



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



FIAMA FERREIRA FIGUEIREDO

CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Xylopiia frutescens Aubl. (ANNONACEAE)

João Pessoa – PB

2019

FIAMA FERREIRA FIGUEIREDO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Xylopi frutescens Aubl. (ANNONACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para a obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**. Área de Concentração: **FARMACOQUÍMICA**.

ORIENTADOR: Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho

COORIENTADOR: Prof. Dr. Josean Fechine Tavares

João Pessoa – PB

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

F475c Figueiredo, Fiana Ferreira.

Constituintes químicos e avaliação da atividade biológica de *Xylopiia frutescens* Aubl. (Annonaceae) / Fiana Ferreira Figueiredo. - João Pessoa, 2019.
104f. : il.

Orientação: José Maria Barbosa Filho.

Coorientação: Josean Fachine Tavares.

Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Xylopiia frutescens*. 2. Metabólitos secundários. 3. Atividade antimicrobiana. 4. Cromatografia. I. Filho, José Maria Barbosa. II. Tavares, Josean Fachine. III. Título.

UFPB/BC

FIAMA FERREIRA FIGUEIREDO

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
Xylopiá frutescens Aubl. (ANNONACEAE)**


Dissertação aprovada em 20/02/2019.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
(Universidade Federal da Paraíba)
Orientador


Prof. Dr. Josean Fchine Tavares
(Universidade Federal da Paraíba)
Coorientador


Prof. Dra. Maria de Fátima Vanderlei Souza
(Universidade Federal da Paraíba)
Examinadora interna


Prof. Dr. Sócrates Golzio dos Santos
(Faculdade Ciências Médicas)
Examinador externo

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua infinita bondade e misericórdia. Por ter me guardado até hoje e realizado os desejos do meu coração. Por se mostrar sempre presente nas coisas simples e me fazer transbordar no seu amor. Toda honra e toda glória a Ti.

À minha família, meu alicerce. Minha escolha mais feliz, sou imensamente grata a Deus quando estou ao lado de vocês. Obrigada por me apoiarem em tudo o que eu decido fazer, e que mesmo na distância, se fazem presentes. Obrigada pelo amor e pela união. Amo muito vocês.

Ao meu orientador José Maria Barbosa pelo apoio e confiança neste trabalho, que sempre esteve disponível quando necessário.

Ao meu coorientador, Josean, que se tornou um amigo muito querido. Obrigada por todas as vezes que você sentou comigo e teve a paciência para me ensinar. Você foi primordial para que tudo desse certo. De todo o coração, muito obrigada!

À minha amiga da vida – te amo (Renata), à minha companheira de apt e alma gêmea (Jéssyca), à minha amiga há 17 anos e também alma gêmea (Marianna com dois N), aos meus topíssimos (Lyvia, Lucas, Hídna, Filipe e Fernando) que se tornaram minha família aqui. Obrigada pela parceria, amor e desunião incondicional. Amo muito vocês!

Ao prof. Dr. Marcelo Sobral por ter esclarecido muitas dúvidas e por ter me ajudado tanto.

À Vicente, obrigada por ter puxado minha mão na iniciação científica, foi muito importante para o começo da minha história na pesquisa.

À minha turma de mestrado que eu amo de coração. Vocês são show!

À toda equipe LMCA por sempre estarem dispostos a ajudar o coleguinha de lab. Que vocês tenham todo o sucesso do mundo.

Aos técnicos Nonato, Evandro, Sócrates e Marcelo, obrigada por aguentarem todos os meus aperreios. Vocês são ótimas aquisições kkkkk!

À Júnior pelo cafezinho de sempre e por arrumar nossas bagunças no lab.

Ao Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal da Paraíba.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

De todo o coração, essas palavras não são suficientes pra mostrar o quanto sou e serei eternamente grata a vocês!

RESUMO

A família Annonaceae reúne cerca de 2.500 espécies distribuídas em 108 gêneros por regiões tropicais e subtropicais. Entre os gêneros que a compõe, *Xylopiá* é considerado um dos maiores, apresentando uma predominância de alcaloides e diterpenos como metabólitos secundários nas suas espécies, como também um grande potencial farmacológico. *Xylopiá frutescens*, comumente conhecida como “embira-vermelha”, é utilizada amplamente na medicina popular, mas poucos estudos científicos são relatados para a espécie. Para a realização do estudo, as cascas de caule de *X. frutescens* foram coletadas em Santa Rita – PB, secas em estufa à 40 °C e trituradas. O pó seco foi submetido a extração com etanol 95% e a solução resultante foi concentrada em rotaevaporador, obtendo-se o extrato etanólico bruto. Este foi particionado, resultando nas fases hexânica, clorofórmica e acetato de etila. As estruturas químicas foram identificadas por espectroscopia de ressonância magnética nuclear, espectrometria de massas e em comparação com dados da literatura. Um precipitado formado na fase hexânica foi identificado como uma mistura de diterpenos: o ácido *ent*-caur-16-en-19-óico e ácido *ent*-traquiloban-19-óico. A fase clorofórmica foi submetida a cromatografia líquida de média pressão, obtendo-se frações que foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de arranjo de diodos em escala analítica e fracionamento em escala semi-preparativa, levando ao isolamento de quatro alcaloides e uma lignana, identificados como pseudopalmatina, oxobuxifolina, lisicamina, laurotetanina e siringaresinol- β -D-glicosídeo, respectivamente. As substâncias identificadas estão sendo descritas pela primeira vez para a espécie, com exceção da laurotetanina. Outra fração dessa mesma fase foi analisada por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas, apresentando oito picos principais que foram identificados putativamente como alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos com seus substituintes. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas. A composição química do óleo essencial foi de monoterpenos e sesquiterpenos, sendo o β -pineno (2,52 %), 1,3,5-trimetilbenzeno (3,2 %), citronelol (1,06 %), geraniol (2,35 %), timol (2,96 %), elemol (1,36 %), espatulenol (1,08 %) e cadin-4-en-10-ol (1,79 %) como constituintes majoritários. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi investigada através da concentração inibitória mínima (CIM), apresentando atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii* (CIM:1024 μ g/mL) e forte atividade antifúngica contra *Cryptococcus gattii* (INCQS-40113) de 32 μ g/mL e de 256 μ g/mL para *Candida tropicalis* (ATCC-13803), sendo classificado como forte potencial antimicrobiano para estudos complementares.

Palavras-chave: *Xylopiá frutescens*, metabólitos secundários, atividade antimicrobiana, cromatografia

**Chemical constituents and evaluation of the biological activity of *Xylopia frutescens* Aubl.
(Annonaceae).**

Figueiredo, F. F.

**Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2019).**

ABSTRACT

The Annonaceae family comprises about 2.500 species distributed in 108 genera by tropical and subtropical regions. Among its genera, *Xylopia* is considered one of the largest, presenting a predominance of alkaloids and diterpenes as secondary metabolites in its species, as well as a great pharmacological potential. *Xylopia frutescens*, commonly known as "embira-vermelha", is widely used in folk medicine, but few scientific studies are reported for the species. For the study, the *X. frutescens* stem bark was collected in Santa Rita - PB, dried in a greenhouse at 40 °C and crushed. The dried powder was extracted with 95% ethanol and the resulting solution was concentrated in a rotary evaporator to give the crude ethanolic extract. This was partitioned, resulting in the hexane, chloroform and ethyl acetate phases. The chemical structures were identified by nuclear magnetic resonance spectroscopy, mass spectrometry and compared with literature data. A precipitate formed in the hexane phase was identified as a mixture of diterpenes: *ent*-caur-16-en-19-oic acid and *ent*-traquiloban-19-oic acid. The chloroform phase was submitted to medium pressure liquid chromatography, obtaining fractions that were analyzed by high performance liquid chromatography coupled to the diode arrangement detector on an analytical scale and fractionation on a semi-preparative scale, leading to the isolation of four alkaloids and a lignan, identified as pseudopalmatine, oxobuxifoline, lysicamine, laurotetanine and syringaresinol- β -D-glycoside, respectively. The identified substances are being described for the first time for the species, except for laurotetanine. Another fraction of this same phase was analyzed by liquid chromatography coupled to the mass spectrometer, presenting eight main peaks that were putatively identified as aporfinic and oxoaporfinic alkaloids with their substituents. The essential oil was extracted by hydrodistillation in a Clevenger apparatus and characterized by gas chromatography coupled to mass spectroscopy. The chemical composition of the essential oil was monoterpenes and sesquiterpenes, with β -pinene (2.52%), 1,3,5-trimethylbenzene (3.2%), citronellol (1.06%), geraniol (35%), thymol (2.96%), elemol (1.36%), spatulenol (1.08%) and cadin-4-en-10-ol (1.79%) as major

constituents. The antimicrobial activity of the essential oil was investigated through the minimum inhibitory concentration (MIC), showing antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* and *Morganella morganii* (MIC: 1024 µg / mL) and strong antifungal activity against *Cryptococcus gattii* (INCQS-40113) of 32 µg / mL and 256 µg / mL for *Candida tropicalis* (ATCC-13803), being classified as a strong antimicrobial potential for complementary studies.

Key words: *Xylopi* *frutescens*, secondary metabolites, antimicrobial activity, chromatography

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mapa de distribuição geográfica da família Annonaceae.....	21
Figura 2. Frutos de <i>Annona muricata</i> e <i>Annona squamosa</i> , respectivamente.....	22
Figura 3. Exemplos de algumas classes de metabólitos secundários descritos em Annonaceae.....	22
Figura 4. Biossíntese dos alcaloides isoquinolínicos.....	26
Figura 5. Faixas de deslocamentos químicos característicos de alguns hidrogênios de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos.....	27
Figura 6. Esqueleto básico dos alcaloides protoberberínicos quaternários.....	28
Figura 7. Espécie <i>Xylopia frutescens</i>	29
Figura 8. Cromatograma da fração XF17 obtida por CLAE-DAD semi-preparativo em 254nm.....	43
Figura 9. Cromatograma da fração XF21 obtida por CLAE-DAD semi-preparativo em 254nm.....	44
Figura 10. Cromatograma da fração XF26 obtida por CLAE-DAD semi-preparativo em 254nm.....	45
Figura 11. Estruturas ácido <i>ent</i> -caur-16-en-19-óico (XF1701b) e ácido <i>ent</i> -traquiloban-19-óico (XF1701a).....	51
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de XFH01.....	52
Figura 13. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de XFH01.....	52
Figura 14. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de XFH01...53	53
Figura 15. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de XFH01...53	53
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de XF1704.....	56
Figura 17. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de XF1704..56	56
Figura 18. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de XF1704..57	57
Figura 19. Espectro de massas de baixa resolução, modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ de XF1704.....	57
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de XF1707.....	57
Figura 21. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de XF1707..60	60
Figura 22. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de XF1707..61	61
Figura 23. Espectro de massas de baixa resolução, modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ de XF1707.....	61
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de XF1709.....	64
Figura 25. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de XF1709....64	64
Figura 26. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de XF1709..65	65
Figura 27. Espectro de massas de baixa resolução, no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ de XF1709.....	65
Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.....	68
Figura 29. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.....	68
Figura 30. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.....	69
Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.....	69

Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.....	70
Figura 33. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.....	70
Figura 34. Espectro de massas MS e MS^2 da substância XF2103.....	71
Figura 35. Espectro de RMN de ^1C (100 MHz, CD_3OD) de XF2103.....	74
Figura 36. Expansão do espectro RMN de ^1C (100 MHz, CD_3OD) de XF2103.....	74
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de XF2103.....	75
Figura 38. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de XF2103.....	75
Figura 39. Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de XF2103.....	76
Figura 40. Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de XF2103.....	76
Figura 41. Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de XF2103.....	77
Figura 42. Expansão do espectro de HMQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) de XF2103.....	78
Figura 43. Possibilidades de estereoquímica para lignanas furofurânicas do tipo 8H.....	78
Figura 44. Estrutura química de siringaresinol- β -D-glicosídeo.....	78
Figura 45. Espectro de íons totais da fração XF24 por CLAE/EM.....	79
Figura 46. Espectro de MS, MS^2 e MS^3 do pico 1 com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 342 (Tr= 36.9 min).....	81
Figura 47. Proposta de fragmentação para o pico 1 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 342.....	82
Figura 48. Espectro de MS, MS^2 e MS^3 do pico 3 com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326 (Tr= 45.8 min).....	83
Figura 49. Proposta de fragmentação para o pico 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326.....	84
Figura 50. Espectro de MS, MS^2 e MS^3 do pico 6 com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326 (Tr= 53.3 min).....	85
Figura 51. Proposta de fragmentação para o pico 6 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 326.....	85
Figura 52. Espectro de MS, MS^2 e MS^3 do pico 2 com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312 (Tr= 38.3 min).....	86
Figura 53. Proposta de fragmentação para o pico 2 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 312.....	87
Figura 54. Espectro de MS, MS^2 e MS^3 do pico 4 com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 266 (Tr= 47.4 min).....	87
Figura 55. Proposta de fragmentação para o pico 4 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 266.....	88
Figura 56. Espectro de MS, MS^2 e MS^3 do pico 5 com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 296 (Tr= 49.5 min).....	88
Figura 57. Proposta de fragmentação para o pico 5 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 296.....	89
Figura 58. Espectro de MS, MS^2 e MS^3 do pico 7 com m/z $[\text{M}+\text{H}]^+$ 276 (Tr= 57.4 min).....	89
Figura 59. Proposta de fragmentação para o pico 7 $[\text{M}+\text{H}]^+$ 276.....	90

Figura 60. Espectro de MS, MS ² e MS ³ do pico 8 com m/z [M+H] ⁺ 306 (Tr= 64.5 min).....	90
Figura 61. Proposta de fragmentação para o pico 8 [M+H] ⁺ 306.....	91
Figura 62. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG-EM) do óleo essencial de <i>Xylopi</i> a frutescens.....	92

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Biossíntese dos diterpenos.....	25
Esquema 2. Obtenção do pó da planta e do extrato etanólico bruto.....	39
Esquema 3. Particionamento do extrato etanólico bruto e obtenção das fases.....	40
Esquema 4. Fracionamento da fase clorofórmica.....	42

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de metabólitos secundários de espécies do gênero <i>Xylopi</i>	23
Quadro 2. Diterpenos isolados de <i>Xylopi frutescens</i>	30
Quadro 3. Alcaloides isolados de <i>Xylopi frutescens</i>	31

/

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fracionamento da fase clorofórmica de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	41
Tabela 2. Dados de RMN ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) de XF01a e XF01b em comparação com os dados da literatura.....	51
Tabela 3. Dados de RMN de ¹ H (500 MHz, DMSO) de XF1704 em comparação com a literatura.....	55
Tabela 4. Dados de RMN de ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N) de XF1707, em comparação com a literatura.....	59
Tabela 5. Dados de RMN de ¹ H (400 MHz, DMSO) de XF1709, em comparação com a literatura.....	63
Tabela 5. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (500 MHz e 125 MHz, CDCl ₃ + CD ₃ OD), em comparação com a literatura.....	67
Tabela 6. Dados de RMN de ¹ H e ¹³ C (400 e 100 MHz) e correlações obtidas em HMBC, registradas em CD ₃ OD em comparação com a literatura.....	73
Tabela 7. Constituintes químicos do óleo essencial das cascas de caule de <i>Xylopi</i> a <i>frutescens</i>	92
Tabela 8. Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM (µg/mL) da substância contra cepas bacterianas e fúngicas.....	94

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APT	Teste de próton anexado
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	Espectroscopia de correlação total
d	Dubleto
dd	Duplo dubleto
EEB	Extrato etanólico bruto
ESI	Ionização por electrospray
ESI-MS	Espectrometria de massa acoplada à ionização por electrospray
EtOH	Etanol
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações
HMQC	Correlação heteronuclear de <i>quantum</i> múltiplo
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Singleto
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1. Considerações sobre a família Annonaceae.....	21
2.2. Considerações sobre o gênero <i>Xylopia</i>	23
2.3. Biossíntese de diterpenos.....	24
2.4. Biossíntese dos alcaloides isoquinolínicos.....	25
2.5. Identificação de alcaloides através de Ressonância Magnética Nuclear de ¹ H 27	
2.6. Atividade antimicrobiana	28
2.7. Considerações sobre a espécie <i>Xylopia frutescens</i> Aubl.....	29
3. OBJETIVOS.....	34
3.1. Geral	34
3.2. Específicos.....	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Materiais e equipamentos	36
4.2. Material vegetal.....	38
4.3. Coleta e identificação do material vegetal.....	38
4.4. Processamento do material vegetal	38
4.5. Obtenção do extrato etanólico bruto	39
4.6. Particionamento do extrato etanólico bruto	39
4.7. Fracionamento da fase clorofórmica.....	41
4.8. Procedimento cromatográfico de XF17, XF21 e XF26 por CLAE-DAD em escala analítica e semi-preparativa	43
4.9. Obtenção do óleo essencial e caracterização química	45
4.10. Atividade antimicrobiana	46
4.11. Amostra.....	46

4.12.	Meios de cultura.....	46
4.13.	Microrganismos.....	46
4.14.	Inóculo	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50
5.1.	Identificação estrutural de XFH01	50
5.2.	Identificação estrutural de XF1704.....	54
5.3.	Identificação estrutural de XF1707.....	58
5.4.	Identificação estrutural de XF1709.....	62
5.5.	Identificação estrutural de XF2604.....	66
5.6.	Identificação estrutural de XF2103.....	71
5.7.	Análise da fração XF24 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de massas (CLAE/EM)	79
5.8.	Identificação dos constituintes voláteis de <i>Xylopi</i> <i>frutescens</i>	91
5.9.	Atividade antimicrobiana	93
6.	CONCLUSÕES.....	96
	REFERÊNCIAS.....	97



Introdução

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde de tempos imemoriais para o alívio de doenças. Esse arsenal químico da natureza, aliado ao conhecimento dos povos primitivos e dos indígenas, é considerado fator fundamental para a descoberta de substâncias tóxicas e medicamentosas, e assim contribuem para o desenvolvimento da pesquisa de produtos naturais e propriedades biológicas (VIEGAS et al., 2006).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o uso de plantas medicinais como importantes instrumentos no combate as doenças, ao observar que 70% a 90% da população nos países em vias de desenvolvimento dependem delas no que se refere à Atenção Primária à Saúde, seja pelo uso através do conhecimento popular, de transmissão oral entre gerações, ou nos sistemas oficiais de saúde, hoje orientada pelos princípios e diretrizes do Sistema Único de Saúde (WHO, 2011). Contudo, esse uso tradicional de plantas medicinais muitas vezes feito de forma empírica, não assegura, em muitos casos, garantia de eficácia e segurança no uso de tais preparações medicinais, podendo não tratar determinadas enfermidades para a qual são utilizadas e causar problemas maiores, como risco de intoxicações (LEITÃO et al., 2014; MOREIRA et al., 2014).

Desta forma, a química de produtos naturais (QPN) pode contribuir essencialmente na manutenção da saúde e cura de doenças, através da investigação de fontes naturais de forma racional, contribuindo para desenvolvimento sustentável de um país, levando a um avanço social e econômico. Isto pode ocorrer, principalmente, pela descoberta de substâncias naturais produzidas pelo metabolismo secundário de organismos vivos, através da caracterização estrutural, avaliação de propriedades e investigações biossintéticas (BRAZ FILHO, 2010).

Além do que foi citado acima, atualmente, o uso indevido e indiscriminado de antimicrobianos tem levado à uma crescente resistência desses microrganismos, em combinação ao surgimento de doenças emergentes, torna-se necessário o desenvolvimento urgente de terapias mais eficazes e que apresentem menos efeitos colaterais aos pacientes (RAI et al., 2017).

Uma revisão sobre produtos naturais como fonte de novas drogas do ano de 1981 a 2014 mostra que a influência das substâncias oriundas de produtos naturais são bastante marcante principalmente na área de contra infecções, como a antibacteriana e antifúngica (NEWMAN; CRAGG, 2016).

A família em estudo, Annonaceae, é caracterizada pela produção de vários metabólitos secundários, como alcaloides, terpenoides, acetongeninas, lignanas, e estes possuem atividades biológicas já relatadas. Muitos dos trabalhos de espécies dessa família foram realizados por grupos de pesquisa do Programa de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba (PgPNSB/UFPB) como os realizados com *Anaxagorea dolichocarpa* (LÚCIO, 2015; LÚCIO et al., 2011), *Annona leptopetala* (COSTA et al., 2012, 2008; SETTE et al., 2000), *Duguetia gardneriana* (ALMEIDA et al., 2007), *Guatteria juruensis* (LIMA et al., 2003), *Guatteria poeppigiana* (LIMA et al., 2004), *Hornschuchia obliqua* (FECHINE et al., 2003), *Xylopiya cayennensis* (ANDRADE et al., 2004), *Xylopiya frutescens* (SOUZA et al., 2015) e *Xylopiya langsdorffiana* (CASTELLO-BRANCO et al., 2011; CASTELLO BRANCO et al., 2009; CORREIA et al., 2015; DOS SANTOS et al., 2013; HUSEIN, 2016; MONTENEGRO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2007; SILVA et al., 2009; TAVARES et al., 2007b, 2006, 2007a)

Diante disso, com o intuito de contribuímos para os problemas acima relatados, optamos por trabalhar com a espécie *Xylopiya frutescens*, pertencente à família Annonaceae, a qual é amplamente estudada no grupo de pesquisa PgPNSB. Essa espécie já possui uso entnofarmacológico, porém poucos estudos científicos são descritos na literatura, evidenciando a importância dessa pesquisa para o enriquecimento do conhecimento químico e biológico da espécie.



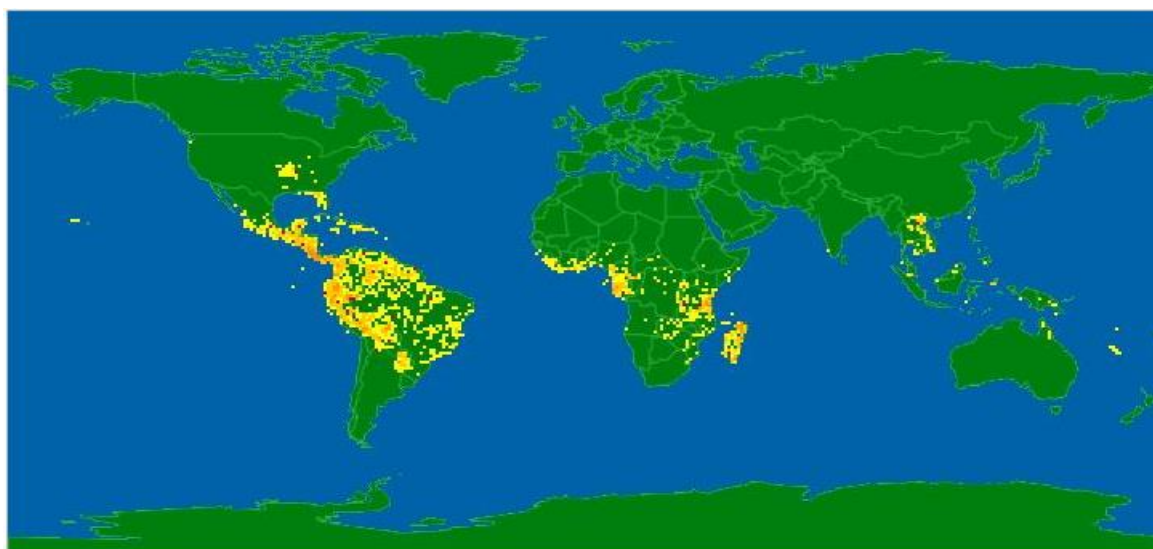
Fundamentação teórica

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Considerações sobre a família Annonaceae

A família Annonaceae é a mais rica em espécies de Magnoliales, reunindo aproximadamente 2.500 espécies em cerca de 108 gêneros com distribuição em regiões tropicais e subtropicais (Figura 1) (CHATROU et al., 2012). No Brasil, ocorrem cerca de 386 espécies, distribuídas em 29 gêneros, sendo encontradas na Amazônia a grande parte da diversidade de Annonaceae, com 27 gêneros e 280 espécies (MAAS et al., 2013).

Figura 1. Mapa de distribuição geográfica da família Annonaceae.



Disponível em <<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=40013549&tab=maps>> acesso em janeiro, 2019.

Essa família possui algumas espécies que produzem frutos comestíveis como a graviola (*Annona muricata* L.) e a pinha (*Annona squamosa* L.) (Figura 2, pág 21), como também fornecem óleos usados para alimentos e cosméticos, sendo considerada importante para a economia (LEBOEUF et al., 1982; WOODE et al., 2011).

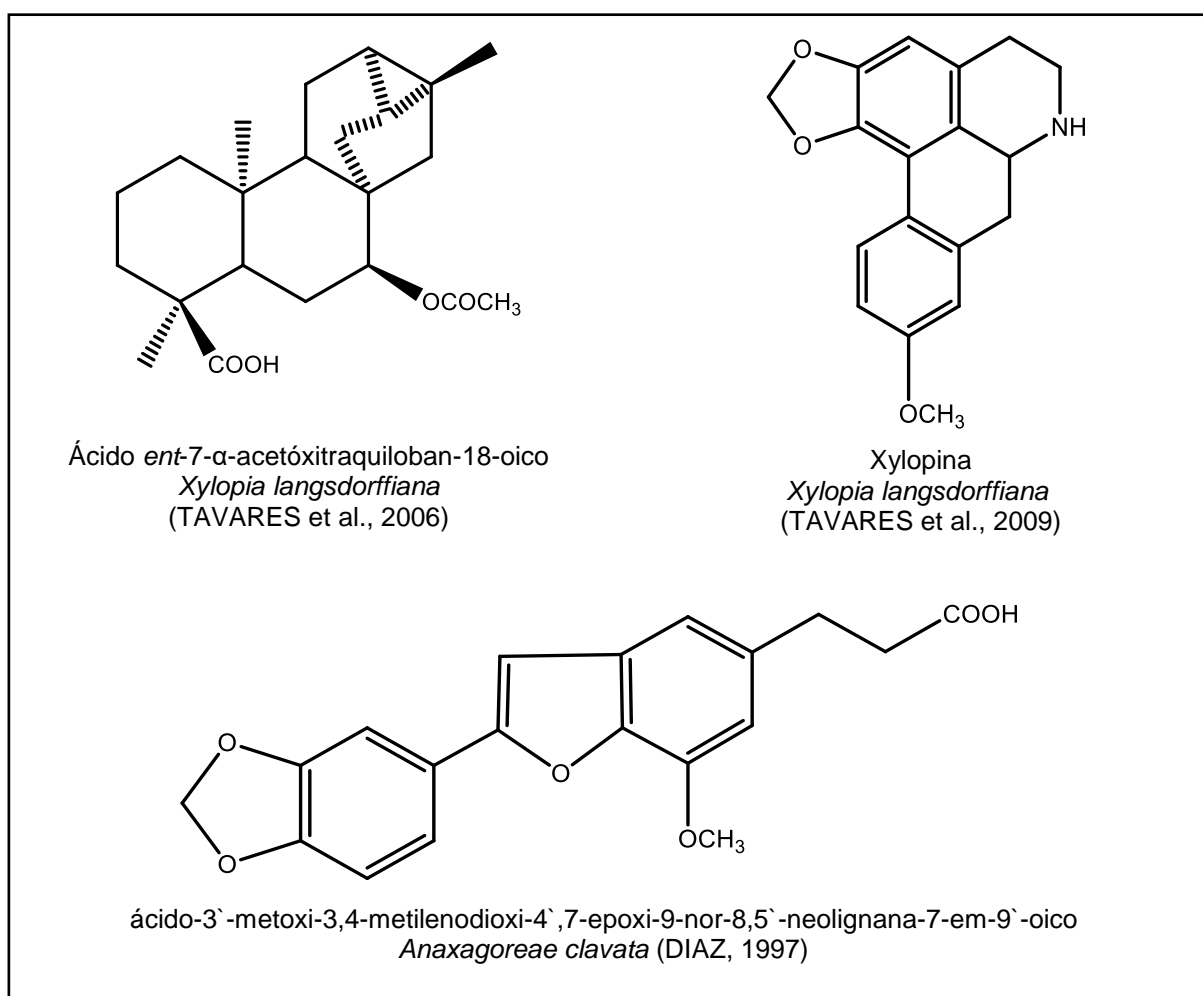
Muitos metabólitos secundários são descritos para espécies dessa família, como a ocorrência de alcaloides, acetongeninas, polifenóis, terpenos, neolignanas, flavonoides, lactonas, amidas (LEBOEUF et al., 1982; DÍAZ, 1997; ALALI et al., 1999; PINTO et al., 2005), dos quais alguns exemplos encontram-se na figura 3, pág 21.

Figura 2. Frutos de *Annona muricata* e *Annona squamosa*, respectivamente.



Disponível em <<https://www.google.de/search?q=annona&source>> Acesso em janeiro de 2019.

Figura 3. Exemplos de algumas classes de metabólitos secundários descritos em Annonaceae.

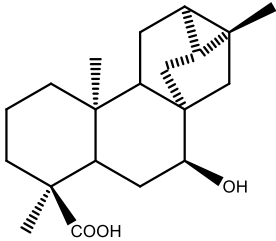
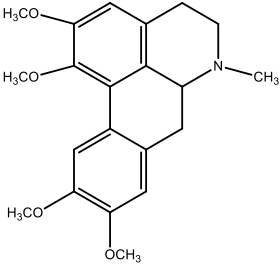


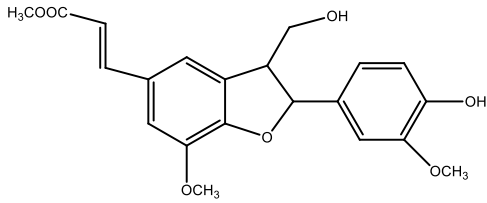
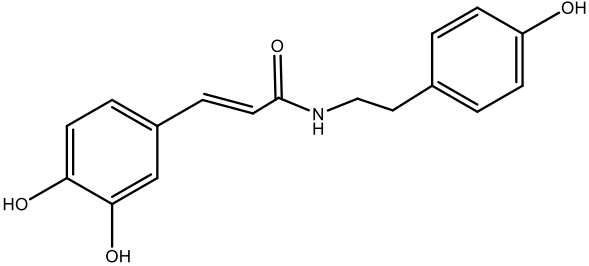
2.2. Considerações sobre o gênero *Xylopi*

O gênero *Xylopi* L. é um dos maiores pertencente à família Annonaceae, compreendendo cerca de 160 espécies (MOREIRA, et al., 2013), sendo distribuídas na América do sul, América Central, África e Ásia (MOREIRA et al., 2005).

Várias classes de metabólitos são descritas para plantas desse gênero, apontando até 2016, predominância no isolamento de alcaloides (41%), seguido de diterpenos (25%), flavonoides, acetogeninas, lignanas (BARBOSA; VEGA, 2017), como exemplo o diterpeno ácido *ent*-7- α -acetóxitraquiloban-18-oico, isolado dos galhos de *Xylopi langsdorffiana*, que mostrou atividade citotóxica frente à fibroblastos (V79) e hepatócitos de ratos (TAVARES et al., 2006); o alcaloide glaucina, isolado de cascas de caule de *Xylopi parviflora*, que apresentou atividade antinociceptiva (NISHIYAMA et al., 2010); a lignana xylobuxina, isolada da espécie *Xylopi buxifolia* (WAHL et al., 1995); a amida *N-trans*-cafeoil tiramina isolada da espécie *Xylopi aromática* (SILVA et al., 2010).

Quadro 1. Exemplos de metabólitos secundários de espécies do gênero *Xylopi*.

Espécies	Substâncias
<p><i>Xylopi langsdorffiana</i> (TAVARES et al., 2006)</p>	 <p>Ácido <i>ent</i>-α-hidróxitraquiloban-18-oico</p>
<p><i>Xylopi parviflora</i> (NISHIYAMA et al., 2010)</p>	 <p>Glaucina</p>

<p><i>Xylopiya buxifolia</i> (WAHL et al., 1995)</p>	 <p>Xylobuxina</p>
<p><i>Xylopiya aromatica</i> (SILVA et al., 2010)</p>	 <p>N-trans-caffeoyltiramina</p>

Algumas espécies pertencentes a este gênero são utilizadas na medicina popular para o tratamento de reumatismo, dor e malária (*Xylopiya vielana*) (KAMPERDICKA et al., 2001), febre, gripes e enfermidades parasitárias (*Xylopiya aromática*) (LAGO et al., 2003), contra dor de estômago, tratamento de bronquites, dor biliar (*Xylopiya aethiopica*) (KARIOTI et al., 2004), como analgésico (*Xylopiya paviflora*) (NISHIYAMA et al., 2004).

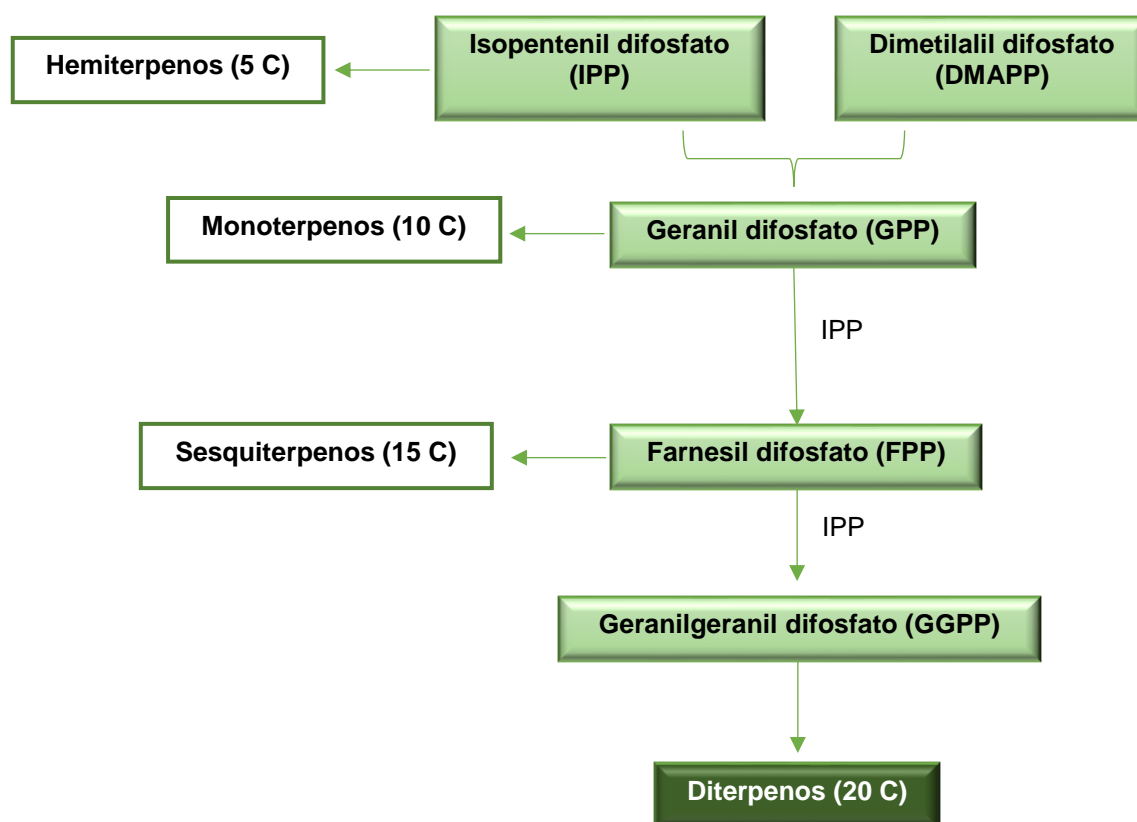
2.3. Biossíntese de diterpenos

Na biossíntese, os terpenoides são originados através da condensação de isopentenil difosfato (IPP) e do dimetilalil difosfato (DMAPP), que são sintetizados pela via do mevalonato utilizando três moléculas de acetil-CoA para formar o ácido mevalônico, e a via do metileritritol fosfato, que tem início com a tiamina difosfato e ácido pirúvico. O IPP e DMAPP dão vez as unidades de isopreno, e são estas que formam terpenos e esteroides, através da reação “cabeça-calda”, levando ao geranyl difosfato (GPP), precursor dos monoterpênicos (C₁₀). A partir de novas ligações das

unidades, é formado o farnesil difosfato (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) (DEWICK, 2009).

Os diterpenos são provenientes de uma unidade de geranylgeranyl difosfato (GGPP), que através da formação de carbocátions e rearranjos moleculares, mediados por enzimas, levam aos núcleos diterpênicos do tipo caurano, traquilobano (NIERO & MALHEIROS, 2014).

Esquema 1. Biossíntese dos diterpenos.



