

UFAL

INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA

MARIA DOS PRAZERES MENEZES DE JESUS

**PURIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE ACETOGENINAS ISOLADAS
DE *Annona mucosa* (Jacq.) ATRAVÉS DE RMN.**

Maceió/AL
2018

Universidade Federal de Alagoas

Campus A. C. Simões
Tabuleiro dos Martins

57.072-970 – Maceió-AL

MARIA DOS PRAZERES MENEZES DE JESUS

**PURIFICAÇÃO E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE ACETOGENINAS ISOLADAS
DE *Annona mucosa* (Jacq.) ATRAVÉS DE RMN.**

Tese apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas, como requisito para obtenção do grau de Doutor Química e Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edson de Souza Bento

Coorientador: Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana

Maceió/AL
2018

Catálogo na fonte
Universidade Federal de Alagoas
Biblioteca Central

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale – CRB4 - 661

J58p Jesus, Maria dos Prazeres Menezes de.
Purificação e elucidação estrutural de acetogeninas isoladas de *Annona mucosa* (Jacq.) através de RMN / Maria dos Prazeres Menezes de Jesus. – 2019.
140 f. : il. color.

Orientador: Edson de Souza Bento.
Coorientador: Antônio Euzébio Goulart Sant`Ana.
Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. Programa de Pós Graduação em Química e Biotecnologia. Maceió, 2018.

Bibliografia: f. 98-106.
Apêndices: f. 107-140.

1. Fitoquímica. 2. Elucidação estrutural. 3. *Annona mucosa*. 4. Acetogeninas.
5. *Aedes aegypti*. I. Título.

CDU: 547.9

FOLHA DE APROVAÇÃO

Membros da Comissão Julgadora da Defesa de Tese da Doutoranda **MARIA DOS PRAZERES MENEZES DE JESUS** intitulada: **“Purificação e elucidação estrutural de acetogeninas isoladas de *Annona Mucosa* (Jacq.) através de RMN”**, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química e Biotecnologia da Universidade Federal de Alagoas no dia 31 de julho de 2018, às 08h30, na sala de reuniões do IQB.

COMISSÃO JULGADORA



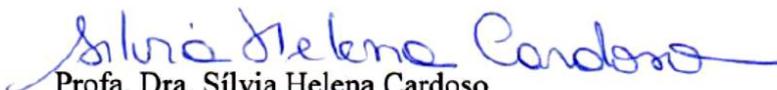
Prof. Dr. Edson de Souza Bento
(Orientador – PPGQB/IQB/UFAL)



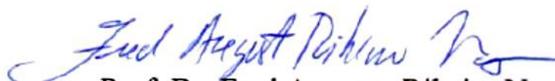
Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana
(Coorientador - PPGQB/IQB/UFAL)



Prof. Dr. Ruth Rufino do Nascimento
(PPGQB/IQB/UFAL)



Profa. Dra. Sílvia Helena Cardoso
(UFAL/ARAPIRACA)



Prof. Dr. Fred Augusto Ribeiro Nogueira
(IFAL/ARAPIRACA)

Aos meus pais Maria das Dores Menezes de Jesus e José Inácio de Jesus (*in memoriam*).
Aos meus nove irmãos. À minha pequena grande Ellen Menezes, meu pedacinho. E ao meu esposo, companheiro e amigo, Alex Lima.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter plantado em mim, a semente da fé, esperança e perseverança. A Ele devo toda a minha gratidão, pela saúde, paz e por iluminar o meu caminho;

A Universidade Federal de Alagoas (UFAL) e ao Instituto de Química e Biotecnologia (IQB) pela oportunidade de estudar nesta instituição;

Ao Prof. Dr. Edson de Souza Bento por sempre me receber de braços abertos, pelos ensinamentos, oportunidade e apoio na realização deste trabalho;

Aos membros do Laboratório de Pesquisa em Recursos Naturais (LPqRN) da UFAL, em especial ao coorientador Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Sant'Ana, pela confiança, ensinamentos e importante colaboração na condução e desenvolvimento deste trabalho.

À Dr^a. Maria Raquel Ferreira de Lima, a prof^a Dr^a. Aldenir Feitosa dos Santos, a Isis Torres e ao Vanderson Barbosa todo o meu carinho e gratidão;

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Alagoas e a Coordenação de aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (FAPEAL/CAPES) pela concessão da bolsa de estudos para realização do curso;

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Química e Biotecnologia, pelos ensinamentos;

À todos os funcionários da Secretaria da pós-graduação;

À minha querida amiga irmã Raquel Ferreira Leite, pelo companheirismo, dedicação, incentivo e carinho, todo o meu carinho a você;

Ao amigo Aldy dos Santos, por todos os 'sim' e nenhum 'não', todo o meu carinho e gratidão;

À amiga Stephanie Córdova, pela amizade e pelos momentos de descontração;

À "pulguentinha" Jéssica Barros, pela amizade e ajuda na execução desse trabalho;

Ao superamigo Alexandre Crispim, toda a minha gratidão pela ajuda de grande valia;

Ao "Lokas" pela ajuda no desenho das estruturas apresentadas nesse trabalho;

Ao amigo e Técnico do Núcleo de Pesquisas em Ressonância Magnética nuclear, Adilson Sabino, pela ajuda na execução das análises;

À Rosilda, pelo carinho e atenção;

Aos demais colegas do NAPRMN, Mariel Matias, Lucas Santos, Michele Marques e Carla Karine, por todos os momentos de descontração.

Ao amigo, Claudio Silva pelas palavras de incentivo durante a realização do curso;

A todos, os meus sinceros agradecimentos!

"Escolha um trabalho que você ame e não terá que trabalhar um único dia em sua vida"

Confúcio.

RESUMO

As espécies do gênero *Annona* são conhecidas por possuir uma vasta quantidade de acetogeninas (ACG) de alta citotóxicidade. As ACGs são caracterizadas por apresentarem uma cadeia longa alifática com 35 a 39 átomos de carbono e um anel γ - lactônico terminal insaturado ou saturado. Ao longo da cadeia alifática podem ser encontrados um, dois ou três anéis tetrahydrofuranos (THF), ou tetrahidropiranos (THP), além de grupos funcionais oxigenados (hidroxilas, cetonas ou epóxidos). Além disso, muitos estudos comprovam também atividade biopesticida das ACG. Diante do potencial químico e biológico desta classe de compostos, este trabalho teve como objetivo purificar e identificar os esqueletos carbônicos de ACGs presentes no extrato clorofórmico da semente da *Annona mucosa* que, em estudos fitoquímicos anteriores, realizados no Laboratório de Síntese e Pesquisas em Recursos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia, sua ação inseticida e pesticida foi observada frente ao mosquito *Aedes aegypti* e *Plutella xylostella*, respectivamente. Este estudo resultou na identificação de quatro acetogeninas, duas das quais, tiveram a identificação do esqueleto carbônico e outras duas encontram-se identificadas de forma parcial. Até o momento, o estudo resultou na determinação de um esqueleto carbônico de ACG não encontrado na literatura. A determinação dos esqueletos carbônicos das ACG foi efetuada através de RMN 1D e 2D e sua massa molecular confirmada por espectroscopia de massas.

Palavras-chave: RMN. Elucidação estrutural. *Annona mucosa*. Acetogeninas. *Aedes aegypti*. *Plutella xylostella*

ABSTRACT

Species of the genus *Annona* are known to have a large amount of high-cytotoxicity acetogenins (ACG). ACGs are characterized by having a long chain aliphatic of 35 to 39 carbon atoms and an unsaturated or saturated γ -lactonic ring. Along the aliphatic chain one, two or three rings of tetrahydrofurans (THF), or tetrahydropyrans (THP) can be found, in addition to oxygenated functional groups (hydroxyls, ketones or epoxides). In addition, many studies also demonstrate biopesticidal activity of ACGs. In view of the chemical and biological potential of this class of compounds, this work had as objective to purify and identify the carbon skeletons of ACGs present in the chloroform extract of the *Annona mucosa* seed that, in previous phytochemical studies carried out in the Laboratory of Synthesis and Research in Natural Resources of the Institute of Chemistry and Biotechnology, its insecticidal action and pesticide was observed in front of the mosquito *Aedes aegypti* and *Plutella xylostella*, respectively. This study resulted in the identification of four acetogenins, two of which had the identification of the carbon skeleton and two others partially identified. To date, the study has resulted in the determination of a carbon skeleton of ACG not found in the literature. The determination of the carbon skeletons of the ACG was carried out through 1D and 2D NMR spectroscopy and its mass confirmed by mass spectroscopy.

Keywords: NMR. Structural elucidation. *Annona mucosa*. Acetogenins. *Aedes aegypti*. *Plutella xylostella*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura molecular da morfina; bulbo da papoila do ópio.	17
Figura 2 - Estrutura molecular da Eritromicina, antibiótico obtido do fungo <i>Streptomyces erytraeus</i> , descoberta em 1952.	18
Figura 3 - Estrutura química da Ciclosporina e fotografia do fungo de onde foi isolada.	18
Figura 4 - Estrutura química da Artemisinina e fotografia da planta de onde é isolada.	19
Figura 5 - Estrutura química do Paclitaxel e fotografia da planta de onde é isolado.	19
Figura 6 - Experiência de Packard, em 1951. Mostra os deslocamentos de Ressonância Magnética Nuclear dos núcleos ^1H do álcool etílico.	22
Figura 7 - Núcleo em movimento gerando um campo magnético.	23
Figura 8 - A movimentação da carga do próton gera um campo magnético.	23
Figura 9 - Níveis de energia de um próton na presença de um campo magnético, onde E é a energia; B_0 intensidade do campo magnético externo; ΔE é a energia liberada quando o campo magnético é desligado.	24
Figura 10 - Esquema do movimento de precessão, interação spin eletrônico/campo magnético B_0	25
Figura 11 - (A) Representação dos prótons de forma aleatória: os vetores se cancelam não havendo formação de momento magnético; (B) Alinhamentos dos prótons após serem colocados sob um campo magnético forte; (C) Após os núcleos absorverem radiação eletromagnética de um campo externo, eles passam do estado de menor energia para o de maior energia: Esse fenômeno designa-se por ressonância.	26
Figura 12 - Transformação do FID em Espectro de RMN.	27
Figura 13 - Diagrama de um espectrômetro de RMN.	28
Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C para o 2-metilbutano.	30
Figura 15 - Espectro de RMN ^{13}C do m-cresol, para cada um dos sete carbonos dá um pico separado.	31
Figura 16 - Diagrama da modulação da amplitude dos carbonos em função do ângulo de nutação (Θ) e do padrão de hidrogenação dos mesmos.	32
Figura 17 - Espectros de ^{13}C , DEPT 45, 90 e 135 para o etilbenzeno, dispostos de baixo para cima.	32
Figura 18 - Possíveis acoplamentos que ocorrem no experimento COSY.	33
Figura 19 - Acoplamento direto observado no experimento HSQC.	33
Figura 20 - Acoplamento à longa distância, observado no experimento HMBC.	34
Figura 21 - Espectro de RMN J-resolvido.	35
Figura 22 - Distribuição geografia da família Annonaceae no mundo.	38
Figura 23 - Alcaloides isolados das folhas de <i>Annona muricata</i> L.	39
Figura 24 - Estrutura molecular da cherinonaína.	39
Figura 25 - Esteroides isolados do extrato bruto de acetato de etila de <i>Annona crassiflora</i>	40
Figura 26 - Terpenos isolados da casca da <i>Annona vepretorum</i>	40
Figura 27 - Flavonoides isolados do extrato metanoico de <i>Annona dioica</i>	41
Figura 28 - Estrutura química da uvaricina.	42
Figura 29 - Exemplos das disposições dos fragmentos de anéis THF e/ou THP e anéis epóxido em acetogeninas de Annonaceae.	43
Figura 30 - Tipos de fragmentos gama lactônico em acetogeninas de Annonaceae.	44
Figura 31 - Foto do biribazeiro. Folha, caule e fruto.	48

Figura 32 - Acetogeninas bis-THF altamente citotóxicas.	55
Figura 33 - Tipos de subunidades γ -lactona mais comuns, em acetogeninas de anonáceas. ...	67
Figura 34 - Subunidades THF mais comuns nas acetogeninas de anonáceas.	68
Figura 35 - Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 da substância AM2.	69
Figura 36 - Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 da substância AM2.	70
Figura 37- Espectro de RMN de ^{13}C DEPT 135 em CDCl_3 da substância AM2.	70
Figura 38 - Espectros de RMN 2D HSQC e HMBC para a substância AM2, em CDCl_3 , com os sinais de correlação direta ^1H - ^{13}C para os anéis bis-THF em evidência. ..	71
Figura 39 - Estrutura molecular da bullatacinona, uma isoacetogenina bis-THF adjacentes. ...	73
Figura 40 - Região do espectro de RMN ^1H em que os sinais do hidrogênio 2 são integrados e mostram uma proporção de 2:1 entre as isoacetogeninas.	73
Figura 41- Esqueleto carbônico dos isômeros (2,4- <i>cis</i> e 2,4- <i>trans</i>) presentes na substância AM2 (39 carbonos), isoacetogenina bis-THF adjacentes.	74
Figura 42 - Estrutura molecular das substâncias 2,4 – <i>cis/trans</i> - Isororolliniastatina-1 (37 carbonos), isoacetogenina bis-THF adjacentes.	74
Figura 43 - Espectro de RMN de ^1H em CDCl_3 da substância AM3.	75
Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 da substância AM3.	76
Figura 45 - Espectro de RMN DEPT 135 em CDCl_3 da substância AM3.	77
Figura 46 - Espectro de RMN 2D HSQC para a substância AM3, em CDCl_3 , com ampliação da região dos sinais de correlação direta ^1H - ^{13}C para os anéis bis-THF e os demais carbonos oxigenados.	77
Figura 47- Espectro de RMN HMBC para a substância AM3, em CDCl_3	78
Figura 48 - Espectro de RMN COSY para a substância AM3, em CDCl_3	78
Figura 49 - Regiões do espectro de RMN HSQC com destaque para ligação direta do C-3 com H-3 e C-4 com H-4.	79
Figura 50 - Esqueleto carbônico para a substância AM3.	81
Figura 51. Estrutura molecular da Rolliniastatina-1 isolada das sementes da <i>Annona Mucoca</i>	81
Figura 52 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , para a substância LC2.	82
Figura 53 - Subunidade γ -lactona α,β -insaturada.	82
Figura 54 - Fragmento bis THF de acetogenina, com destaque dos hidrogênios ligados aos carbonos oxigenados.	83
Figura 55 - Espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 , para a substância LC2.	84
Figura 56 - Expansão e intensificação (4x) da região dos sinais de RMN atribuídos aos carbonos pertencentes aos anéis THF.	85
Figura 57 - Espectro de RMN ^{13}C APT, em CDCl_3 , para a amostra LC2.	85
Figura 58 - Espectro de RMN HSQC em CDCl_3 , para a amostra LC2, com destaque para a região de sobreposição de sinais na região de campo alto.	86
Figura 59 - Espectro de RMN HMBC em CDCl_3 , para a amostra LC2, com destaque na região de sobreposição de sinais na região de campo alto.	86
Figura 60 - Espectro de RMN COSY em CDCl_3 , para a amostra LC2.	87
Figura 61 - Ampliação das regiões do espectro de RMN HSQC que mostra as correlações (^2J e ^3J) do sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,3 com carbonos do anel γ -lactona.	87
Figura 62 - Ampliação da região com sobreposição de sinais da cadeia alifática nos espectros de RMN HSQC e HMBC.	87
Figura 63 - Espectro DOSY 2D, obtido em CDCl_3 , para a amostra LC2.	88
Figura 64 - Espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 , para a amostra LC1.	89

Figura 65 - Ampliação das regiões do espectro de RMN ¹ H da amostra LC1, em CDCl ₃ , onde estão os sinais duplicados, evidenciando a presença de, pelo menos, duas acetogeninas.....	89
Figura 66 - Subunidade anel γ -lactona α,β -insaturada na qual estão dispostas as atribuições dos sinais de hidrogênio característicos desse grupo.....	90
Figura 67 - Ampliação das regiões do espectro de RMN ¹³ C da amostra LC1, em CDCl ₃ que mostra os sinais duplicados, evidenciando a presença de, pelo menos, duas acetogeninas.	90
Figura 68 - Subunidade anel gama-lactona α,β -insaturada na qual estão dispostas as atribuições dos sinais de ¹³ C característicos desse grupo.	91
Figura 69 - Comparação dos espectros de RMN ¹³ C das amostras LC1, LC2 e AM3 (de baixo para cima).	91
Figura 70 - Ampliação das regiões dos espectros de RMN ¹³ C das amostras LC1, LC2 e AM3, em CDCl ₃ , mostrando que existe diferença entre os esqueletos carbônicos das amostras acima citadas.	92
Figura 71 - Ampliação da região dos espectros de RMN ¹³ C da amostra LC1, que confirmam a presença de anéis THF.	92
Figura 72 - Ampliação da região do espectro de RMN ¹³ C, na qual estão presentes os sinais de CH ₂ presentes no fragmento identificado em LC1.	93
Figura 73 - Fragmento do esqueleto carbônico de acetogenina presente na amostra LC1.	93
Figura 74 - Região do espectro de RMN ¹³ C da amostra LC1 onde são observados os sinais dos carbonos metínicos oxigenados, presentes em moléculas de acetogeninas.	94
Figura 75 - Esqueleto carbônico da squamocina, isolada da <i>Annona mucosa</i> , com destaque para o fragmento identificado na amostra LC1.	94
Figura 76 - Espectro DOSY 2D, obtido em CDCl ₃ , para a amostra LC1.....	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Tabela com o nome aceito e seus sinônimos, para a espécie <i>Annona mucosa</i>	48
Tabela 2 - Acetogeninas citotóxicas isoladas da espécie <i>Annona mucosa</i> Jacq.....	49
Tabela 3 - Espécies de Annonaceae do gênero <i>Annona</i> e as partes utilizadas como fitoinseticida contra diferentes tipos de insetos.	51
Tabela 4 - deslocamentos químicos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN para as subunidades γ -lactona.	67
Tabela 5 - Dados de RMN das substâncias AM2 e 2,4 – <i>cis/trans</i> - Isorolliniastatina-1.	71
Tabela 6 - Dados de RMN das substâncias AM3 em comparação com os dados da Rolliniastatina.	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACG → Acetogeninas

APT → Attached Proton Test

AcOEt → Acetato de Etila

MAS → Annona Mucosa Semente

CDCl₃ → Clorofórmio Deuterado

COSY → Correlation Spectroscopy

DEPT → Distortionless Enhancement by Polarization Transfer

DOSY → Diffusion-Ordered Spectroscopy

FID → Free Induction Decay

Hex. → Hexano

HMBC → Heteronuclear Multiple Bond Correlation

HPLC → High Performance Liquid Chromatography

HSQC → Heteronuclear Single Quantum Coherence

Hz → Hertz

IC₅₀ → Concentração do fármaco que induz metade do efeito máximo

In vitro → Do latim “em vidro”

INCA → Instituto Nacional do Câncer

IR → Infravermelho

J → Constante de Acoplamento

MAPA → Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MeOD → Metanol Deuterado

MHz → Megahertz

Kg → Quilograma

mL → Mililitro

mm → Milímetro

OMS → Organização Mundial de Saúde

ppm → Parte Por Milhão

¹H-RMN → Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

¹³C-RMN → Ressonância Magnética Nuclear de ¹³Carbono

THF → Tetrahidrofurano

THP → Tetrahidropirano

UV → Ultravioleta

δ → Descolamento Químico

μg → Microgramas

$^{\circ}\text{C}$ → Graus Celsius

r.f. → Radiofrequência

ΔE → Diferença de Energia

μ → Momento Magnético Nuclear

I → Número Quântico de Spin

J → Momento Angular

B_0 → Campo Magnético Externo

E → Energia

h → Constante de Plank

ν → Frequência da Radiação Eletromagnética

γ → Constante Giromagnética ou Razão Giromagnética

ω_0 → Frequência Angular de Precessão – (frequência de Larmor)

K → Kelvin

α -spin → Spin no Nível de Menor Energia

β → Spin no Nível de Maior Energia

a. C → antes de Cristo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	166
1.1	Ressonância Magnética Nuclear	20
1.1.1	Histórico sobre RMN	21
1.1.2	Princípio da Técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	22
1.1.3	Obtenção do sinal de RMN	25
1.2	Experimentos convencionais aplicados na elucidação estrutural de compostos orgânicos	29
1.2.1	Espectroscopia de RMN de ¹³ C	29
2	OBJETIVO	36
2.1	Objetivo geral	36
2.2	Objetivos Específicos	36
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	37
3.1	A família annonaceae	37
3.1.1	Classes de compostos isolados do gênero <i>Annona</i>	38
3.1.2	Considerações sobre acetogeninas de annonaceae	42
3.1.3	Classificação das acetogeninas	43
3.1.4	O gênero <i>annonna</i>	46
3.1.5	Relação estrutura-citotoxicidade das acetogeninas	53
3.1.6	Utilização da técnica de RMN no estudo das acetogeninas	56
4	METODOLOGIA.....	59
4.1	MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS.....	59
4.1.1	Amostras estudadas	59
4.1.1.1	Frações da <i>Annona Mucosa</i>	59
4.1.2	Solventes e reagentes	59
4.1.3	Coluna cromatográfica em gel de sephadex LH 20	59
4.1.4	Ressonância Magnética nuclear	59
4.2	Purificação das amostras.....	62
4.2.1	Purificação da amostra: AM2.....	63
4.2.2	Purificação da amostra: AM3.....	63
4.2.3	Purificação da amostra: LC2	64
4.2.4	Purificação da amostra: LC1	64
4.3	REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS AM2 E AM3	65
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66

5.1	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS ACETOGENINAS	66
5.1.1	Identificação estrutural da substância codificada como AM2	68
5.1.2	Identificação estrutural da acetogenina codificada como AM3	74
5.1.3	Identificação estrutural (parcial) da acetogenina codificada como LC2	81
5.1.4	Identificação estrutural (parcial) da acetogenina codificada como LC1	89
6	CONCLUSÕES	96
7	PERSPECTIVAS	97
	REFERÊNCIAS	98
	APÊNDICE A	107
	A1 Reação de acetilação	107
	A1.1 Descrição da reação de acetilação	107
	A1.2 Reação de álcool com anidridos dissolvidos em piridina	109
	A1.3 Acetilação da AM2	110
A2	Espectros de RMN ¹ H E ¹³ C da AM2 e do produto da acetilação.	111
A2.1	Espectro de carbono do peracetilado da AM2	113
A2.1.1	Espectro de RMN ¹³ C APT do peracetilado da AM2.	113
	APÊNDICE B	117
B1	Espectros de RMN das substâncias estudadas neste trabalho.....	117
B1.1	Espectros de RMN 1D e 2D da amostra codificada como AM3.....	117
B1.2	Espectros de RMN 1D e 2D da amostra codificada como AM2.....	124
B1.3	Espectros de RMN 1D e 2D da amostra codificada como LC2.	130
B1.4	Espectros de RMN 1D e 2D, em CDCl ₃ , da amostra codificada como LC1.	136

1. INTRODUÇÃO

O uso de extratos vegetais com propriedades biológicas é provavelmente tão antigo quanto o aparecimento do próprio homem. A preocupação com a cura de doenças, através do uso desses extratos, sempre se fez presente ao longo da história da humanidade. Muito antes do surgimento da escrita, o homem já utilizava muitas plantas para fins alimentares e medicinais, buscando as espécies vegetais mais apropriadas para sua alimentação ou para cura de seus males. Desta forma, nossos ancestrais foram descobrindo aquelas que serviam para se alimentar, se medicar, e as que eram venenosas e as que causavam efeitos alucinógenos (SANTOS et. al., 2013; GASPAR, 2018).

Um tratado médico datado de 3.700 a.C., escrito pelo imperador chinês Shen Wung, é um dos mais antigos documentos conhecidos sobre as propriedades medicinais das plantas. Nele, era relatado que para cada enfermidade havia uma planta que seria um remédio natural. Os egípcios, por volta de 1.500 a. C., já utilizavam ervas aromáticas na medicina, na culinária e, principalmente, em suas técnicas para embalsamar os mortos. Os sumérios da Mesopotâmia possuíam receitas valiosas, que só eram conhecidas por sábios e feiticeiras. Na Índia, aproximadamente no ano 1.000 a. C., o uso de ervas era bastante difundido. Durante a Idade Média, o cultivo das ervas utilizadas como alimentos, bebidas e remédios, ficou a cargo dos monges, que as plantavam ao redor dos mosteiros e igrejas (PRIM, 2018).

Atualmente, na Europa, principalmente na Inglaterra, a medicina alternativa tem cada vez mais adeptos e nos Estados Unidos há uma grande quantidade de farmácias naturais. Uma pesquisa realizada nos EUA no ano de 1997 mostrou que 42% da população haviam feito uso de plantas medicinais, pelo menos uma vez no ano de 1996, em tratamentos médicos alternativos. Esse percentual é cerca de 33,8% maior em relação ao ano de 1990, quando a mesma pesquisa foi realizada (JÚNIOR et al., 2005).

Ao longo dos anos, vem se observando um aumento na demanda pelas plantas medicinais para uso no preparo de medicamentos industrializados o que sugere que as indicações populares orientam as pesquisas dos princípios ativos e das plantas que mais se realizam consumo (JÚNIOR et al., 2005).

No Brasil, o conhecimento das propriedades de plantas medicinais é uma das maiores riquezas da cultura indígena, uma sabedoria tradicional que passa de geração em geração. Os povos indígenas têm um conhecimento profundo da flora medicinal, retirando dela os mais diversos remédios, usados de diferentes formas. Suas práticas curativas e preventivas estão

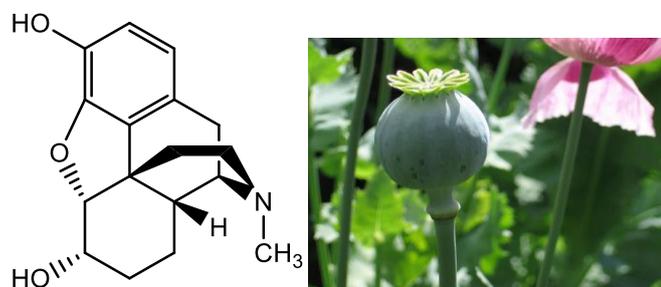
relacionadas com o modo como eles percebem a doença e suas causas, sendo realizadas pelo pajé em rituais cheios de elementos mágicos e místicos (FONSECA, 2006; MACIEL et al., 2002).

Estima-se que na Região Amazônica existam pelo menos 80.000 espécies vegetais, muitas das quais são comercializadas como plantas medicinais, demonstrando a importância que esta floresta possui como maior reservatório natural da diversidade vegetal do planeta. Em meio a esta grande diversidade, várias espécies pertencentes à família Annonaceae destacam-se por serem empregadas na medicina popular. Suas propriedades farmacológicas vêm sendo confirmadas cientificamente e atribuídas à presença de compostos bioativos, como alcaloides, acetogeninas e outros (LEBOEUF et al., 1980a; COSTA et al., 2013; ALALI et al., 2014).

Estima-se que, do total de medicamento disponível no mercado, 49,6% são compostos sintéticos, geralmente fabricados a partir do petróleo, enquanto 50,4% originam-se de produtos naturais ou derivados. É importante salientar que é necessário recorrer às duas opções para o desenvolvimento de medicamentos, ao sintético e ao natural. Os dois caminhos apresentam vantagens e desvantagens. A vantagem dos produtos naturais é que a atividade biológica que eles manifestam resulta de uma evolução de milhões de anos. Além disso, a sua produção constitui em um processo mais sustentável (FAPESP, 2018).

Temos como exemplo de medicamentos originados a partir de produtos naturais a morfina (analgésico), eritromicina (antibiótico), ciclosporina (imunossupressor), a artemisinina (antimalárico) e o paclitaxel (quimioterápico); estes são exemplos de substâncias com uso consolidado na medicina (Figuras de 1 a 5) (FAPESP, 2018).

Figura 1- Estrutura molecular da morfina; bulbo da papoila do ópio.

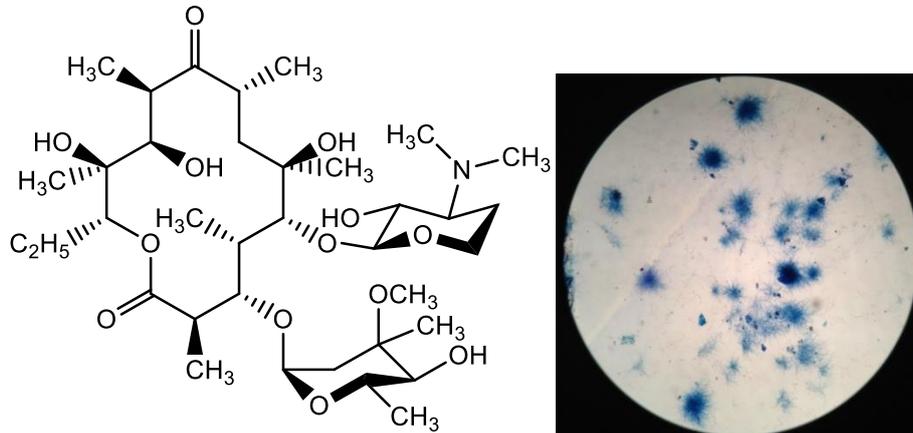


Fonte: https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1175045/mod_resource/content/1/Analgesicos_opioides.pdf

A morfina é um narcótico de alto poder analgésico usado para aliviar dores severas, um fármaco isolado, pela primeira vez em 1804, do bulbo da papoila do ópio. Seus grupos

funcionais foram identificados em 1881, mas somente em 1925 foi proposta a sua estrutura correta (DUARTE, 2005).

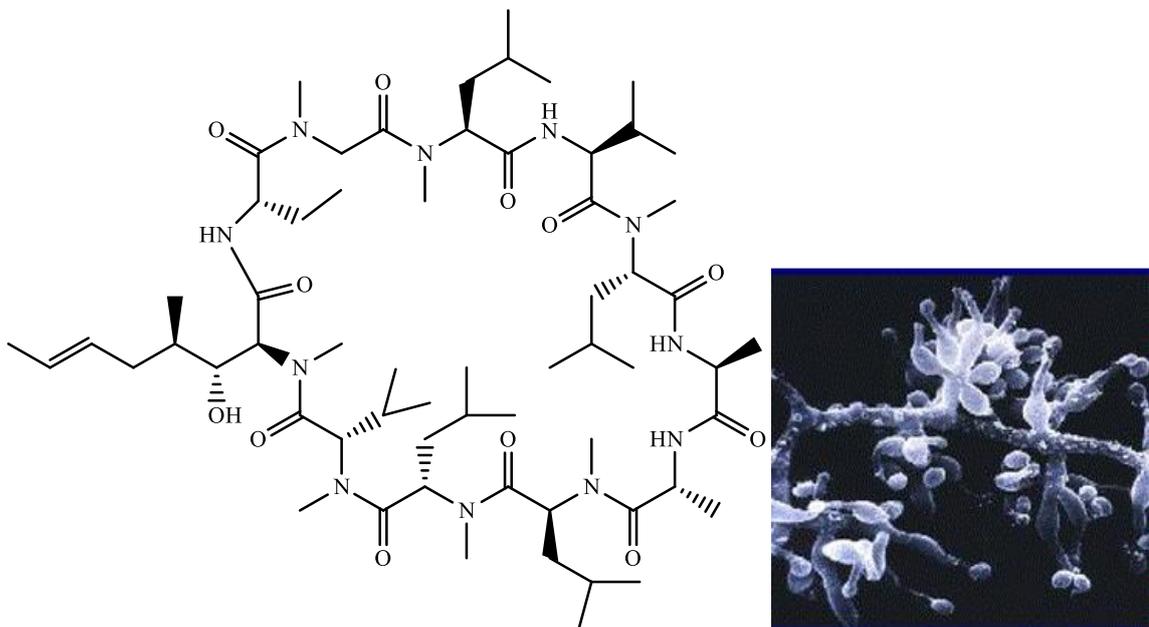
Figura 2 - Estrutura molecular da Eritromicina, antibiótico obtido do fungo *Streptomyces erytraeus*, descoberta em 1952.



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Eritromicina>, https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharopolyspora_erythraea

A Ciclosporina (Figura 3) foi descoberta na década de 60 e isolada do fungo *Tolypocladium inflatum*, encontrado no solo.

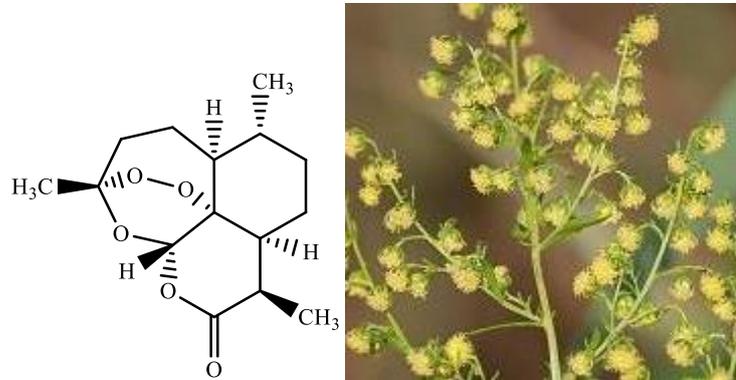
Figura 3 - Estrutura química da Ciclosporina e fotografia do fungo de onde foi isolada.



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Ciclosporina>, http://www.davidmoore.org.uk/Sec04_01.htm

Artemisinina (Figura 4) é encontrada em uma planta chamada *Artemisia annua*, descoberta na china na década de 1970.

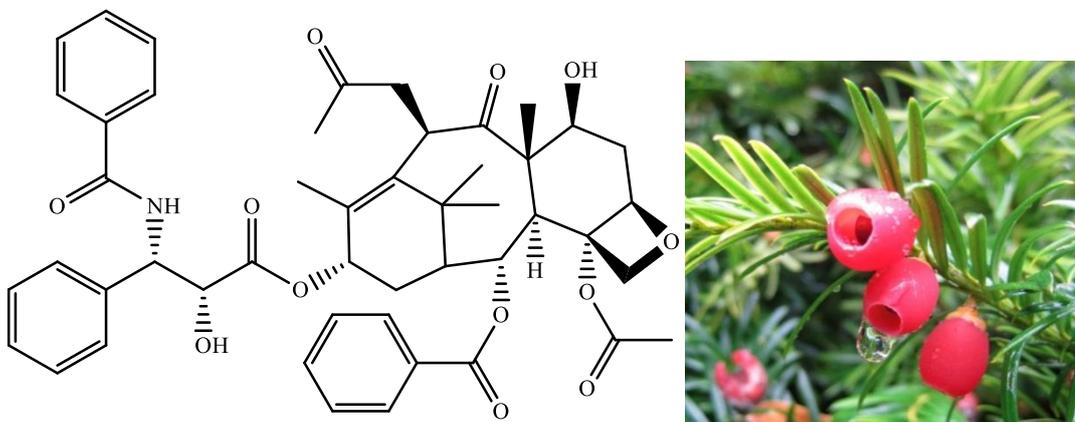
Figura 4 - Estrutura química da Artemisinina e fotografia da planta de onde é isolada.



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Artemisinina>

Paclitaxel, extraído da casca do teixo do Pacífico (*Taxus brevifolia*), descoberto em 1966, levou três anos para a sua estrutura ser completamente elucidada.

Figura 5 - Estrutura química do Paclitaxel e fotografia da planta de onde é isolado.



Fonte: <https://pt.wikipedia.org/wiki/Paclitaxel> e <http://meanderingwa.blogspot.com/2012/02/y-yew-taxus-brevifolia.html>

O interesse por produtos naturais aumentou principalmente devido às populações acreditarem que estes são isentos ou possuem poucos efeitos colaterais, e que são aparentemente eficazes nos casos onde a medicina tradicional não alcançou resultados esperados, o que nem sempre é confirmado pelas pesquisas científicas que avaliam a eficácia

e a segurança, assim também como a garantia de qualidade na produção (CALIXTO, 2005; SARTORELLI, 2015).

Diversos fatores têm impulsionado a busca por novas drogas de origem vegetal, tais como, a descoberta de drogas eficazes para o combate ao câncer, a falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, estudos sobre a biodiversidade e a preservação das espécies (LAGE, 2011).

Há um grande interesse da ciência por produtos naturais, que são metabólitos de natureza química, produzidos por plantas, fungos, bactérias, protozoários e animais por meio do seu metabolismo secundário, em resposta a estímulos externos como mudança nutricional, infecção, competição e predação. No reino vegetal, esses metabólitos secundários (micromoléculas vegetais) são conhecidos por oferecer diferentes tipos de proteção às plantas, como ao ataque de insetos e herbívoros e defesa contra doenças. Muitos desses metabólitos já foram isolados, como é o caso das acetogeninas de *annonaceae*, e os compostos biologicamente ativos possuem grande potencial terapêutico (CHIN et al., 2006).

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas envolvem diversos campos do conhecimento e técnicas de análises como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN), Espectrometria de Massas (MS), Espectrometria no Ultravioleta (UV) e no Infravermelho (IV), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) e a Cromatografia Gasosa (GC). Dentre essas técnicas, destacamos a Ressonância Magnética Nuclear como uma das principais ferramentas para a elucidação estrutural dos compostos ativos isolados.

1.1 Ressonância Magnética Nuclear

A Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica sofisticada e poderosa com uma variedade de aplicações em diferentes campos da pesquisa científica, da medicina e em diferentes setores industriais (farmacêutica, alimentícia, cosmética, agroquímica etc.). Com o desenvolvimento da metodologia e instrumentação ao longo dos anos, a RMN tornou-se uma das mais potentes e versáteis técnicas espectroscópicas para elucidar estruturas químicas de substâncias provenientes do isolamento a partir de produtos naturais. Em particular, é um método decisivo na determinação de estruturas tridimensionais de moléculas no estado líquido e no estudo de substâncias sólidas. Ocupa, igualmente, um lugar de destaque no campo da análise qualitativa e quantitativa, desde componentes em produtos alimentares, por exemplo, fluidos biológicos e metabólitos em tecidos e órgãos de seres vivos intactos, de um modo não invasivo e não destrutivo (TAVARES et al., 2008).

1.1.1 Histórico sobre RMN

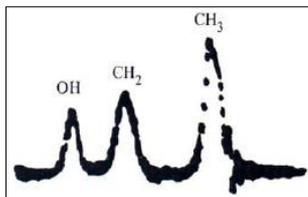
A origem da técnica da RMN remete à investigação fundamental efetuada nas décadas de 1920-30 sobre o comportamento de átomos e moléculas na presença de campos magnéticos. No início dos anos 1920 Otto Stern (1888 – 1969) e Walther Gerlach (1889 – 1979), físicos alemães, verificaram que um feixe de átomos sujeito a um campo magnético não-homogêneo é desviado de acordo com a orientação dos campos magnéticos. Foi Wolfgang Ernst Pauli (1900 – 1958), físico austríaco, quem sugeriu em 1924 a existência de núcleos magnéticos, tendo nos anos 1930 o aperfeiçoamento das experiências de Stern-Gerlach permitindo a determinação de momentos magnéticos nucleares (BONAGAMBA et al., 2005).

Em 1939, o físico Isidor Isaac Rabi (1898 – 1988) da Universidade da Columbia, Nova Iorque, EUA, ao colocar um feixe de moléculas de hidrogênio (em alto vácuo) em um campo magnético homogêneo forte, observou que, quando submetido à ação de ondas de rádio (r.f.) de certa frequência bem definida, esse feixe molecular absorvia energia e sofria um pequeno desvio. Essa frequência é característica da substância utilizada, permitindo sua identificação. Estes resultados foram interpretados pela absorção das ondas de rádio pelos núcleos atômicos da substância orientados no campo magnético, alterando essa sua orientação no processo. Esta seria, de fato, a primeira observação de ressonância magnética nuclear (BONAGAMBA et al., 2005).

A detecção deste fenômeno em amostras líquidas e sólidas só foi realizada em 1946, por Felix Bloch (1905 – 1983), físico suíço da Universidade de Stanford e Edward Purcell (1912 – 1997), físico norte-americano da Universidade de Harvard (ambas nos EUA), que, ao procurarem medir momentos magnéticos nucleares com maior precisão, observaram sinais de absorção r.f. por parte dos hidrogênios da água e da parafina, respectivamente, tendo recebido em conjunto o Prêmio Nobel de Física em 1952 (ARAÚJO, 2002).

O fenômeno de RMN começou a interessar aos químicos por volta de 1950-51, quando Packard, um colaborador de Bloch, substituiu a água por etanol como amostra. Ao observarem três sinais (Figura 6) devidos aos prótons dessa amostra, em vez de um só como na água, sentiram-se desapontados, pois a medida rigorosa de momentos magnéticos nucleares por este método estava definitivamente comprometida (ARAÚJO, 2002).

Figura 6 - Experiência de Packard, em 1951. Mostra os deslocamentos de Ressonância Magnética Nuclear dos núcleos $1H$ do álcool etílico.



Fonte:Araújo, 2002.

Porém ao atribuírem corretamente a ocorrência destes três sinais à estrutura química da substância, chamado desvio químico (*“chemical shift”*) ao fenômeno, reconheceram o enorme potencial da técnica RMN para estudos em química (ARAÚJO, 2002; GERALDES, 2003).

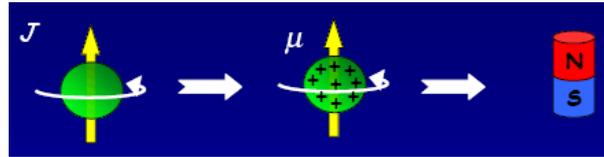
A RMN é uma técnica de ultra-microanálise que a partir de 1953, com a produção e comercialização do primeiro espectrômetro de RMN, já com boa resolução e sensibilidade, desenvolveu uma vastíssima aplicação em vários domínios da Química. Os enormes avanços tecnológicos verificados na instrumentação, tais como a introdução por volta de 1970 de técnicas de impulso r.f. aliada à análise matemática baseadas em transformações de Fourier (GIL & GERALDES, 1987), bem como mais recentemente o desenvolvimento de magnetos supercondutores cada vez mais intensos, sensíveis e homogêneos, chegando atualmente a frequências de ressonância de 1 GHz (BRUKER 2012; GERALDES, 2003).

1.1.2 Princípio da Técnica de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Sob condições apropriadas, uma amostra pode absorver radiação eletromagnética na região de ondas de rádio em uma frequência governada pelas características estruturais da amostra. A absorção é função de determinados núcleos da molécula. Um registro gráfico das frequências dos sinais de absorção contra suas intensidades constitui-se em um espectro de RMN (NARIMOTO, 2006).

Todos os núcleos possuem carga e, em alguns casos essa carga gira em torno do eixo nuclear gerando um dipolo magnético ao longo do eixo (Figura 7). O momento angular (J) da carga em movimento pode ser descrito em termos do “número de spin” I , que pode assumir os valores de 0, $\frac{1}{2}$, 1, $\frac{3}{2}$, etc. ($I = 0$ corresponde a um núcleo que não gira em torno do seu eixo). A magnitude do dipolo gerado é expressa em termos do momento magnético nuclear, μ (NARIMOTO, 2006).

Figura 7 - Núcleo em movimento gerando um campo magnético.

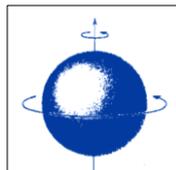


Fonte: Autora, 2018.

Cada próton e cada nêutron têm o seu próprio spin (I), e o número I é a resultante destes spins. Se a soma dos prótons e nêutrons for um número par, I terá o valor zero ou um valor inteiro (0, 1, 2,...). Se a soma for ímpar, I terá valores fracionários (1/2, 3/2, 5/2,...). Se o número de prótons e nêutrons for par, I terá o valor zero. Tanto o ^{12}C como o ^{16}O caem nesta última categoria, não produzindo, portanto, sinal na RMN.

Vários núcleos possuem um número de spin (I) $\frac{1}{2}$ (^1H , ^{19}F , ^{13}C e ^{31}P) e, portanto uma distribuição de carga esférica e uniforme (Figura 8). Os núcleos com número de spin I , 1, ou maior do que 1 possuem uma distribuição de carga não esférica. O spin é o movimento de rotação do elétron. Assim, em função dos dois sentidos de rotação para o elétron, são conhecidos dois valores para o spin: $+\frac{1}{2}$ e $-\frac{1}{2}$ (PAVIA et al. 2010; SILVERSTEIN et al. 2006).

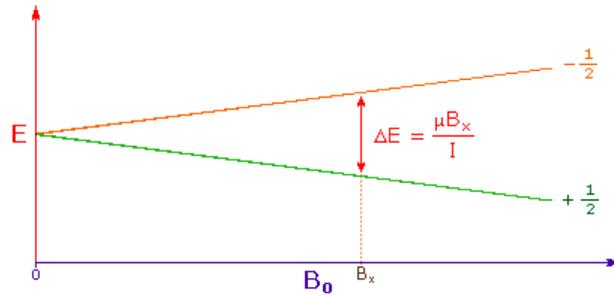
Figura 8 - A movimentação da carga do próton gera um campo magnético.



Fonte: Autora, 2018.

O número de spin I determina o número de orientações diversas que um núcleo pode assumir quando colocado dentro de um campo magnético externo uniforme, de acordo com a fórmula $2I + 1$. No caso do próton, por exemplo, cujo número de spin I é $\frac{1}{2}$, ele possui duas orientações possíveis em relação ao campo magnético externo uniforme: ou o núcleo se coloca paralelamente ao campo aplicado (alinhado com o campo: $+1/2$) ou antiparalelamente (alinhado contra o campo: $-1/2$). O primeiro destes estados tem menor energia (é mais estável). Os níveis de energia dos estados são uma função da magnitude do momento magnético nuclear μ e da força do campo externo aplicado B_0 (Figura 9) (PAVIA et al. 2010; SILVERSTEIN et al. 2006).

Figura 9 - Níveis de energia de um próton na presença de um campo magnético, onde E é a energia; B_0 intensidade do campo magnético externo; ΔE é a energia liberada quando o campo magnético é desligado.



Fonte: Autora, 2018.

Estabelecidos os níveis de energia para o próton, podemos agora introduzir os quanta de energia $h\nu$ (h é a constante de Planck e ν é a frequência da radiação eletromagnética) de forma a que a orientação paralela (estado de menor energia) possa converter-se na orientação antiparalela (estado de maior energia) sob a ação de um campo magnético de uma dada força B_0 . A equação fundamental da RMN relaciona frequência eletromagnética com a força do campo:

$$\nu = \frac{\gamma B_0}{2\pi}$$

(1)

A constante γ é chamada razão giromagnética sendo uma constante nuclear fundamental. A razão giromagnética é a constante de proporcionalidade entre o momento magnético μ e o número de spin I (PAVIA et al. 2010; SILVERSTEIN et al. 2006).

$$\gamma = \frac{2\pi\mu}{hI}$$

(2)

onde h é a constante de Plank.

Diante do que foi descrito anteriormente, consideremos agora o que acontece a um pequeno imã girando em um campo magnético externo: o eixo do pequeno imã (o próton) terá um movimento de precessão ao redor do campo magnético externo, de modo análogo ao que acontece com um giroscópio em movimento sob a influência do campo gravitacional (Figura

10). A velocidade angular de precessão é ω_0 igual ao produto da razão giromagnética γ e da força do campo aplicado B_0 (SILVERSTEIN et al., 2006).

$$\omega_0 = \gamma \cdot B_0$$

Dado que a equação fundamental da RMN é:

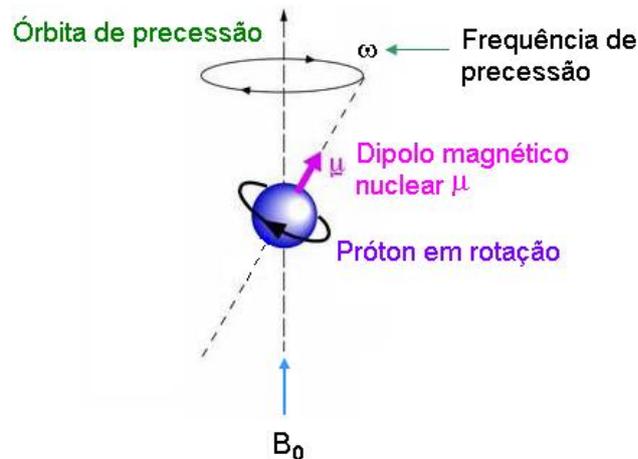
$$\gamma B_0 = 2\pi \nu$$

Portanto

$$\omega_0 = 2\pi \nu$$

(3)

Figura 10 - Esquema do movimento de precessão, interação spin eletrônico/campo magnético B_0 .



Fonte: Autora, 2018.

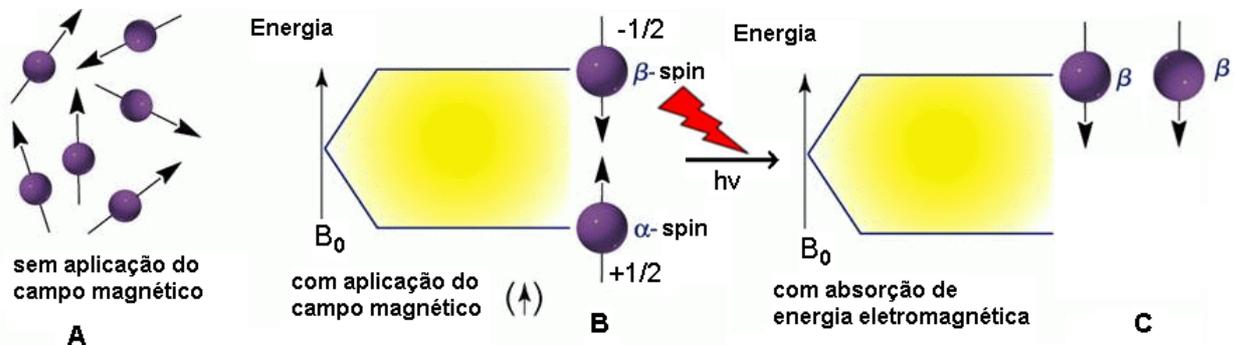
1.1.3 Obtenção do sinal de RMN

Para obtermos um sinal de RMN precisamos colocar a amostra a ser examinada dentro de um campo magnético alto B_0 o qual pode variar a intensidade de acordo com a frequência do aparelho. Este campo magnético (B_0) é gerado pela corrente elétrica circulando por um supercondutor mantido continuamente refrigerado a uma temperatura de 4K, por meio de hélio líquido a fim de manter as características supercondutoras do magneto. O campo

magnético é maior e mais homogêneo no centro do magneto, onde a amostra será posicionada, mas nunca devemos esquecer que também existe um campo magnético em volta do magneto, o suficiente para causar estragos se algum objeto metálico ficar por perto.

Após a amostra ser posicionada no centro do magneto os spins começam a “sentir” o efeito do campo magnético externo B_0 e seus momentos magnéticos (rotação “spin”) se alinham no mesmo sentido (+1/2) ou no sentido contrário (-1/2) ao do campo B_0 (Figura 11B). Este alinhamento, conhecido como polarização, não é instantâneo, leva alguns segundos para ser concluído, simultaneamente se irradia o composto com pulsos de energia eletromagnética e os núcleos absorvem essa energia, num processo denominado *ressonância magnética* (Figura 11C) (AZEVEDO, 2006, HAGE & IWASAKI, 2009).

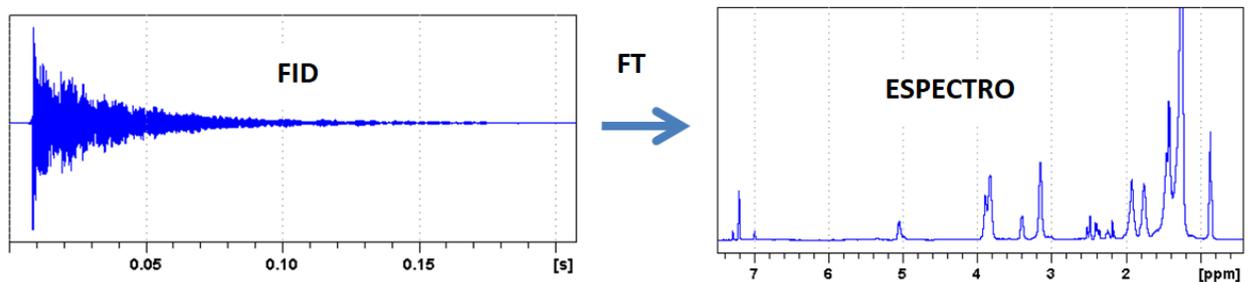
Figura 11 - (A) Representação dos prótons de forma aleatória: os vetores se cancelam não havendo formação de momento magnético; (B) Alinhamentos dos prótons após serem colocados sob um campo magnético forte; (C) Após os núcleos absorverem radiação eletromagnética de um campo externo, eles passam do estado de menor energia para o de maior energia: Esse fenômeno designa-se por ressonância.



Fonte: Autora, 2018.

Quando o pulso de rádiofrequência é subitamente desligado, os spins voltam à sua posição normal (em um processo denominado relaxação), se realinham, e nessa circunstância eles emitem um sinal que é captado por uma bobina localizada ao redor da amostra a ser examinada. O sinal gerado é denominado FID (“*Free Induction Decay*”) ou Decaimento de Indução Livre (DIL), o qual é captado pela bobina, sendo utilizado pelo computador que, através de um procedimento matemático (Transformada de Fourier), é transformado no espectro de RMN, como mostra a Figura 12 (AZEVEDO, 2006; HAGE & IWASAKI, 2009).

