

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Guatteria citriodora* Ducke**

**DIEGO DE MOURA RABELO**

**MANAUS  
2008**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**DIEGO DE MOURA RABELO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE  
*Guatteria citriodora* Ducke**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Química Orgânica” como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**Orientadora:** Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro  
**Co-orientador:** Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

**MANAUS  
2008**

**Ficha Catalográfica**  
**Catálogo na fonte pela Biblioteca Central da**  
**Universidade Federal do Amazonas**

RABELO, Diego de Moura.

Estudo Fitoquímico e Biológico de *Guatteria citriodora* Ducke. – Manaus: UFAM, 2008.

Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Amazonas.

98 p. ilustr.

1. *Guatteria citriodora* Ducke 2. leishmanicida 3. alcalóide  
4. citronelal 5. citronelol

I. Título

**DIEGO DE MOURA RABELO**

**ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE**  
***Guatteria citriodora* Ducke**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, na área de concentração “Química Orgânica” como requisito para a obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

Prof<sup>a</sup> Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof<sup>a</sup> Dra. Ana Lúcia Queiroz de Assis Galotta  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Prof. Dr. Anderson Cavalcante Guimarães  
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

## **DEDICO**

A minha família Vitor José, Dagumar, Vitor Hugo, Dayanne, Vitinho e pelos orientadores Maria Belém e Valdir Veiga por serem fundamentais nesse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela graça, força e pelo amor incondicional concedidos somente por um Pai celestial.

À minha família Vitor José, Daguiamar, Vitor Hugo, Dayanne e Vitor Ferreira pelo amor, dedicação, carinho, criação, incentivo e orações.

Ao grande amor da minha vida Laize Florêncio Pires pelo apoio, dedicação e orações.

À Maria Lúcia Belém Pinheiro e ao Valdir da Veiga Florêncio Junior pela orientação, amizade e conselhos para conquista dessa etapa na minha vida acadêmica.

Aos meus amigos de mestrado Renilto, Jaqueline, Cleuton, Marcondes, Relem, Radamés, Denny, Fátima, Zuanny, André, Junior, Dominique, Madson, Alex, Erica, Karol, Elson, Aline, Darlene, Liege, Orivaldo e a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para elaboração desse trabalho.

Aos professores Jefferson Rocha, Sérgio Nunnomura, Adrian Pohlit, Maria da Paz, Anna Lúcia Gallota e Kelson Motta pelo apoio, conhecimento e incentivo nas aulas ministradas.

Ao técnico botânico Silo Soares pela colaboração servida para coleta da planta e ao professor Weber pela identificação da mesma.

À professora Ana Cláudia e colaboradores da FIOCRUZ-RJ pela realização dos ensaios leishmanicida.

Ao Humberto Bizzo da Embrapa – RJ pela colaboração na identificação dos componentes do óleo essencial.

Ao Emmanoel Vilaça e Anderson Barison da UFPR pela amizade, conhecimento compartilhado, pelo grande apoio, pelas análises realizadas de RMN e colaboração na identificação dos espectros.

À banca examinadora pelas sugestões, contribuições e críticas para melhoria desse trabalho.

À CAPES pelo financiamento.

## RESUMO

A *Guatteria citriodora* Ducke é uma espécie amazônica da família Annonaceae, conhecida popularmente como envira-amarela ou laranjinha, a qual ocorre em floresta pluvial de terra firme com distribuição nos estados do Amazonas e Pará, bem como nas Guianas, Suriname, Bolívia, Equador, Colômbia, Peru e Venezuela. O estudo fitoquímico da casca do caule dessa planta resultou no isolamento de três alcalóides oxoaporfínicos, O-metilmoshatolina, liriodenina e oxoputerina, essas substâncias foram previamente isoladas e descritas em espécies do gênero *Guatteria*. A identificação desses compostos foi realizada por meio de técnicas espectroscópicas (IV, RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC) e por comparação com dados da literatura. O óleo essencial extraído das folhas foi analisado por CG/EM e apresentou como constituintes majoritários os monoterpenóides citronelal (25,5%) e citronelol (22,4%). A avaliação biológica desse óleo apresentou atividade leishmanicida “*in vitro*” contra *Leishmania guyanensis* ( $\text{CI}_{50}=12,1\pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ ), e 94,5% de letalidade frente à *Artemia salina* Leach, na concentração de 500  $\mu\text{g/mL}$ . A espécie necessita de mais pesquisa para o estudo de suas aplicabilidades, por apresentar potencial biotecnológico em seus constituintes.

Palavras-chave: *Guatteria citriodora* Ducke, leishmanicida, alcalóide, citronelal e citronelol.

## ABSTRACT

The *Guatteria citriodora* Ducke is an Amazon species known family Annonaceae, popularly as “enviara amarela” or “laranjinha”, that occurs in rain forest on land-firm, with distribution on the states of Amazonas and Pará, being found in Guiane and Suriname. The phytochemical study of stem bark of this plant resulted on isolation of three oxoaporphine alkaloids, O-methylmoschatoline, liriodenine and oxoputerine, common in Annonaceae, and previously obtained from species of *Guatteria* genus. Their identifications were accomplished through spectroscopic analyses (IR, RMN <sup>1</sup>H, HSQC and HMBC) and by comparison with the data of the literature. The essential oil extracted from leaves was analyzed by GC/MS and presented as major constituents the monoterpenoids citronnelal (25.5%) and citronnelol (22.4%). The biological evaluation of this oil showed leishmanicidal activity “*in vitro*” against *Leishmania guianensis* (IC<sub>50</sub>=12.1±1.5 µg/mL), and 94.5% of lethality against *Artemia salina* Leach, in the concentration of 500 µg/mL. The species needs more research for the study of its application, for presenting biotechnical potential in its constituents.

Keywords: *Guatteria citriodora* Ducke, leishmanicidal, alkaloids, citronnelal and citronnelol

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição das espécies da família Annonaceae .....	4
Figura 2: a) <i>Cananga odorata</i> , b) <i>Annona muricata</i> , c) <i>Monodora tenuifolia</i> , d) <i>Annona squamosa</i> , e) <i>Rollinia mucosa</i> .....	5
Figura 3: Estruturas de alcalóides isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i> .....	12
Figura 4: Flavonóides isolados de algumas espécies do gênero <i>Guatteria</i> .....	14
Figura 5: Sequiterpenos isolados da espécie <i>Guatteria multivenia</i> .....	15
Figura 6: Estruturas de alcalóides isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i> com atividades biológicas .....	17
Figura 7: A – Frutos, B – Folha, C – Árvore da <i>Guatteria citriodora</i> Ducke .....	20
Figura 8: Forma promastigota .....	21
Figura 9: Forma amastigota .....	21
Figura 10: Mosquito do gênero <i>Phlebotomus</i> .....	21
Figura 11: Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> spp .....	23
Figura 12: Fluxograma de obtenção dos extratos brutos da casca de <i>Guatteria citriodora</i> Ducke .....	28
Figura 13: Formula de obtenção do índice de retenção .....	30
Figura 14: Fluxograma de extração das bases presentes no extrato diclorometano ...	33
Figura 15: Esquema do fracionamento da fração alcaloídica das cascas .....	34
Figura 16: Fluxograma do esquema da análise cromatográfica da fração 1-5.....	35
Figura 17: Fluxograma de análise cromatográfica da FAL12-57 .....	36
Figura 18: Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>Guatteria citriodora</i> .....	40
Figura 19: Espectro de massa referente ao pico com $t_r = 13,11$ correspondente ao citronelal.....	42

Figura 20: Espectro de massa referente ao pico com $t_r = 16,43$ correspondente ao citronelol.....	42
Figura 21: Espectro de massa do pico com $t_r = 12,72$ correspondente ao neo-isopulegol.....	43
Figura 22: Espectro de massa do pico com $t_r = 22,678$ correspondente ao $\alpha$ -copaeno .....	43
Figura 23: Espectro de massa do pico com $t_r = 31,39$ correspondente ao óxido de cariofileno.....	43
Figura 24: Constituintes majoritários do óleo essencial das folhas de <i>G. citriodora</i> .....	44
Figura 25: Cromatograma de íons totais do padrão dos hidrocarbonetos $C_9$ a $C_{26}$ .....	45
Figura 26: Espectro no infravermelho da Fb em KBr .....	46
Figura 27: Estrutura de um anel benzeno com os três grupos metoxi .....	47
Figura 28: Estrutura do anel piridínico com os hidrogênios $\alpha$ e $\beta$ .....	47
Figura 29: Estrutura do anel benzeno dissustituído .....	47
Figura 30: a – Espectro de RMN $^1H$ da Fb (400 MHz, $CDCl_3$ e $CD_3OD$ ), b – Ampliação da região entre $\delta$ 7,4 e 9,2 .....	49
Figura 31: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (125 MHz, $CDCl_3$ e $CD_3OD$ ) da amostra Fb .....	51
Figura 32: a - Mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (125 MHz, $CDCl_3$ e $CD_3OD$ ) da amostra Fb; b – ampliação da região entre $\delta$ 7,4 e 9,2.....	52
Figura 33: Estrutura da O-metilmoshatolina.....	53
Figura 34: Espectro no IV da Fc em KBr.....	54
Figura 35: Estrutura de um metilenodioxi ligado ao anel benzeno .....	55
Figura 36: a - Espectro de RMN $^1H$ (400MHz, $CDCl_3$ ) da Fc, b - Ampliação na região entre $\delta$ 9,00 e 7,25 .....	56

Figura 37: Mapa de correlação HSQC (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Fc.....	58
Figura 38: a - Mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Fc entre $\delta$ 8,20 a 9,00. b – Ampliação do espectro de HMBC entre $\delta$ 7,80 a 6,30 .....	59
Figura 39: Estrutura da liriodenina .....	60
Figura 40: Estrutura do anel benzeno dissustituído .....	61
Figura 41: a) Espectro de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Fd, b) Ampliação da região $\delta$ 6,00 a 9,00 .....	62
Figura 42: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Fd.....	64
Figura 43: a - Mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da Fd entre $\delta$ 3,90 a 6,00. b – Ampliação do espectro de HMBC entre $\delta$ 7,00 a 9,00 .....	65
Figura 44: Estrutura da oxoputerina .....	66
Figura 45: Gráfico da diluição nas concentrações de 160 a 0,08 $\mu$ g/mL para <i>L. guyanensis</i> .....	67

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies da família Annonaceae de uso popular com sua atividade farmacológica.....	8
Tabela 2: Alcalóides isolados de espécies do gênero <i>Guatteria</i> .....	11
Tabela 3: Resultados da atividade leishmanicida da <i>Guatteria ssp.</i> ....	17
Tabela 4: Dados dos constituintes químicos identificados do óleo essencial de <i>Guatteria citriodora</i> .....	41
Tabela 5: Dados dos padrões de hidrocarbonetos não ramificados.....	45
Tabela 6: Dados de RMN $^1\text{H}$ da Fb (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ e $\text{CD}_3\text{OD}$ ) comparado com dados da literatura da O-metilmoshatolina .....	50
Tabela 7: Dados de RMN $^1\text{H}$ e $^{13}\text{C}$ da Fb em $\text{CDCl}_3$ e $\text{CD}_3\text{OD}$ .....	53
Tabela 8: Dados de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) para Fc .....	57
Tabela 9: Dados de RMN $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da substância Fc em $\text{CDCl}_3$ .....	60
Tabela 10: Dados de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da Fd comparado com os dados da literatura da oxoputerina.....	63
Tabela 11: Dados das correlações de HSQC e HMBC da Fd em $\text{CDCl}_3$ .....	66
Tabela 12: Atividade tóxica do óleo essencial de <i>Guatteria citriodora</i> contra larvas de <i>A. salina</i> .....	68

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIações E UNIDADES

Fa – Substância não identificada

Fb – *O*-metilmoshatolina

Fc - liriodenina

Fd - oxoputerina

Ab (%) – absorvância em porcentagem

AcOEt – acetato de etila

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CCDP – Cromatografia de Camada Delgada Preparativa

CDCl<sub>3</sub> – Clorofórmio deuterado

CG-EM – Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

Cl<sub>50</sub> – Concentração inibitória a 50%

CIM – Concentração Inibitória Mínima

cm<sup>-1</sup> – centímetros recíprocos

*d* –duplete

*dd* –duplo duplete

*ddd* –duplo duplete duplo

DMSO – dimetilsulfóxido

EDC – Extrato obtido em diclorometano

EM – Espectrômetro de Massa

g – grama

FAA – Fração Aquosa Ácida

FAB - Fração Aquosa Básica

FAL – Fração Alcalóidica

FNDCM – Fração Neutra em Diclorometano

Hex - hexano

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HSQC – Heteronuclear Spectroscopy Quantum Coherence

Hz – Hertz

IV – infravermelho

$J$  – Constante de acoplamento (em Hertz)

L – litro

$m$  – multiplete

MeOH – metanol

mL – mililitros

$\mu\text{L}$  – microlitros

mg - miligrama

nm - nanômetro

RMN  $^1\text{H}$  – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

$s$  – sinpleto

Tween 80 – Polisorbato 80

$\mu\text{g/mL}$  – micrograma por mililitros

$\delta$  - deslocamento químico

## SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS .....	vi
RESUMO.....	viii
ABSTRACT .....	ix
LISTA DE FIGURAS .....	x
LISTA DE TABELAS .....	xiii
LISTA DE SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES .....	xiv
SUMÁRIO.....	xvi
1 INTRODUÇÃO .....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA .....	3
2.1 A FAMÍLIA ANNONACEAE .....	3
2.1.1 ÓLEO ESSENCIAL .....	6
2.1.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FAMÍLIA ANNONACEAE .....	7
2.2 O GÊNERO <i>Guatteria</i> .....	8
2.2.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO GÊNERO <i>Guatteria</i> .....	9
2.2.1.1 ALCALÓIDES .....	10
2.2.1.2 OUTROS CONSTITUINTES QUÍMICOS .....	14
2.2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO <i>Guatteria</i> .....	15
2.3 ESPÉCIE <i>Guatteria citriodora</i> DUCKE .....	19
2.4 LEISHMANIOSE .....	20
2.5 TOXICIDADE UTILIZANDO <i>Artemia salina</i> Leach.....	24
3. OBJETIVOS .....	26
3.1 GERAL .....	26
3.2 ESPECÍFICOS .....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	27

4.1 MATERIAL BOTÂNICO.....	27
4.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS.....	27
4.2.1 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS CASCAS.....	27
4.2.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS.....	28
4.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	29
4.3.1 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA.....	29
4.3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA.....	30
4.3.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	30
4.3.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP).....	30
4.4 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS.....	31
4.5 OBTENÇÃO DE ALCALÓIDES DO EXTRATO EM DICLOROMETANO DAS CASCAS.....	32
4.5.1 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DAS CASCAS.....	33
4.5.1.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO 1-5.....	34
4.5.1.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO 12-57.....	35
4.6 TESTE DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	36
4.7 TESTE DE TOXICIDADE UTILIZANDO <i>Artemia salina</i> Leach.....	38
5. RESULTADOS.....	40
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Guatteria citriodora</i> DUCKE.....	40
5.1 IDENTIFICAÇÃO DA Fb.....	45
5.2 IDENTIFICAÇÃO DA Fc.....	54
5.3 IDENTIFICAÇÃO DA Fd.....	61
5.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA.....	67

5.4 TOXICIDADE FRENTE À <i>Artemia salina</i> Leach .....	68
6. CONCLUSÃO.....	69
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	70

# 1 INTRODUÇÃO

A Amazônia abrange a maior biodiversidade do planeta. Segundo Enriquez (2001), as dimensões da biodiversidade têm feito com que o crescimento da Amazônia se encontre diretamente relacionadas ao dinamismo das atividades vinculadas à exploração dos seus recursos naturais. Assim, a biodiversidade está constituindo-se em um fator verdadeiramente estratégico para a região, revelando a necessidade da criação de novos produtos e/ou processos.

As plantas desde a antiguidade são utilizadas como recurso natural para o tratamento de patologias pelo ser humano. Nessa perspectiva, a pesquisa natural, principalmente na Amazônia, conduziu o homem a encontrar nas plantas medicinais virtudes, cujo valor tornou-se reconhecimento tácito (MARILIS & OBDULIO, 2004).

Os estudos prévios mostraram que menos de 1% das espécies de plantas localizadas em florestas tropicais, foram estudadas quanto à atividade biológica (CONTE, 1996). A Fitoterapia do grego *phthoi* (plantas) e *qerapa* (tratamento), é um tratamento de forma terapêutica utilizando de recursos naturais como plantas secas, frescas e seus preparados, a fim de prevenir, aliviar ou curar um processo patológico (GUYOT, 1990).

Desvendar os mistérios da flora amazônica em benefício do homem significa buscar nas plantas a cura para doenças tropicais através de seus constituintes. Bem como para o desenvolvimento industrial e econômico da região, em equipes multidisciplinares, onde se somam as atividades dos grupos de botânica, microbiologia, química orgânica e farmacologia (MATTOS, 1997).

A descoberta de substâncias bioativas, ou seja, que possuem atividade farmacológica estimulou diversos interesses e gerou incentivos institucionais e

governamentais para sua pesquisa (MARILIS & OBDULIO, 2004). A partir de seus princípios ativos os cientistas começaram a classificar terapeuticamente as plantas de acordo com o efeito farmacológico, sua ação no organismo humano e no combate a agentes patológicos (SIMÕES *et al.*, 2003).

A busca de fitoconstituintes tornou-se a esperança mais concreta para a cura de diversos males e um dos caminhos promissores para a criação de novos agentes terapêuticos contra doenças tropicais. Muitos laboratórios de produtos naturais têm inserido em suas rotinas de isolamento, purificação e elucidação estrutural, diversos ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar o estudo fitoquímico de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (HAMBURGUER & HOSTETTMANN, 1991).

As espécies do gênero *Guatteria* (Annonaceae) têm sido estudadas com a finalidade de se observar atividades biológicas. O extrato etanólico do caule da espécie *Guatteria boliviana* exibiu atividade *in vitro* (100 µg/mL) contra *Leishmania braziliensis*, responsável pela Leishmaniose na forma cutânea (MAHIOU *et al.*, 2000). Nos óleos essenciais obtidos de espécies de *Guatteria sp* observou-se atividade antimicrobiana (SHUNYING *et al.*, 2005; CARLTON *et al.*, 1992) e inseticida (LEBOUEF *et al.* 1982; MOORE *et al.*, 2002). O extrato etanólico das cascas da espécie *Guatteria aff. schomburgkiana* Mart. exibiu atividade antimalárica *in vitro* (4µg/ml) (MUÑOZ *et al.*, 2000).

A escolha da espécie foi considerada a potencialidade farmacológica das espécies do gênero *Guatteria* e por não ter sido encontrado nenhum estudo químico e biológico na literatura, a espécie *Guatteria citriodora* Ducke foi estudada quanto à composição química das cascas do caule e folhas. O óleo essencial das folhas foi avaliado quanto à atividade leishmanicida e letalidade frente à *Artemia salina* Leach.

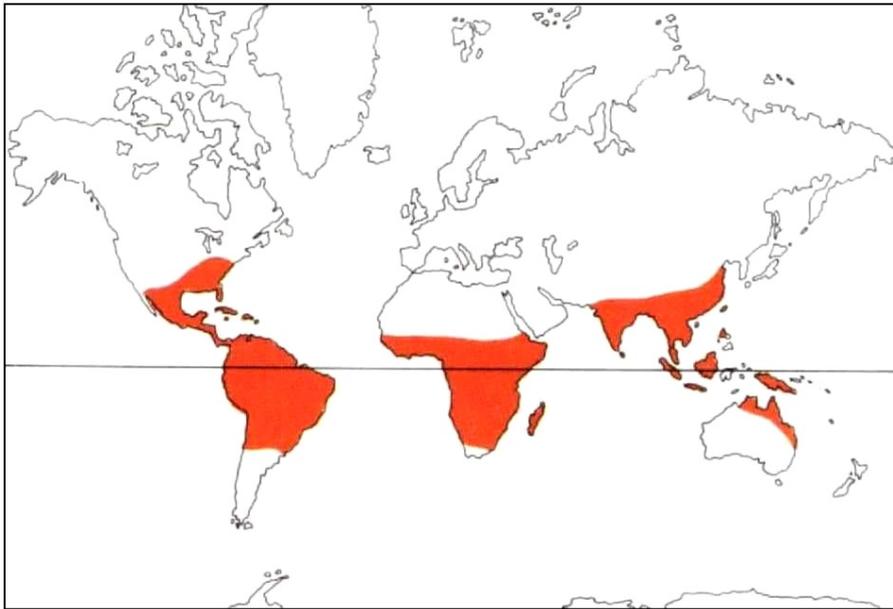
## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 A FAMÍLIA ANNONACEAE

A família Annonaceae, de acordo com Takhtajan, está incluída na ordem das Magnoliales, constituída por dezessete famílias botânicas, algumas com amplo número de espécies no Brasil, tais como Magnoliaceae, Annonaceae, Myristicaceae. Essas três famílias possuem espécies de grande importância, encontradas na Região Amazônica e em áreas da Mata Atlântica (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

A primeira descrição da família Annonaceae foi feita por Jussieu (1789), como pertencente à ordem Annonae, formada pelos gêneros: *Annona*, *Asiminia*, *Unona*, *Uvaria* e *Xylopia*. Essa família compreende cerca de 2500 espécies distribuídas em aproximadamente 135 gêneros (CHATROU *et al*, 2004). Praticamente um terço das espécies distribuem-se em cinco gêneros, *Guatteria* (250), *Uvaria* (150), *Xylopia* (150), *Polyalthia* (120) e *Annona* (120) (HEYWOOD, 1978).

A família é bem distribuída nas regiões tropicais e subtropicais como América do Sul e Central, África, Ásia e Austrália. Na Ásia e Austrália são 51 gêneros com cerca de 950 espécies. Na África e Madagascar há 40 gêneros, com aproximadamente 450 espécies, contra 38 gêneros e 740 espécies no continente americano. No Brasil estão registrados 29 gêneros, compreendendo aproximadamente 260 espécies (BARROSO, 1978; FRIES, 1931) (Figura 1).



**Figura 1:** Distribuição das espécies da família Annonaceae  
**Fonte:** Heywood, 1978

As espécies da família Annonaceae são caracterizadas pelo hábito arbóreo, ou muitas vezes pela presença de arvoretas, raramente na forma de lianas como em *Annona haematantha*. A família pode ser reconhecida pelo odor forte no corte do tronco ou ramos; pela presença de fibras longas e resistentes na casca do caule, conhecidas popularmente como envira; pelas folhas dísticas exceto em *Tetrameranthus*, com folhas espiraladas; e pela presença de marcas de chamuscas no corte transversal do tronco. Pêlos ou escamas estrelados são típicos do gênero *Duguetia*, e ocorrem também em *Tetrameranthus*. As flores têm três sépalas, livres ou unidas (*Tetrameranthus*); geralmente em 2 a 3 verticilos. Os estames e carpelos são numerosos. Os frutos são geralmente apocárpicos, carnosos e indeiscentes ou deiscentes. A semente apresenta endosperma ruminado com período de germinação muito curto (JOLY, 1993; RIBEIRO *et al.*, 1999) (Figura 2).



**Figura 2:** a) *Cananga odorata*, b) *Annona muricata*, c) *Monodora tenuifolia*, d) *Annona squamosa*, e) *Rollinia mucosa*

**Fonte:** Retirado de [www.tradewindsfruit.com](http://www.tradewindsfruit.com). Acesso em: 04 janeiro 2008

A família Annonaceae é muito conhecida popularmente pelos seus frutos, vários deles comestíveis, principalmente do gênero *Annona*, como a *A. muricata* L. (graviola) e a *A. squamosa* L. (fruta do conde). Algumas espécies como *Annona glabra* L. e *A. classiflora* Mart. fornecem madeira própria para carpintaria e raízes utilizáveis como cortiça e outras pelo grande uso na medicina popular (*A. spinescens* Mart. e *A. foetida* Mart.) e ornamentais (*A. cacans* Warm. e *Xylopia sericea* A.St.-Hil.) (PIO CORRÊA, 1984).

Na floresta amazônica, a Annonaceae está entre as famílias mais importantes de número de indivíduos e de espécies. Algumas espécies, como *Annona cherimola* (cherimoya), *A. muricata* (graviola), *A. squamosa* (maçã de açúcar, doce maçã), e *Rollinia mucosa* (biribá) são cultivadas ao longo das regiões tropicais e subtropicais

devido seus frutos comestíveis. A madeira das espécies da família Annonaceae é usada para fabricação de postes, canoas, e pontes.

### 2.1.1 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais são compostos voláteis, geralmente extraídos de plantas, por métodos de destilação como hidrodestilação ou arraste a vapor. Sua composição é constituída por terpenóides, especificamente monoterpenos [C<sub>10</sub>] e sesquiterpenos [C<sub>15</sub>], embora diterpenos [C<sub>20</sub>] possam estar presentes. São também encontrados, uma variedade de hidrocarbonetos alifáticos (linear, ramificado, saturado e insaturado) de baixo peso molecular como ácidos, álcool, aldeídos, ésteres acíclicos ou lactonas e alguns compostos específicos contendo enxofre e contendo nitrogênio (DORMAN, 1999)

Os óleos essenciais são produtos naturais valiosos usados em diversas áreas, incluindo perfumes, cosméticos, aromaterapia, fitoterapia, especiarias e nutrição (BUCHBAUER, 2000). Recentemente, tais óleos têm atraído a atenção de muitos pesquisadores encorajando a realização de pesquisas biodirecionadas de plantas além de investigação química e farmacológica com finalidades terapêuticas.

A família Annonaceae possui várias espécies ricas em óleos essenciais. Das folhas da *Annona muricata* (CALLAN & TUTIN, 1912) e *Annona senegalensis* (MACKIE & MISRA, 1956) e dos frutos da *Xylopiá longifolia* (FARNSWORTH *et al*, 1974) e *Xylopiá striata* (GRIEBEL, 1944) são extraídos óleos essenciais, assim como dos frutos secos de *Xylopiá aethiopica* (GRIEBEL, 1944), utilizados em especiarias e fragrâncias. O óleo de ylang-ylang obtido das flores da *Cananga*

*odorata* é o mais amplamente estudado (KLEIN, 1975). Todos esses óleos são considerados economicamente importantes pela sua difusão na perfumaria.

