

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

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
Unonopsis guatterioides E *Unonopsis duckei*

FELIPE MOURA ÁRAUJO DA SILVA

MANAUS

2011

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

FELIPE MOURA ARAÚJO DA SILVA*

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
Unonopsis guatterioides E *Unonopsis duckei*

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Orgânica

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro
Coorientador: Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza
*bolsista CAPES

MANAUS
2011

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

S586e Silva, Felipe Moura Araújo da

Estudo fitoquímico e biológico de *Unonopsis guatterioides* e *Unonopsis duckei*/ Felipe Moura Araújo da Silva.- Manaus: UFAM, 2011.

117f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Química)— Universidade Federal do Amazonas, 2011.

Orientadora: Prof.^a, Dr.^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro

Co-orientador: Prof^o Dr^o Afonso Duarte Leão de Souza

1. Química orgânica 2. *Unonopsis*- Estudo 3. Alcalóides-
Análise I. Pinheiro, Maria Lúcia Belém (Orient.) II. Souza, Afonso
Duarte Leão de (Co -orient.) III. Universidade Federal do Amazonas
IV. Título

CDU (1997) 582.843(043.3)

FELIPE MOURA ARAÚJO DA SILVA

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE
Unonopsis guatteroides E *Unonopsis duckei*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Química. Área de Concentração: Química Orgânica

Aprovada em 19 de Dezembro de 2011

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lúcia Belém Pinheiro
Universidade Federal do Amazonas – UFAM

Membro: Prof. Dr. Moacir Rossi Forim
Universidade Federal de São Carlos – UFSCar

Membro: Prof. Dr. Sergio Massayoshi Nunomura
Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia - INPA

Dedico este trabalho a Deus e à minha família.

“Se andarmos apenas por caminhos já traçados,
chegaremos apenas onde os outros chegaram”

Alexandre Graham Bell.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar meus passos e por ter me oferecido tantas oportunidades de aprendizado;

A minha família, em especial aos meus pais Luisa Naihara e Francinaldo, pelo amor, educação e apoio dedicados; Ao meu primo Alexandre; Aos meus irmãos Gunther e Francinaldo Filho, e a minha namorada Fernanda Luzeiro, pela amizade, amor e carinho;

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro e ao meu co-orientador Prof. Dr. Afonso Duarte Leão de Souza, pelos conhecimentos transmitidos, amizade, apoio e confiança;

Aos meus grandes amigos Héctor Koolen e Richardson Alves;

Aos colegas de laboratório pelo aprendizado mútuo;

À Universidade Federal do Amazonas, pela oportunidade de aprimoramento;

À CAPES, pela bolsa de estudos concedida durante os dois anos de mestrado;

Ao Prof. Dr. Antonio Carlos Webber do Departamento de Biologia (UFAM) pela identificação botânica da espécie *U. guatterioides*;

Ao Dr. Antonio Gilberto Ferreira, da UFSCar; Dr. Andersson Barison e Dr^a. Francinete R. Campos, da UFPR, pelos espectros de RMN;

À doutoranda Tatiani Bondancia e à aluna de iniciação científica Viviane Magrini, da UFSCar e à doutoranda Rita Souza, da UNICAMP, pelas análises de GC/MS.

À Dr^a. Izaltina Silva Jardim Cavalli, à doutoranda Janaína Paolucci Sales e à técnica Delvânia Marta Ferreira Santos pela realização das análises biológicas.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O gênero neotropical *Unonopsis*, um dos 130 gêneros pertencentes à família Annonaceae, tem se mostrado uma fonte promissora de alcalóides aporfínicos e derivados. A atividade antiprotozoário desta classe de substâncias, principalmente a atividade antileishmania, tem despertado o interesse de diversos grupos de pesquisa ao redor do mundo. No presente trabalho foram realizadas as análises das frações alcaloídicas das folhas, galhos e cascas do tronco de *Unonopsis duckei* e *Unonopsis guatterioides* por meio de espectrometria de massas, investigando seu perfil alcaloídico com vistas à obtenção de estruturas promissoras em atividade antileishmania. Através das análises de MSⁿ e LC/APCI/MS das frações alcaloídicas de *U. guatterioides* foi possível confirmar a presença dos alcalóides anonaina, assimilobina, liriodenina e lisicamina, já reportados na literatura da espécie, identificar pela primeira vez no gênero o alcalóide nornuciferina, além de sugerir a presença de um alcalóide do tipo azafluorenona, previamente reportado na espécie *U. lindimani*. A investigação espectrométrica de *U. duckei* revelou a existência de alcalóides aporfínicos e oxoaporfínicos já reportados no gênero, bem como conduziu ao isolamento do alcalóide aporfínico glaziovina e de uma mistura de glaucina e norglaucina, sendo todos esses alcalóides inéditos no gênero. Foi realizado o isolamento do triterpeno policarpol de ambas as espécies, sendo o melhor rendimento observado em *U. duckei*. A investigação dos constituintes menos polares de *U. guatterioides* levou ao isolamento de misturas de sitosterol/estigmasterol. Das frações alcaloídicas de *U. duckei* e *U. guatterioides* analisadas, quatro foram consideradas altamente ativas, uma ativa e apenas uma não se apresentou ativa frente a *Leishmania amazonensis*. Entre as substâncias avaliadas, o alcalóide glaziovina apresentou alta atividade frente a *Leishmania amazonensis*.

Palavras-chaves: Desreplicação, espectrometria de massas, alcalóides aporfínicos, *Unonopsis*.

ABSTRACT

The neotropical genus *Unonopsis*, one among the 130 genera belonging to the Annonaceae family, has been a promising source of aporphine alkaloids and derivatives. The antiprotozoal activity of this class of substances, mainly anti-leishmania activity, has aroused the interest of several research groups around the world. In the present work were carried out the analysis from alkaloidal fractions of the leaves, twigs and barks of the trunk from *Unonopsis duckei* and *Unonopsis guatterioides* by mass spectrometry, doing an investigation in the alkaloid profile in order to obtain promising structures with activity against *Leishmania*. The analysis of MSⁿ and LC/APCI/MS of the alkaloidal fractions of *U. guatterioides* confirmed the presence of some alkaloids previously reported in the literature such as anonaine, asimilobine, liriodenine and lysicamine. It was possible identify the normuciferine alkaloid which was characterized for the first time in the *Unonopsis* genus, and suggest the presence of azafluorenone type alkaloid. The spectrometric investigation of *U. duckei* revealed the presence of aporphine and oxoaporphine alkaloids which were already reported in this genus, as well as guided the isolation of the proaporphine alkaloid glaziovine and the mixture of glaucine and norglaucine alkaloids. These compounds are inedit in the *Unonopsis* genus. The triterpene polycarpol was isolated from both species, observed *U. duckei* like the best yield. In the phytochemical investigation of the apolar extracts of *U. guatterioides* was possible to identify a mixture of sitosterol/stigmasterol steroids. The biological analyses of *U. duckei* and *U. guatterioides* alkaloidal fractions showed that four of them were considered highly active, one of them was moderatly active and only one was not showed active against *Leishmania amazonensis*. Among the substances evaluated, the alkaloid glaziovine showed the most effective activity against *Leishmania amazonensis*.

Keywords: Dereplication, mass spectrometry, aporphine alkaloids, *Unonopsis*.

LISTA DE SIMBOLOS E ABREVIACOES

% - Porcentagem

δ – Deslocamento químico em partes por milho

APCI - *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*

CCD – Cromatografia em camada delgada

CI₅₀ – Atividade de 50% de concentrao inibitória

CID – *Collision Induced Dissociation*

DEPT- *Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*

ESI - *Electrospray Ionisation*

HPLC - *High performance liquid chromatography*

HSQC - *Heteronuclear single-quantum correlation.*

HMBC - *Heteronuclear Multiple Bond Correlation.*

Hz - Hertz

J - Constante de Acoplamento

MHz - Megahertz

MSⁿ - *Tandem Mass Spectrometry*

m/z - Relaço massa/carga

PDA - *Photodiode array*

R_f - Fator de reteno

RMN¹H - Ressonncia magnética nuclear de hidrogênio

RMN ¹³C - Ressonncia magnética nuclear de carbono

SIM – *Selected ion monitoring*

t_R - Tempo de reteno

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Distribuição geográfica da família Annonaceae.
- Figura 2.** Frutos comestíveis pertencente à família Annonaceae: A) *A. squamosa* (furta do conde); B) *A. muricata* (graviola).
- Figura 3.** Flor de *C. odorata* (Ylang-Ylang) utilizada como matéria-prima na confecção de perfumes.
- Figura 4.** Distribuição geográfica do Gênero *Unonopsis* R. E. Fr.
- Figura 5.** Alcalóides do tipo oxoaporfínicos e azafluorenonas descritos para o gênero *Unonopsis*.
- Figura 6.** Alcalóides do tipo bisaporfínicos e fenantrênicos descritos para o gênero *Unonopsis*.
- Figura 7.** Policarpol, triterpeno tetracíclico do tipo lanostano.
- Figura 8.** Rota biossintética para formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir da L-tirosina.
- Figura 9.** Origem biossintética dos alcalóides isoquinolínicos.
- Figura 10.** Alguns alcalóides oxoaporfínicos descritos por silva e colaboradores (2007). (a) Esqueleto aporfínico. (b) Esqueleto oxaporfínico.
- Figura 11.** Distribuição de *Unonopsis guatteroides* (A. DC.) R. E. Fr
- Figura 12.** Distribuição geográfica de *Unonopsis duckei* R. E. Fr (■)
- Figura 13.** Ciclo de vida da *Leishmania* ssp
- Figura 14.** Espécime de *U. guatteroides* coletado no campus da UFAM em janeiro de 2010.
- Figura 15.** Fluxograma para obtenção dos extatos brutos de *U. guatteroides* e *U. duckei*
- Figura 16.** Formação de precipitado durante o processo de concentração do EHGC.
- Figura 17.** Fluxograma mostrando a purificação do precipitado do EHGC.
- Figura 18.** Reunião das frações da coluna filtrante.

Figura 19. Reunião das frações resultantes da coluna aberta de EHGC-F3.

Figura 20: Reunião das frações resultantes da coluna aberta EHGG.

Figura 21. Fluxograma do protocolo de extração ácido/base para alcalóides quais os extratos metanólicos das espécies *U. guatterioides* e *U. duckei* foram submetidos

Figura 22. Cromatograma obtido por HPLC/DAD/APCI/MS para a fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (FADF) no modo isocrático de eluição MeOH/H₂O (6:4) (v/v) em coluna de Phenyl-hexyl. A) Cromatograma de íons totais de m/z 100-1000; B) Cromatograma com DAD operando na faixa de 200-800 nm.

Figura 23. Esquema do fracionamento em escala semi-preparativa da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (FADF).

Figura 24. Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *U. guatterioides*

Figura 25. Espectro de massas em MS⁴ do íon *quasi*-molecular da anonaina em m/z 266 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica dos galhos de *U. guatterioides*.

Figura 26. Proposta de fragmentação para o íon *quasi*-molecular da anonaina em m/z 266 ([M+H]⁺).

Figura 27. Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *U. guatterioides*.

Figura 28. Espectro de massas em MS⁴ do íon *quasi*-molecular da assimilobina em m/z 268 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. guatterioides*.

Figura 29. Proposta de fragmentação para o íon *quasi*-molecular da assimilobina em m/z 268 ([M+H]⁺).

Figura 30. Espectro de massas em MS⁵ do íon *quasi*-molecular em m/z 282 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. guatterioides*.

Figura 31. Espectro de massas em MS⁵ do íon *quasi*-molecular do padrão de normuciferina em m/z 282 ([M+H]⁺).

Figura 32. Cromatogramas obtidos por LC/APCI/MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM) do íon de m/z 282 ($[M+H]^+$). (A) galhos, (B) folhas, (C) cascas e (D) padrão de nornuciferina.

Figura 33. Espectro de massas da fração alcaloídica das cascas de *U. guatterioides*

Figura 34. A) Espectro de MS^2 do íon em m/z 276 presente na fração alcaloídica das cascas de *U. guatterioides*. B) Espectro de MS^2 do padrão de liriodenina. C) Espectro de MS^2 do íon em 292 ($[M+H]^+$) presentes na fração alcaloídica das cascas de *U. guatterioides*. D) Espectro de MS^2 do padrão de lisicamina.

Figura 35. Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*.

Figura 36. Região ampliada do espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*.

Figura 37. Espectro de massas em MS^6 do íon *quasi*-molecular da nornuciferina em m/z 282 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*.

Figura 38. Cromatogramas obtidos por LC/APCI/MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM) da fração alcaloídica dos galhos (A) e do padrão de nornuciferina (B).

Figura 39. Espectro de massas da fração alcaloídica das cascas de *U. duckei*.

Figura 40. Região ampliada do espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*.

Figura 41. Espectro de massas em MS^6 do íon *quasi*-molecular da nornuciferina em m/z 282 presente na fração alcaloídica das cascas de *U. duckei* ($[M+H]^+$)

Figura 42. Cromatogramas obtidos por LC/APCI/MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM) da fração alcaloídica das cascas (A) e do padrão de nornuciferina (B).

Figura 43. Espectro de massas em MS^4 do íon *quasi*-molecular da anonaina em m/z 266 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica das cascas de *U. duckei*.

Figura 44. Espectro de massas em MS⁴ do íon *quasi*-molecular da assimilobina em *m/z* 268 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica das cascas de *U. duckei*.

Figura 45. Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

Figura 46. Espectro de massas em MS⁵ do íon *quasi*-molecular em *m/z* 298 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

Figura 47. Possíveis estruturas para o íon *quasi*-molecular em *m/z* 298 ([M+H]⁺).

Figura 48. Espectro de massas em MS⁷ do íon *quasi*-molecular em *m/z* 342 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

Figura 49. Espectro de massas em MS⁷ do íon *quasi*-molecular em *m/z* 356 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

Figura 50. Proposta de fragmentação para os íons *quasi*-moleculares em *m/z* 356 ([M+H]⁺) e *m/z* 342 ([M+H]⁺).

Figura 51. Cromatogramas obtidos por LC/DAD/MS da FADF1. A) Cromatograma de íons totais de *m/z* 100-1000; B) Cromatograma com DAD operando na faixa de 200-800 nm.

Figura 52. Estrutura parcial para a substância FADF1.

Figura 53. Espectro ampliado de RMN de ¹H da FADF1 (400 MHz, metanol-d₄).

Figura 54. Espectro ampliado de RMN de ¹H (400 MHz, metanol-d₄) da FADF1.

Figura 55. Algumas correlações hereronucleares ¹H - ¹³C observadas por HSQC para a substância FADF1 em metanol-d₄ (400 MHz).

Figura 56. Algumas correlações hereronucleares ¹H - ¹³C observadas por HMBC para o hidrogênio em δ 3,00 e 3,17.

Figura 57. Algumas correlações hereronucleares ¹H - ¹³C observadas por HMBC para o hidrogênio em δ 3,85.

Figura 58. Algumas correlações hereronucleares ¹H - ¹³C observadas por HMBC para o hidrogênio em δ 6,84.

Figura 59. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, metanol- d_4) de FADF1.

Figura 60. Algumas correlações hereronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 7,10 – 6,31.

Figura 61. Proposta de fragmentação para o alcalóide glaziovina.

Figura 62. Cromatograma obtido através de sistema LC/APCI/MS para a amostra FADF4. A) Cromatograma de íons totais com monitoramento de m/z 100-1000; B) espectro de massas obtido pela média entre os tempos de retenção 2,33- 7,00 minutos.

Figura 63. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da FADF4.

Figura 64. Correlações hereronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HSQC para FADF4.

Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) de FADF4.

Figura 66. Espectro de DEPT 135° para a amostra FADF4.

Figura 67. Correlações hereronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios aromáticos de FADF4.

Figura 68. Correlações hereronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HMBC para os hidrogênios metílicos das quatro metoxilas e da *N*-metila de FADF4.

Figura 69. Esqueleto aporfínico da substância majoritária glaucina devidamente numerado.

Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de EHGCS1.

Figura 71. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de EHGCS1.

Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de EHGCS1.

Figura 73. Espectro de massas da amostra (A) EHGCS1, (B) EHDCS1 e (C) EHDGS1 obtida em fonte APCI.

Figura 74. Esqueleto do porlicarpol devidamente enumerado.

Figura 75. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133.

Figura 76. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133.

Figura 77. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133.

- Figura 78.** Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133.
- Figura 79.** Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133.
- Figura 80.** Espectros de massas do estigmasterol e do sitosterol obtidos por IE a 70 eV, respectivamente de cima para baixo para a amostra EHGG7.
- Figura 81.** Esqueleto do β -sitosterol e estigmasterol respectivamente.
- Figura 82.** Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133.
- Figura 83.** Espectro de MS^2 do constituinte majoritário da amostra em comparação com padrão.
- Figura 84.** Perfil alcaloídico das cascas de (A) *U. guatterioides* e (B) *U. duckei*.
- Figura 85.** Perfil alcaloídico dos galhos de (A) *U. guatterioides* e (B) *U. duckei*.
- Figura 86.** Região do espectro de massas ampliada até aproximadamente m/z 330.
- Figura 87.** Perfil alcaloídico das folhas de (A) *U. guatterioides* e (B) *U. duckei*.
- Figura 88.** Região do espectro de massas ampliada até aproximadamente m/z 330.

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Distribuição Quantitativa das Espécies nas Diversas Classes do Reino Vegetal.
- Tabela 2:** Alcalóides aporfínicos e derivados isolados de espécies do gênero *Unonopsis*.
- Tabela 3.** Rendimento dos extratos brutos das duas espécies.
- Tabela 4:** Solventes utilizados no pré-fracionamento do EHGC.
- Tabela 5.** Rendimento obtido das frações alcaloídicas no procedimento de extração ácido/base quais as espécies *U. guatterioides* e *U. duckei* foram submetidas.
- Tabela 6.** Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN da FADF1 e comparação entre os dados obtidos (metanol-d₄) e aqueles existentes na literatura (DMSO-d₆).
- Tabela 7.** Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN da FADF4 e comparação entre os dados obtidos (CDCl₃) e aqueles existentes na literatura (CDCl₃).
- Tabela 8.** Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³C de EHGCS1 e comparação entre os dados obtidos e aqueles existentes na literatura para o policarpol.
- Tabela 9.** Rendimento do policarpol isolado de *U. guatterioides* e *U. duckei*.
- Tabela 10.** Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ¹³C de EHGCF32133 e comparação entre os dados obtidos e aqueles existentes na literatura para o estigmasterol e sitosterol.
- Tabela 11** – Avaliação da atividade leishmanicida em formas promastigotas *in vitro*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Família Annonaceae.....	5
2.1.1 Atividade biológica da família Annonaceae.....	7
2.1.2 Constituintes químicos da família Annonaceae.....	8
2.2 O Gênero <i>Unonopsis</i>	8
2.2.1 Atividades biológicas de espécies do gênero <i>Unonopsis</i>	8
2.2.2 Constituintes químicos do gênero <i>Unonopsis</i>	10
2.3 Alcalóides.....	14
2.3.1 Alcalóides aporfínicos.....	16
2.3.1.1 Atividade biológica de alcalóides aporfínicos.....	17
2.4. A espécie <i>Unonopsis guatterioides</i> (A. D.C.) R. E. Fr.....	18
2.5 A espécie <i>Unonopsis duckei</i> R. E. Fr.....	19
2.6 Leishmaniose.....	20
2.6.1 Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> ssp.....	21
2.6.2 Tratamento da Leishmaniose.....	22
2.7 Perfil químico.....	23
3. OBJETIVOS.....	24
3.1 Geral.....	24
3.2 Específico.....	24
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	25
4.1 Análises cromatográficas.....	25
4.1.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA).....	25
4.1.2 Cromatografia em coluna (CC).....	25

4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE).....	25
4.1.4 Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa (CLAES-Semi-prep.).....	26
4.2 Solventes e reagentes reveladores.....	26
4.2.1 Solventes.....	26
4.2.2 Reagentes reveladores.....	26
4.3 Métodos espectroscópicos/espectrométricos.....	26
4.4 Outros materiais e equipamentos.....	27
4.5 Material Botânico.....	28
4.5.1 Coleta e identificação.....	28
4.5.2 Secagem e moagem.....	28
4.5.3 Obtenção dos extratos brutos.....	29
4.6 Extrato hexânico das cascas de <i>Unonopsis guatterioides</i> (EHGC).....	30
4.6.1 Fracionamento do extrato hexânico das cascas de <i>U. guatterioides</i> (EHGC).....	32
4.6.1.1 Análise por CCDA das frações 1-5 obtidas na coluna filtrante.....	32
4.6.2 Fracionamento em coluna aberta de EHGC-F3.....	33
4.6.2.1 Análise por CCDA das frações 1-80.....	33
4.7 Fracionamento do extrato hexânico dos galhos de <i>U. guatterioides</i> (EHGG).....	34
4.7.1 Análise por CCD das frações 1-19.....	34
4.8 Extrato hexânico das cascas e galhos de <i>U. duckei</i>	35
4.9 Marcha química para obtenção das frações alcalóidicas.....	35
4.10 Análises espectrométricas das frações alcalóidicas.....	37
4.11 Purificação cromatográfica da fração alcalóidica das folhas de <i>U. duckei</i> (FADF).....	37
4.12 Perfil alcalóidico entre as espécies <i>U. guatterioides</i> e <i>U. duckei</i>	39
4.13 Realização do Ensaio Biológico.....	39
4.13.1 Parasitas.....	39

4.13.2 Atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	39
4.13.3 Análise estatística.....	40
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Análise espectrométrica das frações alcalóidicas de <i>U. guatterioides</i>	41
5.1.1 Desrepliação dos alcalóides dos galhos de <i>U. guatterioides</i>	41
5.1.2 Desrepliação dos alcalóides das folhas de <i>U. guatterioides</i>	44
5.1.3 Desrepliação dos alcalóides das cascas de <i>U. guatterioides</i>	49
5.2 Análise espectrométrica das frações alcalóidicas de <i>U. duckei</i>	51
5.2.1 Desrepliação dos alcalóides dos galhos de <i>U. duckei</i>	51
5.2.2 Desrepliação dos alcalóides das cascas de <i>U. duckei</i>	53
5.2.3 Desrepliação dos alcalóides das folhas de <i>U. duckei</i>	57
5.3 Identificação de FADF1.....	62
5.4 Identificação de FADF4	69
5.5 Identificação de EHGCS1.....	75
5.6 Identificação de EHGCF32133.....	80
5.7 Identificação de EHGG6.....	85
5.8 Análise do perfil alcaloídico entre as espécies.....	86
5.8.1 Perfil alcaloídico das cascas.....	86
5.8.2 Perfil alcaloídico dos galhos.....	87
5.8.3 perfil alcaloídico das folhas.....	88
5.9 Teste <i>in vitro</i> de atividade leishmanicida.....	89
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
7.REFERÊNCIAS.....	92

1.INTRODUÇÃO

A natureza tem sido a principal fonte de moléculas orgânicas conhecidas. Entre os diversos reinos da natureza, destaca-se o reino vegetal o qual vem contribuindo significativamente com o fornecimento de moléculas e novas estruturas orgânicas. Muitas dessas substâncias constituem-se em modelos imprescindíveis para o desenvolvimento de fármacos e tratamento das mais diversas doenças (Pinto et al.,2002). O reino vegetal tem se destacado por fornecer uma grande quantidade de substâncias eficientes no tratamento de doenças negligenciadas, como a leishmaniose, podendo-se destacar os alcalóides (Bacab & Rodriguez, 2001; Rocha et al., 2005, Misha et al., 2008).

O número de espécies que compõem o reino vegetal é estimado em cerca de setecentos e quarenta e três mil, sendo 94% deste total, espécies de angiospermas (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição Quantitativa das Espécies nas Diversas Classes do Reino Vegetal

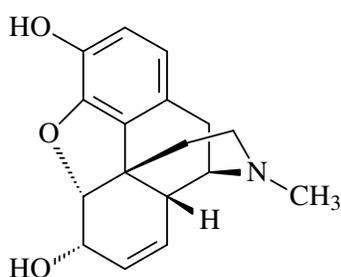
Talófitas		Espermatófitas	
Algas	19.000	Gimnospermas	700
Briófitas	14.000	Angiospermas	700.000
Pteridófitas	10.000	Divididas em	
		Monocotiledôneas	200.000
		Dicotiledôneas	500.000
Subtotal	43.000	Subtotal	700.700
Total de espécies	743.700		

Fonte: Matos, 2009.

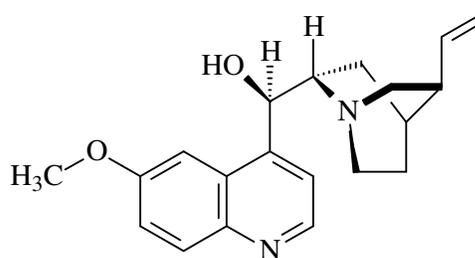
O Bioma Amazônico detém o maior reservatório natural da diversidade vegetal do planeta, onde o contingente vegetal que compõe os diferentes ambientes florestais é amplo e variado, sendo muitas vezes exclusivo de determinado ambiente (Oliveira & Amaral, 2004). Num levantamento realizado por Maciel e colaboradores (2002) estimou-se que somente na Região Amazônica mais de 1200 espécies sejam comercializadas como plantas medicinais Grande parte da população mundial, principalmente as que residem em países em

desenvolvimento, apresentam o hábito de consumir produtos derivados de plantas como medicamentos fitoterápicos (Montanari e Bolzani, 2001).

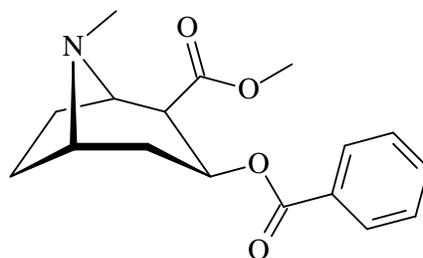
Os primeiros registros de estudos realizados com fundamentos científicos sobre plantas medicinais resultaram no isolamento de alguns princípios ativos. Estas substâncias se consagraram como princípios ativos eficazes, e ainda hoje são bastante empregados no tratamento de certas doenças, a exemplo dos alcalóides morfina (1), quinina (2) e cocaína (3).



(1) Morfina



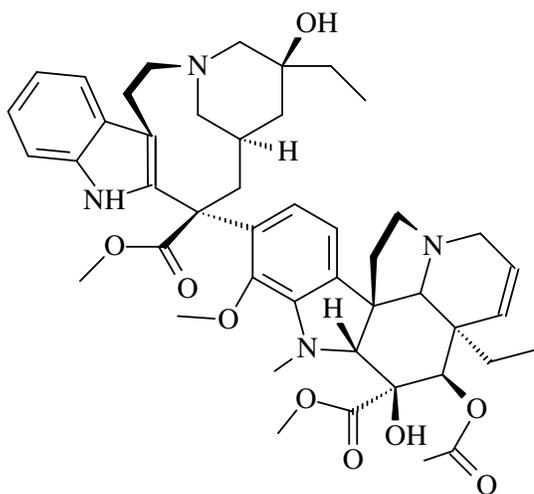
(2) Quínina



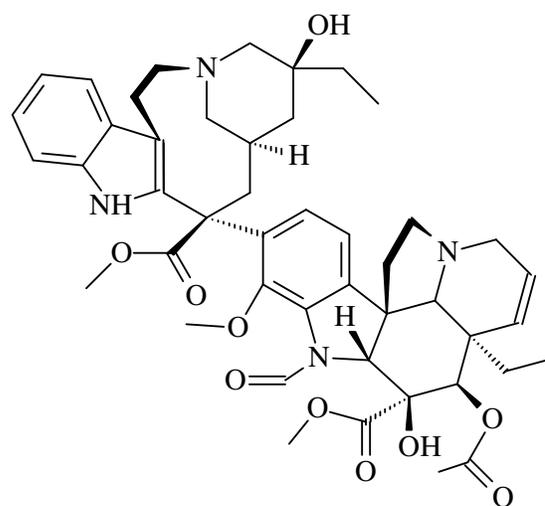
(3) Cocaína

A descoberta de quimioterápicos de origem natural eficazes, porém de elevada complexidade estrutural, como vimblastina (4) (Velban[®]), vincristina (5) (Oncovin[®]) e o taxol (6) (plaxitaxel; Taxol[®]), despertou um renovado interesse das indústrias farmacêuticas pela busca de novos fármacos de origem vegetal, especialmente por estruturas de grande complexidade estrutural para serem obtidos por processo de síntese (Montanari e Bolzani, 2001). Como exemplo pode ser citado o próprio taxol comercial que na realidade é um produto de uma semi-síntese, cuja a parte diterpênica, desacetil-10-bacatina III, tem sido

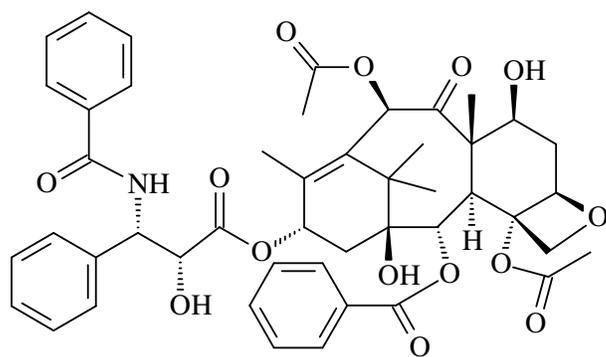
isolada de folhas de *T. baccata* com rendimento de até 1g/Kg de folhas frescas (Corrêa, 1995). Estima-se que o mercado de fármacos movimente cerca de 50 bilhões de dólares anualmente (Pinto et al.,2002).



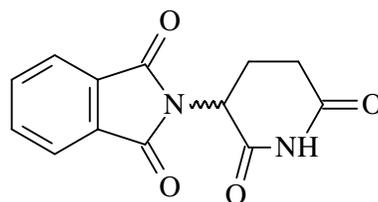
(4) Vimblastina



(5) Vincristina



(6) Taxol



(7) Talidomida

Outro aspecto que reforça a necessidade de buscar metabólitos ativos em fontes vegetais está relacionado ao acúmulo de substâncias enantiomericamente puras. Muitas vezes os processos de síntese geram produtos em misturas racêmicas ou em excesso enantiomérico. A preocupação para com o uso de produtos quirais ganhou destaque a partir da década de 60 com a observação dos efeitos causados por drogas como a talidomida (7). Sabe-se hoje que a teratogênese fetal é uma consequência da ação do enantiômero (-) (Montanari & Bolzani, 2001). Após o fracasso da talidomida, a indústria farmacêutica, bem como laboratórios de pesquisa em todo mundo vem aplicando grandes investimentos em prospecção de substâncias a partir de extratos vegetais que sirvam como modelos para o desenvolvimento de fármacos, com maior atividade e menor efeito colateral, principalmente fármacos que venham a substituir ou suplementar aqueles de uso corrente contra doenças que não tem vacina, como é o caso da leishmaniose (Rocha et al., 2005). Para a leishmaniose este problema se agrava pelo aumento da resistência dos protozoários aos antimoniais pentavalentes e aos fármacos de segunda geração, aliado ao fato de que o número de quimioterápicos disponíveis, principalmente para tratamento de doenças crônicas, está muito abaixo do satisfatório (Gil et al., 2008).

2.REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae é composta por cerca de 2500 espécies distribuídas em 130 gêneros. Esta família é constituída por árvores, arbustos e trepadeiras, tendo sua distribuição geográfica predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do globo (Figura 1) (Richardson et al., 2004). Sua identificação é realizada rotineiramente através da observação de características botânicas particulares, como: odor forte e característico que exala do tronco cortado ou dos ramos; presença de fibras longas e resistentes na casca, conhecidas popularmente como envira; pela filotaxia alterna e dística de suas folhas (exceto em *Tetrameranthus* R. E. Fries, com folhas espiraladas) (Ribeiro et al., 1999). Quanto à forma de polinização, os indivíduos desta família são em sua grande maioria polinizados por Coleópteros, exceções reportadas recentemente são as espécies *Unonopsis guatterioides* e *Unonopsis stipitata*, sendo ambas polinizadas por machos de abelhas da tribo Euglossini (Carvalho & Webber, 2000; Teichert, 2008).



Figura 1. Distribuição geográfica da família Annonaceae

Fonte: Heywood, 1978.

Ao longo dos trópicos estima-se que aproximadamente 950 espécies distribuídas em 51 gêneros estejam presentes entre a Ásia e a Austrália, 450 espécies distribuídas em 40 gêneros na África e Madagascar e outras 740 espécies distribuídas em 38 gêneros no continente americano (Leboeuf et al., 1982). Na América do Sul, encontram-se 34 gêneros, com predomínio dos gêneros *Annona* L., *Duguetia* St. Hil., *Guatteria* Ruiz et Pavon, *Rollinia* St. Hil e *Xylopia* L. No Brasil, estão registrados 29 gêneros (Hutchinson, 1968).

A família Annonaceae tem apreciável importância econômica, sendo uma família que produz diversos frutos comestíveis, tais como a graviola (*Annona muricata* L.) e a fruta do conde (*Annona squamosa* L.) (Figura 2), além de possuir espécies fornecedoras de óleos comestíveis, fornecedoras de matéria prima para a produção de álcool e fontes de matéria-prima para a confecção de perfumes como *Cananga odorata* (Ylang-Ylang) (Figura 3) (Leboeuf et al., 1982).

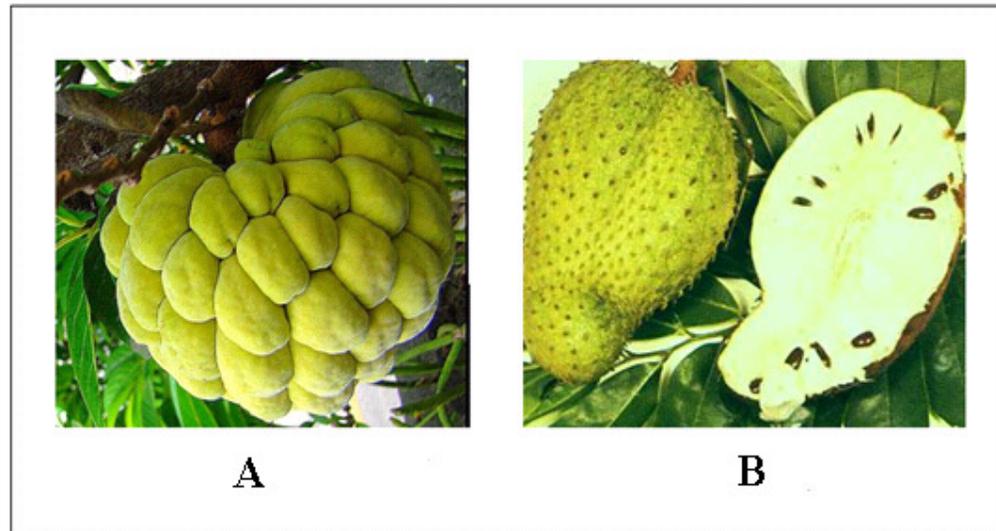


Figura 2. Frutos comestíveis pertencente à família Annonaceae: A) *A. squamosa* (fruta do conde); B) *A. muricata* (graviola).

Fontes: websmed.portoalegre.rs.gov.br ; agadeshe.blogspot.com

2.1.1 Atividade biológica família Annonaceae

Diversas espécies constituintes dos gêneros *Annona*, *Guatteria* e *Uvaria*, vêm sendo relatadas por seu uso medicinal. Muitas destas espécies apresentam atividade contra doenças negligenciadas, como a leishmaniose e a malária, podendo-se destacar *Annona muricata*, *Annona excellens*, *Guatteria amplifolia* e *Uvaria klaineana*. Outras espécies são também utilizadas como antitumorais, parasiticida e antidiarréica (Pimenta et al., 2003; Di stasi & Hiruma-Lima, 2002; Lebouef et al., 1982; Oliveira et al., 2006; Paredes et al., 2001; Akendengue et. al., 2002).



Figura 3. Flor de *C. odorata* (Ylang-Ylang) utilizada como matéria-prima na confecção de perfumes.

Fonte: [www..rareflora.com](http://www.rareflora.com)

2.1.2 Constituintes químicos da família Annonaceae

A família Annonaceae é quimicamente caracterizada pela presença de alcalóides, principalmente derivados isoquinolínicos e terpenóides com monoterpenos e sesquiterpenos, predominantes na composição de óleos essenciais e diterpenos, sendo esta última a classe de terpenos predominante (Leboeuf et al., 1982). Outra característica marcante quanto à sua composição química é a presença de acetogeninas, uma classe química encontrada somente nesta família, e que tem atraído grande interesse devido a sua crescente lista de atividades biológicas e estruturas peculiares descritas na literatura (Cunha et al., 2009; Chang et al., 1999).

2.2 O gênero *Unonopsis*

O gênero neotropical *Unonopsis* foi primeiramente descrito por Robert E. Fries em 1900, chegando à marca de 27 espécies catalogadas em 1959. Numa recente revisão foram reconhecidas 47 espécies, dentre as quais 25 são novas, podendo-se destacar a espécie *U. bauxitae* Maas, Westra & Mello-Silva, endêmica de Minas Gerais (Mass et al., 2007; Lobão et al., 2006).

O gênero é constituído de arbustos e árvores os quais podem alcançar até 30 metros de altura. Sua distribuição é limitada à região entre a América do Sul tropical e a América Central (Figura 4), normalmente presente em áreas não inundadas e a baixas altitudes.

2.2.1 Atividades biológicas de espécies do gênero *Unonopsis*

Algumas utilizações empíricas do gênero *Unonopsis* foram descritas por Adams e colaboradores. (2007), que mencionam a utilização de folhas secas de *Unonopsis veneficiorum* por índios que vivem ao longo do rio Uaupés no estado do Amazonas –Brasil, na comida dos pacientes idosos que sofrem de demência, além da utilização de folhas

pulverizadas de *Unonopsis stipitata* na comida de pessoas com idade avançada que apresentam dificuldade de falar. Ainda a respeito da utilização indígena, pode-se destacar o uso de espécies deste gênero como veneno para ponta de flechas e lanças e também na utilização como antifertilizantes (Siqueira et al., 1998).

