

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA  
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**“Estudo fitoquímico de *Annona squamosa*  
L. e atividades biológicas dos seus  
constituintes”**

**Dianne Dominguez Formoso\***

Tese apresentada como parte  
dos requisitos para obtenção do  
título de DOUTORA EM  
CIÊNCIA, área de  
concentração: QUÍMICA  
ORGÂNICA.

**Orientadora: Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva**

**\* bolsista PEC – PG/ Capes-INCT**

**São Carlos - SP  
2023**

# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e  
de Tecnologia Programa de  
Pós-Graduação em Química

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

---

Defesa de Tese de Doutorado da candidata Dianne Dominguez Formoso, realizada em 30/06/2023.

### COMISSÃO JULGADORA:

Profa. Dra. Maria Fatima das Graças Fernandes da Silva (UFSCar)

Profa. Dra. Rose Maria Carlos (UFSCar)

Profa. Dra. Regiane Cristina de Oliveira (UNESP)

Prof. Dr. Moacir Rossi Forim (UFSCar)

Profa. Dra. Janaina Brandão Seibert (ESALQ/USP)

Dedico este trabalho a minha mãe Nilda Formoso, é o bem mais valioso que Deus me deu. Obrigada por estar sempre ao meu lado.

## Agradecimento

A toda a minha família por todo o apoio, a pesar da distância, em especial a minha mãe, que é meu motor impulsor.

A meu pretinho do coração.

À professora e orientadora Profa. Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva, pela orientação e por sempre ter provido condições excelentes para o desenvolvimento deste trabalho, bem como por suas contribuições em minha formação acadêmica. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo suporte financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Química (PPGQ), pelo esforço na tentativa de manter um nível de excelência do curso de pós-graduação. Às secretárias do PPGQ, pela paciência e gentileza com as quais eu sempre fui tratada.

Ao Laboratório de Produtos Naturais-UFSCAR, e um-especial agradecimento ao professor Tiago Venâncio e Giba, com os quais grande parte deste trabalho foi desenvolvida, a Danielle por toda a paciência e a ajuda nas atividades biológicas, à professora Regiane por oferecer o laboratório de Entomologia para fazer todas as análises frente os insetos, a Jocely por me ajudar a conhecer toda essa variedade de atividade anticancerígena frente células cancerígenas, a Jéssica Amaral, por tudo o aprendizagem., a João Paulo da Silva por toda a ajuda, a Lu do RMN, A Luis Guillermo, a Dorai, em fim todas as pessoas que ficaram envolvidas no trabalho.

A meus colegas do laboratório e meus amigos que sempre ficaram ali para mim.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação específica a 20 °C
$\lambda$	Comprimento de onda
$\delta$	Deslocamento químico
$^1J$	Acoplamento a uma ligação
$^2J$	Acoplamento a duas ligações
$^3J$	Acoplamento a três ligações
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
CLV	Cromatografia líquida à vácuo
<i>D</i>	Dupleto
<i>Dd</i>	Duplo dupleto
d.i.	Diâmetro interno
<i>Dt</i>	Duplo tripleto
Ex AcOEt	Extrato acetato de etila
ESI-MS	<i>Electrospray Ionisation Mass Spectrometry</i>
FIA-ESI-IT-MS	<i>Flow Injection Analysis - Electrospray Ionization - Ion Trap - Mass Spectrometry</i> (Espectrometria de Massas acoplada a um ion-trap com interface de Ionização por Electrospray e inserção direta da amostra)
<i>gHMBC</i>	<i>Heteronuclear multiple bond correlation</i>
<i>gHMQC</i>	<i>Heteronuclear multiple-quantum coherence</i>
IR	<i>Infrared</i> (Infravermelho)
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>M</i>	Multiplete
[M - H] <sup>-</sup>	Molécula desprotonada
[M + H] <sup>+</sup>	Molécula protonada
<i>m/z</i>	Relação massa carga
<i>Q</i>	Quadruplete
NOESY	<i>Nuclear overhauser effect spectroscopy</i>
Nt	não testado
DAD	Photodiode array detector (detector de arranjo de diodos)
PDA	<i>Potato dextrose agar</i> (ágar batata dextrose)
PDB	<i>Potato dextrose broth</i> (meio de batata dextrose)
PBS	tampão fosfato de sódio
PTFE	Politetrafluoroetileno (Teflon)
<i>R<sub>f</sub></i>	Distância percorrida substância / distância percorrida

	solvente, CCD.
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de carbono
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
S	Singleto
sL	Singleto largo
TTC	cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
SPE	Extração em fase sólida ( <i>Solid phase extraction</i> )
sp.	Espécies
T	Tripleto
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
$R_T$	Tempo de retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta
V	Volume

## Lista de Figuras

Figura 1.1: Exemplos de acetogeninas. ....	20
Figura 1.2: Exemplo de lignanas furofurânicas de Annonaceae.....	<b>Error! Bookmark not defined.3</b>
Figura 1.3: Composto isolado de <i>Duguetia lanceolata</i> .....	<b>Error! Bookmark not defined.4</b>
Figura 1.4: Uma das primeiras acetogeninas obtidas de Annonaceae.....	25
Figura 1.5: <i>A. squamosa</i> , fruta do conde.....	27
Figura 3.1: Fluxograma do preparo e fracionamento dos extratos preparados de <i>A. Squamosa</i> .....	34
Figura 3.2-Representação da Atividade insecticida dos Extratos frente á alagarta <i>S. frugiperda</i> . ....	36
Figura 3.3: Esquema de Fraccionamento por SPE do Extrato de Acetato de Folhas.....	37
Figura 3.4-Cromatografia em camada delgada (CCD) .....	38
Figura 3.5- Representação da atividade insecticida. ....	41
Figura 3.7 Reação de redução da resazurina.....	44
Figura 3.8.Revelação com resazurina da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos frente a bactéria em estudo.....	44
Figura 3.9-Determinação CIMB .....	45
Figura 3.10-Ilustração do método por MTT. ....	47
Figura 4.1-Mortalidade das lagartas sob os extratos de Raizes. ....	49
Figura 4.2-Mortalidade das lagartas sob os extratos de Caule.....	50
Figura 4.3-Mortalidade das lagartas sob os extratos das Folha .....	51
Figura: 4.4-Espectro de RMN <sup>1</sup> H do extrato EAE das folhas de <i>A. Squamosa</i> .....	52
Figura 4.5-: Cromatograma da amostra de Acetato de Etila (215 nm).....	53
Figura 4.6: Cromatograma das frações F2 e F3. ....	53
Figura 4.7:Cromatograma das Acetogenina 1 (A), Acetogenina 2 (B) e Acetogenina 3 (C) em UPLC-QTOF-MS/MS.....	54
Figura 4.8: Ilustração da Acetogenina 1 .....	55
Figura 4.9: Cromatograma da fração F3 (obtida por SPE) do EAE (215 nm) .....	56
Figura 4.10. Unidades constituintes da estrutura da acetogenina 1. ....	57
Figura 4.11. A: Espectro de massas “fullscan” da acetogenina 1.....	58

Figura 4.12. Padrão de fragmentação “EI-MS” proposto para a acetogenina 1. ....	59
Figura 4.13 Padrão de fragmentação “EI-MS” proposto para a acetogenina 1. ....	60
Figura 4.14. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 1 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	63
Figura 4.15. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 1 mostrando os sinais de H-35, H-36 e da Me-37 ampliados (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	63
Figura 4.16. Experimentos de HSQC da acetogenina 1 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). ....	64
Figura 4.17. Experimentos de COSY da acetogenina 1 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	64
Figura 4.18. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 1, mostrando os sinais de H-3a e H-3b ampliados (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	65
Figura 4.19 Experimentos de HSQC da acetogenina 1, mostrando os sinais de C- 36, C-24, C-23, C-20, C-12, C-4, C-15, C-19 e C-16 ampliados (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	66
Figura 4.20. Experimentos de HSQC da acetogenina 1 ampliado, mostrando os sinais de δ 2.33 a 0.84. (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). ....	66
Figura 4.21. Experimentos de HMBC da acetogenina 1, mostrando o sinal de H-35 ampliado (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). ....	67
Figura 4.22. Experimentos de HMBC da acetogenina 1, mostrando o sinal de H-36, H-24, H-23, H-20, H-12, H-4, H-15, H-19, H-16 ampliados (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> )..	67
Figura 4.23. Experimentos de HMBC da acetogenina 1, mostrando o sinal de H- 3a, H-3b, Me-34 e Me-37 ampliados (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	68
Figura 4.24. Experimentos de COSY da acetogenina 1 ampliado de δ 4.0-0.84 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	68
Figura 4.25. Experimentos de HSQC-TOCSY da acetogenina 1, ampliando os sinais de δ 15 a 40 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	69
Figura 4.26. Experimentos de “J-Resolved” da acetogenina 1, mostrando o sinal de H-3b (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	69
Figura 4.27. Atribuição dos dados de RMN <sup>1</sup> H, correlações de HMBC ou HSQC- TOCSY, os quais levaram às atribuições dos dados de RMN <sup>13</sup> C aos carbonos da lactona ao carbono C-6. ....	70
Figura 4.28. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 1, mostrando os sinais de H-24, H-23, H-25a e H-25b ampliados, espectro total na figura (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). ..	71
Figura 4.29. Experimentos de “J-resolved” da acetogenina 1, destacando o sinal em δ 4.03 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). ....	72
Figura 4.30. Experimentos de “J-resolved” da acetogenina 1, destacando o sinal em	



$\delta$ 3.89 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	72
Figura 4.31. Experimentos de HSQC-TOCSY da acetogenina 1, ampliando os sinais de $\delta$ 68 a 86 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	73
Figura 4.32 Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 1, mostrando os sinais em $\delta$ 3.89, 2.12 e 1.56 ampliados, espectro total na Figura 5a (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	75
Figura 4.33. Experimentos de “J-resolved” da acetogenina 1, destacando o sinal em $\delta$ 3.48 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	75
Figura 4.34. Atribuição dos dados de RMN <sup>1</sup> H, correlações de HMBC ou HSQC- TOCSY, os quais levaram às atribuições dos dados de RMN <sup>13</sup> C aos carbonos C-17 a C-27 .....	76
Figura 4.35. Atribuição dos dados de RMN <sup>1</sup> H, correlações de HMBC ou HSQC- TOCSY, os quais levaram às atribuições dos dados de RMN <sup>13</sup> C aos carbonos C-16 a C-11.....	78
Figura 4.36. Atribuição dos dados de RMN <sup>1</sup> H, correlações de HMBC ou HSQC- TOCSY, os quais levaram às atribuições dos dados de RMN <sup>13</sup> C aos carbonos C-34 a C-31.....	78
Figura 4.37. Atribuição dos dados de RMN <sup>13</sup> C obtidos pelas correlações observadas nos experimentos de HMBC ou HSQC-TOCSY, carbonos C-34 a C-31, e C-27 a C-11. ....	79
Figura 4.38. Atribuição dos dados de RMN <sup>13</sup> C obtidos pelas correlações observadas nos experimentos de HMBC ou HSQC-TOCSY, carbonos C-34 a C-31, C-27 a C-11, e C-6 a C-1, e C-35 a C-37. ....	79
Figura 4.39. Anéis tetraidrofuranos (THF) sintetizadas por Fujimoto et al. (1994). 80	
Figura 4.40. Dados de RMN de <sup>1</sup> H e <sup>13</sup> C da acetogenina 1 e de modelos (Fujimoto et al. (1994). .....	81
Figura 4.41. Possíveis isômeros para a acetogenina 1. ....	82
Figura 4.42. A: Espectro de massas da acetogenina 2. B: Espectro de massas ampliação da acetogenina 2. Ambos no modo positivo de ionização.....	85
Figura 4.43. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 2 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	87
Figura 4.44. Experimentos de COSY da acetogenina 2 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	87
Figura 4.45. Experimentos de COSY da acetogenina 2 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	88
Figura 4.46. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da acetogenina 2 (125 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	88
Figura 4.47. Experimentos de HSQC da acetogenina 2 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	89

Figura 4.48. Experimentos de HSQC da acetogenina 2 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	89
Figura 4.49. Experimentos de HSQC da acetogenina 2 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	90
Figura 4.50. Experimentos de HMBC da acetogenina 2 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	90
Figura 4.51. Experimentos de HMBC da acetogenina 2 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	91
Figura 4.52. A: Espectro de massas da acetogenina 3. B: Espectro de massas ampliação da acetogenina 3. Ambos no modo positivo de ionização.....	93
Figura 4.53. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	94
Figura 4.54. Experimentos de COSY da acetogenina 3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	95
Figura 4.55. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da acetogenina 3 (125 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	95
Figura 4.57. Experimentos de HSQC da acetogenina 3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	96
Figura 4.58. Experimentos de HSQC da acetogenina 3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	97
Figura 4.59. Experimentos de HMBC da acetogenina 3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	97
98	
Figura 4.60. Experimentos de HMBC da acetogenina 3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	98
Figura 4.61. Experimentos de HMBC da acetogenina 3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	98
Figura 4.62. Espectro de massas da acetogenina 4, no modo positivo de ionização .....	100
Figura 4.64. Experimentos de COSY da acetogenina 4 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	102
Figura 4.65. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da acetogenina 4 (125 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	103
Figura 4.66. Experimentos de HSQC da acetogenina 4 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	103
Figura 4.67. Experimentos de HSQC da acetogenina 4 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	104
Figura 4.68. Experimentos de HSQC da acetogenina 4 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	104

Figura 4.69. Experimentos de HMBC da acetogenina 4 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	105
Figura 4.70. Experimentos de HMBC da acetogenina 4 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	105
105	
Figura 4.71. Experimentos de HMBC da acetogenina 4 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	106
Figura 4.72. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura da acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	108
Figura 4.73. Experimentos de COSY da mistura de acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	108
Figura 4.74. Experimentos de HSQC da mistura de acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	109
109	
Figura 4.75. Experimentos de HSQC da mistura de acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	109
Figura 4.76. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da mistura da acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	110
Figura 4.78. Experimentos de HSQC da mistura de acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	111
Figura 4.79. Experimentos de HSQC da mistura de acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	112
Figura 4.80. Experimentos de HMBC da mistura de acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	112
Figura 4.81. Experimentos de HMBC da mistura de acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	113
Figura 4.83. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).	
Figura 4.84. Experimentos de COSY da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	115
Figura 4.85. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	116
Figura 4.86. Experimentos de HSQC da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). .....	116
Figura 4.87. Experimentos de HSQC da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	117
Figura 4.88. Experimentos de HSQC da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	117

Figura 4.89. Experimentos de HMBC da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	118
Figura 4.90. Experimentos de HMBC da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	118
Figura 4.91. Experimentos de HMBC da acetogenina 5 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	119
Figura 4.92. Espectro de massas da acetogenina 6, no modo positivo de ionização. .....	128
Figura 4.93. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	129
Figura 4.94. Experimentos de COSY da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	130
Figura 4.95. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ). ....	130
Figura 4.96. Experimentos de HSQC da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ).....	131
Figura 4.97. Experimentos de HSQC da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	131
Figura 4.98. Experimentos de HSQC da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	132
Figura 4.99. Experimentos de HMBC da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação.....	132
Figura 4.100. Experimentos de HMBC da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	133
Figura 4.101. Experimentos de HMBC da acetogenina 6 (500 MHz, C <sub>6</sub> D <sub>6</sub> ), ampliação .....	133
Figura 4.102: Espectro de massas da lignana 1 no modo positivo de ionização..	135
Figura 4.103 . Espectro de RMN <sup>1</sup> H da lignana 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	136
Figura 4.104. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da lignana 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), ampliação. .	136
Figura 4.105. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da lignana 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), ampliação. .....	137
Figura 4.106. Experimentos de COSY da lignana 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	137
Figura 4.107. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da lignana 1 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	138
Figura 4.108. Experimentos de HSQC da lignana 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	138
Figura 4.109. Experimentos de HMBC da lignana 1 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ).....	139
Figura 4.110. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da lignana 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). ....	141
Figura 4.111. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da lignana 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), ampliação. .	142
Figura 4.112. Espectro de RMN <sup>1</sup> H da lignana 2 (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), ampliação. .	142

Figura 4.113. Espectro de RMN <sup>13</sup> C da lignana 2 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ). .....	143
Figura 4.115. Experimento de HSQC da lignana 2 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), ampliação .....	144
Figura 4.116. Experimento de HMBC da lignana 2 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), ampliação .....	144
Figura 4.117. Experimento de HMBC da lignana 2 (100 MHz, CDCl <sub>3</sub> ), ampliação. .....	145
Figura 4.118 - Resultado da CIM de uma placa de 96 orifícios com ensaio de uma cepa bacteriana com os compostos. ....	148
Figura 4.119: Colônias da bactéria <i>X. citri</i> em placas de petri contendo apenas o meio nutriente agar.....	151
Figura 4.121: Atividade citotóxica in vitro da Acetogenina 1 (P1), Acetogenina 2 (P2) e Acetogenina 3 (P3) sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5). Os pontos azuis, vermelhos e verdes representam as triplicatas. ....	156
Figura 4.122: Atividade citotóxica in vitro da Acetogenina 8 (P8), Acetogenina 9 (P9) e Acetogenina 10 (P10) sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5). Os pontos azuis, vermelhos e verdes representam as triplicatas. ....	157
Figura 4.123: Atividade citotóxica in vitro da Lignana F2/P1 , Lignana F2/P2 e Lignana F2/P3 sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5). Os pontos azuis, vermelhos e verdes representam as triplicatas. .	159

## Lista de Tabela

Tabela 3.1: Massa obtida de material vegetal e extratos.....	34
Tabela 3.2 : Sistema de eluição do HPLC.....	37
Tabela 3.3-Mistura de solventes para separação em coluna por fase normal o Extrato de Acetato de Etila das sementes.....	39
Tabela 4.1-Mortalidade acumulada (médias $\pm$ erro padrão) de <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> após da aplicação de diferentes tratamentos na dieta das lagartas. .....	49
Tabela 4.2- Mortalidade acumulada (médias $\pm$ erro padrão) de <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> após da aplicação de diferentes tratamentos na dieta das lagartas. .....	50
Tabela 4.3- Mortalidade acumulada (médias $\pm$ erro padrão) de <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> após da aplicação de diferentes tratamentos na dieta das lagartas. .....	51
Tabela 4.4 Dados de RMN da acetogenina 1 em $C_6D_6$ .....	83
Tabela 4.5. RMN $^{13}C$ de anéis tetraidrofuranos (THF) <sup>a</sup> sintetizadas por Fujimoto et al. (1994), (125 MHz, $CDCl_3$ ).....	84
Tabela 4.6 Dados de RMN $^{13}C$ da acetogenina 1 e modelos Squamostatin-C e Squamostatin-B (Fujimoto et al. (1994).....	84
Tabela 4.7. Dados de RMN da acetogenina 2 em $C_6D_6$ .....	92
Tabela 4.8. Dados de RMN da acetogenina 3 em $C_6D_6$ .....	99
Tabela 4.9. Dados de RMN da acetogenina 4 em $C_6D_6$ .....	106
Tabela 4.12. Dados de RMN da acetogenina 5 em $C_6D_6$ .....	120
Tabela 4.13. Dados de RMN das lignanas 1 e 2 e modelo yangambin .....	145
Tabela 4.14 - Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i> .....	147
Tabela 4.15 - Resultado da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das substâncias frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i> .....	151
Tabela 4.16 :Mortalidade acumulada (médias $\pm$ erro padrão) de <i>Spodoptera</i> <i>frugiperda</i> após da aplicação de diferentes tratamentos na das lagartas.em folhas de milho. ....	153

154

Tabela 4.17 Atividade anticâncer <i>in vitro</i> das acetogeninas isoladas de <i>Annona squamosa</i> sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5).....	156
Tabela 4.18- Atividade anticâncer <i>in vitro</i> das acetogeninas isoladas de <i>Annona squamosa</i> sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5).....	158
Tabela4.19. Atividade anticâncer <i>in vitro</i> das Lignanás isoladas de <i>Annona squamosa</i> sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5).....	159

## RESUMO

ESTUDO FITOQUÍMICO DE *ANNONA SQUAMOSA* L. E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS SEUS CONSTITUINTES. *Annona squamosa* L. pertence à família *Annonaceae* que é uma promissora fonte natural de metabólitos com potenciais funções terapêuticas e medicinais. Em 1982, o primeiro membro de uma nova classe de metabólitos secundários em plantas foi relatado, que atualmente compreende um grupo de 430 compostos naturais encontrados quase exclusivamente em plantas das *Annonaceae*, denominadas acetogeninas de *Annonaceae* (ACGs). O presente trabalho visou investigar a composição fitoquímica dos extratos da espécie *A. squamosa* L. através de estudos bioquímicos na procura de substâncias biologicamente ativas, a partir da avaliação da eficiência dos extratos e substâncias isoladas. No trabalho, três acetogeninas foram isoladas de folhas e sementes de *A. squamosa* L. Foram realizadas análises de RMN 1D e 2D, que confirmaram a presença de três acetogeninas, sendo isômeros. São isômeros da Squamostin, contendo uma cadeia de carbono menor entre a lactona e o primeiro anel tetrahydrofurano. Os isômeros se diferenciam pela posição e estereoquímica de seus grupos hidroxilas. Os resultados demonstraram uma massa monoisotópica de  $m/z$  639,4818 [M+H]<sup>+</sup>, correspondendo a uma fórmula molecular  $C_{37}H_{67}O_8^+$  e um erro de massa de 1,02 ppm para as acetogeninas isômeros. Foram identificadas duas lignanas nas folhas da planta, a yanganbim e uma lignana derivada da yangambim, até então desconhecida na literatura (sua estrutura está em processo de estudo mais aprofundado). Além disso, foram isolados e purificados seis compostos pertencentes à classe das acetogeninas a partir do extrato de acetato das sementes de *A. squamosa*, utilizando coluna em bancada em fase normal. Esses compostos foram caracterizados por meio de técnicas espectroscópicas de RMN 1D, 2D, e Espectrometria de Massas de Alta Resolução (UPLC-QTOF-MS/MS). Após confirmação da pureza por RMN e UPLC-QTOF-MS/MS; onze moléculas isoladas de *A. squamosa* foram testadas quanto à sua capacidade de inibir o crescimento da bactéria *Xanthomonas citri* spp. *Citri*, que causa o Cancro Cítrico. Os resultados indicaram uma atividade bacteriostática, ou seja, a capacidade de inibir o crescimento da bactéria, o que pode ser útil no controle da doença em plantações de citros. Também foram avaliadas as atividades inseticida dos extratos de *A. squamosa* contra *Spodoptera frugiperda* e a atividade anticâncer contra células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, câncer de pulmão A549 e células humanas normais MRC-5. Os extratos mostraram potencial como fitofármacos anticâncer, indicando a possibilidade de desenvolver novos candidatos terapêuticos a partir desses compostos.



**ABSTRACT**

PHYTOCHEMICAL STUDY OF ANNONA SQUAMOSA L. AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF ITS CONSTITUENTS. *Annona squamosa* L. belongs to the Annonaceae family which is a promising natural source of metabolites with potential therapeutic and medicinal functions. In 1982, the first member of a new class of secondary metabolites in plants was reported, which currently comprises a group of 430 natural compounds found almost exclusively in plants of the Annonaceae, called Annonaceae acetogenins (ACGs). The present work aimed to investigate the phytochemical composition of extracts of the species *A. squamosa* L. through bioguided studies in the search for biologically active substances, from the evaluation of the efficiency of extracts and isolated substances. In the study, three acetogenins were isolated from leaves and seeds of *A. squamosa* L. 1D and 2D NMR analyses were performed, which confirmed the presence of three acetogenins, being isomers. They are isomers of Squamostin, containing a smaller carbon chain between the lactone and the first tetrahydrofuran ring. Isomers are differentiated by the position and stereochemistry of their hydroxyl groups. The results showed a monoisotopic mass of  $m/z$  639.4818 [M+H]<sup>+</sup>, corresponding to a molecular formula C<sub>37</sub>H<sub>67</sub>O<sub>8</sub><sup>+</sup> and a mass error of 1.02 ppm for the acetogenin isomers. Two lignans were also isolated from the leaves of the plant; Yanganbim is another lignan derived from yangambim, but still unknown in the literature (structure under more detailed study). Subsequently, 6 compounds within the acetogenin class of *A. squamosa* seed acetate extract were isolated and purified by bench column, by normal phase, which were characterized by the spectroscopic technique of 1D and 2D NMR and High Resolution Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS). After confirmation of purity by NMR and UPLC-QTOF-MS/MS; Eleven molecules isolated from *A. squamosa* were tested for their ability to inhibit the growth of the bacterium *Xanthomonas citri* spp. *Citri*, which causes Citrus Cancer. The results indicated a bacteriostatic activity, that is, the ability to inhibit the growth of the bacteria, which may be useful in controlling the disease in citrus plantations. The insecticidal activities of *A. squamosa* extracts against *Spodoptera frugiperda* and the anticancer activity against human breast adenocarcinoma MCF-7, lung cancer A549 and normal human MRC-5 cells were also evaluated. The extracts showed potential as anticancer phytopharmaceuticals, indicating the possibility of developing new therapeutic candidates from these compounds.

## SUMÁRIO

OBLISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	ii
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabela	xi
SUMÁRIO	xv
1. Introdução	19
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3.1. Solventes	31
3.2 Equipamentos	31
3.2.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)	31
3.2.2 Espectrômetro de Massas	31
3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	32
3.2.4 Balança	32
3.2.6 Autoclaves Verticais	32
3.2.7 Estufa Incubadora (B.O.D.).	32
3.2.8 Banho de Ultra-som.	32
3.2.9 Evaporadores rotativos.	32
3.3 Procedimentos experimentais	33
3.3.1 Coleta e identificação do material vegetal:	33
3.3.2 Preparação dos Extratos Vegetais:	33
3.4 Insetos utilizados nos bioensaios	35
3.5 Estudo bioguiado	35
3.6 Separação do Extrato de Acetila de Etila (EAE)	36
3.7 HPLC-PDA (Desenvolvimento Analítico)	37
3.7.1 HPLC-PDA (Separação e coleta dos metabólitos pelo modo semipreparativo)	38
3.8 Estudo químico do EAE das sementes de <i>A. Squamosa</i>	38
3.9 RMN: Ressonância Magnética Nuclear.	39
3.10 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.	40
3.11 Ensaio Biológicos	40
3.11.1 Efeito dos compostos em folha de milho sobre <i>Spodoptera frugiperda</i> .	40
3.13 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos em avaliação sobre a bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. <i>citri</i> .	42

3.13.1 Preparo da Solução Mãe (SM) que são as amostras a serem testadas:	42
3.13.2 Montagem da placa estéril de 96 orifícios e realização da diluição seriada:	42
3.13.3 Preparo do inoculo:	43
3.13.4 Leitura da Concentração Inibitória Mínima das placas:	44
3.14 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras em teste sobre a bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. Citri.	45
3.15 Linhagem de células e condições de avaliação.	46
3.16 Ensaio citotóxico.	46
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
4. Resultados da avaliação da atividade inseticida frente <i>S. frugiperda</i> dos extratos da de <i>Annona squamosa</i> .	49
4.1 Análises por RMN de <sup>1</sup> H e HPLC-PDA do EAE das Folhas.	52
4.2 Análises por RMN <sup>1</sup> H e HPLC-PDA do EAE das Sementes.	55
4.3.1. Elucidação estrutural da Acetogenina	55
4.3.2. Identificação estrutural da Acetogenina 2	85
4.3.3. Identificação estrutural da Acetogenina 3	93
4.3.4. Identificação estrutural da Acetogenina 4	100
4.3.5. Identificação da primeira mistura de Acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3	107
4.3.6. Identificação da segunda mistura de Acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3	110
4.3.7. Identificação da terceira mistura de Acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3	113
4.3.8. Identificação da Acetogenina 5	114
4.3.9. Identificação da Acetogenina 6	128
4.4 Identificação estrutural das Lignanas	134
4.4.1 Lignana 1	134
4.4.2 Lignana 2	139
4.5 Ensaio Microbiológicos	146
4.5.1 Isolados da bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. Citri.	146
4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM, frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. citri.	146
4.5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos e seus ligantes livres frente à bactéria <i>Xanthomonas citri</i> ssp. citri.	150

4.6 Avaliação da atividade inseticida.	152
4.7 Potencial biológico das acetogeninas isoladas em ensaios contra células cancerígenas.	155
4.8 Potencial biológico das lignanas isoladas em ensaios contra células cancerígenas.	159
5. CONCLUSÕES	161
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	161

---

## 1. INTRODUÇÃO

## 1. Introdução

A família Annonaceae foi descrita pela primeira vez por Antoine Laurent de Jussieu em 1789, a qual é ainda hoje conhecida por sua uniformidade anatômica e estrutural. A família é muito consistente morfológicamente, reconhecida como um grupo primitivo único de angiospermas proporcionando fácil identificação. Dois estudos recentes discutem a classificação filogenética da família Annonaceae. O primeiro estudo realizado por Chatrou et al. (2012) utilizou oito marcadores plastidiais e representantes de 94 gêneros para classificar as Annonaceae em quatro subfamílias: Anaxagoreoideae, Ambavioideae, Annonoideae e Malmeoideae. As duas maiores subfamílias, Annonoideae e Malmeoideae, foram divididas em 14 tribos. O segundo estudo foi conduzido por Guo et al. (2017) e considerou a filogenia das Annonaceae baseada em uma supermatriz de oito loci de cloroplastos (em latim: *locus*; lit. "lugar"; pl. *loci*, é uma posição fixa e específica em um cromossomo, onde está localizado determinado gene ou marcador genético; cada cromossomo carrega vários genes, e cada um ocupando uma posição ou locus diferente) e 705 espécies (29% de cerca de 2.400 espécies de 105 gêneros; 98% de 107 gêneros atualmente aceitos). Esta matriz incluiu quase quatro vezes mais espécies, bem como representantes de 15 gêneros adicionais em comparação com o primeiro estudo de importância filogenética realizado por Chatrou et al. (2012). No geral, Guo et al. (2017) reorganizaram a filogenia e a taxonomia de Annonaceae e concluíram seu estudo afirmando que a família contém quatro subfamílias, 15 tribos, 107 gêneros e 2.400 espécies.

O interesse em estudar as plantas de Annonaceae tem crescido ao longo do tempo. Uma explicação para este crescimento é a atividade biológica abundante e diversificada das Annonaceae que advém da diversidade estrutural dos metabólitos secundários, como acetogeninas, flavonóides, alcalóides e terpenos (Costa et al., 2015; Menezes et al., 2021; Di Giulio et al., 2023). Terpenos (46%) e alcaloides (42%) são as maiores classes presentes nessas plantas. Os alcaloides presentes nas Annonaceae são isoquinolinos (entre eles os isoquinolinos simples, proaporfina, aporfina, benzilisoquinolinos, protoberberinos e fenantrenos). Os terpenos ocorrem em todas as subclasses (mono-, di-, sesqui- e triterpenos), sendo os diterpenos os mais abundantes. Os diterpenos mais frequentes são caurenos, traquilobanos, labdanos e atisanos, sendo os cauranos os mais comuns. Os alcaloides, por exemplo, exibiram uma ampla variedade de atividades

farmacológicas e foram clinicamente estudados para o tratamento do câncer, da doença de Parkinson, de doenças cardiovasculares e de diversas infecções virais (Menezes et al., 2021).

A família Annonaceae também tem chamado muita atenção desde a década de 1980, devido à presença de acetogeninas, cujas características estruturais apresentam uma variedade de atividades biológicas, onde se destaca a atividade inseticida (Al Kazman et al., 2022). Quanto à sua estrutura, as acetogeninas compreendem uma série de produtos naturais C-35/C-37 derivados de ácidos graxos C-32/C-34 combinados com uma unidade 2-propanol (Figura 1.1). As acetogeninas são encontradas em folhas, ramos e principalmente em sementes de plantas de Annonaceae, sendo *Annona muricata* a espécie mais estudada. Da grande variedade de acetogeninas, a escamocina e a annonacina (Figura 1.1) demonstraram o maior impacto sobre os insetos (Al Kazman et al., 2022).

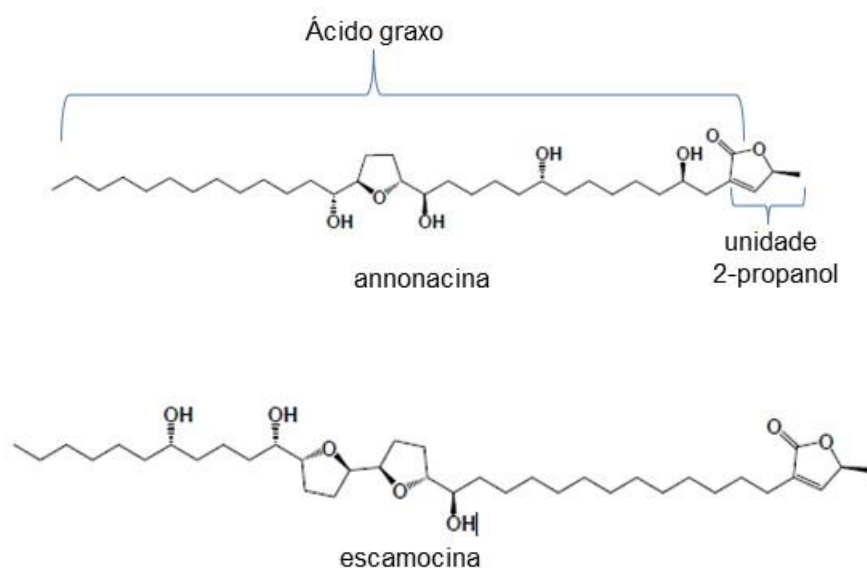


Figura 1.1. Exemplos de acetogeninas

*Annona* é um dos gêneros da família Annonaceae, o qual contém mais de 119 espécies de árvores e arbustos, a maioria delas distribuídas em áreas tropicais das Américas e da África. A maioria dessas espécies é encontrada na América tropical, com mais de 105 espécies (26 delas são endêmicas) e 10 espécies distribuídas na África tropical. Devido aos seus frutos comestíveis e propriedades medicinais, *Annona* é o gênero mais importante da família. Numerosas espécies de *Annona* fornecem frutos comestíveis como *Annona muricata* (“graviola”), *Annona crassiflora* (“araticum”) e *Annona squamosa* (“fruta do conde”). A maioria das frutas é

consumida in natura ou utilizado em sobremesas, sucos e preparações de sorvetes (Al Kazman et al., 2022).

Fitoquimicamente, várias classes de metabólitos secundários, como acetogeninas, ligninas, alcalóides, terpenóides e flavonóides, foram descritas neste gênero. Uma variedade de atividades farmacológicas foi relatada em várias partes de espécies de *Annona*, especialmente em folhas e sementes, incluindo antibacteriano, antinociceptivo, anticancerígeno, anticonvulsivante, antidiarréia, antidiabético, antimalárico, antiinflamatório, antioxidante, antileishmania, antiúlcera e antidepressivo (Al Kazman et al., 2022).

A citotoxicidade da acetogenina annonacina, mostrada na figura x, encontrada em muitas espécies de *Annona*, foi relatada contra várias linhagens celulares derivadas de câncer cervical (HeLa e HeLa S3) com  $IC_{50}$  0,219 e 0,426 g/mL, e câncer de ovário (PA-1 e SKOV3) com  $IC_{50}$ s de 0,452 e 0,411 g/mL. A citotoxicidade da annonacina também foi demonstrada contra câncer de bexiga (T24), câncer de mama (MCH7) e câncer de pele (BCC-1) com  $IC_{50}$ s 0,324, 0,433 e 0,427 g/mL, respectivamente (Al Kazman et al., 2022).

Em estudos clínicos, a atividade anticancerígena de *A. muricata* foi relatada num pequeno número de estudos. Um paciente diagnosticado com câncer de mama manteve atividade estável da doença sem efeitos colaterais relatados após usar um extrato aquoso de folhas de *A. muricata* por mais de cinco anos. Outra paciente com câncer de ovário metastático apresentou estabilidade da doença após começar a tomar uma medicação complementar contendo *A. muricata* na forma de comprimido. Finalmente, o efeito do extrato de folhas de *A. muricata* revelou maior citotoxicidade no grupo suplementado com câncer colorretal em comparação com o grupo placebo em um ensaio clínico randomizado (Al Kazman et al., 2022).

Os alcaloides aporfínicos são os mais representativos da família Annonaceae, uma vez que são encontrados na maioria dos gêneros desta família, sendo considerados marcadores quimiotaxonômicos, como mostrado acima (Menezes et al., 2021). Por outro lado, as lignanas têm sido encontradas bem mais no gênero *Annona*, podendo ser úteis como marcadores quimiotaxonômicos deste (Costa et al., 2015). As lignanas estão bastante difundidas em todo o reino vegetal e foram identificadas em pteridófitas, gimnospermas e angiospermas. Suas funções e distribuição onipresente evidenciam seu papel na evolução das plantas, à medida que a estrutura das lignanas aumenta em complexidade com a evolução das gimnospermas e angiospermas. Elas foram considerados uma das primeiras



formas de defesa a evoluir em plantas vasculares. As lignanas ocorrem em todas as partes das plantas, como cerne, casca, raízes, rizomas, caules, folhas, flores, frutos e sementes, bem como em produtos secretados, como resinas. Elas podem ser encontradas em conteúdo variável tanto no estado livre quanto na combinação glicosídica (Atta-ur-Rahman et al., 2002).

Lignanas furofurânicas são encontradas em poucas espécies de Annonaceae, particularmente nos gêneros não relacionados *Annona*, *Mitrephora* e *Porcelia*. Em *Annona*, elas foram relatadas nas folhas e frutos verdes frescos de *A. mucosa*. As lignanas descritas em Annonaceae a partir das folhas de *A. sylvatica* são mostradas na figura y. Embora lignanas tenham sido encontradas em outras famílias estreitamente relacionadas, como Magnoliaceae e Lauraceae, apenas um número limitado foi relatado nas Annonaceae. Outros exemplos do tipo de lignanas furofurânicas em Annonaceae foram encontrados nos caules de *A. montana* e *A. cherimola*, casca do caule de *A. emarginata*, sementes de *A. membranacea*, folhas de *A. pickelii*, folhas e caules de *Mitrephora maingayi*, e ramos de *Porcelia macrocarpa* (Chaves et al., 2000). Portanto, a presença de lignanas do tipo furofurânicas em *Annona* sugere que estes compostos poderiam ser utilizados como marcadores potencialmente quimiotaxonômicos deste gênero (Dutra et al., 2012).

A resina de *Podophyllum* (Berberidaceae), chamada podofilina (uma lignana ariltetraidronaftaleno), é conhecida por suas propriedades antitumorais há muitos anos. (-)-Siringaresinol de *Annona montana* (Annonaceae) e seu acetato, apresentaram citotoxicidade significativa (valores ED<sub>50</sub> de 0,67 e 3,78 mg/mL, respectivamente) contra células P-388 (Atta-ur-Rahman et al., 2002).

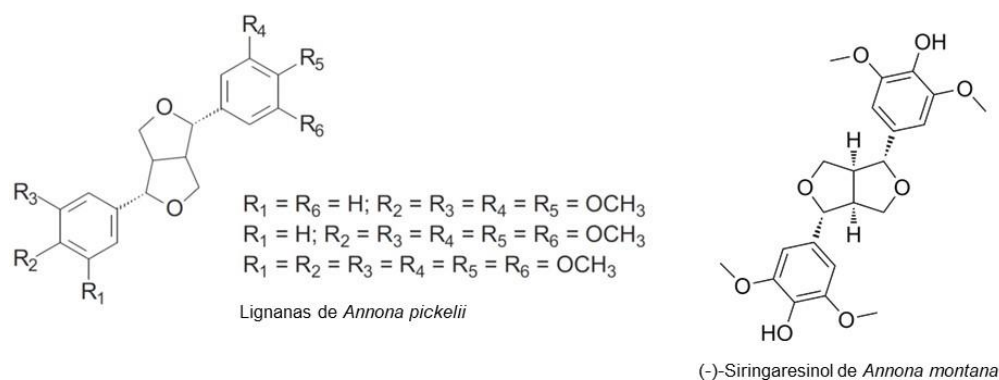
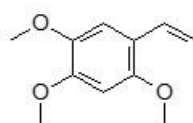


Figura 1.2. Exemplo de lignanas furofurânicas de Annonaceae

O grupo de Produtos Naturais da UFSCar tem estudado plantas da família Annonaceae, cujos extratos têm se mostrado potenciais inseticidas naturais. Foi avaliado os efeitos letais e subletais dos extratos etanólicos de diferentes partes de *Duguetia lanceolata* St.-Hil. contra *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae), principal praga de grãos armazenados em regiões tropicais. Com base em um bioensaio de triagem, o extrato etanólico de folhas de *D. lanceolata* foi selecionado para partição química devido à sua alta bioatividade contra o gorgulho. A partição hexânica do extrato etanólico das folhas causou 98% de mortalidade dos adultos de *Z. subfasciatus* em um bioensaio de contato residual e eliminou completamente o número de ovos por amostra. Uma subfração cromatográfica, do extrato hexânico das folhas de *D. lanceolata*, resultou em 100% de mortalidade de adultos de *Z. subfasciatus*. Um composto aromático (2,4,5-trimetoxiestireno) e uma mistura de esteróis [(campesterol (8,44%) + estigmasterol (12,37%) + sitosterol (79,19%)] foram isolados dessa subfracção utilizando vários procedimentos cromatográficos. O composto 2,4,5-trimetoxiestireno levou à mortalidade 60% do gorgulho e a mistura de esteróides aplicada a 75 mg kg<sup>-1</sup> promoveu 28% de mortalidade; em contraste, o controle positivo (K-Obiol® 2P, deltametrina 2 g i.a./kg) a 375 mg kg<sup>-1</sup> resultou em 100% de mortalidade. Além disso, tanto o 2,4,5-trimetoxiestireno quanto o K-Obiol® 2P impediram completamente a oviposição em amostras de feijão, demonstrando que, semelhante a uma formulação à base de deltametrina, o 2,4,5-trimetoxiestireno é capaz de atuar como protetor de grãos. Portanto, o composto aromático isolado de *D. lanceolata* pode ser ferramenta de manejo adequada de pragas de produtos armazenados e a espécie fonte promissora de moléculas inseticidas com efeitos letais e subletais em *Z. subfasciatus*. A grande vantagem é que o composto é muito simples (figura 1.3) para a síntese e uso industrial econômico (Gonçalves et al., 2017).



2,4,5-trimetoxiestireno

Figura 1.3. Composto isolado de *Duguetia lanceolata*

Estudos bioguiados com extratos preparados a partir das folhas de *D. lanceolata* também foram realizados pelo grupo utilizando o gorgulho do milho, *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae), o qual é um inseto-praga primário de cereais armazenados em condições tropicais. Para tanto, quatro fases (hexano, diclorometano, acetato de etila e hidroalcolico) foram obtidas primeiramente por partição líquido-líquido e testadas por meio de um bioensaio de contato residual (a 1500 mg L<sup>-1</sup>) para verificar sua bioatividade em adultos de gorgulhos do milho. Apenas a fração hexânica causou mortalidade significativa (74%) após o décimo dia de exposição ao inseto nas amostras tratadas de grãos de milho. Assim, essa fração foi separada em sete novas subfrações por meio de cromatografia em coluna a vácuo e solventes de polaridades crescentes. A subfração 2 promoveu 90% de mortalidade enquanto a subfração 6 promoveu 30% de mortalidade dos gorgulhos do milho. Como comentado no primeiro estudo, o composto aromático 2,4,5-trimetoxiestireno e uma mistura de esteróides [campesterol (8,44%) + estigmasterol (12,37%) + sitosterol (79,19%)] foram isolados da subfração 2 e promoveram promissora atividade protetora dos grãos, de maneira comparável a uma formulação baseada em terra de diatomáceas (controle positivo). Portanto, os resultados acima demonstram o potencial de aplicação de derivados de folhas de *D. lanceolata* também no manejo integrado do gorgulho do milho (Domingues et al., 2020).

Poderíamos citar outros estudos com plantas brasileiras, mas no geral, os resultados obtidos pelo grupo confirmam a hipótese de que inseticidas naturais têm o potencial para serem utilizados no controle de algumas pragas, proporcionando uma alternativa promissora ao uso de pesticidas sintéticos, especialmente porque eles apresentam menores riscos para o ambiente local.

### 1.1. Novos desafios e Metodologia para superá-los

A família Annonaceae tem chamado muita atenção desde a década de 1980, devido à presença das acetogeninas, como comentado acima. Estas substâncias são inibidores potentes de uma série de pragas agrícolas e outras: **larvas de mosquito** (Culicidae, família de insetos comumente chamados de muriçoca, mosquito ou pernilongo), **ácaro-rajado** (*Tetranychus urticae*, Koch 1836, é considerado uma das mais importantes pragas agrícolas, não só pelos danos causados, mas também pela ampla variedade de hospedeiros, infestando diversas culturas comerciais, como hortaliças, algodão, feijão, soja, dentre outras), **besouro**

**do feijão mexicano** (Coccinellidae, *Epilachna varivestis*), **besouro listrado do pepino** (Chrysomelidae, *Acalymma vittatum*), **broca europeia do milho** [*Ostrinia nubilalis*, é um inseto praga que causa danos severos à cultura do milho em diversos países produtores, como Estados Unidos e Canadá, no Brasil é considerada praga quarentenária e está presente na lista A1 – (não presente no país)], **pulgões do melão ou do algodão** (*Aphis gossypii*, um afídeo da família Aphididae, que coloniza malváceas, como o algodoeiro bem como algumas cucurbitáceas, como o melão, além de atacar também os citrinos), **larvas de varejeira** (Calliphoridae, moscas-varejeiras) e um **nematoide** (*Caenorhabditis elegans*). As acetogeninas de Annonaceae são um grupo importante de derivados de ácidos graxos de cadeia longa encontrados exclusivamente nesta família de plantas (Krinski et al., 2014). Quase 400 compostos desta classe foram publicados na literatura desde a descoberta da uvaricina (lactona tetrahidrofuranoide) (Figura 1.4). Da grande variedade de acetogeninas, a esquamocina e a annonacina (Figura 1.1) mostraram o maior impacto sobre os insetos.

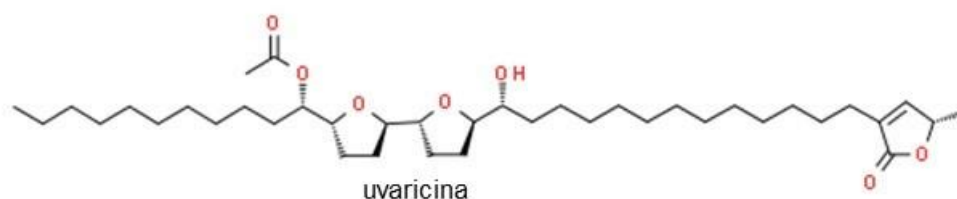


Figura 1.4. Uma das primeiras acetogeninas obtidas de Annonaceae

As acetogeninas são toxinas mitocondriais, que inibem a produção de energia celular por meio de um modo de ação idêntico ao do conhecido inseticida natural e veneno de peixe, a rotenona. Mais especificamente, as acetogeninas bloqueiam a cadeia respiratória na NADH ubiquinona redutase (complexo I) e causam uma diminuição nos níveis de ATP, afetando diretamente o transporte de elétrons na mitocôndria, causando apoptose. Elas também inibem o desenvolvimento e o comportamento dos insetos (Castillo-Sánchez et al., 2010).

Atualmente, existem dois inseticidas comerciais na Índia baseados em *Annona*: Anosom™ [extratos de sementes de *A. squamosa* e *A. reticulata*, contendo 1% de esquamocina (Figura 1.1) como ingrediente ativo] e Bio Rakshak™ (um extrato de sementes de *A. squamosa*) (Ribeiro et al., 2014).

Há anos o grupo de Produtos Naturais (PN) da UFSCar vem trabalhando com plantas de Annonaceae, e seus extratos têm mostrado potenciais inseticidas naturais frente a vários insetos-pragas da nossa agricultura, contudo em todos os

estudos os constituintes ativos não foram acetogeninas. Confirmado o potencial inseticida desta classe de substâncias, o novo desafio do grupo de PN agora será desenvolver metodologias para obtê-las a partir de resíduos da biomassa agroindustrial de graviola, *Annona muricata*, porém, para guiar esta busca inicialmente padrões de acetogeninas em *A. squamosa*, fruta do conde, foram obtidos na presente tese.

No início do estudo que levou a esta tese, em agosto de 2019, entre os frutos de *Annona* em maior produção no período eram aqueles de *A. squamosa*. A frutificação acontece nos meses de março a maio. A literatura mostrada na introdução indica que o maior teor das acetogeninas encontra-se nas sementes dos frutos. Assim, planta como um todo foi obtida de fornecedores com plantas certificadas em agosto de 2019, e os frutos em grande quantidade foram obtidos em supermercados, nos quais o controle de qualidade é exigido (Figura 1.5). Os frutos foram comprados em março de 2020.

Os estudos desta planta e sementes foram parte dos objetivos da presente tese, ou seja, a hipótese de que as diferentes partes da planta poderiam levar ao isolamento de substâncias bioativas, e os frutos em especial às acetogeninas com atividades inseticidas foram averiguadas. Atividade anticancerígena foi relatado no início da introdução para acetogeninas e lignanas ariltetraidronaftalénicas, estas últimas não comuns em Annonaceae. Contudo, a atividade anticâncer com ambas as classes de compostos isolados foram avaliadas, contra células de adenocarcinoma de mama humano MCF-7, câncer de pulmão A549 e células humanas normais MRC-5.



Figura 1.5. *A. squamosa*, fruta do conde, obtidas em supermercado de São Carlos, SP. (fotos do autor).

Há anos o grupo de PN da UFSCar vem trabalhando com plantas de Annonaceae, porém, realizando ensaios frente a pragas de produtos armazenados. Um segundo desafio do grupo de PN agora foi desenvolver metodologias de ensaios com acetogeninas isoladas de *A. squamosa* usando *Spodoptera frugiperda* (Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). A lagarta-do-cartucho, *S. frugiperda*, é uma praga polífaga que causa danos importantes em diferentes regiões da América e afeta principalmente as lavouras de milho em áreas tropicais e subtropicais. Atualmente, o controle depende de plantas transgênicas e/ou pesticidas químicos (Assefa et al., 2018), estimulando os estudos na presente tese.

Mais um desafio da presente tese referiu-se ao manejo das doenças de citros. As árvores cítricas podem apresentar uma série de sintomas que refletem vários distúrbios que podem afetar sua saúde, vigor e produtividade em vários graus. A detecção e o manejo precoces de doenças são essenciais para garantir a viabilidade contínua da citricultura. Nossos resultados em estudos com citros mostram uma união entre vários membros da equipe tentando entender as interações entre os fitopatógenos e seu hospedeiro, e já com respostas para ajudar os produtores e em um futuro próximo oferecer fungicidas, bactericidas para várias das doenças em estudo (Niculau et al., 2022, entre outros anteriores). O Cancro Cítrico é uma das principais doenças da citricultura, onde seu agente etiológico é a bactéria gram-negativa *Xanthomonas citri* ssp *citri*. Esta doença vem causando grandes perdas econômicas na citricultura brasileira. Para o controle dessa doença é utilizado produtos químicos derivados de cobre, porém alguns isolados dessa bactéria já apresentam resistência. Assim, visando buscar novos pesticidas com baixa toxicidade tanto ao meio ambiente como ao homem, a presente tese teve os estudos fotoquímicos bioguiados por ensaios avaliando seus extratos e compostos isolados quanto às suas capacidades de inibir o crescimento da bactéria *Xanthomonas citri* spp.

---

## 2. OBJETIVOS

## 2.1 Objetivo geral

Determinar a composição química de extratos da planta *Annona squamosa* L., pertencente à família Annonaceae, e avaliar a eficácia de seus componentes como agente inseticida contra diversas pragas, bem como investigar suas propriedades antibacterianas e seu impacto nas células tumorais.

## 2.2 Objetivos específicos

Para atingir os mencionados objetivos gerais, os seguintes objetivos específicos serão definidos:

1. Efetuar a coleta de amostras de *Annona squamosa*.
2. Realizar uma análise fitoquímica abrangente das partes da planta, incluindo galhos, folhas, raízes e sementes.
3. Determinar a composição química dos extratos de *Annona squamosa* por meio de técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e Espectrometria de Massa.
4. Avaliar a atividade larvicida dos extratos obtidos.
5. Avaliar a atividade bactericida contra *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.
6. Investigar a atividade antitumoral em linhagens de células humanas, incluindo adenocarcinoma de mama (MCF-7), câncer de pulmão (A549) e células normais (MRC-5).



**3. PARTE EXPERIMENTAL**

---

### 3. PARTE EXPERIMENTAL

A parte experimental foi desenvolvida no Laboratório de Produtos Naturais dentro de Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

#### 3.1. Solventes

- Solventes Grau HPLC: ACN, MeOH, IsoPrOH (Merck<sup>®</sup>, Tedia<sup>®</sup>, HoneyWell<sup>®</sup>, J. T. Baker<sup>®</sup>, Panreac<sup>®</sup>).
- Solventes Deuterados para RMN: CD<sub>3</sub>OD, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, (Merck<sup>®</sup> e Aldrich<sup>®</sup>).
- Água ultrapura - Ultra purificador de Água Master System MS2000 (Gehaka<sup>®</sup>).

#### 3.2 Equipamentos

##### 3.2.1 Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC)

- Cromatográfico líquido de alta eficiência 1200 – Agilent Technologie, equipado com bomba quaternária G1311A, degaseificador G1322A, Injetor automático G1329A, acoplado a um detector de ultravioleta de comprimento de onda variável (VWD) G1314B, e forno de coluna G1316A. A aquisição dos dados foi realizada no Software: EZCromElite (Agilent). Para a realização das análises cromatográficas utilizou-se uma coluna C18- zorbax eclipse e XDB- analytical 4,6 X 150 mm 5 µm.

- Shimadzu-DAD-No modo reverso de eluição, cujo princípio da retenção baseia-se na hidrofobia e na interação entre a parte não polar do soluto e a fase estacionária. Para a análise utilizou-se uma com coluna C18- zorbax eclipse e XDB- analytical 4,6 X 150 mm 5 µm. Fonte de luz : lâmpada D2, lâmpada W ou ambas (3 modos). Rango de longitude de onda entre 190-800 nm, onde a precisão de longitud de onda é de 1 nm.

##### 3.2.2 Espectrômetro de Massas

Para espectrometria em alta resolução, os espectros das amostras foram obtidos em um espectrômetro de massas Ultra Performance Liquid Chromatography on a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS) Agilent modelo G6545B, equipado com um dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em vazão contínuo a 5 µL/min.

### **3.2.3 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

- Bruker DRX - 9,4 T (400 MHz para RMN  $^1\text{H}$ ; 100 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$ ), equipado com trocador automático de amostra, sonda de 5 mm BFO (Smart Probe - ATMA®).

- Bruker Avance III - 14,1 T (600 MHz para RMN  $^1\text{H}$ ; 150 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$ ), com cryo-sonda TCI de 5 mm, e equipado com trocador automático de amostra.

### **3.2.4 Balança**

Balança Analítica - Sartorius modelo BP 210S

### **3.2.5 Câmara de Fluxo Laminar**

Veco VL FS-12M

### **3.2.6 Autoclaves Verticais**

-Phoenix AV 30

-Phoenix AV 50

-Phoenix AV 75

### **3.2.7 Estufa Incubadora (B.O.D.).**

Fanem – 347 CD

### **3.2.8 Banho de Ultra-som.**

Branson 1510, Danburcy, CT

### **3.2.9 Evaporadores rotativos.**

-BUCHI, rota evaporador R-114 equipado com banho BUCHI B-480 e BUCHI B-490 com recirculador refrigerado NESLAB®, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

-BUCHI, rota evaporador R-200 equipado com banho BUCHI B-490 e recirculador refrigerado NESLAB, modelo CFT-25 mantido a 5°C.

### **3.3 Procedimentos experimentais**

#### **3.3.1 Coleta e identificação do material vegetal:**

A espécie *Annona squamosa* L. foi coletada em agosto 2019, no município de Linhares-ES; pela professora Maria Fátima das Graças Fernandes da Silva.

#### **3.3.2 Preparação dos Extratos Vegetais:**

Os extratos vegetais foram preparados no período de setembro a dezembro de 2019. As partes vegetais de *Annona squamosa* foram secas à sombra, em temperatura ambiente. Posteriormente, transferidas para estufa com circulação de ar à temperatura de 40 °C por 15 dias. Após esse período, o material vegetal de cada órgão foi trituradas em moinho de facas (30-35° C); obtendo-se um material finalmente pulverizado. O material seco e moído foi percolado com solventes para extração de metabólitos secundários, em ordem crescente de polaridade. Primeiro o material seco foi colocado em Etanol (EEta) e feito uma partição com hexanos, levando ao Extrato Hexano (EHex); posteriormente com acetato de etila levando ao Extrato Acetato de Etila (EAce), e finalmente com metanol/H<sub>2</sub>O proporção 1:1 levando ao extrato hidroalcolico (EHid), como mostra o esquema da Figura 3.1. Os extratos foram concentrados utilizando evaporador rotativo. Todos os extratos foram conservados em refrigerador para evitar contaminação e degradação dos compostos constituintes. As massas das partes vegetais e dos extratos obtidos estão descritas na Tabela 3.1

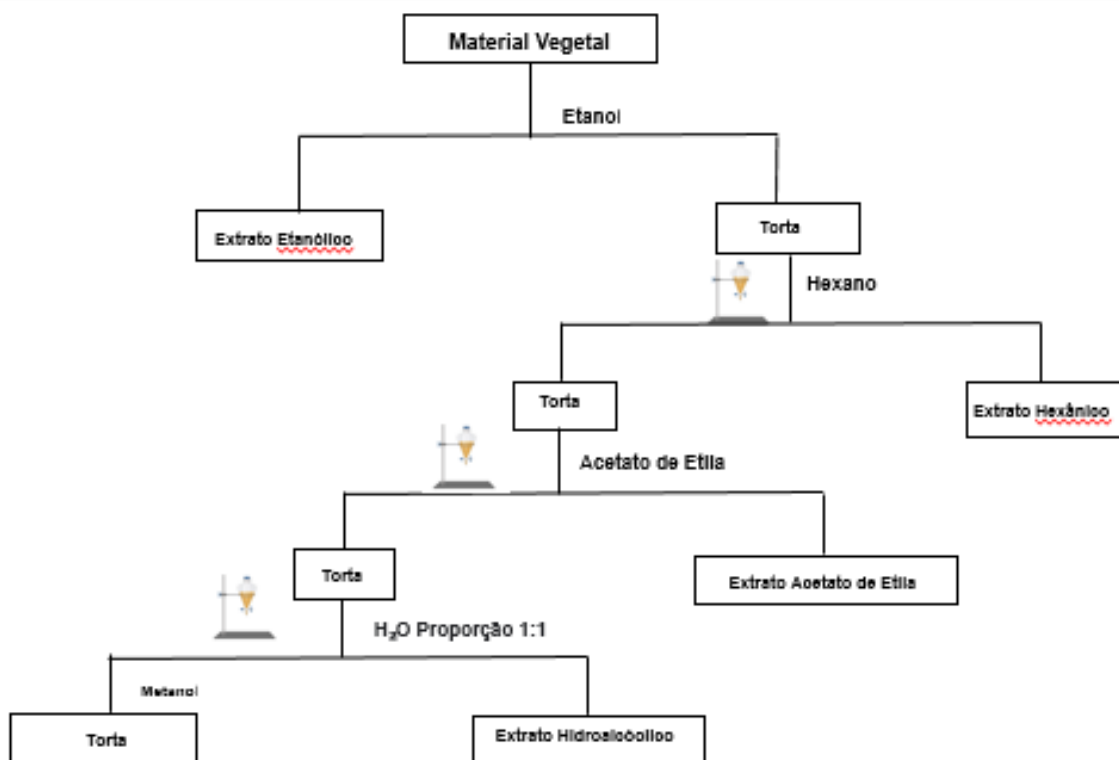


Figura 3.1: Fluxograma do preparo e fracionamento dos extratos preparados de *A. Squamosa*

Tabela 3.1: Massa obtida de material vegetal e extratos.

<b><i>Annona Squamosa</i> L.</b>					
Parte vegetal em gramas		Massas de Extratos obtidos em gramas			
		<b>EE</b>	<b>EH</b>	<b>EAE</b>	<b>EHA</b>
Raízes	760,0	9,4	1,6	5,4	2,8
Tronco	870,0	6,0	2,9	2,8	1,5
Folhas	550,0	8,5	2,8	4,5	1,6
Sementes	350,0	5,4	1,2	2,5	1,2
Casca	270,0	3,8	1,0	1,2	1,4

### 3.4 Insetos utilizados nos bioensaios

Todos os insetos utilizados nos bioensaios foram obtidos a partir de criações mantidas no Laboratório do Grupo de Pesquisa em Manejo Integrado de Pragas na Agricultura (AGRIMIP), do Departamento de Proteção Vegetal da Faculdade, de Ciências Agronômicas (FCA), Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), Botucatu — São Paulo.

Pare a realização dos experimentos com *S. frugiperda*, as lagartas foram alimentadas com dieta artificial adaptada de Greene (1976) até passarem para a fase de pulpa. Após a emergência, os adultos foram transferidos para gaiolas de PVC (20 cm de diâmetro x 30 cm de altura) forradas internamente com papel pardo para servir de substrato à oviposição. As lagartas adultas foram alimentadas com uma solução de água e mel (10,0%) que por sua vez utilizada em um borrifador para impregnar a superfície do papel pardo para manutenção dos insetos até a realização do bioensaio.

### 3.5 Estudo bioguiado

Com o objetivo de conduzir uma pesquisa orientada pela biologia, foram examinados os extratos das folhas, tronco e raízes de *A. squamosa* em relação à lagarta *S. frugiperda*. Para avaliar o potencial inseticida dos extratos EE, EH, EAE e EHA dessas três partes da planta, eles foram incorporados em uma dieta composta principalmente por feijão branco (165 g), seguido de levedura (50,50 g), gérmen de trigo (79,20 g), nipagim (3,15 g), ácido ascórbico (5,10 g), tetraciclina (0,16 g), carragenina (16 g), formaldeído (12 ml), vitamina (9 ml), água destilada (1200 g) e ácido sórbico (1,65 g). Após atingir uma temperatura inferior a 40°C, os extratos foram misturados nas concentrações de 1,0%. Além disso, foram realizados controles negativos, nos quais os extratos não estavam presentes, e um controle positivo (Corteva), totalizando 14 tratamentos.