Maia *et al.*, (2005) estudaram a composição química dos óleos essenciais de várias espécies. Os compostos identificados no óleo essencial das folhas de *Guatteria juruensis* foram espatulenol (77,5%) e  $\alpha$ -pineno (4,5%). No óleo extraído das folhas de *G. microcalyx* foram predominantes o óxido de cariofileno (44,2%),  $\alpha$ -pineno (11,9%) e  $\beta$ -pineno (6,3%). Os constituintes majoritários identificados no óleo das folhas de *Guatteria poeppigiana* foram espatulenol (53,0%), kushinol (10,9%) e epóxido de humuleno II (5,7%). As substâncias óxido de cariofileno e espatulenol são consideradas marcadores quimiotaxonômicos e têm sido relatados em espécies do gênero *Guatteria*, *Xylopi*a e *Duguetia*.

### 2.1.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FAMÍLIA ANNONACEAE

As pesquisas farmacêuticas, recentemente se intensificaram em estudos dos extratos de espécies da Annonaceae, pois algumas apresentaram atividade antifúngica, bacteriostática, e especialmente citostática de alguns componentes químicos das folhas e cascas do caule.

Na medicina tradicional, a família Annonaceae destaca-se pelo amplo número de espécies utilizadas (LEBOEUF *et al.*, 1982). Na Amazônia já foi relatado o uso medicinal de espécies distribuídas nos gêneros *Annona*, *Xylopi*a, *Guatteria* e *Rollinia* (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002).

Na Tabela 1 estão apresentadas algumas espécies de uso popular da família Annonaceae com sua atividade farmacológica relatada.

**Tabela 1:** Espécies da família Annonaceae de uso popular com sua atividade farmacológica.

Espécie	Uso popular	Atividade Farmacológica	Referência
<i>Annona muricata</i>	antiparasitária, antitumoral, inseticida, antimicrobiana e antifúngica	antitumoral, leishmanicida e antimalárica	LEBOEUF <i>et al.</i> , 1982 BRAGA, 1976
<i>Annona aff. excellens</i>	-	<i>Leishmania guyanensis</i> <i>L. amazonensis</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2006
<i>Artabotrys hexapetalus</i>	tratamento da malária	antimalárica e antitumoral	WONG & BROW, 2002; LI <i>et al.</i> , 1997,
<i>Guatteria amplifolia</i>	Antiparasitária	Antimalárica	PAREDES <i>et al.</i> , 2001
<i>Guatteria boliviana</i>	anti-térmico e vermífuga	Antiparasitária	MAHIOU <i>et al.</i> , 2000
<i>Guatteria foliosa</i>	inseticida e antiparasitária	antiparasitária e antiviral	PAREDES <i>et al.</i> , 2001
<i>Guatteria schomburgkiana</i>	-	<i>Leishmania amazonensis</i> , <i>L. brasiliensis</i> , <i>L. donovani</i> e <i>Trypanosoma cruzi</i>	BAYMA <i>et al.</i> , 1988 CORTES <i>et al.</i> , 1985 FOURNET <i>et al.</i> , 1994
<i>Rollinia mucosa</i>	antitumoral, enterocolite e antiescorbútica	antitumoral, antimicrobiana e antifúngica	KUO <i>et al.</i> , 2001; SHI <i>et al.</i> , 1997
<i>Uvaria dependens</i>	Antiparasitária	Antimalárica	NKUNYA <i>et al.</i> , 1993
<i>Uvária klaineana</i>	Antiparasitária	Leishmanicida	AKENDENGUE <i>et al.</i> , 2002

## 2.2 O GÊNERO *Guatteria*

As árvores do gênero *Guatteria* possuem um tronco muito reto, monopodial (35 cm), geralmente cilíndrico e colunar de casca fina, lisa, e de coloração cinzenta-branca. A árvore não mostra nenhuma ramificação exceto no ápice, os galhos são finos e horizontais, os quais se inclinam em seus extremos pelo peso da folhagem. A copa possui forma relativamente pequena, estreita, e piramidal. Sua folhagem nova

é adicionada às copas em maio e junho e as flores são produzidas na região axilar das folhas, única ou em pares, e quando abertas são de coloração amarela com diâmetro de 3 cm e ligeiramente aromáticas. Não há nenhuma estação de floração definitiva para esta espécie, ocorrendo várias vezes durante o ano. Os frutos são de forma globular (6 cm) e as bagas são pequenas de tonalidade marrom escuro, contendo um cerne-colorido, com semente ovóide, observados nos dosséis durante todo o ano (STILES & SKUTCH, 1989).

O gênero *Guatteria* possui 250 espécies principalmente na região amazônica, algumas espécies são usadas na medicina tropical: as sementes de *Guatteria ouregou* são usadas no tratamento de dispepsia, dor estomacal e cólica no norte do Brasil (VAN DEN BERG, 1993); as cascas de *Guatteria quianensis* são usadas como febrífugas e para tratamento de doenças genito-urinárias na Guiana Francesa (GRENAND, 1987); as cascas de *Guatteria modesta* são usadas como contraceptivos no Peru (SCHULTES, 1985).

As espécies do gênero *Guatteria* são utilizadas popularmente como antiparasitárias (*G. amplifoliam* e *G. foliosa*), vermífuga (*G. boliviana*), inseticida (*G. foliosa*). As propriedades terapêuticas comprovadas são antimalárica em *G. amplifoliam*, antiparasitária e antiviral em *G. foliosa* e antiparasitária para *G. boliviana* (MAHIOU *et al.*, 2000; PAREDES *et al.*, 2001).

### **2.2.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DO GÊNERO *Guatteria***

As espécies do gênero *Guatteria* são conhecidas por apresentar em sua composição, alta concentração de alcalóides. A revisão da literatura confirmou a predominância dessa classe de substâncias, sendo também encontrados,

terpenóides, principalmente sesquiterpenos, juntamente com um grande número de flavonóides.

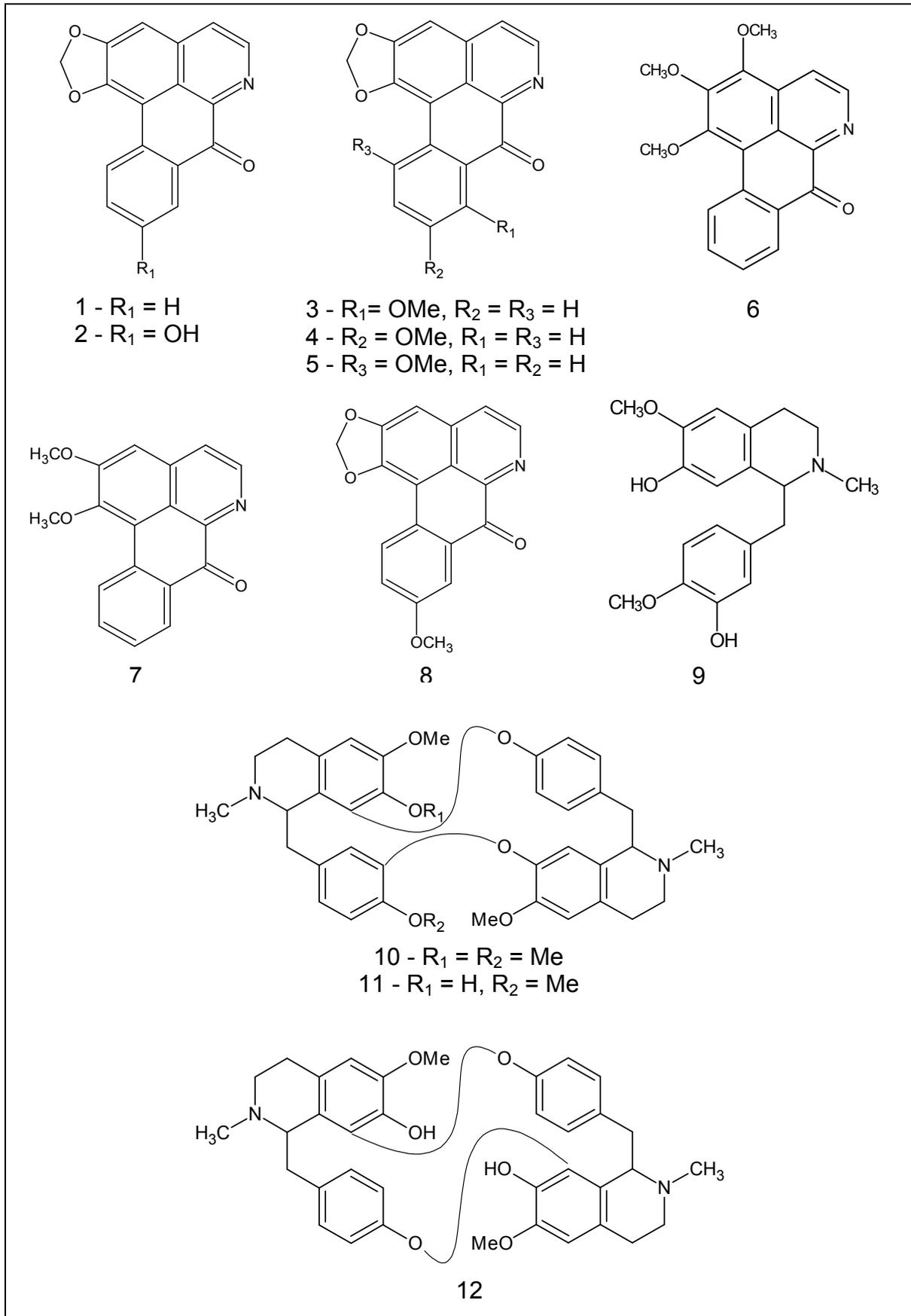
#### **2.2.1.1 ALCALÓIDES**

Os alcalóides são metabólitos secundários nitrogenados, biossinteticamente derivados de amino-ácidos, encontrados principalmente em plantas. Representam uma das mais difundidas classes de substâncias dotadas de múltiplas e variadas propriedades farmacológicas (STÉVIGNY *et al.*, 2005).

O gênero *Guatteria* é uma fonte rica em alcalóides isoquinolínicos, com 241 compostos isolados de 28 espécies, de acordo com o banco de dados da Universidade de Illinois em Chicago, Natural Products Alert (2002) (tabela 2, figura 3) (LIMA *et al.*, 2003).

**Tabela 2:** Alcalóides isolados de espécies do gênero *Guatteria*

Espécie	Parte da planta	Extrato	Alcalóide	Referência
<i>G. diospyroides</i>	Raiz	Clorofórmio	liriodenina [1] oxoanalobina [2] oxostefanina [3]	PÉREZ-AMADOR, 2004
<i>G. calva</i>	Folhas	-	oxoxilopina [4] oxoputerina [5]	RODRIGUEZ <i>et al</i> , 1999
<i>G. poeppigiana</i>	Folhas e caule	Metanol	O-metilmoschatolina [6] lisicamina [7]	LIMA, 2004
<i>G. multivenia</i>	Raiz	Etanol	liriodenina [1] lisicamina [7] lanuginosina [8]	ZHANG, 2002
<i>G. juruensis</i>	Folhas e galhos	Alcalóides totais	reticulina [9]	LIMA, 2003
<i>G. megalofilla</i>	-	-	O'O-dimetilcurina [10] 12'-O-metilcurina [11] sochondodendrina [12]	GALEFFI <i>et al</i> , 1975
<i>G. dumetorum</i>	-	-	criptodorina [13] nornantenina [14] lirioferina [15]	MONTENEGRO <i>et al</i> , 2003
<i>G. dumetorum</i>	Folhas	-	metillaurotetanina [16] norlirioferina [17] isoboldina [18] reticulina [19] xilopina [20]	CORRÊA <i>et al</i> , 2006



**Figura 3:** Estruturas de alcalóides isolados de espécies do gênero *Guatteria*

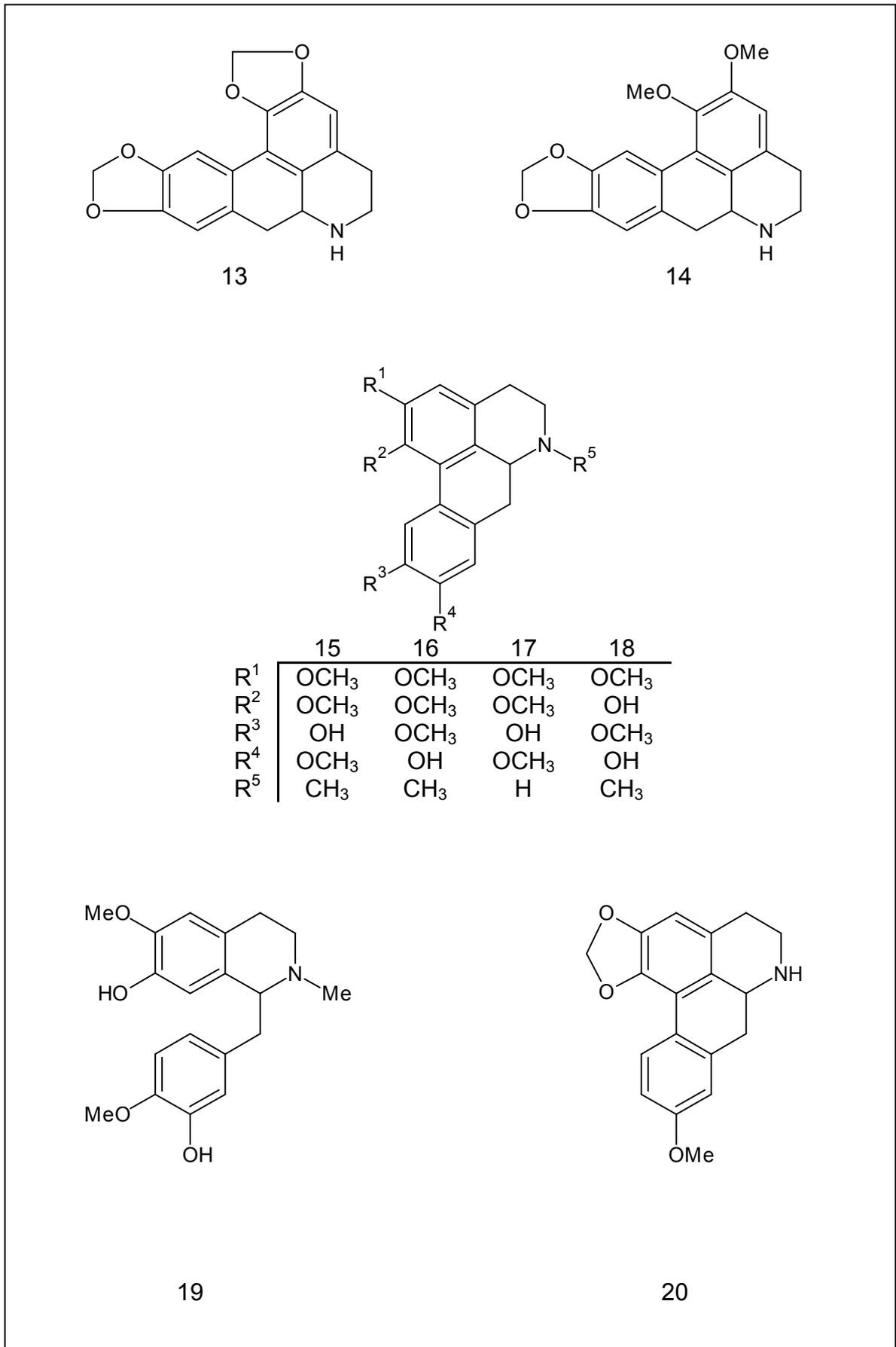
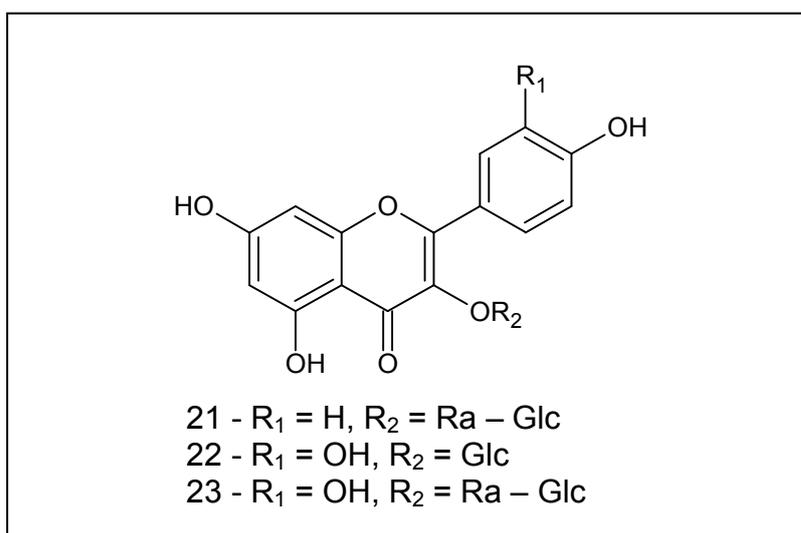


Figura 3: Estruturas de alcalóides isolados de espécies do gênero *Guatteria*

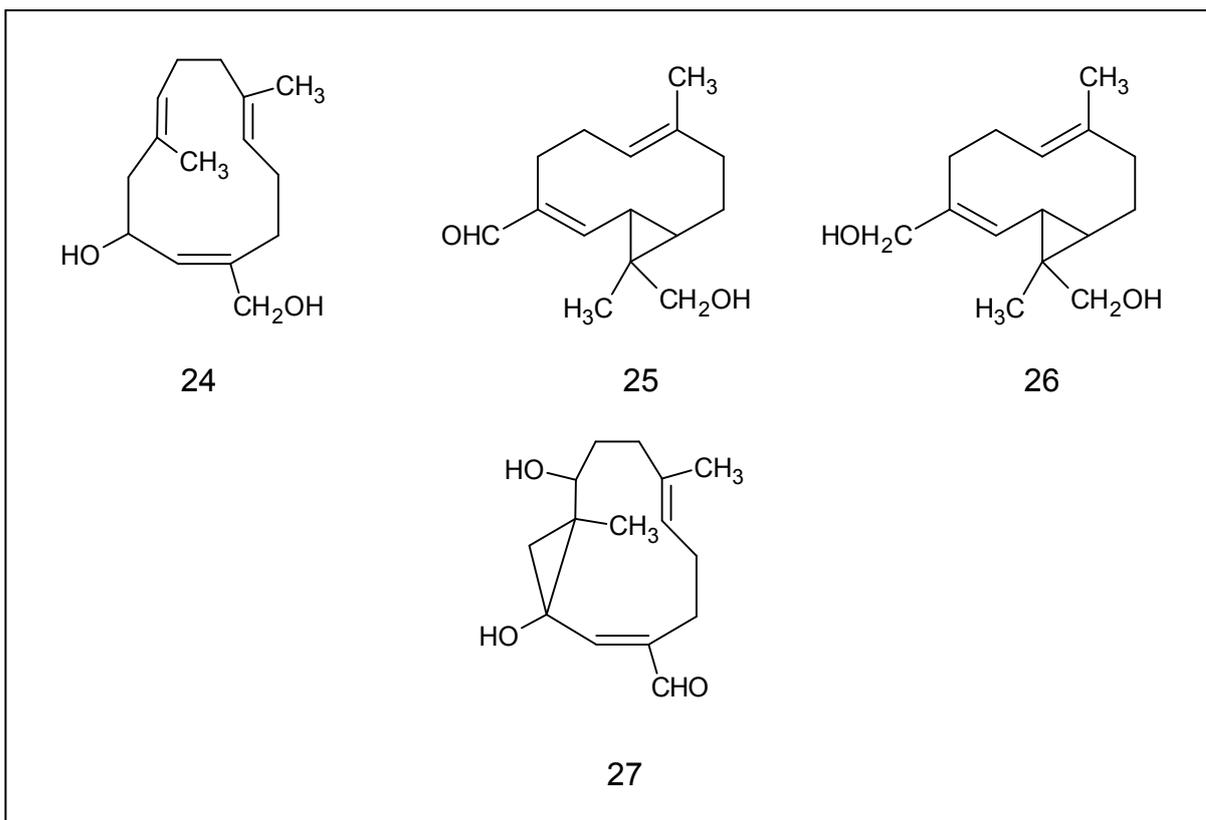
### 2.2.1.2 OUTROS CONSTITUINTES QUÍMICOS

Segundo trabalho realizado por Santos (1998), 76 flavonóides dentre flavonóis e flavonas foram isolados e identificados de 31 espécies da família Annonaceae. Os constituintes campferol, quercetina, isoramnetina e ramnetina são flavonóis isolados de várias espécies do gênero *Guatteria* assim como campferol-3-O-ramnosilglicosídeo (21), quercetina-3-O-glicosídeo (22) e quercetina-3-O-ramnosilglicosídeo (23) (Figura 4).



**Figura 4:** Flavonóides isolados de algumas espécies do gênero *Guatteria*

Uma investigação fitoquímica da fração clorofórmica obtida do extrato etanólico da raiz da espécie *Guatteria multivenia* levou ao isolamento de quatro sesquiterpenos, quaterina A (24), dihidromadolina K (25), madolina K (26) e madolina W (27) (ZHANG, 2002) (Figura 5).



**Figura 5:** Sesquiterpenos isolados da espécie *Guatteria multivenia*

### 2.2.2 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO GÊNERO *Guatteria*

Os estudos farmacológicos e fitoquímicos do gênero *Guatteria* estão intensificado devido às descobertas de novos produtos naturais com diversas atividades biológicas. Os indígenas na Bolívia utilizam a *Guatteria foliosa* como repelente de insetos e novos alcalóides aporfínicos antiparasitários foram isolados dessa planta (MAHIOU *et al.*, 1994). Constituintes antimaláricos foram obtidos da *Guatteria amplifolia* (WENIGER *et al.*, 2000).

A liriodenina [1], alcalóide oxoaporfínico, isolado de várias espécies do gênero *Guatteria*, demonstrou atividade antimicrobiana em *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente a metilina,

apresentando valores de  $CI_{50}$  3,5, 2,0, 2,0 e 2,0  $\mu\text{g/mL}$  e CIM 6,5, 12,5, 3,13 e 3,13  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (ZHANG, 2002).

O extrato das cascas de *Guatteria aff. schomburgkiana* apresentou significativa atividade antimalárica no extrato hidroalcolico (70-30%) das cascas. A atividade *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* (Indo) apresentou  $CI_{50}$  igual a 4 $\mu\text{g/mL}$  (MUÑOZ, 2000).

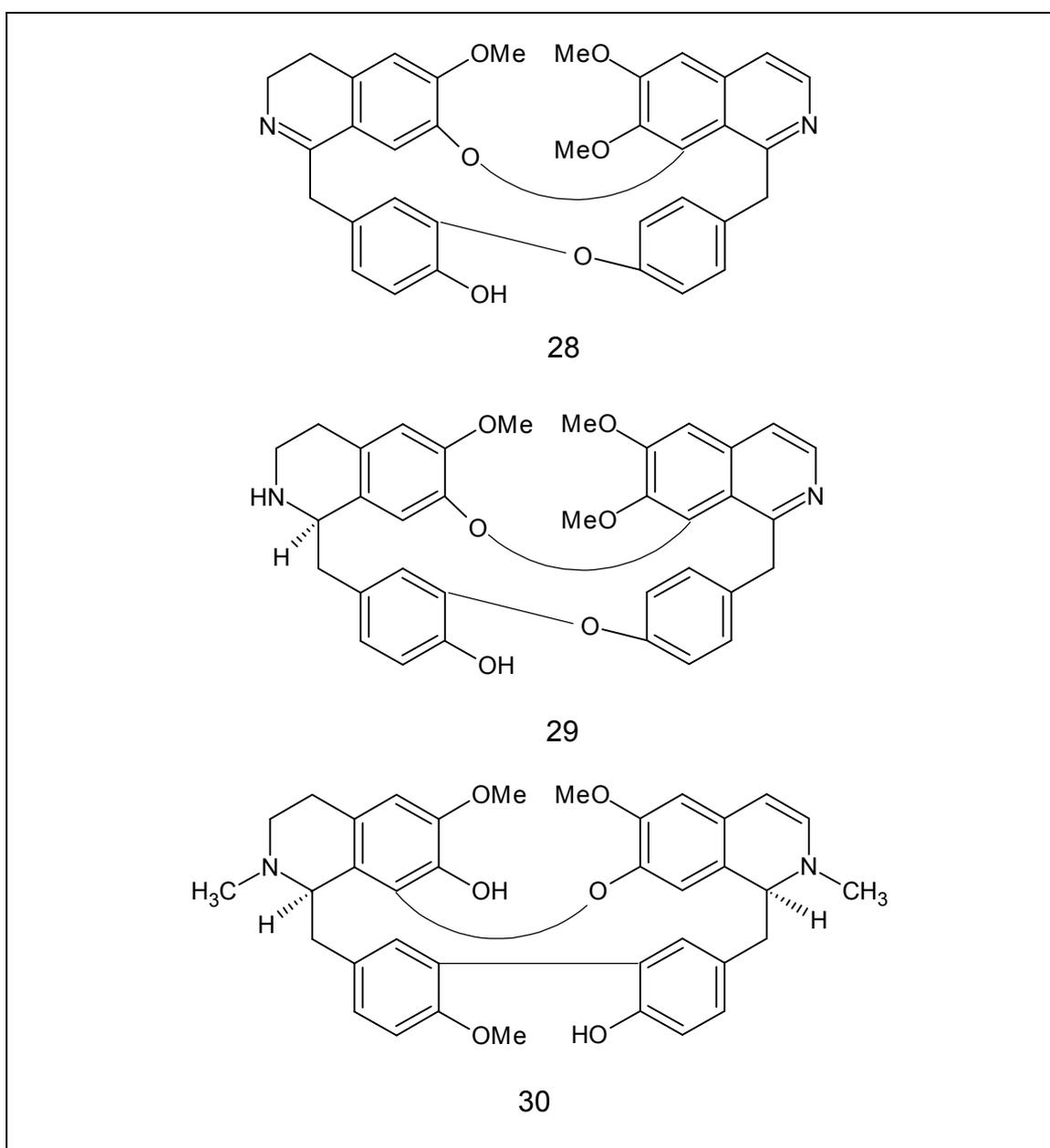
A investigação farmacológica de substâncias químicas indicou que os alcalóides dibenzilisoquinolínicos são compostos bioativos importantes existentes em plantas da família Annonaceae. Os dibenzilisoquinolínicos são conhecidos por possuírem várias atividades farmacológicas incluindo antiparasitária, leishmanicida (FOURNET *et al.*, 1993; MUNSHI *et al.*, 1972) contra doença de chagas (ROJAS DE ARIAS *et al.*, 1994) e antimalárica (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993; VALENTIN *et al.*, 1997; ANGERHOFER *et al.*, 1999). Esses alcalóides, com suas respectivas atividades, estão bem representados no gênero *Guatteria*. Os alcalóides dibenzilisoquinolínicos puertogalina B [28], guattebolina [29], antioquina [30], tiliageina [31], funiferina [32] e sepeerina [33] foram avaliados quanto à atividade antimalárica contra os *Plasmodium falciparum* (D6 e W2). Os resultados indicam forte atividade com  $CL_{50}$  variando de 72,5 a 316,4  $\mu\text{g/mL}$ . A presença do grupo amina (NH-, NH-Me e di-NH-Me) reduz a ação frente ao *Plasmodium falciparum*, com exceção da guattebolina (MAHIOU, 2000).