Figura 12. Transformação do FID em Espectro de RMN.



Fonte: Autora, 2018.

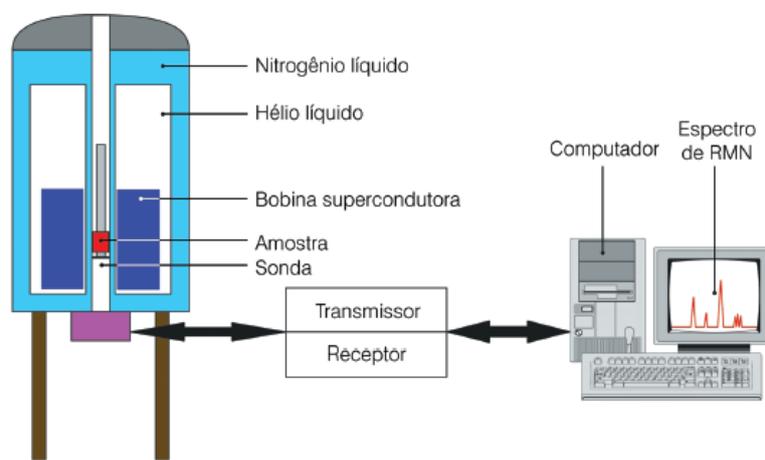
1.1.4 Instrumentação – Espectrômetro de RMN

O requisito fundamental para a realização de RMN de alta resolução é o intenso campo magnético estático. Este campo magnético é criado através de magnetos solenoides supercondutor constituído por uma liga de nióbio. O solenoide funciona imerso num banho de hélio líquido (4 K) em um compartimento arrefecido por um banho de nitrogênio líquido (a 77K), que por sua vez está rodeado por uma câmara de vácuo. Esta construção constitui um sistema extremamente eficiente e uma vez ativado o magneto pode operar durante muitos anos (COLNAGO et al., 2002).

Para o funcionamento e manutenção do magneto são necessários preenchimentos periódicos de nitrogênio e hélio, semanalmente para o nitrogênio (N₂) e a cada quatro ou seis meses para o hélio (He). O *dewar* do magneto é atravessado por um tubo central oco que se encontra à temperatura ambiente. Neste tubo é inserido uma sonda dotada de uma série de bobinas elétricas, conhecidas por bobinas de *shim*, que geram os seus próprios pequenos campos magnéticos e são utilizadas para otimizar o campo central estático, permitindo remover heterogeneidades residuais, num processo conhecido como *shimming*. Este processo é necessário para cada amostra a analisar. Exatamente no centro do campo magnético, rodeada pelas bobinas de *shim*, fica colocada a cabeça da sonda, o coração do espectrômetro de RMN. Na Figura 13 é apresentado um diagrama de um espectrômetro de RMN com ímã supercondutor. A amostra é colocada dentro da sonda de RMN que fica no centro da bobina supercondutora. Um computador central comanda o equipamento, enviando, captando e processando os sinais de RMN (COLNAGO et al., 2002; BRUKER, 2010).

A sonda contém as bobinas de radiofrequência e os circuitos associados que atuam como antenas, transmitindo e recebendo a radiação eletromagnética. Estas bobinas podem estar rodeadas por outras bobinas de gradientes que servem para destruir a homogeneidade de campo de maneira controlada. A amostra é colocada num tubo de vidro, sendo encaixada numa turbina ou rotor (*spinner*) que desce sustentada por uma coluna de ar ao longo do centro do magneto até a cabeça da sonda (COLNAGO et al., 2002).

Figura 13 - Diagrama de um espectrômetro de RMN.



Fonte: Colnago, 2002.

Existem numerosos tipos de sondas, de vários tamanhos e diâmetros que dependem da construção do magneto e que são normalmente referenciadas de acordo com o diâmetro do tubo de amostra que comportam (BRUKER, 2010).

A sonda é introduzida pela base do *dewar* do magneto enquanto a amostra é introduzida pelo topo. O rotor onde está encaixado o tubo de amostra descansa no topo da sonda de tal modo que o volume da amostra fica posicionado no centro das bobinas da sonda. Esta posição em relação às bobinas é muito importante e por esse motivo a posição do tubo de amostra no rotor deve ser corretamente ajustada antes de ser colocado no magneto (COLNAGO et al., 2002).

1.2 Experimentos convencionais aplicados na elucidação estrutural de compostos orgânicos

Atualmente, a rotina de laboratórios de RMN voltados a Química de Produtos Naturais envolve o uso de algumas técnicas, de onde se pode obter praticamente toda a informação necessária para a elucidação estrutural desses tipos de compostos. Normalmente essa rotina inicia-se com técnicas clássicas 1D como RMN ^1H e ^{13}C . Além disso, empregam-se técnicas modernas 2D como COSY, HSQC, HMBC e o pseudo 2D J-resolvido.

Nesse trabalho foram executadas experimentos de rotina utilizados na análise estrutural de produtos naturais. Esses experimentos encontram-se descritos a seguir.

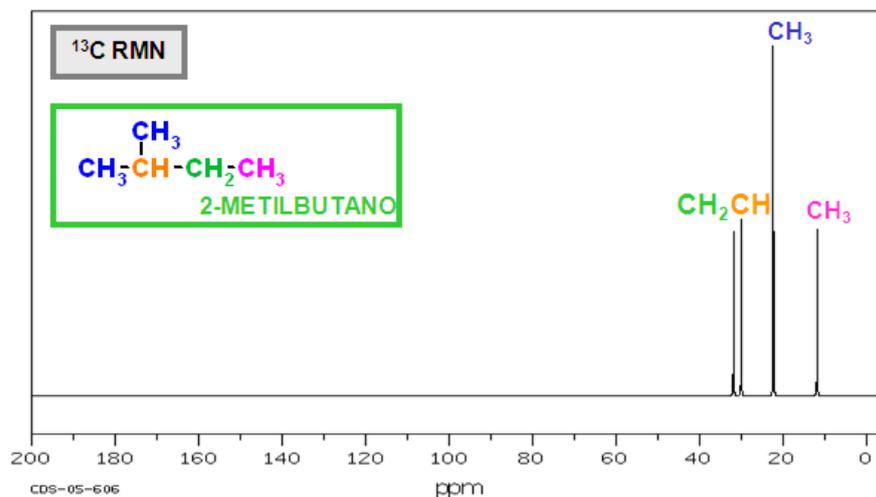
1.2.1 Espectroscopia de RMN de ^{13}C

A RMN de ^{13}C foi estudada pela primeira vez em 1957, mas só a partir de 1970 teve seu uso generalizado. Durante esse período ocorreu o desenvolvimento de instrumentos sensíveis o suficiente para detectar sinais fracos de RMN de ^{13}C . A baixa intensidade dos sinais de ^{13}C deve-se a baixa abundância natural do isótopo (1,1%) e a pequena razão giromagnética, que é cerca de 0,25 vezes a do ^1H (SCOOG et al., 2002).

A RMN de ^{13}C possui várias vantagens sobre a RMN de ^1H , no que diz respeito a sua potência para elucidar estruturas orgânicas e bioquímicas. O intervalo de deslocamentos químicos de ^{13}C em compostos orgânicos é cerca de 200 ppm, comparado a 10-15 ppm para ^1H . Como resultado, há menos superposições de picos nos espectros de ^{13}C do que nos espectros de ^1H (SCOOG et al., 2002).

Um aspecto dos espectros de ^{13}C que simplifica muito o processo de interpretação é que cada tipo de átomo de carbono em uma molécula orgânica comum produz apenas um pico. No entanto, os átomos de hidrogênios ligados a carbono podem desdobrar os sinais de ^{13}C em picos múltiplos, mas, é possível eliminar esse desdobramento de sinal causado pelo acoplamento ^1H - ^{13}C , selecionando os parâmetros instrumentais do espectrômetro de RMN que desacoplam a interação hidrogênio-carbono. Um espectro de ^{13}C cujas interações com ^1H foram eliminadas é chamado completamente desacoplado dos ^1H (desacoplamento em banda larga, BB). Assim, em um espectro típico de ^{13}C completamente desacoplado, cada tipo de átomo de carbono fornece apenas um pico, como mostra a Figura 14 (SOLOMONS et al., 2005).

Figura 14 - Espectro de RMN ^{13}C para o 2-metilbutano.



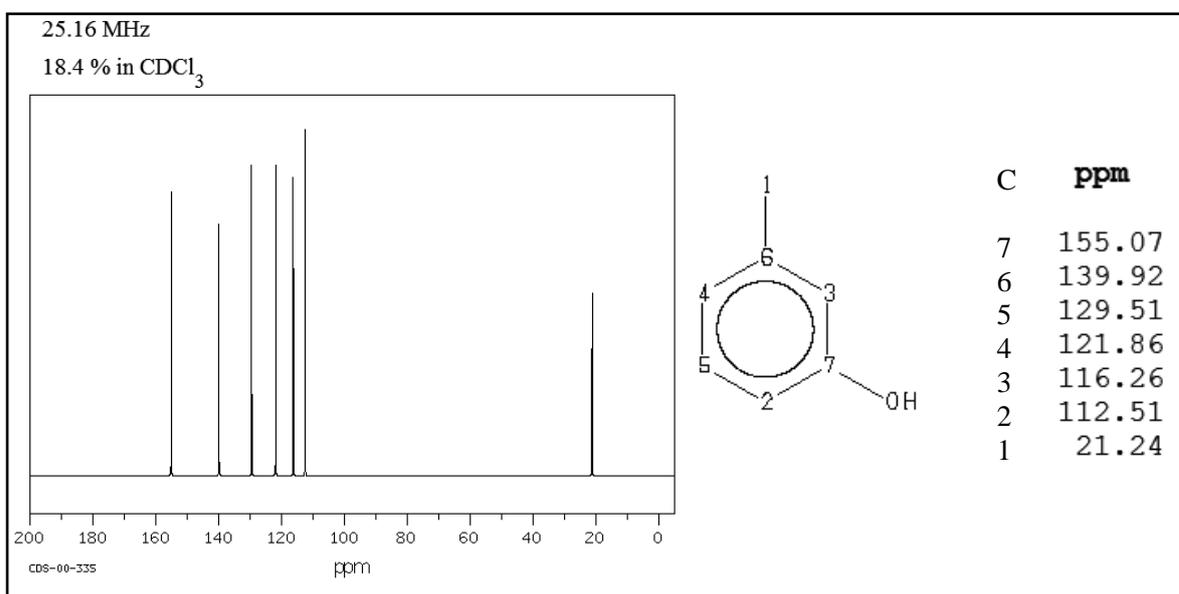
Fonte: Perez, 2016.

1.2.1.1 RMN ^{13}C e intensidade dos picos

Dos aspectos que são fundamentais para a espectroscopia de RMN ^1H – as áreas integradas e os padrões de desdobramento – não são muito importantes na RMN ^{13}C (CAREY, 2011).

Embora tudo isso seja uma questão de integrar os sinais de ^{13}C , raramente isso é feito, porque as relações encontradas são mais enganosas que úteis. A técnica pulso/TF que é padrão em RMN ^{13}C tem o efeito de distorcer as intensidades dos sinais, particularmente nos carbonos que não tem hidrogênios ligados. Tem-se como exemplo, o espectro de RMN ^{13}C do 3-metil-fenol (*m*-cresol) (Figura 15). É possível observar que ao contrário do que seria esperado para um composto com sete picos para sete carbonos diferentes, as intensidades desses picos nunca são iguais. Os dois sinais menos intensos, aqueles em δ 155,07 e δ 139,92, correspondem aos carbonos que não tem hidrogênios ligados (CAREY, 2011).

Figura 15 - Espectro de RMN ^{13}C do *m*-cresol, para cada um dos sete carbonos dá um pico separado.



Fonte: https://www.chemicalbook.com/SpectrumEN_108-39-4_13CNMR.htm, 2018.

1.2.1.2 Espectros de ^{13}C DEPTs

Atualmente é possível obter espectros de ^{13}C muito mais simples para interpretar no que diz respeito ao tipo de carbono. Um desses espectros é denominado espectro de ^{13}C DEPT.

O experimento DEPT é utilizado na determinação do padrão de hidrogenação de um átomo de carbono. Existem três tipos de espectros ^{13}C DEPT:

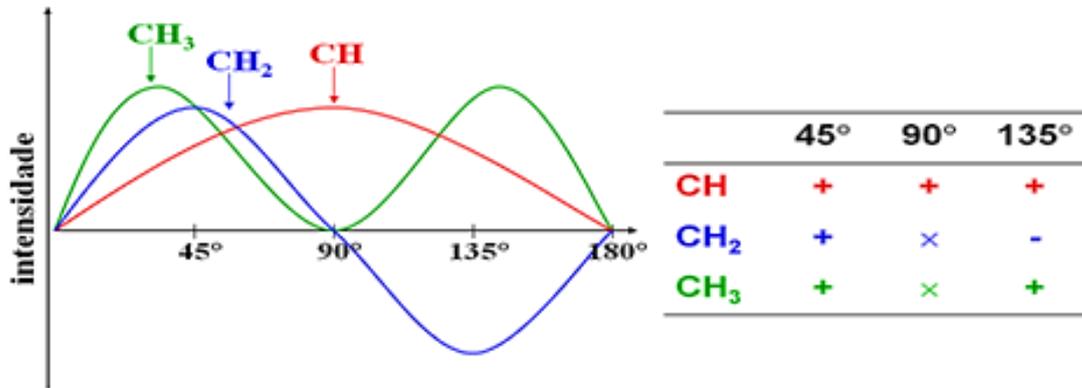
O espectro DEPT 45 – é obtido ajustando o ângulo de nutação (Θ) do pulso de hidrogênios para 45° . Fornece todos os sinais para carbonos hidrogenados (CH , CH_2 , CH_3).

O espectro DEPT 90 – é obtido ajustando o ângulo de nutação (Θ) do pulso de hidrogênios para 90° . Fornece somente sinais para carbonos monohidrogenados (CH – metínicos).

O espectro DEPT 135 – é obtido ajustando o ângulo de nutação (Θ) do pulso de hidrogênios para 135° . Apresenta sinais para carbonos monohidrogenados (CH – metínicos) e trihidrogenados (CH_3 – metílicos) com mesmo sinal de amplitude, em oposição à amplitude dos carbonos dihidrogenados (CH_2 – metilênicos) (Figura. 16).

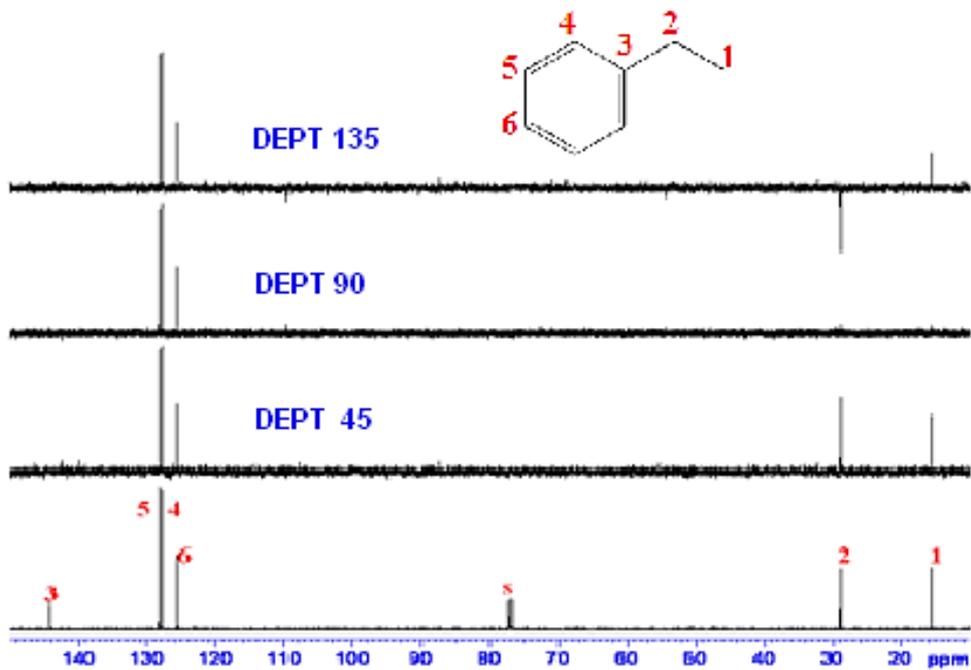
Os sinais de carbonos quaternários não são detectados nos subespectros DEPT (Figura. 17) (EDILBERTO, 2005; PAVIA et al., 2010).

Figura 16 - Diagrama da modulação da amplitude dos carbonos em função do ângulo de nutação (Θ) e do padrão de hidrogenação dos mesmos.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 17 - Espectros de ¹³C, DEPT 45, 90 e 135 para o etilbenzeno, dispostos de baixo para cima.

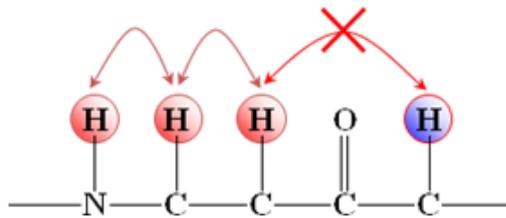


Fonte: http://www.azom.com/images/Article_Images/ImageForArticle_11529.jpg, em 2018.

1.2.1.3 COSY

O espectro COSY evidencia a correlação homonuclear, acoplamento ^1H - ^1H , este acoplamento ocorre através de duas até três ligações (Figura 18). É uma das técnicas mais empregadas na determinação da correlação principalmente entre hidrogênios vicinais e geminais (KAYSER et al., 2000; PAVIA et al., 2010).

Figura 18 - Possíveis acoplamentos que ocorrem no experimento COSY.

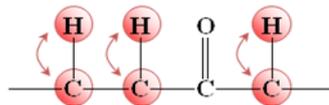


Fonte: Autora, 2018.

1.2.1.4 HSQC

O experimento de RMN HSQC é uma classe de sequências de pulsos de correlação heteronuclear. O espectro HSQC mostra a correlação direta entre os núcleos ^1H e ^{13}C (Figura. 19). Logo, é possível detectar quais carbonos estão diretamente ligados aos hidrogênios presentes numa molécula (PAVIA et al., 2010).

Figura 19 - Acoplamento direto observado no experimento HSQC.

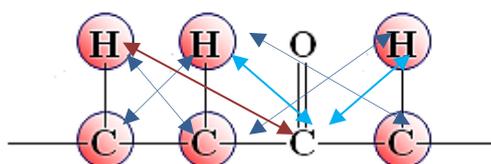


Fonte: Autora, 2018.

1.2.1.5 HMBC

O experimento de RMN HMBC é um método de detecção inversa, que revela a correlação heteronuclear à longa distância (duas ou mais ligações) (Figura. 20) (PAVIA et al., 2010).

Figura 20 - Acoplamento à longa distância, observado no experimento HMBC.

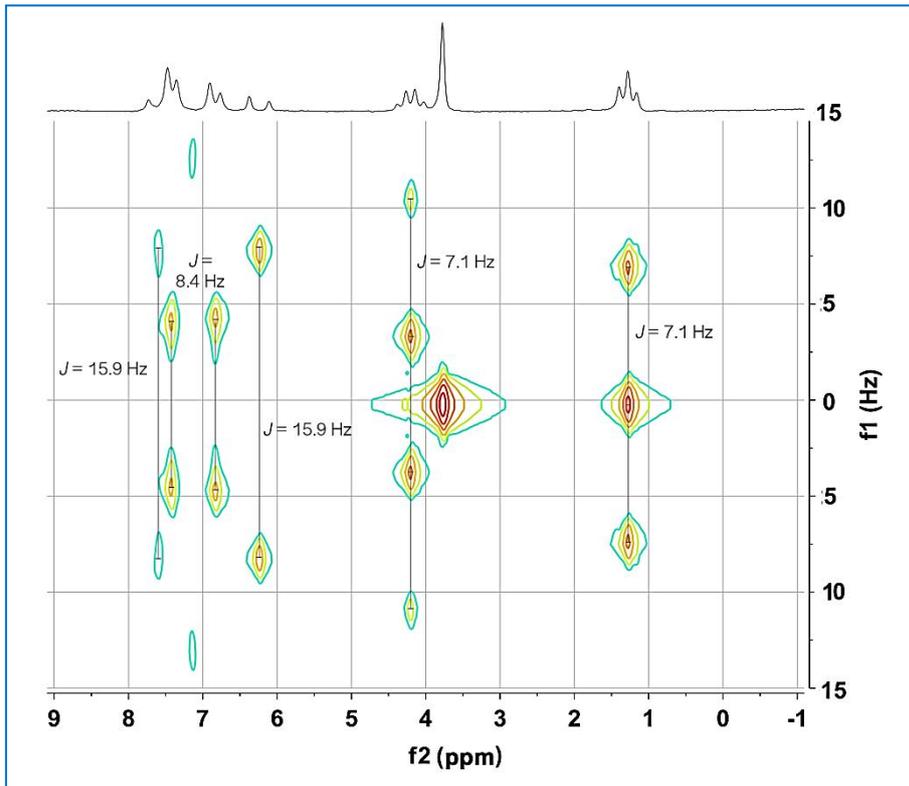


Fonte: Autora, 2018.

1.2.1.6 J – resolvido

O experimento J-resolvido permite separar os deslocamentos químicos dos acoplamentos escalares, de modo que se possa examinar um parâmetro sem as complicações decorrentes de outro. Por exemplo, a análise de espectros de ^1H é muitas vezes complicada pela sobreposição de multipletos vizinhos, tornando a verificação das constantes de acoplamento ou a medição precisa dos deslocamentos químicos difíceis ou mesmo impossível (LUDWIGA et al., 2010).

O espectro J-resolvido pode ser obtido como resultado de um experimento homo e/ou heteronuclear (Figura. 21), apresentando numa dimensão informações a respeito dos deslocamentos químicos (f2), enquanto que na outra as informações sobre os acoplamentos escalares (f1) entre os núcleos.

Figura 21 - Espectro de RMN J-resolvido.

Fonte:

http://nanalysis.com/wp/wordpresscontent/uploads/2015/09/pMeOethylcinnamate_8scans_32pts_spectrum1.png, 2018.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Aplicar a técnica de ressonância magnética nuclear na identificação de acetogeninas isoladas da espécie *Annona Mucosa*.

2.2 Objetivos Específicos

- Purificar frações provenientes do extrato clorofórmico das sementes da *Annona mucosa*. Tais frações ricas em acetogeninas.
- Elucidar as estruturas das acetogeninas isoladas da *Annona Mucosa*;
- Contribuir para o conhecimento químico da espécie *Annona Mucosa*;
- Mostrar a importância do uso da técnica de Ressonância Magnética Nuclear no estudo de compostos provenientes do estudo de produtos naturais.

Justificativa:

- O extrato clorofórmico apresentou mortalidade de 89% contra a traça-das-crucíferas (CL₅₀ e CL₉₉, 0,04 mg.mL⁻¹ e 0,5m g.mL⁻¹ , respectivamente) *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae), praga que causa prejuízos consideráveis nas culturas de alface, alfafa, algodão, amendoim, arroz, batata, beterraba, brócolis, cana-de-açúcar, canola, chicória, côco, couve, couve-chinesa, couve-de-bruxelas, couve-flor, fumo, mandioca, maracujá, milho, nabo, pastagens, rabanete, repolho, seringueira e soja (FERREIRA, 2016).
- O extrato clorofórmico, na concentração de 0,1mg.mL⁻¹, apresentou 100% de mortalidade quando submetidos à atividade inseticida em larvas de *Aedes aegypti* (COSTA et al., 2013).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 A família annonaceae

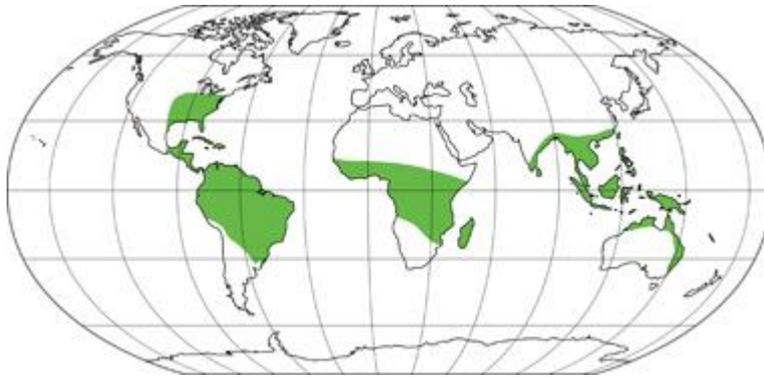
A família Annonaceae compreende 150 gêneros, com aproximadamente 2.500 espécies. Muitas destas espécies possuem atividade farmacológica, tais como atividade antinociceptiva (ALMEIDA et al., 2012) e atividade sobre o sistema nervoso central em roedores (DINIZ et al., 2013), dentre outros. Dentre os gêneros, o *Annona* destaca-se pelo fato das espécies pertencentes apresentarem frutos comestíveis, fonte de aminoácidos e proteínas sendo largamente empregadas na etnofarmacologia devido à ampla gama de propriedades medicinais a elas atribuída. Quimicamente, este gênero se caracteriza por bioproduzir esteroides, amidas, flavonoides, peptídeos, diterpenos, alcaloides e acetogeninas (ACGs). Esta última categoria é detentora de importantes atividades biológicas, o que motivou interesse na pesquisa em busca das ACGs nas espécies da família Annonaceae (LOPES e SILVA, 2014; BRITO et. al., 2008).

Estas plantas geralmente estão distribuídas entre as áreas tropicais dos continentes americano, africano e asiático (Figura 22). A África é o continente que contém o menor número de espécies, aproximadamente 450. Por volta de 900 espécies encontram-se entre os neotrópicos (América do Sul, América Central, parte do México e Caribe) e quase 1200 nas áreas tropicais da Ásia e Austrália (LAGE, 2011).

Há, no Brasil, 29 gêneros e 392 espécies de Annonaceae, distribuídas principalmente na Amazônia com cerca 287 espécies, mas também na Mata Atlântica e no Cerrado. As espécies de Annonaceae estão classificadas em quatro subfamílias, Anaxagoreoideae, Annonoideae, Ambavioideae e Malmeoideae. Anaxagoreoideae inclui apenas *Anaxagorea*, com 14 espécies no Brasil. Annonoideae é a maior subfamília, com 51 gêneros, dos quais 12 ocorrem no Brasil. Estão aqui incluídos *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia*, os gêneros mais representativos da família na flora brasileira. Ambavioideae é composto por 9 gêneros, mas apenas *Tetrameranthus* ocorre no Brasil, com 3 espécies. Malmeoideae inclui principalmente gêneros asiáticos, e apenas os representantes da tribo Malmeae, com 13 gêneros, ocorrem no Brasil (LOPES e SILVA, 2014; MAAS et al., 2017). Estas culturas são encontradas desde o norte do País até o Estado de São Paulo. Foi na região semiárida do Nordeste que o cultivo destas fruteiras se espalhou. Nos Estados da Bahia, Pernambuco, Alagoas, Minas Gerais e São Paulo encontram-se plantios irrigados com bom nível tecnológico. Na região Nordeste, a Bahia é o principal produtor seguido dos estados de Pernambuco e Alagoas (BRAGA SOBRINHO, 2010).

As ACGs constituem uma classe de produtos naturais isolados exclusivamente de espécies da família Annonaceae e, estando presentes em praticamente todas as partes da planta, são encontradas principalmente em espécies dos gêneros *Annona*, *Asimina*, *Uvaria*, *Rollinia* e *Goniothalamus*. Em pouco mais de 35 anos de estudo, o número de ACGs isoladas nesta família já passa de 500. Dentre os 150 gêneros da família Annonaceae, é no gênero *Annona* que está registrado o maior número de substâncias que apresentam potencial citotóxico, além de potencial larvicida e inseticida (KRINSKI *et. al.* 2014; PAES *et al.*, 2016).

Figura 22 - Distribuição geografia da família Annonaceae no mundo.

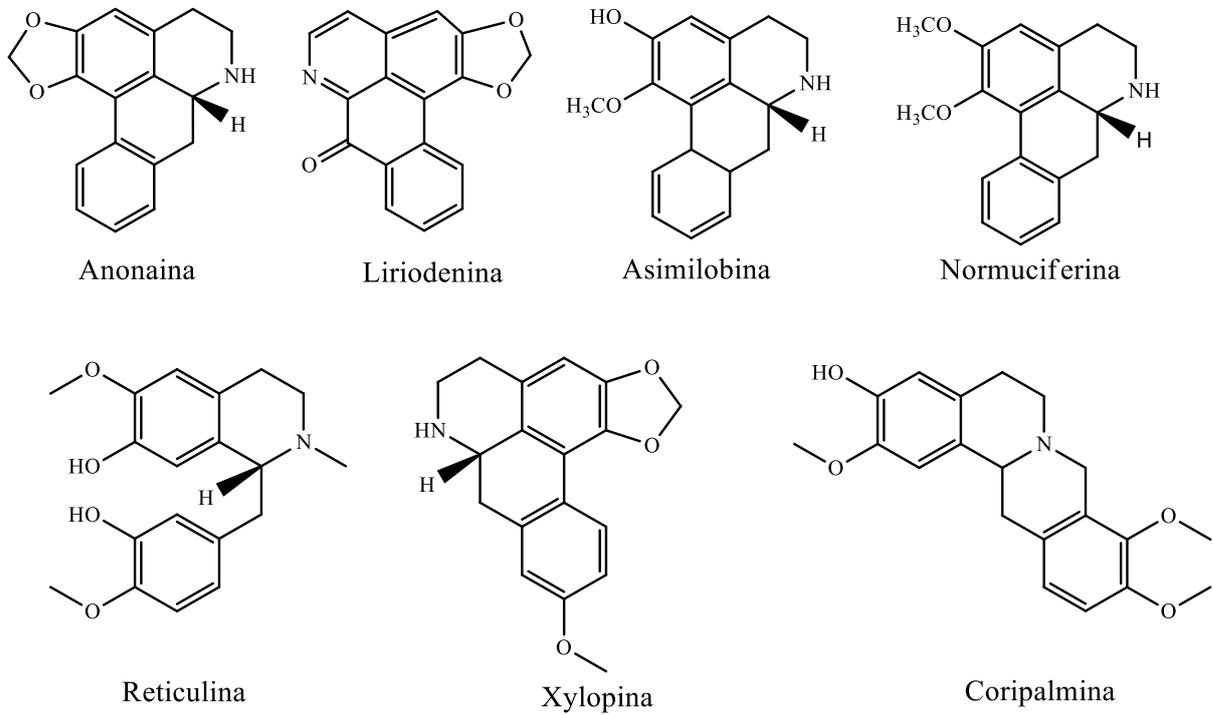


Fonte: http://www.thecompositaehut.com/www_tch/images/webcurso_spv/mapas/annonaceae.jpg

3.1.1 Classes de compostos isolados do gênero *Annona*

Alcaloides: como exemplo, temos as estruturas químicas dos compostos identificados no extrato metanólico de folhas de *Annona muricata* Linnaeus, o qual foi ativo contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostrando maior atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* e *Enterococcus faecalis* (Figura 23) (PINTO, *et al.* 2017).

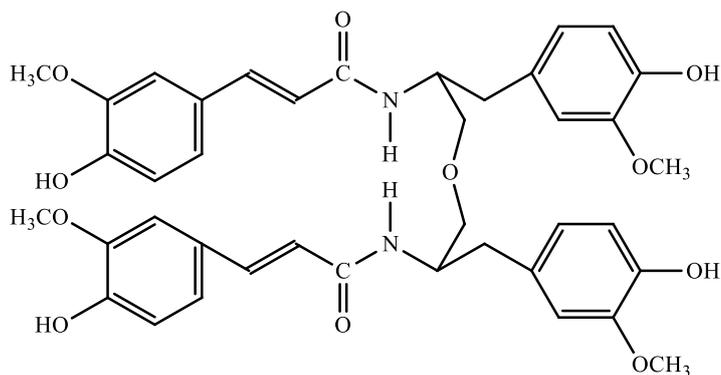
Figura 23 - Alcaloides isolados das folhas de *Annona muricata* L.



Fonte: Pinto et al., 2017.

Amidas: tem-se como exemplo a Cherinonaina (Figura 24) que se trata de um dímero isolado da *Annona cherimola* Mill, planta utilizada pela medicina popular para o tratamento de doenças de pele, especialmente para furúnculos. A Cherinonaina consiste de uma única ligação de éter entre duas amidas monoméricas que são compostas de ácido ferúlico e 6-metoxil-7-hidroxi-anfetamina (CHEN et al., 1998).

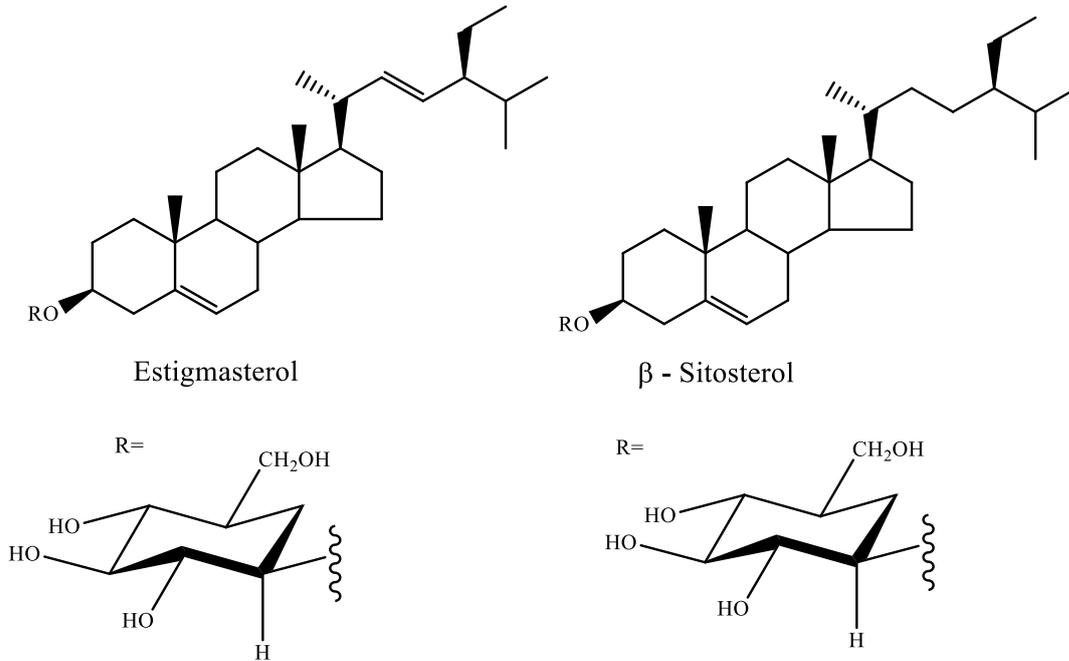
Figura 24 - Estrutura molecular da cherinonaína.



Fonte: Chen et al., 1998.

Esteroides: isolados do extrato bruto de acetato de etila de *Annona crassiflora* (Figura 25). São os esteroides glicosilados: estigmasterol glicosilado e sitosterol glicosilado, apresentaram potencial alelopático (INOUE et al., 2010).

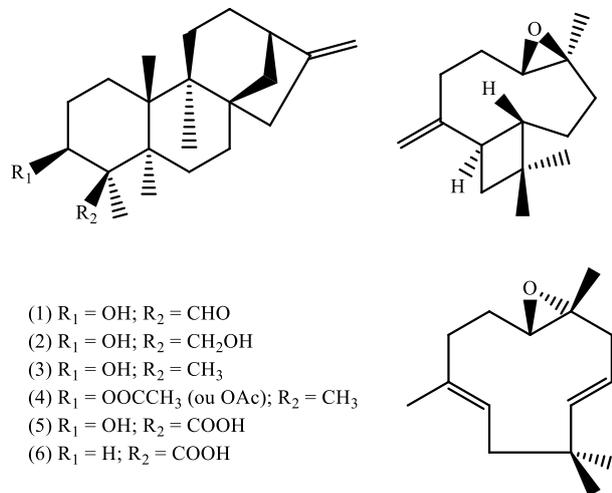
Figura 25 - Esteroides isolados do extrato bruto de acetato de etila de *Annona crassiflora*.



Fonte: Inoue et al., 2010.

Diterpenos: terpenos com efeito citotóxico sobre linha celular K562 (leucemia mielogênica humana), encontrados na casca do caule de *Annona vepretorum* (Figura 26) (DUTRA, et al. 2014).

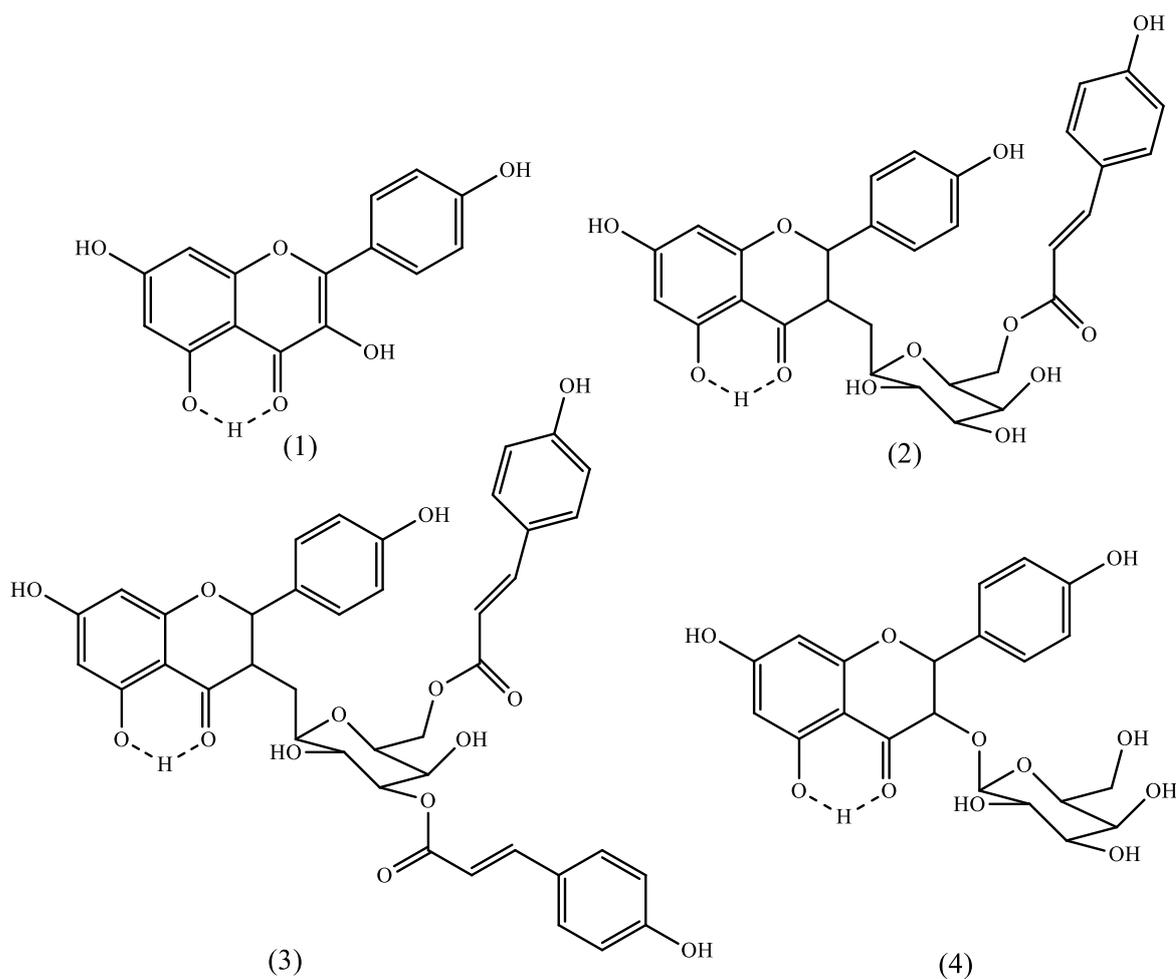
Figura 26 - Terpenos isolados da casca da *Annona vepretorum*.



Fonte: Dutra et al., 2014.

Flavonoides: Uma investigação fitoquímica, feita por VEGA et al. 2007, do extrato metanólico das folhas de *Annona dioica* resultou na identificação dos flavonoides (1) canferol, (2) 3-O-[3",6"-di-O-p-hidroxicinamoil]- β -galactopiranosil-canferol, (3) 6"-O-p-hidroxicinamoil- β -galactopiranosil-canferol e (4) 3-O- β -galactopiranosil-canferol, apresentaram atividade antitumoral (Figura 27).

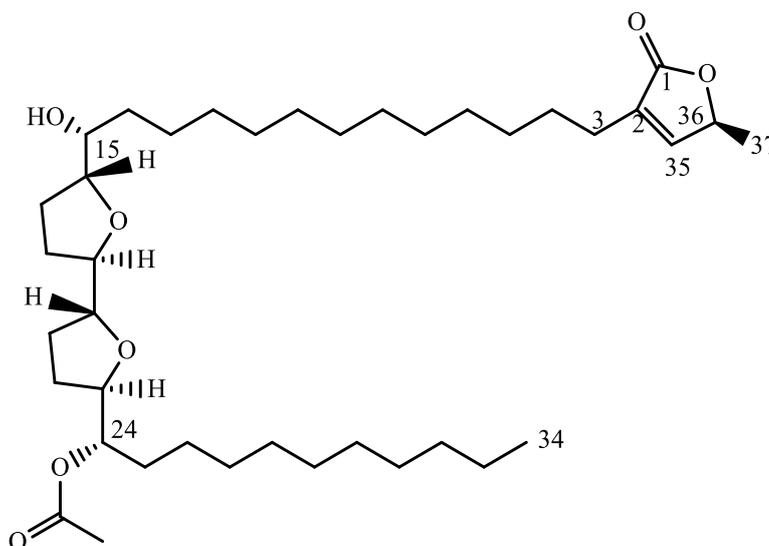
Figura 27 - Flavonoides isolados do extrato metanoico de *Annona dioica*.



Fonte: Vega et al, 2017.

Acetogeninas: Por volta de 1982 JOLAND et al., durante o estudo com plantas e a procura de constituintes inibidores de células cancerosas, um extrato de etanol das raízes da *Uvaria accuminata* produziu uma substância cerosa, denominada uvaricina (Figura 28), que demonstrou propriedades antitumorais no sistema PS *in vivo* (leucemia linfocítica em ratos). Tratava-se da primeira acetogenina bis-tetra-hidrofurânica com um anel gama-lactônico, até então isolada que marcou o início dos estudos dessa classe de compostos.

Figura 28 - Estrutura química da uvaricina.



Fonte: Autora, 2018.

Embora essas plantas sejam usadas há muito tempo em remédios populares, foi a partir da descoberta das propriedades antitumorais que se iniciou a busca por novas acetogeninas e a pesquisa na descoberta de suas estruturas. Atualmente, o grande interesse dos pesquisadores por essa classe de compostos se deve ao fato de que a maior parte das acetogeninas isoladas apresenta atividades antitumoral, citotóxica, imunossupressora, pesticida, antiprotozoária, antielmintica, antimalária, antimicrobiana e inibidora do apetite (CHEN et al., 2013; GONZÁLEZ-ESQUINCA et al., 2014; ELKINGTON et al., 2014; CHINSEMBU, 2015; SANTOS e SANT'ANA, 2001).

3.1.2 Considerações sobre acetogeninas de annonaceae

As acetogeninas são caracterizadas por apresentarem uma cadeia longa alifática com 35 a 39 átomos de carbono e um anel γ -lactônico terminal insaturado ou saturado. Ao longo da cadeia alifática podem ser encontrados um, dois, ou três anéis tetrahydrofuranos (THF) ou tetrahydropiranos (THP), e grupos funcionais oxigenados (hidroxilas, cetonas ou epóxidos).

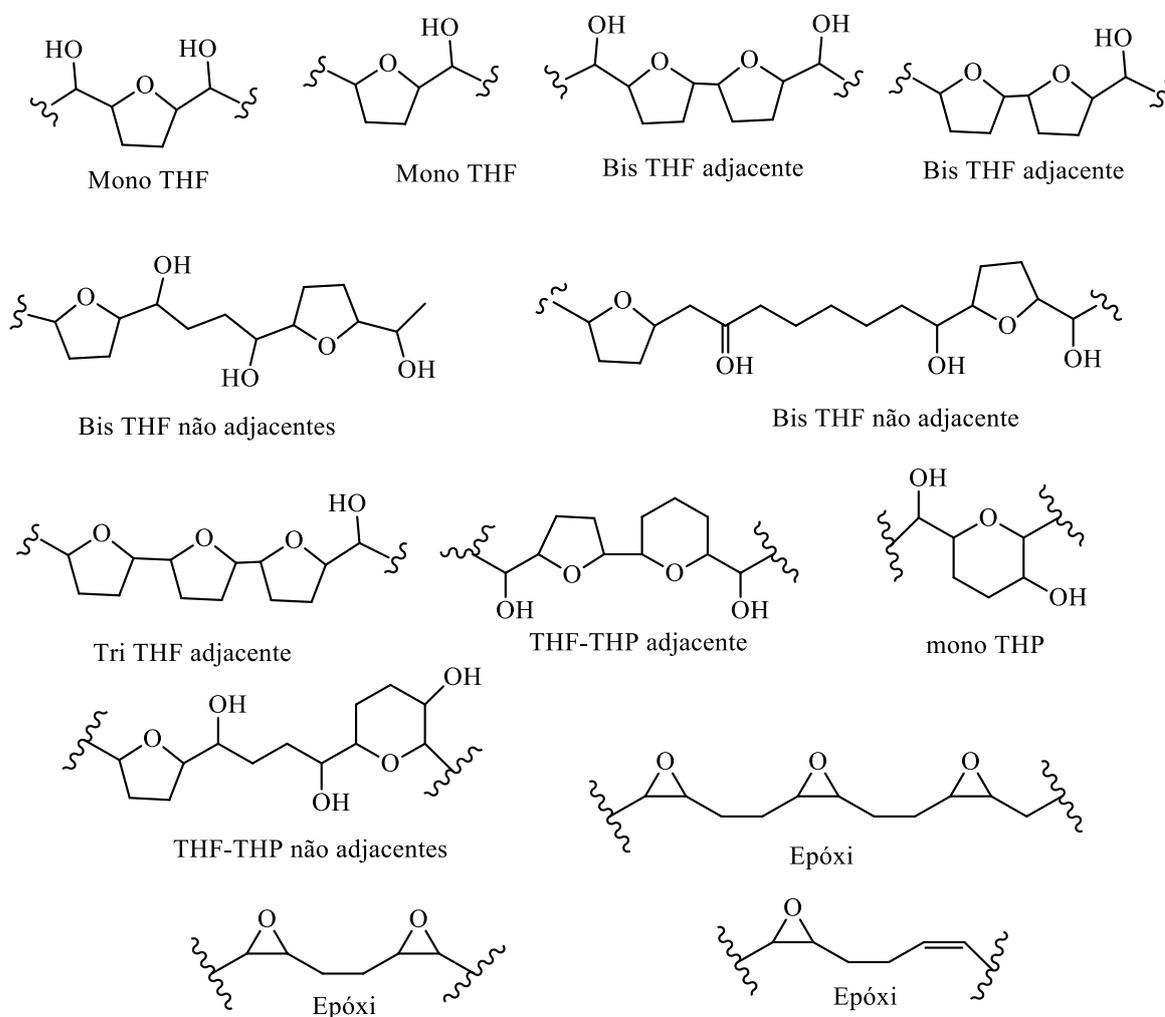
Em termos biossintéticos, as ACGs são derivadas de ácidos graxos de cadeia longa, sendo aparentemente de origem policetídica. Embora não haja relatos na literatura de trabalhos experimentais sobre a biossíntese de ACGs, a análise retrossintética de substâncias conhecidas revela que essas são biossintetizadas através de combinações lineares de duas ou três unidades de carbonos via acetil Co-A e malonil-CoA, por meio de mecanismos semelhantes aos empregados na rota para a biossíntese de ácidos graxos. Os anéis

tetrahidrofuranos (THF) podem ser obtidos por epoxidação de intermediário dieno, trieno e ceto-alceno, nos quais é baseada a classificação das ACGs (BERMEJO, et al., 2005).

3.1.3 Classificação das acetogeninas

As ACGs podem ser classificadas de acordo com a quantidade e/ou tipos de anéis THF, THP ou anéis α,α -dihidroxilas ou α -hidroxilados. Sendo classificadas como: mono THF e/ou THP, bis-THF e/ou THP adjacentes, bis-THP e/ou THP não adjacentes e tri-THF (BERMEJO, et al., 2005; RUPPRECHT et al. 1990).

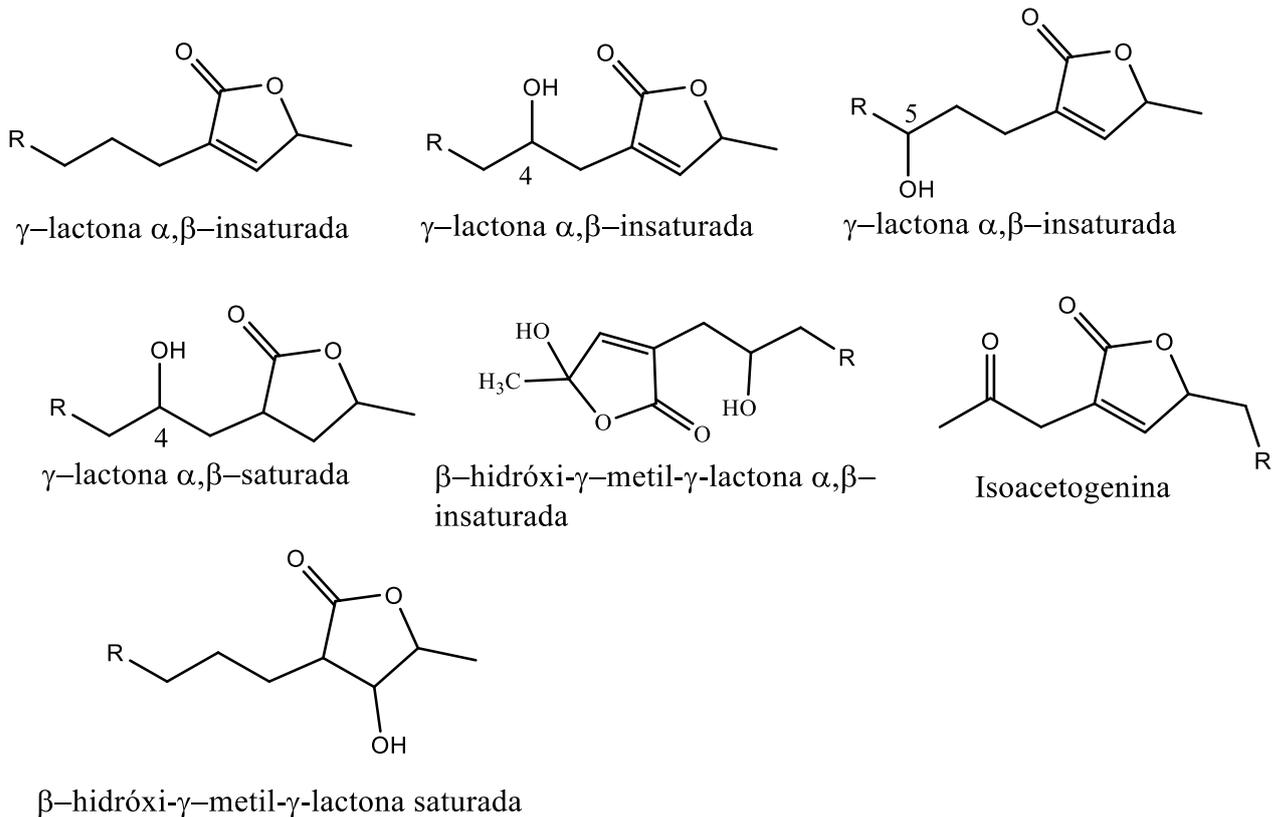
Figura 29 - Exemplos das disposições dos fragmentos de anéis THF e/ou THP e anéis epóxido em acetogeninas de Annonaceae



Fonte: Autora, 2018.

Quanto ao anel lactônico, elas podem ser classificadas em: γ -lactônico substituído, cetolactonas ou hidroxilados. A Figura 30 ilustra os exemplos mais comuns dos fragmentos anéis de γ -lactônico (BERMEJO, et al., 2005; RUPPRECHT et al. 1990).

