

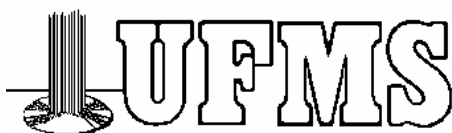
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA
DAS PARTES SUBTERRÂNEAS DE *DUGUETIA*
FURFURACEA (A. ST.-HIL.) BENTH. & HOOK. F. –
ANNONACEAE**

DENISE BRENTAN DA SILVA

CAMPO GRANDE – MS
2006



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO – NÍVEL DE MESTRADO EM QUÍMICA

**ESTUDO FITOQUÍMICO E AVALIAÇÃO ALELOPÁTICA
DAS PARTES SUBTERRÂNEAS DE *DUGUETIA*
FURFURACEA (A. ST.-HIL.) BENTH. & HOOK. F. –
ANNONACEAE**

Dissertação apresentada como um dos requisitos para a obtenção do grau de **Mestre em Química**, área de concentração em Química Orgânica, junto ao Departamento de Química do Centro de Ciências Exatas e Tecnologia da Universidade Federal de Mato Grosso do sul, sob orientação do **Prof. Dr. João Máximo de Siqueira** e co-orientação do **Prof. Dr. Walmir Silva Garcez**.

CAMPO GRANDE – MS
2006

Dedico este trabalho aos meus pais, Cleuza e Valdeci, pelo apoio, carinho, amor e, principalmente, pelo incentivo em todas etapas.

“A mudança está em tuas mãos. Reprograma tua meta, busca o bem e viverás melhor. Embora ninguém possa voltar atrás e fazer um novo começo, qualquer um pode começar agora e fazer um novo fim”

Chico Xavier

AGRADECIMENTOS

A Deus.

Ao Professor Dr. João Máximo de Siqueira pelos ensinamentos propiciados durante a realização deste trabalho e pela amizade sincera e verdadeira em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Walmir Silva Garcez pela sua importante colaboração neste trabalho, pela paciência e compreensão.

Aos meus pais, Cleuza e Valdeci, pelo amor, carinho e incentivo em todos os momentos. E aos meus irmãos, Fábio e Glauco, pelo amor e estímulo.

Aos meus tios, Silvio e Marli, pelo apoio e pelos momentos que puderam ser vividos apenas em família.

Ao Cleber Prudêncio pelo estímulo, amor, paciência e compreensão.

A minha grande amiga Maria Alice Mantovan, pela amizade e carinho.

Ao Euzébio Guimarães Barbosa pela realização dos cálculos teóricos e, principalmente, por ser um grande amigo.

As minhas amigas e companheiras de laboratório Nídia Cristiane Yoshida e Elayne Cristina Tulli (em especial), pela amizade e ajuda nos momentos mais difíceis dessa caminhada.

A todos os meus queridos amigos da Farmacognosia Rodolfo, Alex, Karina (em especial), Rafaela, Ricardo, Hércules e Fabrício pelos momentos inesquecíveis e pelo auxílio nas coletas botânicas.

Aos professores do mestrado Dênis Pires Lima, Adilson Beatriz, Fernanda Rodrigues Garcez e Walmir Silva Garcez pelos ensinamentos.

Ao técnico do laboratório de Farmacognosia, João Roberto Fabri, que sempre se prontificou a auxiliar no que fosse preciso.

A técnica Edilene Delphino Rodrigues pelos experimentos de RMN e pela amizade.

Ao Prof. Dr. Noberto Peporine e Carlos Alexandre Carollo pela confecção dos espectros de Massas.

Ao Luiz Leonardo, pela realização dos experimentos de Rotação Óptica e Infravermelho e aos demais funcionários do DQI pelos serviços realizados.

A Merlin, Edgar e Diego pela realização dos experimentos de Ultravioleta.

Aos secretários da pós-graduação, Maria Otávia e Celestino.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

ÍNDICE

Resumo	iv
Abstract	v
Lista de Abreviaturas	vi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 - A Família Annonaceae	2
1.2 - Perfil Químico de Annonaceae	2
1.3 - Acetogeninas de Annonaceae	3
1.4 - Constituintes dos óleos essenciais de Annonaceae	4
1.5 - Alcalóides em Annonaceae	6
1.6 - O Gênero <i>Duguetia</i>	8
1.7 - <i>Duguetia furfuracea</i>	11
1.7.1 - Descrição Botânica.....	13
1.8 - Alelopatia	14
1.8.1- Plantas invasoras e a Alelopatia	16
2- OBJETIVOS	18
3- PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1 - Material e métodos	21
3.2 - Coleta e identificação do Material Vegetal	22
3.3 - Obtenção do Óleo Essencial das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i>	23
- 2,4,5-trimetoxi-estireno (1)	23
3.4 - Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i> (DfcsOE2)	23
3.5 - Estudo fitoquímico do Óleo Essencial das cascas do caule subterrâneo	23
- Grupo 1	
- DfcsOE2-2	25
- Grupo 2	
- (-)- α -gurjuneno (2)	25
- Grupo 3	
- Aromadendreno (3)	25
- Grupo 6	
- Bicyclogermacrene (4)	26
- Grupo 11	
- (E)-metil-isoeugenol (5)	26
- Grupo 12	
- α -Asarona (6) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (1)	26
3.6 - Obtenção do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i>	27
- policarpol (7)	27
3.7 - Estudo fitoquímico do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo (DfcsEPsob)	28
- Grupo 1	
- Óxido de β -cariofileno (8)	29
- Grupo 9	
- Asaraldeído (9)	29

- Grupo 10	
- 2,4,5-trimetoxiestireno (1) e α -asarona (6)	30
3.8 - Obtenção do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i>	30
3.9 - Marcha Química do Extrato DfecsAlcBr	30
3.10 - Estudo fitoquímico do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i> (DfecsAlc)	31
- Grupo 4	
- (-)-duguetina (10)	33
- Grupo 5	
- Subgrupo 3	
- Dicentrinona (11)	35
- Subgrupo 5	
- (-)-duguetina (10)	35
- Grupo 10	
- (-)-N-metiltetraidropalmatina (12)	35
- Grupo 11	
- (+)-N-metilglaucina (13)	36
3.11 - Obtenção do Extrato etanólico do cerne de caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i> - precipitação com acetona	36
- alantoína (14)	36
3.12 - Avaliação Alelopática	37
3.13 - Avaliação da Atividade Auxínica	41
- Teste do crescimento linear do coleóptilo estiolado	41
3.14 - Toxicidade sobre a <i>Artemia salina</i> (TAS)	44
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
4.1 - Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de <i>D. furfuracea</i> (DfecsOE2)	47
4.2 - 2,4,5-Trimetoxi-estireno (1)	49
4.3 - (-)- α -gurjuneno (2)	53
4.4- Aromadendreno (3)	59
4.5- Biciclogermacreno (4)	63
4.6 - (E)-metil-isoeugenol (5)	69
4.7 - α -asarona (6)	75
4.8 - Policarpol (7)	80
4.9 - Óxido de β -Cariofileno (8)	89
4.10 - Asaraldeído (9)	93
4.11 - Alcalóides aporfínicos	96
4.11.1 - Algumas características físicas e espectroscópicas dos alcalóides aporfínicos	97
4.12 - (-)-duguetina (10)	99
4.13 - Dicentrinona (11)	110
4.14 - (-)-N-metiltetraidropalmatina (12)	115
4.15 - (+)-N-metilglaucina (13)	127
4.16 - Alantoína (14)	139
4.17 - Avaliação Alelopática	143
4.17.1 - Resultados obtidos na avaliação alelopática do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i> (DfecsOE2)	143
4.17.2 - Resultados obtidos na avaliação alelopática do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i> (DfecsEP)	146

4.17.3 - Resultados obtidos na avaliação alelopática do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i> (DfcccAlc)	150
4.18 - Avaliação da Atividade Auxínica	153
4.18.1 - Resultados obtidos na avaliação da atividade auxínica do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i> (DfcccOE2)	154
4.19 - Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> (TAS)	156
4.19.1 - Resultados obtidos na avaliação da Toxicidade frente a <i>Artemia salina</i> (TAS) dos extratos obtidos das cascas do caule subterrâneo de <i>Duguetia furfuracea</i>	156
5 – DADOS FÍSICO-QUÍMICOS	158
5.1 - 2,4,5-Trimetoxi-estireno (1)	159
5.2 - (-)- α -gurjuneno (2)	159
5.3 - Aromadendreno (3)	160
5.4 - Biciclogermacreno (4)	160
5.5 - (<i>E</i>)-metil-isoeugenol (5)	160
5.6 - α -asarona (6) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (1)	161
5.7 - Policarpol (7)	161
5.8 - Óxido de β -Cariofileno (8)	162
5.9 – Asaraldeído (9)	162
5.10 - (-)-duguetina (10)	163
5.11 - Dicentrinona (11)	164
5.12 - (-)- <i>N</i> -metiltetraidropalmatina (12)	164
5.13 - (+)- <i>N</i> -metilglaucina (13)	165
5.14 - Alantoína (14)	165
6 – CONCLUSÃO	166
7 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	168

RESUMO

Duguetia furfuracea (A. St.-Hil.) Benth. & Hook f. – Annonaceae, popularmente conhecida como “araticum-seco”, é uma planta invasora muito comum em Mato Grosso do Sul. No presente trabalho foi realizado, além do estudo fitoquímico das partes subterrâneas desta planta, a avaliação alelopática, teste de toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS) e também o bioensaio de atividade auxínica.

O estudo fitoquímico do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo conduziu ao isolamento de: 2,4,5-trimetoxi-estireno (**1**), α -gurjuneno (**2**), aromadendreno (**3**), biciclogermacreno (**4**), (*E*)-metilisoeugenol (**5**) e α -asarona (**6**). Do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo foram isolados: policarpol (**7**), óxido de β -cariofileno (**8**), asaraldeído (**9**), 2,4,5-trimetoxi-estireno (**1**) e α -asarona (**6**).

A partir do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo foram isolados os alcalóides: (-)-duguetina (**10**), dicentrinona (**11**), (-)-*N*-metiltetraidropalmatina (**12**) e (+)-*N*-metilglaucina (**13**), enquanto do extrato etanólico do cerne do caule subterrâneo foi obtido o ureídeo alantoína (**14**).

As substâncias **5**, **6** e **16** estão sendo descritas pela primeira vez no gênero *Duguetia* e as substâncias **14** e **15** pela primeira vez em Annonaceae.

O óleo essencial e o extrato éter de petróleo apresentaram atividade indutora de crescimento das radículas de *Lactuca sativa*, enquanto que o extrato alcaloídico provocou inibição do crescimento. O óleo essencial, avaliado no teste do crescimento linear do coleóptilo estiolado, apresentou atividade auxínica e todos os extratos obtidos e testados no TAS apresentaram atividade.

ABSTRACT

Duguetia furfuracea (A. St.-Hil.) Benth. & Hook f. – Annonaceae, locally known as “araticum-seco”, is a weed that often invades pastures in the Brazilian state of Mato Grosso do Sul. In the present work, its subterranean parts were used to conduct a phytochemical study, including allelopathic evaluation, brine shrimp (*Artemia salina*) lethality bioassay and auxin bioassay.

2,4,5-Trimethoxystyrene (**1**), α -gurjunene (**2**), aromadendrene (**3**), bicyclogermacrene (**4**), (*E*)-methylisoeugenol (**5**) and α -asarone (**6**) were isolated from the essential oil of the subterranean stem bark. Polycarpol (**7**), β -caryophyllene oxide (**8**), asaraldehyde (**9**), 2,4,5-trimethoxystyrene (**1**) and α -asarone (**6**) were obtained from the petroleum ether extract of the subterranean stem bark.

The alkaloid extract of the subterranean stem bark led to the isolation of (-)-duguetine (**10**), dicentrinone (**11**), (-)-*N*-methyltetrahydropalmatine (**12**) and (+)-*N*-methylglaucine (**13**). From the ethanol extract of the subterranean stem pith, the ureide allantoin (**14**) was isolated.

Substances **6** and **16** are described for the first time in the genus *Duguetia*; substances **14** and **15**, for the first time in Annonaceae.

The essential oil and petroleum ether extract induced root growth in *Lactuca sativa*, whereas the alkaloid extract was growth-inhibiting. In the coleoptile elongation assay, the essential oil exhibited auxin activity. All extracts were active in the brine shrimp lethality bioassay.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS UTILIZADOS

AcOEt	Acetato de etila P. A.
AcOH	Ácido acético glacial
AIA	Ácido indol-3-acético
CCDS	Cromatografia em camada delgada de sílica gel
CCPS	Cromatografia em camada preparativa de sílica gel
CCPS-AgNO ₃	Cromatografia em camada preparativa de sílica gel impregnada com AgNO ₃
CCPS-OXA	Cromatografia em camada preparativa de sílica gel e ácido oxálico (12%)
CG/EM	Cromatografia Gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas
CHCl ₃	Clorofórmio P. A.
COSY	Correlation Spectroscopy
d	Dupleto
dd	Duplo dupleto
dl	Dupleto largo
dq	Duplo quarteto
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer
DfccsAlc	Extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de <i>D. furfuracea</i>
DfccsEPsob	Extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de <i>D. furfuracea</i> (sobrenadante)
DfccsOE1	2,4,5- trimetoxi-estireno (1)
DfccsOE2	Óleo Essencial das cascas do caule subterrâneo de <i>D. furfuracea</i>
DfcercsEt	Extrato etanólico do cerne do caule subterrâneo de <i>D. furfuracea</i>
DL ₅₀	Dose letal para causar morte de 50 % das cobaias testadas
DMAP	<i>N,N</i> -dimetilaminopiridina
DMSO	Sulfóxido de dimetila
EM/IE	Espectro de Massas por Impacto de Elétrons
EP	Éter de petróleo
ESIMS	Electrospray Ionization Mass Spectrum
ESIMS-MS	Electrospray Ionization tandem Mass Spectrum
EtOH	Etanol P.A.

FM	Fase móvel
HMBC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
Hx	Hexano P. A.
IV/FT	Espectro de Infravermelho com Transformada de Fourier
J	Constante de acoplamento
m	Multipleto
MeOH	Metanol P. A.
MM	Massa Molecular
NOESY	Nuclear Overhauser effect Spectroscopy
ppm	Partes por milhão
q	Quarteto
Rf	Fator de retenção
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN de ^{13}C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN de ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
s	Singleto
sl	Singleto largo
t	Tripleto
tm	Triplo multipleto
TAS	Toxicidade sobre a <i>Artemia salina</i>
TMS	Tetrametilsilano
UV	Ultravioleta
δ	Deslocamento Químico em partes por milhão

1 - INTRODUÇÃO

1.1 – A Família Annonaceae

Annonaceae é uma das maiores famílias de plantas da ordem Magnoliales (Annonales), sendo esta considerada uma das mais primitivas de plantas dicotiledôneas [PELLETIER, 1987]. Representa uma família pantropical compreendendo 2300 espécies que estão divididas em aproximadamente 128 gêneros [KEESSLER, 1993], ocorrendo em diversas regiões do planeta e abrangendo árvores aromáticas, arbustos e trepadeiras [LEBOEUF *et al.*, 1982] [SANTOS & SALATINO, 2000]. No continente americano é representada por cerca de 38 gêneros e 740 espécies [WATERMAN, 1986], sendo que no Brasil foram identificados 26 gêneros e 260 espécies [MAAS *et al.*, 2001].

Nessa família algumas espécies são conhecidas pelos seus frutos comestíveis, como em espécies do gênero *Annona* (*A. crassiflora*, cujos frutos são conhecidos como araticum”) e do gênero *Xylopia* (por exemplo, *X. aromatica*, cujos frutos são utilizados como temperos e conhecidos como “pimenta de macaco”)[CORREA, 1978]. Também se destaca a importância comercial de alguns óleos voláteis como o óleo de Cananga (*Cananga odorata* Hook var. *macrophylla*) e de Ylang-Ylang (*Cananga odorata* Hook var. *genuina*) que são usados em perfumaria [CRAVEIRO *et al.*, 1981].

1.2 – Perfil Químico de Annonaceae

É uma das famílias de maior diversidade de constituintes químicos, que inicialmente foram divididos em dois grupos: substâncias alcaloídicas e não alcaloídicas, o que demonstra a importância dada inicialmente à presença de alcalóides. De fato, até 1982, das 371 substâncias isoladas da família, 225 eram alcalóides, mas o perfil químico de Annonaceae sugere um grande número de constituintes não alcaloídicos, tais como polifenólicos com ênfase aos flavonóides e outras substâncias aromáticas, terpenóides (monoterpenos,

sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos), bem como produtos do metabolismo primário que incluem carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas, entre outros [LEBOEUF *et al.*, 1982].

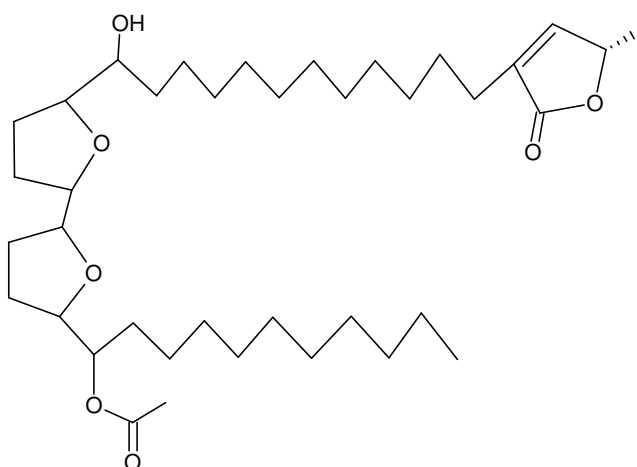
A ampla variação de constituintes químicos pode ser verificada no estudo citado por Waterman (1986) que mostra as diferentes classes de metabólitos secundários isolados das cascas do caule de espécies de Annonaceae encontradas em florestas tropicais africanas. Esta grande diversidade química pode ser uma consequência do isolamento geográfico dos gêneros [WATERMAN, 1986].

Desde a década de 80, o estudo fitoquímico da família Annonaceae se intensificou devido à descoberta de uma nova classe de substâncias, extremamente ativas, denominadas de “acetogeninas de annonáceas”. Em 1999, um artigo de revisão sobre acetogeninas relatou o isolamento de 350 substâncias de 37 espécies diferentes de Annonaceae [ALALI *et al.*, 1999].

1.3 – Acetogeninas de Annonaceae

Acetogeninas são metabólitos de C₃₅ a C₃₇, sendo caracterizados estruturalmente por possuírem uma cadeia alifática longa com um anel α,β -insaturado γ -lactona (ou cetolactona) metil-substituído e anéis tetraidrofurânicos localizados entre as cadeias alifáticas. Estes compostos apresentam atividades anti-helmíntica (*in vivo*), citotóxica, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária e pesticida [ALALI *et al.*, 1999].

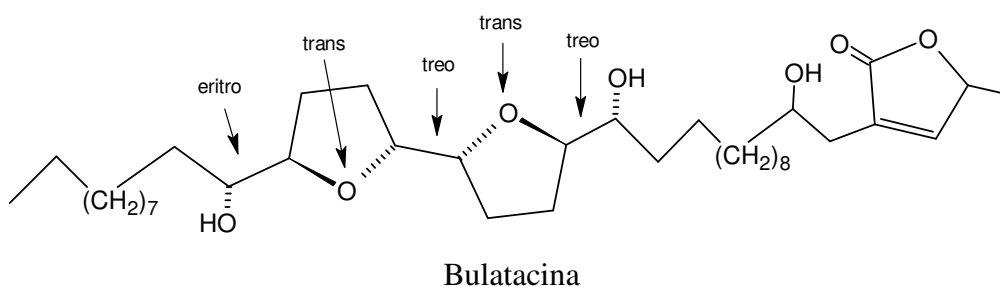
Em 1982, com o isolamento da primeira acetogenina, uvaricina, do extrato etanólico das cascas do caule de *Uvaria accuminata* [JOLAD *et al.*, 1982] os estudos fitoquímicos da família Annonaceae se intensificaram na busca por esses compostos [ALALI *et al.*, 1999].



Uvaricina

Em estudo recente, verificou-se uma significativa atividade leishmanicida de diversas acetogeninas isoladas de Annonaceae, bem como a importância da presença dos grupos hidroxilas em suas estruturas [GRANDIC *et al.*, 2004]. A acetogenina tucumanina (β -hidroxi- γ -lactona bistetraidrofurânica) isolada de *Annona cherimolia* apresentou uma potente atividade inibidora do complexo mitocondrial I [BARRACHINA *et al.*, 2004], e annonacina, uma acetogenina mono-tetraidrofurânica isolada das sementes de *Annona reticulata*, mostrou citotoxicidade nos estágios G1 e S do ciclo celular, sugerindo seu potencial anti-câncer [YUAN *et al.*, 2003].

A acetogenina bulatacina, isolada de *Annona bullata*, detém grande interesse já que apresentou atividade *in vivo* 300 vezes maior do que o taxol sobre células leucêmicas L1210 [AHAMMADSAHIB *et al.*, 1993].

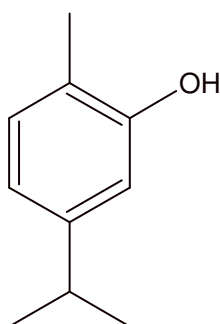


1.4 – Constituintes dos óleos essenciais de Annonaceae

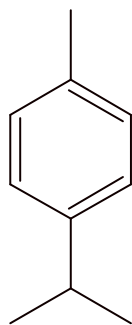
As substâncias voláteis têm despertado interesse por estarem relacionadas com diferentes propriedades biológicas e ecológicas, além de sua importância comercial na indústria alimentícia e cosmética [FOURNIER *et al.*, 1999].

Numerosas espécies da família Annonaceae são odoríferas em consequência da presença de óleos essenciais. Estes são misturas complexas que contém, em geral, uma grande quantidade de compostos orgânicos, mas observa-se a incidência de determinadas classes de compostos conforme o órgão onde se localiza o óleo: monoterpenos não funcionalizados são usualmente encontrados em frutos e sementes, sesquiterpenos não funcionalizados em folhas e sesquiterpenos oxigenados nas raízes e caules [FOURNIER *et al.*, 1999]. A variação dos teores de óleo essencial em diferentes espécies pode ser devido à constituição genética da planta, pois esta influencia a produção de determinados metabólitos [HAY *et al.*, 1993].

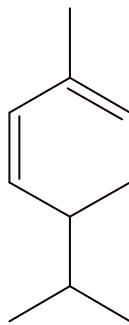
As primeiras substâncias voláteis isoladas de Annonaceae foram os monoterpenos carvacrol, *p* - cimeno, α - felandreno e canfeno de *Monodora grandiflora* [LEIMBACH, 1909].



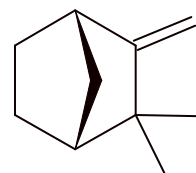
Carvacrol



***p* - cimeno**

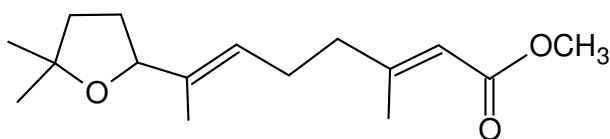


α - felandreno

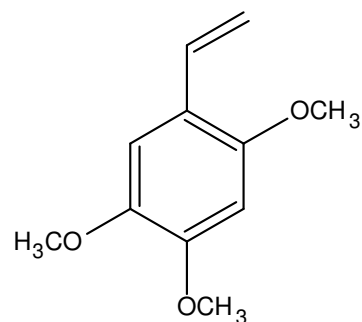


Canfeno

Em estudos fitoquímicos recentes, isolou-se a cazolobina, um novo sesquiterpeno das raízes de *Isolona hexaloba* [MATHOUET *et al.*, 2004]. Já os diterpenos *ent*-cauranos obtidos de *A. squamosa* mostraram atividade de inibição da produção de óxido nítrico em neutrófilos [YANG *et al.*, 2004].



Cazolobina



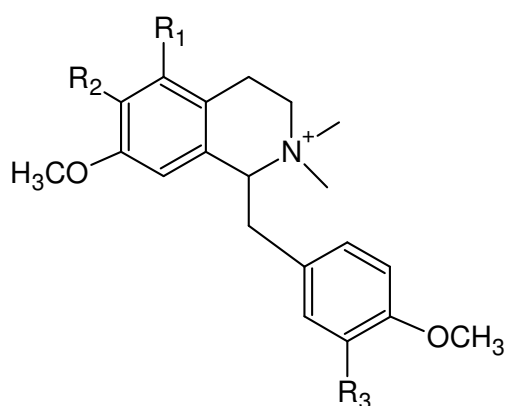
2,4,5-trimetoxi-estireno

O estudo comparativo dos constituintes voláteis de quatro espécies da família Annonaceae (*Anonidium manii*, *Monodora myristica*, *Pachypodanthium staudtii* e *Polyalthia suaveoleans*), por CG/EM, revelou que nos óleos essenciais obtidos há predominância de sesquiterpenos, entretanto em *P. sataudtii* observou-se a predominância de 2,4,5-trimetoxi-estireno (70%) [AGNANIET *et al.*, 2004].

1.5 – Alcalóides em Annonaceae

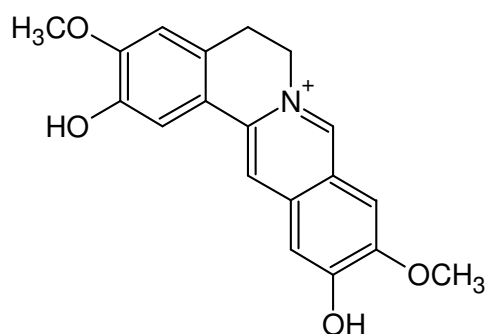
A classe alcaloídica detém grande importância dentro da família Annonaceae, pois diversos tipos de esqueletos já foram isolados, principalmente oxaporfínicos e aporfínicos [LEBOEUF *et al.*, 1982]. Os alcalóides oxaporfínicos têm sido avaliados em diferentes atividades biológicas, entre elas: atividade citotóxica [SONNET & JACOBSON, 1971; WU *et al.*, 1989; WU *et al.*, 1993; WIJERATNE *et al.*, 1995], anti-agregante plaquetária [CHEN *et al.*, 1996], antimicrobiana e antifúngica [HUFFORD *et al.*, 1975; HUFFORD *et al.*, 1980]. A principal atividade dessa classe de constituintes é a citotóxica [CHEN *et al.*, 1996].

De *Xylopia parviflora* foram isolados alcalóides isoquinolínicos quaternários, tais como a xilopinidina, deidrocoreximina, dimetilanomurina e *N*-metilpoebina, sendo este último um alcalóide aporfínico relatado pela primeira vez na literatura [NISHIYAMA *et al.*, 2004].

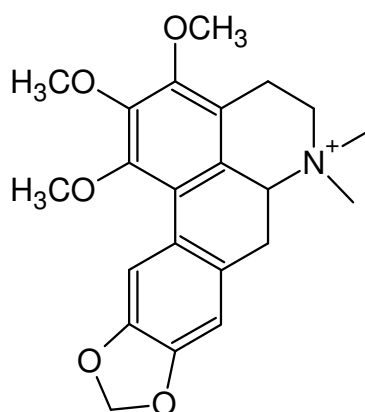


R₁= H R₂= OH R₃= OH Xilopinidina

R₁= OMe R₂= OMe R₃= H Dimetilanomurina

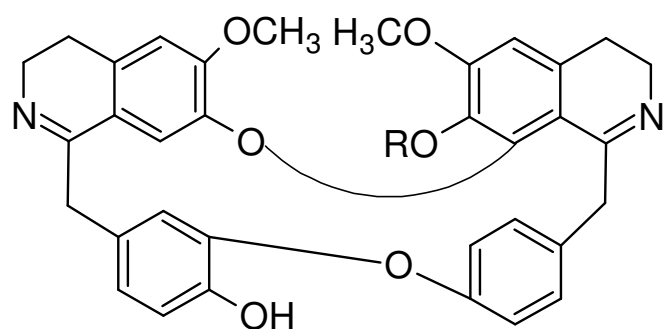


Desidrocoreximina



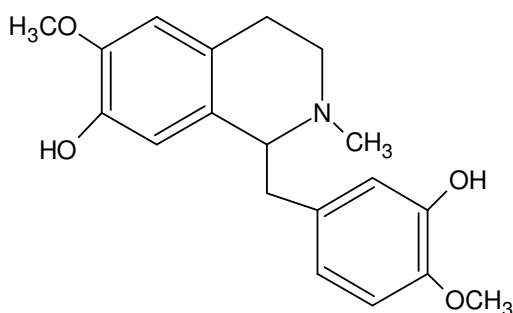
N-metilpoebina

Os alcalóides bisbenzilisoquinolínicos, presentes em um grande número de espécies de Annonaceae, possuem várias atividades farmacológicas que incluem atividade leishmanicida [FOURNET *et al.*, 1993], tripanocida [ARIAS *et al.*, 1994] e anti-malária [LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993]. Da espécie *Guatteria boliviana* foram isolados os alcalóides puertogalina A e B que mostram atividade leishmanicida e anti-malária [MAHIOU *et al.*, 2000].

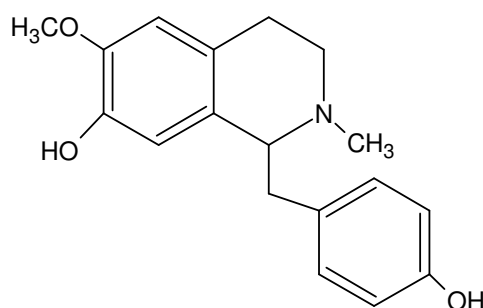


R = H Puertogalina A; **R = CH₃** Puertogalina B

Através de cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massa (LC/MS/MS), determinou-se a presença de reticulina e *N*-metilcoculaurina em frutos e folhas de *A. muricata*, *A. reticulata* e *A. squamosa*. Essas substâncias são potencialmente neurotóxicas devido a similaridade com o MPTP (1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina), a qual provoca lesões nos neurônios dopaminérgicos. Isto poderia explicar a alta incidência de parkinsonismo atípico e paralisia supranuclear progressiva nos pacientes investigados que consumiam os frutos e folhas (chás) de espécies do gênero *Annona* (Annonaceae) em Guadalupe [KOTAKE *et al.*, 2004].



Reticulina



***N*-metilcoculaurina**

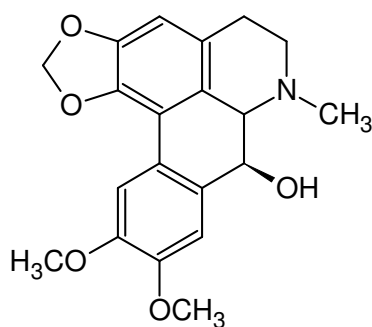
1.6 – O Gênero *Duguetia*

O gênero *Duguetia* contém cerca de 80 espécies nativas na América tropical, sendo um dos 27 gêneros mais importantes dentro da família. Investigações químicas de várias espécies da Bolívia, Colômbia e Brasil têm revelado predominância de alcalóides, incluindo benziltetraidro-isoquinolínicos, aporfínicos e oxaporfínicos, mas ainda não foi relatado o isolamento de acetogeninas neste gênero [NAVARRO *et al.*, 2001; MUHAMMAD *et al.*, 2001; LEBOEUF *et al.*, 1982].

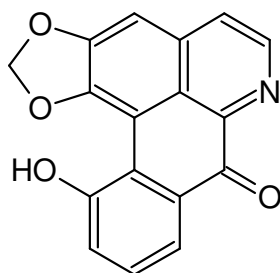
Um dos primeiros estudos de *Duguetia* sp. mostrou a presença de alcalóides aporfínicos e 7-hidroxi-aporfínicos, estando entre estes últimos a duguetina [CASAGRANDE *et al.*, 1970].

Da espécie *D. eximia* foram isolados alcalóides oxaporfínicos, tais como *O*-metilmoscatolina e 11-hidroxi-1,2-metilenodioxioxaporfínico, como também o 2,4,5-trimetoxi-estireno, sendo que este o primeiro composto isolado pertencente a uma classe diferente da alcalóidica no gênero *Duguetia* [GOTTLIEB *et al.*, 1978], mas que também foi encontrado em *D. panamensis* [WANG *et al.*, 1988].

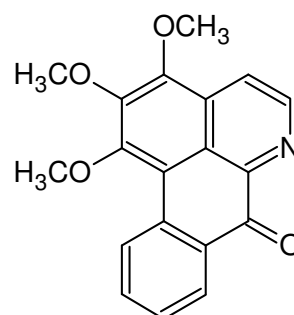
Outros alcalóides aporfínicos, 7-substituídos, fenantrênicos, tal como noraterosperminina, e protoberberínicos (discretamina) foram obtidos de *D. calycina* [LEBOEUF *et al.*, 1982].



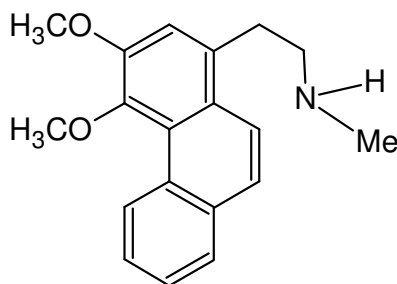
Duguetina



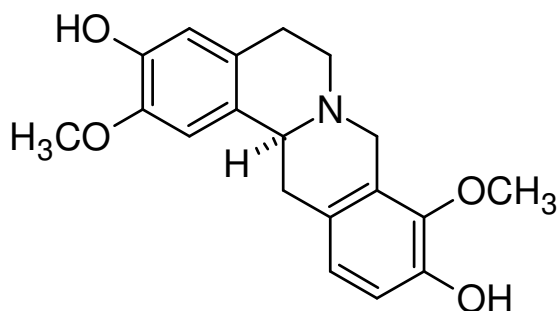
11-hidroxi-1,2-metilenodioxioxaporfínico



***O*-metilmoscatolina**

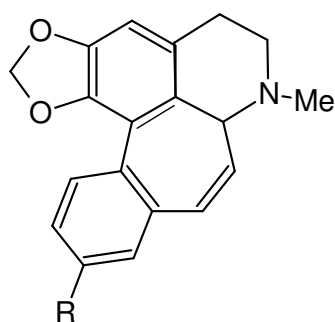


Noraterosperminina



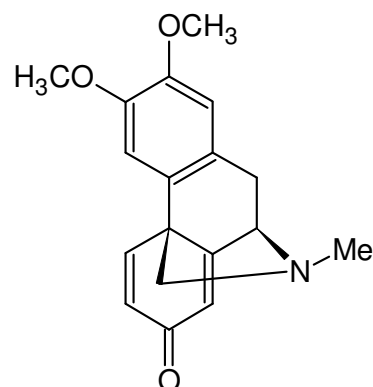
Discretamina

Os alcalóides azaromaporfínicos, espiguetina e espiguetidina, foram identificados em *D. spixiana* [RAZAMIZAFY *et al.*, 1987], e o alcalóide probovatina (morfinanedienona) em *D. obovata* [LEBOEUF *et al.*, 1982].



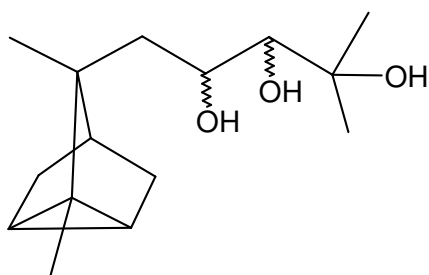
R= OCH₃ **Espiguetina**

R= OH **Espiguetidina**

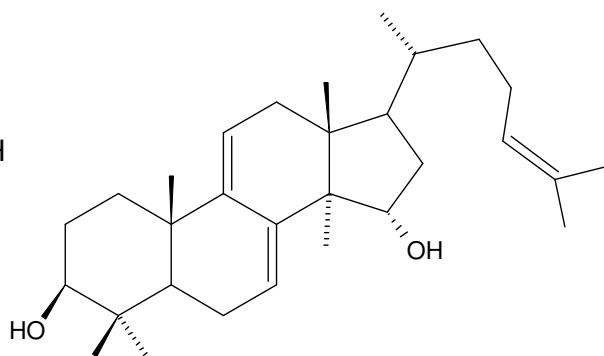


Probovatina

De *D. glabriuscula* foram isolados diversos metabólitos, tais como alcalóides oxaporfínicos, 7-hidroxi-aporfínicos e terpenos, dentre estes se destacam os derivados santalanos e policarpol [SIQUEIRA *et al.*, 1997, 1999, 2001, 2003; PEREIRA, 2002; PEREIRA *et al.*, 2003]. Este último é considerado por muitos autores o marcador químico de Annonaceae, porém recentemente este metabólito foi isolado em uma espécie vegetal pertencente à família Olacaceae [JAYASURIYA *et al.*, 2005].

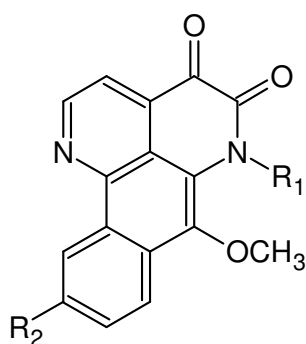


(+) 9,10,11-α-santalano-triol



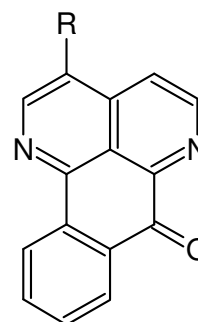
Policarpol

Os alcalóides tipo dioxo-azaporfínico (hadrantina-A e hadrantina-B) e copirínicos (sampangina e 3-metoxisampangina) foram encontrados em *D. hadranta* [MUHAMMAD *et al.*, 2001]. E de *D. flagellaris* foram isolados apenas cinco alcalóides aporfínicos e cinco alcalóides 7-hidroxi-aporfínicos [NAVARRO *et al.*, 2001].



$R_1 = \text{CH}_3$ $R_2 = \text{OCH}_3$ **Hadrantina-A**

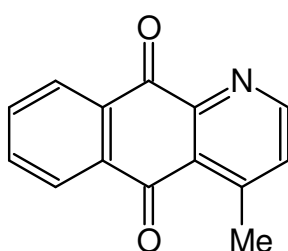
$R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{H}$ **Hadrantina-B**



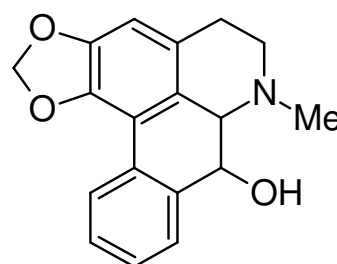
$R = \text{H}$ **Sampangina**

$R = \text{OCH}_3$ **3-metoxisampangina**

Recentemente, alcalóides isoquinolínicos isolados de *D. vallicola* foram avaliados quanto a atividade antiplasmódica, mas somente os alcalóides cleistopolina e (-)-oliverolina exibiram atividade contra o *Plasmodium falciparum* [PEREZ *et al.*, 2004].



Cleistopolina

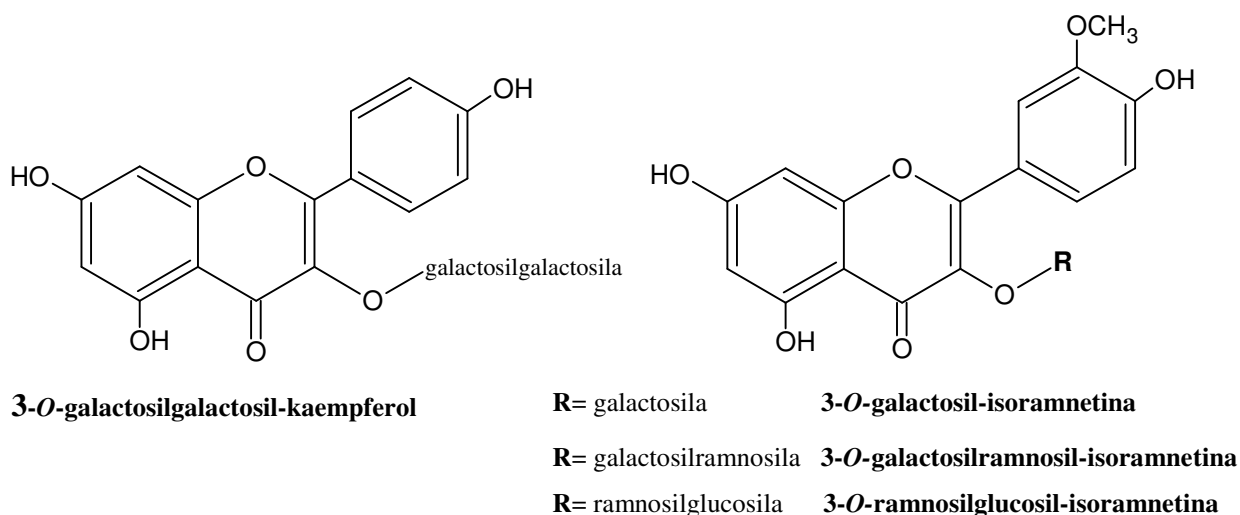


Oliverolina

1.7 – *Duguetia furfuracea*

Duguetia furfuracea (A. St.-Hil.) Benth. & Hook f. é um arbusto, típico do cerrado seco da região central do Brasil, principalmente nos estados de Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Minas Gerais. Conhecida popularmente como “araticum seco”, é considerada uma planta daninha, e geralmente forma grandes infestações de difícil controle. Suas sementes pulverizadas e diluídas em água são utilizadas popularmente como parasiticida, especialmente contra piolhos [CORREA, 1978] [SILBERBAUER-GOTTSBERGER, 1981/1982; LORENZI, 2000] e o infuso ou tisana de seus ramos e folhas é utilizado para combater o reumatismo [RODRIGUES & CARVALHO, 2001].

Santos e Salatino (2000) identificaram duas classes de flavonóides em trabalho comparativo realizado com 31 espécies de Annonaceae. Das folhas de *Duguetia furfuracea* foram identificados quatro diferentes flavonóides glicosilados, que após análise por UV/visível e CLAE/EM-ES observou que se tratavam de: 3-*O*-galactosilgalactosil-kaempferol, 3-*O*-galactosil-isoramnetina, 3-*O*-galactosilramnosil-isoramnetina, 3-*O*-ramnosilglucosil-isoramnetina [SANTOS & SALATINO, 2000].

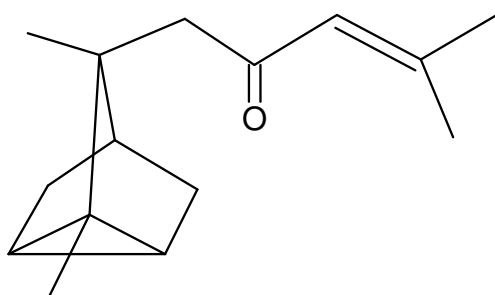


O estudo fitoquímico das partes aéreas (folhas e cascas do caule) de *D. furfuracea* conduziu ao isolamento de diferentes metabólitos secundários, sendo que das folhas foram obtidos seis sesquiterpenos, um flavonóide, um esteróide e nove alcalóides [TABELA 1] e das cascas do caule aéreo foram obtidos os alcalóides oxaporfínicos: aterospermidina, liriodenina e lanuginosina [CAROLLO, 2003; CAROLLO *et al.*, 2005].

TABELA 1- Compostos isolados das folhas de *Duguetia furfuracea*

Extrato	Substâncias isoladas [CAROLLO, 2003; CAROLLO <i>et al.</i>, 2005]
Óleo Essencial	-Sesquiterpenos: (-)-ishwarano, α -santaleno, biciclogermacreno, (+)-espatulenol, óxido de β -cariofileno e (-)- α -santalen-9-ona
Hexânico	- Esteróide: β -sitosterol
Etanólico	- Flavonóide: isoramnetina - Alcalóides aporfínicos: (+)-isocoridina, norisocoridina, xilopina, obovanina, anonaina e (-)-asimilobina - Alcalóide bisbenziltetraidro-isoquinoínico: isocondodendrina - Alcalóide tetraidro-protoberberínico: (-)- discretamina - Alcalóide benziltetraidro-isoquinolínico: (+)- reticulina.

O sesquiterpeno (-)- α -santalen-9-ona é pertencente a rara classe dos santais e foi descrito pela segunda vez na literatura [CAROLLO *et al.*, 2005].

**(-)- α -santalen-9-ona**

O extrato alcaloídico (0,42%) das folhas de *D. furfuracea* apresentou significante toxicidade contra *Plasmodium falciparum* sensíveis a cloroquina [FISCHER *et al.*, 2004]. Essa atividade pode estar relacionada com a presença de alcalóides isoquinolínicos, pois diversas plantas tradicionalmente utilizadas contra malária contêm esses alcalóides, como *Annona muricata* e *Guatteria amplifolia*, ambas pertencentes à família Annonaceae [GUINAUDEAU *et al.*, 1997].

1.7.1 – Descrição Botânica

Duguetia furfuraceae (A. St.-Hil.) Benth. & Hook f. [FIGURA 1] é um arbusto de 0,5 a 2 metros de altura e muito ramificado desde a base. Possui casca suberosa e folhas oblongo-lanceoladas a elípticas (9-14 x 3-5 cm). As flores são vermelhas e o fruto é do tipo baga composta ovóide com aréolas rômbeas de 30-50 mm de diâmetro, com coloração alaranjada e comestível [CORREA, 1978; MAAS *et al.*, 2001].



FIGURA 1 – *Duguetia furfuracea* St. Hil – Partes aéreas

1.8 – Alelopatia

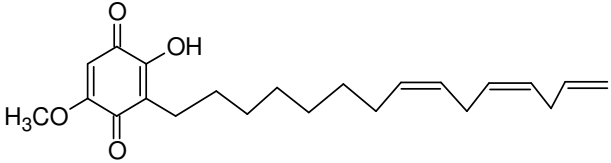
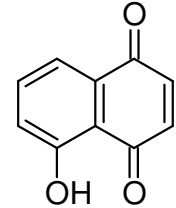
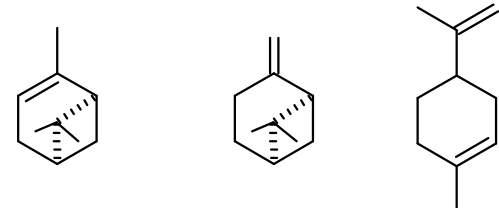
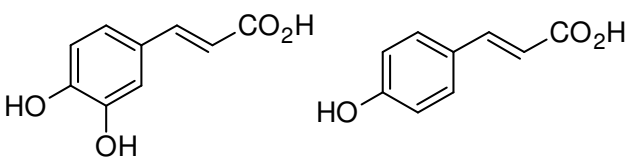
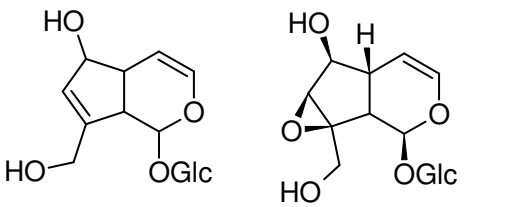
O termo alelopatia foi empregado pela primeira vez por Molisch (1937), sendo derivado das palavras gregas *allelon*= mútuo e *pathos*= prejuízo. Atualmente, defini-se alelopatia como uma interferência positiva (indução) ou negativa (inibição) provocadas por substâncias químicas, denominadas de aleloquímicos, que são lançadas no meio por uma planta, alga bactéria ou fungo e, irão influenciar o desenvolvimento de espécies vizinhas [IAS, 1996; FERREIRA, 2005].

Os aleloquímicos, substâncias provenientes das rotas biossintéticas do ácido chiquímico e acetato, podem atuar como fitotoxinas, inibindo ou promovendo processos bioquímicos e fisiológicos em outras plantas ou organismos. Eles variam na planta em concentração, localização e composição [FERREIRA & AQUILA, 2000; YUNES & CALIXTO, 2001].

A liberação dos aleloquímicos para o meio (solo ou ar) pode ocorrer de diversas maneiras, tais como: partes da planta sobre o solo ao sofrerem decomposição, liberação de substâncias voláteis, exsudação pelas raízes ou os compostos bioativos serem lixiviados [YUNES & CALIXTO, 2001]. Em um estudo realizado no gênero *Eucalyptus* observou-se a relação entre o modo de liberação e os aleloquímicos presentes, como em *E. regnans* que seus aleloquímicos (terpenóides e fenóis) são exsudados pela raiz e em *E. globulus* que os constituintes, como terpenos, taninos e aromáticos (ácidos), são liberados por lixiviação e decomposição das folhas no solo [ALVES *et al.*, 1999].

Os aleloquímicos podem ter ação direta ou indireta, esta última acontece quando ocorrem modificações químicas em suas estruturas, depois de serem excretados e antes de se ligarem ao sítio de ação. Esses compostos podem afetar: estruturas citológicas e ultra-estruturais, hormônios, permeabilidade das membranas, absorção de minerais, movimentos dos estômatos, síntese de pigmentos, fotossíntese, respiração, síntese de proteínas, atividade enzimática, relações hídricas e material genético (alterações no DNA e RNA) [INDERJIT & DUKE, 2003]. Os compostos aromáticos, fenólicos, cumarinas, aldeídos e flavonóides podem, por exemplo, afetar a respiração [FERREIRA & AQUILA, 2000; YUNES & CALIXTO, 2001]. Na **Tabela 2** estão alguns exemplos de aleloquímicos cujos mecanismos de ação são conhecidos.

TABELA 2- Exemplos de alguns aleloquímicos e seus mecanismos de ação

Aleloquímico	Mecanismo de Ação
 Sorgoleona	Afeta a produção de ATP*
 Juglona	Afeta a produção de ATP*
 α -pineno β -pineno Limoneno	Inibem o ciclo do nitrogênio*
 Ácido Cafeico Ácido <i>p</i> -cumárico	Reduzem a mobilização lipídica*
 Aucubina Catalpol	Impedem ou diminuem a velocidade de crescimento de muitos insetos herbívoros**

* [YUNES & CALIXTO, 2001]; **[NIEMINEN *et al.*, 2003]

A atividade dos aleloquímicos tem sido usada como alternativa ao uso de herbicidas, inseticidas e nematicidas, sendo uma tentativa para o controle de invasoras, pois muitas já desenvolveram resistência a alguns dos herbicidas sintéticos [FERREIRA & AQUILA, 2000; YUNES & CALIXTO, 2001].

As interferências alelopáticas raramente são causadas por apenas uma única substância, sendo que os fatores ambientais e a presença de outras substâncias produzidas pela planta no solo podem causar um efeito sinérgico e, por fim, potencializar os efeitos causados pelos aleloquímicos [EINHELLIG, 1999]. Essas outras substâncias que causam efeito sinérgico podem ser, por exemplo, açúcares e aminoácidos que são preferencialmente utilizados por microorganismos como fontes de carbono ao invés dos compostos fenólicos (aleloquímicos), isto permite que os compostos bioativos permaneçam no solo, maximizando o efeito alelopático dos mesmos [FERREIRA, 2005].

Na busca por novos compostos ativos, os bioensaios são necessários em cada etapa do estudo fitoquímico, até se chegar à substância bioativa isolada. O ensaio de inibição de germinação é o mais difundido para a avaliação alelopática, sendo que sementes de *Lactuca sativa* (alface), *Lycopersicon esculentum* (tomate) e *Cucumis sativus* (pepino) são as mais utilizadas, pois são muito sensíveis a pequenas concentrações de aleloquímicos e apresentam germinação rápida e uniforme [ALVES *et al.*, 2004; FERREIRA & AQUILA, 2000].

1.8.1- Plantas invasoras e a Alelopatia

Plantas invasoras ou daninhas são espécies vegetais, silvestres ou exóticas, que nascem e se reproduzem espontaneamente, não sendo cultivadas pelo homem ou não tendo seu cultivo algum interesse econômico, comportando-se de forma indesejável e, geralmente, em áreas de grande importância econômica [LORENZI, 2000].

O sucesso da invasão pode ser justificado por diversos fatores, como as degradações do meio ambiente provocadas principalmente pelo homem, permitindo que as plantas daninhas se difundissem. Portanto, são plantas de habitat incomum que se disseminam facilmente, pois essas espécies, em geral, possuem fácil germinação, rápido crescimento inicial e alto crescimento morfo e fisiológico [DIETZ *et al.*, 1999], podendo ter uma grande agressividade competitiva, grande produção de sementes e grande longevidade das sementes.

A grande agressividade competitiva está relacionada com uma maior capacidade de aproveitamento dos elementos vitais disponíveis, como luz, água, nutrientes e CO₂ [LORENZI, 2000].

Bais e colaboradores (2003) relataram que o sucesso do processo de invasão não está somente relacionado com suas vantagens na competição pelas fontes vitais e as alterações nos processos bioquímicos causados pelos seus aleloquímicos, mas também na inibição nos meristemas da planta receptora por espécies reativas de oxigênio, o que conduz ao influxo de cálcio e altera a expressão dos genes [BAIS *et al.*, 2003].

A campo, um dos indícios de efeito alelopático é a observação de uma grande densidade de uma espécie no mesmo local [FERREIRA, 2005], sendo que esta capacidade de formação de monoculturas é característica de espécies invasoras.

Os extratos aquosos das partes subterrâneas de invasoras como *Cynodon dactylon* (grama-seda), *Cyperus rotundus* (tiririca) e *Sorghum halepense* (capim massambará) inibiram a germinação e o crescimento do tomateiro [CASTRO *et al.*, 1984] e, em algumas plantas de cerrado também foram observados efeitos alelopáticos como a inibição da germinação e do crescimento das raízes de alface (*Lactuca sativa*). Portanto, a agressividade da espécie como invasora pode ocorrer devido a substâncias alelopáticas [FERREIRA & AQUILA, 2000].

Como o uso indiscriminado de herbicidas sintéticos tem causado um aumento da resistência de plantas invasoras a algumas classes destes, tais como triazinas, dinitroanilinas, imidazolinonas [YUNES & CALIXTO, 2001]; os estudos sobre interações alelopáticas poderão ajudar a resolver estes problemas já que as plantas possuem seu próprio mecanismo de defesa e os aleloquímicos poderão ser empregados como herbicidas naturais.

Dentro da família Annonaceae apenas as espécies *Duguetia furfuracea* e *Annona coriacea* são classificadas como invasoras, sendo que estas são amplamente difundidas em Mato Grosso do Sul [LORENZI, 2000].

OBJETIVOS

2 . OBJETIVOS

O presente trabalho teve como objetivos: a continuidade do estudo fitoquímico de *Duguetia furfuracea*, planta invasora pertencente à família Annonaceae, visando a ampliação da caracterização fitoquímica da espécie e a avaliação alelopática de extratos obtidos das partes subterrâneas desta planta, com o intuito de se compreender melhor o processo de invasão, visto que esta espécie causa prejuízos de impacto econômico para o Estado de Mato Grosso do Sul.

PARTE EXPERIMENTAL

3 . PARTE EXPERIMENTAL

3.1 - Material e métodos

- No fracionamento em coluna foi utilizada sílica gel 70-230 mesh, 60A°, Merck. Utilizou-se também óxido de alumínio 70-230 mesh Merck, como fase estacionária.
- Na cromatografia em camada delgada (CCDS) foram utilizadas placas ativadas (105°C por 30 min) de sílica gel 60 G e sílica gel GF₂₅₄.
- Para cromatografia em camada preparativa (CCPS) foram utilizadas placas ativadas de sílica gel 60 G ou mistura de sílica gel 60 G: GF₂₅₄, 9:1. Nestas placas a recuperação das amostras foi feita com CHCl₃ e MeOH.
- Para cromatografia em camada preparativa de sílica gel impregnada com AgNO₃ (CCPS-AgNO₃) foram utilizadas sílica gel 60 G: GF₂₅₄ : AgNO₃ na proporção 80:10:10. As placas foram preparadas em câmara escura, não foram ativadas e, após 24 h , foram utilizadas em ambiente ausente de luz e na recuperação das amostras foi utilizado CHCl₃.
- Para cromatografia em camada preparativa de sílica gel impregnada com ácido oxálico (CCPS-OXA) foi utilizado a mistura de sílica gel 60G: GF₂₅₄: ácido oxálico na proporção 86:10:4. Essas placas foram secadas sem corrente de ar e ativadas em estufa a 105°C por uma hora (Cuidado! Vapores tóxicos). Para a recuperação das amostras foi necessária a utilização de NH₄OH 10% até pH = 7-8, e posterior extração com CHCl₃.
- As revelações foram feitas por irradiação de luz ultravioleta (Monitor UV de mão, modelo UVGL – 25, UVP inc. com lâmpadas BlackRay de 254 e 365 nm) e com os seguintes reveladores: vanilina (1% em EtOH)/ácido sulfúrico (5% em EtOH), sulfato cérico (Ce(SO₄)₂) e Dragendorff.
- Os espectros de RMN de ¹H (300 MHz), ¹³C (75 MHz), DEPT 135° e 90°, COSY, HMBC, HMQC e NOESY foram registrados no espectrômetro Bruker DPX-300, na DQI/UFMS.
- Para a obtenção dos espectros foram utilizados solventes deuterados como CDCl₃, CD₃OD e DMSO-d₆.
- A cromatografia gasosa acoplada ao Espectrômetro de Massas (CG/EM) foi realizada em equipamento Shimadzu 17A/QP5000, no DQI/UFMG.

- O espectro de massas de baixa resolução do composto **13** foi obtido através de ionização por eletrospray e em condições ESI (+), sendo esta análise realizada no aparelho LCQ (Thermo Quest) localizado na Universidade de Cadiz/Espanha.
- Os espectros de baixa resolução dos compostos **10** e **13**, obtidos por impacto eletrônico (70 eV), foram realizados no aparelho LCQ (Thermo Quest) através de injeção direta via capilar. Esta análise foi realizada na Universidade de Cadiz/Espanha.
- O espectro de massas (ESIMS-MS) de alta resolução do metabólito isolado **12** foi obtido no aparelho Ultro TOF-Q, com ionização por eletrospray, tendo como padrões internos a cumarina (147 e 169) e monensina (693) e condições ESI (+). Esta análise foi realizada na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Riberão Preto/USP.
- As absorvâncias foram analisadas em UV/Visível no espectrômetro U-3000 da Hitachi.
- A determinação das rotações específicas, $[\alpha]_D^{20}$, foram feitas em polarímetro Perkin-Elmer 341 EM.
- Os espectros no infravermelho foram obtidos e registrados em espectrômetro Perkin Elmer modelo 783.
- Os critérios de pureza adotados para as substâncias obtidas foram a observação de uma única mancha em CCDS, variando-se ou não o sistema de eluição e pelos sinais dos espectros de RMN de ^1H e de ^{13}C .
- Os cálculos teóricos de análise conformacional foram realizados no programa Gaussian'03 e as gravuras foram geradas no programa gnuplot e ghemical.

3.2 - Coleta e Identificação do Material Vegetal

As cascas e o cerne do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* St.-Hil – Annonaceae, foram coletadas em Março de 2004 no município de Campo Grande/MS, no campus da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. A planta foi identificada pelo Prof. Renato de Mello-Silva (Instituto de Botânica-USP) e uma exsicata depositada no *herbarium* CG/MS (UFMS), Campo Grande – MS, sob o nº 023.

3.3 – Obtenção do Óleo Essencial das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea*

As cascas *in natura* do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (294g) foram trituradas e submetidas à extração exaustiva por hidrodestilação (4h). Com este procedimento obtiveram-se duas frações; uma das frações apresentava-se com aspecto de óleo e a outra como uma suspensão na fase aquosa formada no aparelho de Clevenger.

À fração oleosa adicionou-se éter etílico; a camada etérea foi filtrada sobre sulfato de sódio anidro e rapidamente concentrada com N₂ gasoso, obtendo-se 3,5 mL (1,19% v/p) do óleo denominado DfcsOE2. A água foi recolhida separadamente devido à turvação observada na mesma e com a precipitação, sob condições de resfriamento, obteve-se 117,5 mg de sólido amorfo branco denominado DfcsOE1 (**1**). Este, em CCDS (FM: CHCl₃, revelador: vanilina/ácido sulfúrico) revelou a presença de um único ponto de R_f = 0,53. A partir da análise dos dados espectroscópicos verificou-se tratar do metabólito predominante 2,4,5-trimetoxi-estireno (**1**).

3.4- Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (DfcsOE2)

A identificação dos compostos do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo (DfcsOE2) foi realizada por CG/EM (**Figura 4**, pág. 48), em equipamento Shimadzu, modelo CG17A, com detector seletivo de massa (ionização de chamas), modelo QP 5000 (Shimadzu). A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5 de 30 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador e aquecimento com programação de temperatura de 60-240 °C a 3 °C/min. As temperaturas do injetor e detector foram fixadas em 220°C e 240°C, respectivamente.

3.5 – Estudo fitoquímico do Óleo Essencial das cascas do caule subterrâneo (DfcsOE2)

O óleo (3,19 g), DfcsOE2, foi submetido ao fracionamento em coluna aberta de sílica gel (320 g), utilizando-se o gradiente de polaridade EP, CHCl₃ e MeOH. Desta coluna foram

obtidas 128 frações [TABELA 3] que foram reunidas em 13 grupos de acordo com a semelhança em CCDS e análise espectroscópica [TABELA 4] [ESQUEMA 1].

TABELA 3 - Fracionamento cromatográfico do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo (DfecsOE2)

Eluentes	Proporção	Frações
EP	100	1-52
EP: CHCl ₃	50:50	53-77
CHCl ₃	100	78-102
CHCl ₃ : MeOH	90:10	103-121
MeOH	100	122-128

TABELA 4 – Grupos provenientes do fracionamento do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo (DfecsOE2)

Frações	Grupo	Peso (mg)
1-3	1	6,9
4-7	2	19,5
8-12	3	40,7
13-25	4	137,1
26-38	5	39,8
39-42	6	23,6
43-52	7	20,2
53-76	8	15,2
77-84	9	9,1
85-94	10	13,4
95-102	11	10,1
103-110	12	160,2
111-128	13	127,5

- Grupo 1

- DFCCSOE2-2

As frações deste grupo (6,9 mg) apresentaram-se com o aspecto de óleo incolor e solúvel em CHCl_3 . Em CCDS (FM: EP, revelador: vanilina/ácido sulfúrico) observou-se apenas uma única mancha e com os dados espectroscópicos de IV, RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135° verificou-se tratar do sesquiterpeno, porém este ainda não foi elucidado até o presente momento.

- Grupo 2

- (-)- α -gurjuneno (2)

As frações do grupo 2 (19,5 mg) apresentaram-se com o aspecto de óleo incolor e em CCDS (FM: EP, revelador: vanilina/ácido sulfúrico) observou-se uma única mancha de coloração violeta. A partir dos dados de IV, RMN de ^1H , ^{13}C , DEPT 135° e $[\alpha]_D$ concluiu-se tratar do sesquiterpeno (-)- α -gurjuneno (2).

- Grupo 3

- Aromadendreno (3)

As frações de 8 a 12 (40,7 mg) exibiram uma mancha em CCDS (FM: EP, revelador: vanilina/ácido sulfúrico), porém a análise espectroscópica permitiu-nos visualizar a presença de uma mistura de substâncias. Então, estas frações foram submetidas a CCPS- AgNO_3 (FM: EP) resultando no isolamento do sesquiterpeno aromadendreno (3) (9,1mg), confirmado a partir de seus dados espectrais de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135°.

- Grupo 6

- Biciclogermacreno (4)

As frações de 39 a 42 (23,6 mg) foram reunidas, mas a análise espectroscópica permitiu-nos verificar tratar-se de uma mistura de compostos, assim foram submetidas a CCPS-AgNO₃ (FM: CHCl₃:MeOH 2%). Com isto, obteve-se uma fração com um produto majoritário (17,2 mg), o qual foi identificado, a partir de seus dados espectrais de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135°, como sendo o biciclogermacreno (4).

- Grupo 11

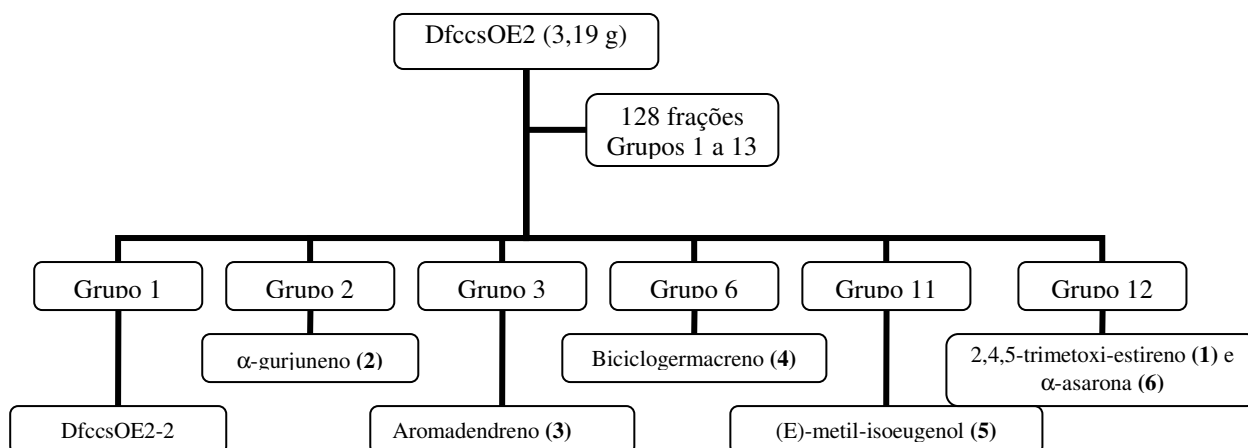
- (*E*)-metil-isoeugenol (5)

Em CCDS (FM: CHCl₃, revelador: vanilina/ácido sulfúrico) as frações 95 a 102 (10,1 mg) apresentaram-se como uma única mancha de R_f = 0,53, portanto foram reunidas. A análise dos dados espectrais de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135° desta substância permitiu identificá-la como sendo (*E*)-metil-isoeugenol (5).

- Grupo 12

- α-asarona (6) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (1)

As frações 103 a 110 (160,2 mg) apresentaram-se como uma única mancha em CCDS (FM: CHCl₃, revelador: vanilina/ácido sulfúrico) de R_f = 0,53. Com os dados de RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135° pôde-se constatar a mistura dos metabólitos 2,4,5-trimetoxiestireno (1) e asarona (6). Esta fração foi submetida a CCPS-AgNO₃ (FM: CHCl₃: MeOH 3%), mas não foram obtidos resultados satisfatórios, já que os produtos separados sofreram degradação.



ESQUEMA 1 – Fracionamento de DfcsOE2

3.6 - Obtenção do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea*

As cascas do caule subterrâneo, secas e trituradas (154g), foram submetidas à extração exaustiva em Soxhlet com EP (6 hs) para a obtenção do extrato DfcsEP (12,96 g). Neste extrato houve a formação de um precipitado, que foi separado por centrifugação e purificado através de recristalização com Hx e CHCl_3 [ESQUEMA 2]. Este precipitado (176,4mg) apresentou-se como um sólido amorfo branco e em CCDS (FM: CHCl_3 , revelador: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) revelou apenas um único ponto de coloração amarela, com R_f de 0,23. A partir da comparação de seus dados espectrais com os citados na literatura verificou-se tratar do triterpeno policarpol (7).