Os alcalóides aporfínicos isolados da espécie *Guatteria ssp.* foram avaliados quanto à atividade citotóxica. Os alcalóides R-xilopina [20], S-criptodrina [13] e S-nornantenina [14] apresentaram  $CI_{50}$  maior que 40 $\mu\text{M}$ , enquanto que o S-nornuciferina [34] apresentou atividade citotóxica com  $CI_{50}$  maior que 13,5  $\mu\text{M}$ . Segundo Stévigny (2005), a explicação está na ausência do metilenodioxí. Esses

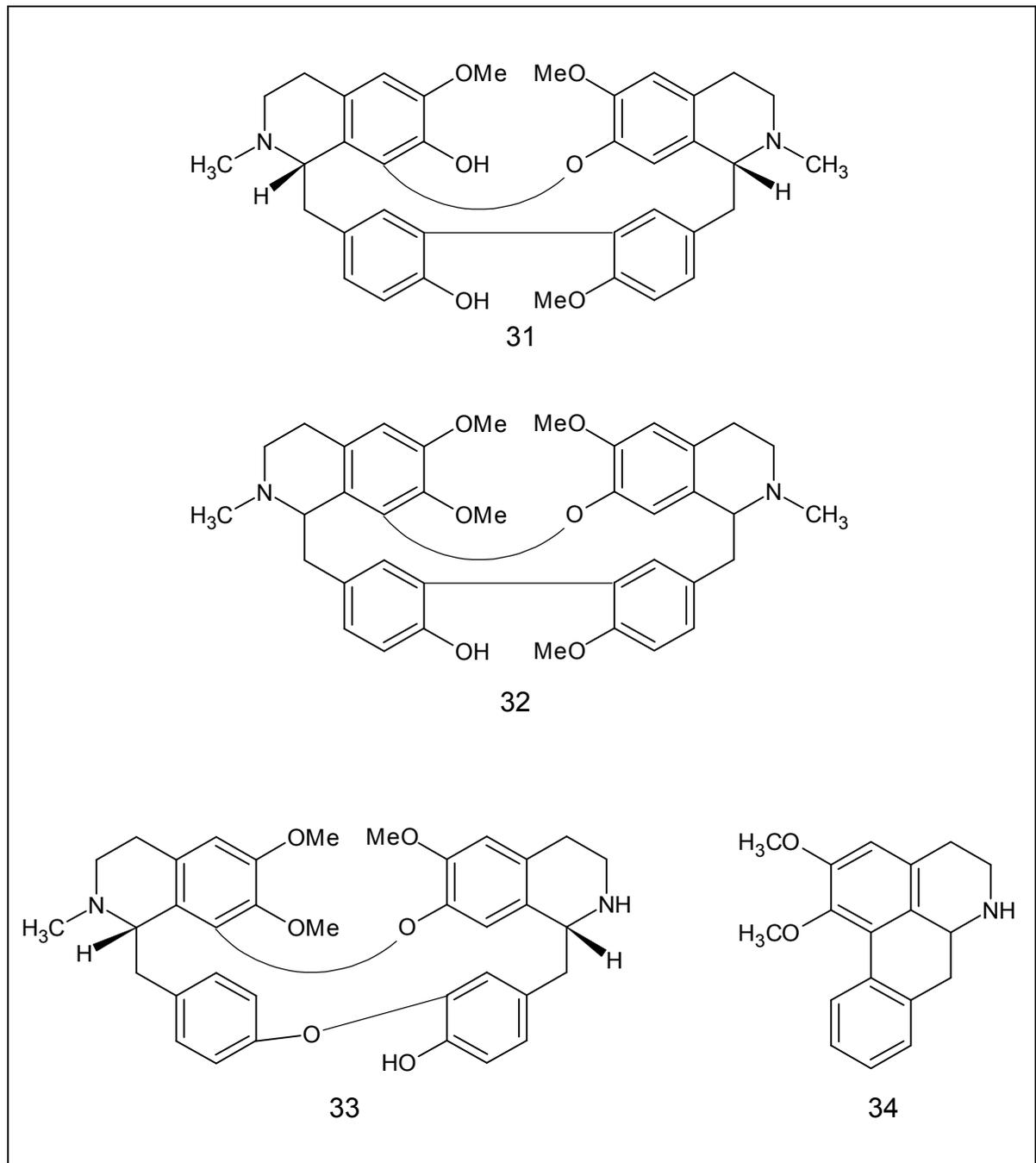
alcalóides aporfínicos isolados apresentaram atividade leishmanicida como mostra na Tabela 3 (MONTENEGRO, 2003) (Figura 6).

**Tabela 3:** Resultados da atividade leishmanicida da *Guatteria* ssp.

Amostra	CI <sub>50</sub> , µg/mL ± Desvio Padrão	
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. panamensis</i>
20-xilopina	1,0 ± 0,08	2,0 ± 0,02
13-criptodorina	1,0 ± 0,2	2,0 ± 0,024
14-nornantenina	8,0 ± 0,1	5,0 ± 0,145
34-nornuciferina	4,0 ± 0,28	8,0 ± 3,2



**Figura 6:** Estruturas de alcalóides isolados de espécies do gênero *Guatteria* com atividades biológicas



**Figura 6:** Estruturas de alcalóides isolados com atividades biológicas de espécies do gênero

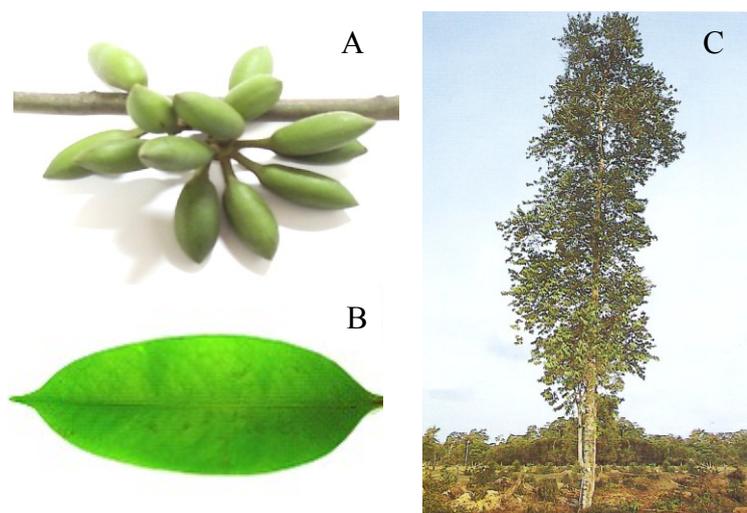
*Guatteria*

### 2.3 ESPÉCIE *Guatteria citriodora* Ducke

A espécie *Guatteria citriodora* Ducke é conhecida popularmente como envira-amarela ou laranjinha. É encontrada nas regiões de maior distribuição como nos estados do Pará, Mato Grosso e Amazonas, na floresta pluvial amazônica de terra firme, e também nas Guianas, Suriname, Bolívia, Equador e Colômbia, Peru e Venezuela (MOBOT, 2003).

As árvores desta espécie têm altura de 15 a 20 m e possui em copa piramidal ou colunar, tronco ereto e cilíndrico, de 20 a 35 cm de diâmetro a altura do peito, com casca fibrosa, quase lisa e lenticelada. As folhas são simples, alternadas, subcoriáceas, discolores, glabras ou com pêlos esparsos na face superior, denso ferrugíneo-tomentosas na face inferior quando jovens e glabrescentes posteriormente; apresentando as nervuras principal e secundária muito salientes na face inferior, de 10 a 20 cm de comprimento por 3 a 6 cm de largura, sobre pecíolo de 3 a 5 mm. As flores são axiliares, aos pares, sobre pedúnculos de 5 a 8 mm, hermafroditas, com cálice de 4 a 5 mm de comprimento e pétalas tomentosas de 1 a 2 cm. Infrutescências, em glomérulo, frutos elipsóides do tipo drupa, lisos, de polpa carnosa e de cor roxa quando maduros (RIBEIRO *et al.*, 1999).

A madeira desta espécie é empregada apenas localmente para construções leves, engradados, caixotaria, bem como para lenha e carvão. A casca do caule é empregada para a confecção de cordas rústicas e para a envira. A árvore possui potencial para uso paisagístico, principalmente para a formação de alamedas e quebra-ventos (RIBEIRO *et al.*, 1999) (Figura 7).



**Figura 7:** A – Frutos, B – Folha, C – Árvore da *Guatteria citriodora* Ducke  
**Fonte:** Retirado de Ribeiro 1999

## 2.4 LEISHMANIOSE

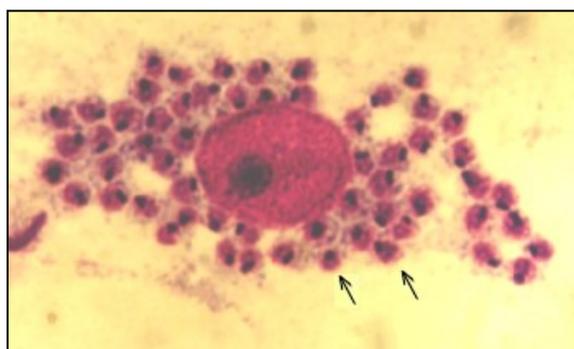
A leishmaniose é uma doença infecciosa zoonótica, causada por espécies de protozoários do gênero *Leishmania*, considerada um grave problema de saúde pública, infectando aproximadamente dois milhões de pessoas anualmente em todo o mundo (ROCHA *et al.*, 2005). O gênero *Leishmania* foi identificado por Ross em 1903 a partir das observações do parasito feitas por Cunningham (1885), Leishman (1900) e Donovan (1903) (GONTIJO & CARVALHO, 2003).

No ciclo de vida do parasito existem duas formas morfológicas: os promastigotas e os amastigotas. Os promastigotas são formas alongadas com flagelo na região anterior, medem 16,0 a 40,0  $\mu\text{m}$  de comprimento e 1,5 a 3,0  $\mu\text{m}$  de largura, incluindo o flagelo, o qual geralmente é maior do que o corpo. Os amastigotas são esféricos com um flagelo interno rudimentar (pequena invaginação na superfície do parasito) medindo de 3,0 a 6,5  $\mu\text{m}$  (Figuras 8 e 9).



**Figura 8:** Forma promastigota

**Fonte:** Sinclair Stammers/TDR/OMS. Acesso em 4 janeiro 2008.



**Figura 9:** Forma amastigota

**Fonte:** Sinclair Stammers/TDR/OMS. Acesso em 4 janeiro 2008.

O vetor da doença é um díptero da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, pertencente aos gêneros: *Phlebotomus*, prevalente na África, Europa e Ásia e *Lutzomyia*, prevalente nas Américas. As fêmeas são hematófagas e se contaminam ao ingerir macrófagos do hospedeiro infectado com formas amastigotas do parasito. No Brasil, as espécies do gênero *Lutzomyia* estão presentes em todas as regiões do país, onde recebem nomes populares, tais como, “cangalha”, “mosquito-palha”, “birigui” e “tatuíra” (Figura 10).



**Figura 10:** Mosquito do gênero *Phlebotomus*

**Fonte:** Sinclair Stammers/TDR/OMS. Acesso em 4 janeiro 2008

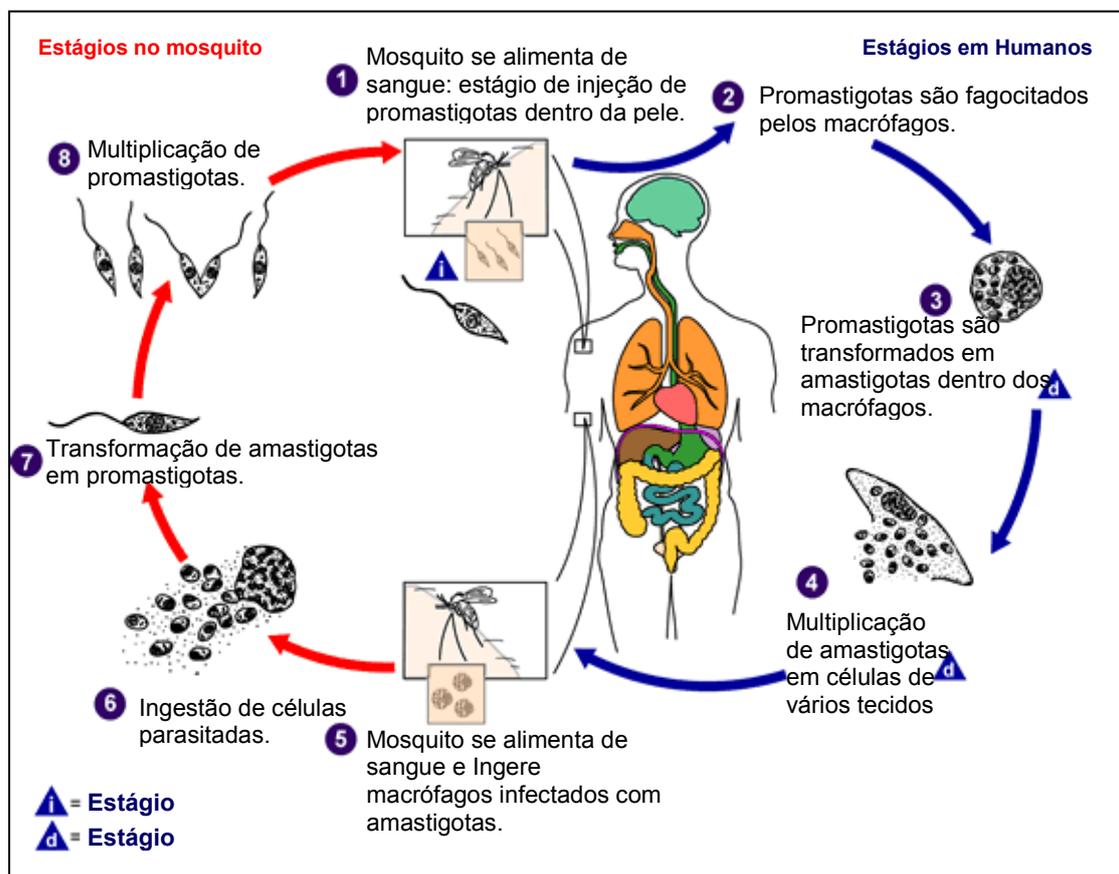
Os cães, roedores, cavalos, gambás, macacos e tamanduás fazem parte do ciclo de vida do parasito e são reconhecidos como reservatórios de *Leishmania* (HEPBURN, 2000; GONTIJO & CARVALHO, 2003).

O gênero *Leishmania* pertence biologicamente a um grupo de parasitas flagelados da família *Trypanosomatidae*. A maioria desses parasitas são patogênicos. Em humanos, a *Leishmania* spp. causa uma variedade de doenças clínicas e suas manifestações são usadas como base para classificar a doença. Dessa forma, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são classificadas em quatro formas clínicas: visceral (*L. chagasi*); mucocutânea (*L. brasiliensis*); cutânea difusa ou disseminada (*L. amazonensis*); e cutânea ou tegumentar (*L. guyanensis*).

A OMS (1993) considerou a leishmaniose como a segunda doença de importância pública, causada por protozoários. Segundo a Folha on line (2008), seis pessoas foram mortas por *Leishmaniose visceral* em 3 meses, somente nos 20 primeiros dias 4 casos foram registrados sendo 2 mortes.

A leishmaniose visceral é a forma clínica mais grave da doença e ataca principalmente crianças desnutridas, podendo ser fatal quando não tratada (BARATA *et al.*, 2000). É caracterizada por seus efeitos em órgãos internos, particularmente o fígado, baço e medula óssea. A leishmaniose mucocutânea resulta na desfiguração facial, devido à erosão em locais mucocutâneos na boca e nariz, enquanto que a leishmaniose cutânea difusa ou disseminada caracteriza-se pela formação de nódulos, placas ou caroços múltiplos, especialmente na face e em braços e pernas. Por outro lado, a leishmaniose cutânea ou tegumentar é a forma clínica menos severa da doença, considerada como uma infecção autolimitada.

A transmissão da doença ocorre quando o flebótomo pica um indivíduo infectado ou um hospedeiro reservatório, aspirando macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou mesmo em tecidos. As formas amastigotas, ao atingirem o intestino médio do inseto, se transformam em promastigotas, essas por sua vez, após rápida multiplicação, se convertem nos promastigotas infectantes e migratórios. Do intestino anterior são regurgitadas ou introduzidas na pele do próximo hospedeiro quando o inseto toma uma nova refeição de sangue (Figura 11).



**Figura 11:** Ciclo de vida do parasita *Leishmania* spp

**Fonte:** Retirado do site [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx). Acesso em 4 janeiro 2008.

No Brasil, o medicamento a base de antimônio, utilizado como a primeira escolha na terapêutica da leishmaniose é o antimoniato de metilglucamina. Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na

terapia e conseqüente aumento das formas resistentes de parasita. A rapidez de absorvidade e 90% do antimônio é excretado pelos rins nas primeiras 48 horas faz-se necessária doses elevadas do fármaco e obter eficácia no tratamento. Em determinados casos, além de destruir o parasita, o medicamento acaba por levar o paciente a óbito (RATH et al., 2003). O tratamento da doença em humanos é realizado administrando-se antimoniais pentavalentes como o antimoniato de meglumine (Glucantime) além dos antimoniais outras drogas têm sido empregadas entre as quais destacam-se a pentamidina, anfotericina B, paramomicina, miltefosine e o estibogluconato de sódio (Pentostam). Seus efeitos colaterais mais freqüentes são artralgia, mialgia, inapetência, cefaléia, febre, vômitos, tontura e inchaço na região de aplicação; e também são observados cardio, hepato e nefrotoxicidade, limitando o seu uso, especialmente em pacientes idosos e, por ser abortiva, a droga é vetada em gestantes. O antibiótico, anfotericina B, de reconhecida ação leishmanicida, é normalmente a opção quando o antimonial se torna proibitivo ou inoperante. Apesar de eficaz para lesões cutâneas, a anfotericina B apresenta sérios efeitos colaterais como náuseas, vômitos, insuficiência renal, anemia e alterações cardíacas. O uso endovenoso e os quadros de cardio e nefrotoxicidade impedem o seu uso fora de ambiente hospitalar (HERWALD, 1999; HEPBRUN, 2000).

## **2.5 TOXICIDADE UTILIZANDO *Artemia salina* Leach**

A citotoxicidade de produtos naturais pode ser determinada através de diferentes ensaios, como o de letalidade dos microcrustáceo *Artemia salina*, que foi desenvolvido para determinar compostos bioativos em extratos vegetais (MEYER et al., 1982; NICK et al., 1995), mas que também pode ser utilizado para expressar a

toxicidade de um extrato com atividade moluscicida contra organismos não-alvos, como peixes e pequenos crustáceos (OLIVEIRA-FILHO & PAUMGARTTEN, 2000).

O bioensaio com larvas é utilizado para testar a toxicidade de inúmeras substâncias e extratos de plantas farmacologicamente ativos. O teste de toxicidade através do uso de microcrustáceo *Artemia salina* serve como uma ferramenta útil para um estudo preliminar biomonitorado dos extratos de plantas sendo também sugestivo como triagem da atividade farmacológica (SIQUEIRA *et al*, 2001; CARVALHO & CARVALHO, 2001). É um método rápido, confiável e economicamente viável para a determinação de toxicidade (SIQUEIRA *et al*, 2001; PAYROL *et al*, 2001)

A toxicidade com *Artemia salina* mostra boa correlação com atividade antitumoral, inseticida (MEYER *et al.*, 1982; MCLAUGHLIN *et al.*, 1998) e anti-*Trypanossoma cruzi* (ALVES *et al.*, 2000) para substâncias com CL<sub>50</sub> menor que 10<sup>3</sup> µg/mL.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar através de estudos fitoquímicos e ensaios biológicos a espécie *Guatteria citriodora* Ducke com vistas à obtenção de compostos bioativos antileishmania.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Isolar e identificar os metabólitos secundários presentes no extrato das cascas do caule através de métodos cromatográficos e espectrométricos;

Verificar a composição química do óleo essencial das folhas por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massa CG/EM.

Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do óleo essencial das folhas contra *Leishmania amazonensis* e *L. guyanensis*, principais causadores da leishmaniose no Estado do Amazonas;

Submeter os óleos essenciais das folhas a testes de toxicidade frente à *Artemia salina*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 MATERIAL BOTÂNICO**

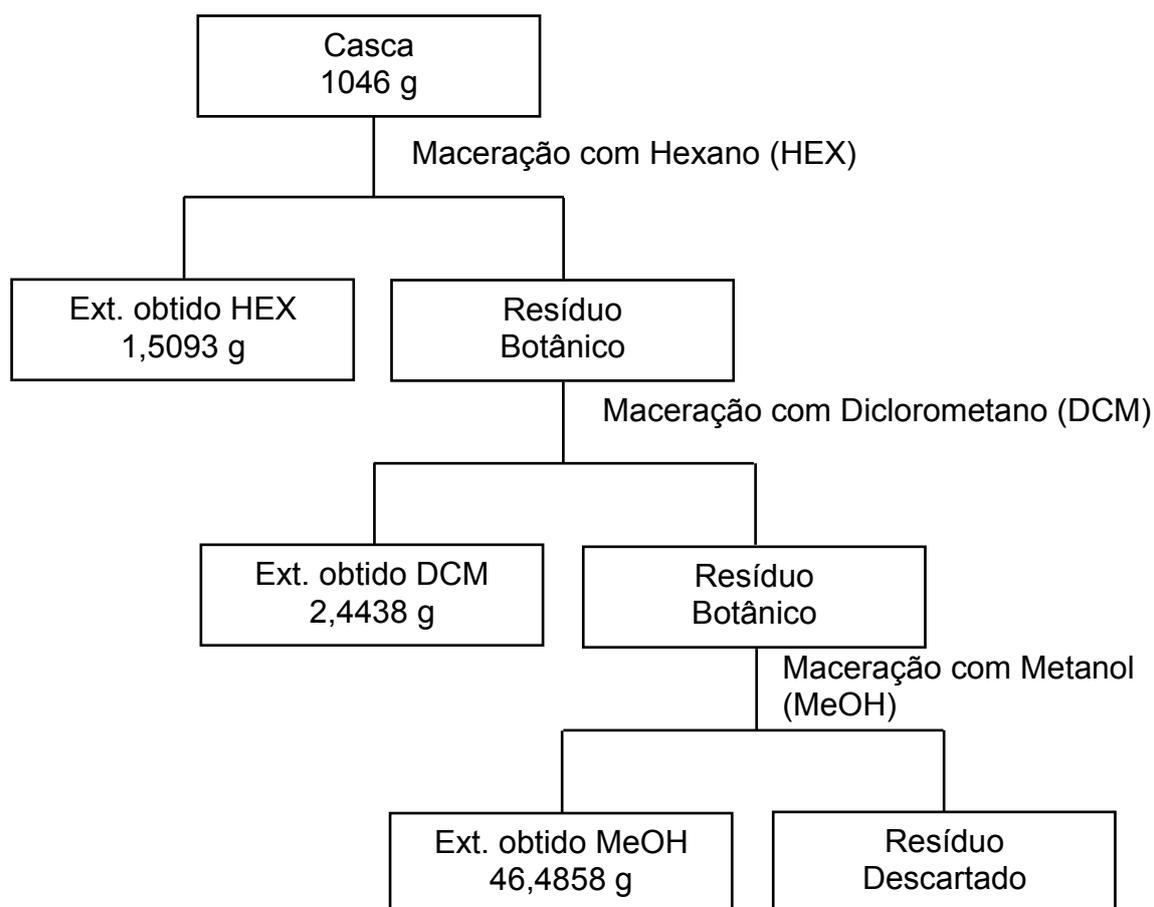
O material botânico (cascas do caule e folhas) foi coletado no dia 25 de julho de 2005 no município em Maués, Amazonas. O material botânico foi identificado pelo Dr. Antonio Carlos Weber, do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) como pertencente à espécie *Guatteria citriodora* Ducke, uma exsicata foi preparada e depositada no herbário do ICB da UFAM com o número 2643.

O material coletado foi seco à sombra, em temperatura ambiente, reduzido a pedaços menores e em seguida pulverizado em moinho de quatro facas.

### **4.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS**

#### **4.2.1 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS CASCAS**

As cascas do caule pulverizadas foram submetidas à maceração em frasco mariote utilizando solventes de crescente polaridade: hexano (HEX), diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), de acordo com a Figura 12. A extração ocorreu a cada 3 dias de intervalo, por 3 vezes para cada solvente. Os extratos foram concentrados para evaporador rotatório sob aquecimento e vácuo para retirada do solvente, após foram transferidos para frascos de cor âmbar e armazenados na geladeira.



**Figura 12:** Fluxograma de obtenção dos extratos brutos da casca de *Guatteria citriodora* Ducke

#### 4.2.2 OBTENÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS FOLHAS

O óleo essencial foi extraído de 70 g das folhas secas em um sistema de Clevenger modificado, foi utilizada a proporção de 1:10 de material botânico para água destilada, durante 3,5 h. Posteriormente, os óleos foram secos, por meio de percolação em sulfato de sódio anidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ), e armazenados em frasco de vidro âmbar sob refrigeração, para evitar perdas dos constituintes voláteis.

## 4.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

### 4.3.1 CROMATOGRAFIA EM FASE GASOSA

O óleo foi submetido à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-DIC-EM) modelo Agilent 6890N, equipado com detector de ionização por chama, operado a 280°C e uma coluna capilar HP5 (30 m x 0,32 mm x 0,25 mm), utilizando-se hidrogênio como gás carreador (1,7 mL min<sup>-1</sup>). Foi injetado 1,0 mL de uma solução a 1% do óleo em diclorometano, em injetor aquecido a 250°C operando no modo com divisão de fluxo (1:20). A programação de temperatura do forno foi de 60°C a 240°C, a uma taxa de aquecimento de 3°C min<sup>-1</sup>. Para a quantificação foram utilizados os valores de área normalizada, expressos em percentagem. Os espectros de massas foram obtidos em sistema Agilent 5973N, equipado com uma capilar HP5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm), utilizando Hélio como gás carreador (1,0 mL min<sup>-1</sup>) nas mesmas condições utilizadas para o CG. O detector foi operado no modo impacto de elétrons com energia de ionização de 70 eV. Os índices de retenção foram calculados após a injeção de uma de n-alcenos (C<sub>9</sub> - C<sub>26</sub>) nas mesmas condições utilizadas para as amostras. A identificação dos constituintes do óleo foi realizada por comparação dos índices de retenção calculados com valores da literatura (ADAMS, 2001) e pela comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles da biblioteca Wiley 6ª edição.

