

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

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

<sup>a</sup>Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

<sup>b</sup>Departamento de Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, 58051-900 João Pessoa – PB, Brasil

<sup>c</sup>Departamento de Química, Instituto de Química, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 23890-000 Seropédica – RJ, Brasil

Recebido em 01/11/2019; aceito em 09/03/2020; publicado na web em 20/04/2020

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

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

## INTRODUÇÃO

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

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

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

O estudo químico do extrato etanólico das raízes de *A. dolichocarpa* levou ao isolamento de seis compostos (**1** – **6**) (Figura 1), sendo esse o primeiro relato das substâncias **1** e **2** na literatura. Suas estruturas químicas foram determinadas com base na análise dos dados espectroscópicos de RMN uni e bidimensionais, espectrometria de massa de alta resolução com ionização por *electrospray* (EMAR-IES) e comparação com dados da literatura. Os dados de RMN de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C dos compostos **1** e **2** estão compilados na Tabela 1.

O composto **1** foi isolado como cristais amarelados. O espectro de EMAR-IES mostrou o pico do íon [M+H]<sup>+</sup> com *m/z* 283,1073 (calcd. para C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 283,1077), compatível com a fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. O espectro de infravermelho mostrou absorção de duas bandas em 3306 e 3139 cm<sup>-1</sup> de estiramento N-H<sub>2</sub>, banda de carbonila de amida em 1646 cm<sup>-1</sup>, absorções em 1618 e 1582 cm<sup>-1</sup> de C=C de aromático, além do sinal em 1055 cm<sup>-1</sup> de estiramento C-O. O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz) mostrou seis sinais de prótons aromáticos, sendo dois dupletos em δ<sub>H</sub> 8,95 (d; *J* = 4,8 Hz) e δ<sub>H</sub> 7,64 (d; *J* = 4,8 Hz), sugestivos para os prótons H-2 e H-3 de um anel piridínico do esqueleto azaaporfinoide,<sup>19,20</sup> e também quatro duplos dupletos duplos compatíveis com um sistema aromático ABCD, sendo um mais desprotegido em δ<sub>H</sub> 9,13 (ddd; *J* = 8,4; 1,2; 0,8 Hz) característico do próton H-10 desse tipo de esqueleto, um em δ<sub>H</sub> 8,26 (ddd; *J* = 8,4; 1,2; 0,8 Hz) atribuído ao H-7 e os outros dois em δ<sub>H</sub> 7,81 (ddd; *J* = 8,4; 7,2; 1,2 Hz) e 7,73 (ddd; *J* = 8,4; 7,2; 1,2 Hz) assinalados para H-8 e H-9, respectivamente. Além desses sinais, foram ainda observados dois simpletos, ambos integrando para três prótons, em δ<sub>H</sub> 4,07 (s) e δ<sub>H</sub> 4,04 (s), correspondentes a duas metoxilas. No espectro de <sup>13</sup>C (CD<sub>3</sub>OD, 100 MHz) foram observados dezesseis sinais. Desses, seis denotam ser de carbonos metínicos aromáticos e dois de grupos metoxila, confirmando dessa forma os dados observados no espectro de RMN de <sup>1</sup>H. Observou-se também um sinal característico de um grupo carbonila e mais sete sinais indicativos de carbonos aromáticos não hidrogenados. A análise desses dados e do espectro de correlações HSQC permitiram atribuir os sinais dos carbonos metínicos em δ<sub>C</sub> 147,3 e 121,8 aos carbonos