A fração sobrenadante (DfcsEPsob) foi avaliada em CCDS com a finalidade de selecionar o melhor sistema eluente, para proceder ao fracionamento em coluna cromatográfica.

3.7 – Estudo fitoquímico do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo (DfcsEPsob)

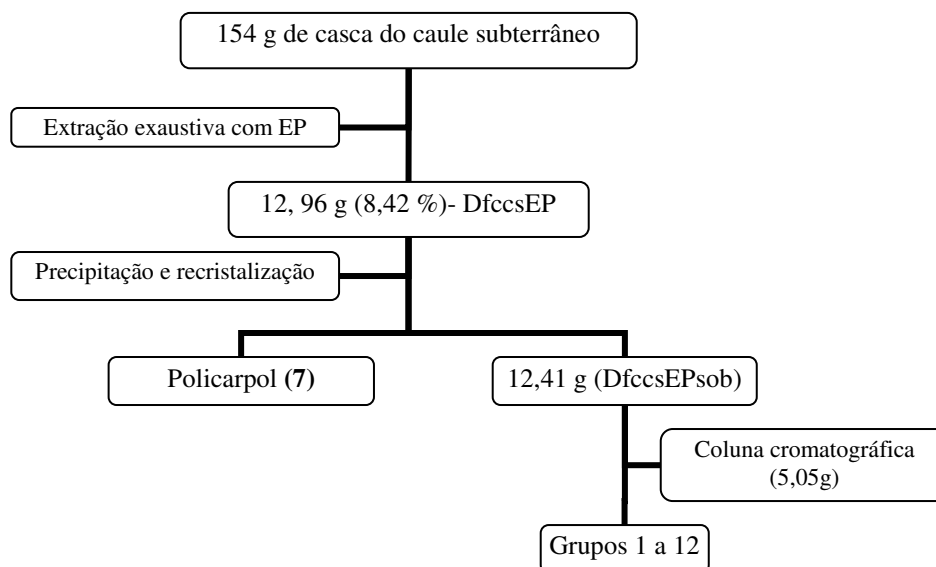
O extrato éter de petróleo (5,05 g) foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica gel 60 (0,063 – 0,200) utilizando o gradiente de polaridade Hx, CHCl₃ e MeOH, assim obteve-se 157 frações de 25 ml [TABELA 5], sendo estas analisadas em CCDS e agrupadas de acordo com os perfis cromatográficos [TABELA 6].

TABELA 5 - Fracionamento cromatográfico do extrato éter de petróleo DfcsEPsob

Eluentes	Proporção	Frações
Hx	100	0-36
CHCl ₃	100	37-73
CHCl ₃ :MeOH	99:1	74-110
CHCl ₃ : MeOH	95:5	111-129
CHCl ₃ : MeOH	90:10	130-147
MeOH	100	148-157

TABELA 6 - Grupos provenientes do fracionamento do extrato éter de petróleo DfcsEPsob

Frações	Grupo	Peso (mg)
1-2	1	224,5
3-10	2	166,5
11-25	3	19,6
26-36	4	30,7
37-44	5	22,8
45-53	6	12,7
54-63	7	27,7
64-88	8	62,5
89-94	9	12,3
95-111	10	122,1
112-135	11	163,4
136-157	12	470,4



ESQUEMA 2- Estudo fitoquímico do extrato éter de petróleo (DfecsEP)

- Grupo 1

- Óxido de β -cariofileno (8)

As frações do grupo 1 foram submetidas a CCPS (FM: CHCl_3) e uma das amostras obtidas apresentou-se como um sólido amorfo branco (11,8 mg). Este em CCDS (FM: CHCl_3 , revelador: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) mostrou a presença de uma única mancha de coloração azulada, com a análise dos dados espectrais obtidos foi identificado como o sesquiterpeno óxido de β -cariofileno (8).

- Grupo 9

- Asaraldeído (9)

As frações 89 a 94 (12,3 mg) apresentaram um aspecto de sólido amorfo branco, e sua análise em CCDS (FM: CHCl_3 , revelador: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) permitiu-nos a visualização de uma única mancha. Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C destas frações confirmaram a presença de uma única substância, sendo esta identificada como asaraldeído (9).

- Grupo 10

Em CCDS (FM: CHCl₃:MeOH 2%, revelador: Ce(SO₄)₂) as frações deste grupo revelaram a presença de uma mistura, sendo então submetidas a CCPS (2 placas) (FM: CHCl₃:MeOH 2%) e obteve-se duas subfrações (A e B) que se mostraram como manchas únicas em CCDS. Porém, suas análises espectroscópicas indicaram tratar-se ambas de misturas.

- 2,4,5-trimetoxiestireno (**1**) e α -asarona (**6**)

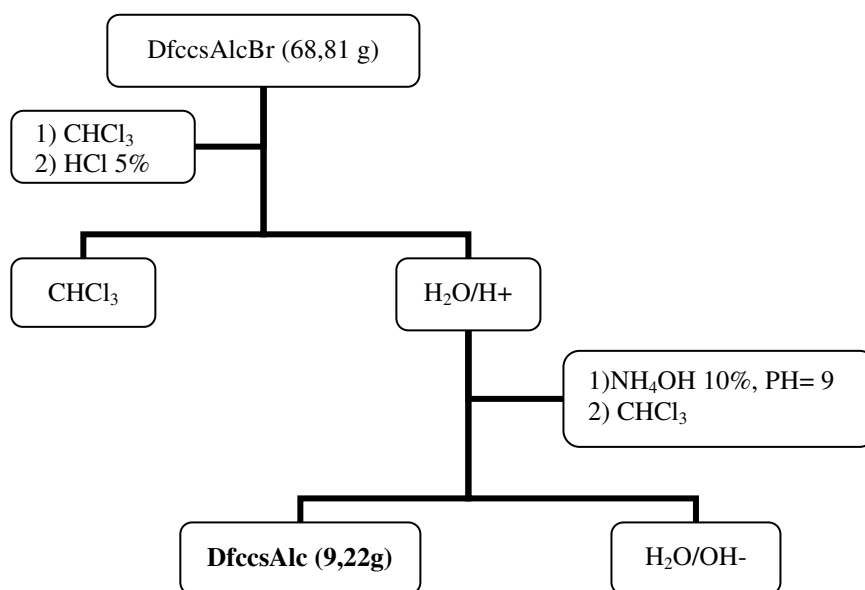
Após o estudo dos dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C verificou-se que a subfração B (33,2 mg) tratava-se da mistura de 2,4,5-trimetoxiestireno (**1**) e α -asarona (**6**), já isolados anteriormente do óleo essencial.

3.8 - Obtenção do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea*

Cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea*, secas e pulverizadas (1,32 Kg), foram submetidas à extração exaustiva com CHCl₃ em meio básico (NH₄OH 10%, PH= 9), obtendo-se o extrato bruto denominado DfcsAlcBr (68,81 g).

3.9 - Marcha Química do Extrato DfcsAlcBr

O extrato DfcsAlcBr, mencionado acima, foi solubilizado em CHCl₃ e submetido à marcha química usual para alcalóides conforme ilustrado no **Esquema 3**, resultando no extrato alcaloídico DfcsAlc (9,22 g).



ESQUEMA 3 - Marcha química para obtenção do extrato alcaloídico DfecsAlc

3.10 - Estudo fitoquímico do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (DfecsAlc)

Uma alíquota (7,16 g) do extrato alcaloídico DfecsAlc foi submetido ao fracionamento em coluna aberta de alumina (422 g), seguindo o gradiente de polaridade CHCl₃, MeOH e H₂O, sendo coletadas 261 frações de 20 mL [TABELA 7]. Essas frações foram analisadas em CCDS, observando-se a presença de 13 grupos com perfis cromatográficos semelhantes [TABELA 8].

TABELA 7 - Fracionamento cromatográfico do extrato alcaloídico (DfecsAlc)

Eluentes	Proporção	Frações
CHCl ₃	100	1-17
CHCl ₃ :MeOH	99:1	18-66
CHCl ₃ :MeOH	98:2	67-87
CHCl ₃ :MeOH	95:5	88-127
CHCl ₃ :MeOH	90:10	128-168
CHCl ₃ :MeOH	80:20	169-188
CHCl ₃ :MeOH	70:30	189-206
CHCl ₃ :MeOH	50:50	207-224
MeOH	100	225-242
H ₂ O	100	243-261

TABELA 8 - Grupos provenientes do fracionamento do extrato alcaloídico (DfecsAlc)

Frações	Grupos	Peso (mg)
1-19	1	44,9
20-40	2	64,8
41-49	3	380,7
50-62	4	812,1
63-79	5	800,0
80-102	6	722,7
103-126	7	386,7
127-156	8	356,0
157-185	9	332,9
186-206	10	69,3
207-213	11	11,2
214-237	12	38,9
238-261	13	830,6

- Grupo 4

- (-)-duguetina (**10**)

As frações do grupo 4 (812,1 mg) apresentavam-se como manchas únicas em CCDS (FM: CHCl₃, revelador: Dragendorff), sendo reunidas e submetidas a análises espectroscópicas. Os dados obtidos confirmaram que se tratava da (-)-duguetina (**12**), um alcalóide 7-hidróxi-aporfínico.

A (-)-duguetina (**10**) foi submetida a reações de acetilações com anidrido acético (1 mL) + piridina (1 mL) e com anidrido acético (1 mL) + DMAP, ambas sob condições de aquecimento, porém com a análise espectroscópica verificou-se que a acetilação não ocorreu.

- Grupo 5

Em CCDS (FM: CHCl₃:MeOH 10%, revelador: Dragendorff) as frações de 63 a 79 (800 mg) apresentaram-se como mistura, assim optou-se em submetê-las a cromatografia em coluna aberta de sílica gel 60 (76 g) utilizando o gradiente de polaridade CHCl₃, MeOH, H₂O e acetona [TABELA 9]. Com isso, obteve-se 221 frações de 10 mL, as quais foram reunidas em 10 subgrupos de acordo com a semelhança dos perfis cromatográficos [TABELA 10].

TABELA 9 - Fracionamento cromatográfico das frações 63-79 (Grupo 5)

Frações	Subgrupos	Pesos (mg)
1-44	1	12,4
45-59	2	13,0
60-75	3	25,6
76-94	4	23,5
95-108	5	289,4
109-128	6	158,1
129-152	7	23,5
153-177	8	18,6
178-193	9	53,5
194-221	10	36,4

TABELA 10 – SubGrupos provenientes do fracionamento das frações 63-79 (Grupo 5)

Frações	Subgrupos	Pesos (mg)
1-44	1	12,4
45-59	2	13,0
60-75	3	25,6
76-94	4	23,5
95-108	5	289,4
109-128	6	158,1
129-152	7	23,5
153-177	8	18,6
178-193	9	53,5
194-221	10	36,4

- Subgrupo 3

- Dicontrinona (**11**)

As frações 60 a 75 (25,6 mg) foram reunidas, pois revelavam uma única mancha em CCDS (FM:CHCl₃:MeOH 6%, revelador: Dragendorff), porém com a análise espectroscópica verificou-se tratar de uma mistura de alcalóides oxaporfínicos detentores de mesmo R_f em placas de sílica gel. Por esta razão, esta foi submetida à CCPS-OXA (FM:CHCl₃:MeOH 15%) para a obtenção do alcalóide dicentrinona (**11**) (4,6 mg).

- Subgrupo 5

- (-)-duguetina (**10**)

As frações 95 a 108 (289,4 mg) apresentaram-se como uma única mancha em CCDS (FM: CHCl₃, revelador: Dragendorff) de R_f coincidente ao do alcalóide, já isolado anteriormente, (-)-duguetina (**10**). Através dos dados espectroscópicos de IV, RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135° confirmou-se que a substância isolada trata-se da (-)-duguetina (**10**).

- Grupo 10

- (-)-*N*-metiltetraidropalmatina (**12**)

Reuniram-se as frações 186 a 206 (69,3 mg), pois apresentavam uma única mancha em CCDS (FM: CHCl₃:MeOH 15%, revelador: Dragendorff) e detinham o mesmo aspecto de sólido amorfo marrom. Após a obtenção dos dados de IV, EM e RMN de ¹H e ¹³C verificou-se que a substância isolada trata-se do alcalóide (-)-*N*-metiltetraidropalmatina (**12**).

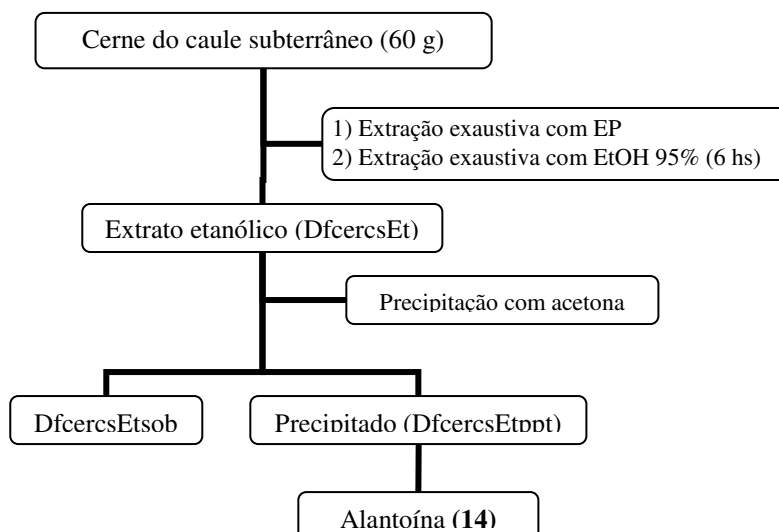
- Grupo 11

- (+)-*N*-metilglaucina (**13**)

As frações 207 a 213 (11,2 mg) foram reunidas e submetidas a análises espectroscópicas, pois se apresentavam puras em CCDS (FM: AcOEt:AcOH:Ac. Fórmico:H₂O 100:11:11:26, revelador: Dragendorff). Após a comparação entre dados obtidos de IV, EM e RMN ¹H e ¹³C com os encontrados na literatura, identificou-se esta substância como sendo o alcalóide (+)-*N*-metilglaucina (**13**).

3.11 – Obtenção do Extrato etanólico do cerne de caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* – precipitação com acetona

O cerne do caule subterrâneo (60 g), após extração em Soxhlet com EP, foi submetido à extração exaustiva com EtOH 95% em Soxhlet por 6 hs, obtendo-se um extrato de coloração marrom denominado DfcercsEt, o qual foi submetido ao processo de precipitação com acetona [ESQUEMA 4]. O precipitado obtido apresentou-se como cristais esbranquiçados e em CCDS (FM: CHCl₃: MeOH 50%, revelador: Ce(SO₄)₂) mostrou-se como uma única mancha de coloração azulada. A partir da análise dos dados espectroscópicos de RMN de ¹H e de ¹³C confirmou tratar-se do ureídeo alantoína (**14**).



ESQUEMA 4 – Metodologia utilizada para a precipitação da alantoína

3.12 – Avaliação Alelopática

A avaliação alelopática é verificada através do ensaio biológico de inibição de germinação em sementes de plantas mais sensíveis com germinação rápida e uniforme, como a *Lactuca sativa* (alface) [FERREIRA & ÁQUILA, 2000].

O ensaio biológico consiste no acompanhamento da germinação das sementes, bem como no crescimento de radículas e hipocótilos das plântulas de *L. sativa*. Em placas de Petri, previamente submetidas à assepsia com álcool etílico 70° GL, foram adicionados papéis de filtro para serem esterilizadas em autoclave por 1 hora a 180°C e, posteriormente deixadas em estufa durante uma hora, a 100°C.

Os materiais que foram utilizados no bioensaio de avaliação alelopática estão relacionados abaixo [TABELA 13].

TABELA 13 – Materiais utilizados na Avaliação Alelopática

Materiais utilizados	Descrição	Marca
Sementes de Alface (<i>L. sativa</i>)	Variedade Green Salad (mimosa); semente comercial, origem chilena; 97% germinação	Feltrin
Solução Tampão, pH 6,2	NaHPO ₄ 0,2M	Merck
	NaH ₂ PO ₄ 0,2M	Nuclear
Placas de Petri	9 cm de diâmetro	Pyrex
Papel de Filtro	Nº 02	Whatman
Glifosato®	Herbicida comercial, 48% pv (480 g/L)	Dipil
Germinador de Sementes	Modelo 347-6 (Mangelsdorf)	Fanem

Em cada placa de Petri foram adicionadas 25 sementes de *L. sativa* e as soluções das amostras a serem testadas, bem como as soluções controle (branco e glifosato). As diferentes concentrações utilizadas foram testadas em triplicatas.

- Preparo das soluções

- Controle negativo (Branco)

No bioensaio utilizou-se solução tampão fosfato [TABELA 14] com água destilada na proporção 20:80 como solvente para a manutenção do pH e da osmolaridade, conforme descrito por Macias [MACIAS *et al.*, 1994], obtendo-se as condições ideais para germinação.

TABELA 14 – Preparo da solução tampão fosfato (pH = 6,2)

Solução A	Solução B	Solução Tampão pH=6,2
27,6 g de NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O (0,2M) em 1L de H ₂ O destilada	53,6 g de NaHPO ₄ .7H ₂ O (0,2M) em 1L de H ₂ O destilada	485 mL da solução A + 61,5 mL da solução B + 500 mL de H ₂ O destilada

- Controle positivo (Glifosato)

O glifosato, um herbicida comercial, foi utilizado como controle positivo no bioensaio nas concentrações de 19,2, 9,6 e 4,8 mg/mL em triplicata.

- Amostras

Os extratos obtidos das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* foram testados em diferentes concentrações no ensaio de inibição de germinação para a avaliação da atividade alelopática [TABELA 15].

TABELA 15 – Extratos de *D. furfuracea* testados no Ensaio de Avaliação Alelopática (Germinação e Desenvolvimento de sementes de alface) e suas respectivas concentrações

Extratos Teste	Concentrações (µg/mL)
DfcsOE2	500, 250 e 125
DfcsEPsob	1000, 500 e 250
DfcsAlc	1000, 500 e 250

As soluções dos extratos teste e do controle foram preparadas com solução tampão: água destilada (20:80) nas concentrações já descritas, sendo adicionados em cada placa 4 mL

da solução sob o papel de filtro. As sementes foram distribuídas de forma homogênea em cada placa, e estas mantidas na estufa de germinação com temperatura controlada num intervalo de 28 a 30° [FIGURA 2].



FIGURA 2 – Germinador 347-6 (Fanen)

As leituras foram realizadas por cinco dias consecutivos, efetuando-se a contagem diária do número de sementes germinadas e no último dia do ensaio a medição das radículas e hipocótilos das plântulas [TABELA 16].

TABELA 16 – Procedimento da leitura do ensaio Alelopático

Leituras	Horários
Preparo do teste	0 h
Contagem do número de sementes germinadas	24 h
	48 h
	72 h
	96 h
	120 h
Leitura do comprimento das radículas	120 h
Leitura do comprimento dos hipocótilos	120 h

3.13 – Avaliação da Atividade Auxínica

As auxinas são hormônios vegetais reguladores de vários processos, como a capacidade de promover o alongamento de coleótilos e segmentos do caule [TAIZ & ZEIGER, 2004; FERRI, 1979].

Devido aos resultados obtidos na avaliação alelopática, foi realizado o ensaio do crescimento linear do coleóptilo para a avaliação da atividade auxínica.

- Teste do crescimento linear do coleóptilo estiolado

Neste bioensaio foram utilizados coleóptilos de 10 mm provindos de plântula de *Zea mays* (milho) germinadas na incubadora [FIGURA 3] com ausência de luz e temperatura a 25°C por 5 dias em caixas de germinação com suporte de vermiculita.



FIGURA 3 – Incubadora B.O.D., 411D

Os materiais que foram utilizados no teste do crescimento linear do coleóptilo estão relacionados abaixo [TABELA 17].

TABELA 17 – Materiais utilizados no teste do crescimento linear do coleóptilo

Materiais utilizados	Descrição	Marca
Sementes de milho (<i>Zea mays</i>)	Família Flex, n: 12,5	Agroceres
MES	$C_6H_{13}NO_4S \cdot xH_2O$, min. 99,5%. Faixa de pH 5,5-6,7.	Sigma
Placas de Petri	9 cm de diâmetro	Pyrex
AIA	Ácido indol-3-acético, $C_{10}H_9NO_2$	Sigma
Vermiculita	Expandida, tipo fina.	Terra Mater
Paquímetro	Aço inoxidável	Worker
Incubadora B.O.D	Modelo 411D	Nova Ética

Em cada placa de Petri foram adicionados 20 coleóptilos de *Zea mays* e 20 mL das soluções dos controles (positivo e negativo) e das amostras teste.

- Preparo das soluções

- Controle negativo (Branco)

No ensaio utilizou-se solução tampão MES [TABELA 18] com água destilada na proporção 20:80 como solvente para a manutenção do pH, pois foram observados melhores resultados com o uso da solução tampão nesta proporção.

TABELA 18 – Preparo da solução tampão MES (pH = 6,2)

Solução Inicial	Solução Tampão pH=6,2
21,32g de MES em 1L de H ₂ O destilada	Solução inicial + NaOH 30% até pH=6,2

- Controle positivo (AIA)

As soluções de AIA (ácido indol-3-acético) com concentrações de 100, 10, 1 e 0,1 µg/mL foram adicionadas nas placas de Petri com os coleóptilos. O AIA foi utilizado como controle positivo, pois possui uma maior solubilidade em água e maior relevância fisiológica [TAIZ & ZEIGER, 2004].

- Amostras teste

O óleo essencial, obtido a partir das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea*, foi testado nas concentrações de 100, 10, 1, e 0,1 µg/mL.

As soluções do extrato teste, bem como os controles, foram preparadas com solução tampão:água destilada (20:80) nas concentrações já descritas, sendo adicionados em cada placa 20 mL da solução e 20 coleóptilos. Estas placas foram mantidas na incubadora com

ausência da luz e temperatura a 25°C, sendo que 24 hs depois do início do experimento faz-se a medição dos comprimentos dos coleóptilos com paquímetro.

3.14 – Toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS)

O teste de toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS) é considerado um ensaio preliminar por apresentar correlações com atividades antitumoral, inseticida e outras [McLAUGHLIN, 1991] [MICHAEL *et al.*, 1956] e caracteriza-se por ser de baixo custo e de considerável sensibilidade. Este teste foi realizado com extratos obtidos das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea*.

Uma solução de sal marinho sintético (38g/L, pH = 8-9) é borbulhada com oxigênio na cuba de eclosão juntamente com os ovos (80 mg), sendo que por um período de 02 hs uma lâmpada é mantida próxima a cuba para que seja atingida a temperatura ideal de eclosão.

Alguns dos materiais utilizados no TAS estão relacionados abaixo [TABELA 19].

TABELA 19– Materiais utilizados para o ensaio de Toxicidade sobre a *A.salina* (TAS)

Materiais utilizados	Descrição	Marca
DMSO	C ₂ H ₆ SO, 99%	Merck
Sal Marinho	-	Marinemix
Ovos de <i>Artemia salina</i>	Ovos de alta eclosão	Maramar

Após 48 hs, as larvas eclodidas atingem o estágio de náuplio e são transferidas para frascos contendo soluções teste e controles (branco e sulfato de quinidina), depois de 72 hs é realizada a leitura [TABELA 20]. As diluições das amostras e do controle positivo (sulfato de quinidina nas concentrações de 500, 250 e 125 µg/mL) foram feitas pelo método de diluição aritmética em solução aquosa de sal marinho sintético (38g/2L de H₂O) com 1% DMSO (v/v). Em cada frasco foram adicionadas 10 larvas, 3 mL de solução (amostra teste e controles), sendo que as concentrações foram testadas sempre em triplicatas [TABELA 21]. A metodologia empregada é descrita por McLaughlin (1991).

TABELA 20 – Cronograma do ensaio de Toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS)

Procedimento realizado	Horários
Adição dos ovos na cuba com oxigenação	0 h
Eclosão e maturação dos ovos	24 hs
Transferências das larvas para frascos com soluções (amostras e controles)	48 hs
Leitura do teste	72 hs

TABELA 21– Extratos de *D. furfuracea* testados no Ensaio de Toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS) e suas respectivas concentrações

Extratos Teste	Concentrações (µg/mL)
DfcsOE2	10, 5 e 2,5
DfcsEPsob	10, 5 e 2,5
DfcsAlc	75, 37,5 e 18,75

Para a análise dos dados, obtenção das DL₅₀ e respectivos intervalos de confiança utilizou-se o método Probitos de análise.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 - Cromatografia gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG/EM) do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (DfccsOE2)

O óleo essencial, obtido das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea*, foi analisado em CG/EM [FIGURA 4], em equipamento Shimadzu, com detector seletivo de massa (modelo QP 5000 Shimadzu), FID e 70eV. A coluna cromatográfica utilizada foi do tipo capilar de sílica fundida com fase estacionária DB-5, de 30 mm de comprimento e 0,25 mm de diâmetro interno, utilizando hélio como gás carreador. Os constituintes que puderam ser identificados (biblioteca de padrões e índice de Kovat's) e confirmados por comparação dos espectros de massas.

Foram identificados como constituintes majoritários de DfccsOE2 os compostos 2,4,5-trimetoxi-estireno (29,2 %) e asarona (23,9 %), sendo que os outros identificados são sesquiterpenos. Dentre os sesquiterpenos, os predominantes são: biciclogermacreno (8,6 %), *Epi*-globulol (8,5 %), δ -cadineno (4,8 %) e (+)-espatulenol (4,7 %) [TABELA 22].

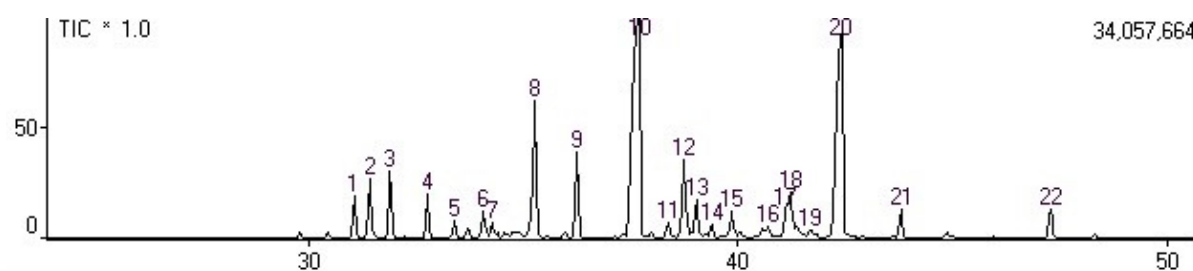
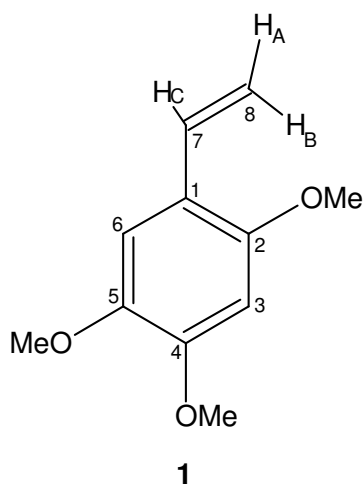


FIGURA 4 – Cromatograma no CG/EM obtido para o óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (DfccsOE2)

TABELA 22 – Principais constituintes do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea*, determinados por CG/EM

Pico	Tr (min)	Teor (%)	Peso Molecular	Composto
1	31,1	2,2	204	α -gurjuneno
2	31,4	3,2	-	-
3	31,9	3,3	204	Trans-cariofileno
4	32,8	2,2	204	Aromadendreno
5	33,4	0,8	204	α - humuleno
6	34,1	1,5	204	Drima-7,9(11)-dieno
7	34,3	0,9	204	γ -gurjuneno
8	35,3	8,6	204	Biciclogermacreno
9	36,3	4,8	204	δ -cadineno
10	37,7	29,2	194	2,4,5-trimetoxi-estireno
11	38,0	1,1	222	Palustrol
12	38,8	4,7	220	(+)-espatulenol
13	39,0	2,2	220	(-)-óxido de cariofileno
14	39,4	1,4	222	Viridiflorol
15	39,9	8,5	222	<i>Epi</i> -globulol
16	40,7	0,7	222	1- <i>Epi</i> -cubenol
17	41,1	1,5	220	(-)-espatulenol
18	41,2	2,7	222	<i>Epi</i> - α -cadinol
19	41,7	1,0	224	Valerianol
20	42,4	23,9	208	Asarona
21	43,8	1,6	196	Asaraldeído
22	47,3	1,6	-	-

4.2 - 2,4,5-Trimetoxi-estireno (1)



O metabólito **1** apresentou-se como um sólido amorfo branco, solúvel em CHCl_3 e em CCDS, eluente CHCl_3 , revelou a presença de um único ponto ($R_f = 0,53$) de coloração roxa ao ser revelado com vanilina/ácido sulfúrico. Além de ser encontrado no óleo essencial, também foi observada a presença do composto **1**, em grande quantidade, no extrato éter de petróleo, ambos obtidos das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea*.

O espectro de RMN ^1H de **1** (**Espectro 1**) exibiu dois singletos relativos a hidrogênios aromáticos em δ 6,99 e 6,48 e três singletos referentes as metoxilas aromáticas em δ 3,80, 3,84 e 3,87. Além destes, os hidrogênios H_A , H_B e H_C apresentaram sinais de mesmo padrão de desdobramento, duplo duplete (dd) em, respectivamente, δ 5,14, 5,57 e 6,96 com constantes de acoplamentos característicos tipo cis, trans e geminal [**TABELA 23**].

O espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 2**), juntamente com os sinais encontrados no espectro de DEPT 135° (**Espectro 3**), revelou sinais intensos relativos a três metoxilas aromáticas com os deslocamentos químicos de δ 56,0, δ 56,4 e δ 56,7. Seis sinais referentes a carbonos aromáticos aparecem em δ 97,7, 109,5, 118,5, 143,3, 149,6 e 151,4, sendo esses últimos referentes aos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos ligados às metoxilas. Além destes sinais, também puderam ser observados os sinais para os carbonos olefínicos em δ 130,9 (CH) e 112,0 (CH_2) [**TABELA 24**].

Os dados encontrados para a substância **1** são compatíveis com aqueles encontrados na literatura para o 2,4,5-trimetoxi-estireno [WATERMAN, 1976] [NAGASHIMA *et al.*, 1999], confirmando tratar-se da mesma substância.

O 2,4,5-trimetoxi-estireno já foi isolado em *D. eximia* e *D. panamensis*, porém ainda não havia sido isolado em *D. furfuracea*. É descrito na literatura que este metabólito possui atividade sobre a *Artemia salina* ($DL_{50} = 8 \mu\text{g/mL}$), mas baixa atividade citotóxica [GOTTLIEB *et al.*, 1978; WANG *et al.*, 1988].

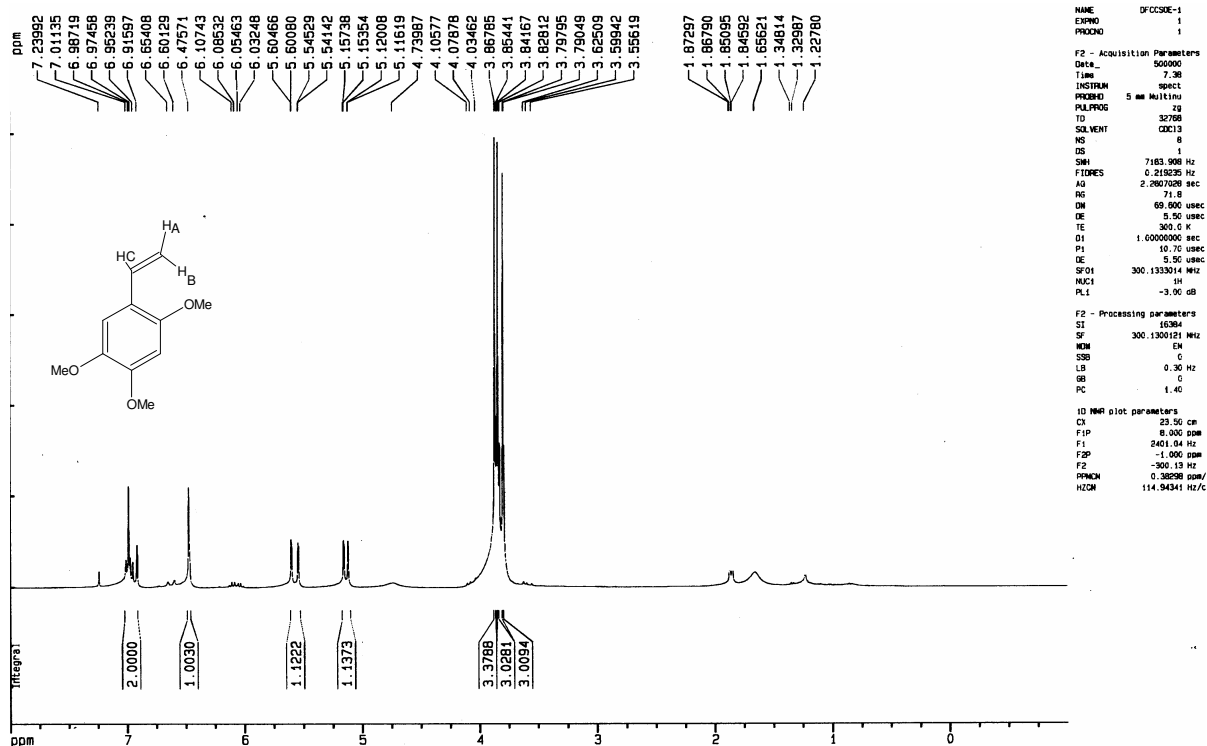
TABELA 23 - Dados de RMN ^1H (δ) de **1** e 2,4,5-trimetoxi-estireno

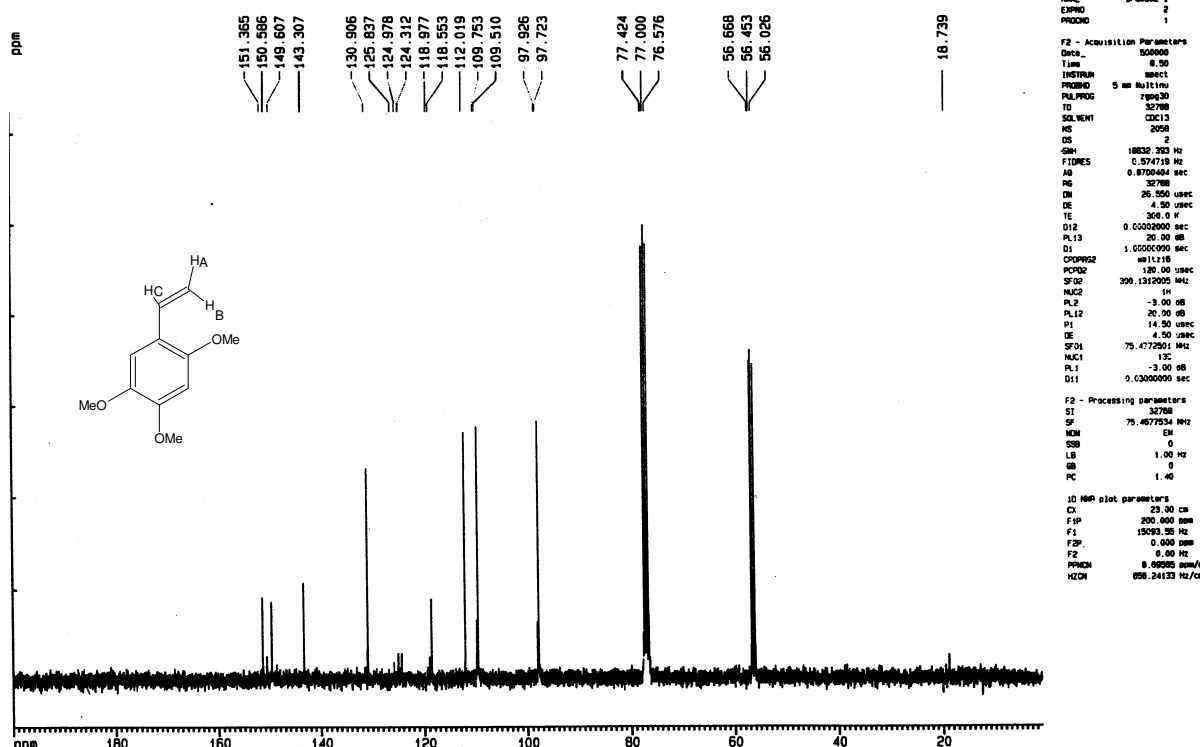
H	1 (δ) ^a	2,4,5-trimetoxi-estireno [WATERMAN, 1976]
H _A	5,14 (dd, $J_{AB} = 1,2$ e $J_{AC} = 11,0$ Hz)	5,20 (dd, $J_{AB} = 2$ e $J_{AC} = 10$ Hz)
H _B	5,57 (dd, $J_{BA} = 1,2$ e $J_{BC} = 17,8$ Hz)	5,65 (dd, $J_{BA} = 2$ e $J_{BC} = 18$ Hz)
H _C	6,96 (dd, $J_{CA} = 11,0$ e $J_{CB} = 17,8$ Hz)	7,05 (dd, $J_{CA} = 10$ e $J_{CB} = 18$ Hz)
3	6,48 (s)	6,58 (s)
6	6,99 (s)	7,10 (s)
OCH ₃	3,80 (s)	3,85 (s)
OCH ₃	3,84 (s)	3,90 (s)
OCH ₃	3,87 (s)	3,95 (s)

^a (300 MHz, CDCl₃)

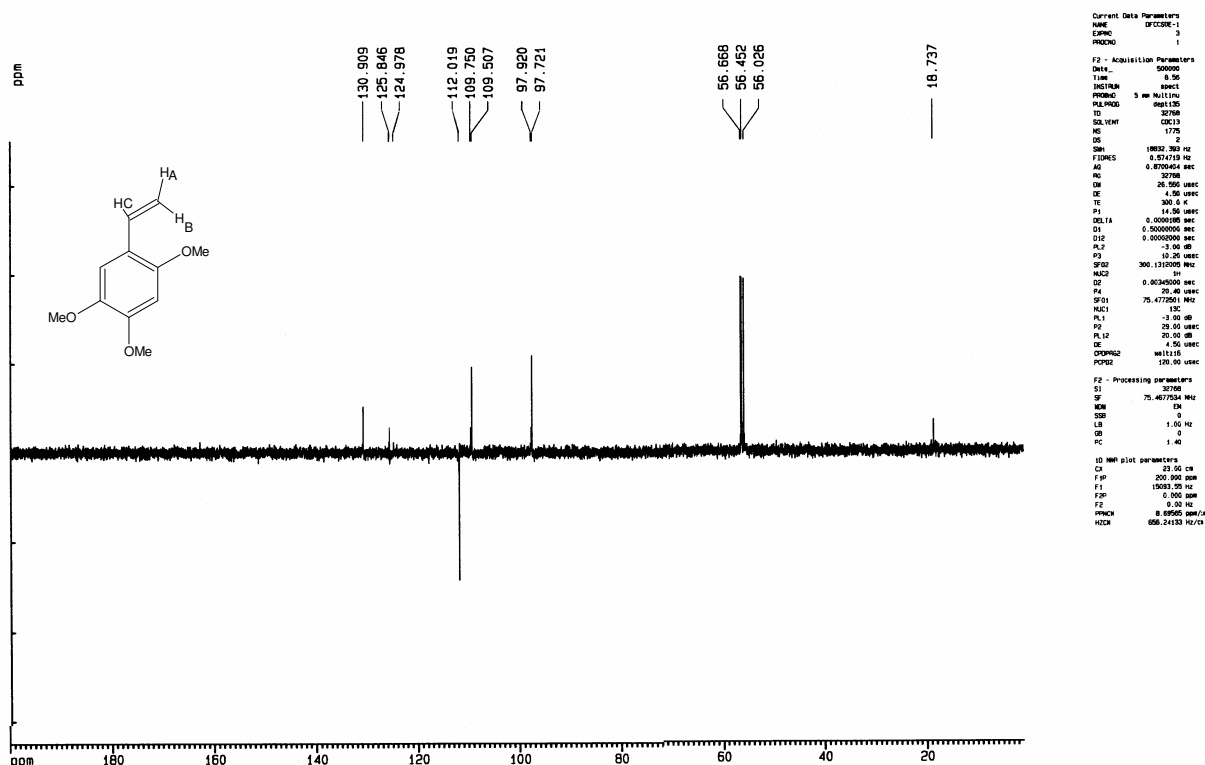
TABELA 24- Dados de RMN ^{13}C (δ) de **1** e 2,4,5-trimetoxi-estireno

C	1 (δ) ^a	2,4,5-trimetoxi-estireno [NAGASHIMA <i>et al.</i> , 1999] ^b
1	118,5	119,3
2	151,4	152,1
3	97,7	98,9
4	149,6	151,0
5	143,3	144,7
6	109,5	111,4
7	130,9	131,8
8	112,0	111,8
OCH ₃	56,0	55,8
OCH ₃	56,4	56,0
OCH ₃	56,7	56,5

^a(75 MHz, CDCl₃), ^b(125 MHz, C₆D₆)ESPECTRO 1- Espectro de RMN ^1H de **1** entre 0-9 ppm (300 MHz, CDCl₃)

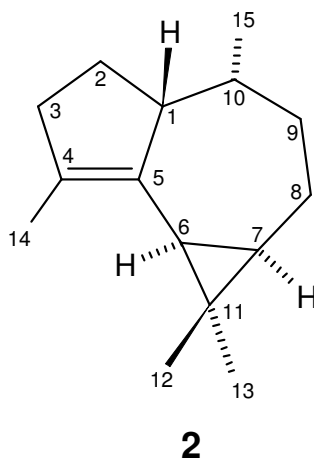


ESPECTRO 2- Espectro de RMN ^{13}C de 1 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 3- Espectro de DEPT 135° de 1 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)

4.3 - (-)- α -gurjuneno (2)



Essa substância, purificada por cromatografia em coluna de sílica, apresentou-se em CCDS como uma mancha de coloração violeta quando revelado com vanilina/ácido sulfúrico, possuindo aspecto de óleo incolor e $[\alpha]_D^{20} = -28,12$.

A análise do seu espectro de RMN ^1H (**Espectros 4 e 5**) permitiu identificar o sinal relativo ao H_6 do anel ciclopropânico em δ 0,75 (d, $J = 8,6$ Hz), enquanto o sinal de H_7 apareceu encoberto por outros sinais. Além disso, observou-se os sinais das metilas em δ 0,82 (s), 0,89 (d, $J = 7,1$ Hz), 1,09 (s) e 1,63 (sl), sendo este último referente a metila ligada ao carbono olefínico [**TABELA 25**].

O espectro de RMN ^{13}C (**Espectro 6**) exibiu sinais referentes às metilas em δ 16,4, 28,9, 18,4 e 14,6, bem como o sinal de um carbono quaternário em δ 21,7, característico do C_{11} do anel ciclopropânico [**TABELA 26**]. A insaturação foi confirmada pelos sinais observados em δ 137,3 e 136,1, respectivamente de C_4 e C_5 , estes não foram visualizados no espectro de DEPT 135° (**Espectro 7**).

Através da comparação dos dados espectrais da substância isolada com os descritos na literatura para α -gurjuneno e seu epímero, 1-*Epi*- α -gurjuneno, [KRISHNAPPA *et al.*, 1973] [ATTA-UR-RAHMAN, 1992] confirmou-se que a substância isolada trata-se do sesquiterpeno (-)- α -gurjuneno (**2**).

TABELA 25 - Dados de RMN ^1H (δ) de **2** e α -gurjuneno

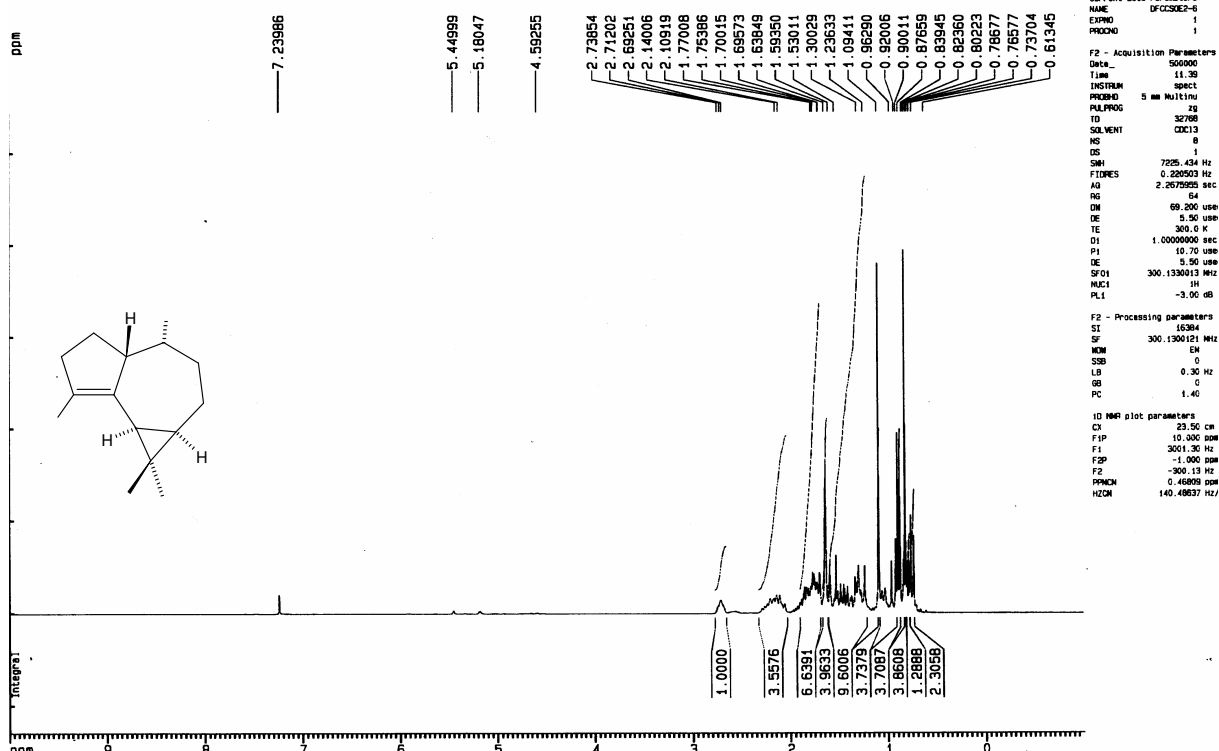
H	2 (δ)^a	(-)-α-gurjuneno [KRISHNAPPA <i>et al.</i> , 1973] ^b
6	0,75 (d, $J = 8,6$ Hz)	nc
12	1,09 (s)	1,08 (s)
13	0,82 (s)	0,81 (s)
14	1,63 (sl)	1,65 (d, $J = 0,5$ Hz)
15	0,89 (d, $J = 7,1$ Hz)	0,86 (d, $J = 7,0$ Hz)

^a(300 MHz, CDCl_3), ^b(CCl_4), nc: não citado pelo autor

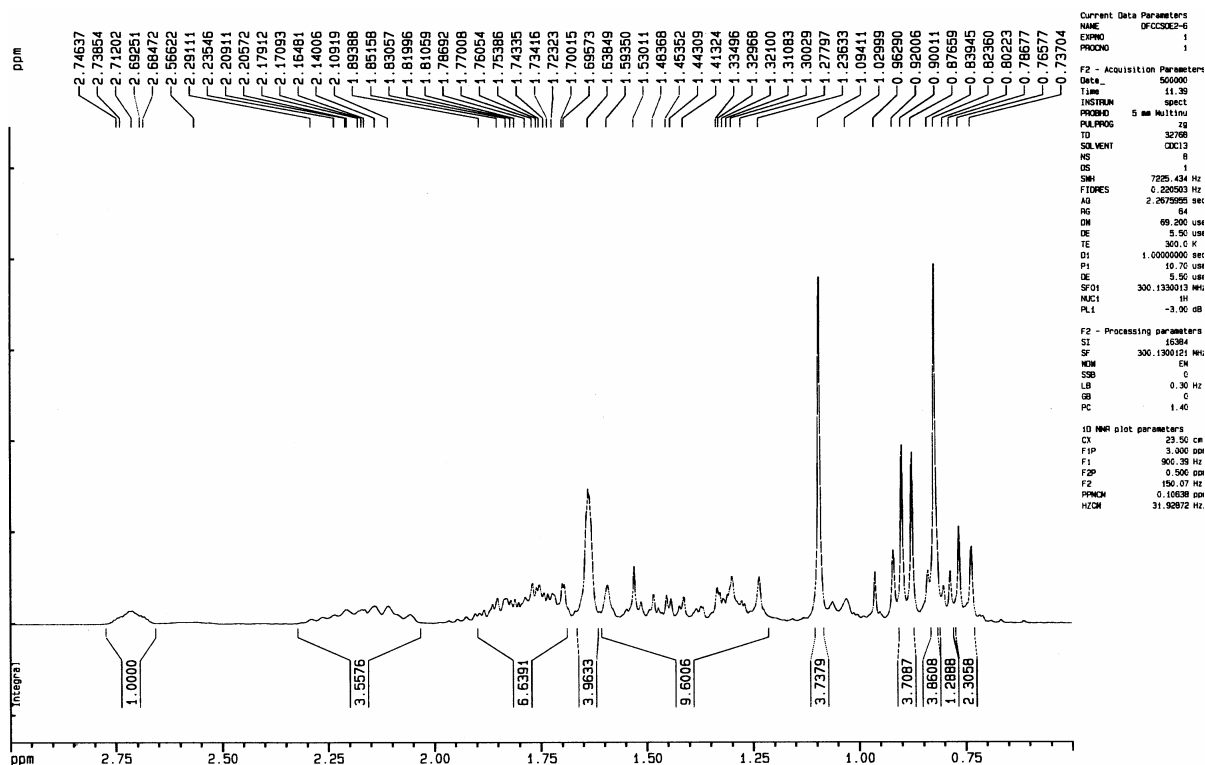
TABELA 26- Dados de RMN ^{13}C (δ) de **2**, α -gurjuneno e 1-*Epi*- α -gurjuneno

C	2 (δ)^a	α-gurjuneno [ATTA- UR-RAHMAN, 1992]^b	1-<i>Epi</i>-α-gurjuneno [ATTA- UR-RAHMAN, 1992]^b
1	48,7	48,9	50,3
2	28,9	29,0	31,6
3	36,4	36,5	35,7
4	137,3	137,3	138,5
5	136,1	136,1	137,0
6	25,7	25,9	26,6
7	28,3	28,5	24,2
8	21,5	21,6	21,0
9	32,5	32,7	35,4
10	32,1	32,3	33,1
11	21,7	21,7	20,0
12	16,4	16,4	16,3
13	28,9	29,0	28,8
14	14,6	14,5	14,8
15	18,4	18,4	20,3

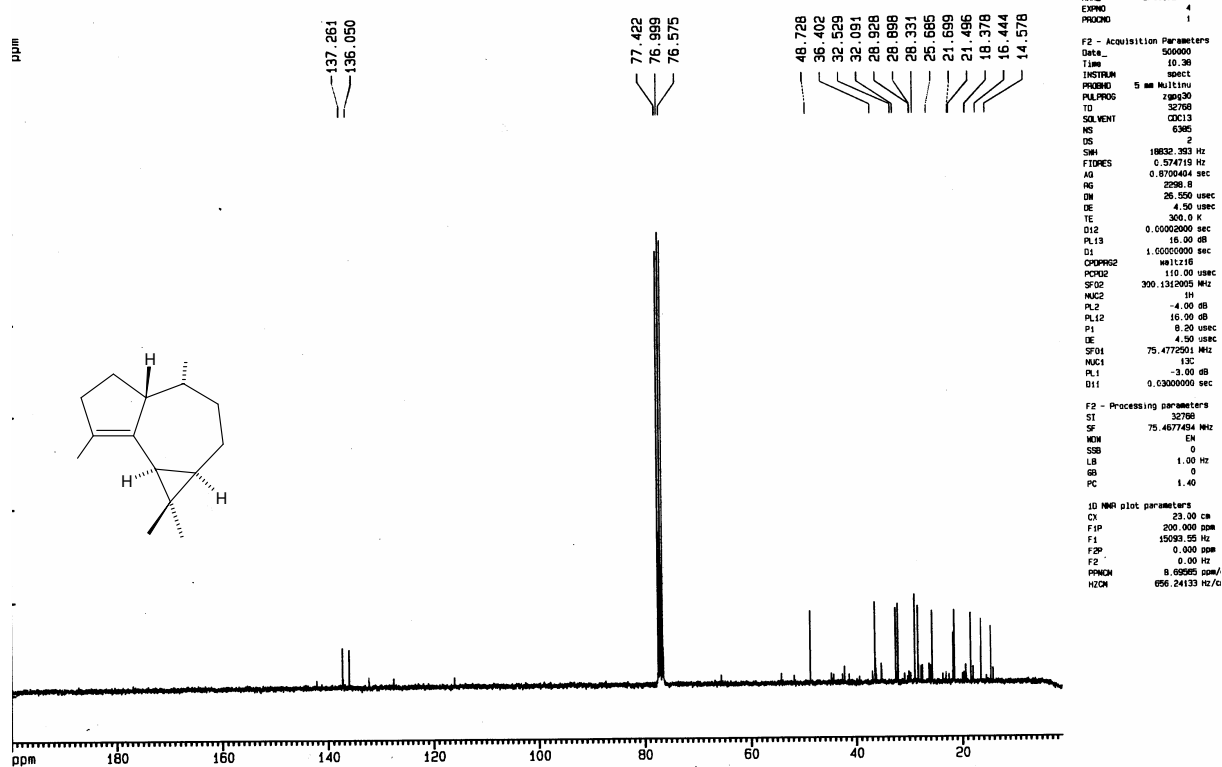
^a(75 MHz, CDCl_3), ^b(CDCl_3)



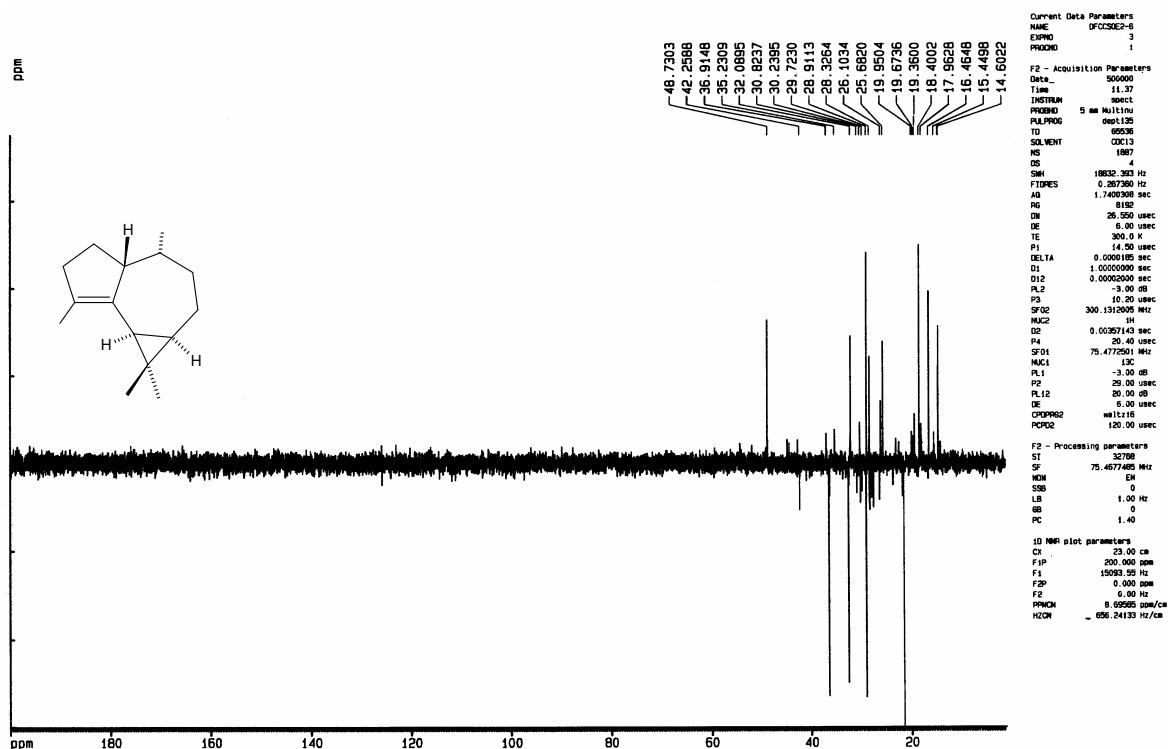
ESPECTRO 4 - Espectro de RMN ^1H de **2** entre 0-10 ppm (300 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 5 – Expansão do espectro de RMN ^1H de **2** entre 0,5-2,5 ppm



ESPECTRO 6 - Espectro de RMN ^{13}C de 2 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 7 - Espectro de DEPT 135° de 2 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)

O α -gurjuneno é um sesquiterpeno pertencente à classe dos aromadendranos, sendo estruturalmente caracterizado por possuir um anel dimetil ciclopropânico fundido a um esqueleto hidroazulênico [GIJSEN *et al.*, 1995]. Este sesquiterpeno foi isolado pela primeira vez da resina proveniente de árvores tropicais da família Dipterocarpaceae, mas somente em 1963 sua estrutura foi determinada [PALMADE *et al.*, 1963]. É um dos principais constituintes do óleo de bálsamo gurjun (resina de árvores tropicais de Dipterocarpaceae), sendo utilizado comercialmente como agente fixador em perfumes [BAUER *et al.*, 1990].

- Rota Biossintética

A biossíntese de sesquiterpenos inicia-se com o trans-farnesil pirofosfato (FDP), este pode ser proveniente da via mevalonato ou da não-mevalonato (via metileritritol) [KNAGGS, 2003].

Schmidt e colaboradores (1999) realizaram um estudo com precursores marcados com deutério e a enzima isolada α -gurjuneno sintase obtida de *Solidago canadensis*. Observou-se que inicialmente ocorria a abstração do grupo fosfato do FDP (a) e formação do cátion germacrenil (b); este sofre um rearranjo com deslocamento dos pares de elétrons internos para a formação do cátion patchoulênil (c) que sofre uma série de reações como os rearranjos 1,2 de hidreto, culminando com a formação do produto α -gurjuneno. Esta também é a rota biossintética aceita para a produção do γ -gurjuneno [FIGURA 5].

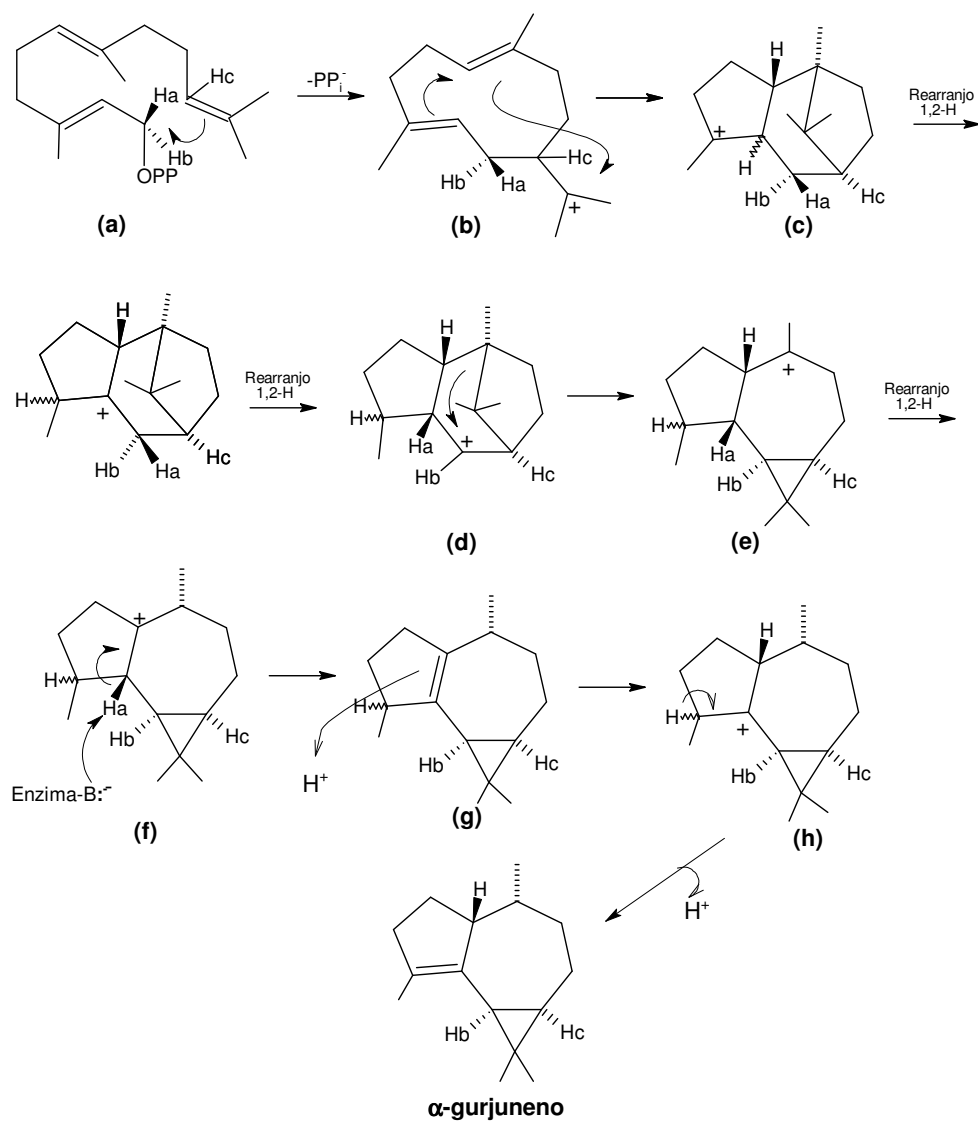
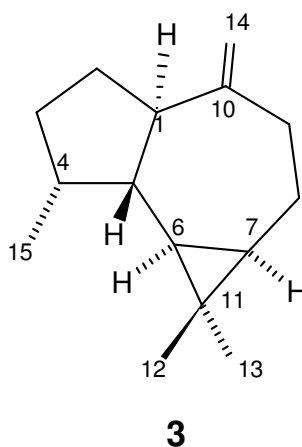


FIGURA 5 - Rota biossintética do sesquiterpeno α -gurjuneno [SCHMIDT *et al.*, 1999]

4.4- Aromadendreno (3)



O composto **3**, purificado por CCPS-AgNO₃, apresentou-se com o aspecto de óleo incolor, sendo solúvel em CHCl₃ e MeOH.

O espectro de RMN ¹H (**Espectros 8 e 9**) caracteriza-se por apresentar sinais relativos aos hidrogênios do anel ciclopropânico em δ 0,60 e 0,83, além dos sinais relativos aos três grupos metila em δ 0,94 (d, $J = 6,9$ Hz), δ 0,95 (s) e 1,01 (s). O singlete largo em δ 4,59 é atribuído aos hidrogênios olefínicos da dupla exocíclica [**TABELA 27**].

Os dados de RMN ¹³C (**Espectros 10 e 11**) confirmaram o tipo de esqueleto e também a insaturação, pois observaram-se sinais característicos de carbonos olefínicos em δ 105,3 (CH₂) e 154,8 (C), bem como sinais em δ 19,9 (C) referente a C₁₁ e δ 15,8, 28,7 e 17,1 relativos as metilas [**TABELA 28**].

Com base no espectro de DEPT 135° (**Espectro 12**), confirmou-se que o composto **4** possui três carbonos metílicos, cinco metilênicos, cinco metínicos e dois carbonos quaternários. É importante ressaltar que o carbono olefínico em δ 105,3 apresentou-se como metilênico, corroborando a ligação dupla ser exocíclica.

Através da comparação dos dados espectrais da substância isolada com o aromadendreno e *allo*-aromadendreno, seu epímero em C₁, confirmou-se que o composto **3** é o aromadendreno [FAURE *et al.*, 1991; MIYAZAWA *et al.*, 1995]. Este sesquiterpeno, já amplamente conhecido em espécies de Annonaceae, foi isolado em *D. glabriuscula* [SIQUEIRA *et al.*, 2003], porém ainda não havia sido isolado em *D. furfuracea*.