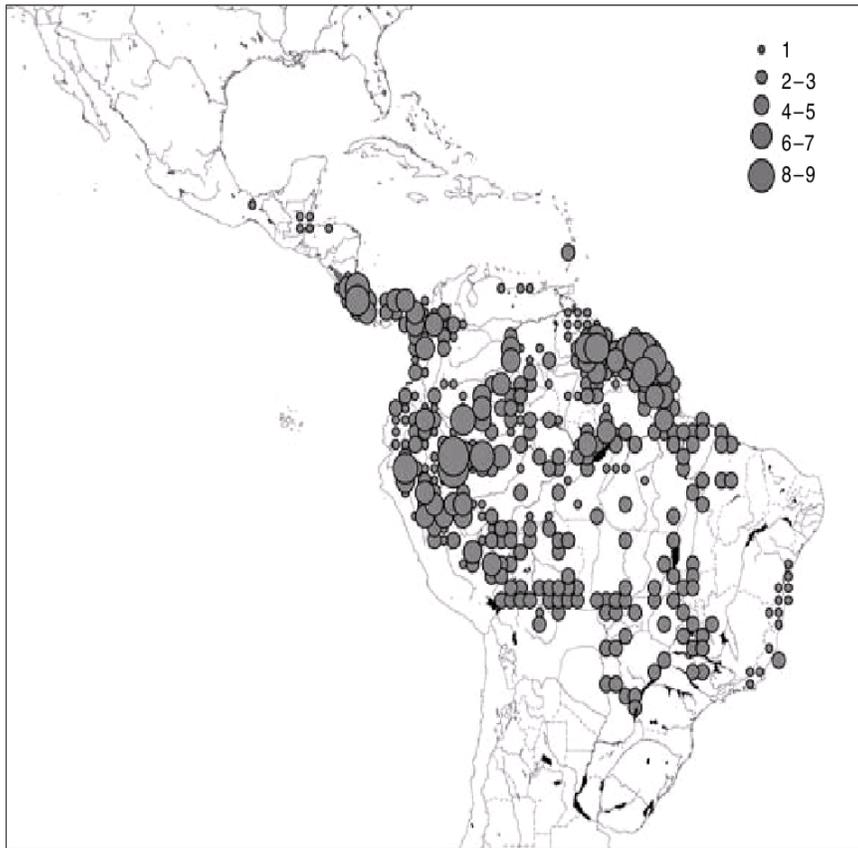


Figura 4. Distribuição geográfica do Gênero *Unonopsis* R. E. Fr

Fonte: Mass et al., 2007

2.2.2 Constituintes químicos do gênero *Unonopsis*

A revisão da literatura confirmou a presença de alcalóides no gênero *Unonopsis*, sendo predominantes os do tipo aporfínicos e derivados (Tabela 2). Entre os derivados mais comuns estão os alcalóides do tipo oxaporfínicos, azafluorenonas (Figura 5), fenantrênicos e bisaporfínicos (figura 6). Estão também disponíveis na literatura, dados sobre a composição dos óleos essenciais de algumas espécies, tais como: *Unonopsis guatterioides*, *Unonopsis lindimani* e *Unonopsis costaricensis* (Fournier et al., 1997; Palazzo et al., 2009; Yoshida et al., 2006). Durante a revisão bibliográfica identificou-se também a presença do triterpeno tetracíclico, derivado lanostano, conhecido como policarpol (Figura 7) nas espécies *Unonopsis glaucopetala*, *Unonopsis guatterioides*, *Unonopsis spectabilis* e *Unonopsis pacifica* (Jayasuriya et al., 2005; Laprévotte et al., 1987; Touché et al., 1981; Arango et al., 1988). Este triterpeno foi descoberto por Cavé e colaboradores simultaneamente nas cascas de *Polyulthia oliveri* e *Meiocurpidium lepidotum* ainda na década de 70 (Lebouef et al., 1982). Ao policarpol são associadas algumas atividades biológicas tais como: antitripanossômica, antifilarial e citotóxica (Ngantchou et al., 2009; Matos et al., 2006; Nyasse et al., 2006)

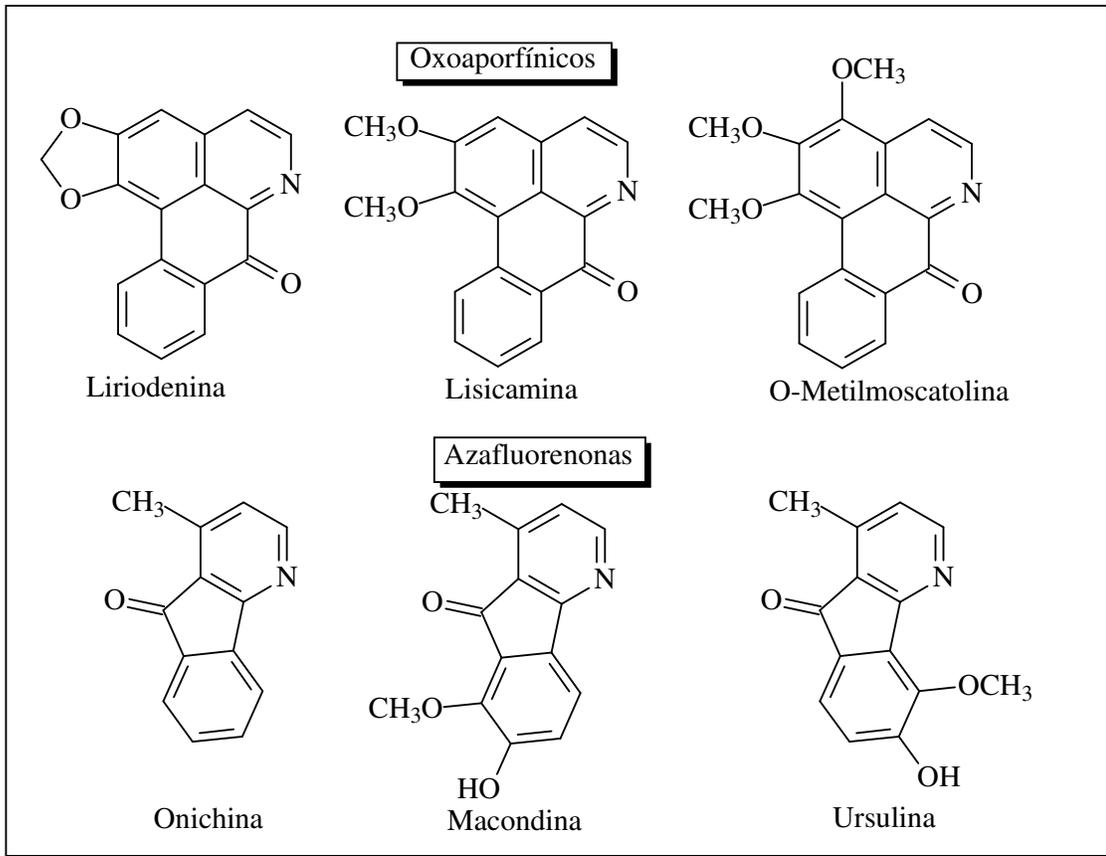


Figura 5. Alcalóides do tipo oxoaporfínicos e azafluorenonas descritos para o gênero *Unonopsis*.

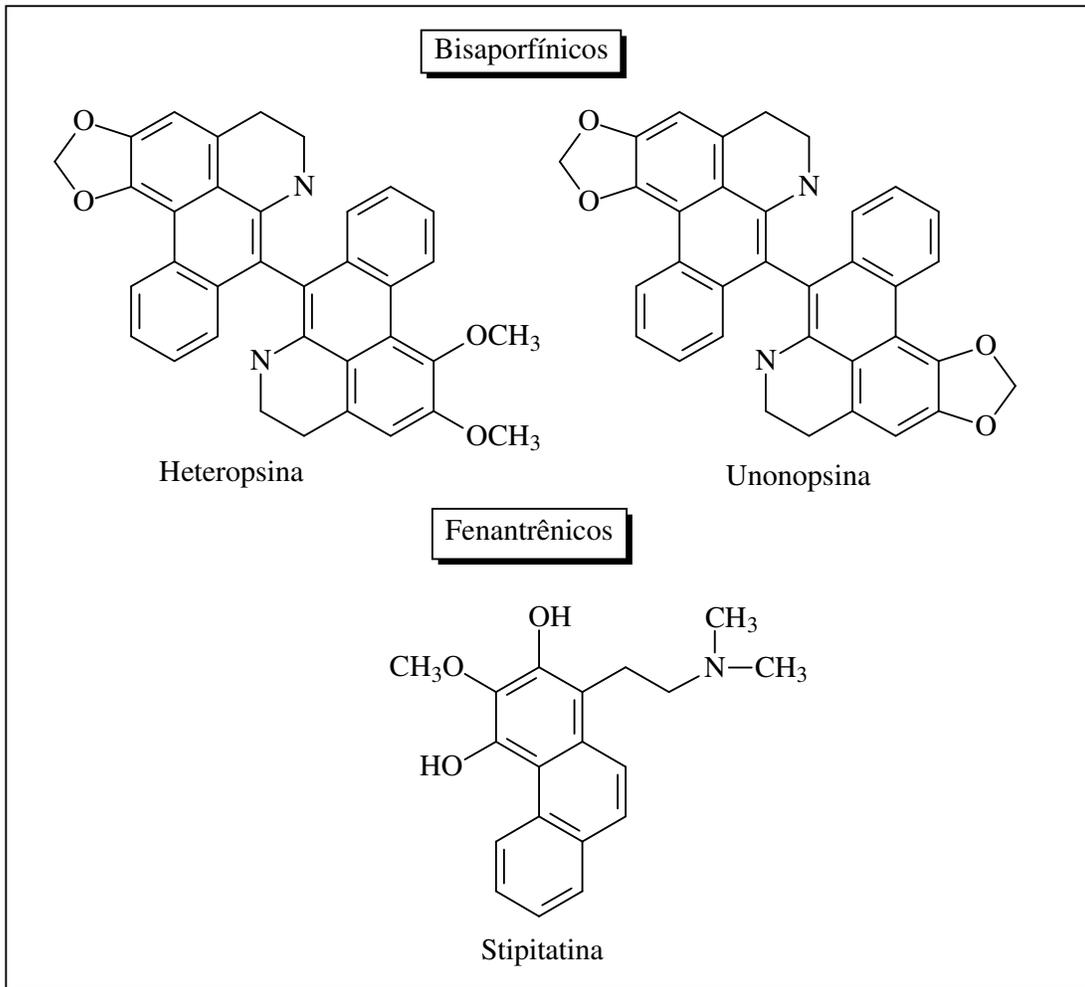


Figura 6. Alcalóides do tipo bisaporfínicos e fantrênicos descritos para o gênero Unonopsis.

Tabela 2: Alcalóides aporfínicos e derivados isolados de espécies do gênero *Unonopsis*

Espécies	Alcalóide	Referência
<i>U. spectabilis</i>	Lisicamina, Liriodenina, Onichina, 6-Hidroxionichina, Ursulina, Macondina, Isoursulina, , Heteropsina e Urabaina	Laprevote et al., 1987; Laprevote et al., 1988
<i>U. guatterioides</i>	Asimilobina, Anonaina, Lisicamina, Liriodenina e Norushinsunina	Eltohami et al., 1984; Guinaudeau et al., 1988
<i>U. stipitata</i>	Argentínina, Stiptatina e Talictuberine	Guinaudeau et al., 1988
<i>U. pacifica</i>	Liriodenina, Norushinsunina, Norcepharadiona A, unonopsina e Heteropsina	Arango et al., 1988
<i>U. butchienii</i>	O-metilmoscatolina, Lisicamina , Liriodenina e Unonopsina	Waechter et al., 1999
<i>U. lindimanii</i>	Asimilobina, Anonaina, Lisicamina Liriodenina, Unonopsina e 5,8-dimetóxi-7-hidróxi-1-metil-4-azafluoren-9-ona	Siqueira et al., 1998; Silva et al., 2007; Yoshida, 2007

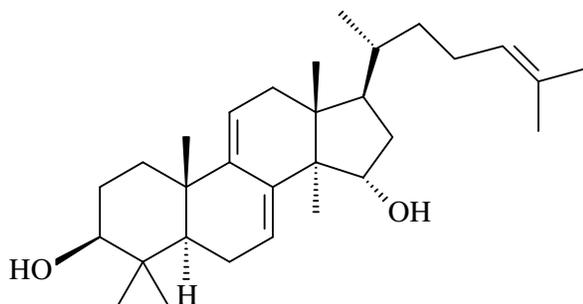


Figura 7. Polycarpol, triterpeno tetracíclico do tipo lanostano.

2.3 Alcalóides

Alcalóides são substâncias nitrogenadas geralmente farmacologicamente ativos, derivados biossinteticamente de aminoácidos, sendo frequentemente encontrados em plantas superiores. Representam uma das mais difundidas classes de substâncias (Stévigny et al., 2005). A origem biossintética dos alcalóides isoquinolínicos inicia pela rota do ácido chiquímico a partir de carboidratos. O ácido chiquímico é responsável pela formação do aminoácido aromático L-tirosina, sendo esse o principal precursor dos alcalóides isoquinolínicos. Todos os alcalóides isoquinolínicos são derivados dos benzilisoquinolínicos. A formação biossintética desse esqueleto tem início com a reação de condensação de duas unidades fenólicas, a dopamina e o 3,4-di-hidróxi-fenilacetaldeído, sendo ambas derivadas do aminoácido L-tirosina. A Figura 8 apresenta a rota biossintética a partir de L-tirosina, para a formação da estrutura benzilisoquinolínica (Dewick, 2009).

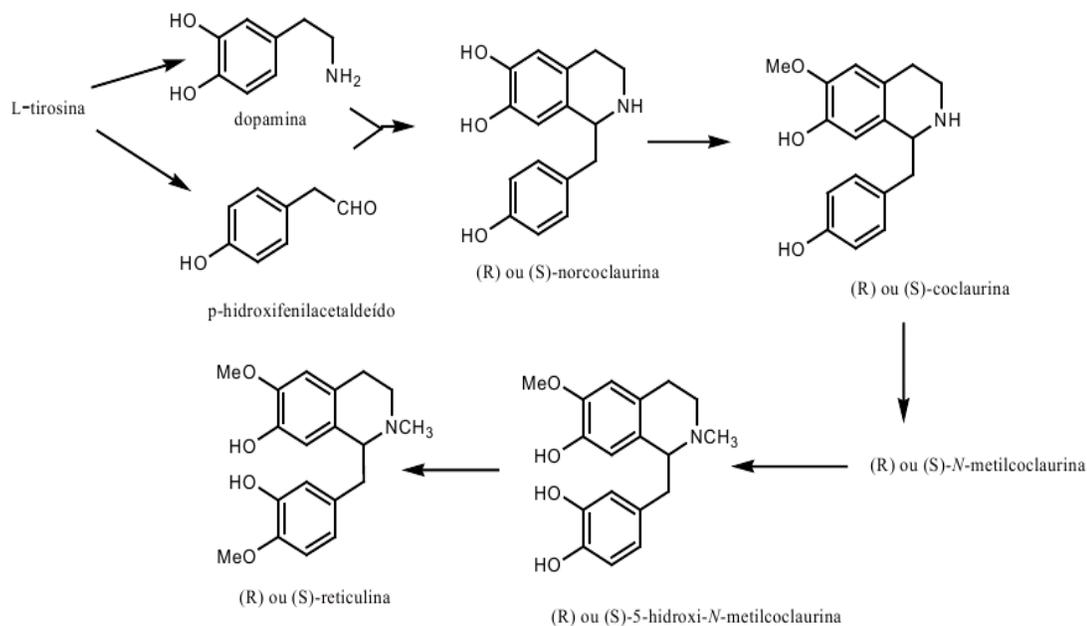


Figura 8. Rota biossintética para formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir da L-tirosina

Fonte: Dewick, 2009

Os alcalóides isoquinolínicos do tipo benzilisoquinolínico são frequentemente encontrados na família Annonaceae, sendo rotineiramente subdivididos nas seguintes classes: berberinas, aporfínicos, oxoaporfínicos, fenantrenos, cularinas, morfinandienonas, isoquinolonas e os bisbenzilisoquinolínicos. A Figura 9 apresenta a origem desses alcalóides a partir de seu provável precursor, a reticulina, constituinte de várias espécies do gênero *Annona* (Rinaldi, 2007).

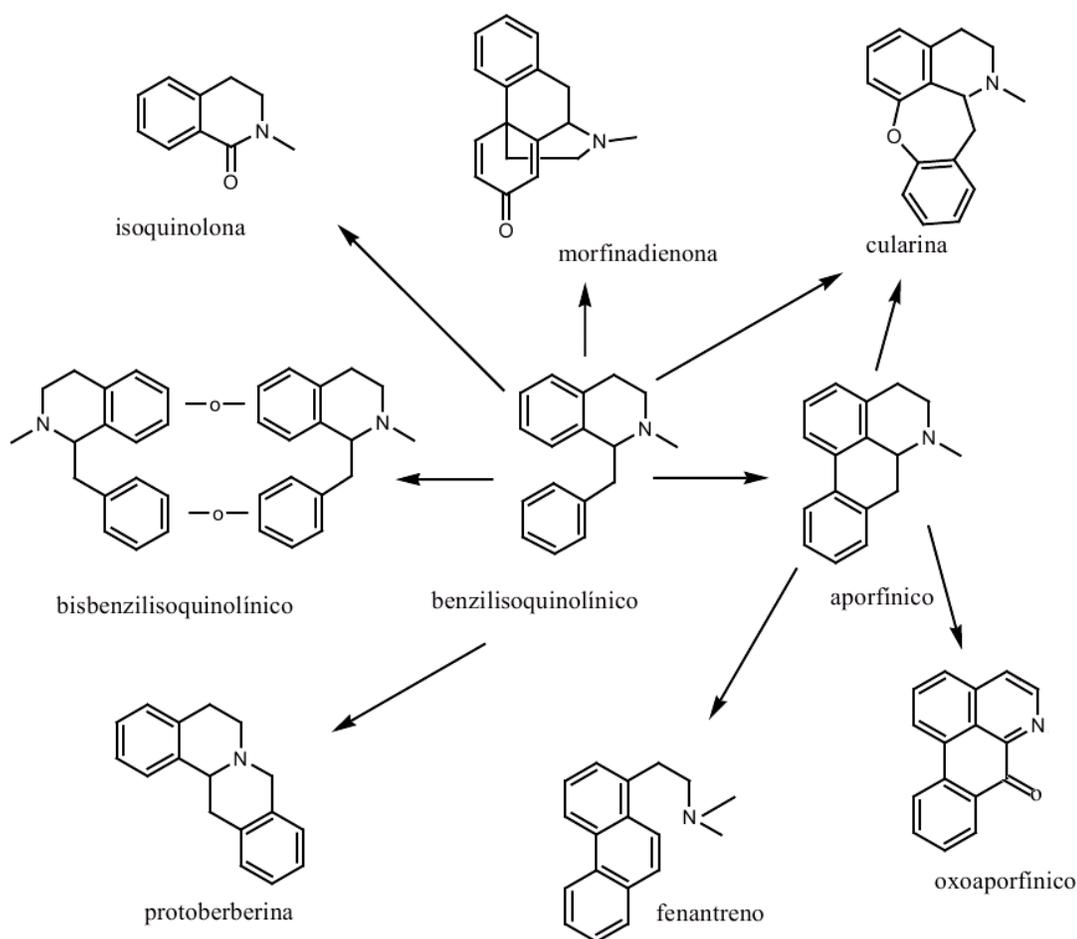


Figura 9. Origem biossintética dos alcalóides isoquinolínicos.

Fonte: Rinaldi, 2007

2.3.1 Alcalóides aporfínicos

Alcalóides aporfínicos caracterizam-se por uma estrutura contendo quatro anéis, sendo os anéis A e D aromáticos e o anel B heterocíclico (Figura 10a). Os alcalóides oxoaporfínicos, derivados dos aporfínicos (Figura 10b), possuem uma estrutura totalmente aromática e um grupo carboníla na posição C-7. Diferentes alcalóides oxoaporfínicos tem sido descritos em função do padrão de substituição encontrado no anel (Figura 10). Esta classe de alcalóide, derivada do esqueleto isoquinolínico, apesar de bastante presente na família Annonaceae, tem sido localizada em outras famílias (Silva et al.,2007).

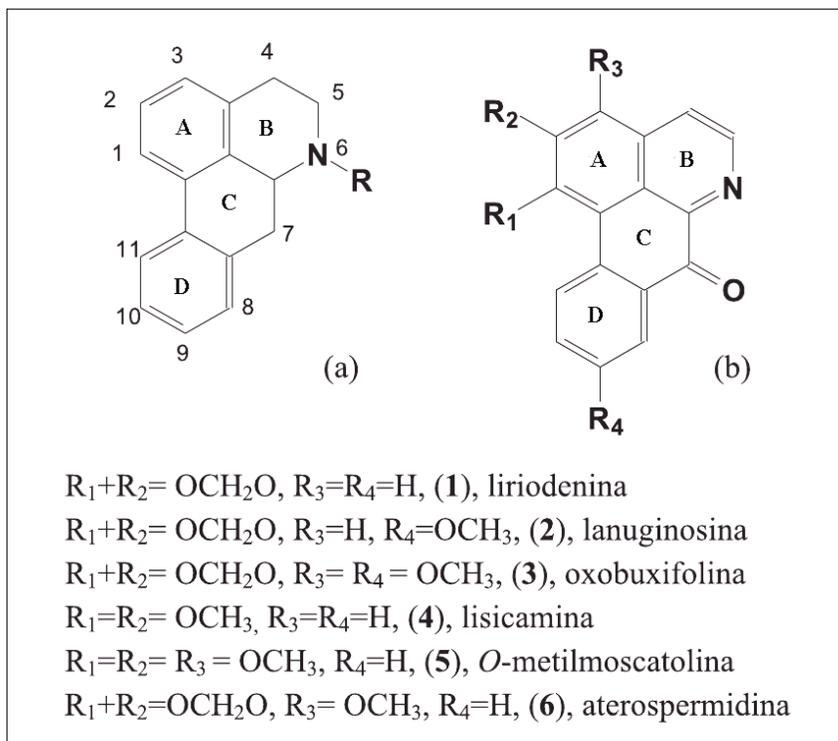


Figura 10. Alguns alcalóides oxoaporfínicos descritos por silva e colaboradores (2007). (a) Esqueleto aporfínico. (b) Esqueleto oxaporfínico.

Fonte: Silva et al., 2007

2.3.1.1 Atividades biológicas de alcalóides aporfínicos

Diversas atividades biológicas são descritas para os alcalóides aporfínicos e derivados com destaque para a citotóxica (Silva et al., 2007). Todavia o potencial antiprotozoário desta classe de substâncias vem sendo cada vez mais estudada e apresentando bons resultados, principalmente quanto à atividade antileishmania (Waechter et al., 1999; Mishra et al., 2008;). As linhagens de protozoários mais avaliadas são as formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* (Bacab & Rodriguez, 2001; Rocha et al., 2005).

2.4 A espécie *Unonopsis guatterioides* (A. D.C.) R. E. Fr.

A espécie *U. guatterioides* é constituída de arbustos e árvores que podem atingir 10 metros de altura e aproximadamente 20 centímetros de diâmetro. Sua distribuição ocorre principalmente na Região Amazônica da Colômbia, Venezuela, Peru e Bolívia e em todo o Brasil (Figura 11). No Brasil a *U. guatterioides* é popularmente conhecida como: Araticum, Ariticum, Ata do igapó, Atinha, Cundurú, Envira, Envira da várzea, Envira do caiso, Envira do igapó, Envira preta, Envira preta do igapó, Envira surucucu, Envira surucucu da várzea, Invira, Mejo de porco, Mutambi, Muxiba, Pindaíba, Pindaíba branca e Pindaíba preta (Mass et al., 2007). Quanto à sua composição química, inicialmente foi relatado o isolamento de policarpol das raízes sendo posteriormente identificado por CCD das cascas por Touche e colaboradores (1981). Posteriormente, através de uma abordagem química constatou-se a presença de alcalóides por Forgacs e colaboradores (1983). Um ano mais tarde, em um simpósio internacional de química e biologia de alcalóides isoquinolínicos, realizado em Londres, houve a divulgação do isolamento de alguns alcalóides do tipo aporfínicos e derivados (Eltohami et al., 1984).

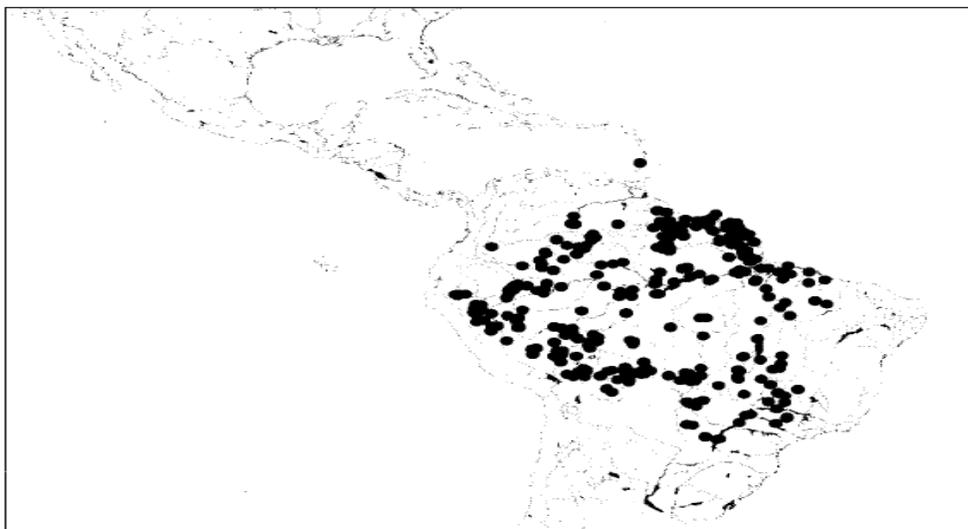


Figura 11. Distribuição de *Unonopsis guatterioides* (A. DC.) R. E. Fr

Fonte: Mass et al., 2007

2.5 A espécie *Unonopsis duckei* R. E. Fr.

Esta espécie é constituída exclusivamente de árvores que chegam a ter 30 metros de altura com aproximadamente 25 centímetros de diâmetro. Sua distribuição em território brasileiro fica restrita aos estados do Amazonas, Pará e Rondônia (Mass et al., 2007)(Figura 12). No estado do Amazonas, além da Reserva Florestal Adolpho Ducke, é possível coletar indivíduos no Distrito Agropecuário da Suframa e no município de Presidente Figueiredo (Ribeiro et al., 1999; Silva & Silva, 2006; Silva et al., 2008). *Unonopsis duckei* é normalmente encontrada em áreas de florestas não inundadas, em solos mais argilosos ou arenosos. No Brasil é conhecida como: Envira, Envira cascuda, Envira preta, Envira surucucu e Envireira. (Mass et al., 2007). Não existem estudos relativos à sua composição química.



Figura 12. Distribuição geográfica de *Unonopsis duckei* R. E. Fr (■)

Fonte: Mass et al., 2007

2.6 Leishmaniose

A leishmaniose, também conhecida como kalazar indiano, botão do oriente, ferida brava, úlcera de Bauru, uta e úlcera dechiclero, é uma doença tropical, considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como a segunda Protozoonose mais importante em saúde pública, chegando a infectar anualmente dois milhões de pessoas em todo o mundo. No Brasil, a Leishmaniose atinge 19 estados, sendo aproximadamente 90% dos casos humanos referentes à região Nordeste, havendo ainda focos importantes nas regiões Centro-Oeste, Norte e Sudeste. (Rath et al., 2003; Rocha et al., 2005; Gil et. al., 2008).

A leishmaniose é causada por espécies de parasitas protozoários do gênero *Leishmania*. O gênero *Leishmania* pertence biologicamente a um grupo de parasitas flagelados da família Trypanosomatidae, sendo que a maioria das espécies é patogênica (Barata et al., 2000). Segundo Chan-Bacab (2001), os principais reservatórios para esses parasitas têm sido identificados em animais como por exemplo cães, cavalos, roedores, gambás, macacos, tamanduás, etc. (Hepburn, 2000; Gontijo & Carvalho, 2003).

A leishmaniose é uma doença transmitida por vetor, sendo atualmente conhecidos os mosquitos fêmea do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) como principais responsáveis pela transmissão da doença. Estes mosquitos são conhecidos popularmente como birigui, mosquito-palha ou cangalhinha.

Nos seres humanos, a *Leishmania* spp. causa uma variedade de sintomas clínicos e suas manifestações são usadas como base para classificar a doença. De acordo com a OMS as leishmanioses podem ser classificadas em 4 formas clínicas: cutânea ou tegumentar, cutânea difusa ou disseminada, mucocutânea e visceral.

A leishmaniose visceral, também conhecida como kalazar, é a forma clínica mais grave da doença, atingindo órgãos internos, principalmente o fígado, baço e medula óssea. Crianças desnutridas são as principais vítimas desta forma clínica, que chega a ser fatal

quanto não tratada. A leishmaniose cutânea ou tegumentar caracteriza-se por úlceras na pele, desenvolvidas no local da picada do inseto vetor e que pode levar meses para cicatrizar. A leishmaniose cutânea difusa ou disseminada caracteriza-se pela formação de nódulos, placas ou caroços múltiplos especialmente na face, braços e pernas. A leishmaniose mucocutânea causa desfiguração facial, uma consequência de erosões nas mucosas do nariz e da boca (Barata et al., 2000; Chan-Bacab et al., 2001).

2.6.1 Ciclo de vida da *Leishmania* spp.

Durante seu ciclo evolutivo, os protozoários de *Leishmania* spp apresentam duas formas básicas: a promastigota (forma extracelular) e a amastigota (forma intracelular). Os promastigotas são formas alongadas com flagelos na região anterior, medem 16,0 a 40,0 μm de comprimento e 1,5 a 3,0 μm de largura, incluindo o flagelo, o qual geralmente é maior do que o corpo. Os amastigotas são esféricos com flagelo interno rudimentar medindo de 3,0 a 6,5 μm .

A forma promastigota é móvel e vive no intestino do inseto vetor, enquanto as amastigotas são formas arredondadas que infectam células do sistema fagocítico do hospedeiro vertebrado.

A doença é transmitida quando o flebótomo pica um indivíduo infectado ou um hospedeiro e aspira macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou mesmo no tecido. No intestino dos flebotomíneos, essas amastigotas se transformam em promastigotas passando por uma série de formas intermediárias e multiplicam-se ativamente, sendo posteriormente inoculada na pele do próximo hospedeiro quando a fêmea voltar a se alimentar de sangue. Um esquema do ciclo de vida do parasita pode ser encontrado na Figura 13.

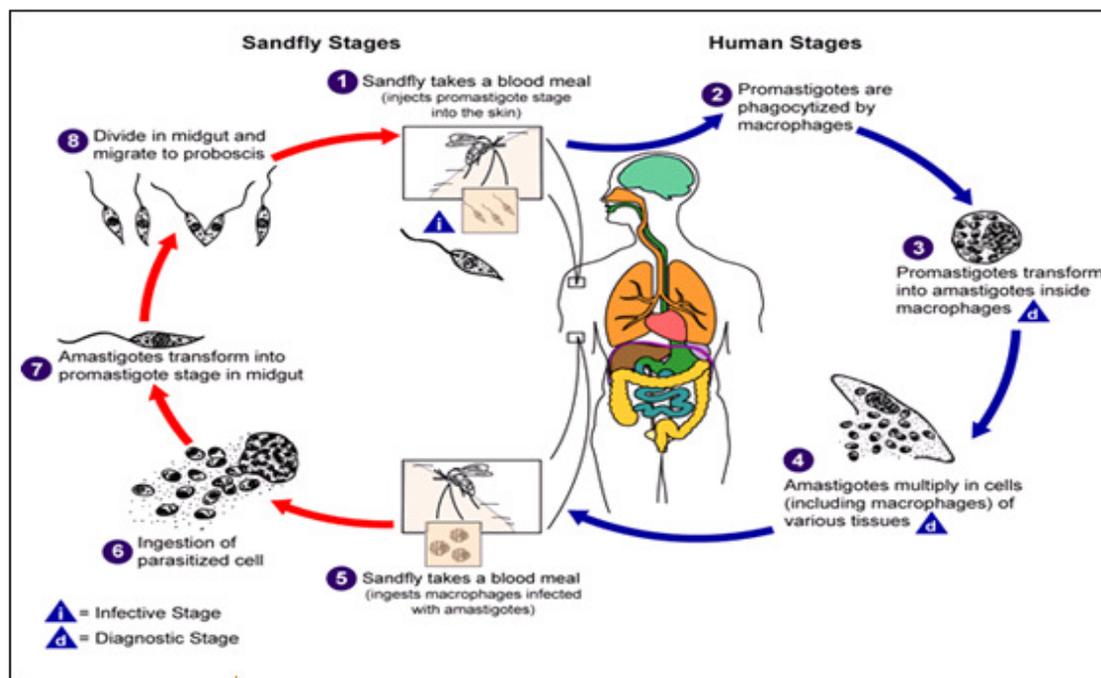


Figura 13. Ciclo de vida da *Leishmania* ssp

Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx.

2.6.2 Tratamento da Leishmaniose

O tratamento da leishmaniose baseia-se no uso em complexos de antimônio trivalentes, como o tartarato antimônio de potássio (Tartarato emético) e pentavalentes, tal como antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime®). Entretanto, devido a cardiotoxicidade e intolerância gastrointestinal que apresentam os antimoniais trivalentes como o Sb (III), os antimoniais pentavalentes do tipo Sb (V), tem encontrado um maior uso terapêutico. Outros problemas associados a estes tipos de medicamentos são: dor no local da aplicação e em alguns casos insuficiência renal e hepática (Chan-Bacab et al., 2001; Gil et al., 2008).

Considerando os efeitos colaterais dos tratamentos e a ausência de vacinas para leishmaniose, há urgência na busca de novos fármacos dentre as quais se incluem os fitoterápicos. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para a humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral,

como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (Chan-Bacab et al., 2001). Muitos destes vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos terpenos, quinolonas, saponinas, lignanas, chalconas, flavonóides, glicosídeos, acetogeninas, lactonas sesquiterpênicas, alcalóides, etc. (Rocha et al., 2005; Gil et al., 2008). Como exemplo, o alcalóide unonopsina, isolado de *Unonopsis buchtienii* apresentou elevada atividade contra a forma promastigota de *Leishmania donovani* (Mishra et al., 2009).

2.7 Perfil químico

A classificação taxonômica de espécies vegetais tem encontrado várias barreiras, podendo-se destacar o pequeno número de especialistas e limitações próprias de classificação morfológica (Souza, 2005). Como exemplo desta dificuldade de classificação, podemos observar a quantidade de tentativas para posicionar o gênero *Unonopsis* dentro da família Annonaceae, bem como a dificuldade de classificar algumas espécies do gênero *Unonopsis*, como é o caso da *Unonopsis guatterioides* (Mass et al., 2007). Propostas para classificação de plantas a partir de perfis de determinadas classes específicas de metabólitos secundários tem sido base de agrupamentos quimiotaxonômicos (Mongrand et al., 2001; Skaltsa et al., 2001).

A caracterização de alcalóides em matriz biológica através de técnicas espectrométricas é uma prática que já vem sendo desenvolvida há bastante tempo (Rouch & Cooks, 1984). Recentemente Koulman et al. (2007) analisaram alcalóides produzidos por fungos endofíticos em matriz vegetal através de infusão direta em espectrômetro de massas do tipo *ion trap*, apresentando resultados satisfatórios quanto à caracterização destas substâncias, mesmo em baixas concentrações. Enquanto que Stévigny et al. (2004) estudando o padrão de fragmentação de alcalóides aporfínicos conseguiram um avanço significativo na caracterização desta classe de substâncias, bem como na determinação da natureza dos grupos substituintes.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral:

Investigar o perfil químico das frações alcaloídicas das folhas, galhos e cascas dos tronco das espécies *Unonopsis duckei* e *Unonopsis guatterioides* por meio de espectrometria de massas e avaliar seu perfil biológico com vistas à obtenção de frações/estruturas promissoras em atividade leishmanicida.

3.2 Específicos:

- Caracterizar dentro das frações alcaloídicas de *Unonopsis duckei* e *Unonopsis guatterioides* os principais alcalóides aporfínicos e derivados por meio de espectrometria de massas.
- Investigar a existência de alcalóides aporfínicos e derivados ainda não identificados no gênero *Unonopsis* através da análise de perfil químico de *Unonopsis duckei*.
- Confirmar a classificação quimiotaxonômica através da análise do perfil químico das frações alcaloídicas de *Unonopsis duckei* e *Unonopsis guatterioides*, em comparação com dados de espécies do gênero *Unonopsis* previamente estudadas.
- Investigar fitoquimicamente as frações alcaloídicas que se mostrarem mais promissoras frente a atividade leishmanicida, bem como as que apresentarem alcalóides inéditos ao gênero.
- Analisar as frações alcaloídicas das folhas, galhos e cascas do tronco de *Unonopsis duckei* e *Unonopsis guatterioides* quanto à sua atividade leishmanicida.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Análises cromatográficas

4.1.1 Cromatografia em camada delgada analítica (CCDA)

As análises em CCD foram realizadas em cromatoplaças pré-fabricadas de sílica gel TLC de 0,2 mm de espessura e indicador de fluorescência F254, da Sorbent Technologies. A detecção preliminar dos compostos foi feita por irradiação com lâmpada ultravioleta (UV) (254 e 365 nm) e posterior revelação com reagente de Dragendorff para frações alcaloídicas e revelação com vanilina sulfúrica para as demais frações.

4.1.2 Cromatografia em coluna (CC)

Foram utilizadas colunas de vidro, cujo comprimento e diâmetro variaram de acordo com a quantidade de amostras a serem analisadas. As separações cromatográficas foram realizadas utilizando-se como suporte sílica gel 60 (70-230 mesh) – Silicycle[®]. Como fase móvel foram utilizados os solventes hexano, acetato de etila e metanol.

4.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência analítica (CLAE)

Para a análise exploratória utilizou-se um cromatógrafo Surveyor[®] (Thermo Scientific), operando simultaneamente com um detector PDA e um detector de MS. Em escala analítica utilizaram-se, durante o desenvolvimento do método as colunas Luna Phenyl-hexyl, (5µm, tamanho 150 x 4,60 mm) e uma coluna Luna C18, (5µm, tamanho 150 x 4,60 mm), ambas da Phenomenex. As fases móveis utilizadas foram metanol e água.

4.1.2 Cromatografia líquida de alta eficiência semi-preparativa (CLAE-Semi-prep.)

Para o isolamento dos metabólitos secundários de interesse foi utilizado um cromatógrafo Shimadzu[®] operando com bomba modelo LC-6AD e detector de UV/VIS modelo SPD-20^a no comprimento de onda de 287 nm. A fase estacionária utilizada foi uma Luna Phenyl-hexyl, (5µm, tamanho 250 x 10,00 mm) da Phenomenex. A fase móvel utilizada foi. MeOH/H₂O (6:4) (v/v) em modo isocrático de eluição com fluxo de 7 ml/min.

4.2 Solventes e reagentes reveladores

4.2.1 Solventes

Foram utilizados solventes grau P. A. (Nuclear[®]) para as análises cromatográficas em modo normal de eluição, bem como para o preparo dos extratos. Para realização das análises cromatográficas em modo reverso de eluição utilizaram-se solventes grau HPLC. Para a obtenção dos espectros de RMN foram utilizados solventes deuterados.

4.2.2 Reagentes reveladores

Reagente de Dragendorff (modificação de Munier) (MUNIER, 1953 apud Merck, 1971): Solução A: 1,7 g de nitrato de bismuto III e 20,0 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada. Solução B: 16,0g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais destas soluções constitui a solução estoque. Para borrifação das cromatoplas, adicionou-se 10,0 g de ácido tartárico, dissolvidos em 50 mL de água destilada. Após borrifação das placas cromatográficas os *spots* referentes as substâncias alcaloídicas apresentaram coloração laranja.

4.3 Métodos espectroscópicos/espectrométricos

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos pelo uso dos seguintes aparelhos: A) Bruker ARX-200 MHz (4,7 T), operando a 200 MHz para RMN de ¹H e 50

MHz para RMN de ^{13}C ; B) Bruker Avance DRX-400 MHz (9,4 T), operando a 400 MHz para RMN de ^1H e 100 MHz e 400 MHz para HSQC e HMBC, UFPR; C) Bruker ULTRASHIELD Plus-600 MHz (14,1 T), operando a 600 MHz para RMN de ^1H e 150 MHz e 600 MHz para HSQC e HMBC, DQ/UFSCar. As amostras foram solubilizadas em clorofórmio (CDCl_3) ou metanol (CD_3OD). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) registradas em Hertz (Hz).

