



PgPNSB

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**

KAIO ARAGÃO SALES

**ALCALOIDES E SESQUITERPENOIDES DE *Anaxagorea dolichocarpa*:
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CITOTOXICIDADE**

JOÃO PESSOA-PB

2020

KAIO ARAGÃO SALES

**ALCALOIDES E SESQUITERPENOIDES DE *Anaxagorea dolichocarpa*:
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CITOTOXICIDADE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Paraíba, em cumprimento às exigências para obtenção do título de doutor em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de concentração: Farmacoquímica.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva

JOÃO PESSOA-PB

2020

Catalogação na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

S163a Sales, Kaio Aragao.

Alcaloides e sesquiterpenoides de *Anaxagorea dolichocarpa* : isolamento, caracterização estrutural e citotoxicidade / Kaio Aragao Sales. - João Pessoa, 2020.

256 f. : il.

Orientação: Marcelo Sobral da Silva.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Alcaloides. 2. *Anaxagorea dolichocarpa*. 3. terpenoides. 4. citotoxicidade. I. Silva, Marcelo Sobral da. II. Título.

UFPB/BC

CDU 543.645.3(043)

KAIO ARAGÃO SALES

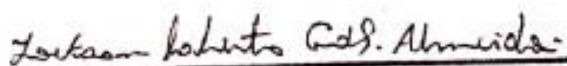
**ALCALOIDES E SESQUITERPENOIDES DE *Anaxagorea dolichocarpa*:
ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CITOTOXICIDADE**

Tese aprovada em 07/08/2020.

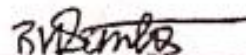
COMISSÃO EXAMINADORA



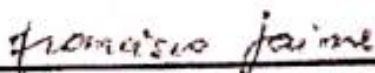
Prof. Dr. Marcelo Sobral da Silva
Orientador



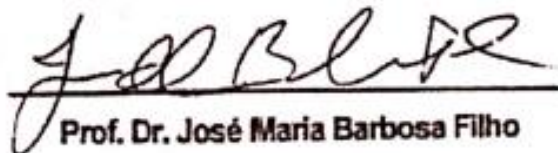
Prof. Dr. Jackson Roberto G. S. Almeida
Examinador externo



Profa. Dra. Bárbara Viviana de O. Santos
Examinadora externa



Prof. Dr. Francisco Jalme B. M. Júnior
Examinador interno



Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho
Examinador interno

*Buscar significa ter um objetivo.
Mas encontrar significa ser livre, estar aberto, não ter um objetivo.
(Hermann Hesse)*

AGRADECIMENTOS

À minha mãe, Iracy, pela criação e cuidado. Pelos conselhos tão importantes para meu crescimento e amadurecimento, e por não medir esforços para proporcionar minha educação e formação escolar.

Ao meu pai, Mário, pela sensibilidade das palavras e dos ensinamentos tão essenciais para minha evolução. Também pelo suporte, apoio e incentivo em todos os momentos, mas que foram particularmente importantes nesse desafio do doutorado.

Aos demais familiares pela preocupação, por terem sido companheiros e companheiras e torcido por minhas conquistas, em especial a Lili, Ivo e minhas tias Dora, Vasty e Ester e meu tio Jamenson.

Ao Professor Marcelo Sobral, por ter aceitado me orientar, por ter investido nesse projeto e se dedicado tanto para sua conclusão.

Ao Professor Josean, pela co-orientação tão participativa que certamente posso considerar uma orientação, pelas dicas, sugestões e apoio.

Aos vários amigos e amigas pela ajuda, apoio e incentivo, principalmente a Raíssa, Paloma, Ingrid, Leo, Ayala, Nayara, Sarah e Adriano.

Aos companheiros e companheiras de jornada na pós-graduação, em especial aos amigos e amigas Márcio, Diego, Rose, Pedro, Andreza, Ana Rita, Juliana, Rodrigo, Anderson. Agradeço ainda a todos os outros que enfrentaram os desafios acadêmicos e com quem pude compartilhar momentos, afetos e conhecimento.

Ao professor Marcus e equipe por toda a colaboração com os experimentos de cálculo e geração de espectros de Dicroísmo Circular.

À Professora Marianna Sobral e equipe pela colaboração nos testes de atividade citotóxica e pelo apoio na discussão dos resultados.

À professora Maysa Furlan e equipe do laboratório do Instituto de Química do Câmpus Araraquara da UNESP pela realização de parte dos experimentos de Dicroísmo Circular e Infravermelho.

Ao professor Massuo Kato e equipe do Centro Analítico de Instrumentação do Instituto de Química da USP pela realização de parte dos experimentos de Ressonância Magnética Nuclear, Dicroísmo Circular e Infravermelho.

Aos servidores da UFPB, Marcelo, Evandro, Alexsandro, Sócrates, Carol, Nonato, Gilmário; não só pela contribuição profissional, mas principalmente pelo incentivo, suporte e ajuda. Gostaria também de incluir Seu Ivan nesse agradecimento.

A todos os docentes do programa, particularmente os que realizaram as disciplinas cursadas no doutorado, Fátima Agra, Vicente, Fátima Vanderlei, Josean, Leônia, Damião e Joseval, pelos ensinamentos compartilhados.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

A todos os outros que direta ou indiretamente contribuíram para conclusão deste projeto.

A todos, muito obrigado.

RESUMO

SALES, K. A. ALCALOIDES E SESQUITERPENOIDES DE *Anaxagorea dolichocarpa*: ISOLAMENTO, CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL E CITOTOXICIDADE. 256 p. Tese de doutorado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Farmacoquímica, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2020.

No Brasil, país mais rico em biodiversidade, o uso medicinal de espécies vegetais é uma prática comum. E a família Annonaceae, com cerca de 2.400 espécies, contribui significativamente para a diversidade em florestas neotropicais, além de ser utilizada na dieta e medicina tradicional, devido a seus frutos comestíveis e propriedades terapêuticas. De uma de suas espécies, a *Anaxagorea dolichocarpa*, conhecida como envira e amplamente distribuída na região neotropical, foram publicados estudos com identificação de alcaloides e terpenoides, e relatos de atividade antitumoral *in vitro*. Diante desse cenário, buscou-se nesse trabalho ampliar o conhecimento sobre essa planta, mediante estudo fitoquímico e investigação da atividade citotóxica. Para isso, o material vegetal foi coletado em Cruz do Espírito Santo-PB e submetido a processos de extração, purificação e análise dos constituintes químicos. Esses procedimentos foram realizados por métodos laboratoriais clássicos, assim como por técnicas modernas de CLAE, RMN, EM e Dicroísmo Circular. Assim, a partir dos extratos das raízes da planta, foi possível isolar e caracterizar as estruturas químicas de seis alcaloides, dois deles inéditos na literatura, dolichocarpina e 9-metoxieupolauramina, além dos conhecidos eupolauramina, 3-metoxieupolauridina, eupolauridina e 4-metilsampangina, e seis sesquiterpenoides humulenos também inéditos, denominados dolichocarpois A-F. Desses, cinco alcaloides e três sesquiterpenoides tiveram sua atividade citotóxica investigada contra linhagens de células HCT-116 (carcinoma colorretal humano), com até 32,42% de inibição, para 3-metoxieupolauridina, e L929 (fibroblastos murinos não-tumorais), com 30,76% de inibição para dolichocarpol F. Dessa forma, os resultados obtidos pelo estudo contribuíram com o conhecimento químico e de atividade biológica de *A. dolichocarpa*.

Palavras-chave: *Anaxagorea dolichocarpa*; alcaloides; terpenoides; citotoxicidade

ABSTRACT

SALES, K. A. ALKALOIDS AND SESQUITERPENOIDS FROM *Anaxagorea dolichocarpa*: ISOLATION, STRUCTURAL CHARACTERIZATION AND CYTOTOXICITY. 256 p. Doctoral thesis, Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products – Pharmacochemistry, Health Sciences Center, Federal University of Paraíba, João Pessoa, 2020.

In Brazil, the most biodiverse country in all around the world, the medicinal use of plants is a usual practice. The Annonaceae family, with around 2,400 species, contributes significantly to the diversity in Neotropical forests, besides being used in the diet and traditional medicine, due to its edible fruits and therapeutic properties. From one of its species, the *Anaxagorea dolichocarpa*, popularly known as envira and widely distributed in the neotropical region, identification of alkaloids and terpenoids were published, along *in vitro* antitumor activities reports. Thus, this work pursuit to expand the knowledge about this specie, through phytochemical and cytotoxic activity investigation. For this, the plant material was collected in Cruz do Espírito Santo-PB and subjected to processes of extraction, purification and analysis of chemical constituents. These procedures were carried out by classical laboratory methods as well as modern techniques of HPLC, NMR, MS and Circular Dichroism. Thus, from the roots extracts of the plant, it was possible to isolate and characterize the chemical structures of six alkaloids, the two new compounds dolichocarpine and 9-methoxyeupolauramine, in addition to the well-known eupolauramine, 3-methoxyeupolauridine, eupolauridine and 4-methylsampangine, and also six unprecedented humulene-type sesquiterpenoids, called dolichocarpols A-F. Of these, five alkaloids and three sesquiterpenoids had their cytotoxic activity investigated against HCT-116 (human colorectal carcinoma cells), with up to 32.42% inhibition for 3-methoxyupolauridine, and L929 (murine non-tumor fibroblasts cells), with 30.76% inhibition for dolichocarpol F. Therefore, the results obtained by this study contribute to the chemical and biological activity of *A. dolichocarpa* knowledge.

Keywords: *Anaxagorea dolichocarpa*; alkaloids; terpenoids; cytotoxicity

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS

ACG	Acetogenina de Anonácea
APT	<i>Attached Proton Test</i>
C₅D₅N	Piridina deuterada
CC	Cromatografia em Coluna
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl₃	Clorofórmio deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
CI₅₀	Concentração Inibitória Média
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLMP	Cromatografia Líquida de Média Pressão
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
d	Dupleto
DC	Dicroísmo Circular
D₂O	Água deuterada
dd	Dupleto duplo
ddd	Duplo dupleto duplo
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
dl	Dupleto largo
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
dt	Tripleto duplo
ECD	<i>Electronic Circular Dichroism</i>
EEB	Extrato Etanólico Bruto
EM	Espectrometria de Massas
EMAR-IES	Espectrometria de Massas com Ionização por <i>Electrospray</i>
ESI	<i>Electrospray Ionization</i>
ESIMS/MS	<i>Electrospray Ionization tandem Mass Spectrometry</i>
FPP	Farnesil difosfato
GGPP	Geranilgeranil difosfato
GPP	Geranil difosfato

Hex	Hexano
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HPLC	<i>High-Performance Liquid Chromatography</i>
HRESIMS	<i>High-Resolution Electrospray Ionization Mass Spectrometry</i>
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Correlation</i>
IES	Ionização por <i>Electrospray</i>
IPP	Isopentenil difosfato
IR	<i>Infrared</i>
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento
m	Multiplete
MEP	2-C-metileritritol-4-fosfato
MPLC	<i>Medium Pressure Liquid Chromatography</i>
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
MVA	Ácido mevalônico
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PN	Produtos Naturais
ppm	Partes por milhão
QPN	Química de Produtos Naturais
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
s	Simpleto
SAM	S-adenosilmetionina
sl	Simpleto largo
t	Triplete
TLC	<i>Thin-Layer Chromatography</i>
δ	Deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1. Mapa e distribuição geográfica da família Annonaceae, representada em verde, no mundo	26
Figura 2. Espécies da família Annonaceae. a) Fruto de <i>Annona muricata</i> ; b) Fruto e flor de <i>Annona squamosa</i> ; c) Flores de <i>Cananga odorata</i> ; d) <i>Polyalthia longifolia</i> em destaque	27
Figura 3. Substâncias isoladas de espécies da família Annonaceae	29
Figura 4. Espécies do gênero <i>Anaxagorea</i> . a) Fruto de <i>A. prinoides</i> ; b) Flores de <i>A. acuminata</i>	31
Figura 5. Mapa e distribuição geográfica do gênero <i>Anaxagorea</i> , representada em verde, no mundo	32
Figura 6. Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Anaxagorea</i>	34
Figura 7. Espécie <i>Anaxagorea dolichocarpa</i> . a) e b) Flores; c) Fruto	35
Figura 8. Mapa e distribuição geográfica da espécie <i>A. dolichocarpa</i> , representada em verde, no mundo	36
Figura 9. Mapa e distribuição geográfica da espécie <i>A. dolichocarpa</i> , representada em laranja, em parte das Américas Central e do Sul	37
Figura 10. Substâncias isoladas e/ou identificadas na espécie <i>A. dolichocarpa</i>	38
Figura 11. Biossíntese dos alcaloides sampangina, imbilina-1, eupolauramina e eupolauridina.....	41
Figura 12. Biossíntese dos blocos construtores IPP e DMAPP.....	44
Figura 13. Biossíntese de mono-, di-, triterpenos e do sesquiterpeno α -humuleno ..	45

CAPÍTULO 2

Manuscrito

Figura 1. Alcaloides isolados de <i>A. dolichocarpa</i>	92
Figura 2. Correlações HMBC de 1 e 2	94
Figura 3. Proposta de fragmentação de EM ⁿ de 1	94
Figura 4. Citotoxicidade dos compostos 1 – 5 em linhagens de células HCT-116 e L929, após 72 h de tratamento. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de	

quatro replicatas na concentração de 50 μ M (*p < 0,05 comparado ao grupo controle)	97
---	----

Material Suplementar

Figura 1S. Espectro de EMAR-IES do composto 1	105
Figura 2S. Espectro EM ⁿ do composto 1	106
Figura 3S. Espectro no IV (KBr, cm ⁻¹) do composto 1	106
Figura 4S. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) do composto 1	107
Figura 5S. Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) do composto 1	108
Figura 6S. Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) do composto 1	109
Figura 7S. Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) do composto 1	110
Figura 8S. Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD ₃ OD) do composto 1	111
Figura 9S. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 1	112
Figura 10S. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃ +D ₂ O) do composto 1	113
Figura 11S. Espectro de EMAR-IES do composto 2	114
Figura 12S. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 2	115
Figura 13S. Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto 2	116
Figura 14S. Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) do composto 2	117
Figura 15S. Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) do composto 2	118
Figura 16S. Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) do composto 2	119
Figura 17S. Espectro de EMAR-IES do composto 3	120
Figura 18S. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 3	121
Figura 19S. Espectro de RMN de ¹³ C (APT, 100 MHz, CDCl ₃) do composto 3	122
Figura 20S. Espectro de EMAR-IES do composto 4	123
Figura 21S. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 4	124
Figura 22S. Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CDCl ₃) do composto 4	125
Figura 23S. Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) do composto 4	126
Figura 24S. Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) do composto 4	127
Figura 25S. Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) do composto 4	128

Figura 26S. Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) do composto 4	129
Figura 27S. Espectro de EMAR-IES do composto 5	130
Figura 28S. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 5.....	131
Figura 29S. Espectro de RMN de ¹³ C (APT, 100 MHz, CDCl ₃) do composto 5.....	132
Figura 30S. Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl ₃) do composto 5	133
Figura 31S. Espectro de EMAR-IES do composto 6	134
Figura 32S. Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CDCl ₃) do composto 6.....	135

CAPÍTULO 3

Manuscrito

Chart 1. Chemical structures of isolated compounds 1–6 from roots of <i>A. dolichocarpa</i>	141
Figure 1. Key HMBC and ¹ H– ¹ H COSY correlations of compounds 1–6	143
Figure 2. Key ¹ H– ¹ H NOESY correlations of compounds 1–6.....	143
Figure 3. Experimental and calculated ECD spectra of compounds 1–3 and 6.....	150
Figure 4. Putative biosynthetic pathway toward compounds 1–6.....	151
Figure 5. Cytotoxicity of the compounds 3, 4 and 6 against HCT-116 (A) and L929 (B) cells lines, after 72 h treatment. The values are the mean ± standard error for four independent replicates at a concentration of 50 µM (*p < 0.05 compared with untreated cells).....	152

Material Suplementar

Figure S1. IR spectrum of compound 1.....	162
Figure S2. HRESIMS spectrum of compound 1 ([M + Na], positive ion mode)	162
Figure S3. ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 1.....	163
Figure S4. ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 1	164
Figure S5. ¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃) spectrum of 1	165
Figure S6. ¹³ C DEPT-135 NMR (100 MHz, CDCl ₃) spectrum of 1.....	166
Figure S7. HSQC NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 1	167
Figure S8. HSQC NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 1	168
Figure S9. HMBC NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 1	169
Figure S10. HMBC NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 1.....	170

Figure S11. HMBC NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 1.....	171
Figure S12. ¹ H- ¹ H COSY NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 1	172
Figure S13. ¹ H- ¹ H NOESY NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 1	173
Figure S14. ¹ H- ¹ H NOESY NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 1.....	174
Figure S15. ESIMS/MS spectrum of compound 1 ([M + Na], positive ion mode)	175
Figure S16. Experimental and calculated ECD spectra and absorption spectra of compounds 1–3 and 6.....	176
Figure S17. IR spectrum of compound 2	177
Figure S18. HRESIMS spectrum of compound 2 ([M + Na], positive ion mode)	177
Figure S19. ¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) spectrum of 2.....	178
Figure S20. ¹ H NMR (500 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 2	179
Figure S21. ¹³ C NMR (125 MHz, CDCl ₃) spectrum of 2	180
Figure S22. ¹³ C NMR (200 MHz, CDCl ₃) spectrum of 2	181
Figure S23. HSQC NMR (500 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 2.....	182
Figure S24. HMBC NMR (500 MHz, CDCl ₃) spectrum of 2.....	183
Figure S25. HMBC NMR (500 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 2.....	184
Figure S26. ¹ H- ¹ H COSY NMR (500 MHz, CDCl ₃) spectrum of 2	185
Figure S27. ¹ H- ¹ H NOESY NMR (500 MHz, CDCl ₃) spectrum of 2	186
Figure S28. ¹ H- ¹ H NOESY NMR (500 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 2.....	187
Figure S29. ESIMS/MS spectrum of compound 2 ([M + H], positive ion mode)	188
Figure S30. IR spectrum of compound 3.....	189
Figure S31. HRESIMS spectrum of compound 3 ([M + Na], positive ion mode)	189
Figure S32. ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 3.....	190
Figure S33. ¹ H NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 3	191
Figure S34. ¹³ C NMR (100 MHz, CDCl ₃) spectrum of 3	192
Figure S35. ¹³ C DEPT-135 NMR (100 MHz, CDCl ₃) spectrum of 3.....	193
Figure S36. HSQC NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 3	194
Figure S37. HSQC NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 3.....	195
Figure S38. HMBC NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 3.....	196
Figure S39. HMBC NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 3.....	197
Figure S40. HMBC NMR (400 MHz, CDCl ₃) extension spectrum of 3.....	198
Figure S41. ¹ H- ¹ H COSY NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 3	199
Figure S42. ¹ H- ¹ H NOESY NMR (400 MHz, CDCl ₃) spectrum of 3	200

Figure S43. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 3.....	201
Figure S44. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated 3	202
Figure S45. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of acetylated 3	203
Figure S46. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated 3	204
Figure S47. HSQC NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated 3	205
Figure S48. HSQC NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of acetylated 3....	206
Figure S49. HMBC NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated 3	207
Figure S50. HMBC NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of acetylated 3 ...	208
Figure S51. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated 3	209
Figure S52. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated 3.....	210
Figure S53. ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spectrum of 3	211
Figure S54. ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) extension spectrum of 3.....	212
Figure S55. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spectrum of acetylated 3	213
Figure S56. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) extension spectrum of 3	214
Figure S57. ESIMS/MS spectrum of compound 3 ($[\text{M}+\text{H}]$, positive ion mode)	215
Figure S58. IR spectrum of compound 4	216
Figure S59. HRESIMS spectrum of compound 4 ($[\text{M} + \text{Na}]$, positive ion mode)	216
Figure S60. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 4.....	217
Figure S61. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 4	218
Figure S62. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of 4	219
Figure S63. ^{13}C DEPT-135 NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of 4.....	220
Figure S64. HSQC NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 4	221
Figure S65. HSQC NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 4.....	222
Figure S66. HMBC NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 4	223
Figure S67. HMBC NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 4.....	224
Figure S68. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 4	225
Figure S69. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 4	226
Figure S70. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 4.....	227
Figure S71. ESIMS/MS spectrum of compound 4 ($[\text{M} + \text{H}]$, positive ion mode)	228
Figure S72. IR spectrum of compound 5	229
Figure S73. HRESIMS spectrum of compound 5 ($[\text{M} + \text{Na}]$, positive ion mode)	229
Figure S74. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 5.....	230
Figure S75. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 5	231

Figure S76. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of 5	232
Figure S77. ^{13}C DEPT-135 NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of 5.....	233
Figure S78. HSQC NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 5	234
Figure S79. HSQC NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 5.....	235
Figure S80. HMBC NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 5.....	236
Figure S81. HMBC NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 5.....	237
Figure S82. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 5	238
Figure S83. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 5.....	239
Figure S84. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 5.....	240
Figure S85. IR spectrum of compound 6.....	241
Figure S86. HRESIMS spectrum of compound 6 ($[\text{M} + \text{Na}]$, positive ion mode)	241
Figure S87. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 6.....	242
Figure S88. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 6	243
Figure S89. ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 6	244
Figure S90. DEPT-135 NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 6.....	245
Figure S91. HSQC NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 6	246
Figure S92. HSQC NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 6.....	247
Figure S93. HMBC NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 6.....	248
Figure S94. HMBC NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 6.....	249
Figure S95. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 6	250
Figure S96. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 6	251
Figure S97. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of 6	252
Figure S98. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of 6.....	253
Figure S99. ESIMS/MS spectrum of compound 6 ($[\text{M} + \text{H}]$, positive ion mode)	254

LISTA DE ESQUEMAS

CAPÍTULO 1

Esquema 1. Obtenção e desengorduramento do EEB-I das raízes de <i>A. dolichocarpa</i>	56
Esquema 2. Tratamento do EEB-I das raízes de <i>A. dolichocarpa</i> e extração ácido-base	57
Esquema 3. Obtenção e particionamento do EEB-II das raízes de <i>A. dolichocarpa</i>	59
Esquema 4. Fracionamento da Fração Alcalóidica do EEB-I de <i>A. dolichocarpa</i>	63
Esquema 5. Purificação da fração 08-15 da Fração Alcalóidica do EEB-I de <i>A. dolichocarpa</i>	64
Esquema 6. Purificação da fração 30-38 da Fração Alcalóidica do EEB-I de <i>A. dolichocarpa</i>	65
Esquema 7. Purificação da fração 39-56 da Fração Alcalóidica do EEB-I de <i>A. dolichocarpa</i>	66
Esquema 8. Fracionamento da fase Hexano do EEB-II de <i>A. dolichocarpa</i>	68
Esquema 9. Fracionamento da fase CHCl_3 do EEB-II de <i>A. dolichocarpa</i>	69

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO 1

Quadro 1. Compostos, frações e extratos obtidos de espécies de Annonaceae com resultados positivos em ensaio de citotoxicidade por redução de MTT	48
---	----

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Dados do fracionamento da Fração Alcaloídica do EEB-I de <i>A. dolichocarpa</i>	62
Tabela 2. Dados do fracionamento da fase Hexano do EEB-II de <i>A. dolichocarpa</i> ...	67
Tabela 3. Dados do fracionamento da fase CHCl ₃ do EEB-II de <i>A. dolichocarpa</i>	69

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Dados de RMN de ¹ H (400 MHz) e ¹³ C (100 MHz) dos compostos 1 e 2, δ em ppm, J em Hz	92
---	----

CAPÍTULO 3

Table 1. ¹³ C (100 and 125 MHz) NMR Spectroscopic Data for Compounds 1–6 in CDCl ₃	145
Table 2. ¹ H (400 and 500 MHz) NMR Spectroscopic Data for Compounds 1–6 in CDCl ₃	146

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	25
2.1. Família Annonaceae	25
2.2. Gênero <i>Anaxagorea</i>	31
2.3. <i>Anaxagorea dolichocarpa</i>	35
2.4. Alcaloides	39
2.5. Terpenoides	42
2.6. Câncer e atividade citotóxica	46
3. OBJETIVOS	49
3.1. Objetivo geral	49
3.2. Objetivos específicos	49
4. MATERIAIS E MÉTODOS	50
4.1. Equipamentos, materiais e procedimentos gerais	50
4.2. Equipamentos e procedimentos analíticos	52
4.2.1. CLAE acoplada a Espectrometria de Massas e Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por <i>Eletrospray</i>	52
4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear	53
4.2.3. Infravermelho	53
4.2.4. Rotação óptica	53
4.2.5. Dicroísmo Circular	53
4.3. Material vegetal	54
4.4. Obtenção dos extratos etanólicos brutos	54
4.5. Isolamento dos constituintes químicos	59
4.6. Avaliação da citotoxicidade	70
REFERÊNCIAS	71
 CAPÍTULO 2	 87
DOIS NOVOS ALCALOIDES AZAFENANTRENO DE <i>Anaxagorea dolichocarpa</i> Sprague & Sandwith	 88
INTRODUÇÃO	91

RESULTADOS E DISCUSSÃO	91
CONCLUSÃO	97
PARTE EXPERIMENTAL	97
Procedimentos experimentais gerais	97
Material vegetal	99
Extração e isolamento	99
Avaliação da citotoxicidade	100
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	101
AGRADECIMENTOS	101
REFERÊNCIAS.....	101
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	104
 CAPÍTULO 3	 136
Dolichocarpols A-F, Unprecedented Macrocyclic Humulene-Type Sesquiterpenoids from <i>Anaxagorea dolichocarpa</i>.....	137
INTRODUCTION	140
RESULTS AND DISCUSSION.....	141
EXPERIMENTAL SECTION	152
ASSOCIATED CONTENT.....	155
AUTHOR INFORMATION.....	155
ACKNOWLEDGMENTS	156
REFERENCES.....	157
SUPPORTING INFORMATION	161
 CONCLUSÃO	 256

CAPÍTULO 1

1. INTRODUÇÃO

Biodiversidade refere-se a todas as formas de vida existentes. Do ponto de vista do bem-estar humano inclui a variedade de plantas, animais, bactérias, fungos, entre outros, usada em seu benefício de forma direta ou indireta, como na produção de medicamentos e alimentos; na regulação climática e controle da erosão do solo; ou ainda devido a seu valor científico (HANLEY; PERRINGS, 2019). Parte dessa diversidade é representada pelas plantas vasculares, que compreendem cerca de 400 mil conhecidas em todo o planeta, das quais uma parcela considerável, por volta de 33%, é encontrada nas Américas. O Brasil se distingue nesse panorama por possuir a flora mais diversa, com mais de 33 mil espécies catalogadas (ULLOA et al., 2017).

Diante da rica biodiversidade brasileira, a qual está reunida em ecossistemas como a Floresta Amazônica, a Mata Atlântica e a Caatinga, muitas plantas ainda não foram investigadas cientificamente. Além disso, como o país é um dos que mais fornece registro de novas espécies vegetais anualmente, surge então uma janela de oportunidade para suas caracterizações genética e química (CHRISTENHUSZ; BYNG, 2016; RIBEIRO et al., 2018).

Além disso, sabe-se que as plantas têm desempenhado um papel importante nos cuidados de saúde desde o começo da civilização, sendo utilizadas por séculos como remédio para as doenças humanas graças ao seu valor terapêutico (ERNST et al., 2016; SADEER et al., 2019). No Brasil, uso medicinal de espécies vegetais é uma prática comum, sobretudo por povos tradicionais, e sua diversidade étnica e cultural possui um valioso conhecimento associado (FUNARI; FERRO, 2005; GROSS et al., 2019).

As plantas produzem, para seu crescimento e desenvolvimento, uma série de metabólitos, divididos entre os primários ou essenciais, e os secundários, também chamados não-essenciais ou especializados, os quais despertaram interesse em razão de seus efeitos benéficos em humanos (NAGEGOWDA; GUPTA, 2020). Assim, espécies utilizadas pela medicina tradicional vêm sendo estudadas há décadas quanto à eficácia de sua atividade biológica e segurança. Pode-se citar como exemplos de importância histórica para a medicina a *Salix alba* (Salgueiro-branco), da qual se isolou a salicina, que deu origem ao conhecido anti-inflamatório não-esteroidal ácido acetilsalicílico, a *Catharantus roseus* (Vinca); produtora dos alcaloides

antineoplásicos vimblastina e vincristina; e, recentemente, tem ganhado cada vez mais destaque a *Cannabis sativa* (Cânhamo), principalmente pelas propriedades anticonvulsivantes e analgésicas de seus fitocanabinoides (BONINI et al., 2018; PATRA; SHUKLA; DAS, 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) valoriza e reconhece a importância da medicina popular tradicional; no entanto, ela enfatiza a necessidade de seu uso racional baseado em evidências científicas (WHO, 2013, 2019). Cabe aqui ressaltar, porém, que a etnofarmacologia não é a única fonte de motivação para a pesquisa na área. As investigações fitoquímicas, por exemplo, podem ter como base os conhecimentos quimiossistemáticos e filogenéticos já divulgados na literatura (LARSSON, 2007; SIMÕES et al., 2010; TAN; GYLLENHAAL; SOEJARTO, 2006).

A pesquisa na Química de Produtos Naturais (QPN) chegou a passar por um período de relativo descrédito por causa de mudanças nas tecnologias industriais e na química sintética (HARVEY et al., 2010; LI; VEDERAS, 2009). Todavia, em virtude de sua variedade estrutural, os Produtos Naturais permanecem sendo a principal fonte de descoberta de novos fármacos, tanto de forma direta como indireta. Logo, mesmos as substâncias sintéticas têm, em muitos casos, sua estrutura química inspirada nas de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2020; RODRIGUES et al., 2016).

Dessa forma, apesar de existirem desafios para a área, tais como as relacionadas com características químicas de solubilidade e instabilidade, descoberta de poucos agentes terapêuticos efetivamente utilizados na clínica em comparação com o total de substâncias isoladas e dificuldades com patentes na indústria farmacêutica, a QPN tem vislumbrado novas oportunidades devido a avanços em bioinformática, genômica e tecnologias analíticas (LI; VEDERAS, 2009; ZHANG et al., 2017). Ademais, embora existam muitos fármacos no mercado, doenças como hipertensão, diabetes e câncer continuam afetando a população no mundo todo e demandando novas opções de tratamento (THOMFORD et al., 2018).

Portanto, em razão da importância da QPN na descoberta de novos fármacos, decidiu-se nesse trabalho isolar e identificar metabólitos secundários de *Anaxagorea dolichocarpa* (Annonaceae), assim como realizar ensaios de atividade biológica.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. Família Annonaceae

Annonaceae Juss. foi catalogada pela histórica publicação *Genera plantarum*, em 1789, na qual Jussieu iniciou a padronização da nomenclatura de famílias de plantas. É considerada de fácil identificação, mesmo sendo umas das famílias mais ricas em espécies da ordem Magnoliales e com isso contribuindo significativamente para a diversidade em florestas nos países neotropicais e no Velho Mundo. Formada por árvores, arbustos e lianas, Annonaceae possui cerca de 2.400 espécies em 107 gêneros (CHATROU et al., 2012a, 2012b; GUO et al., 2017; JUSSIEU, 1789).

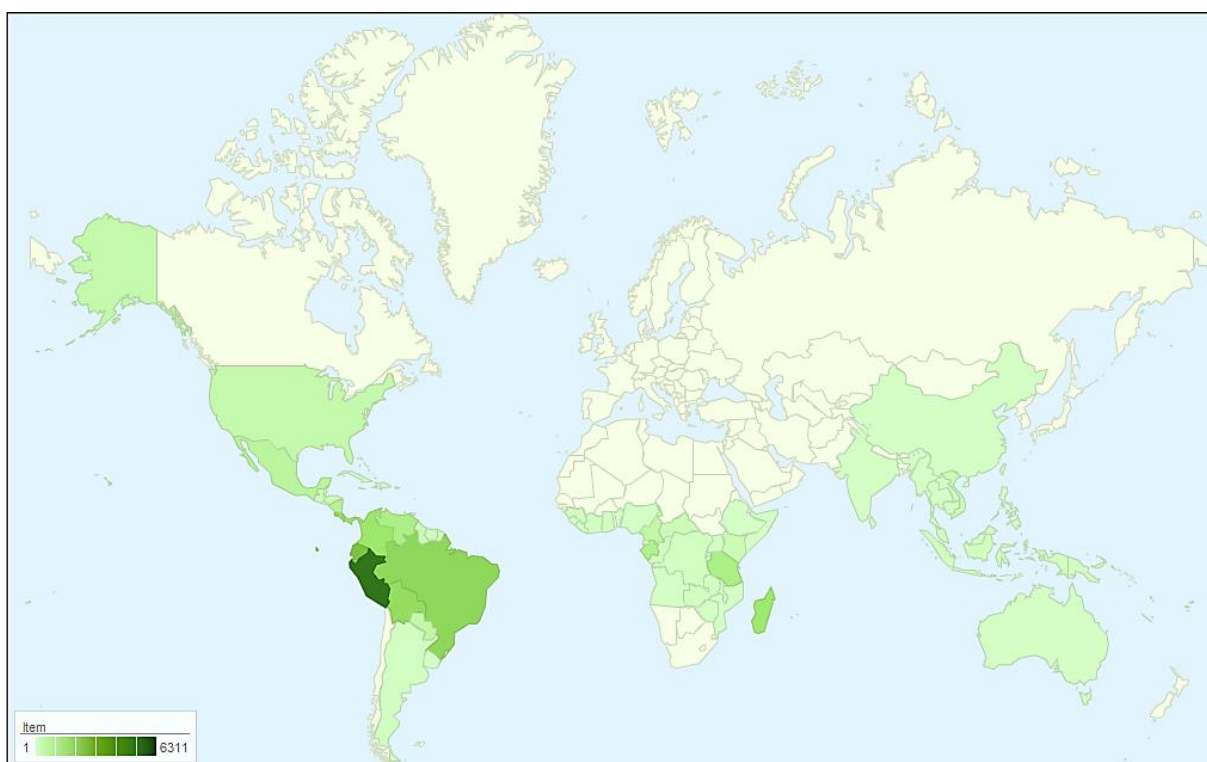
Suas espécies são basicamente reconhecidas por terem folhas simples, alternadas, dísticas, sem estípulas, flores trimerosas, com estames livres e numerosos, carpelos livres, frutos sincárpicos ou aporcápicos e sementes com endosperma ruminado. Têm os besouros como principais agentes polinizadores por serem, em sua maioria, espécies aromáticas contendo óleos essenciais (JÜRGENS; WEBBER; GOTTSBERGER, 2000; LEOEUF et al., 1982; PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004; SAUNDERS, 2012).

A Figura 1 ilustra a distribuição pantropical da família, com maior concentração de espécimes na América do Sul. A região neotropical apresenta cerca de 40 gêneros e 900 espécies, com ocorrência de 29 gêneros e 385 espécies no Brasil. A Amazônia, com 27 gêneros e 280 espécies, possui a maior diversidade, seguida pela Mata Atlântica, com 15 gêneros e 91 espécies, e pelo Cerrado, no qual ocorrem 10 gêneros e 47 espécies. No país, os gêneros mais bem representados são *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia*., todos representantes da subfamília Annonoideae (LOBÃO; LOPES; MELLO-SILVA, 2018; LOPES; MELLO-SILVA, 2014b).

Com relação à importância econômica, esta se deve, principalmente, aos frutos comestíveis de algumas plantas. Dentre elas, destacam-se muitas do gênero *Annona*, como *Annona muricata* (graviola), *A. squamosa* (pinha, atemoia ou fruta do conde) e *A. coriacea* (araticum), bem como algumas de outros gêneros, a exemplo da *Duguetia lanceolata* (pindaíva) e da *Anonidium mannii* (árvore africana conhecida como *jungle sop*). Além disso, há espécies utilizadas com outras finalidades, como *Cananga odorata*, da qual se extrai o óleo de Ylang-Ylang para a indústria de perfume,

Xylopia aromatica (pindaíba ou pimenteira), empregada na culinária como especiaria, e *Polyalthia longifolia*, usada em ornamentação. Algumas dessas são mostradas adiante na Figura 2 (ALVES et al., 2015; BROPHY; GOLDSACK; FORSTER, 2004; MALLAVARAPU; GURUDUTT; SYAMASUNDAR, 2016; NGANGOUE et al., 2020; OLIVEIRA et al., 2012; RABELO et al., 2016; RINALDI et al., 2017; TEIXEIRA et al., 2019; THANG et al., 2013).

Figura 1. Mapa e distribuição geográfica da família Annonaceae, representada em verde, no mundo

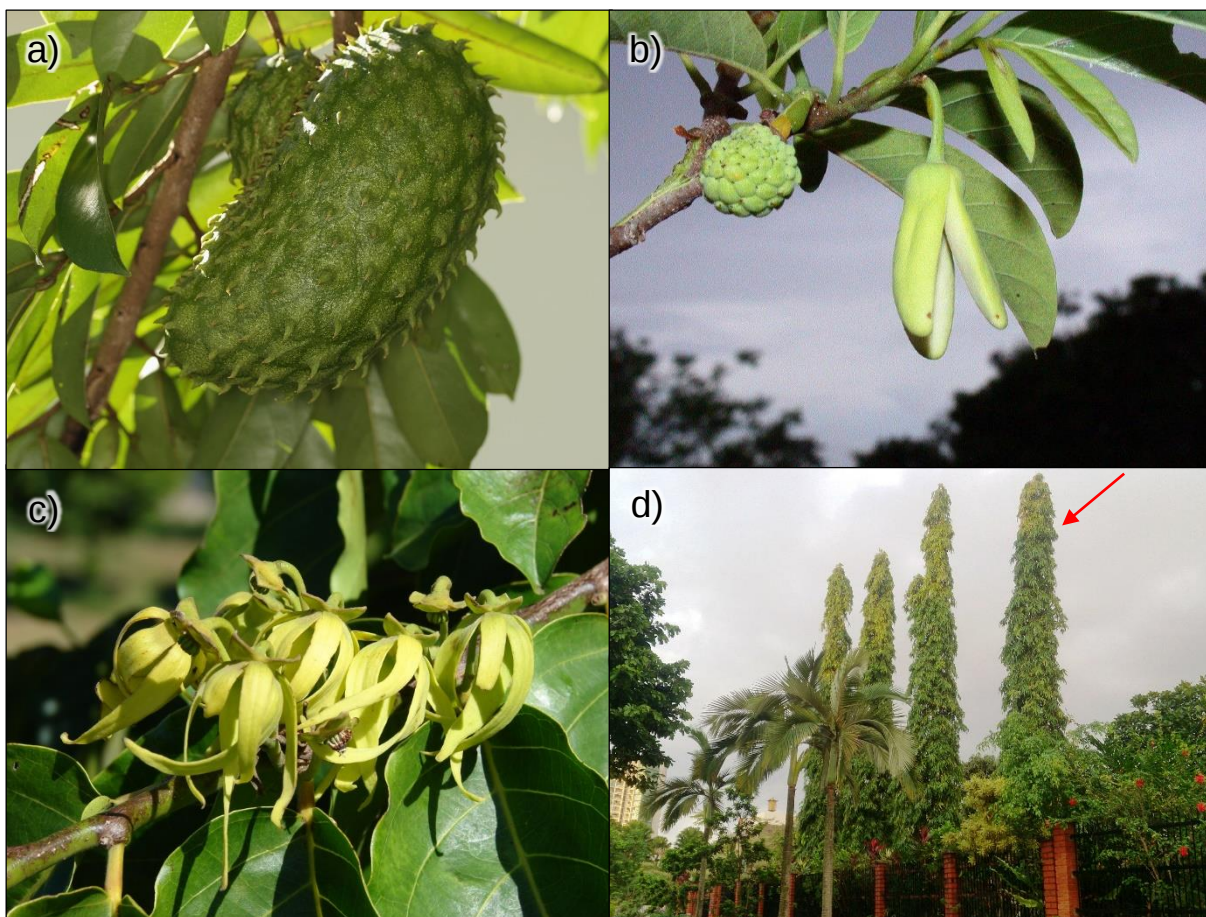


Fonte: tropicos.org/Name/42000007, acesso em 17 de maio de 2020.

Porém, a importância das anonáceas não se limita ao quesito meramente econômico, pois possuem ainda impacto na saúde, graças às suas propriedades terapêuticas. Muitas dessas plantas são aplicadas na medicina tradicional, podendo-se citar diversos exemplos. *A. muricata* e *A. squamosa* são usadas como antitumorais, antiparasitárias, antidiarreicas, analgésicas e sedativas; *A. hypoglauca* também contra parasitas, diarreia e anemia (BARBALHO et al., 2012; MEIRA et al., 2015; RINALDI et al., 2017). *Xylopia frutescens* é utilizada para incontinência urinária, estimular a menstruação e combater reumatismo, mau-hálito, queda de dentes e doenças intestinais (FERRAZ et al., 2013). *Duguetia furfuracea* é usada no tratamento de dismenorreia, diarreia, dor estomacal, cólica renal, reumatismo e como calmante

(SANTOS et al., 2019). Além dessas espécies encontradas no território brasileiro, anonáceas de outros continentes, da mesma forma, são utilizadas na medicina tradicional, como *Mitrephora wangii* e *Miliusa velutina* usadas na Tailândia como tônicas para saúde (JAIDEE et al., 2018; PROMGOOL et al., 2019). Salienta-se que muitas das propriedades terapêuticas atribuídas às espécies da família já foram confirmadas cientificamente em ensaios de atividades biológica (HAMID et al., 2012; NOVAES; TORRES; SANTOS, 2016; SANTOS PIMENTA et al., 2003).

Figura 2. Espécies da família Annonaceae. a) Fruto de *Annona muricata*; b) Fruto e flor de *Annona squamosa*; c) Flores de *Cananga odorata*; d) *Polyalthia longifolia* em destaque



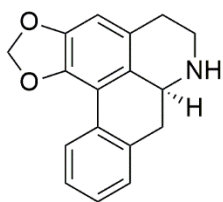
Fonte: a) annonaceae.myspecies.info; b) plantsystematics.org; c) tropical.theferns.info; d) tropical.theferns.info.

Os estudos fitoquímicos com espécies dessa família vêm sendo realizados há anos e apresentam considerável variedade de metabólitos secundários isolados e/ou identificados. As classes de compostos mais comuns são alcaloides, terpenoides, flavonoides, lignoides e acetogeninas, mas, além desses, já foram encontrados, entre

outros, ciclohexenos polioxigenados, sobretudo no gênero *Uvaria*, e estiril-lactonas, recorrentes no gênero *Goniothalamus*. A Figura 3 mostra exemplos dessas substâncias. Apesar da variedade, Annonaceae tem como característica de seu metabolismo secundário a biossíntese de alcaloides, terpenoides e acetogeninas. Grande parte desses alcaloides são derivados isoquinolínicos, como os aporfínicos e protoberberínicos, e serão melhor discutidos numa sessão específica. Sobre os terpenoides, os tipos mais frequentemente isolados são diterpenos, os quais apresentam grande variedade estrutural, e, assim como os alcaloides, essa grande classe será detalhada num tópico posterior nesse texto. (AMINIMOUGHADAMFAROUJ; NEMATOLLAHI; WIART, 2011; BLÁZQUEZ et al., 1999; CHRISTOPHER et al., 2020; DUTRA et al., 2012; FATIMA et al., 2006; GÉNY et al., 2017; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; LEBOEUF et al., 1982; LEKPHROM et al., 2018; LÚCIO et al., 2015; SCOTTI et al., 2012).

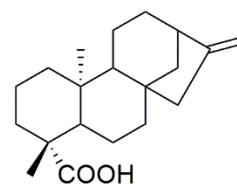
Conforme comentado no parágrafo anterior, as acetogeninas, denominadas como Acetogeninas de Anonáceas (ACGs), são, como se presume, praticamente exclusivas dessa família, representando uma de suas classes típicas de metabólitos. Somando cerca de 530 substâncias isoladas em 16 gêneros, a maioria em *Annona* e *Uvaria*, esses compostos chamaram a atenção não só por suas peculiaridades estruturais, mas especialmente em virtude de suas atividades biológicas. Atribui-se a elas como origem a via dos policetídeos derivados de ácidos graxos, sendo constituídas por 35 ou 37 átomos de carbono. Quanto aos testes de atividade biológica, vários compostos apresentaram, entre outras, significativa atividade antitumoral, como o caso da Uvaricina, relatada como primeira ACG, isolada de *Uvaria accuminata* (CAVÉ et al., 1997; FANG et al., 1993; JACOBO-HERRERA et al., 2019; LIAW et al., 2016; MANGAL; IMRAN KHAN; MOHAN AGARWAL, 2015; NESKE et al., 2020).

Figura 3. Substâncias isoladas de espécies da família Annonaceae



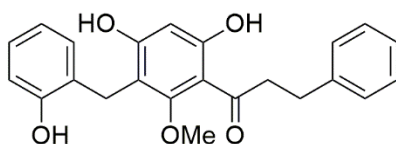
Anonaína

(AMINIMOUGHADAMFAROUJ;
NEMATOLLAHI; WIART, 2011)



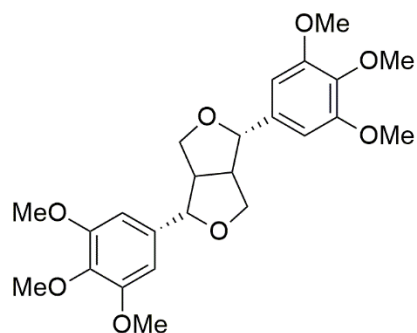
Ácido (-)-caur-16-en-19-óico

(LEBOEUF et al., 1982)



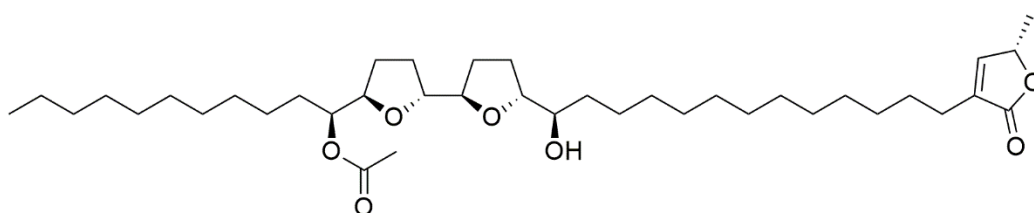
Uvaretina

(CHRISTOPHER et al., 2020)



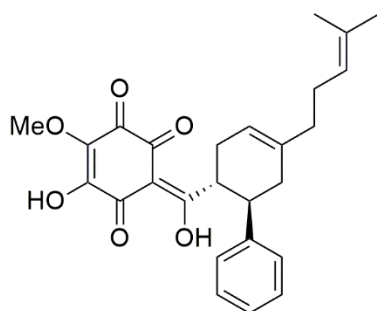
langambina

(DUTRA et al., 2012)



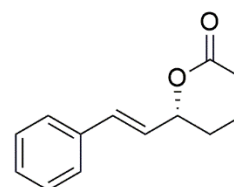
Uvaricina

(LIAW et al., 2016)



(-)-Ecarlotta

(GÉNY et al., 2017)



Goniotalamina

(DE FATIMA et al., 2006)

Acrescenta-se que o grupo de pesquisa possui um histórico de trabalhos com espécies de Annonaceae com bons resultados químicos e de atividade biológica conseguidos. Como exemplos, pode-se citar os isolamentos de compostos fenólicos, sesquiterpenos e alcaloides de *Annona leptopetala*, de alcaloides de *Fusaea longifolia*, de diterpenos cauranos de *X. cayennensis* e de diterpenos atisanos, labdanos e traquilobanos de *X. langsdorffiana*. No que diz respeito aos estudos farmacológicos, entre outros, relatou-se pelo grupo que o óleo essencial de *A. leptopetala* demonstrou atividade moduladora de resistência bacteriana contra *Staphylococcus aureus*, e os de *X. langsdorffiana* e *X. frutescens* atividade antiespasmolídica em íleo de cobaia. Outros estudos exibiram o efeito gastroprotetivo em modelos animais do extrato etanólico e da fase hexano de *X. langsdorffiana*, e um de seus diterpenos labdanos mostrou efeito relaxante em traqueia de cobaia (ANDRADE et al., 2004; CASTELLO BRANCO et al., 2009; CORREIA et al., 2015; COSTA et al., 2008, 2012; MONTENEGRO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2007; SANTOS et al., 2013; SOUZA et al., 2015; TAVARES et al., 2005, 2006, 2007).

2.2. Gênero *Anaxagorea*

Anaxagorea A.St.-Hil. é o único gênero da subfamília Anaxagoreoideae, sendo considerado basal, um grupo-irmão de todas as anonáceas, isto é, refere-se à raiz (base) filogenética da família. As duas primeiras espécies catalogadas foram inicialmente classificadas no gênero *Xylopia* em 1817 e formaram, após anos, seu próprio gênero, primeiramente, *Anaxagorea prinoides* em 1825, e, posteriormente, *A. acuminata* foi igualmente transferida, em 1832 (Figura 4). Suas espécies apresentam-se como árvores, arvoretas ou arbustos, com flor axilar ou raramente terminal e monoclina, geralmente com três sépalas e seis pétalas livres, estames numerosos e carpelos com dois óvulos. É um gênero basal por possuir características distintas e supostamente ancestrais, como estaminódios internos, pólen granular e monossulcado, igualmente encontradas em grupos externos próximos de Annonaceae, especialmente em *Eupomatia* (Eupomatiaceae). Distingue-se ainda por ter frutos contendo carpídios livres e deiscentes, sendo esta última uma característica rara em Annonaceae (ENDRESS; ARMSTRONG, 2011; GOTTSBERGER, 2016; LOBÃO; ARAUJO; KURTZ, 2005; LOPES; MELLO-SILVA, 2014b; MAAS; WESTRA, 1984; SCHARASCHKIN; DOYLE, 2006).

Sobre polinização, observou-se que todas as espécies estudadas emitem odores frutados e picantes das suas flores e, com isso, atraem espécies de besouros Nitidulidae e Staphylinidae, sendo estes os principais polinizadores (JÜRGENS; WEBBER; GOTTSBERGER, 2000; TEICHERT; DÖTTERL; GOTTSBERGER, 2011).

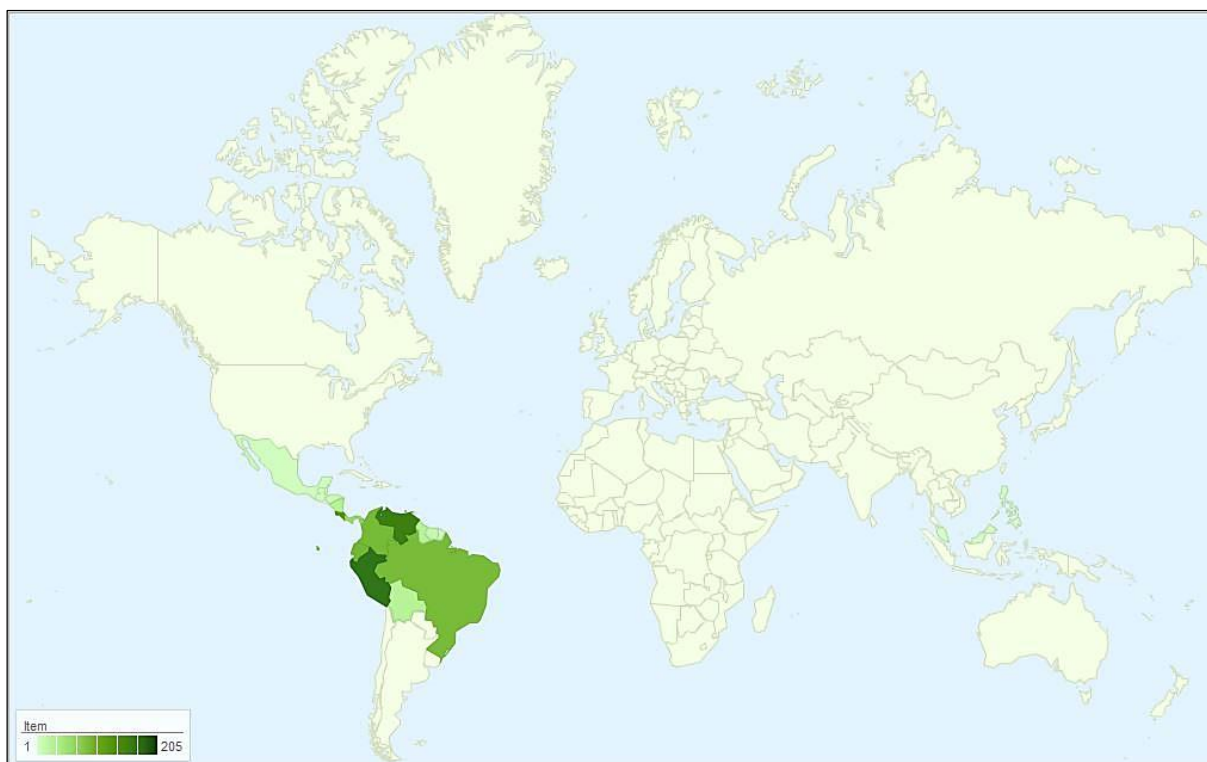
Figura 4. Espécies do gênero *Anaxagorea*. a) Fruto de *A. prinoides*; b) Flores de *A. acuminata*



Fonte: a) adaptado de GOTTSBERGER (2016); b) annonaceae.myspecies.info.

É composto por 30 espécies e, diferentemente de quase todos os outros gêneros, ocorre em ambas as regiões neotropical e paleotropical, nesta incluído o sudeste asiático. Quatro espécies, *A. borneensis*, *A. javanica*, *A. luzonensis* e *A. radiata* ocorrem na Ásia, desde o Sri Lanka até as Filipinas e Indonésia. No entanto, a maioria encontra-se nas Américas Central e do Sul, principalmente na Bacia Amazônica. A Figura 5 mostra como os espécimes concentram-se na América do Sul. No Brasil, encontram-se 14 espécies, com algumas delas ocorrendo também no Sudeste e Nordeste (GOTTSBERGER, 2016; GUO et al., 2017; JÜRGENS; WEBBER; GOTTSBERGER, 2000; LOPES; MELLO-SILVA, 2014b; MAAS; WESTRA, 1984; PIRIE; DOYLE, 2012; SCHARASCHKIN; DOYLE, 2005).

Figura 5. Mapa e distribuição geográfica do gênero *Anaxagorea*, representada em verde, no mundo



Fonte: tropicals.org/Name/40013549, acesso em 25 de maio de 2020.

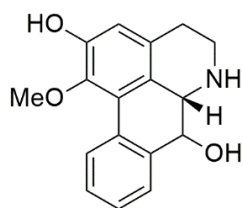
Economicamente não é muito importante, sendo utilizado como fonte para produção de cordas, em carpintaria e outras utilidades variadas e não específicas (MAAS; WESTRA, 1984; PUENTES DE DÍAZ, 1997). Com relação à medicina tradicional, há relatos de utilização de *A. luzonensis* como “tônico sanguíneo”, estimulante estomacal, antipirético e para tratamento de dor muscular (GONDA;

TAKEDA; AKIYAMA, 2000); e *A. javanica* para tratamento no pós-parto (HUSAIN et al., 2012).

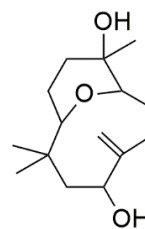
A partir dos estudos químicos em espécies de *Anaxagorea*, foram isolados e/ou identificados compostos de diferentes classes, não divergindo, todavia, do padrão de constituição química da família. Dentre esses, incluem-se alcaloides, terpenoides, flavonoides, xantonas e lignoides. São exemplos, todos ilustrados na Figura 6, o alcaloide anaxagoreína isolado de *A. prinoides*; o sesquiterpeno nordine encontrado em *A. javanica*; o flavonoide 8-isopentenilnaringenina e a xantona 1,3,5-trihidroxi-4-prenilxantona ambos isolados de *A. luzonensis*; a neolignana 3'-metoxi-3,4-metilenodioxo-4',7-epoxi-9-nor-8,5'-neolignan-7,8'-dieno isolada de *A. clavata* (HOCQUEMILLER et al., 1981; HUSAIN et al., 2012; KITAOKA et al., 1998; PUENTES DE DÍAZ, 1997; SABPHON et al., 2015).

Além disso, parte dessas plantas foram analisadas quanto a sua atividade biológica e observou-se que algumas apresentaram resultados positivos. O extrato diclorometano de *A. luzonensis* foi relatado como tendo efeito vasorrelaxante em aorta de rato, e algumas das substâncias isoladas, como a já citada 1,3,5-trihidroxi-4-prenilxantona, mostrou inibição da enzima fosfodiesterase do tipo 5 (PDE5), indicando potencial como agente para tratamento da disfunção erétil (SABPHON et al., 2015; TEP-AREENA; SAWASDEE, 2011). Essa mesma xantona teve sua atividade anticolinesterásica avaliada e apresentou resultado positivo (SABPHON; SERMBOONPAISARN; SAWASDEE, 2012). Além disso, o composto 8-isopentenilnaringenina foi isolado da mesma espécie num estudo de fracionamento guiado por bioensaio, demonstrando ação agonista em receptores de estrogênio, sugerindo que pode ter efeito protetivo contra osteoporose, ataque cardíaco e outros problemas cardiovasculares (KITAOKA et al., 1998). O Óleo essencial obtido das folhas de *A. brevipes* mostrou atividades antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e leveduras, e antiproliferativa contra células de linhagem tumoral MCF-7 (mama), NCI-H460 (fígado) e PC-3 (próstata) (ALENCAR et al., 2016).

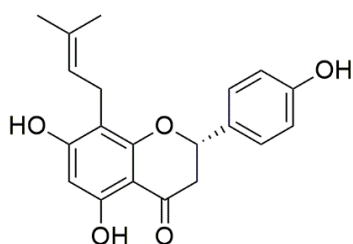
Figura 6. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Anaxagorea*



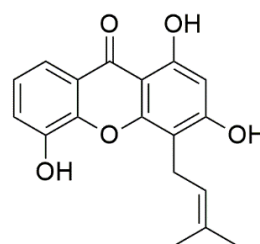
Anaxagoreína
(HOCQUEMILLER et al., 1981)



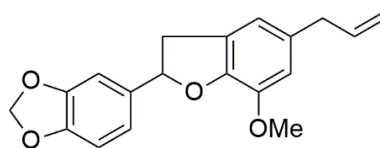
Nordine
(HUSAIN et al., 2012)



8-isopentenilnaringenina
(KITAOKA et al., 1998)



1,3,5-trihidroxi-4-prenilxantona
(SABPHON et al., 2015)



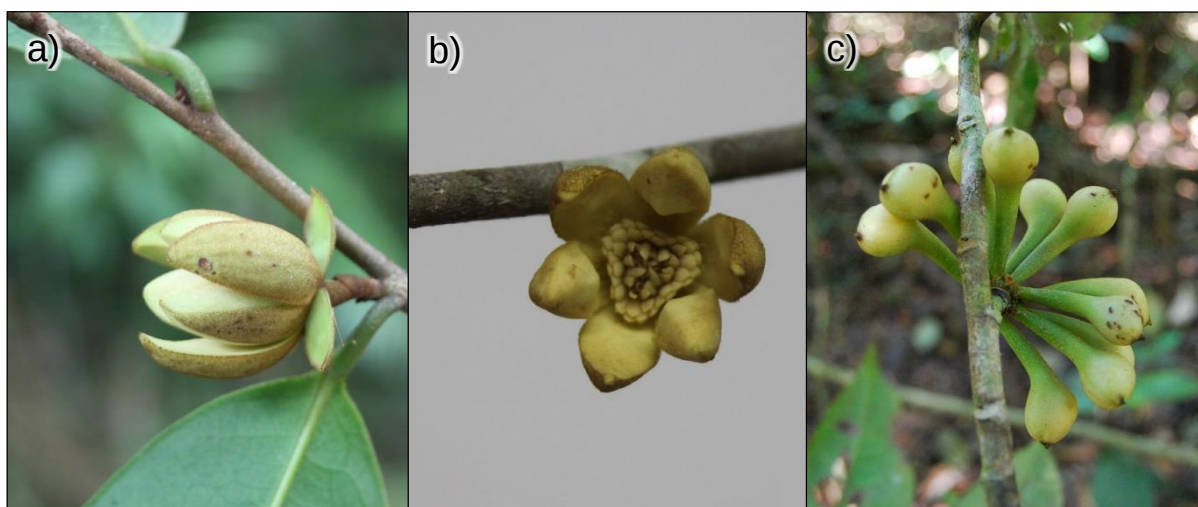
3'-metoxi-3,4-metilenodioxi-4',7-epoxi-9-nor-8,5'-neolignan-7,8'-dieno
(PUENTES DE DÍAZ, 1997)

2.3. *Anaxagorea dolichocarpa*

Anaxagorea dolichocarpa Sprague & Sandwith teve sua descrição publicada em 1930, após coleta na antiga Guiana Britânica, agora independente e conhecida como República da Guiana. Botanicamente é muito semelhante a duas outras espécies do gênero, *A. acuminata* e *A. brevipes*. É relatada como uma árvore com 4,5-9,0 m de altura; com folhas oblongo-lanceoladas, verdes discolores, 20-23 x 6,5-10 cm; flor solitária ou inflorescências com 2-4 flores, axilares, creme-amareladas, botão com 10-23 x 8-20 mm, ovoide, com sépalas livres e glabras, 6 pétalas livres, carnosas e oblongas, contendo estames laminares e carpelos numerosos; seu fruto é apocárpico, carpídios com deiscência explosiva e cerca de 5 cm de comprimento (Figura 7) (LOBÃO; ARAUJO; KURTZ, 2005; MAAS; WESTRA, 1985; PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004; SANDWITH, 1930).

Durante os dois primeiros dias da antese, período de abertura floral, as flores emitem forte odor frutado semelhante ao da banana, fragrância causada por ésteres alifáticos, como 3-metilbutanoato de etila e acetato de isobutila. Dessa forma, como ocorre com outras *Anaxagorea*, besouros Nitidulidae e Staphylinidae são atraídos pela planta, agindo, por conseguinte, como polinizadores (GOTTSBERGER, 2016; JÜRGENS; WEBBER; GOTTSBERGER, 2000).

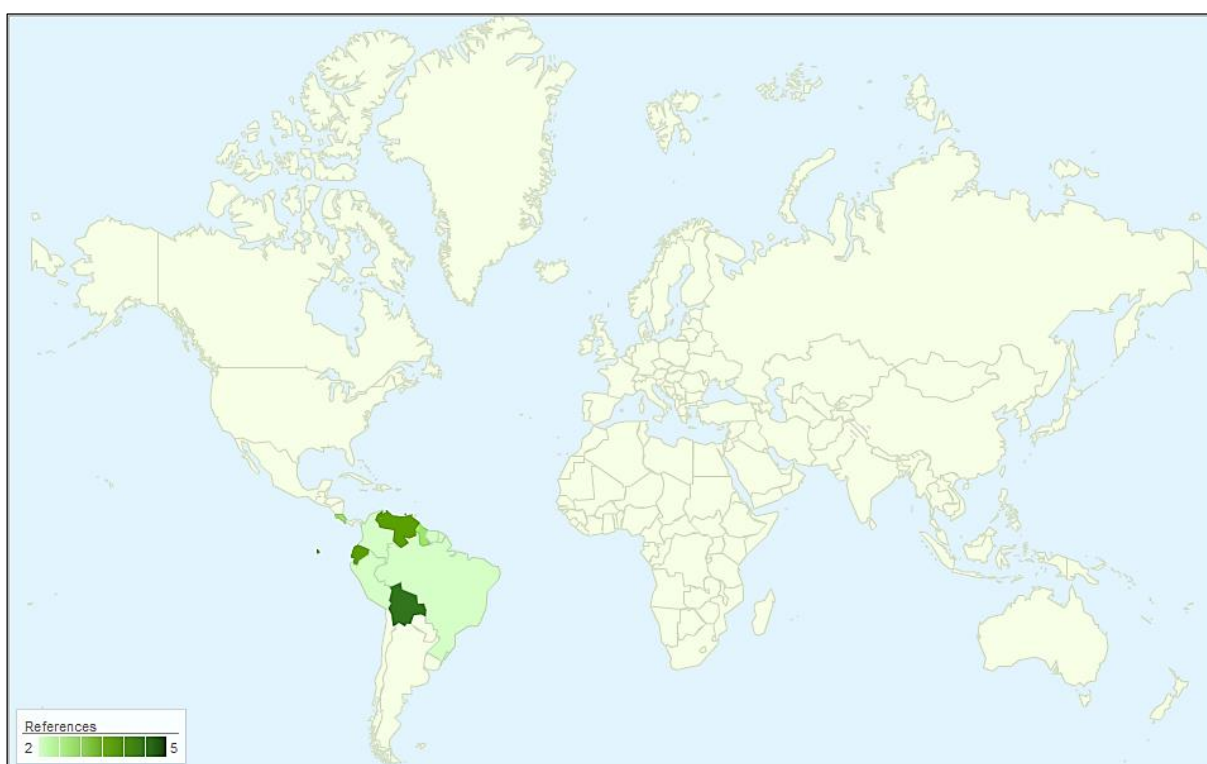
Figura 7. Espécie *Anaxagorea dolichocarpa*. a) e b) Flores; c) Fruto



Fonte: a) e b) adaptado de LOPES (2012); c) powo.science.kew.org.

É a espécie mais amplamente distribuída e comum do gênero na região neotropical. Encontrada usualmente em florestas úmidas com até 1.300 m de altitude, está presente desde a Costa Rica até o sudeste brasileiro, sobretudo na região amazônica, mas também no Cerrado e Mata Atlântica do país (Figura 8 e Figura 9). No Nordeste ocorre na Bahia, Maranhão, Paraíba e Pernambuco (Figura 9) (LOBÃO; ARAUJO; KURTZ, 2005; LOPES; MELLO-SILVA, 2014a; MAAS; WESTRA, 1985; SCHARASCHKIN; DOYLE, 2005).

Figura 8. Mapa e distribuição geográfica da espécie *A. dolichocarpa*, representada em verde, no mundo



Fonte: tropicos.org/Name/1601465, acesso em 05 de junho de 2020.

Conhecida popularmente como bananinha, envira-de-jacu, maraúba-grande, araticum-brabo e paixinho, *A. dolichocarpa* tem suas folhas, casca do caule e frutos usados na medicina tradicional para tratar gripes e resfriados (ANDRADE; OLIVEIRA; ZOGHBI, 2007; BRANDÃO et al., 2011; GRIPP et al., 2020). Além disso, segundo Mass & Westra (1984), na Guiana, sua casca serve para produção de corda e cestas artesanais e, após queimada, para limpeza dos dentes; no Suriname, as cascas e folhas são usadas para aliviar dor de cabeça; e no Equador a casca é um dos ingredientes do curare.

Figura 9. Mapa e distribuição geográfica da espécie *A. dolichocarpa*, representada em laranja, em parte das Américas Central e do Sul

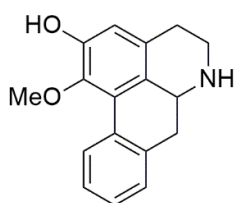


Fonte: gbif.org/pt/species/3156852, acesso em 05 de junho de 2020.

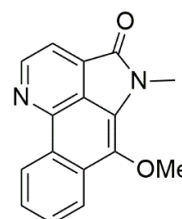
A literatura científica relatou para essa espécie o isolamento de dois alcaloides aporfínicos, asimilobina e anaxogoreína, e alguns azafenantrênicos, como, por exemplo, eupolauramine e sampangina, estes tendo apresentado atividade antitumoral contra células leucêmicas K562, e 3-metoxisampangina e 4-metoxisampangina, os quais e potencial atividade contra *Leishmania donovani* em abordagens de quimioinformática (HOCQUEMILLER et al., 1981; LORENZO et al., 2016; LÚCIO et al., 2011; LÚCIO, 2015). A análise química do óleo essencial obtido de seus frutos demonstrou grande quantidade de sesquiterpenos, fato pouco comum em espécies de Annonaceae, mas já constatado em *Xylopia*. Os principais componentes identificados foram δ -cadinol (23,9%), óxido de cariofileno (12,2%), δ -cadineno (9,5%), α -copaeno (7,9%) e γ -muuroleno (7,7%) (FOURNIER et al., 1994). O estudo do aroma floral por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) mostrou a predominância de ésteres alifáticos, com cerca de 28 e 17% do total de compostos voláteis dos já mencionados 3-metilbutanoato de etila e acetato de isobutila, além de pequenas quantidades de outros compostos, como os sesquiterpenos β -copaeno, γ - e δ -cadineno (JÜRGENS; WEBBER; GOTTSBERGER,

2000). Um outro estudo por CG-EM, nesse caso com óleo essencial das folhas e dos pequenos caules, demonstrou maioria (55 e 60%, respectivamente) de monoterpenos, com maior abundância para α -pineno (folhas 16,8%; caules, 23,4%) e β -pineno (folhas, 12,3%; caules, 17,0%), mas também grande quantidade do sesquiterpeno espatulenol (folhas, 26,2%; caules, 21,1%). Acrescenta-se ainda, a revelação de um perfil de constituintes voláteis semelhante ao de várias espécies de *Xylopi*a, reiterando assim a correlação entre os dois gêneros (ANDRADE; OLIVEIRA; ZOGHBI, 2007). A Figura 10 mostra alguns dos compostos referidos.

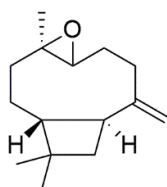
Figura 10. Substâncias isoladas e/ou identificadas na espécie *A. dolichocarpa*



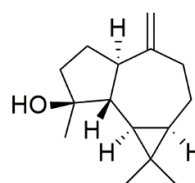
Asimilobina
(HOCQUEMILLER et al., 1981)



Eupolauramina
(LÚCIO et al., 2011)



Óxido de cariofileno
(FOURNIER et al., 1994)



Epatulenol
(ANDRADE; OLIVEIRA; ZOGHBI, 2007)

Ademais, foi realizada a quantificação de fenólicos do extrato etanólico das cascas do caule de *A. dolichocarpa* e avaliação de sua atividade antioxidante *in vitro*. Os resultados indicaram a planta como fonte natural de compostos antioxidantes (ALMEIDA et al., 2011). Mais recentemente, um *screening* fitoquímico revelou os flavonoides e taninos como fenólicos mais frequentes no extrato etanólico da planta. Entretanto, foi sua porção hexânica, menos polar, portanto, a mais citotóxica contra células tumorais de cólon humano (HCT-116) (PINHEIRO et al., 2016). Adicionalmente, já foram relatadas atividades analgésica, antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* e antiviral contra o vírus da encefalomiocardite murina (BRANDÃO et al., 2011; GRIPP et al., 2020; LÚCIO et al., 2011).

2.4. Alcaloides

Dewick (2009a) define alcaloides como sendo compostos de baixo peso molecular contendo nitrogênio, encontrados principalmente em plantas. Podem conter um ou mais átomos de nitrogênio, formando geralmente aminas primárias, secundárias ou terciárias, o que frequentemente confere basicidade ao composto, facilitando seu isolamento e purificação, visto que seus sais hidrossolúveis podem ser formados na presença de ácidos como o clorídrico (HCl), por exemplo.

Os aminoácidos são os precursores desses compostos, sendo os principais a ornitina, a lisina, o ácido nicotínico, a tirosina, o triptofano, o ácido antranílico e a histidina. Seus esqueletos básicos muitas vezes são preservados e em geral os alcaloides são classificados com base na estrutura do aminoácido que os originou. Além disso, blocos construtores de outras vias biossintéticas como do acetato, do chiquimato e do metileritritol-fosfato são comumente incorporados na estrutura química (BÖTTGER et al., 2018; DEWICK, 2009a; SINGH; POONAM; GEETANJALI, 2019).

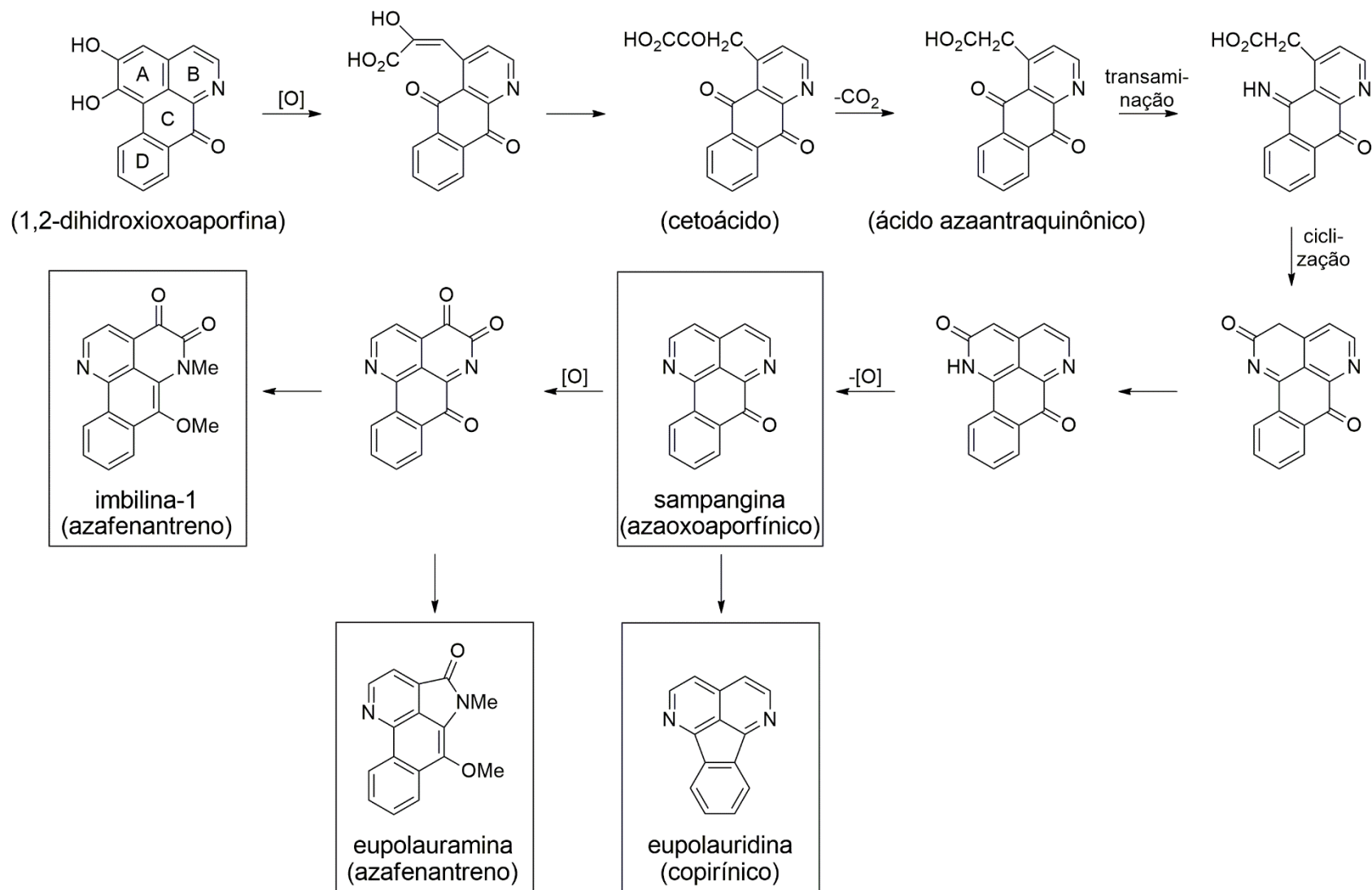
Os alcaloides de Annonaceae são quase todos isoquinolínicos e considerados farmacologicamente importantes, pois formam um grupo de compostos reconhecidamente medicinal. São divididos em diferentes subclasses, como isoquinolínicos simples, benziltetrahydroisoquinolínicos, bisbenzylisoquinolínicos, protoberberínicos, aporfinoides, entre outros. (CAVE, 1985; DEY et al., 2020; LEBOEUF et al., 1982; LÚCIO et al., 2015).

A biossíntese dos isoquinolínicos ocorre a partir de duas moléculas de *L*-tirosina, das quais uma é convertida em *L*-DOPA e em seguida à dopamina, e a outra no ácido 4-hidroxifenilpirúvico e este em 4-hidroxifenilacetaldeído. Após reação de condensação de Mannich e ao final de uma série metilações via enzima *S*-adenosilmetionina (SAM), oxidações e acoplamentos oxidativos um aporfínico típico como a (*S*)-corituberina é formado (BÖTTGER et al., 2018; CAVE, 1985; DEWICK, 2009a).

Os alcaloides azafenantrenos eupolauramina e imbilina-1, e o copirínico eupolauridina, têm como precursor o azaoxaporfínico sampangina. Sua produção inicia da clivagem oxidativa do anel A do composto 1,2-dihidroxi-7-oxaporfínico, formando o ácido azaantraquinônico. Após transaminação deste e posterior

fechamento do anel piridona, a biossíntese é concluída por uma reação de desoxigenação. Além da via biossintética comum, mostrada na Figura 11, todos esses compostos são encontrados tanto em *Anaxagorea* como em *Eupomatia*, o que reafirma a proximidade desses gêneros, não obstante pertençam a famílias distintas (CARROLL; TAYLOR, 1991; TAYLOR, 1984).

Figura 11. Biossíntese dos alcaloides sampangina, imbilina-1, eupolauramina e eupolauridina



Fonte: CARROLL; TAYLOR (1991); TAYLOR (1984).

2.5. Terpenoides

Os terpenoides, terpenos ou isoprenoides representam o maior, mais diverso e antigo grupo de metabólitos secundários, com mais de 80.000 membros relatados em diferentes formas de vida, incluindo plantas. Esse montante corresponde a cerca de 60% de todos os produtos naturais conhecidos. Inicialmente referidos como produtos de desintoxicação em plantas, desde os anos 1970 esses compostos demonstraram possuir diferentes funções, como repelentes e toxinas contra agressores ou, ao contrário, como agentes atrativos para polinizadores. Numa perspectiva econômica, apresentam importância em virtude de sua aplicação nas indústrias farmacêuticas, alimentícias, cosméticas, químicas e recentemente no desenvolvimento de biocombustíveis (ABBAS et al., 2017; GERSHENZON; DUDAREVA, 2007; LANGE et al., 2000; NAGEGOWDA; GUPTA, 2020; THOLL, 2015; XIAO; ZHANG; WANG, 2019).

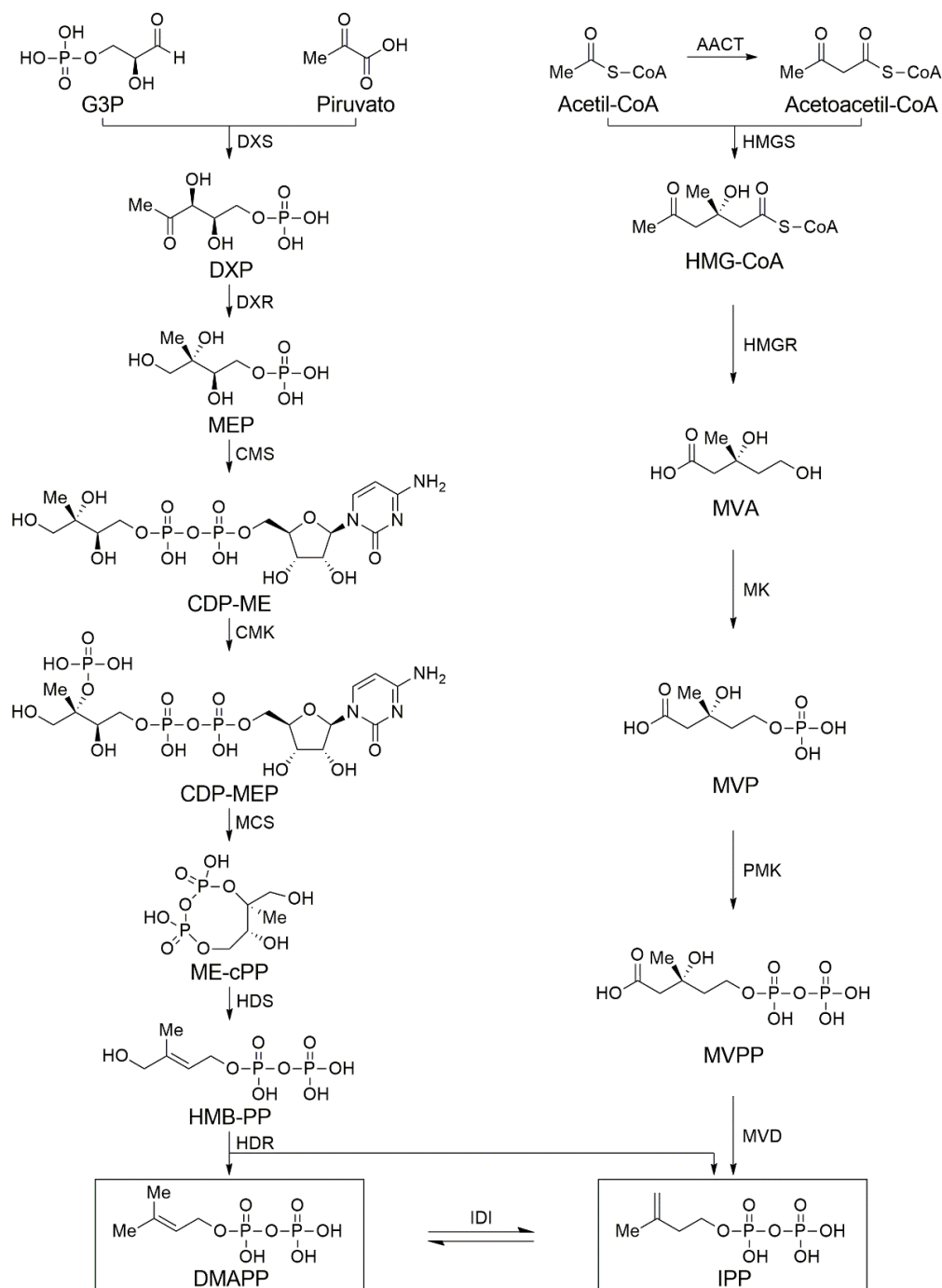
São formados pela fusão de unidades isoprênicas (C_5), mediante ligação do tipo cabeça-cauda dos metabólitos bioquimicamente ativos isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). Nas plantas, esses blocos construtores são gerados por duas vias biossintéticas independentes, processadas em diferentes compartimentos subcelulares. A clássica via do mevalonato ou ácido mevalônico (MVA, do termo em inglês) gera o IPP a partir da acetil-CoA no citosol, enquanto que a via do 2-C-metilerytritol-4-fosfato (MEP) origina IPP e DMAPP do piruvato e também do gliceraldeído-3-fosfato nos plastídeos (Figura 12) (BERGMAN; DAVIS; PHILLIPS, 2019; DEWICK, 2009b; GERSHENZON; CROTEAU, 2018; NAGEGOWDA; GUPTA, 2020; THOLL, 2015).

A combinação das unidades isoprênicas é catalisada por enzimas preniltransferases e produz compostos prenil polifosfatos acíclicos de cadeia longa, os quais são precursores de todos os terpenoides. Assim, geranyl difosfato (GPP, C_{10}), formado pela condensação de DMAPP e IPP, é o precursor dos monoterpenos (C_{10}); farnesil difosfato (FPP, C_{15}), derivado de um DMAPP e dois IPP, dá origem aos sesquiterpenos (C_{15}) e triterpenos (C_{30}); e geranylgeranyl difosfato (GGPP, C_{20}), produzido por um DMAPP e três IPP, fornece os diterpenos (C_{20}). Após formados, os compostos prenil difosfatos acíclicos sofrem uma série de reações de ciclização, acoplamento e rearranjo para então gerar os esqueletos carbônicos de cada uma das

classes de terpenos (Figura 13) (DEWICK, 2009b; GERSHENZON; CROTEAU, 2018; NAGEGOWDA; GUPTA, 2020).

Discorrendo melhor sobre os sesquiterpenos, relata-se que geralmente são biossintetizados pela via do MVA e, devido ao tamanho da cadeia carbônica e às três duplas ligações do seu precursor FPP, apresentam muitas possibilidades de ciclizações, podendo resultar em compostos mono-, bi- ou tricíclicos diversos. Sendo assim, após a produção do cátion farnesil e sua posterior ciclização via C1-C11, pode-se gerar o cátion humulil, o qual é estabilizado pela formação de uma dupla ligação originando um dos esqueletos clássicos para esse grupo de substâncias, o α -humuleno, como mostrado na Figura 13. Este é um composto macrocíclico de 11 membros e um dos sesquiterpenos mais comuns e amplamente distribuídos em plantas, além de ser precursor de uma série de outros compostos (DEWICK, 2009b; GUTTA; TANTILLO, 2006; KUMETA; ITO, 2016).

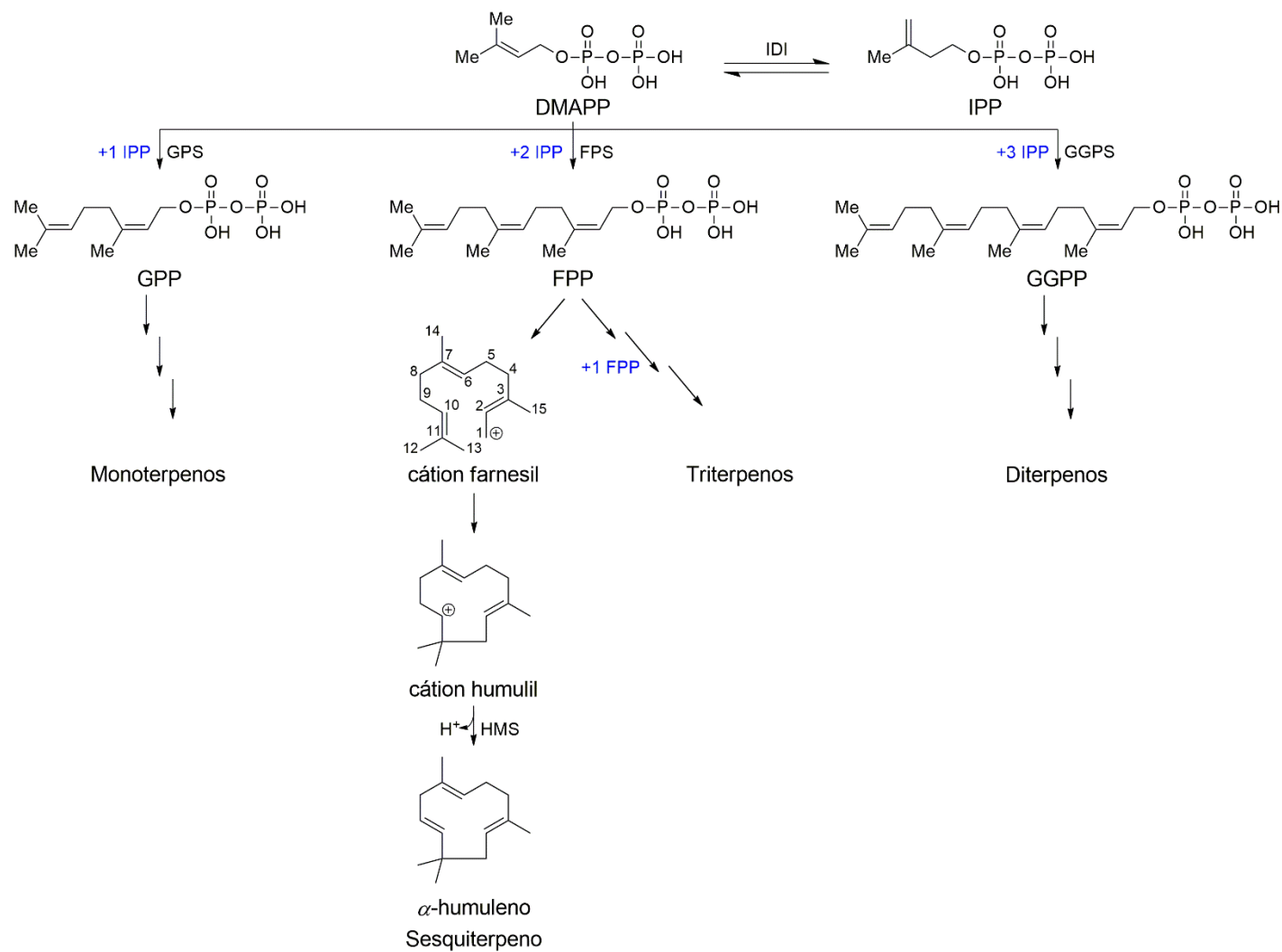
Figura 12. Biossíntese dos blocos construtores IPP e DMAPP



Legenda: AACT, acetoacetyl-CoA tiolase; CDP-ME, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol; CDP-MEP, 4-difosfocitidil-2-C-metil-D-eritritol-2-fosfato; CMK, CDP-ME quinase; CMS, MEP citidilil transferase; DXP, 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato; DXR, DXP redutoisomerase; DXS, DXP sintase; G3P, gliceraldeído-3-fosfato; HDR, HMB-PP redutase; HDS, HMB-PP sintase; HMB-PP, 4-hidroxi-3-metil-but-2-enildifosfato; HMG-CoA, 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA; HMGR, HMG-CoA redutase; HMGS, HMG-CoA sintase; IDI, IPP isomerase; MCS, ME-cPP sintase; ME-cPP, 2-C-metil-D-eritritol-2,4-ciclodifosfato; MK, MVA quinase; MVD, MVPP descarboxilase; MVP, mevalonato-5-fosfato; MVPP, mevalonatodifosfato; PMK, MVP quinase

Fonte: DEWICK (2009b); XIAO; ZHANG; WANG (2019).

Figura 13. Biossíntese de mono-, di-, triterpenos e do sesquiterpeno α -humuleno



Legenda: FPS, FPP sintase; GGPS, GGPP sintase; GPS, GPP sintase; HMS, α -humuleno sintase

Fonte: DEWICK (2009b); KUMETA; ITO (2016); XIAO; ZHANG; WANG (2019).

2.6. Câncer e atividade citotóxica

O câncer, neoplasia maligna ou tumor maligno, é uma doença heterogênea causada por alterações genéticas e epigenéticas e determinada pela divisão desordenada de células anormais. Com frequência essas células podem desenvolver propriedades de invasão de tecidos normais e promover metástases, isto é, disseminar-se entre órgãos distantes do corpo. E além do fator hereditário, outros como exposição a agentes tóxicos e estilo de vida, como ganho de peso, consumo de álcool e cigarro e falta de exercício físico, da mesma forma são considerados de risco, favorecendo o surgimento da doença (GEORGAKOPOULOU; STEBBING; SCULLY, 2018; GRAY et al., 2017; SHANKAR; GUPTA; GUPTA, 2019).

É considerado o principal problema de saúde pública no mundo, estimando-se que em 2018 ocorreram 18 milhões de novos casos e 9,6 milhões de mortes, sendo os cânceres de pulmão, mama, cólon e reto e próstata os mais incidentes. Estudos recentes demonstram que vem ocorrendo um aumento significativo no número de novos casos em países pobres e em desenvolvimento, projetando-se que em 2040 cerca de 70% de todos os casos serão diagnosticados nesses locais. No Brasil, avalia-se que entre 2020 e 2022 ocorrerão em média 625 mil novos casos por ano, com os cânceres de pele, mama, próstata, cólon e reto, pulmão e estômago sendo os mais comuns (CHATTERJEE; RODGER; ECCLES, 2018; INCA, 2019; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2019; WILSON et al., 2019).

Com relação ao tratamento, existem diferentes abordagens, incluindo cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Esta última usa fármacos direcionados à eliminação de células malignas, no entanto tem como importante desvantagem o dano causado em tecidos proliferativos normais como a medula óssea, por exemplo. Logo, apesar dos avanços, com consequente aumento no número de pacientes recuperados da doença, trata-se de uma área que ainda carece de soluções, havendo atualmente intensa busca por novos tratamentos (GEORGAKOPOULOU; STEBBING; SCULLY, 2018; MILLER et al., 2019).

Diante do relevante histórico como fonte para medicamentos antitumorais, correspondendo a cerca de 53% dos agentes empregados na quimioterapia, os PN ou seus derivados continuam sendo um dos principais alvos de pesquisa na área (CRAGG; NEWMAN, 2005; NEWMAN; CRAGG, 2020). Cabendo mencionar o local

de destaque dos alcaloides e terpenoides como compostos promissores para o tratamento das neoplasias (HUANG et al., 2012; LÚCIO et al., 2015; MONDAL et al., 2019).

Esses agentes químicos podem causar toxicidade celular por diversos mecanismos, como por destruição das membranas celulares, inibição de síntese protéica, inibição do alongamento das cadeias nucleotídicas, entre outros. Dessa maneira, para avaliar o efeito induzido por esses compostos, os ensaios de citotoxicidade e viabilidade celular são técnicas frequentemente empregas por serem baratas, rápidas, confiáveis e reprodutíveis. Dentre os tipos de ensaios, o colorimétrico com brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) é um dos mais comuns e fundamenta-se na avaliação da viabilidade celular após tratamento com a amostra-teste, de forma que, caso esta apresente citotoxicidade, a célula inviável não conservará sua atividade enzimática mitocondrial. Para isso, mede-se a coloração roxa do composto formazan produzido após redução do MTT e com isso é possível avaliar a atividade enzimática das células afetadas, sendo a quantidade de formazan produzido, observada pela intensidade da cor, proporcional ao número de células viáveis (ASLANTÜRK, 2018; DENIZOT; LANG, 1986).

Portanto, como a maior parte dos agentes quimioterápicos usados na terapêutica foi selecionado por conta de sua capacidade em influenciar a viabilidade e proliferação celular, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células tumorais pode ser considerada uma técnica adequada para a avaliação preliminar da atividade antitumoral. E a metodologia referida acima (redução do MTT) em estudos com Annonaceae, tanto de extratos e óleos essenciais como de seus metabólitos isolados, tem rendido bons resultados contra células de linhagens tumorais, podendo-se apontar os exemplos mostrados no (ALMEIDA et al., 2005; ASLANTÜRK, 2018; HOUGHTON et al., 2007).

Quadro 1. Compostos, frações e extratos obtidos de espécies de Annonaceae com resultados positivos em ensaio de citotoxicidade por redução de MTT

Compostos, frações e extratos	Linhagem celular (CI ₅₀ ou % inibição)	Referência
Ácido <i>ent</i> -7 α -acetoxitraquiloban-18-oico	HL60 (127 μ M); U937 (156 μ M); K562 (207 μ M); S180 (150 μ M); V79 (224 μ M)	(CASTELLO BRANCO et al., 2009; PITA et al., 2012; TAVARES et al., 2006)
Ácido caurenico	K562 (12 μ g mL ⁻¹); HL60 (9 μ g mL ⁻¹); MDA-MB435 (14 μ g mL ⁻¹); SF295 (12 μ g mL ⁻¹)	(CAVALCANTI et al., 2009)
Ácido 8(17)-12 <i>E</i> ,14-labdatrien-18-oico	HL60 (300 μ M); U937 (252 μ M)	(CASTELLO BRANCO et al., 2009)
Espatulanol	Hep ₂ (36 μ g mL ⁻¹)	(MATOS et al., 2006)
Eupolauramina	K562 (19 μ g mL ⁻¹)	(LÚCIO et al., 2011)
Extratos de <i>A. muricata</i>	HL-60 (6-49 μ g mL ⁻¹)	(PIEME et al., 2014)
Extratos de <i>A. vepretorum</i> (50 μ g mL ⁻¹)	HCT-116 (100%); OVCAR-8 (90%); SF-295 (71%)	(ALMEIDA et al., 2014)
Extratos de <i>A. dolichocarpa</i> (50 μ g mL ⁻¹)	HCT-116 (89%); OVCAR-8 (54%); SF-295 (65%)	(PINHEIRO et al., 2016)
Extratos de <i>D. chrysocarpa</i> (50 μ g mL ⁻¹)	HCT-116 (60%); OVCAR-8 (49%); SF-295 (63%)	(PINHEIRO et al., 2016)
Liriodenina	Hep ₂ (2 μ M)	(LI; XU; WANG, 2015)
O-Metilmoscatoлина	Hep ₂ (12 μ M)	(SILVA et al., 2007)
Óleo essencial de <i>D. bibracteata</i> (100 μ g mL ⁻¹)	MDA-MB-231 (99%); Hs 578T (100%)	(PALAZZO et al., 2009)
Óleo essencial de <i>G. oliviformis</i> (100 μ g mL ⁻¹)	MDA-MB-231 (100%); Hs 578T (36%)	(PALAZZO et al., 2009)
Óleo essencial de <i>U. costaricensis</i> (100 μ g mL ⁻¹)	MDA-MB-231 (100%); Hs 578T (17%)	(PALAZZO et al., 2009)
Óleo essencial de <i>X. frutescens</i>	NCI-H358M (25 μ g mL ⁻¹); PC-3M (40 μ g mL ⁻¹)	(FERRAZ et al., 2013)
Policarpol	Hep ₂ (25 μ g mL ⁻¹)	(MATOS et al., 2006)
Sampangina	K562 (11 μ g mL ⁻¹)	(LÚCIO et al., 2011)
Xylodiol	HL60 (90 μ M); U937 (76 μ M); K562 (40 μ M); V79 (112 μ mol)	(CASTELLO-BRANCO et al., 2011; CASTELLO BRANCO et al., 2009; TAVARES et al., 2007)

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Contribuir para a ampliação do conhecimento sobre a família Annonaceae por meio do estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *Anaxagorea dolichocarpa*.

