Edgar Miguel Peña Hidalgo

Atividades biológicas dos alcaloides de *Annona crassiflora* Mart.

Biological activities of alkaloids of *Annona crassiflora* Mart.

São Paulo

2017

Edgar Miguel Peña Hidalgo

Atividades biológicas dos alcaloides de *Annona crassiflora* Mart.

Biological activities of alkaloids of *Annona crassiflora* Mart.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, para a obtenção do Título de Mestre em Ciências na Área de Botânica.

Orientadora: Prof^a Dr^a Déborah Yara Alves Cursino Dos Santos

VERSÃO CORREGIDA

O original encontra-se disponível na biblioteca do Instituto de Biociências da USP

São Paulo

2017

Ficha Catalográfica

P Hidalgo, E. Miguel.

Atividades biológicas dos alcaloides de *Annona crassiflora* Mart.

111 páginas

Dissertação (Mestrado) - Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo. Departamento de Botânica.

1. *Annona crassiflora* 2. Alcaloides 3. Atividade biológica. I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências. Departamento de Botânica.

Comissão Julgadora:

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof^a Dr^a Déborah Yara Alves Cursino Dos Santos

Orientadora

Nossa lealdade é para as espécies e para o planeta. Nossa obrigação de sobreviver não é apenas para nós, mas também para esse antigo e vasto cosmos a partir do qual derivamos

Carl Sagan

Agradecimentos

A professora Déborah por me receber no Brasil, tanto orientadora como conselheira, sempre presente para escutar, guiar e compartilhar experiências.

Ao Professor Marcelo Pena pelo conhecimento transmitido, o tempo dedicado nos fundamentos dos métodos espectrométricos e a boa atitude para resolver duvidas.

À Paula Novaes pela ajuda no desenvolvimento dos ensaios fitotóxicos, além de estar preste a colaborar.

À Mourisa que sempre está cuidando do laboratório e dos alunos que nele trabalham.

À Aline pela ajuda no ajuste dos métodos desenvolvidos nos cromatógrafos.

Ao Leandro por estar disposto a ajudar.

Às queridas Priscila, que me ajudou bastante, em especial no uso do laboratório e no desenvolvimento de distintas metodologias usadas neste projeto, e Alice pelas dicas estatísticas, as conversas sobre espectrometria de massas e os momentos compartilhados.

Aos meus amigos formados neste processo com os quais compartilhei trabalho e experiencias fora do laboratório Lucas, Wilton, Dalila, Cristiane, Cinthia, Carmen, Fernanda Anselmo, Janayna.

Aos professores Antonio Salatino, Maria Luiza Salatino e Claudia Furlan, que estiveram abertos a ajudar quando fosse necessário.

Ao Luís Doín pela amizade criada nestes anos no Brasil, as conversas, as músicas, as viagens e a paciência.

A Natalia e Ricardo por me receber ao inicio deste processo na sua casa e me mostrar um pouco de como é São Paulo.

Aos mis amigos de Piracicaba, em especial Amparo, Jake e Gaucho, com vocês compartilhei muitas experiências.

A Camila Z, amiga de longo tempo com a qual sempre me sinto como em casa. E a Luana , uma grande amiga com um enorme coração.

À querida Lina, minha luz no caminho, pela paciência nos días longos no laboratório, pelas palavras de ánimo, pelo carinho. Os dois aprendimos muito neste tempo no Brasil.

Aos meus pais Edgar e Martha por dedicar a vida a minhas irmãs e a mim, sempre dando carinho, sempre atentos, amo vocês e cada día sinto saudades.

À minhas irmãs Ximena e Erika, meus cunhados Ignacio e Fabián e meus sobrinhos David, Isaac e Pablo porque dão a força para estar longe de casa e seguir superando barreiras culturais levando vocês no coração.

Por ultimo e não menos importante, ao Brasil, a cada pessoa que encontrei nestes dois anos e fizeram desta experiência algo inesquecível

Índice

Introdução geral	1
AS PLANTAS MEDICINAIS NA HISTÓRIA HUMANA E SEU METABOLISMO SECUNDÁRIO	1
ANNONACEAE E ANNONA CRASSIFLORA MART.	5
OBJETIVO GERAL	8
<i>Objetivos específicos</i>	8
REFERÊNCIAS	9
Capítulo 1: Química dos alcaloides benzilisoquinolínicos de folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	12
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1.1 INTRODUÇÃO	14
1.1.1 OS ALCALOIDES BENZILISOQUINOLÍNICOS EM ANNONACEAE	20
1.2 MATERIAL E MÉTODOS	23
1.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
1.4 REFERÊNCIAS	36
Capítulo 2: Atividade fitotóxica dos alcaloides de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	41
RESUMO	41
ABSTRACT	42
2.1 Introdução	43
2.2 MATERIAL E MÉTODOS	46
2.2.1 Preparação das amostras.....	46
2.2.2 Bioensaio de alongamento de coleótilos	46
2.2.3 Bioensaio de germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas	47
2.2.4 Análises estatísticas	47
2.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
2.3.1 Bioensaio com coleótilos de trigo.	48
2.3.2. Ensaio de fitotoxicidade com diásporos de alface, tomate e braquiária.....	50
2.4 REFERENCIAS	55
Capítulo 3: Alcaloides de <i>Annona crassiflora</i> Mart como possíveis moléculas biologicamente ativas.	57
RESUMO	57
ABSTRACT	58
3.1 INTRODUÇÃO.....	59
3.1.1 Produtos naturais como fonte de substâncias antimicrobianas	59
3.1.2 Potencial dos alcaloides de origem vegetal no tratamento do Alzheimer.....	61
3.1.3 Os produtos naturais como uma alternativa ao tratamento do HIV	63
3.1.4 Produtos naturais como alternativa no tratamento da doença de Chagas.	65
3.2 MATERIAL E MÉTODOS	67
3.2.1 Ensaio antimicrobiano	67
3.2.2 Ensaio da atividade anticolinesterase.....	68
3.2.3 Ensaio da inibição da enzima retroviral transcriptase reversa (HIV-1 RT).....	69
3.2.4 Ensaio da atividade tripanocida frente aos parasitas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	70
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	71
3.3.1 Atividade antimicrobiana.....	71
3.3.2 Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)	74
3.3.3 Inibição da enzima retroviral transcriptase reversa (HIV-1 RT).....	75
3.3.4 Atividade tripanocida frente ao parasita <i>Trypanosoma cruzi</i>	77
3.4 REFERÊNCIAS	80
Discussão geral e conclusões	86
Resumo geral.....	89
General abstract	90
Anexos	91

Introdução geral

As plantas medicinais na história humana e seu metabolismo secundário

Na busca de sustento e de suprir as necessidades de sobrevivência, os seres humanos têm usado a natureza como fonte de alimento, bem como uma fonte de produtos para curar ou aliviar doenças. Os primórdios do uso das plantas medicinais pelo homem foram instintivos como os animais, dado que na época não havia informações sobre quais plantas usar e para qual situação. A busca e descoberta de plantas medicinais foi baseada na experiência. Com o passar do tempo, foi descoberto o uso de plantas medicinais específicas para o tratamento de certas doenças, assim, o uso de plantas medicinais deixou o empirismo e transformou-se num campo de estudo baseado em fatos explicativos (Petrovska, 2012).

O primeiro registro do uso de plantas e seus derivados com fins medicinais está escrito em tábulas de argila encontradas na Mesopotâmia e datam de cerca de 2600 a.e.m.; entre as substâncias relatadas encontram-se óleos de *Cupressus sempervirens* L., *Glycyrrhiza glabra* L. (alcaçuz), *Commiphora myrrha* (Nees) Engl. (mirra) e *Papaver somniferum* L. (papoula), que hoje ainda são utilizados para o tratamento de doenças que vão desde a tosse e resfriados até infecções parasitárias e inflamação (Gurib-Fakim, 2006).

Distintos livros ao longo da história descrevem o uso de plantas para o tratamento de doenças e aflições como, por exemplo, o livro chinês sobre raízes e ervas “Pent T’Sao” escrito pelo Imperador Shen Nung 2500 a.e.m.. Tal obra contém aproximadamente 365 drogas preparadas com partes secas de plantas medicinais. Os livros sagrados da Índia “Vedas” ilustram plantas usadas até hoje como a *Myristica fragrans* Houtt. (noz-moscada), *Piper nigrum* L. (pimenta do reino), *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M.Perry (cravo) e outras. O Papyrus Ebers, escrito cerca de 1550 a.e.m., é uma grande coleção de 800 medicamentos, 700 deles preparados a partir de plantas (Sewell & Rafieian-kopaei, 2014).

Dioscórides, chamado "O pai da farmacognosia" escreveu o livro "De materia medica" no ano 77 a.e.m., no qual relata a indicação e preparo de medicamentos para diversas doenças, incluindo informações sobre o local de origem do vegetal, as descrições da aparência das plantas, a localidade e modo de coleta, assim como o nome em diferentes línguas. Este livro foi traduzido para várias línguas e usado como guia médica básica até o final da Idade Média e do Renascimento (Sewell & Rafieian-Kopaei, 2014).

Durante a Idade Média, a cura com plantas medicinais estava ligada à religião. Os monges, além de participarem na difusão da palavra de Deus, também eram os médicos com

habilidades curativas, tinham o conhecimento sobre o cultivo de plantas e a preparação de drogas. Alguns exemplos de plantas comumente cultivadas dentro dos mosteiros são *Pimpinella anisum* L. (anis), *Satureja hortensis* L. (segurelha), *Trigonella foenum-graecum* L. (fenogreco), *Mentha spicata* L. (hortelã), entre outras (Petrovska, 2012).

Os árabes introduziram numerosas plantas na farmacoterapia, principalmente na Índia, país com o qual mantinham relações comerciais. Alguns exemplos são *Aloe vera* (L.) Burm. f (babosa), *Mimosa pudica* L. (dormideira), *Hyoscyamus niger* L. (meimendro), *Coffea arabica* L. (café), *Zingiber officinale* Roscoe. (gengibre), *Strychnos nux-vomica* L. (noz-vômica), *Crocus sativus* L. (açafrão), *Curcuma longa* L. (açafrão da terra), *Piper nigrum*, *Cinnamomum verum* J. Presl (canela), *Rheum rhabarbarum* L. (ruibarbo), *Senna alexandrina* Mill. (sene), e outras. Os árabes mudaram a forma de tratamento de doenças, deixando de usar drogas de ação forte por medicamentos com ação suave. Por exemplo, *S. alexandrina* passou a ser usado como um laxante suave, em comparação com os purgantes *Helleborus odorus* Waldst. & Kit. ex Willd. e *Euphorbium* sp Hill. usados até então (Petrovska, 2012).

As viagens de Marco Polo (1254-1324) na Ásia tropical, na China e na Pérsia, a descoberta da América (1492) e as viagens de Vasco da Gama à Índia (1498) resultaram na descoberta e introdução de muitas plantas medicinais na Europa onde nos jardins botânicos foram feitas várias tentativas para cultivar plantas medicinais nacionais, assim como outras trazidas do Velho e do Novo Mundo. Com a descoberta da América, a diversidade de conhecimento sobre o material médico foi enriquecida com muitas novas plantas medicinais: *Cinchona officinalis* L. (quina), *Carapichea ipecacuanha* (Brot.) L. Andersson (ipêcacuanha), *Theobroma cacao* L. (cacau), *Krameria lappacea* (Dombey) Burdet & B.B. Simpson (ratanhia), *Lobelia inflata* L. (lobelia), *Ipomoea purga* (Wender.) Hayne. (jalapa), *Podophyllum peltatum* L. (mandrágora americana), *Polygala senega* L. (polígala), *Vanilla planifolia* Andrews. (baunilha), *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. (mate), *Nicotiana tabacum* L. (tabaco), *Capsicum* sp L. (pimenta vermelha), etc. (Petrovska, 2012).

O conhecimento sobre as plantas específicas a serem utilizadas e os métodos de aplicação foram transmitidos através da história de forma oral. Com o transcorrer do tempo, as informações foram usadas pelos boticários e registradas nos herbários. Na história mais recente, a utilização de plantas como medicamentos tem envolvido o isolamento de compostos ativos. Essa era moderna começou com Friedrich Wilhelm Sertürner que em 1806 conseguiu isolar um cristal meio amarelado, o qual ele nomeou de “morphium” em homenagem ao deus grego do sono Morfeu. A descoberta, comprovação e isolamento de alcaloides de papoula (1806), ipêcacuanha (1817), noz-vômica (1817), a quina (1820), romã (*Punica granatum* L.) (1878) e

de outras plantas, seguido do isolamento de glicosídeos, marcou o início da farmácia como ciência. Com a modernização dos métodos químicos, outras substâncias ativas de plantas medicinais também foram descobertas como taninos, saponinas, óleos voláteis, vitaminas, hormônios, propiciando o aumento no conhecimento da Fitoquímica (Kinghorn, 2001; Petrovska, 2012).

No final do século XIX e início do século XX foi observada uma diminuição no uso de plantas medicinais. No século XIX, os glicosídeos e alcaloides isolados em forma pura estavam cada vez mais substituindo as ervas medicinais das quais tinham sido descobertos. Atualmente, devido aos efeitos colaterais potentes das drogas sintéticas modernas e contra-indicações crescentes para seu uso, tem havido um ressurgimento popular bastante forte para o uso de plantas medicinais (Sewell & Rafieian-Kopaei 2014).

As plantas, como organismos autotróficos, podem aproveitar a energia do sol a partir do processo de fotossíntese. Elas capturam energia luminosa e transformam-na em energia química para, subsequentemente, gerar glicose, a qual iniciará vários processos metabólicos dentro do metabolismo primário, necessário para o crescimento e manutenção da planta, assim como na formação de precursores para o metabolismo secundário.

Os produtos do metabolismo secundário, chamados comumente Produtos Naturais, estão relacionados com funções ecológicas tais como defesa contra herbívoros e agentes patogênicos, atração de polinizadores e dispersores de sementes, assim como nas interações com microrganismos simbióticos e alelopatia (Delbone & Lando, 2010). Esses produtos naturais, presentes na natureza tanto em plantas quanto em muitos animais, fornecem um recurso valioso que tem sido usado para encontrar novas moléculas com potencial medicinal (Gurib-Fakim, 2006).

Existem pelo menos quatro vias metabólicas responsáveis pela síntese destes metabólitos que podem ser apresentados, de forma simplificada, em três grandes grupos: terpenos, compostos nitrogenados e compostos fenólicos. Estas vias biossintéticas têm sempre uma ligação com precursores do metabolismo primário destacados na Figura 1.

Os terpenos são biossintetizados por pelo menos duas vias diferentes: a via do ácido mevalônico (MVA), que ocorre no citoplasma, e a via do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos plastídios. Na via do MVA, três moléculas de acetil-CoA são ligadas numa sequência e formam o ácido mevalônico, que é posteriormente fosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o pirofosfato de isopentenila (IPP), a unidade básica dos terpenos. Na via MEP, o gliceraldeído-3-fosfato derivado do piruvato e dois átomos de carbono são combinados e sofrem alguns rearranjos para formar o IPP. Os terpenos são formados por unidades de cinco

carbonos (C5) chamadas isopreno e a sua classificação varia de acordo com o número destas unidades na molécula: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterterpenos (C25), triterpenos (C30), tetraterpenos ou carotenoides (C40) e politerpenos com mais de oito unidades de isopreno, como por exemplo o látex (Taiz & Zeiger, 2006).

Figura 1. Esquema geral das vias de síntese dos metabólitos secundários e suas ligações com o metabolismo primário. Baseado em Taiz & Zeiger (2006)

A via do acetato-malonato origina os ácidos graxos, os componentes das ceras cuticulares, os poliacetilenos, os macrolídeos e algumas substâncias aromáticas tais como xantonas e tetraciclinas; estes compostos são formados quando uma molécula de acetil-CoA do metabolismo primário é adicionada de uma molécula de malonil-CoA com a liberação de CO₂, dando origem ao acetoacetil-CoA, formando assim a cadeia de poli-β-ceto éster, precursor para a formação de todos os compostos desta via (Dewick, 2009).

Os compostos fenólicos são caracterizados por possuírem pelo menos um anel aromático, no qual ao menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila. Sua síntese ocorre através das vias do acetato-malonato ou do ácido chiquímico. A classificação dos compostos fenólicos pode ser feita de acordo com o tipo do esqueleto básico da molécula formado pelo anel aromático e uma cadeia lateral secundária com átomos de carbono em número variável.

Os fenilpropanoides, por exemplo, contêm um anel benzênico e uma cadeia lateral de três carbonos e são unidades básicas importantes para a formação de compostos mais complexos como por exemplo, as cumarinas, as lignanas e neolignanas, a lignina e parte da molécula dos flavonoides (Taiz & Zeiger, 2006).

Diversas substâncias do metabolismo secundário apresentam nitrogênio na sua molécula, compondo um grande conjunto denominado de compostos nitrogenados e sendo, em maioria, biossintetizados a partir de aminoácidos. Nesse grande grupo estão os alcaloides, os glicosídeos cianogênicos e os glicosinolatos (Taiz & Zeiger, 2006). Os glicosídeos cianogênicos e os glicosinolatos são duas classes de metabólitos nitrogenados envolvidos em processos de defesa das plantas, que quando intactas não são tóxicas. No entanto, quando o tecido vegetal é lesionado, estas substâncias são hidrolisadas e há a liberação de substâncias voláteis muito tóxicas. Nas espécies que possuem glicosídeos cianogênicos (por exemplo: mandioca, amêndoa, maracujá) há liberação do ácido cianídrico (HCN). Já naquelas com glicosinolatos (por exemplo, espécies de Brassicaceae – couve, repolho) após a hidrólise há a liberação de substâncias com odor característico, pungentes, incluindo isotiocianatos e nitrilas (Taiz & Zeiger, 2006).

Os alcaloides verdadeiros perfazem o grupo mais diverso dentro dos compostos nitrogenados. Essas substâncias são geralmente definidas pela presença de um átomo de nitrogênio derivado de aminoácido em estado oxidado, como parte de um anel heterocíclico (Kutchan, 1995). Há 10 anos, havia cerca de 15.000 metabólitos secundários considerados alcaloides, encontrados em aproximadamente 20% das espécies de plantas vasculares (Taiz & Zeiger, 2006), formados a partir de diversos aminoácidos, tais como L-arginina, L-ornitina, L-lisina, L-fenilalanina e L-tirosina (García, 2004). Por sua semelhança química às moléculas envolvidas na transmissão de sinais do sistema nervoso, o efeito tóxico dos alcaloides reside na sua capacidade de bloquear sítios receptores, intermediários da transdução de sinal e canais iônicos neuronais de vertebrados e insetos. Para alguns microrganismos patogênicos, os alcaloides atuam como inibidores no crescimento através da sua capacidade de se intercalar com o DNA, interrompendo a síntese de proteínas, induzindo a apoptose (Wink & Schimmer, 2010).

Annonaceae e *Annona crassiflora* Mart.

Annonaceae é uma família essencialmente subtropical e tropical, com exceção de dois gêneros presentes na América do Norte (*Asimina* e *Deeringothamnus*) (Thomas & Doyle,

1996), composta por cerca de 135 gêneros e 2500 espécies (Chatrou et al., 2004). É o grupo mais rico em espécies em Magnoliales e, juntamente com as Piperaceae e Lauraceae, as Annonaceae estão entre as maiores famílias das angiospermas basais (Gottsberger, 2016).

Annonaceae está dividida em quatro subfamílias: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae e Malmeoideae (Chatrou et al., 2012), sendo Annonoideae a maior subfamília com 51 gêneros. No Brasil são encontrados com 29 gêneros e 386 espécies, incluindo *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia*.

Os membros de Annonaceae desempenham um papel significativo na composição da vegetação brasileira (Maas et al., 2001). No Cerrado são encontrados 10 gêneros e 47 espécies, algumas de ampla distribuição e bastante comuns, como *Annona crassiflora* Mart., *Duguetia furfuracea* (A.St.-Hil.) Saff. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. (Lopes & Mello-Silva, 2014).

Aproximadamente 500 alcaloides têm sido identificados em 138 espécies de Annonaceae distribuídas em 43 gêneros (González-Esquinca et al., 2014). Na família relatam-se compostos nitrogenados do tipo bisbenzilisoquinolínicos como componentes bioativos importantes, assim como presença de terpenos (principalmente diterpenos), fenóis como ácido caféico, ácido *p*-cumárico, catequinas, proantocianidinas, taninos e lignanas, além das acetogeninas e óleos voláteis constituídos principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos (Leboeuf et al., 1982; Almeida et al., 2012; Lúcio et al., 2015).

Quimicamente, a presença de acetogeninas (AGEs) é bastante importante na família. Até o ano de 2004, 593 AGEs tinham sido identificadas em Annonaceae a partir de 51 espécies em 13 gêneros (González-Esquinca et al., 2014). As acetogeninas de Annonaceae exibem uma ampla gama de propriedades bioativas tais como antineoplásicas, antiparasitárias, citotóxicas, imunossupressoras, neurotóxicas e pesticidas. Entretanto, os efeitos citotóxicos e antitumorais dessas substâncias são responsáveis pela maior popularidade destas moléculas (Liaw et al., 2016).

Cerca de 160 espécies compõem o gênero *Annona*, muitas delas distribuídas pelos Neotrópicos dos Estados Unidos (Flórida) à Bolívia e Paraguai e nas Índias Ocidentais, com apenas três espécies na África, uma das quais estende-se até Madagascar (Liversidge 1910; Schatz et al. 2015).

Economicamente, este gênero é o mais importante em Annonaceae devido às suas frutas comestíveis e propriedades medicinais. Várias espécies de *Annona* fornecem frutos comestíveis, alguns dos quais são muito apreciados no Brasil, como *Annona crassiflora* Mart. (araticum), *Annona squamosa* L. (fruta-do-conde) e *Annona muricata* L. (graviola) (Rabelo et al., 2016).

Annona crassiflora Mart., popularmente conhecida como araticum, marolo ou pinha-do-cerrado, é uma das espécies arbóreas do cerrado com grande potencial alimentar e econômico (Melo, 2005). É uma árvore de tamanho médio entre 4-8m de altura, o diâmetro do tronco é de 20 a 30 cm, revestido por uma casca áspera. As folhas são alternadas, simples, sem estípulas, crasso-membranosas e glaucas. As flores são solitárias, axilares com pétalas espessas e carnosas. A floração ocorre nos meses de outubro e novembro e a frutificação entre janeiro e fevereiro. O fruto é um tipo de baga subglobosa, com superfície tuberosa ou papilosa. A polpa é amarela ou avermelhada, de gosto doce e cheiro agradável. Possui sementes grandes e elípticas (Lorenzi, 1998). Ocorre no Norte nos estados do Pará e Tocantins, a Nordeste na Bahia e Maranhão, a Oeste no Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, Sudeste de Minas Gerais e São Paulo e no Sul no Paraná.

O araticum (*A. crassiflora*) é uma espécie típica do cerrado brasileiro com grande importância socioeconômica e medicinal (Ribeiro et al., 2009), conhecido, principalmente, por seu uso na culinária, que é difundido entre os habitantes da região, podendo ser encontrado em muitos pratos típicos locais, especialmente doces, geleias, licores, refrigerantes, sorvetes e sucos (Luzia & Jorge, 2013). O seu fruto tem alto valor nutricional, com níveis significativos de lipídios, calorias e fibras, é rico em magnésio e fósforo, contém ácido málico e tem uma boa percentagem de substâncias antioxidantes, atribuídas aos compostos fenólicos presentes tanto nas soluções etanólicas (211,11 mg equivalentes de ácido gálico/100 g), quanto nos extratos aquosos (260,5 mg equivalentes de ácido gálico/100g) (Damiani et al., 2011).

As sementes têm ação contra afecções parasitárias do couro cabeludo. Na medicina popular, a infusão de folhas e sementes em pó pode ser usada para combater a diarreia e induzir a menstruação (Almeida et al., 1994). Existem referências de princípios ativos com potencial para o tratamento do câncer (Melo, 2005). Além disso, a presença de ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido ferúlico, bem como as vitaminas A e C na casca e sementes sugerem uma excelente atividade antioxidante para esta espécie (Roesler et al., 2007; Silva et al., 2013; Damiani et al., 2013). Testes com ratos intoxicados com tetracloreto de carbono mostraram que extratos de sementes e casca de araticum têm alta atividade antioxidante *in vivo*, sugerindo potencial uso para fins terapêuticos (Roesler, 2011).

A atividade antimalárica das frações enriquecidas em flavonoides e alcaloides a partir de extratos etanólicos e hexânicos de folhas de *A. crassiflora* foi observada em modelos de camundongos infectados com *Plasmodium berghei* Marchiafava & Celli, 1885. O tratamento dos camundongos com 12,5 mg/kg/dia durante 4 dias reduziu a parasitemia entre 57–75% (Santos Pimenta et al., 2014).

Além de potenciais usos medicinais, extratos alcoólicos de *Annona crassiflora* apresentam atividade moluscicida contra *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818) com valores significativos de LD90 (<20 ppm) (Dos Santos & Sant'Ana, 2001). Omena et al. (2007) relatam atividades dos extratos da raiz (LD50 = 0,71 µg/mL⁻¹) e da madeira (LD50 = 8,94 µg/mL⁻¹) dessa espécie contra as larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762), sugerindo possível uso como larvicida natural.

Com o exposto, pode-se afirmar que *Annona crassiflora* é uma espécie com grande importância, tanto no uso direto quanto na obtenção de potenciais compostos bioativos, foco desse trabalho.

Objetivo geral

Devido à importância biológica dos compostos presentes em *Annona crassiflora* Mart., o presente estudo tem como objetivo avaliar potenciais atividades biológicas do extrato alcaloídico das folhas e, dos seus alcaloides principais.

Objetivos específicos

1. Obter o extrato bruto, a fase alcaloídica enriquecida e os principais alcaloides presentes em folhas de *A. crassiflora*;
2. Identificar e classificar os alcaloides presentes em folhas de *A. crassiflora* mediante cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos e ressonância magnética nuclear;
3. Avaliar o potencial fitotóxico da fase alcaloídica e dos alcaloides obtidos de folhas de *A. crassiflora* frente ao coleóptilo de *Triticum aestivum* L. variedade Cortez, as espécies alvo *Lactuca sativa* L. cvs. Baba de verão e *Lycopersicon esculentum*, Mill. cvs. Rasteiro Rio Grande e as sementes de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster;
4. Avaliar o potencial antimicrobiano da fase alcaloídica e dos alcaloides obtidos de folhas de *A. crassiflora* frente a *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani e Chalmers 1919 K-12 MG1655 (Blattner, 1997), *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 ATCC 10145 e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872 PY79;
5. Avaliar o potencial inibitório dos alcaloides isolados frente as enzimas acetilcolinesterase e transcriptase reversa do HIV1;
6. Avaliar o potencial antiparasitário dos alcaloides isolados frente aos amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909.

Referências

- Almeida, J. R. G. da S., Araújo, E. C. da C., Ribeiro, L. A. de A., de Lima, J. T., Nunes, X. P., Lúcio, A. S. S. C., Agra, M. de F., & Barbosa Filho, J. M. (2012). Antinociceptive activity of ethanol extract from *Duguetia chrysocarpa* Maas (Annonaceae). *The Scientific World Journal*, ID:859210.
- Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., & Ribeiro, J. F. (1994). *Cerrado: espécies vegetais úteis*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA). Brasil.
- Chatrou, L. W., Pirie, M. D., Erkens, R. H. J., Couvreur, T. L. P., Neubig, K. M., Abbott, J. R., Mols, J. B., Maas, J. W., Saunders, R. M. K., & Chase, M. W. (2012). A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 169(1), 5–40.
- Chatrou, L. W., Rainer, H., Maas, P. J. M., Smith, N., Mori, S. A., Henderson, A., Stevenson, D. W., & Heald, S. V. (2004). Flowering plants of the neotropics. *Annonaceae (Soursop, Family)*, 18–20.
- da Silva, E. P., de Barros Vilas Boas, E. V., & Pereira Ramos Xisto, A. L. (2013). Characterization and development of marolo (*Annona crassiflora*, Mart.). *Food Science and Technology*, 33(4), 666–675.
- Damiani, C., da Silva, F. A., Lage, M. E., Perez Pereira, D. E., Becker, F. S., De, & Barros Vilas Boas, E. V. (2013). Stability of frozen marolo pulp during storage. *Food Science and Technology*, 33(4), 713–721.
- Damiani, C., Vilas Boas, E. V. D. B., Asquieri, E. R., Lage, M. E., Oliveira, R. A. De, Silva, F. A. Da, Pinto, D. M., Rodrigues, L. J., Silva, E. P. Da, & Paula, N. R. F. De. (2011). Characterization of fruits from the savanna: Araça (*Psidium guinnensis* Sw.) and Marolo (*Annona crassiflora* Mart.). *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 31(3), 723–729.
- de Omena, M. C., Navarro, D. M. A. F., de Paula, J. E., Luna, J. S., de Lima, M. R. F., & Sant'Ana, A. E. G. (2007). Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresource Technology*, 98(13), 2549–2556.
- Delbone, C. A. C., & Lando, R. L. (2010). Importância Ecológica e Evolutiva dos principais grupos de metabólitos secundários nas espécies vegetais. In *X congresso de educação do norte pioneiro UENP-CCHE-CLCA-Campus jacarezinho - Anais* (pp. 396–404).
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*. John Wiley & sons, Ltd. (Third Edit). Wiley.
- Dos Santos, A. F., & Sant'Ana, A. E. G. (2001). Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine : International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 8(2), 115–120.
- García, D. E. (2004). Los metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos Y Forrajes*, 27(1).
- González-Esquínca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., & Riley- Saldaña, C. A. (2014). Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 01–16.