\*e-mail: josean@lft.ufpb.br

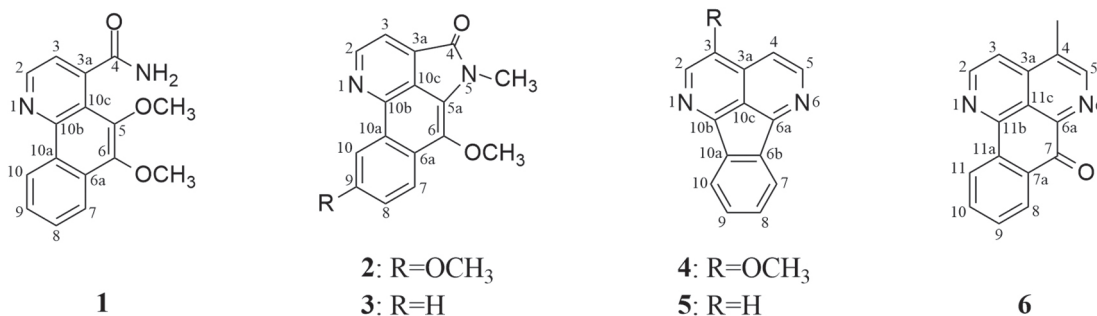


Figura 1. Alcaloides isolados de *A. dolichocarpa*

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

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

<sup>1</sup>Obtido em CD<sub>3</sub>OD; <sup>2</sup>obtido em CDCl<sub>3</sub>; \*dados atribuídos por HMBC.

C-2 e C-3, o primeiro mais desprotegido por estar ligado a um heteroátomo, e em δ<sub>C</sub> 122,9, 130,8, 128,0 e 125,4 aos carbonos C-7, C-8, C-9 e C-10, respectivamente. Os demais carbonos foram definidos com auxílio das correlações a longa distância (<sup>2</sup>J e <sup>3</sup>J) observadas no experimento HMBC (Figura 2), que permitiu também confirmar as demais atribuições já sugeridas. A correlação dos sinais em δ<sub>H</sub> 8,95 (H-2) com δ<sub>C</sub> 121,8 (C-3), 144,4 (C-3a), 144,3 (C-10b) e em δ<sub>H</sub> 7,64 (H-3) com δ<sub>C</sub> 147,3 (C-2), 174,4 (C-4), 122,1 (C-10c) estabeleceu os valores dos carbonos C-3a, C-10b e C-10c, bem como ratificou a posição da carbonila em C-4. A correlação dos sinais em δ<sub>H</sub> 7,81 (H-8) e δ<sub>H</sub> 9,13 (H-10) com δ<sub>C</sub> 132,0 (C-6a) e em δ<sub>H</sub> 8,26 (H-7) e δ<sub>H</sub> 7,73 (H-9) com δ<sub>C</sub> 128,9 (C-10a) determinou o deslocamento dos carbonos C-6a e C-10a. Além dessa correlação, o sinal em δ<sub>H</sub> 8,26 (H-7), assim como o δ<sub>H</sub> 4,07 (H<sub>3</sub>CO-6), correlacionaram-se com δ<sub>C</sub> 147,4 (C-6), permitindo dessa forma atribuir o deslocamento de C-6, substituído, portanto, por um grupo metoxila. A localização da segunda metoxila foi definida por meio da correlação do sinal em δ<sub>H</sub> 4,04 (H<sub>3</sub>CO-5) com o sinal em δ<sub>C</sub> 143,8 (C-5). Para confirmar o grupo NH<sub>2</sub> na estrutura química, a amostra foi submetida a análise de RMN de <sup>1</sup>H em CDCl<sub>3</sub>, na qual pôde-se observar dois sinais largos em δ<sub>H</sub> 5,74 e 5,87 que desapareceram ao adicionar-se D<sub>2</sub>O (Figuras 9S e 10S). Assim, com base nesses dados, foi possível propor para **1** a

estrutura mostrada na Figura 1, um novo alcaloide azafenantreno denominado dolichocarpina. Sua análise por EM<sup>a</sup> apresentou os íons indicados na Figura 2S e a proposta de fragmentação desses íons pode ser observada na Figura 3.<sup>21,22</sup>