3.2. Objetivos específicos

- Isolar por métodos clássicos e modernos de extração, fracionamento e purificação os alcaloides e terpenoides das raízes de *A. dolichocarpa*;
- Caracterizar as estruturas químicas dos compostos isolados por meio das técnicas de Espectroscopia no Infravermelho, Polarimetria, Dicroísmo Circular, Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear;
- Avaliar a citotoxicidade dos compostos isolados contra linhagens de células HCT-116 (carcinoma colorretal humano) e L929 (fibroblastos murinos não-tumorais).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Equipamentos, materiais e procedimentos gerais

A análise, o fracionamento, o isolamento e a purificação dos constituintes químicos do material vegetal ocorreram por uso de técnicas de cromatografia em coluna clássica (CC), cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), cromatografia líquida de média pressão (CLMP) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

Para CC, CCDA e CLMP, foram utilizados como fase móvel os solventes comerciais hexano (Hex), clorofórmio (CHCl_3), diclorometano (CH_2Cl_2), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), puros ou em misturas binárias. Para CLAE, foram utilizados MeOH grau de pureza HPLC (Tedia®) e água ultrapura (purificada em sistema Milli-Q®), puros ou em misturas binárias. Para o isolamento dos alcaloides, a fase aquosa foi acidificada com ácido fórmico (0,1%).

Na CC, foi utilizada como fase estacionária sílica gel (SiliaFlash® G60 da SiliCycle®, com partículas de 60-200 μm , 70-230 mesh, 60 Å). Já na CLMP a fase estacionária utilizada foi sílica gel, porém com menor tamanho de partícula (SiliaFlash® F60 da SiliCycle®, com partículas de 40-63 μm , 230-400 mesh, 60 Å). Para os procedimentos cromatográficos de separação das frações alcaloídicas, procedeu-se previamente o tratamento da sílica com bicarbonato de sódio (NaHCO_3) a 10%, seguindo metodologia desenvolvida por Costa et al. (2006). Para as duas técnicas (CC e CLMP), utilizou-se como suporte colunas cilíndricas de vidro cujo comprimento e diâmetro variaram de acordo com a quantidade da amostra e da fase estacionária utilizadas.

Para a CLMP, utilizou-se o equipamento automatizado BUCHI® conectado a um computador contendo um aplicativo gerenciador e composto por um sistema de duas bombas modelo C-605, unidade de controle C-620, detector fotométrico UV C-640 e coletor de frações C-660. O fluxo empregado para todas as análises foi de 10 mL/min.

As frações obtidas por CC e CLMP foram analisadas por CCDA utilizando-se placas de sílica gel com suporte de alumínio (SiliaPlate® com indicador F-254, espessura de 200 μm e 20x20 cm de dimensão) adquiridas comercialmente. Após

aplicação das amostras, as placas foram reveladas por exposição à luz UV nos comprimentos de onda 254 e 366 nm, no aparelho BOIT-LUB01 da marca Boitton, ou por borrifação de reagente de Dragendorff preparado em laboratório. No caso das frações obtidas por CLMP, o cromatograma gerado pelo *software* do equipamento foi analisado em conjunto com as manchas na CCDA para se decidir os agrupamentos das frações.

As amostras utilizadas nas análises e purificações por CLAE foram preparadas acrescentando-se MeOH e, em seguida, colocando-as em banho de ultrassom, no aparelho USC-1600 da marca Unique, para favorecer a solubilização. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm, por 3 minutos, em 4° C, no equipamento Rotina 380R da Hettich e, por fim, filtradas em filtro de PVDF com poro de 0,45 µm de diâmetro.

Para as purificações por CLAE, primeiramente desenvolveu-se um método na escala analítica orientado para posterior transposição para as escalas preparativa e semipreparativa. Portanto, todas as frações purificadas por essa técnica passaram pela mesma etapa de desenvolvimento de método analítico prévio.

Para CLAE na escala analítica, utilizou-se o equipamento Shimadzu Prominence composto por controlador de sistema modelo CBM-20A, bomba LC-20AT, desgaseificador DGU-20A_{5R}, auto-injetor SIL-20A_{HT} e detector de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A. Foram utilizadas as colunas analíticas 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), Kromasil 100-10-C18 (250 mm x 4,6 mm e partículas de 10 µm) conectada a uma pré-coluna C18 (4 mm x 3,0 mm e partículas de 10 µm) e Phenomenex Gemini 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). O fluxo empregado para as análises foi de 0,6 mL/min, o volume de injeção foi de 20 µl e as amostras preparadas na concentração de 1 mg/mL.

Na escala semipreparativa, os procedimentos foram feitos no equipamento Shimadzu constituído por controlador de sistema SLC-10A vp, bomba LC-10AD vp, válvula solenoide FCV-10AL vp, desgaseificador DGU-14A, injetor manual Rheodyne e detector UV-vis SPD-10A vp. Utilizou-se uma coluna semipreparativa Venusil XBP C18 (250 mm de comprimento x 10 mm e partículas de 10 µm) conectada a uma pré-coluna C18 (4 mm x 3,0 mm e partículas de 10 µm). O fluxo empregado para as

purificações foi de 3,5 mL/min, o volume de injeção foi de 100 µL e as amostras foram preparadas em concentrações de até 100 mg/mL, variando de acordo com as características da amostra, buscando-se com isso prevenir coeluição das substâncias.

Os isolamentos em CLAE na escala preparativa ocorreram no equipamento Shimadzu com controlador de sistema modelo SLC-10A vp, duas bombas LC-6AD, injetor manual Rheodyne e detector DAD SPD-M10A vp. A coluna preparativa utilizada no procedimento foi uma ACE 5 C18 (250 mm x 21,2 mm e partículas de 5 µm). O fluxo da fase móvel foi de 8,0 mL/min, com volume de injeção da amostra de 100 µL, as quais foram preparadas em concentrações de até 100 mg/mL, variando de acordo com suas características das frações.

4.2. Equipamentos e procedimentos analíticos

4.2.1. CLAE acoplada a Espectrometria de Massas e Espectrometria de Massas de Alta Resolução com Ionização por *Eletrospray*

Nas análises realizadas pela técnica de CLAE acoplada a Espectrometria de Massas (CLAE-EM), foi utilizado o equipamento CLAE Prominence composto por controlador de sistema modelo CBM-20A, duas bombas LC-20AD, desgaseificador DGU-20A₃, auto-injetor SIL-20A e, nesse caso, acoplado a um espectrômetro de massas de baixa resolução da marca Bruker, modelo Ion Trap-amaZonX com ionização por *electrospray* (IES), operando no modo positivo de aquisição. A fragmentação por CID foi realizada no modo auto MS/MS utilizando o modo de resolução avançada para o modo MS e MS/MS e os espectros (m/z 50 – 1.000) foram registrados a cada 2 s. A coluna analítica empregada foi uma Kromasil 100-5-C18 (250 mm x 4,6 mm, com partículas de 5 µm) conectada a uma pré-coluna C18 (4 mm x 3,0 mm, partículas de 5 µm).

Foram ainda realizadas algumas análises por injeção direta das amostras, utilizando o mesmo equipamento de EM.

Os picos obtidos, tanto por CLAE-EM, como por injeção direta, foram submetidos ao processo de fragmentação em sequência (*tandem* ou MSⁿ).

Os espectros de massas de alta resolução foram obtidos por IES (EMAR-IES) num aparelho Bruker micrOTOFII, operando em modo positivo.

4.2.2. Ressonância Magnética Nuclear

Os espectros de RMN 1D e 2D foram registrados nos equipamentos Bruker AVANCE III HD (400 e 100 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente), Varian NMR (500 e 125 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente) e Bruker AVANCE III HD 800 MHz (800 e 200 MHz para ^1H e ^{13}C , respectivamente). Para dissolução das amostras foram utilizados os solventes deuterados clorofórmio (CDCl_3) e metanol (CD_3OD) e os solventes residuais CHCl_3 (δ_{H} 7,24 e δ_{C} 77,0) e MeOH (δ_{H} 3,30 e δ_{C} 49,0) como padrão interno. Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento J em Hz. Utilizaram-se as convenções s (simpleto), d (duplete), dd (duplete duplo), ddd (duplo duplete duplo), dt (triplete duplo), t (triplete) e m (multiplete) para indicar as multiplicidades dos sinais de ^1H .

4.2.3. Infravermelho

Na região do infravermelho (IV), os espectros foram obtidos nos espectrômetros Bruker Vertex 70, com amostras solubilizadas em CHCl_3 ; e Rayleigh WQF-510 FT-IR e PerkinElmer Frontier FT-IR, com amostras preparadas em pastilhas de KBr. O número de onda foi medido em cm^{-1} .

4.2.4. Rotação óptica

A rotação óptica ($[\alpha]_{\text{D}}$) foi analisada no polarímetro Jasco P-2000, em CHCl_3 , a 25° C. Após medição do ângulo de desvio da luz polarizada, os dados foram calculados considerando o comprimento da cubeta e a concentração da amostra. O resultado foi expresso em $[\alpha]_{\text{D}}$.

4.2.5. Dicroísmo Circular

Os espectros de Dicroísmo Circular (DC) foram obtidos no espectropolarímetro modelo J-815 da Jasco. As leituras foram feitas no intervalo de 180 a 400 nm, a 25° C e as amostras solubilizadas em EtOH.

Para estabelecer a estereoquímica absoluta dos compostos, os dados experimentais de DC foram comparados com os calculados. Para isso, os estudos conformacionais foram realizados no programa Spartan'16 utilizando o campo de força MMFF94 (*molecular mechanics force field*). Os confôrmeros com até 10 kcal/mol de energia foram gerados e otimizados com cálculos usando DFT (*density functional theory*) em B3LYP/6-311+G(2d,p). Os espectros foram obtidos por DFT e TD-DFT (*time-dependent-DFT*) utilizando o programa Gaussian 09 e analisados no SpecDis v.1.71.

4.3. Material vegetal

As raízes de *A. dolichocarpa* foram coletadas no município de Cruz do Espírito Santo-PB, em dezembro de 2010 e abril de 2018. O registro de acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi obtido com o código AE4B71A. As identificações botânicas foram realizadas pela Profa. Dra. Maria de Fátima Agra, do Centro de Biotecnologia (CBiotec) da Universidade Federal da Paraíba (UFPB). A exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), no Centro de Ciências Exatas e da Natureza (CCEN/UFPB), registrada como AGRA & GÓES 5543.

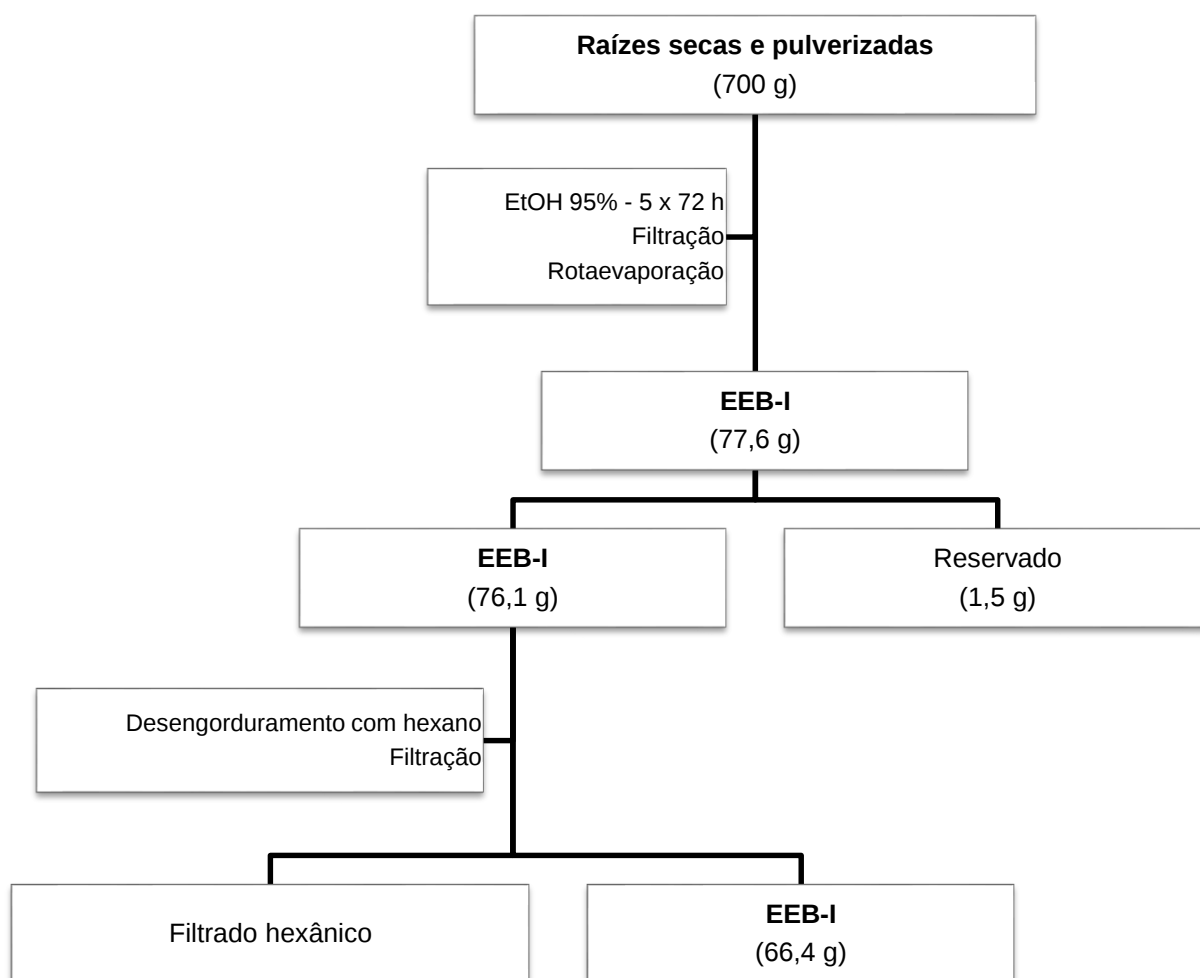
4.4. Obtenção dos extratos etanólicos brutos

As raízes coletadas em 2010 foram desidratadas em estufa com ar circulante à temperatura de 45 °C por um período de 96 h. Em seguida, o material obtido foi pulverizado em moinho mecânico, dando origem a 700 g de pó seco. Este foi então submetido à maceração com etanol (EtOH) a 95% por 72 h, em cinco repetições. A solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo à 45 °C, resultando em 77,6 g do extrato etanólico bruto I (**EEB-I**) (Esquema 1) (LÚCIO, 2015).

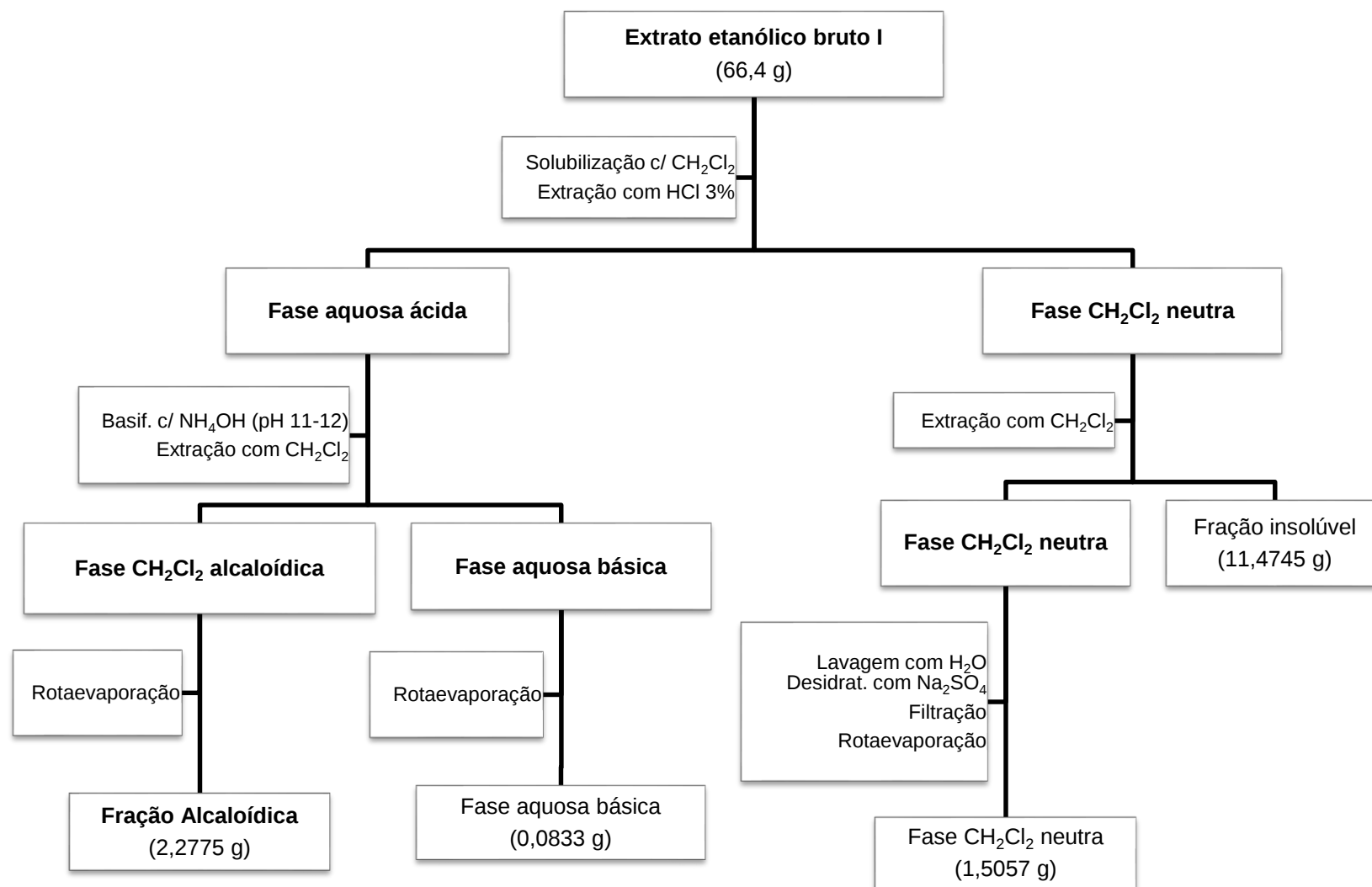
Uma parte do **EEB-I** (76,1 g) foi inicialmente submetida a um desengorduramento com hexano, para extração dos componentes apolares, permanecendo em contato com o solvente, sob agitação mecânica, por cerca de 5 minutos. O material foi então filtrado e separado.

O resíduo do **EEB-I** resultante da filtração, pesando 66,4 g, foi submetido ao procedimento de extração ácido-base para alcaloides seguindo a metodologia desenvolvida por Costa et al. (2006) (Esquema 2). Assim, iniciou-se adicionando 200 mL de CH_2Cl_2 ao **EEB-I**, solubilizando parcialmente o material após agitação. Este foi repetidamente particionado em funil de separação com soluções de 200 mL de HCl a 3%, até que a fase aquosa ácida extrativa se apresentasse límpida. O procedimento gerou as fases CH_2Cl_2 neutra (contendo uma fração insolúvel) e a fase aquosa ácida. A seguir, a fase aquosa ácida, com cerca de 2.000 mL de volume, foi basificada a frio com NH_4OH até atingir pH 11-12. Procedeu-se então a um novo particionamento, sendo utilizadas, em cada ciclo, alíquotas de 150 mL da fase aquosa basificada e 100 mL de CH_2Cl_2 , com três repetições para cada alíquota, dando origem às fases aquosa básica e CH_2Cl_2 alcaloídica. Após esse procedimento, voltou-se à fase CH_2Cl_2 neutra para separá-la da fração insolúvel, o que foi conseguido com auxílio de um funil, adicionando-se pequenos volumes de CH_2Cl_2 à fase para se obter a máxima extração. Para retirada do excesso de solução ácida, a fase CH_2Cl_2 neutra foi lavada com água destilada, desidratada com sulfato de sódio anidro e filtrada. Ao final, as fases em solução foram concentradas em evaporador rotativo à 40 °C, fornecendo 2,2775 g de fase CH_2Cl_2 alcaloídica, agora denominada Fração Alcaloídica (FA), 0,0833 g de fração aquosa básica, 1,5057 g de fase CH_2Cl_2 neutra e 11,4745 g de fração insolúvel.

Esquema 1. Obtenção e desengorduramento do **EEB-I** das raízes de *A. dolichocarpa*



Esquema 2. Tratamento do **EEB-I** das raízes de *A. dolichocarpa* e extração ácido-base

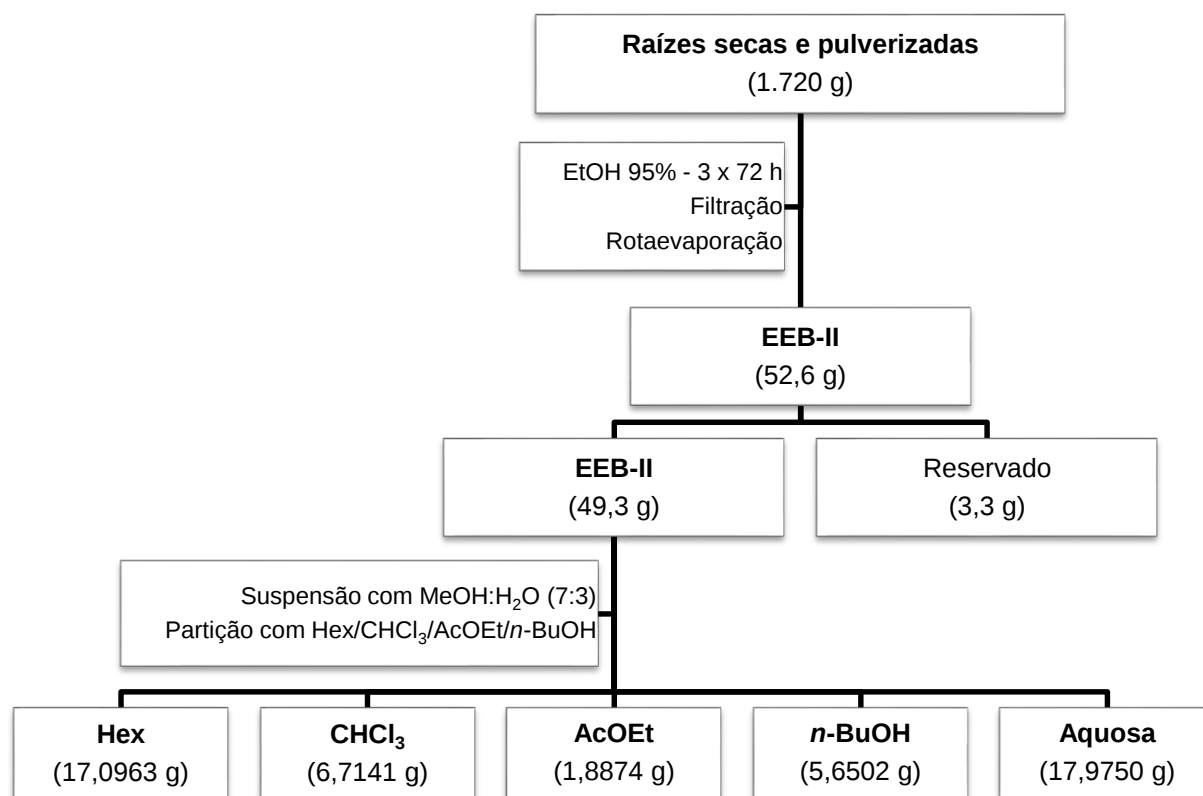


As raízes coletadas em 2018 foram desidratadas do mesmo modo, em estufa com ar circulante à 45 °C por 96 h. O material obtido foi pulverizado em moinho, resultando em 1.720 g de pó seco, o qual foi submetido à três etapas de maceração com EtOH a 95% por 72 h. O solvente foi removido em evaporador rotativo à 45 °C, produzindo 52,6 g do extrato etanólico bruto II (**EEB-II**) (Esquema 3).

À alíquota de 49,3 g do **EEB-II** foi adicionada uma solução de MeOH:H₂O (7:3) e essa mistura foi parcialmente homogeneizada sob agitação mecânica por cerca de sessenta minutos, obtendo-se então uma suspensão hidroalcoólica. Em seguida, esta foi submetida a um procedimento de partição líquido-líquido, utilizando-se os solventes Hex, CHCl₃, AcOEt e *n*-BuOH, em ordem crescente de polaridade, dando origem, respectivamente, às fases Hex, CHCl₃, AcOEt, *n*-BuOH e Aquosa (Esquema 3).

As fases Hex, CHCl₃, AcOEt foram desidratadas com sulfato de sódio anidro, filtradas e concentradas em evaporador rotativo à 40 °C, fornecendo 17,0963 g de fase Hex, 6,7141 g de fase CHCl₃ e 1,8874 g de fase AcOEt. As fases *n*-BuOH e Aquosa foram concentradas em evaporador rotativo à 60 °C e 45 °C, respectivamente, acrescentando-se quantidades de EtOH nas soluções para facilitar o processo de evaporação, obtendo-se 5,6502 g da *n*-BuOH e 17,9750 da Aquosa.

Esquema 3. Obtenção e particionamento do **EEB-II** das raízes de *A. dolichocarpa*



4.5. Isolamento dos constituintes químicos

Para o fracionamento da FA do **EEB-I**, uma alíquota de 2,1330 g foi submetida à CLMP com sílica gel (tratada com NaHCO₃ 10 %) e os eluentes Hex:CHCl₃ (100:0 até 0:100), CHCl₃:AcOEt (100:0 até 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 até 3:7) gerando no total 116 frações de 50 mL, que foram analisadas por meio do cromatograma gerado pelo equipamento e por CCDA e agrupadas de acordo com a similaridade em 20 frações codificadas como FA seguida da numeração que indica a ordem de coleta (e Esquema 4).

Após reaplicação das amostras em CCDA, eluição e revelação com reagente de Dragendorff, optou-se por iniciar o trabalho de isolamento dos constituintes das frações codificadas como FA08-15, FA30-38 e FA39-56, pois apresentaram colorações sugestivas da presença de alcaloides, variando entre manchas escuras, avermelhadas e as características manchas alaranjadas.

A fração FA08-15, pesando 95,0 mg e eluída em Hex:CHCl₃ (8:2), foi submetida à CLMP com sílica gel (com NaHCO₃ 10 %) e os eluentes Hex:CHCl₃ (100:0 até 0:100)

e CHCl₃:AcOEt (100:0 até 0:100) gerando no total 45 frações de 20 mL, que foram analisadas pelo cromatograma do equipamento e por CCDA e agrupadas por similaridade em 09 subfrações (Esquema 5).

A subfração FA08-15.13, com 15,8 mg, obtida em Hex:CHCl₃ (95:05), foi purificada em CLAE semipreparativa. O método analítico desenvolvido consistiu em um sistema de gradiente dos eluentes água (0,1% de ác. fórmico):MeOH (95:5 até 0:100) em 60 min e leitura em 254 nm. O procedimento deu origem à 07 subfrações, das quais a 04 (2,0 mg), purificada com 74% de MeOH, foi codificada como **ALC-05** e encaminhada para análise por espectrometria de RMN (Esquema 5).

A subfração FA08-15.14-16, com 23,4 mg, igualmente coletada em Hex:CHCl₃ (95:05), foi purificada em CLAE semipreparativa. O método analítico compreendeu um gradiente dos eluentes água (0,1% de ác. fórmico) (A) e MeOH (B) e leitura em 254 nm. Assim, o gradiente foi iniciado (0,01 min) com 20% de B até 70% em 40 min, mantendo a eluição isocrática (70%) até 50 min, finalizando a corrida com um novo gradiente até 100% de B com 65 min. A purificação permitiu a separação de 06 subfrações, das quais a 03 (1,5 mg, em 70% de B), a 04 (4,7 mg, em 72% de B) e a 05 (0,6 mg, em 80% de B) foram codificadas como **ALC-04**, **ALC-03** e **ALC-02**, respectivamente, todas levadas para análise por espectrometria de RMN (Esquema 5).

A fração FA30-38, 197,3 mg, eluída em Hex:CHCl₃ (1:9), foi purificada por CLAE preparativa com o gradiente de eluição de água (0,1% de ác. fórmico) (A) e MeOH (B) e leitura em 254 nm. O gradiente iniciou (0,01 min) com 0% indo até 65% de B em 45 min, mantendo-se eluição isocrática (65%) até 55 min, concluindo até 100% de B em 90 min. Das 20 subfrações coletadas, a 16 (1,5 mg), eluída com 65% de B, apresentou-se pura e em quantidade. Por isso, foi codificada como **ALC-06** e analisada em RMN (Esquema 6).

A fração FA39-56, com 295,5 mg e coletada em CHCl₃:AcOEt (9:1), foi submetida à CLMP com sílica gel (com NaHCO₃ 10 %) e os eluentes Hex:CHCl₃ (100:0 até 0:100), CHCl₃:AcOEt (100:0 até 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 até 3:7) gerando no total 49 frações de 50 mL, as quais, após análise do cromatograma gerado pelo equipamento e da CCDA, foram agrupadas por similaridade em 11 subfrações (Esquema 7).

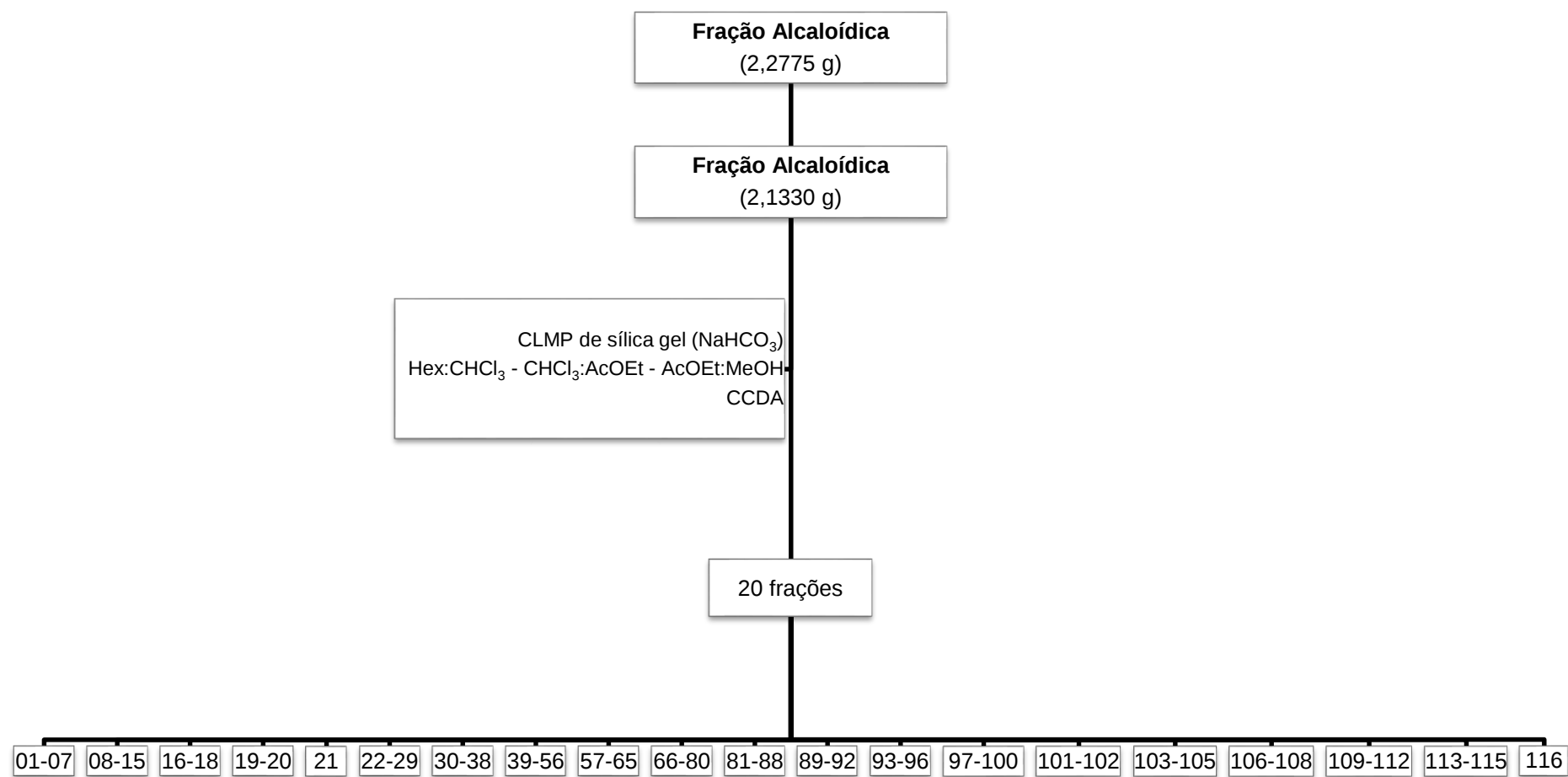
A subfração FA39-56.11-23, com 121,4 mg e separada em CHCl₃, foi submetida à CLAE semipreparativa com os solventes água (0,1% de ác. fórmico) (A) e MeOH (B), e leitura em 254 nm. Assim, o gradiente foi iniciado (0,01 min) com 30% de B até 40% em 20 min, permanecendo com eluição isocrática (40%) até 65 min, retomando-se o gradiente até 100% de B em 100 min. A purificação permitiu a separação de 09 subfrações, das quais a 07 (3,6 mg) foi coletada em 45% de B, codificada como **ALC-01**, e encaminhada para análise por RMN.

Os compostos codificados como **ALC-01 – 06** tiveram seus resultados discutidos no Capítulo 2, onde foram identificados como compostos **1 – 6**, respectivamente. Ou seja, o **ALC-01** é o Composto **1** e assim por diante.

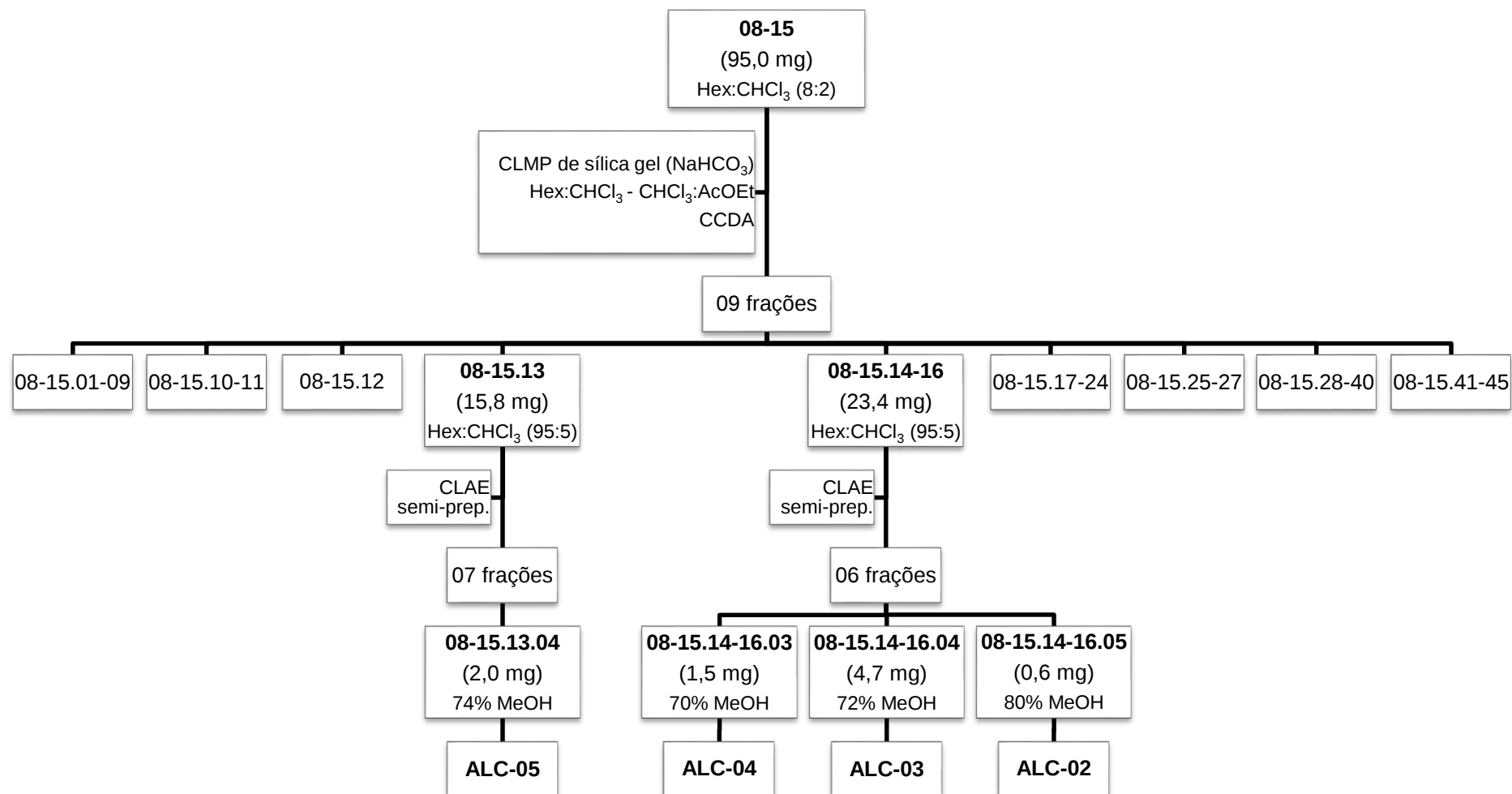
Tabela 1. Dados do fracionamento da Fração Alcaloídica do **EEB-I** de *A. dolichocarpa*

Sistema eluente	Frações FA
Hexano	01-03
Hex:CHCl ₃ (9:1)	04-06
Hex:CHCl ₃ (8:2)	07-09
Hex:CHCl ₃ (7:3)	10-12
Hex:CHCl ₃ (6:4)	13-15
Hex:CHCl ₃ (1:1)	16-19
Hex:CHCl ₃ (4:6)	20-22
Hex:CHCl ₃ (3:7)	23-25
Hex:CHCl ₃ (2:8)	26-28
Hex:CHCl ₃ (1:9)	29-31
CHCl ₃	32-37
CHCl ₃ :AcOEt (9:1)	38-40
CHCl ₃ :AcOEt (8:2)	41-43
CHCl ₃ :AcOEt (7:3)	44-46
CHCl ₃ :AcOEt (6:4)	47-49
CHCl ₃ :AcOEt (1:1)	50-53
CHCl ₃ :AcOEt (4:6)	54-56
CHCl ₃ :AcOEt (3:7)	57-59
CHCl ₃ :AcOEt (2:8)	60
CHCl ₃ :AcOEt (1:9)	61-62
AcOEt	63-68
AcOEt:MeOH (9:1)	69-71
AcOEt:MeOH (8:2)	72-74
AcOEt:MeOH (7:3)	75-84
AcOEt:MeOH (6:4)	85-92
AcOEt:MeOH (1:1)	93-95
AcOEt:MeOH (3:7)	96-116

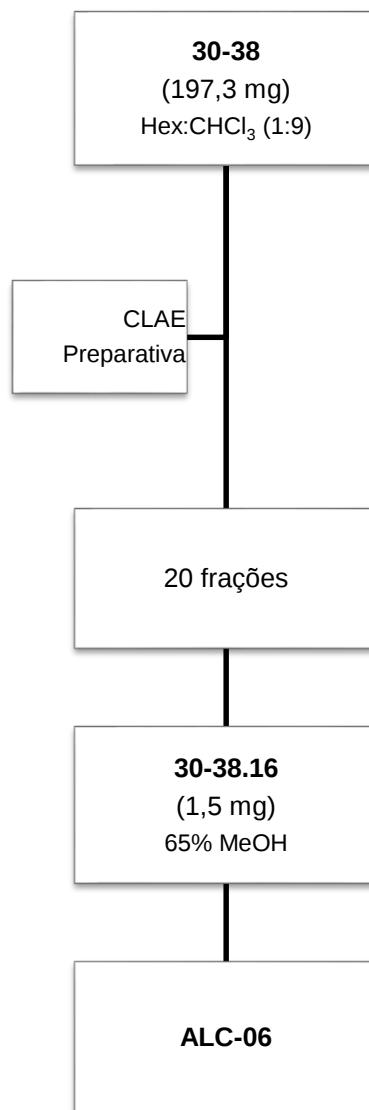
Esquema 4. Fracionamento da Fração Alcaloídica do **EEB-I** de *A. dolichocarpa*



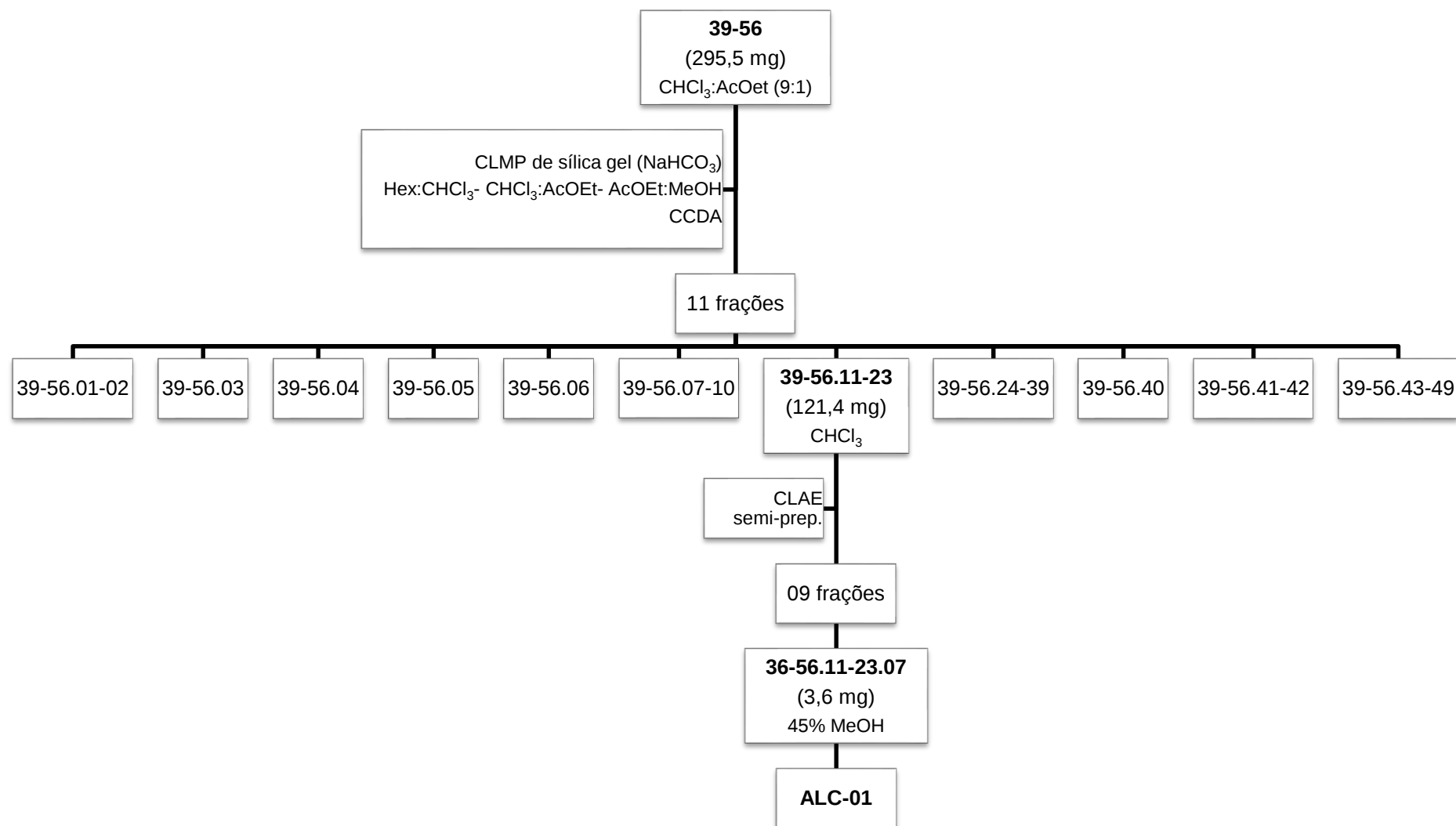
Esquema 5. Purificação da fração 08-15 da Fração Alcaloídica do **EEB-I** de *A. dolichocarpa*



Esquema 6. Purificação da fração 30-38 da Fração Alcaloídica do **EEB-I** de *A. dolichocarpa*



Esquema 7. Purificação da fração 39-56 da Fração Alcaloídica do **EEB-I** de *A. dolichocarpa*



O trabalho com o **EEB-II** foi realizado com o fracionamento da fase Hex. Dessa maneira, uma alíquota de 8,12 g foi submetida à CC com sílica gel e os eluentes Hex:AcOEt (100:0 até 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 até 1:1), gerando no total 24 frações de 100 mL, que foram analisadas por CCDA e agrupadas de acordo com a similaridade em 06 frações codificadas como FH seguida da numeração que indica a ordem de coleta (e Esquema 8).

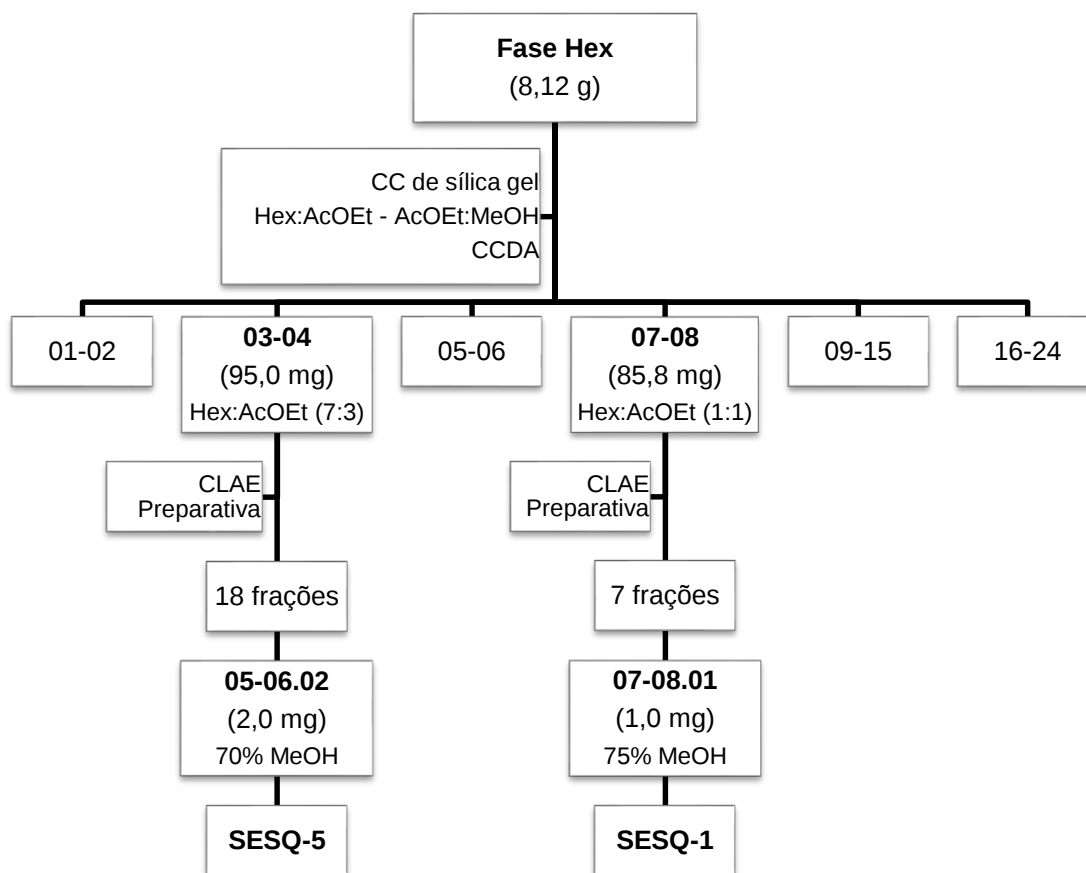
A fração FH03-04, pesando 95,0 mg, eluída em Hex:AcOEt (7:3), foi submetida à CLAE preparativa. O método consistiu em um gradiente de água (A) e MeOH (B), com leitura em 254 nm. Assim, o gradiente foi iniciado (0,01 min) com 20% de B até 70% em 40 min, permanecendo com eluição isocrática (70%) até 50 min, finalizando a corrida com um novo gradiente até 100% em 65 min. O procedimento permitiu a separação de 18 subfrações, das quais a 02 (2,0 mg), coletada em 70% de B, foi codificada como **SESQ-5** e encaminhada para análise por RMN (Esquema 8).

A fração FH07-08, com 85,8 mg e eluída em Hex:AcOEt (1:1), foi separada em CLAE preparativa usando como método analítico o sistema de gradiente de água:MeOH (95:5 até 0:100) em 75 min e leitura em 254 nm. Com isso, foram obtidas 07 subfrações, sendo a 01 (1,0 mg), coletada em 75% de B, codificada como **SESQ-1** e enviada para análise por RMN (Esquema 8).

Tabela 2. Dados do fracionamento da fase Hexano do **EEB-II** de *A. dolichocarpa*

Sistema eluente	Frações FH
Hex:AcOEt (9:1)	01-02
Hex:AcOEt (7:3)	03-06
HexAcOEt (1:1)	07-10
Hex:AcOEt (3:7)	11-12
Hex:AcOEt (1:9)	13-15
AcOEt	16
AcOEt:MeOH (9:1)	17-18
AcOEt:MeOH (7:3)	19-22
AcOEt:MeOH (1:1)	23-24

Esquema 8. Fracionamento da fase Hexano do **EEB-II** de *A. dolichocarpa*



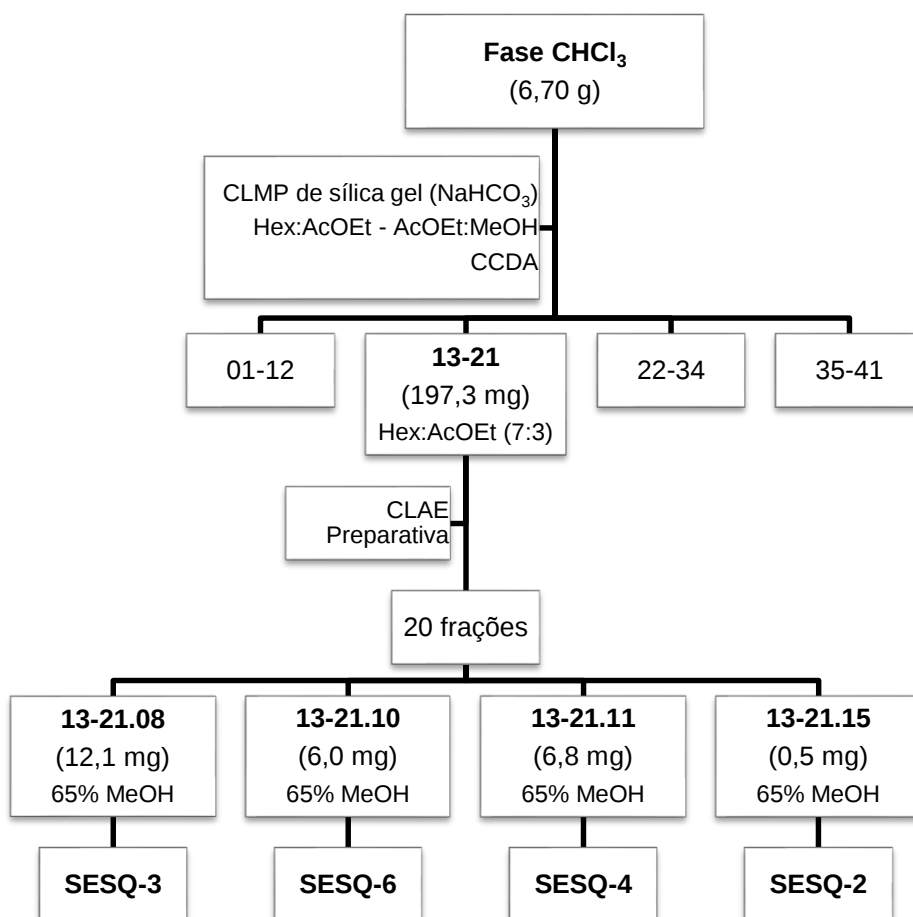
Para o fracionamento da fase CHCl_3 , uma alíquota de 6,70 g foi submetida à CLMP com sílica gel e os solventes Hex:AcOEt (100:0 até 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 até 1:1) rendendo 41 frações de 50 mL, que foram analisadas pelo cromatograma do equipamento e por CCDA e agrupadas por similaridade em 04 frações codificadas como FC seguida da numeração de coleta (e Esquema 9).

A fração FC13-21, com 197,3 mg, obtida em Hex:AcOEt (7:3), foi fracionada em CLAE preparativa. O método analítico consistiu em um gradiente de água (A) e MeOH (B), leitura em 254 nm. O gradiente foi 0% até 65% de B em 45 min, persistindo com eluição isocrática (65%) até 70 min, continuando a corrida com gradiente até 100% em 105 min. A cromatografia permitiu a separação de 20 subfrações, das quais a 08 (2,0 mg), a 10 (6,0 mg), a 11 (6,8 mg) e a 15 (0,5 mg), todas coletadas em 65% de B, foram codificadas como **SESQ-3**, **SESQ-6**, **SESQ-4**, **SESQ-2**, respectivamente, e direcionadas para análise por RMN (Esquema 9).

Tabela 3. Dados do fracionamento da fase CHCl_3 do **EEB-II** de *A. dolichocarpa*

Sistema eluente	Frações
Hex:AcOEt (9:1)	01-12
Hex:AcOEt (7:3)	13-21
Hex:AcOEt (1:1)	22-28
Hex:AcOEt (3:7)	29-30
AcOEt	31-34
AcOEt:MeOH (7:3)	35-37
AcOEt:MeOH (1:1)	38-41

Esquema 9. Fracionamento da fase CHCl_3 do **EEB-II** de *A. dolichocarpa*



Os resultados a cerca dos compostos **SESQ-01** – **06** serão discutidos no Capítulo 3, no qual foram identificados como *compounds* **1** – **6**, na mesma ordem, isto é, **SESQ-01** é o *Compound* **1** e assim por diante.

4.6. Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade foram utilizadas as linhagens HCT-116 (carcinoma colorretal humano) e L929 (fibroblasto murino), mantidas em meio de cultura RPMI-1640. O meio foi suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de solução de antibiótico (penicilina e estreptomicina). As células foram mantidas em estufa à 37 °C, em atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

A citotoxicidade foi mensurada pelo ensaio de redução do MTT, brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MOSMANN, 1983).

As células foram adicionadas em placas de 96 poços, na concentração de 3×10^5 células/mL (HCT-116 e L929). Em seguida, foram preparadas soluções estoque de 20 mM das substâncias, dissolvidas em DMSO (100%), da qual foi produzida solução de trabalho na concentração 50 µM, diluída em meio RPMI-1640, não ultrapassando a concentração final de 0,5% de DMSO. O DMSO (20%) foi utilizado como controle positivo. Após 72 h de incubação as placas foram centrifugadas (500 g, 5 min, 25 °C), foi removido 110 µL do sobrenadante, sendo adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) (Sigma-aldrich). As placas foram incubadas por 3 h em estufa de 5% de CO₂, a 37 °C, para redução do sal e formação dos cristais de formazan. Após o período de incubação, foi adicionado 100 µL de SDS (dodecil sulfato de sódio) (10% HCl 0,01 N), para a solubilização dos cristais de formazan. A absorbância foi medida em um leitor de placa, no comprimento de onda de 570 nm.

Os experimentos foram realizados em triplicata ou quadruplicata e a porcentagem de inibição foi calculada no programa *GraphPad Prism* 5.0. Uma escala de intensidade foi utilizada para avaliar o potencial citotóxico da amostra testada: amostra sem atividade (1 a 20% de inibição), com pouca atividade (inibição de crescimento celular variando de 20 a 50%), com atividade moderada (inibição de crescimento celular variando de 50 a 70%) e com muita atividade (inibição de crescimento variando de 70 a 100%).

Os dados foram analisados no programa *GraphPad Prism* 5.0, realizando o teste ANOVA, seguido do pós-teste de Tukey.

Os resultados de citotoxicidade dos compostos avaliados, quais sejam os alcaloides **ALC-01 – 05** (Compostos **1 – 5**) e os sesquiterpenoides **SESQ-03, 04 e 06** (*Compounds 3, 4 e 6*), são apresentados nos Capítulos 2 e 3, respectivamente.

REFERÊNCIAS

ABBAS, Farhat; KE, Yanguo; YU, Rangcai; YUE, Yuechong; AMANULLAH, Sikandar; JAHANGIR, Muhammad Muzammil; FAN, Yanping. Volatile terpenoids: multiple functions, biosynthesis, modulation and manipulation by genetic engineering. **Planta**, v. 246, n. 5, p. 803–816, 2017. DOI: 10.1007/s00425-017-2749-x.

ALENCAR, Danielle Cardoso de; PINHEIRO, Maria Lúcia Belém; PEREIRA, José Lamak da Silva; CARVALHO, João Ernesto de; CAMPOS, Francinete Ramos; SERAIN, Alessandra Freitas; TIRICO, Ricardo Brunelli; HERNÁNDEZ-TASCO, Alvaro José; COSTA, Emmanoel Vilaça; SALVADOR, Marcos José. Chemical composition of the essential oil from the leaves of *Anaxagorea brevipes* (Annonaceae) and evaluation of its bioactivity. **Natural Product Research**, v. 30, n. 9, p. 1088–1092, 2016. DOI: 10.1080/14786419.2015.1101103.

ALMEIDA, Vera Lúcia de; LEITÃO, Andrei; REINA, Luisa del Carmen Barrett; MONTANARI, Carlos Alberto; DONNICI, Claudio Luis; LOPES, Míriam Teresa Paz. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Química Nova**, v. 28, n. 1, p. 118–129, 2005. DOI: 10.1590/S0100-40422005000100021.

ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva; OLIVEIRA, Marianna Ribeiro de; GUIMARÃES, Amanda Leite; OLIVEIRA, Ana Paula de; RIBEIRO, Luciano Augusto de Araújo; LÚCIO, Ana Sílvia Suassuna Carneiro; QUINTANS JÚNIOR, Lucindo José. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 4, p. 367–374, 2011.

ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes Silva; ARAÚJO, Camila Souza; PESSOA, Cláudia Do Ó.; COSTA, Marcília Pinheiro; PACHECO, Alessandra Gomes Marques. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. 1, p. 258–264, 2014. DOI: 10.1590/S0100-2945201400050003.

ALVES, Deiane Santos; MOREJÓN, Reinaldo Chico; MACHADO, Alan Rodrigues Teixeira; CARVALHO, Geraldo Andrade; PINA, Oriela; OLIVEIRA, Denilson Ferreira. Acaricidal activity of Annonaceae fractions against *Tetranychus tumidus* and *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and the metabolite profile of *Duguetia lanceolata* (Annonaceae) using GC-MS. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, n. 6Supl2, p. 4119, 2015. DOI: 10.5433/1679-0359.2015v36n6Supl2p4119.

AMINIMOGHADAMFAROUJ, Noushin; NEMATOLLAHI, Alireza; WIART, Christophe. Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 13, n. 5, p. 465–476, 2011. DOI: 10.1080/10286020.2011.570265.

ANDRADE, Nilza Campos de; BARBOSA-FILHO, José Maria; SILVA, Marcelo S. da; CUNHA, Emídio V. L. da; MAIA, José Guilherme S. Diterpenes and volatile constituents from the leaves of *Xylopia cayennensis* Maas. **Biochemical Systematics**

and Ecology, v. 32, n. 11, p. 1055–1058, 2004. DOI: 10.1016/j.bse.2004.02.009.

ANDRADE, Eloisa Helena A.; OLIVEIRA, Jorge; ZOGHBI, Maria das Graças B. Volatiles of *Anaxagorea dolichocarpa* Spreng. & Sandw. and *Annona densicoma* Mart. Growing Wild in the State of Pará, Brazil. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 2, p. 158–160, 2007. DOI: 10.1002/ffj.1776.

ASLANTÜRK, Özlem Sultan. *In Vitro* Cytotoxicity and Cell Viability Assays: Principles, Advantages, and Disadvantages. In: **Genotoxicity - A Predictable Risk to Our Actual World**. London, UK: InTech, 2018. p. 1–18. DOI: 10.5772/intechopen.71923.

BARBALHO, Sandra; GOULART, Ricardo de; FARINAZZI-MACHADO, Flavia Vasques; SOUZA, Maricelma da Silva Soares de; BUENO, Patricia Santos; GUIGUER, Elen; ARAUJO, Adriano; GROppo, Milton. *Annona* sp: Plants with Multiple Applications as Alternative Medicine - A Review. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, n. 3, p. 277–286, 2012. DOI: 10.2174/157340712802762500.

BERGMAN, Matthew E.; DAVIS, Benjamin; PHILLIPS, Michael A. Medically useful plant terpenoids: biosynthesis, occurrence, and mechanism of action. **Molecules**, v. 24, n. 21, p. 3961, 2019. DOI: 10.3390/molecules24213961.

BLÁZQUEZ, M. Amparo; BERMEJO, Almudena; ZAFRA-POLO, M. Carmen; CORTES, Diego. Styryl-lactones from *Goniiothalamus* species— A review. **Phytochemical Analysis**, v. 10, n. 4, p. 161–170, 1999. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1565(199907/08)10:4<161::AID-PCA453>3.0.CO;2-2.

BONINI, Sara Anna; PREMOLI, Marika; TAMBARO, Simone; KUMAR, Amit; MACCARINELLI, Giuseppina; MEMO, Maurizio; MASTINU, Andrea. *Cannabis sativa*: A comprehensive ethnopharmacological review of a medicinal plant with a long history. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, p. 300–315, 2018. DOI: 10.1016/j.jep.2018.09.004.

BÖTTGER, Angelika; VOTHKNECHT, Ute; BOLLE, Cordelia; WOLF, Alexander. Alkaloids. In: **Lessons on Caffeine, Cannabis & Co**. Learning Materials in BiosciencesCham: Springer International Publishing, 2018. p. 179–203. DOI: 10.1007/978-3-319-99546-5_12.

BRANDÃO, Geraldo Célio; KROON, Erna G.; SANTOS, João Rodrigues dos; STEHMANN, João Renato; LOMBARDI, Júlio A.; OLIVEIRA, Alaíde Braga de. Antiviral activity of plants occurring in the state of Minas Gerais (Brazil): Part III. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 4, p. 223–236, 2011.

BROPHY, Joseph; GOLDSACK, Robert; FORSTER, Paul. Essential Oils from the Leaves of Some Queensland Annonaceae. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 2, p. 95–100, 2004. DOI: 10.1080/10412905.2004.9698660.

CARROLL, Anthony R.; TAYLOR, Walter C. Constituents of *Eupomatia* Species. XII. Isolation of Constituents of the Tubers and Aerial Parts of *Eupomatia bennettii* and Determination of the Structures of New Alkaloids From the Aerial Parts of *E. bennettii* and Minor Alkaloids of *E. laurina*. **Australian Journal of Chemistry**, v. 44, n. 11, p.

1615, 1991. DOI: 10.1071/CH9911615.

CASTELLO-BRANCO, Marianna Vieira S.; TAVARES, Josean F.; SILVA, Marcelo S.; BARBOSA FILHO, José Maria; ANAZETTI, Maristella C.; FRUNGILLO, Lucas; HAUN, Marcela; MELO DINIZ, Margareth F. F.; MELO, Patrícia S. Xylodiol from *Xylopia langsdorffiana* induces apoptosis in HL60 cells. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 6, p. 1035–1042, 2011. DOI: 10.1590/S0102-695X2011005000135.

CASTELLO BRANCO, Marianna V. S.; ANAZETTI, Maristella C.; SILVA, Marcelo S.; TAVARES, Josean F.; DINIZ, Margareth F. F. Melo; FRUNGILLO, Lucas; HAUN, Marcela; MELO, Patrícia S. 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. DOI: 10.1515/znc-2009-9-1008.

CAVALCANTI, Bruno C.; BEZERRA, Daniel P.; MAGALHÃES, Hemerson I. F.; MORAES, Manoel O.; LIMA, Mary Anne S.; SILVEIRA, Edilberto R.; CÂMARA, Cláudio A. G.; RAO, Vietla S.; PESSOA, Cláudia; COSTA-LOTUFO, Letícia V. Kauren-19-oic acid induces DNA damage followed by apoptosis in human leukemia cells. **Journal of Applied Toxicology**, v. 29, n. 7, p. 560–568, 2009. DOI: 10.1002/jat.1439.

CAVE, A. Annonaceae Alkaloids. In: PHILLIPSON, J. D.; ROBERTS, M. F.; ZENK, M. H. (org.). **The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids**. 1st. ed. Heidelberg: Springer-Verlag, 1985. p. 79–101. DOI: 10.1007/978-3-642-70128-3_6.

CAVÉ, A.; FIGADÈRE, B.; LAURENS, A.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae. In: **Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe. Progress in the chemistry of organic natural products. Progrès dans la chimie des substances organiques naturelles**. v. 70, p. 81–288, 1997. DOI: 10.1007/978-3-7091-6551-5_2.

CHATROU, Lars W.; PIRIE, Michael D.; ERKENS, Roy H. J.; COUVREUR, Thomas L. P.; NEUBIG, Kurt M.; ABBOTT, J. Richard; MOLS, Johan B.; MAAS, Jan W.; SAUNDERS, Richard M. K.; CHASE, Mark W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5–40, 2012. a. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2012.01235.x.

CHATROU, Lars W.; ERKENS, Roy H. J.; RICHARDSON, James E.; SAUNDERS, Richard M. K.; FAY, Michael F. The natural history of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 1–4, 2012. b. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2012.01242.x.

CHATTERJEE, Aniruddha; RODGER, Euan J.; ECCLES, Michael R. Epigenetic drivers of tumorigenesis and cancer metastasis. **Seminars in Cancer Biology**, v. 51, p. 149–159, 2018. DOI: 10.1016/j.semcancer.2017.08.004.

CHRISTENHUSZ, Maarten J. M.; BYNG, James W. The number of known plants species in the world and its annual increase. **Phytotaxa**, v. 261, n. 3, p. 201, 2016. DOI: 10.11646/phytotaxa.261.3.1.

CHRISTOPHER, Robert; MGANI, Quintino A.; NYANDORO, Stephen S.; ROUSSEAU, Amanda L.; ISAACS, Michelle; HOPPE, Heinrich C. A new indole alkaloid and other constituents from *Monodora minor* and *Uvaria tanzaniae*: their antitrypanosomal and antiplasmodial evaluation. **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–8, 2020. DOI: 10.1080/14786419.2019.1710705.

CORREIA, Ana Carolina 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. DOI: 10.1080/14786419.2014.964706.

COSTA, Emmanoel V.; PINHEIRO, Maria L. B.; XAVIER, Clahildek M.; SILVA, Jefferson R. A.; AMARAL, Ana C. F.; SOUZA, Afonso D. L.; BARISON, Anderson; CAMPOS, Francinete R.; FERREIRA, Antonio G.; MACHADO, Gérzia M. C.; LEON, Leonor L. P. A Pyrimidine- β -carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 2, p. 292–294, 2006. DOI: 10.1021/np050422s.

COSTA, Vicente C. O.; TAVARES, Josean F.; AGRA, Maria F.; FALCÃO-SILVA, Vivyanne S.; FACANALI, Roselaine; VIEIRA, Maria Aparecida R.; MARQUES, Márcia Ortiz M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, José P.; SILVA, Marcelo Sobral da. 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. DOI: 10.1590/S0102-695X2008000200019.

COSTA, Vicente Carlos de O.; TAVARES, Josean F.; QUEIROGA, Cinthia F.; CASTELLO-BRANCO, Marianna V. S.; DINIZ, Margareth F. F. M.; Lima, Carolina U. G. B.; SANTOS, Bárbara V. O.; PITA, João C. L. R.; SILVA, Marcelo S. Constituintes químicos das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. **Química Nova**, v. 35, n. 1, p. 138–142, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012000100025.

CRAGG, Gordon M.; NEWMAN, David J. Plants as a source of anti-cancer agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1–2, p. 72–79, 2005. DOI: 10.1016/j.jep.2005.05.011.

DENIZOT, François; LANG, Rita. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, n. 2, p. 271–277, 1986. DOI: 10.1016/0022-1759(86)90368-6.

DEWICK, Paul M. Alkaloids. In: **Medicinal Natural Products**. Wiley Online Books, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. a. p. 311–420. DOI: 10.1002/9780470742761.ch6.

DEWICK, Paul M. The Mevalonate and Methylerythritol Phosphate Pathways: Terpenoids and Steroids. In: **Medicinal Natural Products**. Wiley Online Books, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2009. b. p. 187–310. DOI: 10.1002/9780470742761.ch5.

DEY, Prasanta; KUNDU, Amit; KUMAR, Anoop; GUPTA, Meenakshi; LEE, Byung Mu; BHAKTA, Tejendra; DASH, Suvakanta; KIM, Hyung Sik. Analysis of alkaloids (indole alkaloids, isoquinoline alkaloids, tropane alkaloids). In: **Recent Advances in Natural**

Products Analysis. Elsevier, 2020. p. 505–567. DOI: 10.1016/B978-0-12-816455-6.00015-9.

DUTRA, Livia Macedo; COSTA, Emmanoel Vilaça; MORAES, Valéria Regina de Souza; NOGUEIRA, Paulo Cesar de Lima; VENDRAMIN, Mayara Evelyn; BARISON, Andersson; PRATA, Ana Paula do Nascimento. Chemical constituents from the leaves of *Annona pickelii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 41, p. 115–118, 2012. DOI: 10.1016/j.bse.2011.12.011.

ENDRESS, Peter K.; ARMSTRONG, Joseph E. Floral development and floral phyllotaxis in *Anaxagorea* (Annonaceae). **Annals of Botany**, v. 108, n. 5, p. 835–845, 2011. DOI: 10.1093/aob/mcr201.

ERNST, Madeleine; SASLIS-LAGOUDAKIS, C. Haris; GRACE, Olwen M.; NILSSON, Niclas; SIMONSEN, Henrik Toft; HORN, James W.; RØNSTED, Nina. Evolutionary prediction of medicinal properties in the genus *Euphorbia* L. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 30531, 2016. DOI: 10.1038/srep30531.

FANG, Xin-Ping; RIESER, Matthew J.; GU, Zhe-Ming; ZHAO, Geng-Xian; MCLAUGHLIN, Jerry L. Annonaceous acetogenins: An updated review. **Phytochemical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 27–48, 1993. DOI: 10.1002/pca.2800040108.

FATIMA, A.; MODOLO, L.; CONEGERO, L.; PILLI, R.; FERREIRA, C.; KOHN, L.; CARVALHO, J. De. Styryl Lactones and Their Derivatives: Biological Activities, Mechanisms of Action and Potential Leads for Drug Design. **Current Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 28, p. 3371–3384, 2006. DOI: 10.2174/092986706779010298.

FERRAZ, Rosana P. C.; CARDOSO, Gabriella M. B.; SILVA, Thanany B.; FONTES, José E. N.; PRATA, Ana P. N.; CARVALHO, Adriana A.; MORAES, Manoel O.; PESSOA, Claudia; COSTA, Emmanoel V.; BEZERRA, Daniel P. Antitumour properties of the leaf essential oil of *Xylopi frutescens* Aubl. (Annonaceae). **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 196–200, 2013. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.02.114.

FOURNIER, Gilbert; HADJIAKHOONDI, Abbas; CHARLES, Brigitte; LEBOEUF, Michel; CAVÉ, André. Volatile components of *Anaxagorea dolichocarpa* fruit. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 22, n. 6, p. 605–608, 1994. DOI: 10.1016/0305-1978(94)90073-6.

FUNARI, C. S.; FERRO, V. O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 178–182, 2005. DOI: 10.1590/S0102-695X2005000200018.

GÉNY, Charlotte; ABOU SAMRA, Alma; RETAILLEAU, Pascal; IORGA, Bogdan I.; NEDEV, Hristo; AWANG, Khalijah; ROUSSI, Fanny; LITAUDON, Marc; DUMONTET, Vincent. (+)- and (–)-Ecarlotiones, Uncommon Chalconoids from *Fissistigma latifolium* with Pro-Apoptotic Activity. **Journal of Natural Products**, v. 80, n. 12, p. 3179–3185, 2017. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.7b00494.

GEORGAKOPOULOU, Eleni; STEBBING, Justin; SCULLY, Crispian. Targeted cancer therapies. **The Journal of the American Dental Association**, v. 149, n. 2, p. 100–

111, 2018. DOI: 10.1016/j.adaj.2017.08.046.

GERSHENZON, Jonathan; CROTEAU, Rodney B. Terpenoid Biosynthesis: The Basic Pathway and Formation of Monoterpenes, Sesquiterpenes, and Diterpenes. *In*: MOORE, Thomas S. (org.). **Lipid Metabolism in Plants**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2018. p. 339–388. DOI: 10.1201/9781351074070-14.

GERSHENZON, Jonathan; DUDAREVA, Natalia. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, n. 7, p. 408–414, 2007. DOI: 10.1038/nchembio.2007.5.

GONDA, Ryoko; TAKEDA, Tadahiro; AKIYAMA, Toshiyuki. Studies on the Constituents of *Anaxagorea luzonensis* A. GRAY. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 8, p. 1219–1222, 2000. DOI: 10.1248/cpb.48.1219.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, Alma Rosa; DE-LA-CRUZ-CHACÓN, Iván; CASTRO-MORENO, Marisol; OROZCO-CASTILLO, José Agustín; RILEY-SALDAÑA, Christian Anabi. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 01–16, 2014. DOI: 10.1590/S0100-29452014000500001.

GOTTSBERGER, Gerhard. The reproductive biology of the early-divergent genus *Anaxagorea* (Annonaceae), and its significance for the evolutionary development of the family. **Acta Botanica Brasilica**, v. 30, n. 2, p. 313–325, 2016. DOI: 10.1590/0102-33062015abb0311.

GRAY, Janet M.; RASANAYAGAM, Sharima; ENGEL, Connie; RIZZO, Jeanne. State of the evidence 2017: an update on the connection between breast cancer and the environment. **Environmental Health**, v. 16, n. 1, p. 94, 2017. DOI: 10.1186/s12940-017-0287-4.

GRIPP, Erica Larissa Oliveira; CARNEIRO, Lilian Uchoa; PEREIRA, Isabela de Souza Pinto; VEGA, Maria Raquel Garcia; MARINHO, Bruno Guimarães. Avaliação das propriedades analgésicas de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague and Sandwith LC. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 1, p. 382–395, 2020. DOI: 10.34119/bjhrv3n1-029.

GROSS, Andressa Verдум; STOLZ, Eveline Dischkaln; MÜLLER, Liz Girardi; RATES, Stela Maris Kuze; RITTER, Mara Rejane. Medicinal plants for the “nerves”: a review of ethnobotanical studies carried out in South Brazil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 33, n. 2, p. 269–282, 2019. DOI: 10.1590/0102-33062018abb0386.

GUO, Xing; TANG, Chin Cheung; THOMAS, Daniel C.; COUVREUR, Thomas L. P.; SAUNDERS, Richard M. K. A mega-phylogeny of the Annonaceae: taxonomic placement of five enigmatic genera and support for a new tribe, Phoenicantheae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7323, 2017. DOI: 10.1038/s41598-017-07252-2.

GUTTA, Pradeep; TANTILLO, Dean J. Theoretical Studies on Farnesyl Cation Cyclization: Pathways to Pentalenene. **Journal of the American Chemical Society**, v. 128, n. 18, p. 6172–6179, 2006. DOI: 10.1021/ja058031n.

HAMID, Roslida Abd; FOONG, Chan Pit; AHMAD, Zuraini; HUSSAIN, Mohd Khairi. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 3, p. 630–641, 2012. DOI: 10.1590/S0102-695X2012005000001.

HANLEY, Nick; PERRINGS, Charles. The Economic Value of Biodiversity. **Annual Review of Resource Economics**, v. 11, n. 1, p. 355–375, 2019. DOI: 10.1146/annurev-resource-100518-093946.

HARVEY, Alan L.; CLARK, Rachel L.; MACKAY, Simon P.; JOHNSTON, Blair F. Current strategies for drug discovery through natural products. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 5, n. 6, p. 559–568, 2010. DOI: 10.1517/17460441.2010.488263.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; MORETTI, C.; JACQUEMIN, H.; CAVÉ, A. L'Anaxagoreine, nouvel alcalolde aporphinique isolé de deux espèces d'*Anaxagorea*. **Planta Medica**, v. 41, p. 48–50, 1981.

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, n. 3, p. 391–400, 2007. DOI: 10.1016/j.jep.2007.01.032.

HUANG, Min; LU, Jin-Jian; HUANG, Ming-Qing; BAO, Jiao-Lin; CHEN, Xiu-Ping; WANG, Yi-Tao. Terpenoids: natural products for cancer therapy. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 21, n. 12, p. 1801–1818, 2012. DOI: 10.1517/13543784.2012.727395.

HUSAIN, Khairana; ZAKARIA, Siti Mariam; LAJIS, Nordin H.; SHAARI, Khozirah; ISMAIL, Intan Safinar; ISRAF, Daud A.; PAETZ, Christian. Novel sesquiterpene and copyrine alkaloids from *Anaxagorea javanica* Blume. **Phytochemistry Letters**, v. 5, n. 4, p. 788–792, 2012. DOI: 10.1016/j.phytol.2012.09.003.

INCA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

JACOBO-HERRERA, Nadia; PÉREZ-PLASENCIA, Carlos; CASTRO-TORRES, Víctor Alberto; MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, Mariano; GONZÁLEZ-ESQUINCA, Alma Rosa; ZENTELLA-DEHESA, Alejandro. Selective Acetogenins and Their Potential as Anticancer Agents. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, n. July, p. 1–12, 2019. DOI: 10.3389/fphar.2019.00783.

JAIDEE, Wuttichai; MANEERAT, Wisanu; ANDERSEN, Raymond J.; PATRICK, Brian O.; PYNE, Stephen G.; LAPHOOKHIEO, Surat. Antioxidant neolignans from the twigs and leaves of *Mitrephora wangii* HU. **Fitoterapia**, v. 130, p. 219–224, 2018. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.09.004.

JÜRGENS, Andreas; WEBBER, Antonio C.; GOTTSBERGER, Gerhard. Floral scent compounds of Amazonian Annonaceae species pollinated by small beetles and thrips. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 551–558, 2000. DOI: 10.1016/S0031-9422(00)00241-7.

JUSSIEU, Antoine Laurent De. **Genera plantarum secundum ordines naturales disposita, juxta methodum in Horto Regio Parisiensi exaratum, anno M.DCC.LXXIV**. Parisiis,: Apud Viduam Herissant et Theophilum Barrois, 1789. DOI: 10.5962/bhl.title.7762.

KITAOKA, Masahiro; KADOKAWA, Hiroshi; SUGANO, Machiko; ICHIKAWA, Kazuo; TAKI, Motohiko; TAKAISHI, Sashiko; IJIMA, Yasuteru; TSUTSUMI, Shinya; BORIBOON, Malee; AKIYAMA, Toshiyuki. Prenylflavonoids: A New Class of Non-Steroidal Phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-Isopentenylnaringenin and an Initial Study on its Structure-Activity Relationship. **Planta Medica**, v. 64, n. 06, p. 511–515, 1998. DOI: 10.1055/s-2006-957504.

KUMETA, Yukie; ITO, Michiho. Characterization of α -humulene synthases responsible for the production of sesquiterpenes induced by methyl jasmonate in *Aquilaria* cell culture. **Journal of Natural Medicines**, v. 70, n. 3, p. 452–459, 2016. DOI: 10.1007/s11418-016-0999-8.

LANGE, B. Markus; RUJAN, Tamas; MARTIN, William; CROTEAU, Rodney. Isoprenoid biosynthesis: The evolution of two ancient and distinct pathways across genomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 24, p. 13172–13177, 2000. DOI: 10.1073/pnas.240454797.

LARSSON, Sonny. The “new” chemosystematics: Phylogeny and phytochemistry. **Phytochemistry**, v. 68, n. 22–24, p. 2904–2908, 2007. DOI: 10.1016/j.phytochem.2007.09.015.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1982. DOI: 10.1016/0031-9422(80)85046-1.

LEKPHROM, Ratsami; KANOKMEDHAKUL, Kwanjai; SCHEVENELS, Florian; KANOKMEDHAKUL, Somdej. Antimalarial polyoxygenated cyclohexene derivatives from the roots of *Uvaria cherrevensis*. **Fitoterapia**, v. 127, p. 420–424, 2018. DOI: 10.1016/j.fitote.2018.01.018.

LI, Jesse W. H.; VEDERAS, John C. Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? **Science**, v. 325, n. 5937, p. 161–165, 2009. DOI: 10.1126/science.1168243.

LI, Liang; XU, Ying; WANG, Binqun. Liriodenine induces the apoptosis of human laryngocarcinoma cells via the upregulation of p53 expression. **Oncology Letters**, v. 9, n. 3, p. 1121–1127, 2015. DOI: 10.3892/ol.2014.2834.

LIANG, Chih-Chuang; LIOU, Jing-Ru; WU, Tung-Ying; CHANG, Fang-Rong; WU, Yang-Chang. Acetogenins from Annonaceae. In: **Progress in the chemistry of organic natural products**. Springer International Publishing, 2016. p. 113–230. DOI: 10.1007/978-3-319-22692-7_2.

LOBÃO, Adriana Quintella; ARAUJO, Dorothy Sue Dunn de; KURTZ, Bruno Coutinho. Annonaceae das Restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56,

n. 87, p. 85–96, 2005. DOI: 10.1590/2175-78602005568706.

LOBÃO, Adriana Quintella; LOPES, Jenifer; MELLO-SILVA, Renato de. Check-list das Annonaceae do estado do Mato Grosso do Sul, Brasil. **Iheringia, Série Botânica**, v. 73, n. Suppl, p. 123–126, 2018. DOI: 10.21826/2446-8231201873s123.

LOPES, Jenifer de Carvalho. **Annonaceae da Reserva Natural Vale, Linhares, Espírito Santo**. 2012. Universidade de São Paulo, 2012.

LOPES, Jenifer de Carvalho; MELLO-SILVA, Renato de. Annonaceae da Reserva Natural Vale, Linhares, Espírito Santo. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 599–635, 2014. a. DOI: 10.1590/2175-7860201465304.

LOPES, Jenifer de Carvalho; MELLO-SILVA, Renato. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, n. spe1, p. 125–131, 2014. b. DOI: 10.1590/S0100-29452014000500015.

LORENZO, Vitor Prates; LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro; SCOTTI, Luciana; TAVARES, Josean Fechine; FILHO, José Maria Barbosa; LIMA, Tatjana Keesen de Souza; ROCHA, Juliana da Câmara; SCOTTI, Marcus Tullius. Structure- and Ligand-Based Approaches to Evaluate Aporphynic Alkaloids from Annonaceae as Multi-Target Agent Against *Leishmania donovani*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 22, n. 34, p. 5196–5203, 2016. DOI: 10.2174/1381612822666160513144853.

LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro; ALMEIDA, Jackson R. G. S.; BARBOSA-FILHO, José M.; PITA, João C. L. R.; BRANCO, Marianna V. S. C.; DINIZ, Margareth F. F. M.; AGRA, Maria F.; CUNHA, Emidio V. L.; SILVA, Marcelo S.; TAVARES, Josean F. Azaphenanthrene alkaloids with antitumoral activity from *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague and Sandwith (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7125–7131, 2011. DOI: 10.3390/molecules16087125.

LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro. **ALCALÓIDES DE ANNONACEA: Ocorrência e compilação de suas atividades biológicas e Avaliação fitoquímica e biológica de *Anaxagorea dolichocarpa* SPRAGUE & SANDWITH (Annonaceae)**. 2015. Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2015.

LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva; CUNHA, Emídio Vasconcelos Leitão da; TAVARES, Josean Fechine; BARBOSA FILHO, José Maria. Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In: KNÖLKER, Hans-Joachim (org.). **The Alkaloids: Chemistry and Biology**. San Diego, California, USA: Academic Press, 2015. v. 74p. 233–409. DOI: 10.1016/bs.alkal.2014.09.002.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. Th. Studies in Annonaceae. II. A monograph of the genus *Anaxagorea* A. St. Hil. Part 1. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v. 105, n. 2, p. 73–134, 1984.

MAAS, P. J. M.; WESTRA, L. Y. Th. Studies in Annonaceae. II. A monograph of the genus *Anaxagorea* A. St. Hil., Part 2. **Botanische Jahrbücher für Systematik**, v. 105, n. 1, p. 145–204, 1985.

MALLAVARAPU, G. R.; GURUDUTT, K. N.; SYAMASUNDAR, K. V. Ylang–Ylang (*Cananga odorata*) Oils. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Elsevier, 2016. p. 865–873. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00099-7.

MANGAL, Manu; IMRAN KHAN, Mohd; MOHAN AGARWAL, Subhash. Acetogenins as Potential Anticancer Agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 2, p. 138–159, 2015. DOI: 10.2174/1871520615666150629101827.

MATOS, M. F. C.; LEITE, L. I. S. P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J. M.; CAROLLO, C. A.; HELLMANN, A. R.; PEREIRA, N. F. G.; SILVA, D. B. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. **Fitoterapia**, v. 77, n. 3, p. 227–229, 2006. DOI: 10.1016/j.fitote.2006.01.013.

MEIRA, Cássio S.; GUIMARÃES, Elisalva T.; MACEDO, Taís S.; SILVA, Thanany B.; MENEZES, Leociley R. A.; COSTA, Emmanoel V.; SOARES, Milena B. P. Chemical composition of essential oils from *Annona vepretorum* Mart. and *Annona squamosa* L. (Annonaceae) leaves and their antimalarial and trypanocidal activities. **Journal of Essential Oil Research**, v. 27, n. 2, p. 160–168, 2015. DOI: 10.1080/10412905.2014.982876.

MILLER, Kimberly D.; NOGUEIRA, Leticia; MARIOTTO, Angela B.; ROWLAND, Julia H.; YABROFF, K. Robin; ALFANO, Catherine M.; JEMAL, Ahmedin; KRAMER, Joan L.; SIEGEL, Rebecca L. Cancer treatment and survivorship statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 5, p. 363–385, 2019. DOI: 10.3322/caac.21565.

MONDAL, Arijit; GANDHI, Arijit; FIMOIGNARI, Carmela; ATANASOV, Atanas G.; BISHAYEE, Anupam. Alkaloids for cancer prevention and therapy: Current progress and future perspectives. **European Journal of Pharmacology**, v. 858, p. 172472, 2019. DOI: 10.1016/j.ejphar.2019.172472.

MONTENEGRO, Camila de Albuquerque; LIMA, Gedson Rodrigues de Moraes; GOMES, Isis Fernandes; TAVARES, Josean Fechine; BATISTA, Leônia Maria. Gastroprotective effect of *Xylopia 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.

MOSMANN, Tim. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 1983. DOI: 10.1016/0022-1759(83)90303-4.

NAGEGOWDA, Dinesh A.; GUPTA, Priyanka. Advances in biosynthesis, regulation, and metabolic engineering of plant specialized terpenoids. **Plant Science**, v. 294, p. 110457, 2020. DOI: 10.1016/j.plantsci.2020.110457.

NESKE, Adriana; RUIZ HIDALGO, José; CABEDO, Nuria; CORTES, Diego. Acetogenins from Annonaceae family. Their potential biological applications. **Phytochemistry**, v. 174, p. 112332, 2020. DOI: 10.1016/j.phytochem.2020.112332.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Nearly Four Decades from 01/1981 to 09/2019. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 3, p. 770–803, 2020. DOI: 10.1021/acs.jnatprod.9b01285.

NGANGOUE, Marcelle Oliviane; NGAMENI, Bathelemy; AMBASSA, Pantaleon; CHI, Godloves Fru; WAMBA, Brice Elvis Nougan; OMBITO, Japheth Omollo; BOJASE, Gomotsang Moleta; FOTSO, Ghislain Wabo; KUETE, Victor; NGADJUI, Bonaventure Tchaleu. A phenanthridin-6(5H)-one derivative and a lanostane-type triterpene with antibacterial properties from *Anonidium mannii* (Oliv). Engl. & Diels (Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 0, n. 0, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1080/14786419.2020.1758094.

NOVAES, Paula; TORRES, Priscila Bezerra; SANTOS, Déborah Yara Alves Cursino dos. Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. **Brazilian Journal of Botany**, v. 39, n. 1, p. 131–137, 2016. DOI: 10.1007/s40415-015-0225-z.

OLIVEIRA, Verena B.; YAMADA, Letícia T.; FAGG, Christopher W.; BRANDÃO, Maria G. L. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170–179, 2012. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.03.011.

PALAZZO, Maria C.; WRIGHT, Hilary L.; AGIUS, Brittany R.; WRIGHT, Brenda S.; MORIARITY, Debra M.; HABER, William A.; SETZER, William N. Chemical Compositions and Biological Activities of Leaf Essential Oils of Six Species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. **Records of Natural Products**, v. 1, n. 3, p. 153–160, 2009.

PATRA, Jayanta Kumar; SHUKLA, Amritesh C.; DAS, Gitishree (ORG.). **Advances in Pharmaceutical Biotechnology**. Singapore: Springer Singapore, 2020. DOI: 10.1007/978-981-15-2195-9.

PIEME, Constant Anatole; KUMAR, Santosh Guru; DONGMO, Mireille Sylviane; MOUKETTE, Bruno Moukette; BOYOUUM, Fabrice Fekam; NGOGANG, Jeanne Yonkeu; SAXENA, Ajit Kumar. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 516, 2014. DOI: 10.1186/1472-6882-14-516.

PINHEIRO, Reísa da Silva; RABELO, Suzana Vieira; OLIVEIRA, Ana Paula de; GUIMARÃES, Amanda Leite; MORAES-FILHO, Manoel Odorico de; COSTA, Marcília Pinheiro da; PESSOA, Cláudia do Ó.; LÚCIO, Ana Sílvia Suassuna Carneiro; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva. Phytochemical screening and evaluation of cytotoxicity of stem bark extracts of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 15, n. 4, p. 793, 2016. DOI: 10.4314/tjpr.v15i4.18.

PIRIE, Michael D.; DOYLE, James A. Dating clades with fossils and molecules: the case of Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 84–116, 2012. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2012.01234.x.

PITA, João Carlos Lima Rodrigues; XAVIER, Aline Lira; SOUSA, Tatyanna Kelvia

Gomes de; MANGUEIRA, Vivianne Mendes; TAVARES, Josean Fechine; OLIVEIRA JÚNIOR, Robson José de; VERAS, Robson Cavalcante; PESSOA, Hilzeth de Luna Freire; SILVA, Marcelo Sobral da; MORELLI, Sandra; ÁVILA, Veridiana de Melo Rodrigues; SILVA, Teresinha Gonçalves da; DINIZ, Margareth de Fátima Formiga Melo; CASTELLO-BRANCO, Marianna Vieira Sobral. *In Vitro and in Vivo* Antitumor Effect of Trachylobane-360, a Diterpene from *Xylopia langsdorffiana*. **Molecules**, v. 17, n. 8, p. 9573–9589, 2012. DOI: 10.3390/molecules17089573.

PONTES, Aline Fernandes; BARBOSA, Maria Regina de V.; MAAS, Paul J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 281–293, 2004. DOI: 10.1590/S0102-33062004000200008.

PROMGOOL, Trinop; KANOKMEDHAKUL, Kwanjai; TONTAPHA, Sarawut; AMORNKITBAMRUNG, Vittaya; TONGPIM, Saowanit; JAMJAN, Winai; KANOKMEDHAKUL, Somdej. Bioactive homogentisic acid derivatives from fruits and flowers of *Milusa velutina*. **Fitoterapia**, v. 134, p. 65–72, 2019. DOI: 10.1016/j.fitote.2019.02.007.

PUENTES DE DÍAZ, Aura M. Neolignans from *Anaxagorea clavata*. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 345–346, 1997. DOI: 10.1016/S0031-9422(96)00541-9.

RABELO, Suzana Vieira; QUINTANS, Jullyana de Sousa Siqueira; COSTA, Emmanoel Vilaça; ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva; QUINTANS JÚNIOR, Lucindo José. *Annona* Species (Annonaceae) Oils. In: **Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety**. Elsevier, 2016. p. 221–229. DOI: 10.1016/B978-0-12-416641-7.00024-9.

RIBEIRO, Luciano A. A.; TAVARES, Josean F.; ANDRADE, Nilza C. de; SILVA, Marcelo S. da; SILVA, Bagnólia A. da. O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 197–203, 2007. DOI: 10.1590/S0102-695X2007000200011.

RIBEIRO, Victor Pena; ARRUDA, Caroline; ABD EL-SALAM, Mohamed; BASTOS, Jairo Kenupp. Brazilian medicinal plants with corroborated anti-inflammatory activities: a review. **Pharmaceutical Biology**, v. 56, n. 1, p. 253–268, 2018. DOI: 10.1080/13880209.2018.1454480.

RINALDI, Maria V. N.; DÍAZ, Ingrid E. C.; SUFFREDINI, Ivana B.; MORENO, Paulo R. H. Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 1, p. 77–83, 2017. DOI: 10.1016/j.bjp.2016.08.006.

RODRIGUES, Tiago; REKER, Daniel; SCHNEIDER, Petra; SCHNEIDER, Gisbert. Counting on natural products for drug design. **Nature Chemistry**, v. 8, n. 6, p. 531–541, 2016. DOI: 10.1038/nchem.2479.

SABPHON, Chalisa; SERMBOONPAISARN, Thiendanai; SAWASDEE, Pattara. Cholinesterase inhibitory activities of xanthones from *Anaxagorea luzonensis* A. Gray. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 21, p. 3781–3785, 2012. DOI:

10.5897/JMPR12.346.

SABPHON, Chalisa; TEMKITTHAWON, Prapapan; INGGANINAN, Kornkanok; SAWASDEE, Pattara. Phosphodiesterase Inhibitory Activity of the Flavonoids and Xanthones from *Anaxagorea luzonensis*. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 2, p. 1934578X1501000, 2015. DOI: 10.1177/1934578X1501000222.

SADEER, Nabeelah Bibi; MAHOMOODALLY, Mohamad Fawzi; ZENGIN, Gokhan; JEEWON, Rajesh; NAZURALLY, Nadeem; RENGASAMY, R. R. Kannan; ALBUQUERQUE, R. D. D. G.; SHUNMUGIAH, Karutha Pandian. Ethnopharmacology, Phytochemistry, and Global Distribution of Mangroves—A Comprehensive Review. **Marine Drugs**, v. 17, n. 4, p. 231, 2019. DOI: 10.3390/md17040231.

SANDWITH, N. Y. Contributions to the Flora of Tropical America: III. Annonaceae Collected by the Oxford University Expedition to British Guiana, 1929. **Bulletin of Miscellaneous Information (Royal Gardens, Kew)**, v. 1930, n. 10, p. 466, 1930. DOI: 10.2307/4111522.

SANTOS, Paula F. dos; DUARTE, Marcelo C.; BEZERRA, Denise Aline C.; AGRA, Maria F.; BARBOSA FILHO, José M.; SILVA, Marcelo S.; TAVARES, Josean F. Diterpenes from *Xylopia langsdorffiana*. **Helvetica Chimica Acta**, v. 96, n. 6, p. 1085–1092, 2013. DOI: 10.1002/hlca.201200372.

SANTOS PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). **Phytomedicine**, v. 10, n. 2–3, p. 209–212, 2003. DOI: 10.1078/094471103321659960.

SANTOS, Thiara C. B.; OLIVEIRA, Rennan C. de; VASCONCELOS, Leonardo G. de; SOUSA, Paulo T. de; SILVA, Virgínia C. P.; CARVALHO, Mário G. de; RIBEIRO, Tereza A. N. Chemical constituents from roots of *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 87, p. 103951, 2019. DOI: 10.1016/j.bse.2019.103951.

SAUNDERS, Richard M. K. The diversity and evolution of pollination systems in Annonaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 222–244, 2012. DOI: 10.1111/j.1095-8339.2011.01208.x.

SCHARASCHKIN, Tanya; DOYLE, James A. Phylogeny and Historical Biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) Using Morphology and Non-Coding Chloroplast Sequence Data. **Systematic Botany**, v. 30, n. 4, p. 712–735, 2005. DOI: 10.1600/036364405775097888.

SCHARASCHKIN, Tanya; DOYLE, James A. Character evolution in *Anaxagorea* (Annonaceae). **American Journal of Botany**, v. 93, n. 1, p. 36–54, 2006. DOI: 10.3732/ajb.93.1.36.