- Gottsberger, G. (2016). The reproductive biology of the early-divergent genus *Anaxagorea* (Annonaceae), and its significance for the evolutionary development of the family. *Acta Botanica Brasilica*, 30(2), 313–325.
- Gurib-Fakim, A. (2006). Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(1), 1–93.
- Kinghorn, A. D. (2001). Pharmacognosy in the 21 st century. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 53, 135–148.
- Kutchan, T. M. (1995). Alkaloid Biosynthesis -The Basis for Metabolic Engineering of Medicinal Plants. *The Plant Cell*, 7(July), 1059–1070.
- Leboeuf, M., Cavé, a., Bhaumik, P. K., Mukherjee, B., & Mukherjee, R. (1980). The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, 21(12), 2783–2813.
- Liaw, C.-C., Liou, J.-R., Wu, T.-Y., Chang, F.-R., & Wu, Y.-C. (2016). Acetogenins from Annonaceae. In A. D. Kinghorn, H. Falk, S. Gibbons & J. Kobayashi (Eds.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 101* (pp. 113–230). Cham: Springer International Publishing.
- Liversidge, a. (1910). The Royal Society of New South Wales. *Nature*, 83(2121), 502–504.
- Lopes, J. de C., & Mello-Silva, R. (2014). Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 125–131.
- Lorenzi, H. (1998). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. vol. 2. Nova Odessa, Brazil: Instituto Plantarum de Estudos Da Flora Ltda. 352p.-Col.
- Lúcio, A. S. S. C., Almeida, J. R. G. da S., Da-Cunha, E. V. L., Tavares, J. F., & Barbosa Filho, J. M. (2015). Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In H.-J. Knölker (Ed.), *Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 74, pp. 233–409). Academic Press.
- Luzia, D. M. M., & Jorge, N. (2013). Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. *Industrial Crops and Products*, 42, 231–235.
- Maas, P. J. M., Kamer, H. M. De, Junikka, L., Mello-silva, R. De, Rainer, H., Kamer, H. M. De, Junikka, L., & Mello-silva, R. De. (2001). Annonaceae from Central-eastern Brazil. *Rodriguésia*, 52(80), 61–94.
- Melo, D. L. B. de. (2005). *Dormência em sementes de Annona crassiflora* Mart. Universidade Federal de Lavras.
- Petrovska, B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Review*, 6(11), 1–5.
- Rabelo, F., Siqueira, J. D. S., Silva, J. R. G., Press, A., & Press, A. (2016). *Annona* Species (Annonaceae) Oils. In V. R. Preedy (Ed.), *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* (pp. 221–229). Elsevier.
- Ribeiro, M. de N. O., Pasqual, M., Villa, F., Pio, L. A. S., & Hilhorst, H. W. M. (2009). In vitro seed germination and seedling development of *Annona crassiflora* Mart. *Scientia Agricola*, 66, 410–413.

- Roesler, R. (2011). Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. *Ciência E Tecnologia de Alimentos*, 31(1), 93–100.
- Roesler, R., Catharino, R. R., Malta, L. G., Eberlin, M. N., & Pastore, G. (2007). Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 104(3), 1048–1054.
- Santos Pimenta, L. P., Garcia, G. M., Vale, D., Goncalves, S. G., Dionisio, B. L., Braga, E., Martins, & Furtado Mosqueira, V. C. (2014). In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. *Natural Product Research*, 28(16), 1254–1259.
- Schatz, G. E., Ramos A., C. A., Ortiz, O. O., & McPherson, G. (2015). A New, Restricted Range Species of *Annona* (Annonaceae) Endemic to the Caribbean Slope of Panama. *Novon: A Journal for Botanical Nomenclature*, 24(2), 203–208.
- Sewell, R. D. E., & Rafieian-kopaei, M. (2014). The history and ups and downs of herbal medicines usage. *Journal of HerbsMed Pharmacology*, 3(1), 1–3.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2006). *Fisiologia Vegetal*. Castellón de la Plana: Universitat Jaume I de Castellón.
- Thomas, A. LE, & Doyle, J. A. (1996). Geographic Relationships of Malagasy Annonaceae. *Biogéographie de Madagascar*, 85–94.
- Wink, M., & Schimmer, O. (2010). Molecular Modes of Action of Defensive Secondary Metabolites. In *Annual Plant Reviews Volume 39: Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites* (pp. 21–161). Wiley-Blackwell.

Capítulo 1: Química dos alcaloides benzilisoquinolínicos de folhas de *Annona crassiflora* Mart.

Resumo

Os alcaloides benzilisoquinolínicos (ABI) são compostos nitrogenados formados a partir da tirosina como precursora. Vários esqueletos são formados nesta via biossintética como as aporfinas, fenantrenos, morfinaos, protopinas, protoberberinas, entre outros. Esses alcaloides são encontrados, preferencialmente, nas Ranunculales e no clado das Magnoliídeas, sendo Annonaceae, e principalmente o gênero *Annona* o que apresenta a maior diversidade estrutural de alcaloides aporfínicos. Diversas atividades biológicas são atribuídas a estes compostos, especialmente pela sua ação no sistema nervoso central, razão pela qual possuem um interesse farmacológico. *Annona crassiflora* Mart. é uma espécie nativa do cerrado Brasileiro, para a qual se tem descrito a presença de ABIs de tipo aporfínico como anonaina, anolobina, estefalagina, liriodenina, reticulina e xilopina, além de um fenantreno (annoretina). O principal objetivo deste trabalho foi identificar e purificar os alcaloides presentes nas folhas de *A. crassiflora*. As metodologias de extração ácido-base e as técnicas cromatográficas permitiram sugerir a presença de oito compostos nitrogenados, dos quais foram isolados e purificados as aporfínas xilopina, estefalagina, litseglutina B e um composto inédito, para o qual se propõem o nome de crassiflorina. Além dos isolados, foram encontrados a anonaina, a annoretina, a tetrahidropalmatrubina, identificados com base nos espectros de massas, e um alcaloide não identificado. A presença de anonaina, annoretina, xilopina e estefalagina já havia sido relatada para esta espécie, sendo este último reportado pela primeira vez nas folhas de *A. crassiflora*. Litseglutina B foi identificado pela primeira vez na espécie. Os resultados encontrados corroboram a ideia de grande diversidade química em Annonaceae, especialmente em *Annona*, com respeito a produção de ABIs.

Palavras chave: *Annona crassiflora*, aporfinas, estefalagina, litseglutina B, xilopina.

Chapter 1 Chemistry of benzyloquinoline alkaloids from *Annona crassiflora* Mart leaves.

Abstract

Benzyloquinoline alkaloids (ABI) are nitrogenous compounds originated from tyrosine. Several skeletons are formed in this biosynthetic pathway such as aporphines, phenanthrenes, morphinans, protopins, protoberberines, among others. These alkaloids are found in Ranunculales and in Magnoliidae clade, in which Annonaceae, especially the genus *Annona*, presents the greatest structural diversity of aporphinic alkaloids. Several biological activities have been attributed to ABIs, mainly due their action in the central nervous system. *Annona crassiflora* Mart. is a native species from Brazilian cerrado. Anonaine, anolobine, stephalagine, liriodenine, reticuline and xylophine, all aporphines, as well as a phenanthrene (annoretin) have already been described for this species. The main goal of this work was to identify and purify the alkaloids present in leaves of *A. crassiflora*. The acid-base extraction methodologies and the chromatographic techniques allowed the detection of eight nitrogen compounds. Among them, xylophine, stephalagine, litseglutine B and an unpublished compound (crassiflorine) were isolated. In addition to the isolated compounds, anonaine, annoretine, and tetrahydropalmatrubine were identified on the basis of mass spectra. One nitrogen compound remains unidentified. The presence of anonaine, annoretine, xylophine and stephalagine had already been reported for this species, the latter being reported for the first time in leaves. Litseglutine B was identified in the species for the first time. Concluding, our results reinforce the chemical diversity in Annonaceae, specially in *Annona*, with respect to the production of ABIs.

Keywords: *Annona crassiflora*, aporphins, stephalagin, litseglutin B, xilopine, HPLC, GC-MS, NMR

1.1 Introdução

O nome "alcaloide" vem do conceito de composto "tipo alcalino", isto é, de carácter básico, e contendo pelo menos um átomo de nitrogênio. Com o descobrimento de vários alcaloides em plantas, as definições para essa classe de substâncias incluíam sempre estas três características: presença de nitrogênio, basicidade e origem vegetal. Com o maior conhecimento sobre as estruturas e sobre a origem biossintética dessas substâncias, o conceito de ser derivado de aminoácidos foi adicionado à definição, juntamente com a ideia de que o nitrogênio deve estar em um anel heterocíclico (Cordell et al., 2001).

As fontes mais conhecidas de alcaloides são plantas, fungos, bactérias e animais marinhos. Vários vertebrados, organismos parasitas e insetos também têm sido descritos como fontes de novos alcaloides. A caracterização dessas novas estruturas expandiu substancialmente a rica diversidade química das estruturas estabelecidas (Cordell et al., 2001).

De uma perspectiva biossintética, existem relativamente poucos blocos de construção para alcaloides, compreendendo alguns aminoácidos comuns (por exemplo, ornitina, lisina, tirosina, triptofano e ácido antranílico), unidades de terpenos, unidades de poliketóides e purinas (Cordell et al., 2001; Dewick, 2009).

Os alcaloides oriundos de aminoácidos alifáticos são derivados da ornitina, como os pirrolizidínicos, pirrolidínicos e tropânicos, e derivados da lisina, como os indolizidínicos, quinolizidínicos e piperidínicos. Os derivados do ácido aspártico são formados pela reação entre o ácido aspártico e o fosfato de diidroxiacetona (DHAP) a qual gera o anel piridínico do ácido nicotínico (Figura 1).

Figura 1. Principais classes de alcaloides derivados de aminoácidos alifáticos.

A grande maioria dos alcaloides aromáticos, entretanto, é derivada de aminoácidos aromáticos oriundos da vida do ácido chiquímico (Figura 2). Os derivados a partir do triptofano são os indólicos, pirroloindólicos, β -carbolínicos, quinolínicos, pirroquinolínicos e ergolínicos. Os alcaloides indoloterpênicos são formados por biossíntese mista junto com a via dos terpenoides. Os derivados do ácido antranílico são os quinazolínicos, quinolínicos e acridínicos. Já os derivados da tirosina são as feniletilaminas, os tetraidroisoquinolínicos e os benzilisoquinolínicos (Singla et al., 2010).

Figura 2. Principais classes de alcaloides derivados de aminoácidos aromáticos.

Como representado acima, dentro dos derivados do aminoácido tirosina estão os alcaloides benzilisoquinolínicos (**ABI**). Estes metabólitos são produzidos principalmente pelas angiospermas basais e são preservados em alguns clados mais derivados. Alguns alcaloides desse grupo como morfina, sanguinarina e berberina são muito importantes na medicina moderna (Figura 4) (Chacón et al., 2012).

A síntese de **ABI** em plantas começa com a tirosina metabolizada em dopamina por ação da tirosina dopa descarboxilase (TYDC) e em 4-hidroxifenilacetaldeído pela tirosina transferase (TyrAT). Essas duas moléculas depois condensam-se por ação da (S)-norcoclaurina sintase (NCS) para formar a (S)-norcoclaurina (Figura 3). A partir dessa substância, mais de

2500 **ABIs** podem ser produzidos (Stadler et al., 1989; Narcross et al., 2016). Duas enzimas têm uma participação chave na biossíntese desses alcaloides. A TYDC que desvia a tirosina para a biossíntese dos **ABIs** e a NCS que dá origem ao precursor central da via, do qual são derivados os demais esqueletos; sabe-se que estas duas enzimas podem ser estimuladas pela presença de patógenos (Chacón et al., 2012).

Figura 3. Etapas iniciais da biossíntese dos alcaloides benzilisoquinólicos (ABIs) a partir da L-tirosina. TYDC: tirosina dopa descarboxilase, *EC.1.14.16.2: tirosina 3-monooxigenase, *EC.1.4.18.1: monofenol oxigenase, *EC 1.4.3.2: L-aminoácido oxidase, *EC. 4.1.1.80: 4-hidroxifenilpiruvato decarboxilase, TyrAT: tirosina transferase, NCS: (S)-norcoclaurina sintase. * Enzimas cuja atividade vem sendo determinada, embora não tenham sido isoladas ainda de plantas produtoras de ABIs (Chacón et al., 2012).

Seguindo o caminho biossintético, a (S)-norcoclaurina é metilada para gerar a (S)-coclaurina, a partir da qual vai seguir a via dos benzilisoquinólicos simples, como a papaverina, assim como a via dos bis-benzilisoquinólicos, como a atracuriuma. A (S)-coclaurina vai ser modificada para gerar a (S)-reticulina da qual vão se desprender outras vias de diversificação de esqueletos de **ABIs** (Figura 4).

Os **ABIs** ocorrem principalmente nas Ranunculales e no clado das Magnoliídeas, sendo neste esporadicamente presente em Piperales. Fora destes grupos, também são encontrados nas Rutaceae, Cornaceae e Nelumbonaceae. Como metabólitos secundários ou especializados, os

ABIs não são essenciais para o crescimento e o desenvolvimento da planta, embora o papel geral dos alcaloides na defesa química contra herbívoros e patógenos sugere que os ABIs contribuem para a aptidão reprodutiva das plantas com capacidade de produzir esses compostos (Liscombe et al., 2005).

Figura 4. Diversidade estrutural dos esqueletos dos alcaloides benzilisoquinolínicos. Chacón et al., (2012).

Os alcaloides de tipo isopavina, cularina, pavina e rhoeadina compõem um pequeno grupo de **ABIs** relativamente independente, encontrados em 4 famílias: em Berberidaceae nos gêneros *Berberis* e *Leontice*, em Lauraceae só no gênero *Cryptocarya*, para Ranunculaceae no gênero *Thalictrum* e em Papaveraceae estão presentes em todos os gêneros, exceto *Stylophorum*, *Glaucium* e *Bocconia* (Gozler et al., 1983; Liscombe et al., 2005).

Os bisbenzilisoquinolínicos são dímeros estruturais dos benzilisoquinolínicos. Muitos deles possuem propriedades farmacológicas importantes e têm sido usados pelo homem há séculos. Um exemplo é a (+)-tubocurarina, o principal agente bloqueador neuromuscular

encontrado no curare; os aborígenes sul-americanos usaram a palavra "curare" para descrever venenos, particularmente os derivados da videira *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pav. da qual eram preparados extratos para revestir as pontas das flechas de caça ou dardos (Bowman, 2006; Hagel & Facchini, 2013). São particularmente abundantes em espécies de Berberidaceae, Menispermaceae, Monimiaceae e Ranunculaceae, sendo Menispermaceae a maior fonte destes compostos. Em Annonaceae são encontrados nos gêneros *Cardiopetalum*, *Cleistopholis*, *Crematosperma*, *Guatteria*, *Isolona*, *Phaeanthus*, *Polyalthia*, *Popowia*, *Pseudoxandra*, *Uvaria*, e *Xylopia* (Schiff, 1985; Lúcio et al., 2015).

Os secoberberínicos ocorrem em Fumariaceae, Papaveraceae e Ranunculaceae (Shamma & Moniot, 1978), enquanto os protopínicos são amplamente distribuídos em Berberidaceae, Fumariaceae, Papaveraceae, Ranunculaceae e Rutaceae (Onda & Takahashi, 1988). Estruturalmente, os protopínicos são caracterizados pela presença de um anel de 10 átomos, com um grupo *N*-Me e um grupo carbonila. A classificação como alcaloides isoquinolínicos não é dada pela presença real de um núcleo isoquinolínico, mas sim devido aos alcaloides protoberberínicos serem os precursores das protopinas (Manske, 1954; Orito et al., 1980).

Os alcaloides do tipo protoberberínicos são distribuídos em Papaveraceae, Berberidaceae, Fumariaceae, Menispermaceae, Ranunculaceae, Rutaceae, Annonaceae e algumas ocorrências em Magnoliaceae e Convolvulaceae (Grycová et al., 2007). Os alcaloides tipo benzofenantrínicos estão presentes em cinco famílias: Fumariaceae (gêneros *Corydalis*, *Dicentra* e *Fumaria*), Paveraceae, Rutaceae (nos gêneros *Fagara*, *Zanthoxylum* e *Toddalia*), Caprifoliaceae (gênero *Symphoricarpos*) e Meliaceae (gênero *Xylocarpus*) (Šimánek, 1985). Os protoberberínicos e benzofenantrídínicos geralmente possuem atividade antimicrobiana, apoiando seu uso em medicina tradicional e moderna. Sanguinarina e berberina foram identificadas como potenciais drogas anticancerígenas devido aos seus papéis como ligantes que estabilizam o DNA telomérico humano (Bessi et al., 2012; Hagel & Facchini, 2013).

Os alcaloides promorfinanos e morfinanos, assim como os ftalideisoquinolínicos e secoftalisoquinolínicos representam dois grupos adicionais e distintos de **ABIs** complexos que compartilham uma origem biossintética comum. Os morfinanos e promorfinanos são restritos às Ranunculales, sendo produzidos por alguns gêneros nas Papaveraceae (*Chelidonium*, *Corydalis*, *Glaucium* e *Papaver*), Menispermaceae (*Cocculus*) e Berberidaceae (*Thalictrum* e *Nandina*). Os ftalidoisoquinolínicos e secoftalidoisoquinolínicos são restritos a *Eschscholzia*, *Papaver*, *Dicentra* e *Glaucium* nas Papaveraceae e *Cocculus* nas Menispermaceae (Liscombe et al., 2005).

Os aporfínicos compõem um grupo de alcaloides encontrados em várias famílias, como por exemplo, Fumariaceae, Papaveraceae, Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, entre outras (von Nussbaum, 2003).

Os alcaloides tipo fenantreno são encontrados em Annonaceae, Aristolochiaceae, Berberidaceae, Fumariaceae, Hermandiaceae, Menispermaceae, Monimiaceae e Ranunculaceae. Esse alcaloides ocorrem nas mesmas famílias de plantas que os aporfínicos, dos quais são derivados por degradação oxidativa e, geralmente, são incluídos nos aporfinoides (Castedo & Tojo, 1990).

As aplicações medicinais e farmacológicas, assim como os efeitos dos **ABIs** em humanos e animais são melhores estudadas do que suas funções nas plantas que os produzem. Os **ABIs** como morfina e codeína são potentes analgésicos que foram explorados há milhares de anos e são produzidos, exclusivamente, na papoula (*Papaver somniferum* L.). Outros **ABIs** utilizados como produtos farmacêuticos incluem a sanguinarina e a berberina (antimicrobianos) e papaverina (vasodilatador). A tebaína é um precursor metabólico da morfina e codeína usado para a síntese de analgésicos derivados como oxicodona, naloxona e naltrexona (Liscombe & Facchini, 2008).

Como mostra a Tabela 1, além de seu papel proeminente na medicina tradicional, os **ABIs** possuem uma grande variedade de aplicações farmacológicas, atuando como analgésicos, antitússicos, antimicrobianos e antiespasmódicos, existindo vários membros que compõem a lista da Organização Mundial da Saúde de medicamentos essenciais com diferentes aplicações farmacêuticas. Os estudos clínicos mostram alguns destes metabólitos como aprovados para usos medicinais e outros ainda sendo testados em distintas fases (Singla et al., 2010).

A maioria destes compostos não é alvo viável para síntese química devido, principalmente, à ocorrência de múltiplos centros quirais. Portanto, as plantas permanecem como as principais fontes comerciais para muitos alcaloides de interesse farmacêutico (Liscombe & Facchini, 2008). Uma solução a isto está no campo da bioengenharia o qual tem conseguido produzir **ABIs** por microrganismos como *Aspergillus fumigatus* Fresen. e *Saccharomyces cerevisiae* Meyen. Dessa forma, é possível a maior produção destes compostos que, combinados com métodos de síntese podem ser utilizados para inserir grupos funcionais às moléculas, criando assim uma rica diversidade de alcalóides com potenciais atividades farmacológicas novas e aprimoradas (Hawkins & Smolke, 2008; Baccile et al., 2016).

Tabela 1. Diversidade de ABIs aprovados ou em diferentes fases de teste para desenvolvimento de medicamentos.

Subfamília de ABI	Substância	Aplicação farmacêutica	Estudos clínicos
Aporfínico	Glaucina	Antitussivo	Aprovado
		Antiparasitário	Experimental
		Antifúngico	Experimental
		Antidiarreico	Experimental
		Diabetes tipo II	Ensaio clínico (Fase 3)
Benzofenantridínico	Sanguinarina	Antibacteriano	Não aprovado
Benzilisoquinolínicos	Norcoclaurina	Estimulante cardíaco	Ensaio clínico (Fase 1)
	Drotaverina	Antiespasmódico	Aprovado
	Papaverina	Vasodilatador Relaxante do músculo liso	Aprovado Aprovado
Bisbenzilisoquinolínico	Atracuriuma	Bloqueador neuromuscular	Aprovado
	Mivacuriuma	Bloqueador neuromuscular Relaxante muscular	Aprovado Aprovado
Ftalideisoquinolínico	Narcotina	Antitussivo Anticâncer	Aprovado Ensaio clínico (Fase 2)
Morfinano	Codeína	Analgésico Antitussivo	Aprovado Aprovado
	Morfina	Analgésico	Aprovado
Derivados semissintéticos da Morfina	Oxycodona	Analgésico	Aprovado
	Naloxona	Antagonista opioide	Aprovado
	Naltrexona	Antagonista opioide	Aprovado

Fonte: (Narcross et al., 2016).

1.1.1 Os alcaloides benzilisoquinolínicos em Annonaceae

Lúcio et al. (2015) reportaram 934 alcaloides descritos para Annonaceae em 254 plantas estudadas entre os anos de 1929 até 2012, dos quais cerca de 99 compostos mostram algum tipo de atividade biológica.

A diversidade de alcaloides em Annonaceae sugere uma vantagem evolutiva para esta família. A ampla distribuição desses metabólitos parece indicar um papel importante em funções fisiológicas, ecológicas e/ou evolutivas primordiais para a sobrevivência das plantas desta família (González-Esquinca et al., 2014).

A grande maioria dos alcaloides da família é do tipo benzilisoquinolínico, sendo encontrados esqueletos isoquinolínicos simples, benzilisoquinolínicos, bisbenzilisoquinolínicos, protoberberínicos, aporfínicos e fenantrenos (Leboeuf et al., 1980; Lúcio et al., 2015). Entre os isoquinolínicos simples mais conhecidos estão o salsolinol, isolado a partir da folha e do caule de *Annona reticulata* L. e a coridaldina a partir do caule de *Annickia polycarpa* (DC.) Setten & Maas (Jössang et al., 1977; Lúcio et al., 2015). O salsolinol atua no

equilíbrio entre dopamina e acetilcolina, alterando o sistema colinérgico, bem como o sistema dopaminérgico (Aminimoghadamfarouj et al., 2011).

Os benzilisoquinolínicos mais encontrados na família são a reticulina e a coclaurina, sendo esta última derivada da (S)-norcoclaurina, o precursor inicial da via dos **ABIs** que é transformado em (S)-reticulina, a partir do qual vão se formar os diversos esqueletos de **ABIs**, como já discutido acima (Figuras 3 e 4) (Leboeuf et al., 1981; Chacón et al., 2012; Hagel & Facchini, 2013).

Os bisbenzilisoquinolínicos têm sido isolados a partir dos gêneros *Cardiopetalum*, *Cleistopholis*, *Crematosperma*, *Guatteria*, *Isolona*, *Phaeanthus*, *Polyalthia*, *Popowia*, *Pseudoxandra*, *Uvaria* e *Xylopi*a. Alguns deles como funiferina, antioquina e guattebolina exibem atividades tripanocida frente a tripomastigotos de *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 (Mahiou et al., 2000; Lúcio et al., 2015).

Os protoberberínicos são reportados em vários gêneros como *Annickia*, *Annona*, *Guatteria*, *Schefferomitra* e *Xylopi*a. Um dos alcaloides mais comuns desse grupo é a palmatina, a qual apresenta diversas atividades farmacológicas, incluindo anti-inflamatória, antidepressiva, antipirética, entre outras (Malebo et al., 2013; Lúcio et al., 2015; Kaline et al., 2017).

Os fenantrenos são um grupo pouco comum de alcaloides derivados das aporfinas. Os dois maiores representantes deste grupo são a argentinina, a qual apresenta atividade tripanocida frente a tripomastigotos de *T. cruzi*, e a aterospermidina, a qual parece ser danosa ao DNA em bioensaios feitos com leveduras (Mahiou et al., 1994; Gören et al., 2003; Lúcio et al., 2015).

Os alcaloides de tipo aporfínico são produzidos principalmente por plantas do clado das Malvídeas. No entanto, as Annonaceae são produtoras de 29% das substâncias conhecidas desse grupo. Estes alcaloides têm sido descritos para vários gêneros desta família: *Alphonsea*, *Anaxagorea*, *Annickia*, *Annona*, *Artabotrys*, *Asimina*, *Cananga*, *Desmos*, *Duguetia*, *Enantia*, *Fissistigma*, *Fusaea*, *Goniothalamus*, *Greenwayodendron*, *Guatteria*, *Hexalobus*, *Isolona*, *Meiocarpidium*, *Melodorum*, *Mitrella*, *Monanthotaxis*, *Monodora*, *Pachypodanthium*, *Polyalthia*, *Popowia*, *Pseuduvaria*, *Schefferomitra*, *Uvariopsis* e *Xylopi*a, sendo o gênero *Annona* o maior representante na diversidade estrutural destas moléculas (Chen et al., 2013; González-Esquinca et al., 2014).

Há, no Brasil, 29 gêneros e 386 espécies de Annonaceae, distribuídas principalmente na Amazônia, mas também na Mata Atlântica e no Cerrado. Annonoideae é a maior subfamília, com 51 gêneros, dos quais 12 ocorrem no Brasil incluindo *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e

Xylopia, os gêneros mais representativos da família na flora brasileira. No Cerrado, são encontrados 10 gêneros, nenhum endêmico deste domínio, com algumas espécies de ampla distribuição e bastante comuns, como *Annona crassiflora* Mart., *Duguetia furfuracea* (A.St.-Hil.) Saff. e *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart (Lopes & Mello-Silva, 2014).

Estudos prévios em *Annona crassiflora* reportam alcaloides benzilisoquinolínicos (reticulina), aporfínicos (anonaina, asimilobina, estefalagina, lirioidenina, romucosina e xilopina) e annoretina como representante fenantridínico (Hocquemiller et al., 1982; Egydio et al., 2013a; Pereira et al., 2017), sendo algumas atividades biológicas associadas a essas substâncias (Tabela 2).

Tabela 2 Atividades biológicas dos alcaloides reportados em *Annona crassiflora*.

Alcaloide	Atividade biológica	Referência
anonaina	Antidepressivo	(Hasrat et al., 1997)
	Atividade leishmanicida (<i>Leishmania brasiliensis</i> , <i>L. amazonensis</i> <i>L. donovani</i>) e tripanocida (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	(Queiroz et al., 1996)
	Atividade antimicrobiana (<i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i>)	(Paulo et al., 1992)
	Inibidor da proteína tirosina fosfatase CD45	(Miski et al., 1995)
	Atividade hipotensiva	(Leboeuf et al., 1982)
annoretina	Atividade citotóxica (linhagens celulares KB, P-388, A-549 e HT-29)	(Wu et al., 1993)
asimilobina	Antidepressivo	(Hasrat et al., 1997)
	Atividade anti- α -glucosidase	(Mollataghi et al., 2012)
estefalagina	Atividade inibitória da lipase pancreática	(Pereira et al., 2017)
lirioidenina	Atividade antimicrobiana (<i>Candida dubliniensis</i>)	(Costa et al., 2013)
	Atividade anti- α -glucosidase e inibidor de acetilcolinesterase	(Mollataghi et al., 2012)
	Atividade citotóxica (linhagens KB, A-549, P-388 e L-1210)	(Wu et al., 1993)
	Capacidade redutora de melanina em células B16F10	(Chu et al., 2015)
	Atividade inibitória contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv	(Macabeo et al., 2014)
	Atividade antiprotozoaria (<i>Leishmania donovani</i> , <i>Plasmodium falciparum</i>)	(Camacho et al., 2000)
reticulina	Atividade antimicrobiana (<i>Candida albicans</i> e <i>C. parapsilosis</i>)	(Costa et al., 2013)
	Bloqueador do receptor de dopamina	(Banning et al., 1980)
romucosina	Agregação antiplaquetária induzida pelo ácido araquidônico, pelo colágeno e pelo fator ativador de plaquetas	(Kuo et al., 2001)
xilopina	Analgésico e sedativo	(Casagrande & Merotti, 1970)
	Atividade antimicrobiana (<i>Candida. albicans</i> ATCC26555)	(Villar et al., 1987)
	Atividade leishmanicida (<i>L. mexicana</i> e <i>L. panamensis</i>)	(Montenegro et al., 2003)

Com o exposto, fica evidente o grande potencial biológico dos alcaloides benzilisoquinolínicos e seus derivados, sendo as Annonaceae uma das famílias com grande diversidade estrutural desse grupo de alcaloides, especialmente de alcaloides aporfínicos, o objetivo principal deste trabalho foi identificar e isolar os alcaloides benzilisoquinolínicos

presentes nas folhas de *Annona crassiflora* Mart, afim de posteriormente testar possíveis atividades biológicas ainda não atribuídas a eles.

