UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Análise química e atividades biológicas de
Guatteria elliptica R. E. Fries (Annonaceae)

Agnieszka Katarzyna Rajca Ferreira

Versão corrigida da Tese conforme resolução CoPGr 6018.
O original encontra-se disponível no Serviço de Pós Graduação da FCF/USP.

Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

São Paulo
2016

Agnieszka Katarzyna Rajca Ferreira

Análise química e atividades biológicas de
Guatteria elliptica R. E. Fries (Annonaceae)

Comissão Julgadora
da
Tese para obtenção do Título de DOUTOR

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
Orientador/Presedente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, ____ de _____ de 2016

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paulo R. H. Moreno pela orientação e estímulo científico durante o tempo de realização deste trabalho.

À Professora Dra. Maria C. M. Young do Instituto Botânico pela sua colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Ivana B. Suffredini e ao Sérgio Frana do Laboratório de Extração, Universidade Paulista - UNIP, pela realização dos ensaios antitumorais.

À Professora Dra. Carmen L. Queiroga e ao Professor Dr. Adilson Sartoratto do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pelo auxílio na realização das análises por CG-EM.

À Professora Dra. Telma M. Kaneko da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP, pela sua colaboração na realização dos ensaios antimicrobianos.

Ao Professor Dr. Felipe R. Lourenço da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP, pela sua colaboração na realização dos ensaios antioxidantes.

À Professora Dra. Patrícia S. Lopes e ao Fulvio Corazza do Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal

de São Paulo - UNIFESP, pela sua colaboração na realização dos ensaios citotóxicos.

À Dra. Damila Rodrigues de Moraes do Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, pela sua colaboração na realização de análises LC-EM/EM.

À Dra. Edna T. Miyake Kato da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo - USP, pela sua colaboração na realização de cortes histológicos.

Aos meus pais Małgorzata e Janusz, à minha irmã Monika, ao meu esposo Rodrigo, e a toda família pela compreensão e apoio.

Aos colegas do laboratório: Fabi, Fabiana, Kasia, Marcos, e todos os alunos pela amizade e companheirismo.

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

À CAPES pelo financiamento deste projeto.

*“Cada planta tem centenas de substâncias,
e uma delas pode ser mais importante que uma galáxia”*

Otto Gottlieb

*“Não devemos ter medo de inventar seja o que for.
Tudo o que existe em nós existe também na natureza,
pois fazemos parte dela.”*

Pablo Picasso

RESUMO

Rajca-Ferreira, A.K. **Análise química e atividades biológicas de *Guatteria elliptica* R. E. Fries (Annonaceae)**. 2016. 201f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

A espécie endêmica *G. elliptica* R. E. Fries não apresentava estudos fitoquímicos e biológicos detalhados na literatura. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a composição química e as propriedades biológicas dos óleos essenciais, extratos brutos, alcaloides totais, tortas, frações das tortas, amostras isoladas dessa espécie. O material vegetal foi coletado em Paranapiacaba (Santo André, SP, Brasil). O óleo essencial extraído das folhas por destilação à vapor apresentou um rendimento de 0,2%. A análise histológica das folhas encontrou óleo em células oleíferas localizadas no parênquima esponjoso. A composição do óleo (CG-EM) indicou espatulenol e óxido de cariofileno como compostos majoritários. Os alcaloides totais foram obtidos dos extratos brutos das folhas e dos galhos e analisados por CG-EM, identificando quatro aporfina (nornuciferina, estefarina, corituberina e asimilobina) e duas protoberberinas (discretamina e caseadina). Os alcaloides totais foram fracionados em coluna cromatográfica ou por Extração em Fase Sólida e purificados por cromatografia em camada preparativa, originando duas amostras (Amostra 9 e 10). Na Amostra 9, foram identificados dois alcaloides aporfínicos nornuciferina e asimilobina (CG-EM e RMN-¹H). Na Amostra 10, foram identificados (LC-EM/EM) cinco alcaloides aporfínicos (desidronantenina, glaunidina, liriodenina, *N*-óxido de oliverina e telikovina) e um alcaloide protoberberínico (caseadina). Caseadina, glaunidina, *N*-óxido de oliverina e telikovina não foram previamente identificados em *Guatteria*. Os resíduos dos extratos brutos livres de alcaloides foram fracionados pelo método de partição com solventes de polaridade crescente. Os extratos brutos e as frações acetato de etila e butanólicas de folhas e galhos apresentaram flavonoides (NP-PEG). Nos ensaios biológicos, a melhor atividade antioxidante (sequestro do radical DPPH) foi encontrada para a fração clorofórmica dos galhos ($EC_{50}=24,25\pm1,14\text{ }\mu\text{g/mL}$) e a torta dos galhos ($EC_{50}=26,23\pm4,20\text{ }\mu\text{g/mL}$). No ensaio antimicrobiano pelo método turbidimétrico a atividade mais importante foi obtida contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) para os alcaloides totais dos galhos (CIM/CBM= $0,12\pm0,01/0,26\text{ mg/mL}$) e das folhas (CIM/CBM= $0,21\pm0,01/0,28\text{ mg/mL}$), e fração hexânica das folhas (CIM/CBM= $0,24\pm0,02/>1\text{ mg/mL}$). Uma alta atividade antitumoral foi observada frente a células humanas de mama (MCF-7) para Amostra 10 ($IC_{50}=2,28\pm0,18\text{ }\mu\text{g/mL}$), fração de acetato de etila das folhas ($IC_{50}=4,47\pm0,40\text{ }\mu\text{g/mL}$), óleo essencial ($IC_{50}=7,01\pm0,23\text{ }\mu\text{g/mL}$) e os alcaloides totais das folhas ($IC_{50}=9,32\pm0,36\text{ }\mu\text{g/mL}$). Para as células de próstata (PC-3), foi encontrada atividade para a Amostra 10 ($IC_{50}=1,37\pm0,36\text{ }\mu\text{g/mL}$) e o óleo essencial ($IC_{50}=5,32\pm0,35\text{ }\mu\text{g/mL}$). A futura aplicação dos extratos e frações de *G. elliptica* como um agente antitumoral parece ser segura, pois mantiveram uma viabilidade celular maior do que 90% no ensaio de citotoxicidade com culturas de fibroblasto murino (BALB/c 3T3, ATCC CCL-163) nas concentrações onde a atividade antitumoral foi promissora ($<30\text{ }\mu\text{g/mL}$) contra MCF-7 e/ou PC-3.