SCOTTI, Luciana; TAVARES, Josean Fechine; SILVA, Marcelo Sobral Da; FALCÃO, Emanuela Viana; SILVA, Luana de Moraes e; SOARES, Gabriela Cristina da Silva; SCOTTI, Marcus Tullius. Chemotaxonomy of three genera of the annonaceae family

using self-organizing maps and ¹³C NMR data of diterpenes. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2146–2152, 2012. DOI: 10.1590/S0100-40422012001100008.

SHANKAR, Eswar; GUPTA, Karishma; GUPTA, Sanjay. Dietary and Lifestyle Factors in Epigenetic Regulation of Cancer. *In*: BISHAYEE, Anupam; BHATIA, Deepak B. T. Epigenetics of Cancer Prevention (org.). **Epigenetics of Cancer Prevention**. [s.l.] : Elsevier, 2019. v. 8p. 361–394. DOI: 10.1016/B978-0-12-812494-9.00017-2.

SIEGEL, Rebecca L.; MILLER, Kimberly D.; JEMAL, Ahmedin. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019. DOI: 10.3322/caac.21551.

SILVA, Denise Brentan da; MATOS, Maria de Fátima Cepa; NAKASHITA, Simone T.; MISU, Carina K.; YOSHIDA, Nídia Cristiane; CAROLLO, Carlos Alexandre; FABRI, João Roberto; MIGLIO, Hércules da Silva; SIQUEIRA, João Máximo de. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809–1812, 2007. DOI: 10.1590/S0100-40422007000800004.

SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; SCHENKEL, Eloir Paulo; GOSMANN, Grace; MELLO, João Carlos Palazzo De; MENTZ, Lilian Auler; PETROVICK, Pedro Ros. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

SINGH, Ram; POONAM; GEETANJALI. Chemotaxonomic Significance of Alkaloids in Plants. *In*: RAMAWAT, Kishan Gopal (org.). **Biodiversity and Chemotaxonomy**. Cham, Switzerland: Springer Nature, 2019. p. 121–136. DOI: 10.1007/978-3-030-30746-2_6.

SOUZA, Iara Leão Luna de; CORREIA, Ana Carolina de Carvalho; ARAUJO, Layanne Cabral da Cunha; VASCONCELOS, Luiz Henrique César; SILVA, Maria da Conceição Correia; COSTA, Vicente Carlos de Oliveira; TAVARES, Josean Fachine; PAREDES-GAMERO, Edgar Julian; CAVALCANTE, Fabiana de Andrade; SILVA, Bagnólia Araújo da. Essential oil from *Xylopi 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. DOI: 10.1186/s12906-015-0849-3.

TAN, G.; GYLLENHAAL, C.; SOEJARTO, D. Biodiversity as a Source of Anticancer Drugs. **Current Drug Targets**, v. 7, n. 3, p. 265–277, 2006. DOI: 10.2174/138945006776054942.

TAVARES, J. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. Da; MAIA, J. G. S.; DA-CUNHA, E. V. L. Alkaloids and volatile constituents from the stem of *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 115–118, 2005. DOI: 10.1590/S0102-695X2005000200008.

TAVARES, Josean Fachine; QUEIROGA, Karine F.; SILVA, Marianna Vieira B.; DINIZ, Margareth F. F. M.; BARBOSA FILHO, José M.; CUNHA, Emidio V. L.; SIMONE, Carlos Alberto de; ARAÚJO JÚNIOR, João X. de; MELO, Patrícia S.; HAUN, Marcela;

SILVA, Marcelo Sobral da. ent-Trachylobane Diterpenoids from *Xylopia langsdorffiana*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 6, p. 960–962, 2006. DOI: 10.1021/np050503o.

TAVARES, Josean Fechine; SILVA, Marianna Vieira B.; QUEIROGA, Karine F.; DINIZ, Margareth F. F. Melo; BARBOSA-FILHO, Jose M.; HAUN, Marcela; MELO, Patricia S.; SILVA, Marcelo Sobral da. Xylodiol, a New Atisane Diterpenoid from *Xylopia langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae). **ChemInform**, v. 38, n. 37, p. 742–744, 2007. DOI: 10.1002/chin.200737172.

TAYLOR, WC. Constituents of *Eupomatia* species. IX. N.M.R. evidence for the structure of eupolauramine and hydroxyeupolauramine. **Australian Journal of Chemistry**, v. 37, n. 5, p. 1095, 1984. DOI: 10.1071/CH9841095.

TEICHERT, Holger; DÖTTERL, Stefan; GOTTSBERGER, Gerhard. Heterodichogamy and nitidulid beetle pollination in *Anaxagorea prinoidea*, an early divergent Annonaceae. **Plant Systematics and Evolution**, v. 291, n. 1–2, p. 25–33, 2011. DOI: 10.1007/s00606-010-0367-1.

TEIXEIRA, Nayane; MELO, Jean C. S.; BATISTA, Luiz F.; PAULA-SOUZA, Juliana; FRONZA, Pâmella; BRANDÃO, Maria G. L. Edible fruits from Brazilian biodiversity: A review on their sensorial characteristics versus bioactivity as tool to select research. **Food Research International**, v. 119, p. 325–348, 2019. DOI: 10.1016/j.foodres.2019.01.058.

TEP-AREENA, P.; SAWASDEE, P. The Vasorelaxant Effects of *Anaxagorea luzonensis* A. Grey in the Rat Aorta. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 119–124, 2011. DOI: 10.3923/ijp.2011.119.124.

THANG, Tran D.; DAI, Do N.; HOI, Tran M.; OGUNWANDE, Isiaka A. Essential Oils from Five Species of Annonaceae from Vietnam. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 2, p. 1934578X1300800, 2013. DOI: 10.1177/1934578X1300800228.

THOLL, Dorothea. Biosynthesis and Biological Functions of Terpenoids in Plants. In: **Advances in biochemical engineering/biotechnology**. Springer International Publishing, 2015. p. 63–106. DOI: 10.1007/10_2014_295.

THOMFORD, Nicholas; SENTHEBANE, Dimakatso; ROWE, Arielle; MUNRO, Daniella; SEELE, Palesa; MAROYI, Alfred; DZOBO, Kevin. Natural Products for Drug Discovery in the 21st Century: Innovations for Novel Drug Discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018. DOI: 10.3390/ijms19061578.

ULLOA, Carmen Ulloa; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, Pedro; BECK, Stephan; BELGRANO, Manuel J.; BERNAL, Rodrigo; BERRY, Paul E.; BRAKO, Lois; CELIS, Marcela; DAVIDSE, Gerrit; FORZZA, Rafaela C.; GRADSTEIN, S. Robbert; HOKCHE, Omaira; LEÓN, Blanca; LEÓN-YÁNEZ, Susana; MAGILL, Robert E.; NEILL, David A.; NEE, Michael; RAVEN, Peter H.; STIMMEL, Heather; STRONG, Mark T.; VILLASEÑOR, José L.; ZARUCCHI, James L.; ZULOAGA, Fernando O.; JORGENSEN, Peter M. An integrated assessment of the vascular plant species of the

Americas. **Science**, v. 358, n. 6370, p. 1614–1617, 2017. DOI: 10.1126/science.aao0398.

WHO. **WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023**. Geneva. DOI: 2013.

WHO. **WHO global report on traditional and complementary medicine 2019**. World Health Organization (WHO), 2019.

WILSON, Brooke E.; JACOB, Susannah; YAP, Mei Ling; FERLAY, Jacques; BRAY, Freddie; BARTON, Michael B. Estimates of global chemotherapy demands and corresponding physician workforce requirements for 2018 and 2040: a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 20, n. 6, p. 769–780, 2019. DOI: 10.1016/S1470-2045(19)30163-9.

XIAO, Han; ZHANG, Yue; WANG, Meng. Discovery and Engineering of Cytochrome P450s for Terpenoid Biosynthesis. **Trends in Biotechnology**, v. 37, n. 6, p. 618–631, 2019. DOI: 10.1016/j.tibtech.2018.11.008.

ZHANG, Mingzi M.; QIAO, Yuan; ANG, Ee Lui; ZHAO, Huimin. Using natural products for drug discovery: the impact of the genomics era. **Expert Opinion on Drug Discovery**, v. 12, n. 5, p. 475–487, 2017. DOI: 10.1080/17460441.2017.1303478.

CAPÍTULO 2

**DOIS NOVOS ALCALOIDES AZAFENANTRENO DE *Anaxagorea dolichocarpa*
Sprague & Sandwith**

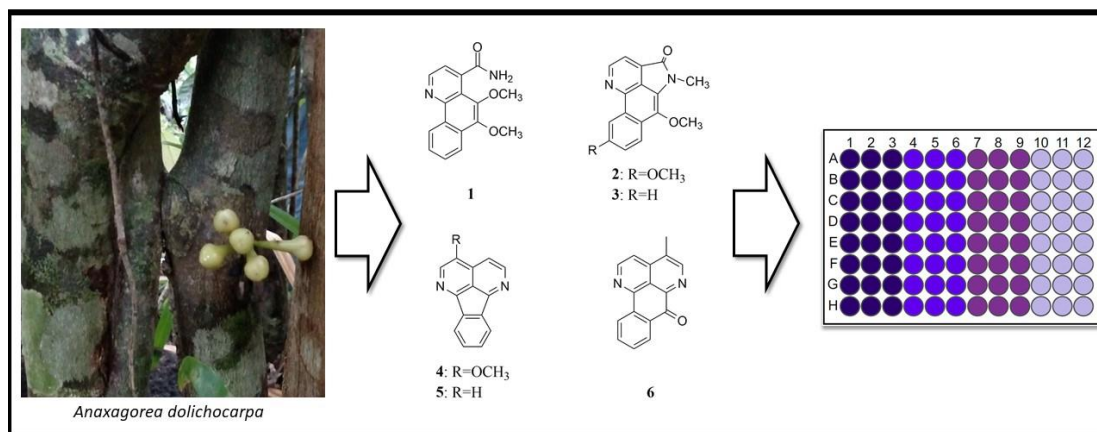
Artigo publicado on-line em 20 de abril de 2020 na Revista Química Nova

ISSN 1678-7064 (versão online)

Fator de Impacto 0,668 (2019), Qualis CAPES A4

Disponível em <http://dx.doi.org/10.21577/0100-4042.20170529>

Graphical Abstract



A chemical investigation of *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith led to isolation of six (1 – 6) alkaloids, five of which had their cytotoxic activity evaluated against HCT-116 and L929 cell lines.

DOIS NOVOS ALCALOIDES AZAFENANTRENO DE *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith

Kaio A. Sales^a, Anderson A. V. Pinheiro^a, Diego I. A. F. Araújo^a, Rodrigo S. de Andrade^a, Maria de Fátima Agra^b, Marianna V. Sobral^a, Hemerson I. F. Magalhães^a, Valgrícia M. de Sousa^a, Raimundo Braz-Filho^c, Marcelo S. da Silva^a e Josean F. Tavares^{a,*}

^aCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

^bDepartamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

^cDepartamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica – RJ, Brasil

*e-mail: josean@ltf.ufpb.br

TWO NEW AZAPHENANTHRENE ALKALOIDS FROM *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith

A chemical investigation of *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith, a member of Annonaceae family, was carried out. The ethanolic extract from the roots of this plant led, by chromatography techniques, to isolation of the new azaphenanthrene alkaloids dolichocarpine (**1**) and 9-methoxyeupolauramine (**2**), besides the known alkaloids eupolauramine (**3**), 3-methoxyeupolauridine (**4**), eupolauridine (**5**) and 4-methylsampangine (**6**). The structures of isolated compounds were established by 1D and 2D NMR, HRESIMS, *tandem* MSⁿ and IR data. The cytotoxicity of compounds **1** – **5** was evaluated against HCT-116 (human colorectal carcinoma) and L929 (murine fibroblast) cell lines.

Keywords: Annonaceae; *Anaxagorea*; alkaloid; cytotoxicity.

INTRODUÇÃO

Annonaceae é uma família de árvores floríferas, arbustos e cipós com distribuição pantropical, sendo composta por 110 gêneros e aproximadamente 2.430 espécies.^{1,2} No Brasil apresenta ampla distribuição, com cerca de 390 espécies encontradas principalmente na Região Amazônica e Mata Atlântica.^{3,4} As espécies da família são conhecidas pela biossíntese de alcaloides e os estudos demonstraram considerável diversidade estrutural, além de notáveis atividades biológicas para esses metabólitos secundários.^{5,6} Com relação ao gênero, *Anaxagorea* compreende 26 espécies,⁷ ocorrendo nas regiões neotropical e paleotropical, e no Brasil é encontrado principalmente no Norte e Nordeste.⁸⁻¹⁰ Das espécies do gênero investigadas até o presente momento, foram identificados principalmente alcaloides, terpenoides, xantonas, flavonoides e lignoides.¹¹⁻¹⁶ Ao passo que em *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith, estudos fitoquímicos prévios permitiram o isolamento de alcaloides azafenantrenos e aporfínicos.^{11,17} Diversos compostos dessas duas subclasses de alcaloides já foram testados em ensaios de atividade citotóxica e antitumoral, alguns deles apresentando resultados positivos, sendo por isso considerados promissores.^{5,11}

Historicamente, produtos naturais obtidos de plantas representam a principal fonte de novos fármacos, além de fornecerem protótipos para a síntese de compostos farmacologicamente ativos, particularmente com atividade anticâncer. Considerando que o câncer é uma das doenças com as mais altas taxas de morbidade e mortalidade no mundo, há um considerável interesse científico e comercial na descoberta de novas drogas a partir de fontes naturais.¹⁸ Então, como continuidade dos estudos do nosso grupo de pesquisa com a família Annonaceae, esse trabalho buscou isolar e identificar novos compostos de *A. dolichocarpa* por meio de métodos cromatográficos e espectroscópicos, respectivamente, e ainda avaliar a citotoxicidade dessas substâncias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico do extrato etanólico das raízes de *A. dolichocarpa* levou ao isolamento de seis compostos (**1** – **6**) (Figura 1), sendo esse o primeiro relato das

substâncias **1** e **2** na literatura. Suas estruturas químicas foram determinadas com base na análise dos dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massa de alta resolução com ionização por *electrospray* (EMAR-IES) e comparação com dados da literatura. Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C dos compostos **1** e **2** estão compilados na Tabela 1.

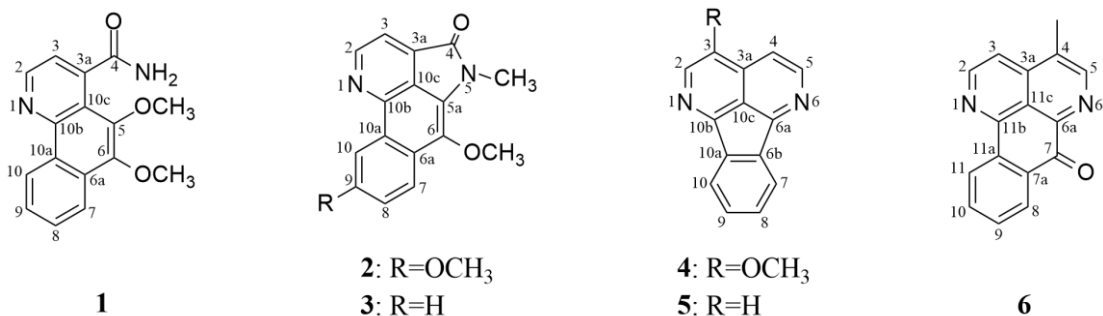


Figura 1. Alcaloides isolados de *A. dolichocarpa*

Tabela 1. Dados de RMN de ^1H (400 MHz) e ^{13}C (100 MHz) dos compostos **1** e **2**, δ em ppm, J em Hz

Posição	Dolichocarpina (1) ¹		Posição	9-metoxieupolauramina (2) ²	
	δ_{H} (mult, J)	δ_{C}		δ_{H} (mult, J)	δ_{C}
2	8,95 (d; 4,8)	147,3	2	9,13 (d; 4,8)	149,9
3	7,64 (d; 4,8)	121,8	3	7,92 (d; 4,8)	117,4
3a	-	144,4	3a	-	133,1*
4	-	174,4	4	-	166,6*
5	-	143,8	5a	-	122,8*
6	-	147,4	6	-	138,1*
6a	-	132,0	6a	-	126,2*
7	8,26 (ddd; 8,4; 1,2; 0,8)	122,9	7	8,04 (d; 9,2)	124,3
8	7,81 (ddd; 8,4; 7,2; 1,2)	130,8	8	7,33 (dd; 9,2; 2,4)	119,3
9	7,73 (ddd; 8,4; 7,2; 1,2)	128,0	9	-	158,5*
10	9,13 (ddd; 8,4; 1,2; 0,8)	125,4	10	8,44 (d; 2,4)	105,2
10a	-	128,9	10a	-	131,8*
10b	-	144,3	10b	-	142,3*
10c	-	122,1	10c	-	122,9*
H ₃ CO-5	4,04 (s)	61,6	H ₃ CO-6	4,05 (s)	55,8
H ₃ CO-6	4,07 (s)	61,3	H ₃ CO-9	4,04 (s)	63,6
			H ₃ C-N	3,72 (s)	28,5

¹Obtido em CD₃OD; ²obtido em CDCl₃; *dados atribuídos por HMBC.

O composto **1** foi isolado como cristais amarelados. O espectro de EMAR-IES mostrou o pico do íon $[M+H]^+$ com m/z 283,1073 (calcd. para $C_{16}H_{15}N_2O_3$, 283,1077), compatível com a fórmula molecular $C_{16}H_{15}N_2O_3$. O espectro de infravermelho mostrou absorção de duas bandas em 3306 e 3139 cm^{-1} de estiramento N-H₂, banda de carbonila de amida em 1646 cm^{-1} , absorções em 1618 e 1582 cm^{-1} de C=C de aromático, além do sinal em 1055 cm^{-1} de estiramento C-O. O espectro de RMN de 1H (CD_3OD , 400 MHz) mostrou seis sinais de prótons aromáticos. Sendo dois dupletos em δ_H 8,95 (d; $J = 4,8$ Hz) e δ_H 7,64 (d; $J = 4,8$ Hz), sugestivos para os prótons H-2 e H-3 de um anel piridínico do esqueleto azaaporfinoide.^{19,20} E também quatro duplos dupletos compatíveis com um sistema aromático ABCD, sendo um mais desprotegido em δ_H 9,13 (ddd; $J = 8,4; 1,2; 0,8$ Hz) característico do próton H-10 desse tipo de esqueleto, um em δ_H 8,26 (ddd; $J = 8,4; 1,2; 0,8$ Hz) atribuído ao H-7 e os outros dois em δ_H 7,81 (ddd; $J = 8,4; 7,2; 1,2$ Hz) e 7,73 (ddd; $J = 8,4; 7,2; 1,2$ Hz) assinalados para H-8 e H-9, respectivamente. Além desses sinais, foram ainda observados dois simpletos, ambos integrando para três prótons, em δ_H 4,07 (s) e δ_H 4,04 (s), correspondentes a duas metoxilas. No espectro de ^{13}C (CD_3OD , 100 MHz) foram observados dezesseis sinais. Destes, seis denotam ser de carbonos metínicos aromáticos e dois de grupos metoxila, confirmando dessa forma os dados observados no espectro de RMN de 1H . Observou-se também um sinal característico de um grupo carbonila e mais sete sinais indicativos de carbonos aromáticos não hidrogenados. A análise desses dados e do espectro de correlações HSQC permitiram atribuir os sinais dos carbonos metínicos em δ_C 147,3 e 121,8 aos carbonos C-2 e C-3, o primeiro mais desprotegido por estar ligado a um heteroátomo, e em δ_C 122,9, 130,8, 128,0 e 125,4 aos carbonos C-7, C-8, C-9 e C-10, respectivamente. Os demais carbonos foram definidos com auxílio das correlações a longa distância (2J e 3J) observadas no experimento HMBC, que permitiu também confirmar as demais atribuições já sugeridas. A correlação dos sinais em δ_H 8,95 (H-2) com δ_C 121,8 (C-3), 144,4 (C-3a), 144,3 (C-10b) e em δ_H 7,64 (H-3) com δ_C 147,3 (C-2), 174,4 (C-4), 122,1 (C-10c) estabeleceu os valores dos carbonos C-3a, C-10b e C-10c, bem como ratificou a posição da carbonila em C-4. A correlação dos sinais em δ_H 7,81 (H-8) e δ_H 9,13 (H-10) com δ_C 132,0 (C-6a) e em δ_H 8,26 (H-7) e δ_H 7,73 (H-9) com δ_C 128,9 (C-10a) determinou o deslocamento dos carbonos C-6a e C-10a. Além dessa correlação, o sinal em δ_H 8,26 (H-7), assim como o δ_H 4,07 (H₃CO-6), correlacionaram-se com δ_C

147,4 (C-6), permitindo dessa forma atribuir o deslocamento de C-6, substituído, portanto, por um grupo metoxila. A localização da segunda metoxila foi definida por meio da correlação do sinal em δ_H 4,04 (H₃CO-5) com o sinal em δ_C 143,8 (C-5). Para confirmar o grupo NH₂ na estrutura química, a amostra foi submetida à análise de RMN de ¹H em CDCl₃, na qual pôde-se observar dois sinais largos em δ_H 5,74 e 5,87 que desapareceram ao adicionar-se D₂O (Figuras 9S e 10S). Assim, com base nesses dados, foi possível propor para **1** a estrutura mostrada na Figura 1, um novo alcaloide azafenantreno denominado dolichocarpina. Sua análise por EMⁿ apresentou os íons indicados na Figura 2S e a proposta de fragmentação desses íons pode ser observada na Figura 3.^{21,22}

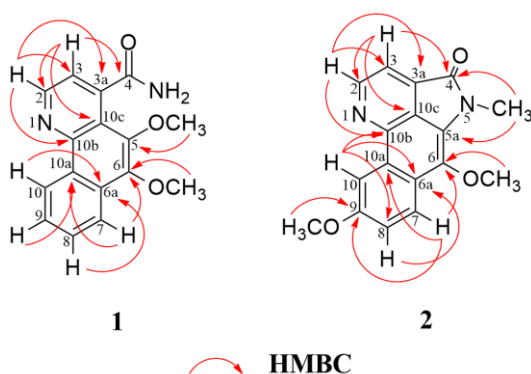


Figura 2. Correlações HMBC de **1** e **2**

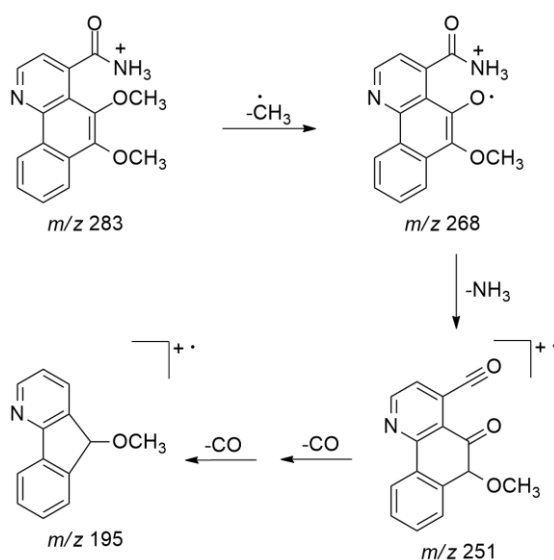


Figura 3. Proposta de fragmentação de EMⁿ de **1**

O composto **2** foi isolado como cristais amarelados. O espectro de EMAR-IES mostrou o pico do íon $[M+H]^+$ com m/z 295,1078 (calcd. para $C_{17}H_{15}N_2O_3$, 295,1077), compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_{15}N_2O_3$. Os dados de RMN dessa substância foram comparados com os dados do alcaloide eupolauramina, isolado previamente de *A. dolichocarpa* e novamente neste trabalho (composto **3**),¹¹ como também com outros relatados na literatura.²⁰ O espectro de RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz) apresentou semelhança com o da eupolauramina (**3**), observando-se porém um sinal de grupo metoxila a mais. Além dessa diferença, o espectro revelou a ausência de um sinal de próton aromático e alteração na multiplicidade dos sinais, apresentando um duplete duplo e dois dupletos no lugar dos quatro duplos dupletos duplos, sugerindo dessa maneira uma substituição no anel D do esqueleto eupolaumarina. Os sinais em δ_H 7,33 (dd; $J = 9,2; 2,4$ Hz), δ_H 8,04 (d; $J = 9,2$ Hz) e δ_H 8,44 (d; $J = 2,4$ Hz) sugerem substituição no C-9, devido à ausência do sinal mais desprotegido na região próxima de 9,0 ppm atribuído ao H-10, que pode ter sofrido um efeito de proteção *orto* da metoxila na posição vizinha (C-9), podendo-se então atribuir esses sinais para H-8, H-7 e H-10, respectivamente. No espectro de RMN de ^{13}C foi possível observar apenas oito sinais, dentre eles destaca-se o sinal de metoxila adicional em δ_C 55,8 e o de um carbono aromático mais protegido em δ_C 105,2, o qual apresentou correlação no espectro HSQC com o sinal em δ_H 8,44, atribuindo-se, por conseguinte, esse sinal ao carbono C-10. Os carbonos que não tiveram seus sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz) foram assinalados após análise do espectro de correlações HMBC. Esse experimento permitiu também confirmar a posição da metoxila em C-9 por meio da correlação do sinal em δ_C 158,5 (C-9) com δ_H 4,04 (H_3CO -9) e 8,04 (H-7), e deste último com δ_C 138,1 (C-6). Assim, o composto **2**, pôde ser identificado como um novo alcaloide azafenantreno, denominado 9-metoxieupolauramina.

Composto **3**: RMN de 1H ($CDCl_3$, 400 MHz), δ em ppm (mult.; J em Hz; H): 9,16 (d; 4,8; H-2), 9,01 (ddd; 8,0; 1,6; 0,8; H-10), 8,13 (ddd; 8,0; 1,2; 0,8; H-7), 7,91 (d; 4,8; H-3), 7,73 (ddd; 8,0; 6,8; 1,6; H-8), 7,67 (ddd; 8,0; 6,8; 1,2; H-9), 4,06 (s; H_3CO -6), 3,73 (s; H_3C -N). RMN de ^{13}C ($CDCl_3$, 100 MHz), δ em ppm: 166,8 (C-4), 150,1 (C-2), 142,5 (C-10b), 132,6 (C-6a), 129,6 (C-8), 126,8 (C-9), 124,9 (C-5a), 124,4 (C-10), 122,8 (C-7), 117,2 (C-3), 63,5 (H_3CO -6), 28,5 (H_3C -N). EMAR-IES: m/z 265,0979 $[M+H]^+$ (calcd.

para C₁₆H₁₃N₂O₂, 265,0972). Dados coerentes com os relatados na literatura para eupolauramina,¹¹ já isolado em *A. dolichocarpa*.

Composto **4**: RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ em ppm (mult.; J em Hz; H): 8,72 (d; 6,0; H-5), 8,15 (s; H-2), 7,98 (ddd; 6,8; 1,2; 0,8; H-10), 7,91 (ddd; 6,8; 1,2; 0,8; H-7), 7,61 (d; 6,0; H-4), 7,45 (dt; 7,6; 1,2; H-9), 7,40 (dt; 7,6; 1,6; H-8), 4,08 (s; H₃CO-3). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ em ppm (alguns dados atribuídos por HMBC): 161,6 (C-6a), 155,0 (C-10b), 150,5 (C-3), 149,2 (C-5), 131,1 (C-9), 129,9 (C-8), 129,4 (C-2), 128,5 (C-3a), 122,6 (C-10), 121,7 (C-7), 113,5 (C-4), 56,4 (CH₃O-3). EMAR-IES: *m/z* 235,0872 [M+H]⁺ (calcd. para C₁₅H₁₁N₂O, 235,0866). Dados compatíveis com os reportados para 3-metoxieupolauridina,²³ isolado pela primeira vez na família Annonaceae.

Composto **5**: RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ em ppm (mult.; J em Hz; H): 8,69 (d; 6,0; H-2/H-5), 7,99 (dd; 8,4; 2,0 H-10/H-7), 7,46 (dd; 8,4; 2,0; H-8/H-9), 7,42 (d; 6,0; H-3/H-4). RMN de ¹³C (CDCl₃, 100 MHz), δ em ppm: 162,7 (C-6a/C-10b), 149,7 (C-2/C-5), 139,6 (C-6b/C-10a), 135,3 (C-3a), 131,4 (C-8/C-9), 122,9 (C-7/C-10), 120,9 (C-10c), 117,6 (C-3/C-4). EMAR-IES: *m/z* 205,0762 [M+H]⁺ (calcd. para C₁₄H₉N₂, 205,0760). Dados semelhantes com os relatados na literatura para eupolauridina,^{15,24} relatado pela primeira vez na espécie *A. dolichocarpa*.

Composto **6**: RMN de ¹H (CDCl₃, 400 MHz), δ em ppm (mult.; J em Hz; H): 8,95 (d; 0,8; H-5), 8,89 (d; 6,0; H-2), 8,83 (ddd; 8,0; 1,2; 0,8; H-11), 8,45 (ddd; 8,0; 1,6; 0,8; H-8), 7,81 (ddd; 8,0; 7,6; 1,6; H-10), 7,79 (d; 6,0; H-3), 7,67 (ddd; 8,0; 7,6; 1,2; H-9), 2,76 (d; 0,8; CH₃-4). EMAR-IES: *m/z* 247,0875 [M+H]⁺ (calcd. para C₁₆H₁₁N₂O, 247,0866). Dados compatíveis com os relatados na literatura para 4-metilsampangina,²⁵ relatado pela primeira vez como produto natural.

Os compostos **2** e **4** inibiram significativamente a proliferação de células HCT-116 com percentual de inibição de 30,22 ± 2,63% e 32,42 ± 0,53%, respectivamente (Figura 4). Assim, comparando-se as estruturas químicas de **2** com **3** e de **4** com **5**, observou-se nos dois casos uma substituição por um grupo metoxila em **2** e **4**, o que permitiu sugerir que essa substituição aumentou a atividade citotóxica desses compostos para células tumorais da linhagem HCT-116. O estudo de citotoxicidade em linhagem não tumoral de fibroblasto de camundongo L929 mostrou que os compostos **2** – **5** podem reduzir a proliferação celular, o que indica citotoxicidade.

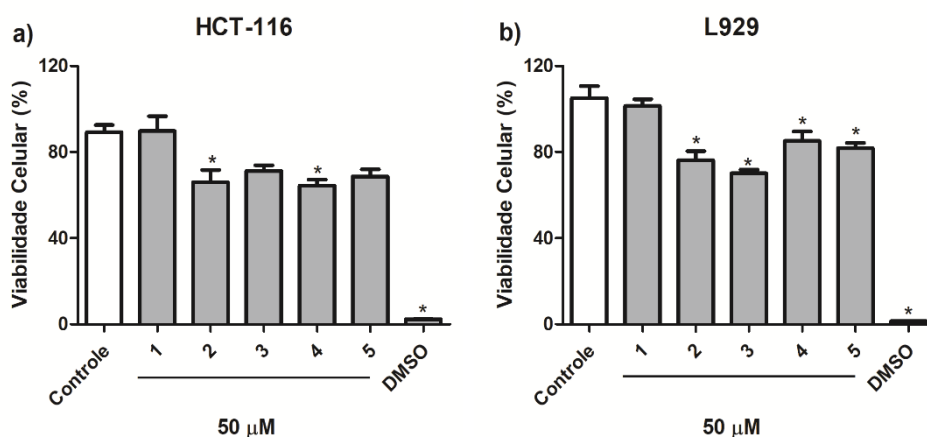


Figura 4. Citotoxicidade dos compostos **1** – **5** em linhagens de células HCT-116 e L929, após 72 h de tratamento. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão de quatro replicatas na concentração de 50 μ M (* p < 0,05 comparado ao grupo controle)

CONCLUSÃO

O estudo do extrato etanólico das raízes de *A. dolichocarpa* levou ao isolamento, por cromatografia líquida de média pressão e cromatografia líquida de alta eficiência, dos novos alcaloides azafenantrenos dolichocarpina (**1**) e 9-metoxieupolauramina (**2**), além dos alcaloides eupolauramina (**3**), já isolado na espécie, 3-metoxieupolauridina (**4**), novo na família, eupolauramina (**5**), novo na espécie e 4-metilsampangina (**6**), relatado pela primeira vez como produto natural. O estudo da atividade citotóxica mostrou que os compostos **2** – **5** induziram citotoxicidade em linhagem celular não tumoral murina L929, e que, em linhagem tumoral HCT-116, apenas os compostos **2** e **4** foram capazes de inibir a proliferação celular.

PARTE EXPERIMENTAL

Procedimentos experimentais gerais

As separações por cromatografia líquida de média pressão (CLMP) foram feitas utilizando como fase estacionária sílica gel (40-63 μ m, 230-400 mesh, SiliCycle) e um equipamento Buchi modelo Sepacore flash system X-50. O *software* desse equipamento permitiu analisar as frações coletadas, auxiliando desse modo no agrupamento das amostras. As frações eluídas foram também analisadas por

cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se placas de alumínio pré-revestidas com sílica gel F₂₅₄ (SiliCycle), revelando-se com reagente de Dragendorff e exposição à luz UV (254 e 366 nm), e agrupadas de acordo com a similaridade de eluição. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica foi realizada no instrumento Shimadzu Prominence equipado com uma bomba de solvente binária LC-20AT, auto-injetor SIL-20A, sistema degaseificador DGU-20A, detector DAD SPD-M20A, sistema de controle CBM-20A e as colunas de fase reversa Kromasil 100-10-C18 (250 mm x 4,6 mm preenchida com partículas de 10 µm) ou ACE 5 C18 (250 mm x 4,6 mm e partículas de 5 µm). As frações foram purificadas por CLAE na escala semipreparativa e preparativa. Para a primeira técnica foi utilizado um equipamento Shimadzu composto por bomba LC-10AD vp, válvula solenoide FCV-10AL vp, injetor manual Rheodyne, degaseificador DGU-14A, detector UV-vis SPD-10A vp, controlador de sistema SLC-10A vp e uma coluna semipreparativa Venusil XBP C18 (250 mm x 10 mm e partículas de 10 µm). No caso da escala preparativa a purificação foi realizada em um Shimadzu contendo duas bombas LC-6AD, injetor manual Rheodyne, detector DAD SPD-M10A vp, controlador de sistema SLC-10A vp e coluna preparativa ACE 5 C18 (250 mm x 21,2 mm e partículas de 5 µm). O fluxo empregado para as purificações foi de 3,5 mL/min para a escala semipreparativa e 8,0 mL/min para a preparativa, realizando-se, para ambas, injeções de 100 µL de amostra para cada corrida cromatográfica.

Os espectros de massa de alta resolução com ionização por *electrospray* (EMAR-IES) e de baixa resolução em *tandem* (MSⁿ) foram obtidos em equipamentos Bruker modelos micrOTOF II e Ion Trap-amaZonX, respectivamente, os dois operando no modo positivo. Os espectros de RMN de ¹H, ¹³C e bidimensionais foram adquiridos no espectrômetro Bruker AVANCE III HD (400 MHz e 100 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente) usando CDCl₃ e CD₃OD como solvente e CHCl₃ (δ_H 7,24 e δ_C 77,0) e CH₃OH (δ_H 3,30 e δ_C 49,0) residual como padrão interno. As análises de infravermelho foram realizadas nos espectrômetros Rayleigh WQF-510 FT-IR e PerkinElmer Frontier FT-IR, com pastilhas de KBr e número de onda em cm⁻¹.

Material vegetal

As raízes de *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith, foram coletadas em Cruz do Espírito Santo, Paraíba, Brasil em dezembro de 2010. O registro de acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) foi obtido sob o número AE4B71A. A identificação botânica foi realizada pela Dr^a Maria de Fátima Agra e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), no Centro de Ciências Exatas e da Natureza, registrada como AGRA & GÓES 5543.

Extração e isolamento

As raízes de *A. dolichocarpa* foram secas em estufa de ar circulante a 45° C por 96h e em seguida trituradas produzindo 700,0 g de pó. Esse material foi então submetido ao processo de extração por maceração com etanol 95% por 72h, em cinco repetições. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo à 45° C, resultando em 77,6 g de extrato etanólico bruto (EEB). Uma alíquota de 76,1 g do EEB foi inicialmente submetida a uma extração com hexano, para separação dos constituintes com baixa polaridade, permanecendo em contato com o solvente, em agitação mecânica, por cerca de 5 minutos. A seguir o material foi filtrado e o resíduo insolúvel pesando 66,4 g foi submetido ao procedimento de extração ácido-base para alcaloides,²⁶ fornecendo 2,3 g de fração alcaloídica (FA). Uma amostra da FA (2,1 g) foi fracionada por CLMP, usando sílica gel previamente tratada com NaHCO₃ 10%,²⁶ e gradientes dos solventes Hex-CHCl₃ (100:0 → 0:100), CHCl₃-AcOEt (100:0 → 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 → 3:7), resultando em 116 frações de 50 mL que após análise em CCD foram agrupadas em 20 (FA1-FA20). A fração FA2 (95,0 mg), eluída em Hex-CHCl₃ (8:2), foi submetida a um novo fracionamento por CLMP, com sílica gel tratada com NaHCO₃ 10%, e gradiente de Hex-CHCl₃ (100:0 → 0:100) e CHCl₃-AcOEt (100:0 → 0:100), fornecendo 9 subfrações (FA2A-FA2I). A subfração FA2D (15,8 mg), obtida em Hex-CHCl₃ (95:5), foi purificada por CLAE semipreparativa com sistema gradiente de água (0,1% de ácido fórmico) e MeOH (95:5 → 0:100, em 60 minutos) a 254 nm, dando origem ao composto **5** (2,0 mg), eluído em 74% de MeOH. A subfração FA2E (23,4 mg), também obtida em Hex-CHCl₃ (95:5), foi purificada por CLAE

semipreparativa usando o seguinte gradiente de eluição: solvente A = água (0,1% de ácido fórmico); solvente B = MeOH; sistema de eluição = 0-40 min (20-70% de B); 40-50 min (70% de B); e 50-65 min (70-100% de B); a 254 nm; fornecendo as substâncias **2** (0,6 mg), **3** (4,7 mg) e **4** (1,5 mg), eluídas em 80%, 72% e 70% de B, respectivamente. A fração FA7 (197,3 mg), eluída em Hex-CHCl₃ (1:9), foi purificada por CLAE preparativa com o gradiente de eluição: solvente A = água (0,1% de ácido fórmico); solvente B = MeOH; sistema de eluição = 0-45 min (0-65% de B); 45-55 min (65% de B); e 55-90 min (65-100% de B); a 254 nm; isolando **6** (1,5 mg), obtido em 65% de B. A fração FA8 (295,5 mg), eluída em CHCl₃-AcOEt (9:1), foi separada em 11 frações (FA8A-FA8M) por CLMP, com sílica gel tratada com NaHCO₃ 10%, e gradiente de Hex-CHCl₃ (100:0 → 0:100), CHCl₃-AcOEt (100:0 → 0:100) e AcOEt:MeOH (100:0 → 3:7). A subfração FA8G (121,4 mg), eluída em CHCl₃, foi submetida a CLAE semipreparativa com o gradiente de eluição: solvente A = água (0,1% de ácido fórmico); solvente B = MeOH; sistema de eluição = 0-20 min (30-40% de B); 20-65 min (40% de B); e 65-100 min (40-100% de B); a 254 nm; obtendo-se o composto **1** (3,6 mg), obtido em 45% de B.

Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade dos compostos **1** – **5** foram utilizadas as linhagens de células HCT-116 (carcinoma colorretal humano) e L929 (fibroblastos murinos não-tumorais). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina à 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5% CO₂. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 3×10^5 células/poço. Após um período de 24 h, as células foram incubadas com os compostos **1** – **5** (50 µM) dissolvidos em DMSO (0,4%), por 72 h. Então, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (5 mg/mL) foi adicionada e incubada por mais 3 h. O sal de formazam depositado foi dissolvido em dodecil sulfato de sódio (SDS) (100 µL).²⁷ O controle positivo foi o DMSO (20%). A densidade ótica foi medida em um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek®) no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. (erro padrão da média) de quatro replicatas e foram comparados por análise de variância (ANOVA – one way),

seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$.

MATERIAL SUPLEMENTAR

Os espectros no IV, de RMN uni e bidimensionais, EMAR-IES e de baixa resolução MSⁿ estão disponíveis em <http://quimicanova.sbq.org.br>, na forma de arquivo PDF, com acesso livre.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem as agências de Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (código de financiamento 001) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e bolsas de pesquisa, ao Laboratório Multiusuário de Caracterização e Análise (LMCA-UFPB) e ao Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo (Central Analítica IQ-USP) pela aquisição dos espectros e a Rede Norte-Nordeste de Fitoprodutos (INCT-RENNOFITO) pela colaboração.

REFERÊNCIAS

1. Guo, X.; Tang, C. C.; Thomas, D. C.; Couvreur, T. L. P.; Saunders, R. M. K.; *Sci. Rep.* **2017**, 7, 1.
2. Couvreur, T. L. P.; Helmstetter, A. J.; Koenen, E. J. M.; Bethune, K.; Brandão, R. D.; Little, S. A.; Sauquet, H.; Erkens, R. H. J.; *Front. Plant Sci.* **2019**, 9, 1941.
3. Lopes, J. de C.; Mello-Silva, R.; *Rev. Bras. Frutic.* **2014**, 36, 125.
4. Lobão, A. Q.; Araujo, D. S. D. de; Kurtz, B. C.; *Rodriguésia* **2005**, 56, 85.
5. Lúcio, A. S. S. C.; Almeida, J. R. G. da S.; Da-Cunha, E. V. L.; Tavares, J. F.; Barbosa Filho, J. M. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Knölker, H.-J., Ed.; Academic Press: San Diego, California, USA, 2015; Vol. 74, pp. 233–409.
6. González-Esquinca, A. R.; De-La-Cruz-Chacón, I.; Castro-Moreno, M.; Orozco-Castillo, J. A.; Riley-Saldaña, C. A.; *Rev. Bras. Frutic.* **2014**, 36, 01.
7. Teichert, H.; Dötterl, S.; Gottsberger, G.; *Plant Syst. Evol.* **2011**, 291, 25.

8. Maas, P. J. M.; Westra, L. Y. T.; *Meded. van het Bot. Museum en Herb. van Rijksuniv. te Utr.* **1984**, 73.
9. Maas, P. J. M.; Westra, L. Y. T.; *Meded. van het Bot. Museum en Herb. van Rijksuniv. te Utr.* **1985**, 543, 145.
10. Scharaschkin, T.; Doyle, J. A.; *Syst. Bot.* **2005**, 30, 712.
11. Lúcio, A. S. S. C.; Da Silva Almeida, J. R. G.; Barbosa-Filho, J. M.; Pita, J. C. L. R.; Branco, M. V. S. C.; De Fátima Formiga Melo, M.; De Fátima Agra, M.; Da-Cunha, E. V. L.; Da Silva, M. S.; Tavares, J. F.; *Molecules* **2011**, 16, 7125.
12. Pinheiro, R. da S.; Rabelo, S. V.; De Oliveira, A. P.; Guimarães, A. L.; De Moraes-Filho, M. O.; Da Costa, M. P.; Do Ó Pessoa, C.; Lúcio, A. S. S. C.; Almeida, J. R. G. da S.; *Trop. J. Pharm. Res.* **2016**, 15, 793.
13. Sabphon, C.; Temkitthawon, P.; Ingkaninan, K.; Sawasdee, P.; *Nat. Prod. Commun.* **2015**, 10, 1934578X1501000.
14. Díaz, A. M. P. de; *Phytochemistry* **1997**, 44, 345.
15. Husain, K.; Zakaria, S. M.; Lajis, N. H.; Shaari, K.; Ismail, I. S.; Israf, D. A.; Paetz, C.; *Phytochem. Lett.* **2012**, 5, 788.
16. Almeida, J. R. G. da S.; Suassuna Carneiro Lúcio, A. S.; Barbosa-Filho, J. M.; de Fátima Agra, M.; da Silva, M. S.; da Cunha, E. V. L.; de Andrade Uchoa, D. E.; Braz-Filho, R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, 35, 456.
17. Hocquemiller, R.; Rasamizafy, S.; Moretti, C.; Jacquemin, H.; Cavé, A.; *Planta Med.* **1981**, 41, 48.
18. Amaral, R. G.; Santos, S. A. dos; Andrade, L. N.; Severino, P.; Carvalho, A. A.; *Clin. Oncol.* **2019**, 4, p1562.
19. Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; *J. Nat. Prod.* **1994**, 57, 1033.
20. Taylor, W.; *Aust. J. Chem.* **1984**, 37, 1095.
21. Silva, F. M. A. da; Koolen, H. H. F.; Almeida, R. A. de; Souza, A. D. L. de; Pinheiro, M. L. B.; Costa, E. V.; *Quim. Nova* **2012**, 35, 944.
22. Stévigny, C.; Jiwan, J. H.; Rozenberg, R.; de Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, 18, 523.
23. Carroll, A.; Taylor, W.; *Aust. J. Chem.* **1991**, 44, 1615.
24. Hang, N. T. M.; Oanh, N. T. T.; Hue, C. T.; Tung, T. H.; Thoa, H. T.; Thanh, L. N.; Giap, T. H.; Dung, N. A.; Hung, N. Van; Minh, C. Van; *Vietnam J. Chem.* **2015**, 53, 73.

25. D. Hufford, C.; K. Zjawiony, J.; R. Srivastava, A.; M. Clark, A.; *Heterocycles* **1994**, 39, 779.
26. Costa, E. V.; Pinheiro, M. L. B.; Xavier, C. M.; Silva, J. R. A.; Amaral, A. C. F.; Souza, A. D. L.; Barison, A.; Campos, F. R.; Ferreira, A. G.; Machado, G. M. C.; Leon, L. L. P.; *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 292.
27. Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55.

MATERIAL SUPLEMENTAR

DOIS NOVOS ALCALOIDES AZAFENANTRENO DE *Anaxagorea dolichocarpa* Sprague & Sandwith

Kaio A. Sales^a, Anderson A. V. Pinheiro^a, Diego I. A. F. Araújo^a, Rodrigo S. de Andrade^a, Maria de Fátima Agra^b, Marianna V. Sobral^a, Hemerson I. F. Magalhães^a, Valgrícia M. de Sousa^a, Raimundo Braz-Filho^c, Marcelo S. da Silva^a e Josean F. Tavares^{a,*}

^aCentro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

^bDepartamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

^cDepartamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000, Seropédica – RJ, Brasil

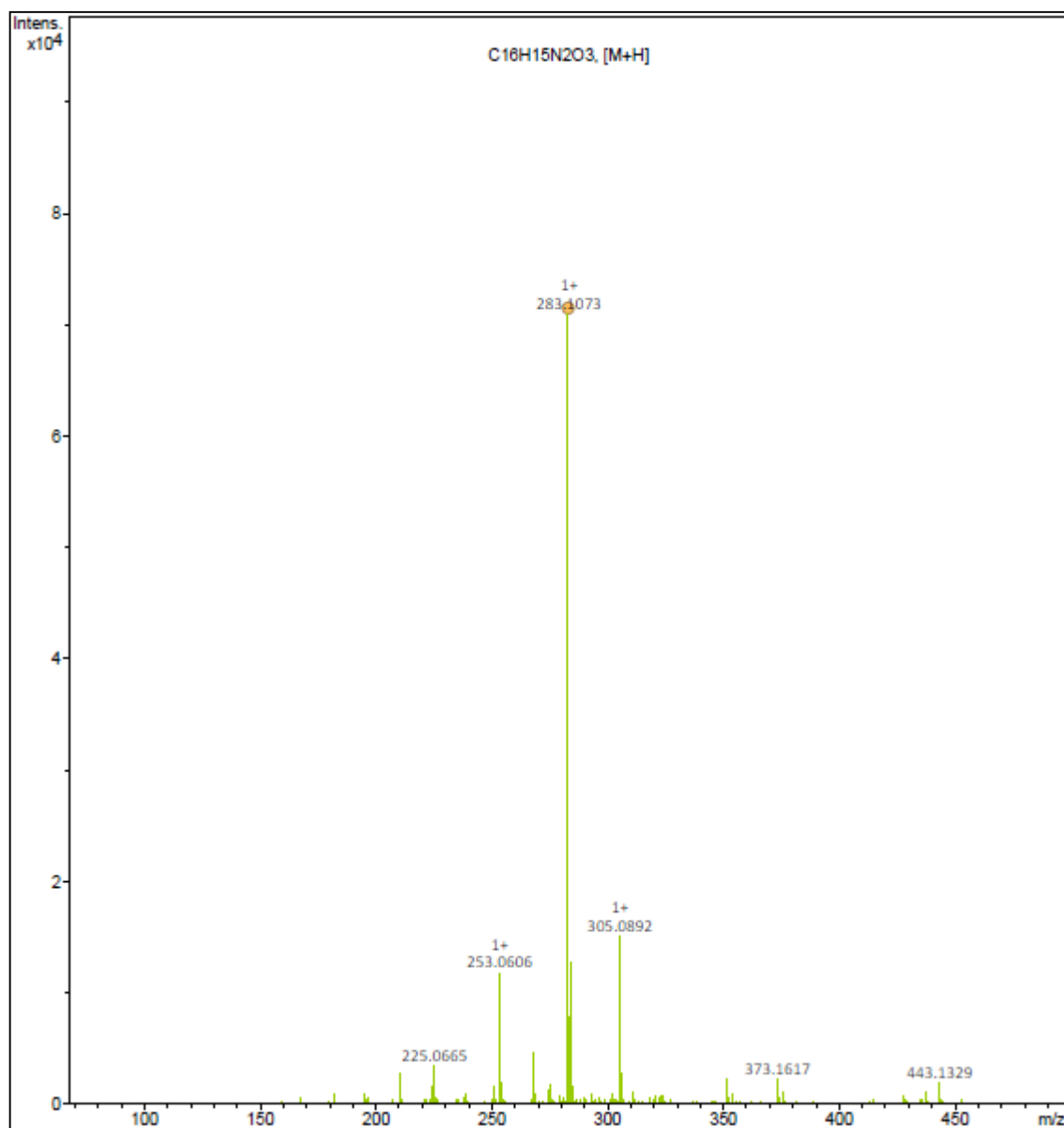


Figura 1S. Espectro de EMAR-IES do composto **1**

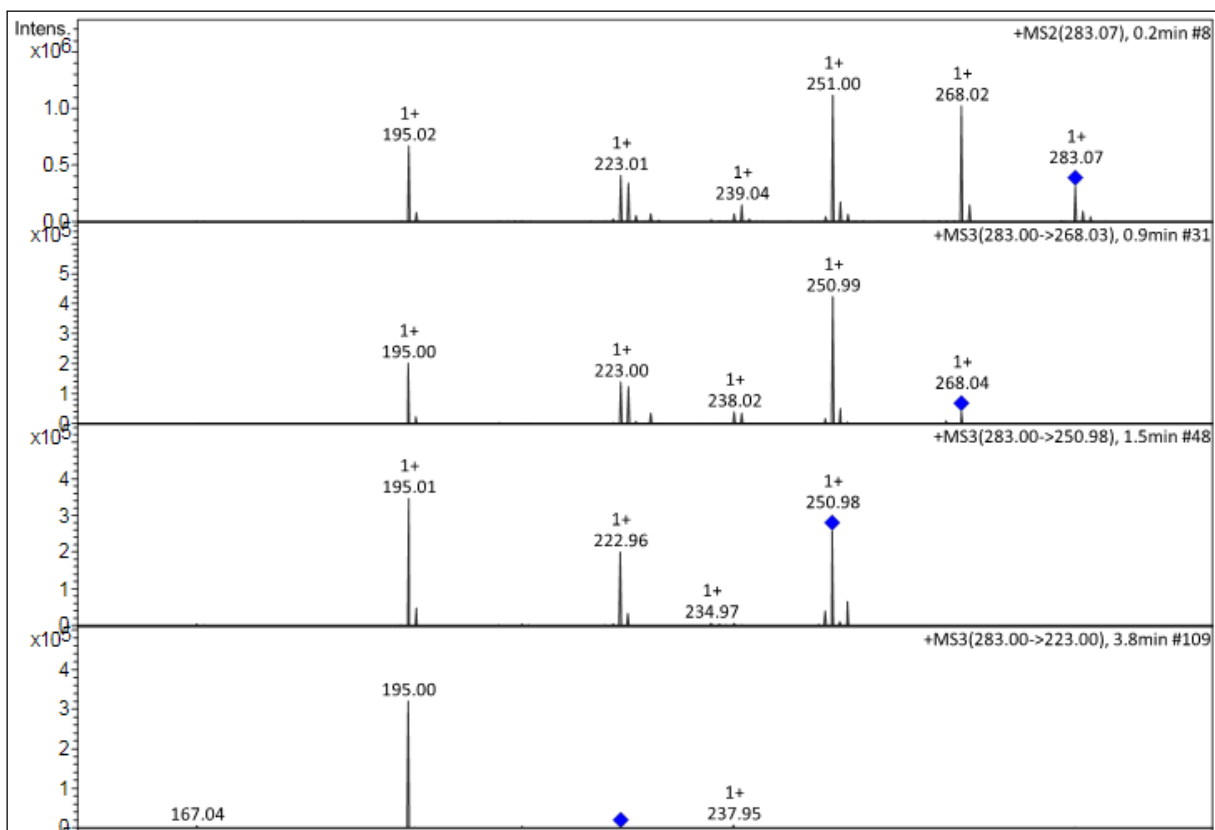


Figura 2S. Espectro EMⁿ do composto **1**

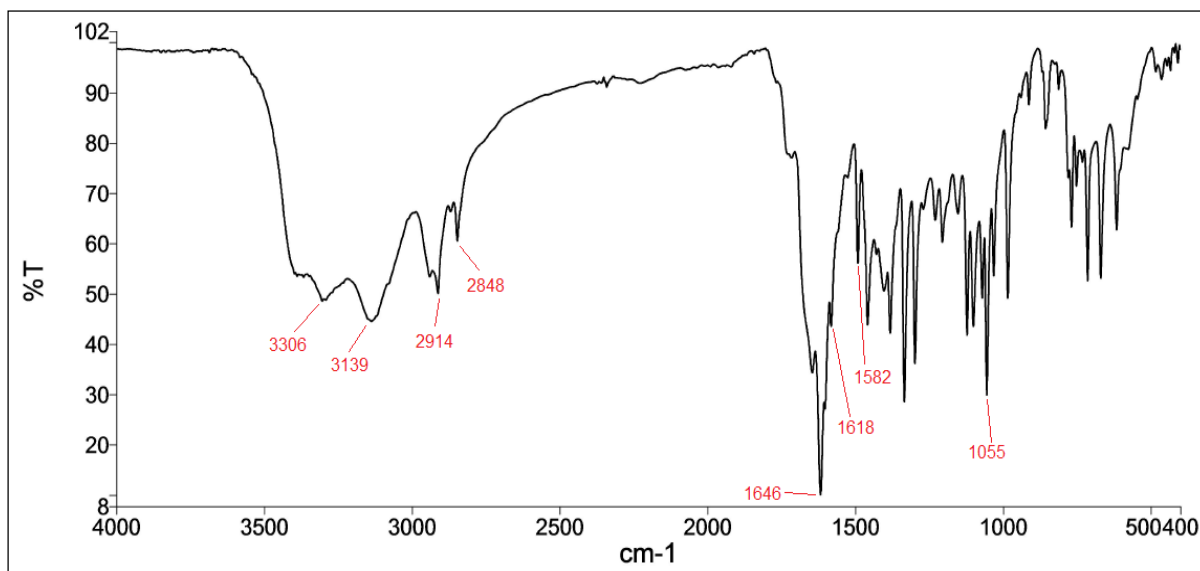


Figura 3S. Espectro no IV (KBr, cm⁻¹) do composto **1**

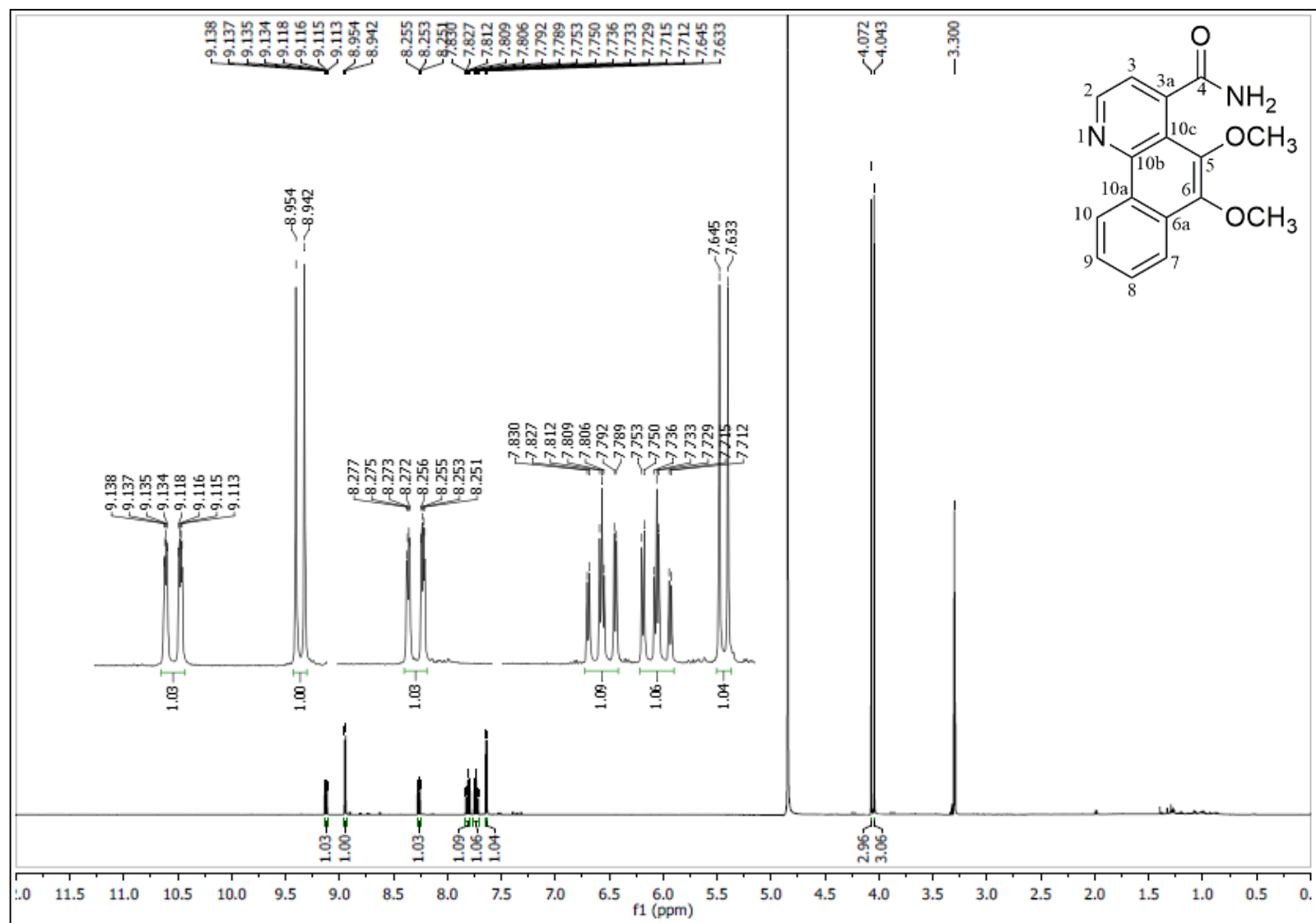


Figura 4S. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) do composto **1**

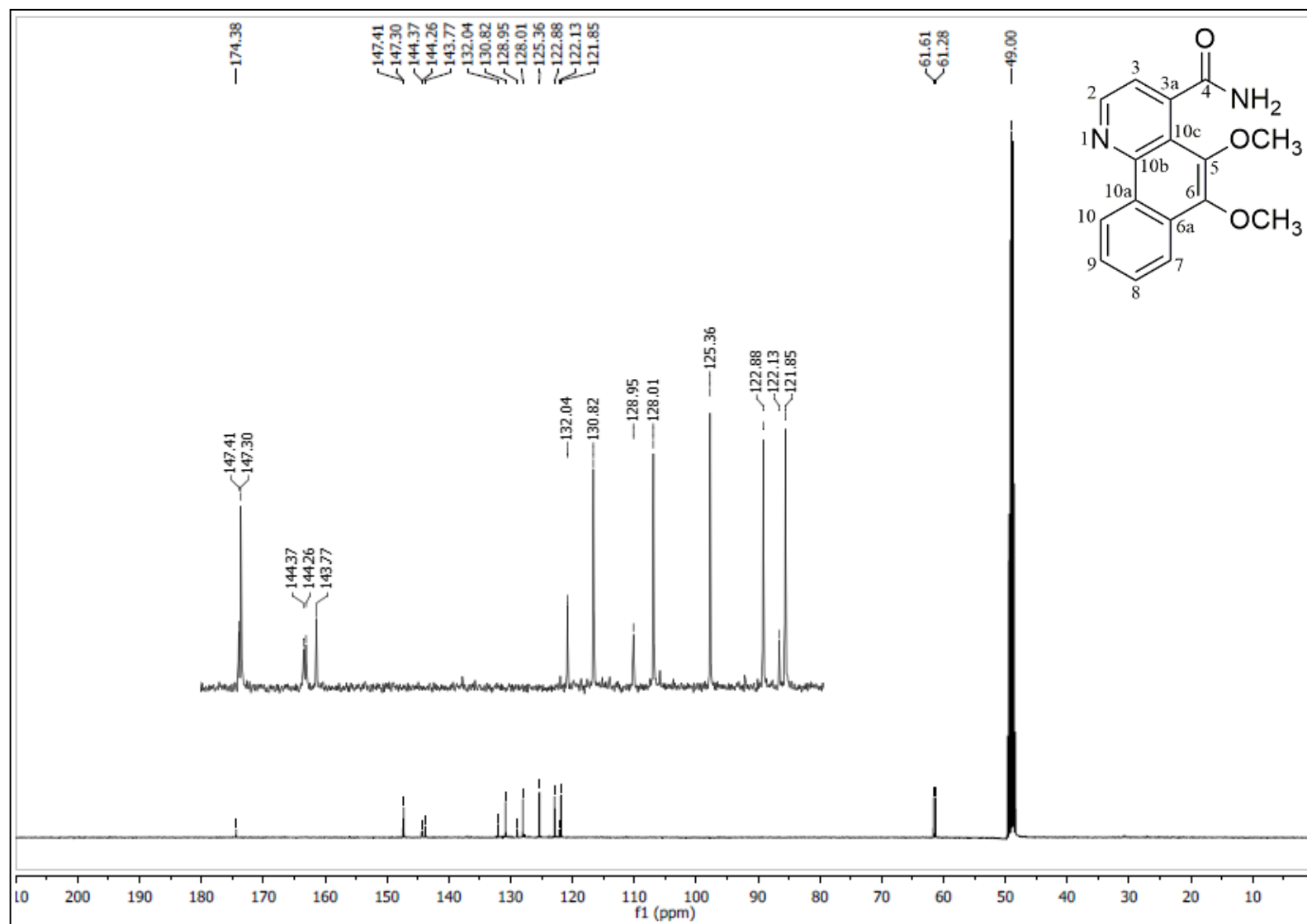


Figura 5S. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CD₃OD) do composto **1**

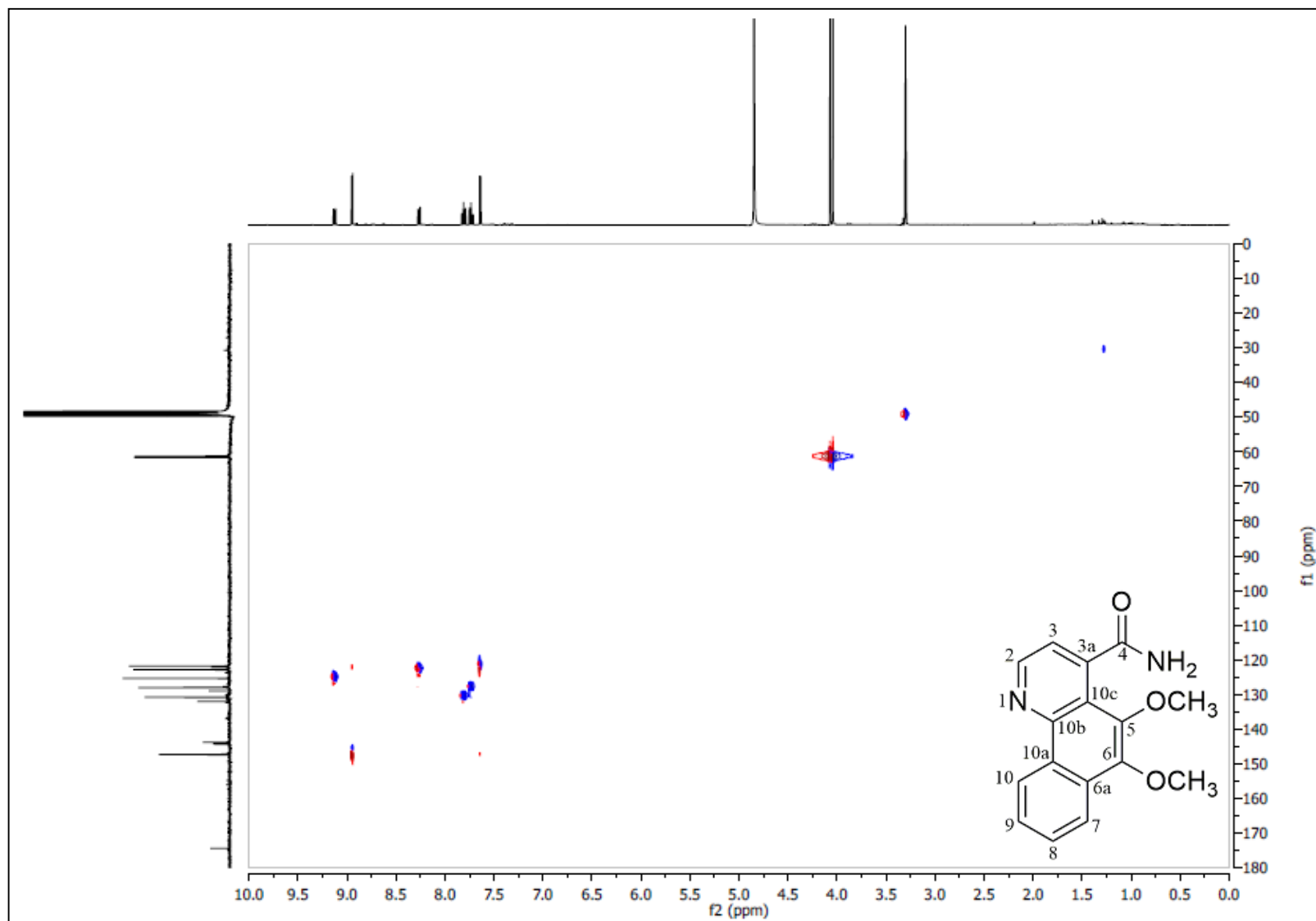


Figura 6S. Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CD_3OD) do composto **1**

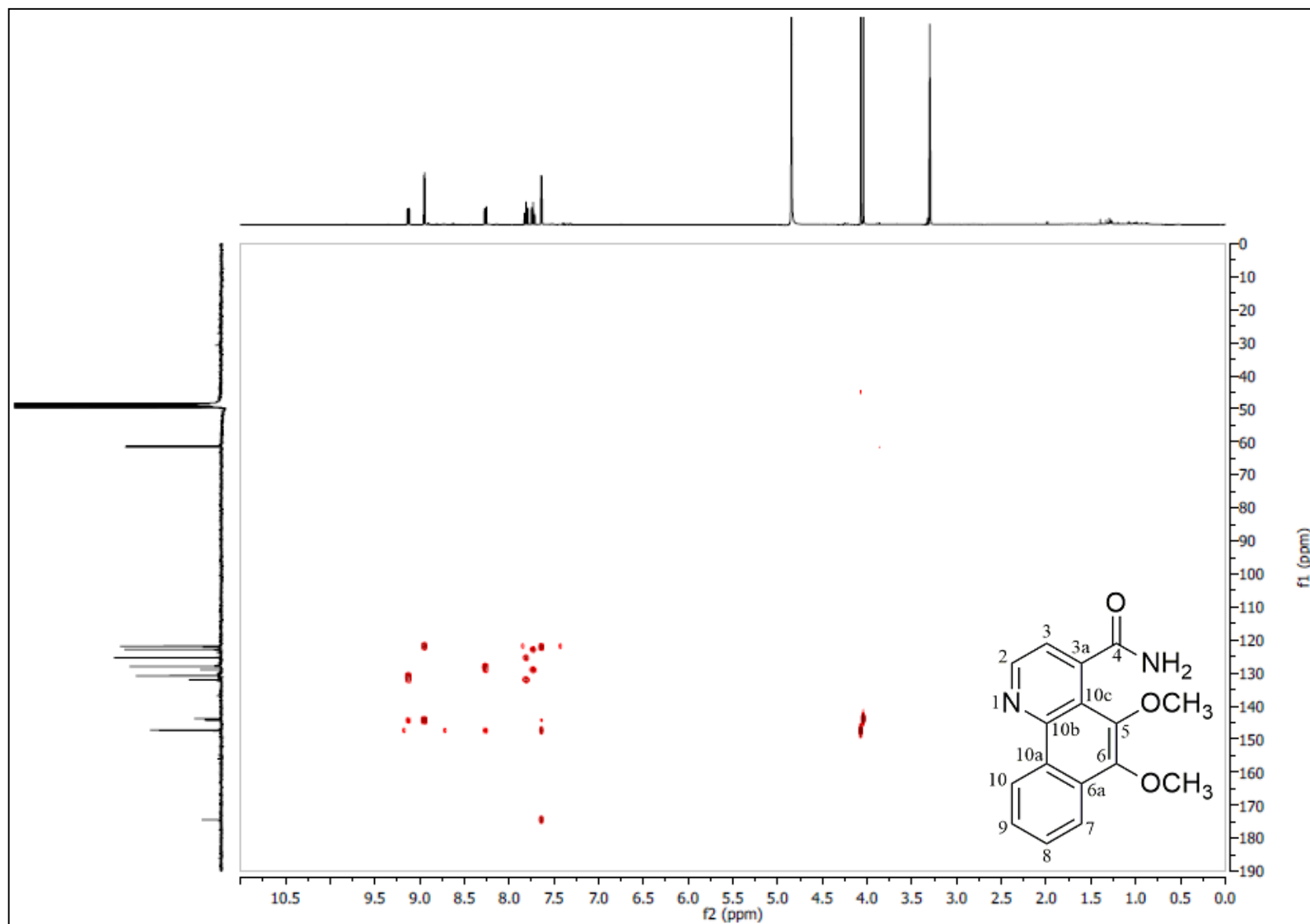


Figura 7S. Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD₃OD) do composto **1**

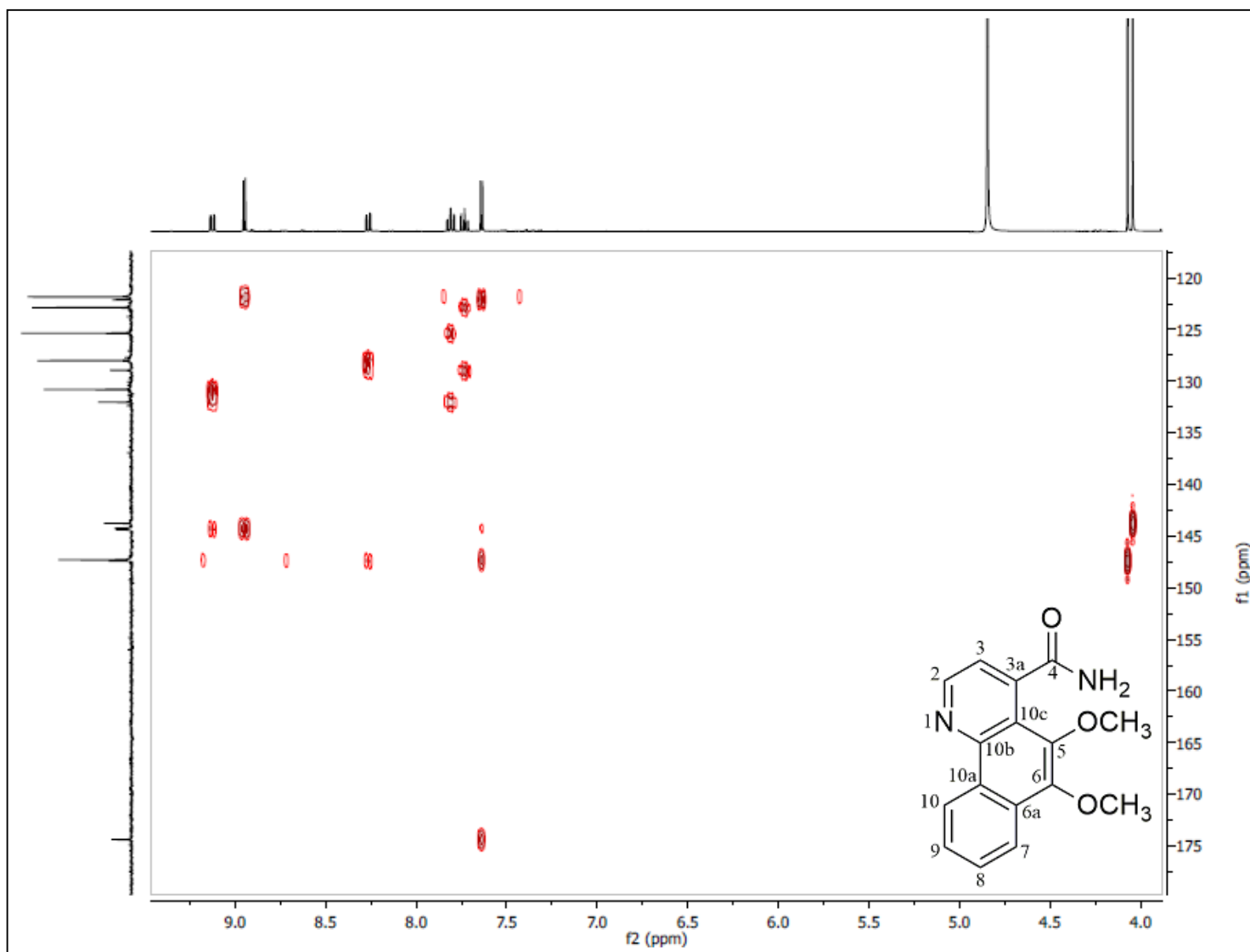


Figura 8S. Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CD_3OD) do composto **1**

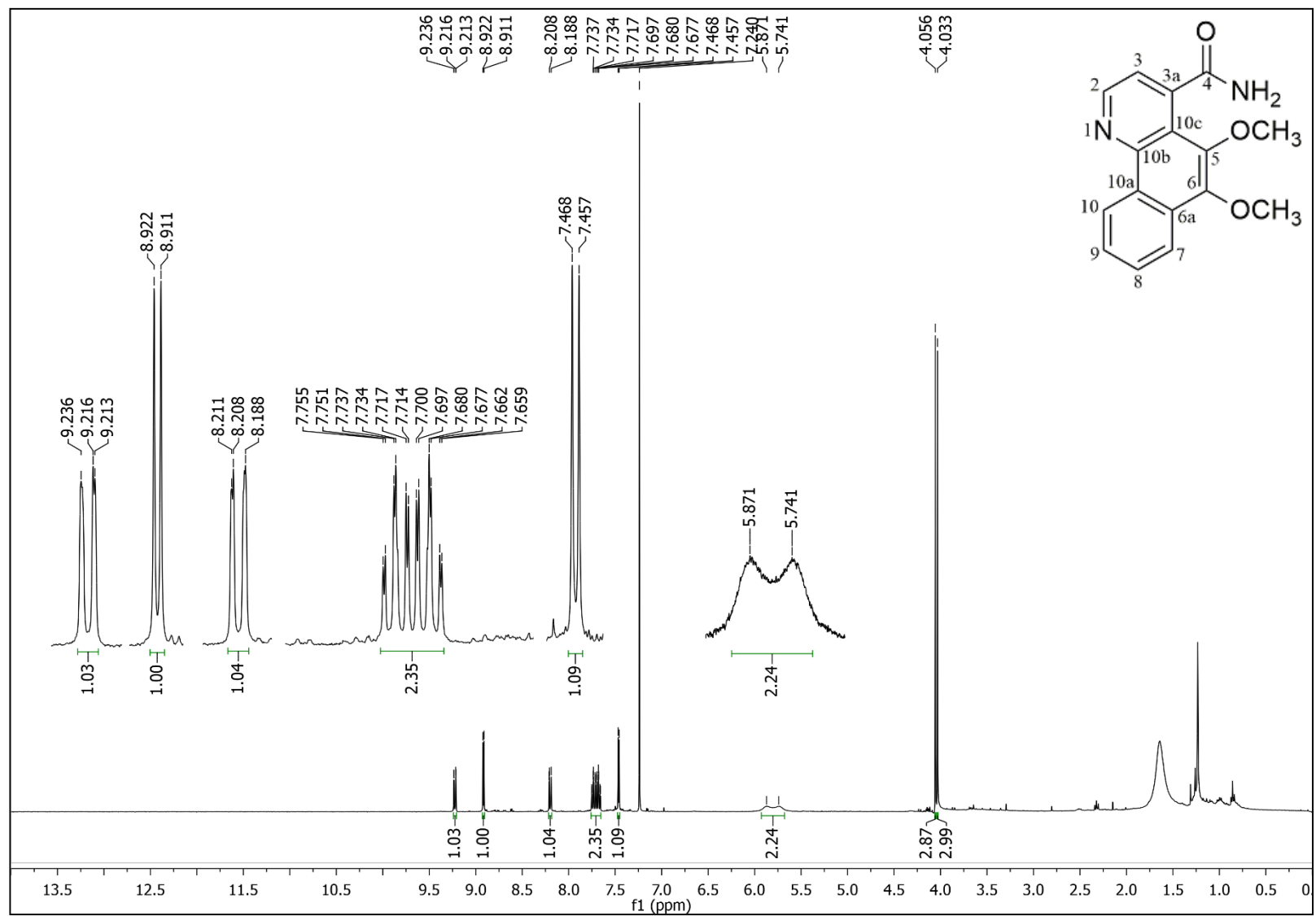


Figura 9S. Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) do composto **1**

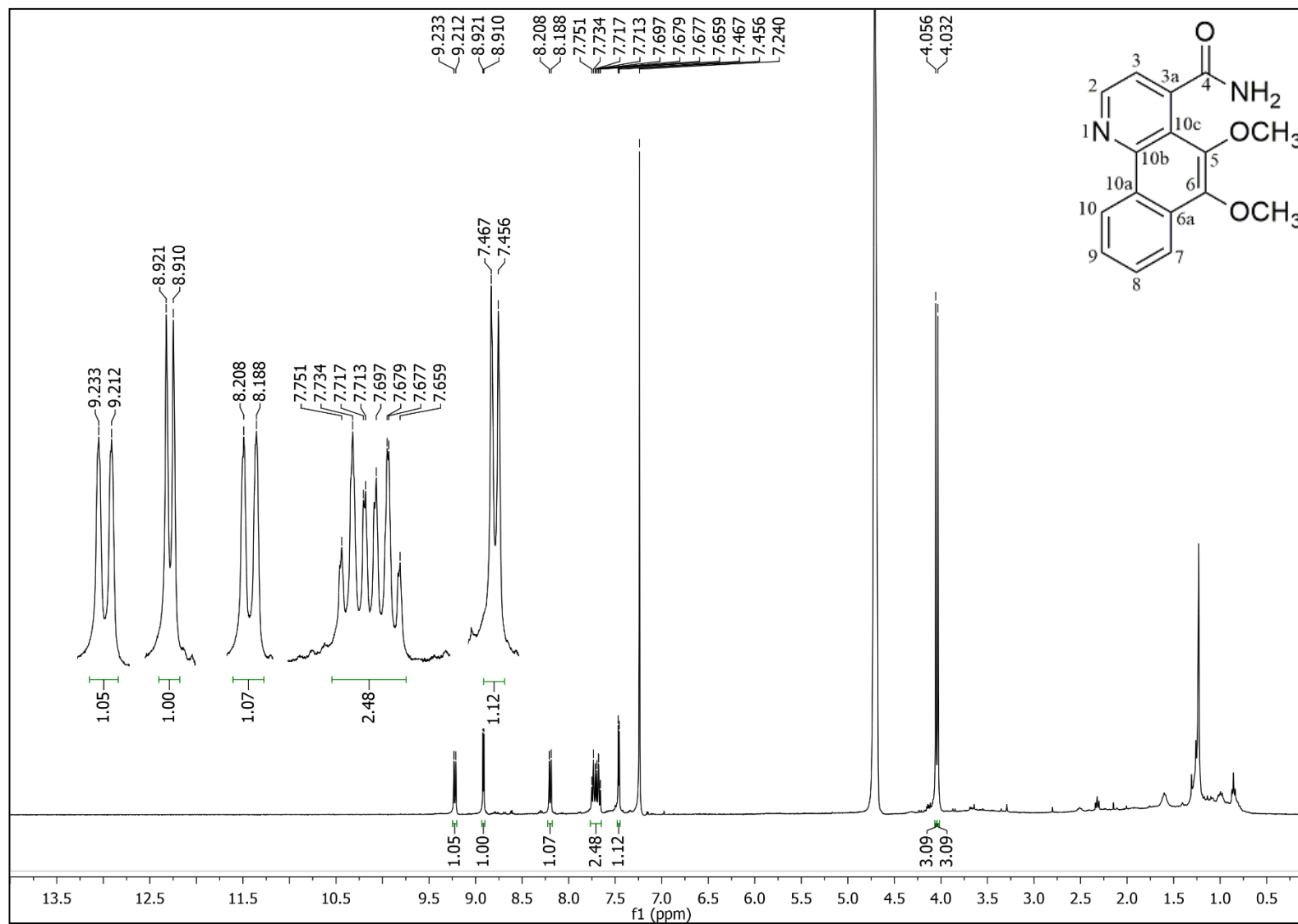


Figura 10S. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, $\text{CDCl}_3+\text{D}_2\text{O}$) do composto **1**

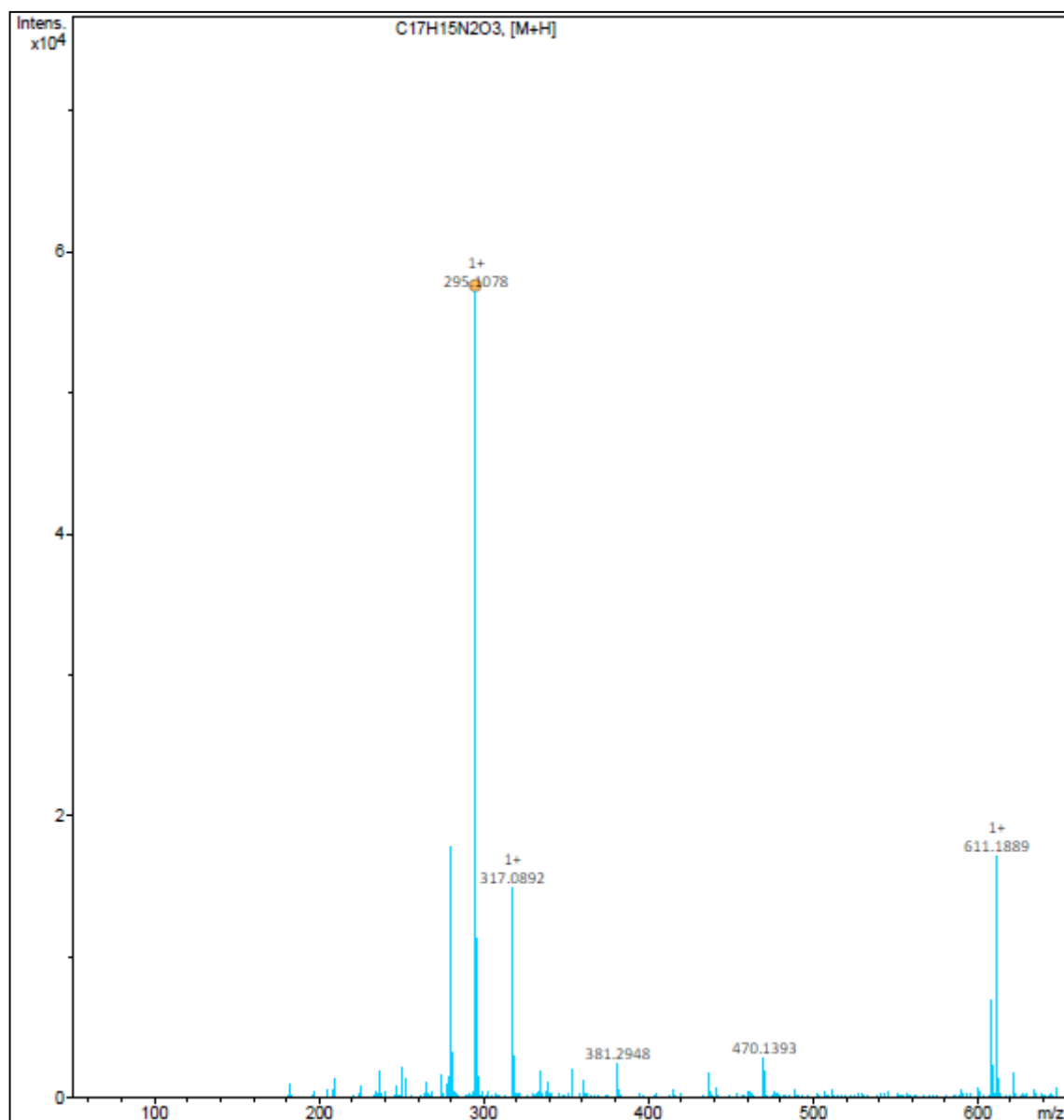


Figura 11S. Espectro de EMAR-IES do composto 2

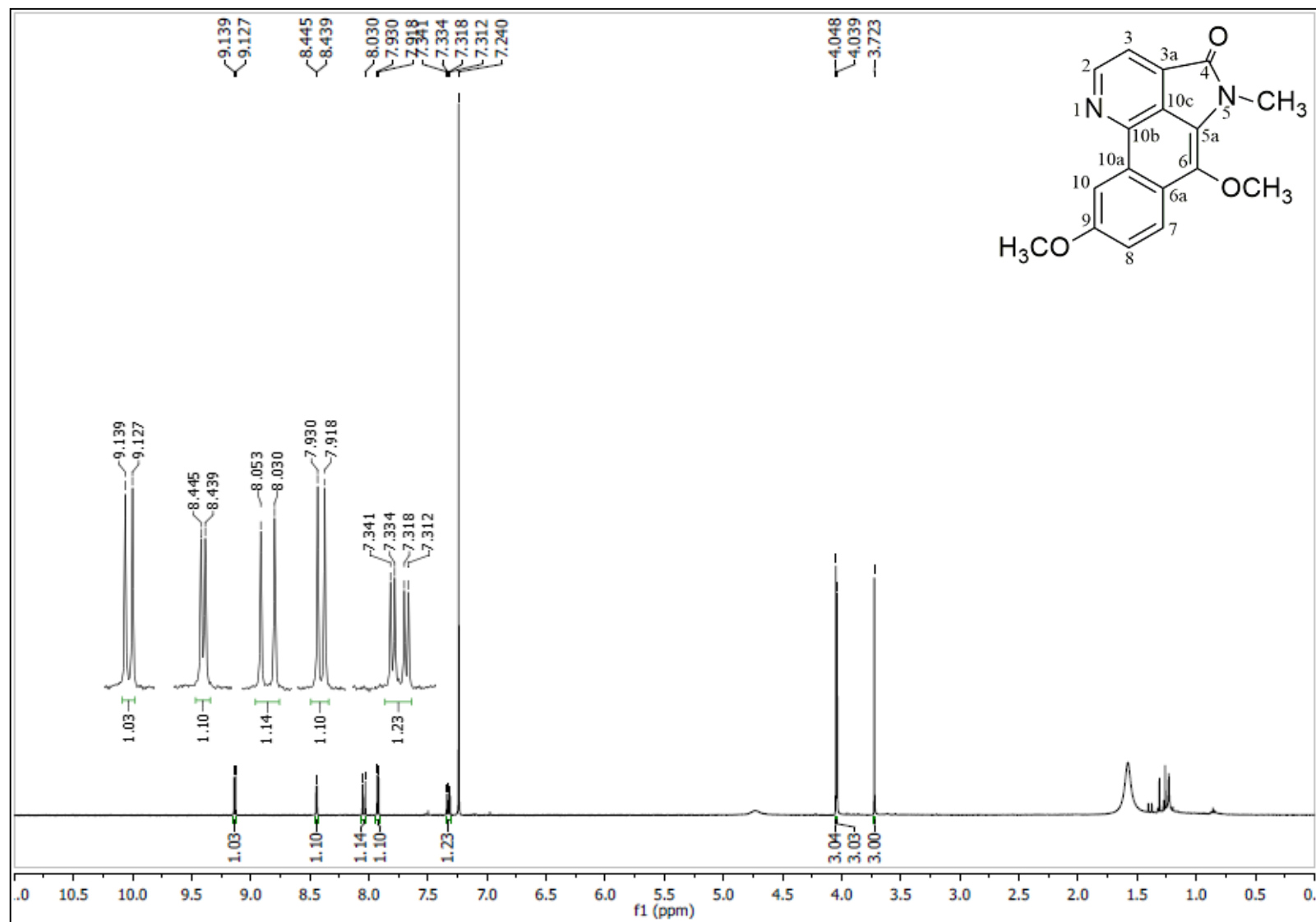


Figura 12S. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **2**

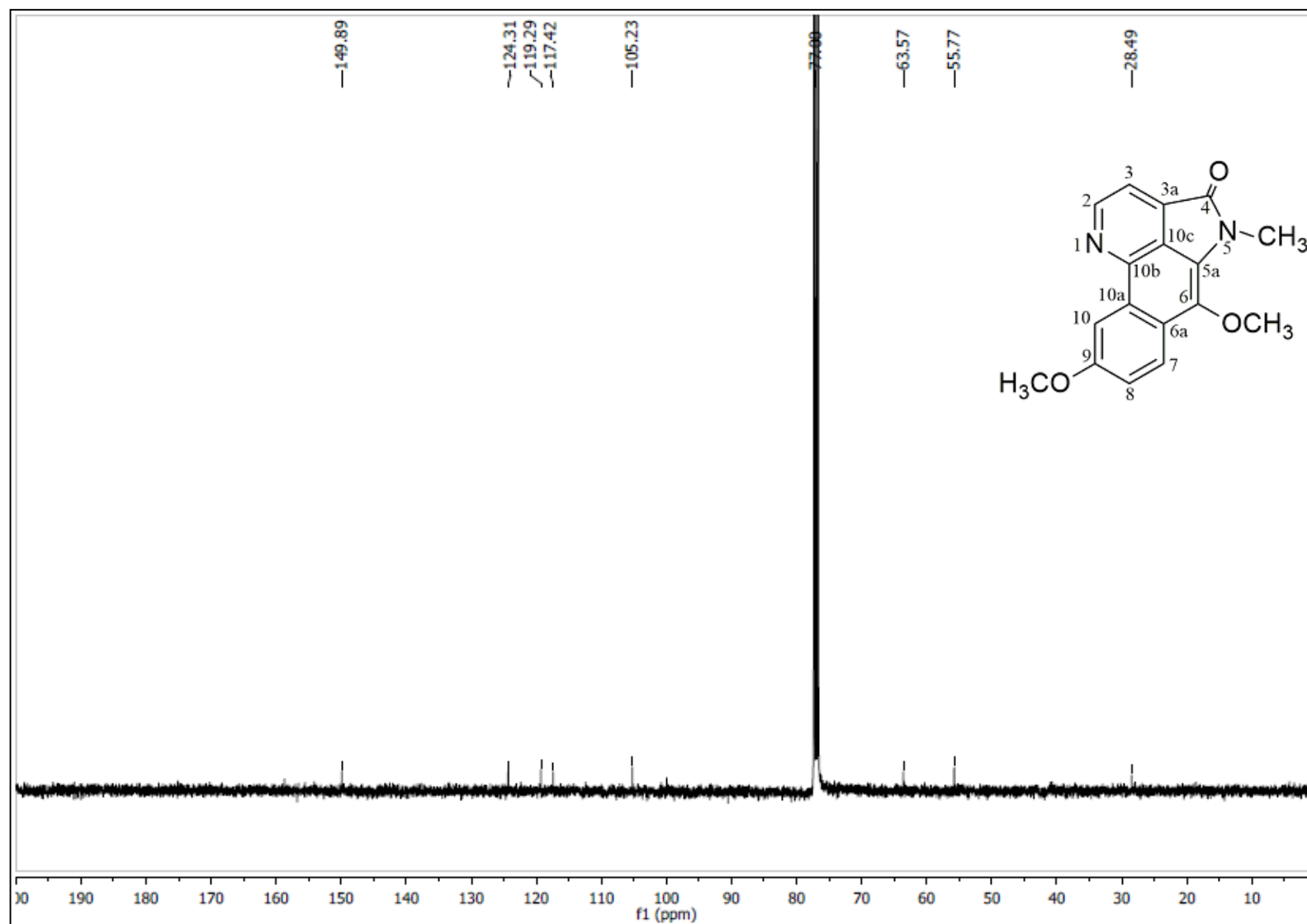


Figura 13S. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) do composto 2

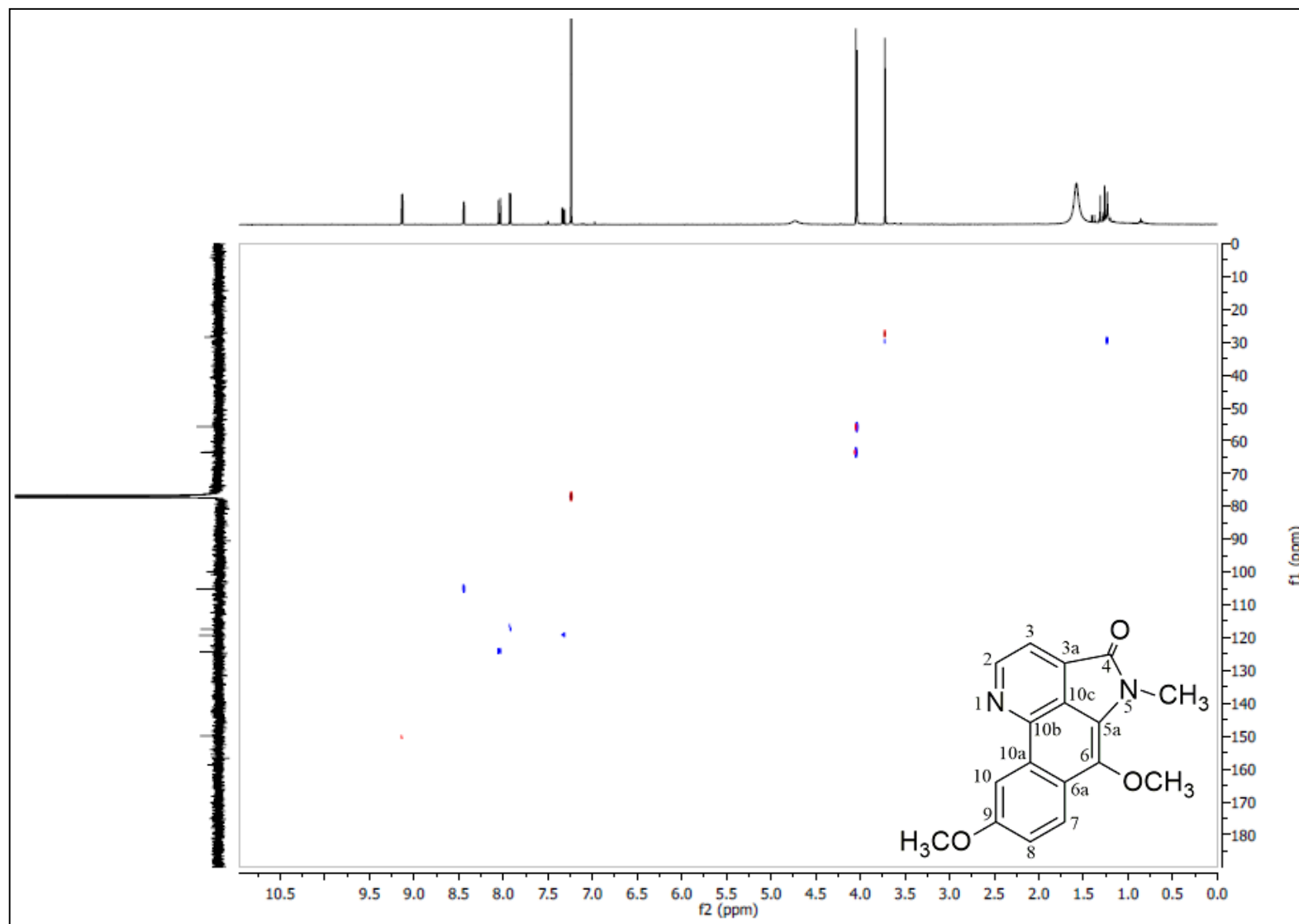


Figura 14S. Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) do composto **2**