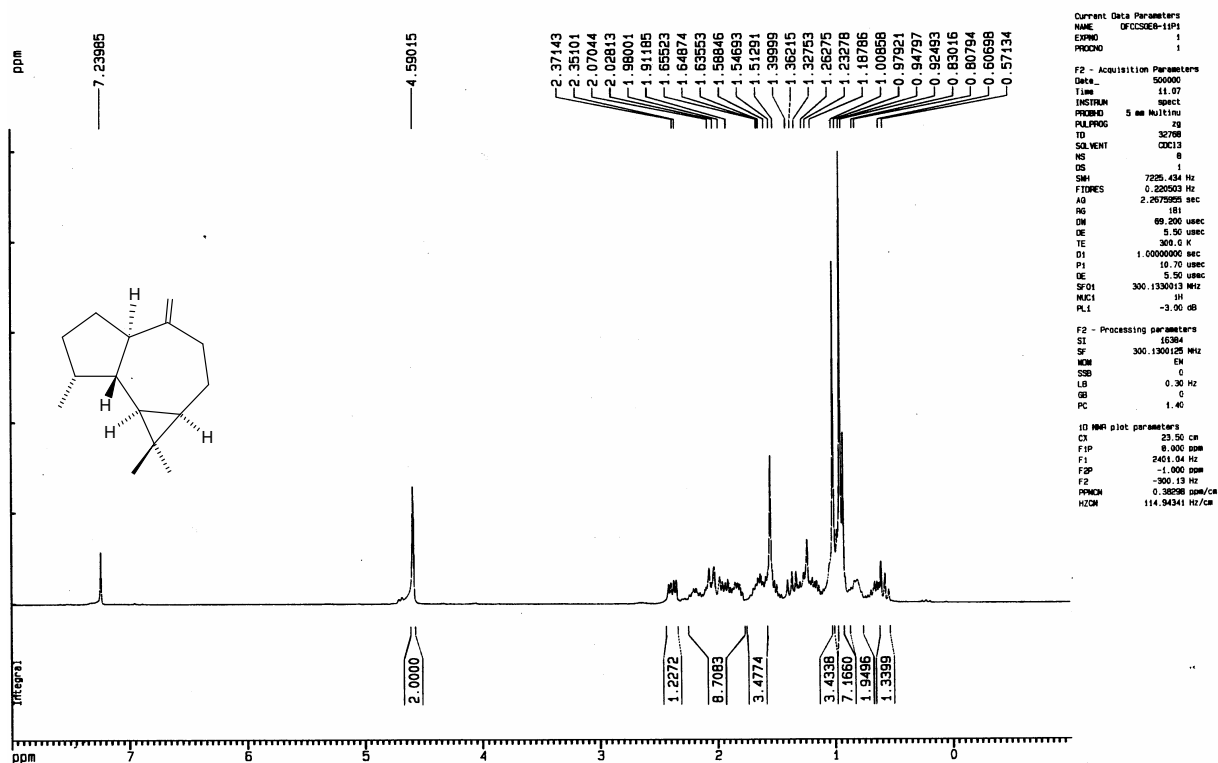
TABELA 27 - Dados de RMN ^1H (δ) de **3** e (+)-aromadendreno

H	3 (δ)^a	(+)-aromadendreno [FAURE <i>et al.</i> , 1991] ^b
6	0,60 (dd, $J = 10,7$ e $9,5$ Hz)	0,62 (dd, $J = 11,0$ e $9,4$ Hz)
7	0,83 (m)	0,70 (ddd, $J = 10,9$, $9,4$ e $5,9$ Hz)
12	1,01 (s)	1,06 (s)
13	0,95 (s)	1,00 (s)
15	0,94 (d, $J = 6,9$ Hz)	0,94 (d, $J = 7,4$ Hz)
14	4,59 (sl)	4,64 (sl)

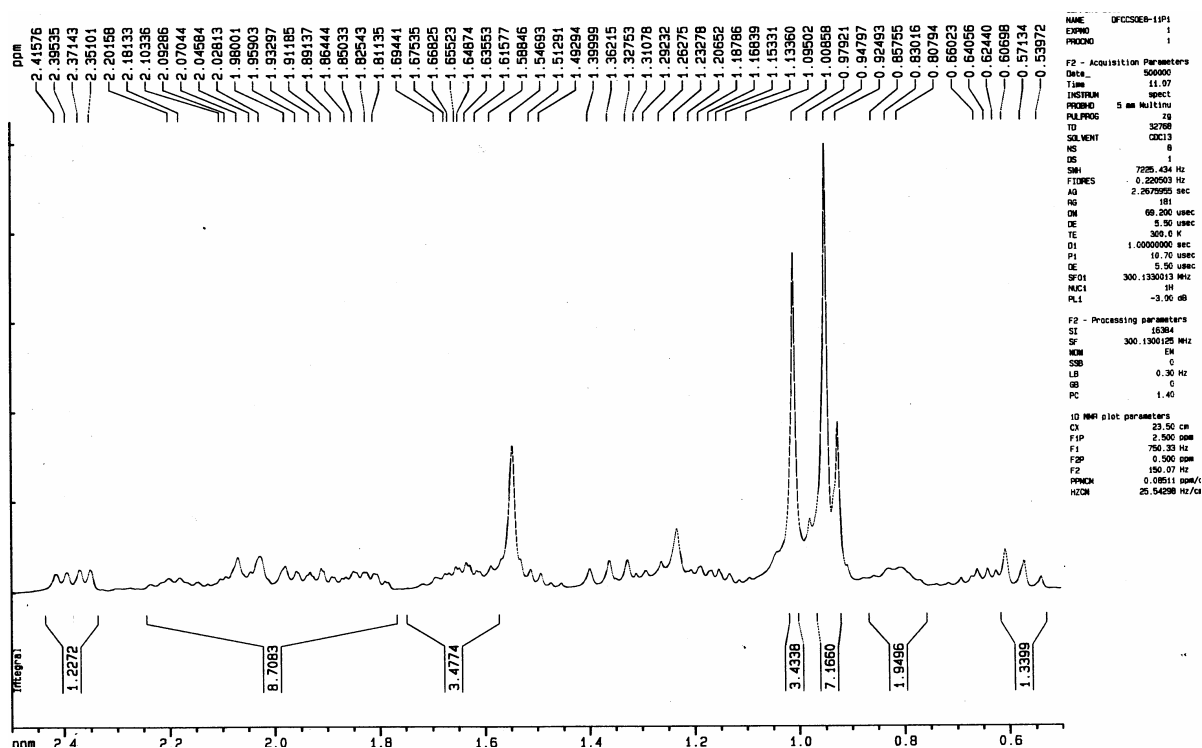
^a(300 MHz, CDCl_3), ^b(400 MHz, CDCl_3)**TABELA 28** - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **3**, (+)-aromadendreno e (-)-*allo*-aromadendreno

C	3 (δ)^a	(+)-aromadendreno [MIYAZAWA <i>et al.</i> , 1995] ^b	(-)-<i>allo</i>-aromadendreno [FAURE <i>et al.</i> , 1991] ^c
1	53,8	53,8	50,8
2	29,5	29,5	28,3
3	35,1	35,2	31,3
4	35,3	35,4	37,9
5	43,7	44,0	42,2
6	29,1	29,3	23,6
7	27,4	27,7	24,9
8	24,8	24,9	22,2
9	39,0	39,2	35,8
10	154,8	154,0	152,3
11	19,9	19,9	17,2
12	15,8	15,8	15,9
13	28,7	28,7	28,7
14	105,3	105,7	109,8
15	17,1	17,1	16,4

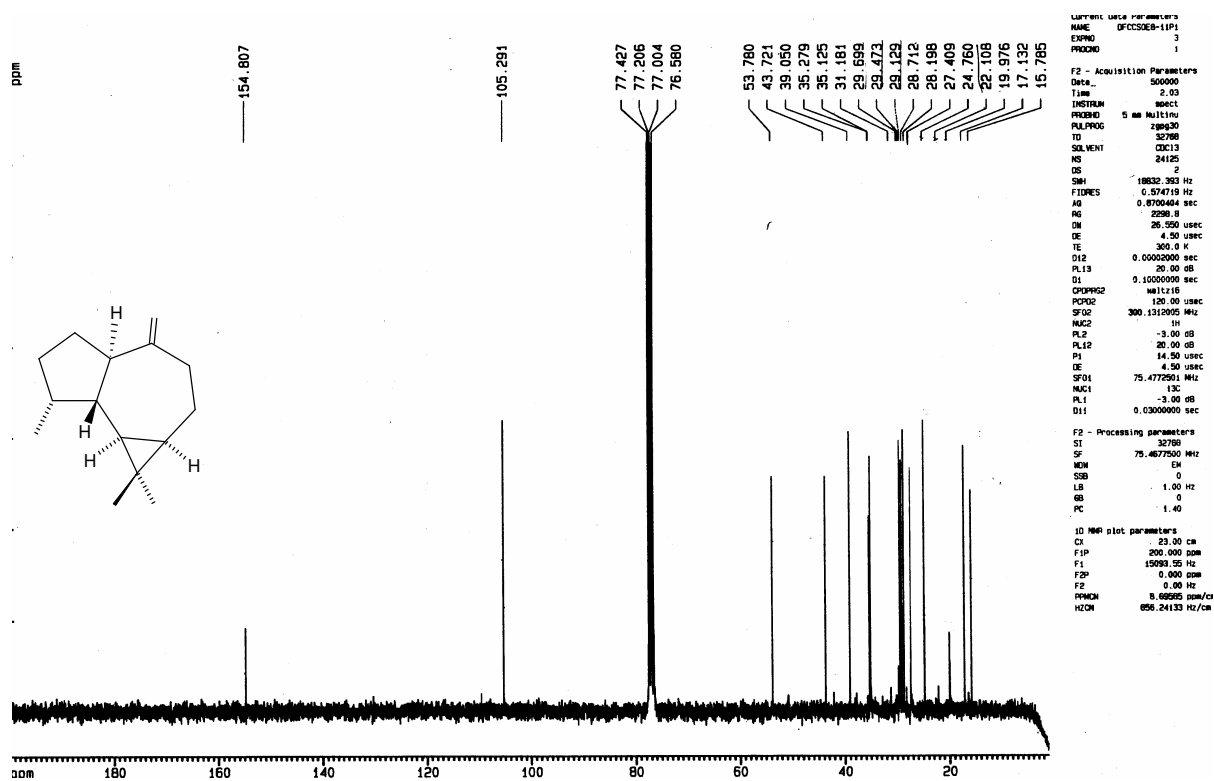
^a(75 MHz, CDCl_3), ^b(125 MHz, CDCl_3), ^c(100 MHz, CDCl_3),



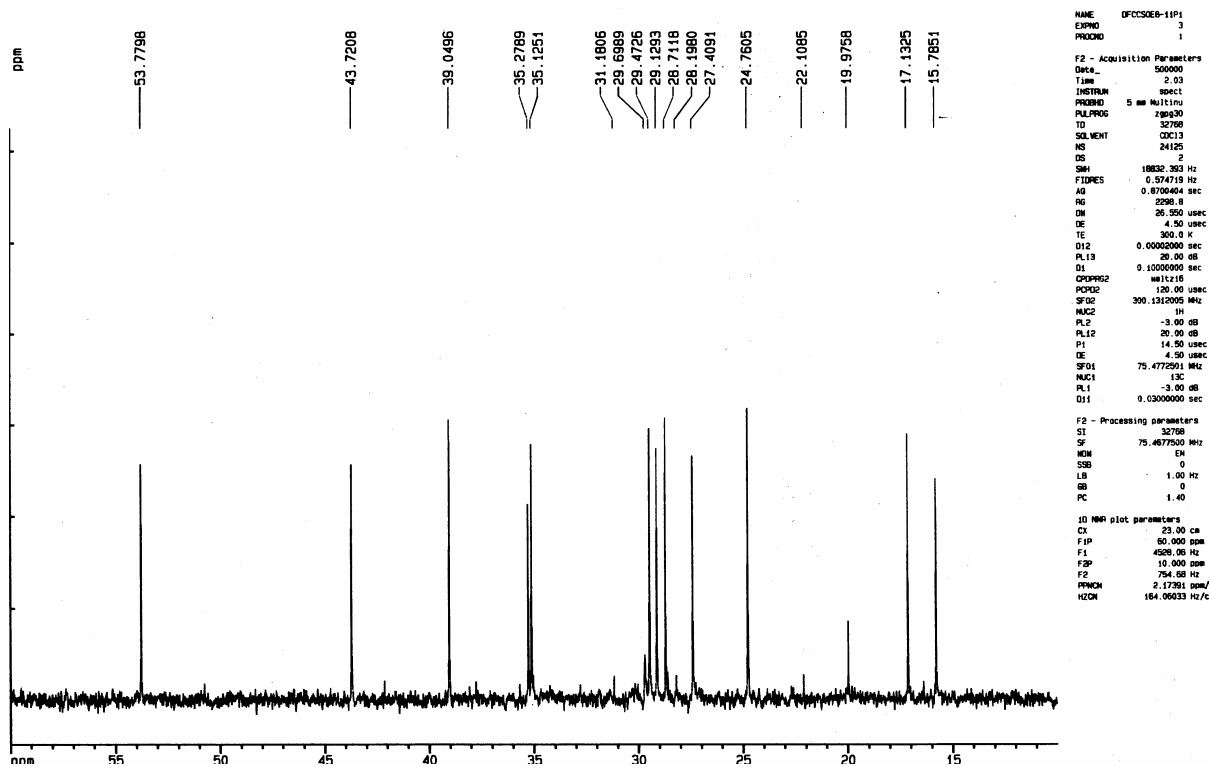
ESPECTRO 8 – Espectro de RMN ^1H de 3 entre 0-8 ppm (300 MHz, CDCl_3)



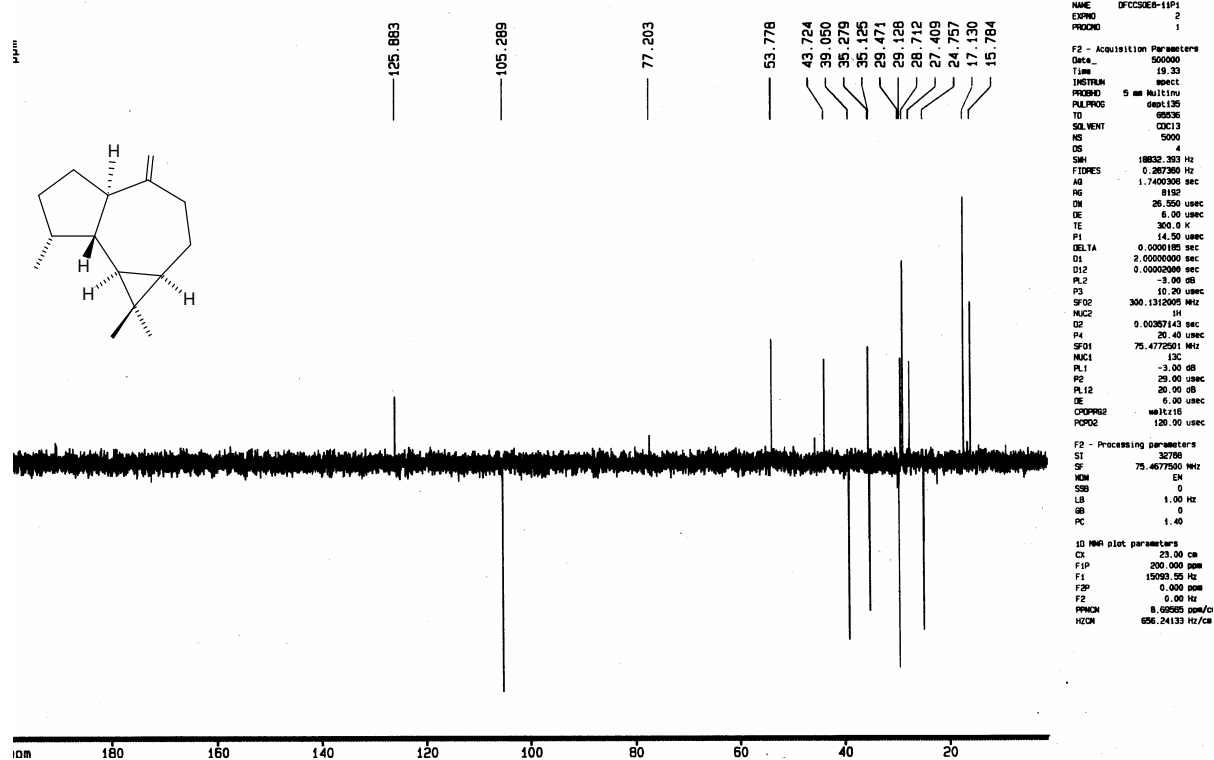
ESPECTRO 9 – Expansão do espectro de RMN ^1H de 3 entre 0,5-2,5 ppm



ESPECTRO 10 – Espectro de RMN ^{13}C de 3 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)

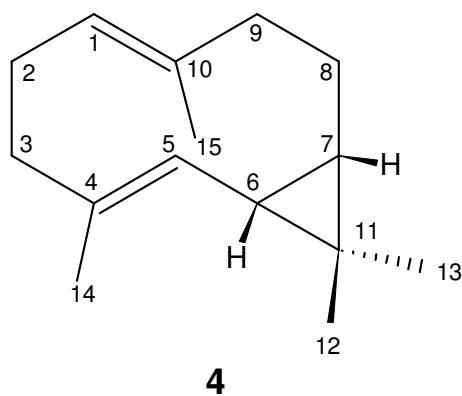


ESPECTRO 11 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C de 3 entre 10-60 ppm



ESPECTRO 12 – Espectro de DEPT 135° de 3 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl₃)

4.5- Biciclogermacreno (4)



Este composto foi isolado a partir frações 39-42, provenientes do grupo 4 do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo, sendo purificado por CCPS-AgNO₃. Apresentou-se como uma única mancha em CCDS e com o aspecto de óleo incolor.

No espectro de RMN ¹H (**Espectros 13 e 14**) são destacáveis quatro singletos em δ 1,00, 1,07, 1,46 e 1,64 referentes, respectivamente, as duas metilas geminais do anel ciclopropânico e as duas metilas olefínicas. Além desses, também há o sinal em δ 4,33 (d, *J* = 11,5 Hz) correspondente a H₅ e em δ 4,81 (dd, *J* = 10,7 e 5,4 Hz) de H₁ [TABELA 29]. A metila H₁₅ encontra-se mais protegida do que a metila H₁₄, pois sofre um efeito anisotrópico de proteção conferido pela ligação dupla entre C₄ e C₅ [FIGURA 6].

Na análise dos dados espectrais de RMN ¹³C (**Espectro 15**), é importante ressaltar que foram observados quinze sinais, indicando tratar-se de um sesquiterpeno. Os sinais mais relevantes na identificação estrutural do composto foram dos carbonos olefínicos em δ 124,8, 140,8, 128,0 e 126,5, bem como o sinal de C₁₁ em δ 19,8 e das metilas em δ 29,2, 15,4, 16,5 e 20,9, sendo os dois últimos relativos as metilas olefínicas [TABELA 30]. Baseando-se no espectro de DEPT 135° (**Espectro 16**) e nos outros dados espectroscópicos obtidos visualizou-se que a substância **4** possui quatro carbonos metilênicos, quatro metínicos, quatro metílicos e três carbonos quaternários, confirmando o esqueleto germacreno.

As análises das informações espectroscópicas obtidas foram compatíveis com um sesquiterpeno de esqueleto bicíclico, incluindo um anel ciclopropânico. Através da comparação entre os dados obtidos do composto **4** com o biciclogermacreno [CAROLLO, 2003; FERREIRA *et al.*, 2001], confirmou que se tratava da mesma substância.

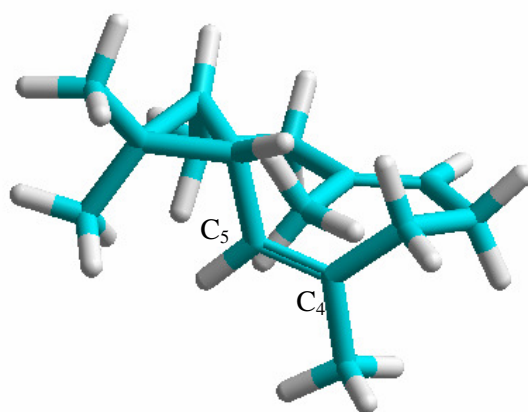
TABELA 29 - Dados de RMN ¹H (δ) de **4** e biciclogermacreno

H	4 (δ) ^a	Biciclogermacreno [CAROLLO, 2003] ^a
1	4,81 (dd, <i>J</i> = 10,7 e 5,4 Hz)	4,81 (dd, <i>J</i> = 5,4 e 10,7 Hz)
5	4,33 (d, <i>J</i> = 11,5 Hz)	4,32 (d, <i>J</i> = 11,5 Hz)
12	1,07 (s)	1,07 (s)
13	1,00 (s)	1,00 (s)
14	1,64 (s)	1,64 (s)
15	1,46 (s)	1,44 (s)

^a (300 MHz, CDCl₃)

TABELA 30 - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **4** e do biciclogermacreno

C	4 (δ) ^a	Biciclogermacreno
		[FERREIRA <i>et al.</i> , 2001] ^a
1	124,8	124,8
2	26,0	26,0
3	41,1	41,0
4	128,0	128,0
5	126,5	126,5
6	26,9	26,8
7	30,0	30,0
8	26,8	26,7
9	37,2	37,2
10	140,8	140,6
11	19,8	19,7
12	29,2	29,2
13	15,4	15,3
14	16,5	16,5
15	20,9	20,7

^a (75 MHz, CDCl_3)**FIGURA 6** – Imagem 3D, gerada no programa Hyperchem, do composto **4**

O biciclogermacreno foi isolado pela primeira vez do óleo essencial de *Citrus junos* [NISHIMURA *et al.*, 1969] e desde então, foi identificado como constituinte de uma grande variedade de plantas [HARDT *et al.*, 1995], inclusive em *D. furfuracea* [CAROLLO *et al.*, 2005].

Toyota e colaboradores (1996) relataram a instabilidade do biciclogermacreno (isomerização, oxidação), pois observaram uma diferença significativa na concentração do (-)-*ent*-biciclogermacreno e (-)-*ent*-espatulenol em extratos de várias espécies vegetais armazenados por longos períodos. Foi proposto, pelos autores, a transformação de acordo com a **Figura 7** [TOYOTA *et al.*, 1996]. O biciclogermacreno é considerado um intermediário na biossíntese dos aromadendranos [NISHIMURA *et al.*, 1969].

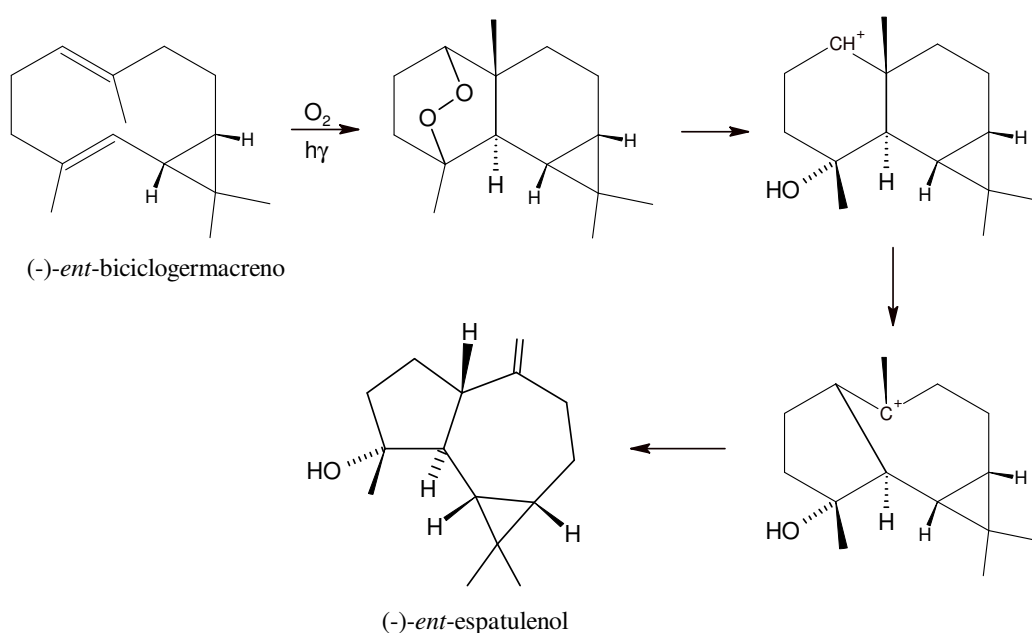


FIGURA 7 – Proposta de transformação do (-)-*ent*-biciclogermacreno no (-)-*ent*-espatulenol

Current Data Parameters

NAME	DFCS02R-39-2
EXPNO	1
PROCNO	1

F2 - Acquisition Parameters

Date_	500000
Time	9.21
INSTRUM	nmr1
PROBHD	5 mm H-1 NMR
PULPROG	zg
TD	32768
SOLVENT	CDCl3
DS	1
NS	8
SH	7205.434 Hz
FIDRES	0.226503 Hz
AQ	2.2675925 sec
RQ	181
DW	69.200 usec
DE	5.50 usec
TE	300.0 K
D1	1.00000000 sec
F1	10.70 usec
DE	5.56 usec
SFO1	300.1330013 MHz
NUC1	1H
PL1	-3.00 dB

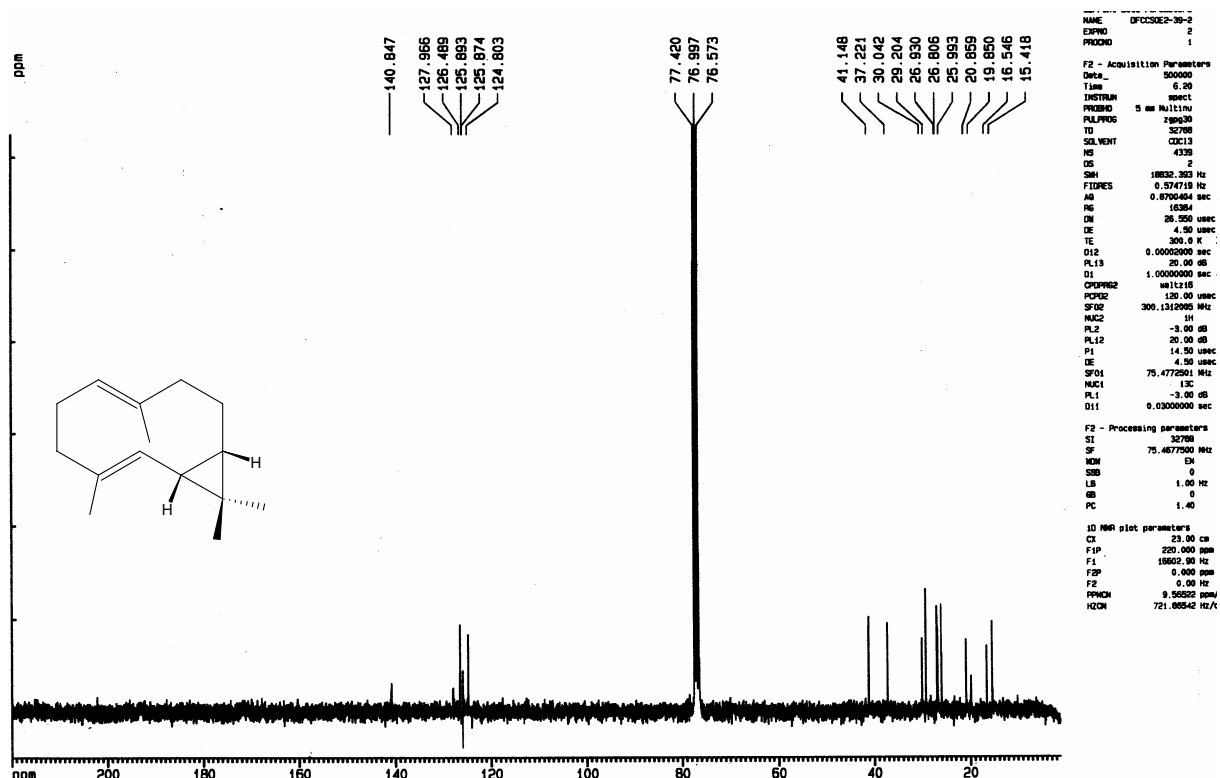
F2 - Processing parameters

SI	16384
SP	300.1300121 MHz
EX	
WM	
SGB	0
LB	0.36 Hz
GB	
PC	1.40

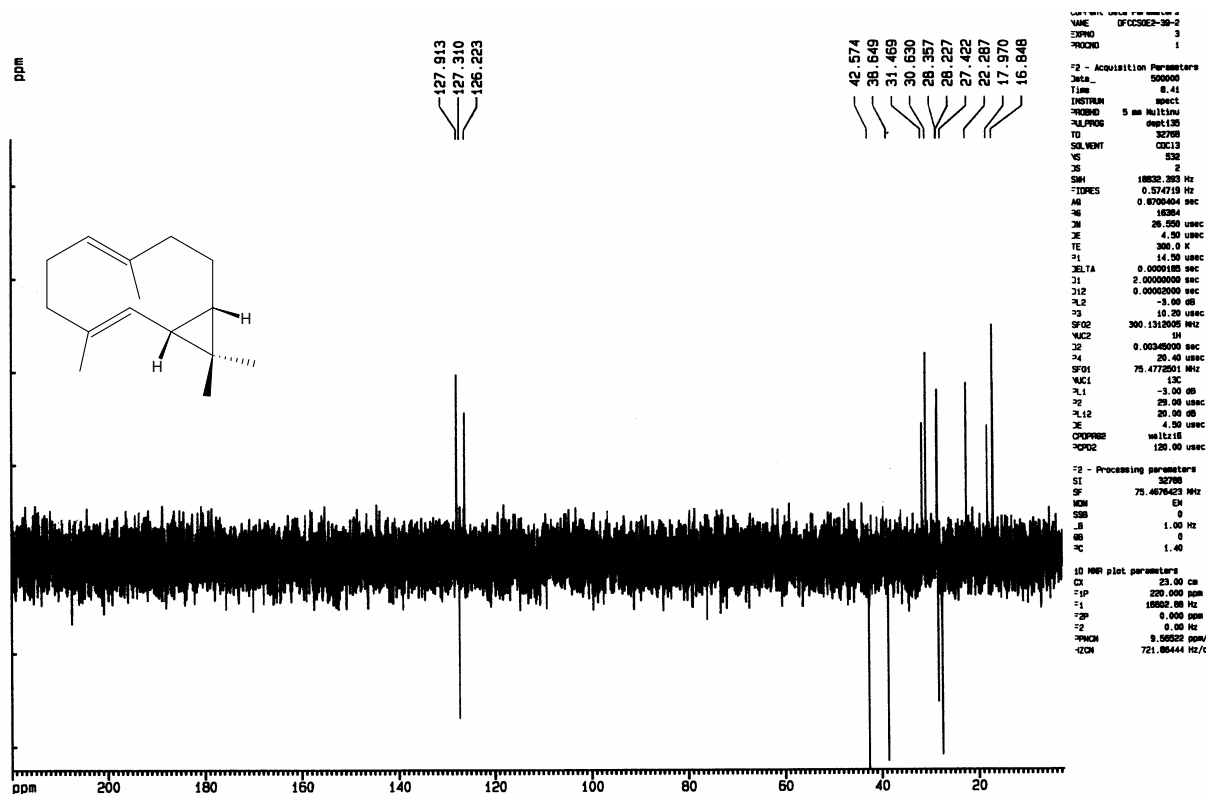
1D NMR plot parameters

CX	29.50 cm
F1P	5.300 ppm
F1	1500.00 Hz
F2P	0.500 ppm
F2	150.07 Hz
PCNCH	0.19149 ppm/cm
H2CH	57.47170 Hz/cm

Estudo Fitoquímico e Avaliação Alelopática das partes subterrâneas de *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Benth. & Hook f. – Annonaceae

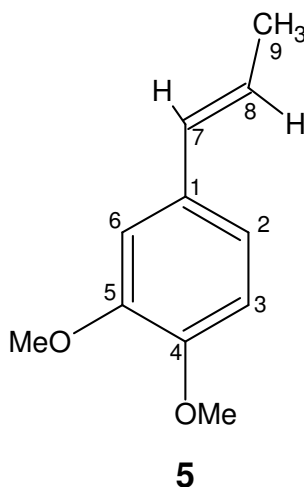


ESPECTRO 15 – Espectro de RMN ^{13}C de 4 entre 0-220 ppm (75 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 16 – Espectro de DEPT 135° de 4 entre 0-220 ppm (75 MHz, CDCl_3)

4.6 – (*E*)-metil-isoeugenol (**5**)



A substância **5** foi obtida a partir das frações 95-100, oriundas do fracionamento do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo, apresentando-se com o aspecto de sólido amorfo branco, solúvel em CHCl_3 e com R_f de 0,53 em CCDS (FM: CHCl_3).

O espectro de RMN ^1H (**Espectros 17 e 18**) revelou a presença de sinais em δ 6,84 (dd), 6,77 (d) e 6,87 (d) relativos a H_2 , H_3 e H_6 , como também um duplete largo em δ 6,32 com J de 15,7 Hz, caracterizando um hidrogênio de ligação dupla *trans* (*E*). Também observou-se a presença de um duplo quarteto em δ 6,08 referente a H_8 e um duplo duplete, relativo à metila na posição 9, em δ 1,85 com J de 6,5 e 1,4 Hz, estes são característicos de acoplamento vicinal e alílico, respectivamente [**TABELA 31**].

No espectro de RMN ^{13}C (**Espectros 19 e 20**) foram observados sinais de duas metoxilas em δ 55,7 e 55,9; um sinal em δ 18,3, relativo a metila e também oito sinais de carbonos olefínicos, sendo que dois desses são referentes aos carbonos da ligação dupla entre C_7 e C_8 e os outros ao anel aromático [**TABELA 32**].

Com a análise do espectro de DEPT 135° (**Espectro 21**) confirmou-se a presença de três carbonos quaternários, três metílicos e cinco metínicos.

TABELA 31 - Dados de RMN ^1H (δ) de **5** e (*E*)-metil-isoeugenol

H	5 (δ) ^a	(<i>E</i>)-metil-isoeugenol [JOSHI <i>et al.</i> , 2005] ^a
2	6,84 (dd, $J = 1,7$ e $8,2$ Hz)	6,90-6,78 (m)
3	6,77 (d, $J = 8,2$ Hz)	6,90-6,78 (m)
6	6,87 (d, $J = 1,7$ Hz)	6,90-6,78 (m)
7	6,32 (dl, $J = 15,7$ Hz)	6,35 (d, $J = 16,2$ Hz)
8	6,08 (dq, $J = 6,5$ e $15,7$ Hz)	6,22-6,11 (m)
9	1,85 (dd, $J = 6,5$ e $1,4$ Hz)	1,87 (dl, $J = 6,2$ Hz)
OCH ₃	3,85 (s)	3,83 (s)
OCH ₃	3,87 (s)	3,87 (s)

^a (300 MHz, CDCl₃)**TABELA 32** - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **5** e (*E*)-metil-isoeugenol

C	5 (δ) ^a	(<i>E</i>)-metil-isoeugenol [POUCHERT & BEHNKE, 1993] ^b
1	131,1	131,2
2	118,6	118,6
3	111,2	111,3
4	148,1	148,2
5	149,8	149,0
6	108,6	108,6
7	123,8	123,7
8	130,6	130,6
9	18,3	18,3
OCH ₃	55,7	55,8
OCH ₃	55,9	55,9

^a (75 MHz, CDCl₃), ^b (60 MHz, CDCl₃)

A estrutura de **5** pôde ser confirmada com os dados obtidos no espectro de ^1H - ^1H COSY 90° (**Espectros 22 e 23**), pois as principais correlações observadas foram entre o H₈ e H₇, a metila na posição 9 com H₇ e H₈ e entre H₂ e H₃ [**FIGURA 8**].

A comparação entre os dados obtidos da substância **5** com os citados na literatura para o (*E*)-metil-isoegenol [JOSHI *et al.*, 2005] [POUCHERT & BEHNKE, 1993] permitiu-nos concluir que se tratam da mesma substância. Este metabólito está sendo descrito pela primeira vez no gênero *Duguetia*.

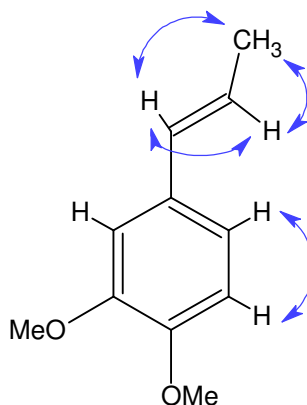
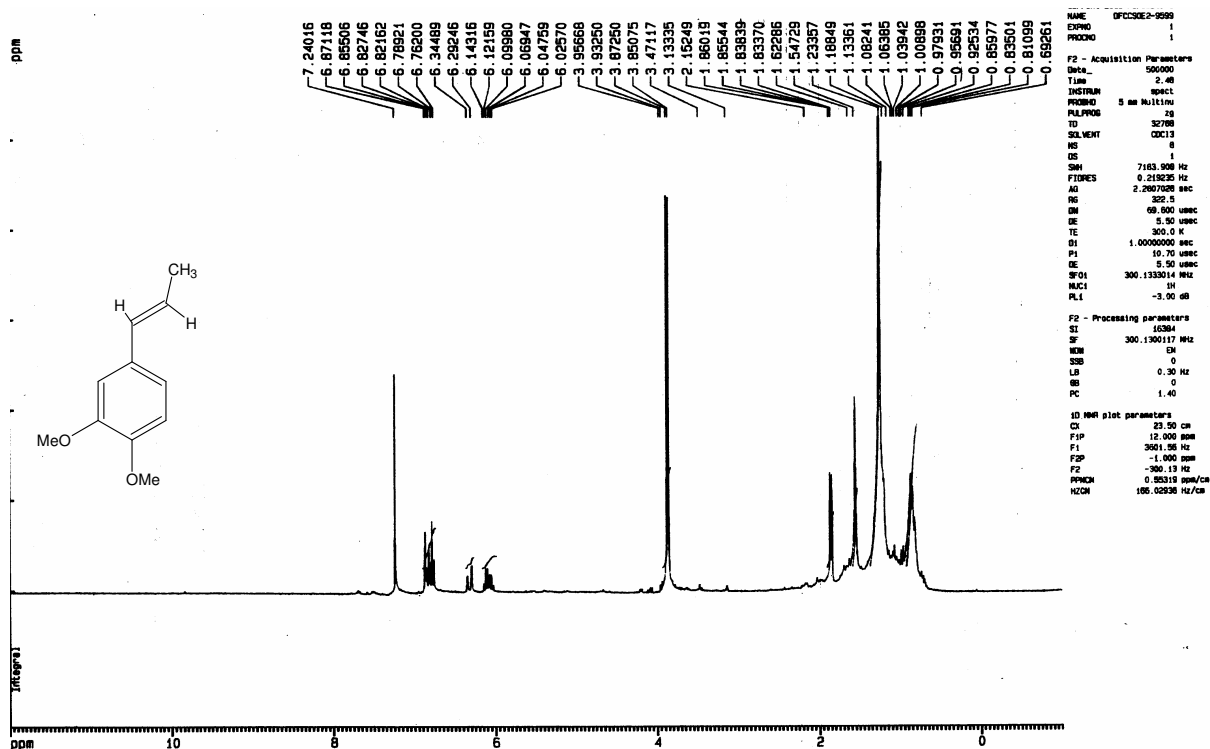
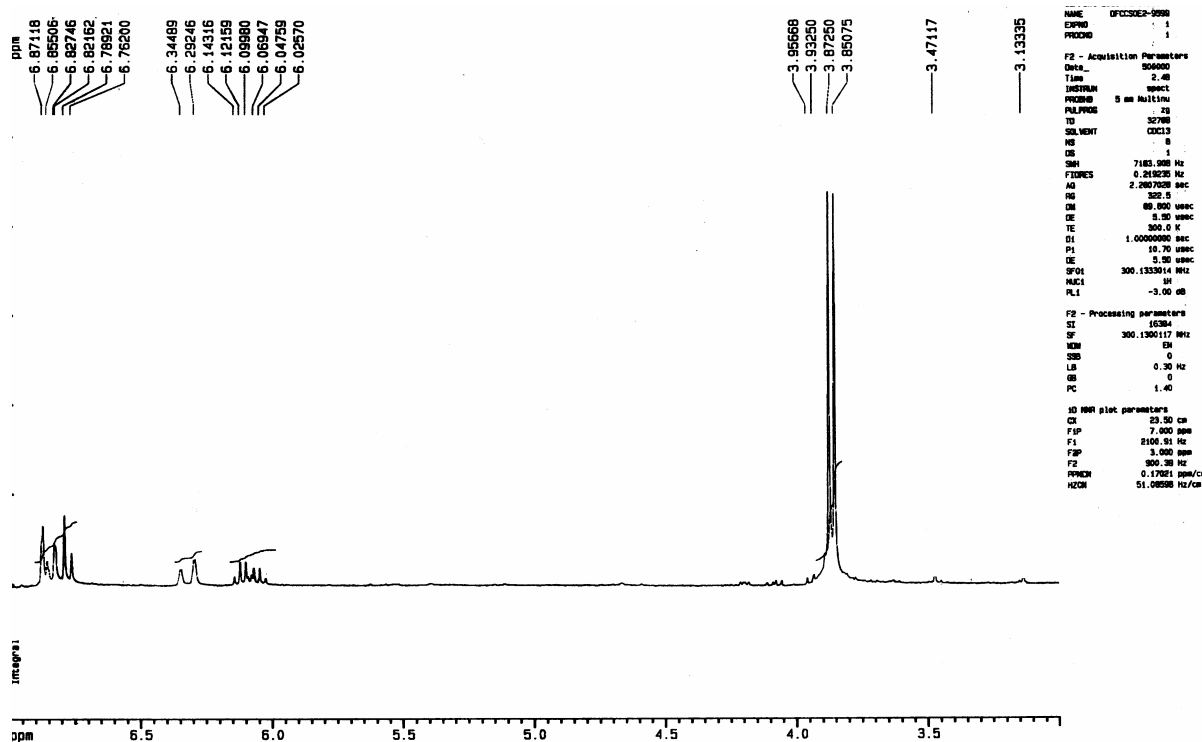


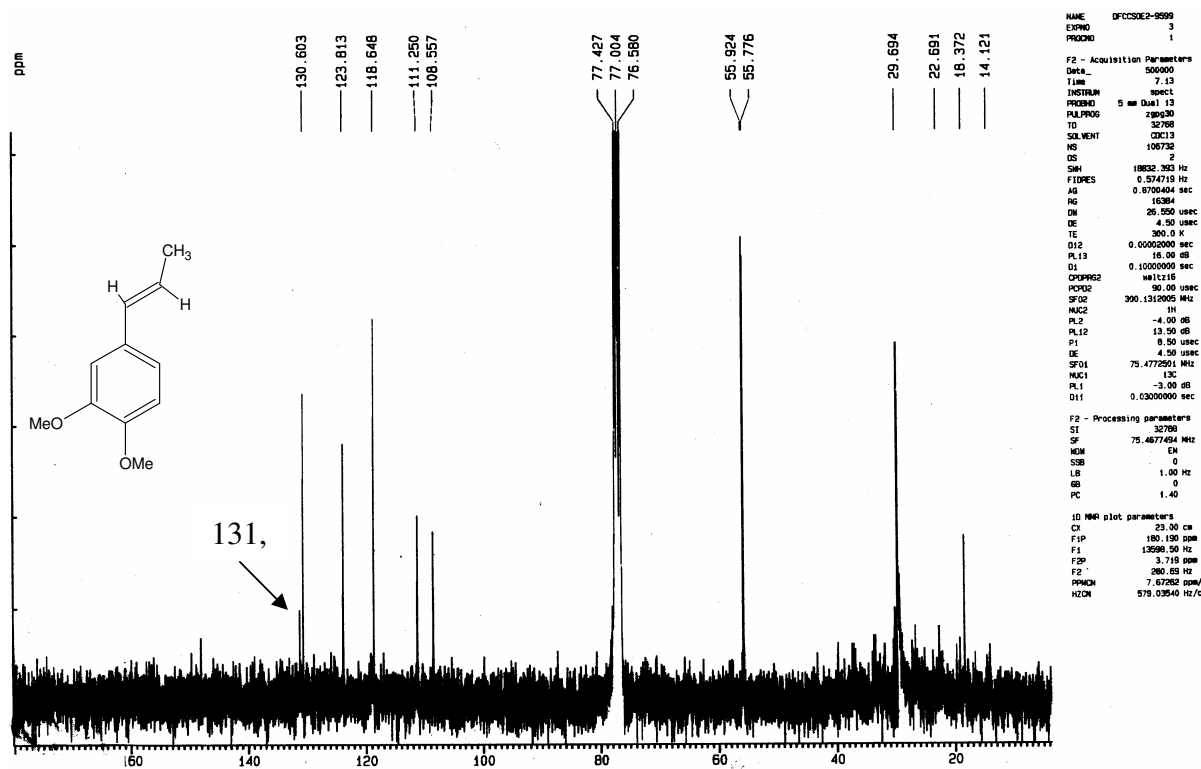
FIGURA 8 – Correlações observadas no mapa de contornos ^1H - ^1H COSY 90° de **5**



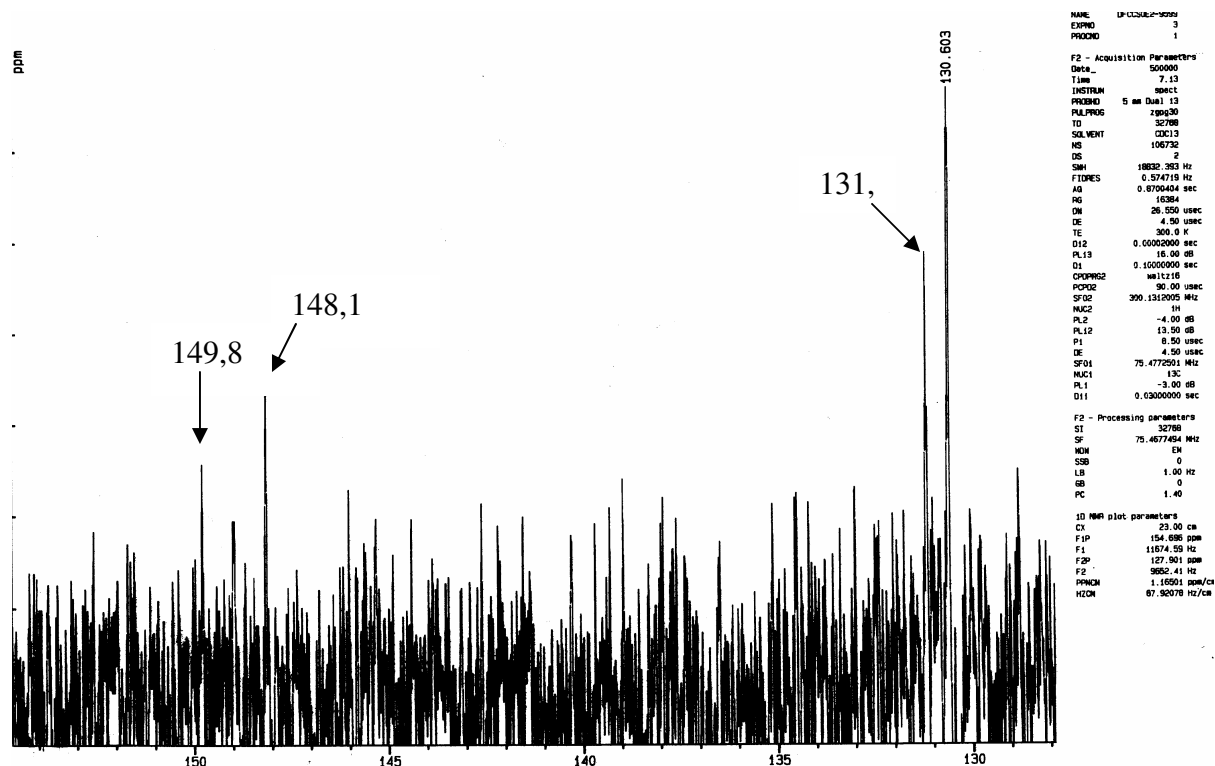
ESPECTRO 17 – Espectro de RMN ^1H de **5** entre 0-12 ppm (300 MHz, CDCl_3)



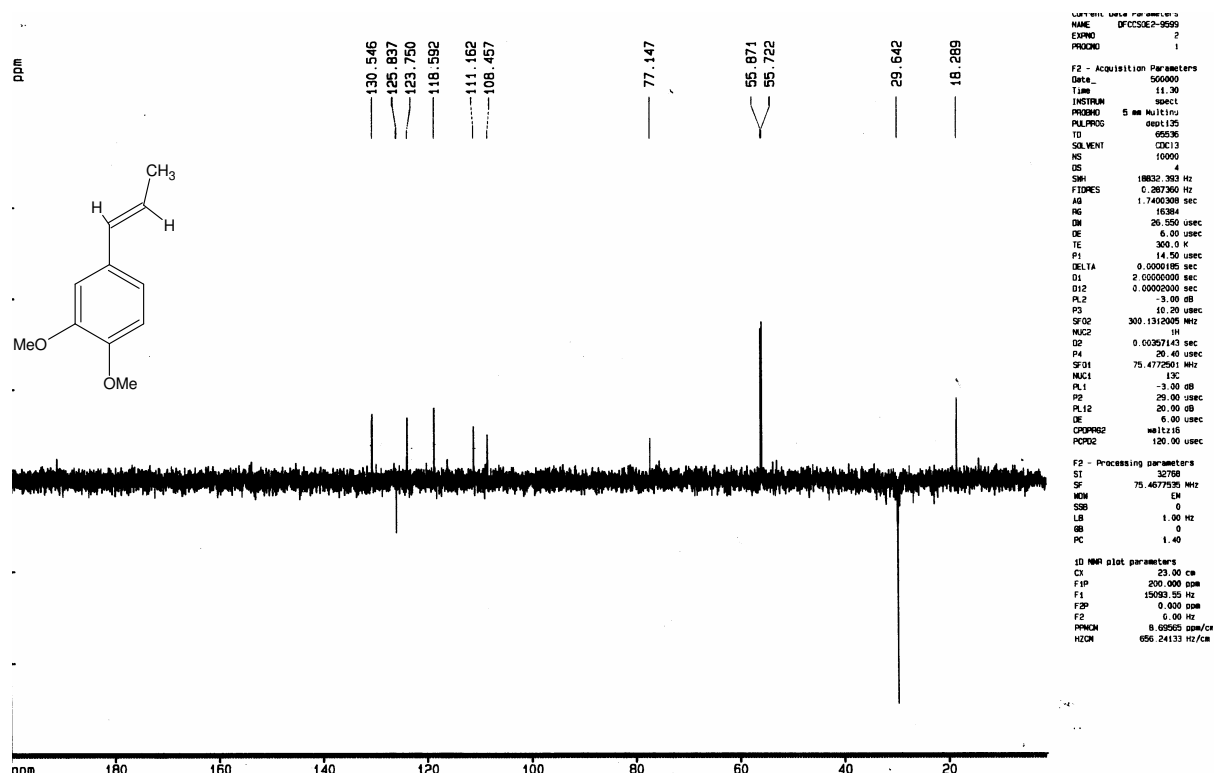
ESPECTRO 18 – Expansão do espectro de RMN ^1H de **5** entre 3-7 ppm



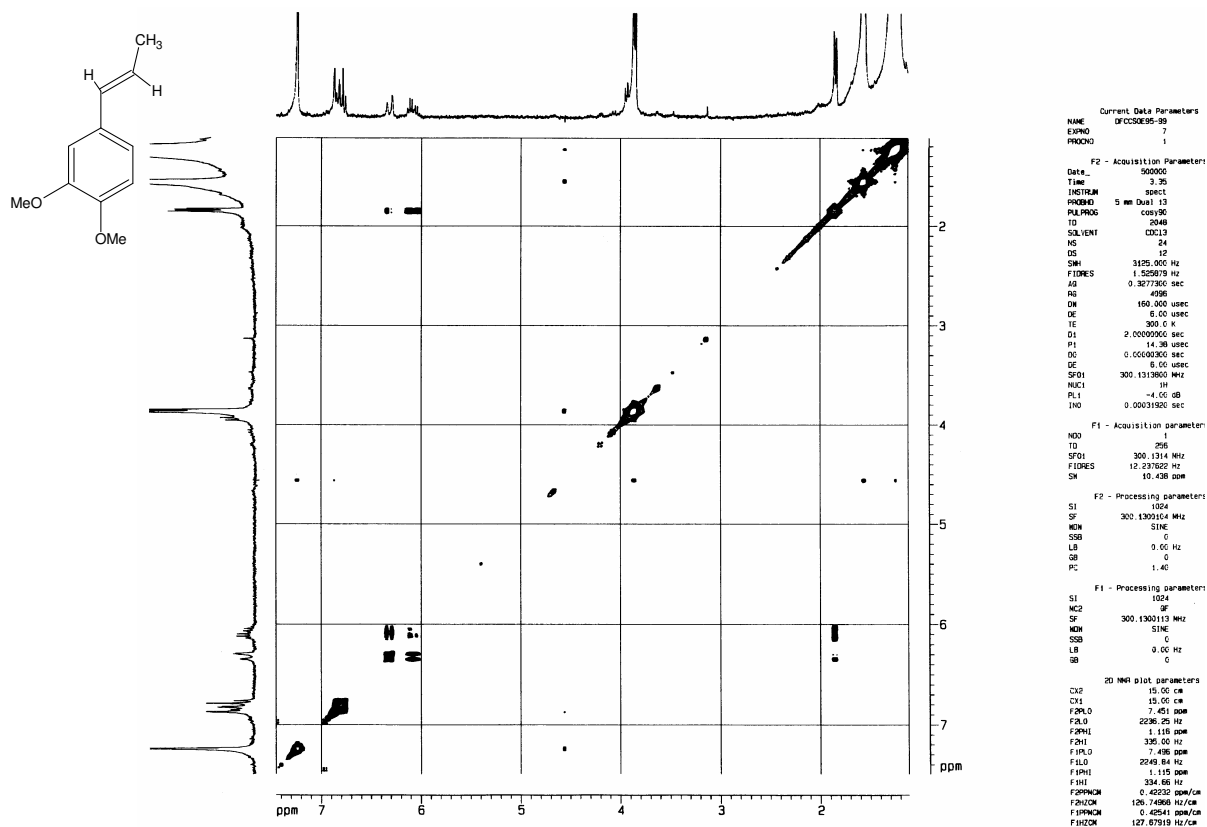
ESPECTRO 19 – Espectro de RMN ^{13}C de **5** entre 0-180 ppm (75 MHz, CDCl_3)



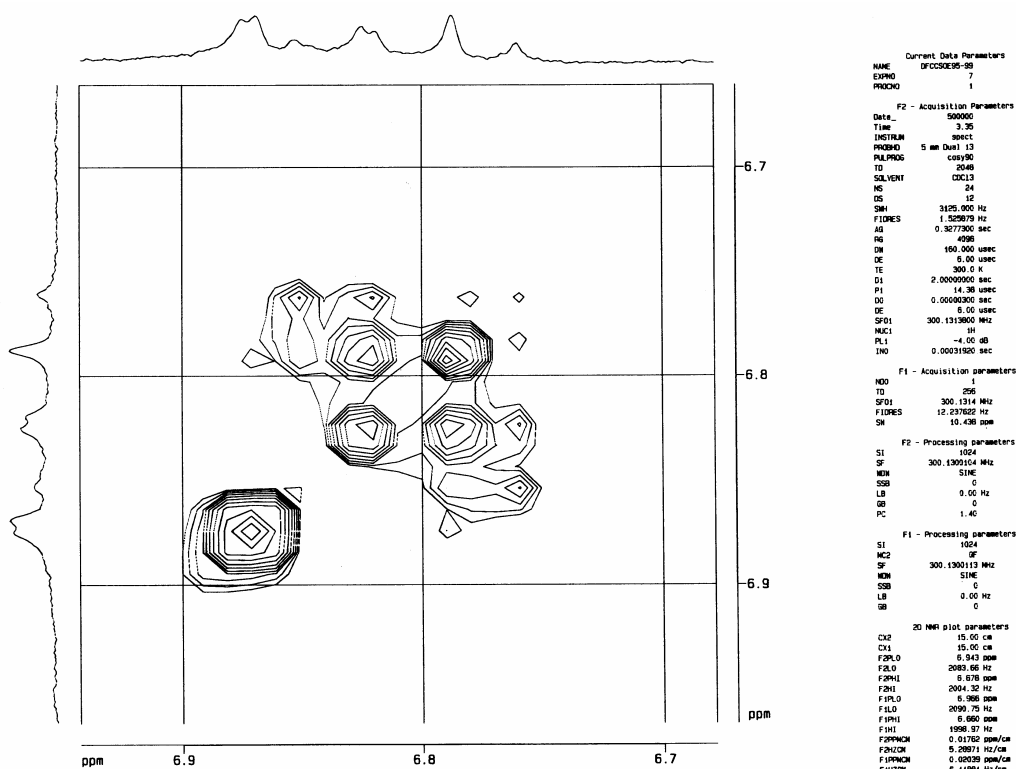
ESPECTRO 20 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **5** entre 128-155 ppm



ESPECTRO 21 – Espectro de DEPT 135° de **5** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)

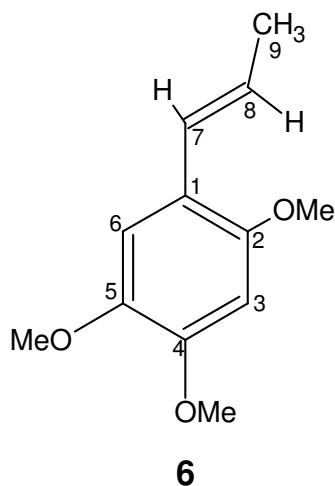


ESPECTRO 22 – Mapa de contorno ^1H - ^1H COSY 90° de **5** na região entre 1-7,5 ppm (300 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 23– Expansão do ^1H - ^1H COSY 90° de **5** na região entre 6,7-7 ppm

4.7 – α -asarona (**6**)



A substância **6** foi obtida em mistura com o 2,4,5-trimetoxi-estireno (**1**), tanto do fracionamento do óleo essencial quanto do extrato éter de petróleo, ambos provenientes das cascas do caule subterrâneo. As frações que continham a mistura entre esses compostos apresentaram-se com o aspecto de sólido amorfo branco e possuíam R_f diferentes em CCPS- AgNO_3 , porém não foi possível separação deles já que são muito instáveis em meio ácido, até mesmo em CHCl_3 e na presença de sílica [NAGASHIMA *et al.*, 1999]. Apesar de se encontrar em mistura, foi possível definir quais sinais pertenciam ao composto **6**, principalmente por dispor dos espectros do 2,4,5-trimetoxi-estireno (**1**).

No espectro de RMN ^1H (**Espectros 24 e 25**) observou-se, para o composto **6**, sinais em δ 6,63 e 6,07 relativos a H_7 e H_8 , exibindo constantes características de acoplamentos tipo *trans* (15,9 Hz), vicinal (6,6 Hz) e alílico (1,6 Hz). Além desses, também se visualizou singletos em δ 6,47 e 6,92 referentes a H_3 e H_6 , bem como três singletos em δ 3,79, 3,83 e 3,85 relativos às três metoxilas aromáticas [TABELA 33].

No espectro de RMN ^{13}C (**Espectros 26 e 27**) observou-se, para o metabólito **6**, sinais de metoxilas aromáticas em δ 55,9, 56,3 e 56,4 e sinais de seis carbonos aromáticos, como também sinais relativos aos carbonos da ligação dupla em δ 124,9 e 124,0, sendo estes confirmados no espectro de DEPT 135° como metínicos (**Espectro 28**) [TABELA 34].

A partir da comparação dos dados espectrais da mistura entre **6** e **1**, com dados do 2,4,5-trimetoxi-estireno e α -asarona (*trans*-asarona), verificou-se que a mistura obtida

consistia nesses metabólitos [NAGASHIMA *et al.*, 1999; GONZÁLEZ *et al.*, 1996]. A α -asarona ainda não havia sido relatada em *Duguetia furfuracea* e em nenhuma espécie do gênero *Duguetia*.

