

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E
ANTIPLASMÓDICA DE ESPÉCIES DE ANNONACEAE DA
AMAZÔNIA: ESTUDO FITOQUÍMICO BIOGUIADO DE
*GUATTERIA CITRIODORA***

DIEGO DE MOURA RABELO

**MANAUS
2014**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

DIEGO DE MOURA RABELO

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA E
ANTIPLASMÓDICA DE ESPÉCIES DE ANNONACEAE DA
AMAZÔNIA: ESTUDO FITOQUÍMICO BIOGUIADO DE
*GUATTERIA CITRIODORA***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro

**MANAUS
2014**

Ficha Catalográfica
(Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

R114a Rabelo, Diego de Moura.
Avaliação das Atividades Antibacteriana e Antiplasmódica de Espécies de Annonaceae da Amazônia: Estudo Fitoquímico Bioguiado de *Guatteria citriodora* / Diego de Moura Rabelo. - 2014.
120 f. : il. color.
Tese (Doutorado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas.
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro.

1. Malária – Tratamento 2. Antimalária 3. Agentes antibacterianos 4. Óleos vegetais I. Pinheiro, Maria Lúcia Belém, orientadora II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

CDU (1997): 616.936:615.281 (811) (043.2)



160ª. ATA DE DEFESA DE TESE

No dia 28 de Fevereiro de 2014 (sexta-feira), às 09h, na Sala de Aula do Bloco “G” Setor Sul - UFAM. **Diego de Moura Rabelo** defendeu sua Tese de Doutorado intitulada: “**Avaliação das Atividades Antibacteriana e Antiplasmódica de Annonaceas da Amazônia: Estudo Fitoquímico Bioguiado de *Guatteria citriodora***”.

Banca de Examinadores:

Membros	Parecer	Assinatura
Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro - (Presidente)	Aprovado (x) Reprovado ()	
Dra. Maria da Paz Lima - (INPA)	Aprovado (x) Reprovado ()	
Dra. Juliana Mesquita Vidal Martinez de Lucena - (IFAM)	Aprovado (x) Reprovado ()	
Dra. Rita de Cassia Saraiva Nunomura - (UFAM)	Aprovado (x) Reprovado ()	
Dra. Ana Cristina da Silva Pinto- (INPA)	Aprovado (x) Reprovado ()	

Manaus, 28 de fevereiro de 2014.

Resultado Final: Aprovado (x)
 Reprovado ()

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
 Programa Multi-Institucional de Pós-graduação em Biotecnologia

 Prof. Dr. Edmar Vaz de Andrade
 Coordenador

 Coordenador do PPGBIOTEC

DEDICATÓRIA

À minha esposa Lorrane Rabelo,
aos meus pais Vitor José e Daguiamar Amaro,
aos meus irmãos Vitor Hugo e Dayanne pelo amor,
compreensão e paciência durante a realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, a Ele toda honra e toda glória.

Aos meus pais, Vitor José e Daguimar, por serem os maiores incentivadores, colaboradores e contribuidores dessa conquista. Sou imensamente grato a vocês porque sei o valor e a importância da família em nossas vidas. Obrigado pelas palavras de incentivo e orações a Deus para ter força na realização deste trabalho.

Aos meus irmãos, Vitor Hugo e Dayanne, pelo carinho, amor, zelo, preocupação, sem esquecer do meu sobrinho Vitor José e minha cunhada Rosangela. Vocês também foram fundamentais.

À minha esposa, Lorrane Rabelo, pelo carinho, amor, paciência, incentivo, preocupação, zelo e sua família Max Eduardo, Ilair Assunção e Morian Assunção, por terem sido fundamentais na reta final. Serei eternamente grato pela ajuda e contribuição.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro, pelos 12 anos de orientação, paciência, conhecimento, educação, disciplina, palavras de incentivo, amor, carinho, preocupação, dedicação, pelas orações nos momentos mais difíceis, pelas palavras sempre dóceis, pelo jargão “vamos trabalhar Diego”. Enfim, todas as palavras ainda seriam poucas para agradecer.

Ao MSc. Kahlil Salomé e Prof. Dr. Andersson Barison, da Universidade Federal do Paraná-UFPR, pelos espectros de RMN 1D e 2D.

Ao MSc. Felipe Moura, pela obtenção dos espectros de massa e contribuição na discussão das fragmentações.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia sob a coordenação do Prof Dr. Edmar Vaz da Universidade Federal do Amazonas – UFAM, por tornar possível a realização deste trabalho de doutorado em Biotecnologia.

À FAPEAM, pela concessão da bolsa de doutorado.

Ao MSc. Yury Chaves, pela amizade e contribuição no ensaio antiplasmódio. A MSc. Ivanildes dos Santos pela amizade e contribuição nas análises microbiológicas. Aos Profs Drs. Paulo e Patricia Nogueira, pela coordenação desses ensaios. E, principalmente, ao Dr. Luiz André Mariúba pela amizade e por abrir as portas tornando possível meu acesso à FIOCRUZ e execução dessas análises.

Aos meus amigos Levi, Renyer, Sidney, Priscilla Oliver, Vanessa Homobono, Junior Carvalho, Danielle Cardoso, Carmem Lúcia, Lamark, Richardson, Elzalina e Fátima, pela amizade, apoio, contribuição e parceria.

Aos meus amigos e irmãos, Vitor Bessa e Bruno Mori, pela amizade, força e sempre com palavras de incentivo.

Aos amigos do Qbioma, Carol, Igor, Alcilene, André, Yury e Priscila Moraes, pela amizade e parceria nas análises cromatográficas.

AGRADEÇO

que Cristo habite no coração de vocês mediante a fé, para que, estando arraigados e alicerçados em amor, vocês possam juntamente com todos os santos compreender a largura, o comprimento, a altura e a profundidade, e conhecer o amor de Cristo que excede todo entendimento, para que vocês sejam cheios de toda a plenitude de Deus.

Ef 3:17-19.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	xi
LISTA DE FIGURAS	xii
LISTA DE ESQUEMAS.....	xiii
LISTA DE ESPECTROS.....	xiv
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xvi
ABSTRACT	xviii
RESUMO	xx
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 INCIDÊNCIA DA MALÁRIA.....	5
2.2 CICLO DA MALÁRIA.....	7
2.2.1 HOSPEDEIRO VERTEBRADO – HUMANO	7
2.2.2 HOSPEDEIRO INVERTEBRADO - INSETO	9
2.3 QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA	10
2.4 MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS	13
2.5 A FAMÍLIA ANNONACEAE	15
2.5.1 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FAMÍLIA ANNONACEAE.....	18
2.5.2 O GÊNERO <i>Guatteria</i>	21
2.6 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FAMÍLIA ANNONACEAE.....	23
2.6.1 ALCALOIDES	23
2.6.2 OUTROS CONSTITUINTES ISOLADOS DA FAMÍLIA ANNONACEAE.....	28

3. OBJETIVOS	32
3.1 GERAL.....	32
3.2 ESPECÍFICOS	32
4 MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	34
4.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS PARA SELEÇÃO DA ESPÉCIE BIOATIVA.....	34
4.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA.....	35
4.3.1 CULTURA DE <i>Plasmodium falciparum</i>	36
4.3.2 ANÁLISE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO POR CITOMETRIA DE FLUXO	36
4.3.3 PADRONIZAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO	37
4.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	38
4.4 TESTES ANTIBACTERIANOS	40
4.4.1 INOCULAÇÃO NAS PLACAS DE TESTE.....	43
4.4.2 APLICAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS.....	43
4.4.3 LEITURA DAS PLACAS E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS.....	44
4.4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM	44
4.5 ESTUDO FITOQUÍMICO BIOGUIADO DE <i>GUATTERIA CITRIODORA</i>	45
4.5.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	45
4.5.2 EQUIPAMENTOS	46
4.5.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE <i>GUATTERIA CITRIODORA</i>	47
4.5.4 ESTUDO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DAS FOLHAS - FAF.....	49
4.5.4.1 ANÁLISE DA F4	50
4.5.4.2 ANÁLISE DA F5-8.....	51
4.5.4.3 ANÁLISE DA F13	51
4.5.5 ESTUDO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DOS GALHOS FINOS - FAG	52
4.5.5.1 ANÁLISE DA F4-6.....	53
4.5.5.2 ANÁLISE DA F8	54
4.5.5.3 ANÁLISE DA F9	54
4.5.5.4 ANÁLISE DA F10-12	55
4.5.5.5 ANÁLISE DA F14-16	56

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	58
5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DE <i>GUATTERIA CITRIODORA</i>	58
5.1.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ALCALOIDES POR ESI-MS	58
5.1.2 ALCALOIDES ISOLADOS DE <i>GUATTERIA CITRIODORA</i>	61
5.1.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALOIDES OXOAPORFÍNICOS	64
5.1.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO ALCALOIDE TIPO PROTOBERBERÍNICO	71
5.1.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO ALCALOIDE TIPO 7,7- DIMETILAPORFÍNICO.....	72
5.2 TESTE DE ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA	78
5.3 TESTE ANTIBACTERIANO	85
6. CONCLUSÃO	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	91
ANEXOS - ESPECTROS.....	107

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies da família Annonaceae, uso popular e atividade farmacológica.	20
Tabela 2: Espécies de Annonaceae e utilização na medicina popular de Camarões, Africa.	21
Tabela 3: Espécies vegetais com numero de registro e massa (g) dos extratos obtidos.	35
Tabela 4: Lista das 29 cepas de bactérias Gram positivas.	41
Tabela 5: Lista das 17 cepas de bactérias Gram negativas.	42
Tabela 6: Rendimento dos extratos e suas frações de <i>Guatteria citriodora</i>	49
Tabela 7: Relação frações/compostos isolados e seus respectivos rendimentos das folhas.	50
Tabela 8: Relação frações/compostos isolados e seus respectivos rendimentos dos galhos.	53
Tabela 9: Perfil de fragmentação dos alcaloides de FAG.	60
Tabela 10: Dados de RMN ¹ H e HSQC em CD ₃ OD do GC1.	65
Tabela 11: Dados de RMN de ¹ H e HSQC do GC2.	67
Tabela 12: Dados de RMN de ¹ H do GC3.	68
Tabela 13: Dados de RMN de ¹ H de GC4.	70
Tabela 14: Dados de RMN de ¹ H de GC5.	72
Tabela 15: Dados de RMN de ¹ H de GC6.	74
Tabela 16: Dados de RMN de ¹ H de GC7.	77
Tabela 17: CI ₅₀ dos extratos e frações de acordo com AIC e o p-valor.	80
Tabela 18: CIM dos extratos e frações que apresentaram halos de inibição.	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição da Transmissão da Malária no Mundo.....	6
Figura 2: Fêmea de <i>Anopheles darlingi</i> realizando o repasto sanguíneo.....	7
Figura 3: Ciclo da Malária nos estágios de reprodução sexuada e assexuada.....	10
Figura 4: Distribuição das espécies da família Annonaceae	16
Figura 5: Representação da família Annonaceae: a) <i>Cananga odorata</i> , b) <i>Annona muricata</i> , c) <i>Monodora tenuifolia</i> , d) <i>Annona squamosa</i> e) <i>A. mucosa</i>	17
Figura 6: Origem biossintética dos alcaloides isoquinolínicos a partir do esqueleto benzilisoquinolínico.	24
Figura 7: Esqueletos básicos dos alcaloides isolados de <i>G. citriodora</i>	62
Figura 8: Alcaloides isolados das folhas e galhos de <i>G. citriodora</i>	63
Figura 9: Correlações observadas no mapa de contorno HMBC da GC4.....	70
Figura 10: Correlações observadas no mapa de contorno HMBC da GC7.....	76
Figura 11: Histograma das hemácias parasitadas em suspensão por citometria de fluxo.....	78
Figura 12: Curva ajustada pelo modelo UCRS.4c, para os dados da FHG.....	81
Figura 13: Curva ajustada pelo modelo MM.3, para os dados EHBFB.	82
Figura 14: Curva ajustada pelo modelo BC.4, para os dados EHBG.....	82
Figura 15: Curva ajustada pelo modelo MM.3, para os dados FAF.....	83
Figura 16: Curva ajustada pelo modelo LL.4, para os dados FAG.	83

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Fluxograma de obtenção dos extratos.....	35
Esquema 2: Fluxograma de extração das bases presentes no extrato etanólico 80%.....	48
Esquema 3: Isolamento do GC1.....	50
Esquema 4: Isolamento do GC2.....	51
Esquema 5: Isolamento do GC3 e GC4.....	52
Esquema 6: Isolamento do GC1.....	53
Esquema 7: Isolamento do GC5.....	54
Esquema 8: Isolamento do GC2.....	55
Esquema 9: Isolamento do GC6.....	56
Esquema 10: Isolamento do GC7.....	57
Esquema 11: Proposta de fragmentação para Anonaina.....	59
Esquema 12: Proposta de fragmentação da Liriodenina e Lisicamina.....	60
Esquema 13: Proposta de fragmentação para Norneolitisina.....	61
Esquema 14: Proposta de fragmentação para o composto GC6.....	73
Esquema 15: Proposta de fragmentação para o composto GC7.....	75

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1: Espectro de ESI-MS em modo positivo da FAG.	108
Espectro 2: Espectro de ESI-MS em modo positivo da FAF.	108
Espectro 3: Espectro <i>fullscan</i> de ESI-MS obtido em modo positivo do composto GC1.....	109
Espectro 4: Espectro de RMN ^1H (600MHz, CD_3OD) do GC1.....	109
Espectro 5: Mapa de correlação HSQC do composto GC1.....	110
Espectro 6: Espectro de ESI-MS obtido em modo positivo do composto do GC2.	110
Espectro 7: Espectro de massa MS^2 obtido em modo positivo do GC2.	111
Espectro 8: Espectro de massa MS^3 obtido em modo positivo do GC2.	111
Espectro 9: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do GC2.	112
Espectro 10: Mapa de contorno HSQC do GC2.....	112
Espectro 11: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do GC3.	113
Espectro 12: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do GC4.	113
Espectro 13: Mapa de contorno HSQC do GC4.....	114
Espectro 14: Mapa de contorno HMBC do GC4.....	114
Espectro 15: Espectro de ESI-MS obtido em modo positivo do composto GC5.....	115
Espectro 16: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do GC5.	115
Espectro 17: Espectro de ESI-MS obtido em modo positivo do composto GC6.....	116
Espectro 18: Espectro de massa MS^5 obtido em modo positivo do GC6.	116
Espectro 19: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do GC6.	117

Espectro 20: Espectro de ESI-MS obtido em modo positivo do composto GC7.....	117
Espectro 21: Espectro de massa MS ⁵ obtido em modo positivo do GC7.	118
Espectro 22: Espectro de RMN de ¹ H (600 MHz, CD ₃ OD) do GC7.	118
Espectro 23: Mapa de contorno HSQC do composto GC7 com expansão de δ 4,1 a δ 1,3.....	119
Espectro 24: Mapa de contorno HSQC do composto GC7 com expansão de δ 8,1 a δ 6,0.....	119
Espectro 25: Mapa de contorno HMBC do composto GC7 com expansão de δ 8,2 a δ 6,0.	120
Espectro 26: Mapa de contorno HMBC do composto GC7 com expansão de δ 4,0 a δ 1,5.	120

LISTA DE ABREVIATURAS

CC – Cromatografia em Coluna

CCD – Cromatografia de Camada Delgada

CCDP – Cromatografia de Camada Delgada Preparativa

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

CI₅₀ – Concentração inibitória a 50%

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CBM – Concentração Bacteriostática Mínima

RMN ¹H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

HMBC – Heteronuclear Multiple Bond Coherence

HSQC – Heteronuclear Spectroscopy Quantum Coherence

CD₃CD – Metanol Deuterado

Hz – Hertz

J – Constante de acoplamento (em Hertz)

δ - deslocamento químico

s – simpleto

d – duplete

dd – duplo duplete

ddd – duplo duplete duplo

m – multiplete

EM – Espectrômetro de Massa

FAA – Fração Aquosa Ácida

FAB - Fração Aquosa Básica

FAL – Fração Alcaloídica

FN – Fração Neutra

HEX – Hexano

Act – Acetona

AcOEt – Acetato de Etila

CHCl₃ – Clorofórmio

DCM – Diclorometano

MeOH – Metanol

DMSO – Dimetilsulfóxido

FHG – Fração hexânica dos galhos

FHF – Fração hexânica das folhas

FAF – Fração alcaloídica das folhas

FAG – Fração alcaloídica dos galhos

FNF – Fração neutra das folhas

FNG – Fração neutra dos galhos

EHBF – Extrato hidroalcoólico bruto das folhas

EHBG – Extrato hidroalcoólico bruto dos galhos

LB – Luria Bertani

OCDE – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

PBS – Phosphate Buffered Saline

ABSTRACT

The rapid growth of resistance of bacteria and malaria parasites against currently available drugs creates an urgent need for new therapeutic approaches. The Annonaceae family, because its history in ethnomedicine and chemical and pharmacological potential, evidenced in the literature, represents a promising natural source of biological active molecules to combat these diseases. In the present study we evaluated, preliminarily, antiplasmodial activities of hydroalcoholic extracts of the leaves of *Unonopsis guatterioides*, *Anaxagorea brevipes*, *Duguetia riparia*, *Tetrameranthus duckei*, *Annona exsucca*, *Xylopia benthamii* and *Guatteria citriodora* species. Among the evaluated species, only *Guatteria citriodora* showed potential antiplasmodial activity with IC_{50} equal to 1.0685 and p-value of 0.540. The evaluation of antiplasmodial activity of hexane fractions (FHF and FHG), alkaloidic (FAF and FAG) and neutral (FNF and FNG) derived from the partitioning of the crude hydroalcoholic extracts of leaves (EHBF) and branches (EHBG) of this species, directed the phytochemical studies for promising fractions, so the alkaloid fractions were selected. In addition, the antibacterial activities of EHBF and EHBG, FHF and FHG, FAF and FAG, FNF and FNF and essential oils of the leaves were also evaluated. The evaluation of antiplasmodial activity were performed against *Plasmodium falciparum* by flow cytometry, and for the antimicrobial activity the technique of agar disk diffusion were used against several gram positive and gram negative pathogenic bacteria. The fractions FHG, FAF and FAG proved to be the most active for antiplasmodial activity with IC_{50} of $1.035 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p-value 0.57), $1.0685 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p-value 0.54) e $0.332 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p-value 0.26), respectively. *Bacillus subtilis* proved to be very sensitive front FAF and FAG showing zone of inhibition of 22 mm and 21mm respectively, both fractions with minimum inhibitory concentration (MIC) equal to $62.5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. *Enterococcus faecalis* showed moderately sensitive to FAF with

inhibition zone of 17 mm and MIC equal to 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A significant antibacterial activity was observed for the essential oils from the leaves, against Gram-negative bacteria *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* EPEC which proved moderately sensitive to essential oils since they showed inhibition halos between the average of 11 and 13 mm, respectively, both with CIM equal to 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. The alkaloid fractions of leaves and twigs of *Guatteria citriodora* species selected by phytochemical study were analyzed by ESI-IT-MS and their chromatographic profile revealed the presence of several ion pair mass, which were consistent with the presence of protonated ions of aporphine alkaloids. From the chromatographic fractionation of these fractions seven alkaloids were isolated, and they were identified by nuclear magnetic resonance of ^1H and ^{13}C (1D and 2D), such as the alkaloids: liriodenine, lyisicamine, *O*-methylnoschatoline and 3-methoxyoxoputerine (oxoaporphine), 3-methoxyguadiscidine (aporphine), palmatine (protoberberine) and guattescidine (7-hydroxy-7-methylaporphine). With the exception of liriodenine and *O*-methylnoschatoline, isolated from the bark of *G. citriodora* by Rabelo (2008), other structures are reported for the first time in the species. The antiplasmodial activities *in vitro* of FAF and FAG fractions are promising and may be associated with their alkaloidal constituents, which encourages deeper studies including *in vivo* investigations to establish its true efficacy and toxicity, providing data to obtaining new antimalarial drugs from vegetable source.

Keywords: antiplasmodial, antibacterial, alkaloids and *Guatteria citriodora*.

RESUMO

O rápido crescimento da resistência de bactérias e parasitas da malária contra as drogas atualmente disponíveis gera uma necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas. A família Annonaceae, pela sua história na etnomedicina e potencial químico e farmacológico, evidenciado na literatura, representa uma fonte natural promissora de moléculas biologicamente ativas para combate a estes patógenos. No presente trabalho, foram avaliadas, preliminarmente, as atividades antiplasmódicas dos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies *Unonopsis guatterioides*, *Anaxagorea brevipes*, *Duguetia riparia*, *Tetrameranthus duckei*, *Annona exsucca*, *Xylopia benthamii* e *Guatteria citriodora*. Das espécies avaliadas somente a *Guatteria citriodora* evidenciou potencial atividade antiplasmódica com CI_{50} igual a 1,0685 e p-valor de 0,540. A avaliação de atividade antiplasmódica das frações hexânicas (FHF e FHG), alcaloídicas (FAF e FAG) e neutras (FNF e FNG), oriundas do particionamento dos extratos hidroalcoólicos brutos das folhas (EHBF) e galhos (EHBG) desta espécie, direcionou o estudo fitoquímico para as frações mais promissoras, sendo selecionadas as frações alcaloídicas. Adicionalmente, foram avaliadas as atividades antibacterianas de EHBF e EHBG, FHF e FHG, FAF e FAG, FNF e FNG e dos óleos essenciais de suas folhas. A avaliação da atividade antiplasmódica foram realizadas frente ao *Plasmodium falciparum* por citometria de fluxo, e para avaliação da atividade antimicrobiana utilizou-se a técnica de difusão em ágar contra diversas bactérias Gram positivas e Gram negativas. As frações FHG, FAF e FAG mostraram-se as mais ativas para atividade antiplasmódica com CI_{50} de $1,035 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p-valor 0,57), $1,0685 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p-valor 0,54) e $0,332 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (p-valor 0,26), respectivamente. Na avaliação antibacteriana *Bacillus subtilis* apresentou-se muito sensível frente a FAF e FAG com halos de inibição de 22 mm e 21 mm, respectivamente, sendo ambos com concentração inibitória mínima (CIM) igual a

62,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. *Enterococcus faecalis* mostrou-se moderadamente sensível a FAF com halo de inibição de 17 mm e CIM igual a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Foi observada atividade antibacteriana ainda para os óleos essenciais das folhas, com CIM igual a 125 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, contra as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* EPEC e *Salmonella typhimurium* que se apresentaram moderadamente sensíveis por evidenciarem halos de inibição em média de 11 e 13 mm, respectivamente. As frações alcaloídicas das folhas e galhos finos da espécie *Guatteria citriodora*, selecionadas para estudo fitoquímico, foram analisadas por ESI-IT-MS e o seu perfil cromatográfico evidenciou a presença de vários íons de massa par, compatíveis com a presença de íons protonados dos alcaloides aporfínicos. O fracionamento cromatográfico destas frações levou ao isolamento de 7 alcaloides, identificados por RMN de ^1H e ^{13}C (1D e 2D), como os alcaloides, liriodenina, lisicamina, *O*-metilmoschatolina e 3-metoxioxoputerina (oxoaporfínicos), 3-metoxiguadiscidina (aporfínico), palmatina (protoberberínico) e guattescidina (7-hidroxi-7-metilaporfínicos). Com exceção da liriodenina, lisicamina e *O*-metilmoschatolina, isoladas anteriormente da casca do caule de *G. citriodora* por Rabelo (2008), as demais estruturas são relatadas pela primeira vez para esta espécie. As atividades antiplasmódicas das frações FAF e FAG *in vitro* são promissoras e podem ser associadas aos seus constituintes alcaloídicos encorajando o aprofundamento dos estudos com investigações *in vivo*, para estabelecer sua verdadeira eficácia e toxicidade, visando fornecer subsídios para a obtenção de novos fármacos antimaláricos de origem vegetal.

Palavras Chave: antiplasmódica, antibacteriana, alcaloides e *Guatteria citriodora*.

1 INTRODUÇÃO

O acelerado crescimento da resistência de bactérias e parasitas da malária contra as drogas atualmente disponíveis gera uma necessidade urgente de descoberta de fontes alternativas de substâncias antimicrobianas e antiprotozoárias para o combate às graves patologias causadas por estes agentes.

A malária é uma doença infecciosa, não contagiosa, que acomete milhões de pessoas nas zonas tropicais e subtropicais do globo. É talvez, a mais antiga amplamente distribuída e conhecida das doenças parasitárias que acometem o homem. Nos últimos anos, adquiriu particular importância, em virtude da extensa distribuição geográfica e a sua atuação como fator limitante do crescimento demográfico, cultural e econômico em vastas áreas do mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (VERONESI-FOCACCIA, 2009).

Apesar das medidas de prevenção e controle a transmissão ainda ocorre em 104 países ao redor do mundo e cerca da metade da população mundial 3,4 bilhões estão em áreas de risco. Em 2012, foram registrados 207 milhões de casos e um número estimado de 627 mil mortes em todo planeta, dos quais 77% foram crianças menores de 5 anos (WHO, 2013). Segundo a diretora geral da agência da ONU, Margareth Chan, o progresso obtido até agora não é motivo de complacência e os números absolutos de infecções e mortes causadas pela malária não estão caindo tão rápido como deveriam. Para Chan, esses dados representam uma das maiores tragédias do século 21 (JÚNIOR, 2014).

A maioria das drogas antimaláricas como a cloroquina, quinina, mefloquina e derivados da artemisinina usadas para o tratamento da doença humana são chamadas de esquizotomicidas sanguíneos, por apresentar ação sobre os estágios assexuados sanguíneos do parasito, responsáveis pelas manifestações clínicas da doença (SANCHEZ, 2007).

O *Plasmodium ovale* e o *P. vivax* têm estágios de vida latentes chamados hipnozoítos que podem se estender por um período que varia de alguns meses a vários anos, após o qual, ocorre o aparecimento de um novo ciclo de esquizogonia pré-eritrocítica, causando os relapsos de infecção de malária (recrudescência). Quando o indivíduo não recebe adequadamente o tratamento contra malária, pode ser fonte de infecção por *P. falciparum* por até 1 ano, *P. vivax* até 3 anos e *P. malariae* por mais de 3 anos, resultando na resistência aos antimaláricos atualmente disponíveis (BRASIL, 2012).

Vários fatores contribuem para o aparecimento e expansão da resistência dos plasmódios aos medicamentos antimaláricos. As razões envolvem a interação dos padrões de uso dos medicamentos, características intrínsecas do fármaco, fatores relacionados ao hospedeiro e fatores ambientais do inseto vetor (WONGSRICHANALAI et al., 2002).

Por outro lado, o uso indiscriminado de antibióticos em medicina humana e o rápido crescimento da resistência bacteriana e parasitária contra as drogas atualmente disponíveis cria novos problemas de saúde pública e gera uma necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas. Entre o impacto e as consequências do uso indiscriminado dos antibióticos destacam-se: seleção de cepas de bactérias resistentes, implicações ecológicas e epidemiológicas, risco de super infecções, maior incidência de efeitos colaterais, e o mais importante, o elevado número de óbitos resultantes daquelas infecções (SANTOS, 2004).

A descoberta da penicilina e a utilização dos antibióticos no tratamento de doenças infecciosas constituiu uma das grandes conquistas da medicina no século XX. Em contrapartida, a Sociedade de Doenças Infecciosas da América (do inglês, IDSA) divulgou que em 2004 nos hospitais dos Estados Unidos, aproximadamente 2 milhões de pessoas adquiriram infecções bacterianas (DEMAIN & SANCHEZ, 2009). Bactérias como *Escherichia coli*, *Enterococcus* do grupo A, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* provocam uma multiplicidade de complicações em pacientes hospitalizados.

Os mecanismos de aquisição de resistência bacteriana podem ser classificados em dois grupos principais: mutação em um gene no cromossomo bacteriano, ou aquisição de um gene de resistência de outro micro-organismo, através de transdução, transformação ou conjugação (ITO et al., 2003). Essas modificações no genoma dos micro-organismos normalmente resultam em mudança na enzima ou estrutura alvo, mudança na via metabólica alvo, bombas de efluxo e inativação do antibiótico por degradação ou inibição competitiva (PRESCOT et al., 2002).

A descoberta da artemisinina e do alcaloide quinina tem estimulado o interesse em pesquisa de plantas medicinais na busca de novas drogas antimaláricas. A diversidade de atividades biológicas atribuídas aos alcaloides é conhecida há muito tempo na família Annonaceae. Esta diversidade está relacionada, principalmente, à variedade estrutural dos alcaloides do tipo aporfínico e seus derivados. Vários relatos na literatura confirmam a atividade dessa classe de substâncias contra a malária, principalmente por *Plasmodium vivax* e *Plasmodium falciparum*, responsáveis pelos elevados índices de casos no Brasil (ANDRADE-NETO et al., 2007; OSORIO et al., 2010; GRAZIOSE et al., 2011). Nesse contexto, a região Amazônica com uma das maiores diversidades existentes, principalmente tratando-se de micro-organismos e vegetais, se apresenta como uma fonte alternativa no combate a inúmeras patologias.

A família Annonaceae destaca-se pelo amplo número de espécies utilizadas na medicina tradicional. As pesquisas farmacêuticas, recentemente se intensificaram em estudos dos extratos de espécies de Annonaceae. Algumas apresentaram atividade antifúngica, bacteriostática, citostática e especialmente antiplasmódica de alguns componentes químicos das folhas, frutos e cerne (STÉVIGNY et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2003; CHANG et al., 1998; QUEIROZ et al., 1996; BOYOM et al., 2003; OSORIO et al., 2007).

A escolha das espécies da família Annonaceae (*Unonopsis guatterioides*, *Anaxagorea brevipes*, *Duguetia riparia*, *Tetrameranthus duckei*, *Annona exsucca*, *Xylopia benthamii* e *Guatteria citriodora*) para este estudo foi baseada na sua potencialidade farmacológica e/ou pela carência de estudos químicos e biológicos na literatura sobre as mesmas.

Após avaliação preliminar da atividade antiplasmódica destas espécies, *Guatteria citriodora* foi considerada a mais promissora. Neste trabalho, é apresentado o resultado da avaliação da atividade antiplasmódica de extratos e frações das folhas e galhos finos desta espécie e o estudo fitoquímico direcionado para as frações bioativas. Adicionalmente, são apresentados os resultados da avaliação de atividade antimicrobiana de extratos e frações de folhas e galhos finos, assim como a avaliação antimicrobiana dos óleos essenciais das suas folhas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 INCIDÊNCIA DA MALÁRIA

A malária é uma doença tropical infecciosa transmitida pelas fêmeas de mosquitos do gênero *Anopheles*. Os parasitas causadores da malária pertencem à família Plasmodiidae, gênero *Plasmodium*. Atualmente, são conhecidas cerca de 150 espécies causadoras de malária em diferentes hospedeiros vertebrados e apenas cinco infectam o homem: *Plasmodium vivax*, *P. ovale*, *P. malariae*, *P. knowlesi* e *P. falciparum*, sendo o último, responsável pela forma mais grave da doença (WHITE, 2008).

No Brasil, três espécies estão associadas à malária em seres humanos: *P. vivax*, *P. falciparum* e *P. malariae*. Em relação ao *P. ovale*, nunca foi registrada transmissão autóctone no Brasil, estando restrita a determinadas regiões do Continente Africano e casos importados de malária no Brasil. O *P. knowlesi* ocorre apenas no Sudeste Asiático (BRASIL, 2012).

De acordo com o Plano de Ação Global contra a Malária (GMPA) as necessidades de recursos globais foram estimados em 5,1 bilhões por ano entre 2011 e 2020. Combinando os fundos nacionais e internacional, os recursos disponíveis para o controle da doença foram de 2,5 bilhões de reais, deixando uma lacuna de 2,6 bilhões. Projeções tanto nacionais como internacionais dos recursos disponíveis entre 2013 e 2016 indicam financiamento total para o controle da malária de 2,85 bilhões de reais entre 2014 e 2016, o que é substancialmente menor do que a quantidade necessária para alcançar o acesso universal para intervenções contra a malária (WHO, 2013).

A malária é uma das cinco principais causas de morbidade e mortalidade no mundo com 207 milhões de casos e um número estimado de 627 mil mortes em todo planeta em 2012, sendo considerado um dos maiores problemas mundiais de saúde pública. Estima-se

que aproximadamente 3,4 bilhões de pessoas vivem em áreas de alto risco de transmissão da malária, que se distribuem na maioria dos países do continente africano ao sul do Saara, no Sudeste Asiático, e em vários países da América Central e do Sul incluindo Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador, Paraguai, Peru e Venezuela. A doença se faz presente em cerca de 104 países nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Em 2013, dos 104 países endêmicos, 97 países estão em curso de transmissão e outros 7 inseridos por estarem em fase de re-introdução desta doença no país (WHO, 2013) (Figura 1).

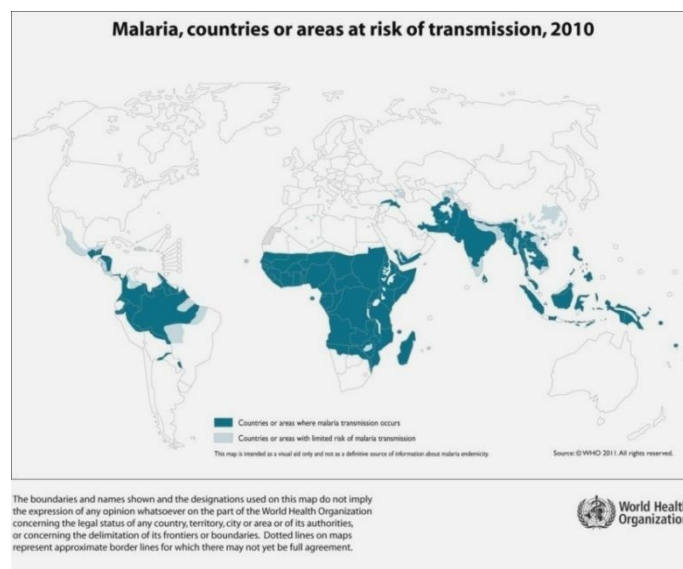


Figura 1: Distribuição da Transmissão da Malária no Mundo.

Fonte: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_Malária_ITHRiskMap.JPG

No Brasil, apesar dos esforços governamentais e o número de casos de malária diminuir de 613 mil para 242 mil de 2000 a 2012, a transmissão ainda ocorre em 9 estados considerados endêmicos, registrando-se 99,5% do total dos casos na região da Amazônia Legal. Estima-se que 40 milhões de pessoas estão em áreas de risco e dos 242 mil casos confirmados, 64 foram a óbito, em 2012. A transmissão por *P. falciparum*, responsável pela ocorrência das formas graves e letais da doença, tem apresentado redução importante nos últimos anos com 15% dos casos contra 85% de *P. vivax*. O número de habitantes com alto risco de transmissão (≥ 1 caso por 1000 habitantes) é de 4,57 mi e de baixo risco de transmissão (0-1 por 1000 habitantes) é de 35,8 mi (WHO, 2013).

2.2 CICLO DA MALÁRIA

2.2.1 HOSPEDEIRO VERTEBRADO – HUMANO

A infecção malárica inicia-se quando esporozoítos infectantes são inoculados nos humanos pelo inseto vetor. Durante um repasto sanguíneo infectante, aproximadamente 15 a 200 esporozoítos são inoculados sob a pele do hospedeiro, permanecendo ali por cerca de 15 minutos antes de alcançarem a corrente sanguínea. A motilidade do esporozoíto está intimamente associada à reorientação de proteínas na superfície do parasito, como é o caso das proteínas circum-esporozoíto (CS) e da proteína adesiva relacionada com a trombospondina (TRAP), essenciais para a invasão das células hospedeiras (NEVES, 2012) (Figura 2).



Figura 2: Fêmea de *Anopheles darlingi* realizando o repasto sanguíneo.

Fonte: <http://www.fiocruz.br/~ccs/arquivosite/estetica/malaria.htm>

Autor: Genilton Vieira – Fiocruz – MG

Entretanto, somente no hepatócito se processa o desenvolvimento parasitário, cerca de 30 minutos após a infecção. A eficiência da invasão e a especificidade da célula-alvo sugerem a participação de moléculas do parasito e receptores específicos na superfície da célula hospedeira. Após invadir o hepatócito, os esporozoítos se diferenciam em trofozoítos pré-eritrocíticos. Estes se multiplicam por meio de reprodução assexuada do tipo *esquizogonia*, dando origem aos *esquizontes* teciduais e, posteriormente, a milhares de merozoítos que

invadirão os eritrócitos (NEVES, 2012). Esta primeira fase do ciclo é denominada exo-eritrocítica, pré-eritrocítica ou esquizogonia tecidual e, portanto, precede o ciclo sanguíneo do parasito.

O ciclo *eritrocítico*, também assexuado, inicia-se quando os merozoítos tissulares invadem os eritrócitos. A interação dos merozoítos com o eritrócito envolve o reconhecimento de receptores específicos. Para o *Plasmodium falciparum*, o principal receptor são as glicoforinas (glicoproteínas presentes no eritrócito) e o ácido siálico e para o *P. vivax*, a glicoproteína do grupo sanguíneo Duffy. Essas características têm implicações diretas sobre as parasitemias verificadas nas infecções causadas pelas diferentes espécies de plasmódio (NEVES, 2012).

No interior dos eritrócitos, os merozoítos transformam-se em trofozoítas jovens, conhecidos como formas em anel, que crescem, se tornam irregulares (trofozoítas amebóides) e, em determinado momento, demonstram sinais de divisão no núcleo, e ele se converte em um esquizonte hemático, o qual, por divisão do núcleo e posterior segmentação, origina um número variável de merozoítos hemáticos (6 a 36). Este processo de multiplicação assexuada se chama esquizogonia eritrocítica (NEVES, 2012).

Depois de algumas gerações de merozoítos sanguíneos, ocorre a diferenciação em estágios sexuais, os macrogametócitos (feminino) e os microgametócitos (masculino), que não mais se dividem e que seguirão o seu desenvolvimento no mosquito vetor, dando origem aos esporozoítos que são as formas infectantes para o homem (ROCHA & PEDROSO, 2009).

O ciclo sanguíneo se repete sucessivas vezes, a cada 48h, nas infecções pelo *P. falciparum*, *P. vivax*, e *P. ovale*, e a cada 72h, nas infecções pelo *P. malariae*. A fonte de nutrição de trofozoítos e esquizontes sanguíneos é a hemoglobina, porém alguns componentes de metabólitos necessários ao seu desenvolvimento são procedentes do plasma: glicose,

metionina, biotina, certas purinas e pirimidinas, fosfatos e ácido paraminobenzoico (PABA) (NEVES, 2012; VERONESI-FOCACCIA, 2009).

A ingestão da hemoglobina se faz através de uma organela especializada, o citostoma. A digestão ocorre dentro de um vacúolo digestivo, com a formação do *pigmento malárico*, ou *hemozoina*, que consiste em 65% de proteínas plasmódicas, 16% de hematina (monômeros ou dímeros de ferriprotoporfirina IX), 6% de carboidratos e pequenas quantidades de lipídeos e ácidos nucléicos (NEVES, 2012; VERONESI-FOCACCIA, 2009).

Após o término da esquizogonia e o rompimento das hemácias parasitadas, o pigmento malárico acumulado no citoplasma do eritrócito é liberado no plasma e, posteriormente, fagocitado pelas células de Kupffer no fígado ou pelos macrófagos do baço e de outros órgãos (NEVES, 2012; VERONESI-FOCACCIA, 2009).

2.2.2 HOSPEDEIRO INVERTEBRADO - INSETO

Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do anofelino ingere as formas sanguíneas do parasito, mas somente os gametócitos serão capazes de evoluir no inseto, dando origem ao ciclo sexuado ou esporogônico. No intestino médio do mosquito, fatores como temperatura inferior a 30°C e aumento do pH por baixa pressão de CO₂ estimulam o processo de gametogênese (gametócitos se transformam em gametas extracelulares) poucos minutos após a ingestão do sangue (ROCHA & PEDROSO, 2009; VERONESI-FOCACCIA, 2009).

O gametócito feminino transforma-se em macrogameta e o gametócito masculino, por um processo denominado exflagelação, dá origem a 8 microgametas. Em 20 a 30 min, um microgameta fecundará um macrogameta, formando o ovo ou o zigoto. Dentro de 24h após a fecundação, o zigoto passa a movimentar-se por contrações do corpo, sendo denominado oocineto. Os oocinetos atravessam a parede do estômago, se transformam em corpúsculos

esféricos dentro de uma membrana elástica e são agora chamados de oocistos. Inicia-se então o processo de divisão esporogônica e, após um período de 9 a 14 dias, ocorre a ruptura da parede do oocisto, sendo liberados os esporozoítos formados durante a esporogonia, migrando posteriormente para as glândulas salivares. Estes esporozoítos atingirão o canal central da glândula e ingressarão no ducto salivar para serem injetados no hospedeiro vertebrado, juntamente com a saliva, durante o repasto sanguíneo infectante (Figura 3) (ROCHA & PEDROSO, 2009; VERONESI-FOCACCIA, 2009).