O índice de retenção de Van Der Dool e Kratz foi utilizado para identificação dos constituintes conforme a figura 13 onde “I<sub>r</sub>” é o índice de retenção; t’ é o tempo de retenção ajustado de cada composto; “N” é o número de carbonos do hidrocarboneto que elui antes do composto; e “a” é o composto do qual se deseja obter o índice.

$$I_r = 100N \frac{100 (t_r' a - t_r' N)}{t_r' (N+1) - t_r' N}$$

**Figura 13:** Formula de obtenção do índice de retenção

#### **4.3.2 CROMATOGRAFIA EM COLUNA**

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro de altura e diâmetro específicos, utilizando como fase estacionária à sílica gel 60 com as seguintes especificações: 230-400 mesh ASTM da Merck.

#### **4.3.3 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)**

As análises em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas da Merck, sílica gel 60, com indicador de fluorescência  $F_{254}$ , com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura.

#### **4.3.4 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA PREPARATIVA (CCDP)**

As análises em CCDP foram realizadas em placas de vidro 10x15 e 20x20 utilizando 6 g de sílica gel para 17 mL de água destilada e 14 g de sílica gel para 38 mL de água destilada, respectivamente. Foi utilizada à sílica gel HF 254 com 13% de Gesso de 400 Mesh.

**Reveladores:** A revelação das substâncias nos experimentos em CCD foi feita em luz ultravioleta 254 e 366 nm, e os reagentes sulfato cérico/ácido sulfúrico e Dragendorff.

O reagente sulfato cérico/ácido sulfúrico foi preparado com solução a 1% de sulfato cérico (IV) em ácido sulfúrico a 10 % de acordo com Mattos (1997). Através de borrifação em placa cromatográfica os “spots” das amostras apresentaram colorações características dos seus cromóforos, a frio ou após aquecimento em estufa, por aproximadamente dois minutos a 110°C.

O reagente de Dragendorff com modificação de Munier (MUNIER, 1953 *apud* MERK, 1971) foi preparado com a mistura das soluções A (1,7 g de nitrato de bismuto III e 20,0 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada) e B (16,0 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada) em partes iguais (1:1) que constituem a solução estoque. Para borrifação das placas, 5,0 mL da solução estoque é adicionado a 10,0 g de ácido tartárico, dissolvido em 50 mL de água destilada. Após borrifação em placa cromatográfica, os “spots” de substâncias alcaloídicas apresentaram coloração laranja.

**Solventes:** As análises cromatográficas foram realizadas com solventes das marcas Merck, Synth, Vetec e Aldrich P.A. Para obtenção de espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados das marcas Merck e Aldrich.

#### 4.4 MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS

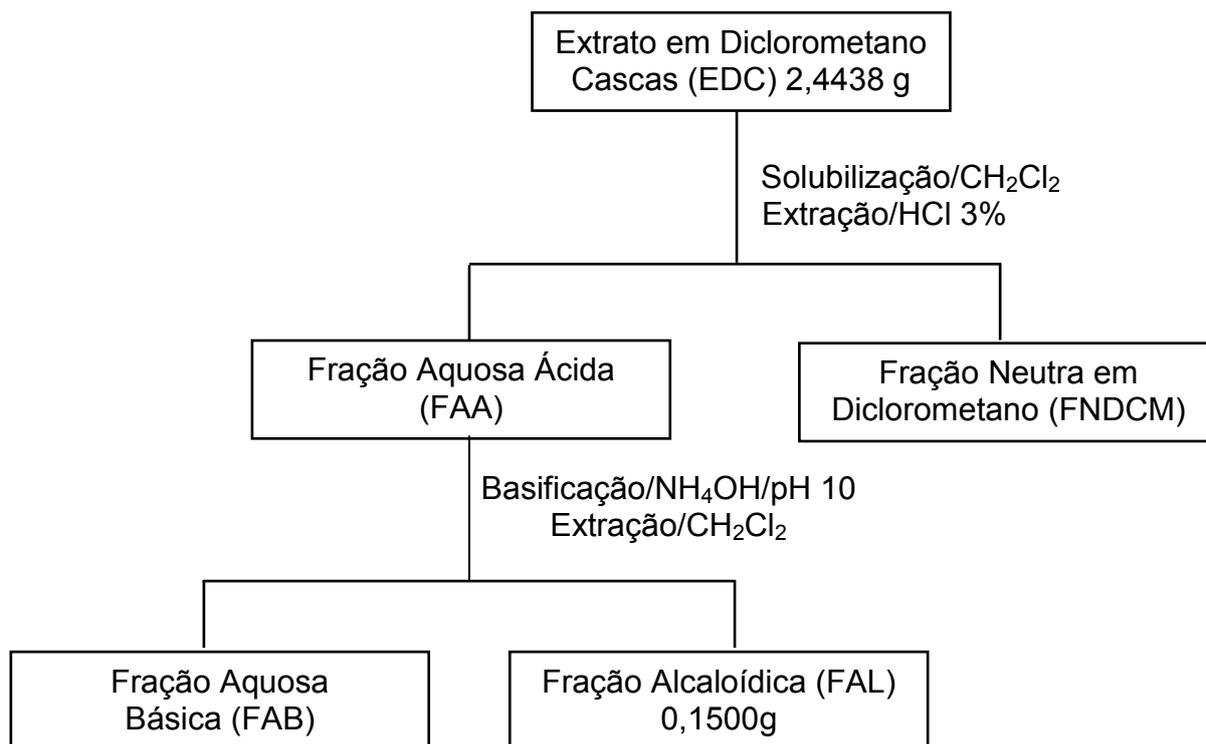
Os espectros de absorção na região do infravermelho foram registrados no aparelho Modelo Spectrum 2000 com transformada de Fourier, FT-IR da Perkin

Elmer, da Central Analítica da Universidade Federal da Amazonas. As amostras foram analisadas em pastilhas de KBr.

Os espectros de ressonância magnética nuclear uni e bi dimensionais foram registrados em aparelho Bruker Avance DRX-400 da Universidade Federal do Paraná (UFPN), operando respectivamente a 400 MHz para RMN de  $^1\text{H}$  e 100 MHz para HSQC e HMBC. As amostras foram solubilizadas em  $\text{CDCl}_3$ ,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$  ou  $\text{C}_2\text{D}_5\text{OD}$ . Os deslocamentos químicos foram expressos em partes por milhão ( $\delta$ ) e as multiplicidades dos sinais indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplete duplo), ddd (duplo duplete duplo), t (triplete), dt (duplo triplete). As constantes de acoplamento ( $J$ ) foram registradas em Hertz (Hz).

#### **4.5 OBTENÇÃO DE ALCALÓIDES DO EXTRATO EM DICLOROMETANO DAS CASCAS**

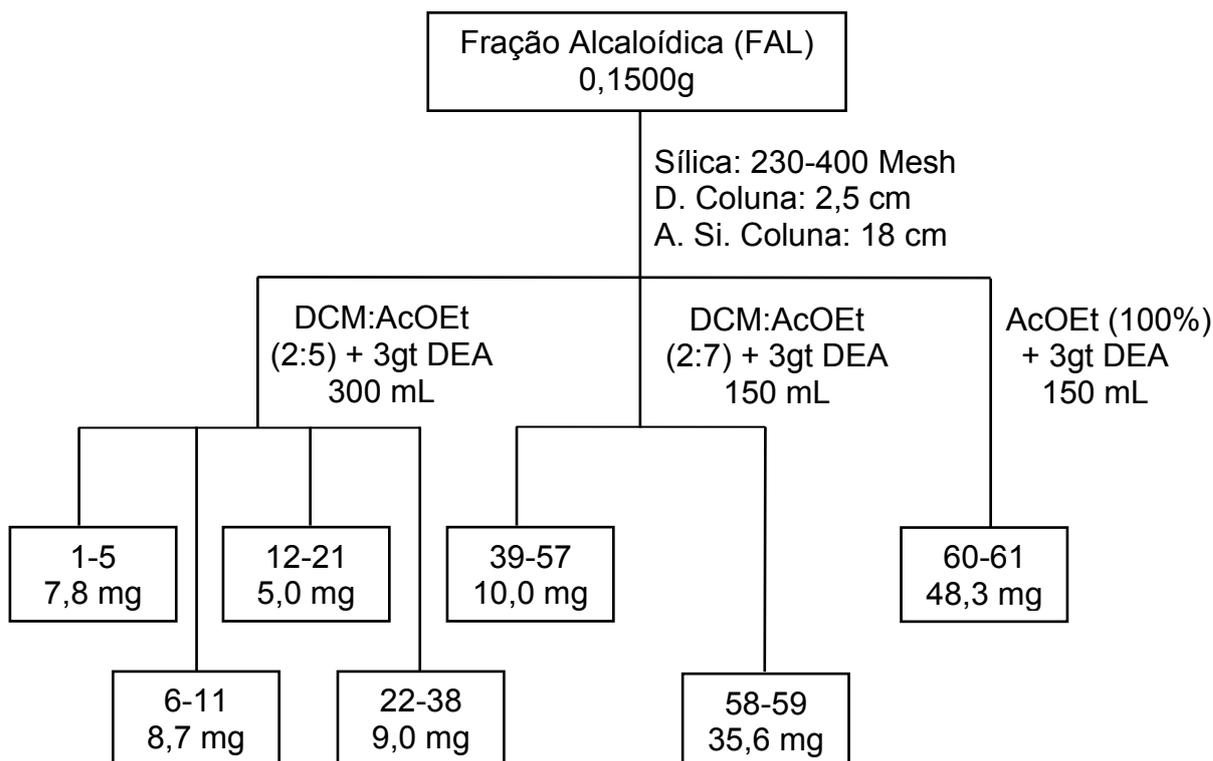
O extrato das cascas obtido com diclorometano (EDC) foi submetido a tratamento ácido-base com a finalidade de se extrair os alcalóides presentes. O EDC foi solubilizado com diclorometano e submetido à extração com HCl a 3%, obtendo a Fração Neutra em Diclorometano (FNDCM) e a Fração Aquosa Ácida (FAA). A FNDCM foi seca em evaporador rotatório e a FAA foi basificada por meio de  $\text{NH}_4\text{OH}$  elevando seu pH a 10. Posteriormente foi extraída com diclorometano obtendo-se duas novas frações, a Fração Aquosa Básica (FAB), que foi descartada, e a Fração Alcaloídica (FAL), conforme a Figura 14.



**Figura 14:** Fluxograma de extração das bases presentes no extrato diclorometano

#### 4.5.1 FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DAS CASCAS

A fração alcaloídica (FAL), 150 mg, obtida pelo tratamento ácido-base foi submetida à CCD utilizando vários sistemas de eluição com diversos gradientes, e observou-se a melhor separação com o eluente diclorometano (DCM):acetato de etila (AcOEt) na proporção 2:7 acrescido de três gotas de dietilamina (DEA). Nesse sistema de eluição a FAL foi fracionada em coluna cromatográfica (altura 18 cm, diâmetro coluna 2,5 cm) de sílica gel 230 – 400 Mesh obtendo-se 61 frações. As frações obtidas foram analisadas em CCD, reveladas em luz ultravioleta e solução de sulfato cérico e as que apresentaram mesmo  $R_f$  foram reunidas (Figura 15).



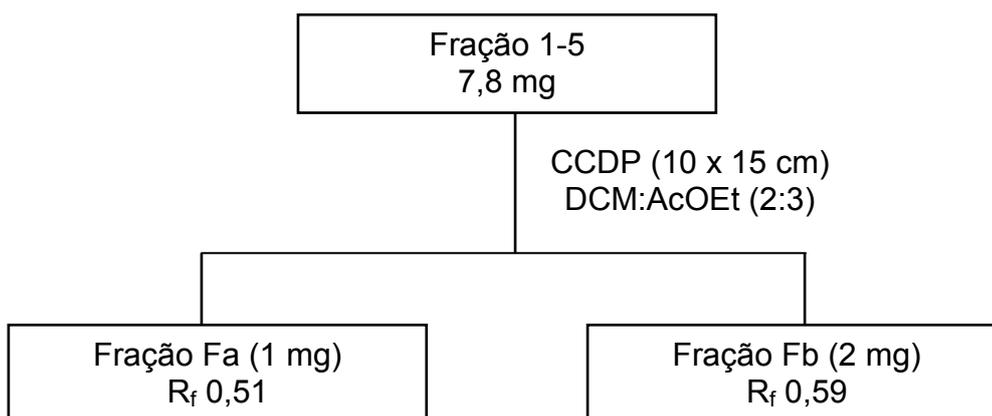
**Figura 15:** Esquema do fracionamento da fração alcaloídica das cascas

#### 4.5.1.1 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO 1-5

A fração 1-5 foi analisada em CCD utilizando vários sistemas de eluentes para melhor separação de seus constituintes. Em seguida, foi submetida à cromatografia em camada delgada preparativa CDDP (10 x 15) preparada com 6 g de sílica gel e 17 mL de água destilada eluída com DCM:AcOEt (2:3). Após a eluição, foram visualizadas com reveladores UV e sulfato cérico, duas faixas com  $R_f$  distintos. As amostras foram separadas e extraídas por filtração simples com etanol e clorofórmio, e posteriormente filtradas. As frações foram codificadas como Fa e Fb, conforme a Figura 16.

A fração Fa e Fb após a evaporação do solvente resultaram em um sólido cristalino e quando analisadas em CCD apresentaram teste positivo para alcalóides

frente ao reagente Dragendorff e um único “spot” ao ser revelado em solução de sulfato cérico. Somente a fração Fb foi submetida à análise espectroscópica para sua identificação, pois a Fa se encontrava em quantidade insuficiente para sua identificação.



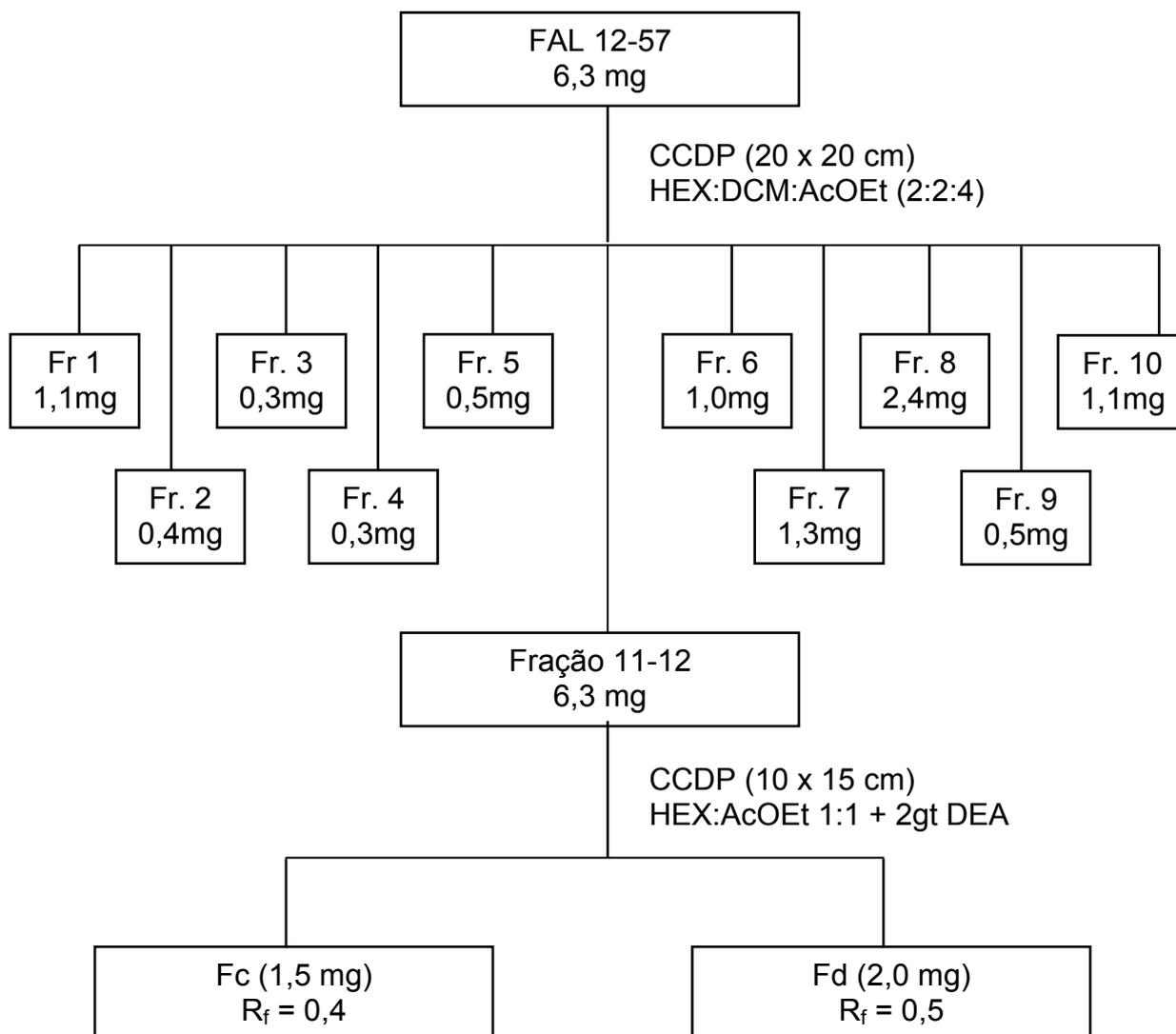
**Figura 16:** Fluxograma do esquema da análise cromatográfica da fração 1-5

#### 4.5.1.2 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA DA FRAÇÃO 12-57

A fração 12-57 foi analisada em CCD utilizando vários sistemas de eluições para melhor separação de seus constituintes. Posteriormente, submetida à cromatografia em camada delgada preparativa CCDP (20 x 20), preparada com 14 g de sílica gel e 38 mL de água destilada, utilizando HEX:DCM:AcOEt (2:2:4) como sistema de eluição. As frações foram extraídas com acetona e metanol, e filtradas obtendo 12 novas frações em ordem crescente de polaridade.

As frações mais polares 11 e 12 foram reunidas (6,3 mg), em seguida, submetidas a CCDP (10 x 15), utilizando 6 g de sílica gel com 17 mL de água destilada, e eluentes HEX:AcOEt (1:1) com 2 gotas de DEA. Após a eluição, foram visualizadas com reveladores UV e sulfato cérico duas faixas com R<sub>f</sub> distintos, das quais extraídas com etanol e clorofórmio foram posteriormente filtradas. As duas

novas frações codificadas como Fc e Fd (Figura 17). As frações apresentaram teste positivo para alcalóides frente ao reagente Dragendorff sendo submetidas à análise espectroscópica para identificação.



**Figura 17:** Fluxograma de análise cromatográfica da FAL12-57

#### 4.6 TESTE DE ATIVIDADE LEISHMANICIDA

Os testes de atividade leishmanicida foram realizados no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, do Departamento de Imunologia (IOC) da

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), sob a orientação da Dra. Leonor Laura Pinto Leon.

Neste estudo foram utilizadas cepas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/77/LTB0016) e *Leishmania guyanensis* (MHOM/BR/77/IM4216), cedidas pela Dra. Antônia Maria Ramos Franco do laboratório de Leishmaniose e Doença de Chagas do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (CPCS/INPA), previamente caracterizada pela técnica molecular de eletroforese de isoenzimas (MOMEN, 1984), as quais foram mantidas em animal de laboratório e em cultivos *in vitro*.

A varredura foi realizada através de ensaio em placa estéril de microtitulação (96 poços) mantida a temperatura de 26 °C. As formas promastigotas foram ajustadas a concentração de  $4,0 \times 10^6$  parasitas/mL, por meio da câmara de Neubauer, após centrifugação (5000 rpm, durante 15 min a 4° C).

Para a atividade leishmanicida os óleos essenciais foram avaliados na concentração de 320 µg/mL. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, usando a pentamidina como droga de referência (controle).

A atividade leishmanicida foi determinada graficamente por concentração *versus* porcentagem de inibição. As amostras que se revelaram ativas quanto a esta triagem foram selecionadas para a determinação da concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) por diluição seriada.

Para a determinação da concentração inibitória (CI<sub>50</sub>) foi realizada a diluição em série das amostras previamente selecionadas na triagem. Utilizou-se um intervalo de concentração de 160 a 0,08 µg/mL (CANTO-CAVALHEIRO, 1999) solubilizadas em DMSO. Após 24 horas de incubação a 26 °C, os valores dos DL<sub>s50</sub>/24 horas, foram determinados pelo método colorimétrico MTT modificado

Abs 490 nm. Todos os experimentos foram realizados em triplicata, usando a pentamidina como droga de referência.

#### **4.7 TESTE DE TOXICIDADE UTILIZANDO *Artemia salina* Leach**

O ensaio foi realizado segundo o procedimento descrito por MEYER *et al*, (1982) e MCLAUGHLIN *et al.*, (1998).

Os ovos de *Artemia salina* foram transferidos para uma placa de Petri e mantidos a uma temperatura de 28 °C com o auxílio de uma lâmpada de 60 W até o período de eclosão das larvas, o qual se completou após cerca de 48 horas do início do experimento.

Após esse período transferiu-se 10 náuplios (larvas de *Artemia salina*) num volume de 180 µL (4 gotas) para a placa multipoço 6 x 4 com 1,8 mL de solução salina.

Em frascos do tipo eppendorf foram pesados 20 mg dos óleos e solubilizados com 200 µL de TWEEN 80. Os óleos solubilizados foram transferidos no volume 20 µL para os poços obtendo concentração de 1000 µg/mL, posteriormente para as concentrações 500, 100 e 10 µg/mL foram transferidos 10,0, 2,0 e 0,2 µL para os poços, respectivamente completando o volume de 20 µL com TWEEN 80. Para o branco, transferiu-se TWEEN 80 na quantidade de 200 µL.

A contagem do número de larvas sobreviventes e mortas nos testes das amostras e do branco foram realizadas após 24 horas. Os ensaios foram realizados em triplicata.

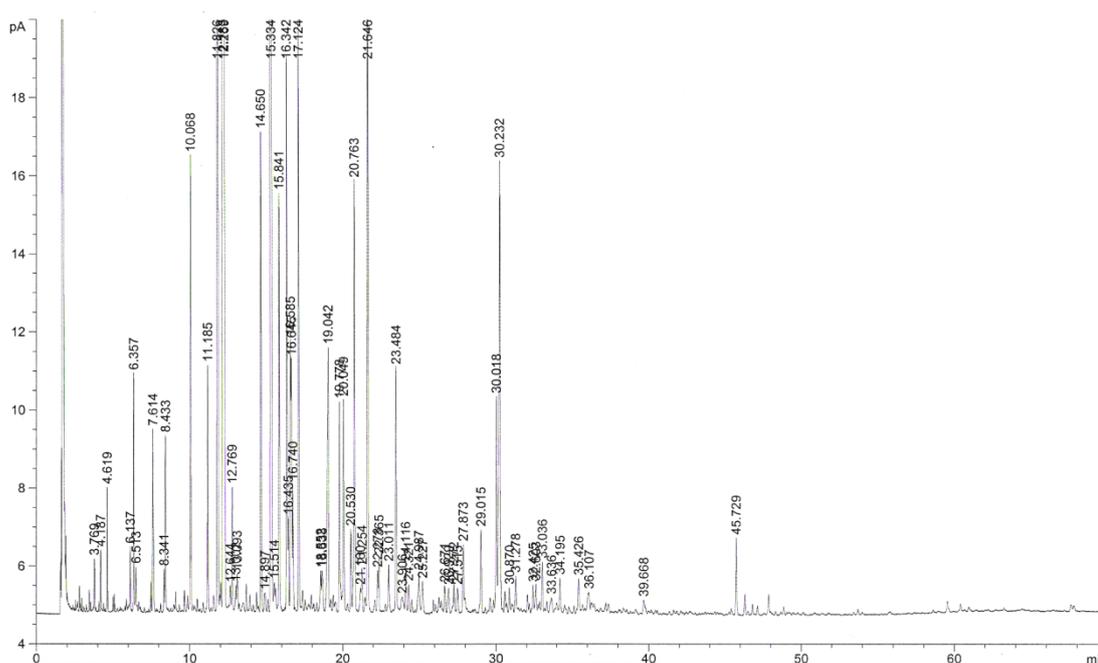
Os dados foram analisados segundo a metodologia de Probit (FINNEY, 1952) e expressos como Concentração Letal 50% (CL<sub>50</sub>), caso de demonstrar toxicidade. As concentrações abaixo de 10<sup>3</sup> µg/mL indicam um potencial de atividade tóxica.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS CONSTITUINTES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Guatteria citriodora* DUCKE

O óleo essencial de *Guatteria citriodora* extraído das folhas secas obteve rendimento de 1,5%. A densidade igual a 0,8815 g/mL foi calculada considerando o volume obtido no próprio sistema de extração. Em seguida, o óleo foi submetido à análise por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) (Figura 18). A tabela 4 apresenta os dados dos constituintes químicos do óleo essencial com seus rendimentos.

O óleo essencial de *Guatteria citriodora* foi avaliado quanto sua composição. Os monoterpenos equivalem a 77,1% enquanto os sesquiterpenos correspondem a apenas 15,1%, totalizando 86,2% de compostos identificados.