1.2 Material e Métodos

Para a extração dos alcaloides de *Annona crassiflora* foi utilizada a metodologia proposta por Suau et al. (2002) e previamente aplicada por Egydio (2009), com algumas adaptações.

Para isso, 600g de folhas secas e pulverizadas de *A. crassiflora* provenientes de amostras coletadas por Egydio (2009) no bioma Cerrado nos Municípios de Brasília e Belo Horizonte foram sometidas a maceração em 6 L de etanol 70% acidificado a pH=2 com HCl, durante 7 dias, com agitação constante, sendo o solvente renovado a cada 2 dias. O extrato bruto foi filtrado e concentrado gerando assim o extrato bruto ácido (**EB**). Material testemunho está depositado no Herbário da Universidade de São Paulo (A. P. M. Egydio 1 e A. P. M. Egydio 3).

Para a obtenção dos alcaloides contidos no EB seguiram-se os passos do diagrama descrito na Figura 5, adaptando a metodologia proposta por Yubin et al. (2014). O EB ressuspendido em etanol 70% acidificado foi submetido a partições líquido-líquido com CH₂Cl₂ em funil de separação, coletando a fase de interesse. Na primeira partição foi recolhida a fase aquosa ácida. Esta fase teve seu pH ajustado com NH₄OH para ficar em torno de 9-10, deixando assim os alcaloides na sua forma livre. Foi feita uma nova partição com CH₂Cl₂ recolhendo-se a fase orgânica (positiva para Dragendorff). Esta fase foi concentrada sob pressão reduzida em rotaevaporador, constituindo a fase alcaloídica enriquecida (**FAE**).

A FAE foi submetida a cromatografia em coluna de sílica de topo aberto previamente tratada com NaHCO₃, usando como fase móvel 200 mL/fração de uma série de eluentes em ordem crescente de polaridade: hexano 100%, hexano:diclorometano (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90), diclorometano 100%, diclorometano:acetato de etila (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90), acetato de etila 100%, acetato de etila:metanol (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50, 40:60, 30:70, 20:80, 10:90) e metanol 100%. As frações obtidas foram concentradas e monitoradas em cromatografia em camada delgada (CCD) empregando-se cromatoplasas de 0,25mm de silicagel 60 Merck® e fase móvel de CH₂Cl₂:MeOH (9:1) e reveladas com reagente de Dragendorff (Pinheiro et al., 2009). As frações positivas para alcaloides foram submetidas a CCD-preparativa usando placas de vidro com sílicagel 60 (Merck®) de 0,75mm e desenvolvidas com a mesma fase móvel descrita acima.

Alíquotas das frações provenientes da cromatografia em coluna positivas para alcaloides e aquelas da cromatografia em camada delgada preparativa, diluídas a 1mg/mL em MeOH, foram analisadas através de cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por arranjo de diodos (CLAE-DAD).

A cromatografia a gás foi desenvolvida em cromatógrafo a gás (HP 5890 ser. II) acoplado a espectrômetro de massas (HP 5989B) usando a seguinte programação: temperatura da fonte=250°C, temperatura do quadrupolo=100°C, EM=70eV, temperatura do injetor=300°C, gás de arraste=He (1mL/min) e uma coluna HP-5MS (30m x 0,25mm). A temperatura inicial foi 150°C e o aquecimento foi de 10°C/min até atingir 280°C a qual foi mantida por 10 min (Suau et al. 2002; Egydio et al. 2013). Volume de injeção = 1µL.

Para as análises das amostras no CLAE-DAD utilizou-se a metodologia de Yan et al. (2013), com adaptações. Foi utilizado cromatógrafo analítico Agilent 1260 com detector de DAD. Os cromatogramas foram processados com detecção em 220, 240, e 280 nm para alcaloides com esqueleto benzilisoquinolínico. Foi utilizada uma coluna Zorbax SB-C18 (4.6 mm X 250.0 mm) de 5µm a 45°C de temperatura. A fase móvel teve fluxo constante de 1mL/min e eluição em gradiente de solução de TFA em H₂O a 0,1% (A) e MeOH (B) seguindo a programação de 0 min =80% A:20% B, 5 min = 70% A:30% B, 10 min = 50% A:50% B, 25 min = 30% A:70% B, 30 min = 100% B. Foram injetados 20µL de amostra.

O isolamento dos alcaloides por CLAE semi-preparativa foi feito no cromatógrafo Agilent 1200, com a transposição do gradiente da fase móvel utilizando os mesmos parâmetros de programação do CLAE-DAD analítico e fazendo um ajuste no fluxo para 4,176 mL/min. Para tanto, foi utilizada a coluna Zorbax eclipse XDB'C18 (9.4 X 250 mm X 5,0µm). Nem todos os alcaloides identificados puderam ser isolados.

As análises de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono (RMN ¹H e ¹³C), assim como as análises bidimensionais HMBC (*Heteronuclear Multiple Bond Correlation*) e HSQC (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*), foram realizadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade de São Paulo. Os alcaloides purificados foram submetidos à ressonância magnética nuclear no equipamento Bruker AIII de 500 MHz numa temperatura de 24,8 °C, usando DMSO deuterado como solvente para solubilização das amostras que foram transferidas para tubos de ressonância de 5mm para o desenvolvimento das análises.

Figura 5. Metodologia seguida para a extração e purificação dos alcaloides de *A. crassiflora*. As caixas destacadas em cinza mostram a presença de alcaloides nos extratos e frações quando revelados com reagente Dragendorff. *Além dos alcaloides isolados, na FAE foram detectados a anonaina, annoretina, tetrahidropalmatrubina, e um alcaloide não identificado. **As metodologias com CCD preparativa e a CLAE semi-preparativa foram desenvolvidas com as frações obtidas da coluna, positivas para alcaloides (F1-F5).

1.3 Resultados e Discussão

Do processo de extração das folhas de *A. crassiflora* originou-se o extrato etanólico (EB) a fase de partição alcaloídica (FAE) e desta, 5 frações provenientes da coluna de sílica de topo aberto, cuja presença de alcaloides foi monitorada através de CCD (Figura 6). O rendimento em relação à massa total de folhas secas (600 g) foi de 35% para o EB, 0,58% para a FAE, para as frações da coluna 0,10% para a F1, 0,12% para a F2, 0,08% para a F3, 0,11% para a F4 e 0,02% para a F5.

Figura 6. Cromatografia em camada delgada (CCD) desenvolvida com CH_2Cl_2 :MeOH (9:1) como fase móvel. Imagem A: placa observada sob luz no comprimento de 266nm. Imagem B: placa após revelação com reagente Dragendorff. Os pontos avermelhados indicam a presença de alcaloides.

A composição da FAE foi analisada em cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas. Para a identificação dos alcaloides contidos na amostra, foi usada a premissa de que os compostos naturais, em geral, contendo na sua estrutura átomos de carbono, hidrogênio e oxigênio, tem massa molecular par. O mesmo se aplica quando a molécula contém um número par de átomos de nitrogênio. No entanto, uma substância com um número ímpar de átomos de nitrogênio mostrará seu íon molecular com um valor de massa ímpar. Esta regra facilita a procura e identificação de compostos nitrogenados nas análises pela espectrometria de massas (Silverstein et al., 2005).

O cromatograma apresentado na Figura 7 evidencia a presença de 8 alcaloides. Os tempos de retenção e fragmentos de massas majoritários utilizados na identificação são apresentados na Tabela 3. Os alcaloides 1, 2, 4, 5, 7 e 8 foram encontrados numa primeira análise da composição da FAE. Os alcaloides 3 e 6, minoritários dentro da amostra, foram identificados em frações provenientes da CLAE-DAD semi-preparativa e, por isso, aparecem como inserções dentro do cromatograma total.

Figura 7. Cromatograma do perfil alcaloídico da FAE de *A. crassiflora* em CG-EM. As duas porções adicionais indicando os alcaloides 3 e 6 foram obtidas de frações semi purificadas provenientes do CLAE-DAD semi-preparativa.

Tabela 3. Alcaloides encontrados nas folhas de *A. crassiflora* com base no CG-EM e CLAE-DAD

Pico	Tempo de retenção (min)		Absorção máxima UV (CLAE DAD)	Dados obtidos do espectro de massas CG-EM (% relativa)		Nome
	CG-EM#	CLAE-DAD		Fragmentos majoritários	Íon molecular	
1	14.17	-----	----	206 (100), 190 (16), 191 (6), 121 (6), 162 (5), 145 (3), 132 (3), 77 (3), 204 (3)	207 (15)	N.I
2	14.86	----	----	192 (100), 73 (47), 207 (36), 44 (26), 281 (19), 193 (18), 135 (15), 253 (15), 147 (14), 176 (12)	341	Tetrahidropalmatrubina*
3	15.635	11.18	236,272,302	326 (100), 310 (59), 324 (36), 327 (22), 340 (19), 281 (18), 295 (18), 311 (14) 154 (11)	341 (44)	N-O-10-metilharnovina (Litseglutina B)**
4	15.96	16.87	212, 242,278,312	308 (100), 266 (55), 165 (28), 292 (16), 307 (14), 278 (14), 152 (14), 265 (14), 163 (12)	309 (52)	Estefalagina**
5	16.13	17.94	211,242,276,313	294 (100), 266 (18), 165 (18), 278 (13), 280 (12), 293 (12), 264 (10), 163 (10), 152 (9)	295 (51)	Xilopina
6	18.9	14.48	216,244,284	310 (100), 309 (45), 282 (18), 294 (16), 296 (14), 280 (14), 277 (11), 312 (11), 152 (11)	311(59)	Crassiflorina**
7	20.01	19.24	264,282,408	261 (26), 95 (21), 294 (20), 277 (10), 115 (10), 220 (9), 248 (9), 82 (8), 163 (8)	293 (100)	Anoretina
8	21.13	19.36	210,237,272,312	266 (28), 291 (25), 323 (23), 429 (23), 147 (22), 103 (21), 221 (16), 116 (16), 164 (15)	265 (100)	Anonaina

#Tempos de retenção para os picos com íon molecular ímpar encontrados no cromatograma do perfil alcaloídico da FAE. A identificação foi feita por comparação do espectro de massas com dados da literatura. * O alcaloide tetrahidropalmatrubina é uma proposta preliminar. ** A identificação desses alcaloides foi confirmada por dados de RMN.

Os alcaloides N.I [1], xilopina [5], annoretina [7] e anonaina [8] já haviam sido encontrados previamente por Egydio et al. (2013). Como a metodologia de análise em CG-EM foi a mesma, a confirmação dessas substâncias foi facilmente feita contrastando os tempos de retenção e o padrão de fragmentação das moléculas. A substância detectada no pico **1**, apresenta um íon molecular ímpar ($M^{+\bullet} = 207$), o que sugere a presença de um nitrogênio na estrutura. Da mesma forma que em Egydio et al. (2013), ainda não foi possível a identificação deste componente. O alcaloide **5**, majoritário na amostra, foi identificado como xilopina. A presença dos fragmentos $M^{+\bullet} = 295$, $[M^{+\bullet}-H] = 294$ como pico base, além de $[M^{+\bullet}-CH_3] = 280$ e $[M^{+\bullet}-C_2H_5] = 266$ auxiliaram na confirmação, principalmente comparando-se com os dados de Bhaumik et al. (1979). Para o alcaloide **7**, o íon molecular ($M^{+\bullet} = 293$) é o pico base, e corresponde a massa molecular da annoretina, encontrada em folhas de *A. montana* e apresentado em Wu et al. (1993). O pico **8**, o qual corresponde ao alcaloide anonaina, apresenta íon molecular de 265, assim como o fragmento 266 $[M + H]^+$. A presença desse alcaloide era esperada visto ser encontrado em várias espécies de Annonaceae, sendo inclusive considerado um marcador quimiotaxonômico para a família junto com os alcaloides asimilobina e liriodenina (da Cruz et al., 2011).

No trabalho prévio de Egydio et al. (2013) para *A. crassiflora* o alcaloide indicado como **4** foi identificado como romucosina. No entanto, uma análise mais cuidadosa no espectro de massas dessa substância mostrou um erro naquela identificação. Como pode ser visto, a massa molecular do alcaloide **4** é $M^{+\bullet} = 309$, diferente da romucosina em que $M^{+\bullet} = 323$. Além disso, o padrão de fragmentação descrito para este último em Chen et al. (1996) difere do encontrado para o alcaloide **4**. Neste trabalho, porém, foi possível obter esse alcaloide isolado e proceder à identificação correta com dados de RMN de 1H , ^{13}C e DEPT 135 (*Distortionless Enhancement by Polarization Transfer*) (Tabela 4).

O alcaloide **4** isolado apresentou uma consistência oleosa de coloração alaranjada, positivo para o teste com Dragendorff. Seu espectro de massas no CG-EM apresenta um íon molecular em 309 e o pico base em 308, referente à perda de um hidrogênio. O espectro UV mostra picos de absorção em 212, 242, 278 e 312 nm (Anexo 1). No espectro de RMN ^{13}C (Anexo 2) foram observadas a presença de cinco carbonos metínicos (δ_C 61.08, 126.45, 128.06, 128.22 e 129.04), três carbonos metilênicos (δ_C 21.24, 51.86 e 30.70), um carbono metoxílico (δ_C 59.93), um sinal para metila ligada ao nitrogênio (δ_C 41.31). O sinal em δ_C 102.07 sugere a presença de um grupamento metilenodioxila. O espectro de RMN de 1H revela dois singletos integrando cada um para um hidrogênio (δ_H 6.06 e 6.22) compatível com substituinte

metilenodióxi em C1 e C2. Nesse mesmo espectro aparecem quatro sinais de dupletos na região aromática (δ_H 7.95, 7.38, 7.37 e 7.28) com constantes de acoplamento em orto ($J = 7,4 - 7,8$ Hz). Comparando com os sinais obtidos no RMN ^{13}C e DEPT 135, corrobora-se que pertence a um anel aromático com dois carbonos quaternários (δ_C 132.26 e 130.19). Observam-se também dois singletos alongados integrando para 3 hidrogênios, um deles indicando a presença de uma metoxila (δ_H 4.01) e outro mostrando a presença de uma metila ligada ao nitrogênio (δ_H 3,07). Com base nos sinais para hidrogênios aromáticos, demonstra-se que o grupamento metoxila está ligado ao carbono 3. Os dados de RMN de 1H e ^{13}C foram comparados com os da literatura e permitiram identificar **4** como o alcalóide aporfínico estefalagina representado na figura 11. Sua fórmula molecular corresponde a $C_{19}H_{20}NO_3$ e foi recentemente encontrado na polpa do fruto de *A. crassiflora* (Pereira et al., 2017). Relatos anteriores mostram sua ocorrência em *Xylopia aromatica* (Martins et al., 1995) e em *Stephania dinklagei* (Engl.) Diels, uma espécie de Menispermaceae, da qual foi dado o nome à substância (Gören et al., 2003).

Tabela 4. Dados espectroscópicos do RMN do alcaloide 4 em DMSO-d6. δ em ppm, J em Hz

Alcaloide 4 em DMSO-d6			Estefalagina CDCl ₃ (Pereira et al. 2017)	
Posição	δ_H	δ_C	δ_H	δ_C
1	-	145.44, C		144.3, C
2	-	136.30, C		135.0, C
3	-	139.68, C		139.9, C
OMe	4.01 s	59.93, O-CH ₃	3.93 s	59.4, O-CH ₃
3a	-	122.56, C		128.0, C
4	3.26 q, ($J = 5.3, 4.4$)	21.24, CH ₂	2.68 m	23.5, CH ₂
4'	3.26 q, ($J = 5.3, 4.4$)	-	2.76 m	
5	3.51 m	51.86, CH ₂	2.37 ddd ($J = 11.8; 11.8; 4.1$)	53.2, CH ₂
5'	3.51 m	-	3.02 ddd ($J = 11.8; 5.9; 1.3$)	
NCH₃	3.07 s	41.31, NCH ₃	2.47 s	43.7 NCH ₃
6a	3.74 m	61.08, CH	3.07c dd ($J = 14.7; 4.0$)	62.0, CH
7	2.92 m	30.70, CH ₂	2.58 dd ($J = 14.7; 14.7$)	34.4, CH ₂
7'	-	-	3.07c dd ($J = 14.7; 4.0$)	
7a	-	132.26, C		134.6, C
8	7.38 d ($J = 7.52$)	129.04, CH	7.15 dd ($J = 7.4; 1.0$)	128.1, CH
9	7.28 d ($J = 7.4$)	128.22, CH	7.10 ddd ($J = 7.4; 7.4; 1.0$)	126.8, CH
10	7.37 d ($J = 7.66$)	128.06, CH	7.20 ddd ($J = 7.4; 7.4; 1.0$)	127.0, CH
11	7.95 d ($J = 7.84$)	126.45, CH	7.91 dd ($J = 7.4; 1.0$)	126.2, CH
11a	-	130.19, C		131.1, C
12	6.06 s	102.07, CH ₂	5.83 d ($J = 1.5$)	100.7, CH ₂
12'	6.22 s	-	5.98 d ($J = 1.5$)	

Além dos alcaloides já encontrados na espécie, três outros alcaloides puderam ser, pelo menos parcialmente, identificados que correspondem aos picos **2**, **3** e **6** (Figura 7).

A identificação do alcaloide **2** com tempo de retenção de 14.8 min e padrão de fragmentação mostrado na Figura 8 foi proposta contrastando os dados obtidos com relatos na

literatura para uma Annonaceae da Nova Guiné. Os picos importantes presentes no espectro de massas são: o íon molecular com $m/z = 341$, o pico base com $m/z = 192$, além dos picos de fragmentação com $m/z = 135$, 149, 150 e 176. Com base no padrão de fragmentação, este alcaloide está sendo proposto como tetrahidropalmatrubina, composto com esqueleto tetrahidroprotoberberínico, descrito anteriormente como schefferine, o qual foi achado em *Schefferomitra subaequalis* (Scheffer) Diels. por Rudzats (1972). Infelizmente, não conseguimos isolar este composto. Para a confirmação da sua identificação seria importante submetê-lo à análise por RMN.

Figura 8. A: Padrão de fragmentação do pico com tempo de retenção 14.8 min. B: Padrão de fragmentação para tetrahidropalmatrubina retirado de Rudzats (1972).

Dois alcaloides minoritários (**3** e **6**) foram isolados a partir do CLAE-semipreparativo. Devido a baixa concentração, ambos não haviam sido encontrados no perfil alcaloídico geral da FAE

O composto **3** foi obtido como uma substância oleosa amorfa de cor marrom. O espectro de massas no CG-EM apresenta como íon molecular o pico em 341 e fragmento em 326 como pico base $[M^{+•}-CH_3]$, resultado da perda de um grupo CH_3 . O espectro UV mostra picos de absorção em 236, 272 e 302 nm (Tabela 3). O espectro RMN ^{13}C mostrou um total de vinte sinais. Destes, nove são de carbonos não hidrogenados (δ_C 119.3, 123.1, 124.8, 126.28, 127, 144.1, 144.3, 149.07 e 152.79), quatro de carbonos metínicos, sendo um referente à carbono da região alifática (δ_C 61.99) e três da região aromática (δ_C 111.8, 112.08, e 119.2), três carbonos metoxílicos (δ_C 56.3, 56.6 e 61.56) e um carbono metílico ligado ao nitrogênio (δ_C 41.31). No espectro de RMN 1H de **3** observam-se sinais de multipletos entre δ_H 2,06 e 4,93 referentes aos hidrogênios em sistemas alifáticos. Na região de hidrogênios de sistemas aromáticos, observam-se dois dupletos em δ_H 6.89 e 6.99 com constantes de acoplamento em orto ($J=8.2$ Hz) sendo estas atribuídas às posições H8 e H9. Além destes sinais, aparece um singlete em δ_H

6.98 integrando para um hidrogênio, o qual foi atribuído à posição H3. Os três singletos em δ_H 3.65, 3.84 e 3.87 foram atribuídos aos hidrogênios metoxílicos (Tabela 5).

A localização das metoxilas em C1, C10 e C11 foi feita a través de comparação com dados na literatura e correlações nos espectros bidimensionais HMBC e HSQC. O espectro HMBC mostrou sinais de correlações entre o hidrogênio em δ_H 3.04 correspondente à metila ligada ao nitrogênio com os carbonos alifáticos em δ_C 51.57 e 61.99, o qual confirma as atribuições para o carbono C5 e C6a. Este último, por sua vez, apresenta correlação com o sinal em δ_H 3.64 correspondente a um dos hidrogênios ligados a C7. Este hidrogênio ligado a C7 se correlaciona com o carbono em δ_C 119.2, confirmando a atribuição feita para o H8. A partir de C8 consegue-se atribuir a posição de uma das metoxilas ligadas ao C10 e, da mesma forma, C9 auxilia no posicionamento da outra metoxila em C11. A terceira metoxila é assinalada na posição C1 baseado na correlação entre o hidrogênio da posição H3 (δ_H 6.98) com o carbono C1 (δ_C 144.3), sendo que este carbono, por sua vez, se correlaciona com o hidrogênio da metoxila (δ_H 3.65). Os dados de RMN e de peso molecular obtidos correspondem a substância representada na figura 9, descrita em *Miliusa cuneata* Craib. (Annonaceae) e *Litsea laeta* (Nees) Hook. f. (Lauraceae) com o nome de *N-O-10-metilarnovina* e em *Litsea glutinosa* (Lour.) C.B. Rob. como litseglutina B. Os valores dessa última foram utilizados para a confrontação e confirmação da estrutura (Rastogi & Borthakur, 1980; Chen et al., 2003; Yang et al., 2005)

Tabela 5. Dados espectroscópicos do RMN do alcaloide 3 em DMSO-d6. δ em ppm, J em Hz.

Composto 3 em DMSO-d6				Litseglutina B em CD ₃ OD (Yang et al., 2005).	
Posição	δ_H	δ_C	HMBC	δ_H	δ_C
1		144.3, C			146.2
OMe	3.65 s	61.56 O-CH ₃	C1	3.44 s	60.9
1a	-	123.1, C			125.6
1b		126.28, C			127
2	-	144.1, C			150.8
3	6.98 s	111.8, CH	C1, C1b, C4	6.69 s 1h	115.9
3a	-	119.3, C			128.1
4	2.96, m	25.95, CH ₂		2.82, 2.76 (m)	28.2
4'	2.99, m	-		-	-
5	3.39 m	51.57, CH ₂	C3a	3.21, 3.80 (m)	53.9
5'	3.67 m	-		-	-
NCH₃	3.04 s	41.31, NCH ₃	C5, C6a	2.70 s	43.2
6a	4.03 m	61.99, CH		3.31 (dd 9.5, 4.3)	64.6
7	3.64 m	32.26, CH ₂	C6a, C8, C11a	3.18, 2.45 dd(13.8, 4.3)	35.6
7'	3.37 m	-		-	-
7a	-	127, C			130.5
8	6.89 d (J=8.2)	119.2, CH	C7, C10	7.05 d (8.2)	123.5
9	6.99 d (J=8.2)	112.08, CH	C7a, C11	6.95 d(8.2)	113.4
10	-	149.07 C			153.6
OMe	3.84 s	56.3 O-CH ₃	C10	3.88 s	56.7
11	-	152.79, C			148.6
OMe	3.87 s	56.6 O-CH ₃	C11	3.61 s	61.1
11a	-	124.8, C			126.3

Figura 9. Representação do alcaloide de *N*-O-10-metilharnovina (Litseglutina B) e as correlações do HMBC.

O composto **6** foi obtido como uma substância oleosa amorfa de cor marrom positivo para o teste de Dragendorff. O espectro de massas gerado no CG-EM apresenta um padrão de fragmentação com íon molecular de $m/z = 311$ e pico base em $m/z = 310$ por conta da perda de um hidrogênio. O espectro UV mostra picos de absorção em 216, 244 e 284 nm. O espectro RMN ^{13}C mostrou um total de dezoito sinais; destes, nove são de carbonos não hidrogenados (δ_{C} 110.9, 117.1, 121.4, 121.9, 133.9, 136.40, 139.0, 144.1 e 157.3), quatro carbonos metínicos (δ_{C} 52.1, 114.9, 115.6 e 128.1), três carbonos metilênicos (δ_{C} 20.6, 33.1 e 40.7) um sinal para carbono metoxílico (δ_{C} 59.9) e um sinal em δ_{C} 101.07 sugere a presença de um grupamento metilenodioxila (Tabela 6).

O espectro de RMN de ^1H do alcaloide **6** mostrou na região de hidrogênios em sistemas alifáticos dois duplo dupletos (δ_{H} 2.89 e 3.02) ($J = 4.8$ Hz) correspondentes aos hidrogênios da posição 7. Além disso, outro duplo duplete integrando para dois hidrogênios em δ_{H} 2.85 correspondentes à posição 4, e três multipletos, cada um deles integrando para um hidrogênio (δ_{H} 3.20, 3.64 e 4.35) correspondentes às posições 5 e 6a. Na região de hidrogênios de sistemas aromáticos foram encontrados três multipletos (δ_{H} 6.75, 7.8 e 7.8) os quais foram atribuídos às posições H8, H10 e H11. A localização da metoxila foi atribuída através da correlação obtida no espectro HMBC, entre o sinal do hidrogênio dela (δ_{H} 3,96 s) com o carbono 3 (δ_{C} 139.0). A correlação dos hidrogênios δ_{H} 6.03 e 6.16 com os carbonos 1 (δ_{C} 144.1) e 2 (δ_{C} 136.40) permite a confirmação do grupamento metilenodioxila.

A representação da estrutura apresenta o alcaloide aporfínico com fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{O}_4\text{NH}_{17}$. A procura na literatura não apresenta correspondência com nenhuma estrutura descrita anteriormente. Dessa forma, trazemos a descrição de uma nova substância dentro dos alcaloides benzilisoquinolínicos, especificamente dentro da classe dos aporfínicos, para a qual propõe-se o nome de crassiflorina (Figura 10).

Tabela 6. Dados espectroscópicos do RMN do alcaloide 6 em DMSO-d₆ δ em ppm, J em Hz.

Posição	δ_H	δ_C mult.	HMBC
1	-	144.1, C	
1a		110.9, C	
1b		117.1, C	
2	-	136.40, C	
3	-	139.0, C	
OMe	3.96 s	59.9, O-CH ₃	C3
3a	-	121.9, C	
4	2.85 dd ($J = 4.5, 10.08$)	20.6, CH ₂	C5
5	3.20 m	40.7, CH ₂	
5'	3.64 m	-	
6a	4.35 m	52.1, CH	
7	2.89 dd ($J = 4.8, 14.2$)	33.1, CH ₂	
7'	3.02 dd ($J = 4.8, 14.2$)	-	C1b, C6a, C7a, C8, C3a, C11a
7a	-	133.9, C	
8	6.75 m ($J = 7.52$)	115.6, CH	C7, C10, C9, C11 ^a
9		157.3, C	
10	7.8 m	114.9, CH	
11	7.8 m	128.1, CH	C7a, C9, C1a
11a	-	121.4, C	
12	6.03 s ($J = 1.07$)	101.7, CH ₂	C1, C2
12'	6.16 d ($J = 1.01$)	-

Figura 10. Representação do alcaloide 6 (crassiflorina) e as correlações do HMBC.

Considerando o processo de identificação dos alcaloides isolados (estefalagina, crassiflorina, litseglutina e xilopina), os alcaloides identificados (annoretina, anonaina, tetrahidropalmatrubina) (Figura 11), além dos anteriormente descritos para a espécie (asimilobina, liriodenina e reticulina), os resultados apresentam a *Annona crassiflora* como uma fonte de diversidade estrutural para alcaloides benzilisoquinólicos. As atividades biológicas reportadas para estes compostos reforçam a necessidade da continuidade na pesquisa e na investigação do potencial farmacológico desta planta, além da importância da conservação da espécie. Além dos diversos usos etnomedicinais seu consumo como alimento *in natura* pelas comunidades do cerrado brasileiro, essa é uma espécie potencial para obtenção de novas drogas.

Figura 11. Alcaloides identificados no presente trabalho nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.