O composto **2** foi isolado como cristais amarelados. O espectro de EMAR-IES mostrou o pico do íon [M+H]<sup>+</sup> com m/z 295,1078 (calcd. para C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 295,1077), compatível com a fórmula molecular C<sub>17</sub>H<sub>15</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Os dados de RMN dessa substância foram comparados com os dados do alcaloide eupolauramina, isolado previamente de *A. dolichocarpa* e novamente neste trabalho (composto **3**),<sup>11</sup> como também com outros relatados na literatura.<sup>20</sup> O espectro de RMN de <sup>1</sup>H (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz) apresentou semelhança com o da eupolauramina (**3**), observando-se porém um sinal de grupo metoxila a mais. Além dessa diferença, o espectro revelou a ausência de um sinal de próton aromático e alteração na multiplicidade dos sinais, apresentando um duplete duplo e dois dupletos no lugar dos quatro duplos dupletos duplos, sugerindo dessa maneira uma substituição no anel D do esqueleto eupolauramina. Os sinais em δ<sub>H</sub> 7,33 (dd; J = 9,2; 2,4 Hz), δ<sub>H</sub> 8,04 (d; J = 9,2 Hz) e δ<sub>H</sub> 8,44 (d; J = 2,4 Hz) sugerem substituição no C-9, devido à ausência do sinal mais desprotegido na região próxima de 9,0 ppm atribuído ao H-10, que pode ter sofrido um efeito de proteção *orto* da metoxila na posição vizinha (C-9), podendo-se

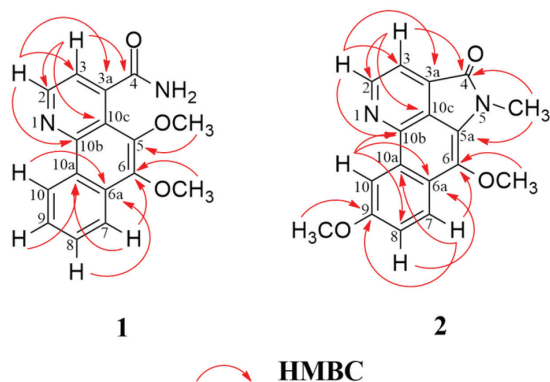


Figura 2. Correlações HMBC de 1 e 2

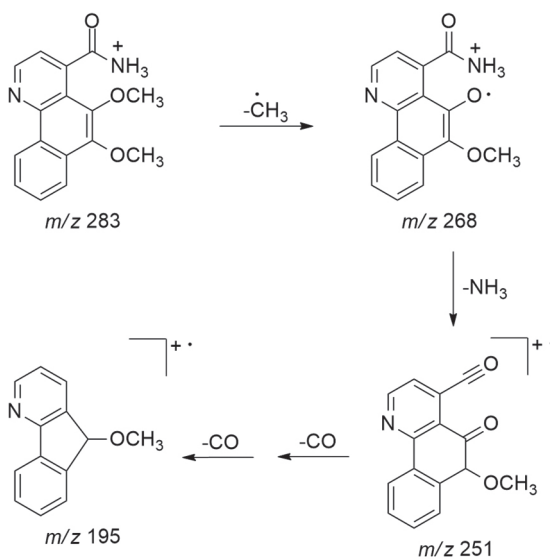


Figura 3. Proposta de fragmentação de  $EM^+$  de 1

então atribuir esses sinais para H-8, H-7 e H-10, respectivamente. No espectro de RMN de  $^{13}C$  foi possível observar apenas oito sinais. Dentre eles se destaca o sinal de metoxila adicional em  $\delta_c$  55,8 e o de um carbono aromático mais protegido em  $\delta_c$  105,2, o qual apresentou correlação no espectro HSQC com o sinal em  $\delta_H$  8,44, atribuindo-se, por conseguinte, esse sinal ao carbono C-10. Os carbonos que não tiveram seus sinais observados no espectro de RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz) foram assinalados após análise do espectro de correlações HMBC (Figura 2). Esse experimento permitiu também confirmar a posição da metoxila em C-9 por meio da correlação do sinal em

$\delta_c$  158,5 (C-9) com  $\delta_H$  4,04 ( $H_3CO$ -9) e 8,04 (H-7), e deste último com  $\delta_c$  138,1 (C-6). Assim, o composto 2, pôde ser identificado como um novo alcaloide azafenantreno, denominado 9-metoxieupolauramina.