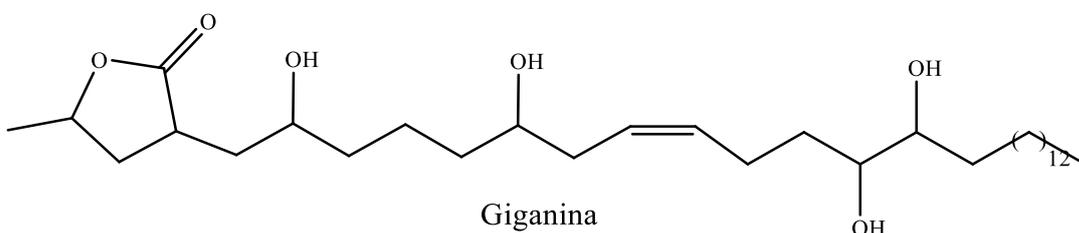
Figura 30 - Tipos de fragmentos gama lactônico em acetogeninas de Annonaceae

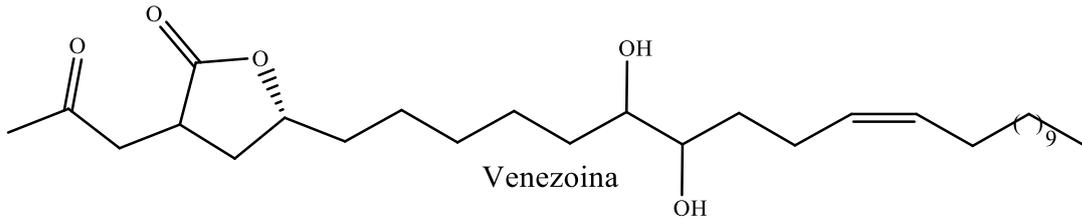


Fonte: Autora, 2018.

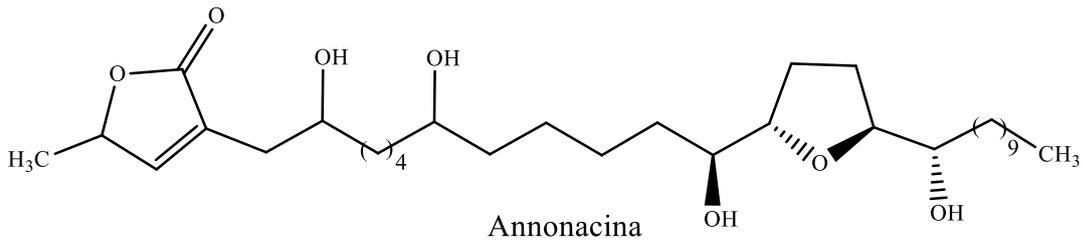
De modo geral, as ACGs foram divididas em seis grandes grupos: acetogeninas lineares, mono-THF, bis-THF adjacente, bis-THF não adjacentes, não THF e THP, e não clássicas. A seguir são mostrados alguns exemplos dos diversos tipos de ACG (BERMEJO, et al., 2005; RUPPRECHT et al. 1990):

- Acetogeninas lineares

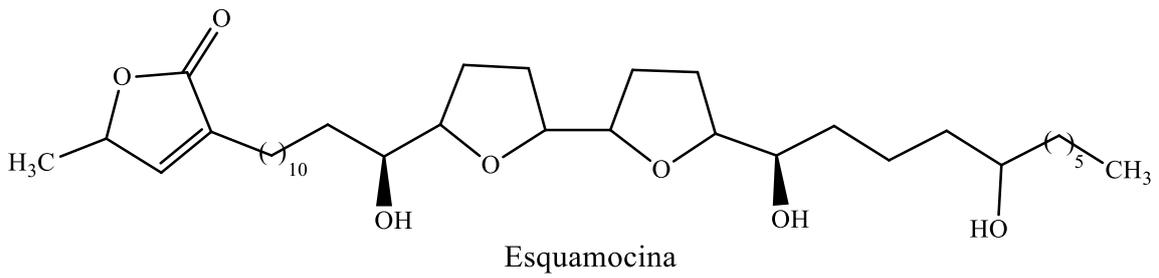




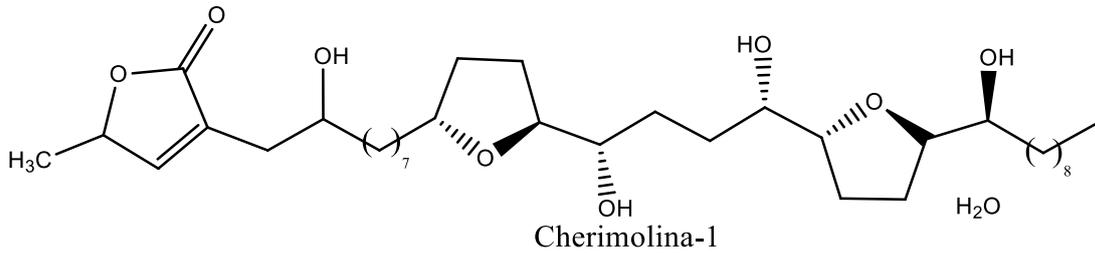
- Mono-THF



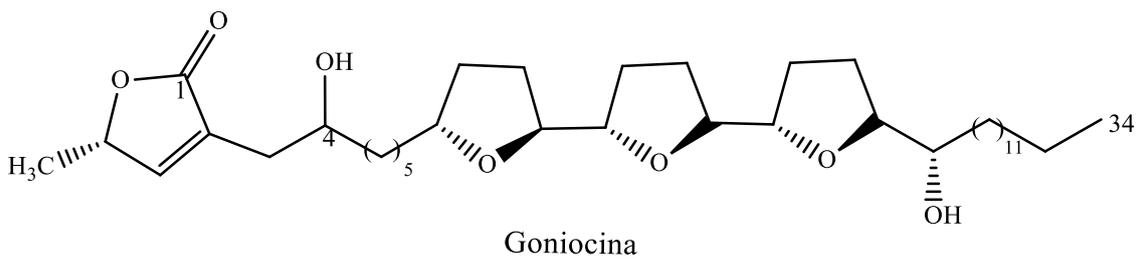
- Bis-THF adjacente



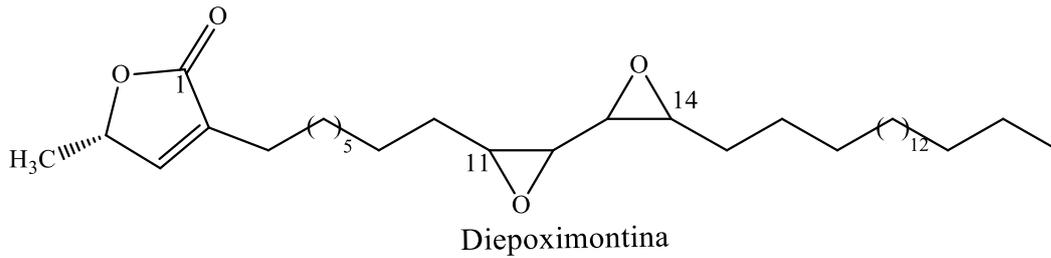
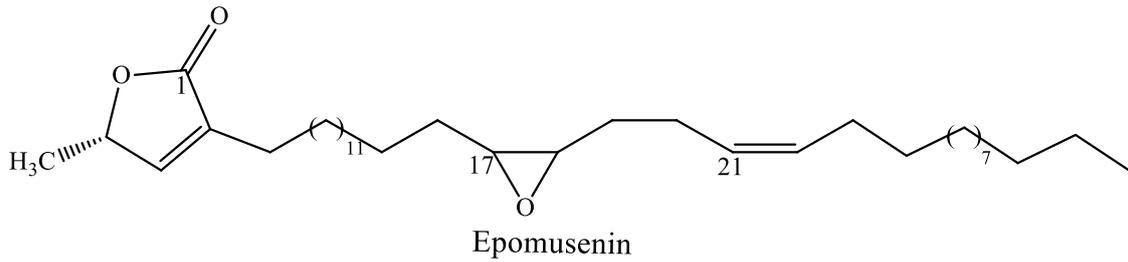
- Bis-THF não adjacentes



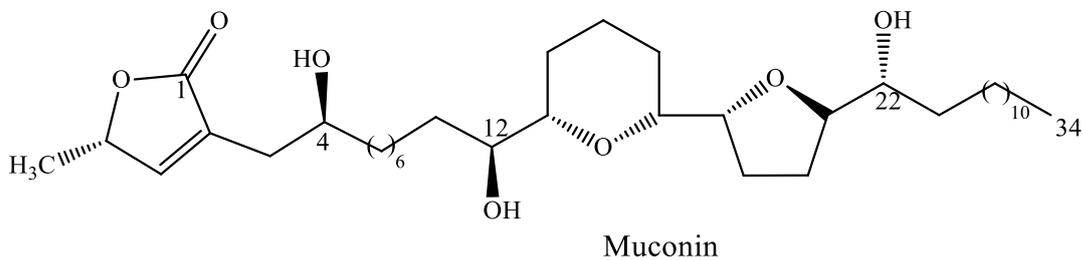
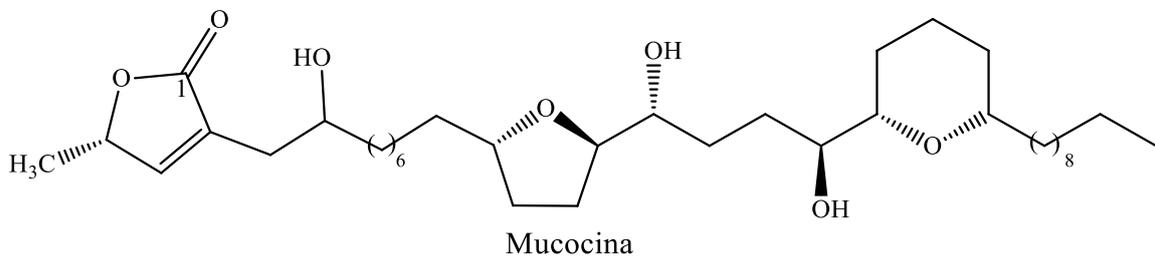
- Tri-THF adjacentes



- Não THF e THP



- Não clássicas



3.1.4 O gênero *annonna*

Economicamente este gênero é considerado o mais importante para a família Annonaceae, por apresentar algumas espécies que são cultivadas e comercializadas no Brasil em larga escala, como *Annona crassiflora* (araticum), *Annona squamosa* (fruta-do-conde), *Annona muricata* (graviola), *Annona reticulata* (condessa) e *Annona cherimola* (cherimoia). O valor econômico dessas espécies está relacionado principalmente às propriedades

nutricionais dos frutos que são consumidos *in natura*, mas também são amplamente utilizados em produtos processados ou semi-processados, especialmente na preparação de sucos, sorvetes e sobremesas (LAGE, 2011; DINIZ et al., 2013). Além disso, várias espécies do gênero *Annona* possuem potencial farmacológico no que diz respeito às atividades antioxidante (LIMA et al., 2010), antimicrobiana (COSTA et al., 2013), antitumoral (LIMA et al., 2012), antinociceptiva, anti-inflamatória (SIEBRA et al., 2009), ansiolítica, sedativa e antidepressiva, são os motivos pelos que despertam o interesse de grupos de pesquisa nacionais e internacionais, além do setor industrial farmacêutico (DINIZ et al., 2013).

3.1.4.1 A espécie *Annona mucosa* (Jacq.)

A espécie *Annona* possui 27 sinônimos (Tabela 1) (CATALOGUE OF LIFE, 2018) e, em um levantamento no site tropicos.org (2018), foram encontradas 404 variações (dentre estes, há 15 nomes inválidos e 12 ilegítimos) para o gênero *annonna*. E muitas dessas espécies já foram investigadas anteriormente por sua composição química e atividades farmacológicas. Dentro do gênero, *A. mucosa* Jacq. tem sido usado como um medicamento tradicional para o tratamento de tumores nas Índias Ocidentais e na Indonésia (HARTWELL, 1982).

Dentre as anonáceas neotropicais, *Annona mucosa* Jacq. (anteriormente agrupados no gênero *Rollinia* (RAINER, 2007)) é uma frutífera nativa da Amazônia e da Mata Atlântica, que é popularmente conhecido como "biribá", biribá-comum, araticum ponhé ou biribá-das Antilhas. É uma árvore originária do ocidente da Amazônia e da Mata Atlântica pluvial (do Rio de Janeiro a Pernambuco) e sua altura atinge até 20 m. Embora o Brasil seja o seu lugar de origem, esta espécie cresce bem em diferentes habitats (FERREIRA et al., 2010). Devido à sua ampla dispersão geográfica, o fruto também é conhecido como: biribá do pará, fruta da condessa, biribá de pernambuco, pinha, anona e jaca de pobre (COSTA e MULLER, 1995).

Por ser uma espécie tropical, desenvolve-se bem em áreas de clima quente e úmido, com temperaturas médias de 24 a 26 °C e chuvas acima de 1.500 mm anuais. Destaca-se das demais espécies do seu gênero por apresentar frutos grandes e comestíveis, contendo polpa mucilaginoso e adocicada e quando maduro, é de coloração amarela, globoso, composto por diversas partes hexagonais, muito unidas, dando um aspecto característico; sua polpa varia de esbranquiçada a creme, com muitas sementes de cor escura (figura 31); possui um aroma agradável, podendo pesar até 1,3 kg (LORENZI, 1998). Os frutos têm grande aceitação

popular, sendo consumidos *in natura*, o que justifica seu amplo cultivo nos neotrópicos (SOARES et al 2014).

Tabela 1 - Tabela com o nome aceito e seus sinônimos, para a espécie *Annona mucosa*.

Nome científico aceito:	<i>Annona mucosa</i> Jacq. (Nome aceito)
Sinônimos:	<i>Annona biflora</i> Ruiz & Pav. ex G. Don (Sinônimo ambíguo)
	<i>Annona biflora</i> Sessé & Moc. (Sinônimo ambíguo)
	<i>Annona muscosa</i> Aubl. (sinônimo)
	<i>Annona obtusiflora</i> Tussac (sinônimo)
	<i>Annona obtusifolia</i> DC. (sinônimo)
	<i>Annona parviflora</i> Ruiz & Pav. (Sinônimo ambíguo)
	<i>Annona parviflora</i> Ruiz & Pav. ex G. Don (Sinônimo ambíguo)
	<i>Annona pterocarpa</i> Ruiz & Pav. ex G. Don (sinônimo)
	<i>Annona pteropetala</i> Ruiz & Pav. (Sinônimo ambíguo)
	<i>Annona pteropetala</i> Ruiz & Pav. ex R. E. Fr. (Sinônimo ambíguo)
	<i>Annona reticulata</i> var. <i>mucosa</i> (Jacq.) Willd. (sinônimo)
	<i>Rollinia biflora</i> Ruiz & Pav. ex G. Don (sinônimo)
	<i>Rollinia curvipetala</i> R. E. Fr. (sinônimo)
	<i>Rollinia deliciosa</i> Saff. (sinônimo)
	<i>Rollinia jimenezii</i> Saff. (sinônimo)
	<i>Rollinia micrantha</i> G. Don (sinônimo)
	<i>Rollinia mucosa</i> (Jacq.) Baill. (sinônimo)
	<i>Rollinia mucosa</i> subsp. <i>aequatorialis</i> R. E. Fr. (sinônimo)
	<i>Rollinia mucosa</i> var. <i>macropoda</i> R. E. Fr. (sinônimo)
	<i>Rollinia mucosa</i> var. <i>neglecta</i> (R. E. Fr.) R. E. Fr. (sinônimo)
	<i>Rollinia mucosa</i> subsp. <i>portoricensis</i> R. E. Fr. (sinônimo)
	<i>Rollinia neglecta</i> R. E. Fr. (sinônimo)
	<i>Rollinia orthopetala</i> A. DC. (sinônimo)
	<i>Rollinia permensis</i> Standl. (sinônimo)
	<i>Rollinia pterocarpa</i> G. Don (sinônimo)
	<i>Rollinia pulchrinervia</i> A. DC. (sinônimo)
	<i>Rollinia sieberi</i> A. DC. (sinônimo)

Fonte: Catalogue of Life: 28th March 2018. Acessado em maio de 2018.<
<http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/bb7eaccd1ba4f4c02c81fb31d2eec55b/synonym/3c1051eddb9b7a2269ff59bc2117792c>>

Figura 31 - Foto do biribazeiro. Folha, caule e fruto.



Fonte: Lorenzi, 1998.

Testes histoquímicos realizados por SOARES 2014, tratadas com corantes evidenciaram a presença de lipídios nas sementes em proporção maior do que proteínas, carboidratos e compostos fenólicos, o que pode ser indício de que a principal reserva energética das sementes do biribazeiro seja de origem lipídica. As sementes têm sido estudadas quanto à composição química de suas reservas, e tal interesse não se dá apenas por seu teor nutritivo, mas por serem úteis na confecção de produtos industrializados (BUCKERIDGE, 2010).

3.1.4.2 Acetogeninas isoladas do gênero *annona*

As acetogeninas isoladas até o momento contêm em sua estrutura vários centros estereogênicos, o que dificulta a elucidação de suas configurações absolutas. Devido a sua natureza graxa, as acetogeninas não formam cristais adequados para uma análise de cristalografia de raios X. Desta forma, a determinação da estereoquímica tem sido feita mediante a comparação do produto natural com modelos sintéticos via preparação do éster de Mosher, ésteres do ácido α -metoxi- α -(trifluorometil)-fenilacético, seguido de uma análise detalhada dos espectros de RMN ^1H dos derivados. Na Tabela 2 são apresentadas acetogeninas citotóxicas isoladas da espécie *annona mucosa* Jacq. (SHI, et al., 1996; RAMIREZ e HOYE, 1995).

Tabela 2 - Acetogeninas citotóxicas isoladas da espécie *Annona mucosa* Jacq.

Nome	Parte estudada	Fórmula Molecular	Referência
Jimenezina	Raíz	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$	CHÁVEZ, et al., 1998.
Membranacina	semente	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_6$	CHÁVEZ, et al., 1998.
Mistura de 20,23- cis-2,4-cis e trans – bullatalicinona	não citado	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$	LIAW, et al., 1999.
Mucocina	não citado	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_8$	LIAW, et al., 1999.
Muconina	semente	$\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$	SHI et al., 1996.
Mucoxina	não citado		SHI et al., 1996.
Muricatetrocina C	não citado	$\text{C}_{35}\text{H}_{66}\text{O}_7$	SHI et al., 1996.
Rolliacocina	Não citado	$\text{C}_{35}\text{H}_{64}\text{O}_7$	GU et al., 1997

Rollicosina	Polpa	$C_{22}H_{36}O_6$	LIAW et al., 2003
Rollidecina C	Folha	$C_{37}H_{66}O_6$	GU et al., 1997
Rollidecina D	Folha	$C_{37}H_{66}O_6$	GU et al., 1997
Rollidecinas A e B	Folha	$C_{35}H_{62}O_6$	SHI et al., 1996
Rollimusina	semente	$C_{37}H_{66}O_8$	LIAW et al., 1999.
Rollinacina	semente	$C_{35}H_{62}O_7$	SHI, et al., 1999
Rolliniastatina 1	semente	$C_{37}H_{66}O_7$	PETIT, et al., 1987
Rolliniastatina 2	semente	$C_{37}H_{66}O_7$	PETIT et al., 1987
Rollitacina	semente	$C_{37}H_{66}O_8$	SHI et al., 1999
Sylvaticina	Folha	$C_{37}H_{66}O_8$	SHI et al., 1995.

3.1.4.3 Espécies de annonaceas do gênero *annonna* com atividade biopesticida

Por serem naturalmente bioativas, as plantas da família Annonaceae estão ganhando destaque como biopesticidas, além das atividades citotóxica, antitumoral, vermícida, antimicrobiana, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e crescimento, antimalárica, os inseticidas vegetais apresentam moléculas biodegradáveis, são menos tóxicos a mamíferos e potencialmente adequados para utilização no controle de pragas. A atividade inseticida das anonáceas deve-se à presença de acetogeninas, substâncias que atuam nas mitocôndrias, inibindo a NADH – ubiquinona oxidoredutase, causando a morte dos insetos. Na tabela 3 estão listadas espécies de *Annona* que apresentam potencial inseticida (KRINSKI et al., 2013). Segundo KRINSKI et al., 42 espécies de anonáceas possuem informações de atividade inseticida contra pouco mais de 60 espécies de insetos-praga.

Nesse contexto, é importante lembrar que o Brasil é o líder mundial no consumo de agrotóxicos e inclusive está entre os maiores produtores mundiais de alimentos e é o segundo maior exportador de produtos agrícolas. A safra de grãos, estimada em mais de 200 milhões de toneladas para ano de 2017, também acendeu um sinal amarelo. O país é um gigante no consumo de agroquímicos, está no topo do ranking. Na última década, segundo dados compilados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA), o mercado de agrotóxicos do país cresceu 190%, ritmo mais acentuado do que o do mercado mundial no mesmo período (93%).

Diante desse cenário, muitos produtores agrícolas se mostram preocupados com a saúde humana, e vem adotando o uso de defensivos agrobiológicos. Dados do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) mostram que em 2010, 2% dos produtos registrados no órgão eram ligados ao controle natural de pragas e doenças. Cinco anos depois, o percentual mais que dobrou, passando para os 5%. Mas ainda é quase nada comparado ao crescimento (190%) do mercado de agrotóxicos. A esperança é que o primeiro passo já foi dado. O potencial de crescimento do controle biológico vem se fortalecendo, e um sinal é dado por grandes iniciadores desse mercado, como é o caso da *FMC Agricultural Solutions*, produtora de agroquímicos, que também está atuando no controle natural; e da multinacional *Bayer CropScience*, que há dois anos entrou para o segmento.

Tabela 3 - Espécies de Annonaceae do gênero *Annona* e as partes utilizadas como fitoinseticida contra diferentes tipos de insetos.

Espécie de Annonaceae	Parte*	Espécies de insetos (Ordem**)
<i>Annona atemoya</i>	S	<i>Trichoplusia ni</i> (Lepidoptera)
<i>Annona cherimólia</i>	S	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hemiptera), <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.) <i>continua...</i>
<i>Annona coriácea</i>	S	<i>Aedes aegypti</i> (Diptera), <i>Anagasta kuehniella</i> (Lep.), <i>Corcyra cephalonica</i> (Lep.), <i>Dichelops melacanthus</i> (Hem.), <i>Euschistus heros</i> (Hem.), <i>Tuta absoluta</i> (Lep.)
<i>Annona cornifolia</i>	F	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lep.), <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.)
<i>Annona crassiflora</i>	F/G/R/S	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.)
	R	<i>Dipetalogaster maxima</i> (Hem.), <i>Aedes aegypti</i> (Dip.)
	S	<i>Euschistus heros</i> (Hem.), <i>Rhodnius neglectus</i> (Hem.), <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.), <i>Tibraca limbativentris</i> (Hem.), <i>Aedes aegypti</i> (Dip.)
<i>Annona dioica</i>	S	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.), <i>Rhodnius neglectus</i> (Hem.)
	F/G	<i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lep.), <i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.)
<i>Annona diversifolia</i>	F/G	<i>Anastrepha ludens</i> (Dip.)
<i>Annona foetida</i>	S	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.)
<i>Annona glabra</i>	S	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.)

<i>Annona lutescens</i>	F/G	<i>Anastrepha ludens</i> (Dip.)
<i>Annona montana</i>	F/G	<i>Oncopeltus fasciatus</i> (Hem.)
	F/G	<i>Spodoptera frugiperda</i> (Lep.)
<i>Annona mucosa</i>	S	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.), <i>Chrysodeixis includens</i> (Lep.), <i>Euschistus heros</i> (Hem.), <i>Tibraca limbativentris</i> (Hem.)
	G/S	<i>Rhodnius neglectus</i> (Hem.)
	F/G/S	<i>Sitophilus zeamais</i> (Coleoptera)
<i>Annona muricata</i>	S	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.), <i>Anopheles albimanus</i> (Dip.), <i>Anticarsia gemmatalis</i> (Lep.), <i>Blatella germanica</i> (Blattodea), <i>Euschistus heros</i> (Hem.), <i>Leptinotarsa</i> <i>decemlineata</i> (Col.), <i>Periplaneta americana</i> (Blat.), <i>Plutella xylostella</i> (Lep.), <i>Pseudaletia sequax</i> (Lep.), <i>Rhodnius pallescens</i> (Hem.), <i>Rhodnius prolixus</i> (Hem.), <i>Sitophilus zeamais</i> (Col.), <i>Zabrotes subfasciatus</i> (Col.)
	F/G	<i>Anastrepha ludens</i> (Dip.)
	F	<i>Callosobruchus maculatus</i> (Col.), <i>Culex quinquefasciatus</i> (Dip.), <i>Leucinodes orbonalis</i> (Lep.), <i>Plutella xylostella</i> (Lep.)
<i>Annona reticulata</i>	S	<i>Epilachna vigintioctopunctata</i> (Col.), <i>Spodoptera litura</i> (Lep.)
	C	<i>Plutella xylostella</i> (Lep.)
	NI	<i>Rhodnius neglectus</i> (Hem.)
<i>Annona salzmannii</i>	C	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.)
<i>Annona senegalensis</i>	R	<i>Callosobruchus maculatus</i> (Col.)
	F	<i>Culex quinquefasciatus</i> (Dip.)
	NI	<i>Sitophilus zeamais</i> (Col.)
<i>Annona squamosa</i>	F	<i>Aedes aegypti</i> (Dip.), <i>Anopheles gambiae</i> (Dip.), <i>Anopheles</i> <i>subpictus</i> (Dip.), <i>Bemisia tabaci</i> (Hem.), <i>Culex</i> <i>quinquefasciatus</i> (Dip.), <i>Culex tritaeniorhynchus</i> (Dip.), <i>Musca domestica</i> (Dip.), <i>Oryctes rhinoceros</i> (Col.), <i>Periplaneta americana</i> (Blat.), <i>Tribolium castaneum</i> (Col.)
	S	<i>Aedes albopictus</i> (Dip.), <i>Callasobruchus chinensis</i> (Col.), <i>Ceratitis capitata</i> (Dip.), <i>Crocidolomia pavonana</i> (Lep.), <i>Culex quinquefasciatus</i> (Dip.), <i>Drosophila melanogaster</i> (Dip.), <i>Dysdercus koenigii</i> (Hem.), <i>Epilachna</i> <i>vigintioctopunctata</i> (Col.), <i>Plutella xylostella</i> (Lep.), <i>Sitophilus oryzae</i> (Col.), <i>Spodoptera litura</i> (Lep.)

Spodoptera litura (Lep.), *Tribolium castaneum* (Col.),
Trichoplusia ni (Lep.), *Trogoderma granarium* (Dip.),
Musca nebulosa (Dip.).

PI *Anopheles stephensi* (Dip.)

G *Musca domestica* (Dip.)

R *Plutella xylostella* (Lep.)

*C= casca; F= folhas; FR= frutos; G= galhos; R= raiz; S= sementes; PA= parte aérea PI= planta inteira; NF= não informado. Adaptado de: KRINSKI et al., 2014.

3.1.5 Relação estrutura-citotoxicidade das acetogeninas

Como principal abordagem na busca de potentes agentes antitumorais ao longo dos últimos 50 anos, ensaios de citotoxicidade *in vitro* em linhagens de células neoplásicas são considerados um parâmetro inicial e fundamental, para a detecção da atividade antitumoral, uma vez que a maioria dos quimioterápicos utilizados na terapia do câncer é fundamentalmente citotóxicos. Dessa forma, os testes *in vitro* têm sido amplamente aplicados para pesquisa (PAES, et al. 2016).

As acetogeninas apresentam diferenças estruturais que potencializam ou não a atividade citotóxica destes compostos. Em estudos de relação estrutura-atividade, foi observado que as unidades hidroxilas são extremamente importantes para a bioatividade dessas moléculas e que a acetilação ou a preparação de outros derivados reduzem a atividade citotóxica. A subunidade γ -lactona α,β -insaturada é essencial para a atividade citotóxica. Redução da ligação dupla reduz a atividade. Segundo TAKADA et al. 2000, o número de carbonos, entre as duas subunidades, anel THF e γ - lactônico, pode ser um fator importante para justificar os diversos efeitos das anonáceas, sendo o tamanho ideal da cadeia em torno de 13 carbonos. Tal observação corrobora com a hipótese de MIYIOSHI et al 1998.

O potencial citotóxico das acetogeninas dependerá, além dos grupos funcionais bem como, da presença, do número e da disposição dos anéis THF (BARRETO, 2014).

A estereoquímica da molécula também é algo fundamental para a sua atividade. A mudança na estereoquímica de um centro assimétrico pode resultar em um aumento ou diminuição da atividade citotóxica. A presença de dióis vicinais e ligação dupla ao longo da cadeia também aumentam a atividade citotóxica. De acordo com o trabalho de MIYIOSHI et al. 2000, ao contrário do que se pensava, a existência de um único anel THF é suficiente para uma potente atividade das ACGs. TORMO et al. 1999, verificaram que as ACGs mono- THF,

podem agir de forma inibitória semelhante às aquelas bis-THF, quando atuam sobre a NADH oxidase. Também foi notado que o encurtamento do espaço, referente ao número de carbonos na cadeia alifática entre o anel THF e γ -lactônico terminal, enfraquece a atividade de algumas ACGs (MIYIOSHI et al, 1998).

Com base em vários trabalhos ALALI et al. 1999, foram relacionadas algumas afirmações em relação à estrutura-atividade das ACGs de anonáceas. Logo, eles concluíram que:

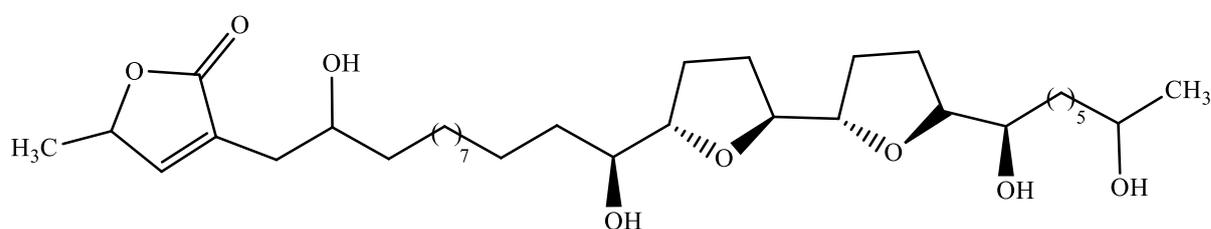
- ✓ se todas as outras características estruturais são idênticas, as menores acetogeninas (C-35) são mais potentes; em seguida, os compostos C-37
- ✓ três grupos hidroxilas, dois deles ao lado do anel THF e o outro em algum lugar da longa cadeia de hidrocarboneto fornece tanto a posição ideal como a polaridade necessária para a atividade mais potente. No entanto, nas ACGs tetra-hidroxiladas a atividade cai drasticamente;
- ✓ uma cetona ao invés do grupamento funcional hidroxila diminui a atividade;
- ✓ os compostos com anel THP são tão ativos quanto os compostos com anel THF e têm o mesmo mecanismo de ação;
- ✓ as ACGs do tipo bis-THF com anéis adjacentes são as mais potentes, seguidas em ordem decrescente de atividade pelas bis-THF não-adjacentes, pelas mono-THF e por último aquelas que não possuem anéis THF (RUPPRECHT et al., 1990; FANG et al., 1993).

Recentemente PAES et al. 2016 reuniram dados de citotóxicidade para 191 ACGs com esqueletos diferentes, as quais foram organizadas e classificadas de acordo com o sistema de classificação geral das acetogeninas juntamente com os valores de IC_{50} (concentração inibitória necessária para a morte de 50% das células) obtidos para estas ACGs em linhagens neoplásicas humanas. Das 191 ACGs testadas, 181 mostraram bioatividade para pelo menos uma das 6 linhagens avaliadas (alguns trabalhos testaram 10). De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), substâncias puras com o valor da $IC_{50} \leq 4 \mu\text{g/mL}$ são consideradas ativas (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990). No entanto, para os melhores valores de IC_{50} serem considerados, devem ser acompanhados pelo valor de IC_{50} de um fármaco de referência, além do índice de seletividade, nas mesmas condições (SECA et al., 2014).

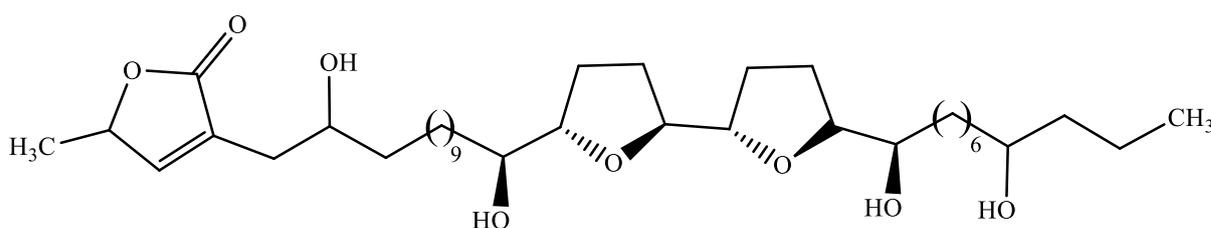
Ainda, nesse contexto, é importante exemplificar algumas ACGs que superam a atividade do fármaco controle. No estudo realizado por SILVA et al. em 1996, a mono-THF

coriacina ($IC_{50} < 3,00 \times 10^{-7} \mu\text{g/mL}$) teve uma atividade superior ao paclitaxel ($IC_{50} 2,00 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$) na linhagem KB (Carcinoma epidermoide nasofaríngeal humano). As bis-THF adjacentes 30-hidroxiullatacina, 31-hidroxiullatacina e 32-hidroxiullatacina foram mais potentes nas linhagens celulares A-549 (carcinoma de pulmão humano), MCF7 (carcinoma de mama humano), A-498 (carcinoma de rins humano) e PaCa-2 (carcinoma pancreático humano) ($IC_{50} < 1,00 \times 10^{-8} \mu\text{g/mL}$) que o fármaco adriamicina usado como controle ($IC_{50} > 2,7 \times 10^{-2} \mu\text{g/mL}$).

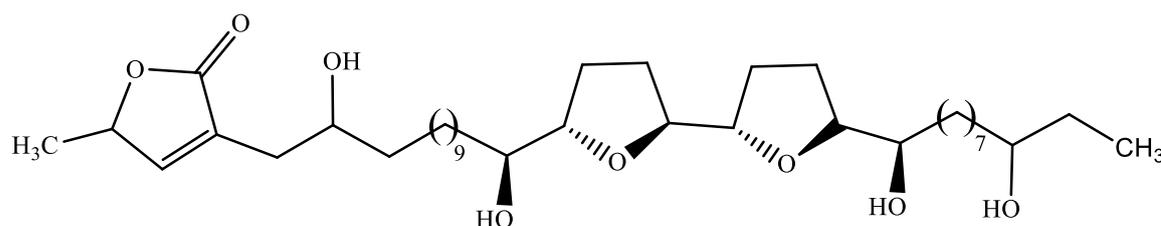
Figura 32 - Acetogeninas bis-THF altamente citotóxicas.



30-hidroxiullatacina



31-hidroxiullatacina



32-hidroxiullatacina

Fonte: Autora, 2018.

Estas observações servem para mostrar a necessidade da busca por um modelo estrutural mais ativo e seletivo para determinados tipos de linhagens celulares. Algumas tentativas de definir uma relação estrutura-atividade das ACGs foram publicadas nos últimos anos, porém, ainda não foi possível estabelecer um padrão de estrutura química das ACGs que seja mais efetivo. Isso faz com que haja uma maior necessidade pela busca da cura destes e

outros tipos de câncer, que são os responsáveis pelo maior número de mortes pela doença, segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2012. De acordo com Instituto Oncoguia existe mais de 200 tipos de câncer. Esta doença é um problema de saúde pública mundial, e a OMS estimou que no ano 2030 podem-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de morte por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente com câncer. (Instituto Oncoguia, 2017 < <http://www.oncoguia.org.br>>).

3.1.6 Utilização da técnica de RMN no estudo das acetogeninas

A técnica de RMN é amplamente aplicada no estudo de compostos provenientes de produtos naturais. Além do uso da técnica na elucidação estrutural das ACGs, é possível também os quantificar, fazer estudo metabolômico dos extratos brutos, determinar a estereoquímica via o método de Mosher e propor rotas sintéticas. A seguir, são citados alguns trabalhos que comprovaram a eficiência da técnica para os casos citados anteriormente.

- Machado (2014) aplicou a técnica de RMN em estudos metabolômicos de plantas do gênero *Annona* com o objetivo de avaliar e relacionar os perfis metabólicos dessas plantas com as suas propriedades nematocidas ou nemato repelentes. Inicialmente ele avaliou a resistência de *Annona muricata* ao nematoide *Meloidogyne javanica* através da comparação do metaboloma de raízes e folhas de plantas inoculadas e não inoculadas com o nematoide utilizando RMN de ^1H e análise quimiométrica. As plantas expostas ao nematoide apresentaram alterações significativas no seu metabolismo após 24 horas de exposição. Os resultados sugeriram que a resistência de *A. muricata* ao nematoide *M. javanica* pode estar associada à reação de hipersensibilidade. Vários metabólitos relacionados com resistência puderam ser identificados nas raízes e folhas de *A. muricata* com o emprego da RMN de ^1H , dentre eles as ACGs, a dopamina e a xantina. Machado (2004) também avaliou o potencial da RMN de ^1H combinado com regressão por mínimos quadrados parciais, para previsão da atividade larvicida dos extratos das folhas de *Annona muricata*. Para tanto, foi construído um modelo de calibração utilizando os sinais entre δ 0,00 e δ 10,00 e os valores de DL_{50} dos extratos frente à *Artemia salina*. Os resultados mostraram o potencial da RMN de ^1H no desenvolvimento de metodologias para a previsão de atividades biológicas. Na busca por substâncias nematocidas foi avaliado o perfil metabólico e a atividade nematocida *in vitro* dos extratos das folhas de *Annona crassiflora*, utilizando o teste de mobilidade sobre o nematoide de vida livre *Caenorhabditis elegans*. Ele destacou a importância da RMN como uma ferramenta

eficaz para a análise das acetogeninas ao quantificar o total de acetogeninas α - β -insaturadas- γ -lactonas em folhas de *Annona muricata*. As concentrações dos compostos foram obtidas diretamente no espectro de RMN ^1H do extrato de *A. muricata* em um curto espaço de tempo sem a necessidade de curvas de calibração de cada composto individual, mostrando uma grande vantagem sobre os métodos HPLC-MALDI MS descritos. Para a quantificação, foi usada a comparação das áreas do sinal atribuído ao hidrogênio olefínico γ -lactona de cada tipo de acetogenina com a área dos sinais dos hidrogênios do padrão interno (antraceno). Este processo de medição foi capaz de estabelecer o total de acetogeninas α , β -insaturadas- γ -lactonas na faixa de 3,38 a 15,05 mg/g de extrato, dependendo da amostra investigada. Este método permitiu uma quantificação rápida e simples de acetogeninas de *A. muricata*.

- Bonneau et al. 2016, realizou um trabalho o qual teve como objetivo desenvolver um método simples para a quantificação direta da maioria das ACGs (mono-THF e Bis-THF) em extratos ricos em ACGs, através da técnica de ^1H RMN. O desenvolvimento do método foi realizado em espectrômetros de 400 MHz e 300 MHz, para aplicação rotineira em extratos brutos de frutos de *Annona muricata* L. O método foi validado com as ACGs annonacina e squamocina como compostos de referência. Dois padrões internos, ácido fumárico e dimetil fumarato, foram utilizados, em metanol deuterado (CD_3OD) e clorofórmio deuterado (CDCl_3), respectivamente. A quantificação foi realizada utilizando sinais correspondentes aos prótons olefínicos desprotegidos que caracterizam a maioria dos ACGs, a δ 7,18 ou δ 6,98 em CDCl_3 . Desta forma, Bonneau et al. 2016 desenvolveram um método simples, preciso e específico para quantificação do conteúdo de ACGs, o qual foi validado para aplicação em extratos brutos de polpa de frutas.
- Riesier e seus colaboradores, em 1992, também utilizaram a técnica, neste caso para determinar a configuração absoluta dos centros carbinólicos estereogênicos em nove acetogeninas através de uma cuidadosa análise dos espectros ^1H e ^{19}F RMN de derivados (S) e (R) do éster de Mosher [metóxi (trifluorometil) fenilacetato ou MTPA]. Foi determinada a configuração absoluta de cinco acetogeninas bis-THF adjacentes (uvaricina, bullatacina, bullatacinona, asimicina e rolliniastatina 1) e quatro acetogeninas mono-THF (reticulatacina, isoannonacin-10-ona, annonacin-10-ona e annonacin). Também foi observado que o centro carbinólico (C-4) em todas as acetogeninas biologicamente mais significativas examinadas no trabalho de Riesier et

al. (1992) possui configuração R. Eles demonstraram que a análise de dados de RMN de ^1H e ^{19}F de átomos em torno do centro carbinólico é sempre uma estratégia válida para atribuir uma configuração absoluta em qualquer um dos centros carbinólicos, dada a disponibilidade de compostos modelo adequados de configuração absoluta conhecida. O autor ressalta ainda, que a interpretação dos dados de RMN de flúor, no entanto, deve ser realizada com cautela, muito embora existam tendências claramente identificáveis entre os dados de flúor, e que eles sejam eles indicativos de R ou S absoluto.

Além dos trabalhos citados anteriormente, existem diversas outras publicações relacionadas à aplicação da RMN na elucidação e propostas de rotas sintéticas na obtenção de acetogeninas (Bermejo et al. 2005; Marshall e Chen, 1997).

4. METODOLOGIA

4.1. MATERIAIS, MÉTODOS E INSTRUMENTOS.

4.1.1. Amostras estudadas

4.1.1.1. Frações da Annona Mucosa

Os extratos foram obtidos pelos alunos de Emerson Ferreira (Doutorado em Proteção de Plantas) e Marilza Costa (Mestrado em Ciências Biológica), no Laboratório de Síntese e Pesquisas em Recursos Naturais do Instituto de Química e Biotecnologia.

Foram estudadas quatro amostras codificadas como AM2, AM3, LC2 e LC1.

4.1.2. Solventes e reagentes

Solventes

Os solventes, utilizados neste trabalho, foram previamente destilados a partir de solvente de grau comercial.

Solventes deuterados

CDCl_3

Reagentes: Piridina ($\text{C}_5\text{H}_5\text{N}$), Anidrido acético ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$), Ácido clorídrico (HCl), Ácido sulfúrico (H_2SO_4), Hidróxido de sódio (NaOH), Sulfato de Sódio (Na_2SO_4), Vanilina ($\text{C}_8\text{H}_8\text{O}_3$) e Bicarbonato de sódio (NaHCO_3).

4.1.3. Coluna cromatográfica em gel de sephadex LH 20

O gel de sephadex foi adquirido da Pharmacia Fine Chemicals e foi mantido em contato com o metanol por 24 horas. Após empacotado em coluna de vidro foi deixado para sedimentação total por cerca de 30 horas. As amostras foram dissolvidas em quantidade suficiente da fase móvel (metanol) e então aplicadas suavemente no topo da coluna, com o solvente (metanol) utilizado na eluição.

4.1.4 Ressonância Magnética nuclear

Todos os experimentos de RMN foram realizados em espectrômetro Bruker de 9,4 Tesla, modelo Avance 400 (400,13 MHz para frequência do hidrogênio e 100,03 MHz para carbono), localizado no Laboratório de RMN do Instituto de Química e Biotecnologia da UFAL, utilizando sonda com detecção inversa (BBI) para tubos de RMN de 5,0 mm de

diâmetro externo e bobinas geradoras de gradiente de campo na coordenada z. Os deslocamentos químicos (δ) foram referenciados pelos sinais do solvente deuterado e foram obtidos em parte por milhão (ppm), enquanto as constantes de acoplamento (J) foram obtidas em Hertz (Hz).

Para a realização dos experimentos de RMN, cerca de 20,0 mg de cada amostra foram solubilizados em 0,6 mL de clorofórmio deuterado (CDCl_3). O processamento dos espectros de RMN foi realizado utilizando-se o programa TOPSPIN (Bruker), versões 1.3 e 2.1. As estruturas químicas foram desenhadas com o uso do programa ChemDraw Ultra 6.0, enquanto os valores teóricos das distâncias internucleares e a otimização das estruturas químicas foram determinados através do programa Chem3D Ultra 6.0.

4.1.4.1 Parâmetros de aquisição e processamento dos dados de RMN

A sequência de pulsos convencional de ^1H utilizada para os experimentos foi a zg30, com a aplicação de pulsos de 30° , visando uma recuperação rápida da magnetização do núcleo. Foram realizadas 32 varreduras (NS = Número de Pulsos), com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,0 segundo, tempo de aquisição (AQ) de 4,5351 s com 64k pontos durante a aquisição (TD) (1K corresponde a 1024 pontos), 32k pontos para o processamento (SI).

Para a elucidação das estruturas dos compostos foram utilizados os experimentos de RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 135, APT, HSQC, HMBC, COSY e J-resolvido. A seguir estão descritos os parâmetros de aquisição e processamento dos experimentos realizados neste trabalho:

- ^{13}C : foram realizados com o programa de pulsos zgpg30, com 16k varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 1,366 s, com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2,0 s e número de pontos na aquisição (TD) de 64k. O processamento foi realizado com 32k pontos (SI).
- DEPT 90: foi realizado com o programa de pulsos 90, com 12k varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 1,366 s, com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2,0 s e número de pontos na aquisição (TD) de 64k. O processamento foi realizado com 32k pontos (SI), utilizando-se uma multiplicação exponencial com um $\text{lb} = 2 \text{ Hz}$.
- DEPT 135: foi realizado com o programa de pulsos dept135, com 13k varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 1,366 s, com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2,0 s e número de pontos na aquisição (TD) de 64k. O

processamento foi realizado com 32k pontos (SI), utilizando-se uma multiplicação exponencial com um $\text{lb} = 2 \text{ Hz}$.

- HSQC: foi realizado com o programa de pulsos `hsqcetgps`, com largura espectral em F2 (SWF2) de 5341.88 Hz e em F1 (SWF1) 20127.88 Hz, com 16 varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 0,383 s, tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,5 s e número de pontos na aquisição de 4k em F2 (TDF2) e 1k em F1 (TDF1), ou seja, foram acumulados 1024 FIDs. No processamento foram utilizados 1k pontos em F2 (SI2) e F1 (SI1).
- HMBC: foi realizado com o programa de pulsos `hmbcgp1pndqf`, com largura espectral em F2 (SWF2) de 5208.33 Hz e em F1 (SWF1) 22351.74 Hz, com 16 varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 0,393 s, tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,5 s, tempo de espera de observação à longa distância (d6) de 65,0 ms e número de pontos na aquisição de 4k em F2 (TDF2) e 1k em F1 (TDF1). No processamento foram utilizados 2k pontos em F2 (SI2) e 1k pontos em F1 (SI1).
- COSY: foi realizado com o programa de pulsos `cosygpqf`, com largura espectral em F2 (SWF2) de 5341.88 Hz e em F1 (SWF1) 5342.815 Hz, com 16 varreduras (NS), com tempo de aquisição (AQ) de 0,191 s, tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 1,48 s e número de pontos na aquisição de 2k em F2 (TDF2) e 512 em F1 (TDF1). No processamento foram utilizados 1k pontos em F2 (SI2) e em F1 (SI1).
- J-resolvido: foi realizado com o programa de pulsos `jresgpqrqf`, com largura espectral em F2 (SWF2) de 8012.82 Hz, com 16 varreduras (NS), tempo de aquisição (AQ) de 1,27 s, com tempo de espera entre cada aquisição (d1) de 2,0 s, número de pontos na aquisição de 2k em F2 (TDF2) e 256 em F1 (TDF1) e tempo de mistura (d8) de 500 ms. No processamento foram utilizados 1k pontos em F2 (SI2) e em F1 (SI1).
- DOSY 2D: foi realizado com as seqüências de pulsos `ledbpgp2s`, todas as medidas de difusão foram obtidas empregando-se larguras espectrais (SW) de 1000 Hz. A rampa de gradiente foi ajustada entre 2 ($1,07 \text{ G}\cdot\text{mm}^{-1}$) a 95% ($50,8 \text{ G}\cdot\text{mm}^{-1}$) da potência total do amplificador do gradiente, em intervalos equidistantes. Tempo de aplicação do pulso de gradiente (d/2) foi ajustado (de 1 a 5 ms) para que cerca de 5% da intensidade dos sinais permanecesse ao final do experimento. O processamento dos espectros DOSY foi realizado utilizando-se o programa Topspin 1.3 e Dynamics Center 2.2.4.

4.1.4.2 Análises de RMN das amostras

- i. Antes de iniciar o processo de purificação das mostras, as mesmas foram submetidas às análises de RMN.
- ii. Foram realizados os seguintes experimentos: H^1 , DOSY 1D e 2D, Jresolvido e C^{13} .
- iii. Com base na análise dos espectros de RMN, foi dado início ao processo de purificação das amostras. As amostras submetidas à purificação foram aquelas que apresentavam sinais (RMN 1H e ^{13}C) característicos de ACG.

4.2 Purificação das amostras

- i. 30 vidros transparentes (8 mL) secos e limpos, foram pesados e etiquetados.
- ii. Antes de cada processo de purificação, foi feita a limpeza do sephadex através da eluição do solvente utilizado como fase móvel.
- iii. As subfrações coletadas, foram deixadas na capela por 3 dias para a evaporação do solvente;
- iv. Após a evaporação do solvente as amostras foram armazenadas por uma semana em dessecador, para a eliminação de qualquer resíduo de solvente e umidade.
- v. As subfrações foram unidas por análise comparativa dos espectros de RMN 1H e/ou ^{13}C .
- iv. As amostras obtidas da última purificação, foram submetidas a experimentos de RMN 1D e 2D: 1H , ^{13}C , DEPT 135, APT, COSY, HSQC e HMBC.
- vi. Os dados foram coletados e processados para posterior elucidação das estruturas dos compostos obtidos.

4.2.1 Purificação da amostra: AM2

AM2			
Purificação	Número de subfrações	RMN ^1H e ^{13}C	Unidas
1	30	14,17 e 21	14 a 21
2	30	15, 18 e 20	15 a 20
3	30	16,18 e 20	16 a 20
4	30	19	17 a 20
5	30	16 (cera branca) AM2	Massa obtida: 130 mg

4.2.2 Purificação da amostra: AM3

AM3			
Purificação	Número de subfrações	RMN ^1H e ^{13}C	Unidas
1	30	15,18 e 21	15 a 22
2	30	18 e 20	16 a 20
3	30	19 e 20	18 a 20
4	30	19	17-20
5	30	18 (oleoso verde claro) (AM3)	18
			Massa obtida: 450 mg

4.2.3 Purificação da amostra: LC2

LC2			
Purificação	Número de subfrações	RMN ^1H e ^{13}C	Unidas
1	30	13 a 17	13 a 15
2	30	12, 13 e 14	12, 13 e 14
3	36 (1 mL cada)	32	32 (cera quase branca)(LC2)
Massa obtida: 50 mg			

4.2.4 Purificação da amostra: LC1

LC1			
Purificação	Número de subfrações	RMN ^1H e ^{13}C	Unidas
1	30	15,18 e 21	17 a 22
2	30	19 e 20	18 a 20
3	30	32 (cera quase branca)(LC1)	19 e 20

Após a realização de purificação das amostras, foram executados experimentos de RMN 1D e 2D.

Reações de acetilação foram realizadas, para as amostras AM2 e AM3, a fim de confirmar, inequivocamente, o número de grupos hidroxila (OH).

4.3. REAÇÃO DE ACETILAÇÃO DAS SUBSTÂNCIAS AM2 E AM3

Em um balão de fundo redondo, adicionou-se à 40 mg da substância (AM1 ou AM2), 0,5 mL de piridina e em seguida 10 mL de anidrido acético. A mistura permaneceu em repouso por 72 horas à temperatura ambiente. A mistura reacional foi vertida em gelo picado em um béquer, no qual foi adicionado ácido clorídrico a 5% e deixou-se em contato por uma hora para a completa hidrólise do anidrido acético. A solução resultante foi submetida à extração com clorofórmio (3 x 50 mL). A solução clorofórmica foi lavada com solução de ácido clorídrico 5% (3 x 50 mL) para eliminar o excesso de piridina e depois lavada novamente com água destilada (3 x 50 mL). O excesso de ácido foi removido pela lavagem com bicarbonato de sódio a 2,5% (3 x 50 mL) seguindo-se a lavagem com água (3 x 50 mL). Após a secagem com Na₂SO₄ (Sulfato de Sódio), o material foi filtrado e o solvente removido à pressão reduzida, obtendo-se o derivado, o peracetilado. Esse derivado foi submetido à coluna cromatográfica de sílica para remoção das impurezas, e após a secagem do solvente obteve-se um material transparente e de aspecto oleoso (ANEXO 1).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

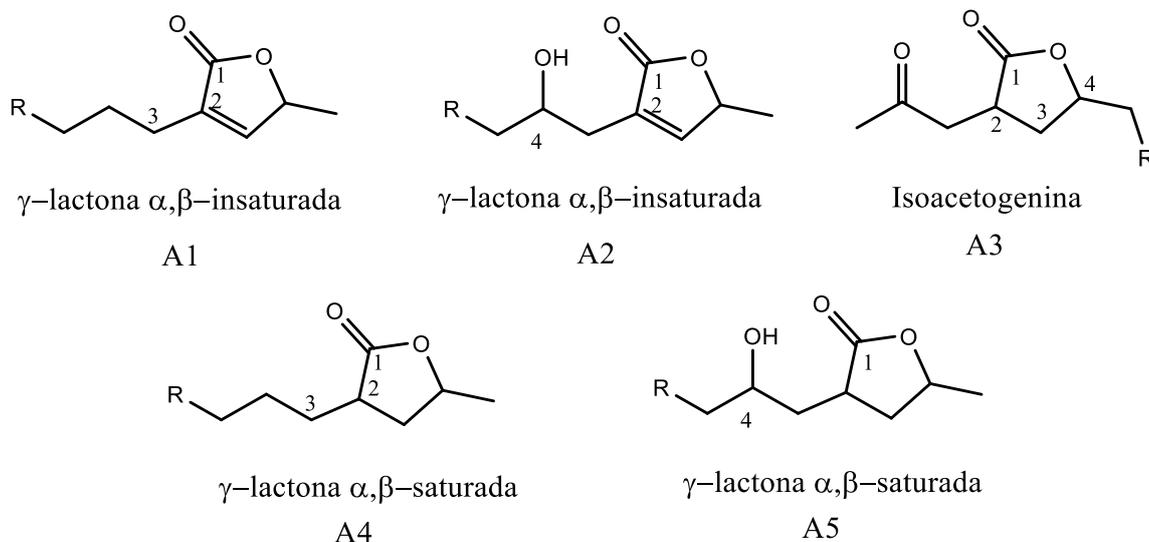
5.1 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS ACETOGENINAS

A elucidação estrutural completa das acetogeninas de annonáceas não é um assunto trivial. Métodos clássicos como UV, IR, espectroscopia RMN 1D e 2D e espectrometria de massas têm sido essenciais na identificação das subunidades estruturais (anéis de γ -lactona, tetrahydrofurano e tetrahydropirano). Como mencionado anteriormente, a natureza cerosa e amorfa desses compostos os tornam inadequados para estudos de difração por raios X diretos e, como as acetogeninas são difíceis de converter em derivados cristalinos que são adequados para a análise de raios X, outros métodos têm sido usados para prever a estereoquímica.