1.4 Referências

- Aminimoghadamfarouj, N., Nematollahi, A., & Wiart, C. (2011). Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. *Journal of Asian Natural Products Research*, 13(5), 465–476.
- Baccile, J. A., Spraker, J. E., Le, H. H., Brandenburger, E., Gomez, C., Bok, J. W., Macheleidt, J., Brakhage, A. A., Hoffmeister, D., Keller, N. P., & Schroeder, F. C. (2016). Plant-like biosynthesis of isoquinoline alkaloids in *Aspergillus fumigatus*. *Nature Chemical Biology*, 12(April), 1–9.
- Banning, J. W., Uretsky, N. J., Patil, P. N., & Beal, J. L. (1980). Reticuline: A dopamine receptor blocker. *Life Sciences*, 26(24), 2083–2091.
- Bessi, I., Bazzicalupi, C., Richter, C., Jonker, H. R. A., Saxena, K., Sissi, C., Chioccioli, M., Bianco, S., Bilia, A. R., Schwalbe, H., & Gratteri, P. (2012). Spectroscopic, molecular modeling, and NMR-spectroscopic investigation of the binding mode of the natural alkaloids berberine and sanguinarine to human telomeric G-quadruplex DNA. *ACS Chemical Biology*, 7(6), 1109–1119.
- Bhaumik, P. K., Mukherjee, B., Juneau, J. P., Bhacca, N. S., & Mukherjee, R. (1979). Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, 18(9), 1584–1586.
- Bowman, W. C. (2006). Neuromuscular block. *British Journal of Pharmacology*, (Suppl 1), S277-86.
- Camacho, M. D. R., Kirby, G. C., Warhurst, D. C., Croft, S. L., & Phillipson, J. D. (2000). Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. *Planta Medica*, 66(5), 478–480.
- Casagrande, C., & Merotti, G. (1970). Studies in aporphine alkaloids. 3. Isolation and synthesis of alkaloids of *Xylopiia brasiliensis* St. Hil. *Il Farmaco; Edizione Scientifica*, 25(11).
- Castedo, L., & Tojo, G. (1990). Phenanthrene Alkaloids. In A. Brossi (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Vol. 39, pp. 99–138). Academic Press.
- Chacón, I. D. L. C., González-Esquinca, A. R., & Riley-Saldaña, C. A. (2012). Biosíntesis de alcaloides bencilisoquinolínicos. *Universitas Scientiarum*, 17(2), 189–202.
- Chen, B., Feng, C., Li, B.-G., & Zhang, G.-L. (2003). Two new alkaloids from *Miliusa cuneata*. *Natural Product Research*, 17(6), 397–402.
- Chen, J., Gao, K., Liu, T., Zhao, H., Wang, J., Wu, H., Liu, B., & Wang, W. (2013). Aporphine alkaloids: A kind of alkaloids' extract source, chemical constitution and pharmacological actions in different botany. *Asian Journal of Chemistry*, 25(18), 10015–10027.
- Chu, C.-W., Liu, C.-M., Chung, M.-I., & Chen, C.-Y. (2015). Biofunctional Constituents from *Michelia compressa* var. *lanyuensis* with Anti-Melanogenic Properties. *Molecules*.
- Cordell, G. A., Quinn-Beattie, M. Lou, & Farnsworth, N. R. (2001). The potential of alkaloids in drug discovery. *Phytotherapy Research*, 15(3), 183-205.
- Costa, E. V., da Cruz, P. E. O., de Lourenço, C. C., de Souza Moraes, V. R., de Lima Nogueira, P. C., & Salvador, M. J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmanii* A. DC. (Annonaceae). *Natural Product Research*, 27(11), 1002–1006.
- da Cruz, P. E. O., Costa, E. V., Moraes, V. R. de S., Nogueira, P. C. de L., Vendramin, M. E.,

- Barison, A., Ferreira, A. G., & Prata, A. P. do N. (2011). Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 39(4–6), 872–875.
- Dewick, P. M. (2009). *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach* (3rd Edition). Wiley.
- Egydio, A. P. M. (2009). *Análises das variações fitoquímicas, estrutura genética e importância econômica de Annona crassiflora Mart. no cerrado*. Universidade de São Paulo.
- Egydio, A. P. M., Valvassoura, T. a., & Santos, D. Y. a C. (2013). Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 145–151.
- González-Esquinca, A. R., De-La-Cruz-Chacón, I., Castro-Moreno, M., Orozco-Castillo, J. A., & Riley- Saldaña, C. A. (2014). Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 01–16.
- Gören, A. C., Zhou, B. N., & Kingston, D. G. I. (2003). Cytotoxic and DNA Damaging Activity of Some Aporphine Alkaloids from *Stephania dinklagei*. *Planta Medica*, 69(9), 867–868.
- Gozler, B., Lantz, M. S., & Shamma, M. (1983). The pavine and isopavine alkaloids. *Journal of Natural Products*, 46(3), 293–309.
- Grycová, L., Dostál, J., & Marek, R. (2007). Quaternary protoberberine alkaloids. *Phytochemistry*, 68(2), 150–175.
- Hagel, J. M., & Facchini, P. J. (2013). Benzyloquinoline alkaloid metabolism: A century of discovery and a brave new world. *Plant and Cell Physiology*, 54(5), 647–672.
- Hasrat, J. A., Bruyne, T., Backer, J.-P., Vauquelin, G., & Vlietinck, A. J. (1997). Isoquinoline Derivatives Isolated from the Fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} Receptor Agonists in Rats: Unexploited Antidepressive (Lead) Products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49(11), 1145–1149.
- Hawkins, K. M., & Smolke, C. D. (2008). Production of benzyloquinoline alkaloids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Chemical Biology*, 4(9), 564–573.
- Hocquemiller, R., Cave, A., Jacquemin, H., Touche, A., & Forgacs, P. (1982). Alcaloides des annonacées. XXXVI. Alcaloïdes de L' *Annona crassiflora* Mart. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, XVI(1), 4–6.
- Jössang, A., Leboeuf, M., & Cavé, A. (1977). Alcaloïdes des Annonacées XVII: Alcaloïdes de l' *Enantia polycarpa* Engl. et diels. *Planta Med*, 32(7), 249–257.
- Kaline, S., Chaves, M., & Feitosa, C. M. (2017). Pharmacological activities palmatine alkaloid compound isolated from *Guatteria friesiana* prospects for new drug development ., 6(59), 35–39.
- Kuo, R. Y., Chang, F. R., Chen, C. Y., Teng, C. M., Yen, H. F., & Wu, Y. C. (2001). Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. *Phytochemistry*, 57(3), 421–425.
- Leboeuf, M., Cave, A., Forgacs, P., Tiberghien, R., Provost, J., Touche, A., & Jacquemin, H. (1982). Alcaloïdes des annonacées XL. étude chimique et pharmacologique des alcaloïdes de L' *Annona montana* macf. *Plantes Médicinales et Phytothérapie*, XVI(3), 169–184.

- Leboeuf, M., Cavé, a., Bhaumik, P. K., Mukherjee, B., & Mukherjee, R. (1980). The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, 21(12), 2783–2813.
- Leboeuf, M., Legueut, C., Cavé, A., Desconclois, J. F., Forgacs, P., & Jacquemin, H. (1981). Alcaloïdes des Annonacées XXIX: Alcaloïdes de l'*Annona muricata* L. TT - Alkaloids of Annonaceae. XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*. *Planta Med*, 42(5), 37–44.
- Liscombe, D. K., & Facchini, P. J. (2008). Evolutionary and cellular webs in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 19(2), 173–180.
- Liscombe, D. K., MacLeod, B. P., Loukanina, N., Nandi, O. I., & Facchini, P. J. (2005). Evidence for the monophyletic evolution of benzyloquinoline alkaloid biosynthesis in angiosperms. *Phytochemistry*, 66(11 SPEC. ISS.), 1374–1393.
- Lopes, J. de C., & Mello-Silva, R. (2014). Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(spe1), 125–131.
- Lúcio, A. S. S. C., Almeida, J. R. G. da S., Da-Cunha, E. V. L., Tavares, J. F., & Barbosa Filho, J. M. (2015). Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. In H.-J. Knölker (Ed.), *Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 74, pp. 233–409). Academic Press.
- Macabeo, A. P. G., Lopez, A. D. A., Schmidt, S., Heilmann, J., Dahse, H.-M., Alejandro, G. J. D., & Franzblau, S. G. (2014). Antitubercular and cytotoxic constituents from *Goniothalamus gitingensis*. *Records of Natural Products*, 8(1).
- Mahiou, V., Roblot, F., Fournet, A., & Hocquemiller, R. (2000). Bisbenzyloquinoline alkaloids from *Guatteria boliviensis* (Annonaceae). *Phytochemistry*, 54(7), 709–716.
- Mahiou, V., Roblot, F., Hocquemiller, R., Cave, A., Rojas de Arias, A., Inchausti, A., Yaluff, G., Fournet, A., & Angelo, A. (1994). New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *Journal of Natural Products*, 57(7), 890–895.
- Malebo, H. M., Wenzler, T., Cal, M., Swaleh, S. M., Omolo, M. O., Hassanali, A., Séquin, U., Häussinger, D., Dalsgaard, P., Hamburger, M., Brun, R., & Ndiege, I. O. (2013). Anti-protozoal activity of aporphine and protoberberine alkaloids from *Annickia kummeriae* (Engl. & Diels) Setten & Maas (Annonaceae). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13, 48.
- Manske, R. H. F. (1954). The Protopine Alkaloids. In R. H. F. Manske & H. L. Holmes (Eds.), *Alkaloids: Chemistry and Physiology* (Vol. 4, pp. 147–166).
- Martins, D., de Alvarenga, M. A., Roque, N. F., & Felicio, J. D. (1995). Diterpenes and alkaloids from Brazilian *Xylopia* species. *Quimica Nova*, 18(1), 14–16.
- Miski, M., Xing Shen, Cooper, R., Gillum, A. M., Fisher, D. K., Miller, R. W., & Higgins, T. J. (1995). Aporphine alkaloids, CD45 protein tyrosine phosphatase inhibitors, from *Rollinia ulei*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 5(14), 1519–1522.
- Mollataghi, A., Coudiere, E., Hadi, A. H. A., Mukhtar, M. R., Awang, K., Litaudon, M., & Ata, A. (2012). Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. *Fitoterapia*, 83(2), 298–302.
- Montenegro, H., Gutierrez, M., Romero, L. I., Ortega-Barría, E., Capson, T. L., & Cubilla-Rios, L. (2003). Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with Leshmanicidal activity, *Planta Medica*, 69, 677–679.

- Narcross, L., Fossati, E., Bourgeois, L., Dueber, J. E., & Martin, V. J. J. (2016). Microbial Factories for the Production of Benzyloquinoline Alkaloids. *Trends in Biotechnology*.
- Onda, M., & Takahashi, H. (1988). Protopine Alkaloids. In A. Brossi (Ed.), *The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Vol. 4, pp. 181–209). Academic Press.
- Orito, K., Kurokawa, Y., & Itoh, M. (1980). On the synthetic approach to the protopine alkaloids. *Tetrahedron*, 36(5), 617–621.
- Paulo, M. de Q., José M. Barbosa-Filho, Edetrudes O. Lima, Maia, R. F., Cassia, R. de, Barbosa, B. B. C., & Kaplan, M. A. C. (1992). Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* DC. *Sabouraudia*, 36, 39–41.
- Pereira, M. N., Justino, A. B., Martins, M., Machado, Peixoto, L. G., Vilela, D. D., Santos, P. S., Teixeira, T. L., da Silva, C., Vieira, Goulart, L. R., Pivatto, M., & Espindola, F. S. (2017). Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Industrial Crops and Products*, 97, 324–329.
- Pinheiro, M. L. B., Xavier, C. M., de Souza, A. D. L., Rabelo, D. D. M., Batista, C. L., Batista, R. L., Costa, E. V., Campos, F. R., Barison, A., Valdez, R. H., Ueda-Nakamura, T., & Nakamura, C. V. (2009). Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(6), 1095–1102.
- Queiroz, E. F., Roblot, F., Cavé, a, Paulo, M. Q., & Fournet, a. (1996). Pessoaine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*, 59(4), 438–440.
- Rastogi, R. C., & Borthakur, N. (1980). Alkaloids of *Litsea laeata* and *L. salicifolia*. *Phytochemistry*, 19, 998–999.
- Rudzats, R. (1972). *The constituents of Schefferomitra and Boletus species from New Guinea*. Wollongong University College.
- Schiff, P. L. (1985). Bisbenzyloquinoline Alkaloids. In J. D. Phillipson, M. F. Roberts & M. H. Zenk (Eds.), *The Chemistry and Biology of Isoquinoline Alkaloids* (1st ed., pp. 126–141). Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Shamma, M., & Moniot, J. L. (1978). *Isoquinoline Alkaloids Research 1972–1977*. Plenum Press.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2005). *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. *Organic Chemistry* (7th ed.). Wiley.
- Šimánek, V. (1985). Benzophenanthridine Alkaloids. In A. Brossi (Ed.), *Alkaloids: Chemistry and Pharmacology* (Vol. 26, pp. 185–240). Academic Press.
- Singla, D., Sharma, A., Kaur, J., Panwar, B., & Raghava, G. P. S. (2010). BIAdb: a curated database of benzyloquinoline alkaloids. *BMC Pharmacology*, 10, 4.
- Stadler, R., Kutchan, T. M., & Zenk, M. H. (1989). (S)-norcoclaurine is the central intermediate in benzyloquinoline alkaloid biosynthesis. *Phytochemistry*, 28(4), 1083–1086.
- Suau, R., Cabezudo, B., Rico, R., Nájera, F., & López-Romero, J. M. (2002). Direct Determination of Alkaloid Contents in *Fumaria* Species by GC-MS. *Phytochemical Analysis*, 367(February), 363–367.
- Villar, A., Mares, M., Rios, J. L., Canton, E., & Gobernado, M. (1987). Antimicrobial activity

-
- of benzyloquinoline alkaloids. *Die Pharmazie*, 42(4), 248—250.
- von Nussbaum, F. (2003). Alkaloids. Nature's Curse or Blessing? By Manfred Hesse. *Angewandte Chemie International Edition*, 42(40), 4852–4854.
- Wu, Y.-C., Chang, G.-Y., Chang-Yih, D., & Shang-Kwei, W. (1993). Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *Phytochemistry*, 33(2), 497–500.
- Yan, R., Wang, W., Guo, J., Liu, H., Zhang, J., & Yang, B. (2013). Studies on the alkaloids of the bark of *Magnolia officinalis*: Isolation and on-line analysis by HPLC-ESI-MSn. *Molecules*, 18(7), 7739–7750.
- Yang, J., Li, L., Wang, Y., Zhao, J., & Zhang, H. (2005). Two New Aporphine Alkaloids from *Litsea glutinosa*. *Helvetica Chimica Acta*, 88(4), 9–12.
- Yubin, J. I., Miao, Y., Bing, W., & Yao, Z. (2014). The extraction , separation and purification of alkaloids in the natural medicine. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 6(1), 338–345.

Capítulo 2: Atividade fitotóxica dos alcaloides de *Annona crassiflora* Mart.

Resumo

Os compostos aleloquímicos são produzidos pelas plantas e utilizados como mecanismos de defesa e interação com o ambiente. Vários destes compostos podem induzir alterações fisiológicas, podendo ser explorados como novas substâncias com propriedades herbicidas. Annonaceae é uma das famílias mais diversas do cerrado brasileiro, sendo *Annona crassiflora* uma espécie nativa amplamente distribuída neste bioma. Diversas substâncias já foram descritas para esta espécie, entre elas os alcaloides aporfínicos, foco deste estudo. Assim, o objetivo deste trabalho consistiu em avaliar a atividade fitotóxica do extrato bruto (EB), da fase alcaloídica enriquecida (FAE) e dos alcaloides aporfínicos xilopina e estefalagina isolados das folhas de *A. crassiflora* em ensaios de inibição do crescimento de coleótilos de trigo, além da atividade sobre o desenvolvimento inicial de espécies alvo (*Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*) e de uma espécie invasora, capim-braquiaria (*Urochloa decumbens*). Os resultados sugerem que a estefalagina parece ser mais fitotóxica que a xilopina no bioensaio com coleótilos, sendo obtidas porcentagens de inibição para as concentrações mais altas (1 mM e 0,5 mM) similares à encontrada para o herbicida glifosato. A FAE apresentou a atividade inibitória mais significativa tanto para *L. sativa* quanto para *L. esculentum*, enquanto que para *U. decumbens*, a xilopina foi a mais ativa, chegando a inibir o crescimento da raiz em 50% na concentração de 0,25 mM. Estes resultados demonstram o potencial fitotóxico da FAE e da xilopina em ensaios *in vitro*. Dessa forma, sugerimos o estudo destas amostras em experimentos em estufas e/ou campo afim de verificar sua possível aplicação como herbicida natural no controle de *U. decumbens*.

Palavras chave: *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Urochloa decumbens*, coleótilo de trigo, estefalagina, xilopina, *Annona crassiflora*, alelopatia.

Chapter 2: Phytotoxic activity of *Annona crassiflora* Mart. alkaloids

Abstract

Allelochemicals are produced by plants and used as defense mechanisms and interaction with the environment. These compounds can induce physiological changes and can be exploited as new herbicidal compounds with potential to provide selective management of herbs, aiming the usage in organic agriculture. Annonaceae is one of the most diverse families in the Brazilian cerrado. *Annona crassiflora* is a native species widely distributed in this biome. Several compounds have already been described for this species, among them, aporphine alkaloids which are the focus of this study. The main objective of the present study was to evaluate the possible phytotoxic activity of the crude extract (EB), the enriched alkaloid enriched phase (FAE) and the aporphine alkaloids xylophine and stephalagine obtained from leaves of *A. crassiflora* leaves over common target-plants (*Lactuca sativa* and *Lycopersicon esculentum*), and a weed species (*Urochloa decumbens*). Stephalagine was more phytotoxic than xylophine in the coleoptile bioassay. The coleoptile growth inhibition obtained with the highest concentrations of this alkaloid (1 mM and 0.5 mM) was similar to that found for glyphosate. The FAE sample presented the most significant inhibitory activity for both *L. sativa* and *L. esculentum*. Notwithstanding, a decrease of 50% on root growth *U. decumbens* was found with xylophine at 0.25 mM. Our results expound the potential phytotoxic activity of FAE and xylophine in *in vitro* assays. Based on that, we suggest future investigations of these two samples in greenhouses/field studies in order to verify their possible application as a natural herbicide for *U. decumbens* control.

Key words: *Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum*, *Urochloa decumbens*, wheat coleoptile, stephalagine, xylophine, *Annona crassiflora*, allelopathy.

2.1 Introdução

A alelopatia é descrita como a interferência no crescimento de plantas resultante de interações químicas com outras plantas e/ou outros organismos, mediada pela liberação de metabolitos secundários bioativos produzidos por uma planta e denominados aleloquímicos. Os mecanismos de liberação destes compostos são relacionados a diversos tecidos vegetais e incluem volatilização ou lixiviação nas partes aéreas, exsudação das raízes e decomposição de resíduos vegetais no solo (Latif et al., 2017).

Alguns mecanismos de ação dos aleloquímicos podem induzir ações fisiológicas como (i) inibição na germinação de sementes, no crescimento de raízes ou no crescimento de plântulas, (ii) alteração da estrutura da célula, (iii) alteração na divisão celular, (iv) interferência nas atividades da membrana celular, no processo de respiração e na fotossíntese, assim como (v) na absorção de nutrientes (Jabran, 2017). Alguns exemplos são o sorgoleone isolado do sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) o qual inibe a função da mitocôndria e do fotossistema II (Rasmussen et al., 1992; Einhellig, 1994), o BOA (2(3H)-benzo-oxazolinoni) isolado do centeio (*Secale cereale* L.) que pode desencadear uma diminuição na regeneração das camadas celulares da raiz, no alongamento da raiz e no número de raízes laterais (Burgos et al., 2004; Alsaadawi, 2013), o DIBOA (2,4-dihidroxi-1,4-benzoxazin-3(4H)) isolado do centeio que pode causar uma diminuição da síntese de clorofila (Barnes & Putnam, 1987), além da inibição da divisão celular, fotossíntese, respiração e absorção de nutrientes, perturbação da membrana celular, hormônios e síntese proteica atribuída á compostos fenólicos (Li et al., 2010).

Os aleloquímicos existem em todas as plantas e seus tecidos (raízes, caule, casca, folhas, flores, frutas ou sementes), com concentrações variáveis de uma parte para outra. Os exsudados de raiz representam a maior fonte de insumos aleloquímicos no solo da rizosfera. A síntese e exsudação destes compostos é reforçada por condições de estresse que as plantas são submetidas, como temperaturas extremas, seca e exposição UV (Jilani et al., 2008).

A alelopatia pode oferecer novas substâncias com propriedades herbicidas que tenham o potencial de prover uma gestão seletiva de ervas, com potencial de uso em agricultura orgânica. Ao contrário dos herbicidas usados comumente, os aleloquímicos são menos prejudiciais ao ambiente e ao homem, menos persistentes e apresentam bioatividade em baixas concentrações (Tharayil et al., 2006; Inoue et al., 2010a). A evolução da resistência a herbicidas tem afetado severamente a sustentabilidade dos sistemas de controle de ervas daninhas em todo o globo. Resíduos de pesticidas tanto em alimentos quanto no ambiente são uma preocupação importante para a humanidade. Além disso, tem havido um aumento na demanda de alimentos

orgânicos em várias partes do mundo. Estes três fatos enfatizam a necessidade de se conseguir um controle sustentável de ervas daninhas com métodos diferentes dos herbicidas comerciais (Jabran, 2017). Por conta disso, as estratégias para a descoberta de aleloquímicos tem tanta importância quanto a procura de compostos de interesse na indústria farmacêutica e envolvem a triagem de extratos brutos e compostos purificados para avaliar seu potencial em atividades biológicas.

Os bioensaios *in vitro* são ferramentas essenciais para a identificação de aleloquímicos, embora a resposta bioquímica e/ou fisiológica de um organismo num bioensaio nem sempre ser linear em termos de dose-resposta. Muitos aleloquímicos são inibitórios em concentrações milimolares, mas podem ser estimulantes em concentrações micromolares, por exemplo. Esta anomalia confunde os esforços para determinar os mecanismos de ação em bioensaios e relacionar os resultados com as concentrações *in situ* dos aleloquímicos (Leather & Einhellig, 1988). A maioria dos bioensaios alelopáticos está correlacionada com estudos fitoquímicos que avaliam a bioatividade afetando a germinação e o crescimento de plântulas. Esses parâmetros são aceitos como medidas indiretas de outros processos fisiológicos afetados pela interação química. Desta forma, uma ampla gama de efeitos são cobertos e esses bioensaios servem para selecionar compostos que poderiam ser avaliados em estudos de estufa e campo (Macías et al., 2000).

As plantas de semente pequena, como *Agrostis stolonifera* L. (Poaceae) e *Lactuca sativa* L. (Asteraceae – alface), são frequentemente usadas para identificar ou avaliar a fitotoxicidade de substâncias em ensaios *in vitro* que requerem pequenas quantidades de produtos (Duke et al., 2000). Estes ensaios têm sido usados para determinar a toxicidade de compostos de mercúrio e vários metais pesados, micotoxinas, herbicidas, entre outros. Nesse ensaio, as sementes germinam em placas sobre um material de suporte (papel de filtro, algodão, quartzo, areia, ágar, etc.) com um volume de solução contendo a substância a ser testada. Após vários dias de incubação no escuro ou sob a luz, a taxa de crescimento ou a presença de sintomas anormais das plântulas são observadas. De um modo geral, o método em placa possui muitas vantagens em comparação com os métodos em vaso ou hidroponia, principalmente, devido ao requisito de menor quantidade das substâncias teste, além de ser mais rápido e menos custoso (Kuboi & Fujii, 1984).

Vários aleloquímicos foram descritos de diferentes espécies de plantas, sendo alguns exemplos os benzoxazinoides, as benzoquinonas, os glucosinolatos e os terpenos (Jabran, 2017).

As Annonaceae são conhecidas por ser uma importante fonte de produtos naturais. Sua ampla gama de metabólitos abarca várias classes como terpenoides, compostos fenólicos, alcaloides, especialmente os benzilisoquinolínicos (derivados da tirosina), além de ser a maior produtora dos policetídeos conhecidos como acetogeninas, os quais apresentam um grande potencial de atividades biológicas descritas. Várias espécies da família apresentam potencial fitotóxico, como o reportado por Formagio et al. (2010) para os extratos metanólicos de *Annona crassiflora* Mart, *A. coriacea* Mart., *A. dioica* A. St.-Hil., *A. sylvatica* A. St.-Hil. e *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. sobre plântulas de *Lactuca sativa* L.. Nesse estudo, as plântulas apresentaram um comprimento da radícula menor que 0,5 cm na presença dos extratos na concentração de 1% (m/v). Novaes et al. (2016), analisando os extratos etanólicos de folhas de *Xylopia aromatica* (Lam.) Mart. e *A. coriacea*, observaram atividade inibitória no crescimento de coleótilos de *Triticum aestivum* L e no desenvolvimento plântulas de espécies alvo (*Lactuca sativa* L, *Allium cepa* L. e *Lycopersicon esculentum* Mill.) e de braquiária (*Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster).

Para *Annona crassiflora* há relato de inibição total na germinação das sementes de *Urochloa brizantha* (Hochst. ex A. Rich.) R.D. Webster (Sinônimo: *Brachiaria brizantha*) e *Euphorbia heterophylla* L. a partir do extrato hidrometanólico das sementes (Inoue et al., 2010a). Estudos com substâncias isoladas da espécie mostraram que o estigmasterol e o sitosterol não inibiram ou alteraram a velocidade de germinação de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia* (Dammer) O'Donell. Por outro lado, essas mesmas substâncias alteraram o desenvolvimento da radícula e do hipocótilo de *E. heterophylla* (Inoue et al., 2010b).

Ainda que diferentes ensaios e relatos descrevam o potencial fitotóxico para os extratos e compostos isolados das Annonaceae, esses estudos geralmente estão focados em compostos fenólicos, como flavonoides e coumarinas, glucosinolatos e terpenoides (Li et al., 2010). Até onde sabemos, não há relatos para análise de atividade fitotóxica de alcaloides isolados de espécies de Annonaceae. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial fitotóxico do extrato bruto, da fase alcaloídica enriquecida e dos alcaloides xilopina e estefalagina isolados das folhas de *Annona crassiflora*, espécie nativa do cerrado.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Preparação das amostras

A preparação do extrato bruto (EB), assim como a obtenção da fração alcaloídica enriquecida (FAE) e dos alcaloides isolados estão descritas em detalhe no Capítulo 1.

O EB e a FAE foram testados em três concentrações (0,2, 0,4 e 0,8 mg/mL). Os alcaloides estefalagina e xilopina foram testados em cinco concentrações (0,062, 0,125, 0,250, 0,5 e 1 mM). Todas as amostras testadas foram dissolvidas em dimetilssulfóxido (DMSO) 0,5%. As amostras foram diluídas em solução tampão de pH 6,0, composta por 10mM de MES (ácido 2-[N-morfolino] etanossulfônico) e 1mM NaOH, em quantidades suficientes para obter as concentrações indicadas acima.

2.2.2 Bioensaio de alongamento de coleóptilos

Sementes de trigo (*Triticum aestivum* L. variedade Cortez - Poaceae) foram adicionadas a placas de Petri de 15 cm de diâmetro previamente forradas com papel de filtro e umedecidas com água destilada. Este conjunto permaneceu em estufa a 24 °C (± 1 °C) durante quatro dias, na ausência de luz. Após este período, as plântulas foram selecionadas e fragmentos de 4 mm do epicótilo, retirados imediatamente abaixo aos 2 primeiros mm do ápice, foram fracionados com o auxílio de uma guilhotina de Van der Weij, sob luz verde de segurança. Estes fragmentos foram mantidos até a sua utilização em meio nutritivo contendo ácido cítrico monohidratado (1,05 g/L), hidrogenofosfato de potássio tri-hidratado ($\text{HK}_2\text{O}_4\text{P} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) (2,9 g/L) e 2% de sacarose, com pH = 5,6 (Nitsch & Nitsch, 1956).

Foram preparados três tubos de ensaios contendo cinco fragmentos de coleóptilo e 2 mL de solução nutritiva adicionada de cada uma das amostras a serem testadas nas concentrações descritas acima. Além disso, foram preparados dois controles: um negativo, contendo apenas solução tampão aquosa e DMSO 0,5% e outro positivo contendo herbicida comercial (glifosato) nas mesmas concentrações que as amostras.

Os tubos de ensaios contendo os fragmentos de coleóptilos em solução foram mantidos durante 24 horas em temperatura de 25 °C no escuro e sob rotação horizontal constante de 20 rpm. Após este período, os fragmentos dos coleóptilos foram retirados dos tubos de ensaio e medidos.

2.2.3 Bioensaio de germinação de sementes e crescimento inicial de plântulas

Alface (*Latuca sativa* L. cvs. Baba de verão), tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. Cvs. Rasteiro Rio Grande) e capim-braquiária (*Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster) foram utilizadas como espécies alvo.

Em placas de 6 poços foram usados quatro poços forrados com papel de filtro autoclavado. A cada um dos quatro poços da mesma placa foi adicionado 1 mL de solução de cada amostra, nas mesmas concentrações descritas acima, e 10 diásporos de cada espécie alvo separadamente. Foram ainda utilizados dois controles: um negativo contendo apenas solução tampão aquosa e DMSO 0,5%, e outro positivo contendo herbicida comercial (glifosato) usado nas mesmas concentrações dos extratos (0,8, 0,4 e 0,2 mg/mL).