Os espectros de massas foram registrados em espectrômetros do tipo *Íon-trap* modelo LCQ *Fleet* (Thermo scientific) operando com fonte de *eletronspray* (ESI) e triplo-quadrupolo modelo TSQ *Quantum Access* operando com fonte de ionização química à pressão atmosférica (APCI). As análises de espectrometria de massas foram realizadas no Laboratório de Espectrometria de Massas e Cromatografia do DQ/UFAM. Os experimentos de GC/MS foram realizados em equipamentos GC-IT-MS modelo Saturn 2100D, Varian, do Instituto de Química da UNICAMP e GC-EM-QP5000, Shimazu, do Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.

4.4 Outros materiais e equipamentos

- Estufa de circulação de ar: Deleo, tipo A6 sefaf
- Evaporador rotatório: Heidolph, tipo Heizbad OB
- Balança analítica: Tecnal, classe 1 (máx. 210 g – mín. 100 mg)
- Ultrason: Unique, modelo USC-2800
- Pipeta automática: Gilson®
- Moinho: Modelo Willey com quatro facas;
- Lâmpada ultravioleta (UV) (254 e 365 nm)
- Ácido clorídrico P. A.
- Hidróxido de amônio P. A.

4.5 Material Botânico

4.5.1 Coleta e identificação

Folhas, galhos e casca do tronco de *Unonopsis guatterioides* foram coletados no Campus da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em janeiro de 2010 (Figura 14). A espécie foi identificada pelo professor Dr. Antônio Carlos Webber do Departamento de Biologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFAM e a exsicata da espécie com material fértil foi depositada no herbário da UFAM sob o número de registro 8249. Folhas, galhos e cascas do tronco de *Unonopsis duckei* foram coletados na Reserva Florestal Adolpho Ducke (Km 26 da rodovia AM-010), de um indivíduo previamente marcado e identificado durante a execução do Projeto Flora da Reserva Ducke.

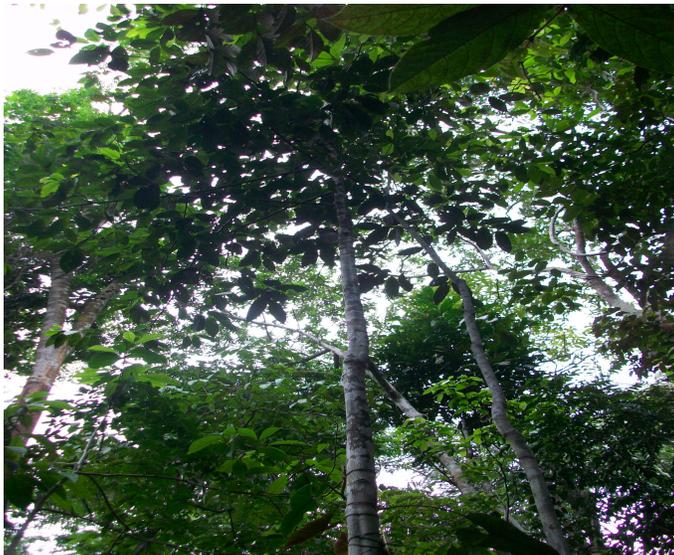


Figura 14. Espécime de *U. guatterioides* coletado no campus da UFAM em janeiro de 2010.

4.5.2 Secagem e moagem

As diferentes partes coletadas das plantas foram secas em uma estufa de circulação de ar à 50 °C durante dois dias, sendo, em seguida, trituradas em moinho de quatro facas e pesadas.

4.5.3 Obtenção dos extratos brutos

O material moído foi submetido à extração a frio, sendo macerado três vezes com hexano, com renovação do solvente em intervalo de três dias, sendo posteriormente extraído exaustivamente com metanol num procedimento similar. A torta remanescente foi desprezada. O processo de preparo dos extratos pode ser encontrado na Figura 15. Todos os extratos foram obtidos após a eliminação do solvente em evaporador rotatório sob pressão reduzida em temperatura de até 50 °C e, em seguida, secos em dessecador. Após completa secagem o rendimento de cada extrato por espécie foi calculado (Tabela 3).

Tabela 3. Rendimento dos extratos brutos das duas espécies

Espécies	Parte da planta (g)	Extratos hexânicos	Rendimento aproximado(%)	Extratos metanólicos	Rendimento (%)
<i>U. guatterioides</i>	F. (373,3 g)	13,0998 g	3,5	44,4618 g	11,9
	G. (630,9 g)	1,9811g	0,3	19,0002 g	3,0
	C. (503,9 g)	3,8561g	0,7	27,7798 g	5,5
<i>U. duckei</i>	F. (988,9 g)	7,3489 g	0,7	22,7235 g	2,2
	G. (1197,7 g)	2,1842 g	0,1	21,5653g	1,8
	C. (766,3 g)	0,9084 g	0,1	17,6387 g	2,3

F – Folhas, G- Galhos e C- Cascas do tronco

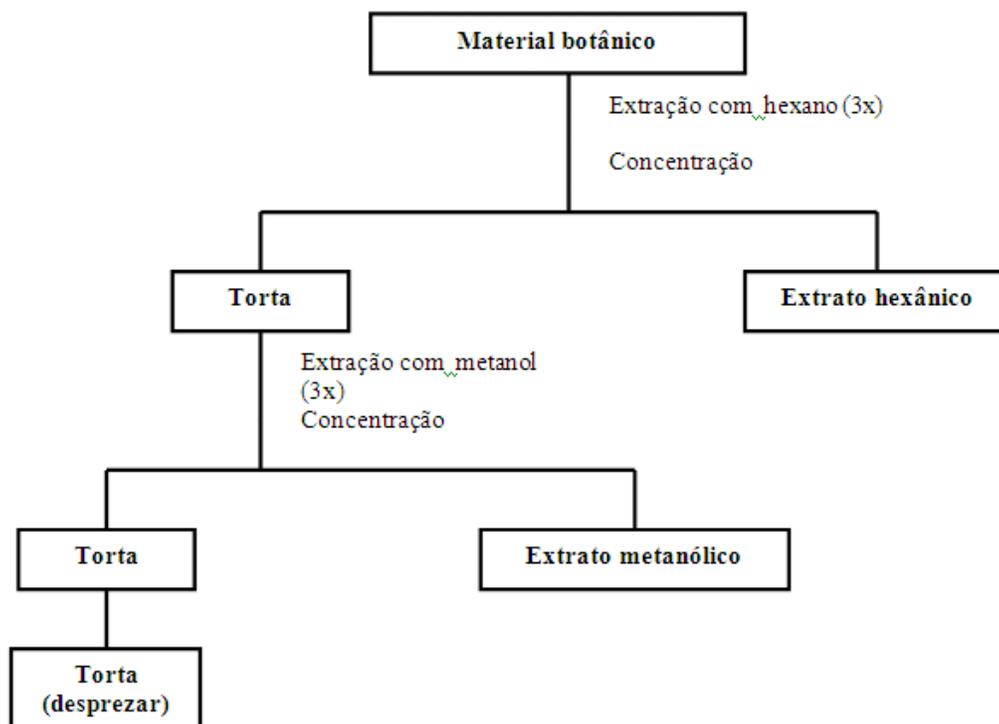


Figura 15. Fluxograma para obtenção dos extatos brutos de *U. guatterioides* e *U. duckei*.

4.6 Extrato hexânico das cascas de *Unonopsis guatterioides* (EHGC)

Durante o processo de concentração do extrato hexânico das cascas de *Unonopsis guatterioides* observou-se a formação de precipitado amarelo, conforme ilustrado na Figura 16. Este precipitado foi purificado através de sucessivas lavagens com hexano e recristalização utilizando acetato de etila. O composto obtido foi analisado por CCDA utilizando vanilina sulfúrica como revelador (Figura 17). A presença desta substância, inicialmente nomeada como EHGCS1 foi decisiva para a escolha deste extrato como material de partida para fracionamento por meios cromatográficos.



Figura 16. Formação de precipitado durante o processo de concentração do EHGC.

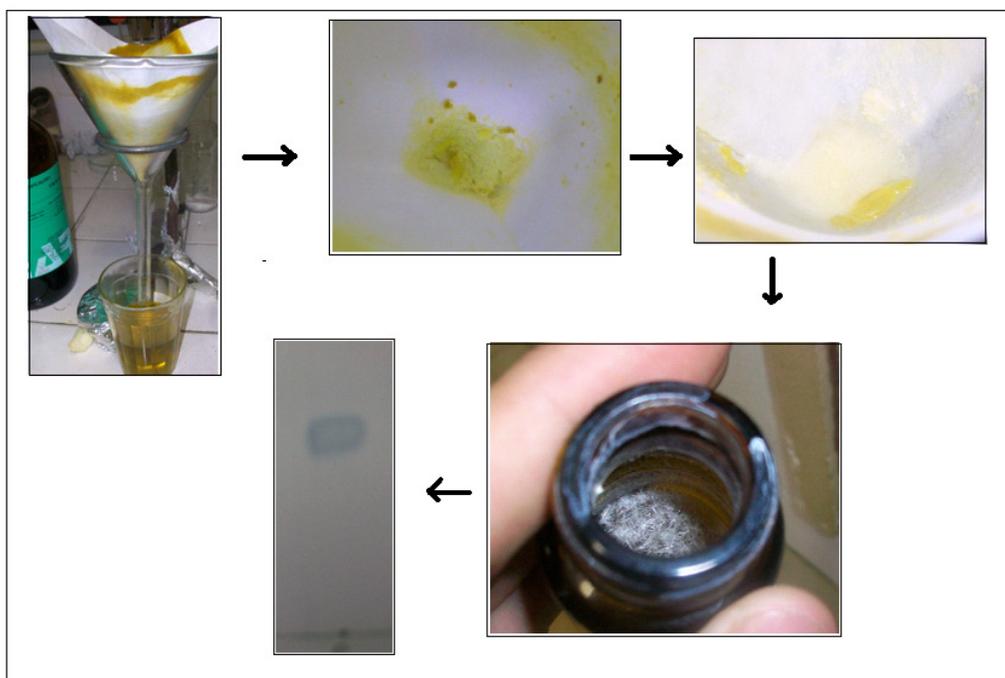


Figura 17. Fluxograma mostrando a purificação do precipitado do EHGC.

4.6.1 Fracionamento do extrato hexânico das cascas de *U. guatterioides* (EHGC)

O extrato hexânico, 3,6651 g, foi inicialmente fracionado em coluna filtrante (funil de separação de 250 mL), usando gel de sílica (70-230 *Mesh-Silicycle*[®]) como adsorvente e solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4: Solventes utilizados no fracionamento de EHGC.

Fração	Eluente	Volume (mL)
1	Hexano	300
2	Hexano/Acetato de etila 9:1	350
3	Hexano/Acetato de etila 6:4	500
4	Acetato de etila	400
5	Metanol	400

4.6.1.1 Análise por CCDA das frações 1-5 obtidas na coluna filtrante.

A análise por CCDA revelou uma boa separação entre as frações 2, 3 e 4, sendo reunidas as frações 1-2 e 4-5 (Figura 18). A fração 3 (EHGC-F3) por apresentar um bom rendimento em massa foi selecionada para ser fracionada em coluna aberta.

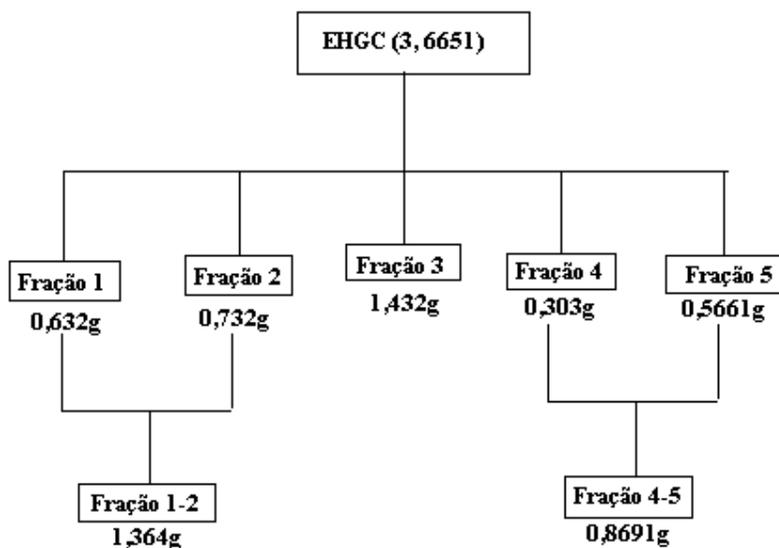


Figura 18. Reunião das frações da coluna filtrante.

4.6.2 Fracionamento em coluna aberta de EHGC-F3

Um total de 1,4 g provenientes da fração 3 (EHGC-F3) foi novamente fracionada em coluna de vidro aberta (24 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro) usando gel de sílica (70-230 *Mesh-Silicycle*[®]) como fase estacionária e solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade, hexano, acetato de etila e metanol, obtendo-se 80 novas frações (EHGC-F3-1 à EHGC-F3-80).

4.6.2.1 Análise por CCDA das frações 1-80

Após a avaliação por CCDA das frações resultantes do fracionamento de EHGC-F3, as seguintes frações foram reagrupadas: 1-11 (EHGC-F3-111), 12-20 (EHGC-F3-1220), 21-33 (EHGC-F3-2133), 34-55 (EHGC-F3-3455), 56-65 (EHGC-F3-5665), 66-75 (EHGC-F3-6675) e 76-80 (EHGC-F3-7680) (Figura 19). A fração 21-33 (EHGC-F3-2133) apresentou-se como um sólido cristalino, sendo encaminhado para análise por RMN. Comparando-se a amostra EHGC-S1 através de CCDA com as frações reunidas, pôde-se observar sua predominância na fração 34-55 (EHGC-F3-3455).

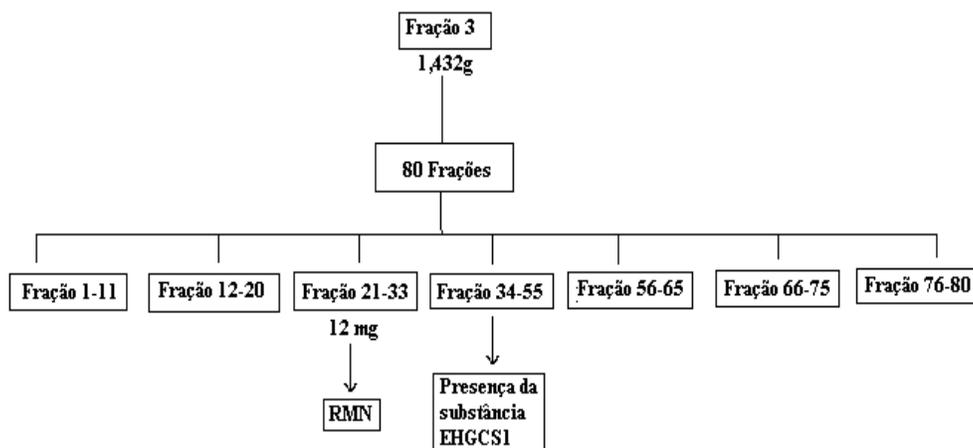


Figura 19. Reunião das frações resultantes da coluna aberta de EHGC-F3.

4.7 Fracionamento do extrato hexânico dos galhos de *U. guatteroides* (EHGG).

Do extrato hexânico dos galhos de *U. guatteroides*, 1,8 g foi fracionado em coluna aberta (15 cm de altura e 2 cm de diâmetro) usando gel de sílica (70-230 *Mesh-Silicycle*[®]) como adsorvente e solventes em ordem crescente de polaridade entre hexano, acetato de etila e metanol, obtendo-se 19 frações (EHGG-1 à EHGG-19)..

4.7.1 Análise por CCDA das frações 1-19

Após análise por CCDA, reuniram-se as frações de 1 à 5 (EHGG-15) e 8 à 19 (EHGG-819) (Figura 20). A fração 6 (EHGG-6) apresentou-se como um sólido amorfo e a fração 7 (EHGG-7) como um sólido cristalino, sendo ambos encaminhados para análises de RMN. A substância EHGG-7 e a substância EHGC-F3-2133 apresentaram o mesmo R_f quando analisadas por CCDA.

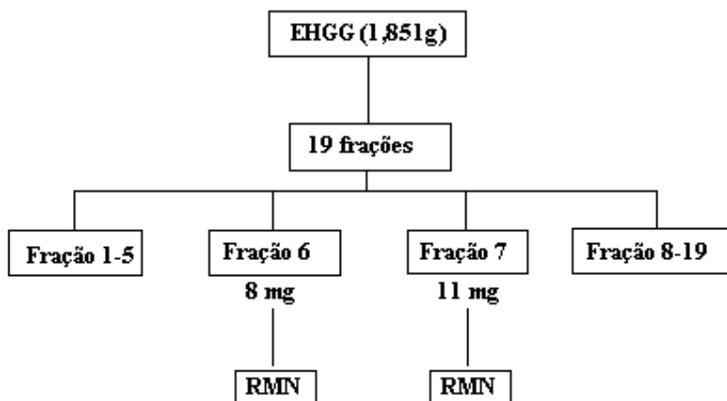


Figura 20: Reunião das frações resultantes da coluna aberta EHGG.

4.8 Extrato hexânico das cascas e galhos de *U. duckei*

Durante o processo de concentração do extrato hexânico das cascas e galhos de *U. duckei*, observou-se em ambos os extratos a formação de um precipitado. Estes precipitados amarelos foram purificados através de sucessivas lavagens com hexano e recristalizados em acetato de etila. As substâncias provenientes das cascas e galhos foram nomeadas como EHDCS1 e EHDGS1 respectivamente. Através da comparação por CCDA entre as substâncias EHDCS1, EHDGS1 e a substância EHGCS1, observou-se que todas apresentaram o mesmo R_f , bem como a mesma coloração quando reveladas com vanilina sulfúrica.

4.9 Marcha química para obtenção das frações alcalóidicas

A presença de alcalóides no gênero *Unonopsis* foi confirmada por meio de análise em CCDA usando Dragendorff como revelador. O extrato metanólico das cascas, galhos e folhas de *U. guatterioides* e *U. duckei* foram submetidos à extração ácido-base conforme a metodologia descrita por Costa e colaboradores (2006) (Figura 21).

Resumidamente: uma determinada quantidade do extrato bruto (Tabela 5) foi solubilizada em diclorometano e três vezes extraído (particionado) com uma solução de ácido clorídrico a 3% (v/v), obtendo-se duas novas frações de cada extrato; uma fração aquosa ácida e outra fração diclorometânica neutra. Na sequência, o pH da fração aquosa ácida foi elevado a pH 10 com hidróxido de amônio concentrado. Por último, a solução alcalina foi extraída três vezes com diclorometano, levando a outras duas novas frações, a fração diclorometânica rica em alcalóides, qual foi concentrada em evaporador rotatório à pressão reduzida, e a fração alcalina qual foi desprezada.

Tabela 5. Rendimento obtido das frações alcaloídicas no procedimento de extração ácido/base quais as espécies *U. guatterioides* e *U. duckei* foram submetidas.

Espécies	Parte da planta	Extratos metanólicos	Massa utilizada (g)	Frações alcaloídicas (mg)	Rendimento (%)
<i>U. guatterioides</i>	Folha	EMGF	4,2342	71,9	1,7
	Galhos	EMGG	4,4222	30,9	0,7
	Casca do tronco	EMGC	4,1241	53,6	1,3
<i>U. duckei</i>	Folha	EMDF	4,7686	47,4	0,9
	Galhos	EMDG	4,3090	13,3	0,3
	Casca do tronco	EMDC	4,1970	25,6	0,6

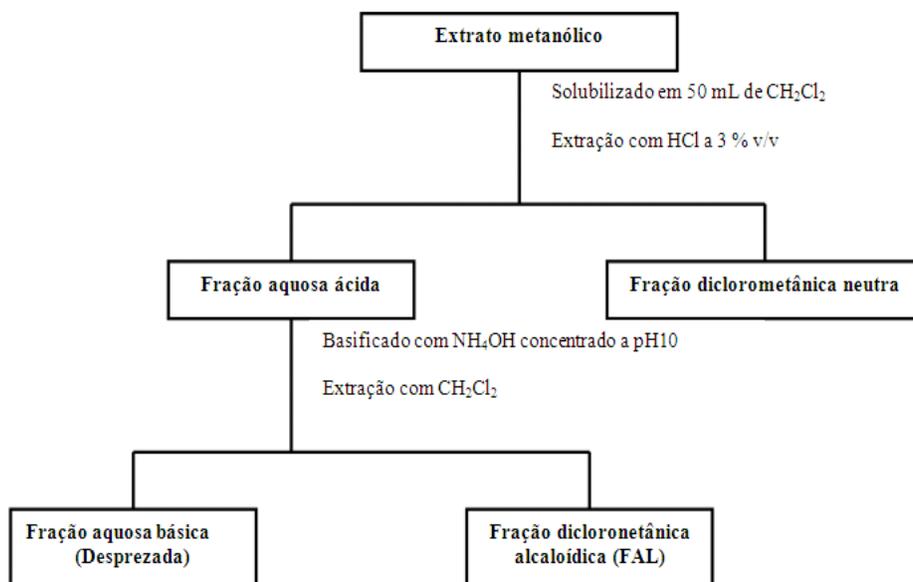


Figura 21. Fluxograma do protocolo de extração ácido/base para alcalóides quais os extratos metanólicos das espécies *U. guatterioides* e *U. duckei* foram submetidos.

4.10 Análises espectrométricas das frações alcaloídicas

Todas as frações alcaloídicas foram analisadas por infusão direta em espectrômetro de massas *ion trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific®), operando com fonte de *eletronspray* e em modo positivo de aquisição. A concentração das amostras foi ajustada a 5 ppm utilizando-se metanol grau HPLC. As condições de fonte foram ajustadas para cada amostra individualmente, sendo o equipamento devidamente limpo entre análises. A faixa de massas analisada entre m/z 200-400, apropriada para análise de alcalóides aporfínicos. Foram aplicadas as chaves de fragmentação propostas por Stévigny et al. (2004) de forma a caracterizar os alcalóides aporfínicos.

4.11 Purificação cromatográfica da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* (FADF)

A análise espectrométrica revelou que a fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* apresentava sinais de alcalóides ainda não reportados no gênero, sendo então encaminhada para CLAE a fim de se desenvolver o melhor método cromatográfico a partir do qual, após escalonamento apropriado, fosse adequado para o isolamento destes compostos em escala semi-preparativa. Para uma melhor resolução cromatográfica, diversos sistemas de eluentes e fases móveis foram testados, sendo o sistema MeOH/H₂O (6:4) em coluna Phenyl-hexyl o mais apropriado para separação em escala semi-preparativa (Figura 22). Após o escalonamento apropriado com ajuste da vazão em escala semi-preparativa, cerca de 150 mg da fração FADF foram solubilizados em 1 ml de metanol (grau HPLC) e injetado utilizando um *looping* de 200 µL. O procedimento foi repetido outras 4 vezes, sendo as frações agrupadas pelo tempo de retenção. Este fracionamento resultou em cinco novas frações (FADF1 à FADF5)(Figura 23), apresentando a primeira fração (t_R 4 min) (FADF1) cristais do tipo agulha. Na sequência, estes cristais foram encaminhados para análises de RMN. A fração 4 (t_R 8 min) (FADF4) quando analisada por infusão direta em Espectrômetro de Massas *ion*

trap, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific®) e por LC/APCI//MS, revelou conter uma mistura de dois alcalóides majoritários, sendo a amostra encaminhada para análises de RMN.

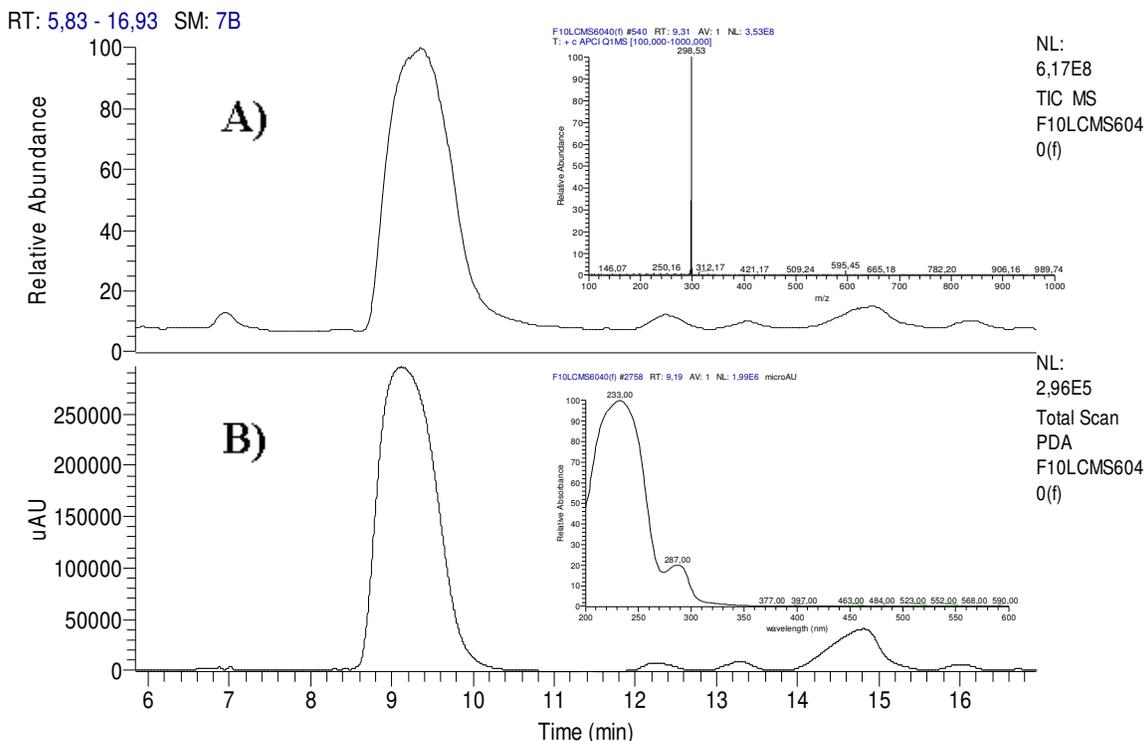


Figura 22. Cromatograma obtido por HPLC/DAD/APCI/MS para a fração alcalóidica das folhas de *U. duckei* (FADF) no modo isocrático de eluição MeOH/H₂O (6:4) (v/v) em coluna de Phenyl-hexyl. A) Cromatograma de íons totais de *m/z* 100-1000; B) Cromatograma com DAD operando na faixa de 200-800 nm.

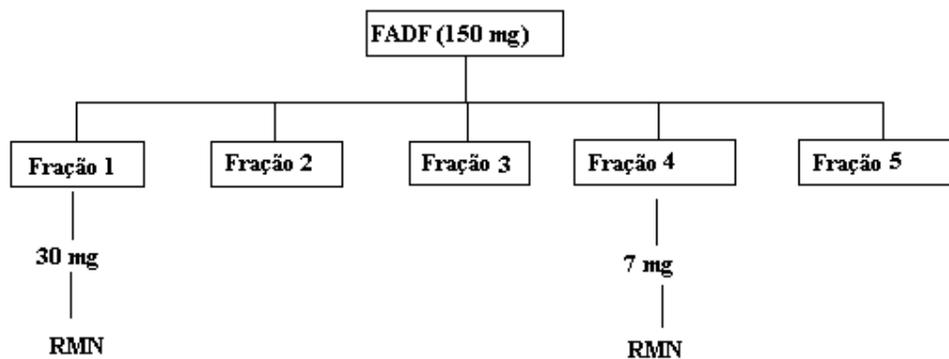


Figura 23. Esquema do fracionamento em escala semi-preparativa da fração alcalóidica das folhas de *U. duckei* (FADF).

4.12 Perfil alcaloídico entre as espécies *U. guatterioides* e *U. duckei*

Os espectros de massas obtidos por varredura de íons totais (m/z 200-400) das frações alcaloídicas das cascas, galhos e folhas das duas espécies foram obtidos através de infusão direta em espectrômetro de massas *ion trap*, modelo LCQ Fleet (Thermo Scientific®), operando com fonte de eletronspray e em modo positivo de aquisição. Os seguintes parâmetros de operação foram utilizados para analisar as frações alcaloídicas das folhas e galhos em ambas as espécies: Spray Voltage: 5 kV; Sheath Gas: 8 arb; Aux Gas: 5 arb; Sweep Gas: 5 arb; Capillary Temp: 175 °C ; Capillary Voltage: 50 V (folhas) e 35 V (galhos); Tube Lens: 120 V; Syringe Pump: 8 $\mu\text{L min}^{-1}$. Destes parâmetros, os de Sheath gás: 5 arb; Capillary Voltage: 45 V, Tube Lens: 115 V e fluxo de infusão: 10 $\mu\text{L min}^{-1}$, foram os únicos modificados para a análise da fração alcaloídica das cascas do tronco. Os espectros foram obtidos e processados através do software Xcalibur 2.07. O perfil espectrométrico das frações alcaloídicas das folhas, galhos e cascas do tronco de *U. duckei* e *U. guatterioides* foram comparados entre si, tentando-se estabelecer uma proximidade química entre as espécies.

4.13 Realização do Ensaio Biológico Leishmanicida

4.13.1 Parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram mantidas a 24 °C em meio de cultura RPMI 1640 contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de gentamicina e suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB).

4.13.2 Atividade leishmanicida in vitro

As análises biológicas foram realizadas no Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais - IPEPATRO pela doutoranda Janaína Paolucci Sales e a técnica Delvânia Marta Ferreira Santos, sob orientação da Dr^a. Izaltina Silva Jardim Cavalli.

Para a avaliação da atividade leishmanicida das frações alcaloídicas e substâncias isoladas, uma quantidade de 5×10^5 promastigotas/mL foram tratadas com 100; 50; 25; 12 e 6 $\mu\text{g/mL}$ das frações alcaloídicas/substâncias por seis dias a 24 °C.

A cada 24 horas, foi realizada a contagem diferencial das formas promastigotas utilizando-se o corante eritrosina B a 0,04% em câmara hemocitométrica de Neubauer em microscópio óptico com aumento de 400X. A Pentamidina (50 $\mu\text{g/mL}$) foi utilizada como droga de referência.

Ensaio com dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,7% foram realizados para controle do solvente dos extratos.

4.13.3 Análise estatística

Os ensaios biológicos foram realizados em duplicata e repetidos duas vezes. Os resultados foram expressos como concentração inibitória para inibição de 50% do crescimento parasitário (CI_{50}), conforme proposto por Schmeda-Hirschman e colaboradores. (1996) e Camacho e colaboradores. (2003).

Os cálculos de CI_{50} foram realizados utilizando modelo de regressão não-linear através da curva dose-resposta de inibição (Log [inibidor] x resposta), descrevendo a relação existente entre as várias concentrações das amostras e o número de leishmania obtidos nas curvas de crescimento.

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Análise espectrométrica das frações alcalóidicas de *U. guatteroides*

5.1.1 Desrepliação dos alcalóides dos galhos de *U. guatteroides*

No espectro de íons totais da fração alcalóidica dos galhos de *U. guatteroides* (Figura 24) foram verificados diversos picos de m/z par, indicando possíveis alcalóides e entre os quais, o mais intenso foi verificado em m/z 266 ($[M+H]^+$). Os fragmentos deste íon foram caracterizados através das chaves de fragmentação de Stévigny et al. (2004).

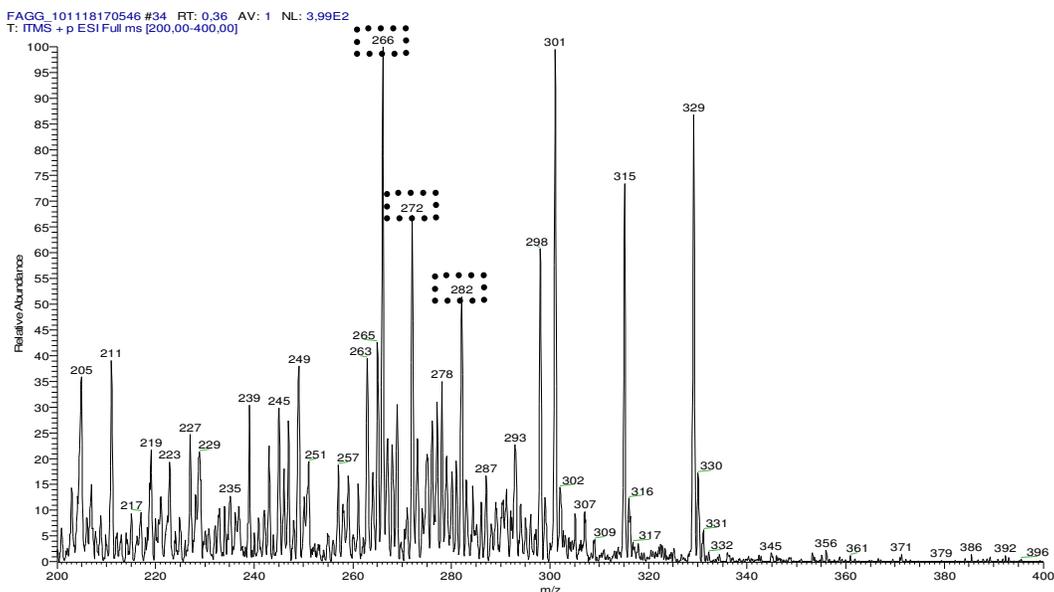


Figura 24. Espectro de massas da fração alcalóidica dos galhos de *U. guatteroides*

A saída do grupo amina e as sucessivas perdas de CH_2O e CO , observadas através da fragmentação até MS^4 (Figura 25), são coerentes com o alcalóide aporfínico anonaína. A perda inicial do fragmento de massa 17 ou 31 Da é fundamental para identificar se ao nitrogênio do grupo amina está ligado um hidrogênio ou uma metila, respectivamente, sendo a perda em sequência dos fragmentos de massa 30 e 28 Da, fundamental para identificar pontes metilenodioxí em estruturas aporfínicas.

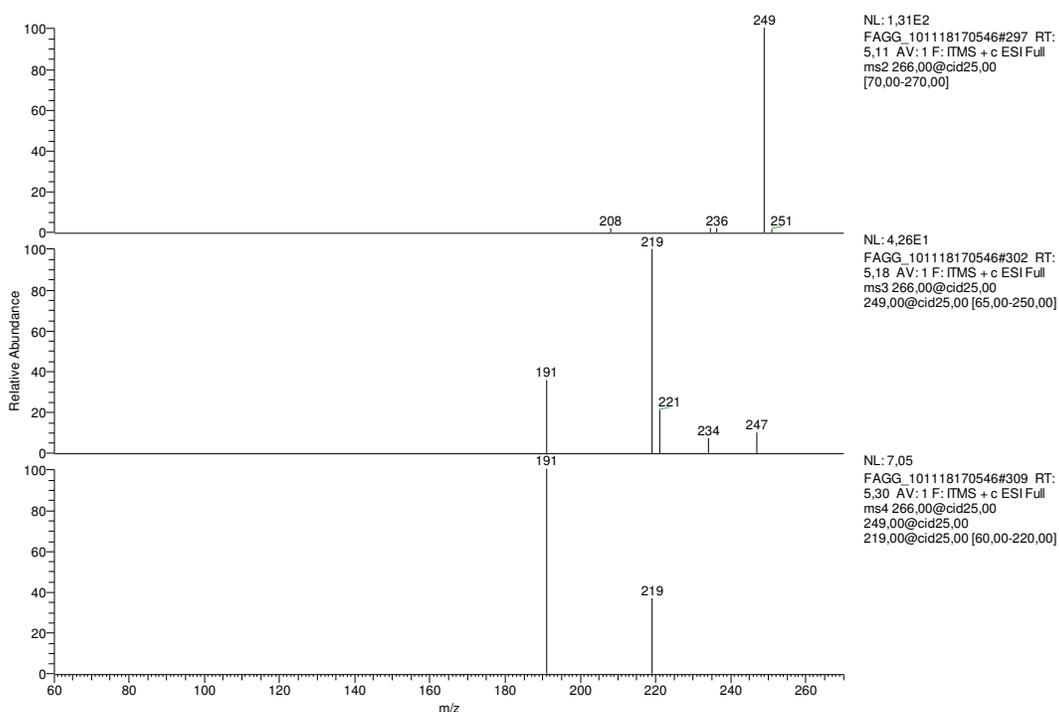


Figura 25. Espectro de massas em MS⁴ do íon *quasi*-molecular da ananaina em m/z 266 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica dos galhos de *U. guatteroides*.

A proposta de fragmentação baseada na aplicação das chaves de fragmentação é apresentada na Figura 26. Ainda através da análise de fragmentação foi possível identificar os alcalóides aporfínicos asimilobina e nornuciferina, cujos íons *quasi*-moleculares foram observados em m/z 268 ([M+H]⁺) e m/z 282 ([M+H]⁺) respectivamente. Por sua vez, os alcalóides oxoaporfínicos liriodenina e liscamina, com íons em m/z 276 ([M+H]⁺) e m/z 292 ([M+H]⁺) respectivamente, foram identificados por comparação dos respectivos espectros de MS² com espectros de padrões. Estudos preliminares sobre a fragmentação destes alcalóides revelaram perdas iniciais, que foram associadas à presença de substituintes metoxila e metilenodioxo nas moléculas. As perdas dos grupos substituintes parecem ser características de derivados aporfínicos contendo o átomo de nitrogênio na forma imino e esqueleto de natureza aromática, o que impossibilita a perda de um grupamento amino.

É importante destacar também que a análise da fragmentação em MSⁿ do íon *quasi*-molecular em m/z 272 ($[M+H]^+$) sugeriu a presença de um alcalóide de natureza não aporfínica. As perdas sucessivas de 15 e 18 Da, atribuídas a grupos periféricos da molécula, aliadas a perda de 28 Da, compatíveis com a presença de um grupo carbonila, estão em acordo com o alcalóide 5,8-dimetóxi-7-hidróxi-1-metil-4-azafluore-9-ona, recentemente isolado de *U. lindimani* (Yoshida et. al., 2006), espécie esta considerada botanicamente próxima à *U. guatteroides* (Mass et al., 2007).