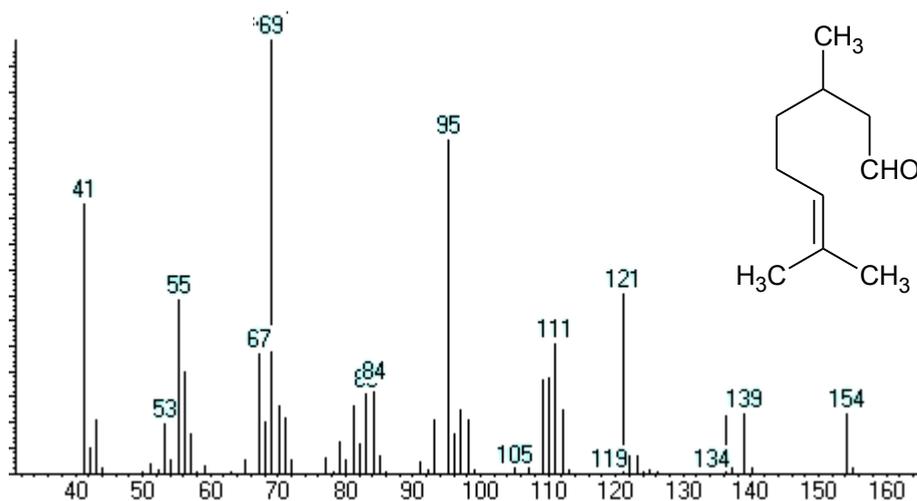
**Figura 18:** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *Guatteria citriodora*

**Tabela 4:** Dados dos constituintes químicos identificados do óleo essencial de *Guatteria citriodora*

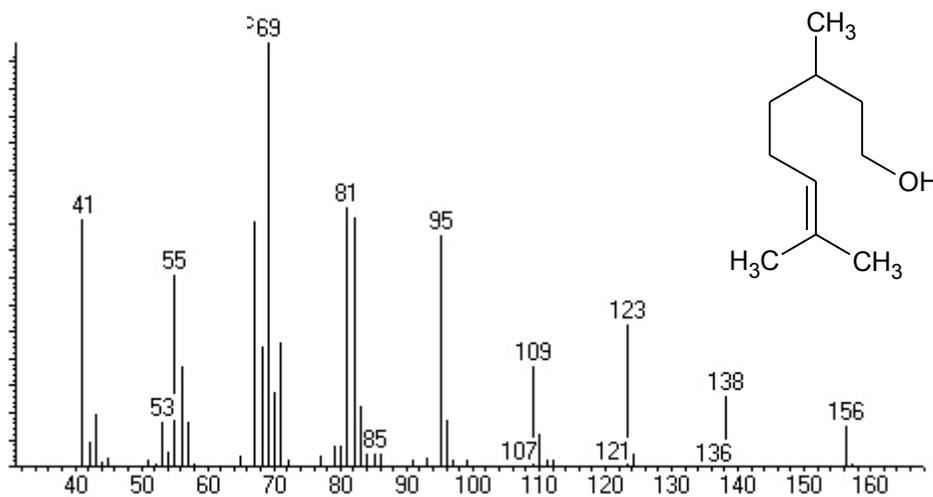
TEOR (%)	IR	IDENTIFICAÇÃO	t <sub>r</sub> (min.)
<b>MONOTERPENOS</b>			
0,2	980	β-pineno	6,137
0,2	993	mircenol	6,513
0,8	1031	limoneno	7,614
0,6	1056	2,6-dimetil-5-heptenal	8,433
1,6	1100	linalol	10,068
8,3	1148	neo-isopulegol	11,826
25,5	1156	citronelal	12,183
3,1	1158	Isopulegol	12,259
0,1	1167	borneol	12,644
0,5	1170	neo-iso-isopulegol	12,769
0,2	1178	terpinen-4-ol	13,093
22,4	1231	citronelol	15,334
1,8	1243	neral	15,841
2,3	1255	geraniol	16,342
1,0	1262	carvenona	16,645
2,5	1272	geranial	17,124
<b>SESQUITERPENOS</b>			
0,4	1351	α-cubebeno	20,530
2,1	1356	acetato de citronelila	20,763
0,1	1365	ciclo-iso-sativeno	21,160
0,2	1367	ciclo-sativeno	21,254
3,3	1376	α-copaeno	21,646
0,2	1390	β-cubebeno	22,278
0,2	1391	β-elemenol	22,365
0,3	1406	α-gurjuneno	23,011
1,3	1418	trans- β-cariofileno	23,484
0,2	1429	β-copaeno	23,096
0,2	1434	α-guaieno	24,116
0,2	1439	aromadrendeno	24,321
0,3	1455	allo- aromadrendeno	24,987
0,2	1493	epi-cubebol	26,671
0,2	1499	α-muurolenol	26,929
0,2	1514	cubebol	27,515
0,4	1523	calameneno	27,873
1,1	1576	espatulenol	30,018
3,0	1581	óxido de cariofileno	30,232
0,1	1596	guaiol	30,870
0,3	1607	epóxido de humuleno	31,278
0,2	1642	epi-α-muurolol	32,603
0,3	1653	selin-11-en-4-α-ol	33,036
0,2	1669	calamenen-10-ol	33,636
86,2 %			

Fonte: ADAMS, 2001

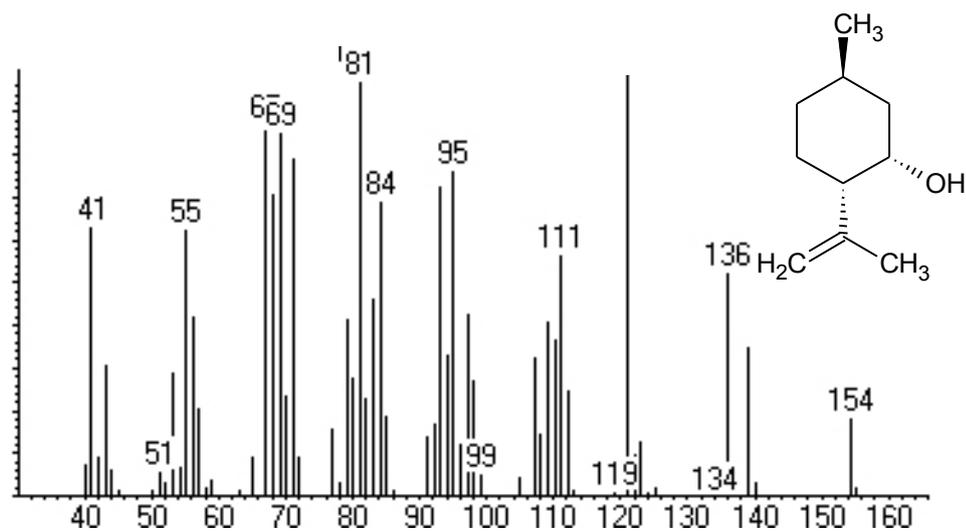
Os espectros de massa das substâncias majoritárias citronelal, citronelol, neo-isopulegol,  $\alpha$ -copaeno e óxido de cariofileno estão expressos nas figuras de 19 a 23, respectivamente. As estruturas de algumas substâncias são apresentadas na figura 24.



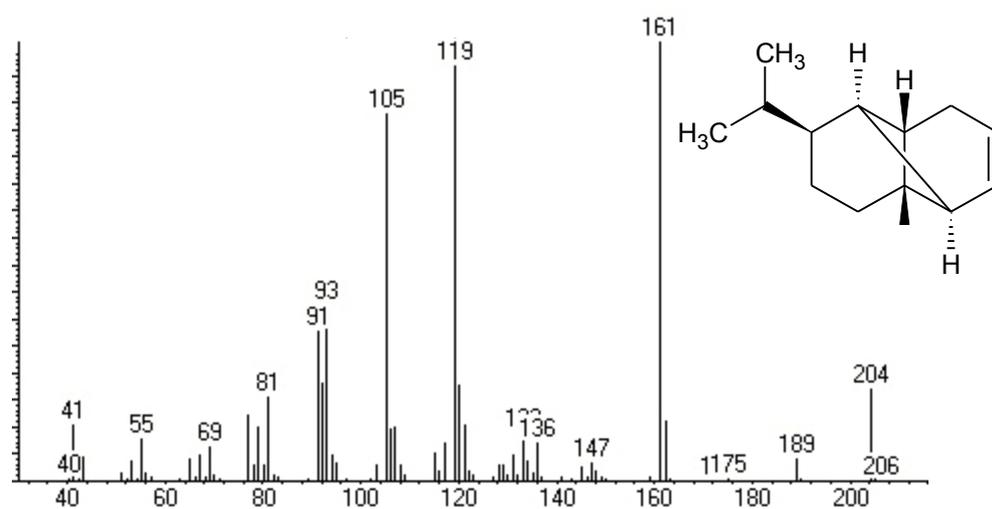
**Figura 19:** Espectro de massa referente ao pico com  $t_r = 13,11$  correspondente ao citronelal



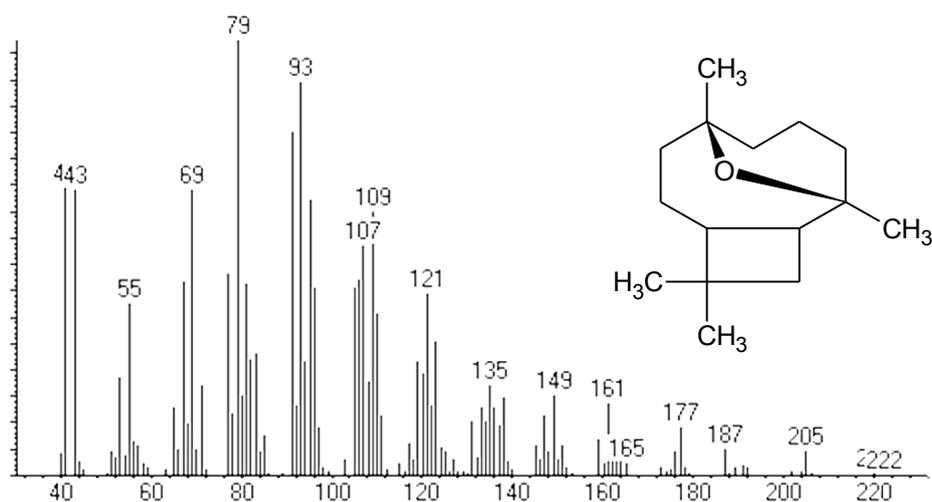
**Figura 20:** Espectro de massa referente ao pico com  $t_r = 16,43$  correspondente ao citronelol



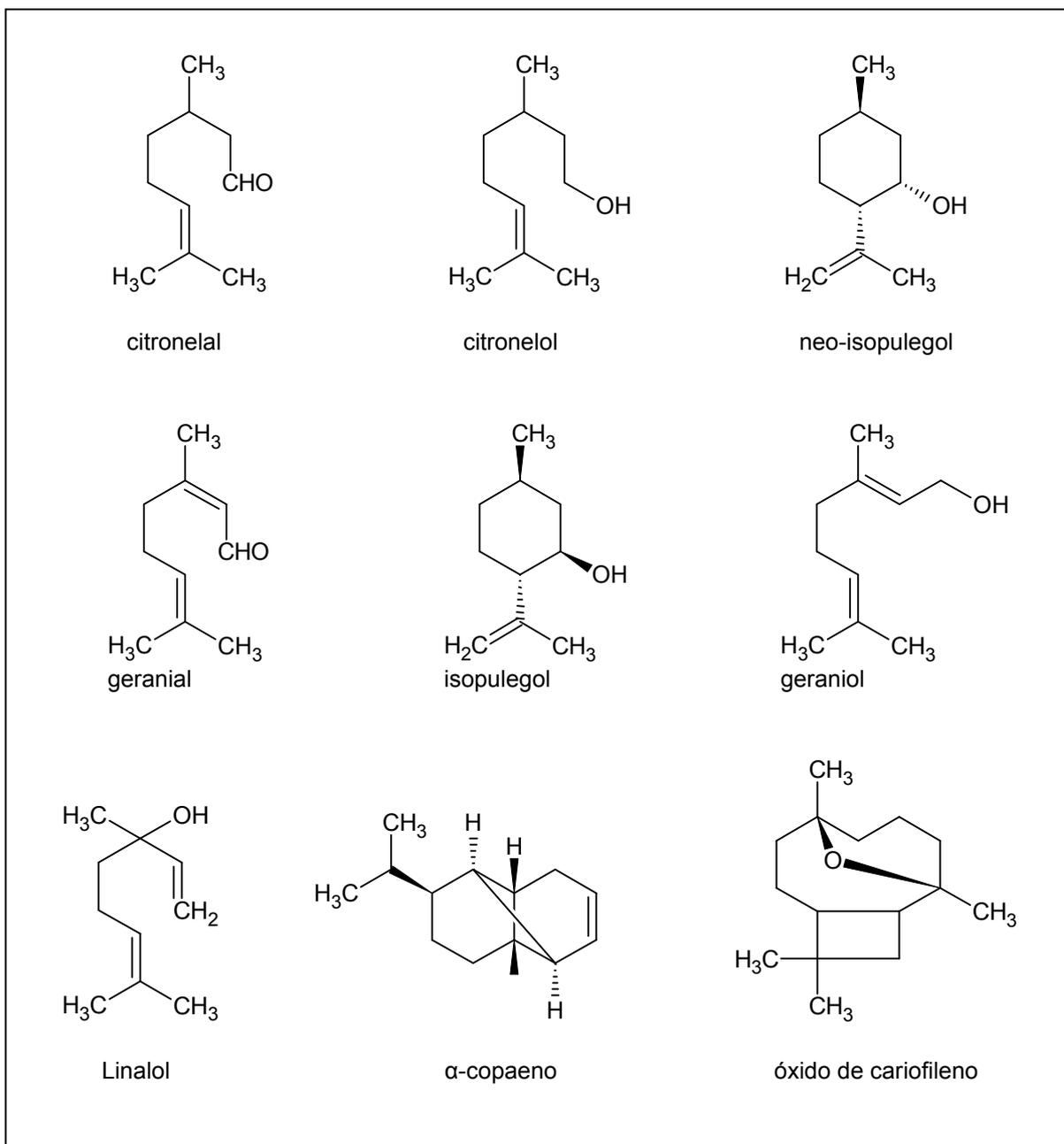
**Figura 21:** Espectro de massa do pico com  $t_r = 12,72$  correspondente ao neo-isopulegol



**Figura 22:** Espectro de massa do pico com  $t_r = 22,678$  correspondente ao  $\alpha$ -copaeno



**Figura 23:** Espectro de massa do pico com  $t_r = 31,39$  correspondente ao óxido de cariofileno

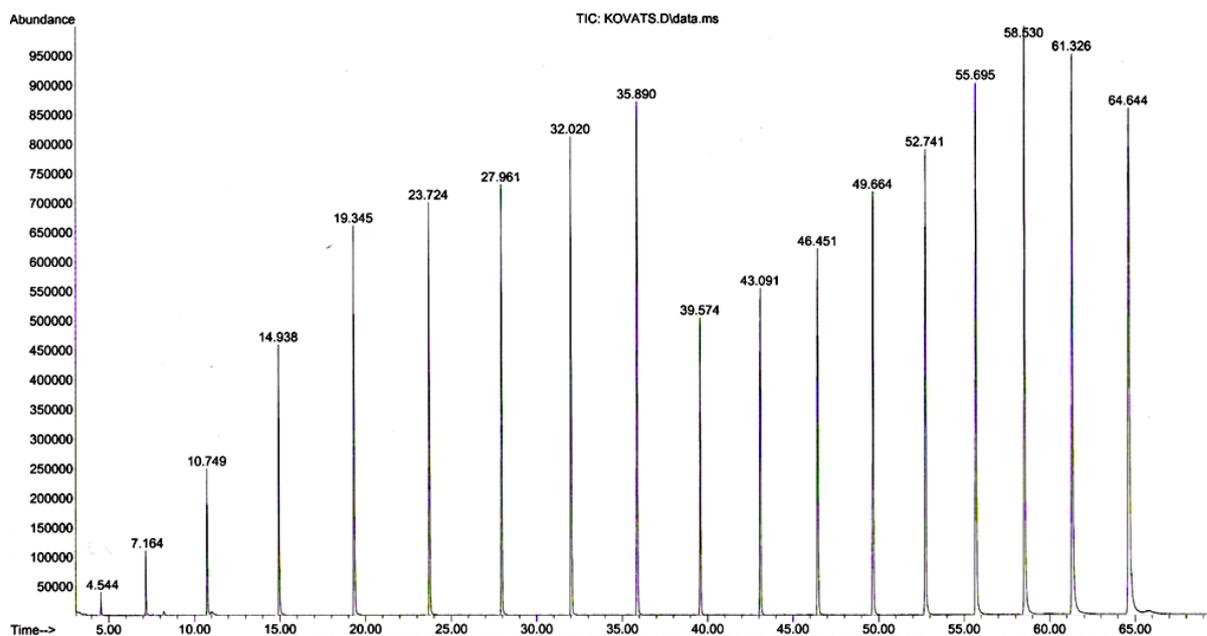


**Figura 24:** Constituintes majoritários do óleo essencial das folhas de *G. citriodora*

Os índices de retenção foram calculados após a injeção de uma série de n-alcenos (Tabela 6, Figura 25) nas mesmas condições utilizadas para as amostras. A identificação dos constituintes do óleo foi realizada por comparação dos índices de retenção calculados com valores da literatura (Adams, 2001) e pela comparação dos espectros de massas obtidos com aqueles da biblioteca Wiley 6<sup>o</sup> edição.

**Tabela 5:** Dados dos padrões de hidrocarbonetos não ramificados

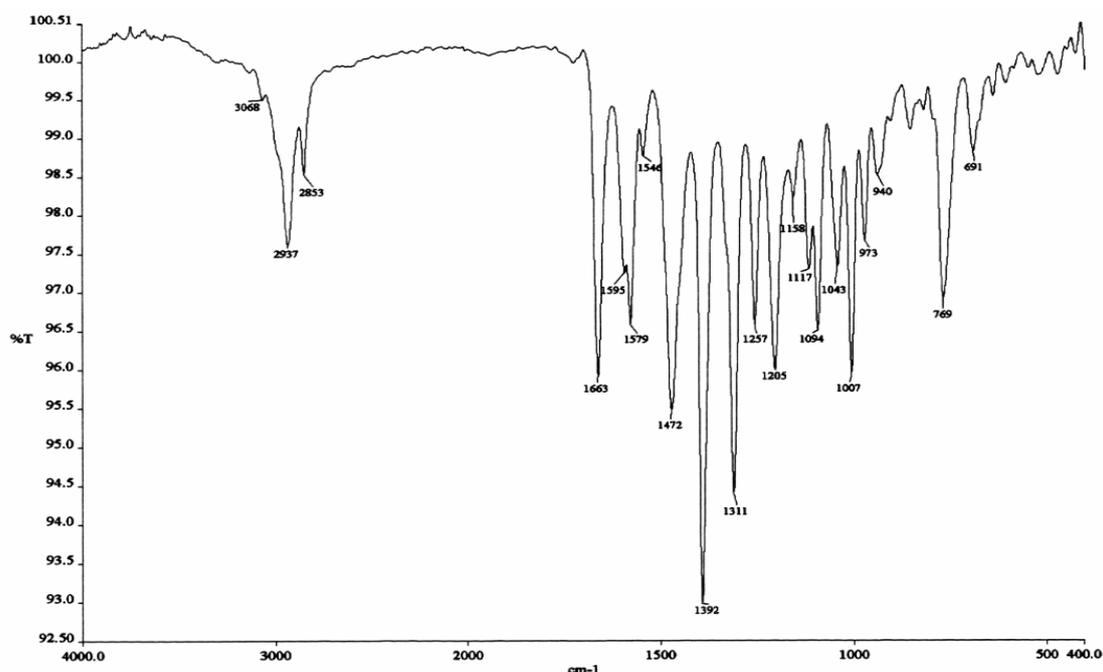
Padrão de hidrocarboneto	t <sub>r</sub> (min.)	Fórmula	Padrão de hidrocarboneto	t <sub>r</sub> (min.)	Fórmula
Nonano	4,544	C <sub>9</sub> H <sub>20</sub>	Octadecano	39,574	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub>
Decano	7,164	C <sub>10</sub> H <sub>22</sub>	Nonadecano	43,091	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub>
Undecano	10,749	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub>	Icosano	46,451	C <sub>20</sub> H <sub>42</sub>
Dodecano	14,938	C <sub>12</sub> H <sub>26</sub>	Heneicosano	49,664	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub>
Tridecano	19,345	C <sub>13</sub> H <sub>28</sub>	Docosano	52,741	C <sub>22</sub> H <sub>46</sub>
Tetradecano	23,724	C <sub>14</sub> H <sub>30</sub>	Tricosano	55,695	C <sub>23</sub> H <sub>48</sub>
Pentadecano	27,961	C <sub>15</sub> H <sub>32</sub>	Tetracosano	58,530	C <sub>24</sub> H <sub>50</sub>
Hexadecano	32,020	C <sub>16</sub> H <sub>34</sub>	Pentacosano	61,326	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub>
Heptadecano	35,890	C <sub>17</sub> H <sub>36</sub>	Hexacosano	64,644	C <sub>26</sub> H <sub>54</sub>

**Figura 25:** Cromatograma de íons totais do padrão dos hidrocarbonetos C<sub>9</sub> a C<sub>26</sub>

## 5.1 IDENTIFICAÇÃO DA Fb

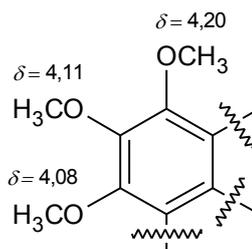
A amostra Fb (2,0 mg) caracterizou-se como um sólido alaranjado e apresentou teste positivo para alcalóides frente ao reagente Dragendorff.

O espectro de absorção na região do infravermelho de Fb (figura 26) mostrou uma forte absorção em  $1663\text{ cm}^{-1}$  típica de grupo carbonila conjugado (C=O). A presença de bandas em 1595, 1579, 1546, características de estiramento C=C do anel benzênico e uma banda de absorção em  $739\text{ cm}^{-1}$ , típicas de deformação fora do plano =C-H, evidenciaram a natureza aromática do composto. Absorções em 2957 e  $2853\text{ cm}^{-1}$  referentes a estiramentos C-H e bandas de absorção na região de 1257 a  $1205\text{ cm}^{-1}$  características de estiramento assimétrico de C-O-C combinadas com bandas na região de 1117 a  $1007\text{ cm}^{-1}$  de estiramento simétrico de C-O-C, indicaram presença de função éter na molécula.



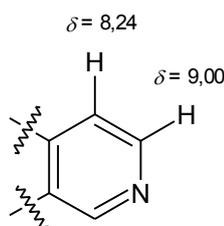
**Figura 26:** Espectro no infravermelho da Fb em KBr

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  evidenciou a presença de nove sinais entre  $\delta$  9,2 e 4,0 com integração para 15 hidrogênios. A presença de três grupos metoxila ligados ao anel benzeno (Figura 27) foi observada através dos sinais em  $\delta$  4,08 (s), 4,11 (s) e 4,20 (s) com integração para nove hidrogênios.



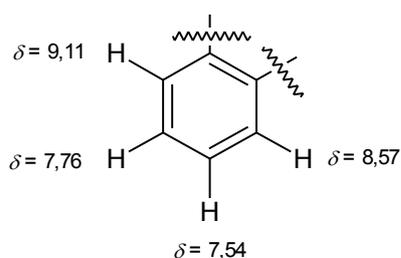
**Figura 27:** Estrutura de um anel benzeno com os três grupos metoxi

Na região entre  $\delta$  9,2 e 7,5 observou-se a presença de sinais com integração para seis hidrogênios aromáticos, sendo dois em 8,24 (d,  $J = 5,40$  Hz, 1H) e 9,00 (d,  $J = 5,40$  Hz, 1H) característico de hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  do anel piridínico em H-4 e H-5, respectivamente (Figura 28).



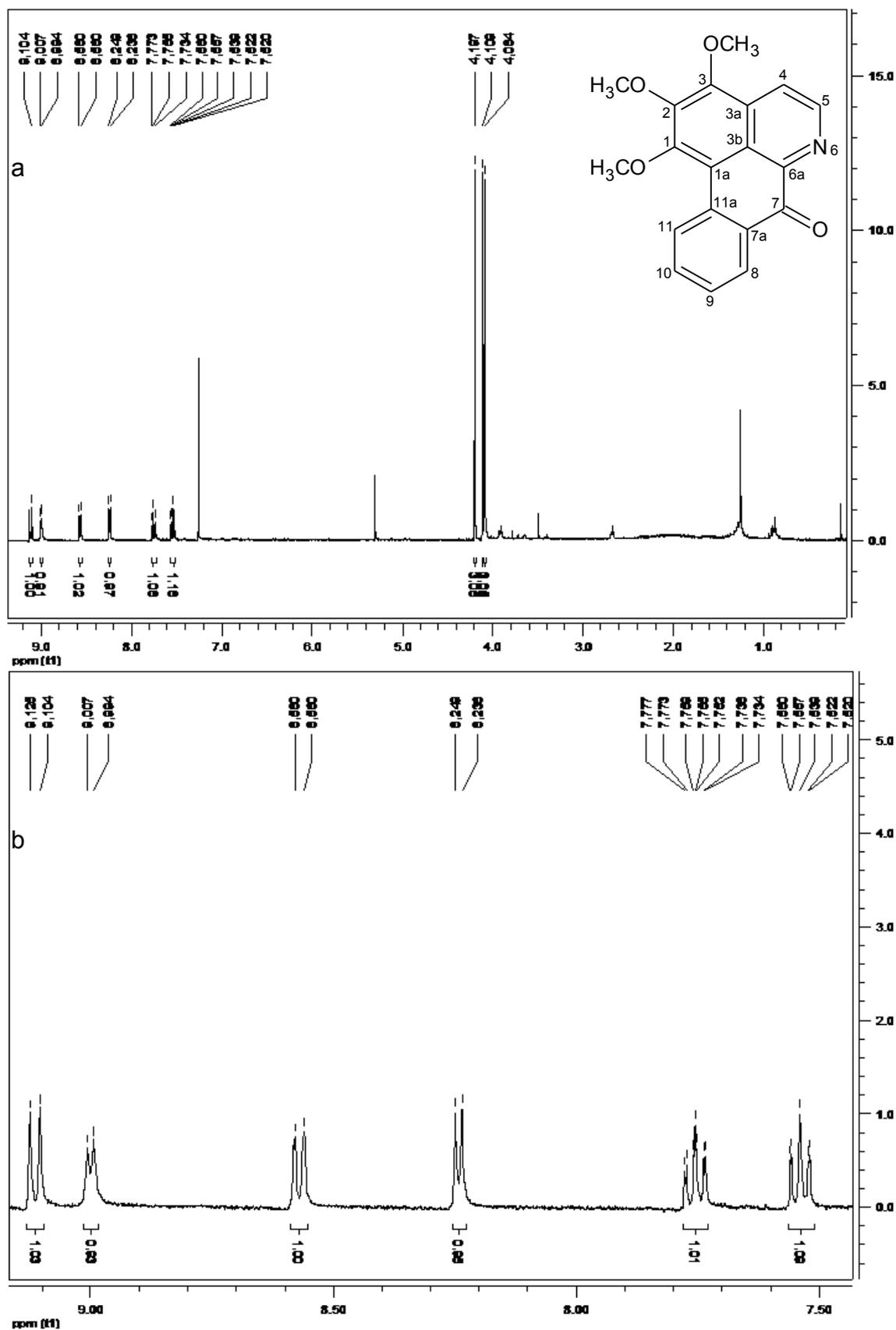
**Figura 28:** Estrutura do anel piridínico com os hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$

O registro de sinais correspondentes a quatro hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,54 (ddd,  $J = 8,49$ ; 7,26 e 1,63 Hz, 1-H),  $\delta$  7,76 (ddd,  $J = 8,49$ ; 7,26 e 1,63 Hz, 1-H),  $\delta$  9,11 (d,  $J = 8,33$  Hz, 1-H) e  $\delta$  8,57 (dd,  $J = 7,85$ ; 1,43 Hz, 1-H) caracterizaram a presença do anel benzênico dissustituído como mostra a figura 29.