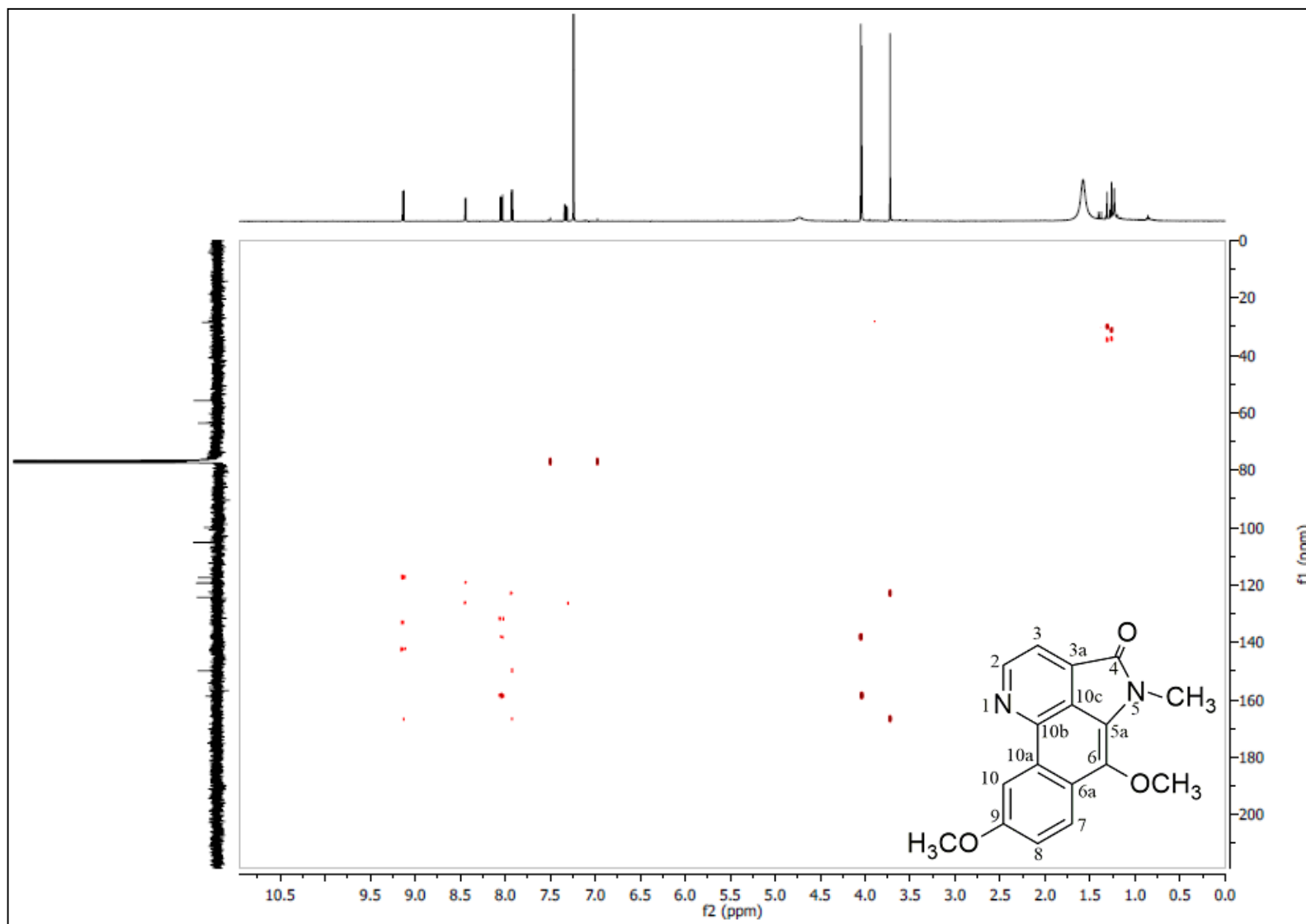


Figura 15S. Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) do composto **2**

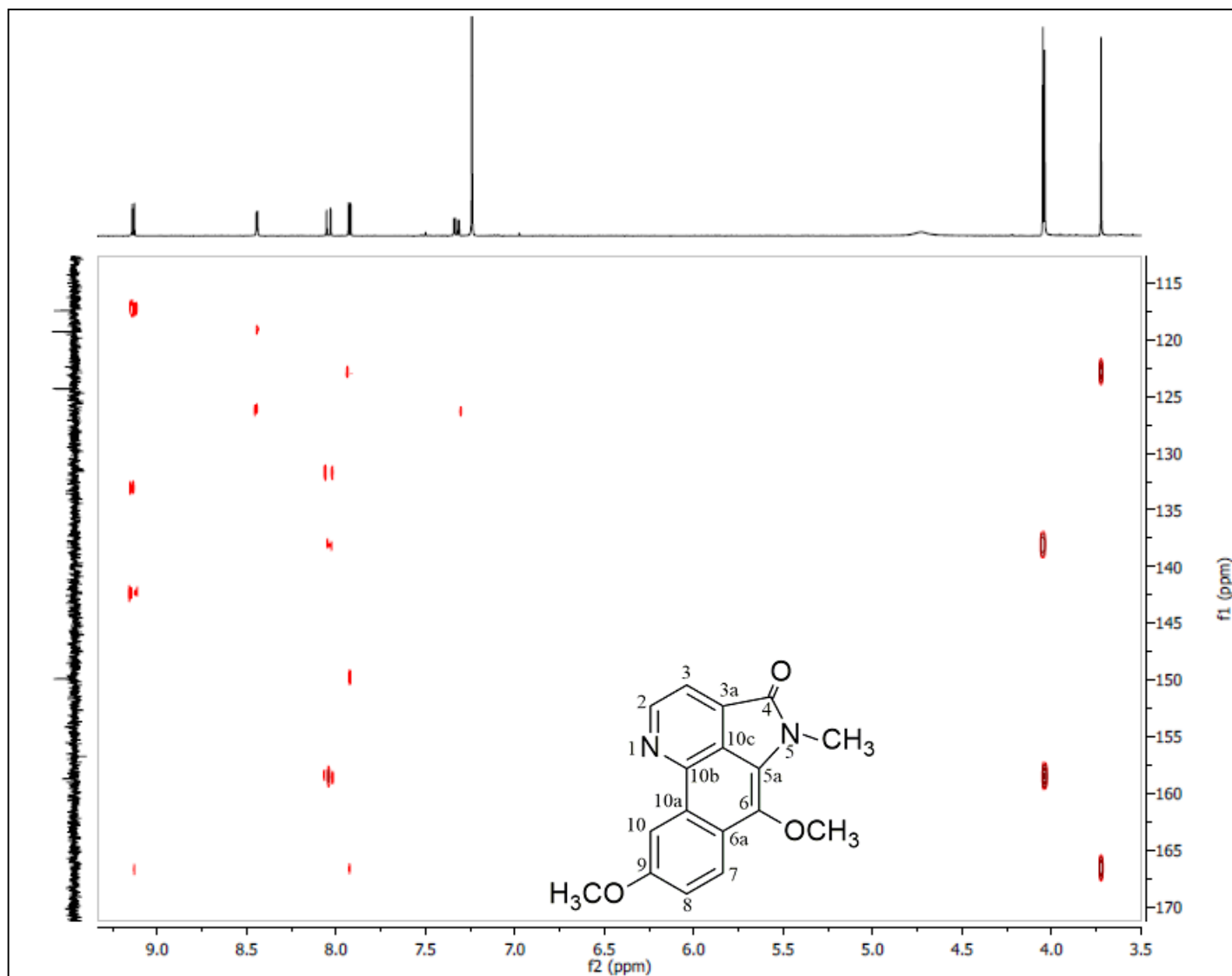


Figura 16S. Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) do composto **2**

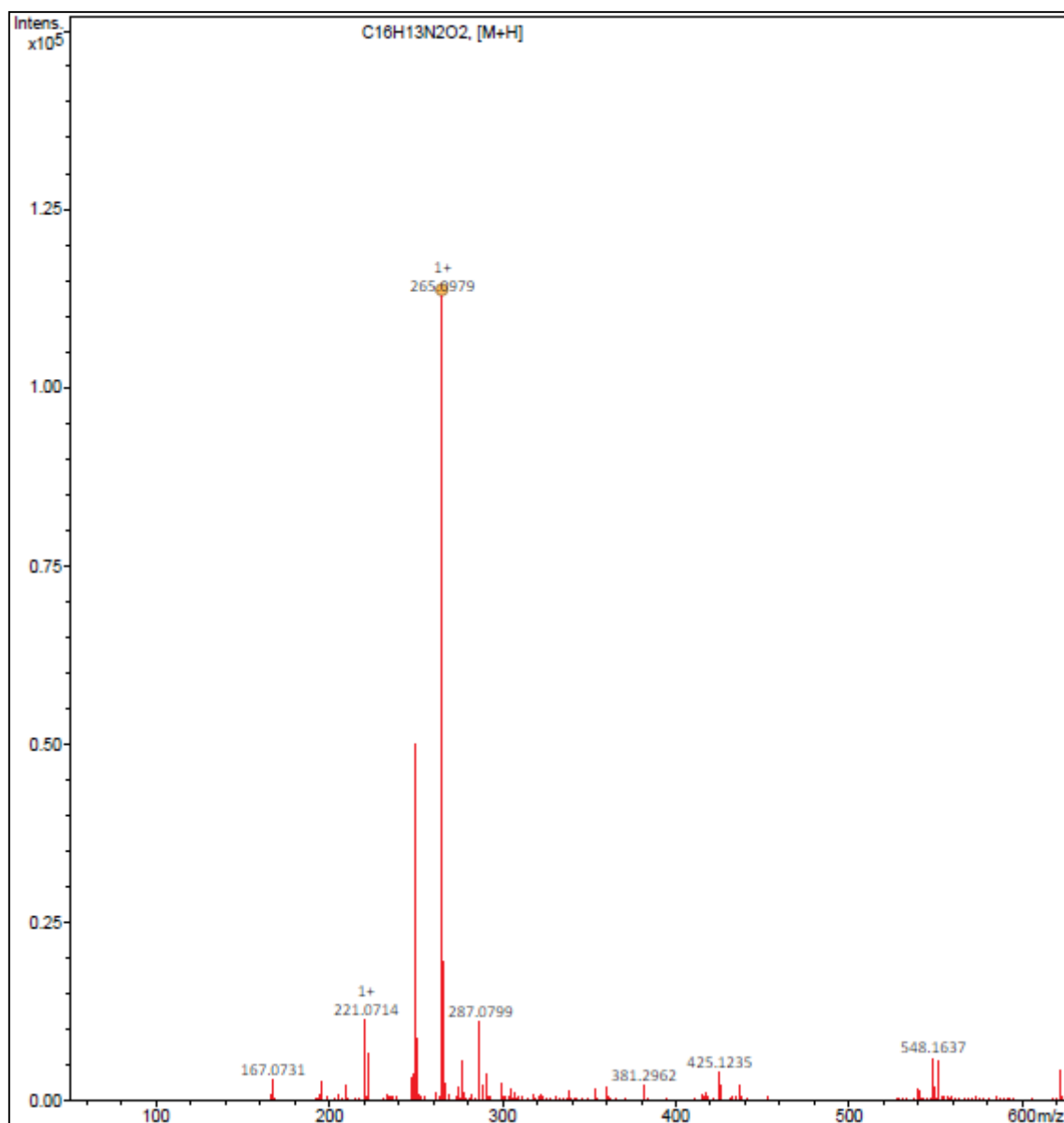


Figura 17S. Espectro de EMAR-IES do composto **3**

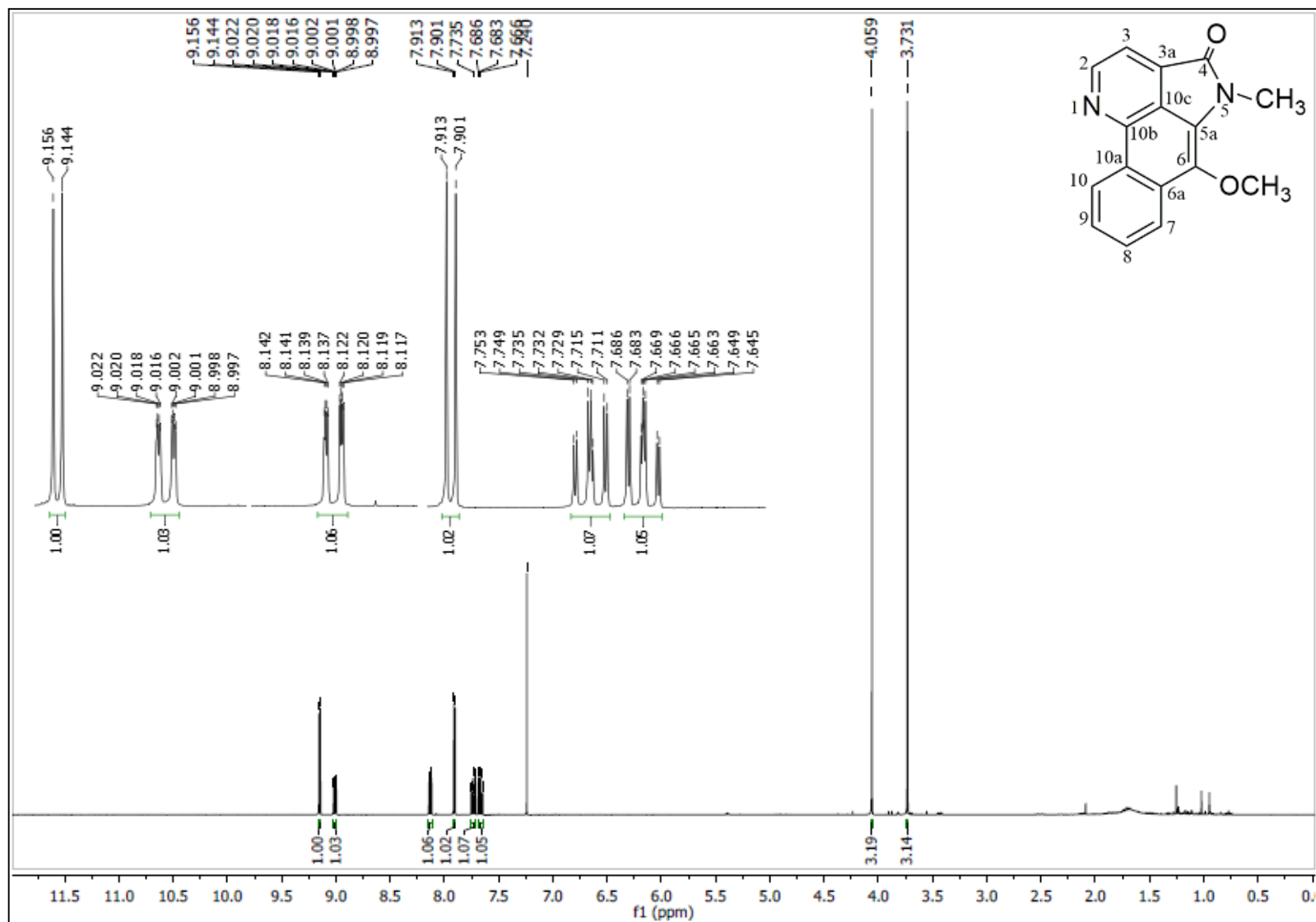


Figura 18S. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **3**

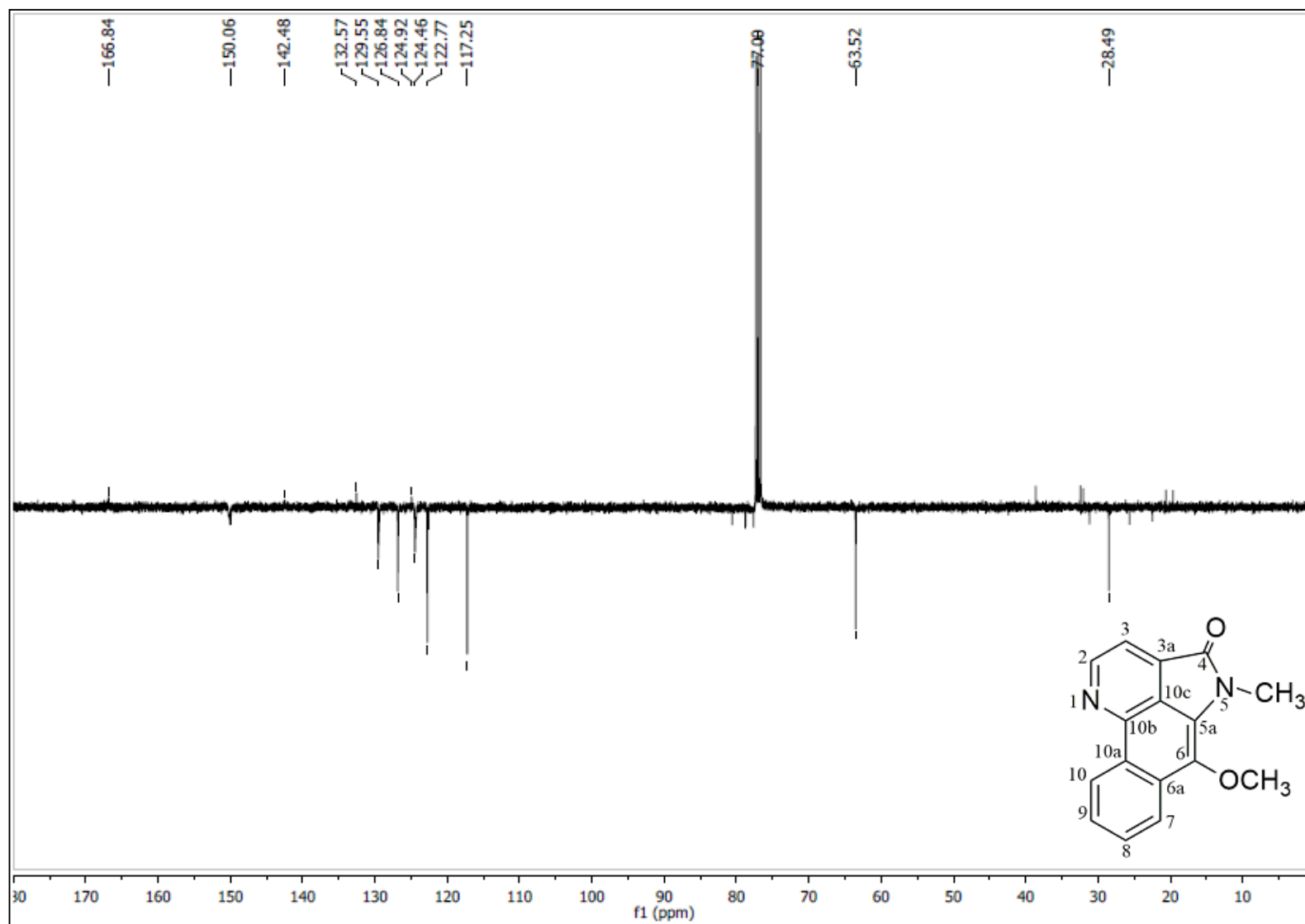


Figura 19S. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, 100 MHz, CDCl_3) do composto **3**

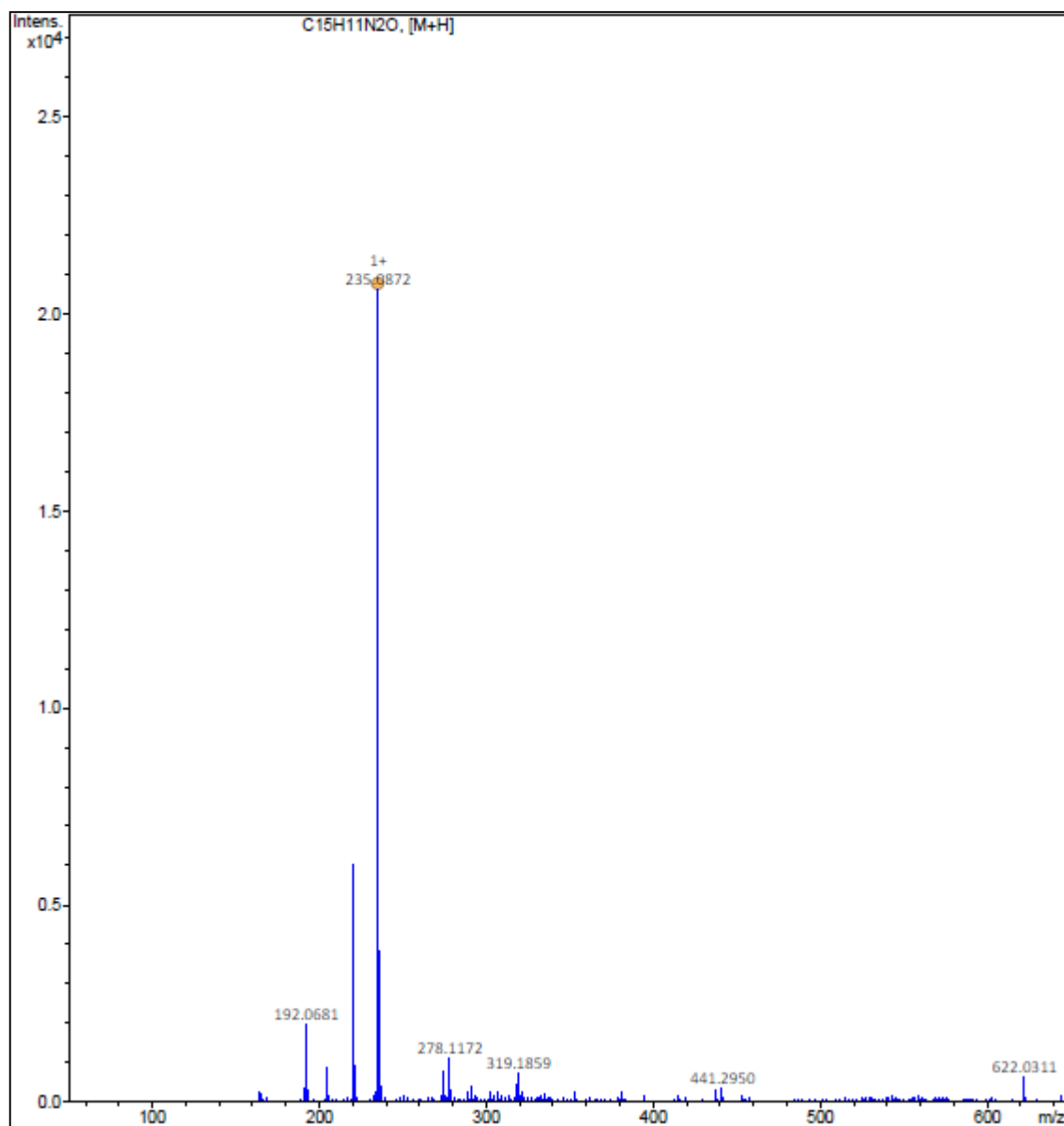


Figura 20S. Espectro de EMAR-IES do composto **4**

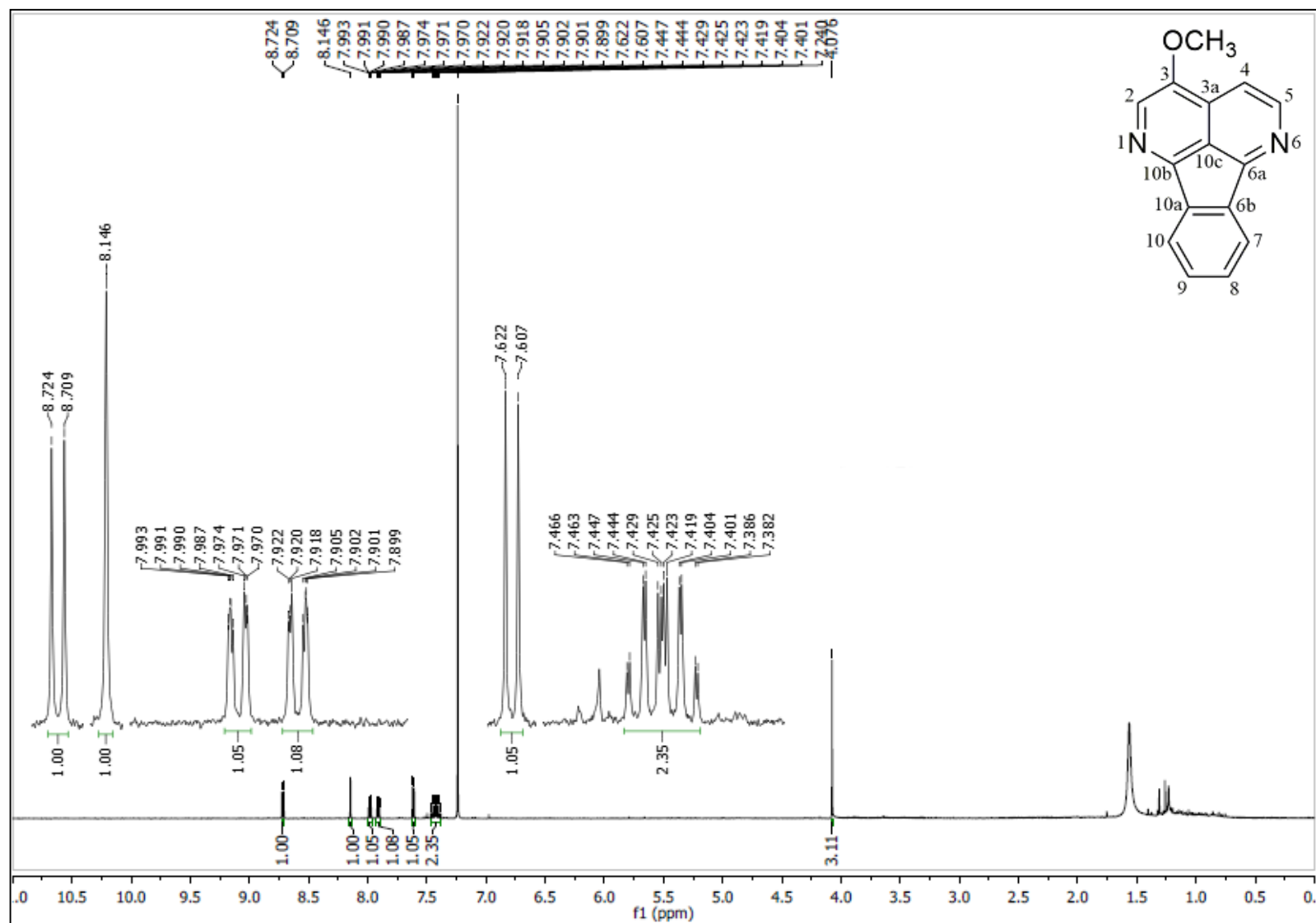


Figura 21S. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **4**

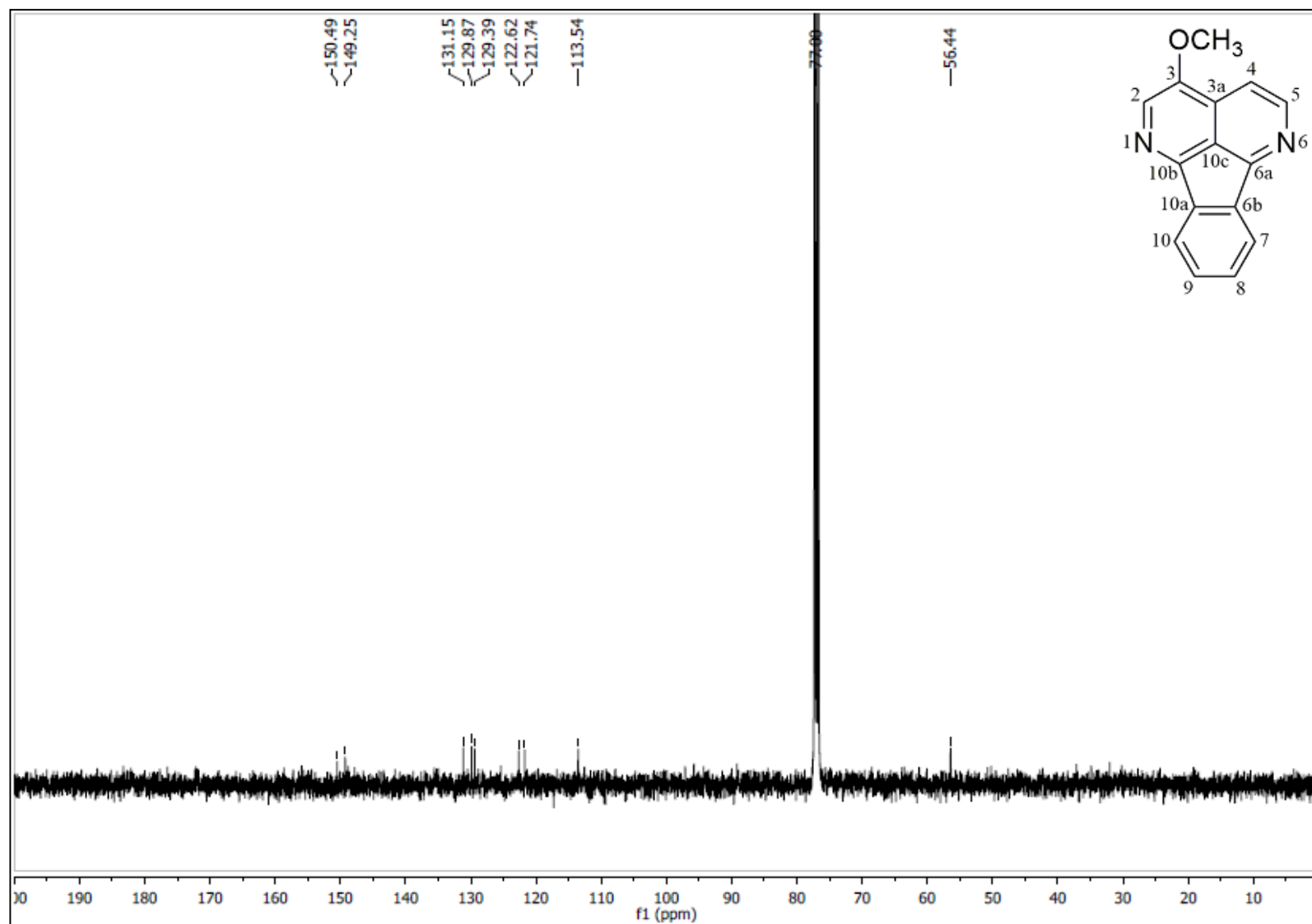


Figura 22S. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, CDCl₃) do composto **4**

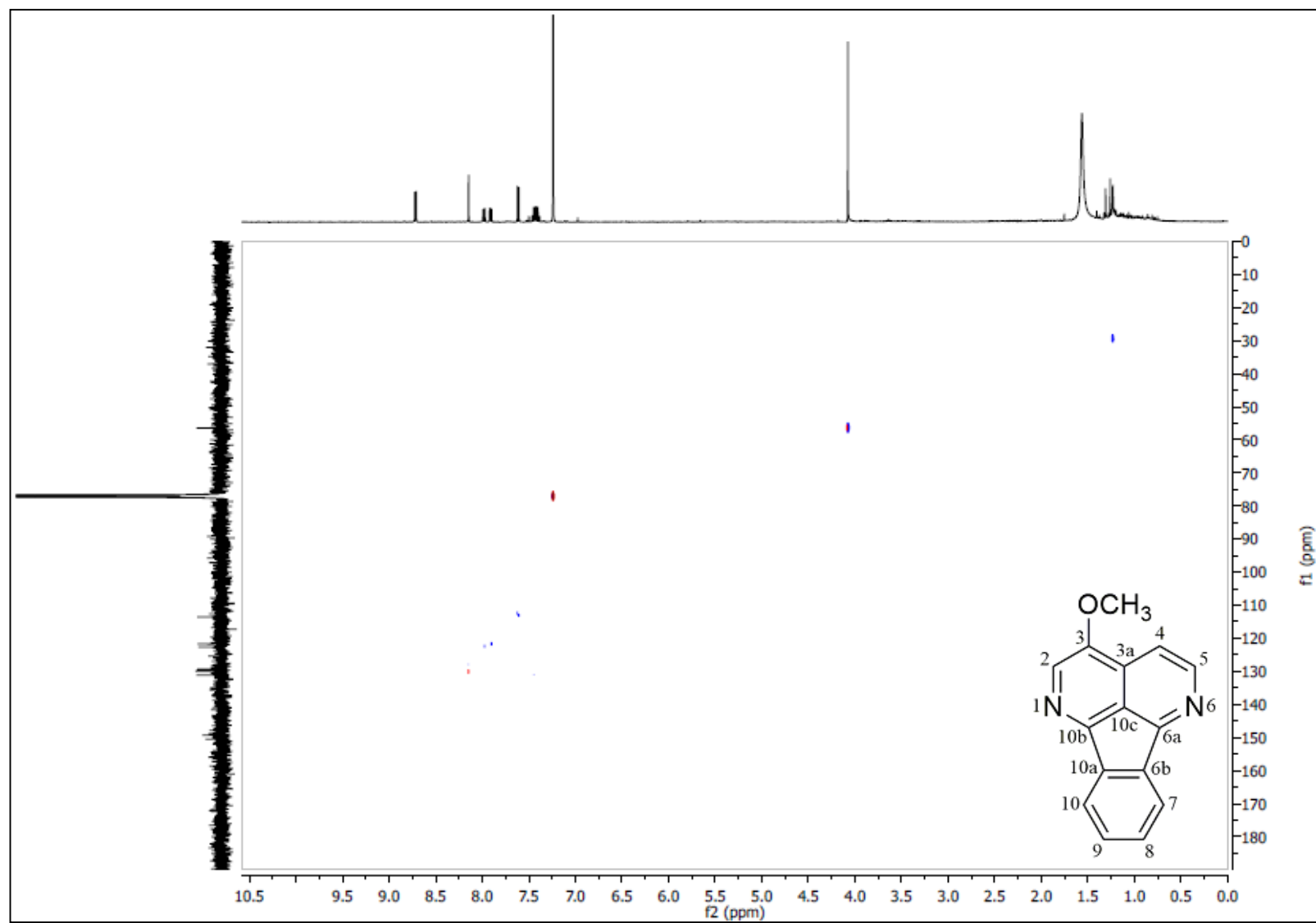


Figura 23S. Espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl_3) do composto **4**

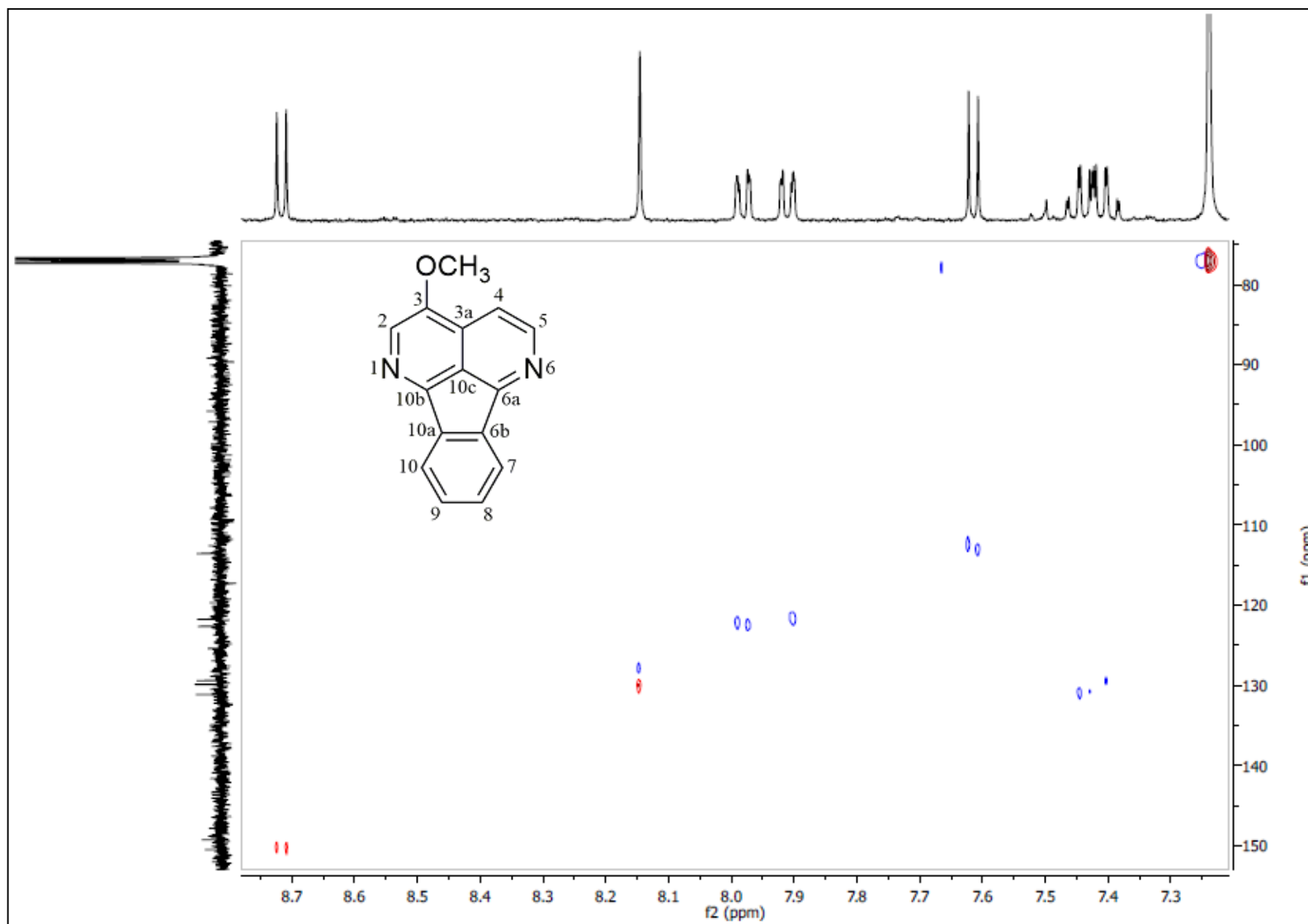


Figura 24S. Expansão do espectro HSQC (400 e 100 MHz, CDCl₃) do composto **4**

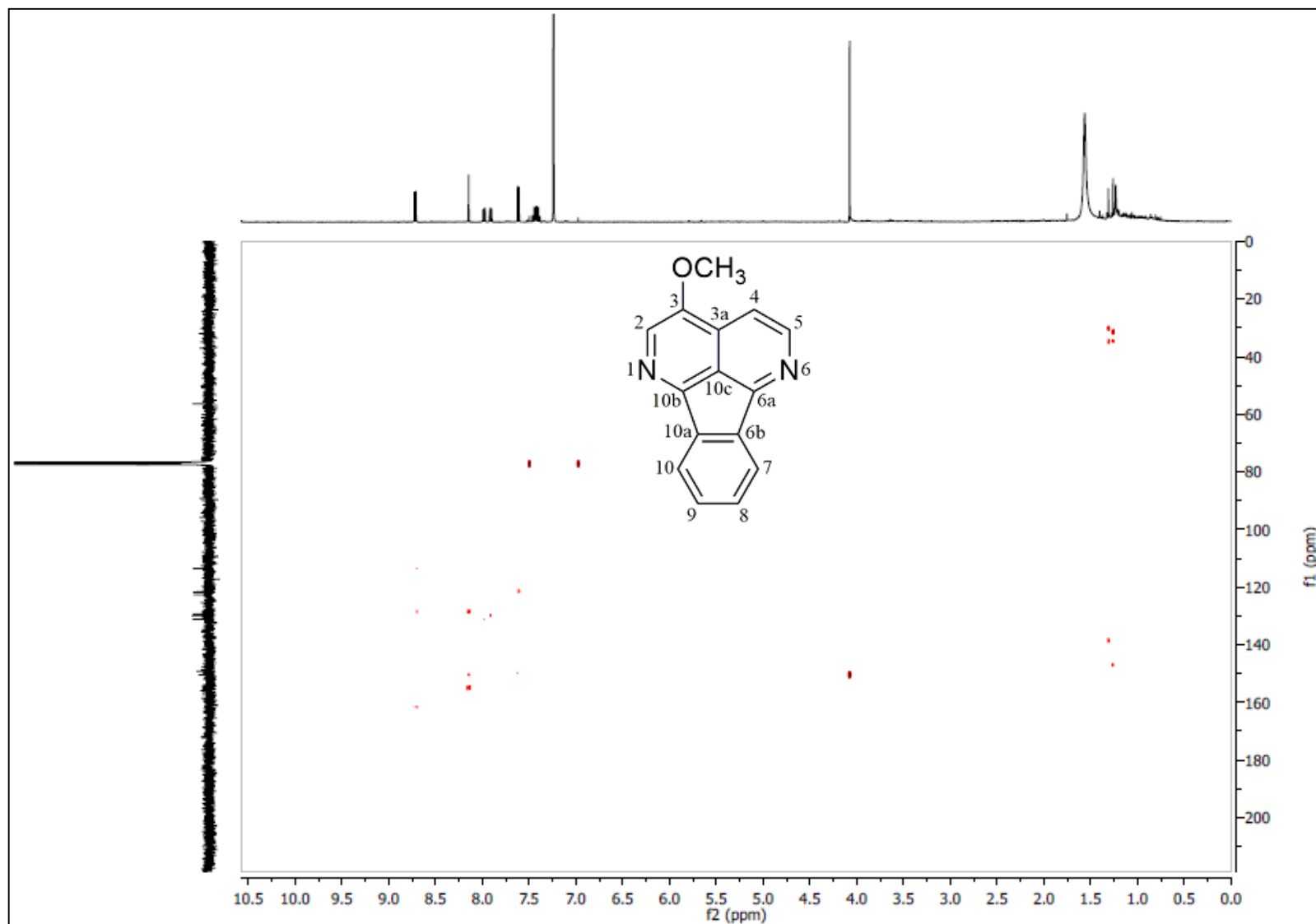


Figura 25S. Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) do composto **4**

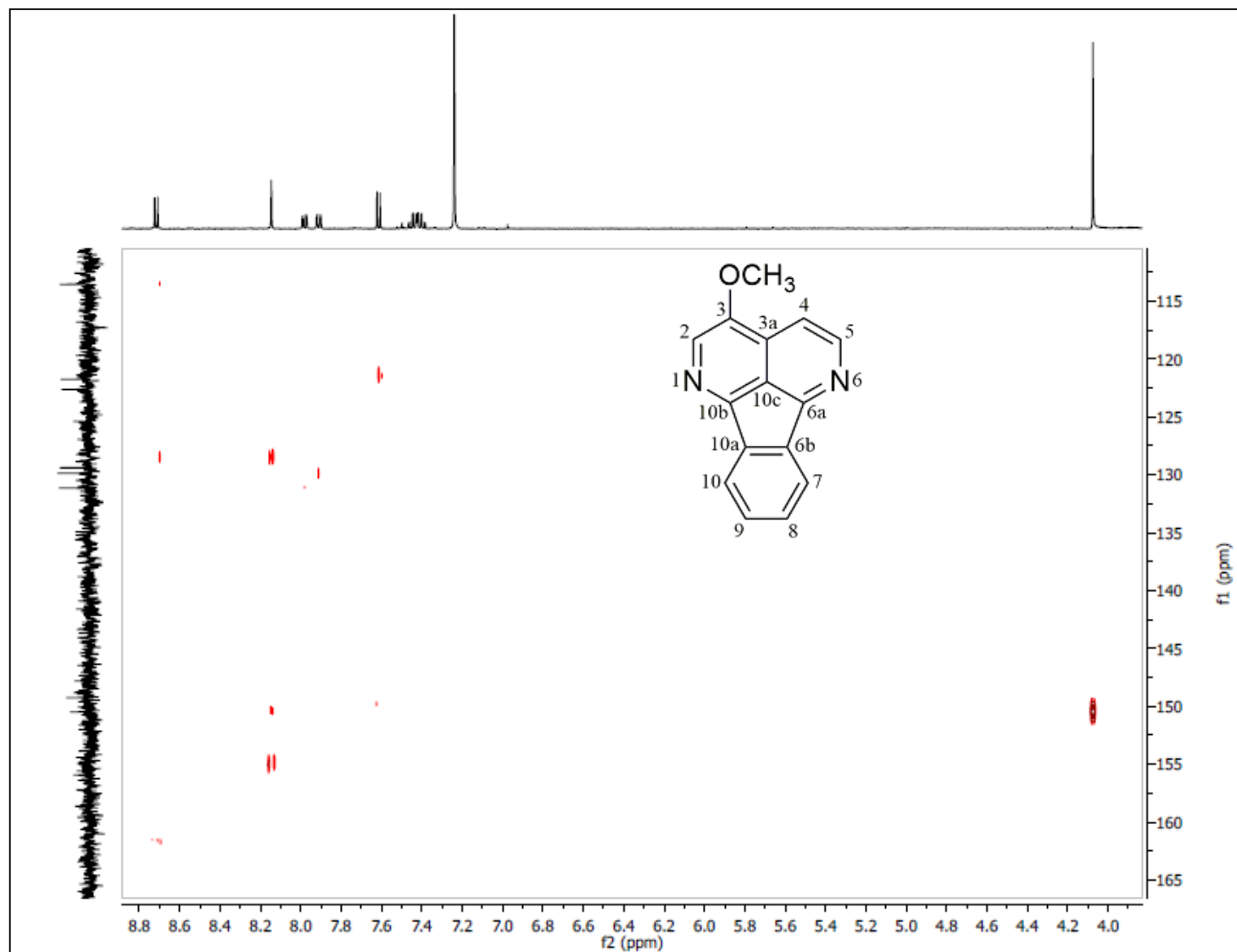


Figura 26S. Expansão do espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) do composto **4**

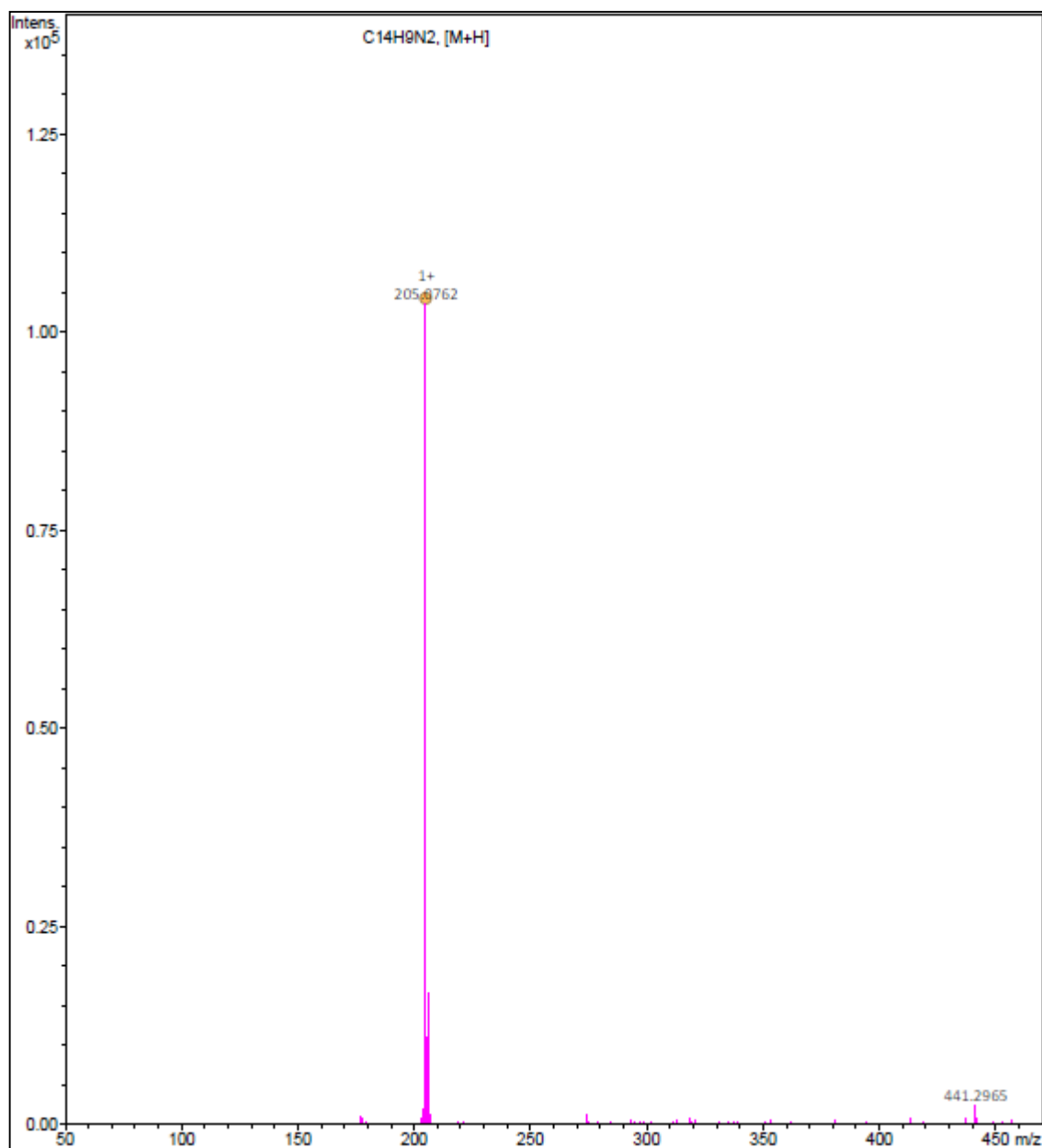


Figura 27S. Espectro de EMAR-IES do composto **5**

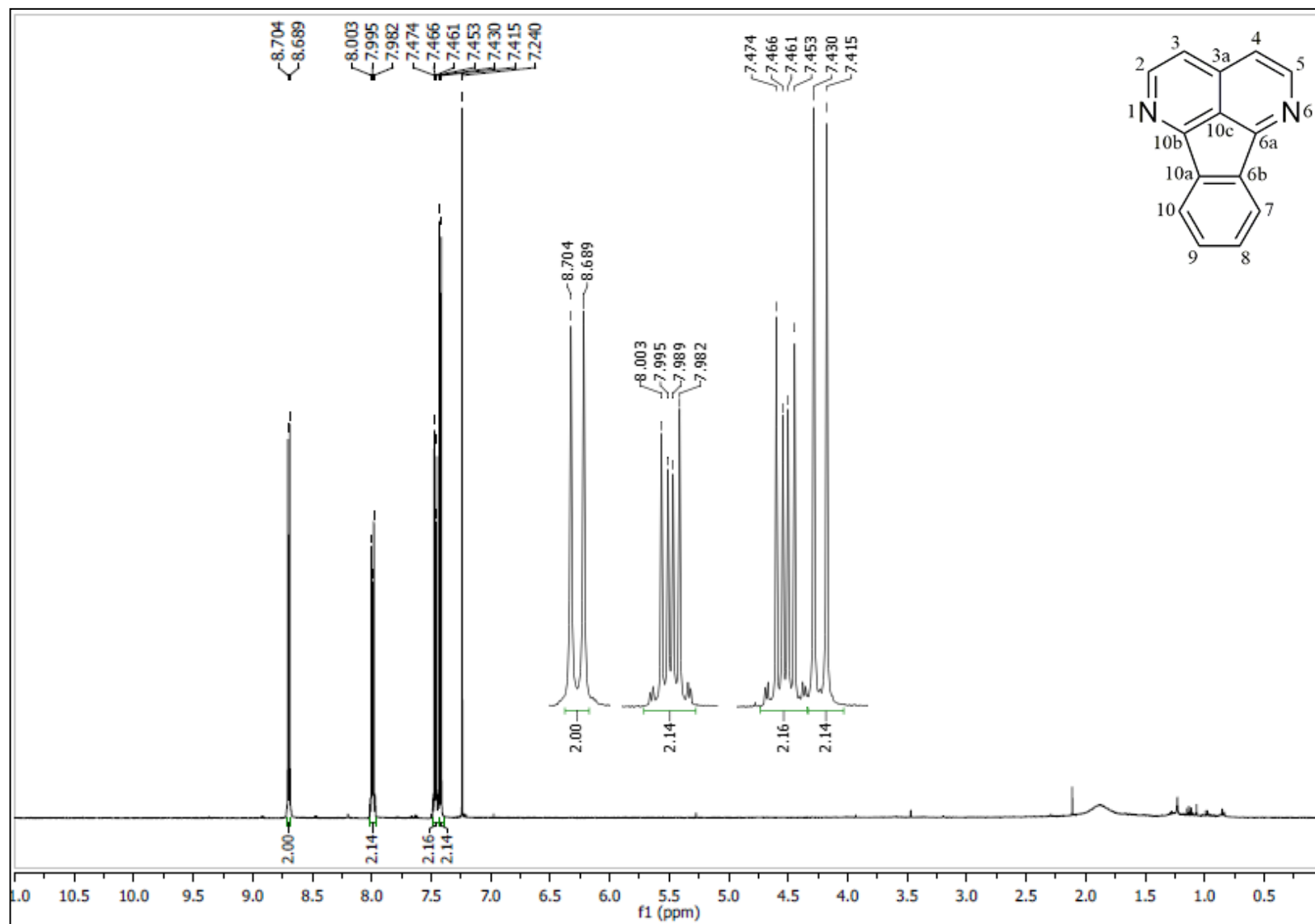


Figura 28S. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **5**

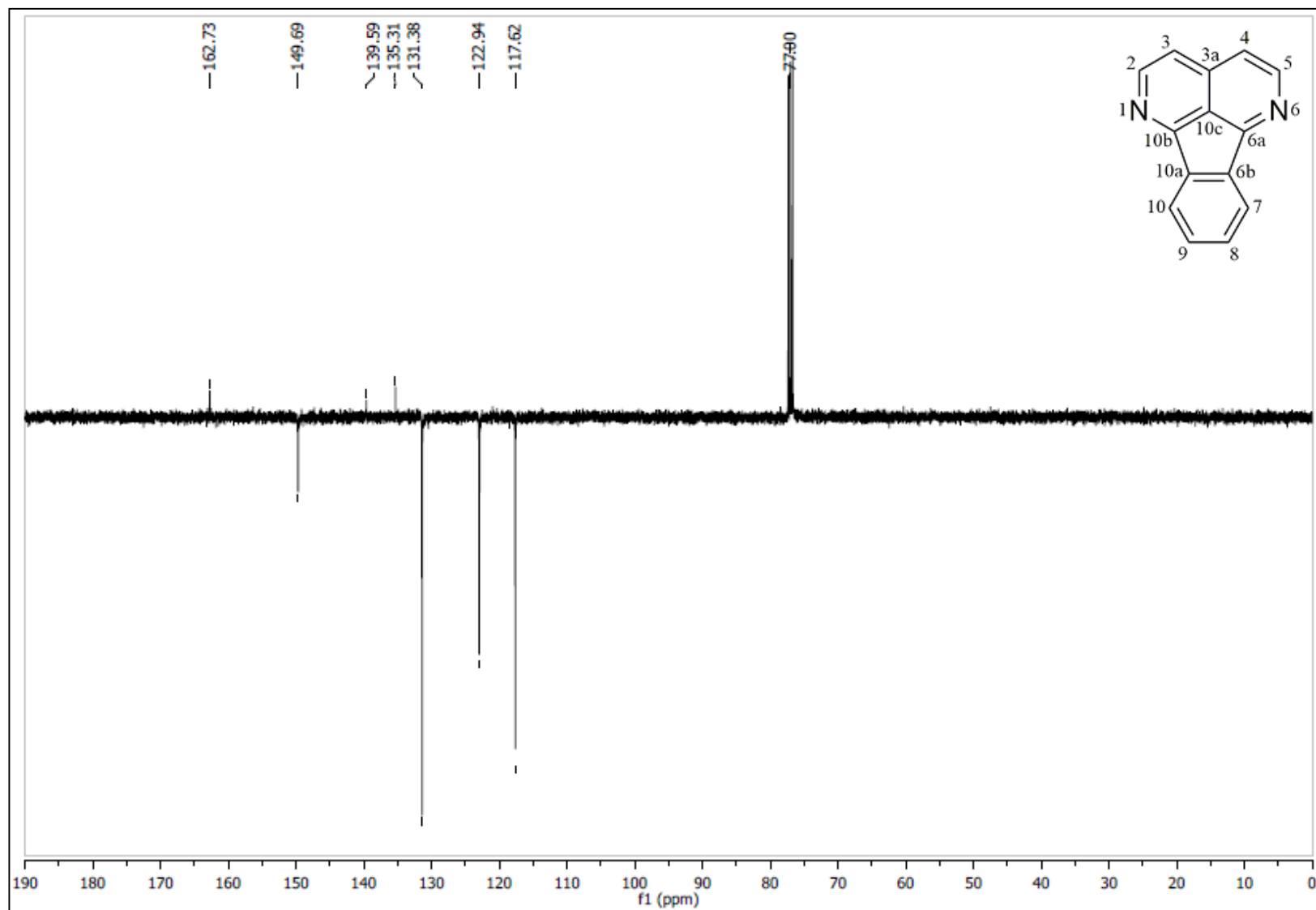


Figura 29S. Espectro de RMN de ^{13}C (APT, 100 MHz, CDCl_3) do composto **5**

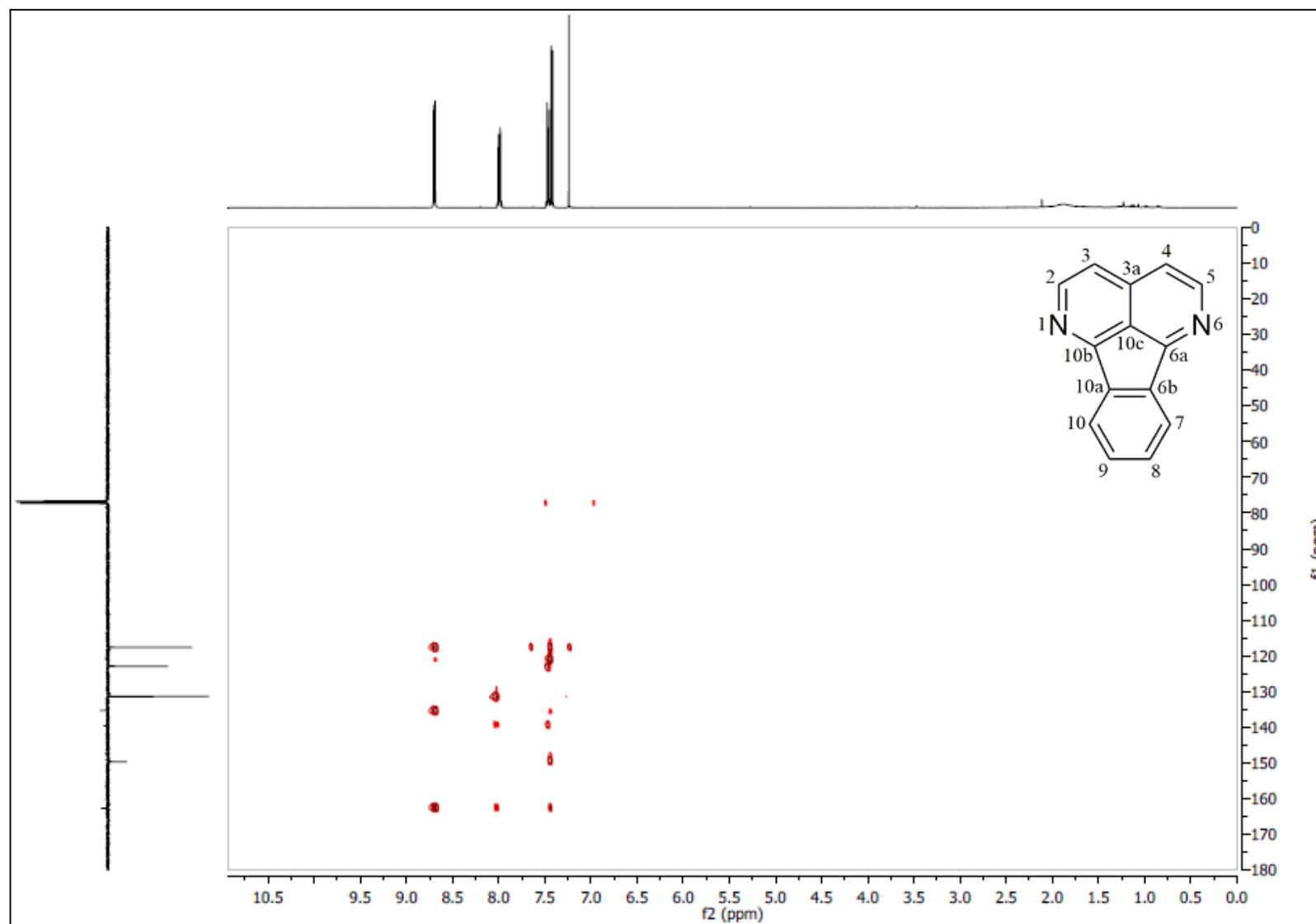


Figura 30S. Espectro HMBC (400 e 100 MHz, CDCl_3) do composto **5**

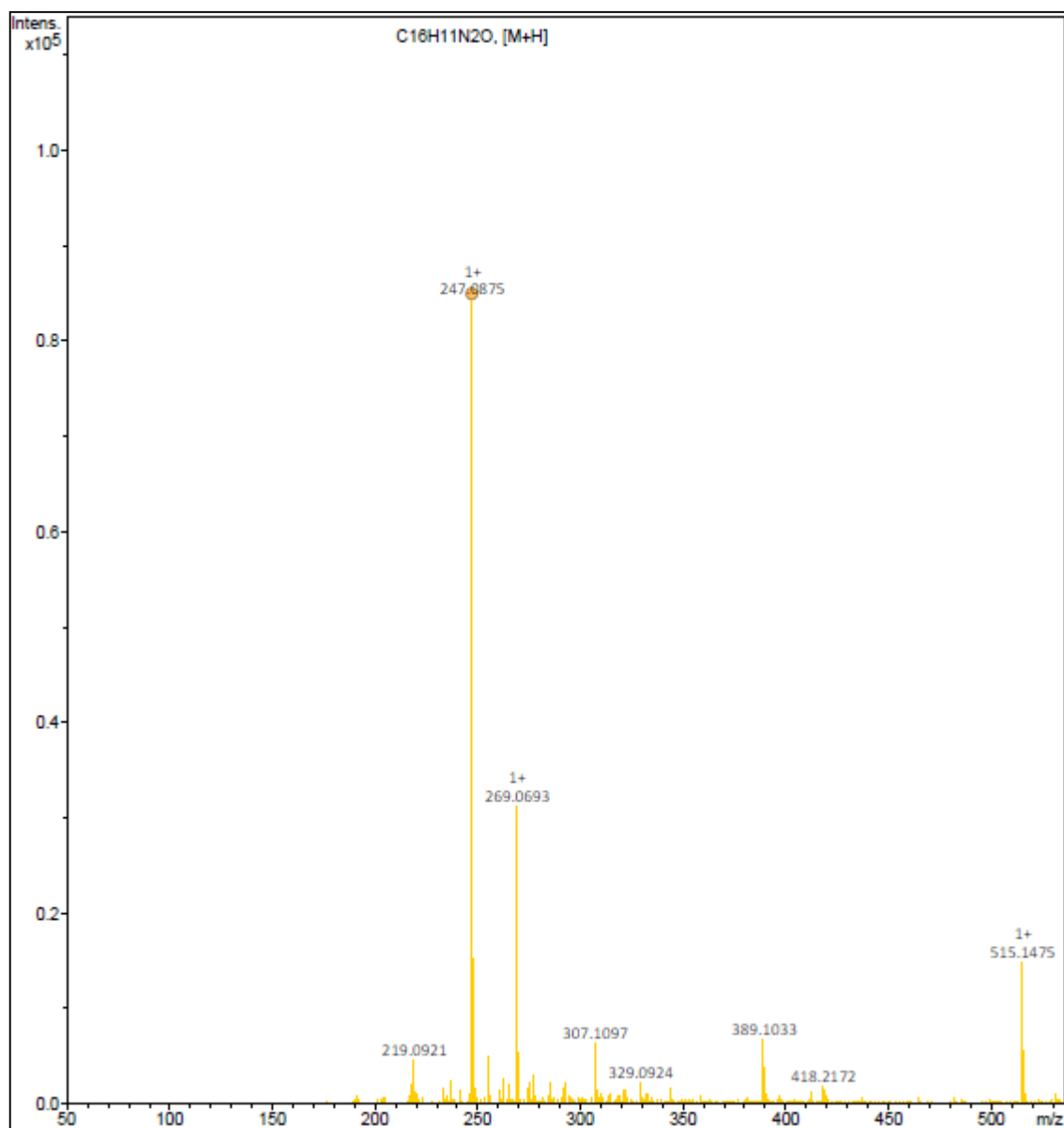


Figura 31S. Espectro de EMAR-IES do composto **6**

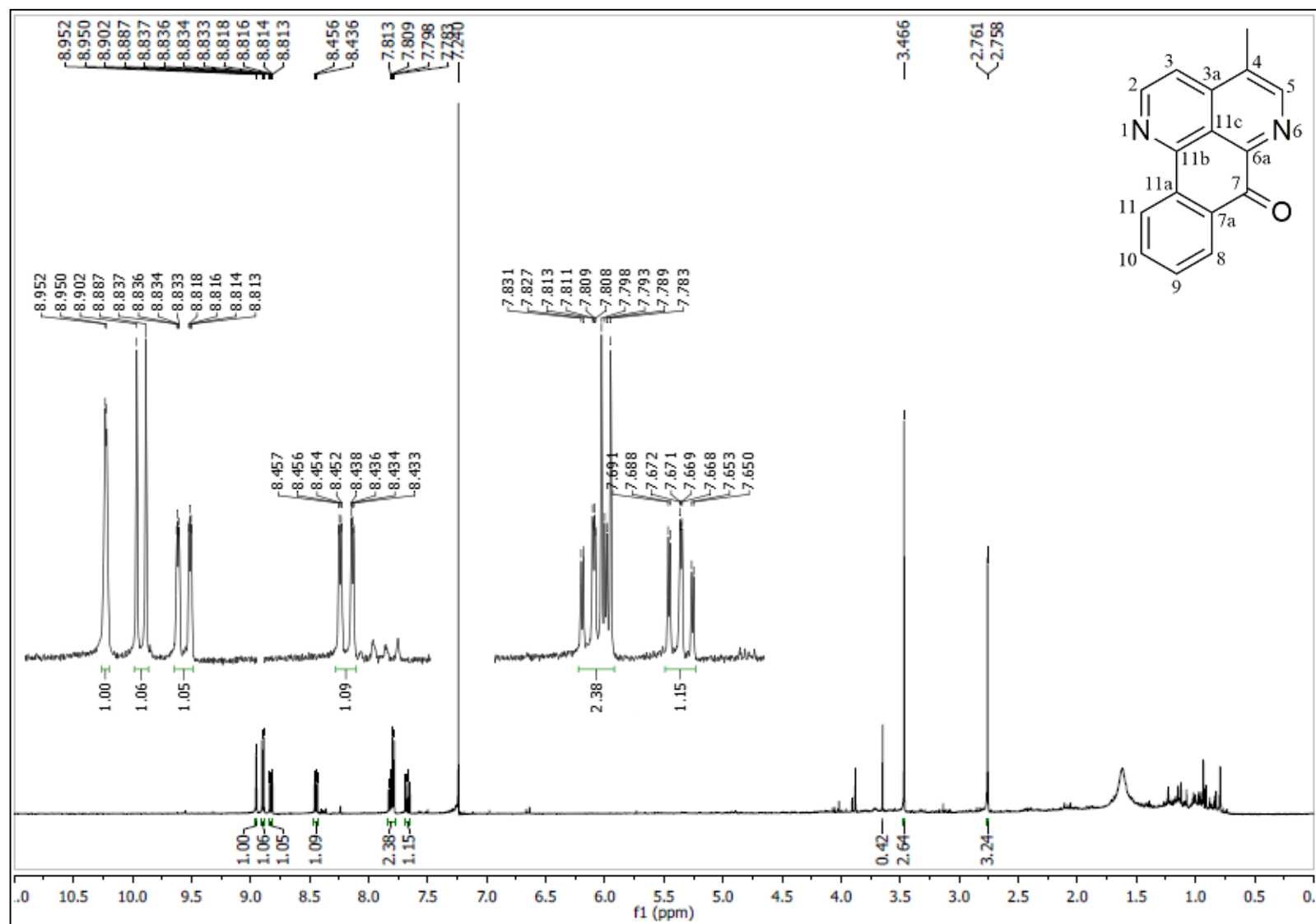


Figura 32S. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do composto **6**

CAPÍTULO 3

**Dolichocarpols A-F, Unprecedented Macrocyclic Humulene-Type
Sesquiterpenoids from *Anaxagorea dolichocarpa***

Artigo publicado on-line em 02 de junho de 2020 na ACS Omega

ISSN 2470-1343 (versão online)

Fator de Impacto 2,87 (2019), Qualis CAPES A3

Disponível em <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c00690>

Dolichocarpols A-F, Unprecedented Macrocyclic Humulene-Type Sesquiterpenoids from *Anaxagorea dolichocarpa*

Kaio Aragão Sales,[†] Anderson Angel Vieira Pinheiro,[†] Diego Igor Alves Fernandes de Araújo,[†] Lucas Silva Abreu,[†] Rodrigo Silva de Andrade,[†] Maria de Fátima Agra,[‡] Marianna Vieira Sobral,[†] Rafael Carlos Ferreira,[†] Raimundo Braz-Filho,[§] Marcus Tullius Scotti,[†] Josean Fachine Tavares,^{†*} and Marcelo Sobral da Silva.[†]

[†]Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

[‡]Biotechnology Department, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

[§]Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil

ABSTRACT: Six sesquiterpenoids with unprecedented macrocyclic humulene-type structures, namely dolichocarpols A–E (**1–5**) with ether-bridged bicyclic rings between C-10 and C-2, C-10 and C-7, C-10 and C-6 (x2) and C-6 and C-3, and dolichocarpol F (**6**) cyclized between C-7 and C-2 and with an ether bridge between C-10 and C-3 were isolated from *Anaxagorea dolichocarpa* roots. The structures of the compounds were elucidated by NMR, MS and IR data. Absolute configurations of compounds **1–3** and **6** were established on the basis of data from electronic circular dichroism whereas relative configuration of compounds **4** and **5** were suggested by NOESY spectrum. In addition, a putative biosynthetic pathway of the compounds is proposed. Furthermore, the cytotoxicity of **3**, **4** and **6** against HCT-116 (human colorectal carcinoma) and L929 (murine fibroblast) was evaluated.

INTRODUCTION

Sesquiterpenoids are considered the most diverse group of terpenoids, containing a large variety of chemical structures which present different forms of derivation and cyclization from farnesyl diphosphate (FPP).^{1,2} The humulene-type, an eleven-membered macrocyclic sesquiterpenoid, is broadly found in plants and previous reports have demonstrated various kinds of biological activities such as anti-tumor, anti-inflammatory, antibacterial, antiviral, and other bioactivities.^{3–5}

The genus *Anaxagorea* (Annonaceae) comprises 30 species distributed in the Neotropics and tropical Asia.⁶ Previous phytochemical studies with plants of this genus revealed the presence of xanthenes, flavonoids,^{7–9} neolignans,¹⁰ terpenoids and alkaloids,^{11–13} some of them exhibiting remarkable biological activities. The analysis of the essential oil from the leaves of *A. brevipes* has revealed the presence of mono- and sesquiterpenes such as α -, β - and γ -eudesmol, guaiaol and caryophyllene oxide. In addition, its biological evaluation showed antimicrobial activity against gram-positive bacteria and yeast, and antiproliferative activity against breast, lung and prostate cancer cell lines.¹¹ An interesting sesquiterpene called nordine besides copryrine alkaloids have been isolated from *A. javanica*, and some of these compounds have been assayed for nitric oxide (NO) inhibition.¹³ *Anaxagorea dolichocarpa*, widely distributed in South America,¹⁴ is found in Brazil mainly in the North and Northeast regions.¹⁵ Previous works exploring different parts of this plant reported the isolation of aporphine and azaphenanthrene alkaloids,^{16,17} the identification of mono and sesquiterpenes,^{12,18} the phenolic quantification and determination of antioxidant activity,¹⁹ along with a phytochemical screening and cytotoxicity evaluation of its extract.²⁰

The gradual emergence of active agents derived from plant kingdom into the fight against cancer has gained importance in the last decade.²¹ These compounds have the potential to be harnessed for preventative strategies, standalone treatments or complementary therapeutics in combination with traditional pharmacological interventions.²² In addition, literature have shown exciting data with respect to potential of natural compounds and their analogues in cancer prevention and treatment.²³

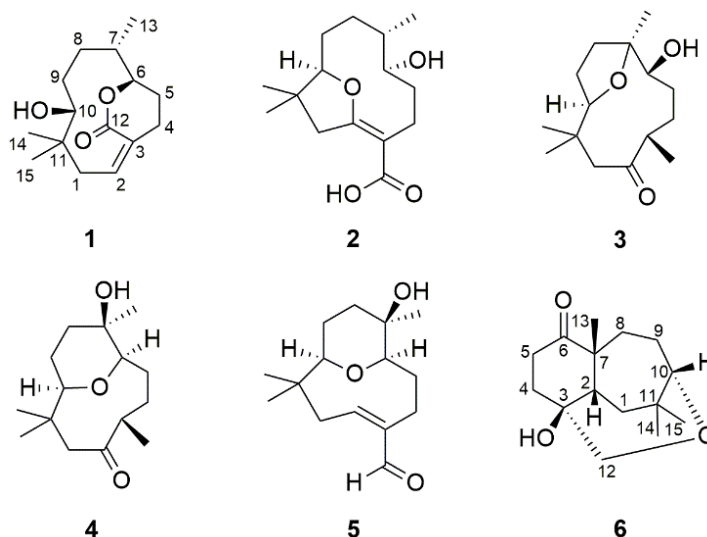
In a continuing effort to isolate active compounds from plants in Brazil's semi-arid area and motivated by the promising bioactivities and diversity of sesquiterpenoids structures, the ethanol extract of *A. dolichocarpa* roots was investigated. Thus, we

describe here the isolation and structural elucidation of six humulene-type sesquiterpenoids (**1-6**). Furthermore, the compounds **3**, **4** and **6** were tested for cytotoxicity.

RESULTS AND DISCUSSION

The roots of *A. dolichocarpa* were dried and extracted with ethanol three times at room temperature. The ethanolic extract was suspended in MeOH-H₂O (7:3) and sequentially partitioned with *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate (EtOAc). The *n*-hexane and chloroform-soluble phases were fractionated by silica gel chromatography column and medium pressure liquid chromatography, respectively. The obtained fractions were then purified by preparative HPLC to yield the unprecedented macrocyclic humulene-type sesquiterpenoids dolichocarpols A (**1**) and E (**5**) from hexane phase and dolichocarpols B-D (**1-4**) and F (**6**) from chloroform phase. The structures were proposed after 1D and 2D NMR, IR, HRESIMS, ESIMS/MS and experimental and calculated electronic circular dichroism (ECD) data analysis.

Chart 1. Chemical structures of isolated compounds **1-6** from roots of *A. dolichocarpa*



Compound **1** was isolated as a colorless oil. Its IR spectrum showed a hydroxyl group (3466 cm^{-1}) and a carbonyl group (1706 cm^{-1}). The molecular formula was determined as $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$ by HRESIMS based on the ion at m/z 275.1614 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$, 275.1618, $\Delta = 1.2\text{ ppm}$), corresponding to four indices of hydrogen deficiency. Of these, the ^{13}C NMR and DEPT spectrum of **1** showed that one was associated with an olefinic group (δ_{C} 134.3, 133.2) and another with a carbonyl group (δ_{C} 168.8). Additionally, the spectrum showed signals assigned to two oxygenated carbons (δ_{C} 83.2, 82.3), one non-hydrogenated carbon (δ_{C} 39.3), one methine carbon (δ_{C} 37.7), five methylene carbons (δ_{C} 40.2, 31.7, 28.9, 27.3, 22.8) and three methyl carbons (δ_{C} 25.9, 22.0, 20.4) (Table 1). In the ^1H NMR spectrum, methyl groups could be inferred from two signals for tertiary methyl protons at δ_{H} 1.08 (s) and 0.82 (s) and one secondary methyl at 0.81 (d, $J = 6.4\text{ Hz}$), an olefinic proton at δ_{H} 5.84 (m) and two oxymethine proton at δ_{H} 4.58 (ddd, $J = 9.2, 6.0, 2.0\text{ Hz}$) and 3.10 (dl, $J = 8.4\text{ Hz}$) (Table 2). The comparison of these 1D NMR spectral data with those of nordine isolated from *A. javanica*,¹³ suggested that compound **1** was a macrocyclic humulene-type sesquiterpenoid as shown in Chart 1. In the HMBC spectrum, the correlations observed of H-10 with C-14, C-15, C-1, C-8 and C-9 and of H₂-1 with C-2 and C-3 localized a $\Delta^{2(3)}$ olefinic double bond (Figure 1). Moreover, correlations of H-6 with C-7, C-8, C-13 and C-12 and of H-2 and H₂-4 with C-3 and C-12, in combination with COSY correlations between H-8, H-7 and H-6 indicated an unusual ester fusion between C-6 and C-3. Also in the COSY spectrum, the correlations between H₂-1, H-2 and H₂-4, H₂-5, established the two pairs of allylic protons to C-1 and C-4. The ESIMS/MS spectrum of **1** exhibited ion fragments at m/z 257 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{Na}]^+$ and 217 $[\text{M} - \text{C}_3\text{H}_6\text{O} + \text{Na}]^+$. The relative configuration was deduced from NOESY experiments. The correlation between H-10, H₃-14 and H-2 indicated that these protons are cofacial adopting an α -orientation and assigning an β -orientation of OH-10 (Figure 2). In addition, the correlation from H-2 to H₃-14 suggested the *E*-configuration of the $\Delta^{2(3)}$ double bond, which is in agreement with an X-ray study that assigns *E*-configuration to $\Delta^{2(3)}$ double bond of humulene skeleton.^{24,25} The negative specific rotation ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} - 41$, CHCl_3) when compared with other humulenes suggests the α -orientation to H₃-13 in this type of sesquiterpenoid and the NOESY cross-peak from H₃-13 to H-6 revealed they are cofacial with an α -orientation.²⁶ The ECD experimental spectra showed a negative Cotton effect at λ 234 nm ($\Delta\epsilon -0.89$) and a positive one at λ 255 nm ($\Delta\epsilon +0.43$), thus the comparison of these with the calculated data allowed to determine the

absolute configuration of **1** as (6*R*,7*S*,10*R*) (Figure 3). According to these lines of evidence, the structure of **1** was defined as humulene-type sesquiterpenoid named dolichocarpol A.

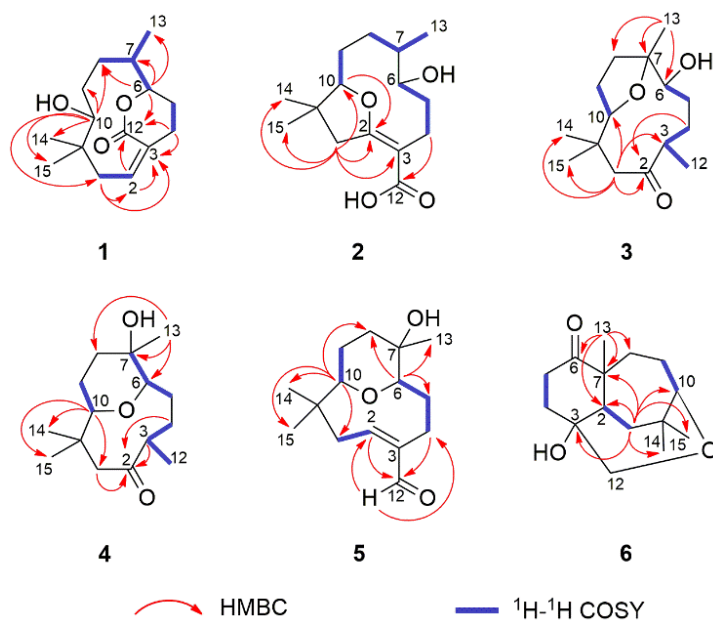


Figure 1. Key HMBC and ^1H - ^1H COSY correlations of compounds **1**–**6**

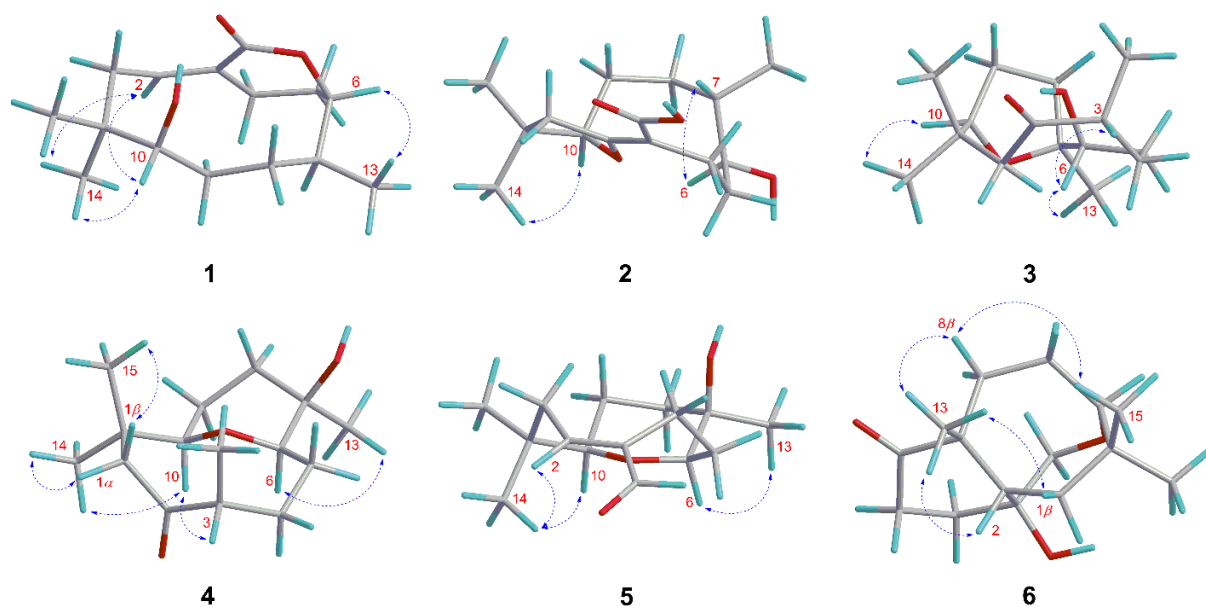


Figure 2. Key ^1H - ^1H NOESY correlations of compounds **1**–**6**

Compound **2** was obtained as a colorless oil. Its IR spectrum showed a hydroxyl group (3401 cm^{-1}) and a carbonyl group (1671 cm^{-1}). The molecular formula was established as $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4$ by HRESIMS m/z 291.1566 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_4\text{Na}$, 291.1567, $\Delta = 0.1\text{ ppm}$), indicating four indices of hydrogen deficiency. The ^1H NMR spectrum of **2** were similar to those of **1**, expect for the absence of olefinic proton, thus still having three methyl groups and five methylene groups, besides two oxymethine protons and one methine proton (Table 2). The ^{13}C NMR spectrum ($125\text{ MHz}/\text{CDCl}_3$), exhibited 12 carbon resonances, corresponding to two oxygenated carbons (δ_{C} 92.3, 67.5), one non-hydrogenated carbon (δ_{C} 40.0), one methine carbon (δ_{C} 31.7), five methylene carbons (δ_{C} 45.3, 33.6, 32.2, 26.1, 22.2) and three methyl carbons (δ_{C} 29.2, 21.9, 14.2) (Table 1). Other three non-hydrogenated carbons (δ_{C} 173.0, 170.6, 101.8) were detected in 200 MHz (CDCl_3) ^{13}C NMR spectrum (Figure S21, Supporting Information). The HSQC spectrum revealed the chemical shifts at δ_{C} 173.0, 101.8 and 170.6 were observed instead of those at δ_{C} 134.3, 133.2 and 168.8 assigned to C-2, C-3 and C-12 of compound **1**, respectively, and a double bond with the ether bridge between C-10 and C-2. In the ^1H and ^{13}C NMR spectra of **2** (Tables 1 and 2), the upfield chemical shifts observed for H-10 and C-10 and a downfield chemical shifts of H-6 and C-6 supported the opening of the ester bridge C-6 and C-3 to form a C-6 hydroxyl. Similarly, the absence of H-2 and C-2 and a downfield chemical shifts for C-2, C-3 and C-12, suggested an ether bridge between C-10 and C-2. In the HMBC spectrum, the correlation from H₂-1 to C-15, C-14, C-10, C-3 and C-2, together with the correlation from H-10 to C-2 and from H₂-4 to C-12 corroborated the connectivity between C-10 to C-2 (Figure 1). In the ^1H - ^1H COSY spectrum of **2**, as expected, the correlation H-2/H₂-1 was not displayed, leaving those between H-10 and H₂-9, between H-8, H-7 and H₃-13, and between H-6, H₂-5 and H₂-4. The ESIMS/MS spectrum of **2** exhibited ion fragments at m/z 251 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$, m/z 233 $[\text{M} - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$, 215 $[\text{M} - 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}]^+$ and 205 $[\text{M} - \text{H}_2\text{O} - \text{HCOOH} + \text{H}]^+$ compatible with a carboxyl group. The insertion of this group at C-3 is compatible with the chemical shift attributed to C-2. The NOESY correlation observed between H-10 and H₃-14 indicated an α -orientation to these protons (Figure 2). The multiplicity of the H-6 signal (dd) together with the absence of the ^1H - ^1H COSY correlation with H-7 suggested that the dihedral angle between these protons is close to 90° . Thus, considering this evidence, the NOESY correlation between H-6 and H-7 indicated that these protons are cofacial with β -orientation, so OH-6 and H₃-13 adopted an α -orientation, with a negative specific

rotation ($[\alpha]^{25}_{\text{D}}$ -15, CHCl_3). The (6*S*,7*S*,10*R*) absolute configuration of **2** was determined by ECD experimental, with positive Cotton effects at λ 201 nm ($\Delta\epsilon$ +1.55) and λ 243 nm ($\Delta\epsilon$ +1.92), and calculated data (Figure 3). Therefore, the structure of compound **2**, named dolichocarpol B, was established as shown.

Table 1. ^{13}C (100 and 125 MHz) NMR Spectroscopic Data for Compounds **1–6** in CDCl_3

n°	1	2^a	3	4	5	6
1	40.2	45.3	47.1	55.4	39.4	33.6
2	134.3	173.0 ^b	213.5	213.2	152.8	52.7
3	133.2	101.8 ^b	47.0	49.4	147.8	74.1
4	28.9	22.2	30.6	32.2	18.1	33.0
5	22.8	33.6	37.5	26.4	26.3	32.9
6	82.3	67.5	75.5	84.6	83.5	215.9
7	37.7	31.7	84.0	69.4	69.9	50.5
8	31.7	32.2	27.7	32.8	34.3	29.9
9	27.3	26.1	29.8	20.9	20.6	23.7
10	83.2	92.3	85.6	73.4	72.7	82.6
11	39.3	40.0	39.6	39.9	36.1	39.5
12	168.8	170.6 ^b	19.3	20.7	195.7	68.3
13	20.4	14.2	20.9	24.7	23.7	30.6
14	25.9	29.2	27.7	27.3	23.7	33.2
15	22.0	21.9	27.6	21.1	22.2	29.2

^a ^{13}C NMR (125 MHz). ^b ^{13}C NMR (200 MHz).

Table 2. ¹H (400 and 500 MHz) NMR Spectroscopic Data for Compounds **1–6** in CDCl₃

n ^o	1	2^a	3	4	5	6
1	2.88, td (13.6, 0.8) 1.96, m	2.97, d (19.5) 2.76, d (19.5)	2.52, d (12.4) 1.84, d (12.4)	2.34, dd (10.8) 1.99, dd (10.8)	3.12, t (11.2) 1.88, dd (11.2, 7.2)	1.91, dd (16.0, 4.8) 1.66, dd (16.0, 2.8)
2	5.84, m				6.52, dd (10.8, 7.2)	2.29, m
3			2.74, m	2.71, dd (9.6, 6.8)		
4	2.51, m 2.51, m	2.39, m 2.39, m	1.89, m 1.37, m	1.86, m 1.49, m	2.61, dd (10.8, 1.2) 2.20, dd (13.2, 8.0)	2.01, dt (13.2, 4.0) 1.74, ddd (13.6, 10.8, 5.6)
5	2.18, m 1.99, m	1.62, m 1.62, m	2.05, m 1.62, m	1.77, m 1.53, m	1.85, m 1.52, m	2.80, ddd (16.4, 13.2, 5.2) 2.29, m
6	4.58, ddd (9.2, 6.0, 2.0)	3.57, dd (11.0, 4.0)	3.50, dd (5.2, 2.4)	3.52, m	3.58, dd (12.4, 5.6)	
7	2.22, m	2.56, m				
8	1.85, m 1.34, m	1.57, m 1.57, m	1.73, m 1.62, m	1.69, m 1.48, m	1.69, m 1.56, m	2.29, m 1.45, ddd (14.8, 12.4, 7.6)
9	1.34, m 1.19, m	1.57, m 1.45	2.09, m 1.21, m	1.53, m 1.40, m	1.49, m 1.30, m	1.93-1.91, m
10	3.10, dl (8.4)	4.07, d (12.0)	3.48, dd (6.8, 4.0)	3.68, m	2.90, dd (11.2, 1.6)	3.52, dd (6.4, 2.4)
11						
12			0.96, d (7.2)	0.96, d (6.8)	9.37, d (0.8)	3.66, d (14.0) 3.26, dd (14.0, 1.6)
13	0.81, d (6.4)	0.84, d (7.0)	1.09, s	0.99, s	0.98, s	1.09, s
14	1.08, s	1.09, s	1.24, s	0.91, s	0.84, s	1.23, s
15	0.82, s	1.07, s	0.85, s	1.03, s	1.00, s	1.05, s

^a ¹H NMR (500 MHz)

Compound **3** was also purified as a colorless oil. The IR spectrum showed a hydroxyl group (3458 cm^{-1}) and a carbonyl group (1703 cm^{-1}). The molecular formula of dolichocarpol C (**3**) was deduced as $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$ by HRESIMS at m/z 277.1773 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}$, 277.1774, $\Delta = 0.3\text{ ppm}$), differing from compound **1** by the absence of the double bond. The 1D NMR data of compound **3** were similar to those of **1** and **2**, but with an additional methyl carbon (δ_{C} 19.3) and a ketone carbonyl group (δ_{C} 213.5) instead of carbonyl ester or acid at C-3 (Tables 1 and 2). In the COSY spectrum, the combination of vicinal homonuclear coupling correlations observed between H-3, H₂-4 and H₃-12, between H-10 and H-9 and between H-6 and H₂-5 indicated an alteration in the junction of carbon skeleton, compatible with a new bicyclic fusion, and defined the chemical shifts of the methine proton H-3 and oxymethine protons H-10 and H-6 (Figure 1). The HMBC cross-peaks correlation from H₂-1 to C-15, C-14, C-10 and C-3 and from H₃-12, H₂-4 and H₂-1 to C-2 established that the ether bridge in **3** continued through C-10, but unlike the previous compounds. Additionally, the correlation from H₃-13 with C-8, C-7 and C-6 defined the ether bridge between C-10 and C-7. Compound **3** was acetylated and only one acetate was obtained at C-6 (δ_{H} 4.61, dd, $J = 5.2, 2.4$, H-6). The HMBC spectrum of acetylated **3** (Figure S21, Supporting Information), showed correlations from H-6 to C-13, C-8, C-7, C-5 and C-4. This finding confirmed the bridge between C-10 and C-7, and the chemical shift at δ_{C} 84.0 was unequivocally assigned to C-7. ESIMS/MS spectrum exhibited ion fragments at m/z 237 [$\text{M} - \text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$, 219 [$\text{M} - 2\text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$ and 201 [$\text{M} - 3\text{H}_2\text{O} + \text{H}$] $^+$. The analysis of specific rotation ($[\alpha]_{\text{D}}^{25} -20$, CHCl_3), ^1H NMR and NOESY spectra of **3** recorded in both chloroform and pyridine defined the correlations between H-3, H-6 and H₃-13 and between H-10 and H₃-14 all with the same α -orientation, while H₃-12 and OH-6 adopted an β -orientation (Figure 2). The absolute configuration was established as (3*R*,6*R*,7*S*,10*R*) by comparing a negative Cotton effect at λ 221 nm ($\Delta\epsilon -0.22$) and a positive one at λ 287 nm ($\Delta\epsilon +0.11$) from experimental ECD with the calculated spectra. In view of the spectral data, including those of the acetylated derivative, the structure of **3** was determined as described and named dolichocarpol C.

Compound **4** was isolated as a colorless oil. Its IR spectrum showed a hydroxyl group (3461 cm^{-1}) and a carbonyl group (1705 cm^{-1}). The $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3$ molecular formula was determined by HRESIMS data, m/z 277.1772 [$\text{M} + \text{Na}$] $^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{26}\text{O}_3\text{Na}$, 277.1774, $\Delta = 0.6\text{ ppm}$). The ^1H and ^{13}C NMR data of **4** (Tables 1 and 2) were similar

to those of **3**, including a carbonyl (δ_c 213.2) and two oxymethine carbons (δ_c 73.4, 84.6). However, a significant alteration occurred at the quaternary carbinolic carbon C-7 (δ_c 69.4, Δ + 14.4 ppm). The HMBC spectrum displayed identical correlations from H₂-1, H-3 and H-4 to C-2, as in **3** (Figure 1). The cross-peaks from H-10 to C-15, C-14 and C-1 and from H₃-13 to C-8, C-7 and C-6, combined with vicinal homonuclear coupling correlations in COSY between H-10 and H₂-9, between H-7, H-6 and H₂-5, and between H-3, H₂-4 and H₃-12 suggested another type of fusion in the carbon skeleton of **4**. Analysis of the HSQC spectrum allowed an unequivocal establishment of the chemical shift of C-10 (δ_c 73.4) and C-6 (δ_c 84.6). Thus, the changes in the chemical shifts were compatible with an ether bridge between C-10 and C-6 instead of C-10 and C-7 (Tables 1 and 2). As expected, compound **4** could not be acetylated. The ESIMS/MS spectrum of **4** exhibited ion fragments at m/z 237 [$M - H_2O + H$]⁺, 219 [$M - 2H_2O + H$]⁺ and 201 [$M - 3H_2O + H$]⁺. The negative specific rotation ($[\alpha]^{25}_D$ -12, CHCl₃) and the NOESY correlations observed from H-10 to H₃-14 and H-3, and from H-14 to H-1 α suggest that these protons are cofacial in the α -orientation, whereas the correlations from H₃-15 to H-1 β indicate β -orientation (Figure 2). Furthermore, the correlation between H-6 and H₃-13 accompanied by previous data from the other compounds suggest the α -orientation for these protons and revealed the relative configuration shown in Figure 2. Thus, the structure of compound **4** was suggested as shown and named dolichocarpol D.

Compound **5** was obtained as a colorless oil. Its IR spectrum showed a hydroxyl group (3321 cm⁻¹) and a carbonyl group (1659 cm⁻¹). The 1D NMR data of compound **5** (Tables 1 and 2) were similar to those of compounds **1**, **2** and **4**, altered by the presence of the formyl proton (δ_H 9.37, d, J = 0.8), as confirmed by HRESIMS at m/z 275.1622 [$M + Na$]⁺ (calcd for C₁₅H₂₄O₃Na, 275.1618, Δ = -1.6 ppm), consistent with a molecular formula of C₁₅H₂₄O₃. The general characteristics observed in the ¹H and ¹³C NMR spectra of **5**, were parallel to those of the previous compounds. 2D NMR – HSQC analysis confirmed the chemical shifts for H-10 (δ_H 2.90, dd, J = 11.2, 1.6 Hz)/C-10 (δ_c 72.7), H-6 (δ_H 3.58, dd, J = 12.4, 5.6 Hz)/C-6 (δ_c 83.5) and H-2 (δ_H 6.52, dd, J = 10.8, 7.2 Hz)/C-2 (δ_c 152.8). Thus, the ether bridge between C-10 and C-6 was maintained. The localization of the double bond in carbons C-2 and C-3 was defined by HMBC, through the identical sequence of the correlation from H-2 and H-4b to C-12 and from H-12 to C-2 and C-4, like in compound **1** (Figure 1). In addition, the cross-peaks from H-10 to C-15, C-14, C-8 and C-1 and from H-6 to C-13, C-8 and C-5

corroborated ether bridge C-10 and C-6. The $^1\text{H} - ^1\text{H}$ COSY spectrum exhibited the vicinal coupling between H-2 and H₂-1, between H-10 and H-9, and between H-6, H-5 and H-4. The negative specific rotation ($[\alpha]^{25}_{\text{D}} -9$, CHCl_3) and NOESY spectrum showed that the α -orientation was maintained for H-2, H-10 and H₃-14 as well as for H₃-13 and H-6, and the relative configuration is shown in Figure 2. From the analysis of the spectral data and comparison with the analogous compounds, the structure of **5** was proposed and named dolichocarpol E.