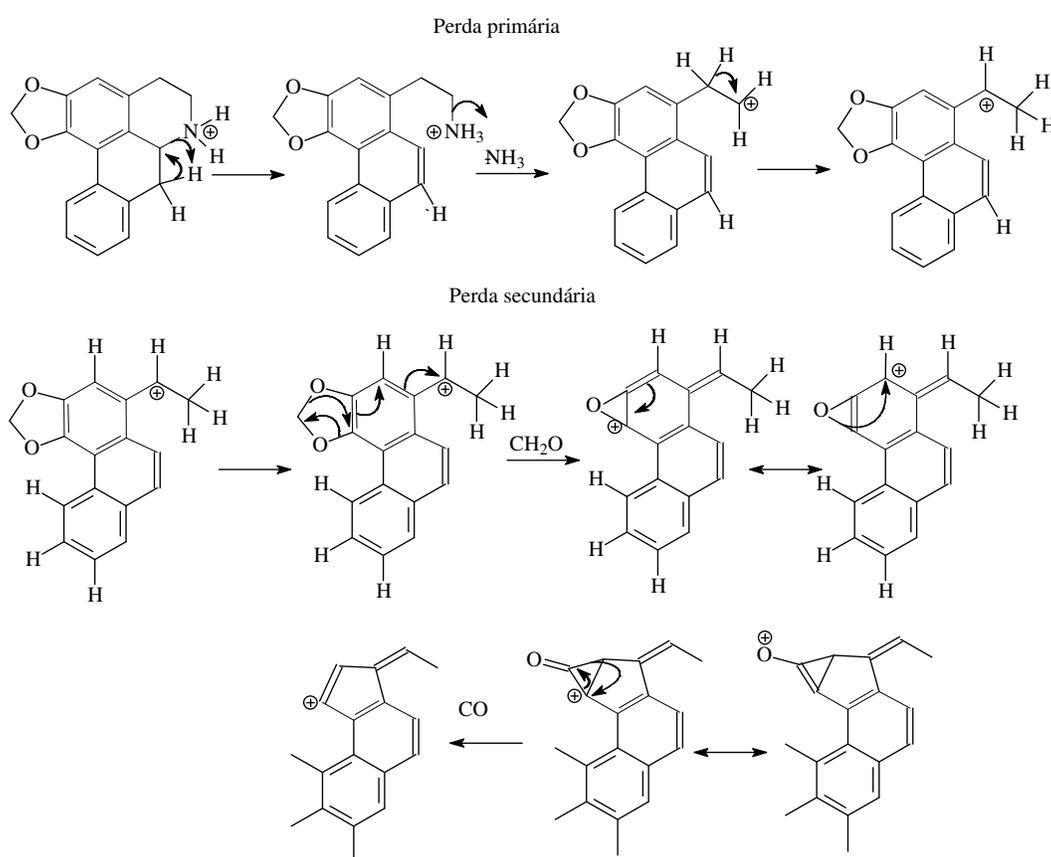


Figura 26. Proposta de fragmentação para o íon *quasi*-molecular da anonaína em m/z 266 ($[M+H]^+$).

5.1.1 Desreplicação dos alcalóides das folhas de *U. guatteroides*

A fração alcaloídica das folhas de *U. guatteroides* apresentou-se bastante complexa (Figura 27) quando analisada por ESI-IT-MS, podendo-se observar diversos picos de m/z par, dentre os quais o mais intenso foi verificado em m/z 268 ($[M+H]^+$).

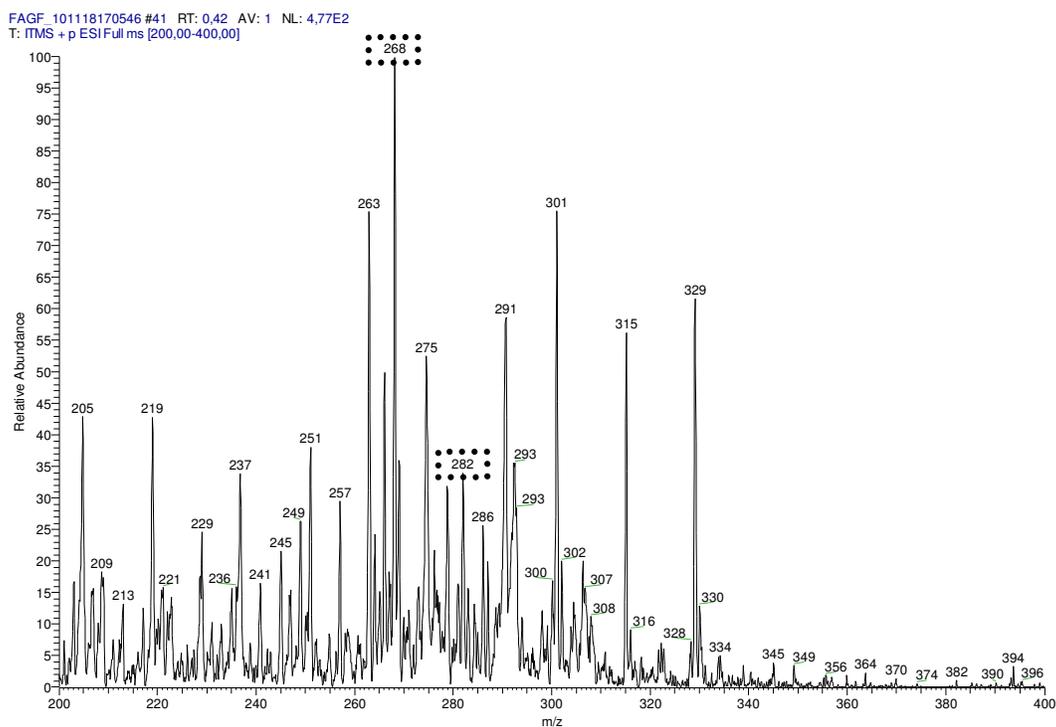


Figura 27. Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *U. guatteroides*.

A perda inicial do grupo amina, observada através da perda do fragmento de massa 17 Da, e as sucessivas perdas de CH_3OH e CO (Figura 28) são coerentes com o alcalóide aporfínico assimilobina, já reportado na literatura da espécie (Tabela 2). A perda em sequência dos fragmentos de massa 32 e 28 Da é fundamental para identificar metoxilas adjacentes a hidroxilas em estruturas aporfínicas.

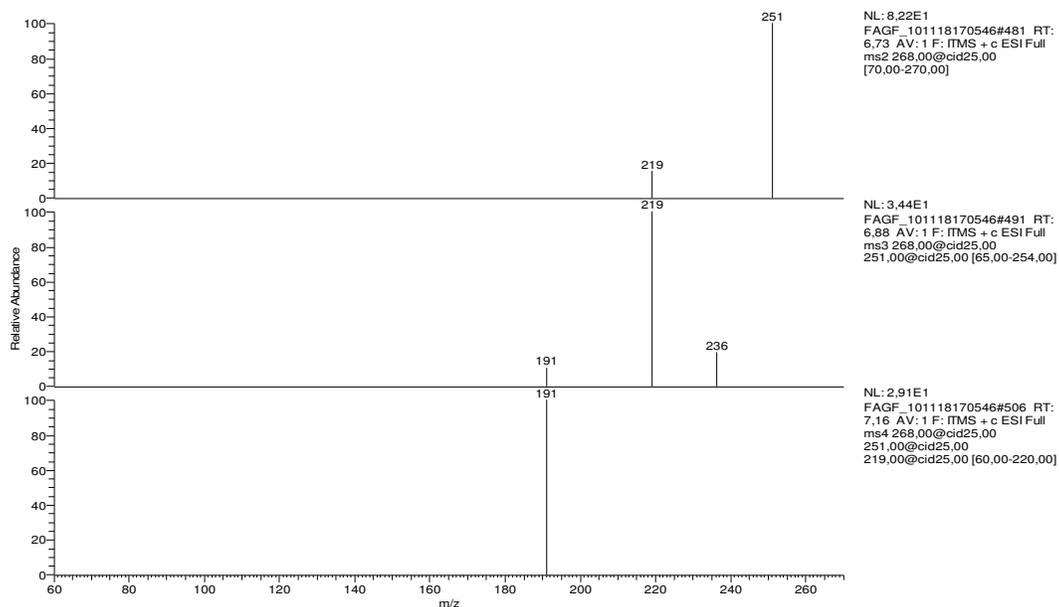


Figura 28. Espectro de massas em MS⁴ do íon *quasi*-molecular da asimilobina em m/z 268 ([M+H]⁺) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. guatteroides*.

Uma proposta de fragmentação baseada nas chaves de Stévigny et al. (2004) é apresentada na Figura 29. Mesmo em menores intensidades foi possível caracterizar, a partir do padrão de fragmentação, os alcalóides aporfínicos anonaina e normuciferina, cujos íons *quasi*-moleculares foram observados em m/z 266 ([M+H]⁺) e m/z 282 ([M+H]⁺) respectivamente, além de caracterizar os oxoaporfínicos lisicamina e liriodenina com íons em m/z 276 ([M+H]⁺) e m/z 292 ([M+H]⁺) respectivamente, através de comparação dos espectros de MS² com padrões.

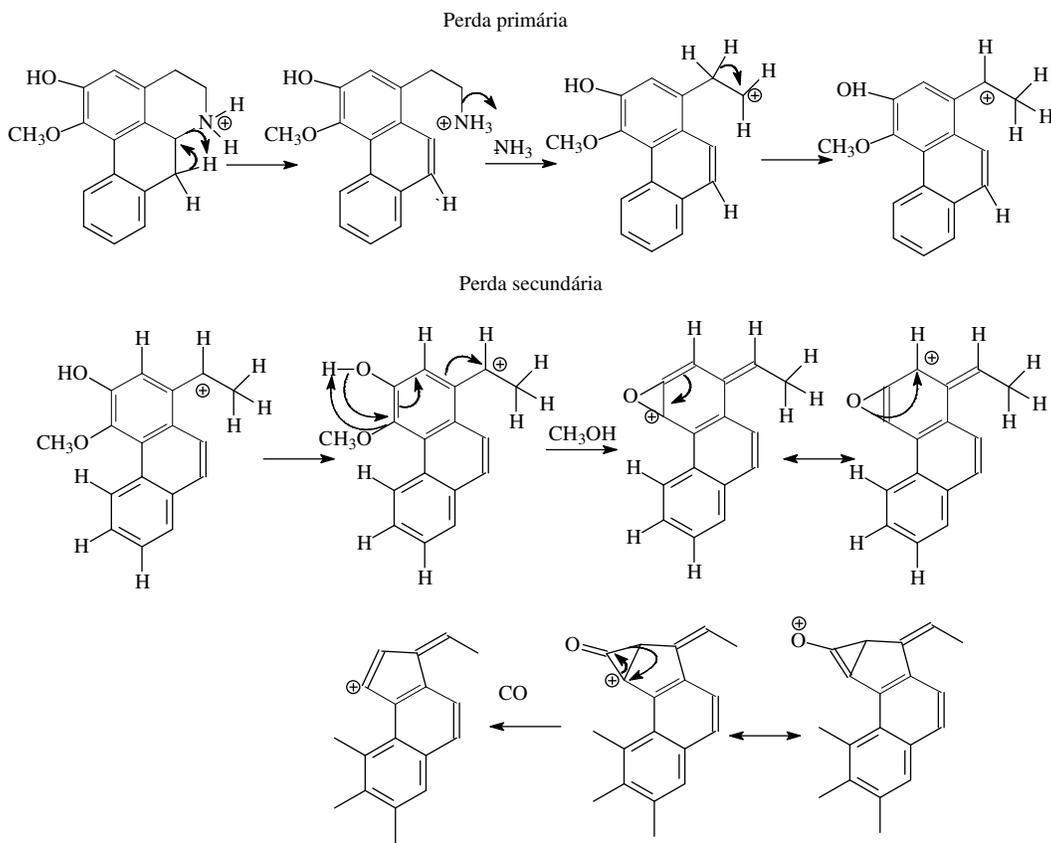


Figura 29. Proposta de fragmentação para o íon *quasi*-molecular da asimilobina em m/z 268 ($[M+H]^+$).

Entre os alcalóides aporfínicos descritos na literatura para a espécie (Tabela 2), a norushinsunina não foi identificada através da aplicação das chaves de fragmentação. O íon *quasi*-molecular em m/z 282 ($[M+H]^+$) presente nas folhas e galhos em melhor intensidade, apresentou um padrão de fragmentação discordante com a estrutura da norushinsunina. (Figura 30). A perda de 15 Da ($.CH_3$) em sequência é uma chave de fragmentação que auxilia na identificação de grupos metoxilas adjacentes ligados a sítios aromáticos. Como demonstrado para a anonaína, uma ponte metilenodioxi na estrutura deveria assegurar a perda de 30 Da (CH_2O) seguida de 28 Da (CO), sendo assim, uma perda de 15 Da em sequência não estaria de acordo com as chaves de fragmentação. Na verdade, o padrão de fragmentação

aponta para uma estrutura aporfínica contendo um átomo de hidrogênio ligado ao átomo de nitrogênio e duas metoxilas adjacentes ligadas ao sistema aromático.

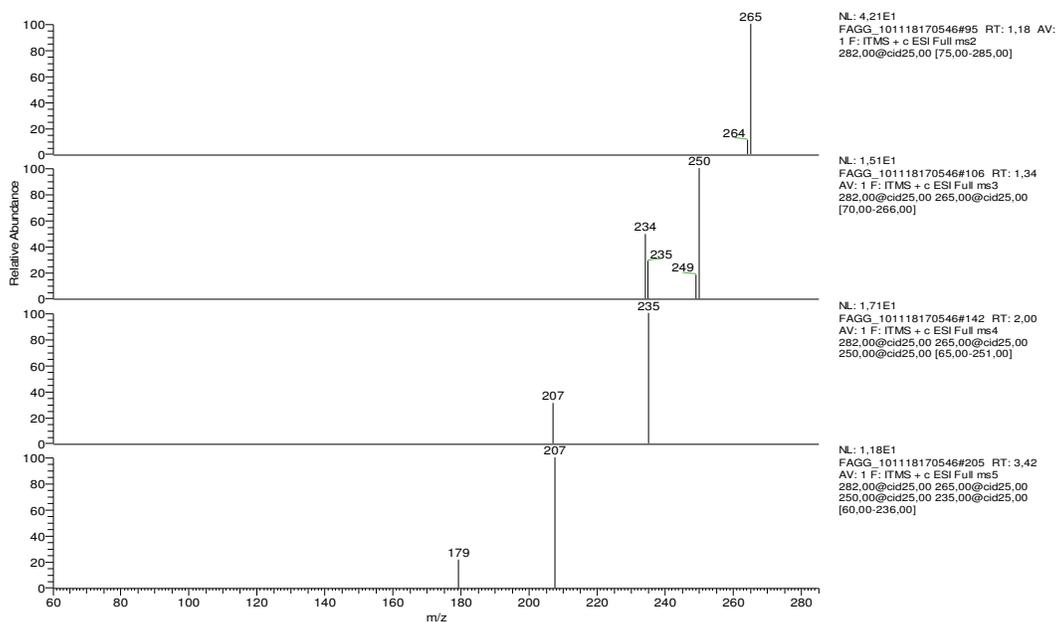


Figura 30. Espectro de massas em MS^5 do íon *quasi*-molecular em m/z 282 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. guatterioides*.

Com base nas chaves de fragmentação observadas, e com o auxílio de artigo de revisão desta classe de substância (Guinaudeau et al., 1975) chegou-se ao alcalóide aporfínico nornuciferina como sendo o possível alcalóide de m/z 282. Sua confirmação foi feita através da comparação do padrão de fragmentação do íon em m/z 282 ($[M+H]^+$) presentes nas frações alcaloídicas (Figura 30) com o padrão autêntico dessa substância (Figura 31), além de experimento de LC-APCI-MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM) (Figura 32). No experimento de LC-APCI-MS pode-se observar que sob as mesmas condições cromatográficas e espectrométricas, a detecção da substância de interesse, na forma do íon *quasi*-molecular em m/z 282 ($[M+H]^+$), ocorre no mesmo tempo de retenção, tanto nas frações quanto no padrão, garantindo assim a confirmação de sua natureza.

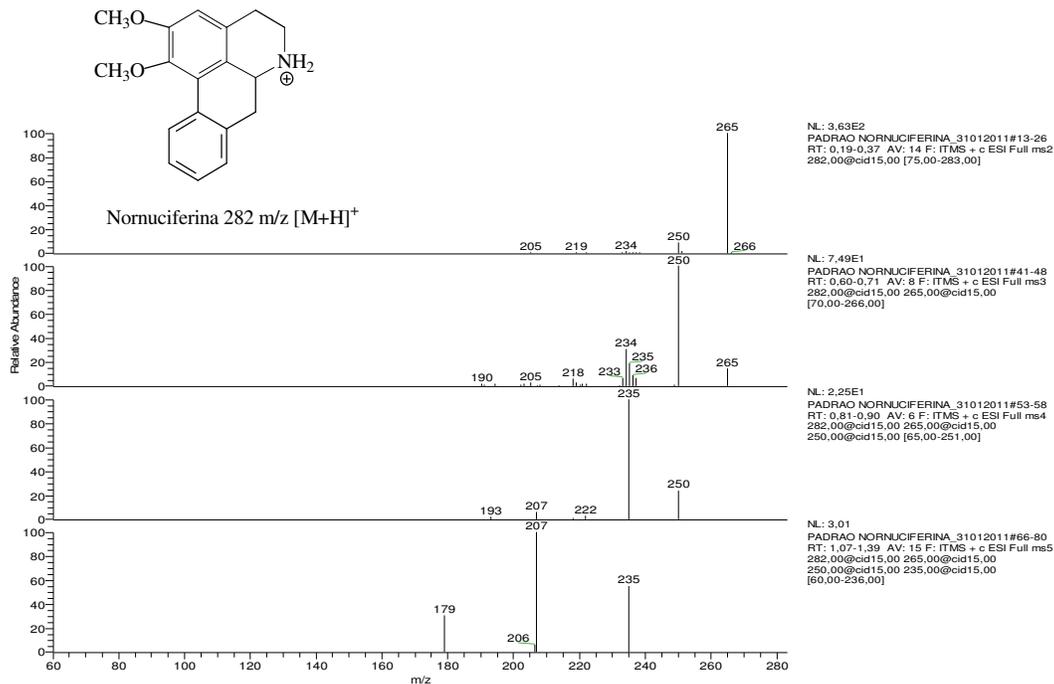


Figura 31. Espectro de massas em MS⁵ do íon *quasi*-molecular do padrão de nornuciferina em m/z 282 ($[M+H]^+$).

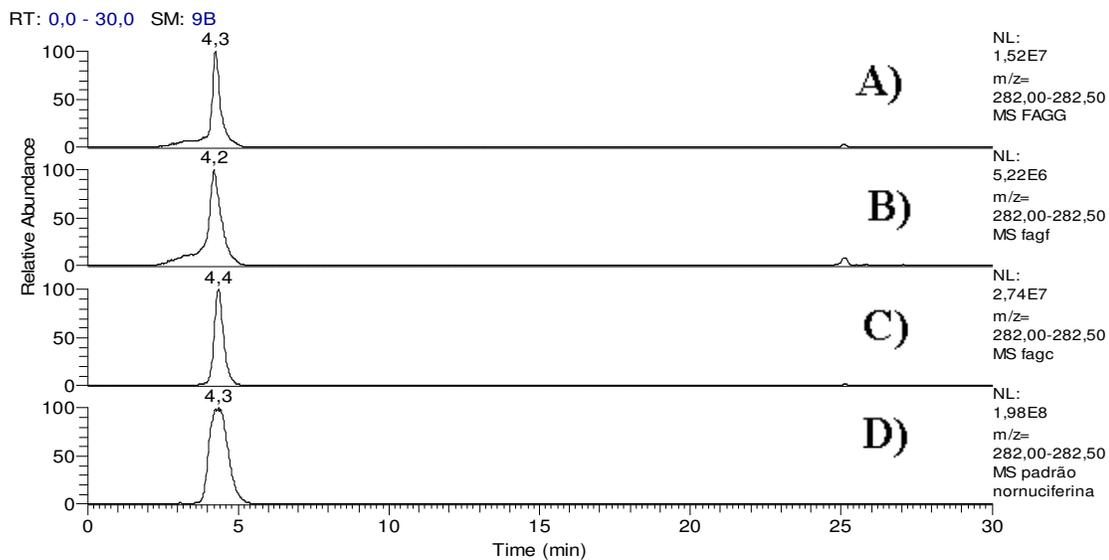


Figura 32. Cromatogramas obtidos por LC/APCI/MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM) do íon de m/z 282 ($[M+H]^+$). (A) galhos, (B) folhas, (C) cascas e (D) padrão de nornuciferina.

5.1.2 Desreplicação dos alcalóides das cascas de *U. guatterioides*

Analisando a fração alcaloídica das cascas de *U. guatterioides* (Figura 33) foi possível observar a predominância dos alcalóides oxoaporfínicos liriodenina e liscamina, através da verificação de seus íons *quasi*-moleculares em m/z 276 ($[M+H]^+$) e m/z 292 ($[M+H]^+$) respectivamente, sendo sua confirmação feita através da comparação dos respectivos espectros de MS^2 com espectros de padrões (Figuras 34). Dentre os alcalóides aporfínicos caracterizados acima, apenas a normuciferina, cujo íon *quasi*-molecular é observado em m/z 282 ($[M+H]^+$), foi identificada nesta fração. Sua caracterização foi realizada através de experimentos de MS^n em comparação com a substância padrão.

Os alcalóides liscamina e liriodenina, já reportados na espécie *U. guatterioides* são comuns dentro do gênero *Unonopsis*, como mostra a tabela 2, observando-se que a liriodenina é considerada marcador da família Annonaceae (Pinheiro et al., 2009).

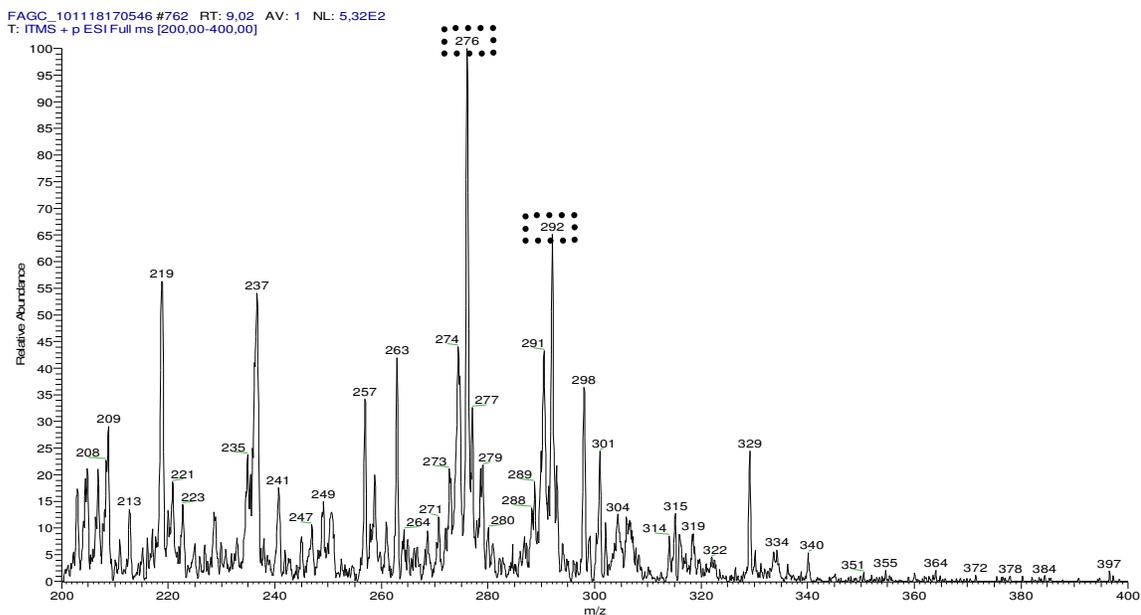


Figura 33. Espectro de massas da fração alcaloídica das cascas de *U. guatterioides*

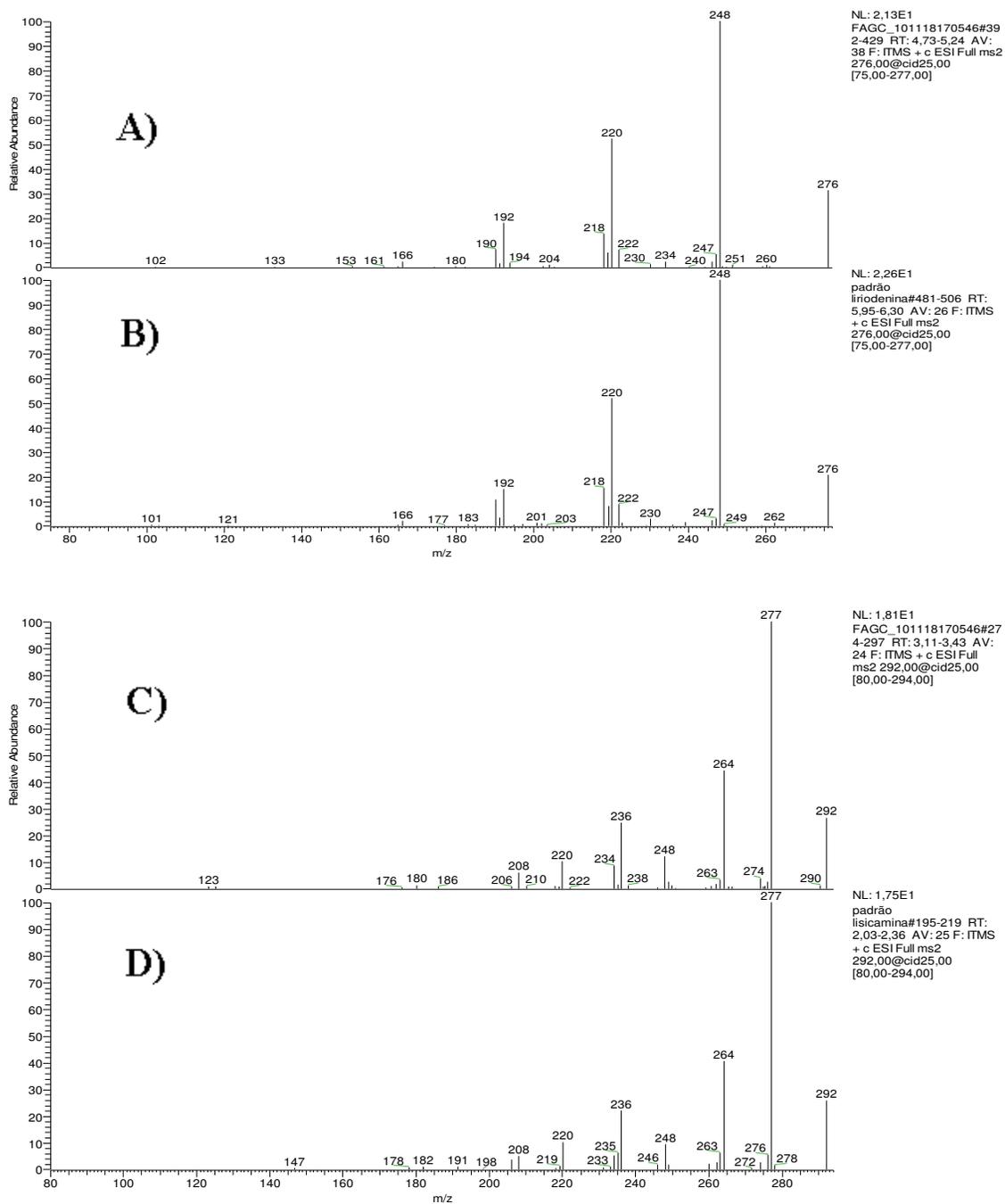


Figura 34. A) Espectro de MS² do íon em m/z 276 presente na fração alcaloídica das cascas de *U. guatteroides*. B) Espectro de MS² do padrão de liriodenina. C) Espectro de MS² do íon em 292 ([M+H]⁺) presentes na fração alcaloídica das cascas de *U. guatteroides*. D) Espectro de MS² do padrão de liscamina.

5.2 Análise espectrométrica das frações alcaloídicas de *U. duckei*

5.2.1. Desrepliação dos alcalóides dos galhos de *U. duckei*

No espectro de íons totais da fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei* (Figura 35) foram verificados diversos picos de m/z par, indicando possíveis alcalóides, entre os quais os mais intenso, a partir da análise da região ampliada de m/z 250-300 (Figura 36), foram verificados como sendo os íons em m/z 292 ($[M+H]^+$), m/z 282 ($[M+H]^+$) e m/z 276 ($[M+H]^+$), sendo possível também observar com menor intensidade os íons em m/z 266 ($[M+H]^+$) e m/z 268 ($[M+H]^+$).

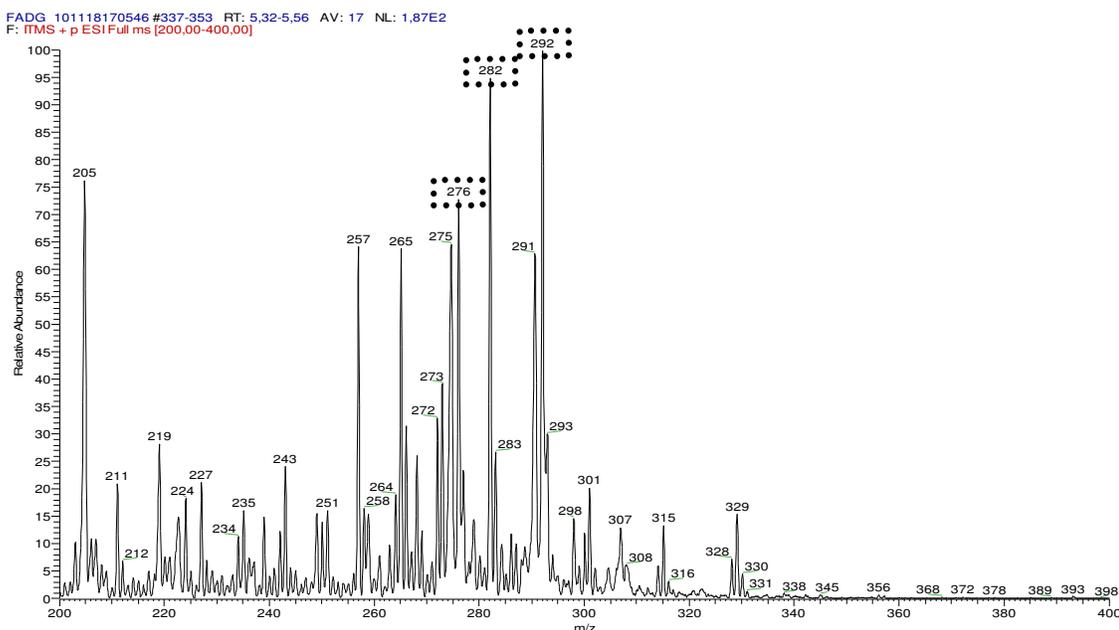


Figura 35. Espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*.

Os íon em m/z 266 ($[M+H]^+$) e m/z 268 ($[M+H]^+$) tiveram seus espectros de MS^n comparados com as substâncias já identificadas, sendo caracterizados respectivamente como anonaina e asimilobina, já os íons em m/z 276 ($[M+H]^+$) e m/z 292 ($[M+H]^+$) foram caracterizados respectivamente como lirioidenina e lisicamina através da comparação dos espectros de MS^2 com padrões.

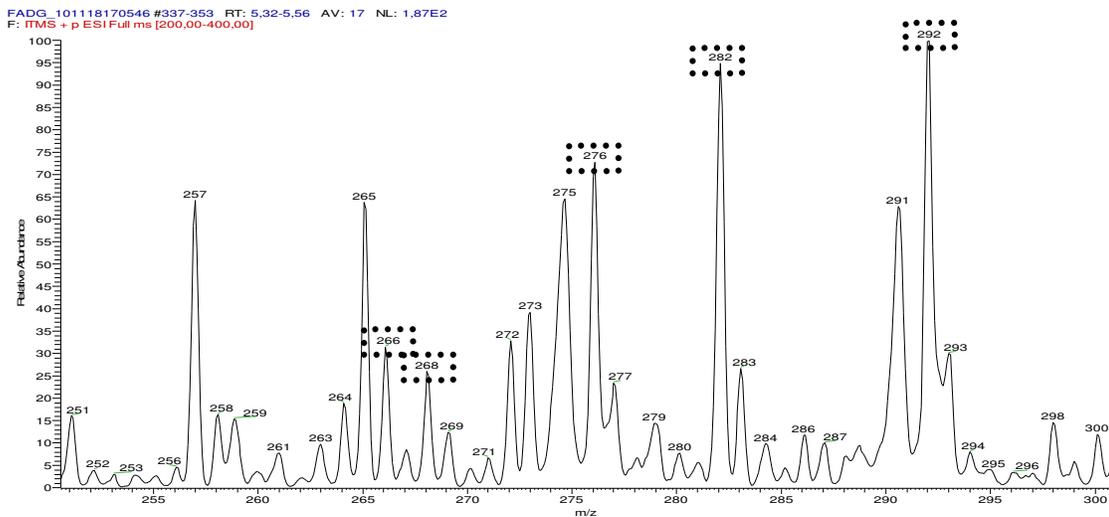


Figura 36. Região ampliada do espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*.

A confirmação da natureza do íon em m/z 282 ($[M+H]^+$) foi possível através da análise de MS⁶ (Figura 37) e comparação do íon presente na fração alcaloídica dos galhos com a substância padrão de nornuciferina por LC/APCI/MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM)(Figura 38).

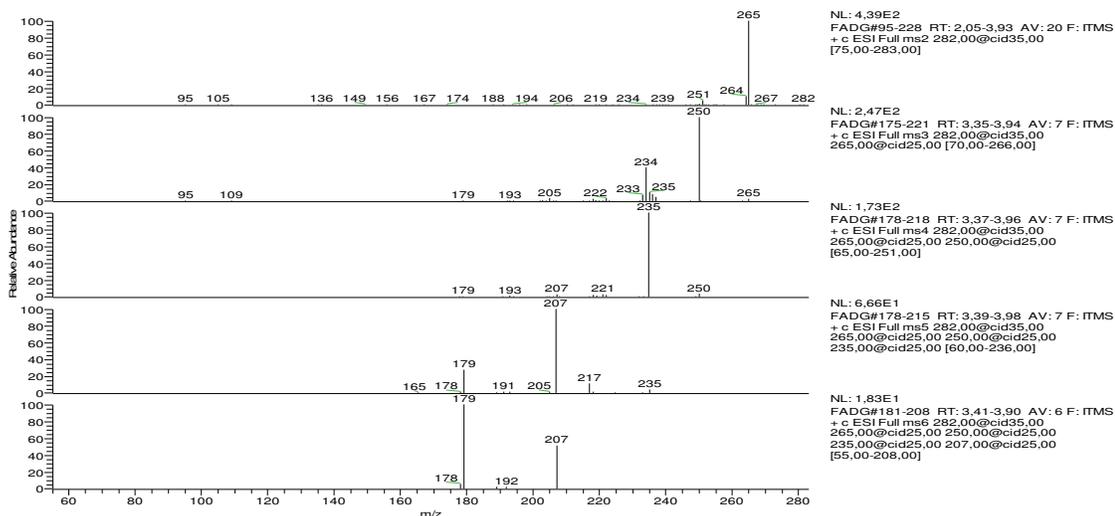


Figura 37. Espectro de massas em MS⁶ do íon *quasi*-molecular da nornuciferina em m/z 282 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*.

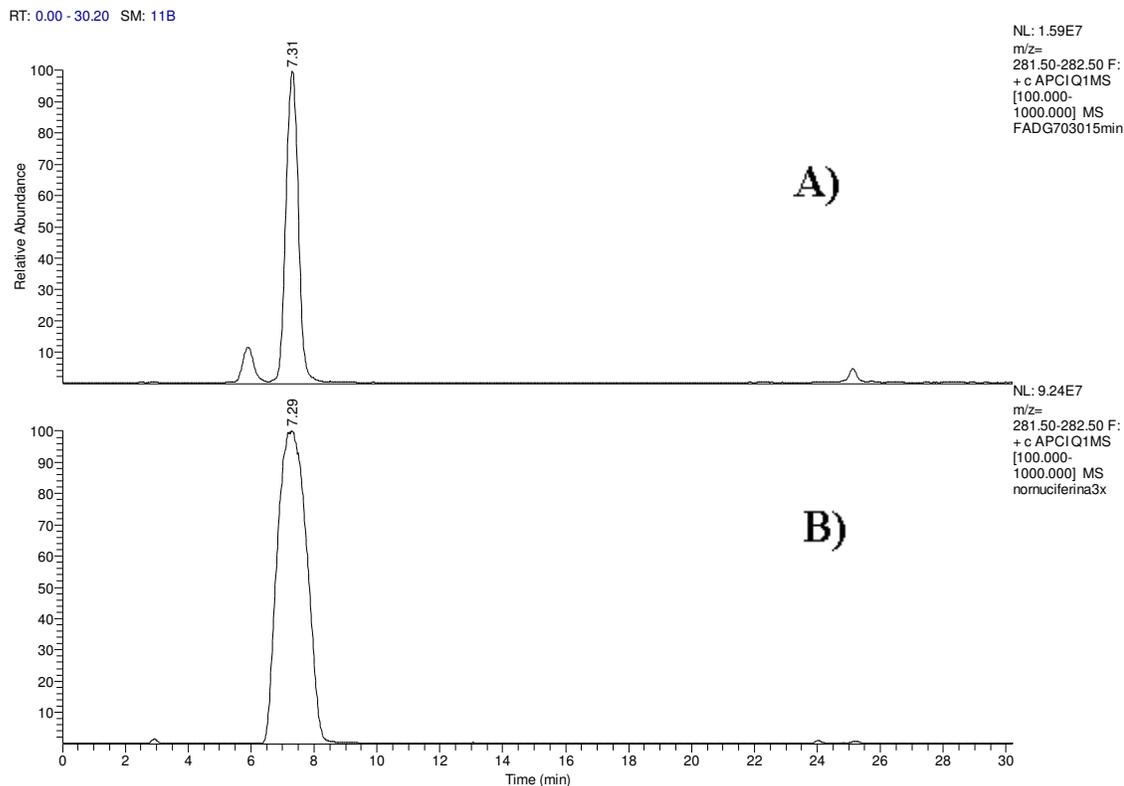


Figura 38. Cromatogramas obtidos por LC/APCI/MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM) da fração alcaloídica dos galhos (A) e do padrão de normuciferina (B).

Por apresentar o mesmo padrão de fragmentação que o alcalóide normuciferina, reportado anteriormente, e o mesmo tempo de retenção em coluna cromatográfica analítica, sob as mesmas condições de análise, o íon em m/z 282 ($[M+H]^+$) foi caracterizado como sendo correspondente ao alcalóide normuciferina.

5.2.2 Desrepliação dos alcalóides das cascas de *U. duckei*

Analisando o espectro de íons totais da fração alcaloídica das cascas de *U. duckei* (Figura 39) foi possível observar a predominância do íon em m/z 282 ($[M+H]^+$), além da presença dos íons em m/z 266 ($[M+H]^+$), m/z 268 ($[M+H]^+$), m/z 276 ($[M+H]^+$) e em menor quantidade o íon de massa m/z 292 ($[M+H]^+$) através da ampliação do espectro de massa na região de m/z 260-300 (Figura 40).