A ocorrência de ACGs pode ser identificada pela presença de alguns grupos funcionais característicos de suas estruturas, como sinais de RMN de ^{13}C de carboxilas de anéis lactônicos, observados na região em torno de 170 ppm, carbonos α e β -carbonílicos, que apresentam deslocamentos em torno de 130 e 150 ppm, respectivamente, CH de epóxidos, THF e THP observados entre 60 e 80 ppm, além da presença de CH_2 de cadeias alquílicas na região de 22 a 29 ppm.

As subunidades características lactona (A1 – A5, Figura 33), presentes em todas as acetogeninas, podem ser diferenciada, por dados de UV, IR, RMN ^1H e RMN ^{13}C , assim como a conversão química. Como a conjugação é mínima, a espectroscopia UV não é muito útil; o espectro, no entanto, fornece informações úteis para distinguir entre as porções lactona saturada (1770 cm^{-1}) e insaturada (1745 cm^{-1}), também possível se observar através de dados de RMN ^1H e RMN ^{13}C como é mostrado na Tabela 4. Nesse trabalho foram identificados os esqueletos carbônicos de duas acetogeninas e dois esqueletos ainda em fase de identificação contendo as subunidades lactona A1, A2 e A3.

Figura 33 - Tipos de subunidades γ -lactona mais comuns, em acetogeninas de anonáceas.



Fonte: Autora, 2018.

Os deslocamentos químicos nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C para as subunidades γ -lactona mais comuns são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Deslocamentos químicos de ^1H -RMN e ^{13}C -RMN para as subunidades γ -lactona.

Carbono	A1 (δ -RMN)		A2(δ -RMN)		A3(δ - RMN)		A4(δ -RMN)		A5(δ -RMN)	
	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C	^1H	^{13}C
C1	-	173,7	-	174,6	-	178,73*	-	175,0	-	177
C2	-	134,6	-	131,1	2,8 m	78,86*	-	131,1	2,62-2,25 dt	29,8
C3	2,26	25,3	2,51 m 2,38 m	37,4	1,70 1,4	34,41	2,40 t	25,2	2,62-2,25 m	36,7
C4	\leq 1,55m	27,5	3,86 m	69,9	4,5m*	44,18*	1,69 m	25,5	4,21-345 m	69,9
C35/36/37	6,99 q	148,7	7,17 d	151,8	1,93 dd 2,53 dd	35,42	7,05 d	151,5	2,62-2,25	37,8
C36/37/38	4,99 qd	77,3	5,05 q	78	-	205,44	5,06 dq	77,8	4,53dd	78,6
C37/38/39	1,41d	19,3	1,41d	19,1	1,55s	24,46	1,43d	19,1	1,36d	19,9

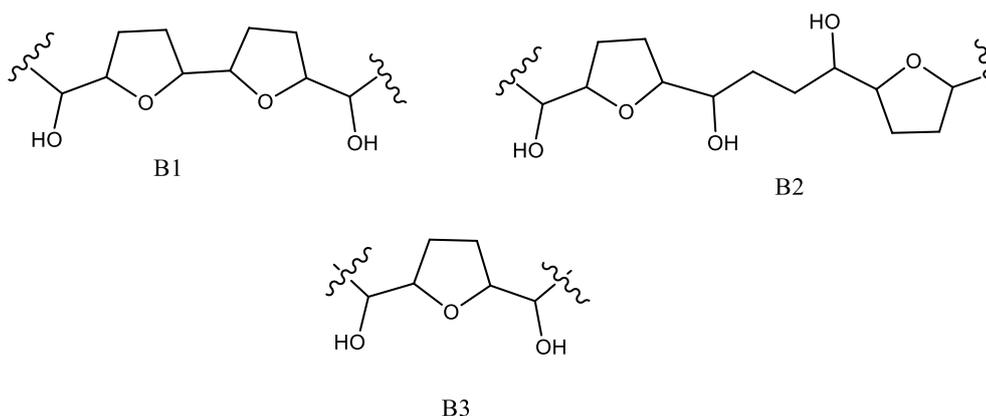
Adaptado de: RUPPRECHT et al, 1990.

A existência de anéis de THF com grupos hidroxila (OH) adjacentes dentro desta classe de compostos é evidente pela presença de sinais característicos no espectro de RMN

^{13}C devido a carbonos hidroxilados na região de $\delta 71$ a 75 e os carbonos oxigenados no intervalo de $\delta 79$ a 84 correspondendo aos carbonos tetrahidrofurano oxigenados. Estes sinais e as suas correspondentes sinais no espectro de RMN ^1H de $\delta 3,3$ a $4,1$ ppm são também indicativos das porções di-hidroxil-THF. As acetogeninas clássicas possuem três tipos diferentes de subunidades de tetrahidrofurano (B1-B3, Figura 34).

Estas subunidades são facilmente diferenciadas pelos seus sinais de RMN ^{13}C ; os do tipo B1 têm quatro sinais entre $\delta 81$ e 83 ppm. O tipo B2 possui apenas três ressonâncias nesta faixa, assim como uma quarta ressonância, superior a $\delta 79$ ppm, que é indicativo do carbono de THF oxigenado sem um grupo hidroxila adjacente. Os tipos B3 têm apenas dois sinais de RMN ^{13}C no intervalo $\delta 81$ - 83 ppm.

Figura 34 - Subunidades THF mais comuns nas acetogeninas de anonáceas.



Fonte: Autora, 2018.

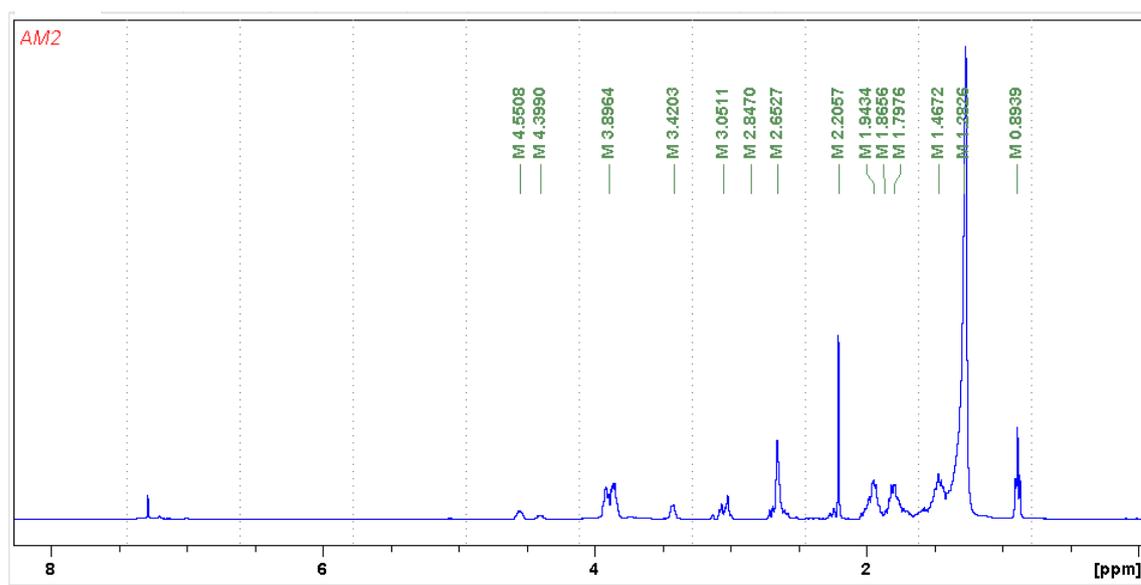
5.1.1 Identificação estrutural da substância codificada como AM2

A substância AM2 foi obtida da fração clorofórmica das sementes da *annona mucosa* na forma de um sólido branco de aspecto ceroso.

A análise do espectro de RMN de hidrogênio (Figura 35) possibilitou a observação da ausência de sinais característicos de anel γ -lactona α,β insaturado, na região de $7,18$ e $5,06$ ppm e a presença de picos em $4,40$ e o outro em $4,54$ ppm (H-4), $2,20$ ppm (H-39) e entre $3,11$ e $2,00$ ppm (H-2, 3 e 37), sugerindo a presença da subunidade γ -lactona do tipo A3 (subunidade A3, Figura 33). A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 36) sugeriu uma mistura de isoacetogeninas, por apresentar pares de valores de ressonâncias em $\delta 178,9/178,2$ (C-1), $\delta 34,6/36,9$ (C-2), $\delta 43,4 /44,03$ (C-37), $\delta 79,5/79,1$ (C-4) e $\delta 205,7/205,6$ (C-38) (DURET et al, 1999). A presença de sinais com deslocamentos químicos $\delta 81,3$, $\delta 81,2$; δ

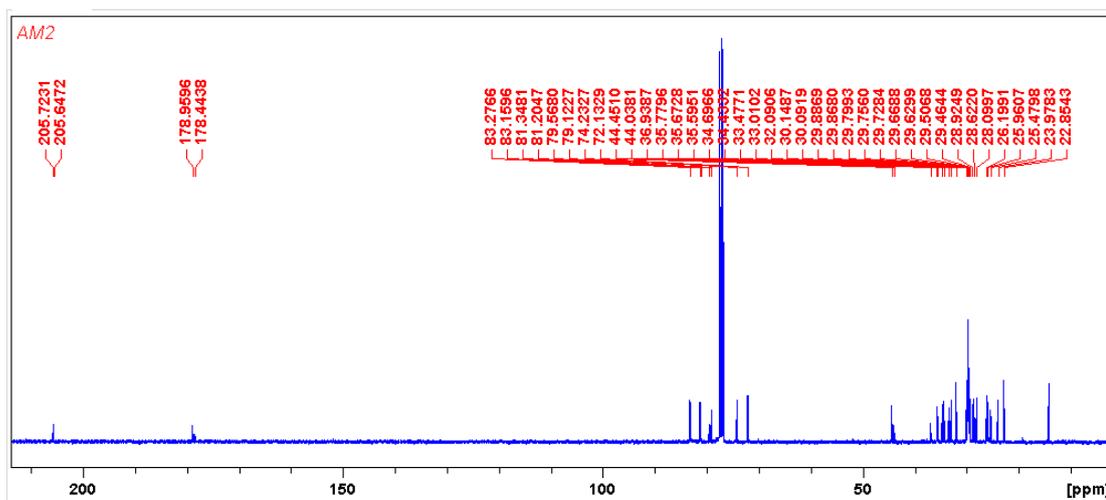
83,2 e δ 83,1 são atribuídos a carbonos hidrogenados (DEPT 135) e indicam a presença de dois anéis THF. Os sinais em δ 72,1 e δ 74,2 referem-se aos carbonos monoidrogenados ligados aos dois grupos hidroxilas presentes na molécula. Após a análise de correlação dos espectros HMBC e HSQC foi possível confirmar que os grupos OH estão ligados aos carbonos α aos anéis THF. Os deslocamentos químicos referentes aos demais carbonos diidrogenados encontram-se na faixa de δ 22,8 a 35,7, e os sinais com deslocamentos químicos em δ 14,2 e 30,09 são atribuídos aos carbonos metilênicos, de acordo com a análise do espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135 (Figura 37). Os dados de RMN da substância AM2 encontram-se na Tabela 5, os quais foram comparados com os dados RMN ^1H e ^{13}C da 2,4 – *cis/trans*- Isororolliniastatina-1 (Figura 42). O número de hidroxilas presentes na molécula foi confirmado, após a realização de reação de acetilação e posterior comparação dos espectros de ^{13}C da substância de partida e do produto da acetilação (peracetilado).

Figura 35 - Espectro de RMN de H^1 em CDCl_3 da substância AM2.



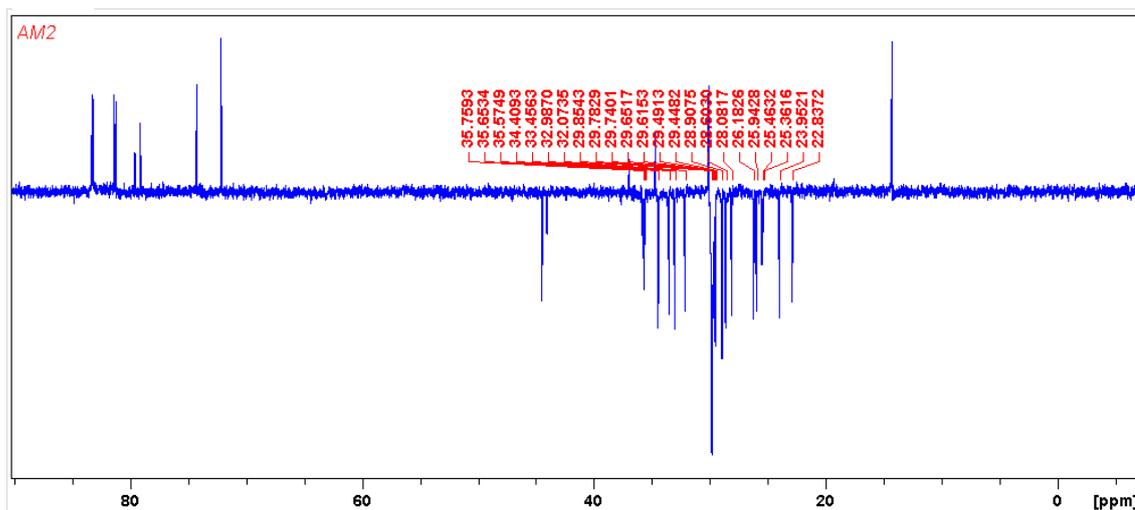
Fonte: Autora, 2018.

Figura 36 - Espectro de RMN de C^{13} em $CDCl_3$ da substância AM2.



Fonte: Autora, 2018.

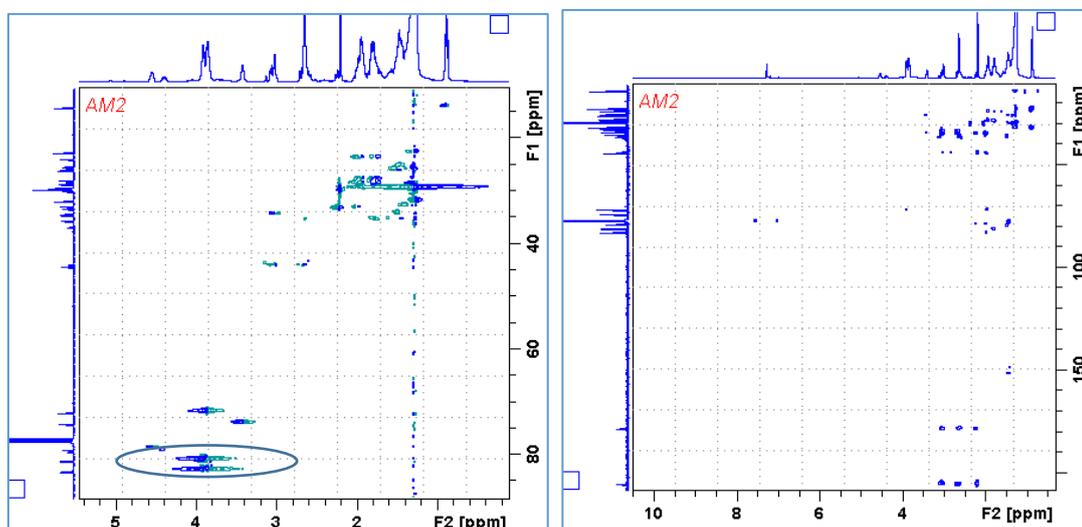
Figura 37 - Espectro de RMN de C^{13} DEPT 135 em $CDCl_3$ da substância AM2.



Fonte: Autora, 2018.

A análise dos espectros de HSQC e HMBC (Figura 38) apresentaram os sinais de correlação direta e à longa distância, respectivamente, entre os átomos de carbonos e hidrogênios e permitindo, assim, em conjunto com os dados de acoplamentos spin-spin (COSY) a confirmação da subunidade lactona do tipo A3, bem como a existência de anel bis-THF adjacentes e os dois grupos hidróxilas em carbonos adjacentes.

Figura 38 - Espectros de RMN 2D HSQC e HMBC para a substância AM2, em CDCl₃, com os sinais de correlação direta ¹H-¹³C para os anéis bis-THF em evidência.



Fonte: Autora, 2018.

Tabela 5 - Dados de RMN das substâncias AM2 e 2,4 – cis/trans- Isororolliniastatina-1.

Carbono	Substância AM2		2,4 – cis/trans- Isororolliniastatina-1 [*]		Carbono
	$\delta^1\text{H}$ (ppm); multiplicidade J (Hz) ^b	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ^a	$\delta^1\text{H}$ (ppm); multiplicidade J (Hz) ^b	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm) ^a	
1	-	178,9/178,23*	-	178,8/178,3*	1
2	1,9 dt	34,67/36,9*	3,15-2,95 m	34,6/36,6*	2
3	1,8 m	35,7	2,10-1,85	35,5	3
4	*4,55/ 4,40 m	79,12/79,55*	4,52/4,36*	79,3/78,9*	4
5	1,8 m	33,4	1,2-3,44m	35,5 – 2,6 (CH ₂)	5-14
6-13 (8-CH ₂)	1,26-2,00 m	29,79-23,97			
14	1,46 m	34,56			
15	3,43 m	74,0	3,45 m	74,08	15
16	3,8 m	83,2	3,8 m	83,0	16
17	1,9 m	28,7	1,2-3,44 m	35,5 – 2,6 (CH ₂)	17
18	1,8 m	28,09			18
19	3,8 m	81,3	3,8 m	81,1	19
20	3,8 m	81,2	3,8 m	81,0	20
21	1,8 m	28,09	1,2-3,44 m	35,5 – 2,6	21

22	1,9 m	28,4		(CH ₂)	22
23	3,9 m	82,9	3,8 m	83,0	23
24	3,8 m	71,9	3,8 m	71,34	24
25	1,23 m	32,98	1,21-3,44 m	35,5 – 2,6 (CH ₂)	5-14 25-33
26-32 (7 – CH ₂)	1,26-2,00 m	29,86-23,97			
33	1,26 m	29,88			
34	1,3 m	32,07			
35	1,27 m	22,85			
36	0,89 t	14,0	0,87 t	14,1	34
37	2,8 m (td)	44,03/44,45*	2,5-3,15 m	44,2/43,7*	35
38	-	205,6/205,7*	-	205,5	36
39	2,2 s	30,1	2,2 s	CH ₃	37

dt = duplo-triplete, m = multiplete, s = simpleto, t = triplete, td= triplo-duplete

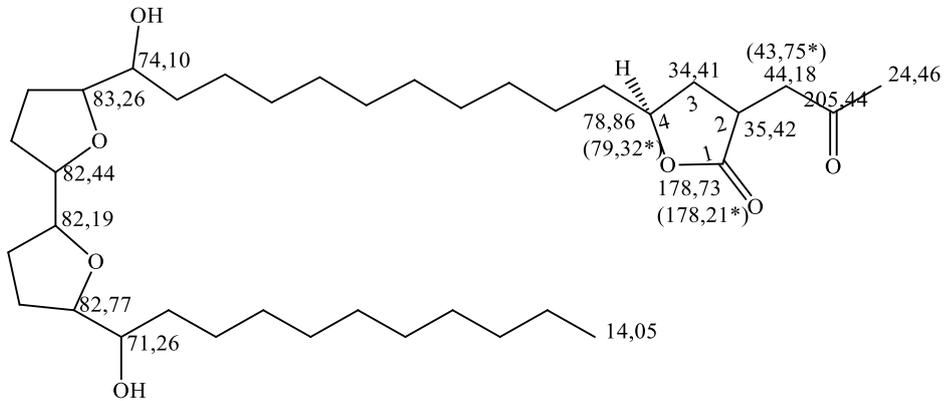
a: 100 MHz, CDCl₃.; b: 400 MHz, CDCl₃.; c: 200 MHz, CDCl₃.; d: 50 MHz, CDCl₃ (RUPPRECHT et al*, 1989; DURET et al. *, 1999). Fonte: Autora, 2018.

Para a substância **AM2** foi possível deduzir, pela análise do espectro de RMN ¹³C, a presença de 39 átomos de carbono com fórmula molecular C₃₉H₇₀O₇ e o seu espectro de massas indicou um massa molecular de 644. Logo, o composto trata-se de uma isoacetogenina natural, o qual é uma mistura de estereoisômeros em C-2, incomum na natureza. A bullatacinona (Figura 39), isolada por HUI et al. 1989, a partir do extrato etanólico da casca da *Annona bullata* é um exemplo de isoacetogenina bis THF que apresenta atividade citotóxica em células tumorais KB (Carcinoma epidermoide nasofaríngeal humano; IC₅₀ < 10⁻¹² µg/ mL). As acetogeninas pertencentes a estes subtipos podem ser consideradas artefatos derivados de 4-hidroxi acetogeninas por rearranjo em meio alcalino (DOWNUM et al., 2013). Até o momento não foram encontrados relatos na literatura de isoacetogeninas com 39 átomos de carbonos, o que nos permite concluir que a substância AM2 é inédita na literatura.

Através da integração dos sinais do hidrogênio 2 (H-2) (Figura 40) de cada um dos isômeros, foi possível ainda, quantificar os isômeros em uma proporção de 2:1. Logo, é possível afirmar que existem 66,7% do isômero cujo valor de deslocamento químico é δ 4,5, (H-4) e para o outro isômero existem 33,3% em quantidade de moléculas. O esqueleto de carbono proposto para a substância, a qual foi codificada como AM2, encontra-se na figura 41.

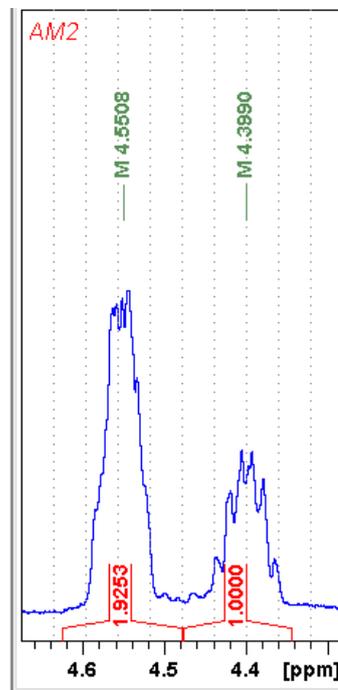
Vale lembrar, que a fim de confirmar a posição dos substituintes ao longo do esqueleto de carbono, é necessário que se faça um estudo do espectro de massas da molécula.

Figura 39 - Estrutura molecular da bullatacinona, uma isoacetogenina bis-THF adjacentes.



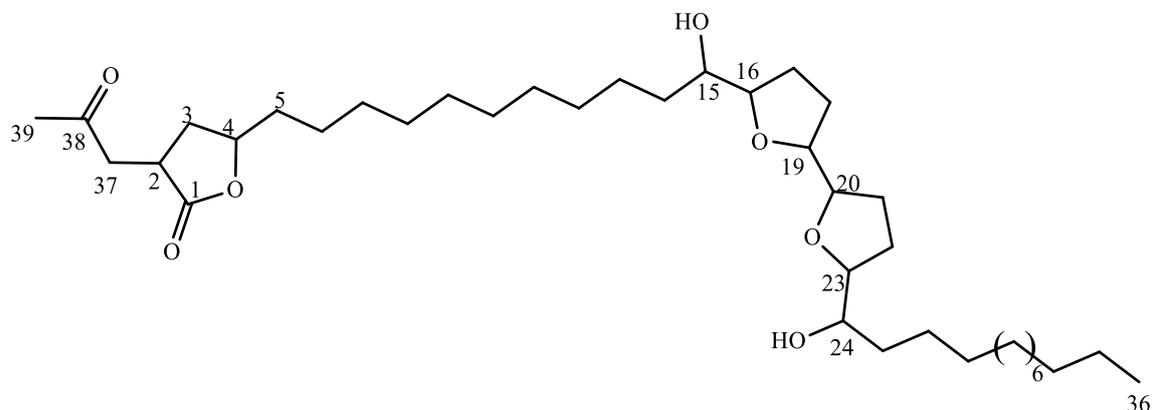
Fonte: Rupprecht et al.,1989.

Figura 40 - Região do espectro de RMN ^1H em que os sinais do hidrogênio 2 são integrados e mostram uma proporção de 2:1 entre as isoacetogeninas.



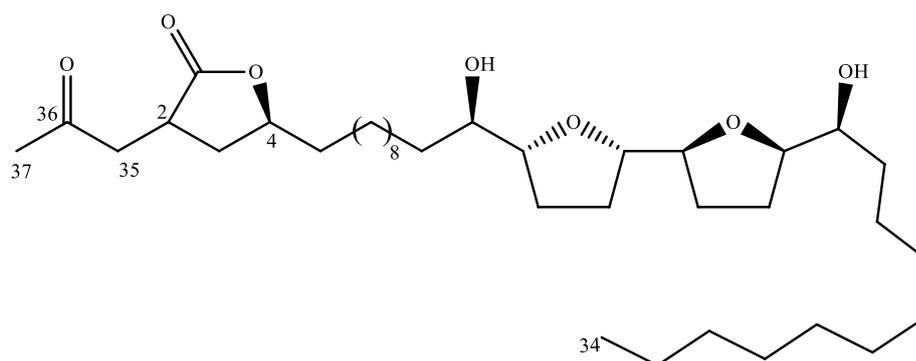
Fonte: Autora, 2018.

Figura 41 - Esqueleto carbônico dos isômeros (2,4-*cis* e 2,4-*trans*) presentes na substância AM2 (39 carbonos), isoacetogenina bis-THF adjacentes.



Fonte: Duret et al., 1999.

Figura 42 - Estrutura molecular das substâncias 2,4 – *cis/trans*- Isororolliniastatina-1 (37 carbonos), isoacetogenina bis-THF adjacentes.



Fonte: Duret et al., 1999.

5.1.2. Identificação estrutural da acetogenina codificada como AM3

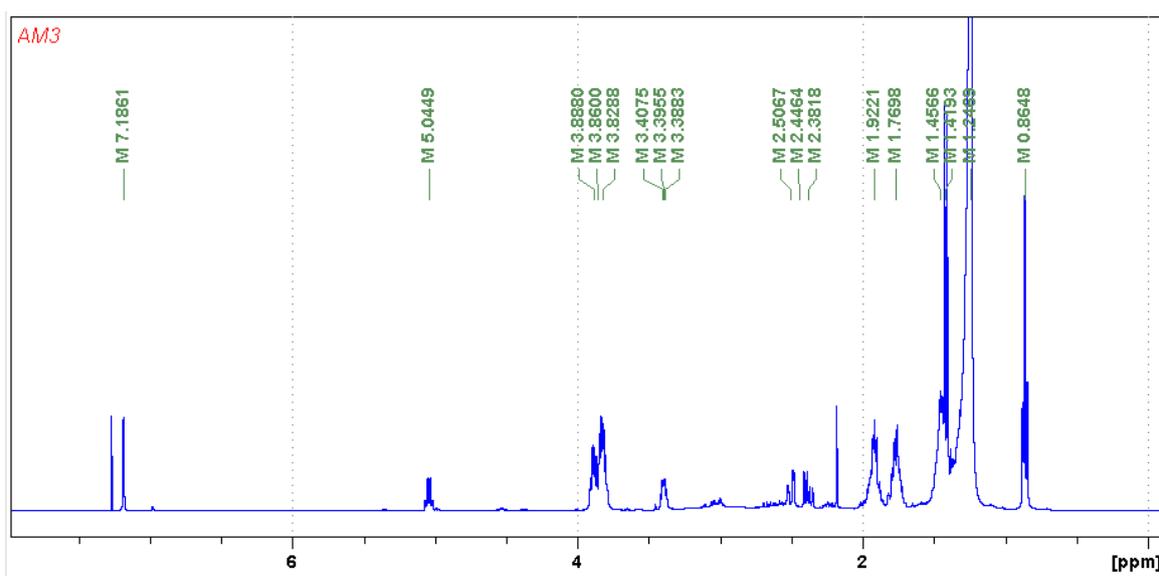
A substância AM3 se apresenta como um óleo esverdeado e pouco viscoso. A análise do espectro de RMN ^1H , (Figura 35) revelou a presença de sinais em: δ 7,18 (d; $J = 1,25$ Hz; 1H); δ 5,04 (qd; $J = 1,4$ Hz; 1H; $J = 6,86$ Hz; 1H); δ 1,41 (d; $J = 1,4$ Hz; 1H; $J = 6,86$ Hz; 3H). Tais sinais permitiram a confirmação da subunidade γ -lactona α,β -insaturada das acetogeninas (CAVÊ et al., 1992). Outros sinais foram observados na região entre δ 3,82 e δ 3,88 m (5H) e de δ 3,38 a δ 3,40 m (2H); estes sinais foram atribuídos aos hidrogênios ligados a carbonos

hidroxilados. O espectro apresentou ainda, sinais em δ 2,38 e δ 2,5 (2H); δ 1,76 a δ 1,92 (8H). Na faixa de δ 1,5 a δ 1,2 o espectro apresentou sinais referentes aos grupos metilênicos (CH_2) de cadeia hidrocarbônica. O sinal observado como um tripleto em δ 0,86 ($J = 7,0$ Hz; 3H) foi atribuído ao grupo metila terminal da cadeia alifática.

A análise dos espectros de RMN ^{13}C , DEPT 135, e HMBC (Figuras 36, 37 e 39) possibilitou deduzir um total de 36 átomos de carbono para a acetogenina AM3, os quais foram classificados como sendo: dois carbonos metílicos (CH_3); vinte e três carbonos metilênicos (CH_2); nove carbonos metínicos (CH) e dois carbonos não hidrogenados (um deles terciário C2 e o outro carbonílico C1). O sinal com deslocamento químico em δ 174,72 foi atribuído ao carbono de carbonila, e os sinais em δ 151,89 e δ 131,38 foram atribuídos a carbonos olefínicos e assim, foi possível confirmar, mais uma vez, a presença da subunidade γ -lactona α,β -insaturada.

A presença de dois anéis bis THF adjacentes também foi confirmada através dos sinais em δ 81,2; δ 81,3; δ 83,1 e δ 83,3. Os sinais de carbonos metínicos em: δ 74,19; δ 72,07 e δ 70,13; característicos de carbonos carbinólicos, permitiram sugerir a presença de três grupos hidroxilas (OH) na molécula. Já os carbonos com deslocamentos químicos na faixa de δ 22,8 a δ 37,5 são referentes a carbonos metilênicos (CH_2) e os deslocamentos químicos observados a δ 19,26 e δ 14,25 foram atribuídos a carbonos metínicos.

Figura 43 - Espectro de RMN de H^1 em CDCl_3 da substância AM3.

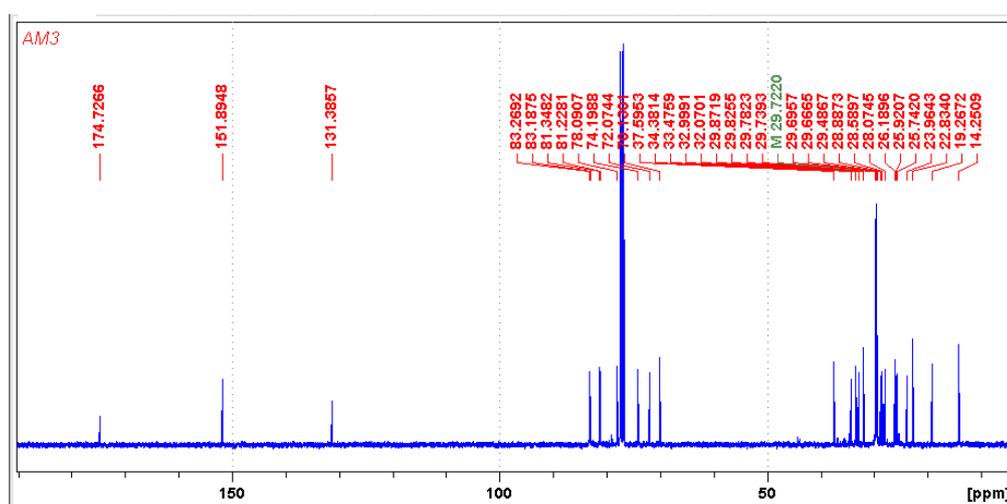


Fonte: Autora, 2018.

A análise do espectro RMN ^{13}C permitiu observar a presença de sete carbonos oxigenados. Quatro deles (δ 81,2; δ 81,3; δ 83,1 e δ 83,3.) foram atribuídos aos quatro carbonos oxigenados dos anéis THF. Estes sinais estão correlacionados com os sinais de hidrogênio da região de δ 3,82 a 3,88 observados na análise de correlação heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC) (Figura 46). Os outros três sinais (δ 74,19; δ 72,07 e δ 70,13) referem-se a carbonos hidroxilados secundários, que estão conectados com os hidrogênios em $\sim \delta$ 3,8; $\sim \delta$ 3,4 e $\sim \delta$ 2,4, respectivamente (Figura 43) (CAVÊ et al., 1992). A posição dos grupos hidroxilas foi definida com base nos dados de correlação obtidos nos espectros 1D e 2D. Os sinais dos carbonos olefínicos da γ -lactona em δ 151,89 (C-35) e δ 131,88 (C-2) sugerem a presença de hidroxila em C-4. Em ausência desta, o sinal de C-35 é observado em menor frequência ($\sim \delta$ 148,0). Os sinais correspondentes ao H-3 no espectro de RMN ^1H permitiu confirmar a presença da hidroxila em C-4 no qual foi observado um duplo duplete para H-3a em δ 2,50, um duplo duplete para H-3b em δ 2,40 e um multiplete para H-4 em δ 3,80, e pelos deslocamentos químicos de C-3 (δ 33,4) e C-4 (δ 70,1) no espectro de RMN ^{13}C . As atribuições desses sinais foram realizadas com base na análise conjunta dos espectros de correlação heteronuclear (HSQC e HMBC) e homonuclear (COSY) Figuras 48 e 49. Este último permitiu estabelecer uma correlação de H-3a e H-3b com H-4.

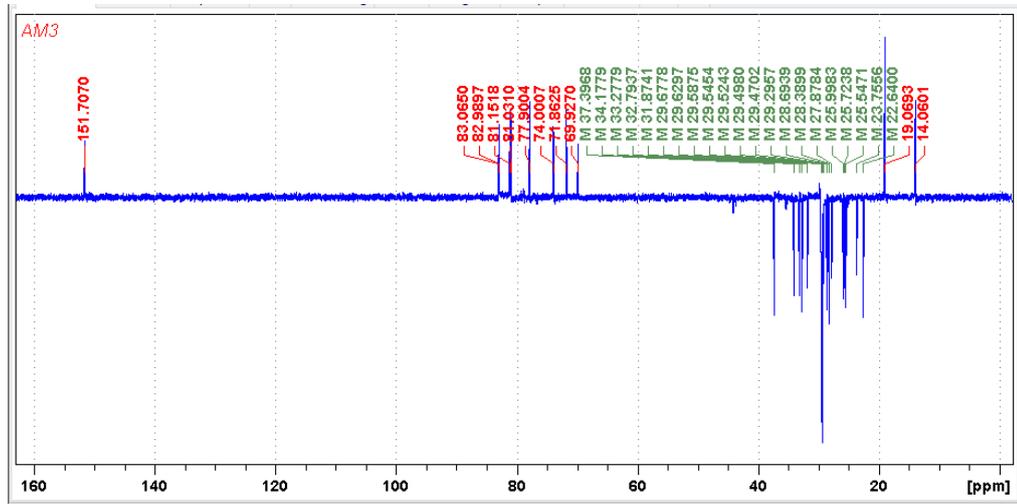
A análise conjunta dos dados de RMN 1D e 2D permitiu confirmar a presença de anel γ -lactona α,β -insaturado e a presença dos anéis bis THF adjacentes.

Figura 44 - Espectro de RMN de ^{13}C em CDCl_3 da substância AM3.



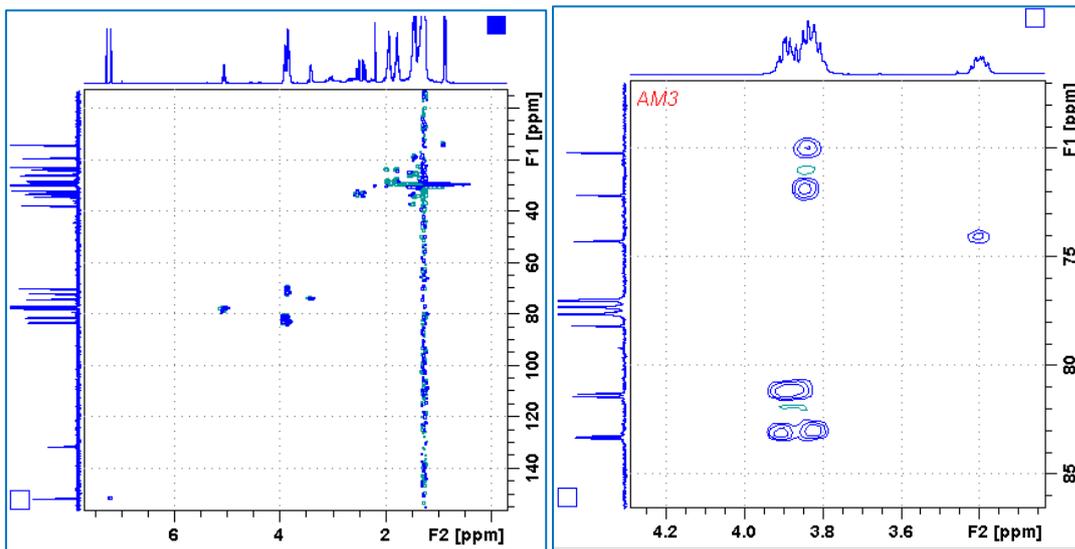
Fonte: Autora, 2018.

Figura 45 - Espectro de RMN DEPT 135 em CDCl_3 da substância AM3.



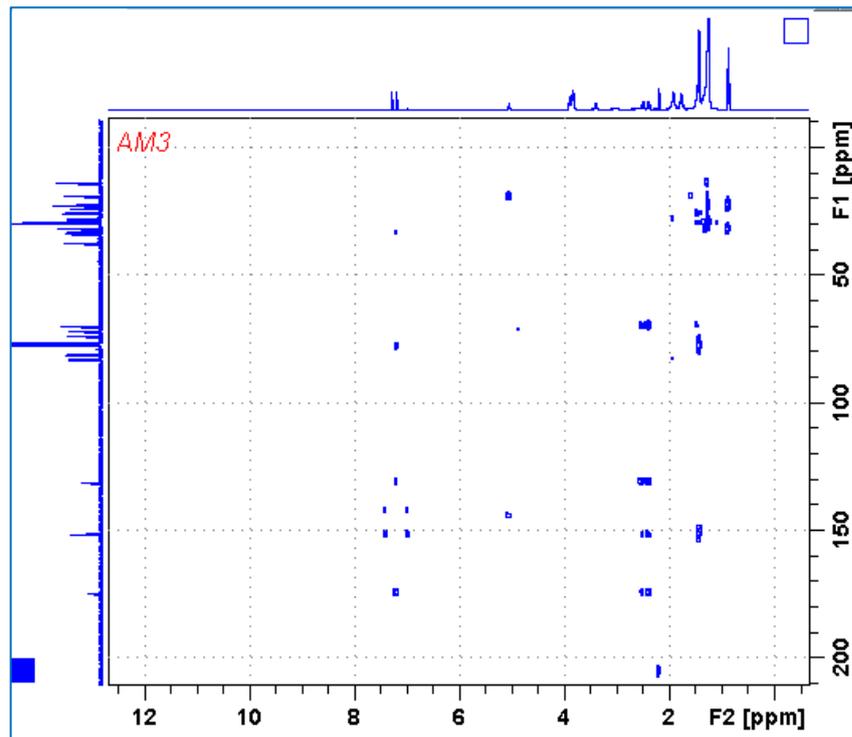
Fonte: Autora, 2018.

Figura 46 - Espectro de RMN 2D HSQC para a substância AM3, em CDCl_3 , com ampliação da região dos sinais de correlação direta ^1H - ^{13}C para os anéis bis-THF e os demais carbonos oxigenados.



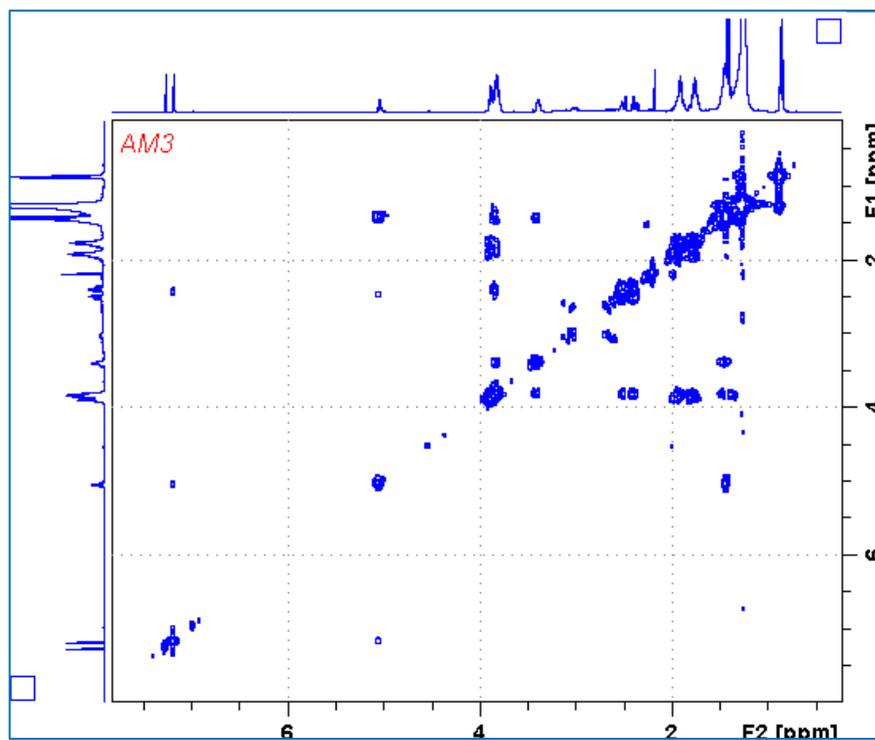
Fonte: Autora, 2018.

Figura 47 - Espectro de RMN HMBC para a substância AM3, em CDCl_3 .



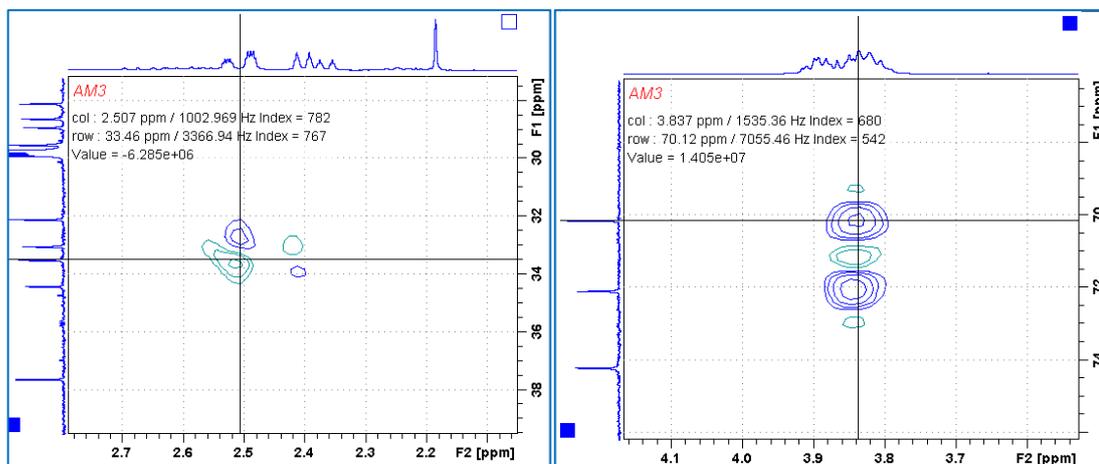
Fonte: Autora, 2018.

Figura 48 - Espectro de RMN COSY para a substância AM3, em CDCl_3 .



Fonte: Autora, 2018.

Figura 49 - Regiões do espectro de RMN HSQC com destaque para ligação direta do C-3 com H-3 e C-4 com H-4.



Fonte: Autora, 2018.

A fórmula molecular sugerida, pela análise dos dados de RMN, para a acetogenina codificada com AM3 foi definida como $C_{37}H_{66}O_7$. Porém devido à sobreposição de sinais observada no espectro de RMN ^{13}C (região de 29,5 a 29,9) foi realizado experimento de massa a fim de confirmar o número de átomos de carbono presente na molécula da AM3, onde o seu espectro de massas indicou uma massa molecular de 622.

Na tabela 6 está descrita a comparação dos dados de RMN 1H e ^{13}C da AM3 com os descritos na literatura para a Rolliniastatina-1 (Figura 51), os dados permitiram concluir que a AM3 possui o mesmo esqueleto carbônico desta acetogenina.

Tabela 6 - Dados de RMN das substâncias AM3 em comparação com os dados da Rolliniastatina-1.

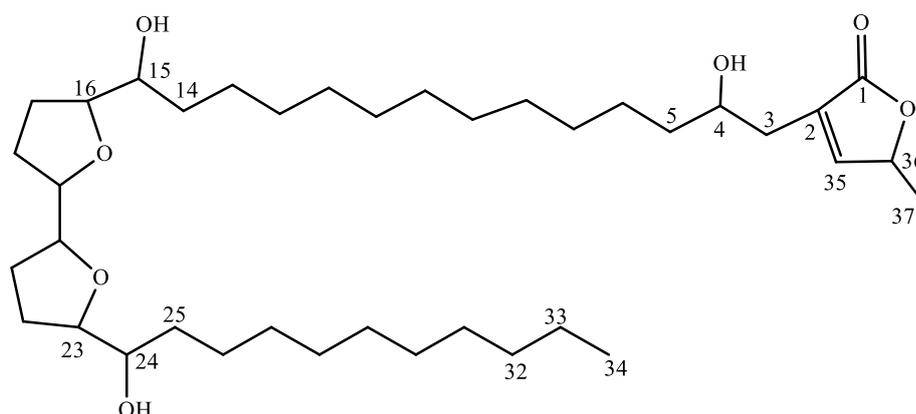
Carbono	Substância AM3		Rolliniastatina-1		Carbono
	$\delta^{13}C$ (ppm) ^a	δ^1H (ppm); multiplicidade J (Hz) ^b	$\delta^{13}C$ (ppm) ^a	δ^1H (ppm); multiplicidade J (Hz) ^b	
1	174,7	-	174,5	-	1
2	131,4	-	131,1	-	2
3	33,4	H3a - 2,5 m H3b - 2,4 m	33,2	H3a - 2,5 m H3b - 2,36 m	3
4	70,1	3,8 m	69,9	3,85 m	4
5	37,6	1,47 m	37,4	1,45 m	5

6	25,9	1,26 m	26,0	1,25 m	6
7-12	28,88 – 29,9	1,27 m	29,5- 29,3	1,25 m	7-12
13	26,18	1,25 m	25,7	1,25 m	13
14	34,4	1,43 m	34,1	1,5 m	14
15	74,2	3,4 m	74,0	3,38 m	15
16	83,1	3,8 m	83,0	3,85 m	16
17	28,58	1,76 m; 1,92 m	28,7	1,7 - 1,9 m	17
18	23,96	1,76 m; 1,92 m	28,8	1,7 - 1,9 m	18
19	81,3	3,8 m	81,1	3,85 m	19
20	81,2	3,8 m	81,0	3,85 m	20
21	23,96	1,76 m; 1,92 m	27,8	1,7 – 1,9 m	21
22	28,07	1,76 m; 1,92 m	28,4	1,7 – 1,9 m	22
23	83,2	3,9 m	83,0	3,85 m	23
24	72,07	3,8 m	71,8	3,85 m	24
25	32,99	1,47 m	32,8	1,45 m	25
26	25,7	1,29	25,5	1,25 m	26
27-31	28,88 – 29,9	1,27 m	29,6	1,25 m	27-31
32	31,8	1,28 m	31,9	1,25 m	32
33	22,8	1,25 m	22,6	1,25 m	33
34	14,25	0,86 t	14,1	0,85 t	34
35	151,9	7,18 quart.	151,7	7,16 q (1,5 Hz)	35
36	78,0	5,04 q	77,9	5,02 qq(1,5 Hz)	36
37	19,26	1,42 d	19,1	1,41 d	37

d = duplete, t = tripleto, m= multipleteo, quart.= quarteto; a: 100 MHz, CDCl₃; b: 400 MHz, CDCl₃; c: 200 MHz, CDCl₃; d: 50 MHz, CDCl₃

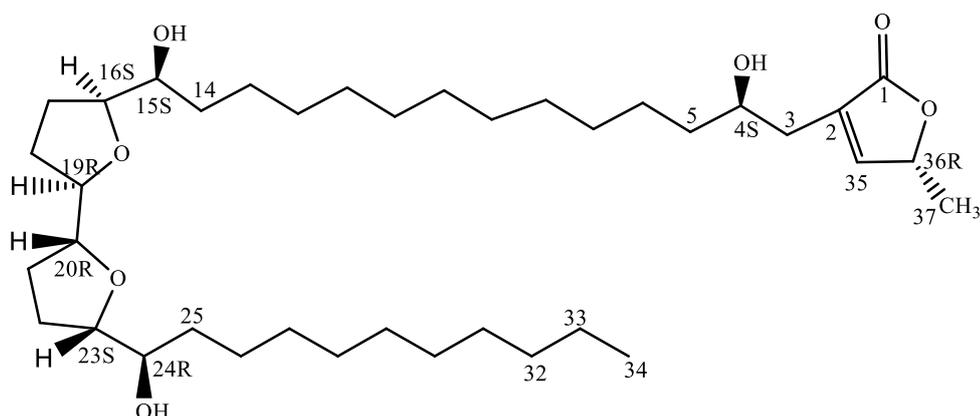
Fonte: Autora, 2018.

Figura 50 - Esqueleto carbônico para a substância AM3.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 51 - Estrutura molecular da Rolliniastatina-1 isolada das sementes da *Annona Muroca*.



Fonte: PettiT et al., 1986.

5.1.3 Identificação estrutural (parcial) da acetogenina codificada como LC2

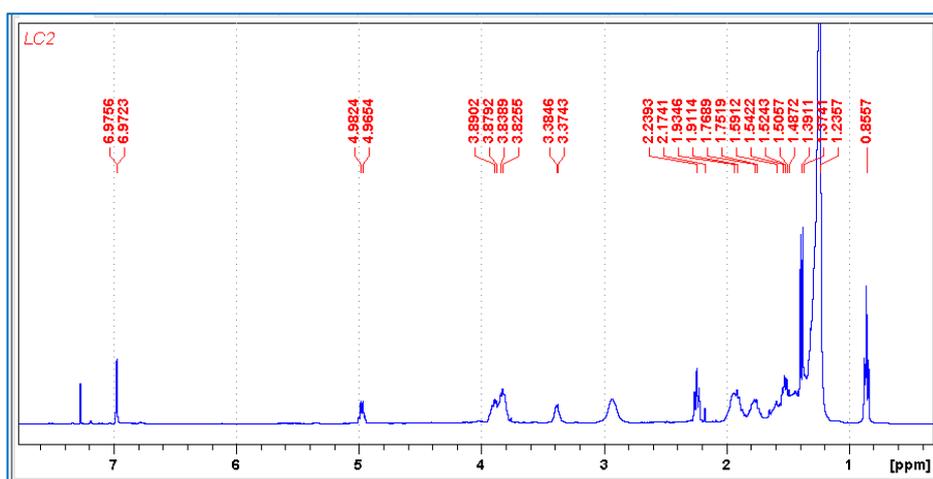
A substância LC2 foi obtida como um sólido de aspecto ceroso e de cor branca amarelada. A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 52) possibilitou a identificação do anel γ -lactona α,β -insaturada (Figura 53), através dos sinais e deslocamentos químicos que o caracteriza, juntamente com os valores de suas constantes de acoplamento: δ 6,98 (d; $J = 1,36$ Hz; 1H); δ 4,96 (qd; $J = 1,36$ Hz; 1H; $J = 6,64$ Hz; 1H); δ 1,41 (d; $J = 1,36$ Hz; 1H; $J = 6,64$ Hz; 3H). Porém, estes sinais foram observados de forma duplicada o que foi possível concluir que se trata de uma mistura de acetogeninas.