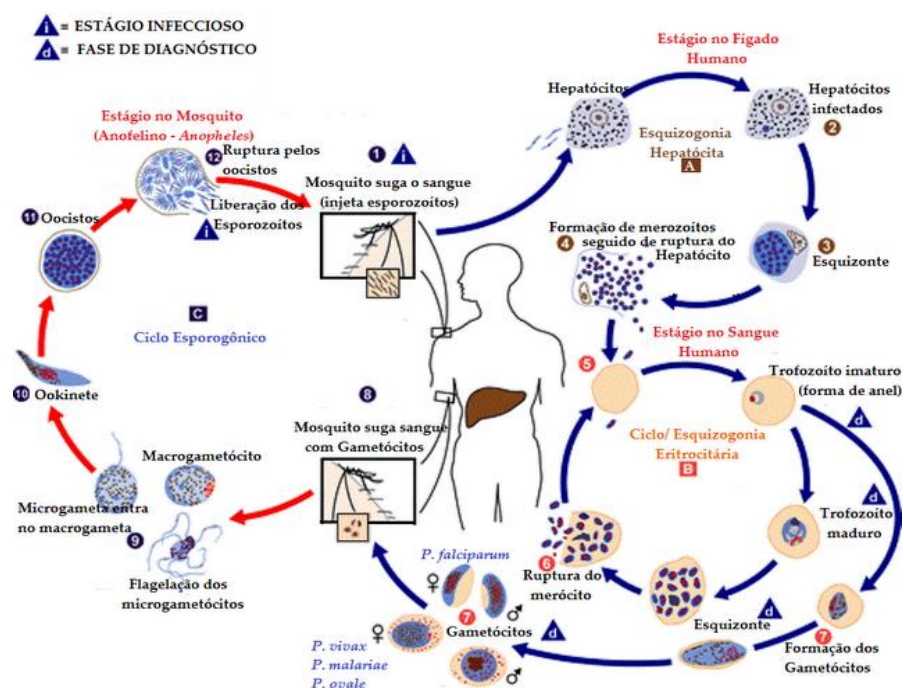


Figura 3: Ciclo da Malária nos estágios de reprodução sexuada e assexuada.

Fonte: www.cdc.gov/malaria/about/biology

2.3 QUIMIOTERAPIA ANTIMALÁRICA

O tratamento da malária visa atingir o parasita em pontos chave do seu ciclo evolutivo como a interrupção da esquizogonia sanguínea, destruição de formas latentes do parasito no ciclo tecidual (hipzonoítos) da espécie *P. vivax*, evitando as recaídas tardias, e a interrupção da transmissão do parasito, pelo uso de drogas que impedem o desenvolvimento de formas sexuais dos parasitos (gametócitos) (BRASIL, 2012).

Diversas drogas são utilizadas agindo de forma específica para impedir o desenvolvimento do parasito no hospedeiro. Dentre os principais compostos antimaláricos utilizados na terapêutica, encontram-se os aminoquilinos (cloroquina, amodiaquina, primaquina, quinina, quinidina e mefloquina); os antifolatos (sulfadoxina); diaminopirimidinas (pirimetamina); os sesquiterpenos lactonas (artemisinina) e alguns antibióticos (tetraciclina, doxiclina e clindamicina combinado principalmente com a quinina) (JORDÃO, 2007).

A quinina foi o primeiro medicamento utilizado contra a malária há mais de 300 anos. Até o início do século XX foi o único tratamento disponível contra a malária, quando então foi substituída por fármacos sintéticos derivados do anel quinolínico. Apesar de sua toxicidade, a quinina continua sendo utilizada no tratamento da malária cerebral, causada por *P. falciparum*, inclusive em crianças menores de cinco anos na África (WHO, 2009).

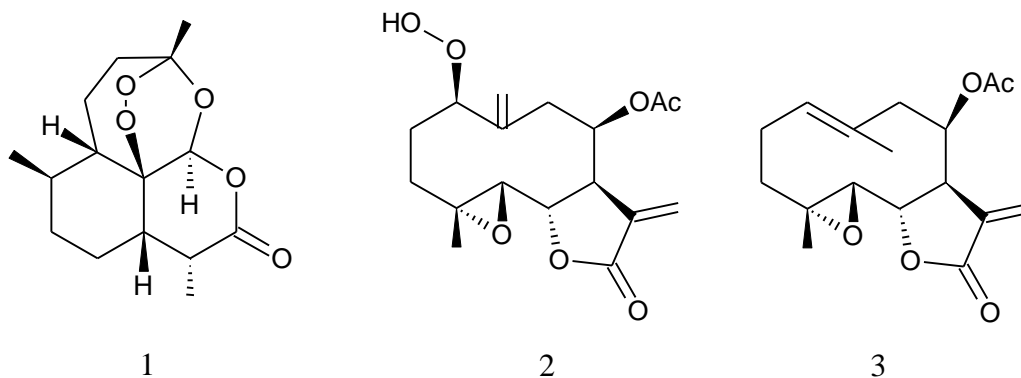
A quinina serviu de base para síntese da cloroquina, uma 4-aminoquinolina utilizada durante décadas na terapêutica e profilaxia de todos os tipos de malária, devido sua alta eficácia contra as formas sanguíneas do parasito, associada a sua baixa toxicidade e seu baixo custo (MARTIN et al., 2009). A cloroquina, apesar de ser utilizada por mais de 50 anos, seu mecanismo de atuação ainda não foi completamente elucidado (KONCAREVIC et al., 2007). Por ser uma base fraca, a cloroquina é acumulada nos vacúolos digestivos. Em pH fisiológico a cloroquina encontra-se desprotonada, mas no vacúolos digestivos, onde o pH é ácido, protona-se, perdendo a capacidade de atravessar a membrana plasmática (BRAY et al., 2005).

A mefloquina, um 4-quinolinometanol derivado da cloroquina, é mais ativa que a cloroquina sendo utilizada contra cepas de *P. falciparum* resistentes as 4-aminoquinolinas. No entanto, por possuir meia vida prolongada, propiciou rápida seleção de parasitos resistentes. Atualmente é recomendada somente em combinação com outros compostos, sobretudo com derivados de artemisinina (WHO, 2013).

A primaquina, uma 8-aminoquinolina é ativa contra hipnozoítos hepáticos de *P. vivax* e *P. ovale* (MUELLER et al., 2009; WELLS et al., 2010), mas pouco eficaz contra estágios eritrocíticos do parasito. Sua utilização é também recomendada em áreas endêmicas da malária por *P. falciparum*, uma vez que a mesma possui ação contra gametócitos, inibindo a evolução do parasito no vetor susceptível e, conseqüentemente, interrompendo a transmissão da doença (WHO, 2009).

A OMS recomenda terapias de combinação “Terapia de Combinação a Base de Artemisinina” ou ACT, uma vez que derivados de artemisinina apresentam um excelente perfil de segurança, uma rápida ação, agem contra gametócitos e possuem meia vida curta, o que dificulta o desenvolvimento da resistência dos parasitas da malária (OKELL et al., 2008; WHITE, 2008).

Várias lactonas sesquiterpênicas isoladas de plantas apresentam atividade antimalárica (BERO et al., 2009). No entanto, com exceção da artemisinina e compostos semelhantes de *Artemisia annua*, nenhum se revelou eficaz terapeuticamente. A atividade antimalárica da artemisinina (1) segundo Cui & Su (2009) está relacionada à presença da ponte endoperóxido. Seis alcaloides aporfínicos das cascas e duas lactonas sesquiterpênicas das folhas isolados de *Liriodendron tulipifera* (Magnoliaceae) apresentaram atividade antiplasmódica. A atividade antimalárica da peroxiferolida (2) com CI_{50} $6,3 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ não é significativamente diferente da lipiferolida (3) CI_{50} $1,8 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ o que sugere que o grupo hidroperóxido não contribui de forma significativa para a atividade observada (GRAZIOSE et al., 2011).



Os mecanismos pelos quais os parasitos da malária tornam-se resistentes a um determinado antimalárico e/ou a vários antimaláricos (multiresistência) são complexos e variam de acordo com o antimalárico. Geralmente, estes mecanismos podem ocorrer por dois processos: por mutações nos alvos onde atuam as drogas, ou por mutações em transportadores envolvidos na distribuição da droga no parasito dentro do eritrócito (WOODROW & KRISHNA, 2006).

Diante dessa problemática, a Organização Mundial de Saúde (OMS) adotou como medida de tratamento, em áreas onde potencialmente haja resistência do parasita, o tratamento com novas drogas e as Terapias Combinadas a base de Artemisinina (ACT's). Porém, o problema de resistência vem se acentuando de forma cada vez mais expressiva (MULLER & HYDE, 2013).

2.4 MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS

A Sociedade de Doenças Infecciosas da América (do inglês, IDSA) divulgou que em 2004 nos hospitais dos Estados Unidos, aproximadamente 2 milhões de pessoas adquiriram infecções bacterianas (DEMAIN & SANCHEZ, 2009). Bactérias como *Escherichia coli*, *Enterococcus* do grupo A, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* provocam uma multiplicidade de complicações em pacientes hospitalizados.

Staphylococcus aureus tem se tornado um grande problema no tocante a infecções hospitalares, devido à resistência adquirida por esse patógeno, desde a descoberta das penicilinas. É uma bactéria responsável por uma ampla variedade de doenças em humanos, que incluem abscessos superficiais e profundos, septicemia, endocardite, osteomielite, pneumonia e meningite (LOPES, 2006).

O uso indiscriminado de antibióticos em medicina humana e o rápido crescimento da resistência bacteriana e parasitária contra todas as drogas atualmente disponíveis cria novos problemas de saúde pública e gera uma necessidade urgente de novas abordagens terapêuticas. Entre o impacto e as consequências do uso indiscriminado dos antibióticos destacam-se: seleção de cepas de bactérias resistentes, implicações ecológicas e epidemiológicas, risco de super infecções, maior incidência de efeitos colaterais, e, o mais importante, o elevado número de óbitos resultantes daquelas infecções (SANTOS, 2004).

Os mecanismos de aquisição de resistência bacteriana podem ser classificados em dois grupos principais: mutação em um gene no cromossomo bacteriano, ou aquisição de um gene de resistência de outro micro-organismo, através de transdução, transformação ou conjugação (ITO et al., 2003). Essas modificações no genoma dos micro-organismos normalmente estão relacionadas à mudança na enzima ou estrutura alvo, mudança na via metabólica alvo, bombas de efluxo e inativação do antibiótico por degradação ou inibição competitiva (PRESCOT et al., 2002).

A busca de plantas com atividade antimicrobiana tem aumentado nas últimas décadas em muitos países, devido a sua riqueza de constituintes, a exemplo de compostos fenólicos como os flavonóides (COWAN, 1999; NASCIMENTO et al., 2000) e alcaloides aporfínicos, os quais possuem potente ação antibacteriana (ZHANG et al., 2002).

Marçal e colaboradores (1992) verificaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca de *Annona salzmanii* a qual foi atribuída aos alcaloides benzilisoquinolínicos. A fração alcaloídica de *Annona hypoglauca* apresentou atividade frente a *S. aureus* (CIM = 60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e CBM = 70 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e *E. faecalis* (CIM e CBM = 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$). Tanto os alcaloides totais bem com suas frações apresentaram atividade antibacteriana. A relação estrutura-atividade de vários alcaloides isoquinolínicos contra bactérias demonstrou

maior atividade para as noraporfínas que continham um grupamento 1,2 metilenodióxido. A presença desses compostos pode ser responsável pela atividade obtida (RINALDI, 2007).

A investigação química e farmacológica de algumas espécies da família Annonaceae, especialmente do gênero *Guatteria*, tem indicado a presença de importantes compostos bioativos exibindo algumas atividades farmacológicas, entre as quais, a antimicrobiana (COSTA et al., 2011b; COSTA et al., 2009a; COSTA et al., 2009b; COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2010)

Os dados acima evidenciam o grande potencial de fontes botânicas em moléculas bioativas, constituindo-se como ferramentas promissoras para o desenvolvimento de novos e relevantes fármacos.

2.5 A FAMÍLIA ANNONACEAE

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

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

família Annonaceae e compreende cerca de 175 espécies com a recente inclusão do gênero *Rollinia* (CHATROU et al., 2009; RAINER, 2007; MAAS et al., 2011).

A família é bem distribuída nas regiões tropicais e subtropicais como América do Sul e Central, África, Ásia e Austrália. Na Ásia e Austrália são 51 gêneros com cerca de 950 espécies. Na África e Madagascar há 40 gêneros, com aproximadamente 450 espécies, contra 38 gêneros e 740 espécies no continente americano. No Brasil, estão registrados 26 gêneros, compreendendo aproximadamente 260 espécies, ocorrendo a maior parte em florestas (MAAS et al., 2007) (Figura 4).

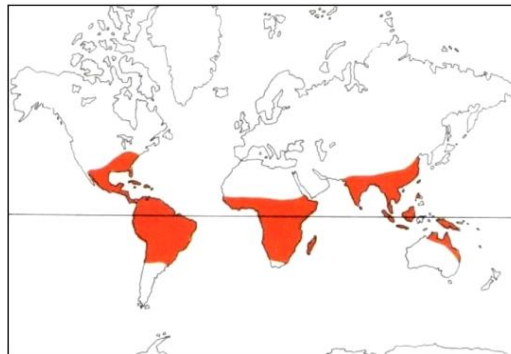


Figura 4: Distribuição das espécies da família Annonaceae
Fonte: Heywood, 1978

As espécies da família Annonaceae são caracterizadas pelo hábito arbóreo, ou muitas vezes pela presença de arvoretas, raramente na forma de lianas como em *Annona haematantha*. A família pode ser reconhecida pelo odor forte no corte do tronco ou ramos; pela presença de fibras longas e resistentes na casca do caule, conhecidas popularmente como envira; pelas folhas dísticas exceto em *Tetrameranthus*, com folhas espiraladas; e pela presença de marcas de chamuscas no corte transversal do tronco. Pêlos ou escamas estrelados são típicos do gênero *Duguetia*, e ocorrem também em *Tetrameranthus*. As flores têm três sépalas, livres ou unidas (*Tetrameranthus*); geralmente em 2 a 3 verticilos. Os estames e carpelos são numerosos. Os frutos são geralmente apocárpicos, carnosos e indeiscentes ou deiscentes. A semente apresenta endosperma ruminado com período de germinação muito curto (JOLY, 1993; RIBEIRO et al., 1999) (Figura 5).



Figura 5: Representação da família Annonaceae: a) *Cananga odorata*, b) *Annona muricata*, c) *Monodora tenuifolia*, d) *Annona squamosa* e) *A. mucosa*

Fonte: Kasuo Yamasaki, disponível em www.tradewindsfruit.com. Acessado em 04 Janeiro 2008.

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

Na floresta amazônica, a Annonaceae está entre as famílias mais importantes em número de indivíduos e de espécies. Algumas espécies, como *Annona cherimola* (cherimoya), *A. muricata* (graviola), *A. squamosa* (fruta do conde, maçã de açúcar, doce maçã), e *Annona mucosa* (biribá) são cultivadas ao longo das regiões tropicais e subtropicais devido aos seus frutos comestíveis. Algumas das espécies da família Annonaceae são de grande importância econômica por suas madeiras (KESSLER, 1993; SÁNCHEZ, 1997; MURILO & RESTREPO, 2000).

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

A família Annonaceae possui várias espécies ricas em óleos essenciais. Das folhas da *Annona muricata* (CALLAN & TUTIN, 1912) e *A. senegalensis* (MACKIE & MISRA, 1956) e dos frutos da *Xylopiya longifolia* (FARNSWORTH et al., 1974) e *X. striata* são extraídos óleos essenciais, assim como dos frutos secos de *X. aethiopica* (GRIEBEL, 1944), utilizados em especiarias e fragrâncias. O óleo de ylang-ylang obtido das flores da *Cananga odorata* é o mais amplamente estudado (KLEIN, 1975).

2.5.1 ATIVIDADE BIOLÓGICA DA FAMÍLIA ANNONACEAE

As pesquisas farmacêuticas se intensificaram recentemente com estudos dos extratos de espécies de Annonaceae. Algumas apresentaram atividade antifúngica, bacteriostática, citostática e especialmente antiplasmódica de alguns componentes químicos das folhas, frutos e cerne (STÉVIGNY et al., 2005; MONTENEGRO et al., 2003; CHANG et al., 1998; QUEIROZ et al., 1996; BOYOM et al., 2003; OSORIO et al., 2007).

Extratos de várias espécies de *Annona* possuem numerosas propriedades antiparasitária, antibiótica, antiinflamatória e antitumoral (SANTOS & SANTÁNA, 2001; YEH et al., 2005; DE MESQUITA et al., 2005). Segundo Costa (2009c), a atividade leishmanicida do óleo essencial das folhas de *Annona foetida* com CI_{50} de 4,1 μ g/mL contra *Leishmania guyanensis* pode provavelmente ser atribuída a uma mistura de constituintes sesquiterpênicos.

Espécies do gênero *Annona* são usadas no tratamento de malária, como *Annona muricata* (WILLCOX & BODEKER, 2004) em frutos imaturos (KHAN et al., 1997) e folhas (LEAMAN et al., 1995); folhas e cerne de *Annona foetida* (PIO CORRÊA, 1984), sementes e cerne de *Annona purpurea* (CAMACHO et al., 2003), *Annona squamosa* (HADI & BREMNER, 2001) e *Annona sylvatica* (BALBACH, 1986).

Boyom et al., (2011) avaliaram 118 extratos de espécies da família Annonaceae entre etanólicos, metanólicos e hexânicos de folhas e galhos de *Annona muricata*, *Monodora myristica*, *Polyalthia oliveri*, *P. suaveolens*, *Uvaria banmanni*, *Uvariastrum zenkeri*, *X. aethiopica*, *X. africana* e *X. parviflora* contra *Plasmodium falciparum*. Dos 118 extratos testados 37 apresentaram atividade contra *Plasmodium falciparum* com valores de CI_{50} variando de $1,07 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $9,03 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Das 29 frações metanólicas, 21 apresentaram inibição de parasitas com $CI_{50} < 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. As 29 frações foram avaliadas quanto à toxicidade aguda em camundongos albinos suíços e apenas 3 extratos de *Annona muricata* foram considerados tóxicos de acordo com o protocolo da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE).

Extratos hexânicos da raiz de *Xylopia aromatica* e casca da raiz de *X. emarginata* mostraram elevada atividade contra *Plasmodium falciparum* com $CI_{50} < 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os extratos hexânicos da casca da raiz de *Annona classiflora*, da casca do caule de *Xylopia emarginata* e extratos etanólicos da raiz de *Duguetia furfuraceae* apresentaram valores de CI_{50} que variaram entre 5 e $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (DE MESQUITA et al., 2007).

A família Annonaceae destaca-se pelo amplo número de espécies utilizadas na medicina tradicional (LEBOEUF et al., 1982). Estudos de etnobotânica realizados na Amazônia têm trazido dados da medicina tradicional dos povos da região. Dentre esses, destaca-se a utilização do suco do fruto de *A. muricata*, usado em bochechos no combate às aftas, internamente como antitérmico, diurético e no combate de insônias leves; a infusão das

folhas secas é usada contra insônias graves, dores de cabeça e como emagrecedor. O óleo essencial das folhas é aplicado por sua ação parasiticida, antirreumática e antinevrálgica. Na Amazônia também já foi relatado o uso medicinal de espécies distribuídas nos gêneros *Xylopi*a e *Guatteria* (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002) (Tabela 1).

Tabela 1: Espécies da família Annonaceae, uso popular e atividade farmacológica.

Espécie	Uso popular	Atividade Farmacológica	Referência
<i>Annona muricata</i>	Antiparasitária, antitumoral, inseticida, antimicrobiana e antifúngica	Antitumoral, leishmanicida e antimalárica	LEBOEUF et al., 1982 BRAGA, 1976
<i>Annona excellens</i>	-	Antileishmania contra <i>L. guyanensis</i> e <i>L. amazonensis</i>	OLIVEIRA et al., 2006
<i>Annona spinenses</i>	Doença de Chagas e picadas de cobra	-	QUEIROZ et al., 1996
<i>Artabotrys hexapetalus</i>	Antimalárica	Antimalárica e antitumoral	WONG & BROWN, 2002; LI et al., 1997,
<i>Guatteria boliviana</i>	Anti-térmico e vermífuga	Antiparasitária	MAHIOU et al., 2000
<i>Guatteria cardoniana</i>	Inseticida e antiparasitária	Antiparasitária, antimalárica e antiviral	PAREDES et al., 2001
<i>Guatteria schomburgkiana</i>	-	Antileishmania contra <i>amazonensis</i> , <i>brasiliensis</i> e <i>donovani</i> ; <i>Trypanosoma cruzi</i>	BAYMA et al., 1988 CORTES et al., 1985 FOURNET et al., 1994
<i>Annona mucosa</i>	Antitumoral, enterocolite e antiescorbútica	Antitumoral, antimicrobiana, antifúngica e antileishmania	KUO et al., 2001; SHI et al., 1997
<i>Uvaria chamae</i>	Antimalárica	-	ADDAE-KYEREME et al., 2001
<i>Uvaria dependens</i>	Antiparasitária	Antimalárica	NKUNYA et al., 1993
<i>Uvária klaineana</i>	Antiparasitária	Leishmanicida	AKENDENGUE et al., 2002
<i>Xylopi</i> a <i>aethiopica</i>	Antimalárica	-	ODUGBEMI et al., 2007

Tsabang et al., (2012) realizaram o levantamento etnofarmacológico de espécies da família Annonaceae utilizada na medicina popular de Camarões, Africa, para o combate à malária. As receitas das espécies *Annickia chlorantha*, *Annona muricata*, *A. senegalensis*, *A. squamosa*, *Polyalthia suaveolens*, *Uvaria* sp. e *Polycerato carpus* sp. são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Espécies de Annonaceae e utilização na medicina popular de Camarões, Africa.

Espécies	Parte da Planta	Métodos de Preparação	Posologia e Duração do Tratamento
<i>Annickia chlorantha</i>	Casca do Caule	Decocção de 500g com 3L de água em 20min	250mL 3 vezes ao dia por 15 dias
<i>Annona muricata</i>	Folhas	Decocção de um punhado de folhas em 3L de água durante 20 min	Tomar 250 mL 1 vez ao dia por 7 dias
<i>Annona senegalensis</i>	Casca do Caule e Raízes	Decocção de 500g em 3 L de água por 20min	Tomar 250 mL 1 vez ao dia por 15 dias
<i>Annona squamosa</i>	Folhas	Decocção de 150g em 3L de água por 20min	Tomar 250 mL 2 vezes ao dia por 10 dias
<i>Polyalthia suaveolens</i>	Casca do Caule	Decocção de 500g em 3 L de água por 20min	Tomar 250 mL 3 vezes ao dia por 15 dias
<i>Uvaria</i> sp.	Casca do Caule	Decocção de 500g em 3 L de água com evaporação até 0,5L	Tomar 250 mL 3 vezes ao dia
<i>Polyceratocarpus</i> sp.	Casca do Caule	Decocção de 500g em 3 L de água com evaporação até 0,5L	Tomar 250 mL 3 vezes ao dia

Fonte: Tsabang (2012).

2.5.2 O GÊNERO *Guatteria*

As espécies do gênero *Guatteria* são conhecidas por apresentar em sua composição, alta concentração de alcaloides. A revisão da literatura confirmou a predominância dessa classe de substâncias, sendo também encontrados, terpenóides, principalmente sesquiterpenos, juntamente com um grande número de flavonóides.

Segundo Erkens et al., (2007) o gênero *Guatteria* possui 290 espécies, a maior parte na Região Amazônica, muitas das quais são usadas na medicina popular: as sementes de

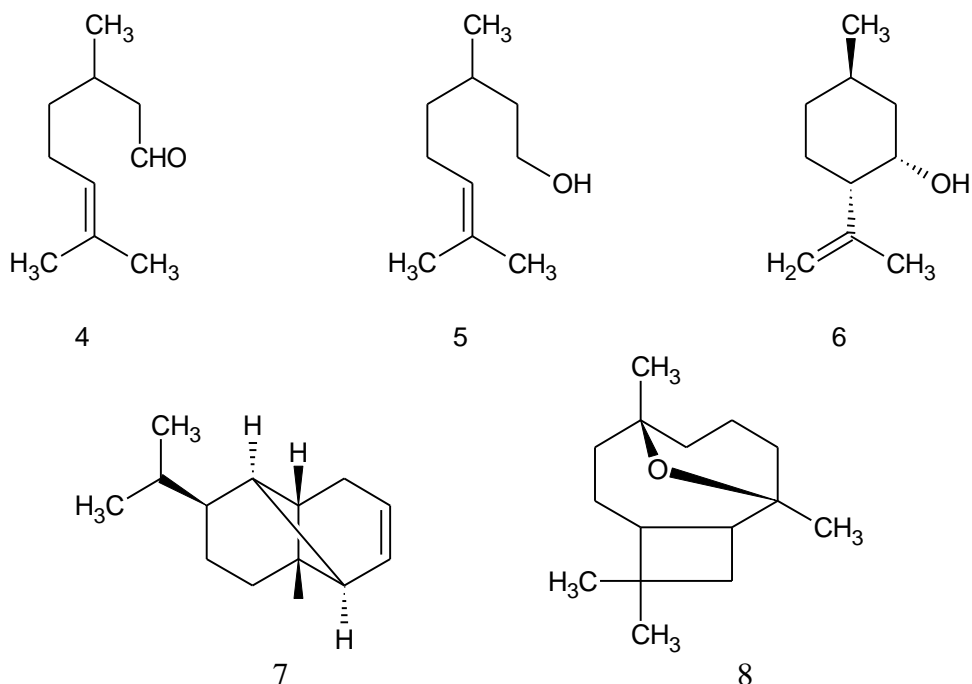
Guatteria ouregou são usadas no tratamento de dispepsia, dor estomacal e cólica pela população na região norte do Brasil (VAN DEN BERG, 1993).

Na Guiana Francesa, as cascas de *Guatteria guianensis* são usadas como febrífugas e para tratamento de doenças genito-urinárias (GRENAND et al., 1987); e no Peru, as cascas de *Guatteria modesta* são usadas como contraceptivos (SCHULTES, 1985).

Os estudos farmacológicos e fitoquímicos do gênero *Guatteria* foram intensificados devido às descobertas de novos produtos naturais com diversas atividades biológicas. Os indígenas na Bolívia utilizam a *Guatteria foliosa* como repelente de insetos e novos alcaloides aporfínicos antiparasitários foram isolados dessa planta (MAHIOU et al., 1994).

O extrato hidroalcolico (70%) das cascas de *Guatteria schomburgkiana* apresentou significativa atividade antimalárica *in vitro* contra o *Plasmodium falciparum* com CI_{50} igual a $4 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (MUÑOZ, 2000).

Em trabalhos de mestrado realizados por Rabelo (2008), o óleo essencial das folhas de *Guatteria citriodora* avaliado quanto sua composição por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM), evidenciou 77,1% de monoterpenos, enquanto os sesquiterpenos corresponderam a apenas 15,1%, totalizando 86,2% de compostos identificados. As substâncias majoritárias são citronelal (25,5%) (4), citronelol (22,4%) (5), neo-isopulegol (6), α -copaeno (7) e óxido de cariofileno (8). Os óleos essenciais demonstraram atividade antiprotozoária contra *Leishmania guyanensis* com CI_{50} igual a $12,1 \pm 1,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Em trabalho de colaboração com Corrêa et al., em 2009, este óleo evidenciou significativa atividade contra *Streptococcus mutans*, constituindo parte de uma mistura que gerou patentes nacional e internacional de produto de uso odontológico.



2.6 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA FAMÍLIA ANNONACEAE

2.6.1 ALCALOIDES

Os alcaloides são metabólitos secundários nitrogenados biossinteticamente derivados de aminoácidos que contêm um ou mais átomos de nitrogênio heterocíclico. A palavra "alcaloide" é derivada do árabe, *al-qali* (uma forma primitiva de carbonato de sódio), a partir do qual o termo "Alcalinos" é derivado. Muitos dos alcaloides são diretamente derivados dos aminoácidos aromáticos, fenilalanina, tirosina e triptofano (CSEKE et al., 2006).

De acordo com Leboeuf (1982), a família Annonaceae se destaca pela ocorrência de alcaloides do tipo isoquinolínico, tais como os alcaloides isoquinolínicos simples; benziltetraisoquinolínicos; bisbenzilisoquinolínicos e bisbenziltetraisoquinolínicos; protoberberínicos e tetrahidroprotoberberínicos; e aporfínicos, incluindo todos os alcaloides com o núcleo aporfínico e os alcaloides baseados em seu núcleo, porém com esqueleto modificado (Figura 6).

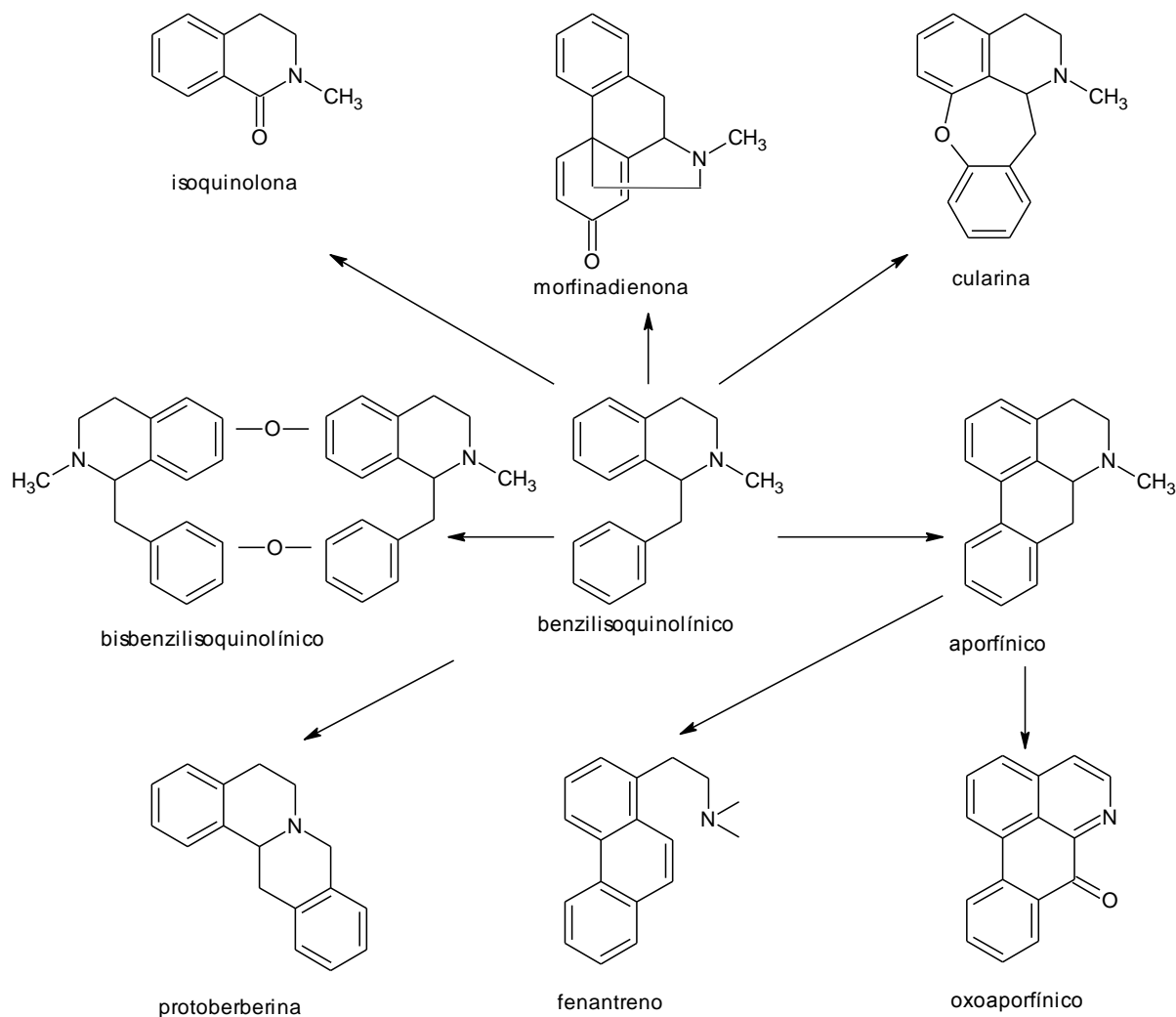
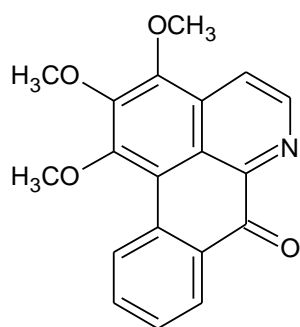


Figura 6: Origem biossintética dos alcalóides isoquinolínicos a partir do esqueleto benzilisoquinolínico.

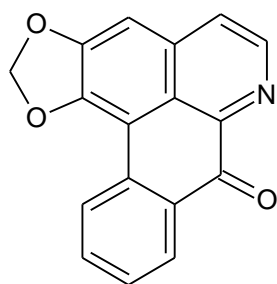
Fonte: CAVÉ, 1985.

Existe um grande interesse no estudo dos alcalóides devido a sua múltipla atividade farmacológica. No sistema nervoso central os alcalóides podem ter atividade depressiva (morfina, escopolamina) e estimulante (estricnina, cafeína); no sistema autônomo parassimpático (pilocarpina), simpático (efedrina), anticolinérgico (atropina, hiosciamina) e o ganglionar (nicotina). Os alcalóides também têm atividade anestésica (cocaína), antitumoral (vimblastina, vincristina), antimalárica (quinina), antibacteriana (berberina) e muitas outras (BRUNETON, 1999).

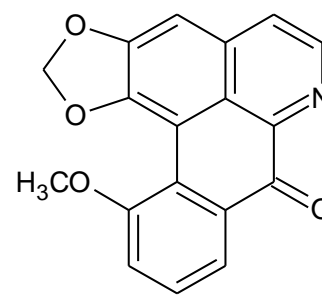
O estudo fitoquímico do cerne de *Guatteria citriodora* realizado por Rabelo (2008), resultou no isolamento de três alcaloides oxoaporfínicos identificados como *O*-metilmoshatolina (9), liriodenina (10) e oxoputerina (11).



9

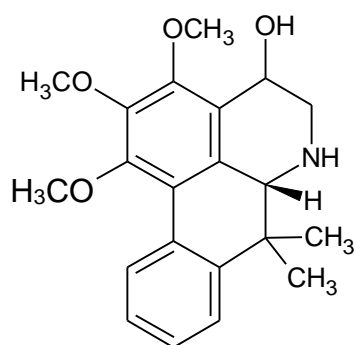


10

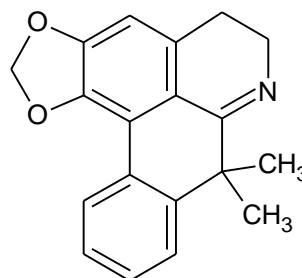


11

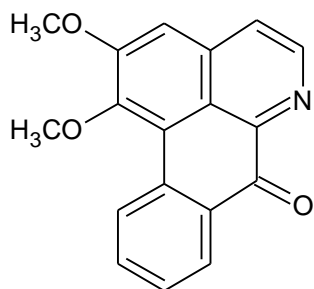
A investigação fitoquímica do extrato metanólico de *Guatteria friesiana* levou ao isolamento de alcaloides aporfínicos guatterioipsisina (12), dimetoxiguadiscina (13) e oxoaporfínico liriodenina (COSTA et al., 2009a). Alcaloides isolados do cerne de *G. blepharophylla* do tipo oxoaporfínico lisicamina (14), e 2 do tipo aporfínicos anonaina (15) e *N*-nornuciferina (16) (COSTA et al., 2009b). O estudo do extrato diclorometânico de galhos de *Annona foetida* levou ao isolamento dos alcaloides oxoaporfínico aterospermidina (17), *O*-metilmoschatolina e uma pirimidina- β -carbolina anomontina (18) (COSTA et al., 2011a).



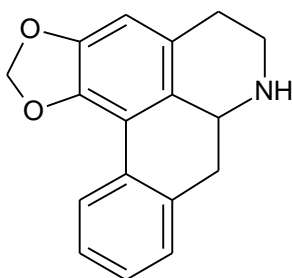
12



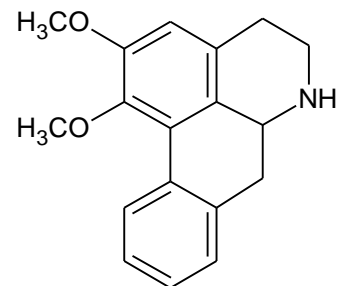
13



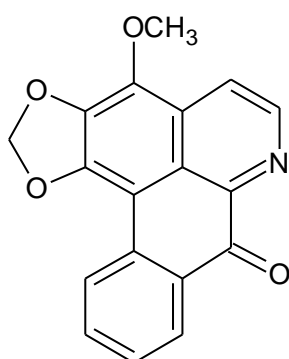
14



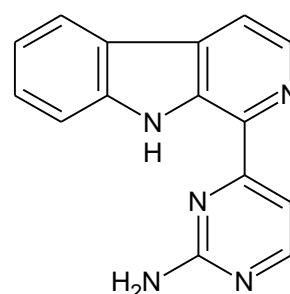
15



16



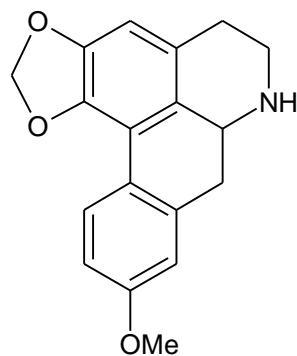
17



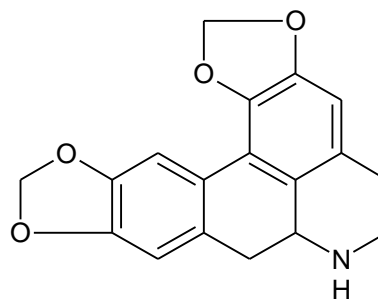
18

A liriodenina, alcaloide oxoaporfínico, isolado de várias espécies do gênero *Guatteria*, demonstrou atividade antimicrobiana contra *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Staphylococcus aureus* e *S. aureus* resistente a metilicina, apresentando valores de CIM 6,5, 12,5, 3,13 e 3,13 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (ZHANG et al., 2002).

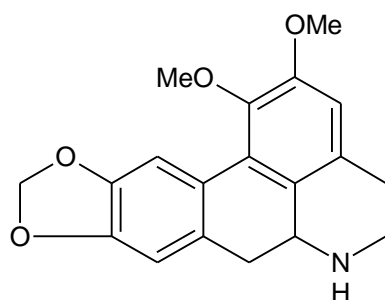
Os alcaloides aporfínicos isolados da espécie *Guatteria sp.* foram avaliados quanto à atividade citotóxica. Os alcaloides *R*-xilopina (19), *S*-criptodrina (20) e *S*-nornantenina (21) apresentaram CI_{50} maior que 40 μM , enquanto que o *S*-nornuciferina (22) apresentou atividade citotóxica com CI_{50} maior que 13,5 μM . Segundo Stévigny et al. (2005), a explicação está na ausência do metilenodioxí. Esses alcaloides aporfínicos isolados apresentaram atividade leishmanicida CI_{50} entre 1,0 a 8,0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *L. mexicana* e *L. panamensis* (MONTENEGRO et al., 2003).