As placas foram seladas e mantidas em câmara de crescimento, com fotoperíodo de 12 h claro/12h escuro, em temperatura de 25°C durante oito dias. Após este período, as placas foram transferidas para freezer a -20°C. As plântulas congeladas foram escaneadas e analisadas mediante o programa ImageJ® para o cálculo do comprimento da raiz para todas as espécies, da primeira folha em *U. decumbens* e do hipocótilo em *L. sativa* e *L. esculentum*.

2.2.4 Análises estatísticas

O delineamento experimental foi inteiramente aleatorizado. Os testes estatísticos e os gráficos foram realizados utilizando o software Graphpad Prims 6.0. A normalidade dos dados foi analisada pelo teste de Shapiro-Wilk. As diferenças significativas entre os tratamentos e o controle foram avaliadas pelo teste Anova e as comparações múltiplas pelo teste de Sidak (quando os valores médios foram normalmente distribuídos), com o nível de decisão em $P < 0,05$.

2.3 Resultados e discussão

Do processo de extração foi obtido o extrato etanólico (rendimento de EB 35%) e a fase de partição alcaloídica (rendimento de FAE 0,583%). Com as técnicas empregadas, oito alcaloides foram detectados. Um deles não foi possível de identificação. Além disso, foram identificados cinco aporfinas (anonaina, crassiflorina, estefalagina, litseglutina B, xilopina), um fenantreno (annoretina) e um tetrahidroprotoberberínico (tetraidropalmatrubina) nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. com base em seus padrões de fragmentação no CGEM, espectros de UV e dados obtidos de RMN. Os detalhes da preparação dos extratos, isolamento e identificação dos alcaloides encontram-se no Capítulo 1.

2.3.1 Bioensaio com coleóptilos de trigo.

O bioensaio com os coleóptilos de trigo foi usado como uma abordagem inicial para avaliar a fitotoxicidade das amostras. A vantagem desse teste é a obtenção rápida de resultados (24 h), além de poder ser, se empregado em conjunto com ensaios usando plantas inteiras, usado para avaliar propriedades agroquímicas de substâncias estruturalmente semelhante a herbicidas e pesticidas (Cutler et al., 2000).

Na figura 1 apresentam-se os resultados obtidos para o ensaio de coleóptilos. Os valores negativos significam inibição, os valores positivos indicam estimulação e zero representa o controle.

Os resultados obtidos para o extrato bruto (EB) não apresentaram diferenças significativas em relação ao controle. A maior concentração testada (0,8mg/mL) acarretou uma estimulação do crescimento do coleóptilo de 10,7%. Nas concentrações menores, 0,4mg/mL e 0,2mg/mL, houve inibição do crescimento de 1,278%, e 12,32 %, respectivamente. O crescimento dos fragmentos de coleóptilos foi significativamente inibido com a maior concentração da FAE (0,8 mg/mL), atingindo 46,77% de redução do alongamento quando comparado ao controle. Nas outras concentrações, os efeitos inibitório (0,4 mg/mL) e estimulante (0,2 mg/mL) não foram significativos. O padrão de inibição e/ou estímulo entre as diferentes concentrações do EB e da FAE foram opostos. No primeiro, a inibição foi inversamente correlacionada à concentração; já com a FAE a maior inibição foi vista com a maior concentração.

Comparando com a literatura, as atividades observadas para a FAE apresentam valores maiores de inibição para a concentração de 0,8 mg/mL que os reportados para as frações de extratos foliares de *Annona glabra*, os quais conseguem inibir o crescimento dos coleóptilos de trigo em um 40 % (Matsumoto et al., 2010). No entanto, os extratos etanólicos das Annonaceae do cerrado *Xylopia aromatica* e *Annona coriacea* apresentam valores superiores a 60% de inibição com o extrato de caule a 0,8 mg/mL (Novaes et al., 2016).

Para os compostos isolados, a aporfina estefalagina inibiu significativamente o alongamento dos coleóptilos nas três maiores concentrações (1mM, 0,5mM e 0,250 mM) quando comparadas com o controle. As duas menores concentrações, 0,125 mM e 0,062 mM, promoveram o alongamento, porém não de maneira significativa. Para a xilopina, diferente do observado para estefalagina, todas as concentrações inibiram o alongamento dos coleóptilos. No entanto, somente nas concentrações de 1mM e 0,5 mM essa inibição foi significativa. Dessa maneira, a estefalagina parece ser mais fitotóxica que a xilopina. É possível observar nos

gráficos que as porcentagens de inibição para as concentrações mais altas dos alcaloides (1 mM e 0,5 mM) foram similares à encontrada para o herbicida (estefalagina 76,5 e 69,7%, xilopina 82,52 e 71,59 % e glifosato 75,76 e 78,52%).

A perda da atividade de inibição para as duas substâncias na menor concentração também é observada no glifosato. Estudos mostram que o glifosato aplicado em doses baixas pode ser estimulante, tendo sido evidenciado o aumento do peso seco em plantas de cana de açúcar e de eucalipto. Este aumento é devido a um efeito hormonal relacionado às baixas concentrações do herbicida que terminam aumentando as taxas de assimilação de CO₂, condutância estomática e taxa de transpiração, indicando que doses baixas de glifosato aumentam a fotossíntese das plantas (Nascentes et al., 2017).

Outros estudos com substâncias isoladas de *A. glabra* reportam a atividade dos esteroides β -sistosterol e estigmasterol, da acetogenina asimicina, além do terpenoide annoglabin B. Este último foi responsável pela inibição de 95% no crescimento do coleóptilo na concentração de 1 mM (Matsumoto et al., 2014), resultado bem maior que o obtido para os alcaloides xilopina e stefalagina.

Figura 1. Efeito do extrato bruto (EB), fase alcaloídica enriquecida (FAE) e alcaloides isolados stefalagina (Est) e xilopina (Xil) obtidos de folhas de *Annona crassiflora* Mart. sobre o alongamento de coleóptilo de *Triticum aestivum* L. Os valores são expressos como diferenças percentuais em relação ao controle e as barras de erro apresentadas com erro padrão. * Valores significativamente diferentes com $P < 0,05$ no teste de Sidak. A foto mostra cinco fragmentos de coleóptilo após 24h no tubo com xilopina 1mM.

Comparando-se a estrutura dos dois alcaloides testados, há pequenas diferenças. Ambos apresentam um esqueleto básico aporfínico derivado do núcleo benzilisoquinolínico, gerado a partir da tirosina, com uma substituição nas posições 1 e 2 formando um anel metileno dioxi, além de uma metoxila na posição 3 para a stefalagina e na posição 9 para a xilopina. A maior diferença está no grupo metila ligado ao nitrogênio na stefalagina. Talvez essa característica

seja responsável pelo maior efeito fitotóxico deste alcaloide quando comparado à xilopina, como o reportado para atividades de inibição enzimática da enzima acetilcolinesterase para as aporfinas, onde o anel metileno dioxi e a metila ligada ao nitrogênio constituem características de compostos mais ativos nestes bioensaios (Chiou et al., 1998) (mais detalhes no Capítulo 3).

2.3.2. Ensaio de fitotoxicidade com diásporos de alface, tomate e braquiária.

A maioria dos bioensaios alelopáticos que estão correlacionados com estudos fitoquímicos avalia a bioatividade dos compostos na germinação e no crescimento de plântulas. Esses parâmetros são aceitos como medidas indiretas de outros processos fisiológicos afetados pela interação química. As espécies alvo mais usadas são alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) e cebola (*Allium cepa* L.), sendo a primeira a mais amplamente utilizada devido à sua rápida germinação e alta sensibilidade (Macías et al., 2000).

Os resultados do bioensaio fitotóxico com espécies alvo são apresentados na Figura 2. Da mesma forma que para o ensaio com coleóptilos, os valores negativos significam inibição, os valores positivos indicam estímulo e zero representa o controle. Para cada espécie, os gráficos mostram os valores obtidos para o crescimento do hipocótilo e da raiz em relação ao controle.

Cabe salientar ainda que, apesar da estefalagina ter apresentado melhores resultados no ensaio com a avaliação do alongamento do coleóptilo de *T. aestivum*, a massa isolada dessa substância não foi suficiente para desenvolver os ensaios de fitotoxicidade. Por isso, somente a xilopina foi utilizada como substância pura nesses ensaios.

O efeito do EB na parte aérea das duas espécies alvo utilizadas foi, principalmente, de estímulo e não de inibição. Para *L. sativa*, todas as concentrações estimularam o crescimento com valores significativos em relação ao controle. No tratamento com 0,8 mg/mL o aumento foi de 60%, 49,7% no tratamento com 0,4 mg/mL e 35% com 0,2 mg/mL. No caso do *L. esculentum*, a maior concentração (0,8mg/mL) causou leve inibição (6,8%), já as outras duas concentrações levaram ao maior crescimento da parte aérea. Na concentração de 0,4 mg/mL o percentual de aumento foi de 6,5%, e na menor concentração testada (0,2 mg/mL) o crescimento de 25% foi significativo comparado com o controle. Para a raiz, o EB não apresentou resultados significativos para qualquer uma das espécies alvo.

A FAE para a parte aérea de *L. sativa* apresenta valores significativos para os três tratamentos. Na concentração de 0,8 mg/mL houve inibição do 36%, já nas concentrações de 0,4 mg/mL e 0,2 mg/mL houve estímulo de crescimento de 29% e 34%, respectivamente. Para

L. esculentum foi observado somente efeito inibitório no crescimento da parte aérea. Tanto para a concentração de 0,8 mg/mL quanto a de 0,4 mg/mL a porcentagem de inibição foi significativa sendo de 100% e 52%, respectivamente. Os efeitos da FAE no crescimento da raiz foram, em linhas gerais, semelhantes aos da parte aérea. Para *L. sativa* houve inibição significativa de 72% com o tratamento de 0,8mg/mL. Nas concentrações de 0,4 mg/mL e 0,2 mg/mL houve certo estímulo, porém não significativo. Em *L. esculentum*, similar à parte aérea, todas as concentrações apresentaram atividade inibitória, sendo significativa (63%) somente na concentração de 0,8 mg/mL.

A fração de acetato de etila obtida a partir do extrato aquoso de *A. glabra* reduz a porcentagem de germinação e afeta o crescimento inicial de *L. sativa*, além de afetar o crescimento de *Euphorbia heterophylla* e *Ipomoea grandifolia* (Matsumoto et al., 2010).

Como dito anteriormente, somente o alcaloide xilopina foi isolado em quantidade suficiente para realização do bioensaio com sementes.

Na parte aérea de *L. sativa*, os resultados para xilopina apresentam uma atividade inibitória significativa na maior concentração (1 mM) com uma porcentagem do 38 %, semelhante ao encontrado para a FAE. A menor concentração testada desse alcaloide (0,062 mM) apresentou atividade estimulante significativa de 43% na parte aérea. Os resultados da parte aérea para *L. esculentum* mostram atividade inibitória significativa nos tratamentos de 1 mM (76%) e 0,5mM (26%). No caso da raiz só houve valores significativos de estímulo de crescimento para *L. sativa* nas concentrações de 0,5 mM (37%) e 0,25 mM (26,8%). No entanto, ainda que com valores não significativos, foi observada leve inibição no crescimento das raízes das duas espécies alvo na maior concentração de xilopina testada (1 mM).

As diferenças obtidas para cada espécie alvo não são incomuns. Novaes et al. (2016) já haviam demonstrado esse comportamento diferenciado na resposta entre alface e tomate. Esta observação reforça a necessidade do uso de mais de uma espécie alvo em ensaios fitotóxicos afim de obter um maior espectro da variação e não perder efeitos particulares que as substâncias possam ter sobre determinada parte da planta.

Os resultados de inibição observados para o crescimento da parte aérea e da raiz das duas espécies alvo para a FAE e para xilopina mostraram valores mais pronunciados para a primeira em relação à substância purificada. Uma possível explicação pode ser por um sinergismo dos diferentes compostos presentes na FAE. A estefalagina, certamente presente na FAE, já havia mostrado resultados mais pronunciados no ensaio de coleóptilos, podendo ser uma das substâncias responsáveis por esse efeito da fração alcaloídica enriquecida.

Figura 2. Efeito do extrato bruto (EB), fase alcaloídica enriquecida (FAE) e da xilopina (Xil) de folhas de *A. crassiflora* sobre o crescimento do hipocótilo e da raiz de plântulas de *Lactuca sativa* L. cv. *Baba de verão* e *Lycopersicon esculentum* Mill. cvs. Rasteiro rio grande. Os valores são expressos como diferenças percentuais do controle e as barras de erro apresentadas com erro padrão. * Valores significativamente diferentes com $P < 0,05$ no teste de Sidak. As fotos mostram uma plântula do controle (A) e uma do tratamento com FAE 0,8 mg/mL (B).

Com base nos resultados obtidos para o ensaio com coleoptilo de trigo e com as espécies alho, alface e tomate, foram desenvolvidos os ensaios de atividade fitotóxica usando sementes de *Urochloa decumbens*, uma espécie de gramínea invasora que combina um conjunto de características que permitem a ela competir com espécies nativas e dominar o ambiente. Altas taxas de crescimento, um desempenho fotossintético altamente eficiente, altas taxas de regeneração, uso efetivo de nutrientes e alta tolerância à defoliação e à herbivoria estão entre as características que tornam esta espécie extremamente adaptada a colonização de áreas abertas degradadas (Ferreira et al., 2016).

A Figura 3 traz os resultados para o crescimento da parte aérea e da raiz de *U. decumbens*. O EB não apresentou efeito significativo na parte aérea ou na raiz. No entanto, na concentração de 0,8 mg/mL da FAE houve inibição significativa tanto da parte aérea (33%) quanto da raiz (38%). A xilopina apresenta resultados de inibição em todos os tratamentos tanto na parte aérea quanto na raiz, sendo os valores significativos encontrados no tratamento com 1 mM (42%) na parte aérea e para a raiz nas três maiores concentrações (1 mM: 45%, 0,5 mM: 43% e 0,25 mM: 49%).

De maneira geral, efeito inibitório foi detectado com a FAE e com a xilopina nas maiores concentrações tanto para o coleóptilo de *T. aestivum*, quanto nos ensaios com sementes de *L. sativa*, *L. esculatum*. A análise em cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas mostrou que a xilopina corresponde a cerca de 80% dos compostos detectáveis na FAE (ver Figura 6 – Capítulo 1). A presença majoritária deste alcaloide na FAE pode ser um indício da alta correspondência nos resultados obtidos. No caso de *U. decumbens* os dados obtidos com o alcaloide isolado foram mais proeminentes que aqueles obtidos com a FAE (Figura 3), diferente do observado para as espécies alvo tradicionalmente usadas (Figura 2). Para essas últimas, a presença de outros alcaloides na FAE, como por exemplo a estefalagina, ainda que em menor concentração, parece ser importante na inibição do desenvolvimento da parte aérea e/ou da raiz.

Figura 3. Efeito do extrato bruto (EB), fase alcaloídica enriquecida (FAE) e de xilopina (Xil) de folhas de *A. crassiflora* sobre o crescimento de *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D. Webster. Os valores são expressos como diferenças percentuais do controle e as barras de erro apresentadas com erro padrão. * Valores significativamente diferentes com $P < 0,05$ no teste de Sidak. As fotos mostram uma plântula do controle (A) e uma do tratamento com FAE 0,8 mg/mL (B).

Espécies de Annonaceae (*A. crassiflora*, *A. coriacea*, *A. dioica*, *A. sylvatica* e *D. furfuracea*) já foram testadas com o objetivo de avaliar o potencial fitotóxico dos seus extratos. Os extratos metanólicos dessas espécies afetaram negativamente o tempo médio e a porcentagem de germinação, além de afetarem o vigor de plântulas de alface, causando a diminuição do comprimento radicular e do hipocótilo (Formagio et al., 2010).

O extrato hidroalcoólico de sementes de *A. crassiflora* inibiu totalmente a germinação das sementes de *Brachiaria brizantha* (*Urochloa brizantha*) e *Euphorbia heterophylla* (Inoue et al., 2010). Extratos etanólicos de folhas de *A. crassiflora* apresentaram inibição somente moderada do alongamento do coleótilo e também do desenvolvimento das raízes de tomate (Novaes et al., 2016), o que corrobora os dados obtidos para o EB neste trabalho.

Até onde sabemos, este é o primeiro relato da atividade inibitória do alongamento do coleótilo de trigo para os alcaloides estefalagina e xilopina, assim como da atividade fitotóxica da xilopina para as espécies estudadas (*Lactuca sativa*, *Lycopersicon esculentum* e *Urochloa decumbens*).

Como dito anteriormente, *Urochloa decumbens* é uma espécie introduzida, para a qual tem sido demonstrado um efeito negativo sobre a riqueza e densidade populacional de espécies nativas (Ferreira et al., 2016). A xilopina, que é um produto natural, poderia ser uma alternativa ecológica para o controle desta planta invasora, causando um impacto menor ao ecossistema comparado com os pesticidas organofosforados usados comumente. Entretanto, para isso seria muito importante o desenvolvimento de mais bioensaios, utilizando distintas fases do desenvolvimento da braquiária e em condições de campo, preferencialmente com a FAE, afim de obter resultados mais próximos a realidade.

2.4 Referencias

- Alsaadawi, I. S. (2013). Allelopathic Potential of *Sorghum* in Agroecosystems. In Z. A. Cheema, M. Farooq & A. Wahid (Eds.), *Allelopathy: Current Trends and Future Applications* (pp. 321–336). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.
- Barnes, J. P., & Putnam, A. R. (1987). Role of benzoxazinones in allelopathy by rye (*Secale cereale* L.). *Journal of Chemical Ecology*, 13(4), 889–906.
- Burgos, N. R., Talbert, R. E., Kim, K. S., & Kuk, Y. I. (2004). Growth Inhibition and Root Ultrastructure of *Cucumber* Seedlings Exposed to Allelochemicals from Rye (*Secale cereale*). *Journal of Chemical Ecology*, 30(3), 671–689.
- Chiou, C., Kang, J., & Lee, S. (1998). Litebamine N -Homologues : Preparation and Anti-Acetylcholinesterase Activity. *Journal of Natural Products*, 61(1), 46–50.
- Cutler, S. J., Hoagland, R. E., & Cutler, H. G. (2000). Evaluation of selected pharmaceuticals as potential herbicides: bridging the gap between agrochemicals and pharmaceuticals. In S. S. Narwal, R. E. Hoagland, R. H. Dilday & M. J. Reigosa (Eds.), *Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry: Proceedings of the III International Congress on Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry, Dharwad, India, 18--21 August 1998* (pp. 129–137). Dordrecht: Springer Netherlands.
- Duke, S. O., Dayan, F. E., Romagni, J. G., & Rimando, A. M. (2000). Natural products as sources of herbicides: current status and future trends. *Weed Research*, 40, 99–111.
- Einhellig, F. A. (1994). Mechanism of Action of Allelochemicals in Allelopathy. In *Allelopathy* (Vol. 582, pp. 7–96). American Chemical Society.
- Ferreira, L. V., Parolin, P., Matos, D. C. L., Cunha, D. A., Chaves, P. P., & Neckel, S. O. (2016). The effect of exotic grass *Urochloa decumbens* (Stapf) R.D.Webster (Poaceae) in the reduction of species richness and change of floristic composition of natural regeneration in the Floresta Nacional de Carajás, Brazil. *Anais Da Academia Brasileira de Ciencias*, 88, 589–597.
- Formagio, A. S. N., Masetto, T. E., Baldivia, D. D. S., Vieira, M. D. C., Zárata, N. A. H., & Pereira, Z. V. (2010). Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Biociencias*, 8(4), 349–354.
- Inoue, M. H., Santana, D. C., Souza Filho, A. P. S., Possamai, A. C. S., Silva, L. E., Pereira, M. J. B., & Pereira, K. M. (2010a). Potencial alelopático de *Annona crassiflora* : efeitos sobre plantas daninhas. *Planta Daninha*, 28(3), 488–498.
- Inoue, M., Santana, D., Vilhena, K., Souza Filho, A., Guilhon, G., Possamai, A., Silva, L., & Dallacort, R. (2010b). Avaliação do potencial alelopático de substâncias isoladas de sementes de araticum (*Annona crassiflora*). *Planta Daninha*, 28(4), 735–741.
- Jabran, K. (2017). Allelopathy: Introduction and Concepts. In *Manipulation of Allelopathic Crops for Weed Control* (pp. 1–12). Cham: Springer International Publishing.

-
- Jilani, G., Mahmood, S., Chaudhry, A. N., Hassan, I., & Akram, M. (2008). Allelochemicals: sources, toxicity and microbial transformation in soil a review. *Annals of Microbiology*, 58(3), 351–357.
- Kuboi, T., & Fujii, K. (1984). A new method for seedling assay of phytotoxic substances: liquid shaking culture. *Soil Science and Plant Nutrition*, 30(2), 209–218.
- Latif, S., Chiapusio, G., & Weston, L. A. (2017). Chapter Two - Allelopathy and the Role of Allelochemicals in Plant Defence. In G. B. B. T.-A. in B. Research (Ed.), *How Plants Communicate with their Biotic Environment* (Vol. Volume 82, pp. 19–54). Academic Press.
- Leather, G. R., & Einhellig, F. A. (1988). Bioassay of naturally occurring allelochemicals for phytotoxicity. *Journal of Chemical Ecology*, 14(10), 1821–1828.
- Li, Z. H., Wang, Q., Ruan, X., Pan, C. De, & Jiang, D. A. (2010). Phenolics and plant allelopathy. *Molecules*, 15(12), 8933–8952.
- Macías, F. A., Castellano, D., & Molinillo, J. M. G. (2000). Search for a Standard Phytotoxic Bioassay for Allelochemicals. Selection of Standard Target Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(6), 2512–2521.
- Matsumoto, R. S., Ribeiro, J. P. N., Takao, L. K., & Lima, M. I. S. (2010). Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 24(3), 631–635.
- Matsumoto, S., Varela, R. M., Palma, M., Molinillo, J. M. G., Lima, I. S., Barroso, C. G., & Macías, F. A. (2014). Bio-guided optimization of the ultrasound-assisted extraction of compounds from *Annona glabra* L. leaves using the etiolated wheat coleoptile bioassay. *Ultrasonics Sonochemistry*, 21(4), 1578–1584.
- Nascentes, R. F., Carbonari, C. A., Brunelli, M. C., Velini, D., & Duke, S. O. (2017). Low doses of glyphosate enhance growth, CO₂ assimilation, stomatal conductance and transpiration in sugarcane and eucalyptus. *Pest Management Science*.
- Novaes, P., Torres, P. B., & dos Santos, D. Y. (2016). Biological activities of Annonaceae species extracts from Cerrado. *Brazilian Journal of Botany*, 39(1), 131–137.
- Rasmussen, J. A., Hejl, A. M., Einhellig, F. A., & Thomas, J. A. (1992). Sorgoleone from root exudate inhibits mitochondrial functions. *Journal of Chemical Ecology*, 18(2), 197–207.
- Tharayil, N., Bhowmik, P. C., & Xing, B. (2006). Preferential sorption of phenolic phytotoxins to soil: Implications for altering the availability of allelochemicals. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(8), 3033–3040.

Capítulo 3: Alcaloides de *Annona crassiflora* Mart como possíveis moléculas biologicamente ativas.

Resumo

As Annonaceae são amplamente conhecidas pelo seu uso alimentar e medicinal na cultura popular, sendo atribuídas várias das atividades terapêuticas aos alcaloides produzidos por espécies desta família. *Annona crassiflora* Mart é uma espécie nativa do cerrado brasileiro comumente consumida *in natura* e usada no tratamento de distúrbios menstruais e no combate de parasitas do couro cabeludo. Nas folhas de *A. crassiflora* têm sido descritos alcaloides derivados da benzilisoquinolina como as aporfinas xilopina, anonaina, e o fenantreno anoretina. Essa classe de substâncias vem sendo comumente estudada no tratamento de doenças neurodegenerativas, no tratamento de doenças negligenciais ou como antimicrobianos. No presente estudo foram estudadas as atividades biológicas do extrato bruto (EB), a fase alcaloídica enriquecida (FAE) e os alcaloides xilopina e estefalagina isolados de folhas de *A. crassiflora* quanto às atividades de inibição frente as enzimas acetilcolinesterase (AChE) e transcriptase reversa do vírus de imunodeficiência tipo 1 (HIV-1 RT), o potencial antimicrobiano (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*) e a atividade antiparasitária (*Trypanosoma cruzi*). Os resultados obtidos mostram atividades promissoras, especialmente, para a FAE e alcaloides isolados. No que refere à atividade antimicrobiana, *E. coli* e *B. subtilis* foram as mais sensíveis, sendo a FAE a amostra mais ativa entre as testadas. Com relação aos alcaloides isolados, foi encontrada uma maior inibição da atividade enzimática (AChE e HIV-1 RT) para o alcaloide estefalagina, enquanto que a xilopina apresentou uma melhor atividade na inibição de parasitas de *T. cruzi*, especialmente na fase de tripomastigota, com um alto índice de seletividade. Concluindo, um esforço futuro para o isolamento em dos outros alcaloides descritos para *A. crassiflora* merece atenção, pois, os resultados obtidos neste trabalho mostram grande potencial biológico para esta espécie.

Palavras chave: xilopina, estefalagina, HIV-1 RT, acetilcolinesterase, *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Annona crassiflora*

Chapter 3: Alkaloids from *Annona crassiflora* Mart as possible biologically active molecules

Abstract

Annonaceae are widely known for their food and medicinal use among local people. Many of the therapeutic activities can be attributed to the alkaloids produced by species of this family. *Annona crassiflora* Mart. is a native species of the Brazilian cerrado, commonly consumed in natura and used in folk medicine to treat menstrual disorders and to combat lice. Several benzyloquinoline alkaloids have been reported in leaves of *A. crassiflora*, as the aporphines xylophine, anonaine, and phenanthrene annoretine. In general, alkaloids have been studied as potential compounds in the treatment of neurodegenerative and neglective diseases, as well as used as antimicrobial agents. In the present study, the crude extract (EB), the enriched alkaloid phase (FAE), and two pure alkaloids (xylophine and stephalagine) isolated from leaves of *A. crassiflora* were investigated as inhibitors of acetylcholinesterase (AChE) and reverse transcriptase (RT-1) enzymes, antimicrobial agents (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*), and as antiparasitic (*Trypanosoma cruzi*). The analyzes unveil interesting results, especially for FAE and pure alkaloids. Concerning antimicrobial activity, FAE was the strongest sample tested, with high inhibition growth rates for *E. coli* and *B. subtilis*. Looking for isolated compounds, stephalagine presented greater inhibition of the enzymatic activity (AChE and HIV-1 RT) than xylophine. By the other hand, the latter presented better activity in the inhibition of *T. cruzi*, especially for the trypomastigote. Besides, xylophine presented high selectivity index. In conclusion, future efforts to isolate other alkaloids described for *A. crassiflora* must be done, since the results obtained in this work show a great biological potential for this species.

Key words: xylophine, stephalagine, HIV-1 RT, acetylcholinesterase, *Trypanosoma cruzi*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Annona crassiflora*

3.1 Introdução

3.1.1 Produtos naturais como fonte de substâncias antimicrobianas

De cerca de 1 milhão de produtos naturais, aproximadamente 25% são biologicamente ativos, isto é, que mostram atividades positivas ou toxicidade. Aproximadamente 60% destes são produzidos por plantas e grande parte dos restantes por microrganismos, sendo alguns de origem animal. São conhecidas as estruturas de mais de 160.000 produtos naturais, cerca de metade proveniente das plantas e metade dos microrganismos. Este número cresce em cerca de 10.000 por ano (Demain, 2014).

Os produtos naturais produzidos por plantas e microrganismos fornecem uma ampla gama de substâncias com excelentes atividades farmacêuticas. Quase metade dos melhores produtos farmacêuticos vendidos são produtos naturais de origem vegetal ou microbiana, ou estão relacionados a eles, como por exemplo, os mais importantes fármacos anticâncer e agentes anti-infecciosos usados hoje em dia. Muitas vezes, a molécula natural não é utilizada em si, mas serve como base para alterações químicas ou para síntese e biossíntese combinatória (Demain, 2014).

A diversidade estrutural de compostos derivados de plantas é imensa e o impacto da ação antimicrobiana que produzem depende da sua estrutura (Gyawali & Ibrahim, 2014). Os principais grupos de substâncias responsáveis pela atividade antimicrobiana das plantas incluem ácidos fenólicos, quinonas, saponinas, flavonoides, taninos, cumarinas, terpenoides e alcaloides. Muitos destes produtos naturais fornecem mecanismos de defesa às plantas contra a predação por insetos e outros herbívoros, assim como ao ataque de microrganismos (Lai & Roy, 2004).

Atualmente, as infecções microbianas tornaram-se uma ameaça clínica importante, com significativa morbidade e mortalidade associadas, que se devem, principalmente, ao desenvolvimento de resistência microbiana aos agentes antimicrobianos existentes. Portanto, os métodos para o teste de susceptibilidade estão relacionados à descoberta de novos agentes antimicrobianos que têm sido amplamente investigados (Balouiri et al., 2016).