Cada tratamento foi conduzido com um total de 50 lagartas em quintuplicata, ou seja, 10 lagartas por réplica, mantidas em tubos de ensaio com rosca, conforme ilustrado na Figura 3.2.

Sendo os tubos posteriormente acondicionados sob temperatura de 25±2°C, umidade relativa de 60±5% e fotofase de 12 horas. As avaliações foram realizadas a cada 24 horas durante todo o desenvolvimento do inseto até a emergência dos adultos. Os parâmetros avaliados foram: mortalidade (%). Para cada extrato e controle

branco (somente a dieta) foram testadas 50 lagartas no segundo estágio de desenvolvimento

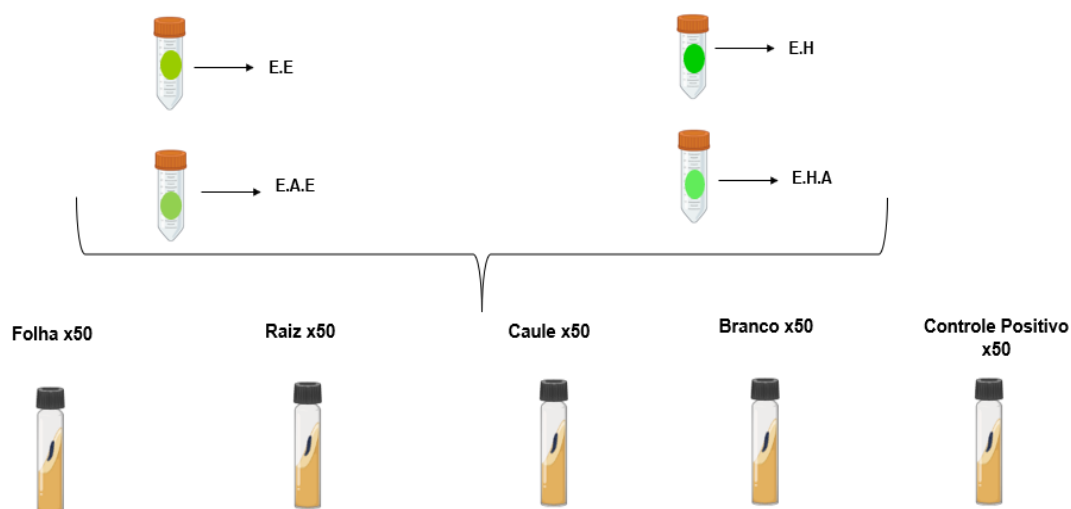


Figura 3.2-Representação da Atividade inseticida dos Extratos frente á alagarta *S. frugiperda*.

### 3.6 Separação do Extrato de Acetila de Etila (EAE)

O procedimento de extração do EAE das folhas de *A. squamosa* foi realizado por meio de fracionamento em fase sólida no modo reverso (SPE-C18), conforme ilustrado na Figura 3.3. A amostra foi solubilizada utilizando uma mistura de solventes composta por H<sub>2</sub>O-ACN, que corresponde à condição inicial cromatográfica, e foi então aplicada na parte superior do cartucho, utilizando o eluente menos polar. A força de eluição da fase móvel pode ser gradualmente aumentada, seguindo um gradiente, com o objetivo de melhorar a capacidade de arrastar substâncias com média e alta polaridade. Os diferentes componentes da mistura se movimentarão a diferentes velocidades, dependendo de sua afinidade predominante pela fase móvel ou estacionária (conforme descrito por QUEZIA CASS em 2009). As frações obtidas passaram por análises posteriores utilizando HPLC-PDA, conforme mencionado no item 3.7.



Figura 3.3: Esquema de Fraccionamento por SPE do Extrato de Acetato de Folhas.

### 3.7 HPLC-PDA (Desenvolvimento Analítico)

Com o objetivo de avaliar a eficiência cromatográfica das frações obtidas por SPE, conforme detalhado na seção 3.6, procedeu-se à preparação das amostras correspondentes para posterior injeção e análise por HPLC-PDA (Shimadzu Tecnologie) no modo analítico inicialmente. Para esta análise, foram empregadas colunas em fase reversa Si-C18 (Zorbax eclipse e XDB) com dimensões de 4,6 x 150 mm e partículas de 5  $\mu$ m.

A fase móvel empregada consistiu em uma mistura de água (A) acidificada com 0,1% de ácido fórmico e acetonitrila (B), com uma taxa de fluxo de 1 ml/minuto. O volume de injeção dos extratos foi fixado em 30  $\mu$ l, com uma concentração de 1 mg/ml, e o detector UV operou a um comprimento de onda de 215 nm. A eluição foi realizada de acordo com o sistema descrito na Tabela 3.2, que apresenta o esquema de eluição do HPLC.

Tabela 3.2 : Sistema de eluição do HPLC.

Tempo	Água + 1% Acido fórmico	ACN
0	95%	5%
1	95%	5%
15	85%	15%
30	50%	50%
40	20%	80%
43	95%	5%
45	95%	5%



### 3.7.1 HPLC-PDA (Separação e coleta dos metabólitos pelo modo semi-preparativo).

Para isolar e coletar as substâncias das frações previamente selecionadas, realizou-se uma análise utilizando cromatografia em escala preparativa. Nesse método, o foco principal não se limita apenas à separação e/ou quantificação dos compostos, mas também inclui a coleta das frações que contêm os compostos para uso futuro. A fase móvel empregada consistiu em uma mistura acidificada de água (A) e acetonitrila (B) contendo 0,1% de ácido fórmico, com um fluxo de 1 ml/minuto, operando no modo isocrático. Os extratos foram injetados em um volume de 100  $\mu$ L com uma concentração de 10 mg/mL, e a detecção foi realizada utilizando um detector UV com um comprimento de onda de 215 nm.

### 3.8 Estudo químico do EAE das sementes de *A. Squamosa*

A análise das sementes envolveu a utilização da cromatografia em coluna de sílica (CCS), uma técnica que separa as substâncias presentes em uma mistura com base em suas propriedades de solubilidade e adsorção. Nessa técnica, a fase sólida é geralmente sílica, enquanto a fase líquida consiste em um solvente ou uma mistura de solventes (consulte a Tabela 3.3). Isso permite a agrupação das substâncias de acordo com suas semelhanças químicas. Posteriormente, a cromatografia em camada delgada (CCD) foi empregada para verificar as separações e semelhanças entre as substâncias. A CCD é uma técnica de afinidade que permite a separação de compostos em uma mistura, conforme ilustrado na Figura 3.4.

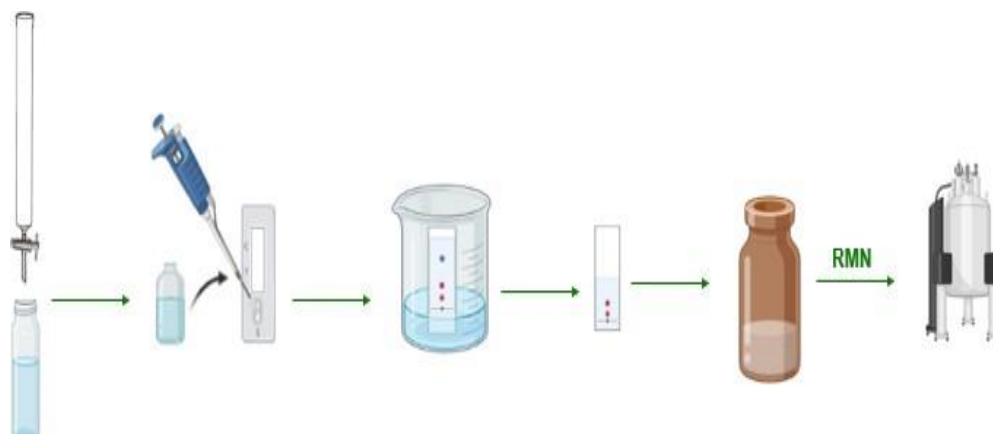


Figura 3.4-Cromatografia em camada delgada (CCD)

Tabela 3.3-Mistura de solventes para separação em coluna por fase normal o Extrato de Acetato de Etila das sementes

Tempo	Hexano	Acetato	Metanol
1	100%	-	
2	90%	10%	
3	80%	15%	
4	70%	20%	
5	60%	30%	
6	50%	50%	
7	40%	60%	
8	30%	70%	
9	20%	80%	20%
10	-	100%	-
11	-	90%	10%
12	-	80%	20%

### 3.9 RMN: Ressonância Magnética Nuclear.

Após a conclusão da separação de cada um dos compostos, procedemos à análise por meio de experimentos de RMN. Esses experimentos foram conduzidos em um espectrômetro Bruker, utilizando uma sonda com detecção inversa (BBI) projetada para tubos de RMN de 5,0 mm de diâmetro externo, juntamente com bobinas geradoras de gradiente de campo na coordenada z. Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram referenciados em relação aos sinais do solvente deuterado e expressos em partes por milhão (ppm), enquanto as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz).

Para a realização dos experimentos de RMN, solubilizamos aproximadamente 20,0 mg de cada amostra em 0,6 mL de clorofórmio deuterado. O processamento dos espectros de RMN foi conduzido utilizando o software TOPSPIN da Bruker, nas versões 1.3 e 2.1. As estruturas químicas foram desenhadas utilizando o programa ChemDraw Ultra 6.0, e os valores teóricos das distâncias internucleares, bem como a otimização das estruturas químicas, foram determinados através do programa Chem3D Ultra 6.0.

### 3.10 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

Para as análises de cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (UPLC-QTOF-MS/MS) foram preparadas soluções dos compostos isolados em acetonitrila, na concentração de 500 ppm, as quais foram filtradas em filtros de seringa com membrana em nylon (0,45  $\mu\text{m}$ ). As separações cromatográficas ocorreram empregando coluna Zorbax Eclipse C18 (2,1 x 50 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ), mantida a 30 °C, após injeção de 3  $\mu\text{L}$  da amostra. A eluição foi realizada no modo gradiente, a um fluxo de 0,350 mL/min, utilizando um sistema constituído pelos eluentes A ( $\text{H}_2\text{O}$  acidificada com 0,1% de ácido fórmico) e B (acetonitrila acidificada com 0,1% de ácido fórmico) na seguinte proporção: 5-100% de B durante 22 min e 100-5% de B durante 3 min. Os dados de MS1 e MS2 foram obtidos em equipamento Agilent 6545 QTOF, no modo positivo, em três níveis de energia: baixa (voltagem do capilar: 2200 V, voltagem de fragmentação: 110 V, voltagem do nozzle: 300 V), média (voltagem do capilar: 2500 V, voltagem de fragmentação: 120 V, voltagem do nozzle: 500 V) e alta (voltagem do capilar: 3000 V, voltagem de fragmentação: 130 V, voltagem do nozzle: 600 V). O modo Auto MS/MS foi executado utilizando tabela de energia de colisão com os seguintes valores: 150-500 Da (20-25 eV), 500-1000 Da (25-50eV) e 1000-1500 (50-60 eV).

### 3.11 Ensaios Biológicos

#### 3.11.1 Efeito dos compostos em folha de milho sobre *Spodoptera frugiperda*.

Pequenos pedaços de folha de milho medindo 3 cm x 3 cm foram submergidos brevemente por três segundos em uma solução contendo 1,0% de cada composto (1-2 mg por composto). Após a secagem, foram transferidas 10 lagartas de primeiro instar para cada pedaço de folha, constituindo uma repetição. Posteriormente, as lagartas foram colocadas em placas plásticas com tampa de 6 cm de diâmetro, que continham papel filtro umedecido na base para manter a turgidez do material vegetal (conforme ilustrado na Figura 3.5). O experimento consistiu em 30 repetições, incluindo um grupo de controle com apenas água, um grupo de controle com água + DMSO (0,5%), e um grupo controle positivo (com tiametoxam+ lambda-cialotrina na proporção de 200 mL por 200L de solução aquosa).

As avaliações foram realizadas a cada 24 horas ao longo de cinco dias, durante os quais o número de indivíduos mortos foi contabilizado. A mortalidade foi calculada e a eficácia dos extratos ou substâncias puras foi determinada de acordo com o método de ABBOTT (1925).

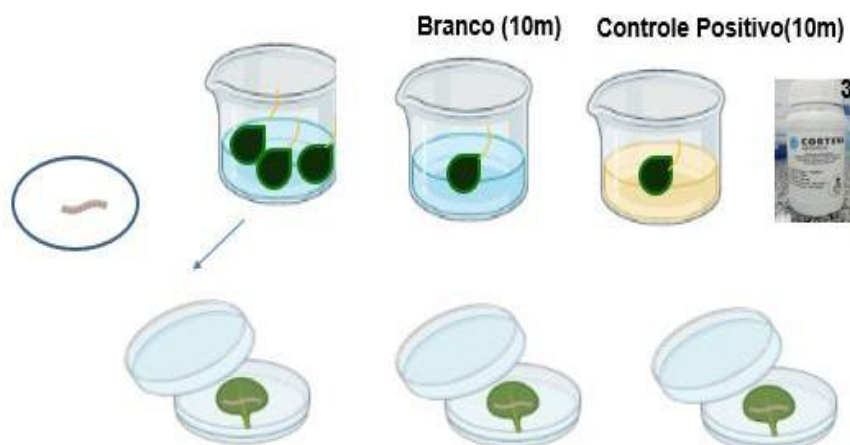


Figura 3.5- Representação da atividade inseticida.

### 3.12 Isolados utilizados da bactéria *Xanthomonas citri* SUBSP. *citri* nos experimentos antimicrobianos *in vitro*.

Para os experimentos microbiológicos *in vitro* e em plântulas de *Citrus sinensis*, utilizou-se 3 isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*, Tabela 3.1. Esses isolados foram fornecidos pela Fundecitrus de Araraquara sob supervisão do pesquisador Franklin Behl.

#### 3.12.1 Crescimento e manutenção dos isolados.

O crescimento dessa bactéria e sua manutenção para a promoção das atividades inibitórias foram feitas em meio de cultura Caldo Nutriente com ou sem ágar, dependendo da metodologia aplicada. A marca utilizada foi Kasvi, o qual possui na sua composição: 1,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de carne, 2,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de levedura, 5,0 g.L<sup>-1</sup> de extrato de peptona e 5,0 g.L<sup>-1</sup> de cloreto de sódio. A dose utilizada foi 25 g.L<sup>-1</sup> e o pH aferido a 6.8. Os 3 isolados eram semeados a 28°C cada 72 horas para garantir que a bactéria estivesse em plena atividade metabólica.

### **3.13 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos em avaliação sobre a bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.**

A CIM foi avaliada através do método de microdiluição em microplaca (NCCLS, 2003). A técnica do CIM foi realizada segundo a metodologia preconizada pelo “National Committee for Clinical Laboratory Standards” (NCCLS), atualmente denominado Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com adaptações. Foram utilizadas microplacas para cultura celular com 96 orifícios estéreis. Utilizou-se um protocolo de diluição seriada iniciando-se em  $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  à  $0,195 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os ensaios antimicrobianos foram feitos em triplicata ( $n=3$ ) com os 3 isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* da TABELA 3.1. Testou-se a atividade antimicrobiana com os 12 compostos. Todos os testes realizados em triplicata.

#### **3.13.1 Preparo da Solução Mãe (SM) que são as amostras a serem testadas:**

As amostras preparadas foram: os compostos entre as acetogeninas e lignanas, todos chamamos de Solução Mãe (S.M). Pesou-se 1 mg de amostra que foi dissolvida em 125  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO), ficando essa solução com a concentração de  $8.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ . Nesta acrescentou-se 125  $\mu\text{L}$  de caldo nutriente, ajustando a concentração da solução para  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , sendo esta classificada como Solução Mãe (SM).

#### **3.13.2 Montagem da placa estéril de 96 orifícios e realização da diluição seriada:**

Inicialmente preencheu-se os poços da placa estéril de 96 orifícios com caldo nutriente: 50  $\mu\text{L}$  em todos os poços onde a SM seria testada; 80  $\mu\text{L}$  em 3 poços para testar a viabilidade do inóculo; 90  $\mu\text{L}$  em 3 poços para testar o controle de assepsia da SM; 75  $\mu\text{L}$ , 76  $\mu\text{L}$ , 77  $\mu\text{L}$ , 78  $\mu\text{L}$  e 79  $\mu\text{L}$ , em poços subsequentes para testar a atividade antiséptica do DMSO. Após preenchimento da placa com o caldo, pipetou-se 50  $\mu\text{L}$  da SM no primeiro poço onde as amostras seriam testadas, como a SM estava com  $4.000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , ajustada a  $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ , ao ser colocada no poço que continha 50  $\mu\text{L}$  de caldo. Realizou-se uma diluição seriada do poço número 1 até o poço número 12, (FIGURA 3.6). O mesmo procedimento de diluição seriada foi feito

para o controle positivo, porém pipetando no primeiro poço 59  $\mu\text{L}$  de solução de streptomicina. Nos poços com caldo nutriente para o controle da SM pipetou-se 10  $\mu\text{L}$  da mesma, para confirmar se não havia o crescimento de outros microrganismos. Nos poços onde continham caldo nutriente 75  $\mu\text{L}$ , 76  $\mu\text{L}$ , 77  $\mu\text{L}$ , 78  $\mu\text{L}$  e 79  $\mu\text{L}$ , para o controle do DMSO, deste pipetou-se doses consecutivas de 5, 4, 3, 2 e 1  $\mu\text{L}$ . Depois desta etapa, completaram-se os poços testes da SM com 30  $\mu\text{L}$  de caldo nutriente e os da streptomicina com 21  $\mu\text{L}$  do caldo.

### 3.13.3 Preparo do inóculo:

O inóculo foi preparado a partir da suspensão de células de crescimento de 72 horas em solução salina 0,9%. A padronização foi realizada usando o Densimat®, um densitômetro que mede a densidade óptica de um inóculo microbiano. A leitura no Densimat® foi feita a um comprimento de onda de 550 nm, resultando em uma densidade óptica correspondente a 0,5 na escala McFarland, o que equivale a uma concentração de  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. Em seguida, foram transferidos 3 mL do inóculo em solução salina. Foram retirados 500  $\mu\text{L}$  dessa solução e transferidos para um tubo de 4,5 mL contendo solução salina. Em seguida, 2000  $\mu\text{L}$  dessa solução foram transferidos para outro tubo contendo 10 mL de caldo de nutriente, resultando em uma concentração final de  $2,5 \times 10^6$  UFC/mL. Posteriormente, foram pipetados 20  $\mu\text{L}$  do inóculo em cada poço, resultando em uma concentração de  $5 \times 10^5$  UFC por poço. A Figura 3.6 representa uma placa de 96 orifícios com um teste de CIM.

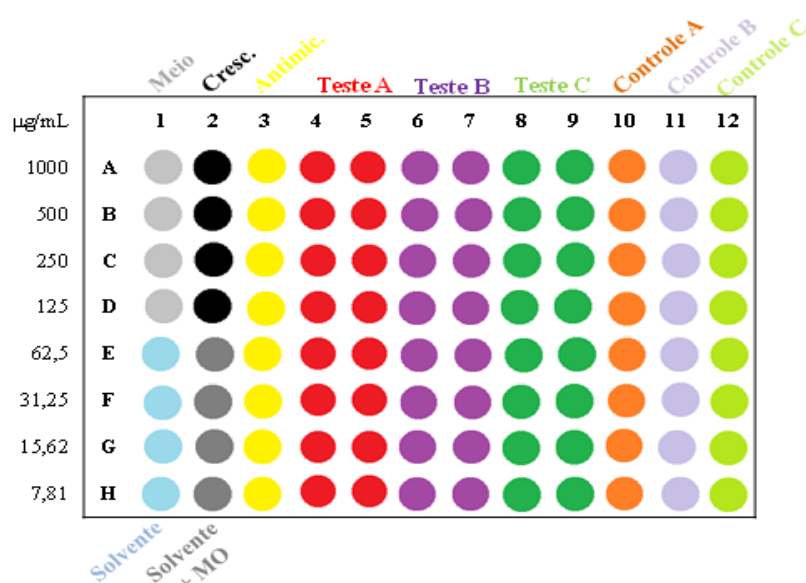


Figura 3.6- Concentração Inibitória Mínima

Após a realização da metodologia do CIM, as placas Elisa® foram guardadas em Câmara Incubadora BOD a temperatura de 28°C onde permaneceram por 72 horas.

### 3.13.4 Leitura da Concentração Inibitória Mínima das placas:

Após o período de incubação, a análise do CIM foi realizada pipetando-se em cada poço 30 µL de solução aquosa de resazurina (Sigma) 0,02% (m/v) (PALOMINO, et. al., 2002), como revelador do crescimento microbiano. A resazurina na presença de células bacterianas viáveis sofre uma reação de redução transformando-se em resofurina e mudando sua coloração de azul para rosa intenso: (Figura 3.7). Após adicionar a resazurina, as placas foram levadas à BOD novamente e, após 12 horas, realizou-se a leitura da CIM dos compostos frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*. Os poços que apresentaram coloração rosa foram os que ocorreram crescimento bacteriano e os que permaneceram em azul onde indica que houve inibição (Figura 3.8).

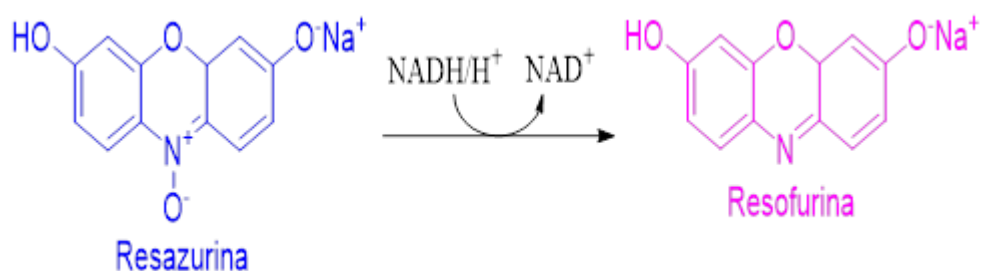


Figura 3.7 Reação de redução da resazurina. Fonte: Adaptada de FUKUSHIMA et al., 2003.

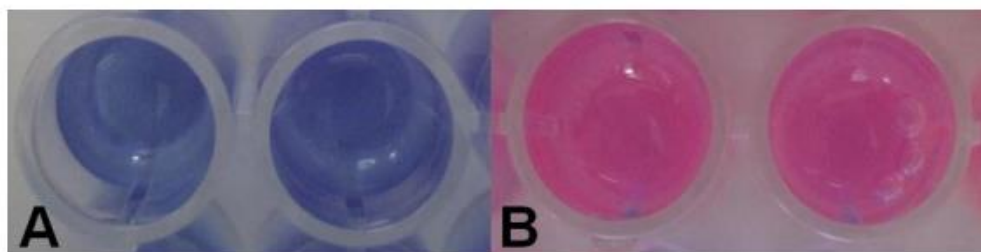


Figura 3.8. Revelação com resazurina da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos compostos frente a bactéria em estudo. A = coloração azul, inibição bacteriana; B = coloração rosa, crescimento bacteriano. . Fonte: MOREIRA, 2011.

### 3.14 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das amostras em teste sobre a bactéria *Xanthomonas citri* ssp. Citri.

Os ensaios de CBM foram feitos em triplicata com os mesmos isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. citri testados para a CIM. Os compostos testados também foram os mesmos. Para realizar testes de CBM, primeiramente se faz os testes de CIM, pois os testes de CBM dos compostos dependem dos resultados da CIM, e alíquotas dos resultados da CIM são utilizados para os testes de CBM. Portanto, primeiramente realizaram-se novamente os testes de CIM de cada complexo, das acetogeninas e lignanas. Os testes de CIM foram feitos em 28 dias placas repetidas, pois em uma placa, chamada de placa1, revelaria a CIM dos compostos com resazurina, e a outra placa, placa 2, igual, seria feita o teste de CBM, como mostra na FIGURA 3.9 . Após o tempo de incubação das placas, revelou-se a CIM dos compostos, com resazurina, da placa 1. Após o resultado da CIM dos compostos na placa 1 e sabendo-se que a placa 2 é igual à placa 1, isto é, apresenta o mesmo resultado de CIM, retirou-se uma alíquota de 10  $\mu$ L de cada poço da placa 2 onde houve inibição bacteriana correspondente à placa 1 e transferiu cada alíquota semeando-as em placa de petri com meio de crescimento microbiano Agar Nutriente (Figura 3.9.).

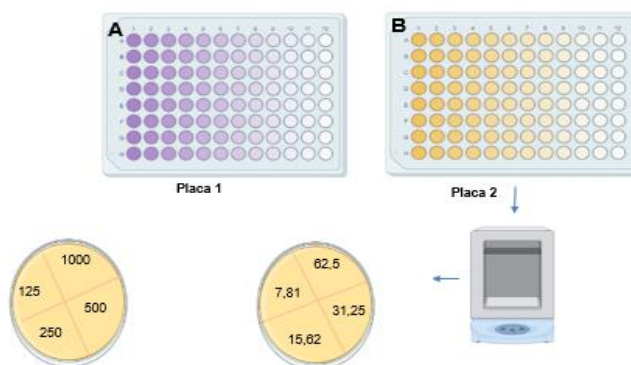


Figura 3.9-Determinação CIMB. A, placa 1, que revelou a CIM dos compostos por resazurina; B, placa de CIM igual a placa 1, porém sem resazurina.



### **3.15 Linhagem de células e condições de avaliação.**

Os compostos analisados foram avaliados pela capacidade de inibir o crescimento *invitro* de células tumorais usando linhagens de célula derivada de tumor humano, MCF-7 (tumor de mama humano), A549 (adenocarcinoma de pulmão humano). Antes das células poderem ser usadas existe uma série de procedimentos e materiais necessários que serão descritos a seguir.

As células MCF-7, MCF-5 (células normais), A549, disponíveis no laboratório de Biologia do Envelhecimento do Departamento de Gerontologia da UFSCar, foram mantidas em vials congelados em nitrogênio líquido; a partir deles, as células foram obtidas (descongeladas a 37°C por cerca de 90 s) e subculturadas serialmente para posterior uso nos experimentos. As células foram cultivadas como cultura de monocamada aderente em meio Leibovitz L-15, suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10% (DMEM para A549, e RPMI para MCF-7), suplementado com soro fetal bovino (SFB) 10%. As culturas foram mantidas a 37°C em uma atmosfera umidificada contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Durante o crescimento das células o meio de cultura foi trocado a cada 2-3 dias para o melhor desenvolvimento destas. O crescimento das células foi acompanhado dia a dia com o auxílio de um microscópio. Quando a garrafa continha uma boa quantidade de células realizava-se a contagem das células e devido à aderência fez-se um procedimento conhecido por tripsinização que é a remoção das células para uso nos experimentos. A contagem das células foi feita ajustando o volume para que cada 200 µL contenha a quantidade desejada de células (1,5 x 10<sup>4</sup> células). Após a aplicação das células em placa para microcultura de 96 poços (estéril) com densidade de 1,5 x 10<sup>4</sup> células por poço (em 200 µL) armazenou-se a placa em estufa (37°C / 5% CO<sub>2</sub>) por 24 horas para que ocorresse a adesão celular. Finalmente, os compostos em diferentes concentrações foram adicionados em triplicata, sendo o tempo de incubação de 48 h.

### **3.16 Ensaio citotóxico.**

A citotoxicidade das acetogeninas foi determinada empregando-se o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetil-tiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio), o qual preconiza que a viabilidade celular é proporcional à formação de cristais de formazan (produto

da redução do MTT). Inicialmente as células foram tripsinizadas para a contagem e ajuste da concentração das células e, em seguida, semeadas em placas de cultura de 96 poços ( $1,5 \times 10^4$  células/poço). As placas foram armazenadas em estufa ( $37^\circ\text{C} - 5\% \text{CO}_2$ ) por 24 h para a adesão celular. Após este tempo adicionou-se os compostos a ensaiar em diferentes concentrações e a placa foi mantida na estufa por 48 horas. A porcentagem de DMSO empregada neste experimento foi de 0,5% e os controles receberam esta mesma porcentagem de DMSO. Após 48 h, foram adicionados  $50 \mu\text{L}$  de MTT ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$  em PBS em cada poço, as quais foram posteriormente incubadas na estufa ( $37^\circ\text{C} - 5\% \text{CO}_2$ ) por um período de 3 — 4 horas, e após esse período foi removido o meio de cultura das placas. Os cristais de formazan formados foram solubilizados pela adição de isopropanol ( $150 \mu\text{L}$ ) e a absorbância dos poços registrada utilizando-se um leitor de microplacas (Labtech LT4000) em um comprimento de onda de 540 nm Figura 3.10. O índice de seletividade (IS) foi calculado pela razão entre citotoxicidade do composto para células de mamíferos (MCF-5) e sua atividade contra células tumorais (A549 e MFC-7).

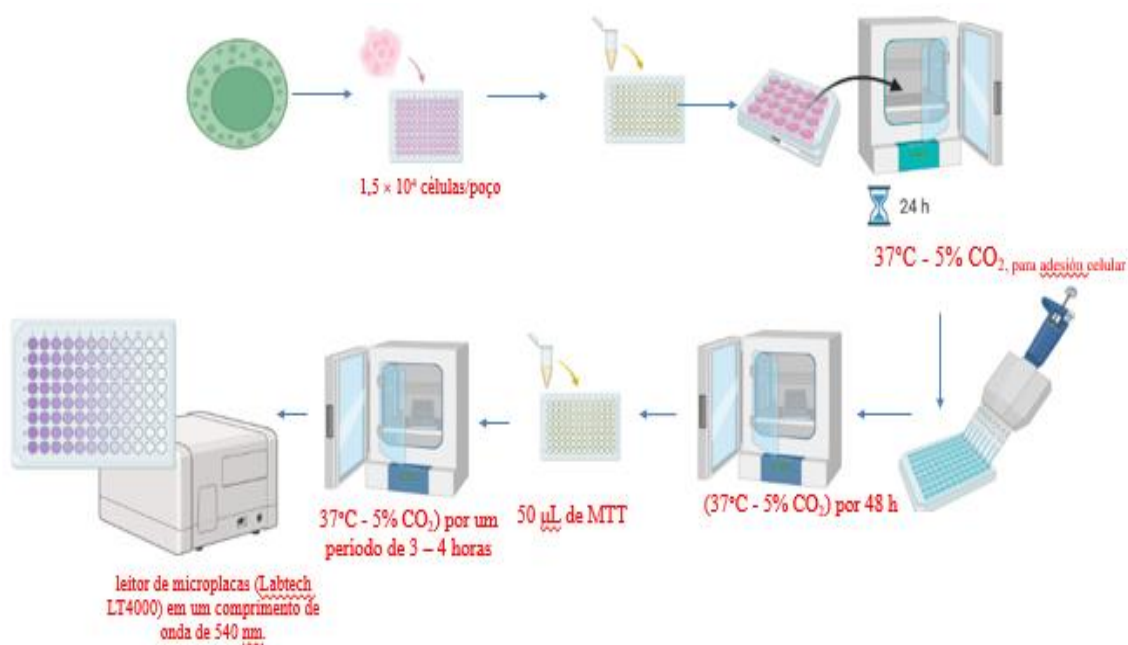


Figura 3.10-Illustração do método por MTT.

---

#### 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4. Resultados da avaliação da atividade inseticida frente *S. frugiperda* dos extratos da de *Annona squamosa*.

Os primeiros experimentos de natureza biológica foram conduzidos utilizando os extratos denominados EE, EH, EAE e EHA, os quais foram dissolvidos em dimetilsulfóxido-DMSO e posteriormente incorporados na dieta das lagartas, resultando em uma concentração final de 1% para as áreas de Raízes, Caule e Folhas (conforme descrito no item 3.5). Os resultados obtidos foram apresentados nas seguintes tabelas: Tabela 4.1, Tabela 4.2, Tabela 4.3 e Tabela 4.4, juntamente com as respectivas figuras: Figura 4.1, Figura 4.2, Figura 4.3 e Figura 4.4. Foi realizado a avaliação estatísticas com os dados transformados pelo método do arcoseno para atingir a normalidade dos dados. Foi feito o quadro ANOVA para avaliar se houve diferença significativa entre os tratamentos, e entre os tratamentos e o controle.

Tabela 4.1-Mortalidade acumulada (médias  $\pm$  erro padrão) de *Spodoptera frugiperda* após da aplicação de diferentes tratamentos na dieta das lagartas.

Tratamento	Mortalidade Acumulada (%)	0 $\pm$ 0 p=0,1815 (Controle vs Trat.)
Raíz E.E	6,0 $\pm$ 2,4	6 $\pm$ 2,45 Bb
Raíz E.H	2,0 $\pm$ 2,0	2 $\pm$ 2 Bb
Raíz E.A.E	2,0 $\pm$ 2,0	2 $\pm$ 2 Bb
Raíz E.H.A	0,0 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0 Bb
Controle	0,0 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0 Bb

E.E: Extrato etanólico; EH: Extrato de Hexano, EAE:Extrato de Acetato de Etila; EHA: Extrato hidroalcoólico; Controle (-): DMSO.

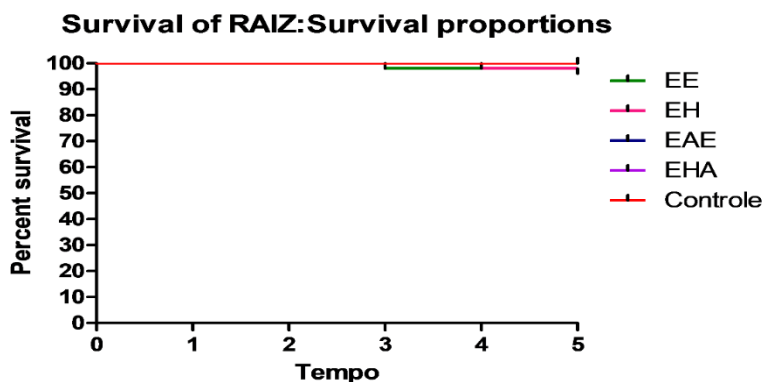


Figura4.1-Mortalidade das lagartas sob os extratos de Raízes.

Tabela 4.2- Mortalidade acumulada (médias  $\pm$  erro padrão) de *Spodoptera frugiperda* após da aplicação de diferentes tratamentos na dieta das lagartas.

Tratamento	Mortalidade Acumulada (%)	$0 \pm 0$ p=0,1815 (Controle vs Trat.)
Caule E.E	$0,0 \pm 0,0$	$0 \pm 0$ Bb
Caule E.H	$0,0 \pm 0,0$	$0 \pm 0$ Bb
Caule E.A.E	$2,0 \pm 2,0$	$2 \pm 2$ Bb
Caule E.H.A	$0,0 \pm 0,0$	$0 \pm 0$ Bb
Controle	$0,0 \pm 0,0$	$0 \pm 0$ Bb

EE: Extrato etanólico; EH: Extrato de Hexano, EAE: Extrato de Acetato de Etila; EHA: Extrato hidroalcoólico; Controle (-): DMSO

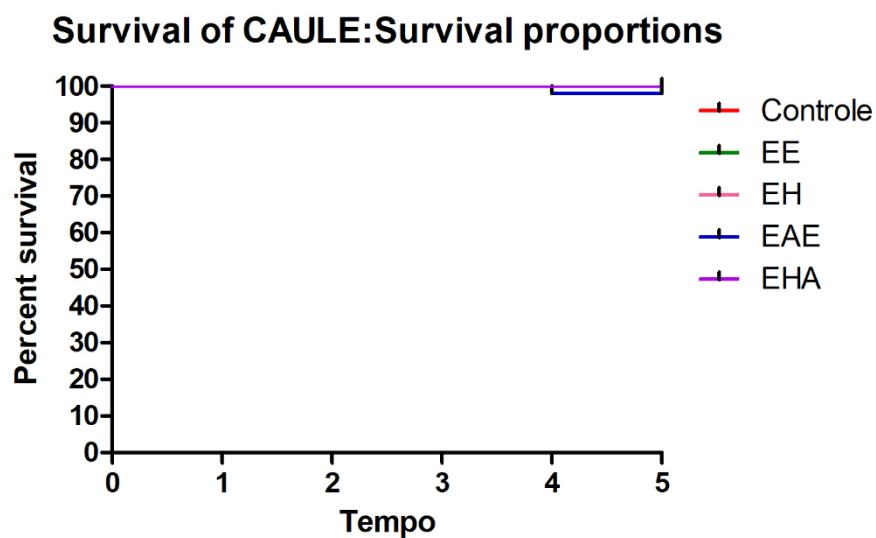


Figura 4.2-Mortalidade das lagartas sob os extratos de Caule.

Tabela 4.3- Mortalidade acumulada (médias  $\pm$  erro padrão) de *Spodoptera frugiperda* após da aplicação de diferentes tratamentos na dieta das lagartas.

Tratamento	Mortalidade Acumulada (%)	0 $\pm$ 0 p=0,1815 (Controle vs Trat.)
Folha E.E	2,0 $\pm$ 2,0	2 $\pm$ 2 Bb
Folha E.H	0,0 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0 Bb
Folha E.A.E	32,0 $\pm$ 10,2	32 $\pm$ 10,20 Aa
Folha E.H.A	0,0 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0 Bb
Controle	0,0 $\pm$ 0,0	0 $\pm$ 0 Bb

EE: Extrato etanólico; EH: Extrato de Hexano, EAE: Extrato de Acetato de Etila; EHA: Extrato hidroalcoólico; Controle (-): DMSO

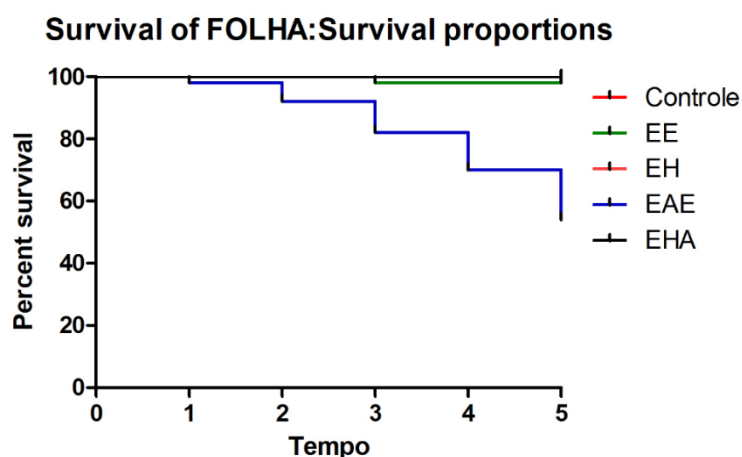


Figura 4.3-Mortalidade das lagartas sob os extratos das Folha

Não houve diferença significativa entre os tratamentos e o controle. Mas entre os tratamentos, o com maior mortalidade acumulada foi a folha acetato como mostrado na Figura 4.3 O EAc demonstrou um efeito inseticida de cerca de 60% na taxa de mortalidade, o que o distinguiu como a única fração a se destacar em comparação com o controle branco. Este resultado orientou todos os esforços para a separação e identificação das moléculas presentes nesse extrato. Portanto, a folha EAc foi escolhida para as etapas subsequentes de purificação.

#### 4.1 Análises por RMN de $^1\text{H}$ e HPLC-PDA do EAE das Folhas.

Uma vez que o extrato de acetato de etila (EAE) demonstrou atividade inseticida contra *S. frugiperda*, foram utilizados vários métodos analíticos (NMR; HPLC-PDA) para a separação e identificação dos componentes do referido extrato. Foi realizada uma análise da amostra do extrato de folhas em acetato de etila por meio de ressonância magnética nuclear (RMN) (conforme apresentado na FIGURA 4.6 em  $\text{CDCl}_3$ ), revelando a presença de clorofila, conforme evidenciado pela comparação do espectro obtido com os espectros conhecidos descritos na literatura (Silverstein et al., 2007).

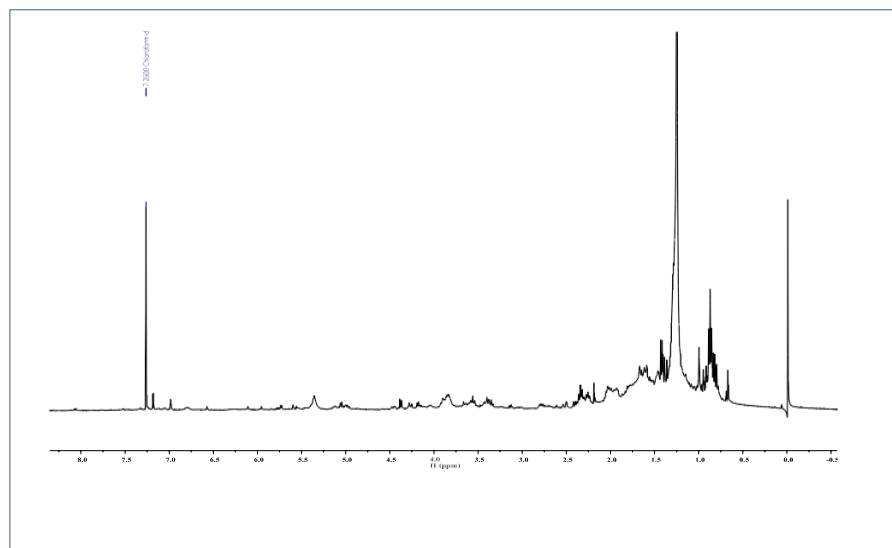


Figura: 4.4-Espectro de RMN  $^1\text{H}$  do extrato EAE das folhas de *A. Squamosa*

Complementarmente foram realizadas as análises cromatográficas analíticas por HPLC-PDA em modo gradiente exploratório e evidenciou a presença da clorofila na amostra (Itens A e B da figura 4.7), apresentando máximos de absorção característicos no espectro de UV com  $\lambda_{\text{max}}$  na faixa 400-600 nm.

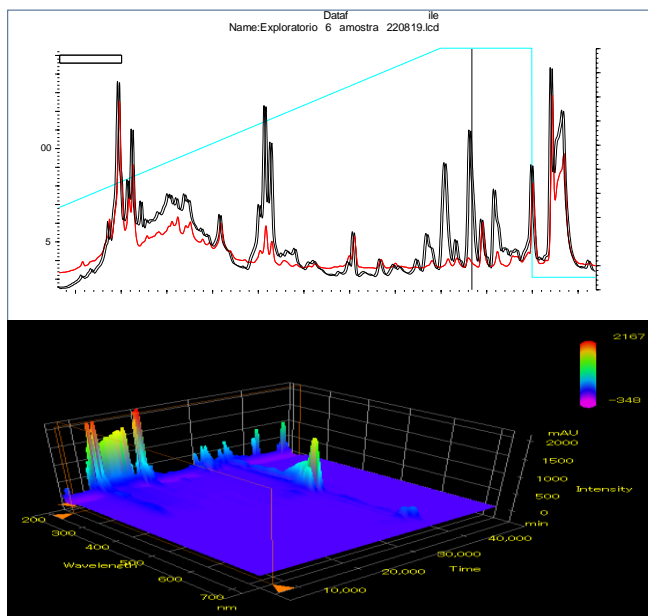


Figura 4.5-: Cromatograma da amostra de Acetato de Etila (215 nm)

Após a etapa anterior foi escolhido fazer o fracionamento por SPE-C18 da amostra. Nesta etapa não só foi possível conseguir remover a clorofila existente na amostra como também viabilizou a obtenção no final de três frações com massa suficiente para as análises em modo semi-preparativo (Figura 4.8) fornecendo o isolamentos de 5 substâncias das frações F2 e F3.

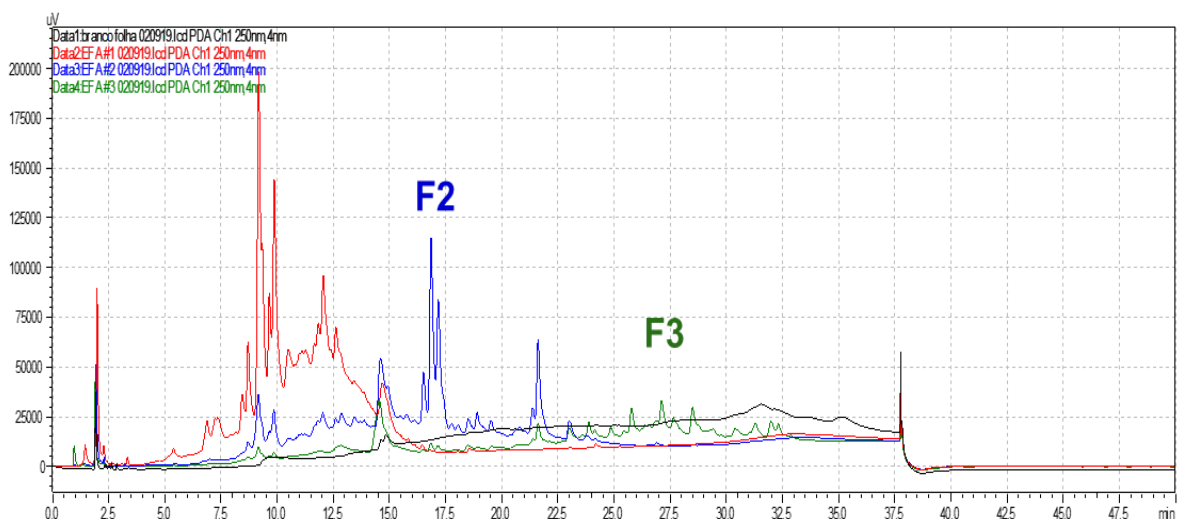


Figura 4.6: Cromatograma das frações F2 e F3.

Após a etapa cromatográfica, cada uma das frações passou por análises de RMN e UPLC-QTOF-MS/MS para avaliar a pureza de três compostos isômeros (F3) pertencentes à classe das acetogeninas, os quais foram denominados como Acetogenina 1, 2 e 3. A Figura 4.9 apresenta o cromatograma das acetogeninas em



UPLC-QTOF-MS/MS, destacando os picos com tempos de retenção de 1.79, 2.08 e 2.53 minutos para a Acetogenina 1, 2 e 3, respectivamente.

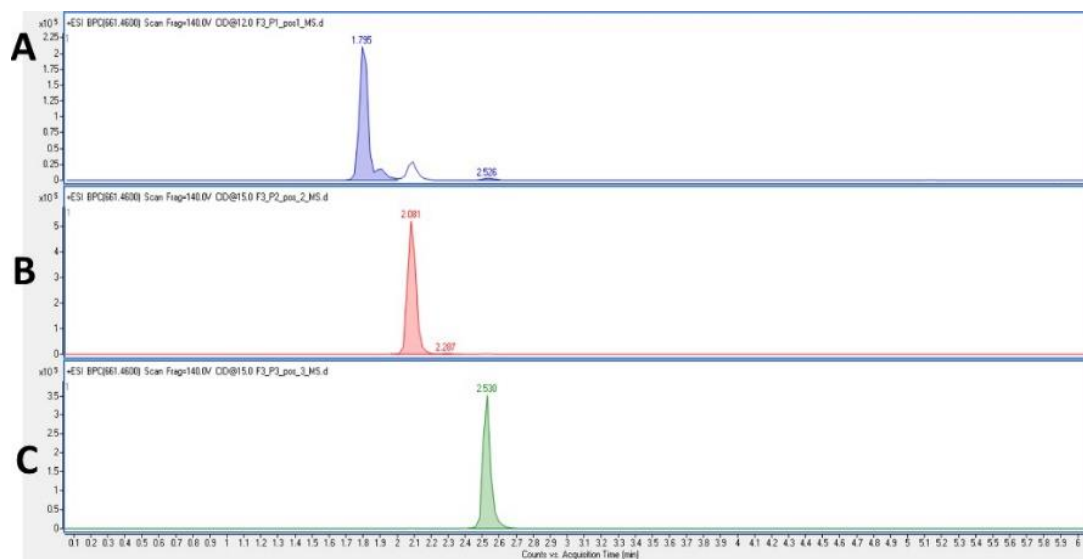


Figura 4.7: Cromatograma das Acetogenina 1 (A), Acetogenina 2 (B) e Acetogenina 3 (C) em UPLC-QTOF-MS/MS.

## 4.2 Análises por RMN $^1\text{H}$ e HPLC-PDA do EAE das Sementes.

O EAE das sementes (1,0 g) foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica (30,0 cm de comprimento e 5,0 cm de diâmetro), e eluída em um gradiente de diferentes proporções de hexano-acetato de etila -metanol (item 3.8). O fraccionamento formeneceu 6 frações oriunda da coluna de sílica e analisadas posteriormente por RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  1D e 2. As respectivas estruturas químicas dos sompostos isolados foram confirmadas por UPLC-QTOF- MS/MS e pela comparação com os dados disponíveis na literatura .

## 4. 3 Análises Estrutural das Acetogeninas.

### 4.3.1. Elucidação estrutural da Acetogenina 1

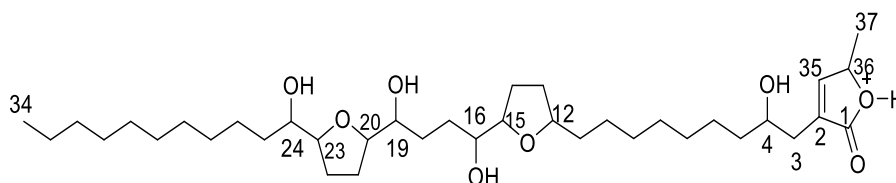


Figura 4.8: Ilustração da Acetogenina 1

A substância 1 (Figura 4.10) apresentou tempo de retenção de (TR) 25.5 min representada pela banda 1 no cromatograma de HPLC-UV-DAD (Figura 4.11). A determinação estrutural foi realizada comparando-se os dados obtidos por experimentos de RMN e espectrometria de massas com a literatura (Cafêu *et al.*, 2005; WUBSHET, et al., 2013).

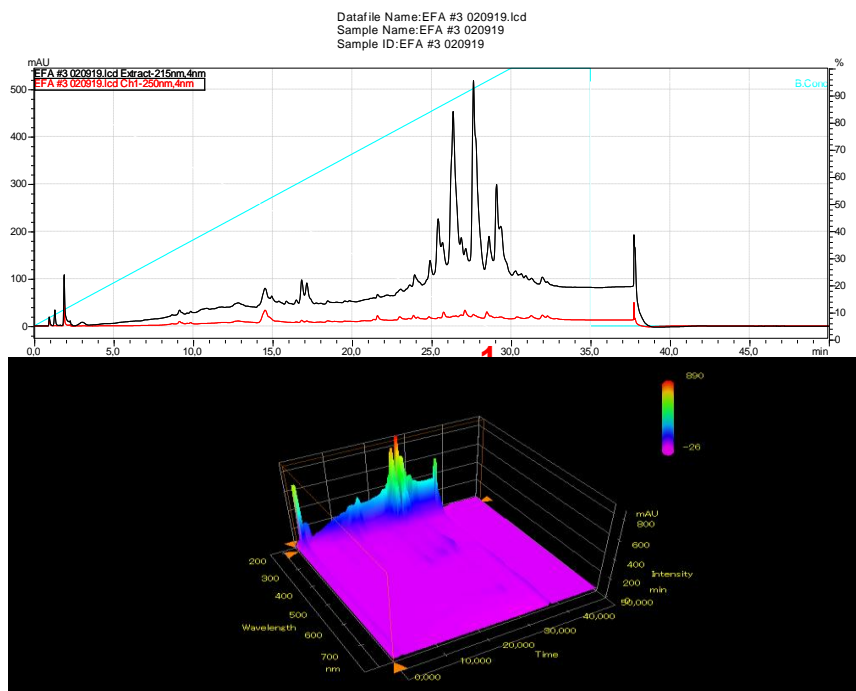


Figura 4.9: Cromatograma da fração F3 (obtida por SPE) do EAE (215 nm)

A amostra contendo a acetogenina **1** foi analisada por “Ultra Performance Liquid Chromatography on a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS)” no modo positivo de ionização, fornecendo  $[M+H]^+ = 639,4818$ , correspondendo a  $C_{37}H_{66}O_8 + H^+$ . As análises dessa amostra por vários experimentos de espectrometria de ressonância magnética nuclear, RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY (homonuclear correlation spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum coherence), HMBC (heteronuclear multiplebond coherence), HSQC-TOCSY (total correlation spectroscopy), e JRES (two-dimensional  $^1H$   $J$ -resolved) permitiu definir a presença de uma acetogenina contendo uma  $\gamma$ -metil-lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, dois anéis tetraidrofurano, e quatro hidroxilas secundárias.

Considerando que a numeração no esqueleto da acetogenina inicia no carbono da lactona, enumeramos a cadeia lateral até o C-6. O restante da cadeia iria até o C-34, os três últimos carbonos (35-37) correspondem ao anel lactônico, como mostrado na Figura 4.12.

As análises de RMN citadas acima permitiram identificar três estruturas precursoras da molécula (**A-C**), as quais também são mostradas na Figura 4.12. Foram definidos 30 carbonos, e a fórmula molecular contém 37, faltando 7 carbonos que se encontram no espectro de RMN  $^{13}C$  entre os deslocamentos químicos  $\delta$  30.1 - 30.8.

Analisando os íons obtidos no espectro de massas verificamos que a maioria se forma por perda de água.

A molécula protonada  $[M+H]^+ = 639,4818$ , correspondendo a  $C_{37}H_{66}O_8 + H^+$ , no espectro de massas (Figura 4.13) mostra íons fragmentos correspondentes à perda de cada hidroxila secundária,  $m/z = 621, 603, 585, e 567$ ; posteriormente a abertura dos anéis tetraidrofurano e perda de água formam os fragmentos  $m/z = 549, e 531$ , confirmando a estrutura precursora **B** (Figura 4.14). O fragmento em  $m/z = 531$  possui uma estrutura 3,12,14,16,18,20,22,24-octaen- $\alpha,\beta$ -insaturada- $\gamma$ -metil-lactona ( $C_{37}H_{55}O_2^+$ ), o qual perde o final da cadeia saturada C-28 a C-34, via a saída do hidrogênio alílico em C-26 levando à ligação dupla C-26=C-27, e transferência do H<sup>+</sup> ao C-28, eliminando o alcano  $C_7H_{16}$  (C-28 a C-34), e confirmando a estrutura precursora **C** com mais 3  $CH_2$ .

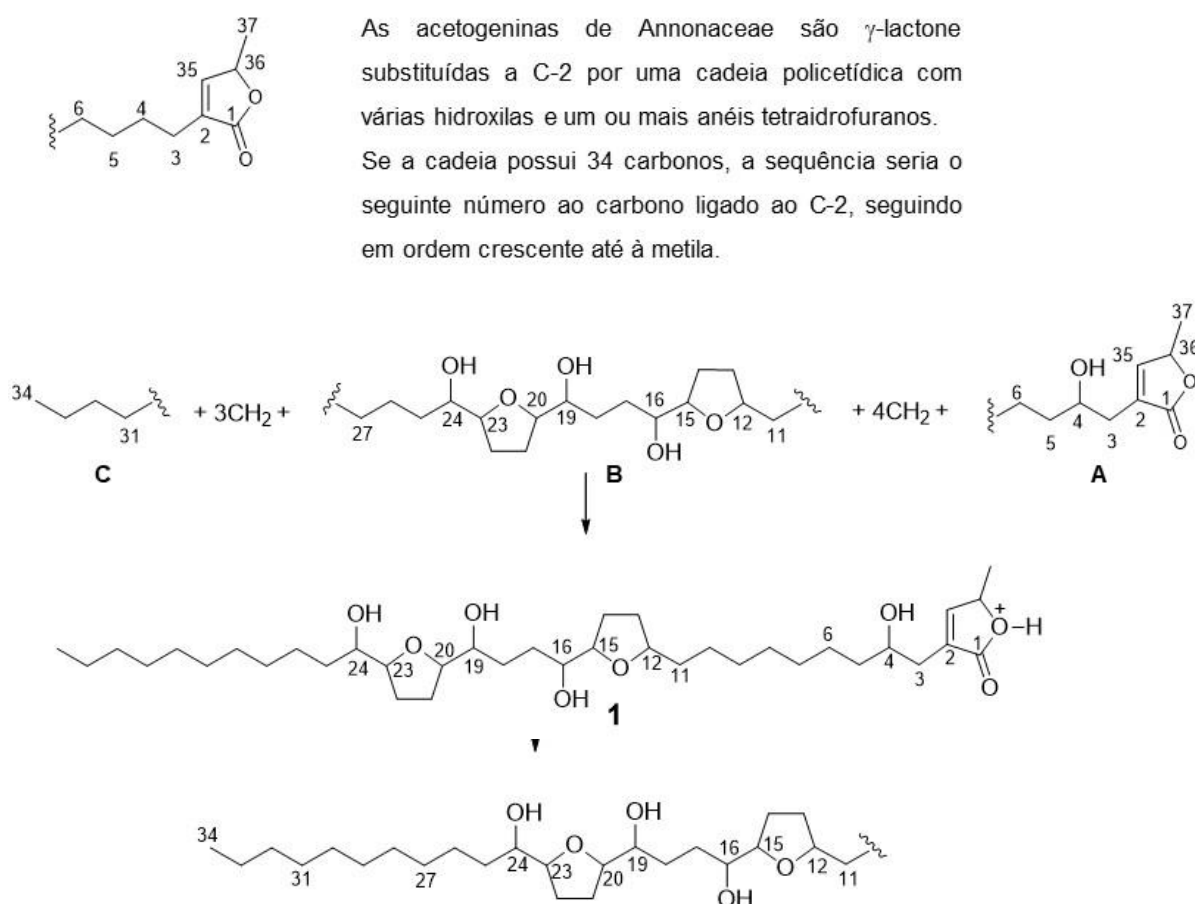


Figura 4.10. Unidades constituintes da estrutura da acetogenina **1**.

Considerando a estrutura precursora **C** com 04 carbonos, referente ao final da cadeia, e definida por RMN como C-31 a C-34, a perda de  $C_7H_{16}$  indica mais três  $CH_2$  a ser acrescentado nesta unidade **C**. A estrutura precursora **B** identificada por RMN possui três grupos  $CH_2$  após a hidroxila em C-24 (Figura 4.12), o fragmento em  $m/z = 431$  possui três carbonos após C-24,  $C-24=C-25$  e  $C-26=C-27$ , indicando que unir a estrutura precursora **C** e mais 3  $CH_2$  ao C-27, leva ao sistema **C**-( $CH_2$ )<sub>3</sub>-**B**, e concluindo a estrutura de C-11 a C-34 (Figura 4.12).

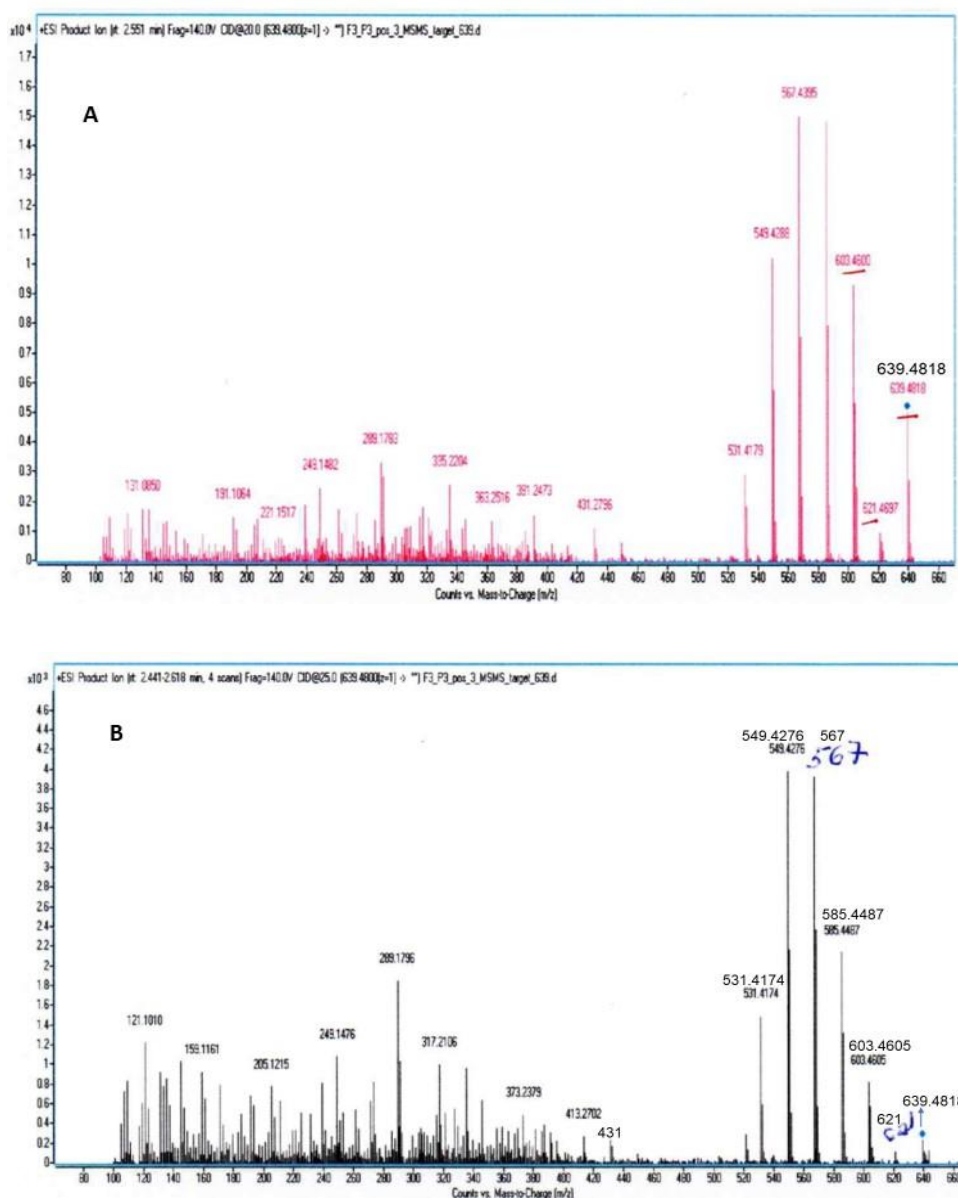


Figura 4.11. A: Espectro de massas “fullscan” da acetogenina 1. B: Espectro de massas  $MS^2$  da acetogenina 1. Ambos no modo positivo de ionização.