A presença do anel γ -lactona α,β -insaturada também foi confirmada através da análise dos espectros de RMN ^{13}C e APT (Figuras 55 e 57), pela presença dos sinais em δ 174,08; δ

149,06 e δ 134,4, referentes ao carbono carbonílico (C=O) e aos dois carbonos insaturados do anel γ -lactona α,β -insaturada (C=C), respectivamente.

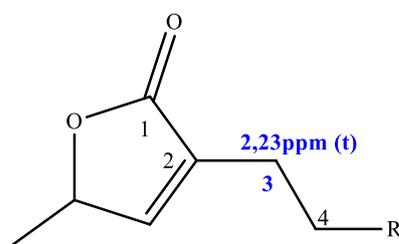
A existência de um tripleto em δ 2,23 no espectro de RMN ^1H , não existente nos espectros das substâncias AM2 e AM3, possibilitou sugerir que a substância LC2 é diferente das duas substâncias anteriormente citadas. Essa observação levou à análise dos espectros de correlação homo- e heteronuclear (HSQC, HMBC e COSY; Figuras: 58, 59 e 60), permitindo atribuir aos hidrogênios H-3 (CH₂) o sinal com valor de deslocamento químico em δ 2,23 (figura 52). Na substância AM3 foi observada a presença de um grupo hidroxila (OH) no carbono quatro (C-4), já na substância LC2 o carbono C4 não possui este grupo, fazendo com que o valor dos deslocamentos químicos dos hidrogênios ligados ao carbono C-2 em LC2 sejam diferentes.

Figura 52 - Espectro de RMN ^1H em CDCl_3 , para a substância LC2.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 53 - Subunidade γ -lactona α,β -insaturada.

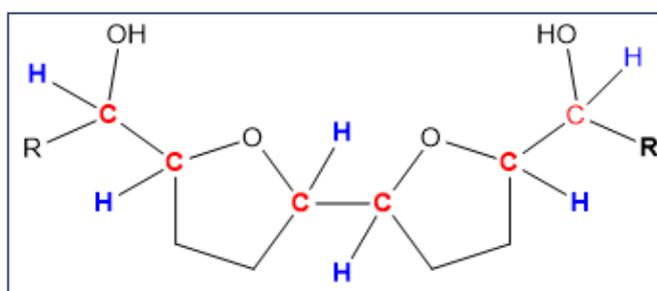


Fonte: Autora, 2018.

O espectro de RMN ^1H revelou ainda a presença de sinais na região de δ 3,82 a δ 3,89 (multiplete) e δ 3,37, atribuídos aos hidrogênios ligados aos carbonos oxigenados dos anéis

THF e aos hidrogênios ligados aos grupos hidroxilas (OH), respectivamente. Tais hidrogênios se encontram em destaque na Figura 54. Estes hidrogênios estão correlacionados com os sinais de carbono com os valores de deslocamentos de δ 81,42 a δ 81,23 atribuídos aos carbonos oxigenados dos anéis THF e δ 71,49 a δ 74,29 (C-OH) atribuídos aos demais carbonos oxigenados presentes na molécula, conforme os dados obtidos da correlação heteronuclear (^1H - ^{13}C) e homonuclear (^1H - ^1H). A figura 54 mostra um fragmento bis THF de acetogenina, o qual está presente na substância em estudo.

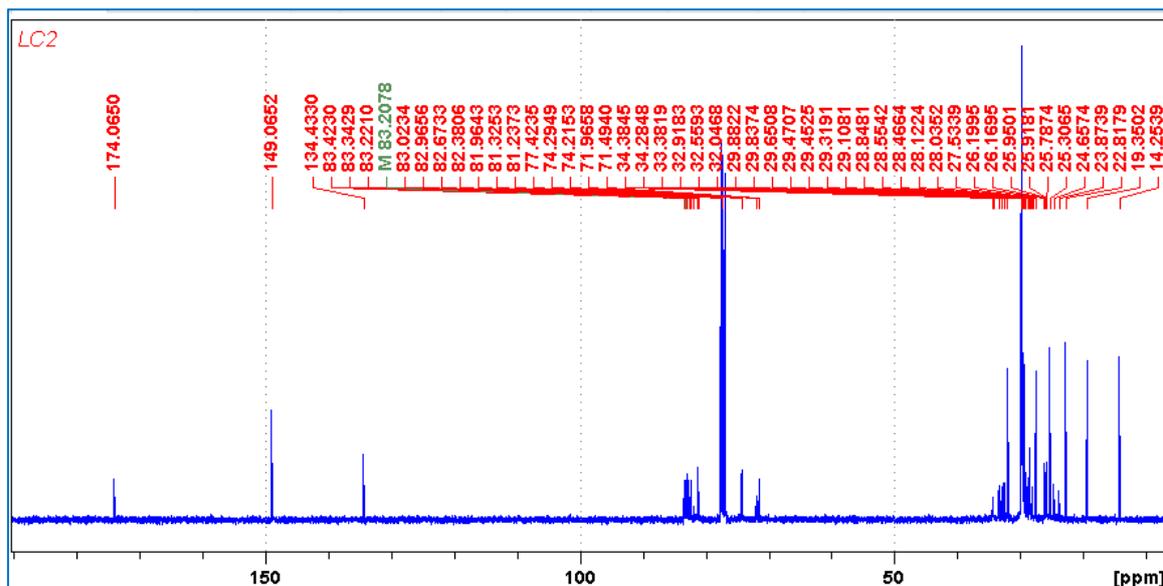
Figura 54 - Fragmento bis THF de acetogenina, com destaque dos hidrogênios ligados aos carbonos oxigenados.



Fonte: Autora, 2018.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 55) permitiu identificar um total de 49 sinais. Isso nos leva a concluir que a substância LC2 trata-se de uma mistura de pelo menos duas acetogeninas como componentes majoritários da mistura. A amostra foi submetida ao processo de purificação em coluna de Sephadex por cinco vezes, não sendo possível a separação de ao menos uma das substâncias presentes na mistura. O que se pode sugerir é que estas substâncias são isômeras e/ou apresentam o mesmo volume molecular.

Figura 55. Espectro de RMN ^{13}C em CDCl_3 , para a substância LC2.

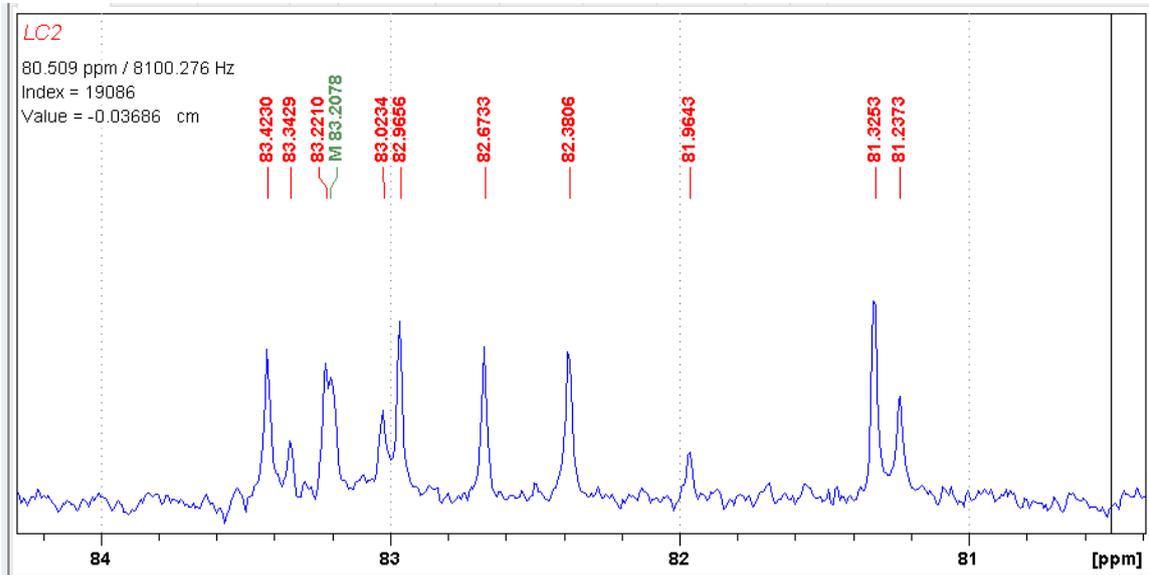


Fonte: Autora, 2018.

No espectro de RMN ^{13}C , na região de deslocamentos químicos dos anéis THF, entre δ 70 e δ 85 (Figura 56), é possível observar a presença de 11 sinais de carbonos. De acordo com o número de sinais, pode-se sugerir a presença de, ao menos duas acetogéninas. Levando em consideração o padrão dos sinais, é possível sugerir que haja pelo menos uma acetogénina bis THF (δ 81,23; δ 81,32; δ 82,96; δ 83,02) e outra mono THF (δ 82,38; δ 82,67).

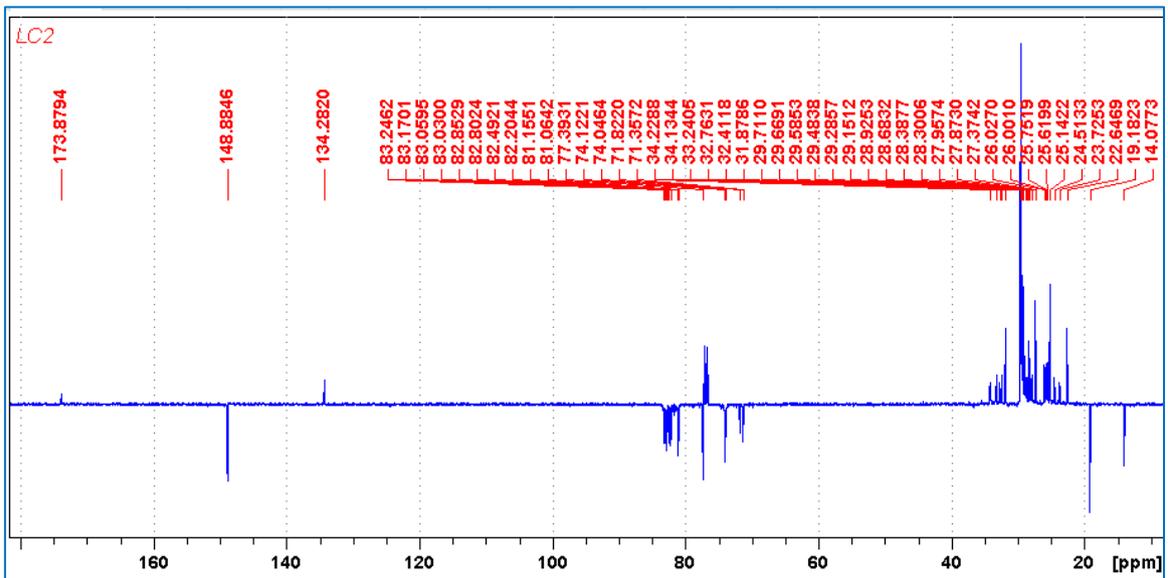
Na região de alto campo (de δ 28 a δ 30), é possível observar sinais sobrepostos. Além disso, estes sinais apresentam intensidades bem diferentes umas das outras, o que sugere a presença de impurezas, impossibilitando a devida atribuição dos sinais no espectro. Tal sobreposição também foi observada nos espectros de correlações heteronucleares HSQC e HMBC

Figura 56 - Expansão e intensificação (4x) da região dos sinais de RMN atribuídos aos carbonos pertencentes aos anéis THF.



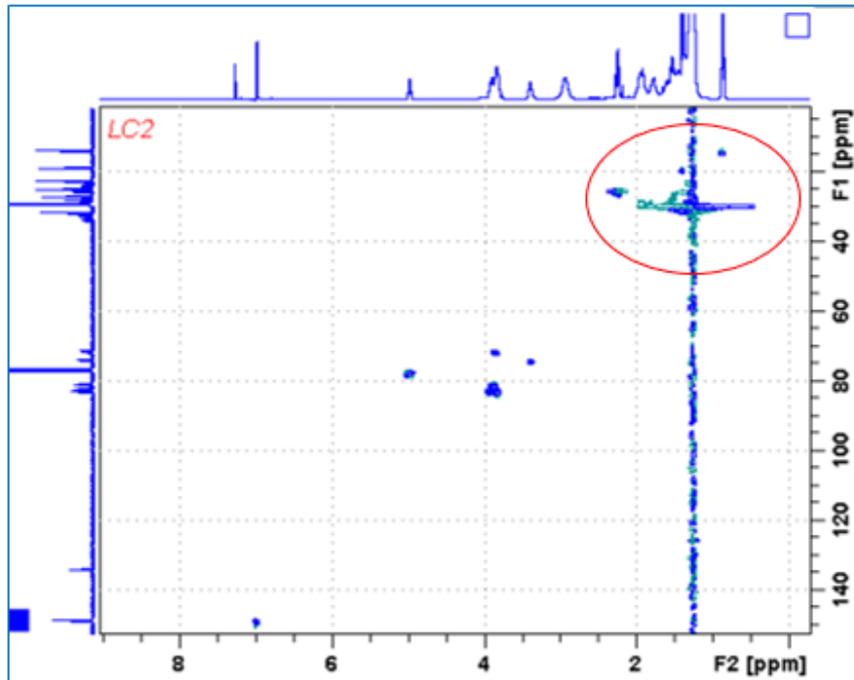
Fonte: Autora, 2018.

Figura 57 - Espectro de RMN ^{13}C APT, em CDCl_3 , para a amostra LC2.



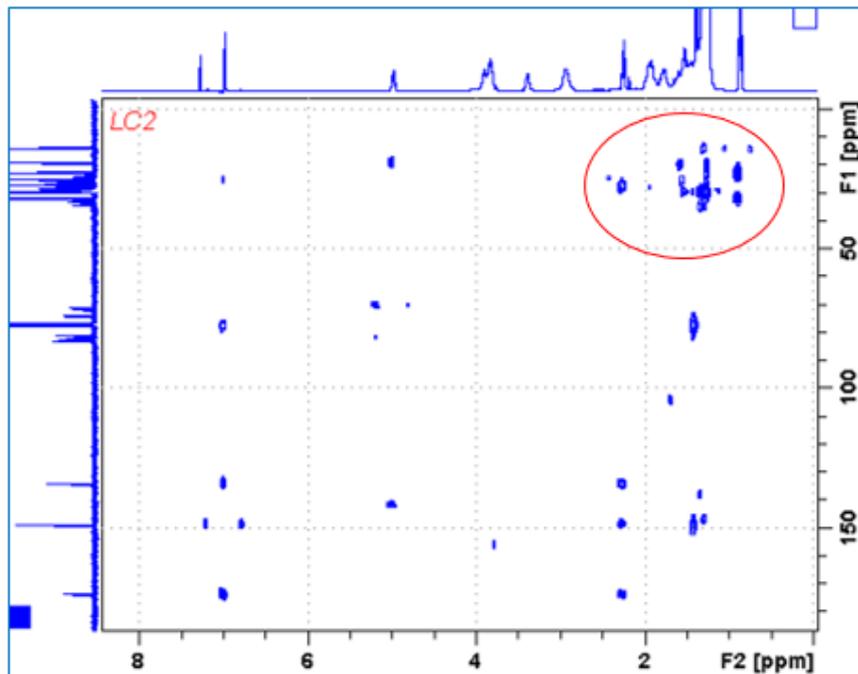
Fonte: Autora, 2018.

Figura 58 - Espectro de RMN HSQC em CDCl_3 , para a amostra LC2, com destaque para a região de sobreposição de sinais na região de campo alto.



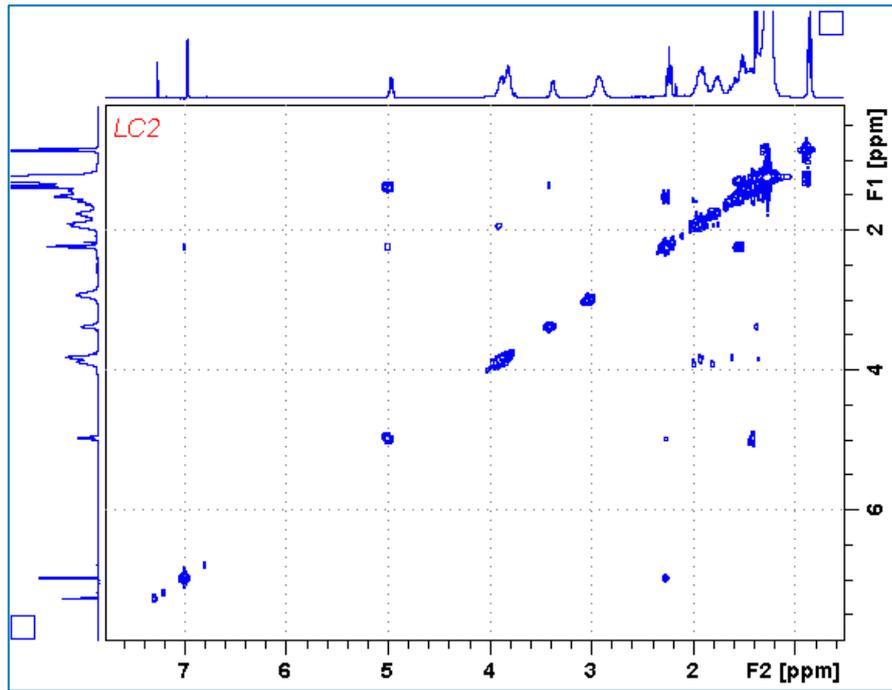
Fonte: Autora, 2018.

Figura 59 - Espectro de RMN HMBC em CDCl_3 , para a amostra LC2, com destaque na região de sobreposição de sinais na região de campo alto.



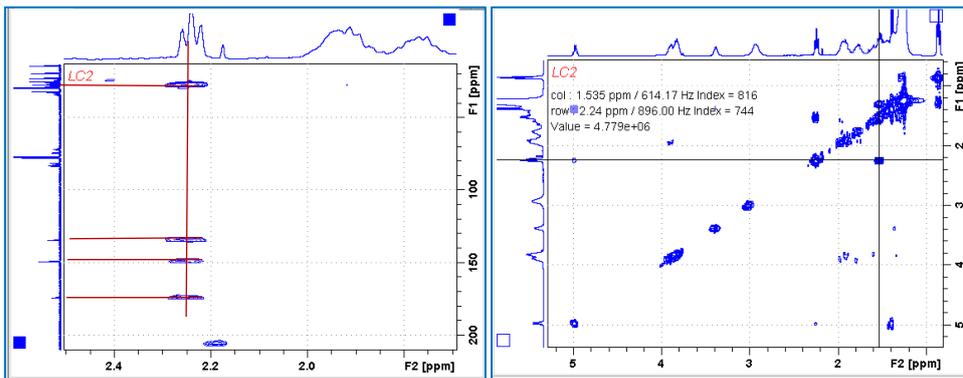
Fonte: Autora, 2018.

Figura 60 - Espectro de RMN COSY em CDCl_3 , para a amostra LC2.



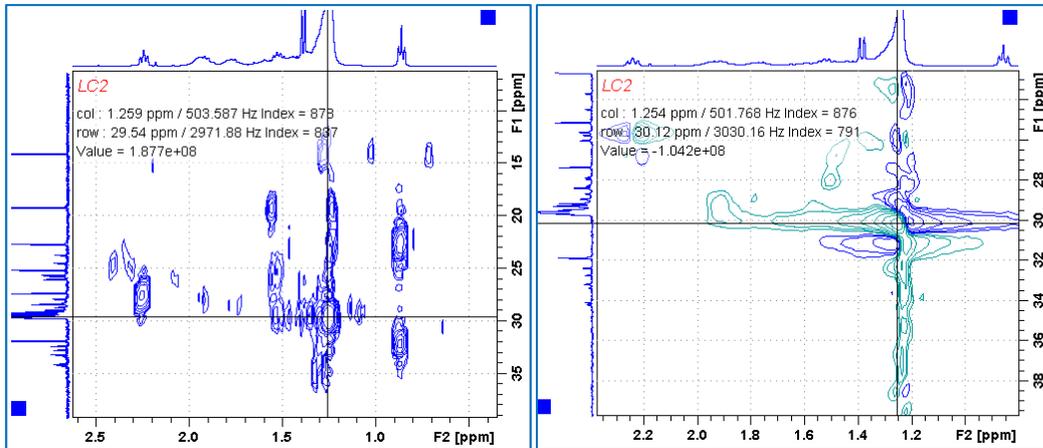
Fonte: Autora, 2018.

Figura 61 - Ampliação das regiões do espectro de RMN HSQC que mostra as correlações (^2J e ^3J) do sinal de hidrogênio em δ_{H} 2,3 com carbonos do anel γ -lactona.



Fonte: Autora, 2018.

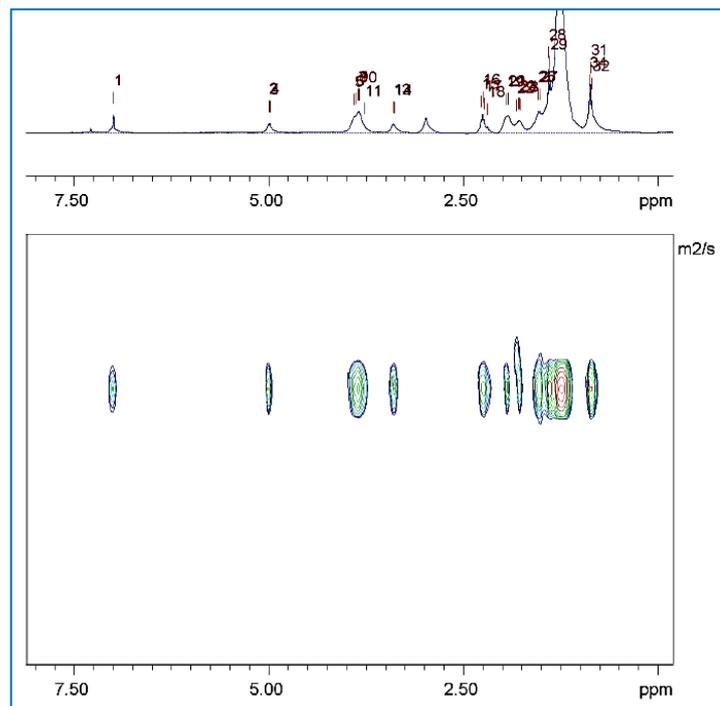
Figura 62 - Ampliação da região com sobreposição de sinais da cadeia alifática nos espectros de RMN HSQC e HMBC.



Fonte: Autora, 2018.

Na análise do espectro DOSY 2D (Figura 63) foi observado que os componentes da mistura possuem os mesmos coeficientes de difusão (m^2/s), não permitindo a separação dos sinais dos componentes da amostra. Logo, foi possível sugerir que os componentes da mistura possuem características estruturais e volumes moleculares semelhantes.

Figura 63 - Espectro DOSY 2D, obtido em $CDCl_3$, para a amostra LC2.

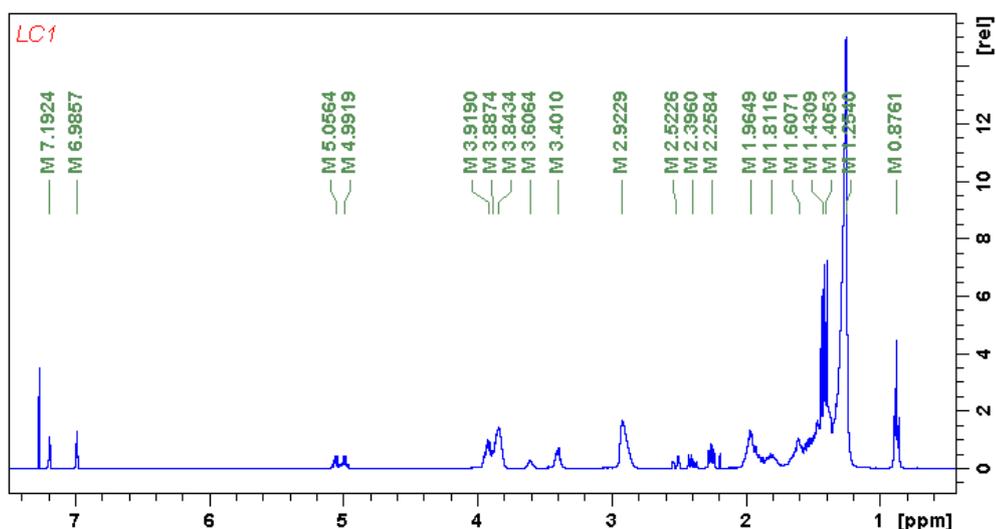


Fonte: Autora, 2018.

5.1.4 Identificação estrutural (parcial) da acetogenina codificada como LC1

A análise do espectro de RMN ^1H (Figura 64) para a amostra LC1 permitiu a observação de dois quartetos com deslocamentos químicos em δ 7,19 e δ 6,98; dois quartetos de quartetos em δ 5,05 e δ 4,99; e dois dupletos em δ 1,43 e δ 1,40. A presença desses sinais permitiu confirmar a presença do anel γ -lactona α,β -insaturada (Figura 65).

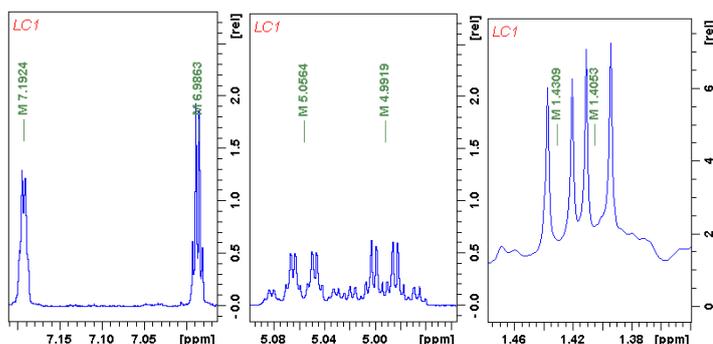
Figura 64 - Espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 , para a amostra LC1.



Fonte: Autora, 2018.

As regiões do espectro, na qual aparecem os sinais característicos do anel γ -lactona α,β -insaturada, foram ampliadas e estão dispostas na Figura 65. É possível observar que estes sinais estão duplicados, sugerindo a presença de pelo menos duas acetogeninas apresentando um anel γ -lactona α,β -insaturado.

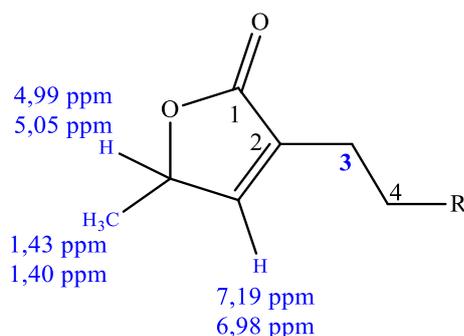
Figura 65 - Ampliação das regiões do espectro de RMN ^1H da amostra LC1, em CDCl_3 , onde estão os sinais duplicados, evidenciando a presença de, pelo menos, duas acetogeninas.



Fonte: Autora, 2018.

A análise parcial dos espectros de RMN ^{13}C , HSQC, HMBC e COSY permitiu a atribuição inequívoca dos sinais característicos do anel γ -lactona α,β -insaturada, como mostra a figura 66.

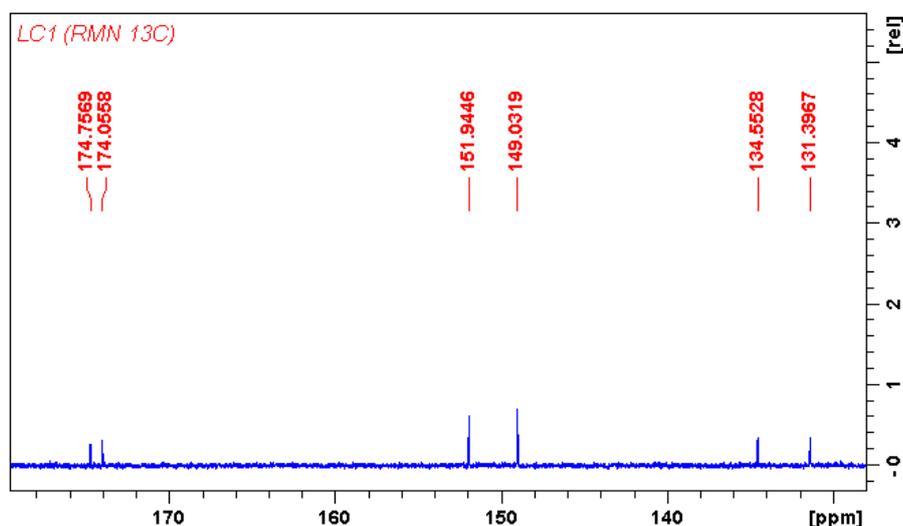
Figura 66 - Subunidade anel γ -lactona α,β -insaturada na qual estão dispostas as atribuições dos sinais de hidrogênio característicos desse grupo.



Fonte: Autora, 2018.

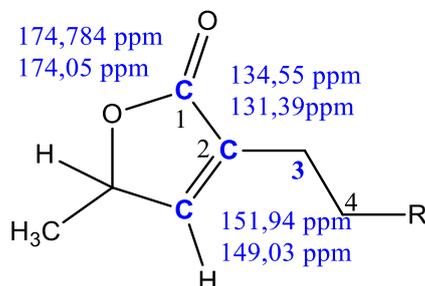
Na análise do espectro de RMN ^{13}C é possível observar que os sinais referentes aos carbonos característicos do anel γ -lactona α,β -insaturada também estão duplicados, sendo possível observar dois sinais para o carbono 1 (δ 174,65 e δ 174,05); dois sinais para cada um dos carbonos insaturados, em δ 134,55 e δ 131,39 para o carbono 2 e δ 151,94 e δ 149,03 para o carbono da posição β , como pode ser observado nas figuras 67 e 68.

Figura 67 - Ampliação das regiões do espectro de RMN ^{13}C da amostra LC1, em CDCl_3 que mostra os sinais duplicados, evidenciando a presença de, pelo menos, duas acetogeninas.



Fonte: Autora, 2018.

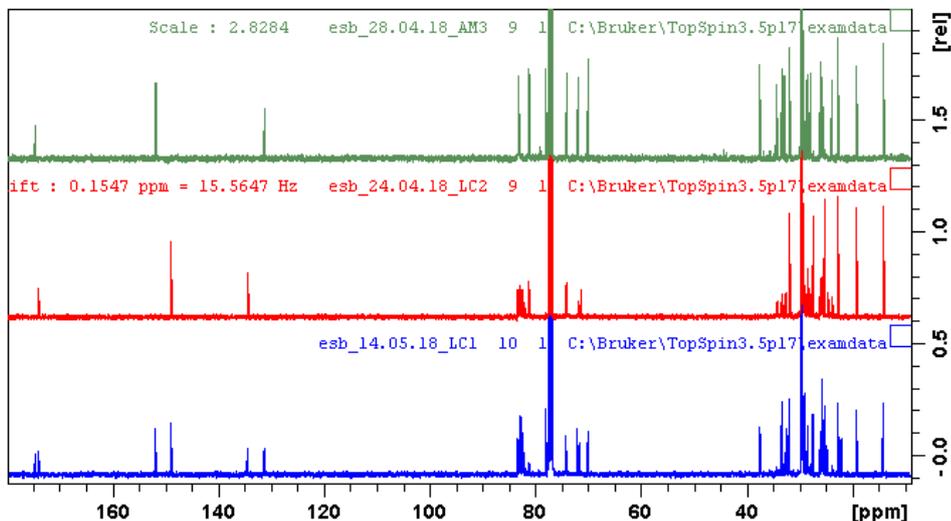
Figura 68 - Subunidade anel gama-lactona α,β -insaturada na qual estão dispostas as atribuições dos sinais de ^{13}C característicos desse grupo.



Fonte: Autora, 2018.

A fim de observar se a amostra LC1 apresentava alguma diferença no esqueleto carbônico em relação às amostras LC2 e AM3, foi realizada uma comparação de seus espectros de RMN ^{13}C (Figura 69).

Figura 69 - Comparação dos espectros de RMN ^{13}C das amostras LC1, LC2 e AM3 (de baixo para cima).



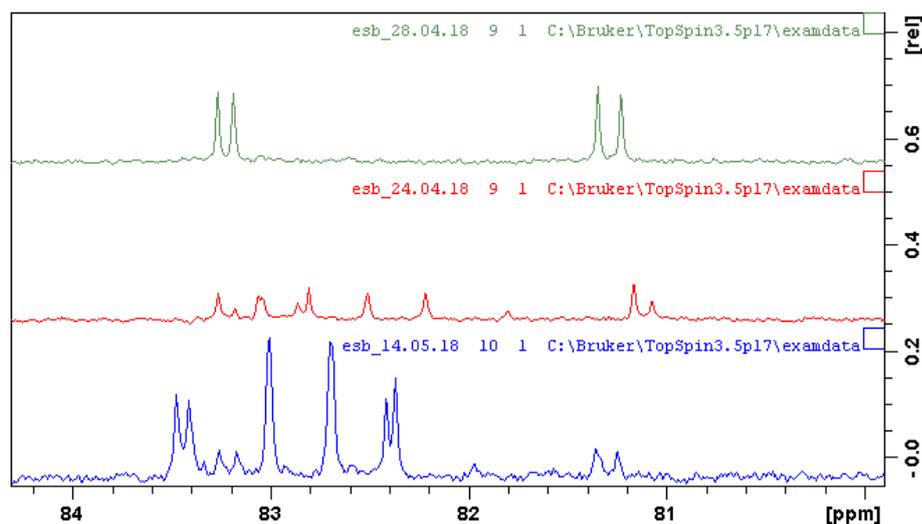
Fonte: Autora, 2018.

Ao comparar as regiões dos espectros de RMN ^{13}C (Figura 70), foi detectada a presença de carbonos atribuídos aos anéis THF (δ 80 a δ 84), sendo possível observar uma diferença, tanto no número quanto no padrão de deslocamento químico destes sinais.

No espectro da amostra LC1 (em azul) é possível observar dois sinais mais intensos em δ 82,69 e δ 83,00. Estes sinais sugerem a presença de anel mono-THF. O conjunto de 4

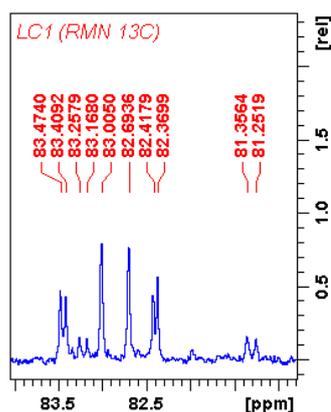
sinais em δ 81,25; δ 81,34; δ 83,16; δ 83,25 e outros 4 sinais em δ 82,36; δ 82,41; δ 83,40; δ 83,47 sugerem a presença de pelo menos duas acetogeninas bis THF adjacentes (Figura 71).

Figura 70 - Ampliação das regiões dos espectros de RMN ^{13}C das amostras LC1, LC2 e AM3, em CDCl_3 , mostrando que existe diferença entre os esqueletos carbônicos das amostras acima citadas.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 71 - Ampliação da região dos espectros de RMN ^{13}C da amostra LC1, que confirmam a presença de anéis THF.



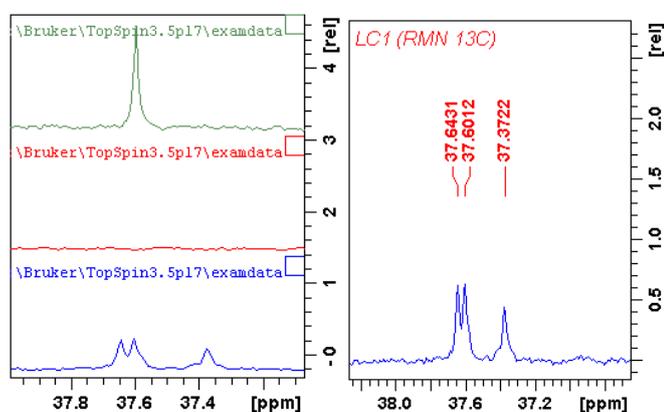
Fonte: Autora, 2018.

Outra região nos espectros em que foram observadas diferenças para as três amostras está entre δ 37,0 e δ 37,8. Estes valores de deslocamentos químicos são, geralmente, nos espectros de RMN ^{13}C de acetogeninas, atribuídos aos carbonos metilenos da cadeia alifática (CH_2), adjacentes a carbonos ligados a grupos OH (Figura 72).

A análise desses sinais nos espectros de correlação HSQC, HMBC e COSY, levou à elucidação do fragmento apresentado na figura 73, presente em uma das moléculas da amostra LC1.

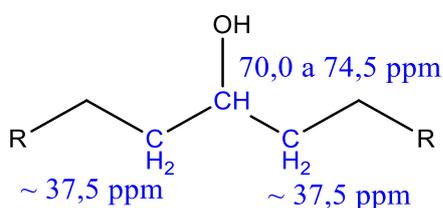
Logo, de acordo com a presença do fragmento mostrado na figura 73, podemos concluir que uma das acetogeninas presente na mistura apresenta um grupo OH, como substituinte na cadeia de hidrocarboneto, como na molécula da Squamocina, uma acetogenina altamente citotóxica (Figura 75).

Figura 72 - Ampliação da região do espectro de RMN ^{13}C , na qual estão presentes os sinais de CH_2 presentes no fragmento identificado em LC1.



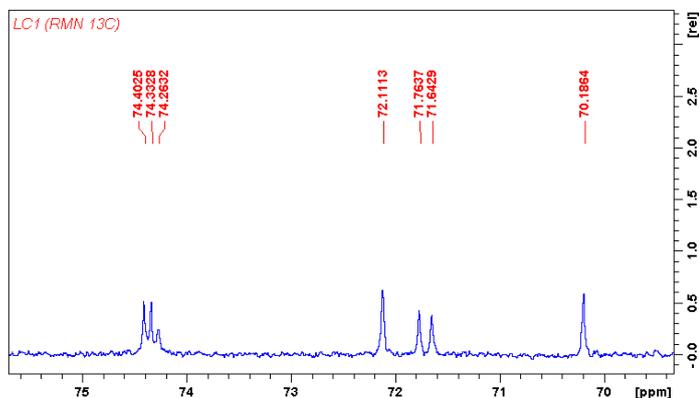
Fonte: Autora, 2018.

Figura 73 - Fragmento do esqueleto carbônico de acetogenina presente na amostra LC1.



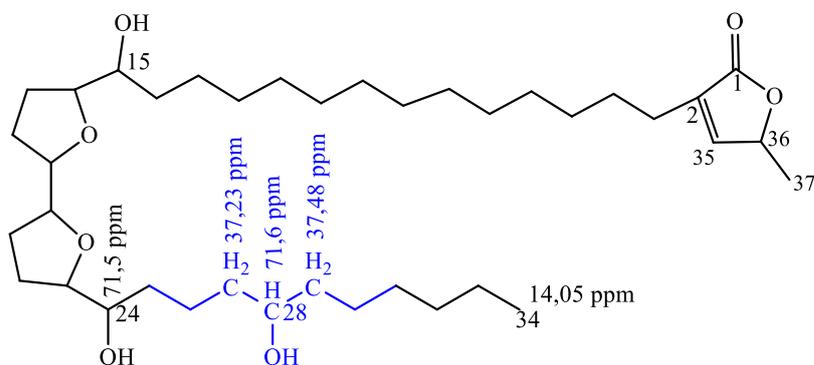
Fonte: Autora, 2018.

Figura 74 - Região do espectro de RMN ^{13}C da amostra LC1 onde são observados os sinais dos carbonos metínicos oxigenados, presentes em moléculas de acetogeninas.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 75 - Esqueleto carbônico da squamocina, isolada da *Annona mucosa*, com destaque para o fragmento identificado na amostra LC1.

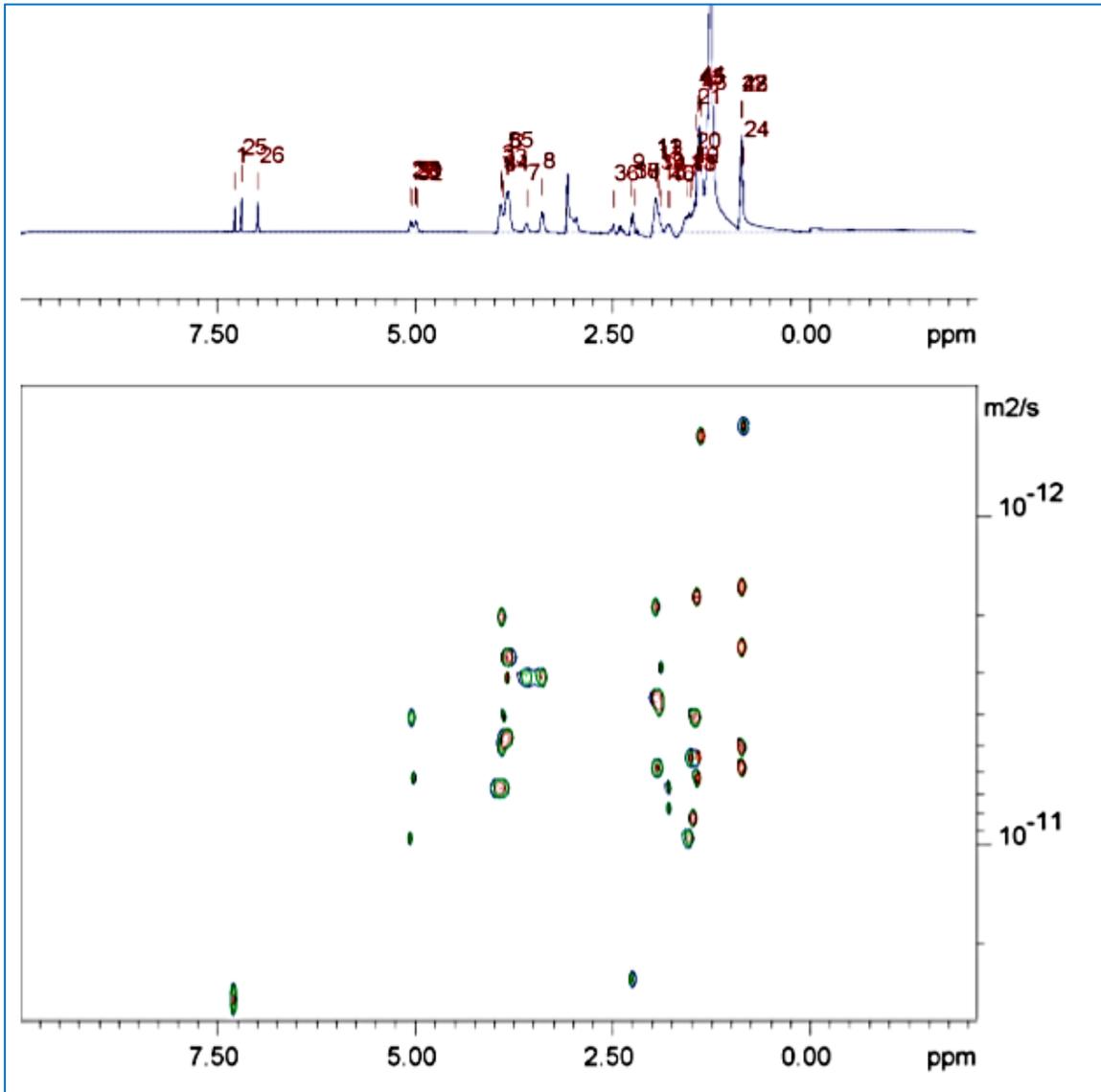


Fonte: Autora, 2018.

Diante desses resultados, conclui-se que amostra deverá ser submetida a processo de purificação, através de HPLC e, posteriormente, a execução de experimentos de RMN 1D e 2D, além de análises por espectroscopia de massas, visando a definição das fórmulas moleculares e as estruturas das moléculas presentes na amostra.

Na análise do espectro DOSY 2D (Figura 76), foi observado que os componentes da mistura possuem distintos coeficientes de difusão (m^2/s), permitindo a separação dos sinais dos componentes da amostra. Logo, foi possível sugerir que os componentes da mistura possuem características estruturais e volumes moleculares diferentes, sendo possível sugerir o isolamento de parte destes compostos em coluna de sephadex.

Figura 76 - Espectro DOSY 2D, obtido em CDCl₃, para a amostra LC1.



Fonte: Autora, 2018.

6. CONCLUSÕES

- ✓ A execução deste trabalho permitiu observar que através da técnica de RMN ^1H e ^{13}C é possível identificar e classificar acetogeninas clássicas presentes em extratos ricos nesses compostos, não necessitando de outro método para este fim;
- ✓ A existência de vários centros quirais nas moléculas de ACG, faz com que haja um grande número destes compostos apresentando os mesmos esqueletos carbônicos e os mesmos grupos substituintes, em consequência disto, os seus espectros de RMN ^1H e ^{13}C pode se apresentar bastante semelhantes ou iguais. Desta forma, torna-se imprescindível a determinação da estereoquímica destes compostos;
- ✓ A presença de constituintes químicos minoritários, na amostra pode dificultar a identificação do esqueleto carbônico.
- ✓ O uso combinado dos dados de RMN com espectroscopia de massas, na determinação do esqueleto carbônico de acetogeninas é importante, principalmente para a confirmação da massa molecular.

7. PERSPECTIVAS

- Isolar os compostos das amostras LC1 e LC2 com o auxílio da técnica de HPLC;
- Executar experimento de RMN 1D e 2D a fim de concluir estrutura química dos compostos obtidos a partir das amostras LC1 e LC2
- Utilizar métodos apropriados para determinar a estereoquímica das moléculas;
- Determinar a estrutura química de outras três acetogeninas (não citadas no trabalho), que possuem 39 átomos de carbono, presentes na amostra AM2 (identificadas por espectroscopia de Massas com as fórmulas moleculares $C_{39}H_{62}O_7$; $C_{39}H_{64}O_8$ e $C_{39}H_{62}O_8$).

8. REFERÊNCIAS

- ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v.62, p.504-540, 1999.
- ALLINGER, N. L.; Cava, M. P.; Jongh, D. C.; Johnson, C. R.; Lebel, N. A.; Stevens, C. L. **Química Orgânica**, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara dois, 1978.
- ALMASSY JÚNIOR, A. A.; SILVA, A. F.; FONSECA, M. C. M. Conhecimento tradicional do uso medicinal das plantas. **Informe Agropecuário**, v. 31, n.255, p. 20- 26, 2010.
- ALMEIDA, J. R. G. S. et al. Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysoarpa* Maas (Annonaceae). **The Scientific World Journal**, v. 2012, p. 1-6, 2012.
- ARAÚJO, D. B. **Sobre neuroimagens funcionais por magnetoencefalografia e ressonância magnética**: novos métodos e aplicações. Tese (Doutorado em Física) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2002. Disponível em: <http://www.neuroimago.usp.br/dissertacoestes/Tese_Draulio.pdf>. Acesso em: 28 out. 2017.
- AZEVEDO, R. B.V. **Análise de grãos e sementes por ressonância magnética nuclear**. Universidade Federal Fluminense. Instituto de Química. Rio de Janeiro abr. 2006. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br/painelsetorial/palestras/PalestraRMN.pdf>>. Acesso: 20 maio 2018.
- BARRETO, F. S. **Estudo da atividade citotóxica de compostos obtidos do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. por fracionamento bioguiado**. 2014. 89 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- FACULDADE DE MEDICINA, UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ, FORTALEZA, 2014.
- BERMEJO, A.; et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Products Reports**, v.22, n.2, p. 269-303, 2005.
- BONAGAMBA, T. J., Capelle, K. W., Azevedo, E. R. A RMN e suas aplicações atuais. **Ciência Hoje**. V. 37, n. 221. p. 40-48, 2005.
- Bonneau, N. et al. ¹H qNMR quantification of annonaceous acetogenins in crude extracts of *annona muricata* L. fruit pulp. **Phytochemical Analysis**. V. 28, n. 4, 251-256, 2017.
- BRAGA SOBRINHO, R. Potencial de exploração de annonaceas no Nordeste do Brasil. EMBRAPA Agroindústria Tropical. XII Agroflores – 17^a Semana Internacional da Fruticultura, Floricultura e Agroindústria, 2010.
- BRESLOW, R. **Mecanismos de reações orgânicas: Uma introdução**, 2. ed. São Paulo: EDART, 1973.
- BRITO, H.O. et al. Phytochemical analysis composition from *Annona squamosa* (ATA) ethanolic extract leaves. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, n.3, p.180-184, 2008.
- BRUKER. **Almanac: 50 Years of Innovation**. 2012. Disponível em: < <http://www.pascal-man.com/pulseprogram/BrukerAlmanac2012.pdf> >. Acesso em 28 maio. 2018.

BUCKERIDGE, M. S. Seed Cell Wall Storage Polysaccharides: models to understand cell wall biosynthesis and degradation. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 154, p.1017-1023, 2010.

CALIXTO, J.B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, n.1-2, p.131-134, 2005.

Catalogue of Life: 30th June 2018. Annual Checklist Interface desenvolvido por Naturalis Biodiversity Center. Disponível em: <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/bb7eaccd1ba4f4c02c81fb31d2eec55b>. Acesso em: 12 julho 2018.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.169, p.5-40, 2012.

CHÁVEZ, D.; Acevedo, L. A; Mata, R. Jimenezin, a novel annonaceous acetogenin from the seeds of *Rollinia mucosa* containing adjacent tetrahydrofuran-tetrahydropyran ring systems. **J Nat Prod**, v.61, n.4, 419-421, 1998.

CHEN, C.Y., et al. Cherinonaine, a Novel Dimeric Amide from the Stems of *Annona cherimola*. **Tetrahedron Letters**. V. 39, p. 407-410, 1998.

CHEN, Y. et al., Antitumor activity and toxicity relationship of annonaceous acetogenins. **Food and Chemical Toxicology**. v. 58, p. 394–400, 2013.

CHIN, Y.W. et al. Drug discovery from natural sources. **The AAPS Journal**, v.8, n.2, p. E239-E253, 2006.

CLAPP, L. B. **Química do grupo OH**, São Paulo: Editora Edgard Blücher LTDA, 1969.

COLNAGO, L.A.; ALMEIDA, F.C.L.; VALENTE, A. P. Espectrometria de massa e RMN multidimensional e multinuclear: revolução no estudo de macromoléculas biológicas. **Química Nova**, n.16. 2002 .Disponível em: <http://edb.fisica.ufs.br/wiki/index.php/Fen%C3%B4meno_de_Resson%C3%A2ncia_Magn%C3%A9tica>. Acesso em: 6 set. 2012.

COSTA, E. V. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, v.27, 1002-1006, 2013.

COSTA, E. V. et al. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v.16, n.11, p. 9714-9720, 2011.

COSTA, J. P. C.; MÜLLER, C. H. **Fruticultura tropical: o biribazeiro (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill.** Belém: EMBRAPA-CPATU, 1995. 35p. (EMBRAPA-CPATU. Documentos, 84).

COSTA, M. S. et al. Larvicidal and cytotoxic potential of squamocin on the midgut of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Toxins**. v.6, n.4, p. 1169-1176, 2014.

DINIZ, T. C. et al. Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.7, p. 2729-2735, 2013.

DINIZ, T. C. et al. Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 7, p. 2729-2735, 2013.

DOWNUM, K. R.; ROMEO, J. T.; STAFFORD, H. A. **Phytochemical Potential of Tropical Plants**. 1. ed. [S.l.]: Springer US, 1993. VII, 300 p. v. 1.

DUARTE, D. F. Uma breve história do ópio e dos opióides. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Vol. 55, n. 1, p. 135 -146. 2005.

DURET, P. et al. Semisynthesis and cytotoxicity of amino acetogenins and derivatives. **Bioorg Med Chem.**, [S.l.], v. 7, n. 9, p. 1821-1826, 1999.

DUTRA, L.M. et al. *ent*- Kaurane diterpenes from the stem bark of *annona vepretorum* (Annonaceae) and cytotoxic evaluation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, p.3315-3320, 2014.

EDILBERTO R. S.; Curso: **Fundamentos Básicos da RMN e Sequências de Pulsos**. 28ª RASBQ – 2005.

ELKINGTON et al., Plants as Antimalarial Agents in Sub-Saharan Africa. **Acta Tropica**. v. 152, p. 32-48, dezembro 2015.

FANG, X. P. et al. Annonaceous acetogenins: An updated review. **Phytochemical Analysis**, v.4, n.1, p. 27-48, 1993.

FAPESP, 2018.

FERREIRA, E.S. **Estudo fitoquímico e atividade inseticida de *Annona crassiflora* Mart., *Annona mucosa* (Jacq.) Baill. (Annonaceae), *Dioscorea rotundata* Poir (Dioscoreaceae) E *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae) em *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1758) (Lepidoptera: Plutellidae)**. Tese. (Doutorado em Química) UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS, Rio Largo 2016.

FERREIRA, M. G. R. et al. Emergência e crescimento inicial de plântulas de biribá (*Rollinia mucosa* (Jacq.) Baill) (Annonaceae) em diferentes substrates. **Ciências Agrárias**. v. 31, p. 373-380, 2010.

FONSECA, O. J. de M. AMAZÔNIA: OLHAR O PASSADO, ENTENDER O PRESENTE, PENSAR O FUTURO. In: DERANI, C. et al. (Org.). **Hiléia: Revista de Direito Ambiental da Amazônia**. Manaus: [s.n.], 2006. p. 87-146.