Palavras-chaves: alcaloides; análise química; Annonaceae; atividades biológicas; *Guatteria elliptica*

ABSTRACT

Rajca-Ferreira, A.K. **Chemical analysis and biological activities of *Guatteria elliptica* R. E. Fries (Annonaceae).** 2016. 201f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

The endemic species *G. elliptica* R. E. Fries had not yet been thoroughly investigated phytochemically and biologically. Therefore, the objective of this work was to evaluate the chemical and biological properties of the *G. elliptica* essential oils, crude extracts, alkaloid-free extracts, total alkaloids, fractions and isolated samples. The plant material was collected in Paranapiacaba (Santo André, SP, Brazil). The leaves essential oil, was obtained by hydrodistillation with a yield of 0.2%. In the leaves, the oil was found in secretory cells, located in the spongy parenchyma. The oil analysis (GC-MS) identified spathulenol and caryophyllene oxide as major compounds. The total alkaloids were extracted from the leaves and branches crude extracts and analysed by GC-MS, identifying four aporphines (nornuciferine, stepharine, corytuberine, assimilobine) and two protoberberines (discretamine and caseadine). Total alkaloids were fractionated by column chromatography or solid phase extraction and purified by preparative thin layer chromatography affording two samples (Sample 9 and 10). In Sample 9, two aporphin alkaloids were found and identified (GC-MS and $^1\text{H-NMR}$) as nornuciferine and assimilobine. In Sample 10, were identified (LC-MS/MS) five aporphin alkaloids (dehydronantenine, glaunidine, liriodenine, *N*-oliverine oxide and telikovine) and one protoberberine alkaloid (caseadine). Caseadine, glaunidine, oliverine *N*-oxide and telikovine were not previously reported for *Guatteria*. The alkaloids-free extracts were fractionated using the increasing polarity solvents. Concerning the biological activities, the highest antioxidant activity (DPPH scavenging) was reported for the branches chloroform fraction ($\text{EC}_{50}=24.25\pm 1.14\text{ }\mu\text{g/mL}$) and ($\text{EC}_{50}=26.23\pm 4.20\text{ }\mu\text{g/mL}$) alkaloid-free extract. In the turbidimetric antimicrobial assay against, the most important activity was found against *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) for the total alkaloids from branches ($\text{MIC/MBC}=0.12\pm 0.01/0.26\text{ mg/mL}$) and leaves ($\text{MIC/MBC}=0.21\pm 0.01/0.28\text{ mg/mL}$) and for the leaves hexane fraction ($\text{MIC/MBC}=0.24\pm 0.02/>1\text{ mg/mL}$). The highest antitumor activity against human breast cancer cell line (MCF-7) was observed for Sample 10 ($\text{IC}_{50}=2.28\pm 0.18\text{ }\mu\text{g/mL}$), leaves ethyl acetate fraction ($\text{IC}_{50}=4.47\pm 0.40\text{ }\mu\text{g/mL}$), essential oil ($\text{IC}_{50}=7.01\pm 0.23\text{ }\mu\text{g/mL}$) and leaves total alkaloids ($\text{IC}_{50}=9.32\pm 0.36\text{ }\mu\text{g/mL}$). For the prostate cancer cell line (PC-3), the most active samples were Sample 10 ($\text{IC}_{50}=1.37\pm 0.36\text{ }\mu\text{g/mL}$) and the essential oil ($\text{IC}_{50}=5.32\pm 0.35\text{ }\mu\text{g/mL}$). The future application of *G. elliptica* extracts and fractions as an antitumor agent appears to be safe, because cell viability remained higher than 90% in the cytotoxicity assay with murine fibroblast cultures (BALB/c 3T3, ATCC CCL-163), in the concentration range where the best antitumor activity ($<30\text{ }\mu\text{g/mL}$) against MCF-7 and PC-3 was found.