Compound **6** was isolated as a light brown oil. The IR spectrum showed a hydroxyl group (3444 cm^{-1}) and a carbonyl group (1701 cm^{-1}). Its molecular formula was determined as $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3$ by HRESIMS analysis on the basis of ion m/z 275.1616 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ (calcd for $\text{C}_{15}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{Na}$, 275.1618, $\Delta = 0.8\text{ ppm}$), corresponding to four indices of hydrogen deficiency. Unlike for compounds **1-5**, the ^1H NMR spectrum of **6** exhibited only one oxymethine proton at δ_{H} 3.52 (dd, $J = 6.4, 2.4\text{ Hz}$) and in addition two oxymethylene protons at δ_{H} 3.66 (d, $J = 14.0\text{ Hz}$) and 3.26 (dd, $J = 14.0, 1.6\text{ Hz}$). Besides these, there were one methine proton at δ_{H} 2.29 (m) and three methyl protons at δ_{H} 1.23 (s), δ_{H} 1.09 (s), and 1.05 (s) (Table 1). The ^{13}C NMR and DEPT spectrum showed a carbonyl group (δ_{C} 215.9), three non-hydrogenated carbons including one oxygenated (δ_{C} 74.1, 50.5, 39.5), methylene carbons (δ_{C} 33.6, 33.0, 32.9, 29.9, 23.7) and methyl carbons (δ_{C} 33.2, 30.6, 29.2). The cross-peaks in HMBC from H₃-13 to C-8, C-7, C-6 and C-2, suggested a C-C fusion not found in the other sesquiterpenoids (**1-5**) (Figure 1). Another correlation equally important from H₂-1 to C-15, C-14, C-10, C-7, C-3 and C-2, defined a new fusion between C-7 and C-2. The HSQC spectrum exhibited the correlation from H₃-13 to C-13, indicating its insertion in the quaternary carbon C-7 (δ_{C} 50.5), neighboring the carbonyl carbon. Likewise, the HMBC correlation of H₂-12 with C-10, C-3 and C-2, combined with the sequence of correlations of vicinal homonuclear coupling in COSY between H-10 and H₂-9, between H₂-1 and H-2 and between H₂-4 and H₂-5, established the ether bridge between C-10 and C-3 via methylene carbon C-12. The ESIMS/MS spectrum showed an ion fragment at m/z 215 $[\text{M} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2 + \text{Na}]^+$. The with positive specific rotation ($[\alpha]^{25}_{\text{D}} +10$, CHCl_3) indicates a different orientation for H₃-13 compared to the compounds shown previously. Furthermore the NOESY correlation between H-2, H₃-13, H-8 β , H₃-15 and H-1 β suggested that all the protons were cofacial assigned thus as β -orientation (Figure 2). The Cotton effects observed at λ 219 nm ($\Delta\epsilon -0.18$) and at λ 291 nm ($\Delta\epsilon +0.09$) allowed to establish the absolute configuration of **6** as (2*S*,3*R*,7*R*,10*S*) by the comparison of

that experimental ECD with the calculated data (Figure 3). On the basis of these findings, the structure of compound **6** was defined as a new humulene-type sesquiterpene, named dolichocarpol F.

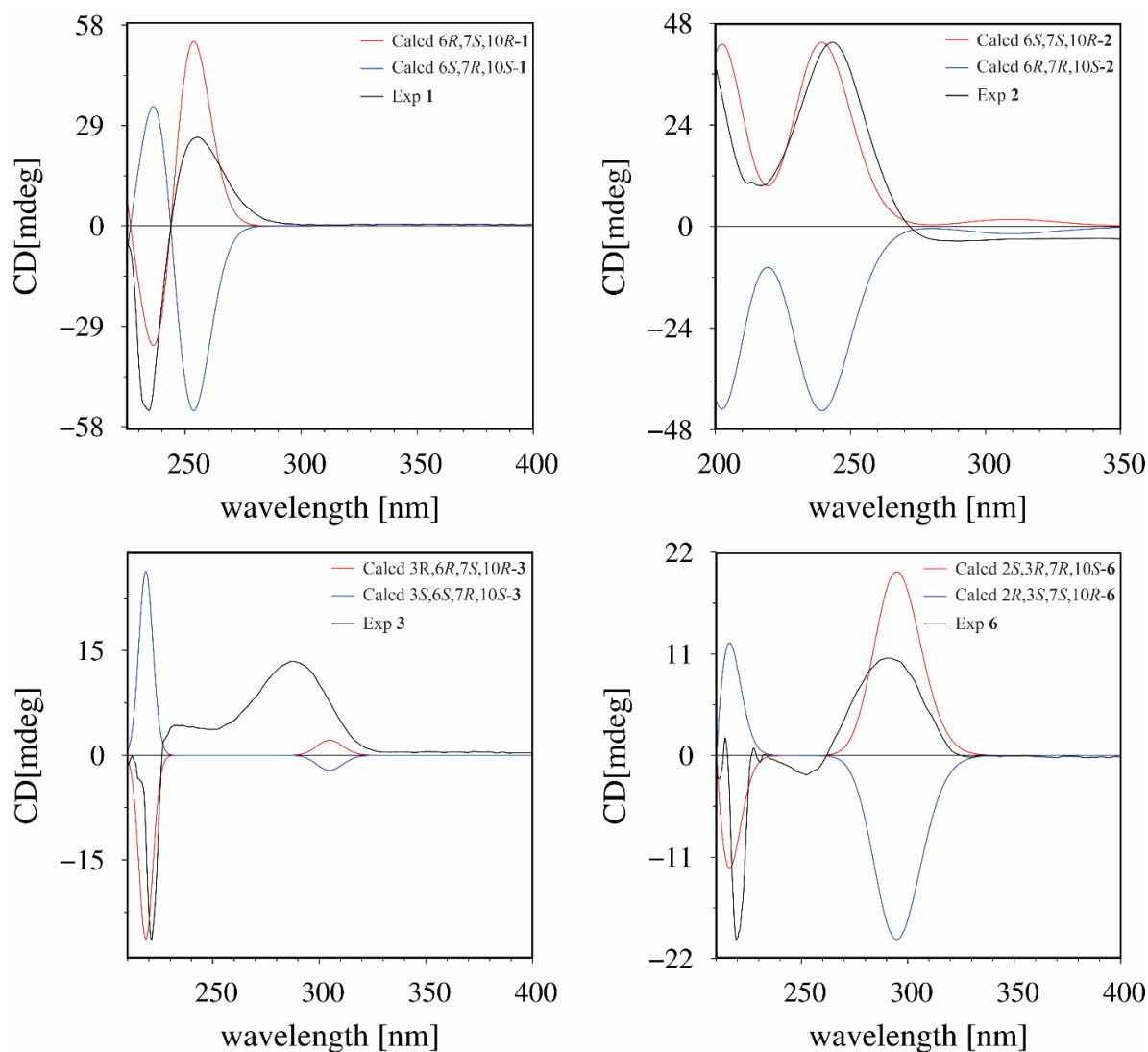


Figure 3. Experimental and calculated ECD spectra of compounds **1–3** and **6**

A putative biosynthetic pathway toward compounds **1–6** is shown in Figure 4. Starting from 10-hydroxyhumula-2*E*,6*E*-diene, oxidations occurred producing the hydroxylated intermediate at C-10 and also the epoxidized intermediate at the double bonds $\Delta^{2,3}$ and $\Delta^{6,7}$. Through successive oxidations and different fusions and cyclizations, compounds **1–6** were produced.

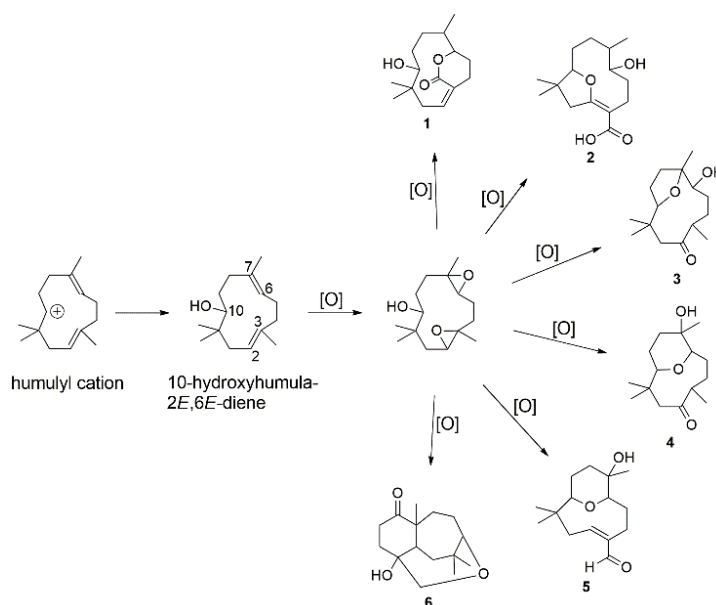


Figure 4. Putative biosynthetic pathway toward compounds **1–6**

The cytotoxicity of the selected sesquiterpenoids (**3**, **4** and **6**) against HCT-116 and L929 cell lines was evaluated. Compound **3** significantly inhibited the proliferation of HCT-116 human colon cancer cells at a concentration of 50 μ M with an inhibitory rate of $26.63 \pm 1.21\%$. No selectivity was observed for **3** toward tumor cells, considering the inhibitory rate against L929 murine fibroblast non-tumor cell line ($27.91 \pm 0.20\%$). Compounds **4** and **6** showed weak cytotoxic effects against HCT-116 cells with inhibitory rates under 20%. Moreover, compound **4** exhibited the highest cytotoxicity against L929 non-tumor cells ($30.76 \pm 3.52\%$).

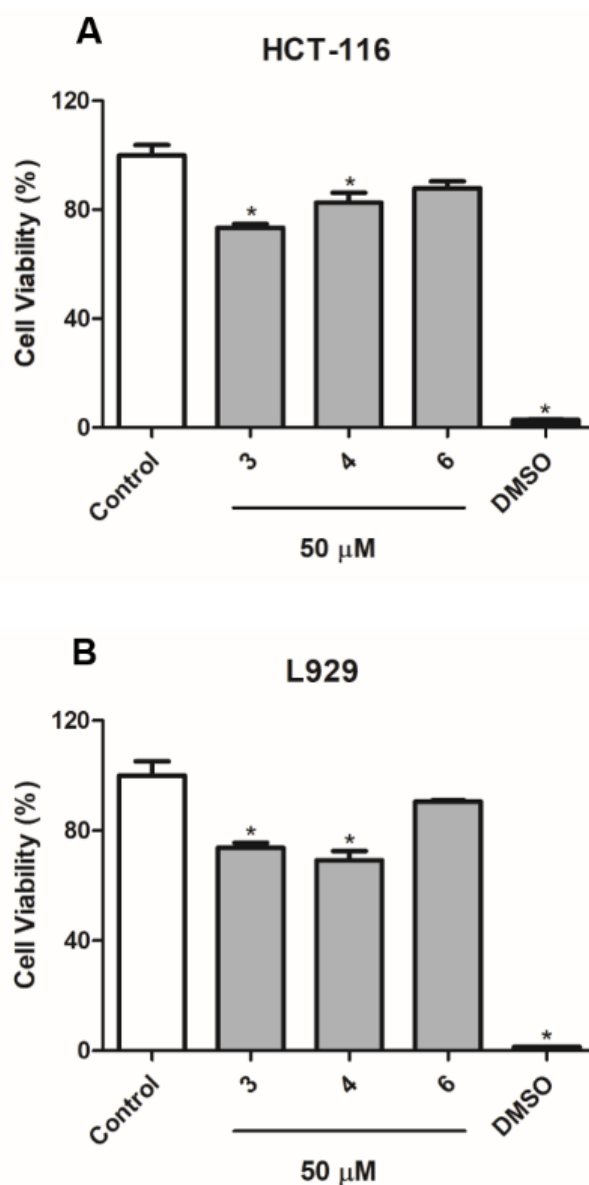


Figure 5. Cytotoxicity of the compounds **3**, **4** and **6** against HCT-116 (A) and L929 (B) cells lines, after 72 h treatment. The values are the mean $\pm$ standard error for four independent replicates at a concentration of 50 μ M (*p < 0.05 compared with untreated cells)

EXPERIMENTAL SECTION

General Experiment Procedures. Optical rotations were measured on a Jasco P-2000 polarimeter (Easton, MD, USA) at 25° C in CHCl₃. FTIR spectra were acquired on a Bruker Vertex 70 (Bruker, Billerica, MA, USA) and a PerkinElmer Frontier (Waltham, MA, USA) spectrometers. 1D- and 2D-NMR spectra were recorded on a Bruker AVANCE III HD 800 MHz spectrometer (800 and 200 MHz for ¹H and ¹³C), Varian NMR spectrometer (500 and 125 MHz for ¹H and ¹³C) and a Bruker AVANCE

III HD spectrometer (400 and 100 MHz for ^1H and ^{13}C) using CHCl_3 (δ_{H} 7.24 and δ_{C} 77.0), the residual solvent, as an internal standard. High-resolution electrospray ionization mass spectrometry (HRESIMS) and tandem (MS^n) analyses were carried out using Bruker spectrometers models micrOTOFII and Ion Trap-amaZonX (Billerica, MA, USA), respectively, both operating in a positive mode. Column chromatography (CC) was performed on a silica gel 60 (60-200 μm , 70-230 mesh, SiliCycle, Quebec, Canada) and medium pressure liquid chromatography (MPLC) on a silica gel 60 (40-63 μm , 230-400 mesh, SiliCycle). Thin-layer chromatography (TLC) was carried out using precoated silica gel F-254 aluminum sheets (SiliCycle) and the compound spots were observed under UV light at 254 and 366 nm, and staining with iodine vapor. Analytical high-performance liquid chromatography (HPLC) was performed on a Prominence Shimadzu instrument equipped with a SPD-M20A diode array detector and a reverse-phase Phenomenex Gemini[®] C18 column (250 mm x 4.6 mm ID filled with 5 μm particles). For preparative HPLC, a Shimadzu apparatus with an SPD-M10A VP diode array detector and an ACE C18 column (250 mm x 21.2 mm and 5 μm particles) was used, with a flow rate of 8.0 mL/min.

Plant Material. The roots of *A. dolichocarpa* were collected from Cruz do Espírito Santo, Paraíba, Brazil (7°09'43.7"S, 35°02'11.1"W) on April 2018. Access registration in the National Management System of Genetic Patrimony and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) was obtained under number AE4B71A. A voucher specimen (AGRA & GÓES 5543) was identified by M. F. Agra and deposited at Herbarium Prof. Lauro Pires Xavier (JPB), Federal University of Paraíba (UFPB), Brazil.

Extraction and Isolation. The air-dried and powdered roots of *A. dolichocarpa* (1.72 kg) were extracted with ethanol for 72 h (3 x 4 L) at room temperature. The extract was concentrated under reduced pressure at 40° C to afford 52.6 g of crude extract (CE). Part of CE (49.3 g) was suspended in MeOH- H_2O (7:3) and sequentially partitioned with hexane, chloroform and EtOAc. An aliquot of the hexane-soluble portion (8.12 g) was subjected to CC over silica gel, eluting with a gradient of hexane-EtOAc and EtOAc-MeOH, which after TLC analysis were grouped to give the fractions H1 to H6. Fraction H-2 (95.0 mg) was subjected to preparative HPLC with the following gradient elution: solvent A = H_2O ; solvent B = MeOH; elution system = 0-40 min (20-70% B); 40-50 min (70% B); and 50-65 min (70-100% B), yielding compound **5** (2.0 mg). Fraction H-4 (85.8 mg) was also subjected to preparative HPLC using gradient

elution with H₂O-MeOH 5 to 100% of MeOH in 75 min to afford compound **1** (1.0 mg). The chloroform-soluble fraction (6.70 g) was separated by MPLC over silica gel using a gradient elution with hexane-EtOAc and EtOAc-MeOH, and the fractions obtained were combined according to the TLC profile to afford C1-C4. The fraction C-2 (197.3 mg) was purified by preparative HPLC with the following elution gradient: solvent A = H₂O; solvent B = MeOH; elution system = 0-45 min (0-65% B); 45-70 min (65% B); and 70-105 min (65-100% B). This resulted in compounds **2** (0.5 mg), **3** (12.1 mg), **4** (6.8 mg) and **6** (6.0 mg).

Dolichocarpol A (1): colorless oil; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -41$ (c. 0.1, CHCl₃); ECD (CHCl₃) λ ($\Delta\epsilon$) 234 (-0.89), 255 (+0.43); IR (film) ν_{max} 3466, 2955, 2931, 2868, 1706, 1468, 1402, 1213, 1104 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Tables 1 and 2; positive-ion HRESIMS m/z 275.1614 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₅H₂₄O₃Na, 275.1618, Δ = 1.2 ppm); positive-ion ESIMS/MS fragments m/z 257, 217.

Dolichocarpol B (2): colorless oil; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -15$ (c. 0.1, CHCl₃); ECD (CHCl₃) λ ($\Delta\epsilon$) 201 (+1.55), 243 (+1.92); IR (film) ν_{max} 3401, 2958, 2923, 2869, 1703, 1459, 1366, 1214, 1082, 1047 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Tables 1 and 2; positive-ion HRESIMS m/z 291.1566 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₅H₂₄O₄Na, 291.1567, Δ = 0.1 ppm); positive-ion ESIMS/MS fragments m/z 251, 233, 215, 205.

Dolichocarpol C (3): colorless oil; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -20$ (c. 0.1, CHCl₃); ECD (CHCl₃) λ ($\Delta\epsilon$) 221 (-0.22), 287 (+0.11); IR (film) ν_{max} 3458, 2956, 2924, 2873, 1703, 1458, 1367, 1215, 1048 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Tables 1 and 2; positive-ion HRESIMS m/z 277.1773 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₅H₂₆O₃Na, 277.1774, Δ = 0.3 ppm); positive-ion ESIMS/MS fragments m/z 237, 219, 201.

Dolichocarpol D (4): colorless oil; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -12$ (c. 0.1, CHCl₃); IR (film) ν_{max} 3461, 2960, 2930, 2875, 1705, 1457, 1363, 1214, 1049 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Tables 1 and 2; positive-ion HRESIMS m/z 277.1772 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₅H₂₆O₃Na, 277.1774, Δ = 0.6 ppm); positive-ion ESIMS/MS fragments m/z 237, 219, 201.

Dolichocarpol E (5): colorless oil; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} -9$ (c. 0.1, CHCl₃); IR (film) ν_{max} 3321, 2975, 2929, 2883, 1659, 1453, 1383, 1270, 1082, 1045 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Tables 1 and 2; positive-ion HRESIMS m/z 275.1622 [M+Na]⁺ (calcd for C₁₅H₂₄O₃Na, 275.1618, Δ = -1.6 ppm).

Dolichocarpol F (6): colorless oil; $[\alpha]^{25}_{\text{D}} +10$ (c. 0.1, CHCl₃); ECD (CHCl₃) λ ($\Delta\epsilon$) 219 (-0.18), 291 (+0.09); IR (film) ν_{max} 3344, 2954, 2923, 2867, 1701, 1462, 1368, 1213, 1092 cm⁻¹; ¹H and ¹³C NMR data, see Tables 1 and 2; positive-ion HRESIMS

m/z 275.1616 $[M+Na]^+$ (calcd for $C_{15}H_{24}O_3Na$, 275.1618, $\Delta = 0.8$ ppm); positive-ion ESIMS/MS fragments m/z 215.

ECD Calculation. Conformational studies for compounds (**1-6**) were carried out on the Spartan'16 software using the MMFF94 molecular mechanics force field calculation. Conformers within a 10 kcal/mol energy window were generated and further optimized using density functional theory (DFT) calculation at the B3LYP/6-31G*(d) level. The conformers with over 1% of Boltzmann distribution were chosen for ECD calculation at the B3LYP/6-311 +G(2d,p) level. The calculated ECD spectra were obtained by DFT and time-dependent DFT (TD-DFT) using Gaussian 09 and analyzed on SpecDis v1.71.

Cytotoxicity Assay. Human colon cancer HCT-116 cells and non-tumor murine fibroblast L929 cells were cultured in RPMI-1640 medium containing 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100 μ g/mL streptomycin at 37 °C with 5% CO₂ in a humidified atmosphere. Cells were seeded in 96-well plates at a density of 3×10^5 cells per well. Following a 24 h period, cells were incubated with the sesquiterpenoids (**3**, **4** and **6**) (50 μ M) dissolved in DMSO (0.4%). After culturing for 72 h, 10 μ L of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) solution (5 mg/mL) was added and incubated for another 4 h. The deposited formazan was dissolved with dodecyl sulfate sodium salt (100 μ L).²⁷ Positive control was DMSO (20%). The optical densities were measured using a microplate spectrophotometer (Microplate reader BioTek Instruments, Sinergy HT, Winooski, VT, USA). Data were analyzed with GraphPad Prism 5.0, using analysis of variance (ANOVA – *one way*).

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information. HRESIMS, IR, NMR and ESIMS/MS data of compounds **1-6** are available as Supporting Information.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author. *Tel: +55 83 32167427. E-mail: josean@lft.ufpb.br.

Author Contributions. The manuscript was written through contributions from all authors. All authors approved the final version of the manuscript. All authors contributed equally.

Notes. The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge the Brazilian agencies Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) (Finance Code 001) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for financial support and fellowships. We are also thankful for collaborating with Rede Norte-Nordeste de Fitoterápicos (INCT-RENNOFITO), Centro Analítico de Instrumentação da Universidade de São Paulo (Central Analítica IQ-USP) and Instituto de Química - Câmpus de Araraquara - UNESP. Dr. A. Leyva (USA) helped with English translation and editing of the manuscript.

Conflict of Interest. The authors declare that they have no conflict of interest.

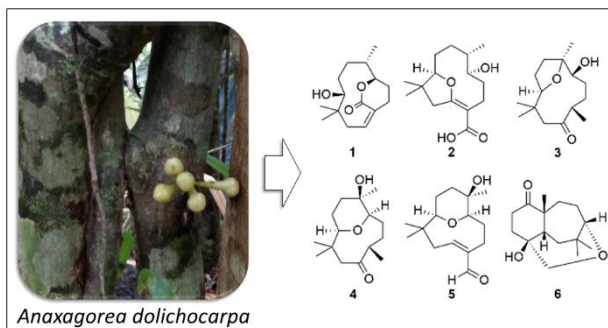
REFERENCES

- (1) Ludwiczuk, A.; Skalicka-Woźniak, K.; Georgiev, M. I. Terpenoids. In *Pharmacognosy: Fundamentals, Applications and Strategies*; McCreath, S. B., Delgoda, R., Eds.; Elsevier/Academic Press: Boston, **2017**; pp 233–266.
- (2) Azimova, S. S.; Saidkhodzhaev, A. I. Natural Sesquiterpene Esters. In *Natural Compounds*; Azimova, S. S., Saidkhodzhaev, A. I., Eds.; Springer-Verlag New York: New York, **2013**; pp 174–370.
- (3) Jiao, S. G.; Zhang, R. F.; Li, J. J.; Wuken, S. N.; Zhang, H. X. G.; Tu, P. F.; Chai, X. Y. Phytochemical and Pharmacological Progress on Humulane-Type Sesquiterpenoids. *China J. Chinese Mater. Medica* **2018**, *43*, 4380–4390.
- (4) Dai, J.-R.; Cardellina, J. H.; Mahon, J. B. M.; Boyd, M. R. Zerumbone, an HIV-Inhibitory and Cytotoxic Sesquiterpene of *Zingiber Aromaticum* and *Z. Zerumbet*. *Nat. Prod. Lett.* **1997**, *10*, 115–118.
- (5) Legault, J.; Dahl, W.; Debiton, E.; Pichette, A.; Madelmont, J. C. Antitumor Activity of Balsam Fir Oil: Production of Reactive Oxygen Species Induced by α -Humulene as Possible Mechanism of Action. *Planta Med.* **2003**, *69*, 402–407.
- (6) Gottsberger, G. The Reproductive Biology of the Early-Divergent Genus *Anaxagorea* (Annonaceae), and Its Significance for the Evolutionary Development of the Family. *Acta Bot. Brasilica* **2016**, *30*, 313–325.
- (7) Gonda, R.; Takeda, T.; Akiyama, T. Studies on the Constituents of *Anaxagorea Luzonensis* A. Gray. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*. **2000**, *48*, 1219–1222.
- (8) Sabphon, C. Cholinesterase Inhibitory Activities of Xanthones from *Anaxagorea Luzonensis* A. Gray. *J. Med. Plants Res.* **2012**, *6*, 3781–3785.
- (9) Sabphon, C.; Temkitthawon, P.; Ingkaninan, K.; Sawasdee, P. Phosphodiesterase Inhibitory Activity of the Flavonoids and Xanthones from *Anaxagorea Luzonensis*. *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 301–303.
- (10) Díaz, A. M. P. de. Neolignans from *Anaxagorea Clavata*. *Phytochemistry* **1997**, *44*, 345–346.

- (11) Alencar, D. C. de; Pinheiro, M. L. B.; Pereira, J. L. D. S.; De Carvalho, J. E.; Campos, F. R.; Serain, A. F.; Tirico, R. B.; Hernández-Tasco, A. J.; Costa, E. V.; Salvador, M. J. Chemical Composition of the Essential Oil from the Leaves of *Anaxagorea Brevipes* (Annonaceae) and Evaluation of Its Bioactivity. *Nat. Prod. Res.* **2016**, *30*, 1088–1092.
- (12) Andrade, E. H. A.; Oliveira, J.; das Graças B. Zoghbi, M. Volatiles of *Anaxagorea Dolichocarpa* Spreng. & Sandw. and *Annona Densicoma* Mart. Growing Wild in the State of Pará, Brazil. *Flavour Fragr. J.* **2007**, *22*, 158–160.
- (13) Husain, K.; Zakaria, S. M.; Lajis, N. H.; Shaari, K.; Ismail, I. S.; Israf, D. A.; Paetz, C. Novel Sesquiterpene and Copyrine Alkaloids from *Anaxagorea Javanica* Blume. *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 788–792.
- (14) Scharaschkin, T.; Doyle, J. A. Phylogeny and Historical Biogeography of *Anaxagorea* (Annonaceae) Using Morphology and Non-Coding Chloroplast Sequence Data. *Syst. Bot.* **2005**, *30*, 712–735.
- (15) Lobão, A. Q.; Araujo, D. S. D. de; Kurtz, B. C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rodriguésia* **2005**, *56*, 85–96.
- (16) Hocquemiller, R.; Rasamizafy, S.; Moretti, C.; Jacquemin, H.; Cavé, A. L'Anaxagoreine, Nouvel Alcalolde Aporphinique Isolé de Deux Espèces d'*Anaxagorea*. *Planta Med.* **1981**, *41*, 48–50.
- (17) Lúcio, A. S. S. C.; Da Silva Almeida, J. R. G.; Barbosa-Filho, J. M.; Pita, J. C. L. R.; Branco, M. V. S. C.; De Fátima Formiga Melo, M.; De Fátima Agra, M.; Da-Cunha, E. V. L.; Da Silva, M. S.; Tavares, J. F. Azaphenanthrene Alkaloids with Antitumoral Activity from *Anaxagorea Dolichocarpa* Sprague and Sandwith (Annonaceae). *Molecules* **2011**, *16*, 7125–7131.
- (18) Fournier, G.; Hadjiakhoondi, A.; Charles, B.; Leboeuf, M.; Cavé, A. Volatile Components of *Anaxagorea Dolichocarpa* Fruit. *Biochem. Syst. Ecol.* **1994**, *22*, 605–608.
- (19) Da Silva Almeida, J. R. G.; De Oliveira, M. R.; Guimarães, A. L.; De Oliveira, A. P.; De Araújo Ribeiro, L. A.; Lúcio, A. S. S. C.; Quintans Júnior, A. L. J. Phenolic

- Quantification and Antioxidant Activity of *Anaxagorea Dolichocarpa* and *Duguetia Chrysocarpa* (Annonaceae). *Int. J. Pharma Bio Sci.* **2011**, 2, 367–374.
- (20) Pinheiro, R. da S.; Rabelo, S. V.; De Oliveira, A. P.; Guimarães, A. L.; De Moraes-Filho, M. O.; Da Costa, M. P.; Do Ó Pessoa, C.; Lúcio, A. S. S. C.; Almeida, J. R. G. da S. Phytochemical Screening and Evaluation of Cytotoxicity of Stem Bark Extracts of *Anaxagorea Dolichocarpa* and *Duguetia Chrysocarpa* (Annonaceae). *Trop. J. Pharm. Res.* **2016**, 15, 793–798.
- (21) Dutt, R.; Garg, V.; Khatri, N.; Madan, A. K. Phytochemicals in Anticancer Drug Development. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **2019**, 19, 172–183.
- (22) Wang, X.-J.; Chen, J.-Y.; Fu, L.-Q.; Yan, M.-J. Recent Advances in Natural Therapeutic Approaches for the Treatment of Cancer. *J. Chemother.* **2020**, 32, 53–65.
- (23) Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *J. Nat. Prod.* **2016**, 79, 629–661.
- (24) Damodaran, N. P.; Dev, S. Studies in Sesquiterpenes—XXXVIII. *Tetrahedron* **1968**, 24, 4123–4132.
- (25) McPhail, A. T.; Sim, G. A. Sesquiterpenoids. Part IV. The Stereochemistry of Humulene: X-Ray Analysis of the Humulene–Silver Nitrate Adduct. *J. Chem. Soc. B* **1966**, 112–120.
- (26) Zhang, R.; Feng, X.; Su, G.; Mu, Z.; Zhang, H.; Zhao, Y.; Jiao, S.; Cao, L.; Chen, S.; Tu, P.; et al. Bioactive Sesquiterpenoids from the Peeled Stems of *Syringa Pinnatifolia*. *J. Nat. Prod.* **2018**, 81, 1711–1720.
- (27) Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. Immunol. Methods* **1983**, 65, 55–63.

For Table of Contents use only



SUPPORTING INFORMATION

Dolichocarpols A-F, Unprecedented Macrocyclic Humulene-Type Sesquiterpenoids from *Anaxagorea dolichocarpa*

Kaio Aragão Sales,[†] Anderson Angel Vieira Pinheiro,[†] Diego Igor Alves Fernandes de Araújo,[†] Lucas Silva Abreu,[†] Rodrigo Silva de Andrade,[†] Maria de Fátima Agra,[‡] Marianna Vieira Sobral,[†] Rafael Carlos Ferreira,[†] Raimundo Braz-Filho,[§] Marcus Tullius Scotti,[†] Josean Fechine Tavares,^{†*} and Marcelo Sobral da Silva.[†]

[†]Postgraduate Program in Natural and Synthetic Bioactive Products, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

[‡]Biotechnology Department, Federal University of Paraíba, João Pessoa, Brazil

[§]Department of Chemistry, Institute of Chemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, Brazil

Figure S1. IR spectrum of compound **1**

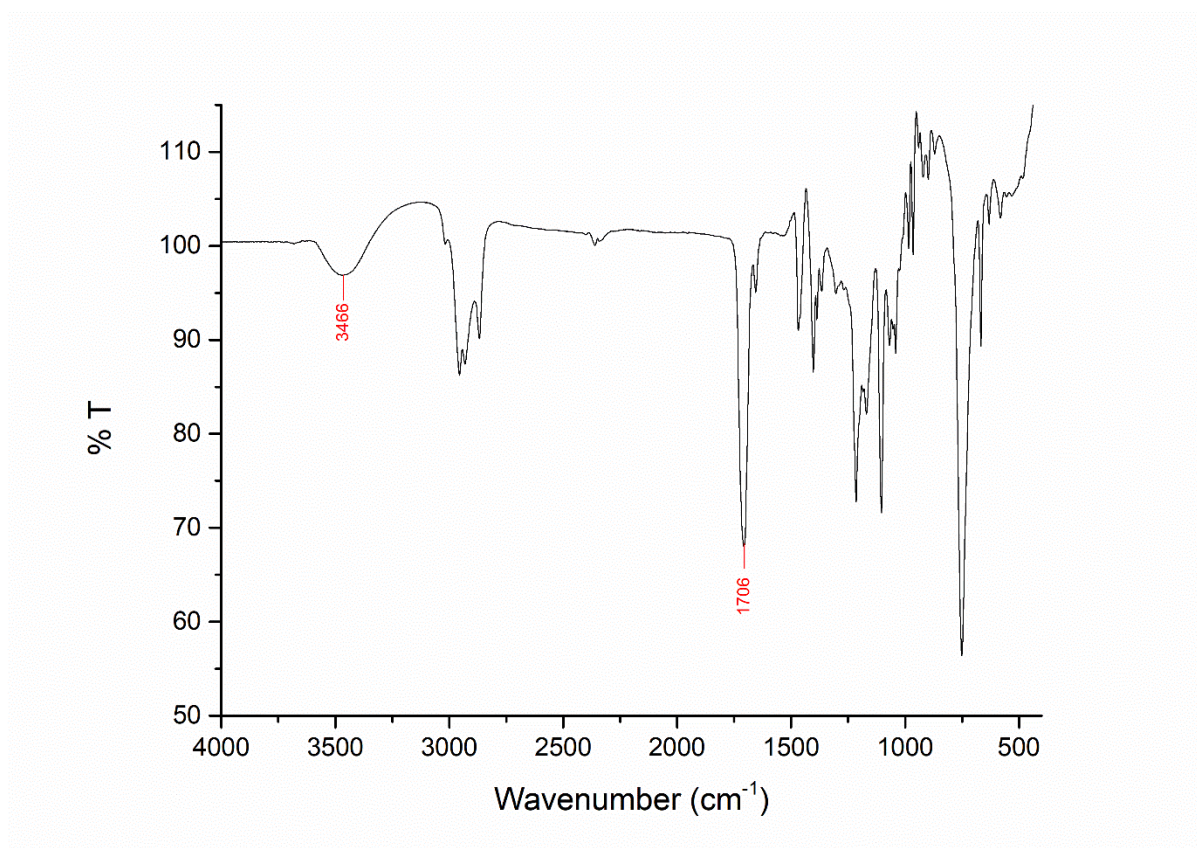


Figure S2. HRESIMS spectrum of compound **1** ([M + Na], positive ion mode)

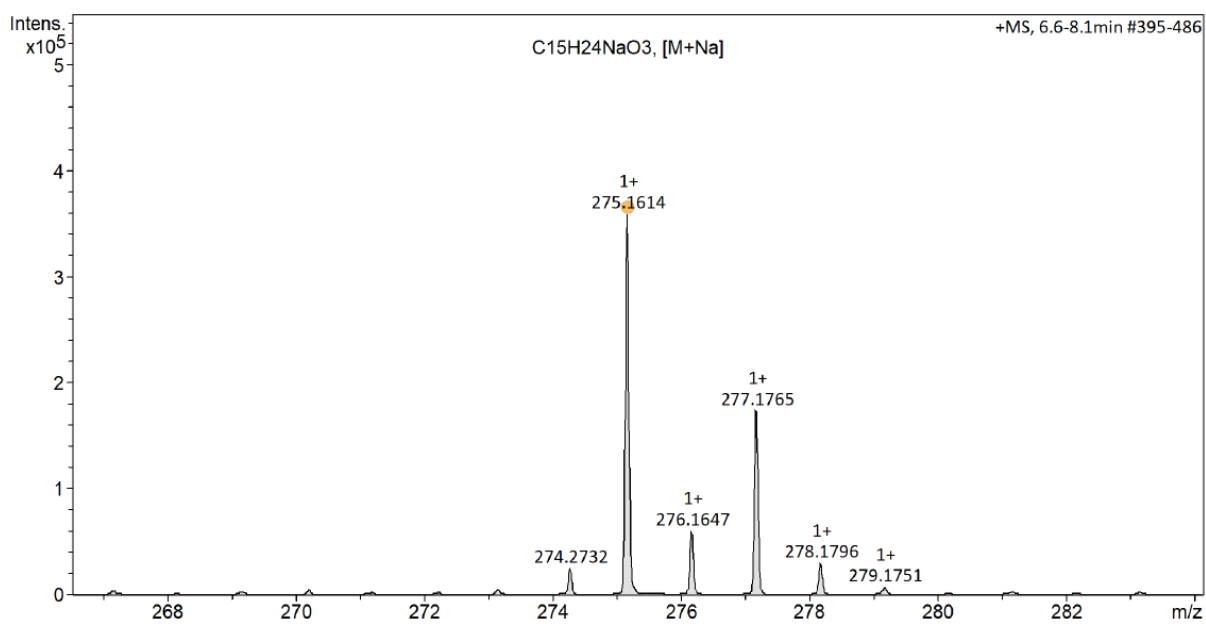


Figure S3. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **1**

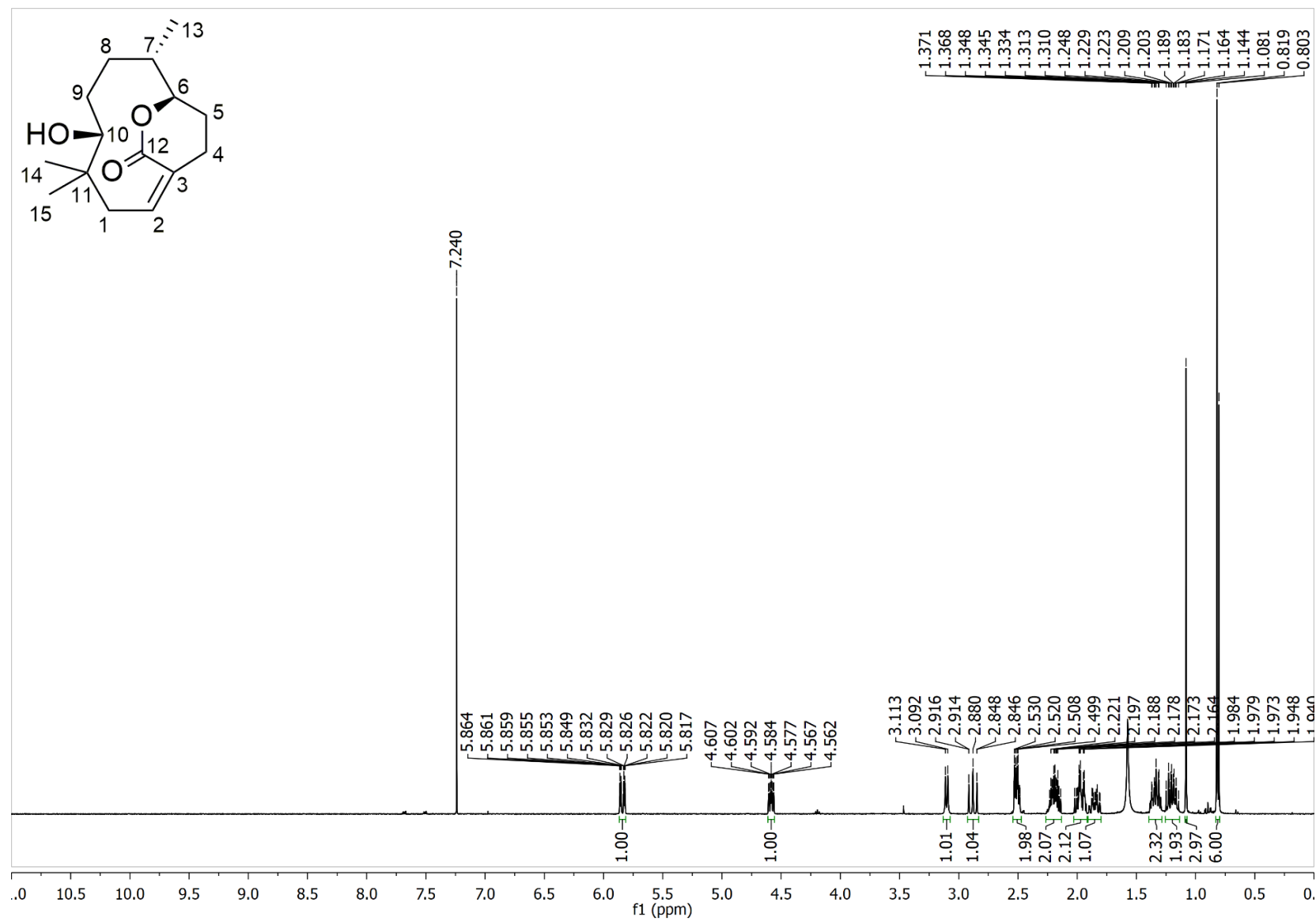


Figure S4. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **1**

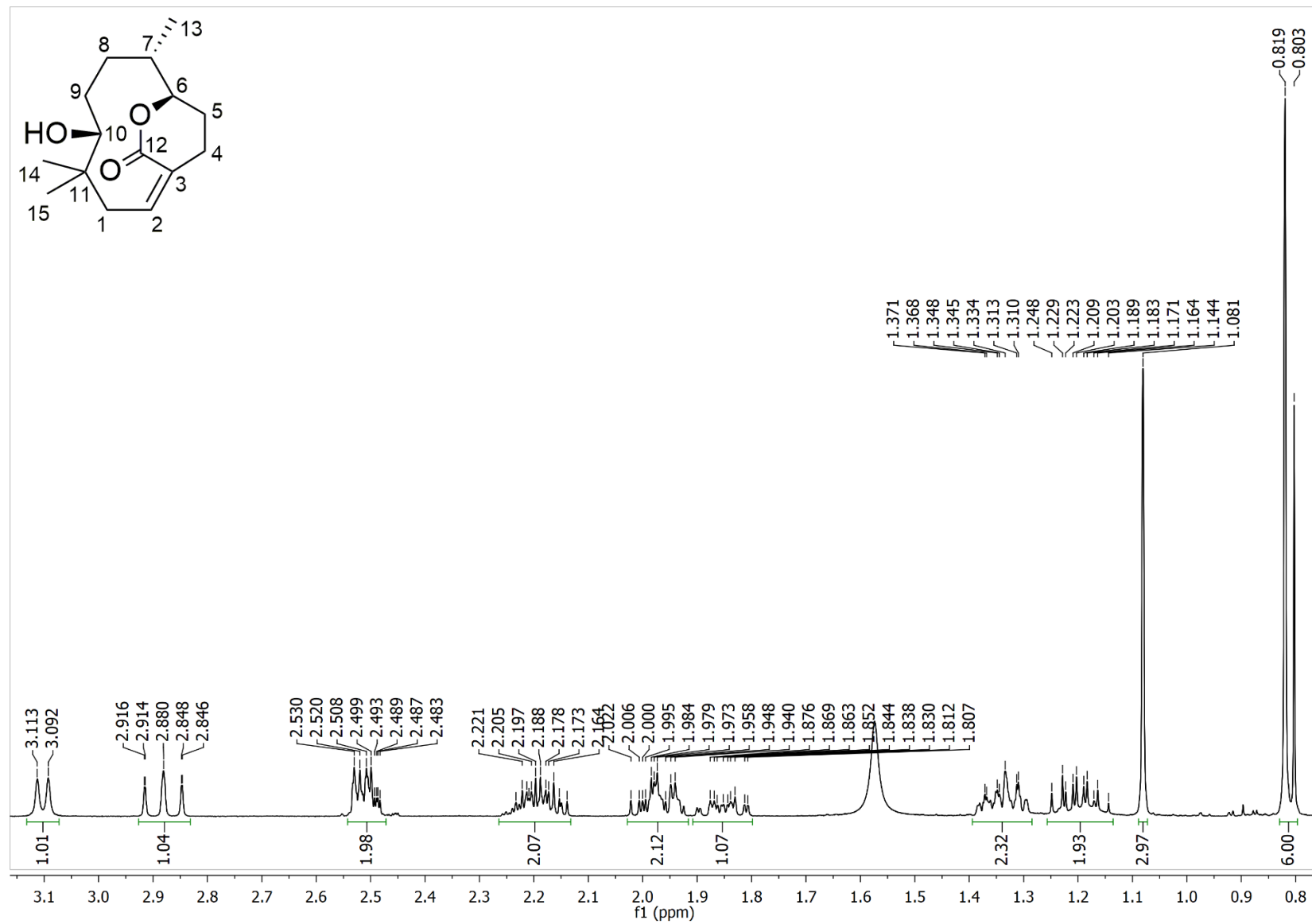


Figure S5. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **1**

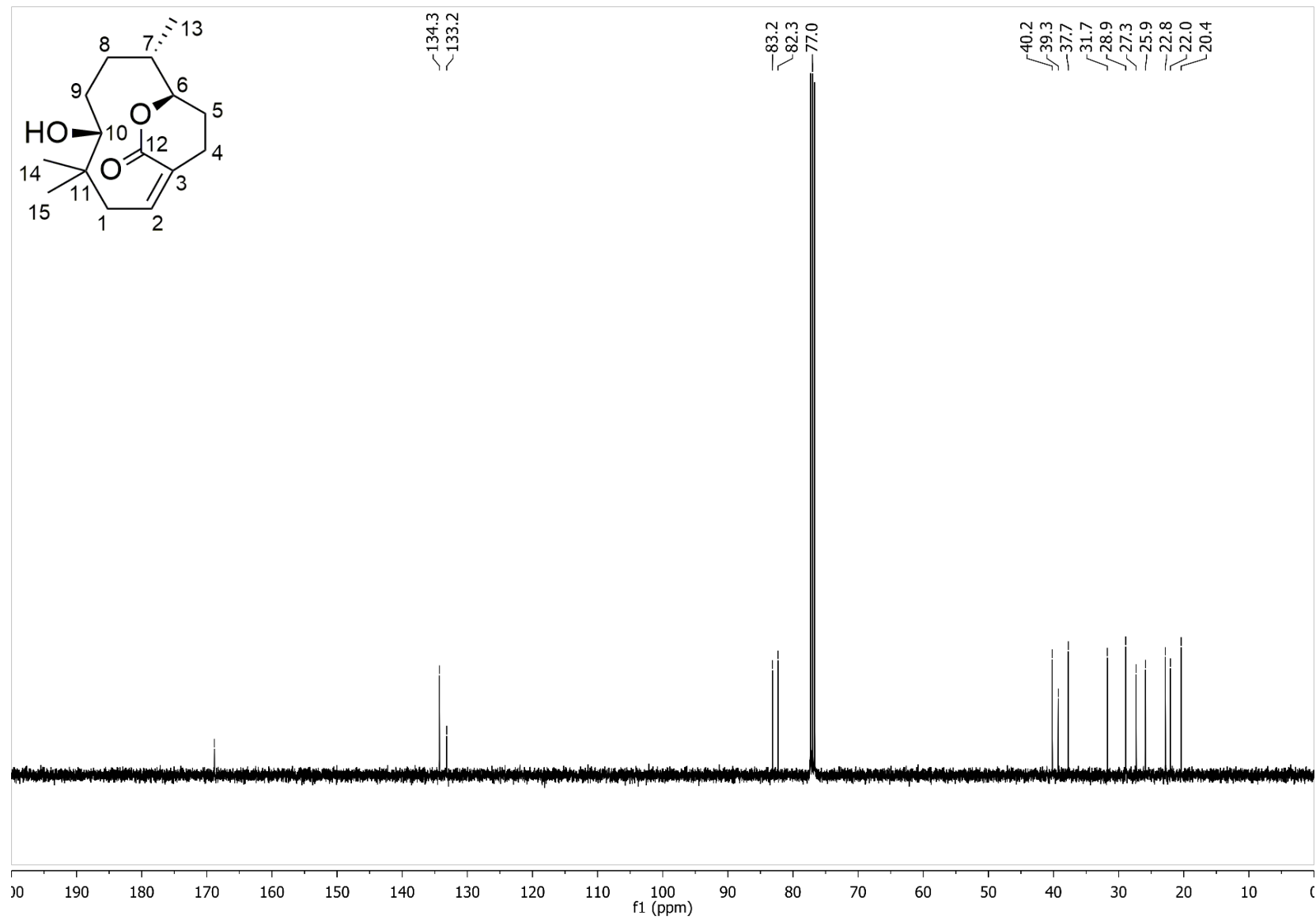


Figure S6. ^{13}C DEPT-135 NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **1**

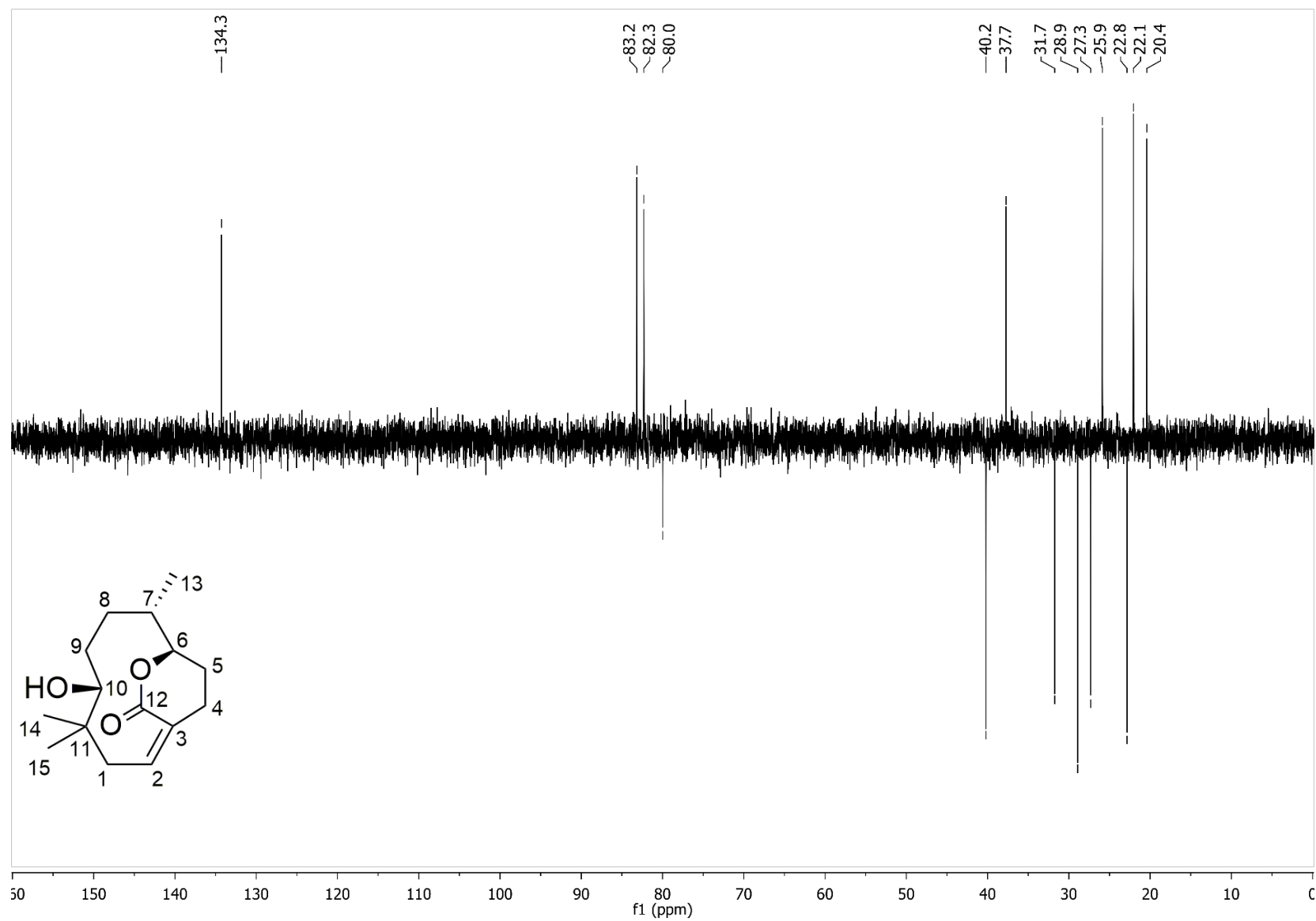


Figure S7. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **1**

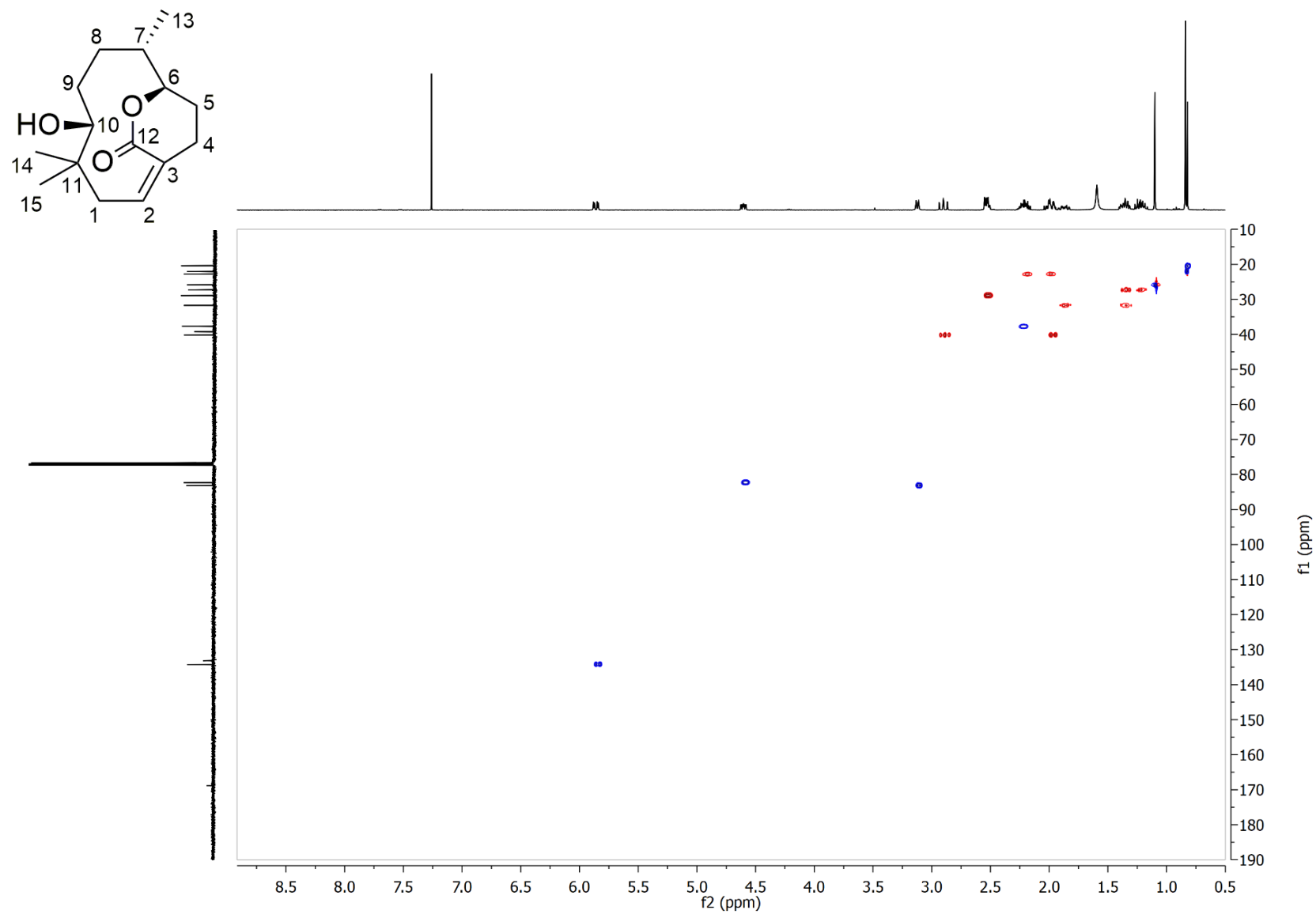


Figure S8. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **1**

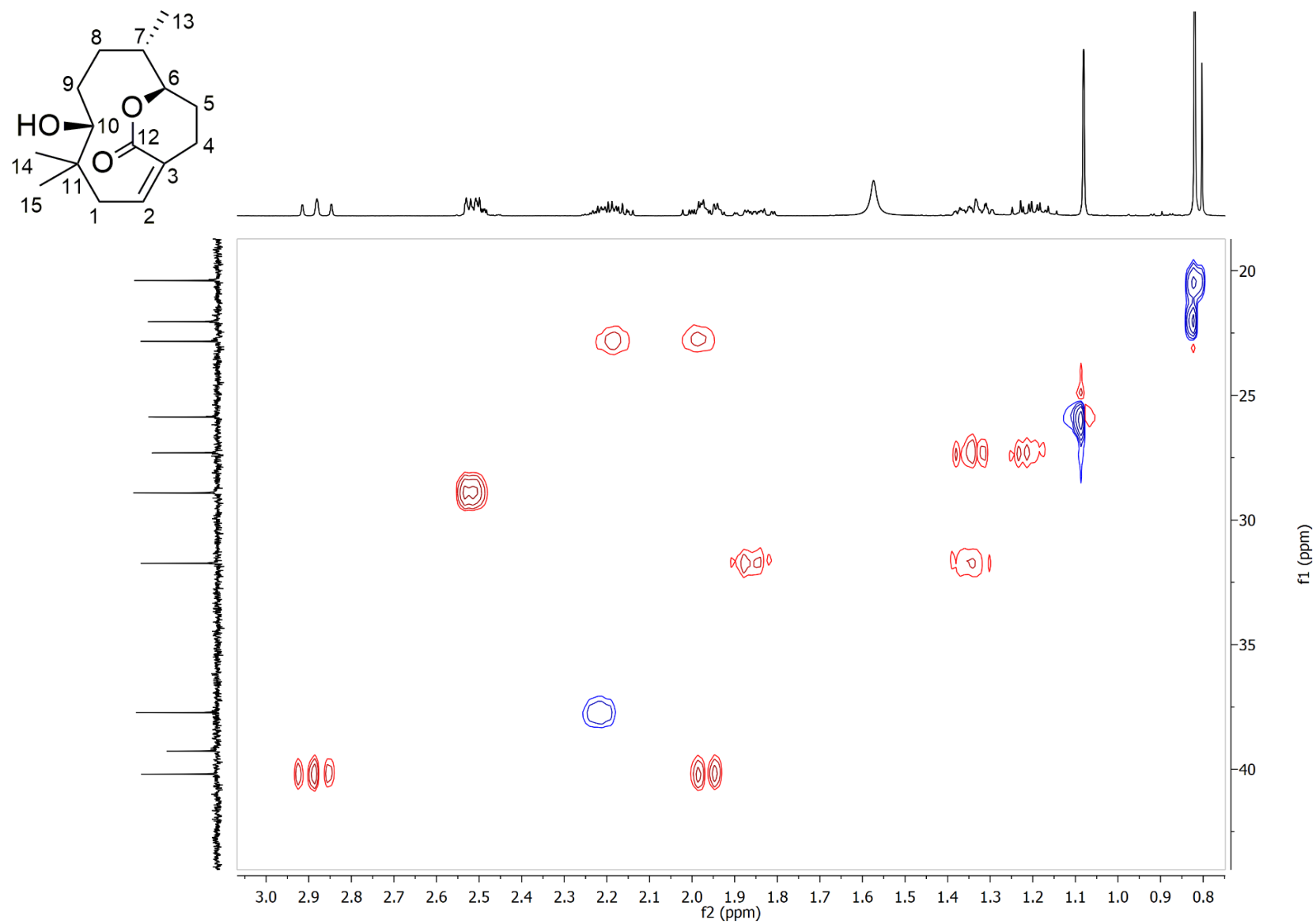


Figure S9. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **1**

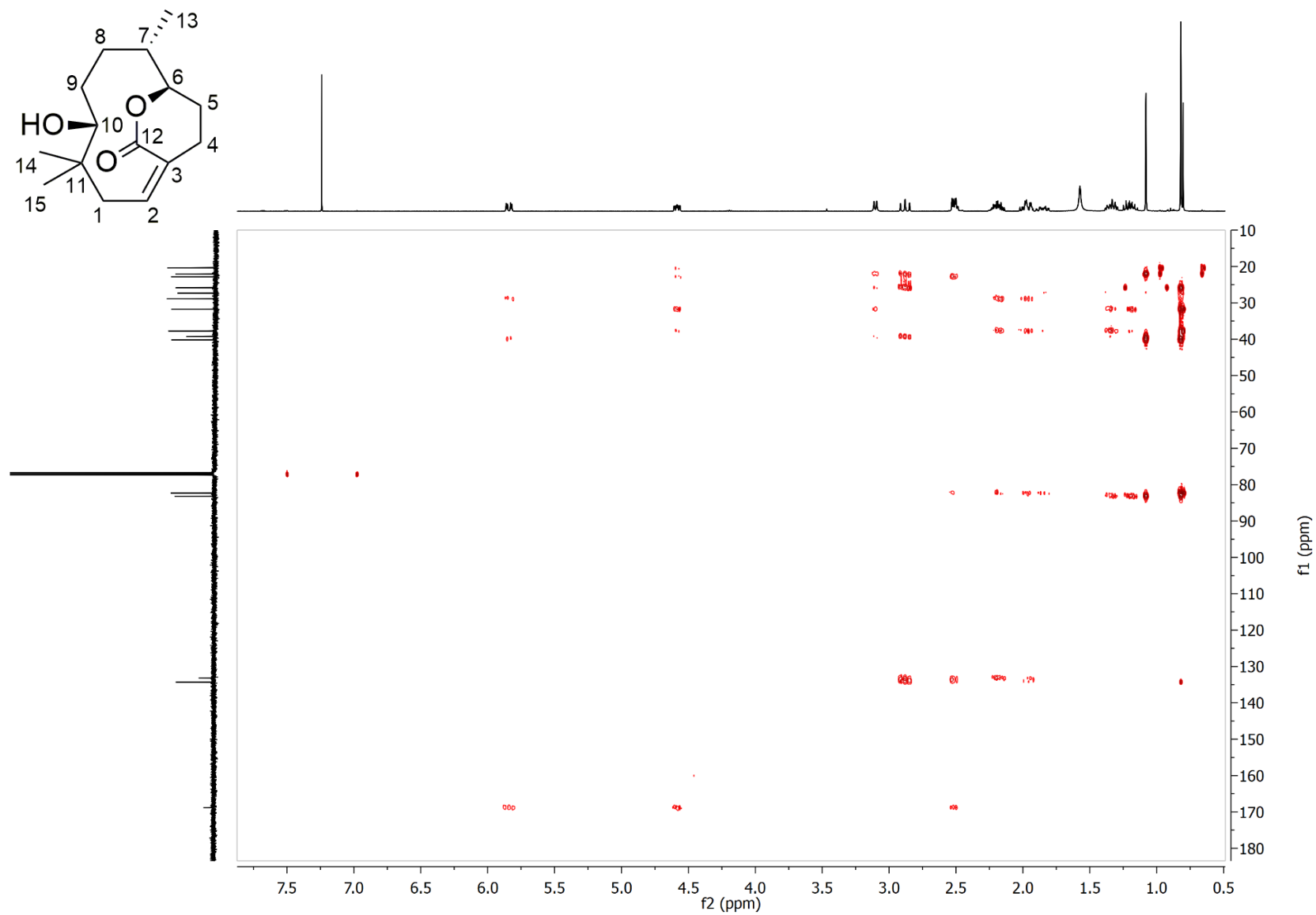


Figure S10. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **1**

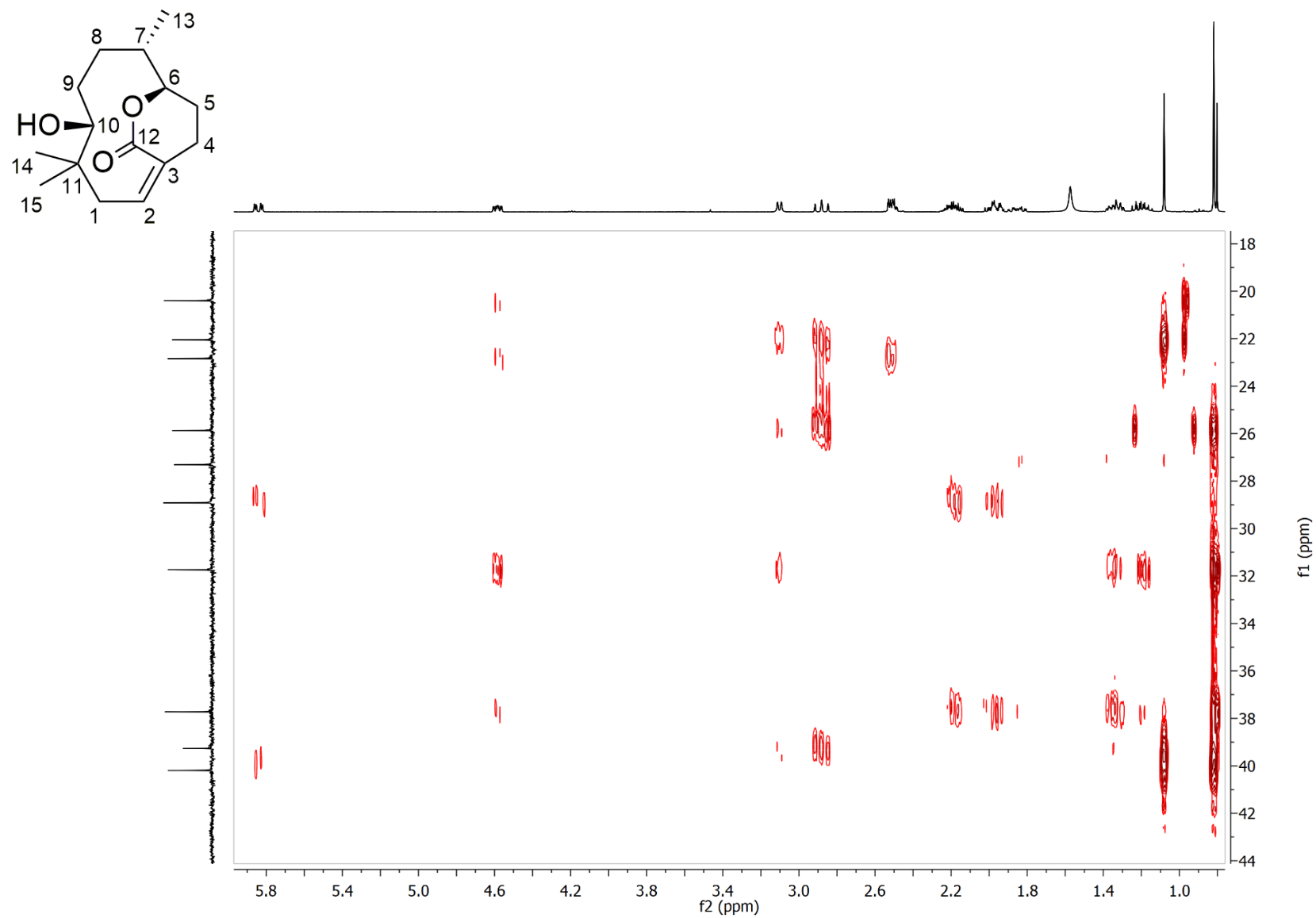


Figure S11. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **1**

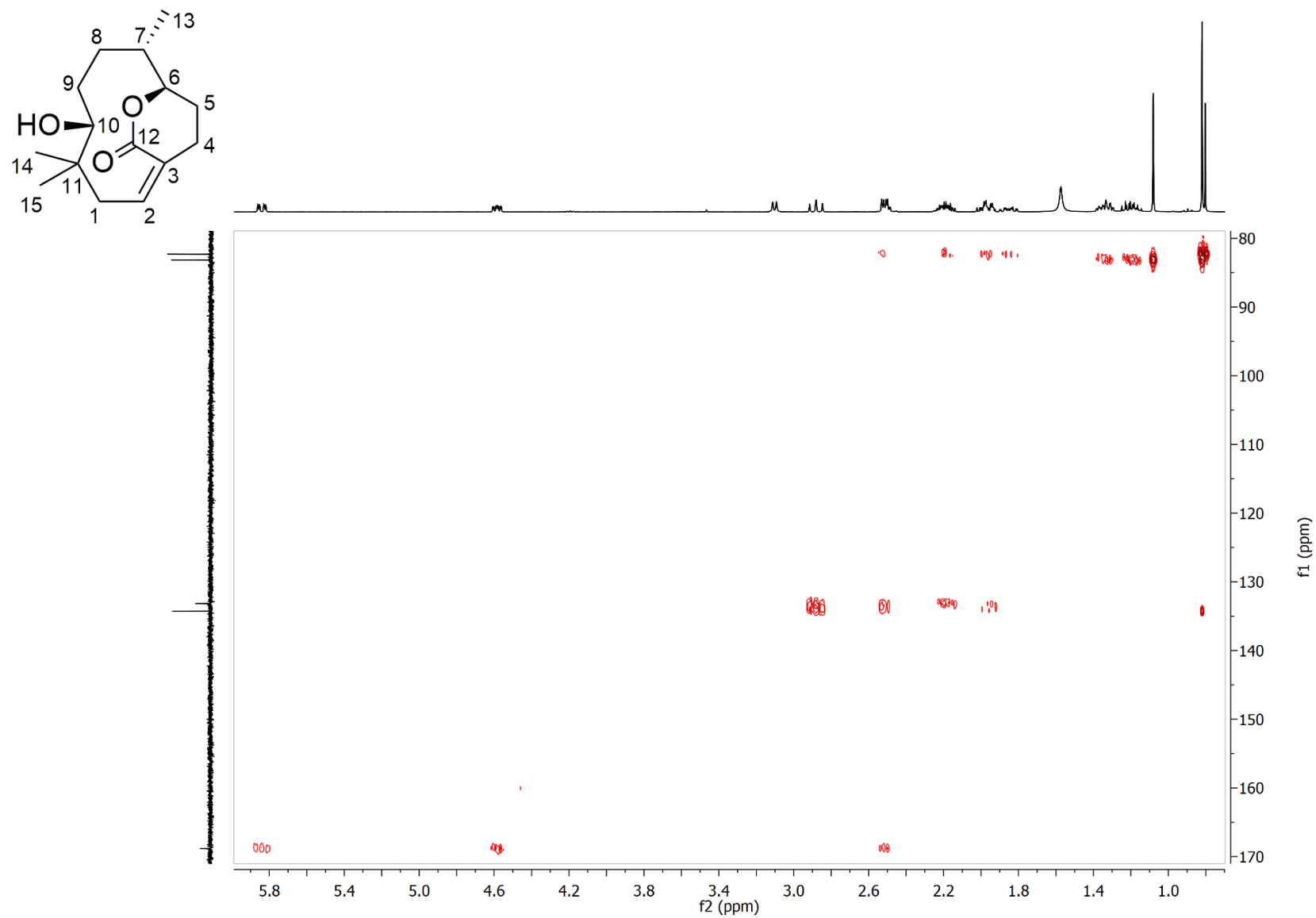


Figure S12. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **1**

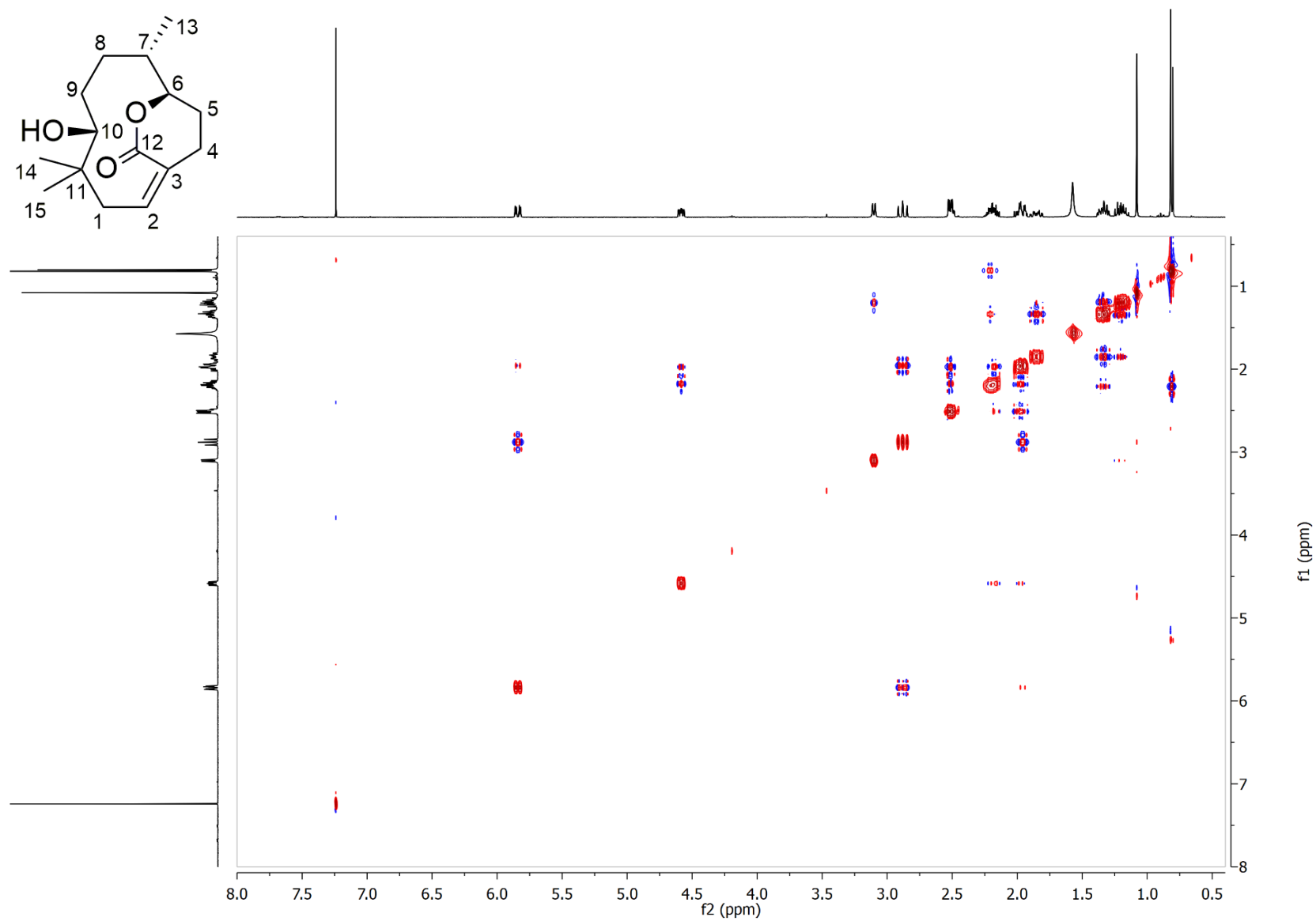


Figure S13. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **1**

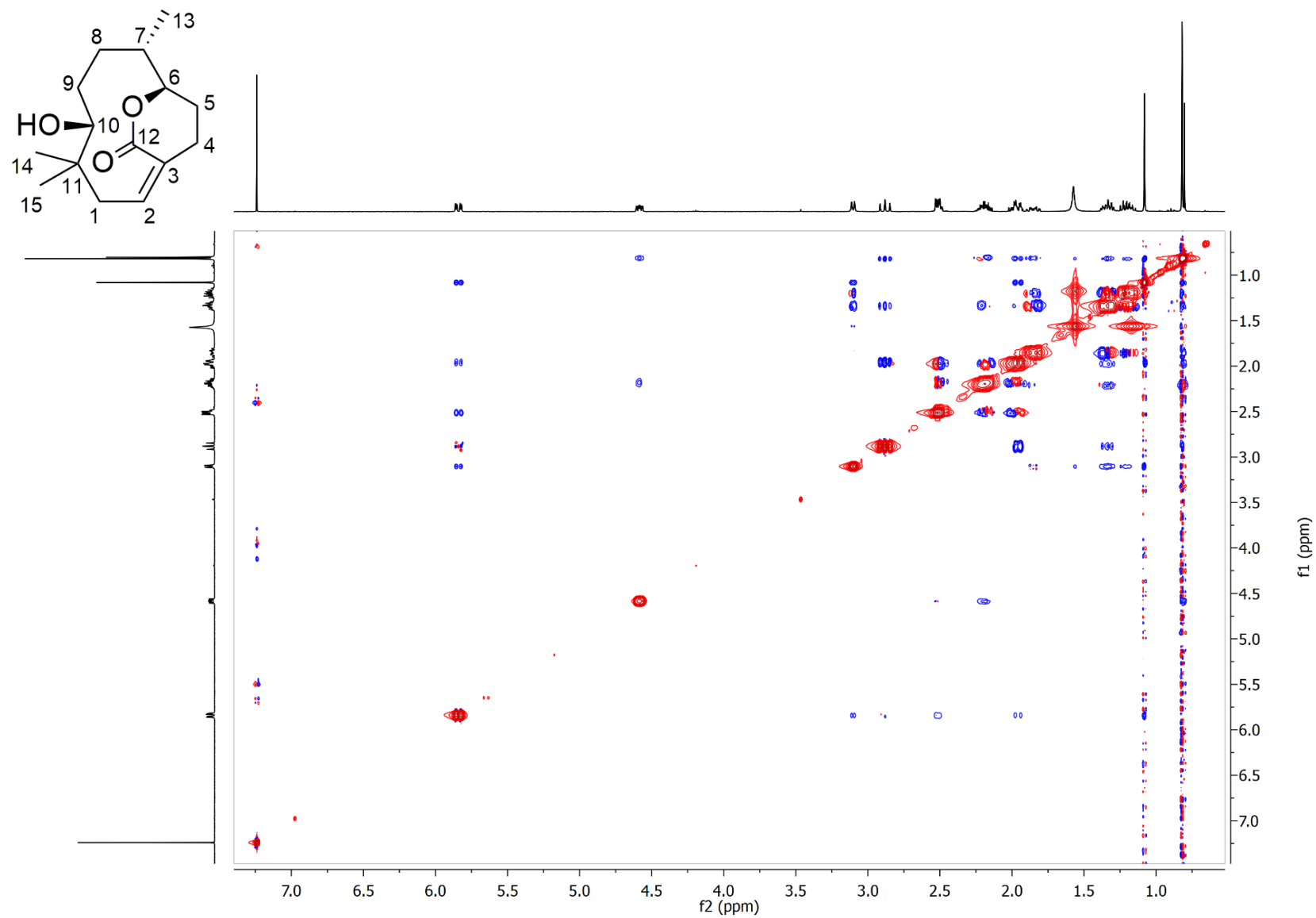


Figure S14. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **1**

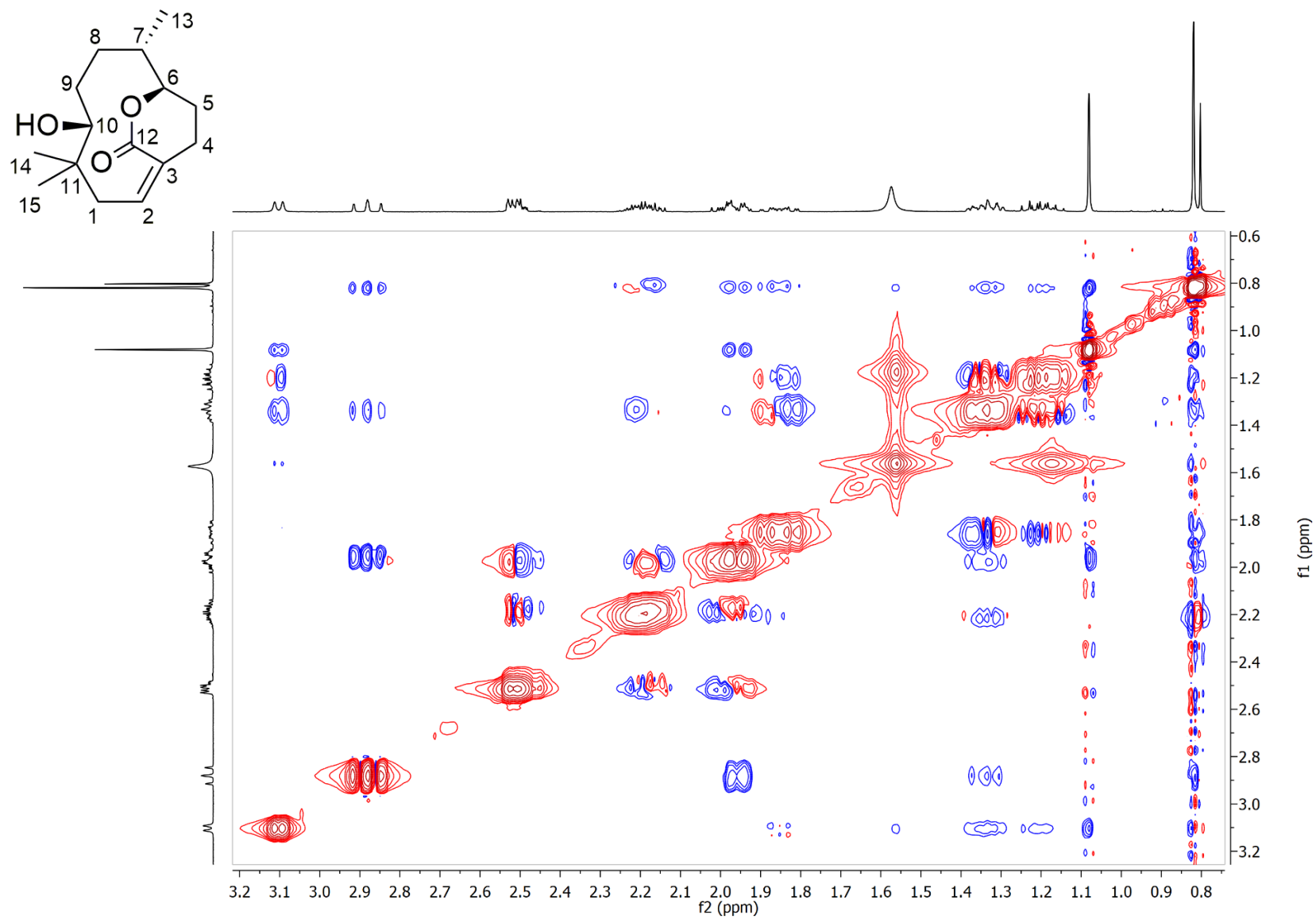


Figure S15. ESIMS/MS spectrum of compound **1** ($[M + Na]$, positive ion mode)

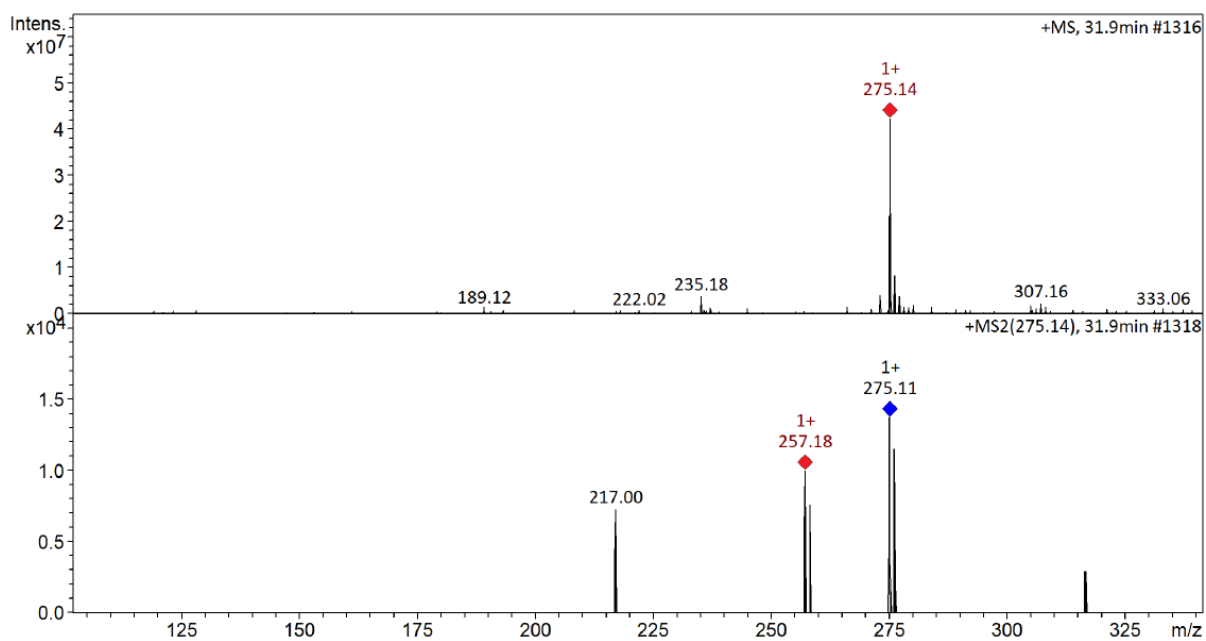


Figure S16. Experimental and calculated ECD spectra and absorption spectra of compounds **1–3** and

6

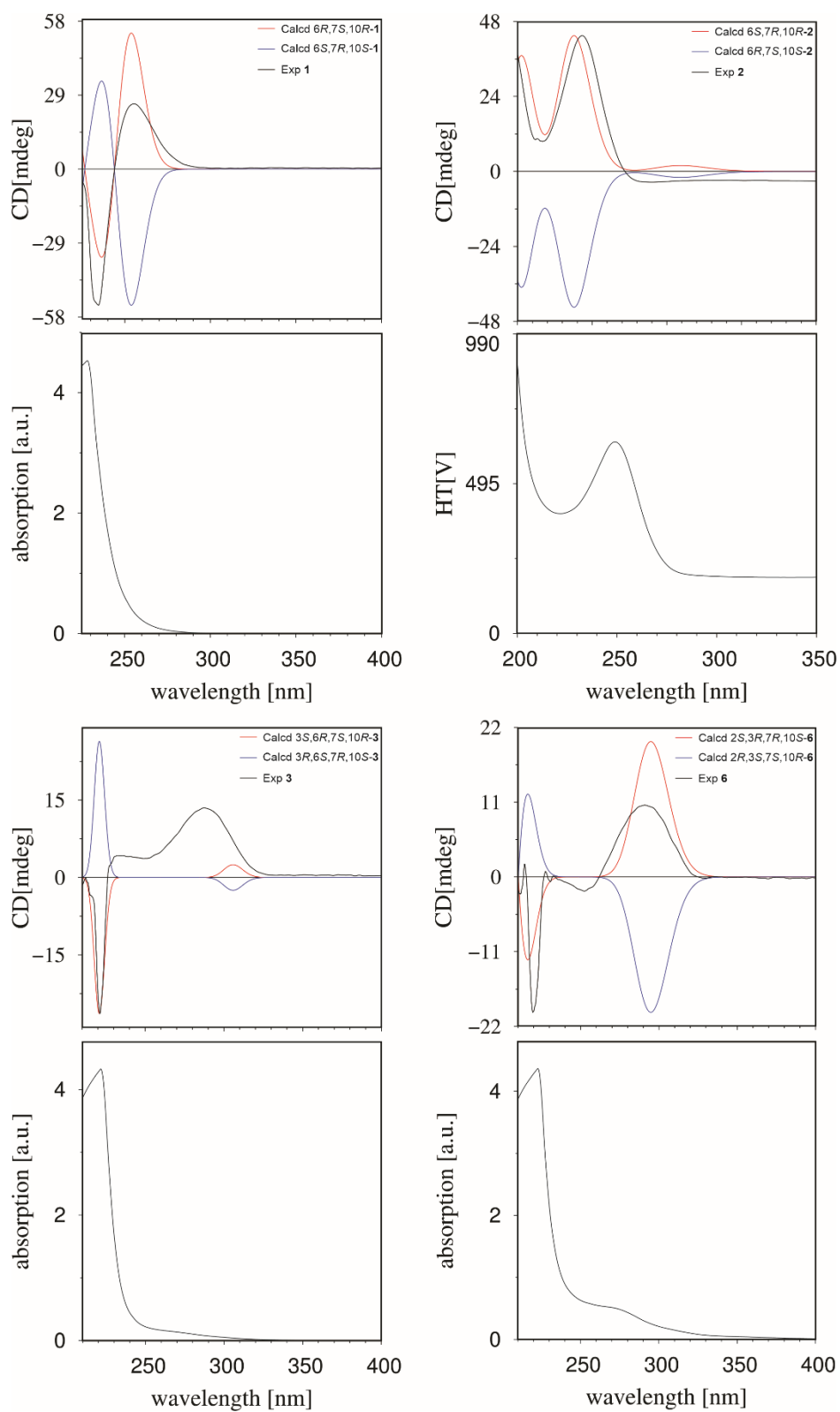


Figure S17. IR spectrum of compound **2**

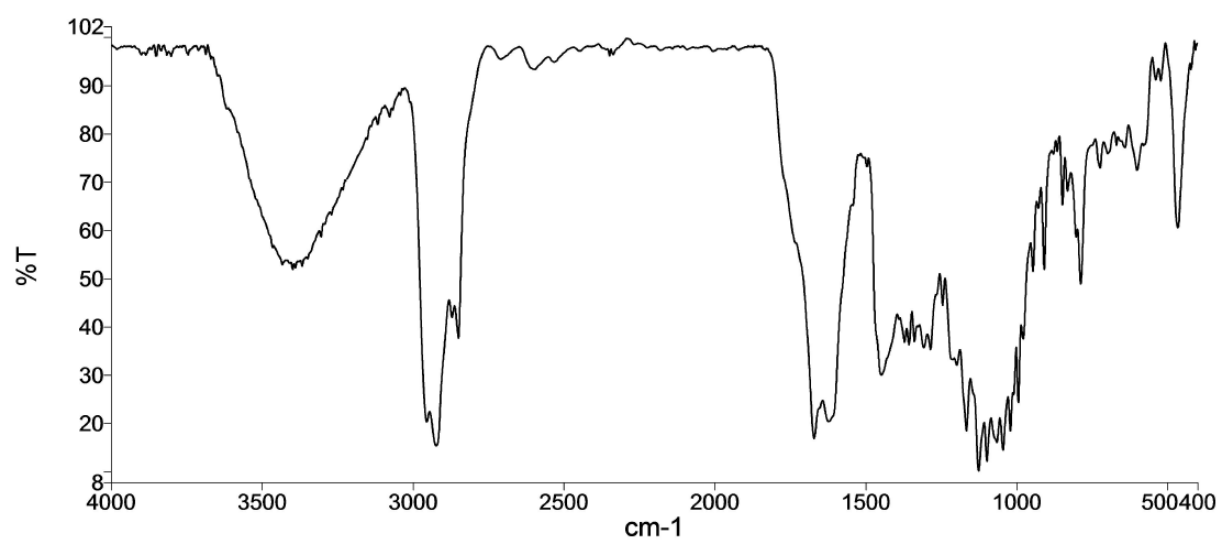


Figure S18. HRESIMS spectrum of compound **2** ([M + Na], positive ion mode)

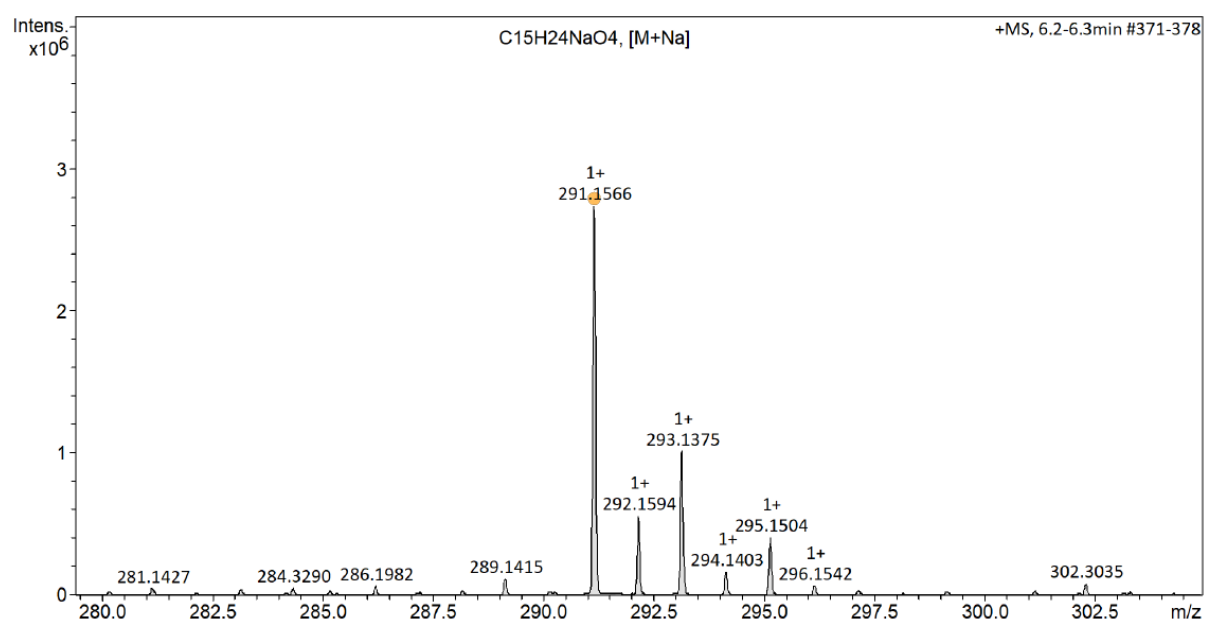


Figure S19. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) spectrum of **2**

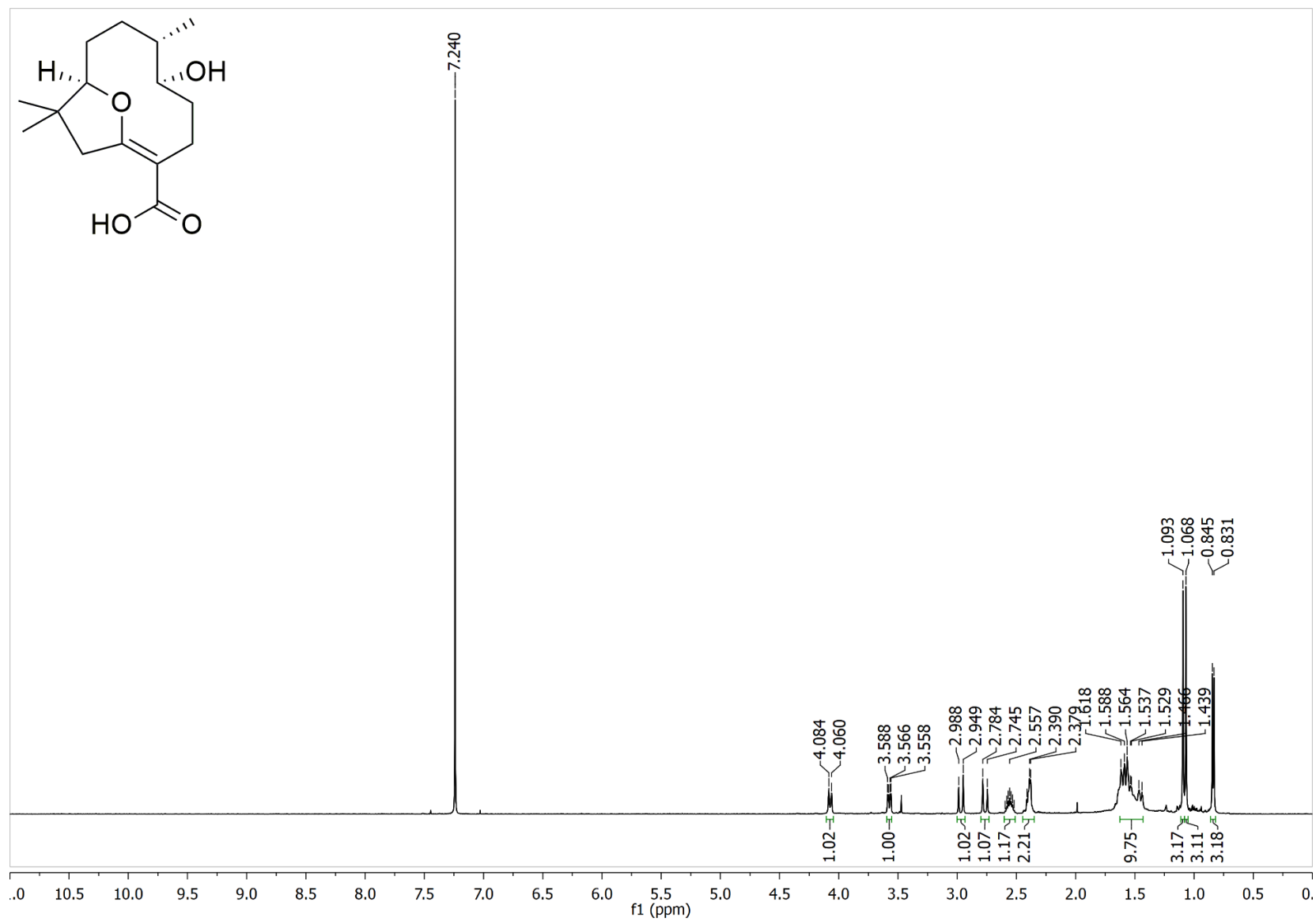


Figure S20. ^1H NMR (500 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **2**