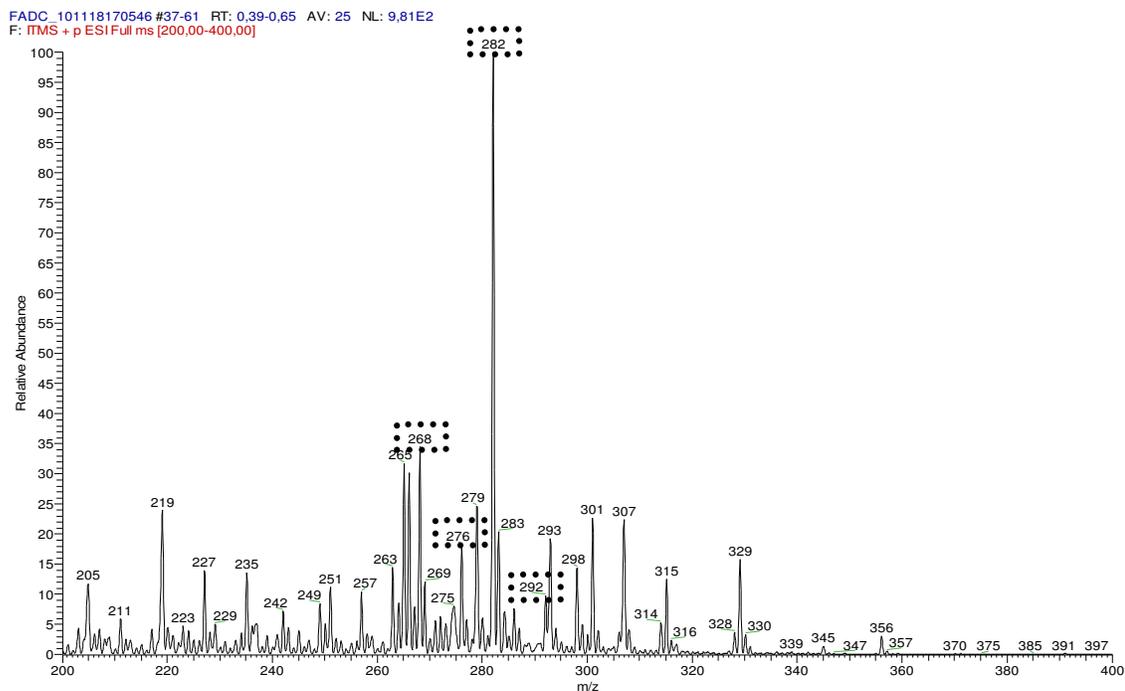


Figura 39. Espectro de massas da fração alcaloídica das cascas de *U. duckei*.

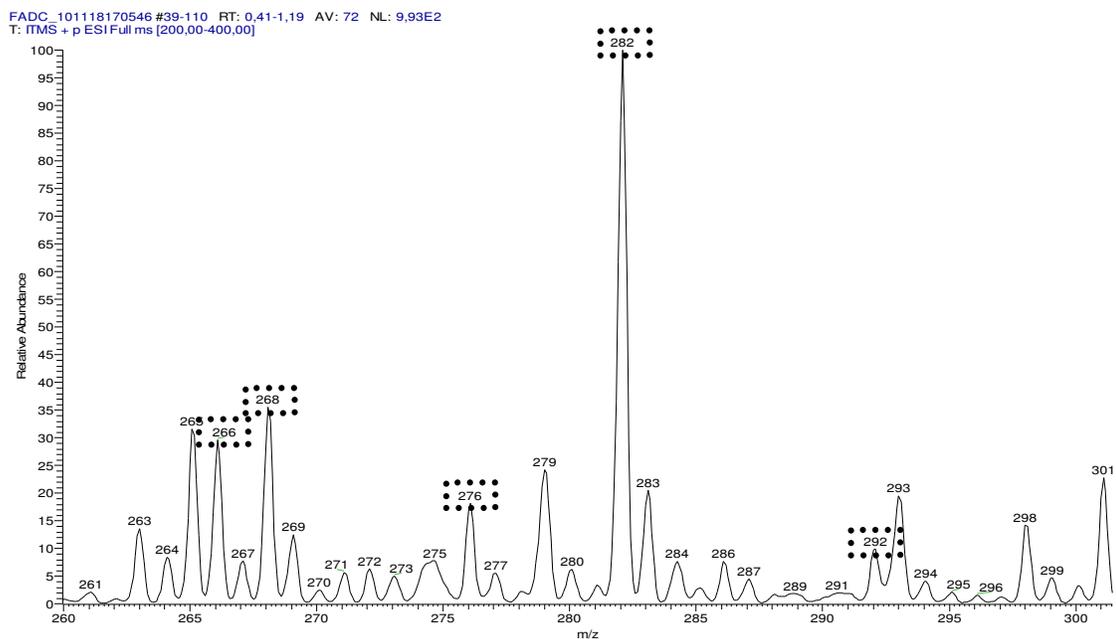


Figura 40. Região ampliada do espectro de massas da fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*.

O estudo de fragmentação por MS⁶ do íon *quasi*-molecular em *m/z* 282 ([M+H]⁺) (Figura 41) revelou um padrão de fragmentação tal como o observado para o alcalóide aporfínico normuciferina, sendo a confirmação de sua natureza obtida através da análise da fração alcaloídica das cascas e do padrão autêntico por LC/APCI/MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM). (Figura 42).

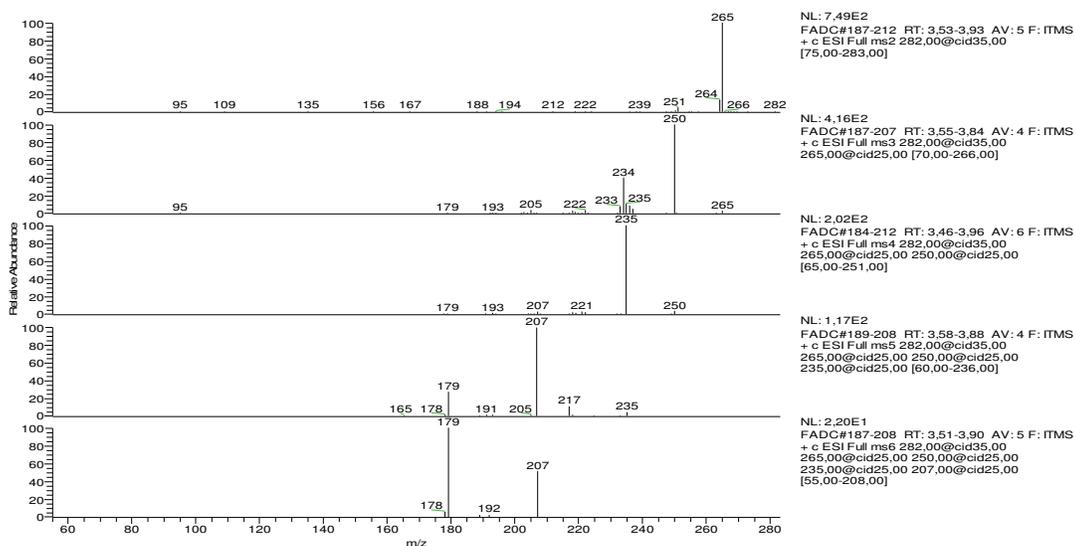


Figura 41. Espectro de massas em MS⁶ do íon *quasi*-molecular da normuciferina em *m/z* 282 presente na fração alcaloídica das cascas de *U. duckei* ([M+H]⁺)

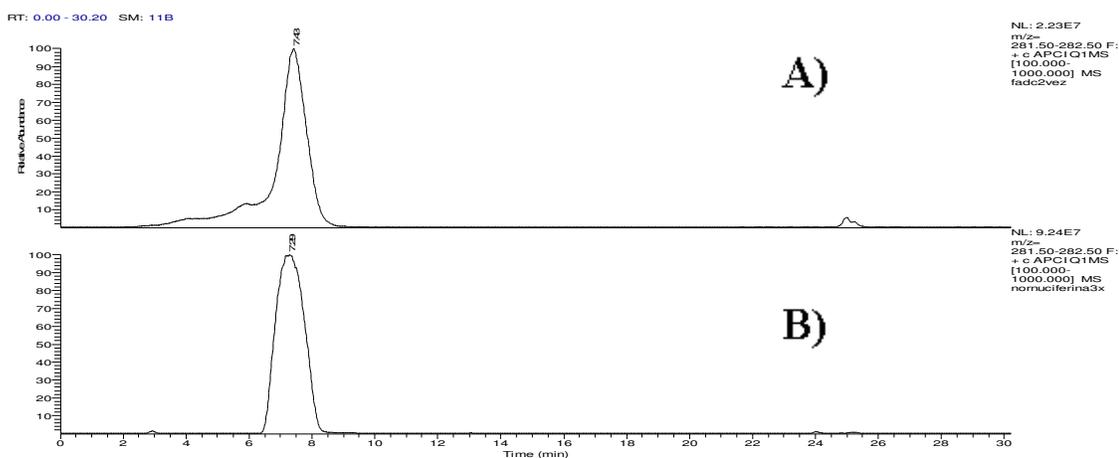


Figura 42. Cromatogramas obtidos por LC/APCI/MS em modo de monitoramento seletivo de íon (SIM) da fração alcaloídica das cascas (A) e do padrão de normuciferina (B).

Os íon *quasi*-moleculares em m/z 266 ($[M+H]^+$) e m/z 268 ($[M+H]^+$) foram atribuídos aos alcalóides anonaina e assimilobina, respectivamente, após comparação dos seus espectros de MS⁴ (Figura 43 e 44 respectivamente) com espectros de substâncias já identificadas. Os íons em m/z 276 ($[M+H]^+$) e m/z 292 ($[M+H]^+$) foram caracterizados como sendo liriodenina e lisicamina respectivamente, através da comparação de seus espectros de MS² com padrões.

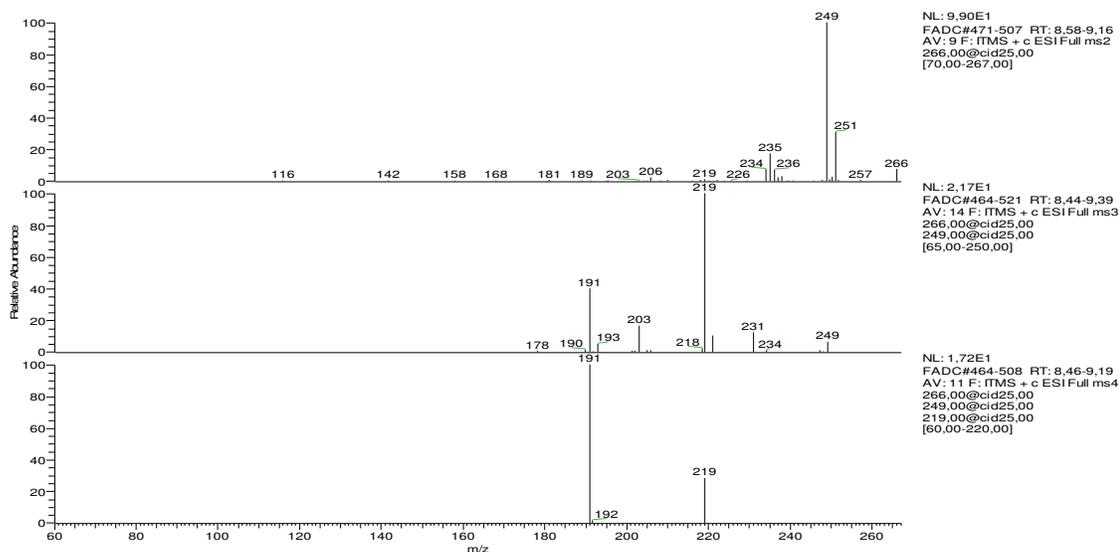


Figura 43. Espectro de massas em MS⁴ do íon *quasi*-molecular da anonaina em m/z 266 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica das cascas de *U. duckei*.

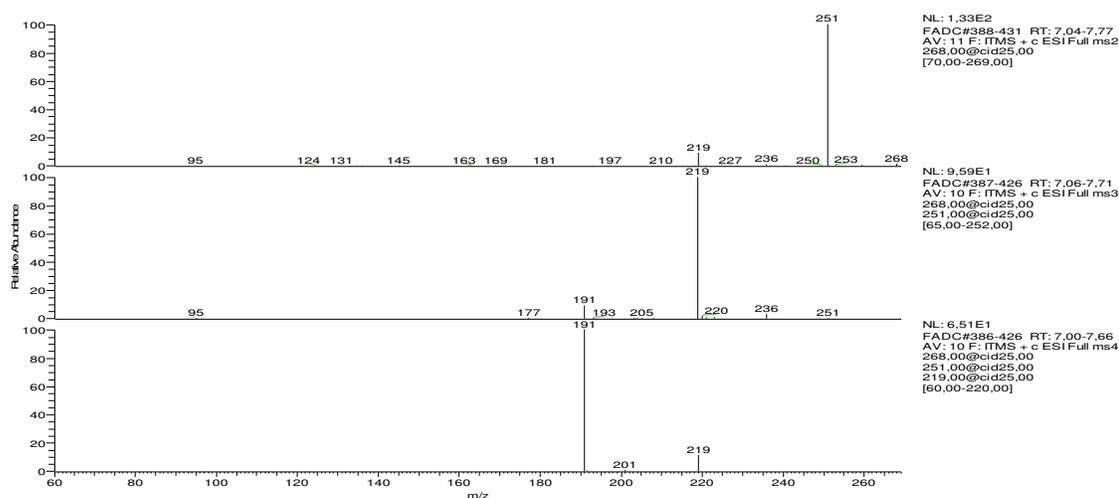


Figura 44. Espectro de massas em MS⁴ do íon *quasi*-molecular da assimilobina em m/z 268 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica das cascas de *U. duckei*.

5.2.3 Desrepliação dos alcalóides das folhas de *U. duckei*

Analisando o espectro de íons totais da fração das folhas de *U. duckei* (Figura 45) foi possível observar com maior intensidade o íon *quasi*-molecular em m/z 298 ($[M+H]^+$), além dos íons em menor intensidade em m/z 342 ($[M+H]^+$) e m/z 356 ($[M+H]^+$).

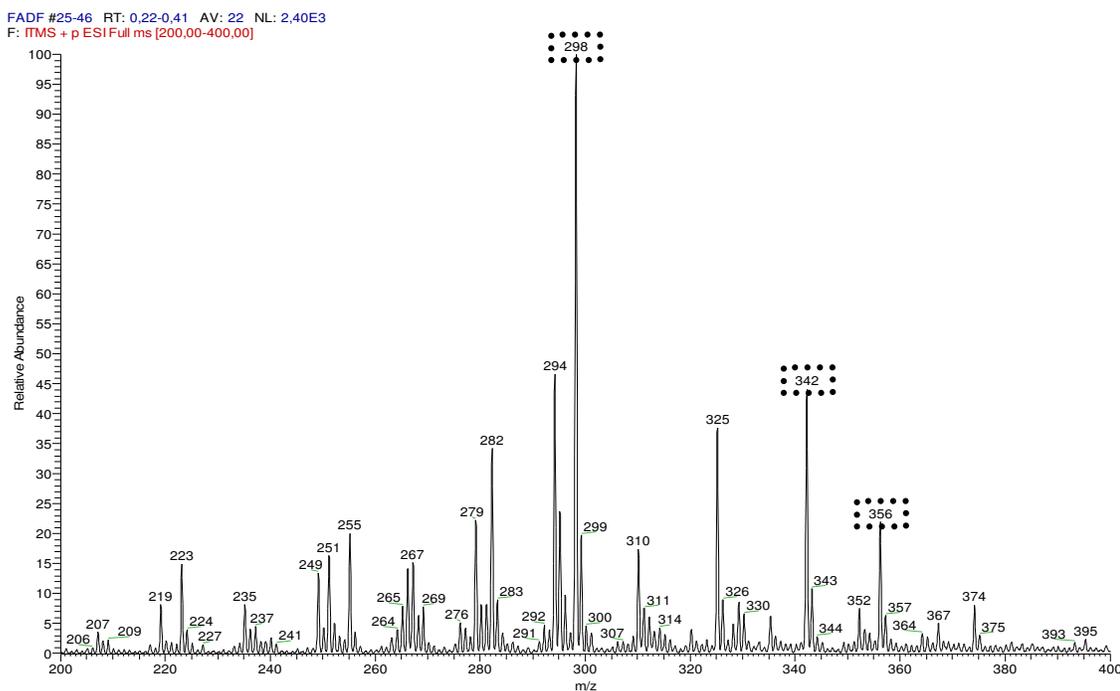


Figura 45. Espectro de massas da fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

Não foi identificado registro na literatura para o gênero *Unonopsis* de alcalóides com estas massas moleculares. O estudo de fragmentação do íon em m/z 298 ($[M+H]^+$) através da análise do espectro de MS^5 (Figura 46) revelou se tratar de um alcalóide aporfínico contendo uma *N*-metila, observada através da perda inicial de NH_2CH_3 (31 Da), e uma hidroxila adjacente a uma metoxila, observada através da perda de MeOH (32 Da) seguida de CO (28 Da). Por último, uma segunda perda de CO (28 Da) sugere a existência de mais um átomo de oxigênio na molécula. Em artigos de revisão desta classe de alcalóides (Guinaudeau et. al., 1975; 1979; 1983; 1988; 1994), as possibilidades, considerando se tratar de um alcalóide aporfínico *sensu strictu* contendo uma *N*-metila e uma hidroxila adjacente a uma metoxila, são apresentadas na Figura 47.

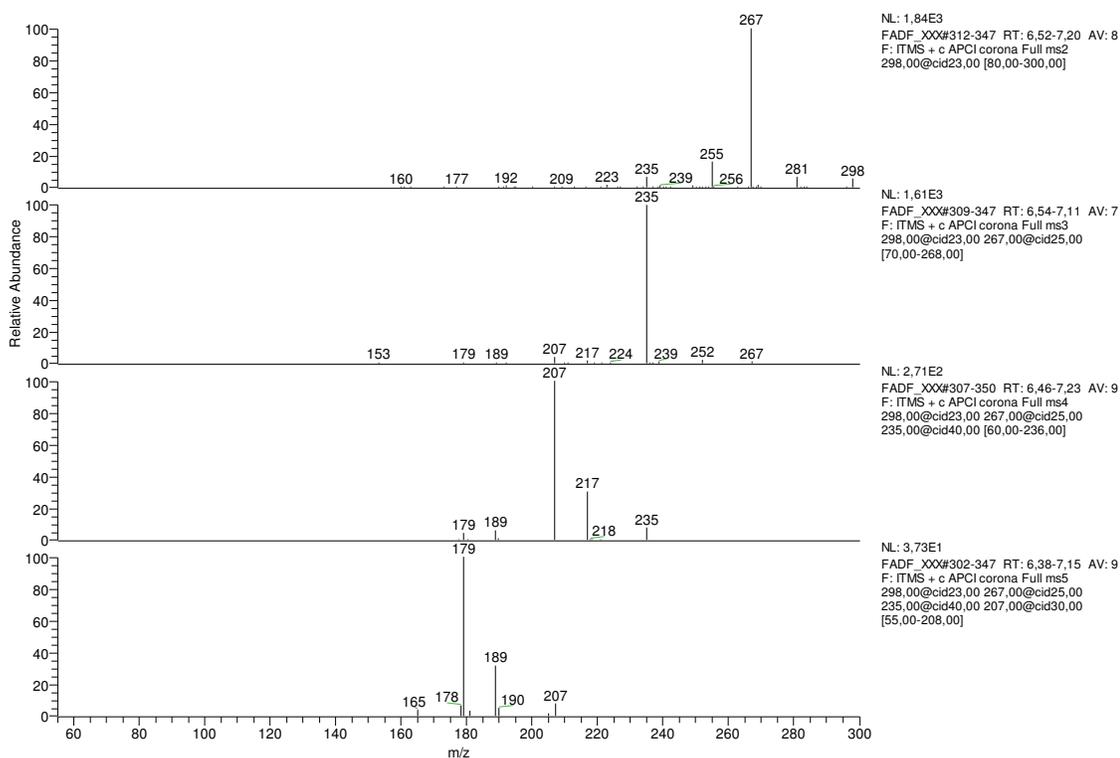


Figura 46. Espectro de massas em MS⁵ do íon *quasi*-molecular em m/z 298 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

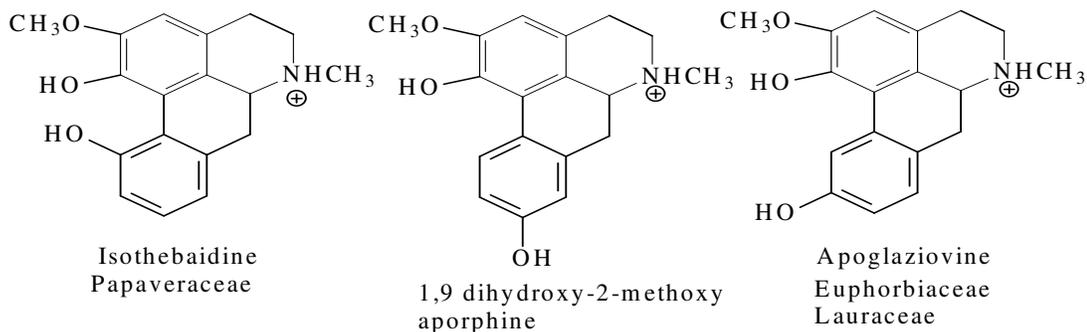


Figura 47. Possíveis estruturas para o íon *quasi*-molecular em m/z 298 ($[M+H]^+$).

Dentre os três alcalóides sugeridos através da revisão da literatura, apenas a isothebaidina e a apoglaziovina já foram identificadas como produtos naturais, sendo isolados respectivamente de espécies das famílias Papaveraceae e Lauraceae. Considerando-se a distância taxonômica entre as famílias Papaveraceae, Lauraceae e Annonaceae, admi-se

como mais provável a proposta do alcalóide apoglaziovina como sendo a possível substância cujo íon *quasi*-molecular é observado em m/z 298 na fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

A análise de fragmentação dos íons em m/z 342 ($[M+H]^+$) e m/z 356 ($[M+H]^+$) revelou um padrão de fragmentação similar entre si, sendo a única diferença observada na primeira fragmentação (Figuras 48 e 49 respectivamente). Por terem sido analisadas em fonte de *eletrospray*, descarta-se a possibilidade de fragmentação em fonte por aplicação de altas temperaturas, uma vez que esta técnica não faz uso de temperaturas elevadas durante o processo de dessolvatação, ou mesmo fragmentação por CID (*Collision Induced Dissociation*) na região do *skimmer*, por terem sido usadas baixas voltagens durante as análises.

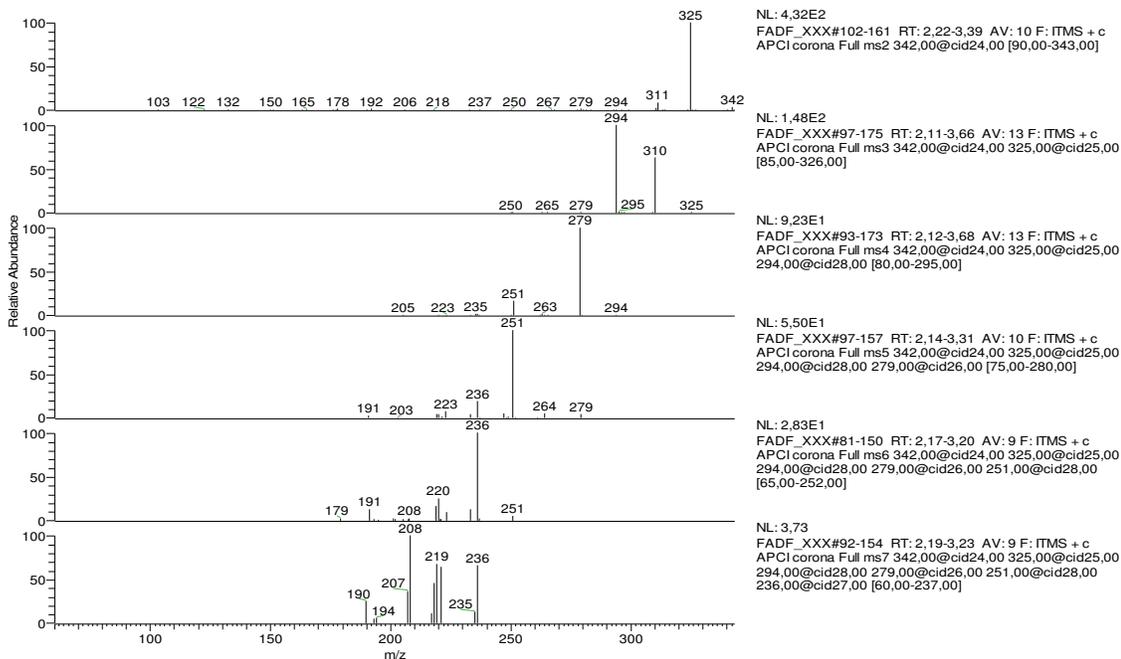


Figura 48. Espectro de massas em MS⁷ do íon *quasi*-molecular em m/z 342 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

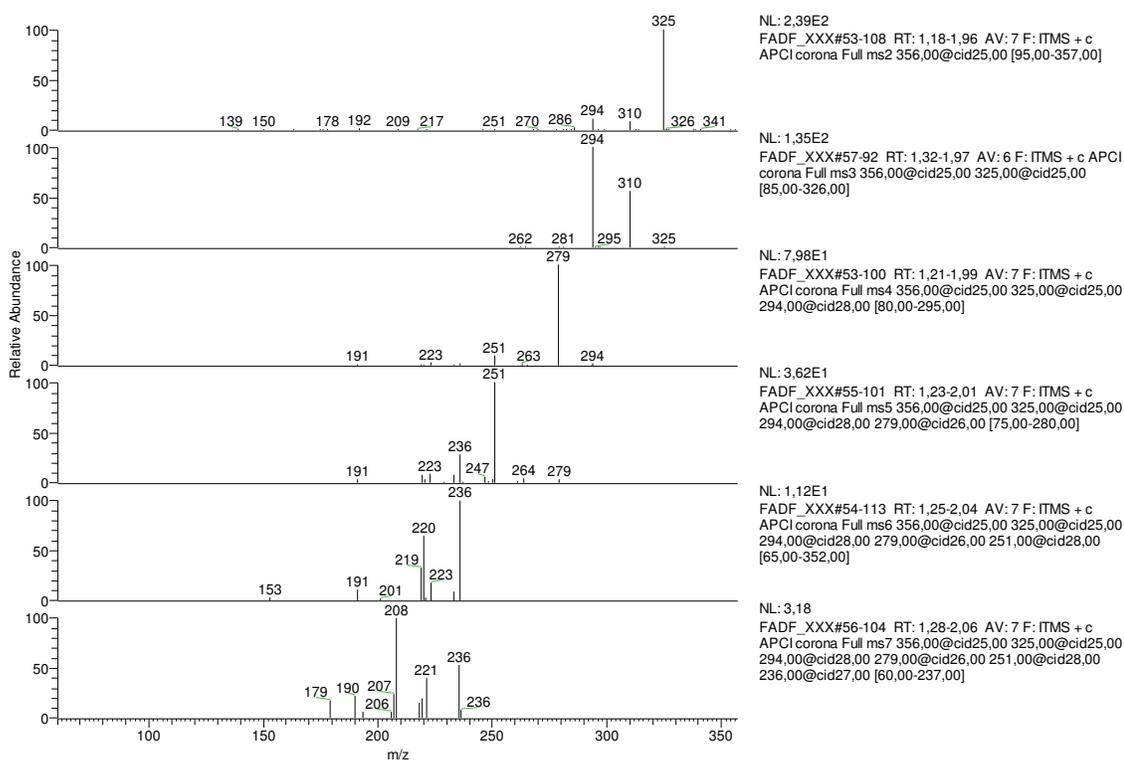


Figura 49. Espectro de massas em MS⁷ do íon *quasi*-molecular em m/z 356 ($[M+H]^+$) presente na fração alcaloídica das folhas de *U. duckei*.

A perda inicial de NH₃ (17 Da) do íon em m/z 342 ($[M+H]^+$) sugere que a substância em questão seja um alcalóide aporfínico contendo o átomo de nitrogênio ligado apenas a átomos de hidrogênio, diferente do íon em m/z 356 ($[M+H]^+$), onde pode-se observar uma perda de NH₂CH₃ (31 Da) atribuída a uma estrutura contendo uma ligação *N*-metil. Na sequência foi possível observar uma perda de CH₃O (31 Da), atribuída a estruturas contendo mais de uma metoxila adjacente em sistema aromático, seguida por perdas de CH₃ (15 Da) e CO (28 Da) duas vezes, nas duas estruturas. A perda de uma metoxila (31 Da) e de duas metilas CH₃ (15 Da) garante ao esqueleto aporfínico dos dois alcalóides, no mínimo, três metoxilações em posições não definidas. Com base nas chaves de fragmentação, e dados da literatura (Guinaudeau et al., 1975), admitiu-se o alcalóide aporfínico glaucina como sendo o

possível alcalóide cujo íon *quasi*-molecular é observado em m/z 356. Este alcalóide já foi isolado de outras espécies de Annonaceae (Guinaudeau et. al., 1975; 1979;1983 e 1988).

Como a diferença estrutural para o alcalóide observado em m/z 342 ($[M+H]^+$) é a ausência da *N*-metila, propõe-se que o íon *quasi*-molecular em m/z 342 ($[M+H]^+$) seja a forma protonada do alcalóide norglaucina. É apresentada na Figura 50 uma proposta de fragmentação para estes dois alcalóides.

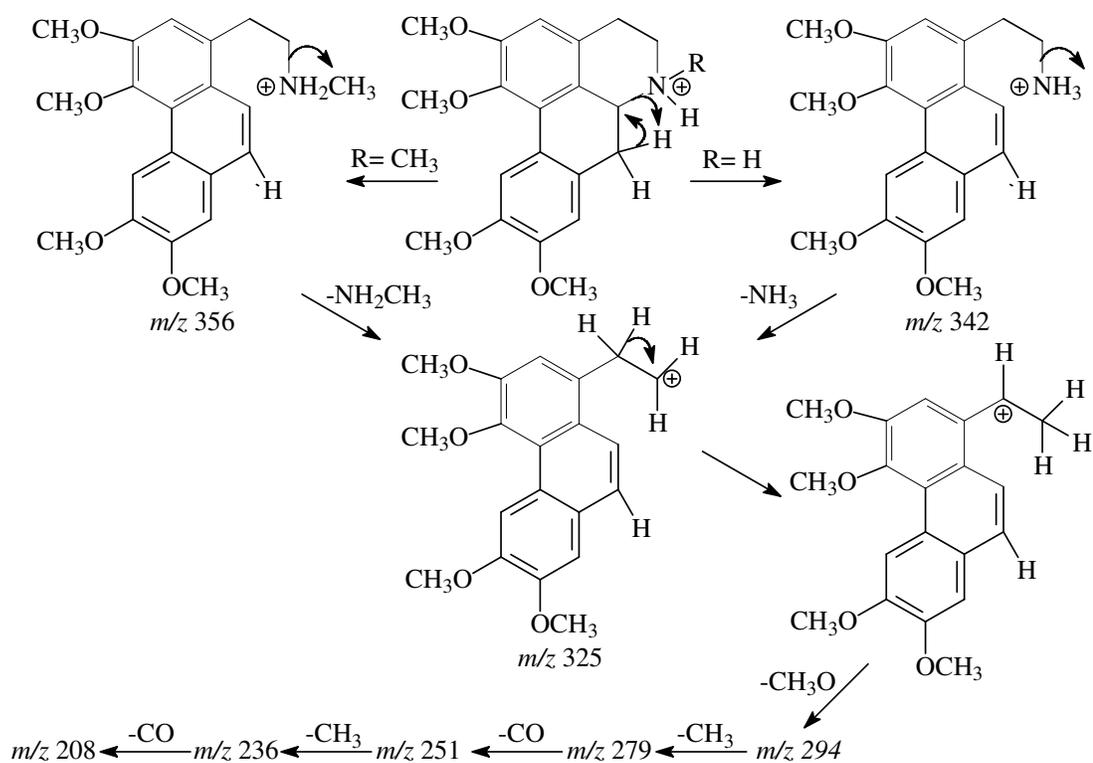


Figura 50. Proposta de fragmentação para os íons *quasi*-moleculares em m/z 356 ($[M+H]^+$) e m/z 342 ($[M+H]^+$).

5.3 Identificação de FADF1

O isolamento da substância foi confirmado através de análise por LC/DAD/MS (Figura 51). A substância apresentou-se como um sólido cristalino do tipo agulha.

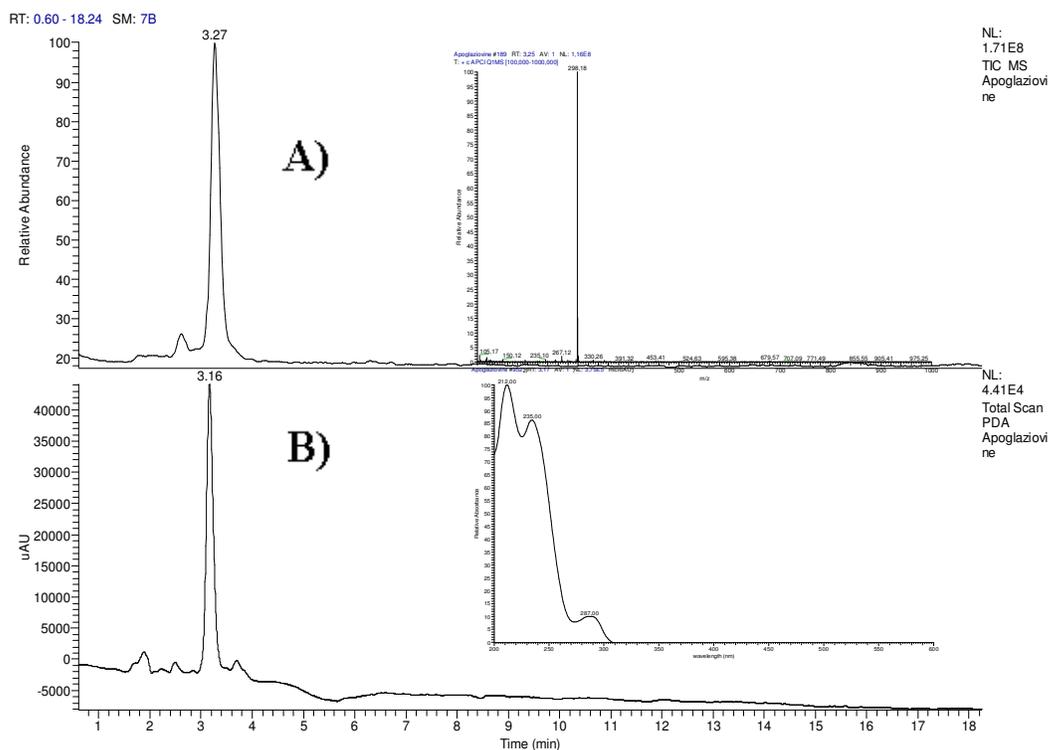


Figura 51. Cromatogramas obtidos por LC/DAD/MS da FADF1. A) Cromatograma de íons totais de m/z 100-1000; B) Cromatograma com DAD operando na faixa de 200-800 nm.

O estudo de fragmentação do íon *quasi*-molecular em m/z 298 ($[M+H]^+$), através da análise do espectro de MS^5 (Figura 46) revelou se tratar de um alcalóide aporfínico contendo uma *N*-metila, observada na perda inicial de NH_2CH_3 (31 Da) e uma hidroxila adjacente a uma metoxila, caracterizados pela perda de $MeOH$ (32 Da) seguida de CO (28 Da). A partir destes dados pode-se propor uma estrutura aporfínica como demonstrado na Figura 52.

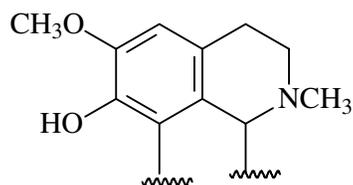


Figura 52. Estrutura parcial para a substancia FADF1.

No espectro de RMN de ^1H (Figura 53) é possível observar um singlete em δ 6,85 referente ao hidrogênio aromático, além dos singletos em δ 3,85 e 3,00 (Figura 54) referentes ao hidrogênio metílico da metoxila e da *N*-Metila respectivamente.

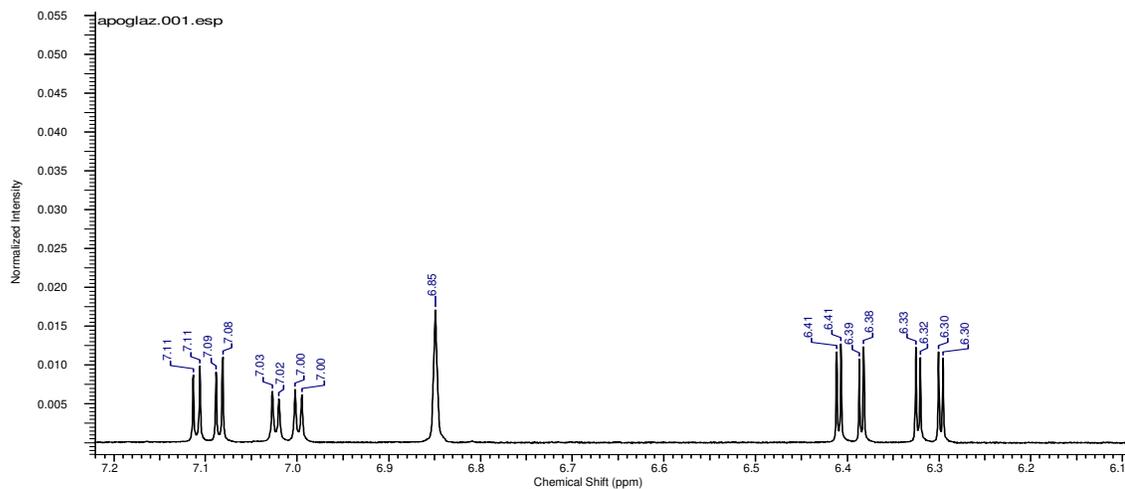


Figura 53. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) da FADF1

Através do espectro de HSQC (Figura 55) é possível confirmar a natureza destes hidrogênios. Para os hidrogênios em δ 3,85 e 3,00 observam-se os acoplamentos com os carbonos em δ 57,1 e 40,9, respectivamente. Também foi possível observar o acoplamento entre o hidrogênio em δ 6,84 com o carbono em δ 111,6.