Nos últimos anos, a pesquisa da indústria farmacêutica em produtos naturais diminuiu, em parte devido à ênfase na procura de substâncias com alto rendimento provenientes de síntese química. Mesmo que muitos produtos naturais estejam sendo usados atualmente por várias indústrias, como por exemplo os utilizados na preservação e extensão da vida dos alimentos, há ainda muitas fontes inexploradas com potencial, dentro dos quais os metabólitos de origem natural podem contribuir no controle de bactérias multiresistentes. O uso de compostos naturais

provenientes de subprodutos vegetais de plantas, algas e fungos aumenta ainda mais a probabilidade de uso desses compostos como novos antimicrobianos. Técnicas como engenharia metabólica e biologia sintética, as quais oferecem tecnologias interessantes para a descoberta de novos medicamentos naturais, também oferecem grandes possibilidades de avanço. Os avanços alcançados com o sequenciamento genético de última geração, juntamente com a manipulação das vias de biossíntese, podem fornecer um vasto recurso para a futura descoberta de agentes farmacêuticos (Gyawali & Ibrahim, 2014; Li & Vederas, 2009).

Os alcaloides têm inspirado o desenvolvimento de várias drogas antibacterianas. Exemplos disso são as quinolonas, sintetizadas a partir da quinina; a produção do metronidazol a partir da alteração estrutural da azomicina; e a produção da bedaquilina através da manipulação da estrutura da quinolina. Em termos de mecanismo de ação, tem sido proposto, com base em ensaios com enzimas purificadas, que os alcaloides do tipo indolizidínicos inibem a atividade da di-hidrofolato redutase, enzima necessária para a transformação de dihidrofolato a tetrahydrofolato, o qual é um cofator necessário para a síntese de DNA. Além disso, os alcaloides isoquinolínicos têm sido descritos como inibidores da topoisomerases do tipo I, resultando no bloqueio do crescimento das bactérias. Dessa forma, esses alcaloides podem ser considerados candidatos terapêuticos para o tratamento de infecções por bactérias resistentes a outros antibióticos e, com isso, abrir um novo cenário para a concepção de antibióticos mais específicos visando a atividade desta enzima (Cushnie et al., 2014; García et al., 2011).

Para medir quantitativamente a atividade antimicrobiana de uma substância *in vitro* contra bactérias e fungos, os métodos de diluição são os mais apropriados. Com eles é possível determinar valores de concentração inibitória mínima (MIC), uma vez que oferecem a possibilidade de estimar a concentração do agente antimicrobiano testado no ágar (diluição em ágar) ou meio em meio líquido (macrodiluição ou microdiluição). O valor de MIC registrado é entendido como a concentração mais baixa do agente antimicrobiano ensaiado que inibe o crescimento visível do microrganismo testado e é, usualmente, expresso em mg/mL ou mg/L (Balouiri et al., 2016).

Diferentes autores reportam atividades antimicrobianas de espécies de Annonaceae. Óleos voláteis de *Annona foetida* Mart. apresentam atividade antimicrobiana contra *Candida albicans* (C.P.Robin); Berkhout 1923 e *Rhodococcus equi* (Magnusson 1923) Goodfellow & Alderson 1977 (Costa et al., 2009). Extratos metanólicos de *Annona muricata* L. e *Annona reticulata* L. mostram atividade bactericida frente a cepas Gram positiva (*Staphylococcus* sp. Rosenbach 1884 e *Bacillus* sp. Cohn 1872) e Gram negativa (*Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani and Chalmers 1919, *Proteus* sp. Hauser 1885. e *Klebsiella* sp. Trevisan 1885)

(Chithra et al., 2016). Em *Annona squamosa* L. a presença de vários metabólitos secundários tais como glicosídeos, fitoesteróis, alcaloides, óleos, saponinas, fenóis e flavonoides confirmaram a eficácia antimicrobiana contra *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 (Simon et al., 2016).

Especificamente para alcaloides, várias espécies da família apresentam atividade. A fração alcaloídica de *Annona hypoglauca* Mart. apresenta atividade antimicrobiana quando testada com *Staphylococcus aureus* Rosenbach 1884 e com *Enterococcus faecalis* (Andrewes and Horder 1906) Schleifer & Kilpper-Bälz 1984 com valores de MIC de 60µg/mL e 50-60µg/mL, respectivamente (Rinaldi et al., 2017). Os alcaloides isolados de *Annona senegalensis* Pers. mostram uma atividade antibacteriana significativa contra *Streptococcus mutans* Clarke 1924, com a anonaina apresentando a maior atividade com valores de MIC de 0,12 mg/mL, seguida pela nornantenina com MIC de 0,25 mg/mL., enquanto asimilobina apresentou baixa atividade com MIC de 2,0 mg/mL (Lall et al., 2016). Ensaio com alcaloides obtidos de *Annona salzmannii* A. DC. mostraram valores de MIC significativos frente aos microrganismos *Staphylococcus epidermidis* (Winslow and Winslow 1908) Evans 1916, *Kocuria rhizophila* Kovács et al. 1999, *Candida dubliniensis* Sullivan et al. (1995), *C. albicans* e *C. parapsilosis* (Ashford) Langeron & Talice na ordem de 25-100 µg/mL, sendo os aporfinoides liriodenina, anonaina e asimilobina os compostos mais ativos, com alguns deles mais ativos que os controles positivos cloranfenicol e cetoconazol (Costa et al., 2013).

3.1.2 Potencial dos alcaloides de origem vegetal no tratamento do Alzheimer

A doença de Alzheimer (DA) é uma doença neurodegenerativa irreversível associada à demência e é mais prevalente entre a população idosa. Caracteriza-se pela formação extracelular de placas amiloides formados a partir do peptídeo β -amiloide, derivando em uma hiperfosforilação das proteínas tau (proteínas que estabilizam os microtúbulos), desencadeando uma deficiência do neurotransmissor acetilcolina no cérebro (Acqua, 2013; Han et al., 2017).

Os sintomas característicos da demência são dificuldades com a memória, linguagem, resolução de problemas e outras habilidades cognitivas que afetam a capacidade de uma pessoa para realizar atividades diárias. Estas dificuldades ocorrem porque as células nervosas (neurônios) em partes do cérebro envolvidas na função cognitiva foram danificadas ou destruídas. Na doença de Alzheimer, neurônios em outras partes do cérebro são eventualmente danificados ou destruídos, como aqueles que permitem a uma pessoa realizar funções corporais básicas, como caminhar e engolir. As pessoas nos estágios finais da doença ficam presas à cama

e necessitam de cuidados 24 horas sendo assim uma doença que leva a morte do indivíduo (Alzheimer's Association 2017).

Os medicamentos atuais só podem tratar os sintomas. A inibição da acetilcolinesterase (AChE), a enzima chave na destruição da acetilcolina, é atualmente a principal estratégia farmacológica disponível para tratar a doença de Alzheimer. Os alcaloides têm sido uma importante fonte terapêutica para vários distúrbios cerebrais. Muitos alcaloides isolados a partir de fontes naturais, tais como a fisostigmina isolada de *Physostigma venenosum* Balf. f., têm sido reconhecidos como inibidores da butirilcolinesterase (BChE) (Acqua, 2013).

Os alcaloides naturais também têm sido demonstrados com função anti-amilóide, antioxidante e propriedades anti-inflamatórias evidenciando assim uma abordagem multifuncional no tratamento de doenças neurodegenerativas como Alzheimer e Parkinson. Estudos clínicos adicionais sugerem que os alcaloides naturais são mais seguros em comparação com as drogas sintéticas. Embora só alguns destes compostos estejam sendo usados para o tratamento de doenças neurodegenerativas, algumas das substâncias de origem natural estão sendo avaliadas em diferentes fases de investigação clínica (Girdhar et al., 2015).

A FDA (Food and Drug Administration) tem aprovado os alcaloides galantamina e rivastigmina como inibidores da acetilcolinesterase. Desde a aprovação destes compostos para o tratamento de pacientes com DA, a pesquisa de novos alcaloides com ação inibitória da acetilcolinesterase tem aumentado, levando à descoberta de novos candidatos. Além disso, ensaios clínicos de quatro outros alcaloides amplamente estudados (dahuperzina, cafeína, nicotina e indometacina) têm sido conduzidos, mas ainda sem demonstração convincente das suas eficácias clínicas para o tratamento da DA (Ansari & Khodagholi, 2013; Ng et al., 2015).

Dentro das Annonaceae, os compostos isolados de *Annona glabra* L. como *N*-metil-10-*O*-dimetilxilopinina, pseudocolumbamina, palmatina, e pseudopalmatina apresentam valores IC₅₀ de atividade anticolinesterase de 8,4, 5, 0,4, e 1,8 µM, respectivamente (Tsai & Lee, 2010). Outros alcaloides isolados da mesma espécie, anolobina e roemerolina, apresentaram atividade inibitória moderada contra a enzima acetilcolinesterase com valores de IC₅₀ de 22,4 e 26,3 µM (Lee et al., 2015). O óleo obtido das sementes de *Annona hypoglauca* inibe 79,75% da atividade da AChE numa concentração de 2,5 mg/mL (Ricardo et al., 2015). Formagio et al. (2015) apresentam os resultados da atividade anti-AChE dos extratos metanólicos de folhas (2 mg/mL) e sementes (1,5 mg/mL) de várias espécies de Annonaceae. Para *Duguetia furfuraceae* (A. St.-Hil.) Saff. a atividade inibitória da acetilcolinesterase foi de 25% para o extrato foliar e de 46% para o de semente. Os extratos das folhas de *Annona sylvatica* A. St.-Hil. mostraram atividade inibitória de 12%, enquanto que o extrato das folhas de *Annona coriacea* Mart. inibiu 33%.

Para esta última espécie, extrato das sementes foi muito mais ativo, chegando a atingir 52% de inibição. Para *Annona crassiflora* Mart., extratos de folhas mostraram atividade inibitória de 22%, enquanto que o extrato das sementes foi mais ativo, inibindo 45% da atividade enzimática. Para esta espécie, as concentrações de ácido cafeico, ácido sinápico e a rutina foram maiores nos extratos das sementes que no das folhas.

Reportam-se também atividades de inibição da acetilcolinesterase para alcaloides puros, como as aporfínicos epigasina B e deidrocentrina isolados de *Stephania epigaea* H.S. Lo (Menispermaceae). Neste caso, a inibição da AChE foi bastante expressiva, com $IC_{50} = 4,36 \mu M$ e $2,98 \mu M$, respectivamente. Outros alcaloides como romerina, romelina, *N*-metilcalycinina, fanostenina e dicentrina também foram ativos, com valores de IC_{50} variando entre $6,6 \mu M$ – $20,4 \mu M$ (Dong et al., 2015).

3.1.3 Os produtos naturais como uma alternativa ao tratamento do HIV

A síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) dos seres humanos é causada por dois *Lentivírus* da família Retroviridae, os vírus da imunodeficiência humana tipos 1 e 2 (HIV-1 e HIV-2). Embora os lentivírus de primatas tenham sido identificados pela primeira vez no final dos anos 1980, os estudos sobre sua origem, aspectos evolutivos, distribuição geográfica, e patogênese em hospedeiros naturais e não naturais são recentes. A epidemia de HIV surgiu após infecções zoonóticas causada por símios com vírus da imunodeficiência de primatas africanos; os caçadores foram, provavelmente, o primeiro grupo de humanos a ser infectado com HIV, sendo o HIV-1 transmitido a partir de macacos Hominoidea e o HIV-2 de macacos *Cercocebus atys* (Sharp & Hahn, 2011).

O alvo principal do HIV são os linfócitos T CD4 ativados. A entrada do vírus ocorre através de interações da proteína viral gp120 a qual liga-se a uma glicoproteína CD4, que é expressa na superfície celular de cerca de 60% de linfócitos T, em precursores de células T dentro da medula óssea e timo, em macrófagos, eosinófilos, células dendríticas e micróglia do sistema nervoso central. Após ligação da gp120 do HIV com as CD4, o capsídeo do vírus sofre uma alteração estrutural fundindo-se à membrana celular e liberando o RNA no citoplasma celular. A conversão do RNA viral em DNA proviral ocorre devido à ação da transcriptase reversa, iniciando a transcrição do RNA viral no citoplasma numa hélice dupla de DNA a qual é transportada ao núcleo celular e integrada ao genoma do hospedeiro mediante a ação da enzima integrase. Após a ativação celular, ocorre a transcrição do DNA proviral em RNA mensageiro. O RNA mensageiro viral migra para o citoplasma, onde são sintetizadas proteínas

estruturais de novos vírus. Para a formação de novas partículas virais, o RNA viral associa-se com enzimas de replicação e as proteínas nucleares começam a formação do capsídeo viral. Esta partícula imatura migra para a superfície celular, onde termina sua formação e, através da membrana da célula, se disseminam começando o ciclo novamente (Fanales-Belasio et al., 2010; Maartens et al., 2014).

Apesar dos avanços contínuos feitos na terapia antirretroviral, o HIV continua sendo um dos maiores problemas para a saúde pública global. Em 2016, um milhão de pessoas morreram no mundo em decorrência de infecção por este vírus e estima-se que o número de pessoas infectadas fosse de, aproximadamente, 36,7 milhões. De acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2016, a região africana tinha 25,6 milhões de pessoas infectadas, sendo ela a mais afetada no globo e com a maior taxa de novas infecções registradas (WHO, 2017).

As plantas sempre forneceram novas drogas candidatas ao tratamento de várias doenças, principalmente, devido a diversidade metabólica e estrutural de compostos. Grandes avanços foram alcançados na descoberta de potentes agentes anti-HIV a partir de fontes naturais, sendo vários desses produtos bastante interessantes devido à sua atividade específica e baixa toxicidade (Singh et al., 2005).

Para Annonaceae, por exemplo, os extratos etanólicos de *Annona muricata* L. mostram atividade inibitória frente à integrase do HIV-1 com valores de $IC_{50} < 100 \mu\text{g/mL}$ (Venter et al., 2014). Extratos aquosos de Annonaceae testados numa concentração de $200 \mu\text{g/mL}$ apresentaram porcentagens de inibição da HIV1-RT de 20% para *A. reticulata*, 30% para *A. muricata*, 32% para *Unona evecta* Pierre, 28,5% para *Mitrephora vandaeiflora* Kurz. e 42,5 % para *Goniothalamus laoticus* (Finet & Gagnep.) Bân (Wiwat & Kwantrairat, 2013). Os extratos metanólicos das folhas e o caule de *Xylopiia frutescens* Aubl. mostraram um IC_{50} de 11 e $22 \mu\text{g/mL}$, respectivamente frente à HIV1-RT (Matsuse et al., 1998).

O número de substâncias isoladas de plantas que exibem atividade anti-HIV está aumentando gradualmente, principalmente, devido à sua atividade específica. Vários produtos naturais têm sido utilizados no tratamento primário da infecção. Uma vez que a resistência do HIV aos fármacos antirretrovirais vem aumentando, há necessidade de busca por agentes mais baratos e menos tóxicos do que os atualmente utilizados. Dessa forma, novos tratamentos com produtos naturais são necessários (Kurapati et al., 2016).

Vários tipos de produtos naturais já foram descritos como inibitórios da atividade da transcriptase reversa do HIV, com sua eficiência expressa em valores de porcentagem de inibição ou IC_{50} , ou seja, valor responsável pela redução em 50% da atividade enzimática,

usualmente expresso em μM , $\mu\text{g/mL}$ ou mg/mL . Flavonoides como baicaleína, quercetina, quercetagetina e miricetina apresentam valores de IC_{50} de 2,52 μM , 0,52 μM , 0,46 μM e 0,08 μM , respectivamente (Ono et al., 1990). Os galotaninos geraniina e corilagina isolados de *Phyllanthus amarus* Schumach. & Thonn. mostram um IC_{50} de 1,9 μM e 9,3 μM (Notka et al., 2003). Para os terpenoides, compostos como o ferulato de cicloartenol ($\text{IC}_{50} = 2,2 \mu\text{M}$), ferulato 24-metilenecicloartenol (1,9 μM), lupenona (2,1 μM), betulina (1,4 μM), e 29-benzoato de karounidiol (2,2 μM) apresentam-se como os mais ativos (Akihisa et al., 2001). Estudos revelam que a cumarina calanolida A, isolada de *Calophyllum lanigerum* Miq, é um inibidor específico da transcriptase reversa do HIV-1 com $\text{IC}_{50} = 0,07 \mu\text{M}$ (Kashman et al., 1992).

O grupo dos alcaloides também apresenta compostos com atividades frente à transcriptase reversa do HIV. O alcaloide aromático polycitona A, isolado da ascídia *Polycitor* sp. (Renier, 1804), é um dos compostos mais ativos na inibição da atividade desta enzima, com IC_{50} entre 245 nM e 470 nM (Loya et al., 1999). As benzofenantridinas fagaronina ($\text{IC}_{50} = 21,8 \mu\text{M}$) e cloreto de nitidina ($\text{IC}_{50} = 19,1 \mu\text{M}$) são descritas como as mais ativas na sua classe (Tan et al., 1992). Outros alcaloides como os quinolizidínicos (ormosinina e asparteina), pirrolizidínicos (retrorsina) e indolizidínicos (swainsonina) não foram considerados ativos ($\text{IC}_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$) (Tan et al., 1991).

3.1.4 Produtos naturais como alternativa no tratamento da doença de Chagas.

A doença de Chagas é uma infecção parasitária causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, descoberto em 1909 por Carlos Chagas (Rassi et al., 2010). A doença de Chagas estabeleceu-se como uma zoonose com o aumento das atividades pecuárias e agrícolas, os insetos triatomíneos, vetores desse parasita, foram se adaptando aos ambientes domésticos e ao uso de animais domésticos como fonte de alimento (Coura, 2007). A doença é endêmica em 21 países das Américas e existem, aproximadamente, entre 6 e 7 milhões de pessoas infectadas. Todos os anos estima-se que haja 30.000 novos casos e mais 9.000 recém-nascidos infectados durante a gravidez. Atualmente, mais de 70 milhões de pessoas nas Américas vivem em áreas com risco de contrair a doença de Chagas (OPS, 2016).

O reservatório natural do parasita são tatus, marsupiais, roedores, morcegos e primatas selvagens, bem como certos animais de estimação como cães, gatos e ratos (Acosta & López, 2013; Deane, 1964; Steindel et al., 2008). O *Trypanosoma cruzi* é um parasita protozoário que assume quatro estágios morfológicos durante o seu ciclo de vida que se passa entre os insetos e os mamíferos. Nos insetos vetores hematófagos da subfamília *Triatominae* Jeannel, 1919, os

epimastigotas de *T. cruzi* se replicam extracelularmente no lúmen do intestino. À medida que os parasitas atingem a extremidade posterior do intestino, eles se juntam à parede do reto e convertem-se em tripomastigotas metacíclicos infecciosos não replicativos que são liberados nas fezes quando o inseto está se alimentando de sangue de um mamífero. Os tripomastigotas metacíclicos entram no hospedeiro mamífero quando são esfregados na ferida da mordida, ou através de outras superfícies abertas da pele ou da mucosa invadindo as células hospedeiras. Os parasitas intracitoplasmáticos convertem-se para o estágio replicativo, amastigota e replicam-se antes de se transformar em tripomastigotas móveis, os quais são liberados quando a célula hospedeira se rompe. Os tripomastigotas são disseminados no sangue e na linfa, onde podem infectar qualquer célula nucleada ou serem absorvidos novamente por um inseto vetor, completando o ciclo de vida (Minning et al., 2009). A patologia clínica inclui lesões inflamatórias e respostas imunes, particularmente mediada por linfócitos CD4+, CD8+, interleucina-2 (IL) e IL-4, com destruição e fibrose celular e neuronal, levando ao bloqueio do sistema de condução cardíaca, arritmia, insuficiência cardíaca, peristalse e dilatação de vísceras, particularmente o esôfago e o cólon (Coura, 2007).

Várias plantas e produtos naturais isolados têm sido descritos com potencial antiparasitário frente a *T. cruzi*. Usualmente, as plantas usadas como fonte de compostos com potencial antiprotozoário são usadas popularmente para o tratamento da infecção (Izumi et al., 2011).

Para Annonaceae, o óleo volátil das folhas de *A. coriacea* apresenta um IC₅₀ de 168,50 µg/mL frente aos tripomastigotas de *T. cruzi* (Siqueira et al., 2011). Extratos de várias anonáceas foram testadas enquanto à atividade antiprotozoaria frente aos epimastigotas de *T. cruzi*, com valores de IC₅₀ próximos a 25 µg/mL. O extrato em acetato de etila das folhas de *A. muricata* apresentou IC₅₀ de 25 µg/mL, o extrato hexânico do caule de *Annona exsucca* DC. ex Dunal IC₅₀ = 26,1 µg/mL, mesmo valor encontrado com o extrato metanólico de *Xylopia aromatica*. Para *Annona pittieri* Donn. Sm, entretanto, os extratos hexânico das folhas (IC₅₀ = 16,5 µg/mL) e do caule (IC₅₀ = 16,4 µg/mL) foram os mais ativos, (Osorio et al., 2007).

Triterpenoides como o ácido ursólico (IC₅₀ = 21,3 µM) e ácido oleanólico (IC₅₀ = 80,4 µM) isolados de espécies de *Miconia* Ruiz & Pav. foram ativos frente aos tripomastigotas (Ferreira et al., 2013). As lignanas veraguensina e grandisina na concentração de 2,5 µg/mL isoladas de galhos de *Virola surinamensis* (Rol. ex Rottb.) Warb levaram a lise de 100% dos tripogastigotas (Lopes et al., 1998). Alguns flavonoides como hispidulina e santina apresentaram valores de IC₅₀ frente a tripomastigotas de 62,3 µM e 42,1 µM, respetivamente

(Sülsen et al., 2007). O ácido acantóico isolado do caule de *Annona amazonica* R.E. Fr. apresentou um IC₅₀ de 59 µmol/L frente aos epimastigotes de *T. cruzi* (Pinheiro et al., 2009).

Os alcaloides, apesar de poderem ser tóxicos para o hospedeiro, apresentam interesse farmacêutico, sendo usados há tempos no tratamento de diversas doenças e com grande potencial para a procura de possíveis antiparasitários. Os alcaloides benzilisoquinolínicos, particularmente, são um grupo de substâncias com descrita atividade antiparasitária (Tempone et al., 2005). Por exemplo, os alcaloides coclaurina e norarmepavina inibem o crescimento dos epimastigotas de *T. cruzi* com um IC₅₀ de 0,30mM (Osorio et al., 2006), os oxaporfínicos liriodenina e *O*-metilmoscatolina isolados dos ramos de *Annona foetida* Mart. são ativos frente aos tripomastigotas de *T. cruzi* com um IC₅₀ de 4 e 3,8 µg/mL, respectivamente (Costa et al., 2011).

Tendo em conta o dito para as diferentes atividades biológicas nas quais os alcaloides podem ser alvo de estudo, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar as potenciais atividades biológicas do extrato bruto, de frações e de substâncias isoladas, quando possível, frente às bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*, aos amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, além de testar a inibição da atividades das enzimas transcriptase reversa do HIV-1 e acetilcolinesterase.

3.2 Material e Métodos

Para o desenvolvimento dos ensaios foram utilizados o extrato bruto (EB), a fase alcaloídica enriquecida (FAE), as frações obtidas da coluna de sílica (F1, F2, F3, F4, F5) para os ensaios antimicrobianos, além dos alcaloides xilopina e estefalagina obtidos das folhas de *Annona crassiflora* Mart. para as demais atividades. Os procedimentos de extração, isolamento, purificação e identificação das distintas amostras estão detalhados no Capítulo 1.

3.2.1 Ensaio antimicrobiano

Para o desenvolvimento do ensaio antimicrobiano foi seguido o método adaptado para microplaca por Sedano-Partida et al. (submetido). Foram usadas cepas de *Escherichia coli* (Migula 1895) Castellani e Chalmers 1919 K-12 MG1655 (Blattner, 1997) e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter 1872) Migula 1900 ATCC 10145 como representantes Gram negativos e *Bacillus subtilis* (Ehrenberg 1835) Cohn 1872 PY79 (Schroeder & Simmons, 2013) como bactéria Gram positiva.

As cepas, conservadas em tubos eppendorff com glicerol a -80°C, foram reativadas em placas de Petri com meio de cultura sólido Luria Bertani (LB). Foi realizado isolamento de colônias pela semeadura em estrias na placa a fim de observar suas características individuais. As placas foram incubadas em estufa a 35°C por 24 h. Como controle de esterilidade do meio, foram incubadas duas placas de meio LB sem bactéria. Posteriormente, foi gerado um pré-inóculo para o qual uma colônia bacteriana foi suspensa em tubo falcon com caldo LB e incubado a 35°C com agitação constante durante 16 h para as bactérias Gram negativas e 18 h para *B. subtilis*. Após o tempo de incubação, uma alíquota do pre-inóculo foi diluída em tubos falcon com caldo LB até atingir a escala de McFarland de 1×10^6 células/mL fazendo uso do leitor de microplacas no comprimento de onda de 595 nm. Este foi o inóculo para a realização dos testes.

No teste, todas as amostras e controles foram feitos em triplicata utilizando placas de Elisa de 96 poços. As amostras foram suspensas em DMSO 4% em diferentes concentrações. Em cada poço, 20 µL de amostra foram diluídos com 180 µL do inóculo das bactérias, atingindo assim as concentrações de 120, 60, 30, 15, 7.5, 3,75 e 1,875 µg/mL. Como controles negativos foram usados o caldo LB sem bactéria, o caldo LB com bactéria e caldo LB com bactéria e DMSO 4%. Como controle positivo de inibição foi usado o antibiótico ampicilina (10 µg/mL). As placas foram incubadas a 35°C com agitação constante (120 rpm) durante 18 h para as bactérias Gram negativas e 20 horas para *B. subtilis*.

Após o tempo de incubação, foram colocados 20 µL de resazurina 0,01% e deixado em incubação por 3 horas para observar a viabilidade celular. Posteriormente, a absorbância de cada poço foi medida em leitor de ELISA a 595 nm. Para os resultados da atividade antimicrobiana foi calculado o percentual de inibição do crescimento bacteriano (%IB) com a fórmula:

$$\%IB = 100 - [(Absorbância da amostra) / Absorbância do controle negativo (meio LB com bactéria e DMSO 4\%)) * 100].$$

Os resultados são apresentados em concentração mínima inibitória necessária para atingir 50% de inibição do crescimento (MIC₅₀).

3.2.2 Ensaio da atividade anticolinesterase

O ensaio em microplacas para medir a atividade da acetilcolinesterase (AChE) foi desenvolvido utilizando a metodologia proposta por Ingkaminam et al. (2002). As amostras foram diluídas em DMSO 10% preparado em tampão Tris-HCl (50mM, pH8). O procedimento foi feito em penumbra para evitar a degradação enzimática por ação da luz. Em cada poço foram

colocados 50µL de solução DTNB (ácido 2,2'-dinitro-5,5'-ditio-benzóico), 10µL de enzima acetilcolinesterase (0,26 U/mL) e 110µL de tampão Tris-HCL. Posteriormente foram adicionados 20 µL de amostra (1000 µg/mL) ou controle positivo (fisostigmina 10 µg/mL em DMSO 10%). A placa foi incubada por 10 min a temperatura ambiente com agitação constante de 400 rpm e a leitura realizada a 405nm correspondente ao branco das amostras. A seguir foram adicionados 10µL de iodeto de acetilcolina em cada poço da placa. Esta foi incubada por 1 minuto sobre agitação constante a 400 rpm e as leituras foram realizadas em 405nm cada 5 minutos até atingir o tempo máximo de 20 minutos do experimento. A atividade enzimática foi calculada em porcentagem de inibição da enzima da seguinte maneira:

$$\% \text{ inibição} = ((\text{Absorbância do controle negativo (DMSO 10\%)} - \text{absorbância da amostra}) * 100 / \text{Absorbância do controle negativo}).$$

As absorbâncias das amostras foram obtidas através da diferença entre os valores de absorbância após a adição do iodeto de acetilcolina e os valores da mesma amostra antes da adição do reagente (branco da amostra).

3.2.3 Ensaio da inibição da enzima retroviral transcriptase reversa (HIV-1 RT)

A avaliação da atividade de inibição da enzima retroviral transcriptase reversa (HIV-1) foi realizada usando a metodologia do Kit ELISA RT (Roche), conforme instruções do fabricante.

As amostras foram diluídas em DMSO 10% preparado em água DEPEC em várias concentrações (6,25-50µg/mL). Como controle positivo foi utilizada uma solução de 3µg/mL de Foscarnet (fosfonoformato trissódico hexa-hidratado). A reação foi desenvolvida em microtubos de 200µL nos quais foram colocados 20µL de amostra, 19µL tampão de lise, 20µL de oligoto (dT) + poli-A e 1µL de enzima transcriptase reversa. Os microtubos foram incubados a 37°C durante 1 h. O conteúdo dos microtubos foi transferido para a placa de reação inclusa no Kit. Estas foram incubadas por mais 1 h a 37°C. Após esse tempo, a solução foi descartada e a placa foi lavada com o tampão de lavagem por cinco vezes. Posteriormente foram adicionados 200µL do Mix 1 (tampão conjugado e anticorpo) em cada poço, permanecendo estes em incubação por 1 h 37°C. Terminada a incubação, os poços foram lavados novamente com tampão de lavagem. Subsequentemente, foram adicionados 200 µL de solução ABTS para leitura da absorbância em leitor de microplacas a 405nm e 490 nm. Os resultados foram expressos em concentração inibitória em 50% da atividade da enzima (IC₅₀).