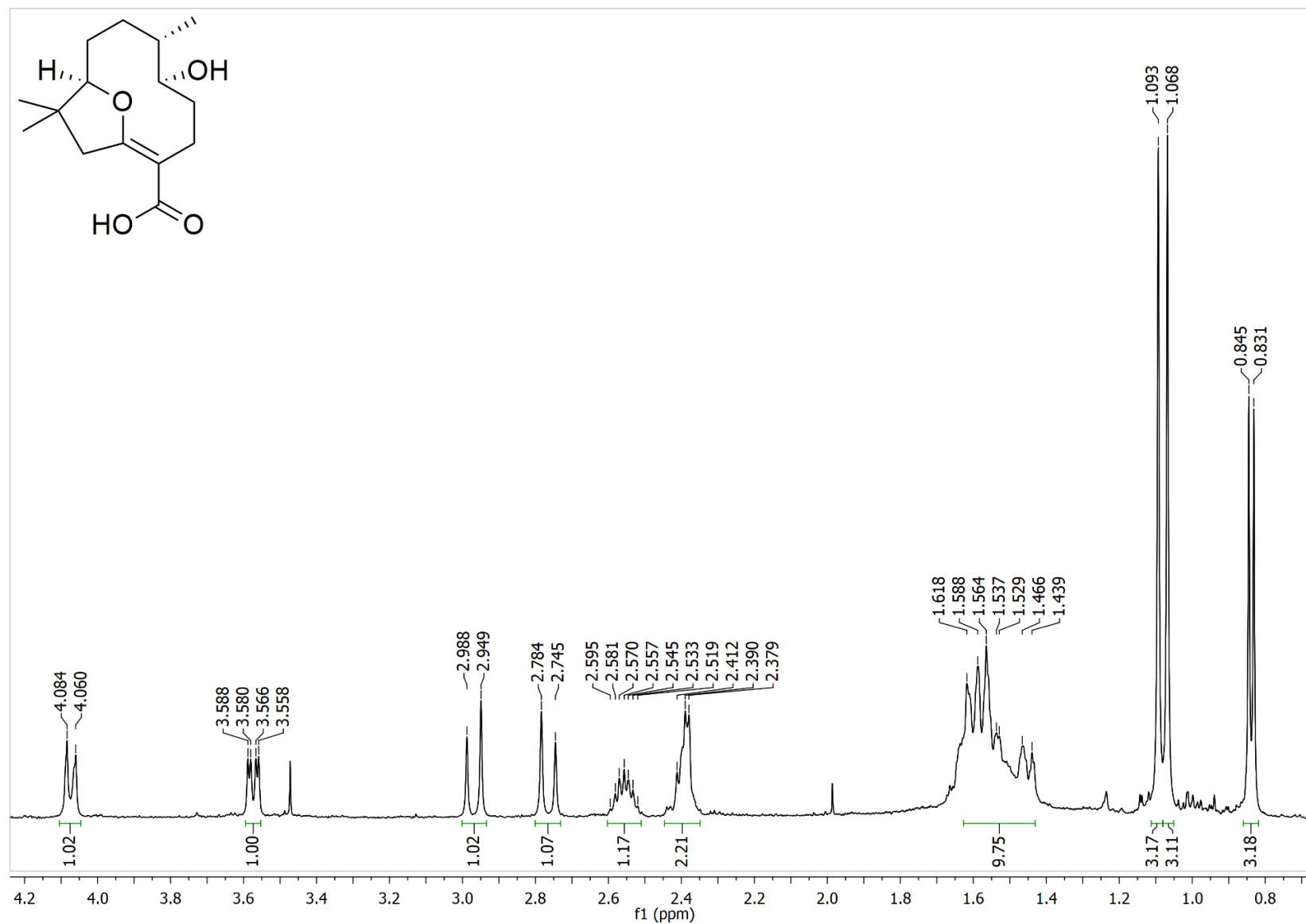


Figure S21. ^{13}C NMR (125 MHz, CDCl_3) spectrum of **2**

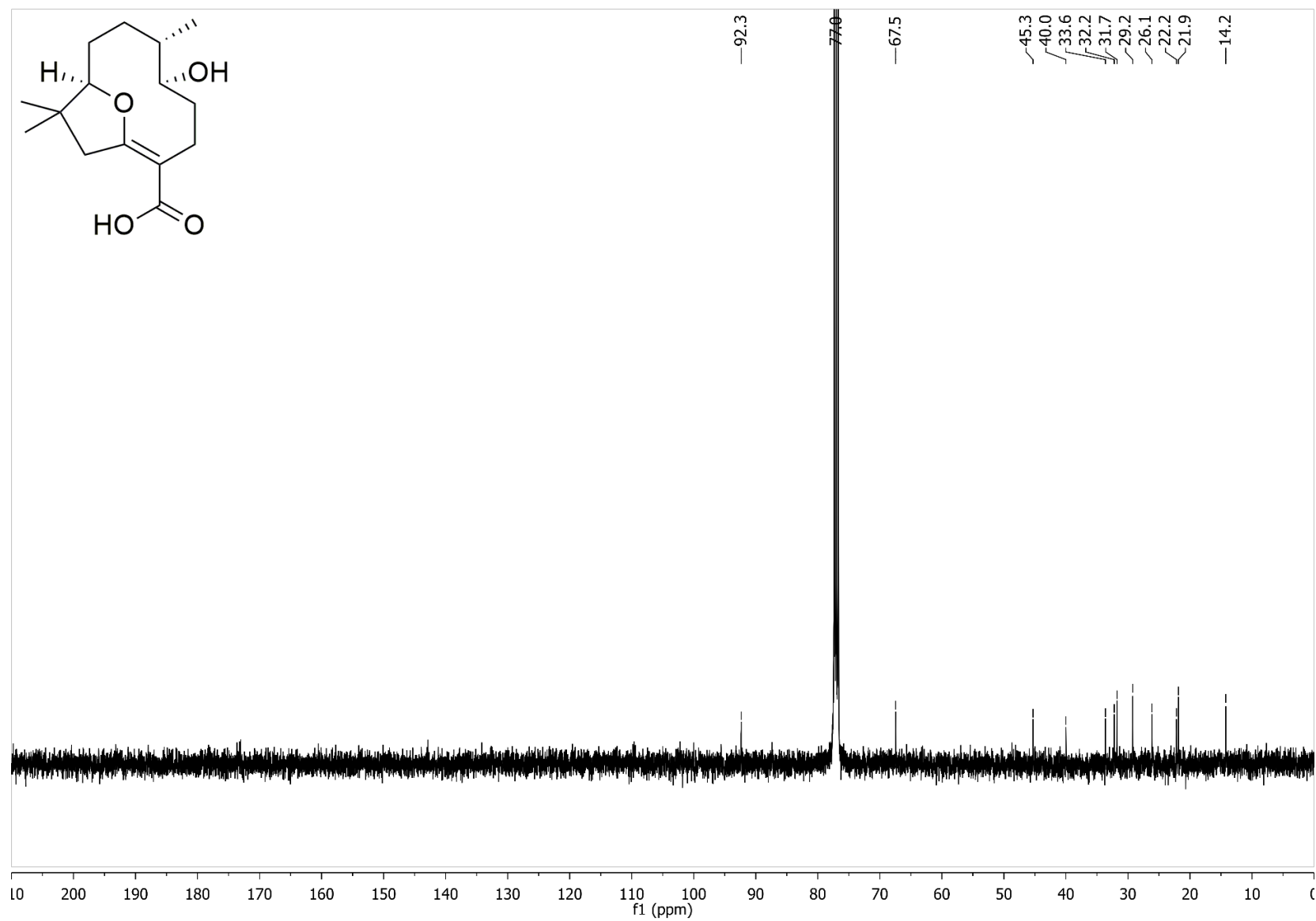


Figure S22. ^{13}C NMR (200 MHz, CDCl_3) spectrum of **2**

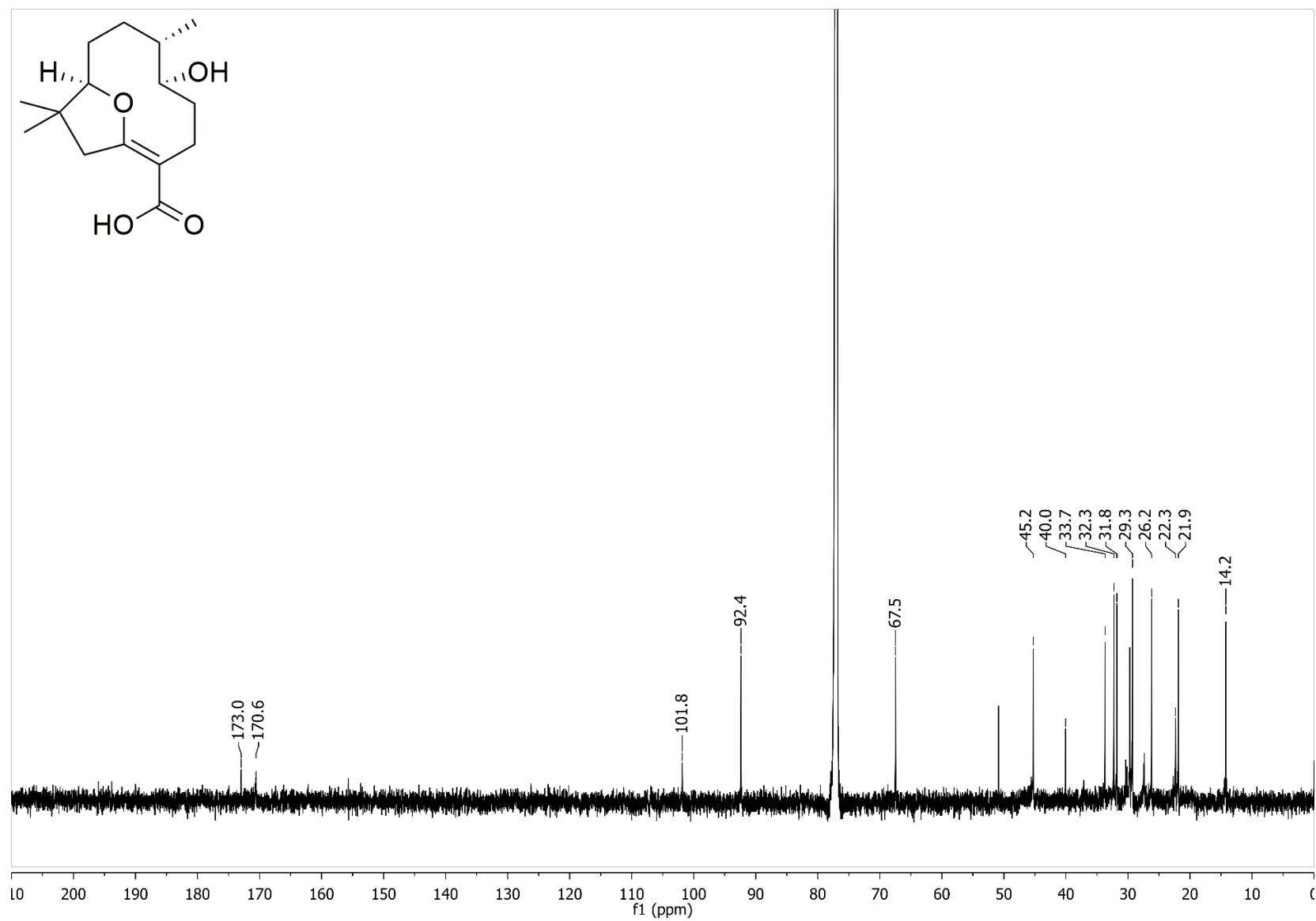


Figure S23. HSQC NMR (500 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **2**

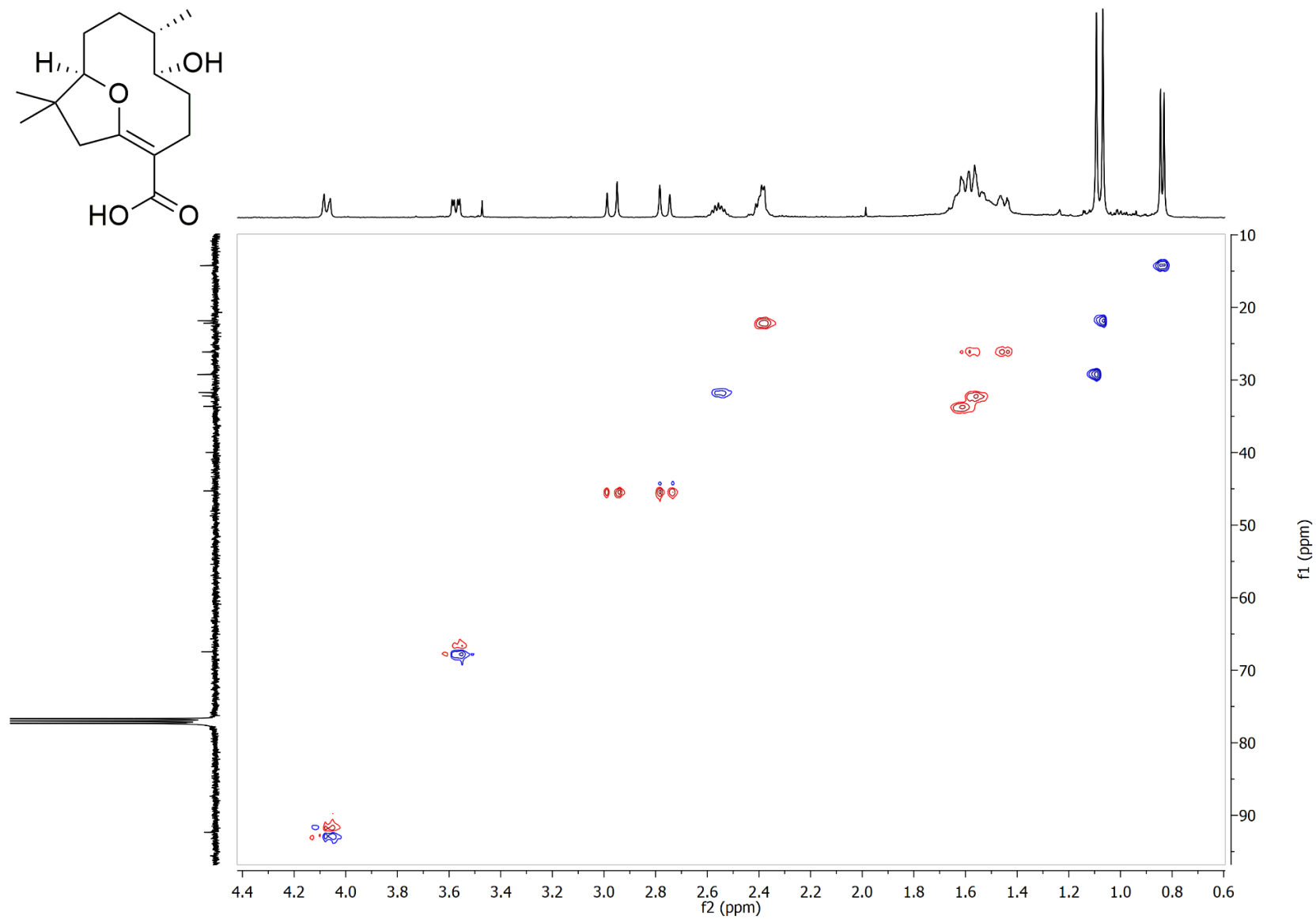


Figure S24. HMBC NMR (500 MHz, CDCl₃) spectrum of **2**

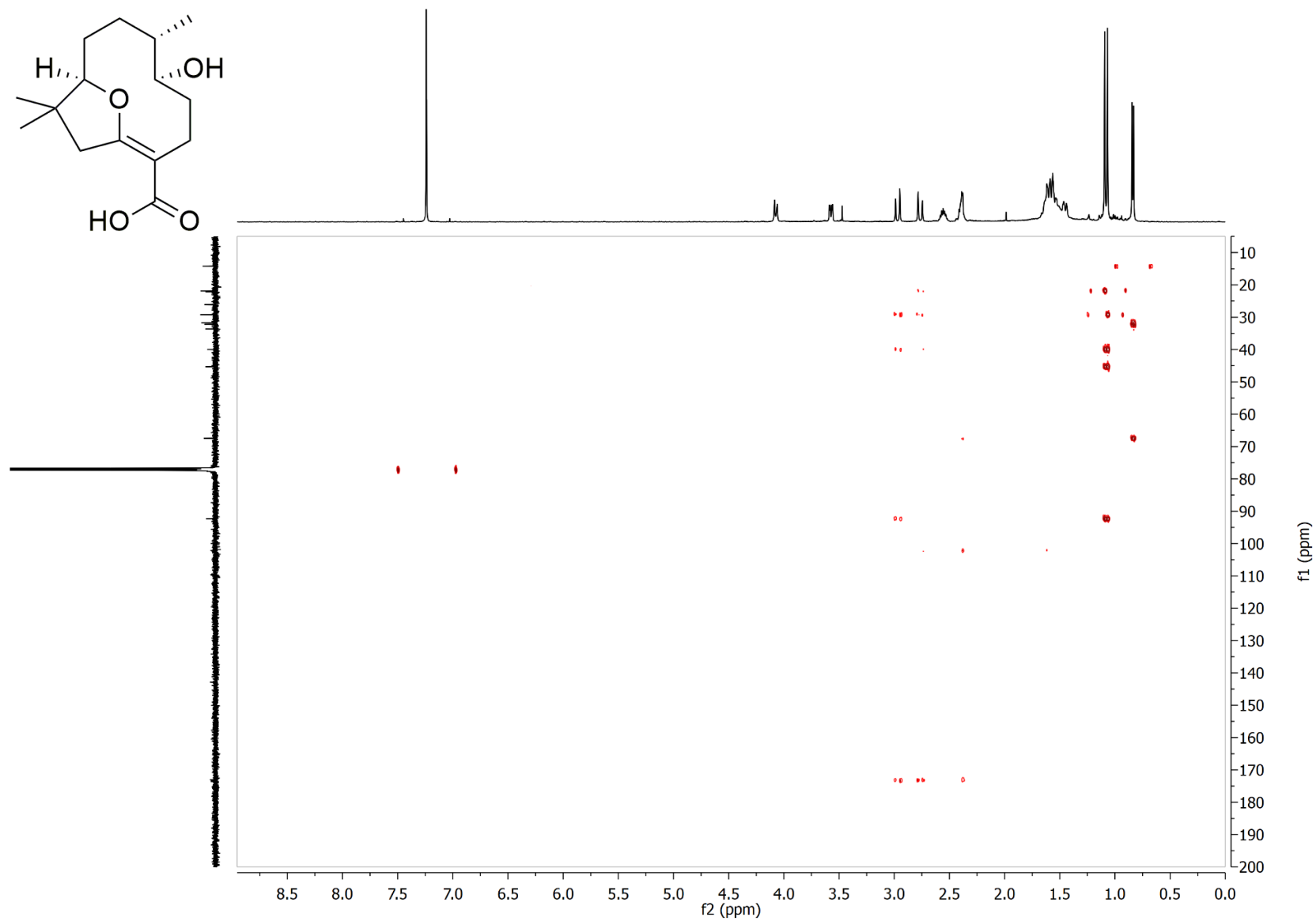


Figure S25. HMBC NMR (500 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **2**

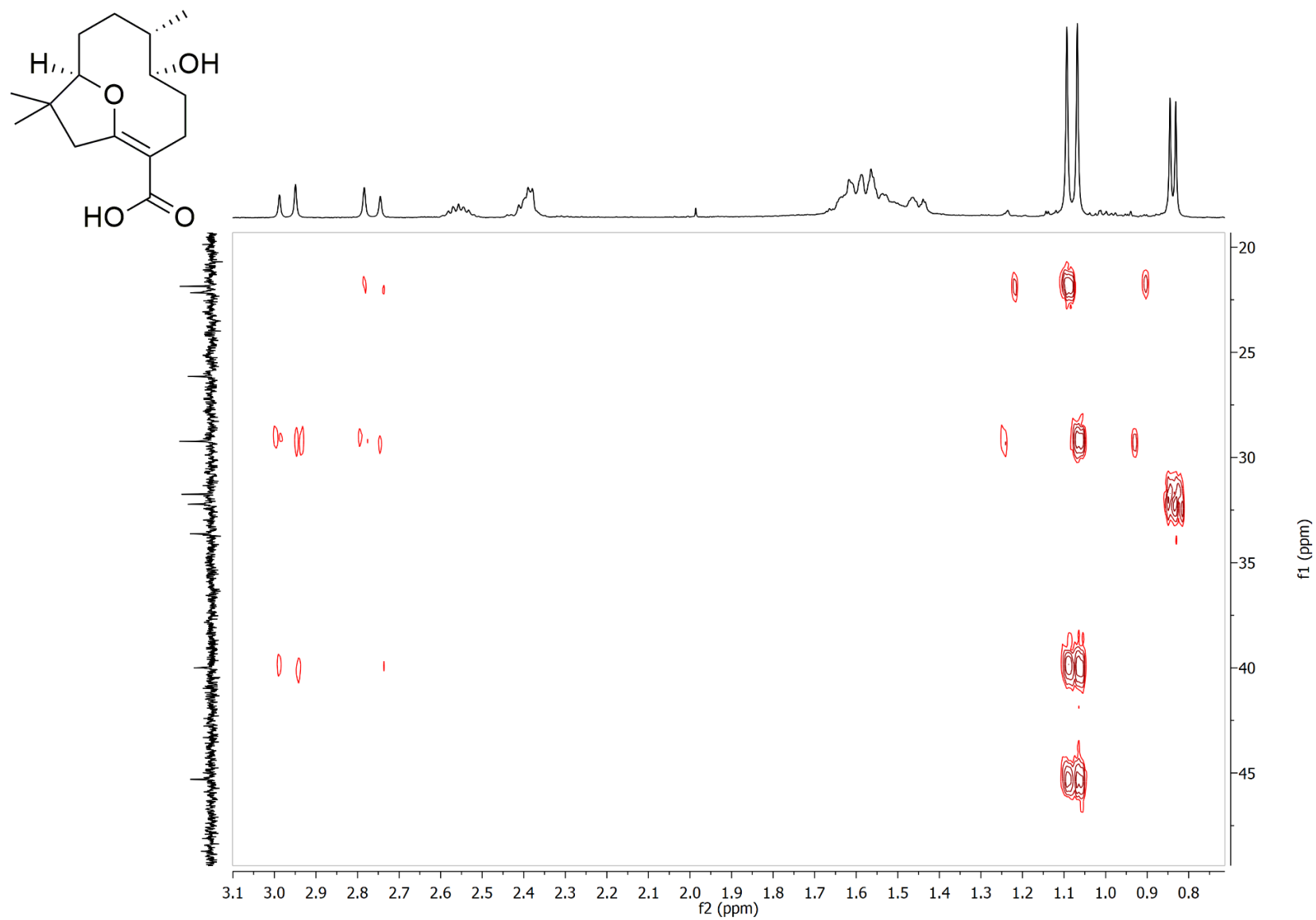


Figure S26. ^1H - ^1H COSY NMR (500 MHz, CDCl_3) spectrum of **2**

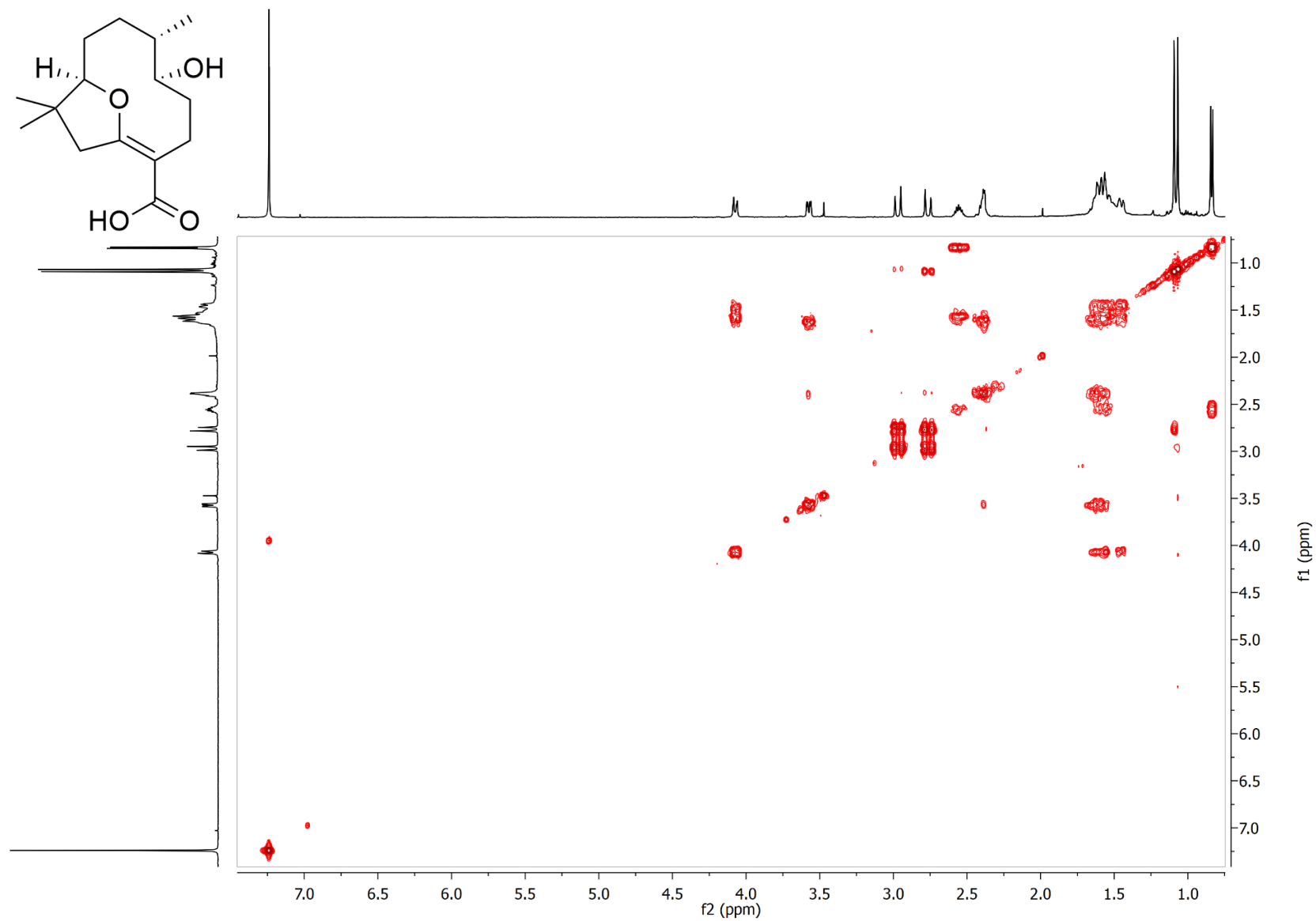


Figure S27. ^1H - ^1H NOESY NMR (500 MHz, CDCl_3) spectrum of **2**

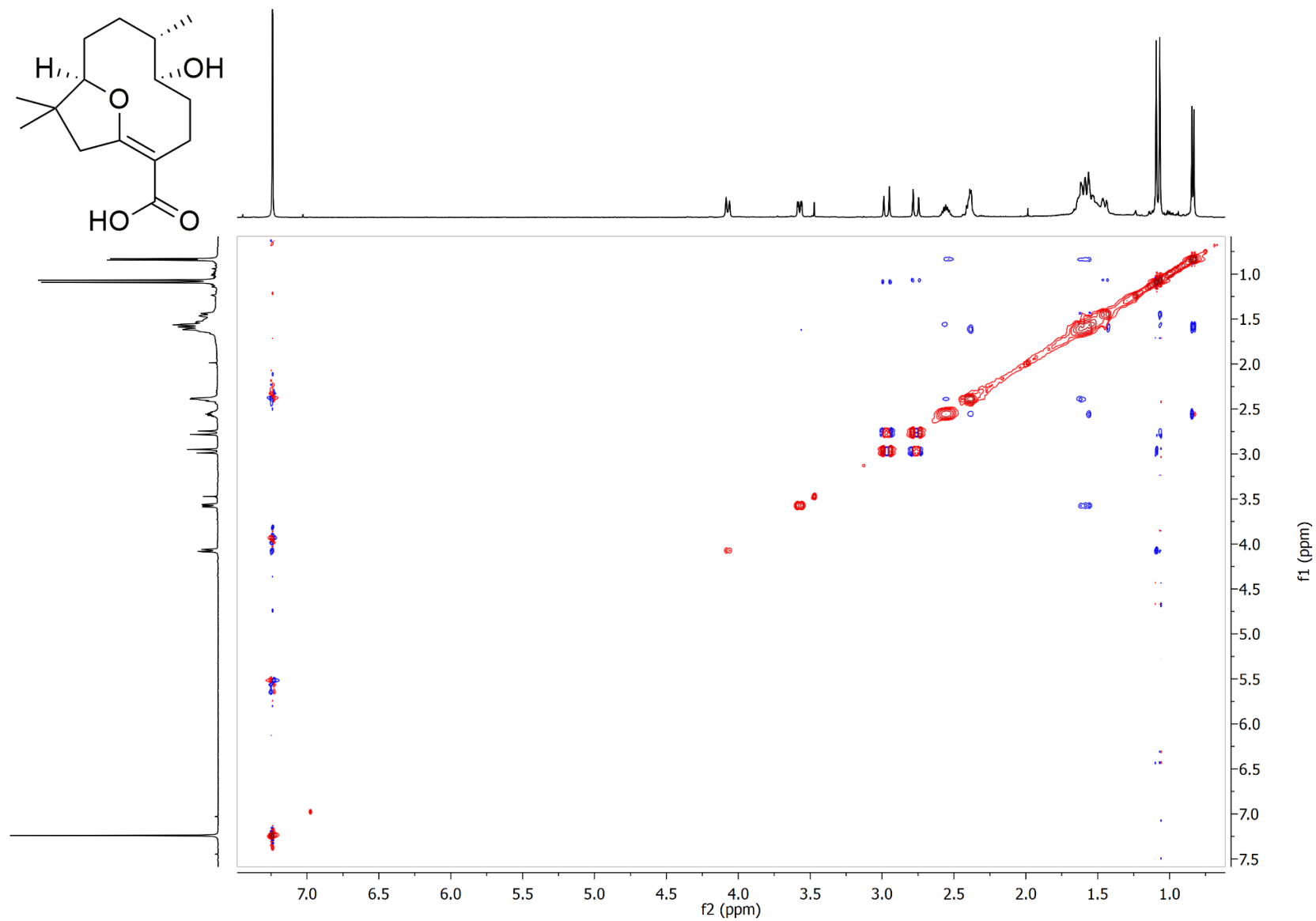


Figure S28. ^1H - ^1H NOESY NMR (500 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **2**

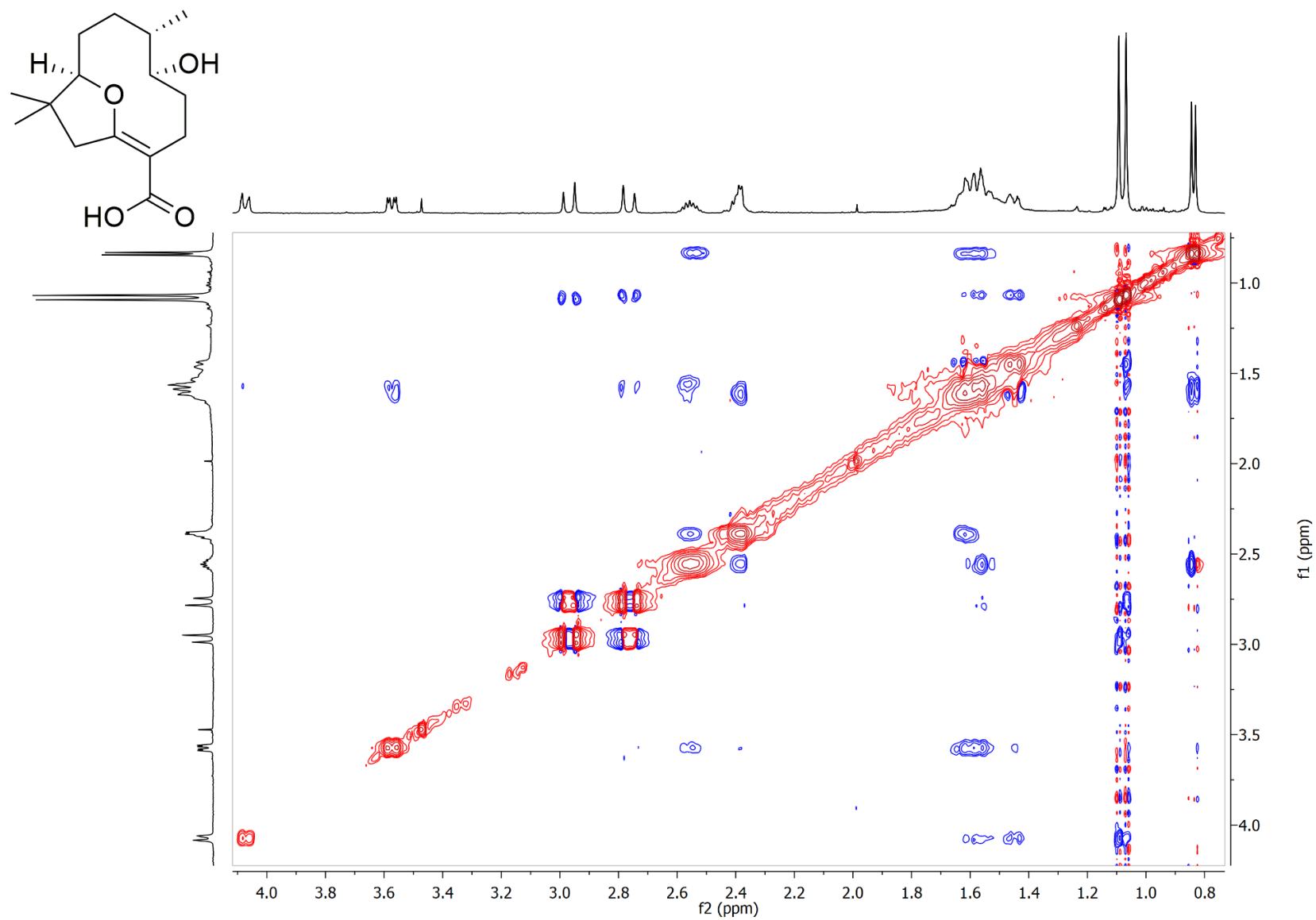


Figure S29. ESIMS/MS spectrum of compound **2** ($[M + H]^+$, positive ion mode)

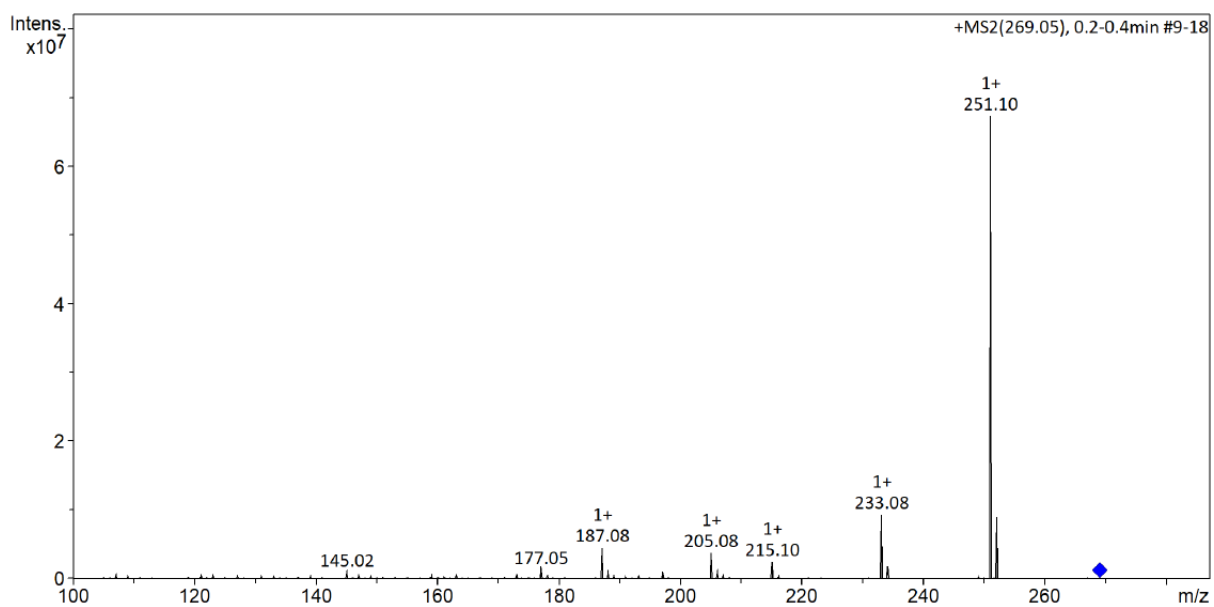


Figure S30. IR spectrum of compound **3**

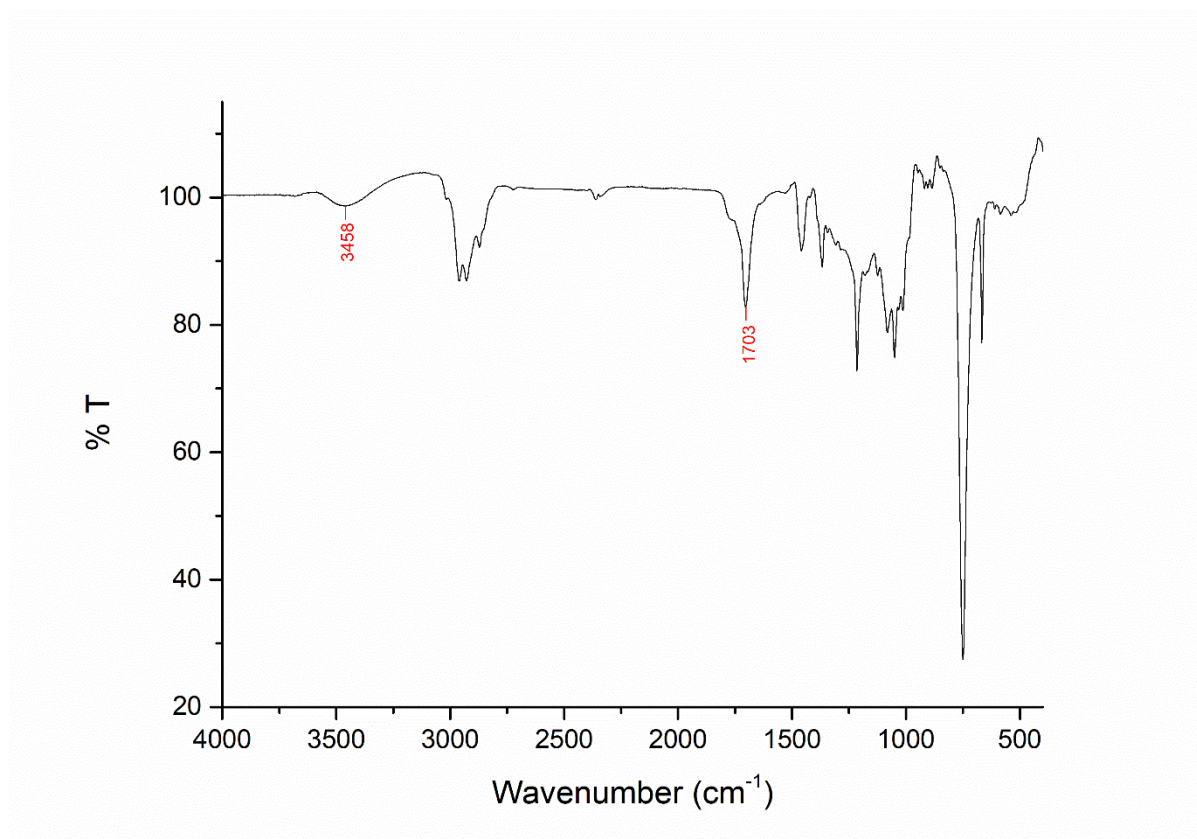


Figure S31. HRESIMS spectrum of compound **3** ([M + Na], positive ion mode)

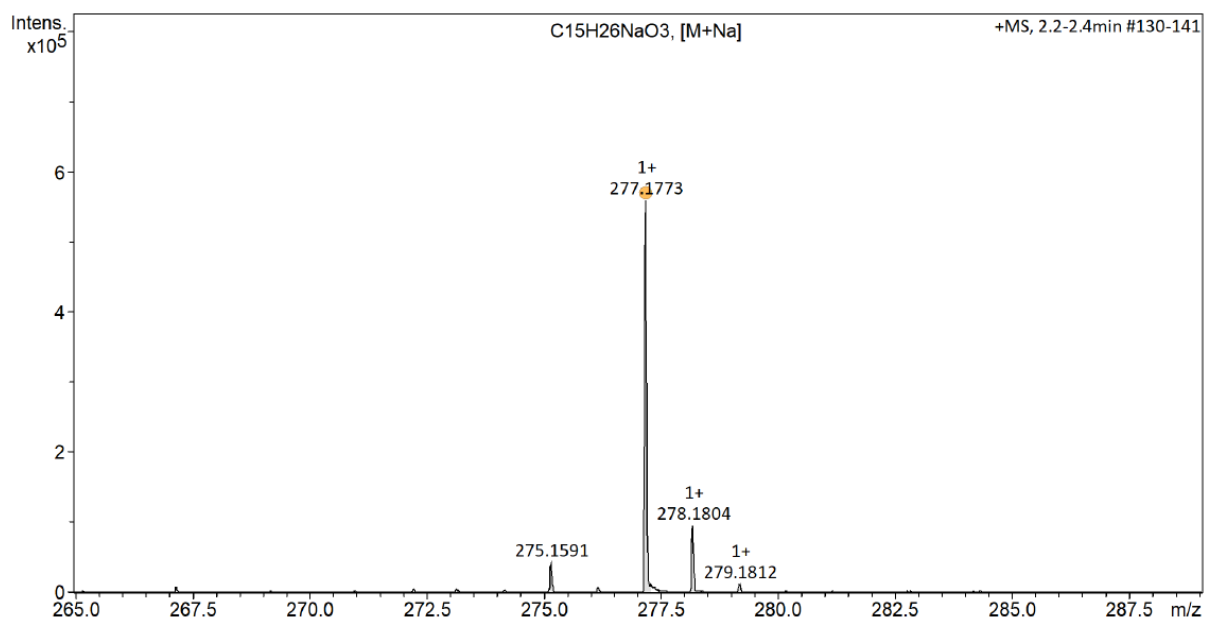


Figure S32. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **3**

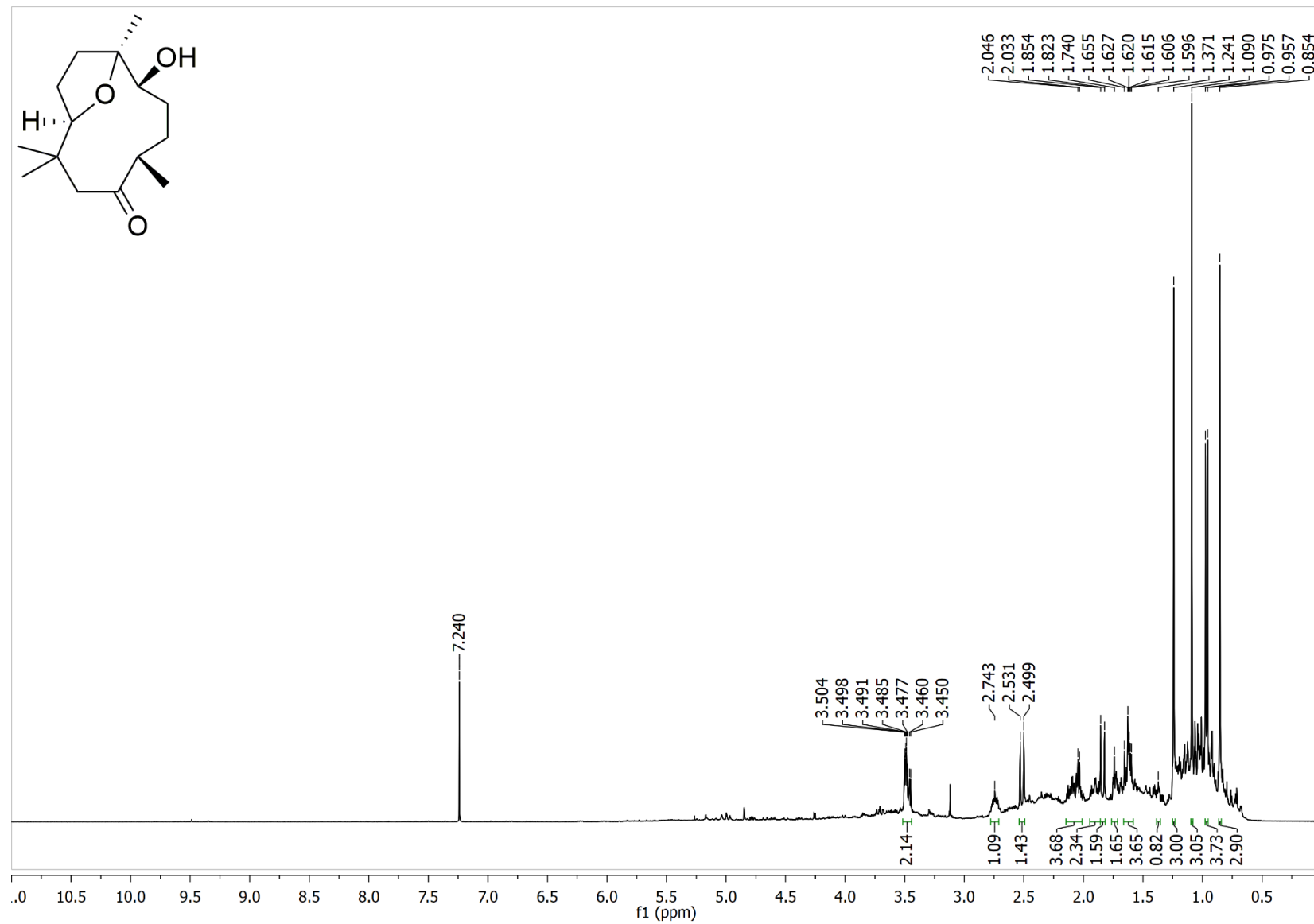


Figure S33. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **3**

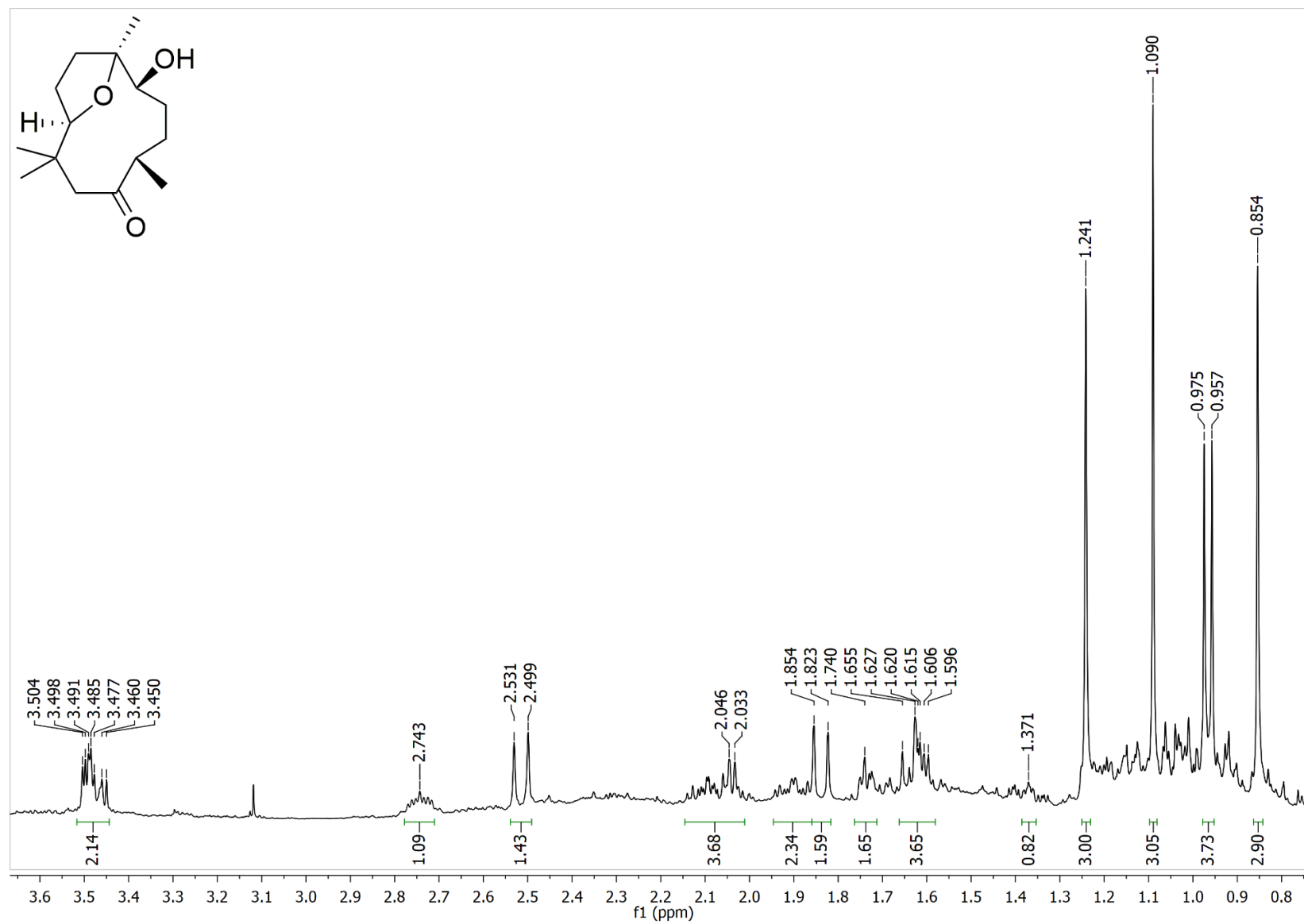


Figure S34. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **3**

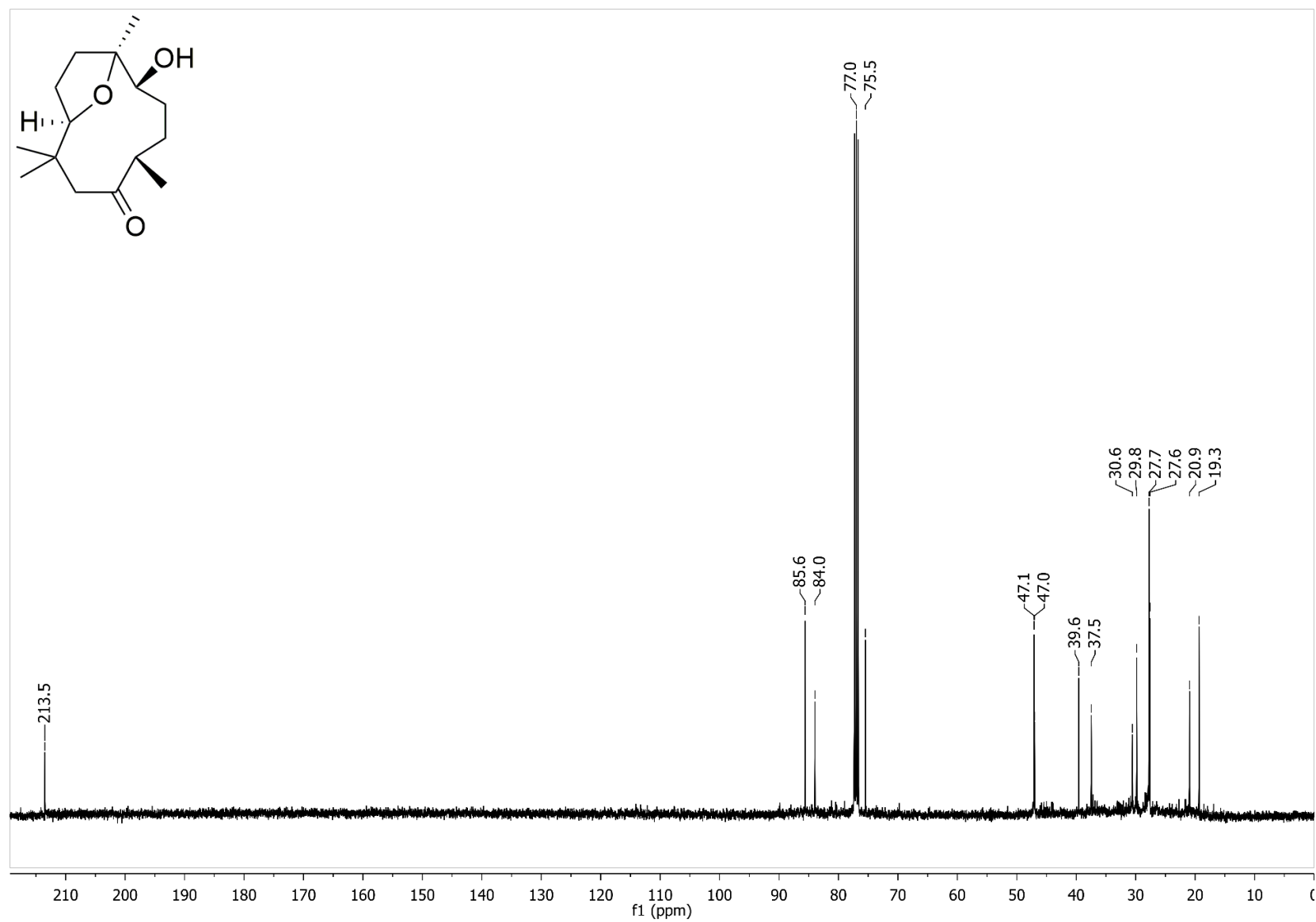


Figure S35. ^{13}C DEPT-135 NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **3**

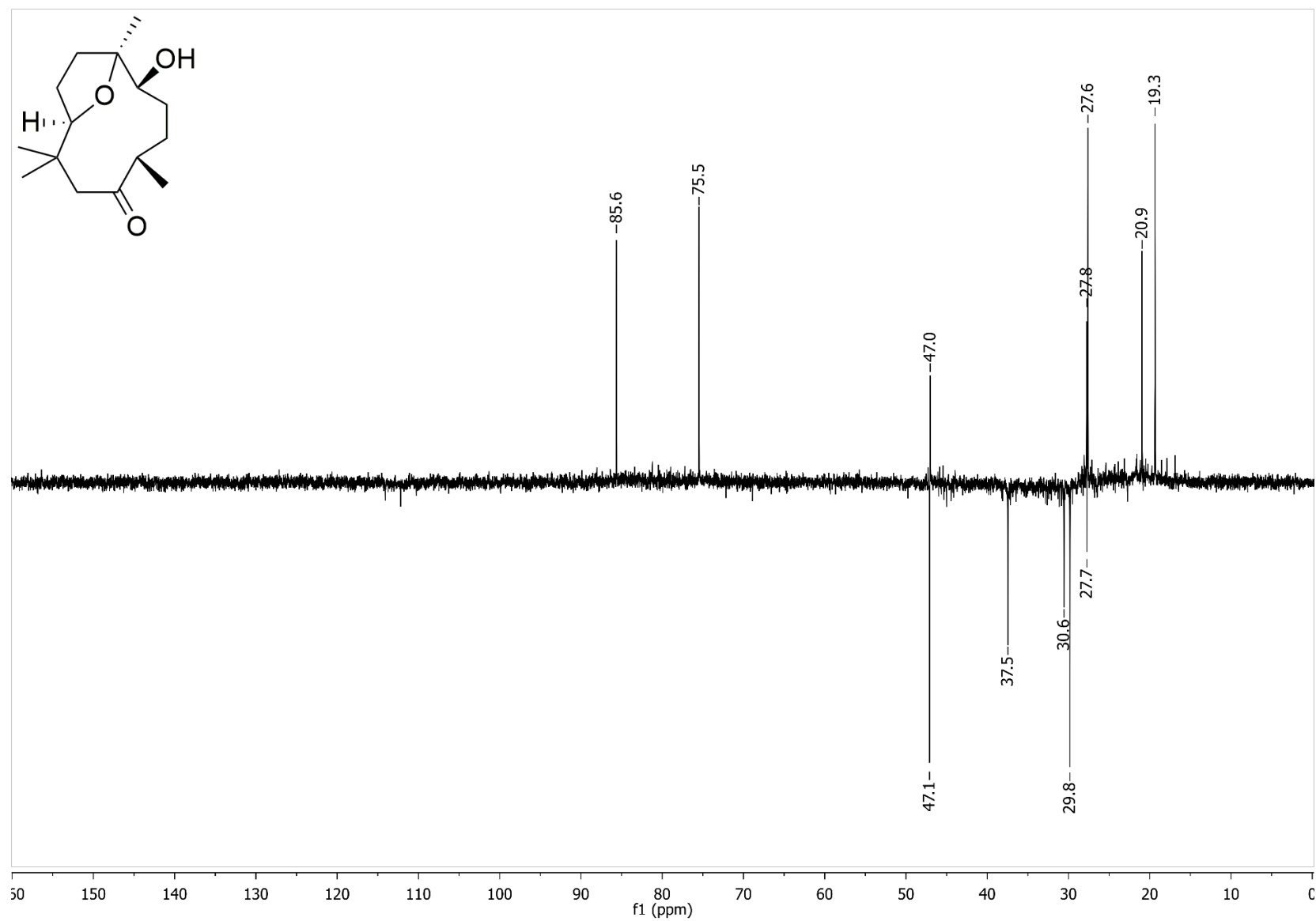


Figure S36. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **3**

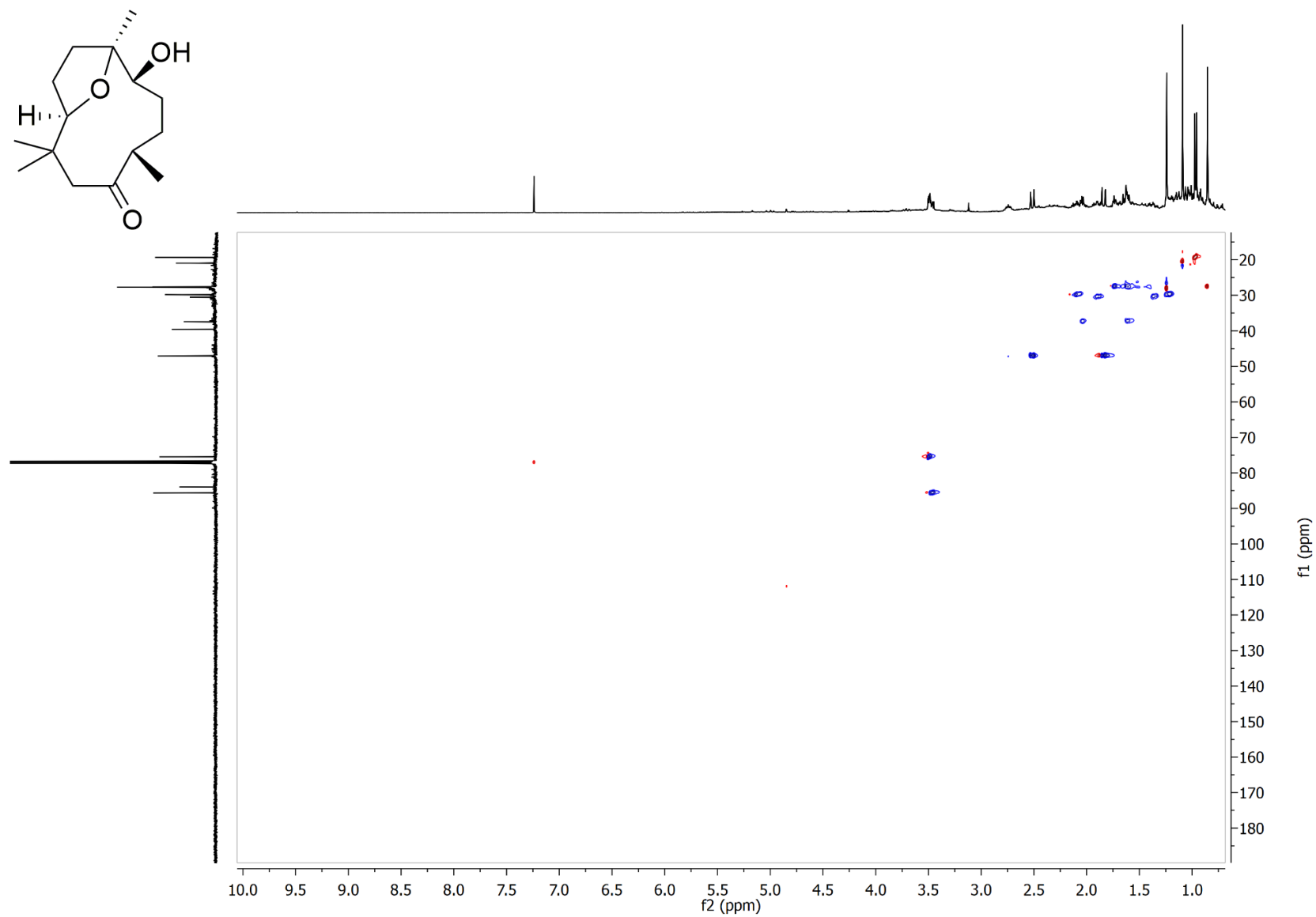


Figure S37. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **3**

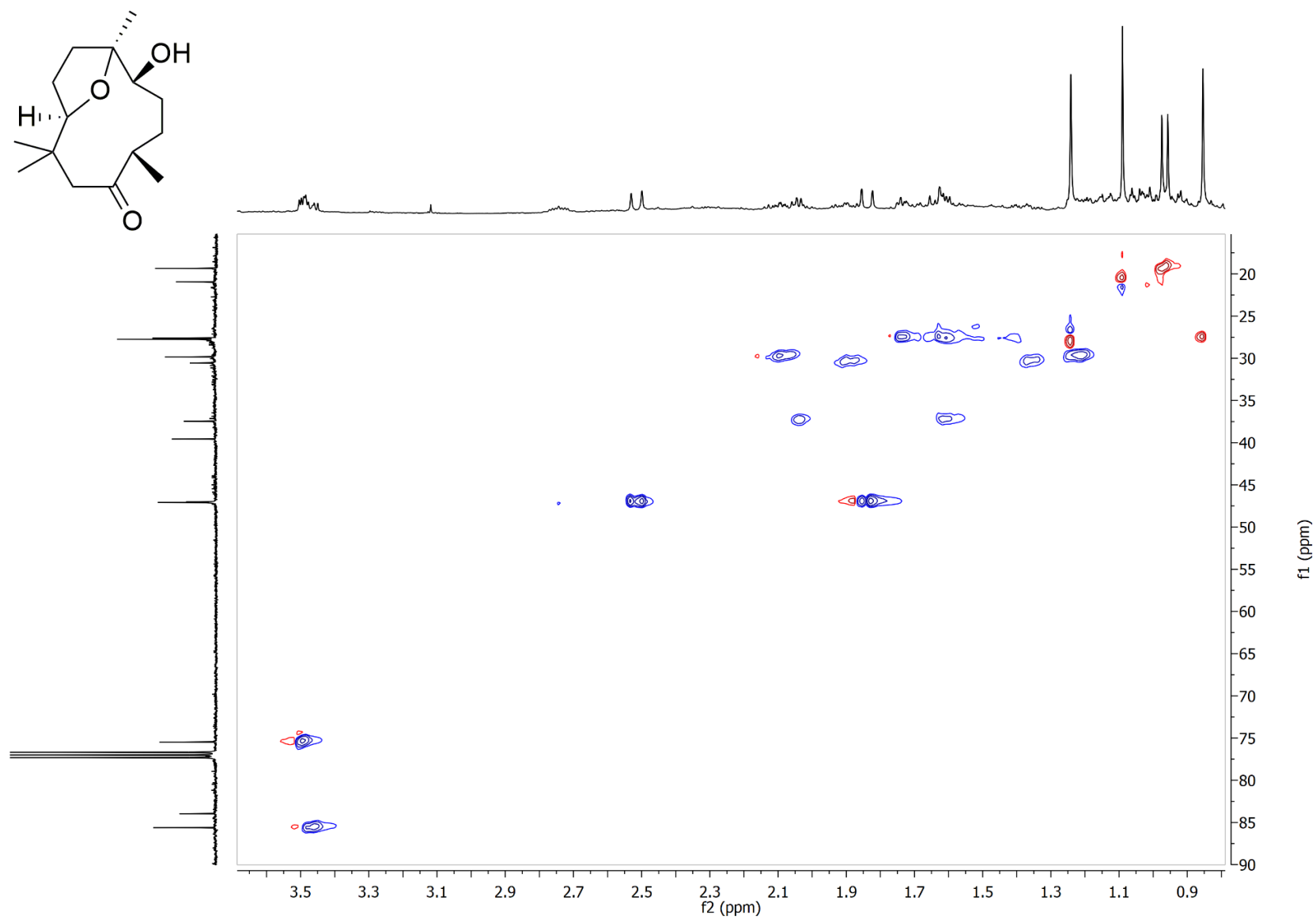


Figure S38. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **3**

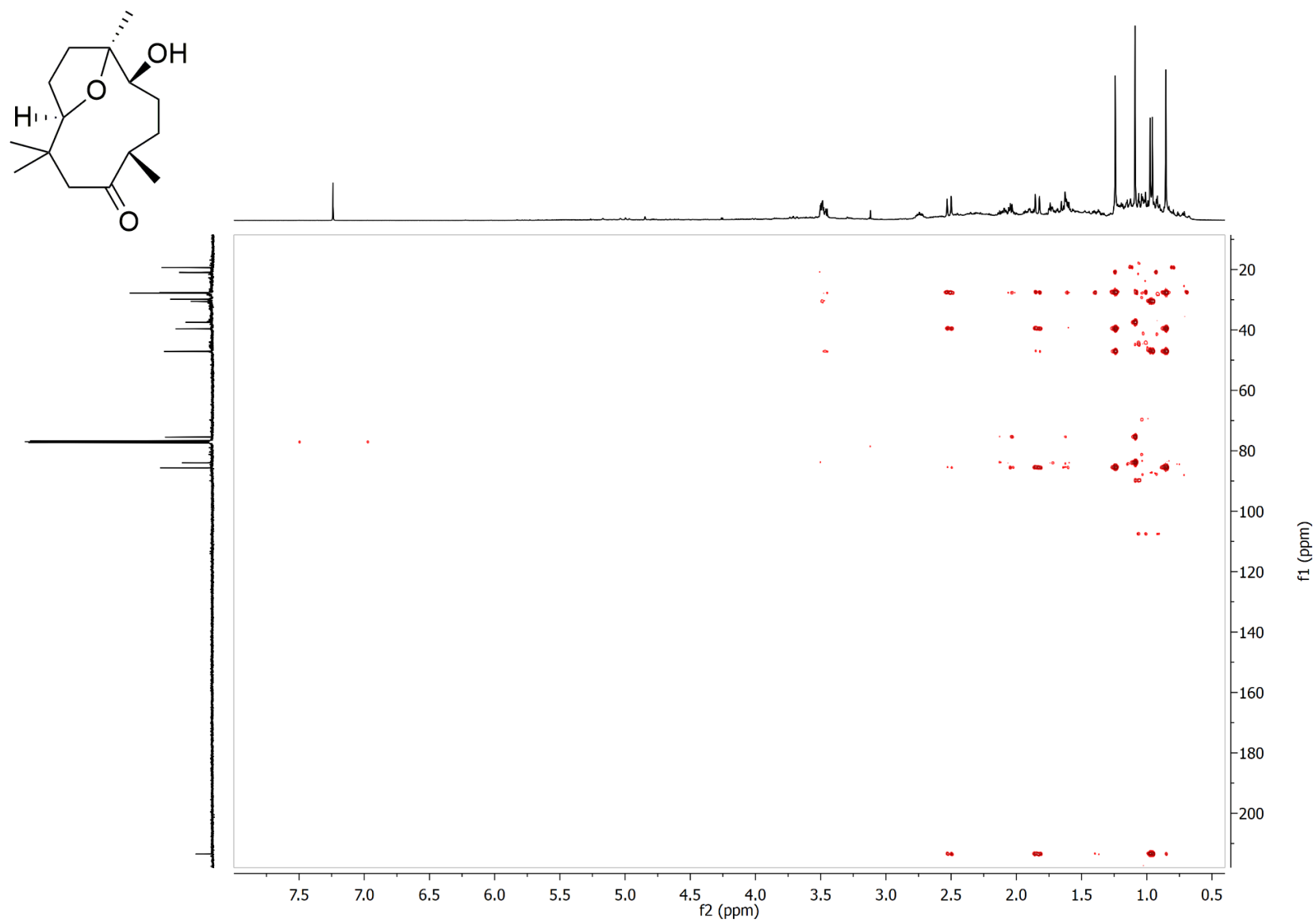


Figure S39. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **3**

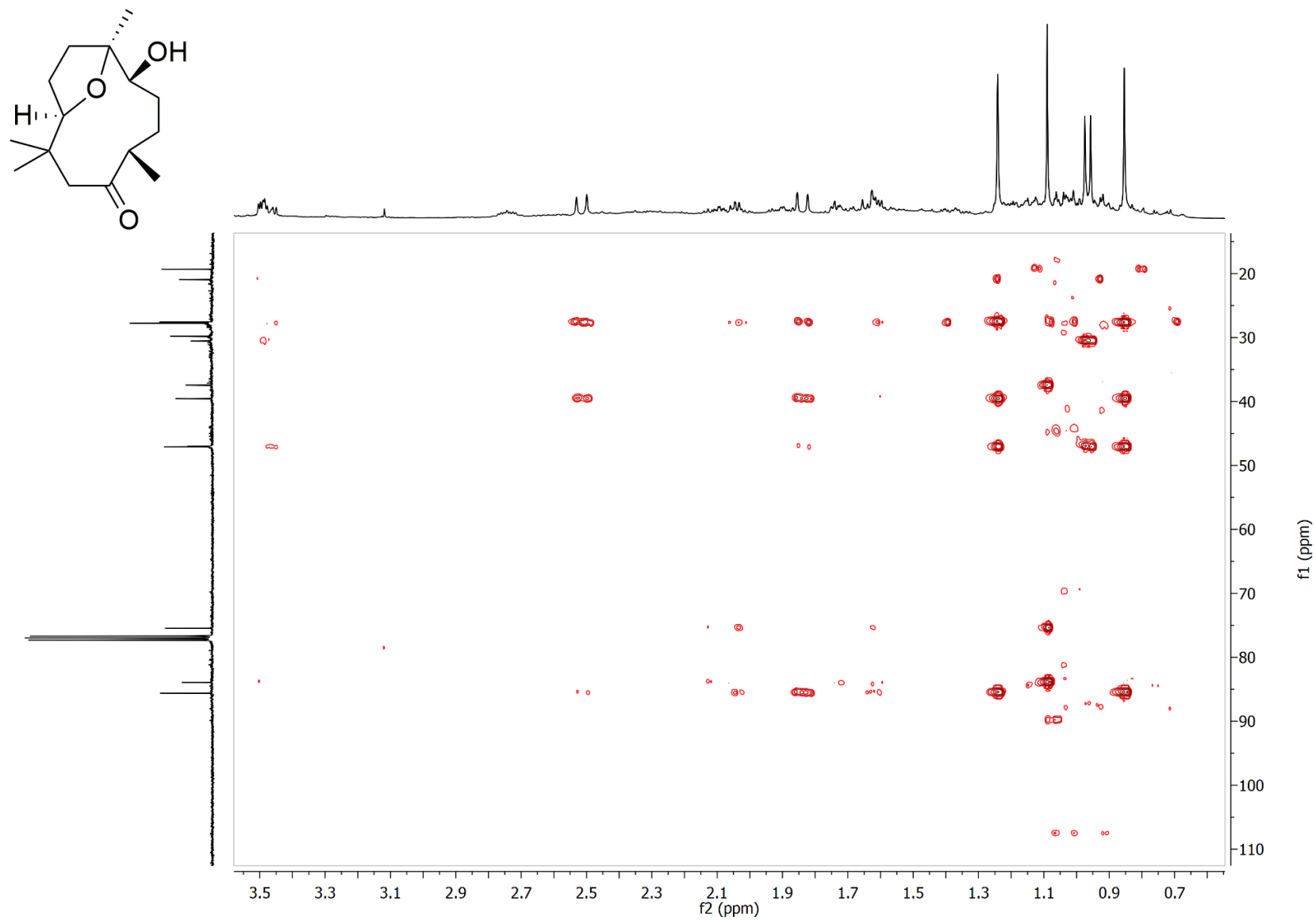


Figure S40. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **3**

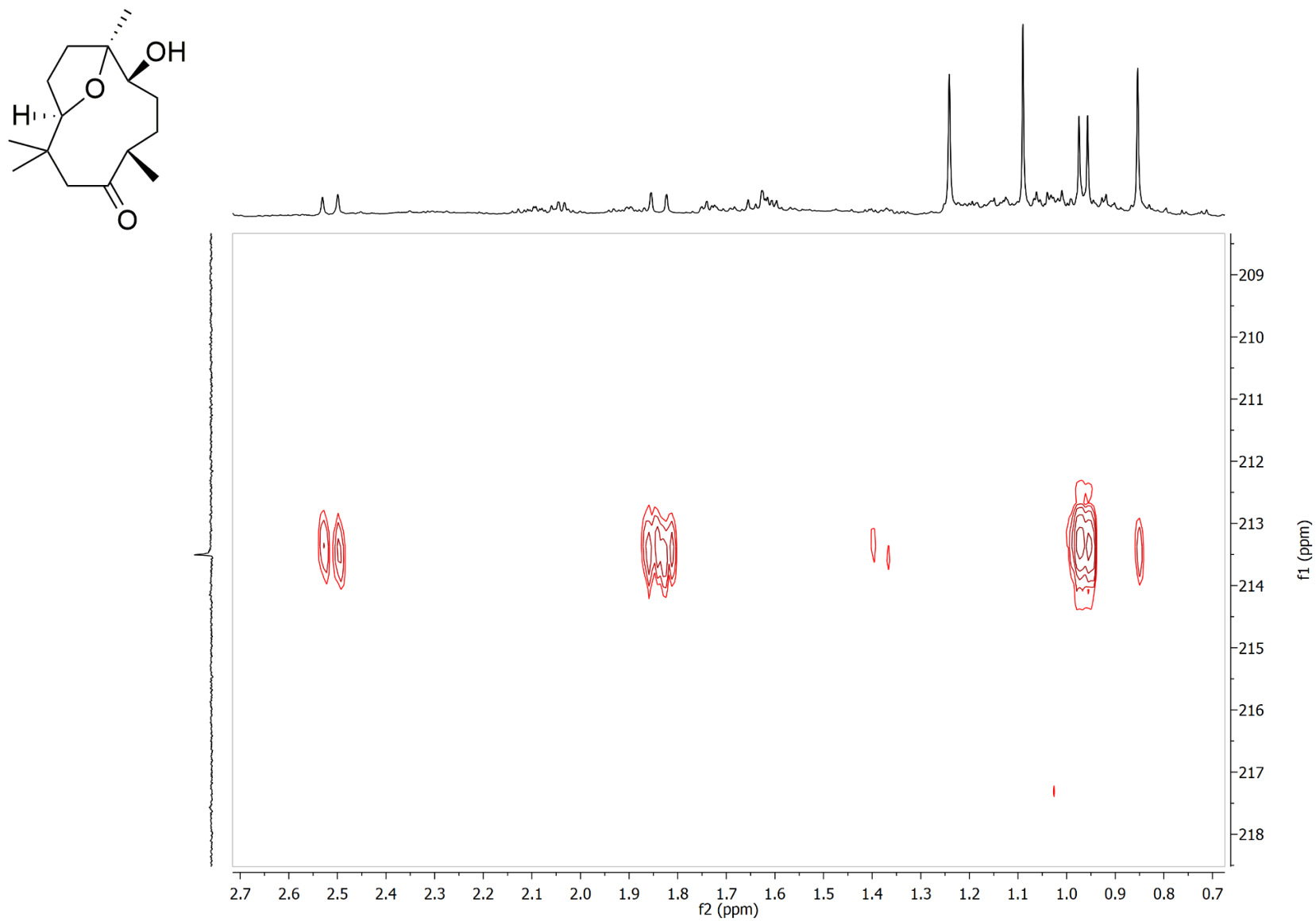


Figure S41. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **3**

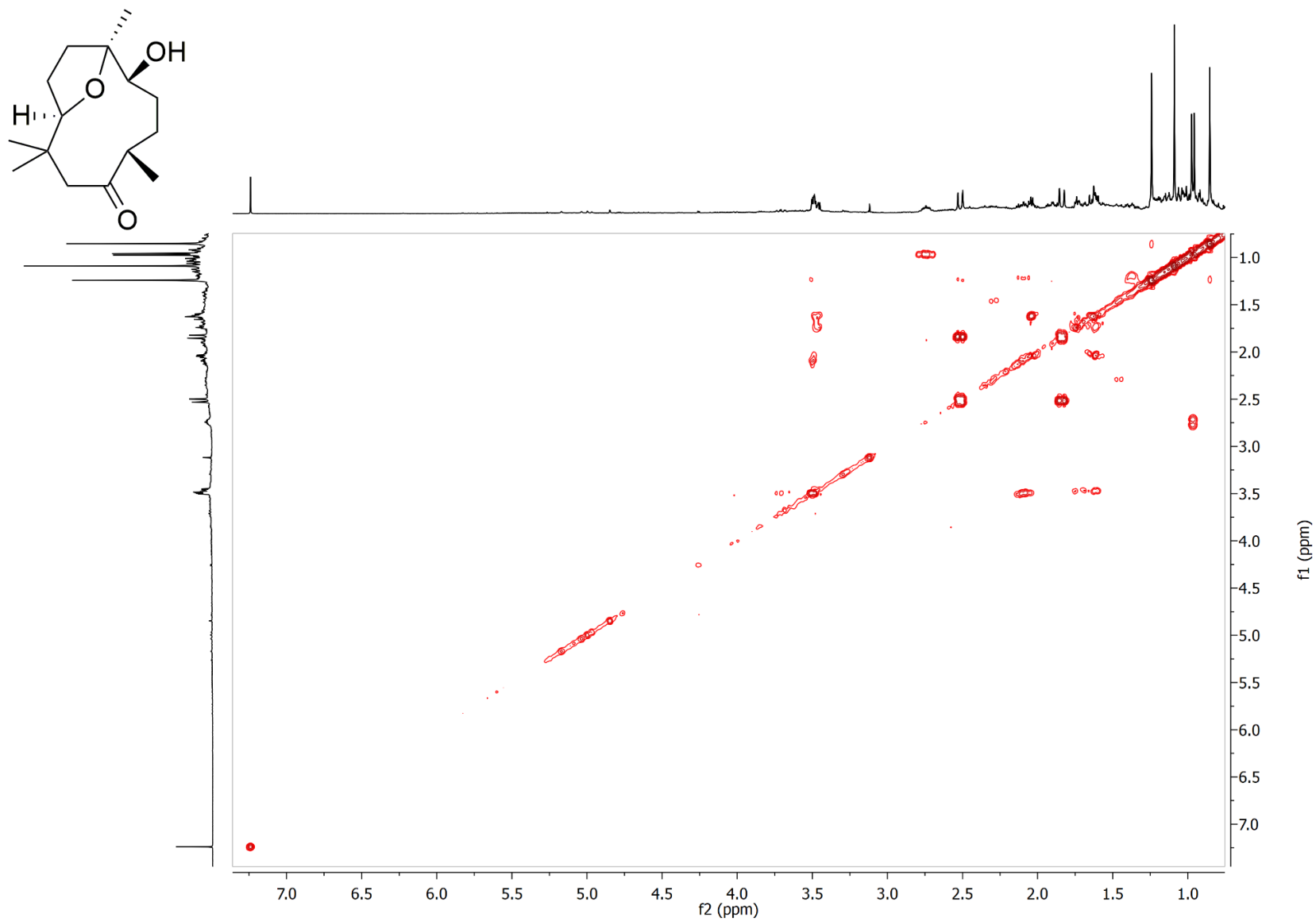


Figure S42. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **3**

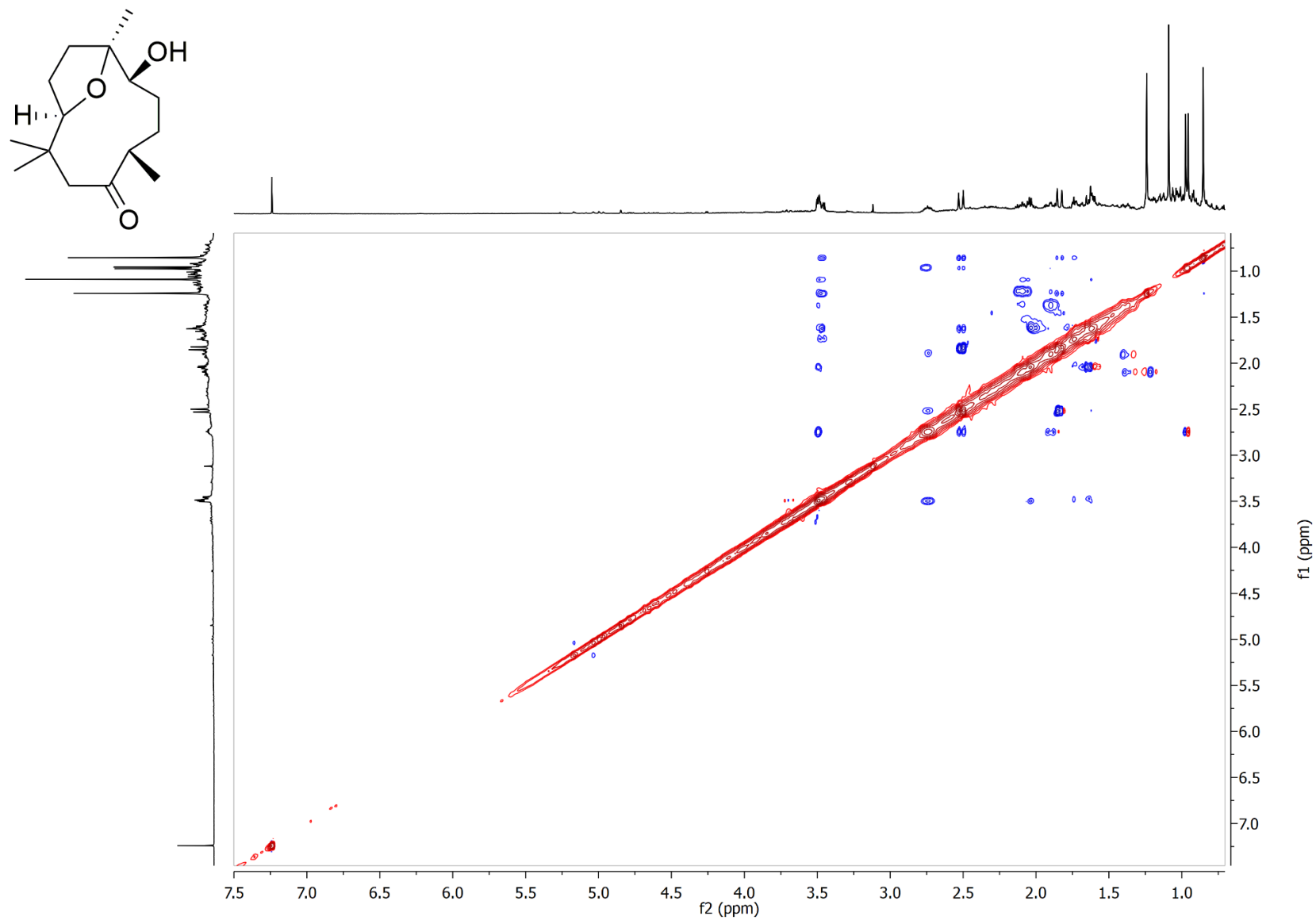


Figure S43. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **3**

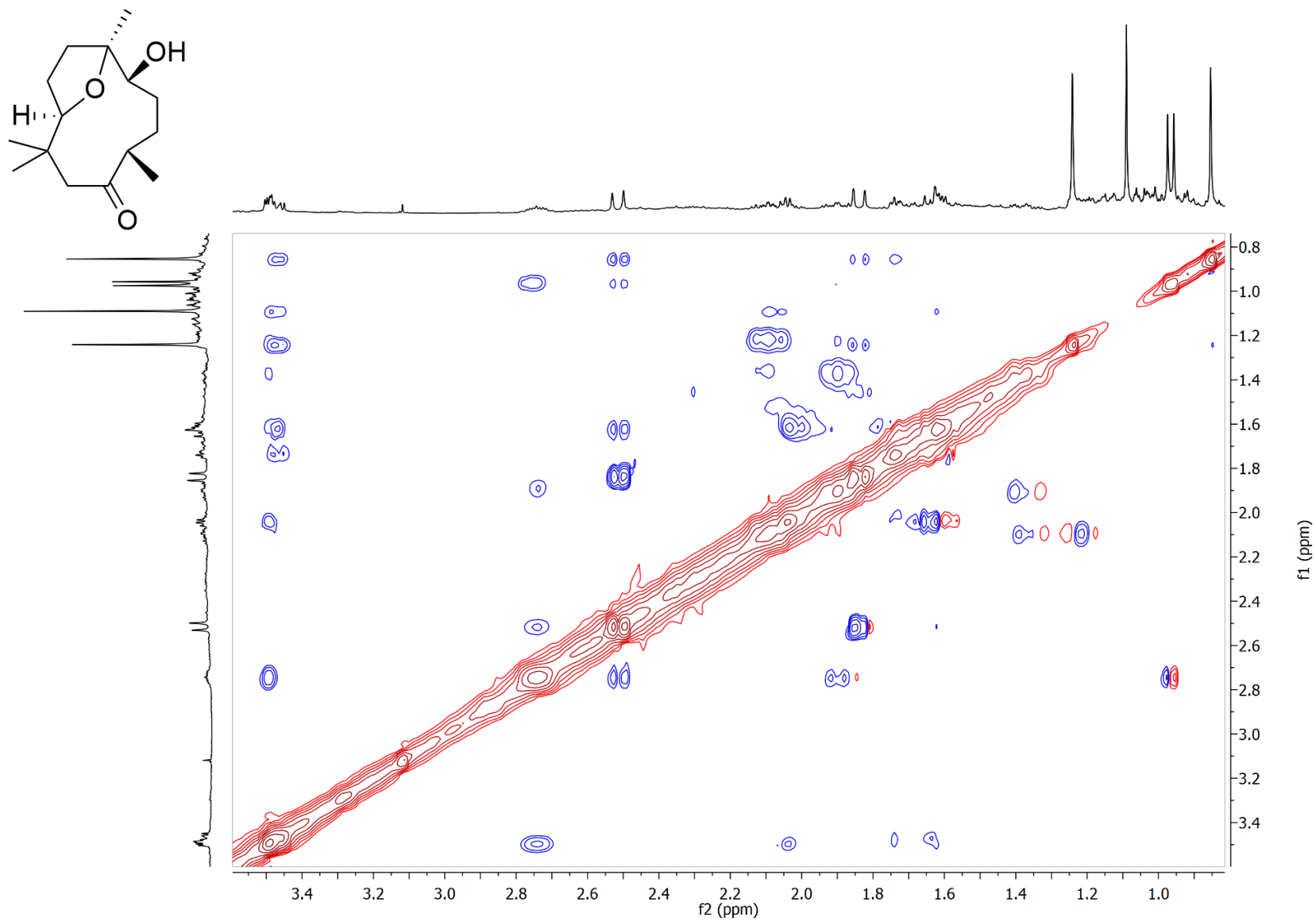


Figure S44. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated **3**

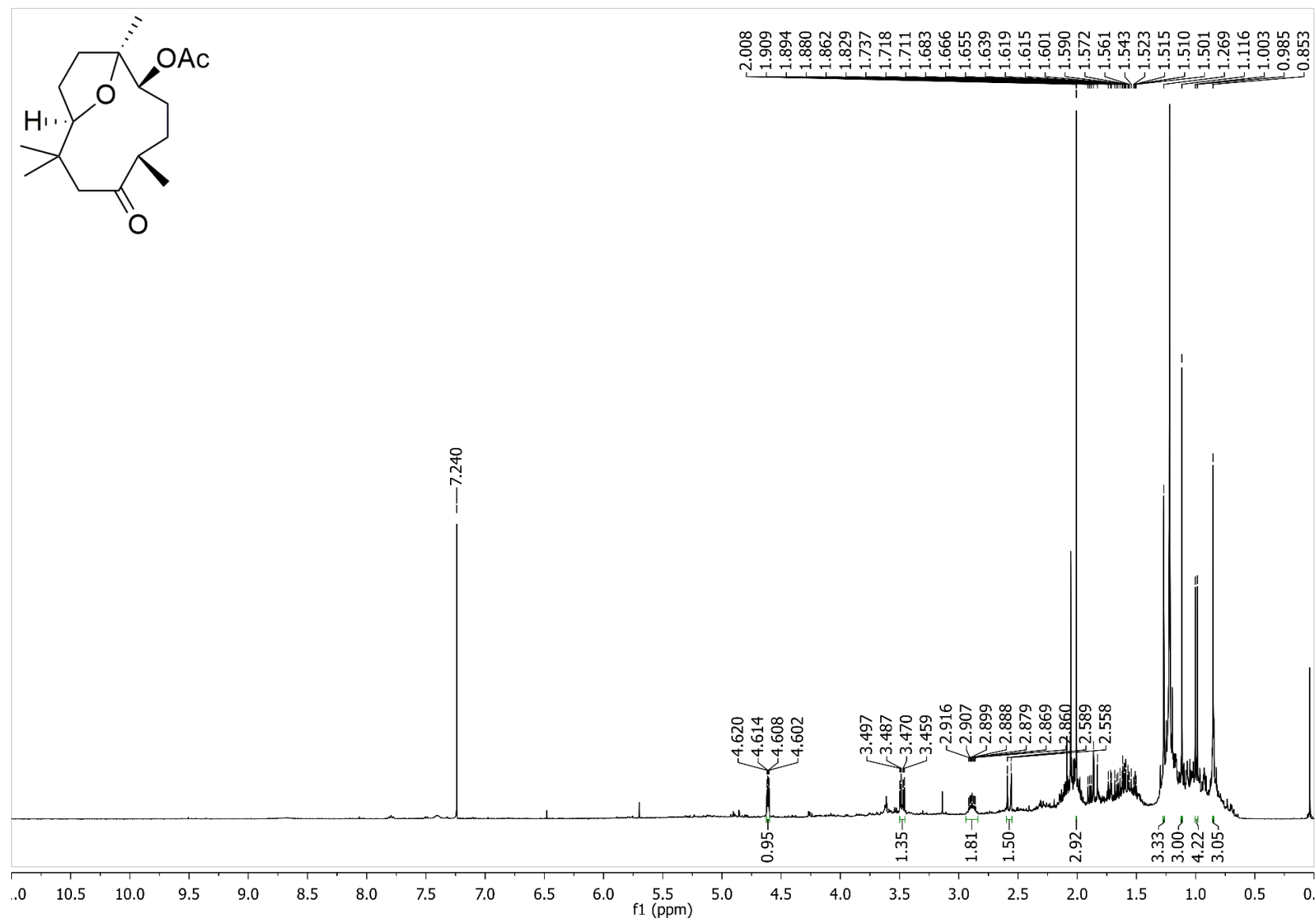


Figure S45. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of acetylated **3**

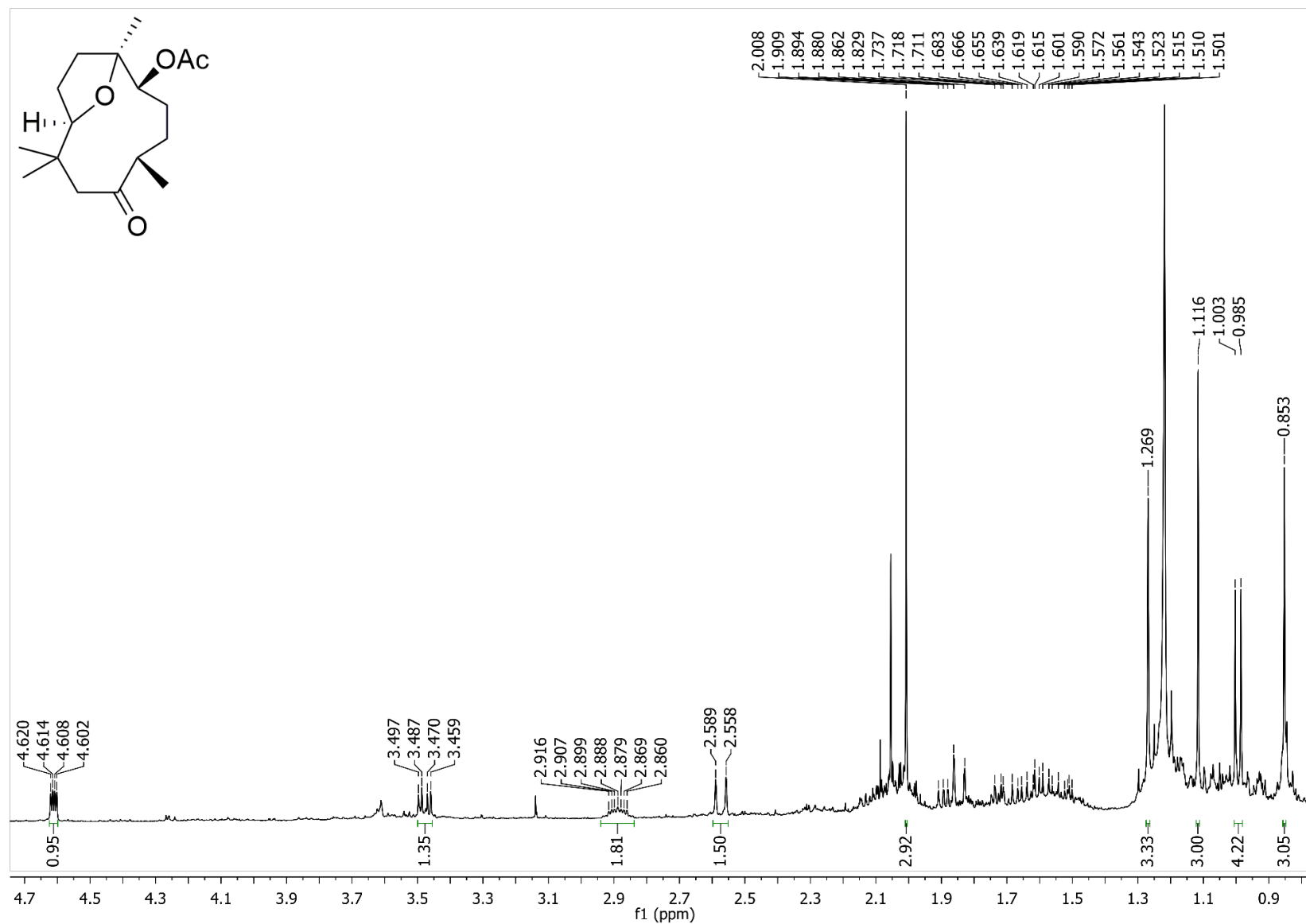


Figure S46. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated **3**

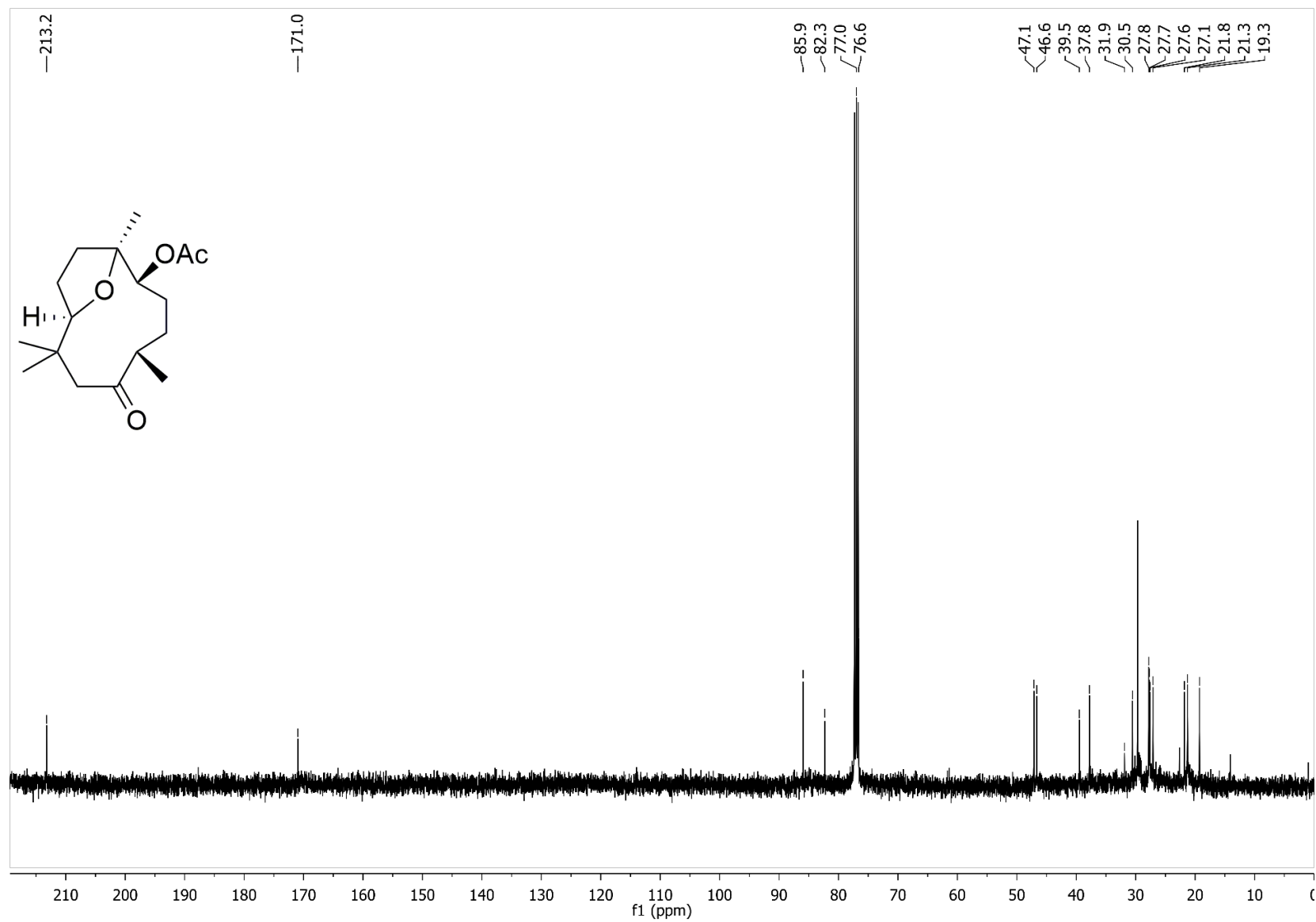


Figure S47. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of acetylated **3**