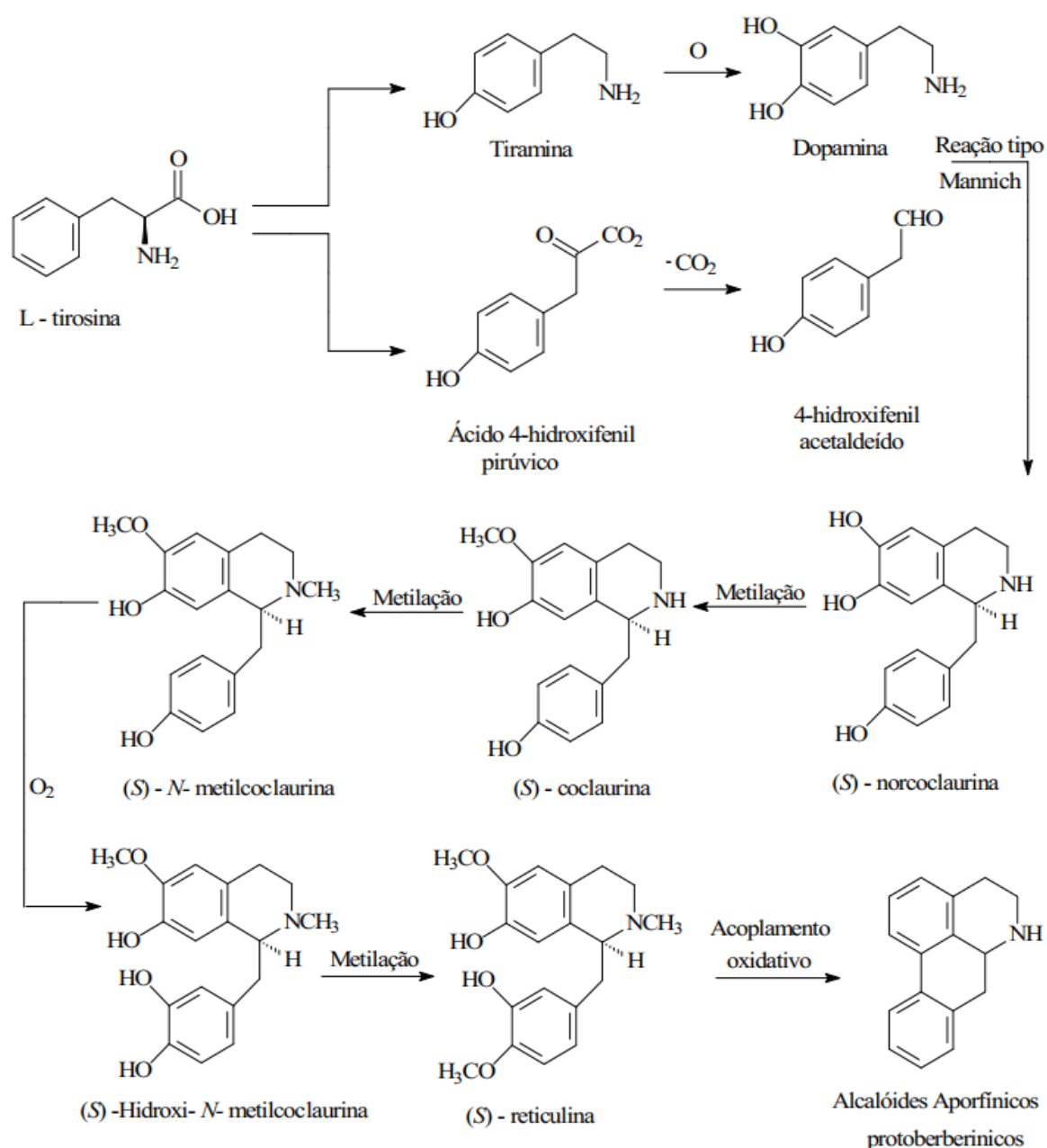
2.4. Biossíntese dos alcaloides isoquinolínicos

A origem biossintética dos alcaloides aporfínicos tem início no aminoácido precursor *L*-tirosina, que forma a dopamina através de uma reação de descarboxilação, seguida de oxidação, e forma também o 4-hidroxifenil acetaldeído, através de uma transaminação seguida de descarboxilação. Ocorre a condensação

dos dois produtos, que dão origem ao alcaloide benzilisoquinolínico (*S*)-norcoclaurina mediante uma reação do tipo Mannich (DEWICK, 2009).

A (*S*)-norcoclaurina sofre O-metilação formando a (*S*)-coclaurina, que em seguida forma a (*S*)-*N*-metilcoclaurina através de uma N-metilação. Após oxidação do anel D, este sofre outra oxidação com subsequente O-metilação, dando origem a (*S*)-reticulina (DEWICK, 2009; LÚCIO, 2011), que por acoplamentos oxidativos forma alcaloides aporfínicos, protoberberínicos, sendo a precursora desses alcaloides (STÉVIGNY et al., 2005; LÚCIO, 2011).

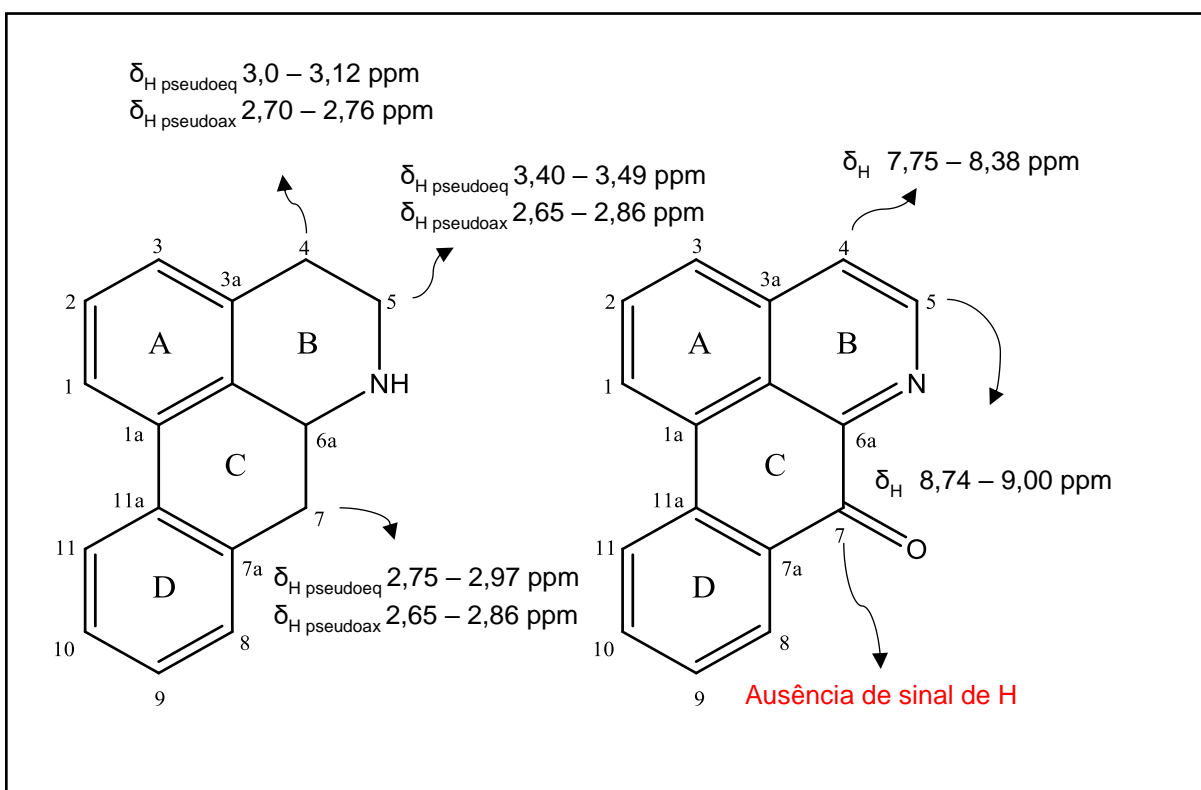
Figura 4. Biossíntese dos alcaloides isoquinolínicos.



2.5. Identificação de alcaloides através de Ressonância Magnética Nuclear de ^1H

Os alcaloides aporfínicos podem ser diferenciados pela presença e ausência de alguns sinais que são característicos no espectro de RMN de ^1H para sua identificação. Esses sinais sofrem variações de acordo com as substituições que ocorrem na sua estrutura básica. A figura 5, pág. 26 mostra as faixas características dos sinais alifáticos em C-7 que ocorrem nesse tipo de estrutura, bem como a presença dos sinais de hidrogênio de C-4 e C-5. Quando estes estão ausentes no espectro, indica que há uma substituição nas ligações desses carbonos. Dentre estas, há a inserção da carbonila em C-7, denominando-se agora alcaloide oxoaporfínico, como também a inserção da ligação dupla entre C-4 e C-5, que é caracterizada pela multiplicidade dos hidrogênios (dubleto) no espectro.

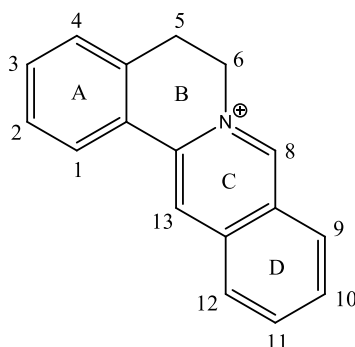
Figura 5. Faixas de deslocamentos químicos característicos de alguns hidrogênios de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos (COSTA et al., 2011; MACEDO et al., 2012; RABELO et al., 2014; TELES et al., 2015)



Os alcaloides tetrahydroberberínicos são isolados também na forma de sais, os denominados protoberberínicos quaternários (Figura 6, pág. 27). Estes são

classificados de acordo com as substituições nos anéis A e D, que quando presentes nas posições C-2, C-3, C-10 e C-11, usa-se o prefixo pseudo, sendo denominado agora como o pseudoprotoberberínico (GRYCOVA; DOSTAL; MAREK, 2007). Esse padrão de substituição é característico no espectro de RMN ^1H por apresentar apenas singletos na região de sistemas aromáticos.

Figura 6. Esqueleto básico dos alcaloides protoberberínicos quaternários.



2.6. Atividade antimicrobiana

Desde muitas décadas, devido à grande diversidade biológica e estrutural de seus componentes, os óleos essenciais têm contribuindo para a descoberta de novos compostos com atividade antibacteriana e antifúngica (SAKKAS, H.; PAPADOPOULOU, C., 2017). Os óleos essenciais constituem elementos voláteis contidos em muitas plantas, e estão relacionados com diversas funções necessárias à sobrevivência vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (LOBO, 2015).

As plantas medicinais fazem parte da cultura popular, através da transmissão do conhecimento de suas propriedades pelas gerações ao longo do tempo (FREIRES, et al., 2010). Algumas simbolizam fator de grande relevância para a conservação das condições de saúde da sociedade (SALES et al., 2015) sendo elas um componente de ampla importância econômica devido às suas ações terapêuticas já comprovadas como ação antifúngica e antibacteriana (BIASI-GARBIN, et al., 2016; NOCCHI, et al., 2016; COLE, et al., 2014; PINHO, et al., 2012; FREIRES, et al., 2010; MUHS, et al., 2017).

A resistência microbiana tem dificultado o tratamento de diversas doenças infecciosas, prolongando o tempo da doença, aumentando a mortalidade e os custos

para combater enfermidades causadas por estes microrganismos (LIMA et al, 2017). Atualmente tem se relatado o aumento de microrganismos resistentes aos fármacos existentes juntamente com uma escassez na descoberta de novos antimicrobianos. Apesar da necessidade de novos medicamentos, existem ainda poucas pesquisas a partir de produtos naturais, que são uma importante fonte de novos fármacos (AMPARO et al., 2017).

Vários estudos realizados com óleo essencial do gênero *Xylopi*a mostraram diversas atividades biológicas. Dentre elas, o óleo essencial da raiz e da casca do caule de *X. pynaetii* e *X. frutescens*, respectivamente, apresentaram uma potente atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus* e *Mycobacterium smegmatis* (FOURNIER et al., 1993; FOURNIER et al., 1994), enquanto que o óleo de casca de caule de *Xylopi*a *longifolia* apresenta apenas atividade contra *Staphylococcus aureus* (CLAESON et al., 1992).

2.7. Considerações sobre a espécie *Xylopi*a *frutescens* Aubl.

*Xylopi*a *frutescens* é uma árvore encontrada na América central e do sul, África e Ásia (TAKAHASHI et al., 1995). No Brasil, é comumente conhecida como “embira”, “embira-vermelha” e “semente-de-embira” (TAKAHASHI, 1995).

Figura 7. Espécie *Xylopi*a *frutescens*.

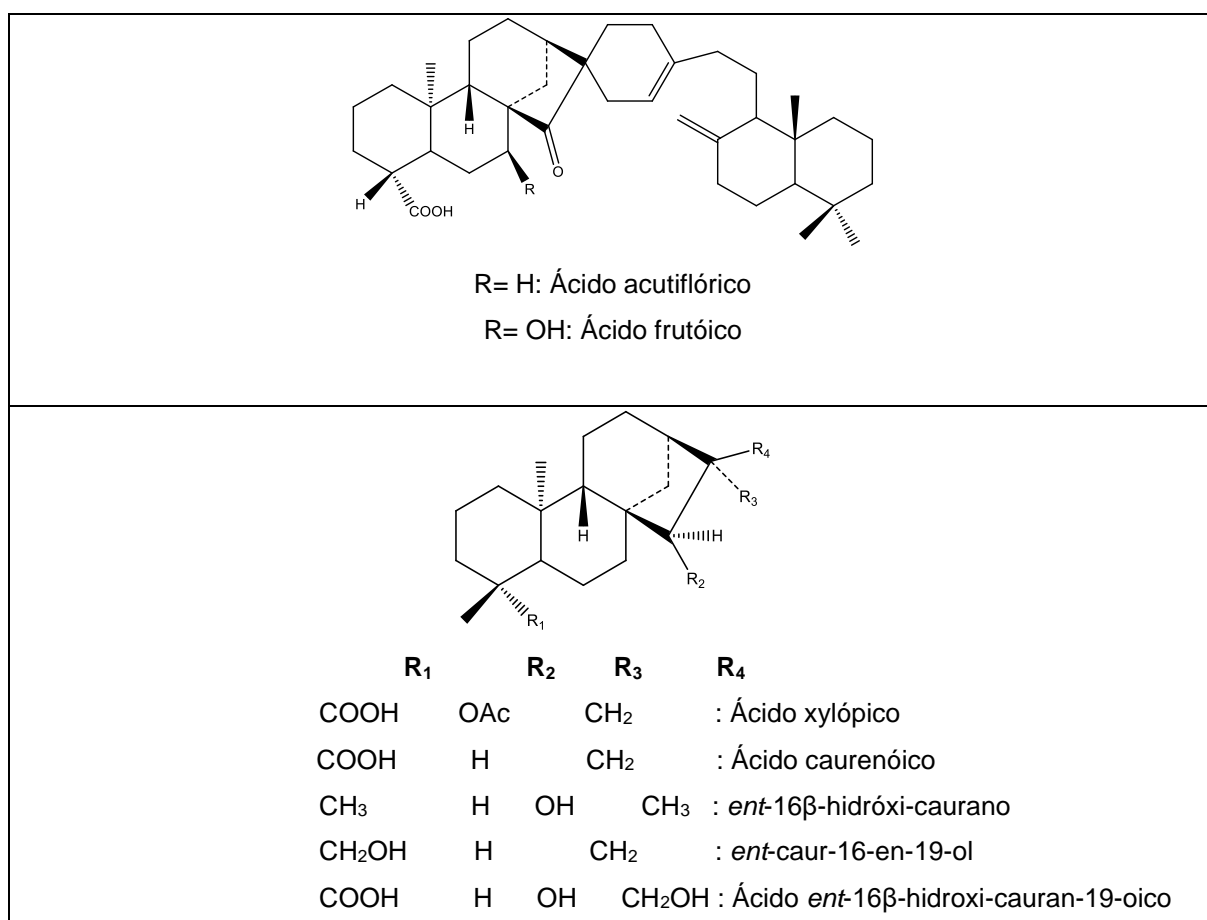


Na medicina popular é utilizada como estimulante da bexiga, no tratamento do reumatismo e doenças intestinais (CORREA, 1984; TAKAHASHI, BOAVENTURA, BAYMA, & OLIVEIRA, 1995), como também no combate de resfriados e dores de cabeça, através da decocção da casca na forma de inalação (DI STASI & HIRUMALIMA, 2002).

Ainda é empregada na culinária como condimento em substituição a pimenta do reino (DI STASI, 2002). Na cordoaria, é usada para amarrar rapaduras e feixes de cana nas roças, através da sua casca que fornece fibra (BRANDAO, et al., 2002).

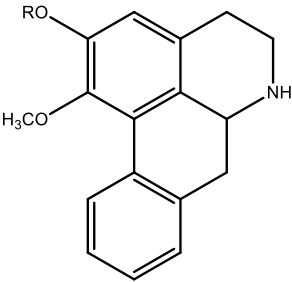
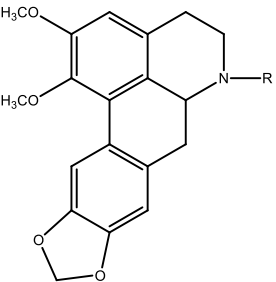
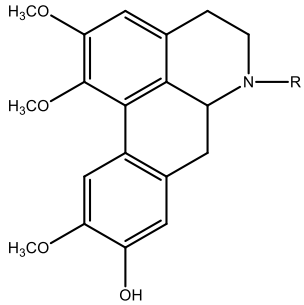
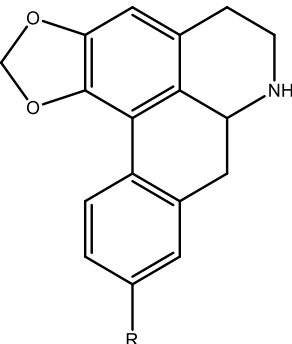
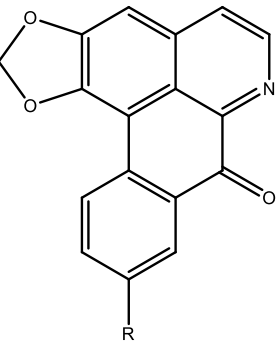
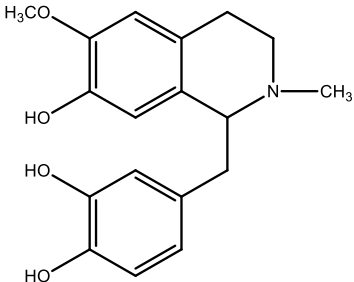
Alguns metabólitos secundários já foram isolados da espécie em estudo, diterpenos do tipo caurano e os dímeros ácido acutiflórico e ácido frutoico, isolados dos frutos, cascas de caule e folhas (Quadro 2, pág. 29), como também o esteroide sitosterol (TAKAHASHI et al., 1995).

Quadro 2. Diterpenos isolados de *Xylopiya frutescens*.



Além dos diterpenos, alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos também foram relatados para essa espécie (Quadro 3, pág. 30) (LEBOEUF et al., 1982).

Quadro 3. Alcaloides isolados de *Xylopia frutescens*.

 <p>R= H: Assimilobina R=CH₃: Nornuciferina</p>	 <p>R= H: Nornantenina R= CH₃: Nantenina</p>	 <p>R= H: Laurotetanina R= CH₃: N-metil laurotetanina</p>
 <p>R= H: Anonaina R= OCH₃: Xylopinina</p>	 <p>R= H: Liriodenina R= OCH₃: Lanuginosina</p>	 <p>Reticulina</p>

Atividades biológicas também são descritas para esta espécie, como atividade antitumoral realizada com o óleo essencial das folhas, tendo sua maior composição de sesquiterpenos, apresentou citotoxicidade contra linhagens celulares e atividade anticancerígena promissora (FERRAZ et al., 2013); mostrou atividade espasmolítica no íleo de cobaias, por ser antagonista do receptor de histamina e bloquear o influxo de Ca²⁺, reduzindo a concentração, levando ao relaxamento da musculatura lisa (LEÃO et al., 2015); exibiu atividade tripanocida significativa *in vitro* frente a formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (SILVA et al., 2013).

Suas folhas apresentam atividade anti-helmíntica e antipirética (JOLY et al., 1987), diurética e antidermatogênica (DI-STASI; HIRUMA-LIMA, 2002), já as sementes possuem propriedades organolépticas, bem como estimulantes digestivos,

da bexiga e úteis contra catarro, leucorréia e cólicas estomacais (DI-STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).



Objetivos

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

- ✓ Contribuir para o conhecimento químico e biológico da família Annonaceae através do isolamento e identificação de novos metabólitos secundários e avaliação da atividade biológica das cascas de caule da espécie *Xylopia frutescens*.

3.2. Específicos

- ✓ Isolamento por métodos cromatográficos;
- ✓ Identificação dos compostos isolados por espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY) e espectrometria de massas;
- ✓ Identificação putativa de moléculas não isoladas por cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (CL/EM/EM);
- ✓ Extração o óleo essencial das cascas de caule de *Xylopia frutescens* e caracterizar os constituintes químicos por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (CG/EM);
- ✓ Realização da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Xylopia frutescens*.



Materiais e métodos

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais e equipamentos

O fracionamento, isolamento, a purificação dos constituintes químicos de *Xylopi* *frutescens* foram realizados utilizando técnicas cromatográficas como: cromatografia líquida de média pressão (CLMP), cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).

Para CLMP foi utilizado cromatógrafo BUCHI® com sistema automatizado conectado ao software Sepacore Control Chromatography. O equipamento possui dois módulos de bombas C-601 e C-605, módulo controlador C-620, detector fotométrico UV C-640 e coletor de frações C-660. Foram utilizados solventes como hexano, acetato de etila e metanol, adquiridos comercialmente. As colunas foram empacotadas com sílica gel (SiliaFlash® G60 da SiliCycle®, com partículas de 60-200 µm, 70-230 mesh, 60Å).

As frações obtidas por CLMP foram separadas por CCDA utilizando cromatofolhas de sílica gel 60 PF₂₅₄ da Silicycle® com suporte de alumínio, adquiridas comercialmente. As cromatoplasmas foram analisadas por exposição à luz UV utilizando dois comprimentos de ondas, 254 e 366 nm, no aparelho da marca Boitton (BOIT-LUB01). A revelação física das substâncias em análises foi realizada através da exposição das cromatoplasmas à luz ultravioleta (UV) em dois comprimentos de ondas, 254 e 366nm, utilizando o aparelho Mineralight modelo UVFL-58, e por borrifação do reagente Dragendorff. Após analisadas, as frações foram reunidas de acordo com a sua similaridade e pelo cromatograma gerado pelo equipamento de CLMP.

Para a CLAE em escala analítica foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu Proeminence, equipado com uma interface CBM-20A, sistema de degaseificação DGU-20A₃, módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AD, detector de arranjo de diodo SPD-M10A e autoinjeter AIL-20A. Foram utilizadas duas colunas analíticas da marca ACE 5 C18 (250 mm x 4,6 mm e partículas de 5 µm) conectada a uma pré-coluna C18 (4 mm x 3,0 mm e partículas de 5 µm), e a Kromasil 100-10-C18 (250 mm x 4,6 mm e partículas de 10 µm) com uma pré-coluna C18 (4 mm x 3,0 mm e partículas de 10 µm) e como fase móvel foi empregado metanol grau HPLC e água ultrapura tipo 1 obtida por sistema de purificação Millipore Direct-Q®, que foi acidificada com ácido trifluoracético 0,01%.

Para escala semi-preparativa, utilizou-se cromatógrafo da marca Shimadzu constituído por módulo de bombeamento de solvente binário LC-10ADvp, detector UV-vis SPD-10AVvp, forno CTO-10Avp, controlador SCL-10Avp, degaseificador DGU-14A e injetor manual com alça de amostragem de 100 μ L. Foi utilizada coluna da marca Venusil® XBP C18 com 250 mm de comprimento, 10 mm de diâmetro interno e 10 μ m de tamanho de partícula e pré-coluna C18 (4 mm x 3 mm de diâmetro interno preenchida com partículas 10 μ m). Foi empregado a mesma fase móvel da escala analítica.

Foram utilizados filtros em PVDF com poro de diâmetro de 0,45 μ m, aparelho de banho de ultrassom Unique-USC-1600 e centrífuga Hettich-Zentrifugen-Rotina 380R durante a preparação das soluções.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de ^1H (RMN de ^1H) e de ^{13}C (RMN de ^{13}C) foram obtidos em equipamentos da BRUKER ASCEND, a 400 (^1H) e 100 MHz, e VARIAN-SYSTEM 500 (^1H) e 125 (^{13}C) MHz, utilizando técnicas unidimensionais e bidimensionais. As amostras foram solubilizadas dimetilsufóxido, piridina, clorofórmio e metanol, da marca Cambrigde Isotope Laboratories. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) referenciados para RMN de ^1H pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteras destes solventes: dimetilsufóxido (δ_{H} 2,59) piridina (δ_{H} 7,55), clorofórmio (δ_{H} 7,24) e metanol (δ_{H} 3,30) e para os espectros de RMN de ^{13}C , os mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio (δ_{C} 77,00), metanol (δ_{C} 49,00). As constantes de acoplamento (J) em Hz. As multiplicidades de RMN de ^1H utilizadas foram: *s* (singleto), *d* (dubleto), *dd* (duplo dubleto), *ddd* (duplo duplo dubleto), *t* (tripelto), *tl* (tripleto largo) e *m* (multiplete). As análises foram realizadas no Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise da Universidade Federal da Paraíba (LMCA-UFPB).

Para obtenção dos espectros de massas das substâncias foi utilizado cromatógrafo da Shimadzu Proeminence UFLC, equipado com módulo de bombeamento de solvente binário LC-20AD, autoinjeter SIL-20A, sistema de degaseificação DGU-20A₃, detector de arranjo de diodo SPD-M10A e interface CBM-20A, acoplado à espectrômetro de massas de baixa resolução da marca Bruker, modelo Ion Trap - amaZon X utilizando técnica de Ionização por Eletrospray,

A coluna utilizada foi Phenomenex Gemini® C18 (250 mm x 4.6 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm), com pré-coluna SecurityGuard Gemini® C18 (4 mm x 3.0 mm d.i. preenchido com partículas 5 µm).

Os parâmetros de análise do Ion-Trap foram: capilar 4,5 kV, ESI no modo positivo, offset da placa final 500 V, nebulizador 24,5 psi, gás seco (N₂) com fluxo de 4,5 L/h e temperatura de 200 °C. A fragmentação de CID foi conseguida no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS. Os espectros (m/z 100-1000) foram registados a cada 2 s.

Para a caracterização química do óleo essencial foi utilizada a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa da marca Shimadzu – QP2010, equipado com uma coluna apolar de sílica Rtx-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Realizou-se a consulta à biblioteca NIST *Mass Spectral Library* (*National Institute of Standards and Technology*) para a identificação dos compostos.

4.2. Material vegetal

4.3. Coleta e identificação do material vegetal

As cascas do caule de *Xylopia frutescens* foram coletadas no município de Santa Rita, no estado da Paraíba, em abril de 2017. O material botânico foi identificado pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra. Uma exsicata dessa espécie encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB, sob registro Agra 7249.

A espécie em estudo foi cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional sob número A8B94C8.

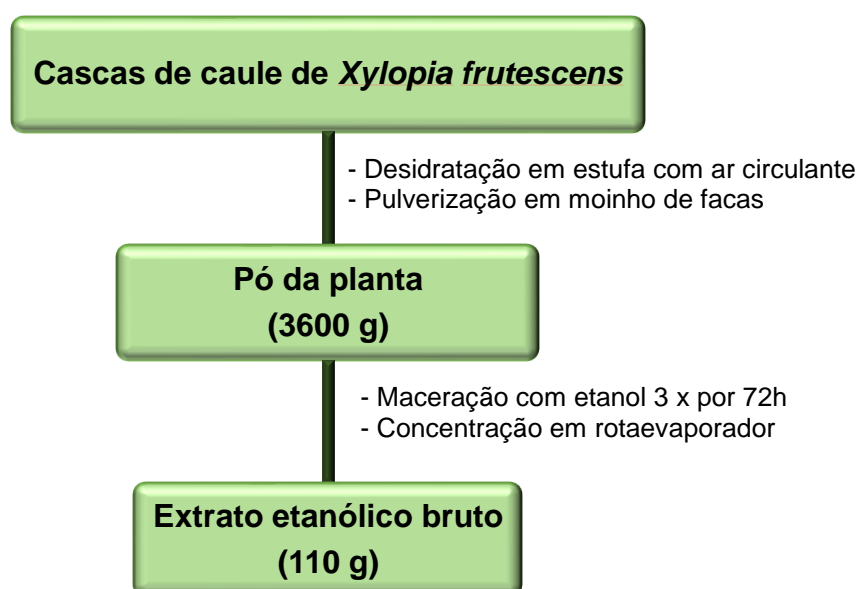
4.4. Processamento do material vegetal

O material vegetal foi submetido a uma desidratação em uma estufa com ar circulante, à temperatura média de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, foi realizada pulverização das cascas de caule em um moinho de facas, obtendo-se 3600g de pó seco da planta (Esquema 2, pag. 38).

4.5. Obtenção do extrato etanólico bruto

O material vegetal seco e pulverizado (3600 g) foi submetido à maceração com etanol 95% durante 72h, sendo esse procedimento repetido por três vezes, resultando em uma solução extrativa. Esta foi filtrada e evaporada em rotaevaporador sob pressão reduzida, à uma temperatura média de 40 °C, obtendo-se 110 g de extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 2, pag. 38).

Esquema 2. Obtenção do pó da planta e do extrato etanólico bruto.

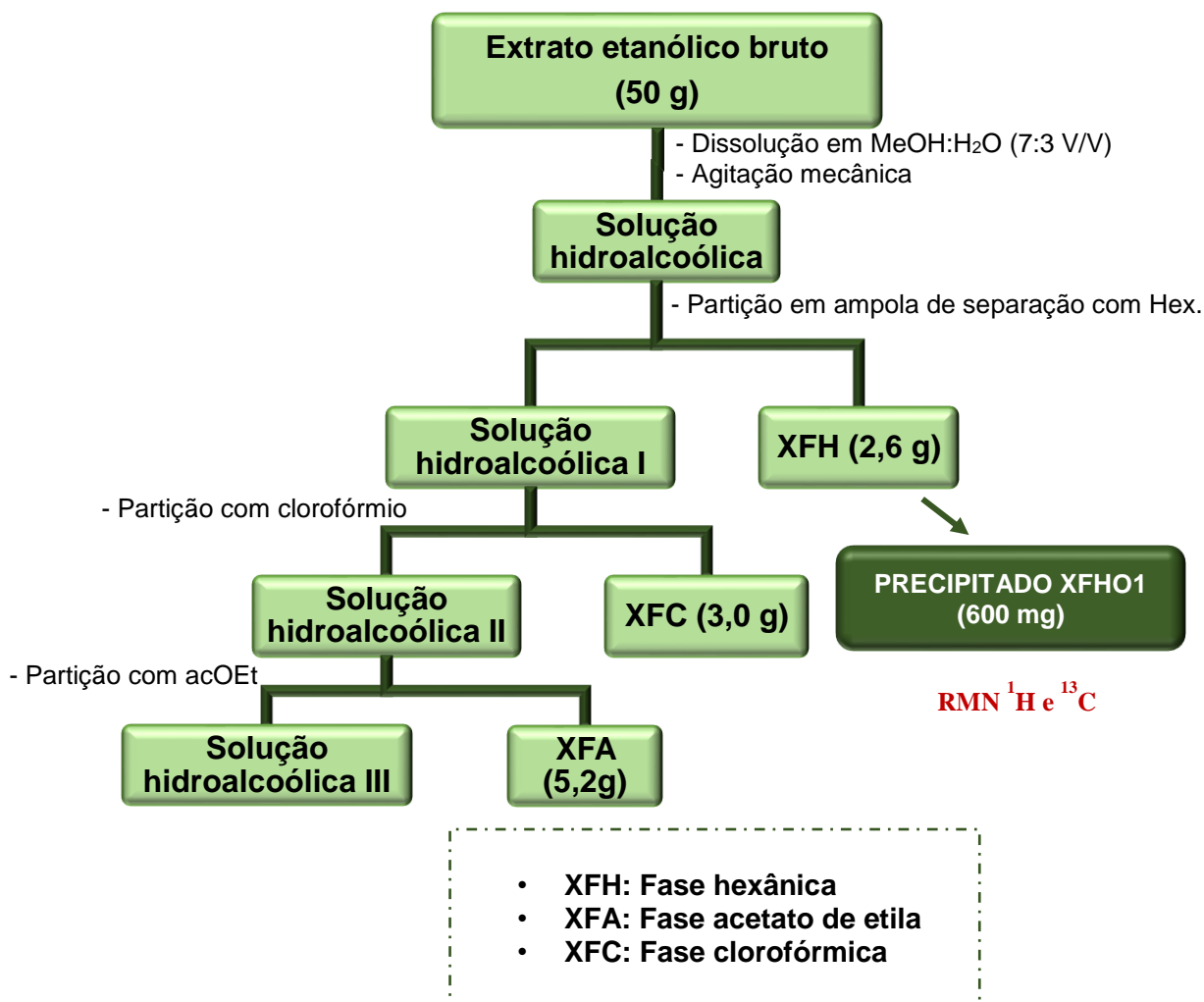


4.6. Particionamento do extrato etanólico bruto

Uma alíquota do extrato etanólico bruto (50 g) foi suspensa em 400 mL de uma solução metanol:água (7:3 v/v) e homogeneizada sob agitação mecânica. Desse processo resultou uma solução hidroalcoólica que foi submetida a uma partição líquido-líquido em uma ampola de separação, utilizando solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila, obtendo-se suas respectivas soluções extrativas (Esquema 3, pág. 39).

As soluções resultantes foram evaporadas em rotaevaporador à uma temperatura média de 40 °C, sob pressão reduzida, obtendo-se: 2,6 g da fase hexânica; 3,0 g da fase clorofórmica e 5,2 g da fase acetato de etila (Esquema 3, pág. 39).

Esquema 3. Particionamento do extrato etanólico bruto e obtenção das fases.



*Todas as fases obtidas foram secas em rotaevaporador.

Enquanto secagem, a fração hexânica formou um precipitado que foi separado, codificado como XFHO1 (600 mg) e encaminhado a RMN de ^1H e ^{13}C .

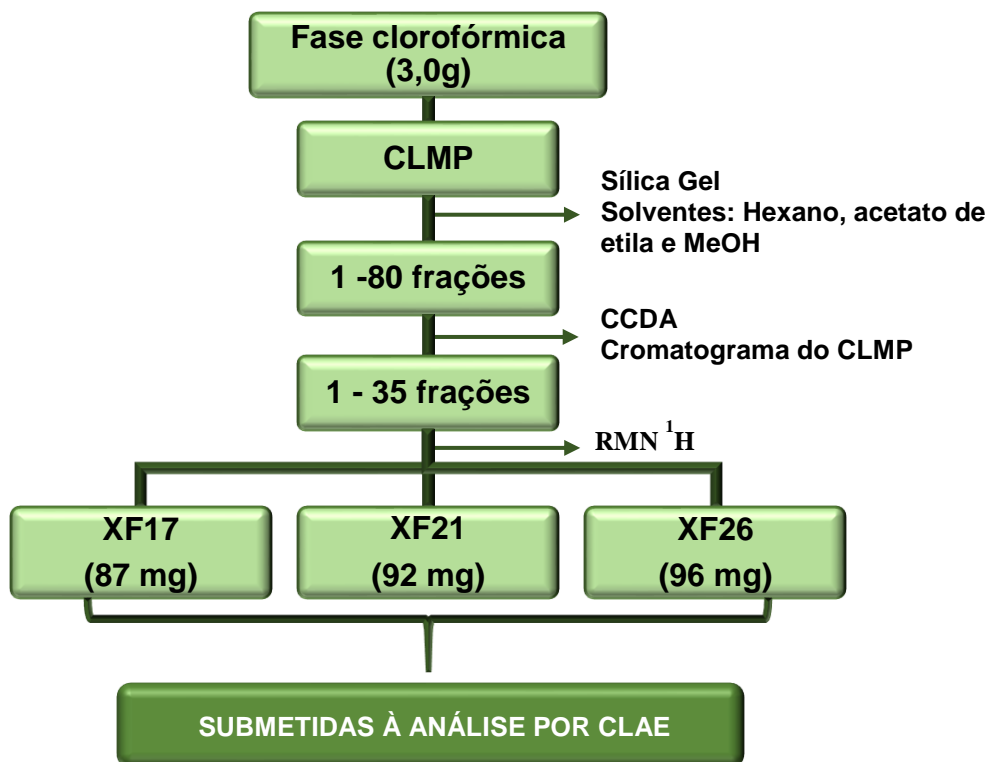
4.7. Fracionamento da fase clorofórmica

A fase clorofórmica (3,0 g) foi submetida a um fracionamento em cromatografia líquida de média pressão (CLMP) utilizando sílica gel como fase fixa e os solventes hexano, acetato de etila e metanol puros ou em misturas binárias, em ordem crescente de polaridade, como fase móvel. Utilizou-se um fluxo de 10 mL/min, obtendo-se ao final 80 frações de 50 mL cada. Estas foram evaporadas em rotaevaporador sob pressão reduzida, à uma temperatura média de 40°C. Após secas, foram analisadas por meio do cromatograma de UV gerado pelo equipamento e por CCDA, sendo agrupadas de acordo com a similaridade em 35 frações. Algumas frações resultantes desse processo foram encaminhadas para análise em RMN de ^1H e posteriormente selecionadas para análise em Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à detector de arranjo diiodo (CLAE-DAD) em escala analítica e fracionamento em escala semi-preparativa, entre elas a XF17 (87 mg), XF21 (92 mg) e XF26 (96 mg).