**Figura 29:** Estrutura do anel benzeno dissustituído

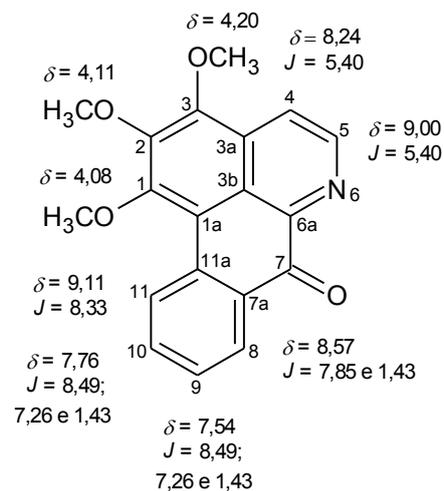
O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância Fb é apresentado na figura 30. Os dados foram comparados com dados de WIJERATNE *et al* (1996) descritos na tabela 6, sugerindo tratar-se do alcalóide oxoaporfínico O-metilmoshatolina (WIJERATNE *et al.*, 1996; COSTA, 2004).



**Figura 30:** a – Espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Fb (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), b – Ampliação da região entre  $\delta$  7,4 e 9,2

**Tabela 6:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  da Fb (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) comparado com dados da literatura da O-metilmoschatolina

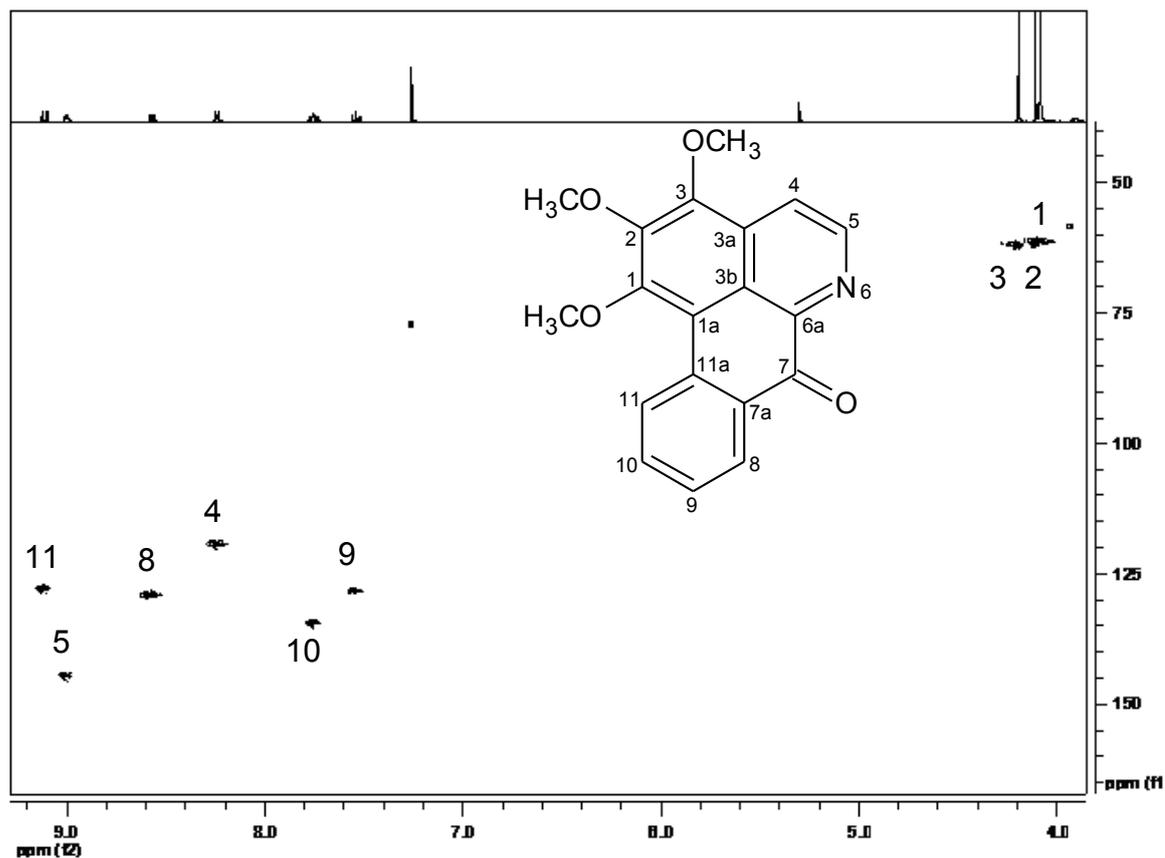
Posição	$\delta_{\text{H}}$ (Integração, mult., J) *O-metilmoschatolina	$\delta_{\text{H}}$ (Integração, mult., J) Fb
1-OCH <sub>3</sub>	4,08 (3H, s)	
2-OCH <sub>3</sub>	4,11 (3H, s)	
3-OCH <sub>3</sub>	4,19 (3H, s)	
4	8,21 (1H, d $J = 5,49$ Hz)	
5	8,97 (1H, d, $J = 5,49$ Hz)	
8	8,58 (1H, dd, $J = 7,93, 1,22$ Hz)	
9	7,54 (1H, t, $J = 7,94$ Hz)	
10	7,75 (1H, dt, $J = 7,93, 1,22$ Hz)	
11	9,10 (1H, d, $J = 7,93$ Hz)	



$\delta$  (deslocamento químico) em ppm (partes por milhão)

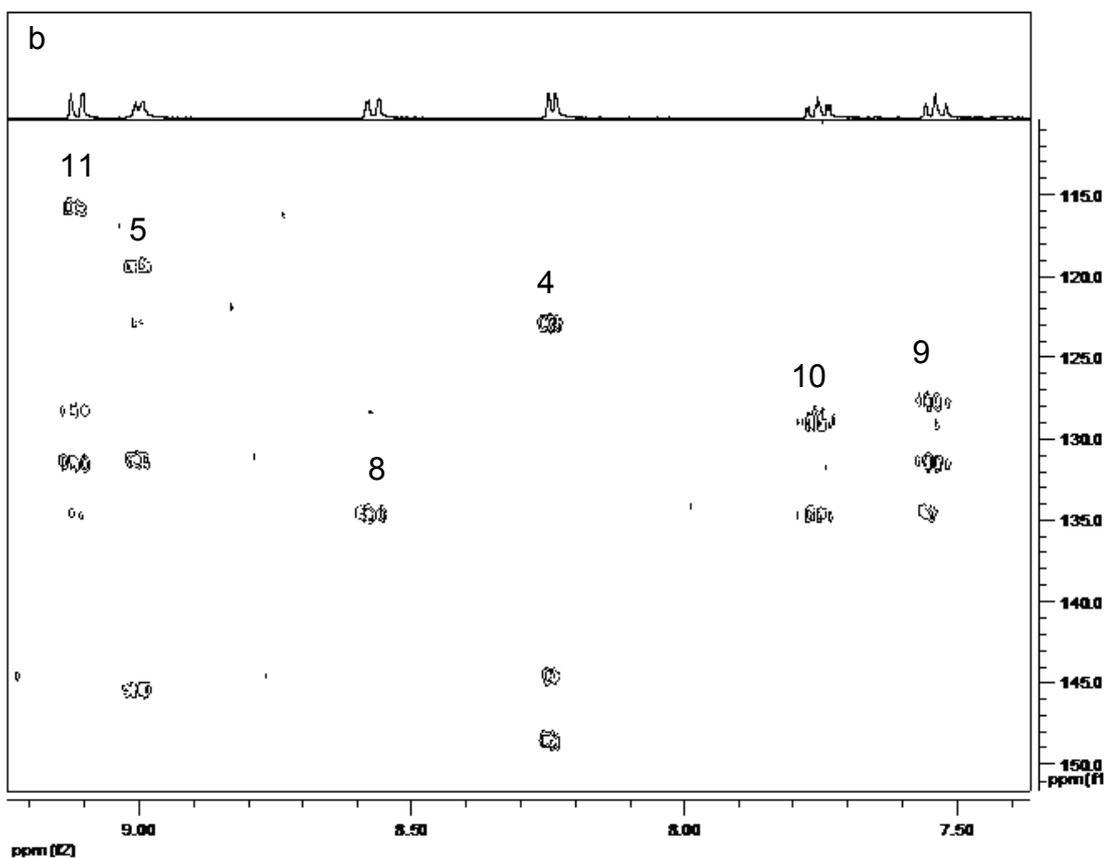
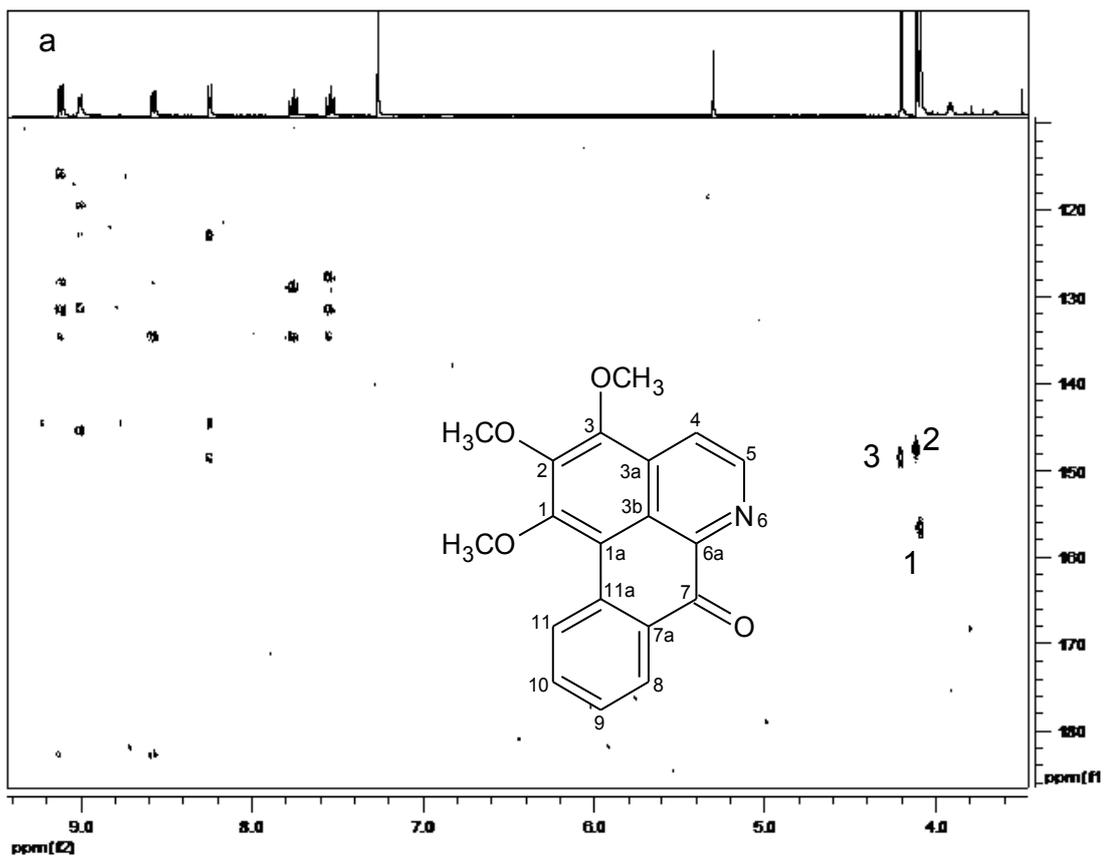
\*Fonte: WIJERATNE *et al*, 1996 (400 MHz  $\text{CDCl}_3$ )

A análise do mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC evidenciou sinais em  $\delta$  60,7, 61,6 e 61,8, correlacionados, respectivamente aos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  4,08, 4,11 e 4,20 foram atribuídos aos carbonos C-1, C-2 e C-3 característicos de grupos metoxila. Os sinais em  $\delta$  144,2 e 119,1 correlacionados, respectivamente aos sinais dos hidrogênios em  $\delta$  8,24 e 9,0 foram atribuídos aos carbonos C-4 e C-5, típicos do anel piridínico. As correlações entre os sinais em  $\delta$  127,5/9,11, 128,0/7,54, 129,0/8,57 e 134,2/7,76 permitiram as atribuições dos carbonos C-11, C-9, C-8 e C-10, respectivamente (Figura 31, Tabela 7).



**Figura 31:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da amostra Fb

Analisando o mapa de correlação heteronuclear a longa distância  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC permitiu correlacionar os sinais dos hidrogênios em  $\delta$  4,08, 4,11 e 4,20 atribuídos aos grupos metoxila, estavam correlacionados com os sinais em  $\delta$  156,5, 147,5, e 148,5 compatíveis com as posições C-1, C-2 e C-3. Os sinais de H-4  $\delta$  8,24 e H-5  $\delta$  9,00 estavam respectivamente, correlacionados com os sinais em 123,0 e 131,5 atribuídos aos carbonos C-3b e C-3a. Do mesmo modo, foram observadas as correlações dos sinais de H-11  $\delta$  9,11 com os sinais em  $\delta$  131,5 e 115,6, atribuídos respectivamente aos carbonos C-11a e C-1a. O sinal de H-8  $\delta$  8,57 estava correlacionado aos sinais em  $\delta$  134,7 e 182,8 atribuídos respectivamente aos carbonos C-7a e C-7 característico de uma carbonila (Figura 32, Tabela 7).



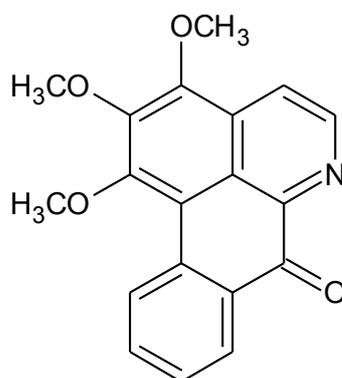
**Figura 32:** a - Mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (125 MHz, CDCl<sub>3</sub> e CD<sub>3</sub>OD) da amostra Fb; b – ampliação da região entre  $\delta$  7,4 e 9,2.

**Tabela 7:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da Fb em  $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ 

Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	HSQC ( $\delta$ )	HMBC ( $\delta$ )	
			$J_2$	$J_3$
1-OCH <sub>3</sub>	4,08 (3H, s)	60,7 (C-1)	-	-
2-OCH <sub>3</sub>	4,11 (3H, s)	61,6 (C-2)	-	-
3-OCH <sub>3</sub>	4,20 (3H, s)	61,8 (C-3)	-	-
H-4	8,24 (1H, d, $J = 5,40$ Hz)	119,1 (C-4)	C-5 (144,2)	C-3b (123,0) C-2 (148,5)
H-5	9,00 (1H, d, $J = 5,40$ Hz)	144,2 (C-5)	C-4 (119,1)	C-3a (131,5) C-6a (145,2)
H-8	8,57 (1H, d, $J = 7,85$ ; 1,43 Hz)	129,0 (C-8)	C-9 (128,0)	C-10 (134,2) C-7 (182,3) C-11 (127,9)
H-9	7,54 (1H, ddd, $J = 8,49$ ; 7,26 e 1,63 Hz)	128,0 (C-9)	-	C-7a (134,7) C-11a (131,5)
H-10	7,76 (1H, ddd, $J = 8,49$ ; 7,26 e 1,63 Hz)	134,2 (C-10)	-	C-8 (129,0) C-7a (134,7)
H-11	9,11 (1H, d, $J = 8,33$ Hz)	127,5 (C-11)	C-11a (131,5)	C-9 (128,0) C-7 (182,3) C-1a (115,6) C-7a (134,7)

$\delta$  (deslocamento químico) em ppm (partes por milhão)

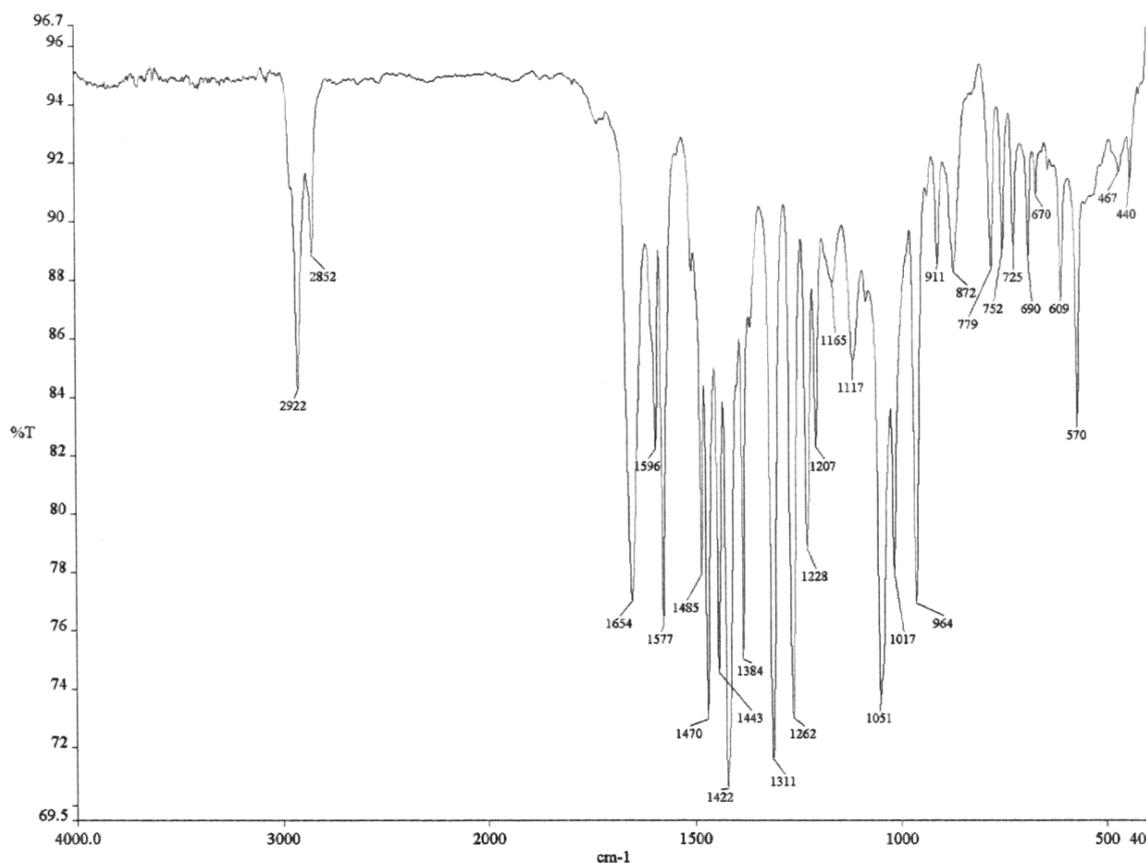
Com base nas análises dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC e comparação com os dados da literatura, Fb foi identificada como o alcalóide oxoaporfínico O-metilmoshatolina, Figura 33.

**Figura 33:** Estrutura da O-metilmoshatolina

## 5.2 IDENTIFICAÇÃO DA Fc

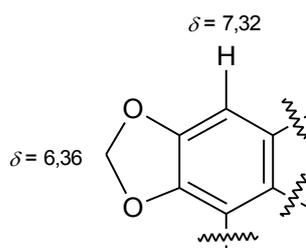
A amostra Fc (1,5 mg) caracterizou-se como um sólido amarelo em forma de agulhas e apresentou teste positivo para alcalóides frente ao reagente Dragendorff.

A análise do espectro de infravermelho de Fc apresentou uma forte absorção em  $1654\text{ cm}^{-1}$  característico de um grupo carbonila (C=O) conjugado, e a presença absorções em  $1596$ ,  $1577$ ,  $1443$  e  $779\text{ cm}^{-1}$  evidenciam a natureza aromática do composto. Verificou-se no espectro absorções em  $2922$  e  $2852\text{ cm}^{-1}$  típica de deformação axial de ligação C-H. Na região de  $1262$  a  $1207\text{ cm}^{-1}$  foi verificado absorções típicas de estiramento assimétrico de C-O-C combinadas com bandas na região de  $1051$  a  $1017\text{ cm}^{-1}$  de estiramento simétrico de C-O-C (Figura 34).



**Figura 34:** Espectro no IV da Fc em KBr

A análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  a 400 MHz em  $\text{CDCl}_3$  evidenciou a presença de oito sinais em  $\delta$  9,20 a 7,32 correspondentes a nove hidrogênios sendo sete aromáticos. A presença do grupo metilenodioxo verificada através do sinal em  $\delta$  6,36 (s, 2H) juntamente com um sinpleto referente a um hidrogênio em  $\delta$  7,32 sugeriu a presença de um anel aromático pentassubstituído conforme a figura 35.



**Figura 35:** Estrutura de um metilenodioxo ligado ao anel benzeno

Na região de  $\delta$  6,36 a 8,88, foram observados sinais para sete hidrogênios aromáticos, sendo dois em  $\delta$  7,75 (d, 1H) e 8,88 (d, 1H), com constantes de acoplamento ( $J$ ) iguais a 5,19 Hz, características de hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  do anel piridínico em H-4 e H-5. O registro de sinais referentes a quatro hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,73 (ddd,  $J = 8,00$ ; 7,86 e 1,33 Hz, 1-H),  $\delta$  7,56 (ddd,  $J = 8,00$ ; 7,86 e 1,33 Hz, 1-H),  $\delta$  8,61 (d,  $J = 8,00$  Hz, 1-H) e  $\delta$  8,57 (dd,  $J = 7,86$ ; 1,33 Hz, 1-H) configuraram a presença do anel benzênico dissustituído do núcleo aporfínico (WIJERATNE *et al.*, 1996; COSTA, 2004).

O espectro de RMN  $^1\text{H}$  da substância da Fc apresentado na figura 36 e comparado aos dados de Wijeratne *et al.*, (1996) descritos na tabela 8 sugeriram tratar-se do alcalóide liriodenina.