TABELA 33 - Dados de RMN ^1H (δ) de **6** e α -asarona

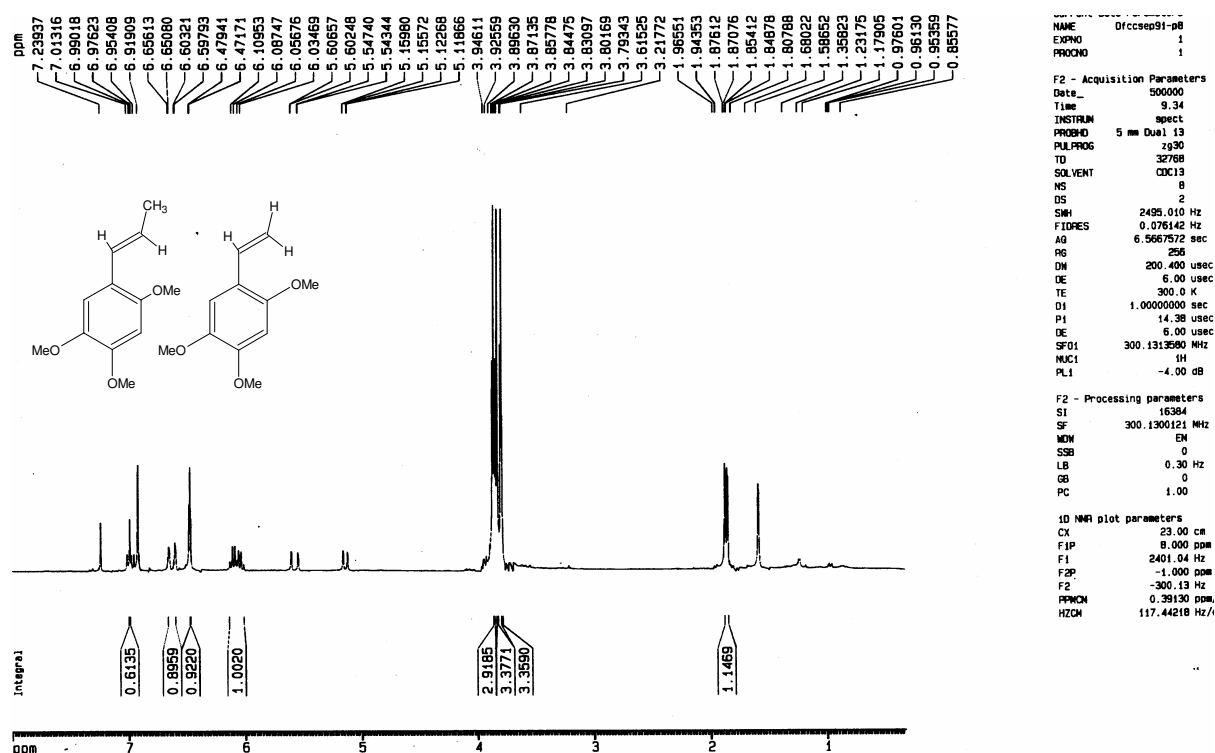
H	6 (δ)^a	α-asarona [GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1996] ^b
3	6,47 (s)	6,48 (s)
6	6,92 (s)	6,93 (s)
7	6,63 (dd, $J = 15,9$ e $1,6$ Hz)	6,64 (dd, $J = 15,8$ e $1,5$ Hz)
8	6,07 (dq, $J = 15,9$ e $6,6$ Hz)	6,10 (dq, $J = 15,8$ e $6,5$ Hz)
9	1,86 (dd, $J = 6,6$ e $1,6$ Hz)	1,87 (dd, $J = 6,5$ e $1,5$ Hz)
OCH ₃	3,79 (s)	3,80 (s)
OCH ₃	3,83 (s)	3,84 (s)
OCH ₃	3,85 (s)	3,86 (s)

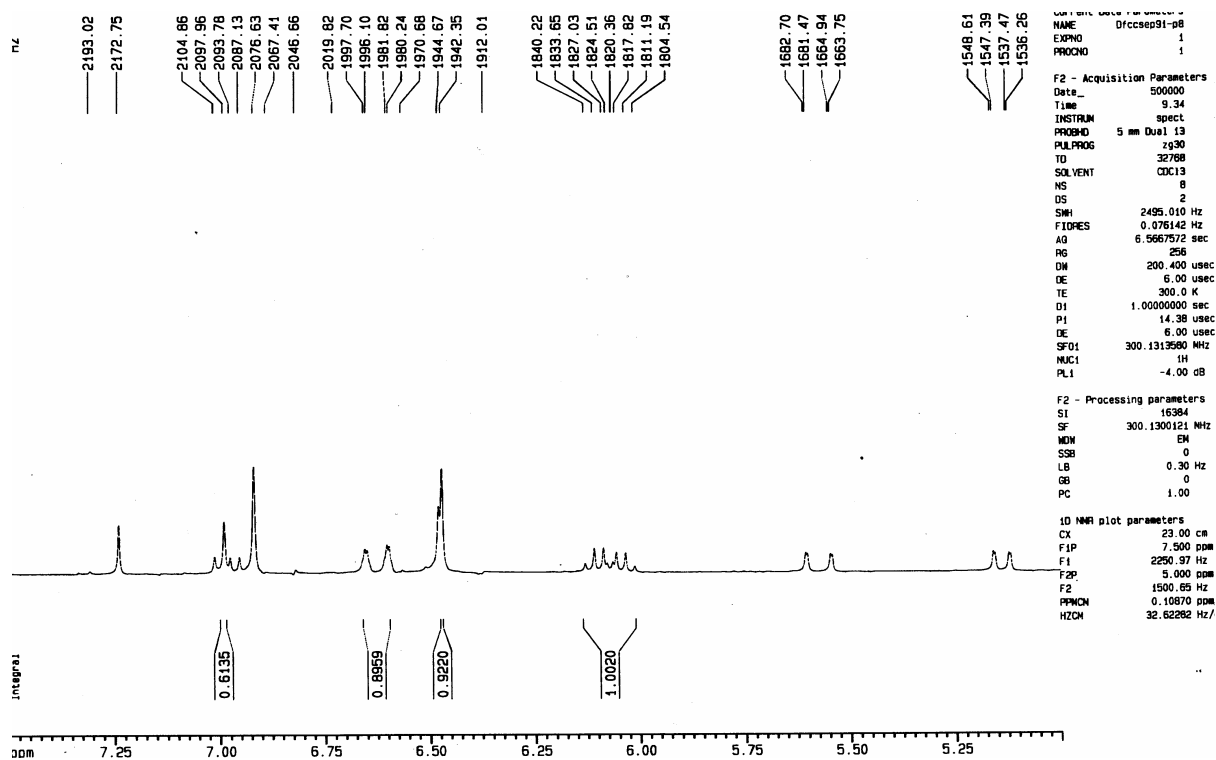
^a(300 MHz, CDCl₃), ^b(250 MHz, CDCl₃)

TABELA 34 - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **6**, α -asarona, **1** e 2,4,5-trimetoxi-estireno

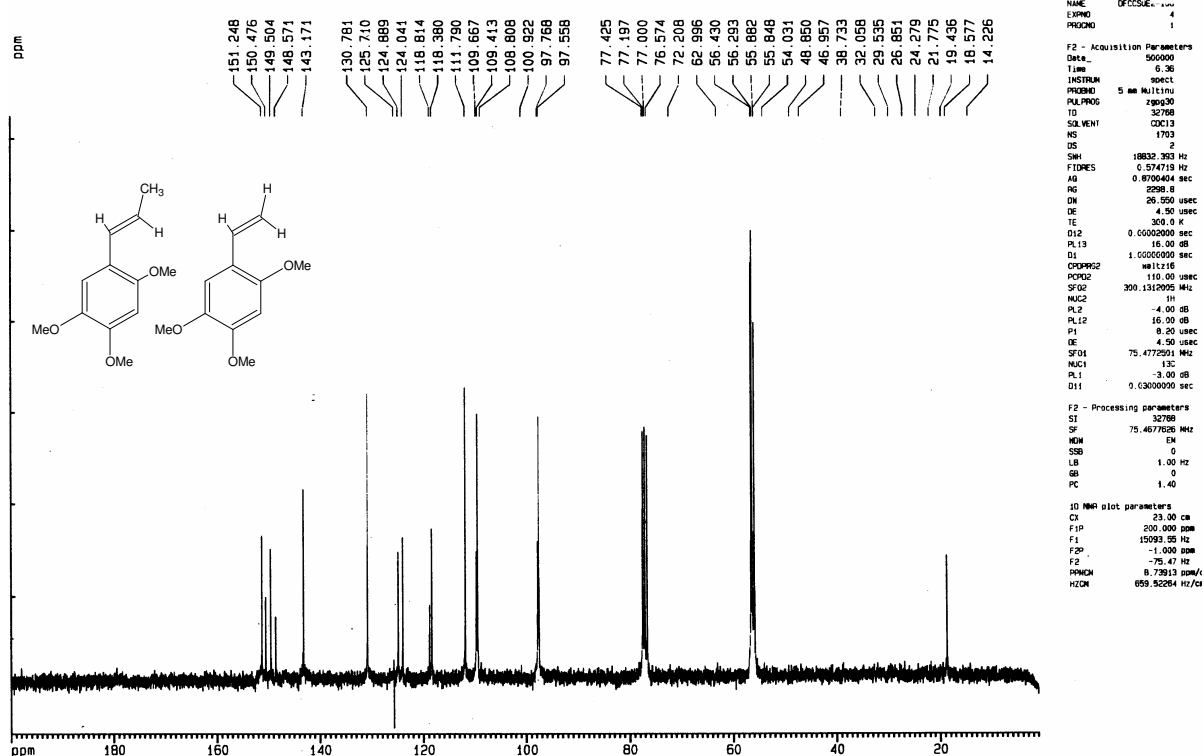
C	6 (δ) ^a	α -asarona	1 (δ) ^a	2,4,5-trimetoxi-estireno
		[GONZÁLEZ <i>et al.</i> , 1996] ^b		[NAGASHIMA <i>et al.</i> , 1999] ^c
1	118,8	118,9	118,4	119,3
2	150,5	150,5	151,2	152,1
3	97,8	97,4	97,6	98,9
4	148,6	148,6	149,5	151,0
5	143,2	143,2	143,2	144,7
6	109,7	109,7	109,4	111,4
7	124,9	124,9	130,8	131,8
8	124,0	124,2	111,8	111,8
9	18,6	18,7	-	-
OCH ₃	55,9	56,0	55,8	55,8
OCH ₃	56,3	56,4	56,3	56,0
OCH ₃	56,4	56,6	56,4	56,5

^a (75 MHz, CDCl₃), ^b (100 Mz, CDCl₃), ^c (125 Mz, C₆D₆)

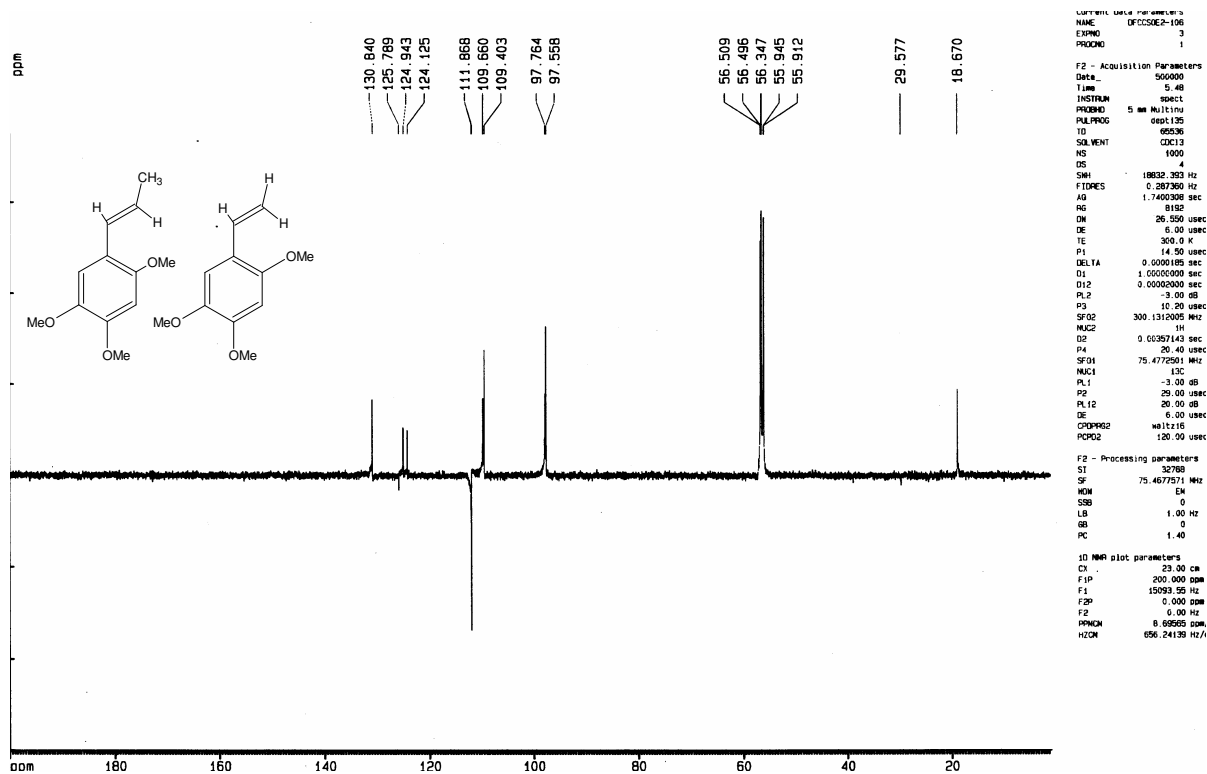
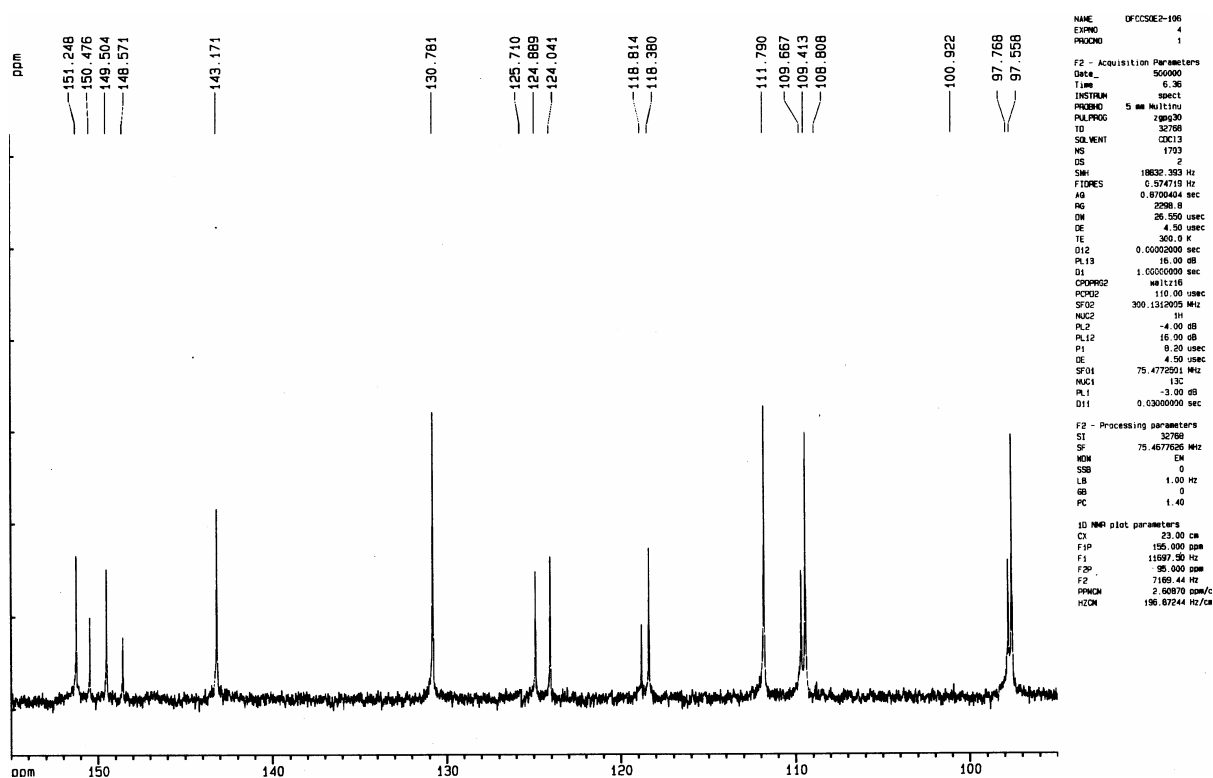




ESPECTRO 25 – Expansão do espectro de RMN ^1H de **6** e **1** entre 5-7,5 ppm



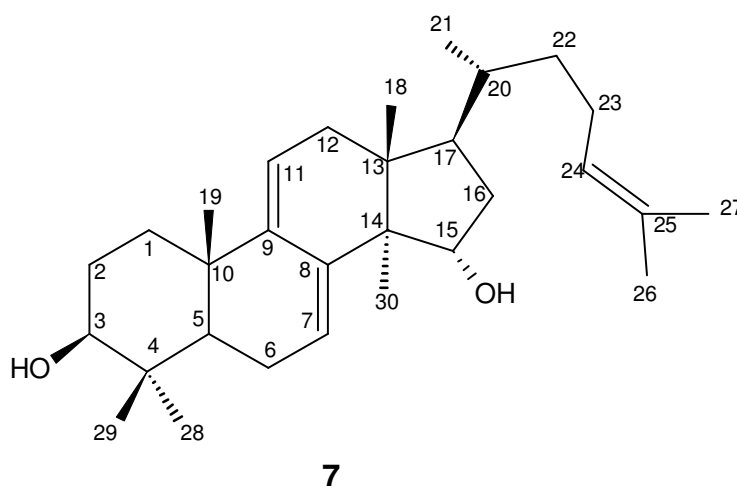
ESPECTRO 26 – Espectro de RMN ^{13}C de **6** e **1** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)



- Atividades biológicas de α -asarona (*trans*-asarona)

A α -asarona é um dos principais constituintes do caule de *Guatteria gaumeri* (Annonaceae) [ENRÍQUEZ *et al.*, 1980], tendo comprovada atividades carcinogênica [WISEMAN *et al.*, 1987], anti-microbiana [MOMIN *et al.*, 2002], espasmolítica [LIU *et al.*, 1983], inseticida, porém menor que da β -asarona [PARK *et al.*, 2003] e, recentemente, verificou ter potencial anti-trombótico [POPLAWSKI *et al.*, 2000]. Além dessas, também se constatou ser um potente agente hipolipidêmico [GARDUÑO *et al.*, 1997] atuando através da inibição da biossíntese do colesterol [ISTVAN *et al.*, 2001] e, com estudos teóricos, comprovou-se que seu mecanismo de ação é semelhante ao das estatinas (medicamentos comercializados), tendo grande importância os grupos metoxílicos para esta atividade [MEDINA-FRANCO *et al.*, 2005].

4.8 - Policarpol (7)



O composto **7**, obtido a partir do extrato éter de petróleo, apresentou-se como um sólido amorfo branco e, em CCDS (FM: CHCl₃: MeOH 1%, revelador: Ce(SO₄)₂) exibiu apenas uma única mancha de coloração amarela.

A análise do espectro no IV/FT de **7** (**Espectro 29**) contribuiu para identificação da substância isolada, pois se visualizou a presença de bandas referentes às deformações axiais das hidroxilas (3416 cm⁻¹), C-H alifático (2965-2886 cm⁻¹) e estiramento C=C (1652-1.557 cm⁻¹).

No espectro de RMN ¹H (**Espectros 31, 32 e 33**) pôde-se observar sinais de hidrogênios olefínicos em δ 5,06 (tm, $J = 7,1$ Hz), 5,28 (dl, $J = 5,6$ Hz) e 5,82 (dl, $J = 5,8$ Hz), sendo estes relativos a H₂₄, H₁₁ e H₇. Também foram observados oito sinais de grupos metila com os seguintes deslocamentos químicos: δ 0,58 (s), 0,85 (s), 0,86 (d), 0,91 (s), 0,95 (s), 0,97 (s), 1,57 (s) e 1,66 (s). As metilas mais desprotegidas são vinílicas, e por esta razão possuem valores de deslocamentos químicos maiores (δ 1,57 e 1,66) [TABELA 35].

Os sinais em δ 3,22 e 4,25, de H_{3 α} e H_{15 β} , são mais desprotegidos do que os hidrogênios alifáticos devido ao efeito indutivo dos grupos hidroxilas, e ambos mostram-se como duplo dubletos (dd) por apresentarem acoplamentos com os hidrogênios H₂ e H₁₆, respectivamente. O sinal em δ 3,22 é compatível com triterpenos que possuem um grupo hidroxila em C₃ [VENKATRAMAN *et al.*, 1994].

O espectro de RMN de ¹³C (**Espectros 34 e 35**) exibiu sinais referentes a trinta carbonos, tendo destaque na identificação desse triterpeno os sinais dos carbonos carbinólicos em δ 74,4 e 78,9, relativos a C₁₅ e C₃. O deslocamento químico de C₃ encontra-se mais desprotegido porque sofre efeitos β de desproteção conferidos pelas metilas C₂₈ e C₂₉. Além desses, também foram visualizados seis sinais relativos aos carbonos olefínicos em δ 116,0, 121,3, 124,9, 131,1, 140,8 e 146,1. A análise do espectro de DEPT 135° (**Espectros 36 e 37**) permitiu-nos constatar que, dentre os trinta carbonos, há sete carbonos metilênicos, oito metílicos, oito metínicos e sete carbonos quaternários [TABELA 36].

No espectro de UV de **7** (**Espectro 30**) observou-se o $\lambda_{\max}$ em 244 nm, que é compatível com ligações duplas conjugadas e heteroanular, pois em homoanular o $\lambda_{\max}$ é em torno de 275 nm [PAVIA *et al.*, 2001]. Portanto, a análise dos dados de UV, RMN ¹H e ¹³C do composto **7** é compatível com um triterpeno de esqueleto lanostano [ROSECKE & KONIG, 1999], com duplas ligações entre C₇ e C₁₁.

Os dados espectrais obtidos foram comparados com os dados encontrados na literatura para o policarpol [JUNG *et al.*, 1990] e, desta maneira, concluiu-se tratarem da mesma

substância. Este metabólito está sendo descrito pela primeira vez na espécie *Duguetia furfuracea*.

TABELA 35 - Dados de RMN ^1H (δ) de **7** e policarpol

H	7 (δ)^a	Policarpol [JUNG <i>et al.</i>, 1990]^b
3 α	3,22 (dd, $J = 10,9$ e $4,6$ Hz)	3,21 (dd)
7	5,82 (dl, $J = 5,8$ Hz)	5,81 (d)
11	5,28 (dl, $J = 5,6$ Hz)	5,27 (d)
15 β	4,25 (dd, $J = 9,5$ e $5,0$ Hz)	4,24 (dd)
18	0,58 (s)	0,58(s)
19	0,91 (s)	0,91 (s)
21	0,86 (d, $J = 4,2$ Hz)	0,86 (d)
24	5,06 (tm, $J = 7,1$ Hz)	5,06 (t)
26	1,66 (s)	1,65 (s)
27	1,57 (s)	1,57 (s)
28	0,95 (s)	0,95 (s)
29	0,97 (s)	0,97 (s)
30	0,85 (s)	0,85 (s)

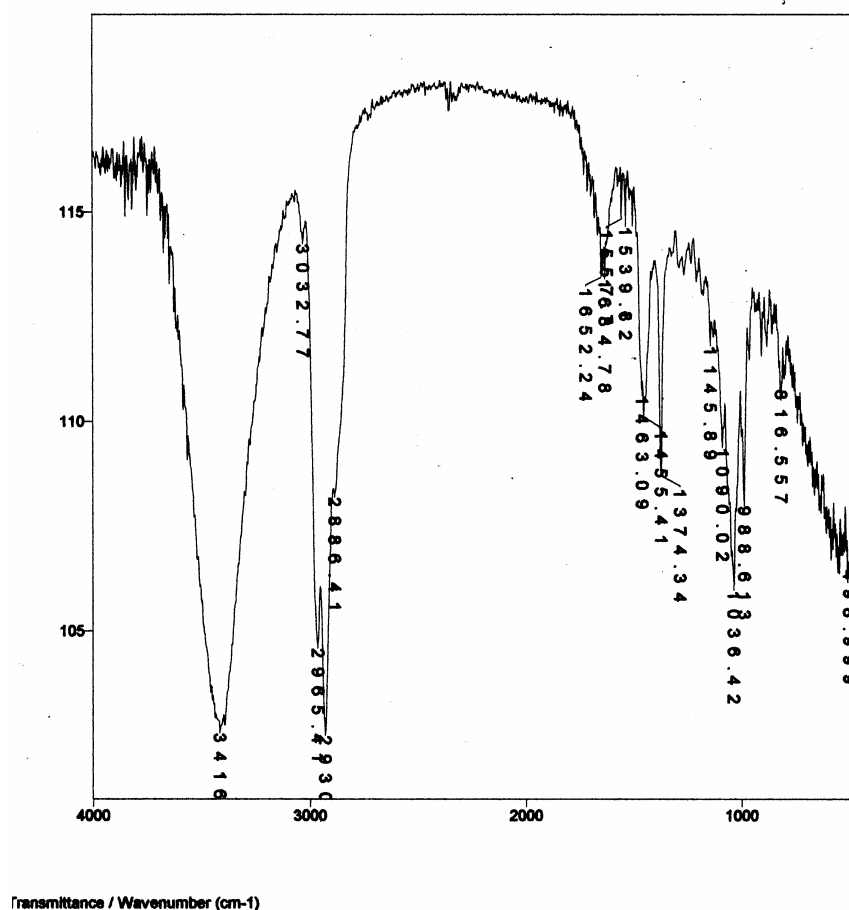
^a (300 MHz, CDCl_3), ^b (200 MHz, CDCl_3)

TABELA 36- Dados de RMN ^{13}C (δ) de **7** e policarpol

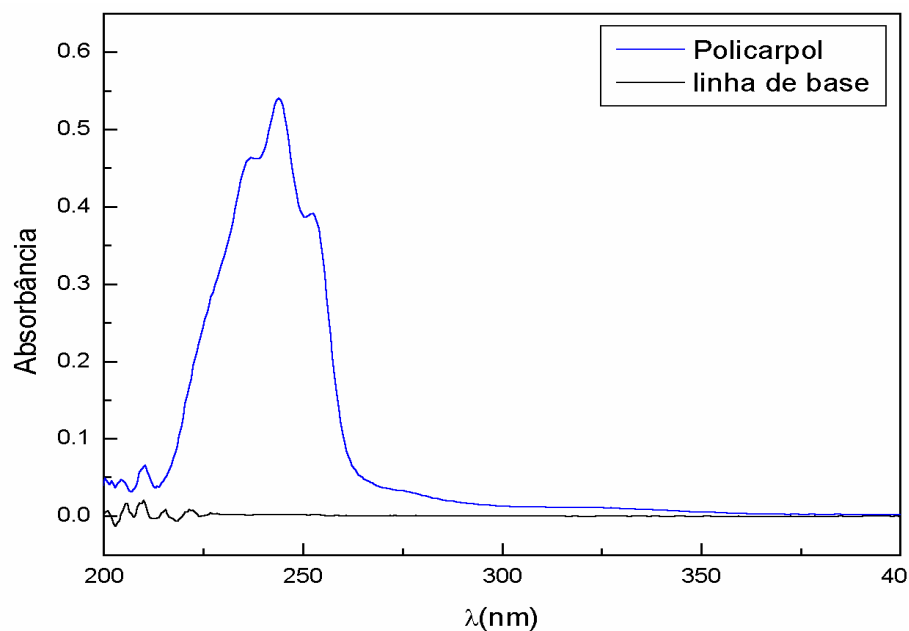
C	Grupo	7 (δ)^a	Policarpol [JUNG <i>et al.</i>, 1990]^b
1	CH ₂	36,2	36,2
2	CH ₂	27,7	27,7
3	CH	78,9	78,9
4	C	38,6	38,6
5	CH	48,8	48,9
6	CH ₂	22,9	22,9
7	CH	121,3	121,3
8	C	140,8	140,8
9	C	146,1	146,1
10	C	37,4	37,4
11	CH	116,0	116,0
12	CH ₂	38,4	38,5
13	C	44,3	44,3
14	C	51,9	51,9
15	CH	74,7	74,7
16	CH ₂	40,1	40,1
17	CH	48,9	48,9
18	CH ₃	15,8	15,8
19	CH ₃	22,8	22,8
20	CH	35,7	35,7
21	CH ₃	18,4	18,4
22	CH ₂	35,6	36,2
23	CH ₂	24,8	24,8
24	CH	124,9	124,9
25	C	131,1	131,1
26	CH ₃	17,6	17,6
27	CH ₃	25,7	25,7
28	CH ₃	28,1	28,1
29	CH ₃	15,9	15,9
30	CH ₃	17,1	17,1

^a (75 MHz, CDCl₃), ^b(50,2 MHz, CDCl₃)

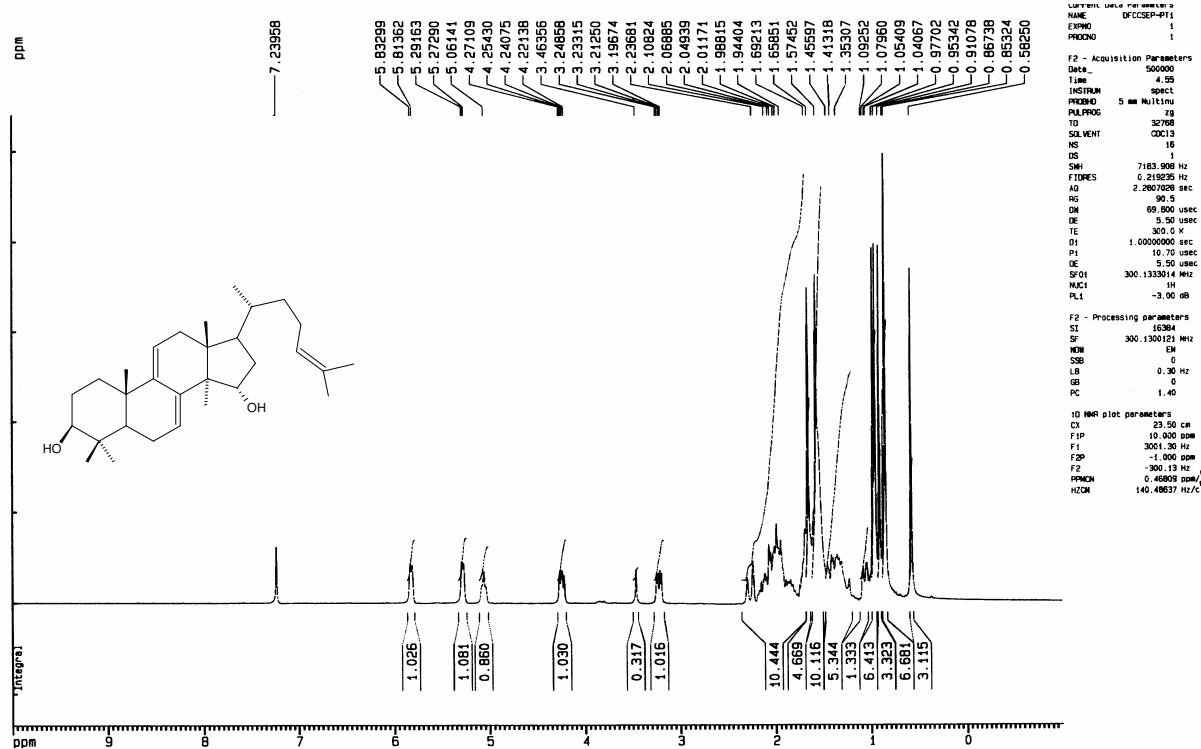
O policarpol foi isolado pela primeira vez em *Polyalthia oliveri* e *Meiocarpidium lepidotum* [HAMONNIÉRE *et al.*, 1976]. É sugerido ser o marcador químico de Annonaceae, por ser um triterpeno raro e encontrado na maioria das plantas desta família. Este triterpeno, de esqueleto lanostano, possui atividade sobre a *Artemia salina*, células tumorais e um pequeno efeito estimulante no crescimento de plantas [JUNG *et al.*, 1990].



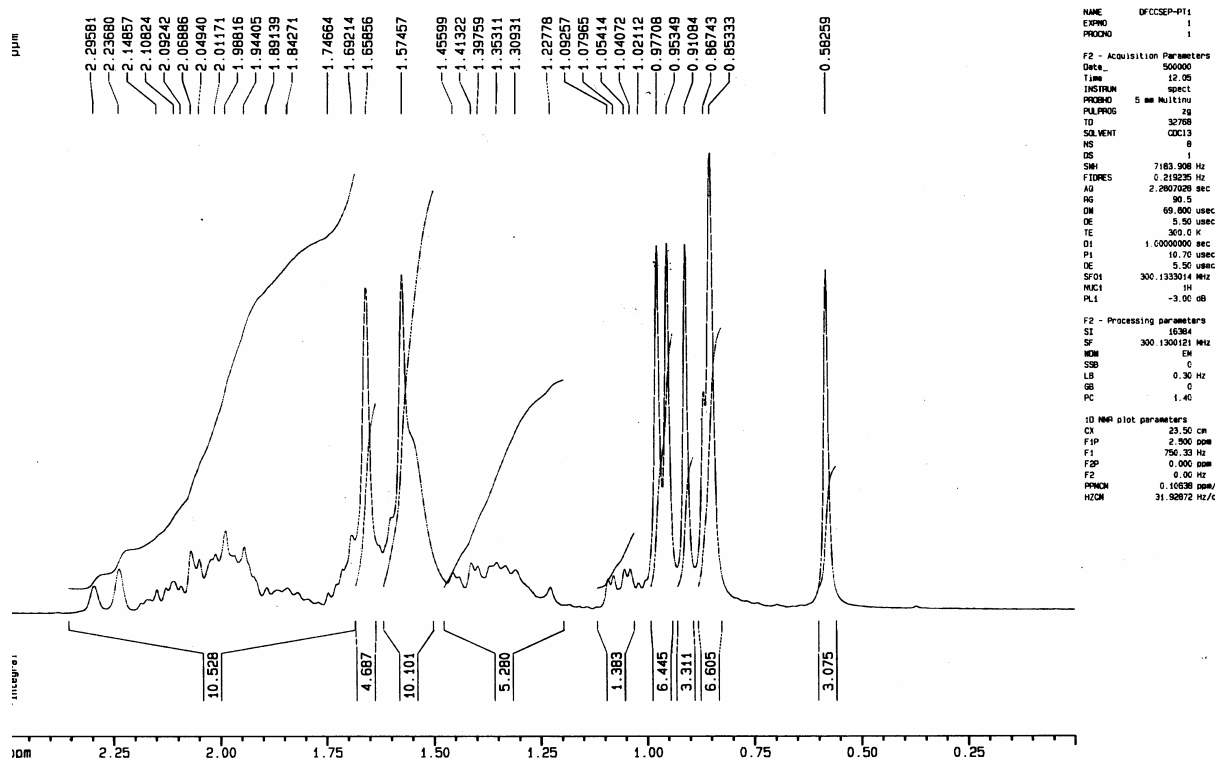
ESPECTRO 29 - Espectro de IV/FT de 7



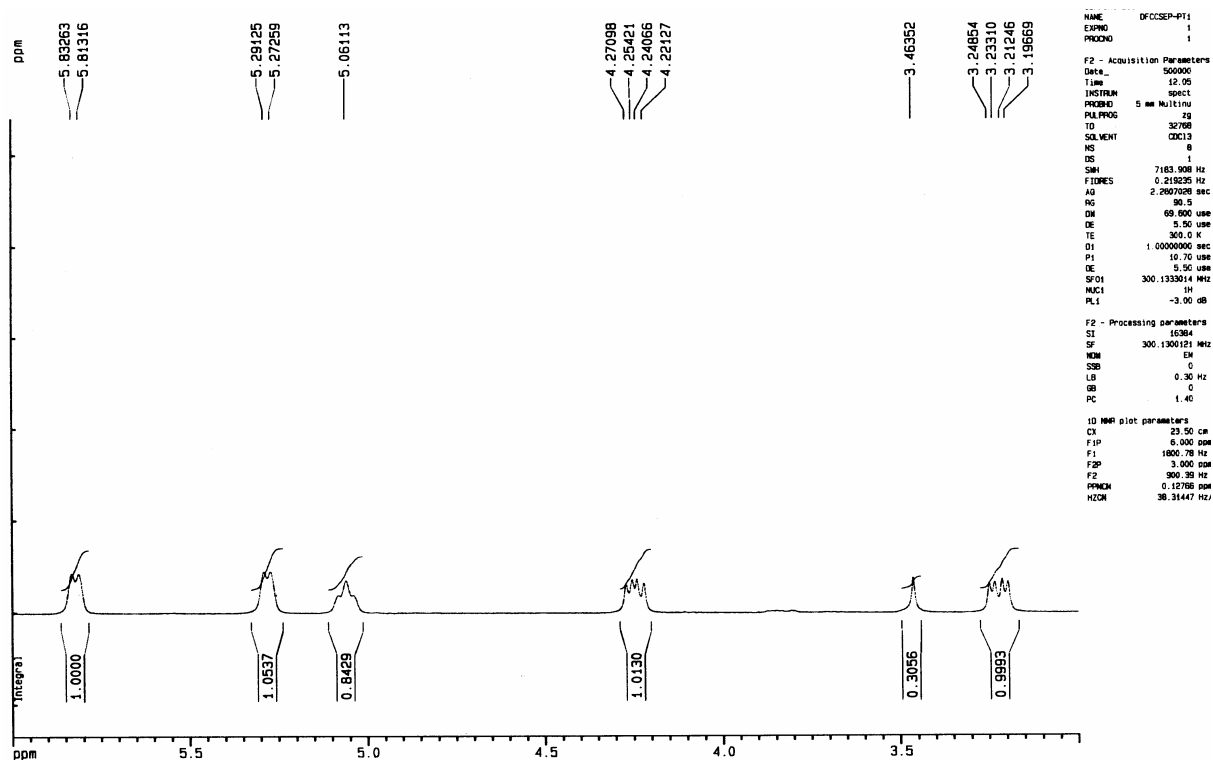
ESPECTRO 30 – Espectro de UV-Visível de **7** (Solvente: MeOH)



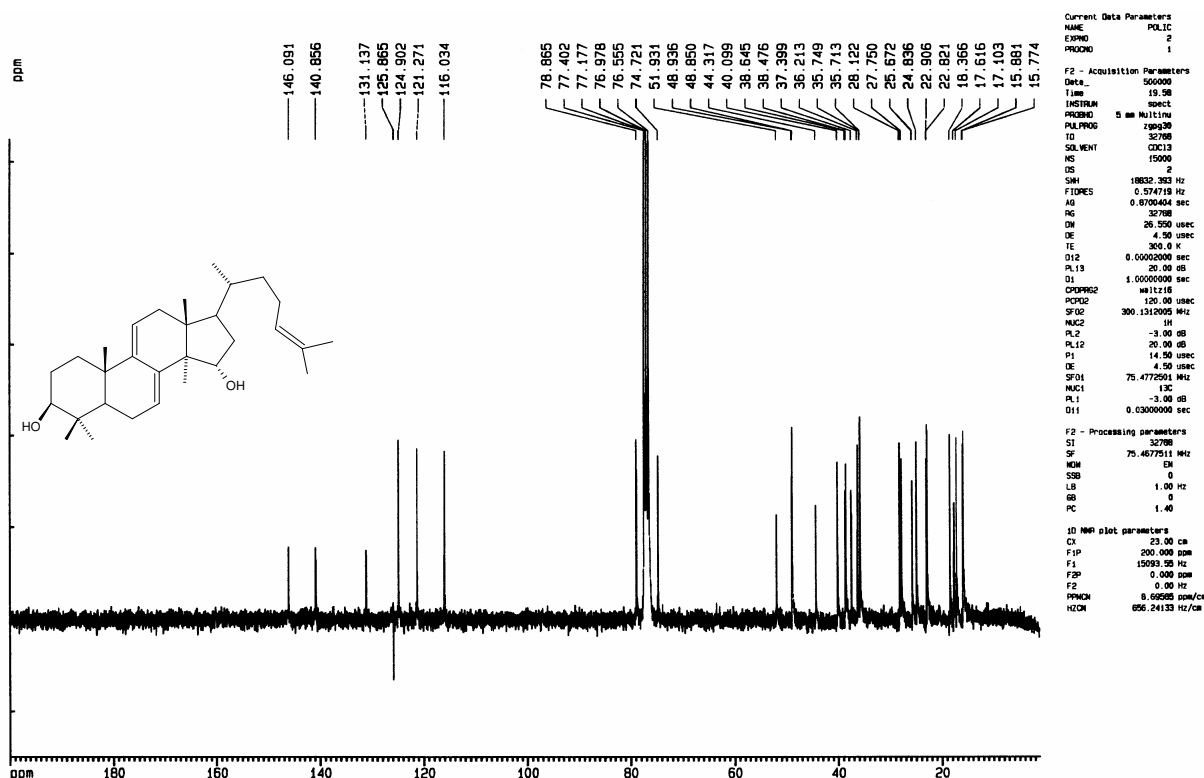
ESPECTRO 31 – Espectro de RMN ^1H de **7** entre 0-10 ppm (300 MHz, CDCl_3)



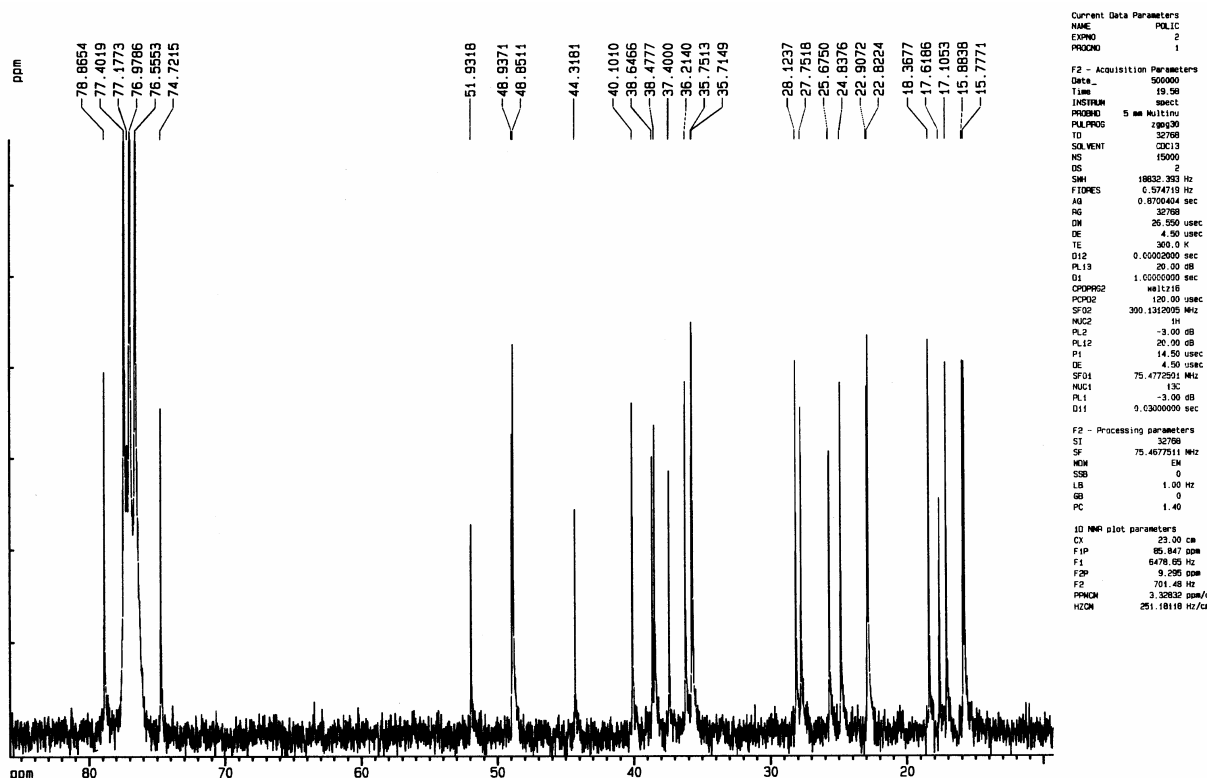
ESPECTRO 32 – Expansão do espectro de RMN ^1H de **7** entre 0-2,5 ppm



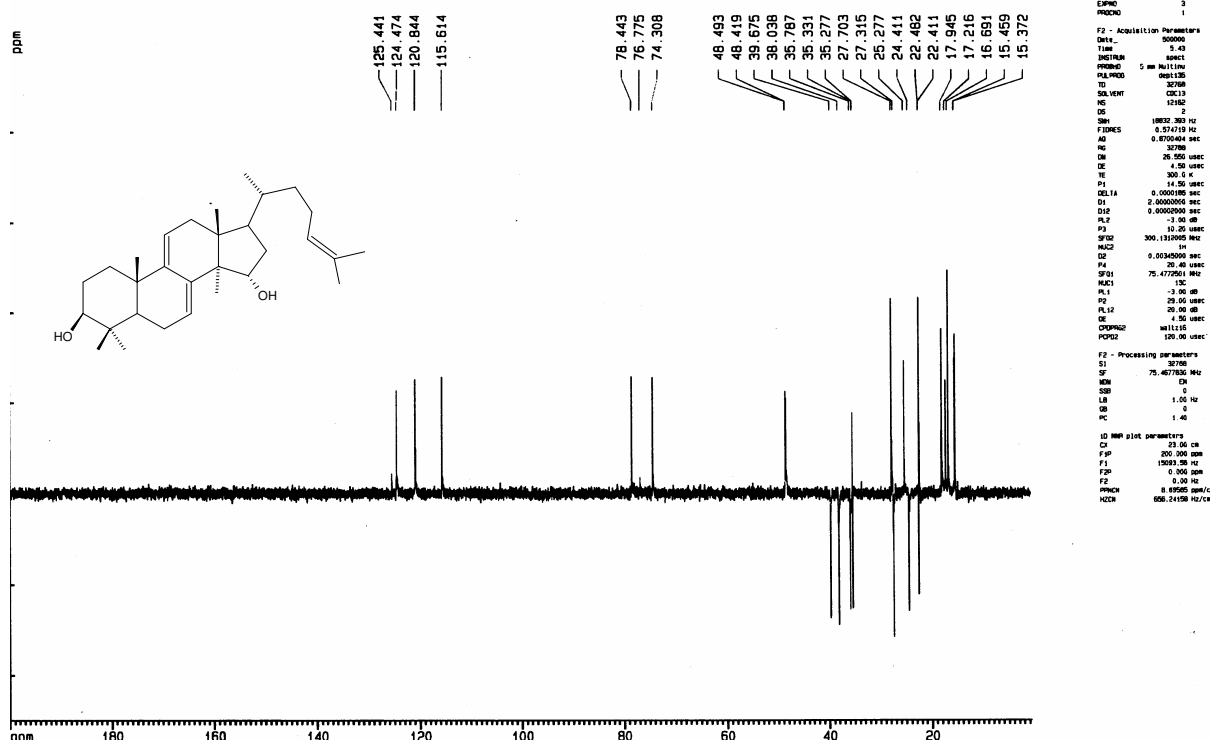
ESPECTRO 33 – Expansão do espectro de RMN ^1H de **7** entre 3-6 ppm



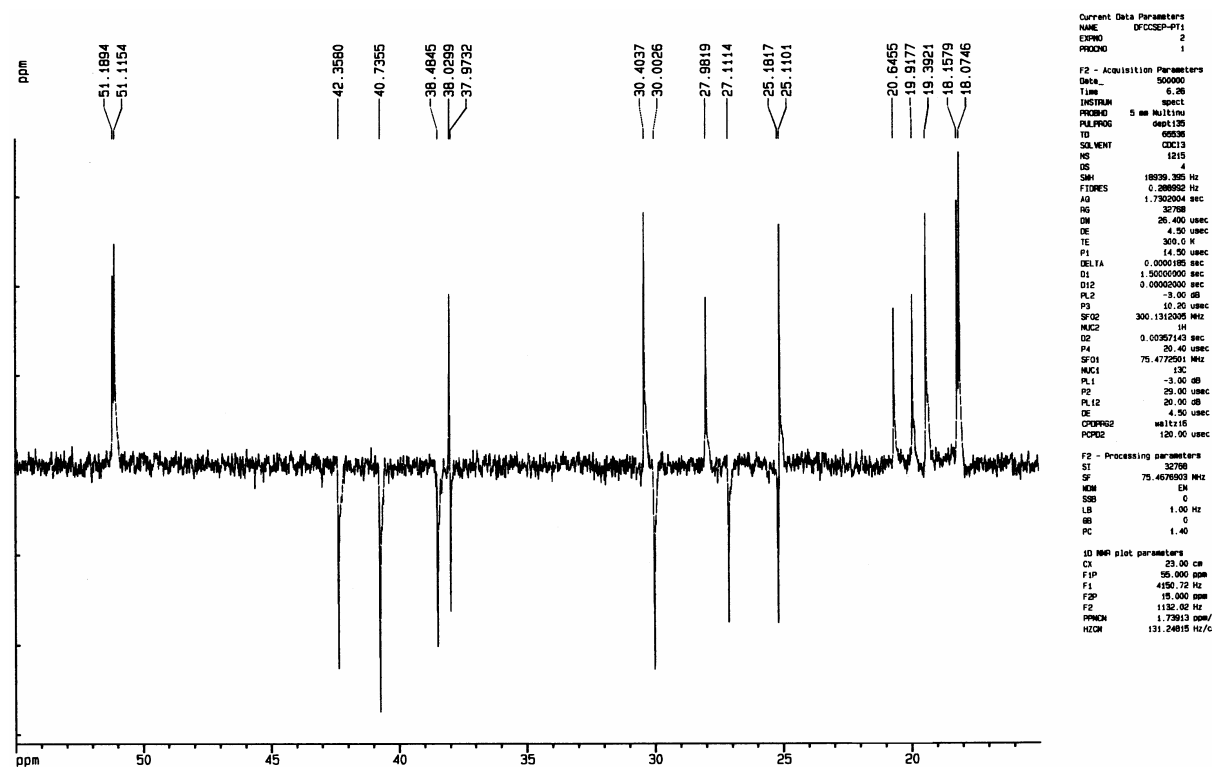
ESPECTRO 34 – Espectro de RMN ^{13}C de 7 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 35 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C de 7 entre 10-85 ppm

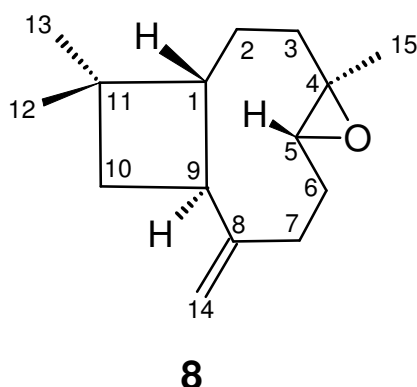


ESPECTRO 36 – Espectro de DEPT 135° de 7 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl₃)



ESPECTRO 37 – Expansão do espectro de DEPT 135° de 8 entre 15-55 ppm

4.9 - Óxido de β -Cariofileno (8)



A substância **8** foi isolada do grupo 1 do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo, apresentando-se com aspecto de sólido amorfo branco e solúvel em CHCl_3 .

O espectro de RMN ^1H de **8** (**Espectros 38 e 39**) exibiu um sinal característico do hidrogênio do anel epóxido em δ 2,86 (dd, $J = 10,5$ e $4,0$ Hz), mas outros sinais significantes para a definição de sua estrutura foram observados em δ 4,84 (sl) e 4,95 (sl) referentes aos hidrogênios olefínicos H_{14} . Também foram visualizados três singletos relativos a metilas em δ 0,96 (s), 0,98 (s) e 1,18 (s) [**TABELA 37**].

Com a análise dos espectros de RMN ^{13}C (**Espectro 40**) e DEPT 135° (**Espectro 41**) observou-se sinais correspondentes a quinze carbonos e, dentre esses estão três metílicos, seis metilênicos, três metínicos e três carbonos quaternários, o que são compatíveis com um sesquiterpeno tricíclico com uma ligação dupla. Os sinais correspondentes as três metilas foram observados em δ 16,9, 21,6 e 29,9, estes dois últimos atribuídos a C_{13} e C_{12} . Também se visualizou sinais característicos dos carbonos do anel epóxido em δ 59,8 e 63,7, sendo que a insaturação foi confirmada pelos sinais observados em δ 151,8 e 112,7, este último é referente a C_{14} e foi confirmado como metilênico no espectro de DEPT 135° [**TABELA 38**].

Através da comparação dos dados espectrais da substância isolada com os descritos na literatura para o óxido de β -cariofileno [SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000] pôde-se concluir serem ambas a mesma substância. O óxido de β -cariofileno já havia sido isolado do óleo essencial das folhas de *Duguetia furfuracea* em trabalhos anteriores [CAROLLO *et al.*, 2005].

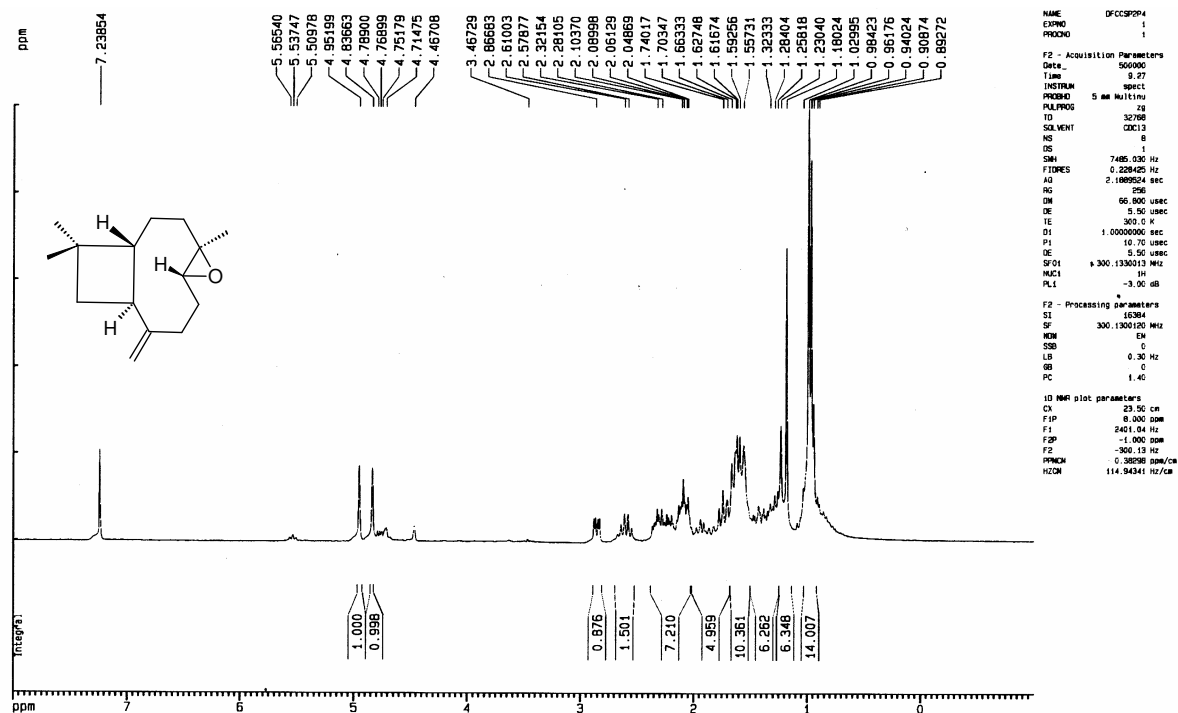
TABELA 37 - Dados de RMN ^1H (δ) de **8** e óxido de β -cariofileno

H	8 (δ)^a	Óxido de β-cariofileno
[SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000]		
5	2,86 (dd, $J = 4,0$ e $10,5$ Hz)	2,86 (dd)
9	2,59 (dd, $J = 9,4$ e $18,8$ Hz)	2,60 (dl)
12	0,96 (s)	0,98 (s)
13	0,98 (s)	1,01 (s)
14	4,84 (sl)	4,86 (sl)
	4,95 (sl)	4,97 (sl)
15	1,18 (s)	1,19 (s)

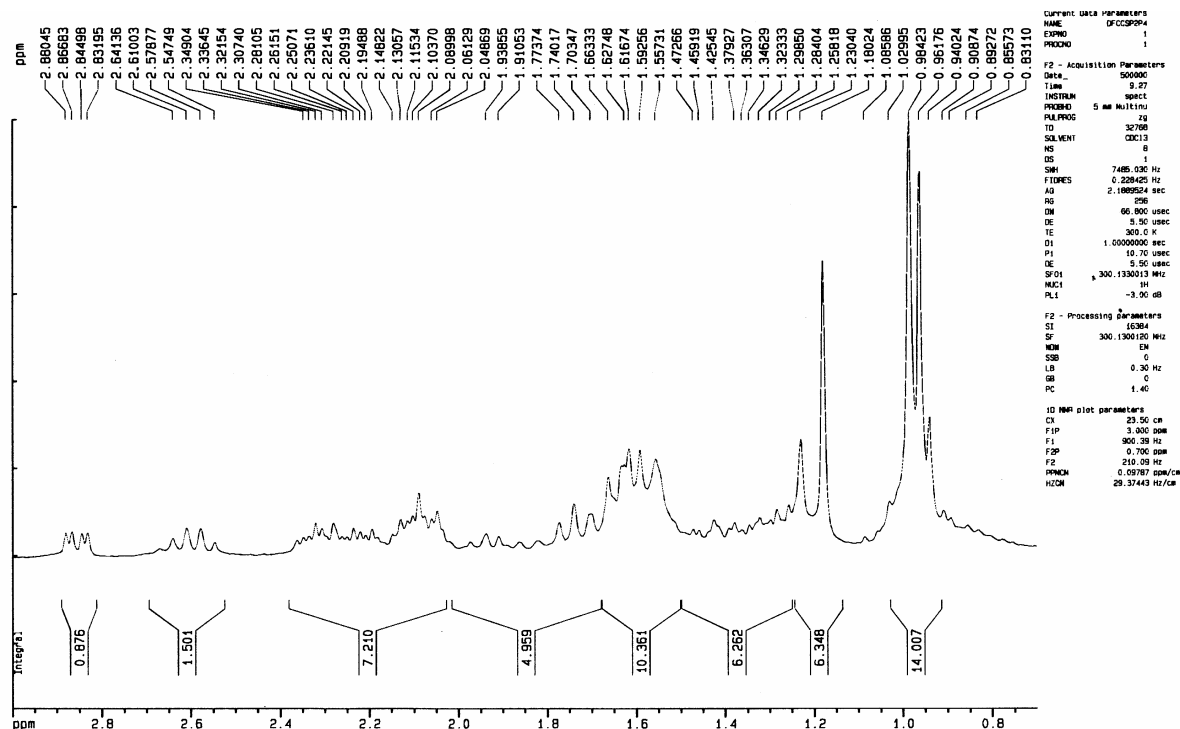
^a (300 MHz, CDCl_3)**TABELA 38** - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **8** e óxido de β -cariofileno

C	8 (δ)^a	Óxido de β-cariofileno
[SILVERSTEIN & WEBSTER, 2000]		
1	50,7	50,9
2	27,2	27,2
3	39,1	39,2
4	59,8	59,7
5	63,7	63,6
6	30,2	30,1
7	29,8	29,9
8	151,8	153,0
9	48,7	48,7
10	39,7	39,8
11	34,0	34,0
12	29,9	30,0
13	21,6	22,6
14	112,7	113,0
15	16,9	16,9

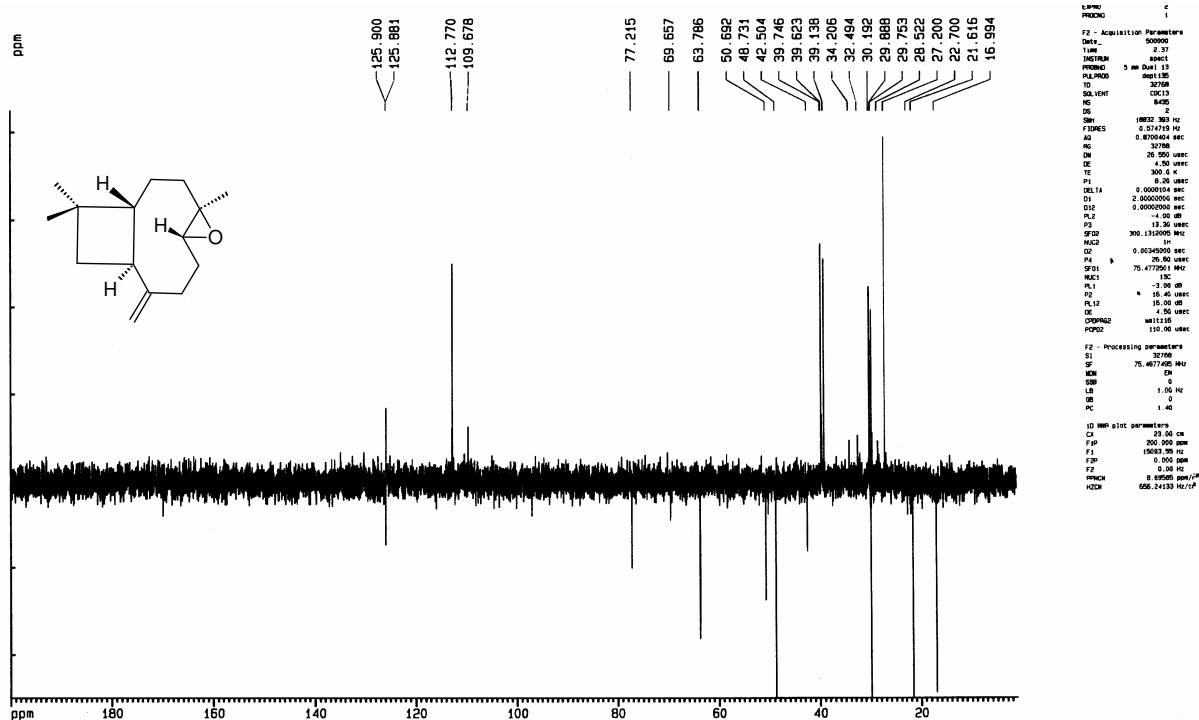
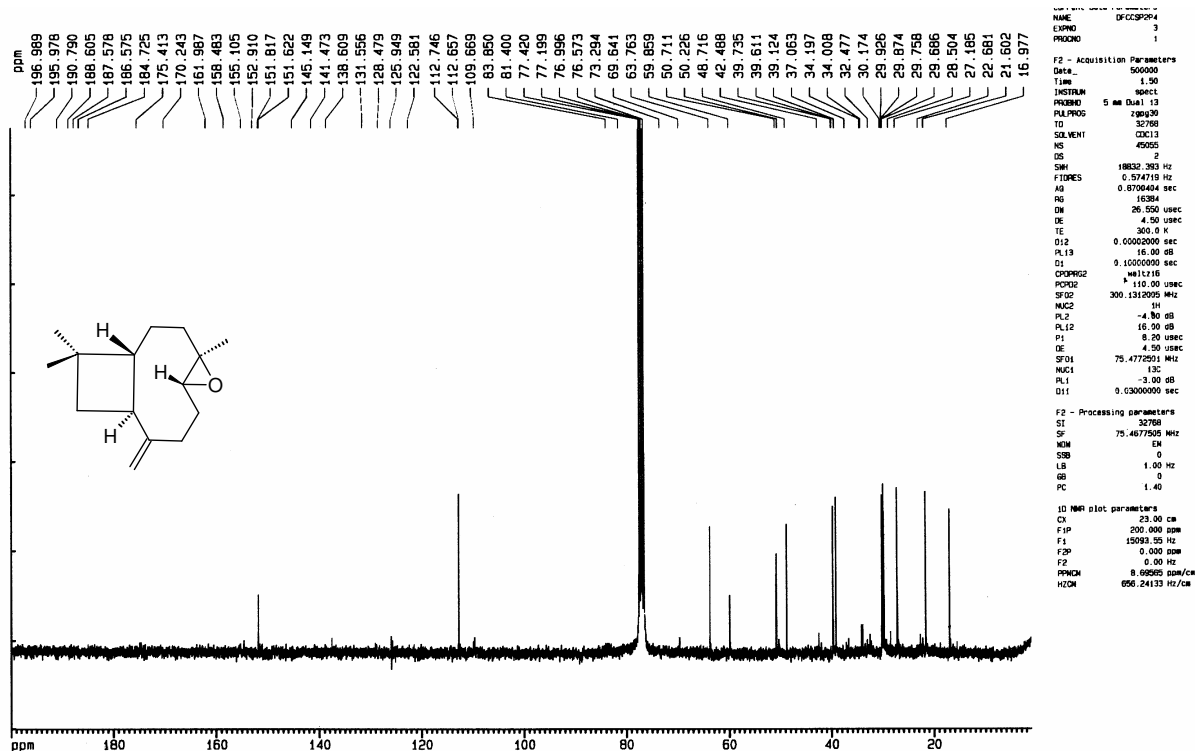
^a (75 MHz, CDCl_3)



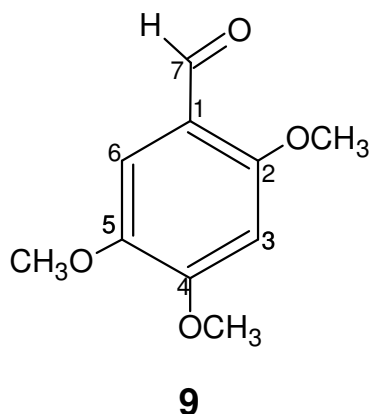
ESPECTRO 38 – Espectro de RMN ¹H de **8** entre 0-8 ppm (300 MHz, CDCl₃)



ESPECTRO 39 – Expansão do espectro de RMN ¹H de **8** entre 0,8-3 ppm



4.10 - Asaraldeído (9)



Esta substância, isolada do grupo 9 do extrato éter de petróleo, apresentou-se como um sólido amorfo branco e em CCDS (FM: CHCl_3 , revelador: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) exibiu apenas uma única mancha.

O espectro de RMN ^1H de **9** (**Espectro 42**) apresentou dois singletos relativos a hidrogênios aromáticos em δ 6,47 (s) e 7,31 (s), bem como sinais de três metoxilas aromáticas em δ 3,86, 3,90 e 3,95 e também um singlete em δ 10,3 relativo a hidrogênio aldeídico [**TABELA 39**].

A análise dos dados espectrais de RMN ^{13}C (**Espectro 43**) e DEPT 135° (**Espectro 44**) do composto **9** permitiu a confirmação da presença de uma carbonila de aldeído e de um anel aromático tetrassubstituído. A carbonila apresentou-se com deslocamento químico de δ 188,0 (CH), caracterizando uma carbonila conjugada com o anel aromático que sofre efeito de ressonância (proteção) que também recebe a contribuição das metoxilas em C_2 e C_4 [**TABELA 40**].

Os dados de RMN ^1H (dois singletos referentes a hidrogênios aromáticos) e os valores dos deslocamentos químicos dos carbonos aromáticos indica um padrão de substituição 1,2,4,5. Considerando os substituintes definidos, a única possibilidade estrutural é a do asaraldeído (2,4,5-trimetoxi-benzaldeído), confirmado através da comparação com os dados da literatura [SIQUEIRA *et al.*, 2001].

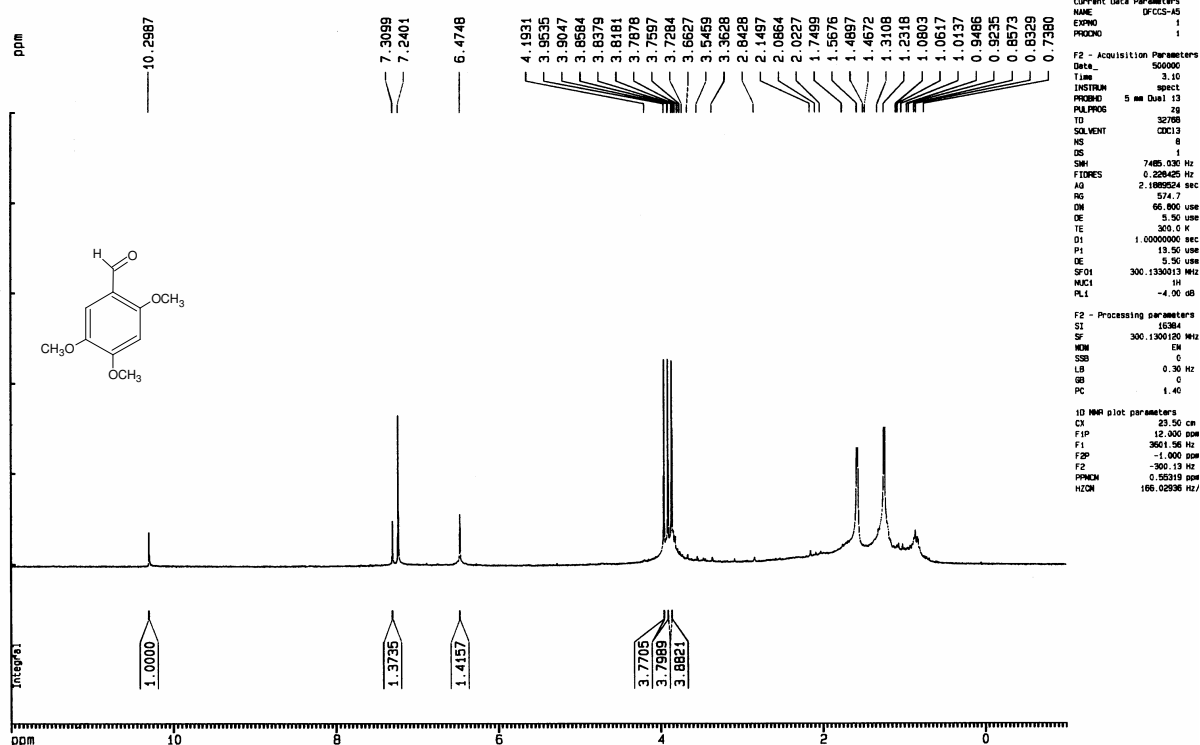
TABELA 39 - Dados de RMN ^1H (δ) de **9** e asaraldeído

H	9 (δ)^a	Asaraldeído [SIQUEIRA <i>et al.</i>, 2001]^a
3	6,47 (s)	6,48 (s)
6	7,31 (s)	7,31 (s)
7	10,3 (s)	10,3 (s)
OCH ₃	3,86 (s)	3,86 (s)
OCH ₃	3,90 (s)	3,91 (s)
OCH ₃	3,95 (s)	3,96 (s)

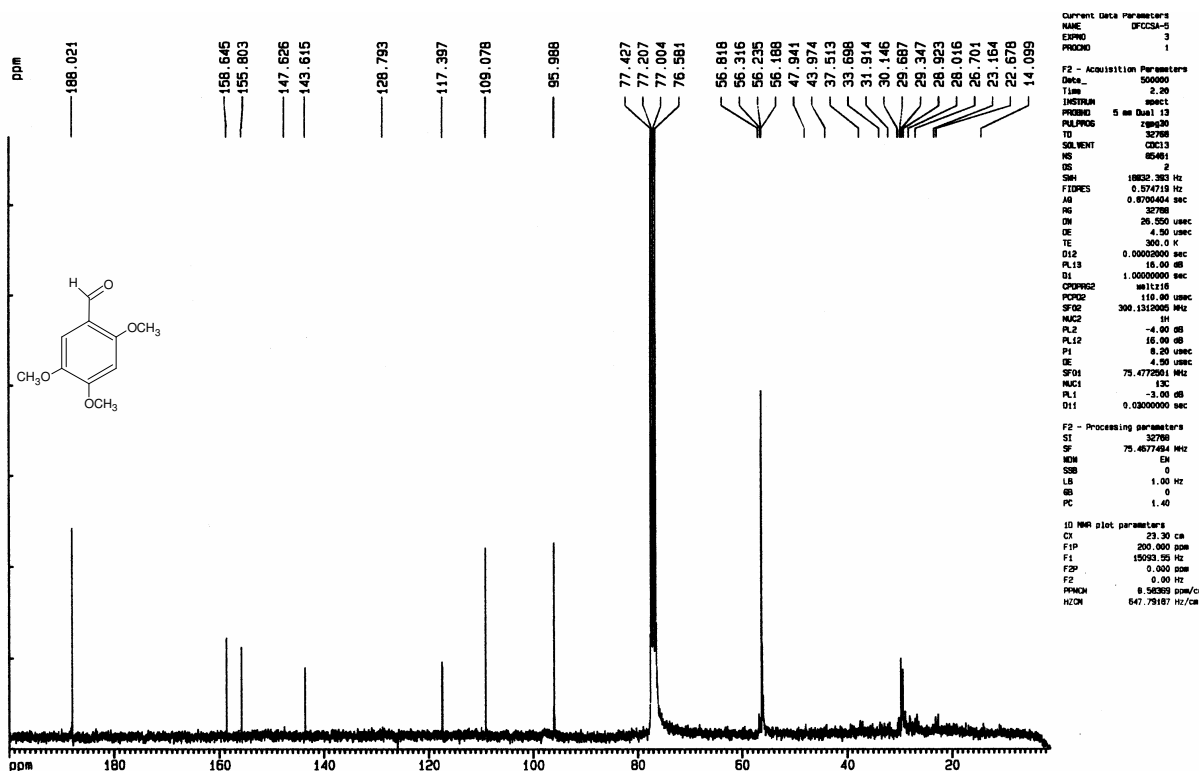
^a(300 MHz, CDCl₃)**TABELA 40** - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **9** e asaraldeído

C	9 (δ)^a	Asaraldeído [SIQUEIRA <i>et al.</i>, 2001]^a
1	117,4	117,3
2	158,6	158,6
3	96,0	95,9
4	155,8	155,6
5	143,6	143,6
6	109,1	109,0
7	188,0	188,1
OCH ₃	56,2	56,2
OCH ₃	56,2	56,2
OCH ₃	56,3	56,3

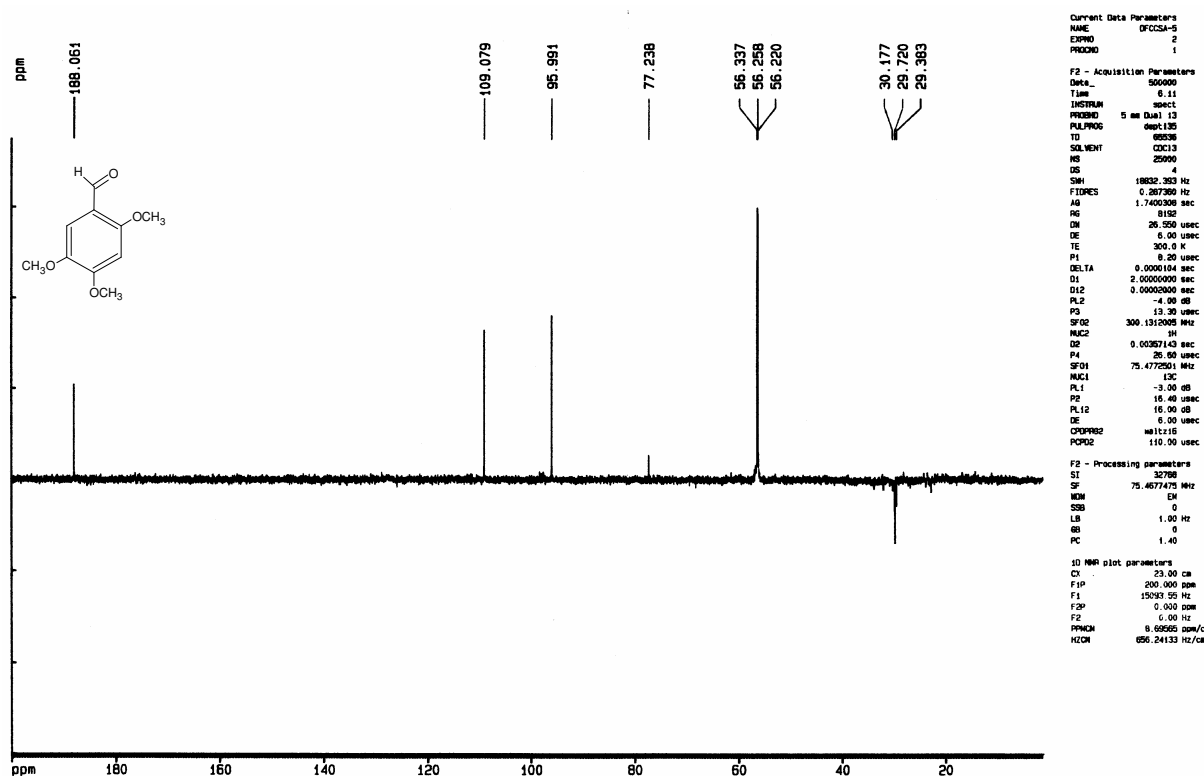
^a(75 MHz, CDCl₃)



ESPECTRO 42 – Espectro de RMN ^1H de 9 entre 0-12 ppm (300 MHz, CDCl_3)



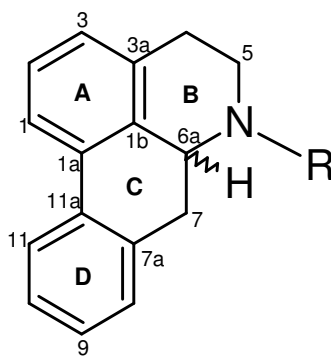
ESPECTRO 43 – Espectro de RMN ^{13}C de 9 entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 44 – Espectro de DEPT 135° de **9** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl₃)

4.11 – Alcalóides aporfínicos

No estudo fitoquímico de *Duguetia furfuracea* foram isolados três alcalóides com esqueleto aporfínico, sendo que dois deles são do tipo 7-hidróxi-aporfínico e um *N,N*-dimetil-aporfínico. Por estãõ razão, algumas características dessa classe serão discutidas com o intuito de esclarecer dados mais relevantes para a elucidação dos mesmos.



