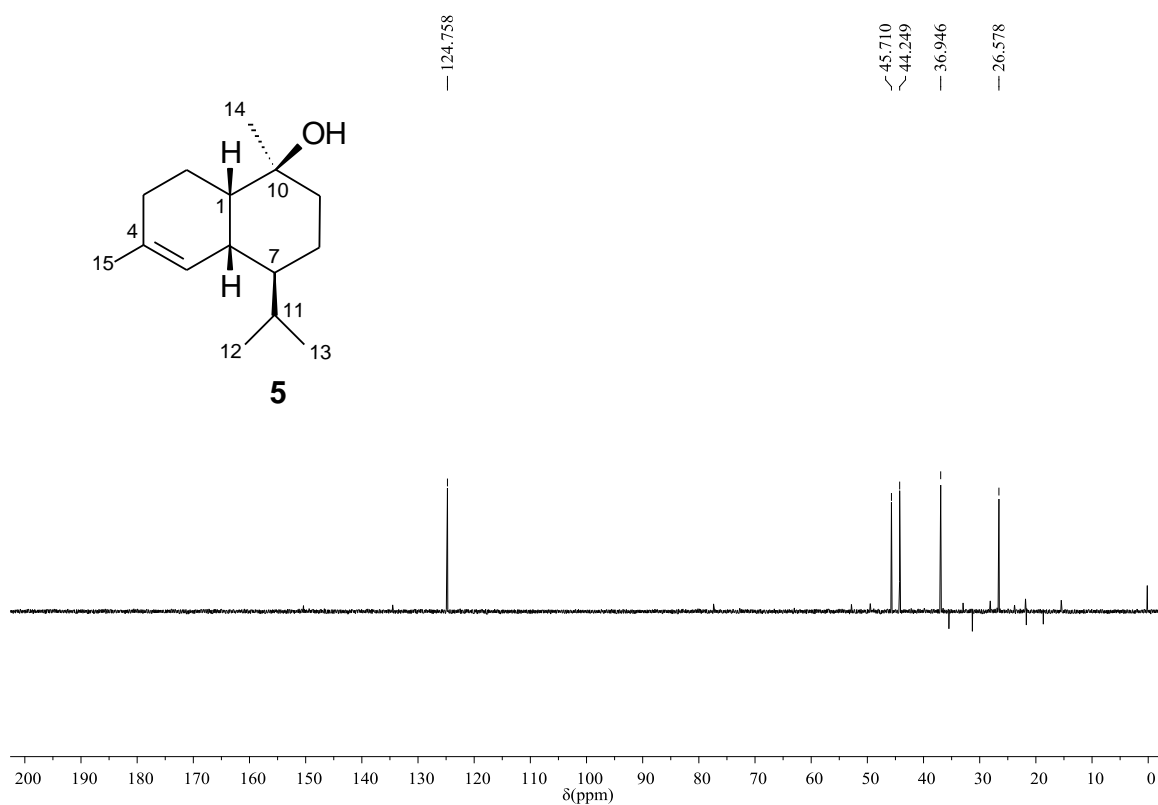
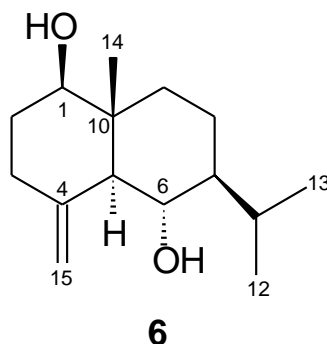
— 134.494
— 124.75877.478
77.160
76.842
72.71245.715
44.258
36.950
35.486
31.297
28.112
26.580
23.761
21.821
21.707
18.674
15.479

Figura 23- DEPT 135° do composto **5** (CDCl₃, 100 MHz)Figura 24- DEPT 90° do composto **5** (CDCl₃, 100 MHz)

5.2.5 Identificação estrutural do composto 6



O composto **6** (6,0 mg) foi isolado como um óleo incolor e solúvel em clorofórmio, obtido por cromatografia em coluna de Sephadex LH-20 do grupo DM22 oriundo da fração diclorometano das folhas de *E. pisocarpus* (Esquema 4, p. 49).

O espectro de RMN ^1H (Figura 25, Tabela 9) do composto **6** apresentou dois dupletos em δ 0,87 e 0,95 ($J= 7,0$ Hz) característicos de hidrogênios metílicos de grupo isopropílico e um simpleto em δ 0,71 atribuído a hidrogênios metílicos ligados a carbono não hidrogenado. Os sinais em δ 3,42 (dd, $J= 11,4$ e 4,8 Hz) e 3,71 (t, $J= 9,8$ Hz) são de hidrogênios em carbonos oximetínicos e indicam a presença de dois grupos hidroxílicos na molécula. Adicionalmente, os dois dupletos em δ 4,74 ($J= 0,8$ Hz) e 5,02 ($J= 1,3$ Hz) sugerem a presença de uma ligação dupla exocíclica.

As análises de RMN ^{13}C , incluindo DEPT 135° e 90° (Figuras 26-28, Tabela 9) possibilitaram a identificação de três carbonos metílicos, cinco metilênicos, cinco metínicos e dois não hidrogenados. Os sinais em δ 79,1 e 67,1 foram atribuídos aos carbonos oximetínicos C-1 e C-6, respectivamente. Além de sinais de carbonos olefínicos em δ 146,3 (C-4) e 107,9 (C-15), confirmando a presença da ligação dupla exocíclica. Estes dados permitiram propor a fórmula $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_2$ com índice de deficiência de hidrogênio igual a 3, correspondendo a uma estrutura bicíclica e uma ligação dupla.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C obtidos para o composto **6** e comparação com os relatados por Miranda et al. (2014) (Tabela 9) permitiram identificar o sesquiterpenoide 1 β ,6 α -di-hidróxi-4(15)-eudesmeno.

O composto **6** foi anteriormente identificado no extrato hexânico dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae) (MOREIRA et al., 2007). Outros estudos também relataram o isolamento desse composto nas espécies *Guarea guidonia* (Meliaceae) e *Carpesium divaricatum* (Asteraceae) (SOARES et al., 2012; XIE et al., 2012).

Tabela 9- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **6** (400 e 100 MHz, δ /ppm, J/Hz, CDCl_3)

Deslocamento Químico δ (ppm)			
C/H	δ_{C}	δ_{H}	1 β -6 α -di-hidróxi-eudesmeno*
1	79,1 (CH)	3,42 (dd, $J= 11,4$ e $4,8$ Hz)	79,0
2	32,0 (CH_2)		31,8
3	35,2 (CH_2)		35,1
4	146,3 (C)		146,2
5	56,0 (CH)		55,8
6	67,1 (CH)	3,71 (t, $J= 9,8$ Hz)	67,0
7	49,4 (CH)		49,3
8	18,3 (CH_2)		18,1
9	36,4 (CH_2)		36,3
10	41,8 (C)		41,6
11	26,1 (CH)		26,0
12	21,2 (CH_3)	0,87 (d, $J= 7,0$ Hz)	21,3
13	16,3 (CH_3)	0,95 (d, $J= 7,0$ Hz)	16,2
14	11,7 (CH_3)	0,71 (s)	11,6
15	107,9 (CH_2)	5,02 (d, $J= 1,3$ Hz)	107,8
		4,74 (d, $J= 0,8$ Hz)	

*Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Miranda et al. (2014)

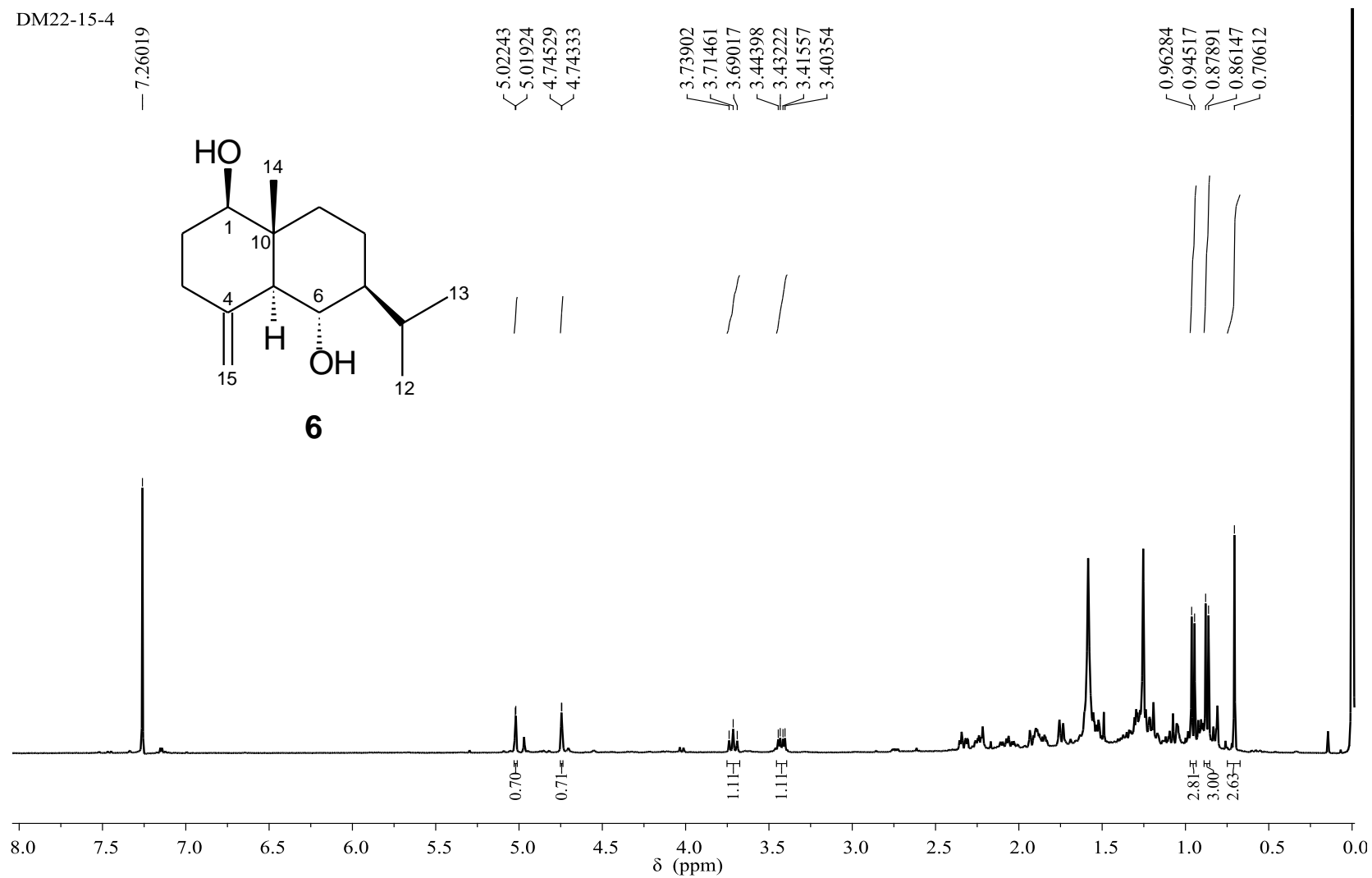
Figura 25- Espectro de RMN ^1H do composto **6** (CDCl_3 , 400 MHz)

Figura 26- Espectro de RMN ^{13}C do composto **6** (CDCl_3 , 100 MHz)

DM22-15-4

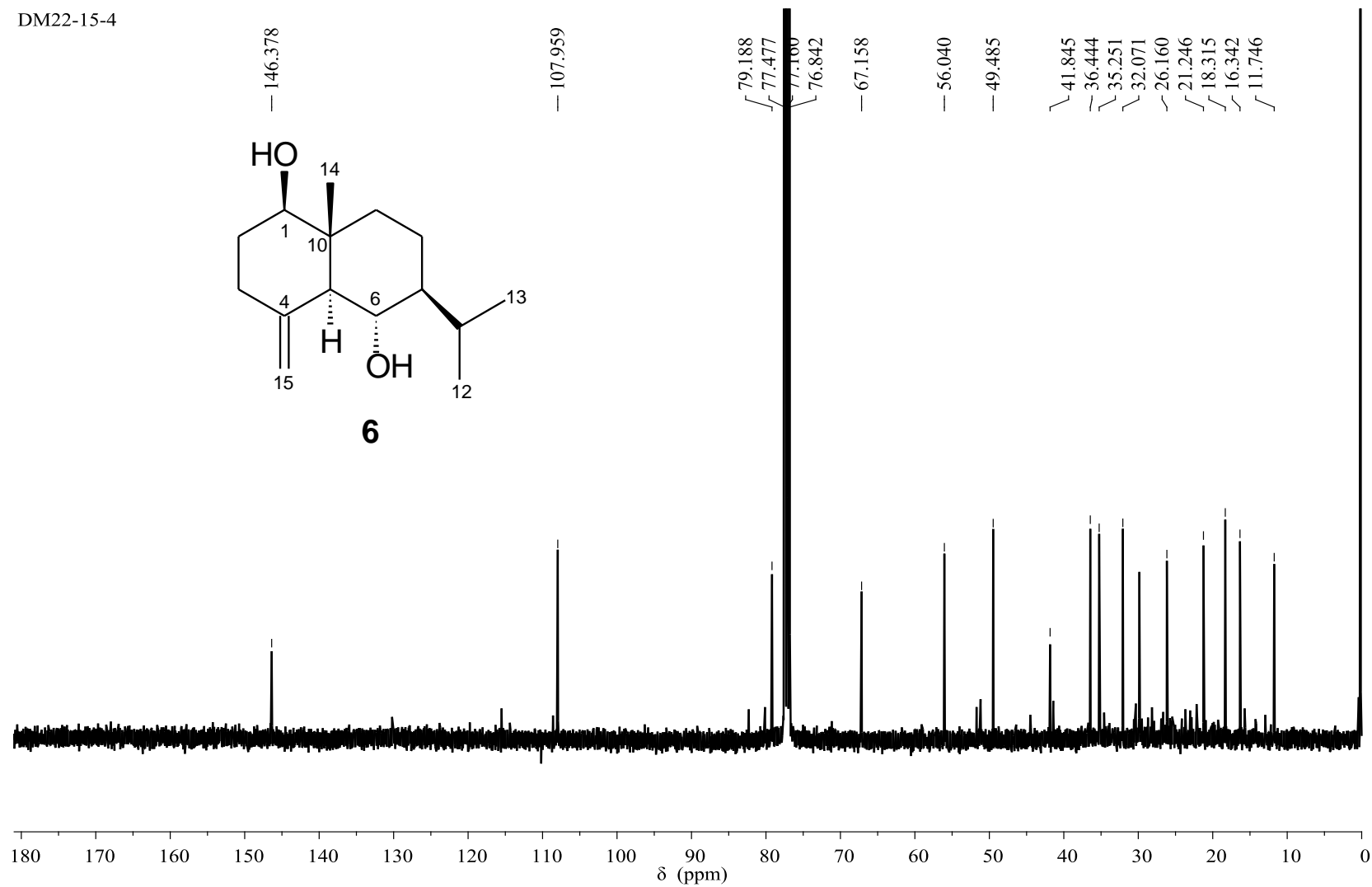
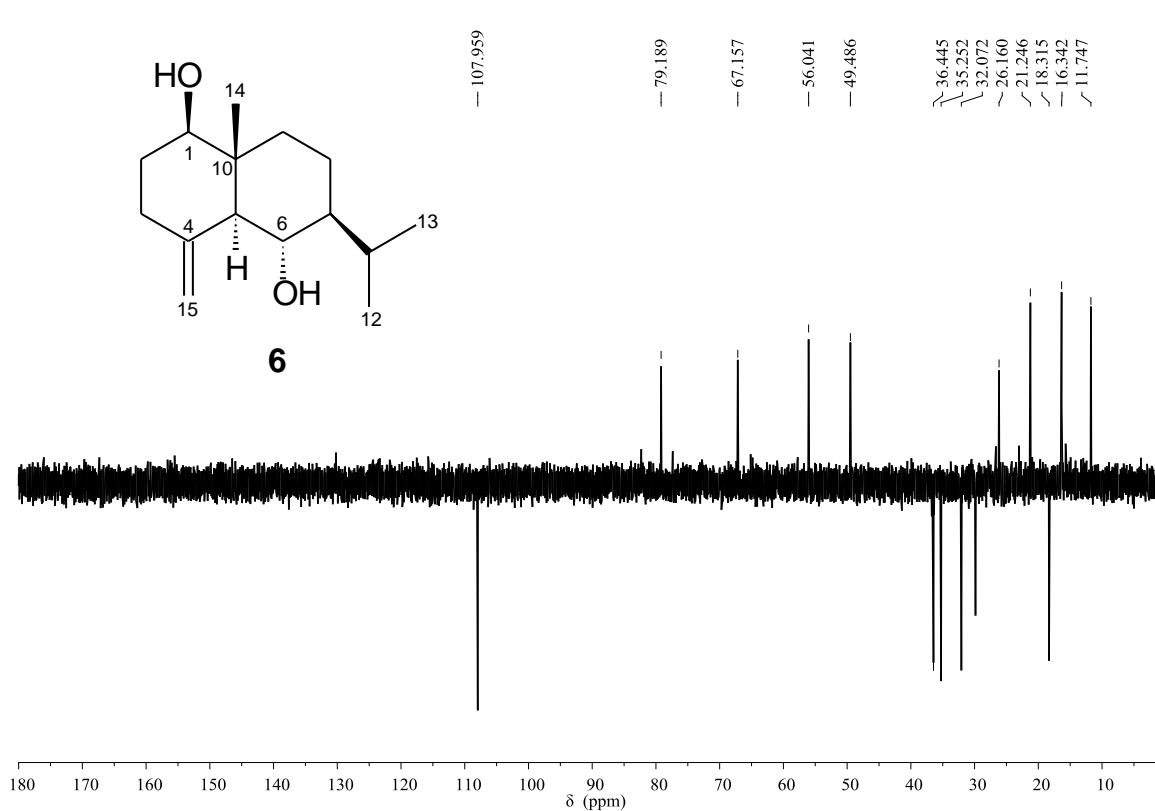
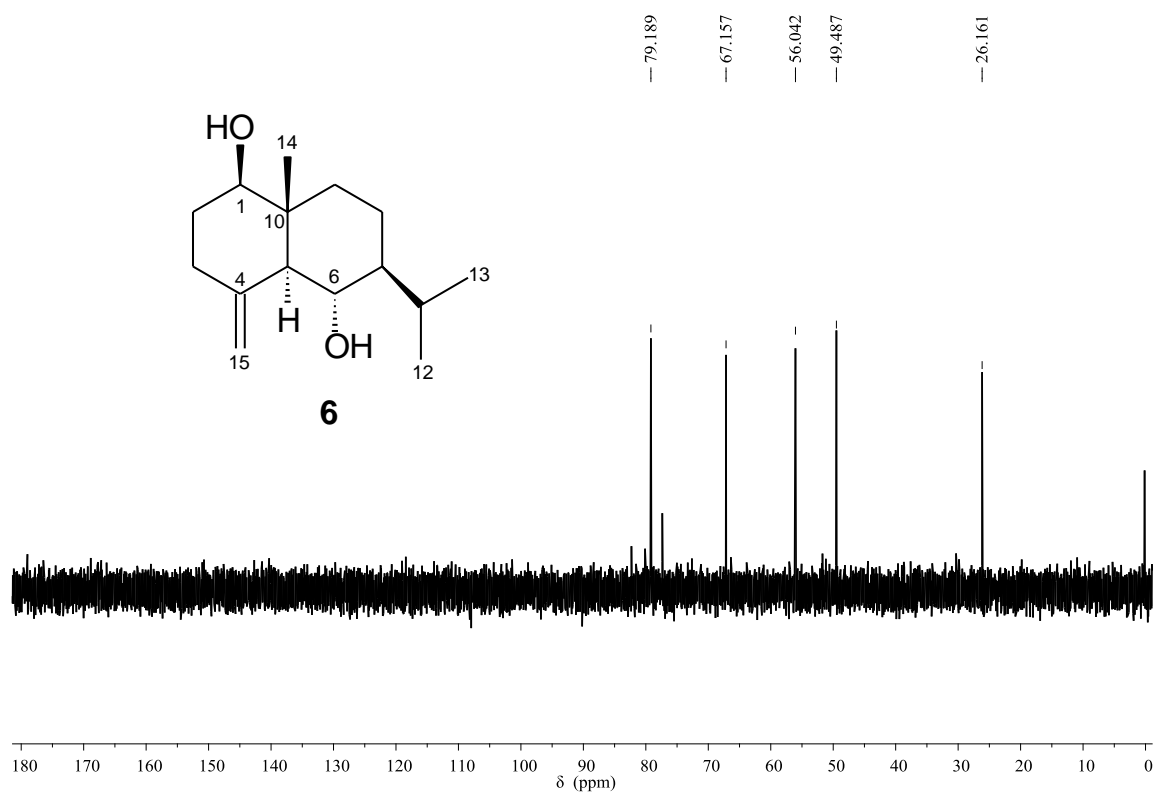
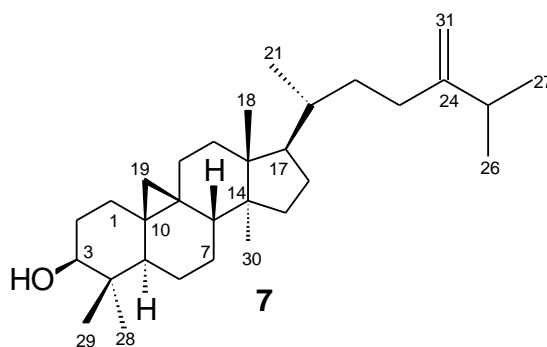


Figura 27- DEPT 135° do composto **6** (CDCl₃, 100 MHz)Figura 28- DEPT 90° do composto **6** (CDCl₃, 100 MHz)

5.2.6 Identificação estrutural do composto 7



O composto **7** (23,3 mg) foi isolado como um sólido amorfo branco solúvel em clorofórmio obtido pelo fracionamento do grupo HE22 proveniente da fração hexano das folhas de *E. pisocarpus* (Esquema 3, p. 46).

O espectro de RMN ^1H (Figura 29, Tabela 10) deste composto apresentou dois dupletos em δ 0,33 ($J= 4,0$ Hz) e 0,55 ($J= 4,0$ Hz) característicos de hidrogênios metilênicos de anel ciclopropânico e simpletos em δ 0,80, 0,89 e 0,96 atribuídos a hidrogênios metílicos. Adicionalmente, o duplo duplete em δ 3,28 ($J= 11,0$ e 4,3 Hz, H-3) é característico de hidrogênios α -axial indicando tratar-se de um triterpenoide tipo cicloartano-3 β -ol (LAGO; ROQUE, 2002). Os sinais em δ 4,71 (sl) e 4,66 (d, $J= 1,1$ Hz) sugerem a presença de uma ligação dupla exocíclica.

O espectro de RMN ^{13}C (Figura 30, Tabela 10) apresentou trinta e um sinais de carbono. O sinal em δ 78,9 (C-3) foi atribuído a carbono oximetínico com configuração 3 β -hidroxi e os sinais em δ 157,0 e 106,0 correspondem aos carbonos olefínicos da cadeia lateral do triterpenoide C-24 e C-31, respectivamente.

Os dados de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135° e 90° (Figuras 29-32) obtidos para o composto **7** em comparação com a literatura (LEE et al., 2010), conforme mostra a Tabela 10, permitiram identificá-lo como o triterpenoide 24-metilenocicloartanol.

O homo-triterpenoide, 24-metilenocicloartanol (**7**), foi anteriormente isolado na fração diclorometano das raízes de *Cleistochlamys kirkii* (Annonaceae) (SANCHA, 2015) e como constituinte majoritário do látex de *Euphorbia palustris* (Euphorbiaceae) exibindo atividade antifúngica contra as espécies *Fusarium sporotrichioides* e *Alterneia alternata* (KRSTIC et al., 2016).