Tabela 1. Fracionamento da fase clorofórmica de *Xylopija frutescens*.

Frações	Solventes	Proporção (%)
1 – 3	Hexano	100
4 – 10	Hexano: Acetato de Etila	90:10
10 – 15	Hexano: Acetato de Etila	80:20
16 – 20	Hexano: Acetato de Etila	70:30
21 – 25	Hexano: Acetato de Etila	60:40
26 – 30	Hexano: Acetato de Etila	50:50
31 – 36	Hexano: Acetato de Etila	40:60
37 – 42	Hexano: Acetato de Etila	30:70
43 – 50	Hexano: Acetato de Etila	20:80
51 – 54	Hexano: Acetato de Etila	10:90
55 – 60	Acetato de Etila	100
61 – 68	Acetato de Etila: Metanol	90:10
69 – 75	Acetato de Etila: Metanol	80:20
75 – 80	Acetato de Etila: Metanol	70:30

Esquema 4. Fracionamento da fase clorofórmica.



A fração XF24 foi submetida à análise por CLAE acoplada ao espectrômetro de massas, utilizando um método gradiente de água acidificada com 0,1% de ácido fórmico e metanol, aumentando de 5 a 100% em 120 minutos.

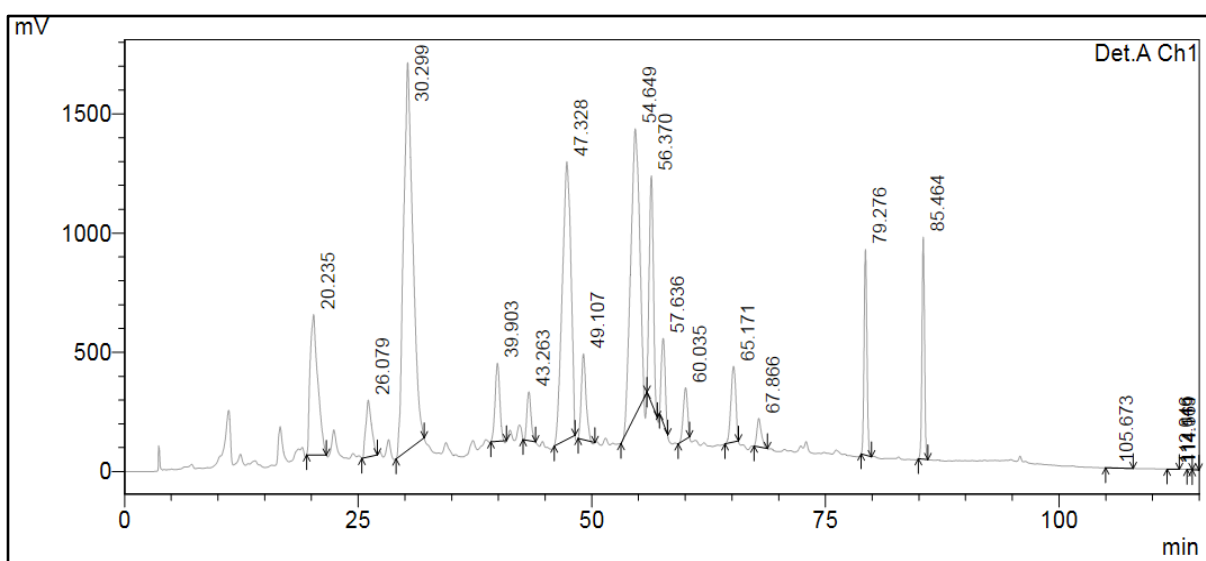
4.8. Procedimento cromatográfico de XF17, XF21 e XF26 por CLAE-DAD em escala analítica e semi-preparativa

As frações foram analisadas separadamente por CLAE-DAD em escala analítica, com a finalidade de desenvolver métodos eficientes e posterior transposições para um cromatógrafo semi-preparativo, para o isolamento das substâncias.

Para as análises por CLAE-DAD em escala analítica, foi preparada uma solução com 1 mg de cada amostra em 1 mL de metanol grau HPLC (1 mg mL^{-1}), submetidas à filtração em filtro PVDF. Utilizou-se fase estacionária reversa (C-18) e como fase móvel água ultrapura acidificada (0,01% ácido trifluoracético) e metanol grau HPLC. As injeções foram de 20 μL cada. As análises foram otimizadas e resultaram em um método eficaz para cada amostra.

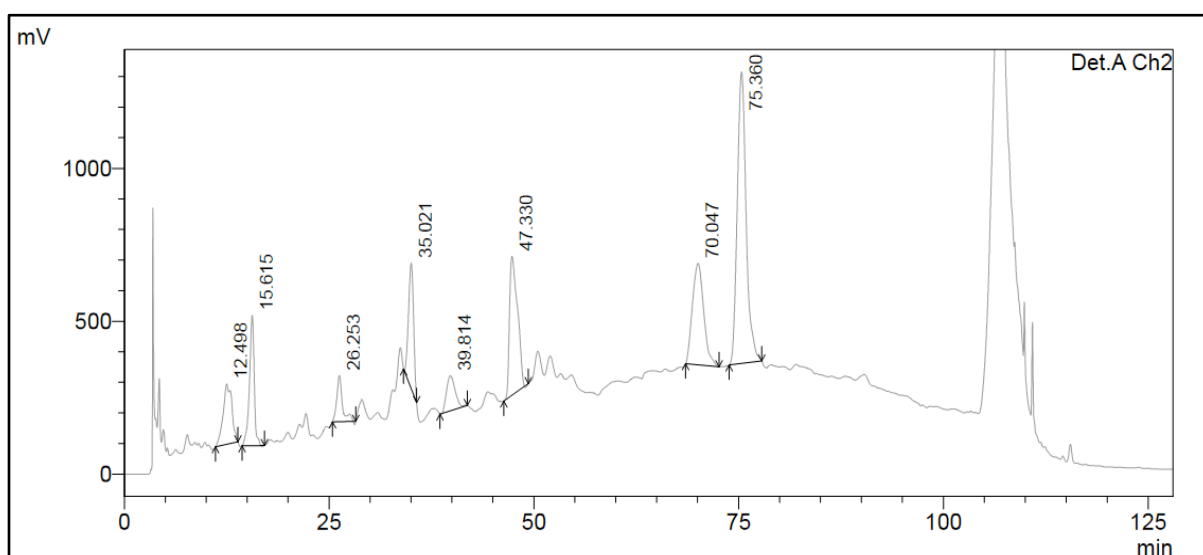
O método mais eficaz para a fração XF17 foi o sistema gradiente, no qual a concentração de metanol variou de 20 a 100% em um tempo de 90 minutos, com um fluxo de $0,6 \text{ mL min}^{-1}$. Na transposição para o cromatógrafo semi-preparativo, preparou-se uma solução com 87 mg da amostra em 1 mL de metanol, foi centrifugada a 15.000 rpm, durante 5 minutos à 4°C , e posteriormente filtrada, com uma concentração final de 87 mg/mL. Foram realizadas 10 injeções de 100 μL cada, utilizando o mesmo método do cromatógrafo analítico, mas agora com o fluxo de $3,5 \text{ mL min}^{-1}$. No cromatograma (Fig. 8, pag. 42) mostrou a presença de 15 picos principais.

Figura 8. Cromatograma da fração XF17 obtida por CLAE-DAD semi-preparativo em 254nm.



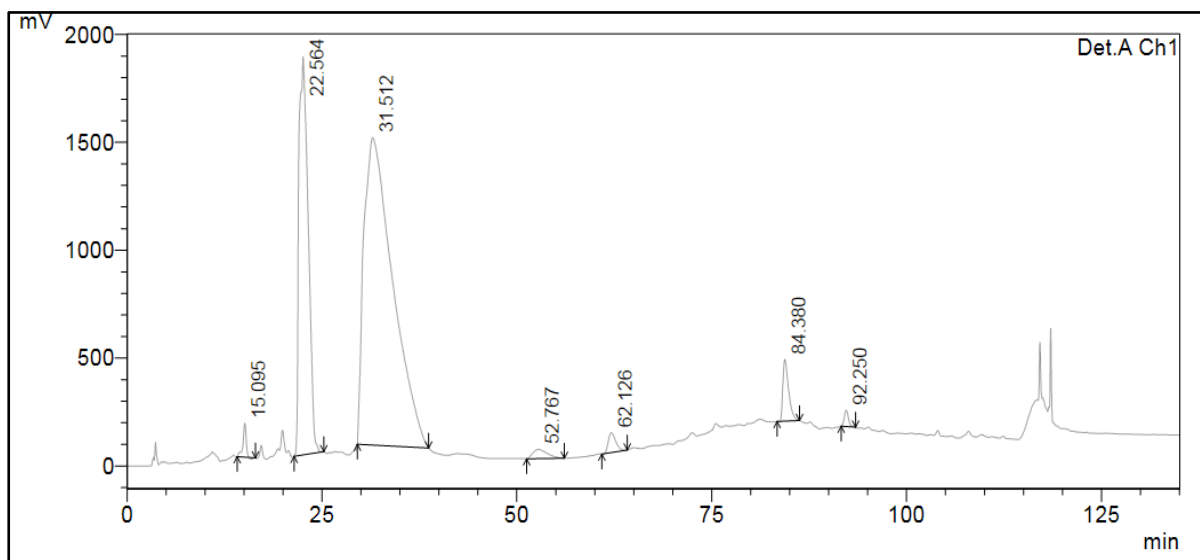
Para a fração XF21, no sistema gradiente a concentração de metanol variou de 30 a 40% por 20 minutos, e de 40 a 65% por 80 minutos, com um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. A amostra (90 mg) foi preparada nas mesmas condições da amostra anterior para o cromatógrafo semi-preparativo, porém resultando em uma solução com concentração aproximada de 90 mg/mL. Foram realizadas 10 injeções de 100 µL cada, utilizando o mesmo método do cromatógrafo analítico, mas agora com o fluxo de 3,5 mL min⁻¹. No cromatograma (Fig. 9, pág. 43) mostrou a presença de 8 picos principais, sendo o pico 3 codificado como XF2103 e encaminhado a RMN para análises.

Figura 9. Cromatograma da fração XF21 obtida por CLAE-DAD semi-preparativo em 254nm.



O gradiente de metanol da fração XF26, variou de 20 a 40% em 20 minutos, se manteve em 40% por 30 minutos, e posteriormente foi aumentando para 80% por 60 minutos, com um fluxo de 0,6 mL min⁻¹. Essa amostra (98 mg) também foi preparada nas mesmas condições para o cromatógrafo semi-preparativo, chegando a uma concentração de aproximadamente 98 mg/mL. Foram realizadas o mesmo número de injeções da amostra anterior, utilizando o mesmo fluxo. O cromatograma na figura 10, pág. 44 mostra a presença de 7 picos.

Figura 10. Cromatograma da fração XF26 obtida por CLAE-DAD semi-preparativo em 254nm.



Todas as frações obtidas pelo cromatógrafo semi-preparativo foram secas em rotaevaporador, à uma temperatura média de 40°C, sob pressão reduzida.

4.9. Obtenção do óleo essencial e caracterização química

O óleo essencial foi obtido por arraste de vapor d'água, utilizando equipamento tipo Clevenger, da marca Marconi, modelo M480.

A caracterização química do óleo foi realizada no CG-EM utilizando as seguintes condições: ionização por impacto de elétrons a 70 eV; hélio como gás de arraste e fluxo de 1,2 mL/min; injetor no modo split (1:10); gradiente crescente de temperatura de 3 °C/min, de 50 a 280 °C. As temperaturas do injetor e detector foram de 200 e 280 °C, respectivamente. Os espectros foram obtidos numa faixa m/z 12 – 600 Da.

A identificação dos compostos presentes no óleo essencial foi realizada através da análise dos espectros de massa e consulta à biblioteca *NIST Mass Spectral Library* (*National Institute of Standards and Technology*).

4.10. Atividade antimicrobiana

Os ensaios laboratoriais referentes a este estudo foram realizados no Laboratório de Pesquisa: Atividade Antibacteriana e Antifúngica de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Departamento de Ciências Farmacêuticas/ Centro de Ciências da Saúde/ Universidade Federal da Paraíba em dezembro de 2018.

4.11. Amostra

Foi avaliada a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial das cascas de caule de *Xylopiya frutescens*. Este foi submetido aos ensaios biológicos para avaliação da atividade antimicrobiana sobre cepas de bactérias e fungos. O óleo foi pesado e devidamente solubilizado em dimetil-sulfóxido (DMSO) numa proporção de até 10%, tween 80 a 0,02%, completando-se o volume final com água destilada esterilizada de forma a se obter uma emulsão do produto na concentração inicial de 1024 µg/mL (CLEELAND; SQUIRES, 1991; NASCIMENTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2014).

4.12. Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados nos ensaios para manutenção foram *Brain Heart Infusion* (BHI), *Agar Sabouraud Dextrose* (ASD) adquiridos da Difco Laboratories Ltd, USA, France, para manutenção, respectivamente, das cepas de bactérias e fungos. E para os ensaios de atividade biológica, foram usados meio nutriente líquido *Brain Heart Infusion* (BHI) para as bactérias e RPMI 1640 com *L*-glutamina e sem bicarbonato para os fungos (Difco Laboratories Ltd, USA, France e INLAB, São Paulo, Brasil). Todos os meios foram preparados conforme as descrições dos fabricantes.

4.13. Microrganismos

Para os ensaios de atividade biológica dos produtos testes, foram utilizadas as seguintes cepas de bactérias: *Staphylococcus aureus* ATCC-6538, *Staphylococcus*

epidermidis ATCC-12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027, *Escherichia coli* LM-39, *Morganella morganii* LM-339, e fungos leveduriformes: *Cryptococcus gattii* INCQS-40113, *Candida tropicalis* ATCC- 13803.

Os microrganismos pertencem a MICOTECA do Laboratório de Micologia, Departamento de Ciências Farmacêuticas (DCF), Centro de Ciências da Saúde (CCS) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As cepas foram mantidas em BHI/bactérias e em ASD/fungos à temperatura de 4 °C. Foram utilizados para os ensaios, repiques de 24 - 48 horas em BHI/ASD, respectivamente, para bactérias e leveduras, incubados a 35 ± 2 °C.

4.14. Inóculo

Para preparação do inóculo, as colônias obtidas de culturas das cepas de bactérias em meio BHI e fungos em meio ASD, foram suspensas em solução fisiológica a 0,9% estéril e ajustadas de acordo com o tubo 0,5 da escala padrão de Mc Farland para obtenção de 10^6 UFC/mL (CLSI, 2015; CLSI^a, 2008; HADACECK; GREEGER, 2000; CLEELAND; SQUIRES, 1991; ANTUNES et al., 2006; ABERKUME et al., 2002; FREIRE et al., 2014).

4.14.1. Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados conforme os protocolos de Cleeland & Squires (1991), Eloff (1998) e CLSI (2008). A determinação da CIM das amostras sobre cepas bacterianas e fúngicas foram realizadas através da técnica de microdiluição em meio líquido em placa para cultura de células (TPP/SWITZERLAND/EUROPA) contendo 96 poços com fundo em “U”. Inicialmente, foram distribuídos 100 µL de caldo RPMI/BHI duplamente concentrado nos poços das placas de microdiluição. Em seguida, 100 µL das substâncias foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada a uma razão de dois, foram obtidas concentrações de 1024 µg/mL até 4 µg/mL. Por fim, foi adicionado 10 µL das suspensões das cepas bacterianas e fúngicas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se, especificamente, a uma espécie. Paralelamente, foram realizados os controles: micro-organismos (CBHI + bactérias e RPMI + fungos)

e meio de cultura (RPMI/CBHI), para comprovação da viabilidade das cepas e esterilidade do meio e controle negativo com antibióticos: Gentamicina (64 µg/mL) para inibição das bactérias e Anfotericina B (32 µg/mL) para inibição dos fungos. As placas preparadas foram assepticamente fechadas e submetidas à incubação numa temperatura de $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 horas para os ensaios com bactérias e leveduras.

No caso do ensaio biológico com as bactérias, após 24 h de incubação, foi adicionado 20 µL de solução do corante resazurina a 0,01% (INLAB), reconhecido como um indicador colorimétrico de óxido-redução (MANN; MARKAN, 1998). O ensaio foi incubado a $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 - 48 h. Após a mudança de coloração do corante (azul para vermelho), considerou-se como indicador de crescimento microbiano; e se a cor permanece azul, significa a ausência de crescimento microbiano. A CIM para cada produto foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento microbiano e/ou verificado pela permanência da coloração do corante indicador.

A atividade antimicrobiana dos produtos foi interpretada e considerada como ativa ou inativa, conforme os seguintes critérios: até 600 µg/mL= forte atividade; 600-1500 µg/mL= moderada atividade; > acima de 1500 µg/mL=fraca atividade ou produto inativo (HOLETZ et al., 2002; SARTORATTO et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).



Resultados e discussão

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Identificação estrutural de XFH01

O composto XFH01 foi isolado como um precipitado cristalino incolor da fase hexânica, solúvel em clorofórmio, pesando 600 mg.

O espectro de RMN de ^1H , 400 MHz, obtido em CDCl_3 , apresentou características que inferem ser da classe dos terpenoides, observado por um envelope de sinais de 0,6-2,2 ppm, com multiplicidades não resolvidas.

No espectro de RMN de ^{13}C -APT, 100 MHz, observou-se a presença 33 sinais, dos quais, dois foram típicos de carbono com dupla terminal, presente em esqueleto de diterpeno do tipo caurano, δ_c 155,8 (C-17) e δ_c 102,9 (C-16) e sinais que são característicos de anel ciclopropano de diterpenos do tipo traquilobano, δ_c 20,2 (C-12), δ_c 22,3 (C-16) e δ_c 24,2 (C-13), sugerindo-se que a amostra se trata de uma mistura de diterpenos agora denominados de XF1701b e XF1701a, respectivamente (OHNO & MABRY, 1979; FRAGA, 1994).

O sinal em δ_c 184,5 mostrou a presença de ácido carboxílico, que associado aos deslocamentos em δ_c 28,9 e δ_c 28,8 das metilas C-18 dos dois diterpenos, foi possível identificar a orientação equatorial das metilas e por consequente, a orientação axial dos grupos carboxílicos. Os demais sinais estão compilados na tabela 2, pág 50.

Desta forma, de acordo com os dados de RMN de ^{13}C em comparação com a literatura (OHNO & MABRY, 1979), e (FRAGA, 1994), foi possível identificar os diterpenos como sendo o ácido *ent*-caur-16-en-19-óico (XFH1701b) e ácido *ent*-traquiloban-19-óico (XFH1701b). Os diterpenos são uma das classes de metabólitos secundários mais presentes em espécies do gênero *Xylopi*a (BARBOSA; VEGA, 2017), como *Xylopi*a *aethiopica* (NGOUELA et al., 1998) e *Xylopi*a *sericea* (TAKAHASHI; VIEIRA; BOAVENTURA, 2001), sendo o ácido *ent*-caur-16-en-19-óico relatado pela primeira vez para a espécie *Xylopi*a *frutescens*.

Tabela 2. Dados de RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de XFH01a e XFH01b em comparação com os dados da literatura (FRAGA, 1994) e (OHNO & MABRY, 1979), respectivamente.

Posição	XFH01a	Literatura	XFH01b	Literatura
	δ_c	δ_c	δ_c	δ_c
1	39,6	39,5	40,6	40,8
2	18,6	18,7	19,0	19,2
3	37,7	37,8	37,7	37,8
4	43,7	43,7	43,7	43,9
5	56,9	57,0	57,0	57,2
6	21,7	21,8	21,8	21,9
7	39,1	39,2	41,2	41,4
8	40,6	40,8	44,2	44,3
9	52,7	52,2	55,0	55,3
10	38,8	38,9	39,6	39,8
11	19,7	19,7	18,4	18,5
12	20,5	20,6	33,0	33,2
13	24,2	24,3	43,8	43,9
14	33,0	33,1	39,6	39,8
15	50,3	50,4	48,9	49,1
16	22,3	22,4	155,8	155,9
17	19,7	20,6	102,9	103,1
18	28,8	28,9	28,9	29,0
19	184,5	184,7	184,5	185,1
20	12,4	12,5	15,5	15,6

*Todos os experimentos foram realizados em CDCl_3 .

Figura 11. Estruturas ácido *ent*-caur-16-en-19-óico (XF1701b) e ácido *ent*-traquiloban-19-óico (XF1701a).

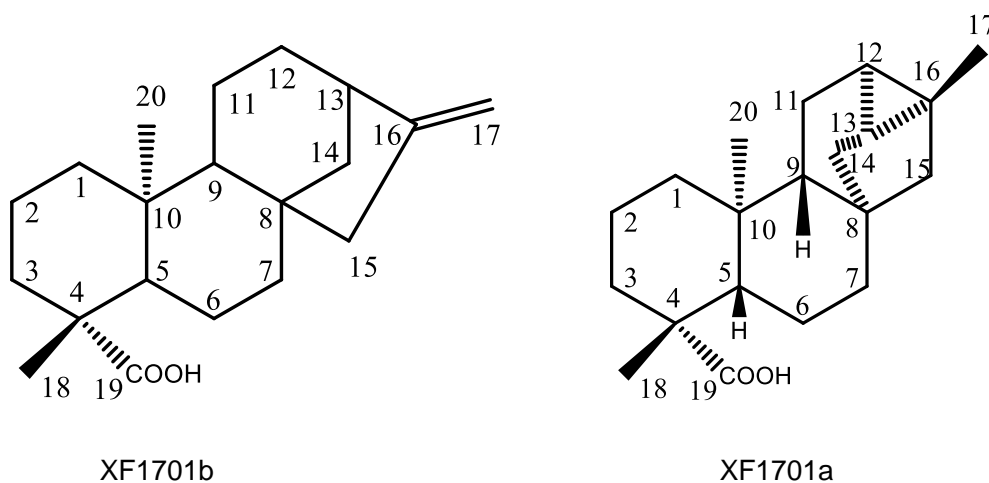


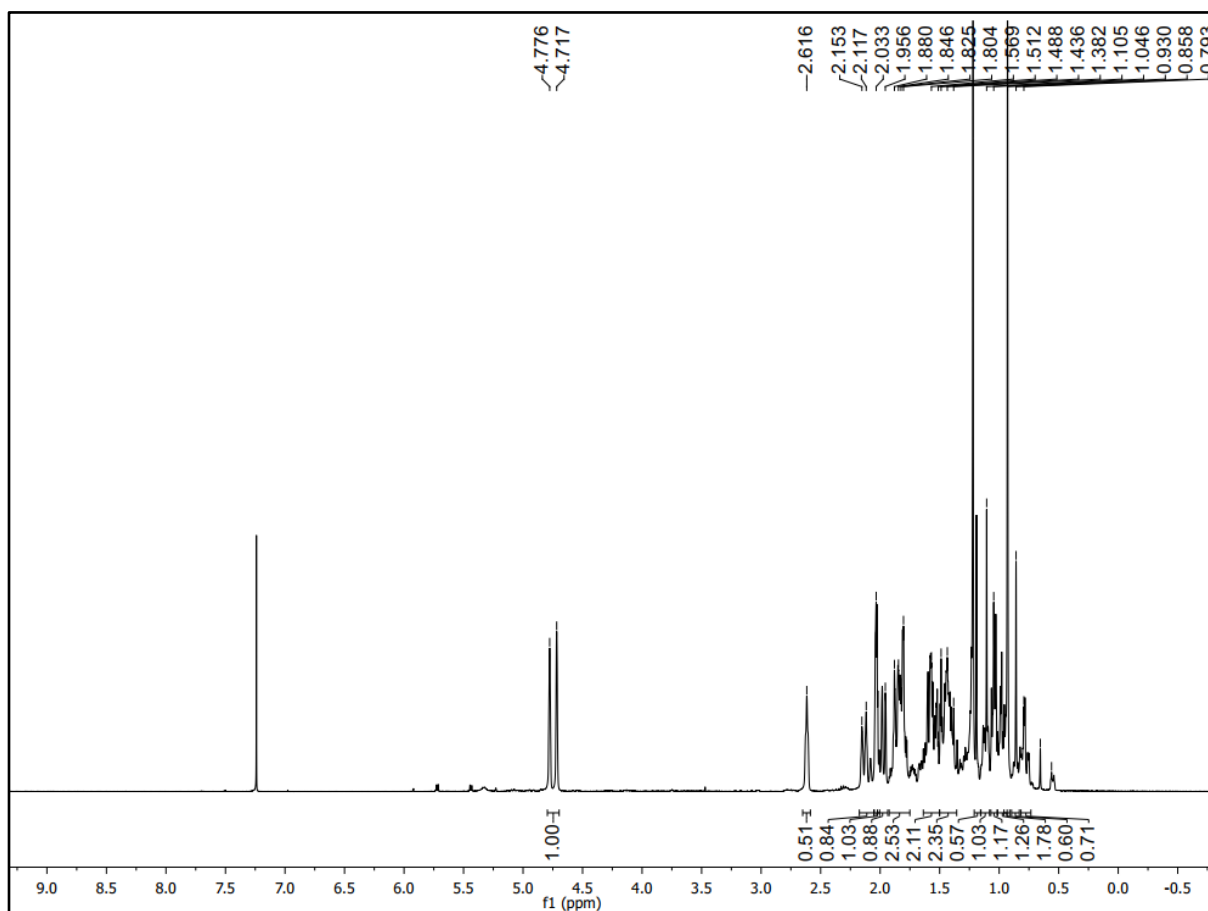
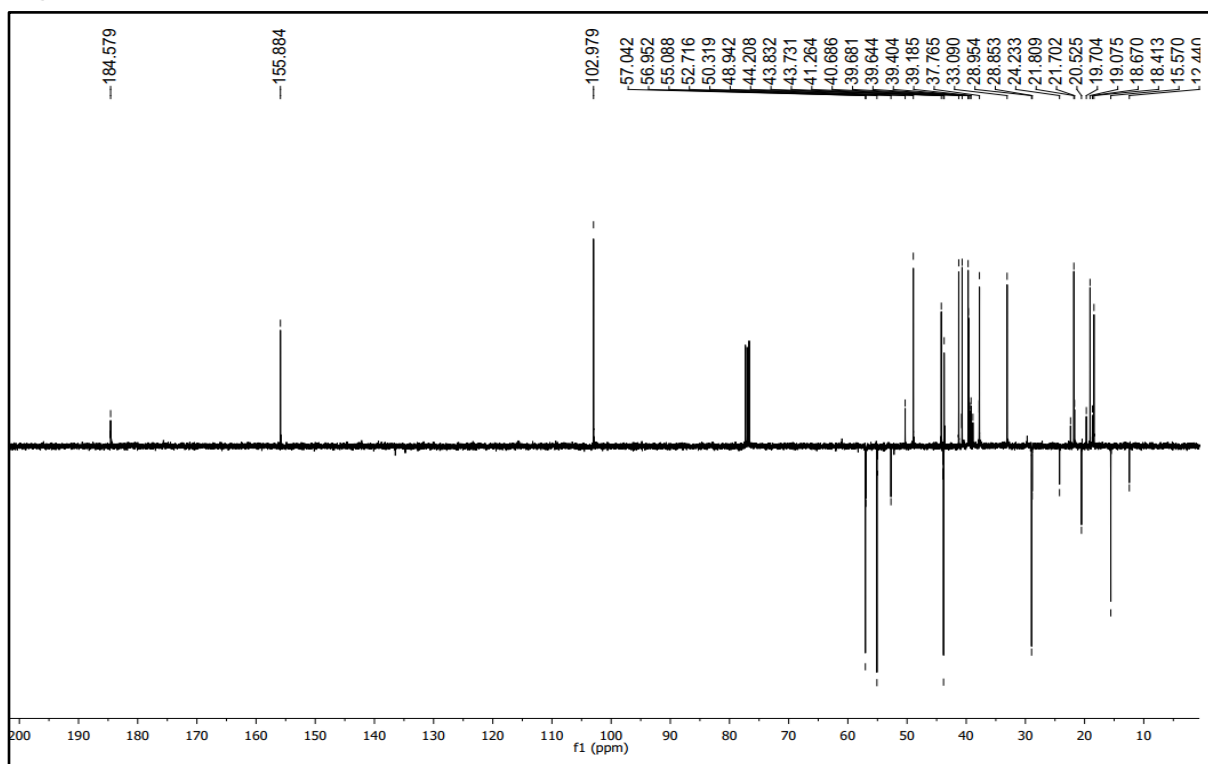
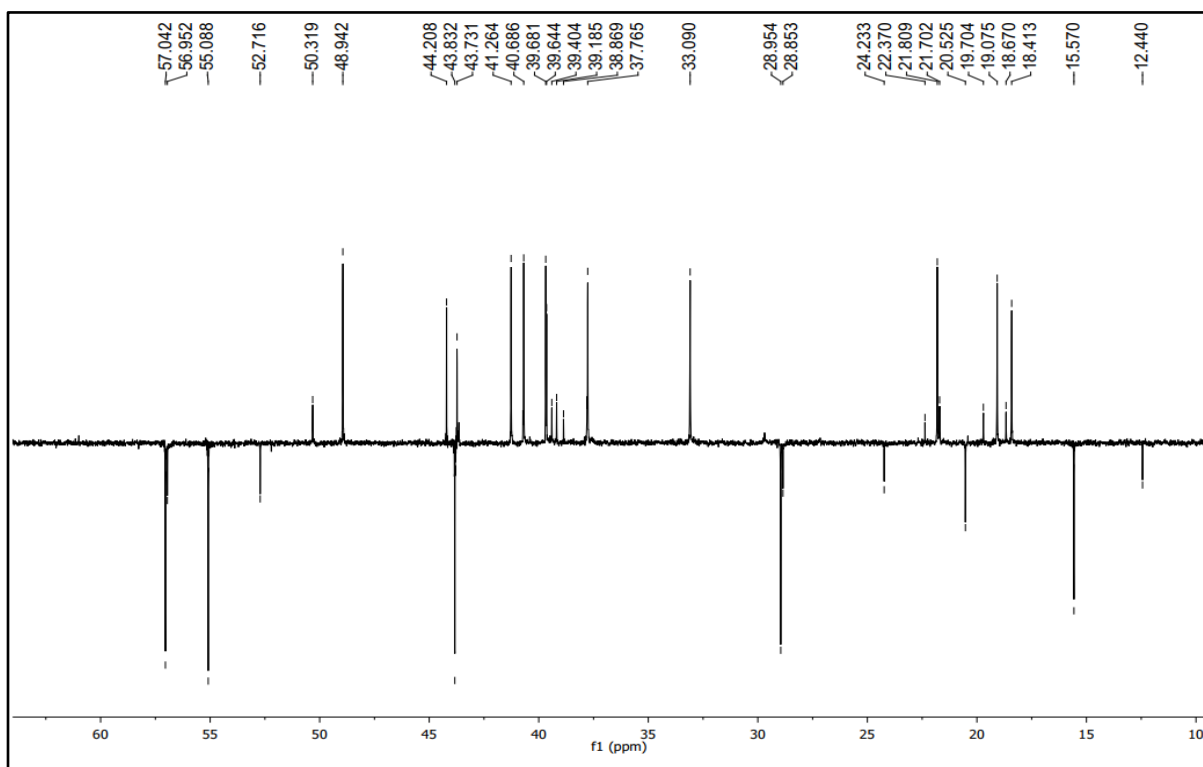
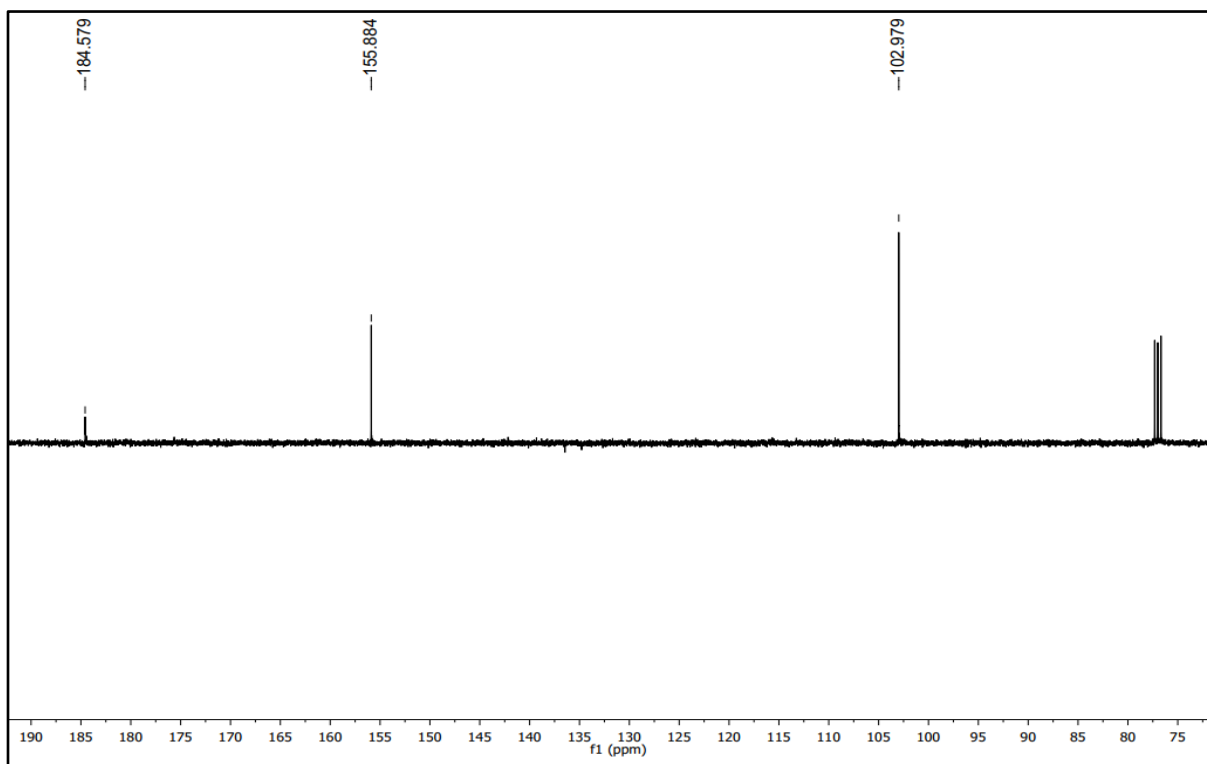
Figura 12. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de XFH01.**Figura 13.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de XFH01.

Figura 14. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de XFH01.**Figura 15.** Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de XFH01.

5.2. Identificação estrutural de XF1704

A substância XF1704 foi isolada da fase clorofórmica, fração 17 por CLAE-DAD semi-preparativa, pesando 3 mg e caracterizada como um sólido amorfo.

No espectro de RMN de ^1H , a 500 MHz, realizado em DMSO, observou-se a presença de sinais relativos de hidrogênios na região de sistemas aromáticos, dos quais dois apontavam deslocamentos típicos de esqueleto berberínico, o δ_{H} 9,55 (s, 1H, H-8) e δ_{H} 8,88 (s, 1H, H-13). Juntamente com esses sinais, os tripletos em δ_{H} 3,22 (t, 2H, $J= 6,5$ Hz) e δ_{H} 4,79 (tl, 2H) de grupos metilênicos foram atribuídos aos H-5 e H-6, respectivamente, sendo estes compatíveis com esqueleto protoberberínico.

Os singletos em torno de 4,0 ppm com integral para três hidrogênios cada foram atribuídos aos grupos metoxílicos, sugerindo a inserção destes em C-2, C-3, C-10 e C-11, uma vez que os sinais na região de aromáticos apresentam-se como singletos, sugerindo-se tratar de um esqueleto pseudoprotoberberínico.

Todos os sinais estão compilados na tabela 3, pág. 54 e quando comparados com os dados descritos na literatura (LAHM et al., 2015), foi possível identificar a substância XF1704 como o alcaloide pseudopalmatina. Corroborando ao RMN de ^1H o espectro de massas (Figura 19, pág. 56) apresentou um pico da substância protonada $[\text{M}+\text{H}]^+$ com m/z 352. Essa substância está sendo isolada pela primeira vez para espécie *Xylopi* *frutescens*.