Keywords: alkaloids; Annonaceae; biological activities; chemical analysis; *Guatteria elliptica*

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Exemplos de fármacos originados de produtos naturais	26
Quadro 2. Alcaloides ou seus compostos derivados empregados como fármacos	30
Quadro 3. Ocorrência de alcaloides no gênero <i>Guatteria</i> e as atividades biológicas reportadas	34
Quadro 4. Estruturas e atividades biológicas de alcaloides encontrados em espécies de <i>Guatteria</i>	50
Quadro 5. Ocorrência de flavonóis no gênero <i>Guatteria</i>	54
Quadro 6. Estruturas e atividades biológicas de flavonoides encontrados em espécies de <i>Guatteria</i>	56
Quadro 7. Principais compostos encontrados nos óleos essenciais de espécies de <i>Guatteria</i>	59
Quadro 8. Estruturas e atividades biológicas de compostos encontrados em óleos essenciais de espécies de <i>Guatteria</i>	60
Quadro 9. Parcelas e subparcelas do Parque Natural Municipal das Nascentes de Paranapiacaba, e números de árvores de <i>Guatteria elliptica</i> coletadas.....	68
Quadro 10. As condições da extração dos extratos brutos das folhas e galhos de <i>Guatteria elliptica</i> por meio de aparelho Accelerated Solvent Extractor.....	70
Quadro 11. Sistemas de solventes de cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ usados para determinar de presença de flavonoides nos extratos e frações de <i>Guatteria elliptica</i>	73
Quadro 12. Sistema de solventes usados para fracionamento de alcaloides totais das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> por meio de cromatografia em coluna sobre gel de sílica (Coluna 1)	74
Quadro 13. Sistema de solventes usados para fracionamento das frações F4, F5 e F6 (obtidas da Coluna 1) dos alcaloides totais das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> por meio de cromatografia em coluna sobre gel de sílica (Coluna 2).....	74
Quadro 14. Sistema de solventes usados como eluente na cromatografia em camada delgada preparativa em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ para isolar e purificar alcaloides das folhas de <i>Guatteria elliptica</i>	75
Quadro 15. Isolamento e purificação de alcaloides das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> por meio de cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa (sílica gel 60 F ₂₅₄).....	76
Quadro 16. Sistema de solventes usados para fracionamento de alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> por meio de cromatografia em coluna sobre gel de sílica.....	77

Quadro 17. Sistema de solventes usados como eluente na cromatografia em camada delgada preparativa em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ para isolar e purificar alcaloides dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i>	78
Quadro 18. Sistema de solventes usado como eluente na extração de alcaloides dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> em fase sólida, utilizando cartucho de fase reversa C18	79
Quadro 19. Sistema de solventes usado como eluente na cromatografia de camada delgada preparativa em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ para isolar e purificar alcaloides dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> obtidos depois da extração em fase sólida	79
Quadro 20. Condições de análise de alcaloides de <i>Guatteria elliptica</i> por CG-EM, utilizando coluna capilar HP5-MS	81
Quadro 21. Condições de análise de óleo essencial das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> por CG-FID e CG-EM, utilizando coluna capilar DB-5.....	82
Quadro 22. Condições de análise de alcaloides (Amostra 10) obtidos dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> por LC-EM/EM, utilizando coluna Zorbax Extend C18.....	83
Quadro 23. Sistema de solventes usados como eluente na cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ , usados para determinar atividade antioxidante dos extratos, alcaloides totais e frações de <i>Guatteria elliptica</i>	84
Quadro 24. Sistema de solventes de cromatografia em camada delgada usado para determinar atividade anticolinesterásica dos extratos, alcaloides totais e frações de <i>Guatteria elliptica</i> ..	87
Quadro 25. Sistemas de solventes de cromatografia em camada delgada usados para determinar atividade antifúngica dos extratos, alcaloides totais e frações de <i>Guatteria elliptica</i>	88
Quadro 26. Sistema de classificação de <i>Globally Harmonised System</i> baseada em dose letal	95

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição de óleo essencial das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> obtida por CG-EM utilizando coluna capilar DB-5.....	100
Tabela 2. Quantidade e rendimento dos extratos brutos e alcaloides totais das folhas e dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i>	103
Tabela 3. Rendimento das frações obtidas das tortas das folhas e dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> depois do fracionamento pelo método de partição	104
Tabela 4. Massas de amostras de alcaloides isoladas das folhas de <i>Guatteria elliptica</i>	124
Tabela 5. Massas de frações obtidas dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> por meio da extração em fase sólida	128
Tabela 6. Atribuições dos valores do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (300 MHz, CDCl ₃) da Amostra 9 obtida de alcaloides totais dos galhos e da nornuciferina.....	132
Tabela 7. Atividade antioxidante dos extratos, alcaloides totais, frações e óleo essencial de <i>Guatteria elliptica</i> pelo método quantitativo e comparação das médias pelo teste de Tukey	149
Tabela 8. Inibição de crescimento de <i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i> pelos extratos, alcaloides totais, frações e óleo essencial de <i>Guatteria elliptica</i>	155
Tabela 9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima contra <i>Candida albicans</i> para amostras ativas de <i>Gatteria elliptica</i> e comparação das médias usando o teste de Tukey	157
Tabela 10. Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima contra <i>Staphylococcus aureus</i> para amostras ativas de <i>Gatteria elliptica</i> e comparação das médias usando o teste de Tukey	158
Tabela 11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima contra <i>Escherichia coli</i> para amostras ativas de <i>Gatteria elliptica</i> e comparação das médias usando o teste de Tukey	159
Tabela 12. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> para amostra ativa de <i>Gatteria elliptica</i>	160
Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima das amostras de <i>Guatteria elliptica</i> testadas contra <i>Aspergillus brasiliensis</i> , <i>Candida albicans</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	161