Esqueleto básico de alcalóides aporfínicos

Os alcalóides aporfínicos são invariavelmente substituídos em C₁ e C₂, podendo também serem substituídos em C₃. No anel D as substituições mais comuns ocorrem em C₉, C₁₀ e C₁₁, sendo que a substituição em C₈ é rara. Em geral, esses substituintes são oxigenados (hidroxilas ou metoxilas), pois estes são importantes na biossíntese desses compostos por permitirem a sua formação a partir de alcalóides benziltetraisoquinolínicos via acoplamentos oxidativos [CAVÉ et al., 1987].

Esta classe de alcalóides é subdivida, de acordo com as características do esqueleto básico, em: alcalóides aporfínicos *sensu stricto*, desidroaporfínicos, 7-alkil-aporfínicos e 7-hidróxi-aporfínicos [CAVÉ et al., 1987].

4.11.1 – Algumas características físicas e espectroscópicas dos alcalóides aporfínicos

- Dados de RMN ¹H [GUINADEAU, 1983, 1988, 1994; CAVÉ et al., 1987; MARSAIOLI et al., 1979]

A análise de espectros de RMN ¹H, principalmente nas regiões referentes a hidrogênios aromáticos e metoxilas, permite definir o padrão de substituição do alcalóide em estudo.

Em geral, o sinal de H₃ aparece entre δ 6,50-6,70 e de H₁₁ entre δ 7,5-8,20, sendo que este último é influenciado pela presença de substituinte em C₁₀ e C₁. Os hidrogênios alifáticos apresentam-se entre δ 2,00-4,00, sendo raramente distinguíveis. Enquanto que as metoxilas do

anel A e D absorvam entre δ 3,75-4,00, com exceção em C₁₁ (δ 3,60-3,80) e em C₁ (δ 3,40-3,70).

Os grupos metilenodioxílicos, quando posicionados no anel A (C₁/C₂ e C₂/C₃) ou no anel D (C₁₀/C₁₁) geralmente exibem dois dubletos com *J* de 1,5 Hz em δ 5,9 e 6,1, mas em C₉/C₁₀ (anel D) apresentam-se como um singlete ou dois dubletos com deslocamentos químicos muito próximos. A não equivalência dos hidrogênios metilenodioxílicos está relacionada com a torção do sistema bifenílico da molécula.

O grupo N-CH₃, quando presente, ocorre como um singlete em δ 2,40-2,50, mas em alcalóides N-óxidos o seu deslocamento é menor.

- Dados de RMN ¹³C [GUINADEAU, 1983, 1988, 1994; CAVÉ et al., 1987; MARSAIOLI et al., 1979]

Os carbonos *sp*³ dos anéis B e C são distinguíveis entre si, sendo que o C₄ ocorre em δ 28-30 ppm, C₅, C_{6a} e C₇ possuem deslocamentos químicos em torno de δ 43, 53 e 37, respectivamente. Porém quando há uma metila ligada ao nitrogênio os carbonos C₅ e C_{6a} sofrem desproteção (efeito β) passando a absorver em δ 53 e 62, enquanto que C₇ sofre efeito γ de proteção apresentando-se em δ 34. Em alcalóides 7-hidróxi-aporfínicos o carbono carbinólico C₇ aparece em torno de δ 70.

Os carbonos aromáticos (anéis A e D) que absorvem entre δ 105 a 115 são adjacentes aos carbonos com substituintes oxigenados. Os deslocamentos entre δ 155-130 são relativos aos carbonos com substituintes oxigenados.

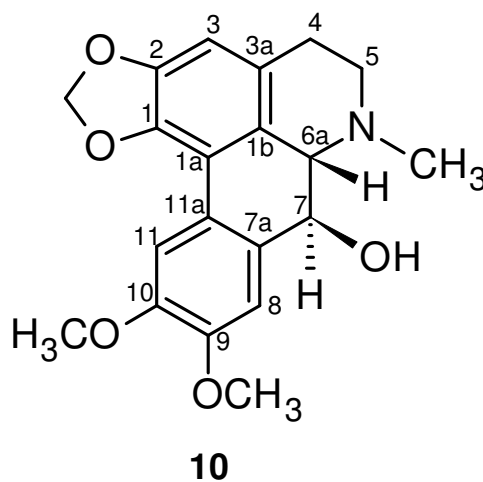
O grupo N-CH₃ aparece entre δ 43-44, mas em 7-hidróxi-aporfínicos apresenta-se em torno de δ 40. Os carbonos dos grupos metoxílicos podem ser observados entre δ 59-61 ou 55-56.

- Configuração absoluta [CAVÉ et al., 1987]

Os alcalóides aporfínicos, possuidores de centro assimétrico em C_{6a}, podem ter sua configuração absoluta determinada de acordo com sua rotação óptica específica na raia D do sódio. Os compostos dextrógiros têm configuração (*S*) e os levógiros (*R*).

A correlação entre a configuração absoluta e a substituição no anel D foi observada, já que os alcalóides substituídos em C₉/C₁₀ ou C₁₀/C₁₁ têm predominantemente a configuração (*S*), enquanto que os alcalóides com apenas uma substituição em C₉, C₁₀ e C₁₁, ou não substituídos podem exibir a configuração (*S*) ou (*R*).

4.12 – (-)-duguetina (**10**)



O alcalóide **10** apresentou-se como um sólido amorfo marrom que em CCDS (FM: CHCl₃:MeOH 8%, revelador: Dragendorff) exibiu um ponto predominante de coloração laranja.

No espectro de IV/FT de **10** (**Espectro 45**) observou-se a presença de uma banda de absorção larga em 3422 cm⁻¹ referente à deformação axial do grupo hidroxila, como também bandas de absorção em 2936 e 2851 cm⁻¹, relativas às deformações axiais de C-H alifático.

A análise do espectro de RMN ^1H (**Espectros 46 e 47**) permitiu a observação de dois dupletos em δ 3,51 e 4,58, referentes a H_{6a} e H_7 , com constantes de acoplamento (J) de 12,1 Hz, o que define a relação *trans* entre estes hidrogênios; além destes, também revelou a presença de singletos relativos a hidrogênios aromáticos em δ 6,51, 7,25 e 7,61, bem como um singlete em δ 2,57 característico de metila ligada a nitrogênio. Todos esses sinais, e outros observados para hidrogênios alifáticos indicaram tratar-se um alcalóide 7-hidróxi-aporfínico [**TABELA 41**]. Como a rotação óptica na raia D do sódio foi negativa ($[\alpha]_D^{20} = -36,06$) concluiu-se que este alcalóide é da série *R* e, portanto, apresenta o H_{6a} com a configuração conforme indicado na estrutura [CAVÉ et al., 1987].

O espectro de RMN ^{13}C (**Espectros 48 e 49**) mostrou a presença de sinais de carbonos metilênicos em δ 23,1 e 49,8, compatíveis com C_4 e C_5 de alcalóides aporfínicos, como também um sinal de metila em δ 39,4 referente a N-CH_3 . Outros sinais importantes para a identificação estrutural desse alcalóide foram observados, como em δ 69,7 característico de carbono carbinólico (C_7) e δ 64,7 relativo a C_{6a} . Devido à metilação do nitrogênio, os carbonos C_5 e C_{6a} sofrem efeitos β de desproteção, enquanto C_7 sofre efeito γ de proteção [**TABELA 42**].

O padrão de substituição foi confirmado pelos dados espectrais de RMN ^{13}C e DEPT 135° (**Espectro 50**), pois foram observados três carbonos metínicos aromáticos e nove carbonos sem hidrogênio, sendo o metilenodioxílico confirmado pelo sinal de carbono metilênico em δ 100,7.

No mapa de contornos NOESY (**Espectros 51 e 52**) foram observadas importantes correlações, como entre o N-CH_3 e os hidrogênios H_{6a} e H_7 , como também entre as metoxilas em δ 3,95 com o H_8 e δ 3,88 com o H_{11} . As outras correlações podem ser observadas de acordo com a **Figura 11** e a **Tabela 43**.

O espectro de massas de baixa resolução de **11** (**Espectro 53**), obtido por impacto de elétrons, exibiu o pico do íon molecular em m/z 355,0 $[\text{M}]^+$, sendo este compatível com $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_5$, e o fragmento em m/z 340,3 $[\text{M-CH}_3]^+$ confirmou a presença da metila ligada ao nitrogênio. Também se visualizou íons fragmentários em m/z 337,1, 324,2 e 311,6, sendo os dois primeiros formados pela perda de água e de metoxila, e o último através de uma fragmentação tipo retro Diels-Alder, característica dos aporfínicos.

A partir da comparação dos dados espectrais obtidos com os observados na literatura pôde-se determinar que a substância **10** é a (-)-duguetina [NAVARRO *et al.*, 2001]. Esta

substância foi isolada pela primeira vez em 1970 de *Duguetia* sp. [CASAGRANDE *et al.*, 1970], mas ainda não havia relatos de seu isolamento em *Duguetia furfuracea*.

TABELA 41 -Dados de RMN ^1H (δ) de **10** e (-)-duguetina

H	10 (δ)^a	(-)-duguetina [NAVARRO <i>et al.</i>, 2001]^b
3	6,51 (s)	6,50 (s)
6a	3,51 (d, $J = 12,1$ Hz)	3,25 (d)
7	4,58 (d, $J = 12,1$ Hz)	4,80 (d)
8	7,25 (s)	7,0 (s)
11	7,61 (s)	7,60 (s)
N-CH ₃	2,57 (s)	nc
O-CH ₂ -O	5,91 (sl) e 6,06 (sl)	4,95 (sl) e 6,05 (sl)
OCH ₃ (C ₁₀)	3,88 (s)*	nc
OCH ₃ (C ₉)	3,95 (s)*	nc
OH	1,94 (sl)	nc

^a (300 MHz, CDCl₃), ^b (200 MHz, CDCl₃); nc: não citado pelo autor; * confirmados pelo espectro de NOESY

TABELA 42 - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **10** e (-)-duguetina

C	10 (δ) ^a	(-)- duguetina [NAVARRO <i>et al.</i> , 2001] ^b
1	141,8	141,8
1a	116,6	116,0
1b	121,3	121,4
2	147,7	148,2
3	106,7	106,6
3a	127,1	127,4
4	23,1	24,9
5	49,8	49,2
6a	64,7	64,6
7	69,7	69,8
7a	132,8	133,6
8	107,3	109,1
9	148,7	148,5
10	146,9	146,3
11	110,4	110,3
11a	122,7	123,9
N-CH ₃	39,4	39,9
O-CH ₂ -O	100,7	100,1
OCH ₃ (C ₉)	55,9	55,2
OCH ₃ (C ₁₀)	56,1	55,6

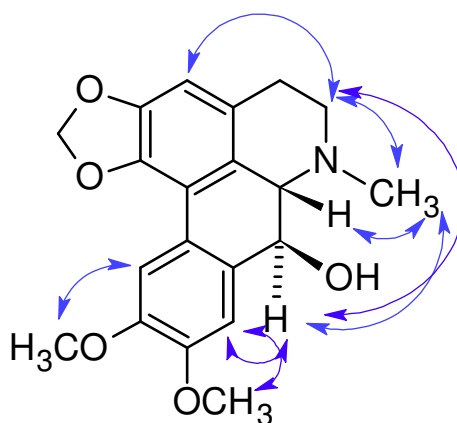
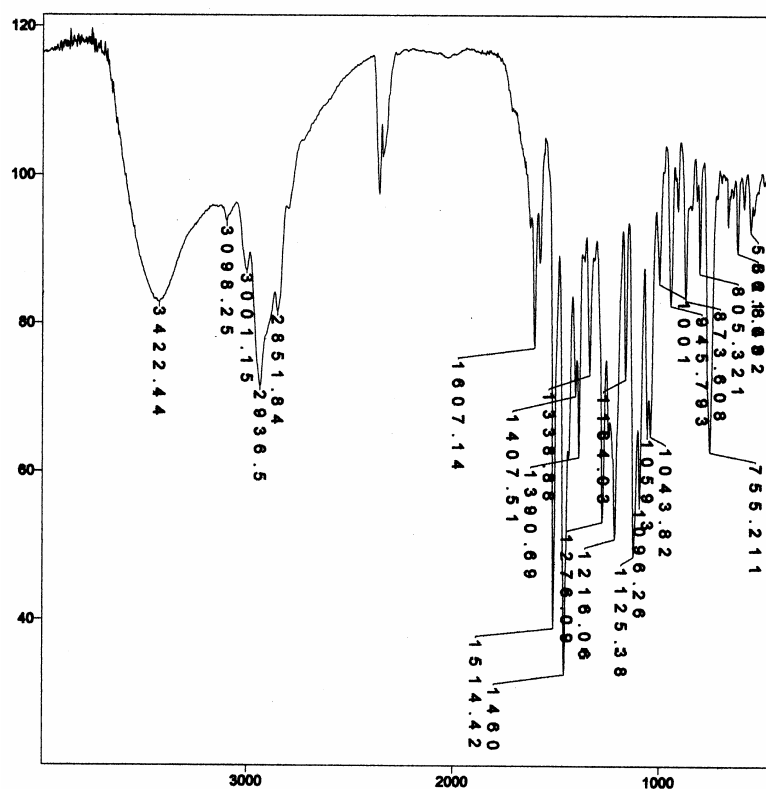
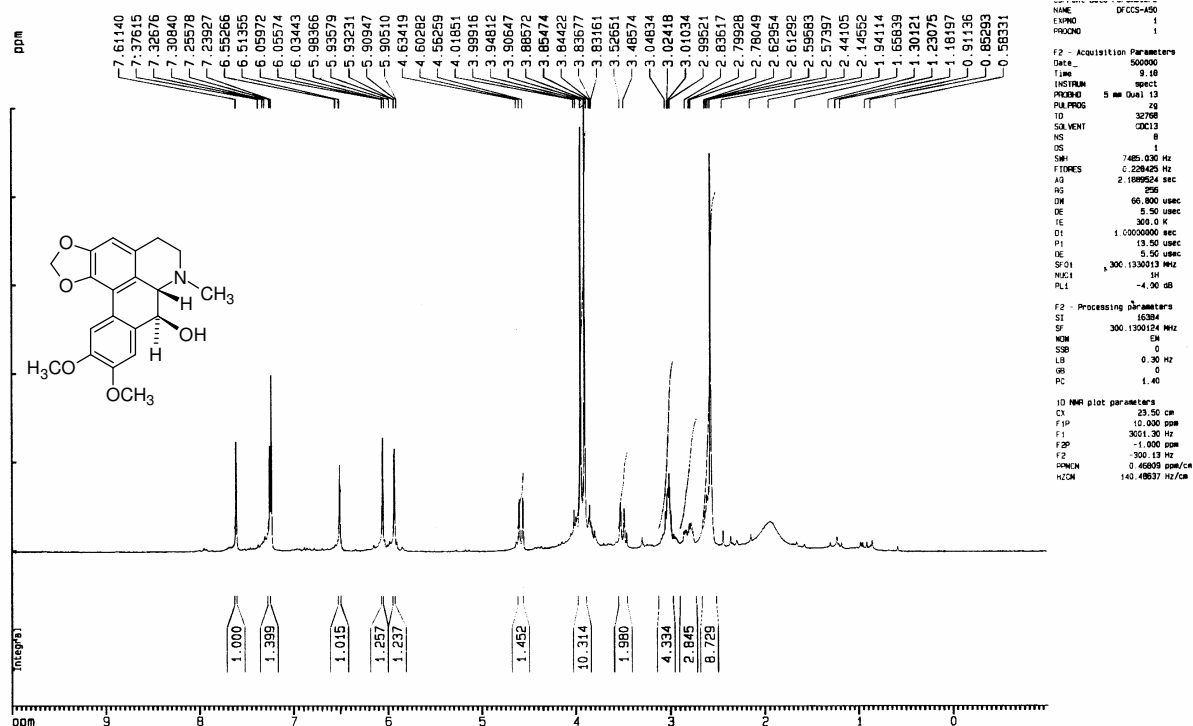
a (75 MHz, CDCl₃), b (50 MHz, CDCl₃)FIGURA 11 - Correlações observadas no mapa de contornos NOESY de **10**

TABELA 43 – Correlações observadas no mapa de contorno NOESY do composto **10**
(300 MHz, CDCl₃)

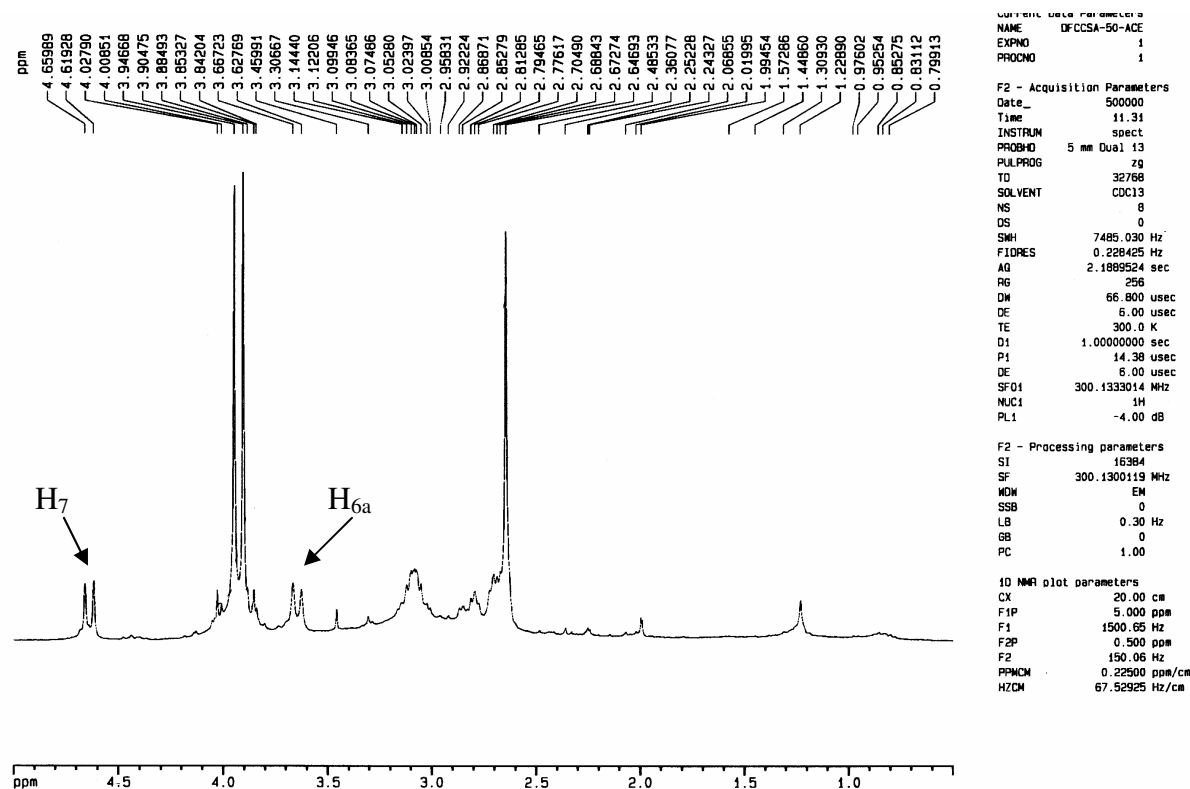
¹ H (δ)	¹ H (δ)
H ₃ (δ 6,51)	H ₅ (δ 3,02)
H _{6a} (δ 3,51)	N-CH ₃ (δ 2,57)
H ₇ (δ 4,58)	N-CH ₃ (δ 2,57), H ₅ (δ 3,02)
H ₈ (δ 7,25)	H ₇ (δ 4,58), OCH ₃ (δ 3,95)
H ₁₁ (δ 7,61)	OCH ₃ (δ 3,88)
N-CH ₃ (δ 2,57)	H ₅ (δ 3,02), H _{6a} (δ 3,51) e H ₇ (δ 4,58)



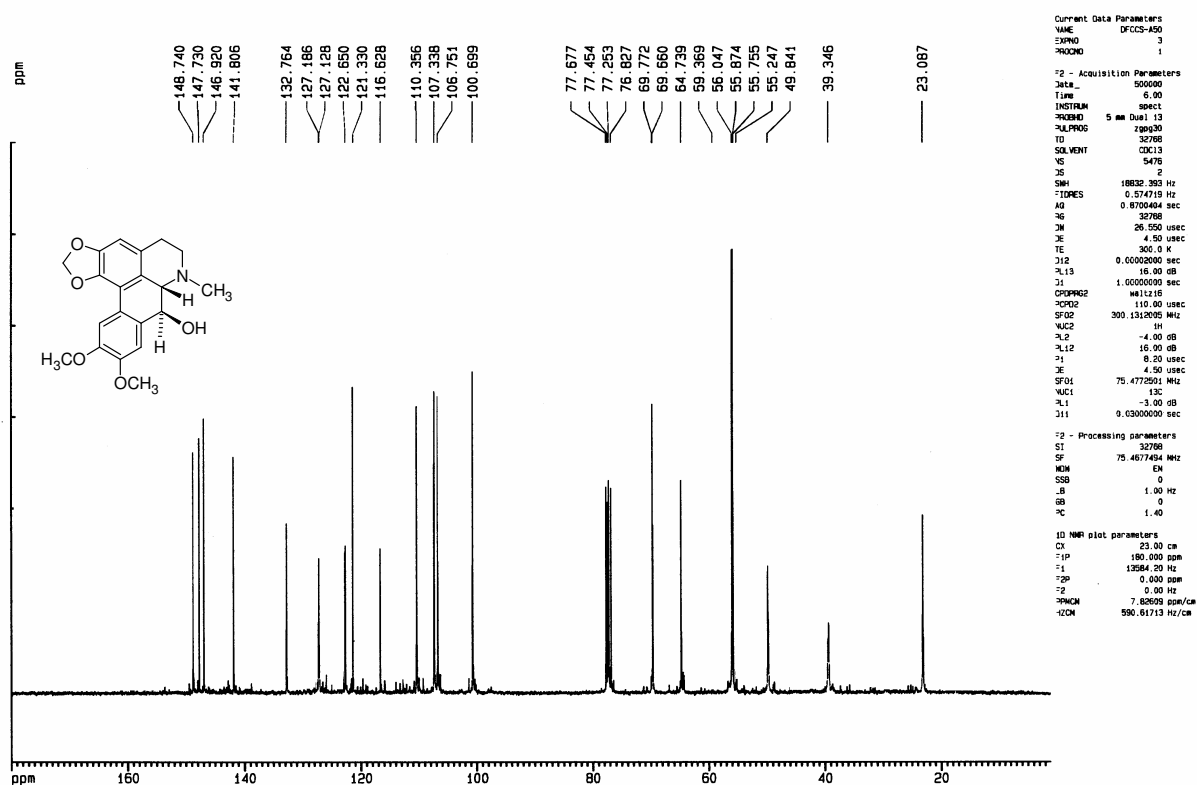
ESPECTRO 45- Espectro de IV/FT de **10**



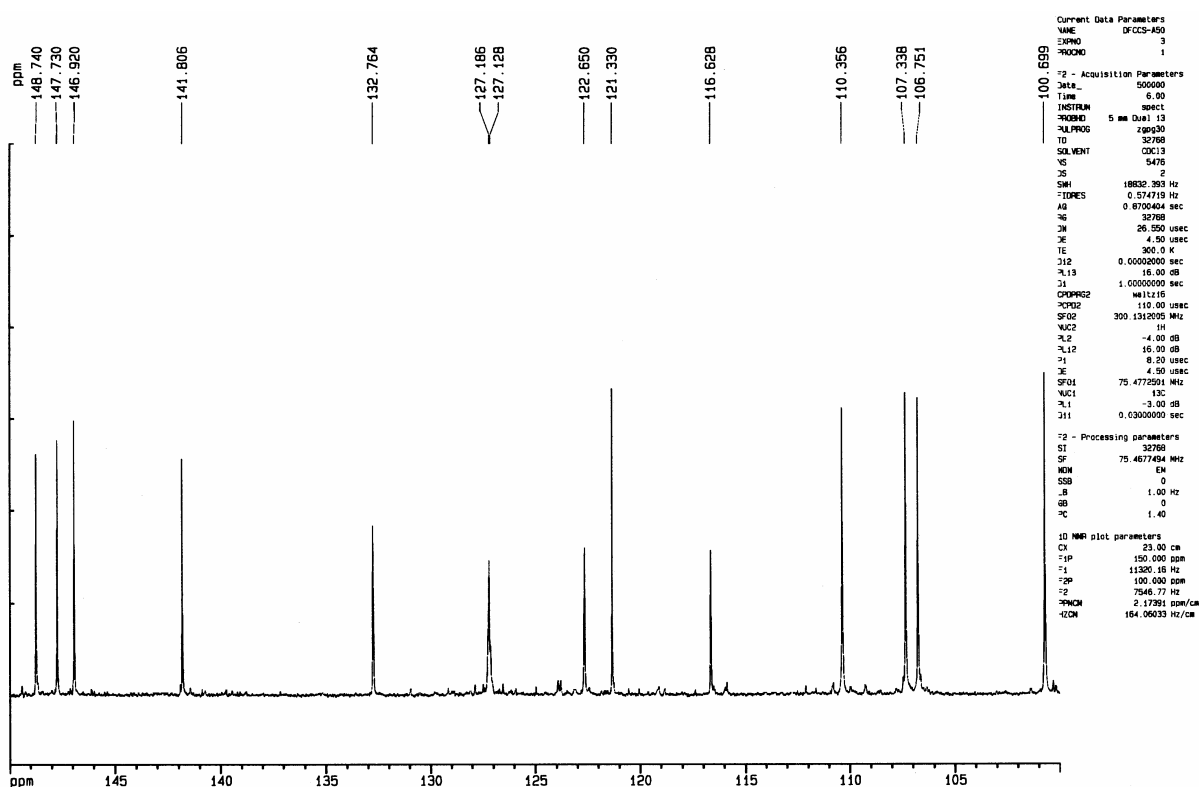
ESPECTRO 46 – Espectro de RMN ¹H de **10** entre 0-10 ppm (300 MHz, CDCl₃)



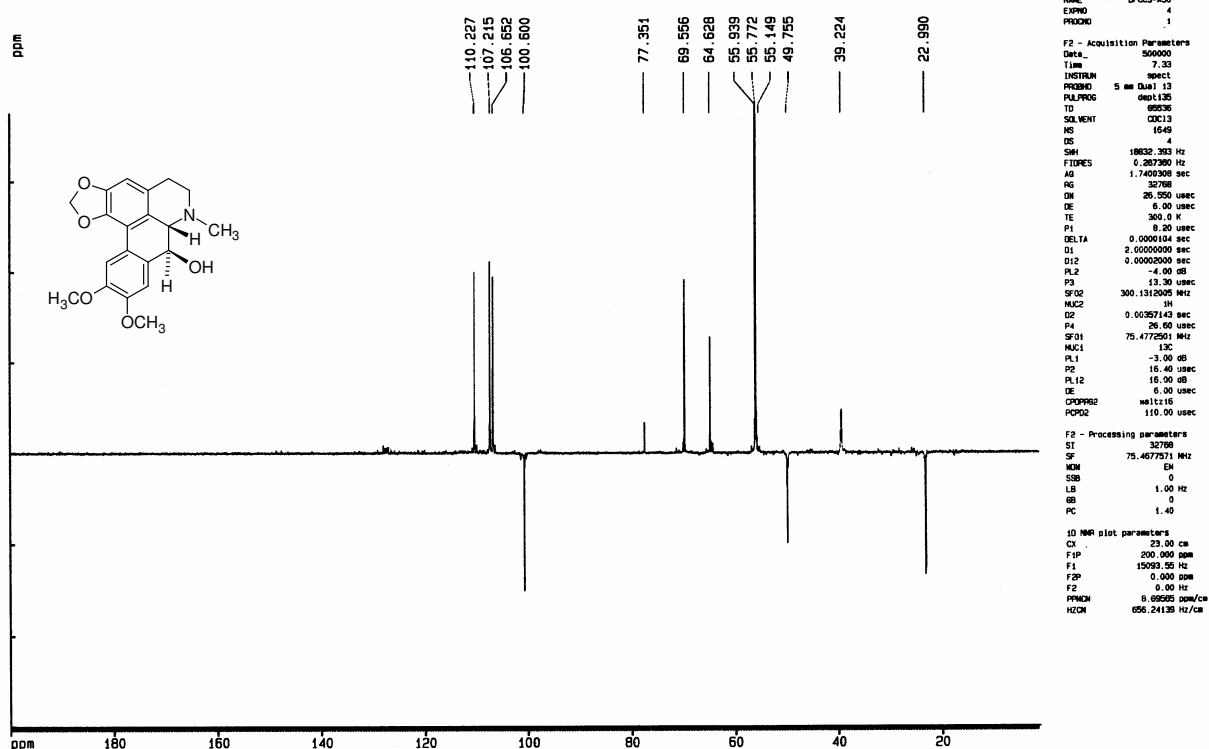
ESPECTRO 47 – Expansão do espectro de RMN ¹H de **10** entre 0,5-5 ppm



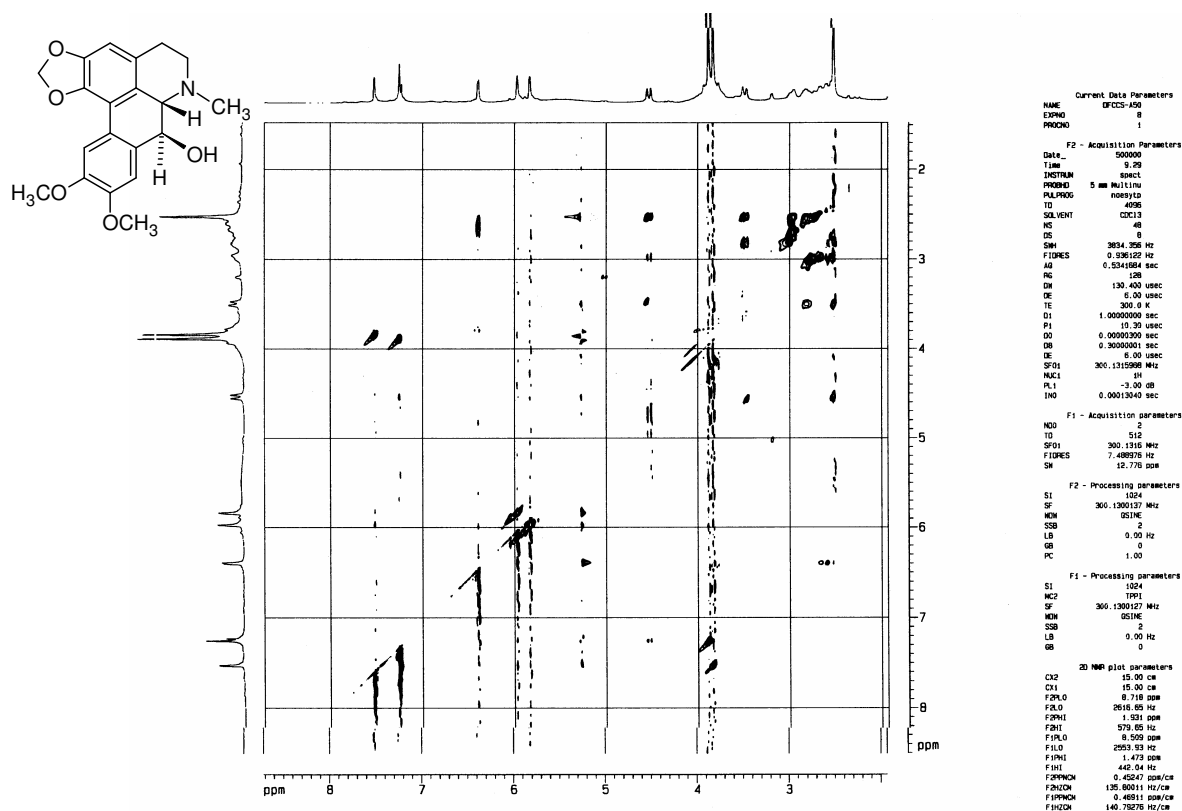
ESPECTRO 48 – Espectro de RMN ^{13}C de **10** entre 20-180 ppm (75 MHz, CDCl_3)



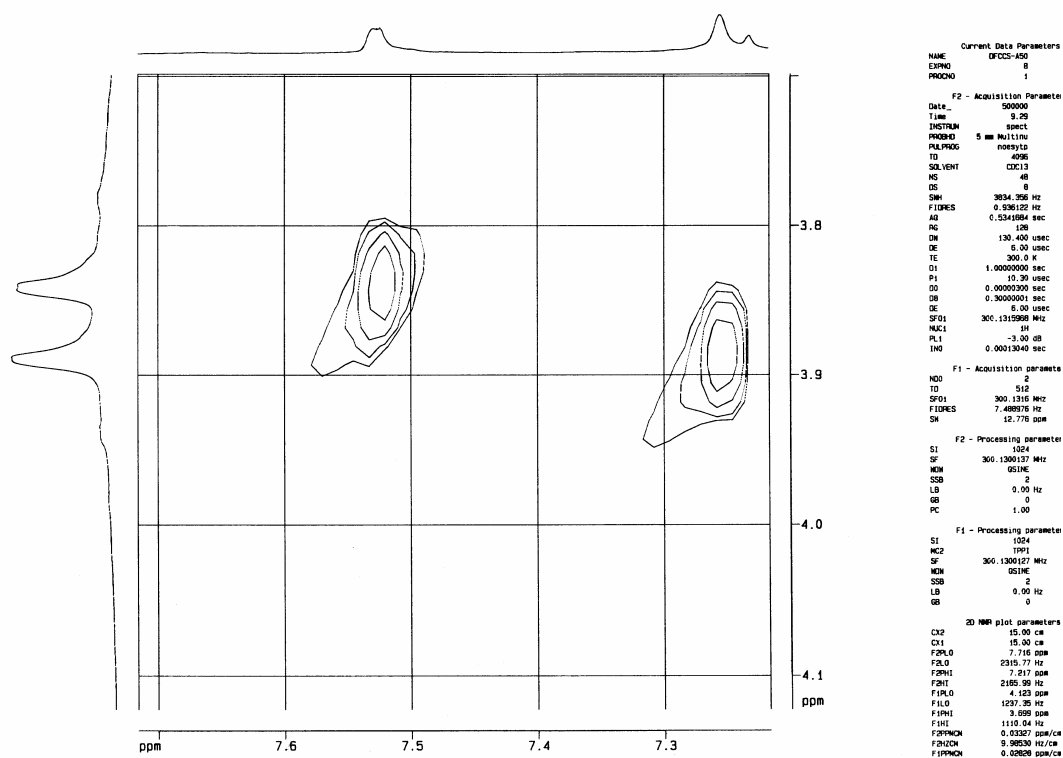
ESPECTRO 49 – Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **10** entre 100-150 ppm



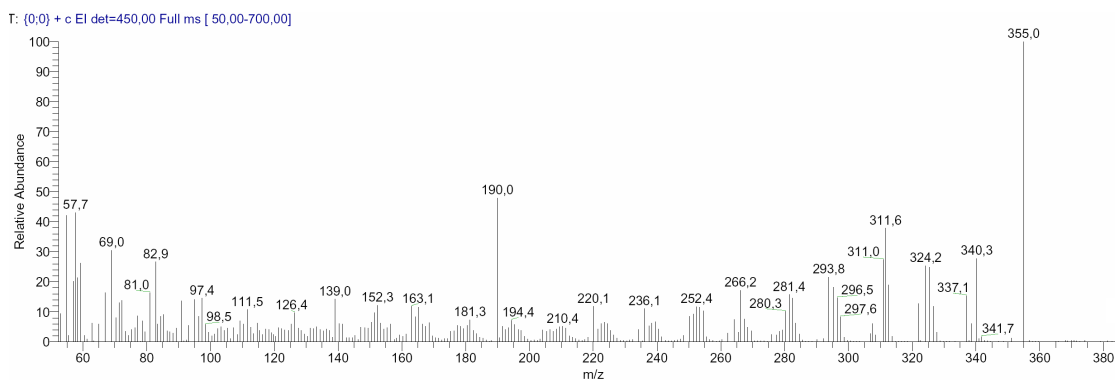
ESPECTRO 50 – Espectro de DEPT 135° de **10** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl₃)



ESPECTRO 51 – Mapa de contornos NOESY de **10** (300 MHz, CDCl₃)



ESPECTRO 52– Ampliação do NOESY de **10** na região entre 3,7-4,1 e 7,2-7,7 ppm



ESPECTRO 53 – EM/IE do composto **10**

- Reação de acetilação de **10**

Esse alcalóide, obtido a partir do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo, foi submetido a processos clássicos de acetilações com anidrido acético/piridina e anidrido acético/DMAP, mas sem sucesso e, por esta razão, sua estrutura foi investigada com estudos teóricos para determinação das preferências conformacionais tanto das metoxilas quanto do N-CH₃, na tentativa de elucidar a resistência às acetilações por parte da hidroxila.

- Análise conformacional de **10**

[Euzébio Guimarães Barbosa (PG), Departamento de Química, UFMS, Campo Grande/ MS]

As conformações das metoxilas do anel D, investigadas por meio de uma superfície de potencial eletrostático realizada com AM1, em que a energia menor é observada quando as metoxilas estão com ambos os ângulos de diedro de 0° [FIGURA 12].

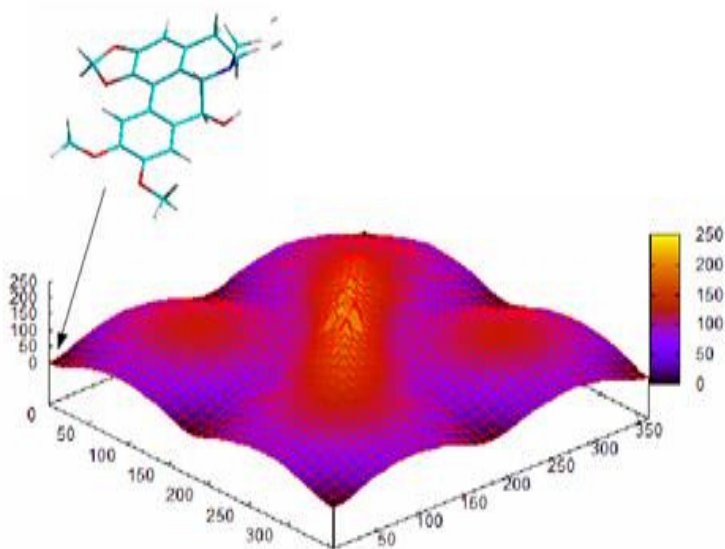


FIGURA 12 - Superfície de energia potencial para a rotação das diedrais da metoxilas.

Duas conformações para o anel B foram selecionadas por dinâmica molecular (MM2) e subsequentemente, as geometrias, otimizadas com nível de teoria B3LYP/6-31G**,

permitiram a observação de uma diferença de energia entre o confômero *a* e *b* de apenas 0,0412 kcal/mol [FIGURA 13]. Também foi constatado que, tanto na conformação *a* como na conformação *b*, o hidrogênio da hidroxila é capaz de fazer ligação de hidrogênio com o nitrogênio em ambas as conformações, porém a ligação de hidrogênio em *b* é mais curta, o que explica a pequena diferença energética entre os confômeros. A distribuição conformacional pôde ser confirmada por correlações observadas no espectro de NOESY [TABELA 43] entre N-CH₃ e os hidrogênios H_{6a} e H₇, o que atesta a existência das duas conformações em proporções muito semelhantes.

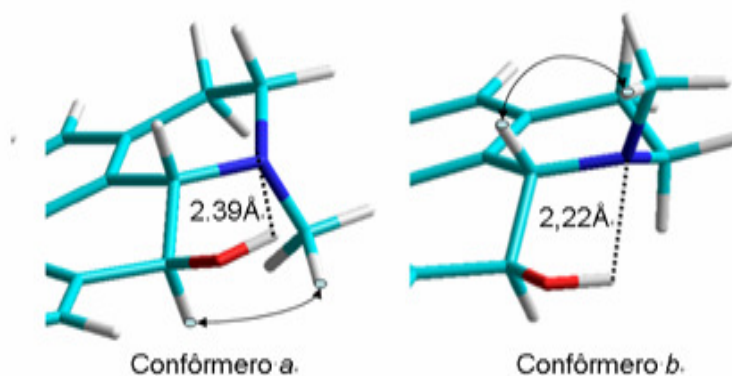
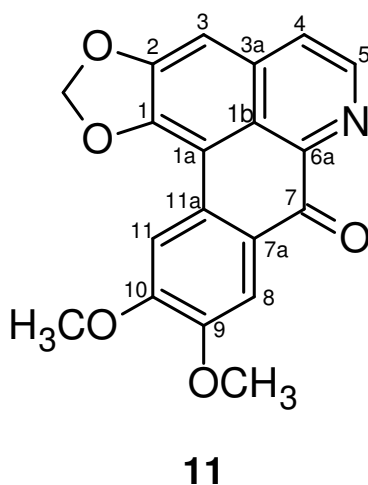


FIGURA 13 - Destaque das correlações observadas no NOESY para N-CH₃ e comprimento das ligações de hidrogênio de **10** nas duas conformações mais estáveis

Portanto, com os estudos teóricos observou-se que o alcalóide duguetina possui confômeros que oscilam entre si muito facilmente devido à pequena diferença de energia entre eles, e as ligações de hidrogênio, constatadas em ambos os confômeros, explicam a marcante dificuldade de acetilação desse alcalóide.

4.13 – Dicentrinona (11)



O metabólito **11**, isolado por CCPS-OXA, apresentou-se como cristais alaranjados solúveis em CHCl_3 e MeOH. Após adição de HCl 5% a uma solução clorofórmica do mesmo observou-se uma alteração da cor para avermelhada, indicando a possibilidade do metabólito ser um alcalóide oxaporfínico, pois em meio ácido esses alcalóides tornam-se protonados resultando em um deslocamento batocrômico [CAVÉ *et al.*, 1987; NIETO *et al.*, 1976]. Os alcalóides oxaporfínicos são estruturalmente caracterizados por possuírem um esqueleto aporfínico totalmente aromatizado e uma carbonila em C_7 .

No espectro de RMN ^1H de **11** (**Espectro 54**) foram observados dois dupletos em δ 7,69 e 8,84 relativos a H_4 e H_5 com J de 5,0 Hz, sendo que esses sinais e o valor de J são compatíveis com os mesmos de esqueletos oxaporfínicos. Também foram observados singletos referentes a hidrogênios benzênicos em δ 7,06, 7,88 e 7,91, como também os sinais do metilenodióxido em δ 6,35 e das duas metoxilas em δ 3,95 e 4,05 [**TABELA 44**]. Esses sinais permitiram o estabelecimento do padrão de substituição, o qual foi confirmado pelos dados espectrais de RMN ^{13}C .

Os sinais mais relevantes na caracterização estrutural do composto **11**, no espectro de RMN ^{13}C (**Espectros 55 e 56**), foram observados em δ 181,2, 102,4, 56,1 e 56,2, sendo o primeiro relativo ao grupo carbonila em C_7 , o segundo ao metilenodióxido e os dois últimos referentes às metoxilas aromáticas [**TABELA 45**]. O sinal do grupo metilenodioxílico foi confirmado no espectro de DEPT 135° (**Espectro 57**) como sendo metilênico.

Os dados espectrais obtidos foram compatíveis com os descritos na literatura para o alcalóide oxaporfínico dicentrinona [WIJERATNE *et al.*, 1996; ZHOU *et al.*, 2000]. Este alcalóide, já conhecido em Annonaceae, mas não em *Duguetia furfuracea*, apresentou significativa atividade de inibição da topoisomerase I, o que está relacionado com sua atividade antitumoral [ZHOU *et al.*, 2000].

TABELA 44 - Dados de RMN ^1H (δ) de **11** e dicentrinona

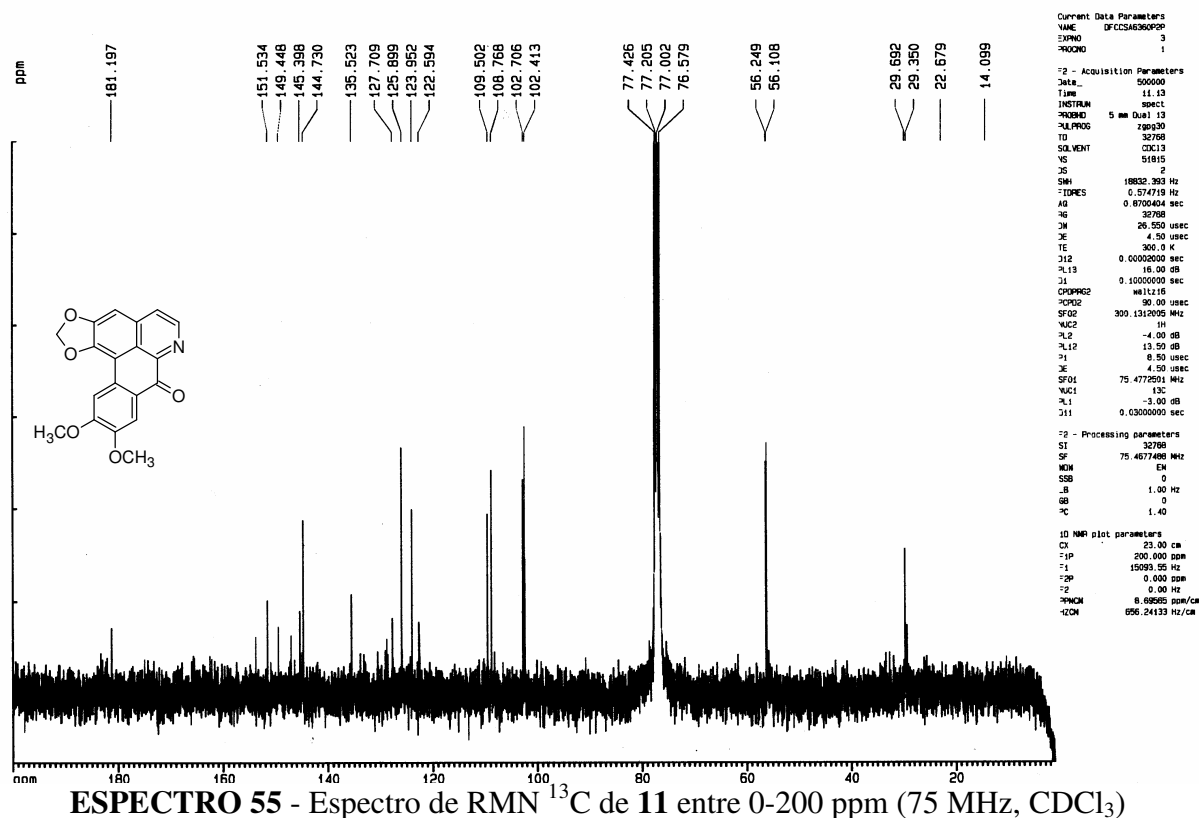
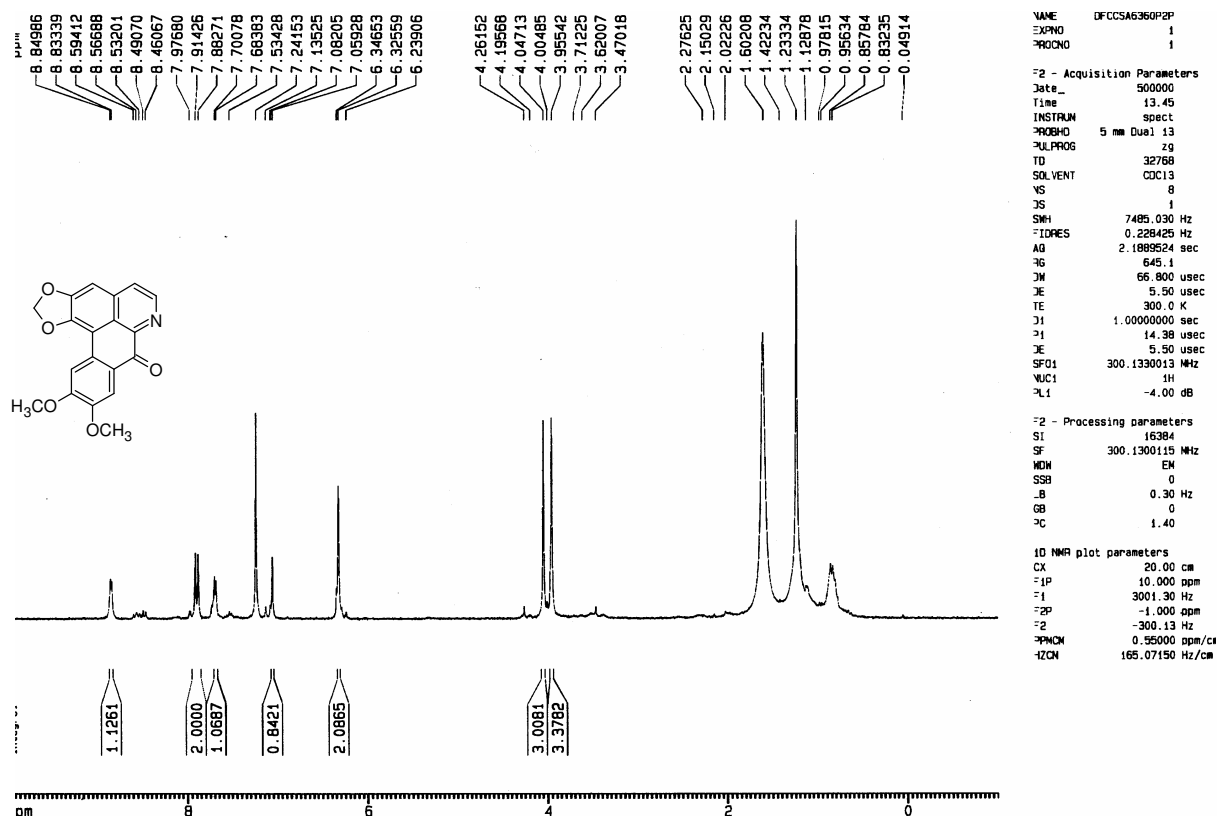
H	11 (δ)^a	Dicentrinona [WIJERATNE <i>et al.</i>, 1996]^b
3	7,06 (s)	7,16 (s)
4	7,69 (d, $J = 5,0$ Hz)	7,74 (d, $J = 5,4$ Hz)
5	8,84 (d, $J = 5,0$ Hz)	8,86 (d, $J = 5,4$ Hz)
8	7,88 (s)	7,97 (s)
11	7,91 (s)	8,64 (s)
O-CH ₂ -O	6,35 (s)	6,13 (s)
OCH ₃	3,95 (s)	3,99 (s)
OCH ₃	4,05 (s)	4,08 (s)

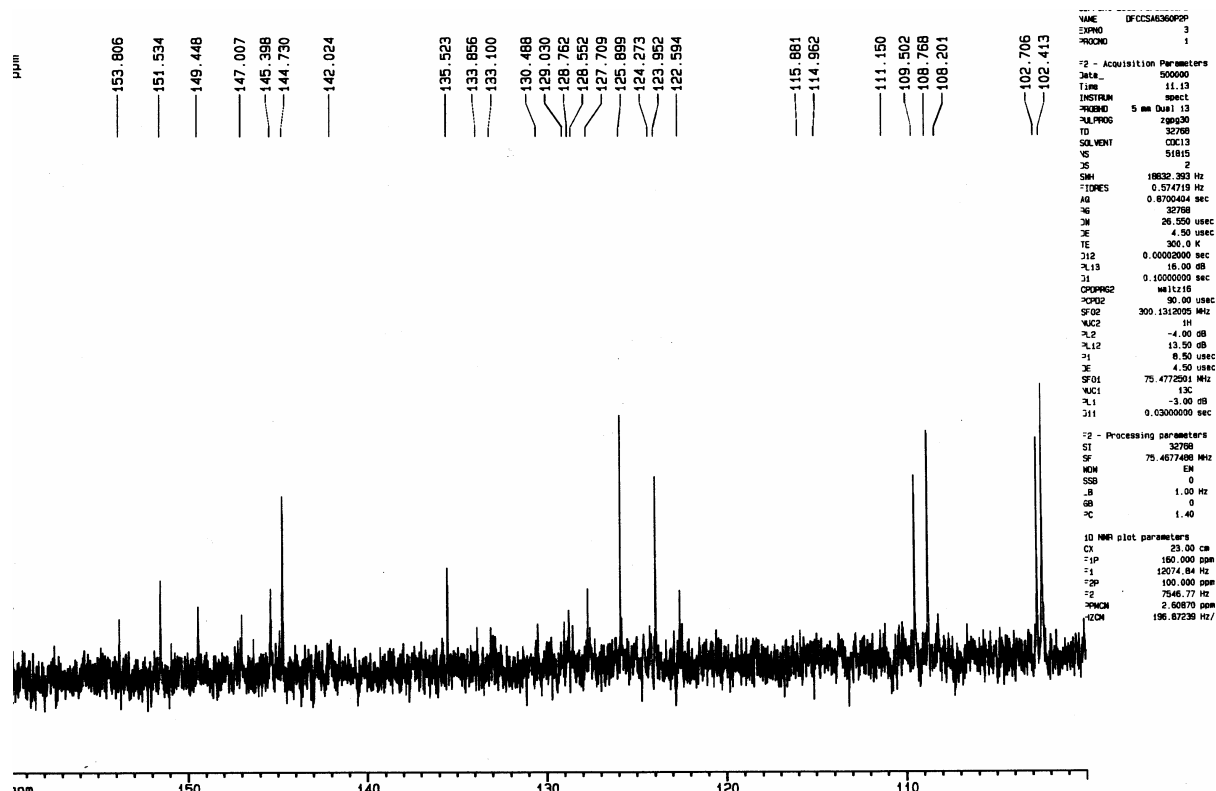
^a (300 MHz, CDCl₃); ^b (400 MHz, CDCl₃)

TABELA 45 - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **11** e dicentrinona

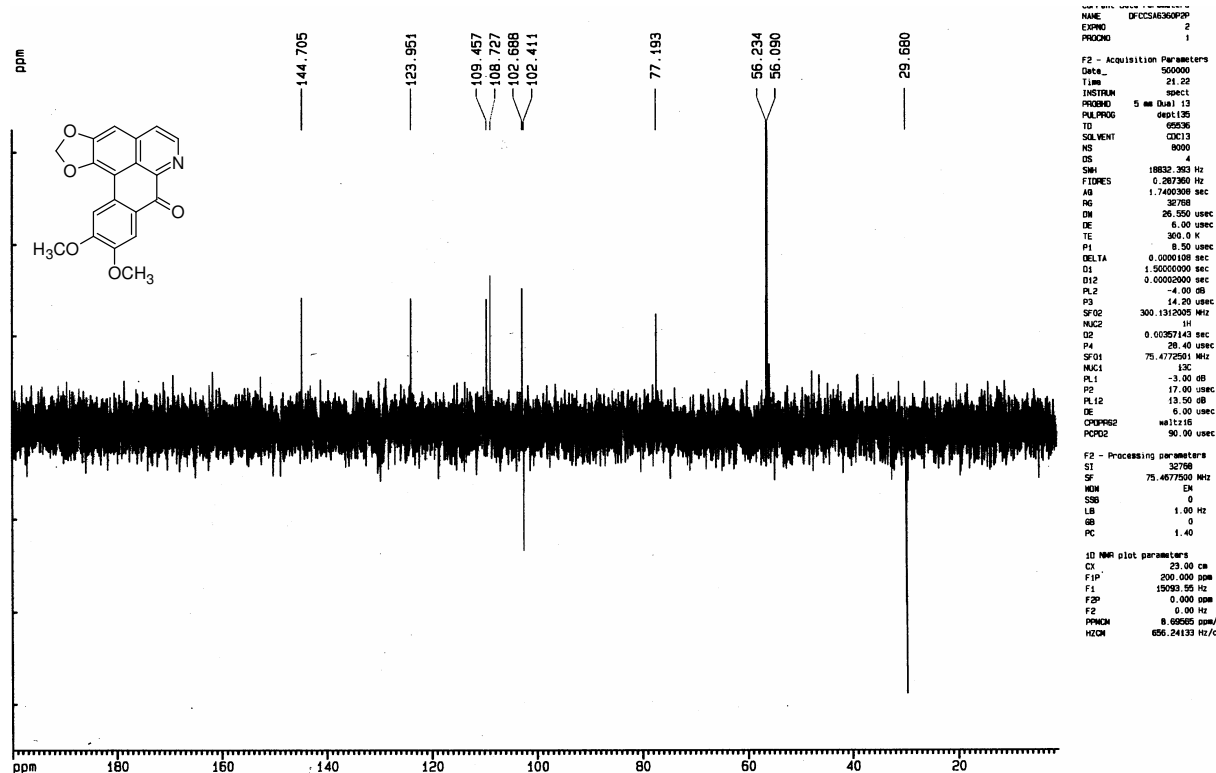
C	11 (δ) ^a	Dicentrinona [ZHOU <i>et al.</i> , 2000] ^b
1	151,5	152,1
1a	108,2	107,5
1b	122,6	122,2
2	147,0	147,6
3	102,4	102,5
3a	135,5	138,2
4	123,9	124,3
5	144,7	142,9
6a	145,4	143,7
7	181,2	180,4
7a	125,9	125,0
8	109,5	109,1
9	149,4	149,4
10	153,8	154,1
11	108,7	108,8
11a	127,7	127,7
O-CH ₂ -O	102,4	102,7
OCH ₃ (C ₉)	56,1	55,6
OCH ₃ (C ₁₀)	56,2	55,7

^a (75 MHz, CDCl₃), ^b (100,6 MHz, CDCl₃-CD₃OD)



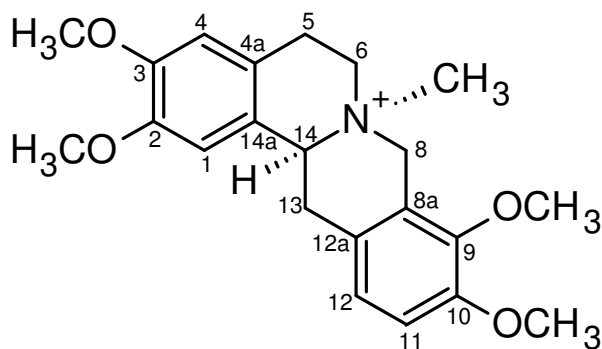


ESPECTRO 56 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **11** entre 100-160 ppm



ESPECTRO 57 - Espectro de DEPT 135° de **11** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)

4.14 - (-)-*N*-metiltetraidropalmatina (**12**)



12

O metabólito **12** foi isolado do grupo 10 do extrato alcaloídico e apresentou-se como um sólido amorfo marrom, solúvel em CHCl_3 e MeOH.

No espectro de RMN ^1H de **12** (**Espectros 58 e 59**) foram observados na região de hidrogênios aromáticos dois singletos em δ 6,77 e 6,66 e dois dupletos de um sistema AB em δ 6,80 e 6,86 com J de 8,5 Hz. Na região de hidrogênios alifáticos apareceram dois dupletos em δ 5,03 e 5,32 com J de 16,0 Hz correspondentes a hidrogênios de um grupo metileno (carbono em δ 59,4), conforme mostrado no mapa de contornos HMQC (**Espectros 64, 65 e 66**), e um duplete largo em δ 5,34 relativo a um grupo metínico (carbono em δ 64,6). Além desses, também há sinais relativos a quatro metoxilas e uma metila em, respectivamente, δ 3,81 (s), 3,85 (s), 3,85 (s), 3,89 (s) e 3,61 (s). O deslocamento químico deste último, que não se encontra ligado a oxigênio, sugere um grupo metílico ligado a nitrogênio quaternário [**TABELA 46**].

A análise conjunta dos espectros de RMN ^{13}C (**Espectros 60 e 61**) e DEPT 135° (**Espectro 62**) revelou a presença de sinais relativos a carbonos de dois anéis aromáticos, quatro carbonos metilênicos (δ 23,3, 33,8, 52,0 e 59,4) e de cinco metilas, compatíveis com um alcalóide de esqueleto tetraidro-protoberberínico. Com o auxílio do espectro de DEPT 90° (**Espectro 63**) pôde-se confirmar que os sinais em δ 64,6 e 50,0 referem-se a carbono metínico e metílico, respectivamente [**TABELA 47**]. O sinal em δ 23,3 relativo a C_5 , confirma a ausência de metoxila em C_4 , pois quando há um substituinte oxigenado nesta

posição o deslocamento de C₅ aparece próximo de δ 19,0 [FIGURA 18] [KANYINDA *et al.*, 1992].

TABELA 46 - Dados de RMN ¹H e ¹³C (δ) do composto **12** e correlações obtidas através do mapa de contorno HMQC

C/H	12 (δ_H) ^a	12 (δ_C) ^b	Grupo
1	6,77 (s)	109,7	CH
2	-	149,5	C
3	-	148,5	C
4	6,66 (s)	111,4	CH
4a	-	123,9	C
5	3,0-3,35 (m)	23,3	CH ₂
6	3,69 (m), 3,94 (m)	52,0	CH ₂
8	5,03 (d, $J = 16,0$ Hz) 5,32 (d, $J = 16,0$ Hz)	59,4	CH ₂
8a	-	120,2	C
9	-	151,2	C
10	-	145,6	C
11	6,86 (d, $J = 8,5$ Hz)	113,1	CH
12	6,80 (d, $J = 8,5$ Hz)	123,3	CH
12a	-	121,1	C
13	3,14 (dd, $J = 6,3$ e 17,9 Hz) 3,48 (dd, $J = 6,3$ e 18,1 Hz)	33,8	CH ₂
14	5,34 (dl, $J = 18,1$ Hz)	64,6	CH
14a	-	119,3	C
N-CH ₃	3,61 (s)	50,0	CH ₃
OCH ₃ (C ₂)	3,85 (s)	56,2*	CH ₃
OCH ₃ (C ₃)	3,85 (s)	56,0*	CH ₃
OCH ₃ (C ₉)	3,81 (s)	61,2	CH ₃
OCH ₃ (C ₁₀)	3,89 (s)	55,9	CH ₃

^a(300 MHz, CDCl₃); ^b(75 MHz, CDCl₃), δ_H das metoxilas foram confirmados no espectro de HMBC; *deslocamentos que podem estar trocados

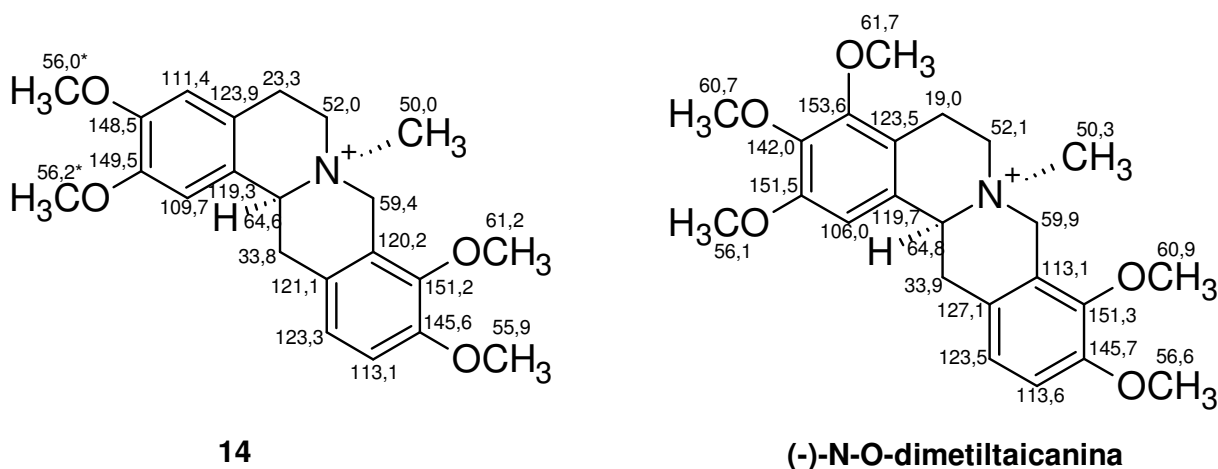


FIGURA 18 - Comparação entre os dados de RMN ¹³C de **14** com (-)-N-O-dimetiltaicanina

No experimento HMBC (**Espectros 67, 68, 69 e 70**) foram visualizadas importantes correlações como de C₅ (δ 23,3) com H₄ (δ 6,66); de N-CH₃ (δ 50,0) com H₈ (δ 5,03 e 5,32) e H₁₄ (δ 5,34); de C₁₄ (δ 64,6) com H₁ (δ 6,77), H₈ (δ 5,03), N-CH₃ (δ 3,61) e H₁₃ (δ 3,14). Outras correlações podem ser observadas na **Figura 19** e **Tabela 47**.