Tabela 10- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **7** (400 e 100 MHz, δ /ppm, J/Hz, CDCl_3)

Deslocamento Químico δ (ppm)			
C/H	δ_{C}	δ_{H}	24-metilenocicloartanol*
1	32,1 (CH ₂)		32,2
2	30,5 (CH ₂)		30,6
3	78,9 (CH)	3,28 (dd, $J= 11,0$ e $4,3$ Hz)	79,1
4	40,6 (C)		40,7
5	47,2 (CH)		47,3
6	21,2 (CH ₂)		21,3
7	26,1 (CH ₂)		26,2
8	48,1 (CH)		48,2
9	20,1 (C)		20,2
10	26,2 (C)		26,3
11	26,6 (CH ₂)		26,7
12	33,0 (CH ₂)		33,1
13	45,4 (C)		45,5
14	48,9 (C)		49,0
15	35,7 (CH ₂)		35,8
16	28,3 (CH ₂)		28,4
17	52,4 (CH)		52,5
18	18,1 (CH ₃)		18,2
19	30,0 (CH ₂)	0,33 e 0,55 (d, $J= 4,0$ Hz)	30,1
20	36,2 (CH)		36,3
21	18,4 (CH ₃)		18,5
22	35,1 (CH ₂)		35,2
23	31,4 (CH ₂)		31,5
24	157,0 (C)		157,1
25	33,9 (CH)		34,0
26	22,1 (CH ₃)	1,01 (d, $J= 6,8$ Hz)	22,2
27	22,0 (CH ₃)	1,03 (d, $J= 6,8$ Hz)	22,1
28	25,5 (CH ₃)	0,89 (s)	25,6
29	14,1 (CH ₃)	0,96 (s)	14,2
30	19,4 (CH ₃)	0,80 (s)	19,6
31	106,0 (CH ₂)	4,71 (sl) 4,66 (d, $J= 1,1$ Hz)	106,1

*Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Lee et al. (2010)

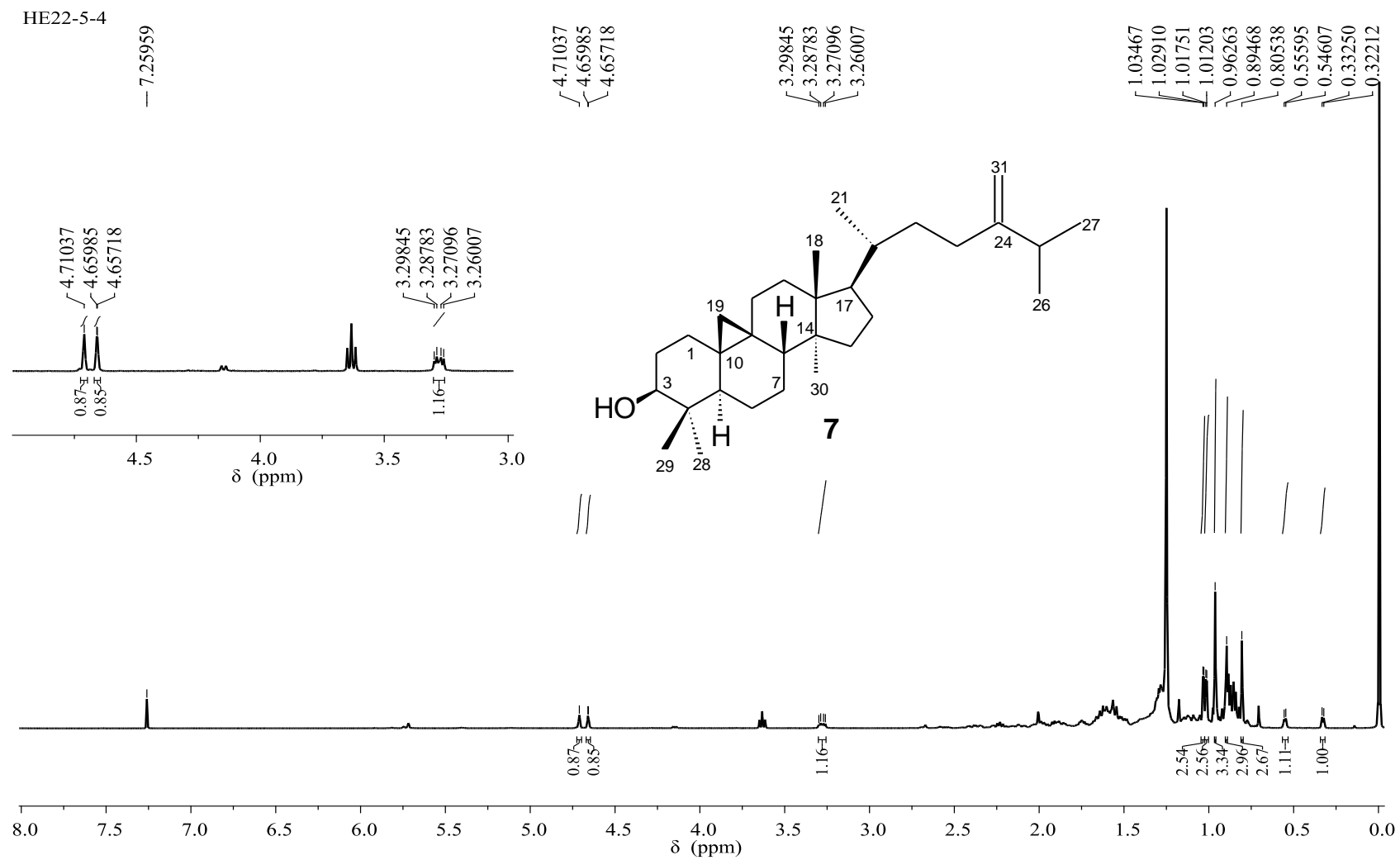
Figura 29- Espectro de RMN ^1H do composto **7** (CDCl_3 , 400 MHz)

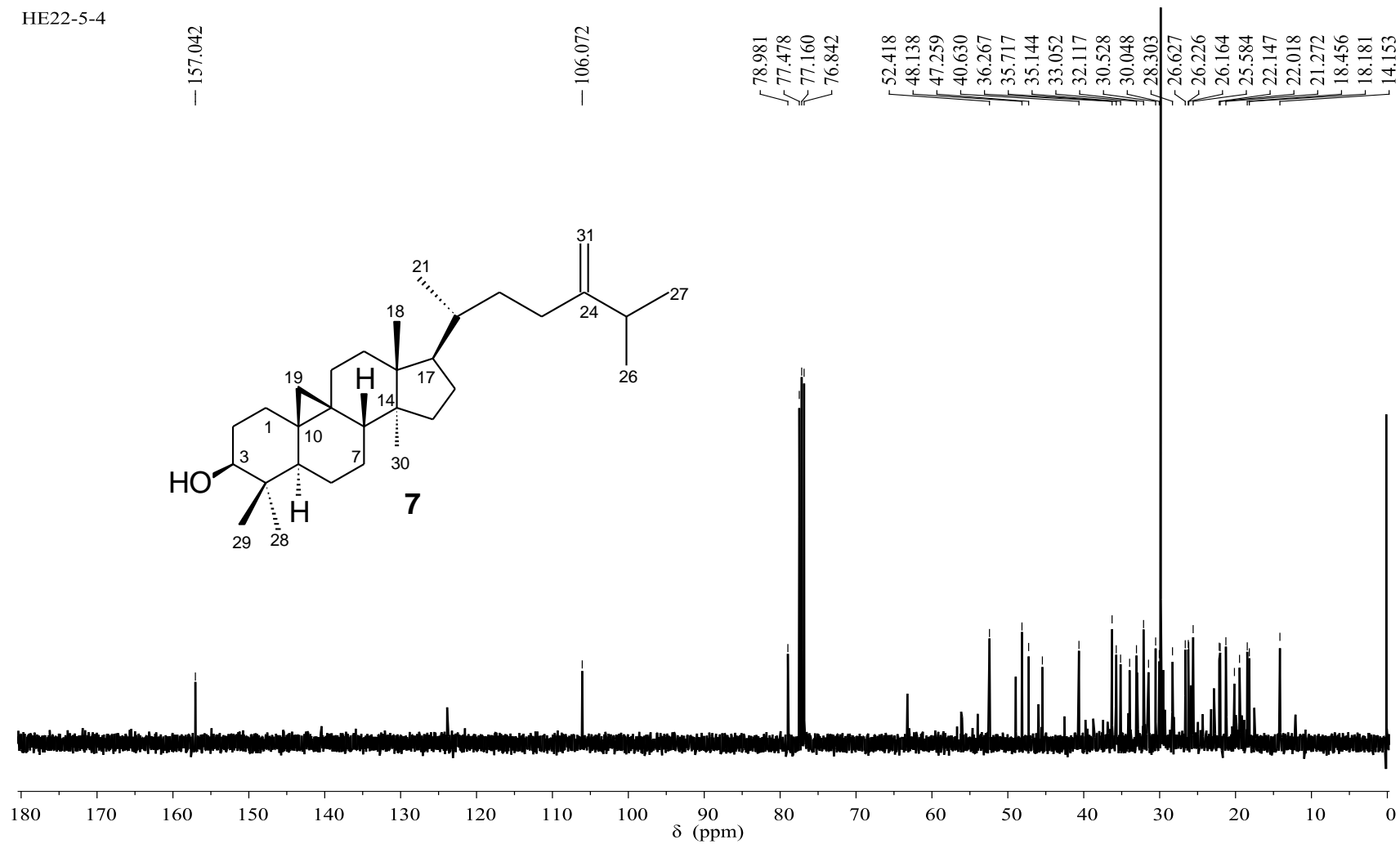
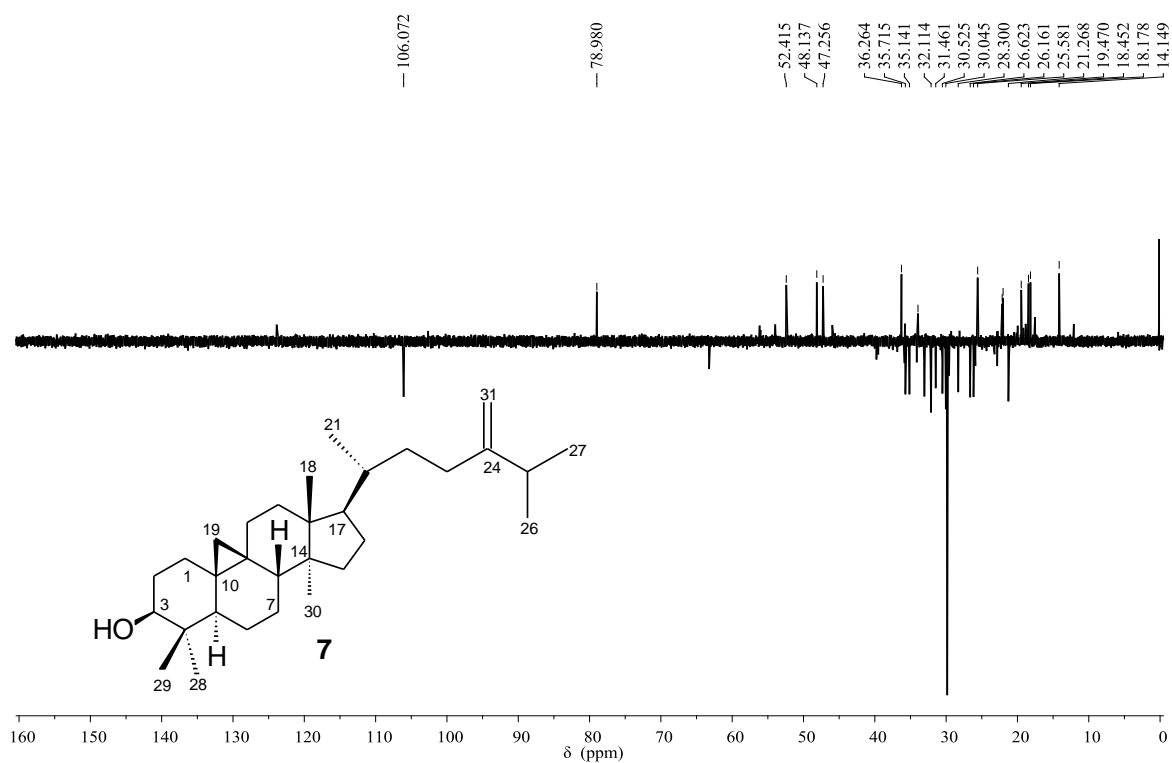
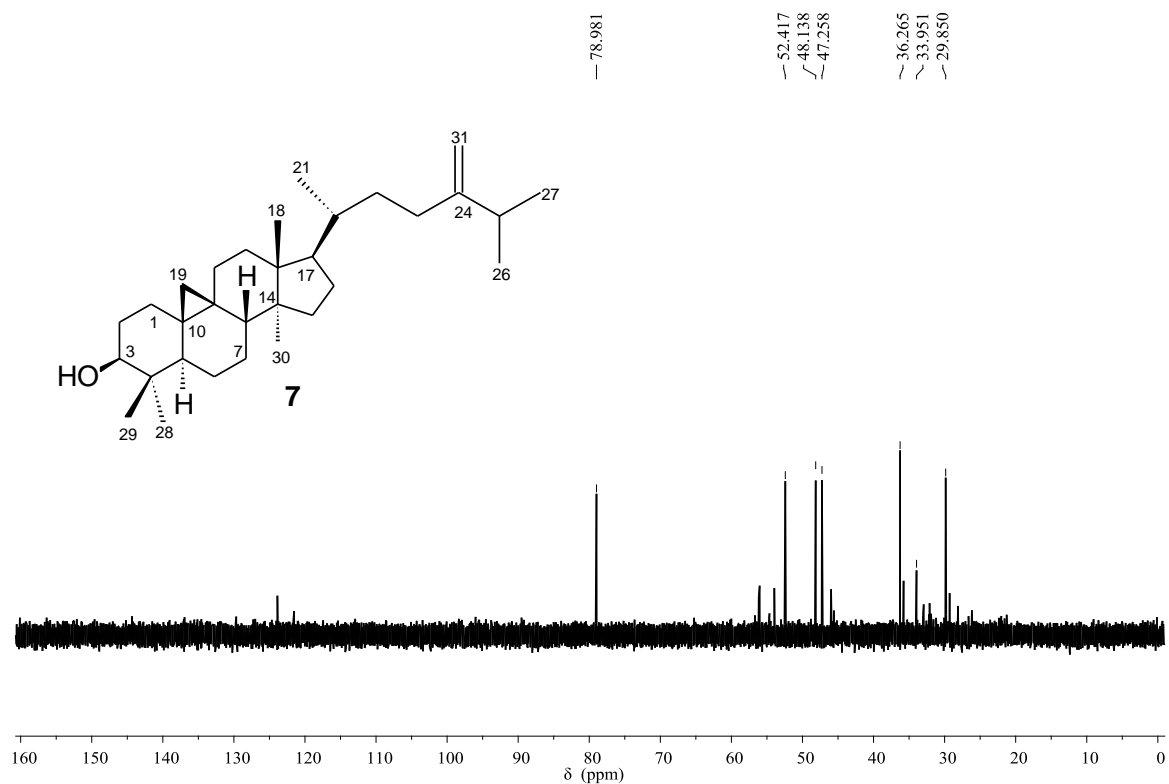
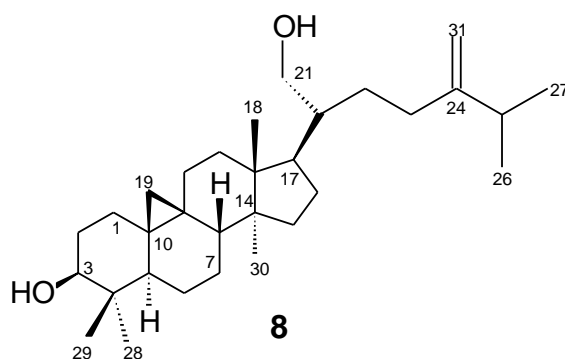
Figura 30- Espectro de RMN ^{13}C do composto 7 (CDCl_3 , 100 MHz)

Figura 31- DEPT 135° do composto **7** (CDCl₃, 100 MHz)Figura 32- DEPT 90° do composto **7** (CDCl₃, 100 MHz)

5.2.7 Identificação estrutural do composto 8



O composto **8** (13,5 mg) foi isolado como um sólido com aspecto de agulhas incolores solúvel em clorofórmio, obtido a partir do fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 do grupo HE66 oriundo da fração hexano das folhas de *E. pisocarpus* (Esquema 3, p. 46).

O espectro de RMN ^1H apresentou perfil característico de triterpenoide do tipo cicloartano-3 β -ol, com dois dupletos em δ 0,33 ($J= 4,1$ Hz) e 0,55 ($J= 4,1$ Hz) atribuídos a hidrogênios metilênicos de anel ciclopropânico. Os simpletos em δ 0,80, 0,91, 0,96, 0,98 foram atribuídos a hidrogênios metílicos e o sinal em δ 3,28 (dd, $J= 11,1$ e 4,3 Hz) corresponde ao hidrogênio oximetínico H-3 com configuração α -axial (OH β -equatorial). Adicionalmente foram observados sinais em δ 3,73 (dd, $J= 11,1$ e 2,5 Hz, H-21') e 3,62 (dd, $J= 11,1$ e 4,4 Hz, H-21'') atribuídos a hidrogênios oximetilênicos e os sinais referentes a um simpleto largo em δ 4,73 e um duplete em δ 4,69 ($J= 0,9$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos em ligação dupla geminal dissubstituída.

O espectro de RMN ^{13}C apresentou trinta e um sinais de carbono, entre eles de um grupo oximetínico em δ 78,9 (C-3) confirmando a configuração 3 β -hidroxi, dois sinais de carbonos olefínicos em δ 156,6 (C-24) e 106,3 (C-31) e um sinal em δ 62,4 (C-21) atribuído a carbono oximetilênico.

Os dados de RMN ^1H , ^{13}C e DEPT 135 $^\circ$ (Figuras 33-35, Tabela 11) em comparação com os descritos na literatura (PRAWAT et al., 2013) permitiram identificar o composto **8** como sendo o 24-metilenocicloartano-3 β ,21-diol.

Estudos relataram o isolamento do composto **8** nas espécies *Dasymaschalon dasymaschalum* (Annonaceae), *Heynia trijuga* (Meliaceae) e do gênero *Lithocarpus* (Fagaceae) (PRAWAT et al., 2013; PURUSHOTHAMAN et al., 1987; ARTHUR; KO; CHEUNG, 1974).

Tabela 11- Dados de RMN ^1H e ^{13}C do composto **8** (600 e 150 MHz, δ/ppm , J/Hz , CDCl_3)

Deslocamento Químico δ (ppm)			
C/H	δ_{C}	δ_{H}	24-metilenocicloartano-3 β ,21-diol*
1	30,4 (CH ₂)		30,3
2	26,0 (CH ₂)		26,0
3	78,9 (CH)	3,28 (dd, $J= 11,1$ e $4,3$ Hz)	78,8
4	40,5 (C)		40,5
5	47,1 (CH)		47,0
6	21,1 (CH ₂)		21,1
7	32,0 (CH ₂)		31,9
8	48,0 (CH)		47,9
9	20,0 (C)		19,9
10	26,2 (C)		26,2
11	26,4 (CH ₂)		26,4
12	32,1 (CH ₂)		32,1
13	45,2 (C)		45,2
14	48,9 (C)		48,9
15	35,5 (CH ₂)		35,4
16	27,7(CH ₂)		27,6
17	42,7 (CH)		42,6
18	18,4 (CH ₃)	0,98 (s)	18,3
19	29,9 (CH ₂)	0,33 e 0,55 (d, $J= 4,1$ Hz)	29,8
20	46,2 (CH)		46,2
21	62,4 (CH ₂)	3,73 (dd, $J= 11,1$ e $2,5$ Hz) 3,62 (dd, $J= 11,1$ e $4,4$ Hz)	62,4
22	28,2 (CH ₂)		28,2
23	31,3 (CH ₂)		31,3
24	156,6 (C)		156,6
25	33,8 (CH)		33,8
26	22,0 (CH ₃)	1,02 (d, $J= 6,8$ Hz)	21,9
27	22,1 (CH ₃)	1,03 (d, $J= 6,8$ Hz)	22,0
28	25,5 (CH ₃)	0,96 (s)	25,4
29	14,1 (CH ₃)	0,80 (s)	14,0
30	19,5 (CH ₃)	0,91 (s)	19,4
31	106,3 (CH ₂)	4,73 (sl) 4,69 (d, $J= 0,9$ Hz)	106,2

*Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Prawat et al. (2013)

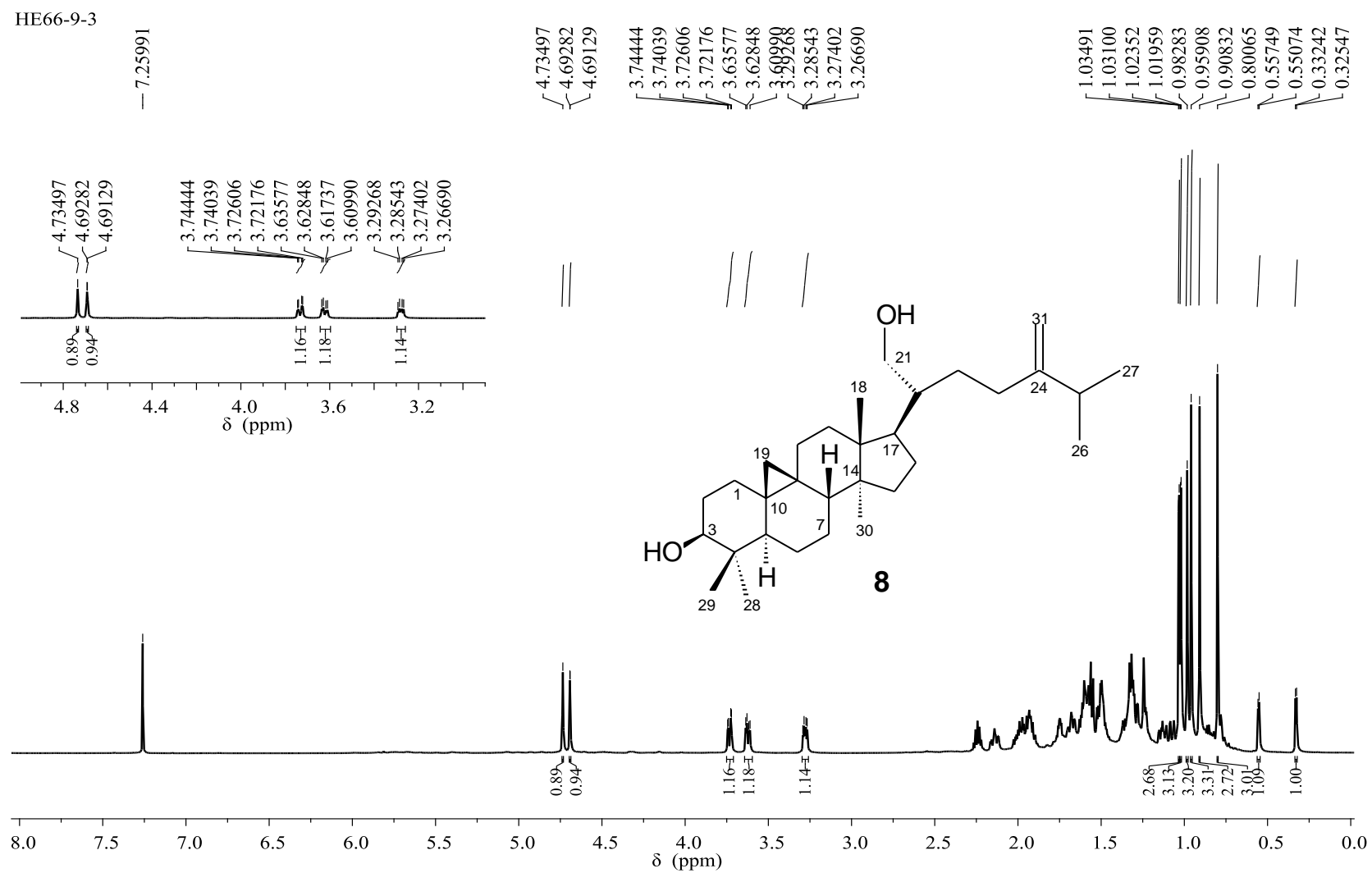
Figura 33- Espectro de RMN ^1H do composto **8** (CDCl_3 , 600 MHz)