3.2.4 Ensaio da atividade tripanocida frente aos parasitas de *Trypanosoma cruzi*.

O ensaio de atividade tripanocida foi realizado pela equipe do Laboratório de Novos Fármacos para doenças Negligenciadas do Instituto Adolfo Lutz, sob responsabilidade do Prof. Dr André Tempone.

Para o desenvolvimento do ensaio, ratos BALB/c foram obtidos da unidade de criação de animais do Instituto Adolfo Lutz-SP. Os animais foram mantidos em gaiolas esterilizadas sob um ambiente controlado e receberam água e comida *ad libitum*. Os procedimentos em animais foram realizados com a aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa (número de projeto CEUA IAL / Pasteur 02/2011), de acordo com o Guia para Cuidados e Uso de Animais de Laboratório da Academia Nacional de Ciências. Desses ratos foram coletados macrófagos da cavidade peritoneal. Estas células foram lavadas com meio RPMI-1640 suplementado com soro fetal bovino a 10% e foram mantidas em incubadora umidificada com 5% de CO₂ a 37 °C.

3.2.4.1 Cultura dos tripomastigotas

Para determinar a concentração inibidora da viabilidade de 50% dos parasitas de *Trypanosoma cruzi* (IC₅₀), foram usados tripomastigota os quais foram contados em câmara de Neubauer e semeados em microplacas de 96 poços numa concentração de 1x10⁶ células/poço. Os alcaloides foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos com meio RPMI-1640 (meio Roswell Park Memorial Institute) em diferentes concentrações. As placas foram colocadas em uma incubadora humidificada com 5% CO₂ durante 24 h a 37°C. A viabilidade parasitária foi determinada utilizando o ensaio colorimétrico da resazurina (Martins et al., 2016). O benzenidazol foi usado como medicamento padrão. A densidade óptica foi lida em 570 nm utilizando leitor de microplacas de múltiplos modos FilterMax F5, Molecular Devices. O DMSO foi utilizado a uma concentração máxima de 0,5% e incubado com células como controle interno.

3.2.4.2 Ensaio com amastigotas intracelulares de *Trypanosoma cruzi* em macrófagos peritoneais

Os macrófagos peritoneais foram dispensados em microplacas de 16 poços (NUNC, Thermo, EUA) e mantidos por 24 h no mesmo meio a 37 °C em uma incubadora umidificada com 5% CO₂. As células não aderentes foram removidas por duas lavagens com meio. Após 24 h as células foram infectadas com tripomastigotas numa concentração de 1x10⁶ células/poço e incubadas durante 4 h. Posteriormente, as células infectadas foram incubadas com os alcaloides durante 48 h. Finalmente, as lâminas foram fixadas com metanol, coradas com Giemsa e observadas em microscopia óptica. A carga parasitária foi definida pela contagem de 400

macrófagos/poço, avaliando o número de macrófagos infectados (Martins et al., 2016). O benzenidazol foi usado como medicamento padrão. O DMSO foi utilizado a uma concentração máxima de 0,5% e incubado com células como controle interno.

3.2.4.3 Citotoxicidade contra células de mamíferos

A linhagem celular NCTC L929 foi incubada em microplacas de 96 poços numa concentração de 6×10^4 células/poço. Os alcaloides foram acrescentados em diferentes concentrações e as placas foram incubadas durante 48 h a 37°C em uma incubadora com 5% de CO₂. Foi calculada a concentração que leva a 50% de citotoxicidade em células de mamífero (CC₅₀), sendo a determinação da viabilidade feita com o ensaio colorimétrico do MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). O DMSO foi utilizado a uma concentração máxima de 0,5% e incubado com células como controle interno. O índice de seletividade (SI) foi determinado utilizando a seguinte fórmula:

$$SI = (CC_{50} \text{ contra as células de mamífero NCTC L929} / IC_{50} \text{ contra os parasitas de } T. \text{ cruzi})$$

3.3 Resultados e discussão

Para a avaliação do potencial biológico de *A. crassiflora* foram desenvolvidos ensaios antibacterianos, inibidores de atividade enzimática (acetilcolinesterase e HIV-RT), assim como antiprotozoário (*T. cruzi*). Como já mencionado anteriormente, para o ensaio antibacteriano foram utilizados o extrato bruto, a fase alcaloídica e as frações da coluna positivas para alcaloides. Para os demais ensaios foram testados os alcaloides purificados xilopina e estefalagina.

3.3.1 Atividade antimicrobiana

Espécies de Annonaceae representam uma ótima fonte de produtos naturais com diversas aplicações, dentre as quais, várias espécies da família apresentam atividades antibacterianas. Extratos aquosos, metanólicos e de éter de petróleo de folhas *Annona squamosa* e *Annona reticulata* já foram relatados como inibidores de crescimento de *Salmonella typhimurium* (Padhi et al., 2011).

Segundo a literatura, extratos de plantas com valores de MIC=0,5 mg/mL para atividades antimicrobianas são considerados como fortes inibidores. Valores entre 0,6-1,5 mg/mL denotam extratos moderadamente ativos, enquanto valores acima de 1,6 mg/mL são associados a extratos pouco ativos (Aligiannis et al., 2001; Severino et al., 2009). Fazendo uma aproximação para nossos resultados, foram considerados valores de MIC₅₀=0,25 mg/mL como

fortes inibidores, valores entre 0,3 e 0,7 mg/mL como moderadamente ativos e valores acima de 0,8 mg/mL como pouco ativos.

As amostras obtidas das folhas de *Annona crassiflora* Mart. apresentaram efeito bactericida frente as três bactérias testadas. Foram ensaiados o extrato bruto hidrometanólico das folhas de *A. crassiflora* (EB), a fase alcaloídica enriquecida (FAE) e as 5 frações positivas para alcaloides obtidas da coluna de topo aberto (F1-F5) (Ver detalhes da metodologia de extração e fracionamento no capítulo 1). Os resultados da atividade antimicrobiana das amostras apresentados em concentração mínima inibitória de 50% do crescimento bacteriano (MIC₅₀) são apresentados na Tabela 1.

Para as bactérias Gram negativas, os valores de MIC₅₀ para o ensaio com *Escherichia coli* MG1655 variaram entre 38,25 e 90,72 µg/mL, sendo a FAE a mais ativa (MIC₅₀=38,25 µg/mL), seguida da F1 (55,17 µg/mL). Os valores obtidos para F2, F3 e F5 foram semelhantes, ficando ao redor de 60 µg/mL. O EB e a F4 foram as amostras menos eficientes, com valores de MIC₅₀ de 75,26 µg/mL e 90,72 µg/mL, respectivamente. Para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145, o MIC₅₀ apresentou valores maiores, sendo neste caso a F3 a mais ativa (MIC₅₀=50,52 µg/mL), seguida da F1 (MIC₅₀=95,88 µg/mL). As demais amostras apresentam valores acima de 200 µg/mL (EB: 218,36 µg/mL, F2: 366,87 µg/mL, F4: 347,91 µg/mL e F5: 261,06 µg/mL).

E. coli foi a bactéria mais sensível aos tratamentos com as amostras de *A. crassiflora*. Na literatura, os extratos metanólico e clorofórmico de *Annona squamosa* apresentam valores de MIC₅₀ = 180 µg/mL e 920 µg/mL, respectivamente, para essa bactéria (Patel & Kumar, 2008). Dessa forma, o EB usado neste trabalho, mesmo estando entre as amostras menos eficientes, foi bem mais eficiente que os extratos de *A. squamosa*. Por outro lado, o extrato clorofórmico de folhas de *Annona reticulata* (MIC₅₀=20 µg/mL) (Jamkhande et al., 2016) foi mais eficiente que a FAE (38,25 µg/mL), amostra que apresentou o melhor resultado neste trabalho. Embora o MIC₅₀ da FAE para *E. coli* tenha sido cerca de 12 vezes maior que o observado para a ampicilina (3 µg/mL), nossos dados são interessantes, já que a FAE não é um composto puro. *Pseudomonas aeruginosa*, por outro lado, foi a bactéria menos susceptível aos tratamentos tendo em conta os valores altos de MIC₅₀. Testes com outras Annonaceae mostram valores de MIC₅₀=1024 µg/mL para os extratos metanólicos de *Annona muricata* e os hidrometanólicos de *Annona glabra* (Dzotam et al., 2016; Stanley de et al., 2016), enquanto extratos metanólicos e clorofórmicos de *A. squamosa* apresentaram valores de 130 µg/mL e 210 µg/mL (Patel & Kumar, 2008), reforçando a menor sensibilidade dessa bactéria também a extratos de outras espécies de *Annona*. Vale ressaltar, porém, ainda que os valores para *P.*

aeruginosa tenham sido maiores que os de *E. coli*, os extratos de *A. crassiflora* foram mais ativos que os de outras espécies do gênero.

Bacillus subtilis PY79, representante Gram positivo, apresentou valores de MIC₅₀ semelhantes aos obtidos com *E. coli*. A FAE foi a mais ativa com MIC₅₀=49,55 µg/mL, seguida da F5 (MIC₅₀=67,13 µg/mL), F1 (MIC₅₀=67,40 µg/mL), F4 (MIC₅₀=78,30 µg/mL) e valores próximos para o EB e F2 (99,19 µg/mL e 105,61 µg/mL). Extratos de outras Annonaceae já foram investigados frente a essa bactéria. Extratos metanólicos e clorofórmicos de *A. squamosa* apresentaram valores de MIC₅₀>1000 µg/mL e 630 µg/mL, respectivamente (Patel & Kumar, 2008). Já os de extratos metanólicos e clorofórmicos de *A. reticulata* foram muito mais eficientes, com valores de 10 µg/mL, sendo estes os mais baixos encontrados para extratos de Annonaceae (Jamkhande et al., 2016).

As Annonaceae são conhecidas pela produção de alcaloides, especificamente os benzilisoquinolínicos e seus derivados como aporfinas e fenantrenos. Alcaloides deste tipo já foram descritos em folhas de *A. crassiflora* (Egydio et al., 2013). Neste trabalho, as análises no CG-EM e CLAE-DAD da FAE e das frações F1-F5 revelaram a presença dos alcaloides aporfínicos já conhecidos anonaina, estefalagina, litseglutina B e xilopina, um novo – crassiflorina, além do protoberberínico tetrahidropalmatrubina e do fenantreno annoretina (ver capítulo 1).

Atividades antibacterianas já foram relatadas somente para dois desses alcaloides detectados em *A. crassiflora*. Anonaina e xilopina apresentaram atividade inibitória contra *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus sp.*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis* (Tsai et al., 1989; Li et al., 2013;).

Na literatura, a atividade antimicrobiana para os alcaloides aporfínicos tem sido atribuída a uma conformação noraporfinica com grupamento 1,2-metilenodioxi. Além disso, já foi proposto que a introdução de um grupo metoxila e/ou a ligação de um grupo metila ao nitrogênio são fatores que diminuem ou eliminam as propriedades antimicrobianas desses alcaloides (Ríos et al., 1999). Tomando em conta as análises cromatográficas da FAE apresentadas no capítulo 1, a maior abundância é atribuída aos alcaloides xilopina e estefalagina (ver Figura 7 – Capítulo 1), podendo esses alcaloides ter papel importante na atividade antimicrobiana apresentada. Entretanto, entre as frações testadas, a F1, da qual foi isolada a litseglutina B, foi a que apresentou melhor atividade bactericida frente s três bactérias testadas. Cabe salientear que este alcaloide não apresenta o grupamento 1,2-metilenodioxi, possui três grupos metoxila, além da metila ligada ao nitrogênio (ver Figura 11 – Capítulo 1). Dessa forma,

a análise dos outros aporfínicos detectados em *A. crassiflora*, num futuro próximo, poderá ajudar a confirmar ou não a correlação entre estrutura e atividade apontada acima.

Tabela 1. Valores de MIC₅₀ (µg/mL) do extrato bruto (EB), fase alcaloídica enriquecida (FAE) e frações positivas para alcaloides obtidas da coluna de topo aberto (F1-F5) de folhas de *A. crassiflora*. Ampicilina foi usada como controle positivo de inibição.

Bactéria	MIC ₅₀ (µg/mL)							Ampicilina
	EB	FAE	F1	F2	F3	F4	F5	
<i>Escherichia coli</i> MG1655	75,26	38,25	55,17	63,99	62,07	90,72	60,40	3,00
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	218,36	95,88	75,03	366,87	50,52	347,91	261,06	3,00
<i>Bacillus subtilis</i> PY79	99,79	49,55	67,40	105,61	87,65	78,30	67,13	3,00

3.3.2 Inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

A atividade anticolinesterásia foi avaliada para dois dos alcaloides isolados de *A. crassiflora* na concentração final de 100 µg/mL. A xilopina inibiu cerca de 20% da atividade, enquanto a estefalagina levou a uma inibição de mais de 75%, sendo o mais ativo depois da fisostigmina (Figura 1). A atividade para este tipo de aporfina era de se esperar, visto que outros alcaloides derivados do esqueleto benzilisoquinolínico, como por exemplo a berberina, têm sido demonstrado como ativos frente as enzimas AChE, BChE (butilcolinesterase), além de reduzir os níveis do peptídeo β-amiloide (Aβ), mostrando assim, potencial para tratar a doença de Alzheimer (DA) (Girdhar et al., 2015; Wei-xing et al., 1980).

Os alcaloides isolados analisados apresentam grande semelhança estrutural. A xilopina apresenta o nitrogênio livre, enquanto que a estefalagina possui uma metila ligada nesta posição. As diferenças nas atividades observadas entre esses alcaloides aporfínicos pode ser explicada exatamente pela metila ligada ao nitrogênio. A estefalagina foi mais de três vezes mais ativa que a xilopina no presente estudo. Chiou et al. (1998), com base em dados obtidos para litebamina (um fenantreno), sugeriram que os resultados inibitórios mais potentes da atividade da acetilcolinesterase são obtidos para os homólogos quaternários *N*-metil e *N*-propil. O ensaio com os alcaloides litseglutina B e anoretina, detectados em *A. crassiflora*, poderá auxiliar na confirmação dessa hipótese de correlação atividade anticolinesterásica x estrutura.

Segundo Vinutha et al. (2007), substâncias testadas numa concentração de 100 µg/mL que apresentem inibição da atividade da AChE >50% são considerados como ativas. Inibição entre 30 – 50% caracteriza substâncias moderadamente ativas, enquanto inibição < 30% está associada a substâncias inativas. Embora os compostos tenham sido testados numa

concentração 100 vezes maior que o controle positivo (fisostigmina), a estefalagina pode ser considerada ativa pelos os parâmetros acima.

Os efeitos dos alcaloides em respostas do sistema nervoso central têm sido demonstrados. No caso da DA, o alcaloide isoquinolínico galantamina, descoberto em *Galanthus nivalis* L., teve seu uso aprovado para o tratamento da doença pela primeira vez na Suécia em 2000 e, posteriormente, na União Europeia e nos Estados Unidos. Este alcaloide possui um mecanismo de ação dupla no sistema colinérgico, inibindo a ação da enzima acetilcolinesterase e estimulando a ação da acetilcolina nos receptores nicotínicos. Dessa forma, há um aumento na atividade do sistema colinérgico, melhorando os sintomas e a qualidade de vida das pessoas com esta doença neurodegenerativa (Ng et al., 2015). Entretanto, como já dito anteriormente, este medicamento não cura a doença funcionando como um paliativo, reforçando a necessidade de mais pesquisas no desenvolvimento de novos tratamentos que permitam frear o avanço da doença ou eliminar seus efeitos por completo.

Figura 1. Porcentagem de inibição da enzima acetilcolinesterase pelos alcaloides estefalagina (EST) e xilopina (XIL) obtidos das folhas de *A. crassiflora* nas concentrações de 100 µg/mL. O controle positivo (C+) foi a fisostigmina (1 µg/mL). Valores expressos em Médias ±DP (n=3).

3.3.3 Inibição da enzima retroviral transcriptase reversa (HIV-1 RT)

Para o ensaio da inibição da HIV-1 RT os resultados foram expressos em concentração inibitória em 50% da atividade da enzima (IC₅₀). Um valor menor neste parâmetro indica uma maior atividade da substância. O controle positivo usado neste ensaio foi o foscarnet com um valor de IC₅₀ de 0,061 µg/mL. As duas aporfina testadas (estefalagina e xilopina) apresentaram valores de IC₅₀ de 57,56 µg/mL para xilopina, enquanto que para estefalagina este valor foi dez vezes menor (5,69 µg/mL) (Tabela 2).

Diversos alcaloides já foram reportados com atividade frente à enzima HIV-1 RT. Dentro dos derivados das benzilisoquinolíνας, os alcaloides benzofenantridínicos fagaronina e nitidina apresentaram os melhores resultados, com valores de IC₅₀ de 8,5 e 7,4 µg/mL, respectivamente; já alguns protoberberínicos como jatrorrizina (IC₅₀ = 42,4 µg/mL) e berberina (IC₅₀ = 60,9 µg/mL) foram menos efetivos (Tan et al., 1992). Alcaloides aporfínicos como boldina, magnoflorina e melosmina foram considerados inativos frente a esta enzima (IC₅₀ > 200 µg/ml) (Tan et al., 1991).

De acordo com vários autores, substâncias com IC₅₀ ≤ 50 µg/mL são consideradas ativas, enquanto aquelas na faixa de 50 µg/ml < IC₅₀ < 150 µg/ml são moderadamente ativas (César et al., 2011; Tan et al., 1991).

Considerando os parâmetros mencionados acima, diferente dos dados obtidos por Tan et al. (1991), ambas aporfinas testadas neste trabalho podem ser consideradas como ativas na inibição da atividade da enzima transcriptase reversa do vírus de imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1 RT), sendo uma de atividade moderada (xilopina) e a outra realmente ativa (estefalagina). A diferença de atividades observadas para as aporfinas nos dois trabalhos pode estar relacionada a presença do anel metilenodioxí nas aporfinas estudadas neste trabalho (xilopina e estefalagina), ausente em boldina, magnoflorina ou melosmina. Esta hipótese também se confirma analisando a estrutura da nitidina, mencionada acima como um dos alcaloides com melhor resultado para este ensaio (Tan et al., 1992), na qual este anel está presente. Além disso, assim como sugerido no ensaio de atividade anticolinesterásica, a maior atividade inibitória da HIV-1 RT da estefalagina em relação a xilopina pode estar relacionada a substituição do nitrogênio por um grupo metila. Esta característica também está presente da nitidina. Seria interessante avaliar a anoretina quanto ao seu potencial na inibição da HIV-1 RT visto ser um derivado fenantreno com uma metila ligada ao nitrogênio.

Embora nossos resultados sejam inéditos para descrição das atividades destas aporfinas e essas atividades sejam altas em comparação com outros compostos de sua classe, são necessários estudos que permitam entender o mecanismo de ação destas moléculas na inibição enzimática da transcriptase reversa do HIV-1 para assim avaliar distintos esqueletos descritos para este tipo de moléculas e conseguir propor mecanismos de modificação estrutural que possam atingir uma maior atividade.

Tabela 2. Porcentagem de inibição da atividade da transcriptase reversa HIV-1 e IC₅₀ dos alcaloides aporfínicos estefalagina e xilopina isolados de folhas de *Annona crassiflora* Mart.

	Concentrações		IC ₅₀ µg/mL
	50 µg/mL	12,5 µg/mL	
Estefalagina	77,11%	57,67%	5,696
Xilopina	41,68%	24,85%	57,56

3.3.4 Atividade tripanocida frente ao parasita *Trypanosoma cruzi*

Os tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* foram incubados com os alcaloides estefalagina e xilopina e a viabilidade celular foi calculada pelo teste da resazurina. Os resultados obtidos para estefalagina mostram uma atividade tripanocida com valores de IC₅₀ de $6,9 \pm 2,4$ µM para tripomastigotas e $8,5 \pm 3,0$ µM para amastigotas, enquanto que para xilopina os resultados foram de $1,7 \pm 1,2$ µM e $14,7 \pm 8,7$ µM, respectivamente. Para o cálculo da concentração que leva a 50% de citotoxicidade em células de mamífero (CC₅₀) foram testados os alcaloides e o controle positivo (benzonidazol) com células NCTC (clon 929). A estefalagina apresentou valores de CC₅₀ de $39,4 \pm 19,4$ µM e a xilopina de $87,9 \pm 48,4$ µM. O índice de seletividade (SI) foi calculado tanto para os tripomastigotas como para os amastigotas usando o CC₅₀ das células de mamífero/IC₅₀ dos alcaloides para cada uma das fases do parasita. Os valores de SI dos dois alcaloides ficaram entre 4,6 e 6 para os amastigotas, enquanto que para os tripomastigotas, a estefalagina apresentou um SI de 5,7 e a xilopina de 51,7. Os valores são apresentados na tabela 3.

Os resultados mostram que o efeito da estefalagina foi mais estável sobre os dois estágios de desenvolvimento do parasita, já que seus valores oscilaram entre 6,9 µM e 8,5 µM. Entretanto, o índice de seletividade muito baixo, 5,7 para tripomastigotas e 4,6 para amastigotas, indicam alta toxicidade desse alcaloide às células. Os valores recomendados para substâncias com atividade tripanocida potenciais pela DNDi “The Drugs for Neglected Diseases initiative” são IC₅₀ <10 µM e SI ≥ 10 (Don & Ioset, 2014). Por outro lado, os resultados obtidos para xilopina mostram essa molécula com ótimo potencial de controle ao parasita na forma de tripomastigota, com valor de IC₅₀=1,7 µM e SI alto de 51,7.

Vários extratos e alcaloides isolados de Annonaceae já foram descritos com atividade frente ao parasita *T. cruzi*. O extrato das folhas de *A. muricata* em acetato de etila sobre epimastigotas de *T. cruzi* apresentou valores de IC₅₀=40,2 µg/mL e um índice de seletividade de 0,26 (Valencia et al., 2011). O extrato hexânico do caule de *Xylopia aromatica*, o extrato hexânico da casca da raiz de *Duguetia furfuracea* e o extrato etanólico da casca da raiz de *A. crassiflora* apresentaram valores de IC₅₀ de 21,6 µg/mL, 6,6 µg/mL e 5,6 µg/mL,

respectivamente (Mesquita et al., 2005). Tempone et al. (2005) analisando diversas espécies produtoras de alcaloides isoquinolínicos verificaram que os extratos etanólicos brutos e as frações enriquecidas de alcaloide de muitas delas, entre as quais as anonáceas *A. crassiflora*, *A. coriacea*, *D. furfuracea*, *D. lanceolata*, *Xylopia emarginata* e *Guatteria austral*, levaram à morte de aproximadamente 100% dos tripomastigotas, reforçando a alta atividade antiparasitária desses alcaloides. Para alcaloides purificados de Annonaceae, o alcaloide duguetina, isolado de *D. furfuracea*, foi descrito com uma forte inibição dos tripomastigotes de *T. cruzi* com um IC₅₀ de 9,32 µM (Silva et al., 2009).

Trabalhos com aporfinas já demonstraram que os alcaloides noraporfinicos (alcaloides com o nitrogênio livre) têm uma maior ação frente aos parasitas. Além disso, o anel metileno dioxi parece afetar a replicação do DNA e a ação da topoisomerase II (Hoet et al., 2004), fazendo com que os parasitas percam sua viabilidade no estágio de tripomastigota. Estas características são coincidentes com a estrutura da xilopina, reforçando os resultados obtidos.

O alcaloide xilopina foi o mais promissor dos alcaloides testados no combate do agente causador da doença de Chagas, já que seu índice de seletividade é alto e sua maior efetividade se deu na fase diagnóstica do parasita (Don & Ioset, 2014). Numa projeção otimista, poderíamos sugerir a manipulação por síntese deste alcaloide visando torná-lo ainda mais ativo e fazendo com que a sua seletividade não fique restrita só a fase de tripomastigota, possibilitando que sua aplicação fosse extrapolada à fase amastigota, a qual é o alvo do tratamento a doença (Izumi et al., 2011).

Resultados de atividade antileishmania já foram reportados para o alcaloide xilopina (Montenegro et al., 2003). No entanto, os resultados obtidos tanto para amastogotes como para tripomastigotes de *T. cruzi* são inéditos para as aporfinas xilopina e estefalagina.

Para finalizar, sugerimos que o alcaloide novo descrito neste trabalho - crassiflorina (ver capítulo 1), que se caracteriza também por ser um composto noraporfinico com substituição em 1 e 2 (metilenodioxi), merece ser testado com esse parasita, pois espera-se uma boa atividade frente aos tripomastigotas e, quiçá, também com os amastigotas de *T. cruzi*. Além disso, tendo em conta os resultados da xilopina para *T. cruzi*, sugere-se investigar sua ação como potencial produto natural frente ao parasita da doença do sono (*Trypanosoma brucei*), pois, o estágio alvo de tratamento deste último é a forma de tripomastigota, fase na qual a xilopina apresentou um índice de seletividade alto e um IC₅₀ baixo, sendo considerado como um fármaco promissor (Don & Ioset, 2014).

Tabela 3. Valores do IC₅₀ (μM) dos alcaloides estefalagina e xilopina isolados de folhas de *Annona crassiflora* Mart. frente aos estágios de tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* e células de mamífero NCTC.

Alcaloides	IC ₅₀ (μM)			Índice de seletividade (SI)	
	tripomastigota	amastigota	NCTC (CC ₅₀)		
				tripomastigota	amastigota
Estefalagina	6,9±2,4	8,5±3,0	39,4±19,4	5,7	4,6
Xilopina	1,7±1,2	14,7±8,7	87,9±48,4	51,7	6,0
Benznidazol	16,4± 2,1	5,2±0,3	> 200	> 12	> 38

IC₅₀: concentração inibitória do 50% dos parasitas; CC₅₀: concentração citotóxica do 50% das células de mamífero; SI – Índice de seletividade (CC₅₀ contra as células de mamífero/IC₅₀ contra os parasitas). Valores expressos em Médias ±EP.

Os resultados das atividades testadas mostram a xilopina como mais ativa na inibição dos parasitas, enquanto que a estefalagina obteve melhores resultados nas atividades enzimáticas, diferença que pode ser explicada com as diferenças estruturais entre as duas aporfinas, sendo que as duas apresentam o anel metilenodioxo nas posições 1 e 2, atribuído a compostos mais ativos, a xilopina apresenta o nitrogênio livre (noraporfina), sendo isto atribuído a alcaloides mais potentes enquanto a atividade antimicrobiana e antiparasitária, enquanto que a adição de uma metila ao nitrogênio (como no caso da estefalagina) é visto em compostos mais ativos em atividades de inibição da anticolinesterase (Chiou et al., 1998).

As atividades informadas neste capítulo demonstram o grande potencial biológico dos alcaloides Benzilisoquinolínicos em diversas aplicações, e por conta disso, consideramos importante a pesquisa mais aprofundada com diferentes fases do ciclo de vida do HIV1-R e com modelos *in vivo* no caso dos parasitas.

3.4 Referências

- Acosta, N., & López, E. (2013). Reservorios mamíferos del *Trypanosoma cruzi* en Paraguay. *Memorias Del Instuto de Investigaciones En Ciencias de la Salud*, 11(2), 90–96.
- Acqua, S. D. (2013). Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. *Botanics: Targets and Therapy*, 3, 19–28.
- Akihisa, T., Ogihara, J., Kato, J., Yasukawa, K., Ukiya, M., Yamanouchi, S., & Oishi, K. (2001). Inhibitory effects of triterpenoids and sterols on human immunodeficiency virus-1 reverse transcriptase. *Lipids*, 36(5), 507–512.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S., & Chinou, I. B. (2001). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two *Origanum* Species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(9), 4168–4170.
- Ansari, N., & Khodagholi, F. (2013). Natural products as promising drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease: molecular mechanism aspect. *Current Neuropharmacology*, 11(4), 414–29.
- Association, A. (2017). 2017 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*, 13(4), 325–373.
- Balouiri, M., Sadiki, M., & Ibnsouda, S. K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), 71–79.
- Blattner, F. R. (1997). The Complete Genome Sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science*, 277(5331), 1453–1462.
- César, G. J., Alfonso, M. G., Marius, M., Elizabeth, E., Ángel, C. M., Maira, H., Guadalupe, C. M., Manuel, J., & Ricardo, R. (2011). Inhibition of HIV-1 reverse transcriptase , toxicological and chemical profile of *Calophyllum brasiliense* extracts from Chiapas , Mexico. *Fitoterapia*, 82(7), 1027–1034.
- Chiou, C., Kang, J., & Lee, S. (1998). Litebamine N -Homologues : Preparation and Anti-Acetylcholinesterase Activity. *Journal of Natural Products*, 61(1), 46–50.
- Chithra, K., Shaji, C., & Thomas, B. (2016). Evaluation of major phytochemical constituents of two edible fruit yielding species of Annonaceae. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 4(44), 198–202.
- Costa, E. V., da Cruz, P. E. O., de Lourenço, C. C., de Souza Moraes, V. R., de Lima Nogueira, P. C., & Salvador, M. J. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). *Natural Product Research*, 27(11), 1002–1006.
- Costa, E. V., Pinheiro, M. L. B., De Souza, A. D. L., Barison, A., Campos, F. R., Valdez, R. H., Ueda-Nakamura, T., Filho, B. P. D., & Nakamura, C. V. (2011). Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* mart. (annonaceae). *Molecules*, 16(11), 9714–9720.
- Costa, E. V., Pinheiro, M. L. B., Silva, J. R. D. A., Maia, B. H. L. D. N. S., Duarte, M. C. T., Amaral, A. C. F., Machado, G. M. D. C., & Leon, L. L. (2009). Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). *Quimica Nova*, 32(1), 78–81.