A configuração relativa da junção dos anéis alifáticos foi determinada como sendo *cis*, visto que em anéis *N*-metil-quinolizidínicos com esta estereoquímica o N-CH₃ aparece como um singlete em δ 3,22-3,50 (δ 51,8-52,4), o C₆ em δ 52,1-56,0 e C₁₃ em δ 34-35, enquanto que na junção *trans* o N-CH₃ aparece em δ 2,83-3,06 (δ 39,0-44,5), o C₆ em δ 61,8-63,8 e C₁₃ em δ 30-33 [RUANGRUNGSI *et al.*, 1986; KAMETANI *et al.*, 1975; IWASA *et al.*, 1988]. Por outro lado, sua rotação óptica específica ([α]_D²⁰ = -104,13) sendo levógira, indica que C₁₄ tem configuração absoluta *R* e, portanto, seu hidrogênio encontra-se localizado para trás do plano, como indicado na estrutura.

A comparação entre os deslocamentos químicos observados para o composto **12** e para o (-)-N-O-dimetiltaicanina [**FIGURA 18**] [KANYINDA *et al.*, 1992] revela uma boa correlação com o alcalóide (-)-*N*-metiltetraidropalmatina, corroborando esta proposição, em vista de que este apresenta fusão *cis* entre os anéis alifáticos.

Esta substância consta da literatura sob a denominação de (-)-*N*-metiltetraidropalmatina, tendo sido isolada de *Fagara capensis*. Porém, não foi possível ter acesso a seus dados espectroscópicos para se efetuar a comparação. Este alcalóide ainda não

havia sido isolado em nenhuma espécie de Annonaceae, portanto o seu isolamento promoveu a ampliação da caracterização fitoquímica da família e de *Duguetia furfuracea*.

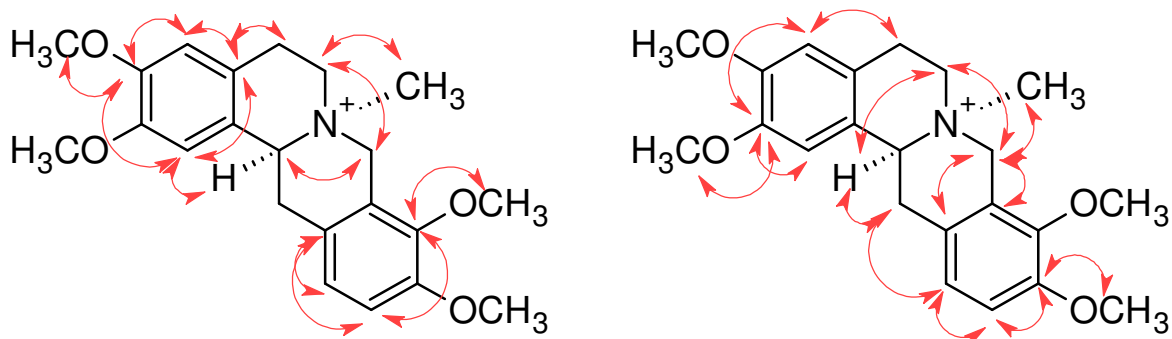


FIGURA 19 – Correlações observadas no mapa de contornos HMBC de **12**

TABELA 47 – Correlações entre carbonos e hidrogênios obtidos através do mapa de contorno HMBC do composto **12** (75 MHz, CDCl₃)

¹³ C (δ)	¹ H (δ)
C ₁ (109,7)	H ₁₄ (5,34)
C ₂ (149,5)	H ₁ (6,77), H ₄ (6,66), OCH ₃ (3,85)
C ₃ (148,5)	H ₁ (6,77), H ₄ (6,66), OCH ₃ (3,85)
C _{4a} (123,9)	H ₁ (6,77), H ₄ (6,66), H ₁₄ (5,34), H ₅ (3,0-3,35)
C ₅ (23,3)	H ₄ (6,66)
C ₆ (52,0)	H ₈ (5,03; 5,32), H ₁₄ (5,34), N-CH ₃ (3,61)
C ₈ (59,4)	H ₆ (3,94), N-CH ₃ (3,61)
C _{8a} (120,2)	H ₈ (5,03; 5,32), H ₁₃ (3,48)
C ₉ (151,2)	H ₁₁ (6,86), OCH ₃ (3,81)
C ₁₀ (145,6)	H ₁₁ (6,86), H ₈ (5,03; 5,32), OCH ₃ (3,89)
C ₁₂ (123,3)	H ₁₁ (6,86), H ₁₃ (3,48)
C _{12a} (121,1)	H ₈ (5,03; 5,32), H ₁₁ (6,86), H ₁₂ (6,80), H ₁₃ (3,14; 3,48)
C ₁₃ (33,8)	H ₁₂ (6,80), H ₁₄ (5,34)
C ₁₄ (64,6)	H ₁ (6,77), H ₈ (5,03), H ₁₃ (3,14), N-CH ₃ (3,61)
C _{14a} (119,3)	H ₁ (6,77), H ₁₄ (5,34), H ₅ (3,0-3,35), H ₁₃ (3,14)
N-CH ₃ (50,0)	H ₈ (5,03; 5,32), H ₁₄ (5,34)

O espectro de ESIMS-MS (**Espectro 71**) de alta resolução de **12**, obtido no modo positivo, exibiu o pico do íon molecular correspondente a $C_{22}H_{28}O_4N$ em m/z 370,2095 ($[M]^+$) o que confirmando ser o alcalóide (-)-*N*-metiltetraidropalmatina. O pico base em m/z 206,1216 corrobora a presença das duas metoxilas no anel A, pois ele é formado devido a uma fragmentação característica tipo retro Diels-Alder e o pico em m/z 354,1735 $[M-CH_3-H]^+$ é importante já que confirma a perda da metila ligada ao nitrogênio. A proposta da fragmentação desse composto foi ilustrada na **Figura 20**.

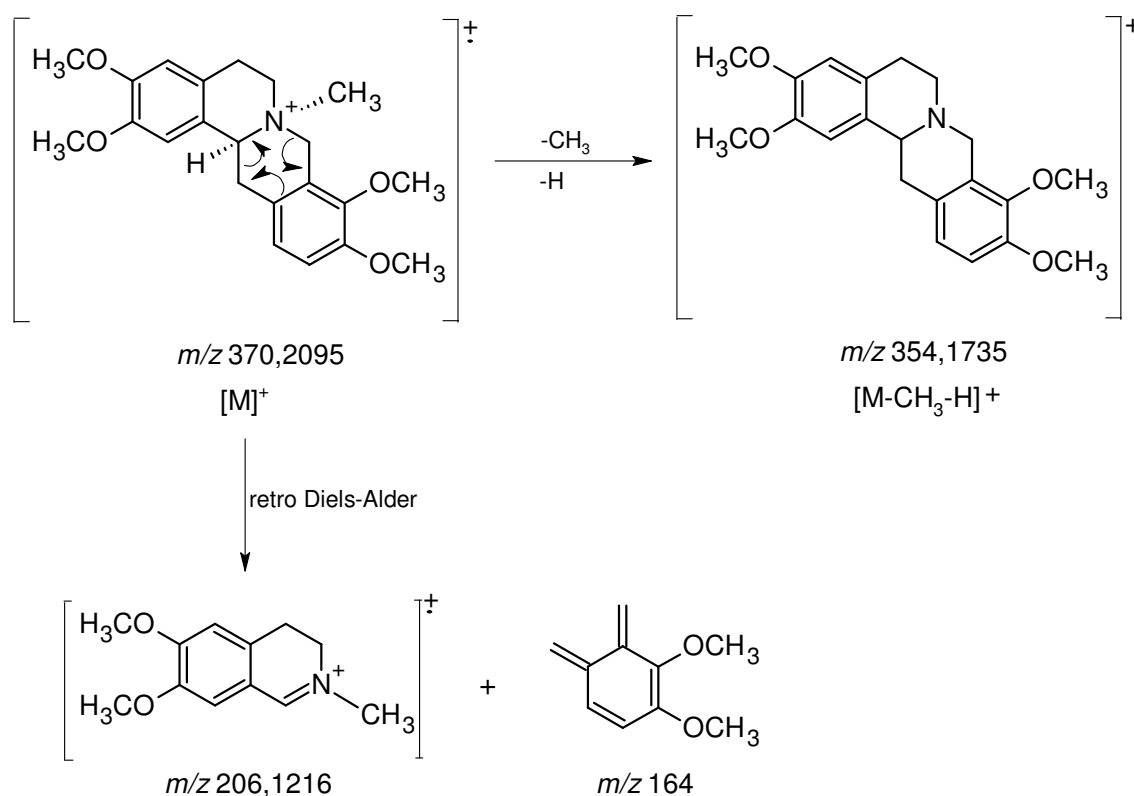
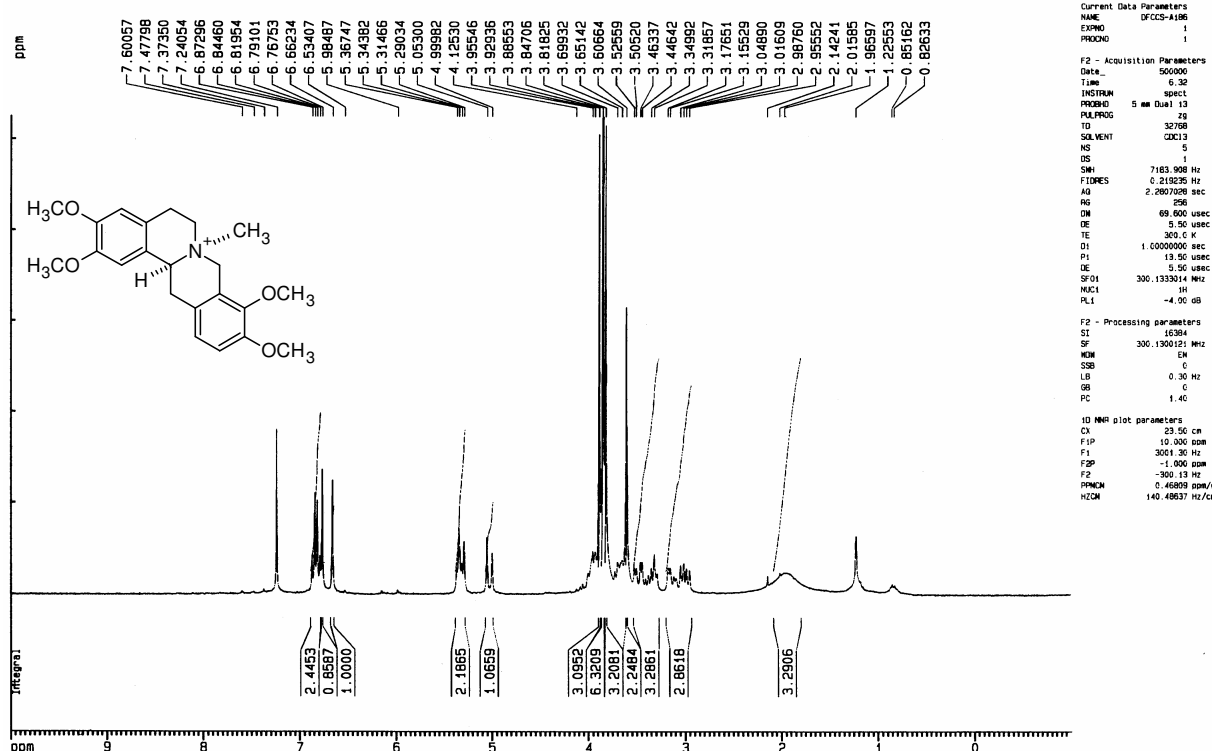
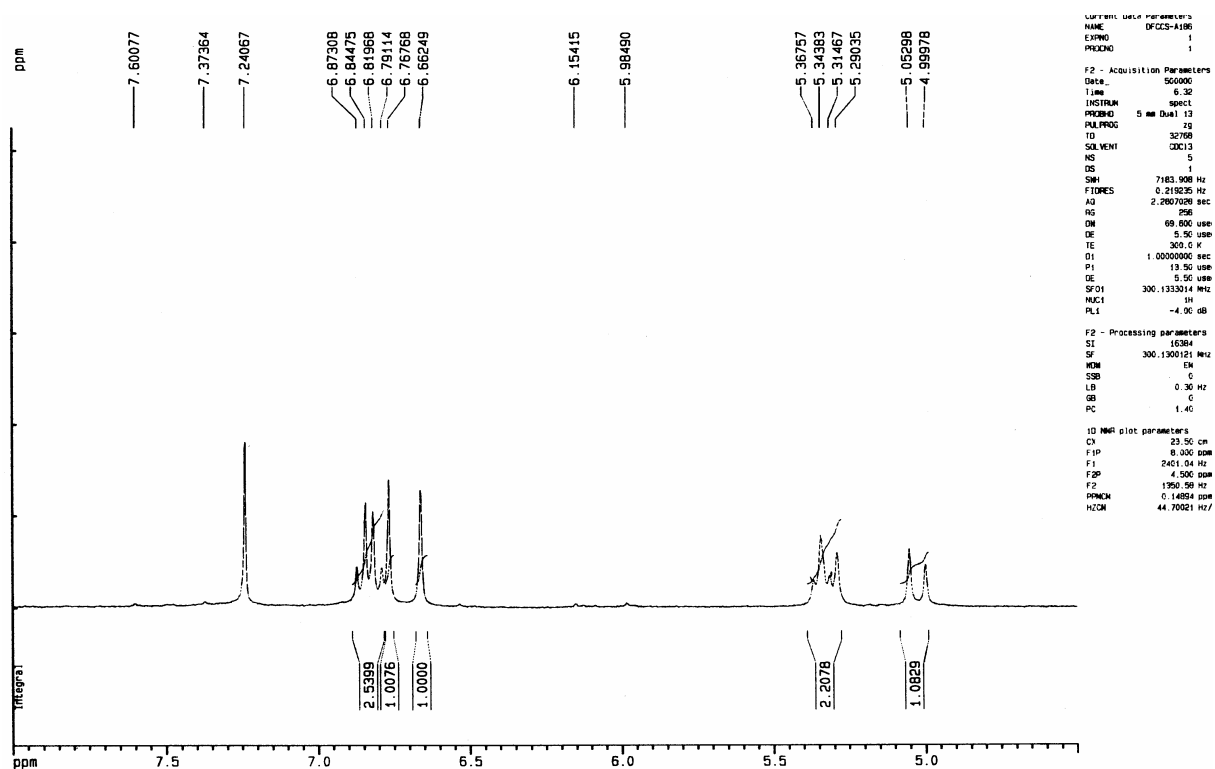


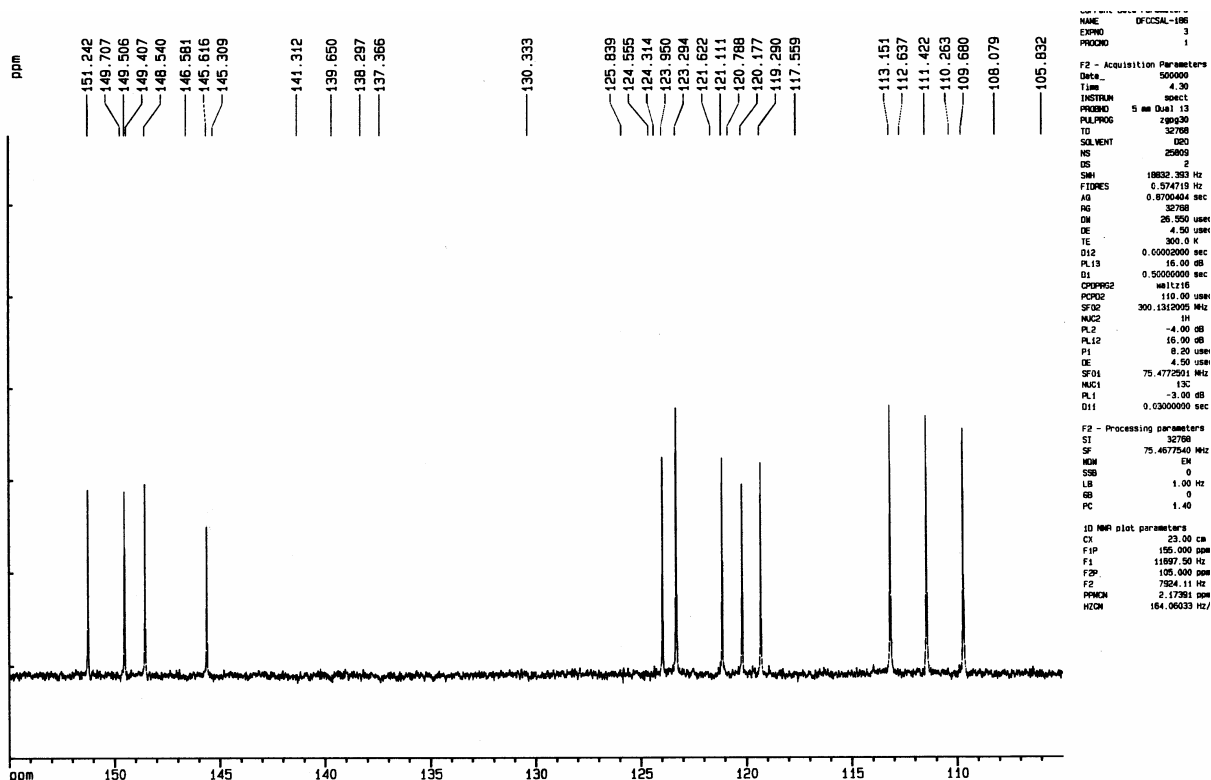
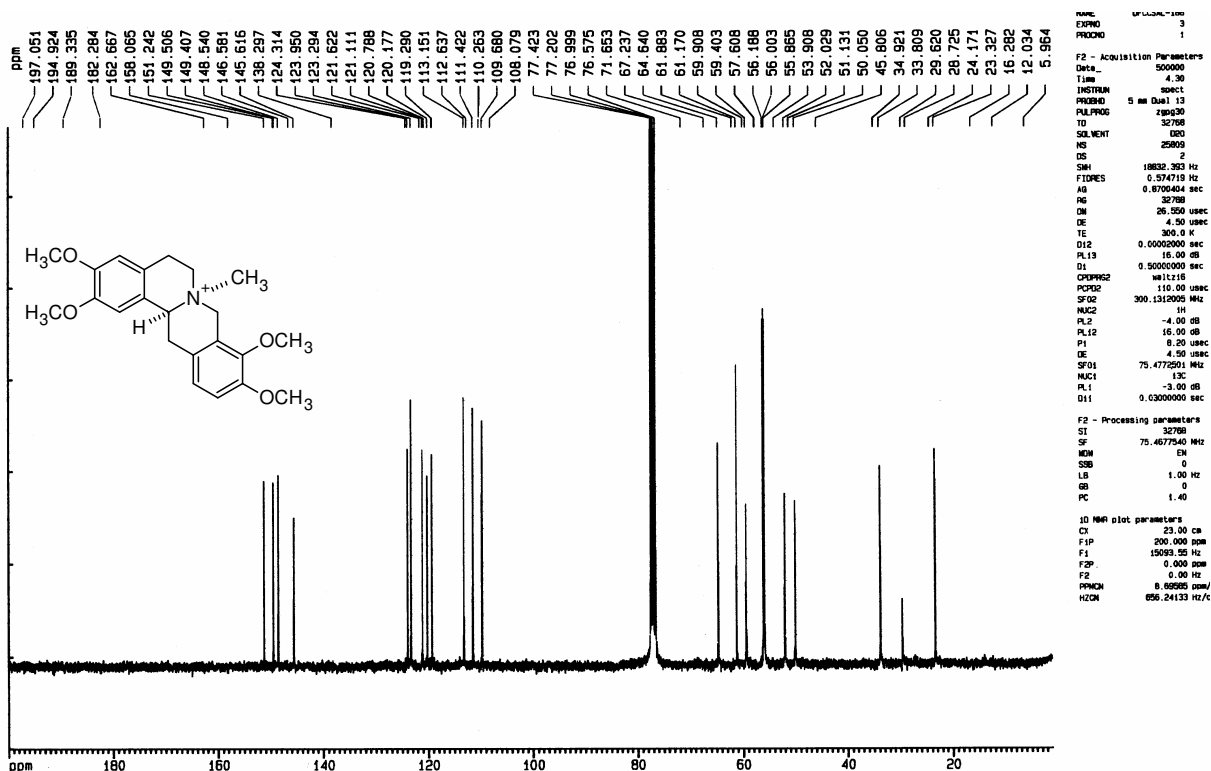
FIGURA 20 – Proposta da rota de fragmentação do composto **14**

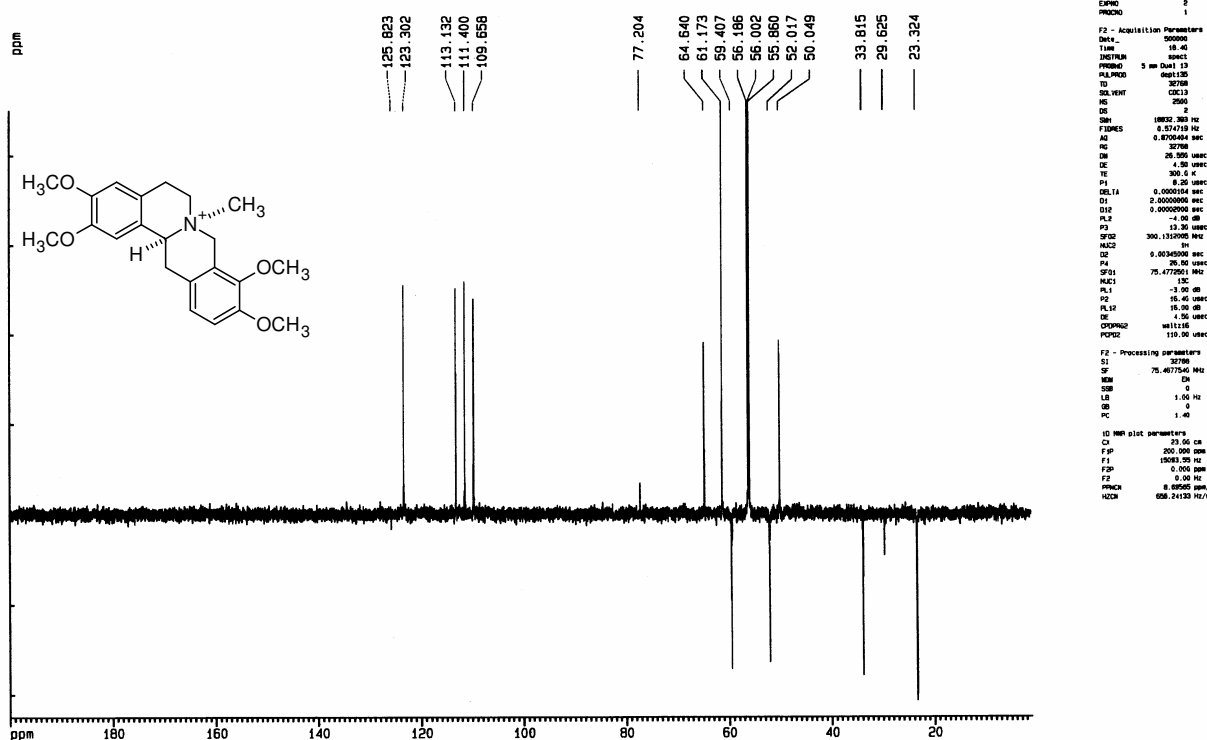


ESPECTRO 58 – Espectro de RMN ^1H de **12** entre 0-10 ppm (300 MHz, CDCl_3)

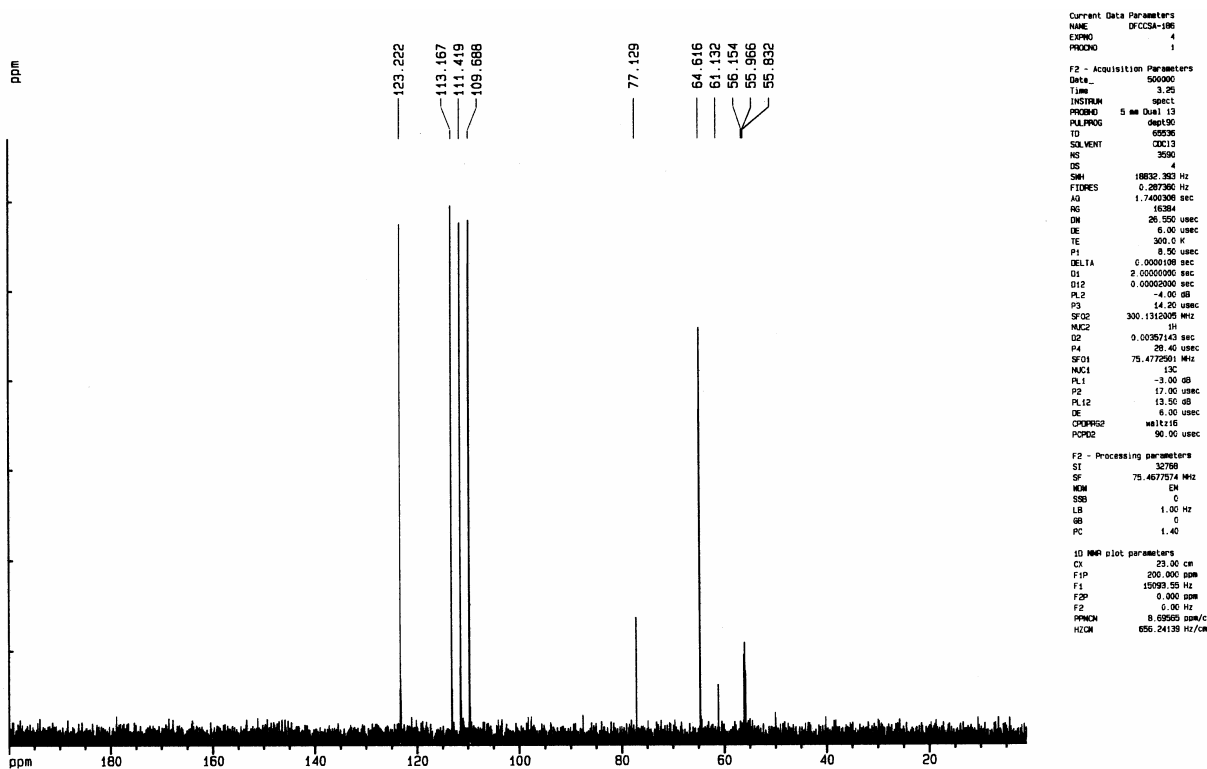


ESPECTRO 59 - Expansão do espectro de RMN ^1H de **12** entre 4,5-8 ppm

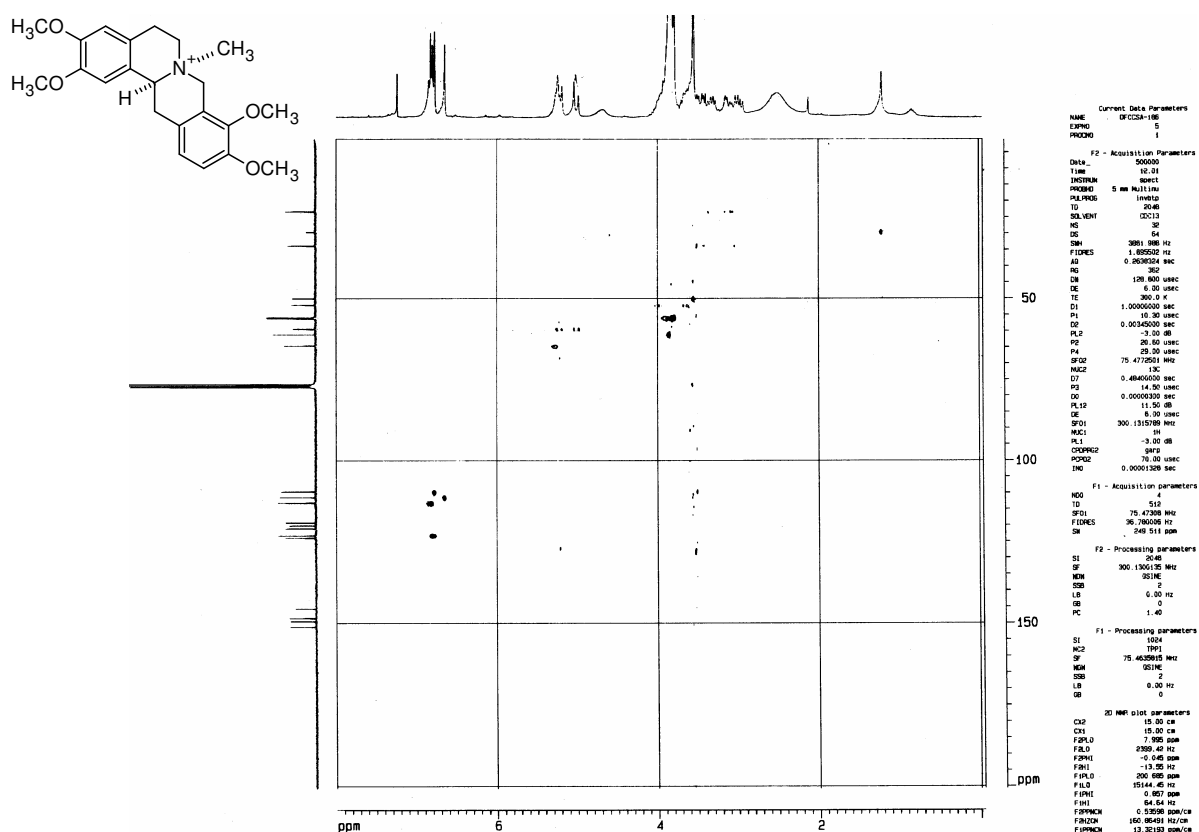
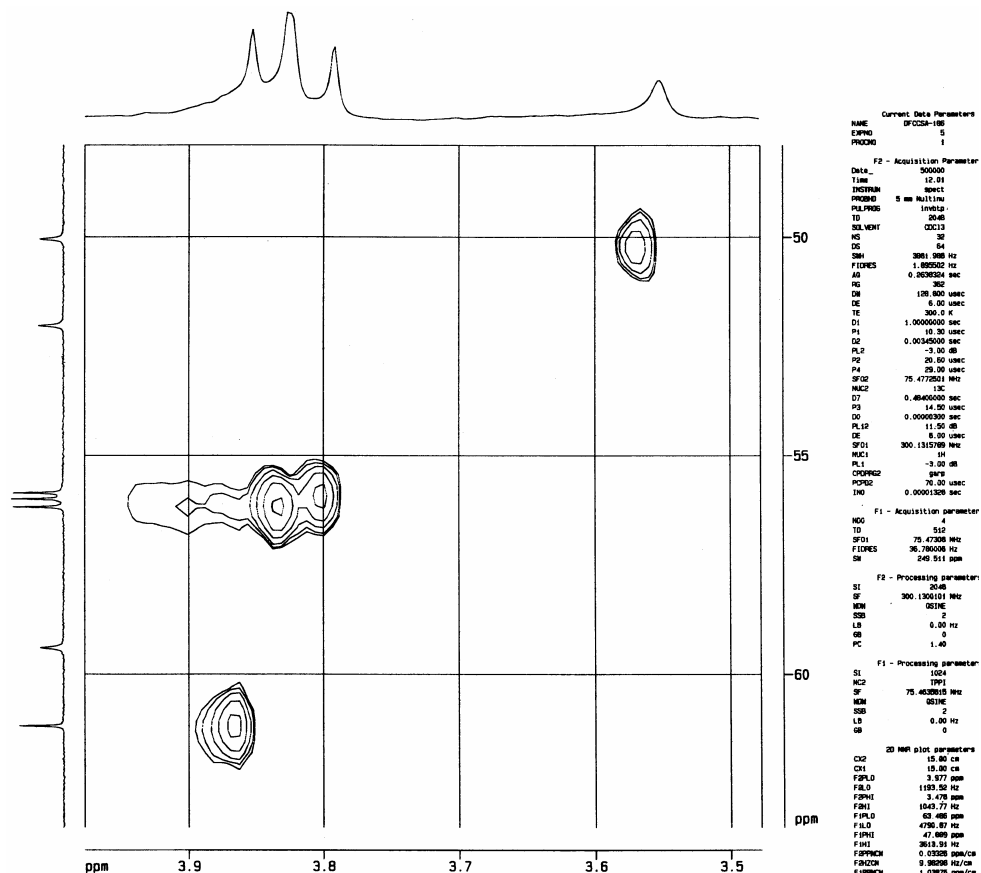


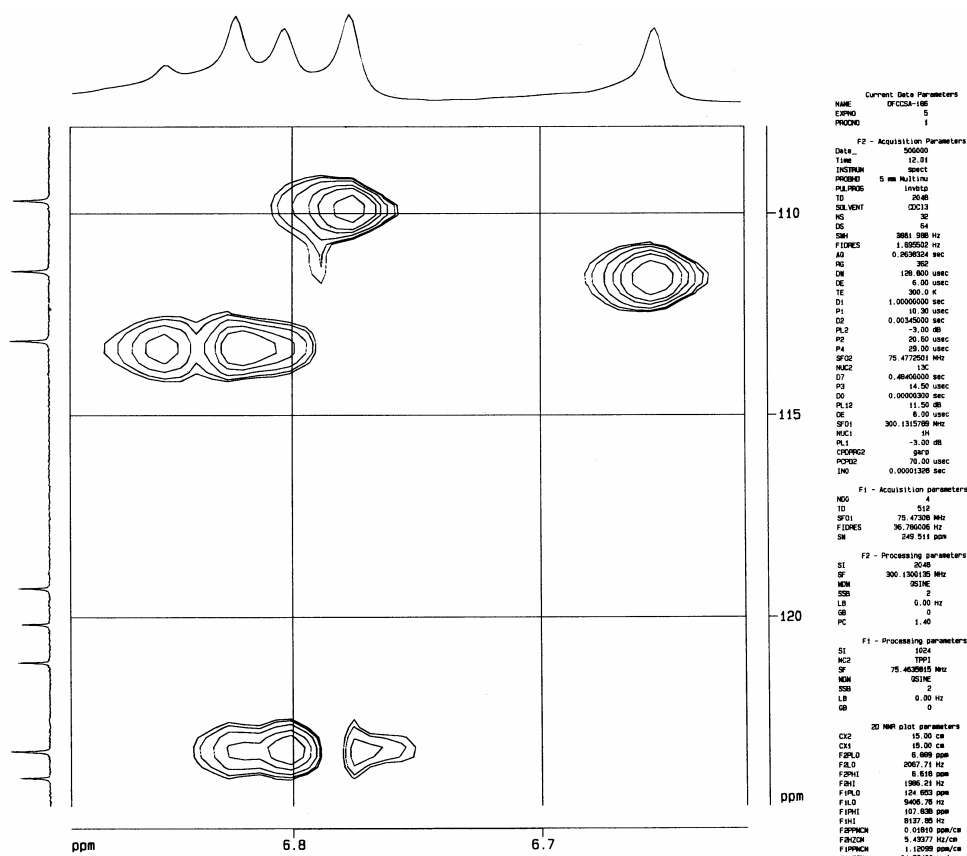
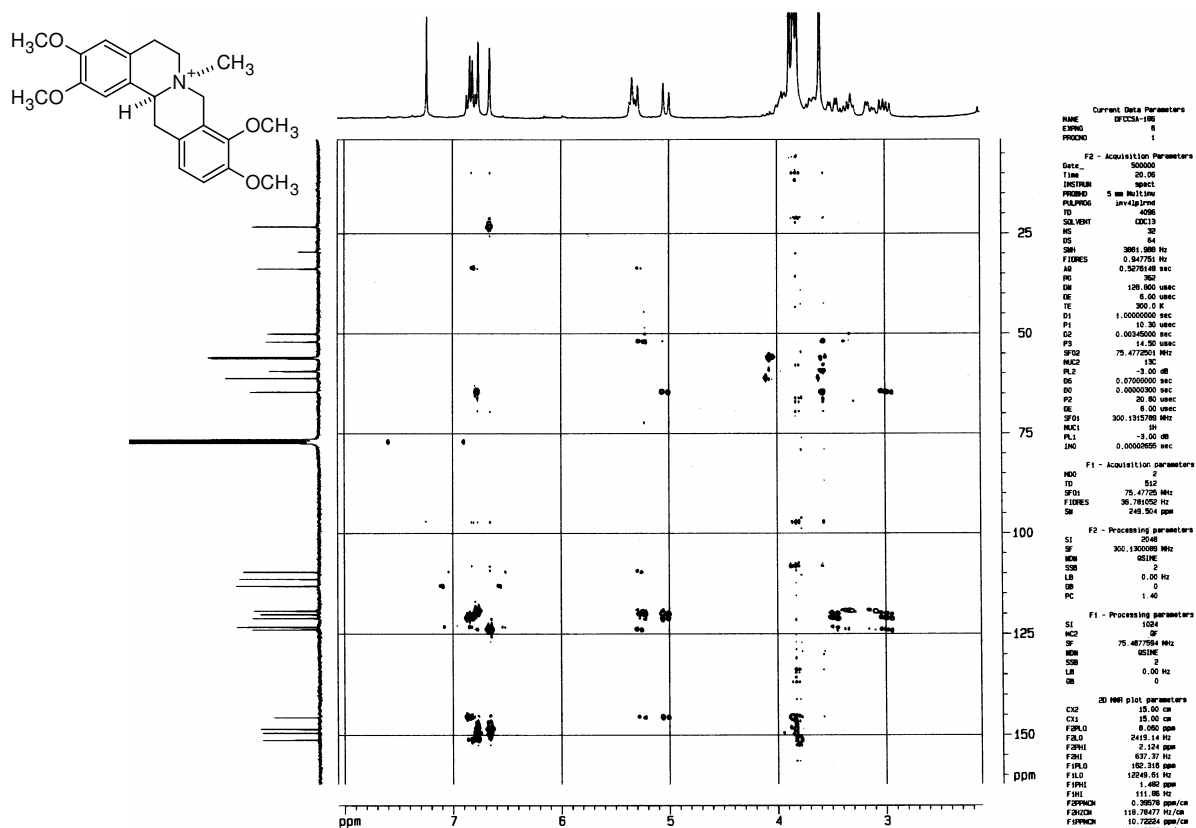


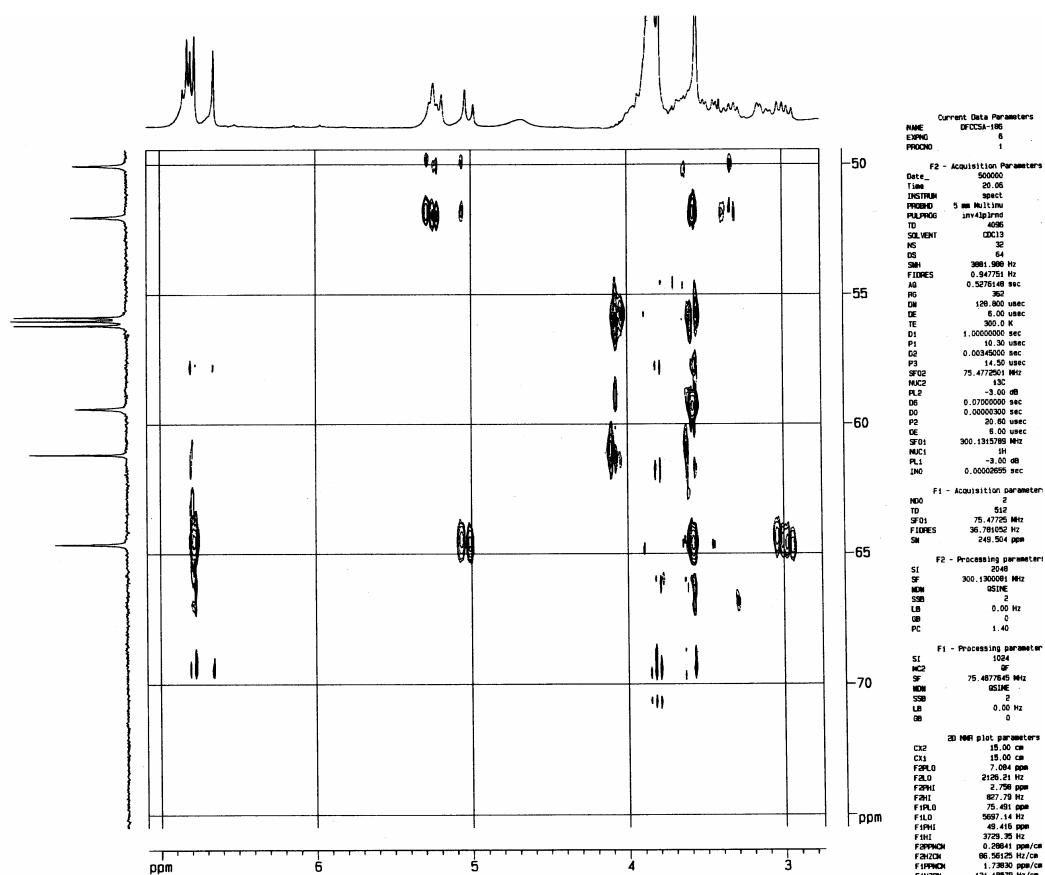
ESPECTRO 62 - Espectro de DEPT 135° de **12** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl₃)



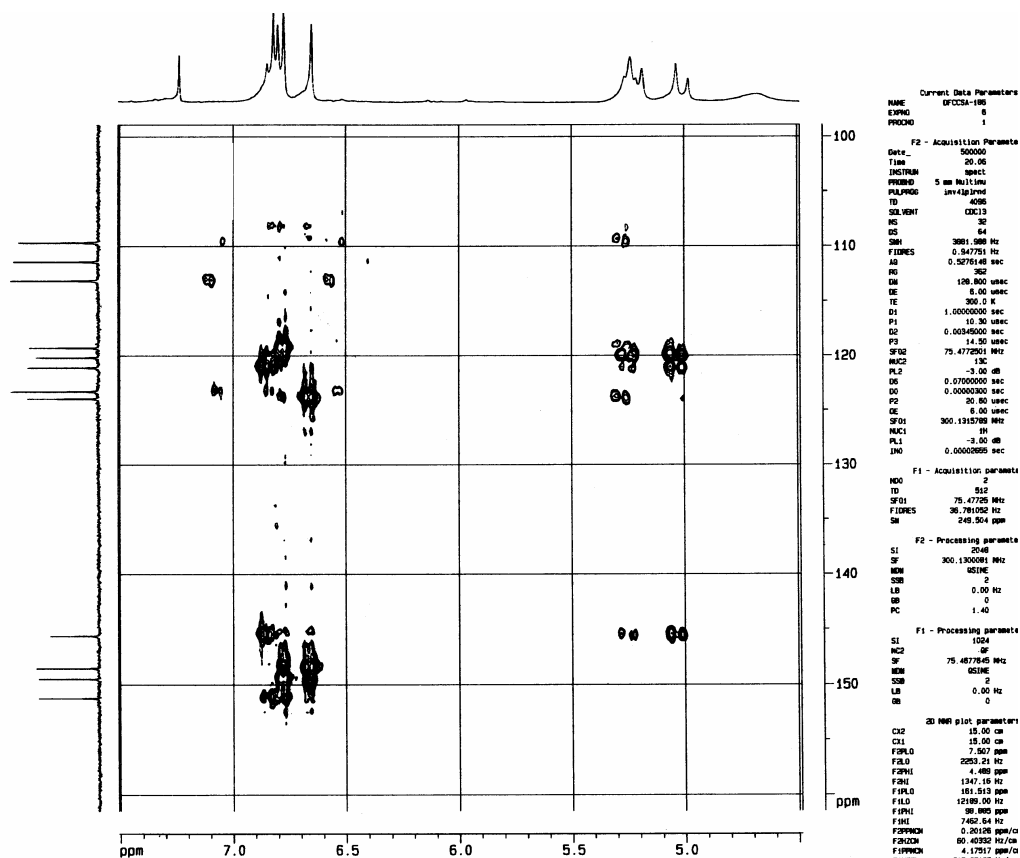
ESPECTRO 63 - Espectro de DEPT 90° de **12** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl₃)

ESPECTRO 64 – Mapa de contornos HMQC de **12** (75 MHz, CDCl₃)ESPECTRO 65 - Ampliação HMQC de **12** na região entre δ_H 3,5-4 ppm

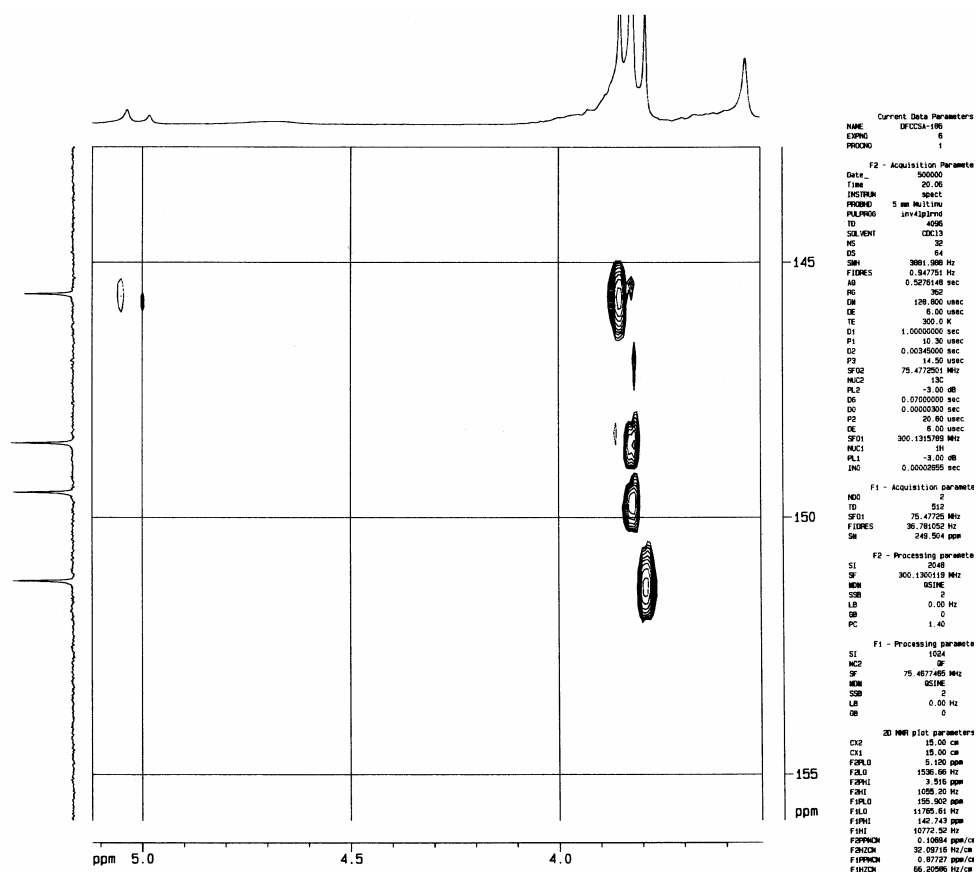
ESPECTRO 66 - Ampliação HMQC de 12 na região entre δ_H 6,6-6,9 ppmESPECTRO 67 - Mapa de contornos HMBC de 12 (75 MHz, $CDCl_3$)



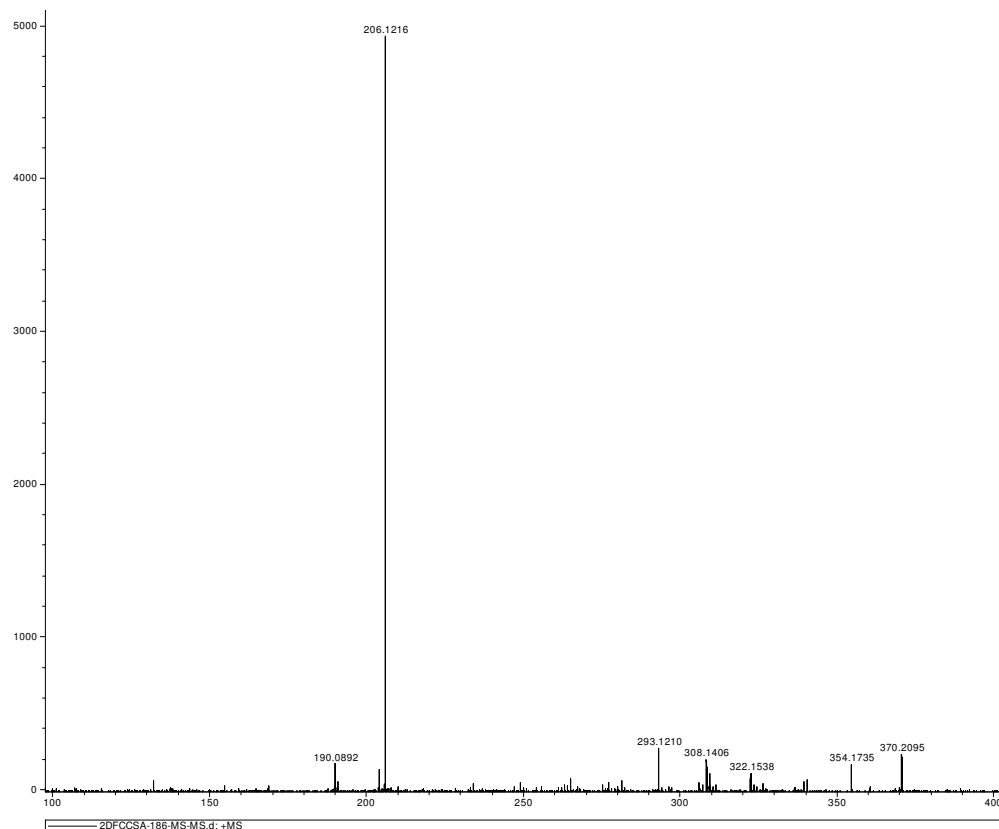
ESPECTRO 68 - Ampliação do HMBC de 12 na região entre δ_H 3-7 ppm



ESPECTRO 69 - Ampliação do HMBC de 12 na região entre δ_H 4,5-7,5 ppm

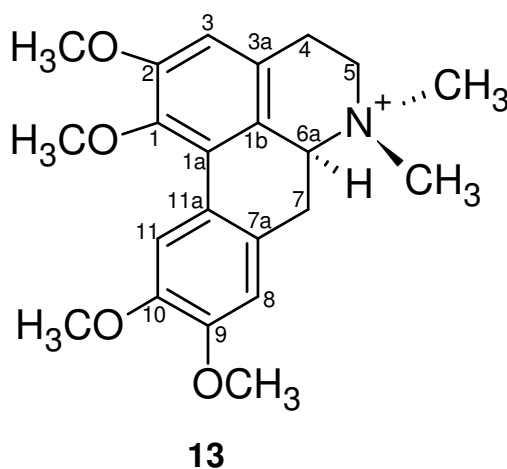


ESPECTRO 70 - Ampliação do HMBC de **12** na região entre δ_H 3,5-5 ppm



ESPECTRO 71 - ESIMS-MS do composto **12**

4.15 - (+)-*N*-metilglaucina (**13**)



O metabólito **13** foi isolado do grupo 11 do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo e, apresentou-se como um sólido amorfo marrom escuro, solúvel em CHCl_3 e MeOH .

No espectro de RMN ^1H de **13** (**Espectro 72**) foram observados três singletos em δ 6,63, 6,91 e 7,95 relativos a H_3 , H_8 e H_{11} , como também diversos sinais correspondentes aos hidrogênios alifáticos e singletos em δ 3,30, 3,65, 3,78, 3,84, 3,88 e 3,90 [**TABELA 48**]. Estes foram confirmados no espectro bidimensional HMQC (**Espectros 77, 78 e 79**) como sendo relativos aos carbonos em δ 43,3, 60,5, 54,16, 56,1, 56,0 e 56,0, respectivamente [**TABELA 50**], portanto, exceto o primeiro, são compatíveis com grupos metoxílicos.

O espectro de RMN ^{13}C (**Espectros 73 e 74**) revelou a presença de doze sinais referentes aos carbonos aromáticos sendo que quatro destes encontraram-se mais desprotegidos (δ 145,8, 148,5, 149,0 e 154,0) indicando serem oxigenados, também se observou sinais de carbonos alifáticos em δ 24,2, 29,5, 61,2 e 69,9, sendo os três primeiros referentes a grupos metilênicos e o último a um grupo metínico [**TABELA 49**]. As análises dos espectros de DEPT 90° (**Espectro 76**) e DEPT 135° (**Espectro 75**) permitiram a confirmação de que os sinais em δ 43,3 e 54,2 são de carbonos metílicos e, como temos apenas quatro carbonos aromáticos oxigenados propôs-se que estejam ligados diretamente a um nitrogênio quaternário. Portanto, verificou-se a presença de seis carbonos metílicos, três metilênicos, quatro metínicos e nove carbonos quaternários, que é condizente com o esqueleto aporfínico *sensu stricto* com duas metilas ligadas ao nitrogênio, sendo que o sinal em δ 4,37

(dl), correspondente a hidrogênio ligado ao carbono δ 69,9, atribuído a posição 6a, reforça a proposição de tratar-se de um alcalóide quaternário.

Os dados de RMN ^1H e ^{13}C indicaram um padrão de substituição idêntico ao do alcalóide glaucina, exceto pela metila adicional ligada ao nitrogênio. Os dados de RMN ^{13}C são compatíveis com os efeitos esperados pela quaternização no nitrogênio, como a desproteção de C_5 e C_{6a} e proteção de C_{1b} , C_{3a} , C_7 e C_{7a} quando comparados com os deslocamentos dos mesmos carbonos no alcalóide glaucina [FIGURA 21] [GUINAUDEAU *et al.*, 1983].

A estereoquímica de C_{6a} foi estabelecida através de sua rotação específica ($[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +34,92$) que por ser dextrógira, permite concluir que o mesmo pertence à série *S* e, portanto tem configuração relativa de C_{6a} como indicada na estrutura [CAVÉ *et al.*, 1987].

TABELA 48 – Dados de RMN ^1H (δ) de **13** e *N*-metilglaucina

H	13 (δ)^a	<i>N</i>-metilglaucina [GUINAUDEAU <i>et al.</i> , 1983] ^b
3	6,63 (s)	6,88 (s)
4	3,01-2,97 (m)	nc
5	4,63 (dd) e 3,71-3,65 (m)	nc
6a	4,37 (dl, $J = 13,2$ Hz)	nc
7	2,92 (dd, $J = 13,2$ e $13,7$ Hz) e 3,35 (dd, $J = 3,7$ e $9,7$ Hz)	nc
8	6,91 (s)	7,04 (s)
11	7,95 (s)	7,95 (s)
N-CH ₃	3,30 (s)	3,09 (s)
N-CH ₃	3,78 (s)	3,47 (s)
OCH ₃ (C ₁)	3,65 (s)	3,68 (s)
OCH ₃ (C ₂)	3,88 (s)	3,89 (s)
OCH ₃ (C ₉)	3,90 (s)	3,83 (s)
OCH ₃ (C ₁₀)	3,84 (s)	3,89 (s)

^a (300 MHz, CDCl₃); ^b (200 MHz, CD₃OD); δ das metoxilas foram confirmados no espectro de HMBC; nc: não citado pelo autor.

TABELA 49 - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **13** e *N*-metilglaucina

C	13 (δ) ^a	<i>N</i> -metilglaucina [MARSAIOLI <i>et al.</i> , 1979] ^b
1	145,8	145,6
1a	127,8	127,7
1b	118,9	118,6
2	154,0	153,9
3	110,2	110,2
3a	124,5	124,1
4	24,2	24,3
5	61,2	61,4
6a	69,9	70,3
7	29,5	29,5
7a	124,3	124,0
8	111,2	111,4
9	149,0	148,8
10	148,5	148,2
11	111,6	111,4
11a	123,1	123,0
N-CH ₃	43,3	44,0
N-CH ₃	54,2	54,8
OCH ₃ (C ₁)	60,5	60,5
OCH ₃ (C ₂)	56,0	55,7
OCH ₃ (C ₉)	56,0	56,1
OCH ₃ (C ₁₀)	56,1	56,1

^a (75 MHz, CDCl₃); ^b (25,2 MHz, CDCl₃ e CD₃OD)

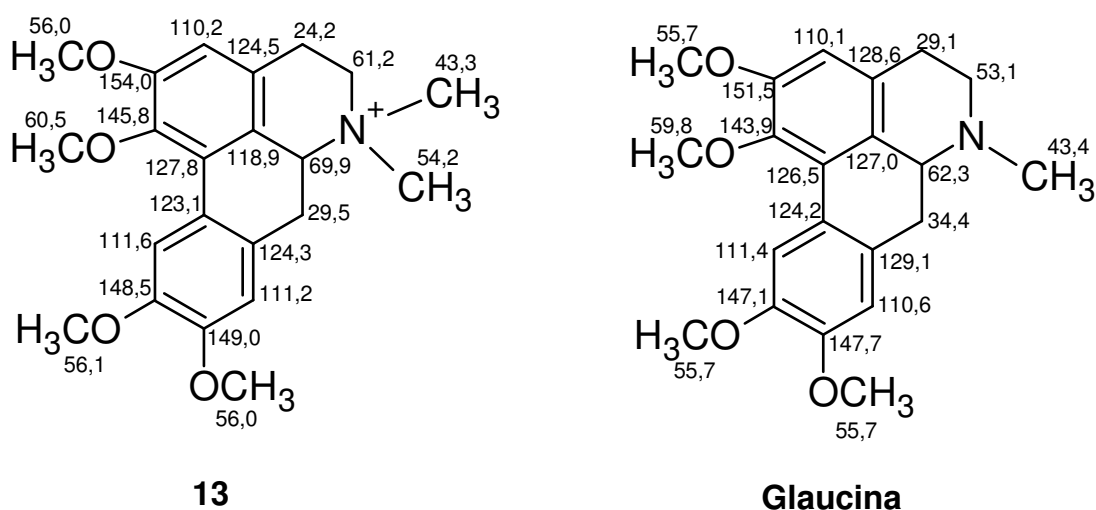


FIGURA 21 - Comparação entre os dados de RMN ¹³C de **13** com glaucina

TABELA 50 – Correlações entre carbonos e hidrogênios obtidos através do mapa de contorno HMQC do composto **13** (75 MHz, CDCl₃)

C/H	¹³ C (δ)	¹ H (δ)
3	110,2	6,63 (s)
4	24,2	3,01-2,97 (m)
5	61,2	4,63 (dd) e 3,71-3,65 (m)
6a	69,9	4,37 (dl)
7	29,5	2,92 (dd) e 3,35 (dd)
8	111,2	6,91 (s)
11	111,6	7,95 (s)
N-CH ₃	43,3	3,30 (s)
N-CH ₃	54,2	3,78 (s)
OCH ₃	56,0	3,90 (s)
OCH ₃	56,0	3,88 (s)
OCH ₃	56,1	3,84 (s)
OCH ₃	60,5	3,65 (s)

Com o espectro bidimensional HMBC (**Espectros 80, 81 e 82**) a estrutura do composto **13** pôde ser confirmada, pois foram observadas importantes correlações como C₅ (δ 61,2) com os hidrogênios das metilas ligadas ao nitrogênio em δ 3,30 e 3,78, bem como a correlação entre C₇ (δ 29,5) com H₈ (δ 6,91). As outras correlações estão descritas na **Figura 22** e **Tabela 51**.

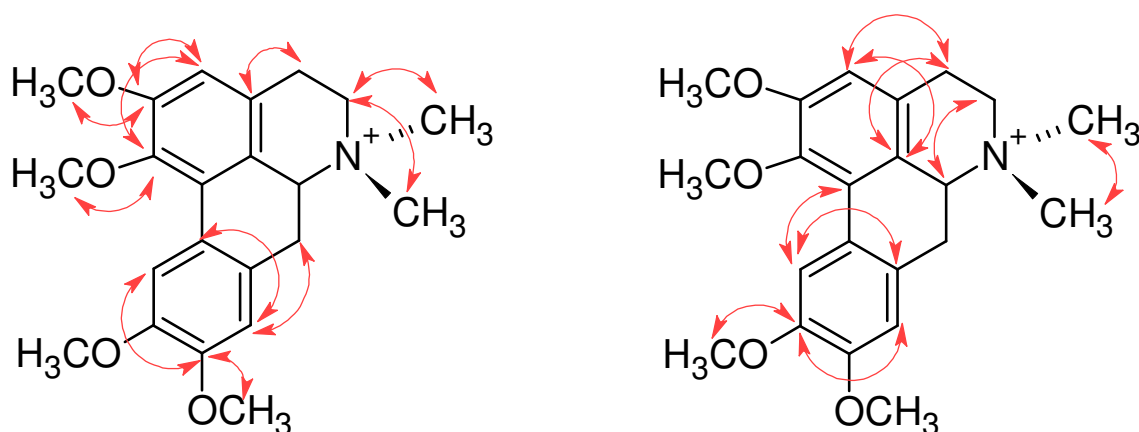


FIGURA 22 – Correlações observadas no mapa de contornos HMBC de **13**

TABELA 51 – Correlações entre carbonos e hidrogênios obtidos através do mapa de contorno HMBC do composto **13** (75 MHz, CDCl₃)

¹³ C (δ)	¹ H (δ)
C ₁ (145,8)	H ₃ (6,63), OCH ₃ (3,65)
C _{1a} (127,8)	H ₁₁ (7,95)
C _{1b} (118,9)	H ₃ (6,63), H ₄ (3,01-2,97)
C ₂ (154,0)	H ₃ (6,63), OCH ₃ (3,88)
C _{3a} (124,5)	H ₄ (3,01-2,97)
C ₄ (24,2)	H ₃ (6,63)
C ₅ (61,2)	N-CH ₃ (3,30), N-CH ₃ (3,78)
C _{6a} (69,9)	H ₅ (3,71-3,65)
C ₇ (29,5)	H ₈ (6,91)
C _{7a} (124,3)	H ₁₁ (7,95)
C ₉ (149,0)	H ₁₁ (7,95), OCH ₃ (3,90)
C ₁₀ (148,5)	H ₈ (6,91), OCH ₃ (3,84)
C _{11a} (123,1)	H ₈ (6,91)
N-CH ₃ (54,2)	N-CH ₃ (3,30)

O espectro de massas de baixa resolução de **13** (**Espectro 83**), obtido por impacto eletrônico, exibiu o pico do íon pseudomolecular em m/z 369,4 $[M-H]^+$ e confirmou ser o alcalóide proposto ($C_{22}H_{28}NO_4$), já que este íon, formado pela perda de um hidrogênio, é característico de alcalóides aporfínicos. Os fragmentos em m/z 352,9 e 338,2 são formados através da perda das metilas, o que confirma os substituintes ligados ao nitrogênio. Também se visualizou os picos em m/z 311,1 e 57,9 (pico base), formados através de uma fragmentação tipo retro Diels-Alder que é compatível com o esqueleto aporfínico contendo quatro metoxilas [**FIGURA 23**].

A comparação entre os dados espectrais do composto **13** com os citados na literatura, juntamente com a interpretação dos espectros bidimensionais e de massas, permitiu-nos concluir que a substância isolada trata-se da (+)-*N*-metilglaucina [GUINAUDEAU *et al.*, 1983; MARSAIOLI *et al.*, 1979]. Este alcalóide ainda não havia sido relatado em nenhuma espécie de Annonaceae, portanto seu isolamento foi importante para a ampliação do conhecimento fitoquímico de Annonaceae e da espécie *Duguetia furfuracea*.