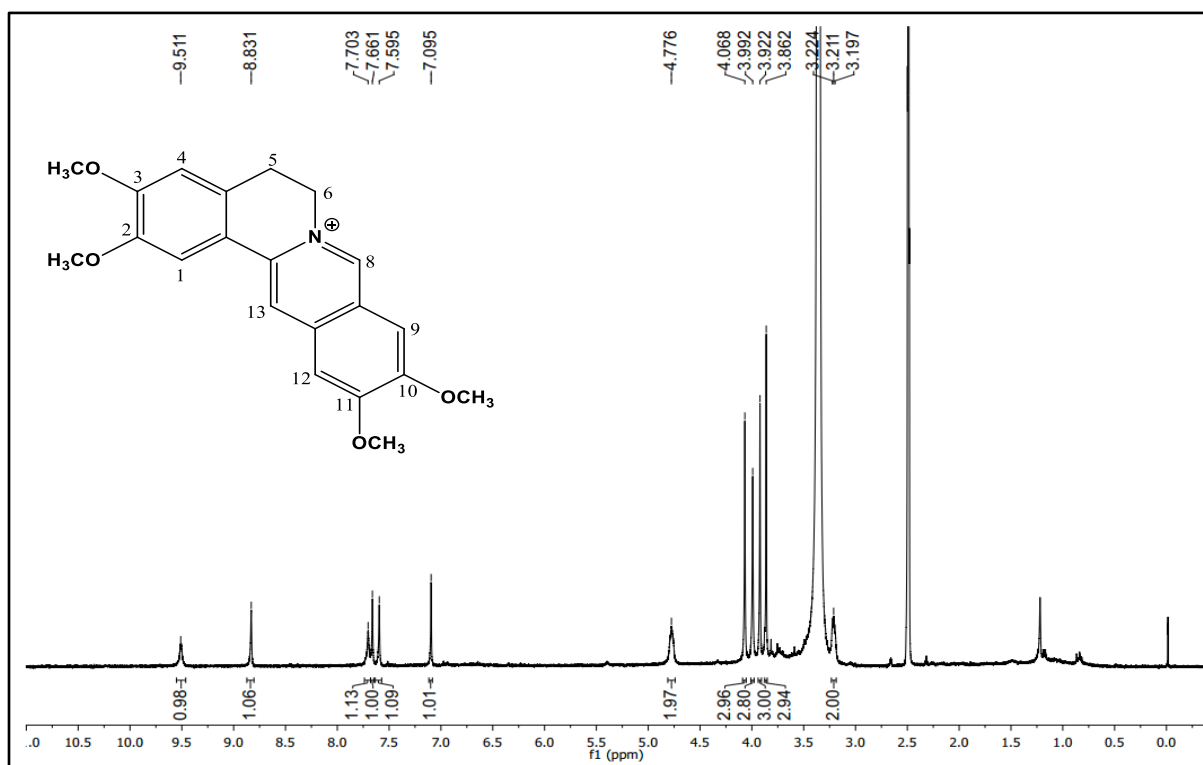
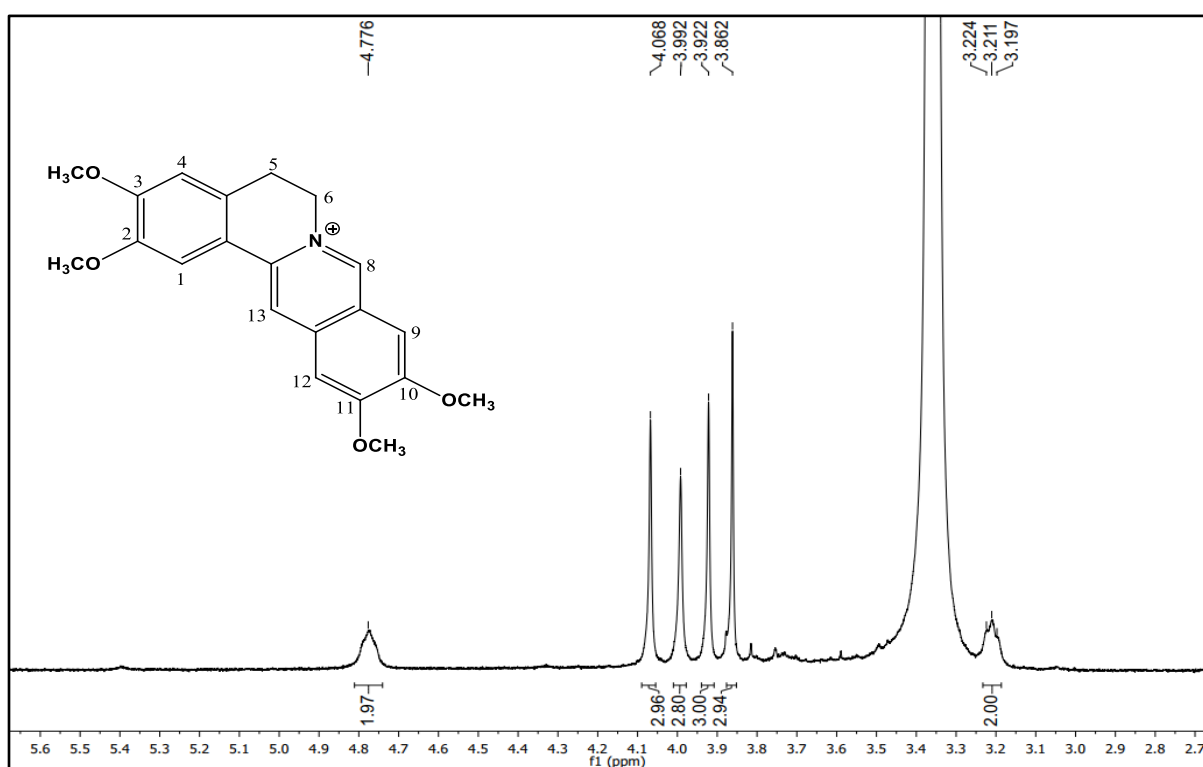
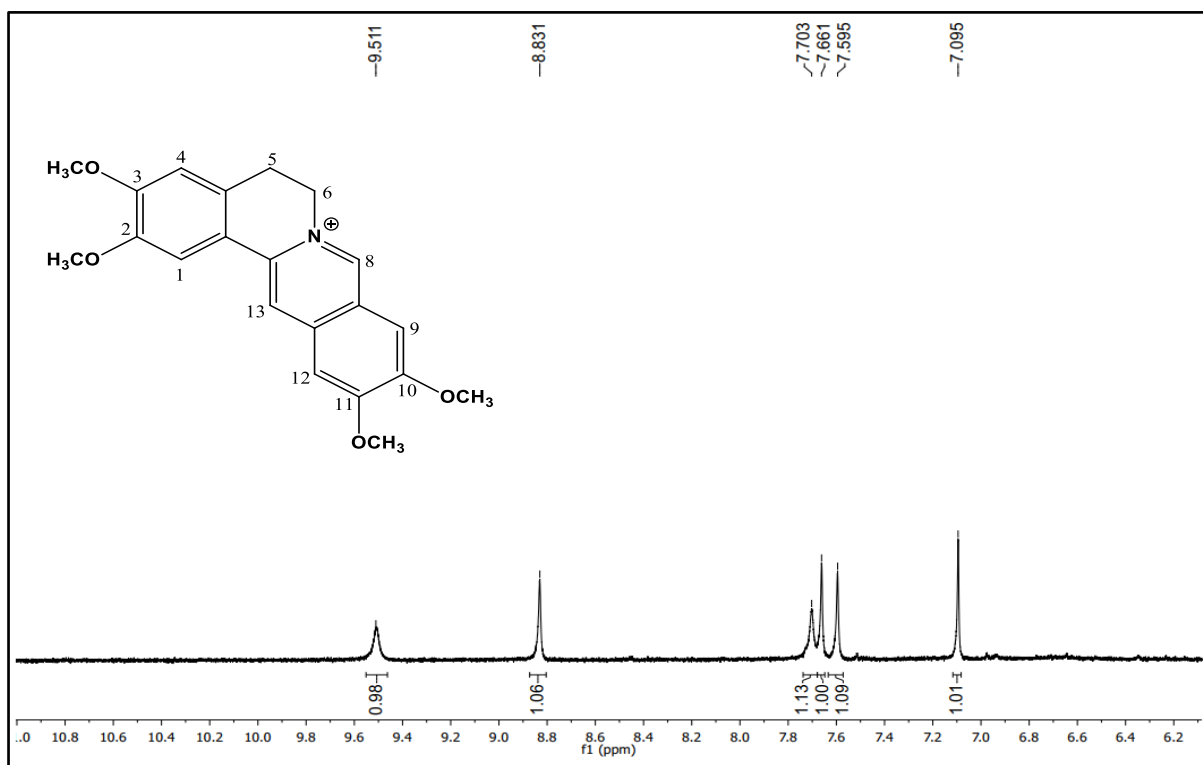
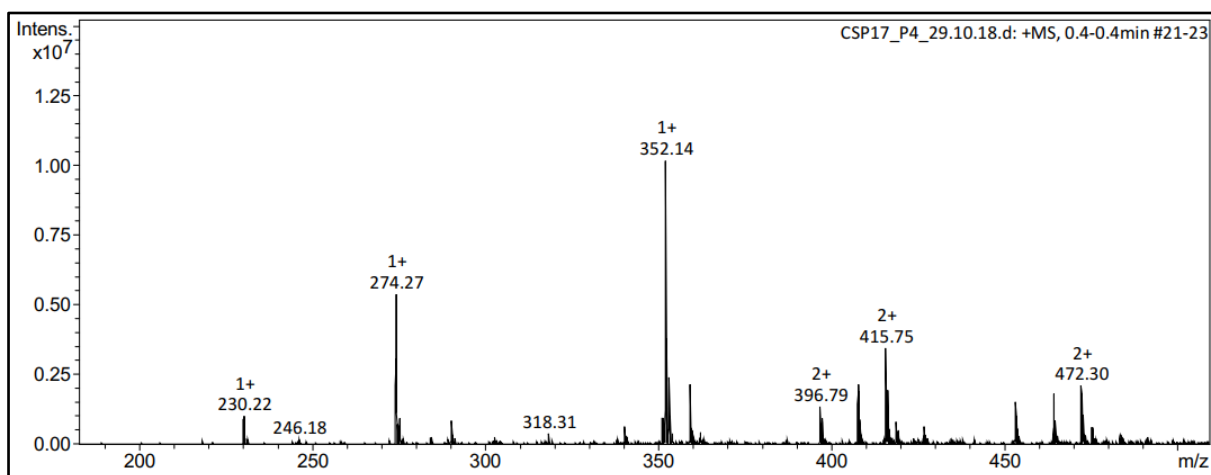
Figura 16. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de XF1704.**Figura 17.** Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de XF1704.

Figura 18. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, DMSO) de XF1704.**Figura 19.** Espectro de massas de baixa resolução, modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ de XF1704.

5.3. Identificação estrutural de XF1707

A substância XF1707 foi isolada da fase clorofórmica, fração 17, na forma de um pó alaranjado, pesando 5 mg.

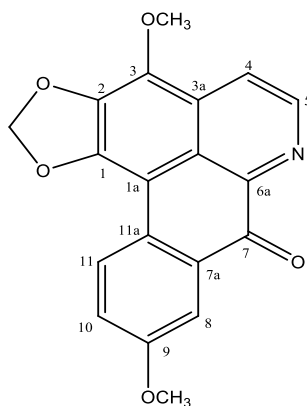
A análise do espectro de RMN ^1H , a 400 MHz, realizado em $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, mostrou uma feição de uma estrutura aporfinoide, do tipo oxoaporfínico pela ausência de sinais na região de hidrogênios de sistemas alifáticos, bem como a presença dos dubletos em δ_{H} 9,06 (d, $J=5,2$ Hz) e δ_{H} 8,21 (d, $J=5,2$ Hz), com integrais para um hidrogênio, atribuídos aos H-5 e H-4 do anel piridínico, respectivamente.

A presença de sinais na região de hidrogênios de sistemas aromáticos em δ_{H} 8,60 (d, 1H, $J= 8,9$ Hz), δ_{H} 7,48 (dd, 1H, $J=9,2$ e 2,8 Hz) e δ_{H} 8,27 (d, 1H, $J= 2,4$ Hz) referentes a H-11, H-10 e H-9, respectivamente, indicou a presença do anel D 1,2,4-trissubstituído do sistema aporfínico. Aliado a isto, o singleto em δ_{H} 4,16 com integração para três hidrogênios foi atribuído ao grupo metoxila nesse anel em C-4.

Um singleto em δ_{H} 6,66, com integral para dois hidrogênios, apontou a presença de metileno dióxido em C-1 e C2, e o singleto em δ_{H} 3,79, com integral para 3 hidrogênios, foi atribuído a uma metoxila em C-3, mostrando toda substituição do anel A. Os sinais estão compilados na tabela 4, pág. 58.

O espectro de massas (Figura 23, pág. 60) realizado no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ apresentou um pico com m/z 336, que associado aos dados de RMN de ^1H e em comparação com dados da literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1997), foi possível identificar a substância XF1707 como o alcaloide oxobuxifolina, sendo descrita pela primeira vez para a espécie em estudo.

Tabela 4. Dados de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de XF1707, em comparação com a literatura (BARBOSA-FILHO et al., 1997) nas mesmas condições.



Posição	XF1707 ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	Referência ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)
	δ_{H}	δ_{H}
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	-	-
3a	-	-
4	8,17 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz)	8,21 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz)
5	9,06 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz)	9,06 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz)
6	-	-
6a	-	-
7	-	-
7a	-	-
8	8,27 (d, 1H, $J = 2,4$ Hz)	8,30 (d, 1H, $J = 2,9$ Hz)
9	-	-
10	7,48 (dd, 1H, $J = 2,8$ e 9,2 Hz)	7,48 (dd, 1H, $J = 2,9$ e 8,9 Hz)
11	8,60 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz)	8,63 (d, 1H, $J = 8,9$ Hz)
11a	-	-
-O-CH ₂ -O-	6,30 (s, 2H)	6,66 (s, 2H)
3 OCH ₃	3,79 (s, 3H)	3,87 (s, 3H)
9 OCH ₃	4,16 (s, 3H)	4,22 (s, 3H)

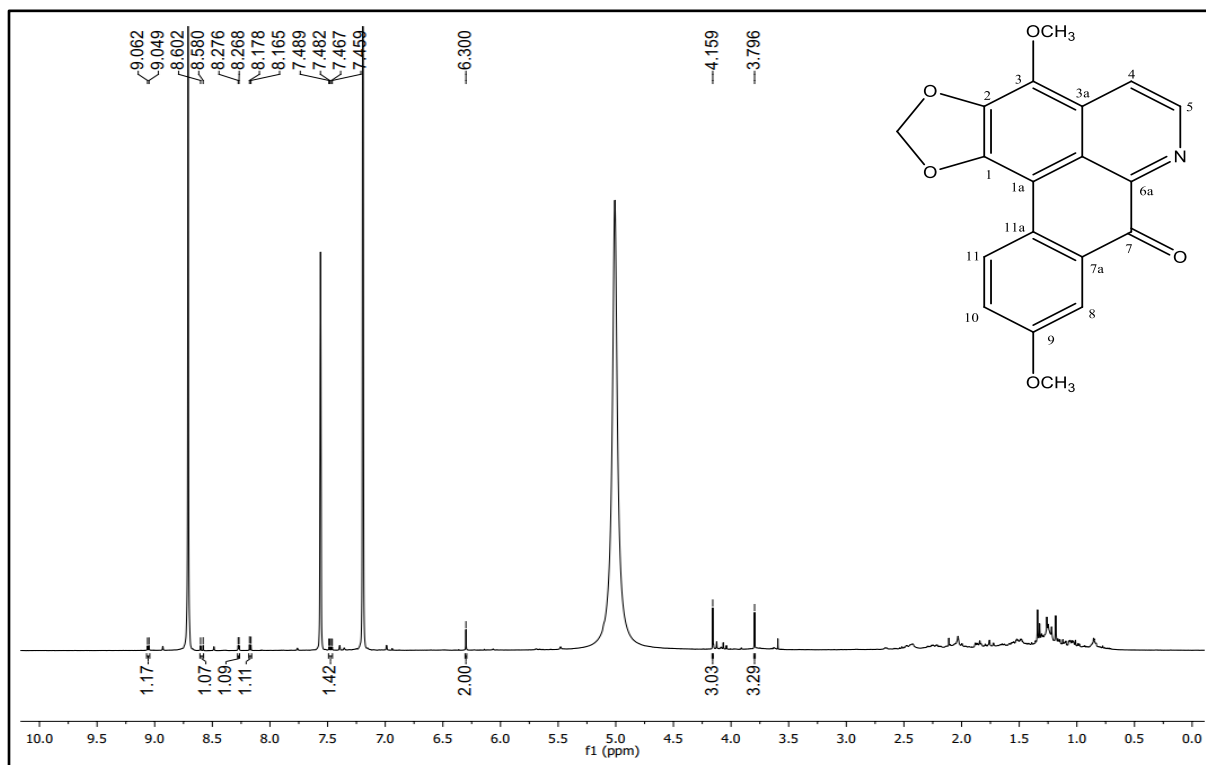
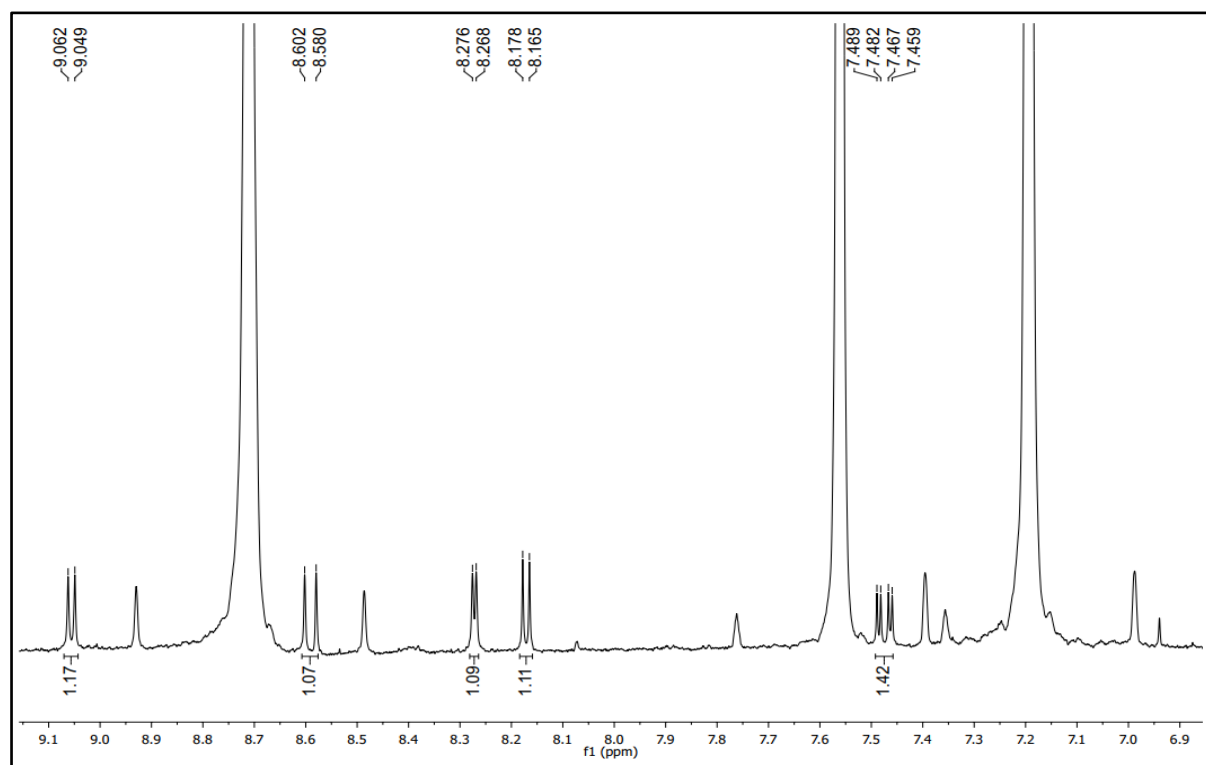
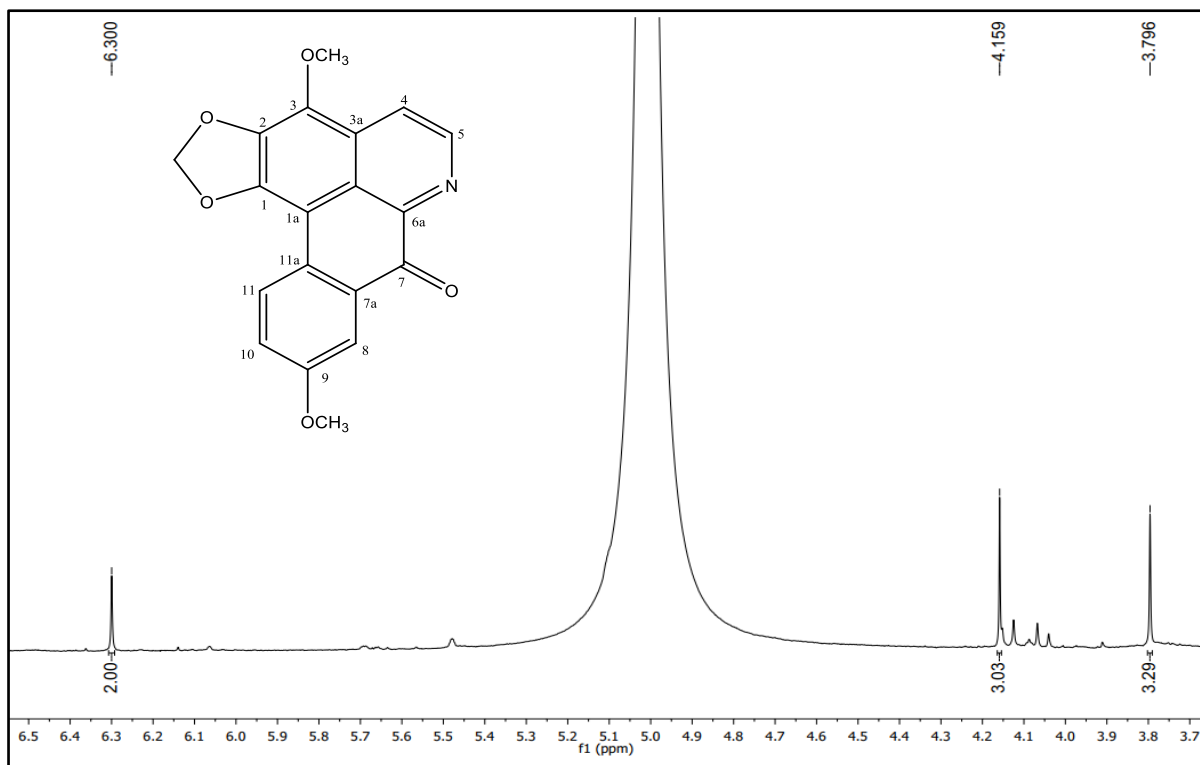
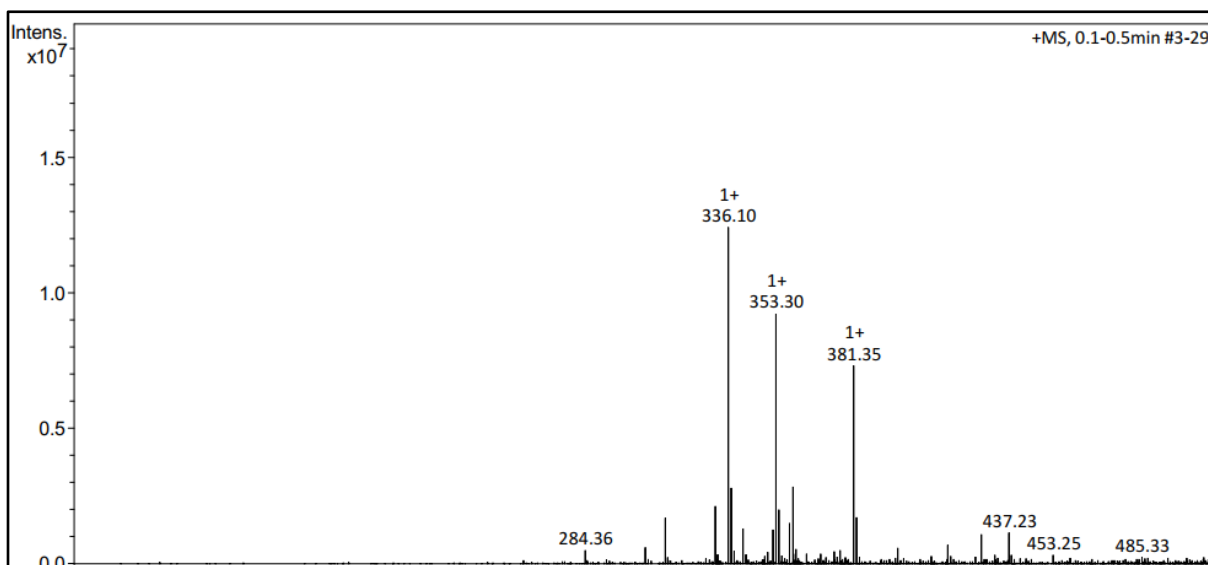
Figura 20. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de XF1707.**Figura 21.** Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de XF1707.

Figura 22. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de XF1707.**Figura 23.** Espectro de massas de baixa resolução, modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ de XF1707.

5.4. Identificação estrutural de XF1709

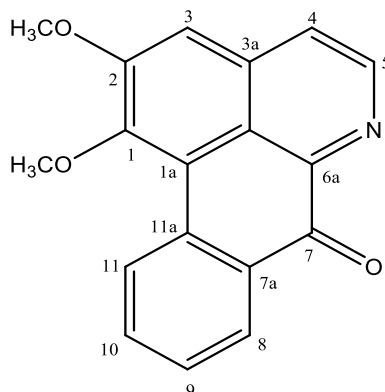
A substância XF1709 (3,5 mg) foi caracterizada como um pó alaranjado, isolada da fração 17 da fase clorofórmica por CLAE semi-preparativa.

O espectro de RMN de ^1H , a 400 MHz, obtido em DMSO, apresentou similaridade com a substância anterior, exceto pela ausência de substituições no anel D, o qual apresentou acoplamentos orto e meta, com sinais em δ_{H} 8,38 (dd, 1H, $J=7,6$ e 1,2 Hz), δ_{H} 7,68 (ddd, 1H, $J=8,0$; 7,6 e 1,2 Hz), δ_{H} 7,77 (ddd, 1H, $J=8,8$; 7,2 e 1,6 Hz) e 9,16 (d, 1H, $J=8,4$ Hz) referentes aos H-8, H-9, H-10 e H-11, sequencialmente.

Os sinais em δ_{H} 8,12 (d, 1H, $J=5,2$ Hz) e δ_{H} 8,87 (d, 1H, $J=5,2$ Hz) foram atribuídos aos H-4 e H-5 do anel piridínico. Foram observados sinais atribuídos aos hidrogênios da metoxila em δ_{H} 3,99 (s, 3H, H-1) e δ_{H} 4,07 (s, 3H, H-2) do anel A, e um sinal em δ_{H} 7,72 com integral para um hidrogênio referente ao H-3, mostrando que esse anel é 1,2,4,5-tetrasubstituído.

O espectro de massas (Figura 27, pág. 64) realizado no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ apresentou um pico com m/z 292, que aliado aos dados de RMN ^1H , apresentados na tabela 5, pág. 62, e em comparação com dados da literatura (TELES et al., 2015), foi possível identificar a substância como o alcaloide oxoaporfínico lisicamina, já descrita muitas vezes em espécies da família Annonaceae, sendo a primeira vez para a espécie *Xylopia frutescens*.

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de XF1709, em comparação com a literatura (TELES et al., 2015).



Posição	XF1709 (DMSO)	Literatura (CDCl ₃)
	δ_{H}	δ_{H}
1	-	-
1a	-	-
2	-	-
3	7,72 (s, 1H)	7,23 (s, 1H)
3a	-	-
3b	-	-
4	8,12 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz)	7,91 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz)
5	8,87 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz)	8,91 (d, 1H, $J = 5,2$ Hz)
6	-	-
6a	-	-
7	-	-
7a	-	-
8	8,38 (dd, 1H, $J = 7,6$ e $1,2$ Hz)	8,58 (ddd, 1H, $J = 7,9$; $1,6$ e $0,5$ Hz)
9	7,68 (ddd, 1H, $J = 8,0$; $7,6$ e $1,2$ Hz)	7,58 (ddd, 1H, $J = 7,9$; $7,2$ e $1,1$ Hz)
10	7,77 (ddd, 1H, $J = 8,8$; $7,2$ e $1,6$ Hz)	7,77 (ddd, 1H, $J = 8,4$; $7,2$ e $1,6$ Hz)
11	9,16 (d, 1H, $J = 8,4$ Hz)	9,18 (ddd, 1H, $J = 8,4$; $1,1$ e $0,5$ Hz)
11a	-	-
1 OCH ₃	3,99 (s, 3H)	4,02 (s, 3H)
2 OCH ₃	4,07 (s, 3H)	4,10 (s, 3H)

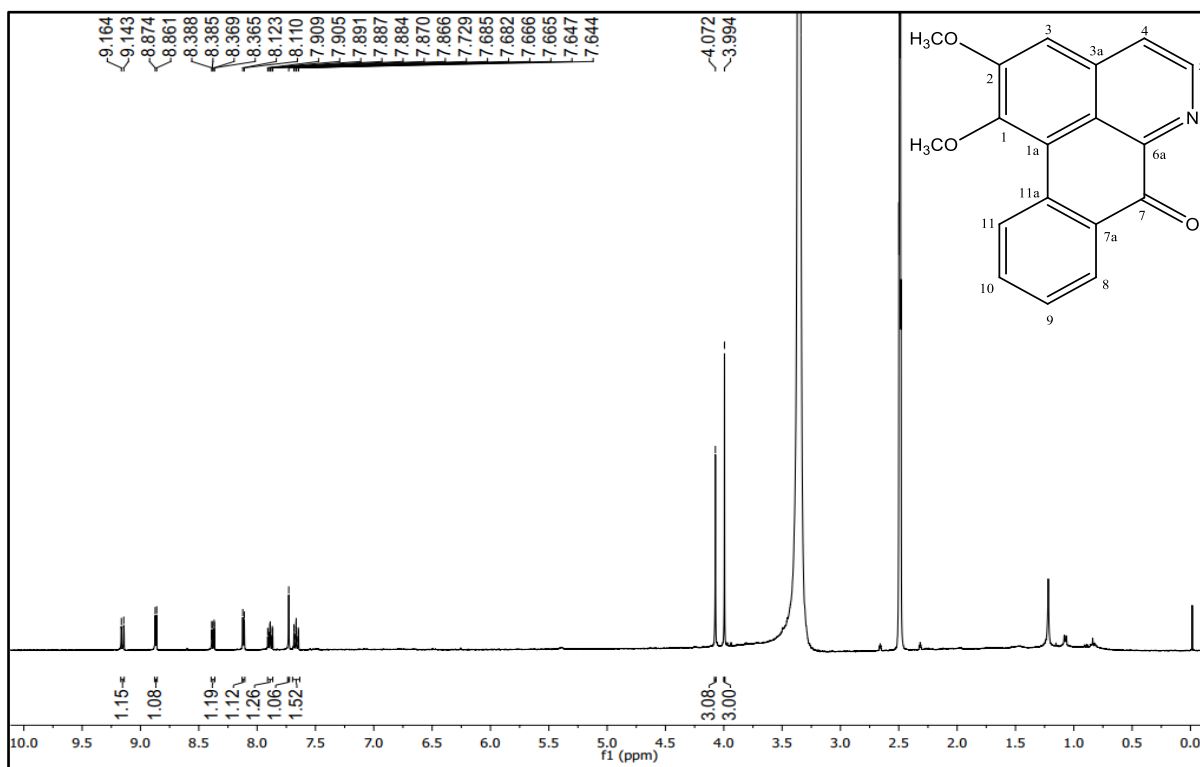
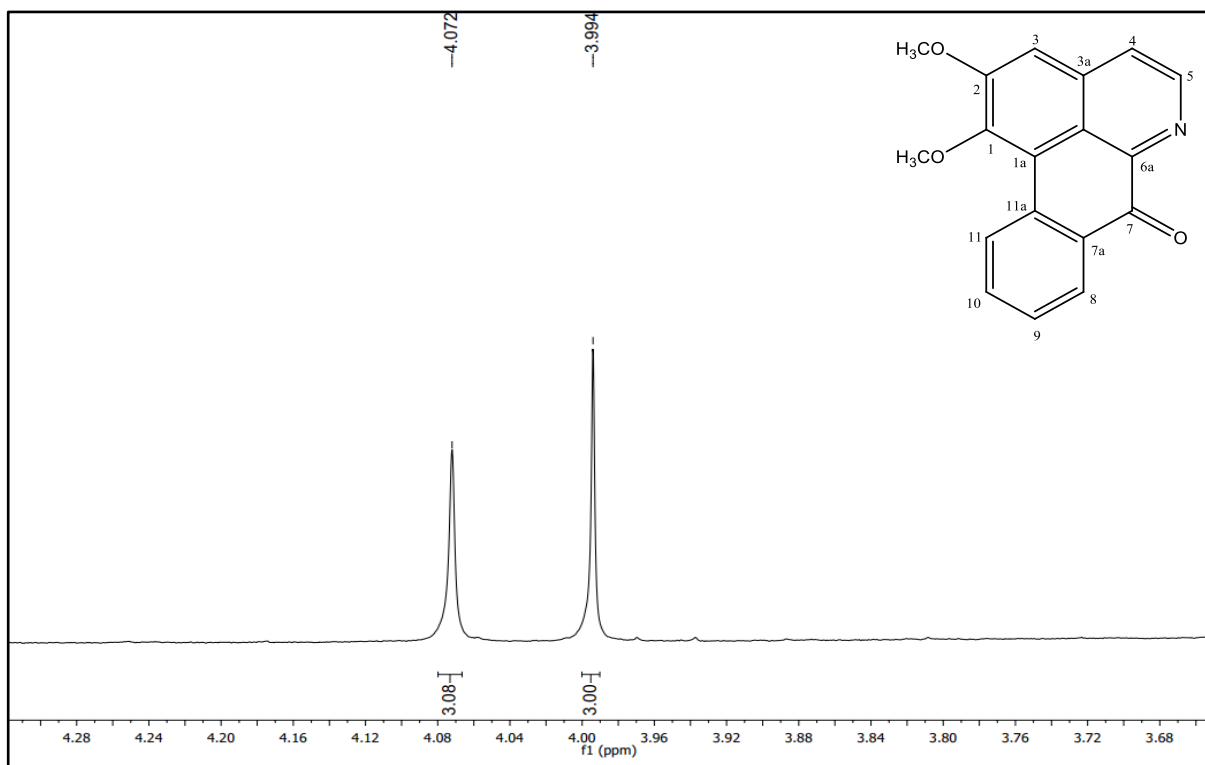
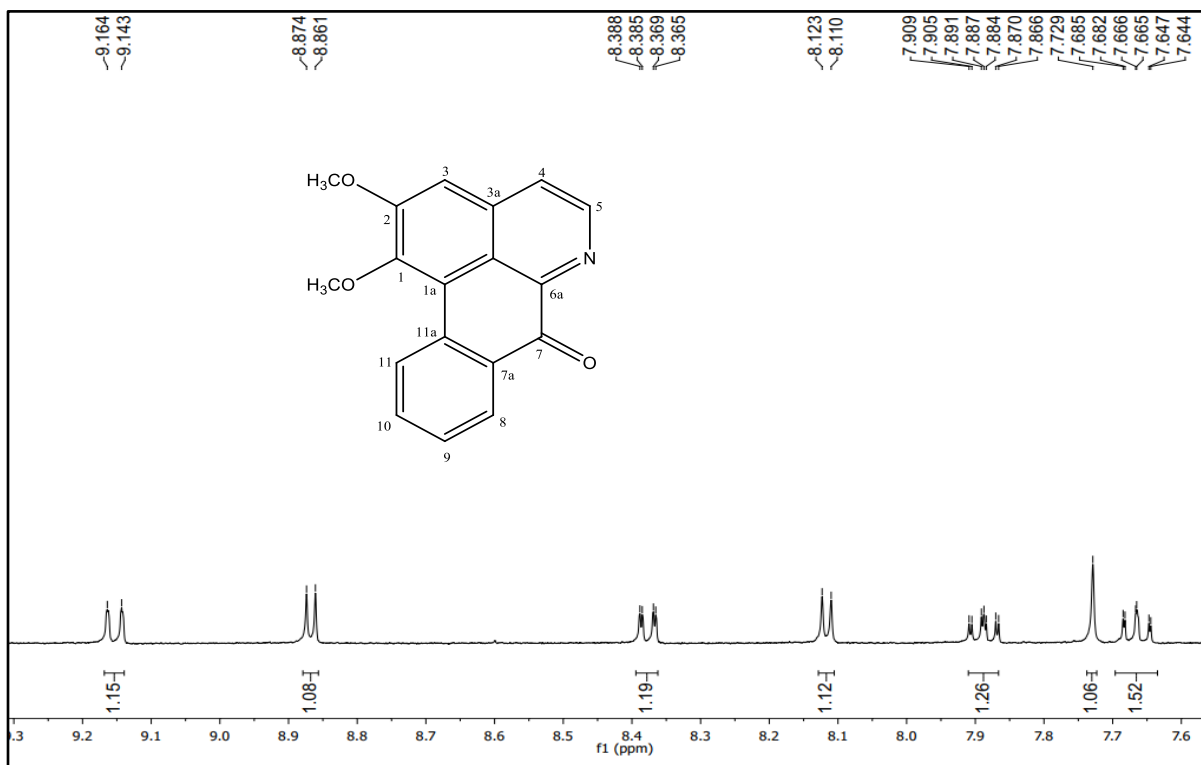
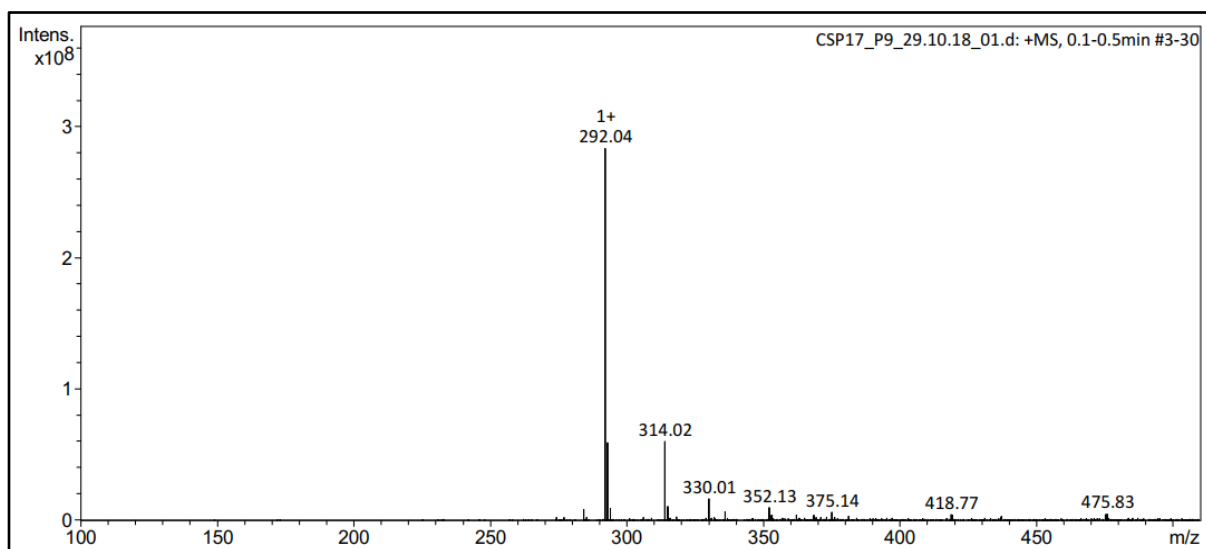
Figura 24. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de XF1709.**Figura 25.** Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de XF1709.