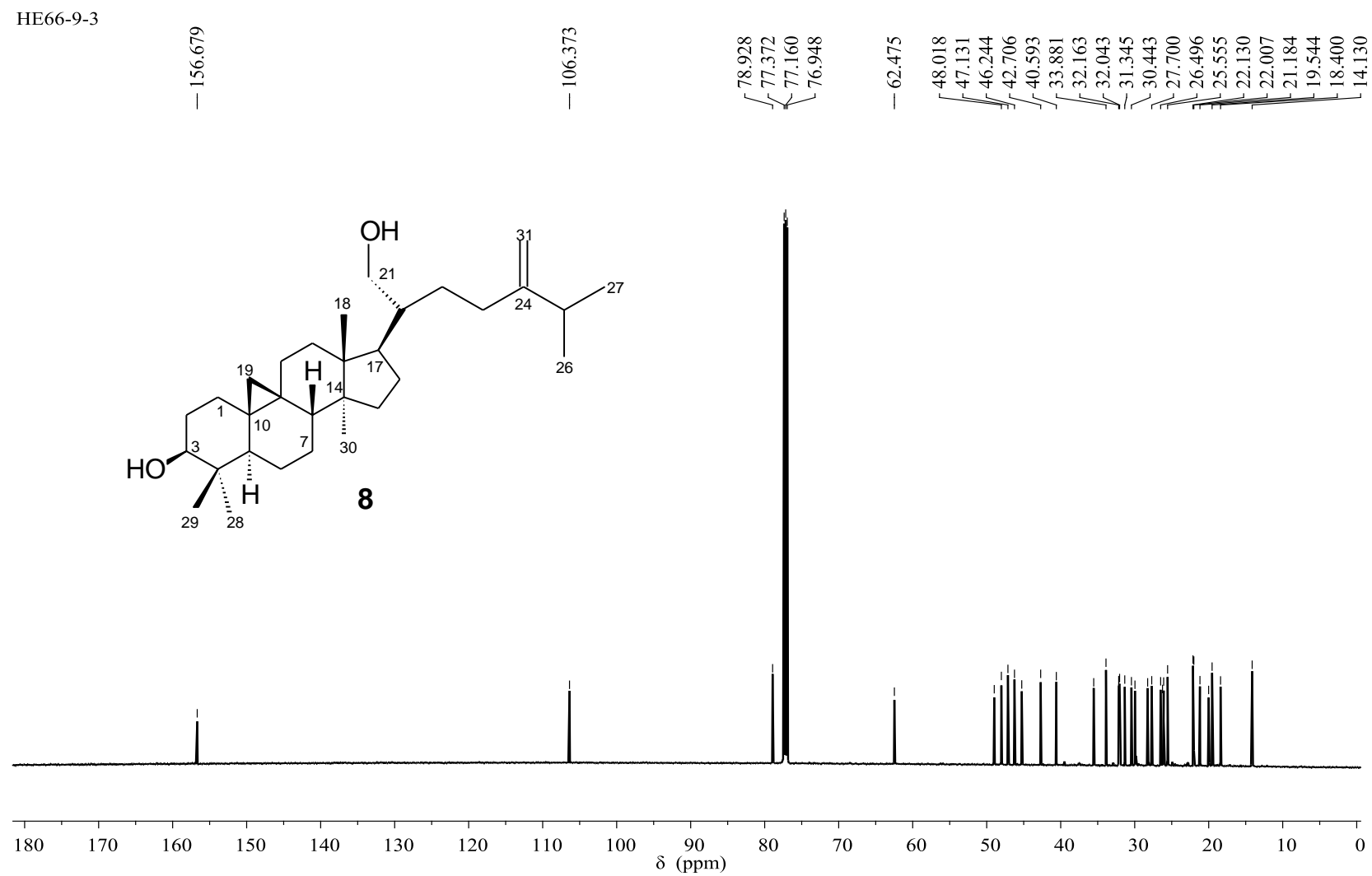
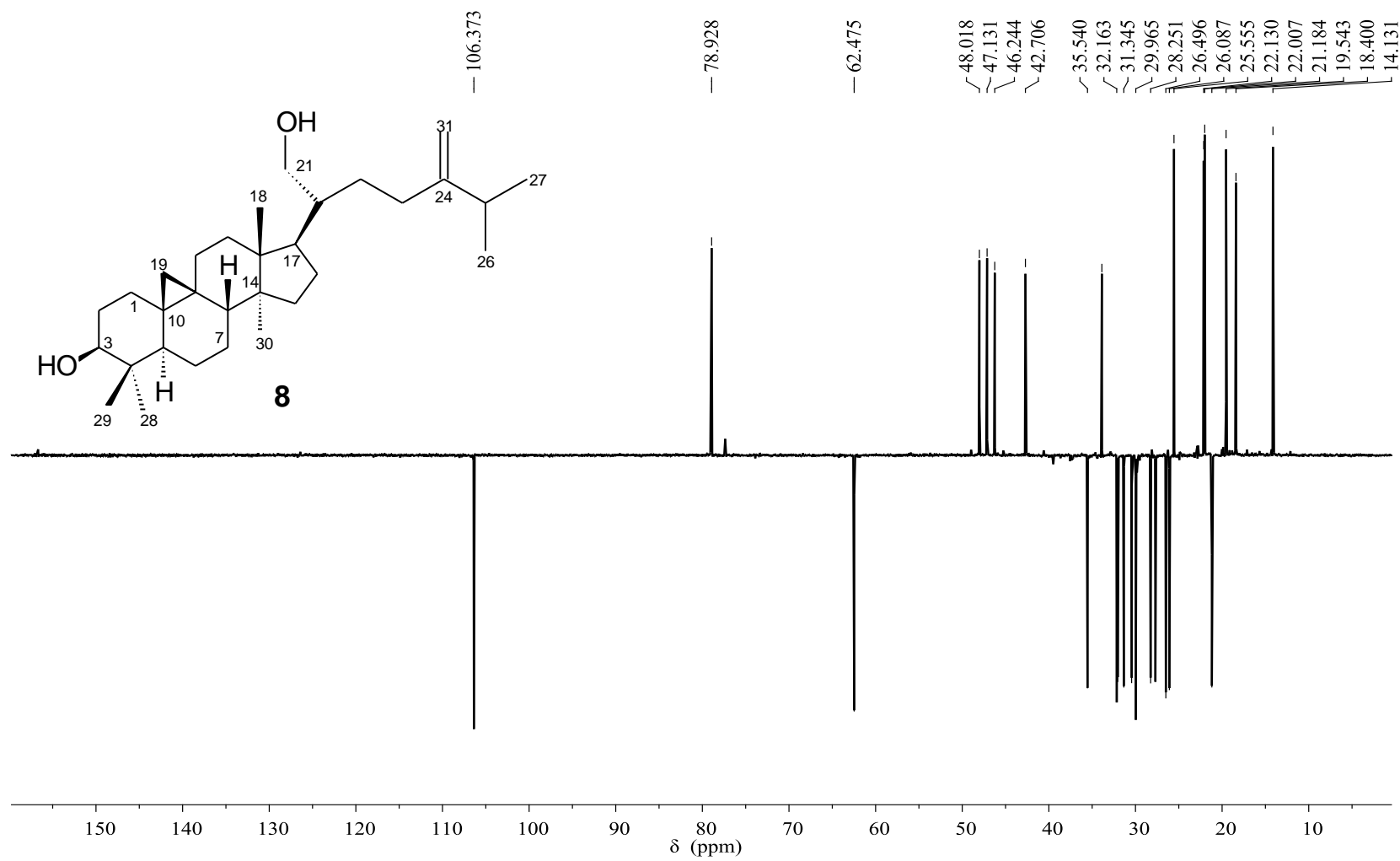
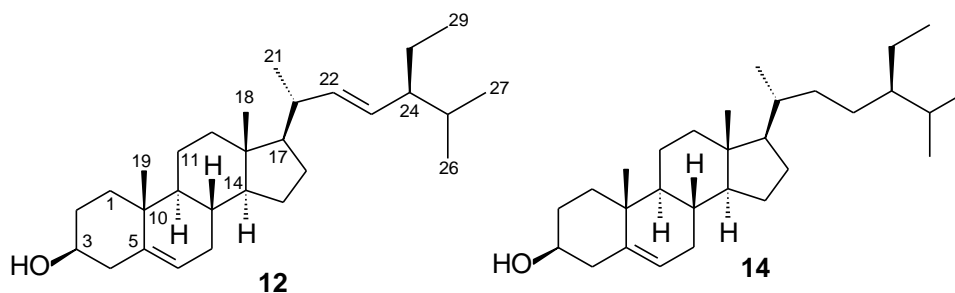
Figura 34- Espectro de RMN ^{13}C do composto **8** (CDCl_3 , 150 MHz)

Figura 35- DEPT 135° do composto **8** (CDCl₃, 150 MHz)

5.2.8 Identificação estrutural dos compostos 12+14



Os compostos **12** e **14** (26,6 mg) foram isolados do subgrupo HE32-8. A mistura foi obtida como um sólido branco solúvel em clorofórmio, proveniente do fracionamento cromatográfico em coluna de Sephadex LH-20 do grupo HE32 (Esquema 3, p. 46).

A análise dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C da fração HE32-8 possibilitou a identificação dos esteroides **12** e **14**, enquanto que a análise por CG-EM do produto sililado, além de confirmar a presença de **12** e **14**, resultou na identificação dos esteroides **9-11**, **13** e **15**.

No espectro de RMN ^1H (Figura 36, Tabela 12) observou-se um perfil característico de esteroides Δ^5 , evidenciado pelo multiplete em δ 3,51, referente à H-3, um duplete largo em δ 5,33 ($J= 5,2$ Hz) atribuído ao hidrogênio olefínico H-6, e simpletos entre δ 0,67-1,00 característicos de hidrogênios metílicos. Adicionalmente foram observados dois duplos dupletos de menor intensidade, em δ 5,01 e 5,15 ($J= 15,2$ e 8,6 Hz) atribuídos aos hidrogênios olefínicos (H-22 e H-23) da cadeia lateral do composto **12**.

Os espectros de RMN ^{13}C e DEPT 135° e 90° (Figuras 36-39, Tabela 12) apresentaram um sinal em δ 71,9 atribuído ao carbono oximetínico C-3, dois sinais em δ 140,8 e 121,8 referentes aos carbonos olefínicos C-5 e C-6, respectivamente. Os sinais de menor intensidade em δ 138,4 e 129,4 foram atribuídos aos carbonos olefínicos C-22 e C-23, confirmando a presença do composto **12** na mistura.

A comparação destes resultados com os dados descritos na literatura (FERREIRA et al. 2014) permitiram identificar os esteroides estigmasterol (**12**) e sitosterol (**14**).

Tabela 12- Dados de RMN ^{13}C dos compostos **12+14** (100 MHz, CDCl_3)

Deslocamento Químico δ (ppm)				
C	12	Estigmasterol*	14	Sitosterol*
1	37,3	37,4	37,3	37,4
2	31,7	31,8	31,7	31,8
3	71,9	71,9	71,9	71,9
4	42,4	42,4	42,4	42,4
5	140,8	140,9	140,8	140,9
6	121,8	121,9	121,8	121,9
7	31,7	32,0	31,7	32,0
8	32,0	32,0	32,0	3,20
9	50,2	50,3	50,2	50,3
10	36,6	36,6	36,6	36,6
11	21,2	21,2	21,2	21,2
12	39,9	39,9	39,9	39,9
13	42,4	42,5	42,4	42,5
14	56,9	56,9	56,9	56,9
15	24,4	24,4	24,4	24,4
16	29,2	28,4	28,3	28,4
17	56,0	56,2	56,0	56,2
18	12,0	12,0	12,0	12,0
19	19,5	19,5	19,5	19,5
20	40,6	36,9	36,2	36,3
21	21,2	21,2	18,9	18,9
22	138,4	138,5	32,0	34,0
23	129,4	129,4	26,2	26,2
24	51,3	50,3	45,9	45,9
25	31,7	31,8	29,2	29,3
26	21,2	21,2	19,1	19,9
27	18,9	18,9	19,9	19,2
28	25,5	25,5	23,2	22,8
29	12,1	12,2	12,0	12,0

*Dados obtidos em CDCl_3 relatados por Ferreira et al. (2014)

Figura 36- Espectro de RMN ^1H dos compostos **12+14** (CDCl_3 , 400 MHz)

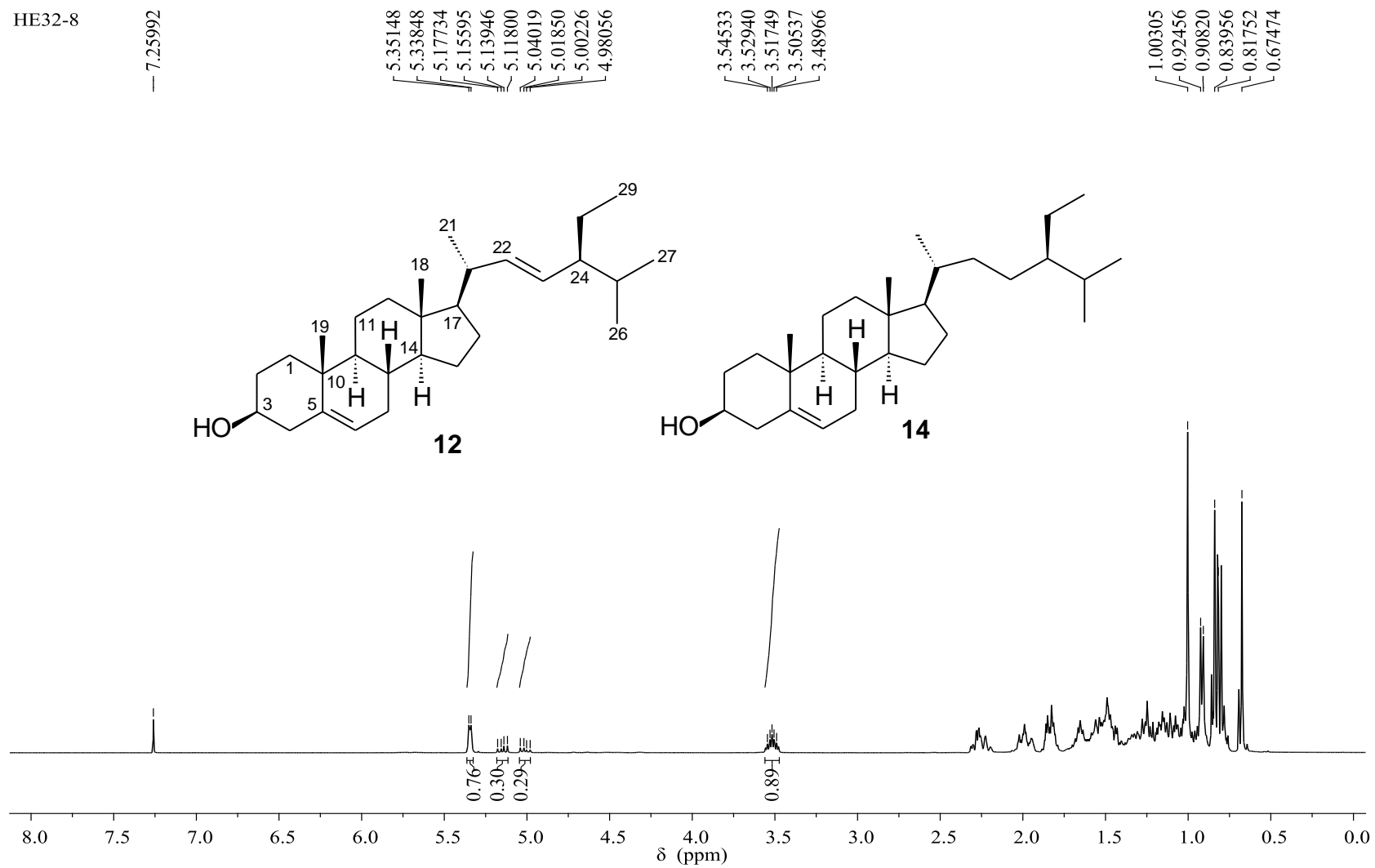


Figura 37- Espectro de RMN ^{13}C dos compostos **12+14** (CDCl_3 , 100 MHz)

HE 32- 8

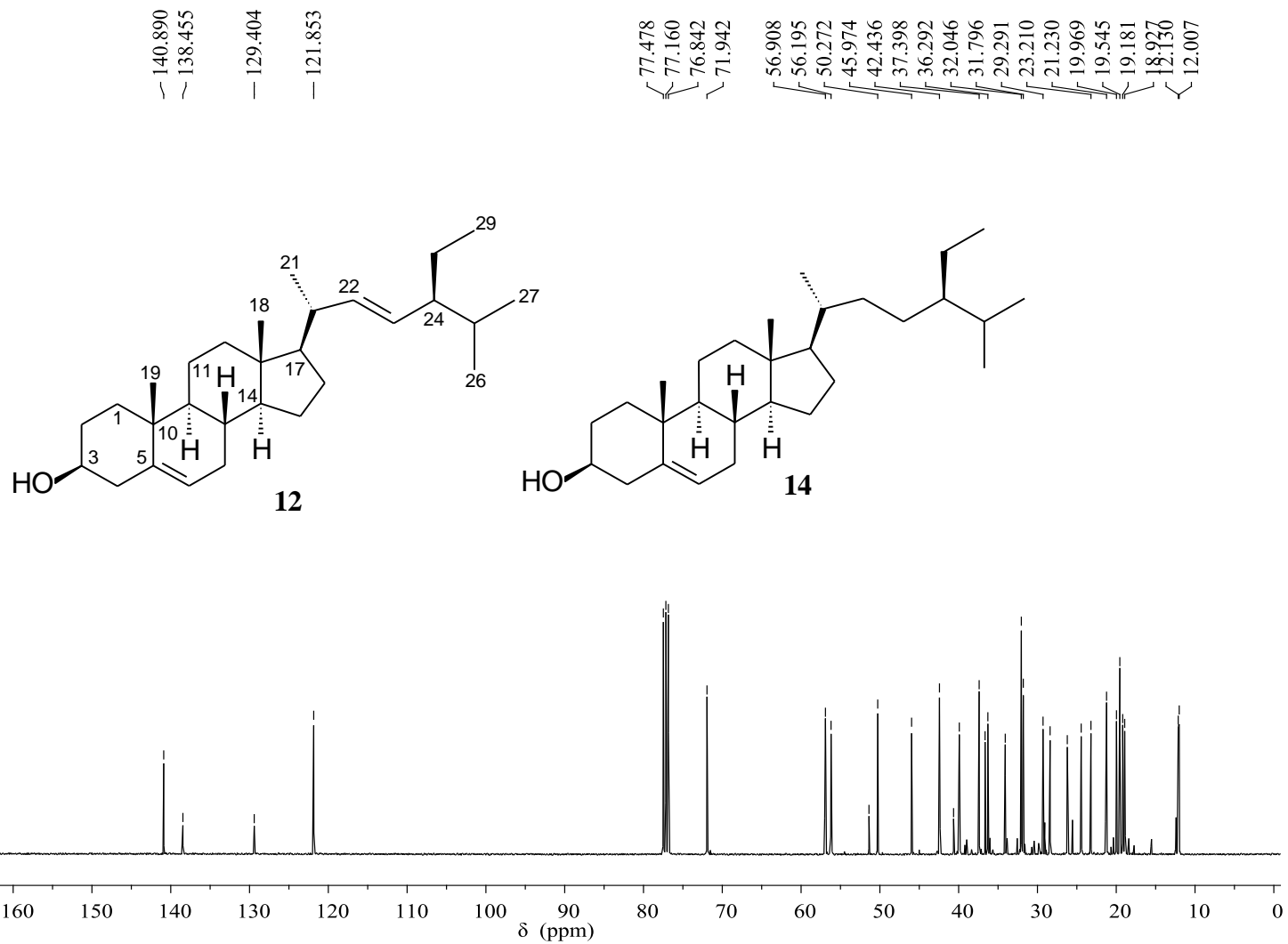
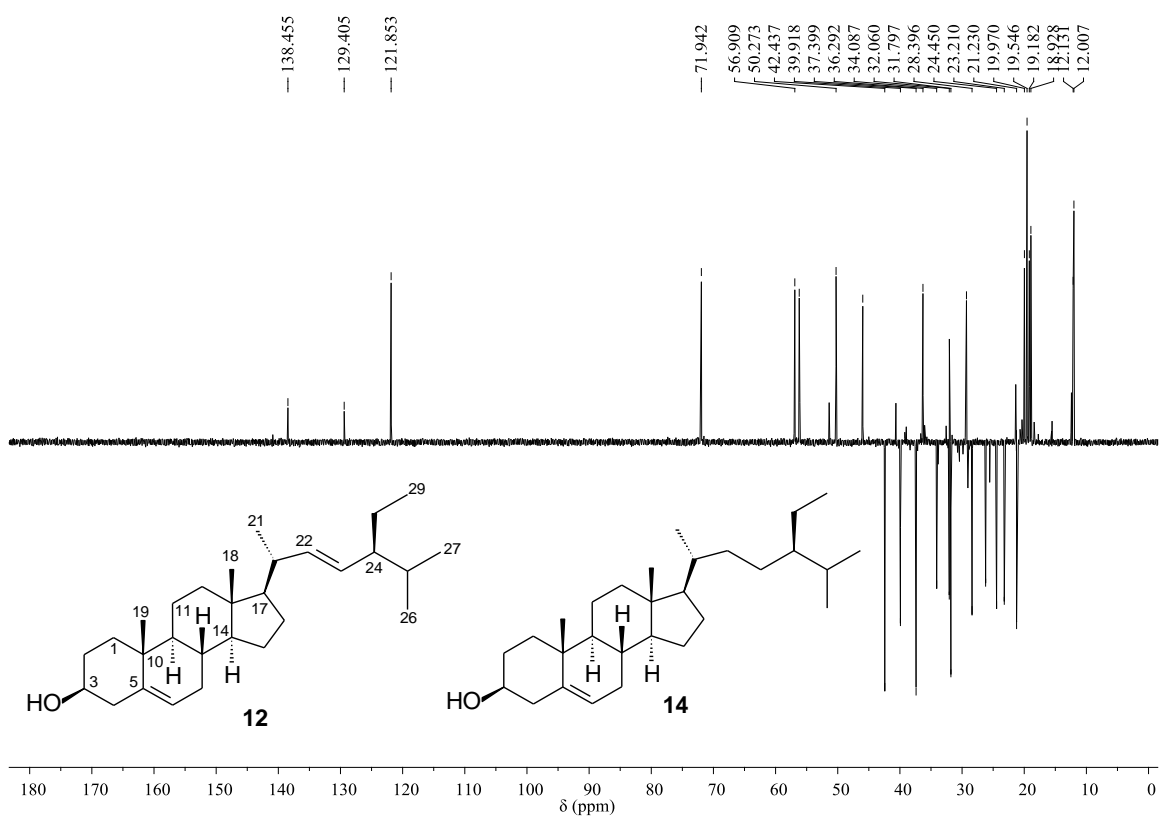
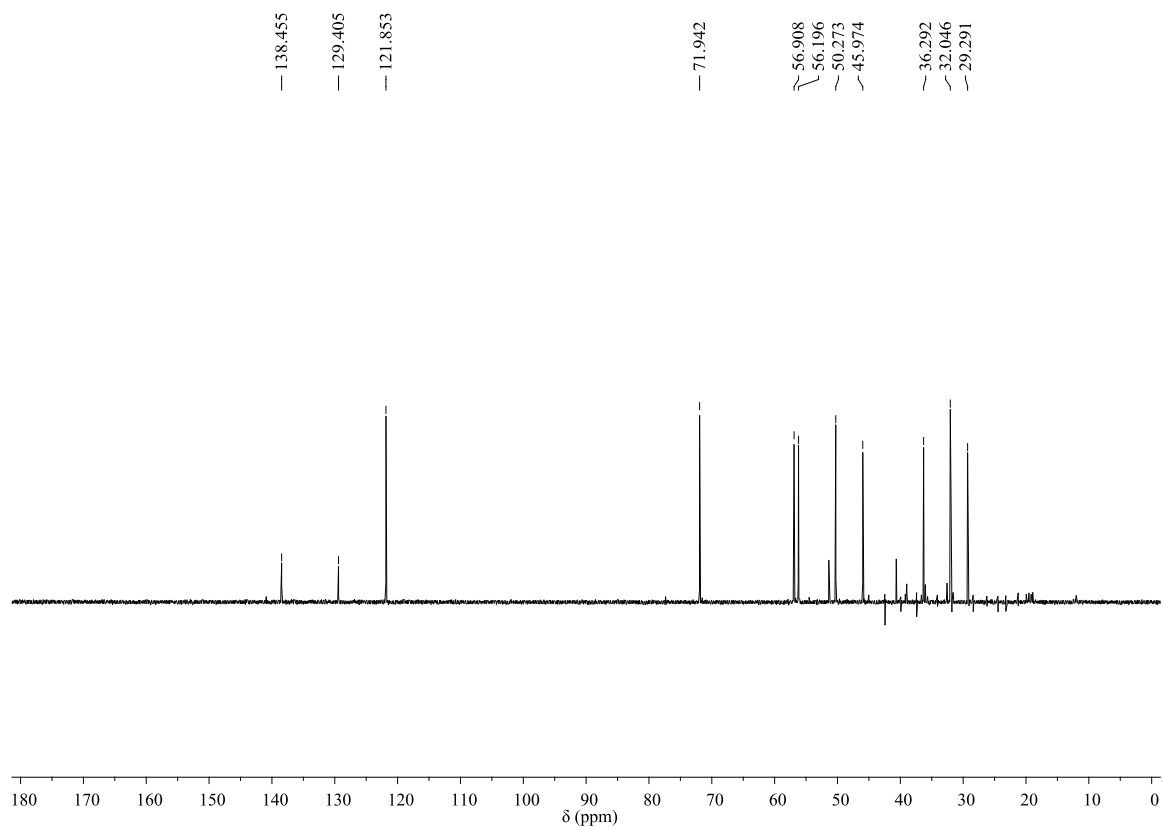


Figura 38- DEPT 135° dos compostos **12+14** (CDCl₃, 100 MHz)Figura 39- DEPT 90° dos compostos **12+14** (CDCl₃, 100 MHz)

A porcentagem de estigmasterol (**12**) na mistura foi determinada com base no espectro de RMN ^1H (Figura 36), pela relação entre o valor da integração do sinal de H-22 ou H-23, dividido pela integração do sinal de H-3, correspondente aos esteroides da mistura e multiplicado por 100. Enquanto, que a porcentagem de sitosterol (**14**) foi obtida pela diferença: $100 - \% \text{estigmasterol}$. Desta forma, a proporção entre estigmasterol (**12**) e sitosterol (**14**) é de 33,7:66,3.