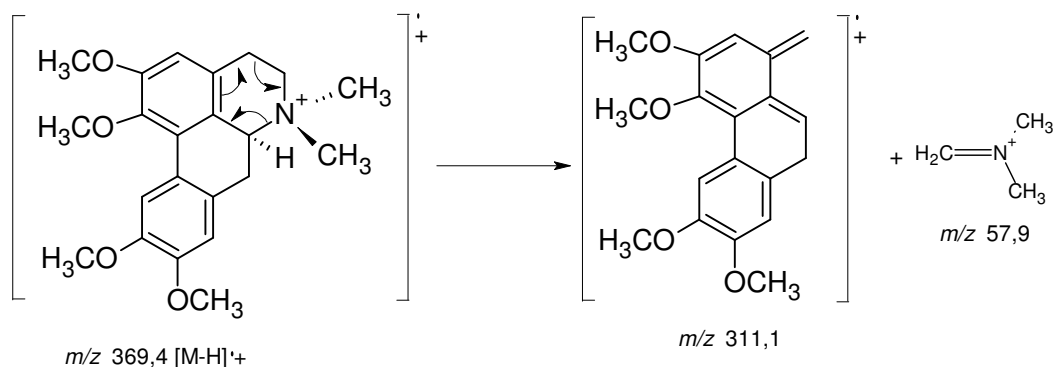
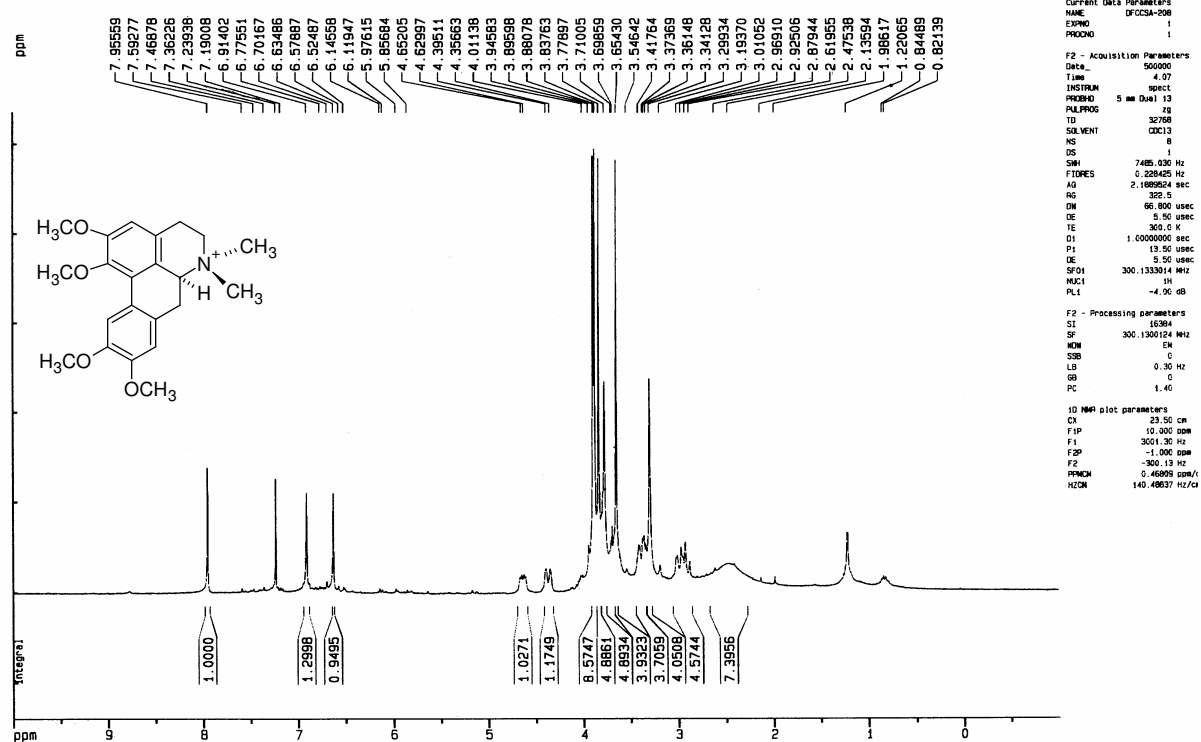
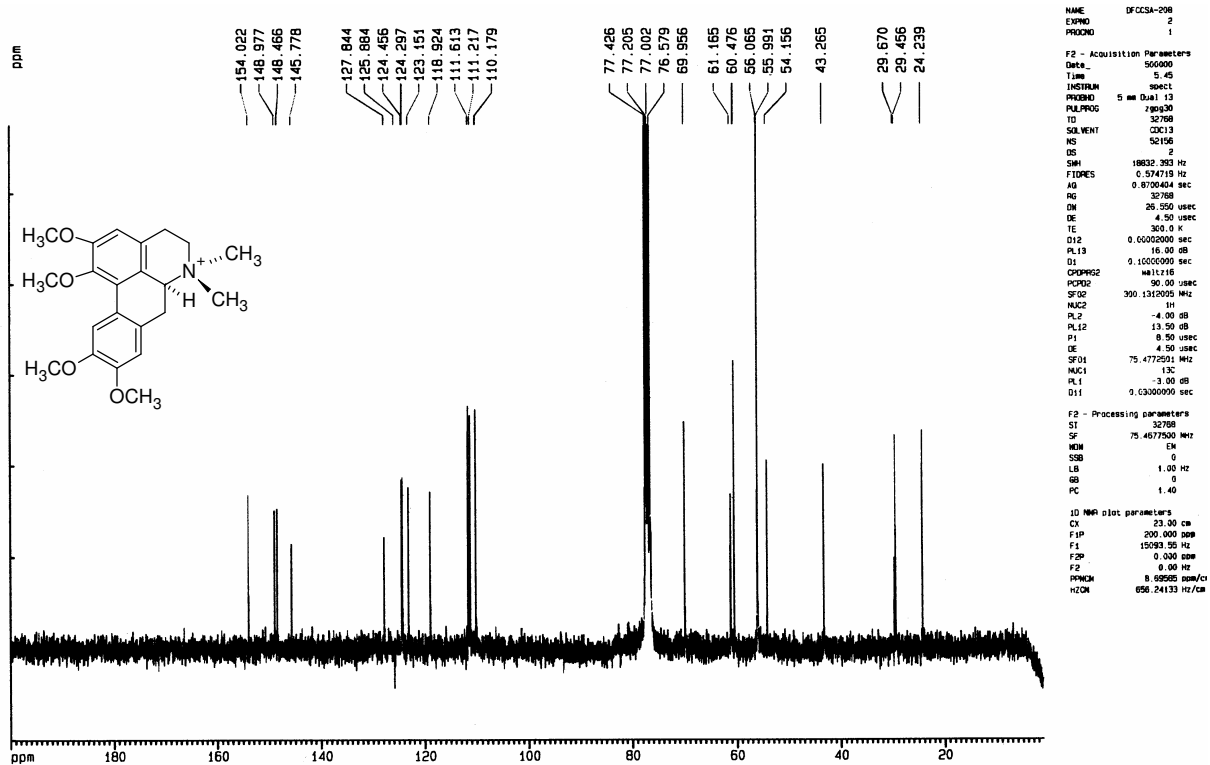


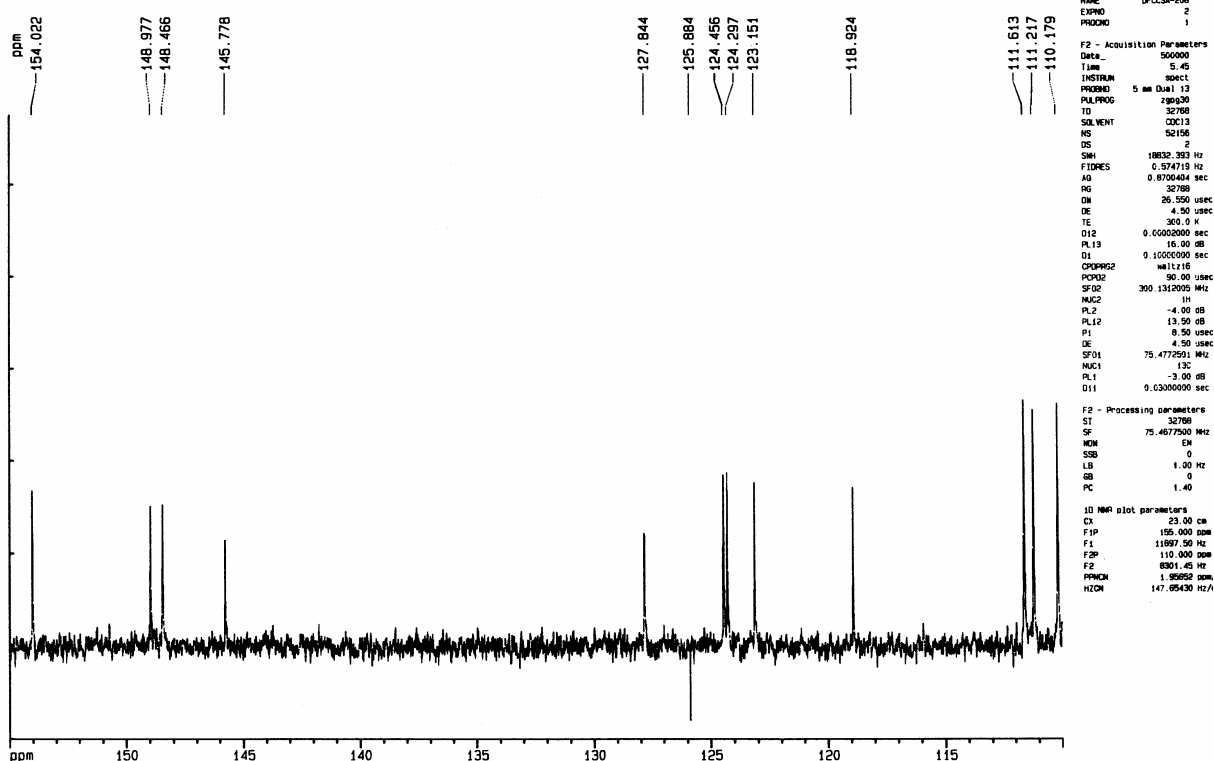
FIGURA 23 – Fragmentação tipo retro Diels-Alder de **13**



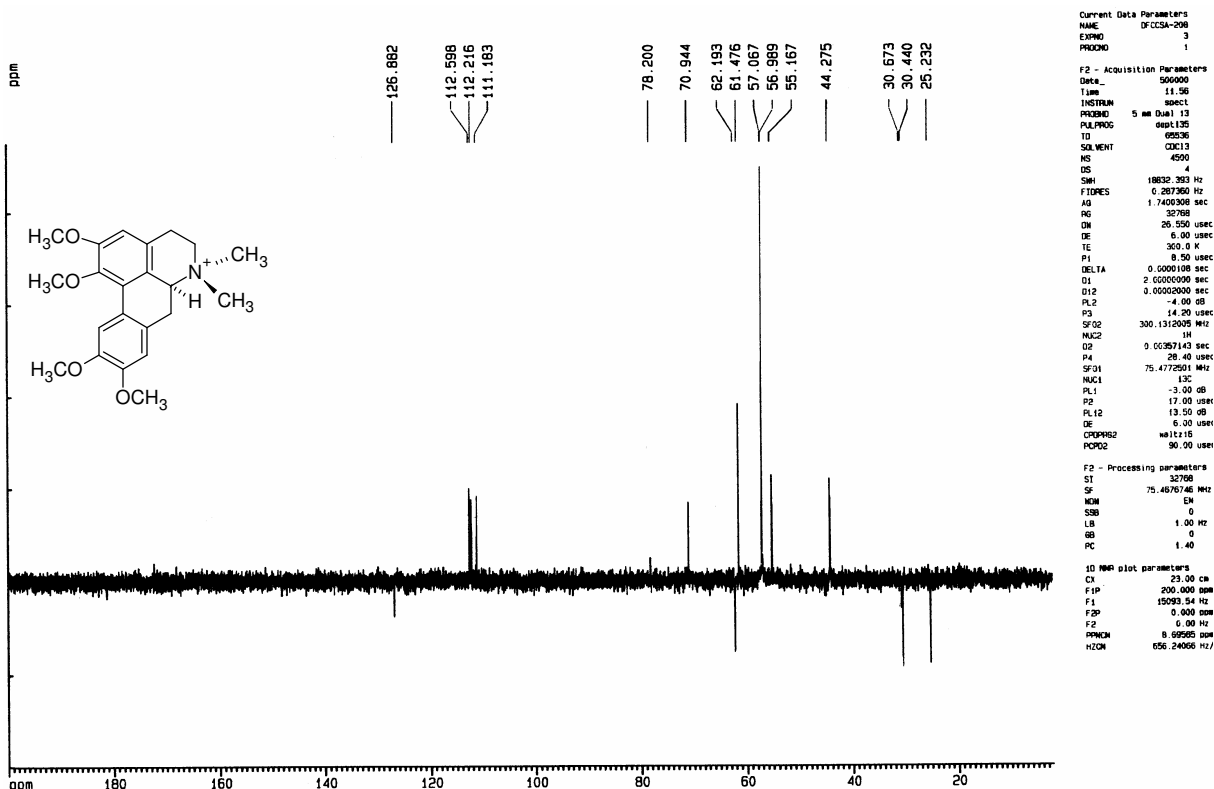
ESPECTRO 72 - Espectro de RMN ^1H de **13** entre 0-10 ppm (300 MHz, CDCl_3)



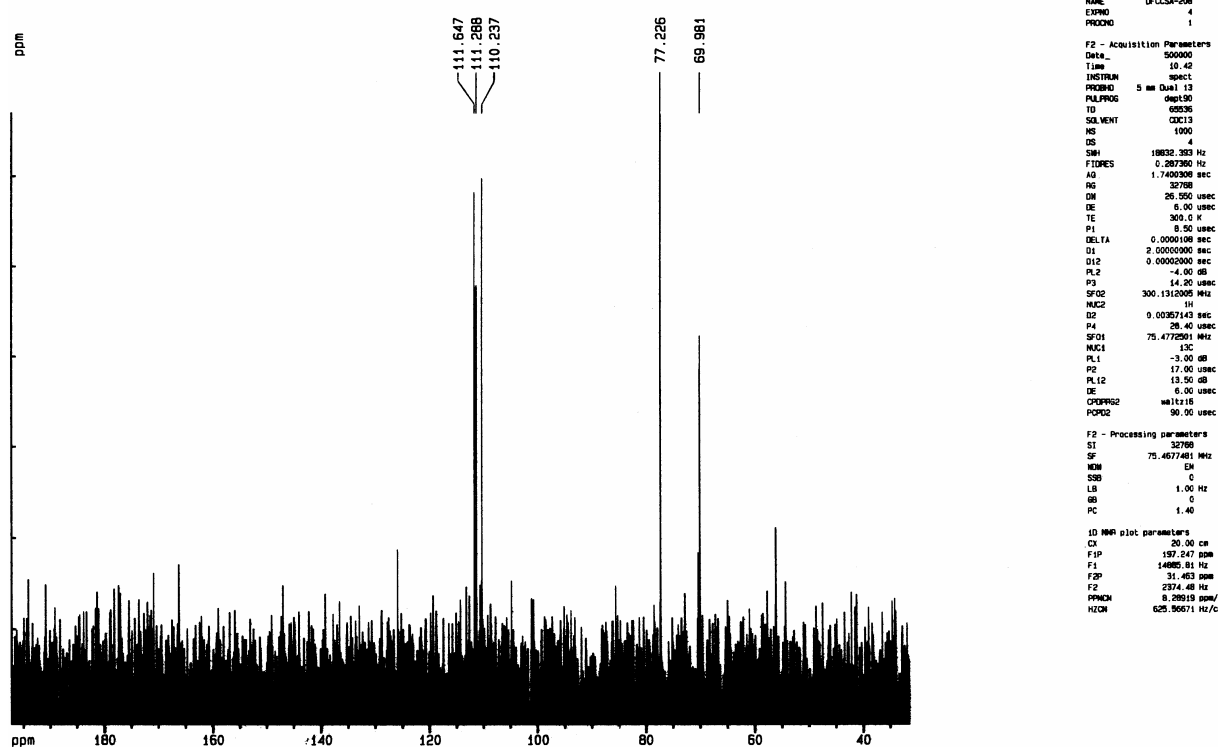
ESPECTRO 73 - Espectro de RMN ^{13}C de **13** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)



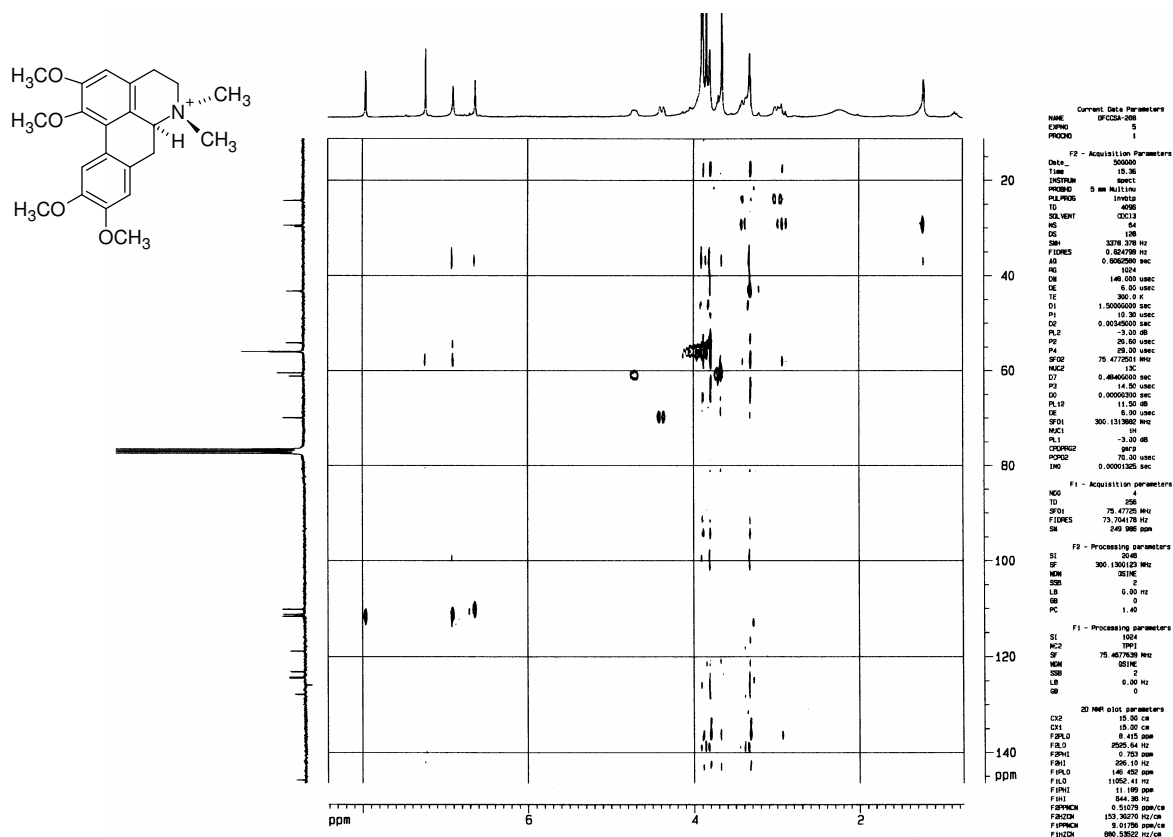
ESPECTRO 74 - Expansão do espectro de RMN ^{13}C de **13** entre 110-155 ppm



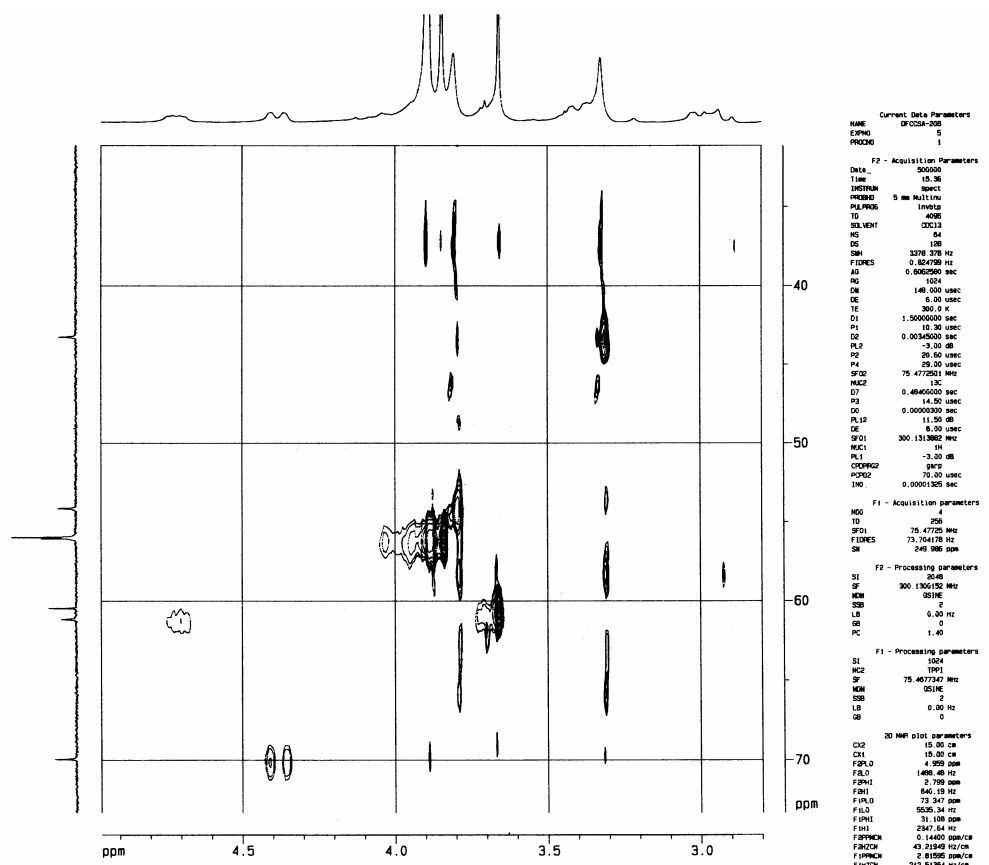
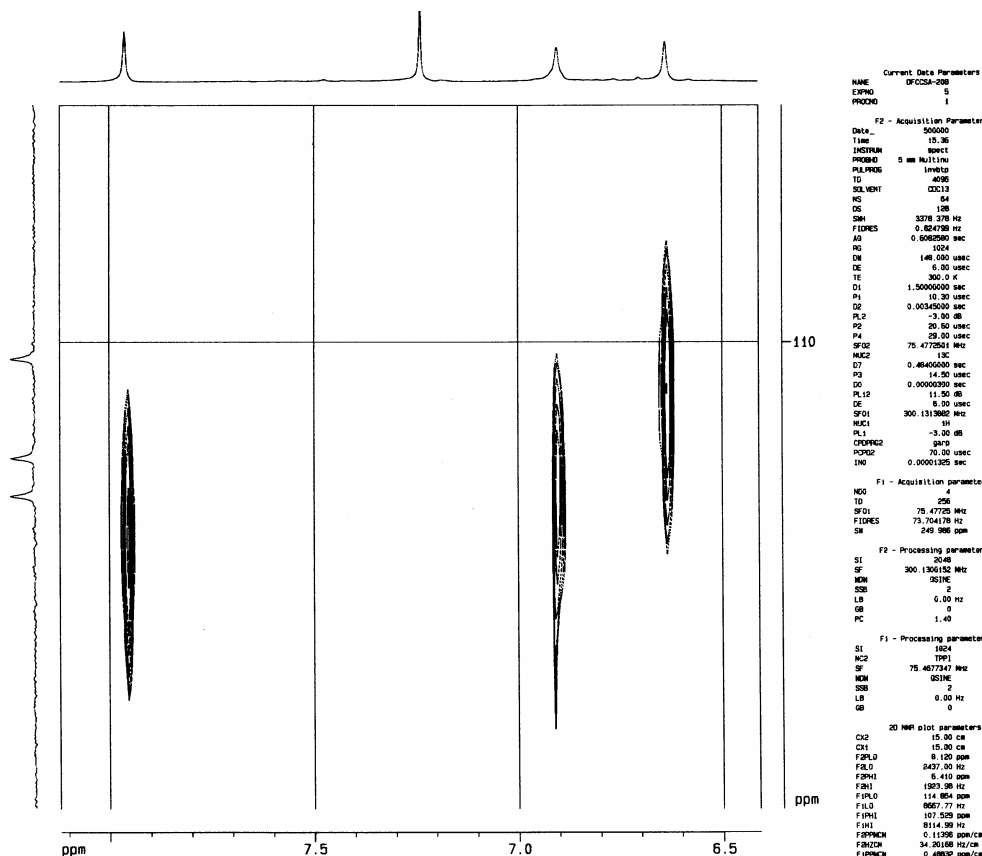
ESPECTRO 75 - Espectro de DEPT 135° de **13** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)

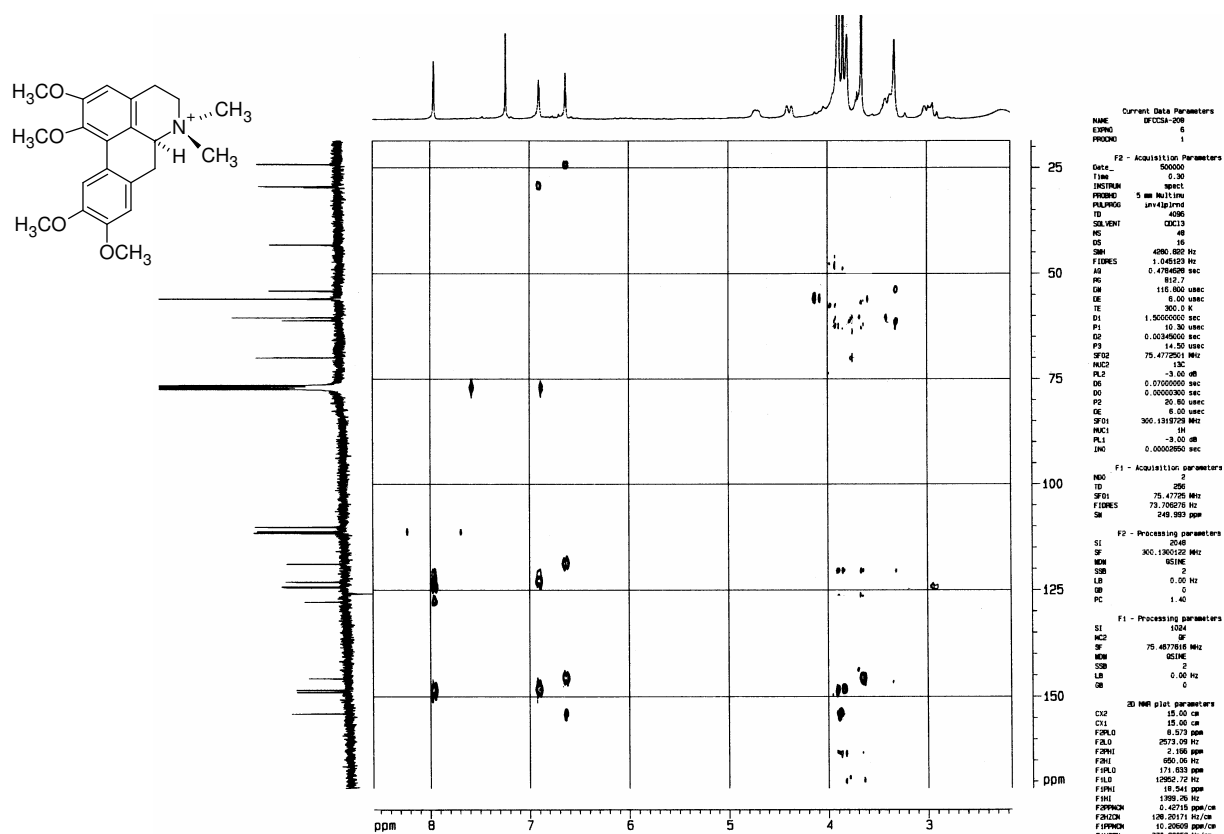
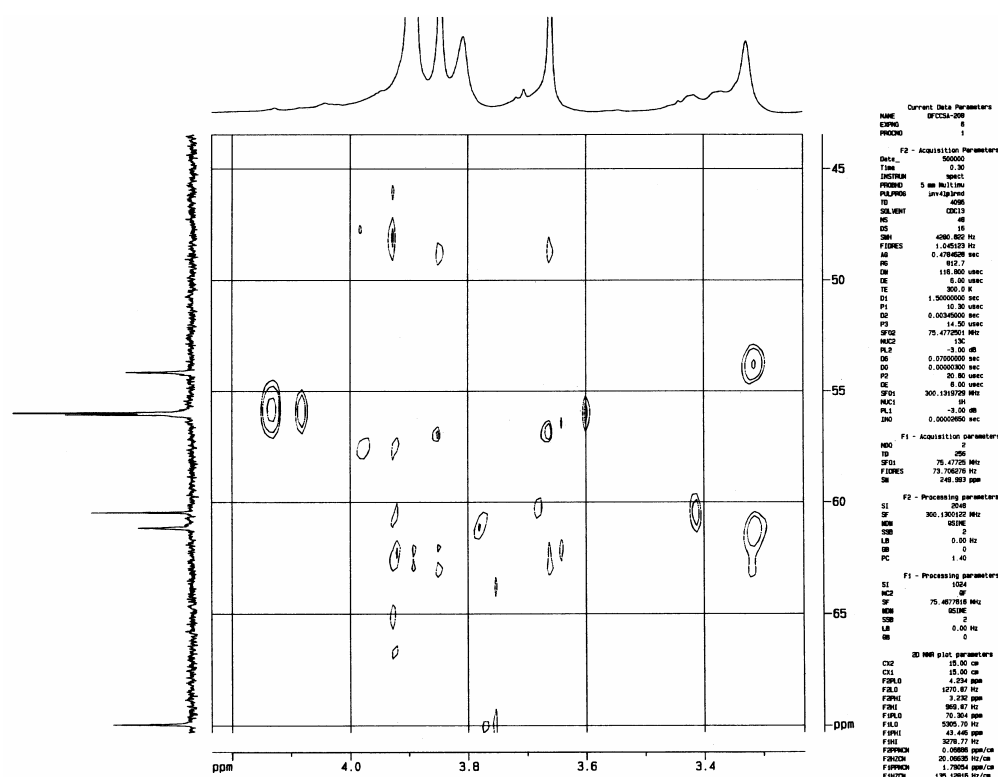


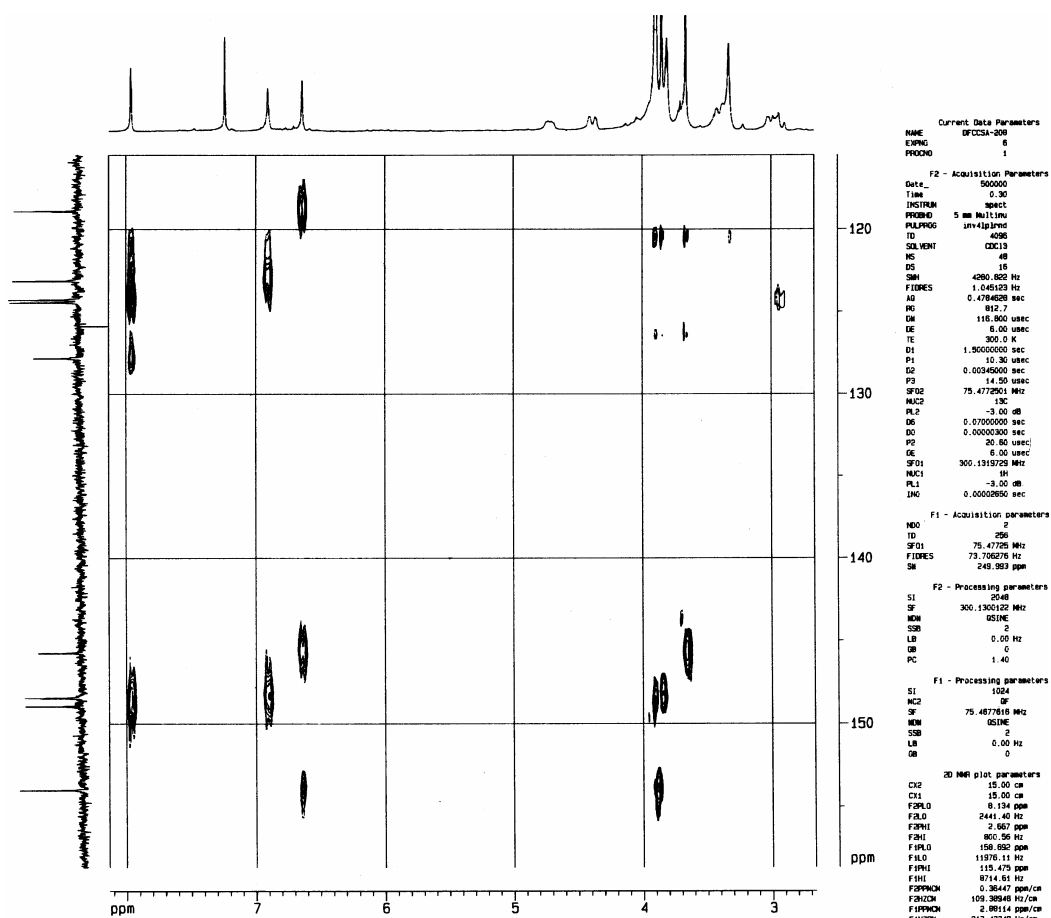
ESPECTRO 76 - Espectro de DEPT 90° de **13** entre 30-200 ppm (75 MHz, CDCl₃)



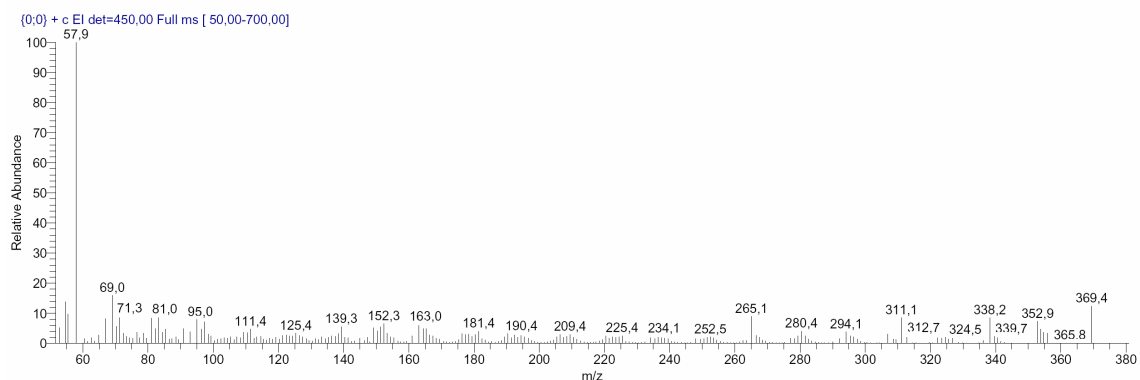
ESPECTRO 77 - Mapa de contornos HMBC de **13** (75 MHz, CDCl₃)

ESPECTRO 78 - Ampliação do HMQC de 13 na região entre δ_H 2,8-5 ppmESPECTRO 79 - Ampliação do HMQC de 13 na região entre δ_H 6,5-8 ppm

ESPECTRO 80 - Mapa de contornos HMBC de **13** (75 MHz, CDCl₃)ESPECTRO 81 - Ampliação do HMBC de **13** na região entre δ_H 3,3-4,2 ppm

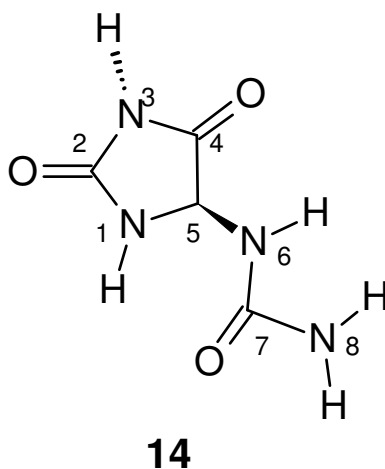


ESPECTRO 82 - Ampliação do HMBC de **13** na região entre δ_H 2,7-8 ppm



ESPECTRO 83 – EM/IE do composto **13**

4.16 - Alantoína (14)



Este metabólito, obtido a partir do extrato etanólico do cerne, apresentou-se como cristais esbranquiçados, e em CCDS (FM: CHCl_3 : MeOH 50%, revelador: $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2$) exibiu apenas uma única mancha de coloração azulada.

O espectro de RMN ^1H de **14** (**Espectro 84**) revelou três singletos largos correspondentes aos grupos HN_1 (δ 10,56), HN_3 (δ 8,04) e H_2N_8 (δ 5,79) e dois dupletos em δ 5,21 e 6,92 com um J característico de 7,6 Hz, sendo relativos a H_5 e HN_6 , respectivamente [**TABELA 52**].

O espectro de RMN de ^{13}C (**Espectro 85**) exibiu sinais relativos a 4 carbonos, sendo que três estão na faixa de carbonos carbonílicos. Os sinais em δ 157,2 e 157,8, típicos de carbonila de carbamida, são referentes aos carbonos C_7 e C_2 , enquanto que o deslocamento observado em δ 173,9 refere-se a C_4 . Além desses, também observou-se um sinal em δ 62,7 relativo a C_5 , sendo este o único observado no espectro de DEPT 135° (**Espectro 86**) [**TABELA 53**].

Os dados espectrais obtidos de RMN de ^1H e ^{13}C para a substância **14** foram comparados com os dados encontrados na literatura para o ureídeo alantoína e, desta maneira, concluiu-se tratar da mesma substância [FERREIRA *et al.*, 2000].

TABELA 52 - Dados de RMN ^1H (δ) de **14** e alantoína

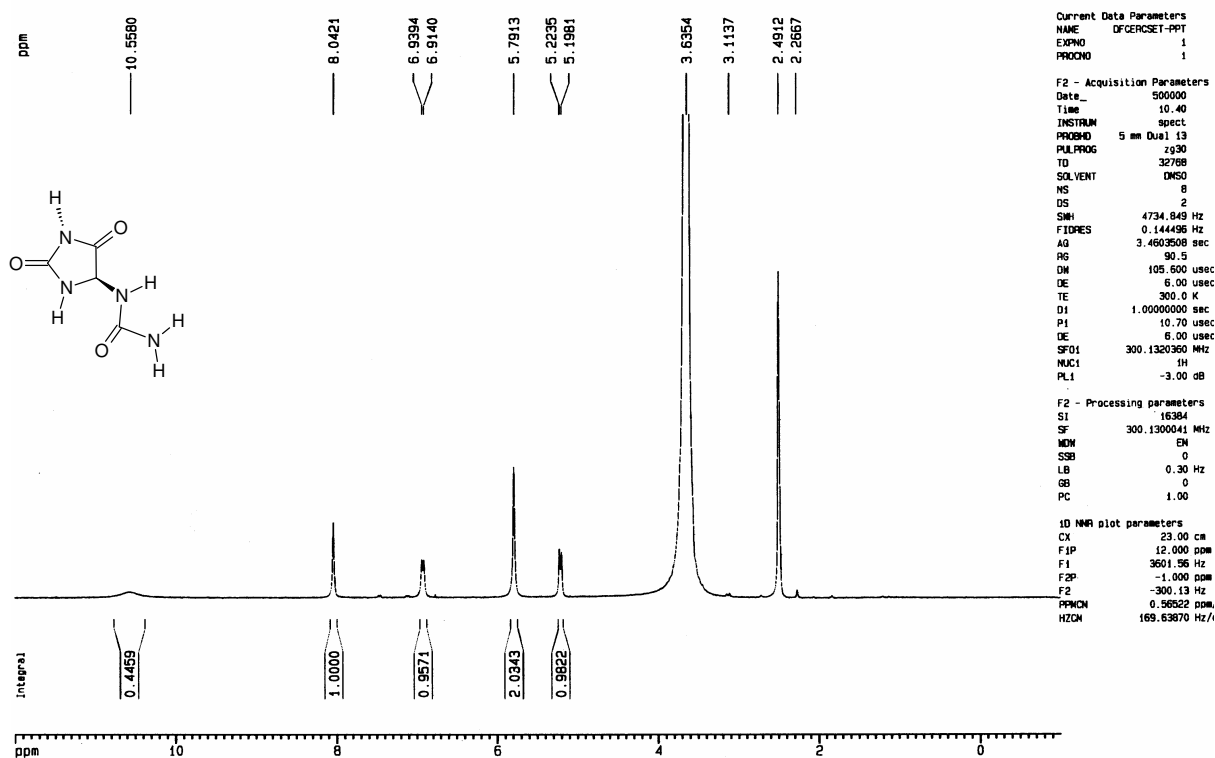
H	14 (δ) ^a	Alantoína [FERREIRA <i>et al.</i> , 2000] ^b
HN ₁	10,56 (s)	10,54 (s)
HN ₃	8,04 (s)	8,05 (s)
5	5,21 (d, $J = 7,6$ Hz)	5,21 (d, $J = 8,1$ Hz)
HN ₆	6,92 (d, $J = 7,6$ Hz)	6,91 (d, $J = 8,1$ Hz)
H ₂ N ₈	5,79 (s)	5,82 (s)

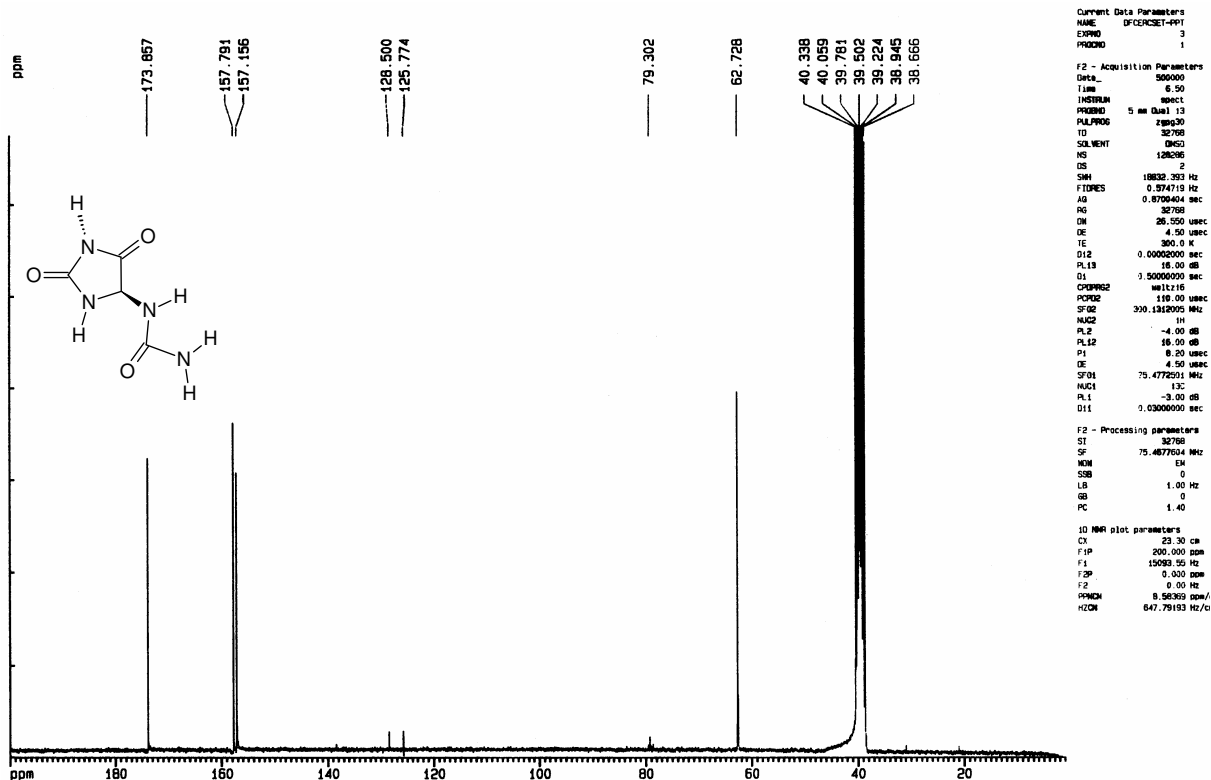
^a (300 MHz, DMSO- d_6); ^b (200 MHz, DMSO- d_6)

TABELA 53 - Dados de RMN ^{13}C (δ) de **14** e alantoína

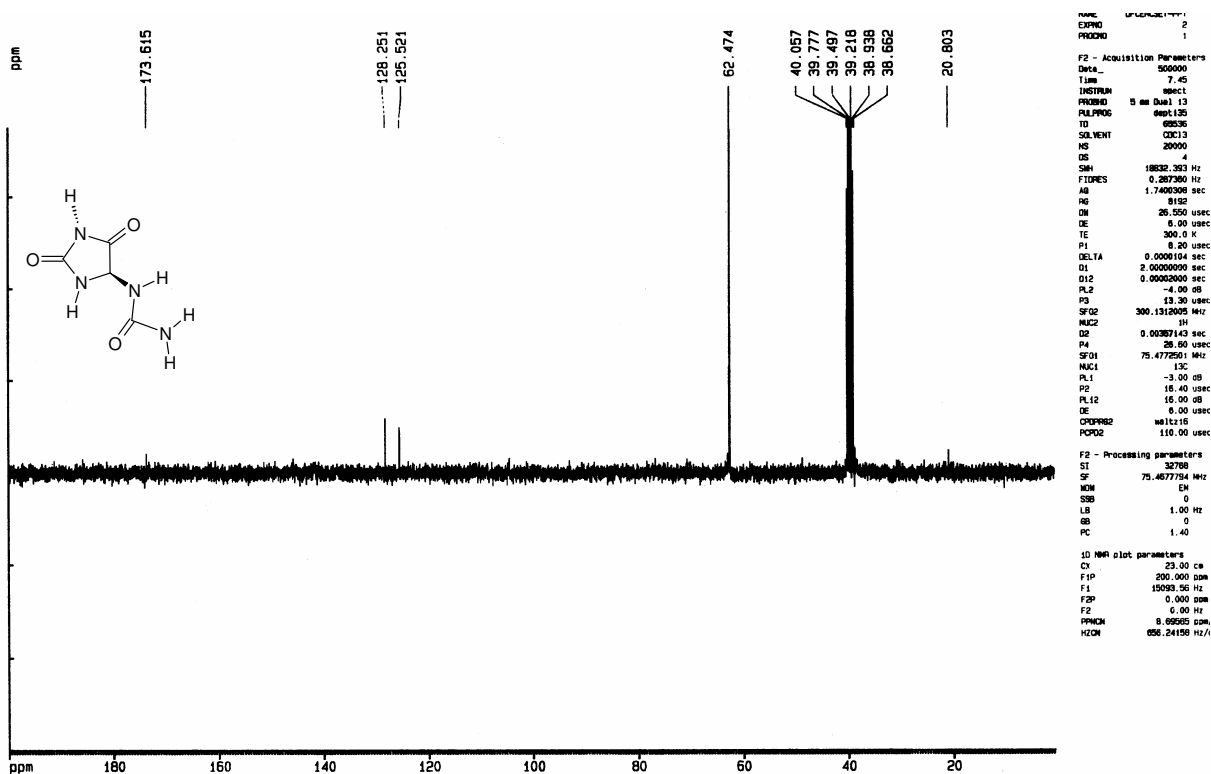
C	14 (δ) ^a	Alantoína [FERREIRA <i>et al.</i> , 2000] ^b
2	157,8	157,7
4	173,9	173,4
5	52,7	62,7
7	157,2	156,7

^a (75 MHz, DMSO- d_6); ^b (50 MHz, DMSO- d_6)

ESPECTRO 84 – Espectro de RMN ^1H de **14** entre 0-12 ppm (300 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 85 – Espectro de RMN ^{13}C de **14** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)



ESPECTRO 86 – Espectro de DEPT 135° de **14** entre 0-200 ppm (75 MHz, CDCl_3)

- Importância da alantoína

A alantoína é um importante metabólito pertencente à classe dos ureídeos, e juntamente com o ácido alantóico são considerados excelentes carreadores de nitrogênio, principalmente em leguminosas tropicais, como é o caso da soja [KAHN, 2000].

Os ureídeos são compostos utilizados para o transporte e armazenamento de nitrogênio [THOMAS, 1981]. Eles são enviados das raízes para as folhas, onde são metabolizados liberando o nitrogênio para a biossíntese de aminoácidos e desenvolvimento de vagens e frutos [WINKLER, 1998].

A alantoína possui atividade antiinflamatória, antiéptica, antipsoríase, antiúlcera, imunoestimulante e queratolítica, sendo muito utilizada em cosméticos [MARTINDALE, 1993; JOANNE, 1988].

Recentemente, foi observado o efeito alelopático de indução do crescimento de radículas de *Lactuca sativa* pela alantoína obtida a partir de *Memora peregrina*-planta invasora (Bignoniaceae), sugerindo uma correlação da presença deste metabólito em órgãos subterrâneos e a alta capacidade de crescimento vegetativo e disseminação dessas espécies invasoras [GRASSI et al., 2005]. Como foi isolado este composto em *Duguetia furfuracea* e em outras espécies invasoras, pode-se a partir disso estudar maneiras de controlar essas espécies, onde são consideradas invasoras, pois geralmente crescem em áreas de grande interesse econômico, sendo, portanto, indesejáveis [LORENZI, 2000].

Este metabólito está sendo descrito pela primeira vez na família Annonaceae e, portanto, também no gênero *Duguetia*. Ela é descrita como indutor da síntese de compostos de defesa em outra espécie vegetal, podendo ser um indicativo da sua utilização como protetor de plantas cultivadas em escala comercial [FERREIRA et al., 2000].

4.17 – Avaliação Alelopática

A possibilidade de existência de substâncias com atividade alelopática na porção subterrânea de *Duguetia furfuracea* foi proposta como parte deste trabalho em função da característica desta planta ser considerada infestante de pastagens, pois a agressividade no processo de infestação pode ter relação com a presença de substâncias alelopáticas [FERREIRA & AQUILA, 2000; GOSLEE *et al.*, 2001], como encontrado nas espécies invasoras cornichão (*Lotus corniculatus*) e trevo-branco (*Trifolium repens*) que tinham influência sobre a germinação e desenvolvimento de forragens na tentativa de formar monoculturas, como acontece com plantas invasoras [COELHO, 1986].

No bioensaio de germinação em sementes de *Lactuca sativa*, para a verificação de efeitos alelopáticos, foram avaliados parâmetros como germinação e desenvolvimento das plântulas, uma vez que estes são os testes considerados mais sensíveis ao efeito de substância alelopáticas [FERREIRA & AQUILA, 2000].

4.17.1 - Resultados obtidos na avaliação alelopática do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (DfcsOE)

- Germinação de sementes de *Lactuca sativa*

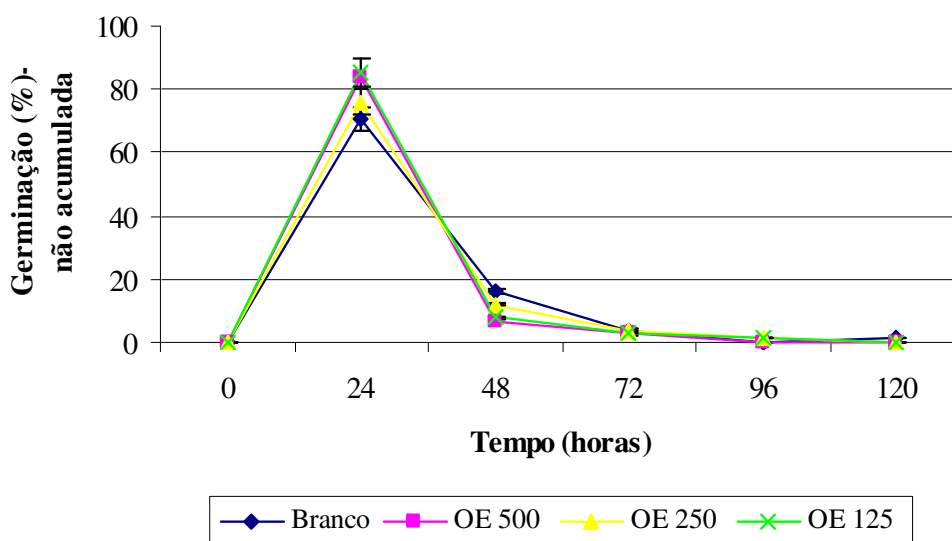
Ao analisar os percentuais de germinação observou-se que o óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfcsOE) não alterou a germinabilidade (percentual final de germinação) e, nem a distribuição da curva de germinação [TABELA 54] (Gráfico 1).

TABELA 54 – Percentuais de germinação acumulada de sementes de *L. sativa* no óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfecsOE) em comparação aos controles (branco e glifosato)

	<i>Germinação (%) - acumulada</i>				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1- Branco	71 a	87 a	91 a	91 a	92 a
2- DfecsOE 500 µg/mL	84 b	91 a	93 a	93 a	93 a
3- DfecsOE 250 µg/mL	76 a	88 a	92 a	93 a	93 a
4- DfecsOE 125 µg/mL	85 b	93 a	96 a	97 a	97 a
5- Glifosato 19.200 µg/mL	41 c	68 b	73 b	75 b	76 b
6- Glifosato 9.600 µg/mL	75 a	83 a	84 a	85 a	85 a
7- Glifosato 4.800 µg/mL	84 a	89 a	92 a	92 a	92 a

*Números seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (n = 75; p<0,05, ANOVA)

Gráfico 1 – Germinação, em percentuais não acumulados, de sementes de *L. sativa* promovida pelo óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfecsOE) em comparação ao branco



- Crescimento das radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa*

O óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfocsOE) apresentou grande estímulo do crescimento das radículas de *L. sativa* em uma relação dose dependente inversa. Observaram-se estímulos do crescimento de radículas de 45,0% e 71,1% em relação ao controle (branco) nas concentrações de, respectivamente, 250 e 125 $\mu\text{g/mL}$ e uma inibição do crescimento de radículas na maior concentração (**Gráfico 2**) [TABELA 55]. Este efeito é semelhante ao apresentado por reguladores do crescimento de plantas, que em baixas concentrações agem como hormônios de crescimento e, em altas concentrações, agem como herbicidas [YUNES & CALIXTO, 2001].

Além da variação no comprimento, observou-se nas plântulas a oxidação do ápice e, também uma menor espessura das radículas, essas alterações são comuns quando estão presentes substâncias alelopáticas [FERREIRA & AQUILA, 2000].

Gráfico 2 – Inibição/estimulação do crescimento de *L. sativa* promovido pelo óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfocsOE) sendo a linha de base representada pelo valor do branco (n = 75; p<0,05, ANOVA)

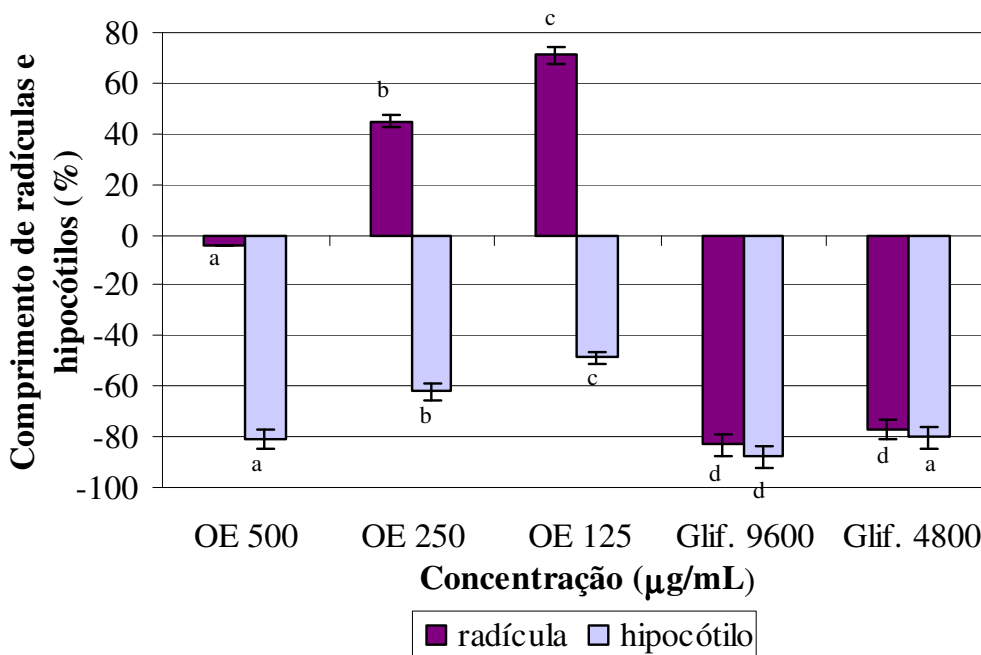


TABELA 55 – Efeito de inibição e estimulação do crescimento de *L. sativa* promovido por diferentes concentrações do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfcsOE) e pelo glifosato comparados ao branco

	<i>Radícula</i>		<i>Hipocótilo</i>	
	Estímulo (%)	Inibição (%)	Estímulo (%)	Inibição (%)
DfcsOE 500 µg/mL	-	4,0 a	-	81,0 a
DfcsOE 250 µg/mL	45,0 b	-	-	62,0 b
DfcsOE 125 µg/mL	71,1 c	-	-	48,5 c
Glifosato 9.600 µg/mL	-	83,2 d	-	87,7 d
Glifosato 4.800 µg/mL	-	77,2 d	-	80,4 a

*Números seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (n = 75; p<0,05, ANOVA)

A análise de CG/EM desse óleo essencial revelou como constituintes majoritários os compostos aromáticos, derivados da via do ácido chiquímico, 2,4,5-trimetoxi-estireno (29,2%) e asarona (23,9%), como também os sesquiterpenos biciclogermacreno (8,6%), *epi*-globulol (8,5%), delta-cadineno (4,8%) e espatulenol (4,7%). Muitos aleloquímicos ou agentes alelopáticos conhecidos são derivados das vias acetato e chiquímico, dentre eles destacam-se os terpenos, compostos fenólicos e alcalóides [YUNES & CALIXTO, 2001].

A deficiência de água, nutriente e a baixa fertilidade do solo podem ter um efeito sinérgico aumentando o potencial alelopático das espécies [FERREIRA, 2005]. Estas deficiências são típicas de solos de cerrado e, por esta razão, podem estar influenciando no efeito alelopático de *D. furfuracea*, fazendo com que concentrações baixas de possíveis aleloquímicos sejam potencializados.

4.17.2 - Resultados obtidos na avaliação alelopática do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (DfcsEP)

- Germinação de sementes de *Lactuca sativa*

O extrato éter de petróleo (DfecsEP) na concentração de 1000 µg/mL apresentou uma redução da germinabilidade (percentual final de germinação) de 20,0% quando comparado com o branco e, também causou uma redução da velocidade de germinação (**Gráfico 3**) [**TABELA 56**]. Já nas menores concentrações a germinabilidade não sofreu alteração.

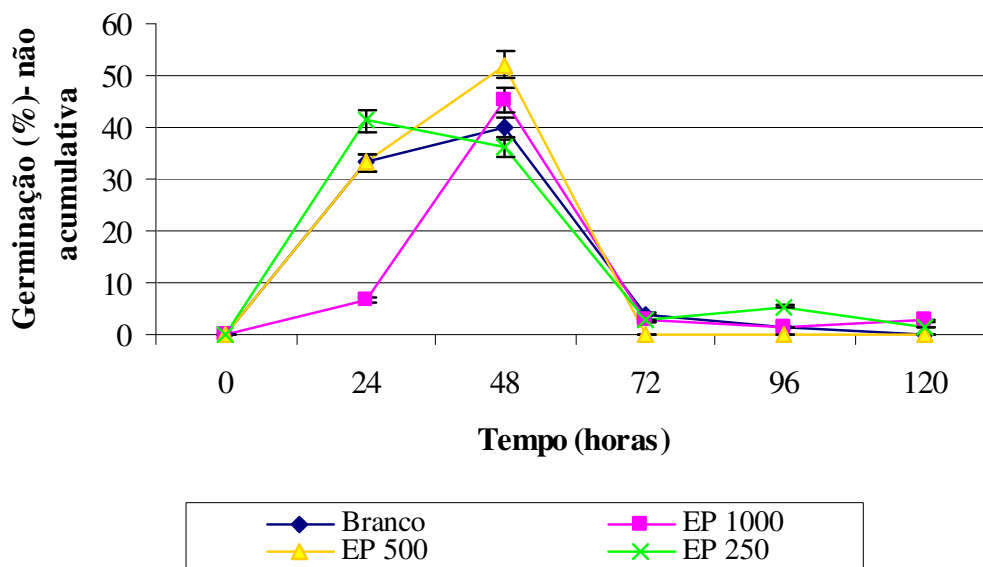
Essas alterações no padrão de germinação podem ocorrer devido aos efeitos sobre a permeabilidade de membranas, a transcrição e tradução do DNA, o funcionamento dos mensageiros secundários, a respiração por seqüestro de oxigênio (com fenóis), a conformação de enzimas e receptores ou por combinação desses fatores [FERREIRA & AQUILA, 2000].

TABELA 56 - Percentuais de germinação acumulada de sementes de *L. sativa* no extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfecsEP) em comparação aos controles (branco e glifosato)

	<i>Germinação (%) - acumulada</i>				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1- Branco	33 a	73 a	77 a	79 a	79 a
2- DfecsEP 1000 µg/mL	7 b	52 b	55 b	56 b	59 b
3- DfecsEP 500 µg/mL	33 a	85 c	85 c	85 a	85 a
4- DfecsEP 250 µg/mL	41 c	77 a	80 a	85 a	87 a
5- Glifosato 19.200 µg/mL	12 d	23 d	25 d	27 c	31 c
6- Glifosato 9.600 µg/mL	32 a	55 b	55 b	56 b	63 b
7- Glifosato 4.800 µg/mL	47 e	75 a	79 a	79 a	79 a

*Números seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (n = 75; p<0,05, ANOVA)

Gráfico 3 – Germinação, em percentuais não acumulados, de sementes de *L. sativa* promovida pelo extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfecsEP) em comparação ao branco



- Crescimento das radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa*

O extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfecsEP) causou um estímulo do crescimento das radículas com relação dose dependente inversa e uma relação dose dependente quanto a inibição do crescimento de hipocótilos de *L. sativa*. Pôde-se observar, no crescimento das radículas, um significativo estímulo de 69,7% em relação ao branco na concentração de 250 µg/mL e, uma inibição na maior concentração (1000 µg/mL) (Gráfico 4) [TABELA 57]. Este efeito, também observado na avaliação alelopática do óleo essencial, pode ter relação com a presença de alguns fitoformônios que estimulem o crescimento nas menores concentrações, mas inibem nas maiores.

As mesmas alterações morfológicas observadas com o óleo essencial sobre as plântulas de *L. sativa*, também foram visualizadas com o extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo (DfecsEP), como a oxidação do ápice e menor espessura das radículas das plântulas.

Gráfico 4 – Inibição/estimulação do crescimento de *L. sativa* promovido pelo extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfccsEP) sendo a linha de base representada pelo valor do branco (n = 75; p<0,05, ANOVA)

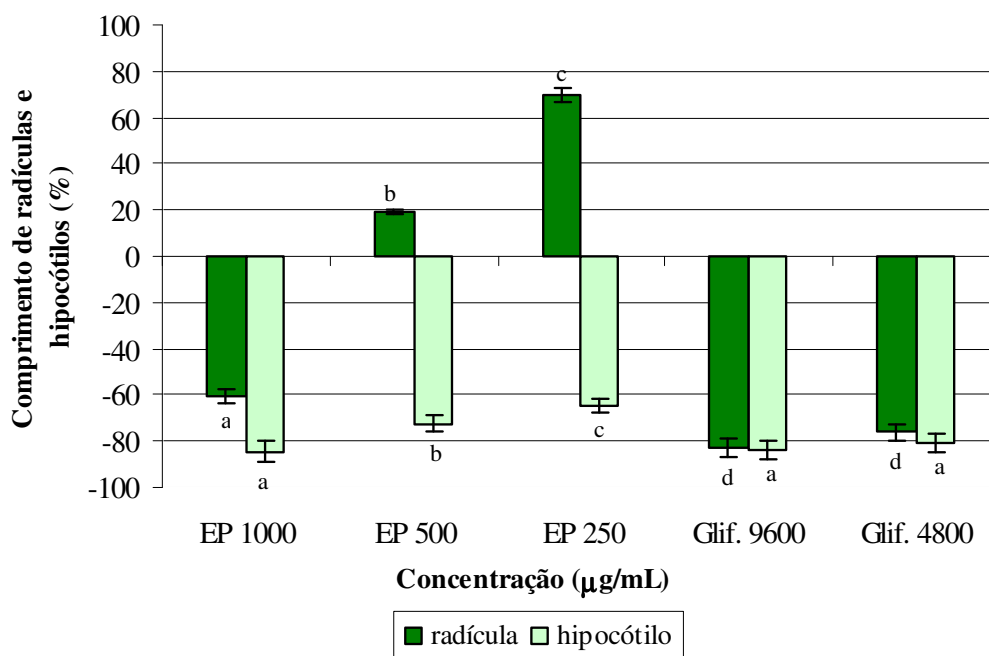


TABELA 57 – Efeito de inibição e estimulação do crescimento de *L. sativa* promovido por diferentes concentrações do extrato éter de petróleo das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfccsEP) e pelo glifosato comparados ao branco

	<i>Radícula</i>		<i>Hipocótilo</i>	
	Estímulo (%)	Inibição (%)	Estímulo (%)	Inibição (%)
DfccsEP 1000 µg/mL	-	60,6 a	-	84,4 a
DfccsEP 500 µg/mL	18,8 b	-	-	72,6 b
DfccsEP 250 µg/mL	69,7 c	-	-	64,4 c
Glifosato 9.600 µg/mL	-	82,8 d	-	83,7 a
Glifosato 4.800 µg/mL	-	76,2 d	-	80,7 a

*Números seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (n = 75; p<0,05, ANOVA)

Alterações ambientais que provoquem estresse podem desencadear alterações nos níveis de produção de aleloquímicos, como também nos níveis de fitoalexinas [INDERJIT, 1996; ZOBEL & LYNCH, 1999]. Estas fitoalexinas e/ou aleloquímicos podem ser excretadas no meio para atuarem, como o observado pelos compostos fenólicos e terpenóides de *Eucalyptus regnas* que são exsudados da raiz para o solo, podendo ocorrer o mesmo com os aleloquímicos de *D. furfuracea*.

Esses aleloquímicos produzidos podem atuar sob a própria planta causando alterações visíveis à germinação, como a indução de seu crescimento. Mas, quando liberados ao seu redor, atuam em outras plantas como fitotoxinas, podendo estar relacionadas com a supressão do crescimento de ervas daninhas próximas à ela [YU *et al.*, 2000].

4.17.3 - Resultados obtidos na avaliação alelopática do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (DfecsAlc)

*- Germinação de sementes de *Lactuca sativa**

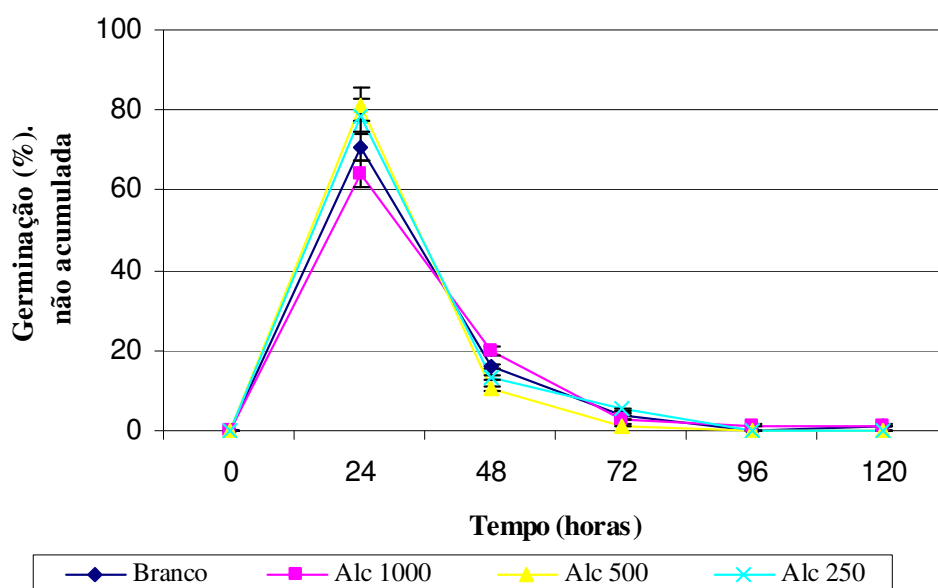
No extrato alcaloídico (DfecsAlc) não foram observadas alterações na germinabilidade e na distribuição da curva de germinação [TABELA 58] (Gráfico 5). Porém, observou-se uma pequena redução da velocidade de germinação na concentração de 1000 µg/mL, mas somente na leitura realizada após 24 horas. O efeito alelopático desse extrato foi mais notório sobre o crescimento das plântulas de *L. sativa*.

TABELA 58 – Percentuais de germinação acumulada de sementes de *L. sativa* no extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfccsAlc) em comparação aos controles (branco e glifosato)

	<i>Germinação (%) - acumulada</i>				
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h
1- Branco	71 a	87 a	91 a	91 a	92 a
2- DfccsAlc 1000 µg/mL	64 b	84 a	87 a	88 a	89 a
3- DfccsAlc 500 µg/mL	81 c	92 a	93 a	93 a	93 a
4- DfccsAlc 250 µg/mL	79 c	92 a	97 a	97 a	97 a
5- Glifosato 19.200 µg/mL	41 d	68 b	73 b	75 b	76 b
6- Glifosato 9.600 µg/mL	75 ab	83 a	84 a	85 a	85 a
7- Glifosato 4.800 µg/mL	84 b	89 a	92 a	92 a	92 a

*Números seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (n = 75; p<0,05, ANOVA)

Gráfico 5 – Germinação, em percentuais não acumulados, de sementes de *L. sativa* promovida pelo extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfccsAlc) em comparação ao branco



- Crescimento das radículas e hipocótilos de *Lactuca sativa*

O extrato alcaloídico (DfecsAlc) causou inibição do crescimento de radículas e hipocótilos em uma relação dose dependente. Observou-se uma maior inibição do crescimento de radículas (78,5%) na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$, sendo que esta inibição é semelhante a causada pelo herbicida glifosato [TABELA 59] (Gráfico 6).