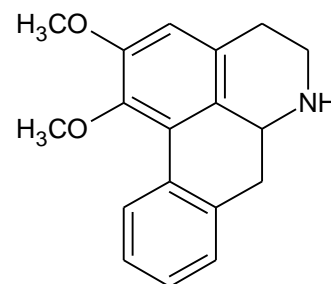
19



20

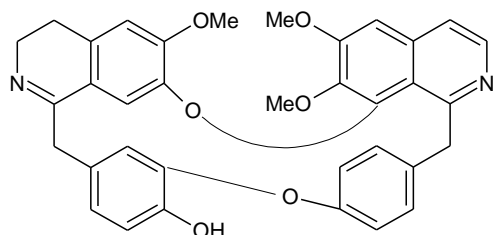


21

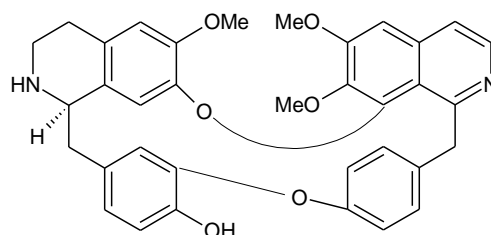


22

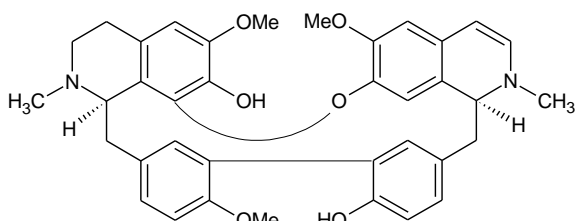
A investigação farmacológica de substâncias químicas indicou que os alcaloides dibenzilisoquinolínicos são compostos bioativos importantes existentes em plantas da família Annonaceae. Os dibenzilisoquinolínicos são conhecidos por possuírem várias atividades farmacológicas incluindo antiparasitária, leishmanicida (FOURNET et al., 1994; MUNSHI et al., 1972), contra doença de chagas (ROJAS DE ARIAS et al., 1994) e antimalárica (LIKHITWITAYAWUID et al., 1993a; VALENTIN et al., 1997; ANGERHOFER et al., 1999). Esses alcaloides, com suas respectivas atividades, estão bem representados no gênero *Guatteria*. Os alcaloides dibenzilisoquinolínicos puertogalina B (23), guattebolina (24), antioquina (25), tiliageina (26), funiferina (27) e sepeerina (28) foram avaliados quanto à atividade antimalárica contra os *Plasmodium falciparum* (D6 e W2). Os resultados indicam forte atividade com CL_{50} variando de 72,5 a 316,4 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A presença do grupo amina (NH-, NH-Me e di-NH-Me) reduz a ação frente ao *Plasmodium falciparum*, com exceção da guattebolina (MAHIOU et al., 2000).



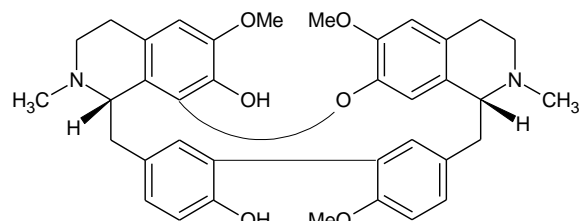
23



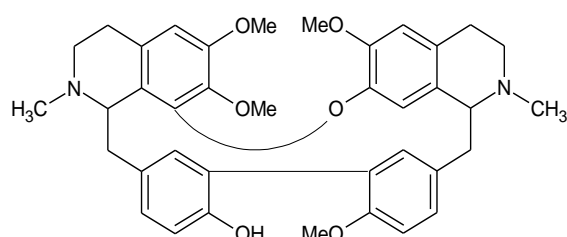
24



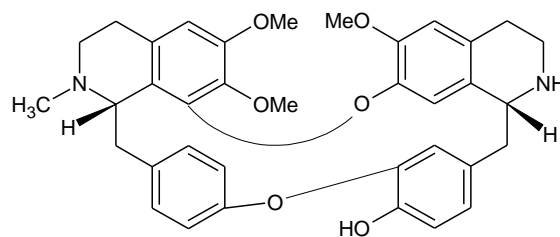
25



26



27

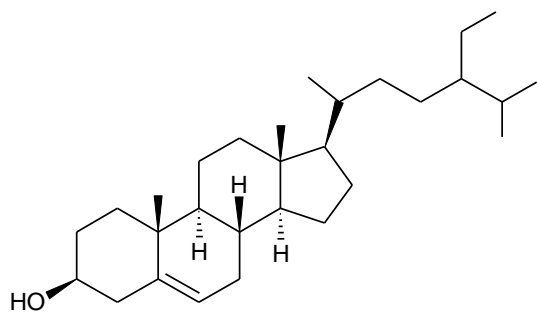
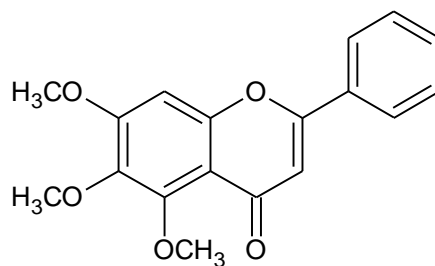


28

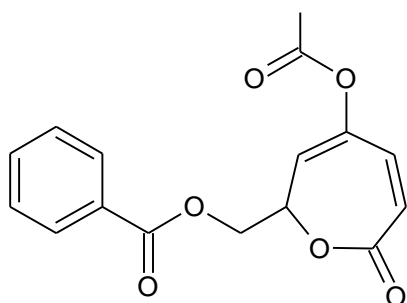
Os alcaloides definidos como derivados de plantas opticamente ativos representam uma das mais difundidas classes de substâncias dotadas de múltiplas e variadas propriedades farmacológicas (STÉVIGNY et al., 2005).

2.6.2 OUTROS CONSTITUENTES ISOLADOS DA FAMÍLIA ANNONACEAE

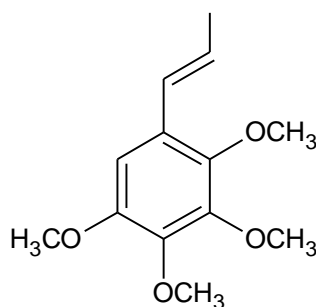
Embora os alcaloides sejam seus principais produtos biossintéticos, outras classes de substâncias podem ser encontradas nesta família de acordo com a revisão de LÉBOUEF et al. (1982), tais como: esteroides (29), flavonoides (30), lactonas (31) (AKENDENGUE et al., 2002), aromáticos (32), monoterpênos (33), sesquiterpênos (34), diterpênos (35) e triterpênos (36).

29 β -sitosterol

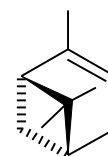
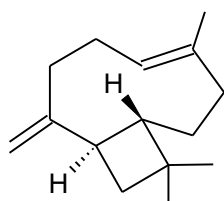
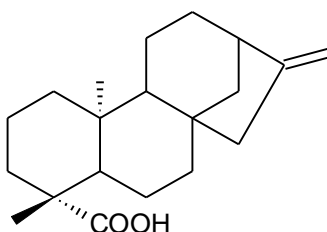
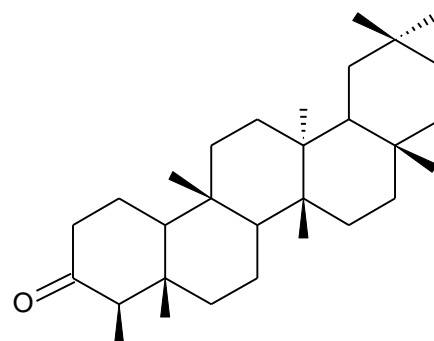
30 - 5,6,7 trimetoxi-flavona



31 Klaivanolida

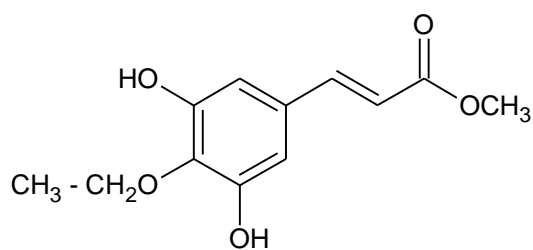


32 Isomyristicina

33 α -pineno34 *trans*-Cariofileno35 Ácido *ent*-kaurano-16-em-óico

36 Fridelina

Um novo derivado do cinamato foi isolado dos extratos etanólicos das cascas de *Duguetia gardneriana*, o metil 3,5 dihidroxi-4-etoxicinamato (37) (ALMEIDA et al., 2007).

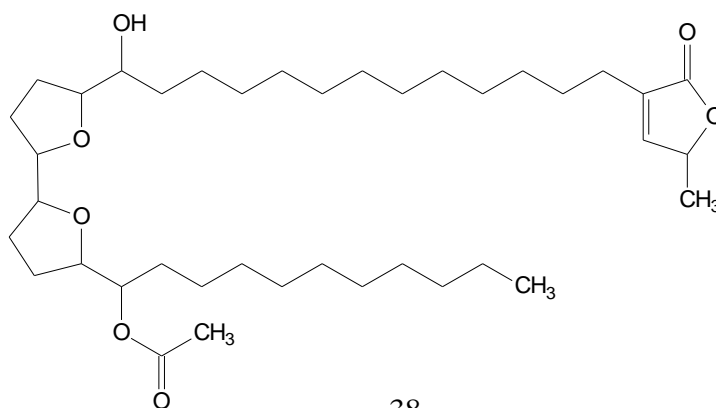


37

As acetogeninas de Annonaceae são substâncias naturais bioativas que estão presentes nas espécies dessa família, principalmente no gênero *Annona*. O esqueleto comum mais encontrado é formado por 32 ou 34 carbonos de ácidos graxos com ligações duplas e triplas, sem ramificações e no final desse uma γ -lactona. Alguns esqueletos apresentam grupos funcionais oxigenados como hidroxilas, cetonas, epóxi, tetra-hidrofurano e tetra-hidropirano (RINALDI, 2007).

Alguns tipos de acetogeninas são caracterizados com base nos grupos funcionais presentes. Essa funcionalidade confere uma grande atividade biológica, com propriedades citotóxicas, antiparasitária, pesticida, antimicrobiana, imunossupressora e antitumoral. Para essa última atividade as acetogeninas têm como mecanismo de ação a inibição nas mitocôndrias da cadeia respiratória do complexo I (BERMEJO et al., 2005).

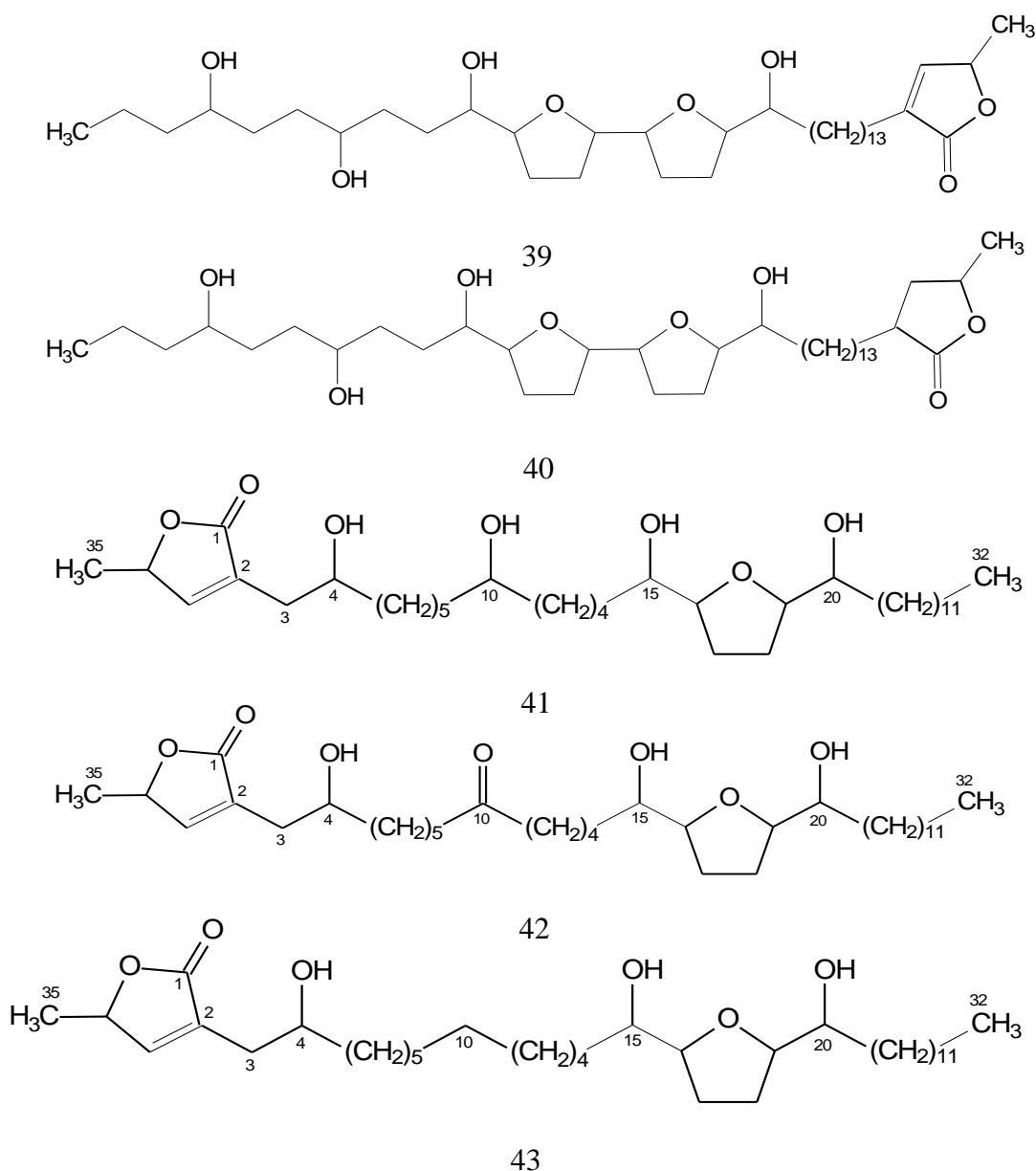
As acetogeninas são relatadas em diversos artigos como uma classe exclusiva da família Annonaceae. Em uma revisão, compreendendo o período de 1998 a 2004, Bermejo et al., (2005) reportam o isolamento de 417 acetogeninas em espécies desta família, sendo que a predominância dos compostos descritos era para espécies de *Annona*. Desde a descoberta da uvaricina (38) em 1982, houve um aumento no interesse por estudos de espécies desta família, devido à ampla variedade de atividades biológicas, dentre elas às atividades antitumoral, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária e pesticida (ALALI et al., 1999).



38

As acetogeninas têm sido encontradas, em apenas quatro gêneros: *Annona*, *Asimina*, *Goniothalamus*, e *Uvaria* (PIMENTA, 1995), sendo que o gênero *Annona* é um dos mais estudados.

O fracionamento biomonitorado dos extratos metanólicos de sementes conduziu à identificação de sete acetogeninas. Da espécie *Annona cherimolia* foram isoladas duas acetogeninas bis-tetrahidrofurânicas γ -lactonas cherimolina (39) e desidrocherimolina (40). De *Annona muricata* foram obtidas cinco acetogeninas do tipo mono-tetrahidrofurânicas γ -lactonas: annonacina (41), annonacinona (42) e murisolina (43) (BORIES et al., 1991).



3. OBJETIVOS

3.1 GERAL

Avaliar as atividades antiplasmódica e antibacteriana de espécies da família Annonaceae e realizar estudo fitoquímico da espécie mais promissora visando à identificação de compostos com potencial atividade antiplasmódica e antibacteriana.

3.2 ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade antiplasmódica contra o *Plasmodium falciparum* do tipo FCR3 dos extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies *Unonopsis guatterioides*, *Anaxagorea brevipes*, *Duguetia riparia*, *Tetrameranthus duckei*, *Annona exsucca*, *Xylopiia benthamii* e *Guatteria citriodora* direcionando a espécie mais promissora ao estudo fitoquímico.

Fracionar os extratos hidroalcoólicos bioativos das folhas e adicionalmente os galhos finos e submeter as frações hexânicas, neutras e alcaloídicas a testes de atividade antibacteriana e antiplasmódica contra *Plasmodium falciparum* FCR3.

Avaliar a atividade antibacteriana pela técnica de difusão em ágar por meio de poços de extratos e frações de *Guatteria citriodora* frente aos micro-organismos *Y. enterocolitica*, *S. dysenteriae*, *S. braenderup*, *S. typhimurium*, *S. choleraesuis*, *S. gallolyticus*, *E. hirae*, *S. parasanguinis*, *Staphylococcus* sp., *S. pneumoniae*, *S. mutans*, *E. cloacae*, *C. jejuni*, *S. xylopus*, *S. simulans*, *S. enteritidis*, *N. gonorrhoeae*, *S. agalactiae*, *S. flexneri*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. oralis*, *S. epidermidis*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *G. stearothermophilus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *L. innocua* e *L. ivanovii*.

Submeter os óleos essenciais das folhas de *Guatteria citriodora* a testes de atividade antibacteriana.

Obter frações enriquecidas e/ou puras dos metabólitos secundários presentes nos extratos bioativos através de métodos cromatográficos convencionais.

Identificar as frações enriquecidas e/ou puras por técnicas espectroscópicas e espectrométricas modernas (ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C (1D e 2D), infravermelho (FT/IR) e espectrometria de massas.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

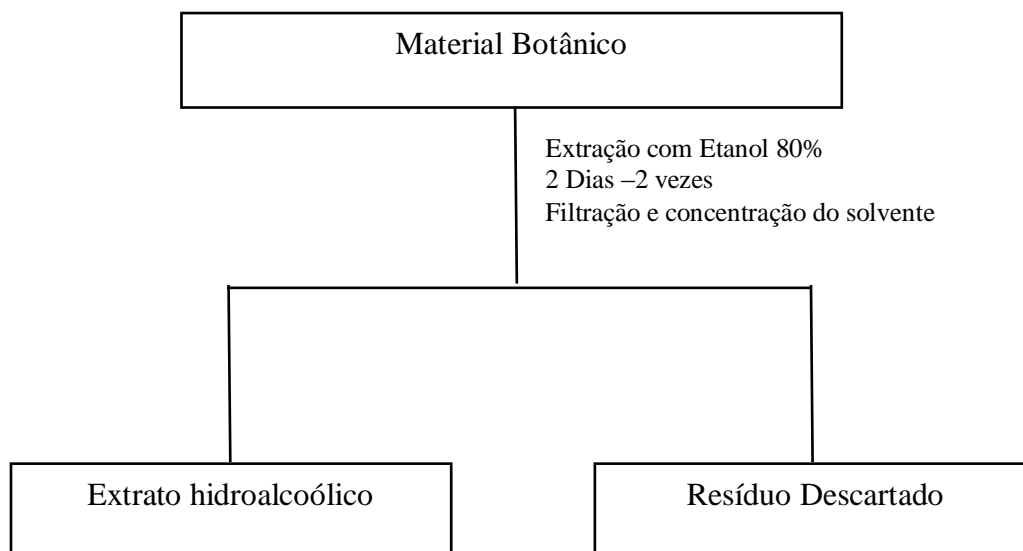
4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As espécies vegetais *Unonopsis guatterioides*, *Anaxagorea brevipes*, *Duguetia riparia*, *Tetrameranthus duckei*, *Annona exsucca*, *Xylopia benthamii* foram coletadas na Reserva Adolpho Ducke, localizada no Km 26 da AM-010, e no Campus Universitário da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). A espécie *Guatteria citriodora* foi coletada no município de Maués (AM) no lago Canaranas em setembro de 2009 e as exsiccatas depositadas no Herbário da UFAM (Tabela 3).

As plantas selecionadas foram desinfetadas para evitar contaminação por micro-organismos, posteriormente secas em estufa de ar circulante a uma temperatura máxima de 45 °C por 48 horas e pulverizadas em moinho de quatro facas.

4.2 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS FOLHAS PARA SELEÇÃO DA ESPÉCIE BIOATIVA

O material botânico (30 g de folhas secas) pulverizado foi submetido à extração em temperatura ambiente (maceração), em um frasco Mariotte, com os solventes etanol e água na proporção de 8:2, em 100 mL. O solvente foi renovado a cada 24 horas, por quatro vezes. Após esse período, a solução filtrada foi transferida para um balão e submetida imediatamente à concentração por evaporador rotatório com pressão reduzida com aquecimento em banho-maria à temperatura de no máximo 40 °C, para máxima evaporação do solvente (Esquema 1). Os extratos hidroalcoólicos das folhas foram obtidos de plantas da família Annonaceae, incidentes na Amazônia, a escolha das espécies foi feita por indicação etnofarmacológica ou outras abordagens, como screening farmacológico, ou a quimiotaxonômica.



Esquema 1: Fluxograma de obtenção dos extratos.

Tabela 3: Espécies vegetais com numero de registro e massa (g) dos extratos obtidos.

Espécie	Nº Exsicata	Massa do Extrato Hidroalcoólico (g)
<i>Duguetia riparia</i> Huber	8278	3,8929
<i>Tetrameranthus duckei</i> R.E. Fries	8149	3,3988
<i>Xylopia benthamii</i> R.E. Fries	8150	5,2861
<i>Unonopsis guatterioides</i> A. DC.	8249	3,6057
<i>Annona exsucca</i> DC.	8147	3,5009
<i>Anaxagorea brevipes</i> Benth	8280	3,9108
<i>Guatteria citriodora</i> Ducke	7346	5,0708

Os extratos hidroalcoólicos das plantas selecionadas foram submetidos a ensaios de atividade antiplasmódica para avaliação da espécie mais promissora e posterior estudo fitoquímico.

4.3 TESTE DE ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

Para a avaliação da atividade antiplasmódica utilizaram-se cepas FCR3 de *Plasmodium falciparum* com a colaboração do MSc. Yury Chaves sob a coordenação do Prof. Dr. Paulo Afonso Nogueira no Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ - AM.

4.3.1 CULTURA DE *Plasmodium falciparum*

As cepas FCR3 de *P. falciparum* foram mantidas em cultivo no meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) incompleto com 10 % de soro humano AB+ e alimentadas com eritrócitos humanos normais incubadas a 37 °C em atmosfera de baixa concentração de oxigênio e gás carbônico seguindo a técnica de micro-aerofilia tradicional da queima de vela em dessecador. O meio de cultura RPMI 1640 incompleto foi constituído de 10,4 g de RPMI, 5,94 g de hepes, 40 mg de gentamicina, 2 g de glicose e 50 mg de hipoxantina a pH 6,8. E o meio completo foi suplementado com 5 mL soro humano AB+ previamente tratado em banho-maria a 56 °C durante 30 minutos, 1 mL de NaHCO₃ 10 % e 44 mL de meio RPMI incompleto (LJUNGSTRÖM et al., 2004).

4.3.2 ANÁLISE DE INIBIÇÃO DE CRESCIMENTO POR CITOMETRIA DE FLUXO

As soluções estoque dos extratos foram preparadas em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídas em meio completo até a concentração final de DMSO de 0,02 – 0,05%. Para cada experimento *in vitro*, as soluções estoque foram diluídas seriadamente em meio completo (1:10) de concentração 100 a 0,01 µg.mL⁻¹ em cinco diluições e distribuídas em triplicata nos poços da placa (50 µL/poço).

O parasita foi distribuído utilizando uma solução com 100 µL de hemácias parasitadas, 100 µL de hemácias saudas, 10 µL de gentamicina e avolumado para 10 mL de meio completo obtendo uma suspensão de parasita a 2% de hematócrito e parasitemia de 3 a 5%. Desta solução foram distribuídos 50 µL em cada um dos poços e uma triplicata para o controle positivo (meio de cultura + parasita), no controle negativo (eritrócitos não parasitados) ambos

sem a presença dos extratos, utilizou-se 20 μ L de hemácias saudias e 1 mL de meio completo com hematócrito a 2 %.

A leitura foi realizada em 72 h com contagem da porcentagem da parasitemia por citômetro de fluxo FAC-SCAN com identificação do parasito através do brometo de etídio (substância acumulativa fluorescente que se liga ao DNA das células). A inibição foi determinada comparando à parasitemia observada com a parasitemia do controle positivo sem extrato vegetal e a sensibilidade fluorescente do teste foi comparada com controle negativo possuindo hemácias saudias.

A concentração inibitória 50 % (CI_{50}) foi determinada a partir da curva dose-resposta de extratos de planta vs hemácias parasitadas, por análise de regressão não linear.

4.3.3 PADRONIZAÇÃO DO BROMETO DE ETÍDIO

Foram realizados testes com corante acumulativo fluorescente (brometo de etídio) com o objetivo de determinar a diluição de maior detecção do teste em duas condições: hemácias parasitadas e não parasitadas.

Foram realizadas seis diluições do brometo em microtubos de 1 mL utilizando 3 μ L de brometo de etídio em 147 μ L de phosphate buffer saline (PBS) na proporção de 1:50. Utilizou-se microtubo de 1 mL com 5 μ L de sangue parasitado à 2 % de parasitemia e 5 μ L de sangue não parasitado como controle negativo e adicionado 50 μ L das seis diluições seriadas do brometo nas amostras parasitadas e não parasitadas incubando a 37 °C por 30 minutos. Após a incubação, o sangue parasitado e não parasitado foi lavado com 1 mL de PBS (Phosphate Buffered Saline) centrifugando à 800 rpm por 5 minutos três vezes e descartando o sobrenadante. Posteriormente, o sangue parasitado foi ressuspenso em 1 mL de PBS levando-os para a análise no citômetro de fluxo.

4.3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

A análise estatística dos dados foi realizada pelo Dr. James Dean e a Dra Carina Figueiredo do Laboratório de Estatística - LabEst da Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

Foram avaliados 41 modelos estatísticos para determinar a concentração inibitória 50% (CI₅₀) a partir da curva dose-resposta de extratos de planta vs hemácias parasitadas. Foram utilizadas as curvas logística, log-logística, Weibull do tipo I e II, Brain-Cousens, Cedergreen-Ritz-Streibig e curva de Michaelis-Mentenpor, por não apresentaram instabilidade numérica, além de apresentarem melhor desempenho. Todas as análises foram feitas utilizando o pacote *drm* do software R (KNEZEVIC, 2009).

Curva Logística: A curva logística com quatro parâmetros de notação L.4 foi definida por:

$$f(x) = c + \frac{d - c}{(1 + \exp(b(x - e)))}$$

onde “*c*” e “*d*” são os valores mínimo e máximo da resposta, “*e*” é o CI₅₀ e “*b*” é um parâmetro relacionado com a inclinação da curva. Quando $c = 0$ a curva resultante é denominada logística com 3 parâmetros denotada por L.3.

Curva Log-logística: A curva logística com 4 parâmetros de notação LL.4 foi definida por:

$$f(x) = c + \frac{d - c}{(1 + \exp(b(x - e)))}$$

onde “*c*” e “*d*” são os valores mínimo e máximo da resposta e “*b*” é um parâmetro relacionado com a inclinação da curva.

Curvas Weibull: A curva Weibull do tipo 1 com 4 parâmetros de notação W1.4 foi definida por:

$$f(x) = c + (d - c)\exp(-\exp(b(\log(x) - \log(e))))$$

onde “c” e “d” são os valores mínimo e máximo da resposta, “b” é um parâmetro relacionado com a inclinação da curva e o CI₅₀ é dado por

$$CI_{50} = \exp\left(\frac{1}{b}\log(\log(2)) + \log(e)\right)$$

Quando $c = 0$ a curva resultante é denominada Weibull do tipo 1 com 3 parâmetros (W1.3).

A curva Weibull do tipo 2 com 4 parâmetros de notação W2.4 foi definida por

$$f(x) = c + (d - c)(1 - \exp(-\exp(b(\log(x) - \log(e))))$$

onde “c” e “d” são os valores mínimo e máximo da resposta, “b” é um parâmetro relacionado com a inclinação da curva e o CI₅₀ foi dado pela mesma equação da Weibull tipo 1. Quando $c = 0$ a curva resultante é denominada Weibull do tipo 2 com 3 parâmetros (W2.3).

Curvas de Brain-Cousens: A curva de Brain-Cousens com cinco parâmetros de notação BC.5 foi definida por

$$f(x) = c + \frac{d - c + fx}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

onde “c” e “d” são os valores mínimo e máximo da resposta, “b” é um parâmetro relacionado com a inclinação da curva. Quando $c=0$, a curva resultante é denominada Brain-Cousens com 4 parâmetros denotada por BC.4.

Curvas de Cedergreen-Ritz-Streibig: A curva de Cedergreen-Ritz-Streibig com 6 parâmetros de notação CRS.6 foi definida por:

$$f(x) = c + \frac{d - c + f \exp(-x^{-a})}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

Sua versão com $c=0$ e $a = 0,25$ é denotada curva de Cedergreen-Ritz-Streibig com 4 parâmetros (CRS.4c). A versão desta curva com forma invertida denotada por UCRS.4c é dada por:

$$f(x) = d - \frac{d - c + f \exp(-x^{-a})}{1 + \exp(b(\log(x) - \log(e)))}$$

Curvas de Michaelis-Menten: A curva de Michaelis-Menten com 4 parâmetros denotada por MM.4 é definida por

$$f(x) = c + \frac{d - c}{1 + \frac{e}{x}}$$

Sua versão com $c=0$ é denotada curva de Michaelis-Menten com 3 parâmetros (MM.3).

Foram utilizadas duas medidas de ajuste: o Critério de Informação de Akaike (AIC) e o do ajuste da curva contra a análise de variância com um fator (ANOVA). A primeira mede o quão verossímil é o ajuste com o número de parâmetros necessários para ajustá-lo nesta medida. Quanto menor for o valor do AIC, melhor será o ajuste. A segunda é um teste de hipóteses e o seu p-valor será reportado.

4.4 TESTES ANTIBACTERIANOS

Os ensaios antibacterianos foram realizados em colaboração com a MSc. Ivanildes dos Santos sob a coordenação da Profa. Dra. Patricia Puccinelli Orlandi Nogueira no Instituto Leônidas e Maria Deane – FIOCRUZ – AM. Foram submetidas à avaliação de atividade antibacteriana cepas padrões de 29 bactérias Gram positivas (Tabela 4).

Tabela 4: Lista das 29 cepas de bactérias Gram positivas.

Micro-organismo	Referência
<i>Listeria ivanovii</i>	ATCC 19119 ATCC 19112
<i>L. monocytogenes</i>	ATCC 19117 ATCC 15313 ATCC 7644
<i>L. innocua</i>	ATCC 33090
<i>Bacillus subtilis</i>	ATCC 6051
<i>Streptococcus agalactiae</i> (CT)	ATCC 13813
<i>S. mutans</i>	ATCC 25175
<i>S. pneumoniae</i>	ATCC 11733
<i>S. gallolyticus</i>	ATCC 9809
<i>S. oralis</i> (<i>Streptococcus sanguis</i>)	ATCC 10557
<i>S. parasanguinis</i>	ATCC 903
<i>S. pyogenes</i>	ATCC 19615
<i>S. pyogenes</i> grupo A tipo 1	ATCC 12344
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 14458 ATCC 12598 ATCC 8095 ATCC 29213 ATCC 12600
<i>S. epidermidis</i>	ATCC12228
<i>S. simulans</i>	ATCC27851
<i>S. xylosus</i>	ATCC 29971
<i>S. aureus</i> sensível a meticilina	ATCC 25923
<i>S. aureus</i> resistente a meticilina	ATCC 33591
<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	ATCC 7953
<i>Enterococcus hirae</i> (<i>Streptococcus lactis</i>)	ATCC 8043
<i>E. faecalis</i>	ATCC 4083 ATCC 14506

As 17 cepas de bactérias Gram negativas selecionadas para avaliação da atividade bactericida (Tabela 5).

Tabela 5: Lista das 17 cepas de bactérias Gram negativas.

Micro-organismo	Referência
<i>Campylobacter jejuni</i> (CT)	ATCC 33560
<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 23355
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1
<i>Escherichia coli</i>	DAEC C1845 ATCC 10536
<i>E. coli</i> (EIEC)	CDC EDL-1284
<i>E. coli</i> (EPEC)	CDC O86:H35
<i>E. coli</i> (EHEC)	CDC EDL-933
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	ATCC 9826
<i>Salmonella enteritidis</i> (CT)	ATCC 13076
<i>S. typhimurium</i>	ATCC 6539 ATCC 13311
<i>S. braenderup</i>	ATCC H9812
<i>S. choleraesuis</i>	ATCC6958
<i>Shigella dysenteriae</i> (CT)	ATCC 13313
<i>S. flexneri</i>	ATCC 12022
<i>Yersinia enterocolitica</i> (CT)	ATCC 9610

O método de crescimento bacteriano de acordo com Grove e Randall (1955) com modificações foi realizado com a utilização de três a cinco colônias, bem isoladas do mesmo tipo morfológico. A superfície de cada colônia foi tocada com uma alça de platina e os micro-organismos transferidos para um tubo contendo 4-5 mL do meio de cultura em caldo LB. A cultura em caldo foi incubada à temperatura de 37°C, até alcançar ou exceder a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5. A turbidez da cultura em crescimento foi ajustada de modo a obter uma turbidez óptica comparável à da solução padrão de McFarland 0,5, que corresponde a uma suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL de micro-organismos.

4.4.1 INOCULAÇÃO NAS PLACAS DE TESTE

Em condições ideais, mergulha-se um swab de algodão estéril na suspensão ajustada, até 15 minutos após ajustar a turbidez da suspensão de inóculo. O swab foi girado várias vezes e apertado firmemente contra a parede interna do tubo, acima do nível do líquido, de modo a retirar qualquer excesso de inóculo no swab. Os inóculos foram semeados em placas de Petri de 90 mm de diâmetro preparadas com 10 mL de ágar bacteriológico (camada inferior) e 15 mL Agar Müeler Hinton (camada superior). A superfície da placa seca da camada superior da placa foi inoculada esfregando o swab em toda a superfície estéril do ágar girando a placa aproximadamente 60°, a fim de assegurar a distribuição uniforme do inóculo. A tampa ficou entre aberta de três a cinco minutos, não superior a 15 minutos, de maneira a permitir que qualquer excesso de umidade tenha sido absorvido.

4.4.2 APLICAÇÃO DOS PRODUTOS NATURAIS

Foram perfurados 6 orifícios cilíndricos (5 mm de diâmetro) de forma equidistante no meio de cultura na camada superior das placas de 90 mm correspondentes a 4 extratos vegetais, 1 para o controle positivo (Imipinem) e mais 1 para o controle negativo (DMSO 80%), realizados em duplicata. Os extratos previamente solubilizados em DMSO 80% na concentração de 10 mg/mL foram aplicados 40 µL suficientes para preencher os orifícios nas placas.

4.4.3 LEITURA DAS PLACAS E INTERPRETAÇÃO DOS RESULTADOS

Após 16-24 horas de incubação das placas a 37°C os diâmetros dos halos de inibição total (julgadas a olho nu) foram mensurados em milímetros com auxílio de uma régua. O perfil de sensibilidade da bactéria alvo ao produto testado foi classificado de acordo com a seguinte escala: **resistente:** Ausência de halo de inibição; **pouco sensível:** halos de até 10 mm de diâmetro; **moderadamente sensível:** halos entre 10 e 20 mm; **muito sensível:** halos entre 20 e 30 mm; e **severamente sensível:** halos acima de 30 mm. Os extratos vegetais que apresentaram halos de inibição foram avaliados para determinação da concentração inibitória mínima – CIM.

4.4.4 DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA – CIM

Os extratos vegetais que apresentaram atividade bactericida no antibiograma foram avaliados para determinação da concentração inibitória mínima – CIM de acordo com a CLSI (2012). As cepas que se apresentaram sensíveis foram cultivadas em 3 mL a 5 mL de caldo nutritivo Luria Bertani (LB), selecionando-se para a inoculação de 3 a 5 colônias isoladas com o auxílio de uma alça de platina sendo posteriormente incubados a 37 °C, por 18 a 24 horas. Para o preparo do inóculo bacteriano foi transferido com auxílio de micropipeta uma alíquota de 50 a 100 µL da cultura para um tubo com 3 a 5 mL de meio estéril suficiente para atingir a turvação padrão de 0,5 na escala de McFarland ($1,5 \times 10^8$ UFC/mL).

Nos orifícios da coluna 1 foram acrescidos 60 µL do meio LB sendo nas linhas de A a F 40 µL referentes a 3 extratos e/ou frações em duplicatas e nas linhas G e H 40 µL da droga controle (Imipinem). O conteúdo da coluna 1 foi homogeneizado e uma diluição seriada (1:2) foi realizada até a coluna 10. Em seguida, foram acrescidos 60 µL do meio LB estéril, 20 µL

de resazurina a 0,01 % filtrada como indicador colorimétrico de oxi-redução para caracterização da viabilidade celular e 20 μL de inóculo a 0,5 da escala McFarland. A concentração final avaliada foi de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ a 1,95 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Nas colunas 11 (controle positivo) e 12 (controle negativo) foram acrescentados 60 μL do meio estéril e 20 μL de resazurina 0,01% filtrada, sendo na coluna 11 foi acrescido de 20 μL de inóculo.

Em seguida, a placa foi incubada a 37 °C por 18 a 48 horas, e posteriormente, realizada leitura considerando negativo a conversão do corante azul para rosa (ou incolor) e positivo a permanência da coloração azul. A concentração inibitória mínima CIM foi definida como a menor concentração das amostras capaz de inibir o crescimento de bactérias, como indicado pela coloração da resazurina.

4.5 ESTUDO FITOQUÍMICO BIOGUIADO DE *GUATTERIA CITRIODORA*

4.5.1 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

Cromatografia em Coluna: Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro de altura e diâmetro específicos de acordo com as quantidades de amostras a serem cromatografadas. Como fase estacionária três tipos de suportes cromatográficos foram utilizados com as seguintes especificações: (i) sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) (Merck); (ii) sílica gel 60 com partículas entre 0,063-0,200 mm (70-230 mesh ASTM) (Merck) tratada previamente com solução de bicarbonato de sódio 10 % (NaHCO_3) específico para alcaloides.

Cromatografia em Camada Delgada: As análises em camada delgada foram realizadas em cromatofolhas (Merck), sílica gel 60, com indicador de fluorescência F_{254} , com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura.

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

Reveladores: A revelação das substâncias nos experimentos em CCD foi feita em luz ultravioleta 254 e 366 nm, e os reagentes sulfato cérico/ácido sulfúrico, Dragendorff, ácido sulfúrico/etanol 5% e vanilina sulfúrica.

O reagente **sulfato cérico/ácido sulfúrico** foi preparado com solução a 1 % de sulfato cérico (IV) em ácido sulfúrico a 10 % de acordo com Mattos (1997). Através de borrifação em placa cromatográfica os “spots” das amostras apresentarem colorações características dos seus cromóforos, a frio ou após aquecimento em estufa, por aproximadamente 2 min a 110 °C.

O reagente de **Dragendorff** com modificação de Munier (MUNIER, 1953 *apud* MERK, 1971) foi preparado com a mistura das soluções A (1,7 g de $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$ e 20,0 g de ácido tartárico dissolvidos em 80 mL de água destilada) e B (16,0 g de KI dissolvidos em 40 mL de água destilada) em partes iguais (1:1) que constituem a solução estoque. Para borrifação das placas, 5,0 mL da solução estoque foi adicionado a 10,0 g de ácido tartárico, dissolvido em 50 mL de água destilada. Após borrifação em placa cromatográfica, os “spots” de substâncias alcaloídicas apresentaram coloração laranja.

Solventes: As análises cromatográficas foram realizadas com solventes das marcas Merck, Synth, Vetec e Aldrich P.A.

4.5.2 EQUIPAMENTOS

Polarímetro: O $[\alpha]_D$ foi obtido no polarímetro Jasco P-2000, operando com lâmpada de Na (589 nm) com uma cela de 1 mL (10 cm).