A análise do cromatograma de íons totais (Figura 40) e dos espectros de massas (Figuras 41-47) resultantes da análise por CG-EM da fração HE32-8 sililada permitiu confirmar a presença de estigmasterol (**12**) e sitosterol (**14**), e identificar os esteroides colesterol (**9**), campesterol (**10**), campestanol (**11**), Δ^{22} -estigmasterol (**13**) e sitostanol (**15**) (Tabela 13).

Tabela 13- Derivados sililados dos esteroides (**9-15**) identificados na fração HE32-8 das folhas de *E. pisocarpus*

Compostos	Tr (min)	m/z [M] ⁺	Área relativa (%)
ColesterolTMS (9)	18,9	458	0,2
CampesterolTMS (10)	20,1	472	12,1
CampestanolTMS (11)	20,2	474	0,8
EstigmasterolTMS (12)	20,3	484	17,6
Δ^{22} -EstigmasterolTMS (13)	20,5	486	0,8
SitosterolTMS (14)	21,2	486	66,4
SitostanolTMS (15)	21,3	488	2,1

Tr: tempo de retenção

O estigmasterol e sitosterol foram os compostos majoritários nas amostras com 17,6 e 66,4%, respectivamente, correlacionando com as análises de RMN ^1H e ^{13}C .

Os esteroides são compostos comumente encontrados em diversas espécies vegetais. Estudos relatam que essas substâncias são eficazes no tratamento de câncer (BRADFORD; AWAD, 2007), doenças cardiovasculares

(CALPE-BERDIEL; ESCOLÀ-GIL; BLANCO-VACA, 2009) e diabetes (MISAWA et al., 2012).

Figura 40- Cromatograma de íons totais dos derivados siliados dos esteroides **9-15**

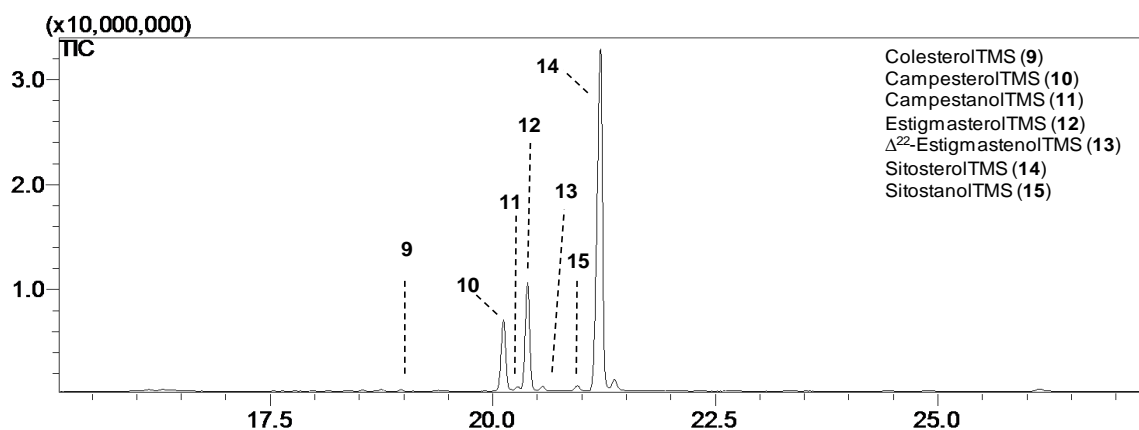


Figura 41- Espectro de massas do derivado siliado de **9** (colesterolTMS)- M^{+} 458

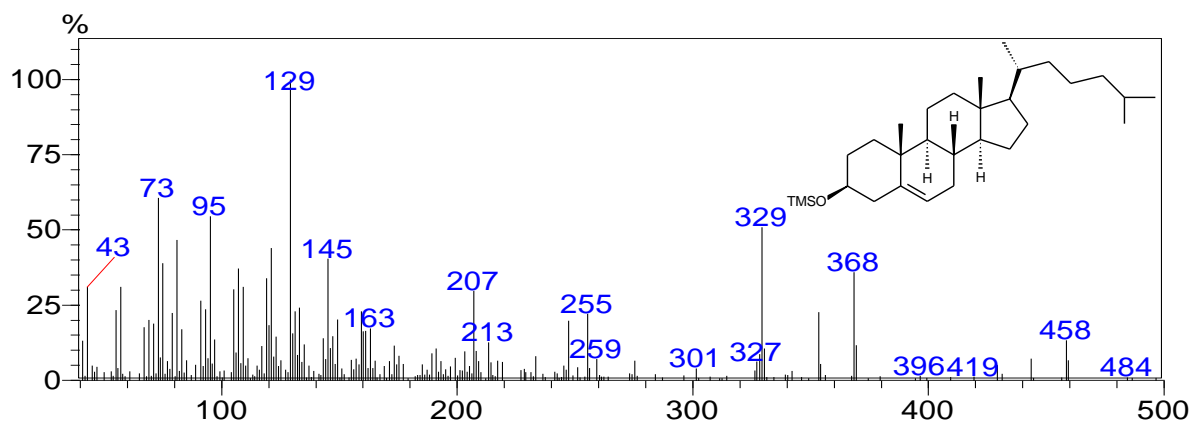


Figura 42- Espectro de massas do derivado siliado de **10** (campesterolTMS)- M^{+} 472

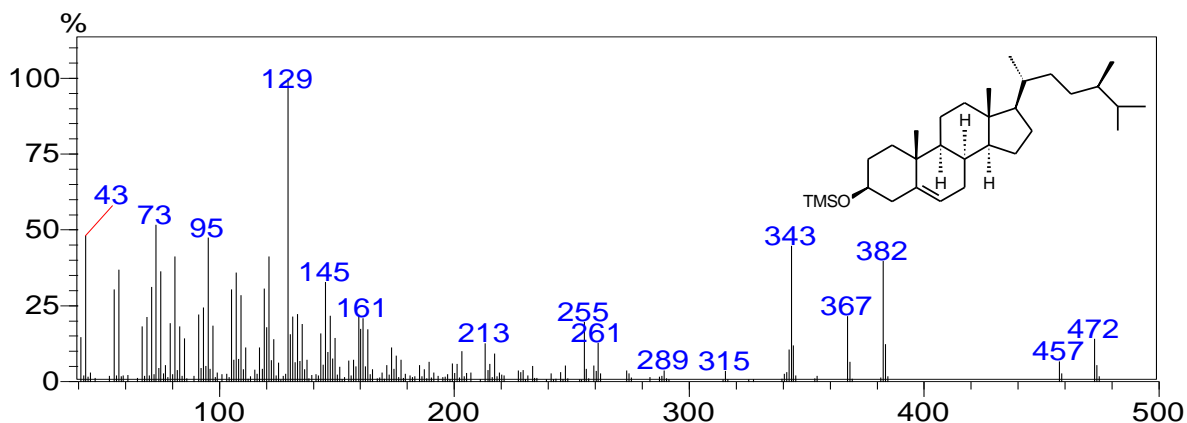


Figura 43- Espectro de massas do derivado sililado de **11** (campestanolTMS)-
M⁺: 474

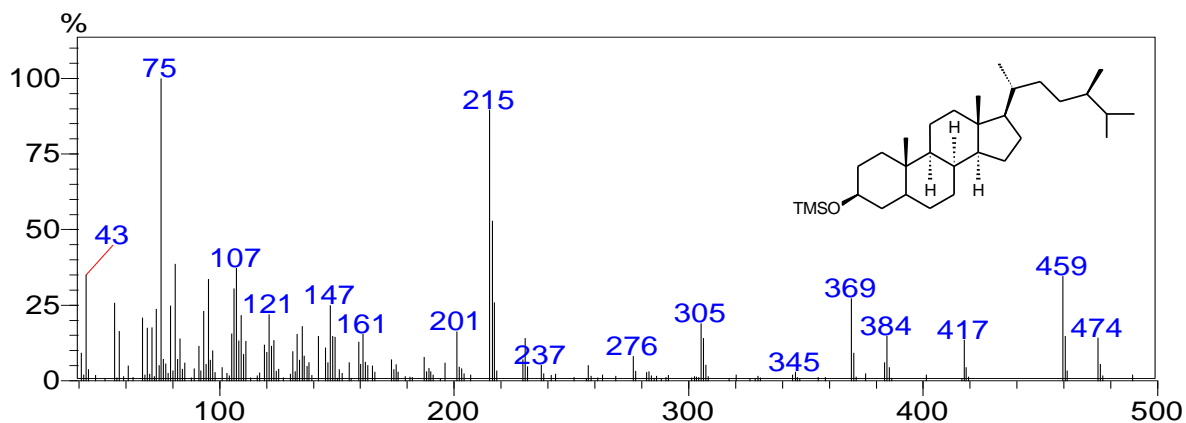


Figura 44- Espectro de massas do derivado sililado de **12** (estigmasterolTMS)-
M⁺: 474

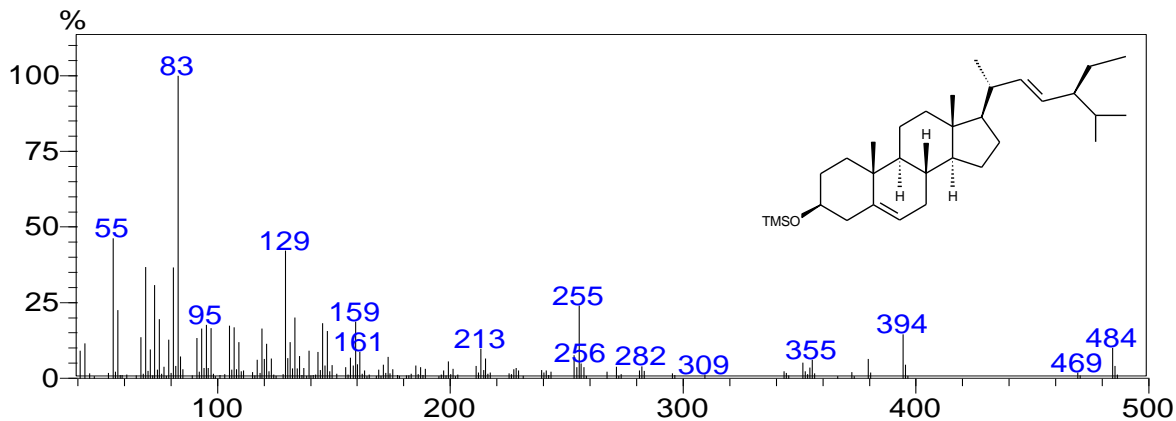


Figura 45- Espectro de massas do derivado sililado de **13** (Δ^{22} -
estigmasterolTMS)- M⁺ 486

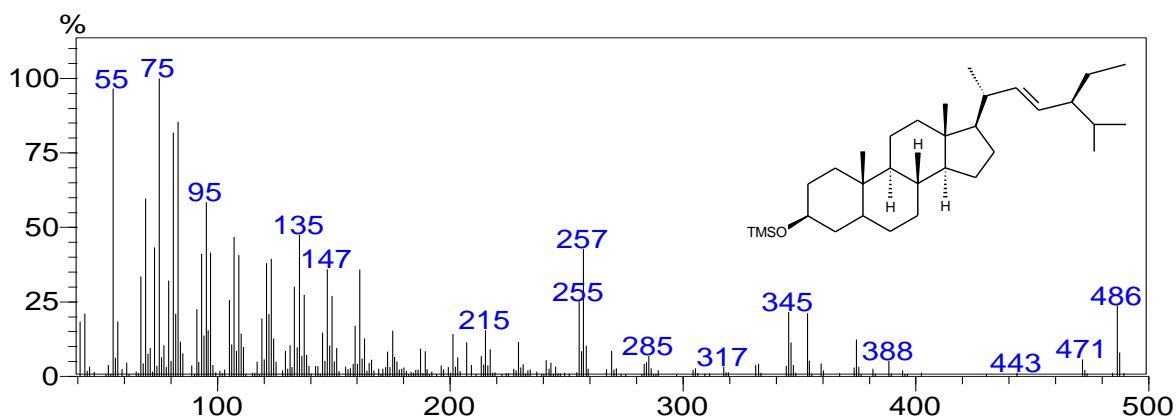


Figura 46- Espectro de massas do derivado siliado de **14** (sitosterolTMS)- M^{+} 486

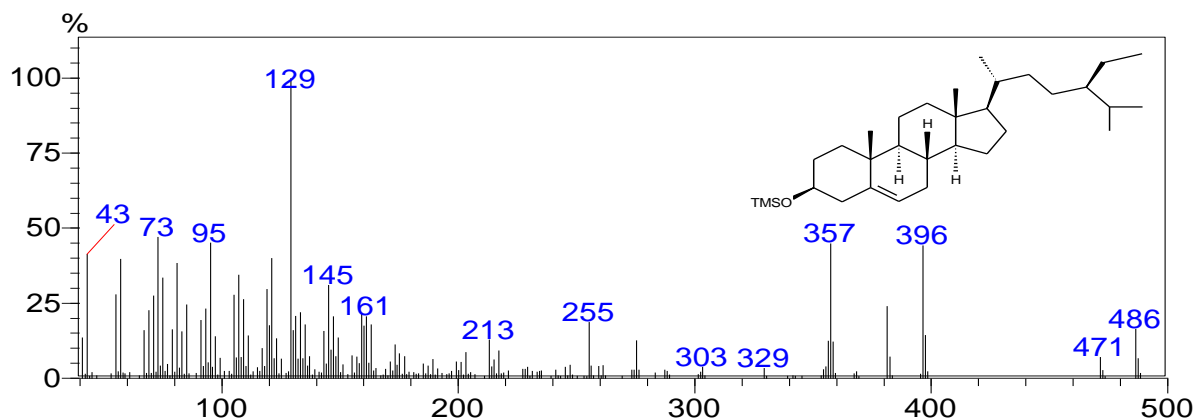
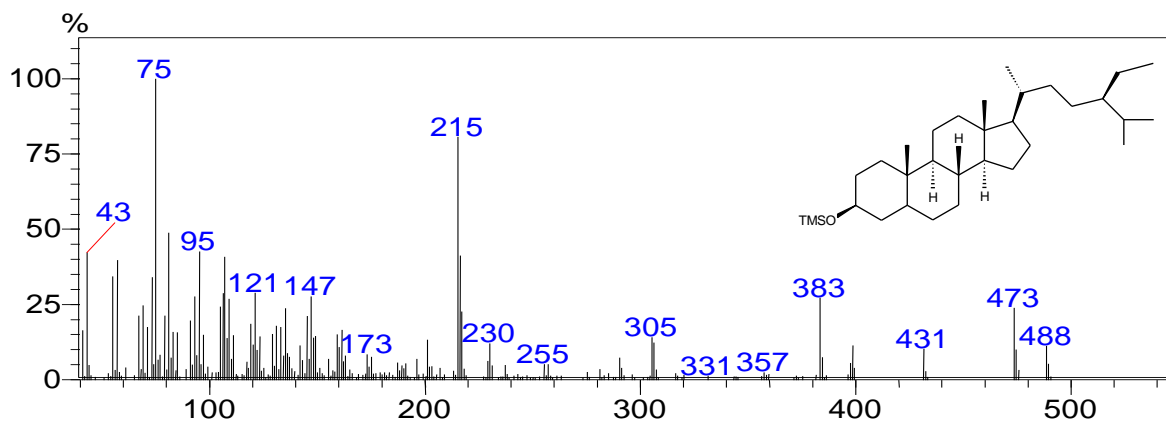


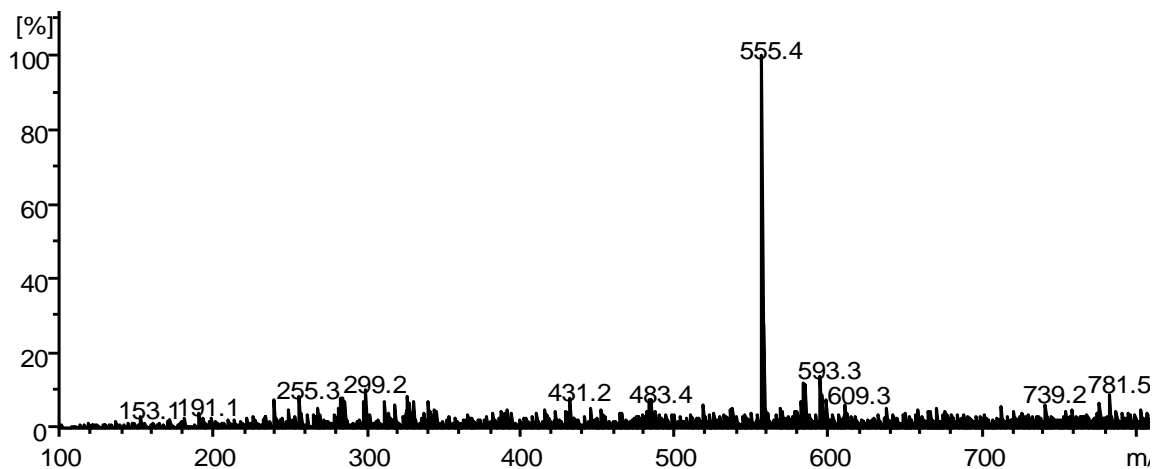
Figura 47- Espectro de massas do derivado siliado de **15** (sitostanoTMS)- M^{+} 488



5.3 Constituintes identificados na fração acetato de etila das folhas de *E. pisocarpus* por ESI-ITMS

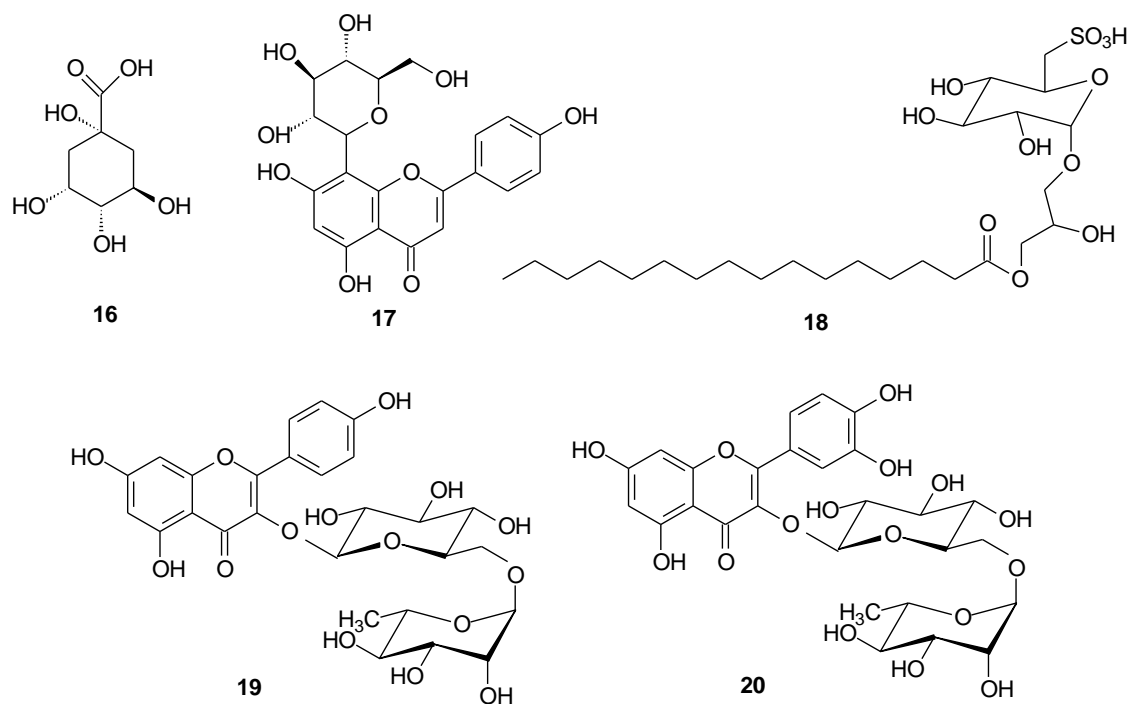
A investigação de constituintes químicos da fração AcOEt das folhas de *E. pisocarpus* foi realizada por espectrometria de massas com ionização por eletrospray em espectrômetro de massas (*ion trap*) (ESI-ITMS), operando no modo negativo. O *fingerprint* da fração AcOEt (Figura 48) apresentou cinco bandas mais intensas e, com base nos espectros de massas e comparação com a literatura, permitiram a identificação dos compostos **16-20**, sendo o composto **18** (m/z 555) o majoritário.

Figura 48- *Fingerprint* da fração AcOEt das folhas de *E. pisocarpus* obtido por ESI-ITMS



A análise por ESI-ITMS possibilitou a identificação de cinco compostos: ácido quínico (**16**), vitexina (**17**), sulfoquinovosilmonoacilglicerol (**18**), canferol-3-O-rutinosídeo (**19**) e rutina (**20**). As estruturas destes compostos são mostradas na Figura 49.

Figura 49- Estrutura dos constituintes químicos identificados na fração AcOEt das folhas de *E. pisocarpus*



O pico da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 191 (Figura 48) foi atribuído ao composto **16**. Seu espectro MS^2 gerou íons fragmentos em m/z 173, 127 e 111 (Figuras 50 e 51, Tabela 14), sendo identificado como ácido quínico (PEREIRA et al., 2017).

O composto **16** é um ácido ciclohexanocarboxílico e apresenta atividades antidiabética, antioxidante, antineuroinflamatória e radioprotetora (ARYA et al., 2014; PERO; LUND; LEANDERSON, 2009; LEE et al., 2013; CINKILIK et al., 2013). Estudos realizados por Garcia-Sales (2015) relatam a identificação do ácido quínico (**16**) na polpa dos frutos de *Annona cherimola* (Annonaceae).

Figura 50- MS^2 do pico m/z 191 (ácido quínico, **16**)

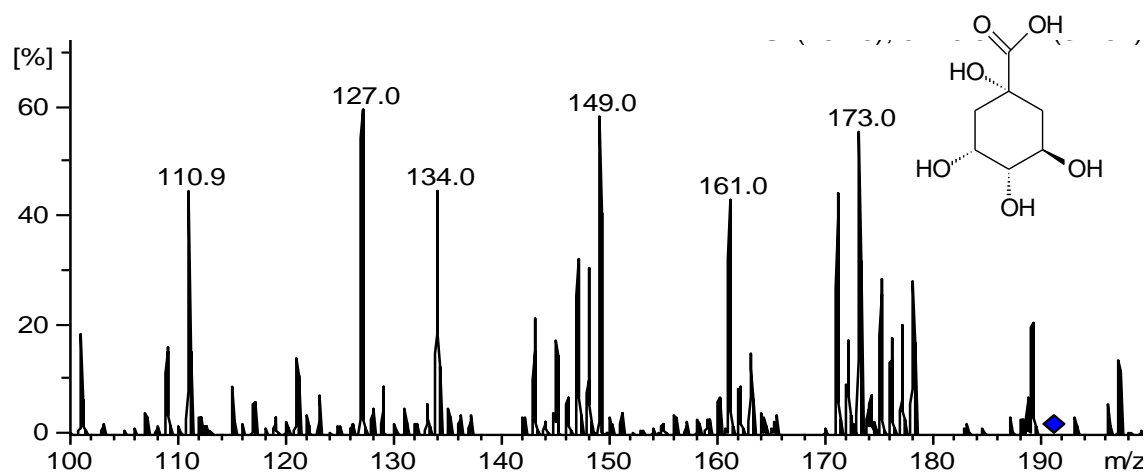
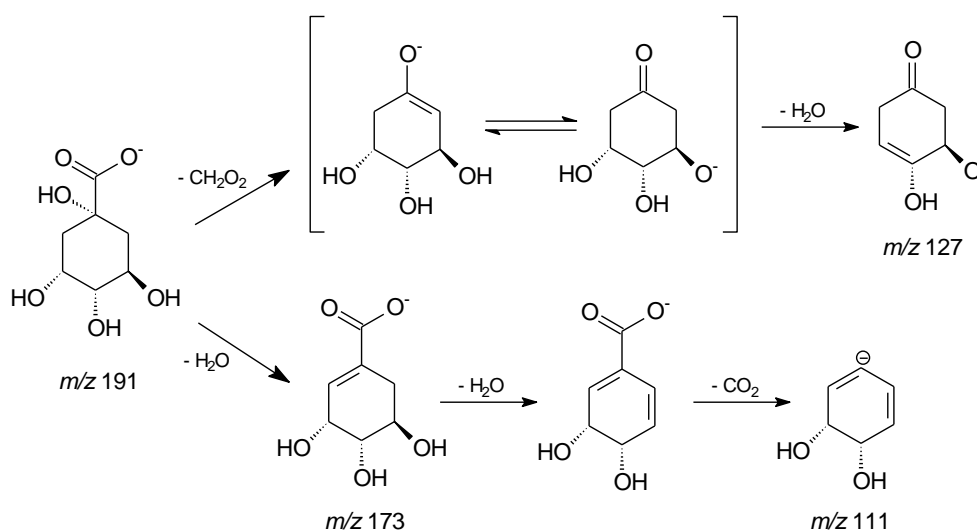


Figura 51- Proposta de fragmentação para o ácido quínico (**16**)



Fonte: Adaptado de Chornobai (2008)

A vitexina (**17**) apresentou o íon da molécula desprotonada [M-H]⁻ em m/z 431 (Figura 48) e o seu espectro MS² (Figura 52 e Tabela 14), gerou os fragmentos em m/z 341 (perda de 90 Da) e 311 (perda de 120 Da) resultantes da unidade de açúcar, conforme proposta de fragmentação relatada por Krasteva; Nikolov (2008), mostrada na Figura 53.