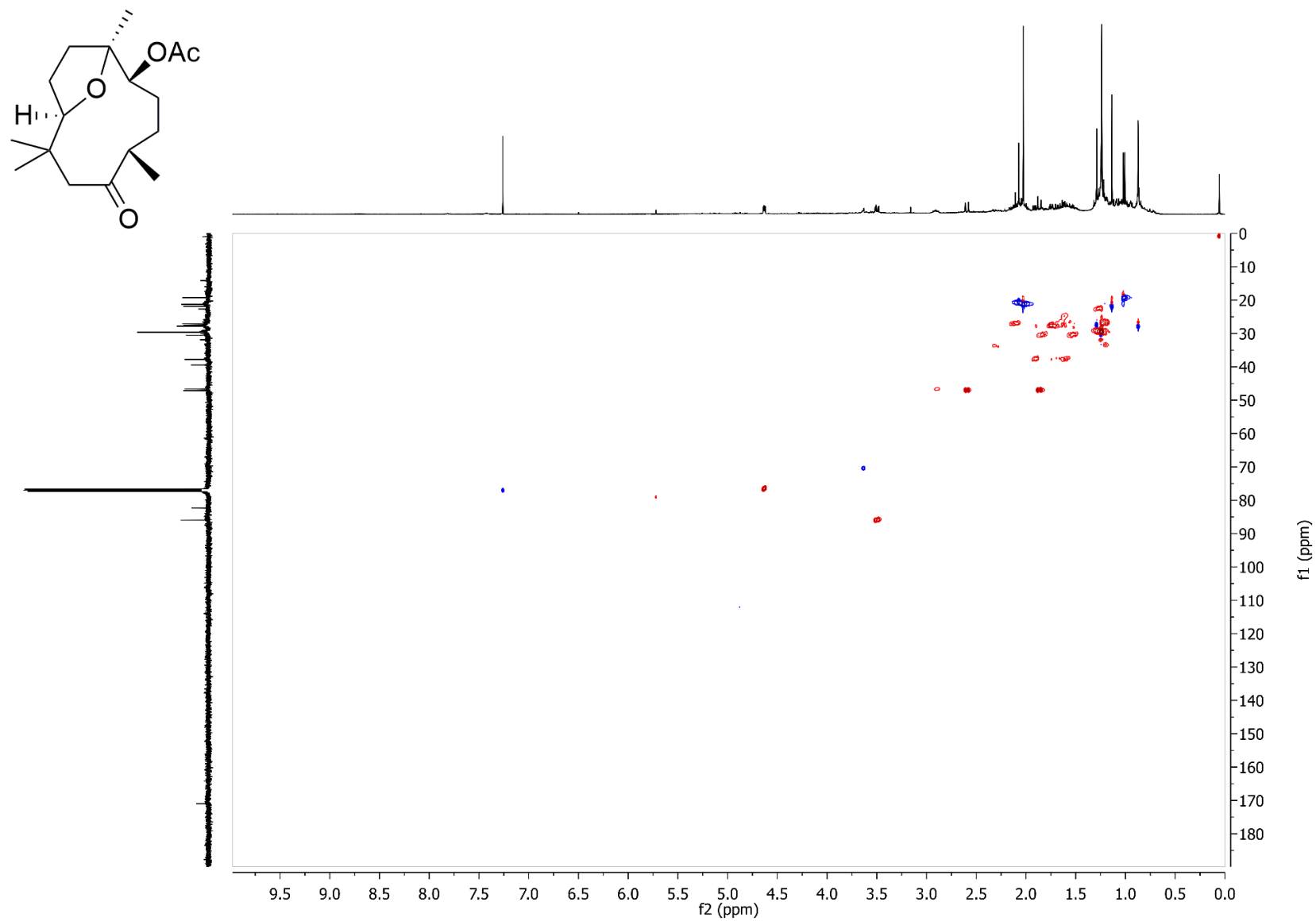


Figure S48. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of acetylated **3**

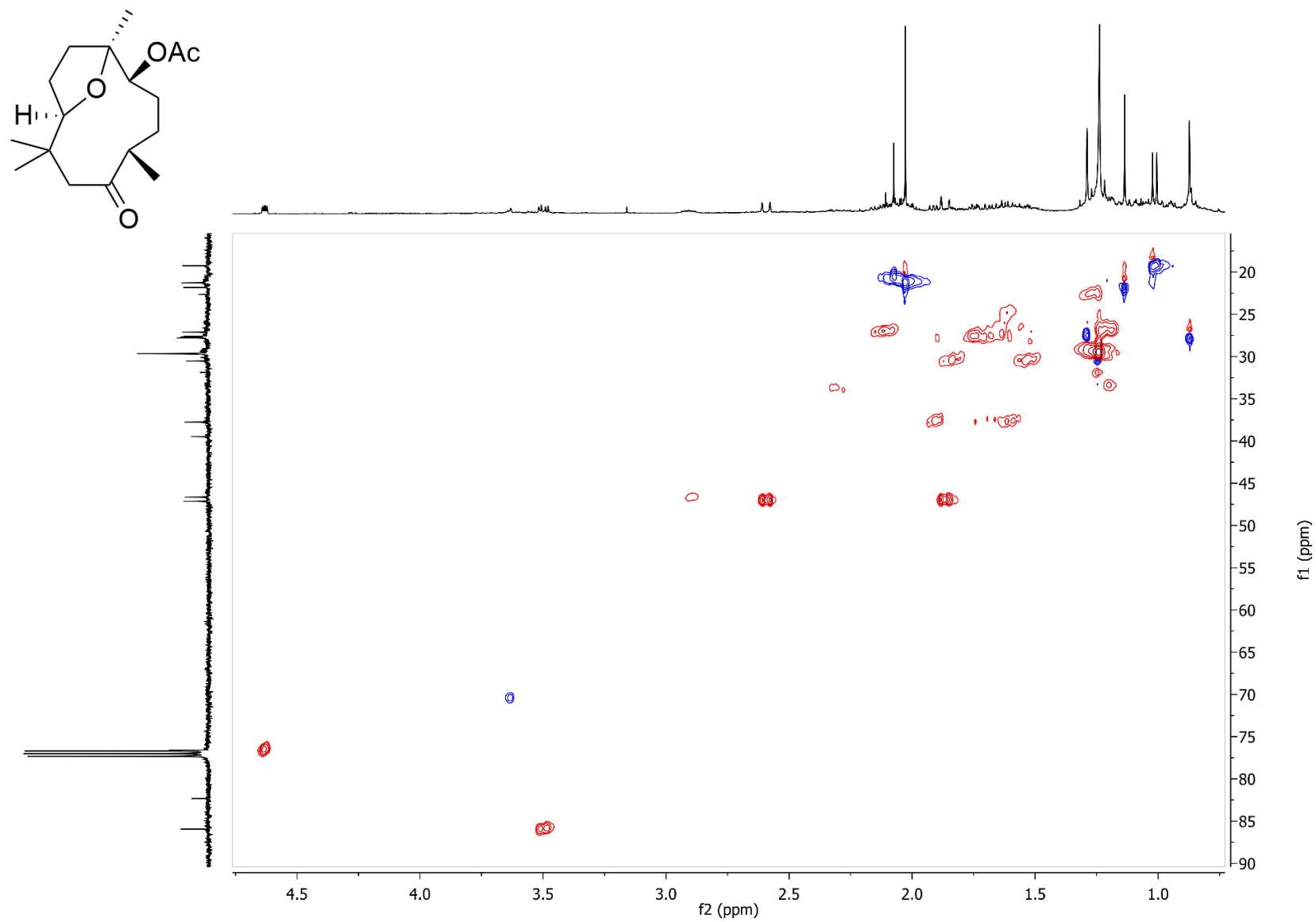


Figure S49. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of acetylated **3**

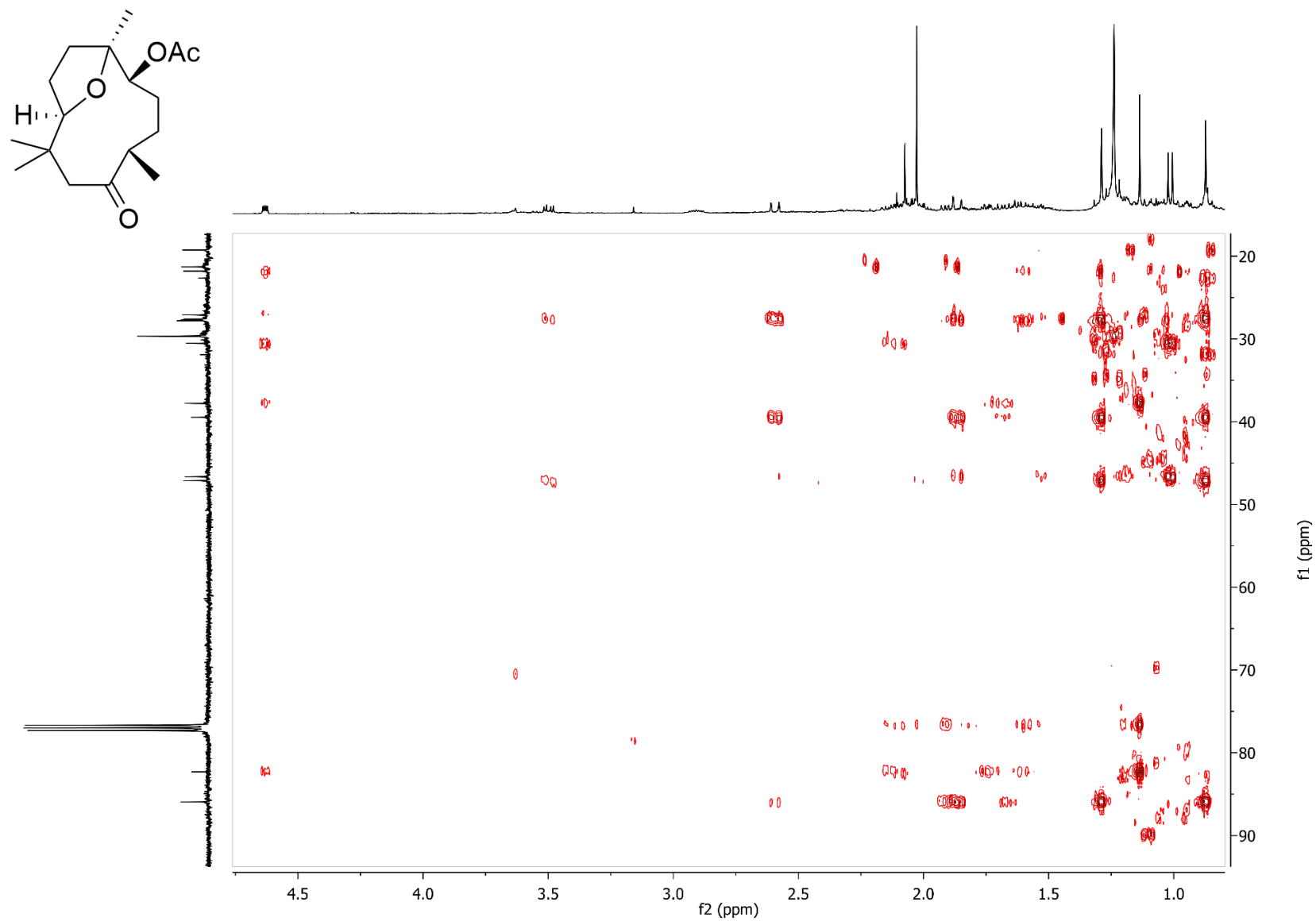


Figure S50. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of acetylated **3**

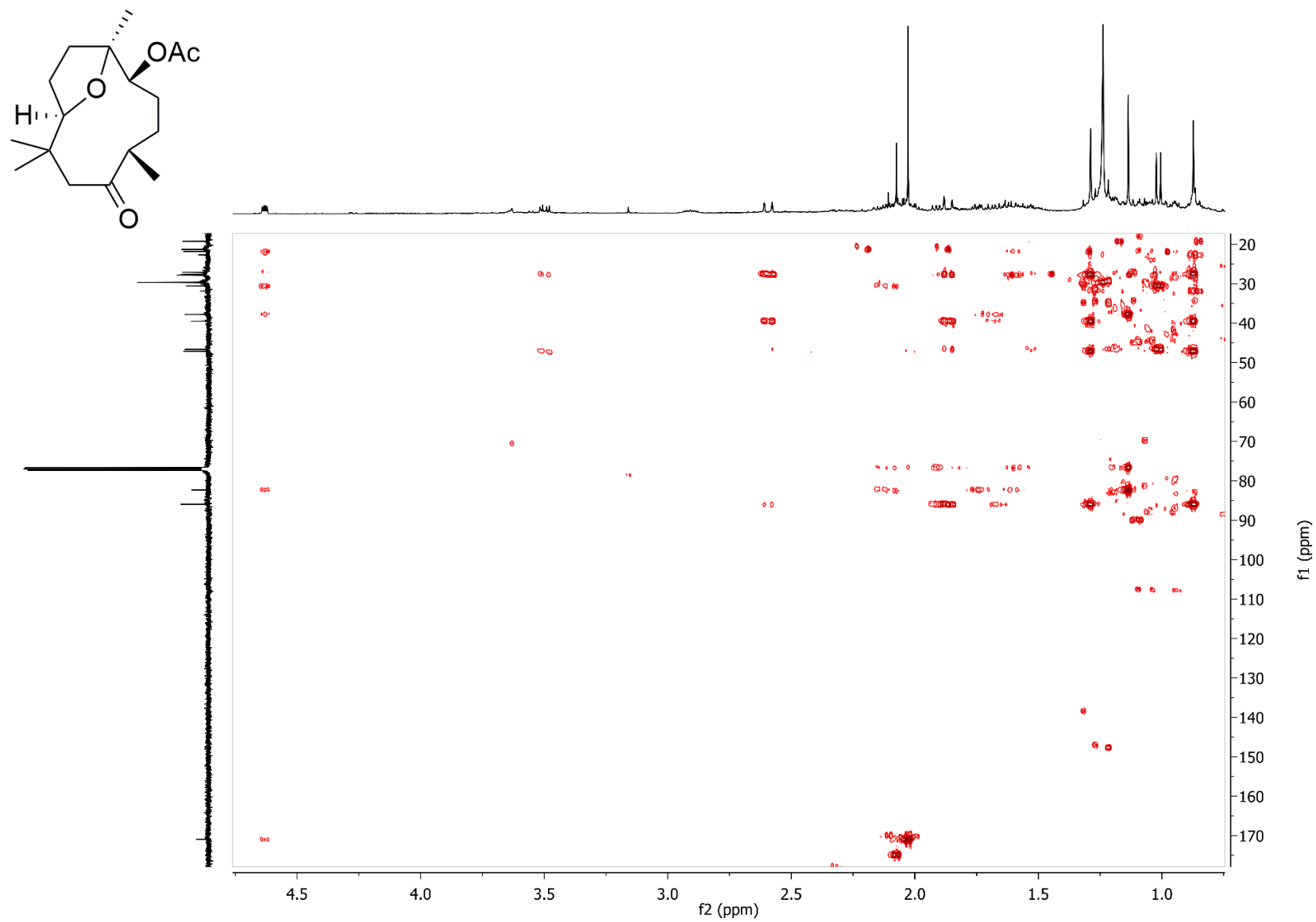


Figure S51. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated **3**

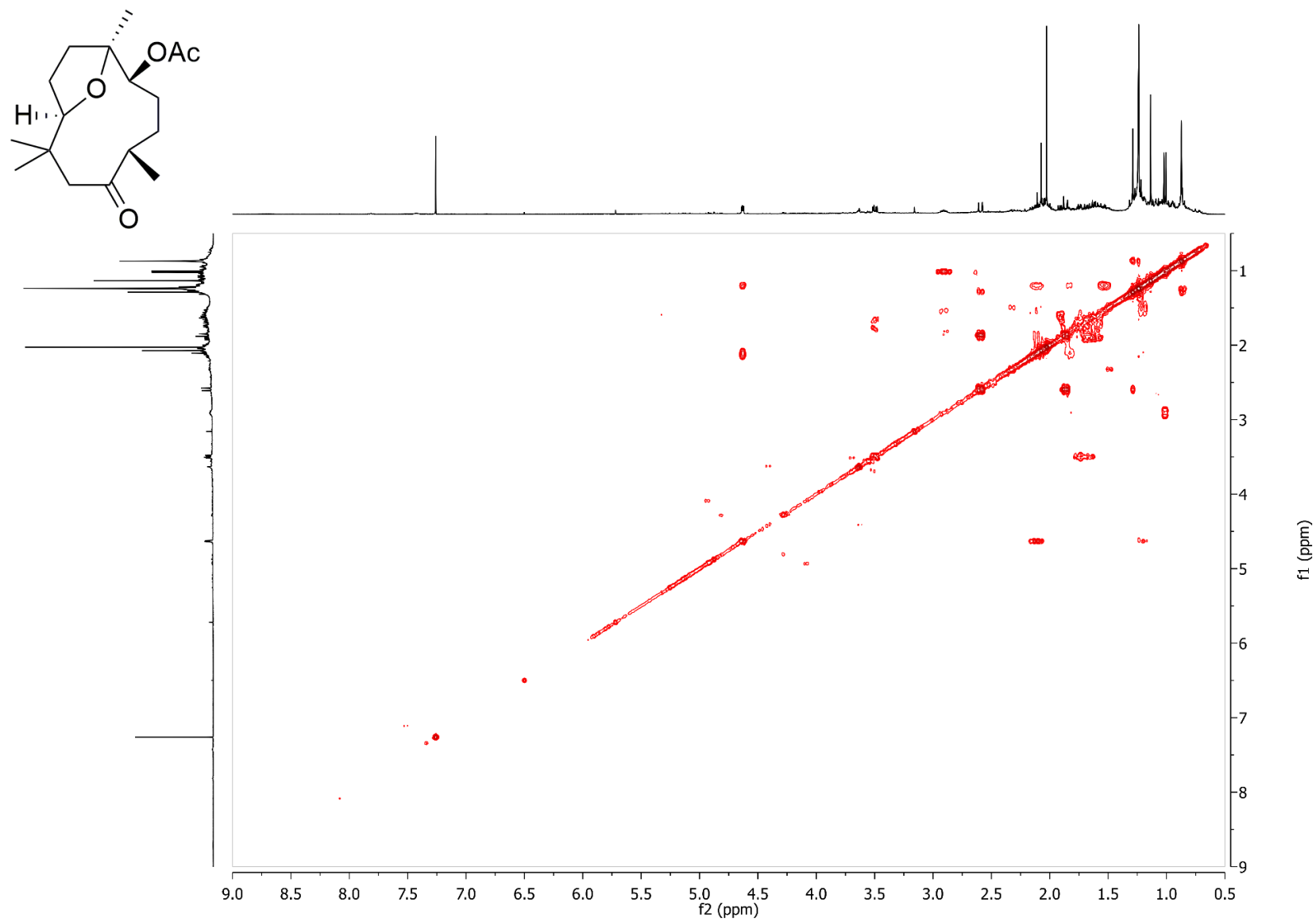


Figure S52. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of acetylated **3**

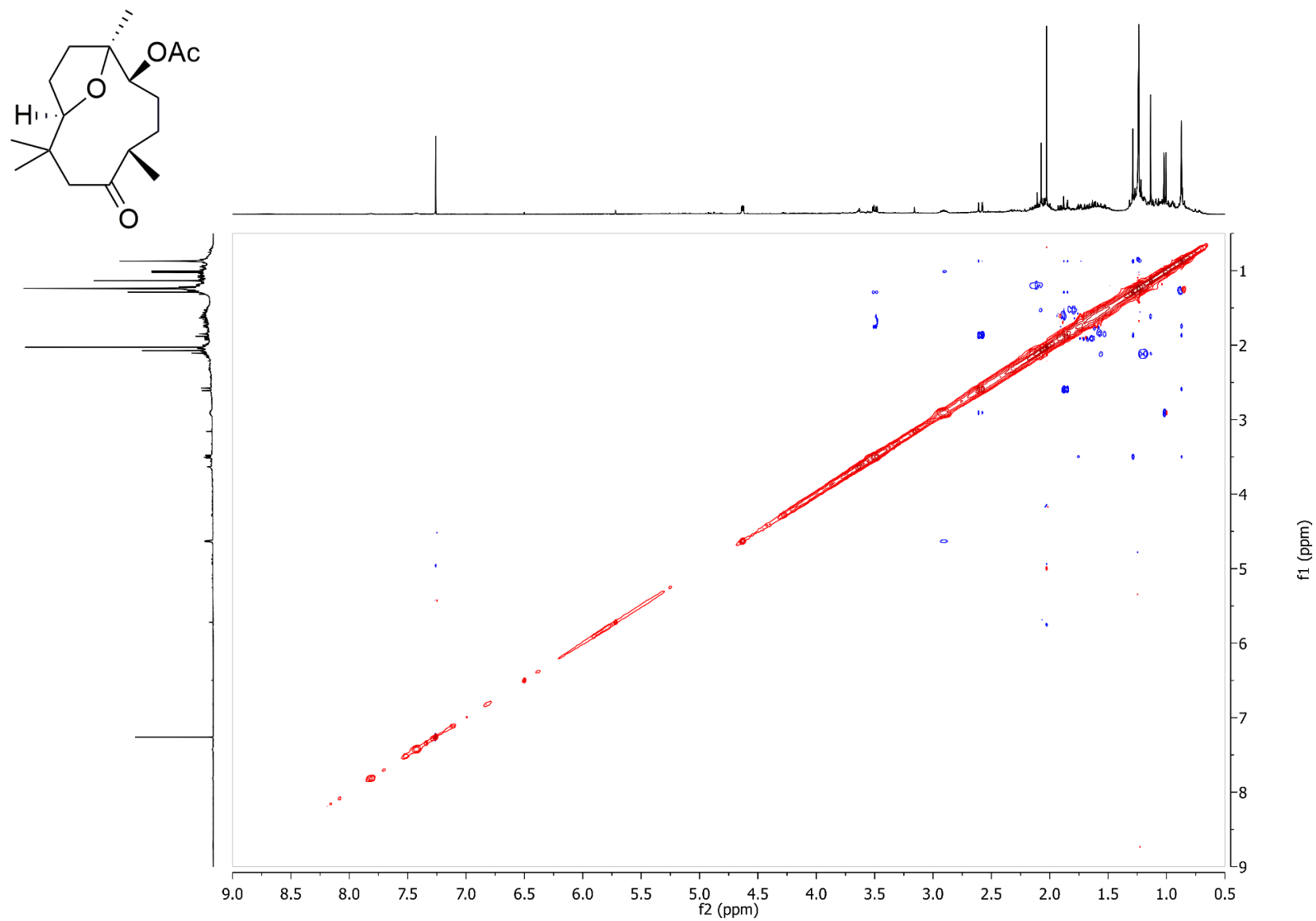


Figure S53. ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spectrum of **3**

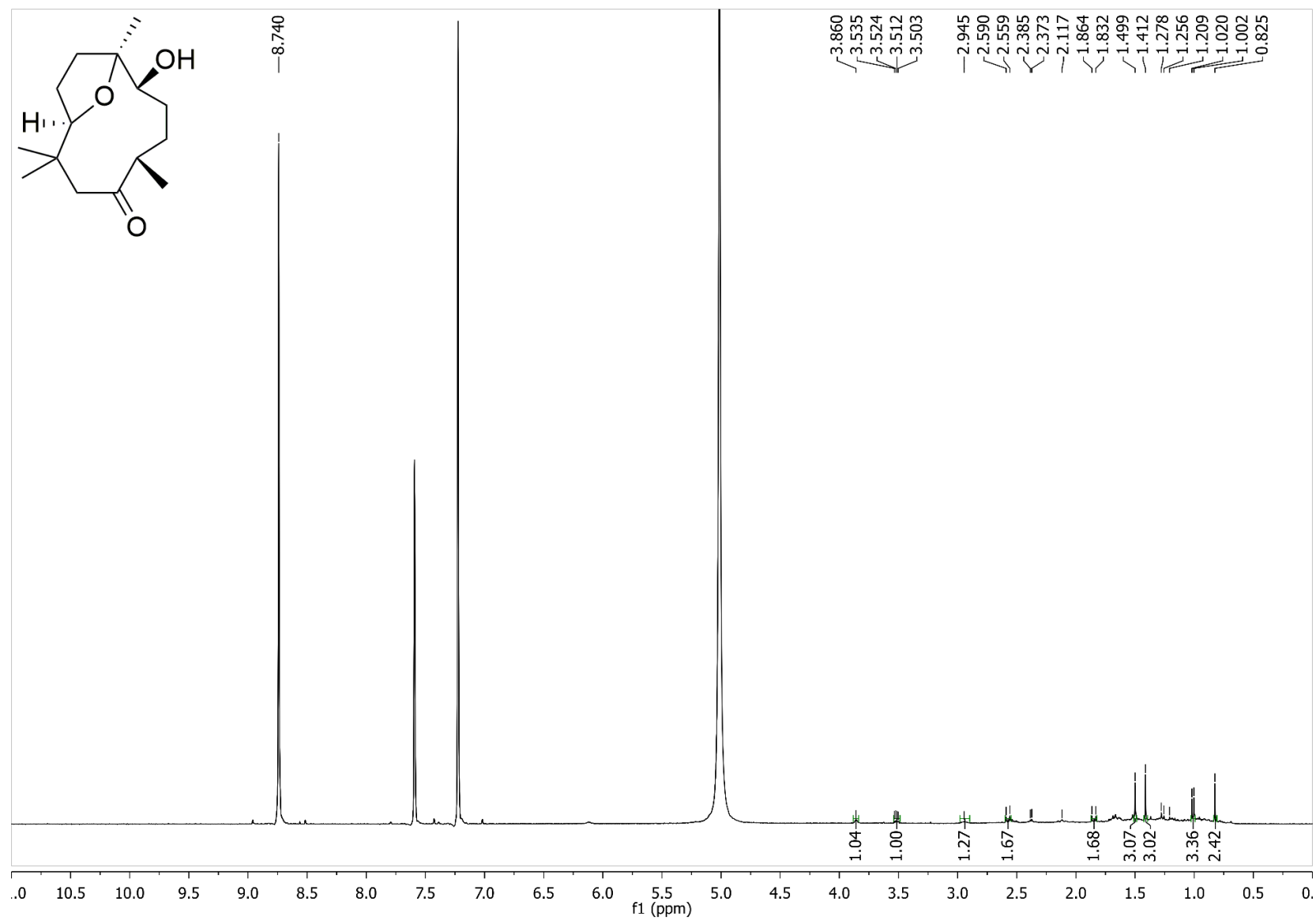


Figure S54. ^1H NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) extension spectrum of **3**

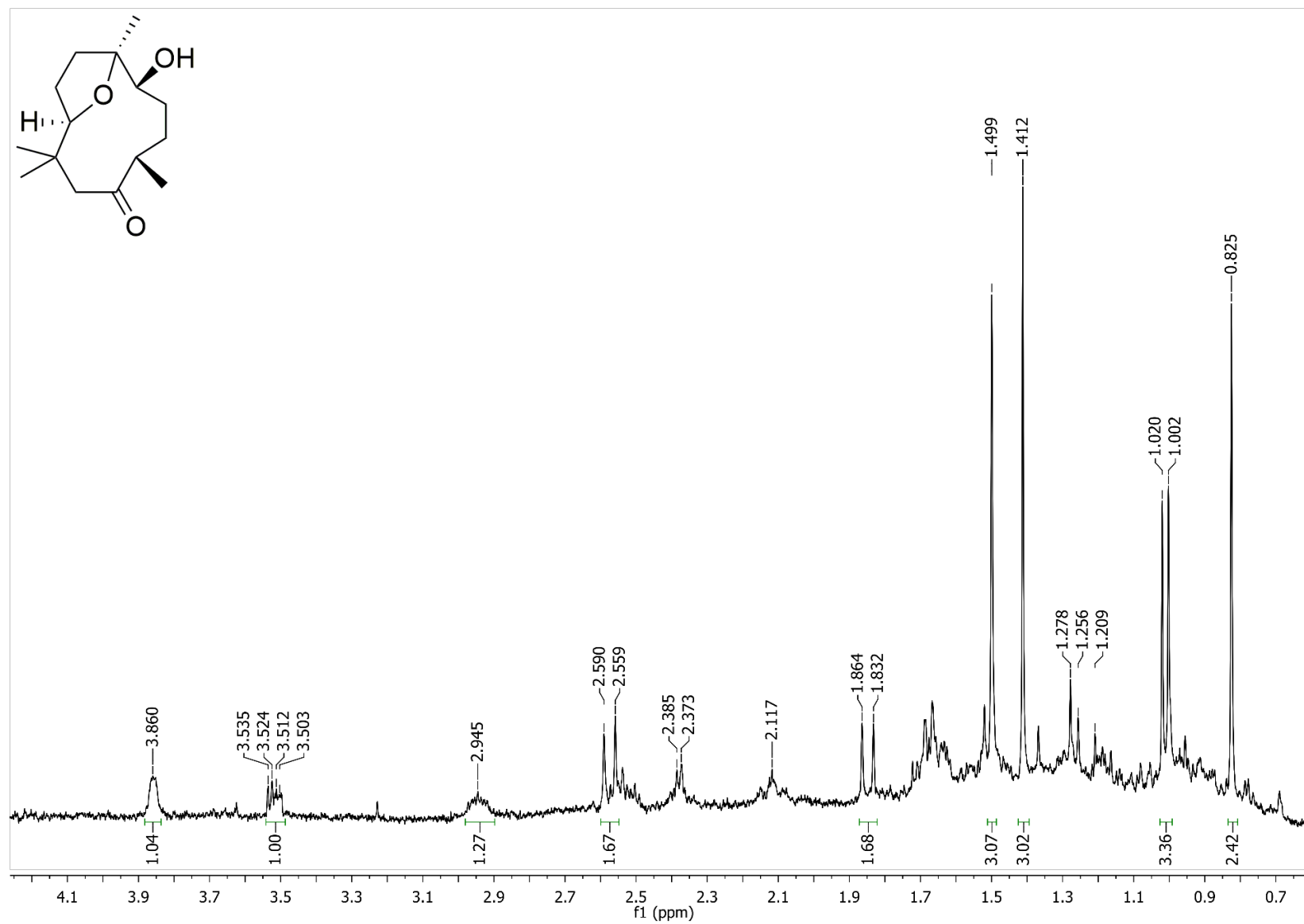


Figure S55. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) spectrum of acetylated **3**

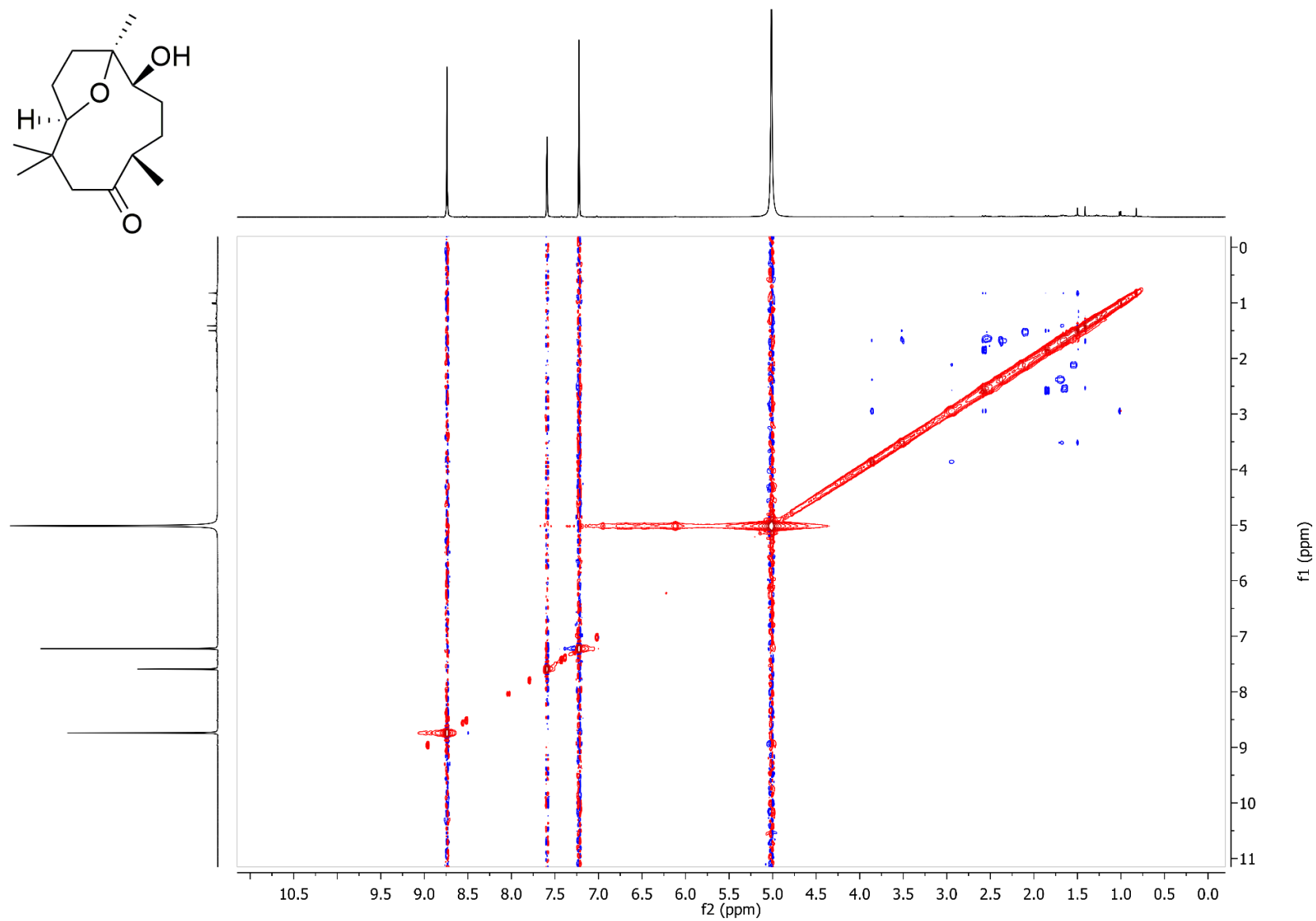


Figure S56. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) extension spectrum of **3**

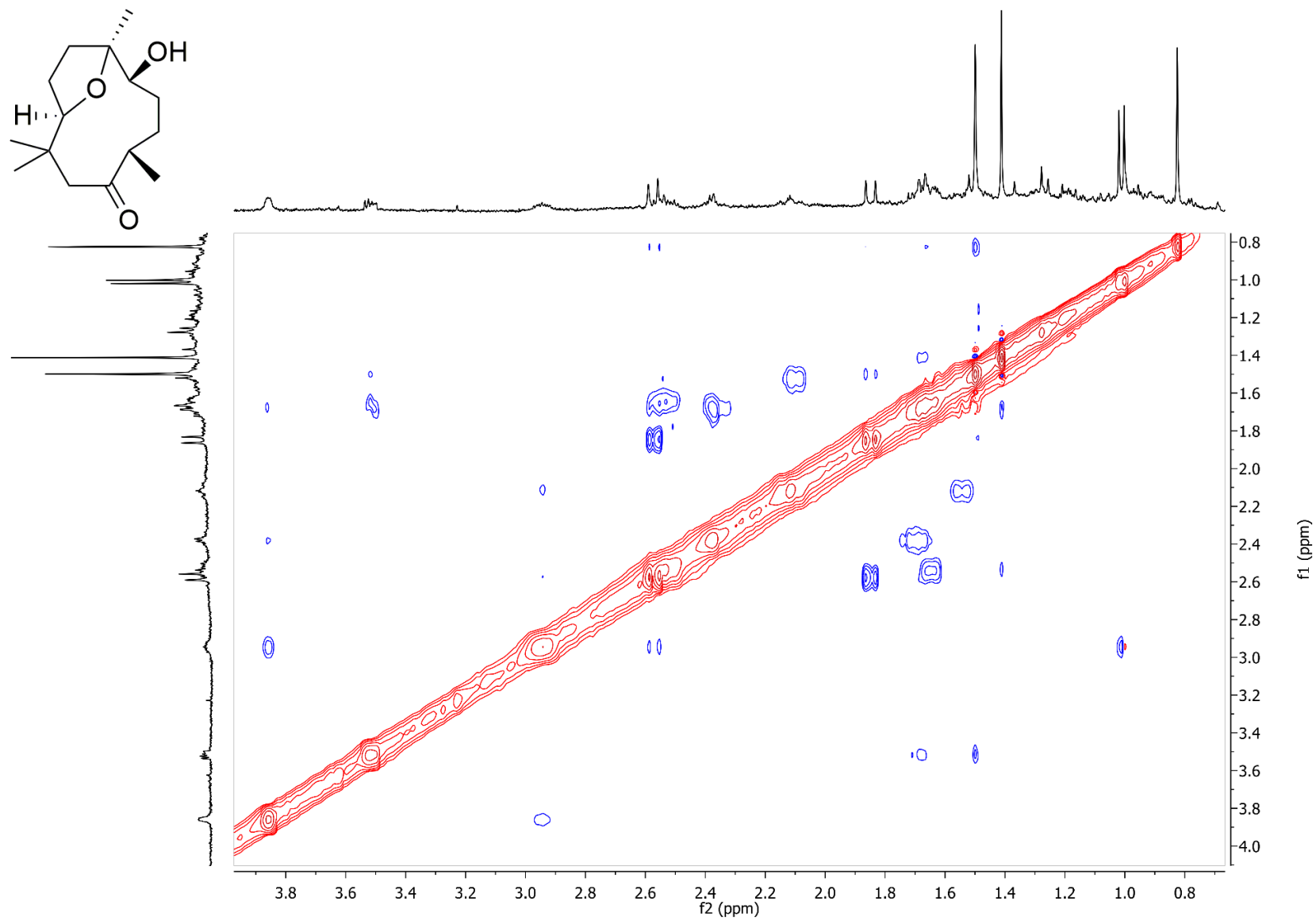


Figure S57. ESIMS/MS spectrum of compound **3** ([M+H], positive ion mode)

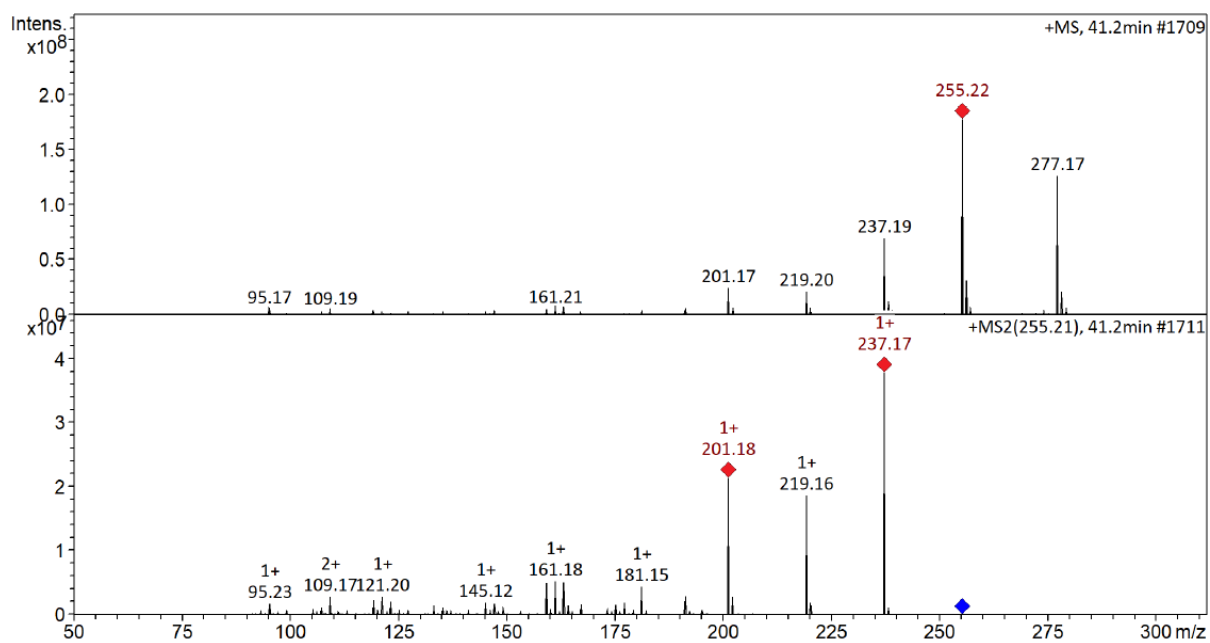


Figure S58. IR spectrum of compound **4**

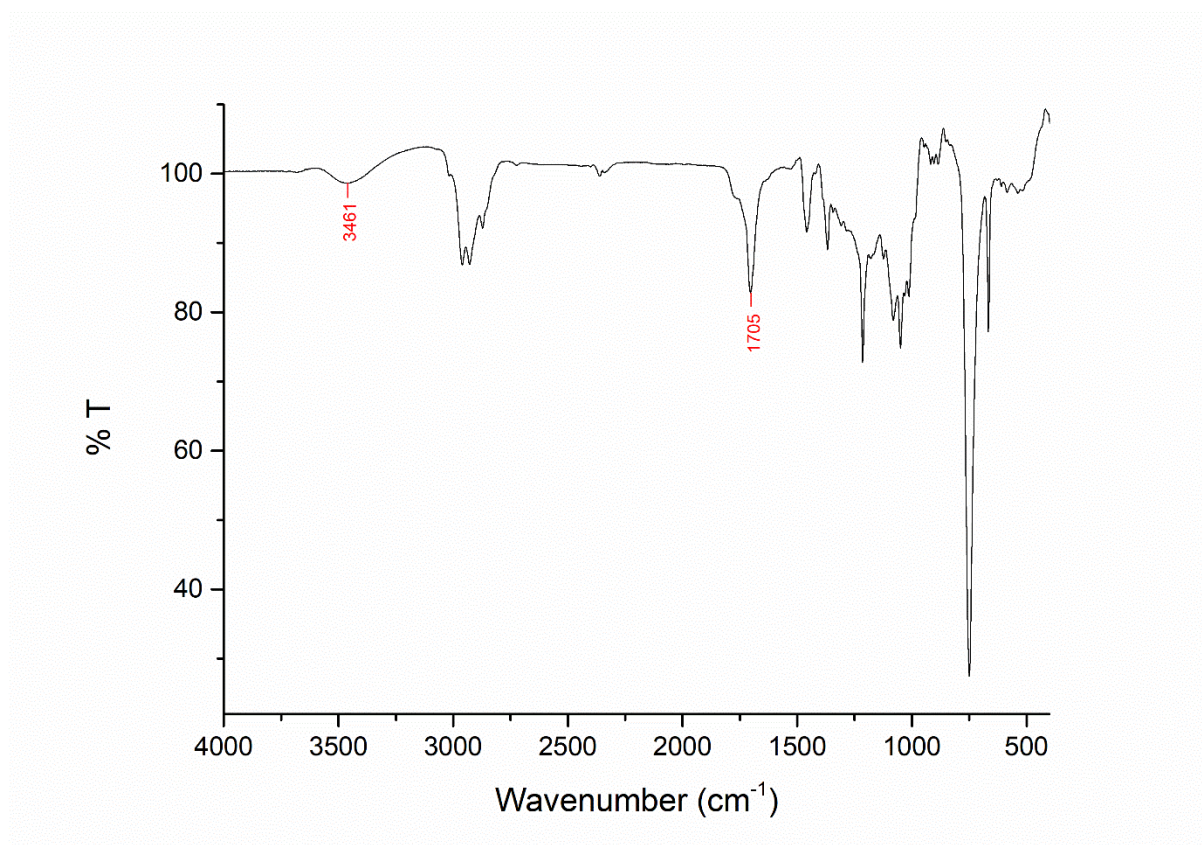


Figure S59. HRESIMS spectrum of compound **4** ([M + Na], positive ion mode)

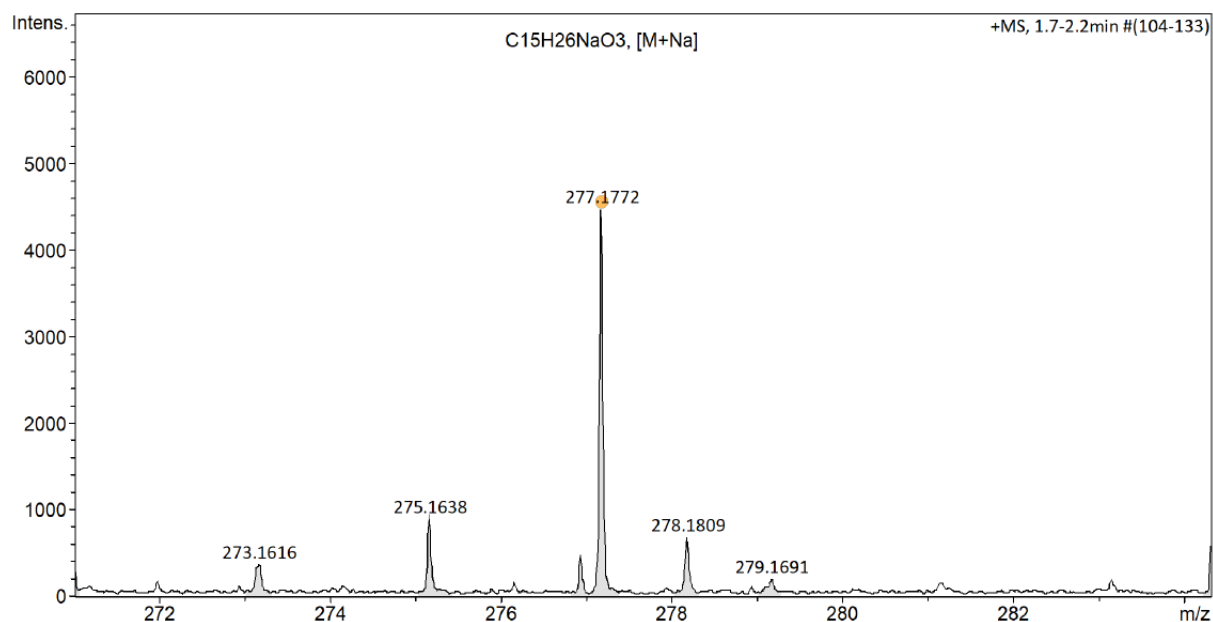


Figure S60. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **4**

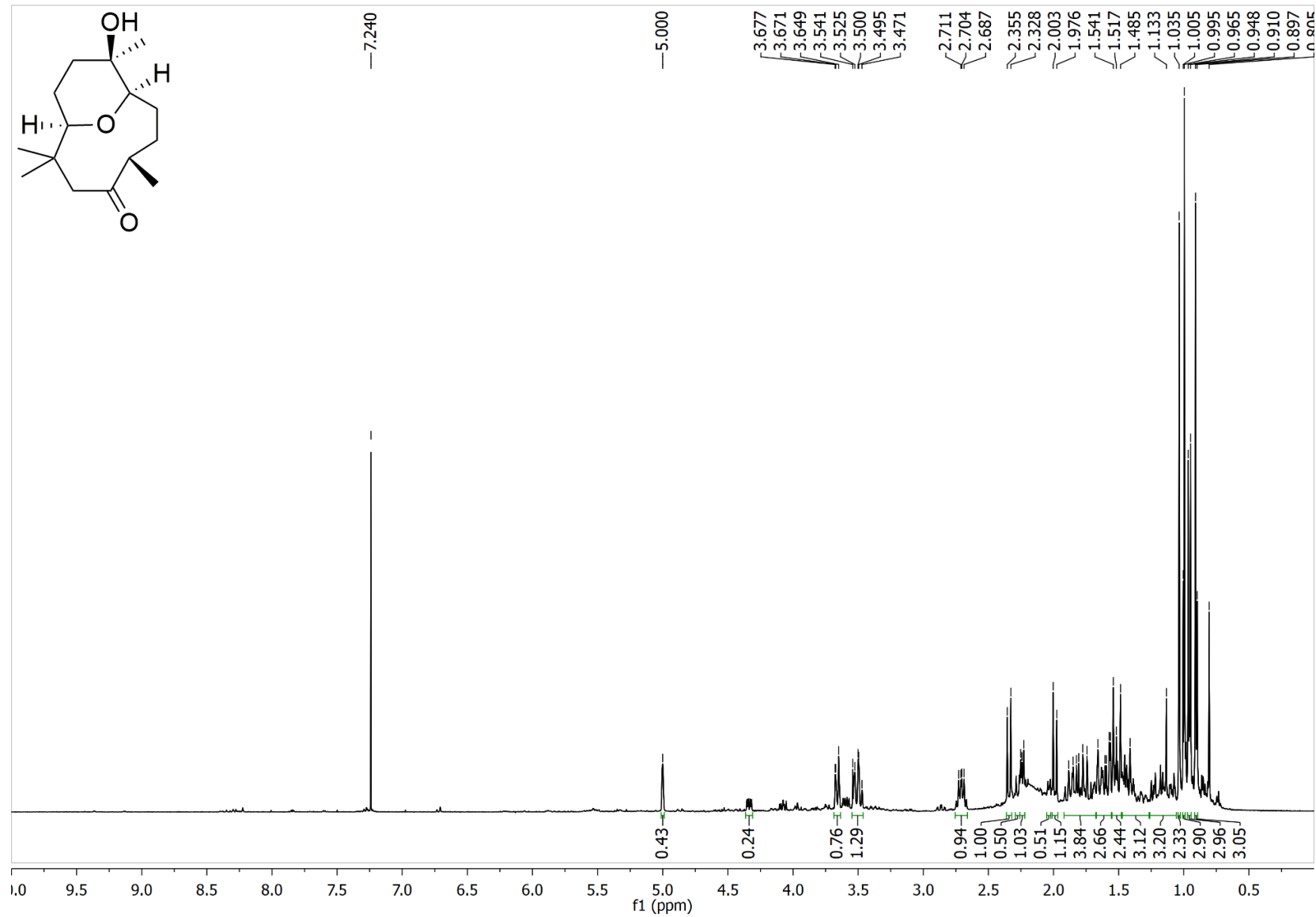


Figure S61. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **4**

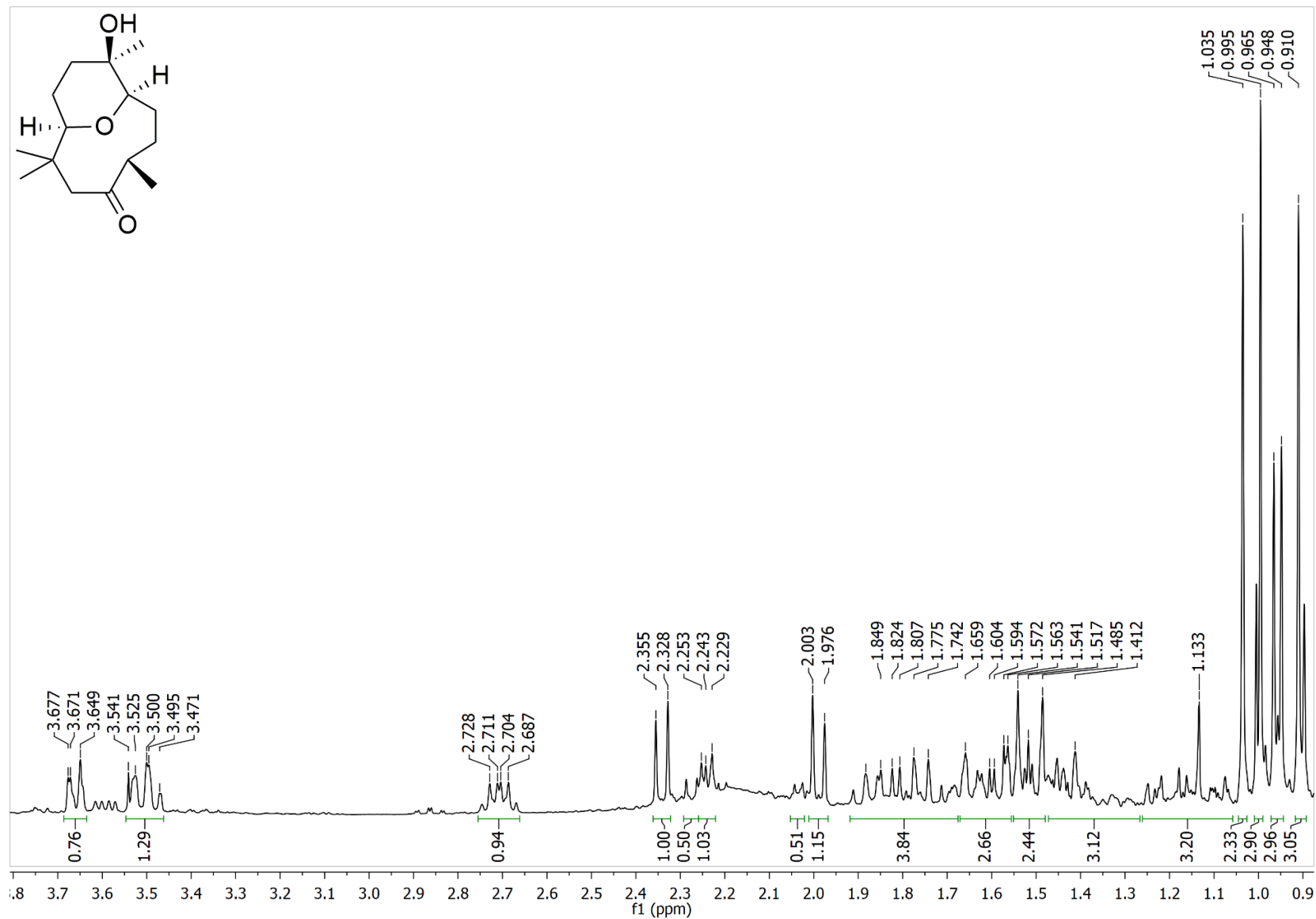


Figure S62. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **4**

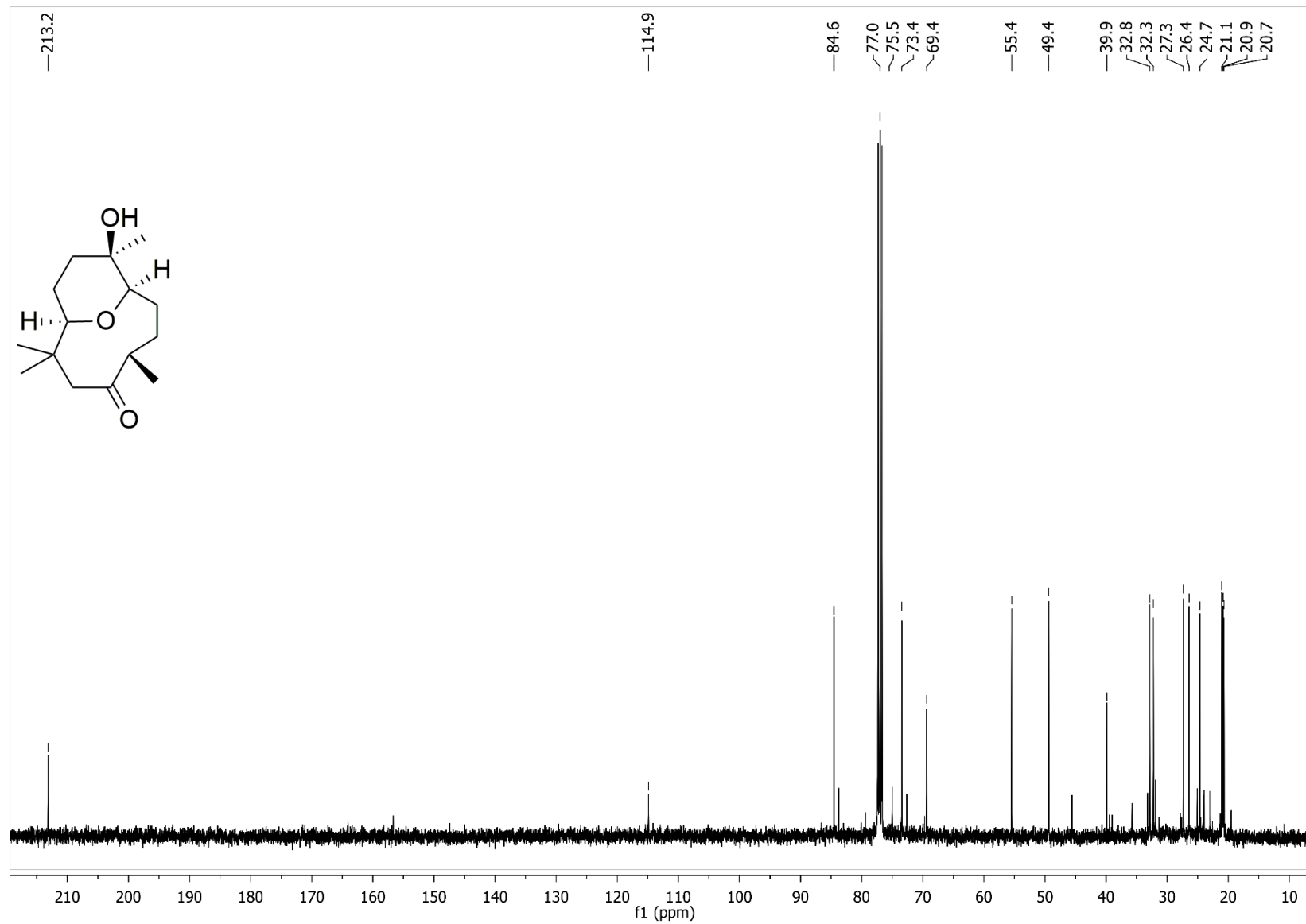


Figure S63. ^{13}C DEPT-135 NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **4**

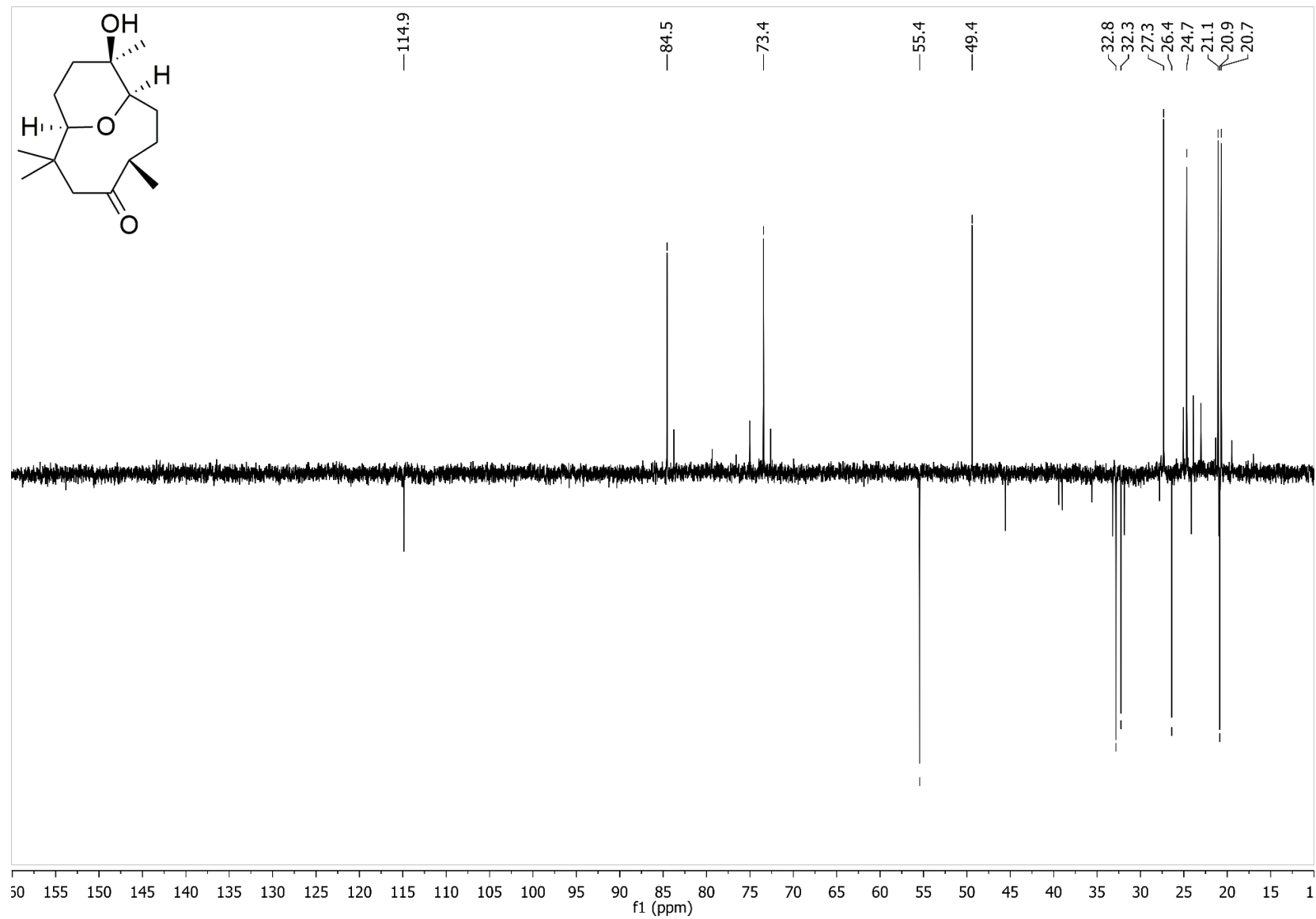


Figure S64. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **4**

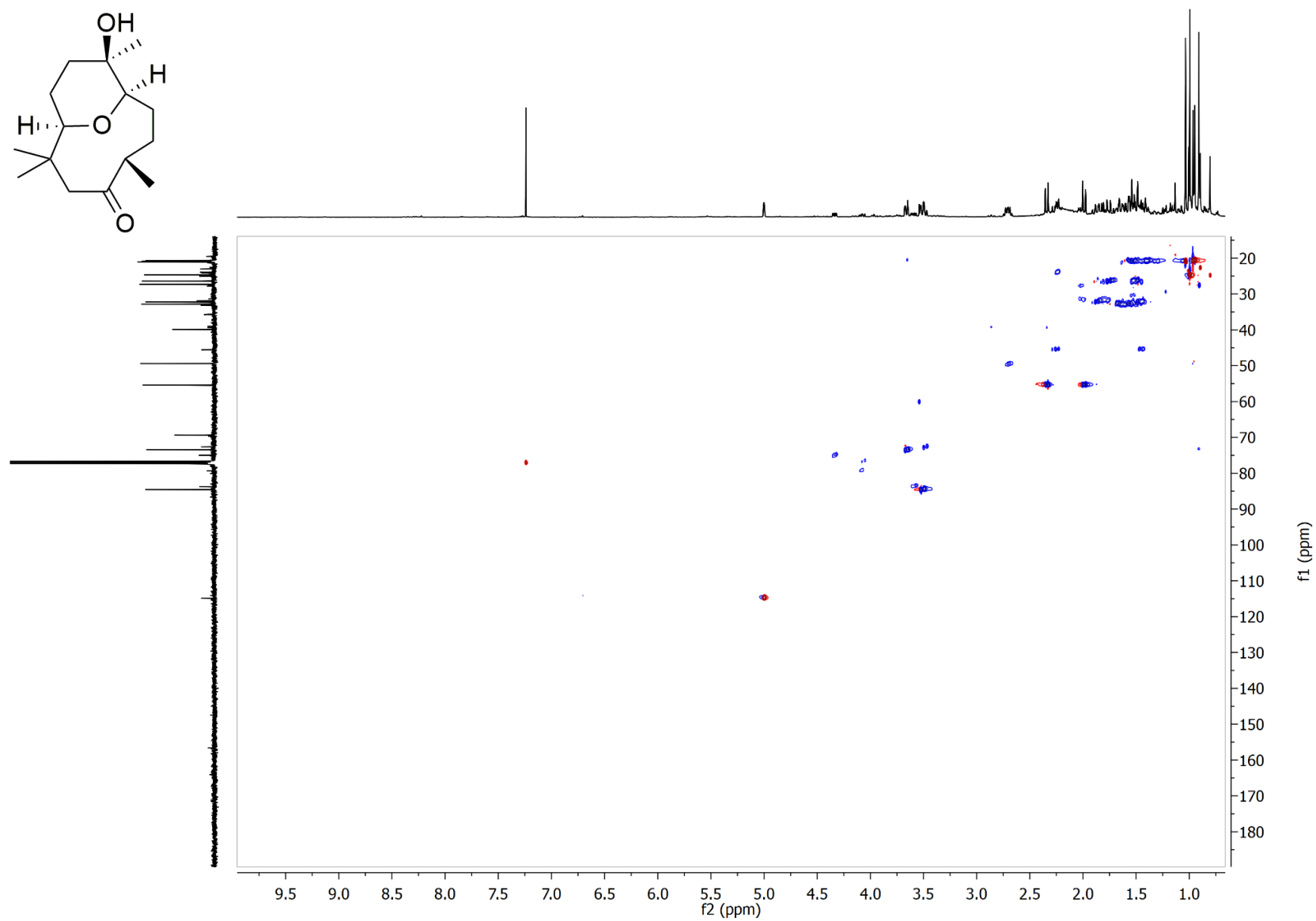


Figure S65. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **4**

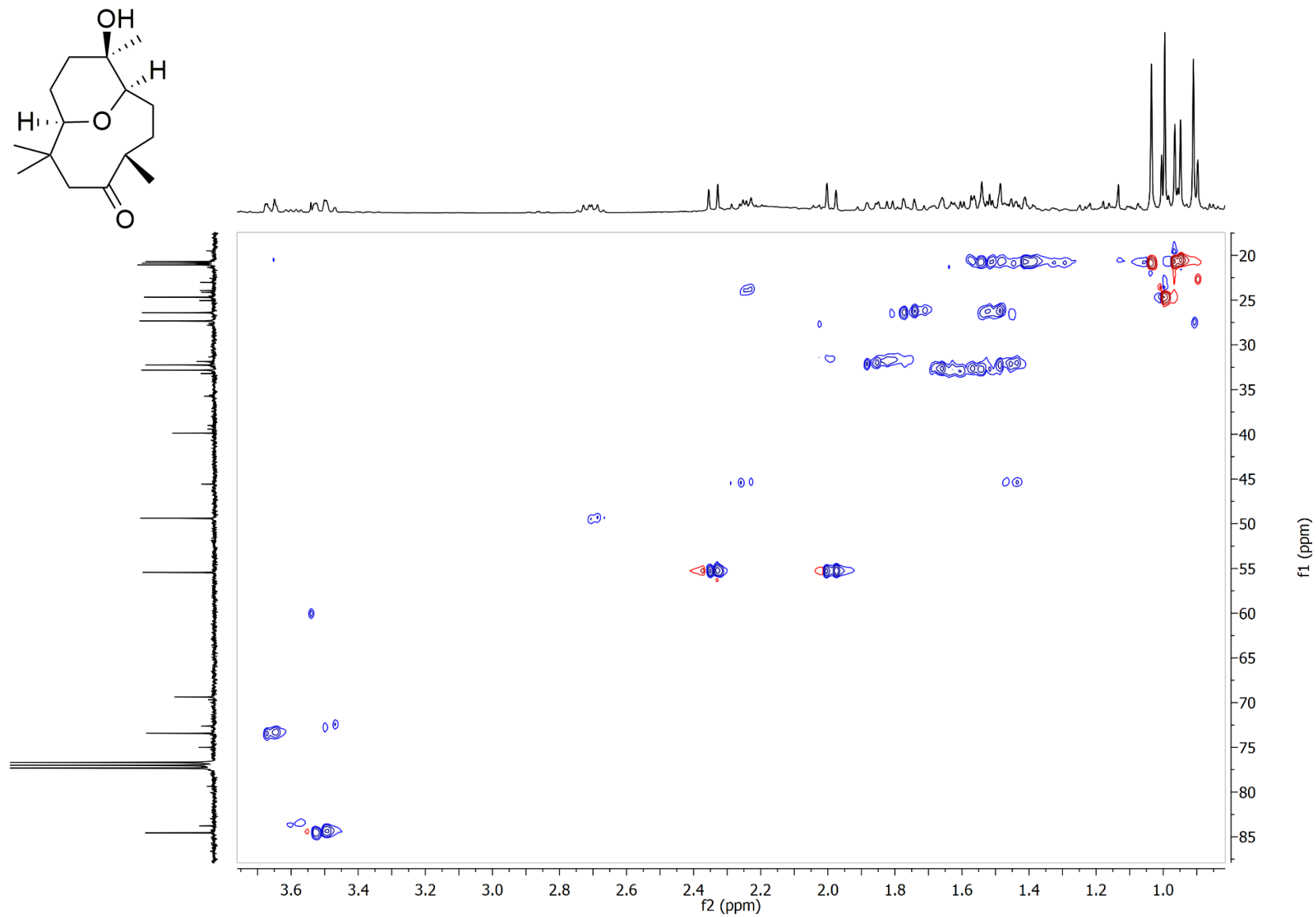


Figure S66. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **4**

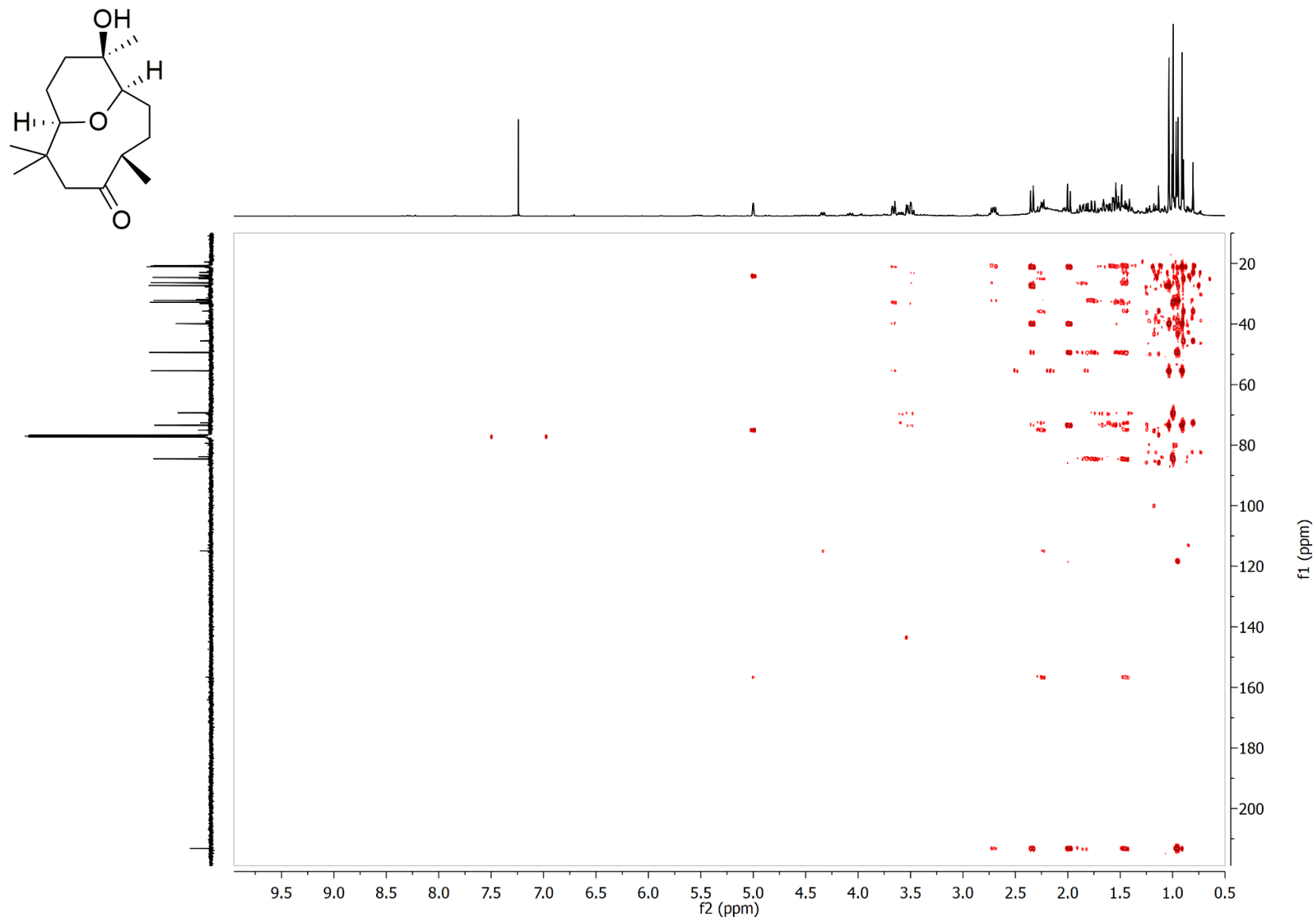


Figure S67. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **4**

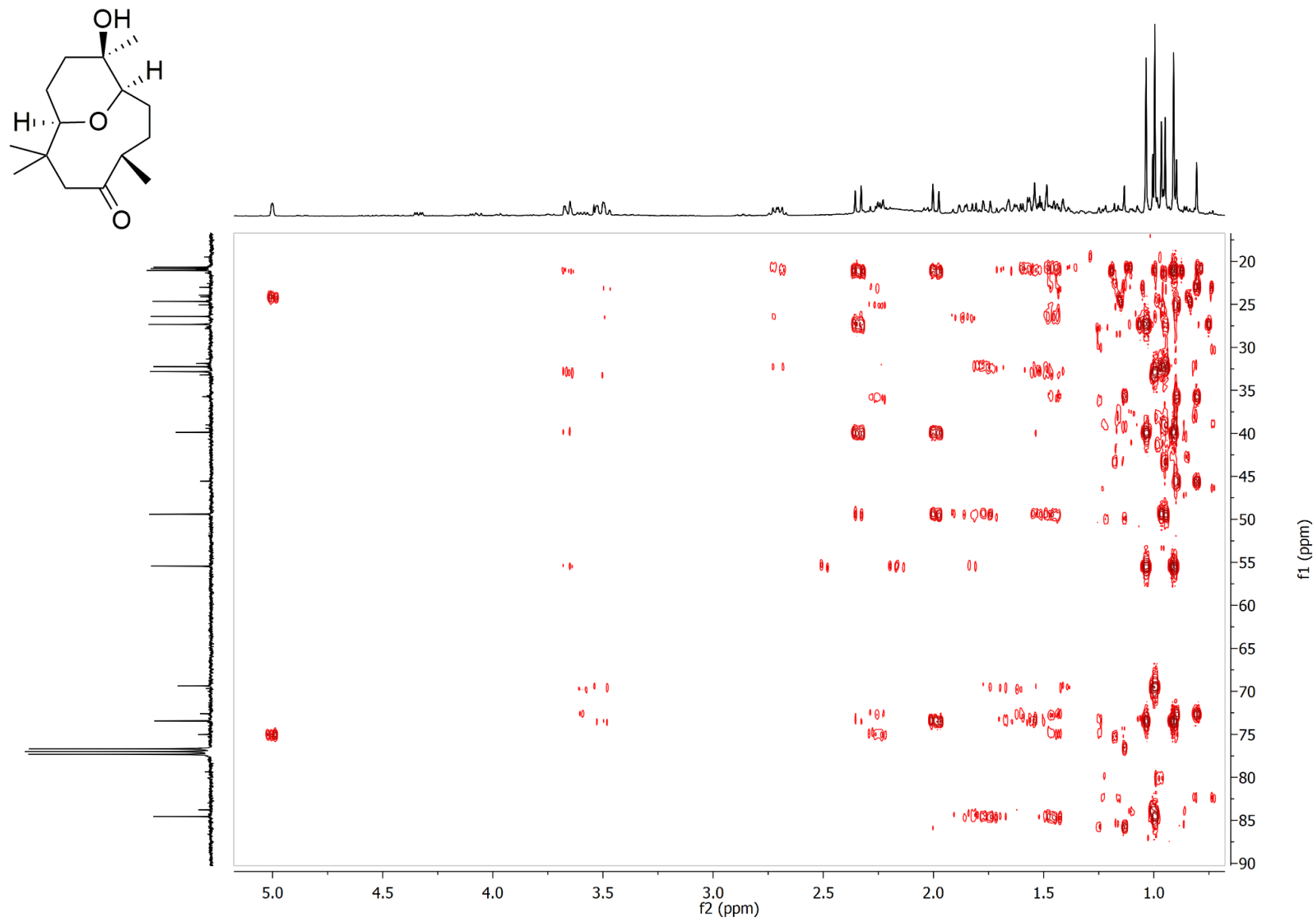


Figure S68. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **4**

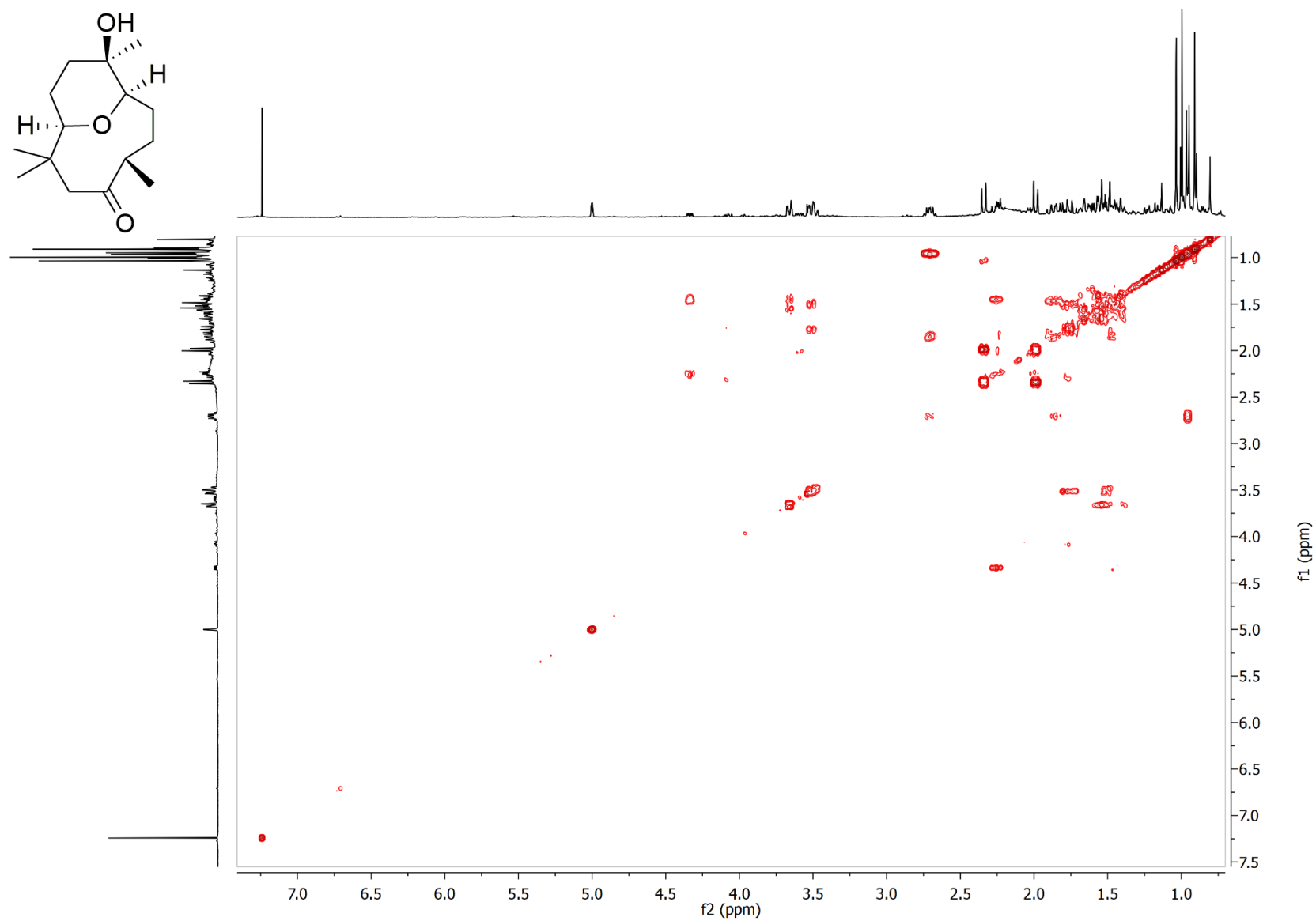


Figure S69. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **4**

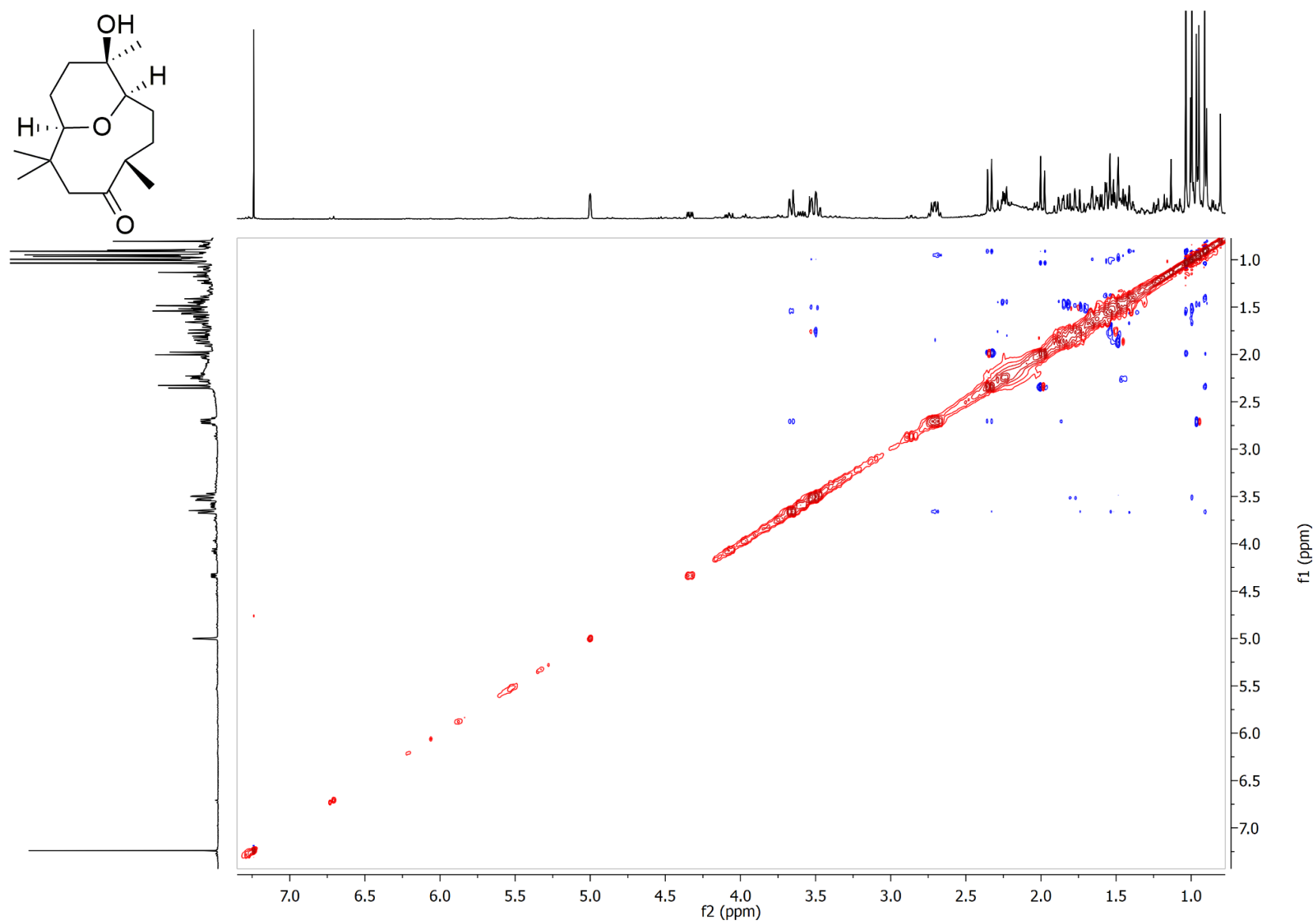


Figure S70. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **4**

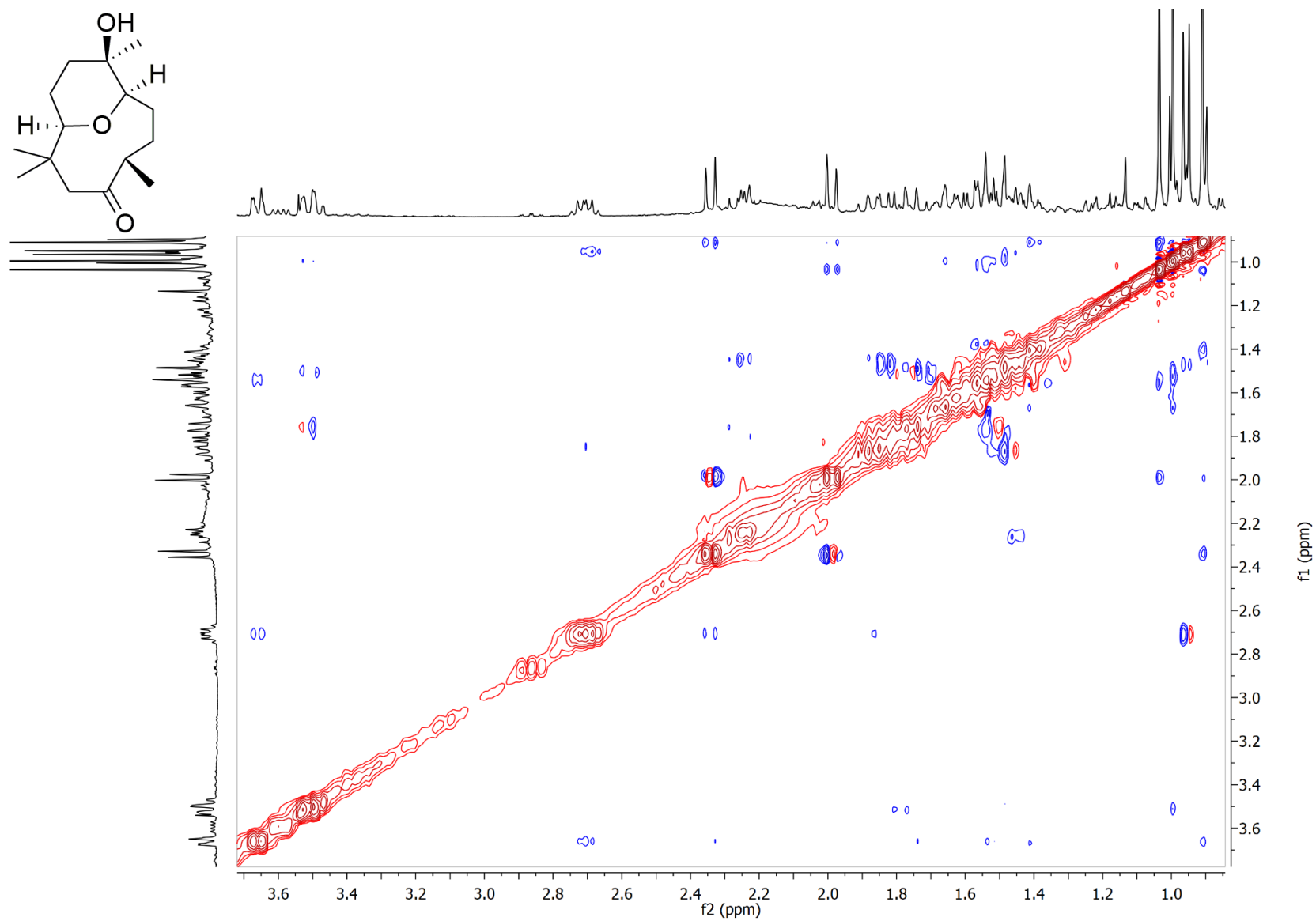


Figure S71. ESIMS/MS spectrum of compound **4** ($[M + H]^+$, positive ion mode)

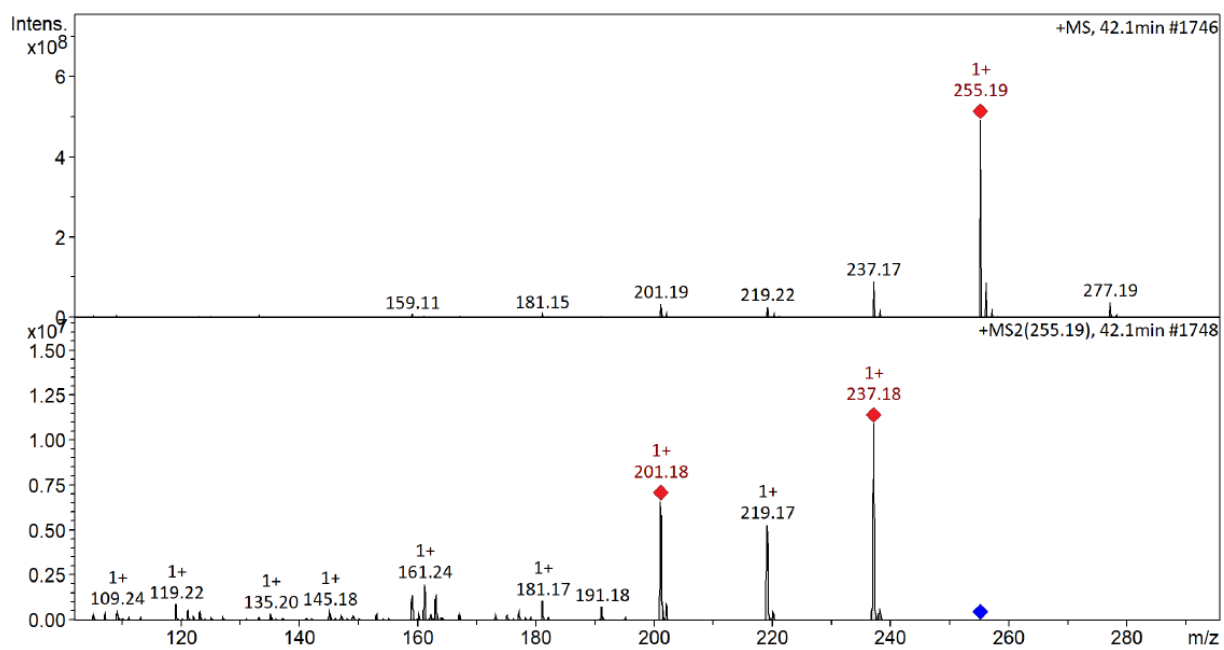


Figure S72. IR spectrum of compound **5**

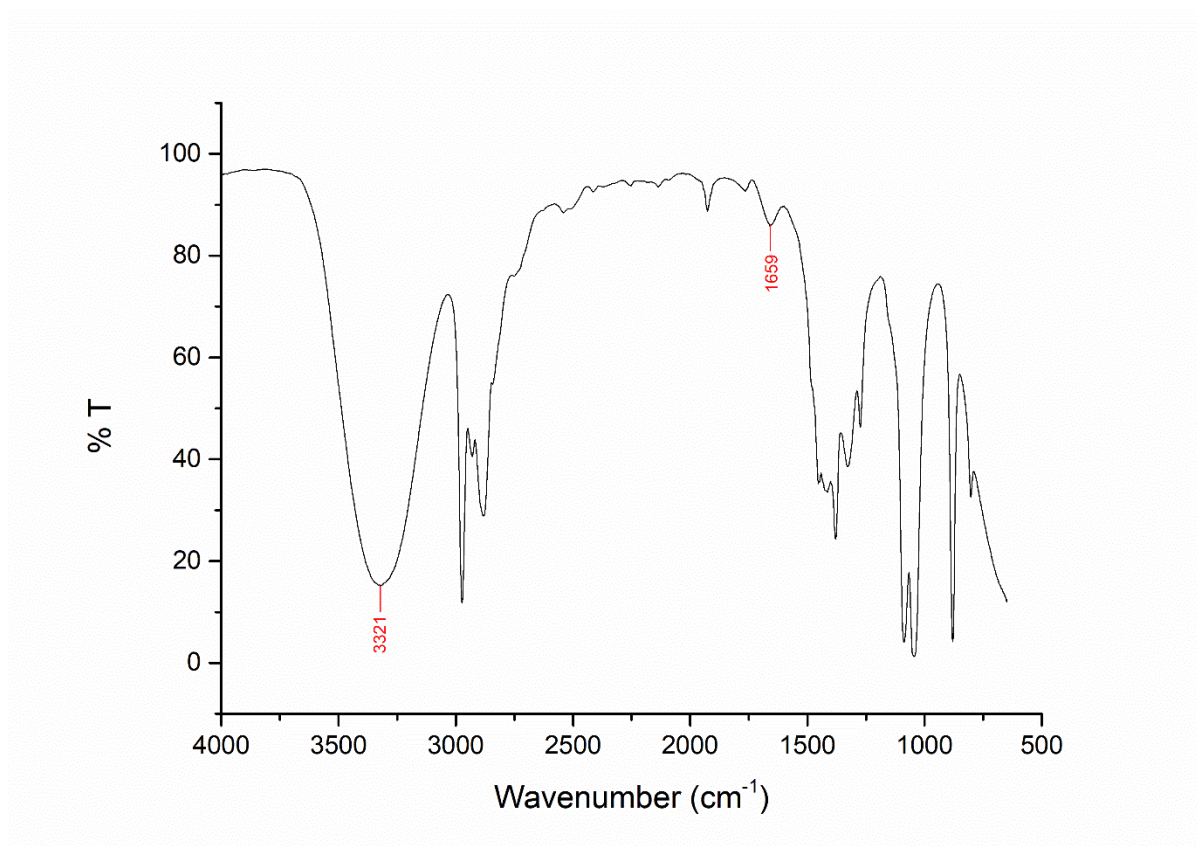


Figure S73. HRESIMS spectrum of compound **5** ([M + Na], positive ion mode)