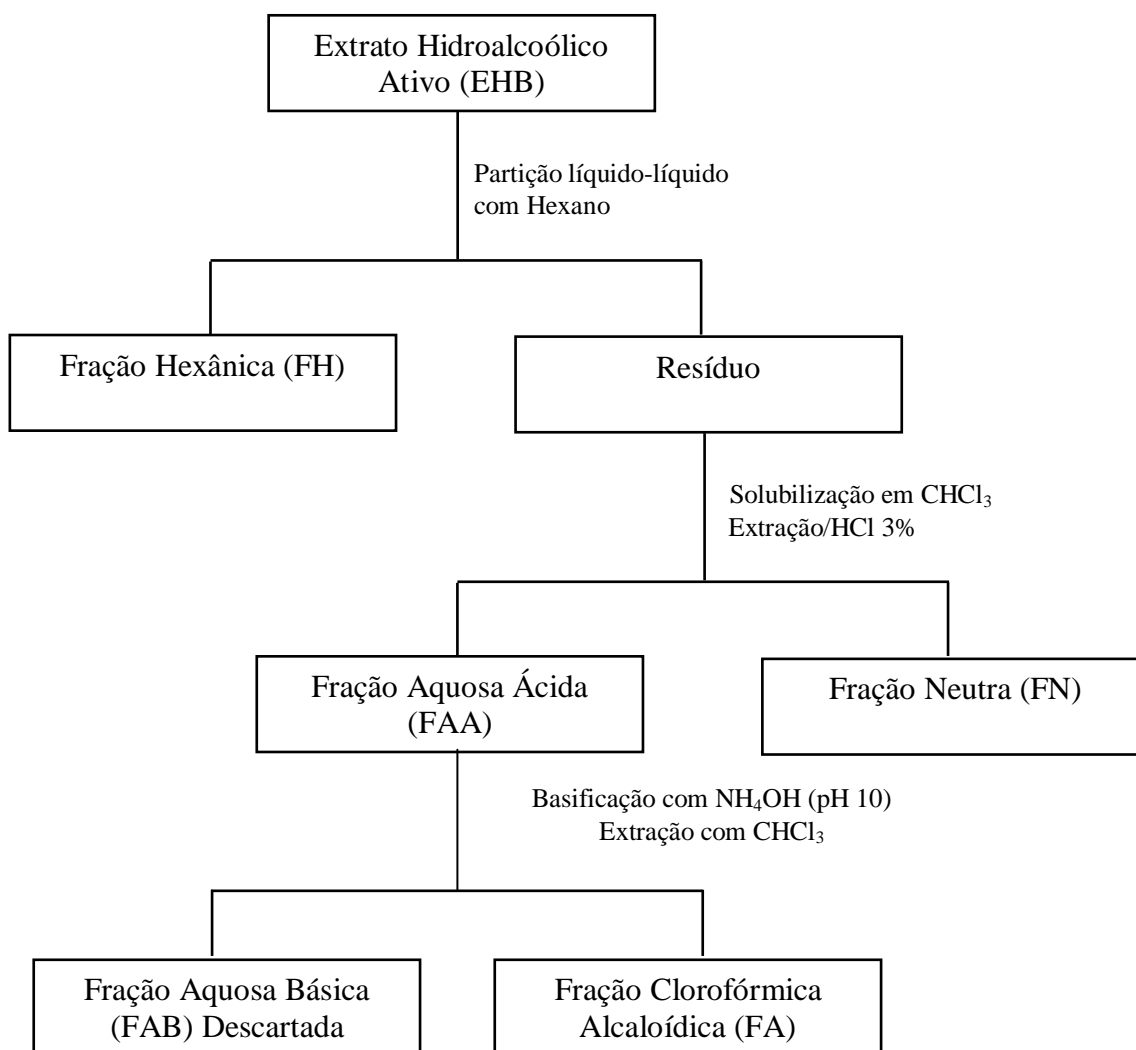
Ressonância Magnética Nuclear 1D e 2D: Os espectros foram registrados em aparelhos Bruker Avance 600, operando a 9,4 Tesla (T), a 600 MHz. As amostras foram solubilizadas em metanol deuterado (CD_3OD) utilizando o tetrametilsilano (TMS) como padrão de referência interna. Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) foram registradas em Hertz (Hz). Ambos os equipamento de RMN e polarímetro, os experimentos obtidos foram realizados pelo mestrando Kahlil Schwanka Salomé sob responsabilidade do prof Dr Anderson Barison do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná UFPR.

Espectro de Massas – ESI-IT-MS: Os espectros de massas foram adquiridos usando um espectrômetro *iontrap* LCQ FleetTM (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de eletrospray, operando no modo positivo. As soluções estoque foram diluídas a 5 ppm em metanol grau HPLC e aplicadas diretamente na fonte de *ESI* por meio de uma seringa infusora, **com um loop de 5 μL** e um sistema de bombeamento em fluxo de 25 $\mu\text{L}/\text{min}$. Os experimentos foram realizados em colaboração com o doutorando Felipe Moura na Central Analítica do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas UFAM.

4.5.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS E FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DE *GUATTERIA CITRIODORA*

O material vegetal seco (600,0 g de folhas e adicionalmente os galhos finos) pulverizado foi submetido à maceração em etanol e água, em 1500 mL na proporção de 8:2. Após a quarta extração, a solução obtida foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida e a temperatura de 45 °C de acordo com o Esquema 1 (Pag. 35).

Os extratos hidroalcoólicos brutos resultantes das folhas (EHB – 92,80 g) e galhos finos (EHBG – 70,63 g) foram submetidos, separadamente, à partição líquido-líquido com hexano obtendo-se as frações codificadas como FHF (4,73 g) e FHG (2,50 g), respectivamente. Os correspondentes resíduos hidroalcoólicos, foram solubilizados em CHCl_3 , tratados com HCl a 3%, e extraídos com CHCl_3 . Foram obtidas frações orgânicas neutras FNF (14,56 g) e FNG (14,2 g) e frações aquosas ácidas (FAAF e FAAG). FAAF e FAAG foram alcalinizadas com NH_4OH até pH 10 e extraídas com clorofórmio, fornecendo, respectivamente, as frações aquosas básicas que foram descartadas e as fração alcaloídicas FAF (1 g) e FAG (1,48 g) (Esquema 2) (Tabela 6).



Esquema 2: Fluxograma de extração das bases presentes no extrato etanólico 80%.

Tabela 6: Rendimento dos extratos e suas frações de *Guatteria citriodora*.

Espécie	Rendimento em g (%)			
		Folhas (600g)		Galhos Finos (600g)
Extrato Hidroalcoólico Bruto	EHBF	92,80 (15,4)	EHBG	70,63 (11,8)
Fração Hexânica	FHF	4,73 (5,1)	FHG	2,50 (3,54)
Fração Neutra	FNF	14,56 (15,7)	FNG	14,2 (20,2)
Fração Alcaloídica	FAF	1,48 (1,6)	FAG	1,01 (1,4)

Após completa secagem e cálculos de rendimentos, pequenas quantidades (aproximadamente 60 mg) dos extratos hidroalcoólicos de *Guatteria citriodora* e suas frações hexânicas, neutras e alcaloídicas das folhas e galhos finos bem como os óleos essenciais das folhas foram submetidos a ensaios de atividade antiplasmódica e antibacteriana. O estudo fitoquímico concentrou-se nos extratos e frações bioativos mais promissores em atividade antiplasmódica.

O óleo essencial foi extraído de 70 g das folhas secas por hidrodestilação por arraste a vapor em um sistema de Clevenger modificado durante a realização do mestrado de Rabelo (2008). Foi utilizada a proporção de 1:10 de material botânico para água destilada, durante 3,5h, posteriormente os óleos foram secos, por meio de percolação em sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), e armazenados em frasco de vidro âmbar sob refrigeração, para conservar e evitar perdas dos constituintes voláteis.

4.5.4 ESTUDO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DAS FOLHAS - FAF

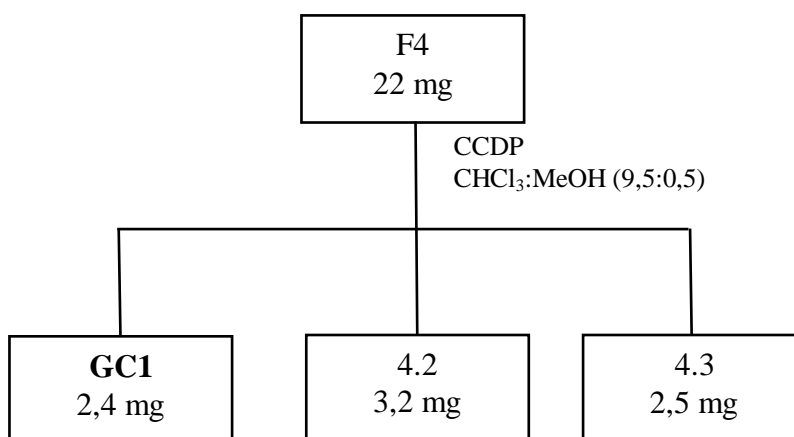
A fração alcaloídica FAF (1,0g) foi inicialmente submetida ao fracionamento através de uma coluna (altura x diâmetro = 19,0 x 2,0 cm) de sílica gel (0,063 – 0,200 mm, 5,6g) previamente tratada com bicarbonato de sódio NaHCO_3 10% eluída $\text{HEX}:\text{CHCl}_3$ na proporção isocrática 1:1 obtendo 21 frações de 30 mL cada, as quais foram analisadas por CCD e reunidas de acordo com seu respectivos R_{fs} (Tabela 7).

Tabela 7: Relação frações/compostos isolados e seus respectivos rendimentos das folhas.

Frações (F)	Massa (mg)	Composto Isolado (GC)	Quantidade (mg)
1-3	12,5		
4	22,0	GC1	2,4
5-8	74,6	GC2	3,6
9	26,0		
10	44,6		
10-12	90,7		
13	69,0	GC3	4,1
		GC4	6,3
14	82,0		
15-18	144,1		
19	27,1		
20	64,3		
21	98,6		

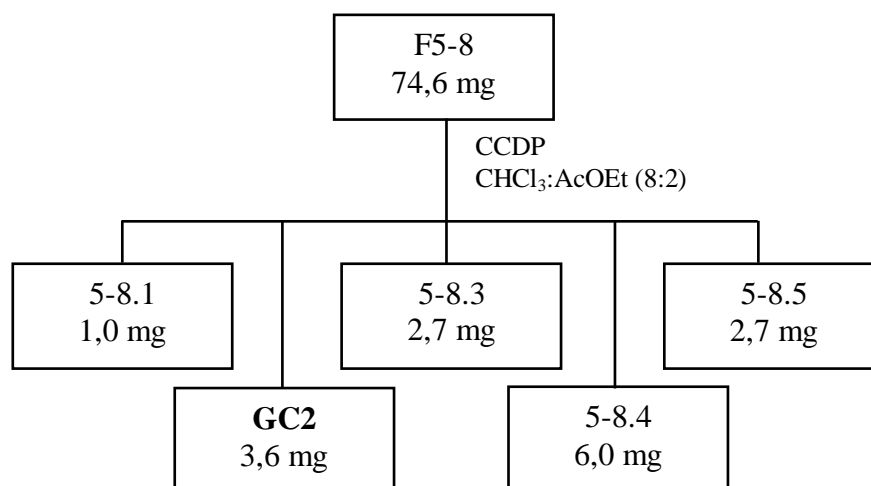
4.5.4.1 ANÁLISE DA F4

O Esquema 3 apresenta o fracionamento da F4 (22 mg) por cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) utilizando eluente $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9,5:0,5), fornecendo 3 frações dos quais resultou no isolamento do composto codificado em GC1 (2,4 mg).

**Esquema 3:** Isolamento do GC1.

4.5.4.2 ANÁLISE DA F5-8

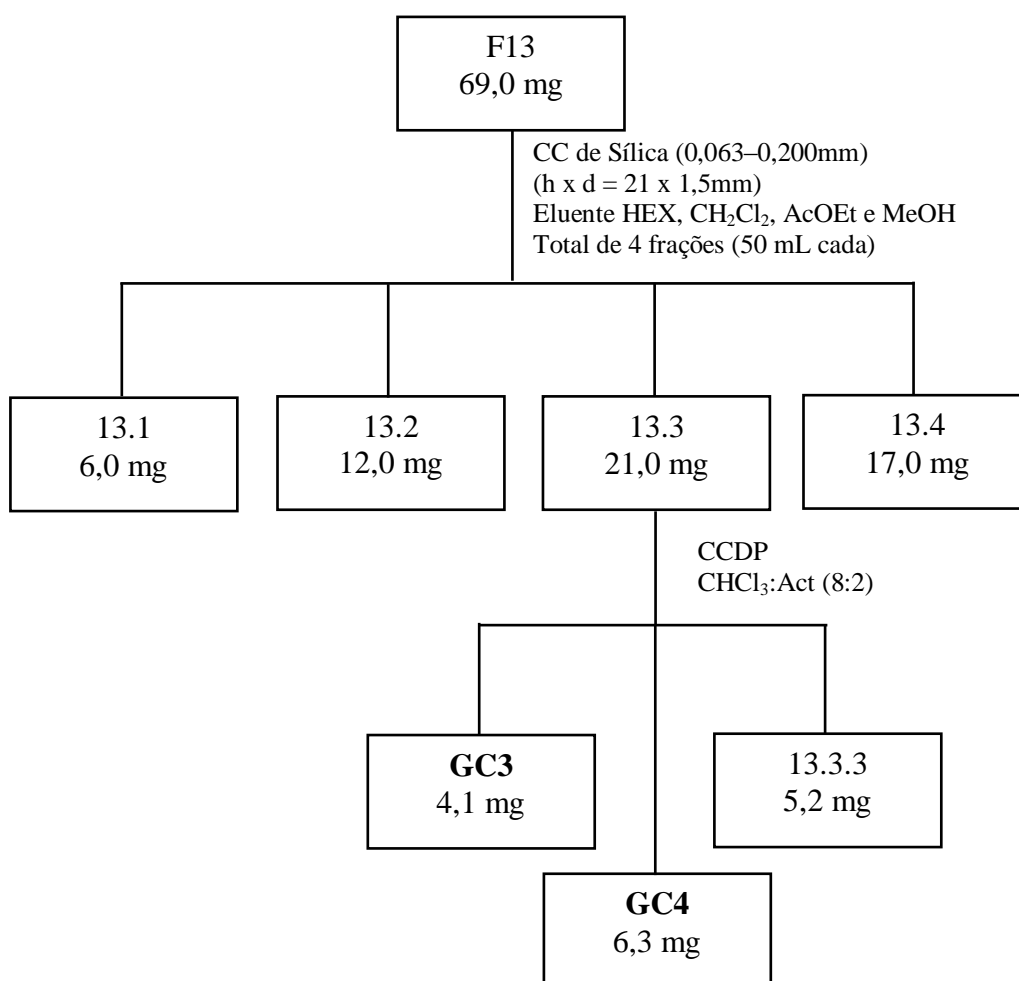
A F5-8 (74,6 mg) foi submetida a CCDP utilizando eluentes $\text{CHCl}_3:\text{AcOEt}$ (8:2) fornecendo 5 frações, dos quais resultou no isolamento do composto codificado em GC2 (3,6 mg) (Esquema 4).



Esquema 4: Isolamento do GC2.

4.5.4.3 ANÁLISE DA F13

A F13 (69 mg) fracionada em coluna cromatográfica de sílica 70-230 Mesh, utilizando como fase móvel solventes de polaridade crescente Hex-DCM-AcOEt-MeOH, forneceu a partir da fração AcOEt, cromatografada em CCDP utilizando $\text{CHCl}_3:\text{Act}$ (8:2), os sólidos codificados em **GC3** (4,1 g) e **GC4** (6,3 mg) (Esquema 5).



Esquema 5: Isolamento do GC3 e GC4.

4.5.5 ESTUDO DA FRAÇÃO ALCALOÍDICA DOS GALHOS FINOS - FAG

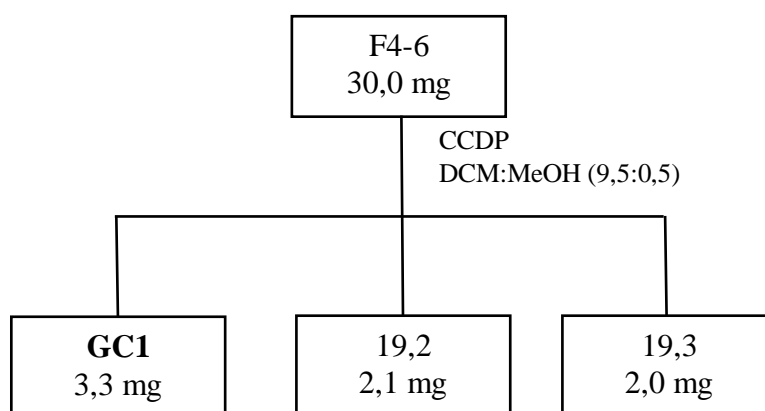
A fração alcaloídica FAG (950 mg) foi cromatografada como descrito para FAF, utilizando uma coluna (altura x diâmetro = 18,0 x 1,5 cm) de sílica gel (0,063 – 0,200 mm, 4,3g) previamente tratada com bicarbonato de sódio NaHCO₃ 10% e eluída com CH₂Cl₂:AcOEt (2:7) obtendo 20 frações de 30 mL cada, agrupadas segundo semelhança em análise por CCD (Tabela 8).

Tabela 8: Relação frações/compostos isolados e seus respectivos rendimentos dos galhos.

Frações (F)	Massa (mg)	Composto Isolado (GC)	Quantidade (mg)
1-3	15,5		
4-6	30,0	GC1	3,3
7	4,1		
8	10,0	GC5	1,2
9	16,0	GC2	2,4
10-12	170,0	GC6	4,6
13	39,0		
14-16	125,0	GC7	1,9
17	24,1		
18	87,1		
19	114,3		
20	117,6		

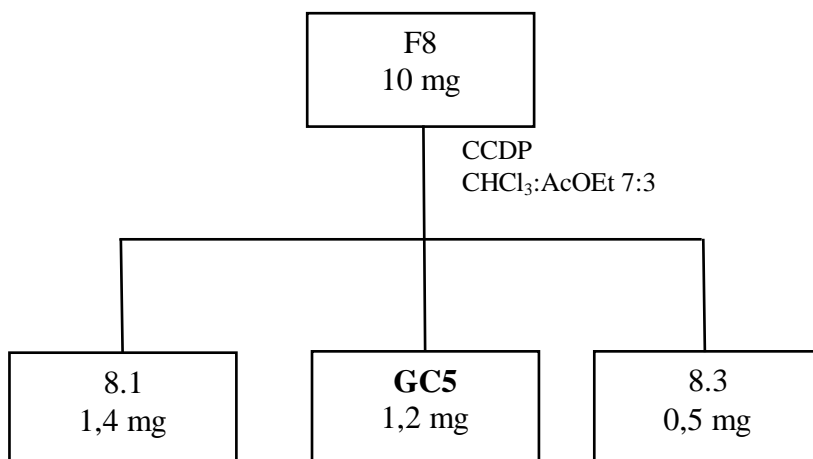
4.5.5.1 ANÁLISE DA F4-6

A F4-6 (30,0 mg) foi submetida a Cromatografia de Camada Delgada Preparativa (CCDP) utilizando DCM:MeOH (9,5:0,5) fornecendo 3 frações dos quais resultou no isolamento do GC1 (3,3 mg) também isolado nas folhas de *G. citriodora*, confirmado em Espectrometria de Massas e CCD por apresentar o mesmo R_f (Esquema 6).

**Esquema 6:** Isolamento do GC1.

4.5.5.2 ANÁLISE DA F8

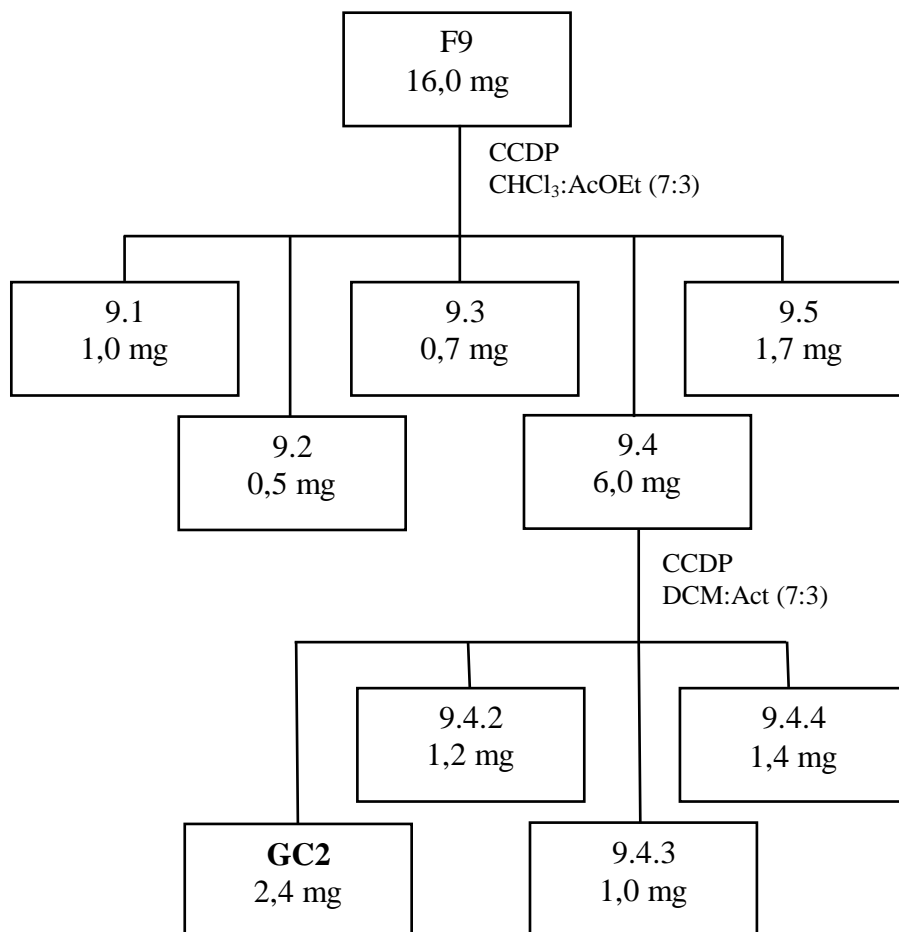
A F8 (10 mg) foi submetida a CCDP utilizando CHCl_3 :AcOEt (7:3) fornecendo 3 frações dos quais resultou no isolamento do composto codificado GC5 (1,2 mg) (Esquema 7).



Esquema 7: Isolamento do GC5.

4.5.5.3 ANÁLISE DA F9

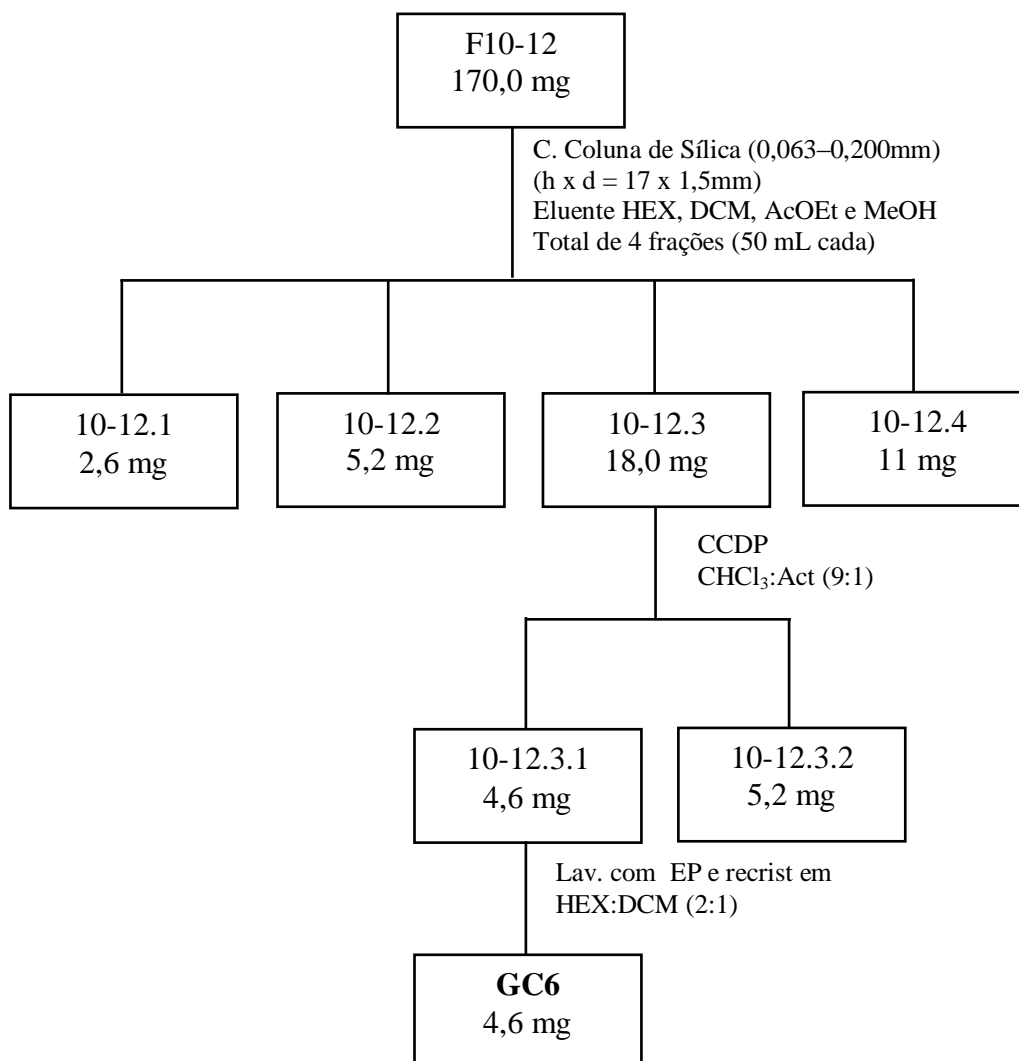
O fracionamento da F9 (16 mg) através de duas sucessivas CCDP utilizando eluentes CHCl_3 :AcOEt (7:3) e DCM:Act (7:3) resultou no isolamento do composto GC2 (2,4 mg), já isolado das folhas de *G. citriodora*, confirmado em Espectrometria de Massas e CCD por apresentar o mesmo R_f (Esquema 8).



Esquema 8: Isolamento do GC2.

4.5.5.4 ANÁLISE DA F10-12

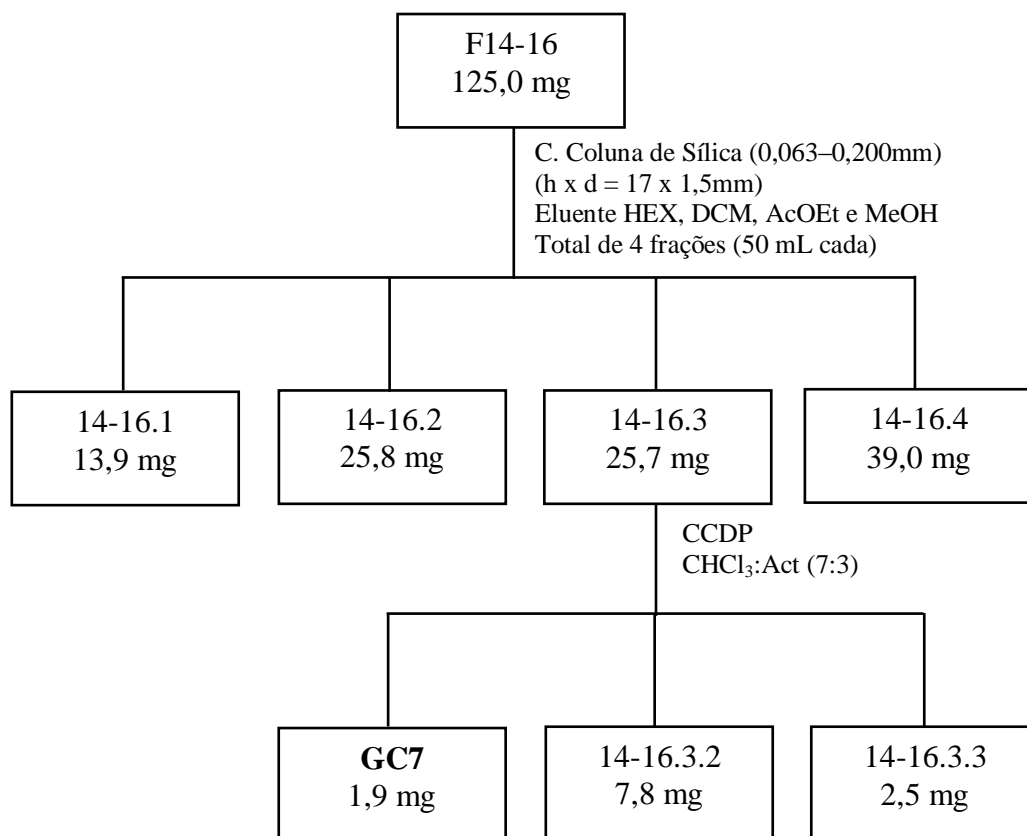
No Esquema 9 é apresentado o fracionamento da F10-12 (170,0 mg), a partir de coluna cromatográfica de sílica 70-230 Mesh, eluída sucessivamente com Hex-DCM-AcOEt-MeOH, que por sua vez a fração AcOEt foi cromatografada em CCDP utilizando CHCl_3 :Act (9:1), fornecendo 2 frações dos quais resultou no isolamento do composto codificado em GC6 (4,6 mg).



Esquema 9: Isolamento do GC6.

4.5.5.5 ANÁLISE DA F14-16

No Esquema 10 é apresentado o fracionamento da F14-16 (125,0 mg), a partir de coluna cromatográfica de sílica 70-230 Mesh, eluída sucessivamente com Hex–DCM–AcOEt–MeOH, que por sua vez a fração AcOEt foi cromatografada em CCDP utilizando CHCl_3 :Act (7:3), fornecendo 3 frações dos quais resultou no isolamento do composto codificado em GC7 (1,9 mg).



Esquema 10: Isolamento do GC7.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ESTUDO FITOQUÍMICO DE *GUATTERIA CITRIODORA*

5.1.1 PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS ALCALOIDES POR ESI-MS

As frações alcaloídicas dos extratos hidroalcoólicos das folhas (FAF) e galhos finos (FAG) de *Guatteria citriodora* foram avaliadas quanto ao seu perfil cromatográfico obtido por espectrometria de massas equipado com uma fonte de *eletrospray* ESI-IT-MS operando no modo positivo.

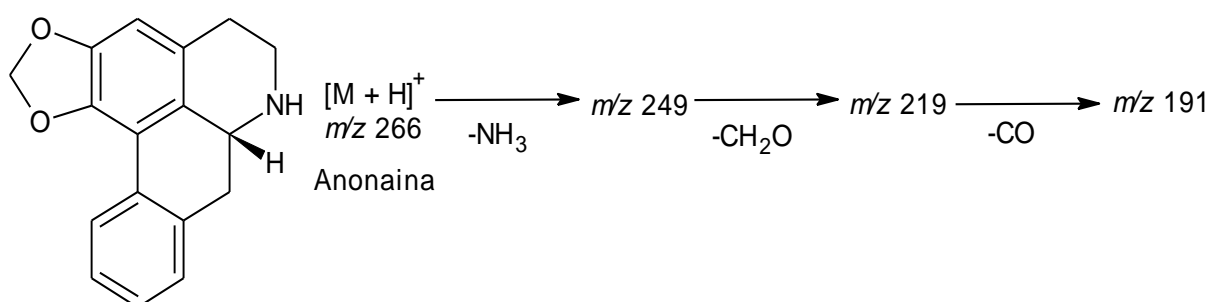
O espectro de massa da FAG foi obtido em *full-scan* apresentando os íons precursores das moléculas protonadas $[M+H]^+$ (Espectro 1 – ANEXO I). No espectro de íons totais foram verificados diversos íons de m/z par, sugerindo a existência de alcaloides tipo aporfínicos, comuns na família. Os íons mais intensos foram observados em m/z 266, 276 e 292 e a análise de fragmentação (MS^4) destes íons, juntamente com a comparação com dados da literatura sugerem a presença dos alcaloides anonaina, liriodenina e lisicamina, respectivamente.

A perda inicial do grupo amina e as sucessivas perdas dos grupos substituintes, CH_2O e CO , observadas através da fragmentação até MS^4 (Tabela 9), são compatíveis com a presença do alcaloide aporfínico anonaina (Esquema 11), também encontrado nas folhas. A perda inicial do fragmento de massa $[M + H - 17]^+$ ou $[M + H - 31]^+$ é fundamental para identificar se ao nitrogênio do grupo amina está ligado um hidrogênio $[M + H - NH_3]^+$ ou uma metila $[M + H - CH_3NH_2]^+$, respectivamente (SILVA, 2012).

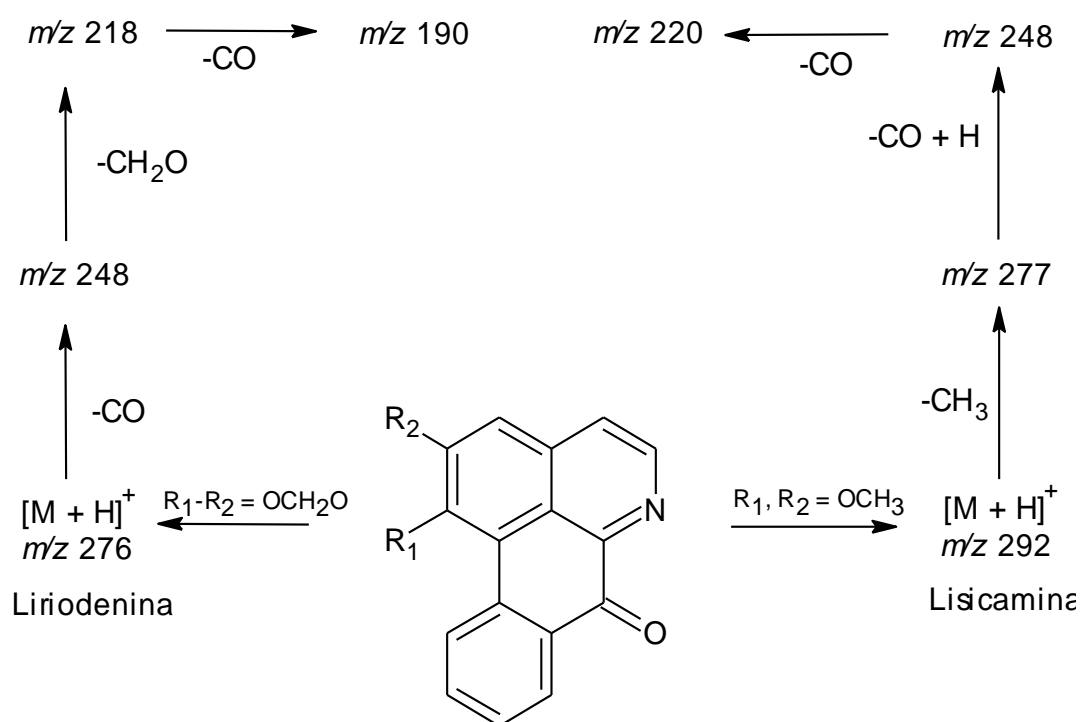
O espectro de massas da FAG indica íon molecular em m/z 292 ($[M+H]^+$). Na análise da fragmentação observou-se a perda inicial do grupo metila e perdas dos grupos $-CO + H$ da metoxila e $-CO$ da carbonila. Estas perdas observadas até MS^4 (Tabela 9) e em comparação

com dados da literatura (NASCIMENTO, 2008), permitem sugerir como o possível alcaloide oxoaporfínico lisicamina de massa nominal 292 (Esquema 12). Por sua vez, o íon em m/z 276 ($[M+H]^+$) foi identificado como alcaloide oxoaporfínico liriodenina em análise do respectivo espectro de MS^4 (Tabela 9), com por uma perda inicial de 28Da $[M + H - CO]^+$ referente a carbonila na posição 7 do anel C, seguida de perda de 30Da $[M + H - CH_2O]^+$ e 28 Da $[M + H - CO]^+$ do grupo metilenodioxi (Esquema 12).

Estudos preliminares sobre a fragmentação destes alcaloides revelaram perdas iniciais, que foram associadas à presença de substituintes metoxila e metilenodioxi nas moléculas. Segundo Fabre (2000) as perdas dos fragmentos dependem do substituinte do composto, em grupos metilenodioxi são observadas perdas padrões de CH_2O (-30) e CO (-28), e grupos metoxila são detectadas perdas padrões de CH_3 (-15) e/ou CH_3O (-31). Estas perdas iniciais 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 (SILVA, 2012).



Esquema 11: Proposta de fragmentação para Anonaina.



Esquema 12: Proposta de fragmentação da Liriodenina e Lisicamina.

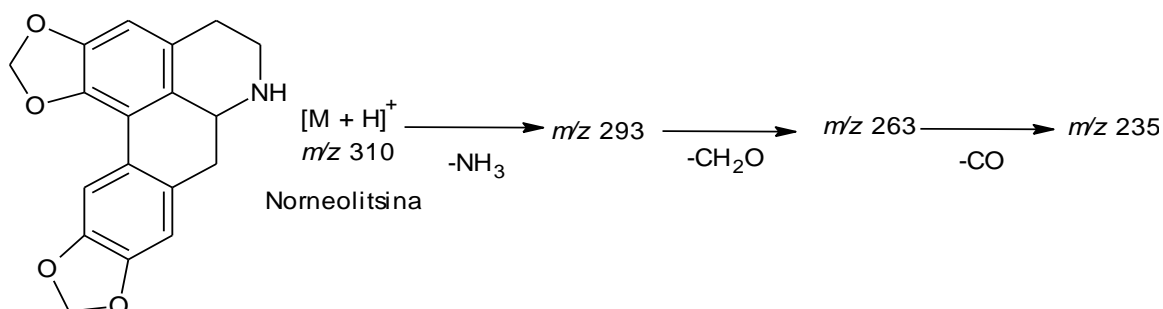
Tabela 9: Perfil de fragmentação dos alcaloides de FAG.

Composto	R_1	R_2	R_3	R_4	MS	MS ²	MS ³	MS ⁴
Anonaina	O-CH ₂ -O		H	H	266	249	219	191
Lisicamina	OCH ₃	OCH ₃	H	H	292	277	248	220
Liriodenina	O-CH ₂ -O		H	H	276	248	218	190

O espectro de massa da FAF foi obtido em *full-scan* apresentando os íons precursores das moléculas protonadas $[M+H]^+$. No espectro de íons totais foram verificados diversos íons de m/z par, sugerindo a existência de alcaloides tipo aporfínicos. Os íons mais intensos foram observados em m/z 276, 292 e 310 e a análise do padrão de fragmentação destes íons, juntamente com a comparação com dados da literatura sugerem a presença dos alcaloides liriodenina, lisicamina e norneolitsina, respectivamente (Espectro 2 – ANEXO I).

Na análise de fragmentação dos íons molecular protonados m/z 292 e 276 da FAF, observou-se as mesmas perdas até MS^4 como na amostra FAG, dos quais são coerentes com os alcaloides oxoaporfínicos lisicamina e liriodenina, respectivamente (Espectro 2 – ANEXO I).

O padrão de fragmentação do íon em m/z 310 ($[M+H]^+$) é coerente com uma estrutura aporfínica evidenciada pela perda do grupo $[M + H - NH_3]^+$ (17Da) e $[M + H - CH_2O]^+$ (30Da) e $[M + H - CO]^+$ (28 Da) referente aos dois grupos metilenodioxi ligados ao sistema aromático. Com base nas fragmentações chave observadas e com o auxílio de um artigo de revisão desta classe de alcaloides (STÉVIGNY et al., 2004), chegou-se ao alcaloide norneolitsina (Esquema 13) como sendo o possível alcaloide de massa nominal 309 .



Esquema 13: Proposta de fragmentação para Norneolitsina.

5.1.2 ALCALOIDEOS ISOLADOS DE *GUATTERIA CITRIODORA*

O estudo fitoquímico das frações alcaloídicas das folhas e galhos finos de *Guatteria citriodora* resultou no isolamento de sete alcaloides. Os compostos isolados foram identificados por técnicas de elucidação estrutural tais como RMN 1H , HSQC, HMBC e EM, bem como a comparação dos dados com os descritos na literatura.

No presente trabalho foi possível o isolamento de duas subclasses, os aporfinoídeos e os protoberberinos (Figura 7). Os aporfinoídeos de acordo com PELLETIER (1987) podem ser subdivididos em sete subclasses: proaporfínicos, aporfínicos, oxoaporfínicos, oxoaporfínicos no anel B, aporfinoídeos diméricos, fenantrenos e aporfinoídeos degradados. Foram isolados alcaloides aporfínicos e os oxoaporfínicos. Os aporfínicos por sua vez também podem ser subdivididos em quatro subgrupos, aporfínicos *sensu stricto*, desidroaporfínicos, 7,7-dimetilaporfínicos ou 7-hidroxi-7-metilaporfínicos, e 7-oxigenadoaporfínicos ou 4,7-dioxigenado aporfínicos. Dentre estes foi possível o isolamento do aporfínico *sensu stricto* 7,7-dimetilaporfínicos e 7-hidroxi-7-metilaporfínicos (Figura 8)

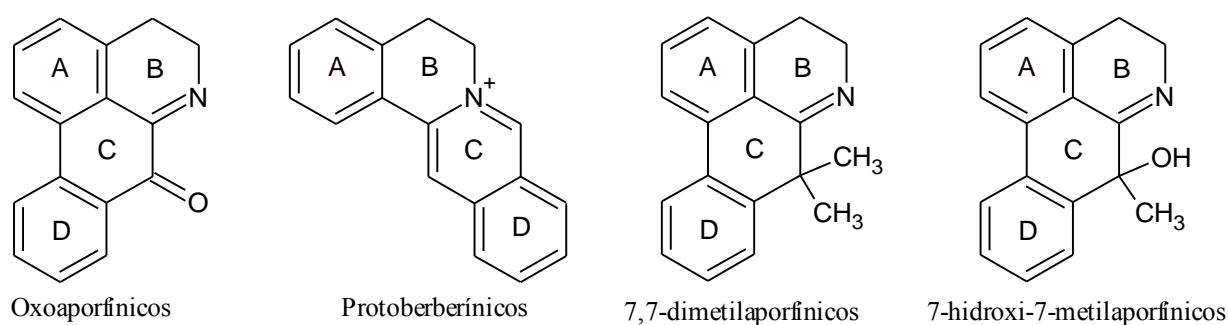


Figura 7: Esqueletos básicos dos alcaloides isolados de *G. citriodora*.