Composto 3: RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  em ppm (mult.; J em Hz; H): 9,16 (d; 4,8; H-2), 9,01 (ddd; 8,0; 1,6; 0,8; H-10), 8,13 (ddd; 8,0; 1,2; 0,8; H-7), 7,91 (d; 4,8; H-3), 7,73 (ddd; 8,0; 6,8; 1,6; H-8), 7,67 (ddd; 8,0; 6,8; 1,2; H-9), 4,06 (s;  $H_3CO$ -6), 3,73 (s;  $H_3C$ -N). RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz),  $\delta$  em ppm: 166,8 (C-4), 150,1 (C-2), 142,5 (C-10b), 132,6 (C-6a), 129,6 (C-8), 126,8 (C-9), 124,9 (C-5a), 124,4 (C-10), 122,8 (C-7), 117,2 (C-3), 63,5 ( $H_3CO$ -6), 28,5 ( $H_3C$ -N). EMAR-IES:  $m/z$  265,0979  $[M+H]^+$  (calcd. para  $C_{16}H_{13}N_2O_2$ , 265,0972). Dados coerentes com os relatados na literatura para eupolauramina,<sup>11</sup> já isolado em *A. dolichocarpa*.

Composto 4: RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  em ppm (mult.; J em Hz; H): 8,72 (d; 6,0; H-5), 8,15 (s; H-2), 7,98 (ddd; 6,8; 1,2; 0,8; H-10), 7,91 (ddd; 6,8; 1,2; 0,8; H-7), 7,61 (d; 6,0; H-4), 7,45 (dt; 7,6; 1,2; H-9), 7,40 (dt; 7,6; 1,6; H-8), 4,08 (s;  $H_3CO$ -3). RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz),  $\delta$  em ppm (alguns dados atribuídos por HMBC): 161,6 (C-6a), 155,0 (C-10b), 150,5 (C-3), 149,2 (C-5), 131,1 (C-9), 129,9 (C-8), 129,4 (C-2), 128,5 (C-3a), 122,6 (C-10), 121,7 (C-7), 113,5 (C-4), 56,4 ( $CH_3O$ -3). EMAR-IES:  $m/z$  235,0872  $[M+H]^+$  (calcd. para  $C_{15}H_{11}N_2O$ , 235,0866). Dados compatíveis com os reportados para 3-metoxieupolauridina,<sup>23</sup> isolado pela primeira vez na família Annonaceae.

Composto 5: RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  em ppm (mult.; J em Hz; H): 8,69 (d; 6,0; H-2/H-5), 7,99 (dd; 8,4; 2,0 H-10/H-7), 7,46 (dd; 8,4; 2,0; H-8/H-9), 7,42 (d; 6,0; H-3/H-4). RMN de  $^{13}C$  ( $CDCl_3$ , 100 MHz),  $\delta$  em ppm: 162,7 (C-6a/C-10b), 149,7 (C-2/C-5), 139,6 (C-6b/C-10a), 135,3 (C-3a), 131,4 (C-8/C-9), 122,9 (C-7/C-10), 120,9 (C-10c), 117,6 (C-3/C-4). EMAR-IES:  $m/z$  205,0762  $[M+H]^+$  (calcd. para  $C_{14}H_9N_2$ , 205,0760). Dados semelhantes com os relatados na literatura para eupolauridina,<sup>15,24</sup> relatado pela primeira vez na espécie *A. dolichocarpa*.

Composto 6: RMN de  $^1H$  ( $CDCl_3$ , 400 MHz),  $\delta$  em ppm (mult.; J em Hz; H): 8,95 (d; 0,8; H-5), 8,89 (d; 6,0; H-2), 8,83 (ddd; 8,0; 1,2; 0,8; H-11), 8,45 (ddd; 8,0; 1,6; 0,8; H-8), 7,81 (ddd; 8,0; 7,6; 1,6; H-10), 7,79 (d; 6,0; H-3), 7,67 (ddd; 8,0; 7,6; 1,2; H-9), 2,76 (d; 0,8;  $CH_3$ -4). EMAR-IES:  $m/z$  247,0875  $[M+H]^+$  (calcd. para  $C_{16}H_{11}N_2O$ , 247,0866). Dados compatíveis com os relatados na literatura para 4-metilsampangina,<sup>25</sup> relatado pela primeira vez como produto natural.