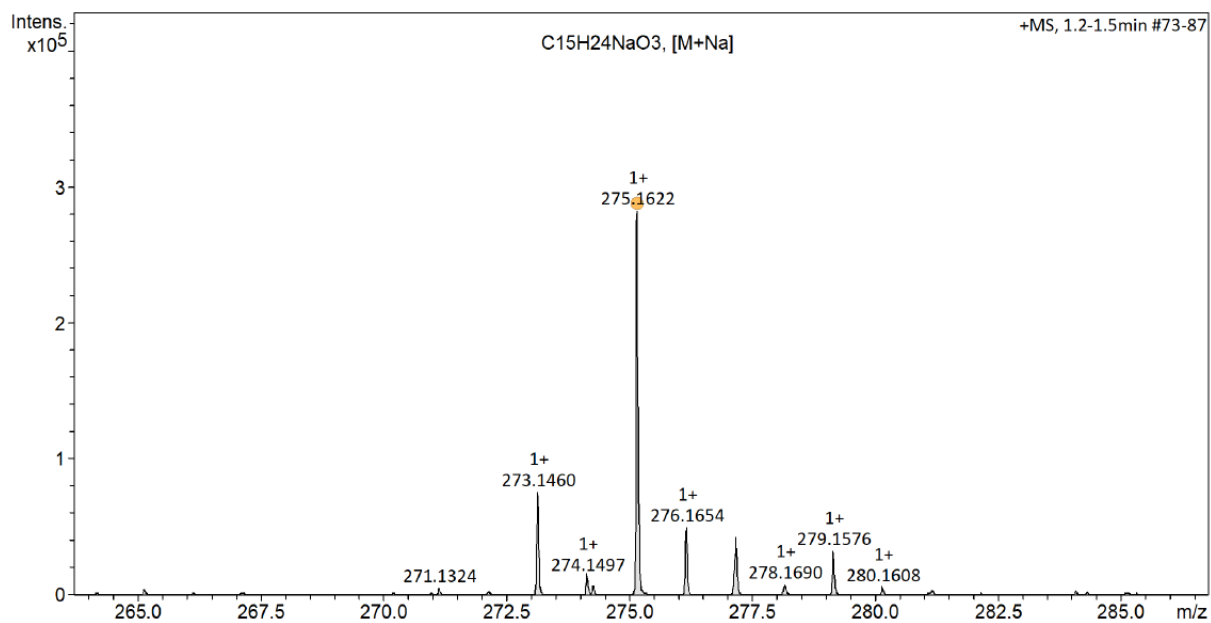


Figure S74. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **5**

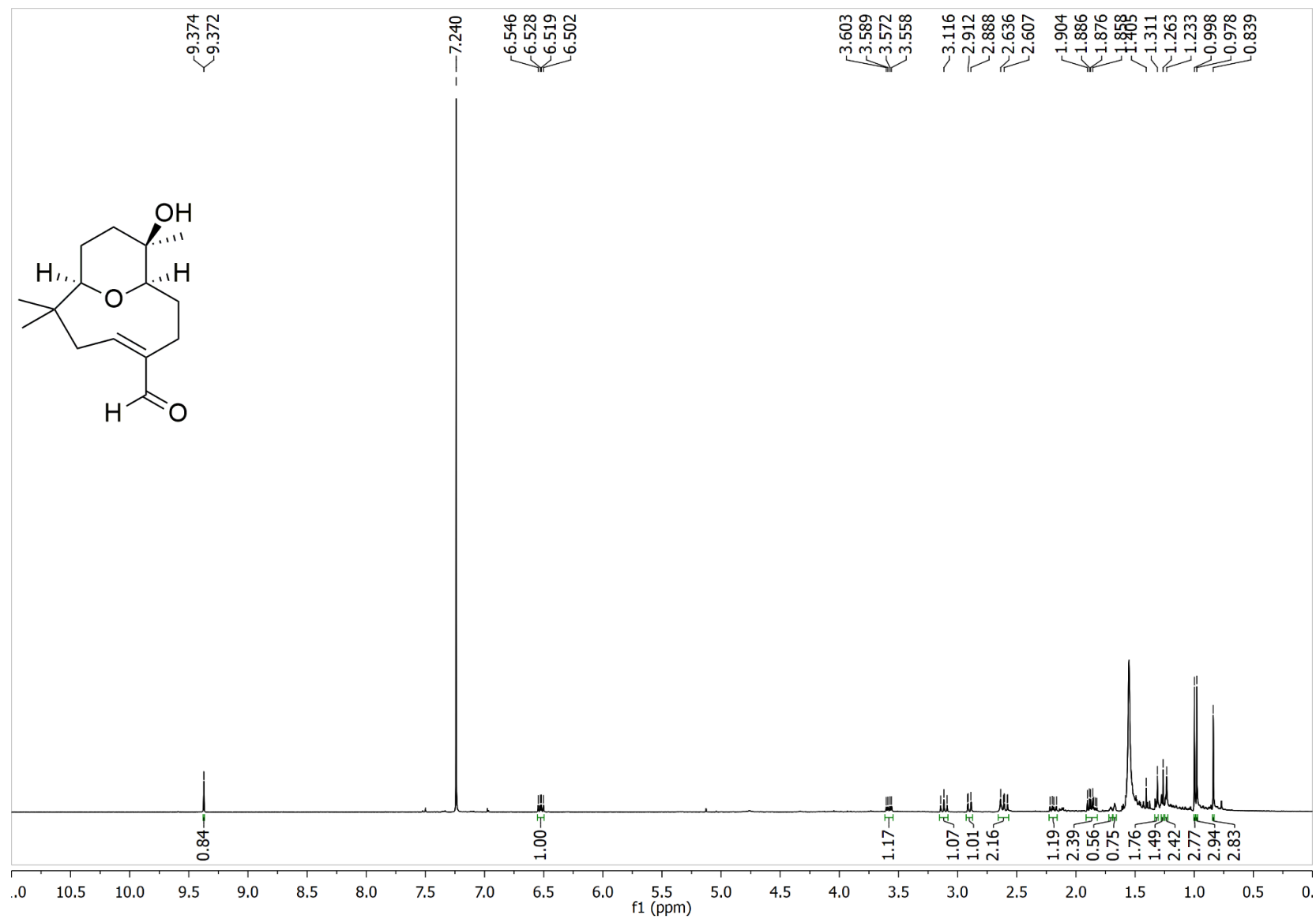


Figure S75. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **5**

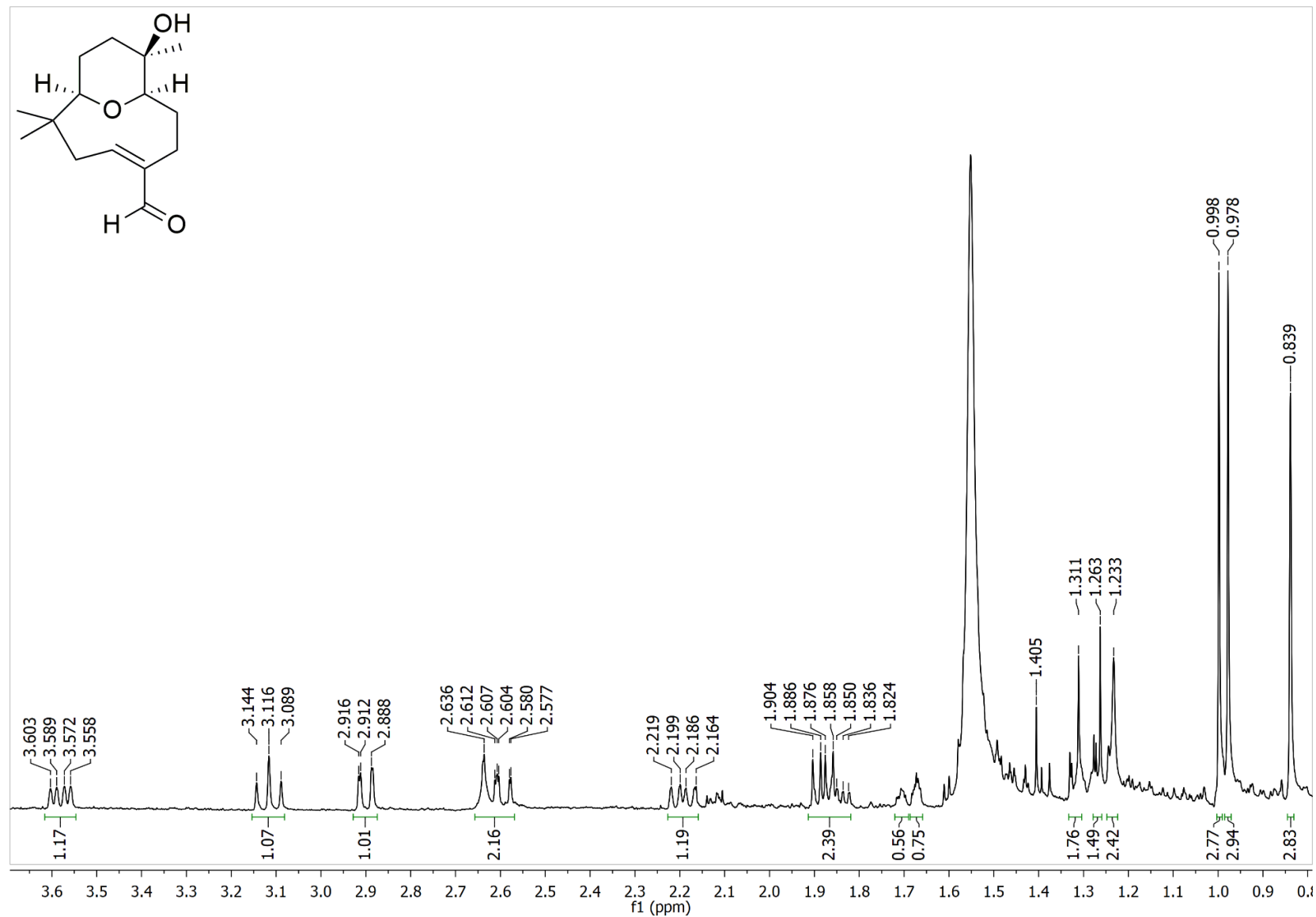


Figure S76. ^{13}C NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **5**

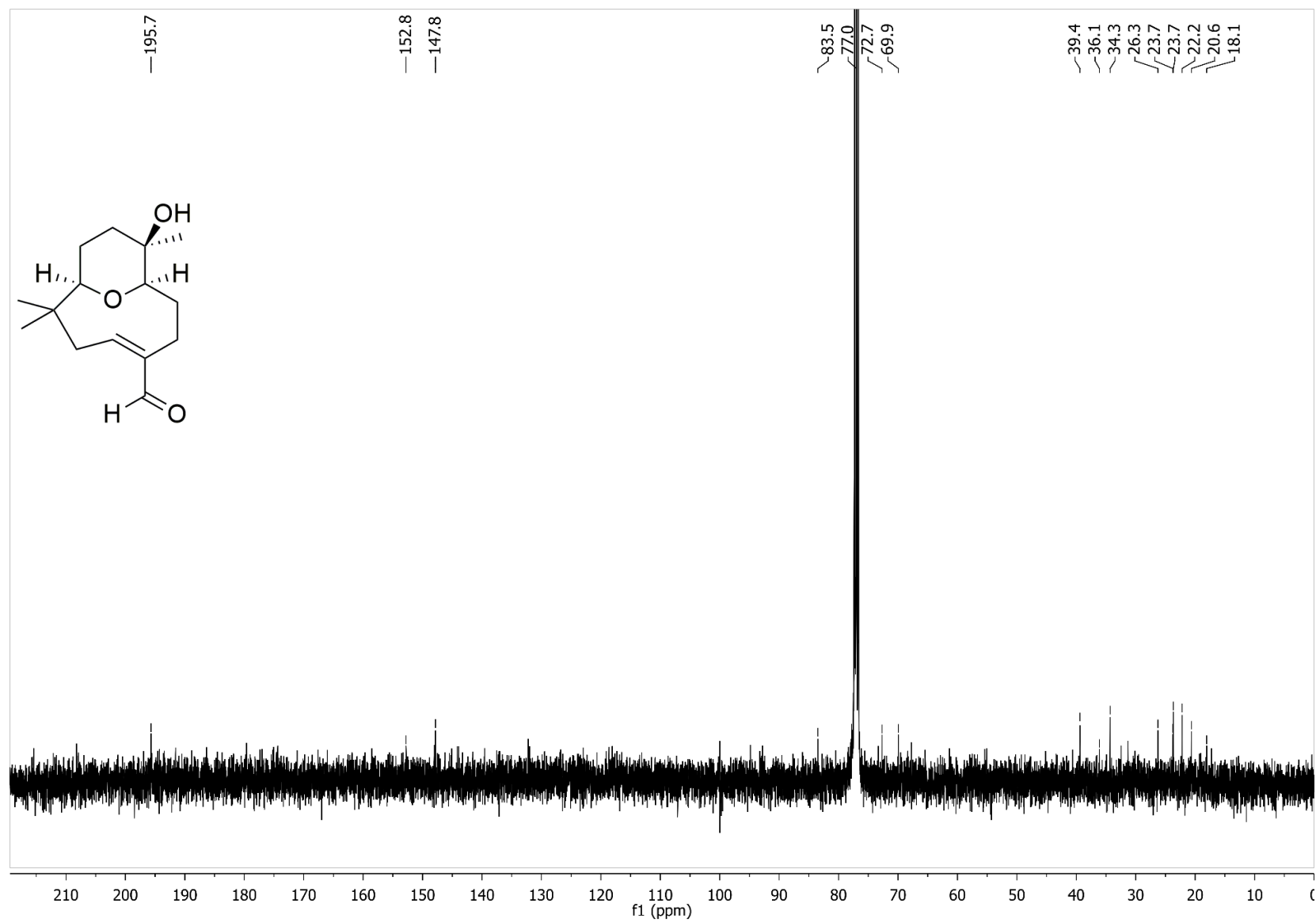


Figure S77. ^{13}C DEPT-135 NMR (100 MHz, CDCl_3) spectrum of **5**

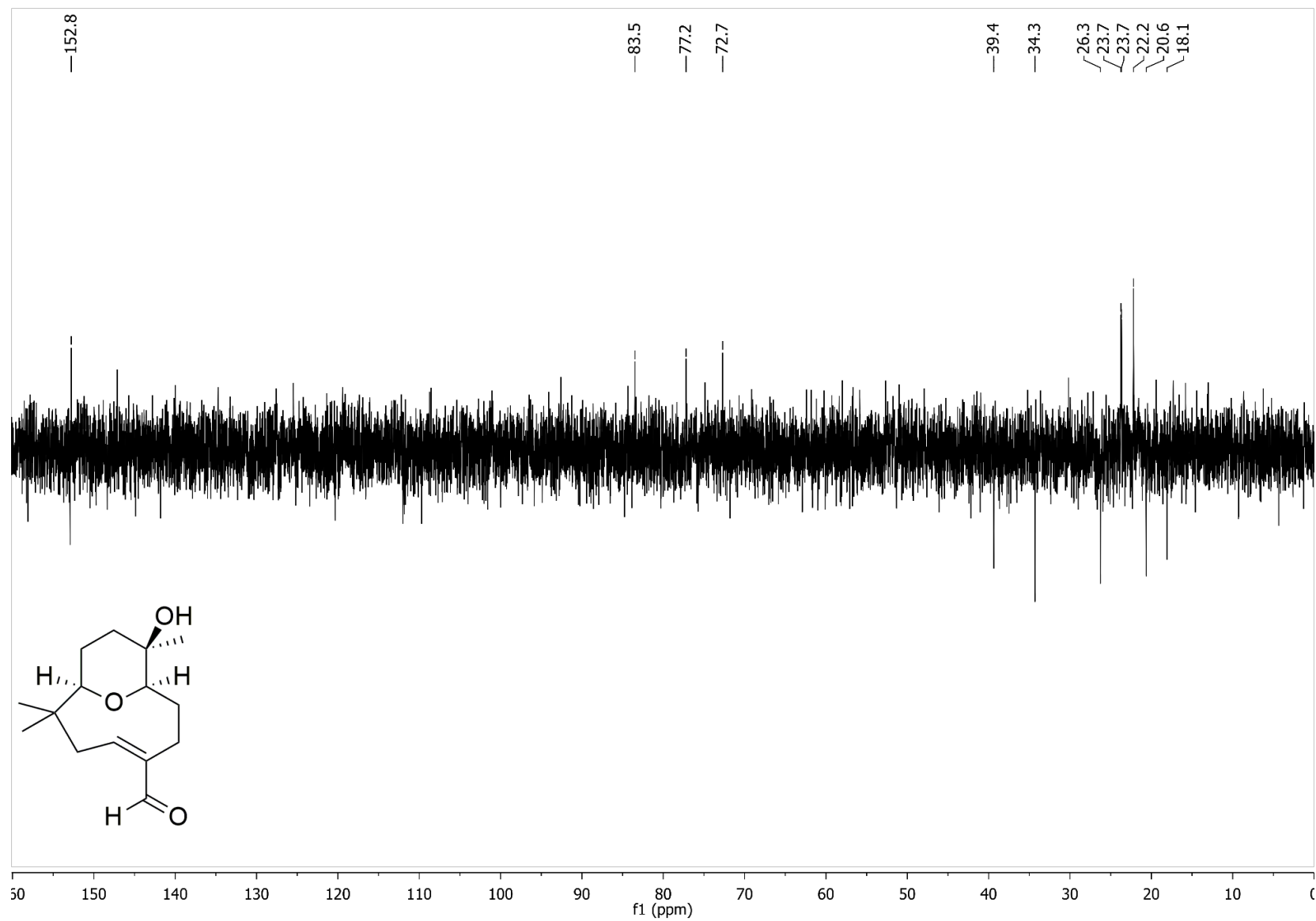


Figure S78. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **5**

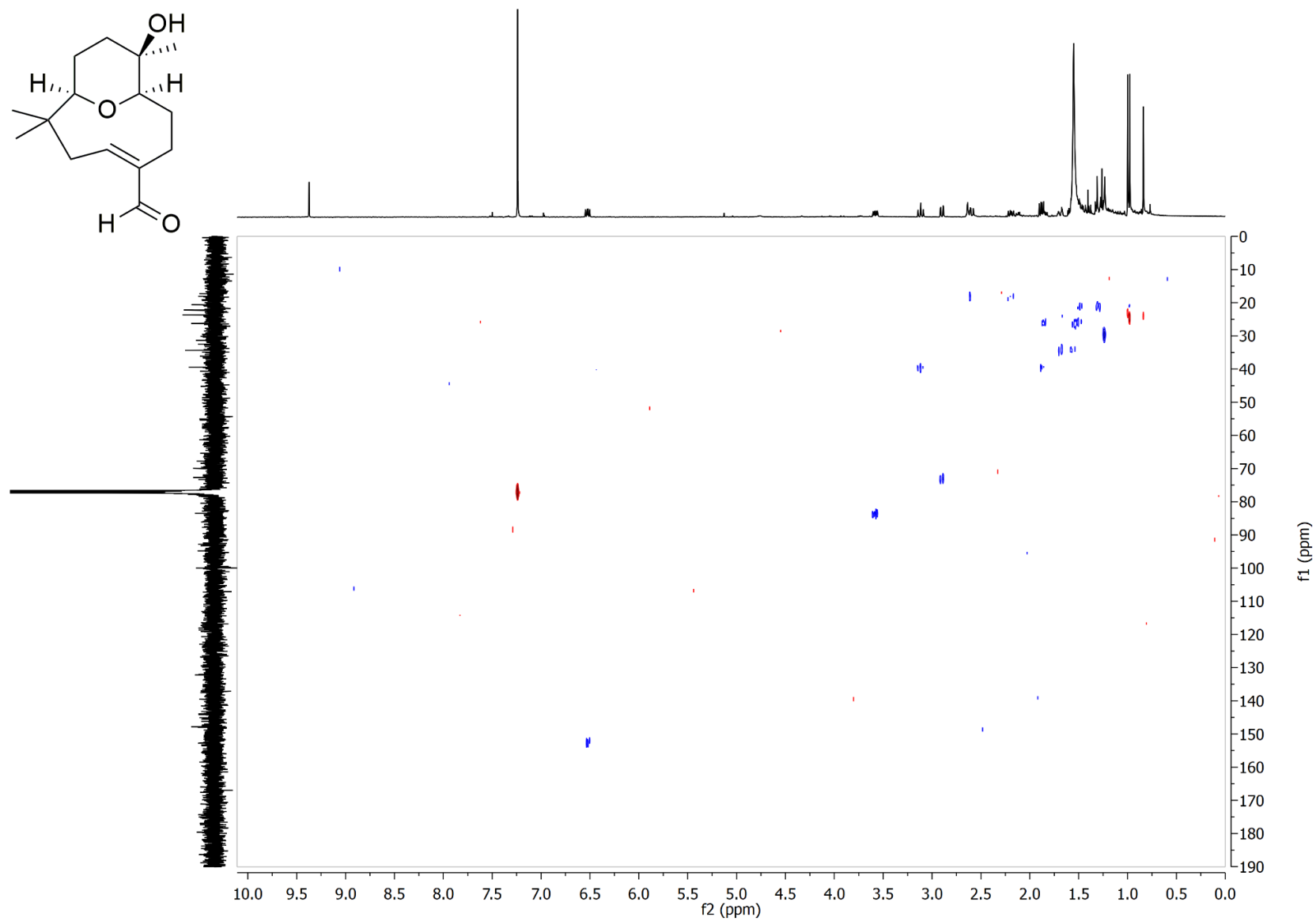


Figure S79. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **5**

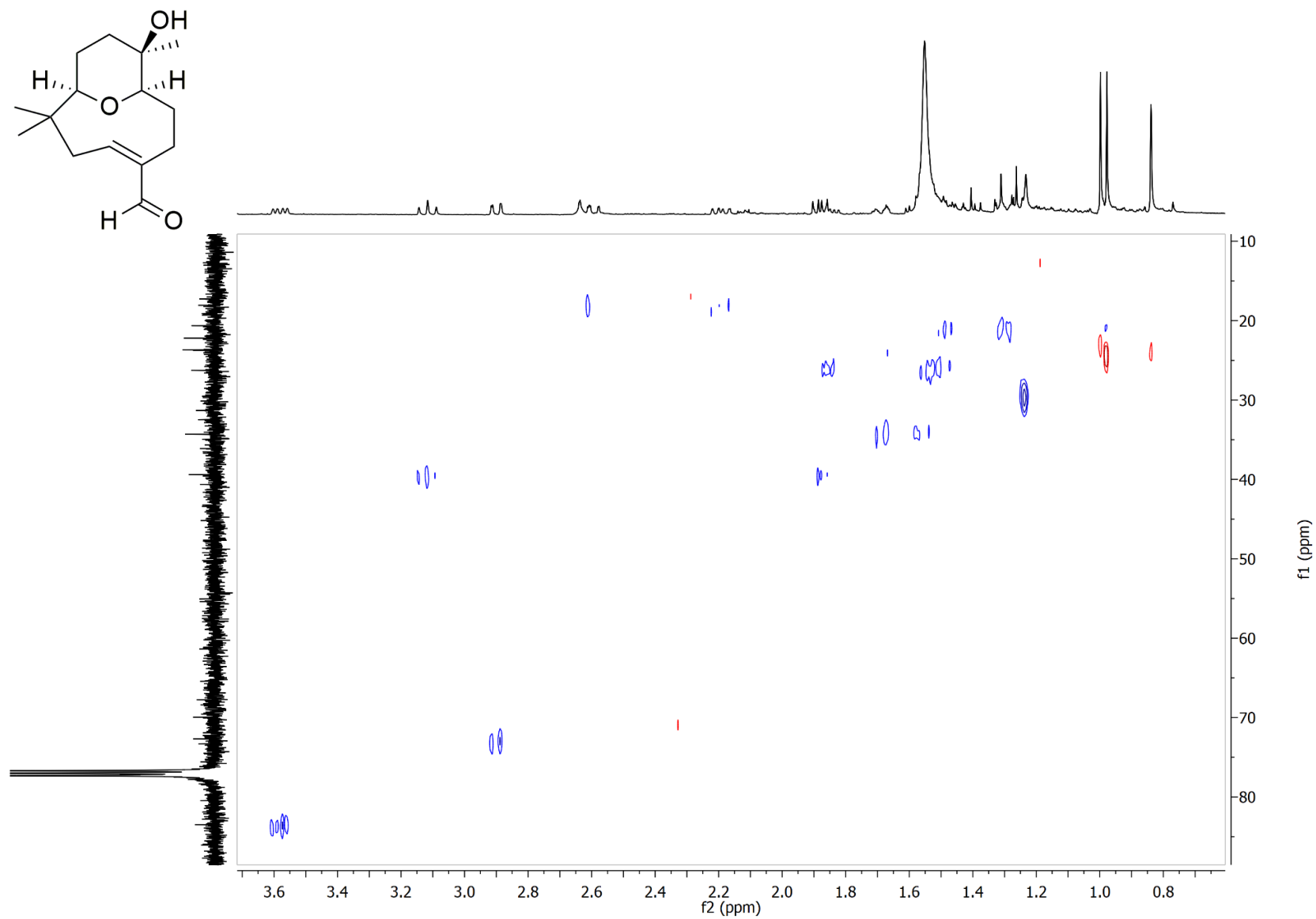


Figure S80. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **5**

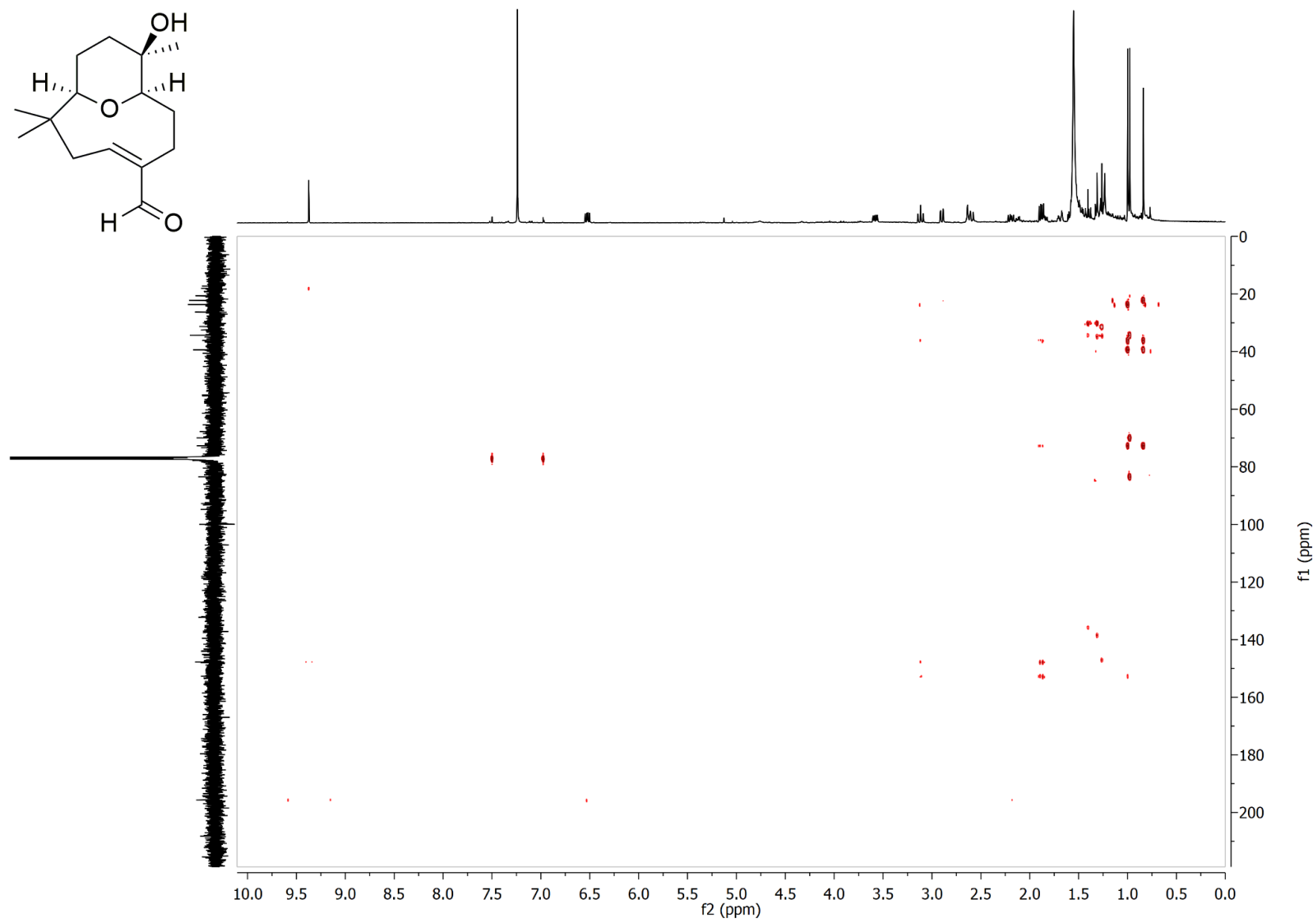


Figure S81. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **5**

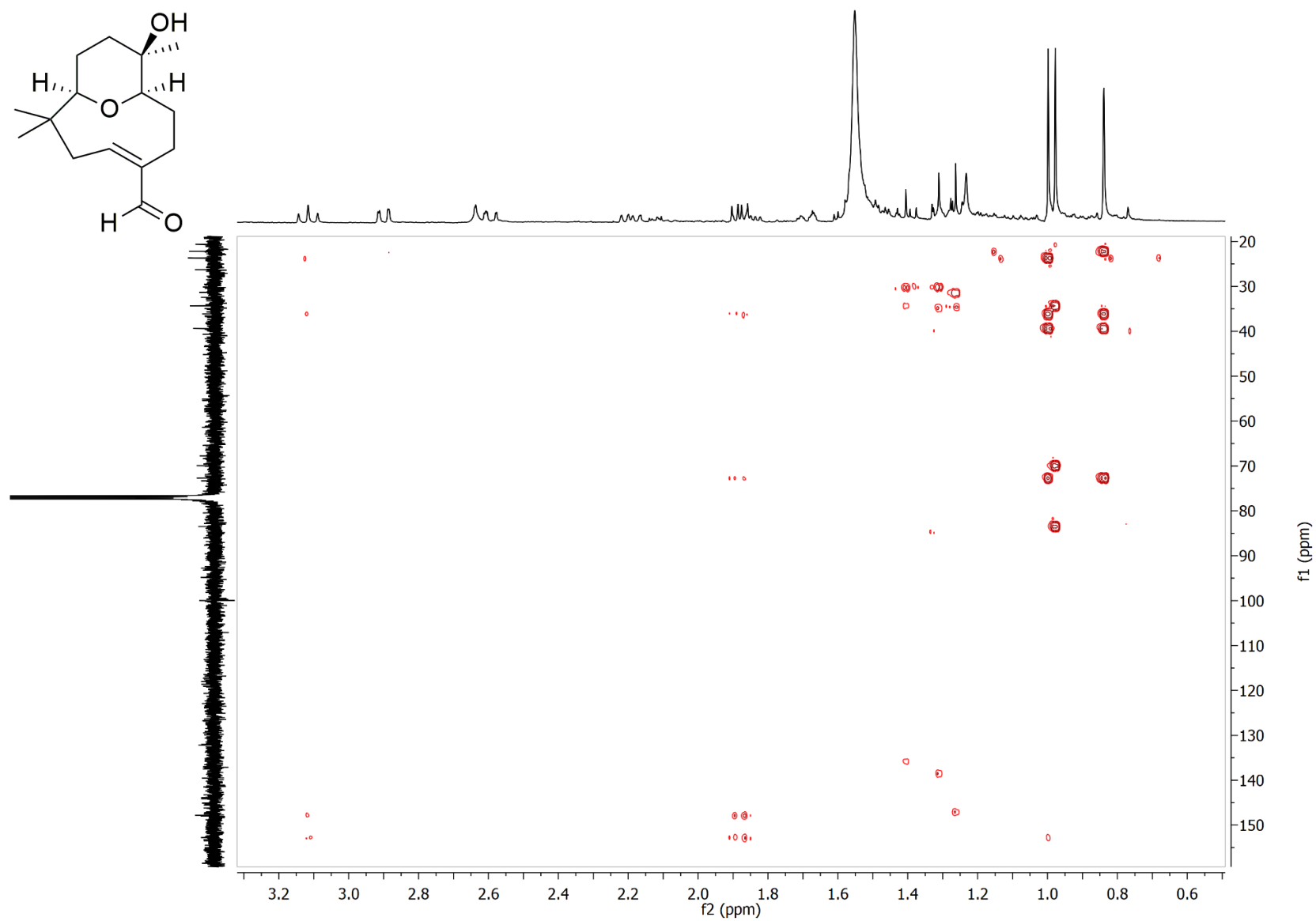


Figure S82. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **5**

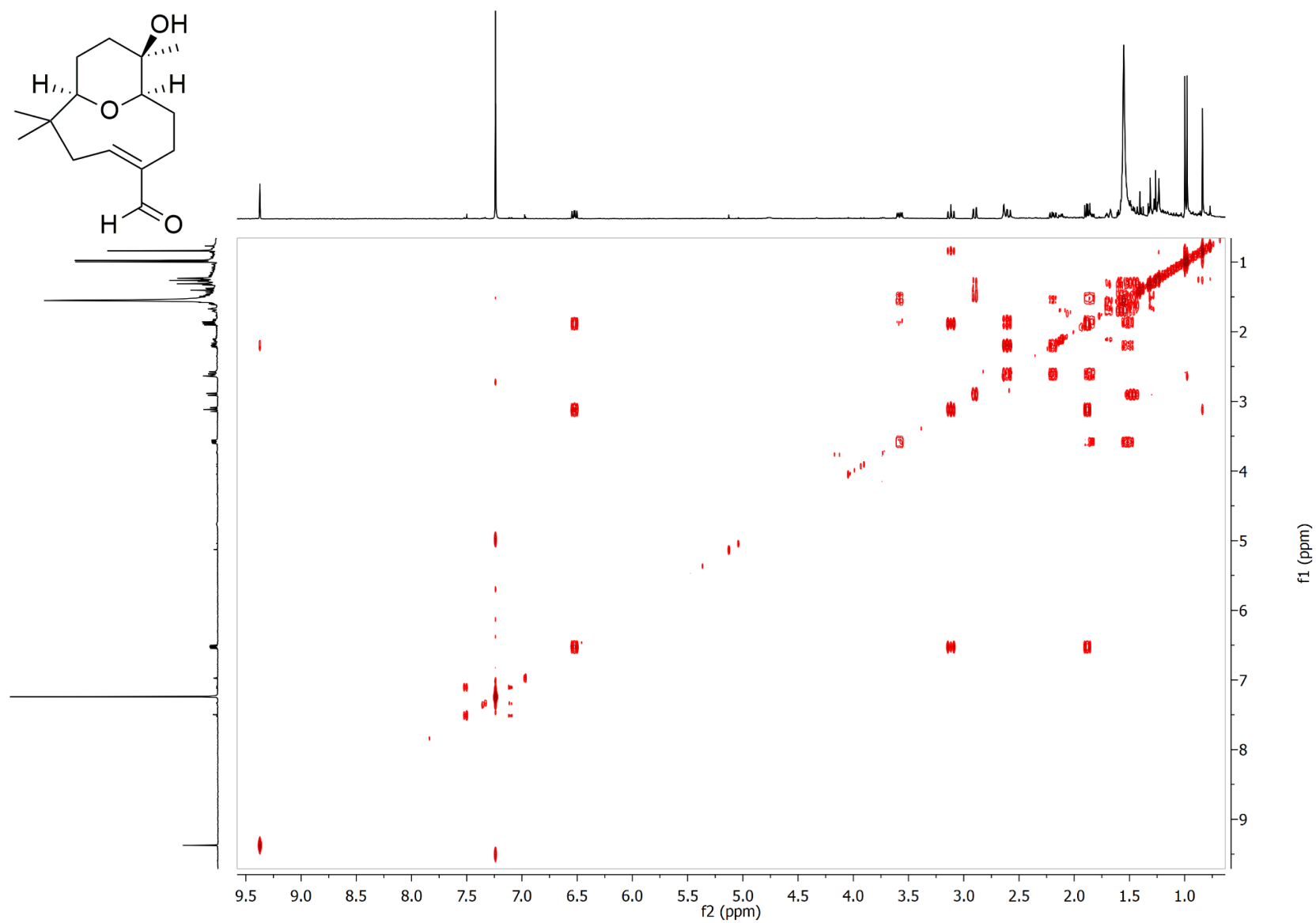


Figure S83. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **5**

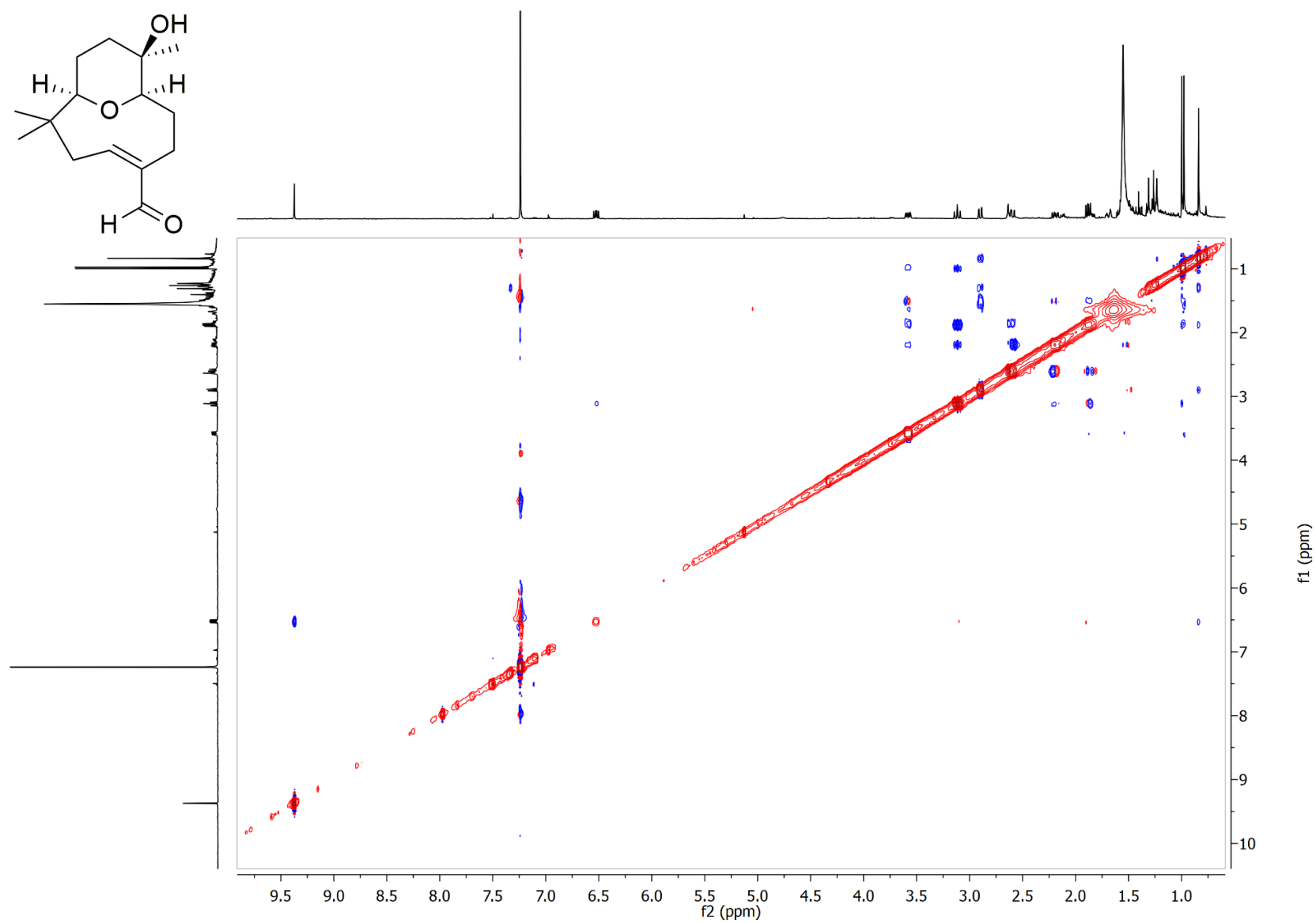


Figure S84. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **5**

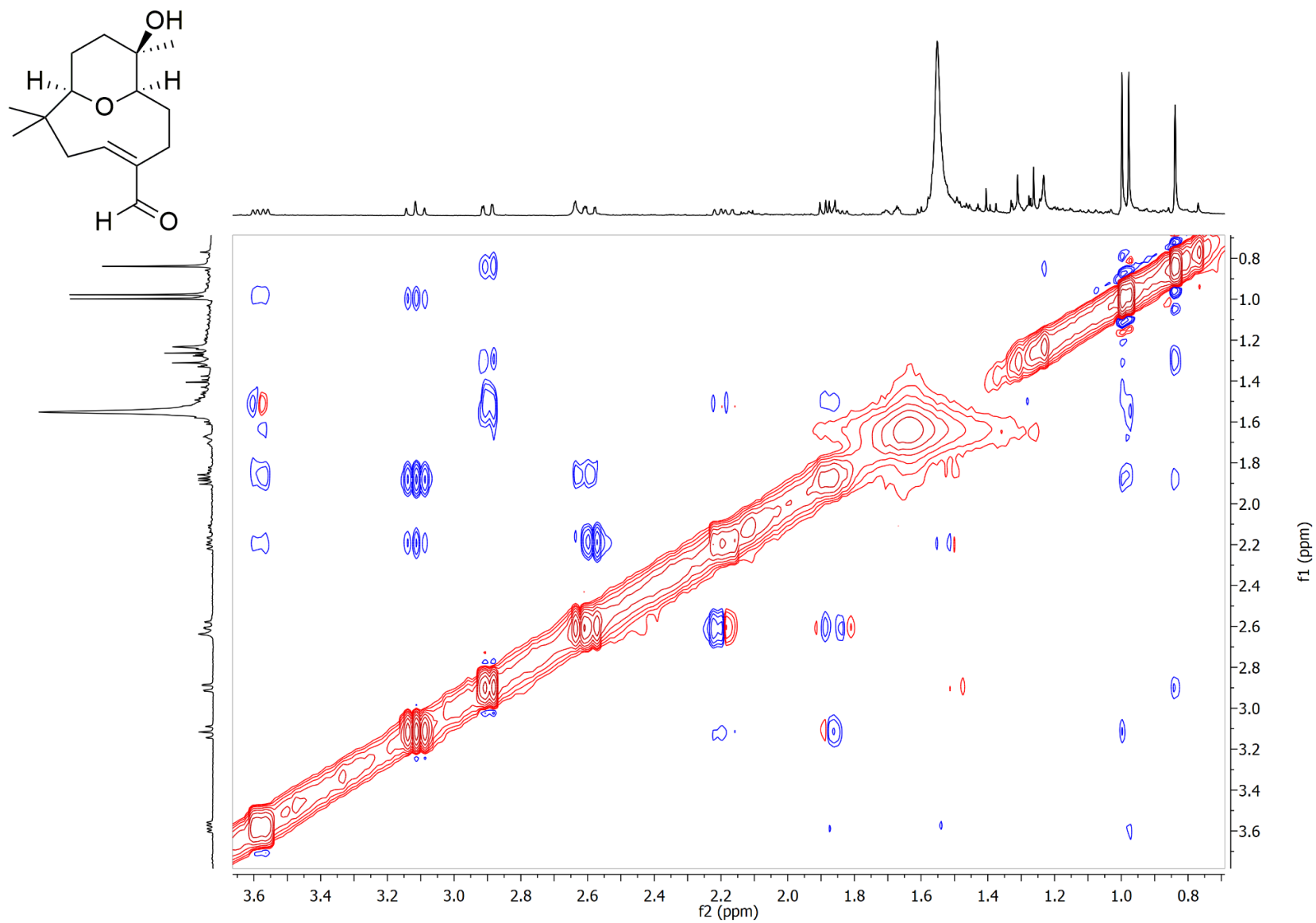


Figure S85. IR spectrum of compound **6**

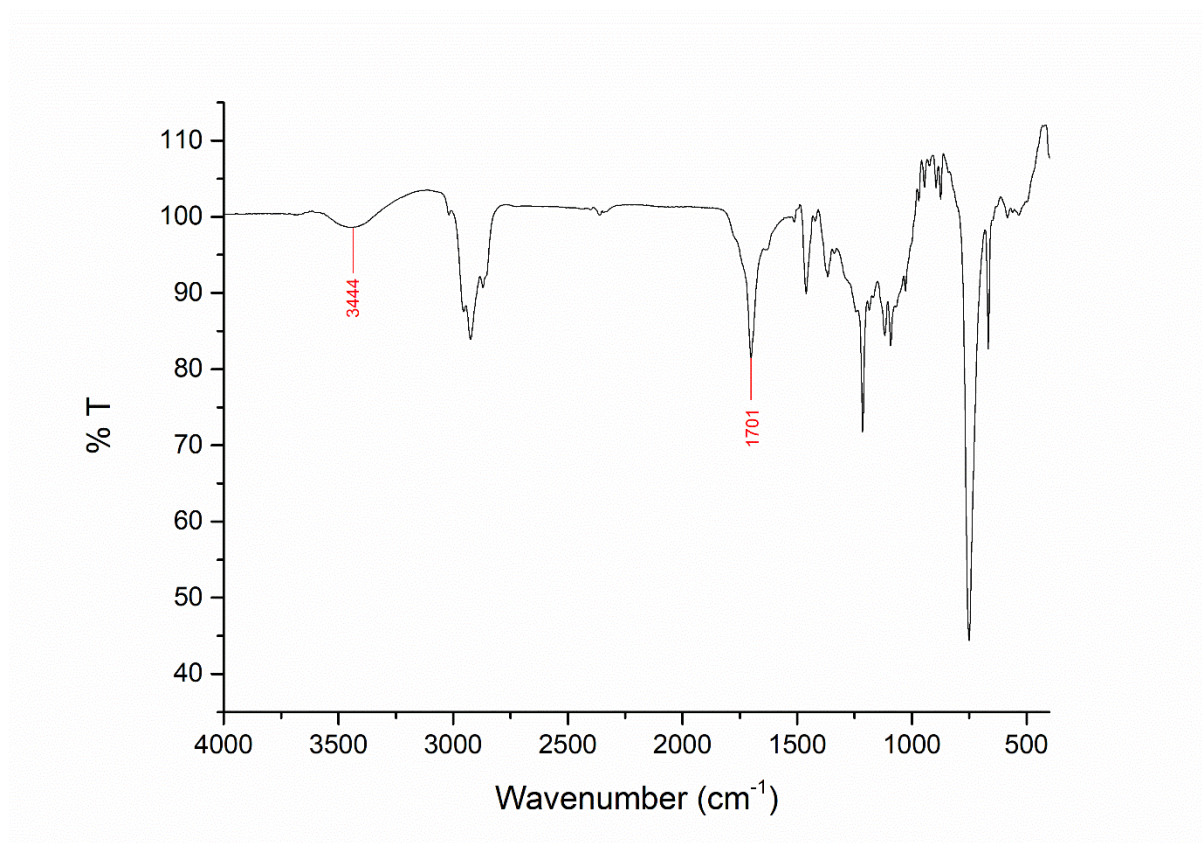


Figure S86. HRESIMS spectrum of compound **6** ([M + Na], positive ion mode)

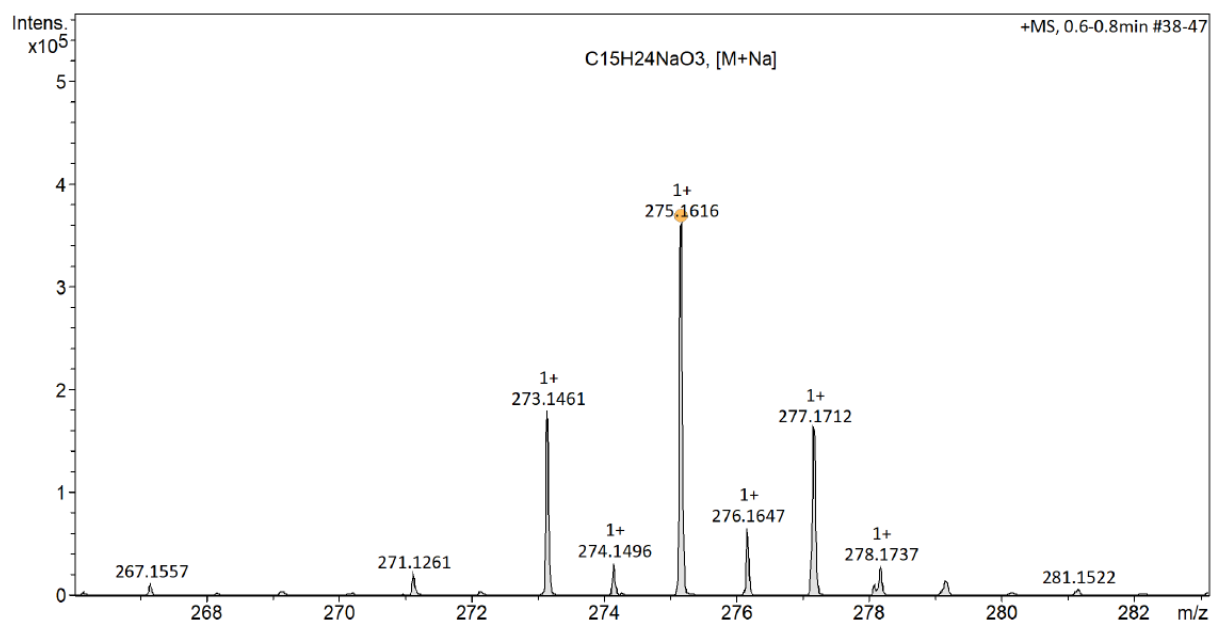


Figure S87. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **6**

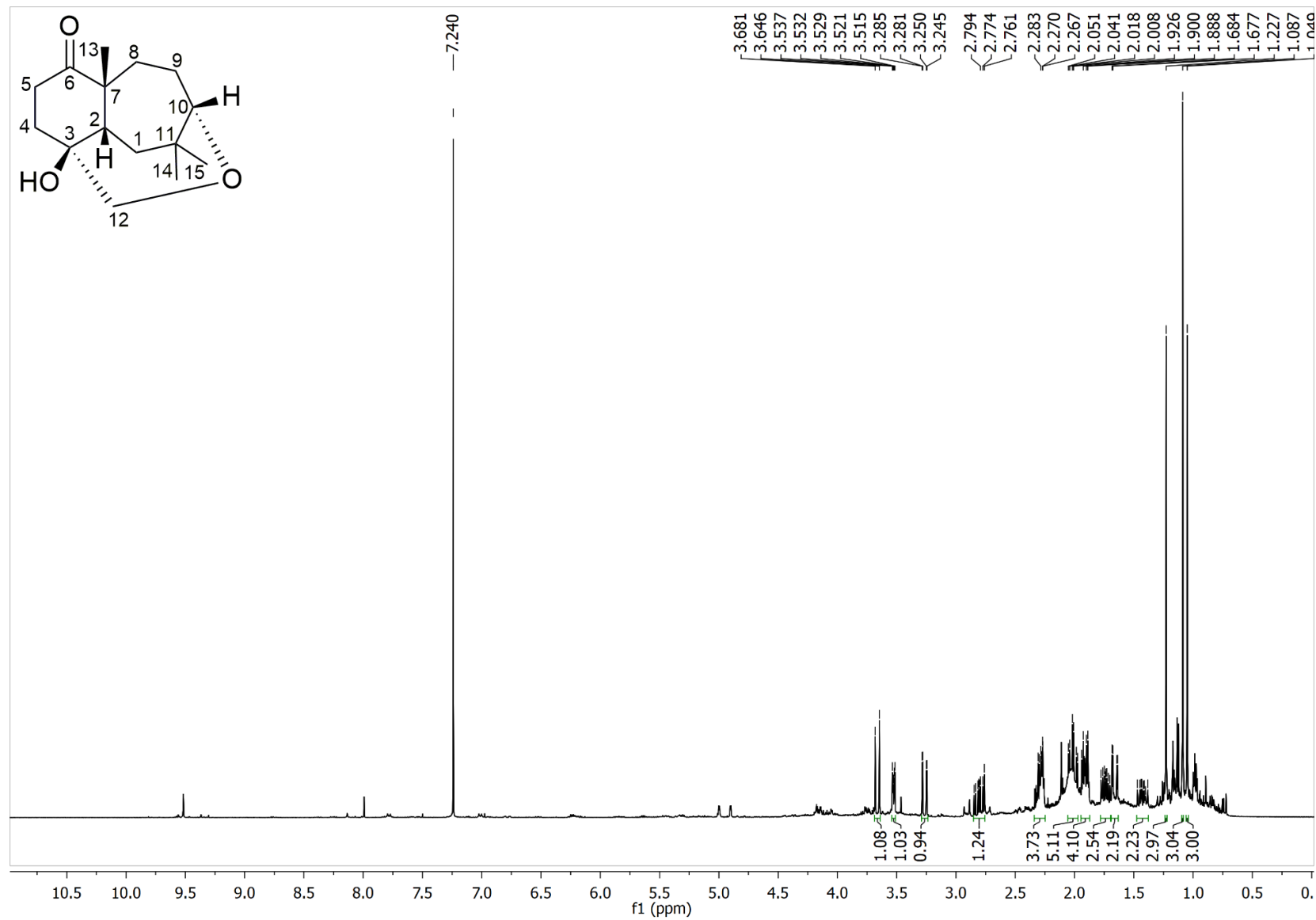


Figure S88. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **6**

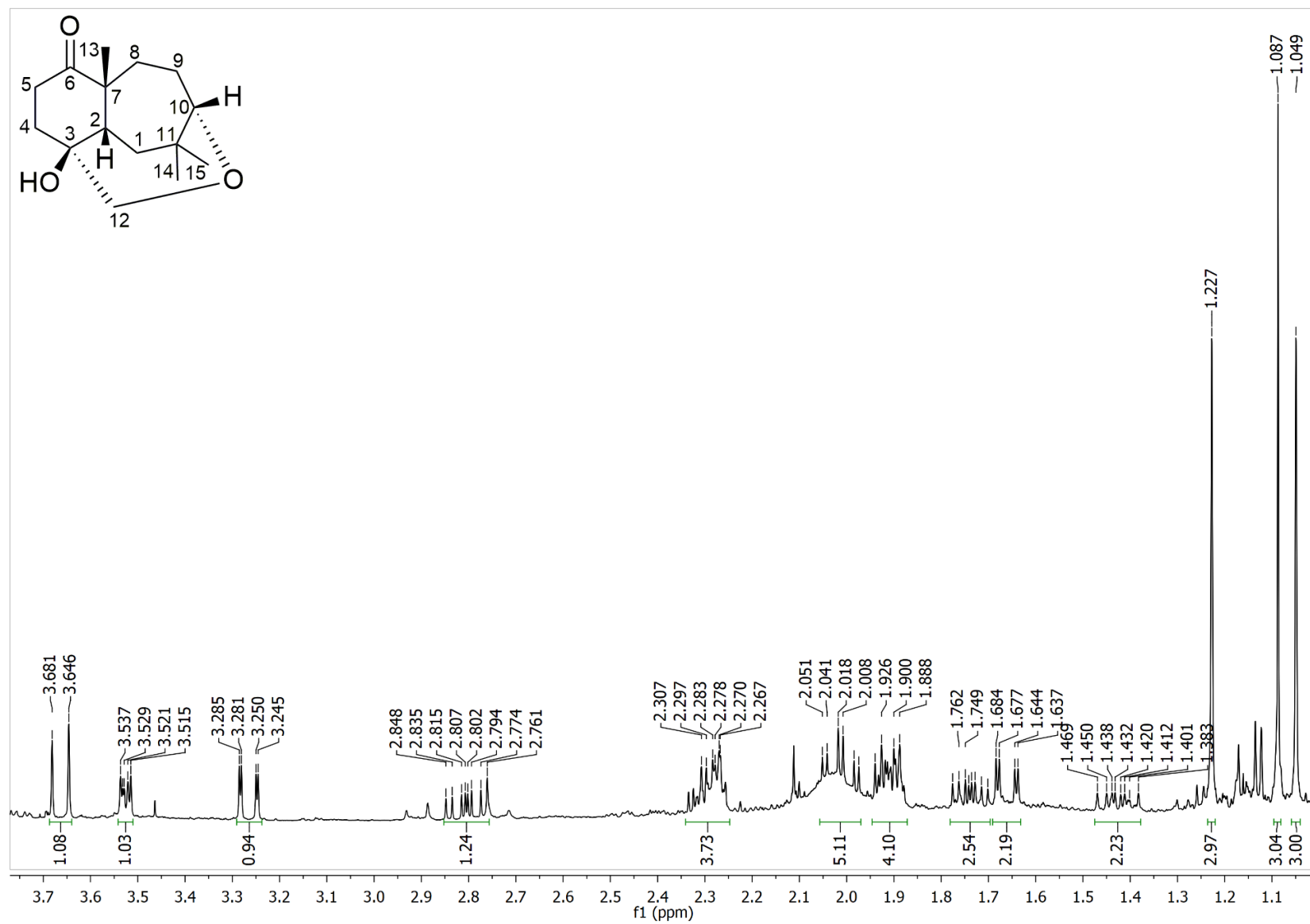


Figure S89. ^{13}C NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **6**

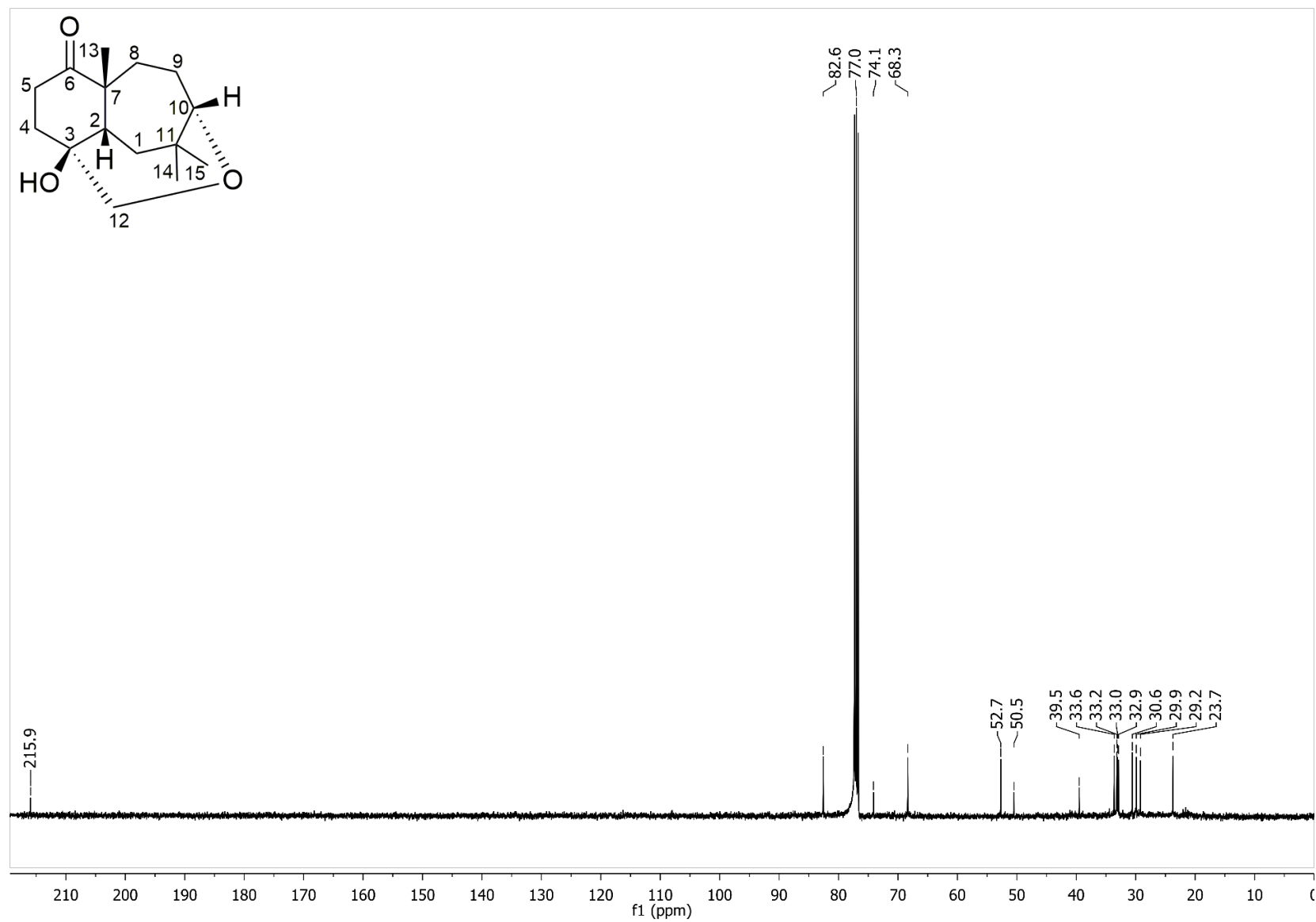


Figure S90. DEPT-135 NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **6**

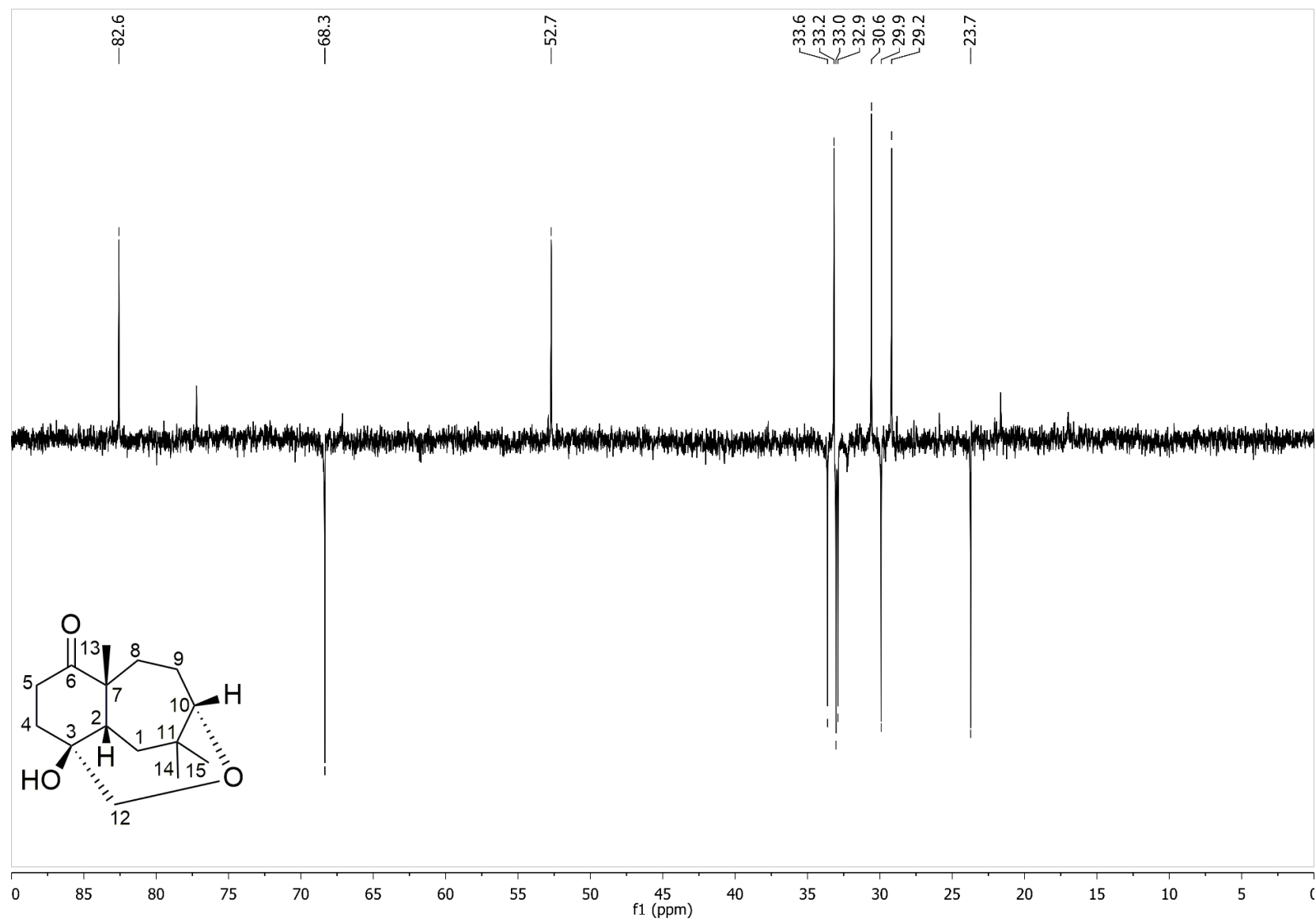


Figure S91. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **6**

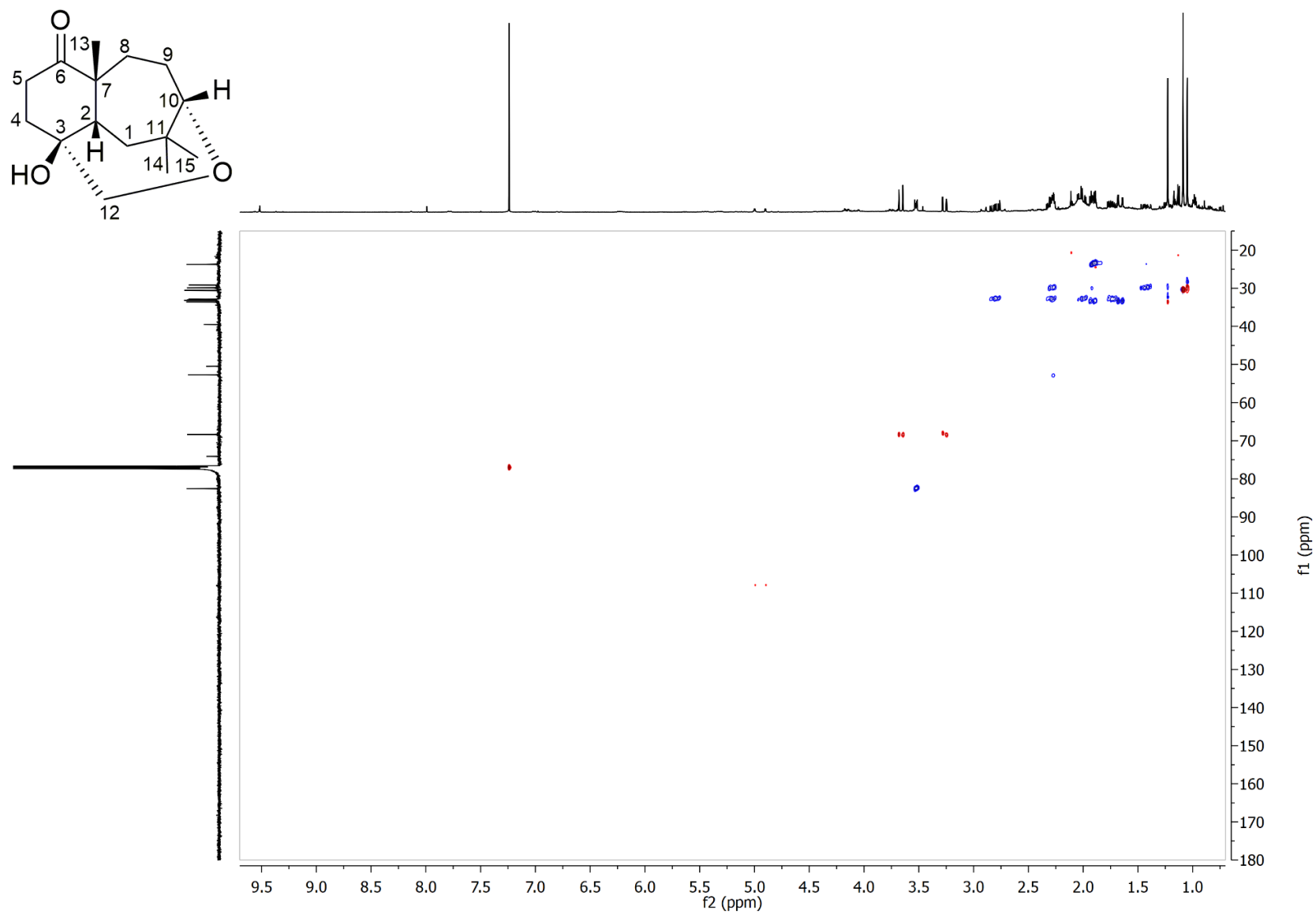


Figure S92. HSQC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **6**

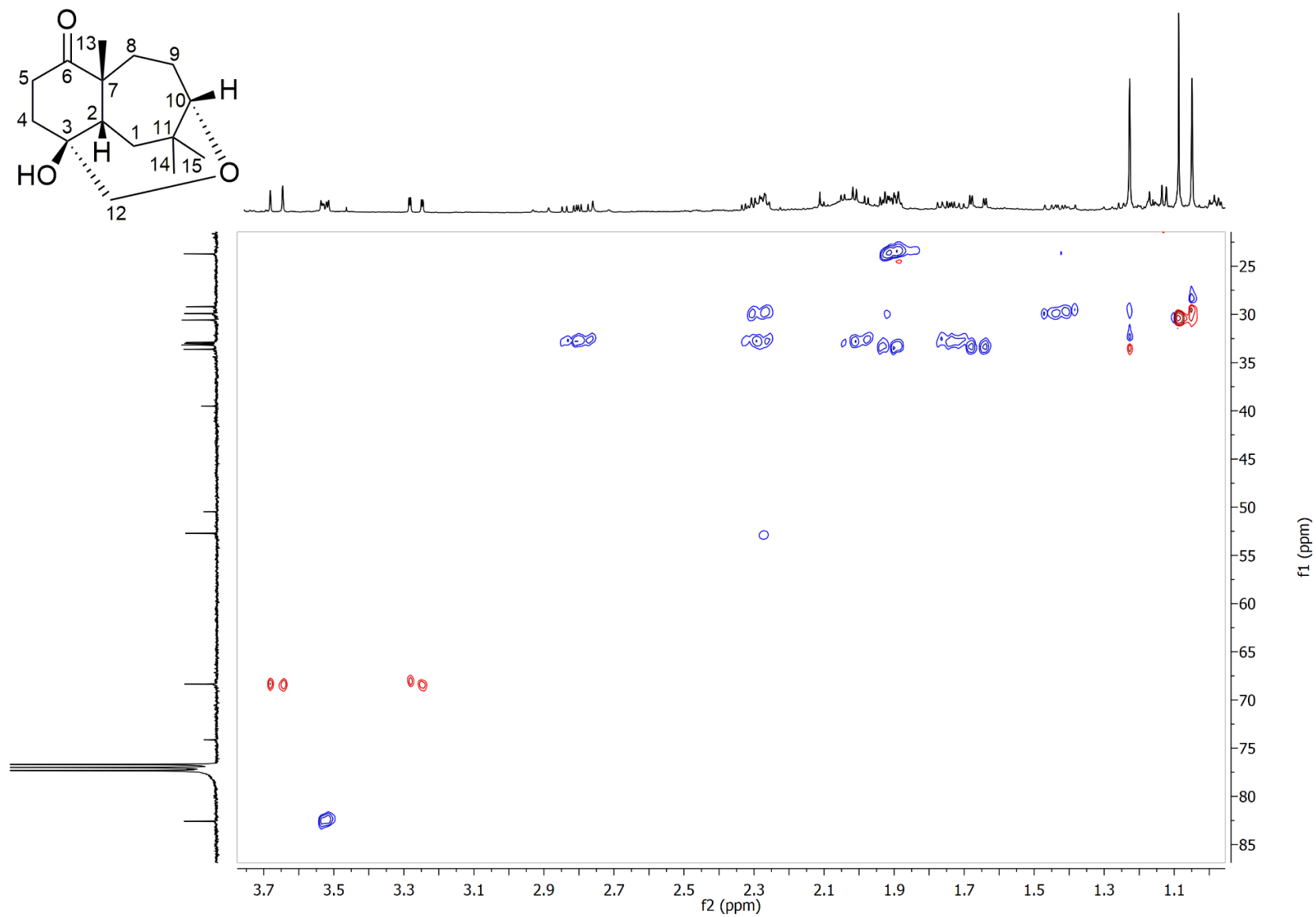


Figure S93. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) spectrum of **6**

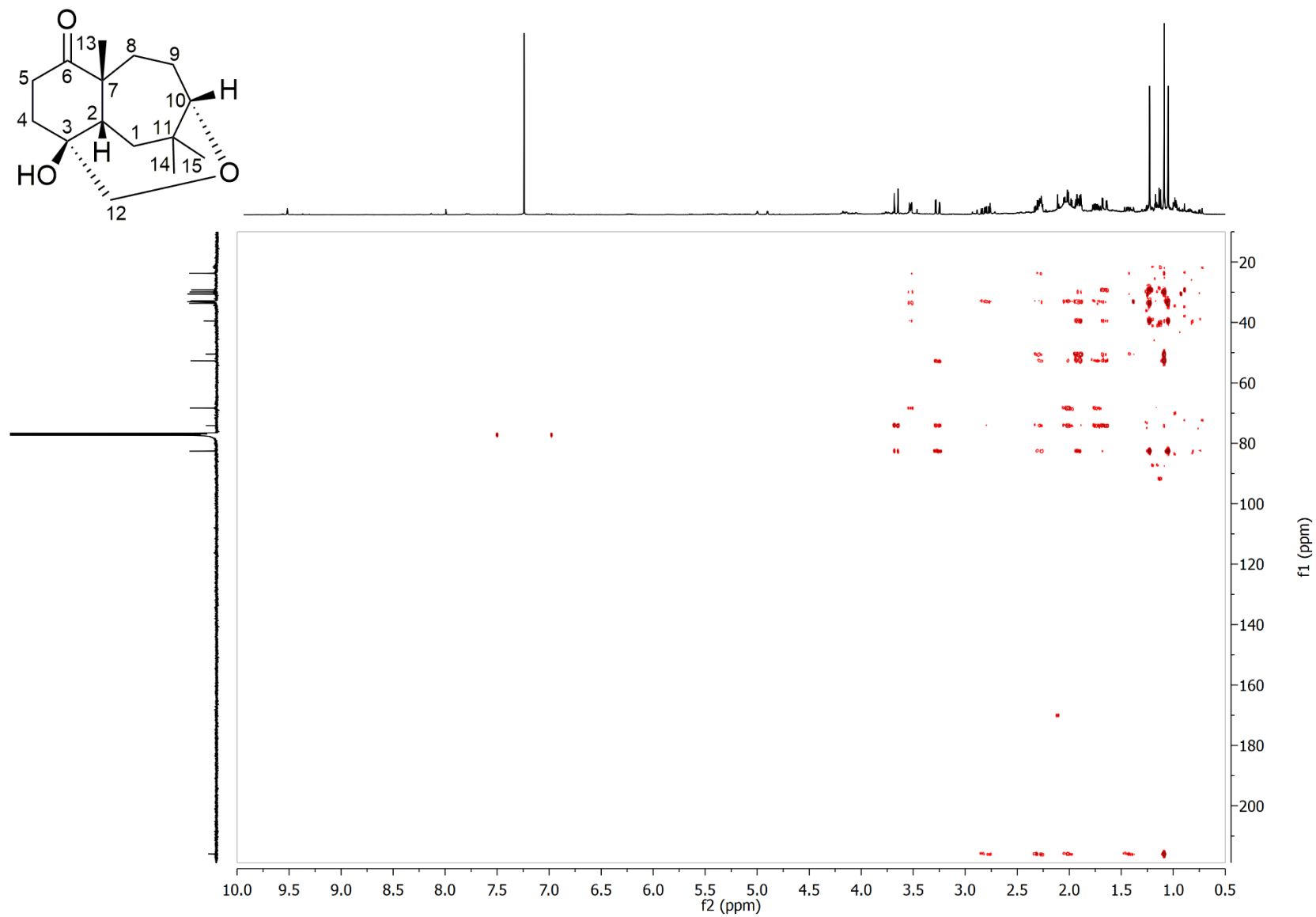


Figure S94. HMBC NMR (400 MHz, CDCl₃) extension spectrum of **6**

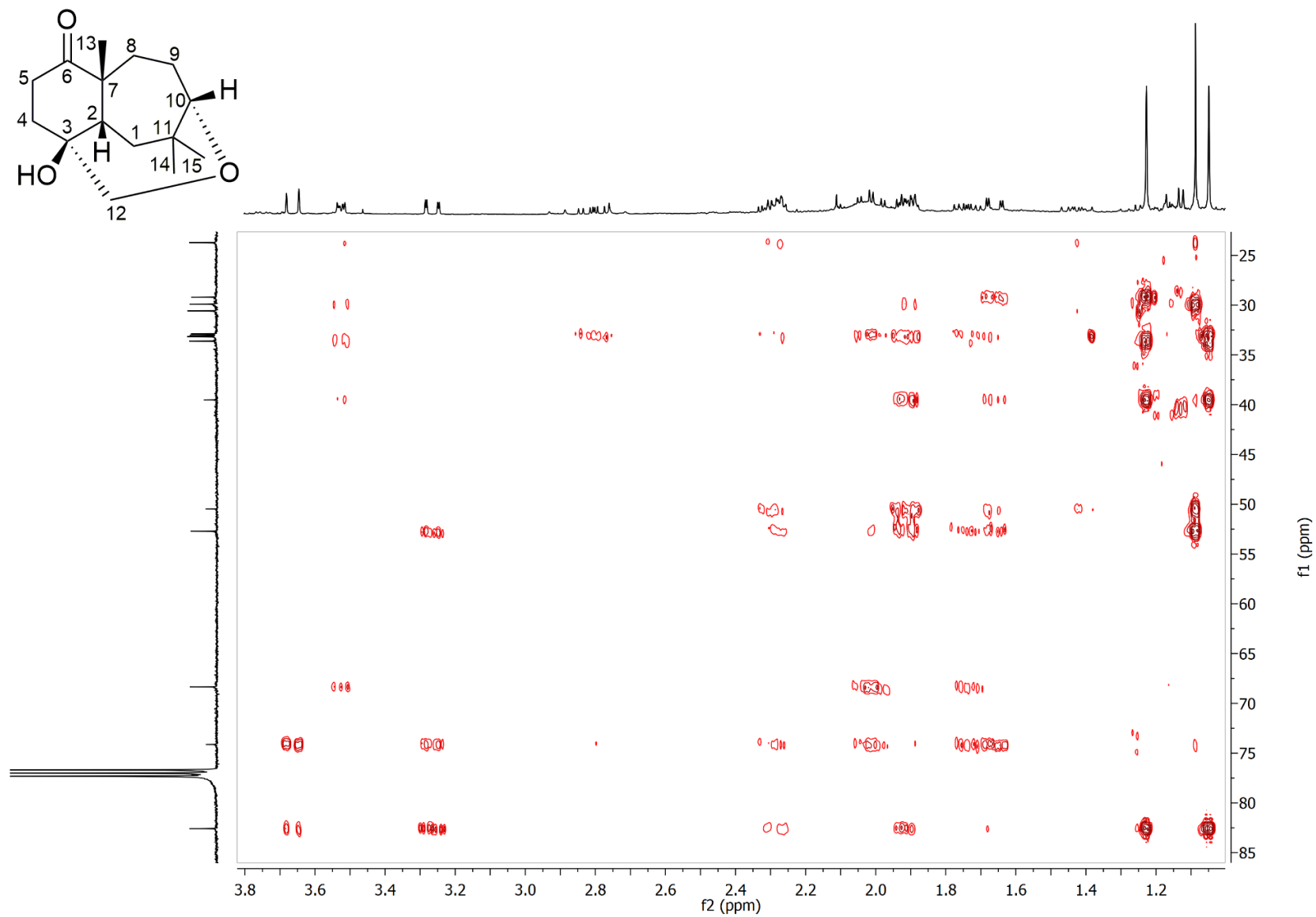


Figure S95. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **6**

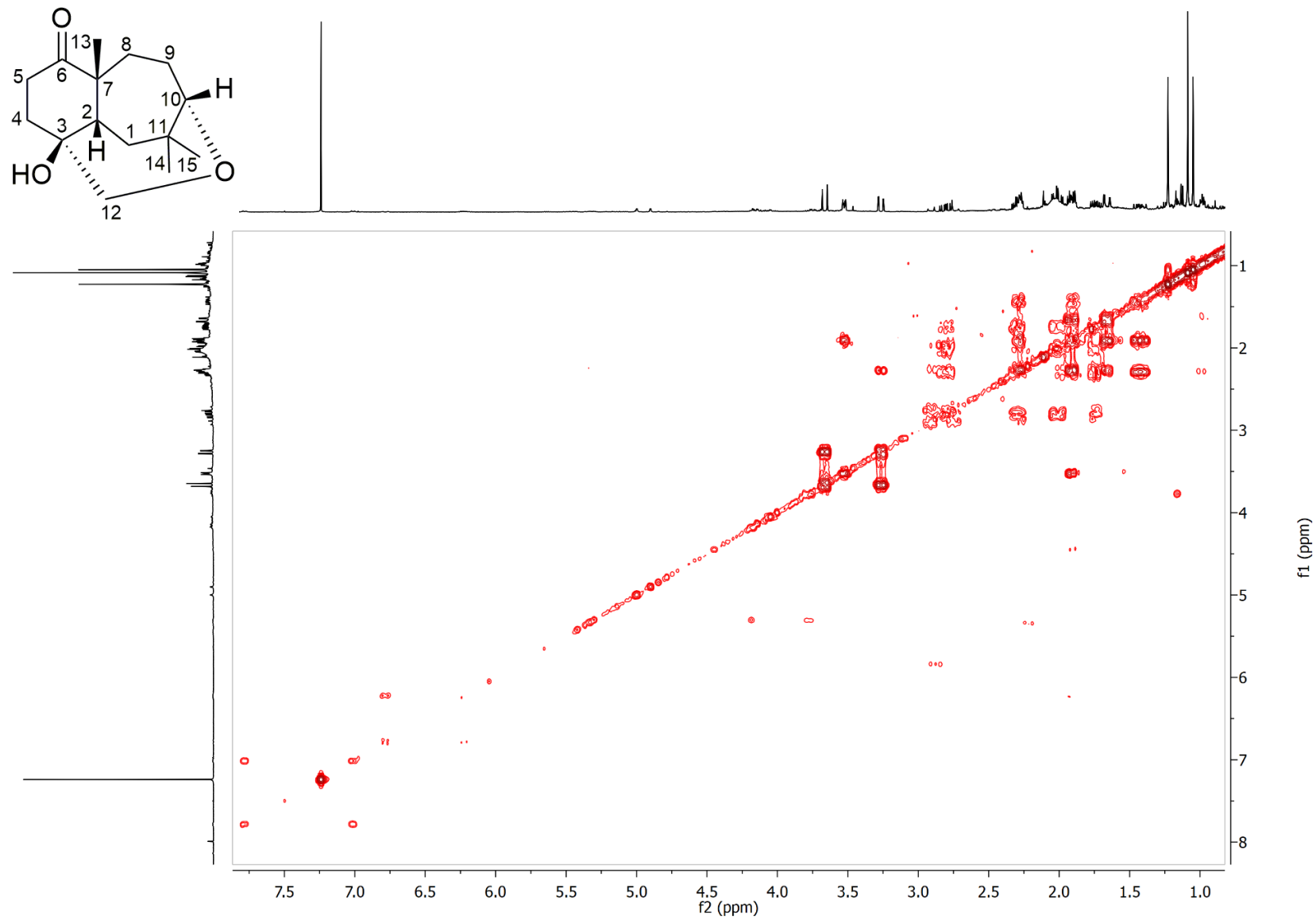


Figure S96. ^1H - ^1H COSY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **6**

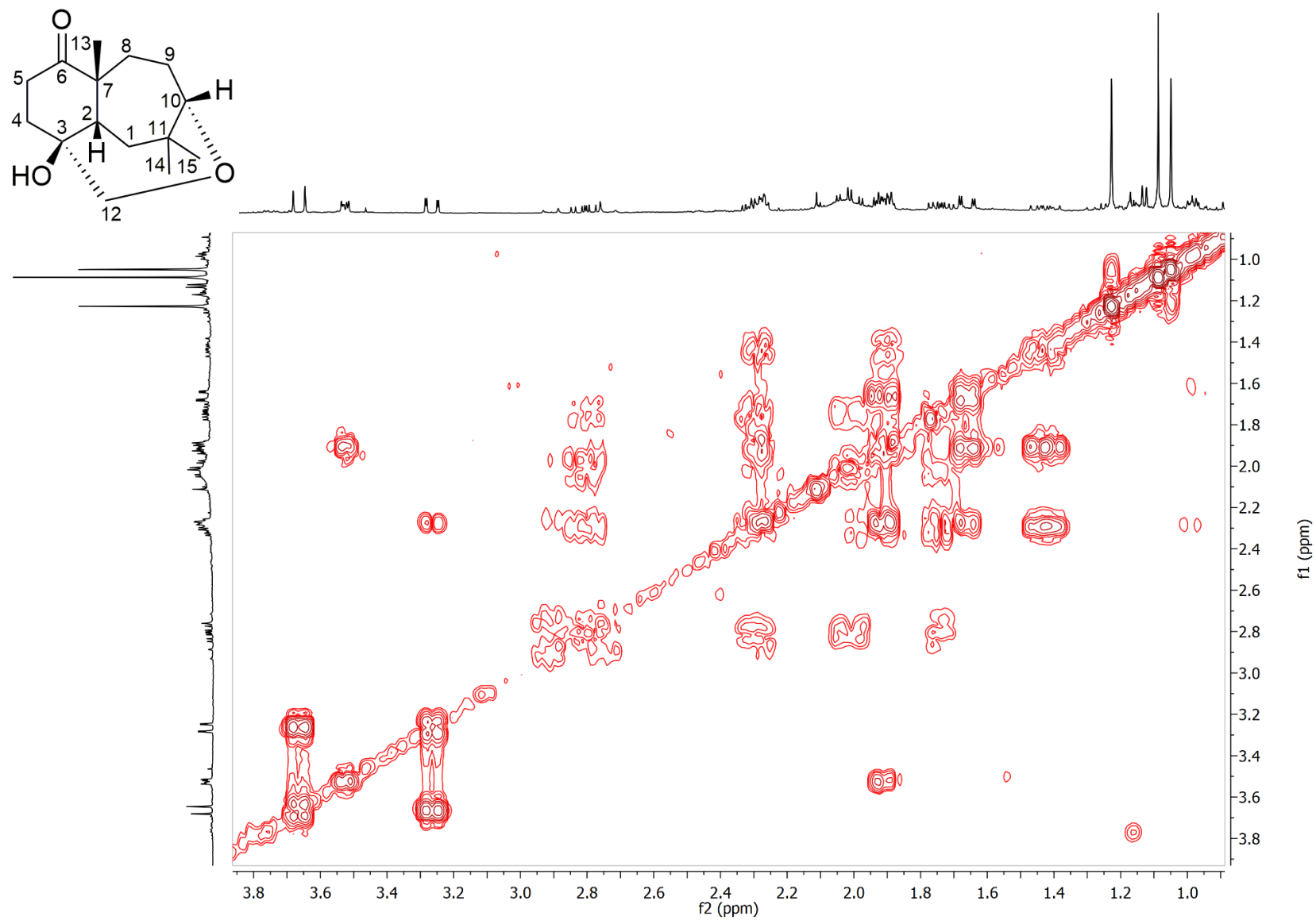


Figure S97. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) spectrum of **6**

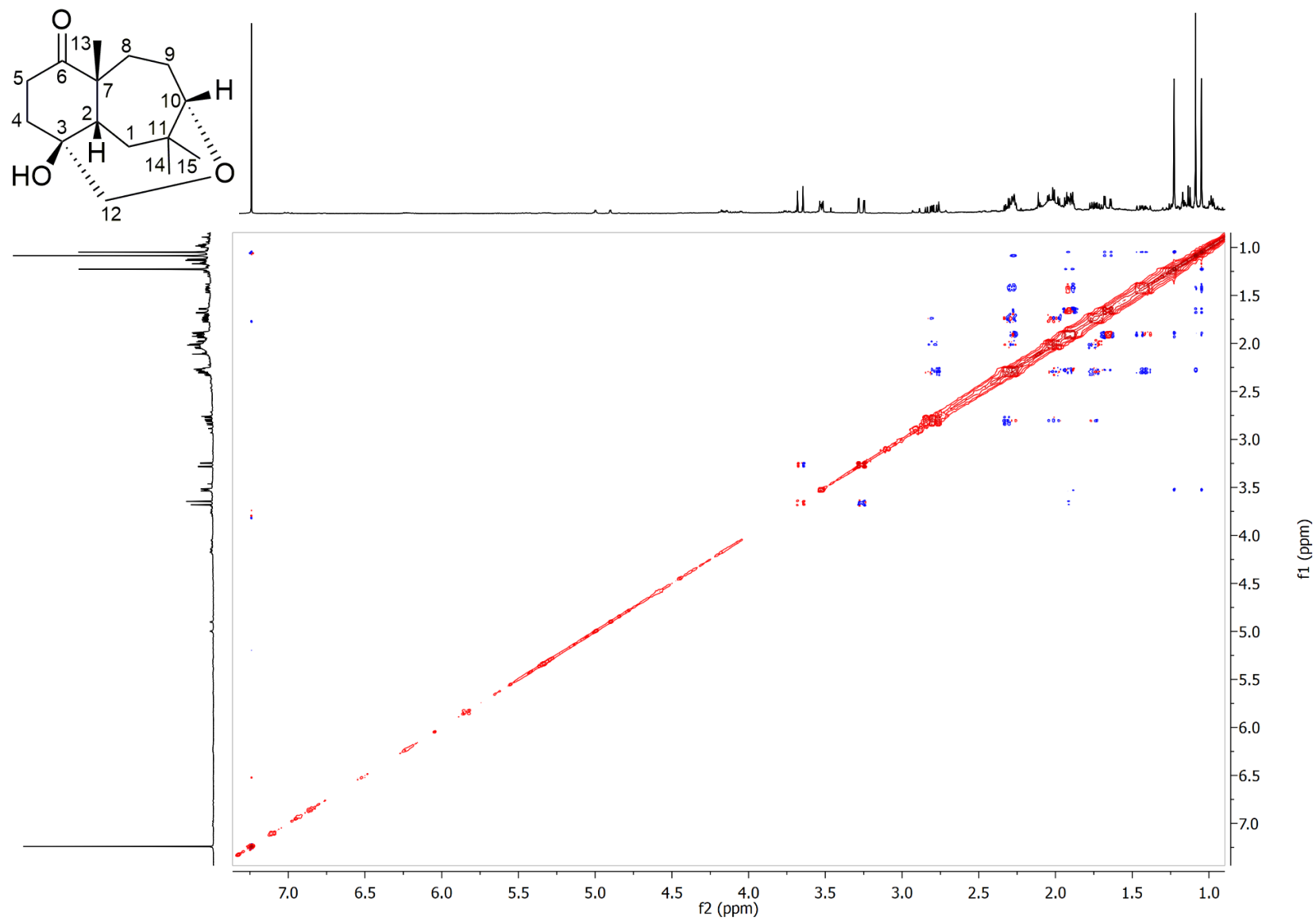


Figure S98. ^1H - ^1H NOESY NMR (400 MHz, CDCl_3) extension spectrum of **6**

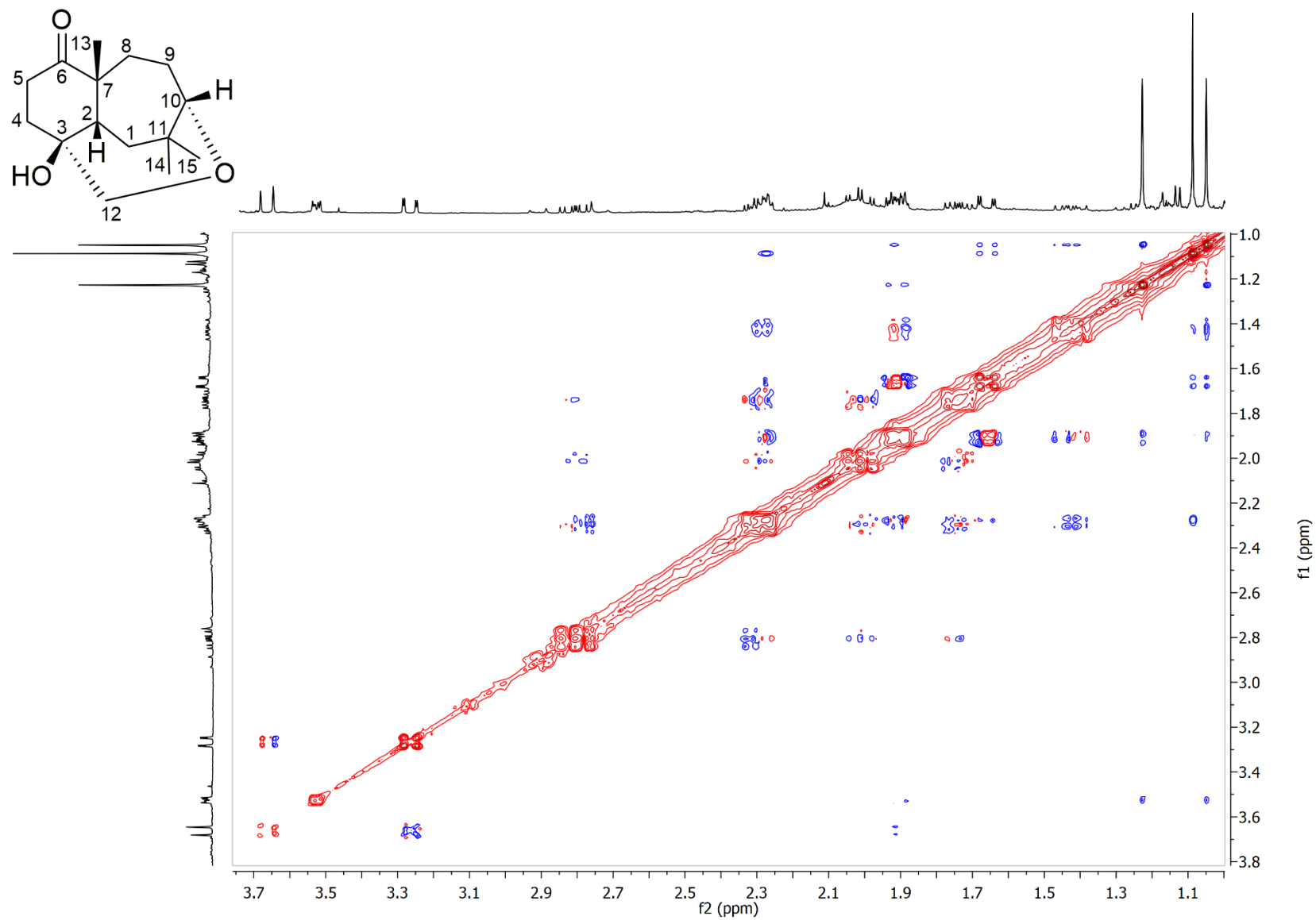
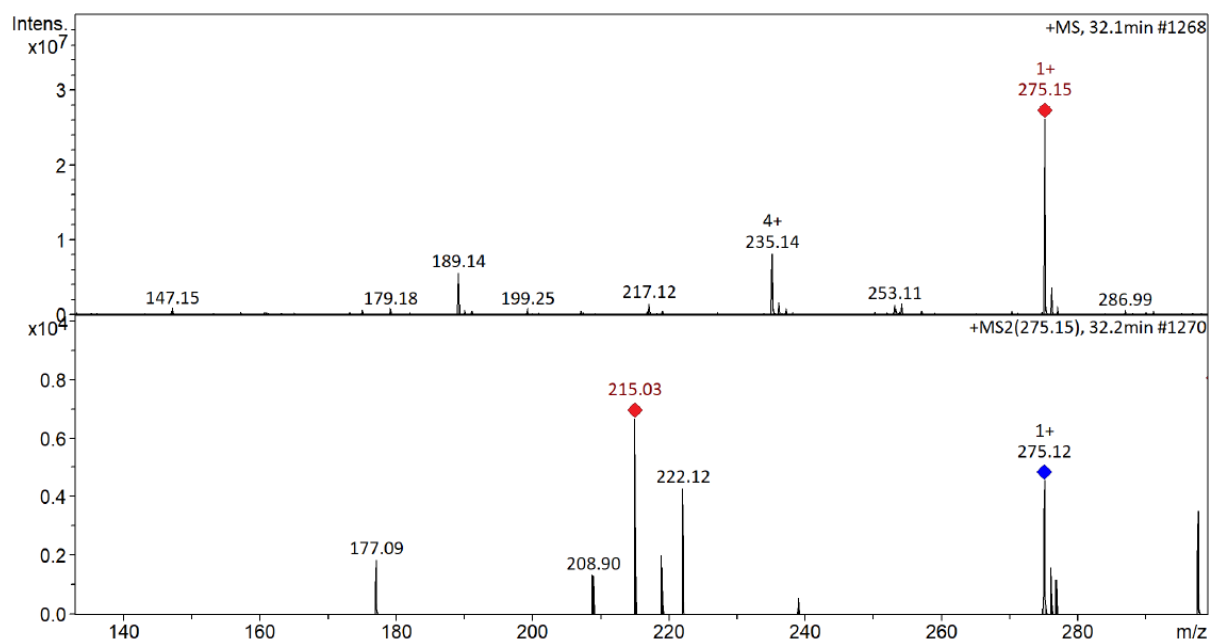


Figure S99. ESIMS/MS spectrum of compound **6** ($[M + H]^+$, positive ion mode)



CONCLUSÃO

CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico dos extratos etanólicos das raízes de *A. dolichocarpa*, levou ao isolamento de doze metabólitos secundários, alguns dos quais foram investigados em ensaio de atividade citotóxica contra linhagens de células HCT-116 (carcinoma colorretal humano) e L929 (fibroblastos murinos não-tumorais).

Foram isolados seis alcaloides, os inéditos dolichocarpina e 9-metoxieupolauramina, além dos conhecidos eupolauramina, 3-metoxieupolauridina, eupolauridina e 4-metilsampangina. Com exceção deste último, os demais foram avaliados no ensaio de citotoxicidade. Para a linhagem de HCT-116, apenas os compostos 9-metoxieupolauramina e 3-metoxieupolauridina foram capazes de inibir a proliferação celular e somente dolichocarpina não induziu citotoxicidade em L929.

Seis sesquiterpenoides macrocíclicos do tipo humuleno, denominados como dolichocarpois A-F, todos novos e apresentando esqueleto químico incomum, foram também isolados. Três deles, dolichocarpois C, D e F, foram testados. O dolichocarpol C inibiu significativamente a proliferação celular de HCT-116, porém sem seletividade já que inibiu L929 em proporções semelhantes. Os outros dois exibiram efeito fraco contra HCT-116, com dolichocarpol F sendo o mais citotóxico contra as células não-tumorais L929.

Portanto, os resultados químicos e de atividade biológica obtidos nesse trabalho, com isolamento e caracterização estrutural de substâncias novas e conhecidas e demonstração da inibição de proliferação celular de algumas delas, contribuíram para o conhecimento sobre *A. dolichocarpa*. Ademais, o ineditismo dos compostos revela novas possibilidades de estudos para busca de metabólitos secundários ainda não encontrados.