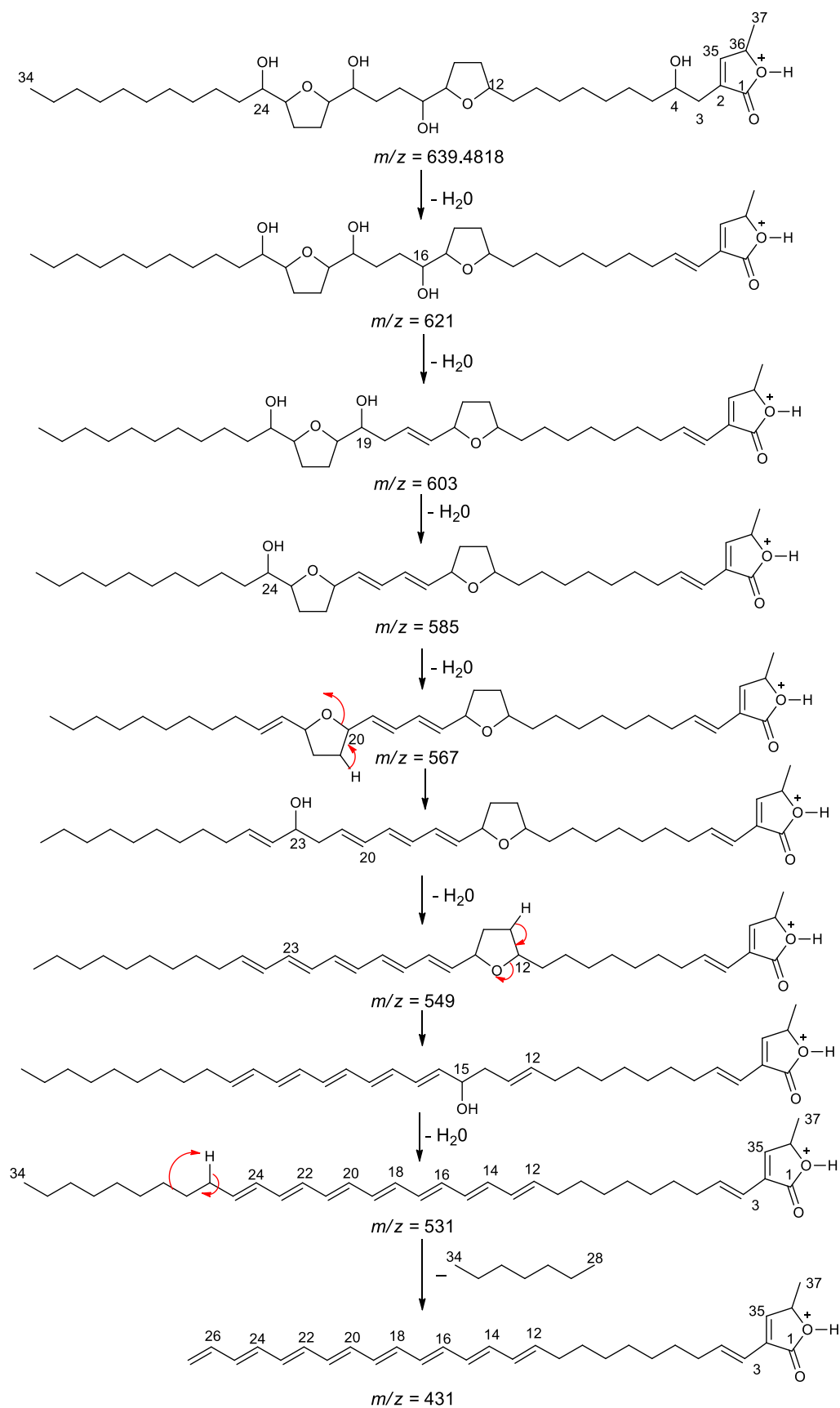


Figura 4.12. Padrão de fragmentação “EI-MS” proposto para a acetogenina 1.

O fragmento em  $m/z = 549$  ( $C_{37}H_{57}O_3^+$ ), mostrado na Figura 4.14, apresenta também outra sequência de fragmentações no espectro “EI-MS”, as quais confirmam o restante da molécula (Figura 4.15). A abertura do anel tetraidrofurano no fragmento em  $m/z = 549$  leva a uma hidroxila em C-15 e uma ligação dupla entre C-12 e C-13. Em seguida a formação de um aldeído em C-15 e a perda da cadeia de C-16 a C-34, leva ao íon fragmento em  $m/z = 291$  ( $C_{18}H_{27}O_3^+$ ). Em seguida perda de  $H^+$  em C-11 com o rearranjo alílico da ligação dupla e saída de  $H^+$  ( $-H_2$ ) leva ao dieno conjugado com o aldeído, 3,11,13-trien-15-al-3- $\alpha,\beta$ -insaturada- $\gamma$ -metil-lactona,  $m/z = 289$  ( $C_{18}H_{25}O_3^+$ ).

A estrutura precursora **A** identificada por RMN possui dois grupos  $CH_2$  após a hidroxila em C-4, e a estrutura precursora **B** mostra a identificação de C-11 a C-27. Comparando estas unidades com o fragmento em  $m/z = 289$ , verifica-se que entre o C-6 correspondente à estrutura precursora **A** e o C-11 existem 4 grupos  $CH_2$ . Portanto, estes dados sugerem que a estrutura precursora **C** + 03  $CH_2$  + **B** + 04  $CH_2$  + **A** forma a acetogenina **1** (Figura 4.12).

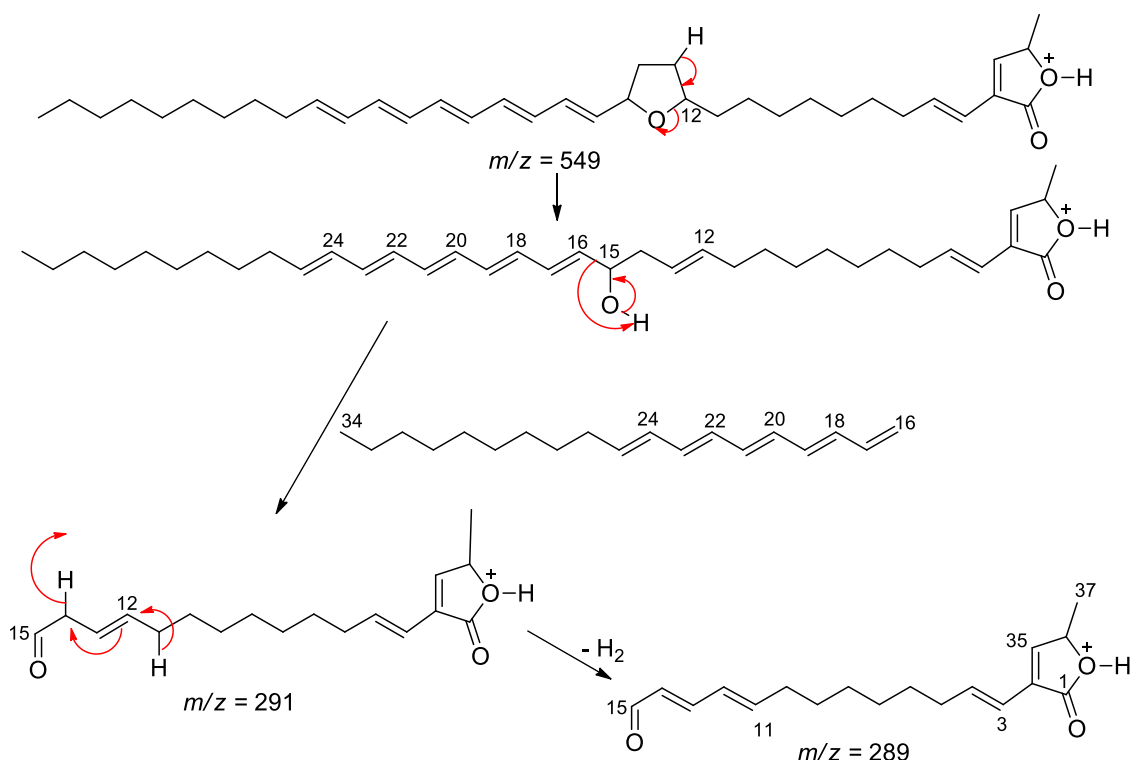


Figura 4.13 Padrão de fragmentação “EI-MS” proposto para a acetogenina **1**.

Definida a estrutura da acetogenina **1** e cada carbono com seu respectivo número, a seguir discutiremos os resultados obtidos com os experimentos de espectrometria de ressonância magnética nuclear, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY (homonuclear correlation spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum coherence), HMBC (heteronuclear multiplebond coherence), HSQC-TOCSY (total correlation spectroscopy), e JRES (two-dimensional  $^1\text{H}$   $J$ -resolved), os quais definiram cada unidade precursora mostrada acima. A enumeração de cada carbono na estrutura **1** facilitou as interpretações e discussões dos espectros de RMN.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  (Figura 4.16 e 4.17) mostra um duplo dubleto em  $\delta$  6.31 (dd,  $J = 2.5, 1.4$  Hz), o qual no experimento HSQC (Figura 4.18) se correlaciona com o carbono em  $\delta$  151.7, permitindo atribuí-lo ao H-35 e C-35, respectivamente (Tabela 4.5). O sinal de H-35 em  $\delta$  6.31 no experimento COSY (Figura 4.19) mostra três correlações, uma com o sinal em  $\delta$  4.28 (qdd,  $J = 6.3, 2.5$  e  $1.5$  Hz) e outras duas em  $\delta$  2.33 [ddt,  $J = 14.5$  ( $J$  geminal),  $3.4$  ( $J$  vicinal com H-4),  $1.5$  ( $J =$  homoalílico H-3 e H-36) Hz] e  $\delta$  2.25 [(ddt,  $J = 14.5$  ( $J$  geminal),  $8.1$  ( $J$  vicinal com H-4), e  $1.4$  ( $J =$  alílico) Hz] (Figura 4.20), permitindo atribuir o sinal em  $\delta$  4.28 ao H-36, o qual no espectro HSQC (Figura 4.21) correlaciona-se com o sinal de carbono em  $\delta$  77.8, confirmando C-36 ser um carbono oxigenado. As outras duas correlações em  $\delta$  2.33 e 2.25, sugerem acoplamentos alílico, H-3 e H-35, e homoalílico H-3 e H-36, e permitindo atribuí-los aos hidrogênios H-3a e H-3b, os quais no espectro HSQC (Figura 4.22) se correlacionam com o sinal em  $\delta$  34.1 ou 34.2, confirmando os dois como diastereotópicos e exigindo um substituinte em C-4, tornando-o quiral.

O sinal em  $\delta$  4.28 (H-36) no espectro COSY (Figura 4.19) mostra acoplamento com um sinal dubleto à  $\delta$  0.84 ( $J = 6.3$  Hz) correspondendo a uma metila, a qual pode ser atribuída à Me-37. O sinal desta metila em  $\delta$  0.84 no espectro de HSQC (Figura 4.22) se correlaciona com o sinal em  $\delta$  19.3. O sinal de H-35 em  $\delta$  6.31 no experimento HMBC (Figura 4.23, Tabela 4.5) mostrou as seguintes correlações:  $\delta$  19.3, 34.1 ou 34.2, 70.1 (fraca), 77.8, 131.7, 174.6, confirmando as atribuições acima, e permitindo atribuir os deslocamentos 131.7, 174.6 a C-2 e C-1, respectivamente, e indica a presença de uma hidroxila na cadeia lateral ( $\delta$  70.1). O sinal de H-36 ( $\delta$  4.28) no HMBC (Figura 4.24) mostrou as correlações a seguir, as quais também confirmam as atribuições acima:  $\delta$  19.3 (C-37), 70.1 (fraca, hidroxila



na cadeia lateral), 131.7 (C-2), 151.7 (C-35) e 174.6 (C-1). O mesmo ocorreu como o sinal da Me-37 em  $\delta$  0.84, a qual se correlacionou com os deslocamentos 77.8 (C-36) e 151.7 (C-35) (Figuras 4.25).

Os dois sinais de H-3a e H-3b ( $\delta$  2.33 e 2.25) no experimento HMBQ mostram as seguintes correlações:  $\delta$  38.1, 70.1 (forte, C-4), 131.7 (C-2), 151.7 (C-35) e 174.6 (C-1) (Figura 4.25), estas últimas correlações confirmam hidrogênios diastereotópicos vizinhos de uma  $-\alpha,\beta$ -insaturada- $\gamma$ -metil-lactona, como mostra na unidade **A** na Figura 1.

Os sinais dos hidrogênios H-3a e H-3b em  $\delta$  2.33 e 2.25 no COSY também mostra acoplamento com um sinal no multiplete de  $\delta$  3.70 a 3.85 (Figura 4.26). O espectro HSQC (Figura 4.21) mostra sinais para quatro carbonos nesta região, um deles sendo  $\delta$  70.1, permitindo colocar uma hidroxila no carbono vizinho ao C-3, como mostram as discussões acima. No espectro de HSQC considerando o centro do sinal em  $\delta$  70.1 e correlacionando com um deslocamento para hidrogênio pode-se atribuir ao H-4 o deslocamento  $\delta$  3.76 m ( $\delta$  70.1). Este sinal em  $\delta$  3.76 m ( $\delta$  70.1) mostra correlação no HMBC (Figura 4.24) com o sinal em  $\delta$  131.7 (C-2), também confirmando suas atribuições H-4 e C-4. Acima comentamos que os dois sinais de H-3a e H-3b ( $\delta$  2.33 e 2.25) no experimento HMBC mostram correlações com o sinal em  $\delta$  38.1 (Figura 4.25), permitindo atribuir este sinal ao C-5. Analisando o deslocamento  $\delta$  38.1 no espectro HSQC (Figura 4.22) verifica-se corresponder a um CH<sub>2</sub> diastereotópico, um sinal em  $\delta$  1.43 m (H-5a) e 1.38 m (H-5b) (vizinho do carbono quiral C-4).

Os experimentos HSQC-TOCSY (Tabela 4.5) mostrou as mesmas correlações discutidas acima, uma delas observada melhor aqui; a correlação dos sinais de H-3a e H-3b ( $\delta$  2.33 e 2.25) com o sinal de carbono em  $\delta$  26.3 (Figura 4.27). Este sinal no HSQC se correlaciona a uma área congestionada ( $\sim \delta$  1.3 – 1.5) (Figura 4.22), mas não sugere hidrogênios diastereotópicos, e sugerindo atribuí-los ao C-6 ( $\delta$  26.3) e  $\sim \delta$  1.3 – 1.5 aos H-6a e H-6b.

O espectro de <sup>1</sup>H RMN usado para as discussões acima foi o mesmo obtido no experimento “J-resolved”, o qual encontra-se em ótima resolução. Contudo nos experimentos bidimensionais de “J-resolved”, devido a aglomeração de sinais, nem todas as multiplicidades e correspondentes constantes de acoplamentos foram

observadas (Figura 4.28). No entanto, o sinal de H-3b em  $\delta$  2.25 [(ddt,  $J_R = 14.5$  ( $J$  geminal), 8.1 ( $J$  vicinal com H-4), 1.4 ( $J$  = alílico) Hz] mostrou a mesma multiplicidade e as correspondentes constantes de acoplamento (Figura 4.28).

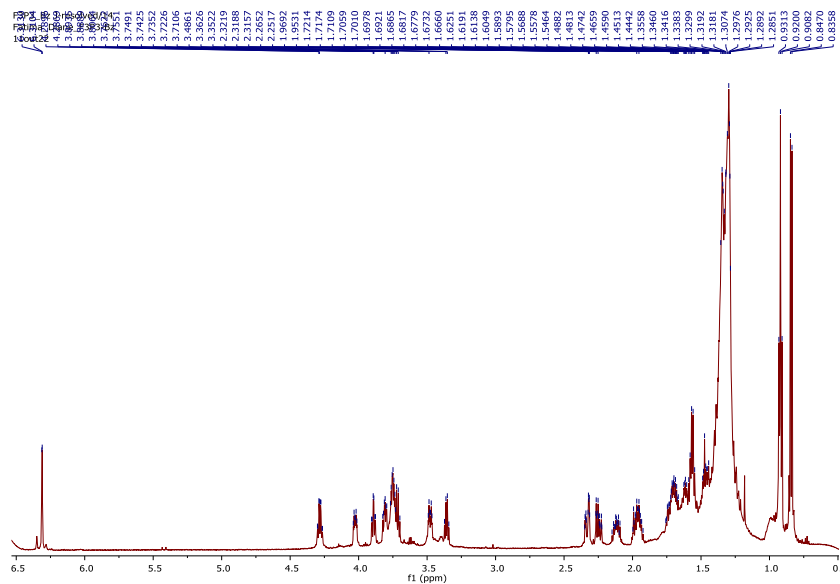


Figura 4.14. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acetogenina 1 (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

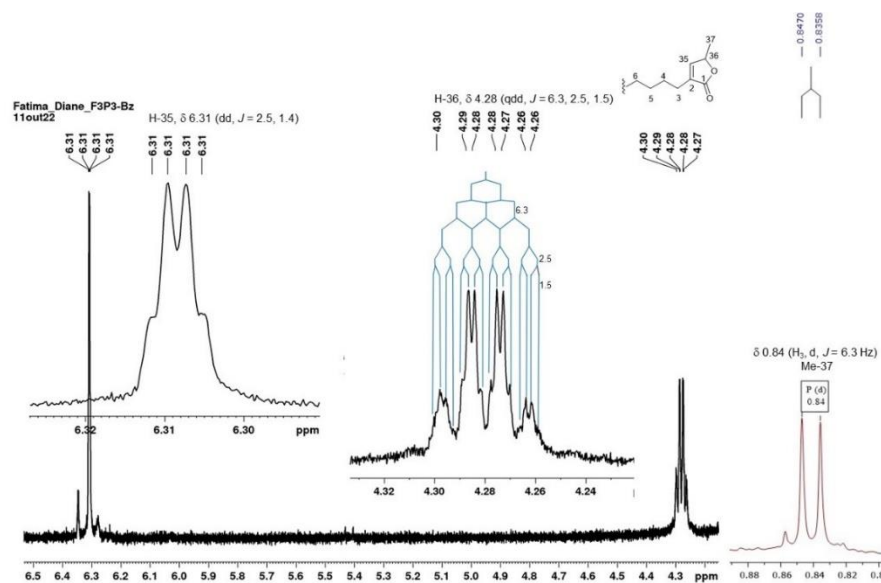


Figura 4.15. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acetogenina 1 mostrando os sinais de H-35, H-36 e da Me-37 ampliados (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

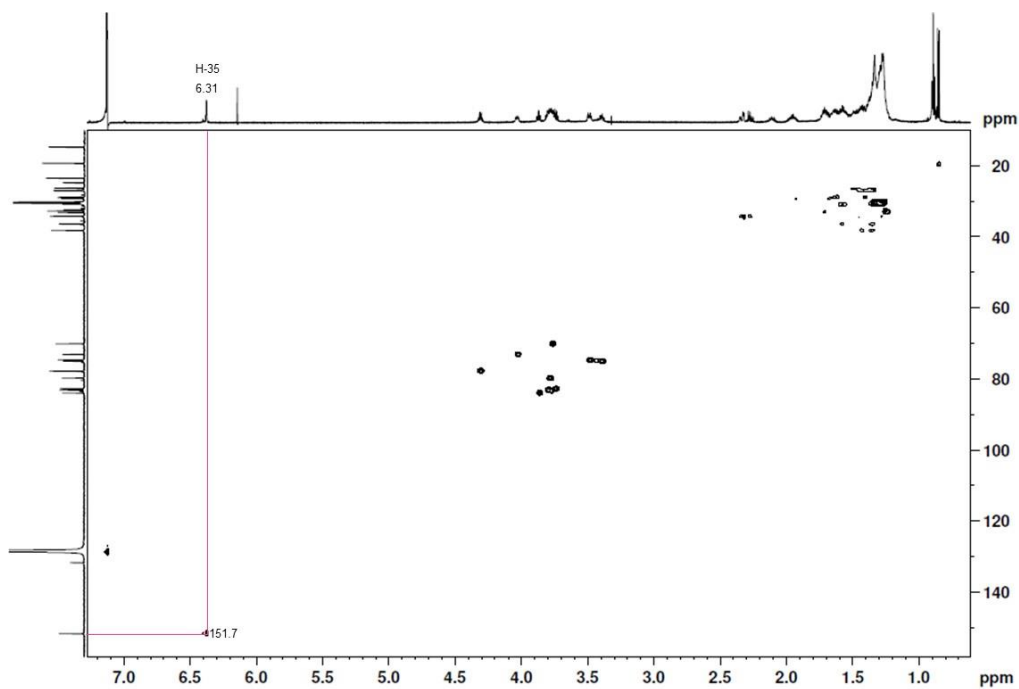


Figura 4.16. Experimentos de HSQC da acetogenina 1 (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

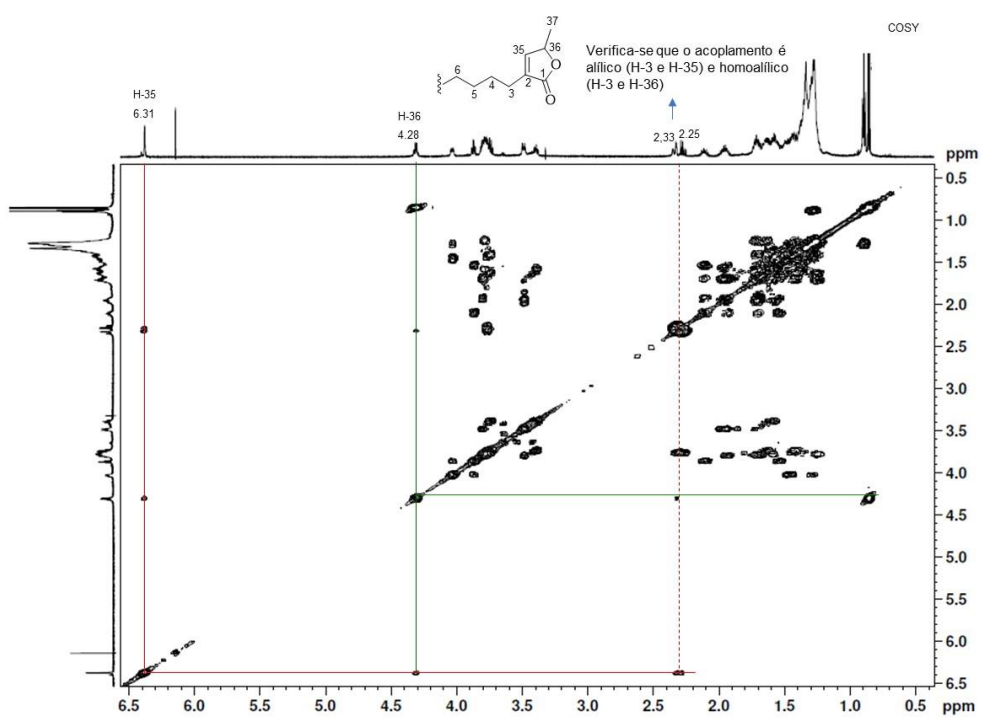
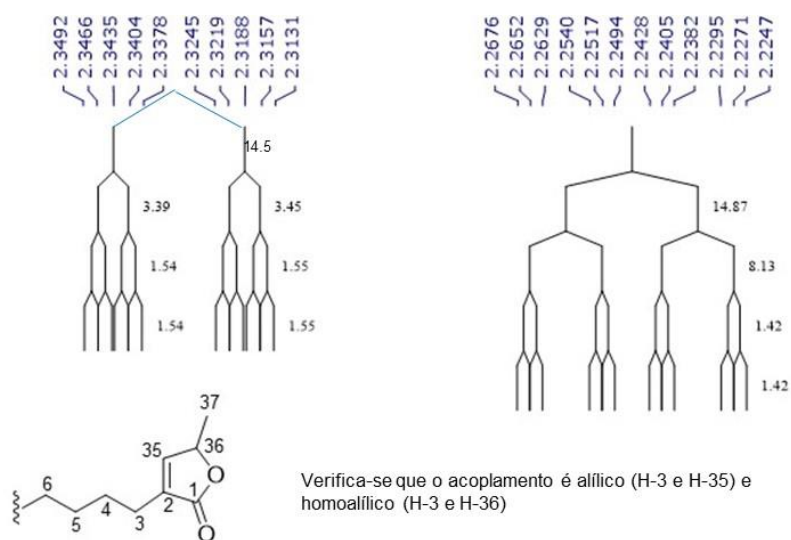


Figura 4.17. Experimentos de COSY da acetogenina 1 (500 MHz,  $C_6D_6$ ).



$\delta$  2.33 (ddt,  $J_R = 14.5$  ( $J$  geminal), 3.4 ( $J$  vicinal com H-4), 1.5 ( $J$  = homoalílico) Hz  
H-3a

$\delta$  2.25 (ddt,  $J_R = 14.5$  ( $J$  geminal), 8.1 ( $J$  vicinal com H-4), 1.4 ( $J$  = alílico Hz)  
H-3b

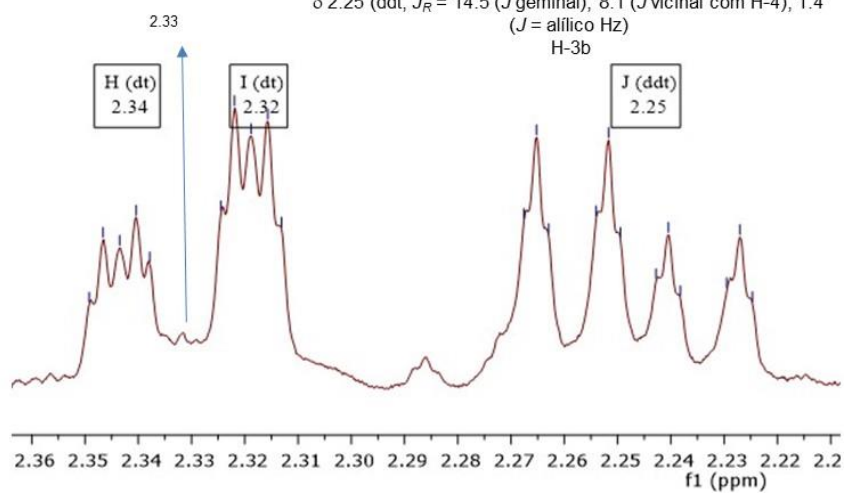


Figura 4.18. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acetogenina **1**, mostrando os sinais de H-3a e H-3b ampliados (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

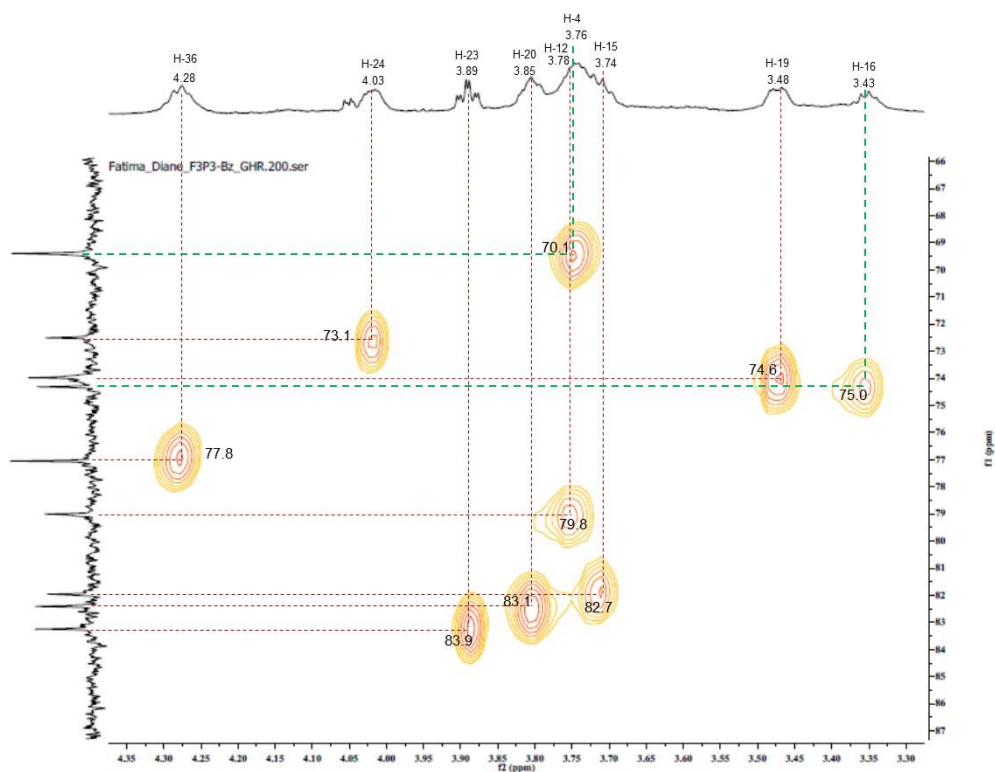


Figura 4.19 Experimentos de HSQC da acetogenina 1, mostrando os sinais de C-36, C-24, C-23, C-20, C-12, C-4, C-15, C-19 e C-16 ampliados (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

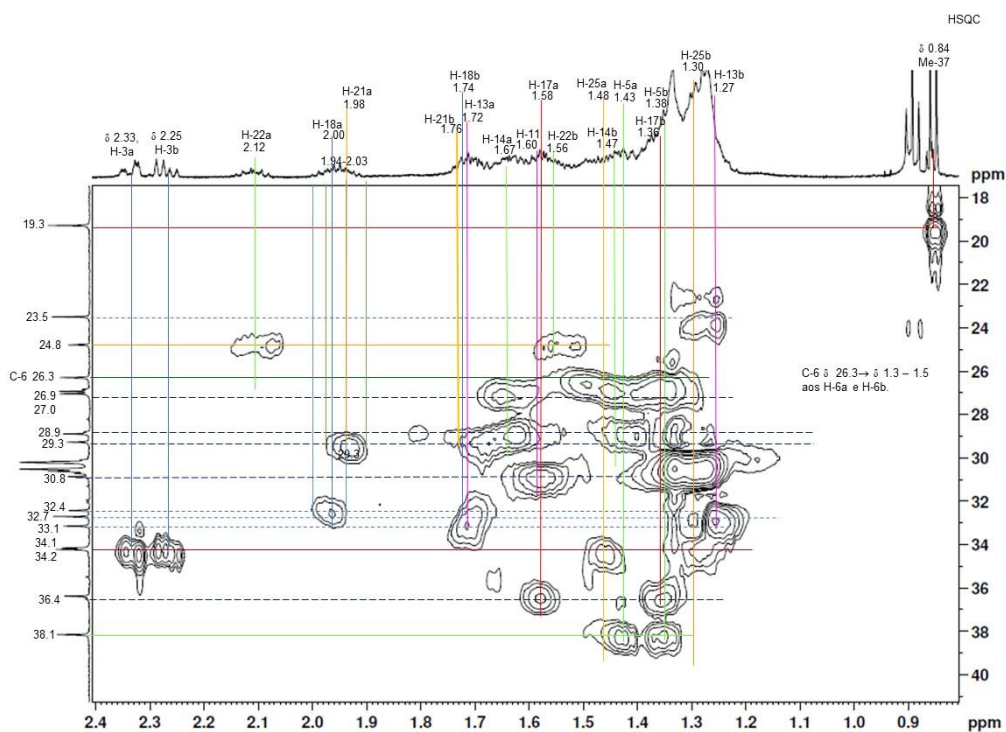


Figura 4.20. Experimentos de HSQC da acetogenina 1 ampliado, mostrando os sinais de  $\delta$  2.33 a 0.84. (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

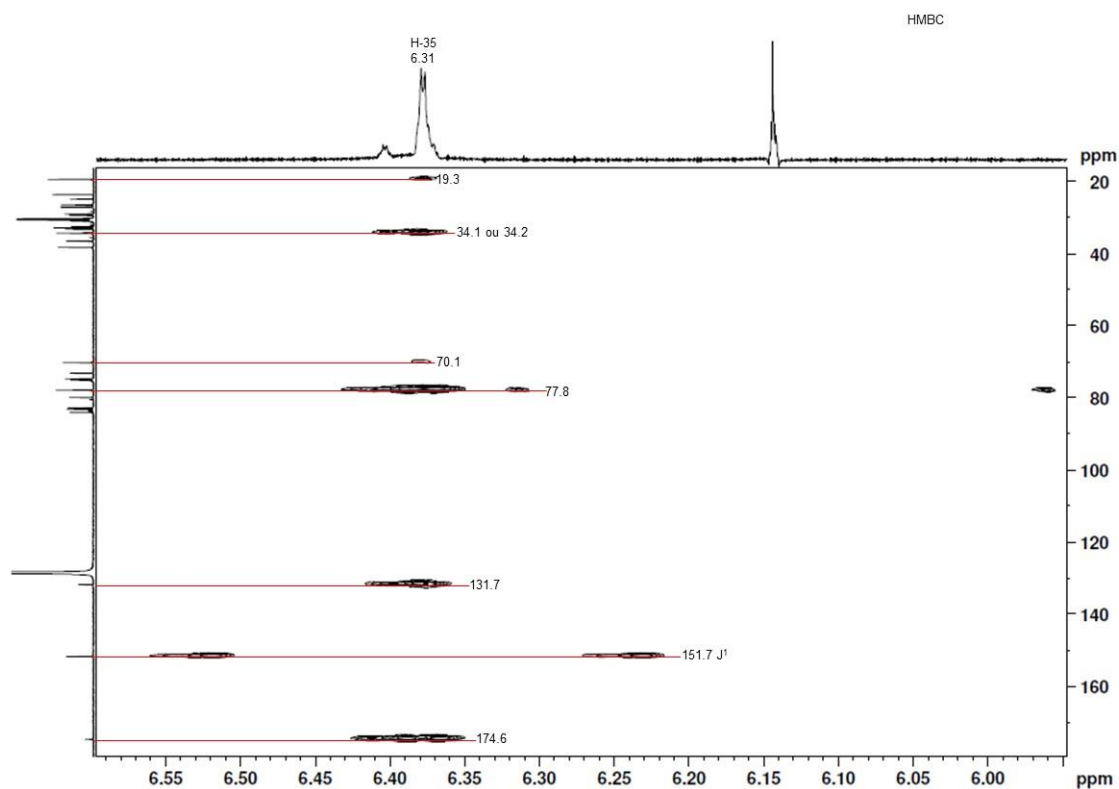


Figura 4.21. Experimentos de HMBC da acetogenina 1, mostrando o sinal de H-35 ampliado (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

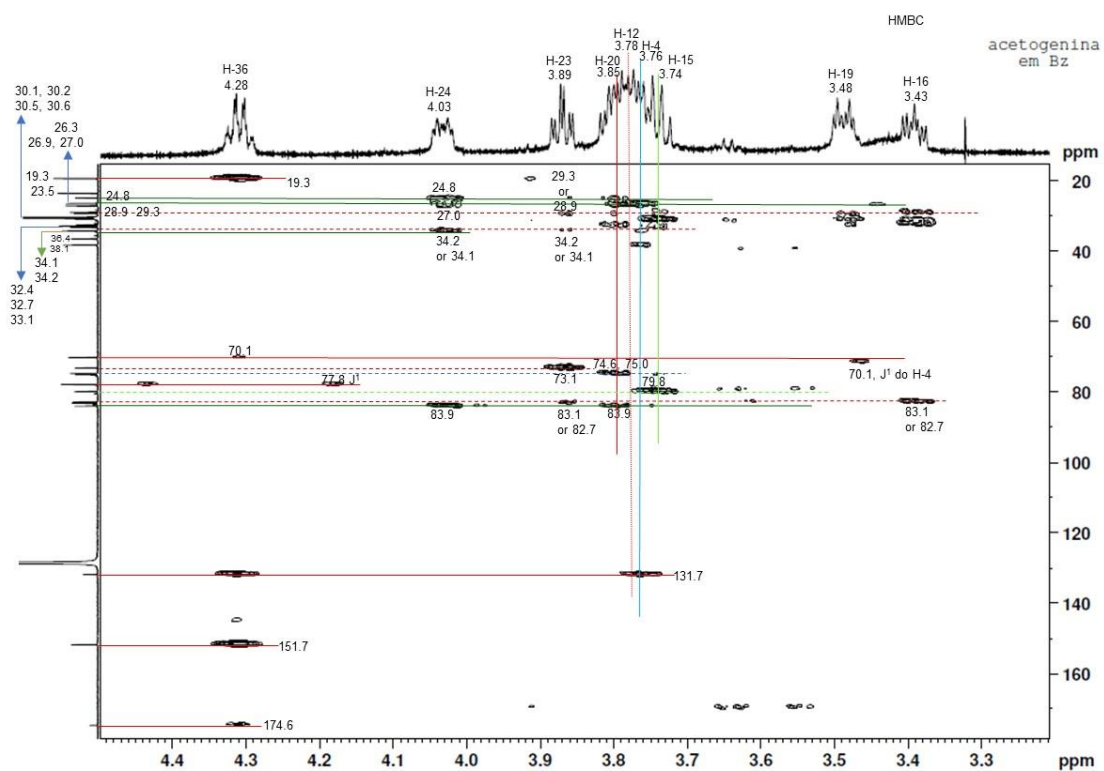


Figura 4.22. Experimentos de HMBC da acetogenina 1, mostrando o sinal de H-36, H-24, H-23, H-20, H-12, H-4, H-15, H-19, H-16 ampliados (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

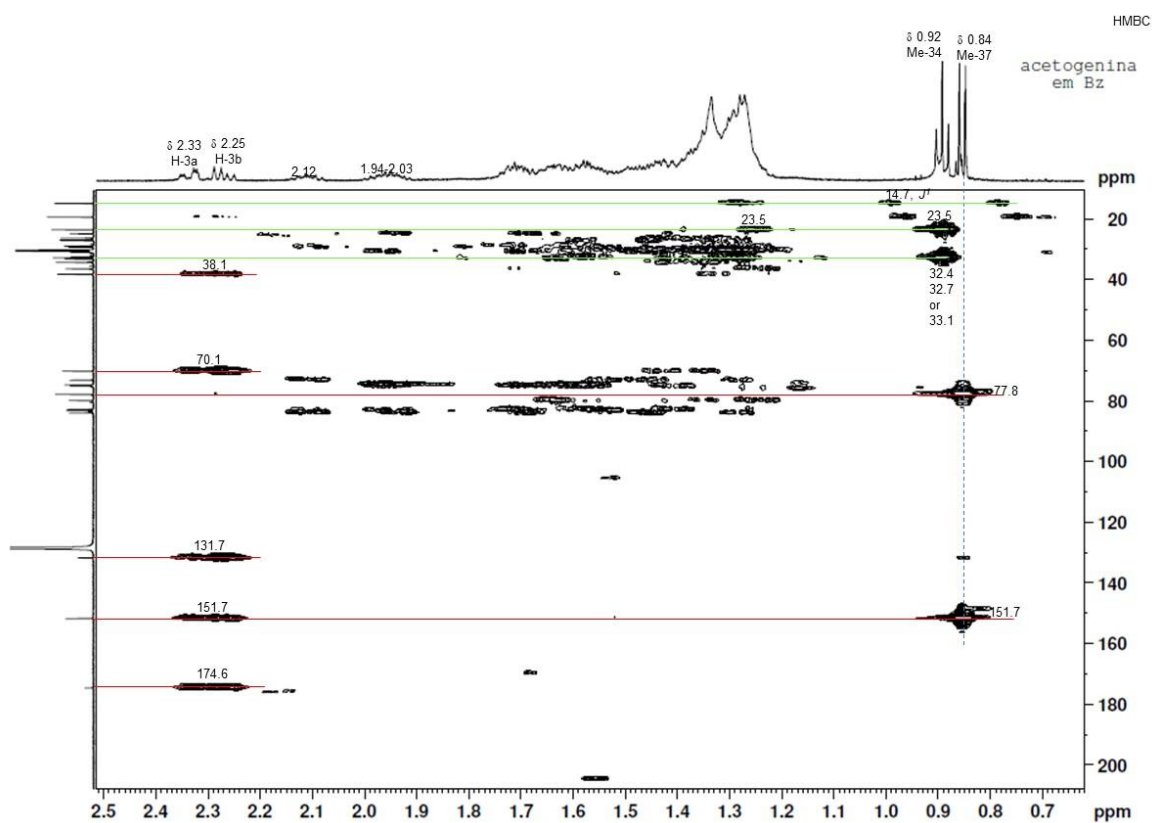


Figura 4.23. Experimentos de HMBC da acetogenina 1, mostrando o sinal de H-3a, H-3b, Me-34 e Me-37 ampliados (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

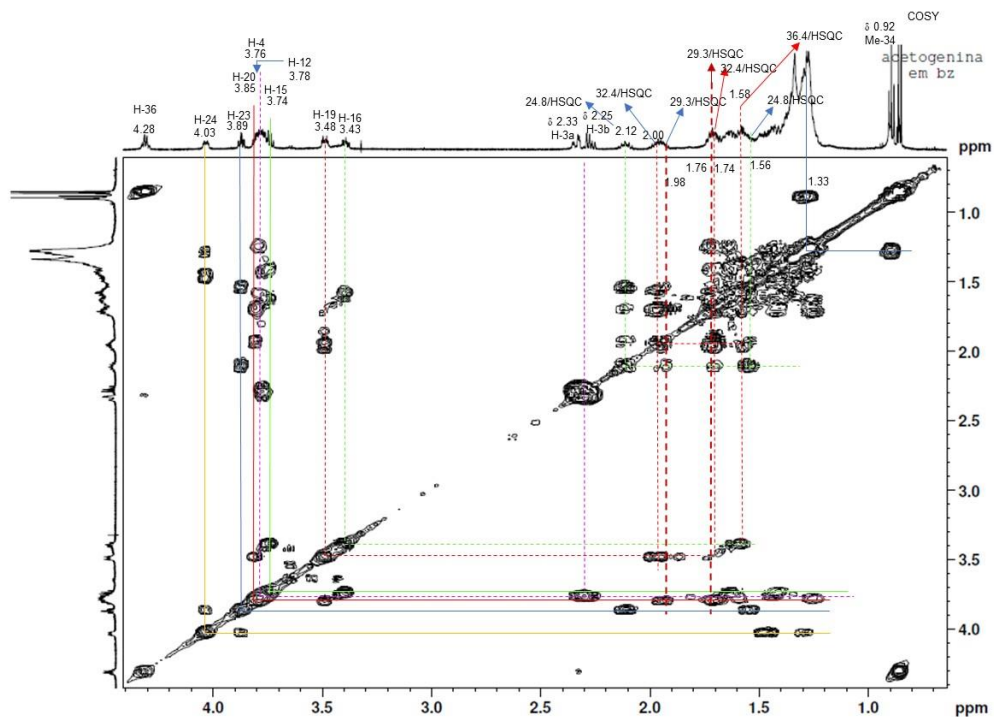


Figura 4.24. Experimentos de COSY da acetogenina 1 ampliado de  $\delta$  4.0-0.84 (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

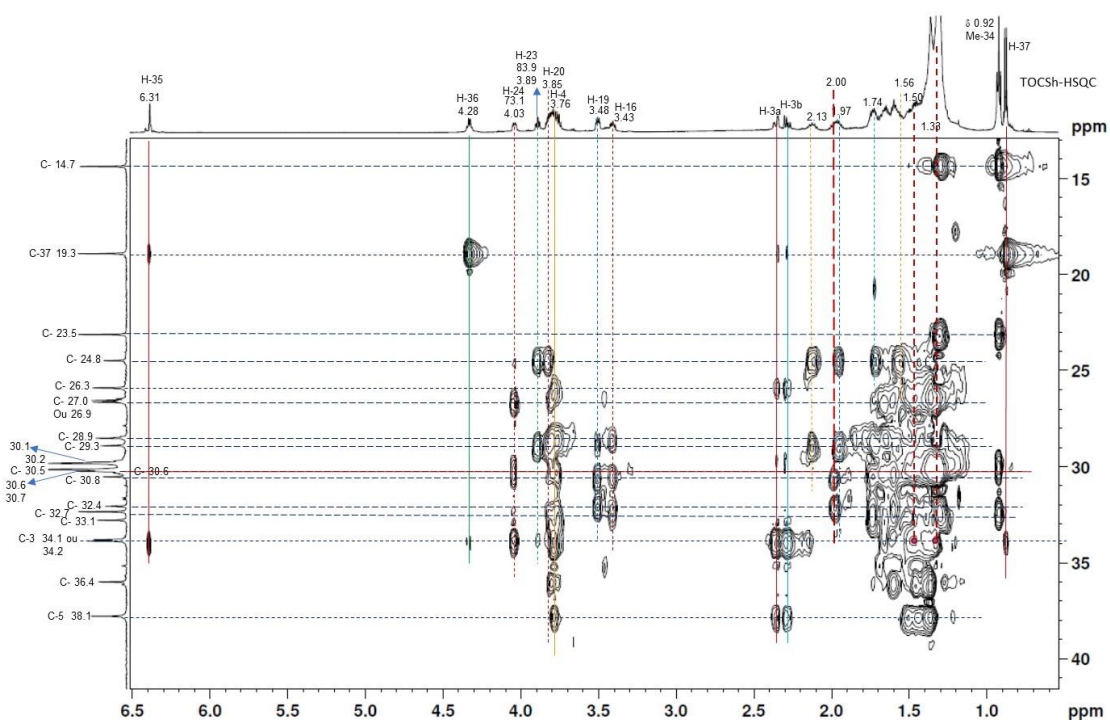


Figura 4.25. Experimentos de HSQC-TOCSY da acetogenina 1, ampliando os sinais de  $\delta$  15 a 40 (500 MHz, C6D6).

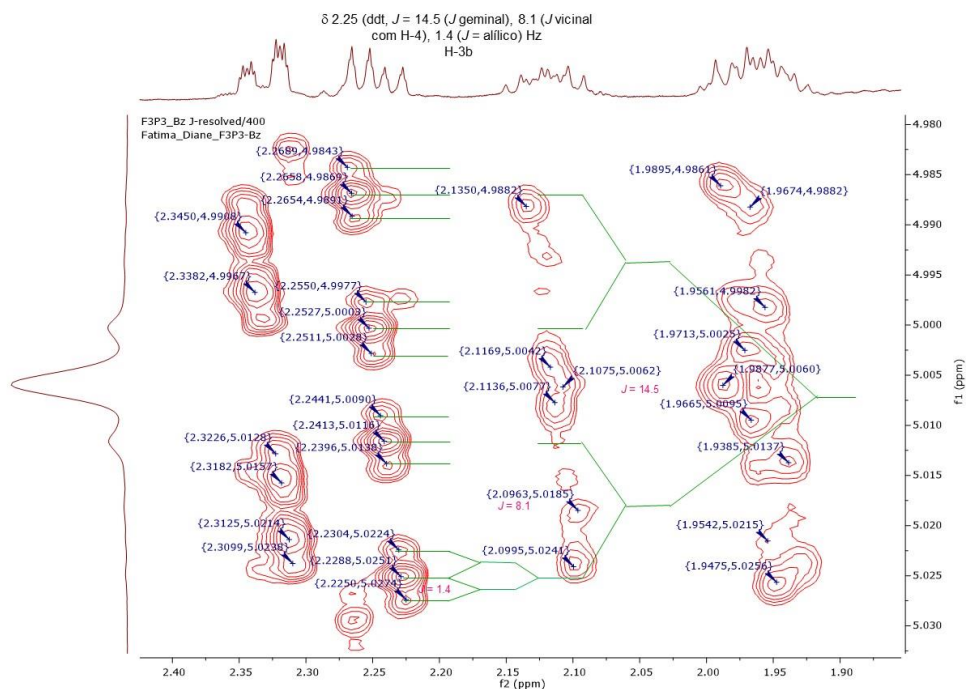


Figura 4.26. Experimentos de “J-Resolved” da acetogenina 1, mostrando o sinal de H-3b (500 MHz, C6D6).



Todos os dados anteriores permitem definir a lactona e parte da cadeia lateral até o carbono C-6, como mostra a estrutura lactônica de uma acetogenina na figura 4.29.

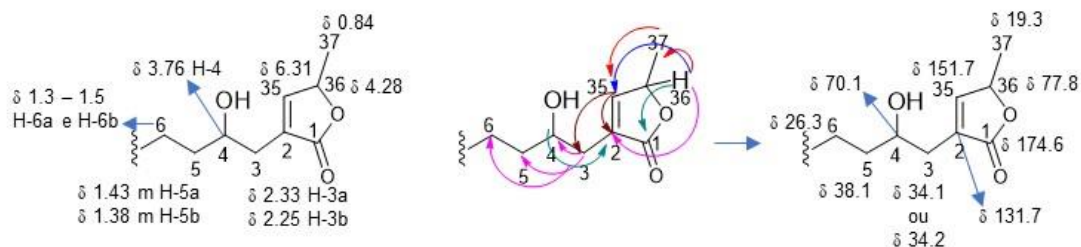


Figura 4.27. Atribuição dos dados de RMN  $^1\text{H}$ , correlações de HMBC ou HSQC-TOCSY, os quais levaram às atribuições dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  aos carbonos da lactona ao carbono C-6.

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostra um sinal desblindado em  $\delta$  4.03 (ddd,  $J_R = 8.9, 4.4$  e  $2.3$  Hz) (Figura 4.30), o qual no experimento HSQC se correlaciona com o deslocamento em  $\delta$  73.1 (Figura 4.21). O experimento “J-resolved” mostrou este sinal em  $\delta$  4.03 com boa resolução, e o indicando como um ddd e com as constantes de acoplamento mostradas na (Figura 4.31). No espectro COSY este sinal mostra acoplamento a um outro sinal também desblindado em  $\delta$  3.89 (td,  $J_R = 7.2,$  e  $2.3$  Hz) (Figura 4.25), cuja correlação no experimento HSQC refere-se ao deslocamento em  $\delta$  83.9 (Figura 4.21). O experimento “J-resolved” mostrou este sinal em  $\delta$  3.89 com boa resolução, e o indicando como um td e com as constantes de acoplamento mostradas acima (Figura 4.32). Os deslocamentos em  $\delta$  73.1 e 83.9 correlacionados com a proposta da unidade **B** sugerida por espectrometria de massas, nos leva a atribuir estes dados a uma hidroxila vizinha de um anel tetraidrofurano,  $\delta$  4.03 ( $\delta$  73.1) aos H-24 e C-24, e  $\delta$  3.89 ( $\delta$  83.9) aos H-23 e C-23.

O sinal em  $\delta$  4.03 ( $\delta$  73.1) também mostra correlação com outros dois sinais no espectro COSY (Figura 4.25), um em  $\delta$  1.48 m (H-25a) e 1.30 m (H-25b), e o HSQC (Figura 4.22) indica para estes hidrogênios diastereotópicos o deslocamento  $\delta$  34.1 ou 34.2 (C-25). O sinal em  $\delta$  4.03 ( $\delta$  73.1) no HMBC (Figura 4.24) mostrou as seguintes correlações:  $\delta$  24.8-27.0, 34.1 ou 34.2 e 83.9. Este mesmo sinal no experimento HSQC-TOCSY (Figuras 4.27 e 4.33) mostrou correlações mais claras:

27.0 ou 26.9, 30.6, 34.1 ou 34.2 e 83.9. Os sinais em  $\delta$  27.0 ou 26.9 e  $\delta$  30.6 no experimento HSQC-TOCSY possuem correlações somente com o sinal de hidrogênio em  $\delta$  4.03 ( $\delta$  73.1), sugerindo atribuí-los aos CH<sub>2</sub> a  $\beta$  e  $\gamma$  da hidroxila. Considerando que uma hidroxila ocasiona um efeito de desblindagem no carbono  $\beta$  e blindagem ao carbono  $\gamma$  (Silverstein et al., 2005), atribuímos o sinal em  $\delta$  34.1 ou 34.2 ao C- $\beta$  (C-25, confirmado pelo COSY e HSQC), e o sinal em  $\delta$  27.0 ou 26.9 ao C- $\gamma$  (C-26, HSQC 1.68-136 m), ou seja, respeitando o efeito de blindagem. Outros modelos mostram que o C- $\delta$  sofre o efeito de desblindagem (Alali et al., 1999), nos levando a atribuir o sinal em  $\delta$  30.6 ao carbono C- $\delta$  (C-27).

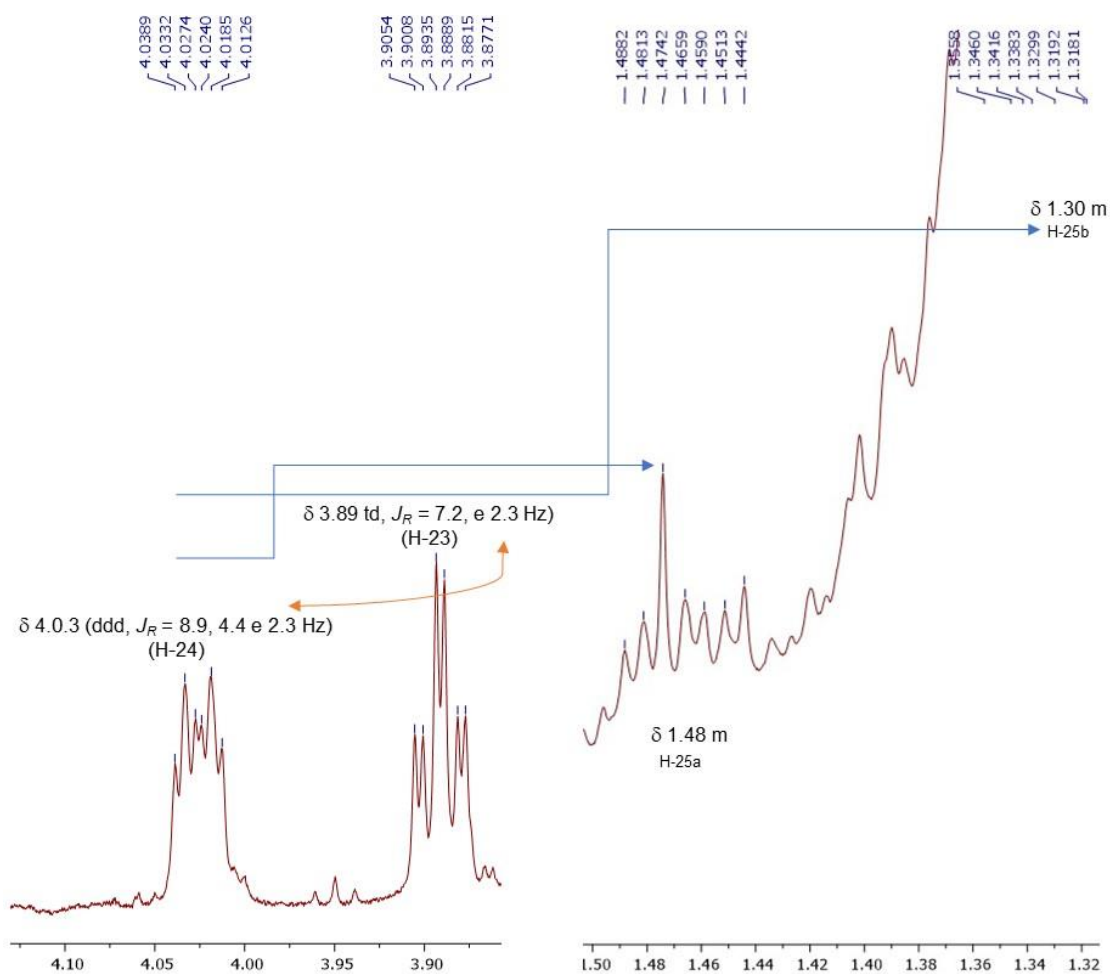


Figura 4.28. Espectro de RMN <sup>1</sup>H da acetogenina **1**, mostrando os sinais de H-24, H-23, H-25a e H-25b ampliados, espectro total na figura (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

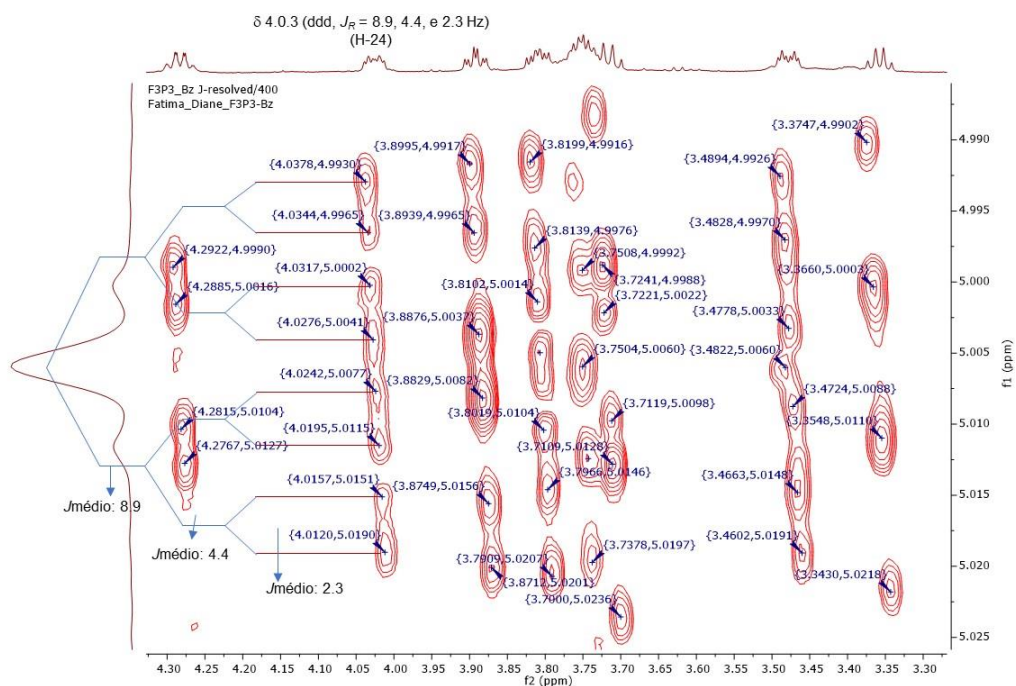


Figura 4.29. Experimentos de “J-resolved” da acetogenina **1**, destacando o sinal em  $\delta$  4.03 (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

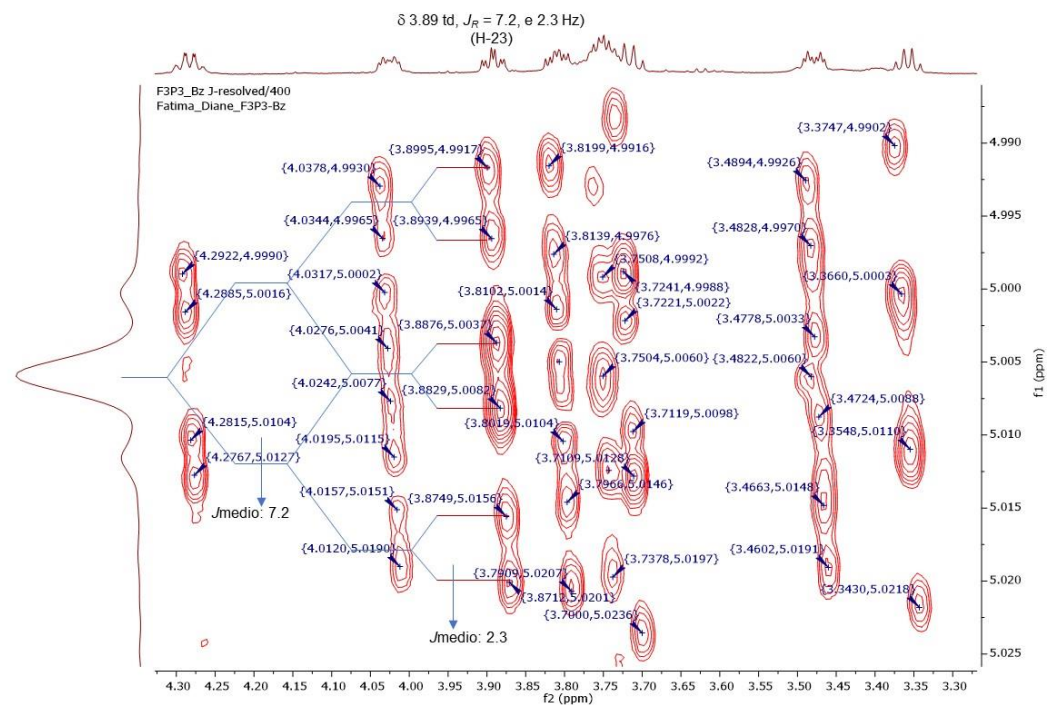


Figura 4.30. Experimentos de “J-resolved” da acetogenina **1**, destacando o sinal em  $\delta$  3.89 (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

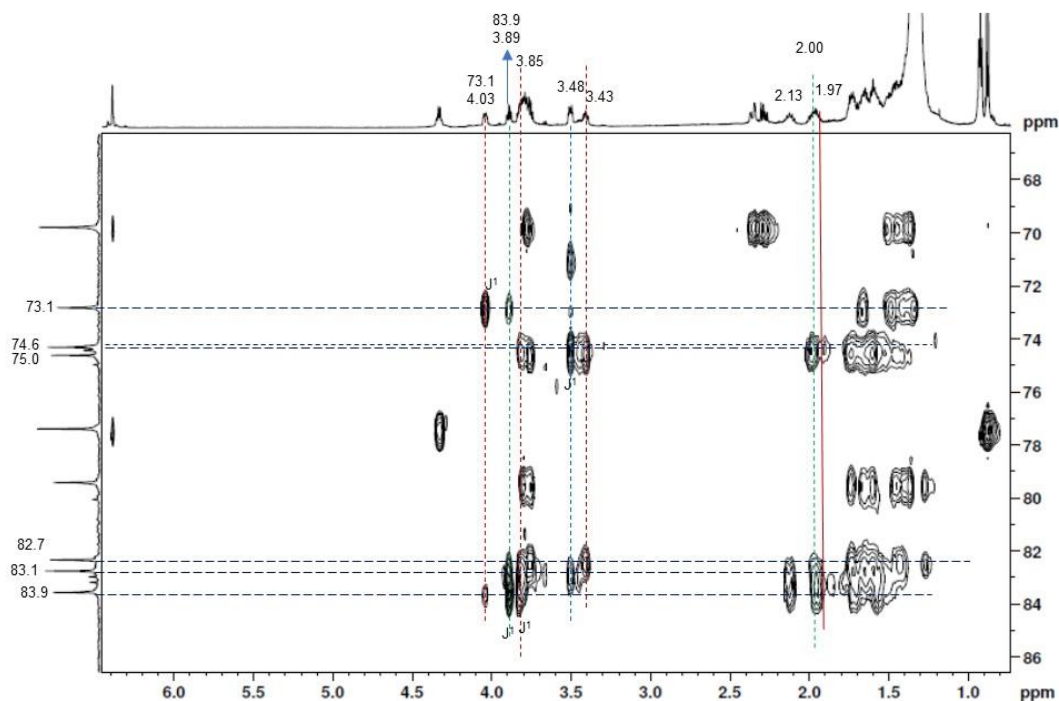


Figura 4.31. Experimentos de HSQC-TOCSY da acetogenina **1**, ampliando os sinais de  $\delta$  68 a 86 (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

O sinal em  $\delta$  3.89 ( $\delta$  83.9; H-23 e C-23) também acopla com outros dois em  $\delta$  2.12, 4.28 e 1.56 m (COSY, Figura 4.26; RMN Figura 4.34), e o experimento HSQC (Figura 4.22) indica para estes hidrogênios diastereotópicos o deslocamento  $\delta$  24.8. O sinal em  $\delta$  3.89 ( $\delta$  83.9) no espectro HMBC (Figura 4.24) mostra as seguintes correlações:  $\delta$  29.3 ou 28.9, 34.1 ou 34.2, 73.1, 83.1 ou 82.7. Este sinal no experimento HSQC-TOCSY (Figura 4.27 e 4.33) mostrou correlações mais claras: com  $\delta$  24.8, 29.3, 34.1 ou 34.2 (fraco), 73.1. Os sinais em  $\delta$  24.8 e 29.3 possuem correlações somente com o sinal de hidrogênio em  $\delta$  3.90 ( $\delta$  83.9) no experimento HSQC-TOCSY, sugerindo atribuí-los ao anel tetraidrofurano;  $\delta$  24.8 ao carbono  $\beta$  (C-22), confirmado pelo COSY (2.12 m H-22a, e 1.56 m H-22b) e HSQC. Faltando definir o deslocamento  $\delta$  29.3. Os sinais em  $\delta$  2.12 m e 1.56 m de hidrogênios diastereotópicos (HSQC  $\delta$  24.8, Figura 4.22), atribuídos acima aos hidrogênios H-22a, H-22b e C-22 do anel tetraidrofurano mostram acoplamento entre eles. O sinal em  $\delta$  2.12 m nos experimentos de COSY (Figura 4.26) além deste último acoplamento, mostra correlações com os sinais em  $\delta$  1.98 m e  $\delta$  1.76 m, os quais no HSQC (Figura 4.22) correlaciona-se com o sinal em  $\delta$  29.3, indicando hidrogênios

diastereotópicos, e permitindo atribuí-los aos hidrogênios H-21a e H-21b. Estes dois últimos sinais no espectro COSY (Figura 4.26) mostram acoplamentos com o sinal em  $\delta$  3.85 m, cujo deslocamento do carbono no HSQC (Figura 4.21) corresponde ao sinal em  $\delta$  83.1, permitindo atribuí-los ao H-20 e C-20 do anel tetraidrofurano.