Tabela 14. Índice de citotoxicidade para 50% da população de linhagens tumorais humanas de mama e próstata para extratos, frações, alcaloides totais, alcaloides isolados e óleo essencial de *Guatteria elliptica* e comparação das médias para as amostras ativas ($IC_{50} < 30 \mu g/mL$), usando o teste de Tukey 164

Tabela 15. Índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo, Índice de citotoxicidade para 10% da população celular em estudo, estimativa da LD_{50} e a classificação da toxicidade oral aguda para as amostras de *Guatteria elliptica* obtidos para cultura celular de fibroblasto murino (BALB/C, ATCC CCL 163)..... 169

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Tipos de fármacos aprovados no período de 1981 a 2014.....	25
Figura 2. Fármacos aprovados no período de 1981 a 2014, segregados por ano	27
Figura 3. Mapa do Domínio da Mata Atlântica nos anos 1500 e 2007	28
Figura 4. Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir da <i>L</i> -tirosina.....	31
Figura 5. Origem biossintética dos alcaloides isoquinolínicos a partir do esqueleto benzilisoquinolínico	32
Figura 6. Tipos e numeração de esqueleto aporfínico.....	32
Figura 7. Origem biossintética de fenóis simples e flavonoides	52
Figura 8. Ocorrência das geninas que dão origem aos flavonoides isolados de espécies de <i>Annonaceae</i>	54
Figura 9. Origem biossintética de terpenos	58
Figura 10. Ramo folhar e os frutos (no início de frutificação) de <i>Guatteria elliptica</i> coletados no Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba.....	66
Figura 11. Área de abrangência da Subprefeitura de Paranapiacaba e Parque Andreense	67
Figura 12. Esquema do processo da extração de alcaloides totais dos folhas e dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i>	71
Figura 13. Cortes transversais da folha de <i>Guatteria elliptica</i> , coradas utilizando Azul de Asta e Sudam III, com as células oleíferas (aumento de 200 vezes).....	98
Figura 14. Cromatograma obtido para óleo essencial das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar DB-5.....	99
Figura 15. Estruturas dos compostos majoritários identificados no óleo das folhas de <i>Guatteria elliptica</i>	100
Figura 16. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ para pesquisa de flavonoides nos extratos e frações de <i>Guatteria elliptica</i> pelo reagente visualizador NP-PEG	106
Figura 17. Placas de cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ dos alcaloides totais das folhas e dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i>	107
Figura 18. Cromatograma obtido para os alcaloides totais das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	108

Figura 19. Espectro de massas do composto TR = 14,1 min obtido dos alcaloides totais das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	109
Figura 20. Mecanismo de fragmentação da nornuciferina	110
Figura 21. Espectro de massas do composto TR = 14,7 min obtido dos alcaloides totais das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	111
Figura 22. Espectro de massas do composto TR = 15,1 min obtido dos alcaloides totais das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	111
Figura 23. Mecanismo de fragmentação da estefarina	112
Figura 24. Espectro de massas do composto TR = 18,9 min obtido dos alcaloides totais das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	113
Figura 25. Fragmentos obtidos da fragmentação do tipo retro Diels Alder da discretamina	114
Figura 26. O cromatograma obtido para os alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	115
Figura 27. Espectro de massas do composto TR = 14,1 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS.....	116
Figura 28. Espectro de massas do composto TR = 15,1 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	116
Figura 29. Espectro de massas do composto TR = 18,4 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS.....	117
Figura 30. Espectro de massas do composto TR=13,9 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	118
Figura 31. Mecanismo de fragmentação da assimilobina	118
Figura 32. Espectro de massas do composto TR = 16,8 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS.....	119
Figura 33. Mecanismo de fragmentação da corituberina	120
Figura 34. Espectro de massas do composto TR = 19,2 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS.....	121
Figura 35. Mecanismo de fragmentação da caseadina	121
Figura 36 Estruturas dos alcaloides identificados nas folhas e nos galhos de <i>Guatteria elliptica</i>	122
Figura 37. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ das frações F1-F7 dos alcaloides totais das folhas de <i>Guatteria elliptica</i> obtidos por meio de cromatografia em coluna observadas em luz ultravioleta luz e visível.....	123

Figura 38. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ das frações F1-F10 dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> obtidos por meio de cromatografia em coluna observadas em luz visível e ultravioleta	126
Figura 39. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ das frações F1-F8 dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> obtidos por meio da extração em fase sólida (cartucho de fase reversa C18) observadas em luz ultravioleta e visível	127
Figura 40. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ da Amostra 9 obtida dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> observada em luz ultravioleta e visível	129
Figura 41. Cromatograma da Amostra 9 isolada dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	129
Figura 42. Espectro de massas dos compostos TR = 16,4 min (A) e TR=17,0 min (B) presentes na Amostra 9 obtida dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna capilar HP5-MS	130
Figura 43. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (300 MHz, CDCl ₃) da Amostra 9 obtida dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i>	131
Figura 44. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ da Amostra 10 obtida dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> observada em luz ultravioleta e visível	133
Figura 45. Cromatograma obtido para a Amostra 10 isolada dos alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna Zorbax Extend C18.....	134
Figura 46. Espectro de massas total do pico TR=5,00 min (A) e espectro de massas obtido pela fragmentação adicional do íon m/z=342 (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna Zorbax Extend C18....	135
Figura 47. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da caseadina.....	136
Figura 48. Espectro de massas do pico de TR=5,40 min (A) e espectro de massas do íon m/z=356 min (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna Zorbax Extend C18	137
Figura 49. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM do N-óxido de oliverina.....	138
Figura 50. Espectro de massas do pico RT=6,27 min (A) e espectro de massas do íon m/z=338 (B) encontrado na Amostra 10 isolada dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna Zorbax Extend C18	139
Figura 51. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da deidronantenina	139