Figura 26. Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, DMSO) de XF1709.**Figura 27.** Espectro de massas de baixa resolução, no modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$ de XF1709.

5.5. Identificação estrutural de XF2604

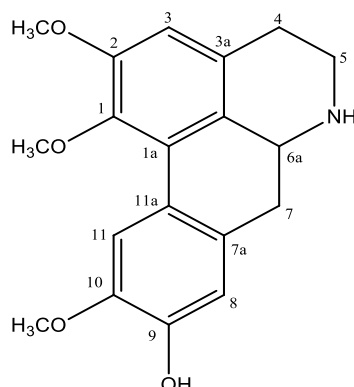
A substância XF2604, pesando 6 mg, foi isolada da fase clorofórmica, fração 26 por CLAE semi-preparativa.

O espectro de RMN de ^1H , a 500 MHz, obtido em CDCl_3 com gotas de CD_3OD , apresentou sinais na região de hidrogênios de sistemas alifáticos, bem como singletos na região de sistemas aromáticos, sugerindo tratar-se de uma estrutura aporfínica. Os multipletos da região de δ_{H} 2,74- 3,19 foram atribuídos aos hidrogênios metilênicos 4, 5 e 7, descritos na tabela 5, pág. 66.

Os singletos na região de aromático em δ_{H} 6,51(H-3), δ_{H} 6,54 (H-8) e δ_{H} 7,88 (H-11) com integral para um hidrogênio cada, sugeriram substituições no anel A em C-1 e C-2, e substituições no anel D em C-9 e C-10, corroborando em comparação com a literatura (COSTA et al., 2013). Associado a isto, o espectro de RMN de ^{13}C , a 125 MHz, apresentou quatro sinais na região mais desblindada do espectro, em δ_{C} 144,8 (C-1), δ_{C} 153,3 9 (C-2), δ_{C} 145,8 (C-9) e δ_{C} 146,4 (C-10), característico de carbonos de anel aromático ligados a elementos eletronegativos. Os sinais das 3 metoxilas em δ_{H} 3,53 (s, 3H), δ_{H} 3,74 (s, 3H) e δ_{H} 3,76 (s, 3H) foram atribuídos a C-1, C-2 e C-10, sugerindo que a substituição de C-9 se tratava de uma hidroxila.

Após análises dos dados de RMN ^1H e ^{13}C e comparação com literatura (COSTA et al., 2013), o alcaloide aporfínico foi identificado como laurotetanina. Este já foi relatado para essa espécie (LEBOEUF et al., 1982), como também *Xylopija laevigata* (COSTA et al., 2013).

Tabela 5. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (500 MHz e 125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$), em comparação com a literatura (COSTA et al., 2013).



Posição	XF2604	XF2604	Literatura	Literatura
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
1	144,8	-	143,3	-
1a	127,0	-	127,1	-
2	153,3	-	152,2	-
3	110,0	6,51 (s, 1H)	110,7	6,61 (s, 1H)
3a	126,1	-	128,4	-
3b	125,5	-	126,5	-
4	28,2	2,79 (m, 1H) 3,12 (m, 1H)	28,2	2,75 (m, 1H) 3,04 (m, 1H)
5	41,0	3,08 (m, 1H) 3,19 (m, 1H)	42,5	3,02 (m, 1H) 3,04 (m, 1H)
6a	53,5	4,03 (d, 1H, $J=13$ Hz)	53,5	3,84 (dd, 1H, $J=14,5$ e 4,9 Hz)
7	32,7	2,74 (m, 1H) 2,87 (m, 1H)	35,7	2,68 (dd, 1H, $J=14,5$ e 3,8 Hz)
7a	126,9	-	129,1	-
8	114,4	6,54 (s, 1H)	114,4	6,77 (s, 1H)
9	145,8	-	145,6	-
10	146,4	-	146,1	-
11	111,6	7,88 (s, 1H)	111,8	8,06 (s, 1H)
11a	122,5	-	123,6	-
1- OCH_3	59,8	3,53 (s, 3H)	60,2	3,67 (s, 3H)
2- OCH_3	55,8	3,74 (s, 3H)	56,1	3,89 (s, 3H)
10- OCH_3	55,6	3,76 (s, 3H)	55,9	3,90 (s, 3H)

*Todos experimentos foram realizados em CDCl_3 com gotas de CD_3OD .

Figura 28. Espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.

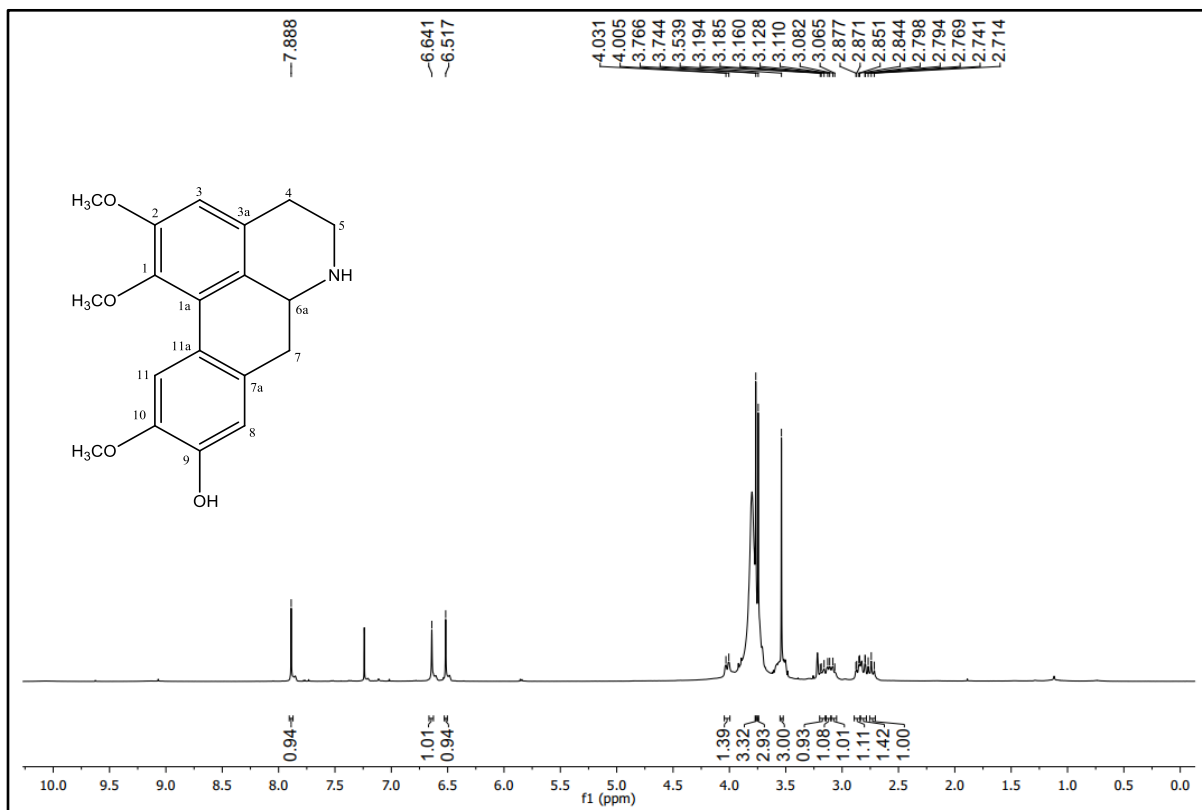


Figura 29. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.

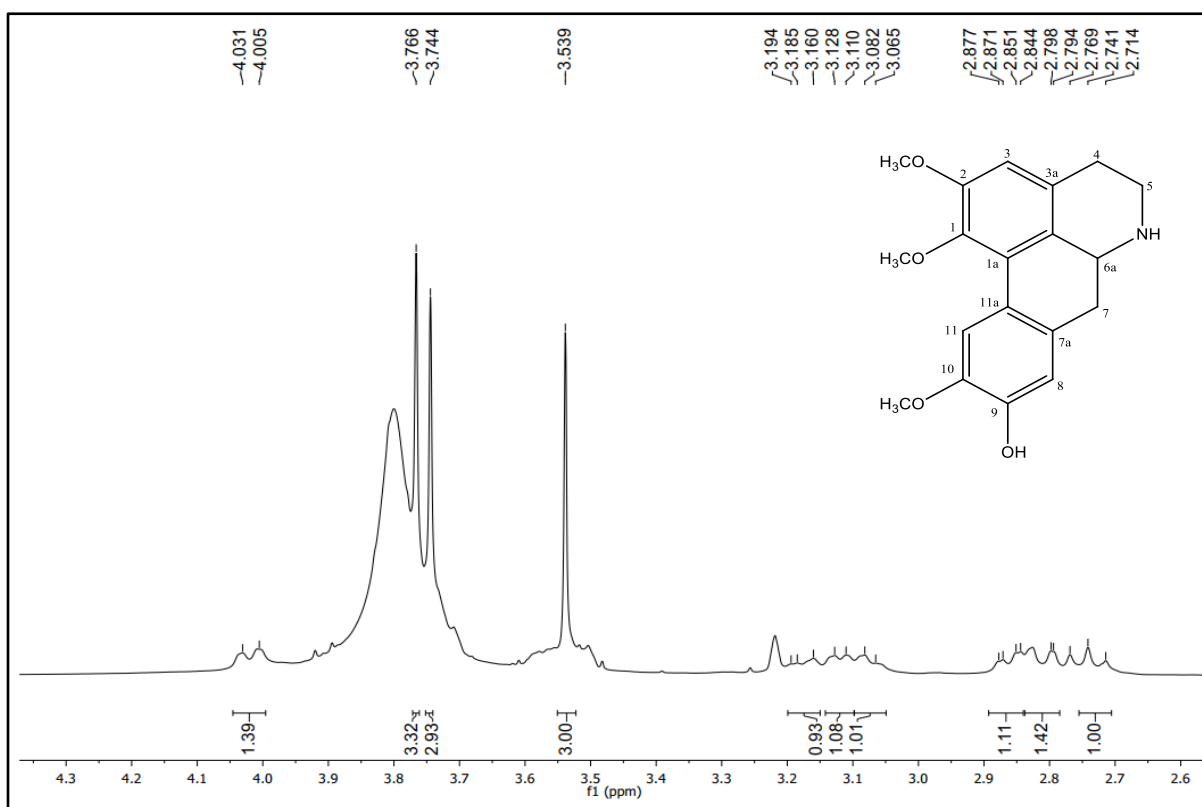


Figura 30. Expansão do espectro de RMN de ^1H (500 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.

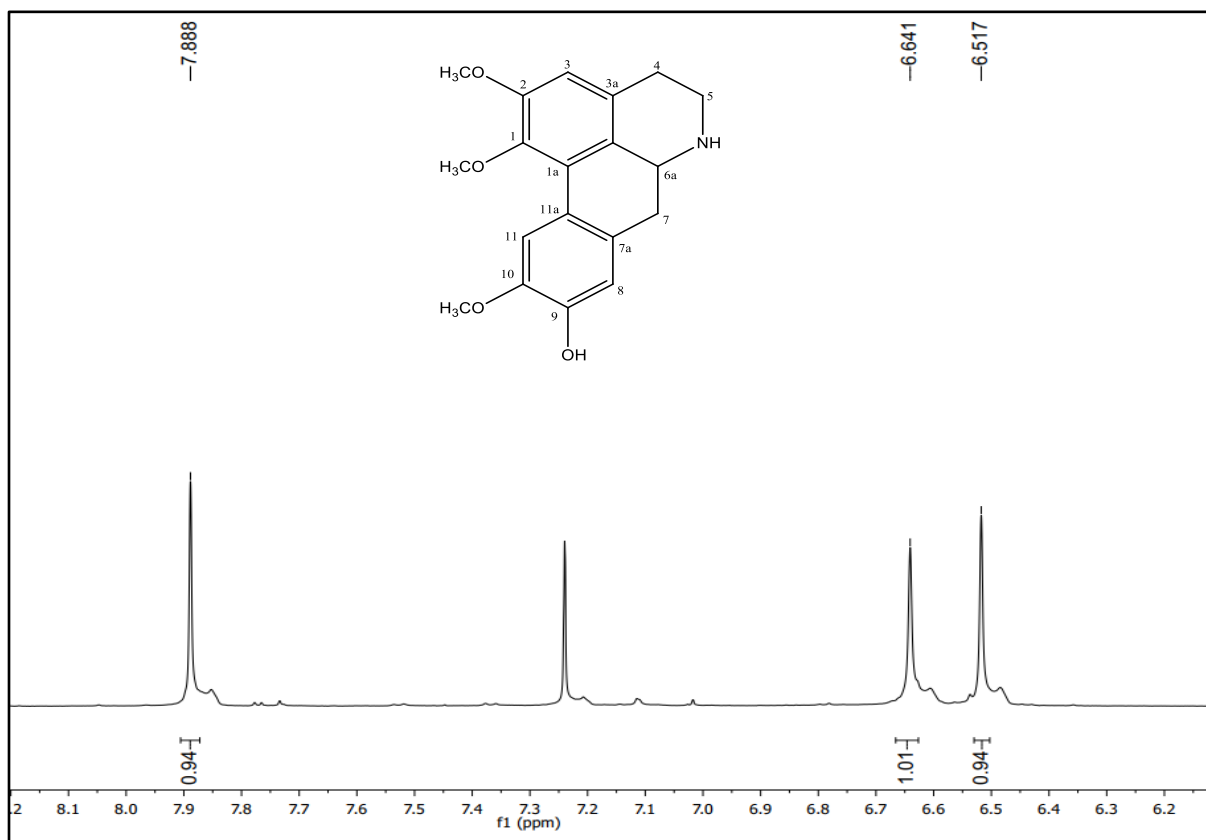


Figura 31. Espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.

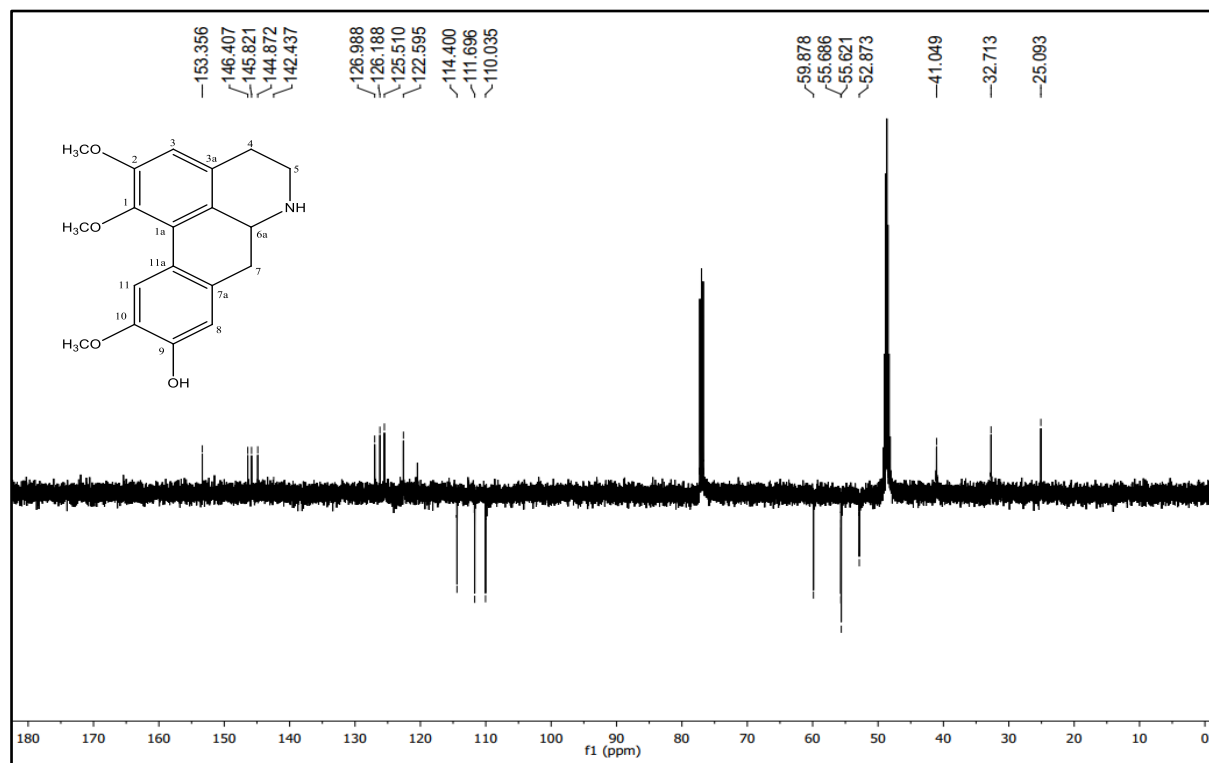
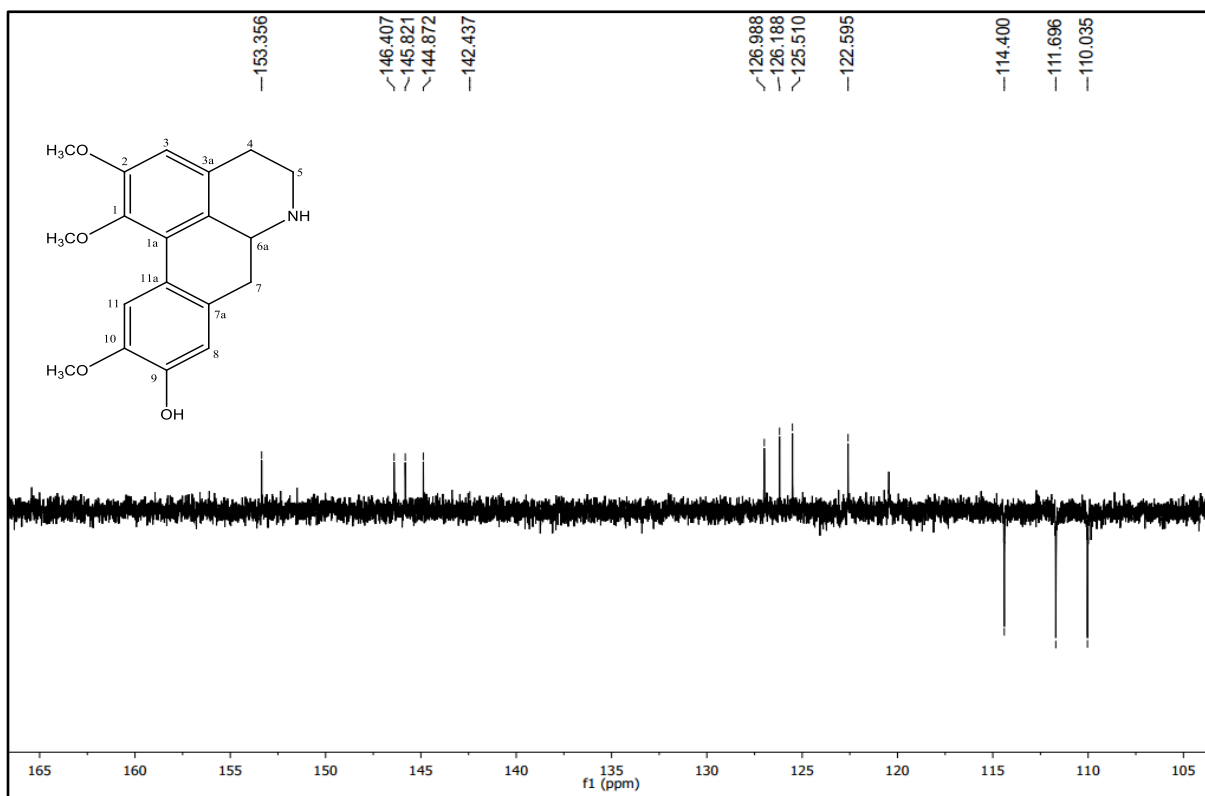
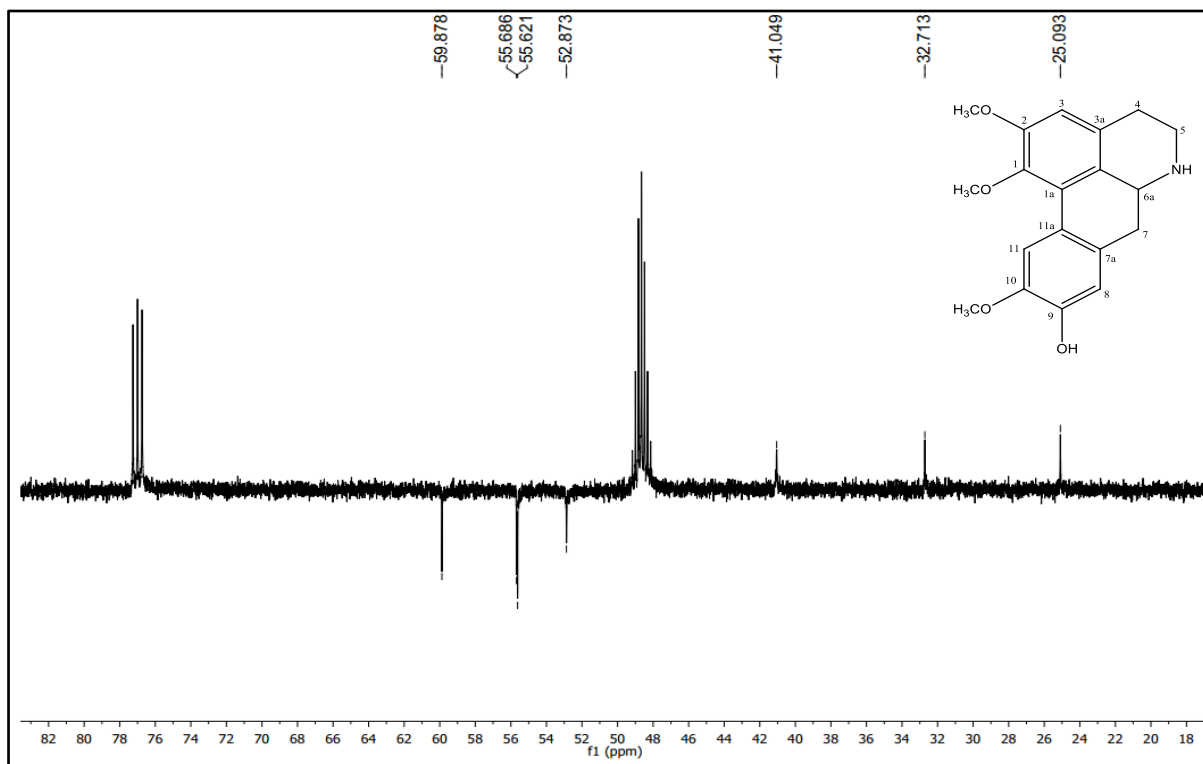


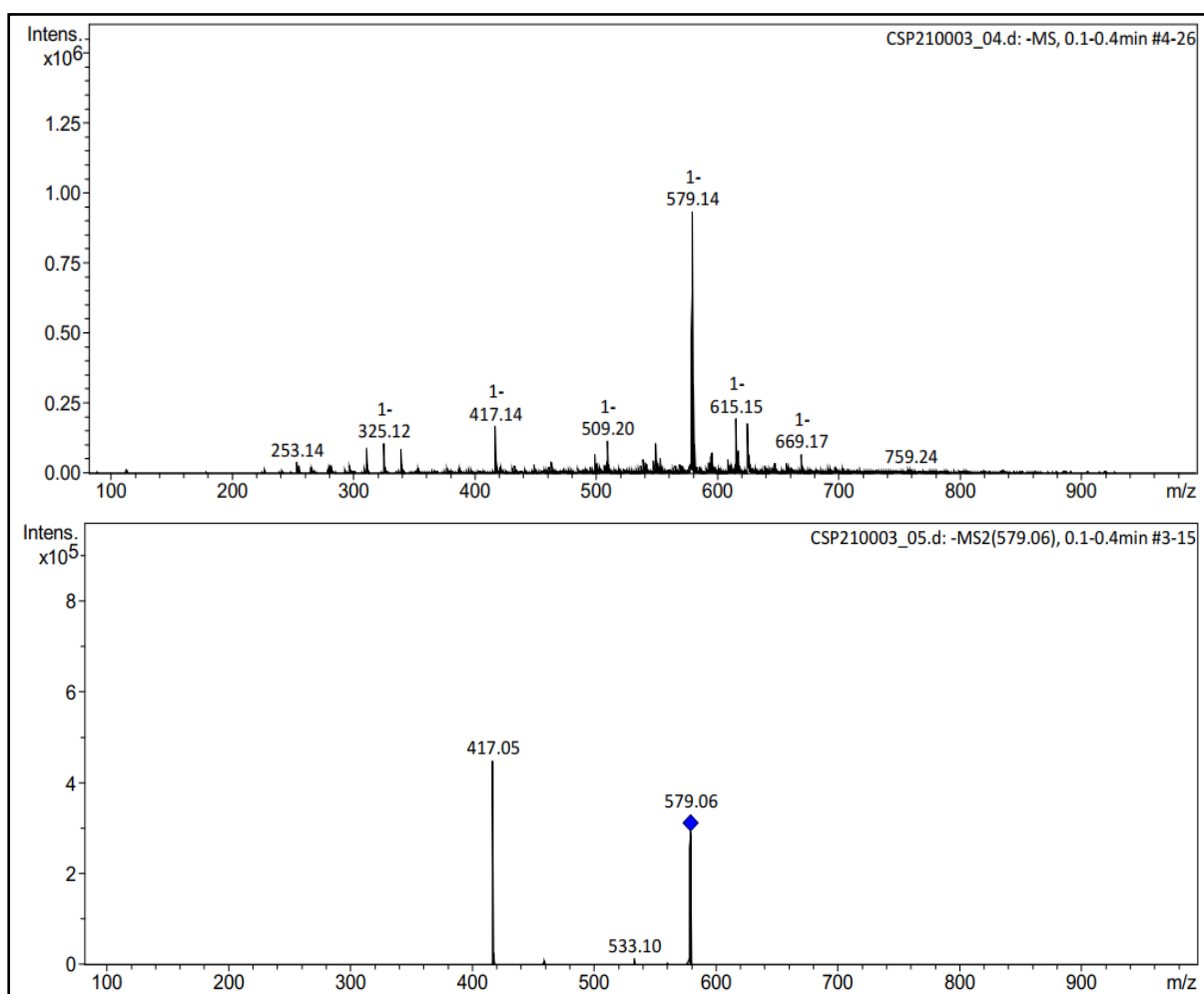
Figura 32. Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.**Figura 33.** Expansão do espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$) de XF2604.

5.6. Identificação estrutural de XF2103

A substância XF2103 foi caracterizada com um pó amorfo, isolada da fração 21 da fase clorofórmica por CLAE semi-preparativa.

O espectro de massas, realizado no modo negativo, apresentou um pico $[M-H]^-$ 579.12. Quando fragmentado em MS^2 , este mostrou uma m/z 417.05, devido à perda de 162 Da, sugerindo a presença de uma hexose na molécula (Figura 34, pág. 70).

Figura 34. Espectro de massas MS e MS^2 da substância XF2103.



Associado a isto, o espectro de RMN ^{13}C , a 100 MHz, obtido em CD_3OD , apresentou sinais característicos de unidade osídica, δ_{c} 103,85 (1"), 73,07 (C2"), 76,30 (C3"), 68,59 (C4"), 78,16 (C5") e 62,93 (C6") (Figura 36, pág. 73), como também o espectro de RMN de ^1H , a 400 MHz, indicou a existência de um hidrogênio anomérico em δ_{H} 5,14 (d, 1H, $J= 7,6$ Hz) atribuindo configuração do tipo β ao glicosídeo com base no valor da constante de acoplamento (Figura 38, pág. 74). A correlação observada no mapa de contorno HMBC entre o hidrogênio 1" com o δ_{c} 135,92 (C4) a J_3 inferiu a posição da glicose na molécula (Figura 39, pág.75).

Na expansão do espectro de RMN de ^1H , foi observado a presença de dois singletos na região de aromáticos. O sinal em δ_{H} 6,71 (2H, H-6), no mapa de contorno HMBC, correlacionou-se com δ_{c} 139,48 (C1), δ_{c} 154,33 (C5) a J_2 , δ_{c} 135,92 (C4) a J_3 , sugerindo tratar-se de um anel tetrassubstituído. Enquanto δ_{H} 6,65 (3H, H-6') correlacionou-se com δ_{c} 133,12 (C1'), δ_{c} 149,33 (C5') a J_2 , e δ_{c} 136,17 a J_3 (C4'), apontando assim, a existência de um segundo anel aromático tetrassubstituído (Figura 40, pág. 75).

O mapa de contorno de HMQC demonstrou que δ_{H} 4,71 (3H, d, $J= 4,4$ Hz) correlacionou-se com δ_{c} 87,61, apontando ligação de elemento eletronegativo neste carbono. E por HMBC, este correlaciona-se a J_2 com δ_{c} 133,12 (C1') e δ_{c} 55,69 (C8'), a J_3 com δ_{c} 104,49 (C2' e C6') e δ_{c} 72,90 (C9'). O sinal δ_{H} 4,76 (3H, d, $J= 3,6$ Hz) foi similar pois apresentou correlações com C8, C9, C2 e C6 (Figura 41 e 42, pág. 76), demonstrando assim a existência de uma unidade dimérica C6-C3 na molécula, caracterizando a mesma como lignana, e devido aos deslocamentos e correlações observadas entre 7,9':9,7', sugere-se um esqueleto 7,9':9,7' diepóxido, corroborando a estrutura tratar-se de uma lignana do tipo furofurânica. Todos os dados encontram-se compilados na tabela 6, pág. 72.

Tabela 6. Dados de RMN de ^1H e ^{13}C (400 e 100 MHz) e correlações obtidas em HMBC, registradas em CD_3OD em comparação com a literatura (SHAHAT et al., 2004).

Posição	XF2103 (CD_3OD)		HMBC $\bar{\delta}_\text{C} \times \bar{\delta}_\text{H}$	Literatura (CD_3OD)	
	$\bar{\delta}_\text{H}$	$\bar{\delta}_\text{C}$		$\bar{\delta}_\text{H}$	$\bar{\delta}_\text{C}$
1	-	139,8		-	139,62
2	6,71 (s, 2H)	104,73		6,72 (s, 2H)	104,96
3	-	154,33		-	154,49
4	-	135,92		-	135,72
5	-	154,33		-	154,33
6	6,71 (s, 2H)	104,73	C1; C5; C4	6,72 (s, 2H)	104,96
7	4,76 (d, 3H, $J= 3,6$ Hz)	87,17	C8; C9; C2; C6	4,77 (d, 1H, $J= 4,6$ Hz)	87,26
8	3,12 (m, 4H)	55,48		3,14 (m, 1H)	55,57
9a	3,88 (m, ??)	72,90		3,91 (m, 1H)	72,93
9b	4,26 (m, 4H)	-		4,28 (m, 1H)	-
1'	-	133,12		-	133,17
2'	6,64 (s, 3H)	104,49		6,65 (s, 2H)	104,66
3'	-	149,33		-	149,44
4'	-	136,17		-	136,35
5'	-	149,33		-	149,44
6'	6,64 (s, 3H)	104,49	C1'; C5'; C4'	6,65 (s, 2H)	104,66
7'	4,71 (d, 3H, $J= 4,4$ Hz)	87,61	C1'; C8'; C2'; C6'; C9'	4,72 (d, 1H, $J= 4,5$ Hz)	87,65
8'	3,12 (m, 4H)	55,69		3,14 (m, 1H)	57,78
9'a	3,88 (m)	72,85		3,91 (m, 1H)	72,99
9'b	4,26 (m, 4H)	-		4,28 (m, 1H)	-
OCH_3	3,85 (s, 6H)	-		3,86 (s, 6H)	56,90
OCH_3	3,83 (s, 1H)	-		3,84 (s, 6H)	57,16
1''	5,13 (d, 1H, $J= 7,6$ Hz)	103,85		4,85 (d, 1H, $J= 7,5$ Hz)	105,43
2''	-	73,07		3,47 (m, 1H)	75,78
3''	-	76,30		3,40 (2H, m)	77,90
4''	-	68,59		3,40 (2H, m)	71,43
5''	-	78,16		3,20 (1H, m)	78,40
6''a	-	62,93		3,76 (1H, m)	62,67
6''b				3,65 (dd, 1H, $J= 12,0$ e 5,2 Hz)	

Figura 35. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de XF2103.

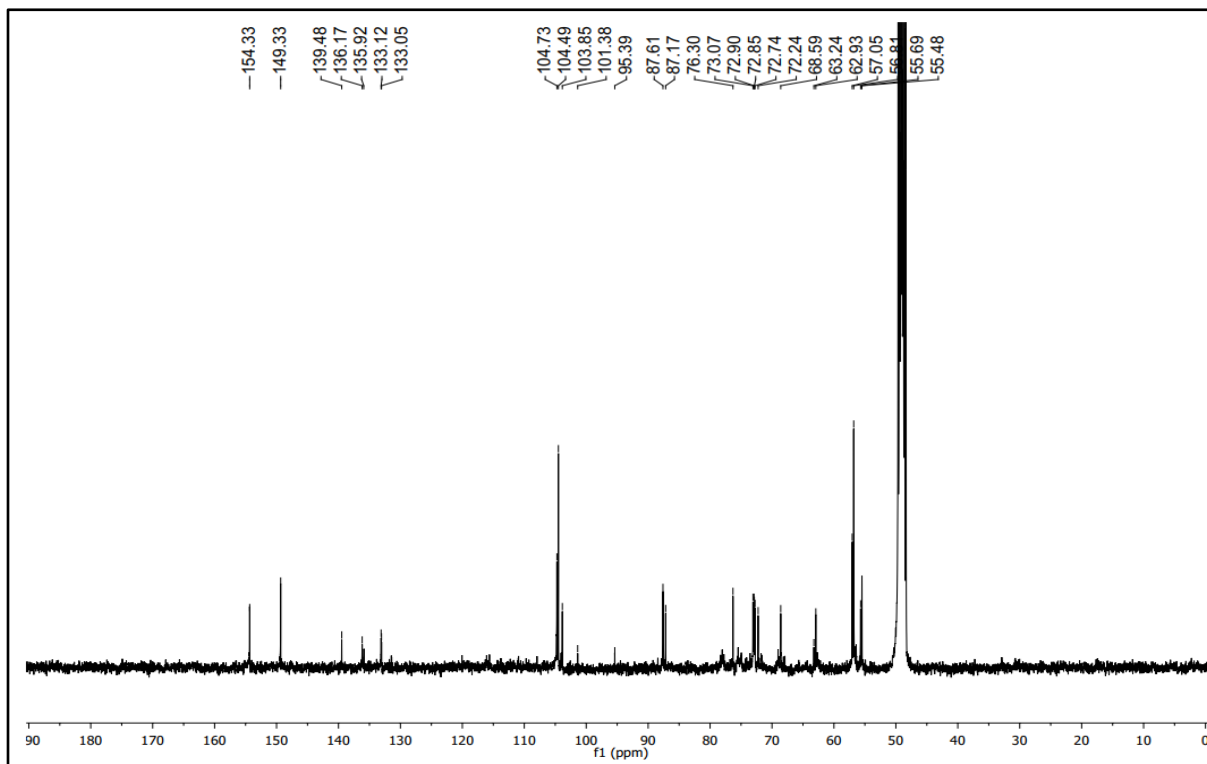


Figura 36. Expansão do espectro RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de XF2103.