O COSY (Figura 4.26) mostra este sinal em  $\delta$  3.85 m ( $\delta$  83.1) acoplando com um outro em  $\delta$  3.48 (ddd,  $J_R = 7.08, 6.30, \text{ e } 2.61$  Hz), cujo sinal de carbono no experimento HSQC (Figura 4.21) corresponde ao deslocamento em  $\delta$  74.6, indicando que na sequência da estrutura da acetogenina há um -CHOH. O experimento "J-resolved" (Figura 4.35) mostrou este sinal em  $\delta$  3.48 com boa resolução, e o indicando como um ddd e com as constantes de acoplamento mostradas acima. O sinal em  $\delta$  3.85 ( $\delta$  83.1) no HMBC (Figura 4.24) mostra as seguintes correlações:  $\delta$  74.6 ou 75.0, 83.9, 32.4 ou 32.7 ou 33.1, 26.3 ou 26.9 ou 27.0, 29.3 ou 28.9. As correlações com os sinais em  $\delta$  83.9 e 24.8 confirma o anel tetraidrofurano proposto anteriormente, e confirma a atribuição dos sinais em  $\delta$  3.85 m e  $\delta$  83.1 ao hidrogênio H-20 e ao C-20 do anel tetraidrofurano. Além disso, o sinal em  $\delta$  3.48 ( $\delta$  74.6) pode ser atribuído ao C-19.

O sinal em  $\delta$  3.48 ( $\delta$  74.6) no espectro COSY (Figura 4.26) mostra acoplamento com o sinal em  $\delta$  2.00 m, e este último acopla com outro em  $\delta$  1.74 m, estes dois sinais no experimento HSQC (Figura 4.22) se correlacionam com o deslocamento em  $\delta$  32.4, permitindo atribuir estes sinais aos H-18a e H-18b e ao C-18, respectivamente. O sinal em  $\delta$  2.00 m também mostra acoplamento com o sinal em  $\delta$  1.58 m (Figura 4.26), o qual no experimento HSQC (Figura 4.22) corresponde ao deslocamento em  $\delta$  36.4. Este sinal em  $\delta$  36.4 no experimento HSQC (Figura 4.22) corresponde a duas áreas, uma correspondendo ao sinal de hidrogênio em  $\delta$  1.58 m, e a outra área (spot) em  $\delta$  1.36 m, sugerindo um CH<sub>2</sub> com dois hidrogênios diastereotópicos. Estas correlações permitem atribuir os sinais de hidrogênios em  $\delta$  1.58 m e 1.36 m e o correspondente <sup>13</sup>C em  $\delta$  36.4 aos H-17a e H-17b e ao C-17, respectivamente.

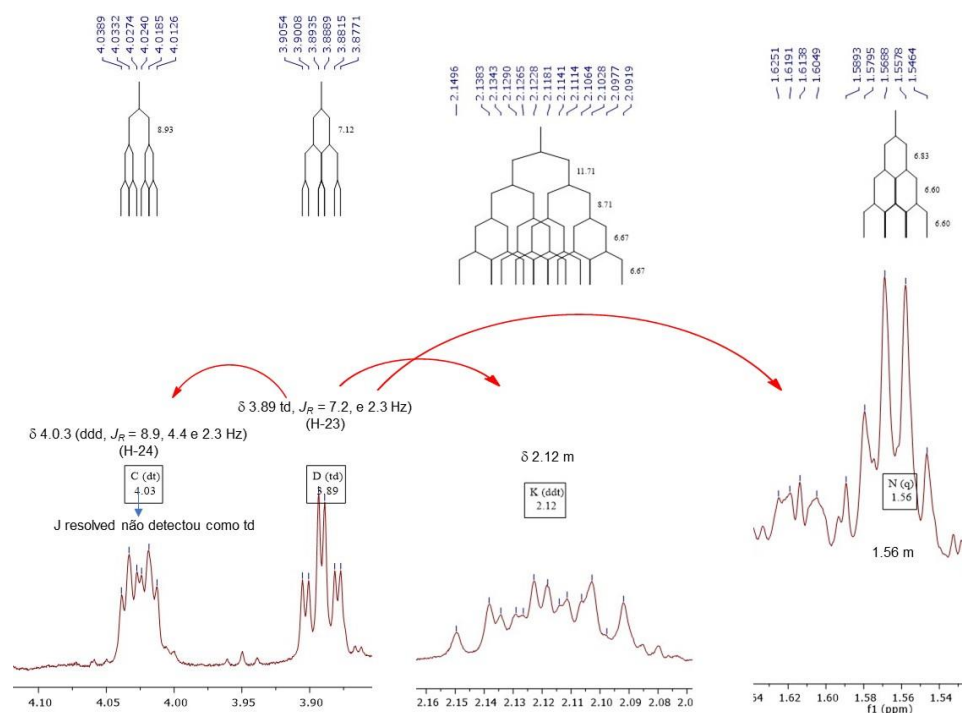


Figura 4.32 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acetogenina 1, mostrando os sinais em  $\delta$  3.89, 2.12 e 1.56 ampliados, espectro total na Figura 5a (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

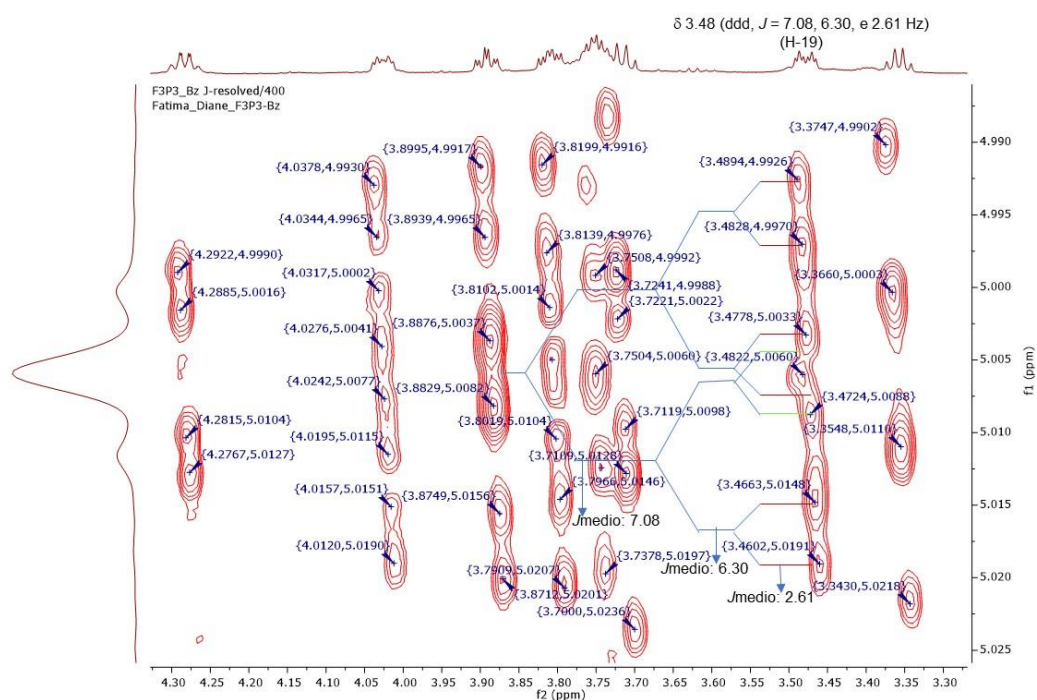


Figura 4.33. Experimentos de “J-resolved” da acetogenina 1, destacando o sinal em  $\delta$  3.48 (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

Estes dados anteriores sugerem a unidade tetraidorfurano C-17 a C-27, com as atribuições indicadas no fragmento na figura 4.36.

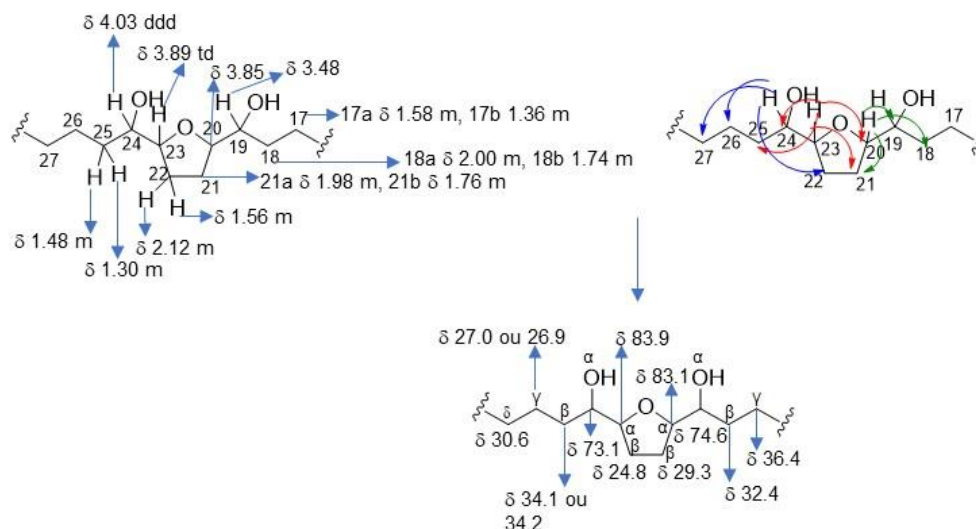


Figura 4.34. Atribuição dos dados de RMN 1H, correlações de HMBC ou HSQC-TOCSY, os quais levaram às atribuições dos dados de RMN 13C aos carbonos C-17 a C-27.

Os sinais em  $\delta$  1.36 m e 1.58 m encontram-se em uma região com vários sinais, porém, o último em  $\delta$  1.58 mostra correlação (COSY, Figura 4.26) com o sinal em  $\delta$  3.43 m (HSQC 75.0, Figura 4.21), sugerindo um CH<sub>2</sub> com dois hidrogênios diastereotópicos ( $\delta$  1.58 e 1.36,  $\delta$  36.4) vizinho de um carbono contendo uma hidroxila, ou seja, um carbono quiral, explicando o efeito sobre estes dois hidrogênios e desblindando seu sinal a  $\delta$  36.4. Estas observações permitem atribuir o sinal em  $\delta$  3.43 ( $\delta$  75.0) ao H-16 e C-16, respectivamente. O sinal em  $\delta$  3.48 ( $\delta$  74.6) no experimento HMBC (Figura 4.24) mostra as correlações a seguir:  $\delta$  28.9 ou 29.3, 30.1-30.6, e 32.4-33.1, porém no HSQC-TOCSY (Figuras 4.27 e 4.33) as interações foram mais informativas, mostrando correlações com os sinais em  $\delta$  29.3, 32.4, 75.0, 83.1, confirmando as atribuições acima,  $\delta$  29.3 ao C-21, 32.4 ao C-18, 75.0 ao C-16 e o 83.1 ao C-20.

O sinal em  $\delta$  3.43 m (HSQC 75.0) também acopla (Figura 4.26) com outro sinal em  $\delta$  3.74 m (HSQC  $\delta$  82.7, Figura 4.21), cujo carbono em  $\delta$  82.7 sugere mais um anel

tetraidrofurano. O sinal em  $\delta$  3.74 m ( $\delta$  82.7) no espectro COSY (Figura 4.26) mostra acoplamentos em  $\delta$  1.67 m e 1.47 m, estes dois últimos no espectro de HSQC (Figura 4.22) se correlacionam com sinais difíceis de se definir, mas sugerindo ser com o deslocamento em  $\delta$  28.9. Estes sinais podem ser atribuídos, o  $\delta$  3.74 m ( $\delta$  82.7) aos H-15 e C-15, e aqueles em  $\delta$  1.67 m, 1.47 m e  $\delta$  28.9 aos H-14a, H-14b e C-14. No HSQC (Figura 4.21) entre  $\delta$  3.74 a 3.85 há sinais para quatro carbonos, já foram atribuídos os sinais  $\delta$  3.74 ( $\delta$  82.7) C-15,  $\delta$  3.76 ( $\delta$  70.1) C-4, e  $\delta$  3.85 ( $\delta$  83.1) C-20. Portanto, falta atribuir o sinal em  $\delta$  3.78 m ( $\delta$  79.8), o qual só pode ser atribuído ao outro carbono do anel tetraidrofurano C-12, vizinho do  $\delta$  3.74 ( $\delta$  82.7), C-15. Este sinal em  $\delta$  3.74 ( $\delta$  82.7, C-15) no HMBC (Figura 4.24) mostra correlação com o sinal em  $\delta$  79.8, confirmando a atribuição deste último ao C-12.

O sinal em  $\delta$  3.43 ( $\delta$  75.0) no HMBC (Figura 4.24) mostra as seguintes correlações:  $\delta$  82.7 e 32.4-33.1, enquanto no experimento HSQC-TOCSY (Figuras 4.27 e 4.33) mostrou as correlações:  $\delta$  28.9, 32.7, 30.8, 74.6 e/ou 75.0 ( $J^1$ ), 82.7. A correlação com o sinal em  $\delta$  28.9 permite atribuir com mais segurança este sinal ao C-14, e os sinais em  $\delta$  1.67 m e 1.47 m aos hidrogênios H-14a e H-14b. O sinal em  $\delta$  3.78 m (H-12) ( $\delta$  79.8, C-12, Figura 4.21) no COSY (Figura 4.26) parece acoplar com os sinais em  $\delta$  1.72 m e 1.27 m, os quais no HSQC (Figura 4.22) podem ser correlacionados ao sinal de  $^{13}\text{C}$  em  $\delta$  32.7, permitindo atribuí-los aos H-13a, H-13b e ao C-13. No experimento HSQC-TOCSY (Figura 4.33) o sinal em  $\delta$  3.43 ( $\delta$  75.0) mostrou correlação com o sinal em  $\delta$  82.7, confirmando a atribuição deste último ao C-15 e o sinal em  $\delta$  79.8 ( $\delta$  3.78) ao C-12. O sinal em  $\delta$  3.78 ( $\delta$  79.8) no COSY (Figura 4.26) parece acoplar com mais um sinal em  $\delta$  1.60, o qual no espectro de HSQC (Figura 4.22) corresponde ao carbono em  $\delta$  30.8. O sinal em  $\delta$  30.8 podem ser atribuídos um ao C-11.

Esta última sequência de dados sugere o sistema  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$ -tetraidrofurano- $\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$ -tetraidrofurano- $\text{CH}_2$  (Figura 4.37), como parte da estrutura da acetogenina.



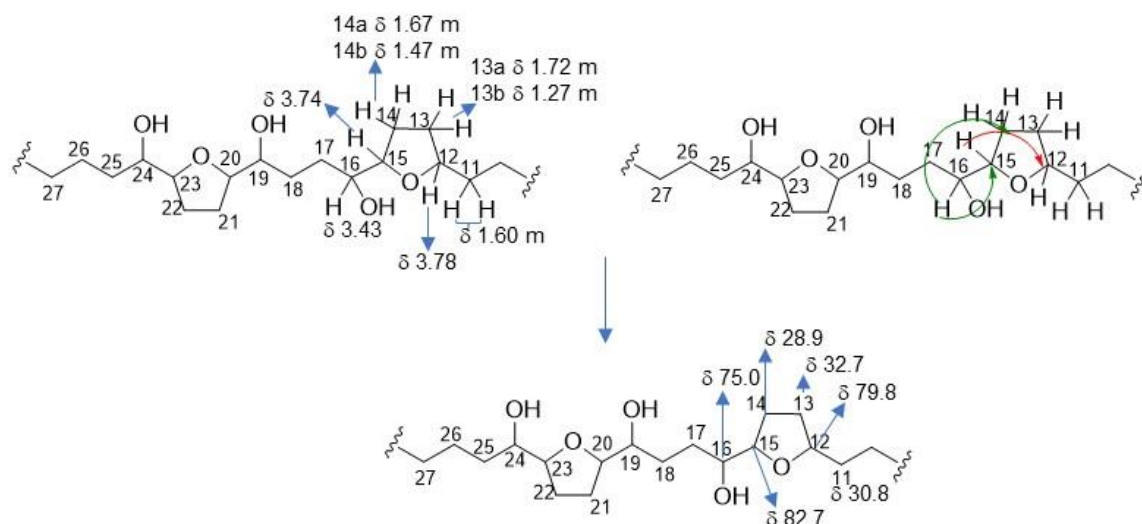


Figura 4.35. Atribuição dos dados de RMN  $^1\text{H}$ , correlações de HMBC ou HSQC-TOCSY, os quais levaram às atribuições dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  aos carbonos C-16 a C-11.

O espectro de  $^1\text{H}$  RMN mostra uma metila a  $\delta$  0.92 (t,  $J = 7.0$  Hz), a qual no experimento COSY (Figura 4.26) mostra acoplamento com o sinal em  $\delta$  1.33 m. No espectro HSQC (Figura 4.22) o sinal de metila a  $\delta$  0.92 (t) não mostrou correlação, mas no experimento HMBC (Figura 4.25) este mostrou seu  $J^1$  em  $\delta$  14.7 e correlações com os sinais em 23.5, 32.4, 32.7 ou 33.1, e no HSQC-TOCSY (Figura 4.27) este sinal e aquele em  $\delta$  1.33 m (também sem correlação no HSQC) também se correlacionam com o sinal a  $\delta$  14.7, permitindo atribuí-lo à metila terminal da acetogenina. O experimento HSQC-TOCSY (Figura 4.27) mostrou as seguintes correlações com estes sinais: Me  $\delta$  0.92 ( $\delta$  14.7): 23.5, 30.5-30.7, 32.4-32.7; e o sinal em  $\delta$  1.33: 14.7, 23.5. Considerando que a metila terminal ocasiona um efeito de blindagem no carbono  $\beta$  e desblindagem ao carbono  $\gamma$  (Silverstein et al., 2005), atribuímos ao final da cadeia da acetogenina os deslocamentos químicos como mostrado na Figura 4.38.

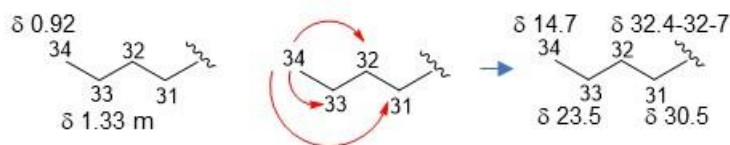


Figura 4.36. Atribuição dos dados de RMN  $^1\text{H}$ , correlações de HMBC ou HSQC-TOCSY, os quais levaram às atribuições dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  aos carbonos C-34 a C-31.

Foram definidos 30 carbonos, e a fórmula molecular contém 37, faltando 7 carbonos que se encontram entre os deslocamentos químicos  $\delta$  30.1 - 30.8. Unir a unidade de quatro carbonos da Figura 4.39 com mais três metilenos à unidade anteriormente proposta, temos a acetogenina de C-11 a C-34 (Figura 4.39).

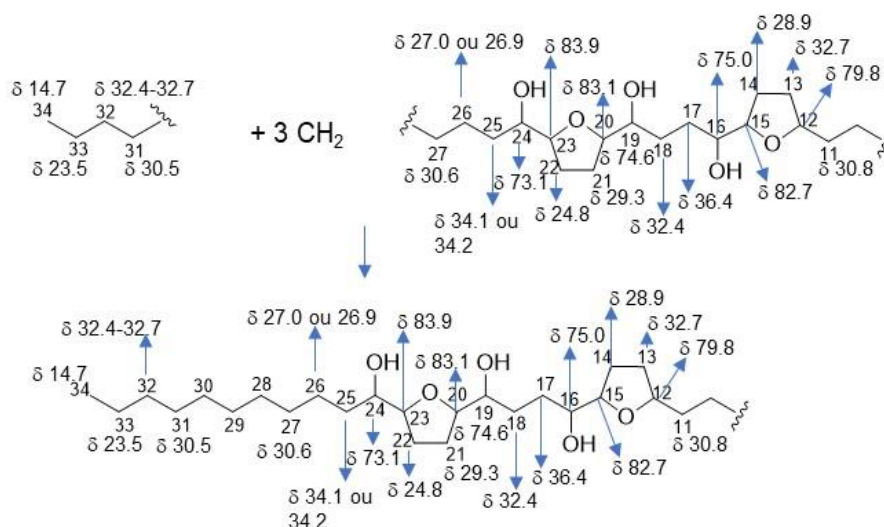


Figura 4.37. Atribuição dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos pelas correlações observadas nos experimentos de HMBC ou HSQC-TOCSY, carbonos C-34 a C-31, e C-27 a C-11.

Estes dados sugerem acrescentar mais quatro metilenos nesta sequência  $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$ -tetraidofurano- $\text{CHOHCH}_2\text{CH}_2\text{CHOH}$ -tetraidofurano- $\text{CH}_2$  e uni-la à cadeia lateral da lactona (Figura 4.29), levando à estrutura total da acetogenina

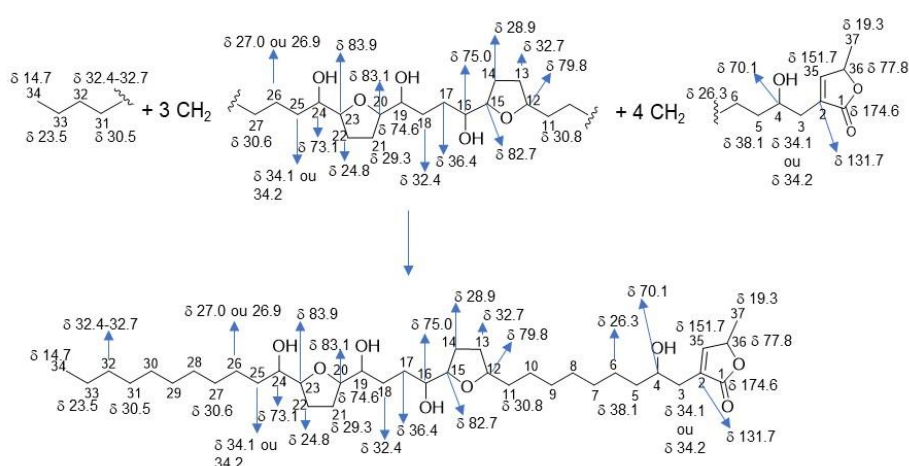


Figura 4.38. Atribuição dos dados de RMN  $^{13}\text{C}$  obtidos pelas correlações observadas nos experimentos de HMBC ou HSQC-TOCSY, carbonos C-34 a C-31, C-27 a C-11, e C-6 a C-1, e C-35 a C-37.

A estrutura da acetogenina **1** foi, portanto, definida usando várias técnicas de RMN como mostra a Figura 4.40, cujos dados estão muito próximos àqueles publicados para squamostatin-B e -C (Tabela 2) (Fujimoto et al., 1994). Born et al. (1990) fez um estudo de RMN  $^{13}\text{C}$  com alguns derivados de acetogeninas e modelos sintéticos, cujos dados levou à “Regra de Born”, o hidrogênio oximetino e o carbono  $\alpha$  a um anel tetraidrofurano ressonam a  $\delta_{\text{H}}$  próximo de 3.8 e  $\delta_{\text{C}}$  71-72 em compostos *eritro*, e a  $\delta_{\text{H}}$  próximo de 3.4 e  $\delta_{\text{C}}$  próximo de 74 em compostos *treo*. Posteriormente Fujimoto et al. (1994) para confirmar a regra de Born e definir as estereoquímicas de várias acetogeninas, ele sintetizou alguns esqueletos com anéis tetraidrofuranos (THF) e fez um estudo de RMN  $^{13}\text{C}$  destes compostos. Os modelos de tetraidrofuranos sintetizados por Fujimoto et al. (1994), são colocados na Figura 4.41 para compararmos com os dados obtidos para a acetogenina **1**.

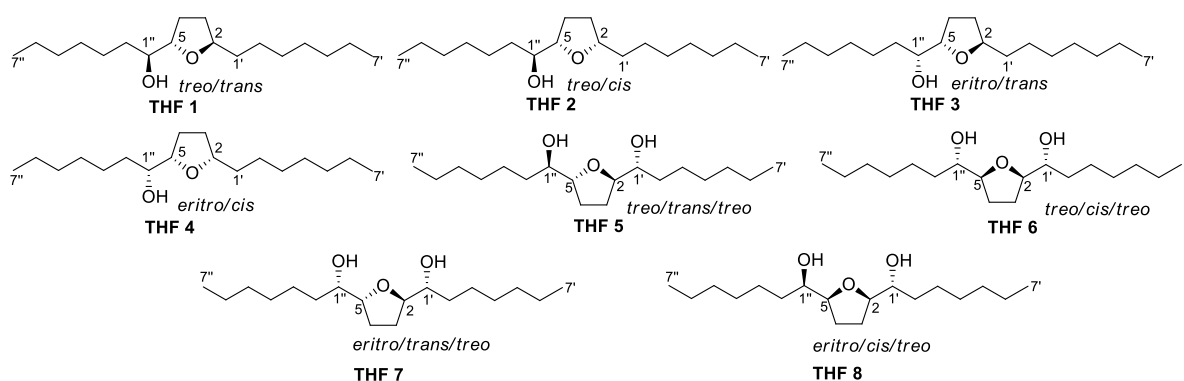


Figura 4.39. Anéis tetraidrofuranos (THF) sintetizadas por Fujimoto et al. (1994).

As atribuições dos deslocamentos químicos de RMN  $^{13}\text{C}$  no estudo de Fujimoto et al. (1994) não foram feitos usando RMN 2D, assim, as análises neste estudo foram feitas explorando os HSQC, MBC e HSQC-TOCSY, com o objetivo de comparar com os dados de Fujimoto e confirma-los ou sugerir correções.

O clorofórmio deuterado é um solvente muito barato adequado para muitos compostos orgânicos, no entanto, os espectros de prótons dos compostos dissolvidos em  $\text{CDCl}_3$  geralmente têm picos sobrepostos, complicando a interpretação dos dados. Um método muito usado no passado parece ter sido esquecido - o uso de um solvente aromático como benzeno ou piridina. Esses solventes induzem mudanças nas ressonâncias dos solutos, muitas vezes

proporcionando uma resolução dramaticamente melhor. Todo o trabalho realizado com a acetogenina **1** foi em benzeno e realmente a resolução dos sinais foram muito melhores, permitindo usar os experimentos de HSQC, MBC e HSQC-TOCSY para fazer atribuições de deslocamentos de carbono e hidrogênios, muitos dos quais em  $\text{CDCl}_3$  estavam sobrepostos. O sinal em  $\delta$  4.03 (ddd,  $J_R = 8.9, 4.4$  e  $2.3$  Hz) e  $\delta$  73.1 atribuídos ao H-24 e C-24, comparando com os dados acima sugere configuração *erito* ao C-24. Enquanto os sinais em  $\delta$  3.48 (ddd,  $J_R = 7.08, 6.30, \text{ e } 2.61$  Hz) e  $\delta$  74.6, atribuídos ao H-19 e C-19, comparando com os dados acima sugere configuração *treo* ao C-19, e aquele em  $\delta$  3.43 m e  $\delta$  75.0, atribuídos ao H-16 e C-16, também sugere configuração *treo* ao C-16. Contudo, os deslocamentos químicos dos carbonos C-2 e C-5, e hidrogênios H-2 e H-5 dos anéis THF nos modelos sintéticos **THF 7** e **8** são muito próximos, com exceção do sinal de C-2 ( $\delta$  83.3 para o isômero **THF 7**, e 82.3 para o **THF 8**), mostrando uma diferença de 1 ppm. Porém, como são compostos sintéticos, a rota indica **THF 7** *erito/trans/treo* e **THF 8** *erito/cis/treo*. A Figura 4.42 mostra a comparação entre os dados da acetogenina **1** e os modelos sintéticos **THF 6** e **8**, e **1** e **2**, deixando mais claro esta discussão.

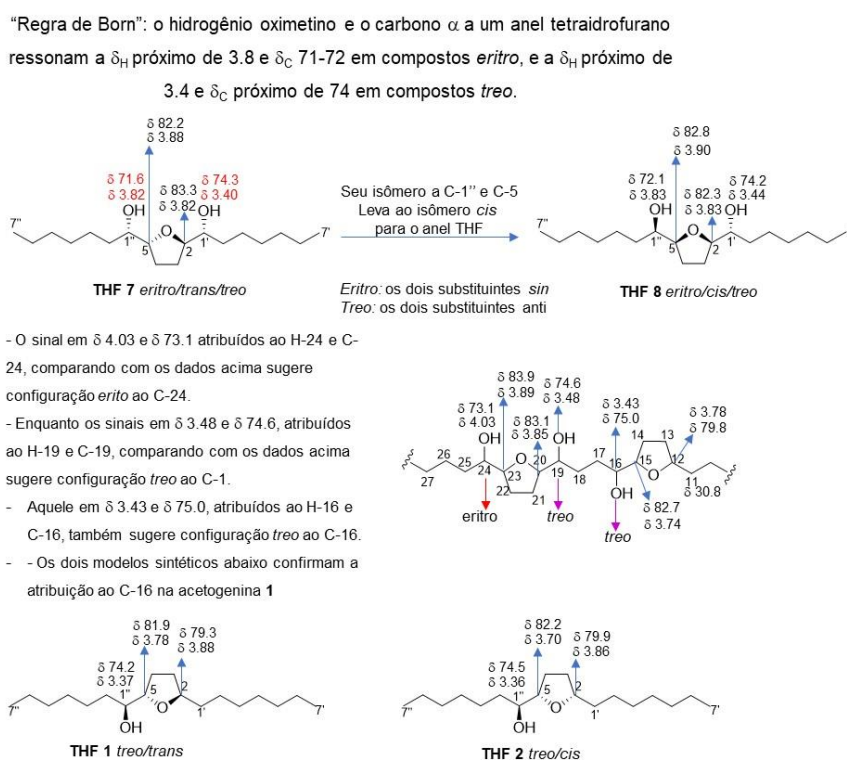


Figura 4.40. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da acetogenina **1** e de modelos (Fujimoto et al. (1994)).

Comparando os deslocamentos químicos de hidrogênio e carbono  $^{13}$ , em nossa opinião, as diferenças para os anéis THF não permitem definir suas estereoquímicas; a “Regra de Born” garante C-24 ser *eritro*, e C-19 e C-16 são *treo*. Os isômeros *eritro* possuem os dois substituintes oxigênio *sin*, enquanto no *treo* eles são *anti*, porém no *eritro* eles podem estar na mesma face da ligação C-C, mas na face  $\alpha$  ou face  $\beta$ , logo indicando a possibilidade de dois isômeros. O carbono *treo* também pode ter o seu isômero. A Figura 4.43 mostra alguns isômeros possíveis para a acetogenina **1**.

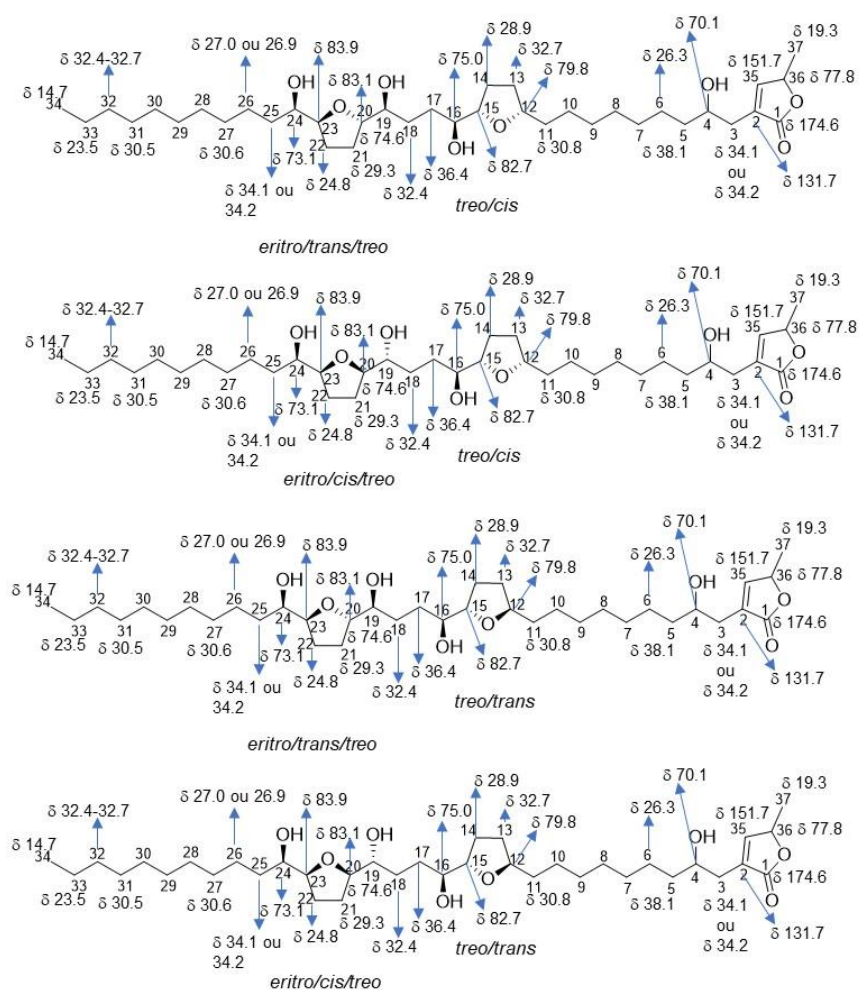


Figura 4.41. Possíveis isômeros para a acetogenina **1**.

O isômero *eritro/trans/treo*, *treo/trans* é nomeado squamostatina-B ((Fujimoto et al. 1994), porém, discordamos que os dados apresentados pelos autores permitem confirmar a estrutura proposta. A acetogeninas e seus respectivos nomes são confusos na literatura, como pode ser visto na revisão (Attiq et al., 2017). A configuração dos centros estereogênicos oximetínicos têm sido determinados usando análises por RMN  $^1\text{H}$  de seus ésteres de Mosher (Rieser et al., 1992). A próxima

etapa será realizar este experimento, e também buscar o auxílio de métodos modernos de química computacional para auxiliar na determinação da estereoquímica dos anéis THF. Acreditamos que os dados do “J-Resolved” irão ajudar muito.

Tabela 4.4 Dados de RMN da acetogenina 1 em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>

Carbono	RMN <sup>1</sup> H	HSQC	HMBC	HSQC-TOCSY
1		174.6		
2		131.7		
3	2.33 ddt, J = 14.5, 3.4, 1.5 2.25 ddt, J = 14.5, 8.1, 1.4	34.1 ou 34.2	38.1, 70.1 (forte), 131.7, 151.7, 174.6	19.3, 26.3, 34.1 ou 34.2, 38.1
4	3.76 m	70.1	131.7	70.1, 34.1 ou 34.2, 38.1
5	1.43 m, 1.38 m	38.1		
6	~1.3-1.5 m	26.3		
7				
8				
9				
10				
11	1.60 m	30.8		
12	3.78 m	79.8		
13	1.72m, 1.27 m	32.7		
14	1.67 m, 1.47 m	28.9		
15	3.74 m	82.7	79.8	
16	3.43 m	75.0	82.7 e 32.4-33.1	28.9, 32.7, 30.8, 74.6 e/ou 75.0 (J'), 82.7
17	1.58 m, 1.36 m	36.4		
18	2.00 m, 1.74 m	32.4		
19	3.48 ddd J = 7.1, 6.3, 2.6	74.6	28.9 ou 29.3, 30.1- 30.6, 32.4-33.1	29.3, 32.4, 75.0, 83.1
20	3.85 m	83.1	75.0 ou 74.6, 83.9, 32.4 ou 32.7 ou 33.1, 26.3 ou 26.9 ou 27.0, 29.3 ou 28.9	24.8, 74.6 e 75.0, 83.1 e/ou 83.9
21	1.98 m, 1.76 m	29.3		
22	2.12 m e 1.56 m	24.8		
23	3.89 td, J = 7.2 e 2.3 Hz	83.9	29.3 ou 28.9, 34.1 ou 34.2, 73.1, 83.1 ou 82.7	24.8, 29.3, 34.1 ou 34.2, 73.1
24	4.03 ddd, J = 8.9, 4.4, 2.3	73.1	24.8-27.0, 34.1 ou 34.2, 83.9	27.0 ou 26.9, 30.6, 34.1 ou 34.2, 83.9
25	1.48 m, 1.30 m	34.1 ou 34.2		
26	1.68-1.36 m	26.9 ou 27.0		
27	1.8-1.3 (HSQC)	30.6		
28				
29				
30				
31	1.4-1.27 (HSQC)	30.5		
32	1.4-1.27 (HSQC)	32.4-32.7		
33	1.33 m	23.5		14.7, 23.5
34	0.92 t, J = 7.0	14.7	23.5, 32.4, 32.7 ou 33.1	23.5, 30.5-30.7, 32.4-32.7
35	6.31 dd, J = 2.5, 1.4	151.7	19.3, 34.1 ou 34.2, 70.1 (fraca), 77.8, 131.7, 174.6	19.3, 34.1 ou 34.2, 70.1, 77.8, 151.7
36	4.28 qdd, J = 6.3, 2.5, 1.5	77.8	19.3, 70.1 (fraca), 131.7, 151.7, 174.6	19.3, 34.1 ou 34.2, (fraca), 77.8, 151.7 (fraca)
37	0.84 d, J = 6.3	19.3	77.8, 151.7	19.3, 34.1 ou 34.2, 77.8, 151.7

Tabela 4.5. RMN  $^{13}\text{C}$  de anéis tetraidrofuranos (THF)<sup>a</sup> sintetizadas por Fujimoto et al. (1994), (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

Carbono	THF1	THF2	THF3	THF4	THF5	THF6	THF7	THF8	$\Delta$ THF7- THF8
2	79.3	79.9	80.2	79.6	82.7	82.8	83.3	82.3	1.0
3	32.4	31.4	32.3	31.4	28.8	28.1	28.6	28.4	
4	28.4	27.8	25.0	23.9	28.8	28.1	25.2	24.1	
5	81.9	82.2	81.5	82.1	82.7	82.8	82.2	82.8	-0.6
1'	35.7	36.1	36.1	35.8	74.0	74.3	74.3	74.2	-0.1
2'	26.2	26.2	26.1	26.2	33.4	34.0	33.2	34.2	
3'	29.7	29.7	29.7	29.7	25.5	25.6	25.5f	25.7h	
4'	29.3b	29.3c	29.2d	29.2e	29.4	29.3	29.4g	29.3	
1''	74.2	74.5	72.0	71.6	74.0	74.3	71.6	72.1	-0.5
2''	33.4	34.0	32.6	32.6	33.4	34.0	32.5	33.1	
3''	25.6	25.7	26.0	25.9	25.5	25.6	25.9f	25.9h	
4''	29.4b	29.4c	29.4d	29.3e	29.4	29.3	29.3g	29.3	

Tabela 4.6 Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  da acetogenina 1 e modelos Squamostatin-C e Squamostatin-B (Fujimoto et al. (1994))

Carbono	Acetogenina 1 ( $\text{C}_6\text{D}_6$ )	Squamostatin- C ( $\text{CDCl}_3$ )	Squamostatin- B ( $\text{CDCl}_3$ )
1	174.6	174.6	174.6
2	131.7	131.2	131.2
3	34.1 ou 34.2	33.4	33.4
4	70.1	70.0	70.0
5	38.1	37.4	37.4
6	26.3	25.5	25.5
7			
8			
9			
10		26.1	26.2
11	30.8	35.6	35.6
12	79.8	79.3	79.3
13	32.7	32.4	32.4
14	28.9	28.4	28.4
15	82.7	82.0	82.0
16	75.0	74.4	74.5
17	36.4		
18	32.4		
19	74.6	74.3	74.6
20	83.1	82.7	83.3
21	29.3	28.7	28.6
22	24.8	28.7	25.2
23	83.9	82.7	82.2
24	73.1	74.0	71.6
25	34.1 ou 34.2	33.5	32.6
26	26.9 ou 27.0	25.6	26.0
27	30.6		
28			
29			
30			
31	30.5		
32	32.4-32.7	31.9	31.9
33	23.5	22.7	22.7
34	14.7	14.1	14.1
35	151.7	151.7	151.8
36	77.8	77.9	78.0
37	19.3	19.1	19.1

### 4.3.2. Identificação estrutural da Acetogenina 2

A amostra contendo a acetogenina **2** (Figura 4.10, C) foi analisada por “Ultra Performance Liquid Chromatography on a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS)” no modo positivo de ionização, fornecendo  $[M+H]^+ = 639,4789$ , correspondendo a  $C_{37}H_{66}O_8 + H^+$  (Figura. 4.44).

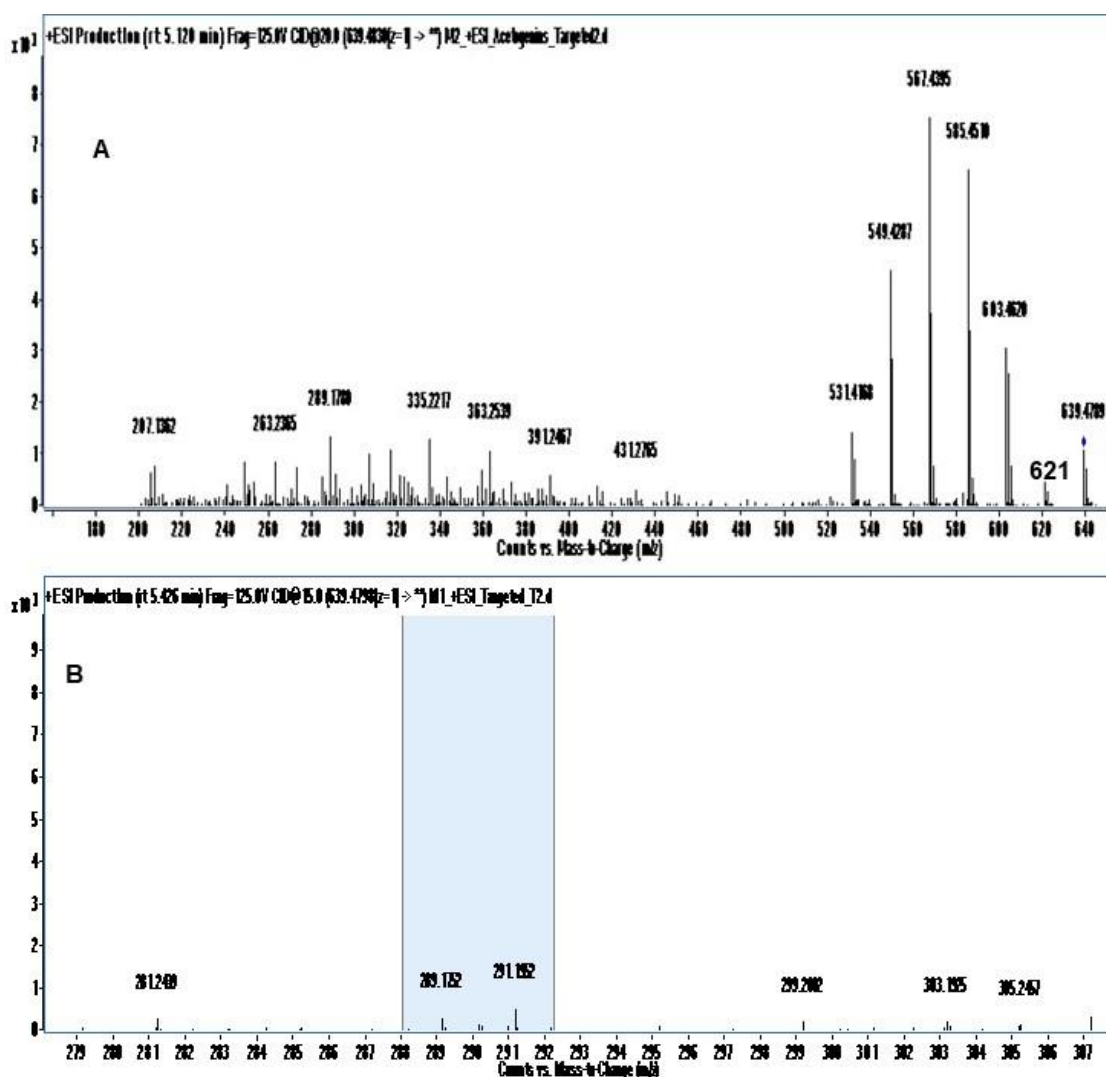


Figura 4.42. **A**: Espectro de massas da acetogenina **2**. **B**: Espectro de massas ampliação da acetogenina **2**. Ambos no modo positivo de ionização.



O espectro de massas (Figura 4.44) mostra íons fragmentos correspondentes à perda de cada hidroxila secundária,  $m/z = 621, 603, 585, \text{ e } 567$ ; posteriormente a abertura dos anéis tetraidrofurano e perda de água formam os fragmentos  $m/z = 549, \text{ e } 531$ . O fragmento em  $m/z = 549$  ( $\text{C}_{37}\text{H}_{57}\text{O}_3^+$ ) apresenta também outra sequência de fragmentações no espectro "EI-MS", levando aos íons fragmentos em  $m/z = 291$  ( $\text{C}_{18}\text{H}_{27}\text{O}_3^+$ ) e  $m/z = 289$  ( $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{O}_3^+$ ), sugerindo a acetogenina **2** ser um isômero da acetogenina **1**.

As análises dessa amostra por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, e HMBC permitiram confirmar esta proposta. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e COSY (Figuras 4.45 e 4.46, respectivamente) mostram semelhanças com aqueles da acetogenina **1**, diferenciando pelos deslocamentos (Tabela 4.8). Os experimentos HSQC e COSY permitiram atribuir os dados de  $^{13}\text{C}$  por comparação com os dados da acetogenina **1**, em  $\delta 3.82$  ( $\delta 82.5$ ) acopla com o sinal em  $\delta 3.45$  ( $\delta 74.2$ ), cujos deslocamentos indicam um anel tetraidrofurano e um dos seus hidrogênios do carbono oxigenado acoplado com uma hidroxila vizinha. O HSQC indicou mais três sinais característicos de anéis tetraidrofuranos  $\delta 3.84$  ( $\delta 82.5$ ),  $3.79$  ( $\delta 82.8$ ),  $3.70$  ( $\delta 80.5$ ). O HSQC também mostra sinais oximetinos característicos da presença de mais duas hidroxilas  $\delta 3.81$  ( $\delta 71.5$ ) e  $3.42$  ( $\delta 74.2$ ), além do sinal em  $\delta 3.77$  ( $\delta 69.2$ ) acoplado com os dois sinais característicos de H3a/H3b em  $\delta 2.36$  e  $2.27$  ( $\delta 33.5$ ), indicando este último corresponder ao H-4, similar à acetogenina **1**. O HMBC não mostrou correlações que permitissem atribuir os sinais acima aos respectivos carbonos, comparando com os dados da acetogenina **1**, atribuímos  $\delta 3.82$  ( $\delta 82.5$ ) aos H-15 e C-15 e  $\delta 3.45$  ( $\delta 74.2$ ) aos H-16 e C-16;  $\delta 3.79$  ( $\delta 82.8$ ) aos H-23 e C-23;  $\delta 3.84$  ( $\delta 82.5$ ) aos H-20 e C-20;  $\delta 3.70$  ( $\delta 80.5$ ) aos H-12 e C-12;  $\delta 3.42$  ( $\delta 74.2$ ) aos H-19 e C-19;  $\delta 3.81$  ( $\delta 71.5$ ) aos H-24 e C-24.

O HMBC permitiu confirmar somente as atribuições dos sinais de H-35 em  $\delta 6.35$  ( $\delta_{\text{C}} 150.8$ , HSQC) devido às suas correlações com os sinais em  $\delta 174.1$  (C-1),  $77.5$  (C-36); os H3a/H3b em  $\delta 2.36$  e  $2.27$  ( $\delta 33.5$ ), os quais se correlacionaram com os sinais  $131.4$  (C-2),  $69.2$  (C-4).

Espectros com melhores resoluções e um experimento HSQC-TOCSY e J-Resolved serão obtidos para confirmar as atribuições de RMN citadas em vermelho na Tabela 4.8, assim como aquelas sem atribuição.

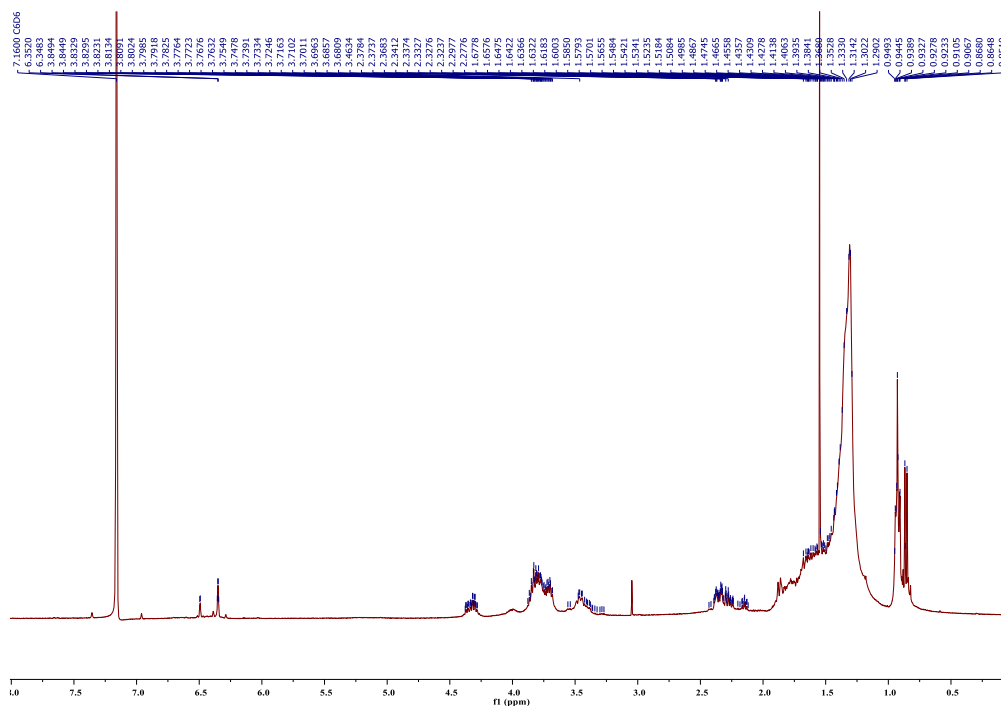


Figura 4.43. Espectro de RMN 1H da acetogenina 2 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

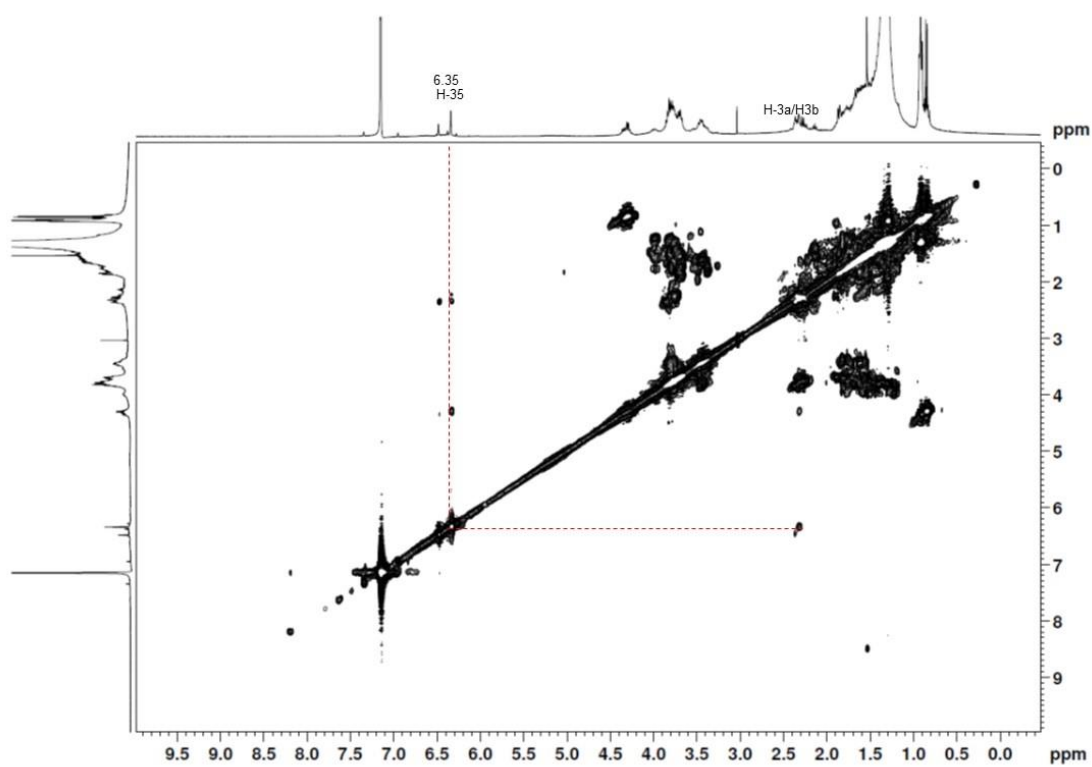


Figura 4.44. Experimentos de COSY da acetogenina 2 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

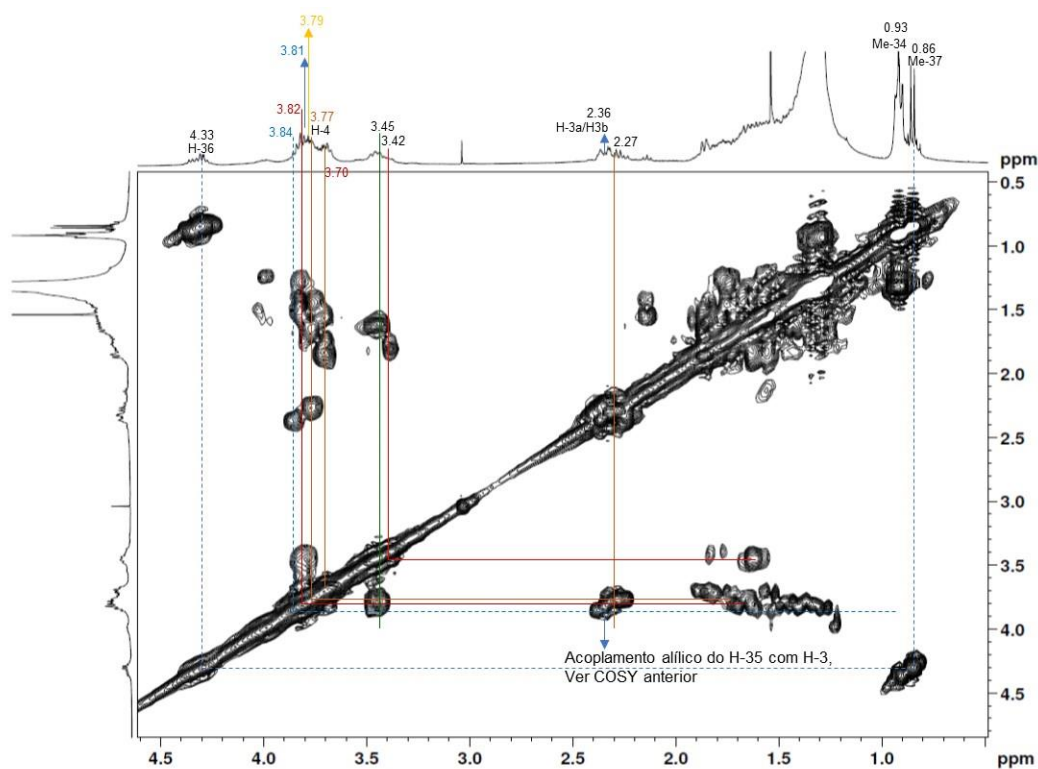


Figura 4.45. Experimentos de COSY da acetogenina 2 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

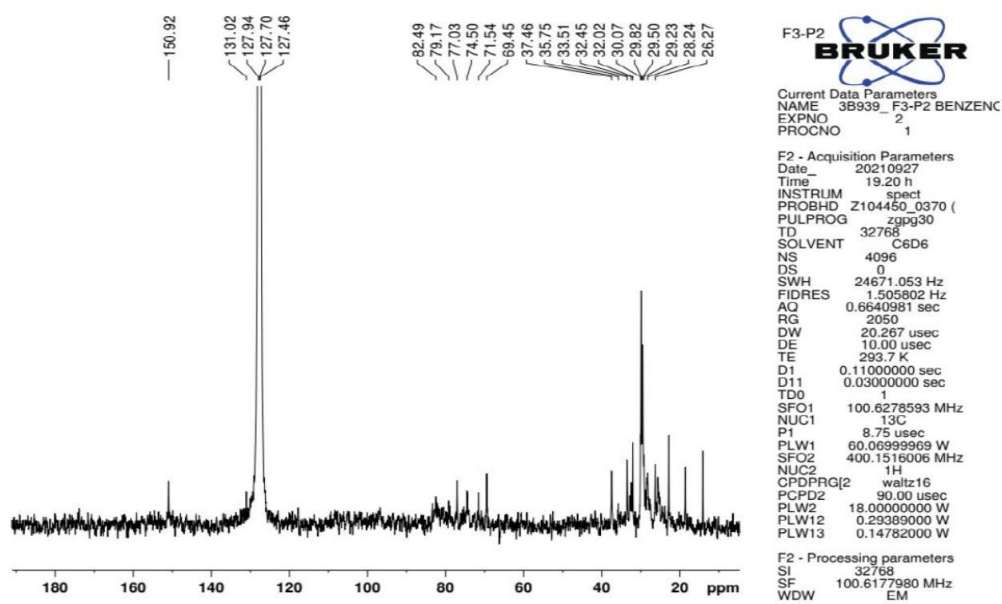


Figura 4.46. Espectro de RMN <sup>13</sup>C da acetogenina 2 (125 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

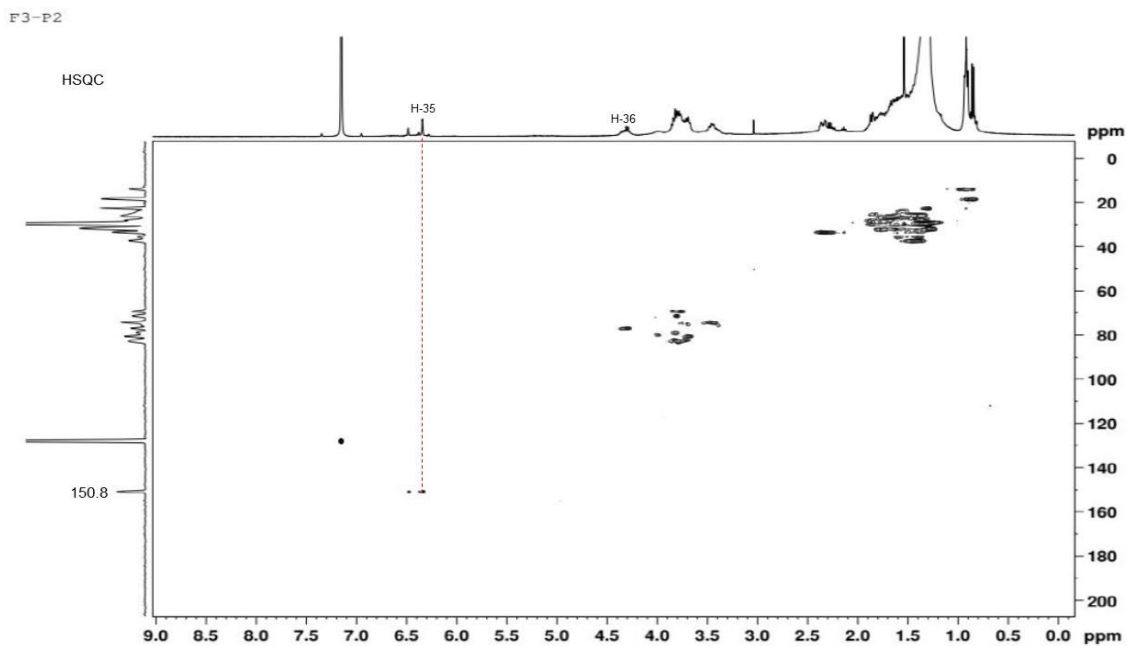


Figura 4.47. Experimentos de HSQC da acetogenina 2 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