Figura 52. Espectro de massas do pico TR=6,80 min (A) e espectro de massas do íon m/z=352 (TR=6,80 min) (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna Zorbax Extend C18.....	141
Figura 53. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da glaunidina	141
Figura 54. Espectro de massas do pico TR=7,63 min (A) e espectro de massas do íon m/z=308 (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna Zorbax Extend C18.....	142
Figura 55. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da telkovina	143
Figura 56. Espectro de massas do pico TR=8,23 min (A) e espectro de massas do íon m/z=276 (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i> utilizando coluna Zorbax Extend C18.....	144
Figura 57. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da liriodenina.....	144
Figura 58. Estruturas dos alcaloides identificados na Amostra 10 isolada dos galhos de <i>Guatteria elliptica</i>	145
Figura 59. Ensaio de atividade antioxidante utilizando cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ das amostras de <i>Guatteria elliptica</i> em luz visível	146
Figura 60. Curvas de redução do DPPH obtidas para amostras ativas de <i>Guatteria elliptica</i>	148
Figura 61. Ensaio de atividade anticolinesterásica utilizando cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ em luz visível das amostras de <i>Guatteria elliptica</i> ..	152
Figura 62. Ensaio de atividade antifúngica utilizando cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F ₂₅₄ em luz visível das amostras de <i>Guatteria elliptica</i>	153
Figura 63. Crescimento de <i>Aspergillus brasiliensis</i> depois de 5 dias de incubação observado para extratos, alcaloides totais e frações de <i>Guatteria elliptica</i>	154
Figura 64. Curvas de inibição de crescimento contra <i>Candida albicans</i> obtidas para amostras ativas de <i>Guatteria elliptica</i>	157
Figura 65. Curvas de inibição de crescimento contra <i>Staphylococcus aureus</i> obtidas para amostras ativas de <i>Guatteria elliptica</i>	158
Figura 66. Curvas de inibição de crescimento contra <i>Escherichia coli</i> obtidas para amostras ativas de <i>Guatteria elliptica</i>	159
Figura 67. Curva de inibição de crescimento contra <i>Pseudomonas aeruginosa</i> obtida para amostra ativa de <i>Guatteria elliptica</i>	160

Figura 68. Curvas de viabilidade celular para cultura de fibroblasto murino (BALB/C, ATCC CCL 163) dos extratos, alcaloides totais, amostras isoladas, frações e óleo essencial de *Guatteria elliptica* na faixa de concentrações testada. 168

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Índice de retenção de Kóvats	82
Equação 2. Equação geral de curva do tipo de dose-resposta (Origin 9.1 [®])	86
Equação 3. Sequestro do radical livre DPPH	86
Equação 4. Crescimento microbiano	90
Equação 5. Crescimento celular	93
Equação 6. Determinação da dose letal mediana (DL ₅₀)	95

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviação	Significado
Abs	Absorbância
A9	Amostra 9
A10	Amostra 10
ASE	Accelerated Solvent Extractor
AT	Alcaloides totais
ATCC	American type culture collection
ATF	Alcaloides totais das folhas
ATG	Alcaloides totais dos galhos
BDA	Batata-dextrose-água
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CCDp	Cromatografia em camada delgada preparativa
CG	Cromatografia à gás
CG-EM	Cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CPQBA	Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas
d	Dubleto
dd	Dubleto de dubleto
DL₅₀	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EB	Extrato bruto
EBF	Extrato bruto das folhas
EBG	Extrato bruto dos galhos
EC₅₀	Concentração de amostra necessária para sequestrar 50 % da concentração inicial de DPPH
EFS	Extração em fase sólida
EM	Espectrometria de massas

EP	Erro padrão
FAA	Fase aquosa alcalina
FC	Fase clorofórmica
FCF	Faculdade de Ciências Farmacêuticas
FH	Fração hexânica
h	Hora
RMN-¹H	Ressonância magnética nuclear de nuclídeo de hidrogênio 1
IC₅₀	Índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo
CI₉₅	Intervalo de confiança de 95%
J	Constante de acoplamento
KI	Kóvats Index
LC-EM	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
m	Multipeto
MCF-7	Linhagem celular de câncer de mama
MeOH	Metanol
m/m	Proporção massa/massa
m/z	Razão massa/carga
NaOH	Hidróxido de sódio
NH₄OH	Hidróxido de amônio
NP	Difenilboriloxietilamina 1,0% em metanol
NP-PEG	Difenilboriloxietilamina 1,0% em metanol seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol
PC-3	Linhagem celular de câncer de próstata
PEG	Polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol
OE	Óleo essencial
R. E. Fries	Robert Elias Fries (botânico)
Rf	Fator de retenção
s	Singleto
SAA	Solução aquosa ácida
SAAL	Solução aquosa ácida lavada
SALA	Solução aquosa lavada alcalizada
SDA	Ágar sabouraud dextrose
SDB	Caldo Sabouraud Dextrose