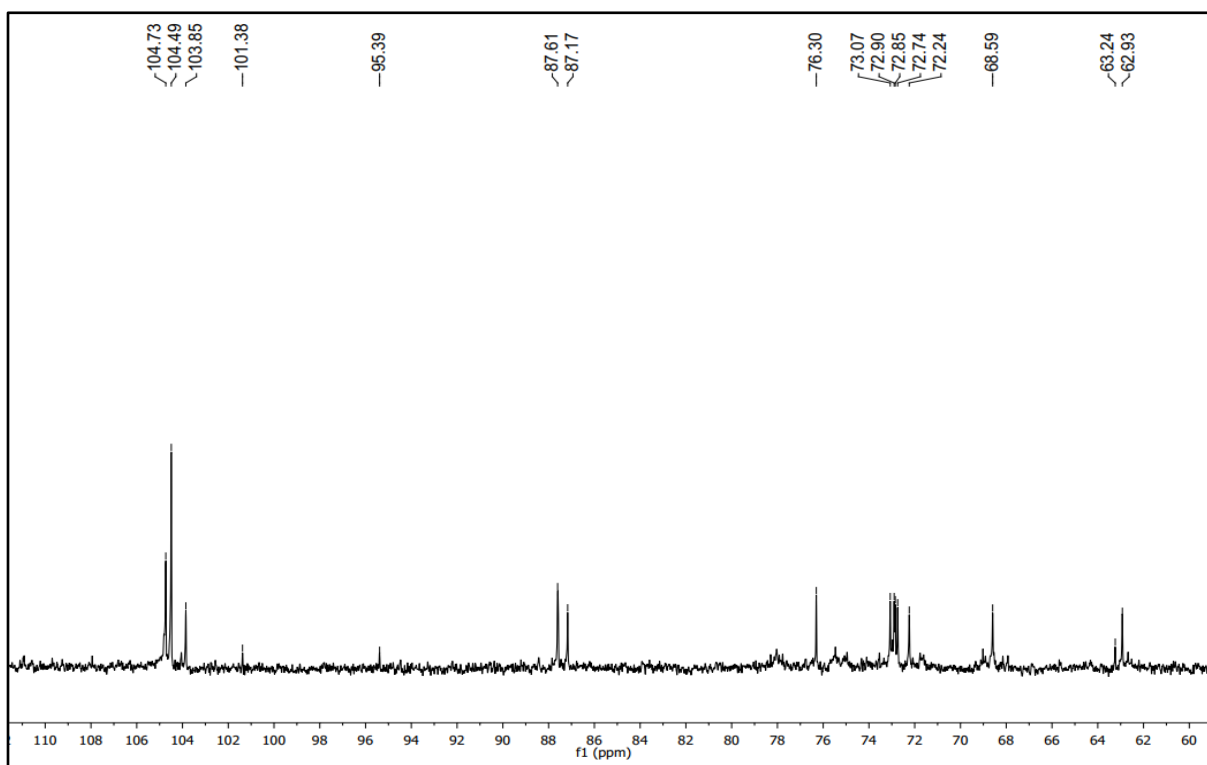


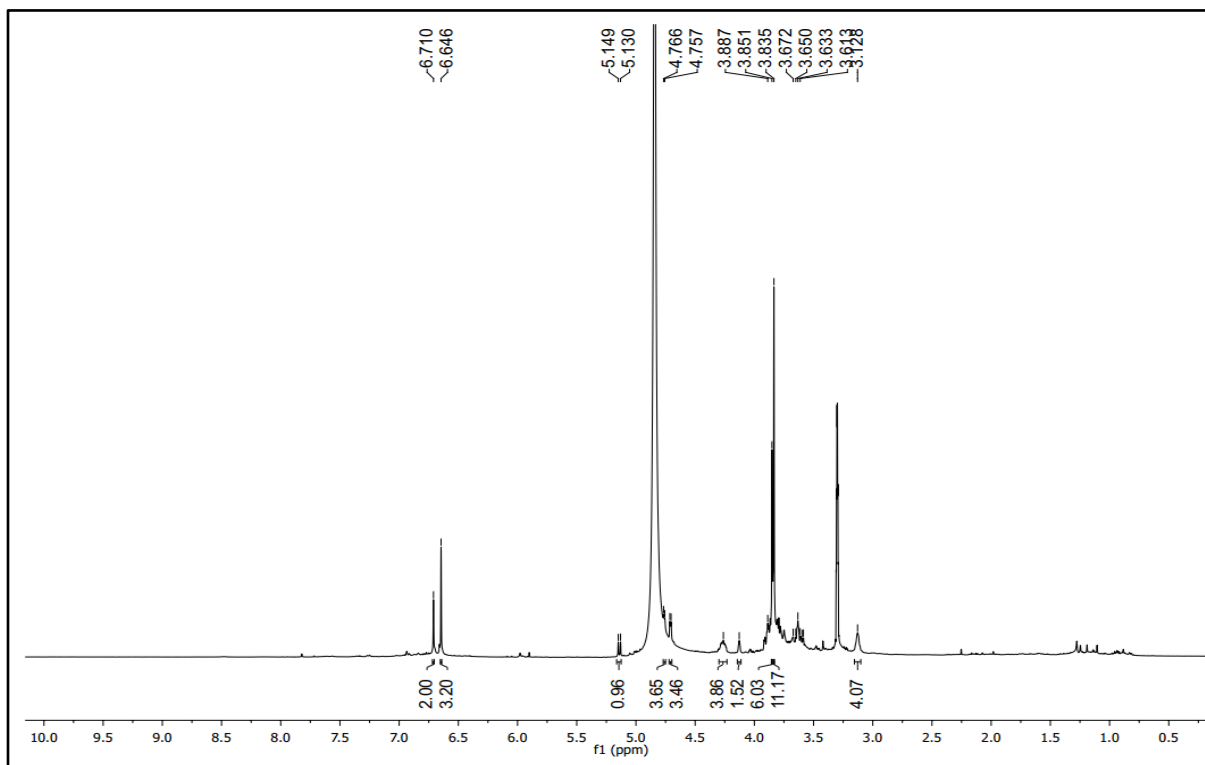
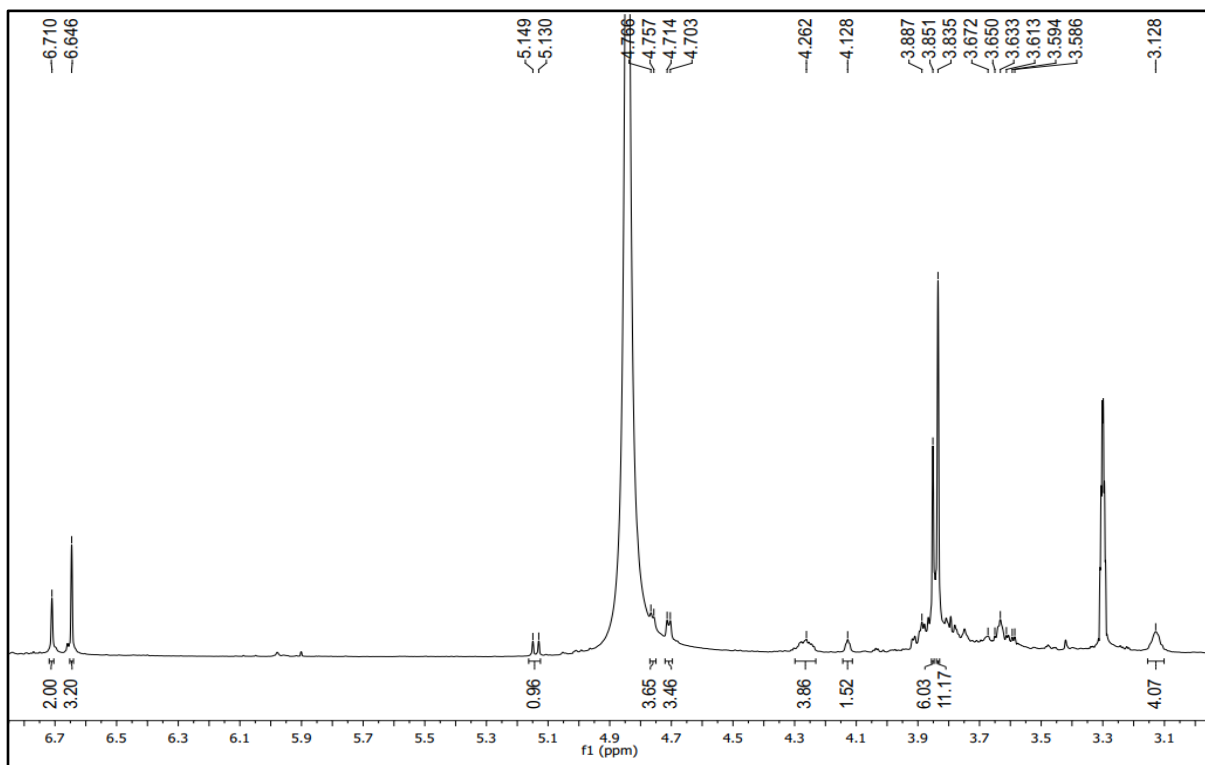
Figura 37. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de XF2103.**Figura 38.** Expansão do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de XF2103.

Figura 39. Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de XF2103.

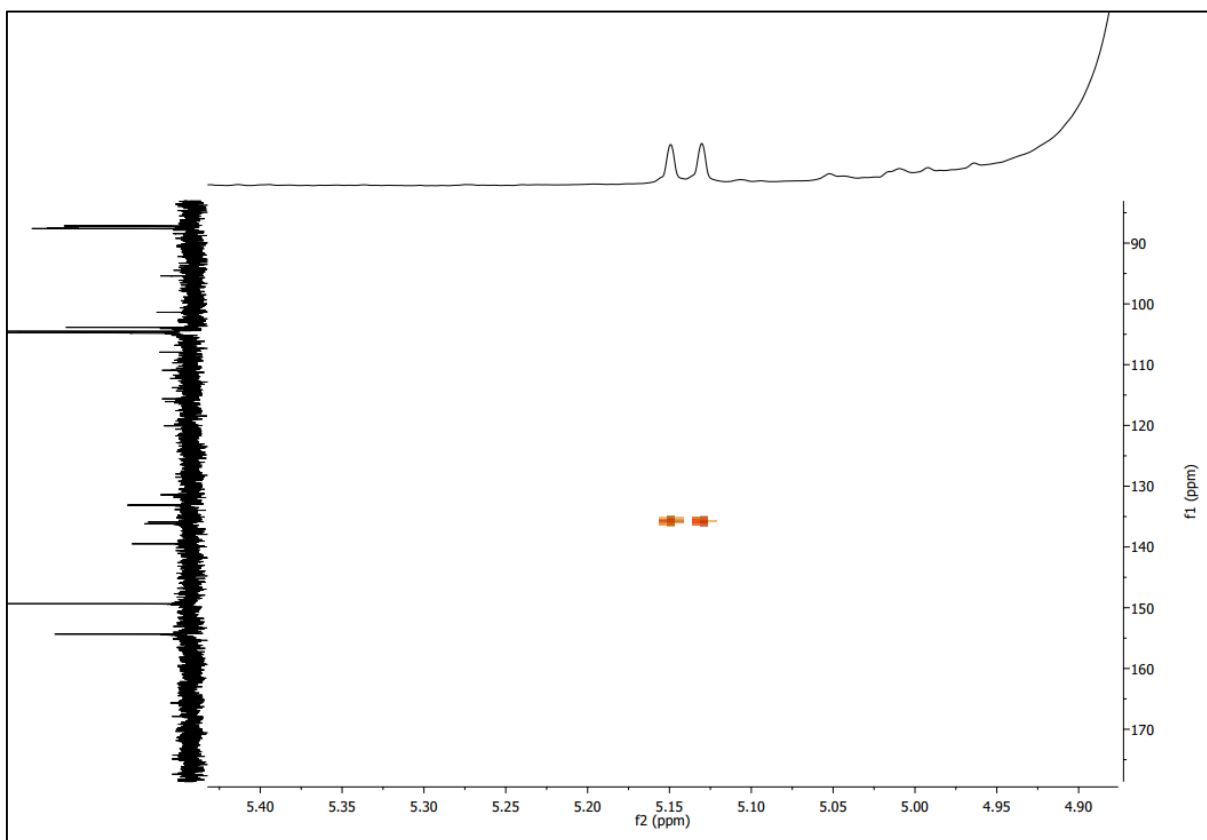


Figura 40. Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de XF2103.

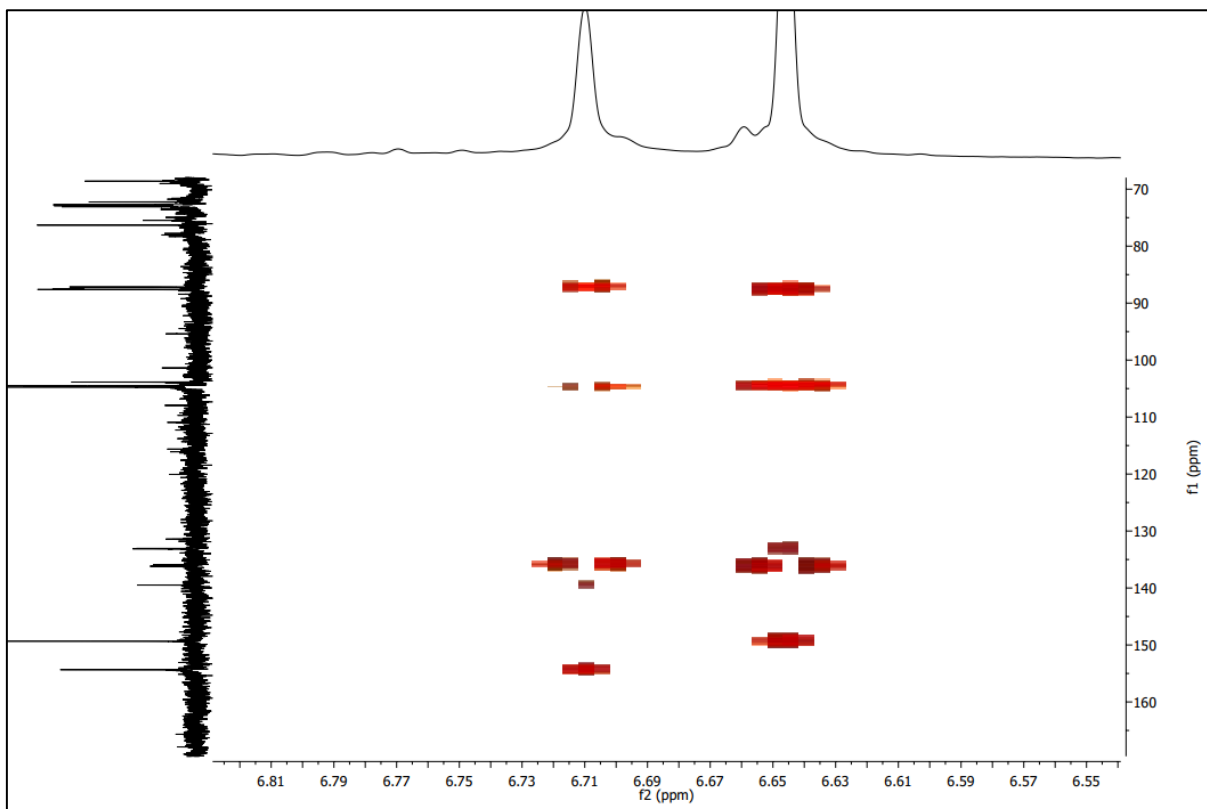


Figura 41. Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de XF2103.

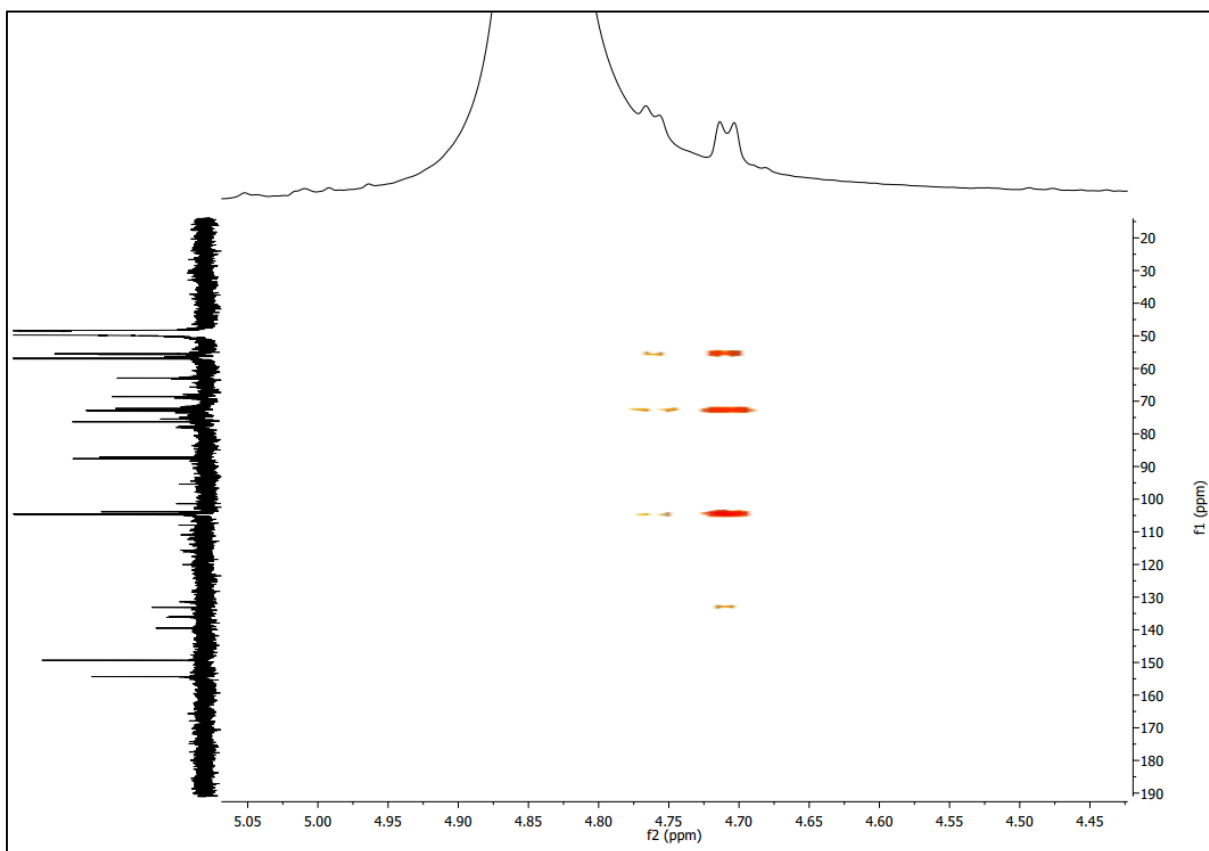
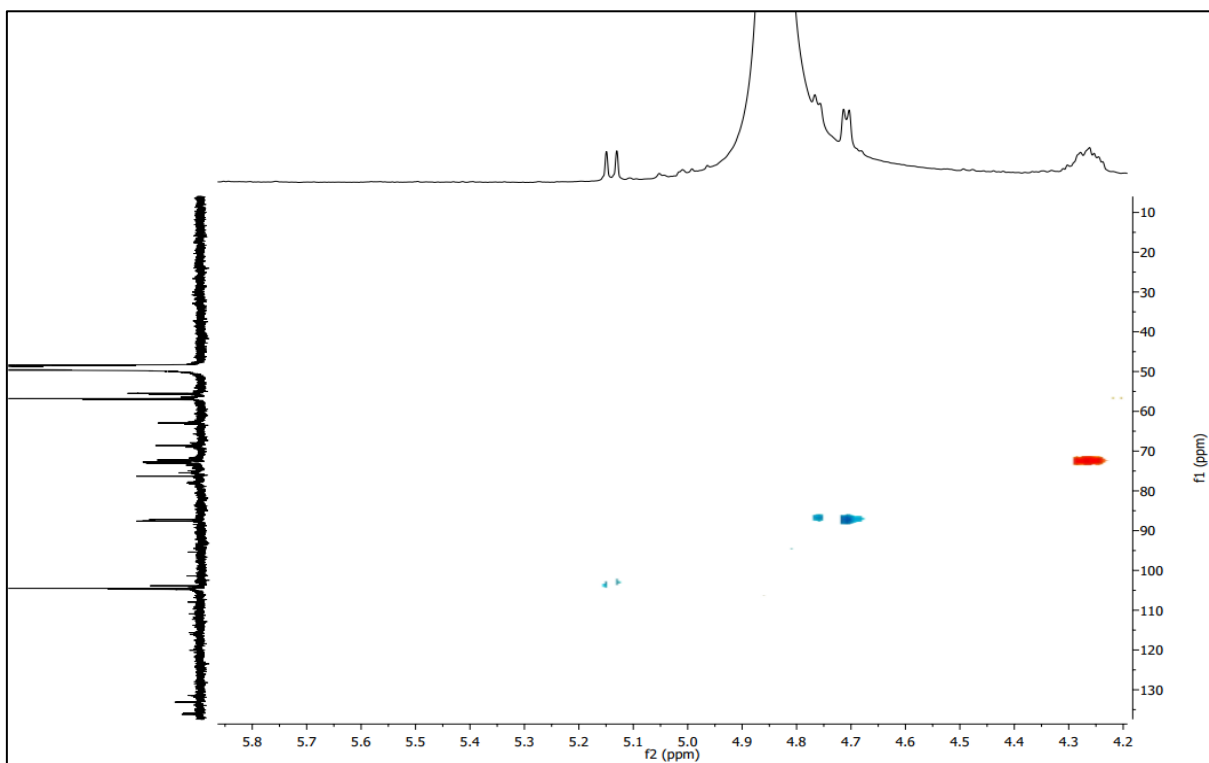


Figura 42. Expansão do espectro de HMQC (400 e 100 MHz, CD₃OD) de XF2103.



As atribuições das estereoquímicas relativas de C7/C8 e C7'/C8' foram realizadas baseado em Shao e colaboradores (2018), pelos desvios químicos de $\Delta\delta_{H9}$ e $\Delta\delta_{H9'}$. Há três possibilidades de estereoquímica para lignanas furofurânicas do tipo 8-H (Figura 43, pág. 77), sendo a XF2103 classificada como 7-H/8-H *trans*, 7'-H/8'H *trans*, uma vez que a diferença dos deslocamentos químicos de $\Delta\delta_{H-9}$ e $\Delta\delta_{H-9'}$ foi igual a 0.38.

Figura 43. Possibilidades de estereoquímica para lignanas furofurânicas do tipo 8H (SHAO et al., 2018).

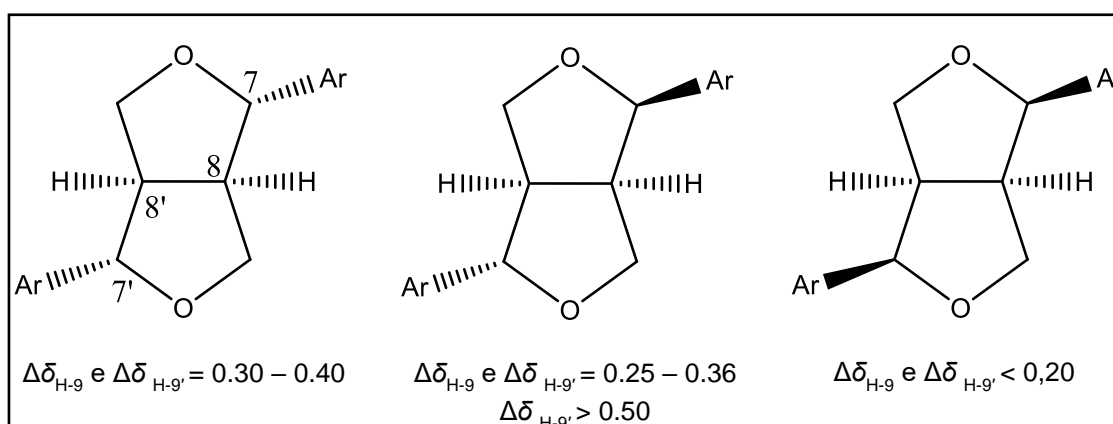
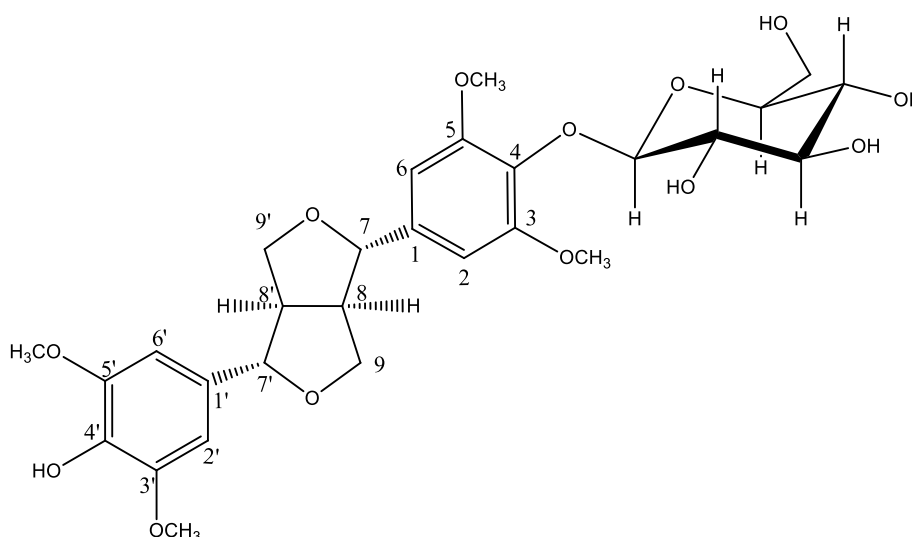


Figura 44. Estrutura química de siringaresinol- β -D-glicosídeo.



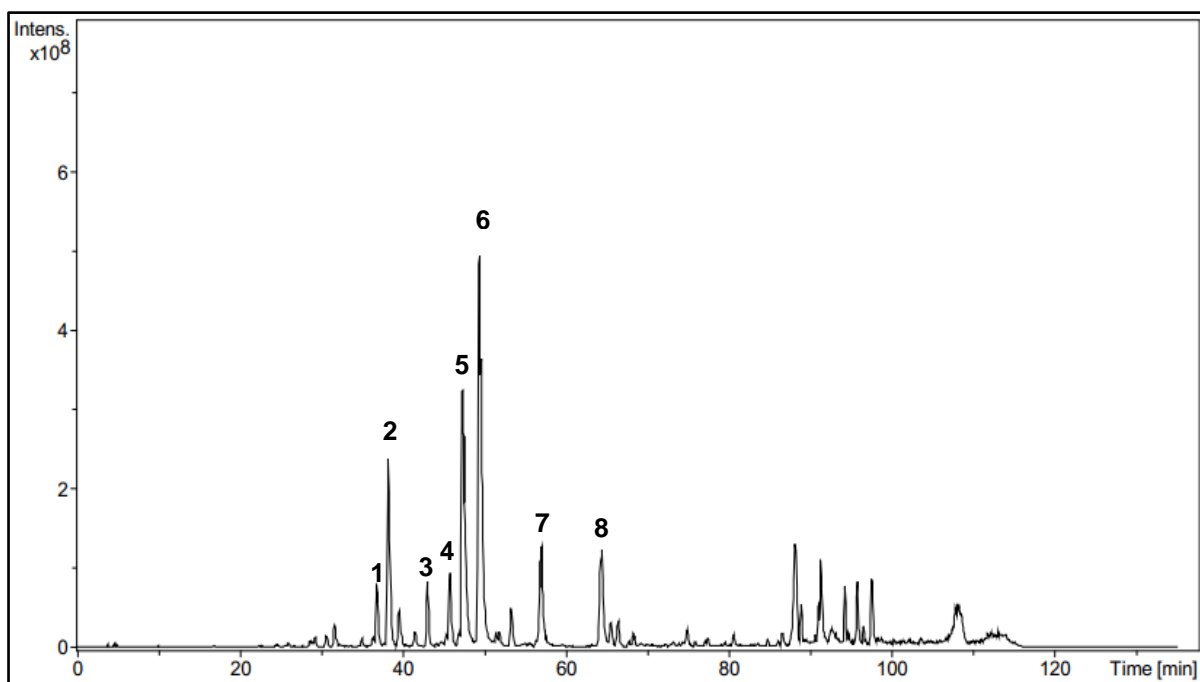
Diante do exposto e das observações feitas para os valores das integrais de hidrogênios, com os sinais a mais de carbonos e em comparação com a literatura (SHAHAT et al., 2004), notou-se que essa substância se tratava de uma mistura do

siringaresinol- β -D-glicosídeo com outro composto similar. Esse é o segundo relato de lignana para o gênero *Xylopi*a, sendo o primeiro da lignana xylobuxina, isolada da espécie *Xylopi*a *buxifolia* (WAHL et al., 1995).

5.7. Análise da fração XF24 por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada ao Espectrômetro de massas (CLAE/EM)

A análise do espectro de íons totais da fração XF24, obtida da fase clorofórmica, apresentou diversos picos referentes as substâncias protonadas com m/z par, indicando a presença de possíveis alcaloides (Figura 45, pág. 78).

Figura 45. Espectro de íons totais da fração XF24 por CLAE/EM.



Quando os íons m/z 342 (pico 1), 312 (pico 2), 326 (pico 3), 266 (pico 4) e 296 (pico 5) foram submetidos a fragmentação (MS^n), apresentaram no MS^2 uma perda inicial de 17 Da ou 31 Da, atribuídos ao nitrogênio com seus substituintes, NH_3 e CH_3NH_2 , respectivamente, sugerindo se tratar de alcaloides do tipo aporfínicos, segundo Stévigny e colaboradores (2004), que propuseram regras gerais de fragmentações para esses tipos de alcaloides.

Analisando o espectro do íon $[M+H]^+$ 342 (Figura 46, pág 80), foi possível observar perda inicial de 31 Da (NH_2CH_3) no MS^2 , formando o íon m/z 311, seguido de perdas de 15 Da ($-CH_3^\bullet$) ou 31 Da ($-OCH_3^\bullet$), formando os íons com m/z 296 e 280, respectivamente. Stévigny e colaboradores (2004) sugerem, como regras específicas para alcaloides aporfínicos com perdas radiculares de ($-CH_3^\bullet$) e ($-OCH_3^\bullet$), que estes possuam mais de um grupo metoxila e/ou substituinte hidroxila. Desta forma, sugere-se que haja três grupos de metoxilas e uma hidroxila distribuídos entre os anéis A e D. A proposta de fragmentação está representada na figura 47, pág. 81, na qual a saída $-CH_3^\bullet$ ou $-OCH_3^\bullet$ pode ser de qualquer substituinte metoxila.

Para os picos 3 (Figura 45, pág. 82) e 6 (Figura 50, pág 83.) com íons de m/z $[M+H]^+$ 326, em tempos de retenção diferentes, sugere-se, de acordo com suas perdas, que estes tenham os mesmos substituintes (metoxilas e metileno dióxi) em posições diferentes distribuídos entre os anéis A e D, indicando tratar-se, putativamente, dos alcaloides normantenina (Figura 49, pág. 83) e nordicetrina (Figura 51, pág. 84).

O espectro do íon $[M+H]^+$ 312 (Figura 52, pág.85) mostrou como perda inicial 17 Da no MS^2 , atribuído ao NH_3 , resultando no íon com m/z 295 e neste um perda sequencial de 32 Da (CH_3OH), formando o íon com m/z 263. No MS^3 houveram perdas de 28 Da (CO) e 30 Da (CH_2O), formando o íon com m/z 205. Essas perdas seguidas de 32 Da e 28 Da sugerem que exista grupos substituintes de hidroxila e metoxilas vicinais, e a perda de 30 Da, a presença de um metileno dioxo em alcaloides do tipo aporfínicos (STÉVIGNY et al., 2004).

O pico $[M+H]^+$ 266 (Figura 54, pág. 86.) apresentou perda de NH_3 (17 Da), resultando no íon com m/z 249. Este sofreu perdas de 30 Da e 28 Da, atribuídos a saída de CH_2O e CO, sequencialmente, formando o íon m/z 191, apontando que no esqueleto exista a presença no metileno dioxo (Figura 55, pág. 87) (STÉVIGNY et al., 2004). Essa massa já é encontrada na espécie e atribuída ao alcaloide aporfínico anonaína, sugerindo que esse pico se trata desta, uma vez que na literatura não há alcaloides do tipo aporfínico que tenham o substituinte metileno dioxo apenas no anel D.

No espectro do pico $[M+H]^+$ 296 (Figura 56, pág. 87) exibiu uma perda inicial de 17 Da (NH_3), com perdas de 30 Da (CH_2O) e 28 Da (CO), referentes ao grupo metileno dioxo, resultando no íon com m/z 221 (Figura 57, pág. 88).

O pico 7 $[M+H]^+$ 276 e pico 8 $[M+H]^+$ 306, tiveram perdas iniciais sugestivas de alcaloides do tipo oxoaporfínico, como perdas dos substituintes que estavam ligados aos anéis A e D, ou perda de CO a partir do grupo carbonílico em C-7 (DA SILVA et al., 2017). No espectro com m/z 276, observou-se a perda de CO (28 Da) três vezes consecutivas, sugerindo que no esqueleto exista um metileno dioxi, e este esteja inserido na no anel A, apontando que esse alcaloide se trata da liriodenina, já relatado para essa espécie.

No espectro do outro alcaloide oxoaporfínico com m/z 306, observou-se perdas de 15 Da ($-CH_3^+$) e 28 Da (CO), resultando no íon com m/z 263 (Figura60, pág.89). Segundo Da Silva e colaboradores (2017), esse esqueleto é sugestivo do alcaloide lanuginosina (Figura 61, pág.90), o qual já foi descrito na literatura para a espécie *Xylopiia frutescens*.

Figura 46. Espectro de MS, MS² e MS³ do pico 1 com m/z $[M+H]^+$ 342 (Tr= 36.9 min).

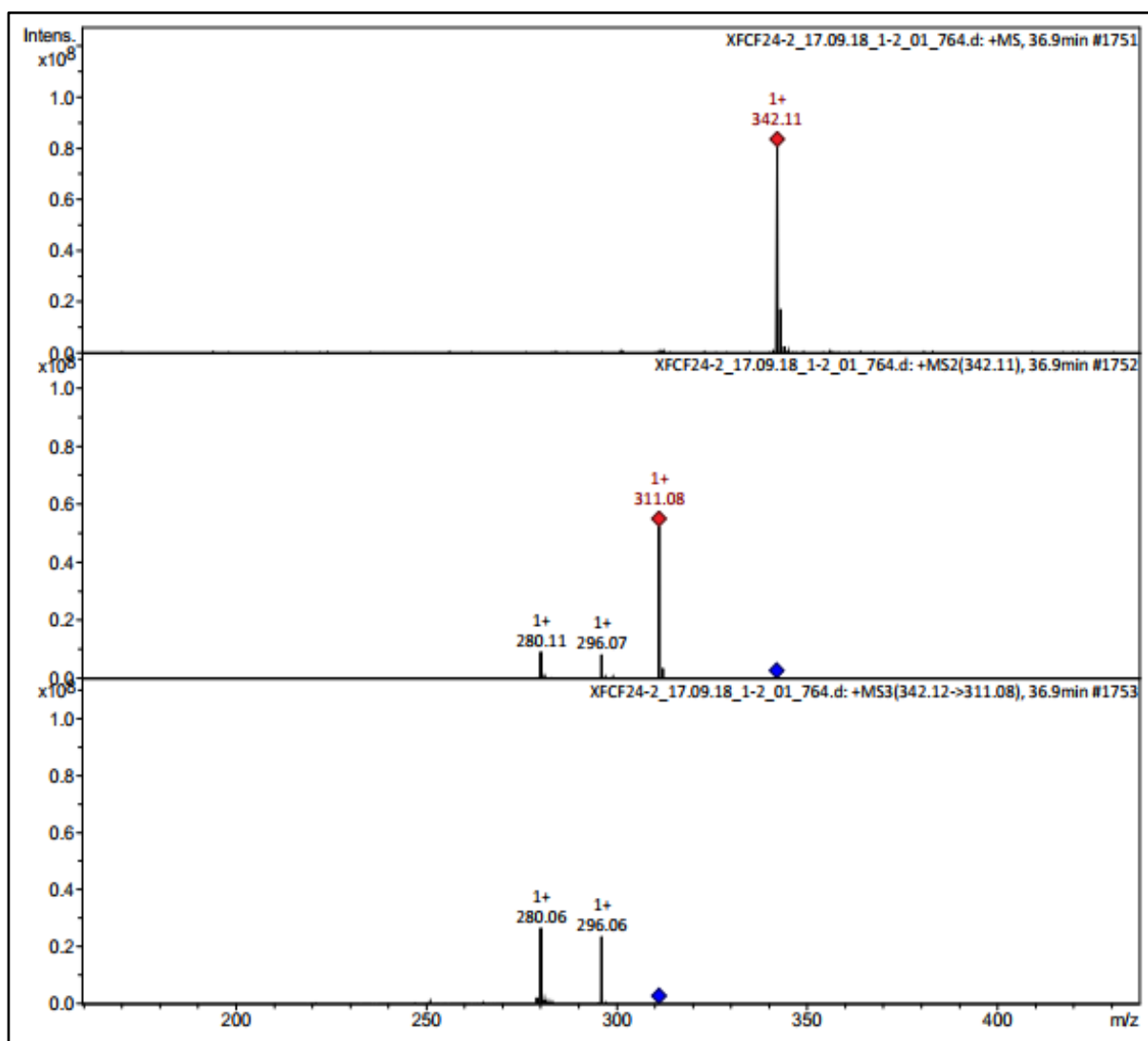


Figura 47. Proposta de fragmentação para o pico 1 $[M+H]^+$ 342.