GASPAR, L., Plantas medicinais. **Pesquisa Escolar Online**, Fundação Joaquim Nabuco, Recife. Disponível em: <<http://basilio.fundaj.gov.br/pesquisaescolar/>>. Acesso em: 02 julho 2018.

GERALDES, C. F. G. C.; **Imagem através de ressonância magnética nuclear: prêmio nobel de medicina ou fisiologia de 2003**. Disponível em: <http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ_091_047_09.pdf>. Acesso em: 9 maio 2018.

GERALDES, C. F. G. C.; **Imagem através de ressonância magnética nuclear**: prêmio nobel de medicina ou fisiologia de 2003. Disponível em: <http://www.spq.pt/boletim/docs/BoletimSPQ_091_047_09.pdf>. Acesso em: 9 out. 2016.

GIL, VICTOR M. S.; GERALDES, CARLOS F. G. C.; **Ressonância Magnética Nuclear: Fundamentos, Métodos e Aplicações**, Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1987.

González-Esquinca, A. R. et al. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 36, edição especial, p. 001-016, Fevereiro 2014.

GU, Z. M. et al. Isolation of new bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa* guided by liquid chromatography/mass spectrometry. **Bioorg Med Chem**, v.5, n. 10, p. 1911-1916, 1997.

GUILHON, G.M,S.P. **Química orgânica experimental**. Belém: UFPA, 2009.

HAGE, M. C. F. N. S.; IWASAKI, M. Imagem por ressonância magnética: princípios básicos. **Ciência Rural**. v. 39, Santa Maria, Jul. 2009. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/cr/2009nahead/a147cr1097.pdf>>. Acesso em: 3 maio 2018.

Hartwell J. L. Plants used Against Cancer. A survey Lawrence. **Quarterman Publications**, p 438- 39, 1982.

<http://meanderingwa.blogspot.com/2012/02/y-yew-taxus-brevifolia.html> Acessado em 02 de maio, 2018.

http://www.davidmoore.org.uk/Sec04_01.htm, Acessado em 02 de maio de 2018.

https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/1175045/mod_resource/content/1/Analgesicos_opioides.pdf Acessado em 02 de maio, 2018.

https://en.wikipedia.org/wiki/Saccharopolyspora_erythraea Acessado em 02 de maio, 2018.

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Artemisinina>, Acessado em 02 de maio de 2018.

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Ciclosporina>, Acessado em 02 de maio de 2018.

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Eritromicina> Acessado em 02 de maio, 2018.

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Eritromicina>, Acessado em 02 de maio,

<https://pt.wikipedia.org/wiki/Paclitaxel> Acessado em 02 de maio, 2018.

HUI, Y. H. et al. Bullatacin and Bullatacinone: Two Highly Potent Bioactive Acetogenins from *Annona bullata*. *Journal Natural Products*. v. 52, n. 3, 463-477, 1989.

HUY, Y. H. et al. Bullatacin and bullatacinone: two highly potent bioactive acetogenins from *Annona bullata*. **Journal of Natural Products**., [S.l.], v. 52, n. 3, p. 463-477, maio. 1989.

INOUE, M.H. et al. Allelopathic Potential of Substances Isolated from *Annona crassiflora* Seeds. **Planta Daninha**. v. 28, n. 4, p. 735-741, Viçosa-MG, 2010.

Instituto Oncoguia. <http://www.oncoguia.org.br/> Acesso: Maio 2018.

JOLAND, et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**. V. 47, p. 3151-3153, 1982.

JÚNIOR, A. C. G. **Estudos de equilíbrio e seletividade de um trocador aniônico a base de quitosana e sua aplicabilidade para extração de fósforo disponível em solos**. 2003. 28 f. Tese. (Doutorado em Química) UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA, Florianópolis 2003.

JÚNIOR, V. F. V., et al. Plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**, Vol. 28, No. 3, p. 519-528, 2005.

JUNIOR, V.F.V.; PINTO, A.C. A expropriação do professor: plantas medicinais: cura segura?. **Química Nova**. Valinhos, v. 128, n. 3, p. 519-529, fev. 2005. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/qn/v28n3/24145.pdf>>. Acessado em: 28 maio 2018.

KAYSER, C. R. **RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos**. *Química Nova*, 23, 2, 231-236, 2000.

KRINSKI, D.; MASSAROL, A.; MACHADO, M. Edição Especial. In: V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação, 18, 2013, Botucatu-SP. **POTENCIAL INSETICIDA DE PLANTAS DA FAMÍLIA ANNONACEAE...** [S.l.: s.n.], 2014. p. 225-243. v. 36.

KUO, R. Y. et al. Antiplatelet activity of *N*-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v.57, n.3, p. 421-425, 2001.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários das folhas de *Annona crasiflora* Mart. (Annonaceae)**. 2011. Dissertação em Química (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.** 2014. 27 f. Dissertação (Mestrado em Química) UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS, Belo Horizonte 2011.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v.21, n.12, p. 2783-2813, 1980.

LIAW C. C. et al. A novel constituent from *Rollinia mucosa*, rollicosin, and a new approach to develop annonaceous acetogenins as potential antitumor agents. **Journal of Natural Products**, v.66, n.2, p. 279-281, 2003.

LIAW, C. C. et al. New annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, v.62, n.12, p. 1613-1617, 1999

LIMA, J. P. S. et al. In vitro antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa* (Annonaceae). **Revista Virtual de Química**, v.4, n.6, p. 692-702, 2012.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, n.4; p. 1129-1138, 2010.

LOPES, J. de C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 36, p. 125-131, jan. 2014.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, v.1, p. 368, 1998.

LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p.

LUDWIGA, C. et al. **Two-dimensional J-resolved NMR Spectroscopy: Review of a Key Methodology in the Metabolomics Toolbox**, *Phytochem. Anal.*, **21**, 22–32, 2010.

MAAS, P. J. M. et al. Flora da reserva ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. *Rodriguésia*. **Rodriguésia**, v.58, n.3, p. 617-662, 2007.

Machado A. R. T. et al. Total α,β -unsaturated- γ -lactone acetogenins in *Annona muricata* by proton NMR spectroscopy. *Applied Magnetic Resonance*. **46**, 153-160. 2015.

Machado, A. R. T. **Metabolômica por Ressonância Magnética Nuclear de *Annona* spp para o Controle de Nematoides**. 2014. V f. Tese. (Doutorado em Química). UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS, Belo Horizonte 20014.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3 p. 429-438, 2002.

MASSAROLI, A.; MACHADO, M.; KRINSKI, D.; POTENCIAL INSETICIDA DE PLANTAS DA FAMÍLIA ANNONACEAE. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v. 36, p. 225-242, 2014.

MIYOSHI, H. et al. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1365,p. 443-452, 1998.

MIYOSHI, H.; et al. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1365, n.3, p. 443-452, 1998.

NARIMOTO, K. M. **Técnicas espectroscópicas aplicadas à análise da matéria orgânica do solo em pomares de citros sob adição de lodo do esgoto**. 2006. 30 f. Dissertação. (Mestrado em Química) UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO, São Carlos 2003.

NICOLETTI, M. A. et al. PRINCIPAIS INTERAÇÕES NO USO DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, Lago Sul - Brasília - DF, v. 29, n. 1/2, p. 32-40, jan. 2007.

PAES, M. M. et al. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. **Rev. Virtual Quim.**, v.8, n.3, p. 945-980, 2016.

PAVIA, D. L. et al. **Introdução à Espectroscopia**, 4.ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PETTIT, G. R.; CRAGG, G. M.; POLONSKY, J. Isolation and structure of rolliniastatin 1 from the South American tree *Rollinia mucosa*. **Canadian Journal of Chemistry**, v.65, n.6, p. 1433-1435, 1987.

PINTO, N. C. C. et al. Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Industrial Crops & Products**. v. 107, p. 332-340, 2017.

PRIM, M. B. S., Breve história das ervas. Disponível em: <http://users.matrix.com.br/mariabene/breve_historia_das_ervas.htm> . Acesso em: 02 julho 2018.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): inclusion of the genus *Rollinia* A.ST.-HIL. **Annalen Naturhistorischen Museums in Wien**. v. 108B, p. 191-205, 2007.

RAINER, H.; CHATROU, L. W. **Catalogue of Life: 30th April 2018**: Detalhes das espécies : *Annona mucosa* Jacq.. 2018. 2014. Disponível em: <<https://www.dicio.com.br/escrutino/>>. Acesso em: 28 maio 2018.

RAMIREZ, E. A.; HOYE, T. R. Determination of Relative and Absolute Configuration in the Annonaceous Acetogenins. **Studies in Natural Products Chemistry**, [S.l.], v. 17, n. D, p. 251-282, jun. 1995.

Rieser, M.J. Determination of absolute configuration of stereogenic carbinol centers in annonaceous acetogenins by ^1H and ^{19}F NMR analysis of Mosher ester derivatives. **Journal of the American Chemical Society**, v. 114, n.26, pp 10203-10213, 1992.

RUPPRECHT et al. Annonaceous Acetogenins: A Review. **Journal of Natural Products**. v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: A Review. **Journal of the Natural Products**, v.53, n.2, p. 237-278, 1990.

SANTOS, A.F., SANT'ANA, A.E.G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**. V. 8, p. 115-120, 2001.

SANTOS, P. L., et al. Utilização de extratos vegetais em proteção de plantas. **Enciclopédia biosfera**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.9, n.17, p. 2562. 2013.

SARTORELLI, P. A química das plantas medicinais. **Química Viva, Conselho Regional de Química IV região**. Disponível em: <https://www.crq4.org.br/quimica_viva_plantas_medicinais>. Acesso em: 03 maio 2018.

SCKOOG, DOUGLAS A. et al. **Princípios de Análise Instrumental**, 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.

SECA, A. M. L. et al. The genus *Inula* and their metabolites: From ethnopharmacological to medicinal uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v.154, n.2, p. 286-310, 2014.

SHI G. et al. (1996) Muconin and mucosin: additional nonclassical bioactive acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Journal of Organic Chemistry**, v.61, n.23, p. 7988-7989, 1996.

SHI, G. et al. Absolute stereochemistries of sylvaticin and 12,15-cis-sylvaticin, bioactive C-20,23-cis nonadjacent bistetrahydrofuran annonaceous acetogenins, from *Rollinia mucosa*. **Heterocycles**, v.41, n.8, p.1785, 1995.

- SHI, G. et al. Applying Mosher's Method to Acetogenins Bearing Vicinal Diols. The Absolute Configurations of Muricatetrocin C and Rollidecins A and B, New Bioactive Acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.4, n.8, p. 1281-1286, 1996.
- SHI, G.; MacDOUGAL, J. M.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v.45, n.4, p. 719-723, 1997.
- SIEBRA, C. A. et al. Potencial antiinflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 82 - 88, 2009.
- SILVA, E. L. M. et al. Coriadienin, the first annonaceous acetogenins with two double bonds isolated from *Annona coriacea*. **Journal of the Natural Products**. v. 59, p. 528-530, 1996.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRIL, T. C.; **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**, 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Dois S.A., 1979.
- SILVERSTEIN, R. M.; BASSLER, G. C.; MORRILL, T. C. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 5. Ed., Editora Guanabara Koogan S. A., Rio de Janeiro, 2006.
- SKOOG, DOUGLAS A.; HOLLER, F. JAMES; NIEMAN, TIMOTHY A.; **Princípios de Análise Instrumental**, 5.ed. Porto Alegre: Bookman, 2002.
- SOARES, J. D. R. et al. Caracterização anatômica e citométrica em biribazeiro (*Rollinia mucosa* [Jacq.]). **Revista Brasileira de Fruticultura** v. 36, edição especial, p. 272-280, Fevereiro 2014.
- SOLOMONS, T. W. G. et al. **Química Orgânica**. Vol. 1. 8ª Ed., Rio de Janeiro: LTC, 2005.
- SOLOMONS, T.W.G.; FRYHLE, C.B. **Química Orgânica**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2002. 474 p.
- SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity*, 1a. ed., Academic Press: London 1990.
- TAKADA, M. et al. Definition of crucial factors of acetogenins, potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochimica et Biophysica Acta.**, v.1460, p. 302-310, 2000.
- TAVARES, M.I.B. et al. Estudo de argilas organicamente modificadas por RMN no estado sólido. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 31, 2008, Águas de Lindóia, SP. **Anais...** Águas de Lindóia, SP: [s.n], 2008.
- THE PLANT List: A working list of all plant species. 2013. Disponível em:<<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 28 de maio de 2018.
- TORMO, J. R. et al.. Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. **Chemico-Biological Interactions**. v. 122, p. 171-183, 1999.
- TORMO, J. R. Specific interactions of monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins as inhibitors of mitochondrial complex I. **Chemico-Biological Interactions**, v.122, n.3, p. 171-183, 1999.

TROPICOS. 2018. 2018. Disponível em:
<<http://www.tropicos.org/NameSearch.aspx?name=Annona&commonname>>. Acesso em: 28 maio 2018.

VEGA, M. R. G. et al. Flavonoids from *Annona díóica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n. 48, p. 1554-1559, 2007.

VEIGA-JUNIOR, V.F.; MELLO, J.C.P. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.3, p.464-71, 2008.

WORD Health Organization : Cancer. 201-. [201-]. Disponível em:
<<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 28 maio 2018.

APÊNDICE A

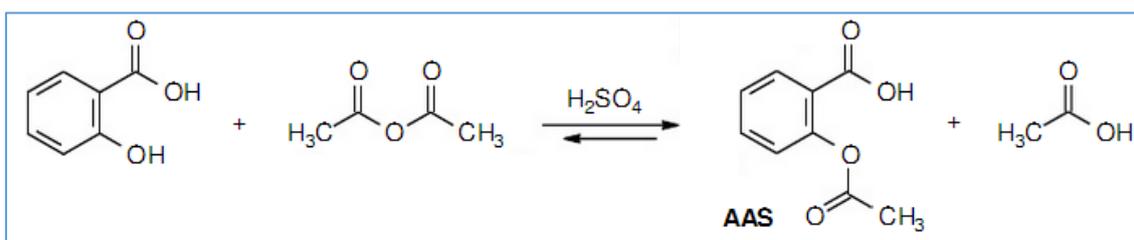
A1.Reação de acetilação

Acetilação (ou na nomenclatura IUPAC, etanoilação) descreve uma reação que introduz um grupo funcional acetila em um composto orgânico. Uma reação envolvendo a substituição do átomo de hidrogênio de um grupo hidroxila com um grupo acetila (CH_3CO) rende um específico éster, o acetato.

A1.1 Descrição da reação de acetilação

O anidrido acético é comumente usado como um agente acetilante reagindo com grupos hidroxilas livres. Por exemplo, é usado na síntese da Aspirina.

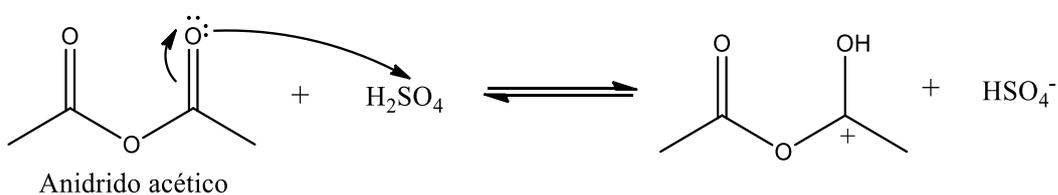
Esquema 1. Reação que representa a síntese da aspirina.



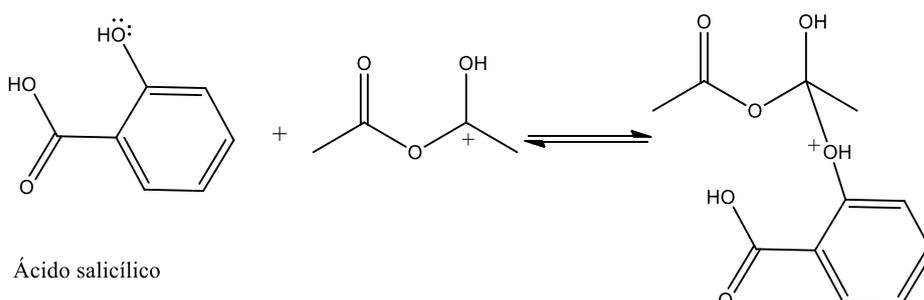
Fonte: BRESLOW, 1973.

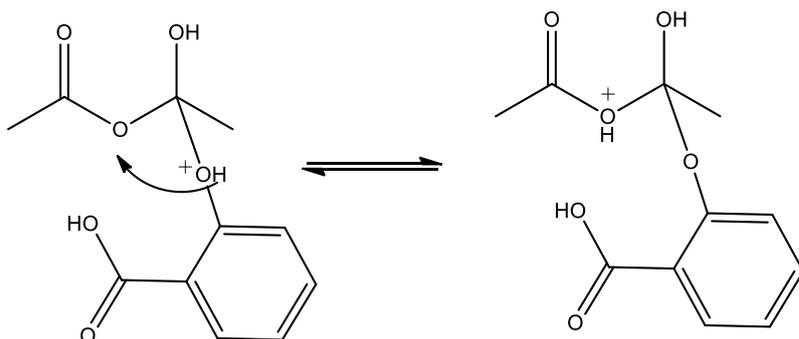
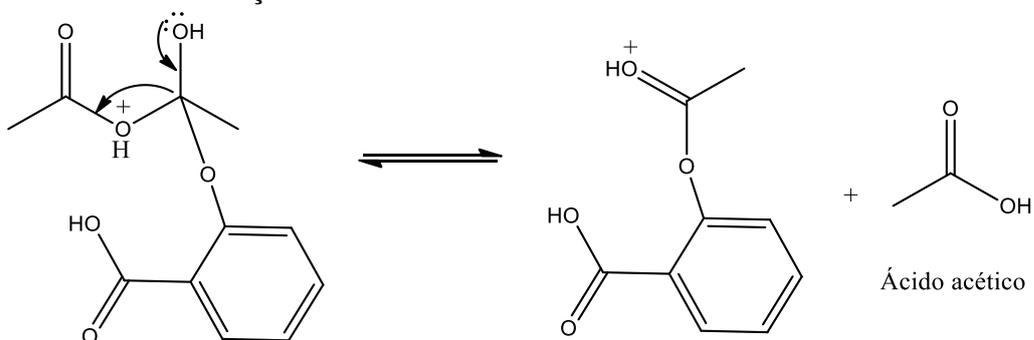
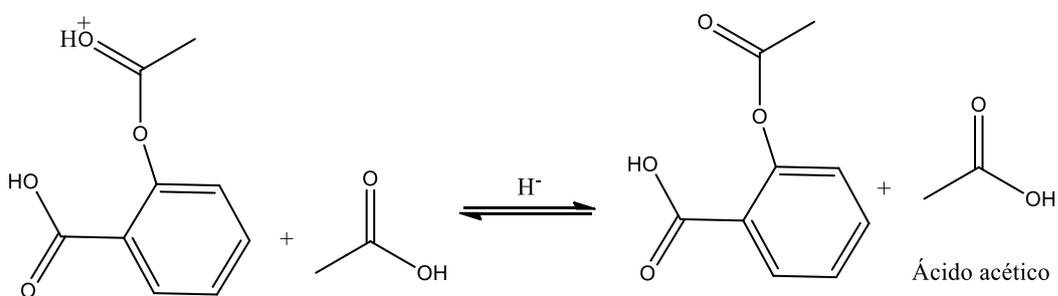
Esquema 2. Mecanismo da síntese da Aspirina

1ª ETAPA: Protonação da carbonila



2ª ETAPA: O nucleófilo do ácido salicílico ataca o centro catiônico

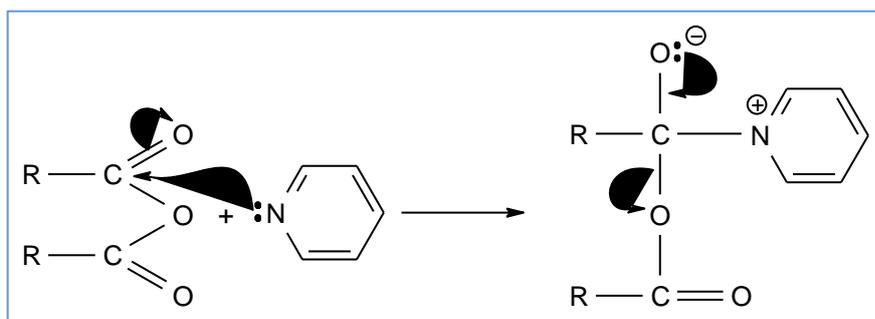


3ª ETAPA: Migração do hidrogênio**4ª ETAPA: Eliminação do ácido acético****5ª ETAPA: Desprotonação**

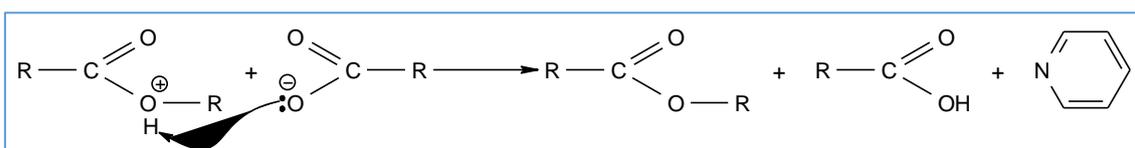
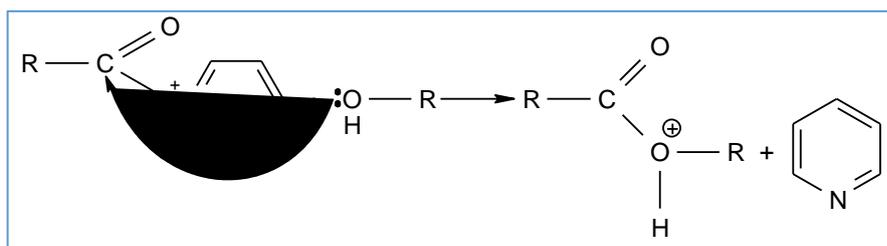
Fonte: BRESLOW, 1974.

A1.2 Reação de álcool com anidridos dissolvidos em piridina

- Inicialmente ocorre um ataque nucleofílico da piridina ao carbono da carbonila do anidrido (solvólise);
- Forma-se um ânion acetato e um derivado da piridina;

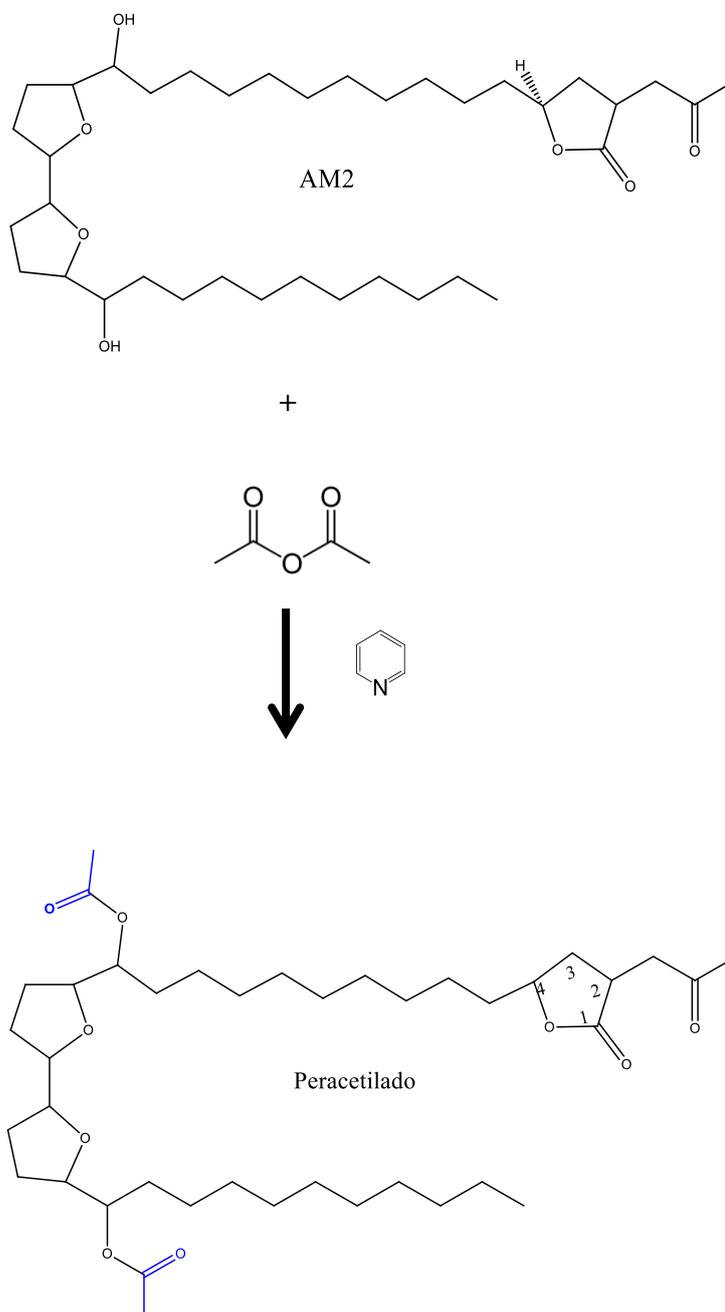


- Logo em seguida reage com o álcool presente, formando o éster e regenerando a piridina.



Fonte: CLAP, 1969.

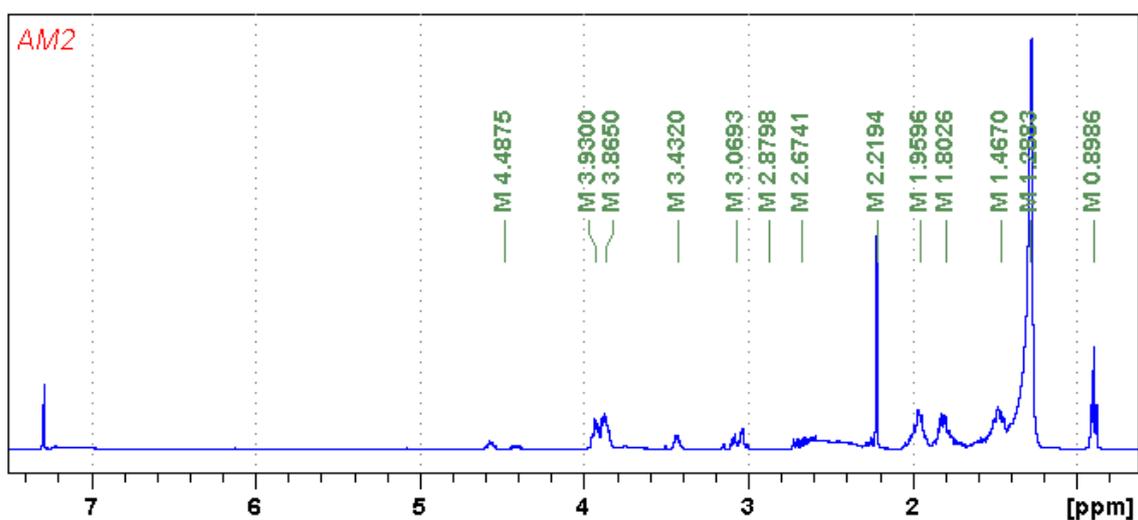
A1.3 Acetilação da AM2



A2. Espectros de RMN ^1H e ^{13}C da AM2 e do produto da acetilação.

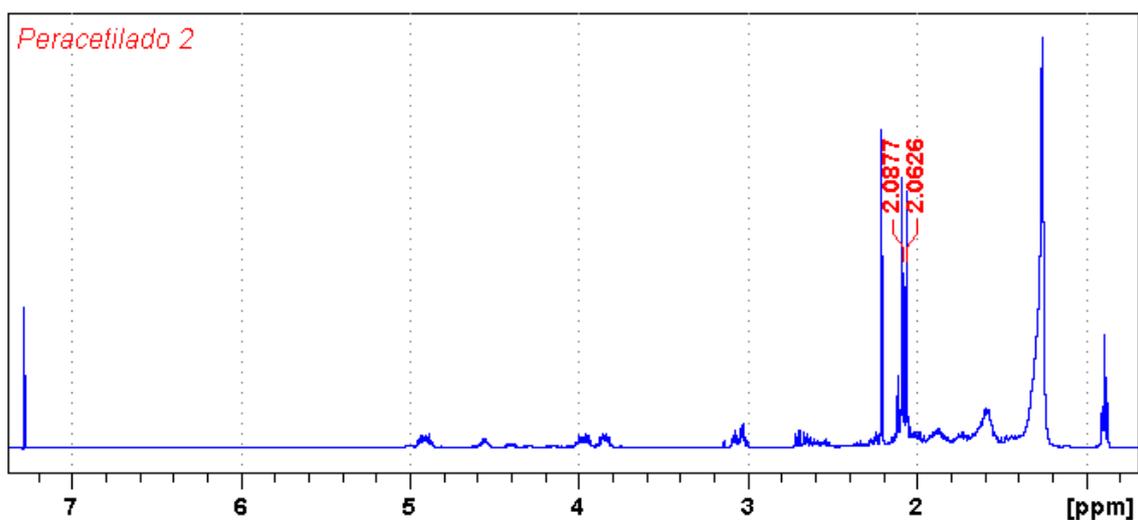
Após a acetilação da AM2, foram executados experimentos de RMN ^1H e ^{13}C do produto da acetilação (peracetilado). A figura 1 mostra o espectro de RMN ^1H da AM2, e a figura 2 mostra o espectro RMN ^1H do peracetilado.

Figura 1 - Espectro de hidrogênio da AM2 antes da acetilação.



Fonte: Autora, 2018.

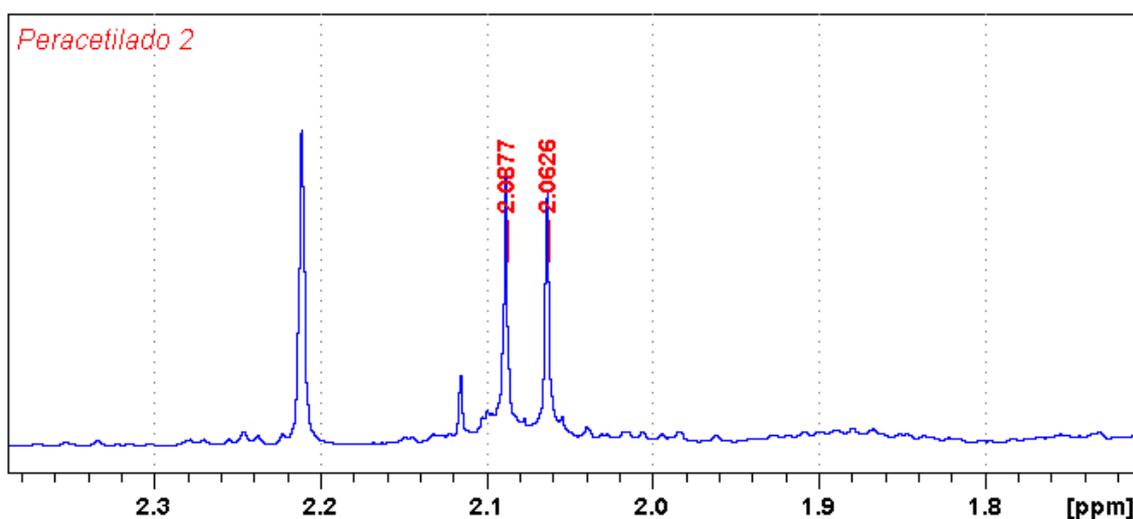
Figura 2 - Espectro de RMN ^1H do peracetilado da AM2.



Fonte: Autora, 2018.

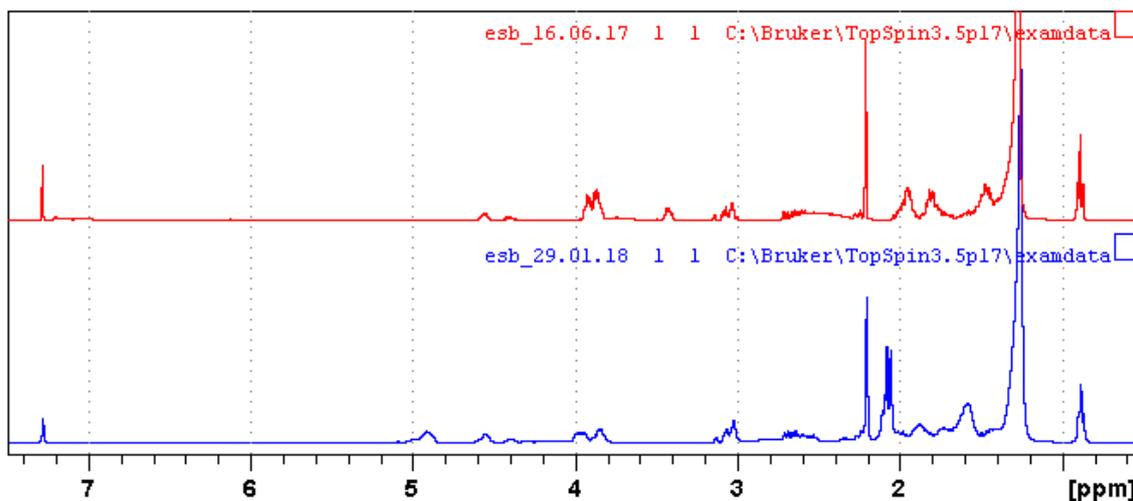
No espectro do peracetilado é possível observar a presença de dois sinais em δ 2,06 e δ 2,08, estes sinais são referentes aos hidrogênios metilênicos pertencentes aos grupos acetila. Logo é possível concluir que, se existe dois sinais é porque existem duas hidroxilas na cadeia carbônica da AM2. Na figura 3 é possível observar a região em que aparecem os sinais das duas metilas ligadas aos oxigênios das metoxilas (δ 2,08 e 2,06).

Figura 3 - Região do espectro de RMN 1H na qual estão os sinais atribuídos às metilas do grupo acetila.



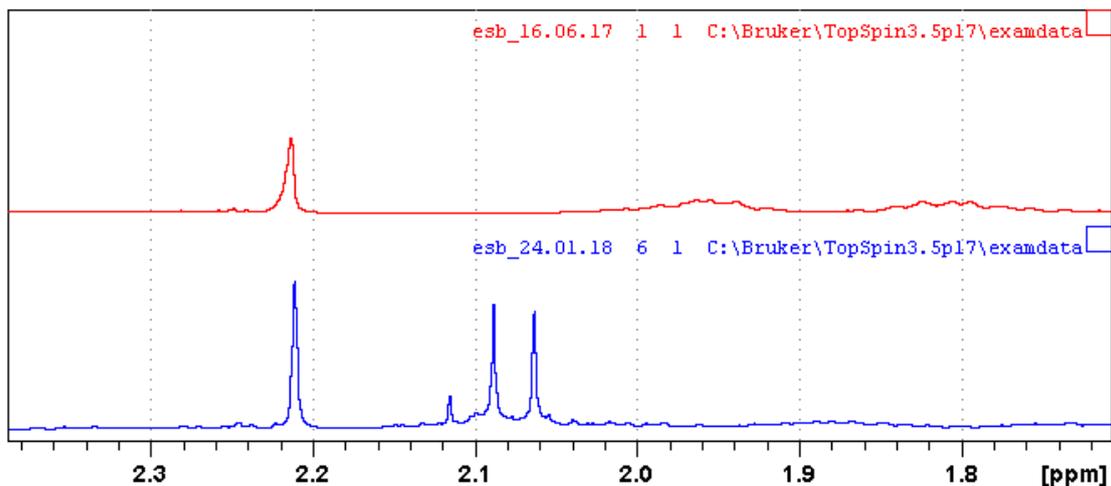
Fonte: Autora, 2018.

Figura 4 - Comparação entre os espectros de hidrogênio da AM2 (vermelho) e do peracetilado (azul) da AM2.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 5 - Comparação dos espectros onde é possível observar os dois sinais das metilas dos dois grupos acetila (2,06 e 2,08 ppm).



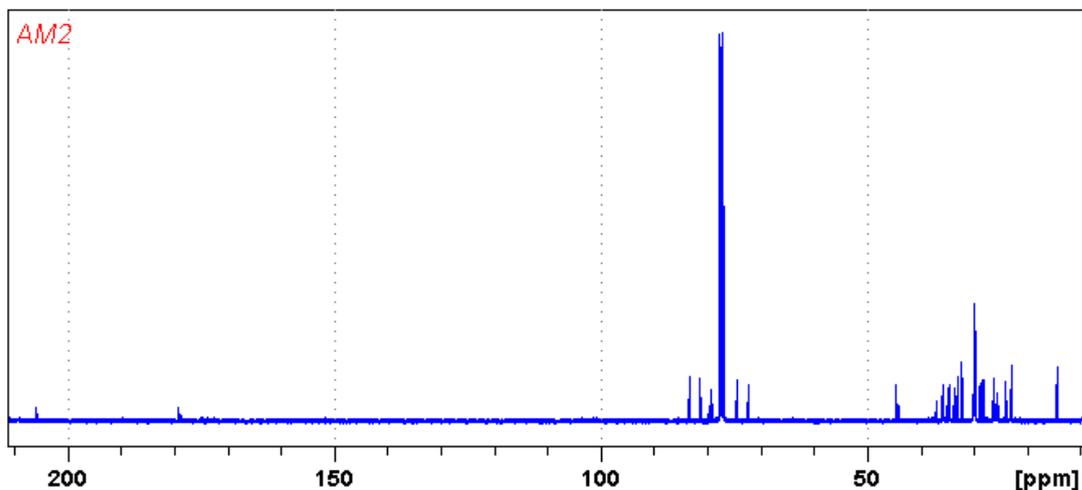
Fonte: Autora, 2018.

A2.1 Espectro de carbono do peracetilado da AM2

A2.1.1 Espectro de RMN ^{13}C APT do peracetilado da AM2.

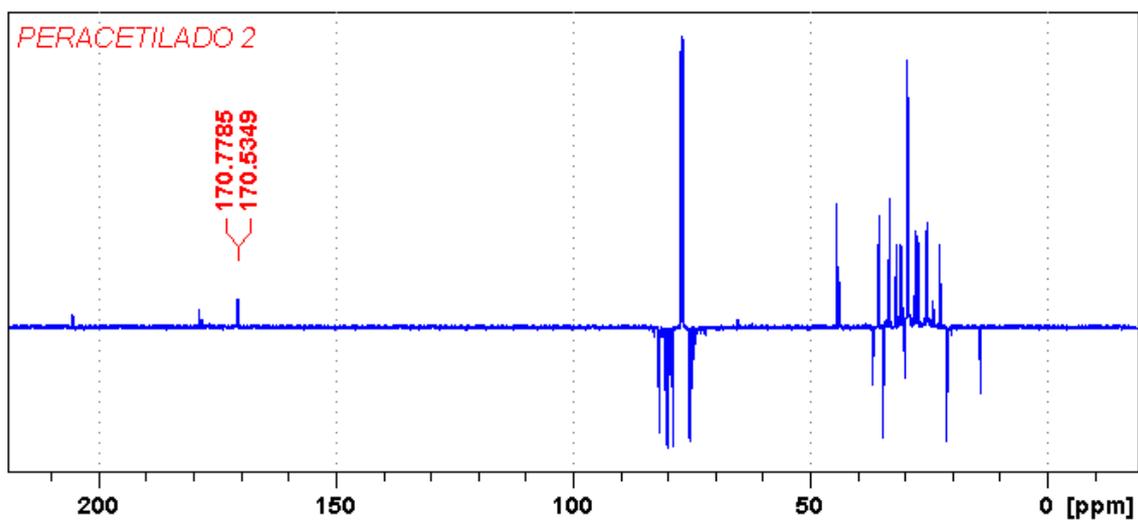
No espectro de RMN ^{13}C APT (Figura 7), é possível observar a presença de sinais e, δ 170,77 e δ 170,53, sinais que não existiam no espectro de RMN ^{13}C da AM2. Estes sinais formam atribuídos às carbonilas do grupo acetila, presentes do peracetilado.

Figura 6 - Espectro de RMN ^{13}C APT da AM2.



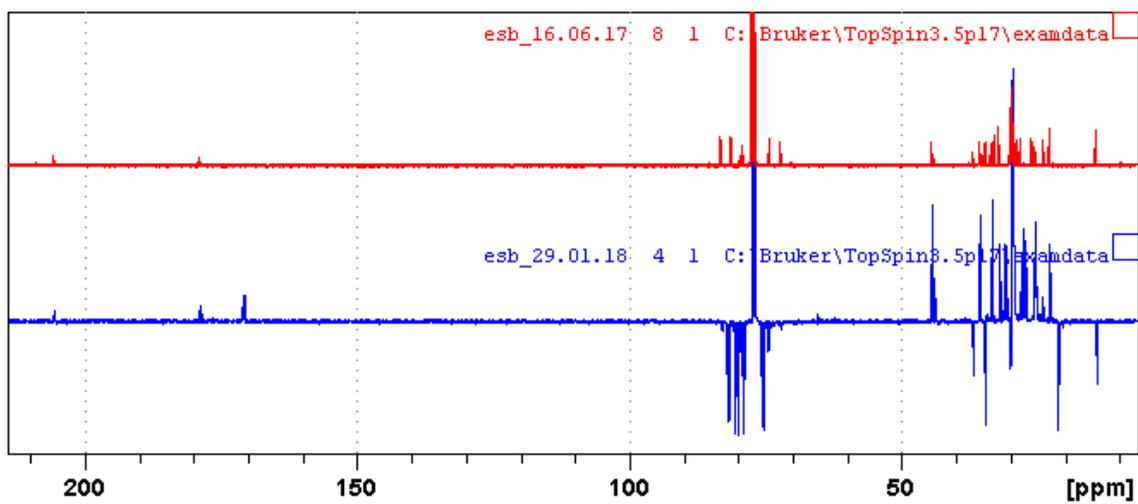
Fonte: Autora, 2018.

Figura 7- Espectro de RMN ^{13}C APT do peracetilado.



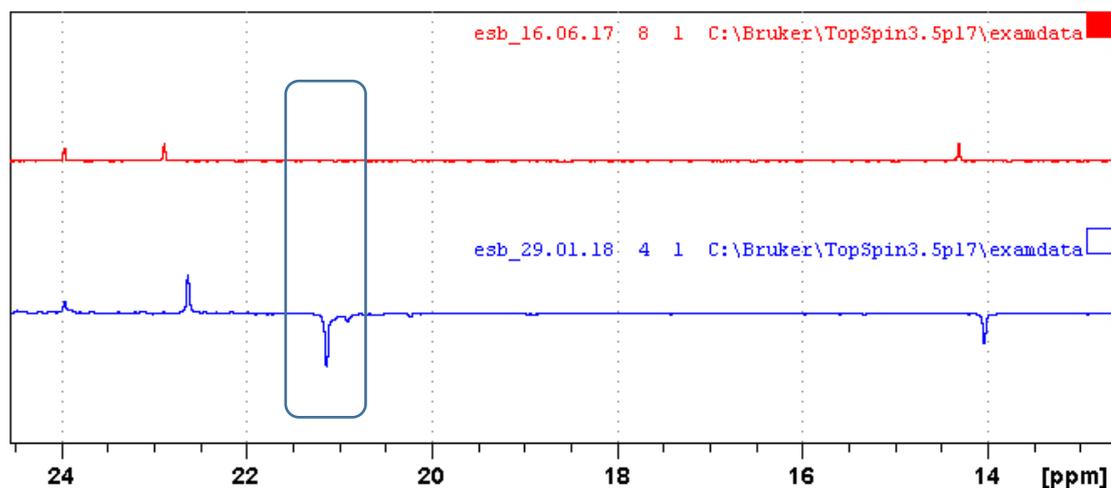
Fonte: Autora, 2018.

Figura 8 - Comparação dos espectros da AM2. Antes da acetilação (espectro vermelho) e após a acetilação (espectro azul).



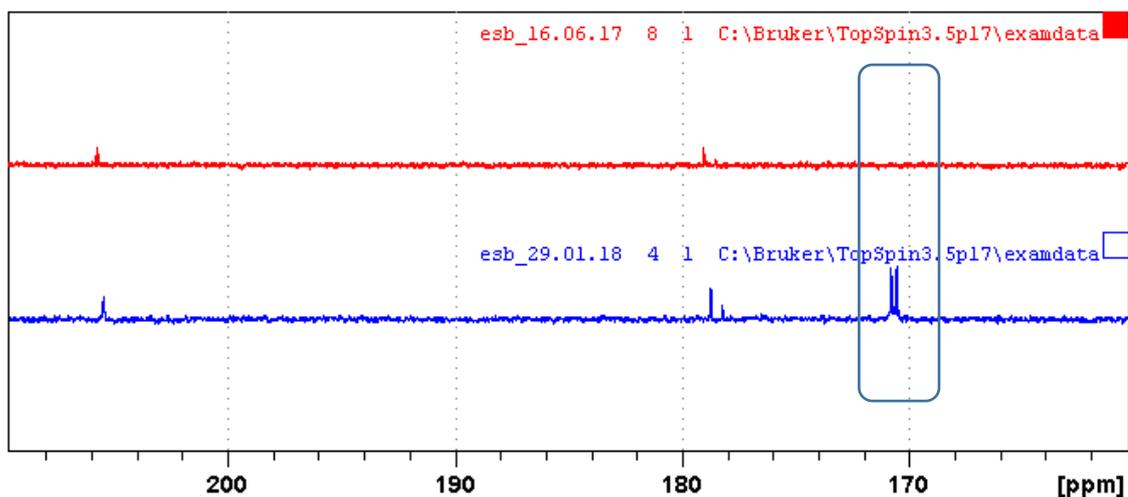
Fonte: Autora, 2018.

Figura 9 - Comparação dos espectros da AM2. Antes da acetilação (espectro vermelho) e após a acetilação (espectro azul). Ampliação da região do sinal (~ 21,0 ppm) das metilas do grupo acetila.



Fonte: Autora, 2018.

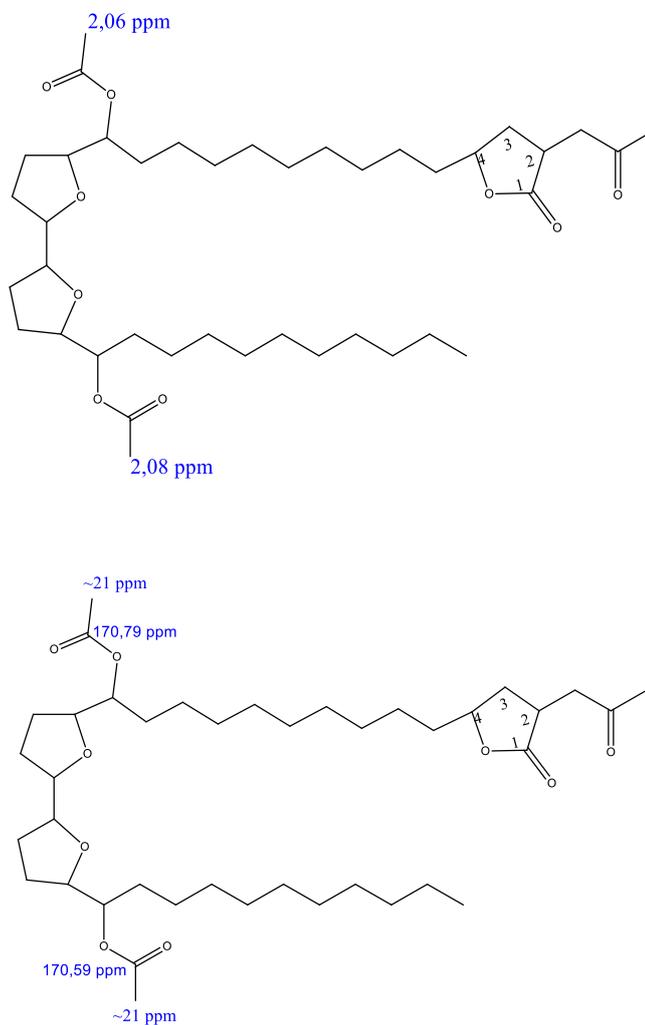
Figura 10 - Comparação dos espectros da AM2. Antes da acetilação (espectro vermelho) e após a acetilação (espectro azul). Ampliação da região dos sinais (~ 21,0 ppm) das carbonilas do grupo acetila.



Fonte: Autora, 2018.

A seguir, na figura 11, estão mostradas as estruturas químicas da AM2 e do peracetilado com os seus respectivos valores de deslocamentos químicos para ^1H e ^{13}C para a parte da molécula onde houve mudança após a reação de acetilação.

Figura 11 - Estruturas moleculares da AM2 e produto da acetilação e seus respectivos valores de deslocamentos químicos de ^1H e ^{13}C , respectivamente.



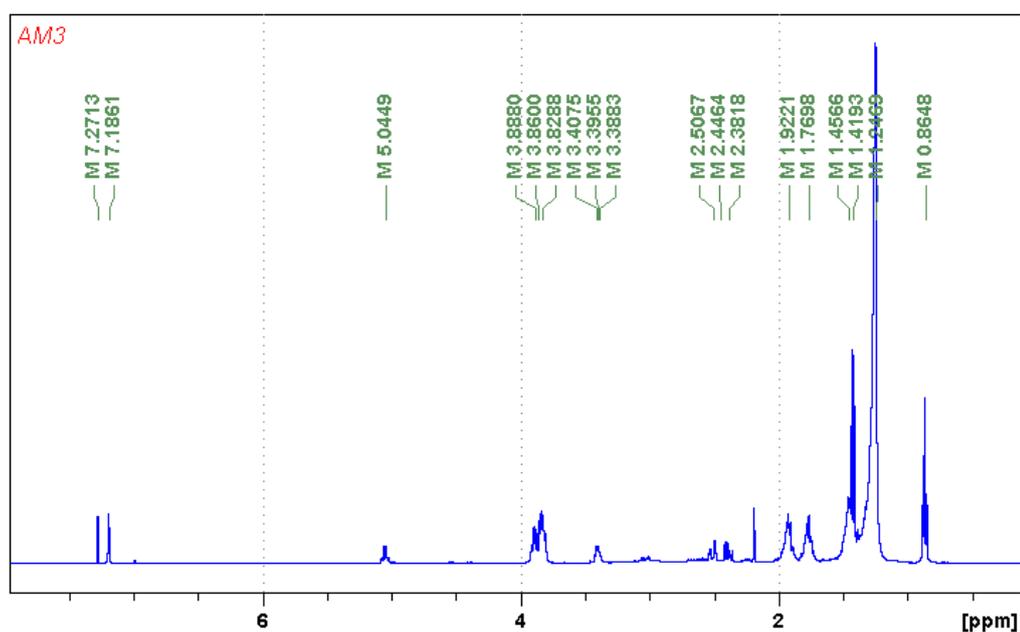
Fonte: Autora, 2018.

APÊNDICE B

B1. Espectros de RMN das substâncias estudadas neste trabalho

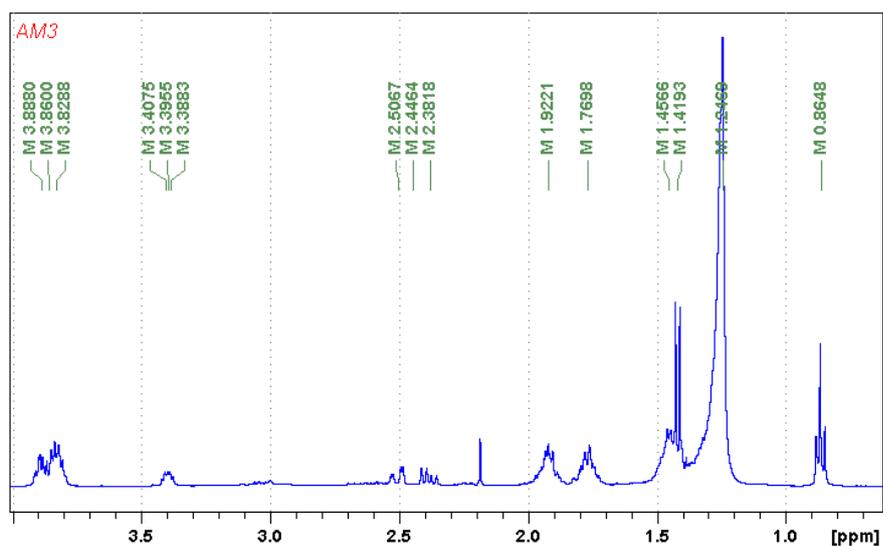
B1.1 Espectros de RMN 1D e 2D da amostra codificada como AM3

Figura 12 - Espectro de ^1H , em CDCl_3 , da substância codificada como AM3.