Os compostos 2 e 4 inibiram significativamente a proliferação de células HCT-116 com percentual de inibição de  $30,22 \pm 2,63\%$  e  $32,42 \pm 0,53\%$ , respectivamente (Figura 4). Assim, comparando-se as estruturas químicas de 2 com 3 e de 4 com 5, observou-se nos dois casos uma substituição por um grupo metoxila em 2 e 4, o que

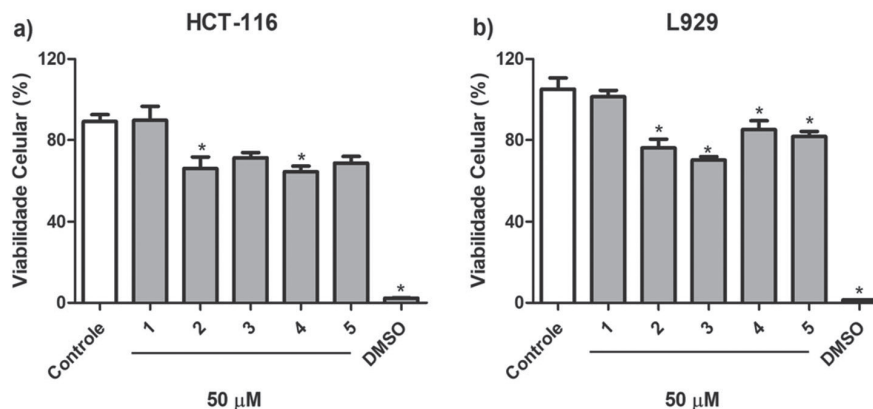


Figura 4. Citotoxicidade dos compostos 1 – 5 em linhagens de células HCT-116 e L929, após 72 h de tratamento. Os valores representam a média  $\pm$  erro padrão de quatro replicatas na concentração de  $50 \mu mol L^{-1}$  (\* $p < 0,05$  comparado ao grupo controle)

permitiu sugerir que essa substituição aumentou a atividade citotóxica desses compostos para células tumorais da linhagem HCT-116. O estudo de citotoxicidade em linhagem não tumoral de fibroblasto de camundongo L929 mostrou que os compostos **2** – **5** podem reduzir a proliferação celular, o que indica citotoxicidade.

## CONCLUSÃO

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

## PARTE EXPERIMENTAL

### Procedimentos experimentais gerais

As separações por cromatografia líquida de média pressão (CLMP) foram feitas utilizando como fase estacionária sílica gel (40-63  $\mu\text{m}$ , 230-400 mesh, SiliCycle) e um equipamento Buchi modelo Sepacore flash system X-50. O *software* desse equipamento permitiu analisar as frações coletadas, auxiliando desse modo no agrupamento das amostras. As frações eluídas foram também analisadas por cromatografia de camada delgada (CCD) utilizando-se placas de alumínio pré-revestidas com sílica gel F<sub>254</sub> (SiliCycle), revelando-se com reagente de Dragendorff e exposição à luz UV (254 e 366 nm), e agrupadas de acordo com a similaridade de eluição. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) analítica foi realizada no instrumento Shimadzu Prominence equipado com uma bomba de solvente binária LC-20AT, auto-injetor SIL-20A, sistema degaseificador DGU-20A, detector DAD SPD-M20A, sistema de controle CBM-20A e as colunas de fase reversa Kromasil 100-10-C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm preenchida com partículas de 10  $\mu\text{m}$ ) ou ACE 5 C18 (250 mm  $\times$  4,6 mm e partículas de 5  $\mu\text{m}$ ). As frações foram purificadas por CLAE na escala semi-preparativa e preparativa. Para a primeira técnica foi utilizado um equipamento Shimadzu composto por bomba LC-10AD vp, válvula solenoide FCV-10AL vp, injetor manual Rheodyne, degaseificador DGU-14A, detector UV-vis SPD-10A vp, controlador de sistema SLC-10A vp e uma coluna semi-preparativa Venusil XBP C18 (250 mm  $\times$  10 mm e partículas de 10  $\mu\text{m}$ ). No caso da escala preparativa a purificação foi realizada em um Shimadzu contendo duas bombas LC-6AD, injetor manual Rheodyne, detector DAD SPD-M10A vp, controlador de sistema SLC-10A vp e coluna preparativa ACE 5 C18 (250 mm  $\times$  21,2 mm e partículas de 5  $\mu\text{m}$ ). O fluxo empregado para as purificações foi de 3,5 mL min<sup>-1</sup> para a escala semipreparativa e 8,0 mL min<sup>-1</sup> para a preparativa, realizando-se, para ambas, injeções de 100  $\mu\text{L}$  de amostra para cada corrida cromatográfica.