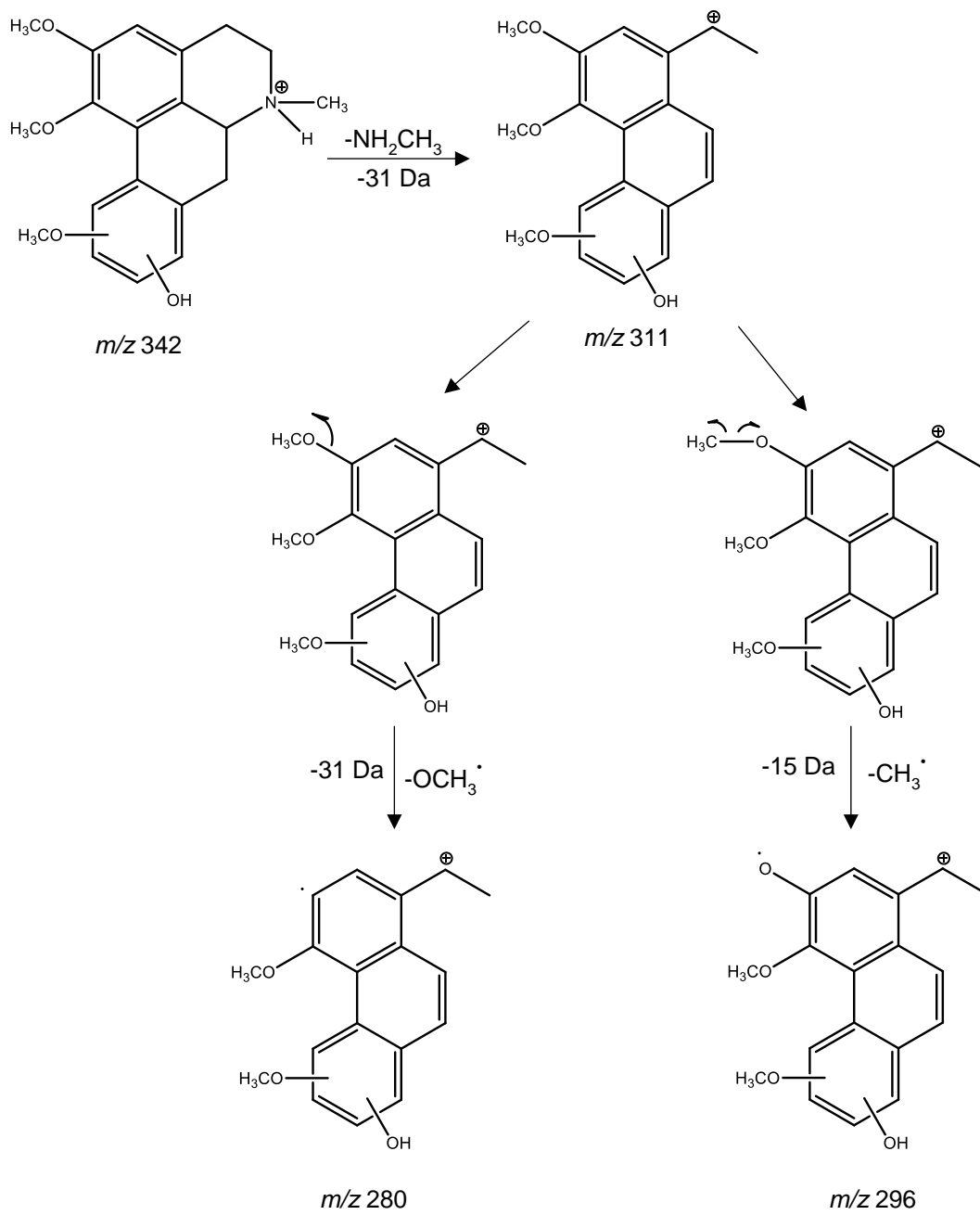


Figura 48. Espectro de MS, MS² e MS³ do pico 3 com m/z $[M+H]^+$ 326 (Tr= 45.8 min).

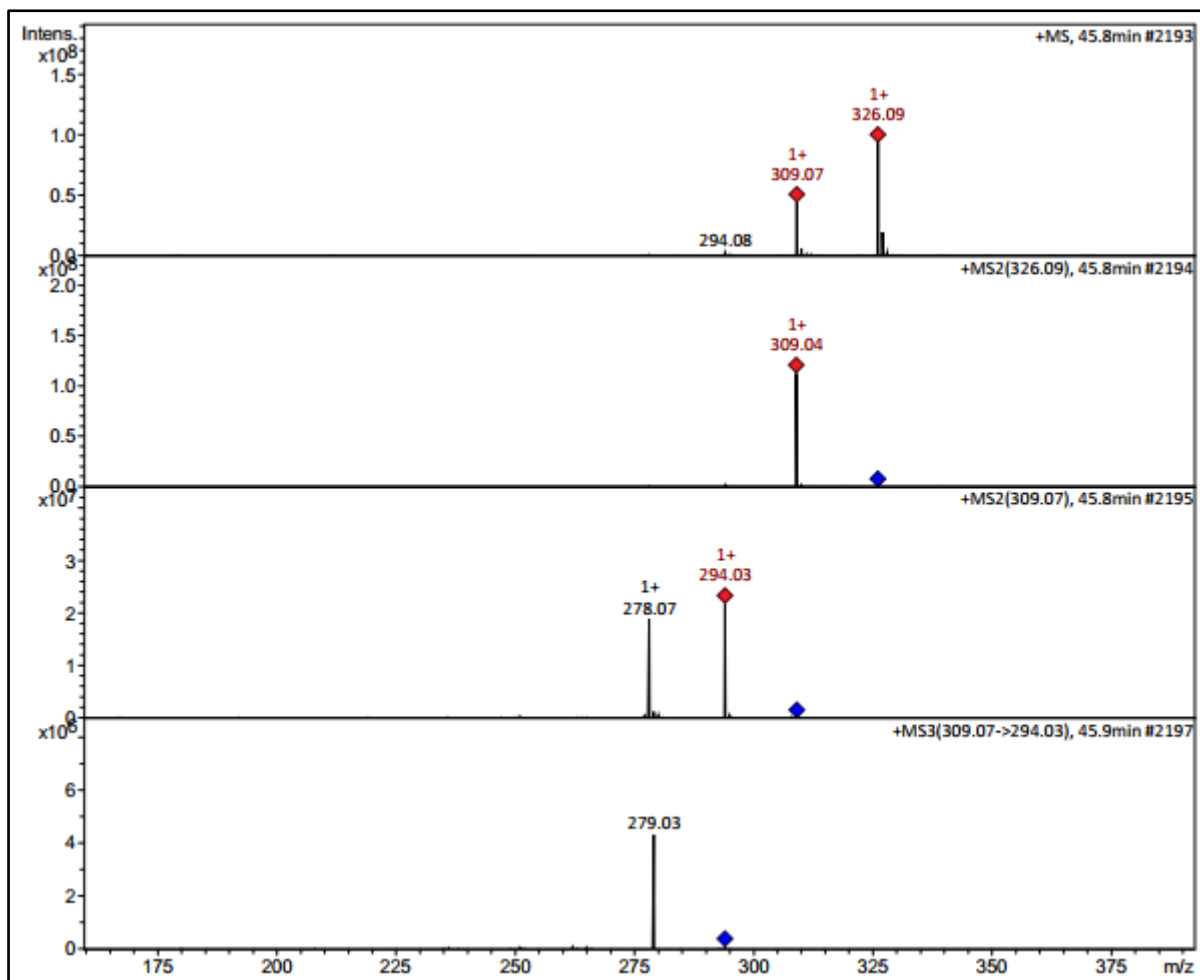


Figura 49. Proposta de fragmentação para o pico 3 $[M+H]^+$ 326.

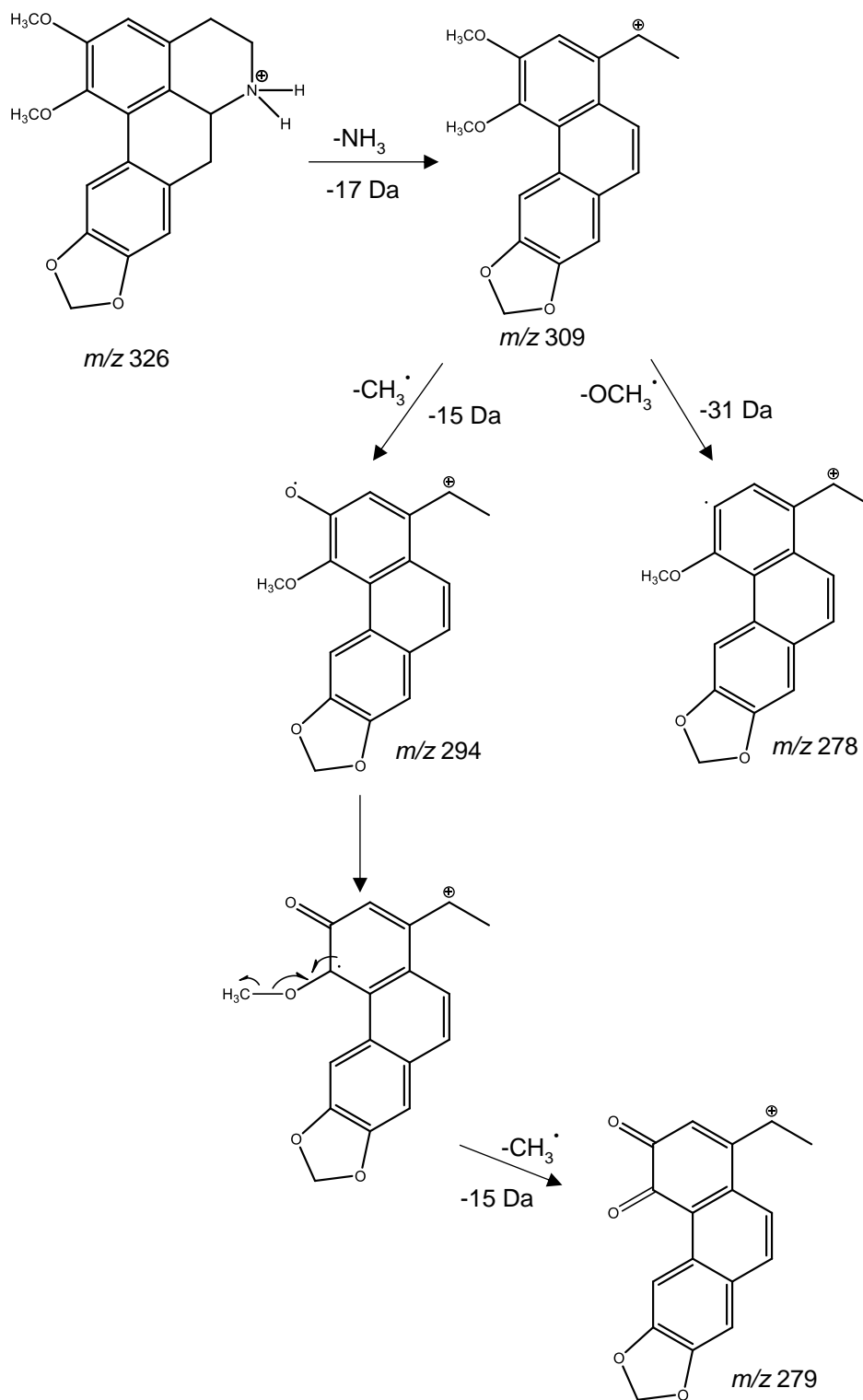


Figura 50. Espectro de MS, MS² e MS³ do pico 6 com m/z [M+H]⁺ 326 (Tr= 53.3 min).

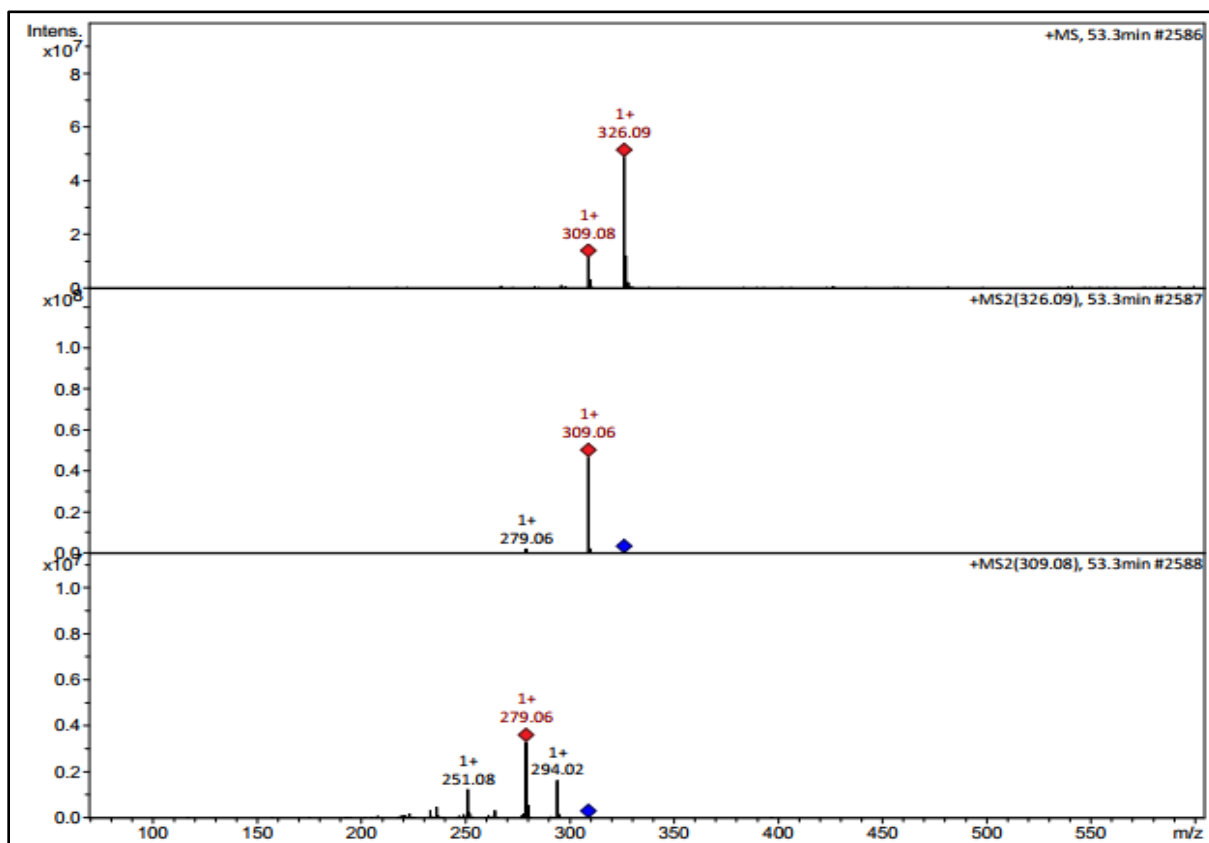


Figura 51. Proposta de fragmentação para o pico 6 [M+H]⁺ 326.

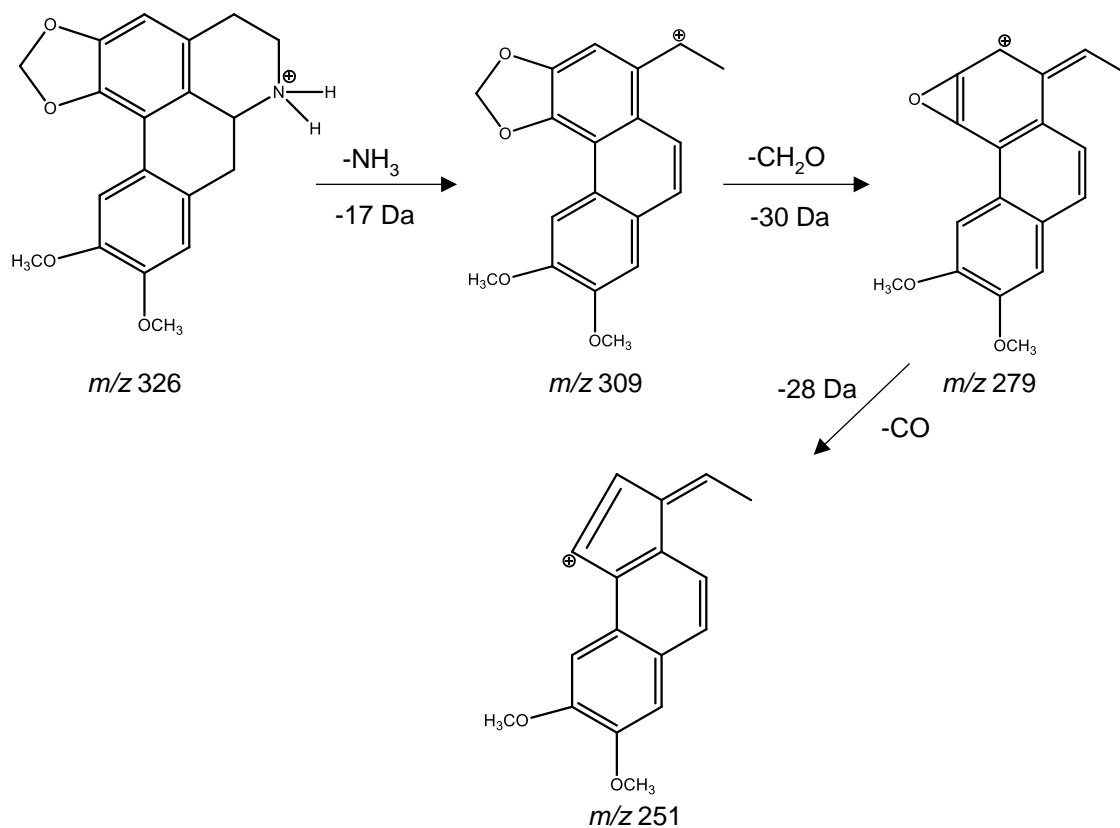


Figura 52. Espectro de MS, MS² e MS³ do pico 2 com m/z $[M+H]^+$ 312 (Tr= 38.3 min).

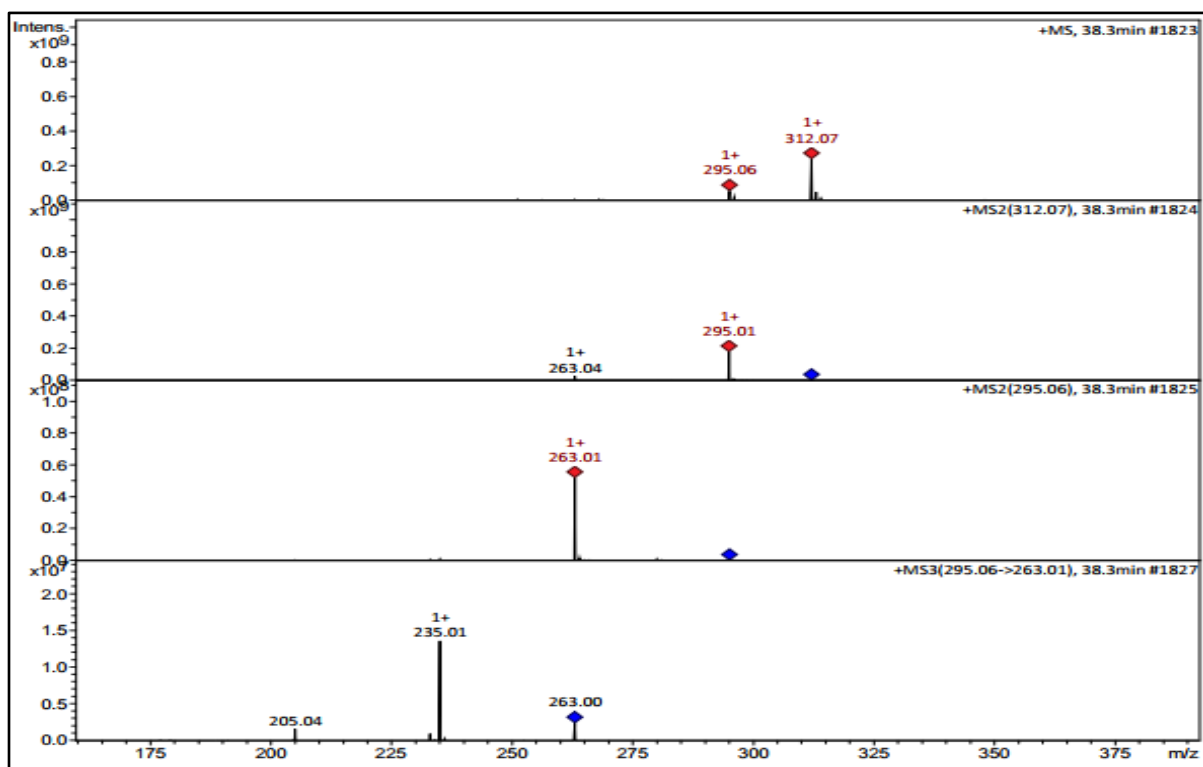


Figura 53. Proposta de fragmentação para o pico 2 $[M+H]^+$ 312

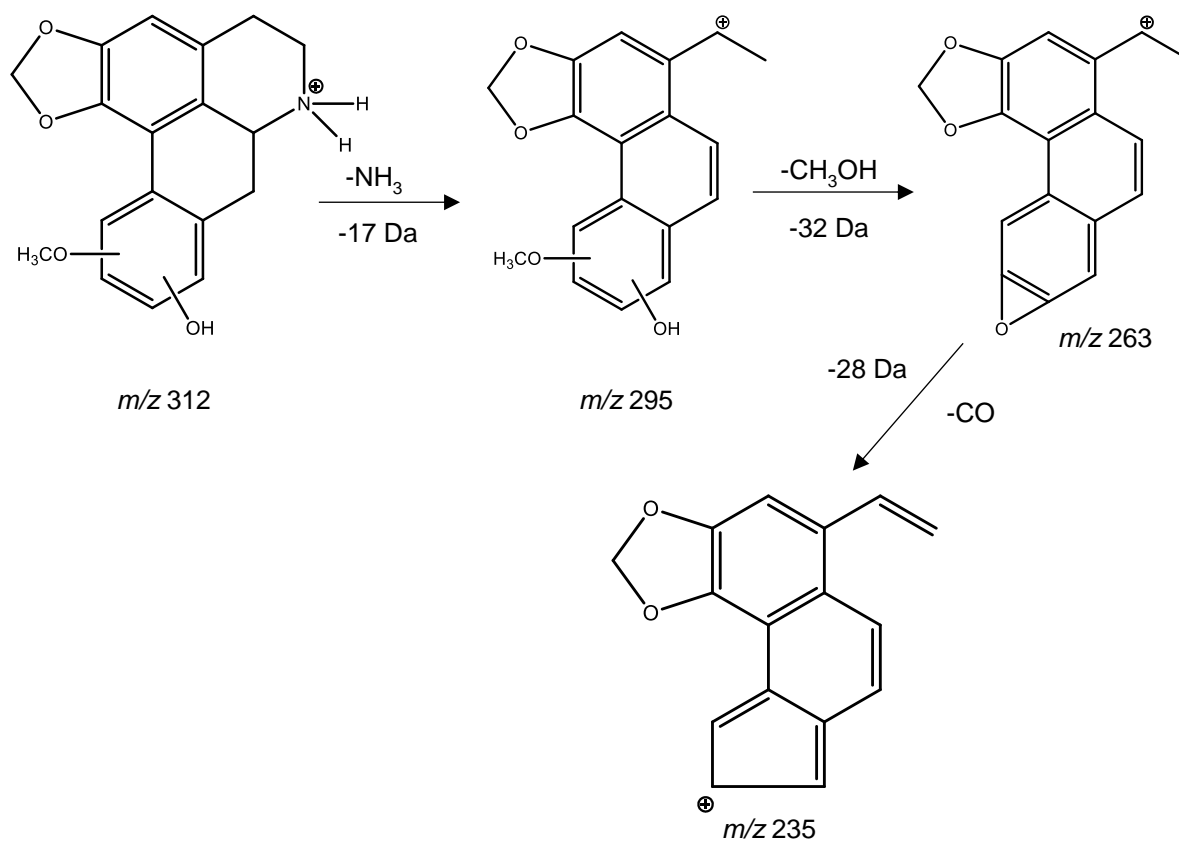


Figura 54. Espectro de MS, MS² e MS³ do pico 4 com m/z $[M+H]^+$ 266 (Tr= 47.4 min).

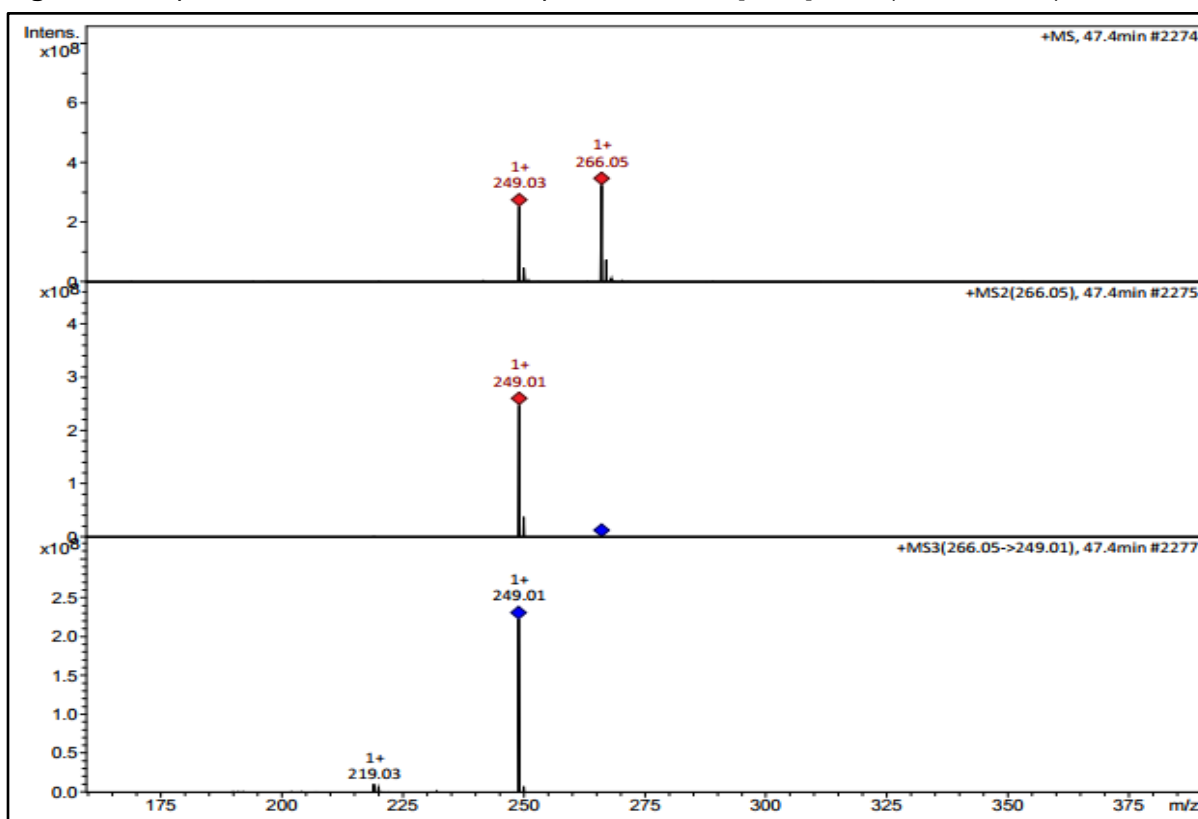


Figura 55. Proposta de fragmentação para o pico 4 $[M+H]^+$ 266.

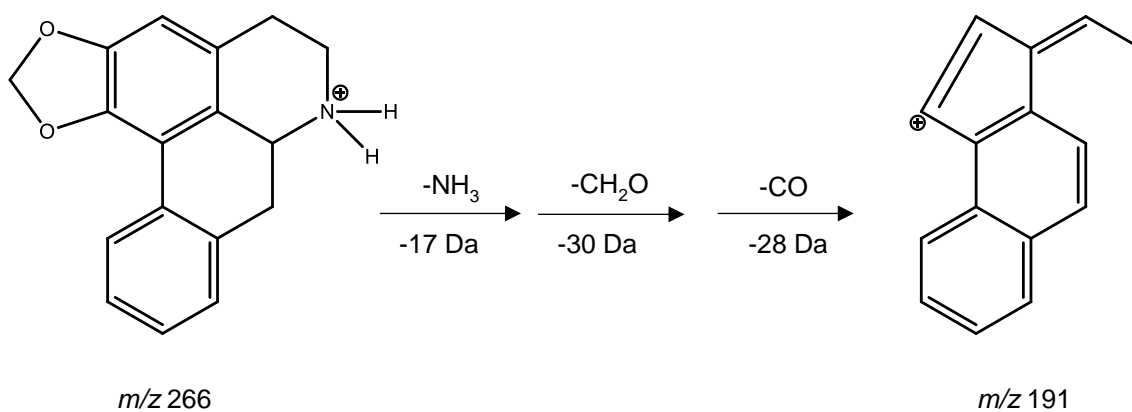


Figura 56. Espectro de MS, MS² e MS³ do pico 5 com m/z $[M+H]^+$ 296 (Tr= 49.5 min).

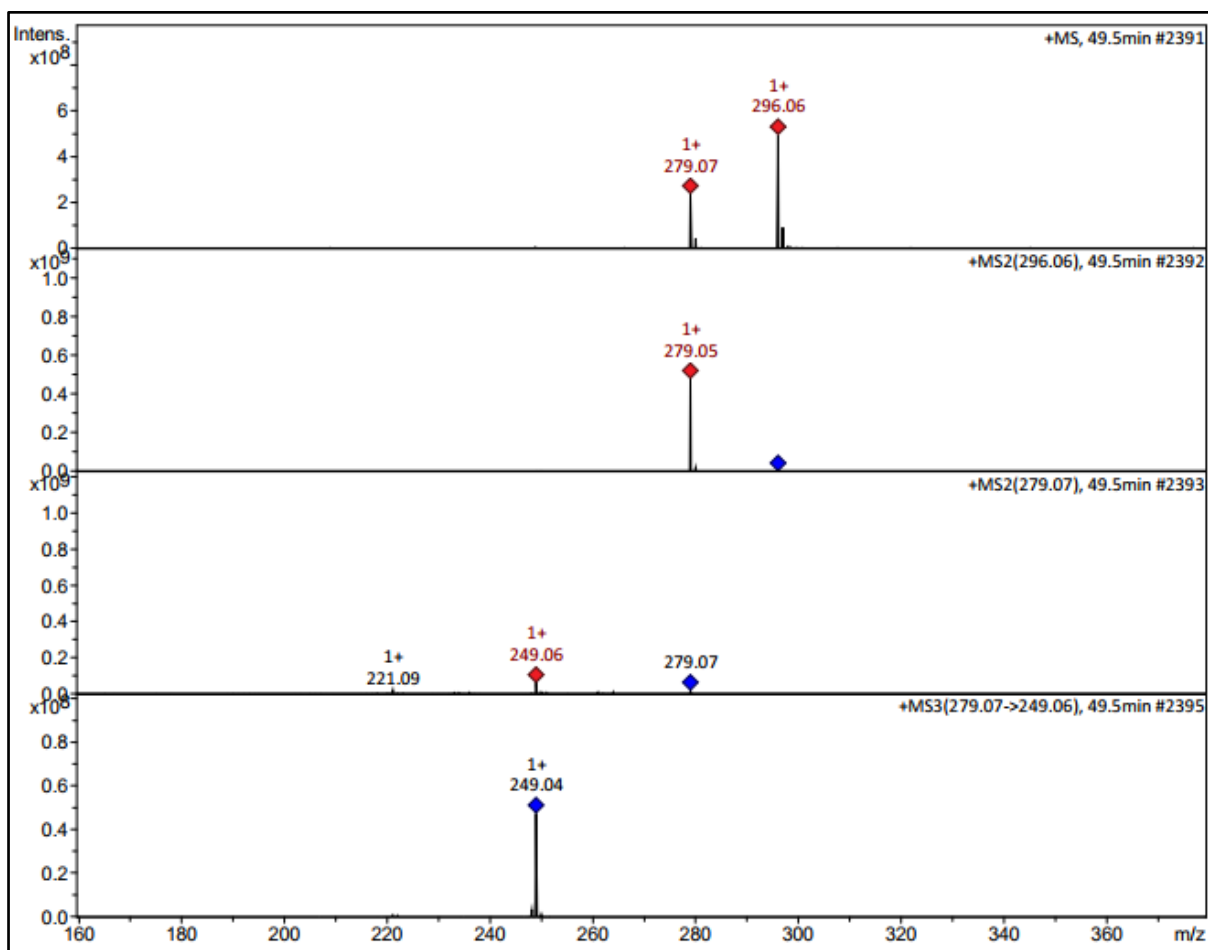


Figura 57. Proposta de fragmentação para o pico 5 $[M+H]^+$ 296.

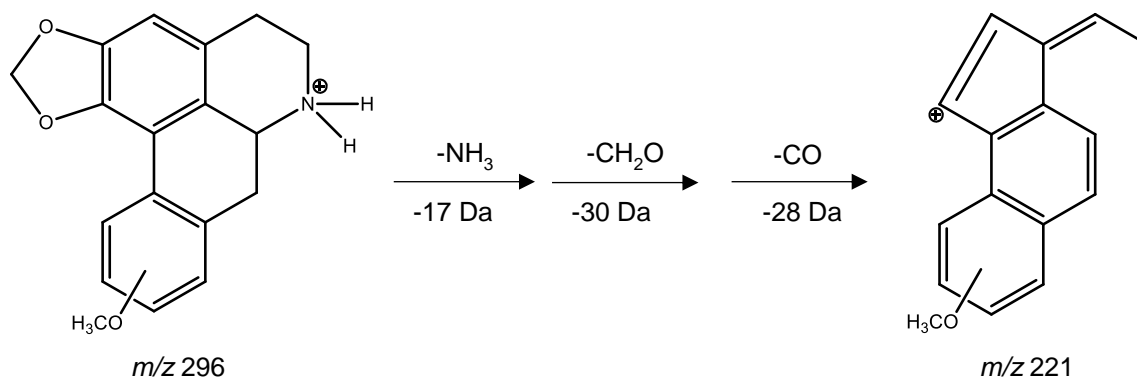


Figura 58. Espectro de MS, MS² e MS³ do pico 7 com m/z $[M+H]^+$ 276 (Tr= 57.4 min).