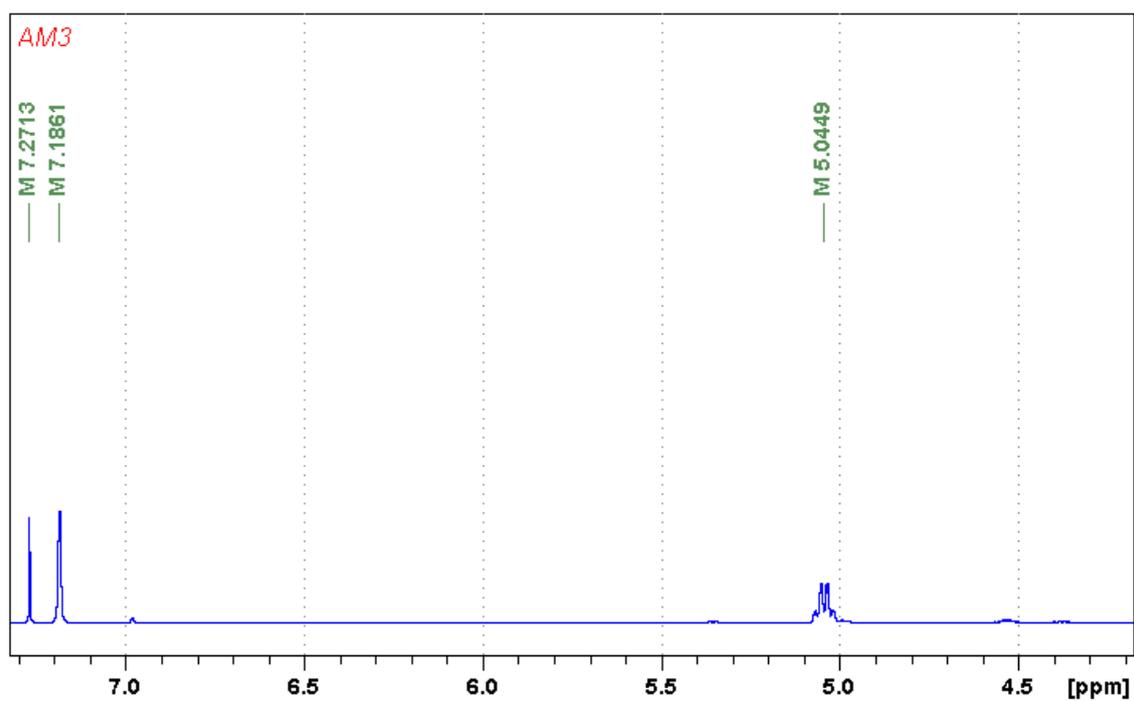


Fonte: Autora, 2018.

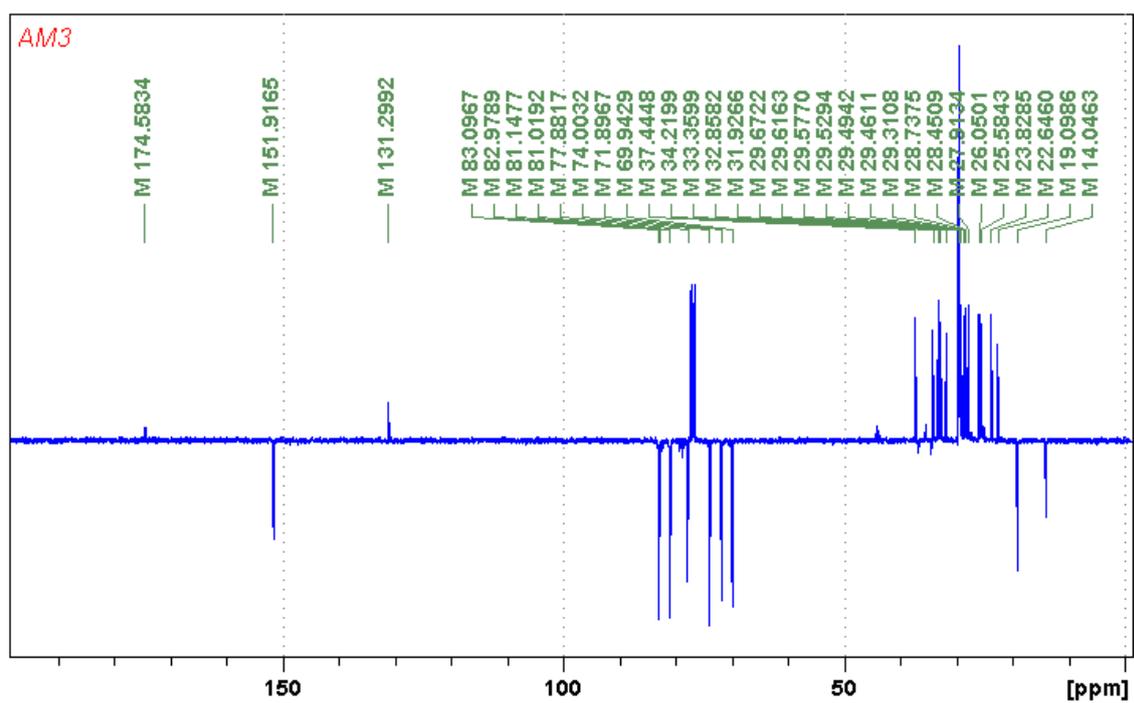
Figura 13 - Ampliação do espectro de hidrogênio da substância codificada como AM3.



Fonte: Autora, 2018.

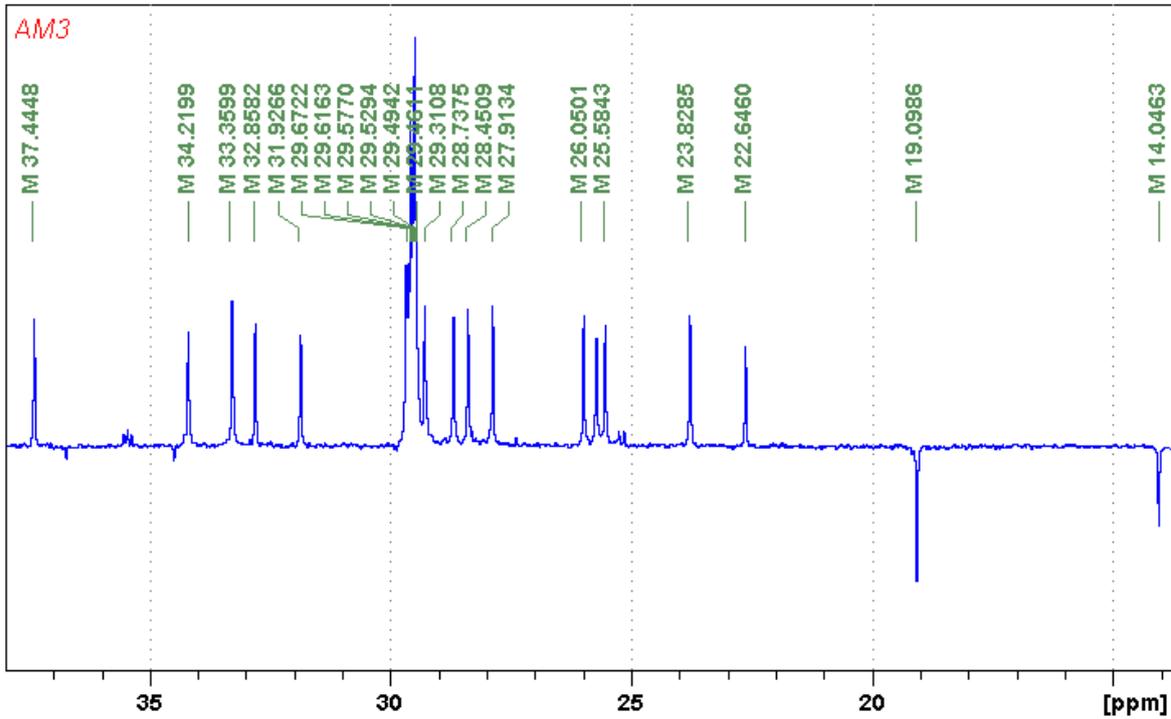
Figura 14 - Ampliação do espectro de hidrogênio da substância codificada como AM3.

Fonte: Autora, 2018.

Figura 15 - Espectros de ^{13}C APT, em CDCl_3 , da substância codificada como AM3.

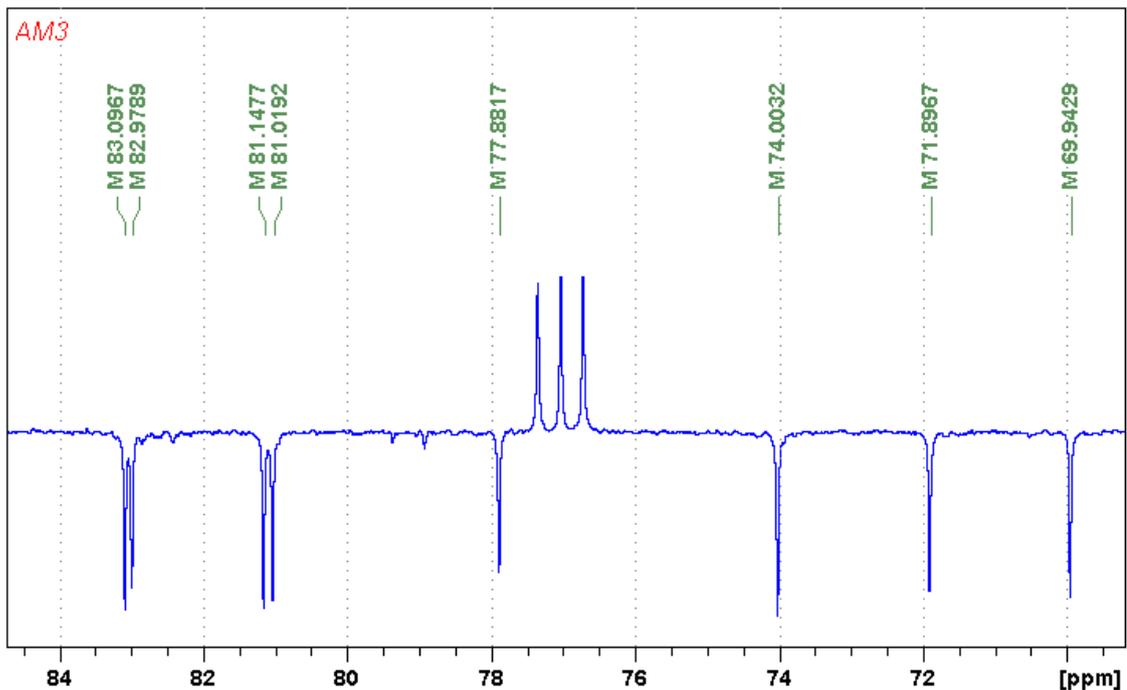
Fonte: Autora, 2018.

Figura 16 - Ampliação de região (13,8 a 37,8 ppm) do espectro de ¹³C APT da amostra codificada como AM3.



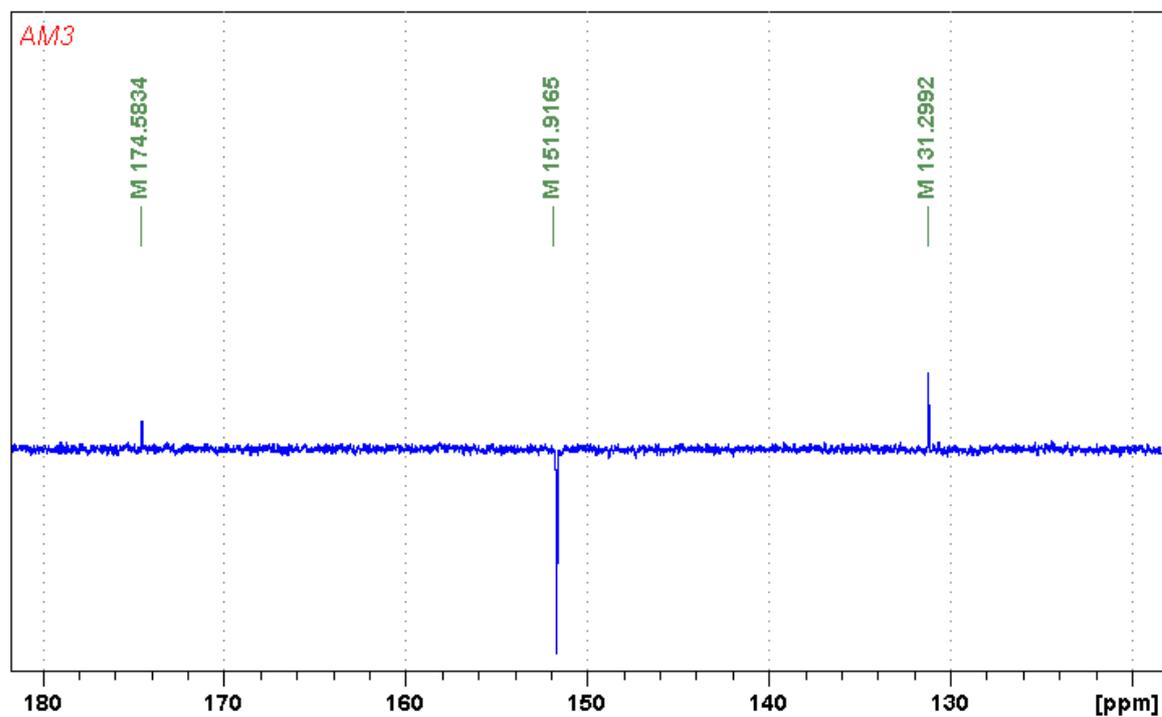
Fonte: Autora, 2018.

Figura 17 - Ampliação de região (69,5 a 84 ppm) do espectro de ¹³C APT da amostra codificada como AM3.



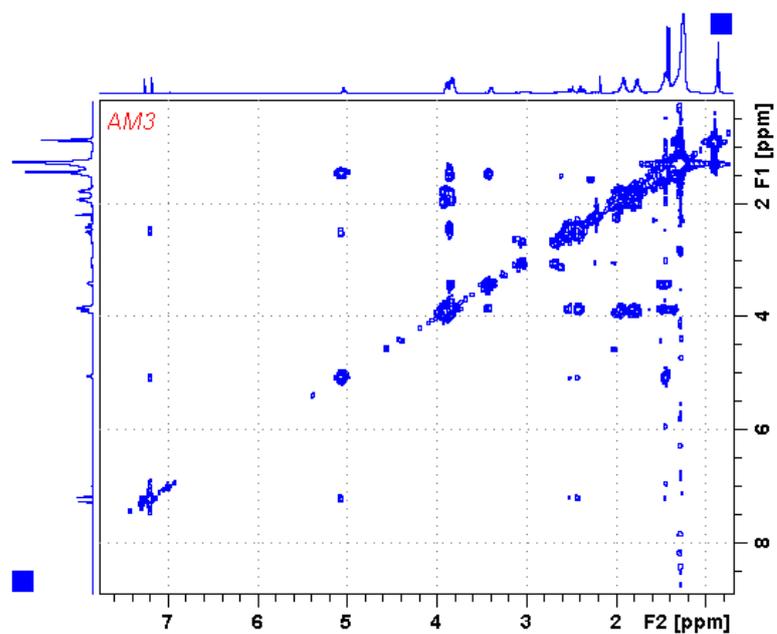
Fonte: Autora, 2018.

Figura 18 - Ampliação de região (69,5 a 84 ppm) do espectro de ^{13}C APT da amostra codificada como AM3.



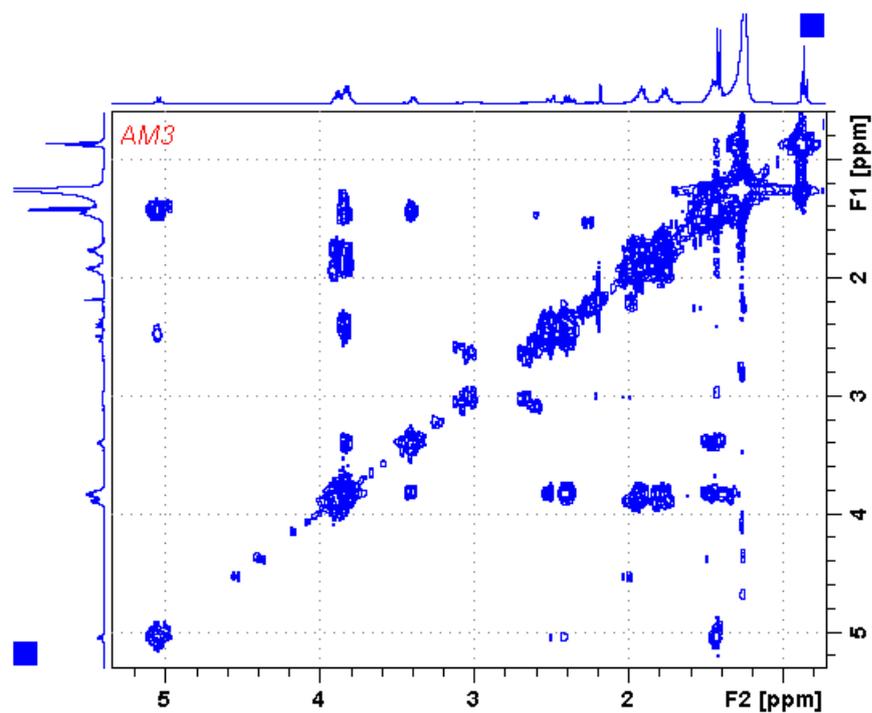
Fonte: Autora, 2018.

Figura 19 - Espectro de RMN COSY, em CDCl_3 , da amostra codificada como AM3.



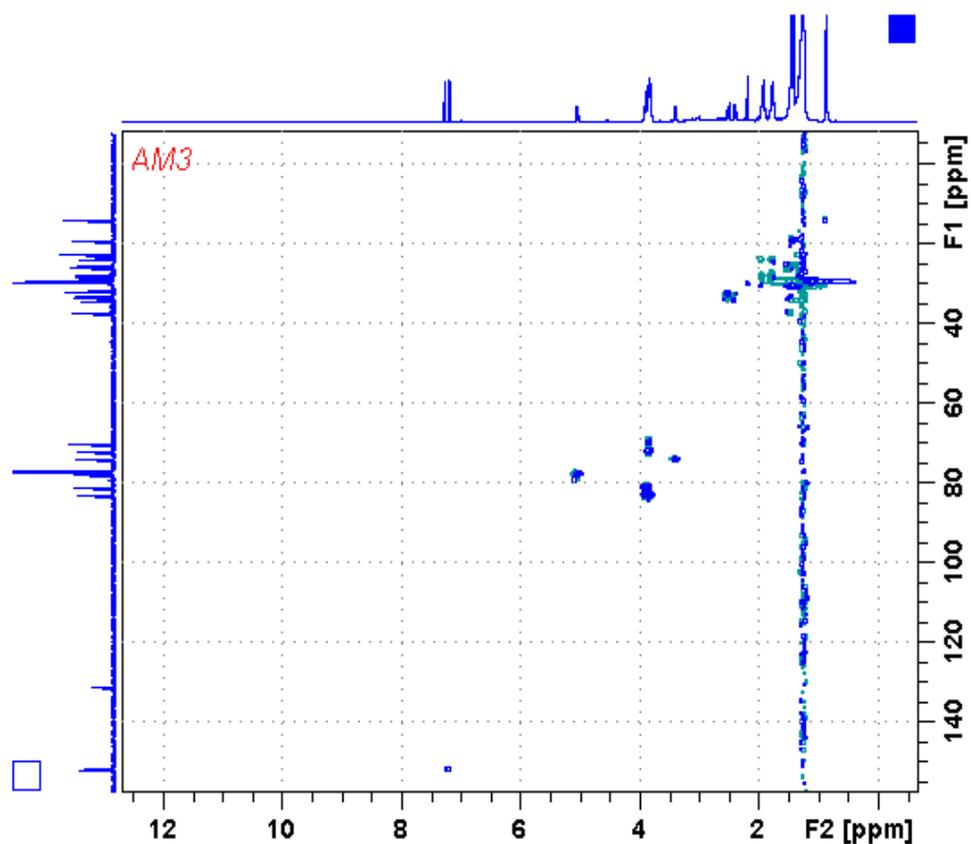
Fonte: Autora, 2018.

Figura 20 - Ampliação do espectro COSY (região 0,8 a 5,22 ppm) da substância codificada como AM3.



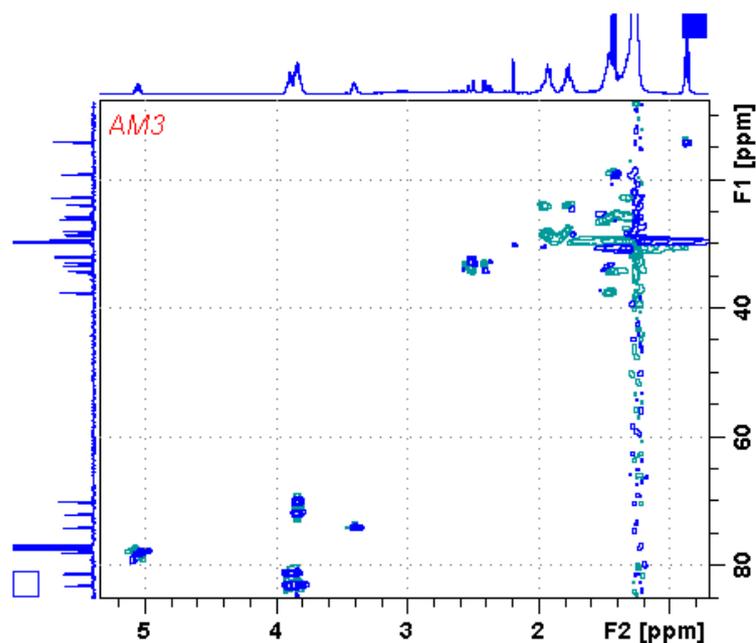
Fonte: Autora, 2018.

Figura 21. Espectro de RMN HSQC, obtido em CDCl₃, da amostra codificada como AM3.



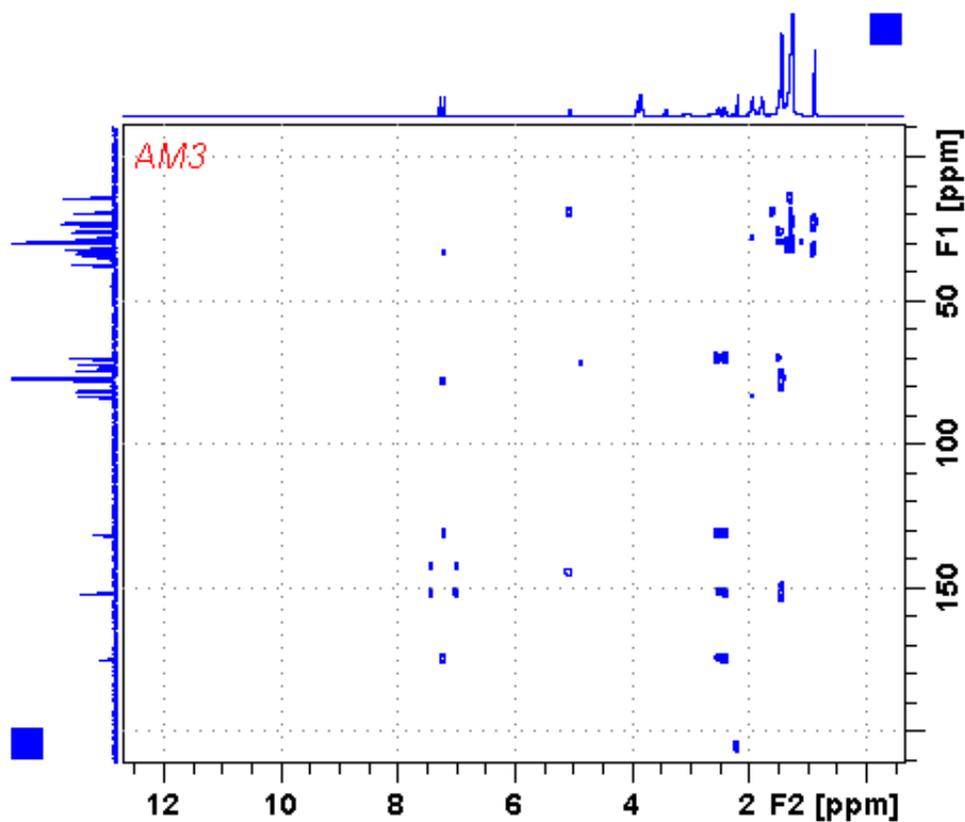
Fonte: Autora, 2018.

Figura 22 - Ampliação (0,7 a 5,18 ppm) do espectro de RMN HSQC, em CDCl_3 , da amostra codificada como AM3.



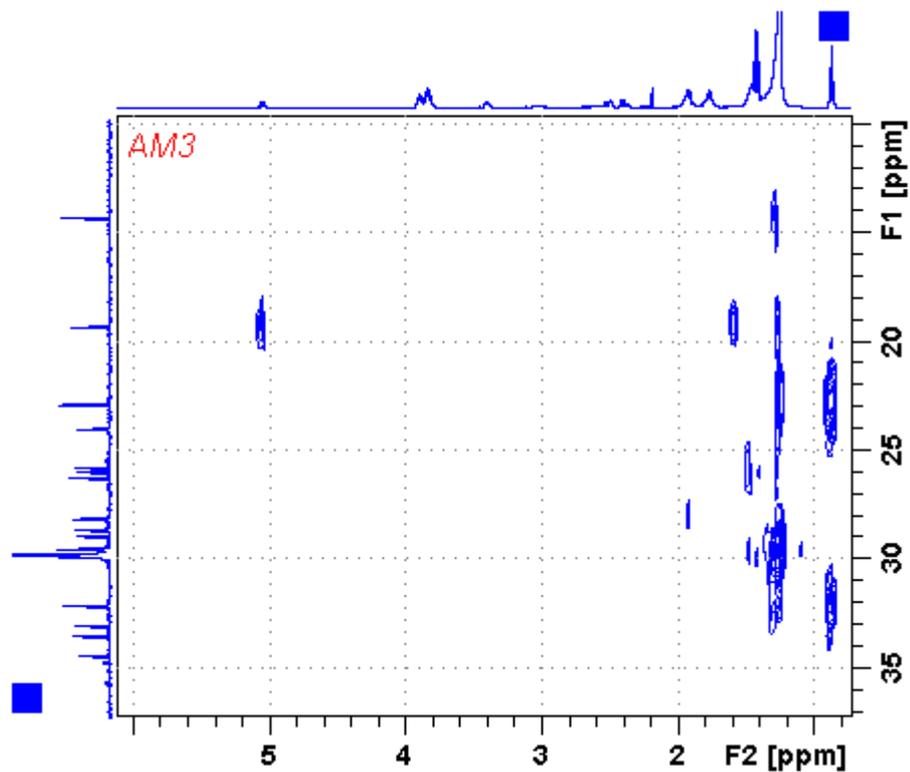
Fonte: Autora, 2018.

Figura 23 - Espectro de RMN HMBC, em CDCl_3 , da amostra codificada como AM3.



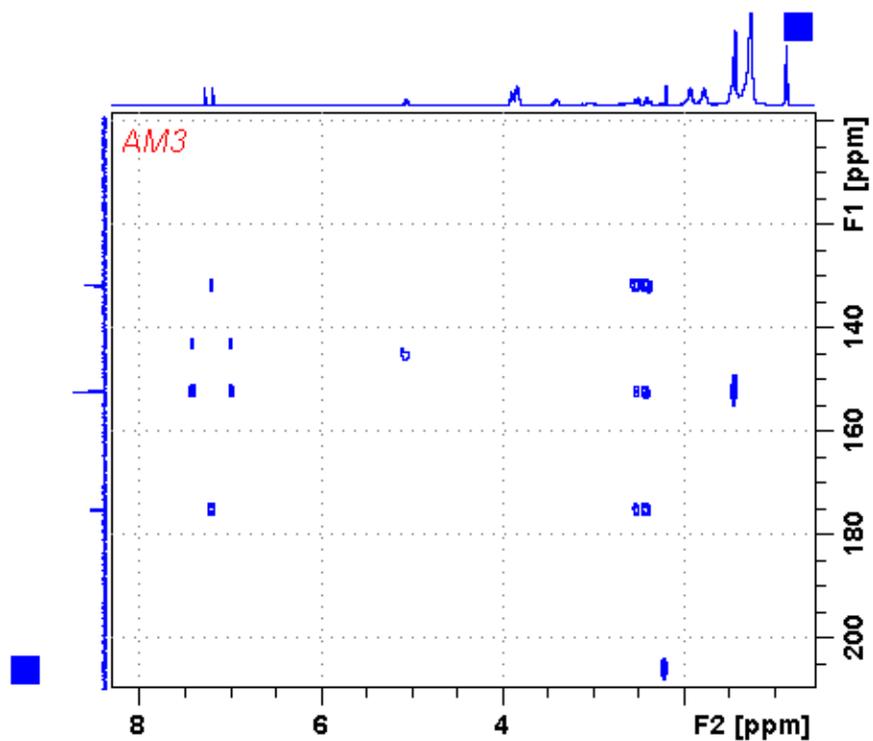
Fonte: Autora, 2018.

Figura 24 - Ampliação da região de CH₂ do espectro de HMBC, em CDCl₃, da amostra codificada como AM3.



Fonte: Autora, 2018.

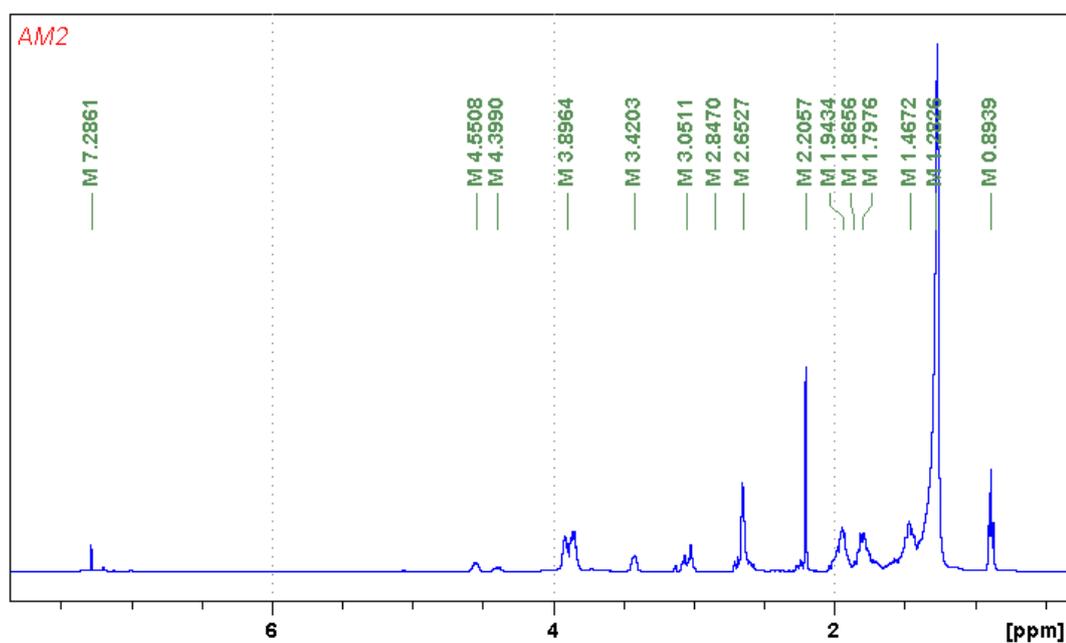
Figura 25 - Ampliação da região (C=O, C e CH) do espectro de HMBC, em CDCl₃, da amostra codificada como AM3.



Fonte: Autora, 2018.

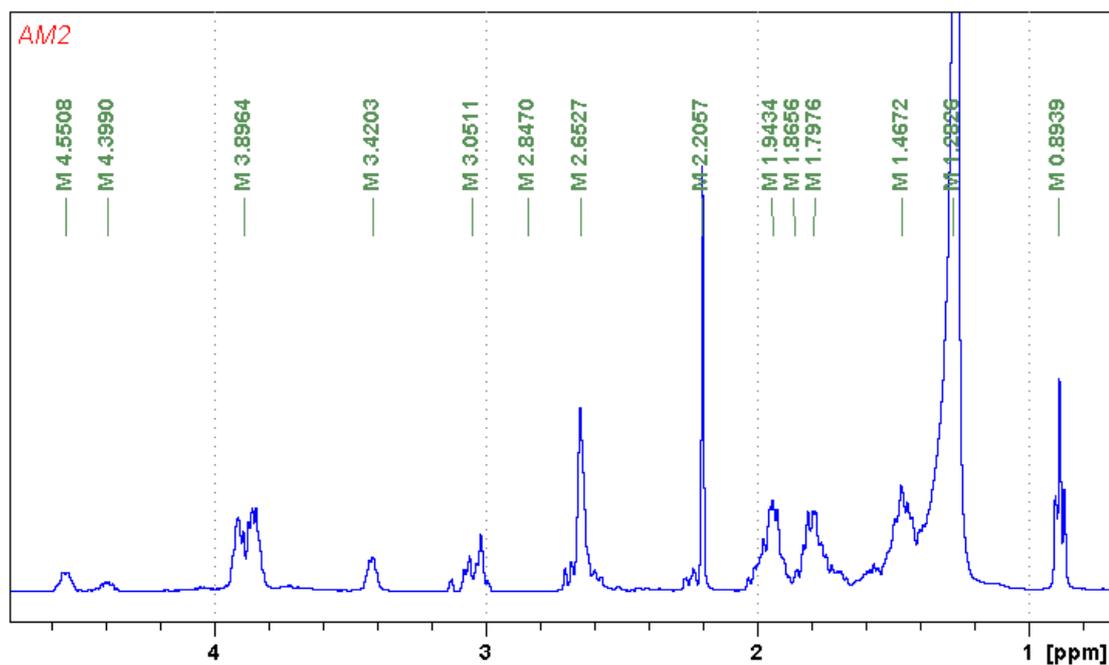
B1.2 Espectros de RMN 1D e 2D da amostra codificada como AM2

Figura 26 - Espectro de ^1H , em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



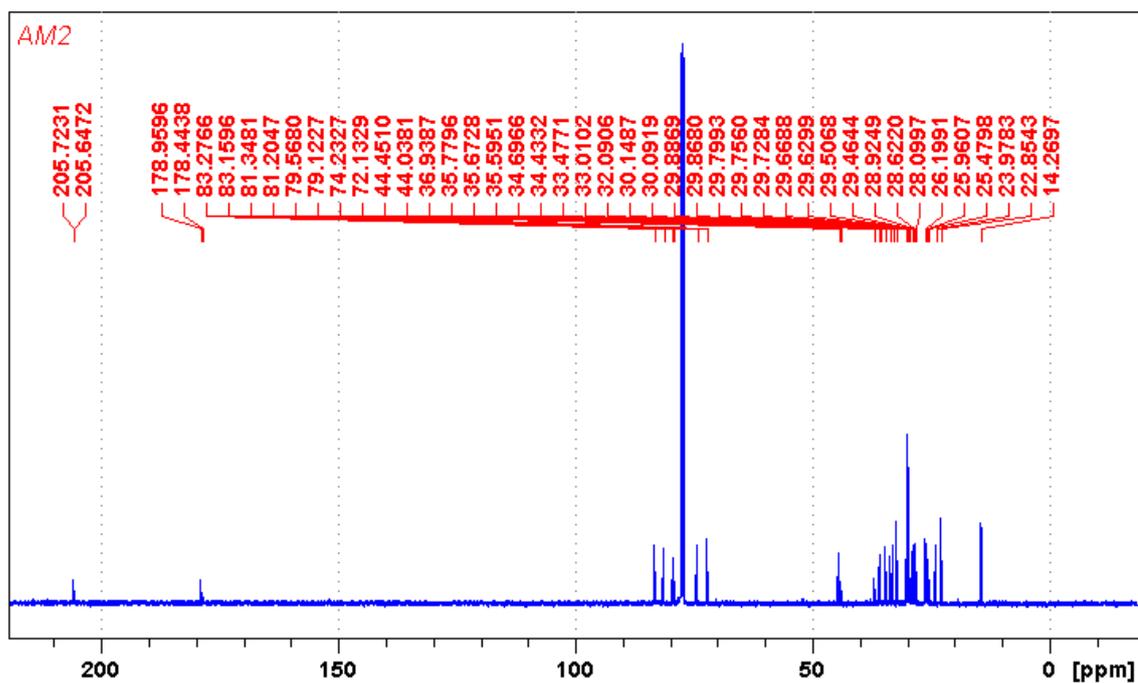
Fonte: Autora, 2018.

Figura 27 - Ampliação (0,76 a 4,7 ppm) do espectro de ^1H , em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



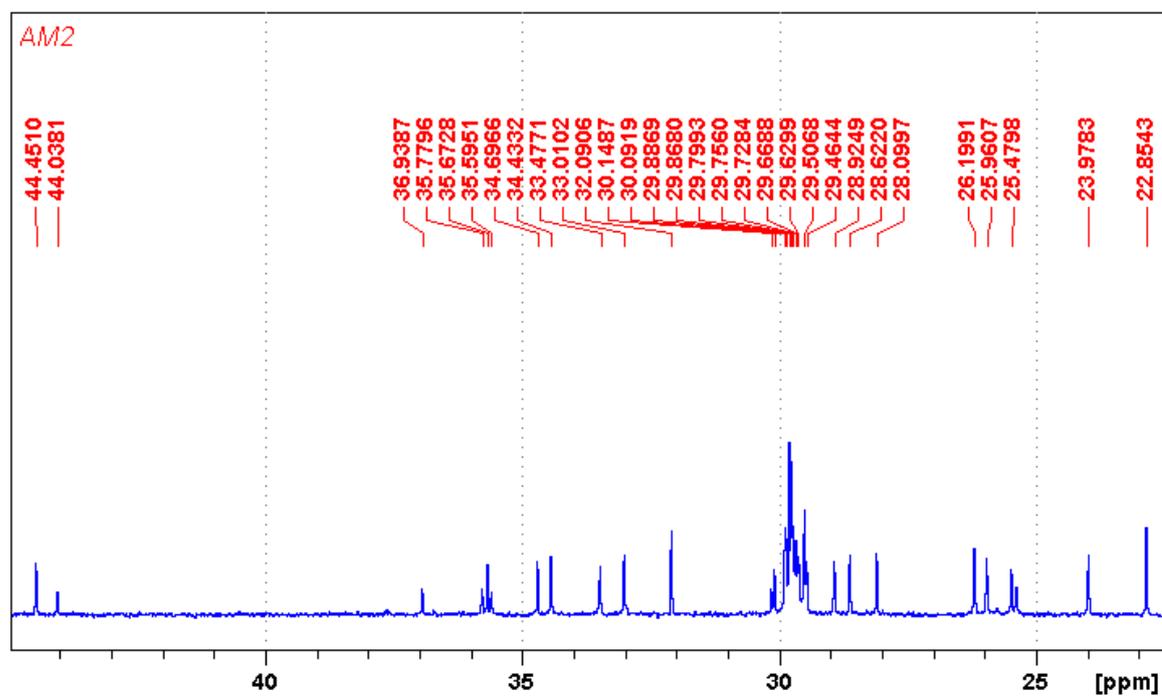
Fonte: Autora, 2018.

Figura 28 - Espectro de ^{13}C , em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



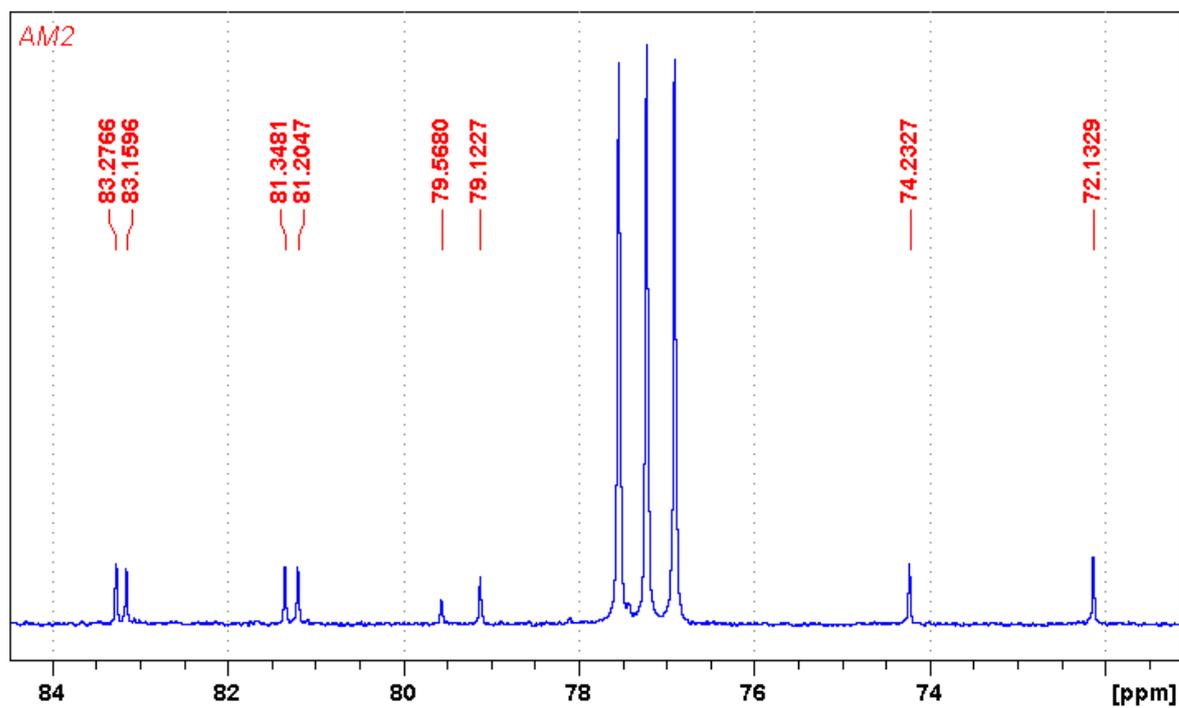
Fonte: Autora, 2018.

Figura 29 - Ampliação (22,85 a 44,45 ppm) do espectro de ^{13}C , em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



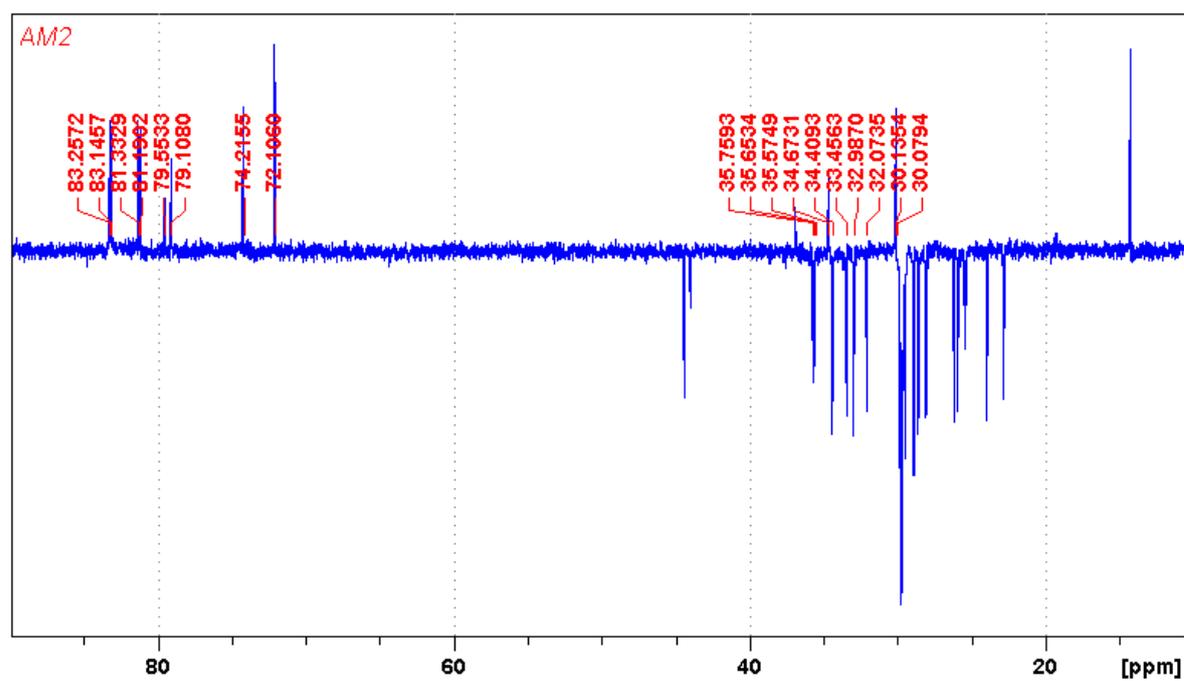
Fonte: Autora, 2018.

Figura 30 - Ampliação (72,0 a 84,45 ppm) do espectro de ^{13}C , em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



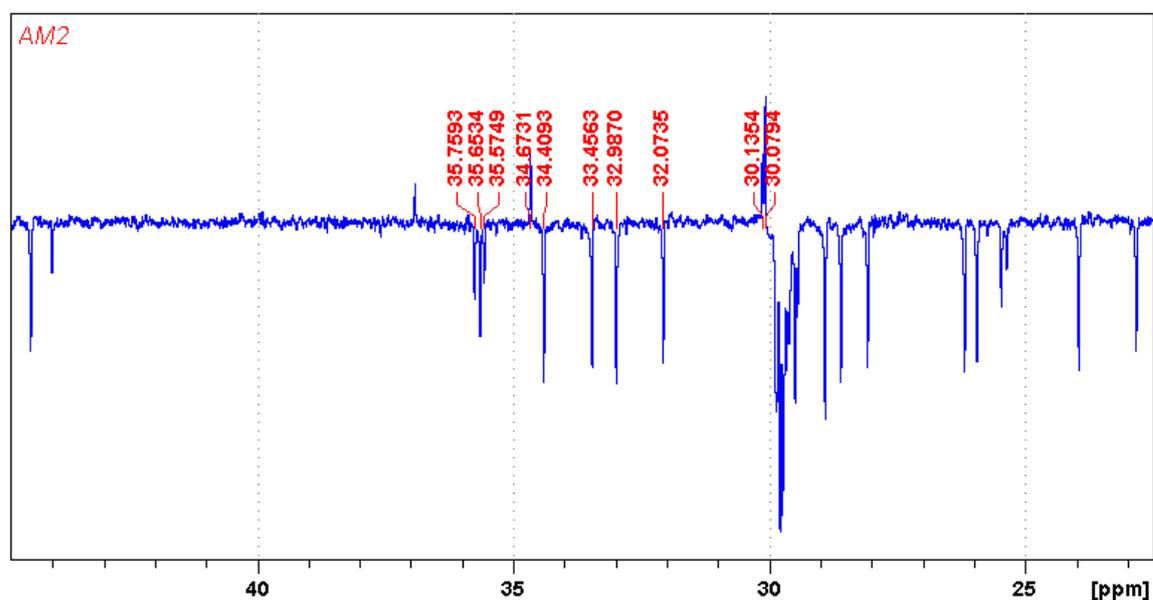
Fonte: Autora, 2018.

Figura 32 - Espectro de RMN ^{13}C DEPT 135, em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



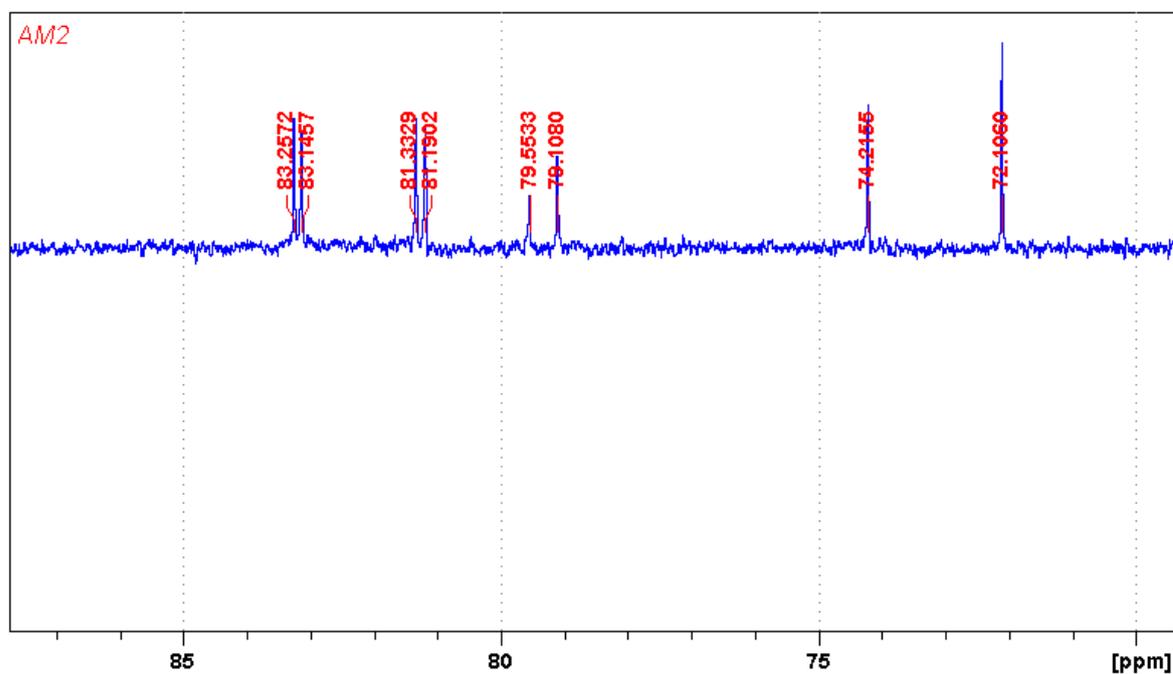
Fonte: Autora, 2018.

Figura 33 - Ampliação do espectro de ^{13}C , em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



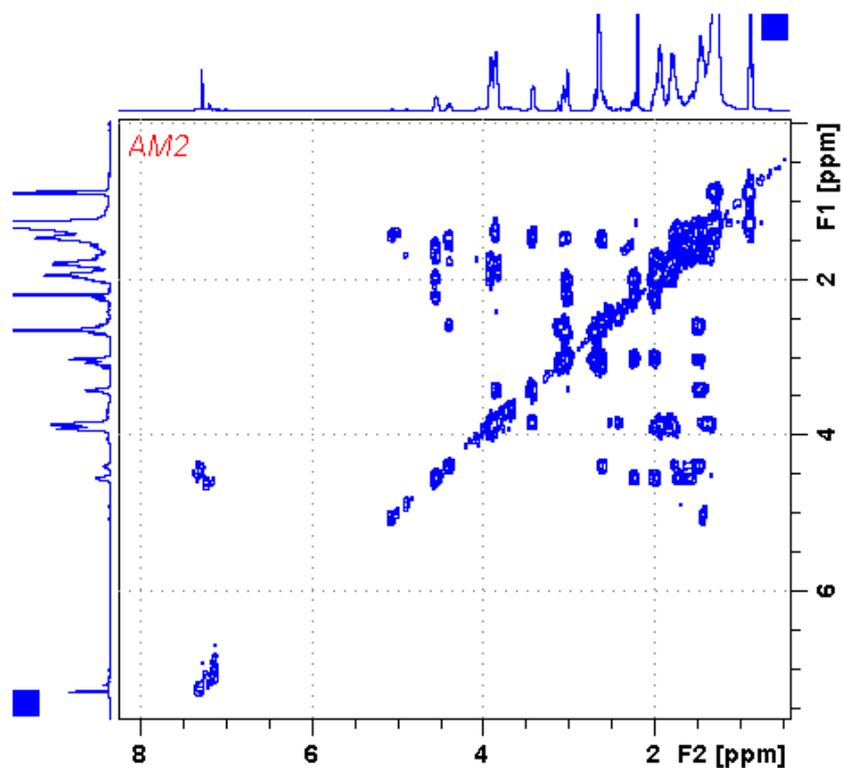
Fonte: Autora, 2018.

Figura 34 - Ampliação do espectro de ^{13}C , em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



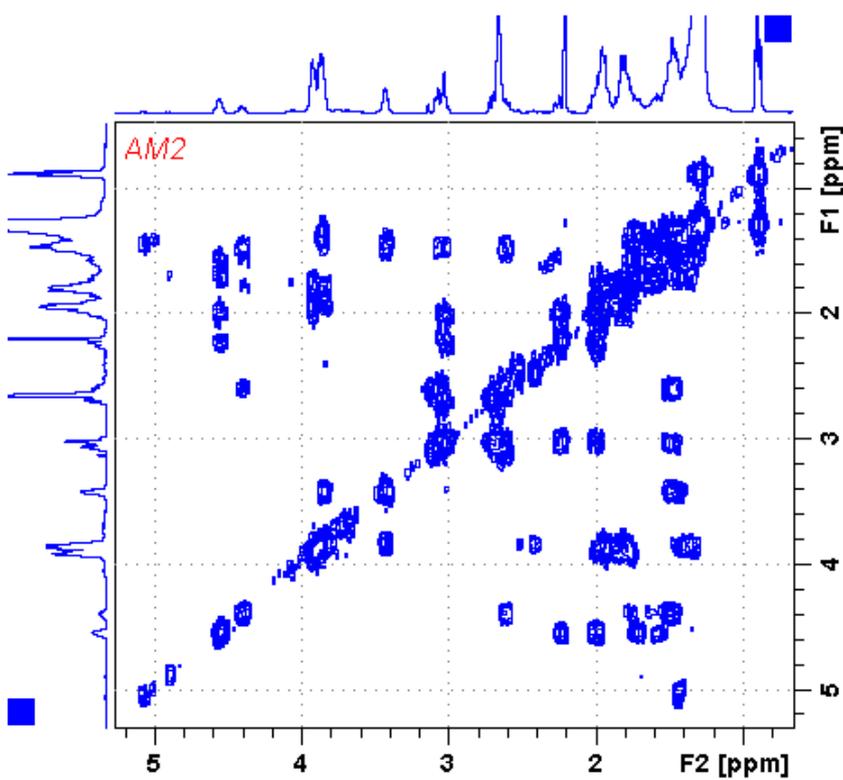
Fonte: Autora, 2018.