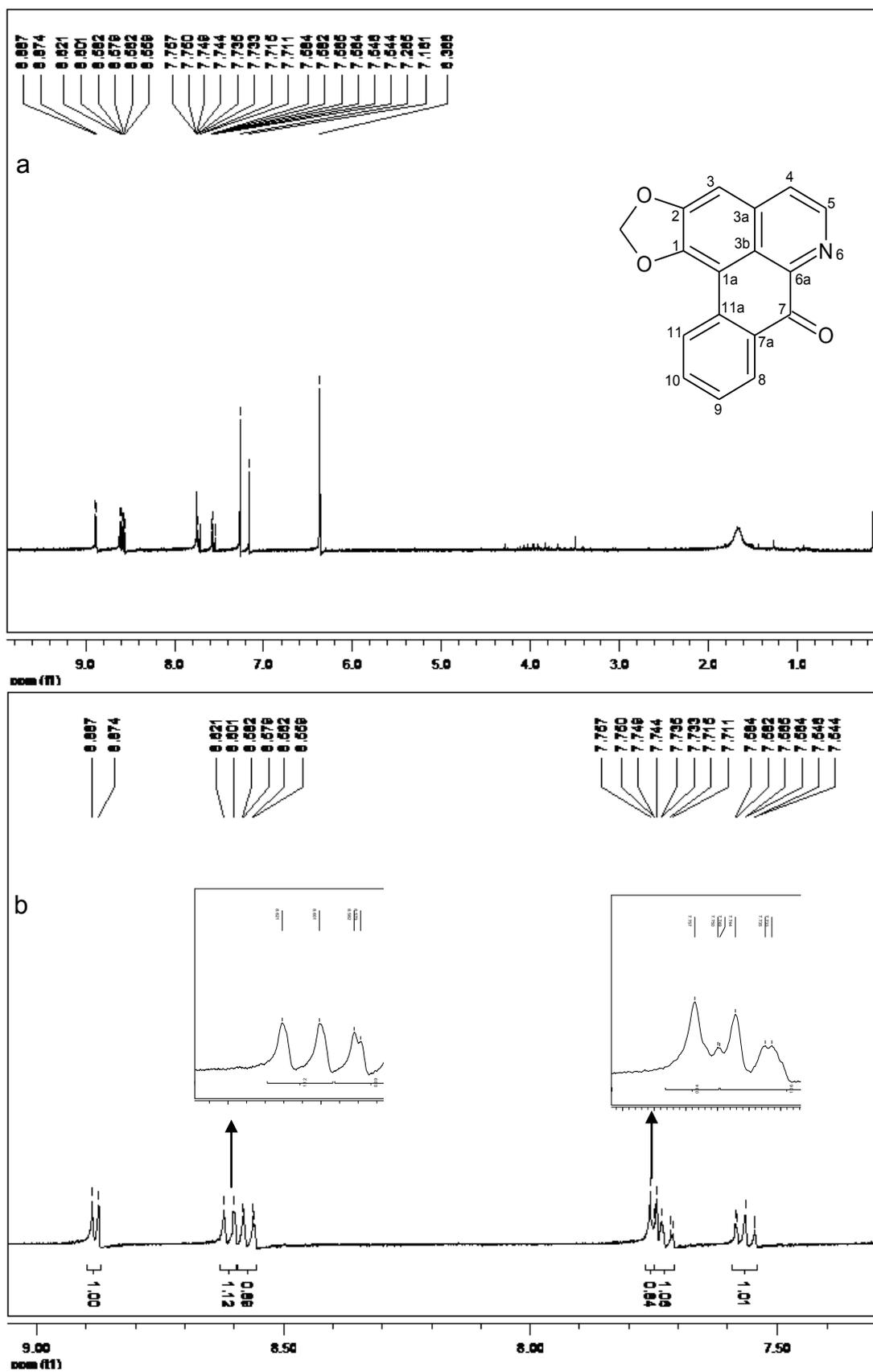
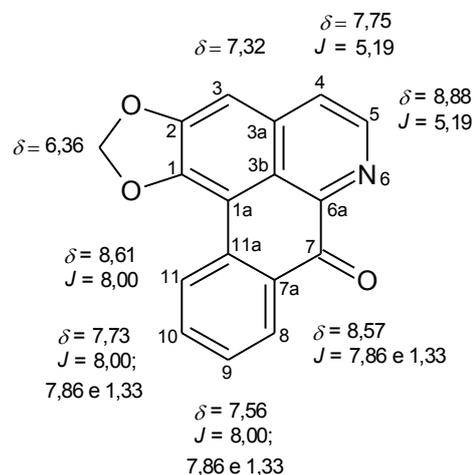


Figura 36: a-Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Fc, b-Ampliação na região entre  $\delta$  9,00 e 7,25

**Tabela 8:** Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) para Fc

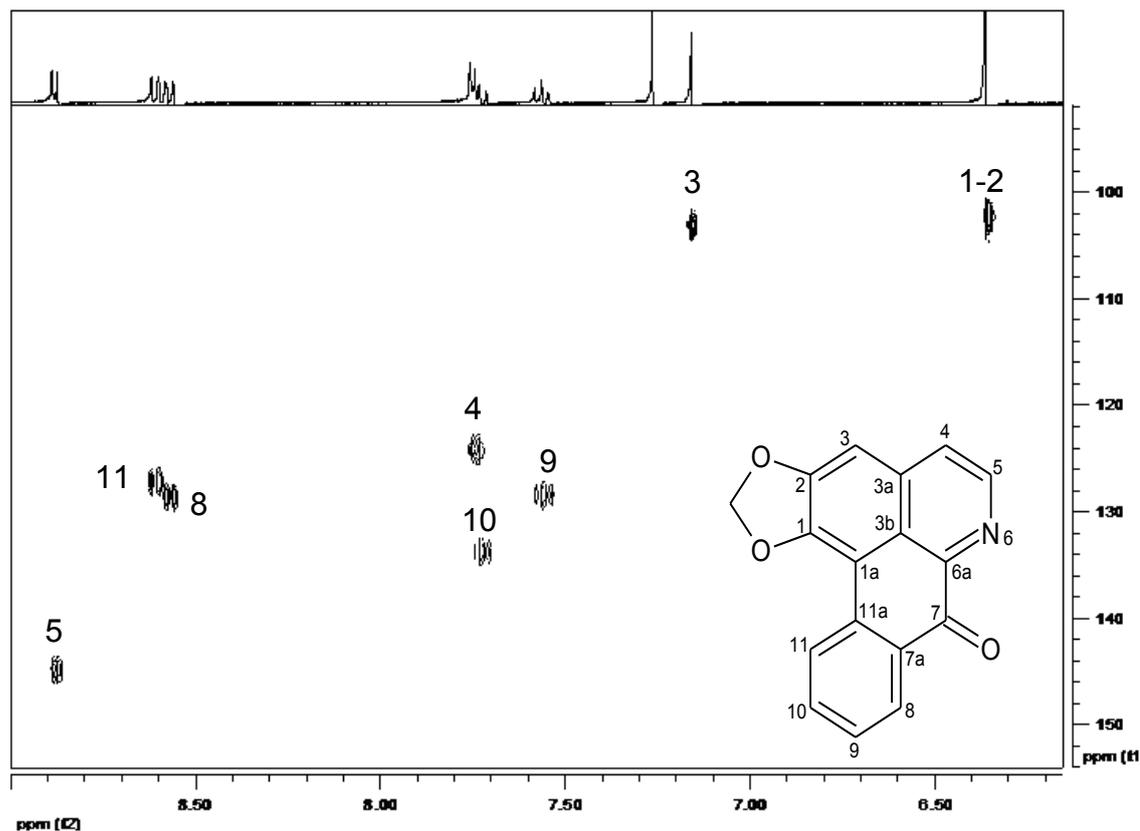
Posição	$\delta$ (Integração, Mult., J) *liriodenina	$\delta$ (Integração, Mult., J) Fc
1-2 OCH <sub>2</sub> O	6,36 (2H, s)	
H-3	7,16 (1H, s)	
H-4	7,74 (1H, d $J = 5,19$ Hz)	
H-5	8,87 (1H, d, $J = 5,19$ Hz)	
H-8	8,57 (1H, dd, $J = 7,93, 1,22$ Hz)	
H-9	7,57 (1H, dt, $J = 7,94$ e $1,22$ Hz)	
H-10	7,72 (1H, dt, $J = 7,94, 1,22$ Hz)	
H-11	8,60 (1H, d, $J = 7,94$ Hz)	



$\delta$  (deslocamento químico) em ppm (partes por milhão)

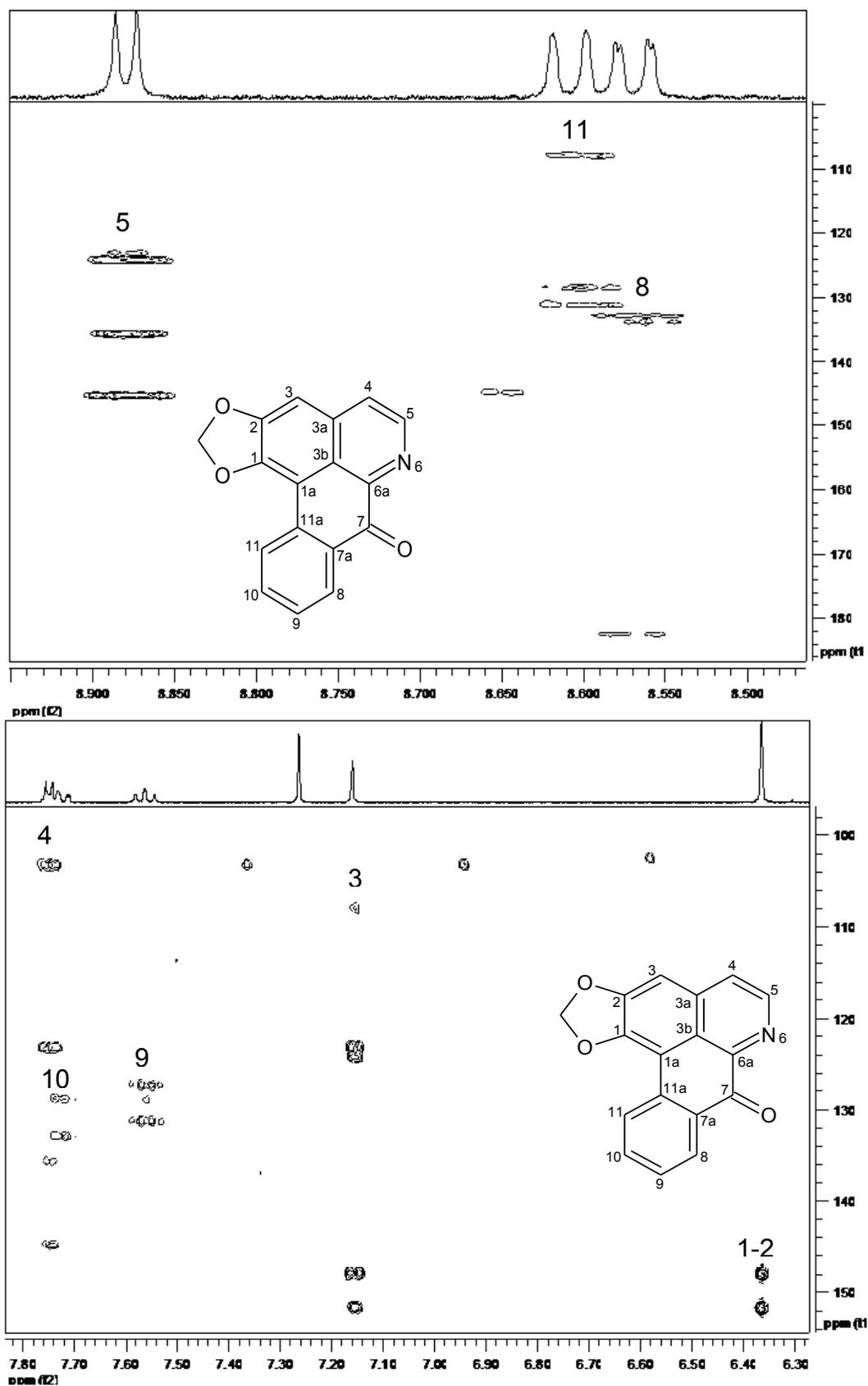
\* Fonte: Wijeratne *et al* (1996) (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )

O mapa de correlação heteronuclear HSQC evidenciou sinais a presença de linhas espectrais correspondentes a carbonos de sete grupos metínicos  $\text{sp}^2$ , que foram correlacionados aos respectivos sinais de hidrogênios, no mapa de correlação heteronuclear  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HSQC (figura 37), definindo os deslocamentos químicos dos carbonos hidrogenados do esqueleto oxoaporfínico. Assim, através das correlações dos sinais em  $\delta$  124,2/7,75 e 145,0/8,88, foram atribuídos os carbonos do anel piridínico C-4 e C-5 respectivamente. Do mesmo modo os sinais em  $\delta$  102,3/6,36 foram atribuídos ao metilenodioxí e os sinais em  $\delta$  103,3/7,16, 128,4/8,57, 128,7/7,56, 134,0/7,73 e 127,2/8,61, foram atribuídos aos carbonos C-3, C-8, C-9, C-10 e C-11 (Tabela 9).



**Figura 37:** Mapa de correlação HSQC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Fc

Os deslocamentos químicos dos carbonos foram determinados por intermédio do mapa de correlação heteronuclear de  $^1\text{H}, ^{13}\text{C}$ -HMBC (figura 38). Foi observado que o sinal em  $\delta$  6,36 pertencente ao grupo metilenodioxi estava correlacionado com o sinal em  $\delta$  148,0 e 152,0, confirmando assim a posição do grupo metilenodióxi em C-1 e C-2. O sinal  $\delta$  7,16 (H-3) evidenciou a correlação com o sinal em  $\delta$  124,2, atribuído ao carbono hidrogenado C-4, e com o sinal em  $\delta$  123,3, o qual foi atribuído ao carbono C-3b, ratificado pela correlação adicional com o sinal em  $\delta$  7,75 relativo ao H-4. Do mesmo modo, foram observadas as correlações dos sinais em  $\delta$  8,88 relativo ao H-5 com os sinais em  $\delta$  135,8 e 145,0, atribuídos respectivamente a C-3a e C-6a. Verificou-se ainda as correlações dos sinais em  $\delta$  7,56 (H-9), 7,73 (H-10) e 8,61 (H-11), com os sinais em  $\delta$  133,0, 131,3 e 108,0, pertencentes respectivamente aos carbonos C-11a, C-7a e C-1a (Tabela 9).



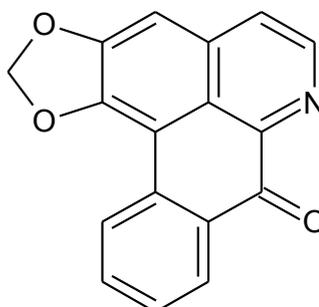
**Figura 38:** a - Mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Fc entre  $\delta$  8,20 a 9,00. b – Ampliação do espectro de HMBC entre  $\delta$  7,80 a 6,30

**Tabela 9:** Dados de RMN  $^1\text{H}$ , HSQC e HMBC da substância Fc em  $\text{CDCl}_3$ 

Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	HSQC ( $\delta$ )	HMBC ( $\delta$ )	
			$J_2$	$J_3$
1-2 OCH <sub>2</sub> O	6,36 (2H, s)	102,3 (OCH <sub>2</sub> O)	-	C-1 (148,0) C-2 (152,0) C-1 (148,0)
H-3	7,32 (1H, s)	103,3 (C-3)	C-2 (152,0)	C-1a (108,0) C-3b (123,3) C-4 (124,2) C-3 (103,3)
H-4	7,75 (1H, d, $J = 5,19$ Hz)	124,2 (C-4)	-	C-3b (123,3) C-6a (145,0)
H-5	8,88 (1H, d, $J = 5,19$ Hz)	145,0 (C-5)	C-4 (124,2)	C-3a (135,8) C-6a (145,0)
H-8	8,57 (1H, dd, $J = 7,86;$ 1,33 Hz)	128,7 (C-8)	-	C-7 (182,0) C-10 (134,0)
H-9	7,56 (1H, ddd, $J = 8,00;$ 7,86 e 1,33 Hz)	128,4 (C-9)	-	C-11 (127,2) C-11a (133,0)
H-10	7,73 (1H, ddd, $J = 8,00;$ 7,86 e 1,33 Hz)	134,0 (C-10)	-	C-7a (131,3) C-8 (128,7)
H-11	8,61 (1H, d, $J = 8,00$ Hz)	127,2 (C-11)	C-11a (133,0)	C-1a (108,0) C-7a (131,3) C-9 (128,4)

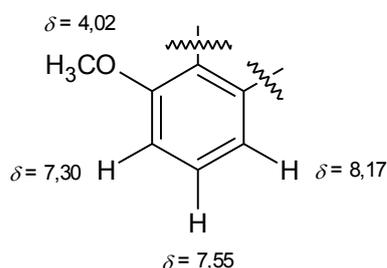
$\delta$  (deslocamento químico) em ppm (partes por milhão).

Os dados apresentados dos espectros RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  HMBC e comparação com os dados da literatura confirmaram a identificação Fc como alcalóide oxoaporfínico liriodenina, figura 39.

**Figura 39:** Estrutura da liriodenina

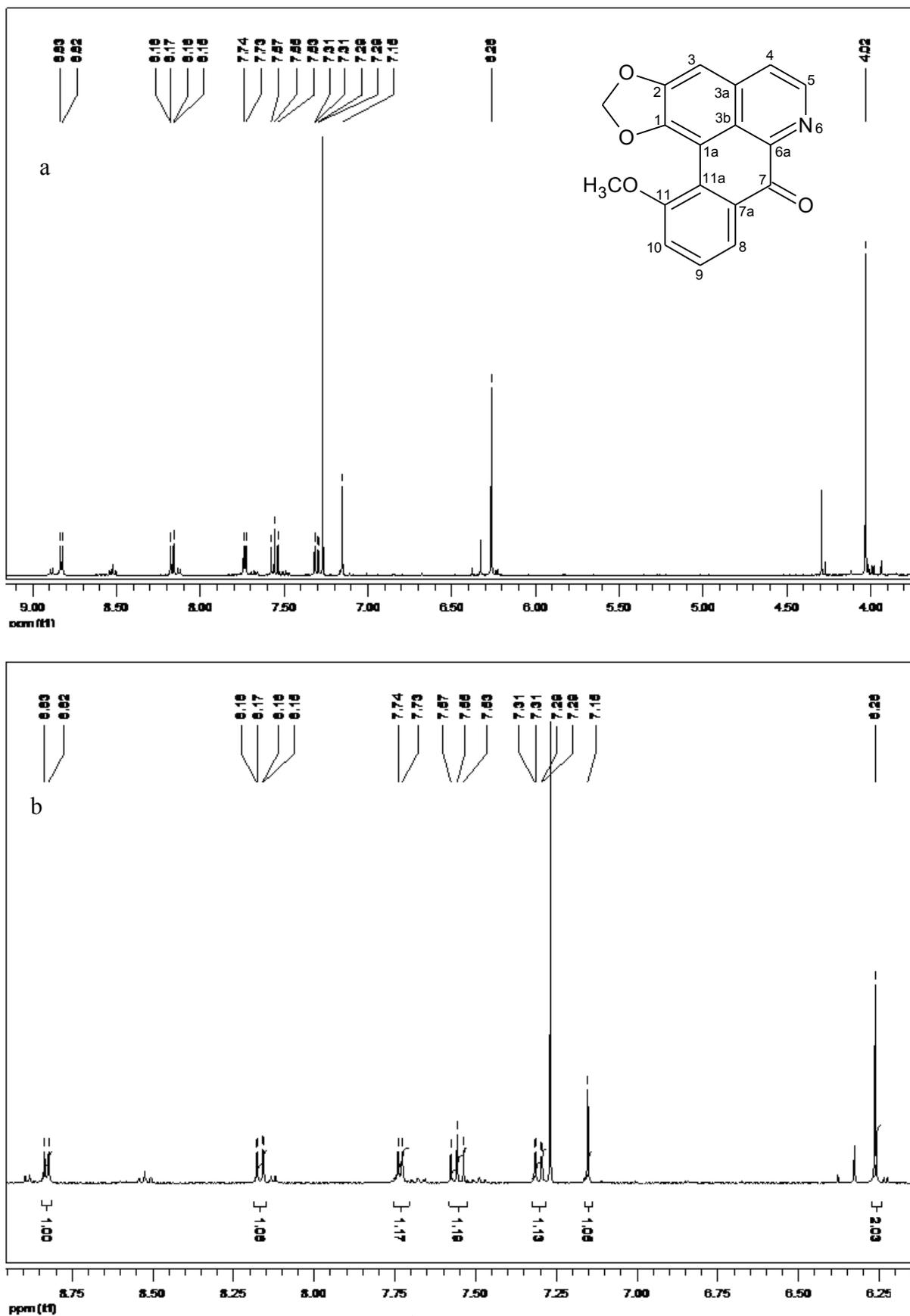
### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DA Fd

A análise do espectro de RMN  $^1\text{H}$  da Fd evidenciou a presença de oito sinais entre  $\delta$  8,83 a 4,02 com integração para onze hidrogênios. A presença de um grupo metilenodioxí foi verificada através do sinal  $\delta$  6,26 com integração para dois hidrogênios e um hidrogênio aromático em  $\delta$  7,15 (s, 1-H) evidenciou a presença de anel pentassubstituído, semelhante ao apresentado pela liriodenina (figura 38). Na região de  $\delta$  8,83 a 7,15 observaram-se sinais com integração para seis hidrogênios, sendo dois em  $\delta$  7,73 (d, 1-H) e 8,83 (d, 1-H), com constantes de acoplamento ( $J$ ) igual a 5,10 Hz, característico de hidrogênios  $\alpha$  e  $\beta$  do anel piridínico em H-4 e H-5, respectivamente. Os sinais correspondentes aos três hidrogênios aromáticos em  $\delta$  7,30 (1-H, dd,  $J = 8,2$  e  $1,1$  Hz),  $\delta$  7,55 (1-H, dd,  $J = 8,2$  e  $7,8$  Hz) e  $\delta$  8,17 (1-H, dd,  $J = 7,8$  e  $1,1$  Hz) e ao sinal em  $\delta$  4,02 foram atribuídos ao grupo metoxila com integração para três hidrogênios, caracterizou a presença do benzeno trissubstituído (Figura 40). Estes dados sugeriram a presença de um derivado da liriodenina substituído com um grupo metoxila em C-11.



**Figura 40:** Estrutura do anel benzeno dissustituído

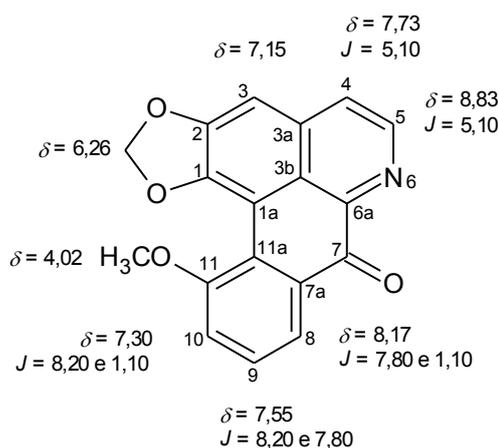
Os dados do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (figura 41) foram semelhantes com deslocamentos químicos constantes na literatura para o alcalóide oxoaporfínico oxoputerina (CORTES *et al.*, 1985) como descritos na tabela 10.



**Figura 41:** a) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Fd, b) Ampliação da região  $\delta$  6,00 a 9,00

**Tabela 10:** Dados de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Fd comparado com os dados da literatura da oxoputerina

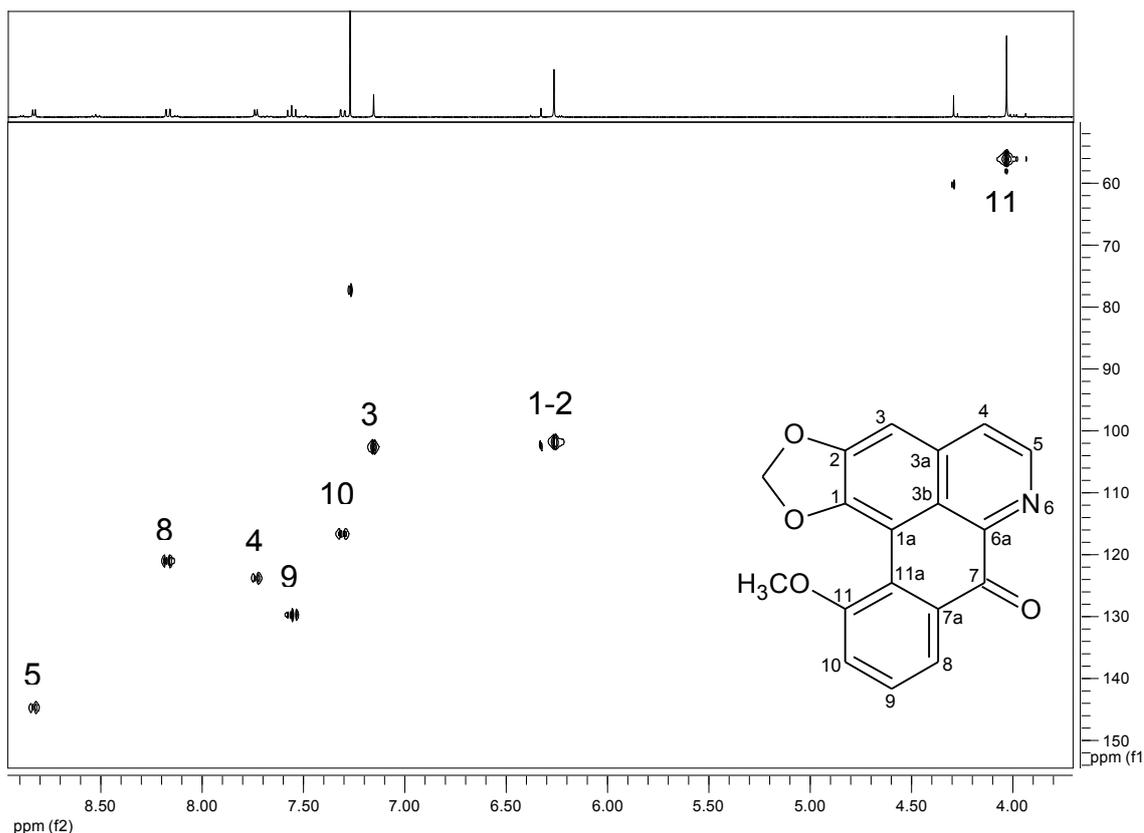
Posição	$\delta$ (Integração, Mult., J) *oxoputerina	$\delta$ (Integração, Mult., J) Fd
1-2 OCH <sub>2</sub> O	6,62 (2H, s)	
H-3	7,56 (1H, s)	
H-4	8,45 (1H, d $J = 6,00$ Hz)	
H-5	8,80 (1H, d, $J = 6,00$ Hz)	
H-8	8,20 (1H, dd, $J = 9,00$ e $2,00$ Hz)	
H-9	7,80 (1H, t, $J = 9,00$ Hz)	
H-10	7,69 (1H, dd, $J = 9,00$ e $2,00$ Hz)	
H-11 OCH <sub>3</sub>	4,17 (3H, s)	



$\delta$  (deslocamentos químicos) em ppm (partes por milhão)

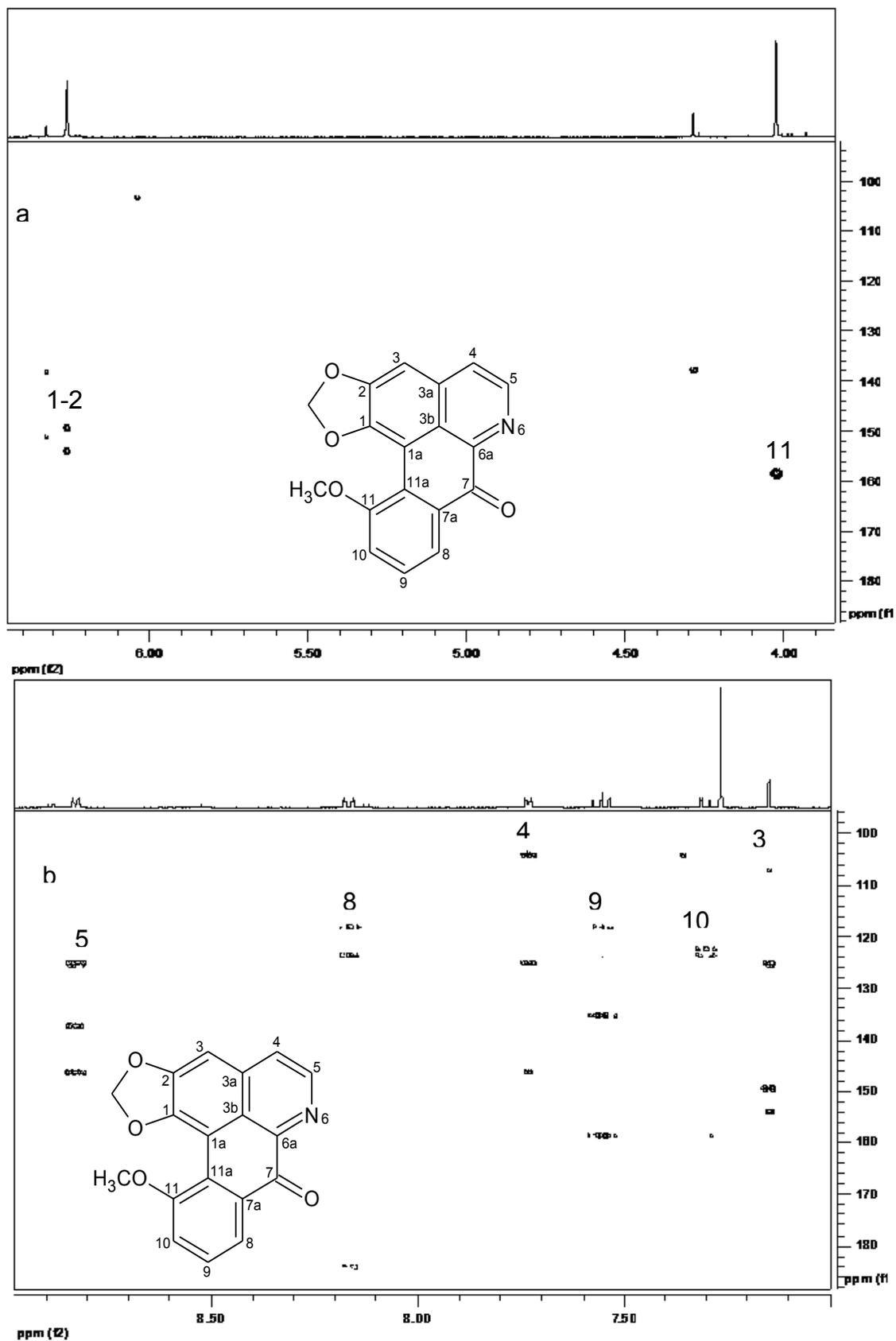
\*Fonte: CORTES *et al.*, 1985 (60 MHz,  $\text{CF}_3\text{COOD}$ )

O mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 42) evidenciou sinal em  $\delta$  56,2 o qual foi atribuído ao carbono C-11 característico do grupo metoxila. Os sinais em  $\delta$  123,7 e 144,6 correlacionados aos sinais em  $\delta$  7,73 e 8,83 foram atribuídos aos carbonos C-4 e C-5 típico do anel piridínico. As correlações entre os sinais em  $\delta$  116,5/7,30, 120,9/8,17 e 129,7/7,55 permitiram as atribuições dos deslocamentos químicos dos carbonos C-10, C-8 e C-9, respectivamente (Tabela 11).