Os espectros de massa de alta resolução com ionização por *electrospray* (EMAR-IES) e de baixa resolução em *tandem* (MS<sup>n</sup>) foram obtidos em equipamentos Bruker modelos micrOTOF II e Ion Trap-amaZonX, respectivamente, os dois operando no modo positivo. Os espectros de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e bidimensionais foram adquiridos no espectrômetro Bruker AVANCE III HD (400 MHz e 100 MHz para <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C, respectivamente) usando CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD como solvente e CHCl<sub>3</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  7,24 e  $\delta_{\text{C}}$  77,0) e CH<sub>3</sub>OH ( $\delta_{\text{H}}$  3,30 e  $\delta_{\text{C}}$  49,0) residual como padrão interno. As análises de infravermelho foram realizadas

nos espectrômetros Rayleigh WQF-510 FT-IR e PerkinElmer Frontier FT-IR, com pastilhas de KBr e número de onda medido em cm<sup>-1</sup>.

### Material vegetal

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

### Extração e isolamento

As raízes de *A. dolichocarpa* foram secas em estufa de ar circulante a 45 °C por 92 h e em seguida trituradas produzindo 700,0 g de pó. Esse material foi, então, submetido ao processo de extração por maceração com etanol 95% por 72 h, em cinco repetições. A solução extrativa obtida foi concentrada em evaporador rotativo a 45 °C, resultando em 77,6 g de extrato etanólico bruto (EEB). Uma alíquota de 76,1 g do EEB foi inicialmente submetida a uma extração com hexano, para separação dos constituintes com baixa polaridade, permanecendo em contato com o solvente, em agitação mecânica, por cerca de 5 minutos. A seguir o material foi filtrado e o resíduo insolúvel pesando 66,4 g foi submetido ao procedimento de extração ácido-base para alcaloides,<sup>26</sup> fornecendo 2,3 g de fração alcaloídica (FA). Uma amostra da FA (2,1 g) foi fracionada por CLMP, usando sílica gel previamente tratada com NaHCO<sub>3</sub> 10%,<sup>26</sup> e gradientes dos solventes Hex-CHCl<sub>3</sub> (100:0  $\rightarrow$  0:100), CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (100:0  $\rightarrow$  0:100) e AcOEt:MeOH (100:0  $\rightarrow$  3:7), resultando em 116 frações de 50 mL que após análise em CCD foram agrupadas em 20 (FA1-FA20). A fração FA2 (95,0 mg), eluída em Hex-CHCl<sub>3</sub> (8:2), foi submetida a um novo fracionamento por CLMP, com sílica gel tratada com NaHCO<sub>3</sub> 10%, e gradiente de Hex-CHCl<sub>3</sub> (100:0  $\rightarrow$  0:100) e CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (100:0  $\rightarrow$  0:100), fornecendo 9 subfrações (FA2A-FA2I). A subfração FA2D (15,8 mg), obtida em Hex-CHCl<sub>3</sub> (95:5), foi purificada por CLAE semi-preparativa com sistema gradiente de água (0,1% de ácido fórmico) e MeOH (95:5  $\rightarrow$  0:100, em 60 minutos) a 254 nm, dando origem ao composto **5** (2,0 mg), eluído em 74% de MeOH. A subfração FA2E (23,4 mg), também obtida em Hex-CHCl<sub>3</sub> (95:5), foi purificada por CLAE semi-preparativa usando o seguinte gradiente de eluição: solvente A = água (0,1% de ácido fórmico); solvente B = MeOH; sistema de eluição = 0-40 min (20-70% de B); 40-50 min (70% de B); e 50-65 min (70-100% de B); a 254 nm; fornecendo as substâncias **2** (0,6 mg), **3** (4,7 mg) e **4** (1,5 mg), eluídas em 80%, 72% e 70% de B, respectivamente. A fração FA7 (197,3 mg), eluída em Hex-CHCl<sub>3</sub> (1:9), foi purificada por CLAE preparativa com o gradiente de eluição: solvente A = água (0,1% de ácido fórmico); solvente B = MeOH; sistema de eluição = 0-45 min (0-65% de B); 45-55 min (65% de B); e 55-90 min (65-100% de B); a 254 nm; isolando **6** (1,5 mg), obtido em 65% de B. A fração FA8 (295,5 mg), eluída em CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (9:1), foi separada em 11 frações (FA8A-FA8M) por CLMP, com sílica gel tratada com NaHCO<sub>3</sub> 10%, e gradiente de Hex-CHCl<sub>3</sub> (100:0  $\rightarrow$  0:100), CHCl<sub>3</sub>-AcOEt (100:0  $\rightarrow$  0:100) e AcOEt:MeOH (100:0  $\rightarrow$  3:7). A subfração FA8G (121,4 mg), eluída em CHCl<sub>3</sub>, foi submetida a CLAE semi-preparativa com o gradiente de eluição: solvente A = água (0,1% de ácido fórmico); solvente B = MeOH; sistema de eluição = 0-20 min (30-40% de B); 20-65 min (40% de B); e 65-100 min (40-100% de B); a 254 nm; obtendo-se o composto **1** (3,6 mg), obtido em 45% de B.