SRB	Sulforodamina B
T	Torta
Tr	Transmitância
TAF	Fração de acetato de etila da torta das folhas
TAG	Fração de acetato de etila da torta dos galhos
TBF	Fração butanólica da torta das folhas
TBG	Fração butanólica da torta dos galhos
TCF	Fração clorofórmica da torta das folhas
TCG	Fração clorofórmica da torta dos galhos
TF	Torta das folhas
TG	Torta dos galhos
THF	Fração hexânica da torta das folhas
THG	Fração hexânica da torta dos galhos
TR	Tempo de retenção
TSA	Ágar de Soja-Caseína
TSB	Caldo de Soja-Caseína
UFC	Unidade formadora de colônia
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
UNIP	Universidade Paulista
USP	Universidade de São Paulo
UV	Ultra-violeta
v/v	Proporção volume/volume

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
1.1. Fármacos baseados em produtos naturais	25
1.2. Annonaceae	29
1.3. <i>Guatteria</i>	29
1.3.1. Alcaloides de <i>Guatteria</i>	30
1.3.2. Flavonoides de <i>Guatteria</i>	51
1.3.3. Óleos essenciais de <i>Guatteria</i>	56
1.4. <i>Guatteria elliptica</i> R. E Fries	61
2. OBJETIVOS	63
2.1. Objetivos específicos	64
3. MATERIAL E MÉTODOS	65
3.1. Material vegetal	66
3.2. Análise química	69
3.2.1. Extração de óleo essencial	69
3.2.2. Extração de alcaloides	69
3.2.3. Fracionamento da torta	72
3.2.4. Pesquisa de flavonoides	72
3.2.5.1. Isolamento e purificação de alcaloides das folhas	73
3.2.5.2. Isolamento e purificação de alcaloides dos galhos por meio de cromatografia em coluna	77
3.2.5.3. Isolamento e purificação de alcaloides dos galhos por meio de extração em fase sólida	78
3.2.6. Análise dos alcaloides por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)	80
3.2.7. Análises de óleo essencial	81
3.2.8. Análise dos alcaloides por RMN- ¹ H	82
3.2.9. Análise dos alcaloides por LC-EM/EM	83
3.3. Análises biológicas	84
3.3.1. Atividade antioxidante – método qualitativo	84
3.3.2. Atividade antioxidante - método quantitativo	85
3.3.3. Atividade anticolinesterásica – método qualitativo	86
3.3.4. Atividade antifúngica - método qualitativo	87

3.3.5.	Atividade antimicrobiana - método quantitativo	89
3.3.6.	Teste de atividade antitumoral <i>in vitro</i>	91
3.3.7.	Teste de toxicidade <i>in vitro</i>	93
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
4.1.	Análise química.....	97
4.1.1.	Óleo essencial.....	97
4.1.1.1.	Extração de óleo essencial	97
4.1.1.2.	Composição química do óleo essencial	99
4.1.2.	Extratos e frações	102
4.1.2.1.	Extração de alcaloides.....	102
4.1.2.2.	Fracionamento da torta.....	103
4.1.2.3.	Pesquisa de flavonoides	105
4.1.3.	Alcaloides.....	106
4.1.3.1.	Alcaloides totais	106
4.1.3.2.	Análise dos alcaloides totais por CG-EM	107
4.1.3.3.	Análise dos alcaloides totais das folhas por CG-EM	107
4.1.3.4.	Análises por CG-EM de alcaloides totais dos galhos	114
4.1.3.5.	Isolamento e purificação dos alcaloides das folhas.....	122
4.1.3.6.	Isolamento e purificação dos alcaloides dos galhos.....	125
4.1.3.7.	Identificação da Amostra 9	128
4.1.3.8.	Identificação da Amostra 10	133
4.2.	Análise biológica.....	145
4.2.1.	Atividade antioxidante - método qualitativo	145
4.2.2.	Atividade antioxidante – método quantitativo.....	147
4.2.3.	Atividade anticolinesterásica	151
4.2.4.	Atividade antifúngica - método qualitativo	152
4.2.5.	Atividade antimicrobiana - método quantitativo	154
4.2.5.1.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima	156
4.2.6.	Teste de atividade antitumoral <i>in vitro</i>	163
4.2.7.	Teste de toxicidade <i>in vitro</i>	167
5.	CONCLUSÕES	173
6.	REFERÊNCIAS	175

7. CURRICULUM VITAE	200
----------------------------------	------------

1. INTRODUÇÃO

1.1. Fármacos baseados em produtos naturais

Produtos naturais têm importância como fonte de moléculas bioativas. Fármacos originados de produtos naturais podem incluir compostos produzidos por microrganismos, plantas e animais (Quadro 1). Além disso, há compostos sintéticos ou semissintéticos baseados em produtos naturais.

O fato de que cerca da metade dos fármacos aprovados desde 1994 foram baseados em produtos naturais (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001; HARVEY, 2008; NEWMAN; CRAGG; SNADER., 2003), e que ainda a metade dos 20 fármacos mais vendidos no mundo são produtos naturais, mostram a importância e o potencial da mega diversidade de plantas brasileiras como uma alternativa em pesquisas de desenvolvimento de novos fármacos (BARREIRO; SILVA-BOLZANI, 2009). Existe uma estimativa de que aproximadamente 375 fármacos podem ser encontrados em florestas tropicais do mundo, sendo que destes menos de 10 % já foram descobertos (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

Um levantamento de 1562 fármacos aprovados no período de 1981 a 2014 (NEWMAN; CRAGG, 2016) mostrou que 4 % fármacos foram produtos naturais, 21 % - derivados de produtos naturais, 16 % – biológicos, 4 % - sintéticos, com farmacóforo de um produto natural e 10 % - sintéticos, mimetizando um produto natural (Figura 1 e 2).