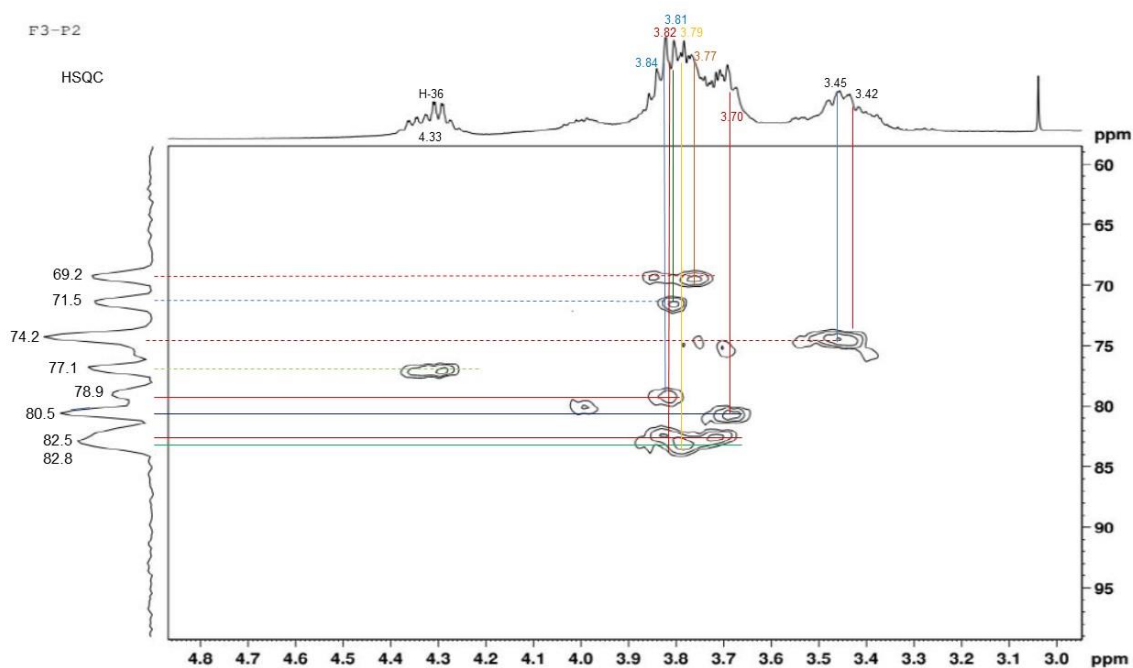


Figura 4.48. Experimentos de HSQC da acetogenina 2 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

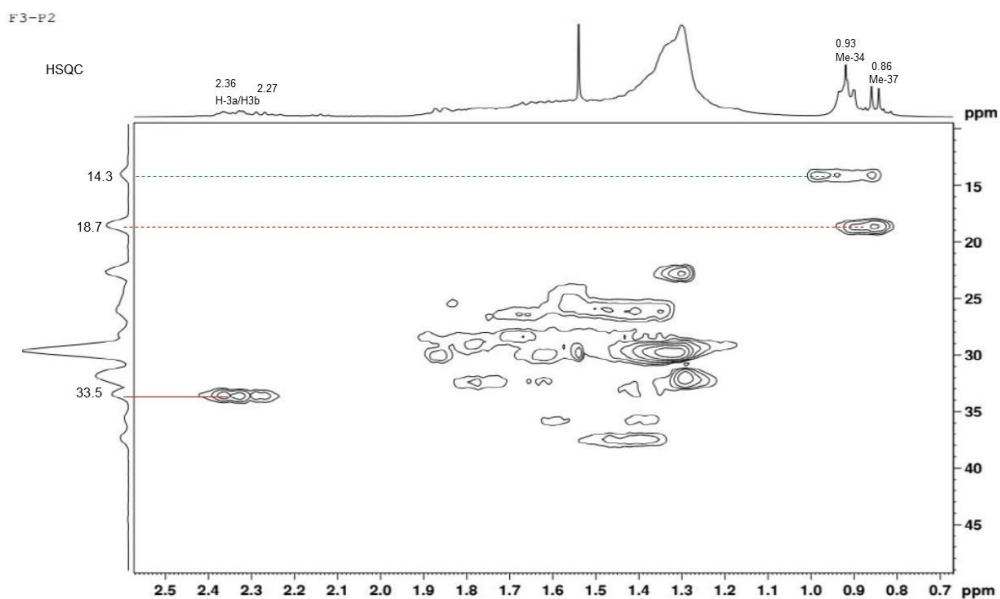


Figura 4.49. Experimentos de HSQC da acetogenina 2 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

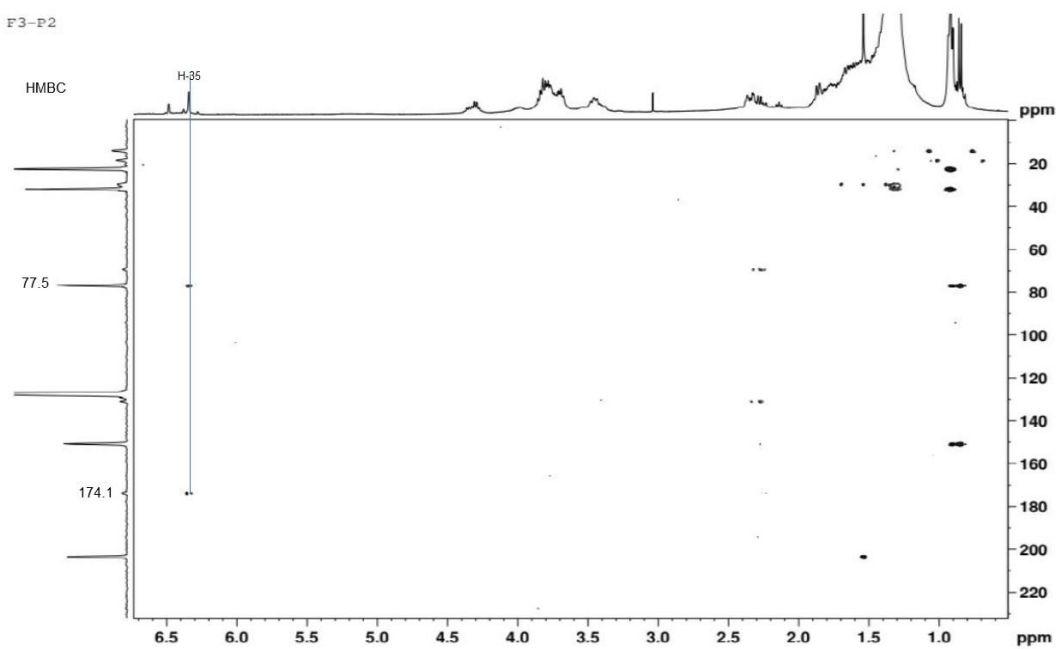


Figura 4.50. Experimentos de HMBC da acetogenina 2 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

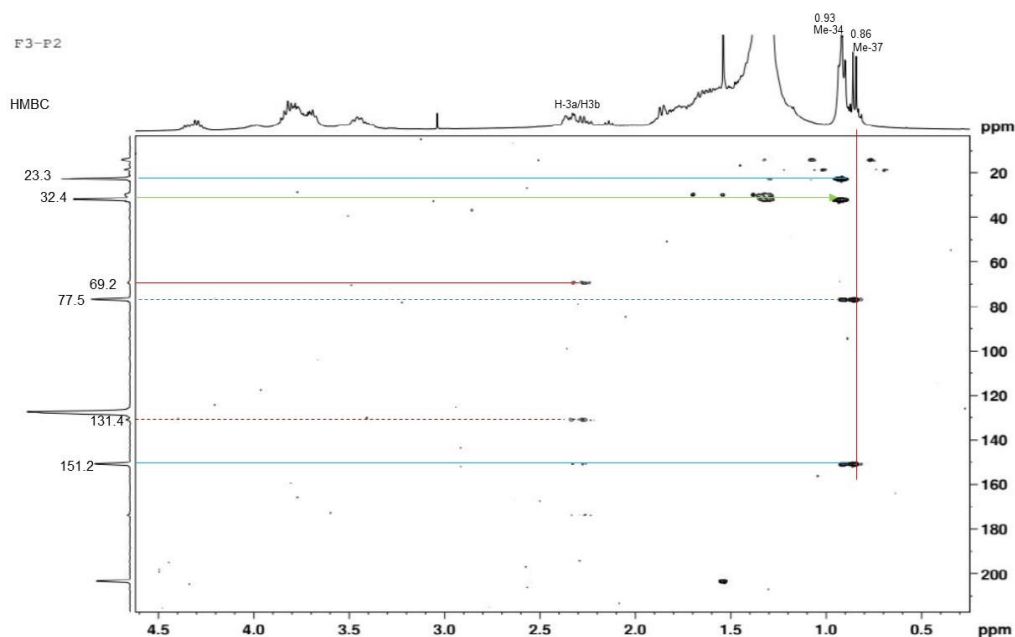


Figura 4.51. Experimentos de HMBC da acetogenina 2 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

Comentamos nas discussões da acetogenina **1** que o isômero *eritro/trans/treo*, *treo/trans* é nomeado squamostatina-B (Fujimoto et al. 1994), porém, discordamos que os dados apresentados pelos autores permitem confirmar a estrutura proposta. As acetogeninas e seus respectivos nomes são confusos na literatura, como pode ser visto em duas revisões (Rieser et al. 1992; Attiq et al., 2017). A configuração dos centros estereogênicos oximetinos têm sido determinados usando análises por RMN <sup>1</sup>H de seus ésteres de Mosher (Rieser et al., 1992). A próxima etapa será realizar este experimento, e também buscar o auxílio de métodos modernos de química computacional para auxiliar na determinação da estereoquímica dos anéis THF. Acreditamos que os dados do “J-Resolved” irão ajudar muito.

Portanto acreditamos que a diferença entre a acetogenina **1** e **2** estejam nas estereoquímicas dos anéis tetraidrofuranos e mesmo dos carbonos hidroxilados. A lactona e parte da cadeia lateral até o carbono C-5 os dados são muito similares àqueles da acetogenina **1**, sugerindo esta unidade na acetogenina **2** ser igual aquela em **1**.

Tabela 4.7. Dados de RMN da acetogenina 2 em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>

Carbono	RMN <sup>1</sup> H	HSQC		HSQC	HMBC
	Acetogenina 1	Acetogenina 1		Acetogenina 2	
1		174.6		174.1	
2		131.7		131.4	
3	2.33 ddt, J = 14.5, 3.4, 1.5 2.25 ddt, J = 14.5, 8.1, 1.4	34.2	34.1 ou 2.36 m; 2.27 m	33.5	131.4, 69.2
4	3.76 m	70.1	3.77 m	69.2	
5	1.43 m, 1.38 m	38.1			
6	~1.3-1.5 m	26.3			
7					
8					
9					
10					
11	1.60 m	30.8			
12	3.78 m	79.8	3.70 m	80.5	
13	1.72m, 1.27 m	32.7			
14	1.67 m, 1.47 m	28.9			
15	3.74 m	82.7	3.82 m	82.5	
16	3.43 m	75.0	3.45 m	74.2	
17	1.58 m, 1.36 m	36.4			
18	2.00 m, 1.74 m	32.4			
19	3.48 ddd J = 7.1, 6.3, 2.6	74.6	3.42 m	74.2	
20	3.85 m	83.1	3.84 m	82.5	
21	1.98 m, 1.76 m	29.3			
22	2.12 m e 1.56 m	24.8			
23	3.89 td, J = 7.2 e 2.3 Hz	83.9	3.79 m	82.8	
24	4.03 ddd, J = 8.9, 4.4, 2.3	73.1	3.81	71.5	
25	1.48 m, 1.30 m	34.2	34.1 ou 26.9 ou		
26	1.68-136 m	27.0			
27	1.8-1.3 (HSQC)	30.6			
28					
29					
30					
31	1.4-1.27 (HSQC)	30.5			
32	1.4-1.27 (HSQC)	32.7	32.4-		
33	1.33 m	23.5			
34	0.92 t, J = 7.0	14.7			
35	6.31 dd, J = 2.5, 1.4	151.7	6.35 sl	150.8	174.1, 77.5
36	4.28 qdd, J = 6.3, 2.5, 1.5	77.8	4.33 m	77.5	
37	0.84 d, J = 6.3	19.3			

### 4.3.3. Identificação estrutural da Acetogenina 3

A amostra contendo a acetogenina **3** (Figura 4.10, C) foi analisada por “Ultra Performance Liquid Chromatography on a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS)” no modo positivo de ionização, fornecendo  $[M+H]^+ = 639,4819$ , correspondendo a  $C_{37}H_{66}O_8 + H^+$  (Figura. 4.54).

O espectro de massas (Figura 4.54) mostra íons fragmentos correspondentes à perda de cada hidroxila secundária,  $m/z = 621, 603, 585$ , e  $567$ ; posteriormente a abertura dos anéis tetraidrofurano e perda de água formam os fragmentos  $m/z = 549$ , e  $531$ . O fragmento em  $m/z = 549$  ( $C_{37}H_{57}O_3^+$ ) apresenta também outra sequência de fragmentações no espectro “EI-MS”, levando aos íons fragmentos em  $m/z = 291$  ( $C_{18}H_{27}O_3^+$ ) e  $m/z = 289$  ( $C_{18}H_{25}O_3^+$ ), sugerindo a acetogenina **3** ser um isômero da acetogenina **1**.

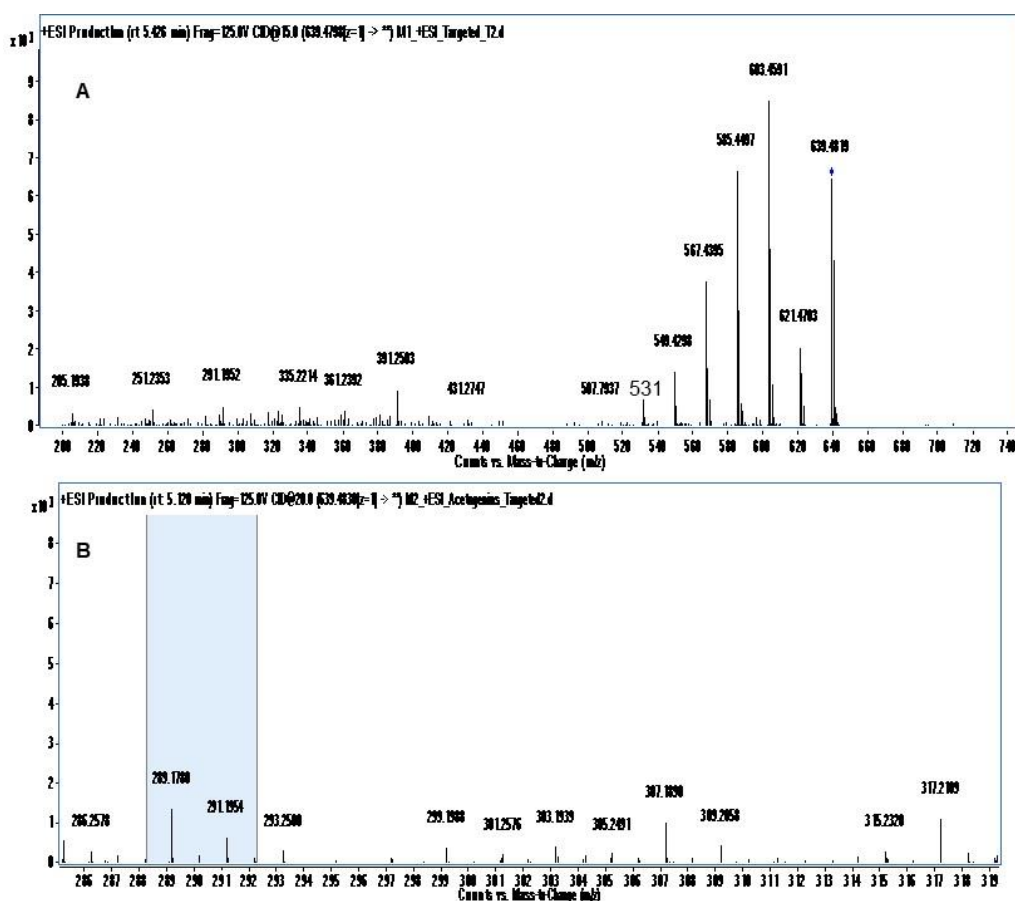


Figura 4.52. **A**: Espectro de massas da acetogenina **3**. **B**: Espectro de massas ampliação da acetogenina **3**. Ambos no modo positivo de ionização.



As análises dessa amostra por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, e HMBC permitiram confirmar esta proposta. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  e COSY (Figuras 4.55 e 4.56, respectivamente) mostram semelhanças com aqueles da acetogenina **1**, diferenciando pelos deslocamentos (Tabela 4.9). Os experimentos HSQC permitiu atribuir os dados de  $^{13}\text{C}$  por comparação com os dados da acetogenina **1**, pois o HMBC permitiu confirmar somente as atribuições dos sinais de H-35 em  $\delta$  6.37 ( $\delta_{\text{C}}$  151.3, HSQC) devido às suas correlações com os sinais em  $\delta$  173.5 (C-1), 151.3 (C-35,  $^1\text{J}$ ) 131.3 (C-2), 77.4 (C-36) e 33.8, permitindo atribuir este último ao C-3; H-36 em  $\delta$  4.33, pois este se correlacionou com os sinais em  $\delta$  151.3 (C-35), 131.3 (C-2) e 18.9, permitindo atribuir este último à Me-37; o H-4 em  $\delta$  3.77 devido às suas correlações com os sinais em  $\delta$  131.3 (C-2) e 26.6, permitindo atribuir este último ao C-6 por comparação com a acetogenina **1**; os H-3a em  $\delta$  2.35 e H-3b em  $\delta$  2.27, os quais se correlacionaram com os sinais  $\delta$  173.5 (C-1), 151.3 (C-35) 131.3 (C-2), 69.8 (C-4) e 37.3, permitindo atribuir este último ao C-5 por comparação.

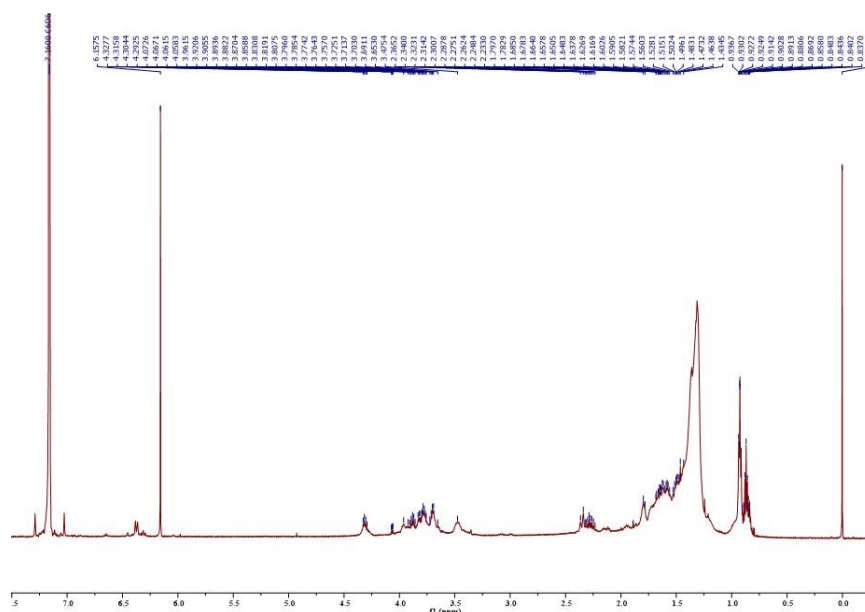
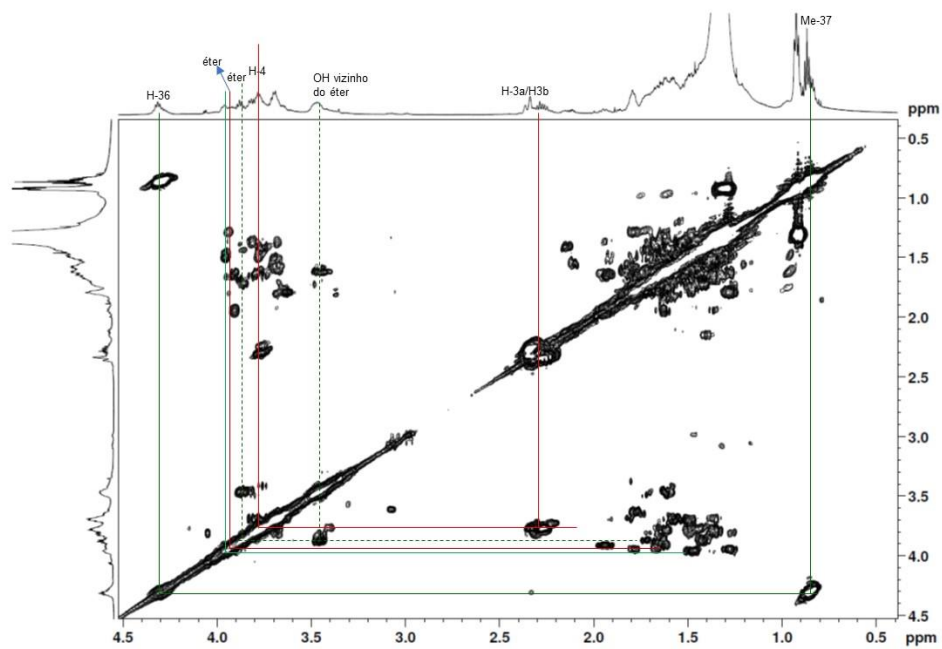


Figura 4.53. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acetogenina **3** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).



OBS: COSY processado pela Lu

Figura 4.54. Experimentos de COSY da acetogenina **3** (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

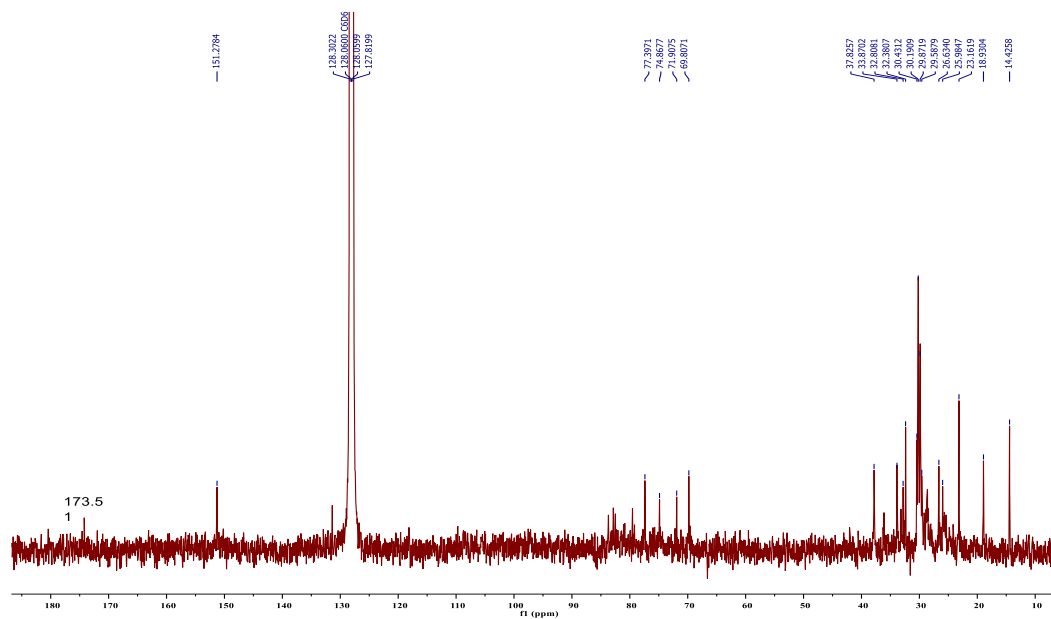


Figura 4.55. Espectro de RMN  $^{13}C$  da acetogenina **3** (125 MHz,  $C_6D_6$ ).

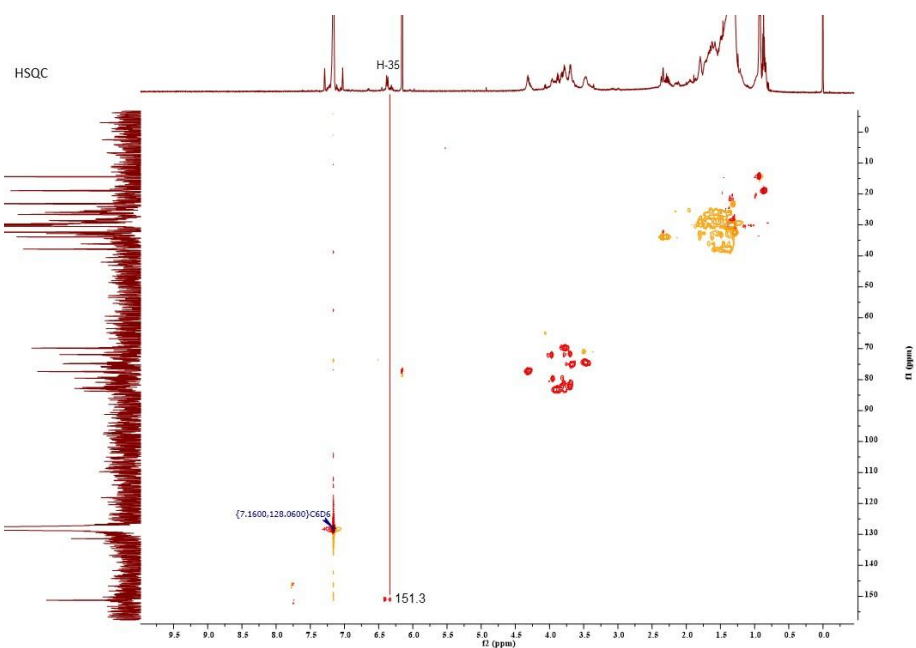


Figura 4.56. Experimentos de HSQC da acetogenina 3 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

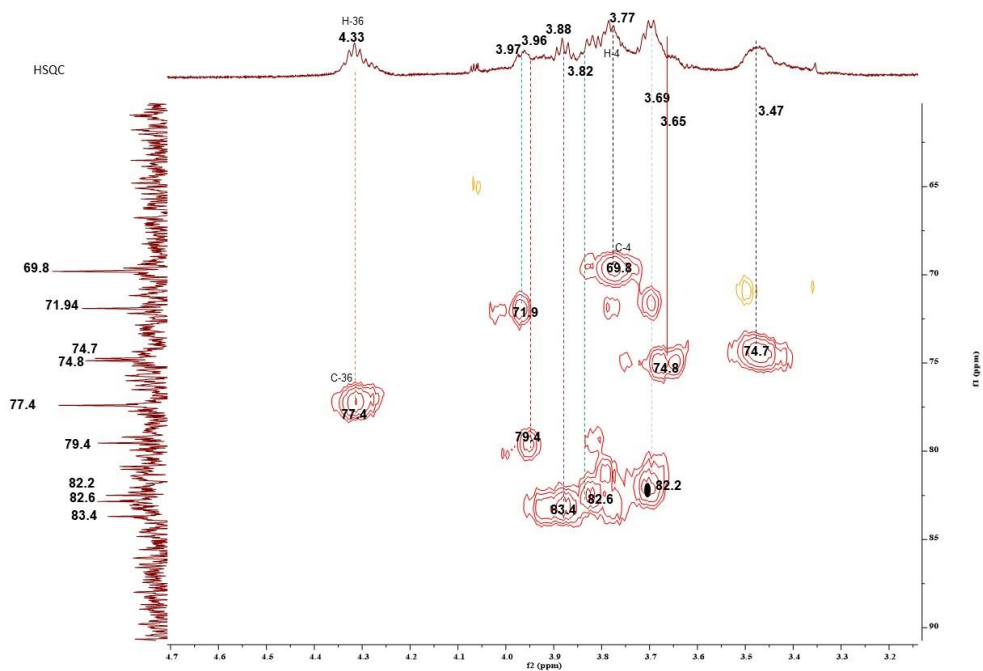


Figura 4.57. Experimentos de HSQC da acetogenina 3 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

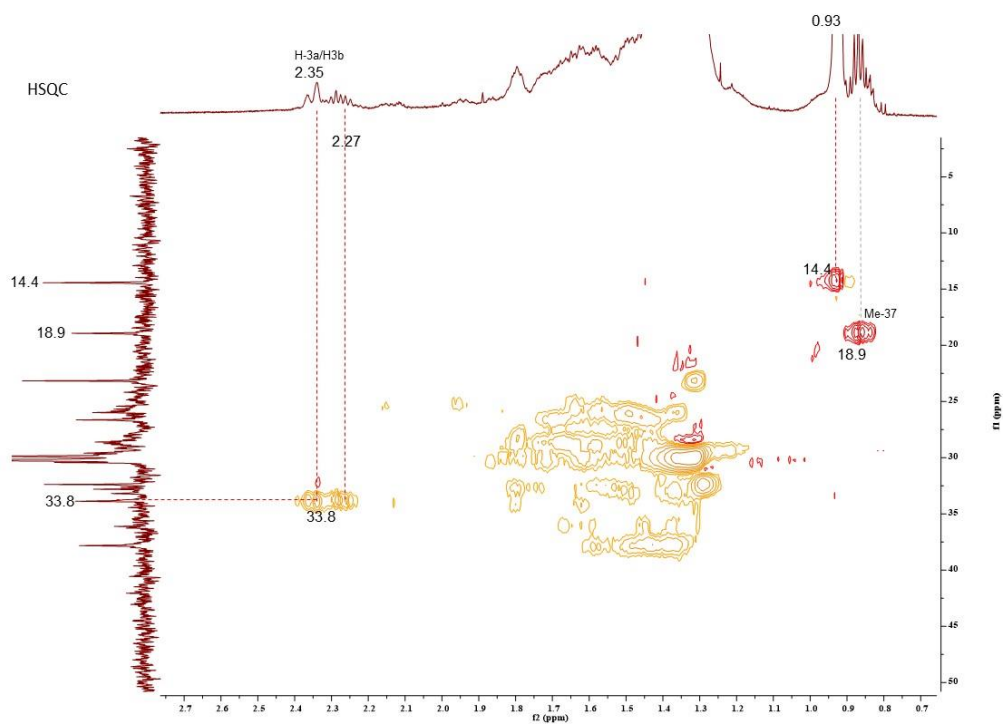


Figura 4.58. Experimentos de HSQC da acetogenina **3** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

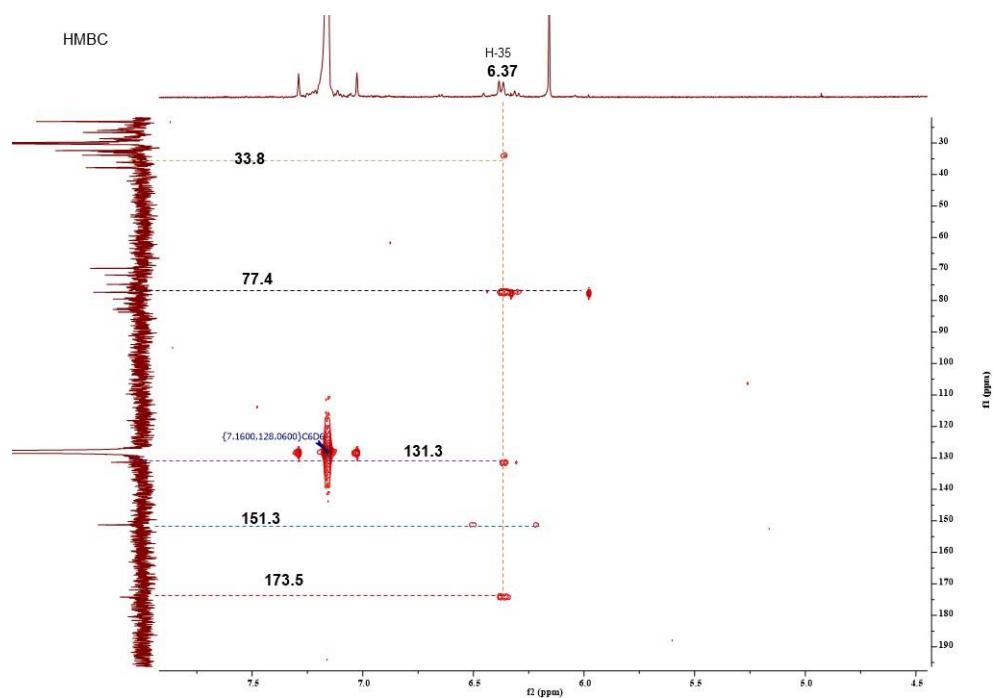


Figura 4.59. Experimentos de HMBC da acetogenina **3** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

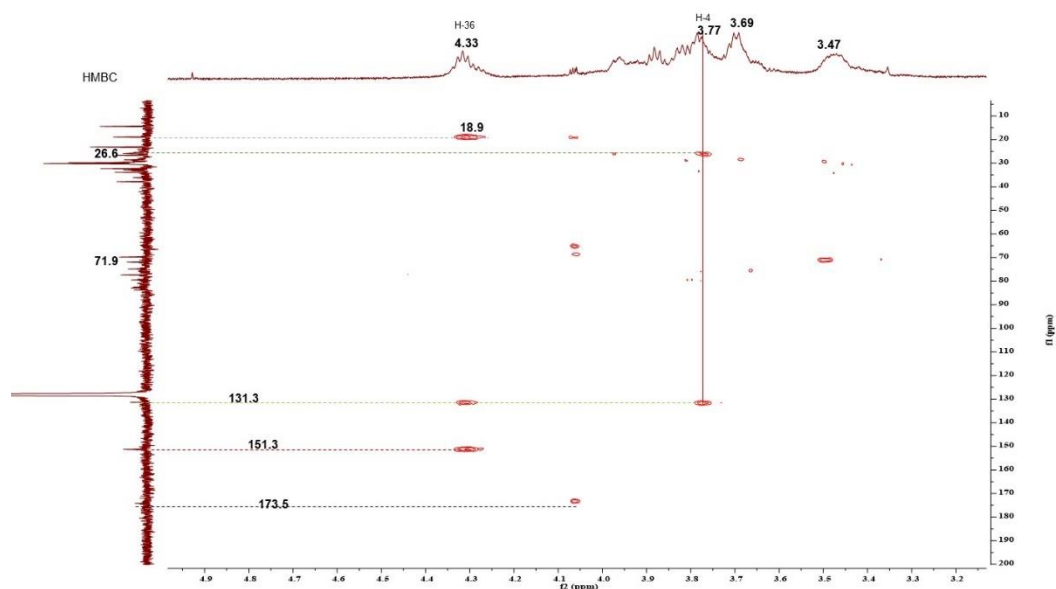


Figura 4.60. Experimentos de HMBC da acetogenina **3** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

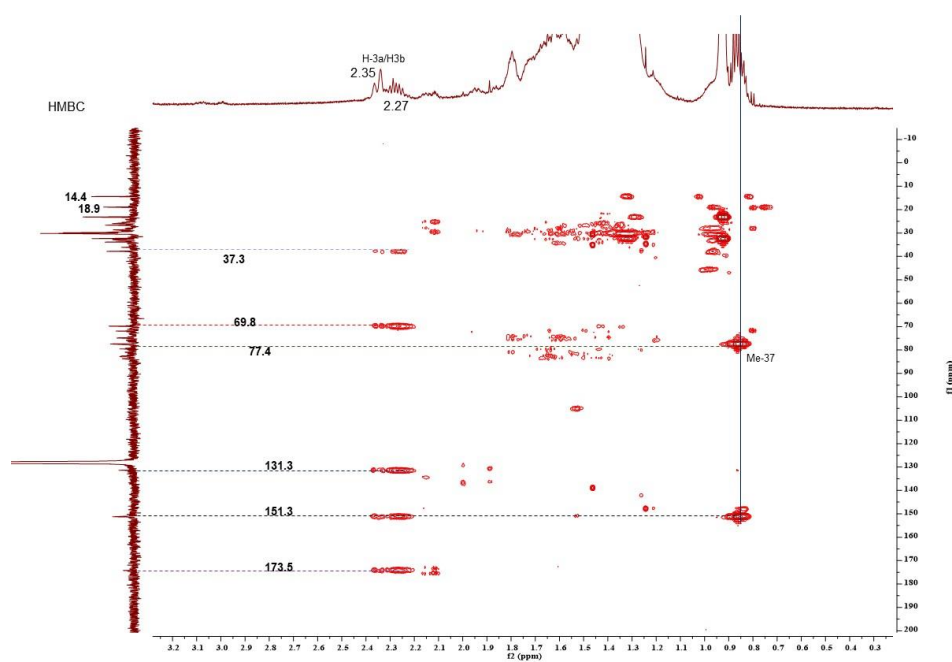


Figura 4.61. Experimentos de HMBC da acetogenina **3** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

Espectros com melhores resoluções e um experimento HSQC-TOCSY e J-Resolved serão obtidos para confirmar as atribuições de RMN citadas em vermelho na Tabela 4.9, assim como aquelas sem atribuição.

Os mesmos comentamos nas discussões da acetogenina **1** e **2** são válidos aqui, ou seja, as diferenças entre as acetogeninas **1-3** estão nas estereoquímicas dos anéis tetraidrofuranos e mesmo dos carbonos hidroxilados. A lactona e parte da cadeia lateral até o carbono C-5 os dados são muito similares àqueles da acetogenina **1**, sugerindo esta unidade na acetogenina **2** e **3** serem iguais àquela em **1**.

Tabela 4.8. Dados de RMN da acetogenina 3 em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>

Carbono	RMN <sup>1</sup> H	HSQC		HSQC	HMBC
	Acetogenina 1	Acetogenina 1	Acetogenina 3		
1		174.6		173.5	
2		131.7		131.3	
3	2.33 ddt, <i>J</i> = 14.5, 3.4, 1.5 2.25 ddt, <i>J</i> = 14.5, 8.1, 1.4	34.1 ou 34.2	2.35 m, 2,27 m	33.8	173.5, 151.3, 131.3, 69.8, 37.3
4	3.76 m	70.1	3.77 m	69.8	131.3, 26.6
5	1.43 m, 1.38 m	38.1		37.3	
6	~1.3-1.5 m	26.3		26.6	
7					
8					
9					
10					
11	1.60 m	30.8			
12	3.78 m	79.8	3.96	79.4	
13	1.72m, 1.27 m	32.7			
14	1.67 m, 1.47 m	28.9			
15	3.74 m	82.7	3.69	82.2	
16	3.43 m	75.0	3.65	74.8	
17	1.58 m, 1.36 m	36.4			
18	2.00 m, 1.74 m	32.4			
19	3.48 ddd <i>J</i> = 7.1, 6.3, 2.6	74.6	3.47	74.7	
20	3.85 m	83.1	3.79	82.6	
21	1.98 m, 1.76 m	29.3			
22	2.12 m e 1.56 m	24.8			
23	3.89 td, <i>J</i> = 7.2 e 2.3 Hz	83.9	3.88 m	83.4	
24	4.03 ddd, <i>J</i> = 8.9, 4.4, 2.3	73.1	3.97 m	71.9	

25	1.48 m, 1.30 m	34.1 ou 34.2			
26	1.68-136 m	26.9 ou 27.0			
27	1.8-1.3 (HSQC)	30.6			
28					
29					
30					
31	1.4-1.27 (HSQC)	30.5			
32	1.4-1.27 (HSQC)	32.4- 32.7			
33	1.33 m	23.5			
34	0.92 t, $J = 7.0$	14.7	0.93	14.4	
35	6.31 dd, $J = 2.5$ , 1.4	151.7	6.37	151.3	173.5, 151.3, 131.3, 77.4, 33.8
36	4.28 qdd, $J = 6.3$ , 2.5, 1.5	77.8	4.33	77.4	151.3, 131.3, 18.9
37	0.84 d, $J = 6.3$	19.3	0.87	18.9	151.3, 77.4

#### 4.3.4. Identificação estrutural da Acetogenina 4

A amostra contendo a acetogenina 4 foi analisada por “Ultra Performance Liquid Chromatography on a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS)” no modo positivo de ionização, fornecendo  $[M+H]^+ = 623.4859$ , correspondendo a  $C_{37}H_{66}O_7 + H^+$  (Figura. 4.64).

O espectro de massas mostra íons fragmentos correspondentes à perda de hidroxilas ( $H_2O$ ) secundária,  $m/z = 605, 587, 569, 551$ , e  $533$ .

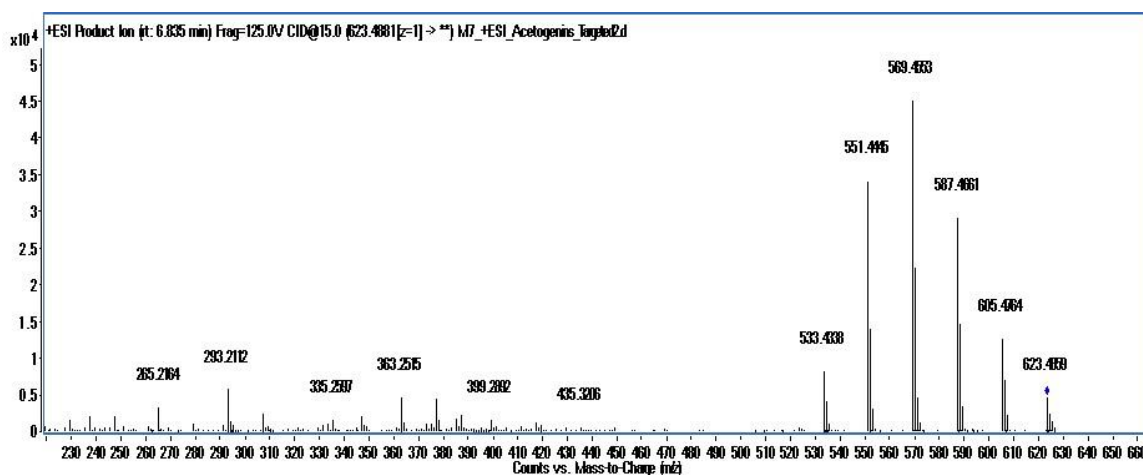
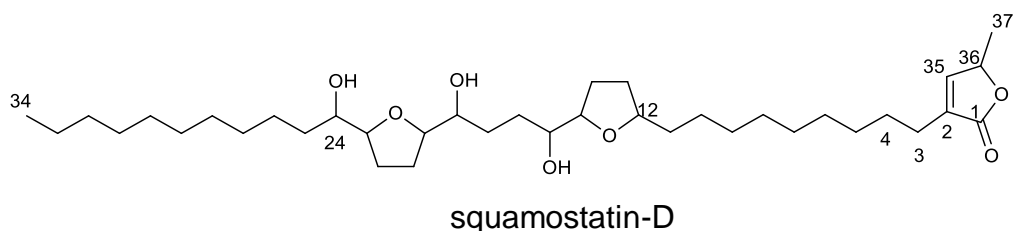


Figura 4.62. Espectro de massas da acetogenina 4, no modo positivo de ionização.

As análises dessa amostra por RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC, e HMBC mostraram dados muito semelhantes àqueles das acetogeninas **1-3**, exceto pela ausência do sinal que permitiu atribuir uma hidroxila em C-4 nestas acetogeninas. Os espectros de RMN  $^1\text{H}$  mostra o sinal de 2H-3 como um tripleto em  $\delta$  2.12, ou seja, não mais como em **1-3** devido à ausência de uma hidroxila em C-4. O HSQC mostra este sinal se correlacionando com o deslocamento em  $\delta$  25.6.

O HMBC permitiu confirmar as atribuições dos sinais de H-35 em  $\delta$  6.19 ( $\delta_{\text{C}}$  148.6, HSQC) devido às suas correlações com os sinais em  $\delta$  173.3 (C-1), 134.2 (C-2), 76.9 (C-36); H-36 em  $\delta$  4.37 m, pois este se correlacionou com os sinais em  $\delta$  173.3 (C-1), 148.6 (C-35), 134.2 (C-2) e 19.1, permitindo atribuir este último à Me-37; os 2H-3 em  $\delta$  2.12, os quais se correlacionaram com os sinais  $\delta$  173.3 (C-1), 148.6 (C-35) 134.2 (C-2). Todos estes dados, assim como aqueles da EM indicam a acetogenina **4** como a estrutura abaixo, a qual também já é conhecida na literatura como squamostatín-D (Fujimoto et al. (1994).



Os mesmos comentários nas discussões da acetogenina **1** e **3** são válidos aqui, ou seja, os dados não nos permitem comentar sobre as estereoquímicas dos anéis tetrahydrofuranos e mesmo dos carbonos hidroxilados. A lactona e parte da cadeia lateral até o carbono C-3 os dados são muito similares àqueles das acetogeninas **1-3**. Espectros com melhores resoluções e um experimento HSQC-TOCSY e J-Resolved serão obtidos para confirmar as atribuições de RMN citadas acima e na Tabela 4.9.



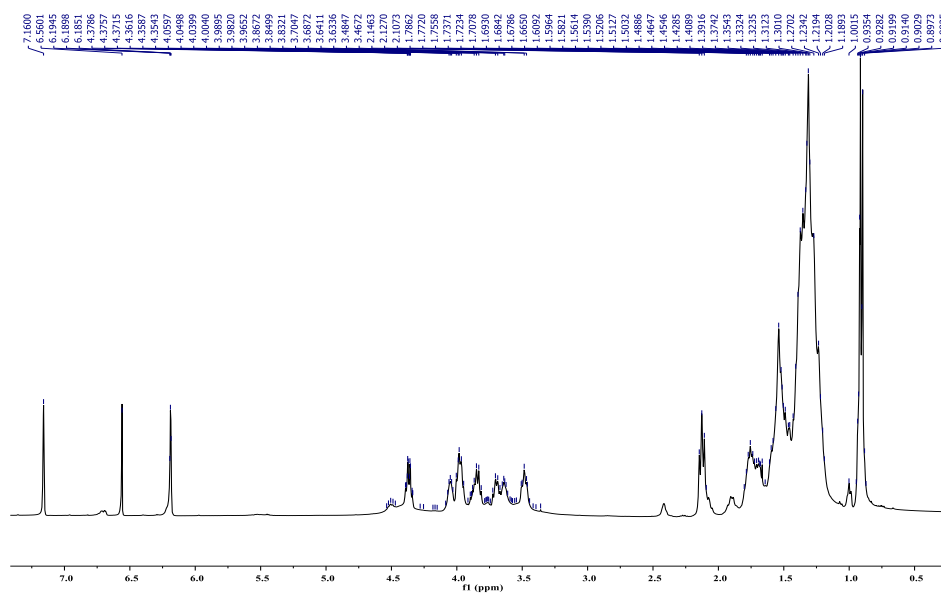


Figura 4.63. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acetogenina **4** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

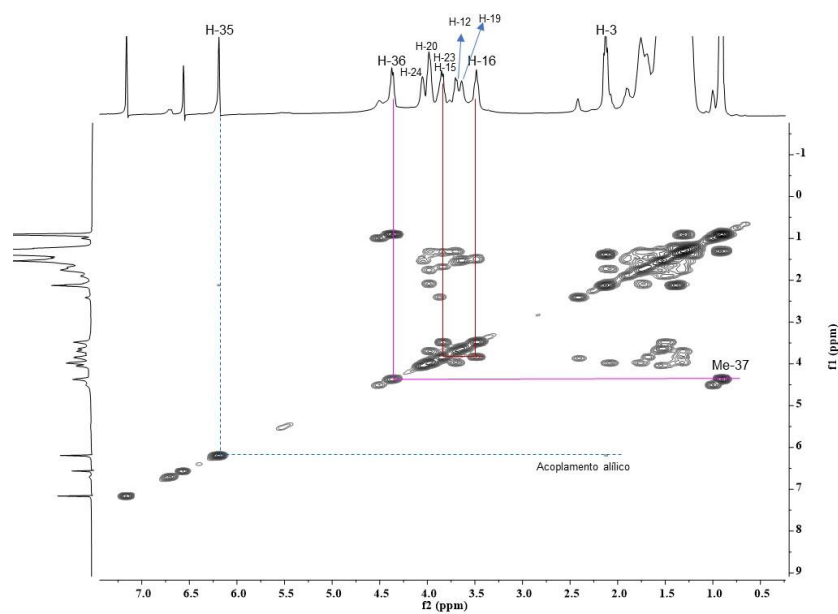


Figura 4.64. Experimentos de COSY da acetogenina **4** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

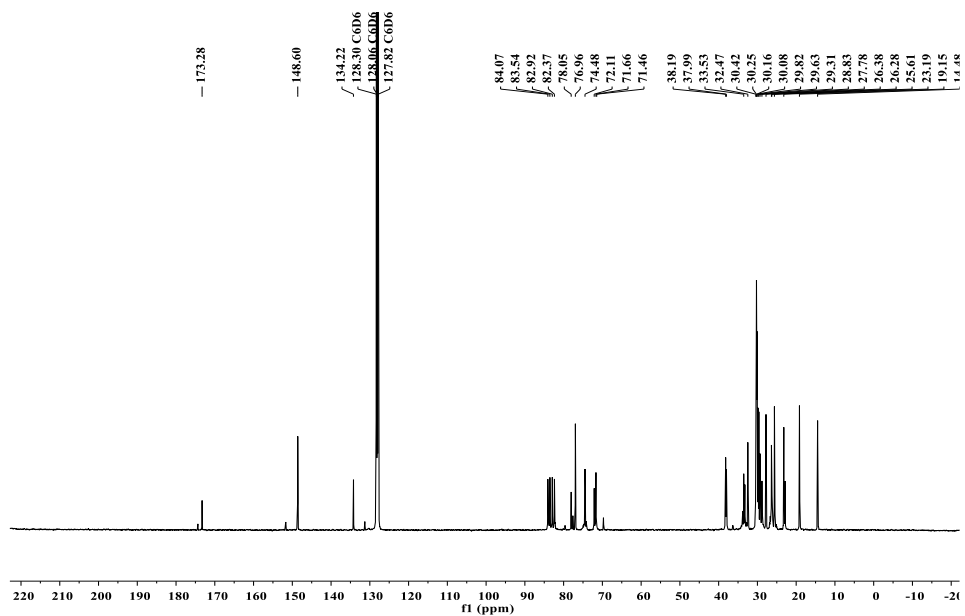


Figura 4.65. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da acetogenina 4 (125 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

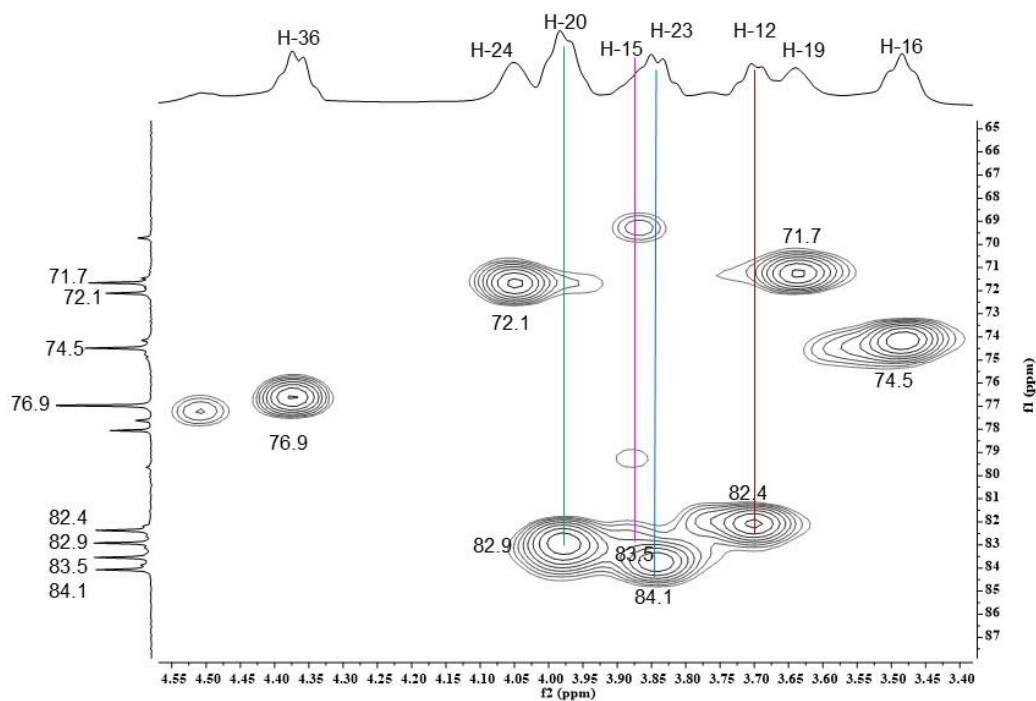


Figura 4.66. Experimentos de HSQC da acetogenina 4 (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

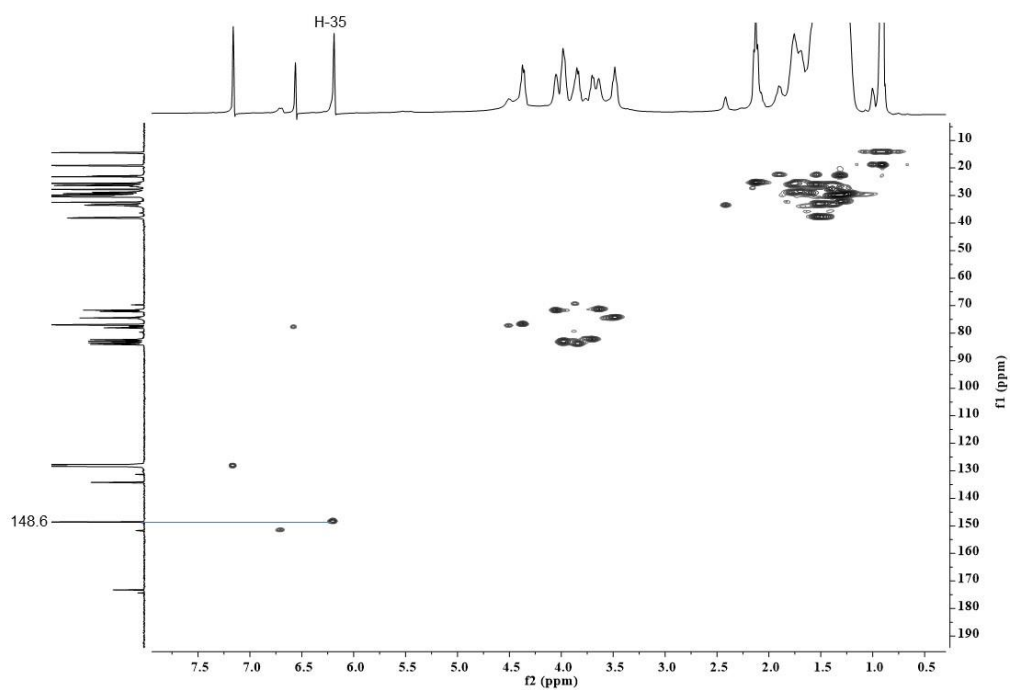


Figura 4.67. Experimentos de HSQC da acetogenina 4 (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ), ampliação.

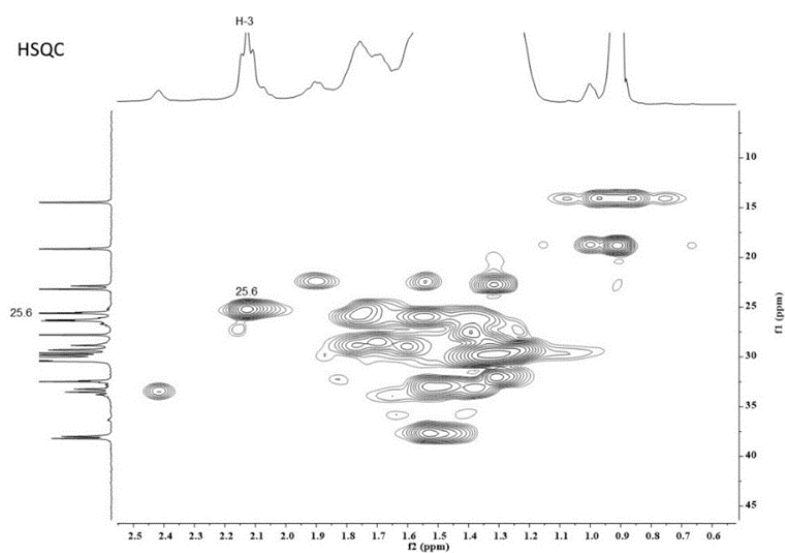


Figura 4.68. Experimentos de HSQC da acetogenina 4 (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ), ampliação.

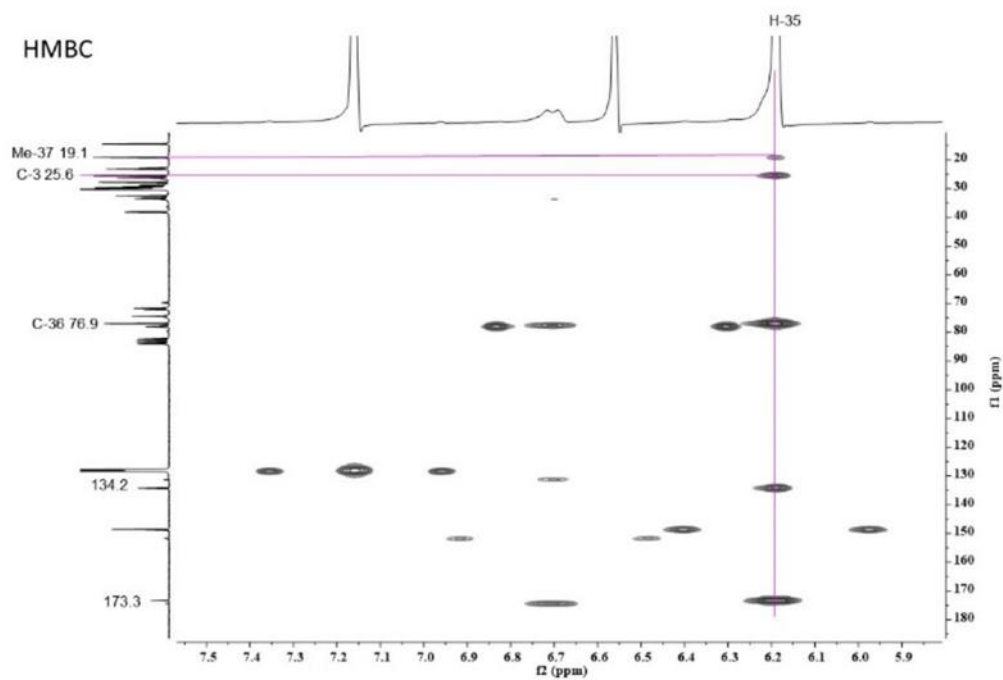


Figura 4.69. Experimentos de HMBC da acetogenina **4** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

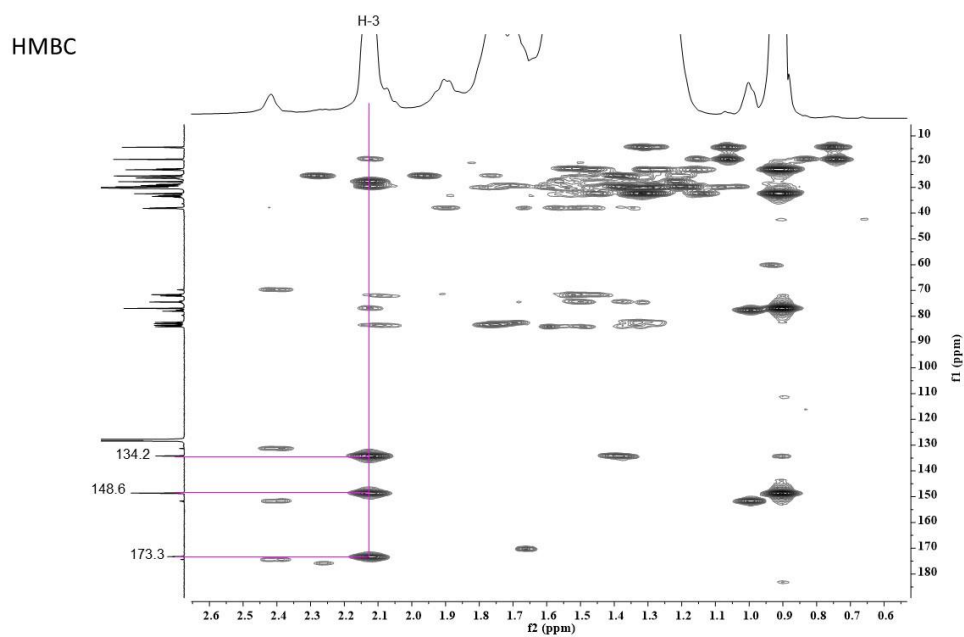


Figura 4.70. Experimentos de HMBC da acetogenina **4** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

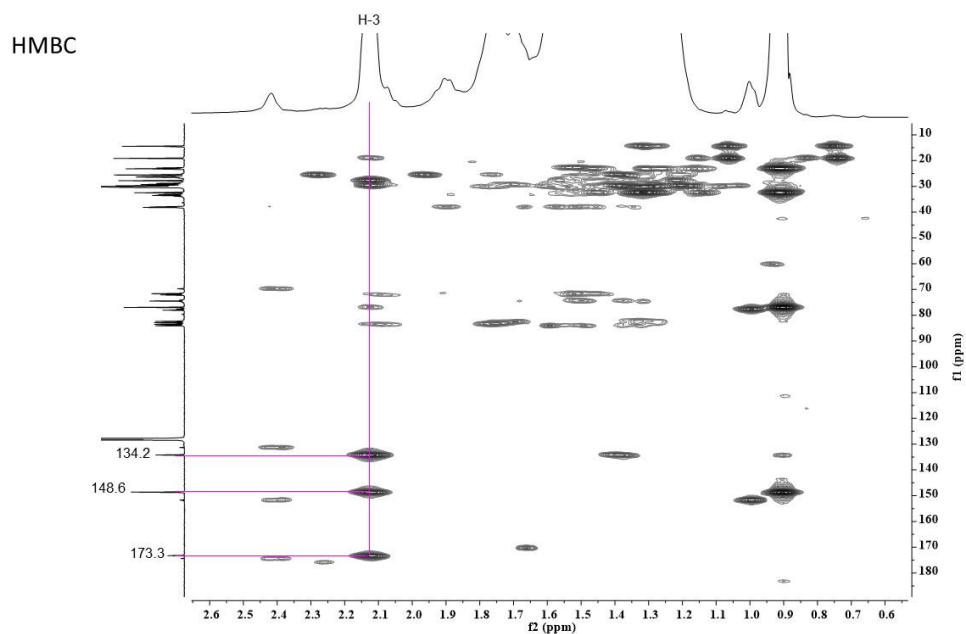


Figura 4.71. Experimentos de HMBC da acetogenina 4 (500 MHz,  $C_6D_6$ ), ampliação.