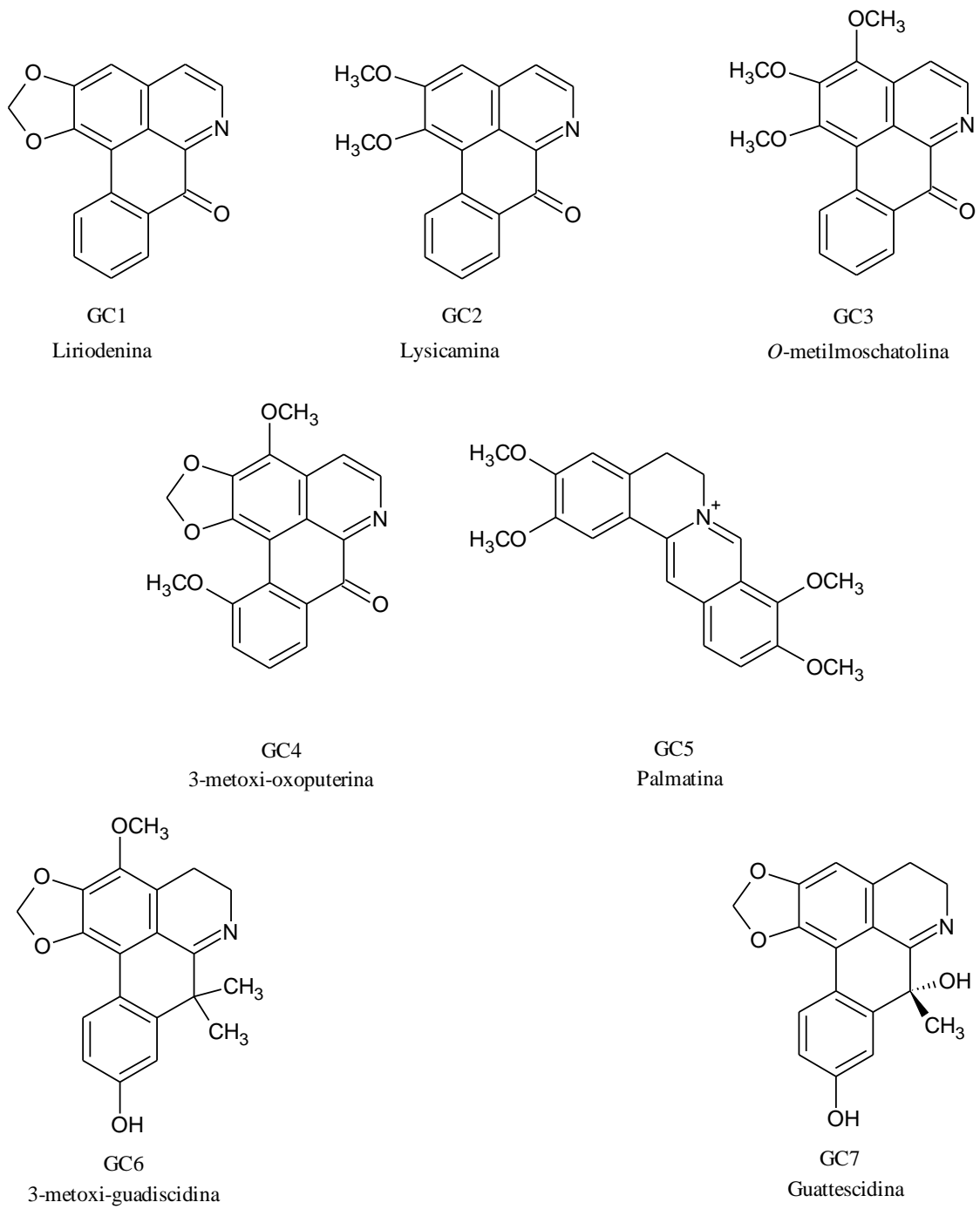
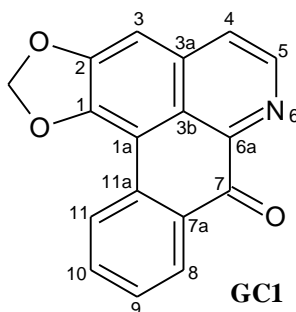


Figura 8: Alcaloides isolados das folhas e galhos de *G. citriodora*.

5.1.3 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALOIDES OXOAPORFÍNICOS



O espectro de massa do composto **GC1** sugere a existência de alcaloide por apresentar um íon molecular protonado em m/z 276 ($[M+H]^+$) (Espectro 3 – ANEXO I), compatível com a fórmula molecular $C_{17}H_9NO_3$, confirmada pela análise do espectro de RMN de 1H e HSQC.

O espectro de RMN 1H a 600 MHz em CD_3OD (Espectro 4 – ANEXO I) evidenciou a presença de oito sinais entre δ 8,78 a 6,49 correspondentes a sete hidrogênios aromáticos. O grupo metilenodioxí (OCH_2O), localizado no anel A em C-1 e C-2, foi reconhecido através do sinal em δ 6,49 (s, 2H) correlacionado ao sinal do carbono em δ 103,9, através do mapa de contorno HSQC (Espectro 5 – ANEXO I). Foi observada a presença do sinal simpleto em δ 7,44 atribuído a H-3, correlacionado no HSQC com o carbono em δ 102,9, e atribuído ao C-3, do anel A. Foram observados sinais em δ 8,04 (d, 1H) e 8,75 (d, 1H), com constantes de acoplamento (J) iguais a 5,2 Hz, características de hidrogênios do núcleo isoquinolínico em H-4 e H-5, respectivamente, confirmados pelo mapa de contorno HSQC em δ 124,9 (C-4) e δ 143,6 (C-5).

O registro de sinais referentes a quatro hidrogênios aromáticos em δ 8,48 (dd, $J = 7,8$ e 1,5 Hz, 1H), δ 7,64 (ddd, $J = 7,8$; 7,4 e 1,1 Hz, 1H), δ 7,88 (ddd, $J = 8,3$; 7,4 e 1,5 Hz, 1H) e δ 8,78 (dd, $J = 8,3$; 1,1 Hz, 1H) correlacionados aos carbonos em δ 127,8, δ 128,2, δ 133,9 e δ

127,4 no mapa de contorno HSQC, atribuídos respectivamente H-8/C-8, H-9/C-9, H-10/C-10 e H-11/C-11 configuram o anel D do núcleo oxoaporfínico

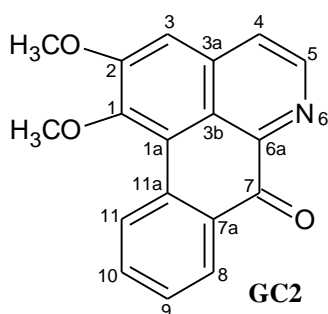
Estes dados aliados à comparação com os registros na literatura levaram a identificação do composto **GC1** como o alcaloide oxoaporfínico conhecido como *liriodenina*, encontrado com frequência em espécies do gênero *Guatteria* (ZHANG et al., 2002; COSTA et al., 2010; ORTIZ, 2007). Na Tabela 10 são apresentados os valores de RMN ^1H , HSQC de **GC1**.

Tabela 10: Dados de RMN ^1H e HSQC em CD_3OD do **GC1**.

Posição	^{13}C (δ) ^{a,c}	^{13}C (δ) ^b	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^b
1		147,9		
1a		130,2		
2		151,7		
3	102,9	103,2 d	7,44 (1H, s)	7,16 (1H, s)
3a		135,7		
3b		123,2		
4	124,9	124,2 d	8,04 (1H, d, 5,2)	7,75 (1H, d, 5,2)
5	143,6	144,8 d	8,75 (1H, d, 5,2)	8,87 (1H, d, 5,2)
6a		145,2		
7		182,3		
7a		131,2		
8	127,8	128,8 d	8,48 (1H, dd, 7,8 e 1,5)	8,57 (1H, ddd, 7,9, 1,4 e 0,5)
9	128,2	128,5 d	7,64 (1H, ddd, 7,8, 7,4 e 1,1)	7,56 (1H, ddd, 7,9, 7,4 e 1,0)
10	133,9	133,9 d	7,88 (1H, ddd, 8,3, 7,4 e 1,5)	7,73 (1H, ddd, 8,1, 7,4 e 1,4)
11	127,4	127,3 d	8,78 (1H, dd, 8,3 e 1,1)	8,61 (1H, ddd, 8,1, 1,0 e 0,5)
11a		132,8		
1-2	103,9	102,4 t	6,49 (2H, s)	6,37 (2H, s)

(OCH_2O)

^aExperimento realizado a 600 MHz para ^1H em CD_3OD , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Dados da literatura de acordo com ORTIZ 2007 (400MHz, CDCl_3). ^c Sinais determinados pelo espectro de HSQC. (δ) Deslocamento químico em ppm.



O espectro de massa do composto **GC2** sugere a existência de alcaloide por apresentar um íon molecular protonado em m/z 292 ($[M+H]^+$) (Espectro 6 – ANEXO I) compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{13}NO_3$, confirmada pela análise do espectro de RMN de 1H e HSQC. Na análise de sua fragmentação observou-se a perda inicial do grupo uma metila $[M + H - CH_3]^+$ e perda incomum de 29 muito característico de oxoaporfínicos, provavelmente do grupo $CO + H$ (Espectro 7 e 8 – ANEXO I).

O espectro de RMN 1H a 600 MHz em CD_3OD (Espectro 9 – ANEXO I) difere da **GC1** pela ausência do sinal de metilenodioxí e presença dos sinais simpletos em δ 4,07 (3H) e δ 4,14 (3H), típicos de grupos metoxílicos, correlacionados aos sinais de carbono em δ 59,28 (H-1/C-1) e δ 55,18 (H-2/C-2) pelo mapa de contorno HSQC (Espectro 10 – ANEXO I). Foram observados dubletos nos sinais em δ 8,02 (H-4) e δ 8,74 (H-5), com constantes de acoplamento (J) iguais a 5,3 Hz com integração para um hidrogênio, acoplados no HSQC aos sinais em δ 124,70 e δ 143,40 que foram atribuídos aos carbonos do núcleo isoquinolínico C-4 e C-5.

Observou-se ainda sinais referentes a quatro hidrogênios aromáticos em δ 9,21 (dd, $J = 8,4$, e 1,1 Hz, 1H), δ 7,83 (dd, $J = 8,4$, 7,1 e 1,3 Hz, 1H), δ 7,61 (ddd, $J = 8,1$, 7,1 e 1,1 Hz, 1H) e δ 8,45 (dd, $J = 8,1$ e 1,3 Hz, 1H), atribuídos a H-11, H-10, H-9 e H-8, respectivamente do anel D não substituído, e δ 7,56 (1H, s) típico de H-3 do anel A do sistema oxoaporfínico. Do mesmo modo, considerando as correlações dos carbonos, pelo mapa de contorno HSQC,

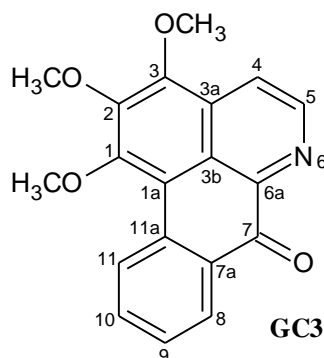
com os respectivos hidrogênios os sinais em δ 106,97 (H3/C3), δ 127,80 (H-8/C-8), δ 128,19 (H-9/C-9), δ 134,49 (H-10/C-10) e δ 128,22 (H-11/C-11).

Estes dados e a comparação com os registros na literatura permitiram identificar o composto **GC2** como o alcaloide oxoaporfínico *lisicamina*, já isolado de outras espécies do gênero *Guatteria* (COSTA et al., 2009b; SAEZ et al., 1997) (Tabela 11).

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H e HSQC do **GC2**.

Posição	$^{13}\text{C}(\delta)^{a,c}$	$^{13}\text{C}(\delta)^b$	$^1\text{H}(\delta)$ (mult., <i>J</i> em Hz) ^a	$^1\text{H}(\delta)$ (mult., <i>J</i> em Hz) ^b
3	106,97	106,48 d	7,56 (1H, s)	7,23 (1H, s)
4	124,70	123,62 d	8,02 (1H, d, 5,3)	7,81 (1H, d, 5,2)
5	143,40	145,01 d	8,74 (1H, d, 5,3)	8,91 (1H, d, 5,2)
8	127,80	128,91 d	8,45 (1H, dd, 8,1 e 1,3)	8,58 (1H, ddd, 7,9, 1,6 e 0,5)
9	128,19	128,82 d	7,61 (1H, ddd, 8,1, 7,1 e 1,1)	7,58 (1H, ddd, 7,9, 7,2 e 1,1)
10	134,49	134,35 d	7,83 (1H, ddd, 8,4, 7,1 e 1,3)	7,77 (1H, ddd, 8,4, 7,2 e 1,6)
11	128,22	128,46 d	9,21 (1H, dd, 8,4 e 1,1)	9,18 (1H, ddd, 8,4, 1,1 e 0,5)
1-OCH ₃	59,28	60,67 q	4,07 (3H, s)	4,02 (3H, s)
2-OCH ₃	55,18	56,23 q	4,14 (3H, s)	4,10 (3H, s)

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno. ^b Dados da literatura de acordo com COSTA (2009b) (400MHz, CDCl₃). ^c Sinais determinados pelo espectro de HSQC. (δ) Deslocamento químico em ppm.



A análise do espectro de RMN de ^1H a 600 MHz em CD₃OD (Espectro 11 – ANEXO I) do composto **GC3** apresentou similaridades quando comparado com os espectros de ^1H do composto **GC2**, diferenciado pela ausência do sinal δ 7,56 (1H, s) atribuído a H-3/C-3 e pela presença de um sinal do grupo metoxílico em δ 4,23 (3H, s), que foi posicionado em C-3.

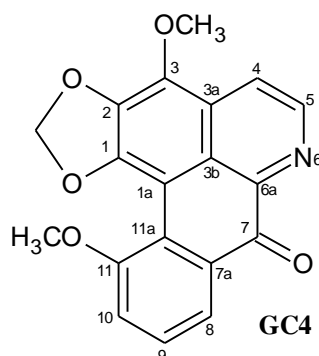
O espectro de RMN ^1H também evidenciou a presença de sinais em δ 8,38 (d, 1H, $J = 4,5$ Hz) e δ 8,87 (d, 1H, $J = 4,4$ Hz), características de hidrogênios do núcleo isoquinolínico em H-4 e H-5, respectivamente. O registro de sinais referentes a quatro hidrogênios aromáticos em δ 8,48 (1H, dd, 7,9 e 1,4), δ 7,59 (1H, ddd, 7,9, 7,2 e 1,1), δ 7,84 (1H, ddd, 8,5, 7,2 e 1,5) e δ 9,20 (1H, d, 8,5), foram atribuídos a H-8, H-9, H-10 e H-11, respectivamente, típicos dos hidrogênios aromáticos do anel D não substituído.

Na Tabela 12 são apresentados os valores de RMN ^1H e pela comparação com os registros na literatura identificou o composto **GC3** como o alcaloide oxoaporfínico conhecido como *O-metilmoschatolina* de fórmula molecular $\text{C}_{19}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ (321), já isolado de outras espécies da família Annonaceae (TORRES et al., 2007).

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H do **GC3**.

Posição	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^b
4	8,38 (1H, d, 4,5)	8,13 (1H, d, 5,5)
5	8,87 (1H, d, 4,4)	8,88 (1H, d, 5,5)
8	8,48 (1H, dd, 7,9 e 1,4)	8,48 (1H, dd, 7,8 e 1,4)
9	7,59 (1H, ddd, 7,9, 7,2 e 1,1)	7,69 (1H, ddd, 7,8, 7,1 e 1,0)
10	7,84 (1H, ddd, 8,5, 7,2 e 1,5)	7,76 (1H, ddd, 7,8, 7,1 e 1,4)
11	9,20 (1H, d, 8,5)	9,11 (1H, d, 8,3)
1-OCH ₃	4,126 (3H, s)	4,08 (3H, s)
2-OCH ₃	4,127 (3H, s)	4,10 (3H, s)
3-OCH ₃	4,23 (3H, s)	4,18 (3H, s)

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H em CD_3OD , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Dados da literatura de acordo com TORRES et al., (2007) (400MHz, CDCl_3). (δ) Deslocamento químico em ppm.



Os espectros de RMN ^1H a 600 MHz (Espectro 12 – ANEXO I) e HSQC (Espectro 13 – ANEXO I) em CD_3OD do composto **GC4** apresentaram similaridades a **GC1**. O grupo metilenodioxi foi reconhecido através do sinal em δ 6,31 (s, 2H) correlacionado ao sinal do carbono em δ 103,82. Foi observada ausência do sinal em δ 7,44/H-3 da **GC1**, e a presença de um simpleto em δ 4,29 (3H), atribuído a um grupo metoxílico, correlacionado pelo mapa de contorno HMBC (Espectro 14 – ANEXO I) com o carbono em δ 137,02, e atribuído ao C-3, do anel A. Foram observados dois sinais, em δ 8,24 (d, 1H, $J = 4,8$) e δ 8,72 (d, 1H, $J = 4,8$) característicos de hidrogênios do núcleo isoquinolínico em H-4 e H-5, respectivamente. O registro de sinais referentes a três hidrogênios aromáticos em δ 8,01 (dd, $J = 7,9$ e $0,7$ Hz, 1H), δ 7,55 (t, $J = 7,9$ Hz, 1H) e δ 7,46 (dd, $J = 7,9$ e $0,7$ Hz, 1H), característicos do anel D dos sistemas oxoaporfínicos substituído em C-11, compatíveis com os sinais de H-8, H-9 e H-10. A presença de sinal em δ 4,04 (3H) correlacionado no HSQC ao sinal do carbono em 56,71 indicou a presença de uma metoxila como o grupo substituinte, enquanto a correlação (J^3) do sinal em δ 8,01 (H-8) no HMBC com o sinal da carbonila (C-7) em δ 183,85, confirmou a sua localização no C-11 (δ 158,48) (Figura 9).

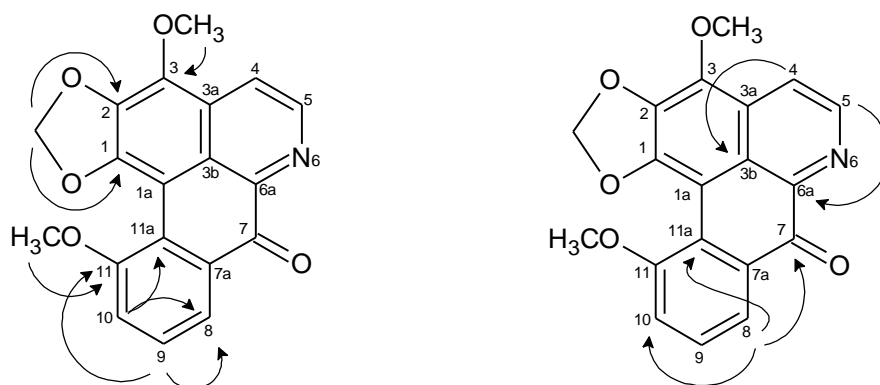


Figura 9: Correlações observadas no mapa de contorno HMBC da **GC4**.

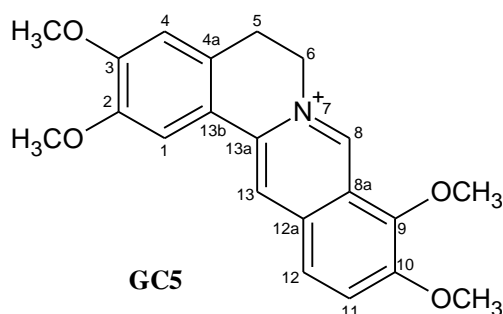
Na Tabela 13 são apresentados os valores de RMN ^1H atribuídos de acordo com as análises dos mapas de contorno HSQC e HMBC e pela similaridade com os dados na literatura, identificou o composto **GC4** como sendo o alcaloide oxoaporfínico conhecido como *3-metoxi-oxoputerina*, já isolado de *Guatteria foliosa* (MAHIOU et al., 1994).

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H de **GC4**.

Posição	$^{13}\text{C}(\delta)^{a,c}$	$^1\text{H}(\delta)$ (mult., J em Hz) ^a	$^1\text{H}(\delta)$ (mult., J em Hz) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^{a,d}
1	139,90			
1a	-			
2	151,88			
3	137,02			
3a	-			
3b	124,37			
4	120,44	8,24 (1H, d, 4,8)	8,18 (1H, m)	3b
5	144,38	8,72 (1H, d, 4,8)	8,90 (1H, m)	6a ^e
6a	132,65			
7	183,85			
7a	134,13			
8	121,13	8,01 (1H, dd, 7,9 e 0,7)	8,18 (1H, m)	7 ^e , 10 e 11a
9	130,09	7,55 (1H, t, 7,9)	7,53 (1H, t, 8)	8 e 11
10	118,47	7,46 (1H, dd, 7,9 e 0,7)	7,28 (1H, dd, 8 e 2)	8 e 11 ^a
11	158,48			
11a	124,08			
(1-2) OCH ₂ O	103,82	6,31 (2H, s)	6,24 (2H, s)	1 e 2
3-OCH ₃	60,98	4,29 (3H, s)	4,29 (3H, s)	3
11-OCH ₃	56,71	4,04 (3H, s)	4,04 (3H, s)	11

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H em CD_3OD , utilizando o TMS como padrão interno. ^b Dados da literatura de acordo com MAHIOU et al. 1994 (200MHz, CDCl_3). ^c Sinais determinados pelo espectro de HSQC e HMBC. ^d Átomos de carbonos que mostraram correlação com os hidrogênios em J^3 . ^e Correlação fraca. (δ) Deslocamento químico em ppm.

5.1.4 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO ALCALOIDE TIPO PROTOBERBERÍNICO



O espectro de massa do composto **GC5** apresentou um íon molecular protonado em m/z 352 ($[M+H]^+$) (Espectro 15 – ANEXO I) compatível com a fórmula molecular $C_{21}H_{22}NO_4$, confirmada pela análise do espectro de RMN de 1H .

Pela a análise do espectro de RMN 1H (600 MHz, CD_3OD) (Espectro 16 – ANEXO I) observou-se dois sinais em δ 9,76 (1H, s) e δ 8,80 (1H, s) típicos de esqueleto berberínico os quais foram atribuídos a H-8 e H-13. Dois sinais de grupos metilênicos mutuamente acoplados, um em δ 3,23 (2H, t, $J = 4,3$ Hz) e outro relativamente deslocado (desblindado) em δ 4,94 (2H, t, $J = 4,3$ Hz) em virtude da presença de uma nitrogênio quaternário, eram compatíveis com H-5 e H-6 do esqueleto protoberberínico (CHIA et al., 1998; GRICOVÁ et al., 2007). Verificou-se também quatro sinais típicos de grupos metoxílicos em δ 4,00, δ 3,95, δ 4,21 e δ 4,11, todos com integração para três hidrogênios; dois simpletos em δ 7,06 e δ 7,67 atribuídos a dois hidrogênios aromáticos situados em posição relativa *para*, característicos de anel benzênico 2,3,5-6-tetrassubstituído; e dois sinais de hidrogênios aromáticos em δ 8,12 e δ 8,02, ambos dubletos com constante de acoplamento *orto* ($J = 9,1$ Hz).

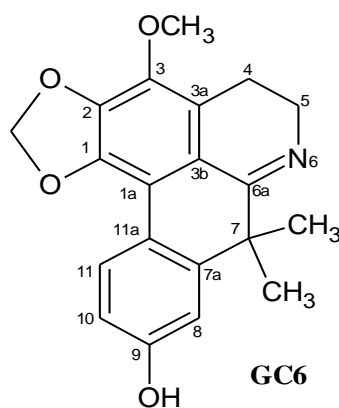
Na Tabela 14 são apresentados os valores de RMN de 1H , os quais aliados aos descritos na literatura permitiram a identificação do composto **GC5** como o alcaloide do tipo tetrahidroprotoberberínico quaternário conhecido como *palmatina*, também encontrado na espécie *Guatteira friesiana* (COSTA et al., 2013).

Tabela 14: Dados de RMN de ^1H de **GC5**.

Posição	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^b
1	7,67 (1H, s)	7,64 (1H, s)
4	7,06 (1H, s)	7,03 (1H, s)
5	3,23 (2H, t, 4,3)	3,28 (2H, t, 6,3)
6	4,94 (2H, t, 4,3)	4,93 (2H, t, 6,3)
8	9,76 (1H, s)	9,75 (1H, s)
11	8,12 (1H, d, 9,1)	8,09 (1H, d, 9,1)
12	8,02 (1H, d, 9,1)	8,01 (1H, d, 9,1)
13	8,80 (1H, s)	8,79 (1H, s)
2-OCH ₃	4,00 (3H, s)	3,98 (3H, s)
3-OCH ₃	3,95 (3H, s)	3,93 (3H, s)
9-OCH ₃	4,21 (3H, s)	4,20 (3H, s)
10-OCH ₃	4,11 (3H, s)	4,09 (3H, s)

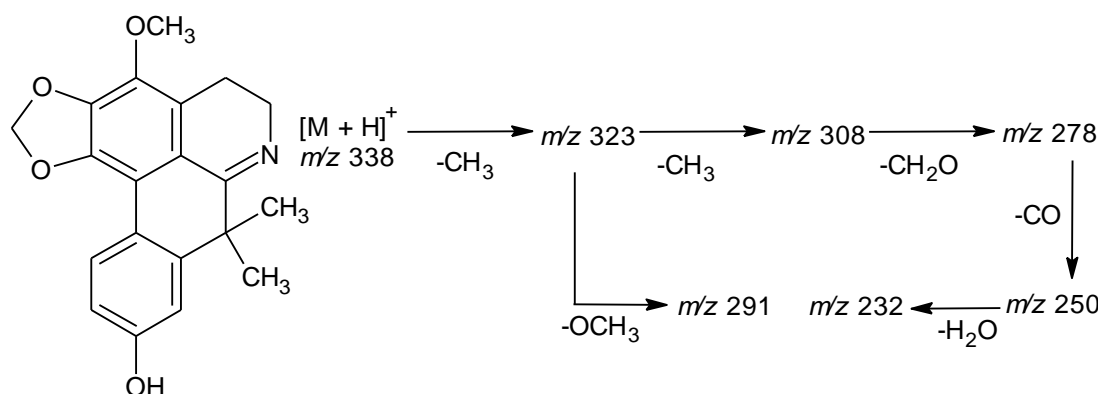
^a Experimento realizado a 600 MHz em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno. ^b Dados da literatura de acordo com WAFO et al., (1999) (400MHz, CDCl₃). (δ) Deslocamento químico em ppm.

5.1.5 DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DO ALCALOIDE TIPO 7,7-DIMETILAPORFÍNICO



O espectro de massa do composto **GC6** apresentou um íon molecular protonado de m/z par indicando possível alcaloide. O íon mais abundante foi observado em m/z 338 ($[\text{M}+\text{H}]^+$) (Espectro 17 – ANEXO I) cujos os fragmentos iônicos foram caracterizados através da análise das fragmentações chave e com base nos dados de RMN de ^1H o composto **GC6** refere-se ao alcaloide tipo aporfínico de fórmula molecular C₂₀H₁₉NO₄.

A fragmentação no espectro de massas (ESI-IT-MS) até MS^5 (Esquema 14) revelou duas perdas iniciais de 15 Da, evidenciadas pelos fragmentos a m/z 323 e m/z 308. Foram ainda observadas sucessivas perdas de 30 Da e 28 Da, correspondentes a CH_2O (m/z 278) e CO (m/z 250), que estão relacionadas à presença de uma ponte metilenodioxi na estrutura, conforme observado em alcaloides aporfínicos *sensu stricto* (STÉVIGNY, 2004) (Espectro 18 – ANEXO I).



Esquema 14: Proposta de fragmentação para o composto **GC6**.

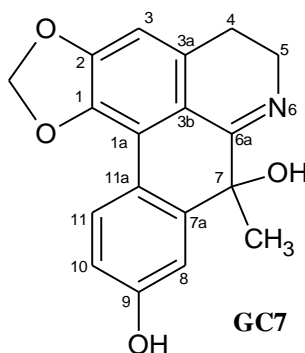
O espectro de RMN ¹H a 600 MHz em CD₃OD (Espectro 19 – ANEXO I) confirmou a presença do grupo metilenodioxi no anel A, verificado através do sinal em δ 6,11 (s, 2H). Como no composto **GC4**, o sinal correspondente ao H-3, foi substituído por uma metoxila (δ 4,00, 3H). Observou-se ainda características de um alcalóide do tipo 7,7-dimetilaporfínico devido a um sinal em δ 1,42 com integração para seis hidrogênios no espectro de RMN ¹H, indicando os grupos metílicos ligados ao C-7. Foram observados sinais em δ 2,58 e 3,51 ambos tripletos ($J = 7,4$, 2H), características de hidrogênios no anel tetraidroisoquinolínico em H-4 e H-5, respectivamente. O registro de sinais referentes a três hidrogênios aromáticos em δ 6,98 (d, $J = 2,5$ Hz, 1H), δ 6,70 (dd, $J = 8,6$ e 2,5 Hz, 1H) e δ 8,04 (d, $J = 8,6$ Hz, 1H) atribuídos ao H-8, H-10 e H-11, indicaram uma substituição em C-9 do anel D, deduzida pelo espectro de massas, como uma hidroxila (Espectro 18 – ANEXO I).

Na Tabela 15 são apresentados os valores de RMN ^1H , os quais, pela similaridade com os registros da literatura, identificaram o composto **GC6** como o alcaloide oxoaporfínico conhecido como *3-metoxi-guadiscidina*, já isolado pela primeira vez na espécie *Guatteria friesiana* (COSTA et al., 2009a).

Tabela 15: Dados de RMN de ^1H de **GC6**.

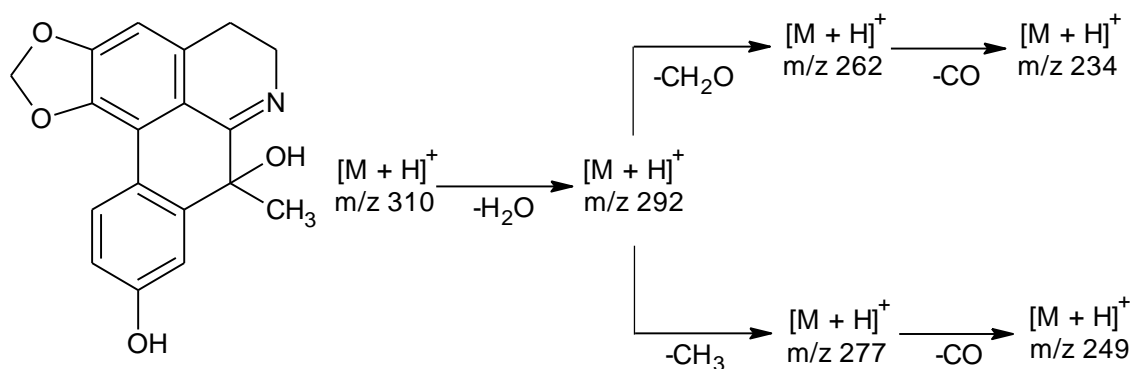
Posição	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^b
4	2,58 (2H, t, 7,4)	2,58 (2H, m)
5	3,51 (2H, t, 7,4)	3,53 (2H, m)
8	6,98 (1H, d, 2,5)	7,01 (1H, d, 2,5)
10	6,70 (1H, dd, 8,6 e 2,5)	6,76 (1H, dd, 8,5 e 2,5)
11	8,04 (1H, d, 8,6)	8,04 (1H, d, 8,5)
(1-2) OCH ₂ O	6,11 (2H, s)	6,09 (2H, s)
3-OCH ₃	4,00 (3H, s)	4,01 (3H, s)
9-OH	-	-
7-CH ₃	1,42 (6H, s)	1,45 (6H, s)

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno. ^b Dados da literatura de acordo com COSTA et al. (2009a) (400MHz, CDCl₃ + gotas de CD₃OD). (δ) Deslocamento químico em ppm.



O espectro de massa do composto **GC7** apresentou o íon molecular protonado em m/z 310 ($[\text{M} + \text{H}]^+$) (Espectros 20 – ANEXO I) cujos os fragmentos iônicos obtidos até MS^4 foram caracterizados através da análise das fragmentações chave. O **GC7** compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{15}\text{NO}_4$ foi confirmada com base nos dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC e por comparação com os registros da literatura.

Na análise do padrão de fragmentação (Esquema 15) observou-se a perda inicial de $[M + H - H_2O]^+$ gerando o íon m/z 292 que por sua vez apresentou dois tipos de perdas distintas, uma perda de 15 Da (CH_3) seguida de 28 Da (CO) evidenciadas pelos fragmentos m/z 277 e m/z 249, e outra perda de 30 Da (CH_2O) seguida de 28 Da (CO) referente ao grupo metilenodioxi (STÉVIGNY, 2004) (Espectros 21 – ANEXO I).



Esquema 15: Proposta de fragmentação para o composto **GC7**.

Pela análise do espectro de RMN 1H a 600 MHz em CD_3OD (Espectro 22 – ANEXO I) observaram-se características de um alcaloide do tipo 7-hidroxi-7-metilporfínico devido ao sinal em δ 1,41 com integração para três hidrogênios no espectro de RMN 1H , correlacionado com o sinal em δ 34,28 no mapa de contorno HSQC (Espectro 23 – ANEXO I). Foram observados sinais em δ 2,66 e 3,98, ambos multipletos com integração para 2 hidrogênios, acoplados no HSQC aos sinais em δ 27,26 e 46,23, característicos de hidrogênios/carbono do anel tetraidroisoquinolínico H-4/C-4 e H-5/C-5, respectivamente (Espectro 23 – ANEXO I).

No espectro de RMN 1H observou-se um simpleto referente a um hidrogênio em δ 6,69 no anel A e a ausência do sinal de H-6a entre δ 3,50-3,71 do anel B, indicando a presença de uma ligação dupla entre C-6a e N-6, confirmada pelo sinal do carbono imínico em δ 172,29. Apesar da presença do grupo imino entre C-6a e N-6 que, de acordo com a literatura (PELLETIER, 1987), restaura a planaridade da molécula (evidenciada em **GC6** pelo simpleto

O composto **GC7** foi identificado como o alcaloide *guattescidina*, isolado anteriormente de *Guatteria scandens*, por Hocquemiller et al. (1982), sendo sua estrutura corrigida por CHIARONI et al. em 1983, com base em análise de difração de raios X do derivado 9-metoxilado análogo, guattescina, sendo incompletos os dados da literatura sobre este alcaloide. No presente trabalho que constitui o segundo isolamento de **GC7** são apresentados dados completos de RMN ^1H , HSQC e HMBC inequívocos sobre a sua estrutura (Tabela 16).

Tabela 16: Dados de RMN de ^1H de **GC7**.

Posição	^{13}C (δ) ^{a, c}	^{13}C (δ) ^b	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^a	^1H (δ) (mult., J em Hz) ^b	HMBC (^1H - ^{13}C) ^{a, d}
1a	117,70	114,3			
1	143,15	143,4			
2	152,44	151,8			
3	106,64	106,0	6,69 (1H, s)	6,53 (1H, s)	1, 2, 3b e 4
3a	134,80	133,4			
3b	116,62	117,1			
4	27,26	26,0	2,66 (2H, m)		3, 3a, 3b e 5
5	46,23	44,6	3,98 (2H, m)		3a
6a	172,29	172,6			
7	74,34	73,1			
7a	146,32	141,7			
8	113,30	111,3	7,24 (1H, d, 2,5)	7,43 (1H, d, 2,8)	11a, 10 e 7 ^e
9	159,45	157,9			
10	115,50	114,7	6,74 (1H, dd, 8,6 e 2,6)	6,76 (1H, dd, 9 e 2,8)	7a e 11a
11	130,50	129,0	8,07 (1H, d, 8,6)	7,99 (1H, d, 9)	1a, 9, 7a e 7 ^e
11a	119,97	117,9			
7-CH ₃ _eq	34,28	33,6	1,41 (3H, s)	1,45 (3H, s)	6a, 7 e 7a
7 - OH					
9 - OH					
(1-2)					
OCH ₂ O_H β	102,80	101,3	6,17 (1H, d, 1,2)	6,08 (1H, 1,5)	1 e 2
(1-2)					
OCH ₂ O_H α			6,05 (1H, d, 1,2)	5,9 (1H, 1,5)	1 e 2 ^e

^a Experimento realizado a 600 MHz para ^1H em CD₃OD, utilizando o TMS como padrão interno. ^b Dados da literatura de acordo com HOCQUEMILLER et al., 1982. ^c Sinais determinados pelo espectro de HSQC e HMBC.

^d Átomos de carbonos que mostraram correlação com os hidrogênios em J² e J³. ^e Correlação fraca. (δ) Deslocamento químico em ppm. ^e Correlação fraca. (δ) Deslocamento químico em ppm.

5.2 TESTE DE ATIVIDADE ANTIPLASMÓDICA

Foram avaliados inicialmente os extratos hidroalcoólicos das folhas das espécies *U. guaterioides*, *A. brevipes*, *D. riparia*, *T. duckei*, *A. exsucca*, *X.benthamii* e *G. citriodora* contra *Plasmodium falciparum* FCR3, e posteriormente, os extratos hidroalcoólicos das folhas e galhos de *G. citriodora* e suas frações hexânicas, alcaloídicas e neutras.

Ao avaliar a morfologia das células presentes em suspensão por citometria de fluxo foram selecionadas de acordo com tamanho e granularidade o segundo quadrante (Q2) representado pelas hemácias parasitadas marcadas com brometo de etídio (Figura 11). Observou-se em média $5,79\% \pm 0,66$ das células que demonstravam morfologia característica de hemácias.

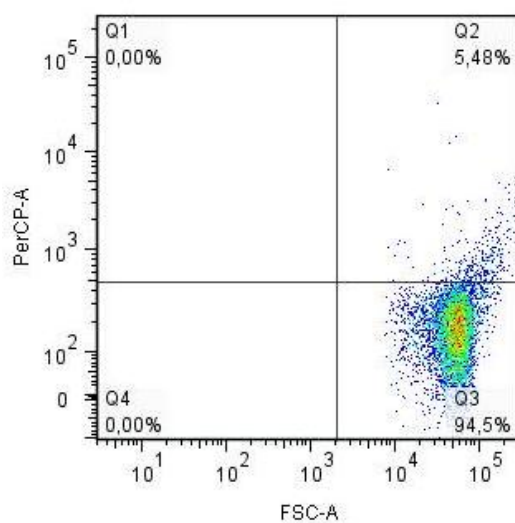


Figura 11: Histograma das hemácias parasitadas em suspensão por citometria de fluxo.

Foram avaliados 41 modelos de curvas estatísticas para determinação do CI_{50} dos extratos e frações de *G. citriodora*. Foi utilizado o método dos mínimos quadrados generalizados considerando variâncias constantes. Alguns ajustes apresentaram evidências de variâncias não constantes, contudo, segundo O'CONNELL (1993) isto não produz mudanças

marcantes nas estimativas das curvas. Na tabela 17, é apresentado o resultado dos modelos estatísticos de melhor desempenho para cada extrato e fração segundo o critério de informação Akaike (AIC) e levando em consideração o nível de significância de 5%.

Os extratos que diminuíram a parasitemia com valores de $CI_{50} \leq 5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram considerados altamente ativos, aqueles com $5 \mu\text{g/mL} \leq CI_{50} \leq 10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ foram classificados como moderadamente ativos e com $10 \mu\text{g/mL} \leq CI_{50} \leq 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com baixa atividade antiplasmódica.

As espécies de Annonaceae *U. guaterioides*, *A. brevipes*, *D. riparia*, *T. duckei*, *A. exsucca* e *X.bentharii* avaliadas não apresentaram atividade antiplasmódica com exceção dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *G. citriodora*, e por este motivo, avaliaram-se também os extratos hidroalcoólicos dos galhos e suas frações (Tabela 17).