- Coura, J. R. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed-a background article. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 102 Suppl(August), 113–122.
- Cushnie, T. P. T., Cushnie, B., & Lamb, A. J. (2014). Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 44(5), 377–386.
- Deane, L. M. (1964). Animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi* in Brazil. *Revista Brasileira de Malariologia e Doencas Tropicais*, 16(1), 27–48 .
- Demain, A. L. (2014). Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 41(2), 185–201.
- Don, R., & Ioset, J.-R. (2014). Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology*, 141(2014), 140–6.
- Dong, J. W., Cai, L., Fang, Y. S., Xiao, H., Li, Z. J., & Ding, Z. T. (2015). Proaporphine and aporphine alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Stephania epigaea*. *Fitoterapia*, 104, 102–107.
- Dzotam, J. K., Touani, F. K., & Kuete, V. (2016). Antibacterial activities of the methanol extracts of *Canarium schweinfurthii* and four other Cameroonian dietary plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 23(5), 565–570.
- Egydio, A. P. M., Valvassoura, T. a., & Santos, D. Y. a C. (2013). Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology*, 46, 145–151.
- Fanales-Belasio, E., Raimondo, M., Suligoi, B., Buttò, S., Bozzuto, G., Toccaceli, L., Mazzoleni, S., Frustagli, G., Chistolini, P., Galli, R., & Molinari, A. (2010). HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Annali dell'Istituto Superiore Di Sanità*, 46(1), 5–14.
- Ferreira, D. da S., Esperandim, V. R., Marçal, M. G., Neres, N. B. dos R., Cunha, N. L., Silva, M. L. A., & Cunha, W. R. (2013). Natural products and Chagas' disease: The action of triterpenes acids isolated from *Miconia* species. *Universitas Scientiarum*, 18(3), 243–256.
- Formagio, A. S. N., Vieira, M. C., Volobuff, C. R. F., Silva, M. S., Matos, A. I., Cardoso, C. A. L., Foglio, M. A., & Carvalho, J. E. (2015). In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 48(4), 308–315.
- García, M. T., Blázquez, M. A., Ferrándiz, M. J., Sanz, M. J. S., Silva-Martín, N., Hermoso, J. A., & De La Campa, A. G. (2011). New alkaloid antibiotics that target the DNA topoisomerase I of *Streptococcus pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 286(8), 6402–6413.
- Girdhar, S., Girdhar, A., Verma, S. K., Lather, V., & Pandita, D. (2015). Plant derived alkaloids in major neurodegenerative diseases : from animal models to clinical trials. *Journal of Ayurvedic and Herbal Medicine* 1(3), 91–100.
- Gyawali, R., & Ibrahim, S. A. (2014). Natural products as antimicrobial agents. *Food Control*, 46, 412–429.

- Han, S., Kollmer, M., Markx, D., Claus, S., Walther, P., & Fändrich, M. (2017). Amyloid plaque structure and cell surface interactions of β -amyloid fibrils revealed by electron tomography. *Scientific Reports*, 7(January), 43577.
- Hoet, S., Stévinny, C., Block, S., Opperdoes, F., Colson, P., Baldeyrou, B., Lansiaux, A., Bailly, C., & Quetin-Leclercq, J. (2004). Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: Antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Medica*, 70(5), 407–413.
- Izumi, E., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B. P., Veiga Júnior, V. F., & Nakamura, C. V. (2011). Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. *Natural Product Reports*, 28(4), 809–823.
- Jamkhande, P. G., Wattamwar, A. S., Kankudte, A. D., Tidke, P. S., & Kalaskar, M. G. (2016). Assessment of *Annona reticulata* Linn. leaves fractions for invitro antioxidative effect and antimicrobial potential against standard human pathogenic strains. *Alexandria Journal of Medicine*, 52(1), 19–25.
- Kashman, Y., Gustafson, K. R., Fuller, R. W., Cardellina, J. H., McMahon, J. B., Currens, M. J., Buckheit, R. W., Hughes, S. H., Cragg, G. M., & Boyd, M. R. (1992). The calanolides, a novel HIV-inhibitory class of coumarin derivatives from the tropical rainforest tree, *Calophyllum lanigerum*. *Journal of Medicinal Chemistry*, 35(15), 2735–2743.
- Kurapati, K. R. V., Atluri, V. S., Samikkannu, T., Garcia, G., & Nair, M. P. N. (2016). Natural products as Anti-HIV agents and role in HIV-associated neurocognitive disorders (HAND): A brief overview. *Frontiers in Microbiology*, 6(JAN), 1–14.
- Lai, P. K., & Roy, J. (2004). Antimicrobial and chemopreventive properties of herbs and spices. *Current Medicinal Chemistry*, 11, 1451–1460.
- Lall, N., Kishore, N., Bodiba, D., More, G., Tshikalange, E., Kikuchi, H., & Oshima, Y. (2016). Alkaloids from aerial parts of *Annona senegalensis* against *Streptococcus mutans*. *Natural Product Research*, 6419(December), 1–4.
- Lee, S.-S., Wu, D.-Y., Tsai, S.-F., & Chen, C.-K. (2015). Anti-Acetylcholinesterase Alkaloids from *Annona glabra* Leaf. *Natural Product Communications*, 10(6), 891–893.
- Li, H. T., Wu, H. M., Chen, H. L., Liu, C. M., & Chen, C. Y. (2013). The pharmacological activities of (-)-anonaine. *Molecules*, 18(7), 8257–8263.
- Li, J. W.-H., & Vederas, J. C. (2009). Drug Discovery and Natural Products: End of an Era or an Endless Frontier? *Science*, 325(5937), 161 LP–165.
- Lopes, N. P., Chicaro, P., Kato, M. J., Albuquerque, S., & Yoshida, M. (1998). Flavonoids and Lignans from *Virola surinamensis* Twigs and their in vitro Activity against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Medica*, 64(7), 667–669.
- Loya, S., Rudi, A., Kashman, Y., & Hizi, A. (1999). Polycitone A, a novel and potent general inhibitor of retroviral reverse transcriptases and cellular DNA polymerases. *The Biochemical Journal*, 344, 85–92.
- Maartens, G., Celum, C., & Lewin, S. R. (2014). HIV infection : epidemiology, pathogenesis, treatment, and prevention. *The Lancet*, 384(9939), 258–271.

- Martins, L. F., Mesquita, J. T., Pinto, E. G., Costa-Silva, T. A., Borborema, S. E. T., Galisteo Junior, A. J., Neves, B. J., Andrade, C. H., Shuhaib, Z. Al, Bennett, E. L., Black, G. P., Harper, P. M., Evans, D. M., Tempone, A. G. (2016). Analogues of Marine Guanidine Alkaloids Are in Vitro Effective against *Trypanosoma cruzi* and Selectively Eliminate *Leishmania* (L.) *infantum* Intracellular Amastigotes. *Journal of Natural Products*, 79(9), 2202–2210.
- Matsuse, I. T., Lim, Y. A., Hattori, M., Correa, M., & Gupta, M. P. (1998). A search for anti-viral properties in Panamanian medicinal plants. The effects on HIV and its essential enzymes. *Journal of Ethnopharmacology*, 64(1), 15–22.
- Mesquita, M. L. de, Desrivot, J., Bories, C., Fournet, A., De, Paula, J. E., Grellier, P., & Espindola, L. S. (2005). Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 783–787.
- Minning, T. A., Weatherly, D. B., Atwood, J., Orlando, R., & Tarleton, R. L. (2009). The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*, 10(1), 370.
- Montenegro, H., Gutierrez, M., Romero, L. I., Ortega-Barría, E., Capson, T. L., & Cubilla-Rios, L. (2003). Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with Leshmanicidal activity, 69, 677–679.
- Ng, Y. P., Or, T. C. T., & Ip, N. Y. (2015). Plant alkaloids as drug leads for Alzheimer’s disease. *Neurochemistry International*, 89, 260–270.
- Notka, F., Meier, G. R., & Wagner, R. (2003). Inhibition of wild-type human immunodeficiency virus and reverse transcriptase inhibitor-resistant variants by *Phyllanthus amarus*. *Antiviral Research*, 58(2), 175–186.
- Ono, K., Nakane, H., Fukushima, M., Chermann, J. C., & Barré-Sinoussi, F. (1990). Differential inhibitory effects of various flavonoids on the activities of reverse transcriptase and cellular DNA and RNA polymerases. *European Journal of Biochemistry*, 190(3), 469–76.
- Organización Panamericana de la Salud. (2016). *Enfermedades infecciosas desatendidas en las Américas: Historias de éxito e innovación para llegar a los más necesitados*. Washington, DC.
- Osorio, E., Arango, G. J., Jiménez, N., Alzate, F., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Paco, M. A., Giménez, A., & Robledo, S. (2007). Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, 111(3), 630–635.
- Osorio, E., Montoya, G., & Arango, G. (2006). Productos Naturales Alcaloidales Con Actividad Antiprotozoaria. *Vitae*, 13(1), 61–84.
- Padhi, L. P., Panda, S. K., Satapathy, S. N., & Dutta, S. K. (2011). In vitro evaluation of antibacterial potential of *Annona squamosa* L. and *Annona reticulata* L. from Similipal Biosphere Reserve, Orissa, India. *Journal of Agricultural Technology*, 7(1), 133–142.
- Patel, J. D., & Kumar, V. (2008). *Annona squamosa* L: Phytochemical analysis and Antimicrobial Screening. *Phytochemical Analysis*, 1(1), 34–38.

- Pinheiro, M. L. B., Xavier, C. M., de Souza, A. D. L., Rabelo, D. D. M., Batista, C. L., Batista, R. L., Costa, E. V., Campos, F. R., Barison, A., Valdez, R. H., Ueda-Nakamura, T., & Nakamura, C. V. (2009). Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(6), 1095–1102.
- Rassi, A., Rassi, A., & Marin-Neto, J. A. (2010). Chagas disease. *The Lancet*, 375(9723), 1388–1402.
- Ricardo, C. dos S., Antonio, A. de M. F., Edvan, A. C., Jacqueline, A. T., Vany, P. F., Ane, K. P. C., Ana Reis de Melo, C. G. alves, Ismael, F. ndez M., & Pedro, R. E. R. (2015). Fatty acid profile and bioactivity from *Annona hypoglauca* seeds oil. *African Journal of Biotechnology*, 14(30), 2377–2382.
- Rinaldi, M. V. N., Díaz, I. E. C., Suffredini, I. B., & Moreno, P. R. H. (2017). Alkaloids and biological activity of beribá (*Annona hypoglauca*). *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 27(1), 77–83.
- Ríos, J. L., Máñez, S., Giner, R. M., & Recio, M. C. (1999). Biological Aspects of Aporphinoid Alkaloids. In G. A. Cordell (Ed.), *Alkaloids: Chemistry and Biology* (Vol. 53, pp. 57–117). Academic Press.
- Schroeder, J. W., & Simmons, L. A. (2013). Complete Genome Sequence of *Bacillus subtilis* Strain PY79. *Genome Announcements*, 1(6), e01085-13.
- Severino, V. G. P., Silva, M. F. D. G. F. Da, Lucarini, R., Montanari, L. B., Cunha, W. R., Vinholis, A. H. C., & Martins, C. H. G. (2009). Determination of the Antibacterial Activity of Crude Extracts and Compounds Isolated from *Hortia Oreadica* (Rutaceae) Against Oral Pathogens. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40, 535–540.
- Sharp, P. M., & Hahn, B. H. (2011). Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 1(1), 1–22.
- Silva, D. B. d., Tulli, E. C. O., Militão, G. C. G., Costa-Lotufo, L. V., Pessoa, C., de Moraes, M. O., Albuquerque, S., & de Siqueira, J. M. (2009). The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. *Phytomedicine*, 16(11), 1059–1063.
- Simon, N. k, Santhoshkumar, R., & Kumar, N. S. (2016). Phytochemical analysis and antimicrobial activities of *Annona squamosa* (L) leaf extracts. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 5(4), 128–131.
- Singh, I. P., Bharate, S. B., & Bhutani, K. K. (2005). Anti-HIV natural products. *Current Science*, 89(2), 269–290.
- Siqueira, C. A. T., Oliani, J., Sartoratto, A., Queiroga, C. L., Moreno, P. R. H., Reimão, J. Q., Tempone, A. G., & Fischer, D. C. H. (2011). Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 21(1).
- Stanley de, S. de S., Monteiro, A. de S., Siqueira, E. P., Bomfim, M. R. Q., Dias-Souza, M. V., Ferreira, G. F., Denadai, A. M. L., Santos, Áquila R C, Santos, V. L. dos, de Souza-Fagundes, E. M., Fernandes, E. S., & Monteiro-Neto, V. (2016). *Annona glabra* flavonoids act as antimicrobials by binding to *Pseudomonas aeruginosa* cell walls. *Frontiers in Microbiology*, 7(DEC), 1–9.

- Steindel, M., Kramer Pacheco, L., Scholl, D., Soares, M., de Moraes, M. H., Eger, I., Kosmann, C., Sincero, T. C. M., Stoco, P. H., Murta, S. M. F., de Carvalho-Pinto, C. J., & Grisard, E. C. (2008). Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 60(1), 25–32.
- Sülsen, V. P., Cazorla, S. I., Frank, F. M., Redko, F. C., Anesini, C. A., Coussio, J. D., Malchiodi, E. L., Martino, V. S., & Muschietti, L. V. (2007). Trypanocidal and leishmanicidal activities of flavonoids from Argentine medicinal plants. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77(4), 654–659.
- Tan, G. T., Miller, J. F., Kinghorn, A. D., Hughes, S. H., & Pezzuto, J. M. (1992). HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptases: A comparative study of sensitivity to inhibition by selected natural products. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 185(1), 370–378.
- Tan, G. T., Pezzuto, J. M., Kinghorn, a D., & Hughes, S. H. (1991). Evaluation of natural products as inhibitors of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) reverse transcriptase. *Journal of Natural Products*, 54(1), 143–154.
- Tempone, A. G., Treiger Borborema, S. E., De Andrade, H. F., De Amorim Gualda, N. C., Yogi, Á., Salerno Carvalho, C., Bachiega, D., Lupo, F. N., Bonotto, S. V., & Fischer, D. C. H. (2005). Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. *Phytomedicine*, 12(5), 382–390.
- Tsai, I. L., Liou, Y. F., & Lu, S. T. (1989). Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities. *The Kaohsiung Journal of Medical Sciences*, 5(3), 132–145.
- Tsai, S.-F., & Lee, S.-S. (2010). Characterization of Acetylcholinesterase Inhibitory Constituents from *Annona glabra* Assisted by HPLC Microfractionation. *Journal of Natural Products*, 73(10), 1632–1635.
- Valencia, L., Muñoz, D. L., Robledo, S. M., Echeverri, F., Arango, G. J., Vélez, I. D., & Triana, O. (2011). Actividad tripanocida y citotóxica de extractos de plantas Colombianas. *Biomedica*, 31(2011), 1–7.
- Venter, M. van de, Pruissen, M., Koekemoer, T., Sowemimo, A., & Govender, S. (2014). In vitro anti-HIV and -TB activities of *Annona muricata* and *Artemisia afra* extracts. *Planta Medica*, 80(16), P1L29.
- Vinutha, B., Prashanth, D., Salma, K., Sreeja, S. L., Pratiti, D., Padmaja, R., Radhika, S., Amit, A., Venkateshwarlu, K., & Deepak, M. (2007). Screening of selected Indian medicinal plants for acetylcholinesterase inhibitory activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 109(2), 359–363.
- Wei-xing, Y. A. O., Guo--jin, X. I. A., & Ming-xing, J. (1980). Blocking Action of Berberine on Various Receptors in Rat Anococcygeus Muscle, 9(2), 88–90.
- WHO. (2017). HIV/AIDS Fact sheet.
- Wiwat, C., & Kwantrairat, S. (2013). HIV-1 Reverse Transcriptase Inhibitors from Thai Medicinal Plants and *Elephantopus scaber* Linn. *Mahidol University Journal of Pharmaceutical Sciences*, 40(3), 35–44.

Discussão geral e conclusões

O trabalho apresentado teve como objetivo geral avaliar a atividade biológica dos alcaloides de *Annona crassiflora* Mart.. Considerando a diversidade química da família, assim como os trabalhos anteriormente feitos com a espécie, foi possível evidenciar a necessidade de aprofundar o estudo de isolamento de alguns compostos previamente identificados, embora não isolados e confirmados por técnicas mais sensíveis. Observando o potencial farmacológico destes compostos, optou-se por estudar o potencial biológico dos alcaloides aporfínicos isolados frente a diferentes ensaios *in vitro*.

No capítulo 1 foi descrita a biossíntese inicial dos alcaloides benzilisoquinolínicos (**ABIs**), alcaloides amplamente usados pelo homem há séculos, com representantes farmacêuticos bem conhecidos como a morfina e a codeína. Estes alcaloides produzidos por plantas, estão distribuídos em diferentes famílias, principalmente nas Ranunculales e no clado das Magnoliídeas, e dentro deste, esporadicamente presente em Piperales. Fora destes grupos, também são encontrados nas Rutaceae, Cornaceae e Nelumbonaceae. Uma das classes derivadas dos benzilisoquinolínicos são as aporfinas, produzidas principalmente por plantas do clado das Malvídeas. No entanto, as Annonaceae são produtoras de 29% das substâncias conhecidas desse grupo e, dentro da família, o gênero *Annona* é o maior representante na diversidade estrutural destas moléculas. Em *Annona crassiflora* foi possível observar essa diversidade estrutural de **ABIs**, já que foram encontrados os alcaloides previamente descritos na espécie anoretina e anonaina, além do espectro de massas de um composto nitrogenado, que confrontado com a literatura foi identificado como tetrahidropalmatrubina. A metodologia de extração focada na obtenção de alcaloides, além das técnicas cromatográficas empregadas, especialmente a cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa (CLAE-semipreparativa), permitiram isolar compostos minoritários com características atribuídas a metabólitos nitrogenados da classe dos **ABIs**, isto baseado especialmente nos espectros de massas e na absorção UV.

Dos quatro compostos isolados, o alcaloide **5** foi identificado como xilopina baseado nos dados espectrométricos. Já os compostos **3**, **4** e **6** foram identificados com o auxílio de ressonância magnética nuclear (RMN) sendo encontrado que a estefalagina [4] já tinha sido reportada na polpa da fruta de *A. crassiflora*, entretanto não nas folhas. Os dados obtidos para o alcaloide **3** permitiram identifica-lo como litseglutine b, sendo este o primeiro relato deste alcaloide no gênero *Annona*. Os dados de ressonância para o composto **6** deram como resultado

a estrutura apresentada na figura 10 do capítulo 1. Este alcaloide não apresenta relatos na literatura, sendo inédito e nomeado como crassiflorina em homenagem à espécie.

O isolamento destes alcaloides permitiu desenvolver ensaios a fim de avaliar o potencial dos alcaloides. A xilopina e a estefalagina apresentaram o maior rendimento, o que era de se esperar, visto que no perfil cromatográfico da fase alcaloídica enriquecida, os picos referentes a estas duas aporfinas aparecem como os mais abundantes (Figura 7- Capítulo 1). Dessa forma, os ensaios que foram feitos com estes dois alcaloides isolados.

Com relação às atividades fitotóxicas, xilopina apresenta uma inibição significativa no crescimento do hipocótilo tanto para *Lactuca sativa* quanto para *Lycopersicon esculentum* na concentração de 1 mM, porém a fase alcaloídica enriquecida na concentração de 0,8mg mostra-se como a mais ativa para as duas espécies estudadas. Já os estudos com a planta invasora *Urochloa decumbens* (capim-braquiaria) evidenciaram a xilopina como ativa frente aos dois parâmetros (hipocótilo e raiz), sendo significativamente ativa na raiz na concentração de 0,25 mM. Apesar dos resultados com coleóptilos de trigo mostrarem a estefalagina como a mais ativa quanto ao efeito inibitório no crescimento, esta substância não foi usada no ensaio com sementes, por conta de se necessitar uma quantidade de composto maior que a massa que obtivemos.

A atividade antimicrobiana *in vitro* também apresentou resultados considerados ativos, observando-se uma inibição no crescimento das bactérias testadas. Neste ensaio não foram testados os alcaloides isolados, porém a atividade da FAE e das frações da coluna positivas para alcaloides (F1-F5) resultou em valores de MIC₅₀ entre 38,25 e 90,72 µg/mL para *Escherichia coli* e de 49,55-105,61 µg/mL para *Bacillus subtilis*. Para estas duas bactérias a FAE apresentou o menor valor de MIC₅₀, e considerando a composição desta fase (Figura 7- Capítulo 1), é possível que os alcaloides presentes na amostra estejam desempenhando um papel importante na inibição do crescimento das bactérias.

Os ensaios com os compostos puros xilopina e estefalagina, apresentaram uma diferença entre as atividades tripanocida e de inibição enzimática (acetilcolinesterase e HIV1-RT). A xilopina é mais ativa na inibição dos parasitas, enquanto que a estefalagina apresentou melhores resultados nas atividades enzimáticas; esta diferença pode ser explicada devido as características estruturais entre as duas aporfinas. As duas apresentam o anel metilenodioxi nas posições 1 e 2, característica relacionada a compostos mais ativos. A xilopina apresenta o nitrogênio livre (noraporfina), o que já foi apontado como importante para alcaloides mais potentes quanto à atividade antimicrobiana e antiparasitária. Entretanto, a adição de uma metila

ao nitrogênio (como no caso da estefalagina) é vista como a responsável pela maior atividade no teste da anticolinesterase.

Os resultados fitotóxicos, antiparasitários e enzimáticos levados a cabo com estes alcaloides são os primeiros relatos referente às atividades destes compostos neste tipo de ensaio. Da mesma forma, não há relatos dessas atividades para os alcaloides encontrados em baixas quantidades (crassiflorina, litseglutina b, annoretina e tetrahidropalmatrubina). Assim, consideramos importante um futuro isolamento destes compostos para completar as informações referentes aos compostos alcaloídicos produzidos por esta família.

Como principais conclusões deste projeto apresentamos:

- *Annona crassiflora* é uma fonte de alcaloides benzilisoquinilínicos diversos. No trabalho foram encontrados sete alcaloides, dos quais um nunca tinha sido reportado na literatura;
- A cromatografia líquida de alta eficiência semipreparativa apresenta uma alta sensibilidade nas análises de amostras complexas, tanto que para o desenvolvimento deste trabalho foi essencial para o isolamento dos compostos identificados como xilopina, estefalagina, litseglutina b e crassiflorina;
- Apesar das atividades fitotóxicas dos produtos naturais serem um foco de pesquisa, poucos trabalhos avaliam alcaloides. Este trabalho apresenta o potencial da xilopina e da fração alcaloídica enriquecida, como possíveis fontes de bioherbicidas com menor impacto ao ambiente;
- As amostras não purificadas testadas nos ensaios antibacterianos (FAE e F1-F5) apresentaram valores de MIC₅₀ considerados ativos, razão pela qual seria interessante a avaliação dos compostos isolados, para assim verificar se as atividades são atribuídas aos alcaloides.
- A estefalagina mostra-se como um composto ativo para ensaios de atividades enzimáticas, sendo observada uma inibição da acetilcolinesterase e um IC₅₀ baixo frente à HIV1-RT;
- A xilopina mostra-se tóxica frente aos tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* com IC₅₀ baixo e um índice de seletividade alto.

Resumo geral

Annona crassiflora é uma espécie nativa do cerrado brasileiro, conhecida pelo uso popular como alimento e na etnofarmacologia para o tratamento de parasitas do couro cabeludo e de transtornos menstruais. Quimicamente, Annonaceae é conhecida pela produção de acetogeninas e alcaloides benzilisoquinolínicos, dentro dos quais o gênero *Annona* apresenta a maior diversidade de compostos aporfínicos. O objetivo central deste trabalho foi avaliar potenciais atividades biológicas para *Annona crassiflora*, relacionadas a sua composição alcaloídica. A análise do extrato foliar de *A. crassiflora* através de técnicas cromatográficas, espectrométricas e por ressonância magnética nuclear levou a detecção de oito compostos nitrogenados, sendo sete deles identificados: anonaina, annoretina, estefalagina e xilopina, já previamente descritos na espécie, litseglutina B e tetrahidropalmatrubina, identificados pela primeira vez no gênero, e um alcaloide aporfínico inédito proposto como crassiflorina, em homenagem a espécie. A partir das amostras obtidas, foram desenvolvidos diversos ensaios de atividades biológicas, sendo testado o potencial fitotóxico, a atividade antimicrobiana frente as bactérias (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Bacillus subtilis*), a inibição de atividade enzimática (acetilcolinesterase e transcriptase-reversa do HIV1) e a atividade antiparasitária (amastigotas e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*). Somente dois dos alcaloides identificados, estefalagina e xilopina, foram isolados em quantidades suficientes para alguns bioensaios. De maneira geral, a estefalagina apresentou maior efeito inibitório no alongamento dos coleóptilos de trigo, além de melhores resultados nos ensaios de inibição de atividade enzimática (acetilcolinesterase e HIV1-RT). A xilopina foi mais eficiente nos ensaios fitotóxicos com braquiária (*Urochloa decumbens*) e com o parasita causador da doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*). Resultados interessantes com a fração enriquecida em alcaloides também foram obtidos para os ensaios fitotóxicos com espécies-alvo (*Lactuca sativa* e *Lycopersicon esculentum*) e antimicrobianos. Estes resultados reforçam o grande potencial biológico dos alcaloides produzidos por *Annona crassiflora*, sendo, a maioria das atividades descritas neste trabalho, inéditas para estas substâncias.

General abstract

Annona crassiflora is a native species of Brazilian cerrado, used as food for local people and for treatment of scalp parasites and menstrual disorders in folk medicine. Chemically, Annonaceae is known for the production of acetogenins and benzyloquinoline alkaloids, within which the *Annona* genus presents the greatest diversity of aporphine compounds. The aim of this work was to evaluate potential biological activities for *Annona crassiflora*, related to its alkaloid composition. The analysis of the foliar extract of *A. crassiflora* by chromatographic, spectrometric and nuclear magnetic resonance techniques led to the detection of eight nitrogen compounds. Seven of which were identified: anonaine, annoretine, stephalagine and xylopine, previously described in the species, litseglutine B and tetrahydropalmatrubine, as first report for the genus, and an unpublished aporphine alkaloid proposed as crassiflorine, in honor of the species. From the obtained samples, several biological assays were developed, being tested the phytotoxic potential, the antimicrobial activity against three bacteria (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Bacillus subtilis*), the inhibition of enzymatic activity (acetylcholinesterase and transcriptase-reverse of HIV1) and the antiparasitic activity (amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*). Only two of the identified alkaloids, stephalagine and xylopine, were isolated in sufficient amounts for some bioassays. In general, stephalagine had significant inhibitory effect on wheat coleoptile elongation, as well as strong results in inhibition of enzymatic activity (acetylcholinesterase and HIV1-RT). Xylopine was more efficient in phytotoxic trials with *Urochloa decumbens*, and with the parasite that causes Chagas disease (*Trypanosoma cruzi*). Interesting results with an alkaloid enriched fraction were also obtained for the phytotoxic assays with target species (*Lactuca sativa* and *Lycopersicon esculentum*) and antimicrobials. These results reinforce the great biological potential of the alkaloids produced by *Annona crassiflora*. As the best of our knowledge, most of the activities described in this work are unpublished for these compounds.

Anexos

Anexo 1

Espectros de massas e de UV-Vis obtidos para os alcaloides identificados nas folhas de *Annona crassiflora* Mart. Apresentados no capítulo 1.

-Não identificado

-**possível Tetrahidropalmatrubina

Litseglutina B

Estefalagina

Xilopina

Crassiflorina

Anoretina

Anonaina

Anexo 2

Espectros de RMN do alcaloide Estefalagina [4]

Espectro de RMN ^1H

Espectro de RMN ^{13}C

Espectro de RMN DEPT 13

Espectros de RMN do alcaloide Litseglutina B [3]

Espectro de RMN ^1H

Espectro de RMN ^{13}C

Espectro de RMN DEPT 135

Espectro RMN HSQC

Espectro de RMN HBMC

Espectros de RMN do alcaloide Crassiflorina [6]

Espectro de RMN ^1H

Espectro de RMN ^{13}C

Espectro de RMN DEPT 135

Espectro de RMN HSQC

Espectro RMN HBMC