Tabela 4.9. Dados de RMN da acetogenina 4 em  $C_6D_6$

Carbono	RMN $^1H$	HSQC	RMN		HMBC
			$^1H$	HSQC	
	Acetogenina 1	Acetogenina 1	Acetogenina 4		
1		174.6		173.3	
2		131.7		134.2	
3	2.33 ddt, $J = 14.5$ , 3.4, 1.5 2.25 ddt, $J = 14.5$ , 8.1, 1.4	34.1 ou 34.2	2.12 tl	25.6	173.3, 148.6, 134.2
4	3.76 m	70.1			
5	1.43 m, 1.38 m	38.1			
6	~1.3-1.5 m	26.3			
7					
8					
9					
10					
11	1.60 m	30.8			
12	3.78 m	79.8	3.70 m	82.4	
13	1.72m, 1.27 m	32.7			
14	1.67 m, 1.47 m	28.9			
15	3.74 m	82.7	3.86 m	83.5	
16	3.43 m	75.0	3.49 m	74.5	
17	1.58 m, 1.36 m	36.4			
18	2.00 m, 1.74 m	32.4			
19	3.48 ddd $J = 7.1$ ,	74.6	3.65 m	71.7	

	6.3, 2.6				
20	3.85 m	83.1	4.04 m	82.9	
21	1.98 m, 1.76 m	29.3			
22	2.12 m e 1.56 m	24.8			
23	3.89 td, $J = 7.2$ e 2.3 Hz	83.9	3.86 m	84.1	
24	4.03 ddd, $J = 8.9$ , 4.4, 2.3	73.1	4.37 m	72.1	
25	1.48 m, 1.30 m	34.1 ou 34.2			
26	1.68-136 m	26.9 ou 27.0			
27	1.8-1.3 (HSQC)	30.6			
28					
29					
30					
31	1.4-1.27 (HSQC)	30.5			
32	1.4-1.27 (HSQC)	32.4-32.7			
33	1.33 m	23.5			
34	0.92 t, $J = 7.0$	14.7	0.91 m	14.5	
35	6.31 dd, $J = 2.5, 1.4$	151.7	6.19 m	148.6	173.3, 134.2, 76.9
36	4.28 qdd, $J = 6.3, 2.5, 1.5$	77.8	4.37 m	76.9	173.3, 148.6, 134.2, 19.1
37	0.84 d, $J = 6.3$	19.3	0.93 d	19.1	

#### 4.3.5. Identificação da primeira mistura de Acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3

Uma amostra contendo acetogeninas, mostrou na realidade ser uma mistura da acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3**. Os espectros abaixo deixam claro a presença da acetogenina **4** em um percentual um pouco maior que um dos isômeros das acetogeninas **1-3**. Em todos os experimentos fica claro a presença do sinal de 2H-3 não diastereotópicos e estes como diastereotópicos acoplado com o sinal de H-4 hidroxilado nas acetogeninas isômero de **1** a **3**. Os experimentos de COSY e HSQC, confirmam esta mistura, dispensando maiores discussões. Ver as discussões na próxima mistura a seguir, na qual os experimentos de HMBC garantiram a presença da acetogenina **4** e um dos isômeros de **1-3**. Esta mistura provavelmente teve separação cromatográfica da próxima porque não necessariamente um dos isômeros de **1-3** é o mesmo que está presente na seguinte.

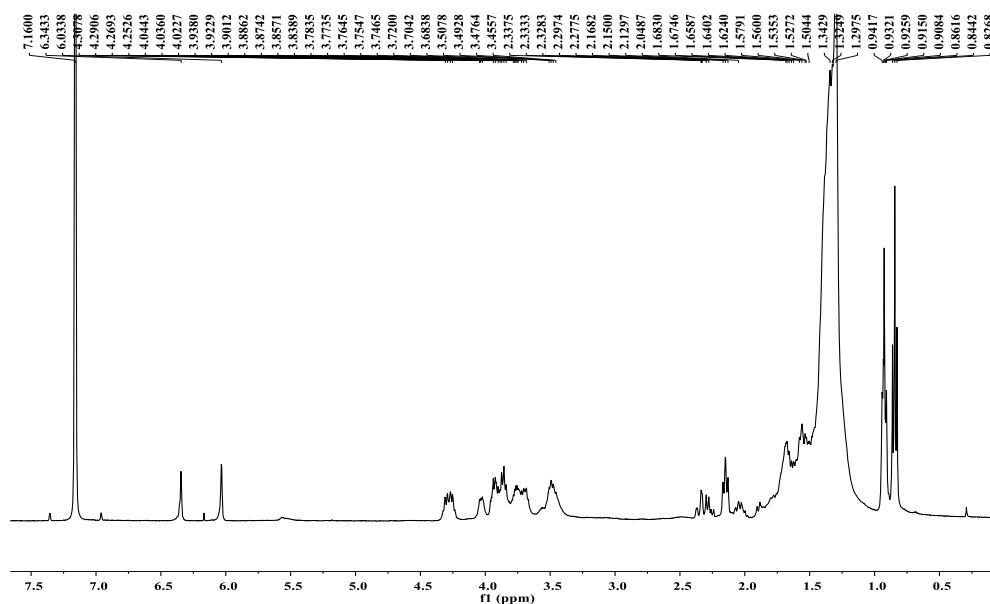


Figura 4.72. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da mistura da acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

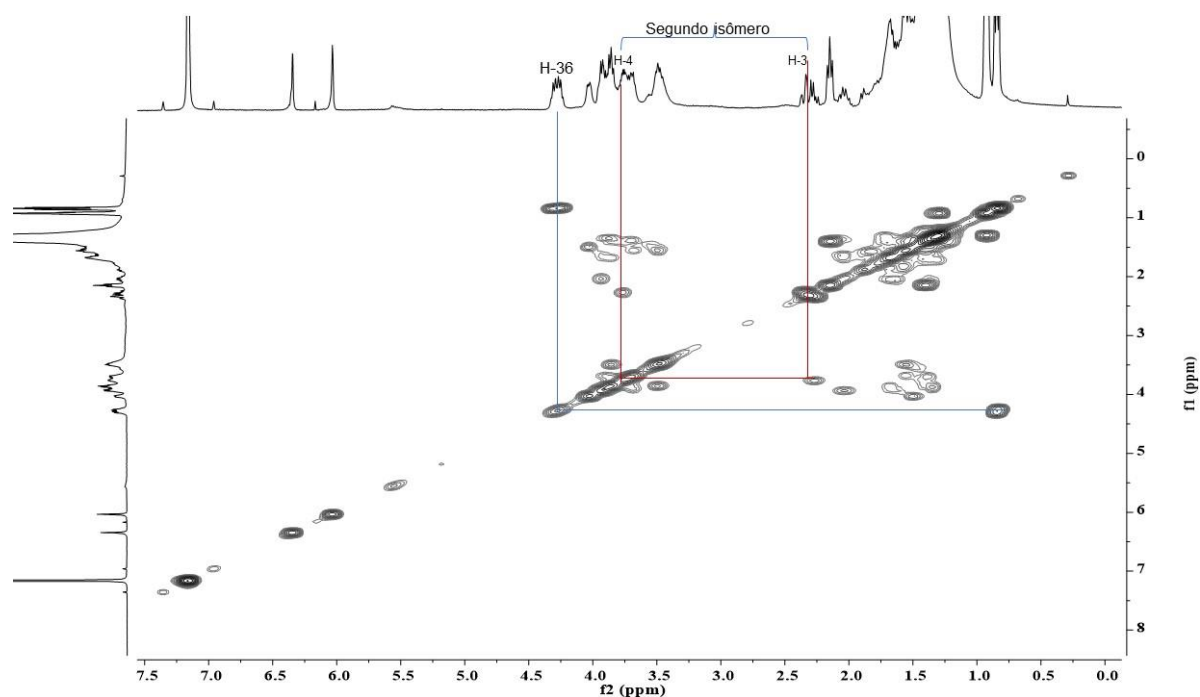


Figura 4.73. Experimentos de COSY da mistura de acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

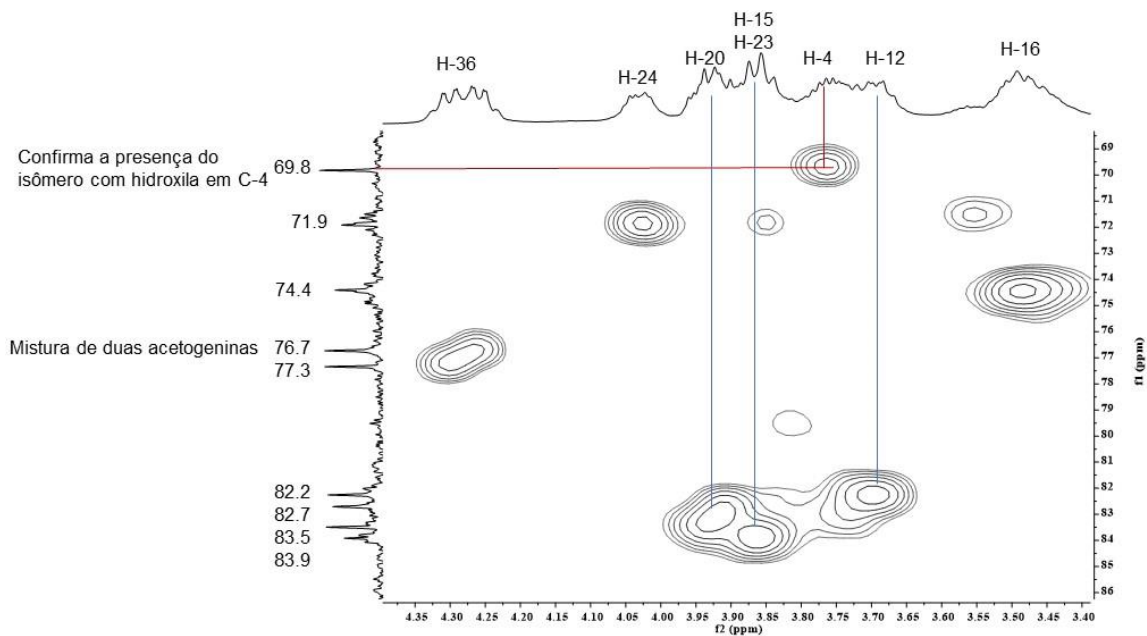


Figura 4.74. Experimentos de HSQC da mistura de acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz,  $C_6D_6$ ), ampliação.

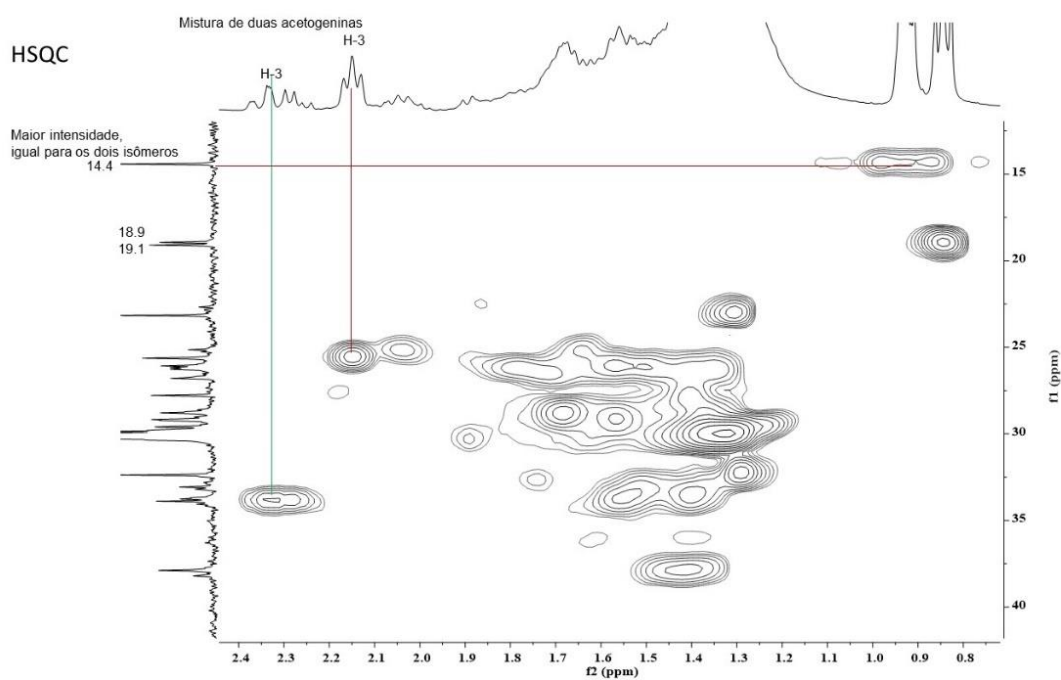


Figura 4.75. Experimentos de HSQC da mistura de acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz,  $C_6D_6$ ), ampliação.



#### 4.3.6. Identificação da segunda mistura de Acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3

Uma amostra contendo acetogeninas, mostrou na realidade ser uma mistura da acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3**. Os experimentos de COSY e HSQC, confirmam esta mistura, dispensando maiores discussões. O HMBC confirma a mistura, mostrando o sinal de 2H-3 em  $\delta$  2.15 t correlacionando com os sinais em  $\delta$  134.2 (C-2), 151.2 (C-35), 174.1 (C-1); o H-3a em  $\delta$  2.34 e H-3b em 2.27 correlacionando com os sinais em  $\delta$  69.8  $^1J$ , 131.4 (C-2), 148.2 (C-35), 173.1 (C-1). Estas correlações só existem se tivermos duas acetogeninas.

Estas acetogeninas são muito similares, levando a propriedades físicas próximas, o que não levou a uma separação cromatográfica, eluindo as duas juntas. Como os isômeros de **1-4** foram separados e estudados, não foi necessário tentar a separação entre estes.

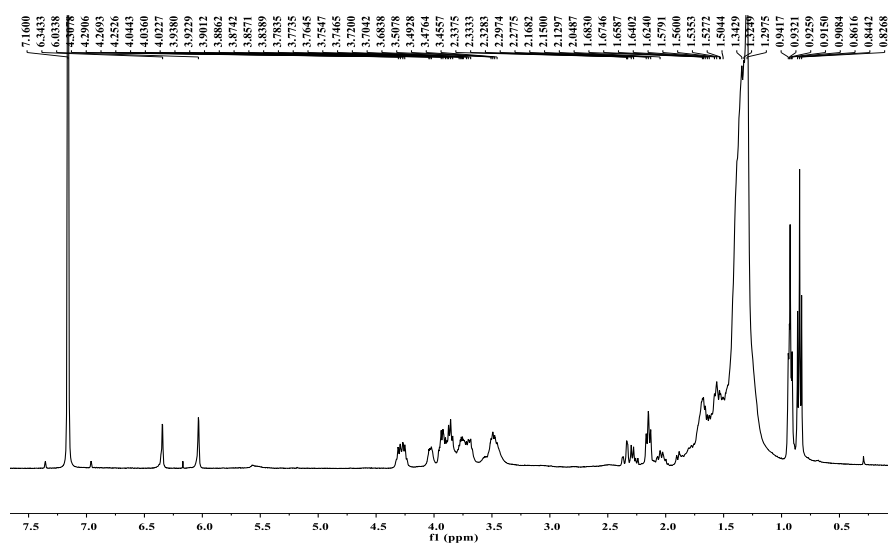


Figura 4.76. Espectro de RMN  $^1H$  da mistura da acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

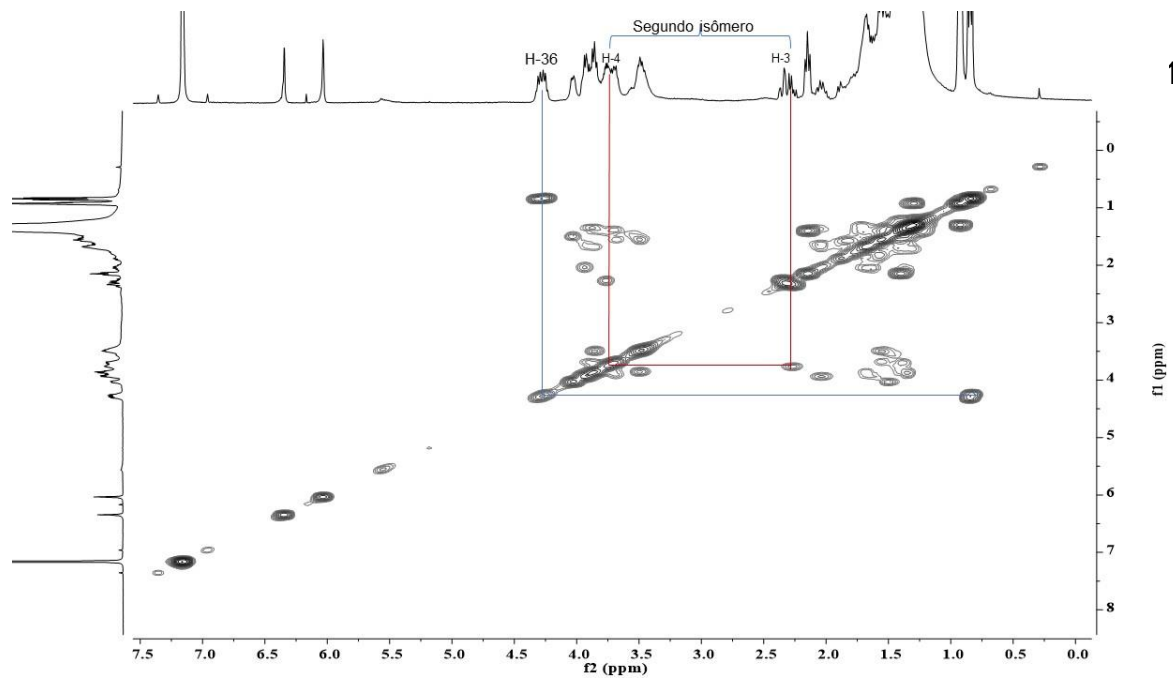


Figura 4.77. Experimentos de COSY da mistura de acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

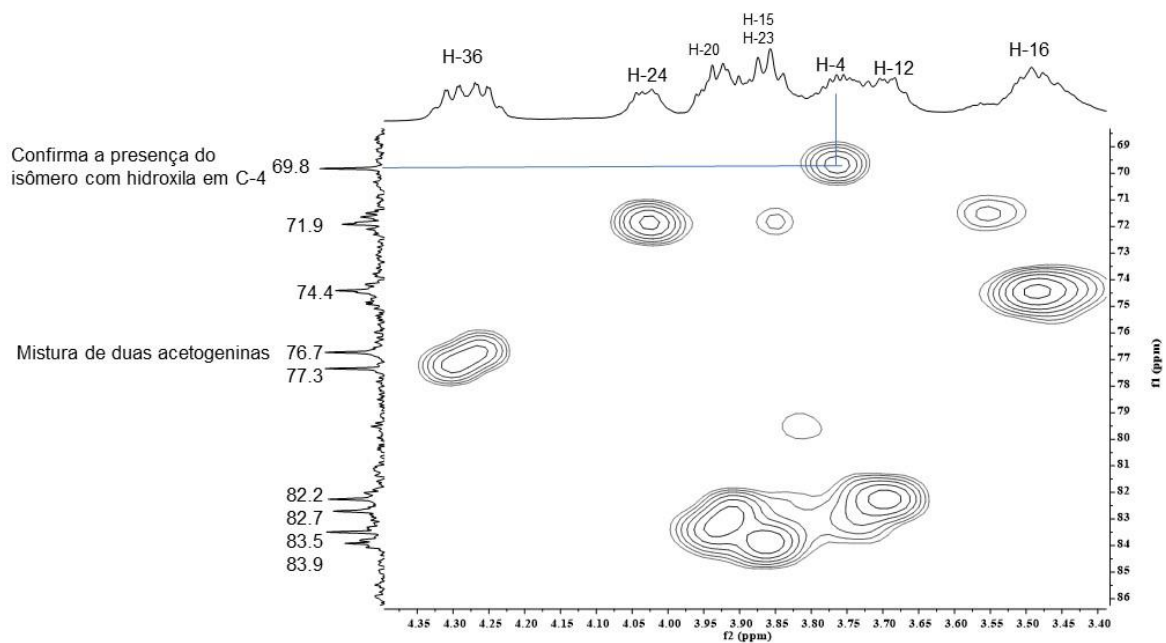


Figura 4.78. Experimentos de HSQC da mistura de acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

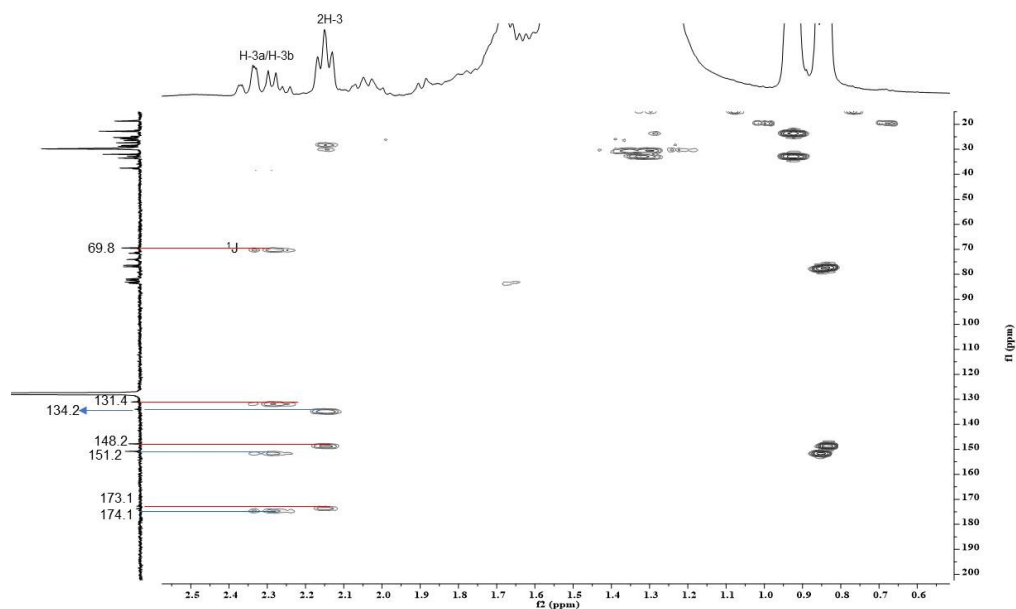


Figura 4.79. Experimentos de HSQC da mistura de acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ), ampliação.

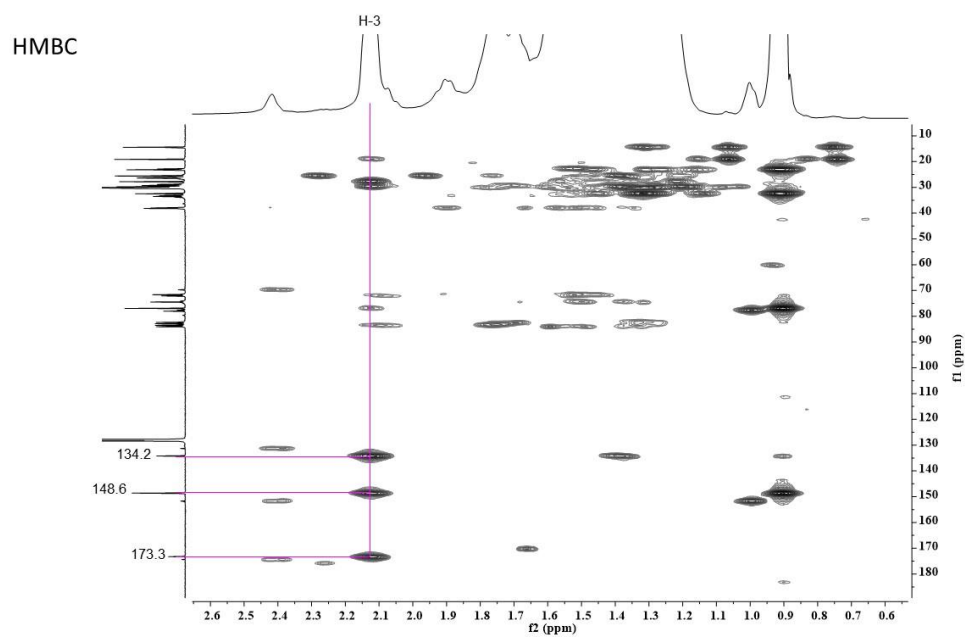


Figura 4.80. Experimentos de HMBC da mistura de acetogenina **4** e um dos isômeros das acetogeninas **1-3** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ), ampliação.

#### 4.3.7. Identificação da terceira mistura de Acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3

Novamente, os experimentos de HMBC confirmam a mistura da acetogenina **4** e um dos isômeros de **1-3**. O HMBC mostrou o sinal de 2H-3 em  $\delta$  2.15 t correlacionando com os sinais em  $\delta$  131.4 (C-2), 151.1 (C-35), 174.0 (C-1); o H-3a em  $\delta$  2.34 e H-3b em 2.25 correlacionando com os sinais em  $\delta$  69.8  $^1J$ , 131.3 (C-2), 152.3 (C-35), 174.1 (C-1). Estas correlações só existem se tivermos duas acetogeninas.

Como comentado acima, estas acetogeninas são muito similares, levando a propriedades físicas próximas, o que não levou a uma separação cromatográfica, eluindo as duas juntas. A terceira mistura sugere exatamente cada uma ter um dos isômeros de **1-3** mais o **4**.

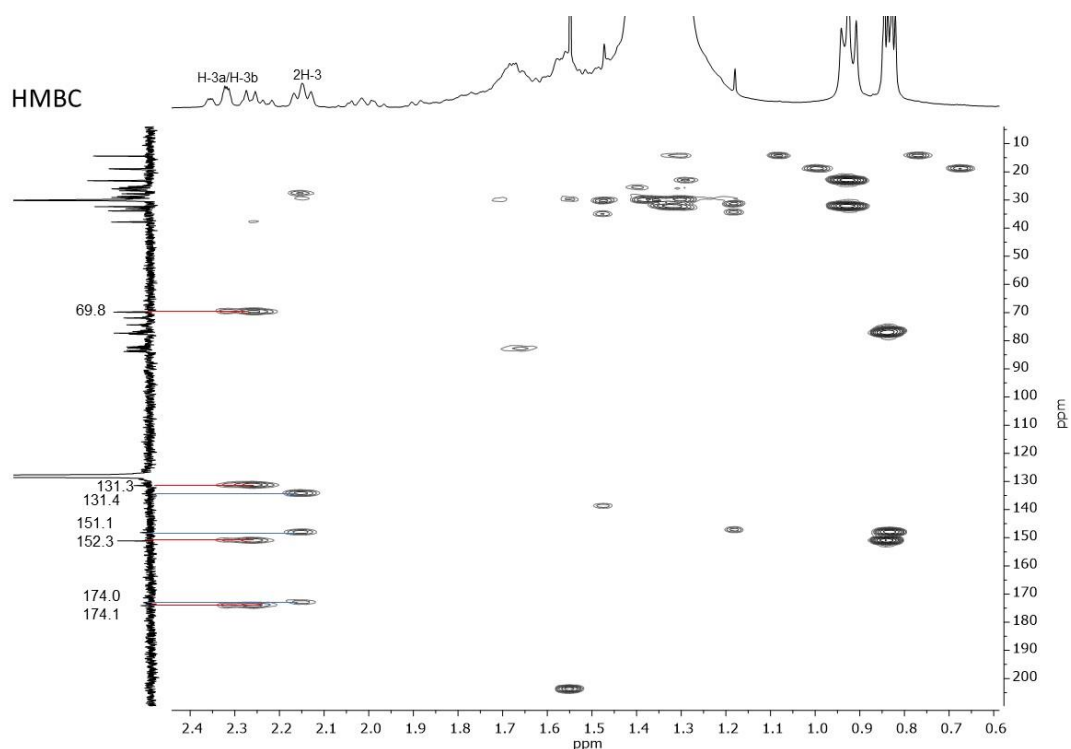


Figura 4.81. Experimentos de HMBC da mistura de acetogenina 4 e um dos isômeros das acetogeninas 1-3 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

### 4.3.8. Identificação da Acetogenina 5

A amostra contendo a acetogenina **5** foi analisada por “Ultra Performance Liquid Chromatography on a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS)” no modo positivo de ionização, fornecendo  $[M+H]^+ = 623.4867$ , correspondendo a  $C_{37}H_{66}O_7 + H^+$  (Figura. 4.3.4.1).

O espectro de massas mostra íons fragmentos correspondentes à perda de hidroxilas ( $H_2O$ ) secundaria,  $m/z = 605, 587, 569, 551, e 533$ .

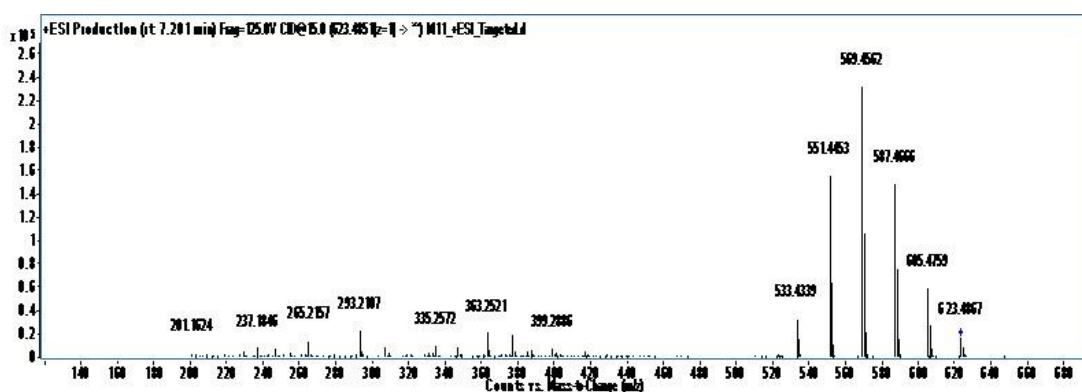


Figura 4.82. Espectro de massas da acetogenina **5**, no modo positivo de ionização.

As análises dessa amostra por RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, HSQC, e HMBC mostraram dados muito semelhantes àqueles da acetogenina **4**. Os espectros de RMN  $^1H$  mostra o sinal de 2H-3 como um tripleto em  $\delta$  2.14 tl. O HSQC mostra este sinal se correlacionando com o deslocamento em  $\delta$  25.6.

O HMBC permitiu confirmar as atribuições dos sinais de H-35 em  $\delta$  6.06 ( $\delta_c$  148.2, HSQC) devido às suas correlações com os sinais em  $\delta$  173.1 (C-1), 134.5 (C-2), 76.8 (C-36); H-36 em  $\delta$  4.28 dt ( $J = 6.8; 1.8$ ) pois este se correlacionou com os sinais em  $\delta$  148.2 (C-35), 134.5 (C-2) e 19.1, permitindo atribuir este último à Me-37; os 2H-3 em  $\delta$  2.14, os quais se correlacionaram com os sinais  $\delta$  173.1 (C-1), 148.2 (C-35) 134.5 (C-2). Todos estes dados, assim como aqueles da EM indicam a acetogenina **5** um isômero da **4**, como a estrutura abaixo, a qual também já é conhecida na literatura como squamostatina-D (Fujimoto et al. (1994). Os dados mostram deslocamento próximos, mas distintos, confirmando a proposta de isômero (Tabela 4.11.). O experimento de COSY permitiu traçar os acoplamentos comuns de acetogeninas, mas aqueles característicos dos anéis tetraidrofuranos não foi possível, contudo, pode ser verificado que os deslocamentos químicos dos

respectivos sinais são um pouco diferentes daqueles do isômero **4**

Os mesmos comentamos nas discussões da acetogenina **1-4** são válidos aqui, ou seja, os dados não nos permitem comentar sobre as estereoquímicas dos anéis tetraidrofuranos e mesmo dos carbonos hidroxilados. A lactona e parte da cadeia lateral até o carbono C-3 os dados são muito similares àqueles das acetogeninas **1-4**. Espectros com melhores resoluções e um experimento HSQC-TOCSY e J-Resolved serão obtidos para confirmar as atribuições de RMN citadas acima e na tabela 4.11

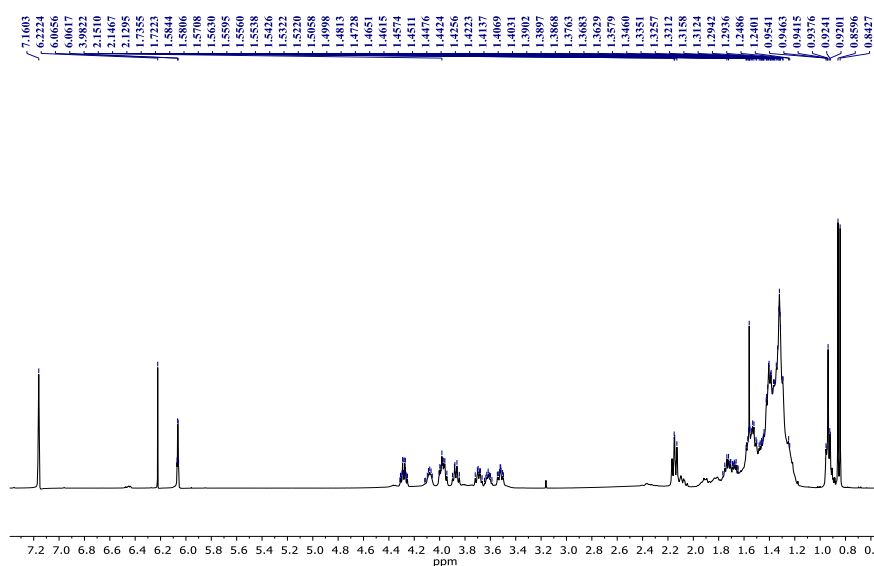


Figura 4.83. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da acetogenina **5** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

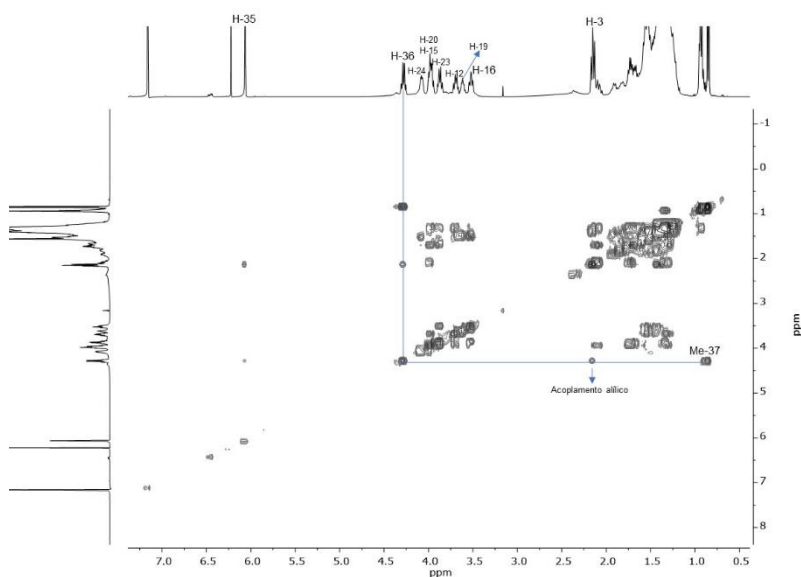


Figura 4.84. Experimentos de COSY da acetogenina **5** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

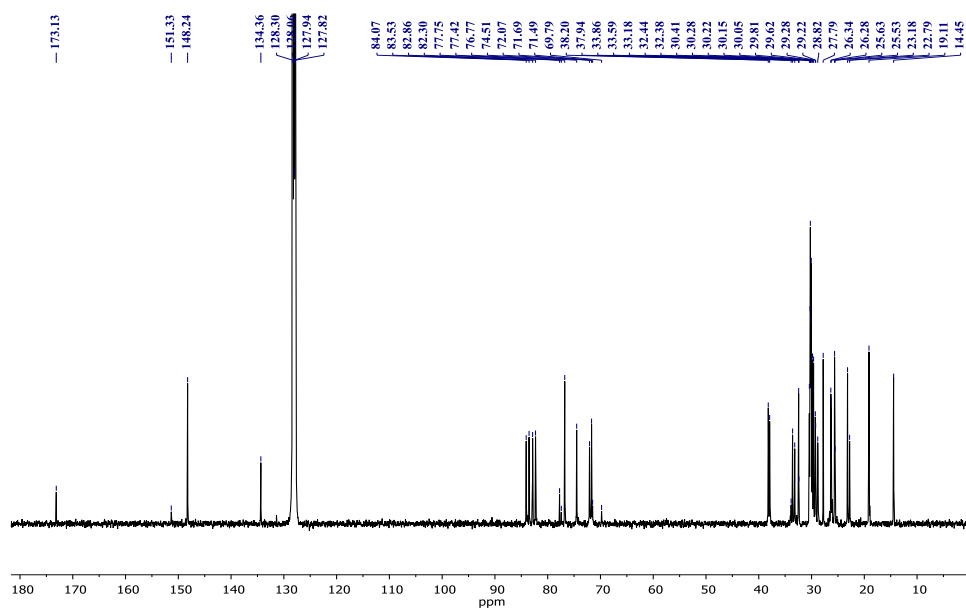


Figura 4.85. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da acetogenina **5** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

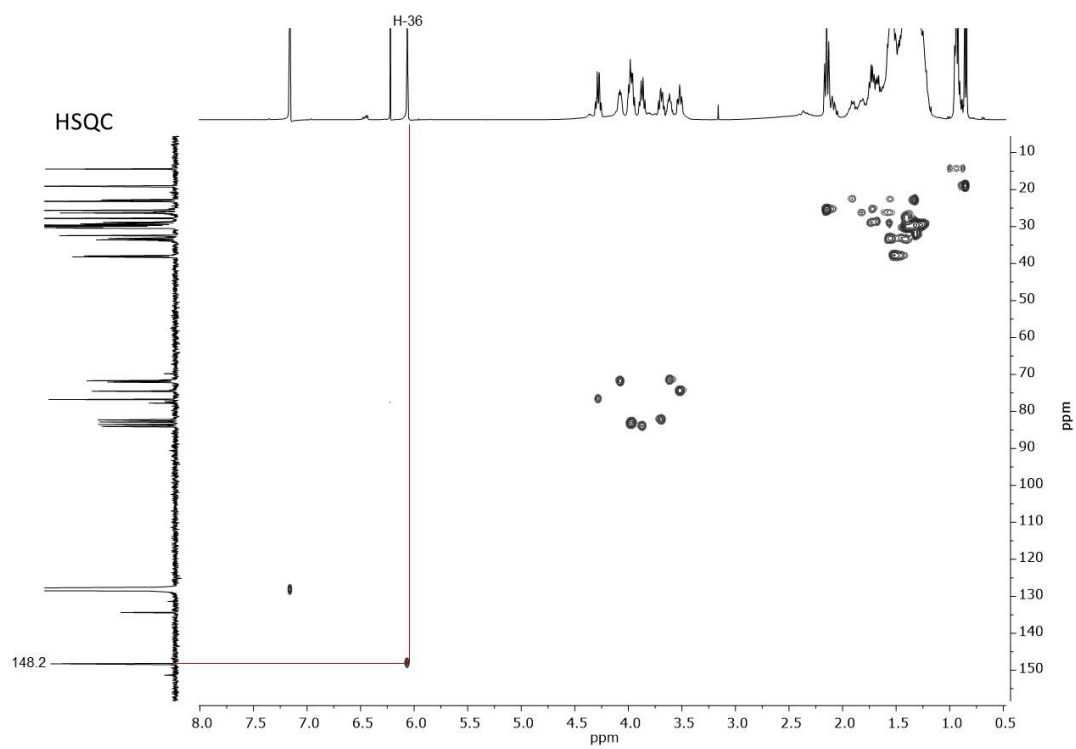


Figura 4.86. Experimentos de HSQC da acetogenina **5** (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ).

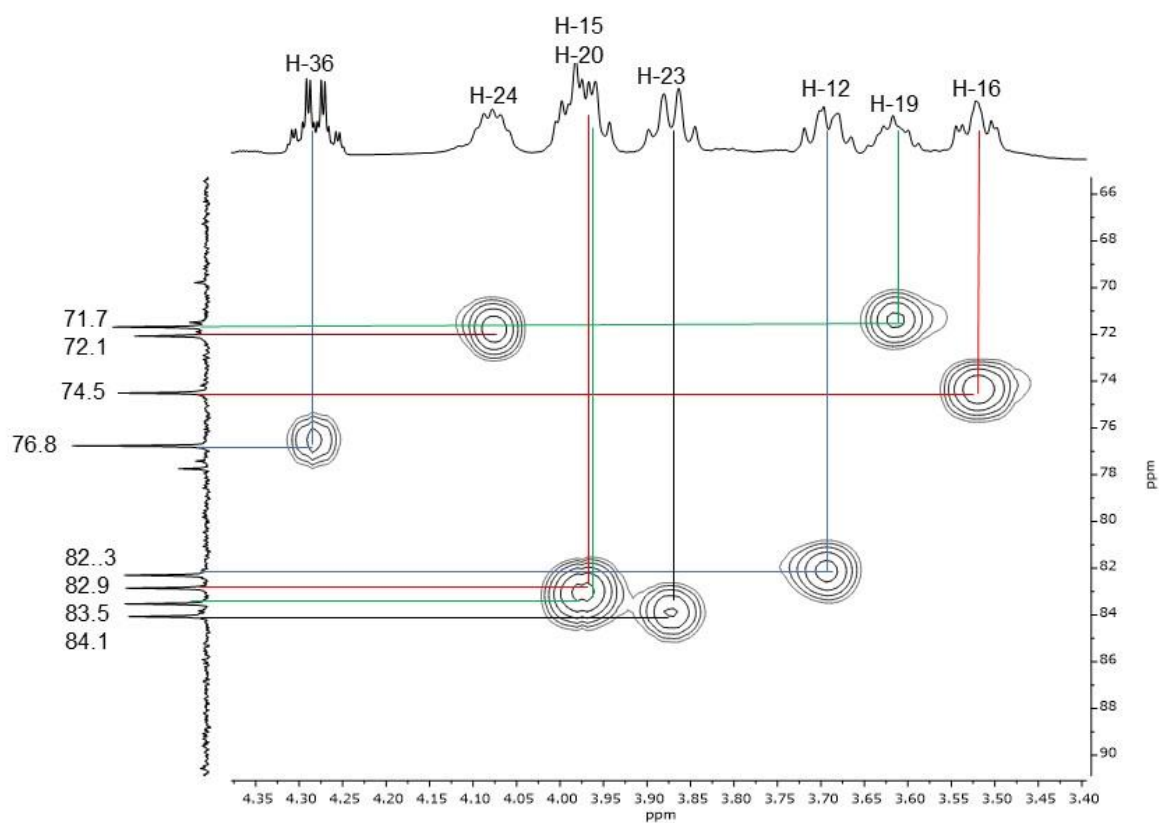


Figura 4.87. Experimentos de HSQC da acetogenina **5** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

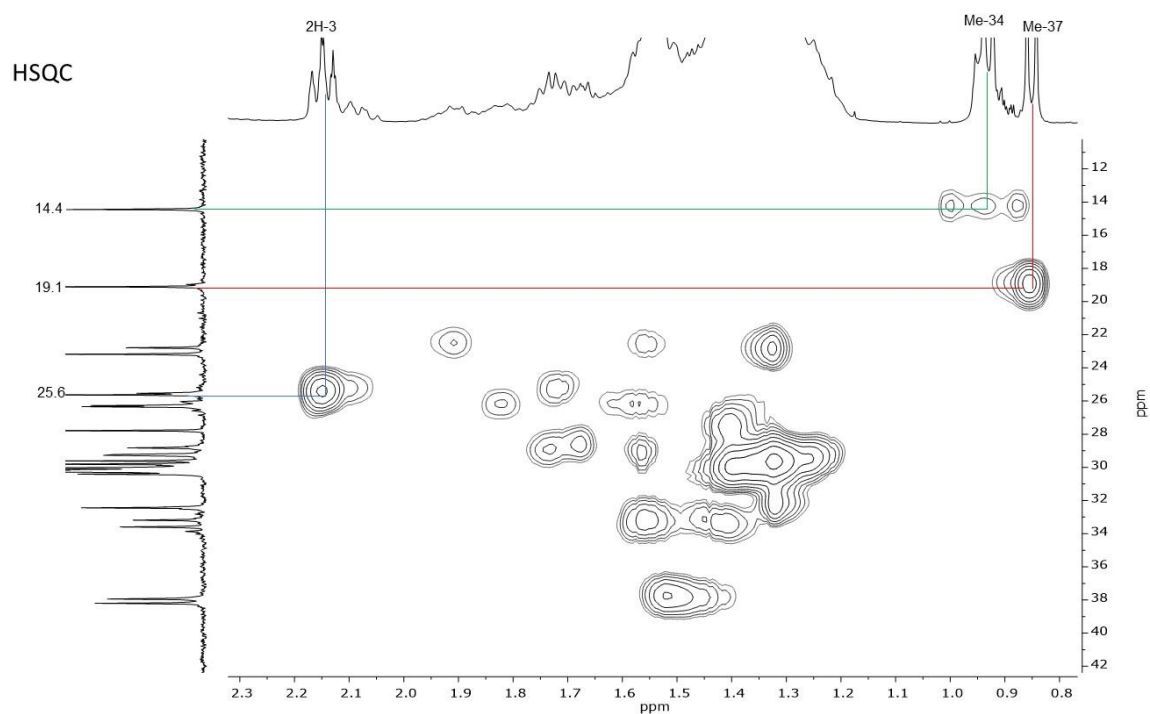


Figura 4.88. Experimentos de HSQC da acetogenina **5** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.



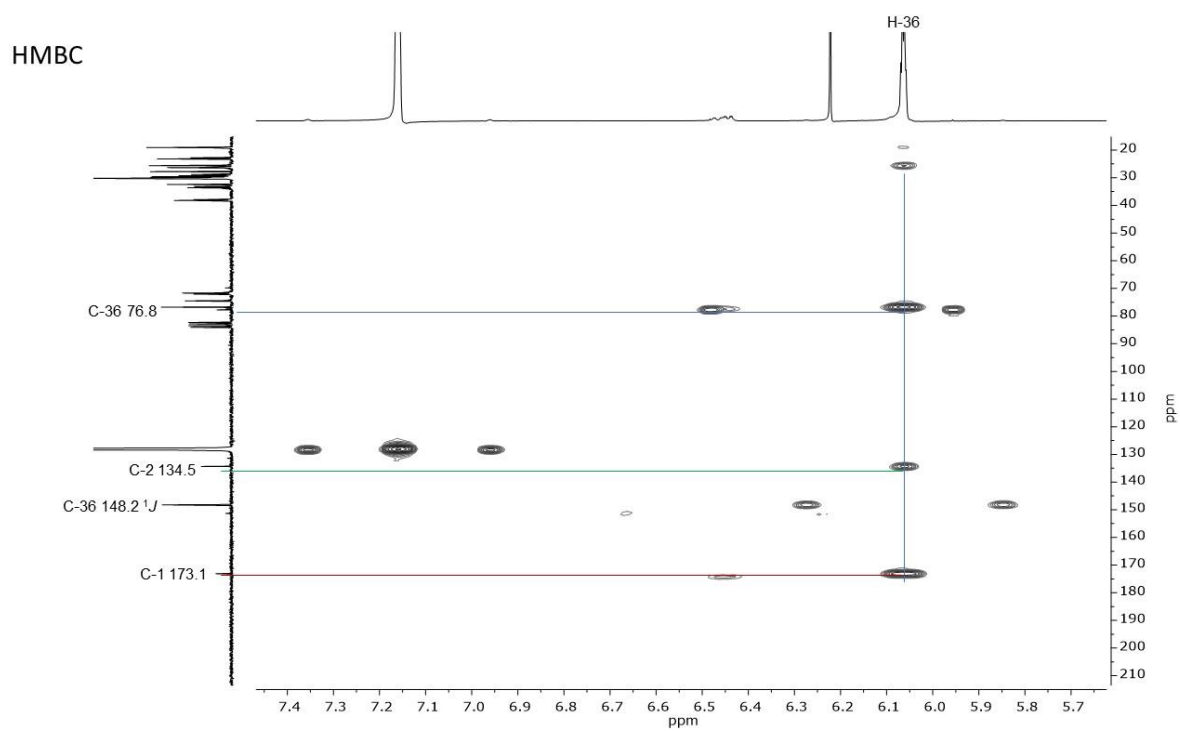


Figura 4.89. Experimentos de HMBC da acetogenina 5 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

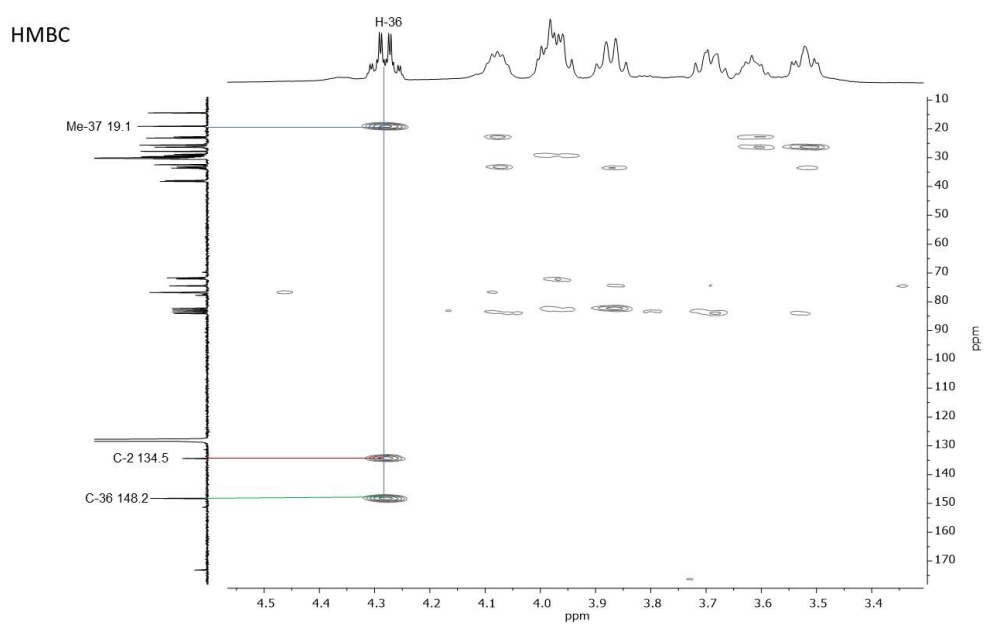


Figura 4.90. Experimentos de HMBC da acetogenina 5 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

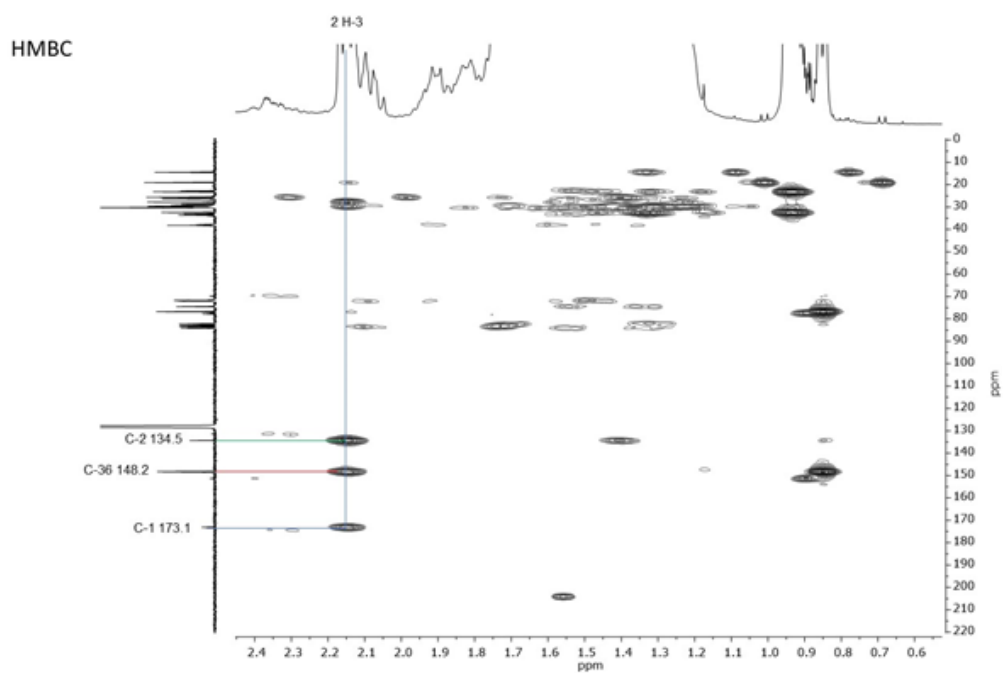


Figura 4.91. Experimentos de HMBC da acetogenina **5** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

Tabela 4.12. Dados de RMN da acetogenina 5 em C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>

Carbono	RMN <sup>1</sup> H	HSQC	RMN <sup>1</sup> H	HSQC	RMN <sup>1</sup> H	HSQC	HMBC
	Acetogenina 1	Acetogenina 1	Acetogenina 4	Acetogenina 4	Acetogenina 5		
1		174.6		173.3		173.1	
2		131.7		134.2		134.5	
3	2.33 ddt, $J = 14.5, 3.4, 1.5$ 2.25 ddt, $J = 14.5, 8.1, 1.4$	34.1 ou 34.2	2.12 tl	25.6	2.14 tl	25.6	173.1, 148.2, 134.5
4	3.76 m	70.1					
5	1.43 m, 1.38 m	38.1					
6	~1.3-1.5 m	26.3					
7							
8							
9							
10							
11	1.60 m	30.8					
12	3.78 m	79.8	3.70 m	82.4	3.69 m	82.3	
13	1.72m, 1.27 m	32.7					
14	1.67 m, 1.47 m	28.9					
15	3.74 m	82.7	3.86 m	83.5	3.98 m	82.9	
16	3.43 m	75.0	3.49 m	74.5	3.52 m	74.5	
17	1.58 m, 1.36 m	36.4					
18	2.00 m, 1.74 m	32.4					
19	3.48 ddd $J = 7.1, 6.3, 2.6$	74.6	3.65 m	71.7	3.63 m	71.7	
20	3.85 m	83.1	4.04 m	82.9	3.98 m	83.5	
21	1.98 m, 1.76 m	29.3					
22	2.12 m e 1.56 m	24.8					
23	3.89 td, $J = 7.2$ e 2.3 Hz	83.9	3.86 m	84.1	3.87 m	84.1	
24	4.03 ddd, $J = 8.9, 4.4, 2.3$	73.1	4.37 m	72.1	4.08 m	72.1	

25	1.48 m, 1.30 m	34.1 ou 34.2					
26	1.68-136 m	26.9 ou 27.0					
27	1.8-1.3 (HSQC)	30.6					
28							
29							
30							
31	1.4-1.27 (HSQC)	30.5					
32	1.4-1.27 (HSQC)	32.4-32.7					
33	1.33 m	23.5					
34	0.92 t, $J = 7.0$	14.7	0.91 m	14.5	0.94 t	14.4	
35	6.31 dd, $J = 2.5, 1.4$	151.7	6.19 m	148.6	6.06	148.2	173.1, 134.5, 76.8
36	4.28 qdd, $J = 6.3, 2.5, 1.5$	77.8	4.37 m	76.9	4.28 dt ( $J =$ 6.8., 1.8)	76.8	148.2, 134.5, 19.1
37	0.84 d, $J = 6.3$	19.3	0.93 d	19.1	0.85 d ( $J =$ 6.8)	19.1	

### 4.3.9. Identificação da Acetogenina 6

A amostra contendo a acetogenina **6** foi analisada por “Ultra Performance Liquid Chromatography on a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS)” no modo positivo de ionização, fornecendo  $[M-H]^+ = 579.4596$  correspondendo a  $C_{32}H_{51}O_9$  (Figura. 4.3.8.1).

O espectro de massas mostra íons fragmentos correspondentes à perda de hidroxilas ( $H_2O$ ) secundária,  $m/z = 561, 543, 525$ .

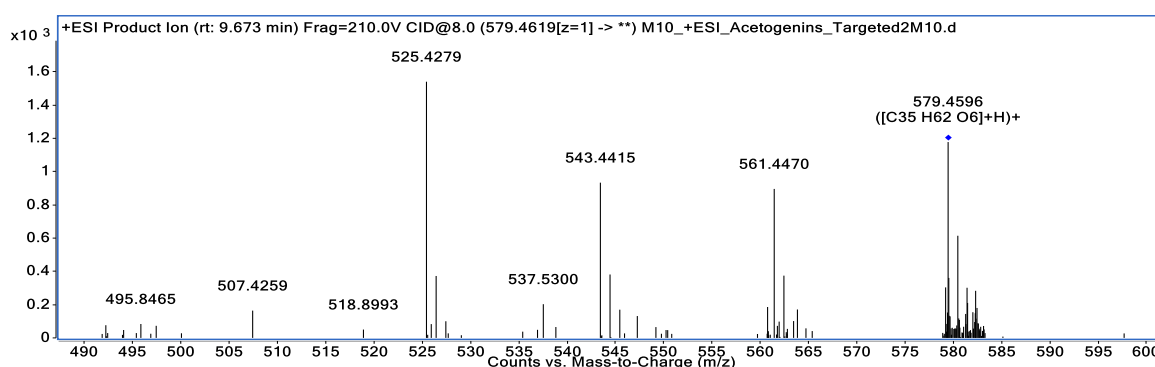
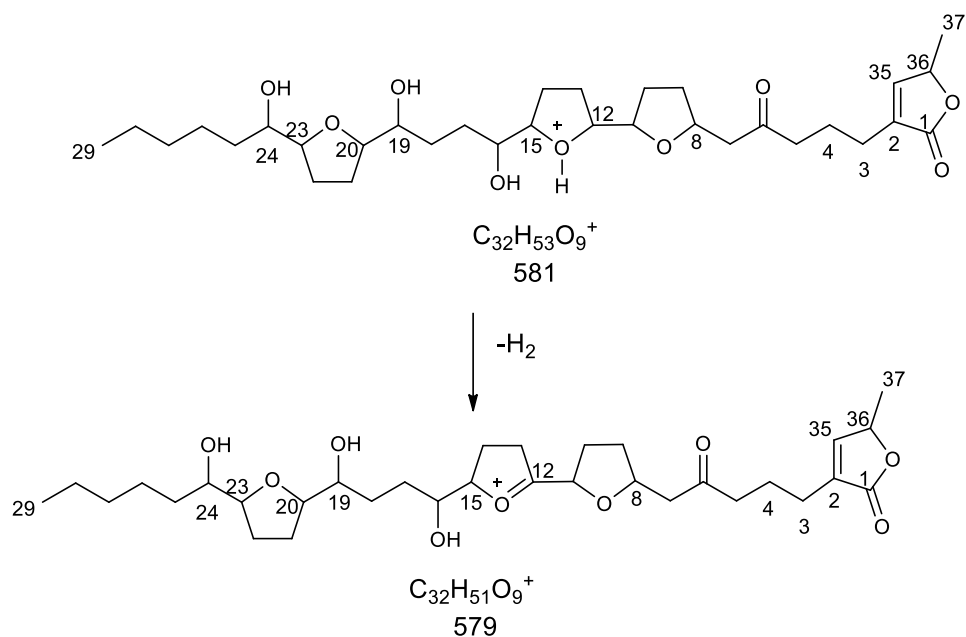


Figura 4.92. Espectro de massas da acetogenina **6**, no modo positivo de ionização.

As análises dessa amostra por RMN  $^{13}C$  e HSQC mostraram a presença de sinais para seis carbonos característicos de anéis tetraidrofuranos e três carbonos hidroxilados,  $\delta$  83.4, 83.7, 83.9, 82.4, 82.1, e 81.9 (THF);  $\delta$  74.4, 74.1, 71.9 (carbono hidroxilado). Estes dados sugerem três anéis THF, entre as três hidroxilas aquela em C-4 (comum nas acetogeninas discutidas anteriormente) está ausente, pois o espectro de RMN  $^1H$  mostrou o sinal de 2H-3 como um tripleto em  $\delta$  2.14 ( $\delta$  25.3, HSQC).

O HMBC permitiu confirmar as atribuições dos sinais de H-35 em  $\delta$  6.02 ( $\delta_c$  148.1, HSQC) devido às suas correlações com os sinais em  $\delta$  173.0 (C-1), 134.4 (C-2); H-36 ( $\delta_c$  76.7) em  $\delta$  4.24 m, pois este se correlacionou com o sinal em 19.1 referente à Me-37; os 2H-3 em  $\delta$  2.14, os quais se correlacionaram com os sinais  $\delta$  173.0 (C-1), 148.1 (C-35), 134.4 (C-2) e 76.7 (C-36).

Além destas correlações comuns nas acetogeninas contendo a  $\gamma$ -metil-lactona  $\alpha,\beta$ -insaturada, o HMBC mostrou uma correlação de um sinal em  $\delta$  1.44 s com o sinal de uma carbonila em  $\delta$  205, sugerindo uma carbonila na molécula, a qual permitiu entender os dados do EM. A molécula deve ter sido protonado em um de seus anéis THF e perdido  $H_2$  levando ao  $m/z$  579, como mostra a proposta abaixo para a acetogenina **6**.



Todas as correlações nos experimentos de HSQC e HMBC mostrados abaixo confirmam a estrutura acima para a acetogenina **6**, contudo, espectros com melhores resoluções e um experimento HSQC-TOCSY e J-Resolved serão obtidos para confirmar a estrutura proposta.