O composto **17** foi anteriormente identificado no extrato n-butanólico das folhas de *Annona muricata* (Annonaceae) (GEORGE et al., 2012). Há relatos na literatura que este flavonoide apresenta ações anticancerígena, anti-hipertensiva e anti-inflamatória (YANG et al., 2013; JE et al., 2014; DONG et al., 2013).

Figura 52- MS² do pico m/z 431 (vitexina, **17**)

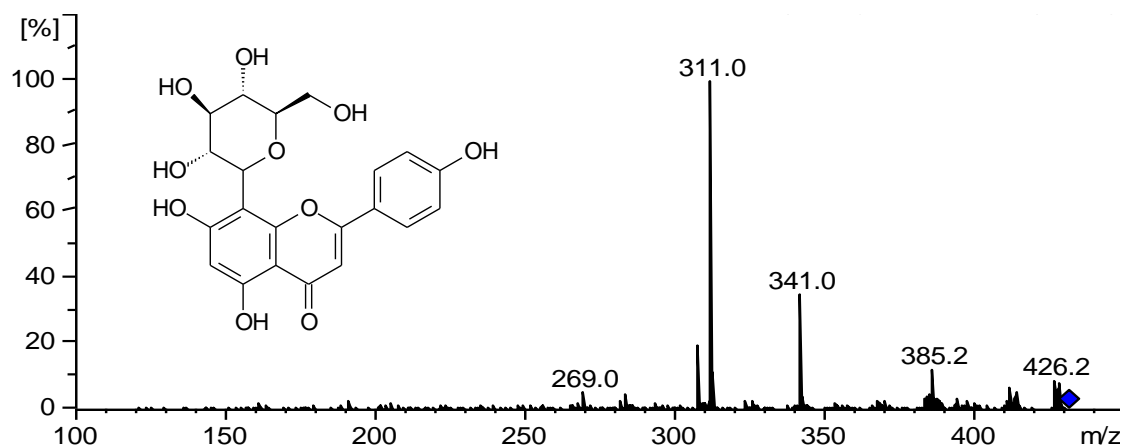
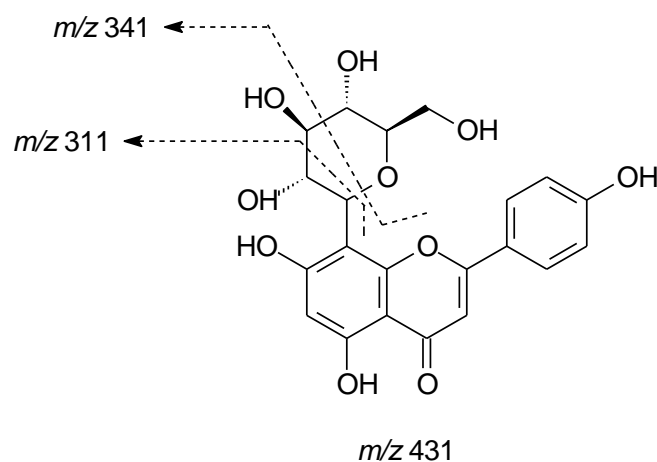


Figura 53- Proposta de fragmentação para a vitexina (**17**)



Fonte: Adaptado de Krasteva; Nikolov (2008)

O composto **18** apresentou pico da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 555 (Figura 48) e gerou íons fragmentos no espectro MS^2 em m/z 299, 255, 225 e 165 (Figura 54 e Tabela 14) indicando tratar-se de um sulfoquinovosilmonoacilglicerol (SQMG) esterificado com ácido palmítico (16:0) com proposta de fragmentação mostrado na Figura 55 (RATTMANN et al., 2011).

O composto **18** pertence à classe dos sulfoglicolipídeos, macromoléculas comumente encontradas nas membranas celulares de algas e plantas. Este composto foi anteriormente identificado nas algas *Ulveella lens* e *Osmundaria obtusiloba*. Contudo, está sendo relatado pela primeira vez na família Annonaceae. Estudos descrevem que o sulfoquinovosilmonoacilglicerol apresenta atividade antitumoral *in vitro* (TAKAHASHI et al., 2002; SOUZA et al., 2012; HANASHIMA et al., 2001).

Figura 54- MS^2 do pico m/z 555 (sulfoquinovosilmonoacilglicerol (16:0), **18**)

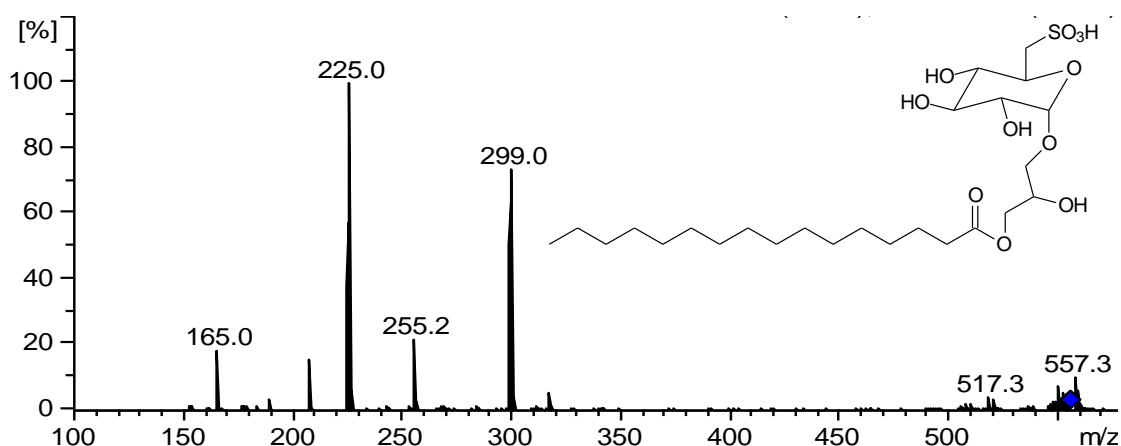
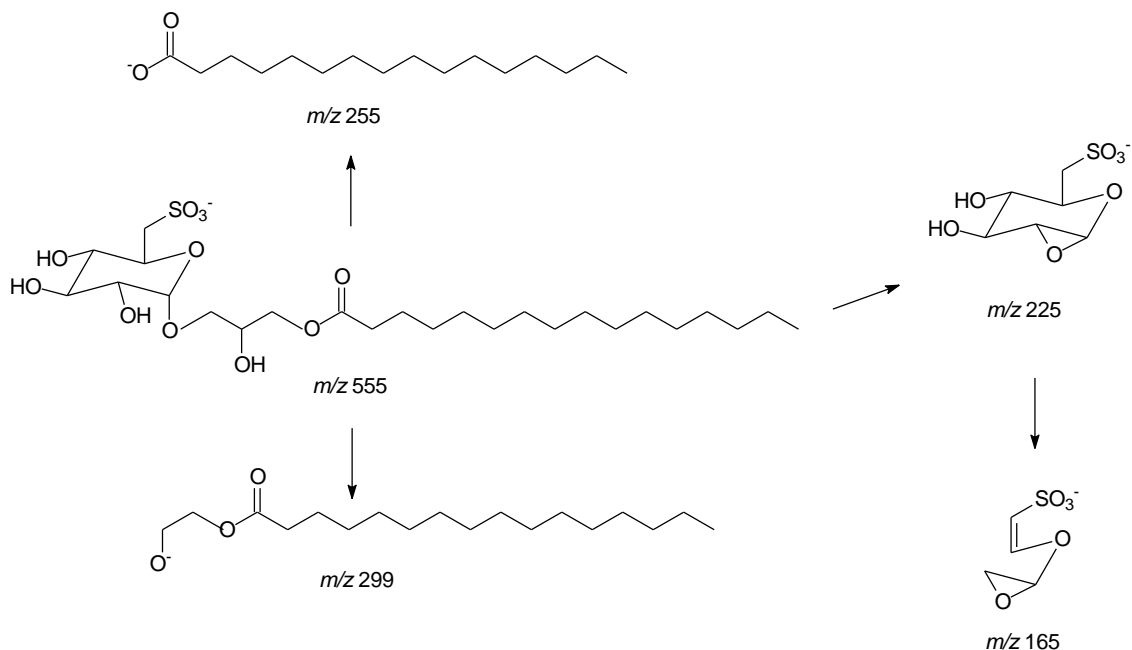


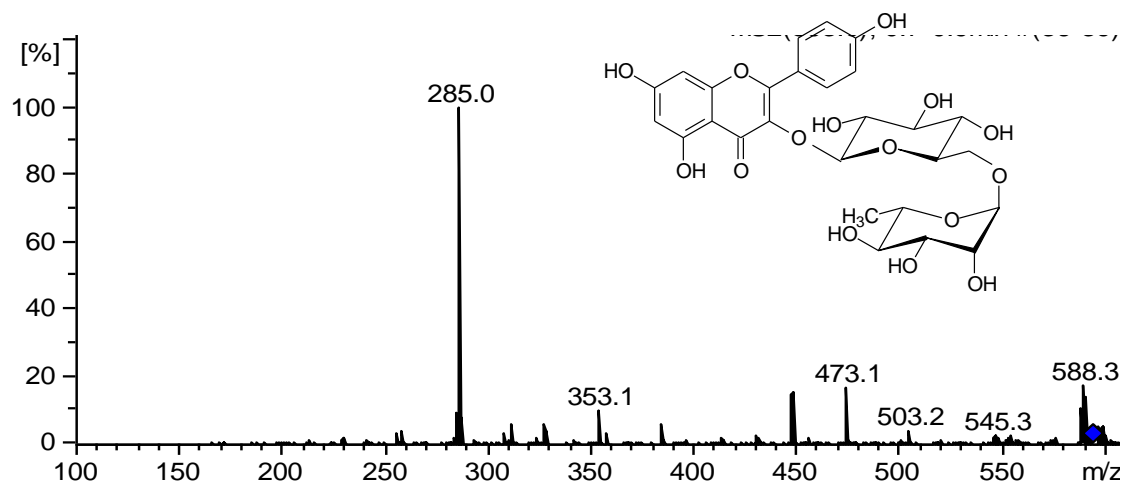
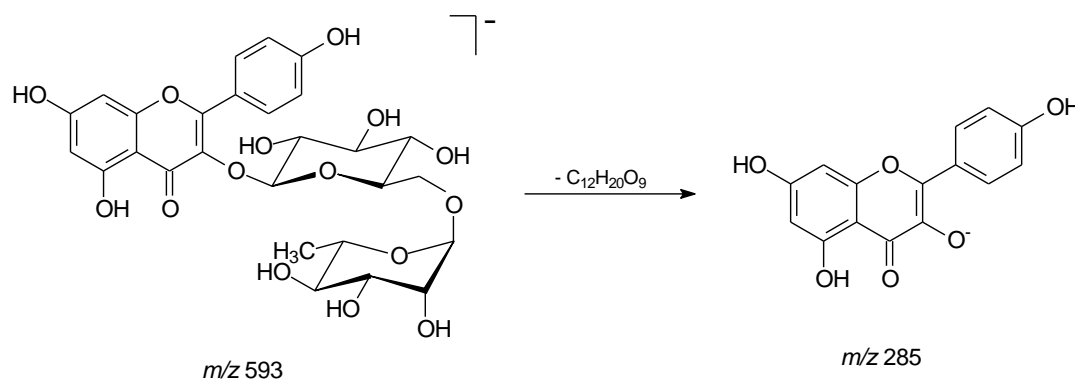
Figura 55- Proposta de fragmentação para o sulfoquinovosilmonoacilglicerol (16:0) (**18**)



Fonte: Adaptado de Souza et al. (2012)

O flavonoide canferol-3-O-rutinosídeo (**19**) apresentou pico da molécula desprotonada $[M-H]^-$ em m/z 593 (Figura 48) e seu MS^2 gerou um fragmento em m/z 285 (Figuras 56 e 57, Tabela 14) referente a aglicona canferol (BRITO et al., 2014).

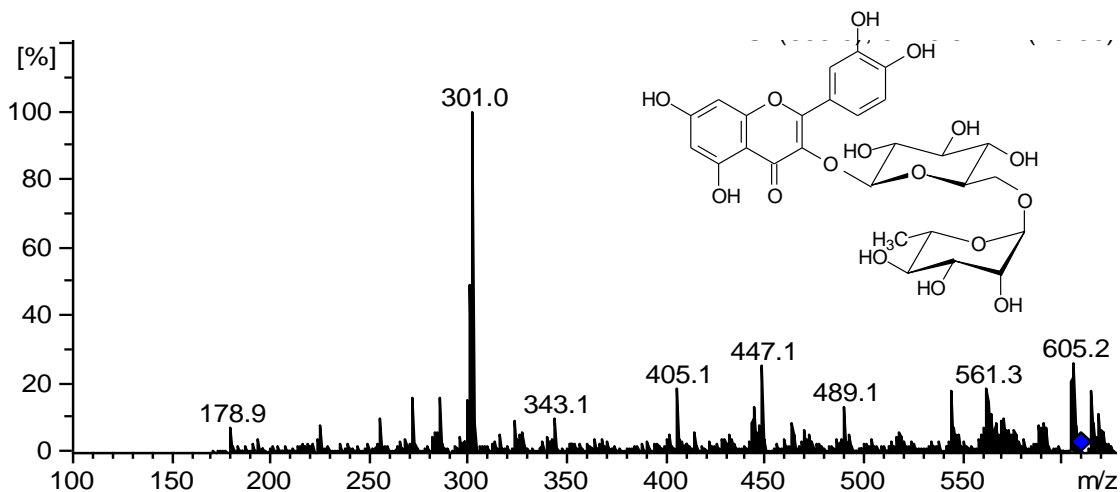
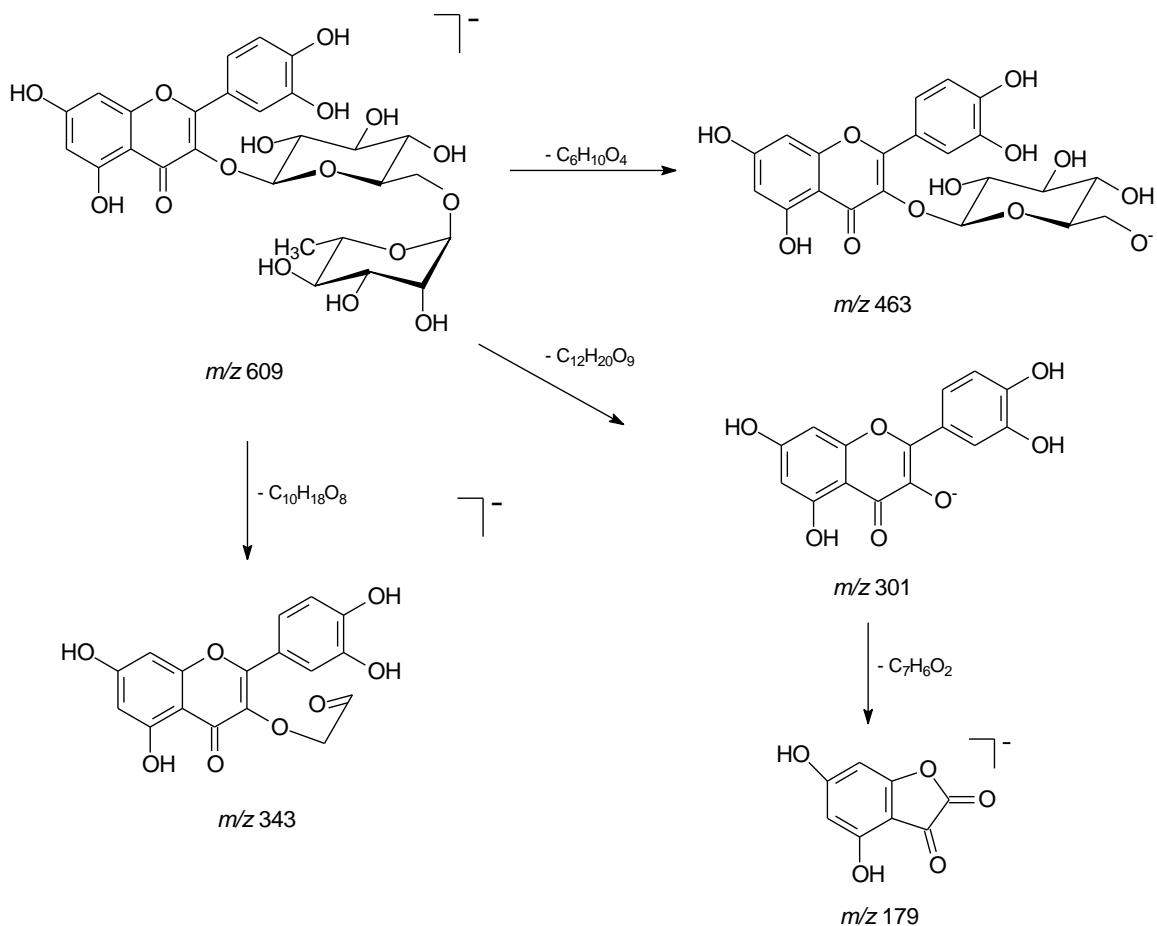
Estudos realizados por Sousa et al. (2014b) relataram o isolamento e identificação do composto **19** nas folhas de *Oxandra sessiliflora* (Annonaceae). O canferol-3-O-rutinosídeo apresenta atividade citotóxica frente a linfócitos humanos (BROCHADO et al., 2003).

Figura 56- MS² do pico *m/z* 593 (canferol-3-O-rutinosídeo, **19**)Figura 57- Proposta de fragmentação para o canferol-3-O-rutinosídeo (**19**)

Fonte: Adaptado de Brito et al. (2014)

O espectro de massas do composto **20** apresentou íon da molécula desprotonada em *m/z* 609 (Figura 48) indicando tratar-se da rutina (M'RABET et al., 2017). O espectro MS² de *m/z* 609 gerou os fragmentos em *m/z* 463 atribuído a perda da ramnose (146 Da) e em *m/z* 301 referente à aglicona quercetina (perda de 162 Da) (Figuras 58 e 59, Tabela 14).

A rutina (**20**) é um flavonoide encontrado em diversas plantas e que apresenta inúmeras atividades biológicas tais como, antioxidante, anti-inflamatória, hepatoprotetora e antiglicêmica (GHORBANI, 2017). O composto **20** já foi anteriormente identificado em outras espécies da família Annonaceae tais como, *Annona squamosa* e *Oxandra sessiliflora* (JAYENDRA; KUMAR, 2013; SOUSA et al., 2014b).

Figura 58- MS² do pico *m/z* 609 (rutina, **20**)Figura 59- Proposta de fragmentação para a rutina (**20**)

Fonte: Adaptado de M'rabet et al. (2017)

O resumo dos dados obtidos na análise da fração AcOEt das folhas de *E. pisocarpus* por espectrometria de massas (ESI-ITMS), operando no modo negativo, são apresentados na Tabela 14.

Tabela 14- Compostos identificados por ESI-ITMS na fração AcOEt das folhas de *E. pisocarpus*

N°	Fórmula molecular	Massa molecular	[M-H] ⁻ (m/z)	MS/MS (intensidade relativa, %)	Compostos
16	C ₇ H ₁₂ O ₆	192	191	173 (38), 127 (70), 111 (27)	Ácido quínico
17	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	432	431	341 (33), 311 (100), 269 (3)	Vitexina
18	C ₂₅ H ₄₆ O ₁₁ S	556	555	299 (74), 255 (18), 225 (100), 165 (19)	SQMG (16:0)
19	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	594	593	285 (100)	Canferol-3-O- rutinosídeo
20	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	610	609	463 (12), 343 (9), 301 (100), 179 (5)	Rutina

SQMG: sulfoquinovosilmonoacilglicerol

5.4 Avaliação do potencial biológico do extrato e frações das folhas de *E. piscocarpus*

5.4.1 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são geralmente provenientes de reações biológicas ou de fontes exógenas. As EROs incluem todas as espécies que contenham oxigênio, tais como o ânion superóxido (O_2^-), os radicais hidroxila ($HO\bullet$) e peroxila ($ROO\bullet$) e espécies não radicalares como o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio singlete (1O_2). Estas espécies podem provocar diversas desordens metabólicas ao reagirem com moléculas essenciais, tais como, carboidratos, lipídeos, ácidos nucleicos e proteínas. O excesso de radicais livres está relacionado ao surgimento de inúmeras doenças, dentre elas, inflamações crônicas, diabetes, problemas respiratórios, doenças neurodegenerativas, câncer e envelhecimento precoce (GULCIN et al., 2003; ANDRADE et al., 2007).

Antioxidantes são moléculas naturais capazes de prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo, pois sequestram e estabilizam os radicais livres impedindo que essas moléculas altamente reativas causem danos às células e, por conseguinte, prevenindo o aparecimento de doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

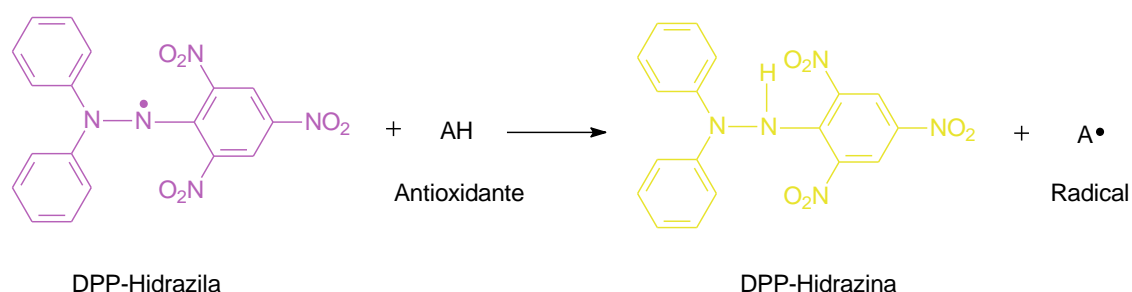
Os antioxidantes podem ser classificados em naturais ou sintéticos. Contudo, estudos têm relatado que os antioxidantes sintéticos apresentam elevada toxicidade e isso vem contribuindo para o crescente interesse por antioxidantes naturais obtidos a partir de extratos vegetais (MANACH et al., 2004).

Atualmente, existem diversos métodos para avaliação da atividade antioxidante *in vitro*, dentre eles o sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoléico e métodos de sequestro do radical livre DPPH, do cátion radical ABTS e do radical peroxila. O ensaio com o radical livre DPPH é amplamente utilizado para avaliação do potencial antioxidante de extratos vegetais por ser um método simples, eficiente e de baixo custo (ALVES et al., 2010; ZHOU et al., 2017).

O DPPH é um radical estável de coloração púrpura que absorve a 516 nm. Na presença de um antioxidante o DPP-hidrazila pode receber um elétron

ou um átomo de hidrogênio, por meio de uma reação de redução, convertendo-se em uma molécula de DPPH estável de coloração amarela (DPP-hidrazina), porém menos reativa (Figura 60). Os resultados obtidos na análise são expressos em percentual de atividade antioxidante (%AA), que corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. A concentração eficiente (CE_{50}) é definida como a concentração de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Dessa forma, quanto menor a CE_{50} maior o potencial antioxidante da amostra (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 60- Estabilização do radical livre DPPH por uma espécie antioxidante (AH)



Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2009

Os percentuais de atividade antioxidante do extrato etanólico e frações das folhas de *E. piscocarpus* e dos controles positivos (rutina e BHT) frente ao radical DPPH são apresentados na Figura 61 e Tabela 15.