Figura 1. Tipos de fármacos aprovados no período de 1981 a 2014

Tipo de fármaco: **B** – biológico, **N** - produto natural, **NB** - produto natural botânico, **ND** - derivado de produto natural, **NM** - mímico de produto natural, **S** - sintético, **S*** - feito por síntese total, com farmacóforo a partir de produto natural, **V** – vacina; N=1562 (NEWMAN; CRAGG, 2016)

Quadro 1. Exemplos de fármacos originados de produtos naturais

nome genérico	espécies	indicação terapêutica
Artemisinina	<i>Artemisia annua</i>	Antiparasitário
Atropina	<i>Atropa belladonna</i> , <i>Datura stramonium</i>	pré-anestesia, infarto, agudo, cólicas geniturinárias
Cocaína	<i>Erythroxylum coca</i>	dores severas
Codeína	<i>Papaver somniferum</i>	dor moderada
Colchicina	<i>Colchicum autumnale</i>	gota
Digoxina	<i>Digitalis purpurea</i> D. <i>lanata</i>	insuficiência cardíaca
Fisostigmina	<i>Physostigma venenosum</i>	miastenia gravis, glaucoma, doença de Alzheimer, esvaziamento gástrico lento
Hiosciamina	<i>Atropa belladonna</i> , <i>Datura stramonium</i>	transtornos gastrointestinais
Morfina	<i>Papaver somniferum</i>	dores severas
Quinidina	<i>Cinchona</i> spp.	malária
Quinina	<i>Cinchona</i> spp.	malária
Paclitaxel	<i>Taxus brevifolia</i>	anticâncer
Pilocarpina	<i>Pilocarpus</i> spp.	glaucoma
Solamargina	<i>Solanum lycocarpum</i>	anticâncer
Tubocurarina	<i>Strychnos</i> spp.	relaxante muscular
Vimblastina	<i>Catharanthus roseus</i>	anticâncer
Vincristina	<i>Catharanthus roseus</i>	anticâncer

(NEWMAN; CRAGG, 2007; BALANDRIN et al., 1985)

Figura 2 Fármacos aprovados no período de 1981 a 2014, segregados por ano

Tipo de fármaco: **B** – biológico, **N** - produto natural, **NB** - produto natural botânico, **ND** - derivado de produto natural, **NM** - mímico de produto natural, **S** - sintético, **S*** - feito por síntese total, com farmacóforo a partir de produto natural, **V** – vacina, n=1562 (NEWMAN; CRAGG, 2016)

Muitas pesquisas são direcionadas para o desenvolvimento de novas moléculas com atividades biológicas. Poderia se dizer que a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos com atividade antimicrobiana e antitumoral foi aumentada por causa, entre outros, do aumento da resistência bacteriana, aparecimento de novas infecções e novos tipos de tumores (VALGAS et al., 2007). Desde que radicais livres desempenham um importante papel no processo de formação de tumores, antioxidantes presentes em plantas têm recebido atenção como agentes quimiopreventivos do câncer (LEE et al., 1998). O estresse oxidativo está também associado às outras patologias, como doenças cardiovasculares e neurodegenerativas (LÓPEZ-ALARCÓN; DENICOLA, 2013). A aprovação alcaloide galantamina como medicamento acetilcolinesterásico para tratar doença neurodegenerativa de Alzheimer, decorre da importância de produtos naturais na inovação farmacêutica (BARREIRO; SILVA-BOLZANI, 2009). Portanto, é previsto que no futuro os produtos naturais continuarão a desempenhar um papel importante como substâncias ativas e moléculas para a descoberta e validação de alvos bioquímicos (VUORELA et al., 2004).

O Brasil é considerado como o detentor da flora mais rica do mundo, com mais de 43 000 espécies reconhecidas. Conforme as estimativas da Convenção da Diversidade Biológica, o Brasil hospeda cerca de 20% da biodiversidade mundial, sendo considerado o maior do planeta em número de espécies endêmicas. Dados estatísticos indicam que ainda existem no Brasil 55.000 espécies de plantas desconhecidas (BARREIRO; SILVA-BOLZANI, 2009). A ampla variedade climática e geomorfológica encontrada no país

é responsável pela presença de diferentes biomas e ecossistemas. Um dos mais ricos biomas em biodiversidade é a Mata Atlântica, listada entre os 25 *hotspots* para prioridade de conservação (MORENO et al., 2013). Hoje, menos de 8 % dessa floresta original permanecem não alterada (Figura 3). O desmatamento é muito mais grave nos estados do Nordeste do Brasil, onde apenas 1-2 % da mata original perdura. Apesar destas alterações, a Mata Atlântica é ainda extremamente rica em biodiversidade, com altos níveis de endemismo (Critical Ecosystem Partnership Fund, 2001). Estima-se que na Mata Atlântica crescem cerca de 8.000 espécies endêmicas, o que representa 2,7 % de plantas endêmicas do mundo (MYERS et al., 2004).