Os extratos EHBFB e EHBFG apresentaram elevada atividade antiplasmódica exibindo CI_{50} de $1,183 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,3277 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente. Observou-se que as frações alcaloídicas FAF CI_{50} de $1,066 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e FAG ($CI_{50} = 0,332 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e FHG (CI_{50} de $1,035 \mu\text{g.mL}^{-1}$) foram muito ativas, sendo que a constituição química da última não foi investigada neste trabalho.

Tabela 17: CI₅₀ dos extratos e frações de acordo com AIC e o p-valor.

	MM.3		L.3		LL.3		LL.4		CRS.4c		UCRS.4c		BC.4		CI ₅₀ µg.mL ⁻¹
	AIC	p-valor	AIC	p-valor	AIC	p-valor	AIC	p-valor	AIC	p-valor	AIC	p-valor	AIC	p-valor	
EHBF	-114,7	0,9837													1,183
FHF			-120,2	0,0897											42,725
FNF									-142,5	0,6325					75,650
FAF	-117,1	0,5402													1,066
EHBG													-152,4	0,2172	0,328
FHG											-106,7	0,5707			1,035
FNG															> 100
FAG							-110,6	0,2644							0,332
<i>U. guaterioides</i>															> 100
<i>A. brevipes</i>															> 100
<i>D. riparia</i>															> 100
<i>T. duckei</i>															> 100
<i>A. exsucca</i>															> 100
<i>X. benthamii</i>															> 100
Quinina^a					-158,9	0,682									0,018

MM.3: Michaelis-Menten; Logística; Log-Logística; BC.4: Brain-Cousens; CRS.4c: Cedergreen-Ritz-Streibig; UCRS.4c: Cedergreen-Ritz-Streibig invertida AIC: Critério de Informação Akaike; EHB: Extrato Hidroalcoólico Bruto; FH: Fração Hexânica; FN: Fração Neutra; FA: Fração Alcaloídica; F: Folhas e G: Galhos. ^a Droga controle: Quinina.

As frações neutras das folhas e galhos não apresentaram atividade antiplasmódica relevante com valores respectivamente de CI_{50} de $75,65 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e superior a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A FHF evidenciou baixa atividade com CI_{50} igual a $42,725 \mu\text{g.mL}^{-1}$ diferentemente da FHG com alta atividade plasmocida de CI_{50} de $1,035 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A Figura 12 apresenta o gráfico da curva ajustada para os dados da FHG.

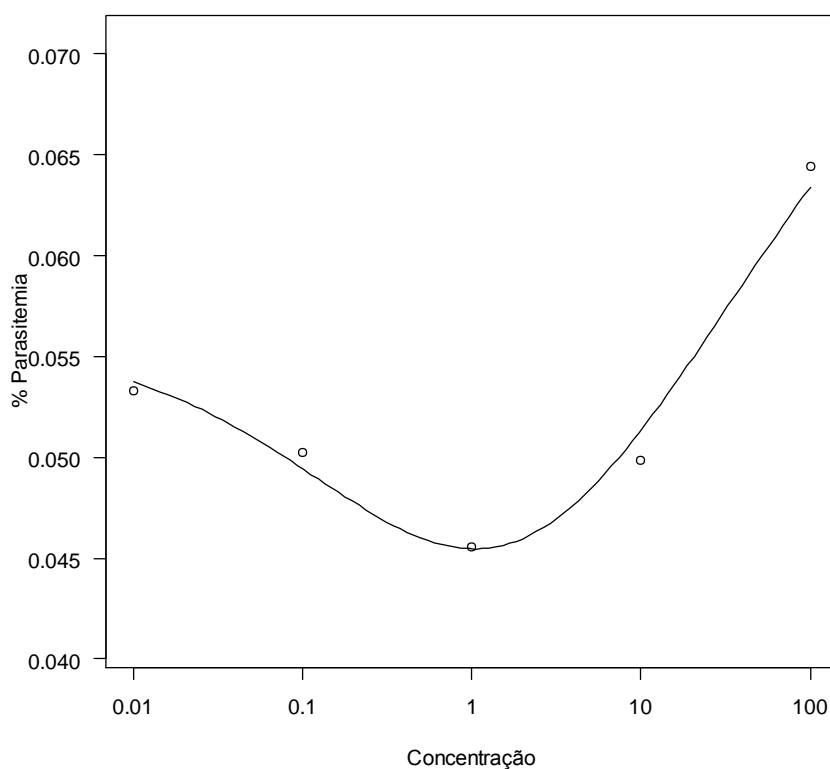


Figura 12: Curva ajustada pelo modelo UCRS.4c, para os dados da FHG.

A Figura 13 e 14 apresenta o gráfico da curva ajustada para os dados do EHBF e EHBG, respectivamente. Verifica-se nas curvas de parasitemia a atividade relativa referente à menor concentração. Esse resultado sugere uma competição entre os metabólitos bioativos exibindo um bloqueio estérico no sítio ativo do *Plasmodium* acarretando uma diminuição da atividade à medida que se eleva a concentração.

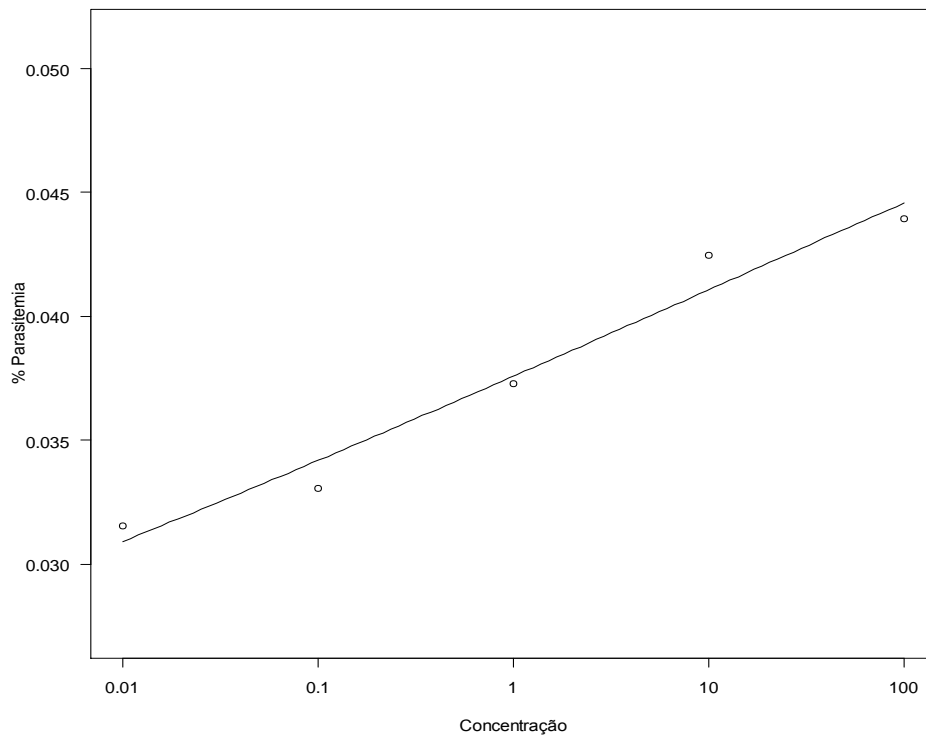


Figura 13: Curva ajustada pelo modelo MM.3, para os dados EHBG.

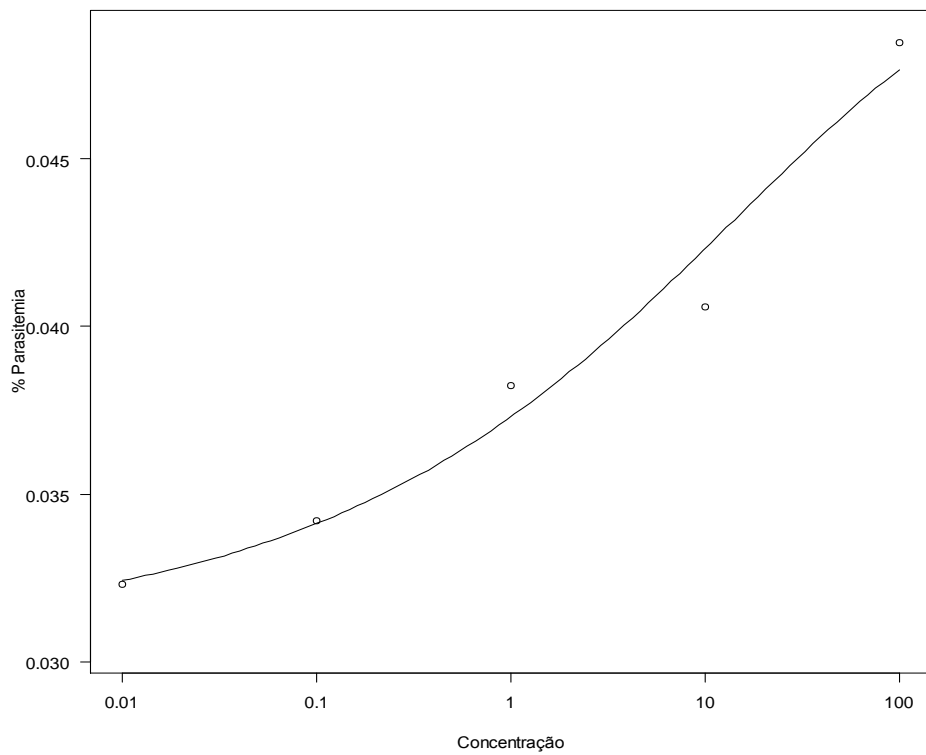


Figura 14: Curva ajustada pelo modelo BC.4, para os dados EHBG.

O mesmo comportamento dos extratos EHBf e a EHBg foi observado para as frações alcaloídicas FAF e FAG (Figura 15 e 16) ao apresentarem elevada atividade antiplasmodica relativo à menor concentração com CI_{50} de $1,183 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,3277 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

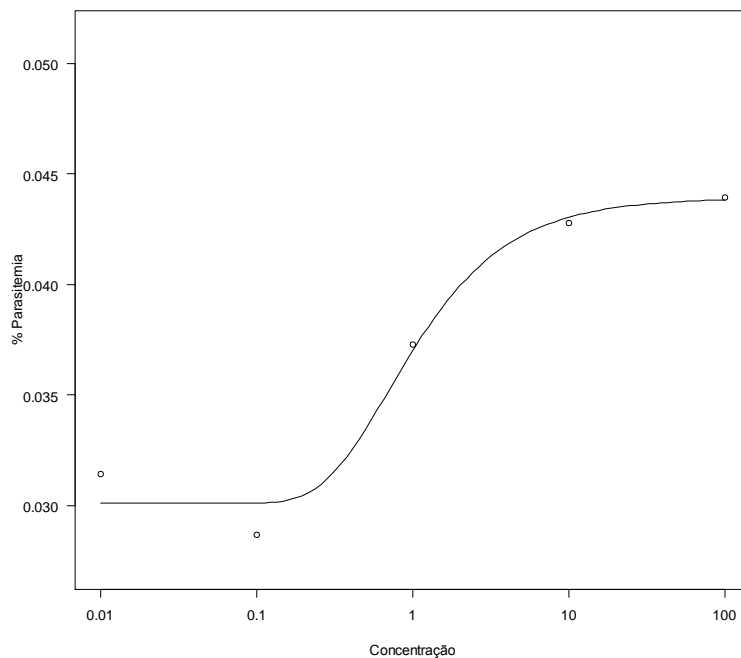


Figura 15: Curva ajustada pelo modelo MM.3, para os dados FAF.

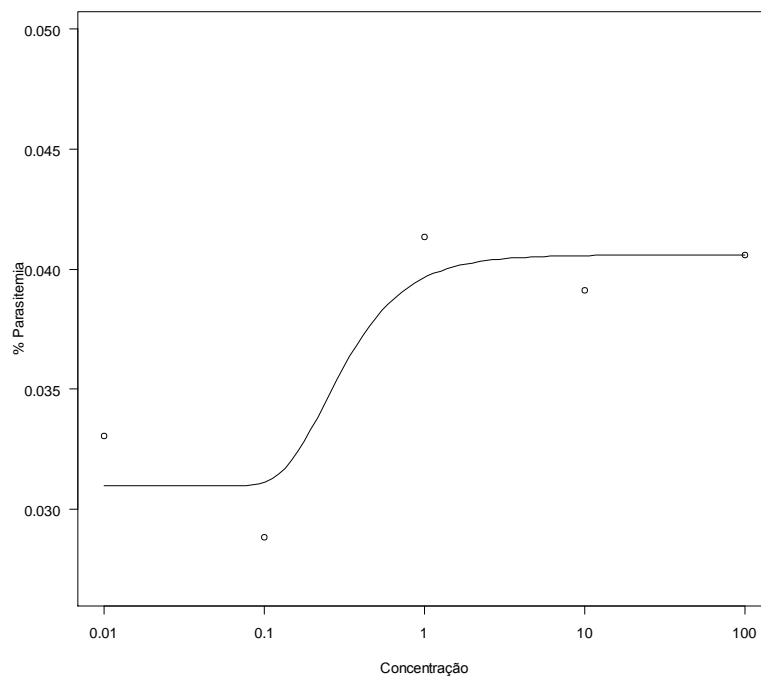


Figura 16: Curva ajustada pelo modelo LL.4, para os dados FAG.

Observou-se ainda que as frações alcaloídicas apresentaram atividades relativamente próximas aos extratos hidroalcoólicos brutos levando a admitir que a atividade dos extratos brutos seja atribuída aos alcaloides presentes, especialmente para as folhas, cuja fração hexânica (FHF) e fração neutra (FNF) apresentaram baixa atividade.

Vários relatos na literatura contribuem e fortalecem esta observação como os resultados obtidos por Fisher et al., (2004), em que os extratos alcaloídicos foram mais ativos que os extratos etanólicos brutos com valores de CI_{50} entre 0,3 - 8,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, e a fração alcaloídica de *Guatteria australis* foi o mais ativo contra K1 de *Plasmodium falciparum* com CI_{50} igual a 0,3 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Sener et al., (2003) sugerem que o grupo metilenodioxido e o nitrogênio terciário não metilado contribuem para alta atividade dos alcaloides. Porém, foi observada uma elevada atividade em alcaloides com o nitrogênio quaternário (OSORIO et al., 2010).

Wright et al., (2000) avaliaram a atividade antiplasmódica de alguns grupos de alcaloides e relataram que a presença do nitrogênio quaternário aumenta a atividade dos protoberberínicos. No grupo dos aporfínicos, os autores sugerem que a função amina secundária e um substituinte fenólico aumentam a atividade antiplasmódica *in vitro* em relação às aminas terciárias e aos substituintes metoxilados, os quais foram cerca de sete vezes menos ativos. Resultados similares também foram encontrados por COSTA et al., (2011b) em que o autor sugere que o grupo metoxila reduz a atividade antiproliferativa para o alcaloide oxoaporfínico subsessilina e inativa a *O*-metilmoschatolina, enquanto a hidroxila favorece a atividade da isomoschatolina.

GRAZIOSE et al., (2011) isolou os alcaloides aporfínicos assimilobina, liriodenina e oxoglaucaína, os quais apresentaram atividade antiplasmódica contra *P. falciparum* D10 sensível a cloroquina, e Dd2 resistente a cloroquina com CI_{50} entre 1,2 a 4,1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os

resultados desses compostos são consistentes com trabalhos publicados anteriormente (DEL RAYO et al., 2000; LIKHITWITAYAWUID et al., 1993b; WIRASATHIEN et al., 2006) .

Portanto, os resultados deste trabalho confirmam o potencial antimalárico dos constituintes alcaloídicos, como já descritos na literatura (PHILLIPSON & WRIGHT, 1991; GUINAUDEAU et al., 1997; ANGERHOFER et al., 1999; STEELE et al., 1999; WENIGER et al., 2000; IWASA et al., 2001; MUÑOZ et al. 2000; MAHIOU et al., 2000).

Merece atenção ainda a elevada atividade de FHG ($CI_{50} = 1,035$), cujos constuintes deverão ser investigados em trabalhos posteriores.

5.3 TESTE ANTIBACTERIANO

Os resultados obtidos da avaliação da atividade antibacteriana contra 46 micro-organismos e as concentrações inibitórias mínima dos extratos e frações ativos são apresentados na Tabela 18. Foram avaliados os extratos hidroalcoólicos das folhas e galhos de *G. citriodora* e suas frações hexânicas, alcaloídicas e neutras, bem como os óleos essenciais das folhas.

Na avaliação do antibiograma de acordo com a técnica de difusão em ágar por meio de poço foi possível verificar o grau de sensibilidade segundo o diâmetro dos halos de inibição, nos seguintes termos: resistente: ausência de halo de inibição; pouco sensível: halos de até 10 mm de diâmetro; moderadamente sensível: halos entre 10 e 20 mm; muito sensível: halos entre 20 e 30 mm; severamente sensível: halos acima de 30 mm.

A. S. aureus sensível à metilina MSSA (ATCC 25923) se apresentou moderadamente sensível ao extrato hidroalcoólico das folhas de *G. citriodora* evidenciado pelo halo de inibição de 14 mm com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

A fração alcaloídica das folhas (FAF) e galhos finos (FAGF) de *G. citriodora* exibiram uma significativa atividade contra a bactéria Gram positiva *Bacillus subtilis* por apresentar halo de inibição de 22 mm e 21 mm, respectivamente e ambos com CIM igual a 62,5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. A Gram positiva *Enterococcus faecalis* (ATCC 4083) se apresentou moderadamente sensível apenas à fração alcaloídica das folhas com halo de inibição em média de 17 mm e CIM igual a 125 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

A atividade observada nas frações alcaloídicas foi atribuída provavelmente a presença da alta concentração de alcaloides, uma vez que não foi observado atividade nos respectivos extratos brutos. Similarmente, resultados encontrados por Costa e colaboradores (2010), ao avaliar os extratos metanólicos e suas frações do cerne de *Guatteria hispida* constatou os melhores resultados para a fração alcaloídica com atividade antimicrobiana contra alguns micro-organismos. Destaque ao alcaloide liriodenina por ser mais ativo em relação ao controle positivo cloranfenicol contra a Gram positiva *Staphylococcus epidermidis*. Em estudos anteriores, foi relatada a atividade frente à bactérias Gram + para alcaloides isoquinolínicos (ABBASOGLU et al., 1991).

A resistência de bactérias Gram negativas a frações alcaloídicas e alguns alcaloides isolados de espécies do gênero *Guatteria* já foi relatada na literatura. *G. hispida* e *G. blepharophylla* e seus compostos majoritários *O*-metilmoshatolina, lisicamina, isomoshatolina, nornuciferina, isocoreximina e liriodenina não apresentaram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (COSTA et al., 2010 e 2011b).

Atividade antibacteriana também foi observada para os óleos essenciais das folhas, mas somente para as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* EPEC e *Salmonella enterica* subespécie *enterica* serovar *Typhimurium* que se apresentaram moderadamente sensíveis ao óleo essencial por evidenciarem halos de inibição em média de 11 e 13 mm, respectivamente.

ambos com CIM igual a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. O óleo essencial extraído das folhas e seus constituintes químicos foram identificados por Rabelo (2008) com 77% dos constituintes majoritários de monoterpenos, dos quais 48% corresponderam ao citronelal e citronelol. Esses compostos já possuem atividade antimicrobiana comprovada (TOSCAN, 2010; BEZERRA et al., 2013; CASTRO et al., 2010; ORDÓÑEZ et al., 2004).

De acordo com Toscan (2010) em trabalho realizado com o citronelol e citronelal, não foram constatadas diferenças evidentes entre os comportamentos de bactérias Gram positivas e negativas frente aos compostos de um modo geral, indicando que a presença da membrana externa lipoproteica existente nas Gram negativas não estabelece barreira eficaz, permitindo a interação dos terpenoides com a membrana celular. Contudo, de acordo com Sinkkema *et al.* (1993, 1995), a membrana celular pode ser significativamente diferente de um organismo a outro afetando a permeabilidade e conseqüentemente, a resposta dos mesmo a compostos inibitórios. Por outro lado, não se pode descartar os diversos mecanismos que podem atuar de forma a tornar o micro-organismo resistente aos terpenoides, como bombas de efluxo, modificação nos sítios alvos e modificação enzimática da molécula inibitória. Além destes dados, representantes do gênero *Pseudomonas* são capazes de transformar ou utilizar terpenoides, no caso, o citronelal e citral, como fonte de carbono (TOZONI et al., 2010)

Os resultados observados mostram que o mecanismo de ação bactericida de algumas frações e extratos da espécie *Guatteria citriodora* é diferente quanto ao micro-organismo testado, uma vez que a fração alcaloídica foi ativa apenas para bactérias Gram positivas e o óleo essencial ativo somente para Gram negativa, podendo ainda ocorrer efeitos sinérgicos de outros componentes presentes no mesmo.

Tabela 18: CIM dos extratos e frações que apresentaram halos de inibição.

Extrato	Média dos halos de Inibição (mm) / CIM ^a (µg.mL ⁻¹)				
	<i>E. faecalis</i> ATCC4083	<i>B. subtilis</i> ATCC6051	<i>S. aureus</i> MSSA ^c ATCC25923	<i>E. coli</i> EPEC CDC O86:H35	<i>S. typhimurium</i> ATCC 13311
EHBF	ND	ND	14 / 250	ND	ND
FAF	17 / 125	22 / 62,5	ND	ND	ND
FAG	ND	21 / 62,5	ND	ND	ND
Óleo Essencial	ND	ND	ND	11 / 125	13 / 125
Imipinem^b	62,5	31,2	15,6	31,2	62,5

^a CIM: Determinação da Concentração Inibitória Mínima, ^b Droga Controle: Imipinem, ^c MSSA: *Staphylococcus aureus* sensível a metilina, ND: Não Detectado.

6. CONCLUSÃO

O screening da atividade antiplasmódica realizado em algumas espécies da família Annonaceae revelou atividade mais promissora para os extratos hidroalcoólicos das folhas de *G. citriodora* com CI_{50} de $1,183 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e dos galhos com $0,328 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Após o fracionamento dos extratos, as frações hexânicas dos galhos e frações alcaloídicas das folhas e galhos revelaram elevada atividade antiplasmódica com CI_{50} de $1,035 \mu\text{g.mL}^{-1}$, $1,066 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e $0,332 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente.

A avaliação antibacteriana mostrou atividade para as frações alcaloídicas de *G. citriodora* evidenciada pela ação bactericida das folhas e galhos contra *Bacillus subtilis* com CIM $62,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ e das folhas contra *Enterococcus faecalis* com CIM $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Uma significativa atividade antibacteriana também foi observada para os óleos essenciais das folhas, mas somente para as bactérias Gram negativas *Escherichia coli* EPEC e *Salmonella enterica* subespécie *enterica serovar Typhimurium* que se apresentaram moderadamente sensíveis ao óleo essencial por evidenciarem CIM ambos igual a $125 \mu\text{g.mL}^{-1}$. A atividade foi atribuída aos monoterpenos por serem a maioria dos constituintes químicos presentes no óleo. Destes, metade correspondem ao citrionelal e citrionelol, os quais já possuem atividade antimicrobiana comprovada na literatura.

O trabalho reporta o isolamento e a identificação de 7 alcaloides descritos pela primeira vez na espécie *G. citriodora*, liriodenina, lisicamina, *O*-metilmoschatolina e 3-metoxioxoputerina (oxoaporfínicos), 3-metoxiguadiscidina (aporfínico), palmatina (protoberberínico) e guattescidina (7-hidroxi, 7-metilaporfínicos), revelando-a como uma fonte promissora de alcaloides isoquinolínicos. Os estudos fitoquímicos evidenciaram a diversidade estrutural, característica do gênero, contribuindo para o seu conhecimento químico-taxonômico. Adicionalmente, foram detectados através da análise de perfil químico

por ESI-IT-MS, os alcaloides anonaína e norneolitisina, respectivamente das frações alcaloídicas dos galhos e das folhas, os quais não foram isolados neste trabalho.

As atividades antiplasmódicas das frações FAF e FAG *in vitro* são promissoras e podem ser associadas aos seus constituintes alcaloídicos encorajando o aprofundamento dos estudos com investigações *in vivo*, para estabelecer sua verdadeira eficácia e toxicidade, assim como estudos sobre a relação entre estrutura e atividade, visando fornecer subsídios para a obtenção de novos fármacos antimaláricos de origem vegetal.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASOGLU, U.; SENER, B.; GUNAY, Y.; TEMIZER, H. Antimicrobial activity of some isoquinoline alkaloids. *Archiv der Pharmazie*, v. 324, p. 379-381, 1991.

ADDAE-KYEREME, J.; CROFT, S.L.; KENDRICK, H.; WRIGHT, C.W. Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 76, p. 99-103, 2001.

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

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MACLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.

ALMEIDA, J. R. G. S.; LUCIO, A.S.S.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; UCHOA, D.E.A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids and a new cinnamate derivative from *Duguetia gardneriana*. *Biochemical Systematics and Ecology*, v. 35, p. 456-458, 2007.

ANDRADE-NETO, V. F.; POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; SILVA, E. C. C.; NOGUEIRA, K. L.; MELO, M. R. S.; HENRIQUE, M. C.; AMORIM, R. C. N.; SILVA, L. F. R.; COSTA, M. R. F.; NUNOMURA, R. C. S.; ALECRIM, W. D.; ALECRIN, M. G.; CHAVES, F. C. M.; VIEIRA, P. P. R. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonia antimalarial plants. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, n. 3, p. 359-365, 2007

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

BALBACH, A. *As plantas curam*. Ed. Edel, São Paulo - SP, 1986, 415 p.

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

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Products Reports*, v. 22, p. 269–303, 2005.

BERO, J.; FREDERICH, M.; QUETIN-LECLERCQ, J. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 61, p. 1401–1433, 2009.

BEZERRA, L. M. D.; FERREIRA, G. L. S.; DA SILVA, I. C. G.; CASTRO, R. D. Atividade antibacteriana in vitro de fitoconstituintes sobre micro-organismos do biofilme dentário. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, v. 17, n. 1, p. 79-84, 2013.

BORIES, C.; LOISEAU, P.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P.; CAVÉ, A.; LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. *Planta Medica*, v. 57, p. 434-436, 1991.

BOYOM, F. F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P. H. A.; MENUT, C.; BESSIERE, J. M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. *Phytochemistry*, v. 64, p. 1269–1275, 2003.

BOYOM, A. F.; FOKOU, P. V. T.; YAMTHE, L. R. T.; MFOPA, A. N.; KEMGNE, E. M.; MBACHAM, W. F.; TSAMO, E.; ZOLLO, P. H. A.; GUT, J.; ROSENTHAL, P. J. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 134, p. 717–724, 2011.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Saúde Brasil 1: Casos de Saúde caem 56% em seis anos. Brasília: Portal da Saúde, 2012.

BRAY, P. G.; WARD, S. A.; O'NEILL P. M. Quinolines and artemisinin: chemistry, biology and history. *Current Topics in Microbiology Immunology*, v. 295, p. 3-38, 2005.

BRUNETON, L. Pharmacognosy, phytochemistry, medicinal plants. 2 ed., Paris: Lavoisier; Secaucus: Intercept, p. 784-799, 1999.

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

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

CAMACHO, M.D. R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; SOLIS, P. N.; MARSHALL, S. J.; GHAZANFAR, S.A. Screening of plant extracts for antiprotozoal and cytotoxic activities. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 89, p. 185–191, 2003.

CASTRO, R. D.; FREIRES, I. A. F.; FERREIRA, D. A. H.; JOVITO, V.C.; PAULO, M. Q. Atividade antibacteriana in vitro de produtos naturais sobre *Lactobacillus casei*. *International Journal of Dentistry*, v. 9, n. 2, p. 74-77, 2010.

CAVÉ, A. Annonaceae Alkaloids. In: PHILLIPSON, J. D.; ROBERTS, M. F.; ZENK, M. H., eds. *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. Berlin, New York: Springer-Verlang, p. 79-101, 1985.

CHANG, F. R.; YANG, P. Y.; LIN, J. Y.; LEE, K. H.; WU, Y. C. Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. *Journal Natural Product*, v. 61, p. 437-439, 1998.

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

CHATROU, L. W.; ESCRIBANO, M. P.; VIRUEL, M. A.; MAAS, J. W.; RICHARDSON, J. E.; HORMAZA, J. I. Flanking regions of monomorphic microsatellite loci provide a new source of data for plant species-level phylogenetics. *Molecular Phylogenetic Evolution*, v. 53, p. 726-733, 2009.

CHIA, Y.-C.; CHANG, F.-R.; MING, LI, C.-M.; WU, Y.C. Protoberberine alkaloids from *Fissistigma balansae*. *Phytochemistry*, v. 48, p. 367-369, 1998.

CHIARONI A.; RICHIE C.; HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY S.; CAVÉ A. Structure cristalline de la guattescine; revision de structure. *Tetrahedron*, v. 39, n. 13, p. 2163-2167, 1983.

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility. Tests for Bacteria that Grow Aerobically*. Approved Standard M07-A9, ed. 9, v. 32, 2012.

CORRÊA, R. F.; SALES, J. P.; BEZERRA, J. A.; RABELO, D. M.; PINHEIRO, M. L. B.; OLIVEIRA, L. A.; SILVA, S. S.; ASTOLFI FILHO, S. Efeitos antimicrobianos, antiácidos e removedores de biofilme de algumas espécies vegetais amazônicas sobre *Streptococcus mutans*. Brasil, WO 2009/082797 A1. 09 Julho 2009. World Intellectual Property Organization.

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

COSTA, E. V.; TEIXEIRA, S. D.; MARQUES, F. A.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M. L. B.; TRIGO, J. R.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon *Gutteriopsis* species. Phytochemistry, v. 69, p. 1895-1899, 2008.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; VAZ, N. P.; DUARTE, M. C. T.; DELARMELINA, C.; BRAGA, R. M.; MAIA, B.H.L.N. S. 7,7-Dimethylaporphine alkaloids from the stem of *Gutteriopsis friesiana*. Journal of Natural Products, v. 72, p. 1516–1519, 2009a.

COSTA, E.V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M.L. B.; BRAGA, R. M.; MAIA, B.H.L.N.S. First report of alkaloids in the genus *Gutteriopsis* (Annonaceae). Biochemical Systematics and Ecology, v. 37, 43–45, 2009b.

COSTA, E. V.; MAIA, B. H. L. N. S.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; DUARTE, M. C. T.; AMARAL, A. C.F.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. Antimicrobial and Antileishmanial Activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). Química Nova, v. 32, n. 1, p. 78-81, 2009c.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SALVADOR, M. J.; MAIA, B. H. L. N. S.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N. Alkaloids from the bark of *Gutteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. Journal of Natural Products, v. 73, p. 1180-1183, 2010.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M.L.B.; SOUZA, A.D.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; VALDEZ, R.H.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Trypanocidal Activity of Oxoaporphine and Pyrimidine- β -Carboline Alkaloids from the Branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). Molecules, v. 16, p. 9714-9720, 2011a.

COSTA, E. V.; MARQUES, F. A.; PINHEIRO, M. L. B.; BRAGA, R. M.; DELARMELINA, C.; DUARTE, M. C. T.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. C.; MAIA, B. H. L. N. S. Chemical Constituents Isolated from the bark *Guatteria blepharophylla* (Annonaceae) and their Antiproliferative and antimicrobial Activities. Journal Brazilian Chemical Society, v. 22, n. 6, p. 1111-1117, 2011b.

COSTA, E. V.; DA CRUZ, P. E. O.; PINHEIRO, M. L. B.; MARQUES, F. A.; RUIZ, A. L. T. G.; MARCHETTI, G. M.; CARVALHO, J. E.; BARISON, A.; MAIA, B. H. L. N. S. Aporphine and Tetrahydroprotoberberine Alkaloids from the Leaves of *Guatteria friesiana* (Annonaceae) and their Cytotoxic Activities. Journal Brazilian Chemical Society, v. 24, n. 5, p. 788-796, 2013.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. Revista Clinica Microbiologia, v.12, p. 564-582, 1999.

CSEKE, L. J.; KIRAKOSYAN, A.; KAUFMAN, P. B.; WARBER S. L.; DUKE, J. A.; BRIELMANN, H. L. Natural Products from Plants. 2ed, CRC Press, 2006, 632 p.

CUI, L.; SU, X.Z. Discovery, mechanisms of action and combination therapy of artemisinin. Expert Review of Anti-Infective Therapy, v. 7, p. 999–1013, 2009.

DEMAIN, A. L.; SANCHEZ, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. The Journal of Antibiotics, v. 62, p. 5-16, 2009.

DE MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORRIES, F. C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 100, p. 783–787, 2005.

DE MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. Journal of Ethnopharmacology, v.110, p.165–170, 2007.

DEL RAYO C. M.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; CROFT, S. L.; PHILLIPSON, J. D. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. Planta Medica, v. 66, p. 478–480, 2000.

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

ERKENS, R. H. J.; CHATROU, L. W.; KOEK-NOORMAN, J.; MAAS, J. W.; MAAS, P. J. M. Classification of a large and widespread genus of Neotropical trees, *Guatteria* (Annonaceae) and its three satellite genera *Guatteriella*, *Guatteriosis* and *Heteropetalum*. *Taxonomy*, v. 56, p. 757-774, 2007.

FABRE, N.; CLAPAROL, C.; RICHELME, S.; ANGELIN, M-L.; FOURASTE, I.; MOULIS, C. Direct characterization of isoquinoline alkaloids in a crude plant extract by ion-pair liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry: example of *Eschscholtzia californica*. *Journal of Chromatography A*, v. 904, p. 35–46, 2000.

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

FISHER, D. C. H.; GAULDA, N. C. A.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C. S.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; ALVES, M. O.; YOGI, A.; SANTI, S. M. D.; AVILA, P. E.; KIRCHGATTER, K.; MORENO, P. P. H. In vitro screening of antiplasmodial activity isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Tropical*, v. 92, p. 261-266, 2004.

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

GRAZIOSE, R.; RATHINASABAPATHY, T.; LATEGAN C.; POULEV, A.; SMITH, P. J.; GRACE, M.; LILA, M. A.; RASKIN I. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 13, p. 26–30, 2011.

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

GRYCOVÁ, L.; DOSTÁL, J.; MAREK, R. Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, v. 68, p. 150-175, 2007.

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

GROVE, D. C.; RANDALL, W. A. *Assay Methods of Antibiotic: a Laboratory Manual*, *Medical Encyclopedia*: New York, 1955.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Aporphinoid alkaloids, III. *Journal Natural Product*. v. 46, n. 6, p. 761-835, 1983.

GUINAUDEAU, H.; BÖHLKE, M.; LIN, L. Z.; ANGERHOFER, C. K.; JONAS, P. (+)-Angchibangine, a new type of bisbenzylisoquinoline alkaloid, and other dimers from *Pachygone dasycarpa*. *Journal of natural products*, v. 60, n.3, p. 258-260, 1997.

HADI, S.; BREMNER, J.B. Initial studies on alkaloids from lombok medicinal plants. *Molecules*, v. 6, 117–129, 2001.

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

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY S.; CAVÉ A. Guattescine et guattescidine, nouveaux alcaloides aporphiniques de *Guatteria scandens*, Annonaceae. *Tetrahedron*, v. 38, n. 7, p. 911-915, 1982.

ITO, T.; OKUMA, K.; MA, X. X.; YUZAWA, H.; HIRAMATSU, K. Insights on antibiotics resistance of *Staphylococcus aureus* from its whole genome: genomic island SCC. *Drug Resistance Updates*, v. 6, n.1, p. 41-52, 2003.

IWASA, K.; MORIYASU, M.; TACHIBANA, Y.; KIM, H. S.; WATAYA, Y.; WIEGREBE, W.; BASTOW, K.F.; COSENTINO, L.M.; KOZUKA, M.; LEE, K.H. Simple isoquinoline and benzylisoquinoline alkaloids as potential antimicrobial, antimalarial, cytotoxic, and anti-HIV agents. *Bioorganic Medicinal Chemical*, v. 9, p. 2871–2884, 2001.

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

JORDÃO, F. M. *Caracterização Bioquímica da Biossíntese de Tiamina (Vitamina B1) em Plasmodium falciparum*. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, 2007, 89 p.

JÚNIOR, E. OMS afirma que malária matou 627 mil pessoas no mundo em 2012. Site <http://envolverde.com.br/saude/oms-afirma-que-malaria-matou-627-mil-pessoas-mundo-em-2012/>. *Envolverde Jornalismo e sustentabilidade*. Acessado em 11 de janeiro de 2014.

KNEZEVIC, S. Z.; STREIBIG, J. C.; RITZ, C. "Utilizing R software package for dose-response studies: the concept and data analysis." *Weed Technology*, v. 21, n. 3, p. 840-848, 2007.

KESSLER, P. J. A. Annonaceae. *In*: Kubitski, K., Rohwer, J. C., Bittrich, V. (eds.). The families and genera of vascular plants II: Flowering plants. Dicotyledons. Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid families, Springer-Verlag, Berlin, p. 93-129, 1993.

KHAN, M.R.; KORNINE, K.; OMOLOSO, A.D. Antibacterial activity of some Annonaceae, Part 1. *Fitoterapia*, v. 69, p. 367–369, 1997.

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

KONCAREVIC, S.; BOGUMIL, R.; BECKER, K. SELDI-TOF-MS analysis of chloroquine resistant and sensitive *Plasmodium falciparum* strains. *Proteomics*, v. 7, p. 711-721, 2007.

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

LEAMAN, D. J.; ARNASON, J. T.; YUSUF, R.; SANGAT-ROEMANTYO, H.; SOEDJITO, H.; ANGERHOFER, C. K.; PEZZUTO, J.M. Malaria remedies of the Kenyah of the Apo Kayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: a quantitative assessment of local consensus as an indicator of biological efficacy. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 49, p. 1–16, 1995.

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

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

LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CORDELL, G. A.; PEZZUTO, J. M. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 30-38, 1993a.

LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C. K.; CHAI, H.; PEZZUTO, J. M.; CORDELL, G. A.; RUANGRUNGSI, N. Cytotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *Journal of Natural Products*, v. 56, p. 1468–1478, 1993b.

LIU, XIAO-XI, ALALI, F. Q.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J.L. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 815–821, 1999.

LJUNGSTRÖM, I.; PERLMANN H.; SCHICHTERLE, M.; SCHERF A.; WAHLGEN M. *Methods in Malaria Research*, editora MR4/ATCC 4th ed., Manassas, Virginia, 2004, 130 p.

LOPES, A. C. *Diagnóstico e Tratamento*. Editora Manole, v. 2, 2006, 1245p.

MAAS, P. J. M.; MAAS, H.; MIRALHA, J. M. S.; JUNIKKA, L. Flora da reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. *Rodriguésia* v. 58, p. 617-662, 2007.

MAAS, P.J. M.; WESTRA, L.Y. T.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Q.; ERKENS, R.H.J. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. *Nordic Journal Botany*, v. 29, p. 257-356, 2011.

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

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

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

MARTIN, R. E.; MARCHETTI, R. V.; COWAN, A. I.; HOWITT, S. M.; BRÖER S.; KIRK, K. Chloroquine transport via the malaria parasite's chloroquine resistance transporter. *Science*, v. 325, p. 1680-1682, 2009.

MATTOS, F. J. A. *Introdução a fitoquímica experimental*. 2a ed. Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1997, 141p.

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

MULLER, I. B.; HYDE, J. E. Folate metabolism in human malaria parasites—75 years on. *Molecular & Biochemical Parasitology*, v. 188, p. 63–77, 2013.

MUELLER, I.; GALINSKI, M. R.; BAIRD, J. K.; CARLTON, J. M.; KOCHAR, D. K.; ALONSO, P. L.; DEL PORTILLO, H. A. Key Gaps in the Knowledge of *Plasmodium vivax*, a Neglected Human Malaria Parasite. *Lancet Infect Dis*, v. 9, p. 555-566, 2009.

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

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

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

MURILO, J.; RESTREPO, D. Las anonáceas de la región de Araracuara. *Estudios en la Amazonía Colombiana XX Soporte Editorial*, Bogotá, 2000, 218p.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G.L. Antibacterial activity of extracts and phytochemicals antibiotic-resistant bacteria. *Brazilian Journal Microbiol*, v. 31, p. 247- 256, 2000.

NASCIMENTO, M. C. B. S. Tese de Doutorado. Constituintes Bioorgânicos Isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e Avaliações de Bioatividades. Universidade Federal Rural de Rio de Janeiro, Fevereiro de 2008, 197p.

NEVES, D. P. *Parasitologia Humana*. Editora Atheneu, Rio de Janeiro, 12 Ed., 2012, 576p.

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

O'CONNELL, M. A.; BELANGER, B. A.; HAALAND, P. D. Calibration and assay development using the four-parameter logistic model. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, v. 20, n. 2, p. 97-114, 1993.