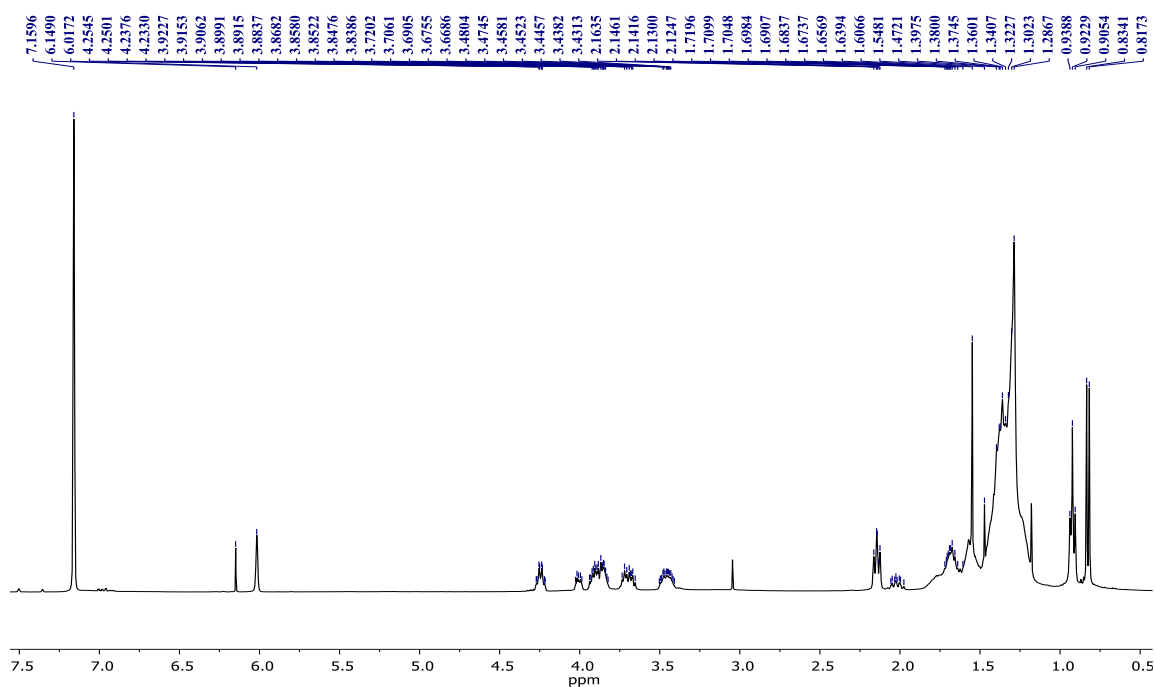


Figura 4.93. Espectro de RMN  $^1H$  da acetogenina **6** (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

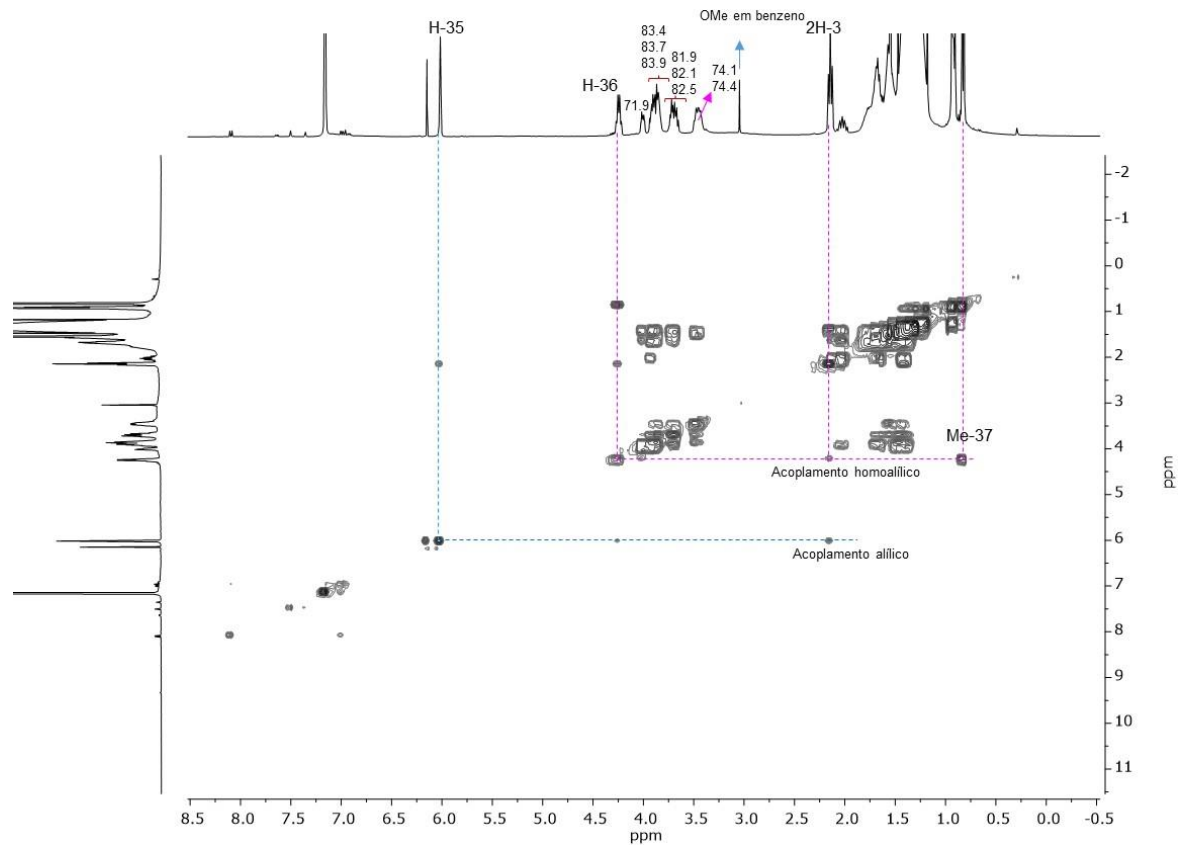


Figura 4.94. Experimentos de COSY da acetogenina **6** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

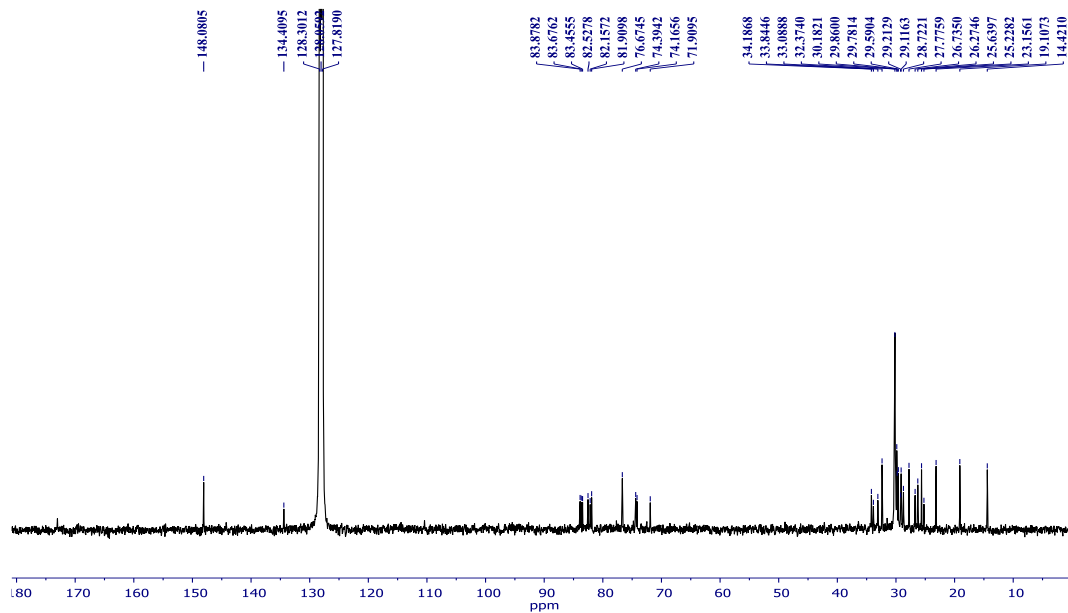


Figura 4.95. Espectro de RMN <sup>13</sup>C da acetogenina **6** (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>).

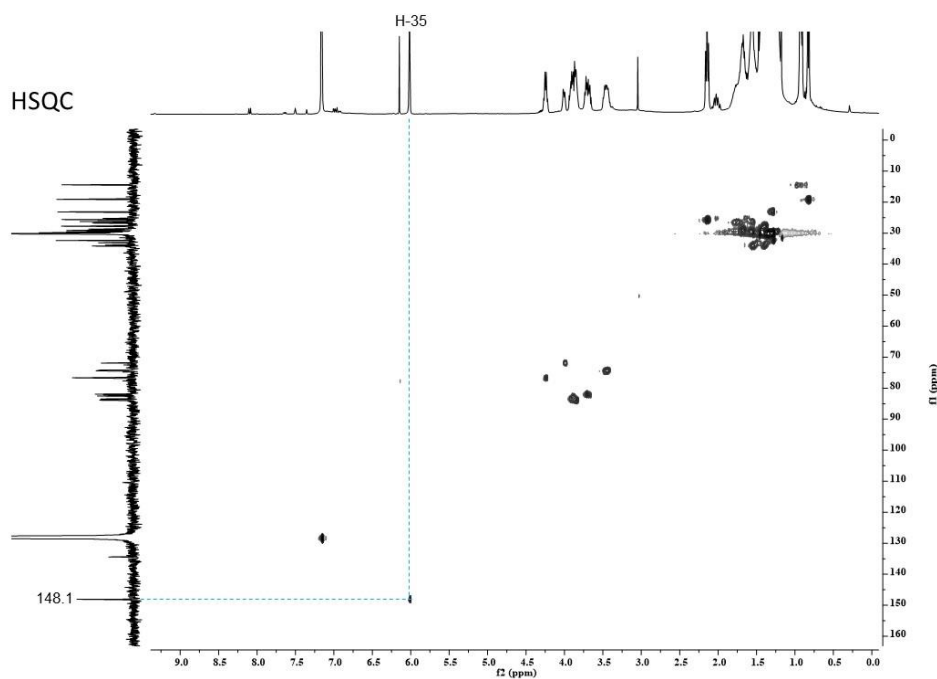


Figura 4.96. Experimentos de HSQC da acetogenina **6** (500 MHz,  $C_6D_6$ ).

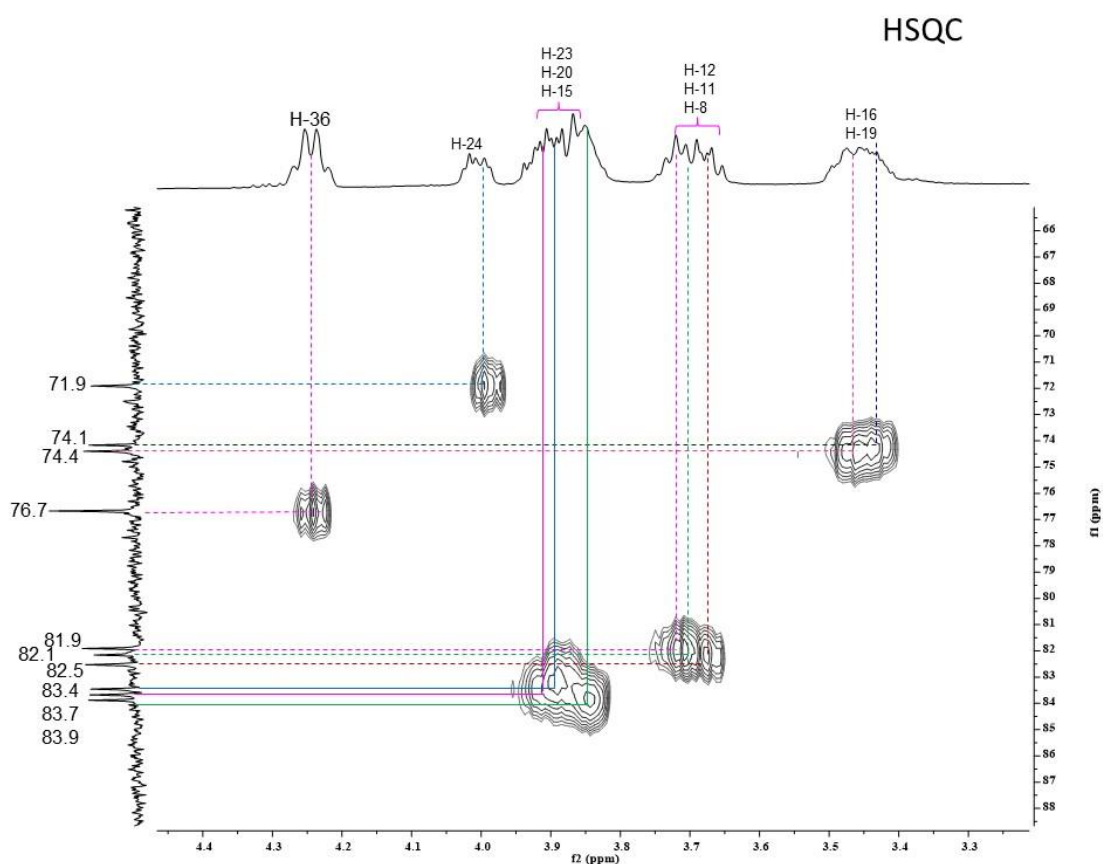


Figura 4.97. Experimentos de HSQC da acetogenina **6** (500 MHz,  $C_6D_6$ ), ampliação.



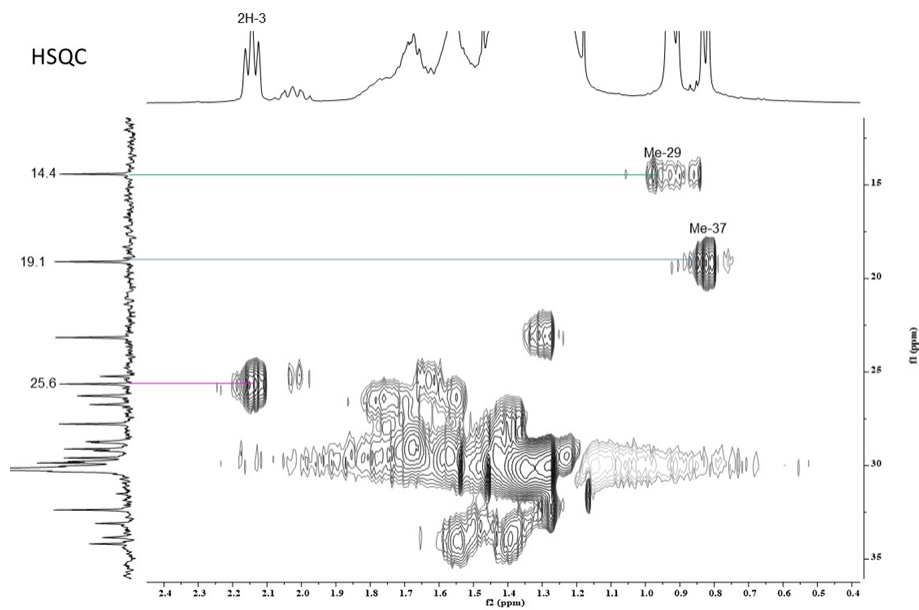


Figura 4.98. Experimentos de HSQC da acetogenina 6 (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ), ampliação.

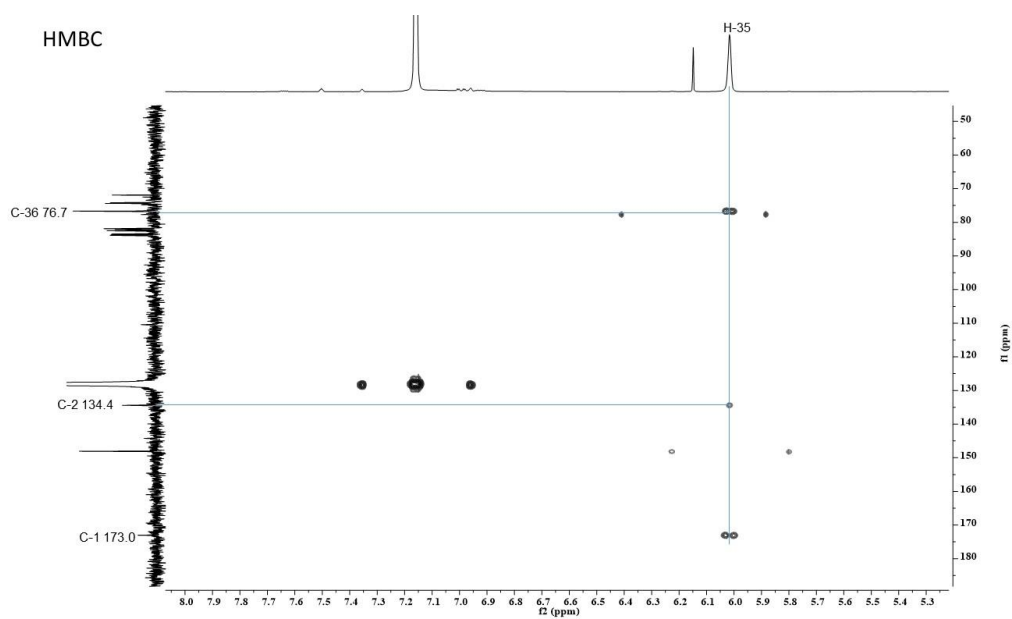


Figura 4.99. Experimentos de HMBC da acetogenina 6 (500 MHz,  $\text{C}_6\text{D}_6$ ), ampliação.

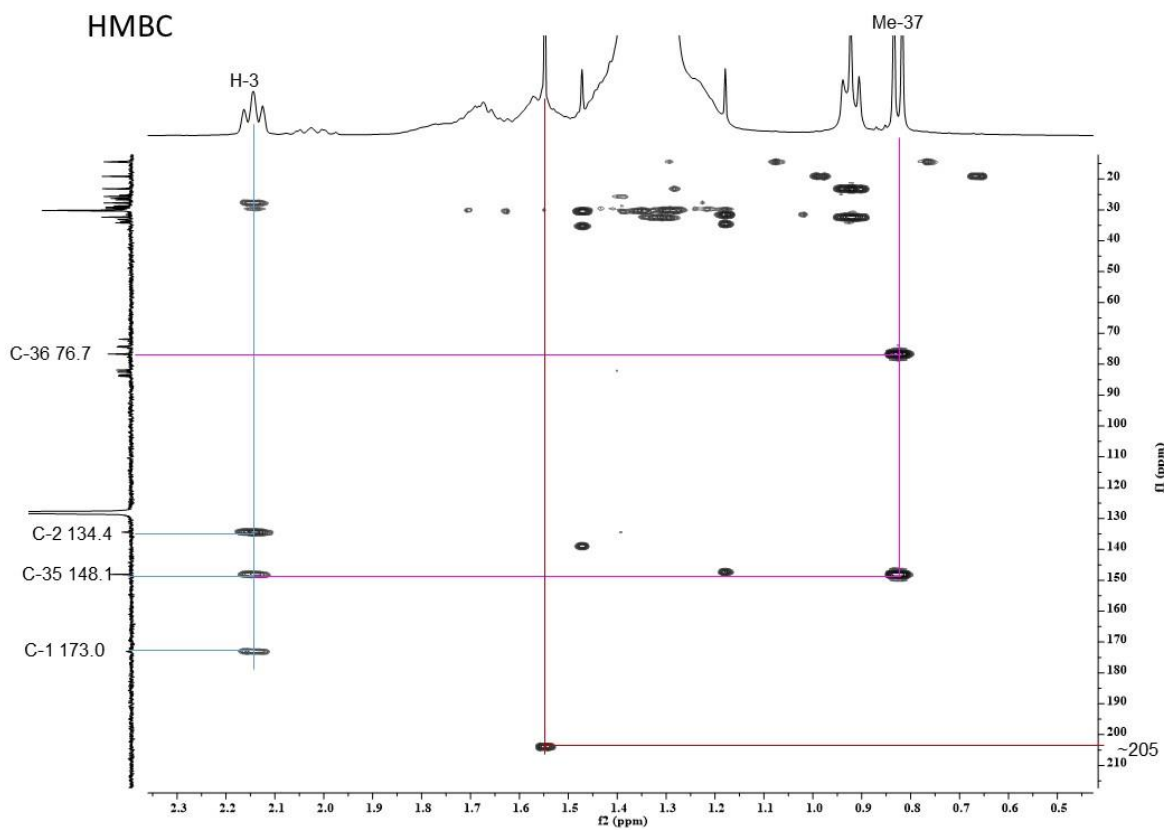


Figura 4.100. Experimentos de HMBC da acetogenina 6 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

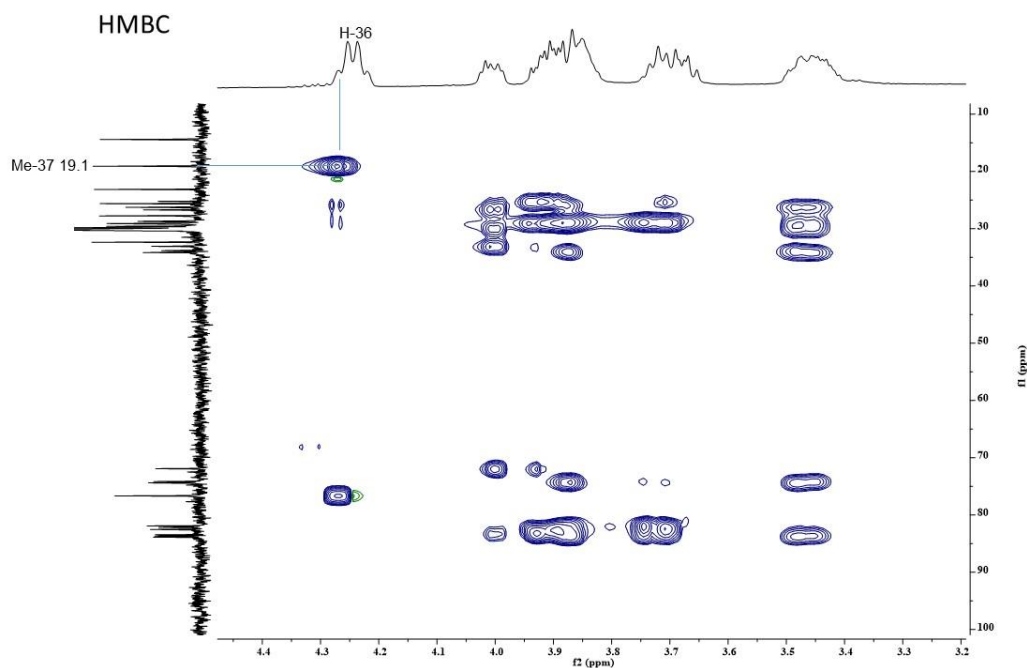


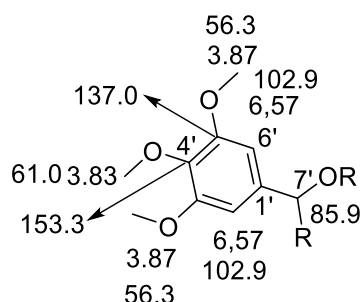
Figura 4.101. Experimentos de HMBC da acetogenina 6 (500 MHz, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>), ampliação.

## 4.4 Identificação estrutural das Lignanas

### 4.4.1 Lignana 1

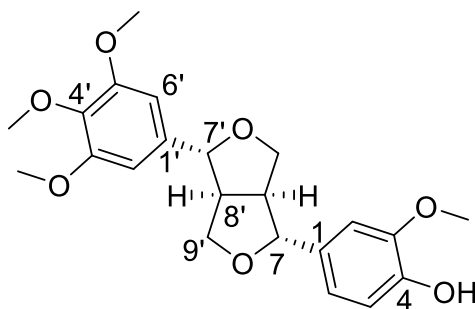
A amostra contendo a lignana1 foi analisada por “Ultra Performance Liquid Chromatography on a Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry (UPLC-QTOF-MS/MS)” no modo positivo de ionização, fornecendo  $[M+H]^+ = 447.1984$ , correspondendo a  $C_{24}H_{30}O_8 + H^+$ . As análises dessa amostra por vários experimentos de espectrometria de ressonância magnética nuclear, RMN  $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY (homonuclear correlation spectroscopy), HSQC (heteronuclear single quantum coherence), e HMBC (heteronuclear multiplebond coherence), permitiu definir a presença de uma unidade  $C_6C_3$  como 3',4',5'-trimetoxifenil-CH(OR)-CHR-CH<sub>2</sub>OR.

O espectro de RMN  $^1H$  mostrou um singleto em  $\delta$  6.57 (2H,  $\delta$  102.9, HSQC) e sinais de metoxilas em  $\delta$  3.87 (H<sub>6</sub>,  $\delta$  56.3) e  $\delta$  3.83 (3H,  $\delta$  61.0). O HMBC mostrou o sinal em  $\delta$  6.57 e das metoxilas se correlacionando com os sinais em  $\delta$  153.3 e 137.0, e o sinal em  $\delta$  6.57 também com pico cruzado com o sinal em  $\delta$  85.9, permitindo confirmar a presença da unidade mostrada abaixo.



O espectro de RMN  $^1H$  também mostrou um dubleto em  $\delta$  4.75 (d,  $J = 3.7$ ;  $\delta$  85.9, HSQC), dois duplodubletos acoplado entre eles (COSY) em  $\delta$  4.31 (dd  $J = 9.0, 6.2$ ;  $\delta$  72.1) e 3.93 (dd  $J = 9.0, 2.8$ ,  $\delta$  72.1) e um singleto largo em  $\delta$  3.10 sl ( $\delta$  54.5). Infelizmente o COSY não detectou acoplamentos com constantes de acoplamentos pequenos. No HMBC o sinal em  $\delta$  4.75 se correlacionou com os sinais em  $\delta$  102.9, 72.1 e 54.5, permitindo confirmar a sequência 3',4',5'-trimetoxifenil-CH(OR)-CHR-CH<sub>2</sub>OR, e atribuir o sinal em  $\delta$  4.75 ao C-7',  $\delta$  3.10 sl ( $\delta$  54.5) ao H-8' e C-8',  $\delta$  4.31 (dd  $J = 9.0, 6.2$ ;  $\delta$  72.1) e 3.93 (dd  $J = 9.0, 2.8$ ,  $\delta$  72.1) aos CH<sub>2</sub>OR, 2H-9' e C-9', respectivamente. Estes dados sugerem a presença de uma lignana bistetraidrofurano, e exigindo que a segunda unidade seja equivalente a esta, ou seja tenha uma simetria na molécula. Estes dados são coerentes com a lignana conhecida yangambin, comum em algumas famílias vegetais como Rutaceae (*Zanthoxylum acanthopodium*) (Pelster et al., 1976). Considerando a

necessidade de simetria na molécula o isômero yangambin corresponde com os dados de RMN (Tabela 4.12).



Lignana 1

Experimento de NOE estão em desenvolvimento para concluir as estereoquímicas dos abeis tetraidrofuranos.

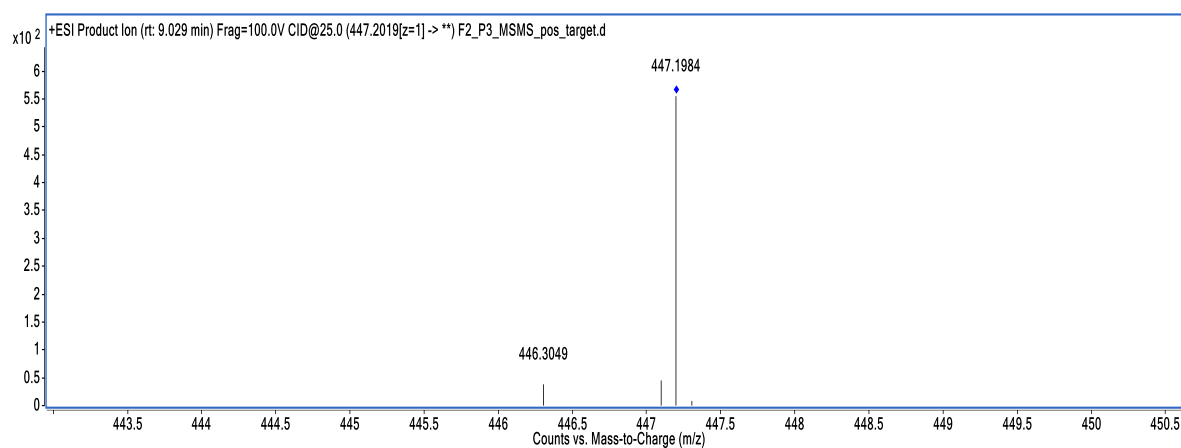


Figura 4.102: Espectro de massas da lignana 1 no modo positivo de ionização.

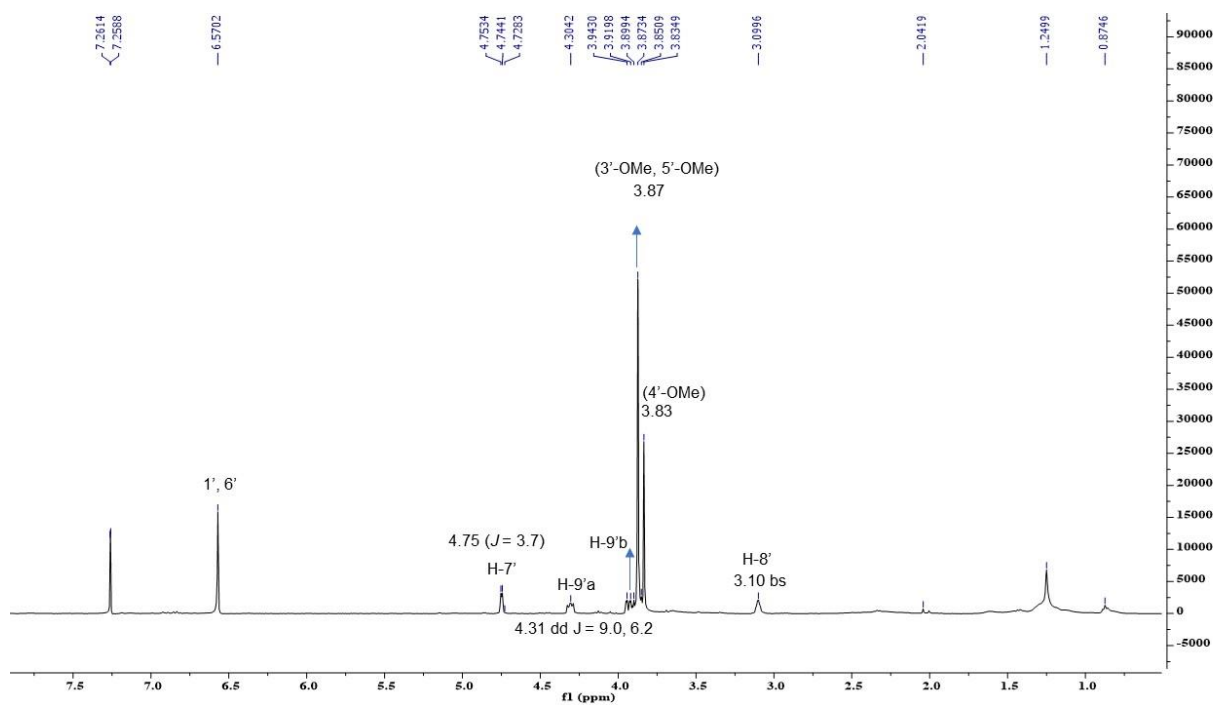


Figura 4.103 . Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da lignana **1** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

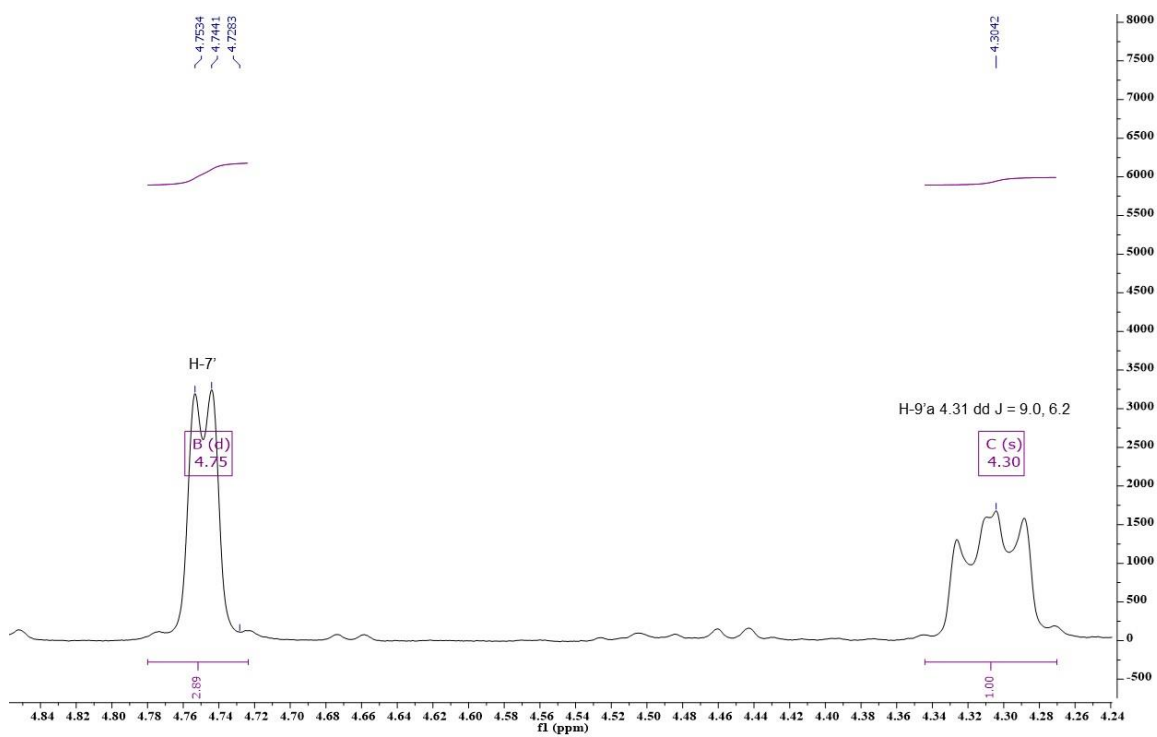


Figura 4.104. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da lignana **1** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ampliação.

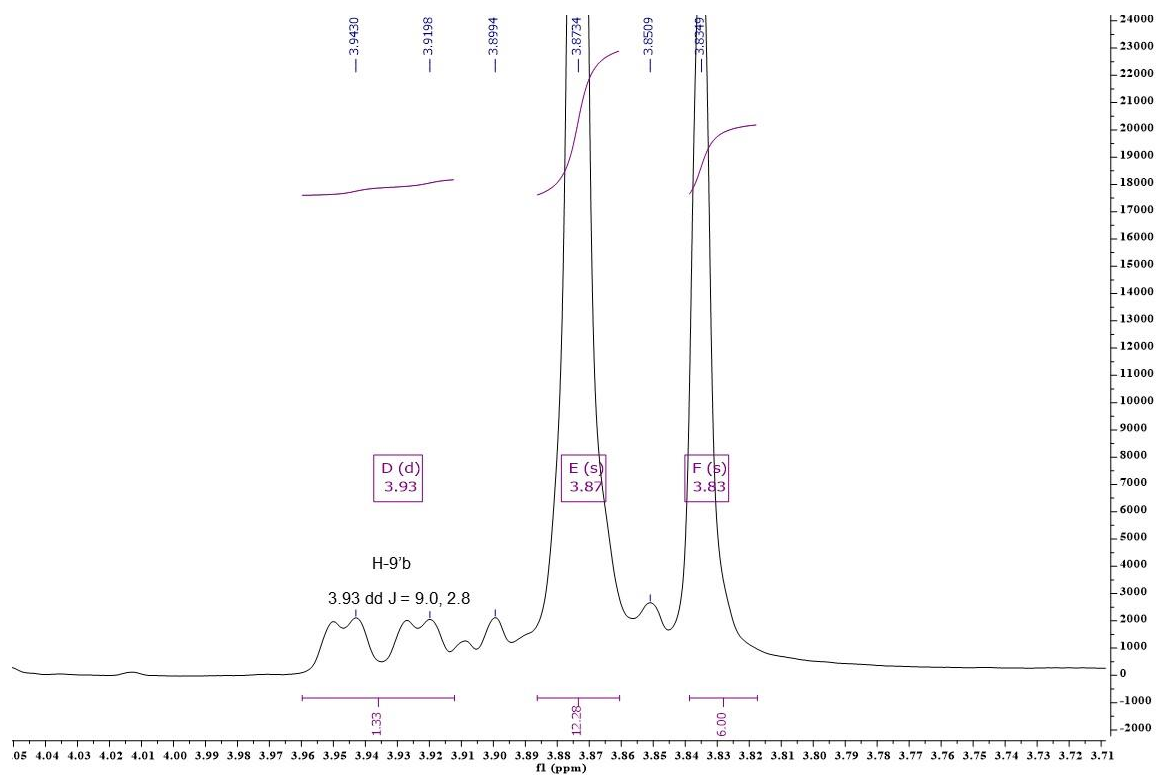


Figura 4.105. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da lignana **1** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ampliação.

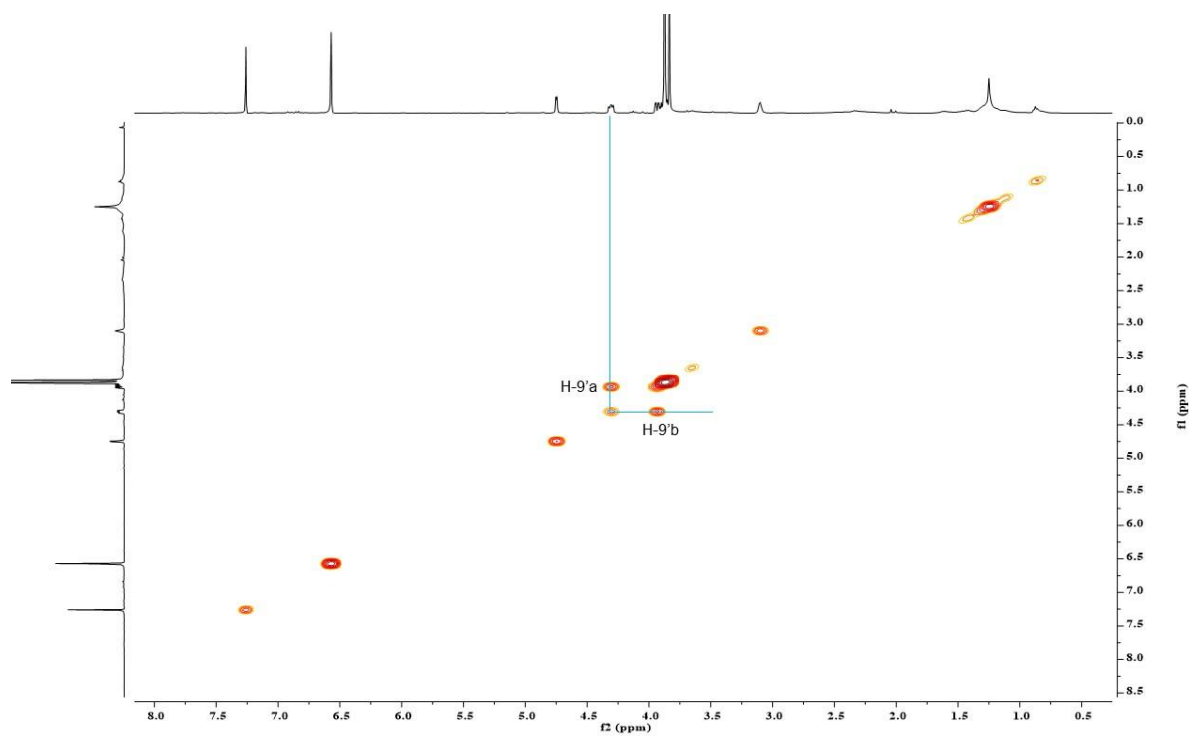


Figura 4.106. Experimentos de COSY da lignana **1** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

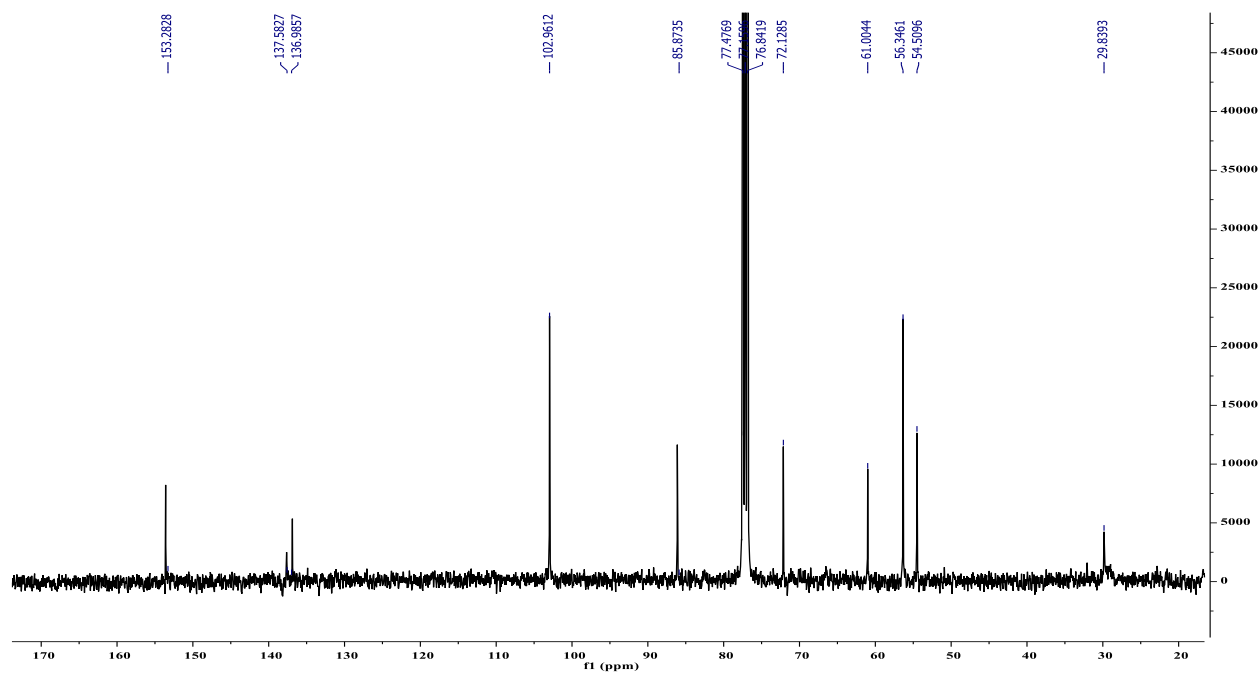


Figura 4.107. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da lignana **1** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

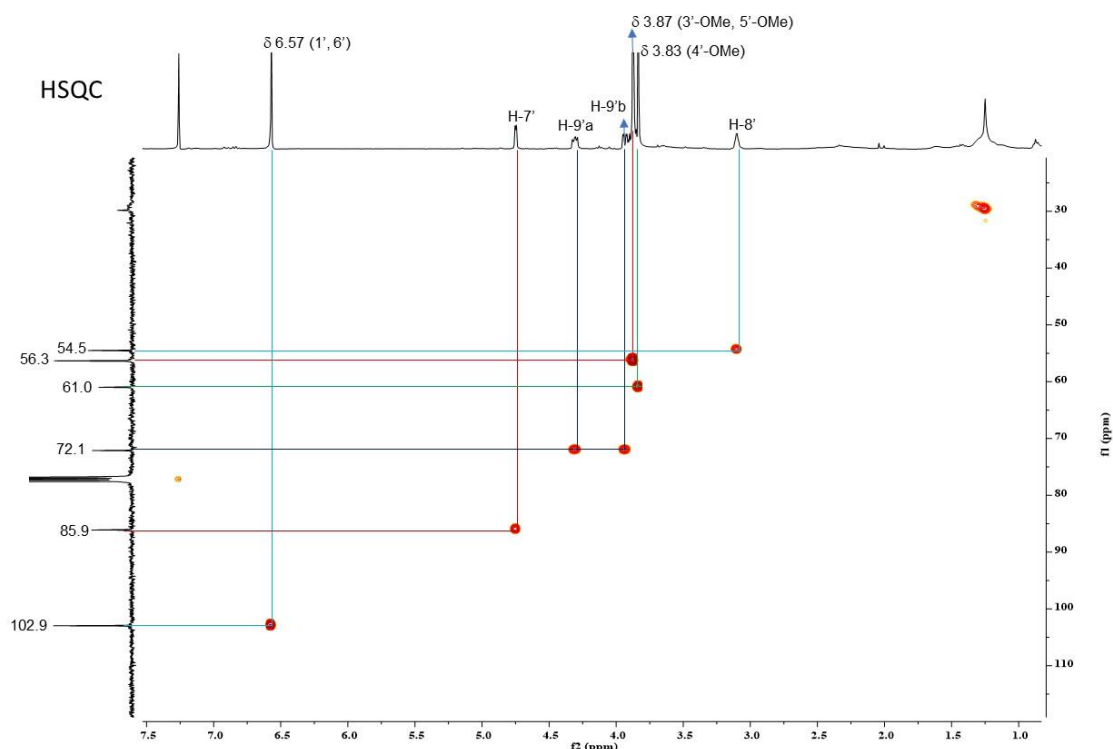


Figura 4.108. Experimentos de HSQC da lignana **1** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

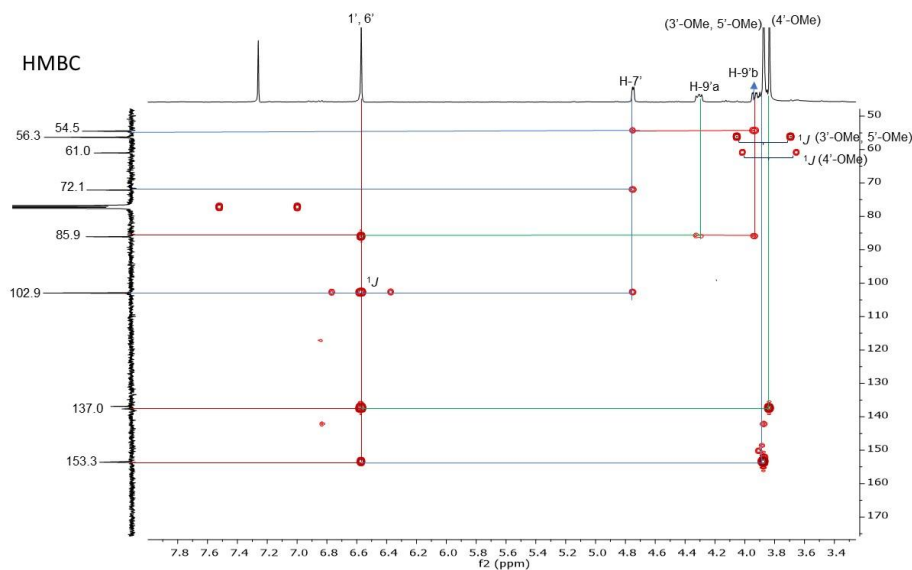
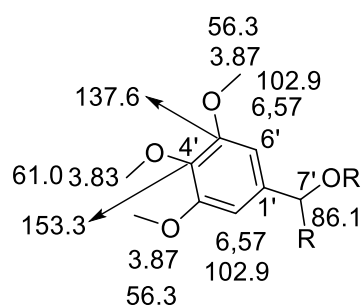


Figura 4.109. Experimentos de HMBC da lignana **1** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

#### 4.4.2 Lignana **2**

A amostra contendo a lignana **2** foi analisada por vários experimentos de espectrometria de ressonância magnética nuclear, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ , COSY, HSQC e HMBC, permitindo definir a presença da mesma unidade  $\text{C}_6\text{C}_3$  da lignana **1**, como 3',4',5'-trimetoxifenil- $\text{CH}(\text{OR})\text{-CHR-CH}_2\text{OR}$ .

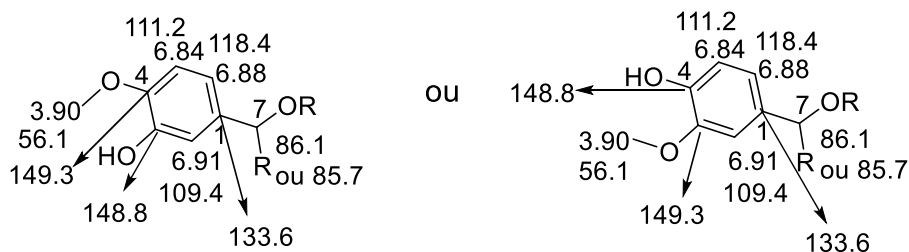
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  mostrou um singlete em  $\delta$  6.57 (2H,  $\delta$  102.9, HSQC) e sinais de metoxilas em  $\delta$  3.87 (6H,  $\delta$  56.3), 3.83 (3H,  $\delta$  61.0) e 3.90 (3H,  $\delta$  56.1). O HMBC mostrou o sinal em  $\delta$  6.57 se correlacionando com os sinais em  $\delta$  153.6; o sinal em  $\delta$  6.57 e a metoxila em  $\delta$  3.83 (3H,  $\delta$  61.0) se correlacionando com o sinal em  $\delta$  137.6; o sinal em  $\delta$  6.57 também com pico cruzado com o sinal em  $\delta$  86.1 (ou  $\delta$  85.7), permitindo confirmar a presença da unidade mostrada abaixo.



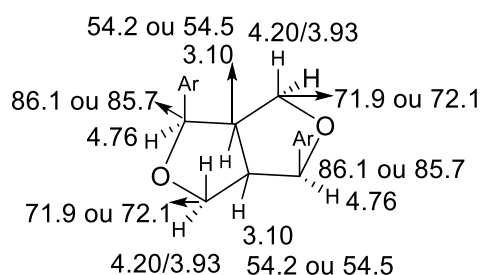
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  também mostrou dois sinais dubletos largos em  $\delta$  6.88 ( $J = 8.1$ ;  $\delta$  118.4) e 6.84 ( $J = 8.1$ ;  $\delta$  111.2) e um singlete largo em  $\delta$  6.91 ( $\delta$  109.4), os quais



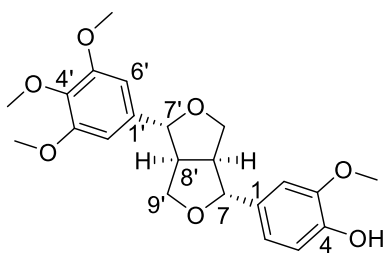
indicam a segunda unidade  $C_6C_3$  da lignana **2**, como  $C_6C_3$ (trisubstituído)-CH(OR)-CHR-CH<sub>2</sub>OR. O sinal da metoxila citada acima  $\delta$  3.90 (3H,  $\delta$  56.1) não pertencia à unidade 3',4',5'-trimetoxifenil-CH(OR)-CHR-CH<sub>2</sub>OR, sendo um dos substituintes na unidade  $C_6C_3$ (trisubstituído). O HMBC mostrou o sinal em  $\delta$  6.91 se correlacionando com os sinais em  $\delta$  85.7 (ou  $\delta$  86.1), 118.4 e 148.8 (ou  $\delta$  149.3);  $\delta$  6.88 se correlacionando com os sinais em  $\delta$  133.6 e 148.8;  $\delta$  6.84 mostrou pico cruzado com os sinais em  $\delta$  133.6 e 149.3, porém estas correlações podem ser intercambiáveis. Abaixo do sinal de duas metoxilas em  $\delta$  3.87 (6H,  $\delta$  56.3), parece haver o sinal de uma hidroxila, a qual se correlacionou com o sinal em  $\delta$  148.8 e/ou 149.3. Estes dados permitem propor a estrutura abaixo a outra unidade  $C_6C_3$ (trisubstituído).



O espectro de RMN <sup>1</sup>H também mostrou sinal multipeto em  $\delta$  4.76, o qual se correlaciona com dois sinais no HSQC, em  $\delta$  86.1 e 85.7; sinal de CH<sub>2</sub> como diastereotópicos em  $\delta$  4.29 e 3.93, os quais se correlacionam com dois sinais no HSQC, em  $\delta$  71.9 e 72.1; sinal em  $\delta$  3.10, os quais se correlacionam com dois sinais no HSQC, em  $\delta$  54.2 e 54.5. Estes dados indicam a unidade bistetraidrofurano indicada abaixo.

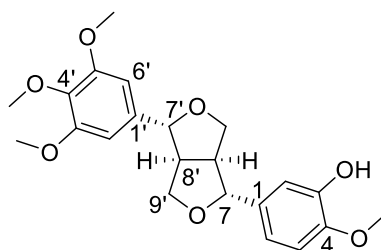


Estes dados são coerentes com uma lignana nova, mostrada abaixo as duas possibilidades.



7'-(3',4',5'-trimethoxy)-7-(3-methoxy-4-hydroxy)-7',7'-dioxabicyclo [3.3.0]octane

### Lignana 2



7'-(3',4',5'-trimethoxy)-7-(4-methoxy-3-hydroxy)-7',7'-dioxabicyclo [3.3.0]octane

### Lignana 2

Experimento de NOE estão em desenvolvimento para concluir as estereoquímicas dos abeis tetraidrofuranos, e mesmo a posição da metoxila e hidroxila.

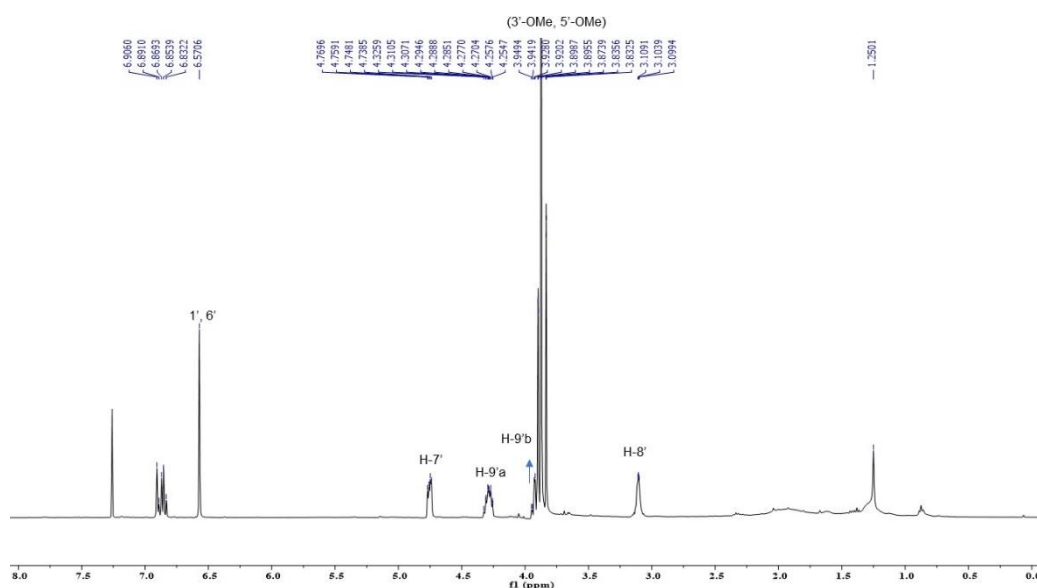


Figura 4.110. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da lignana 2 (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

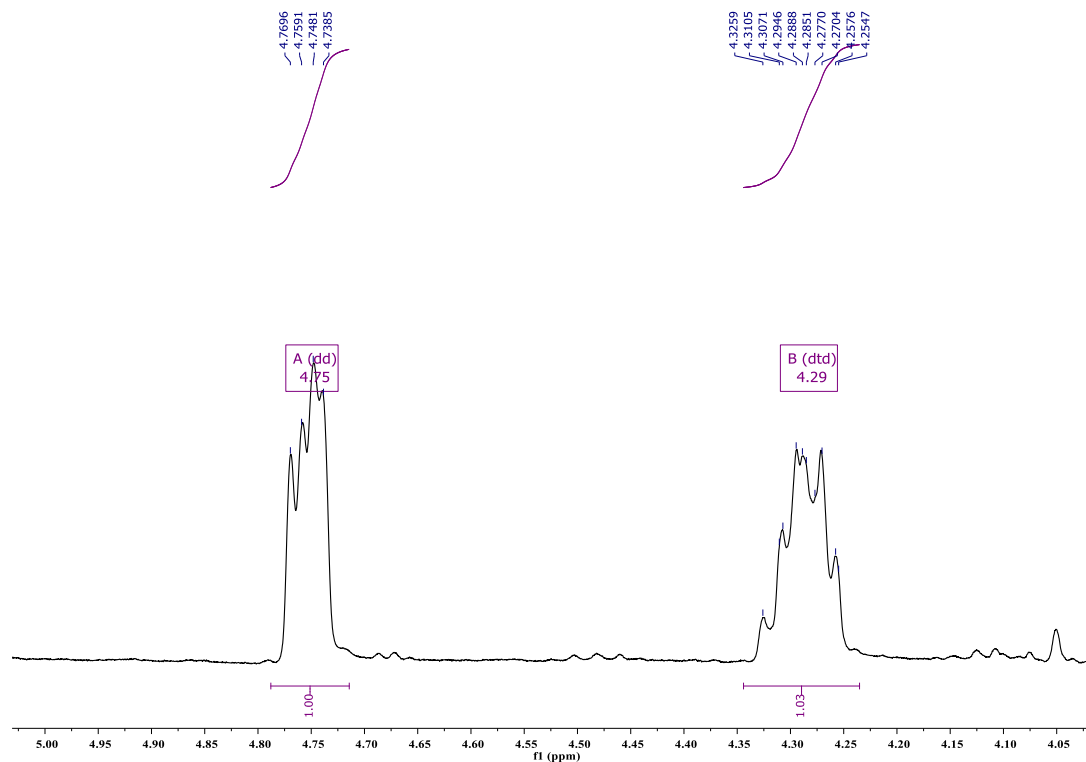


Figura 4.111. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da lignana **2** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ampliação.

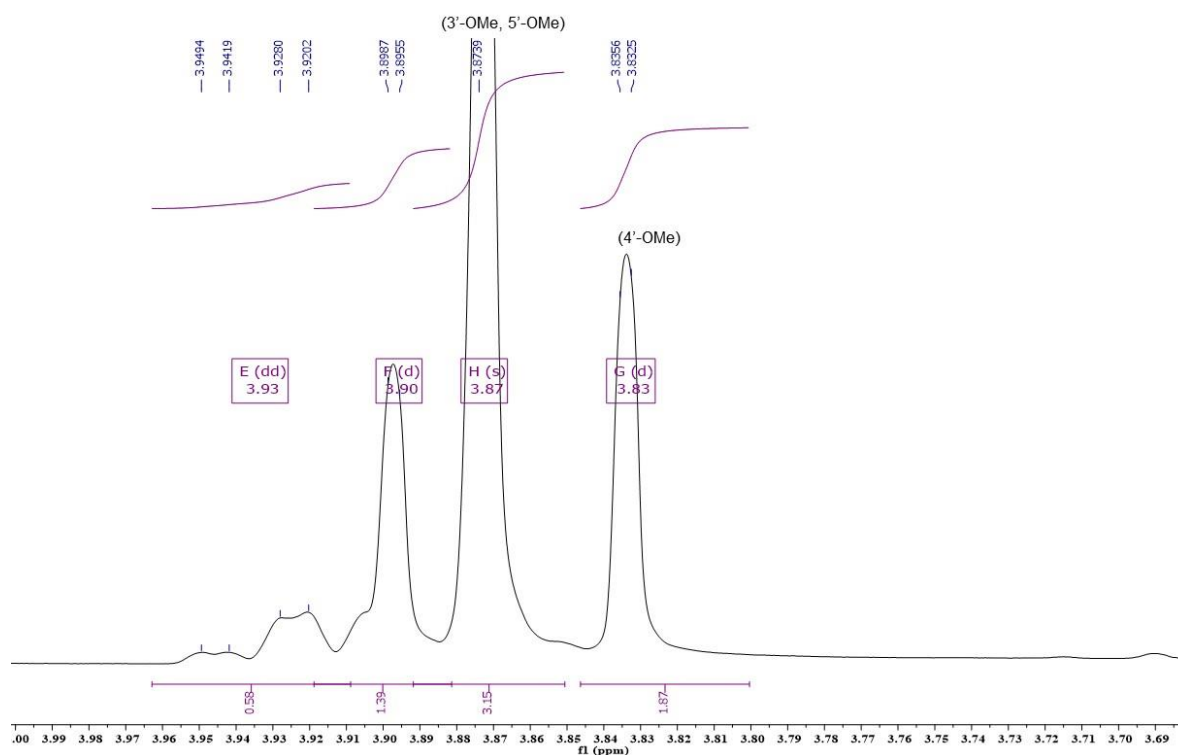


Figura 4.112. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da lignana **2** (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ampliação.

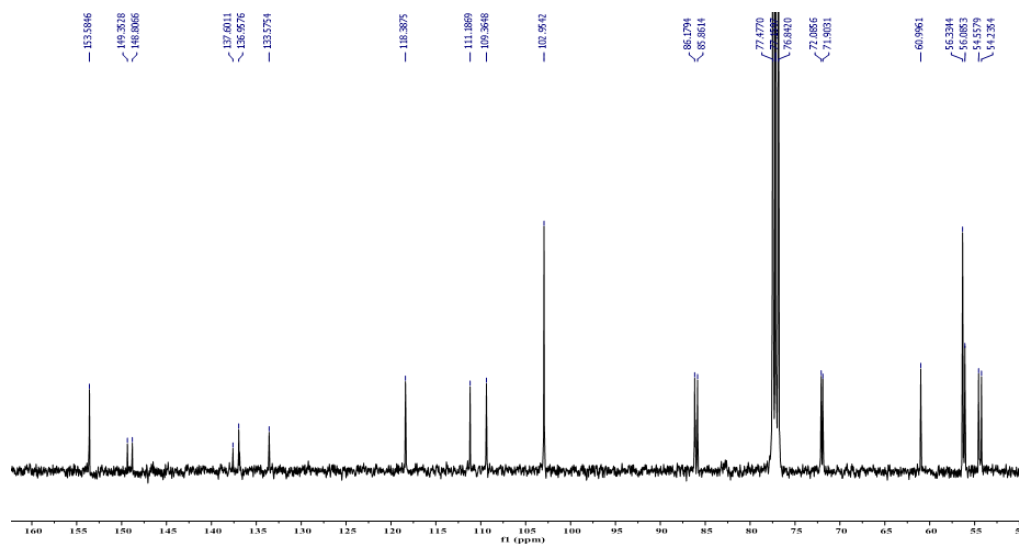


Figura 4.113. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  da lignana **2** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).