**Figura 42:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da Fd

O Mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (Figura 43) evidenciou sinal em  $\delta$  7,30 (H-10) correlacionando com o sinal em  $\delta$  156,9 confirmando a posição do grupo metoxila em C-11. Os sinais de H-4  $\delta$  7,73 e H-5  $\delta$  8,83 estavam respectivamente, correlacionados com os sinais em  $\delta$  123,5, 135,9 e 144,8 atribuídos aos carbonos C-3a, C-3b e C-6a. Do mesmo modo, foram observadas as correlações dos sinais de H-9  $\delta$  7,55 com os sinais em  $\delta$  133,7 e 156,9, atribuídos respectivamente aos carbonos C-7a e C-11 (Tabela 11). O sinal de H-8 em  $\delta$  8,17 foi correlacionado ao sinal em  $\delta$  182,4 atribuído à carbonila do esqueleto oxoaporfínico.



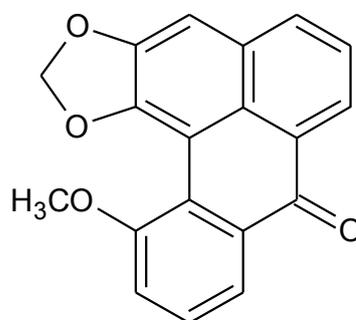
**Figura 43:** a - Mapa de correlação heteronuclear a longa distância HMBC (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da Fd entre  $\delta$  3,90 a 6,00. b – Ampliação do espectro de HMBC entre  $\delta$  7,00 a 9,00

**Tabela 11:** Dados das correlações de HSQC e HMBC da Fd em  $\text{CDCl}_3$ 

Posição	RMN $^1\text{H}$ ( $\delta$ )	HSQC ( $\delta$ )	HMBC ( $\delta$ )	
			$J^2$	$J^3$
1-2 OCH <sub>2</sub> O	6,26 (2H, s)	101,8 (OCH <sub>2</sub> O)	-	C-1 (147,8) C-2 (152,5)
H-3	7,15 (1H, s)	102,5 (C-3)	C-2 (152,5)	C-1 (147,8) C-4 (123,7)
H-4	7,73 (1H, d, $J = 5,1\text{Hz}$ )	123,7 (C-4)	C-5 (144,6)	C-3b (123,5) C-3 (102,5)
H-5	8,83 (1H, d, $J = 5,1\text{Hz}$ )	144,6 (C-5)	C-4 (123,7)	C-3a (135,9) C-6a (144,8)
H-8	8,17 (1H, dd, $J = 7,8$ e 1,1Hz)	120,9 (C-8)	-	C-7 (182,4) C-10 (116,5) C-11a (122,0)
H-9	7,55 (1H, dd, $J = 8,2$ e 7,8Hz)	129,7 (C-9)	C-10 (116,5)	C-7a (133,7) C-11 (156,9)
H-10	7,30 (1H, dd, $J = 8,2$ e 1,1Hz)	116,5 (C-10)	C-11 (156,9)	C-8 (120,9) C-11a (122,0)
H-11 OCH <sub>3</sub>	4,02 (3H, s)	56,2 (OCH <sub>3</sub> )	-	C-11 (156,9)

$\delta$  (deslocamentos químico) em ppm (partes por milhão)

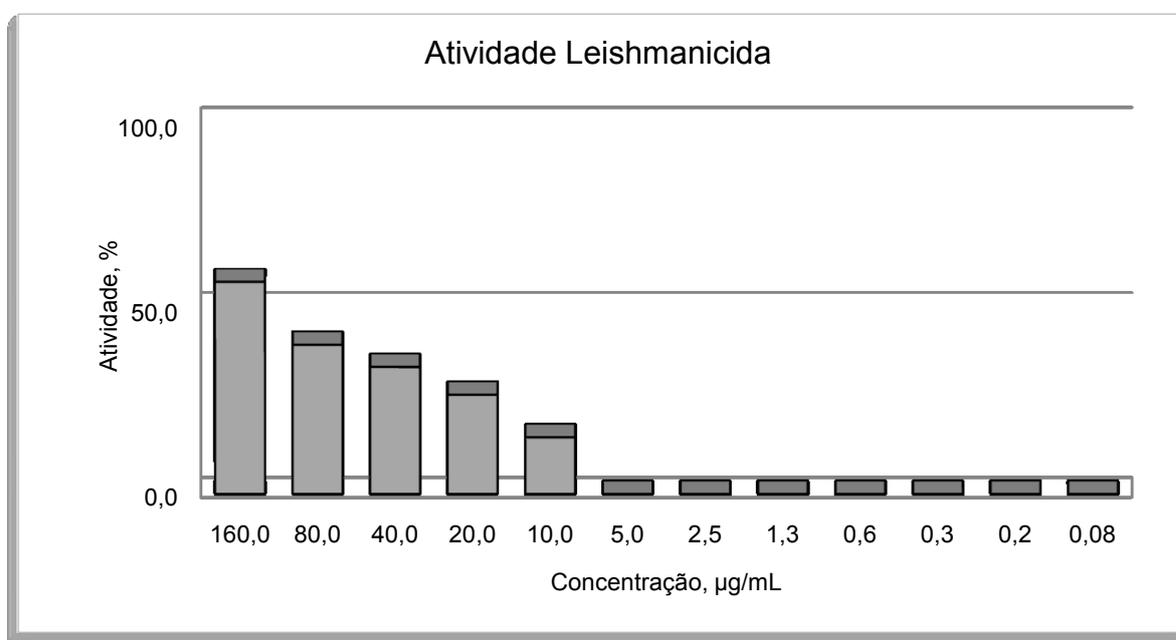
Com base na análise dos espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC e a comparação com os dados da literatura, Fd foi identificada como derivado do alcalóide oxoaporfínico liriodenina, oxoputerina, já isolado de *Guatteria calva* (RODRÍGUEZ, 1999) (Figura 44).

**Figura 44:** Estrutura da oxoputerina

### 5.3 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

O ensaio da atividade leishmanicida foi avaliado para os óleos essenciais dos frutos da espécie *Guatteria citriodora* Ducke contra *Leishmania amazonensis* e *Leishmania guyanensis*. A amostra submetida à análise, na concentração de 320  $\mu\text{g/mL}$ , apresentou-se ativo a apenas contra *L. guyanensis* permitindo a determinação da concentração inibitória mínima CIM<sub>50</sub>.

Para a determinação da CI<sub>50</sub> a amostra foi submetida à diluição nas concentrações de 160 a 0,08  $\mu\text{g/mL}$ . Observou-se que a amostra apresentou pronunciada atividade leishmanicida na concentração de 160  $\mu\text{g/mL}$ , aproximadamente 57,3%. Portanto, a CIM contra *L. guyanensis* foi igual a  $12,1 \pm 1,5$   $\mu\text{g/mL}$  (Figura 45).



**Figura 45:** Gráfico da diluição nas concentrações de 160 a 0,08  $\mu\text{g/mL}$  para *L. guyanensis*

#### 5.4 TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* Leach

Os ensaios de toxicidade foram realizados com os microcrustáceos *Artemia salina* nas concentrações 1000, 500, 100 e 10 µg/mL. O Tween-80 foi utilizado para solubilizar o óleo essencial das folhas de *Guatteria citriodora* Ducke. Em cada placa o solvente serviu de branco.

Diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, parasiticida, tripanossomicida, entre outras (SOLIS *et al.*, 1993; SIQUEIRA *et al.*, 1998; PAYROL *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2001; KANEGUSUKU *et al.*, 2002; MOREIRA *et al.*, 2003). Parra *et al* (2001) utilizou o teste com *Artemia salina* como um teste preliminar para avaliar a toxicidade do composto.

Conforme a Tabela 12, o óleo essencial apresentou atividade tóxica no bioensaio em microplaca para *Artemia salina*, uma vez que excedeu a letalidade em 30% na concentração de 500 µg/mL.

**Tabela 12:** Atividade tóxica do óleo essencial de *Guatteria citriodora* contra larvas de *A. salina*

Concentração (µg/mL)	Larvas de <i>Artemia salina</i> mortas (%)
1000	100
500	94,5
100	0
10	0

Estudos de toxicidade auxiliam na triagem de uma grande variedade de compostos com atividade biológica para definir seu potencial de aplicação terapêutica mensurando a toxicidade apresentada dos possíveis futuros fármacos (CARBALLO *et al.*, 2002).

## 6. CONCLUSÃO

O estudo fitoquímico de *Guatteria citriodora* resultou no isolamento de três alcalóides oxoaporfínicos identificados como O-metilmoshatolina, liriodenina e oxoputerina, com base nos espectros de IV, RMN  $^1\text{H}$ ,  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HSQC e  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$ -HMBC.

A análise do óleo essencial obtido evidenciou a presença majoritária de monoterpenos, sendo os principais constituintes, o citronelal (25,5%) e o citronelol (22,4%).

O teste de atividade leishmanicida demonstrou atividade e sua concentração inibitória mínima contra *L. guyanensis* foi igual a  $12,1 \pm 1,5 \mu\text{g/mL}$ .

Os ensaios com a *Artemia salina* evidenciaram que o óleo essencial apresentou atividade citotóxica, uma vez que excedeu a letalidade em 30% na concentração de  $500 \mu\text{g/mL}$ .

Novos estudos devem ser realizados com os extratos brutos hexano e metanol e substâncias isoladas da espécie *Guatteria citriodora* Ducke para suas aplicabilidades, por apresentar potencial biotecnológico em seus constituintes.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Quadrupole Mass Spectrometry. 3<sup>rd</sup> edition New York: Allured Publishing, p. 446, 2001.

AKENDENGUE, B.; ROBLLOT, F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Klaivanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. *Phytochemistry*, v. 59, p. 885-888, 2002.

ALVES T. M. D.; SILVA A. F.; BRANDÃO M.; GRANDI T. S. M.; SMÂNIA E. F. A.; SMÂNIA A.; ZANI C. L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 95, p. 367-373, 2000.

ANGERHOFER, C. K.; GUINAUDEAU, H.; WONGPANICH, V.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, v. 62, p. 59-66, 1999.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; SIMON, L. C. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry*, v. 55, p. 589-595, 2000.

BAYMA, J.C.; OLIVEIRA, A.B.; CAVE, A.; DADOUN, H.. Aporphinoid Alkaloids from *Guatteria schomburgkiana* Leaves. *Planta Medica*, v.54, n.1, p.84, 1988.

BARROSO, G. M. Sistemática de Angiospermas do Brasil. Volume I, LTC, São Paulo – SP, 1978.

BRAGA, R. Plantas do nordeste especialmente do Ceará. 4<sup>o</sup> ed. Editora Universitária UFRN. Natal-Rio Grande do Norte, p. 540, 1976.

BUCHBAUER, G. The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. *Perfumes & Flavorist*, v. 25, p. 64-67, 2000.

CALLAN, T.; TUTIN, F. Chemical Examination of the leaves of *Anona muricata*. *Pharmaceutical Journal*. v. 87, p. 743-745, 1912.

CANTO-CAVALHEIRO, M. M. Estudo de compostos sintéticos com atividade tripanomicida. Avaliação da relação estrutura x atividade. Tese de doutorado em biologia parasitária. Ministério da saúde, fundação Oswaldo Cruz/Instituto Oswaldo Cruz, p. 113, 1999.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INCA, S.L.; PÉREZ, P.; GARCIA-GRÁVALHOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC biotechnology*, v. 2, n. 1, p. 17, 2002.

CARLTON, R. R.; WATERMAN, P. G.; GRAY, A. I.; DEANS, S. G. The antifungal activity of the leaf gland volatile oil of sweet (myrtaceae). *Chemoecology*, v. 3, p. 55-59, 1992.

CARVALHO, G. J. A.; CARVALHO, M. E. Diterpenos, tripterpenos e esteróides das flores da *Wedelia paludosa*. *Química Nova*, v. 24, n. 1, p. 24-26, 2001.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae (Soursop Family). *In:Smith, N. et al. (eds.). Flowering Plants of the Neotropics*. Botanical Garden, New York, p. 18-20, 2004.

CONTE, L. A. Shaman pharmaceuticals's approach to drug development. *In. Medicinal resources of the Tropical Forest – biodiversity and its importance to human health*. (BALICK, M. J.; ELISABETSKY, E.; LAIRD, A. S., EDS.). Columbia University Press, New York, p. 94-100, 1996.

CORRÊA, J. E.; RÍOS, C. H.; CASTILLO, A. D. R.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A.; HELLER, M. V.; GERWICK, W. H.; RÍOS, L. C. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with Antileishmanial Activity. *Planta Medica*, v. 72, p. 270-272, 2006.

CORTES, D.; RAMAHATRA, A.; CAVÉ, A.; BAYMA, J. C.; DADOUN, H. Alcaloides des Annonacees, LVIII. Alcaloides des Ecorces de *Guatteria schomburgkiana*. *Journal of Natural Products*, v. 48, n. 2, p. 254-259, 1985.

COSTA, E. V. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). Dissertação de Mestrado em Química de Produtos Naturais (UFAM), 2004.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Ed. UNESP, São Paulo, p. 605, 2002.

DORMAN, H. J. D. Phytochemistry and bioactive properties of plant volatile oils: antibacterial, antifungal and antioxidant activities. PhD Thesis, University of Strathclyde, Glasgow, 1999.

ENRIQUEZ, G. *Dos desafios da inovação tecnológica às janelas de oportunidades para os recursos naturais da Amazônia: o papel da incubadora da UFPA*. In: SEMINÁRIO DE PARQUES TECNOLÓGICOS E INCUBADORAS DE EMPRESAS, Belém. Anais, p. 15, 2001.

FARNSWORTH, N. R.; BLOMSTER, R. N.; QUIMBY, M. W.; SCHERMERHORN, J. W. *The Lynn Index, Monograph*, v. 8, p. 60, 1974.

FINNEY, D.J. *Probit Analysis*, Cambridge University Press, London. 2<sup>nd</sup> ed., p. 318, 1952.

FOURNET, A.; ANGELO, B. A.; MUÑOZ, 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.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUNOZ, V. Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Bolivian Medicinal Plants. *Journal Ethnopharmacology*, v.41, n.1/2, p. 19-37, 1994

FRIES, R. E. Revision der Arten einiger Anonaceen-Gattungen II. *Acta Horti Berg*, v. 10, n. 2, p. 197-341, 1931.

GALEFFI, C.; MARINI-BETTOLO, G. B.; VECCHI, D. *Gazzetta Chimica Italiana*, v. 105, p. 1207-1213, 1975.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R.; Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, n. 1, p. 71-80, 2003.

GRENAND, P. MORETTI, C. JACQUEMIN, H. *Pharmacopées Traditionnelles em Guiana*. Editions de l'ORSTOM: Paris, 1987.

GRIEBEL, C. Kani Codiment. *Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und Forschung*, v. 87, p. 69-77, 1944.

GUINAUDEAU, H. Aporphinoid alkaloids, V. *Journal of Natural Product*, v. 57, p. 1033-1135, 1994.

GUYOT, M. A. M. *Perspectivas da fitoterapia*. *Acta Farmaceutica Bonaerense*, v. 9, n. 2, p. 131-138, 1990.

HAMBURGUER, M.; HOSTETTMANN, K.; Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine *Phytochemistry*, v. 30, p. 3864-3874, 1991.

HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and Experimental Dermatology*, v. 25, p. 363-370, 2000.

HEYWOOD, V. H. Flowering Plants of the World. University Press, Oxford, p 30-31, 1978.

JOLY, A. B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. Ed. Nacional, São Paulo, v. 4, p. 286-289, 1993.

KLEIN, E. Ylang-ylang and Cananga. Dragoco Report (German Edition) 22, 167-177, 1975.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. Nature Reviews Drug Discovery, v. 4, p. 206-220, 2005.

KUO, R. Y.; CHANG, F. R.; CHEN, C. Y.; TENG, C. M.; YEN, H. F.; WU, Y. C. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. Phytochemistry, v. 57, p.421-425, 2001.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae. Phytochemistry, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LI, T. M.; LI, W. K.; YU, J. G. Flavonoids from *Artabotrys hexapetalus*. Phytochemistry, v. 45 (4), p. 831-833, 1997

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.

LIMA, M. A.; FECHINE, I. M.; SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria juruensis* Biochemical Systematic and Ecology, v. 31, p. 423-425, 2003.

LIMA, M. A.; MERLIC, C. A.; SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; DOROH, B. C. Alkaloids and volatile constituents from *Guatteria poeppigiana* Biochemical Systematic and Ecology, v. 32, p. 347–349, 2004.

MCLAUGHLIN, J. L.; ROGERS, L. L.; ANDERSON, J. E. The use of biological assays to evaluate botanicals. Drug Informat Journal, v. 32, p. 513-524, 1998.

MACKIE, A.; MISRA, A. L. Chemical Investigation of the leaves of *Anona senegalensis*. I. Constituents of the leaf wax. Journal Science of Food Agriculture, v. 7, p. 203-209, 1956.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). Phytochemistry, v. 54, p. 709-716, 2000.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO, A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. Journal of Natural Products, v. 7, p. 890–895, 1994.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A.; CARREIRA, L. M. M.; OLIVIRA, J.; ARAÚJO, J. S. Essential oils of the Amazon *Guatteria* and *Guatteriopsis* species. Flavour and Fragrance Journal, v. 20, p. 478-480, 2005.

MARILIS, D. M.; OBDULIO, G. M. Desenvolvimento de fitoterápicos. Ed.: Tecmedd, p. 11-13, 2004

MATTOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 2ª ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, p. 141, 1997.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E. R.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp, a convenient general bioassay for active-plant constituents. Planta Medica, v. 45, p. 31-34, 1982.

MOBOT. MISSOURI BOTANICAL GARDEN-W3-TROPICOS[Arquivo capturado em 4 de janeiro de 2008]. Disponível na Internet via WWW: <URL: [http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search\\_vast?name=Guatteria+citriodora](http://mobot.mobot.org/cgi-bin/search_vast?name=Guatteria+citriodora)

MOMEN, H. Parasite characterization by zimodeme analysis. In: Genes and antigens of parasites. A laboratory manual, 2nd edition, C.M. Morel editor. UNDP/World BANK/WHO-Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases-Finep, CNPq, FIOCRUZ, cap. 2.2, p. 111-120, 1984.

MONTENEGRO, H.; GUTIERREZ M.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRIA, E.; CAPSON, T. L.; CUBILLA RIOS, L. Aporphine alkaloids from *Guatteria ssp.* with leishmanicidal activity. 2003. *Planta Medica*, v. 69, p. 677-679, 2003.

MOORE, S. J.; LENGLET, A.; HILL, N. Field evaluation of three plant-based insect repellents against malaria vectors in vaca Diez province the Bolivian Amazon. *Journal American Mosquito Control Association*, v. 18, p. 107-110, 2002

MOREIRA, F. P. M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A. B. P.; CARO, M. S. B.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – bioatividade sobre artemia salina. *Quimica Nova*, v. 26. n. 3, p. 309-311, 2003.

MUNIER, R., *apud* MERCK, 1971. Dyeing Reagents for Thin Layer and Paper Chromatography. E. Merck, Darmstadt, Germany, p. 118, 1953.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach Part I. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Chacobo Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, p. 127–137, 2000.

MUNSHI, C. P.; VAIDYA, P. M.; BURANPURI, J. J.; GULATI, O. D. Kalaazar in Gujarat. *Journal of the Indian Medical Association*, v. 59, p. 287-293, 1972.

NICK, A.; RALI, T.; STICHER, O. Biological screening of traditional medicinal plants from Papua New Guinea. *Journal Ethnopharmacol*, v. 49, p. 147-156, 1995.

NKUYA, M. H. H. ; WAIBEL, R. ; ACHENBACH, H. Three flavonoids from the stem bark of the antimalarial *Uvaria dependens*. *Phytochemistry*, v. 34 (3), p.885-888, 1993.

OLIVEIRA-FILHO, E. C.; PAUMGARTTEN, F. J. R. Toxicity of *Euphorbia milli* latex and niclosamide to snails and nontarget aquatic species. *Ecotoxicology Environmental Safe*, v. 46, p. 342-350, 2000.

OLIVEIRA DE, V. M., PINHEIRO, M. L. B., SILVA, J. R. DE A., AMARAL, A. C. F., LEON, L. L., MACHADO, G. M. C., PIMENTA, L. P. S. Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Annona aff.excellens*. 29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Site da SBQ, 2006.

PAREDES, A.; HASEGAWA, M.; PRIETO, F.; MENDEZ, J.; RODRIGUEZ-ORTEGA, M.; RODRIGUE-ORTEGA, M. Biological activity of *Guatteria cardoniana* fractions. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 78, p. 129-132, 2001.

PAYROL, J. A.; MARTINEZ, M. M.; CARRABEO, G. T.; GARCIA, O. C. Actividad farmacologica preliminar del frutode *Bromelia pinguin* L. (piña de ratón). *Revista Cubana Farmacology*, v. 35, n. 1, p. 56-60, 2001.

PÉREZ-AMADOR, M. C.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.; MORALES, M. C.; TORIZ F. Oxoaporphine alkaloids in *Guatteria diospyroides* Baill. and *Annona squamosa* L. (Annonaceae). *Revista Internacional de Botânica Experimental*. p. 53-55, 2004.

PARRA, A.L.; YHEBRA, R.S.; SARDIÑAS, I.G.; BUELA L.I.. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 8: 395-400, 2001.

PIO CORRÊA, M. P. Dicionários das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas, Ministério da Agricultura, RJ, p. 315, 1984.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v. 26, n. 4, pg. 550-555, 2003

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke Guia de Identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. DFID (Departamento for International Development), Manaus - AM. INPA, p. 816, 1999.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomedicine*, v. 12, p. 514-535, 2005.

RODRÍGUEZ, M.; HASEGAWA, U. M.; MÉNDEZ, J.; PEREIRA, G.; ARVELO, F. Bioactive oxoaporphine alkaloids from *Guatteria calva*. *Fitoterapia*, v. 70, p. 74-76, 1999.

ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; ASCURRAT, M.; FLEITAS, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. In vitro activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Phytotherapy Research*, v. 8, p. 141-144, 1994.

SANTOS, L. G. Biodiversidade e Políticas Públicas. In: FATHEUER, T; ARROYO, J. C.; MACHADO, J. A. (Orgs.). *Relatos e reflexões a partir do Simpósio Internacional Amazônia: Estratégias de Desenvolvimento Sustentável em Debate*. Belém: NAEA/UFPA, 1998.

SHI, G.; MACDOUGAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, v. 45 (4) p.719-723.

SCHULTES, R. E. De plantis toxicariis e mundo novo tropicale commentationes XXXV: miscellaneous notes on biodynamic plants of the northwest Amazon. *Journal Ethnopharmacol* v. 14, p. 125-158, 1985.

SHUNYING, Z., YANG, Y., HUAIDONG, Y., YUE, Y., GUOLIN, Z.. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of *Chrysanthemum indicum*. *Journal Ehnopharmacol*, v. 96, p. 151-158, 2005.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENCKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P. *Farmacognosia. Da planta ao medicamento*. Porto Alegre/ Florianópolis. Ed. UFRGS/UFSC, p. 387-415, 2003.

SIQUEIRA, J. M.; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D.; Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriúscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico da *Unonopsis lindmanii* Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Química Nova*, v. 25, n. 5, p. 557-559, 1998.

SOLIS, P. N.; WRIGHT, C. W.; ANDERSON, M. M.; GUPTA, M. P.; PHILLIPSON, D. A microwell citotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica*, v. 59, n. 3, p. 250-252, 1993.

STÉVIGNY, C. M.; BAILLY, C.; QUERTIN-LECLERCQ. Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. *Curr. Med. Chem. – Anti-Cancer Agents*, v. 5, p. 173-182, 2005.

STILES, F. G. & A. F. SKUTCH. *A guide to the birds of Costa Rica*. 1989, Cornell University Press, Ithaca, NY.

TAKHTAJAN, A. Flowering Plants, Origin and Dispersal. Oliver & Boyd, Ednburgh, 1969.

VAN DEN BERG, M. E. Plantas Mediciniais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. Museu Paraense Emílio Goeldi: Belém, 1993.

VALENTIN, A.; BENOIT-VICAL, F.; MOULIS, C.; STANISLAS, E.; MALLIÉ, M.; FOURASTE, I.; BASTIDE, J. M. In vitro antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 41, p. 2305-2307, 1997.

WENIGER, B.; ARAGON, R.; DEHARO, E.; BASTIDA, J., CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTÓN, R. Antimalarial constituents from *Guatteria amplifolia*. *Pharmazie*, v. 55, p. 867–868, 2000.

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, n. 6, p. 1703-1706, 1996.

WONG, H.F.; BROWN, G. D.  $\beta$ -Methoxy- $\gamma$ -methylene- $\alpha,\beta$ -unsaturated- $\gamma$ -butyrolactones from *Artabotrys hexapetalus*. *Phytochemistry*, v. 59, p. 99-104, 2002

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H. N.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. New Sesquiterpenoids from the Root of *Guatteria multivenia*. *Journal Naural Products*, v. 65, p. 856-859, 2002.