Figura 35 - Espectro de RMN COSY, em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



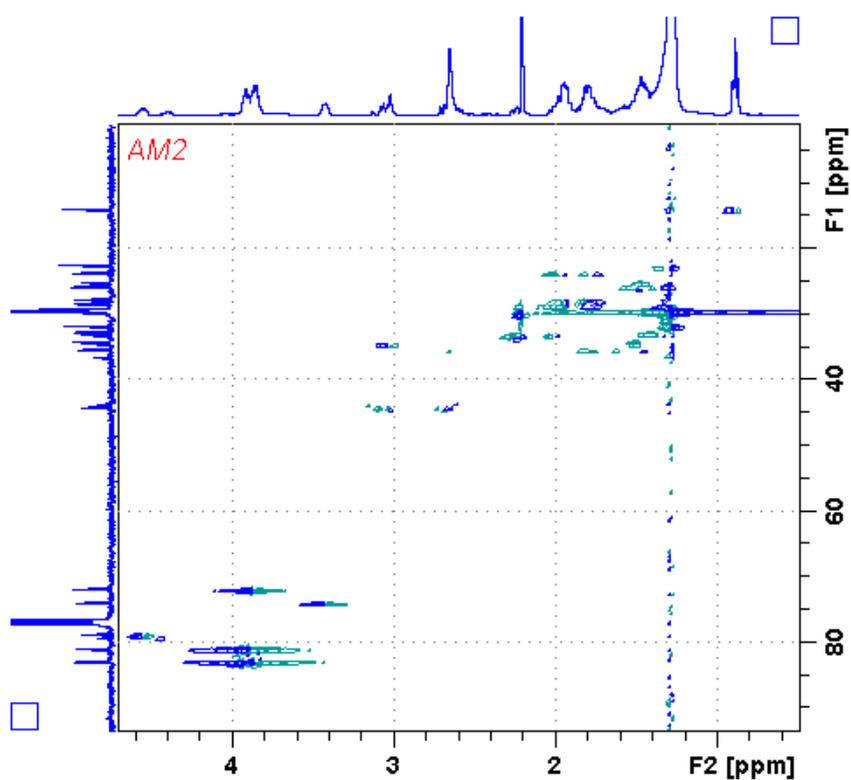
Fonte: Autora, 2018.

Figura 36 - Ampliação (0,75 a 5,2 ppm) do espectro de RMN COSY, em CDCl_3 , da amostra codificada como AM2.



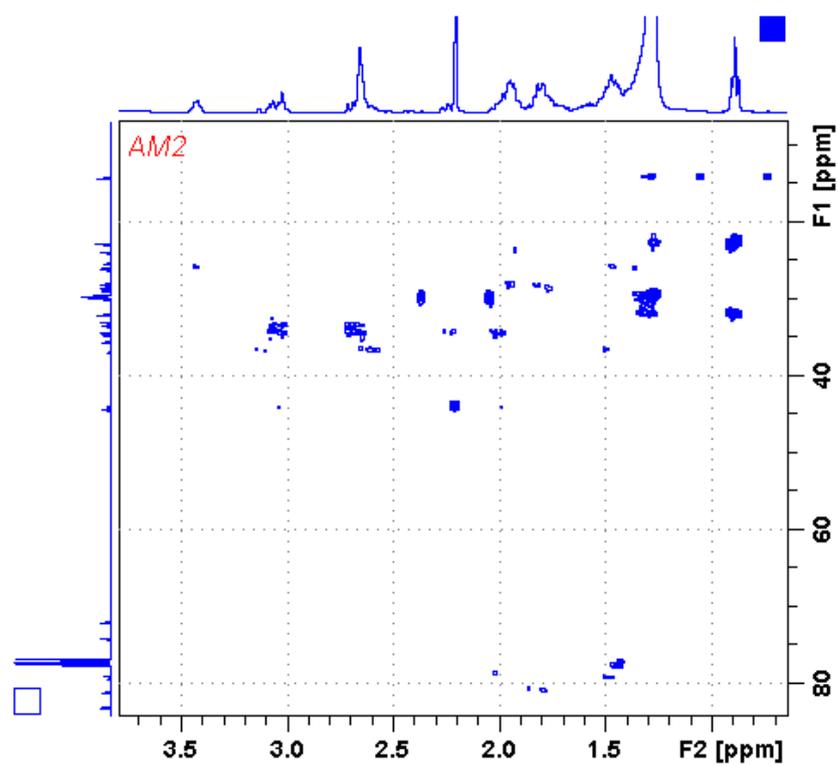
Fonte: Autora, 2018.

Figura 37 - Espectro de RMN HSQC, em CDCl_3 , para a amostra codificada como AM2.

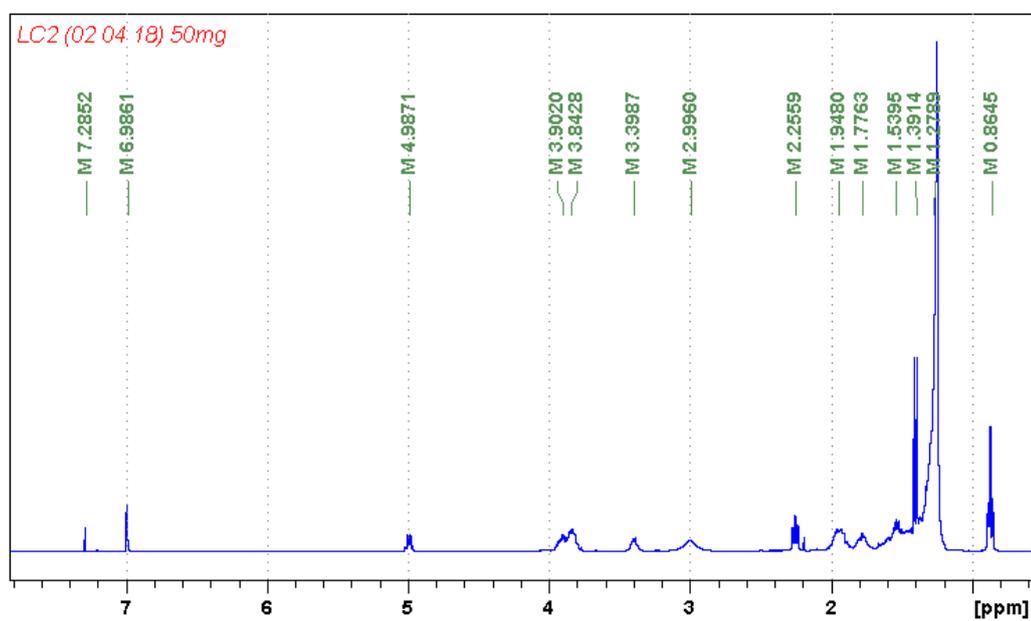


Fonte: Autora, 2018.

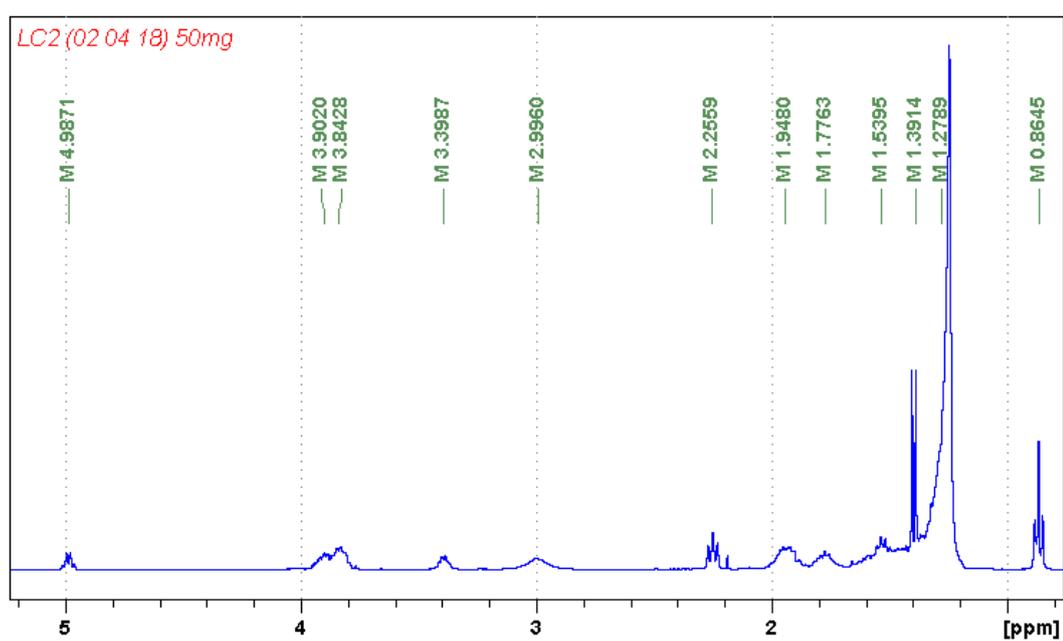
Figura 38 - Espectro de RMN HMBC, em CDCl_3 , para a amostra codificada como AM2.



Fonte: Autora, 2018.

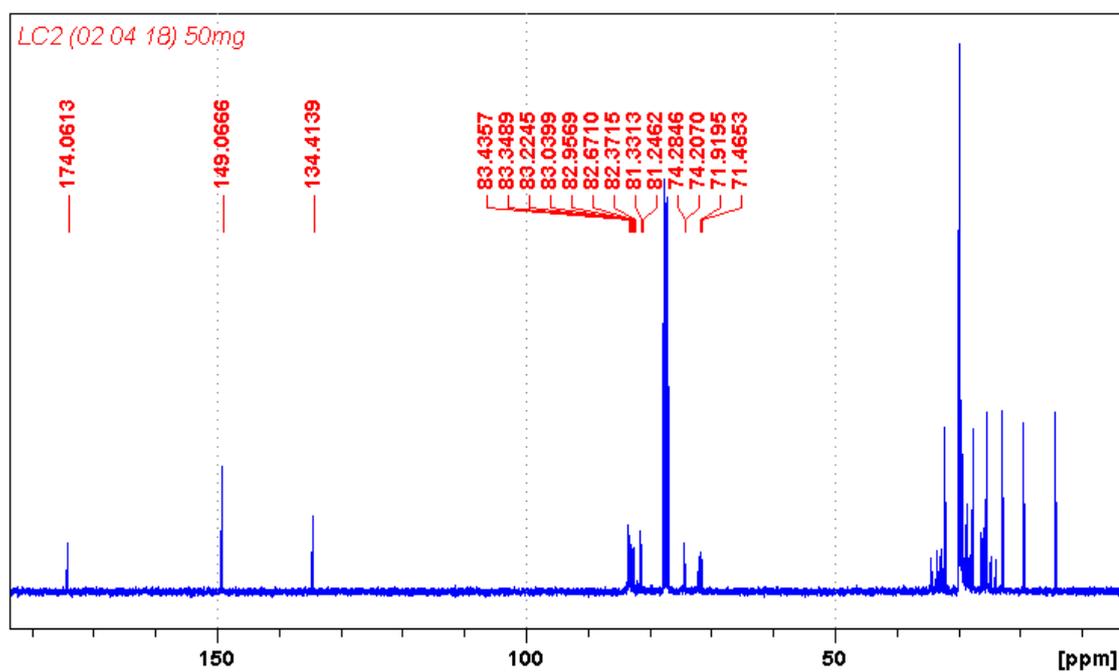
B1.3 Espectros de RMN 1D e 2D da amostra codificada como LC2.**Figura 39 - Espectro de RMN de ^1H , EM CDCl_3 , codificada como LC2.**

Fonte: Autora, 2108.

Figura 40 - Ampliação do espectro (0,7 a 5,0 ppm) de RMN ^1H , em CDCl_3 , da amostra codificada como LC2.

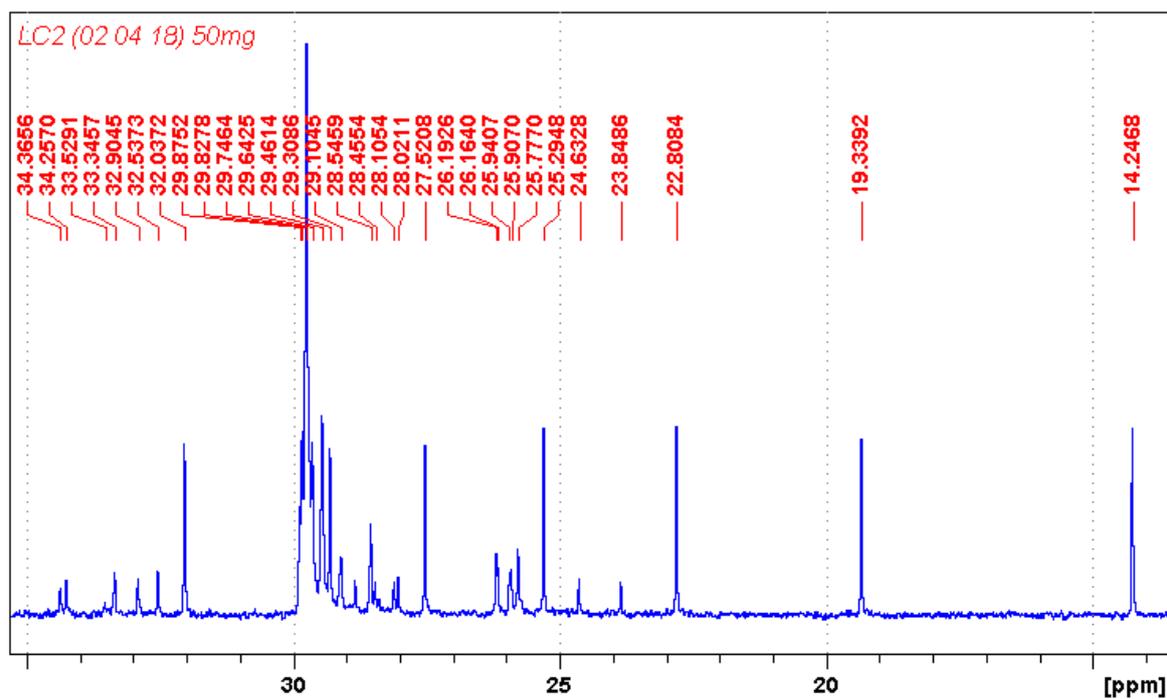
Fonte: Autora, 2018.

Figura 41 - Espectro de ^{13}C , em CDCl_3 , da amostra codificada como LC2.



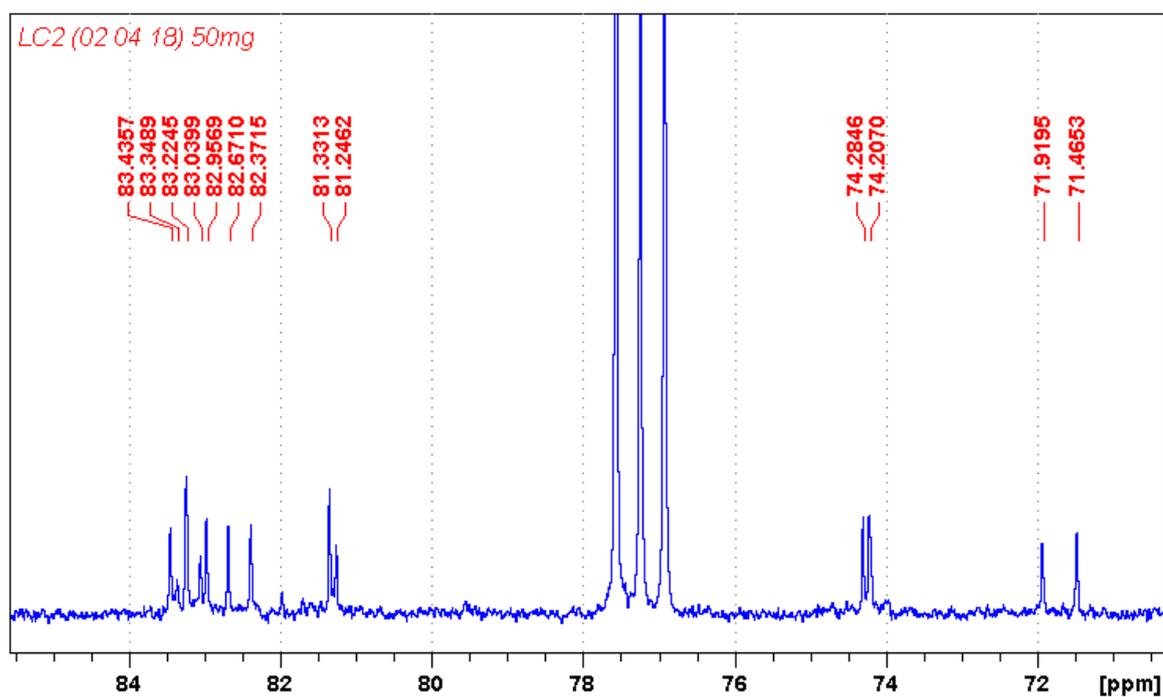
Fonte: Autora, 2018.

Figura 42 - Ampliação (14 a 35 ppm) do espectro de ^{13}C da amostra codificada como LC2.



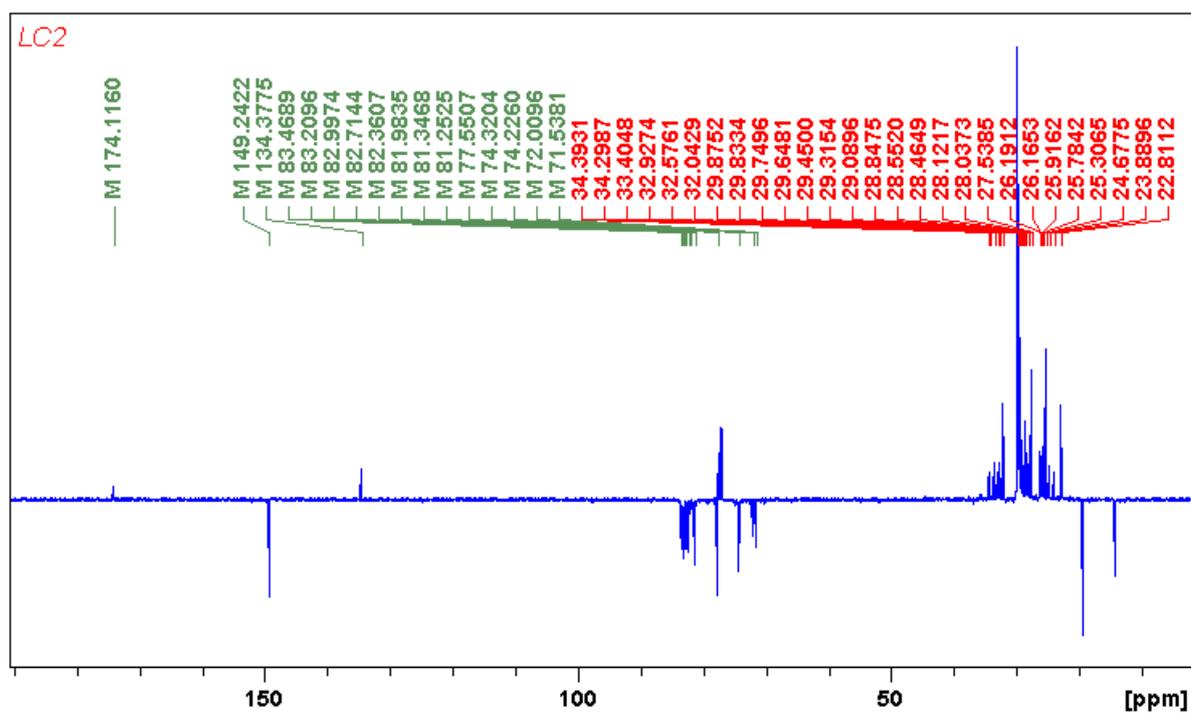
Fonte: Autora, 2018.

Figura 43 - Ampliação (71 a 84 ppm) do espectro de ^{13}C da amostra codificada como LC2.



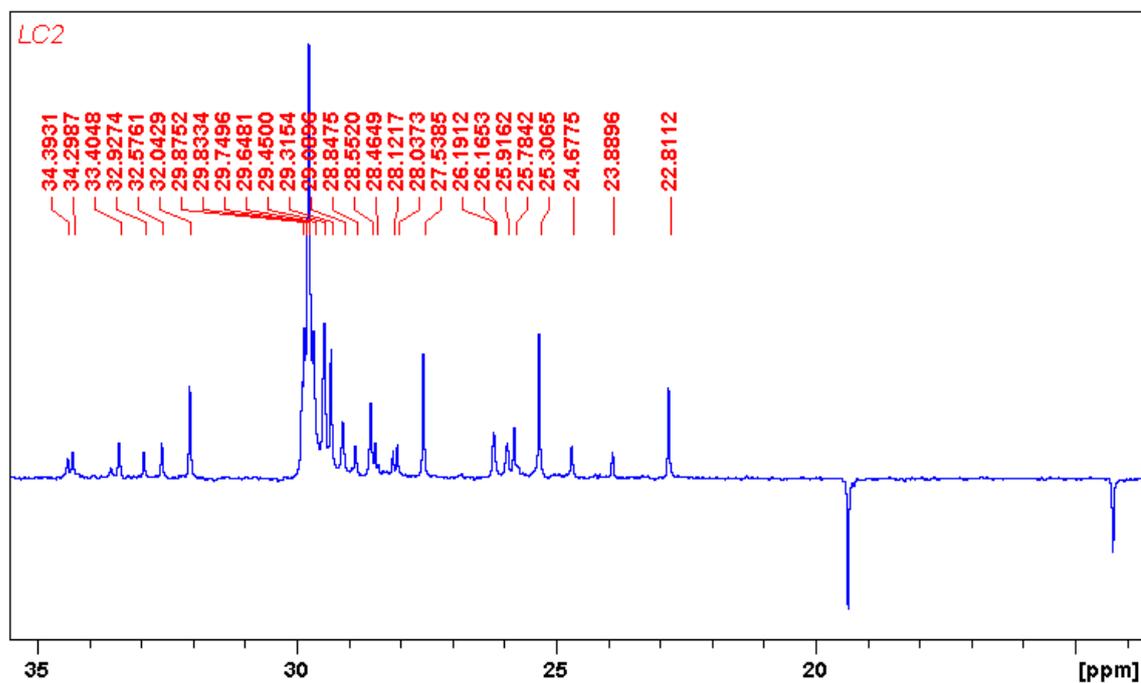
Fonte: Autora, 2018.

Figura 44 - Espectro de ^{13}C APT, em CDCl_3 , para a amostra codificada como LC2.



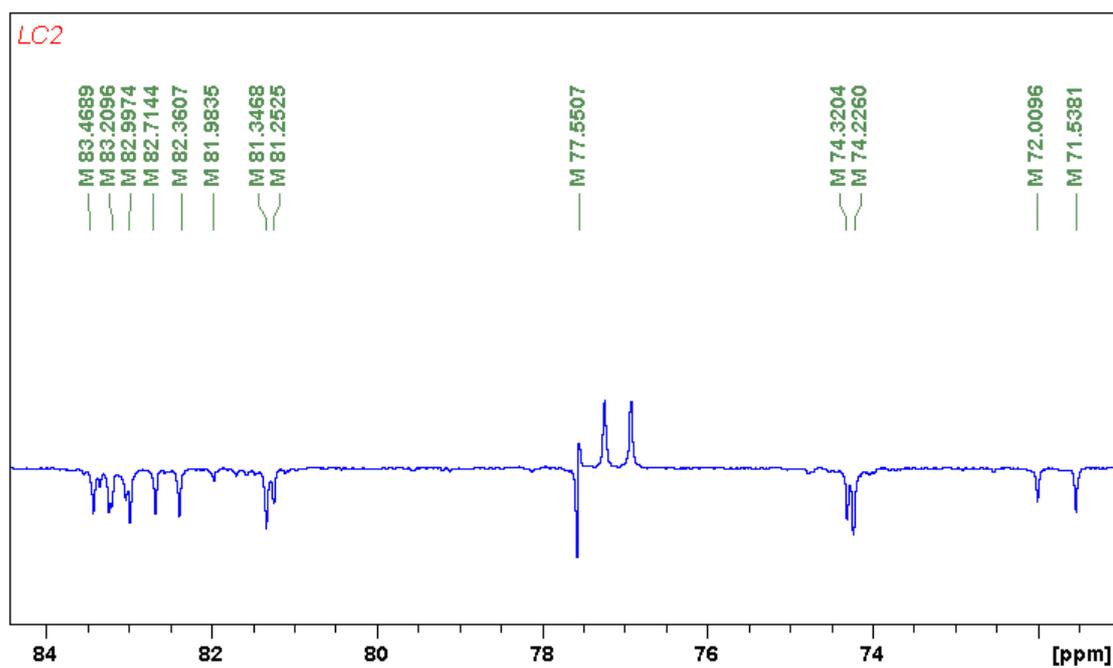
Fonte: Autora, 2018.

Figura 45 - Ampliação do espectro (região de 14 a 35 ppm) de RMN ^{13}C APT, em CDCl_3 , para a amostra codificada como LC2.



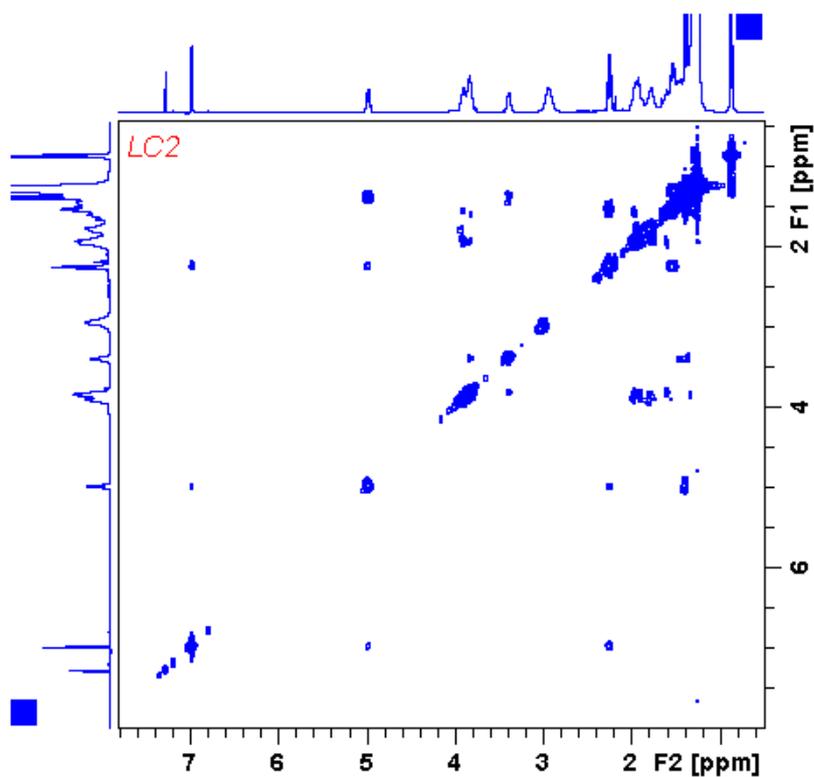
Fonte: Autora, 2018.

Figura 46 - Ampliação do espectro (região de 71 a 84 ppm) de RMN ^{13}C APT, em CDCl_3 , para a amostra codificada como LC2.



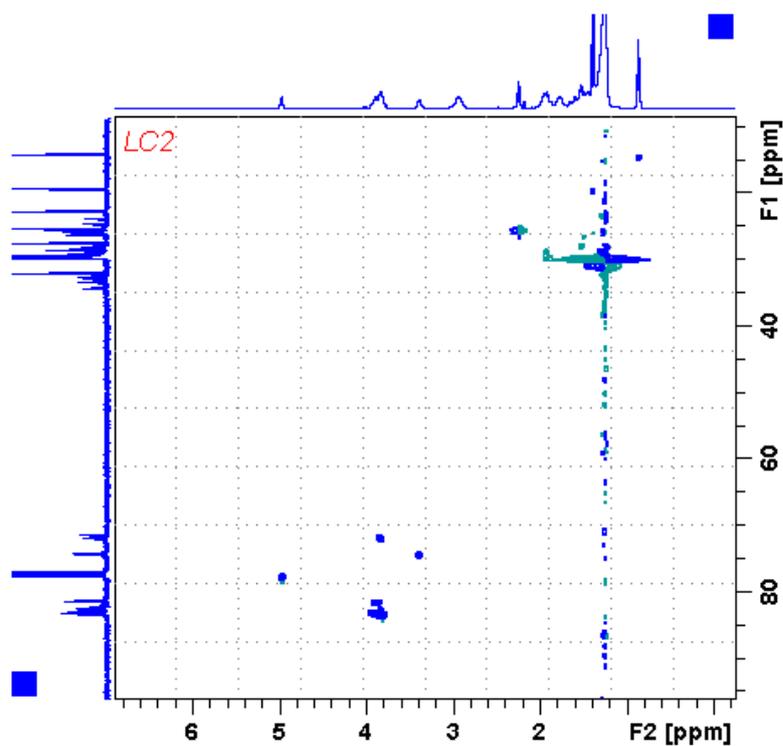
Fonte: Autora, 2018.

Figura 47- Espectro de RMN COSY, em CDCl_3 , da amostra codificada como LC2.



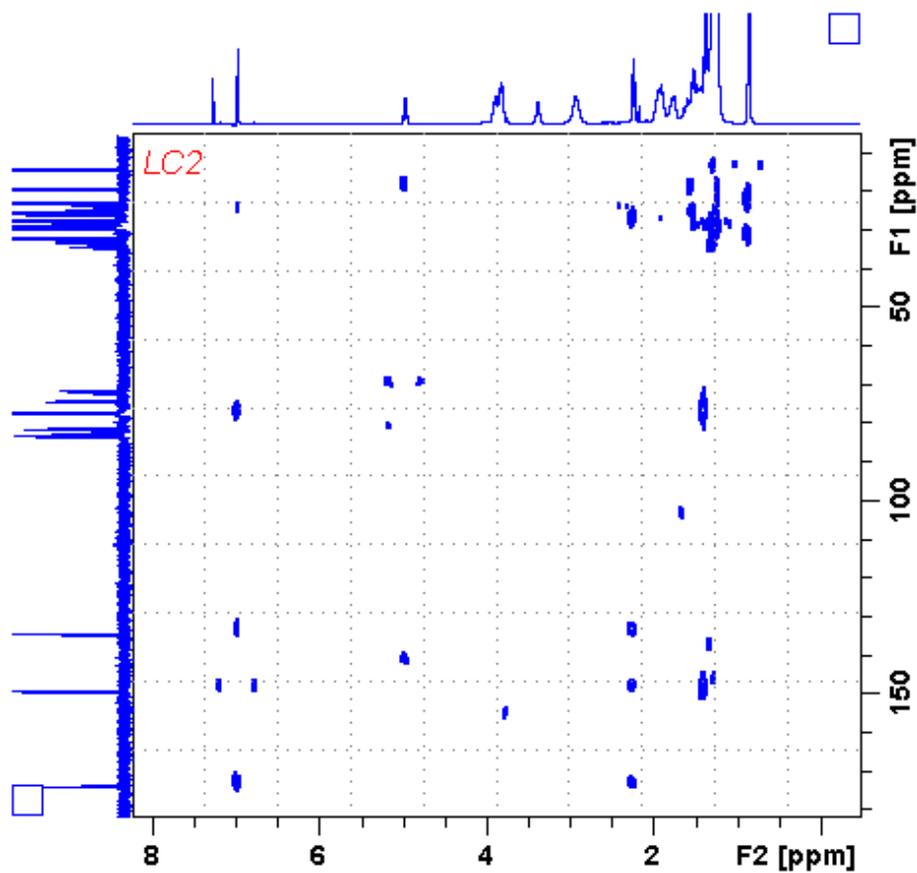
Fonte: Autora, 2018.

Figura 48 - Espectro de RMN HSQC, em CDCl_3 , da amostra codificada como LC2.



Fonte: Autora, 2018.

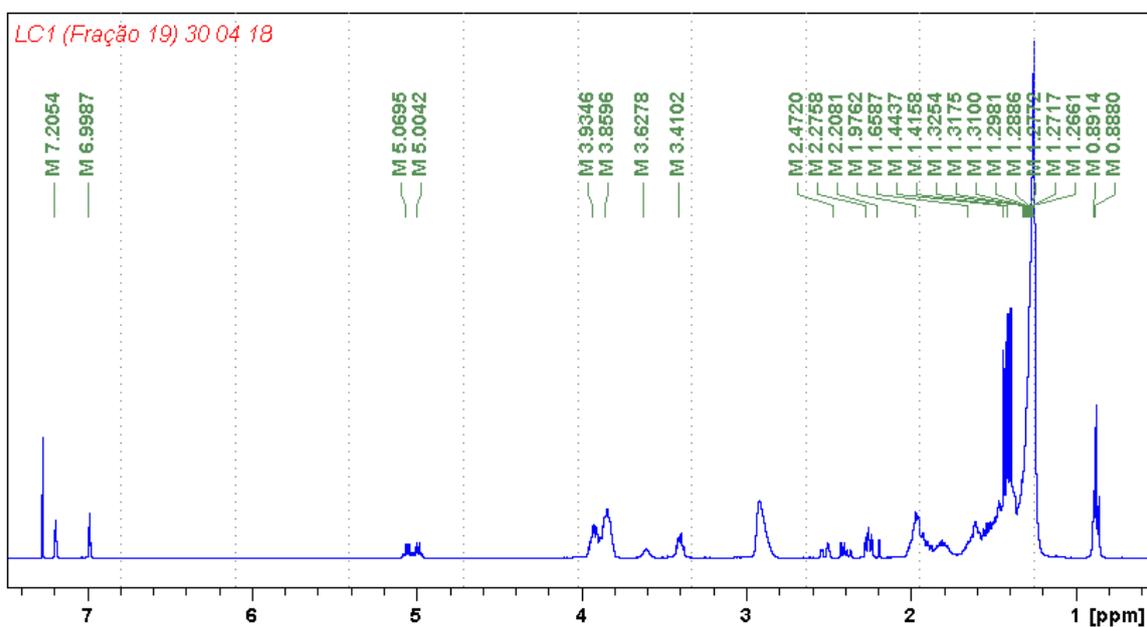
Figura 49 - Espectro de RMN HMBC, em CDCl_3 , da amostra codificada como LC2.



Fonte: Autora, 2018.

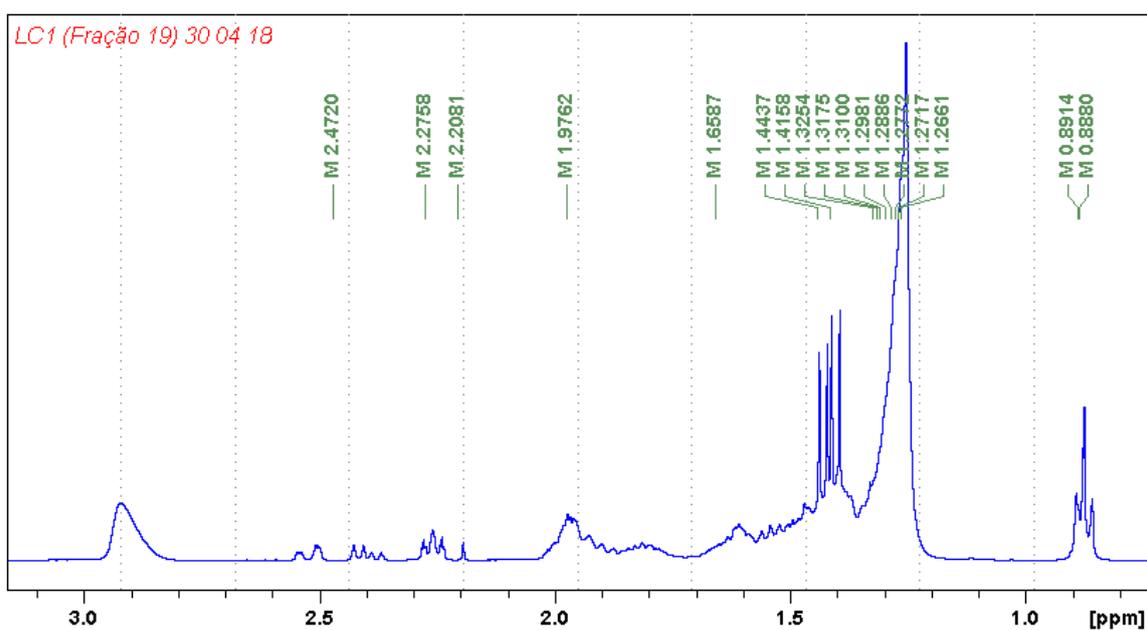
B1.4 Espectros de RMN 1D e 2D, em CDCl_3 , da amostra codificada como LC1.

Figura 50 - Espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 , da amostra codificada como LC1.



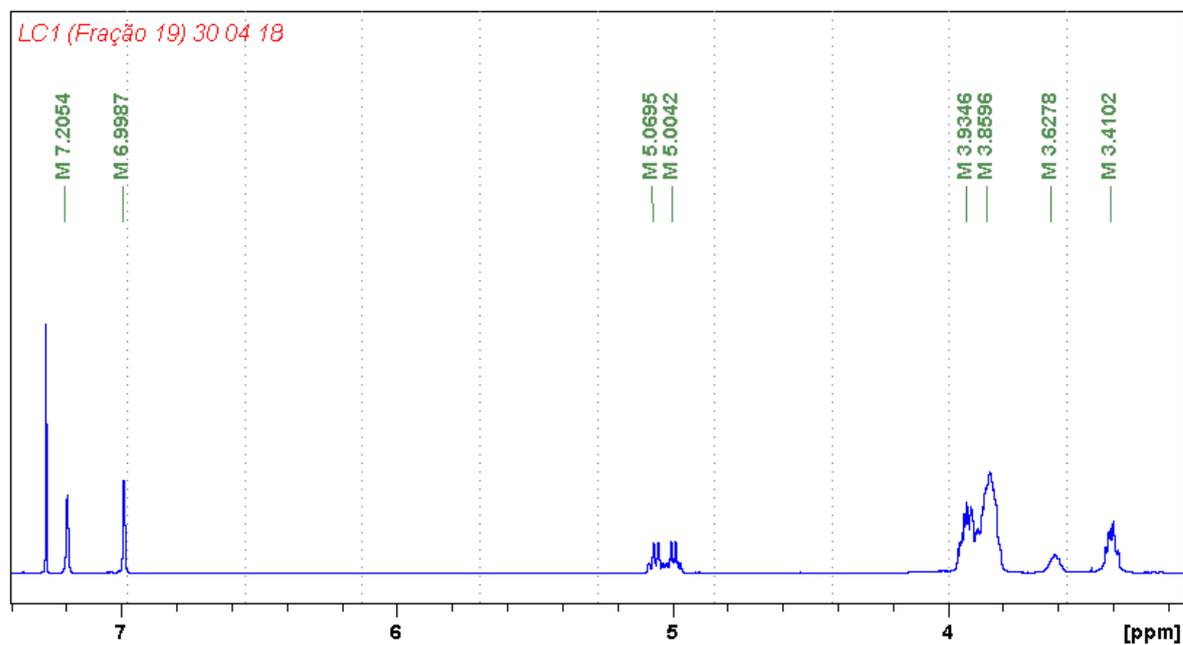
Fonte: Autora, 2018.

Figura 51 - Ampliação (0,7 a 3,0 ppm) do espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 , da amostra codificada como LC1.



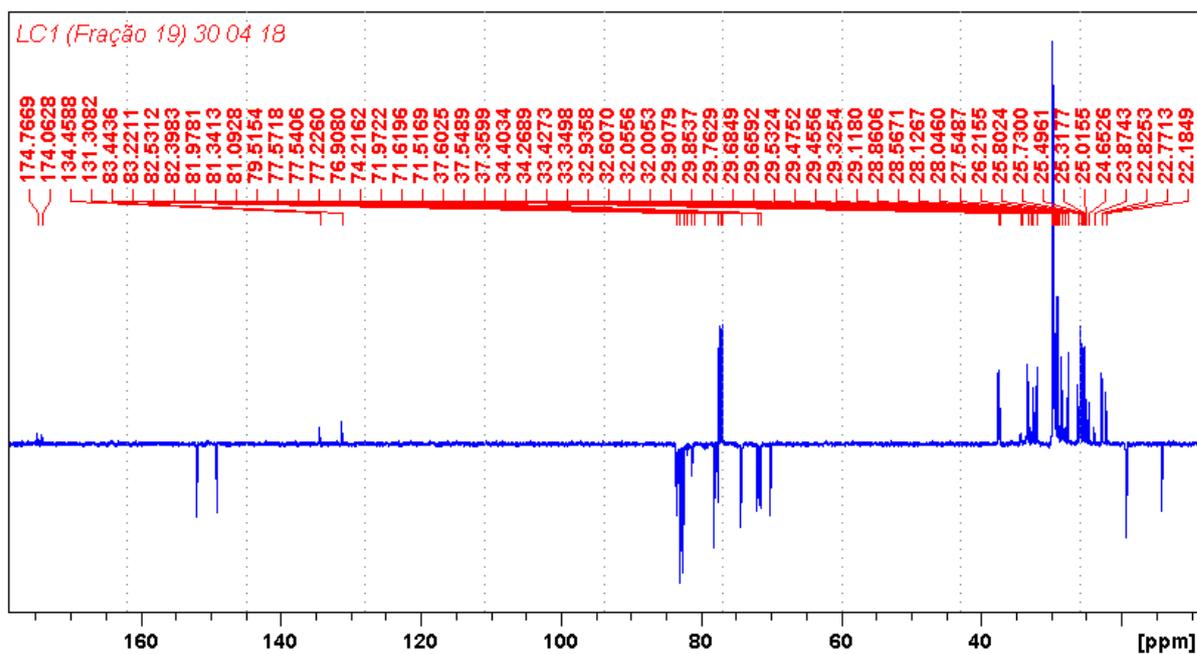
Fonte: Autora, 2018.

Figura 52 - Ampliação (3,2 a 7,2 ppm) do espectro de RMN ^1H , em CDCl_3 , da amostra codificada como LC1.



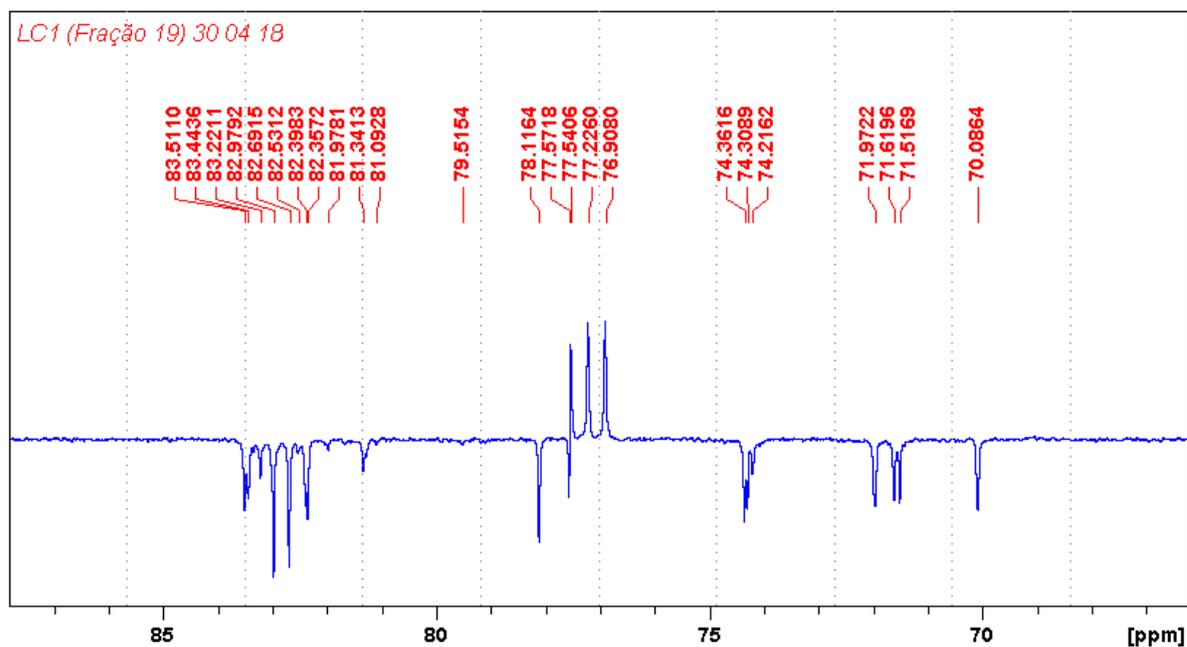
Fonte: Autora, 2018.

Figura 53 - Espectro de ^{13}C , em CDCl_3 , da amostra codificada como LC1.



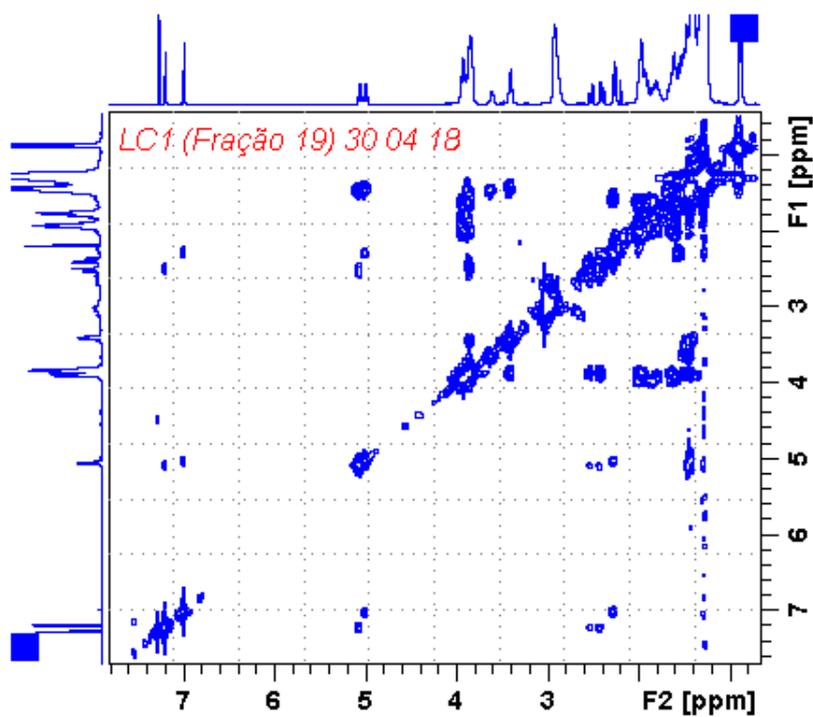
Fonte: Autora, 2018.

Figura 54 - Ampliação do espectro de RMN ^{13}C , em CDCl_3 , da amostra codificada como LC1.



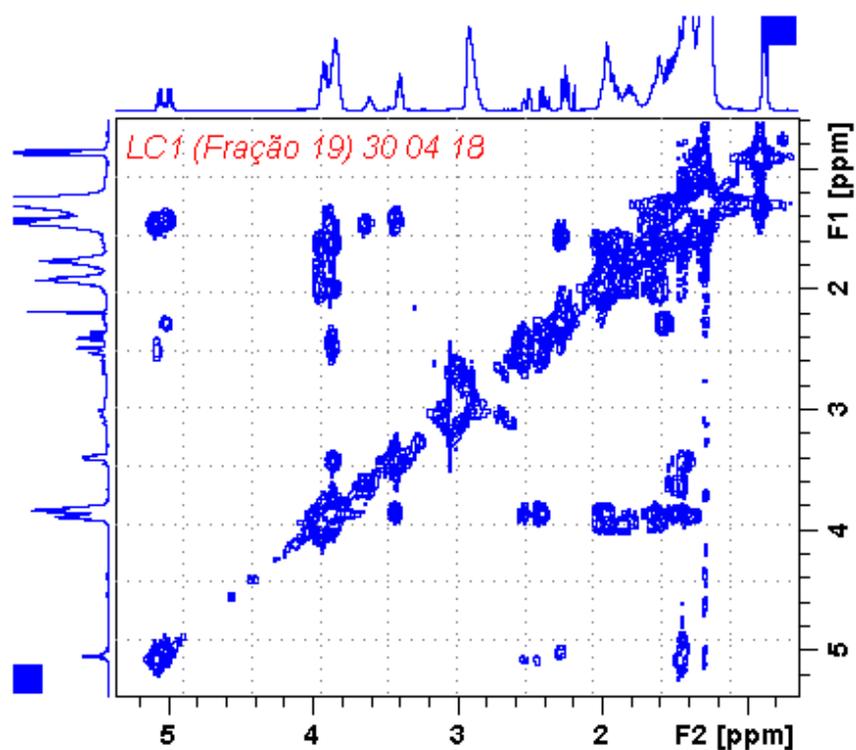
Fonte: Autora, 2018.

Figura 55 - Espectro de RMN COSY, em CDCl_3 , para a amostra codificada como LC1.



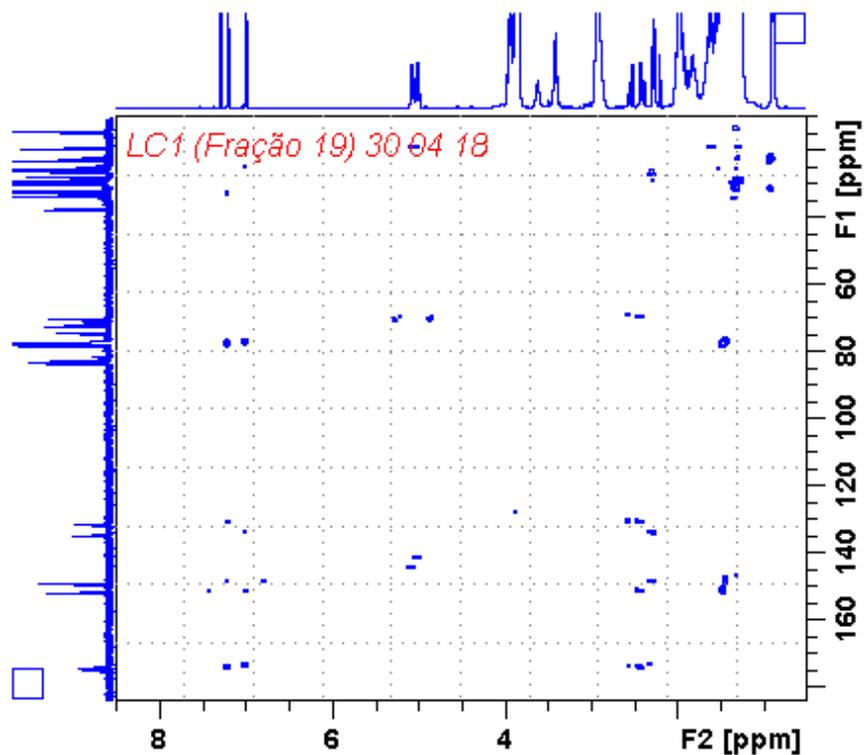
Fonte: Autora, 2018.

Figura 56 - Ampliação (0,70 a 5,2 ppm) do espectro de RMN COSY, em CDCl_3 , para a amostra codificada como LC1.



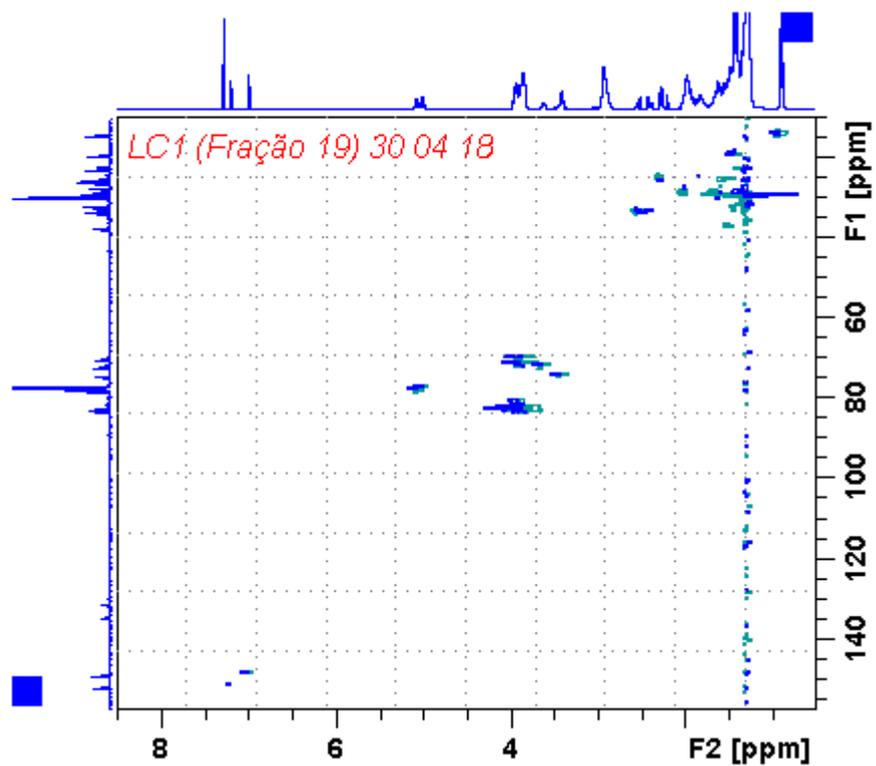
Fonte: Autora, 2018.

Figura 57- Espectro de HMBC, em CDCl_3 , para a amostra LC1.



Fonte: Autora, 2018.

Figura 58 - Espectro de RMN HSQC, em CDCl_3 , da amostra codificada como LC1.



Fonte: Autora, 2018.