Gráfico 6 – Inibição/estimulação do crescimento de *L. sativa* promovido pelo extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfecsAlc) sendo a linha de base representada pelo valor do branco (n = 75; $p < 0,05$, ANOVA)

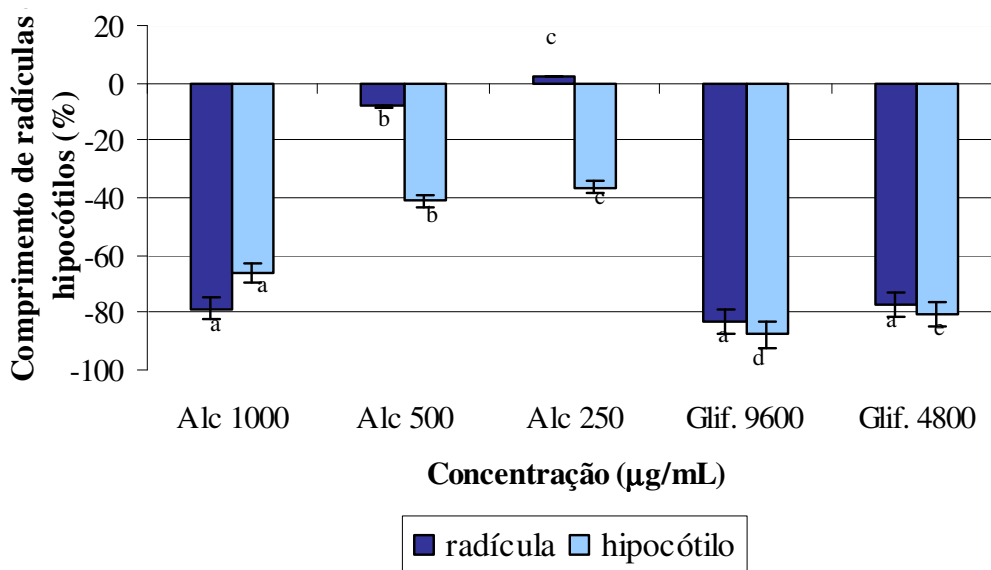


TABELA 59 - Efeito de inibição e estimulação do crescimento de *L. sativa* promovido por diferentes concentrações do extrato alcaloídico das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfcsAlc) e pelo glifosato comparados ao branco

	<i>Radícula</i>		<i>Hipocótilo</i>	
	Estímulo (%)	Inibição (%)	Estímulo (%)	Inibição (%)
DfcsAlc 1000 µg/mL	-	78,5 a	-	66,3 a
DfcsAlc 500 µg/mL	-	8,0 b	-	41,1b
DfcsAlc 250 µg/mL	2,0 c	-	-	36,2 c
Glifosato 9.600 µg/mL	-	83,2 a	-	87,7 d
Glifosato 4.800 µg/mL	-	77,2 a	-	80,4 e

*Números seguidos da mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si (n = 75; p<0,05, ANOVA)

Os compostos como alcalóides já foram identificados como possuidores de atividade alelopática [YUNES & CALIXTO, 2001] e como o uso indiscriminado de herbicidas sintéticos tem causado um aumento da resistência de muitas plantas daninhas essas interações alelopáticas podem ser uma alternativa aos métodos tradicionais de controle.

4.18 - Avaliação da Atividade Auxínica

A avaliação da atividade auxínica do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfcsOE2) foi proposta como parte do trabalho, pois o mesmo apresentou, no ensaio de inibição de germinação, um efeito semelhante ao dos hormônios reguladores do crescimento de plantas, já que em baixas concentrações agem como hormônios e em altas concentrações agem como inibidores [YUNES & CALIXTO, 2001].

A busca por novas auxinas é necessária porque elas vêm sendo utilizadas na agricultura e na horticultura com o intuito de prevenir a abscisão de frutos e folhas, promover o enraizamento de estacas na propagação vegetal ou como herbicidas. As auxinas sintéticas são amplamente utilizadas como herbicidas no controle de invasoras, porém somente das espécies dicotiledôneas [TAIZ & ZEIGER, 2004].

No bioensaio do crescimento linear do coleóptilo, a atividade auxínica é verificada com o alongamento dos segmentos de coleóptilo, sendo que as leituras foram realizadas após 24 horas de incubação.

- Padronização do ensaio de crescimento linear de coleóptilo

A padronização do ensaio de atividade auxínica teve por finalidade determinar condições ideais para o bioensaio, sendo que o processo foi baseado na literatura com pequenos ajustes nas condições quando necessário [TAIZ & ZEIGER, 2004; FERRI, 1979].

A mistura de água destilada e solução tampão MES (pH = 6,2) na proporção 80:20, foi utilizada porque neste meio obtiveram-se os melhores resultados. Os tampões mais ácidos podem causar um aumento rápido e imediato na taxa de crescimento, enquanto que nos meios neutros o crescimento induzido por auxinas é inibido.

Este ensaio biológico consistiu em determinar a taxa de alongamento dos coleóptilos provenientes de plântulas estioladas de *Zea mays* (milho) após 24 horas da adição das soluções teste. Os coleóptilos foram mantidos no escuro e com temperatura controlada de 25° C na incubadora.

4.18.1 - Resultados obtidos na avaliação da atividade auxínica do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea* (DfccsOE2)

O óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfccsOE2) apresentou atividade auxínica, mas de menor intensidade quando comparado ao AIA (ácido indol-3-acético). A atividade de DfccsOE2 foi confirmada pela visualização de um maior alongamento do coleóptilos (12,50 %) na concentração de 10 µg/ml, enquanto que nas

menores e maiores concentrações que 10 $\mu\text{g/ml}$ observou-se um menor alongamento; este tipo de resposta é característica de auxinas (**Gráfico 7**) [TABELA 60].

Gráfico 7 - – Alongamento de coleótilos de *Zea mays* promovido pelo óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea*, sendo a linha de base representada pelo valor do branco (n = 40; $p < 0,05$, ANOVA)

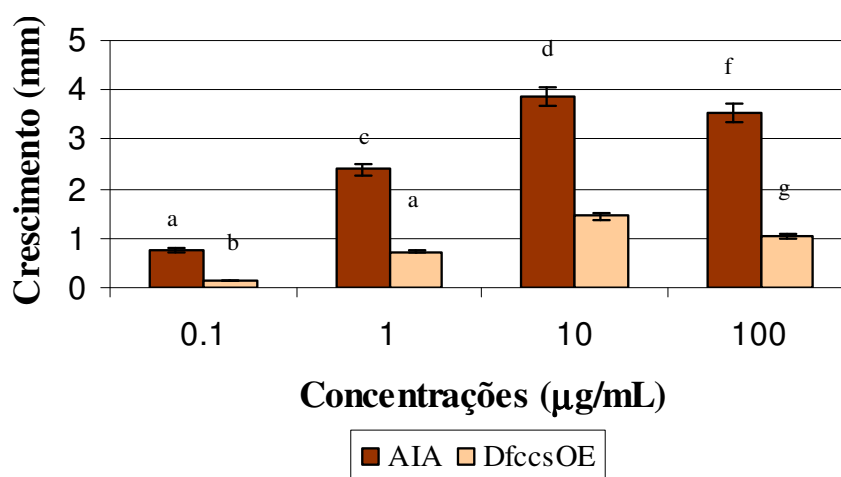


TABELA 60 - Efeito de alongamento dos coleótilos promovido por diferentes concentrações do óleo essencial das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea* (DfcssOE2) e pelo AIA (controle) comparados ao branco

	Alongamento (%)
AIA 100 $\mu\text{g/mL}$	30,43 f
AIA 10 $\mu\text{g/mL}$	34,45 d
AIA 1 $\mu\text{g/mL}$	20,69 c
AIA 0,1 $\mu\text{g/mL}$	6,46 a
DfcssOE2 100 $\mu\text{g/mL}$	9,05 g
DfcssOE2 10 $\mu\text{g/mL}$	12,50 e
DfcssOE2 1 $\mu\text{g/mL}$	6,29 a
DfcssOE2 0,1 $\mu\text{g/mL}$	1,29 b

*Números seguidos da mesma letra não diferem estatisticamente entre si (n = 40; $p < 0,05$, ANOVA)

Os hormônios desempenham funções como o controle do crescimento e desenvolvimento de plantas, estando relacionados com vários processos, como o alongamento do caule, a dominância apical, formação de raiz, desenvolvimento de frutos e o crescimento orientado (tropismos) [TAIZ & ZEIGER, 2004]. Esse grupo de substâncias ocorre naturalmente em concentrações muito baixas, sendo que sua biossíntese é alterada em condições de ambientes adversos e ameaças biológicas [GÓMEZ-CADENAS *et al.*, 1998; O'DONNELL *et al.*, 2003].

As auxinas, em baixos níveis, também são necessários para o crescimento das raízes, mas em concentrações mais altas inibem o seu crescimento, pois passam a induzir a produção de etileno e, este inibe o alongamento da raiz [TAIZ & ZEIGER, 2004], podendo ser utilizadas como herbicidas naturais e ser uma alternativa no controle de espécies invasoras substituindo o uso de herbicidas sintéticos.

4.19 - Toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS)

O bioensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* (TAS) foi realizado com os extratos obtidos das cascas do caule subterrâneo de *D. furfuracea*, pois o TAS apresenta correlações com outros ensaios biológicos mais complexos, dentre estes se destacam atividades como inseticida e antitumoral [MICHAEL *et al.*, 1956; ANDERSON *et al.*, 1997].

Este ensaio foi realizado segundo a metodologia proposta por McLaughlin [McLAUGHLIN, 1991], sendo que cada concentração foi testada em triplicata

4.19.1 - Resultados obtidos na avaliação da Toxicidade frente a *Artemia salina* (TAS) dos extratos obtidos das cascas do caule subterrâneo de *Duguetia furfuracea*

Todos os extratos de *D. furfuracea* analisados mostraram-se ativos no TAS, sendo que a menor atividade foi observada no extrato alcaloídico ($DL_{50} = 36,9 \mu\text{g/mL}$) e a maior no óleo

essencial ($DL_{50} = 2,60 \mu\text{g/mL}$) [TABELA 61]. O extrato é considerado ativo quando $DL_{50} < 1000 \text{ppm}$ [SIQUEIRA et al., 1998].

TABELA 61 – Resultados da avaliação da toxicidade dos extratos oriundos das cascas do caule subterrâneo sobre a *Artemia salina* (TAS)

Extrato teste	DL_{50} (Intervalo de Confiança 95 %)
1 – DfcsOE2	2,60 $\mu\text{g/mL}$ (1,44 - 4,64)
2 - DfcsEP	6,07 $\mu\text{g/mL}$ (5,07 – 7,28)
3 - DfcsAlc	36,9 $\mu\text{g/mL}$ (31,33 – 43,44)

DL_{50} : Dose letal para causar a morte de 50% dos indivíduos ($\mu\text{g/mL}$); Probit Analysis

A alta toxicidade de DfcsOE2 pode ser devido a presença de constituintes majoritários como 2,4,5-trimetoxi-estireno (29,2 %) e asarona (23,9 %), estes já foram descritos serem ativos no TAS [WANG et al., 1988].

DADOS FÍSICO-QUÍMICOS

5. DADOS FÍSICO-QUÍMICOS

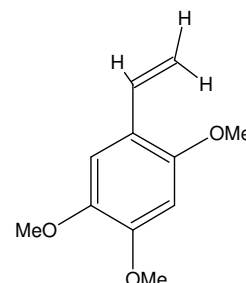
5.1 - 2,4,5-Trimetoxi-estireno (1)

Fórmula Molecular: C₁₁H₁₄O₃

Peso Molecular: 194

Estado Físico: sólido amorfo branco

Solubilidade: CHCl₃, MeOH



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 6,99 (s, H₆), 6,96 (dd, *J*= 11,0 e 17,8 Hz, H_C), 6,48 (s, H₃), 5,57 (dd, *J*= 1,2 e 17,8 Hz, H_B), 5,14 (dd, *J*= 1,2 e 11,0 Hz, H_A), 3,87 (s, OCH₃), 3,84 (s, OCH₃), 3,80 (s, OCH₃)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 151,4 (C₂), 149,6 (C₄), 143,3 (C₅), 130,9 (C₇), 118,5 (C₁), 112,0 (C₈), 109,5 (C₆), 97,7 (C₃), 56,7 (OCH₃), 56,4 (OCH₃), 56,0 (OCH₃)

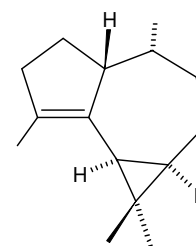
5.2 - (-)-α-gurjuneno (2)

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₄

Estado Físico: óleo incolor

Solubilidade: CHCl₃, MeOH, Hx, Acetona

[α]_D²⁰: - 28,12 (CHCl₃, c: 0,0085)



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 1,63 (sl, H₁₄), 1,09 (s, H₁₂), 0,89 (d, *J*= 7,1 Hz, H₁₅), 0,82 (s, H₁₃), 0,75 (d, *J*= 8,6 Hz, H₆)

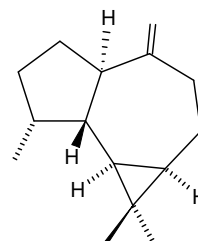
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 137,3 (C₄), 136,1 (C₅), 48,7 (C₁), 36,4 (C₃), 32,5 (C₉), 32,1 (C₁₀), 28,9 (C₂), 28,9 (C₁₃), 28,3 (C₇), 25,7 (C₆), 21,7 (C₁₁), 21,5 (C₈), 18,4 (C₁₅), 16,4 (C₁₂), 14,6 (C₁₄)

5.3 - Aromadendreno (3)

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₄

Estado Físico: óleo incolor

Solubilidade: CHCl₃, MeOH, Hx, Acetona



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 4,68 (sl, H₁₄), 1,00 (s, H₁₂), 0,97 (s, H₁₃), 0,94 (d, *J*= 6,9 Hz, H₁₅), 0,83 (m, H₇), 0,60 (dd, *J*= 9,5 e 10,7 Hz, H₆)

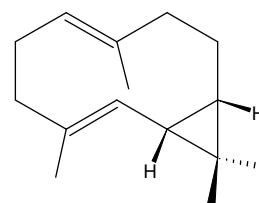
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 154,8 (C₁₀), 105,3 (C₁₄), 53,8 (C₁), 19,9 (C₁₁), 43,7 (C₅), 24,8 (C₈), 28,7 (C₁₃), 15,8 (C₁₂), 29,5 (C₂), 27,4 (C₇), 35,3 (C₄), 35,1 (C₃), 39,0 (C₉), 29,1 (C₆), 17,1 (C₁₅)

5.4 - Biciclogermacreno (4)

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₄

Estado Físico: óleo incolor

Solubilidade: CHCl₃, MeOH, Hx, Acetona



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 4,81 (dd, *J*= 5,4 e 10,7 Hz, H₁), 4,33 (d, *J*= 11,5 Hz, H₅), 1,64 (s, H₁₄), 1,46 (s, H₁₅), 1,07 (s, H₁₂), 1,00 (s, H₁₃)

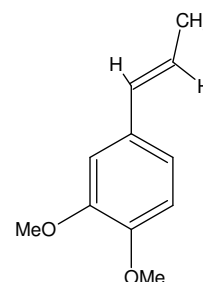
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 140,8 (C₁₀), 128,0 (C₄), 126,5 (C₅), 124,8 (C₁), 41,1 (C₃), 37,2 (C₉), 30,0 (C₇), 29,2 (C₁₂), 26,9 (C₆), 26,8 (C₈), 26,0 (C₂), 20,9 (C₁₅), 19,8 (C₁₁), 16,5 (C₁₄), 15,4 (C₁₃)

5.5 - (*E*)-metil-isoeugenol (5)

Fórmula Molecular: C₁₁H₁₄O₂

Estado Físico: sólido amorfo branco

Solubilidade: CHCl₃, MeOH, Acetona



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ): 6,87 (d, $J= 1,7$ Hz, H_6), 6,84 (dd, $J= 1,7$ e $8,2$ Hz, H_2), 6,77 (d, $J= 8,2$ Hz, H_3), 6,32 (dl, $J= 15,7$ Hz, H_7), 6,08 (dq, $J= 6,5$ e $15,7$ Hz, H_8), 3,87 (s, OCH_3), 3,85 (s, OCH_3), 1,85 (dd, $J= 1,4$ e $6,5$ Hz, H_9)

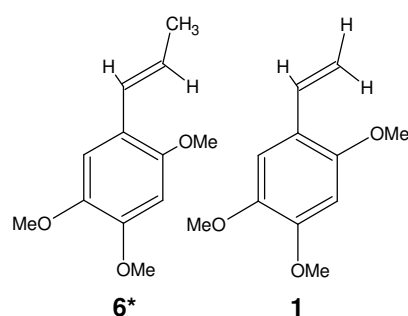
RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ): 149,8 (C_5), 148,1 (C_4), 131,1 (C_1), 130,6 (C_8), 123,8 (C_7), 118,6 (C_2), 111,2 (C_3), 108,6 (C_6), 55,9 (OCH_3), 55,7 (OCH_3), 18,3 (C_9)

5.6 - α -asarona (6) e 2,4,5-trimetoxi-estireno (1)

Fórmula Molecular: $\text{C}_{12}\text{H}_{16}\text{O}_3$

Estado Físico: sólido amorfo branco

Solubilidade: CHCl_3 , MeOH, Acetona



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ): 6,99 (s, H_6), 6,97 (dd, $J= 11,0$ e $17,8$ Hz, H_C/H_7), 6,92 (s, H_6)*, 6,63 (dd, $J= 1,6$ e $15,9$ Hz, H_7)*, 6,48 (s, H_3), 6,47 (s, H_3)*, 6,07 (dq, $J= 6,6$ e $15,9$ Hz, H_8)*, 5,57 (dd, $J= 1,2$ e $17,8$ Hz, H_B/H_8), 5,14 (dd, $J= 1,2$ e $11,0$ Hz, H_A/H_8), 3,87 (s, OCH_3), 3,85 (s, OCH_3)*, 3,84 (s, OCH_3), 3,83 (s, OCH_3)*, 3,80 (s, OCH_3), 3,79 (s, OCH_3)*, 1,86 (dd, $J= 1,6$ e $6,6$ Hz, H_9)*

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ): 151,2 (C_2), 150,5 (C_2)*, 149,5 (C_4), 148,6 (C_4)*, 143,2 (C_5), 143,2 (C_5)*, 130,8 (C_7), 124,9 (C_7)*, 124,2 (C_8)*, 118,8 (C_1)*, 118,4 (C_1), 111,8 (C_8), 109,7 (C_6)*, 109,4 (C_6), 97,8 (C_3)*, 97,6 (C_3), 56,4 (OCH_3)*, 56,4 (OCH_3), 56,3 (OCH_3)*, 56,3 (OCH_3), 55,9 (OCH_3)*, 55,8 (OCH_3), 18,3 (C_9)*

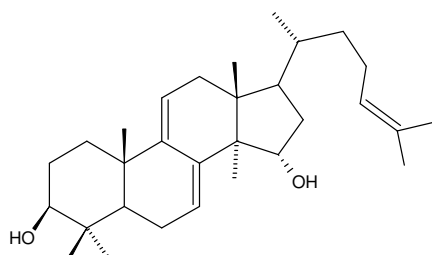
5.7 - Policarpol (7)

Fórmula Molecular: $\text{C}_{30}\text{H}_{48}\text{O}_2$

Estado Físico: sólido amorfo branco

Solubilidade: CHCl_3 e MeOH

UV-Visível (MeOH): 244 nm (λ_{max})



IV/FT (cm⁻¹): 3416, 2965, 2930, 2886, 1652, 1634, 1557, 1463, 1455, 1374, 1145, 1090, 1036.

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 5,82 (dl, *J*= 5,8 Hz, H₇), 5,28 (dl, *J*= 5,6 Hz, H₁₁), 5,06 (tm, *J*= 7,1 Hz, H₂₄), 4,25 (dd, *J*= 5,0 e 9,5 Hz, H_{15β}), 3,22 (dd, *J*= 4,6 e 10,9 Hz, H_{3α}), 1,66 (s, H₂₆), 1,57 (s, H₂₇), 0,97 (s, H₂₉), 0,95 (s, H₂₈), 0,91 (s, H₁₉), 0,86 (d, *J*= 4,2 Hz, H₂₁), 0,85 (s, H₃₀), 0,58 (s, H₁₈)

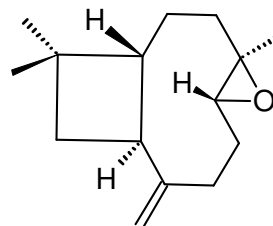
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 146,1 (C₉), 140,8 (C₈), 131,1 (C₂₅), 124,9 (C₂₄), 121,3 (C₇), 116,0 (C₁₁), 78,9 (C₃), 74,7 (C₁₅), 51,9 (C₁₄), 48,9 (C₁₇), 48,8 (C₅), 44,3 (C₁₃), 40,1 (C₁₆), 38,6 (C₄), 38,4 (C₁₂), 37,4 (C₁₀), 36,2 (C₁), 35,7 (C₂₀), 35,6 (C₂₂), 28,1 (C₂₈), 27,7 (C₂), 25,7 (C₂₇), 24,8 (C₂₃), 22,9 (C₆), 22,8 (C₁₉), 18,4 (C₂₁), 17,6 (C₂₆), 17,1 (C₃₀), 15,9 (C₂₉), 15,8 (C₁₈)

5.8 - Óxido de β-Cariofileno (8)

Fórmula Molecular: C₁₅H₂₄O

Estado Físico: sólido amorfo branco

Solubilidade: CHCl₃, MeOH e Acetona



RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 4,95 (sl, H₁₄), 4,84 (sl, H₁₄), 2,86 (dd, *J*= 4,0 e 10,5 Hz, H₅), 2,59 (dd, *J*= 9,4 e 18,8 Hz, H₉), 1,18 (s, H₁₅), 0,98 (s, H₁₃), 0,96 (s, H₁₂)

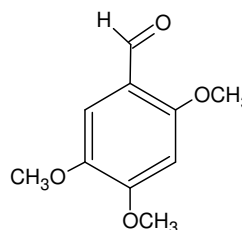
RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 151,8 (C₈), 112,7 (C₁₄), 63,7 (C₅), 59,8 (C₄), 50,7 (C₁), 48,7 (C₉), 39,7 (C₁₀), 39,1 (C₃), 34,0 (C₁₁), 30,2 (C₆), 29,9 (C₁₂), 29,8 (C₇), 27,2 (C₂), 21,6 (C₁₃), 16,9 (C₁₅)

5.9 – Asaraldeído (9)

Fórmula Molecular: C₁₀H₁₂O₄

Estado Físico: sólido amorfo branco

Solubilidade: CHCl₃ e MeOH



RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ): 10,3 (s, H_7), 7,31 (s, H_6), 6,47 (s, H_3), 3,95 (s, OCH_3), 3,90 (s, OCH_3), 3,86 (s, OCH_3)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ): 188,0 (C_7), 158,6 (C_2), 155,8 (C_4), 143,6 (C_5), 117,4 (C_1), 109,1 (C_6), 96,0 (C_3), 56,3 (OCH_3), 56,2 (OCH_3), 56,2 (OCH_3)

5.10 - (-)-duguetina (10)

Fórmula Molecular: $\text{C}_{20}\text{H}_{21}\text{NO}_5$

Estado Físico: sólido amorfo marrom

Solubilidade: CHCl_3 e MeOH

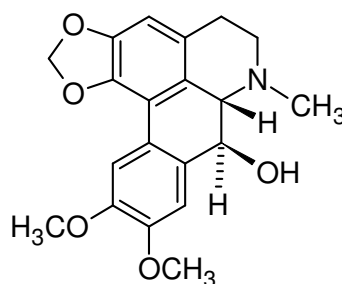
$[\alpha]_{\text{D}}^{20}$: -36,06 (MeOH, c: 0,00122); literatura -41,3 (EtOH, c = 1) [CASAGRANDE *et al.*, 1970].

IV/FT (cm^{-1}) : 3422, 3098, 3001, 2936, 2851, 1607, 1514, 1460, 1407, 1338, 1390, 1276, 1216, 1164, 1125, 945, 873, 805, 755

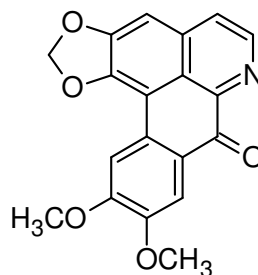
EM/IE (70 eV) m/z (int. rel.) : 355,0 $[\text{M}]^+$ (100), 340,0 (30), 337,1 (16), 324,2 (26), 311,6 (40), 311,0 (28), 297,6 (10), 296,5 (16), 293,8 (24), 281,4 (16), 280,3 (10), 266,2 (18), 252,4 (12), 236,1 (10), 220,1 (12), 210,4 (4), 194,4 (6), 190,0 (50), 181,3 (8), 163,1 (12), 152,3 (12), 139,0 (14), 126,4 (10), 111,5 (12), 98,5 (6), 97,4 (14), 82,9 (26), 81,0 (16), 69,0 (30), 57,7 (44)

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , δ): 7,61 (s, H_{11}), 7,25 (s, H_8), 6,51 (s, H_3), 5,91 (sl, O- CH_2 -O), 6,06 (sl, O- CH_2 -O), 4,58 (d, $J = 12,1$ Hz, H_7), 3,51 (d, $J = 12,1$ Hz, H_{6a}), 3,95 (s, OCH_3 - C_9), 3,88 (s, OCH_3 - C_{10}), 2,57 (s, N- CH_3), 1,94 (sl, OH)

RMN ^{13}C (75 MHz, CDCl_3 , δ): 148,7 (C_9), 147,7 (C_2), 146,9 (C_{10}), 141,8 (C_1), 132,8 (C_{7a}), 127,1 (C_{3a}), 122,7 (C_{11a}), 121,3 (C_{1b}), 116,6 (C_{1a}), 110,4 (C_{11}), 107,3 (C_8), 106,7 (C_3), 100,7 (O- CH_2 -O), 69,7 (C_7), 64,7 (C_{6a}), 56,1 (OCH_3 - C_{10}), 55,9 (OCH_3 - C_9), 49,8 (C_5), 39,4 (N- CH_3), 23,1 (C_4)



5.11 - Dicentrinona (11)



Fórmula Molecular: C₁₉H₁₃NO₅

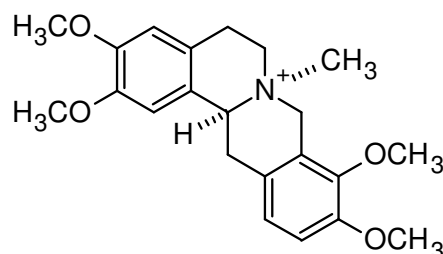
Estado Físico: cristais alaranjados

Solubilidade: pouco solúvel em CHCl₃, solúvel em CHCl₃/MeOH

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 8,84 (d, *J* = 5,0 Hz, H₅), 7,91 (s, H₁₁), 7,88 (s, H₈), 7,69 (d, *J* = 5,0 Hz, H₄), 7,06 (s, H₃), 6,35 (s, O-CH₂-O), 4,05 (s, OCH₃), 3,95 (s, OCH₃)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 181,2 (C₇), 153,8 (C₁₀), 151,5 (C₁), 149,4 (C₉), 147,0 (C₂), 145,4 (C_{6a}), 144,7 (C₅), 135,5 (C_{3a}), 127,7 (C_{11a}), 125,9 (C_{7a}), 123,9 (C₄), 122,6 (C_{1b}), 109,5 (C₈), 108,7 (C₁₁), 108,2 (C_{1a}), 102,4 (C₃), 102,4 (O-CH₂-O), 56,2 (OCH₃), 56,1 (OCH₃)

5.12 - (-)-N-metiltetraidropalmatina (12)



Fórmula Molecular: C₂₂H₂₈NO₄

Estado Físico: sólido amorfo marrom

Solubilidade: CHCl₃, MeOH

[α]_D²⁰: -104,13 (MeOH, c: 0,00121); literatuta -110 (MeOH, c: 0,05) [SAN *et al.*, 1998]

ESIMS-MS (ESI: +) *m/z* (int. rel.): 370,2095 [M]⁺(4), 354,1735 (4), 322,1538 (2), 308,1406 (4), 293,1210 (5), 206,1216 (100), 190,0892 (4)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 6,86 (d, *J* = 8,5 Hz, H₁₁), 6,80 (d, *J* = 8,5 Hz, H₁₂), 6,77 (s, H₁), 6,66 (s, H₄), 5,34 (dl, *J* = 18,1 Hz, H₁₄), 5,32 (d, *J* = 16,0 Hz, H₈), 5,03 (d, *J* = 16,0 Hz, H₈), 3,94 (m, H₆), 3,89 (s, OCH₃-C₁₀), 3,85 (s, OCH₃-C₂), 3,85 (s, OCH₃-C₃), 3,81 (s, OCH₃-C₉), 3,69 (m, H₆), 3,61 (s, N-CH₃), 3,48 (dd, *J* = 6,3 e 17,9 Hz, H₁₃), 3,0-3,35 (m, H₅), 3,14 (dd, *J* = 6,3 e 18,1 Hz, H₁₃)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 151,2 (C₉), 149,5 (C₂), 148,5 (C₃), 145,6 (C₁₀), 123,9 (C_{4a}), 123,3 (C₁₂), 121,1 (C_{12a}), 120,2 (C_{8a}), 119,3 (C_{14a}), 113,1 (C₁₁), 111,4 (C₄), 109,7 (C₁), 64,6 (C₁₄), 61,2 (OCH₃-C₉), 59,4 (C₈), 56,2 (OCH₃-C₂)*, 56,0 (OCH₃-C₃)*, 55,9 (OCH₃-C₁₀), 52,0 (C₆), 50,0 (N-CH₃), 33,8 (C₁₃), 23,3 (C₅)

5.13 - (+)-*N*-metilglaucina (13)

Fórmula Molecular: C₂₂H₂₈NO₄

Estado Físico: sólido amorfo marrom escuro

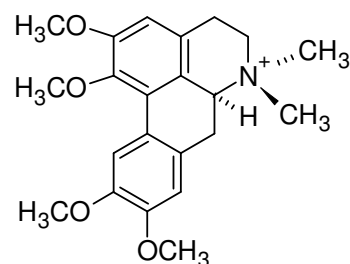
Solubilidade: CHCl₃, MeOH

$[\alpha]_D^{20}$: +34,92 (MeOH, c: 0,00063); literatura +81 (MeOH, c: 0,53) [GUINAUDEAU *et al.*, 1983]

EM/IE (70 eV) *m/z* (int. rel.): 369,4 (14), 352,9 (6), 339,7 (2), 338,2 (6), 324,5 (1), 312,7 (2), 311,1 (6), 294,1 (4), 280,4 (4), 265,1 (8), 252,5 (1), 234,1 (2), 225,4 (2), 209,4 (4), 190,4 (4), 181,4 (4), 163,0 (6), 152,3 (6), 139,3 (6), 125,4 (4), 111,4 (5), 95,0 (8), 81,0 (8), 71,3 (8), 69,0 (16), 57,9 (100)

RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, δ): 7,95 (s, H₁₁), 6,91 (s, H₈), 6,63 (s, H₃), 4,63 (dd, H₅), 4,37 (dl, *J*= 11,5 Hz, H_{6a}), 3,90 (s, OCH₃-C₉), 3,88 (s, OCH₃-C₂), 3,84 (s, OCH₃-C₁₀), 3,71-3,65 (m, H₅), 3,65 (s, OCH₃-C₁), 3,78 (s, N-CH₃), 3,35 (dd, *J*= 13,2 e 13,7 Hz, H₇), 3,30 (s, N-CH₃), 3,01-2,97 (m, H₄), 2,92 (dd, *J*= 3,7 e 9,7 Hz, H₇)

RMN ¹³C (75 MHz, CDCl₃, δ): 154,0 (C₂), 149,0 (C₉), 148,5 (C₁₀), 145,8 (C₁), 127,8 (C_{1a}), 124,5 (C_{3a}), 124,3 (C_{7a}), 123,1 (C_{11a}), 118,9 (C_{1b}), 111,6 (C₁₁), 111,2 (C₈), 110,2 (C₃), 69,9 (C_{6a}), 61,2 (C₅), 60,5 (OCH₃-C₁), 56,1 (OCH₃-C₁), 56,0 (OCH₃-C₂), 56,0 (OCH₃-C₉), 54,2 (N-CH₃), 43,3 (N-CH₃), 29,5 (C₇), 24,2 (C₄)



5.14 - Alantoína (14)

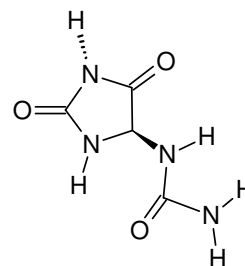
Fórmula Molecular: C₄H₆O₃N₄

Estado Físico: cristais esbranquiçados

Solubilidade: H₂O, DMSO

RMN ¹H (300 MHz, DMSO-d₆, δ): 10,56 (s, HN₁), 8,04 (s, HN₃), 6,92 (d, *J*= 7,6 Hz, HN₆), 5,79 (s, H₂N₈), 5,21 (d, *J*= 7,6 Hz, H₅)

RMN ¹³C (75 MHz, DMSO-d₆, δ): 173,9 (C₄), 157,8 (C₂), 157,2 (C₇), 52,7 (C₅)



CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico das partes subterrâneas de *Duguetia furfuracea* conduziu ao isolamento e identificação de 16 substâncias, sendo que das cascas do caule subterrâneo foram isolados quatro compostos aromáticos: 2,4,5-trimetoxi-estireno (**1**), (*E*)-metiliso Eugenol (**5**), α -asarona (**6**) e asaraldeído (**9**); quatro sesquiterpenos: α -gurjuneno (**2**), aromadendreno (**3**), biciclogermacreno (**4**) e óxido de β -cariofileno (**8**); um triterpeno: policarpol (**7**) e quatro alcalóides: (-)-duguetina (**10**), dicentrinona (**11**), (-)-*N*-metiltetraidropalmatina (**12**) e (+)-*N*-metilglaucina (**13**). A partir do cerne do caule subterrâneo foi obtido o ureídeo alantoína (**14**).

Este trabalho contribuiu para a ampliação do conhecimento fitoquímico de *Duguetia furfuracea*, já que as substâncias **5**, **6** e **14** estão sendo descritas pela primeira vez no gênero *Duguetia* e as substâncias **12** e **13** pela primeira vez em Annonaceae.

Na avaliação alelopática do óleo essencial e do extrato éter de petróleo foram observados efeitos, sobre o crescimento, de indução nas radículas e inibição nos hipocótilos de *Lactuca sativa*, enquanto que o extrato alcaloídico provocou acentuada inibição do crescimento de ambos. O óleo essencial, avaliado no teste do crescimento linear do coleóptilo estiolado, apresentou-se com atividade auxínica e todos os extratos obtidos e testados no TAS apresentaram-se ativos.

As atividades biológicas descritas no presente trabalho possibilitaram a formulação de hipóteses para o entendimento dessa espécie na biota, podendo seu comportamento como espécie invasora receber a contribuição de um ou do somatório dos fatores descritos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGNANIET, H.; MENUT, C.; BESSEIERE, J. Aromatic plants of tropical central Africa. Part LII. Comparative study of the volatil constituents from barks of four Annonaceae species growing in Gabon, *Journal Of EssentialOil-Bearing Plants*, v. 7, n. 3, p. 201-209, 2004.
- AHAMMADSAHIB, K. I.; HOLLINGWORTH, R. M.; MCGOVREN, J. P.; HUI, Y. H.; McLAUGHLIN, J. L. Mode of action of bullatacin: A potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin, *Life Sciences*, v. 53, p. 1113-1120, 1993.
- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress, *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 504-540, 1999.
- ALVES, M. C. S.; FILHO, S. M.; INNECCO, R.; TORRES, S. B. Alelopatia de extratos voláteis na germinação de sementes e no comprimento da raiz de alface, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, v. 39, n. 11, p. 1083-1086, 2004.
- ALVES, P. L. C. A.; TOLEDO, R. E. B.; GUSMAN, A. B. Allelopathy potencial of *Eucalyptus* ssp., 1999. *Apud*: FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.
- ANDERSON, J. E.; GOETZ, C. M.; McLAUGHLIN, J. L.; SUFFNESS, M. A blind comparision of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens, *Phytochemical Analysis*, v. 2, p. 107-111, 1991.
- AQUILA, M. E. A.; UNGARETTI, J. A. C.; MICHELIN, A. Preliminary observation on allelopathic activity in *Achryrocline satureioides* (Lam) DC., *Acta Horticulturae*, v. 502, p. 383-387, 1999.
- ARIAS, A. R.; INCHAUSTI, A.; ASCURRAT, M.; FLEITAS, N.; RODRIGUES, E.; FOURNET, A. *In vitro* activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes, *Phytotherapy Research*, v. 8, p. 141-144, 1994.
- ATTA-UR-RAHMAN, AHMAD, V. A. ¹³C-NMR of Natural Products, v. 1 (Monoterpenes and Sesquiterpenes), Plenum Press, Nova Iorque, p. 467-474, 1992.
- BAIS, H. P.; VEPACHEDU, R.; GILROY, S.; CALLAWAY, R. M.; VIVANCO, J. M. Allelopathy and exotic plant invasion: from molecules and genes to species interactions, *Science*, v. 301, p. 1377-1380, 2003.

- BARRACHINA, I.; NESKE, A.; GRANELL, S.; BERMEJO, A.; CHAHBOUNE, N.; EL-AOUAD, N.; ALVAREZ, O.; BARDON, A.; ZAFRA-POLO, M. C. Tucumanin, a β -hydroxy- γ -lactone bistetrahydrofuranic acetogenin from *Annona cherimolia*, is a potent inhibitor of mitochondrial complex I, *Planta Medica*, v. 70, n. 9, p.866-868, 2004.
- BAUER, K.; GARBE, D.; SURBURG, H. Common Fragrance and Flavor materials : preparation, properties and uses, 1990. *Apud*: SCHMIDT, C. O.; BOUWMEESTER, H. J.; BÜLOW, N.; KÖNIG, W. A. Isolation, characterization, and mechanistic studies of (-)- α -gurjunene synthase from *Solidago canadensis*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 364, n. 2, p. 167-177, 1999.
- CAROLLO, C. A. Estudo fitoquímico das partes aéreas (folha e casca do caule) de *Duguetia furfuracea*- Annonaceae, *Dissertação de mestrado*, Depto de Química/CCET – UFMS, 2003.
- CAROLLO, C.A.; HELLMAN, A. R.; SIQUEIRA, J. M. Sesquiterpenoids from the essential oil from leaves of *Duguetia furfuracea* (Annonaceae), *Biochemical Systematics and Ecology*, v.33, n. 6, p. 647-649, 2005.
- CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Studies in Aporphine Alkaloids I. Alkaloids of a Brazilian *Duguetia*, *Farmaco Ed. Sci.*, v. 25, p. 442-443, 1970.
- CASTRO, P. R. C.; RODRIGUES, J. D.; RONDELLA-MAIMONI, R. C. S.; RABELO, J. C.; VEIGA, R. F. A.; LIMA, G. P. P.; JUREIDINI, P.; DENADAI, I. A. M. Ação alelopática de alguns extratos de plantas daninhas na germinação de arroz, 1984. *Apud*: FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.
- CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; WATERMAN, P.G. The Aporphinoid alkaloids of the Annonaceae *Apud*: *Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives*, Ed. S. William Pelleiter (John Wiley , Sons), v. 5, cap. 3, p.133-627, New York, 1987.
- CHEN, K-S; KO, F-N; TENG, C-W; WU, Y-C. Antiplatelet and vasorelaxing actions of some aporphinoids, *Planta Medica*, v. 62, p. 133-136, 1996.
- COELHO, R. W. Substâncias fitotóxicas presentes no capim annoni, *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 1986. In: FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.
- CORREA, M. P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*, 6 volumes, II edição, Rio de Janeiro, Imprensa nacional, 1978.

- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A., ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. *Óleos essenciais de plantas do Nordeste*, 1 ed., Fortaleza, Edições UFC, 1981.
- DIETZ, H.; STEINLEIN, T.; ULLMANN, I. Establishment of the invasive perennial herb *Bunias orientales* L.: An experimental approach, *Acta Oecologia*, v. 20, n. 6, p. 621-632, 1999.
- EINHELLIG, F. A.; An integrate view of allelochemicals amid multiple stresses, 1999. *Apud*: FERREIRA, A. G. Alelopatia: Sinergismo e inibição, *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*, Ed. MXM, Recife, 2005.
- ENRÍQUEZ, R. G.; CHÁVEZ, M. A.; JÁUREGUI, F. Propenylbenzenes from *Guatteria gauremi*, *Phytochemistry*, v. 19, p. 2024-2025, 1980.
- FAURE, R.; RAMANOELINA, A. R. P.; RAKOTONIRAINY, O.; BIANCHINI, J-P.; GAYDOU, E. M. Two-dimensional nuclear magnetic resonance of sesquiterpenoids - application to complete assignment of ^1H and ^{13}C NMR spectra of some aromadendrane derivatives, *Magnetic Ressonance in Chemistry*, v. 29, p. 969-971, 1991.
- FERREIRA, A. G. Alelopatia: Sinergismo e inibição, *Estresses ambientais: danos e benefícios em plantas*, Ed. MXM, Recife, p. 433-440, 2005.
- FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.
- FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M., HOUGHTON, P. J., BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre sua importância medicinal, *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 42-46, 2000.
- FERREIRA, M. J. P.; COSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; RODRIGUES, G. V.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; KATO, M. J.; EMERENCIANO, V. P. Computer-aided method for identification of components in essential oils by ^{13}C NMR Spectroscopy, *Analytica Chimica Acta*, v. 447, p. 125-134, 2001.
- FERRI, M. G. *Fisiologia Vegetal*, Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo, cap. 2, 1979.
- FISCHER, D. C. H.; GUALDA, N. C. A.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C. S.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; ALVES, M. O.; YOGI, A.; SANTI, S. M.; AVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K.; MORENO, P. R. H. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species, *Acta Tropica*, v. 92, p. 261-266, 2004.

- FOURNET, A.; ANGELO, B. A.; MUNÓZ, V. HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloids on American *Leishmania* sp. in BALB/c mice, *Phytotherapy Research*, v. 7, p. 281-284, 1993.
- FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ A. Annonaceae essential oils: A review, *Journal of Essential Oil Research*, v. 11, p. 131-142, 1999.
- GARDUÑO, L.; SALAZAR, M; SALAZAR, S.; MORELOS, M. E.; LABARRIOS, F.; TAMARÍZ, J.; CHAMORRO, G. A. Hypolipidaemic activity of α -asarone in mice, *Journal of Ethnopharmacology*, v. 55, n. 2, p. 81-163, 1997.
- GIJSEN, H. J. M., WIJNBERG, J. B. P. A., DE GROOT, A. E. Structure, Occurrence, Biosynthesis, Biological Activity, Synthesis and Chemistry of Aromadendrane Sesquiterpenoids, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, Nova Iorque, p. 149-184, 1995.
- GÓMEZ-CADENAS, A.; TADEO, F. R.; PRIMO-MILO, E.; TALON, M. Involvement of abscisic acid and ethylene in the responses of citrus seedlings to salt shock, *Physiologia Plantarum*, v. 103, p. 475-484, 1998.
- GONZÁLEZ M. C.; SENTANDREU, M. A.; RAO, K. S.; ZAFRA-POLO, M. C.; CORTES, D. Prenylated benzopyran derivatives from two *Polyalthia* species, *Phytochemistry*, v. 43, n. 6, p. 1361-1364, 1996.
- GOSLEE, S. C.; PETERS, D. P. C.; BECK, K. B. Modelling invasive weeds in grasslands: the role of allelopathy in *Acroptilon repens* invasion, *Ecological Modelling*, v. 139, p. 31-45, 2001.
- GOTTLIEB, O. R; MAGALHÃES, A. F.; MAGALHÃES, E. G.; MAIA, J. G. S.; MARSAIOLI, A. J. Oxoaporphine alkaloids from *Duguetia eximia*, *Phytochemistry*, v. 17, p. 837-838, 1978.
- GRANDIC, S. R.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae, *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 58, p. 388-392, 2004.
- GRASSI, R. F.; RESENDE, U. M.; SILVA, W.; MACEDO, M. L. R.; BUTERA, A. P.; TULLI, E. O.; SAFFRAN, F. P.; SIQUEIRA, J. M. Estudo fitoquímico e Avaliação Alelopática de *Memora peregrinal*-“Ciganinha”- Bignoniaceae, uma espécie invasora de pastagens em Mato Grosso do Sul, *Química Nova*, v. 28, n. 2, p. 199-203, 2005.
- GUINAUDEAU, H.; BOHLKE, M.; LIN, L. Z.; ANGERHOFER, C. K.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. (+)-Angehibangine, a new type of bisbenzylisoquinoline

- alkaloid, and other dimers from *Pacchigone dasycarpa*, *Journal of Natural Products*, v. 60, p. 258-260, 1997.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids III, *Journal of Natural Products*, v. 46, p. 761-835, 1983.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids IV, *Journal of Natural Products*, v. 51, p. 389-474, 1988.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoids alkaloids V, *Journal of Natural Products*, v. 57, p. 1033-1135, 1994.
- HARDT, I. H.; RIECK, A.; KÖNIG, W. A.; MUHLE, H. Isolepidozene, a diastereomer of bicyclogermacrene, in some liverworts, *Phytochemistry*, v.40, p. 605-606, 1995.
- HARMONNIÉRE, M.; FOURNET, A.; LEBOEUF, M.; BOUQUET, A.; CAVÉ, A. Polycarpol, a new triterpene from *Polyalthia oliveri* Engl. and *Meiocarpidium lepidotum* Engl. And Diels, Annonaceae (1976). *Apud*: JUNG, J. H.; PUMMANGURA, S.; CHAICHANTIPYYUTH, C.; PATARAPANICH, C.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*, *Phytochemistry*, v.29, n.5, p.1667-1670, 1990.
- HAY, R. K. M.; SVOBODA, K. P.; WATERMAN, P. *Volatile oil crops: their biology, biochemistry and production*, eds. Longman Group, England, p.5, 1993.
- HUFFORD, C. D.; FUNDERBURK, M. J.; MORGAN, J. M.; ROBERTSON, L. W. Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera*, *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 64, n. 5, p. 789-792, 1975.
- HUFFORD, C. D.; SHARMA, A. S.; OGUNTIN, B. O. Antibacterial and antifungal activity of liriodenine and related oxoaporphine alkaloids, *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 69, n. 10, p. 1180-1183, 1980.
- IAS (International Allelopathy Society Constitution). A science for the Future, First World Congress on Allelopathy, 1996. *In*: MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standard phytotoxic bioassay for Allelochemicals. Select of standard target species, *Journal Agricultural Food Chemistry*, v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.
- INDERJIT, DUKE, S. O. Ecophysiological aspects of allelopathy, *Planta*, v. 217, p. 529-539, 2003.
- INDERJIT. Plant phenolics in allelopathy, *The Botanical Review*, v. 62, p. 186-202, 1996.
- ISTVAN, E. S.; DEISENHOFER, J. Structural mechanism for statin inhibition of HMG-CoA reductase, *Science*, v. 292, p. 1160-1164, 2001.

- IWASA, K.; KAMIGAUCHI, M.; TAKAO, N. Biotransformation of the protoberberines into benzindanoazepine and spirobenzylisoquinoline-type alkaloids by tissue cultures of several *Corydalis* species, *Journal of Natural Products*, v. 51, n. 6, p. 1232-1235, 1988.
- JAYASURIYA, H.; HERATH, K. B.; ONDEYKA, J. G.; GUAN, Z.; BPRIS, R. P.; TIWARI, S.; JONG, W.; CHAVEZ, F.; MOSS, J.; STEVENSON, D. W.; BECK, H. T.; SLATTERY, M.; ZAMORA, N.; SCHULMAN, M.; ALI, A.; SHARMA, N.; MACNAUL, K.; HAYES, N.; MENKE, J. G.; SINGH, S. B. Diterpenoid, steroid and triterpenoid agonists of liver x receptors from diversified terrestrial plants and marine sources, *Journal of Natural Products*, v. 68, p. 1247-1252, 2005.
- JOANNE, M. M., *Cosmetic Ingredient Handbook*, 1988. Apud: FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M., HOUGHTON, P. J., BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre sua importância medicinal, *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 42-46, 2000.
- JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae), *Journal of Organic Chemistry*, n. 47, p. 3151-3153, 1982.
- JOSHI, B. P.; SHARMA, A.; SINHA, A. K. Ultrasound-assisted convenient synthesis of hypolipidemic active natural methoxylated (*E*)-arylalkenes and arlyalkanones, *Tetrahedron*, v. 61, p. 3075-3080, 2005.
- JUNG, J. H.; PUMMANGURA, S.; CHAICHANTIPYYUTH, C.; PATARAPANICH, C.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*, *Phytochemistry*, v.29, n.5, p.1667-1670, 1990.
- KNAGGS, A. R. The biosynthesis of shikimate metabolites, *Natural Products Report*, v. 20, p. 119-136, 2003.
- KAHN, K.; TIPTON, P. A. kinetics and mechanism of allantoin racemization, *Bioorganic Chemistry*, v. 27, p. 62-72, 2000.
- KAMETANI, T.; UJIE, A.; IHARA, M.; KUKUMOTO, K.; KOIZUMI, H. Conformational analysis of tetrahydroprotoberberines by Carbon-13 NMR Spectroscopy, *Heterocycles*, v. 3, n. 5, p. 371-377, 1975.
- KANYINDA, B.; VANHAELEN-FASTRE, R.; VANHAELEN, M.; OTTINGER, R. Identification by two-dimensional NMR spectroscopy of two new benzylisoquinoline alkaloids from leaves of *Anisocycla cymosa*, *Journal of Natural Products*, v. 55, p. 607-612, 1992.

- KESSLER, P. J. A. Annonaceae, 1993. *Apud*: MAAS P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil, *Rodriguésia*, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.
- KOTAKE, Y.; OKUDA, K.; KAMIZONO, M.; MATSUMOTO, N.; TANAHASHI, T.; HARA, H.; CAPARROS-LEFEBVRE, D.; OHTA, S. Detection and determination of reticuline and *N*-methylecoclaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography B*, v. 806, p. 75-78, 2004.
- KRISHNAPPA, S.; DEV, S. Sesquiterpenes from *Lansium anamalayanum*, *Phytochemistry*, v. 12, p. 823-825, 1973.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae, *Phytochemistry*, v. 21, p. 2783-2813, 1982.
- LEIMBACH, R. Ethereal oil from the seeds of *Monodora grandiflora*, *Wallach-Fest.*, p. 502-512, 1909; *Chemical Abstracts*, v. 5, p. 885, 1911. *Apud*: FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ A. Annonaceae essential oils: A review, *Journal of Essential Oil Research*, v. 11, p. 131-142, 1999.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*, *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 30-38, 1993.
- LIU, G. Q.; SUN, J. N.; HE, Z. Z.; JIANG, Y. Spasmolytic effects of active principles of the essential oil of *Acorus gramineus*, *Acta Pharmacological*, 1983. *In*: PARK, C.; SOON-H, K.; YOUNG-JOON, A. Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against three coleopteran stored-product insects, *Journal of Stored Products Research*, v. 39, p. 333-342, 2003.
- LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas e tóxicas*, Ed. Plantarum Ltda, 3ª edição, 2000.
- MAAS P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil, *Rodriguésia*, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.
- MACIAS, F. A.; SIMONET, A. M.; ESTEBAN, M. D. Potencial allelopathic lupane triterpenes from bioactive fractions of *Melliotus messamensis*, *Phytochemistry*, v. 36, n. 6, p. 1369-1379, 1994.
- MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae), *Phytochemistry*, v. 54, p. 709-716, 2000.

- MANN, J. *Secondary Metabolism*, 2º ed, Oxford Science Publications, cap. 3 , 1992.
- MARSAIOLI, A. J.; RÚVEDA, E. A.; REIS, F. A. M.; KUCK A. M., MAGALHÃES A. F. ¹³C NMR Analysis of aporphine alkaloids, *Phytochemistry*, v. 18, p. 165-169, 1979.
- MARTINDALE, The Extra Pharmacopoeia, 3º ed., 1993. In: FERREIRA, D. T.; ALVARES, P. S. M., HOUGHTON, P. J., BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre sua importância medicinal, *Química Nova*, v. 23, n. 1, p. 42-46, 2000.
- MATHOUET, H.; CAZOULAT, I.; OULYADI, H.; SEGUIN, E.; DAICH, A.; ELOMRI, A. Cazolobine, a new sesquiterpene from *Isolona hexaloba* (Annonaceae), *B: Chemical Sciences* , v. 59, p. 1118-1120, 2004.
- McLAUGHLIN, J. L. Grown-Gall tumours on potato discs and Brine Shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation in *Methods in Plant Biochemistry*, K. Hostettmann Ed., London, v. 6, p. 1-32, 1991.
- MEDINA-FRANCO, J. L.; LÓPEZ-VALLEJO, F.; RODRÍGUES-MORALES, S.; CASTILHO, R.; CHAMORRO, G.; TAMARIZ, J. Molecular docking of the highly hypolipidemic agent α -asarone with the catalytic portion of HMG-CoA reductase, *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, p. 989-994, 2005.
- MICHAEL, A. S.; THOMPSON, C. G.; ABRAMOVITZ. *Artemia salina* as a test organism for bioassay, *Science*, v. 123, p. 646, 1956.
- MIYAZAWA, M.; UEMURA, T.; KAMEOKA, H. Biotransformation of sesquiterpenoids, (+)-aromadendrene and (-)-allo-aromadendrene by *Glomerella cingulata*, *Phytochemistry*, v.40, n.3, p.793-796, 1995.
- MOLISCH, H. Der Einfluss einer Pflanze auf die andere Allelopathie, 1937. In: FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.
- MOMIN, R. A.; NAIR, M. G. Pest-managing efficacy of *trans*-asarone isolated from *Daucus carota* L. Seeds, *Journal Agricultural and Food Chemistry*, v. 50, n. 16, p. 4475-4478, 2002.
- MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; TAKAMATSU, S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antimalarial, cytotoxic, and antifungal alkaloids from *Duguetia hadrantha*, *Journal of Natural Products*, v. 64, p. 559-562, 2001.
- NAGASHIMA, F.; MURAKAMI, Y.; ASAKAWA, Y. Aromatic compounds from the Ecuadorian liverwort *Marchesinia brachiata*: a revision, *Phytochemistry*, v. 51, p. 1101-1104, 1999.

- NAVARRO, V. R.; SETTE I. M. F.; DA-CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MAIA, J. G. S. Alcalóides de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae), *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.*, v. 3, p. 23-29, 2001.
- NIEMINEN, M.; SOUOMI, J.; NOUHUYS, S.; SAURI, P. ; RIEKKOLA, M. L. Effect of iridoid glycoside content on oviposition host plant choice and parasitism in a specialist herbivore, *Journal of Chemical Ecology*, v. 29, n. 4, p. 823-844, 2003.
- NIETO, M.; CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; Alcaloides des Annonacees: Composition des écorces de tronc et de racines de l'*Enantia pilosa*, *Journal of Natural Products*, v. 39, p. 350-356, 1976.
- NISHIMURA, K.; SHINODA, N.; HIROSE, Y. A new sesquiterpene, bicyclogermacrene, *Tetrahedron Letters*, p. 3097-3100, 1969.
- NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATTHENGE, S. G.; CHALO, M.; PATRICK, B.; JUMA, F. D. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*, *Phytochemistry*, v. 65, p. 939-944, 2004.
- O'DONNELL, P. J.; SCHMELZ, E.; BLOCK, A.; MIERSCH, O.; WASTERNAK, C.; JONES, J. B.; KLEE, H. J. Multiple hormones act sequentially to mediate a susceptible tomato pathogen defense response, *Plant Physiology*, v. 133, p. 1181-1189, 2003.
- PALMADE, M.; PESNELLE, P. ; STREITH, J. ; OURISSON, G. L' α -Gurjunene, I : Structure et Stereochimie, 1963. In: GIJSEN, H. J. M.; WIJNBERG, J. B. P. A.; DE GROOT, A. E. Structure, Occurrence, Biosynthesis, Biological Activity, Synthesis and Chemistry of Aromadendrane Sesquiterpenoids, *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer-Verlag, Nova Iorque, p. 149-184, 1995.
- PARK, C.; SOON-H, K.; YOUNG-JOON, A. Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against three coleopteran stored-product insects, *Journal of Stored Products Research*, v. 39, p. 333-342, 2003.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. *Introduction to spectroscopy*, 3^o ed., Ed. Brooks/Cole Thomson Learning, Estados Unidos, cap. 7, 2001.
- PELLETIER, S. W. *Chemical and biological perspectives*, Ed. Johny Wiley & Sons, Nova Iorque, v.5, p.135-141, 1987.
- PEREIRA, N. F. G.; CAROLLO, C. A.; GARCEZ, W. S.; SIQUEIRA, J. M. Novel santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, *Química Nova*, v. 26, p. 512-516, 2003.

- PEREIRA, N.F.G.; Estudo fitoquímico biomonitorado do extrato éter de petróleo das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* R. E. Fries (R. E. Fries), *Dissertação de Mestrado*, Depto de Química/CCET – UFMS, 2002.
- PEREZ, E.; SAEZ, J.; BLAIR, S.; FRANCK, X. ; FIGADERE, B. Isoquinoline alkaloids from *Duguetia vallicola* stem bark with antiplasmodial activity, *Letters in Organic Chemistry*, v. 1, p. 102-104, 2004.
- POCHERT C. J.; BEHNKE, J. *The Aldrich Library of ¹³C and ¹H NMR spectra*, Aldrich Chemical Company, v. II, ed. I, 1993.
- POPLAWSKI, J.; LOZOWICKA, B.; DUBIS, A. T.; LACHOWSKA, B.; WITKOWSKI, S.; SILUK, D.; PETRUSEWICZ, J.; KALISZAN, R.; CYBULSKI, J.; STRZALKOWSKA, M.; CHILMONCZYK, Z. Synthesis and hypolipidemic and antiplatelet activities of α -asarone isomers in human (*in vitro*), mice (*in vivo*) and rats (*in vivo*), *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 43, n. 20, p. 3671-3676, 2000.
- RAZAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; FOURNET, A. Alcaloïdes des Annonacées, 78. Alcaloïdes des écorces d'un *Duguetia spixiana* de Bolivie, *Journal of Natural Products*, v. 50, p. 674-679, 1987.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais, *Ciência e Agrotecnologia*, v. 25, p. 102-123, 2001.
- ROSECKE, J.; KONIG, W. A. Steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*, *Phytochemistry*, v. 52, p. 1621-1627, 1999.
- RUANGRUNGSI, N.; LANGE, G. L.; LEE, M. Constituents of *Parabaena sagittata*. Two new tetrahydroprotoberberine alkaloids, *Journal of Natural Products*, v. 49, p. 253-258, 1986.
- SAN, A.; SANYAR, G.; MAT, A.; HIRLAK, F. Alkaloids and bioactivity of *Papaver lateritium* occurring in Turkey, *Planta Medica*, v. 64, n. 6, p. 582, 1998.
- SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance, *Phytochemistry*, v. 55, p. 567-573, 2000.
- SCHMIDT, C. O.; BOUWMEESTER, H. J.; BÜLOW, N.; KÖNIG, W. A. Isolation, Characterization, and Mechanistic studies of (-)- α -Gurjunene Synthase from *Solidago canadensis*, *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 364, n. 2, p. 167-177, 1999.
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. *O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas*, Oréades, v.14/15, p.15-30, 1981/1982.

- SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X. *Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos*, 6a. Ed. , Rio de Janeiro, editora LTC, 2000.
- SINHA, A. K.; JOSHI, B. P.; SHARMA, A.; GOEL, H. C.; PRASAD, J. Ultrasound-assisted conversion of toxic β -asarone into nontoxic bioactive phenylpropanoid: isoacoramone, a metabolite of *Piper marginatum* and *Acorus tararinowii*, *Natural Product Research*, v. 18, n. 3, p. 219-223, 2004.
- SIQUEIRA, J. M.; CAROLLO, C. A.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; MULLER, L.; NASCIMENTO, E. A. Aromadendrane sesquiterpenoids from the essential oil of leaves of *Duguetia glabriuscula*– Annonaceae, *Journal of the Chilean Chemical Society*, v.48, 2003.
- SIQUEIRA, J. M.; MÜLLER, L.; SOUZA, M. C. G; BOAVENTURA, M. A. D. Ácido Allo-aromadendran-14-óico, um novo sesquiterpeno, isolado como artefato do óleo volátil das folhas de *Duguetia glabriuscula* R. E. Fries (R. E. Fries), Annonaceae, 23^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Poços de Caldas, resumo, PN 104, 1999.
- SIQUEIRA, J. M.; OLIVEIRA, C. C.; GARCEZ, W. S.; GARCEZ, F. R; BOAVENTURA, M. A. Bioactive sesquiterpene from *Duguetia glabriuscula*, *Fitoterapia*, v. 66, p. 89-90, 1997.
- SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* - Annonaceae, Biomonitorado Pelo Ensaio de Toxicidade Frente a *Artemia salina* Leach, *Química Nova*, v. 24, p. 185-187, 2001.
- SONNET, P. E.; JACOBSON, M. Tumor inhibition II: Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*, *Journal of Pharmaceutical Science*, v. 60,p. 1254-1256, 1971.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal*, 3º ed., Ed. ArtMed, Porto Alegre, cap. 19, 2004.
- THOMAS, R.; SCHRADER, L. E. Ureide metabolism in higher plants, *Phytochemistry*, v. 20, p. 361-371, 1981.
- TOYOTA, M.; KOYAMA, H.; MIZUTANI, M.; ASAKAWA, Y. (-)-Ent-spathulenol isolated from liverworts is an artefact, *Phytochemistry*, v. 41, p. 1347-1350, 1996.
- VENKATRTAMAN, G.; THOMBARE, P. S.; SABATA, B. K. A tetracyclic triterpenoid from *Garuga pinnata*, *Phytochemistry*, v. 36, p. 417-419, 1994.
- WANG, Z-W.; MA, W-W.; McLAUGHLIN, J. L.; GUPTA, M. P. 2,4,5-Trimethoxystyrene, a bioactive component of the bark of *Duguetia panamensis*, *Journal of Natural Products*, v. 51, p. 382-384, 1988.

- WANG, Z-W.; MA, W-W.; McLAUGHLIN, J. L.; GUPTA, M. P. 2,4,5-Trimethoxystyrene, a bioactive component of the bark of *Duguetia panamensis*, *Journal of Natural Products*, v. 51, p. 382-384, 1988.
- WATERMAN, P. G. A phytochemistry in the African rain forest, *Phytochemistry*, v. 25, p. 3-17, 1986.
- WATERMAN, P. G., 2,4,5-trimethoxystyrene from *Pachypodanthium staudi*, *Phytochemistry*, v.15, p.347, 1976.
- WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; HALTIWANGER, R. C.; EGGLESTON, D. S. Artabotrine: A novel bioactive alkaloid from *Artabotrys zeylanicus*, *Tetrahedron*, v. 51, p. 7877-7882, 1995.
- WIJERATNE, E. M. K.; HATANAKA, Y.; KIKUCHI, T.; TEZUKA, Y.; GUNATILAKA, A. A. L. A dioxoaporphine and other alkaloids of two Annonaceous plants of Sri Lanka, *Phytochemistry*, v. 42, p. 1703-1706, 1996.
- WINKLER, R. G. BLEVINS, D. G.; POLACCO, J. C.; RANDALL, D. D., Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes, *TIBS*, v. 13, 1998.
- WISEMAN, R. W.; MILLER, E. C.; MILLER, J. A.; LIEM, A. Structure-activity studies of the hepatocarcinogenicities of alkenylbenzene derivatives related to estragole and safrole on administration to preweaning male C57BL/6J x C3H/HeJ F₁ mice, *Cancer Research*, 1987. In: PARK, C.; SOON-H, K.; YOUNG-JOON, A. Insecticidal activity of asarones identified in *Acorus gramineus* rhizome against three coleopteran stored-product insects, *Journal of Stored Products Research*, v. 39, p. 333-342, 2003.
- WU, Y-C.; CHANG, G-Y.; YIH, C.; DUH, C-Y.; WANG, S-K. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*, *Phytochemistry*, v. 33, n. 2, p. 497-500, 1993.
- WU, Y-C.; CHEN, C-H.; YANG, T. H.; LU, S-T.; McPHAIL, D. R.; McPHAIL, A. T.; LEE, K-H. Cytotoxic aporphines from *Artabotrys uncinatus* and the structure and stereochemistry of artacinine, *Phytochemistry*, v. 28, p. 2191-2195, 1989.
- YANG, Y.; CHANG, F.; HWANG, T.; CHANG, W.; WU, Y. Inhibitory effects of ent-kauranes from the stems of *Annona squamosa* on superoxide anion generation by human neutrophils, *Planta Medica*, v. 70, p. 256-258, 2004.
- YU, J. Q.; SHOU, S. Y.; QIAN, Y. R.; ZHU, Z. J.; HU, W. H. Autotoxic potential of cucurbit crops, *Plant Soil*, v. 223, p. 147-151, 2000.
- YUAN, S. F.; CHANG, H.; CHEN, H.; YEH, Y.; KAO, Y.; LIN, K.; WU, Y.; SU, J. Annonacin, a mono-tetrahydrofuran acetogenin, arrests cancer cells at the G1 phase and

causes cytotoxicity in a Bax- and caspase-3-related pathway, *Life Sciences*, v. 72, p. 2853-2861, 2003.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*, Ed. ARGOS, Chapecó, cap. 14, 2001.

ZHOU, B.; JOHSON, R. K.; MATTERN, M. R.; XIANGYANG, W.; HECHT, S. M.; BECK, H. T.; ORTIZ, A.; KINGSTON, D. G. I. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxylon*, *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 217-221, 2000.

ZOBEL, A. M.; LYNCH, J. M. Shielding against ultraviolet radiation causes production of both phytoalexins and allelochemicals, 1999. *Apud*: FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopátia: uma área emergente da ecofisiologia, *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, v. 12, p. 175-204, 2000.