### Avaliação da citotoxicidade

Para a avaliação da citotoxicidade dos compostos **1** – **5** foram utilizadas as linhagens de células HCT-116 (carcinoma colorretal humano) e L929 (fibroblastos murinos não-tumorais). As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100 U mL<sup>-1</sup> de penicilina e 100 µg mL<sup>-1</sup> de estreptomicina a 37 °C em uma atmosfera umidificada de 5% CO<sub>2</sub>. As células foram semeadas em placas de 96 poços em uma densidade de 3 × 10<sup>5</sup> células/poço. Após um período de 24 h, as células foram incubadas com os compostos **1** – **5** (50 µmol L<sup>-1</sup>) dissolvidos em DMSO (0,4%), por 72 h. Então, o sobrenadante foi descartado e a solução de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (5 mg mL<sup>-1</sup>) foi adicionada e incubada por mais 3 h. O sal de formazam depositado foi dissolvido em dodecil sulfato de sódio (SDS) (100 µL).<sup>27</sup> O controle positivo foi o DMSO (20%). A densidade ótica foi medida em um leitor de microplacas (Synergy HT, BioTek®) no comprimento de onda de 570 nm. Os resultados foram expressos como média ± e.p.m. (erro padrão da média) de quatro replicatas e foram comparados por análise de variância (ANOVA – one way), seguido do pós-teste de Tukey. Os resultados foram considerados significativos quando p < 0,05.