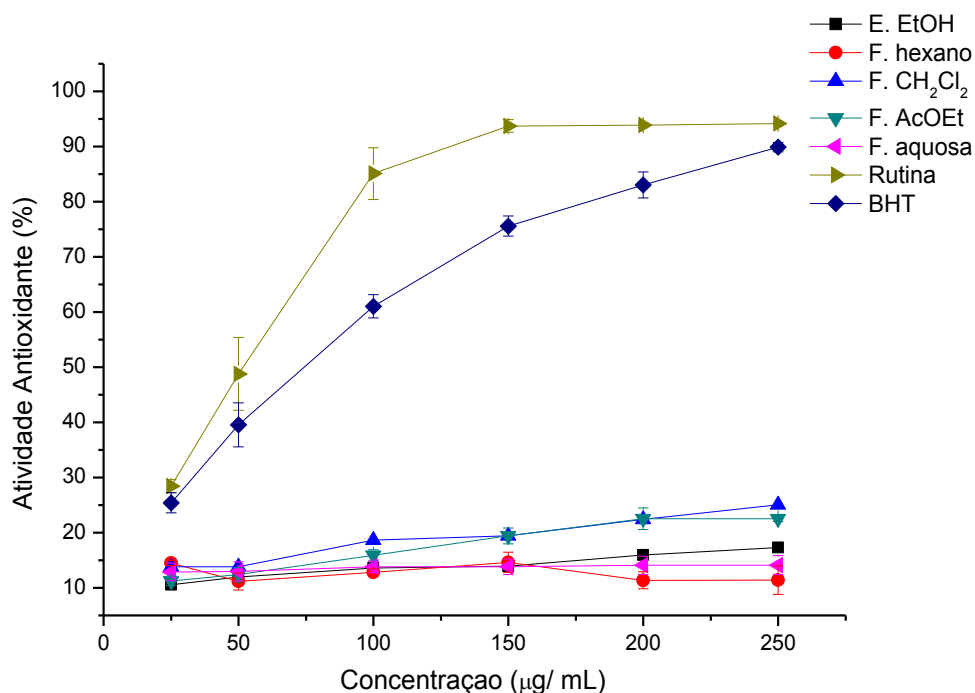
Os resultados demonstram que todas as amostras avaliadas na concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram percentuais inferiores aos obtidos para os padrões rutina (%AA= $94,14 \pm 0,22$) e BHT (%AA= $89,88 \pm 0,83$).

As amostras que exibiram os maiores percentuais de atividade antioxidante foram as frações diclorometano e AcOEt, com valores de 25,03 e 22,55% (Tabela 15), respectivamente, na maior concentração testada ($250 \mu\text{g mL}^{-1}$).

O extrato etanólico e as frações hexano e aquosa foram as menos ativas, com %AA de $17,31 \pm 0,09$, $11,39 \pm 2,59$ e $14,12 \pm 1,72$, respectivamente (Tabela 15). Não foi possível calcular a CE_{50} , pois nenhuma das amostras foi

capaz de reduzir a concentração de DPPH em 50% nas concentrações testadas.

Figura 61- Percentual de atividade antioxidante do extrato etanólico e frações hexano, diclorometano (CH₂Cl₂), acetato de etila (AcOEt) e aquosa das folhas de *E. pisocarpus* e dos controles positivos rutina e BHT. Tempo de reação com DPPH: 30min



O extrato etanólico e as frações das folhas de *E. pisocarpus* apresentaram atividade antioxidante inferior aos relatados para outras espécies da família Annonaceae. Estudos realizados com o extrato aquoso e fração acetato de etila dos frutos da espécie *Annona muricata* apresentaram percentuais de 71,7 e 54,2%, respectivamente (NUNES et al., 2013). Os extratos etanólicos de *Fusaea longifolia* (caule) e *Annona vepretorum* (folhas) exibiram CE₅₀ de 26,84±0,23 e 98,87±11,24 µg mL⁻¹, respectivamente (ALMEIDA et al., 2014; ANDRADE, 2017).

Tabela 15- Percentual de atividade antioxidante (%AA) do extrato etanólico e frações das folhas de *E. piscocarpus* e dos padrões rutina e BHT

Amostras	DPPH %AA ± DP					
	25 µg mL ⁻¹	50 µg mL ⁻¹	100 µg mL ⁻¹	150 µg mL ⁻¹	200 µg mL ⁻¹	250 µg mL ⁻¹
E. EtOH	10,574±0,39	11,973±0,50	13,620±0,03	13,911±0,06	15,958±0,32	17,311±0,09
F. hexano	14,507±0,45	11,155±1,56	12,788±0,65	14,634±1,84	11,369±1,52	11,391±2,59
F. CH ₂ Cl ₂	13,844±1,51	13,797±2,95	18,624±0,66	19,448±2,25	22,400±1,82	25,036±1,55
F. AcOEt	11,259±0,84	12,388±1,28	15,884±1,01	19,431±1,44	22,545±1,95	22,555±0,54
F. Aquosa	12,877±1,61	12,986±1,73	13,829±1,03	13,839±1,40	14,077±1,65	14,120±1,72
Rutina	28,41±1,19	48,79±6,60	85,09±4,68	93,72±1,14	93,90±0,45	94,14±0,22
BHT	25,41±1,82	39,55±3,99	61,02±2,11	73,58±1,84	83,03±2,37	89,88±0,83

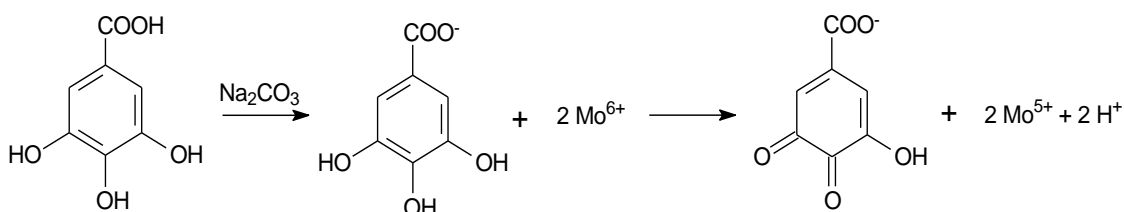
5.4.2 Determinação do teor de fenóis totais (FT)

Os compostos fenólicos são antioxidantes naturais que possuem a capacidade de sequestrar radicais livres e agir na complexação de íons metálicos, prevenindo processos oxidativos responsáveis pelo aparecimento de doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e inflamatórias (ANDRADE et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2009). Os compostos fenólicos podem ser classificados em ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos, lignanas, ligninas e dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

O teor de fenóis totais é frequentemente determinado por métodos espectrofotométricos, utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu, constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico. Os metais molibdênio e tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6+ e apresentam coloração amarela. Na presença de agentes redutores, como os compostos fenólicos, são formados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais os metais têm estado de oxidação médio entre 5+ e 6+ e absorvem em 760 nm (IKAWA et al., 2003; EVERETTE et al., 2010).

A mudança de coloração permite a determinação das substâncias redutoras. Em meio básico (Na_2CO_3), o reagente de Folin-Ciocalteu reage com o composto fenólico, que é primeiramente desprotonado formando o ânion fenolato. Posteriormente, o ânion fenolato sofre oxidação e os metais, molibdênio e tungstênio, presentes no reagente são reduzidos. Durante este processo ocorre mudança na coloração do meio reacional que passa de amarelo para azul. A Figura 62 mostra a oxidação do ácido gálico na presença do reagente de Folin-Ciocalteu. Essa reação inicia-se com a desprotonação do composto fenólico formando o ânion carboxilato, que posteriormente sofre oxidação (SOUSA et al., 2007).

Figura 62- Reação de redução do molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu pelo ácido gálico



Os teores de fenóis totais expressos em miligramas de ácido gálico por grama de amostra (mg EAG g^{-1} de amostra) são mostrados na Tabela 16.

Tabela 16- Teores de fenóis totais do extrato etanólico e frações hexano, diclorometano, acetato de etila e aquosa das folhas de *E. pisocarpus*

Amostras	mg EAG g^{-1} de amostra
Extrato EtOH	102,37 \pm 4,35
Fração hexano	61,18 \pm 2,50
Fração diclorometano	115,65 \pm 1,49
Fração acetato de etila	155,22 \pm 3,04
Fração aquosa	91,35 \pm 3,28

EAG: equivalente de ácido gálico

A fração acetato de etila da partição do extrato etanólico das folhas de *E. pisocarpus* apresentou o maior teor de fenóis totais 155,22 \pm 3,04 EAG g^{-1} de amostra. Esse resultado demonstra que os compostos fenólicos, durante a extração líquido-líquido concentraram-se na fração acetato de etila.

O extrato EtOH das folhas de *E. pisocarpus* apresentou teor de fenóis totais (102,37 \pm 4,35 EAG g^{-1} de amostra) superior ao obtido para o extrato etanólico das folhas de *Annona vepretorum* (Annonaceae) que exibiu teor de 76,60 \pm 5,57 EAG g^{-1} de amostra (ALMEIDA et al., 2014). Estudos realizados por Rabêlo et al. (2014) relatam que o extrato etanólico do caule de *Annona cherimola* (Annonaceae) apresentou teor de fenóis totais de 207,80 \pm 7,21 EAG g^{-1} de amostra.

Os resultados de fenóis totais se correlacionaram com a atividade antioxidante, pois geralmente quanto maior o teor de compostos fenólicos de uma amostra, maior a atividade antioxidante. Assim, a baixa atividade antioxidante observada para as amostras testadas, em comparação com outras espécies da família Annonaceae, pode ser explicada pelo menor teor de compostos fenólicos nas folhas de *E. pisocarpus*.

5.4.3 Atividade fotoprotetora

Os filtros solares são substâncias capazes de absorver, refletir ou refratar a radiação ultravioleta (UV), protegendo a pele contra a exposição direta a luz solar (GOKAS et al., 2005). A eficácia desses filtros solares é avaliada em função do seu fator de proteção solar (FPS), pois quanto maior o valor de FPS maior a proteção da pele contra a radiação (VIOLANTE et al., 2009; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2013).

A exposição excessiva a radiação pode causar envelhecimento precoce, imunossupressão, alterações químicas e histológicas na epiderme, catarata e câncer. Com a finalidade de evitar esses danos causados pela radiação existem os chamados fotoprotetores (BALOGH et al., 2011).

Extratos e óleos vegetais têm sido amplamente empregados na indústria de cosméticos, principalmente na produção de filtros solares, devido à ação fotoprotetora de algumas espécies. Contudo, é importante ressaltar que esta atividade depende, dentre outros fatores, da capacidade de absorção da radiação ultravioleta e da composição química da amostra (VIOLANTE et al., 2009).

A atividade fotoprotetora observada em algumas plantas deve-se principalmente a presença de determinadas classes de metabólitos secundários tais como, flavonoides, cumarinas, taninos e alcalóides que têm a capacidade de proteger a planta dos efeitos provocados pela radiação ultravioleta (CUNHA, 2005; HENRIQUES; KERBER; MORENO, 2000; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2013).

Os resultados de FPS obtidos para o extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus* na maior concentração testada (100 mg L^{-1}) variaram de 3,0 a 3,9. As frações acetato de etila e aquosa foram as mais ativas, pois exibiram FPS de $3,90 \pm 0,3$ e $3,85 \pm 0,1$, respectivamente. O extrato etanólico ($3,00 \pm 0,2$) e a fração hexano ($3,75 \pm 0,5$) foram os menos ativos, pois apresentaram os menores valores de FPS (Tabela 17).

Tabela 17- Fator de proteção solar (FPS) *in vitro* do extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus*

Amostras	Fator de proteção solar (FPS)
Extrato EtOH	3,00±0,2
Fração hexano	3,75±0,5
Fração diclorometano	3,80±0,2
Fração acetato de etila	3,90±0,3
Fração aquosa	3,85±0,1

Segundo a legislação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012) um protetor solar para ser considerado ativo deve apresentar em testes preliminares FPS maior ou igual a 6. Contudo, segundo Violante et al. (2009) quando se trata de extratos vegetais, uma espécie é considerada com potencial fotoprotetor quando possui valores de FPS ≥ 2 . Desta forma, o extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus* apresentam atividade fotoprotetora. A fração acetato de etila apresentou o maior valor de FPS (3,90±0,3) correlacionando com o teor de fenóis totais. Esses resultados podem ser justificados pela presença dos flavonoides identificados nesta fração por ESI-ITMS (Figuras 48 e 49, Tabela 14, p.107 e 114), uma vez que os flavonoides são capazes de absorver a radiação ultravioleta diminuindo os efeitos nocivos que a exposição excessiva pode causar as células.

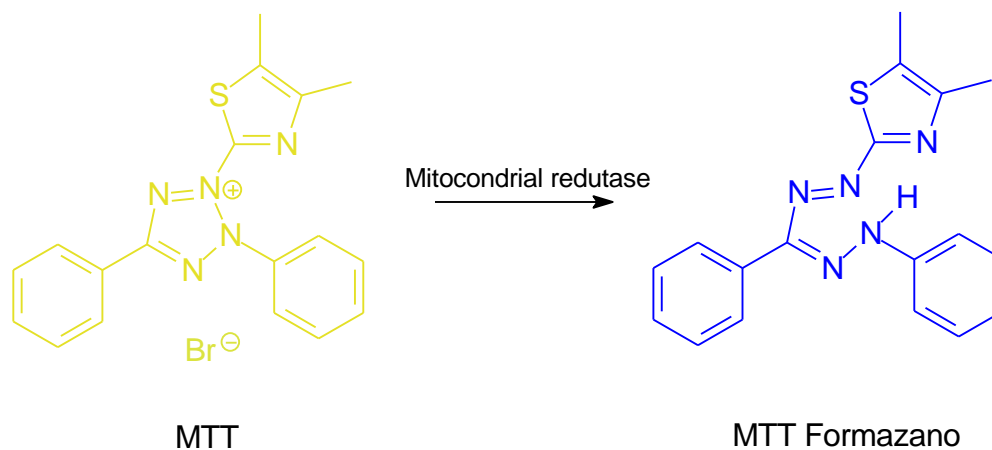
O extrato EtOH e frações de *E. pisocarpus* apresentaram atividade fotoprotetora superior aos relatados em um estudo com espécies pertencentes às famílias Apocynaceae, Lythraceae e Oxalidaceae, no qual todas as plantas testadas exibiram FPS < 2, não apresentando efeito fotoprotetor (VIOLANTE et al., 2009).

5.4.4 Atividade citotóxica

O melanoma cutâneo ou neoplasia maligna é um tipo de câncer de pele que se origina nos melanócitos, predominantemente em adultos brancos. Embora existam diversas estratégias quimioterápicas convencionais para o tratamento de melanoma, esta linha de pesquisa permanece como uma das principais no campo da Oncologia (LEWANDOWSKA et al, 2014).

A citotoxicidade do extrato etanólico e frações de *E. pisocarpus* foi avaliada pelo método MTT [brometo-3-(4,5-dimetiltiozol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio], bastante empregado devido a sua rapidez, sensibilidade e baixo custo. Este ensaio colorimétrico consiste na redução do MTT de coloração amarela a cristais de formazano, um precipitado de coloração azul. Esta conversão ocorre por ação da enzima mitocondrial redutase presente em células metabolicamente ativas (Figura 63). O estudo citotóxico pelo método MTT permite definir facilmente a citotoxicidade, mas não o mecanismo de ação (BERRIDGE et al., 1996; BURIOL et al., 2009; CHANDEL et al., 2016; EREN; OZATA, 2014; STOCKERT et al., 2012).

Figura 63- Reação de redução do MTT a cristais de formazano



Fonte: Adaptado de Buriol et al., 2009

A citotoxicidade do extrato etanólico e frações foi avaliada por meio da diminuição da viabilidade celular frente à linhagem de células tumorais B16-F10 (Figura 64). O extrato etanólico diminuiu a viabilidade de B16-F10 de 100%

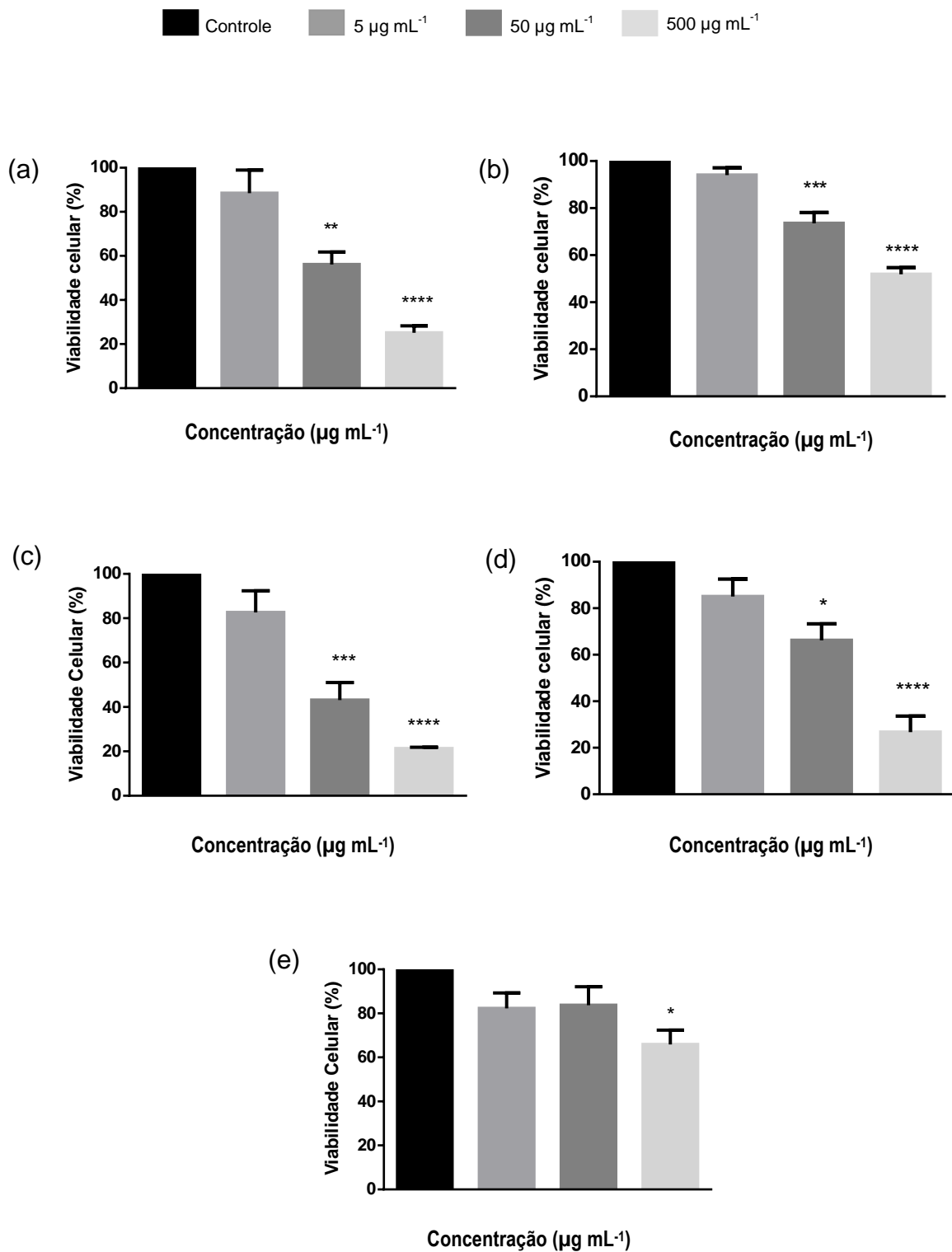
(controle) para 88,5%, 56,1% e 25,1%, nas concentrações de 5, 50 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sendo portanto, a segunda amostra mais ativa. A fração hexano quando incubada por 48 horas com a linhagem B16-F10 reduziu a viabilidade celular para 51,9% na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

O efeito citotóxico da fração diclorometano de *E. pisocarpus* na linhagem celular B16-F10 foi o mais eficaz dentre todas as amostras testadas. O gráfico do efeito citotóxico da fração diclorometano (Figura 64) demonstra uma redução considerável da viabilidade das células tumorais tratadas com essa amostra, variando diretamente com o aumento da concentração. Na concentração de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ houve uma redução significativa da viabilidade celular de 100% (controle) para 43,2%. Na maior concentração (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), a redução da viabilidade celular foi de 21,3%, indicando que o efeito citotóxico é potencializado à medida que a concentração da amostra aumenta.

A fração acetato de etila também demonstrou significativa redução de viabilidade celular da linhagem B16-F10 apresentando percentuais de 85,0%, 66,2% e 26,6%, nas concentrações de 5, 50 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. (Figura 64).

O gráfico do efeito citotóxico (Figura 64) demonstrou que a fração aquosa foi a amostra menos ativa, tendo reduzido em 65,9% a viabilidade celular apenas na maior concentração testada (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O veículo (DMSO 0,1% em RPMI), não induziu qualquer alteração na viabilidade celular.

Figura 64- Efeito citotóxico do extrato EtOH (a) e frações hexano (b), diclorometano (c), acetato de etila (d) e aquosa (e) das folhas de *E. pisocarpus* em células B16-F10 (melanoma murino) após 48 horas. Controle negativo: células em meio RPMI



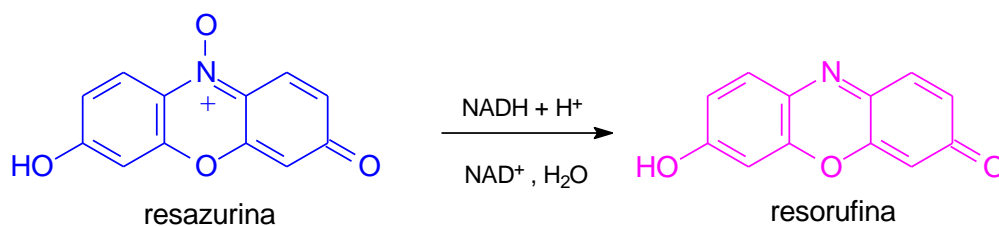
5.4.5 Atividade antileishmania

A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*. Estes agentes transmissores são seres eucariontes e por esse motivo compartilham muitas características celulares com os mamíferos. Estas semelhanças tornam difícil o tratamento da doença, pois os antiparasitários atuam em vias comuns para parasita e hospedeiro. Compostos antimonial e os antibióticos anfotericina B e pentamidina são algumas das substâncias utilizadas no tratamento da leishmania. Entretanto, estes compostos apresentam um alto custo e elevada toxicidade, causando vários efeitos colaterais (NAKAMURA et al., 2006).

A leishmania pode ocorrer nas formas: cutânea, mucocutânea ou visceral. A leishmaniose cutânea é a manifestação com maior ocorrência e a visceral a forma mais grave, pois atinge órgãos vitais. Os parasitas causadores desta doença possuem duas formas morfológicas: promastigotas (flagelada e extracelular) e amastigotas (circular e intracelular) (FIGUÊREDO et al., 2016). Estudos relatam que algumas classes de metabólitos secundários como alcaloides, terpenoides, lactonas sesquiterpênicas e flavonoides apresentam atividade antileishmania contra espécies do gênero *Leishmania* (TIUMAN et al., 2004; SEN & CHATTERJEE, 2011; RABITO et al., 2014).

A atividade antileishmania do extrato etanólico e frações foi avaliada pelo método colorimétrico com resazurina. Trata-se de um bioensaio bastante empregado devido a sua sensibilidade, baixo custo e elevada reprodutibilidade. Este método consiste na redução da resazurina, um corante de coloração azul não fluorescente, a resofurina de coloração rosa fluorescente (Figura 65). O mecanismo para descrever esta reação não é bem esclarecido, contudo acredita-se que a reação de redução ocorre por ação de enzimas mitocondriais de organismos vivos. A resazurina é empregada em ensaios de citotoxicidade, proliferação e viabilidade celular (FUKUSHIMA; WEIMER; KUNZ, 2003; ROLÓN et al., 2006).

Figura 65- Reação de redução da resazurina a resorufina



Fonte: Adaptado de Fukushima; Weimer; Kunz (2003)

A atividade antileishmania e os valores de concentração inibitória média (CI_{50}) do extrato etanólico e frações são apresentados na Figura 66 e Tabela 18.

O extrato EtOH não foi capaz de inibir o crescimento das promastigotas nas concentrações de 6,25 e 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Contudo, nas concentrações de 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a amostra testada apresentou percentuais de inibição do crescimento de 40, 60, 78 e 90%, respectivamente. Na maior concentração testada (800 $\mu\text{g mL}^{-1}$) o extrato etanólico apresentou 100% de atividade antileishmania (Figura 66).