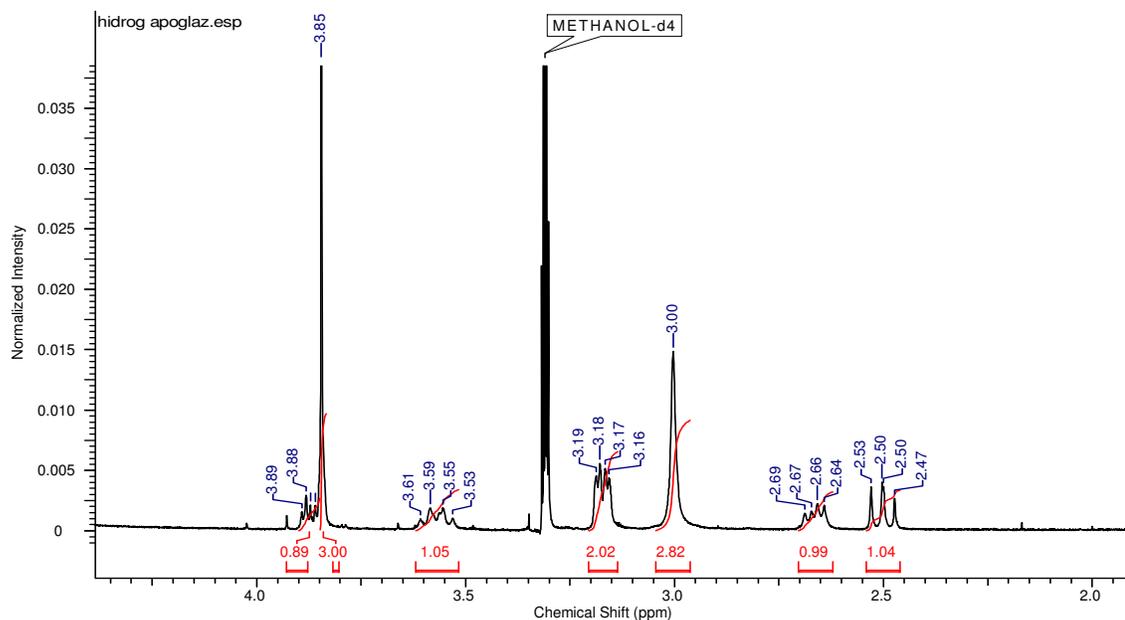


Figura 54. Espectro ampliado de RMN de ^1H (400 MHz, metanol- d_4) da FADF1

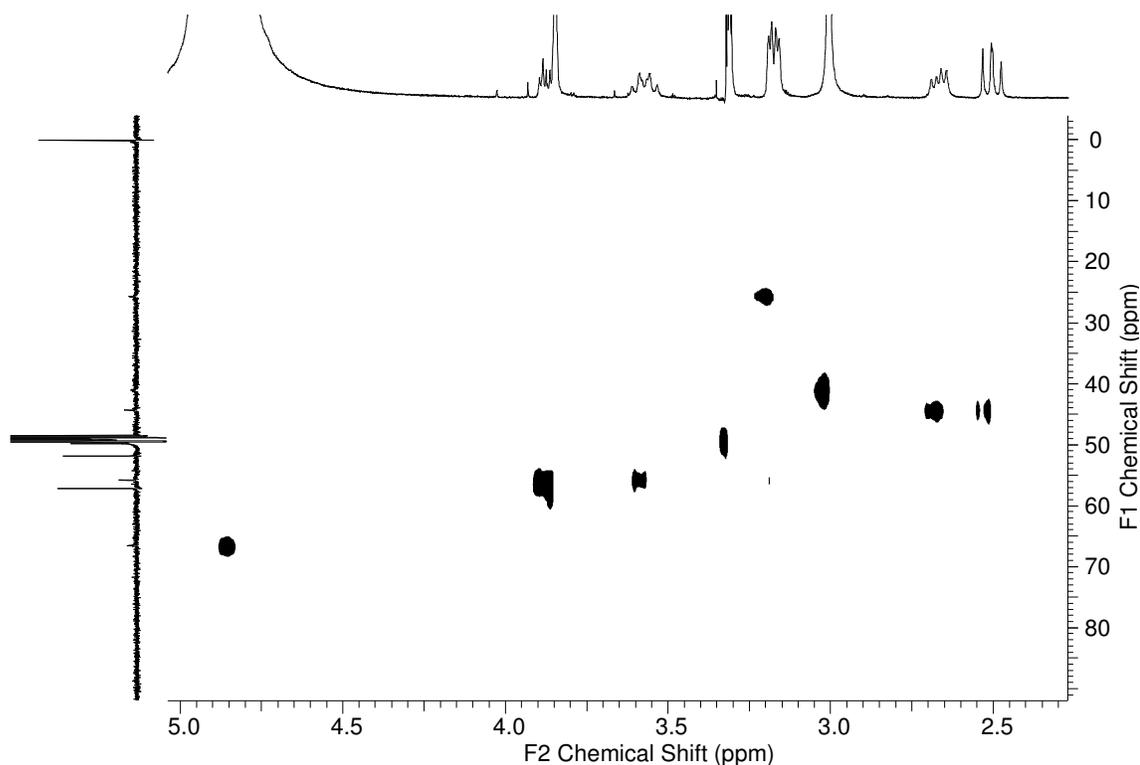


Figura 55. Algumas correlações hereronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas por HSQC para a substância FADF1 em metanol- d_4 (400 MHz).

No experimento de HMBC observa-se a correlação dos hidrogênios metílicos em δ 3,00 com carbonos em δ 66,5 e 55,8, além da correlação dos hidrogênios metilênicos em δ 3,17 com os carbonos em δ 55,8, 111,6, 121,5 e 128,5 (Figura 56). Ainda através do experimento de correlação HMBC é possível observar para o hidrogênio em δ 3,85 correlação com o carbono em 151,2 (Figura 57) e para o hidrogênio em δ 6,84, correlação com os carbonos em δ 25,6, 128,5, 144,2 e 151,2 (Figura 58), desta forma concordando com a proposta sugerida através da análise das chaves de fragmentação, confirmando assim a estrutura do anel A e B.

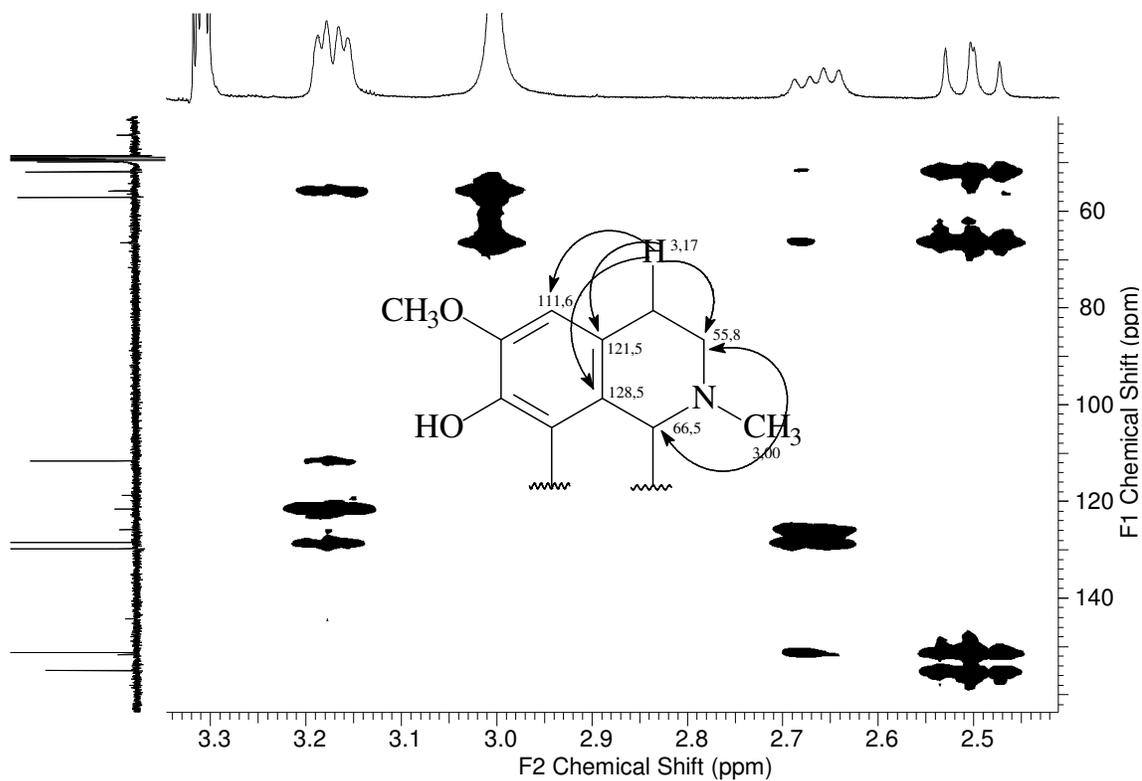


Figura 56. Algumas correlações hereronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas por HMBC para os hidrogênio em δ 3,00 e 3,17.

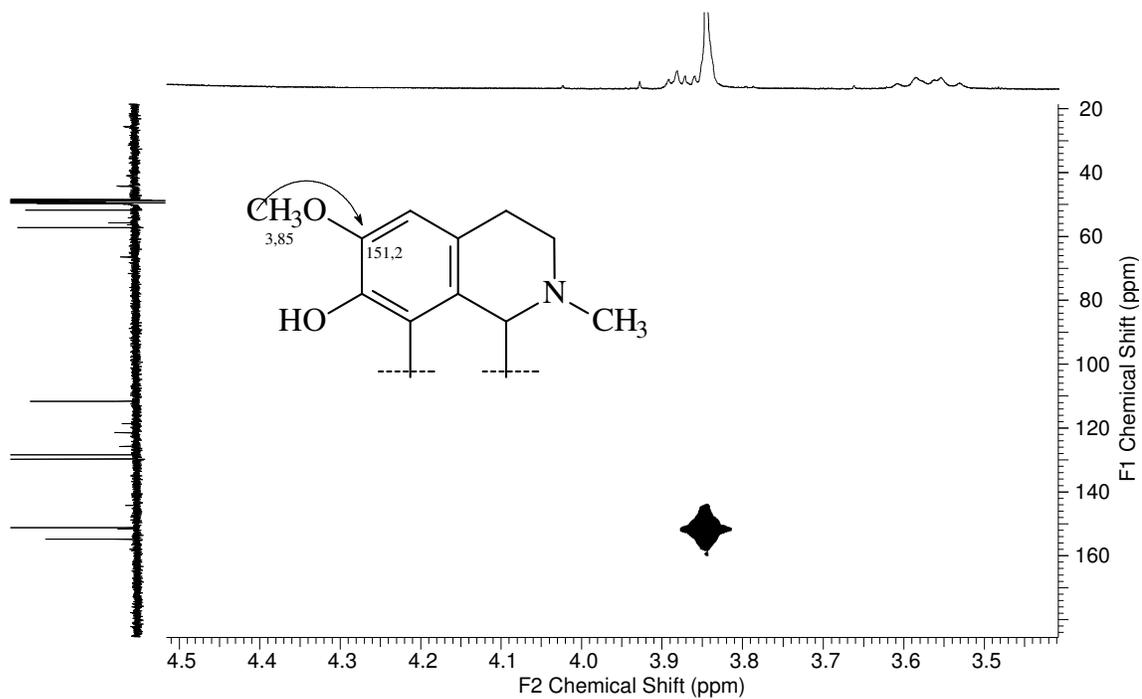


Figura 57. Algumas correlações hereronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas por HMBC para o hidrogênio em δ 3,85.

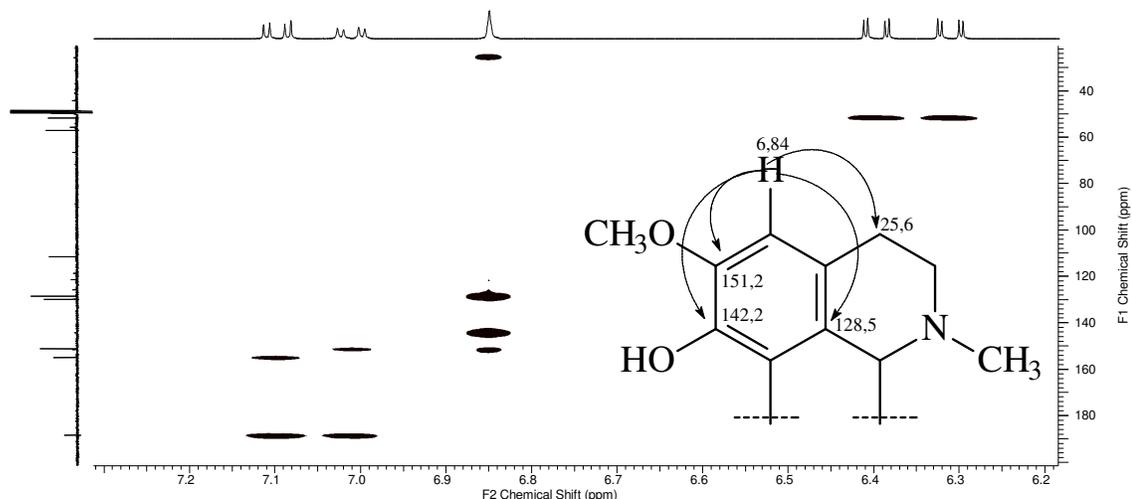


Figura 58. Algumas correlações hereronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas por HMBC para o hidrogênio em δ 6,84.

Ao se analisar o espectro de RMN de ^{13}C (Figura 59) observou-se um sinal em δ 188,4, característico de carbonila α,β insaturada, incomum em estruturas aporfínicas, porém concordante com a oxigenação prevista pela espectrometria de massas para o anel D da estrutura. A partir daí suspeitou-se tratar de um alcalóide aporfínico modificado do tipo proaporfínico, único tipo de aporfínico com esqueleto contendo carbonila α,β insaturada no anel D. Analisando-se o mapa de correlação HMBC (Figura 60) na região dos olefínicos, observou-se que o hidrogênio olefínico em δ 7,10 (dd, $J_1= 2,8$, $J_2= 9,9$) se correlacionava com os carbonos em δ 188,4 e δ 154,9 e que o hidrogênio olefínico em δ 7,01 (dd, $J_1= 2,8$, $J_2= 9,9$) se correlacionava com os carbonos em δ 188,4 e δ 151,6. Para os hidrogênios olefínicos em δ 6,39 (dd, $J_1= 2,0$, $J_2= 9,9$) e em δ 6,31 (dd, $J_1= 2,0$, $J_2= 9,9$) observa-se correlação com o carbono em δ 51,8, concordando com uma estrutura proaporfínica.

A observação por HMBC do acoplamento dos hidrogênios metilênicos em δ 2,50 (dd, $J_1= 10,8$, $J_2= 12,0$) e 2,66 (dd, $J_1= 6,4$, $J_2= 12,0$), pertencentes ao carbono em δ 44,2, com os carbonos em 51,8; 66,5; 151,6 e 154,9 e 51,8; 66,5; 151,6; 125,8 e 128,5, respectivamente, confirma a conectividade da estrutura. Com estes dados conclui-se que a substância isolada trata-se do alcalóide proaporfínico glaziovina, sendo este o primeiro relato de seu isolamento

no gênero *Unonopsis*. A glaziovina, originalmente isolada de *Ocotea glaziovii* (Lauraceae), pertence a uma pequena classe de alcalóides. Sua exploração farmacêutica ocorreu na década de 70, sendo registrada como tranqüilizante sob a marca suavadol[®]. Glaziovina apareceu em uma lista recente de sessenta alcalóides de importância farmacêutica e biológica (Pérez et al. 2005). Uma comparação entre os dados de RMN de ¹³C da amostra com dados da literatura (De Wet et al., 2004) é apresentada na tabela 6, e uma proposta de fragmentação na Figura 61.

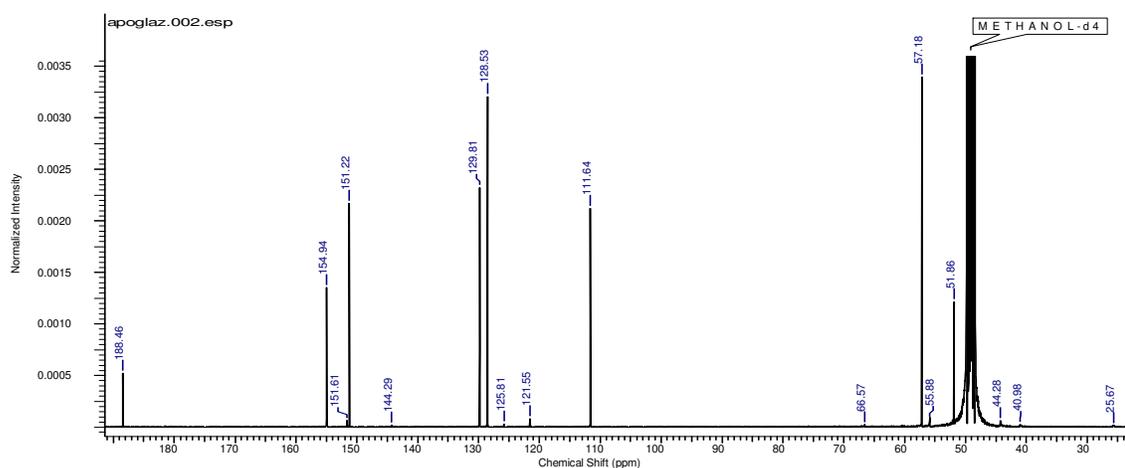


Figura 59. Espectro de RMN de ¹³C (100 MHz, metanol-d₄) de FADF1

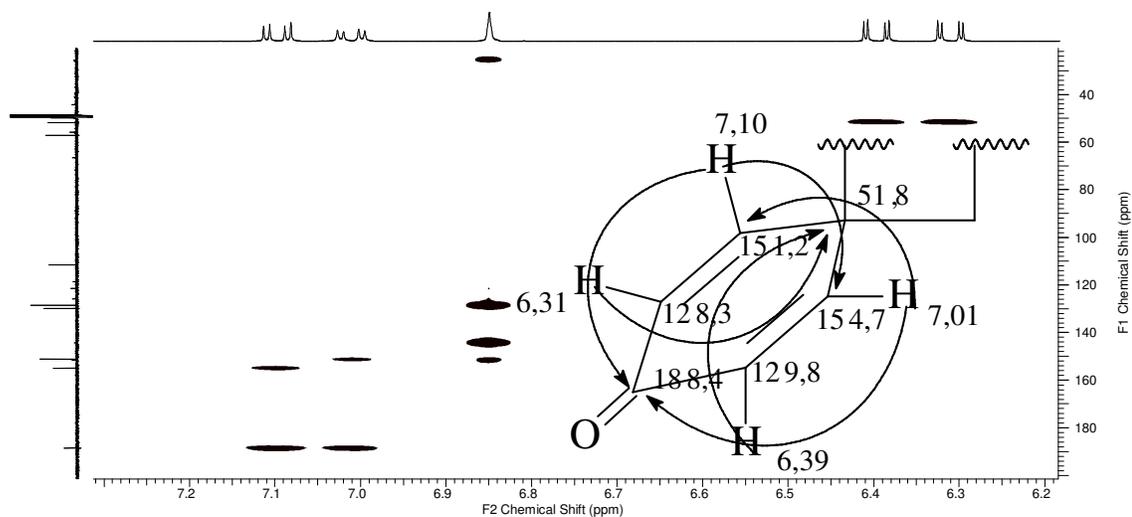


Figura 60. Algumas correlações hereronucleares ¹H - ¹³C observadas por HMBC para os hidrogênios em δ 7,10 – 6,31.

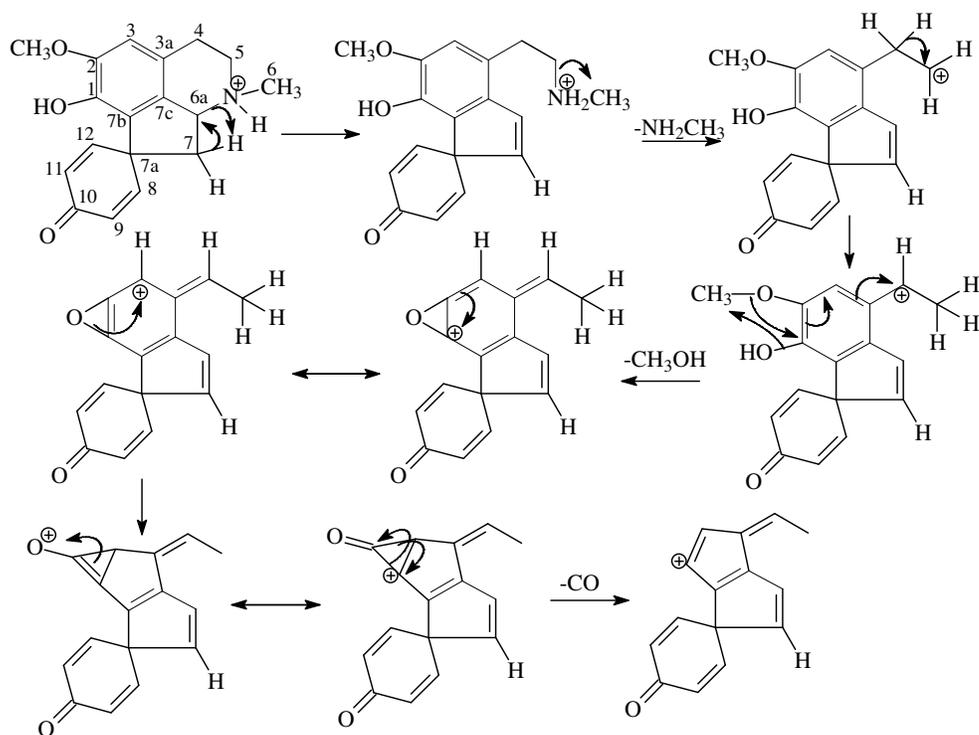


Figura 61. Proposta de fragmentação para o alcalóide glaziovina.

Tabela 6. Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de FADF1 e comparação entre os dados obtidos (metanol-d₄) e aqueles existentes na literatura.

Posição	Glaziovina*	FADF1		HMBC
	δ_c	δ_c	δ_H (J em Hz)	
1	140,9	144,2		
2	147,4	151,2		
3	109,8	111,6	6,84 s	25,6; 128,5; 144,2 e 151,2
3a	134,5	121,5		
4	27,1	25,6	3,17 dd ($J_1=3,6$ e $J_2=8,4$)	55,8; 111,6; 121,5 e 128,5
5	55,0	55,8	3,53-3,60 m 3,84-3,86 m	
6a	65,7	66,5		
7	47,1	44,2	2,51 dd ($J_1=10,8$ e $J_2=12,0$) 2,66 dd ($J_1=6,4$ e $J_2=12,0$)	51,8; 66,5; 151,6 e 154,9 51,8; 66,5; 151,6; 125,8 e 128,5
7a	50,7	51,8		
7b	122,9	125,8		
7c	124,0	128,5		
8	153,4	154,9	7,01 dd ($J_1=2,8$ e $J_2=9,9$)	188,4 e 151,6
9	128,7	129,8	6,39 dd ($J_1=2,0$ e $J_2=9,9$)	51,8
10	186,4	188,4		
11	127,5	128,3	6,31 dd ($J_1=2,0$ e $J_2=9,9$)	51,8
12	149,7	151,6	7,10 dd ($J_1=2,8$ e $J_2=9,9$)	188,4 e 154,9
OCH ₃ -2	56,5	57,1	3,85 s	151,2
N-CH ₃ -6	43,5	40,9	3,00 s	66,5 e 55,8

* De Wet et al., 2004

5.4 Identificação de FADF4

A amostra inicial identificada como FADF4 apresentou-se como um sólido amorfo amarelado. Pela análise de LC/APCI/MS (Figura 62) foi possível constatar que a amostra continha majoritariamente uma mistura de dois alcalóides, através da observação de seus íons *quasi*-moleculares em m/z 342 ($[M+H]^+$) e m/z 356 ($[M+H]^+$), sendo o de m/z 356 ($[M+H]^+$) o mais abundante na amostra. Através de investigações espectrométricas em sistema *ion trap*, foi possível sugerir a presença dos alcalóides já reportados na família Annonaceae, norglaucina e glaucina, respectivamente (Guinaudeau et. al., 1975; 1979; 1983 e 1988).

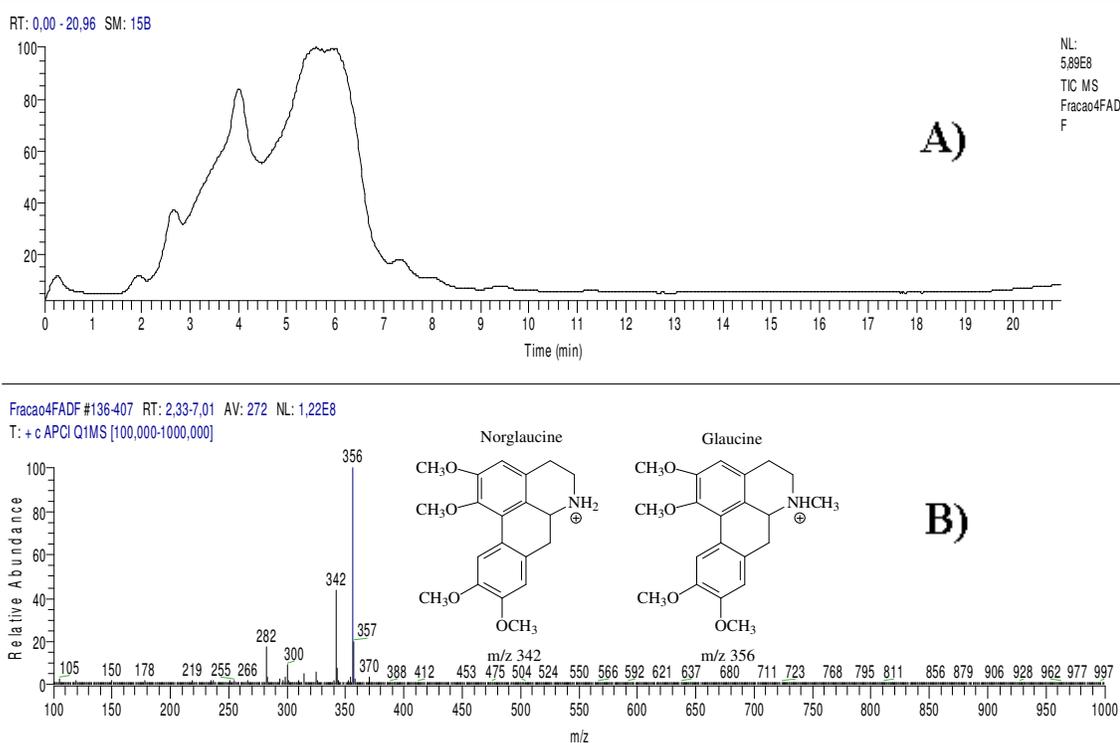


Figura 62. Cromatograma obtido através de sistema LC/APCI/MS para a amostra FADF4. A) Cromatograma de íons totais com monitoramento de m/z 100-1000; B) espectro de massas obtido pela média entre os tempos de retenção 2,33- 7,00 minutos.

No espectro de RMN ^1H (Figura 63) foram observados três singletos em δ 8,09, 6,78 e 6,63, relativos aos hidrogênios aromáticos, assim como singletos em δ 3,14, 3,65, 3,90, 3,91 e 3,93 os quais, no espectro bidimensional HSQC mostraram-se acoplados aos carbonos

em δ 42,3, 60,2, 55,8, 55,9 e 55,9, respectivamente. Estes dados estão de acordo com a presença da *N*-metila e de quatro metoxilas no esqueleto da glaucina. Observa-se também a partir do experimento de HSQC a correlação dos três singletos em δ 8,09, 6,78 e 6,63 com os carbonos em δ 111,6, 110,8 e 110,2, respectivamente (Figura 64).

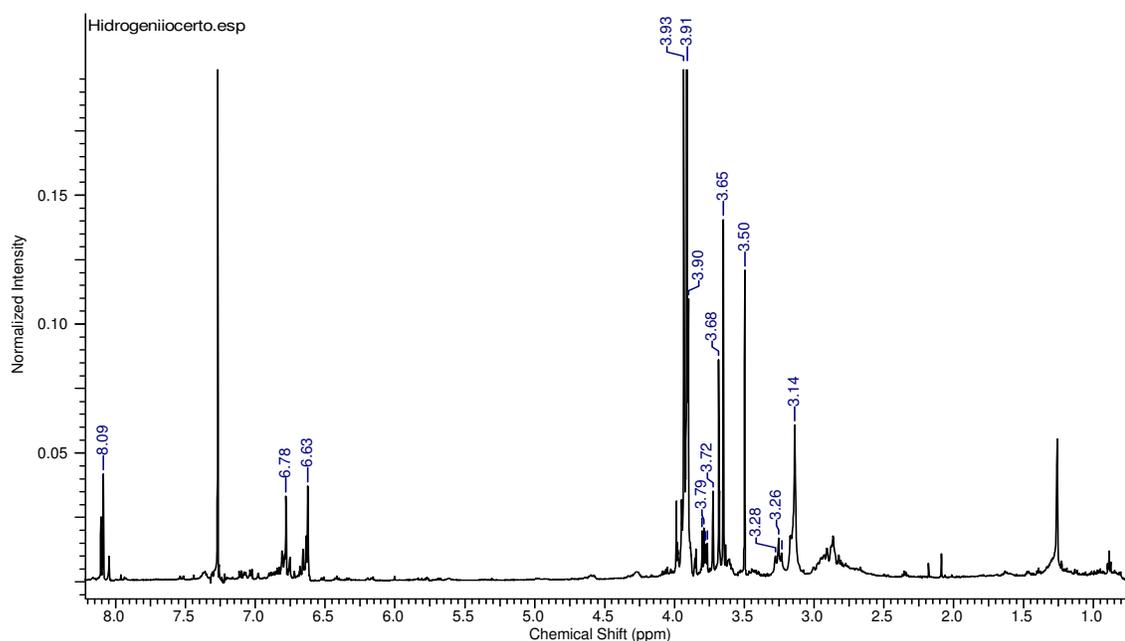


Figura 63. Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CDCl_3) da FADF4

O espectro de RMN de ^{13}C (Figura 65) revelou a presença de diversos sinais na região mais desprotegida do espectro, destacando-se os sinais em δ 153,6, 148,7, 148,0 e 145,2. Estes sinais estão de acordo com o grau de metoxilação esperado. Ainda analisando o espectro de RMN de ^{13}C , observam-se de carbonos metilênicos em δ 26,1, 31,8 e 52,8, sendo os mesmos confirmados através do experimento de DEPT 135° (Figura 66).

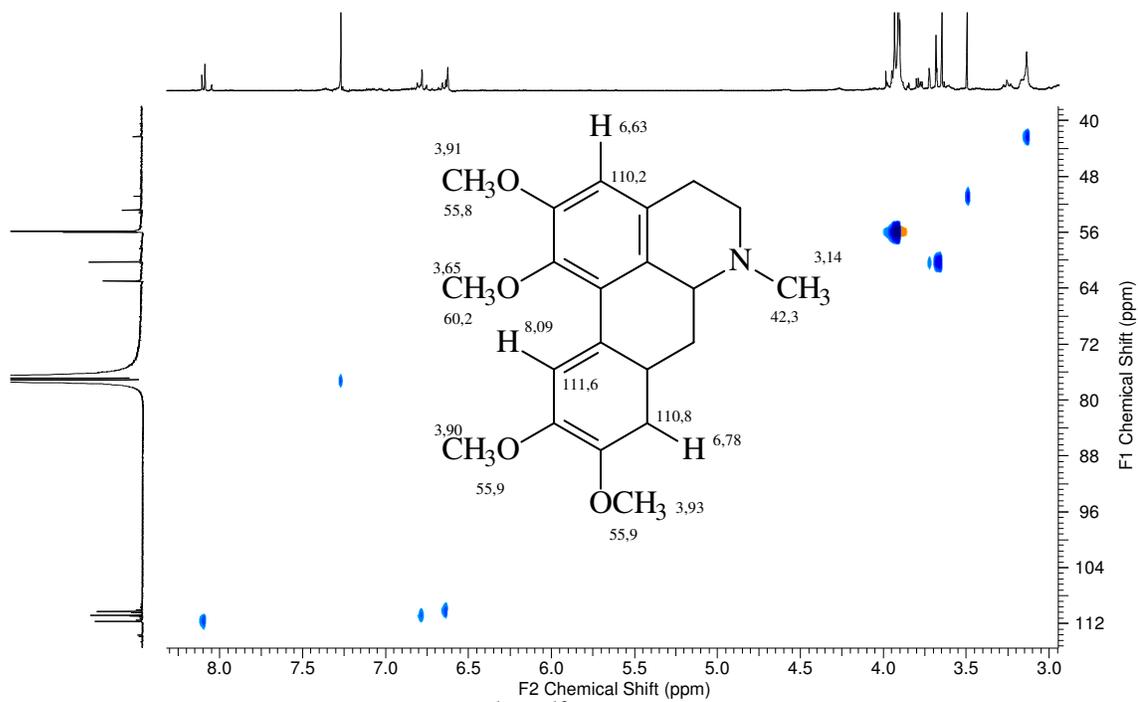


Figura 64. Correlações hereronucleares ^1H - ^{13}C observadas por HSQC para FADF4

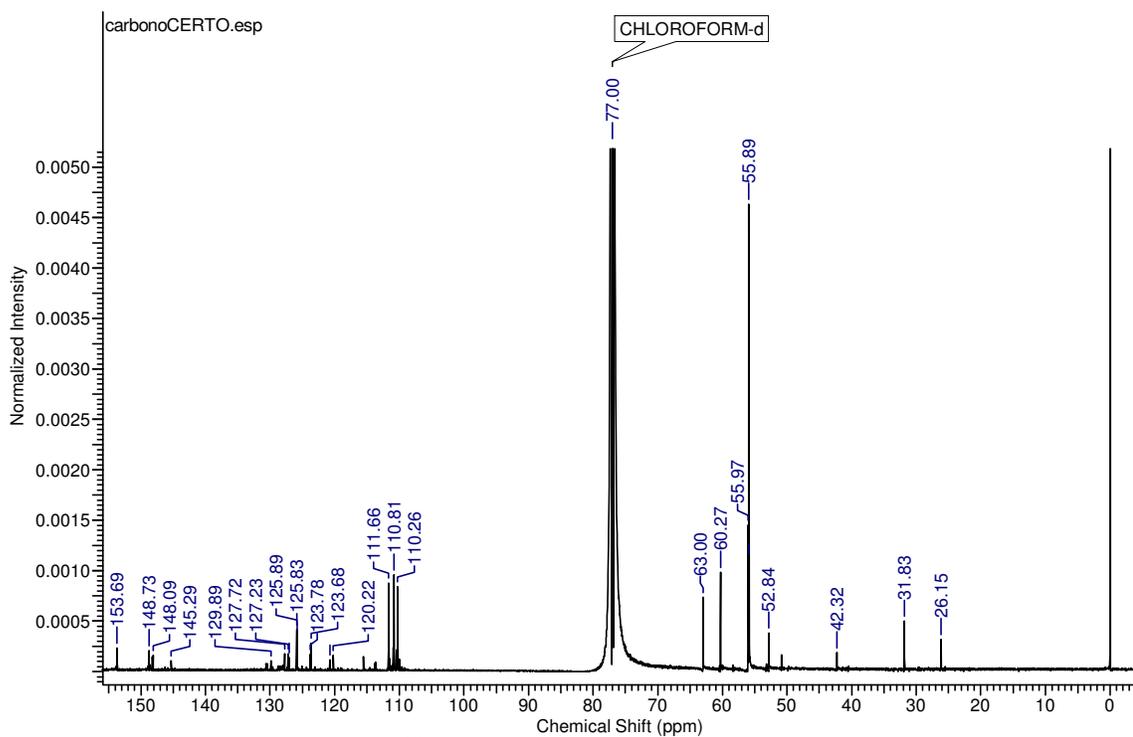


Figura 65. Espectro de RMN de ^{13}C (150 MHz, CDCl_3) de FADF4.

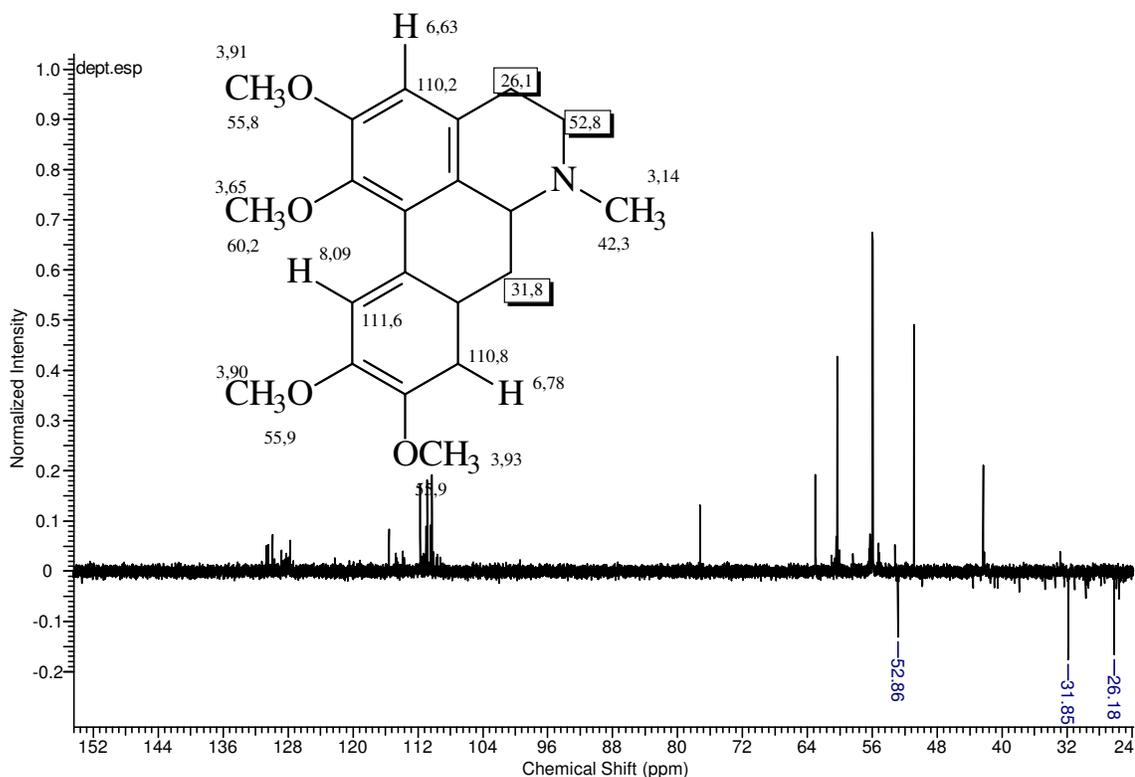


Figura 66. Espectro de DEPT 135° para a amostra FADF4.

Ao se analisar o espectro de HMBC, observam-se as correlações a longa distancia do hidrogênio aromático em δ 8,09 com os carbonos em δ 125,8 e 148,7; do hidrogênio aromático em δ 6,78 com os carbonos em δ 31,8, 123,7 e 148,2; e do hidrogênio aromático em δ 6,63 com os carbonos em δ 26,1, 120,2, 145,2 e 153,6 (Figura 67). Na ampliação do espectro de HMBC observam-se os acoplamentos dos hidrogênios metílicos das metoxilas em δ 3,65, 3,90, 3,91 e 3,93 com os carbonos em δ 145,2, 148,2, 153,6, e 148,7, respectivamente, além do acoplamento dos hidrogênios metílicos da *N*-metila com os carbonos em δ 52,8 e 63,0 (Figura 68), conforme esperado para a estrutura proposta. Uma comparação entre os dados de RMN de ^{13}C da amostra com dados da literatura (Zanin & Lordello, 2007) é mostrada na tabela 7, uma estrutura numerada é apresentada na Figura 69.