ODUGBEMI, O. T.; AKENSULIRE, R.O.; AIBINU, E. I.; FABEKU, O.P. Medicinal plants used for malaria therapy in Okeigbo, ondo State, Southwest of Nigeria. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, v. 4, 191–198, 2007.

OKELL, L. C.; DRAKELEY, C. J.; BOUSEMA, T.; WHITTY, C. J.; GHANI, A. C. Modelling the Impact of Artemisinin Combination Therapy and Long-Acting Treatments on Malaria Transmission intensity. *Plos Medicine*, v. 5, p. 226, 2008.

OLIVEIRA, 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 excellens*. 29^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, Águas de Lindóia, 2006.

ORDÓÑEZ, M. G.; JORGE, M. R.; SIMÓN, G. G.; RANGEL, C. L. Actividad antimicrobiana Del aceite esencial y crema de *Cymbopogon citratus* (DC). *Stapf. Revista Cubana de Plantas Medicinales*, v. 9, n. 2, p. 0-0, 2004.

ORTIZ, A. A.; SUAREZ, L. E. C.; PATIÑO, G. S. Aporfinoides en hojas de *Oxandra longipetala* R. E. FR. (Annonaceae). *Scientia et Technica*, vol. XIII, n. 33, p. 19-22, 2007.

OSORIO, 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 Ethnopharmacol*, v. 111, p. 630–635, 2007.

OSORIO, E. J.; BERKOV, S.; BRUN, R.; CODINA, C.; VILADOMAT, F.; CABEZAS, F.; BATISTA, J. In vitro activity of alkaloids from *Phaedranassa dúbia* (Amaryllidaceae). *Phytochemistry Letters*, v. 3, p. 161-163, 2010.

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

PAULO, M. DE Q.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; BARBOSA, R. DE C. B. B. C.; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity, of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii*. *D. C. Journal of Ethnopharmacology*, v. 36, p. 39-41, 1992.

PELLETIER, S. W. Alkaloids: Chemical and biological perspectives; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; WATERMAN, P. G., eds.; John Wiley & Sons: Georgia, cap. 3, 1987.

PHILLIPSON, J. D.; WRIGHT, C. W. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents. *Journal Ethnopharmacol*, v. 32, p. 155–165, 1991.

PIMENTA, L. P. S. Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora* objetivando o isolamento de acetogeninas tetra-hidrofurânicas. Tese de Doutorado em Ciências-Química (UFMG), 1995.

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

PRESCOT, L. M.; HARLEY, J. P.; KLEIN, D. A. *Microbiology*, 5ed. EUA: The McGraw Hill Companies, p. 819-820, 2002.

QUEIROZ, E. F.; ROBLLOT, F.; CAVE, A.; PAULO, M. Q.; FOURNET, A. Pseudo and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products* v. 59, p. 438–440, 1996.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (*Annonaceae*): inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. *Annalen des Museus Naturhistorisches Wien* 108B, p. 191-205, 2007.

RAKOTOMANGA, M.; RAZAKANTOANINA, V.; RAYNAUD, S.; LOISEAU, P. M.; HOCQUEMILLER, R.; JAUREGUIBERRY, G. Antiplasmodial activity of acetogenins and inhibitory effect on *Plasmodium falciparum* adenylate translocase. *Journal of Chemotherapy*, v. 16, p. 350–356, 2004.

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, 1999, 816 p.

RINALDI, M. V. N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. Dissertação de mestrado, São Paulo – SP, 2007, 125 p.

ROCHA, M. O. C.; PEDROSO, E. R. P. Fundamentos em Infectologia. Editora Rubia Ltda, 2009.

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

SAEZ, A.; BLAIR, S.; SAEZ, J. Aporfinoides en corteza de *Guatteria lehmannii* y evaluación de su actividad antimalárica *in vitro*. *Revista Colombiana de Química*, v. 26, n. 1, 1997.

SÁNCHEZ, M. Catálogo preliminar comentado de la flora Del Medio Coquetá. *Estudios en la Amazônia Colombiana XII Impreandes Presencia*, Bogotá, 1997, 557 p.

SANCHEZ, B. A. M. Plasmódios transfectados com a proteína de fluorescência verde (gfp) para ensaios de quimioterapia experimental. *Dissertação de Mestrado em Ciências do Ambiente na Área de Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Belo Horizonte - MG, 2007.

SANTOS, A. F.; SANTÁNA, A. E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine*, v. 8, p. 115–120, 2001.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto Contexto Enfermagem*, v. 13, p. 64-70, 2004.

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

SENER, B.; ORHAN, I.; SATAYAVIVAD, J. Antimalarial activity screening of some alkaloids and the plant extracts from Amaryllidaceae. *Phytotherapy Research*, v. 17, p. 1220–1223, 2003.

SHI, G.; MACDOUGAL, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, v. 45, n. 4, p.719-723. 1997.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E. V. Desrepliação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterioides* por ESI-IT-MS. *Química Nova*, v. 35, n. 5, p. 944-947, 2012.

SINKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 8022-8028, 1993.

SINKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological Reviews*, v. 59, p. 201-222, 1995.

STEELE, J. C. P.; SIMMONDS, M. S. J.; VEITCH, N. C.; WARHURST, D. C. Evaluation of the Anti-Plasmodial Activity of Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Medica*, v. 65, n. 5, p. 413-416, 1999.

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

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

TORRES, O.; SANTAFE, G.; ÂNGULO, A.; VILLA, H.; ROJANO, B.; SAEZ, J.; MONTAÑO, M.; GALEANO, P. Estudio químico y obtención de principios activos de la especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae) del alto sinu. *Scientia et Technica*, v. 13, n. 33, p. 55-58, 2007.

TOSCAN, C. M. Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenoides. Dissertação de mestrado em biotecnologia. Caxias do Sul, 2010, 84p.

TOZONI, D.; ZACARIA, J.; VANDERLINDE, R.; DELAMARE, A. P. L.; ECHEVERRIGARAY, S. Degradation of citronellol, citronellal and citronellyl acetate by *Pseudomonas mendocina* IBPse 105. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 13, p. 1-7, 2010.

TSABANG, N.; FOKOU, P. V. T.; TCHOKOUAHA, L. R. Y.; NOGUEM, B.; BAKARNGA-VIA, I.; NGUEPI, M. S. D.; NKONGMENECK, B. A.; BOYOM, F. F. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, p. 171-180, 2012.

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

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

VERONESI-FOCACACCIA, R. Tratado de Infectologia. 4 Edição Revista e Atualizada, Editora Atheneu, São Paulo, 2009.

WAFU, P.; NYASSE, B.; FONTAINE, C. A 7,8-dihydro-8-hydroxypalmatine from *Enantia chlorantha*. *Phytochemistry*, v. 50, p. 279-281, 1999.

WELLS, T. N.; BURROWS, J. N.; BAIRD, J. K. Targeting the hypnozoite reservoir of *Plasmodium vivax*: the hidden obstacle to malaria elimination. *Trends Parasitology*, v. 26, p. 145-151, 2010.

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

WHITE, N. J. *Plasmodium knowlesi*: the fifth human malaria parasite. *Clinical Infectious Diseases*, v. 46, p. 172-173, 2008.

WHO, World Health Organization 2006. Guidelines for the treatment of malaria. Disponível em: <http://apps.who.int/malaria/docs/TreatmentGuidelines2006.pdf>. Acessado em: 29/out/2012.

WHO, World Health Organization 2009. Guidelines for the treatment of malaria, 2 ed. Disponível em: http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241547925_eng.pdf. Acessado em: 29/out/2012.

WHO, World Health Organization. World Malaria Report 2013. Geneva, 284 p., 2013.

WIRASATHIEN, L.; BOONARKART, C.; PENGSUPARP, T.; SUTTISRI, R. Biological activities of alkaloids from *Pseuduvaria setosa*. *Pharmaceutical Biology*, v. 44, p. 274-278, 2006.

WILLCOX, M. L.; BODEKER, G. Traditional herbal medicines for malaria. *British Medical Journal* 329, p. 1156-1159, 2004.

WONG, H.F.; BROWN, G. D. β -Methoxy- γ -methylene- α,β -unsaturated- γ -butyrolactones from *Artabotrys hexapetatus*. *Phytochemistry*, v. 59, p. 99-104, 2002.

WONGSRICHANALAI, C.; PICKARD, A. L.; WERNSDORFER, W. H.; MESHNICK, S. R. Epidemiology of drug-resistant malaria. *The Lancet Infectious Diseases*, London, v. 2, p. 209-218, 2002.

WOODROW, C. J.; KRISHNA, S. Antimalarial drugs: recent advances in molecular determinants of resistance and their clinical significance. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 63, n. 14, p. 1586–1596, 2006.

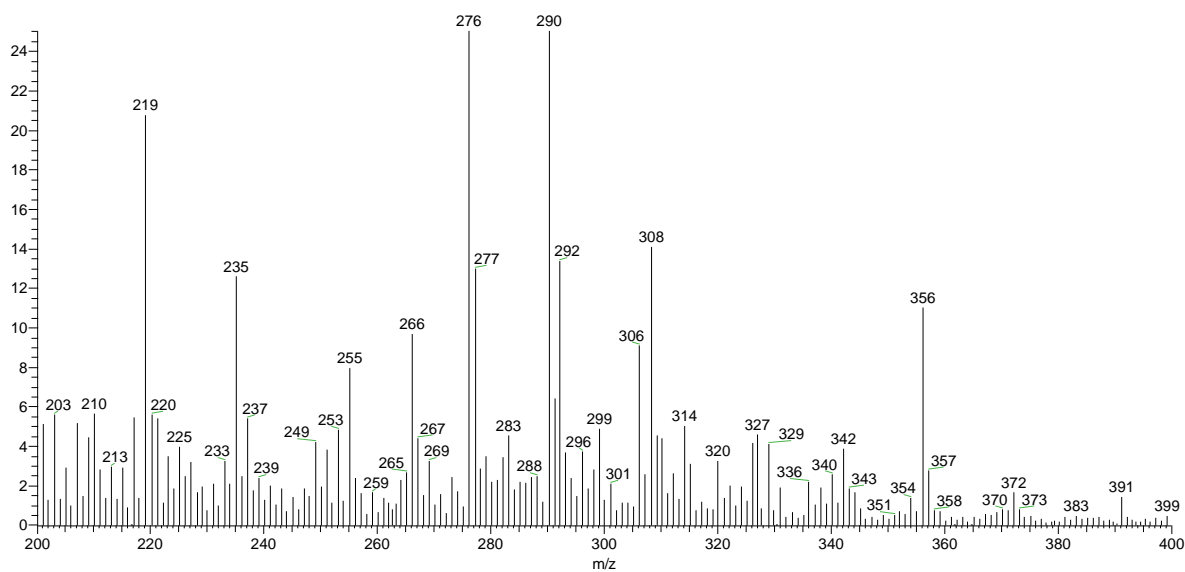
WRIGHT, C. W.; MARSHALL, S. J.; RUSSELL, P. F.; ANDERSON, M. M.; PHILLIPSON, J. D.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; SCHIFF, P. L. In vitro antiplasmodial, antiamebic, and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. *Journal of Natural Products*, v. 63, p. 1638-1640, 2000.

YEH, S. H.; CHANG, F. R.; WU, Y. C.; YANG, Y. L.; ZHUO, S. K.; HWANG, T. L. An anti-inflammatory ent-kaurane from the stems of *Annona squamosa* that inhibits various human neutrophil functions. *Planta Medica*, v. 71, p. 904–909, 2005.

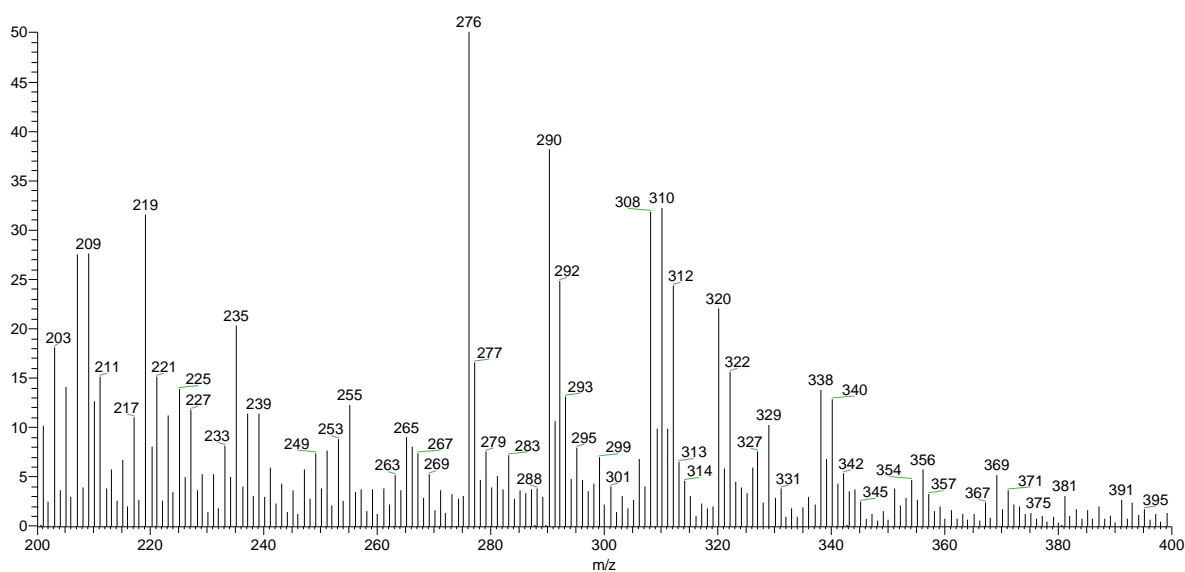
ZENG, L.; YE, Q.; OBERLIES, N. H.; S. H. I. G.; CU, Z.-M.; HE, K. Recent advances in annonaceous acetogenins. *Natural Products Reports*, v. 13, p. 275–306, 1996.

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

ANEXOS: ESPECTROS

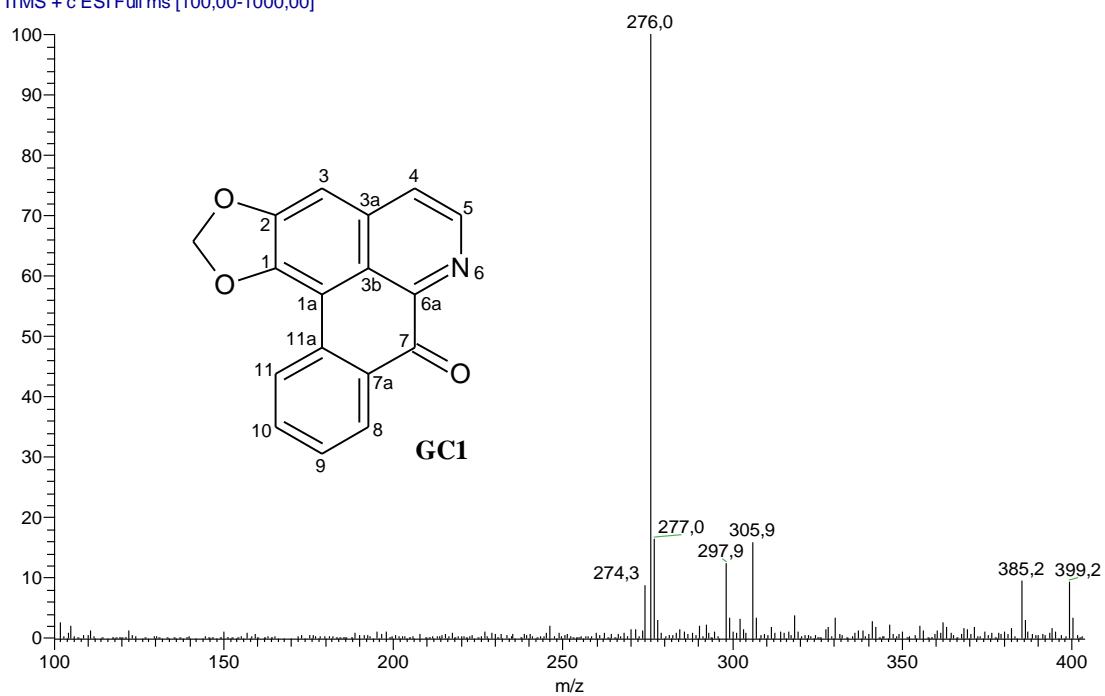


Espectro 1: Espectro de ESI-MS em modo positivo da FAG.

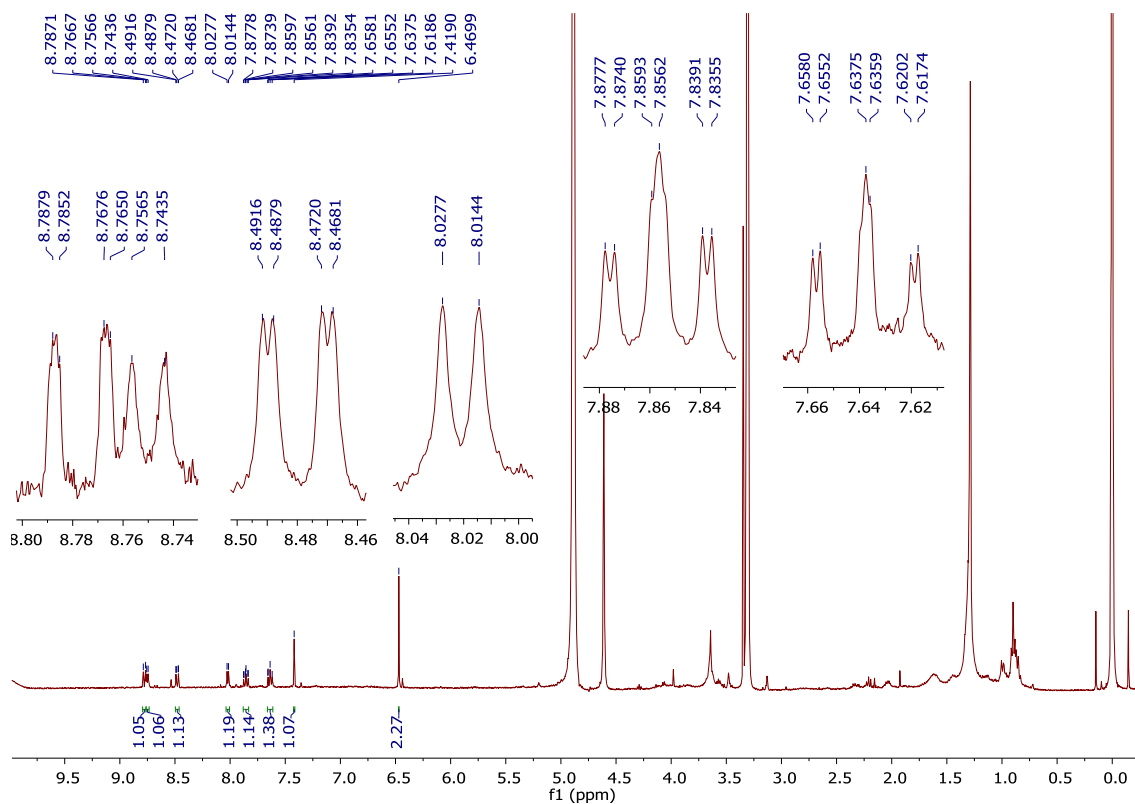


Espectro 2: Espectro de ESI-MS em modo positivo da FAF.

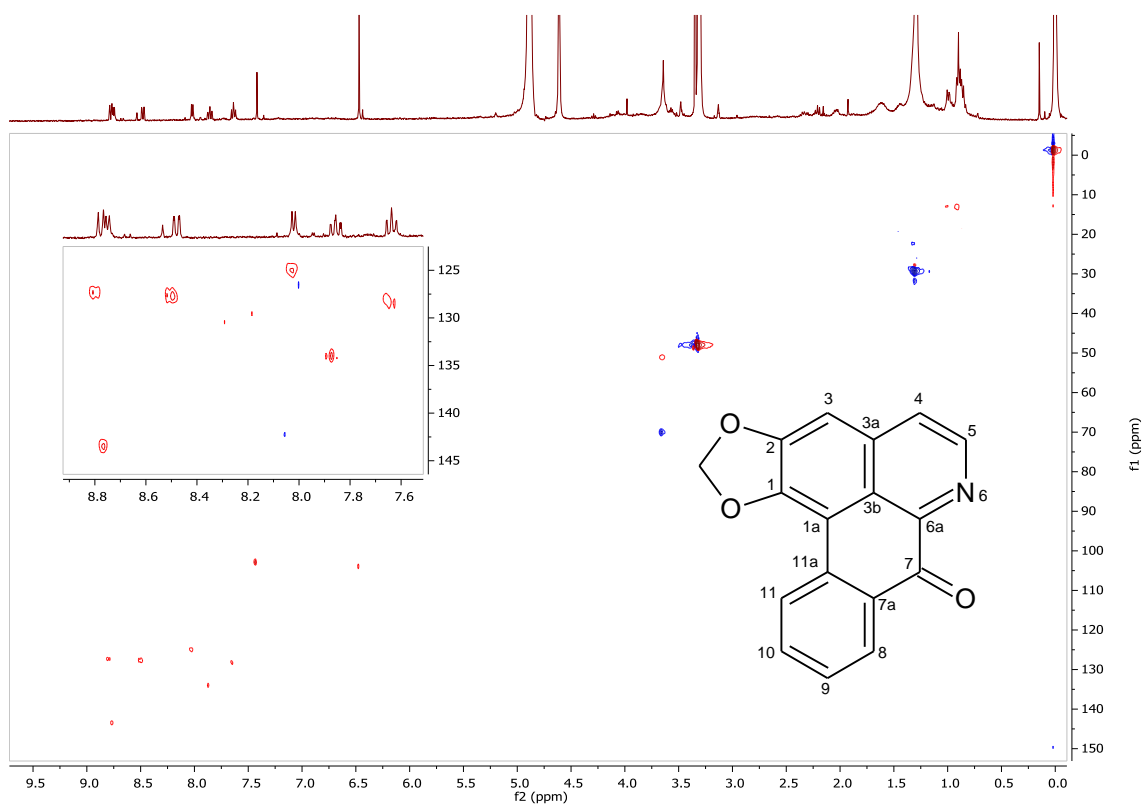
Diego0208 #58 RT: 0,69 AV: 1 NL: 3,12E4
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



Espectro 3: Espectro *fullscan* de ESI-MS obtido em modo positivo do composto **GC1**.

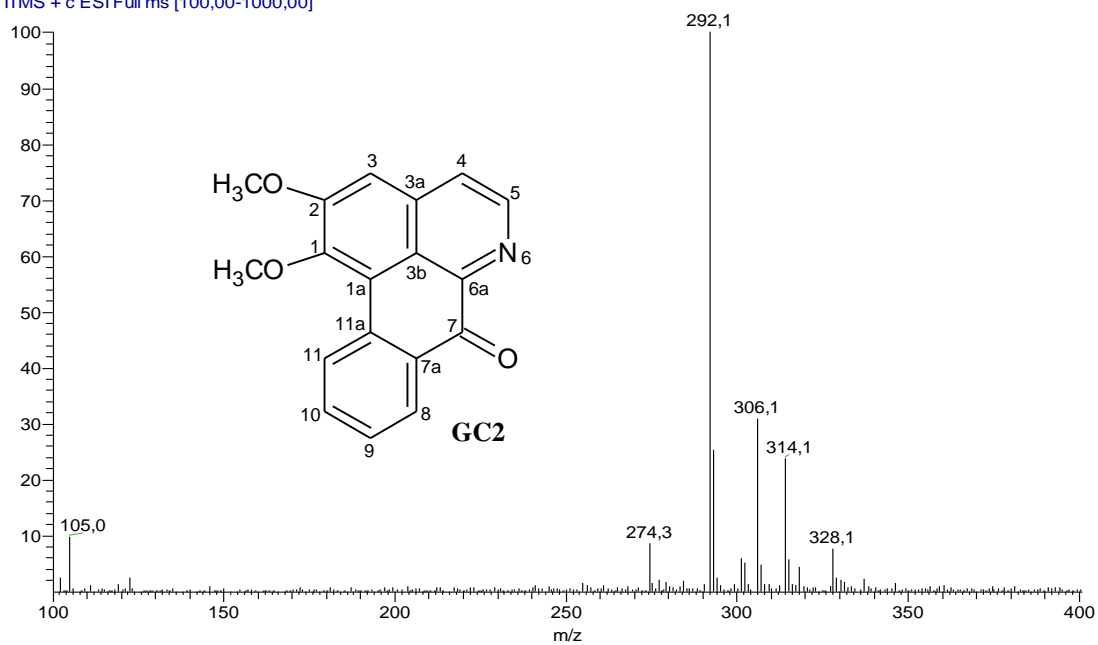


Espectro 4: Espectro de RMN ¹H (600MHz, CD₃OD) do **GC1**.



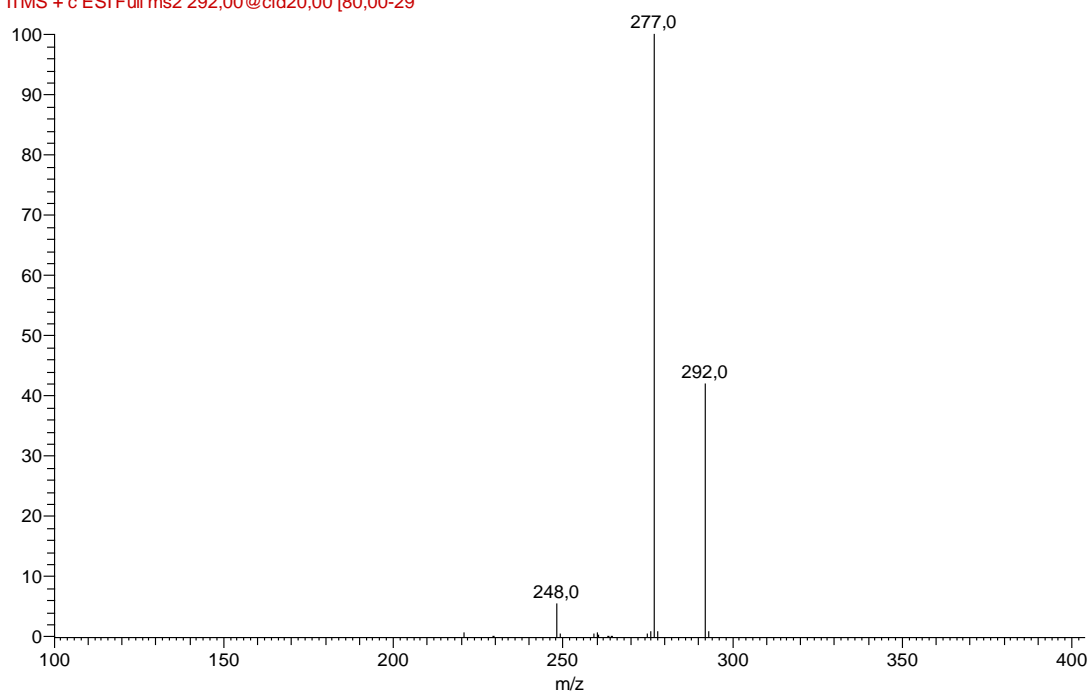
Espectro 5: Mapa de correlação HSQC do composto **GC1**.

Diego0208 #507 RT: 6,13 AV: 1 NL: 3,18E3
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



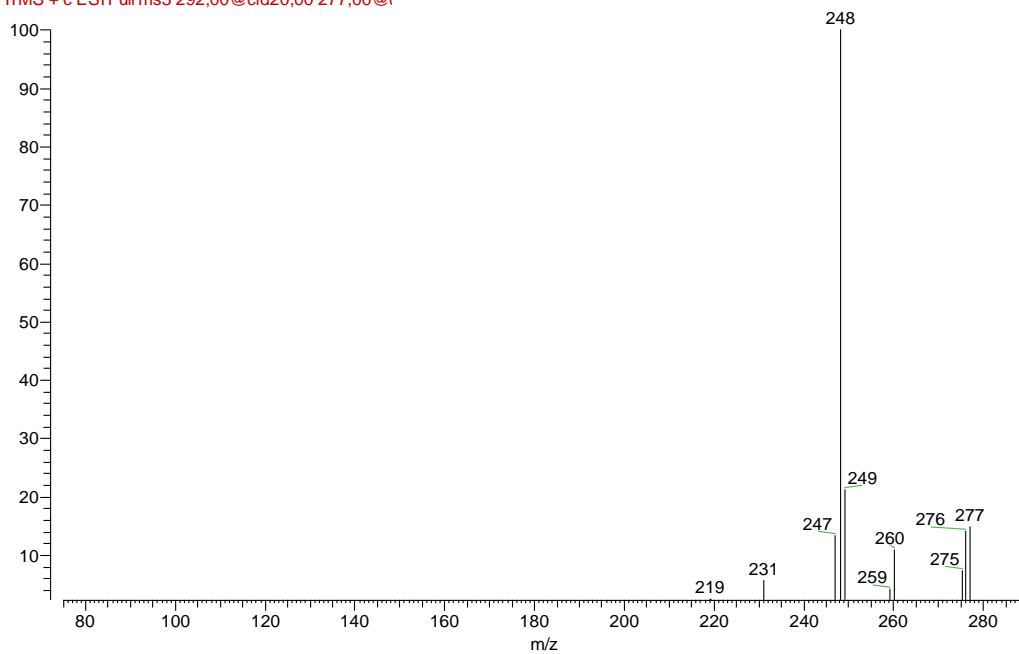
Espectro 6: Espectro de ESI-MS obtido em modo positivo do composto do **GC2**.

31msms.292 #580 RT: 9,47 AV: 1 NL: 8,92E3
F: ITMS + c ESI Full ms2 292,00@cid20,00 [80,00-29

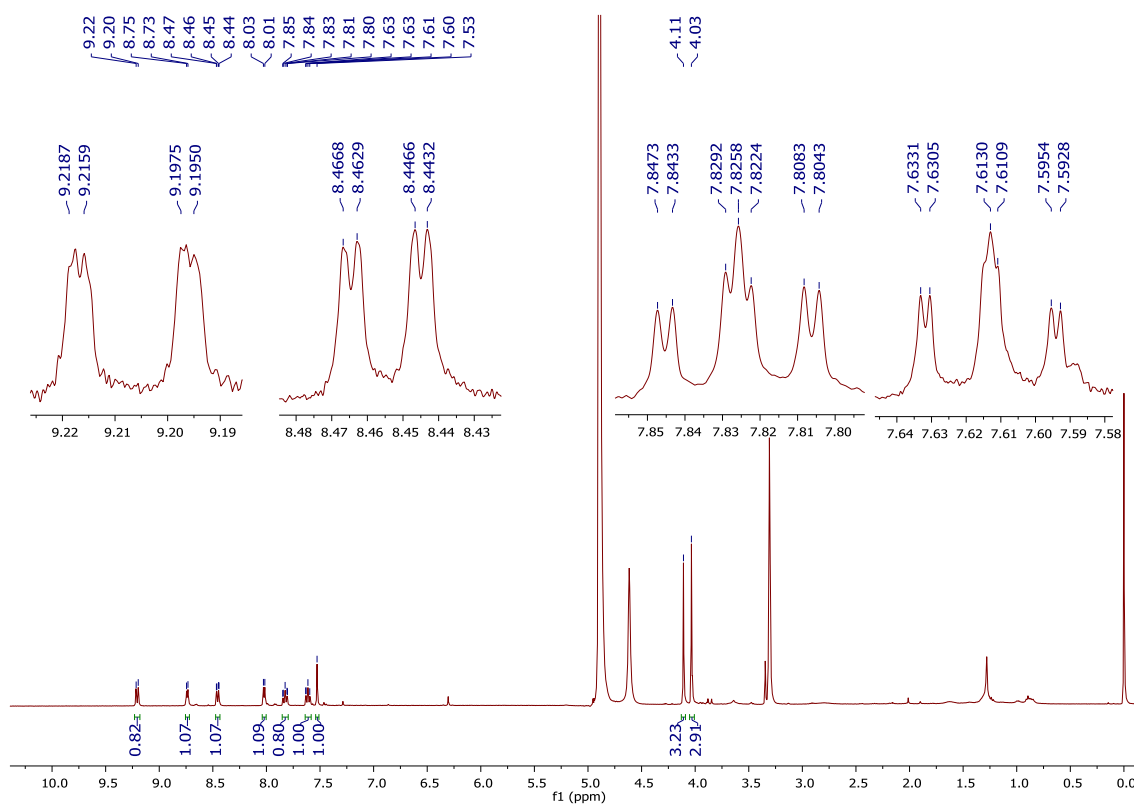


Espectro 7: Espectro de massa MS² obtido em modo positivo do GC2.

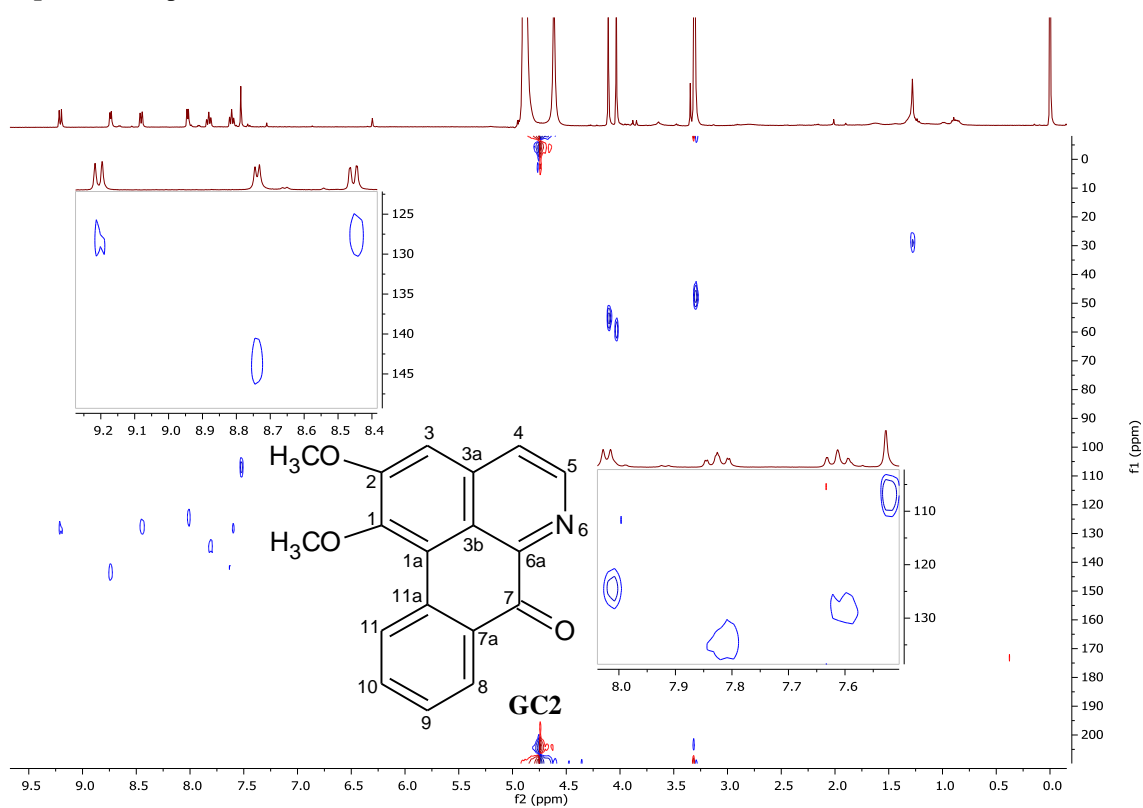
31msms.292 #706 RT: 11,46 AV: 1 NL: 2,59E2
F: ITMS + c ESI Full ms3 292,00@cid20,00 277,00@ci



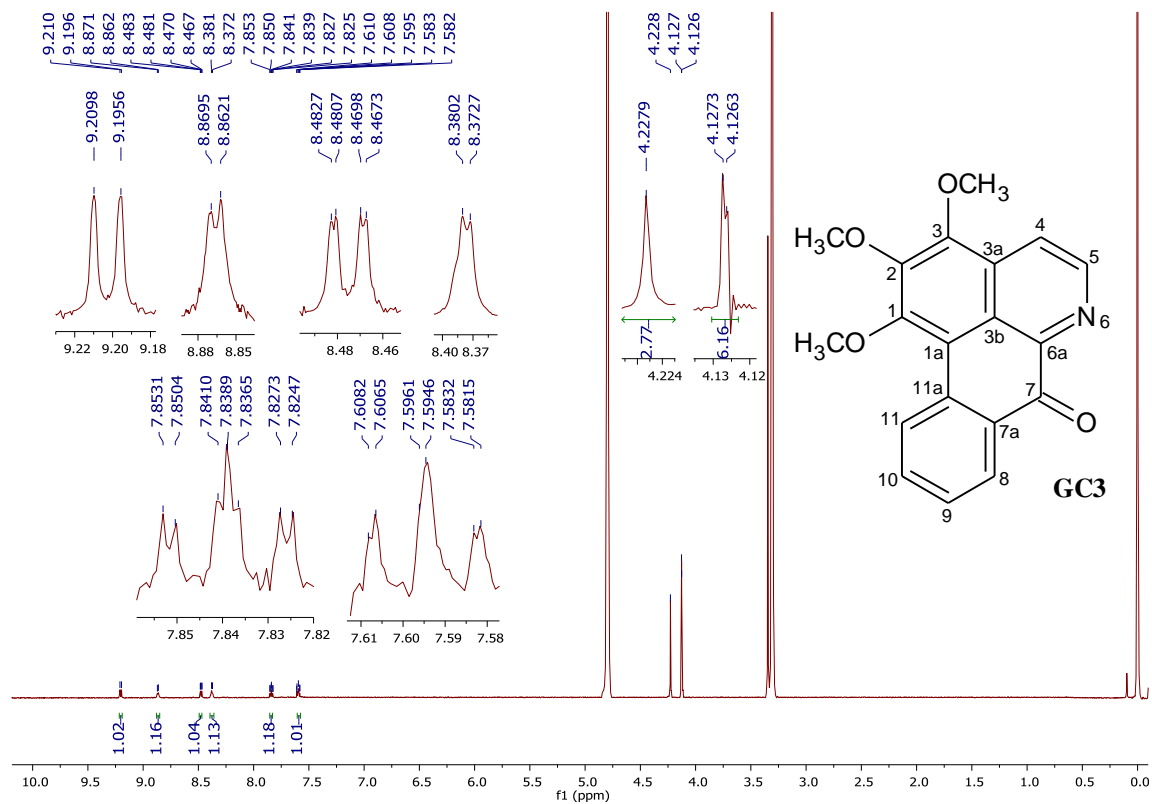
Espectro 8: Espectro de massa MS³ obtido em modo positivo do GC2.



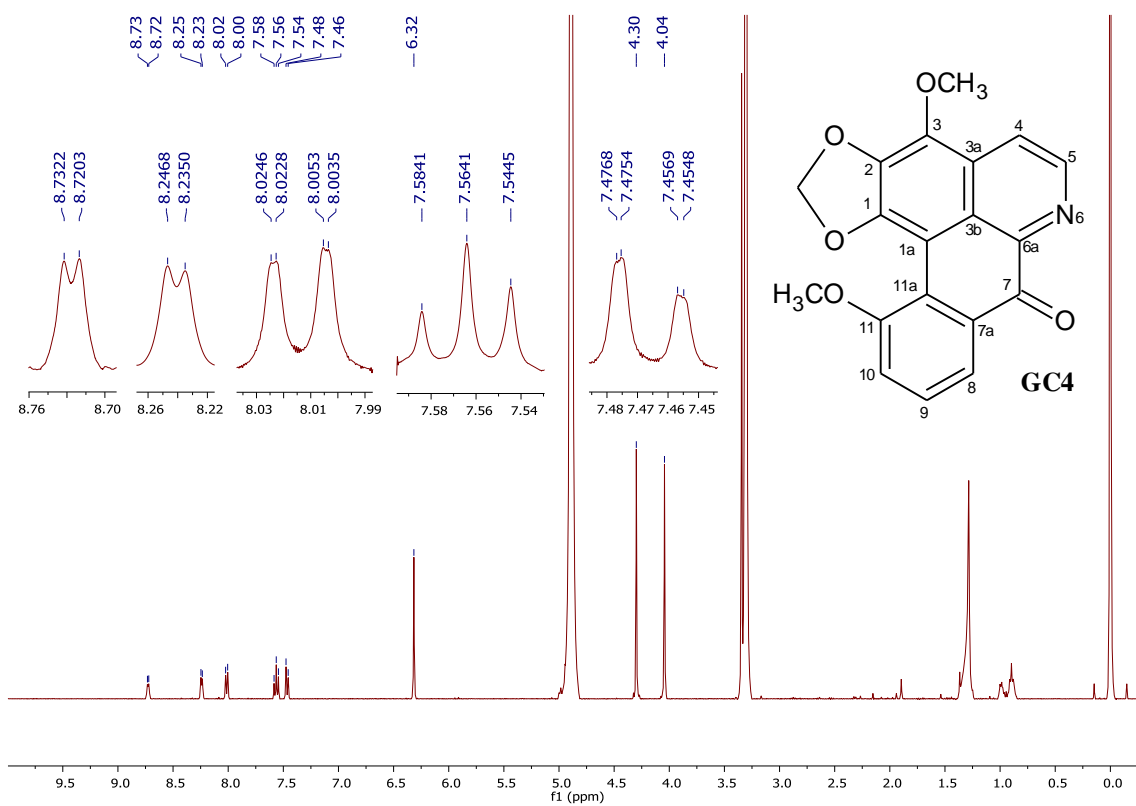
Espectro 9: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do GC2.