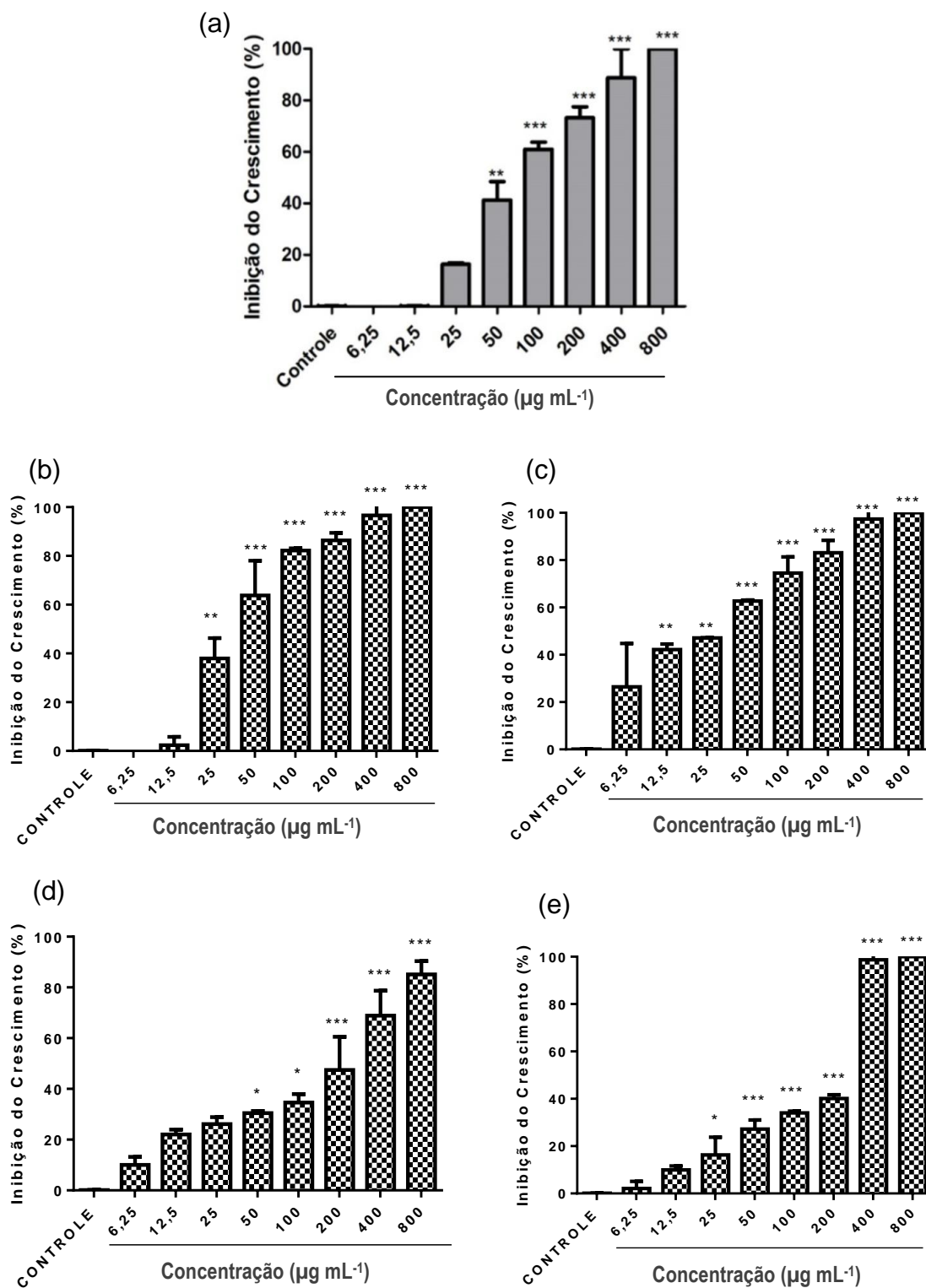
A fração hexano apresentou significativa atividade antileishmania, pois nas concentrações de 25, 50, 100, 200, 400 e 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os percentuais de inibição do crescimento foram de 39, 61, 81, 83, 98 e 100%, respectivamente (Figura 66).

A fração diclorometano foi a mais eficiente dentre as amostras testadas. A Figura 66 mostra que no gráfico desta fração, a partir da concentração de 6,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ocorreu redução de 27% no crescimento das promastigotas de *L. amazonensis*. Os percentuais de inibição do crescimento nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram de 42, 50, 62, 78, 83 e 99%, respectivamente. A fração diclorometano reduziu 100% do crescimento das promastigotas na maior concentração testada (800 $\mu\text{g mL}^{-1}$), indicando que a atividade antileishmania é potencializada com o aumento na concentração da amostra.

O gráfico da atividade antileishmania da fração acetato de etila (Figura 66) demonstra que ocorreu redução no crescimento das promastigotas, sobretudo nas duas maiores concentrações testadas (400 e 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentando percentuais de inibição do crescimento de 70 e 82%,

respectivamente. A fração aquosa foi mais eficiente nas duas maiores concentrações testadas de 400 e 800 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 66).

Figura 66- Atividade antileishmania *in vitro* do extrato EtOH (a) e frações hexano (b), diclorometano (c), acetato de etila (d) e aquosa (e) das folhas de *E. piscocarpus* frente as formas promastigotas de *L. amazonensis*



Os valores de CI_{50} (concentração inibitória de 50% dos parasitas) obtidos para o extrato etanólico e frações variaram de 23,3 a 140,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 18). Segundo Osório et al. (2007), em ensaios biológicos *in vitro*, as amostras podem ser classificadas como: altamente ativas ($CI_{50} < 10 \mu\text{g mL}^{-1}$), ativas (CI_{50} entre 10-50 $\mu\text{g mL}^{-1}$), moderadamente ativas (CI_{50} entre 50-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e inativas ($CI_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$). As frações hexano e diclorometano apresentaram CI_{50} de 45,1 e 23,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, sendo consideradas ativas. O extrato EtOH apresentou CI_{50} de 82,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e foi classificado como moderadamente ativo, entretanto as frações acetato de etila e aquosa foram inativas nas mesmas condições testadas (Tabela 18).

Tabela 18- Valores de CI_{50} do extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus* no ensaio de atividade antileishmania

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Extrato EtOH	82,0
Fração hexano	45,1
Fração diclorometano	23,3
Fração acetato de etila	140,3
Fração aquosa	113,1
Anfotericina B*	1,7

*Controle positivo

Estudos relatam que extratos hexano e metanólico das folhas de *Annona mucosa* (Annonaceae) apresentaram atividade antileishmania com CI_{50} de 24,2 e 28,3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, portanto inferior à fração diclorometano das folhas de *E. pisocarpus* (LIMA et al., 2012). O óleo essencial das folhas de *Annona coriacea* e o extrato hidroetanólico das folhas de *Annona crassiflora*, espécies pertencentes à família Annonaceae, foram inativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, pois apresentaram $CI_{50} > 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SIQUEIRA et al., 2011; SILVA et al., 2016).

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este é um estudo pioneiro para a espécie *Ephedranthus pisocarpus*, tanto do ponto de vista químico quanto com relação à avaliação do potencial biológico.

A investigação fitoquímica das frações hexano e diclorometano, provenientes da extração líquido-líquido do extrato etanólico das folhas de *E. pisocarpus*, resultou no isolamento de seis sesquiterpenoides: óxido de cariofileno (1), espatulenol (2), 4 α ,10 β -aromadendranodiol (3), 1 α -hidróxi-espatulenol (4), T-muurolol (5) e 1 β ,6 α -di-hidróxi-4(15)-eudesmeno (6), dois triterpenoides: 24-metilenocicloartanol (7) e 24-metilenocicloartano-3 β ,21-diol (8), e uma mistura contendo sete esteroides: colesterol (9), campesterol (10), campestanol (11), estigmasterol (12), Δ^{22} -estigmasterol (13), sitosterol (14) e sitostanol (15).

A análise da fração acetato de etila por ESI-ITMS possibilitou a identificação de cinco compostos: ácido quínico (16), vitexina (17), sulfoquinovosilmonoacilglicerol (18), canferol-3-O-rutinosídeo (19) e rutina (20).

Todos esses metabólitos estão sendo descritos pela primeira vez no gênero *Ephedranthus*, contudo este é o primeiro relato dos compostos 4 e 18 na família Annonaceae.

A fração acetato de etila apresentou o maior teor de fenóis totais, bem como um percentual de atividade antioxidante de 22,55% na maior concentração testada (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Estes resultados podem ser justificados, em parte, pela presença dos flavonoides vitexina (17), canferol-3-O-rutinosídeo (19) e rutina (20) identificados na fração AcOEt por ESI-ITMS.

O extrato etanólico e frações das folhas de *E. pisocarpus* apresentaram potencial fotoprotetor, pois os resultados de FPS variaram de 3,0 a 3,9 na maior concentração testada (100 mg L^{-1}), sendo as frações acetato de etila e aquosa as mais ativas, pois exibiram FPS de 3,90 \pm 0,3 e 3,85 \pm 0,1, respectivamente. Estes resultados podem ser justificados, em parte, pela presença dos flavonoides identificados na fração acetato de etila.

No ensaio de atividade citotóxica o extrato etanólico e as frações hexano, diclorometano e acetato de etila reduziram significativamente a

viabilidade celular, sendo a fração diclorometano a amostra mais ativa, pois reduziu a viabilidade celular de 100% (controle) para 21,3% na maior concentração testada. No entanto, a fração aquosa foi a amostra que exibiu menor citotoxicidade.

O extrato etanólico e frações foram avaliados frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e, como resultado, o extrato EtOH apresentou atividade antileishmania moderada, com CI_{50} de $82,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As frações hexano e diclorometano foram ativas, com valores de CI_{50} de 45,1 e $23,3 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, enquanto as frações acetato de etila e aquosa foram inativas.

Os resultados obtidos contribuem para o conhecimento da composição química e potencial biológico da espécie *E. pisocarpus*.

REFERÊNCIAS

ACHENBACH, H.; FREY, D. Cycloartanes and other terpenoids and phenylpropanoids from *Monocyclanthus vignei*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 4263-4274, 1992.

ACHENBACH, H.; SCHWINN, A. Aporphinoid alkaloids and terpenoids from *Piptostigma fugax*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1037-1048, 1995.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada: RDC nº 30, de 01/06/2012.

ALENCAR, D. C. **Perfil alcaloídico de Anonáceas do Campus da UFAM e estudo fitoquímico e biológico de *Ephedranthus amazonicus* R. E. Fries (Annonaceae)**. 2010. 139 f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais)-Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2010.

ALMEIDA, J. R. G. S.; ARAÚJO, C. S.; PESSOA, C. O.; COSTA, M. P.; PACHECO, A. G. M. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 258-264, 2014.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, p. 2202-2210, 2010.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, N.; NEMATOLLAHI, A.; WIART, C. Annonaceae: bio resource for tomorrow's drug discovery. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, p. 465-476, 2011.

ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K. MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 231-235, 2007.

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

ANDRADE, R. S. **Avaliação da atividade antioxidante e fotoprotetora de espécies da família Annonaceae**. 2017. 73 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Farmácia)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2017.

ARRUDA, D. C.; MIGUEL, D. C.; YASUNAKA, J. K. U. Y.; KATZIN, M.; ULIANA, S. R. B. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 63, p. 643-649, 2009.

ARTHUR, H. R.; KO, P. D. S.; CHEUNG, H. T.; Triterpenes of *Lithocarpus* species. **Phytochemistry**, v. 13, p. 2551-2557, 1974.

ARYA, A.; AI-OBAIDI, M. M. J.; SHAHID, N.; NOORDIN, M. I. B.; LOOI, C. Y.; WONG, W. F.; KHAING, S. L.; MUSTAFA, M. R. Synergistic effect of quercetin and quinic acid by alleviating structural degeneration in the liver, kidney and pancreas tissues of STZ induced diabetic rats: a mechanistic study. **Food and Chemical Toxicology**, v. 71, p. 183-196, 2014.

BALOGH, T. S.; VELASCO, M. V. R.; PEDRIALI, C. A.; KANEKO, T. M.; BABY, A. R. Proteção à radiação ultravioleta: recursos disponíveis na atualidade em fotoproteção. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 86, p. 732-742, 2011.

BERRIDGE, M. V., TAN, A. S., McCOY, K. D., WANG, R. The Biochemical and Cellular basis of cell proliferation assays that use tetrazolium salts. **Biochemica**, v. 4, p. 14-19, 1996.

BORSTNIK, K.; PAIK, I.; SHAPIRO, T. A.; POSNER, G. H. Antimalarial chemotherapeutic peroxides: artemisinin, yingzhaosu A and related compounds. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1661-167, 2002.

BRADFORD, P. G.; AWAD, A. B. Phytosterols as anticancer compounds. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 51, p. 161-170, 2007.

BRITO, A.; RAMIREZ, J. E.; ARECHE, C.; SEPÚLVEDA, B.; SIMIRGIOTIS, M. J. HPLC-UV-MS profiles of phenolic compounds and antioxidant activity of fruits from three citrus species consumed in northern Chile. **Molecules**, v. 19, p. 17400-17421, 2014.

BROCHADO, C. O.; ALMEIDA, A. P.; BARRETO, B. P.; COSTA, L. P.; RIBEIRO, L. S.; PEREIRA, R. L. C.; KOATZ, V. L. G.; COSTA, S. S. Flavonol robinobiosides and rutinosides from *Alternanthera brasiliana* (Amaranthaceae) and their effects on lymphocyte proliferation *in vitro*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 449-451, 2003.

BURIOL, L.; FINGER, D.; SCHMIDT, E. M.; SANTOS, J. M.; ROSA, M. R. D.; QUINÁIA, S. P.; TORRES, Y. R.; SANTA, H. S. D.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; FERREIRA, P. M. P.; SAWAYA, A. C. H. F.; EBERLIN, M. N. Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, p. 292-302, 2009.

CALPE-BERDIEL, L.; ESCOLÀ-GIL, J. C.; BLANCO-VACA, F. New insights into the molecular actions of plant sterols and stanols in cholesterol metabolism. **Atherosclerosis**, v. 203, p. 18-31, 2009.

CANG, J.; WANG, C.; HUO, X. K.; TIAN, X. G.; SUN, C. P.; DENG, S.; ZHANG, B. J.; ZHANG, H. L.; LIU, K. X.; MA, X. C. Sesquiterpenes and triterpenoids from the rhizomes of *Alisma orientalis* and their pancreatic lipase inhibitory activities. **Phytochemistry Letters**, v. 19, p. 83-88, 2017.

- CANO-FLORES, A. Biotransformación de triterpenos con diferentes microorganismos. **Revista Mexicana de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, p. 7-16, 2013.
- CANTRELL, C. L.; KLUN, J. A.; BRYSON, C. T.; KOBASISY, M.; DUKE, S. O. Isolation and identification of mosquito bite deterrent terpenoids from leaves of american (*Callicarpa americana*) and japonese (*Callicarpa japonica*) beautyberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 5948-5953, 2005.
- CAO, S. Y.; LI, Y.; MENG, X.; ZHAO, C. N.; LI, S.; GAN, R. Y.; LI, H. B. **Dietary natural products and lung cancer: Effects and mechanisms of action.** *Journal of Functional Foods*, v. 52, p. 316-331, 2019.
- CARTAXO, S. L.; ALMEIDA SOUZA, M. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 326-342, 2010.
- CHANDEL, M.; KUMAR, M.; SHARMA, U.; KUMAR, N.; SINGH, B.; KAUR, S. Isolation and characterization of flavanols from *Anthocephalus cadamba* and evaluation of their antioxidant, antigenotoxic, cytotoxic and COX-2 inhibitory activities. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 474-483, 2016.
- CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, p. 5-40, 2012.
- CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine**, v. 17, p. 149-151, 2010.
- CHAVES, M. H. LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Macrocarpane, a New sesquiterpene Skeleton from the leaves of *Porcelia macrocarpa*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 16-19, 2003.
- CHEN, H. W.; HE, X. H.; YUAN, R.; WEI, B. J.; CHEN, Z.; DONG, J. X.; WANG, J. Sesquiterpenes and a monoterpene with acetylcholinesterase (AChE) inhibitory activity from *Valeriana officinalis* var. *latifolia* *in vitro* and *in vivo*. **Fitoterapia**, v. 110, p. 142-149, 2016.
- CHORNOBAI, C. A. M. **Determinação do ácido quínico e derivados antioxidantes da erva mate (*Ilex paraguariensis*).** 2008. 170 f. Tese (Doutorado em Química)-Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

CINKILIK, N.; CETINTAS, S. K.; ZORLU, T.; VATAN, O.; YILMAZ, D.; CAVAS, T.; TUNC, S.; OZKAN, L.; BILALOGLU, R. Radioprotection by two phenolic compounds: chlorogenic and quinic acid on X-ray induced DNA damage in human blood lymphocytes *in vitro*. **Food and Chemical Toxicology** v. 53, p. 359-363, 2013.

CONNOLLY, J. D.; HAQUE, M. D. E.; HASAN, C. M.; HOSSAIN, M. S. 15 α -hydroxy-24-methylenelanosta-7,9(11)-dien-3-one from the stem bark of *Desmos longiflorus*. **Phytochemistry**, v. 36, p. 1337-1338, 1994

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

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

COSTA, E. V.; 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, p. 1111-1117, 2011.

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

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

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

CUNHA, A. P. **Farmacognosia e Fitoquímica**. 1 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

DAI, D. N.; THANG, T. D. Chemical Composition of the Leaf Essential Oil of *Desmos chinensis* Lour. (Annonaceae) from Vietnam. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 15, p. 1044-1048, 2012.

DERBRÉ, S.; GIL, S.; TAVERNA, M.; BOURSIER, C.; NICOLAS, V.; DEMEY-THOMAS, E.; VINH.; SUSIN, S. A.; HOCQUEMILLER, R.; POUPON, E. Highly cytotoxic and neurotoxic acetogenins of the Annonaceae: new putative biological targets of squamocin detected by activity-based protein profiling. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 5741-5744, 2008.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3 ed. Wiley, 2009.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C.A. **As plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Editora da UNESP, p. 89-102, 2002.

DOMINGUEZ-CARMONA, D. B.; ESCALANTE-EROSA, F.; GARCIA-SOSA, K.; RUIZ-PINELL, G.; GUTIERREZ-YAPU, D.; CHAN-BACAB, M. J.; GIMENEZ-TURBA, A.; PENÃ-RODRIGUEZ, L.M. Antiprotozoal activity of betulinic acid derivatives. **Phytomedicine**, v. 17, p. 379–382, 2010.

DONG, L. Y.; LI, S.; ZHEN, Y. L.; WANG, Y. N. SHAO, X.; LUO, Z. G. Cardioprotection of vitexin on myocardial ischemia/reperfusion injury in rat via regulating inflammatory cytokines and MAPK pathway. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 41, 1251-1266, 2013.

DUTRA, L. M.; BOMFIM, L. M.; ROCHA, S. L. A.; NEPEL, A.; SOARES, M. B. P.; BARISON, A.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. *ent*-Kaurane diterpenes from the stem bark of *Annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, p. 3315-3320, 2014.

EREN, Y.; OZATA, A. Determination of mutagenic and cytotoxic effects of *Limonium globuliferum* aqueous extracts by *Allium*, Ames, and MTT tests. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 51-59, 2014.

ETSE, J. T.; GRAY, A. I.; TOMAS, D. W.; WATERMAN, P. G. Terpenoid and alkaloid compounds from the seeds of *Monodora brevipes*. **Phytochemistry**, v. 28, p. 2489-2492, 1989.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

FÉLIX-SILVA, J.; TOMAZ, I. M., SILVA, M. G., SANTOS, K. S. C. R., SILVAJÚNIOR, A. A., CARVALHO, M. C. R. D.; SOARES, L. A. L.; FERNANDESPEDROSA, M. F. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 14, p. 548-555, 2012.

FERREIRA, E. L. F.; MASCARENHAS, T. S.; OLIVEIRA, J. P. C.; CHAVES, M. H.; ARAÚJO, B. Q.; CAVALHEIRO, A. J. Phytochemical investigation and antioxidant activity of extracts of *Lecythis pisonis* Camb. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, p. 353-360, 2014.

FIGUÊIREDO, F. R. S. D. N.; DELMONDES, G. A.; CRUZ, L. P.; NASCIMENTO, E. A.; SAULO, R. T.; LEMOS, I. C. S.; CUNHA, F. A. B.; GOMEZ, M. C. V.; CORONEL, C.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; FELIPE, C. F. B.; MENEZES, I. R. A.; KERNTOPF, M. R. Evaluation of the anti leishmania and anti-trypanosoma activity of ethanolic extract from the leaves of *Annona squamosa* L. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 24, p. 173-179, 2016.

FLEISCHER, T. C.; WAIGH, R. D.; WATERMAN, P. G. Pogostol O-methyl ether and artabotrol: Two novel sesquiterpenes from the stem bark of *Artabotrys stenopetalus*. **Journal of Natural Products**, v. 60, p. 1054-1056, 1997a.

FLEISCHER, T. C.; WAIGH, R. D.; WATERMAN, P. G. Bisabolene sesquiterpenes and flavonoids from *Friesodielsia enghiana*. **Phytochemistry**, v. 44, p. 315-318, 1997b.

FUKUSHIMA, R. S.; WEIMER, P. J.; KUNZ, D. A. Use of photocatalytic reduction to hasten preparation of culture media for saccharolytic *Clostridium* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 22-26, 2003.

GARCIA-SALES, P.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; MORALES-SATO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-Q-TOF-MS. **Food Research International**, v. 78, p. 246-257, 2015.

GEORGE, V. C.; KUMAR, D. R. N.; RAJKUMAR, V.; SURESH, P. K.; KUMAR, R. A. Quantitative assesment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona muricata* Linn in normal and immortalized human cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 699-704, 2012.

GHORBANI, A. Mechanisms of antidiabetic effects of flavonoid rutin. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 96, p. 305-312, 2017.

GIOKAS, D. L.; SAKKAS, V. A.; ALBANIS, T. A.; LAMPROPOULOU, D. A. Determination of UV-filter residues in bathing waters by liquid chromatography UV-diode array and gas chromatography-mass spectrometry after micelle mediated extraction-solvent back extraction. **Journal Chromatography A**, v. 1077, p. 19-27, 2005.

GOIS, M.; LUCAS, F.; COSTA, J.; MOURA, P.; LOBATO, G. Etnobotânica de espécies vegetais medicinais no tratamento de transtornos do sistema gastrointestinal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, p. 547-557, 2016.

GOLDSBY, G.; BURKE, B. A. Sesquiterpene lactones and sesquiterpene diol from *Ambrosia peruviana*. **Phytochemistry**, v. 26, p. 1059-1063, 1987.

GULCIN, I.; OKTAY, M.; KIRECCI, E.; KÜFREVIÖGLÜ, O. I. Screening of antioxidant and antimicrobial activities of anise (*Pimpinella anisum* L) seed extracts. **Food Chemistry**, v. 83, p. 371-382, 2003.

GUPTA, C.; PRASAD, S.; SAHAI, M.; ASAI, T.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Artabotryols A-E, new lanostane triterpenes from the seeds of *Artabotryus odoratissimus*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 1925-1932, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 ed. Oxford: Oxford University Press, 2007.

HANASHIMA, S.; MIZUSHINA, Y.; YAMAZAKI, T.; OHTA, K.; TAKAHASHI, S.; SAHARA, H.; SAKAGUCHI, K.; SUGAWARA, F. Synthesis of sulfoquinovosylacylglycerols, inhibitors of eukaryotic DNA polymerase α and β . **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 367-376, 2001.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcaloides: generalidades e aspetos básicos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 2 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, p. 641-642, 2000.

HERMAWAN, A.; PUTRI, H. Current report of natural product development against breast cancer stem cells. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 104, p. 114-132, 2018.

HSIEH, T.; CHANG, F.; CHIA, Y.; CHENG, C.; HIU, H.; WU, Y. Cytotoxic Constituents of the fruits of *Cananga odorata*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 616-619, 2001.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J. J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 1811-1815, 2003.

JAYENDRA; KUMAR, Y. New compound 6,7-dimethoxy-2-methylisoquinolinium from Indian medicinal plant *Annona squamosa* L. **International Journal of Chemical and Analytical Science**, v. 4, p. 161-168, 2013.

JE, H. G.; HONG, S. M.; JE, H. D.; SOHN, U. D.; CHOI, Y. S.; SEO, S. Y.; MIN, Y. S.; CHUNG, S. J.; SHIN, Y. K.; LEE, T. J.; PARK, E. S.; JEONG, J. H. The inhibitory effect of vitexin on the agonist-induced regulation of vascular contractility. **Pharmazie**, v. 69, p. 224-228, 2014.