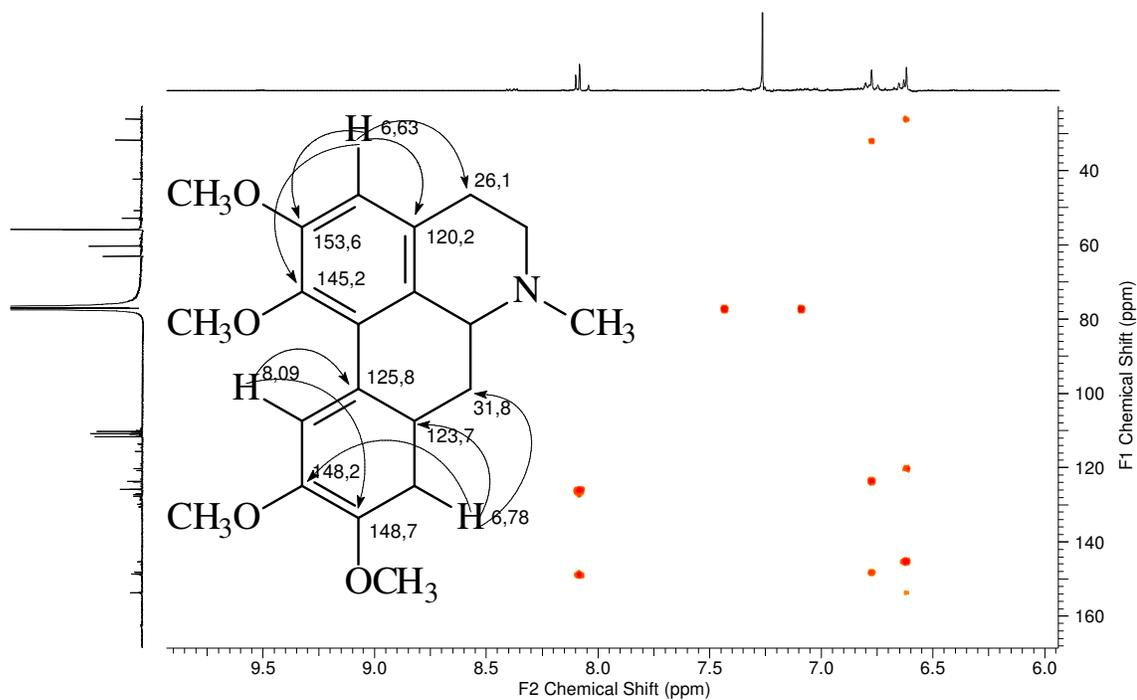


Figura 67. Correlações hereronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas por HMBC para os hidrogênios aromáticos de FADF4

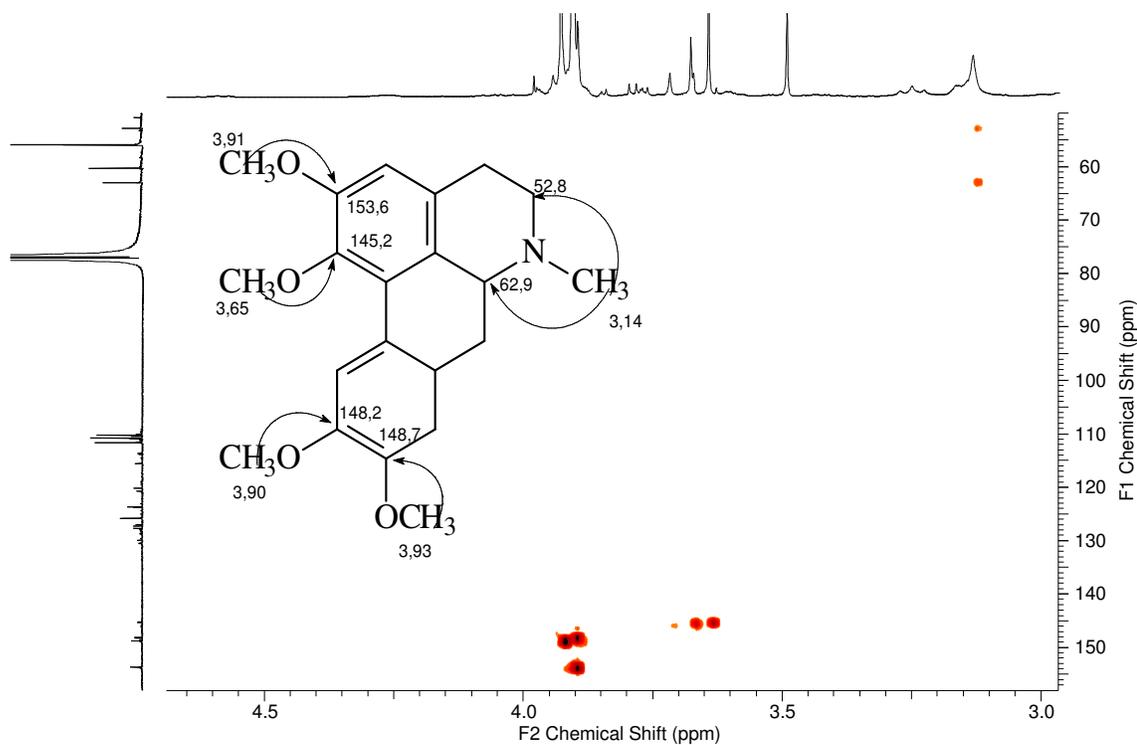


Figura 68. Correlações hereronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ observadas por HMBC para os hidrogênios metílicos das quatro metoxilas e da *N*-metila de FADF4.

Tabela 7. Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de FADF4 e comparação entre os dados obtidos (CDCl₃) e aqueles existentes na literatura (CDCl₃).

Posição	Glaucina*	FADF4	δ_H (J em Hz)	HMBC
	δ_C	δ_C		
1	143,9	145,2		
2	151,5	153,6		
3	110,1	110,2	6,63s	26,1, 120,2, 145,2 e 153,6
3a	127,0	120,2		
4	29,1	26,1		
5	53,1	52,8		
6a	62,3	63,0		
7	34,4	31,8		
7a	129,1	123,7		
8	110,6	110,8	6,78s	31,8, 123,7 e 148,0;
9	147,7	148,7		
10	147,1	148,0		
11	111,4	111,6	8,09s	125,8 e 148,7
11a	124,2	125,8		
11b	126,5	127,7		
11c	128,6	129,8		
N-CH3-12	43,4	42,3	3,14s	52,8 e 63,0
OCH3-1	59,8	60,2	3,65s	145,2
OCH3-2	55,5	55,8	3,91s	153,6
OCH3-9	55,5	55,9	3,90s	148,2
OCH3-10	55,7	55,9	3,93s	148,7

* Zanin & Lordello, 2007

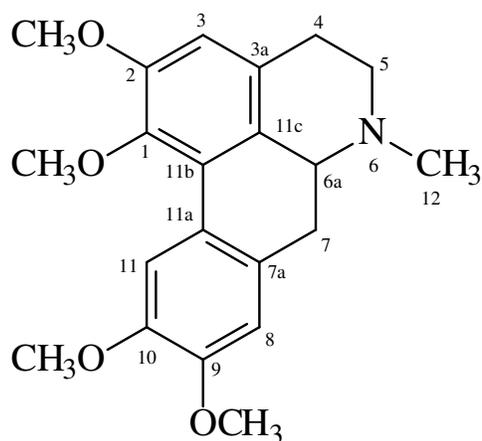


Figura 69. Esqueleto aporfínico da substância majoritária glaucina devidamente numerado.

5.5 Identificação de EHGCS1

A substância apresentou-se como um sólido cristalino. No espectro de RMN ^1H (Figuras 70 e 71) foram observados sinais em δ 5,85 (d, $J=6,0$ Hz), 5,31 (d, $J=6,0$ Hz), sugerindo a presença de ligações duplas conjugadas e em 5,09 (t, $J=7,0$ Hz), sugerindo a presença de outro hidrogênio olefinico na estrutura, além de δ 4,31-4,24 (m,) e δ 3,29-3,21 (m) sugerindo a presença de hidrogênios carbinólicos. O espectro de RMN ^{13}C evidenciou sinais de 30 carbonos, destacando-se os sinais de metilas em δ 16,1-28,4; de carbonos olefinicos em δ 146,1; 140,8; 131,2; 124,9; 121,3; 116,0 e de dois carbonos carbinólicos em δ 78,9 e 74,7 (Figura 72).

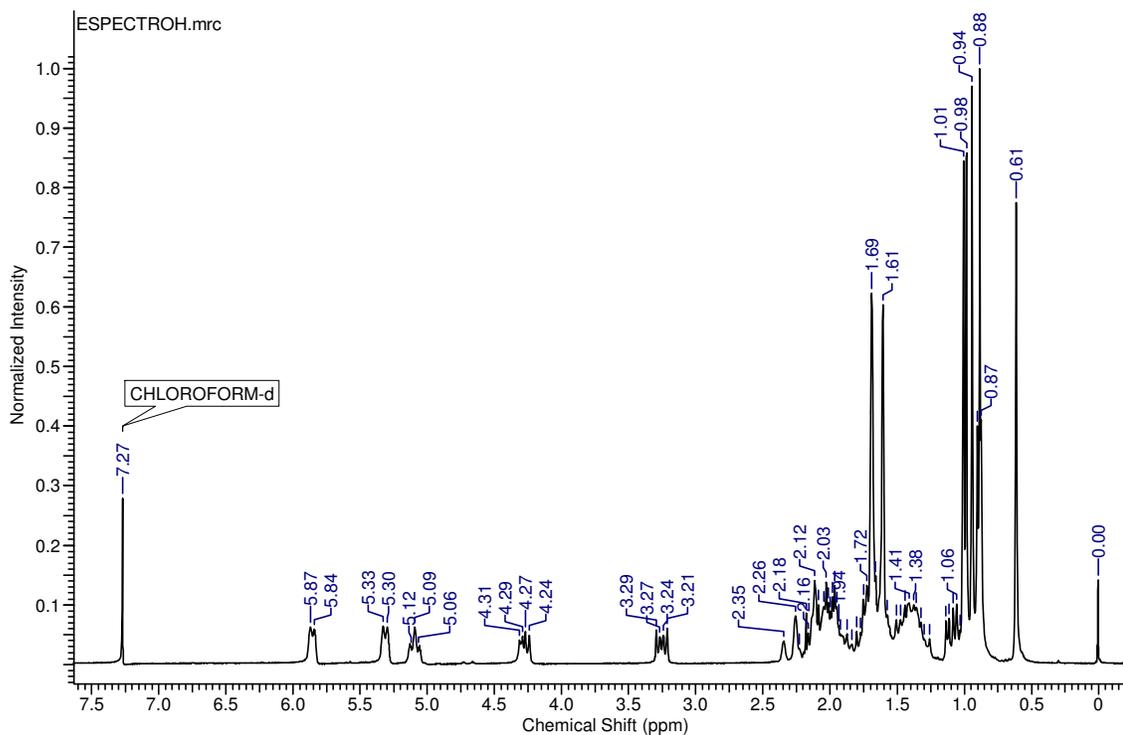


Figura 70. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de EHGCS1

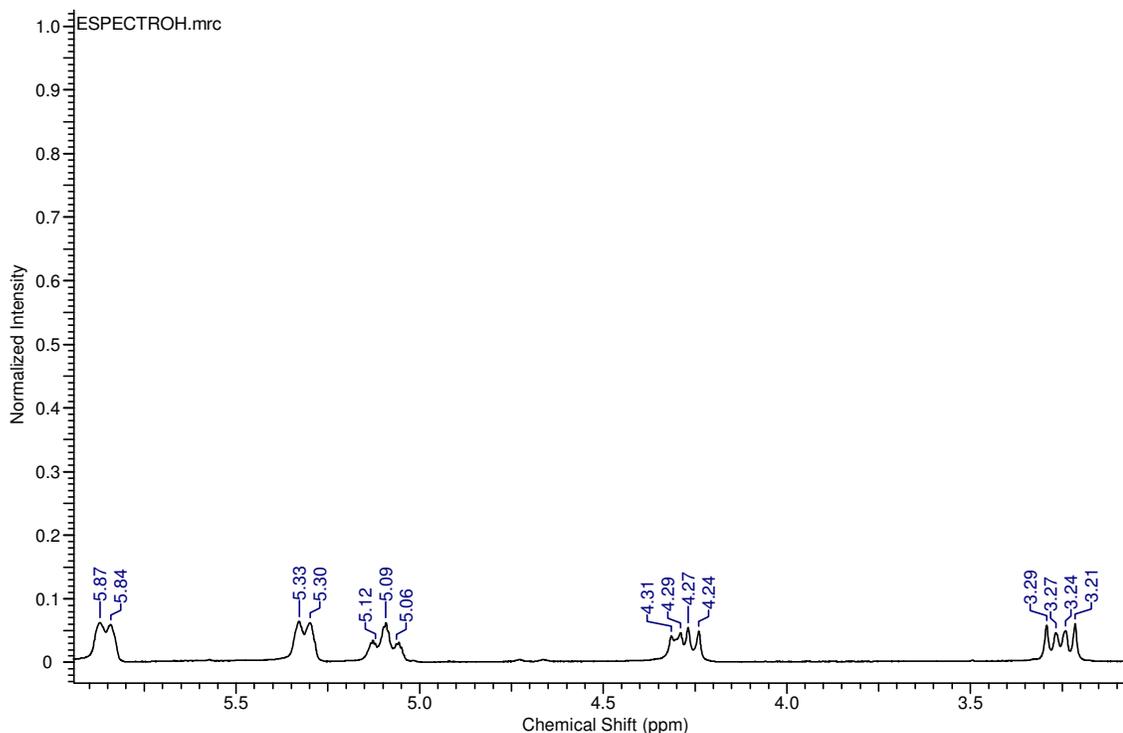


Figura 71. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de EHGCS1

A análise por espectrometria de massas operando com fonte APCI confirmou a massa de 440 Da, sendo visualizado no espectro a forma *quasi*-molecular da molécula de m/z 441 ($[\text{M}+\text{H}]^+$). No espectro de massas é possível observar ainda a perda de duas moléculas de água, concordando com a presença das hidroxilas ligadas aos carbonos em δ 78,9 e 74,7, o que é comum em substâncias hidroxiladas sensíveis à aplicação de temperatura (Figura 73).

A identificação do triterpeno policarpol (Figura 74), já isolado das raízes de *U. guatterioides* e identificado nas suas cascas através de análise de CCD por Touche et al. (1981), foi comprovada a partir da comparação dos dados de RMN de ^{13}C com dados da literatura (Pereira et al., 2003) (Tabela 8). Esta substância foi também isolada de *Unonopsis glaucopetala*, *Unonopsis spectabilis* e *Unonopsis pacifica* (Jayasuriya et al., 2005; Laprévotte et al., 1987; Arango et al., 1988).

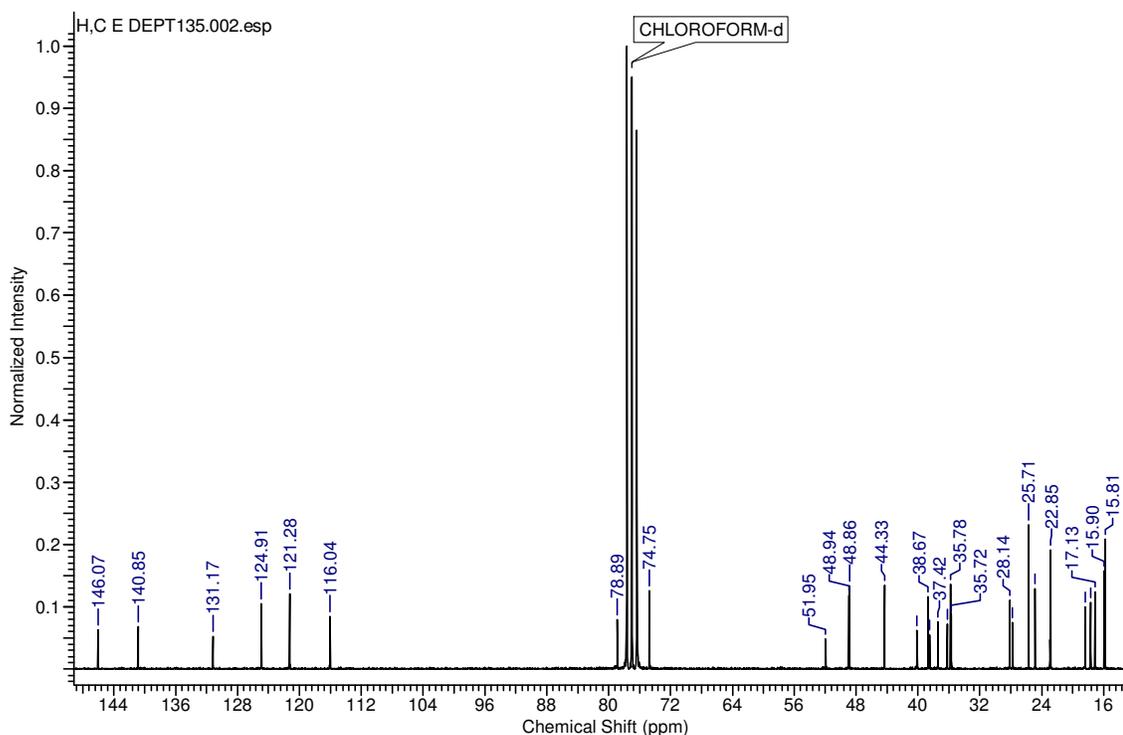


Figura 72. Espectro de RMN de ^{13}C (50 MHz, CDCl_3) de EHGCS1

Vale destacar que a este triterpeno, descoberto por Cavé e colaboradores simultaneamente nas cascas de *Polyulthia oliveri* e *Meiocurpidium lepidotum* na década de 70 (Lebouef et al., 1982), estão associadas algumas atividades biológicas tais como: Atividade antitripanossômica, antifilarial e citotóxica (Ngantchou et al., 2009; Matos et al., 2006; Nyasse et al., 2006)

Os sólidos cristalinos previamente identificados como EHDCS1 e EHDGS1 foram caracterizados como sendo o triterpeno policarpol através da análise por cromatografia em camada delgada e espectrometria de massas (Figura 73), sendo os rendimentos de eficiência de extração para os diferentes materiais vegetais descritos tabela 9.

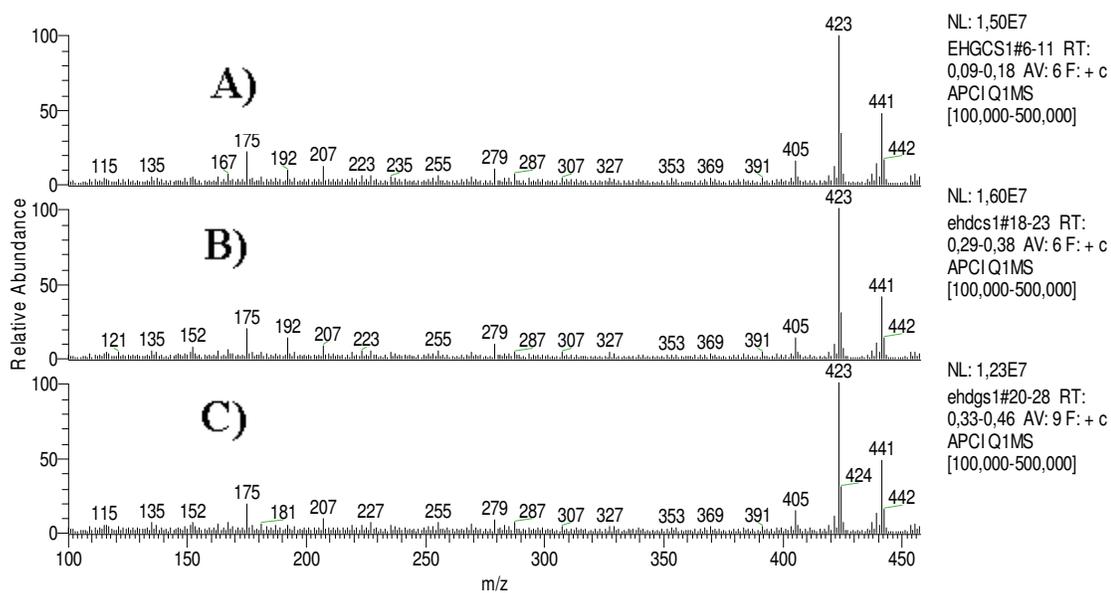


Figura 73. Espectro de massas da amostra (A) EHGCS1, (B) EHDCS1 e (C) EHDGS1 obtida em fonte APCI.

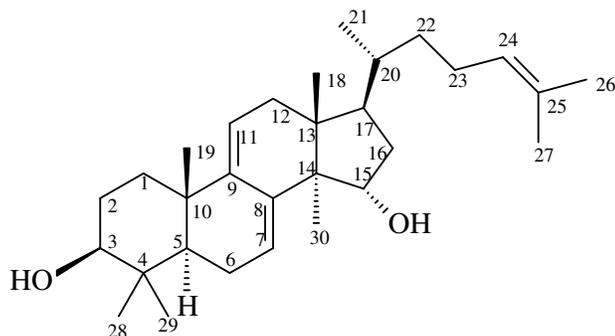


Figura 74. Esqueleto do polricarpol devidamente enumerado.

Tabela 8. Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de EHGCS1 e comparação entre os dados obtidos e aqueles existentes na literatura para o policarpol.

Carbonos	Policarpol*	EHGCS1
C-1	35,7	35,7
C-2	27,8	27,7
C-3	78,9	78,9
C-4	38,7	38,7
C-5	48,9	48,8
C-6	22,9	22,9
C-7	121,3	121,3
C-8	140,9	140,8
C-9	146,1	146,1
C-10	37,4	37,4
C-11	116,1	116,0
C-12	38,5	38,5
C-13	44,3	44,3
C-14	51,9	51,9
C-15	74,7	74,7
C-16	40,1	40,1
C-17	48,9	48,9
C-18	15,8	15,9
C-19	22,8	22,8
C-20	35,8	35,8
C-21	18,4	18,3
C-22	36,2	36,2
C-23	24,9	24,8
C-24	124,9	124,9
C-25	131,2	131,2
C-26	17,6	17,6
C-27	25,7	25,7
C-28	28,1	28,1
C-29	15,0	15,8
C-30	17,1	17,1

* Pereira et al., 2003

Tabela 9. Rendimento do policarpol isolado de *U. guatteroides* e *U. duckei*

Espécie	Quantidade
<i>U. guatteroides</i> (cascas)	20,3 mg (503,9g) (40,1 mg/Kg)
<i>U. duckei</i> (cascas)	185,8 mg (766,3g) (242,4 mg/Kg)
<i>U. duckei</i> (galhos)	297,3 mg (1197,7) (248,2 mg/Kg)

5.6 Identificação de EHGCF32133

O sólido cristalino identificado como EHGCF32133 apresentou o mesmo R_f quando comparado ao padrão de β -sitosterol em cromatografia em camada delgada.

Pela análise do espectro de RMN de ^1H de EHGCF32133, Figuras 75 e 76, verificou-se a presença de sinais em $\delta 5,36$ (d $J= 4,8$) indicativo da presença de hidrogênio vinílico de esqueleto esteroidal e dois sinais em $\delta 5,16$ (dd $J_1= 8,5$, $J_2= 15,5$) e $\delta 5,00$ (dd $J_1= 8,7$, $J_2= 15,5$) confirmando a presença de dupla ligação trans dissubstituída, além de um multipeto em $\delta 3,57-3,50$ referente a um hidrogênio carbinólico. Observaram-se também sinais na região de $\delta 0,68-2,2$ correspondentes aos hidrogênios metílicos (Figura 77).

Pelo espectro de RMN de ^{13}C (Figura 78) verificaram-se os sinais em $\delta 140,7$ e $121,7$ típicos de esqueletos esteroidal 3β -ol-5-en, e em $\delta 138,3$ e $129,2$ compatível com a presença de outra dupla ligação, localizada em cadeia lateral de esteróides.

Através de comparação entre os dados da literatura (Pateh et al., 2009) e o espectro de RMN de ^{13}C , Figuras 78 e 79, foi possível realizar o assinalamento dos demais carbonos, sendo estes apresentados na tabela 10. Os sinais em $\delta 33,9$ e $26,0$ correspondem aos deslocamentos químicos dos átomos de carbono da ligações simples (C_{22} - C_{23}) do β -sitosterol. Os sinais em $\delta 25,4$ e $23,0$ são respectivamente correspondentes aos carbonos metilênicos (C_{28}) do estigmasterol e β -sitosterol e o sinal em $\delta 71,8$ ao C_3 do estigmasterol e β -sitosterol.

O sólido cristalino identificado como EHGG7 apresentou o mesmo R_f quando comparado ao sólido EHGCF32133 e ao padrão autêntico de β -sitosterol em cromatografia em camada delgada, além de revelar de forma idêntica com vanilina sulfúrica. O sólido foi analisado por GC/MS (Figura 80), confirmando assim se tratar também de uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol (Figura 81).

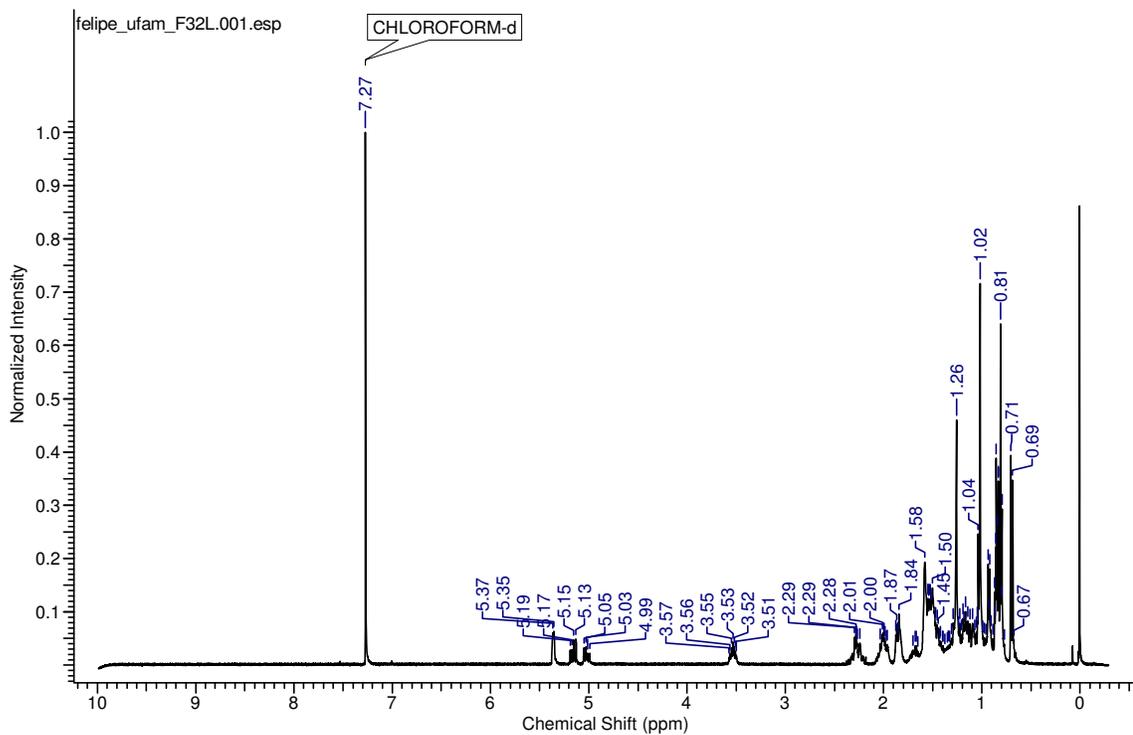


Figura 75. Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133.

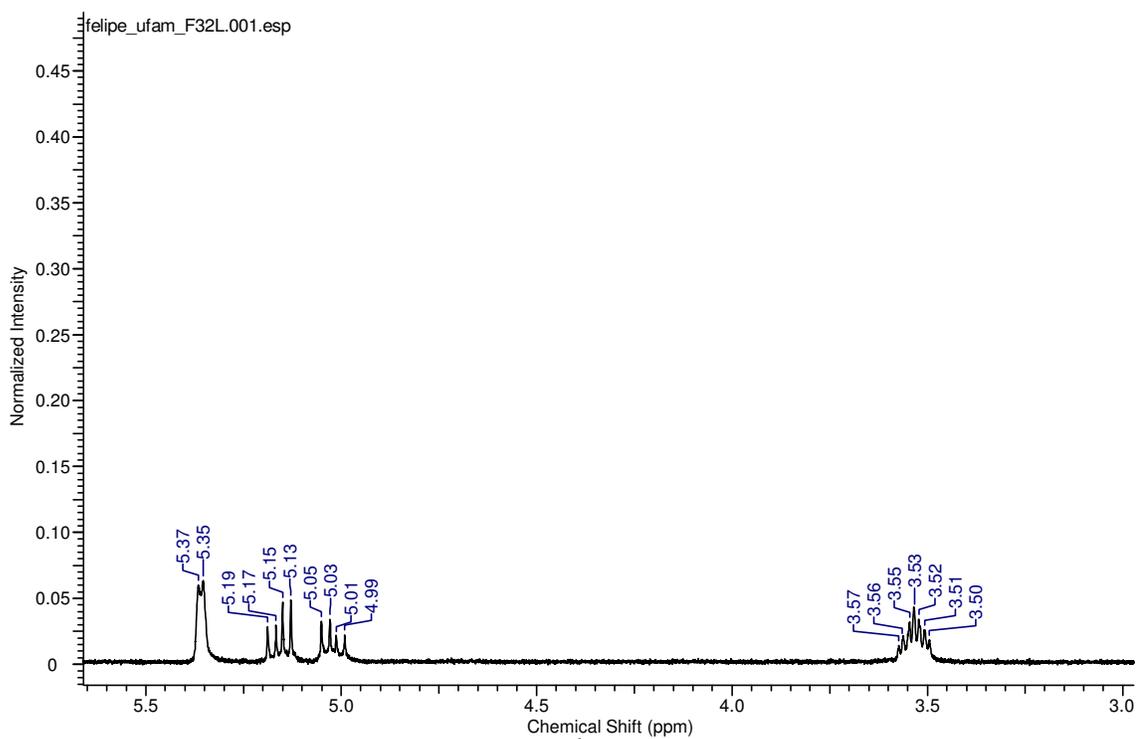


Figura 76. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133

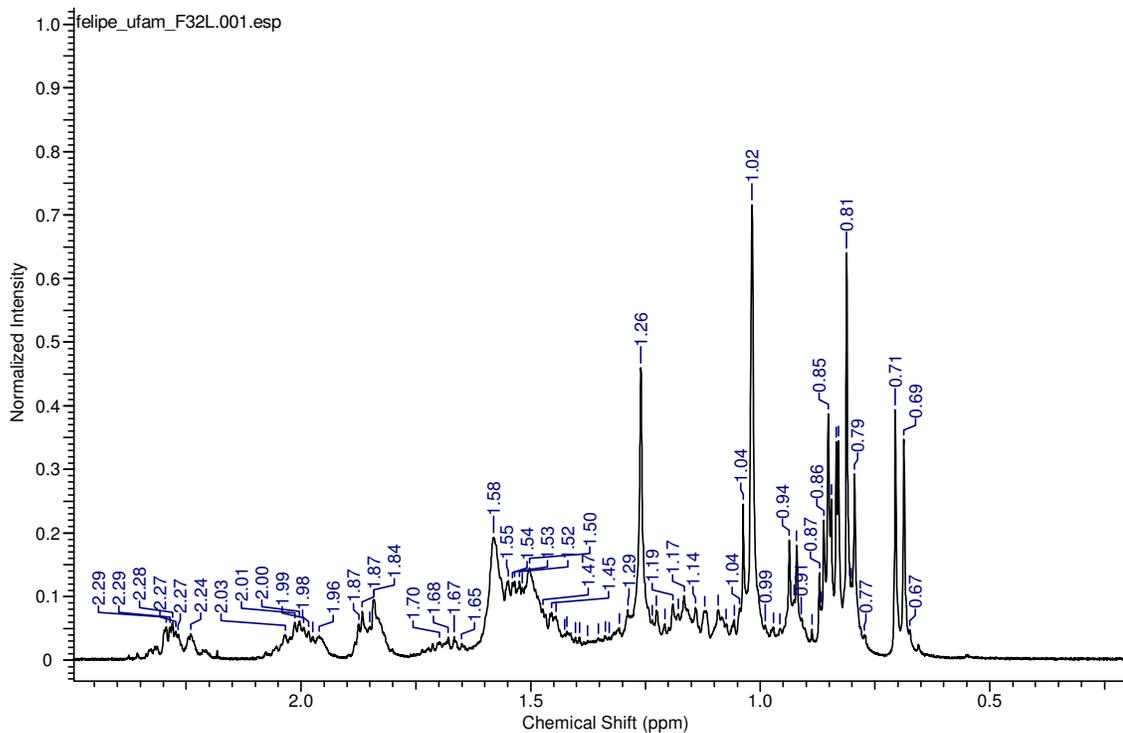


Figura 77. Ampliação do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133

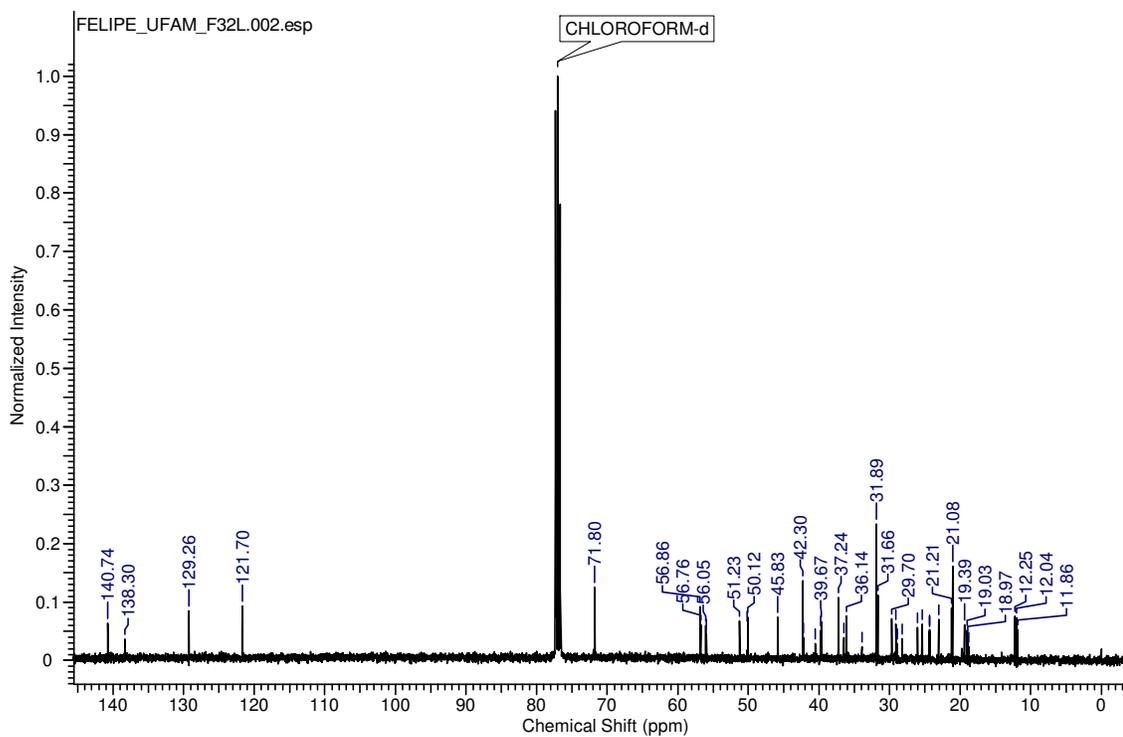


Figura 78. Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de EHGCF32133

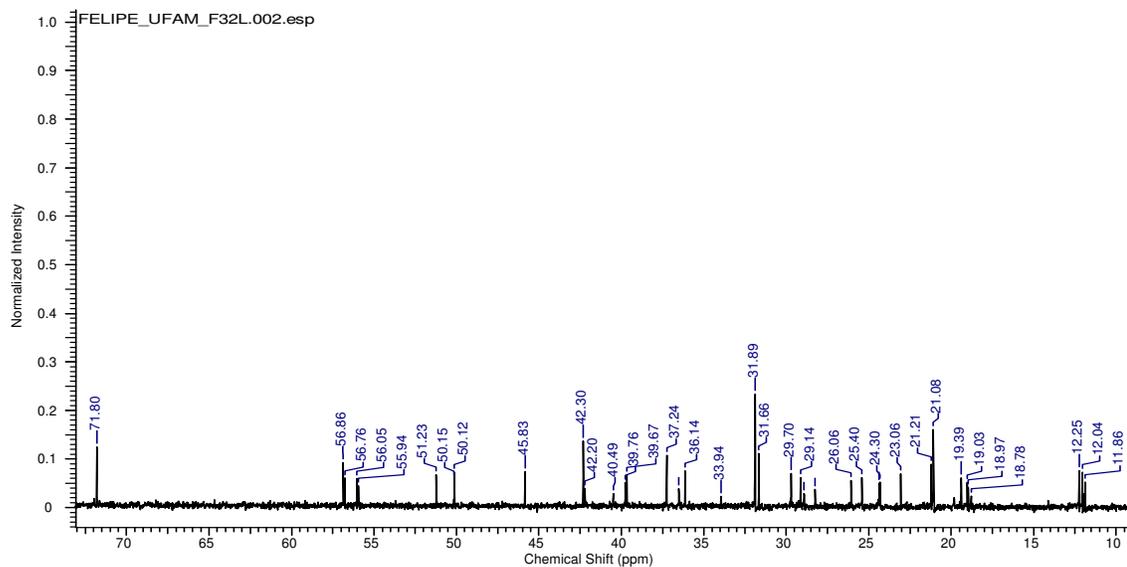


Figura 79. Ampliação do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) de EHGGCF32133

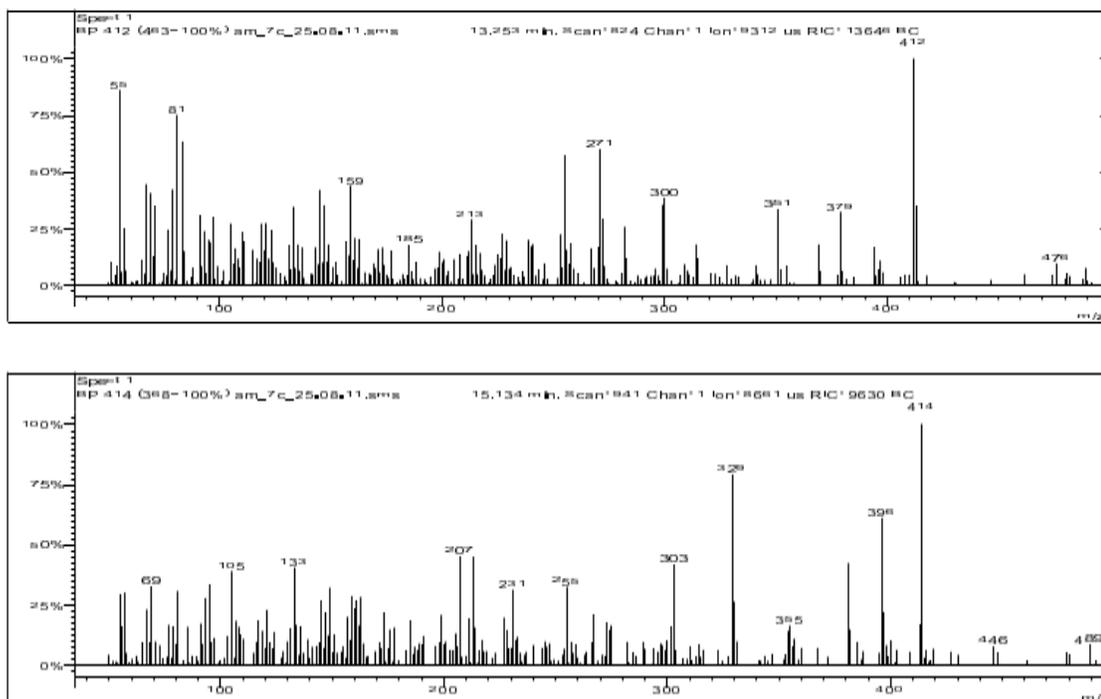


Figura 80. Espectros de massas do estigmasterol e do sitosterol obtidos por IE a 70 eV, respectivamente de cima para baixo para a amostra EHGG7.