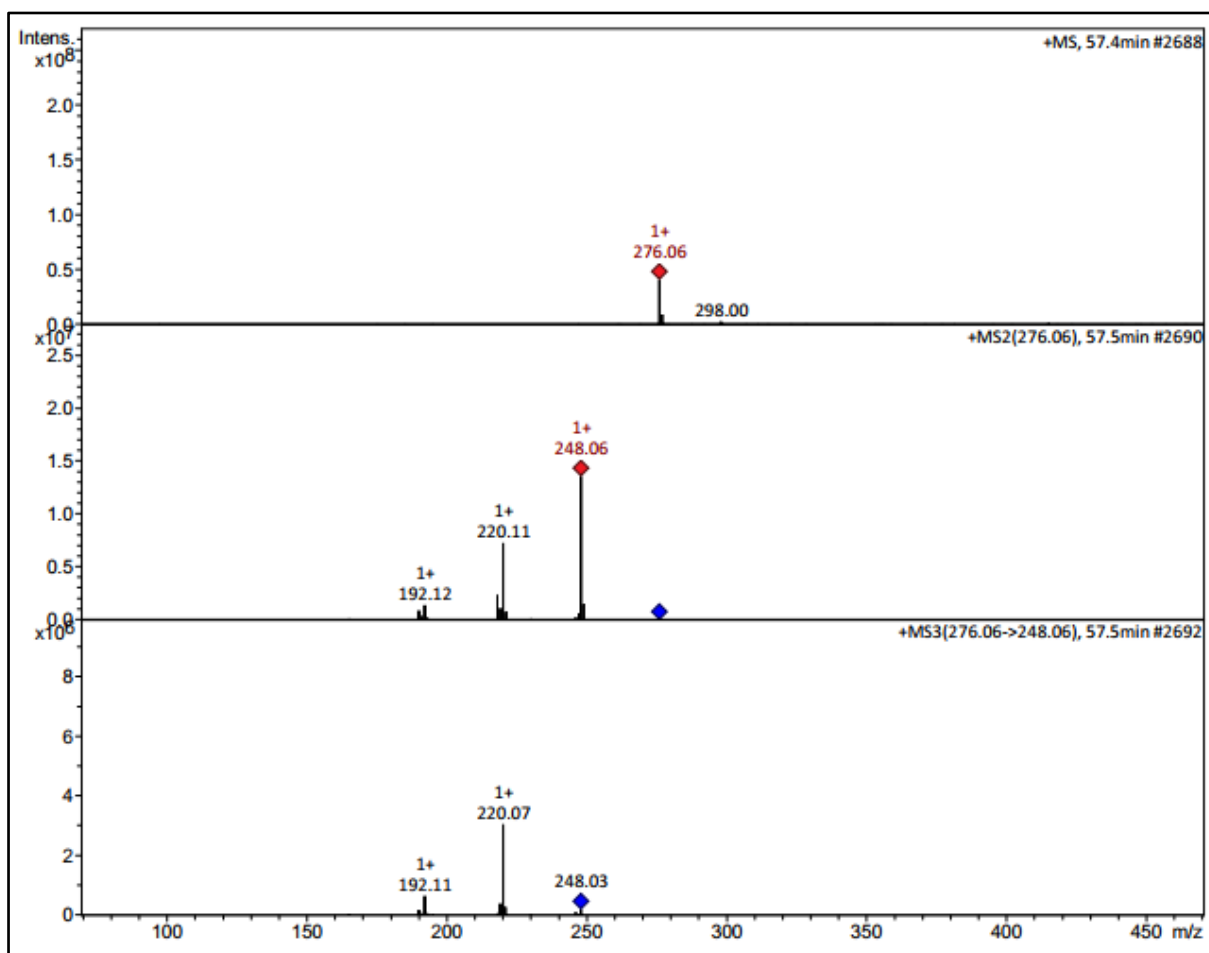


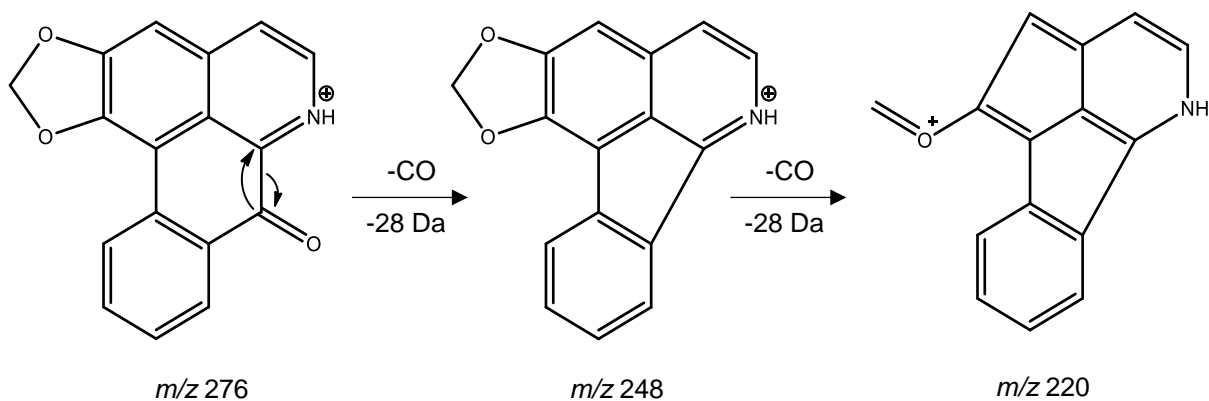
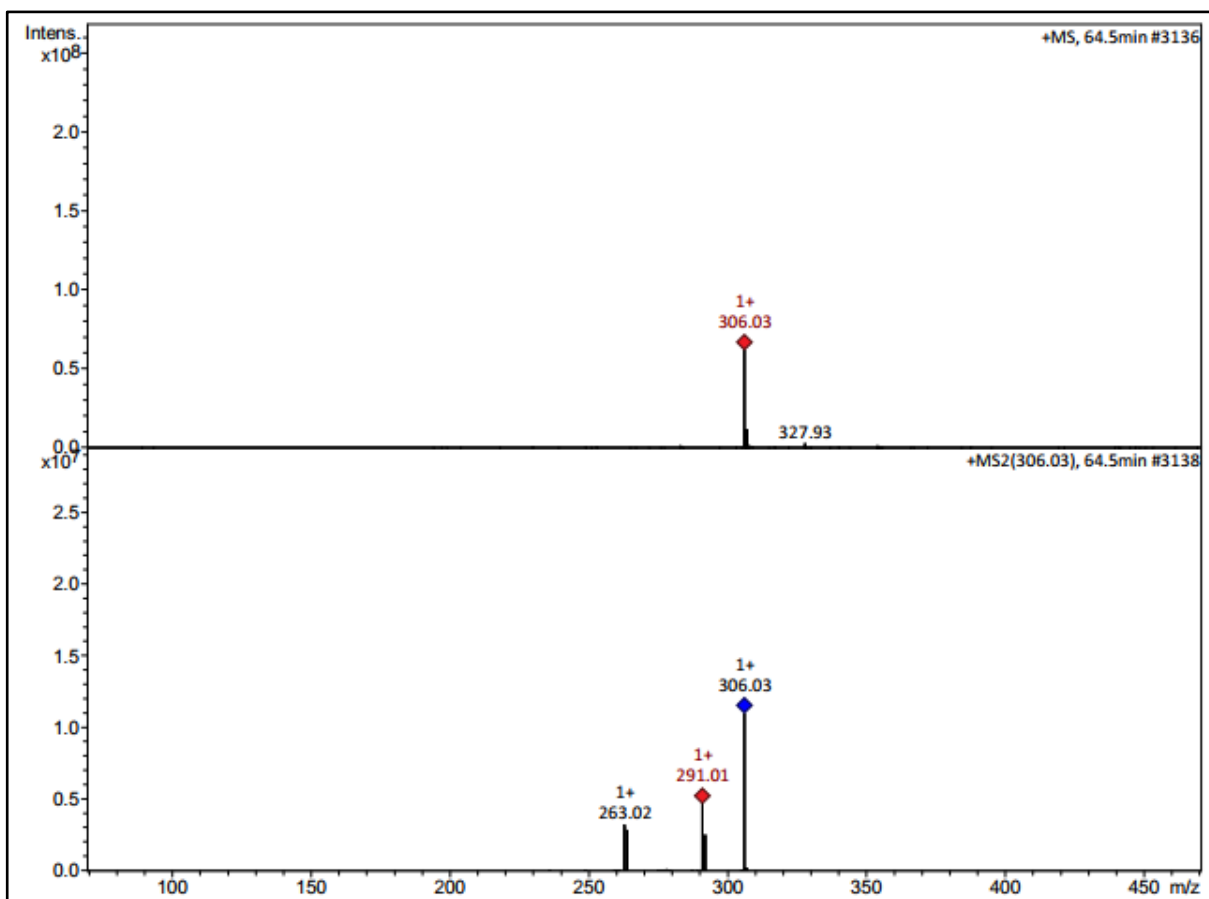
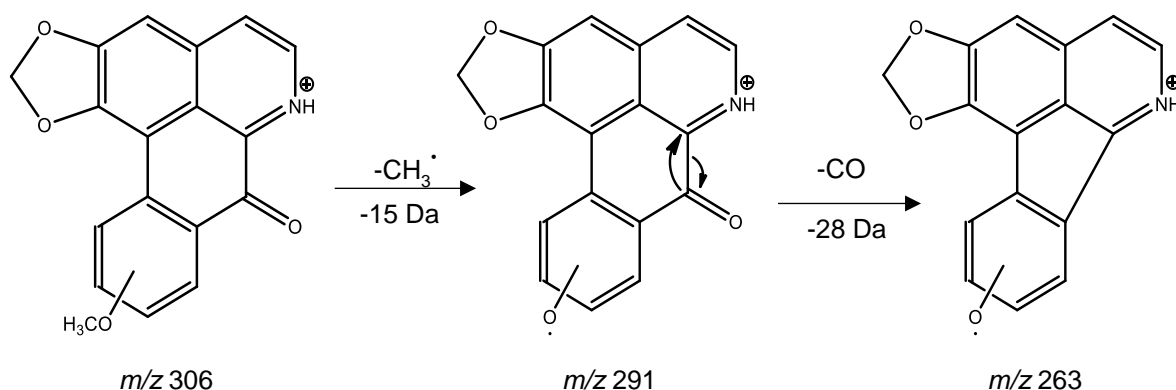
Figura 59. Proposta de fragmentação para o pico 7 $[M+H]^+$ 276.**Figura 60.** Espectro de MS, MS² e MS³ do pico 8 com m/z $[M+H]^+$ 306 (Tr= 64.5 min).

Figura 61. Proposta de fragmentação para o pico 8 $[M+H]^+$ 306.



5.8. Identificação dos constituintes voláteis de *Xylopiya frutescens*

O óleo essencial das cascas de caule de *Xylopiya frutescens* teve o rendimento de 0,8% em relação ao peso do material fresco. Os constituintes voláteis foram identificados de acordo com a biblioteca NIST *Mass Spectral Library*. Foram calculados os índices de Kovats e comparados com os da biblioteca, sendo identificados os que tinham até 5% de diferença. As porcentagens e os índices encontram-se listados na tabela 7, pág. 89.

A análise levou a identificação de 40 constituintes, sendo constituído por monoterpenos e sesquiterpenos, e como compostos majoritários o β -pineno (2,52 %), 1,3,5-trimetilbenzeno (3,2 %), citronelol (1,06 %), geraniol (2,35 %), timol (2,96 %), elemol (1,36 %), espatulenol (1,08 %), cadin-4-en-10-ol (1,79 %). Quando comparado a um estudo realizado com a mesma espécie, mas com os frutos, em Timbaúba, Pernambuco, os constituintes majoritários foram diferentes, sendo para esta o linalol (12,1 %), *trans*-pinocarveol (7,8 %), germacrene D (24,2 %) (TAYLOR et al., 2011). Isso pode ser explicado pelas diferenças geográficas e condições genéticas que podem alterar a composição química e a produção de óleo essencial (MORSHELOO et al., 2018; SAEIDI et al., 2018).

Figura 62. Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG-EM) do óleo essencial de *Xylopi* *frutescens*.

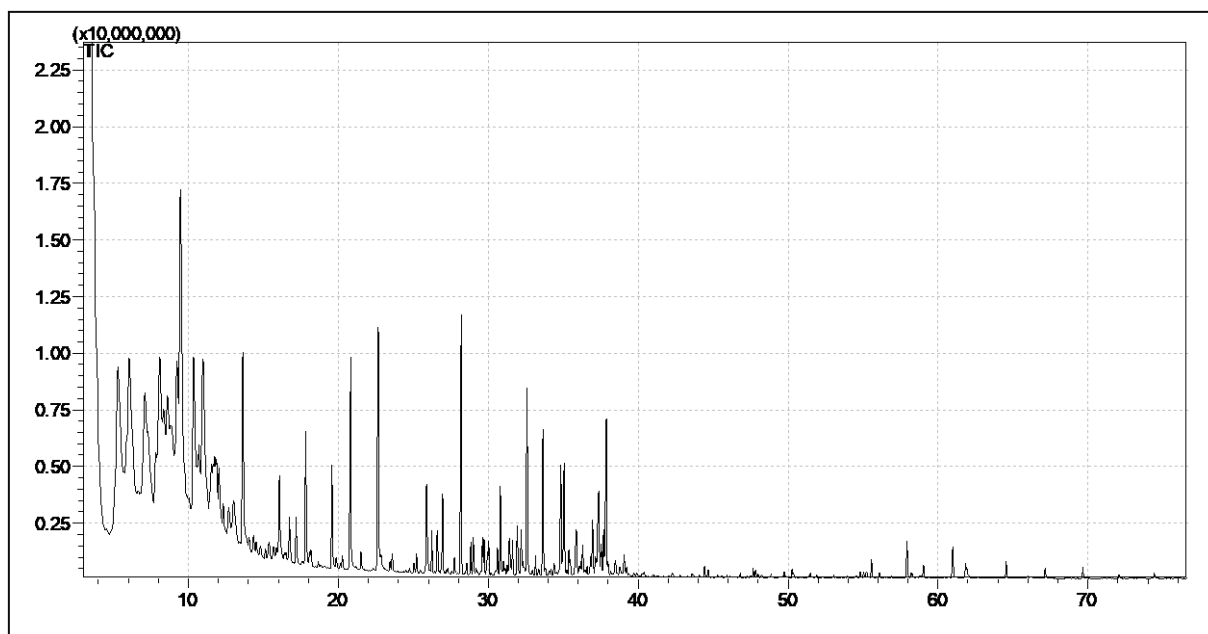


Tabela 7. Constituintes químicos do óleo essencial das cascas de caule de *Xylopi* *frutescens*.

	Constituintes	TR	IK _a	IK _L	Área (%)
1	β-pineno	8,594	974	978	2,52
2	1,3,5-trimetilbenzeno	9,235	993	994	3,2
3	Decano	9,466	1000	1000	7,52
4	Undecano	13,626	1098	1100	2,59
5	Terpinen-4-ol	17	1175	1180	0,52
6	Dodecano	18,166	1197	1200	0,13
7	Verbenona	18,654	1207	1208	0,05
8	Citronelol	19,57	1227	1232	1,06
9	Geraniol	20,824	1254	1255	2,35
10	Geranial	21,506	1269	1268	0,17
11	Timol	22,661	1294	1293	2,96
12	Trans-pinocarveol acetato	22,846	1298	1296	0,07
13	α-cubeneno	25,052	1347	1349	0,08
14	Isoledene	26,1	1371	1372	0,01
15	Geranil-acetato	26,591	1382	1380	0,44
16	Elemene	26,956	1390	1390	0,72
17	α-cis-bergamoteno	27,966	1413	1416	0,01
18	Selina-5,11-dieno	29,185	1441	1445	0,04

19	Cadina-3,5-dieno	29,495	1449	1452	0,03
20	α -humuleno	29,617	1451	1454	0,31
21	Farneseno	30	1454	1452	0,26
22	4-(14),5-dieno muurola	30,023	1461	1466	0,28
23	γ - muuroleno	30,615	1475	1478	0,25
24	α -muuroleno	31,621	1498	1497	0,31
25	β -bisaboleno	31,936	1506	1508	0,44
26	γ -cadineno	32,192	1512	1512	0,37
27	α -cadineno	33,155	1536	1538	0,16
28	Elemol	33,653	1548	1546	1,36
29	Nerolidol	34,168	1561	1561	0,05
30	Espatuleno	34,835	1577	1576	1,08
31	Viridiflorol	35,381	1591	1594	0,2
32	Humuleno epóxido	36,077	1608	1613	0,05
33	Epi-cubenol	36,818	1628	1631	0,16
34	Eudesmol	36,954	1631	1632	0,5
35	Muurolol	37,534	1646	1651	0,24
36	Cadin-4-en-10-ol	37,873	1655	1659	1,79
37	Oplopanona	40,991	1738	1738	0,01
38	Neofitadieno	44,437	1833	1836	0,09
39	Hexadecanoato	47,487	1921	1925	0,02
40	Octadecanoato	53,972	2122	2127	0,01

IK_a = índice de Kovats da amostra; IK_L: índice da biblioteca NIST *Mass Spectral Library* (National Institute of Standards and Technology).

5.9. Atividade antimicrobiana

A concentração inibitória mínima do óleo essencial de *Xylopi frutescens* foi determinada para as cepas *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC-12228), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-9027), *Escherichia coli* (LM-39), *Morganella morganii* (LM-339), *Cryptococcus gattii* (INCQS-40113), *Candida tropicalis* (ATCC- 13803), conforme descrito na tabela 8, pág. 94.

Tabela 8. Resultados da avaliação da Concentração Inibitória Mínima/CIM ($\mu\text{g/mL}$) da substância contra cepas bacterianas e fúngicas.

Amostras	Microrganismos						
	<i>S. aureus</i> ATCC-6538	<i>S. epidermidis</i> ATCC-12228	<i>P. aeruginosa</i> ATCC-9027	<i>E. coli</i> ATCC-18739	<i>M. morganii</i> LM-339	<i>C. gattii</i> INCQS-40113	<i>C. tropicalis</i> ATCC-13803
XFOE	+	+	1024	+	1024	32	256
Meio de cultura	-	-	-	-	-	-	-
Microrganismo	+	+	+	+	+	+	+
Anfortericina B	x	x	x	x	x	x	x
Gentamicina	-	-	-	-	-	-	x

O óleo essencial apresentou atividade antibacteriana frente as cepas de *P. aeruginosa* e *Morganella morganii*, com CIMs de 1024 $\mu\text{g/mL}$. Diferentemente do que já foi descrito na literatura para o óleo essencial de *X. frutescens*, que apresentou atividade contra *S. aureus* (FOURNIER et al., 1994) e o óleo de casca de caule de *Xylopiya longifolia* que também apresentou atividade contra essa cepa (CLAESON et al., 1992)., isso não ocorreu nos nossos testes, uma vez que houve crescimento bacteriano desta.

Com relação à atividade antifúngica, o óleo essencial foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas fúngicas utilizadas, com CIM de 32 $\mu\text{g/mL}$ para *C. gattii* (INCQS-40113) e de 256 $\mu\text{g/mL}$ para *C. tropicalis* (ATCC-13803) corroborando dados da literatura (LEBOEU et al., 1982.; LIMA et al., 1992.; FOURNIER et al., 1994.; TAKAHASHI et al., 2006.), bem como *X. aethiopica* pertencente ao mesmo gênero, que também apresenta atividade antifúngica (TATSADJIEU et al., 2003).



Conclusões

6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico das cascas de caule de *Xylopiá frutescens* levou ao isolamento e identificação de uma mistura de diterpenos o ácido *ent-caur-16-en-19-óico* e ácido *ent-traquiloban-19-óico*, sendo este relatado pela primeira vez para espécie, de quatro alcaloides, a pseudoplamatina, oxobuxifolina, lísic, também relatados pela primeira vez para *X. frutescens* e laurotetanina já descrita anteriormente, e por fim uma mistura de lignana, a siringaresinol- β -D-glicosídeo e um composto similar, sendo este o segundo relato de lignana para o gênero *Xylopiá*.

A análise da fração da fase clorofórmica por CL/EM/EM mostrou a identificação de oito picos, todos com *m/z* par e atribuídos a alcaloides, sendo seis do tipo aporfínico e dois do tipo oxoaporfínico e seus respectivos grupos substituintes.

A caracterização do óleo essencial da espécie em estudo demonstrou ter sua composição constituída por monoterpenos e sesquiterpenos, e quando realizado o teste de atividade antimicrobiana, o óleo essencial apresentou moderada atividade antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* e *Morganella morganii* (CIMs:1024 μ g/mL) e forte atividade antifúngica contra *C. gattii* (INCQS-40113) com CIM de 32 μ g/mL e de 256 μ g/mL para *C. tropicalis* (ATCC-13803), sendo classificado com potencial forte para as cepas analisadas neste estudo, contribuindo, assim, para o conhecimento biológico da espécie *X. frutescens*.

REFERÊNCIAS

- ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: Recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.
- ALMEIDA, J. R. G. DA S. et al. Alkaloids and a new cinnamate derivative from *Duguetia gardneriana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 7, p. 456–458, 2007.
- ALBERKUME, A.; CUENCA-ESTRELLA, M.; GOMEZ-LOPEZ, A.; PETRIKKOU, E.; MELLADO, E.; MONZÓN, A.; RODRIGUES-TUDELA, J. L.; NETWORK, E. Comparative evaluation of two different methods of inoculum preparation for antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy** v. 50, p. 719-722, 2002
- ANDRADE, N. C. DE et al. Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopia cayennensis* Maas. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 11, p. 1055–1058, 2004.
- ANTUNES, R. M. P.; LIMA, E. O.; PEREIRA, M. S. V.; CAMARA, C. A.; ARRUDA, T. A.; CATÃO, R. M. R.; BARBOSA, T. P.; NUNES, X. P.; DIAS, C. S.; SILVA, T. M. S. Atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de fitoconstituintes e produtos sintéticos sobre bactérias e fungos leveduriformes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 4, p. 517-524, 2006.
- ASEKUN, O.T; ADENIYI, B.A. Antimicrobial and cytotoxic activities of the fruit essential oil of *Xylopia aethiopica* from Nigeria. **Fitoterapia**, v. 75, p. 368-700, 2004.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; DA-CUNHA, E. V. L.; LOPES, M.; LIO, C.; DA, C.; DIAS, S.; GRAY, A. I. Cissaglaberrimine, an aporphine alkaloid from *Cissampelos glaberrima*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 5, p. 959–961, 1997.
- BARBOSA, L. T. C.; VEGA, M. R. G. Diterpenes from the Genus *Xylopia*. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1712–1733, 2017.
- BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.
- CASTELLO BRANCO, M. V. S. et al. Diterpenes from *Xylopia langsdorffiana* Inhibit Cell Growth and Induce Differentiation in Human Leukemia Cells. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 64, n. 9–10, p. 650–656, 2009.
- CASTELLO-BRANCO, M. V. S. et al. Xylodiol from *Xylopia langsdorffiana* induces apoptosis in HL60 cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1035–1042, 2011.
- CHATROU, L. W.; CHASE, M. W.; COUVREUR, T. L. P.; MAAS, J. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B. 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, n. 1, p. 5, 2012.

CLAESON, P.; RADSTROM, P.; SKOLD, O.; NILSSON, A.; HOGLUND, S. Bactericidal effect of sesquiterpene T-cadinol on *Staphylococcus aureus*. **Phytother. Res.** 6,94-98, 1992.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^c. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard M07-A10. Pennsylvania, United States of America: National Committee for Clinical Laboratory Standards, 2015.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^a. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts**. Approved standard M27-A3. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLINICAL LABORATORY STANDARDS INSTITUTE^b. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi**. Approved standard M38-A2. Pennsylvania, United States of America: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

CLELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials “*in vitro*” and in experimental animal infections. In: LORIAN, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

CORREIA, A. C. DE C. et al. Essential oil from the leaves of *Xylopia langsdorfiana* (Annonaceae) as a possible spasmolytic agent. **Natural Product Research**, v. 29, n. 10, p. 980–984, 2015.

COSTA, E. V.; DUTRA, L. M.; NEPEL, A.; BARISON, A. Isoquinoline alkaloids from the leaves of *Xylopia laevigata* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 51, n. 15440, p. 331–334, 2013.

COSTA, E. V.; LÚCIA, M.; PINHEIRO, B.; DUARTE, A.; SOUZA, L. De; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; PRADO, B.; FILHO, D.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine- β -Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, p. 9714–9720, 2011.

COSTA, V. C. D. O. et al. Constituintes químicos das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 138–142, 2012.

COSTA, V. C. O. et al. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 245–248, 2008

DA SILVA, F. M. A.; BATAGLION, G. A.; DE ALMEIDA, R. A.; HEERDT, G. Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and ab initio computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 30–36, 2017.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Product: a biosynthetic approach**. Chichester 3^a ed. John Wiley & Sons, LTD, 509p, 2009.

DÍAZ, A. M. P. Neolignans from *Anaxagorea clavata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 345-346, 1997.

DI-STASI, L.C; HIRUMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata atlântica**. 2. Ed. São Paulo: UNESP, 2002, p. 604.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELENA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 97, p. 305-311, 2005.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplatemethod to determine the Minimal Inhibitory Concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, 1998.

FECHINE, I. M. et al. Two new alkaloids from *Hornschurchia obliqua*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1–2, p. 29–33, 2003.

FERRAZ, R. P. C.; CARDOSO, G. M. B.; THANANY, B.; ERALDO, J.; FONTES, N.; PAULA, A.; PRATA, N.; CARVALHO, A. A.; MORAES, M. O.; PESSOA, C.; COSTA, E. V.; BEZERRA, D. P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopi frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 196–200, 2013.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FOURNIAT, J.; CHARLES, B. Chemical and biological studies of *Xylopi longifolia* A. DC. essential oils. **J. Essent. Oil Res.** v. 5, p. 403-410, 1993.

FRAGA, B. M. The trachylobane diterpenes. **Phytochemical Analysis**, v. 5, p. 49–56, 1994.

FREIRE, I.C.M.; PÉREZ, A.L.A.L. ; CARDOSO, A.M.R.; MARIZ, B.A.L.A.; ALMEIDA, L.F.D.; CAVALCANTI, Y.W.; PADILHA, W.W.N. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.16 n.2, 2014.

GRYCOVA, L.; DOSTAL, J.; MAREK, R. Quaternary protoberberine alkaloids. **Phytochemistry**, v. 68, p. 150–175, 2007.

HADACEK, F. GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**, v. 11, p. 137-147, 2000.

HOLETZ, F.B.; HOMES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.

HOUGHTON, P. J.; HOWES, M. J.; LEE, C. C.; STEVENTON, G. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.391-400, 2007.

HUSEIN, C. C. **ALCALOIDES DAS RAIZES DE XYLOPIA LANGSDORFFIANA STHIL & TUL. (ANNONACEAE)**. João Pessoa, 2016. 91p. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Paraíba.

- JOLY, L.G. et al. Ethnobotanical inventory of medicinal plants used by the Guayami Indians western Panama. **Journal Ethnopharmacology**, v. 20, p. 145-171, 1987.
- KAMPERDICKA, C.; PHUONGA, N. M.; ADAM, G.; VAN SUNG, T. Guaiane dimers from *Xylopi*a vielana. **Phytochemistry**, v. 64, n. 4, p. 811–816, 2001.
- KARIOTI, A.; HADJIPAVLOU-LITINA, D.; MENSAH, M. L. K.; FLEISCHER, T. C.; SKALTSA, H. Composition and Antioxidant Activity of the Essential Oils of *Xylopi*a *aethi*opica (Dun) A. Rich. (Annonaceae) Leaves, Stem Bark, Root Bark, and Fresh and Dried Fruits, Growing in Ghana. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8094–8098, 2004.
- LAGO, J. H. G.; DE ÁVILA, P.; MORENO, P. R. H.; LIMBERGER, R. P.; APEL, M. A.; HENRIQUES, A. T. Analysis, comparison and variation on the chemical composition from the leaf volatile oil of *Xylopi*a *aromatica* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 6, p. 669–672, 2003.
- LAHM, G.; DEICHMANN, J. G.; RAUEN, A. L.; OPATZ, T. A one-pot cascade to protoberberine alkaloids via stevens rearrangement of nitrile-stabilized ammonium ylides. **Journal of Organic Chemistry**, v. 80, n. 3, p. 2010–2016, 2015.
- LEÃO, I.; SOUZA, L. De; CAROLINA, A.; CORREIA, D. C.; CABRAL, L.; HENRIQUE, L.; VASCONCELOS, C.; CORREIA, C.; CARLOS, V.; COSTA, D. O.;
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; PROVOST, J.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alcaloides des Annonacées. XLIII: Alcaoides du *Xylopi*a *frutescens* Aubl. **Plantes médicinales et phytothérapie**, n. 253–259, 1982.
- LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, p. 2783, 1982.
- LEITÃO, F.; GUIMARÃES, S.; STERN, V.; MACHLINE, I.; MARTINS, K. Medicinal plants traded in the open-air markets in the State of Rio de Janeiro , Brazil : an overview on their botanical diversity and toxicological potential. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 225–247, 2014.
- LIMA, M. A. et al. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria juruensis*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 31, n. 4, p. 423–425, 2003.
- LIMA, M. A. et al. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria poeppigiana*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 32, n. 3, p. 347–349, 2004.
- LÚCIO, A. S. S. C. Alcaloides Azafenantrenos Isolados de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith (Annonaceae). Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Paraíba-UFPB, João Pessoa, 2011.
- LÚCIO, A. S. S. C. **ALCALÓIDES DE ANNONACEA: Ocorrência e compilação de suas atividades biológicas e Avaliação fitoquímica e biológica de *Anaxagorea dolichocarpa* SPRAGUE & SANDWITH (Annonaceae)**. João Pessoa, 2015. 305p. Tese de Doutorado - Universidade Federal da Paraíba.

- LÚCIO, A. S. S. C. et al. Azaphenanthrene alkaloids with antitumoral activity from *anaxagorea dolichocarpa* sprague and sandwith (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7125–7131, 2011.
- MAAS, P. J. M.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil Rio de Janeiro**: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: Acesso em: janeiro de 2019.
- MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*, v.84, p.538-544, 1998.
- MACEDO, L.; VILAÇA, E.; REGINA, V.; MORAES, D. S.; CESAR, P.; NOGUEIRA, D. L.; EVELYN, M.; BARISON, A.; PAULA, A. Chemical constituents from the leaves of *Annona pickellii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 115–118, 2012.
- MOREIRA, D. D. L.; TEIXEIRA, S. S.; MONTEIRO, M. H. D.; DE-OLIVEIRA, A. C. A. X.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Traditional use and safety of herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 248–257, 2014.
- MONTENEGRO, C. DE A. et al. Gastroprotective effect of *Xylopi langsdorffiana* A. St.-Hil. & Tul. (Annonaceae): Involvement of endogenous sulfhydryls compounds and nitric oxide. **Records of Natural Products**, v. 8, n. 2, p. 165–183, 2014.
- MORSHEDLOO, M. R.; MAGGI, F.; NEKO, H. T.; AGHDAM, M. S. Sumac (*Rhus coriaria* L.) fruit: Essential oil variability in Iranian populations. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 1-7, 2018.
- NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. P. O.; JÚNIOR, A. M. B., TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.
- NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016.
- NGOUELA, S.; NYASSE, B.; TSAMO, E.; BROCHIER, M. C.; MORIN, C. A trachylobane diterpenoid from *Xylopi aethiopica*. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 264–266, 1998.
- NIERO, R.; MALHEIROS, A. Em **Química de Produtos Naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**; 4a. ed. Itajaí, SC: Univali, 2014.
- NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; CHALO MUTISO, P. B.; JUMA, F. D. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopi parviflora*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 939–944, 2004.
- NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S. G.; MUTISO, P. B. C.; JUMA, F. D. Antinociceptive effects of the extracts of *Xylopi parviflora* bark and its alkaloidal components in experimental animals. **Journal Natural Medicine**, v. 64, p. 9–15, 2010.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS-NCCLS. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests. 7 ed. Villanova, PA: NCCLS, 2000.

OHNO, N.; MABRY, T.J.; ZABEL, V.; WATSON, W.H. Tetrachyrin, a new rearranged kaurenoide lactone, ad diterpene acids from *Tetrachyron orizabaensis* and *Helianthus debilis* **Phytochemistry**, p. 1687-1689, 1979.

PEREIRA, F. O.; MENDES, J. M.; LIMA, I. O.; MOTA, K. S. L.; OLIVEIRA, W. A.; LIMA, E. O. Antifungal activity of geraniol and citronellol, two monoterpenes alcohols, against *Trichophyton rubrum* involves inhibition of ergosterol biosynthesis. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 2, p. 1–7, 2014.

PINTO, A. C. DE Q.; CORDEIRO, M. C. R.; DE ANDRADE, S. R. M.; FERREIRA, F. R.; FILGUEIRAS, H. A. DE C.; ALVES, R. E.; KINPARA, D. I. *Annona* species. **International Centre for Underutilised Crops, University of Southampton, UK**. 2005.

RABELO, D. M.; PINHEIRO, M. B.; BARISON, A.; SALOMÉ, K. S.; COSTA, E. V.; DA SILVA, F. M. A.; CHAVES, Y. O.; BASTOS, I. dos S. Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de *Guatteira citiodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1453–1458, 2014.

RIBEIRO, L. A. A. et al. O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopija langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 2, p. 197–203, 2007.

SAEIDI, K.; MOOSAVI, M.; LORIGOOINI, Z.; MAGGI, F. Chemical characterization of the essential oil compositions and antioxidant activity from Iranian populations of *Achillea wilhelmsii* K. Koch. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 274-280, 2018.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARMELENA, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 275-280, 2004.

SETTE, I. M. F. et al. Tetrahydroprotoberberine And Aporphine Alkaloids From *Rollinia leptopetala*. **Pharmaceutical Biology**, v. 38, n. 4, p. 318–320, 2000.

SHAHAT, A. A.; ABDEL-AZIM, N. S.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Isolation and NMR spectra of syringaresinol- β -D-glucoside from *Cressa cretica*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7–8, p. 771–773, 2004.

SHAO, S.; YANG, Y.; FENG, Z.; JIANG, J.; ZHANG, P. An efficient method for determining the relative configuration of Furofuran Lignans by ^1H NMR spectroscopy. **Journal of Natural Products**, 2018.

SILVA, T. B. Da; MENEZES, L. R. A.; SAMPAIO, M. F. C.; MEIRA, C. S.; GUIMARÃES, E. T.; SOARES, M. B. P. S.; PRATA, A. P. do N.; NOGUEIRA, P. C. de L.; COSTA, E. V. Chemical Composition and Anti-Trypanossoma cruzi Activity of Essential Oils Obtained from Leaves of *Xylopija frutescens* and *X. laevigata*

(Annonaceae). **Natural Product Communications**, v. 8, n. 3, p. 403–406, 2013.

SILVA, M. S. DA et al. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566–1570, 2009.

SILVA, V. C.; VALLADÃO, D. M. S.; FERREIRA, J. N.; DALL’OGLIO, E. L.; SILVA, M. S.; SOUSA, P. T. Amidas das sementes de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. In: **Sociedade Brasileira de Química (SBQ)**, 2010, Fortaleza.

SOUZA, I. L. L. DE et al. Essential oil from *Xylopia frutescens* Aubl. reduces cytosolic calcium levels on guinea pig ileum: mechanism underlying its spasmolytic potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, p. 327, 2015.

SOUZA, I.L.L.; CORREIA, A.C.C.; ARAUJO, L.C.C.; VASCONCELOS, L.G.C.; CORREIA-SILVA, M.C.; OLIVEIRA-COSTA, V.C.; TAVARES, J.F.; PAREDES-GAMERO, E.J.; CAVALCANTE, F.A.; SILVA, B.A. Essential oil from *Xylopia frutescens* Aubl. reduces cytosolic calcium levels on guinea pig ileum: mechanism underlying its spasmolytic potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.15, p. 327, 2015.

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

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E. De; STE, C. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid Communications in mass spectrometry**, v. 18, p. 523–528, 2004.

TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D.; DE CARVALHO BAYMA, J.; ALAÍDE B. O. Frutoic acid, a dimeric kaurane diterpene from *Xylopia frutescens*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 607–609, 1995.

TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Mono ad diterpenes from seeds of *Xylopia sericea*. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 616–618, 2001.

TATSADJIEU, L.N. et al. Antibacterial and antifungal activity of *Xylopia aethiopica* *Monodora myristic*, *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Zanthoxylum leprieurii* from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 469-472, 2003.

TAVARES, F. J.; DA SILVA, S. M.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. de F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1566–1570, 2009.

TAVARES, J. F. et al. Alkaloids and volatile constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 115–118, 2005.

TAVARES, J. F. et al. Composition and molluscicidal properties of essential oils from leaves of *xylopia langsdorffiana* A. St. Hil. et Tul. (annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 3, p. 282–284, 2007b.

TAVARES, J. F. et al. Xylodiol, a new atisane diterpenoid from *Xylopija langsdorffiana* st.-hil. & tul. (Annonaceae). **Zeitschrift fur Naturforschung - Section B Journal of Chemical Sciences**, v. 62, n. 5, p. 742–744, 2007a.

TAVARES, J. F.; PAREDES-GAMERO, E. J.; CAVALCANTE, F. D. A.; ARAÚJO, B. Essential oil from *Xylopija frutescens* Aubl. reduces cytosolic calcium levels on guinea pig ileum: mechanism underlying its spasmolytic potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, p. 1–10, 2015.

TAYLOR, P.; ANNONACEAE, A.; FILHO, J. G. S.; DURINGER, J. M.; CRAIG, A. M.; SCHULER, A. R. P.; XAVIER, H. S.; FILHO, J. G. S.; CRAIG, A. M. Preliminary Phytochemical Profile and Characterization of the Extract from the Fruits of *Xylopija frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, p. 3–6, 2011.

TELES, M. N. de O.; MACEDO, L.; BARISON, A.; VILAÇA, E. Alkaloids from leaves of *Annona salzmannii* and *Annona vepretorum* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 465–469, 2015.

VIEGAS, C.; BOLZANI, S.; QUÍMICA, I. De; ESTADUAL, U.; JULIO, P.; FILHO, D. M.; SP, A.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WAHL, A.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Isolation and structure elucidation of xylobuxin, a new neolignan from *Xylopija bruxifolia*. **Journal Natural Product**, v. 58, p. 786-789, 1995.

WAHL, A.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Isolation and structure elucidation of xylobuxin, a new neolignan from *Xylopija buxifolia*. **Journal Natural Product**, v. 58, p. 786-789, 1995.

WOODE, E.; ALHASSAN, A.; ABAIDOO, C.S. Effect of ethanolic fruit extract of *Xylopija aethiopica* on reproductive function of male rats. **International journal of pharmaceutical and biomedical research**, v. 2, p. 161-165, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva, 2011. 12p.