KAMPERDIK, C.; PHUONG, N. M.; SUNG T. V.; ADAM, G. Guaiane dimers from *Xylopia vielana*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 335-340, 2001.

KIRBY, J.; KEASLING, J. D. Biosynthesis of plant isoprenoids perspectives for microbial engineering. **Annual Review of Plant Biology**, v. 60, p. 335-355, 2009.

KOUAM, S.F.; NGOUONPE, A. W.; LAMSHOFT, M.; TALONTSI, F. M.; BAUER, J.O.; STROHMANN, C.; NGADJUI, B. T.; LAATSCH, H.; SPITELLER, M. Indolosesquiterpenealkaloids from the cameroonian medicinal plant *Polyalthia oliveri* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v. 105, p. 52-59, 2014.

KRASTEVA, I.; NIKILOV, S. Flavonoids in *Astragalus corniculatus*. **Química Nova**, v. 31, p. 59-60, 2008.

KRSTIC, G.; ANDELKOVIC, B.; CHOI, Y. H.; VAJS, V.; STEVIC, T.; TESEVIC, T.; GODEVAC, D. Metabolic changes in *Euphorbia palustris* latex after fungal infection. **Phytochemistry**, v. 131, p. 17-25, 2016.

KUTSCHABSKY, L.; SANDOVAL, A.; RIPPERGER, H. Bullatantriol, a sesquiterpene from *Annona bullata*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 2724-2725, 1985.

LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Cycloartane triterpenoids from *Guarea macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 60, p. 329-332, 2002.

LAGO, J. H. G.; CHAVES, M. H.; AYRES, M. C. C.; AGRIPINO, D. G.; YOUNG, M. C. M. Evaluation of antifungal and DNA-damaging activities of alkaloids from branches of *Porcelia macrocarpa*. **Planta Médica**, v. 73, p. 292-295, 2007.

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

LEE, S. Y.; CHOI, S. U.; LEE, J. H.; LEE, D. U.; LEE, K. R. A new phenylpropane glycoside from the rizome of *Sparganium stoloniferum*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, p. 515-521, 2010.

LEE, S. Y.; MOON, E.; KIM, S. Y.; LEE, K. R. Quinic acid derivatives from *Pimpinella brachycarpa* exert anti-neuroinflammatory activity in lipopolysaccharide-induced microglia. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 23, p. 2140-2144, 2013.

LEWANDOWSKA, U.; GORLACH, S.; OWCZAREK, K.; HRABEC, E.; SZEWCZYK, K. Synergistic interactions between anticancer chemotherapeutics and phenolic compounds and anticancer synergy between polyphenols. **Postepy Hig Med Dosw** (Online), v. 68, p. 528- 540, 2014.

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

LIMA, J. P. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SANTOS, A. M. G.; PEREIRA, J. L. S.; SANTOS, D. M. F.; BARISON, A.; SILVA, I, J.; COSTA, E. V. *In vitro* antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, v. 4, p. 692-702, 2012.

- LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BÈSSIERE, J. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, p. 916-919, 2004.
- LONDERO, V. S.; SILVA, T. A. C.; GOMES, K. S.; FERREIRA, D. D.; MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; YOUNG, M. C. M.; JERZ, G.; LAGO, J. H. G. Acetylenic fatty acids from *Porcelia macrocarpa* (Annonaceae) against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: effect of octadec-9-ynoic acid in plasma membrane electric potential. **Bioorganic Chemistry**, v. 78, p. 307-311, 2018.
- LUE, Y. P.; MU, Q.; ZENG, H. L.; LI, C. M. 24-methylene tetracyclic triterpenes from *Polyalthia lancilimba*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 2053-2056, 1998.
- LUNA, J. S.; SANTOS, A. F.; LIMA, M. R. F.; OMENA, C. M.; MENDONÇA, F. A. C.; BIEBER, L. W.; SANT'ANA, A. E. G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.
- MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J. M. S.; JUNIKKA, L. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. **Rodriguésia**, v. 58, p. 617-662, 2007.
- MAHATO, S. B.; SEN, S. Advances in triterpenoid research, 1990-1994. **Phytochemistry**, v. 44, p. 1185-1236, 1997.
- MAHMOOD, K.; PAIS, M.; FONTAINE, C.; ALI, H. M.; HADI, A. H. A.; DAVID, B.; GUITTET, E. Monocarpin, a new cyclotane from *Monocarpia marginalis*. **Tetrahedron Letters**, v. 33, p. 3761-3764, 1992.
- MANACH, C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; REMESY, C.; JIMÉNEZ, L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 79, p. 727-747, 2004.
- MATHOUET, H.; CAZOULAT, I.; OULYADI, H.; SEGUIN, E.; DAICH, A.; ELOMRI, A. Cazolobine, a New sesquiterpene from *Isolona hexaloba* (Annonaceae). **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 59b, p. 1118-1120, 2004.
- MATOS, M. F. C.; LEITE, L. I. S. P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J. M.; CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; PEREIRA, N. F. G.; SILVA, D. B. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriúscula*. **Fitoterapia**, v. 77, p. 227-229, 2006.
- MATSUDA, H.; KOBAYASHI, G.; YAMAHARA, J.; FUJIMURA, H.; KURAHASHI, K.; FUJIWARA, W. Effects of alismol isolated from *Alismatis* rhizoma on calcium-induced contraction in the rabbit thoracic aorta. **Life Science**, v. 41, p. 1845-1852, 1987.
- MIRANDA, M. L. D., GARCEZ, F. R.; ABOT, A. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos e outros constituintes das folhas de *Pterodon pubescens* Benth (Leguminosae). **Química Nova**, v. 37, p. 473-476, 2014.

MISAWA, E.; TANAKA, M.; NOMAGUCHI, K.; NABESHIMA, K.; YAMADA, M.; TOIDA, T.; IWATSUKI, K. Oral ingestion of *Aloe vera* phytosterols alters hepatic gene expression profiles and ameliorates obesity-associated metabolic disorders in Zucker diabetic fatty rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 2799-2806, 2012.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Alkaloid, flavonoids and terpenoids from leaves and fruits of *Xylopiá emarginata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, p. 535-537, 2003a.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; YOUNG, M. C. M.; ROQUE, N. F. Antifungal aromadendrane sesquiterpenoids from the leaves *Xylopiá brasiliensis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, p. 828-831, 2003b.

MOREIRA, I. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Sesquiterpenes, diterpenes, steroids and alkaloid from branches of *Xylopiá brasiliensis* Spreng (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, p. 948-951, 2005.

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

M'RABET, Y.; ROKBENI, N.; CLUZET, S.; BOULILA, A.; RICHARD, T.; KRISA, S.; MARZOUKI, L.; CASABIANCA, H.; HOSNI, K. Profiling of phenolic compounds and antioxidant activity of *Melia azedarach* L. leaves and fruits at two stages of maturity. **Industrial Crops & Products**, v. 107, p. 232-243, 2017.

MORIYASU, M.; TAKEUCHI, S.; ICHIMARU, M.; NISHIYAMA, N. N. Y.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; JUMA, F. D.; CHALOMUTISO, P. B. Pyrenes and pyrendiones from *Uvaria lucida*. **Journal of Natural Medicines**, 2012.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunology Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, p. 95-111, 2004.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMETTO, M. C.; LUIZE, P. S.; FILHO, B. P. D.; CORTEZ, A. G.; NAKAMURA, T. U. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 61-66, 2006.

NASCIMENTO, K. F.; MOREIRA, F. M. F.; SANTOS, J. A.; KASSUYA, C. A. L.; CRODA, J. H. R.; CARDOSO, C. A. L.; VIEIRA, M. C.; RUIZ, A. L. T. G.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; FORMAGIO, A. S. N. Antioxidant, anti-inflammatory, antiproliferative and antimycobacterial activities of the essential oil of *Psidium guineense* Sw. and spathulenol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 210, p. 351-358, 2018.

NGANTCHOU, I.; NKWENGOUA, E.; NGANSO, Y.; NYASSE, B.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; SCHNEIDER, B. Antitrypanosomal activity of polycarpol from *Piptostigma preussi* (Annonaceae). **Fitoterapia**, v. 80, p. 188–191, 2009.

NGOUONPE, A. W.; MBOBDA, A. S. W.; HAPPI, G. M.; MBIANTCHA, M.; TATUEDOM, O. K.; ALI, M. S.; LETEEF, M.; TCHOUANKEU, J. C.; KOUAM, S. F. Natural products from the medicinal plant *Duguetia staudtii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and ecology**, v.83, p. 22-25, 2019.

NKUNYA, M. H. H.; JONKERA, S. A.; MAKANGARA, J. J.; WAIBELB, R.; ACHENBACH, H. Aporphinoid alkaloids and other constituents from *Lettowianthus stellatus*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 1067-1073, 2000.

NUNES, C. R.; BERNADES, N. R.; GLÓRIA, L. L.; BARBOSA, J. B.; PEREIRA, S. M. F.; OLIVEIRA, D. B. Atividade antioxidante e o teor de taninos e fenóis totais dos frutos de *Annona muricata* L. **Vértices**, v. 15, p. 93-110, 2013.

NYASSE, B.; NGANTCHOU, I.; NONO, J.J.; SCHNEIDER, B. Antifilarial activity *in vitro* of polycarpol and 3-O-acetyl aleuritolic acid from cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. **Natural Product Research**, v. 20, p.391–397, 2006.

OLIVEIRA, J.; SALES, M. F. Estudo taxonômico dos gêneros *Ephedranthus* S. Moore e *Pseudephedranthus* Aristeg - Annonaceae. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, série Botânica, v. 15, p. 14-35, 1999.

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química Nova**, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. G.; ARAÚJO, C. S.; SOUZA, G. R.; GUIMARÃES, A. L.; OLIVEIRA, A. P.; SARAIVA, S. R. G. L.; MORAIS, A. C. S.; SANTOS, J. S. R.; ALMEIDA, J. R. G. S. *In vitro* and photoprotectiv activities of dried extracts from *Neoglaziovia variegata* (Bromeliaceae). **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, p. 122-127, 2013.

OLIVEIRA JÚNIOR, R. G.; RABÊLO, S. V.; ARAÚJO, C. S.; SILVA, J. C.; DINIZ, T. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Prospecção tecnológica do gênero *Annona* (Annonaceae). **Revista Geintec**, v. 4, p. 850-858, 2014.

OLOYEDE, H. O. B.; AJIBOYE, H. O.; SALAWU, M. O.; AJIBOYE, T. O. Influence of oxidative stress on the antibacterial activity of betulin, betulinic acid and ursolic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p. 338-344, 2017.

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

PATOCKA, J. Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **Journal of Applied Biomedicine**, v. 1, p.7-12, 2003.

PAVLOVA, N. I.; SAVINOVA, O. V.; NIKOLAEVA, S. N.; BOREKO, E. I.; FLEKHTER, O. B. Antiviral activity of betulin, betulinic and betulonic acids against some enveloped and non-enveloped viruses. **Fitoterapia**, v. 74, p. 489-492, 2003.

PEREIRA, N. F. G.; CAROLLO, C. A.; GARCEZ, W. S.; SIQUEIRA, J. M. Novel santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae. **Química Nova**, v. 26, p. 512-516, 2003.

PEREIRA, P.; OLIVEIRA, M. C.; GIL, M. G. B.; CEBOLA, M. J. HPLC/MS identification of the polyphenols present in an extract of *Myrtus communis* L. obtained by supercritical fluid extraction. **Biomedical and Biopharmaceutical Research**, v. 14, p. 195-203, 2017.

PERO, R. W.; LUND, H. LEANDERSON, T. Antioxidant metabolism induced by quinic acid. Increased urinary excretion of tryptophan and nicotinamide. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 335-346, 2009.

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

PRAWAT, U.; CHAIRERK, O.; LENTHAS, R.; SALAE, A. W.; TUNTIWACHWUTTİKUL, P. Two new cycloartane-type triterpenoids and one new flavanone from the leaves of *Dasymaschalon dasymaschalum* and their biological activity. **Phytochemistry Letters**, v. 6, p. 286-290, 2013.

PROSSER, I.; PHILLIPS, A. L.; GITTINGS, S.; LEWIS, M. J.; HOOPER, A. M.; PICKETT, J. A.; BEALE, M. H. (+)-(10R)-Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. **Phytochemistry**, v. 60, p. 691-702, 2002.

PURUSHOTHAMAN, K. K.; VENKATANARASIMHAN, M.; SARADA, A.; CONNOLY, J. D.; RYCROFT, D. S. Trijugins A and B, tetranortriterpenoids with a novel rearranged carbon skeleton from *Heynea trijuga* (Meliaceae). **Canadian Journal of Chemistry**, v. 65, p. 35-37, 1987.

RABÊLO, S. V.; COSTA, M. M.; LIBÓRIO, R. C.; ALMEIDA, J. R. G. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill. x *A. squamosa* L.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 265-271, 2014.

RABITO, M. F.; BRITTA, E. A.; PELEGRINI, B. L.; SCARIOT, D. B.; ALMEIDA, M. B.; NIXDORF, S. L.; NAKAMURA, C. V.; FERREIRA, I. C. P. *In vitro* and *in vivo* antileishmania activity of sesquiterpene lactone-rich dichloromethane fraction obtained from *Tanacetum parthenium* (L.) Schultz-Bip. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 18-23, 2014.

RAMESH, N.; VISWANATHAN, M. B.; SARASWATHY, A.; BALAKRISHNA, K.; BRINDA, P.; LAKSHMANAPERUMALSAMY, P. phytochemical and microbial studies of *Begonia malabarica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 129-132, 2002.

RATTMANN, Y. D.; MÉNDEZ-SÁNCHEZ, S. C.; FURIAN, A. F.; PALUDO, K. S.; SOUZA, L. M.; DARTORA, N.; OLIVEIRA, M. S.; COSTA, E. M. S.; MIGUEL, O. G.; SASSAKI, G. L.; IACOMINI, M.; MELLO, C. F.; FRANCO, C. R. C.; SILVA-SANTOS, J. E.; CADENA, S. M. S. C.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Standardized extract of *Dicksonia sellowiana* Presl. Hook (Dicksoniaceae) decreases oxidative damage in cultured endothelial cells and in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 999-1007, 2011.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G.R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, RS, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, p. 51-62, 2002.

RODRIGUES, G.; SOUZA, W.; GODINHO, M.; FERREIRA, H.; VILA VERDE, G. M. Determinação de parâmetros farmacognósticos para as folhas de *Erythroxylum suberosum* A. St.-Hilaire (Erythroxylaceae) coletadas no município de Goiânia, GO. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai.**, v. 17, p. 1169-1176, 2015.

ROJANO, B.; PEREZ, E.; FIGADERE, B.; MARTIN, M. T.; RECIO, M. C.; GINER, R.; RIOS, J. L.; SCHINELLA, G.; SAEZ, J. Constituents of *Oxandra cf. xylopioides* with anti-inflammatory activity. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 835-838, 2007.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, p. 103-107, 2006.

SANCHA, S. A. R. **Avaliação da atividade antimicrobiana de metabolitos secundários isolados a partir de uma planta usada na medicina tradicional africana**. 2015. 145 f. Dissertação (Mestrado em Química Farmacêutica e Terapêutica)-Universidade de Lisboa, Portugal, 2015.

SAYRE, R. M.; AGIN, P. P.; LEVEE, G. J.; MARLOWE, E. Comparison of *in vivo* and *in vitro* testing of sunscreens formulas. **Photochemistry and Photobiology**, v. 29, p. 559-566, 1979.

SEIDEL, V.; BAILLEUL, F.; WATERMAN, P. G. A diterpene, a sesquiterpene and a flavonol glycoside from *Piptostigma fasciculata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 27, p. 543-545, 1999.

SEIDEL, V.; BAILLEUL, F.; WATERMAN, P. G. Novel oligorhamnosides from the stem bark of *Cleistopholis glauca*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 6-11, 2000a.

SEIDEL, V.; BAILLEUL, F.; WATERMAN, P. G. (Rel)-1 β ,2 α -di-(2,4-dihydroxy-6-methoxybenzoyl)-3 β ,4 α -di-(4-methoxyphenyl)-cyclobutane and other γ -avonoids from the aerial parts of *Goniothalamus gardneri* and *Goniothalamus thwaitesii*. **Phytochemistry**, v. 55, p. 439-446, 2000b.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056-1069, 2011.

SILVA, M. A.; ROSA, C. P.; BASTOS, R. G.; SILVA, A. F.; SILVA, G. A.; MARQUES, M. J.; ESPURI, P. F. Triagem fitoquímica, atividade antioxidante e leishmanicida do extrato hidroetanólico 70% (v/v) e das frações obtidas de *Annona crassiflora* Mart. **Fitos**, v. 10, p. 375-547, 2016.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS / UFSC, 2010.

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

SIQUEIRA, C. A. T.; OLIANI, J.; SARTORATTO, A.; QUEIROGA, C. L.; MORENO, P. R. H.; REIMÃO, J. Q.; TEMPONE, A. G.; FISCHER, D. C. H. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, p. 33-40, 2011.

SOARES, D. C.; MEIRELES, M. A. A.; PEREIRA, C. G.; SARAIVA, E. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOARES, L. R.; SILVA, A. C. Q.; FREIRE, T. V.; GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S. Sesquiterpenos de sementes de *Guarea guidonia* (Meliaceae). **Química Nova**, v. 35, p. 323-326, 2012.

- SOUSA, O. V.; SOARES JÚNIOR, D. T.; DEL-VECHIO, G.; MATTOSINHOS, R. G.; GATTASS, C. R.; KAPLAN, M. A. C. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de *Duguetia lanceolata* St. Hil., Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, p. 11-14, 2004.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.
- SOUSA, E. A.; SILVA, A. A. C. A.; ROQUE, N. F.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; LAGO, J. H. G.; CHAVES, M. H. Terpenes and steroids from leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. **Phytochemistry Letters**, v. 8, p. 193-195, 2014a.
- SOUSA, E. A.; SILVA, A. A. C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; LAGO, J. H. G.; CHAVES, M. H. A new flavonoid derivative from leaves of *Oxandra sessiliflora* R. E. Fries. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, p. 704-708, 2014b.
- SOUZA, L. M.; SASSAKI, G. L.; ROMANOS, M. T. V.; BARRETO-BERGTER, E. Structural characterization and anti-HSV-1 and HSV-2 activity of glycolipids from the marine algae *Osmundaria obtusiloba* isolated from southeastern Brazilian coast. **Marine Drugs**, v. 10, p. 918-931, 2012.
- STOCKERT, J. C.; BLÁZQUEZ-CASTRO, A.; CAÑETE, M.; HOROBIN, R. W.; VILLANUEVA, Á. MTT assay for cell viability: intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. **Acta Histochemica**, v. 114, p. 785-796, 2012.
- SUN, N. J.; HO, D. K.; SNEDDON, J.M.; STEPHENS, R. E.; CASSADY, J. M. New cytotoxic cycloartane triterpenoids from *Desmos cochinchinensis* (Annonaceae). **Natural Product Letters**, v. 1, p. 109-115, 1992.
- SUN, Y. Y.; XING, J. Z.; ZHANG, J. S.; ZHOU, W. J.; PU, Y. F. Sesquiterpenoids with antialgal activity against the common red tide microalgae from marine microalga *Porphyra yezoensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 25, p. 7844-7859, 2018.
- SUNG, T. V.; KUTSCHABSKY, L.; PORZEL, A.; STEGKICH, W.; ADAM, G. Sesquiterpenes from the roots of *Homalomena aromatica*. **Phytochemistry**, v. 31, p. 1659-1661, 1992.
- TAKAHASHI, Y.; ITOH, K.; ISHII, M.; SUZUKI, M.; ITABASHI, Y. Induction of larval settlement and metamorphosis of the sea urchin *Strongylocentrotus intermedius* by glycoglycerolipids from the green alga *Ulva lens*. **Marine Biology**, v. 140, p. 763-771, 2002.

TINTO, W.; BLAIR, L. C.; RAYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Terpenoid constituents of *Oxandra asbeckii*. *Journal of Natural Products*, v. 55, p. 701-706, 1992.

TIUMAN, T.S., UEDA-NAKAMURA, T., CORTEZ, D.A.G., DIAS FILHO, B.P., MORGADO-DÍAZ, J.A., DE SOUZA, W., NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 176–182, 2004.

VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; OLIVEIRA, J. S.; FUMAGALLI, M. A. C.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; LEITE, J. P. V.; SANTORO, M. M.; RÉGIS, W. C. B.; TAVARES, C. A. P. V.; COELHO, E. A. F. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, p. 357-363, 2011.

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

VIOLANTE, I. M.; SOUZA, I. M.; VENTURINI, C. L.; RAMALHO, A. F.; SANTOS, R. A.; FERRARI, M. Avaliação *in vitro* da atividade fotoprotetora de extratos vegetais do cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 452-457, 2009.

WATERMAN, P. G.; MOHAMMAD, I. Uvariastrol, a novel acloartane triterpene from the stem bark of *Uvariastrum zerkeri*. **Phytochemistry**, v.23, p. 2077-2079, 1984.

WATERMAN, P. G.; MUHAMMAD, I. Sesquiterpenes and alkaloids from *Cleistopholis patens*. **Phytochemistry**, v. 24, p. 523-527, 1985.

WOGUEM, V.; FOGANG, H. P. D.; MAGGI, F.; TAPONDJOU, L. A.; WOMENI, H. M.; QUASSINTI, L.; BRAMUCCI, M.; VITALI, L. A.; PETRELLI, D.; LUPIDI, G.; PAPA, F.; VITTORI, S.; BARBONI, L. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopia parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. **Food Chemistry**, v. 149, p. 183-189, 2014.

XI, F. M.; LIU, Y. B.; QU, J.; LI, Y.; TANG, Z. H.; LI, L.; LI, Y. H.; CHEN, X. G.; MA, S. G.; YU, S. S. Bioactive sesquiterpenoids from the roots of *Artabotrys hexapetalus*. **Tetrahedron**, v. 73, p. 571-582, 2017.

XIE, W. D.; WANG, X. R.; MA, L. S.; LI, X.; ROW, K. H. Sesquiterpenoids from *Carpesium divaricatum* and their cytotoxic activity. **Fitoterapia**, v. 83, p. 1351-1355, 2012.

XU, J.; JIN, D.; SHI, D.; MA, Y.; YANG, B.; ZHAO, P.; GUO, Y. Sesquiterpenes from *Vladimiria souliei* and their inhibitory effects on NO production. **Fitoterapia**, v. 82, p. 508-511, 2011.

YANG, S. H.; LIAO, P. H.; PAN, Y. F.; CHEN, S. L.; CHOU, S. S.; CHOU, M. Y. The novel p53-dependent metastatic and apoptotic pathway induced by vitexin in human oral cancer OC2 cells. **Phytotherapy Research**, v. 8, p. 1154-1161, 2013.

ZHANG, L.; ZHOU, W.; XU, X. A new sesquiterpene peroxide (Yingzhaosu C) and sesquiterpenol (Yingzhaosu D) from *Artabotrys unciatus* (L.) Meer. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p. 523-524, 1988.

ZHANG, X. J.; LIU, S.; XING, J. P.; LIU, Z. Q.; SONG, F. R. Effect of type 2 diabetes mellitus on flavonoid pharmacokinetics and tissue distribution after oral administration of *Radix Scutellaria* extract in rats. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 16, p. 418-427, 2018.

ZHANG, Y. L.; XU, Q. Q.; ZHOU, X. W.; WU, L.; WANG, X. B.; YANG, M. H.; LUO, J.; LUO, J. G.; KONG, L. Y. Rare dimeric guaianes from *Xylopiya vielana* and their multidrug resistance reversal activity. **Phytochemistry**, v. 158, p. 26-34, 2019.

ZHANG, Z.; ELISOHLY, H. N.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. New sesquiterpenoids from the root of *Guatteria multivenia*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 856-859, 2002.

ZHOU, F.; PENG, J.; ZHAO, Y.; HUANG, W.; JIANG, Y.; LI, M.; WU, X.; LU, B. Varietal classification and antioxidant activity prediction of *Osmanthus fragrans* Lour. flowers using UPLC–PDA/QTOF–MS and multivariable analysis. **Food Chemistry**, v. 217, p. 490-497, 2017.

ZHOU, X. M.; ZHENG, C. J.; ZHANG, Y. Q.; ZHANG, X. P.; SONG, X. P.; XU, W.; CHEN, G. Y. Guaiane-Type Sesquiterpenoids from *Fissistigma oldhamii* Inhibit the Proliferation of Synoviocytes. **Planta Med**, v. 83, p. 217-223, 2016.