### MATERIAL SUPLEMENTAR

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

### AGRADECIMENTOS

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

### REFERÊNCIAS

- Guo, X.; Tang, C. C.; Thomas, D. C.; Couvreur, T. L. P.; Saunders, R. M. K.; *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1.
- Couvreur, T. L. P.; Helmstetter, A. J.; Koenen, E. J. M.; Bethune, K.; Brandão, R. D.; Little, S. A.; Sauquet, H.; Erkens, R. H. J.; *Front. Plant Sci.* **2019**, *9*, 1941.
- Lopes, J. C.; Mello-Silva, R.; *Rev. Bras. Frutic.* **2014**, *36*, 125.
- Lobão, A. Q.; de Araujo, D. S. D.; Kurtz, B. C.; *Rodriguésia* **2005**, *56*, 85.
- Lúcio, A. S. S. C.; Almeida, J. R. G. S.; Da-Cunha, E. V. L.; Tavares, J. F.; Barbosa Filho, J. M. In *The Alkaloids: Chemistry and Biology*; Knölker, H.-J., ed.; Academic Press: San Diego, 2015, vol. 74, pp. 233–409.
- González-Esquinca, A. R.; De-La-Cruz-Chacón, I.; Castro-Moreno, M.; Orozco-Castillo, J. A.; Riley-Saldaña, C. A.; *Rev. Bras. Frutic.* **2014**, *36*, 01.
- Teichert, H.; Dötterl, S.; Gottsberger, G.; *Plant Syst. Evol.* **2011**, *291*, 25.
- Maas, P. J. M.; Westra, L. Y. T.; *Bot. Jahrb. Syst.* **1984**, *105*, 73.
- Maas, P. J. M.; Westra, L. Y. T.; *Bot. Jahrb. Syst.* **1985**, *105*, 145.
- Scharaschkin, T.; Doyle, J. A.; *Syst. Bot.* **2005**, *30*, 712.
- Lúcio, A. S. S. C.; Almeida, J. R. G. S.; Barbosa-Filho, J. M.; Pita, J. C. L. R.; Branco, M. V. S. C.; Melo, M. F. F.; Agra, M. F.; Da-Cunha, E. V. L.; Da Silva, M. S.; Tavares, J. F.; *Molecules* **2011**, *16*, 7125.
- Pinheiro, R. S.; Rabelo, S. V.; De Oliveira, A. P.; Guimaraes, A. L.; De Moraes-Filho, M. O.; Da Costa, M. P.; Pessoa, C. Ó.; Lúcio, A. S. S. C.; Almeida, J. R. G. S.; *Trop. J. Pharm. Res.* **2016**, *15*, 793.
- Sabphon, C.; Temkithawon, P.; Ingkaninan, K.; Sawasdee, P.; *Nat. Prod. Commun.* **2015**, *10*, 301.
- de Díaz, A. M. P.; *Phytochemistry* **1997**, *44*, 345.
- Husain, K.; Zakaria, S. M.; Lajis, N. H.; Shaari, K.; Ismail, I. S.; Israf, D. A.; Paetz, C.; *Phytochem. Lett.* **2012**, *5*, 788.
- Almeida, J. R. G. S.; Lúcio, A. S. S. C.; Barbosa-Filho, J. M.; Agra, M. F.; da Silva, M. S.; da Cunha, E. V. L.; Uchoa, D. E. A.; Braz-Filho, R.; *Biochem. Syst. Ecol.* **2007**, *35*, 456.
- Hocquemiller, R.; Rasamizafy, S.; Moretti, C.; Jacquemin, H.; Cavé, A.; *Planta Med.* **1981**, *41*, 48.
- Amaral, R. G.; dos Santos, S. A.; Andrade, L. N.; Severino, P.; Carvalho, A. A.; *Clin. Oncol.* **2019**, *4*, 1562.
- Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A.; *J. Nat. Prod.* **1994**, *57*, 1033.
- Taylor, W.; *Aust. J. Chem.* **1984**, *37*, 1095.
- da Silva, F. M. A.; Koolen, H. H. F.; de Almeida, R. A.; de Souza, A. D. L.; Pinheiro, M. L. B.; Costa, E. V.; *Quim. Nova* **2012**, *35*, 944.
- Stévigny, C.; Jiwan, J. H.; Rozenberg, R.; de Hoffmann, E.; Quetin-Leclercq, J.; *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2004**, *18*, 523.
- Carroll, A.; Taylor, W.; *Aust. J. Chem.* **1991**, *44*, 1615.
- Hang, N. T. M.; Oanh, N. T. T.; Hue, C. T.; Tung, T. H.; Thoa, H. T.; Thanh, L. N.; Giap, T. H.; Dung, N. A.; Van Hung, N.; Van Minh, C.; *Vietnam J. Chem.* **2015**, *53*, 73.
- Hufford, C. D.; Zjawiony, J. K.; Srivastava, A. R.; Clark, A. M.; *Heterocycles* **1994**, *39*, 779.
- Costa, E. V.; Pinheiro, M. L. B.; Xavier, C. M.; Silva, J. R. A.; Amaral, A. C. F.; Souza, A. D. L.; Barison, A.; Campos, F. R.; Ferreira, A. G.; Machado, G. M. C.; Leon, L. L. P.; *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 292.
- Mosmann, T.; *J. Immunol. Methods* **1983**, *65*, 55.