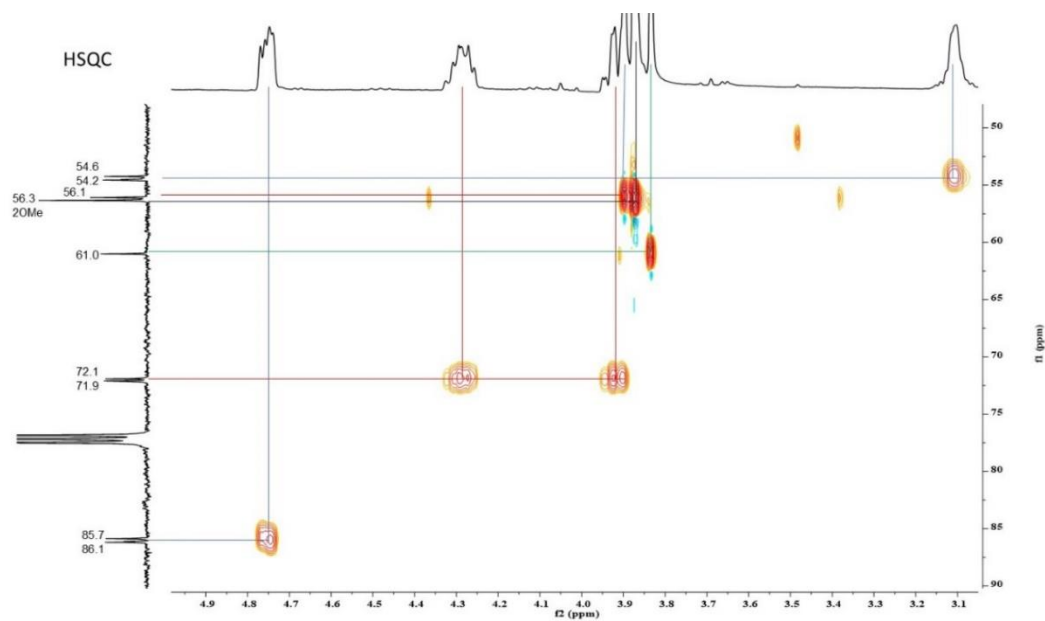


Figura 4.114. Experimento de HSQC da lignana **2** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ampliação.

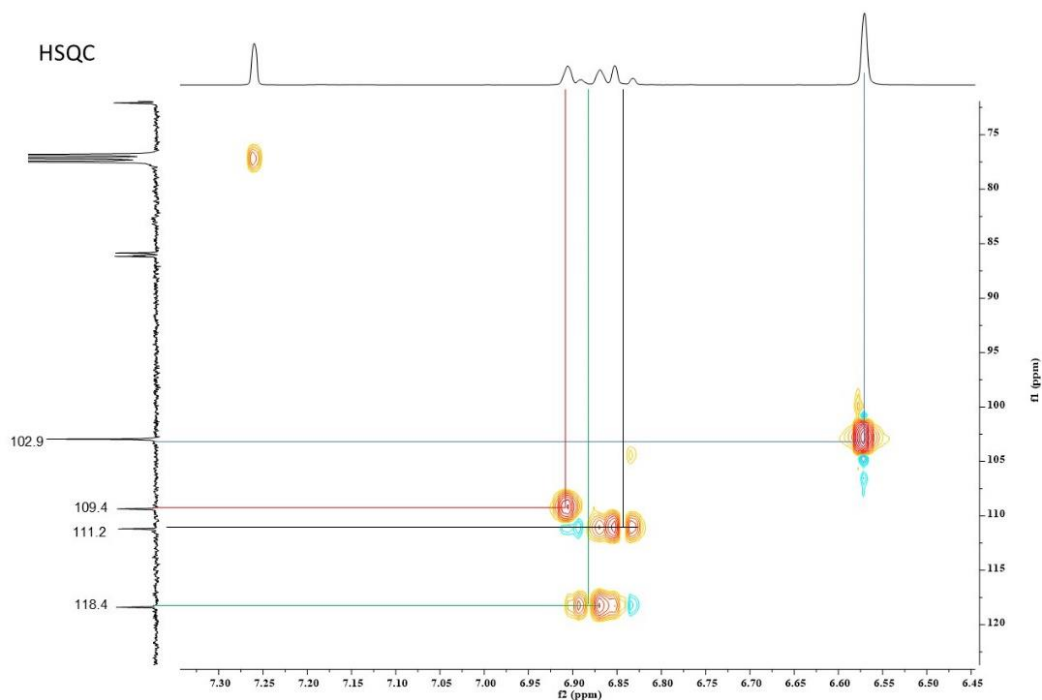


Figura 4.115. Experimento de HSQC da lignana 2 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ampliação.

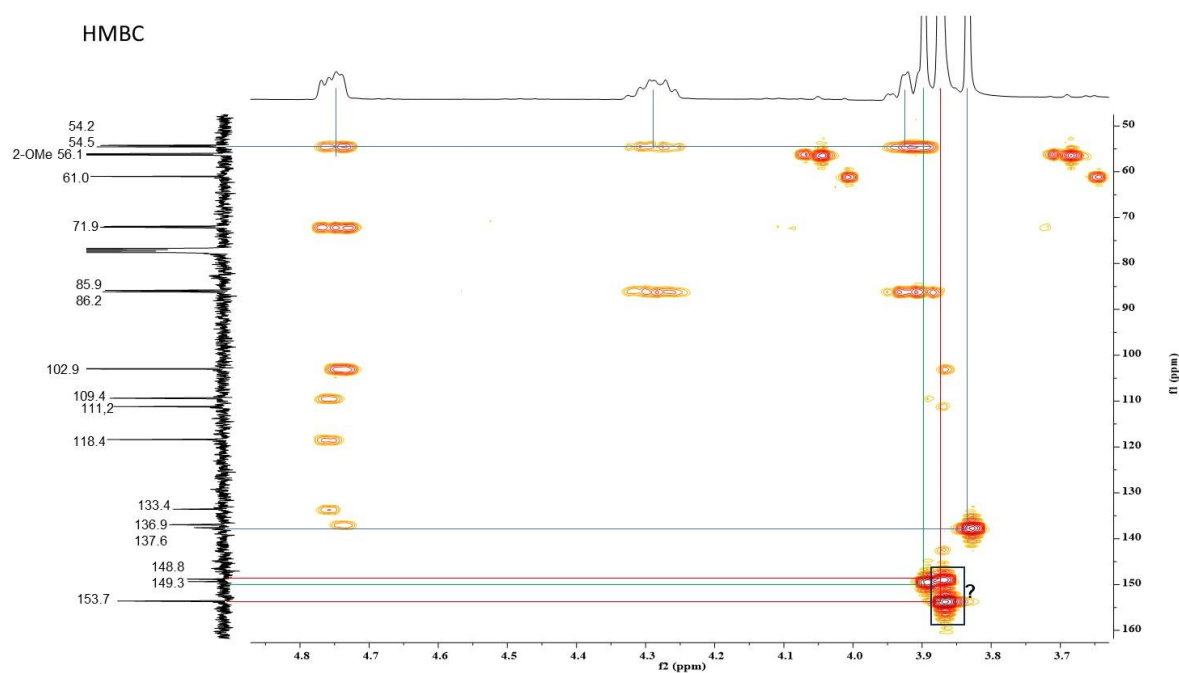


Figura 4.116. Experimento de HMBC da lignana 2 (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>), ampliação.

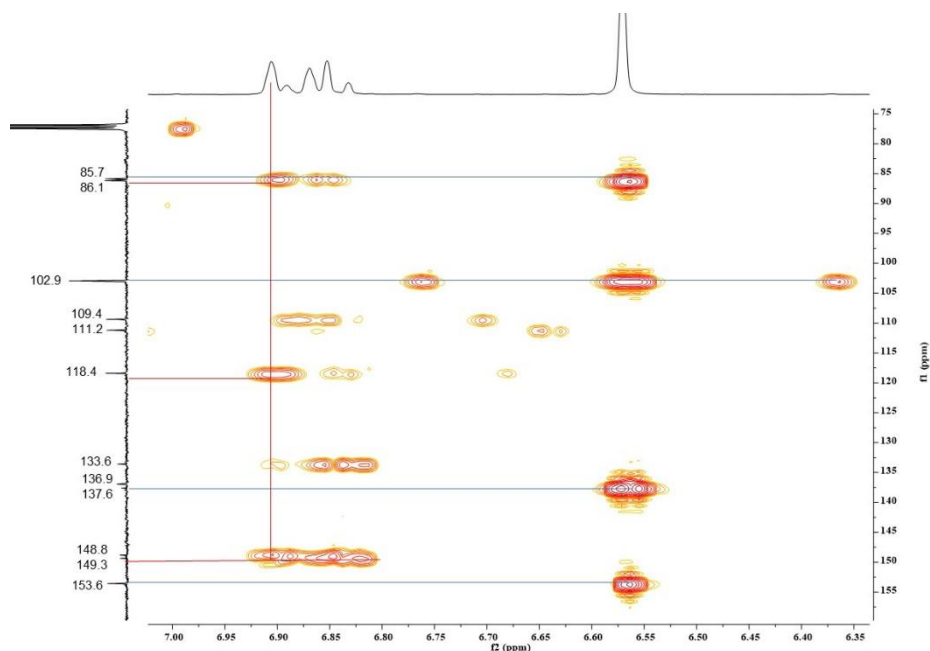


Figura 4.117. Experimento de HMBC da lignana **2** (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ), ampliação.

Tabela 4.13. Dados de RMN das lignanas 1 e 2 e modelo yangambin

Carbono	Lignana 1	yangambin	Lignana 2
1' 137.6	137.6	136.6	137.6
2' 102.9	102.9	102.8	102.9
3' 153.3	153.3	153.3	153.6
4' 136.9	136.9	137.5	137.0
5' 153.3	153.3	153.3	153.6
6' 102.9	102.9	102.8	102.9
7' 85.9	85.9	85.9	86.2
8' 54.5	54.5	54.4	54.5
9' 72.1	72.1	71.9	71.9 ou 72.1
1			133.6
2			109.4
3			149.3
4			148.8
5			111.2
6			118.4
7			85.8
8			54.2
9			71.0 ou 72.1
3' OMe	56.3		
4' OMe	61.0		

5' OMe

56.3

56.1

3 OMe ou 4

---

## 4.5 Ensaio Microbiológicos

### 4.5.1 Isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *Citri*.

Os três isolados da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* foram mantidos em atividade ao longo de todos os experimentos. De acordo com BEHLAU e BELASQUE JR, 2014, a faixa ideal de temperatura para o cultivo da bactéria em laboratório varia entre 28°C e 32°C, e sob essas condições de temperatura, as colônias geralmente se tornam visíveis a olho nu após um período de 48 a 72 horas. Portanto, todos os experimentos de MIC e CBM foram conduzidos com a bactéria após 72 horas de crescimento, conforme também mencionado em várias outras fontes, como por exemplo, LI e WANG, 2014.

### 4.5.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM, frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

A metodologia REMA (Resazurin Microtiter Assay), para leitura da CIM de compostos antimicrobianos, foi realizada previamente por PALOMINO et al., 2002 e MARTIM et al., 2003. CIM foi realizada visualmente com a adição da resazurina. O corante resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-ona 10-óxido) é amplamente utilizado como um indicador de viabilidade celular em vários tipos de proliferação e ensaios citotóxicos (AHMED et al., 1994 e NOCIARI et al., 1998). A resazurina, de cor azul intensa, na presença de células viáveis sofre um processo de redução passando para resofurina de coloração rosa. A reação de redução da resazurina está correlacionada o número de organismos vivos, como bactérias, fungos e células de mamíferos. Enzimas mitocondriais como transportadoras da atividade diaforase, como NADPH desidrogenase, provavelmente são responsáveis pela transferência de elétrons de NADPH + H + à resazurina, que é reduzida a resorufin, O'BRIEN et al., 2000. Sendo a Concentração Inibitória Mínima (CIM) a menor quantidade do antimicrobiano necessária para inibir o crescimento de um organismo in vitro, (PELCZAR et al., 1980), os princípios ativos, testados frente aos 3 isolados da bactéria X. Citri.

As acetogeninas e lignanas extraídas de *A. squamosa* foram investigadas quanto à sua capacidade de inibir três linhagens de bactérias fitopatogênicas *Xanthomonas*, através de um processo de diluição em série em microplacas. Os valores de Concentração

Inibitória Mínima (CIM) destacaram o efeito bacteriostático desses compostos. Para este teste de CIM, obtivemos resultados em concentrações em  $\mu\text{g/mL}$  que foram capazes de inibir o crescimento das bactérias. Em outras palavras, os resultados da CIM confirmaram o papel bacteriostático dos princípios ativos testados. A Figura 4.118 apresenta os resultados da CIM para os compostos analisados.

As placas A, B e C retratam o desfecho da reação de redução da resazurina para resofurina, evidenciando a transição da coloração azul para um rosa vibrante. Esta transformação colorimétrica ocorreu após um período de incubação de 4 horas. Conforme demonstrado na FIGURA 4.5, na linha 1 da placa A, os poços de 1 a 6 exibem os resultados da atividade de inibição bacteriana, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de  $31,25 \mu\text{g/mL}$  para a Acetogenina 1. Vale mencionar que os poços 7 e 8 também apresentaram mudança de cor para rosa, embora não tenham sido registrados na imagem capturada no momento da análise. Na linha 3 da placa A, os poços de 1 a 7 representam os resultados da inibição bacteriana pela Acetogenina 3, cuja CIM foi de  $15,62 \mu\text{g/mL}$ . Neste caso, assim como no anterior, o poço 8 evidenciou a transição de cor, embora não tenha sido completamente registrado na imagem. Na linha 1 da placa C, os poços de 1 a 7 também exibem resultados da inibição bacteriana pela Acetogenina 1, mas desta vez para a cepa 1670, com uma CIM de  $15,62 \mu\text{g/mL}$ . Notavelmente, os poços 8 e 9 começaram a mostrar sinais de mudança da coloração azul para rosa. A placa na figura representa os resultados obtidos para uma cepa bacteriana. Este mesmo experimento foi conduzido em triplicata utilizando os 3 isolados da bactéria *X. citri*. Os resultados das CIM dos compostos das Acetogeninas e Lignanas frente aos 3 isolados bacterianos podem ser encontrados na Tabela 4.14.

Tabela 4.14 - Resultado da Concentração Inibitória Mínima (CIM) das substâncias frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*..

	<i>Xanthomonas</i> sp. 1645	<i>Xanthomonas</i> sp. 1670	<i>Xanthomonas</i> sp 12
MIC ( $\mu\text{g/mL}$ )			
Amostra 1	31,25	62,50	125
Amostra 2	125	125	125
Amostra 3	15,62	15,62	62,50
Amostra 4	125	125	125
Amostra 5	125	62,50	62,50
Amostra 6	250	250	>1000



Amostra 7	250	250	125
Amostra 8	15,62	31,25	62,50
Amostra 9	62,50	125	62,50
Amostra 10	250	31,25	62,50
Amostra 11	250	31,25	15,62

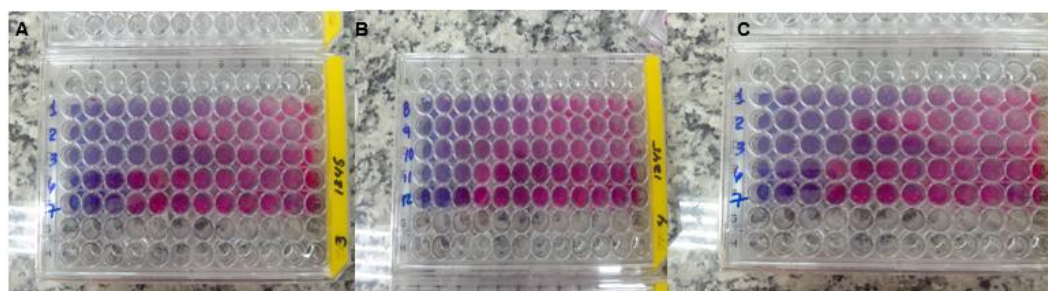


Figura 4.118 - Resultado da CIM de uma placa de 96 orifícios com ensaio de uma cepa bacteriana com os compostos.

O composto que apresentou os resultados mais positivos foi a Acetogenina 3, com todas as cepas de *X. citri* obtendo resultados muito baixos, com uma Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 18,12 a 72,5  $\mu\text{g/mL}$ . Isso demonstra a confiabilidade dos resultados, já que a mesma concentração inibitória foi observada nas três repetições e com os três isolados. O composto 8 também mostrou um resultado promissor, com uma CIM de 18,12  $\mu\text{g/mL}$ . Isso é especialmente relevante porque em um estudo anterior realizado por RIBEIRO et al. em 2008, a Uvaricina foi testada como um inibidor da bactéria *X. fastidiosa*, que causa a Clorose Variegada do Citrus (CVC), e obteve uma CIM de 2.000  $\mu\text{g/mL}$ . Isso ressalta a importância desses compostos.

Todas as acetogeninas e lignanas exibiram atividade antibacteriana contra todas as linhagens testadas. Isso sugere que essas moléculas têm um grande potencial na área de controle de doenças de plantas causadas por bactérias. No entanto, são necessários estudos adicionais para avaliar a atividade desses compostos em relação a outras bactérias.

Na literatura, foi documentada a investigação sobre a ação antimicrobiana de espécies de *Annona*, tanto de extratos não refinados como de substâncias isoladas, principalmente alcaloides, e em menor proporção, acetogeninas.

Roberto e seus colaboradores constataram que as folhas de *Annona vepretorum*

demonstraram uma ação intensa nos extratos etanólico e hexânico em relação à bactéria *Escherichia coli*, com um valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 0,39 mg/mL. O extrato hexânico também inibiu fortemente o crescimento da *Salmonella choleraesuis* com o mesmo valor de CIM e apresentou uma atividade moderada contra *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*. O extrato clorofórmico exibiu atividade moderada contra *Escherichia coli*. Todos os extratos mostraram uma atividade fraca contra outros micro-organismos, como *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella flexneri*. A atividade antimicrobiana tem sido associada à presença de flavonoides, esteroides e terpenoides nestes extratos (ROBERTO et al., 2014).

Testou-se seletivamente o metanólico e o extrato clorofórmico, bem como as frações das folhas da planta *Annona reticulata*, contra várias estirpes de micro-organismos. Foram incluídas no estudo estirpes de bactérias Gram-positivas, nomeadamente *S. aureus* e *S. epidermidis*, bem como bactérias Gram-negativas, como *E. coli* e *P. aeruginosa*. Além disso, estirpes fúngicas como *Candida albicans* e *Candida blanki* foram utilizadas para avaliar a atividade antifúngica. Os resultados revelaram que os extratos foram eficazes contra todas as estirpes bacterianas e fúngicas testadas. As amostras apresentaram uma atividade significativa contra as estirpes bacterianas, com valores de Concentração Inibitória Mínima (CIM) variando de 10 µg mL<sup>-1</sup> a 60 µg mL<sup>-1</sup> para o extrato metanólico e de 10 µg mL<sup>-1</sup> a 70 µg mL<sup>-1</sup> para o extrato clorofórmico. Este potente efeito inibitório observado no extrato metanólico pode ser atribuído à presença de compostos fenólicos e polifenólicos (JAMKHANDE et al., 2016).

As lignanas do subgrupo estrutural da dibenzilbutirolactona (-) – nortraquelogenina, isoladas da raiz de *Patrinia scabiosaefolia*, demonstraram uma notável atividade antibacteriana contra diversas cepas, incluindo *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *E. coli*, *Salmonella typhi*, bem como 29 cepas bacterianas resistentes a antibióticos, como *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina e *Pseudomonas aeruginosa* resistente a antibióticos (MRSA e ARPA). Esses resultados indicam uma alta sensibilidade dessas bactérias à ação da nortraquelogenina, com concentrações variando de IC<sub>50</sub> = 2,5 a 5,0 µg/ml (Lee, Ji, Ryoo, Choi, Woo, & Lee, 2015).

#### **4.5.3 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos complexos e seus ligantes livres frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.**

A concentração Inibitória Mínima (CIM) é a menor concentração de um produto químico que impede o crescimento visível de uma bactéria, ou seja, que tem atividade bacteriostática, enquanto que a Concentração Bactericida Mínima (CBM) é a concentração que resulta na morte microbiana, ou seja, a concentração que é bactericida (TRIPATHI, 2013). Sendo a Concentração Bactericida Mínima a menor concentração do princípio ativo capaz de matar 99,9% da bactéria (KONEMAN et al., 2001), através dos resultados da CIM, foi possível determinar a CBM de cada composto frente a cada cepa de *X. citri*. Os valores encontrados para a Concentração Inibitória Mínima (CIM), nos mostram que houve a inibição do crescimento bacteriano, isto é, através do reagente revelador resazurina foi possível dizer apenas se a bactéria está em atividade ou não. Dentro dos valores de CIM, existiria a possibilidade de a bactéria estar presente, esperando apenas condições favoráveis para se desenvolver novamente. Devido às estas circunstâncias, se fez necessária a determinação da CBM de cada composto isolado com as 3 cepas de *X. Citri*.

Portanto, para determinar a CBM, foi necessário refazer a CIM de todos os compostos testados com cada cepa da bactéria. A CIM é feita em duplicata, pois em uma das placas seria necessário pipetar resazurina para revelar a CIM, chamada de placa 1, apesar de a resazurina manter as células intactas (ZHIJUN et al., 1997), e com a outra placa faria o teste de CBM. Após o teste de revelação da CIM, a placa sem resazurina, foi utilizada para avaliar a CBM dos compostos, caso houvesse, pois os compostos poderiam apresentar apenas atividade inibitória da bactéria. Assim, retirando uma alíquota dos poços da placa sem a resazurina que obtiveram inibição bacteriana (CIM) a mesma foi semeada em meio de crescimento Caldo Nutriente, nas condições favoráveis de temperatura 28 °C num período de 48 horas; caso houve alguma atividade bacteriana naquele meio de CIM, ela iria se manifestar nas condições favoráveis de crescimento dessa bactéria. Nestas condições, seria possível determinar em qual das concentrações de inibição houve uma morte de 99,9% das bactérias. A Figura 4.119 retrata os resultados da isolamento e caracterização de compostos de acetogeninas e lignanas. Na Figura A, estão apresentados os resultados dos compostos que demonstraram uma Concentração Mínima Bactericida (CMB) de 500 µg.mL<sup>-1</sup>. Enquanto isso, a Figura B exibe os resultados específicos das acetogeninas que também apresentaram uma CMB de 500 µg.mL<sup>-1</sup>. Portanto, pode-se confirmar que tanto na Figura A quanto na Figura B, a menor

concentração dessas substâncias capaz de eliminar 99,9% da bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri* foi de 500 µg.mL<sup>-1</sup>.

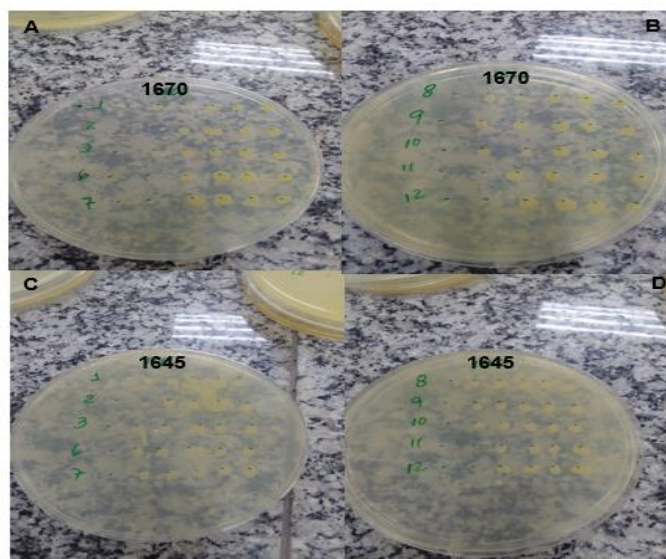


Figura 4.119: Colônias da bactéria *X. citri* em placas de petri contendo apenas o meio nutriente agar.

Tabela 4.15 - Resultado da Concentração Bactericida Mínima (CBM) das substâncias frente à bactéria *Xanthomonas citri* ssp. *citri*.

	<b>Xanthomonas 1645</b>	<b>Xanthomonas 1670</b>	<b>Xanthomonas 12</b>
<b>CBM (ug/mL)</b>			
Amostra 1	>1000	500	500
Amostra 2	500	500	500
Amostra 3	500	500	500
Amostra 4	500	500	500
Amostra 5	>1000	500	500
Amostra 6	>1000	>1000	>1000
Amostra 7	>1000	>1000	500
Amostra 8	>1000	>1000	>1000
Amostra 9	>1000	>1000	500
Amostra 10	>1000	>1000	500
Amostra 11	>1000	>1000	500

Olugbuyiro et al. (2017) empregaram o extrato metanólico das folhas de *A. muricata*, que foi subfracionado em hexano, acetato de etila e água. Os resultados evidenciaram atividade antimicrobiana nos extratos hexânico e acetato de etila, comparando-os com a atividade padrão da gentamicina (0,02 mg/mL).

Por outro lado, Rabêlo e colaboradores (2014) utilizaram folhas e caules de atemoia, um híbrido que resulta da cruzamento entre a cherimólia (*A. cherimola* Mill.) e a pinha ou fruta-do-conde (*A. squamosa* L.) (OLIVEIRA et al., 2010). Foram examinados os extratos metanólico das folhas e etanólico dos talos. *E. faecalis* demonstrou resistência a todos os extratos testados, em contrapartida, outros micro-organismos foram suscetíveis. O extrato etanólico apresentou valores de CBM variando de 0,7812 a 6.250 mg/mL para os *Staphylococcus*, enquanto o extrato metanólico variou de 3,125 a 12,5 mg/mL.

Al-Nemari e coautores (2020) utilizaram extratos aquoso, metanólico e acetônico de folhas *A. squamosa* contra *S. aureus* e *E. faecalis*. A atividade antimicrobiana dos diferentes extratos foi avaliada por difusão em ágar. O extrato acetônico apresentou atividade somente contra *E. faecalis* com halo de inibição de 8 mm, frente ao controle positivo com 12,7mm. O extrato metanólico, por sua vez, foi considerado altamente eficaz quando a antibacteriana contra *S. aureus*, apresentando halo de inibição de 16,5 mm, superior ao antibiótico tetraciclina com 14,8 mm usado como controle. O mesmo extrato exibiu halo de inibição de 7, 9mm contra *E. faecalis*, em comparação ao controle de 12,7 mm.

#### **4.6 Avaliação da atividade inseticida.**

Os inseticidas botânicos tem utilizados desde tempos remotos antes que os inseticidas organosintéticos; com diversos efeitos no comportamento dos insectos, já que atúan cmo confusor ou disruptor . Os lepidópteros, em geral, alimentamse do limbo

e das nervuras foliares, podendo ocasionar desfolhamento total em diversas culturas (LOURENÇÃO et al., 2010).

Os compostos extraídos da *Annona squamosa* demonstraram ser altamente letais para lagartas em estágio inicial, resultando em quase 100,0% de mortalidade nas primeiras 24 horas após a aplicação nos tratamentos 1 e 8 (conforme indicado na Tabela 4.15). Os tratamentos que incluíam as acetogeninas apresentaram uma eficácia notável em termos de atividade inseticidas.

Tabela 4.16 :Mortalidade acumulada (médias  $\pm$  erro padrão) de *Spodoptera frugiperda* após da aplicação de diferentes tratamentos na das lagartas.em folhas de milho.

<b>Tratamento</b>	<b>Mortalidade Acumulada (%)</b>
Testem. (C-)	50
DMSO	56,66
Trat. 1	76,66
Trat. 2	60
Trat. 3	50
Trat. 6	60
Trat. 7	53,34
Trat. 8	73,34
Trat. 12	50
Trat. 14	50
Trat. 15	43,34
C+	0

### Survival of TRATAMENTOS: Survival proportions

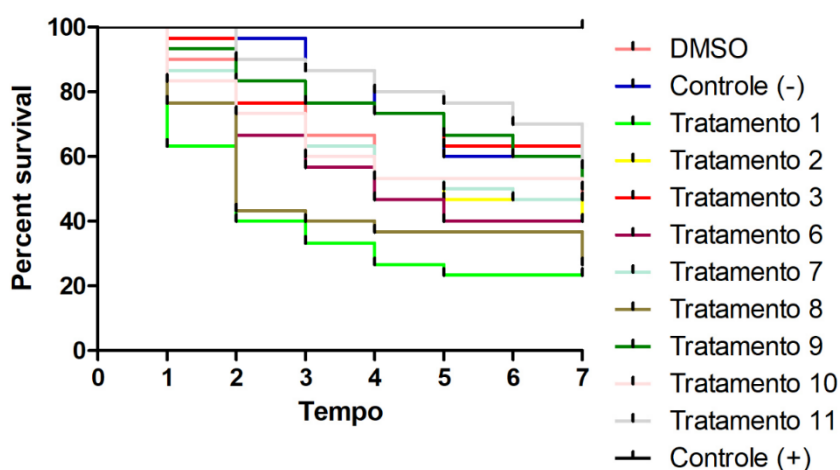


Figura 4.120: Gráfico de sobrevivência das lagartas frente às Acetogeninas testadas.

Os indicadores biológicos foram analisados somente para as faixas de concentração de 0,00 mg/g a 2,00 mg/g. Notou-se que o período larval foi influenciado pelos diversos tratamentos, com os maiores valores registrados nos tratamentos 1 e 8 (com durações de 1 a 2 dias, respectivamente) (ver Tabela 4.15). Esses valores aumentaram à medida que as concentrações utilizadas aumentaram.

De acordo com Alegre et al. (2017), os compostos secundários encontrados nas anonas possuem propriedades inseticidas, sendo eficazes contra piolhos e pulgas. As acetogeninas presentes nas plantas da família Annonaceae demonstraram efeitos antialimentares e inseticidas em *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith), alcançando uma taxa de mortalidade de 80% nas pupas quando adicionadas à dieta na concentração de 50  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . A principal acetogenina identificada foi a escamocina, que também afetou negativamente o crescimento larval, reduzindo a eficiência da conversão de alimento em biomassa corporal (Álvarez et al., 2007).

Em estudos separados, a aplicação de um extrato etanólico de sementes de graviola (*A. muricata*) diluído em água destilada na concentração de 2% p/v resultou em uma taxa de mortalidade de 87,9% das larvas (Ángel-Ríos et al., 2015; Aguilar et al., 2021). Da mesma forma, a aplicação de extrato de folhas da graviola *A. muricata* em etanol na concentração de 2,0% durante o outono causou uma mortalidade de 87,9% nas larvas da lagarta do cartucho *S. frugiperda* (Angel-Rios et al., 2015).

#### **4.7 Potencial biológico das acetogeninas isoladas em ensaios contra células cancerígenas.**

Desde 1982, mais de 500 AGEs foram identificadas em diversas partes da planta. Devido às suas atividades biológicas, as acetogeninas têm atraído crescente interesse nos últimos anos, e várias técnicas de extração e testes têm sido empregados para confirmar a presença destas substâncias ou para realizar novas descobertas.

Com o intuito de avaliar o potencial biológico das acetogeninas isoladas, foram conduzidos ensaios em células cancerígenas de pulmão (A549) e adenocarcinoma de mama humano (MCF-7). Apesar da disponibilidade de um amplo arsenal terapêutico contra o câncer, muitos tipos de tumores ainda carecem de tratamentos adequados, e aproximadamente 60% das drogas utilizadas têm origem em plantas. Nas últimas décadas, as acetogeninas provenientes de anonáceas têm se destacado na busca por novos candidatos a fármacos antitumorais, devido à sua notável eficácia contra células cancerígenas. O efeito citotóxico das acetogeninas é ilustrado na figura 13, onde é possível observar uma resposta dose-dependente nas células testadas. A concentração que inibiu em 50% o crescimento celular (IC<sub>50</sub>) foi de  $36,68 \pm 0,43 \mu\text{mol/L}$  para as células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e de  $36,68 \pm 0,43 \mu\text{mol/L}$  para as células cancerígenas de pulmão (A549), enquanto o IC<sub>50</sub> para células normais foi de  $63,86 \pm 1,29 \mu\text{mol/L}$ . A Acetogenina 3 demonstrou um elevado potencial, com um IC<sub>50</sub> de  $20,66 \pm 0,75 \mu\text{mol/L}$  para A549, ao passo que apresentou um IC<sub>50</sub> de  $61,54 \pm 0,36 \mu\text{mol/L}$  para células normais (MRC-5).

Curiosamente, a atividade citotóxica da Acetogenina 1 contra as células cancerígenas (A549 e MFC-7) e da Acetogenina 3 contra A549 foi significativamente menor em comparação com a sua ação nas células normais (MCF-5). Isso pode ser observado através do cálculo do índice de seletividade, que foi de 1,7 e 1,4 para a Acetogenina 1, enquanto para a Acetogenina 3 foi de 3 (ver Tabela 4.17). O índice de seletividade avalia o grau de atividade de um composto contra as células cancerígenas sem comprometer a viabilidade das células de mamíferos. Portanto, quanto maior o valor do índice de seletividade, mais seletiva é a molécula em relação às células cancerígenas.



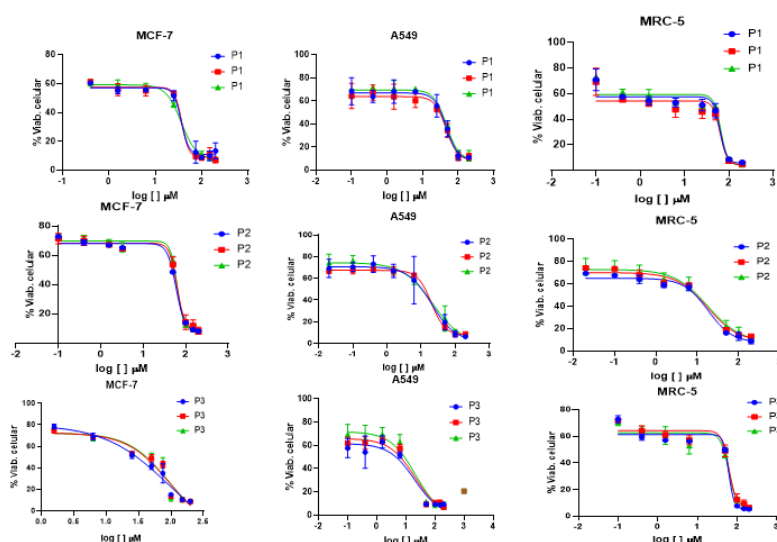


Figura 4.121: Atividade citotóxica *in vitro* da Acetogenina 1 (P1), Acetogenina 2 (P2) e Acetogenina 3 (P3) sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5). Os pontos azuis, vermelhos e verdes representam as triplicatas.

Tabela 4.17 Atividade anticâncer *in vitro* das acetogeninas isoladas de *Annona squamosa* sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5).

	IC <sub>50</sub> (µmol/L)				
	MCF-7	A549	MRC-5	S <sup>1</sup>	IS <sup>2</sup>
P1	36,68 ± 0,43	5,87 ± 0,65	63,86 ± 1,29	,7	10,87***
P2	61,58 ± 1,80	20,74 ± 0,95	17,91 ± 0,40		-
P3	92,39 ± 0,92	20,66 ± 0,75	61,54 ± 0,36		3,0

$$*IS^1 = \text{MRC-5/ MCF-7}; IS^2 = \text{MRC-5/ A549}$$

É possível notar uma relação dose-resposta significativa em relação às células avaliadas para as Acetogeninas P8, P9 e P10. A concentração necessária para inibir em 50% o crescimento celular (IC<sub>50</sub>) foi consideravelmente maior, 200 µmol/L, para as células de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) em relação a cada um dos compostos testados. Para as células cancerígenas de pulmão (A549), o menor IC<sub>50</sub> foi de 28,22 ± 0,53 µmol/L, enquanto que o IC<sub>50</sub> para as células normais foi de 14,38 ± 0,38 µmol/L. Destaca-se a notável eficácia da Acetogenina 3, com um IC<sub>50</sub> de apenas 4,32 ± 0,32 µmol/L para as células A549, ao passo que apresentou um IC<sub>50</sub> de 11,59 ± 0,23 µmol/L para as células normais (MRC-5).

Curiosamente, a citotoxicidade da Acetogenina 9 em relação às células tumorais A549 e da Acetogenina 10 em relação às A549 foi significativamente maior do que o observado na linhagem de células tumorais MCF-7. Isso é evidenciado pelo índice de seletividade, que foi de 1,0 e 2,4 para Acetogenina 9 e 10, respectivamente, enquanto para a Acetogenina 8, o índice de seletividade foi zero (conforme apresentado na Tabela 4.18).

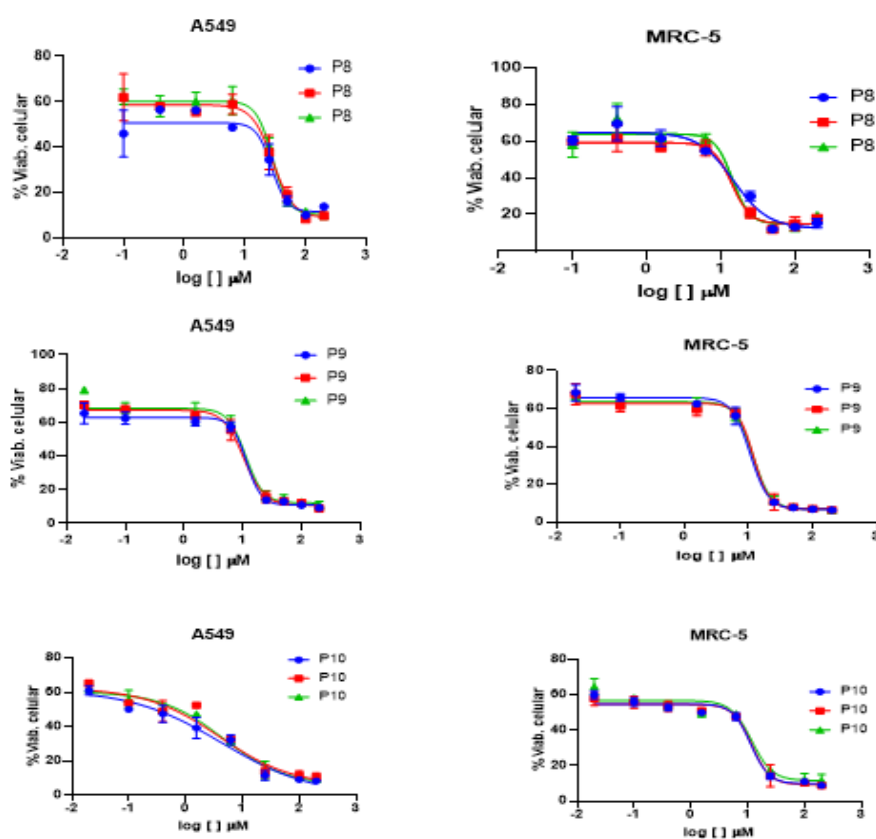


Figura 4.122: Atividade citotóxica in vitro da Acetogenina 8 (P8), Acetogenina 9 (P9) e Acetogenina 10 (P10) sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5). Os pontos azuis, vermelhos e verdes representam as triplicatas.

Tabela 4.18- Atividade anticâncer *in vitro* das acetogeninas isoladas de *Annona squamosa* sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5).

	IC <sub>50</sub> (µmol/L)				
	MCF-7	A549	MRC-5	IS <sup>1</sup>	IS <sup>2</sup>
<b>P8</b>	>200	28,22 ± 0,53	14,38 ± 0,38	-	-
<b>P9</b>	>200	11,01 ± 0,60	11,38 ± 0,68	-	1,0
<b>P10</b>	>200	4,32 ± 0,32	11,59 ± 0,23	-	2,7

\*IS<sup>1</sup> = MRC-5/ MCF-7; IS<sup>2</sup> = MRC-5/ A549

Assim, as novas acetogeninas de *Annona squamosa* surgem como promissores candidatos a fitofármacos anticâncer. No entanto, são necessários estudos adicionais para uma compreensão mais aprofundada de seus mecanismos de ação, farmacocinética e potenciais efeitos tóxicos a médio e longo prazo. Existem exemplos na literatura que corroboram os resultados apresentados anteriormente, destacando a importância científica desses compostos em face de uma doença tão prejudicial e letal na época atual.

Varuva Ashok Kumar\* and C. Girish 2021, se basearam em testes de toxicidade de extratos de folhas e sementes da *A. squamosa*, onde se determinou que a acetogenina Annotemoyin 1 não apresenta efeitos tóxicos em ratos de Long Evan, administrando o composto em 200 µg diariamente por 14 dias.

Varuva Ashok Kumar\* and C. Girish, 2021 estudaram dois novos compostos isolados do extrato de semente da *A. Squamosa*. O estudo foi realizado contra HCT, câncer de órgão respiratório humano (A-549), câncer de mama humano (MCF-7) e carcinoma adrenérgico da próstata humana (PC-3) com adriamicina como padrão positivo usando o método MTT.

Abdullah et al. (2017), utilizando o ensaio colorimétrico MTT 3- (4,5-dimetitiazole-Brometo de 2-il) -2,5-difeniltetrazólio, em cultura de célula do Colo-205, verificaram que a Ciências da Saúde: desafios, perspectivas e possibilidades. O Volume da citotoxicidade da *A. muricata* para o referido teste foi superior à leucovorina e placebo, como os autores descreveram: “A partir do resultado, descobrimos que após 48 horas de incubação, a viabilidade celular do extrato de folhas de *A. muricata* foi de 21,01%, enquanto a viabilidade celular de leucovorina foi de 201,85%. A célula de viabilidade foi reduzida para 61,3% após incubação com extrato da folha de *A. muricata* por 48 horas.

#### 4.8 Potencial biológico das lignanas isoladas em ensaios contra células cancerígenas.

Um efeito dose-dependente pode ser notado nas células avaliadas. Os valores de IC<sub>50</sub> para a linhagem MCF-7 e MRC-5 excedem 200 µM, que é a concentração mais alta testada, para todos os compostos avaliados. No caso das células cancerígenas de pulmão (A549), a substância F2/P2, uma lignana derivada do Yangambim previamente não documentada na literatura, apresentou o IC<sub>50</sub> mais baixo, medindo 12,29 ± 0,59 µmol/L, seguida pela lignana F2/P1, com um IC<sub>50</sub> de 12,82 ± 0,92 µmol/L, e pela lignana F2/P3, conhecida como Yangambim.

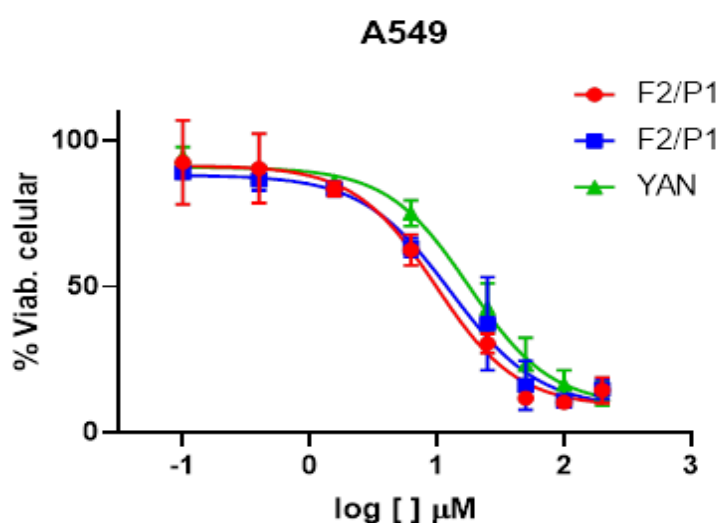


Figura 4.123: Atividade citotóxica in vitro da Lignana F2/P1 , Lignana F2/P2 e Lignana F2/P3 sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5). Os pontos azuis, vermelhos e verdes representam as triplicatas.

Tabela4.19. Atividade anticâncer *in vitro* das Lignanas isoladas de *Annona squamosa* sob as linhagens celulares de: câncer de pulmão (A549); adenocarcinoma de mama humano (MCF-7) e células humanas normais (MRC-5).

Compostos	IC <sub>50</sub> (µmol/L)			IS <sup>1</sup>
	A549	MCF-7	MRC-5	
F2/P2	12,29 ± 0,59	>200*	>200	16,27
F2/P1	12,82 ± 0,92	>200	>200	15,60
F2/P3 (Yan)	17,68 ± 0,26	>200	>200	11,31

\*Os valores de IC<sub>50</sub> na linhagem MCF-7 e MRC-5 são maiores que 200 µM (maior concentração testada).

Recentemente, estudos têm revelado o potencial benéfico de várias lignanas em diferentes contextos de saúde. Por exemplo, a lignana filigenina demonstrou ter propriedades protetoras contra a osteoartrite, inibindo processos inflamatórios associados a essa condição (ZHOU et al., 2021). Além disso, a lignana fargesina mostrou a capacidade de suprimir o crescimento de células de câncer de cólon, interferindo em uma das vias de sinalização envolvidas na doença (LEE et al., 2021).

Também foram relatadas lignanas tetraidrofurofurânicas com atividades anticolinesterásicas que apresentaram resultados promissores no tratamento de doenças neurodegenerativas, como Alzheimer e Parkinson. Além disso, lignanas e neolignanas têm sido investigadas como substâncias-chave ou intermediárias no tratamento de condições crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes, obesidade e inflamações do sistema nervoso (HU et al., 2021; WORAWALAI et al., 2019).

Estes são apenas alguns exemplos do vasto potencial que as lignanas podem oferecer no contexto biológico. Com certeza, existe um imenso território ainda inexplorado dentro desta família de compostos. Portanto, a continuação das pesquisas relacionadas a essas substâncias pode desvendar novas lignanas e neolignanas com propriedades biológicas inéditas, além de fornecer estruturas fundamentais para o desenvolvimento de protótipos e derivados mais eficazes do que os atualmente disponíveis para uma ampla gama de doenças.

## 5. CONCLUSÕES

1. A presença de acetogeninas pode ser identificada através da detecção de determinados grupos funcionais característicos em suas estruturas. Estes incluem sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  das carboxilas dos anéis lactônicos, que são observados na faixa de aproximadamente 170 ppm, os carbonos  $\alpha$  e  $\beta$ -carbonílicos, com deslocamentos em torno de 130 e 150 ppm, respectivamente, os CH de epóxidos, THF e THP, que são observados em intervalos de 60 a 80 ppm, bem como a presença de grupos  $\text{CH}_2$  em cadeias alquílicas na faixa de 22 a 29 ppm. É importante notar que a numeração na estrutura das acetogeninas começa a partir do carbono da lactona e continua até o C-6. Os três últimos carbonos (35-37) correspondem ao anel lactônico.

2. A *Annona squamosa* tem sido objeto de estudos desde a década de 1940, com suas propriedades sendo investigadas tanto em ensaios *in vitro* quanto em experimentos *in vivo*. Diversas pesquisas destacaram três características distintivas da *Annona squamosa*: a capacidade de evitar ou atenuar os efeitos adversos dos métodos tradicionais de tratamento do câncer; a segurança das acetogeninas como substâncias; e a evidência de que as acetogeninas, tanto isoladamente quanto na forma *in natura* da planta, são reconhecidas como agentes preventivos contra tumores ou redutores do risco de desenvolvimento de câncer, com um aspecto fundamental: elas não afetam as células saudáveis.

3. Interessantemente, o efeito citotóxico da Acetogenina 1 contra células tumorais (A549 e MFC-7) e a Acetogenina 3 contra A549 foi bem inferior que o efeito na linhagem decélulas normais (MCF-5). Isso pode ser evidenciado pelo índice de seletividade que foi de 1,7 e 1,4 para Acetogenina 1, enquanto para a Acetogenina 3 foi de 3 (Tabela 05). O índice de seletividade mede o quanto um composto é ativo contra células tumorais sem causar danos à viabilidade das células de mamíferos. Portanto, quanto maior o IS, mais seletiva é a molécula pelas células tumorais.

4. Portanto, as novas acetogeninas de *A. squamosa* surge como um possível candidato a fitofármaco anticâncer, e, novos estudos são necessários para uma melhor compreensão de seus mecanismos de ação, farmacocinética e toxicidade a médio e longo prazo.

5. Em resumo, o estudo revela que *A. squamosa* contém uma variedade de compostos, incluindo acetogeninas e lignanas, com potencial atividade biológica, incluindo atividades antimicrobianas, inseticidas e anticâncer. Essas descobertas podem ter implicações importantes para a pesquisa farmacêutica e agrícola, explorando as propriedades terapêuticas e medicinais desses compostos naturais.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALALI, F.Q., X.X. LIU & J.L. Mclaughlin. “*Annonaceous acetogenins: Recent progress*”. J. Nat. Prod. 62: 504-540, 1999.
2. AL KAZMAN, B.S.M.; HARNETT, J.E.; HANRAHAN, J.R. Traditional Uses, Phytochemistry and Pharmacological Activities of Annonaceae. *Molecules* 2022, 27, 3462. doi.org/10.3390/molecules27113462.
3. ASSEFA, F. Status of fall armyworm (*Spodoptera frugiperda*), biology and control measures on maize crop in Ethiopia: a review. *Int. J. Entomol. Res.* 06 (02) 2018, 75-85. DOI: 10.33687/entomol.006.02.2498
4. ATTA-UR-RAHMAN (Ed.) *Studies in Natural Products Chemistry*, Vol. 26, 2002 Elsevier Science B.V. All rights reserved. New findings on the bioactivity of Lignans. Rios, J.L.; Giner, R.M.; Prieto, J.M.
5. BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. “Acetogenins from *Annonaceae*: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action”. *Natural Product Reports*, London, v. 22, n.2, p.269-303, 2005.
6. BOGORNI PC, VENDRAMIM JD. “Bioatividade de extratos aquosos de *Trichilia* spp. sobre *S. frugiperda* (J. E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae) em milho”. *NeotropEntomol* 32: 665-669, 2003.
7. CAMILA M. SOUZA; EDSON L. L. BALDIN; LEANDRO P. RIBEIRO; IVANA F. SILVA; RAFAELA MORANDO; KEYLLA U. BICALHO; 8. JOSE´ D. VENDRAMIM; JOÃO B. FERNANDES. “Lethal and growth inhibitory activities of Neotropical *Annonaceae*-derived extracts, commercial formulation, and an isolated acetogenin against *Helicoverpa armigera*”. *J Pest Sci*, 2016.
8. CASTILLO-SÁNCHEZ, L. H. C.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J. J.; DELGADO-HERRERA, M. A. “Secondary metabolites of the *Annonaceae*, *Solanaceae* and *Meliaceae* families used as biological control of insects”. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, Yucatán, v. 12, n.3, p.445-462, 2010.
9. CASTRO, D. P.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; SANTOS, N. M.; BALIZA,

- D.P. "Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L". Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.8, p.27-32, 2006.
10. COSTA ELN, SILVA RFP, FIUZA LM." Efeitos, aplicações e limitações de extratos de plantas inseticidas". Acta Biol Leopold 26: 173-185, 2004.
  11. COSTA, E.V.; SAMPAIO, M.F.C.; SALVADOR, M.J.; NEPEL, A.; BARISON, A. Chemical constituents from the stem bark of *Annona pickelii* (Annonaceae). Química Nova 2015, 38, No. 6, 769-776.
  12. CHATROU, L.W.; PIRIE, M.D.; ERKENS, R.H.J.; COUVREUR, T.L.P.; NEUBIG, K.M.J.; ABBOTT, R.; MOLLS, J.B.; MAAS, J.W.; SAUNDERS, R.M.K.; CHASE, M.W."A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics". Botanical Journal of the Linnean Society, London, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.
  13. CHAVES, M.H.; DE FREITAS, A.; ROQUE, N.F.; CAVALEIRO, A.J. Separação e Identificação de Constituintes Químicos Polares dos Galhos de *Porcelia macrocarpa*. Quim. Nova 23, 2000, 307-309.
  14. CHEN CY, CHANG FR, WU YC (1997). "Cherimoline, a novel alkaloid from the stems of *Annona cherimola*". Tetrahedron Lett. 38: 6247-6248, 1997.
  15. CHEN CY, CHANG FR, YEN HF, WU YC. "Amides from the stems of *Annona cherimola*". Phytochem.49: 1443-1447, 1998.
  16. CHEN CY, CHANG FR, CHIU HF, WU MJ, WU YC. "Aromin-A, an Annonaceous acetogenin from *Annona cherimola*". Phytochem. 51: 429-33, 1999.
  17. CHEN CY, CHANG FR, PAN WB, WU YC. "Four alkaloids from *Annona cherimola*". Phytochem. 56: 753-757, 2001.
  18. DANIEL BERNARDI, LEANDRO RIBEIRO, FELIPE ANDREAZZA, CAMILA NEITZKE, EUGÊNIO EDUARDO OLIVEIRA, MARCOS BOTTON, DORI EDSON NAVA, JOSÉ DJAIR VENDRAMIM; DANIEL BERNARDI, LEANDRO RIBEIRO, FELIPE ANDREAZZA, CAMILA NEITZKE, EUGÊNIO EDUARDO OLIVEIRA; MARCOS BOTTON, DORI EDSON NAVA, JOSÉ DJAIR VENDRAMIM. "Potential use of *Annona* by products to control *Drosophila suzukii* and toxicity to its parasitoid *Trichopria anastrephae*". Industrial Crops &



Products (2017).

19. DIAS, M.C. “Estudos taxonômicos do gênero *Xylopia* L. (*Annonaceae*) no Brasil extra-amazônico”. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1988.
20. DI GIULIO, C.; GUZMAN, J.M.G.; GOMES, J.V.D.; CHOI, Y.H.; MAGALHÃES, P.O.; FONSECA-BAZZO, Y.M.; SILVEIRA, D.; ESTRADA, O. A New Lignan from *Annona squamosa* L. (*Annonaceae*) demonstrates vasorelaxant effects *in vitro*. *Molecules* 2023, 28, 4256. doi.org/10.3390/molecules28114256
21. DOMINGUES, V.C.; RIBEIRO, L.P.; GONÇALVES, G.L.P.; FORIM, M.R.; SILVA, M.F.G.F.; FERNANDES, J.B.; VENDRAMIM, J.D. Grain-protectant compounds from *Duguetia lanceolata* (*Annonaceae*) derivatives: Bioassay-guided searching and toxicity against the maize weevil. *Journal of Stored Products Research*, 85, 101549, 2020.
22. DOYLE, J.A.; LE THOMAS, A. “Phylogenetic analysis and character evolution in *Annonaceae*”. *Bulletin du Muséum National d’Histoire Naturelle, Section B, Adansonia*, v. 18, p. 279-334, 1996.
23. DOYLE, J.A.; BYGRAVE, P.; LE THOMAS, A. “Implications of molecular data for pollen evolution in *Annonaceae*. In: HARLEY, M.M.; MORTON, C.M; BLACJMORE, S. (Ed.). *Pollen and spores: morphology and biology*”. Royal Botanic Gardens, Kew, p. 259-284, 2000.
24. DOYLE, J. A.; LE THOMAS, A. “Evolution and phylogenetic significance of pollen in *Annonaceae*”. *Botanical Journal of the Linnean Society, London*, v. 169, n. 1, p. 190-221, 2012.
25. ERKENS, R.H.J.; CHATROU, L.W.; KOEK-NOORMAN, J.; MAAS, J.W.; MAAS, P.J.M. “Classification of the large widespread genus of Neotropical trees, *Guatteria* (*Annonaceae*) and its three satellite genera *Guatteriella*, *Guatteriopsis* and *Heteropetalum*”. *Taxon, Utrecht*, v. 56, n. 3, p. 757-774, 2007.
26. FRIES, R.E. *Annonaceae*. In: ENGLER, A.; PRANTL, K. (Ed.). *Die natürlichen Pflanzenfamilien*. 2nd ed. Berlin: Duncker und Humblot, p. 1-171, 1959.
27. FRIES, R.E. Revision der Arten einiger *Annonaceen*- Gattungen II. *Acta Horti Bergiani, Stockholm* v. 10, n. 2, p. 129-341, 1931.
28. GLEYE C, LAURENS A, LAPREVOTE O, SERANI L, HOCQUEMILLER R.

- “Isolation and structure elucidation of sabadelin, an acetogenin from roots of *Annona muricata*”, *Phytochem.* 52: 1403-1408, 1999.
29. GABRIEL LUIZ PADOAN GONÇALVES, VANESSA DE CÁSSIA DOMINGUES, LEANDRO DO PRADO RIBEIRO, JOÃO BATISTA FERNANDES, MARIA DE FÁTIMA DAS GRAÇAS FERNANDES, MOACIR ROSSI FORIM, JOSÉ DJAIR VENDRAMIM. “Compounds from *Duguetia lanceolata* St.- Hil. (*Annonaceae*) bioactive against *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae)”. *Industrial Crops and Products* 97 360–367, 2017.
  30. GONÇALVES, G.L.P.; DOMINGUES, V.C.; RIBEIRO, L.P.; FERNANDES J.B.; SILVA, M.F.G.F.; FORIM, M.R.; VENDRAMIM, J.D. Compounds from *Duguetia lanceolata* St.- Hil. (*Annonaceae*) bioactive against *Zabrotes subfasciatus* (Boheman) (Coleoptera: Chrysomelidae: Bruchinae). *Industrial Crops and Products* 97, 360-367, 2017.
  31. GUO, X.; TANG, C.C.; THOMAS, D.C.; COUVREUR, T.L.P.; SAUNDERS, R.M.K. A mega-phylogeny of the *Annonaceae*: taxonomic placement of five enigmatic genera and support for a new tribe, *Phoeniciantheae*. *Sci. Rep.* 2017, 7, 7323. DOI:10.1038/s41598-017-07252-2
  32. KESSLER, P.J.A. “*Annonaceae*. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. (Ed.)”. *The families and genera of vascular plants. II. Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families.* Berlin: Springer Verlag, p. 93-129, 1993.
  33. KRINSKI, D.; MASSAROLI, A.; MACHADO, M. (2014). Potencial inseticida de plantas da família *Annonaceae*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 225–242. doi:10.1590/S0100-29452014000500027.
  34. LOBÃO, A.Q. “Filogenia de *Guatteria* (*Annonaceae*) e revisão taxonômica das espécies da Floresta Atlântica”. Tese (Doutorado) - Escola Nacional de Botânica Tropical, Instituto de Pesquisa Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.
  35. LOPES, J.C. “*Annonaceae* da Reserva Natural Vale, Linhares, Espírito Santo”. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
  36. LÜMMEN, P. “Complex I inhibitors as insecticides and acaricides”. *Biochimica*

- et Biophysica Acta, Amsterdam, v. 1364, n.2, p.287–296, 1998.
37. MAAS, P.J.M. Neotropical *Annonaceae*. In: MILLIKEN, W.; KLITGARD, B.; BACARAT, A. Neotropikey: interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics. 2009.
  38. MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T. “Studies in *Annonaceae*. II A monograph of the genus *Anaxagorea* A.St.-Hil”. Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie, Stuttgart, v. 105, n. 1, p. 73-134, 1984.
  39. MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y. T. et al.” *Rollinia*”. Flora Neotropica Monograph, New York, v.57, p.1-188, 1992.
  40. MELLO-SILVA, R.; LOPES, J.C.; PIRANI, J.R. “Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: *Annonaceae*”. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 37-56, 2012.
  41. MENEZES, E.L.A. “Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Seropédica: Embrapa Agrobiologia”, Rio de Janeiro, p: 58, 2005.
  42. MENEZES, R.P.B.; SESSIONS, Z.; MURATOV, E.; SCOTTIA, L.; SCOTTI, M.T. Secondary metabolites extracted from *Annonaceae* and chemotaxonomy study of terpenoids. J. Braz. Chem. Soc. 2021, Vol. 32, 2061-2070.
  43. NICULAU, E.S.; FERREIRA, D.; RODRIGUES-FILHO, E.; BEHLAU, F.; MAGNANI, R.F.; TOFFANO, L.; PRIETO, E.L.; FERNANDES, J.B.; SILVA, M.F.G.F. MALDI-TOF Mass Spectrometry for the Diagnosis of Citrus Canker Caused by *Xanthomonas citri* subsp. *citri*. Molecules 27, p. 8947, 2022. doi.org/10.3390/molecules27248947
  44. PIRIE, M.D.; CHATROU, L.W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H.J.; OOSTERHOF, J. “‘Andean-centred’ genera in the short-branch clade of *Annonaceae*: testing biogeographical hypotheses using phylogeny reconstruction and molecular dating”. Journal of Biogeography, Oxford, v. 33, p. 31–46, 2006.
  45. POGUE G. M. “A world revision of the genus *Spodoptera* Guenée (Lepidoptera: Noctuidae)”. Memoirs of the American Entomological Society, Philadelphia, v. 43, n.28, p.117-124, 2002.

46. PRATIBHA V. D.; HOOLI, A. A.; HOLIHOSUR, S. N. "Bioefficacy of cold ethyl alcohol extract of *Annona squamosa* against *Spodoptera litura* Fabricius". Journal of Biopesticides, Tamilnadu, v. 3, n.1, p.271-274, 2010.
47. RAINER, H. "Monographic studies in the genus *Annona* L. (*Annonaceae*): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hi". Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien: Serie B: für Botanik und Zoologie, Ann Arbor, v. 108, p. 191-205, 2007.
48. RIBEIRO, L.P.; ZANARDI, O.Z.; VENDRAMIM, J.D.; YAMAMOTO, P.T. Comparative toxicity of an acetogenin-based extract and commercial pesticides against citrus red mite. Experimental and Applied Acarology 2014, 64(1), 87–98. doi:10.1007/s10493-014-9810-2
49. RICHARDSON, J.E.; CHATROU, L.W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H.J; PIRIE, M.D. "Historical biogeography of two cosmopolitan families of flowering plants: *Annonaceae* and *Rhamnaceae*". Philosophical Transactions of the Royal Society B, London, v. 359, p. 1495-1508, 2004.
50. RIZZINI, C.T.; HERINGER, E.P. "Studies on the underground organs of trees and shrubs from some southern Brazilian savannas". Anais da Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, v. 34, n. 2, p. 235-247, 1962.
51. TONG, H.; SU, Q.; ZHOU, X.; BAI, L. "Field resistance of *Spodoptera litura* (Lepidoptera: Noctuidae) to organophosphates, pyrethroids, carbamates and four newer chemistry insecticides in Hunan, China". Journal of Pest Science,