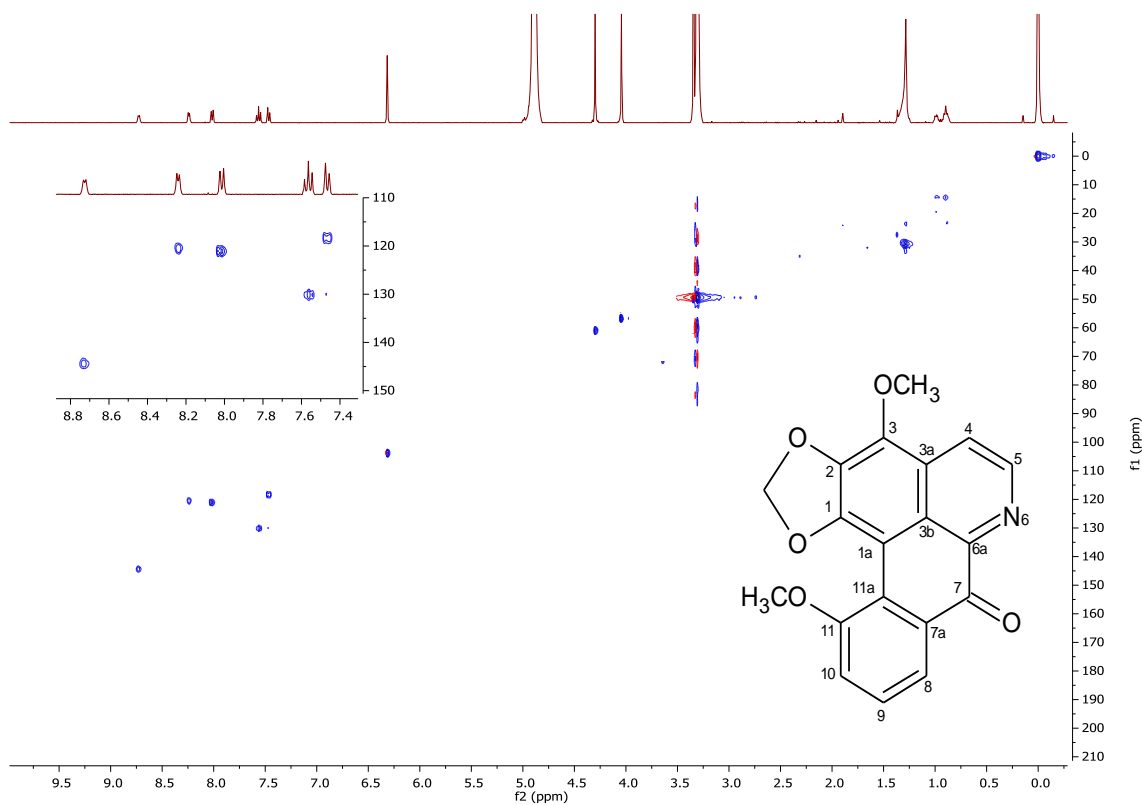
Espectro 10: Mapa de contorno HSQC do GC2.



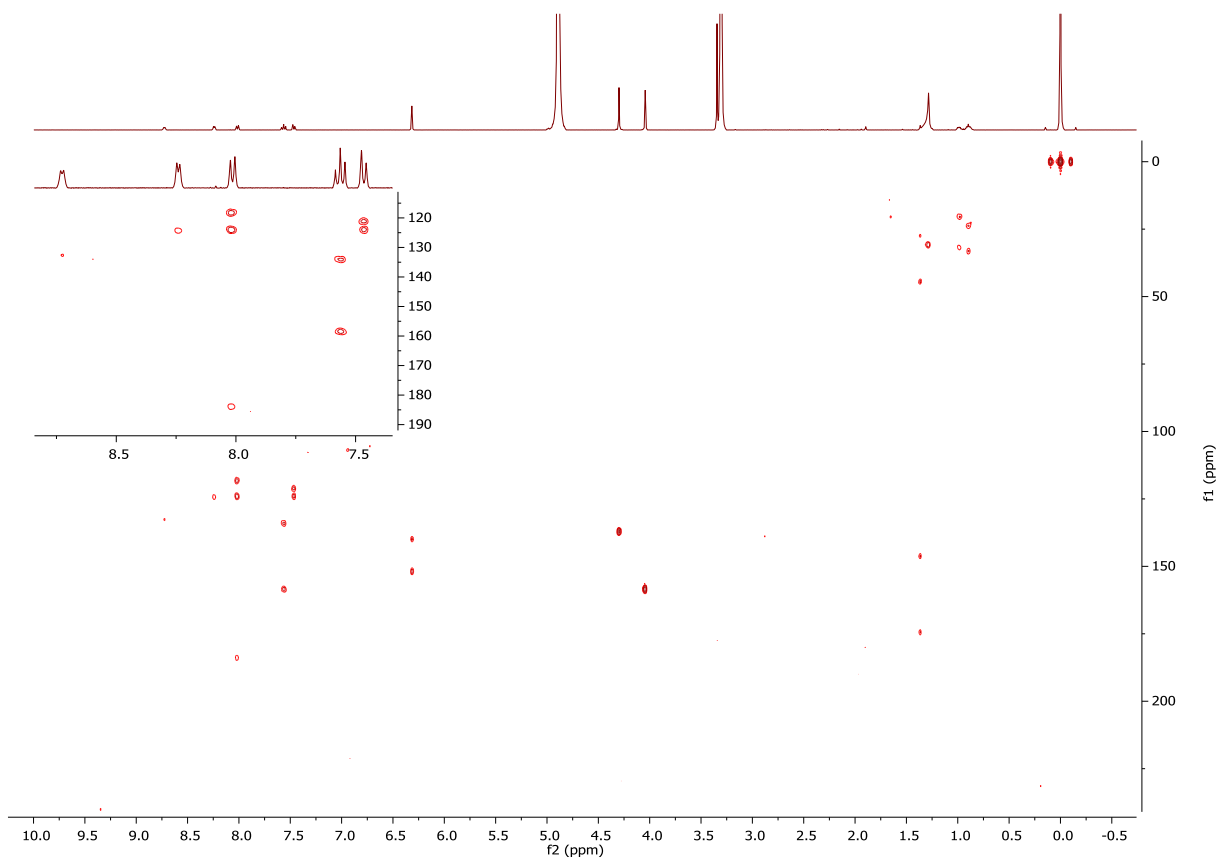
Espectro 11: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) do GC3.



Espectro 12: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) do GC4.

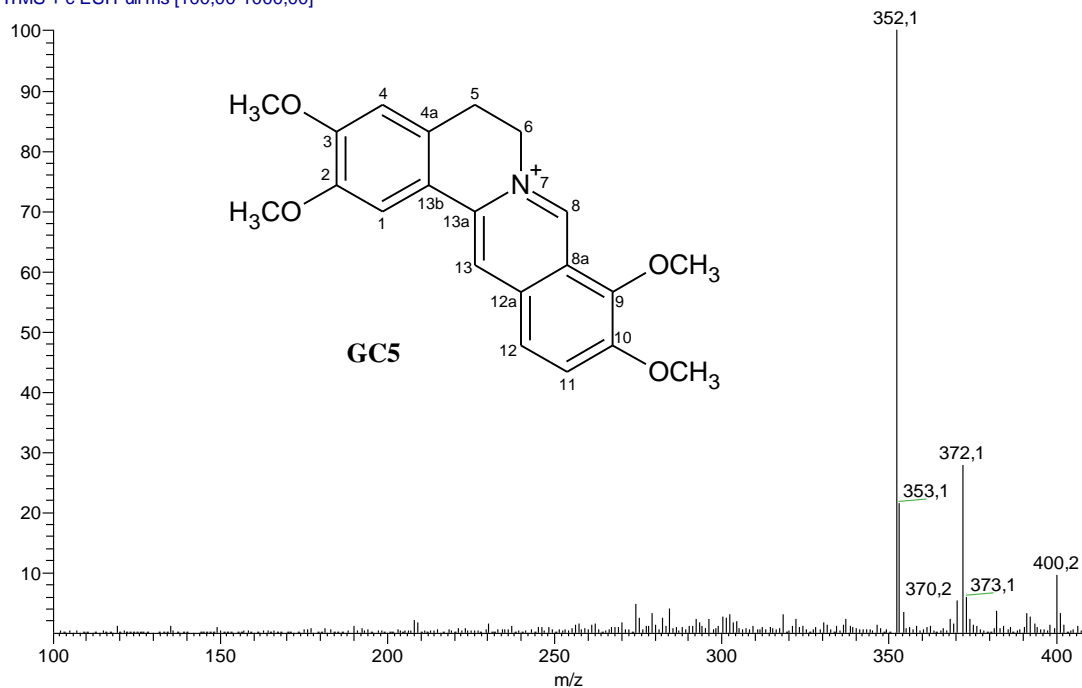


Espectro 13: Mapa de contorno HSQC do GC4.

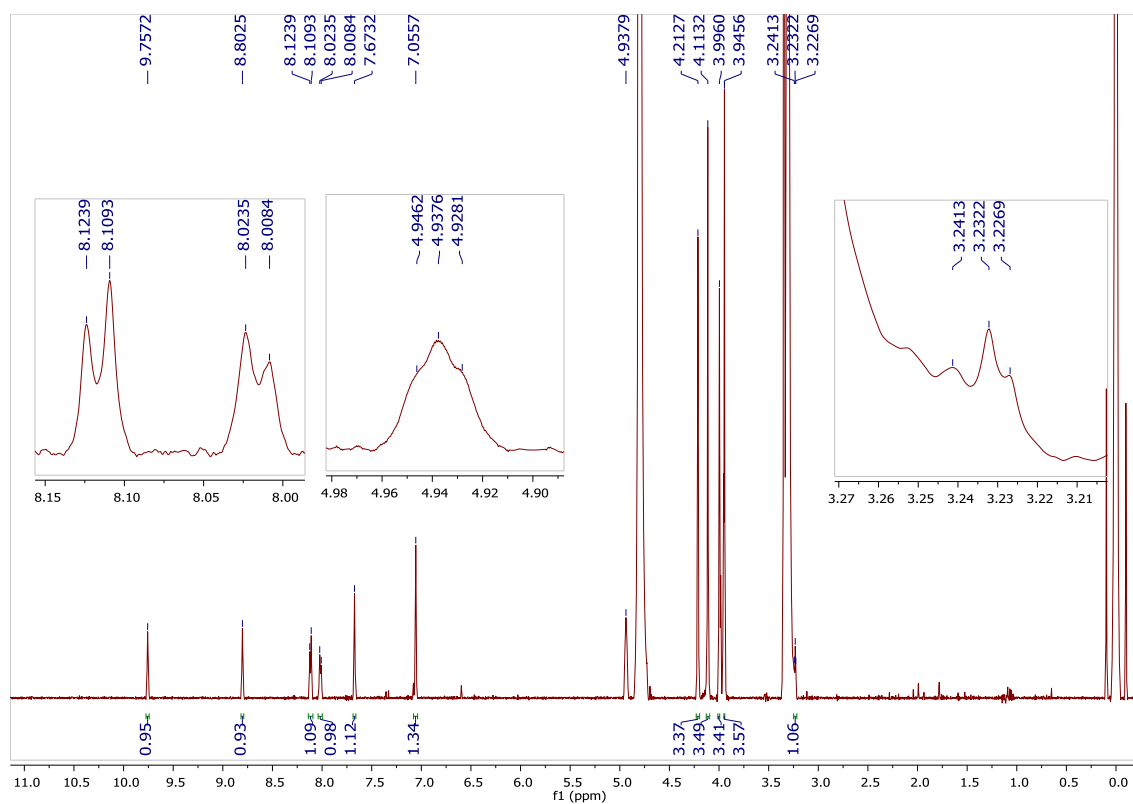


Espectro 14: Mapa de contorno HMBC do GC4.

DIEGO3007 #566 RT: 5,75 AV: 1 NL: 1,12E4
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]

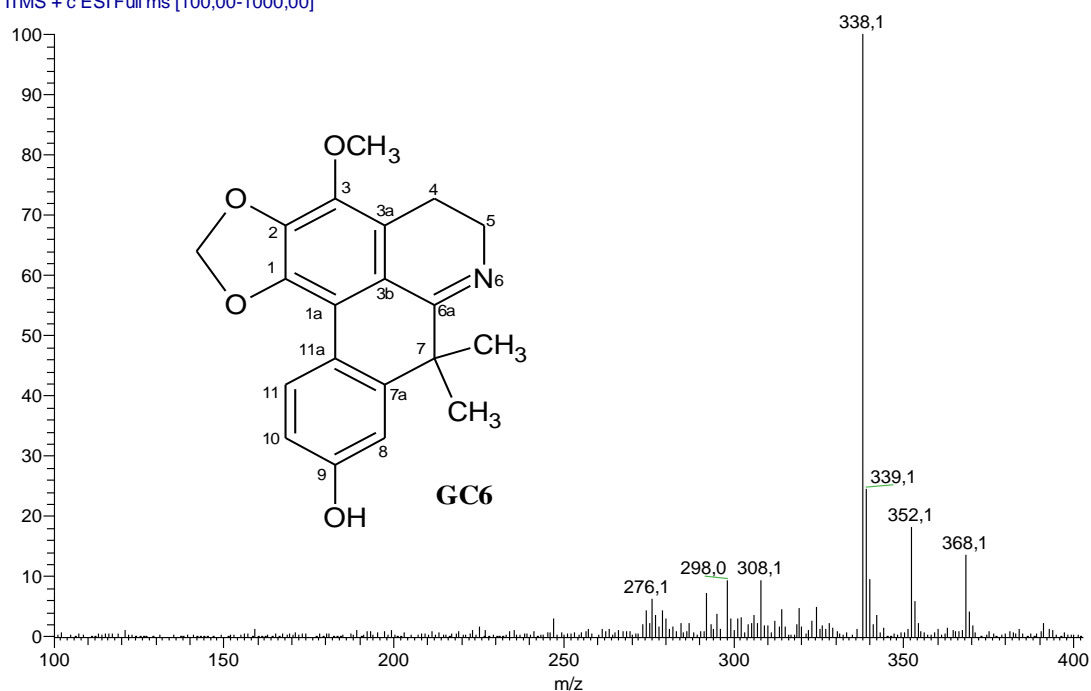


Espectro 15: Espectro de ESI-MS obtido em modo positivo do composto **GC5**.

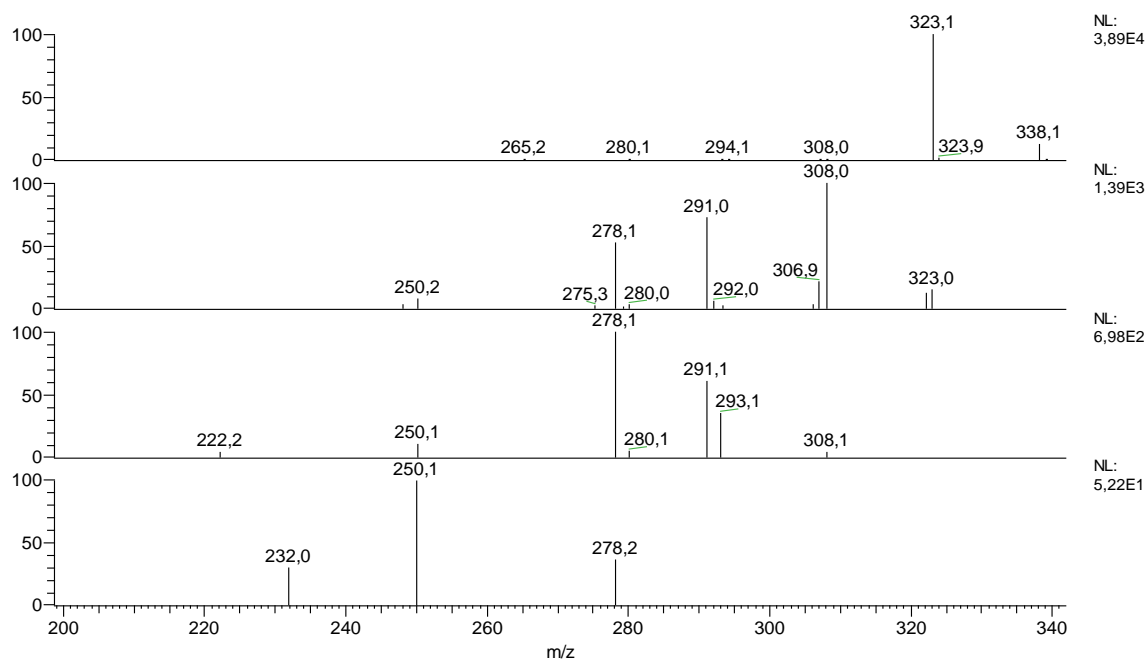


Espectro 16: Espectro de RMN de ^1H (600 MHz, CD_3OD) do **GC5**.

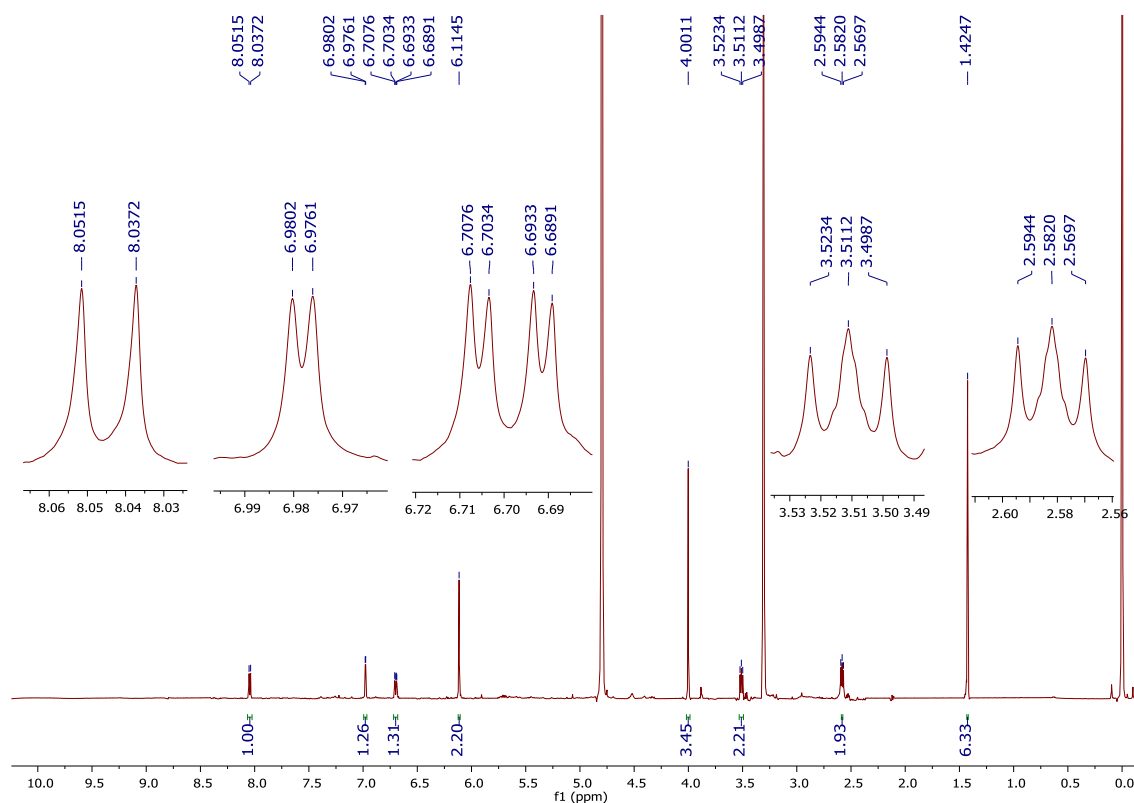
DIEGO3007 #1301 RT: 16,20 AV: 1 NL: 1,66E3
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



Espectro 17: Espectro de ESI-MS obtido em modo positivo do composto **GC6**.

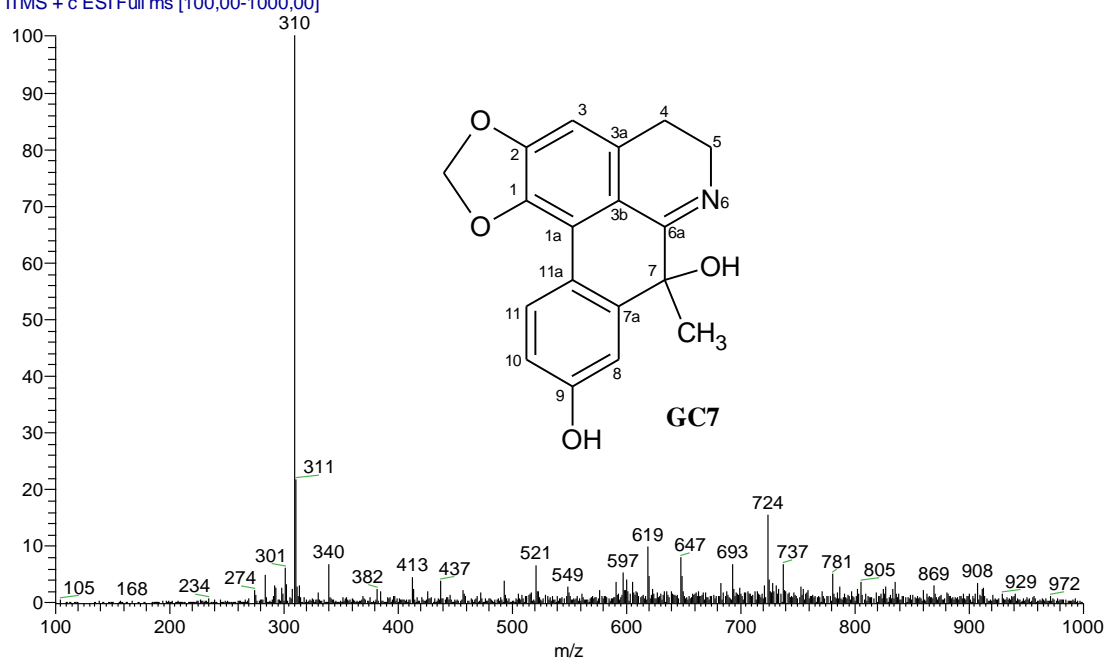


Espectro 18: Espectro de massa MS^5 obtido em modo positivo do **GC6**.

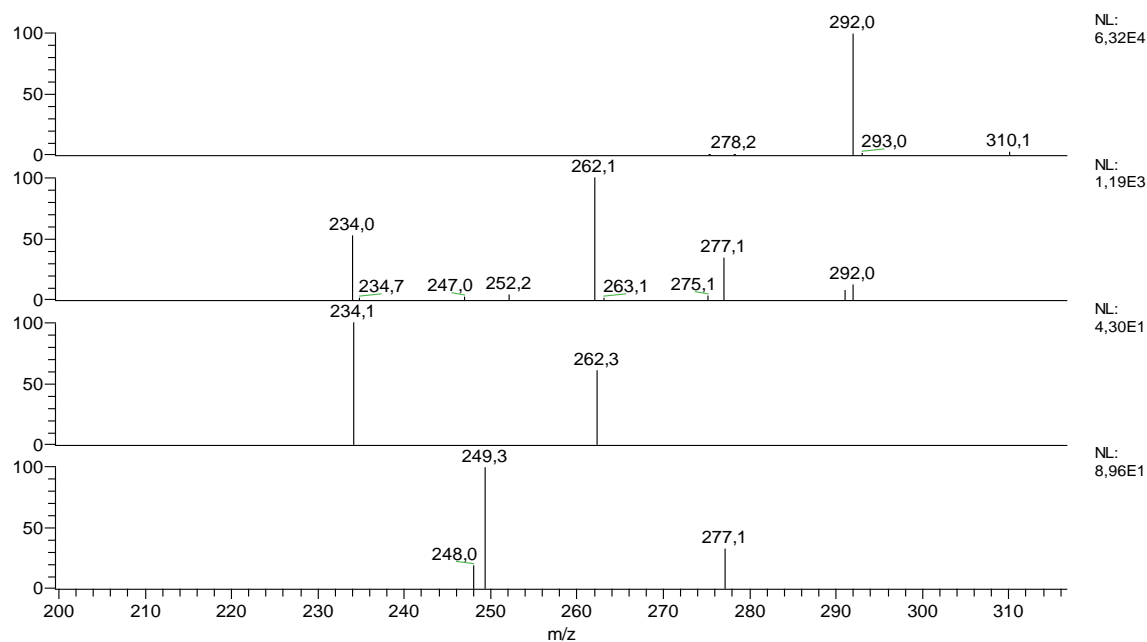


Espectro 19: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) do GC6.

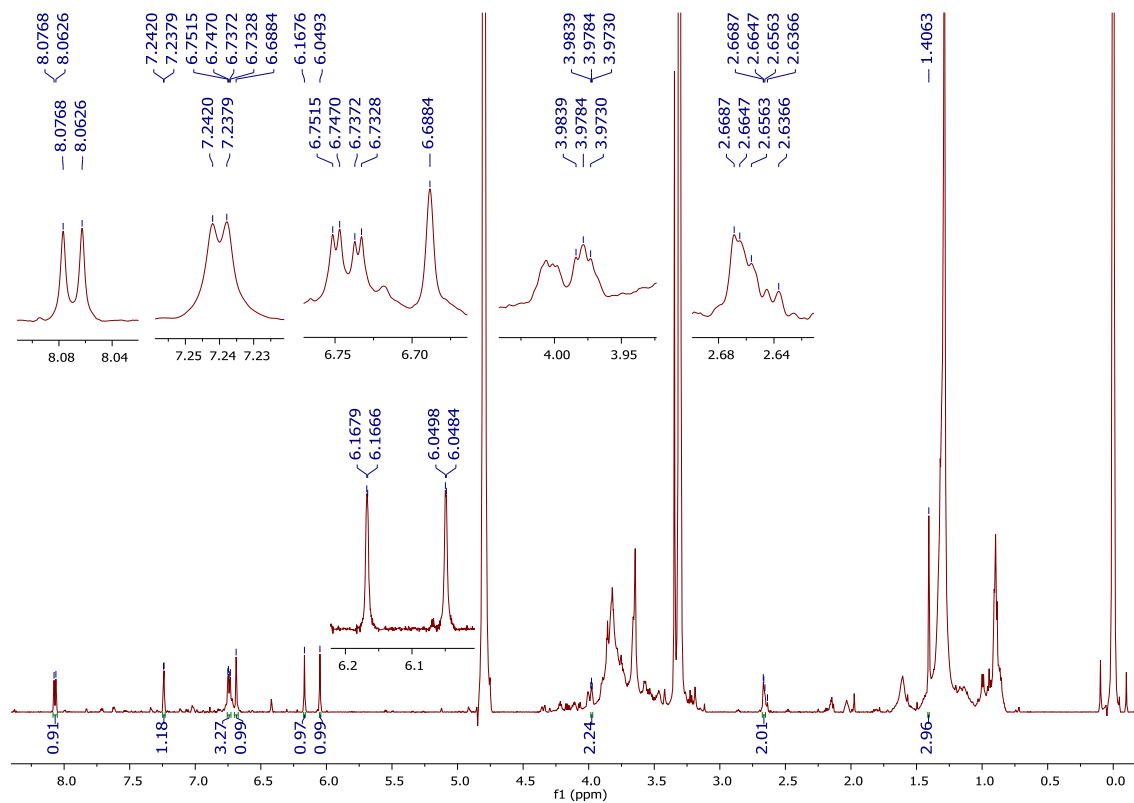
Diego0208 #1686 RT: 20,90 AV: 1 NL: 7,30E4
T: ITMS + c ESI Full ms [100,00-1000,00]



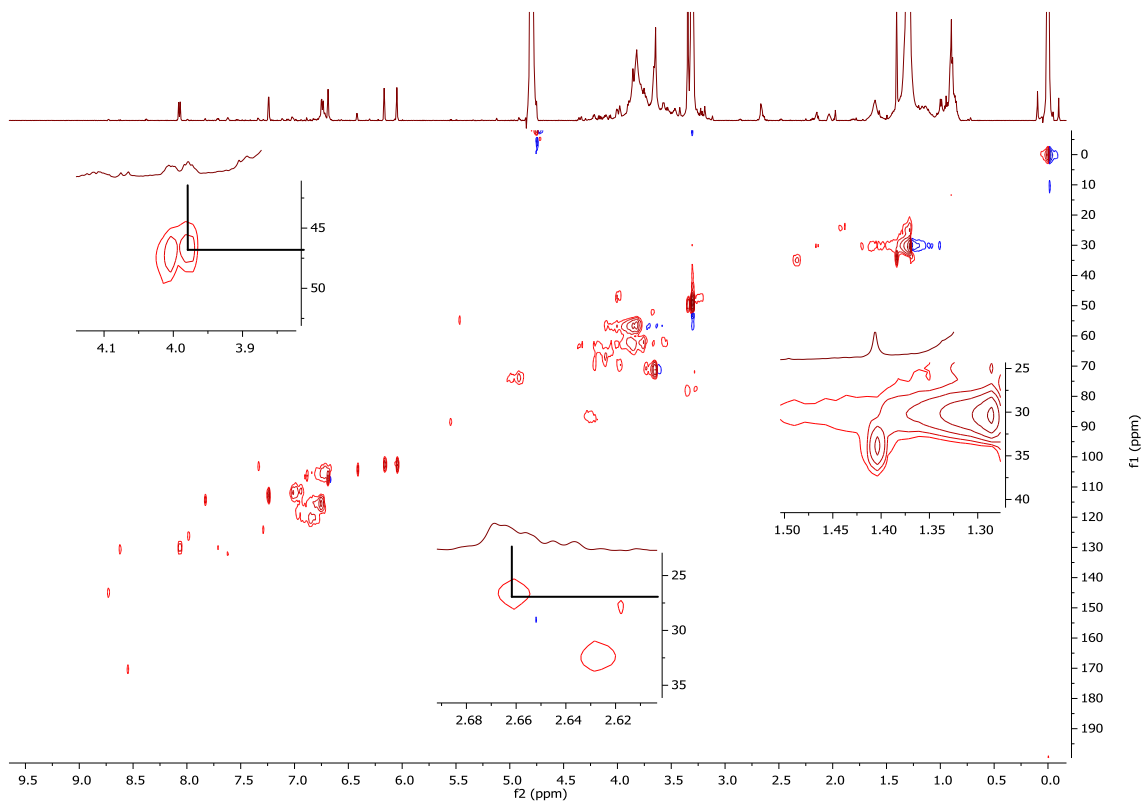
Espectro 20: Espectro de ESI-MS obtido em modo positivo do composto GC7.



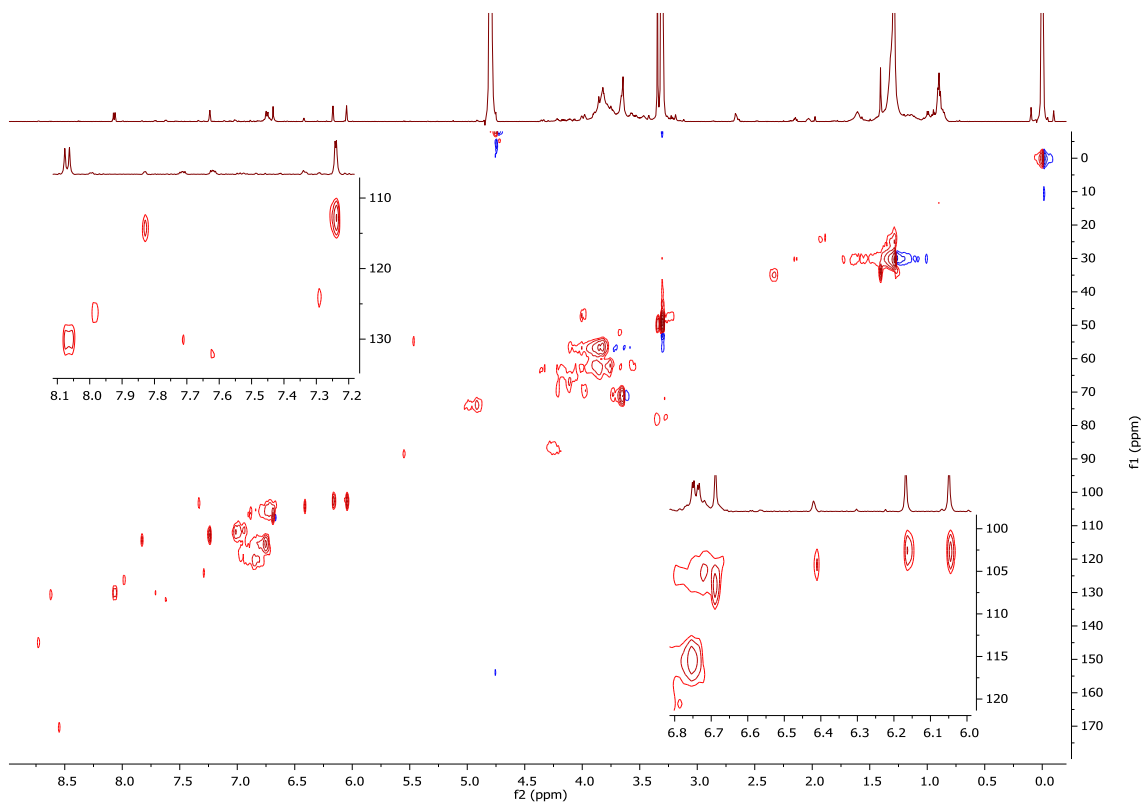
Espectro 21: Espectro de massa MS⁵ obtido em modo positivo do GC7.



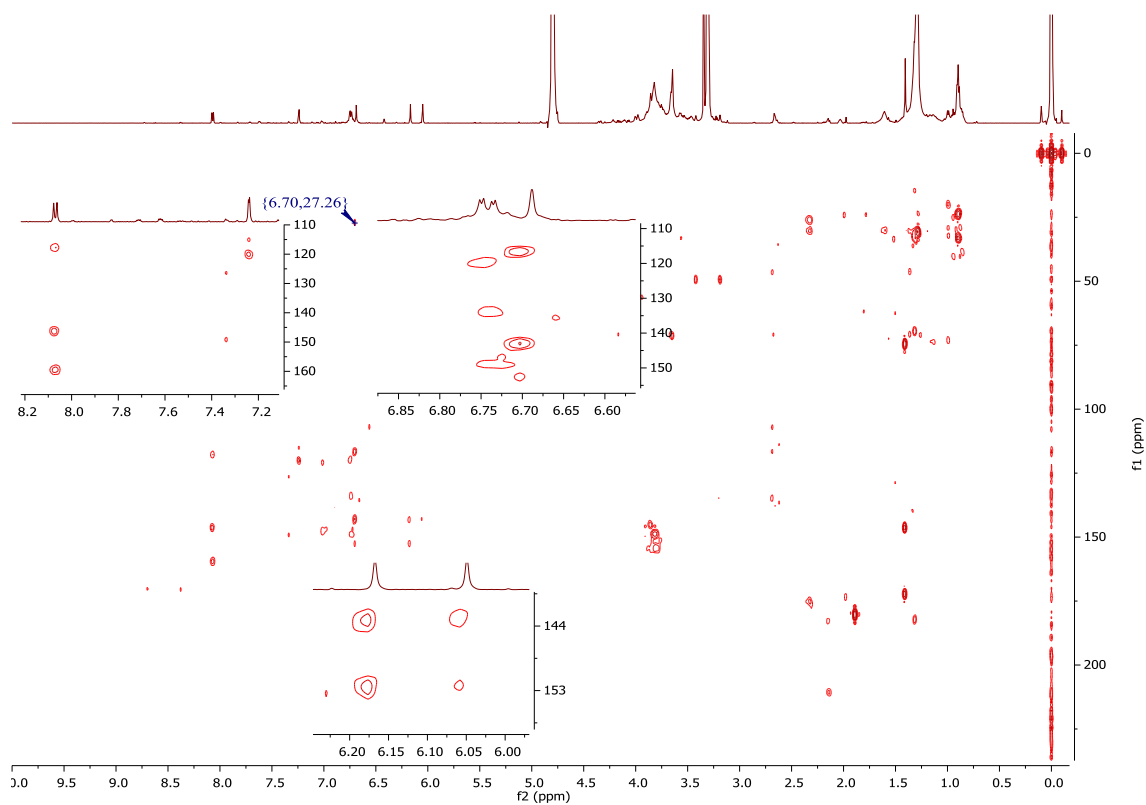
Espectro 22: Espectro de RMN de ¹H (600 MHz, CD₃OD) do GC7.



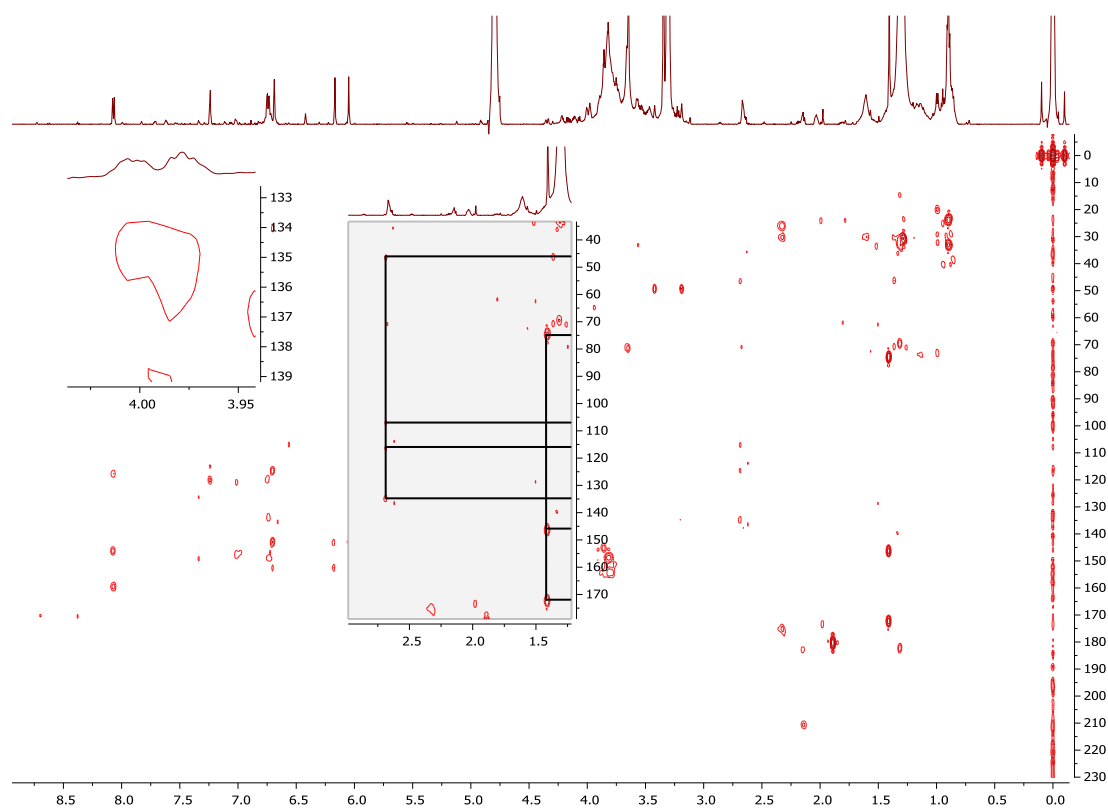
Espectro 23: Mapa de contorno HSQC do composto **GC7** com expansão de δ 4,1 a δ 1,3.



Espectro 24: Mapa de contorno HSQC do composto **GC7** com expansão de δ 8,1 a δ 6,0.



Espectro 25: Mapa de contorno HMBC do composto **GC7** com expansão de δ 8,2 a δ 6,0.



Espectro 26: Mapa de contorno HMBC do composto **GC7** com expansão de δ 4,0 a δ 1,5.