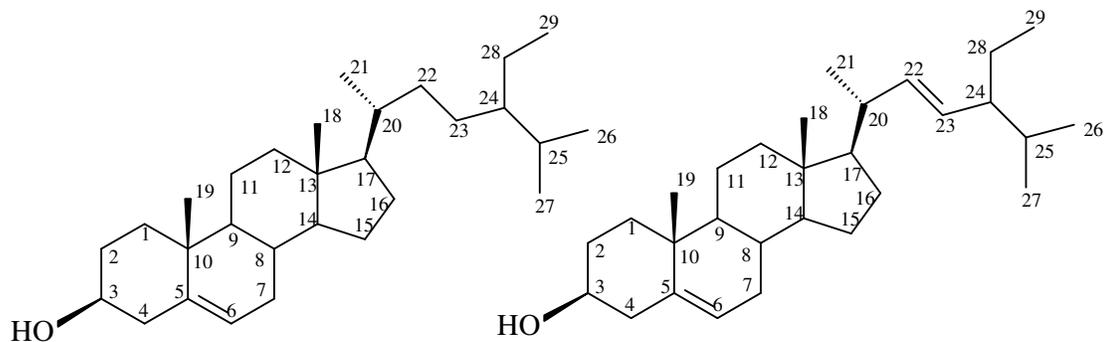


Figura 81. Esqueleto do β -sitosterol e estigmasterol respectivamente.

Tabela 10. Atribuição dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C de EHGCF32133 e comparação entre os dados obtidos e aqueles existentes na literatura para o estigmasterol e sitosterol.

Carbonos	β -Sitosterol*	EHGCF32133	Estigmasterol*	EHGCF32133
C-1	37,3	37,2	37,3	37,2
C-2	31,6	31,6	31,6	31,8
C-3	71,8	71,8	71,8	71,8
C-4	42,2	42,2	42,3	42,3
C-5	140,8	140,7	140,8	140,7
C-6	121,7	121,7	121,7	121,7
C-7	31,9	31,9	31,9	31,9
C-8	31,9	31,9	31,9	31,9
C-9	50,2	50,1	50,2	50,1
C-10	36,5	36,5	36,5	36,5
C-11	21,1	21,1	21,1	21,1
C-12	39,8	39,8	39,7	39,7
C-13	42,3	42,2	42,3	42,3
C-14	56,8	56,7	56,9	56,8
C-15	24,3	24,3	24,4	24,3
C-16	28,3	28,2	28,4	28,9
C-17	56,0	56,0	56,1	56,0
C-18	11,9	11,8	12,1	12,0
C-19	19,4	19,4	19,4	19,4
C-20	36,2	36,1	40,5	40,5
C-21	18,8	18,8	21,2	21,1
C-22	33,9	33,9	138,3	138,3
C-23	26,1	26,0	129,3	129,2
C-24	45,9	45,8	51,2	51,2
C-25	29,2	29,1	31,9	31,8
C-26	19,8	19,8	21,2	21,2
C-27	19,3	19,3	19,0	18,9
C-28	23,1	23,0	25,4	25,4
C-29	12,2	12,3	12,1	12,2

* Patch et al, 2009

5.7 Identificação de EHGG6

O sólido amorfo codificado como EHGG6 apresentou em seu espectro de RMN de ^1H (Figura 82) um singlete característico em $\delta 1,26$ evidenciando se tratar de uma substância ou mistura de substâncias com características graxas. Analisando o cromatograma de íons totais, obtido por GC/MS, pôde-se confirmar que a amostra analisada tratava-se de uma mistura de ésteres metílicos e ácidos graxos, sendo o constituinte majoritário caracterizado como ácido palmítico, através da comparação do espectro de MS^2 (Figura 83) com o padrão de fragmentação contido na biblioteca do aparelho.

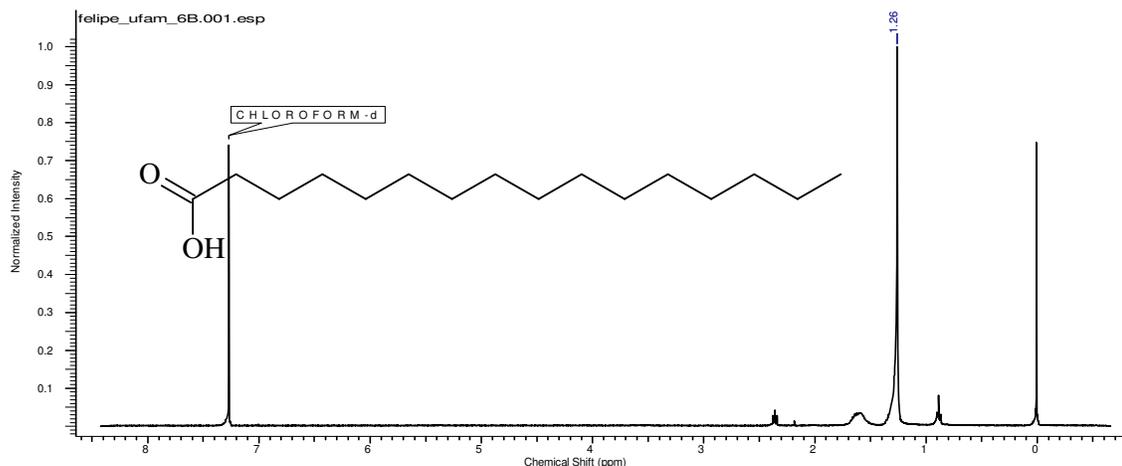


Figura 82. Espectro de RMN de ^1H (200 MHz, CDCl_3) de EHGGCF32133.

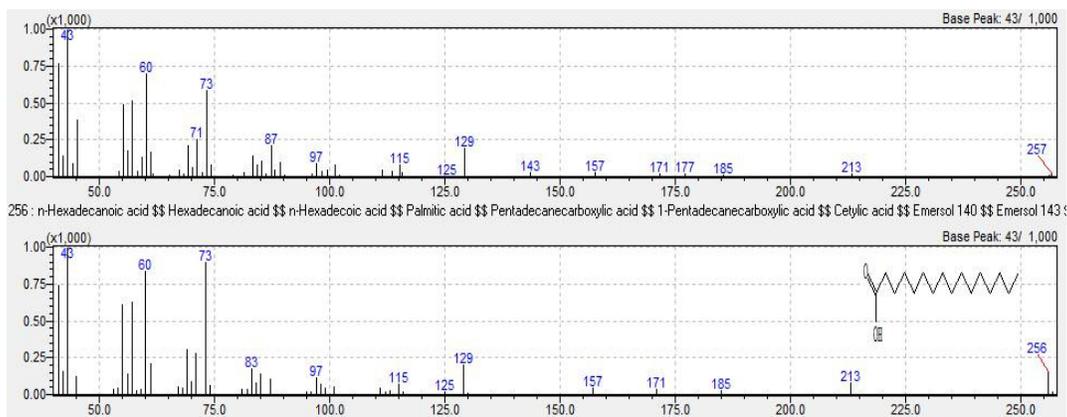


Figura 83. Espectro de MS^2 do constituinte majoritário da amostra em comparação com padrão.

5.8 Análise do perfil alcaloídico entre as espécies *U. guatterioides* e *U. duckei*

5.8.1 Perfil alcaloídico das cascas

Através da comparação entre os perfis alcaloídicos das cascas de *U. guatterioides* e *U. duckei* (Figura 84) é possível perceber uma similaridade química satisfatória a ponto de concordar com o agrupamento taxonômico. Apesar da fração alcaloídica das cascas de *U. guatterioides* ter mais expressivamente os alcalóides liriodenina e lisicamina e a fração alcaloídica das cascas de *U. duckei* ter majoritariamente o alcalóide nornuciferina, observa-se uma similaridade muito grande quando comparados os íons de menor intensidade.

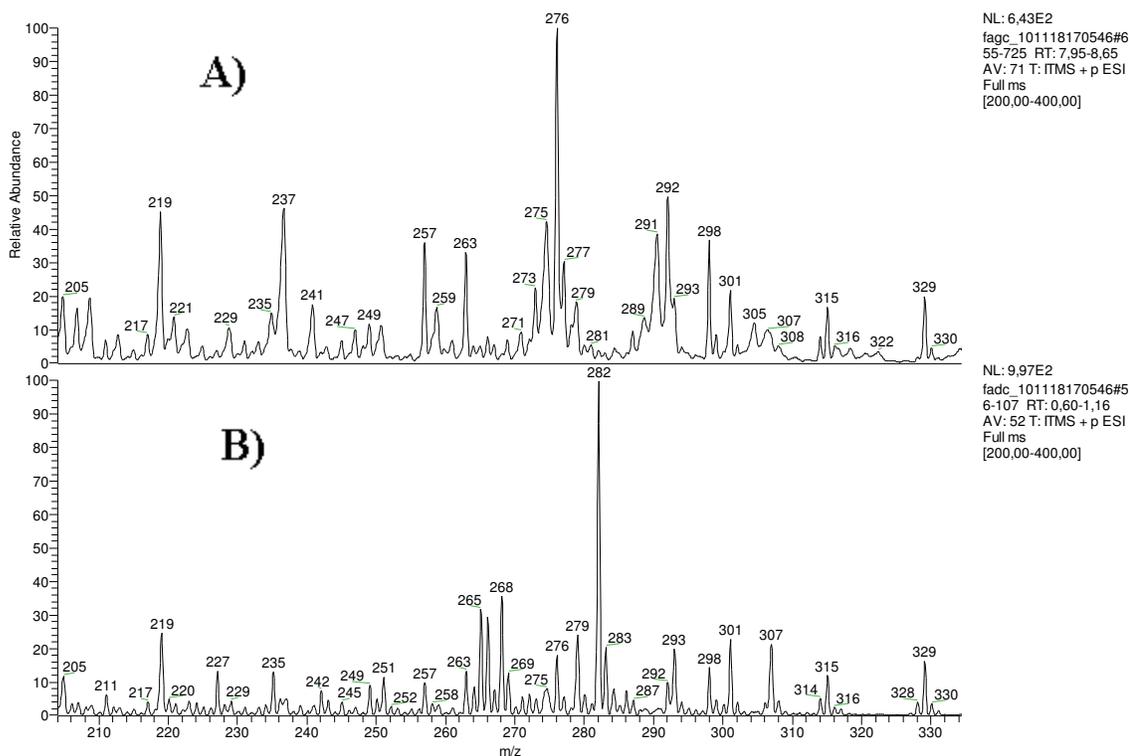


Figura 84. Perfil alcaloídico das cascas de (A) *U. guatterioides* e (B) *U. duckei*.

5.8.2 Perfil alcaloídico dos galhos

Comparando-se os perfis alcaloídicos dos galhos de *U. guatterioides* e *U. duckei* (Figura 85) é possível demonstrar que a técnica espectrométrica possibilita tanto diferenciar indivíduos de uma mesma espécie (observação dos alcalóides de melhor abundância relativa), quanto observar sua similaridade química (observação dos alcalóides de menor abundância relativa). Uma região ampliada do espectro é apresentada na Figura 86.

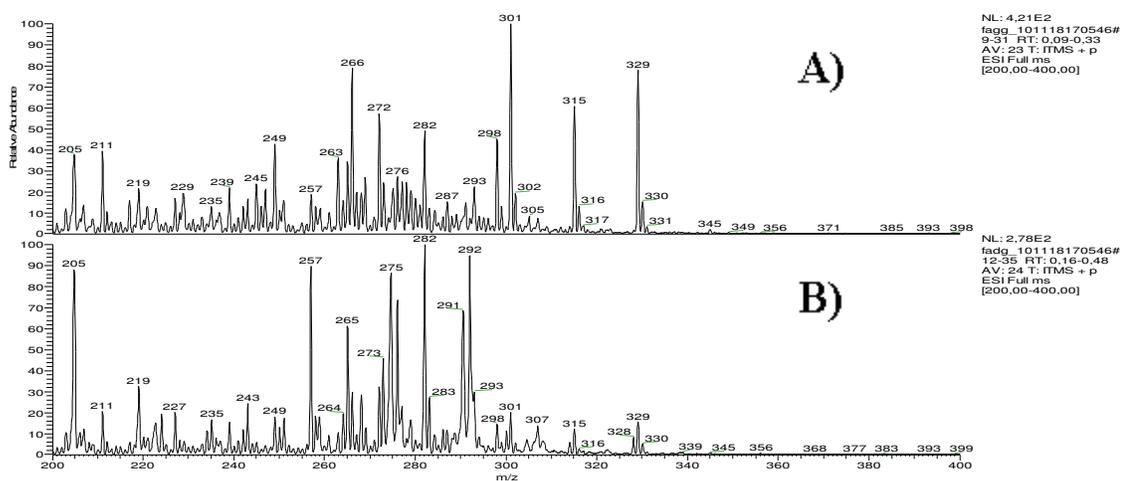


Figura 85. Perfil alcaloídico dos galhos de (A) *U. guatterioides* e (B) *U. duckei*.

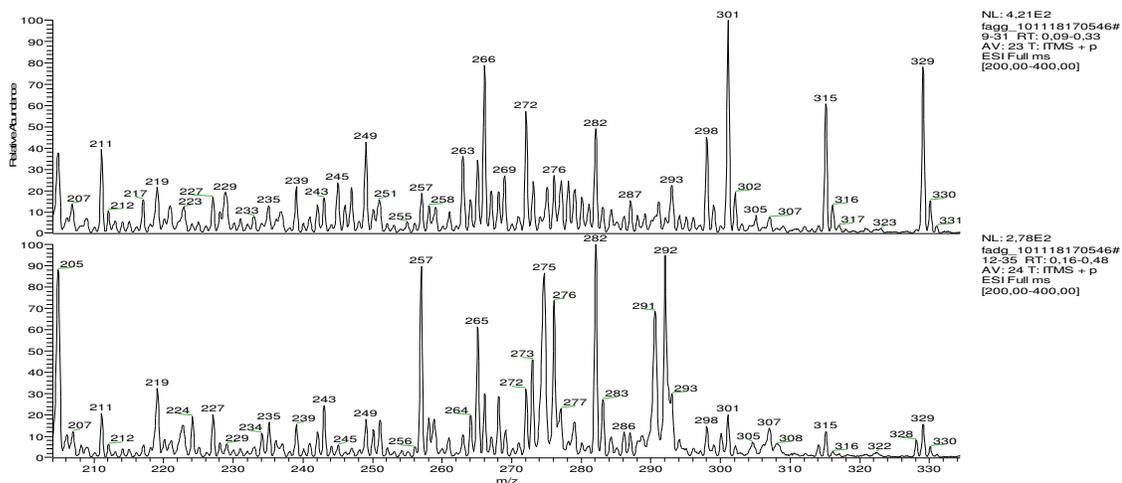


Figura 86. Região do espectro de massas ampliada de m/z 205 até aproximadamente m/z 330.

5.8.3 perfil alcaloídico das folhas

A baixa similaridade química observada na comparação entre o perfil alcaloídico das folhas de *U. Guatterioides* e *U. Duckei* (Figura 87) demonstra que determinados órgãos das plantas contribuem pouco quando se pretende realizar o agrupamento quimiotaxonômico através da análise do perfil de determinadas classes específicas de metabólitos secundários. Uma ampliação entre a região de m/z 250-330 pode ser observada na Figura 88.

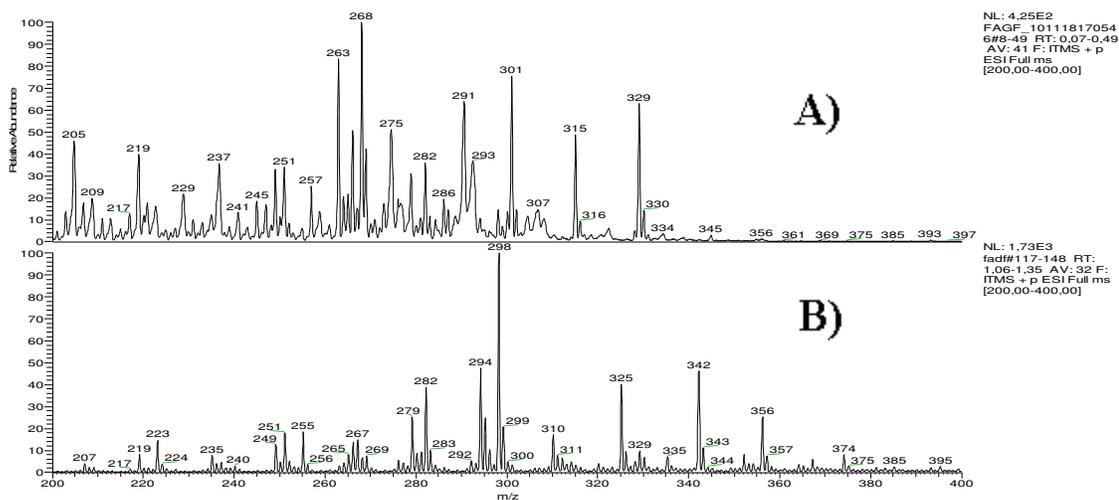


Figura 87. Perfil alcaloídico das folhas de (A) *U. guatterioides* e (B) *U. duckei*.

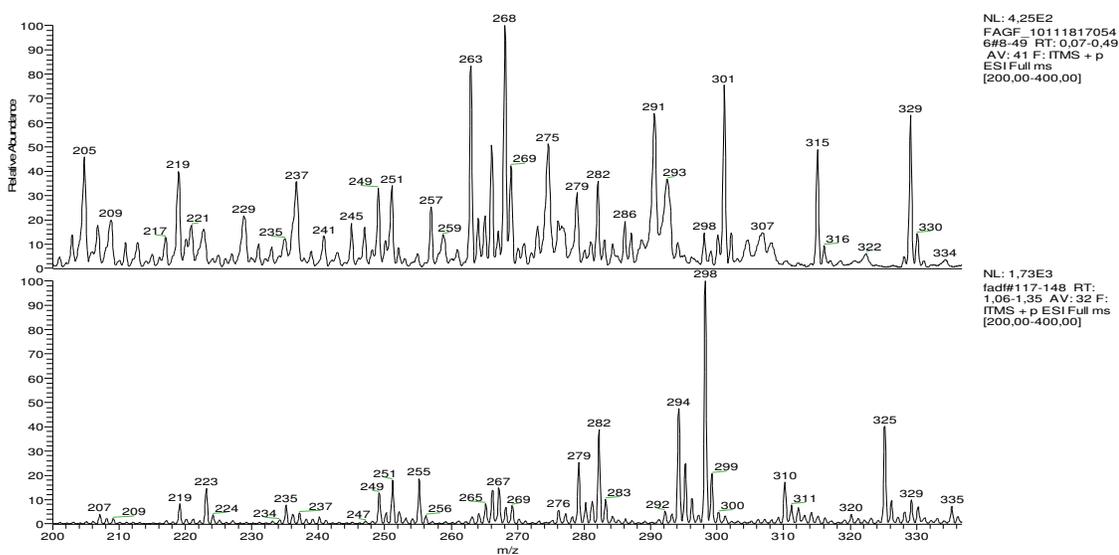


Figura 88. Região do espectro de massas ampliada até aproximadamente m/z 330.

5.9 Teste *in vitro* de atividade leishmanicida

Os resultados das amostras testadas para a atividade leishmanicida frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* são apresentadas na Tabela 11. Cada amostra foi avaliada pela atividade de 50% de Concentração Inibitória (CI₅₀). As amostras foram classificadas como altamente ativas (CI₅₀ < 10µg/mL), ativas (10 µg/mL < CI₅₀ < 50µg/mL), moderadamente ativas (50µg/mL < CI₅₀ < 100µg/mL) e não-ativas (CI₅₀ > 100µg/mL) (Osório *et al.*, 2007).

Tabela 1 – Avaliação da atividade leishmanicida em formas promastigotas *in vitro*

Nome Botânico	Frações e Metabólitos	Código	Parte da planta	CI ₅₀ (µg/mL) ^a
U.duckei	Fração Alcaloídica	FADC	cascas	32,16
		FADG	galhos	155,61
		FADF	folhas	4,00
U.guatterioides	Fração Alcaloídica	FAGC	cascas	2,79
		FAGG	galhos	1,07
		FAGF	folhas	1,90
	Policarpol	POLI		153,18
	Glaziovina	ALCA		0,01
Pentamidina ^b				9,8

^a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, cepa PH8 (IFLA/BR/67/PH8); CI₅₀, 50% de Concentração Inibitória.

^b A pentamidina é usada como droga referência.

As frações alcaloidicas provenientes de *U. guatterioides* foram classificadas como altamente ativas, sendo o CI₅₀ das frações dos galhos, das folhas e das cascas, respectivamente de 1,07; 1,90 e 2,79 µg/mL. Por outro lado, das frações alcaloídicas de *U. duckei* avaliadas, apenas a fração proveniente das folhas apresentou alta atividade, com CI₅₀ de 4,00 µg/mL, sendo a fração proveniente das cascas classificada como ativa (CI₅₀ = 32,16 µg/mL) e a fração proveniente dos galhos classificada como inativa (CI₅₀ = 155,61 µg/mL).

A atividade mais pronunciada da fração alcaloídica dos galhos de *U. Guatterioides* (CI₅₀ = 1,07 µg/mL) pode estar relacionada com a presença majoritária do alcalóide aporfínico anonaina. Estudos anteriores revelaram que esse alcalóide apresenta significativa atividade leishmanicida frente a formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (Queiroz *et al.*, 1996).

A observação da elevada atividade da fração alcaloídica das folhas ($IC_{50} = 1,90 \mu\text{g/mL}$) pode também estar relacionada à presença do alcalóide aporfinico assimilobina, ainda não testado frente a parasitas da leishmaniose.

Dentre as três frações alcaloídicas de *U. guatteroides* avaliadas, a fração alcaloídica das cascas do tronco ($CI_{50} = 2,79 \mu\text{g/mL}$) foi a que apresentou atividade mais discreta. Por ser constituída majoritariamente pelos alcalóides oxoaporfínicos liriodenina e lisicamina, esperava-se observar uma atividade relativamente elevada, pois tanto a liriodenina, quanto a lisicamina foram anteriormente avaliadas frente a formas promastigotas de *L. major* e *L. donovani*, apresentando boa atividade leishmanicida (Waechter et al, 1999).

A elevada atividade observada para a fração alcaloídica das folhas de *U. duckei* ($CI_{50} = 4,00 \mu\text{g/mL}$) deve-se possivelmente à presença majoritária do alcalóide glaziovina, visto que esta substância quando avaliada *in vitro* apresentou CI_{50} de $0,01 \mu\text{g/mL}$, sendo classificada como altamente ativa.

O triterpeno policarpol com $CI_{50} = 153,18 \mu\text{g/mL}$ foi classificado como inativo frente a formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A desreplicação de todas as frações alcaloídicas de forma a caracterizar satisfatoriamente os principais alcalóides das folhas, galhos e cascas do tronco de *Unonopsis guatterioides* e *Unonopsis duckei* através da aplicação das chaves de fragmentação foi realizada com sucesso.

O esclarecimento sobre a natureza do íon *quasi*-molecular em m/z 282 ($[M+H]^+$) contribuiu para o conhecimento fitoquímico do gênero, uma vez que este alcalóide já isolado de outras espécies de Annonaceae nunca foi reportado no gênero *Unonopsis*.

A possível detecção do alcalóide do tipo azafluorenona na espécie *U. guatterioides* reforça o potencial da técnica, inclusive para investigação quimiotaxonomica de plantas do gênero, uma vez que todos os alcalóide aporfínicos já descritos na literatura da espécie *U. lindimani* foram identificados neste estudo, confirmando o consenso botânico no sentido de aproximar as duas espécies.

A investigação por espectrometria de massas resultou na descoberta de três novos alcalóides no gênero *Unonopsis*.

O alto rendimento do policarpol nas duas espécies indica o gênero *Unonopsis* como fonte promissora deste composto de importância biológica.

A comparação do perfil alcaloídico das espécies revelou uma boa similaridade química entre as frações alcaloídicas das cascas e galhos, sendo a principal diferença, a abundância relativa de íons, o que reforça a idéia de se fazer o agrupamento taxonômico através da análise do perfil de alcalóides de determinados órgãos vegetais.

As frações alcaloídicas das duas espécies, com exceção da fração alcaloídica dos galhos de *U. duckei*, assim como o alcalóide glaziovina, apresentaram elevada atividade leishmanicida.

7. REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; GMUNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders- A survey of ethnobotanical literature. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 113, p. 363–381, 2007.
- ARANGO,G.J.; CORTES, D.; CAVÉ, A.; D’OCON. M.F. 7-7'-bisdesidroaporfns de *Unonopsis pacifica*. *Anales de Quimica, Serie C: Quimica Organica y Bioquimica*, v. 84, p. 124-127, 1988.
- AKENDENGUE, B.; ROBLOT, F.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; NGOU-MILANA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Klaivanolide, an antiprotozoal lactone from *Uvaria klaineana*. *Phytochemistry*, v. 59, p.885-888, 2002.
- BACAB, M. J.C.; RODRIGUEZ, L. M. P. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Natural Product Reports*, v.18, p. 674–688, 2001.
- BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.;PHILIPSON, 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.
- CAMACHO, M.R.; PHILLIPSON, S.L.; CROFT, P.N.; MARSHALL, S.J.; GHAZANFAR, S.A . Screening of plants extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 185-191, 2003.
- CARVALHO, R.; WEBBER, A. C. Biologia floral de *Unonopsis guatterioides* (A. D.C.) R.E. Fr., uma Annonaceae polinizada por *Euglossini*. *Revista Brasileira de Botânica*, v.23, p.421-425, 2000.
- CHANG, F. R.; CHEN, J. L.; LIN, C. Y.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. C. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. *Phytochemistry*, v. 51, p. 883-889, 1999.
- 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.
- CORREA, A. G. Taxol: da descoberta ao uso terapêutico. *Quimica Nova*, v. 18, p. 460-467, 1995.
- COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C.M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. A pyrimidine-beta-carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. *Journal of Natural Products*, v.69, p. 294- 2006, 292-294.
- CUNHA, M. M.; NASCIMENTO, F. C.; SANTOS PIMENTA, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; SALAS, C. E.; LOPES, M. T. P. Screening of cytotoxic activity in hexanic and ethanolic extracts of *Rollinia laurifolia*. *Latin America Journal of Pharmacy*, v.28, p. 234-240, 2009.

- DE WET, H.; VAN HEERDEN, F. R.; VAN WYK, BEN-ERIK. Alkaloids of *Antizoma angustifolia* (Menispermaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, v.32, 1145–1152, 2004.
- DEWICK, P.M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3 ed. Chichester, New York: John Wiley, p.341, 2009.
- DI STASI, L.C.;HIRUMA-LIMA, C.A. Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. Ed. UNESP, São Paulo, p. 605, 2002.
- ELTOHAMI, M; LEOEUF, M; CAVÉ, A. Communication, International Symposium on The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids, London, 1984.
- FORGACS, P.; JACQUEMIN, H.; MORETTI, C.; PROVOST, J.; TOUCHÉ, A. Etudes phytochimiques et activités biologiques de 18 plantes de la Guyane Française. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v. 17, p.22-32, 1983.
- FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; LEOEUF, M.; CAVÉ A.; CHARLES, B. Essential oils of Annonaceae. Part VII. Essential oils of *Monanthes dielma* (Sprague) Verdcourt and *Unonopsis guatterioides* R. E. Fries. *Flavour and Fragrance Journal*, v.12, p. 95-98, 1997.
- GIL, E.S.; PAULA,J.R.; NASCIMENTO, F.R.F.; BEZERRA, J.C.B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. *Revista de Ciências. Farmaceuticas Básica e Aplicada*, v.29,p. 223-230, 2008.
- GONTIJO, B.; CARVALHO, M.L.R.; Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 36, p. 71-80, 2003.
- GUINAUDEAU, H.; LEOEUF, M.; CAVE, A. Aporphine Alkaloids. *Lloydia*. v. 38, p. 275-339, 1975.
- GUINAUDEAU, H.; LEOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, II. *Journal of Natural Products*. v. 42, p. 325-360, 1979.
- GUINAUDEAU, H.; LEOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, III. *Journal of Natural Products*. v. 46, p. 761-835, 1983.
- GUINAUDEAU, H.; LEOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, IV. *Journal of Natural Products*. v. 51, p. 389-474, 1988.
- GUINAUDEAU, H.; LEOEUF, M. CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, V. *Journal of Natural Products*. v. 57, p. 1033-1135, 1994.
- HEPBURN, N. C. Cutaneous leishmaniasis. *Clinical and experimental Dermatology*, v. 25, p. 363-370, 2000.
- WAECHTER, A.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; BORIES, V. M.; FOURNET, A. Antiprotozoal Activity of Aporphine Alkaloids Isolated from *Unonopsis Buchtienii* (Annonaceae). *Phytotherapy Research.*, v. 13, p.175-177, 1999.

- HEYWOOD, V. H. Flowering Plants of the World. University Press, Oxford, p 30-31, 1978.
- HUTCHINSON, J. The genera of flowering plants. Clarendon Press, Oxford. p. 71-108, 1964.
- JAYASURIYA, H.; HERATH, K. B.; ONDEYKA, J. G.; GUAN, Z.; BORRIS, R. P.; TIWARI, S.; JONG, W.; CHAVEZ, F.; MOSS, J.; STEVENSON, D. W.; BECK, H. T.; SLATTERY, M.; ZAMORA, N.; SCHULMAN, M.; ALI, A.; SHARMA, N.; MACNAUL, K.; HAYES, N.; MENKE, J. G.; SINGH, S.B. Diterpenoid, Steroid, and Triterpenoid Agonists of Liver X Receptors from Diversified Terrestrial Plants and Marine Sources. *Journal of Natural Products*, v 68, p. 1247-1252, 2005.
- KOULMAN, A.; TAPPER, B. A.; FRASER, K.; CAO, M.; LANE, G. A.; RASMUSSEN, S. High-throughput direct-infusion ion trap mass spectrometry: a new method for metabolomics. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*. v. 21, p. 421-428, 2007.
- LAPRÉVOTE, O.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des annonacées, 84. Bisaporphidoides de *L'Unonopsis spectabili*. *Journal of Natural Products*. v. 50, p. 984-988, 1987.
- LAPRÉVOTE, O.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des annonacées, 87 Azafluorénones de *L'Unonopsis spectabili*. *Journal of Natural Products*. v. 51, p. 555-561, 1988.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, v. 21, p. 2783-2813, 1982.
- LOBÃO, A. Q.; FORZZA, R. C.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae da reserva biológica da represa do Grama, descoberto, Minas Gerais, Brasil, com uma nova espécie, *Unonopsis bauxitae*. *Rodriguésia*. v. 57, p. 137-147, 2006.
- MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T.; VERMEER, M. Revision of the Neotropical Genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (Annonaceae). *BLUMEA*. v. 52, p. 413-554, 2007.
- MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Ed UFC, Fortaleza, 2009.
- MATOS, M.F.C.; LEITE, L.I.S.P.; BRUSTOLIM, D.; SIQUEIRA, J.M.; CAROLLO, C.A.; HELLMANN, A.R.; PEREIRA, N.F.G.; SILVA, D.B. Antineoplastic activity of selected constituents of *Duguetia glabriuscula*. *Fitoterapia* v. 77, p. 227-229, 2006.
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ENCHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Quimica Nova*, v. 25, p. 429-438, 2002.
- MISHRA, B.B.; KALE, R.R.; SINGH, R.K.; TIWARI, V.K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*, v. 80, p. 81-90, 2009.

MONGRAND, S.; BADO, A.; PATOUILLE, B.; LACOMBLEZ, C.; CHAVENT, M.; CASSAGNE, C. & BESSOLE, J. J. "Taxonomy of gymnospermae: multivariate analyses of leaf fatty acid composition". *Phytochemistry*, v. 58, p. 101-115, 2001.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais. *Quimica Nova*, v. 24, p.105-111, 2001.

MUNIER, R., apud MERCK, 1971. Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography. E. Merck, Darmstadt, Germany, p. 118, 1953.

NGANTCHOU, I.; NKWENGOUA, E.; NGANSO, Y.; NYASSE, B.; DENIER, C.; HANNAERT, V.; SCHNEIDER, B. Antitrypanosomal activity of polycarpol from *Piptostigma preussi* (Annonaceae). *Fitoterapia*. v. 80, p.188-191, 2009.

NYASSE, B.; NGANTCHOU, I.; NONO, J.J.; SCHNEIDER, B. Antifilarial activity in vitro of polycarpol and 3-O-acetyl aleuritolic acid from cameroonian medicinal plants against *Onchocerca gutturosa*. *Natural Product Research*. v. 20, p. 391-7, 2006.

OLIVEIRA, A. N.; AMARAL, L.L. Florística e fitossociologia de uma floresta de vertente na Amazônia Central, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonica*, v. 34,p.21-34, 2004.

OLIVEIRA, V. M. Estudo fitoquímico e atividade leishmanicida (in vitro) de *Annona pulchra* H. Rainer (Annonaceae). Dissertação de mestrado, Manaus, 2007.

OSÓRIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D., PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, p. 630–635, 2007.

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.

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

PALAZZO, M. C.; WRIGHT, H. L.; AGIUS, B. R.; WRIGHT, B. S.; MORIARITY, D. M.; HABER, W.A.; SETZER, W. N. Chemical Compositions and Biological Activities of Leaf Essential Oils of Six Species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. *Records of Natural Products*. v. 3, p.153-160, 2009.

PATEH, U. U.; HARUNA A. K.; GARBA, M.; ILIYA, I.; SULE, I. M.; ABUBAKAR, M. S.; AMBI A.A. Isolation of stigmasterol, β -sitosterol and 2-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester from the rhizomes of *Stylochiton lancifolius* pyer and kotchy (Araceae). *Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences*. v. 8, p.19–25, 2009.

PEREIRA, N. F. G.; CAROLLO, C.A.; GARCEZ, W. S. SIQUEIRA, J.M. novel santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula* –Annonaceae. *Quimica Nova*, v. 26, p.512-516, 2003.

PÉREZ, E. G.; SÁEZ, J.; CASSELS, B. K.; A convenient, renewable source of the anxiolytic proaporphine alkaloid glaziovine: *Duguetia vallicola* leaves. *Journal of the Chilean. Chemical Society*, v.50, p. 553-557, 2005.

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G. F.; BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, v. 10, p. 209-212, 2003.

PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SOUZA, A. D. L.; RABELO, D. M.; BATISTA, C. L.; BATISTA, R. L.; COSTA, E. V.; CAMPOS, F. R.; BARISON, A.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T. NAKAMURA, C. V. Acanthoic Acid and other Constituents from the Stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). *Journal of the. Brazilian. Chemical. Society*, v. 20, p.1095-1102, 2009.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: atualidade, desafios e perspectivas. *Química Nova*, v. 25, p.45-61, 2002.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v. 26, p. 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.

RICHARDSON, J. E.; CHATROU, L. W.; MOLS, J.B.; ERKENS, R.H. J.; PIRIE, M.D. Historical biogeography of thow cosmopolitan families of flowering plants: Annonaceae and Rhamnaceae. *Philosophical Transactions of the Royal society B*. v.359, p.1495-1508, 2004.

RINALDI, M. V. N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. Dissertação de Mestrado. São Paulo, 2007.

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

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RAZMILIC, I.; SAUVAIN, M.; MORETTI, C.; MUNOZ, V. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabelli*. *Phytotherapy Research*. v. 10, p. 375-378, 1996.

SKAL TSA, H. D.; MAVROMMATI, A. & CONSTANTINIDIS, T. "A chemotaxonomic investigation of volatile constituents in *Stachys subsect. Swainsonianae* (Labiatae)". *Phytochemistry*, v. 57, p. 235-244, 2001.

SILVA, J. A. C.; SILVA, M. F. Estudos florísticos no município de Presidente Figueiredo, Amazonas. Brasil – I. Famílias Annonaceae e Gnetaceae. *Acta Amazonica*, v. 36, p. 53-58, 2006.

SILVA, K. E.; MATOS, F. D. A.; FERREIRA, M. M. Composição florística e fitossociologia de espécies arbóreas do Parque Fenológico da Embrapa Amazônia Ocidental. *Acta Amazonica*, v. 38, p. 213-222, 2008.

SILVA, D.B.; MATOS, M. F. C.; NAKASHITA, S.T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. S.; SIQUEIRA, J.M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. *Quimica Nova*, v. 30, p. 1809-1812, 2007

SIQUEIRA, J. M.; BOMM, M. D.; PEREIRA, F.G.; GARCEZ, W. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de toxicidade sobre a *artemia salina* leach. *Quimica Nova*, v. 21, p. 557-559, 1998.

SOUZA, A. D. L. DE. Perfis químicos e metabólitos de fungos endofíticos dos gêneros *Eutypa*, *Trichoderma* e *Pestalotiopsis* Isolados das plantas *Murraya paniculata*, *Strychnos cogens*, *Pinus taeda* e *Gustavia cf. elliptica*. Tese de Doutorado. São Carlos, 2005.

STÉVIGNY, C.; JIWAN, J. L. H.; ROZENBERG, R.; HOFFMANN, E. LECLERCQ, J. Q. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. *Rapid Communication in. Mass Spectrometry*. v. 18, p. 523-528, 2004.

STÉVIGNY, C.M.; BAILLY, C.; QUERTIN-LCLERCQ. Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. *Current Medicinal Chemistry. – Anti-Cancer Agentes*, v. 5, p. 173-182, 2005.

TEICHERT, H.; DOTTERL, S.; ZIMMA, B.; AYASSE, M.; GOTTSBERGER, G. Perfume-collecting male euglossine bees as pollinators of a basal Angiosperm: the case of *Unonopsis stipitata* (Annonaceae). *Plant Biology*. v.11, p.29–37, 2009.

TOUCHÉ, A.; DESCONCLOIS, J. F.; JACQUEMIN, H.; LELIÈVRE, Y.; FORGACS, P. Constituants de quelques annonacées guyanaises analyse qualitative et quantitative des acides aminés basiques libres. Présence d'un triterpène, Le polycarpol. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*. v.15, p. 4-9, 1981.

WAECHTER, A.I.; CAVE, A.; HOCQUEMILLER, R.; BORIES, C.; MUNÕZ, V.; FOURNET, A. Antiprotozoal Activity of Aporphine Alkaloids Isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytotherapy Research*. v. 13, p. 175–177, 1999.

YOSHIDA, N. C.; SIQUEIRA, J. M.; GARCEZ, W. S.; SILVA, D. B.; GRASSI, R. F.; PATUSSI, R. F.; FABRI, J. R. Sesquiterpenos das Folhas de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae. 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2006, Águas de Lindóia. Site da SBQ, 2006.

YOSHIDA, N. C.; GARCEZ, W. S.; SIQUEIRA, J. M.; RODRIGUES, R. P; FABRI, J. R. Nova Azafluorenona e Alcalóides Aporfinóides de *Unonopsis lindmanii* - Annonaceae, 2007, Águas de Lindóia. Site da SBQ, 2006.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfínicos do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Quimica Nova*, v. 30, p. 92-98, 2007.