Figura 3. Mapa do Domínio da Mata Atlântica nos anos 1500 e 2007

A-Domínio da Mata Atlântica no ano 1500, **B-** Domínio da Mata Atlântica no ano 2007
(Fonte: <http://ambiente.hsw.uol.com.br/mata-atlantica1.htm>)

Um levantamento de plantas medicinais usadas pelos moradores rurais e urbanos em três cidades da Mata Atlântica (Região do Vale do Ribeira, São Paulo, Brasil) descreveu 114 espécies de plantas com 628 propriedades medicinais, principalmente utilizadas como analgésicos e para tratamento de doenças respiratórias e gastrointestinais (AGRIPINO et al., 2004). Além disso, estudos anteriores mostraram que a floresta tropical contém mais do que metade de espécies de plantas do mundo, porém poucas pesquisas sobre plantas medicinais

foram realizadas na região dessa floresta e menos de 1 % das plantas da floresta foram pesquisadas para atividades biológicas (AGRIPINO et al., 2004).

1.2. *Annonaceae*

A família *Annonaceae* pertence ao grupo das Eudicotiledôneas, clado das Magnolíideas. Esse clado é constituído por quatro ordens: Canellales, Laurales, Magnoliales e Piperales, sendo a ordem Magnoliales representada pelas famílias Magnoliaceae, Myristicaceae e *Annonaceae* (NUNES et al., 2012).

Essa família é principalmente pantropical e contém 135 gêneros e 2 500 espécies. No Brasil, existem 29 gêneros e 392 espécies que tendem a crescer em florestas, mas também podem ocorrer em áreas abertas. O impressionante é que das 392 espécies com ocorrência no Brasil, 162 são endêmicas (MAAS et al., 2016).

Annonaceae é conhecida por suas propriedades medicinais e farmacológicas. Além disso, essa família é reconhecida como fonte de frutas comestíveis, matéria prima para cosméticos e perfumaria. A família é muito rica em substâncias químicas como: ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, catequinas, proantocianidina, óleos essenciais, terpenos, esteroides, alcaloides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, proteínas, lactonas, vitaminas, carotenos, saponinas, entre outros (NUNES et al., 2012).

1.3. *Guatteria*

O gênero *Guatteria* Ruiz et Pav. é o terceiro maior gênero de árvores neotropicais após *Inga* Mill. (Fabaceae) e *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) (ERKENS et al., 2007). Além disso, o gênero é o maior e mais complexo da família *Annonaceae*, que compreende cerca de 265 espécies (LOBÃO; MELLO-SILVA., 2007). O gênero é amplamente distribuído na região da Mesoamérica (cerca 30 espécies), do Caribe (cerca 3 espécies) e da América do Sul (cerca 230 espécies) (ERKENS et al., 2007; CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989). No Brasil, 88 espécies ocorrem naturalmente, sendo que 47 são endêmicas. Elas se distribuem por várias regiões do país: Norte (Roraima, Amapá, Pará, Amazonas, Acre, Rondônia), Nordeste (Maranhão, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Bahia, Alagoas), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal), Sudeste (Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo, Rio de Janeiro) e Sul (Paraná, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (MAAS et al., 2013). Devido a suas

propriedades medicinais e farmacológicas, as plantas desse gênero são frequentemente utilizadas na medicina popular e foram objeto de estudos fitoquímicos (COSTA et al., 2010).

1.3.1. Alcaloides de *Guatteria*

Uma grande parte dos fármacos de origem vegetal pertencem a classe dos alcaloides (Quadro 2), os quais são geralmente definidos como compostos naturais derivados de aminoácidos e contendo pelo menos um nitrogênio em um anel heterocíclico (alcaloides verdadeiros). Porém, essa definição é ainda incompleta pois existem alcaloides com nitrogênio em uma cadeia lateral (protoalcaloides) e compostos nitrogenados, que não são derivados de aminoácidos (pseudoalcaloides) (HENRIQUES et al., 2010). Há cerca de 27 000 estruturas conhecidas de alcaloides isolados de plantas, fungos, organismos marinhos e mamíferos. Estima-se que os alcaloides são distribuídos em aproximadamente 7 500 espécies de plantas superiores (cerca de 1 700 gêneros e 190 famílias). Cerca de 850 de alcaloides estão presentes na família Annonaceae (CORDELL; QUINN-BEATTIE.; FARNSWORTH., 2001).

Quadro 2. Alcaloides ou seus compostos derivados empregados como fármacos

protótipo natural	fármaco descoberto	indicação terapêutica
Quinina	Mefloquina	Antimalárico
Pilocarpina	Pilocarpina	Colinesterásico
Tubocurarina	Hexametônio	Bloqueador ganglionar
Papaverina	Sildenafil	Antidisfunção erétil
Reserpina	Reserpina	Antiarritmico
Mescalina	Anfetamina	Anoréxico
Vincristina	Vincristina	Anticâncer
Galantamina	Galantamina	AntiAlzheimer
Camptotecina	Exatecan	Inibidor de topoisomerase-2
Huperzina-A	Selagina	AntiAlzheimer
Epibatidina	ABT-418	Analgésico periférico

(BARREIRO; SILVA BOLZANI, 2009)

O gênero *Guatteria* é conhecido por uma grande diversidade de alcaloides, e até o presente, cerca de 130 alcaloides foram isolados e identificados (RODRIGUEZ et al., 2007).

A maioria dos alcaloides de *Guatteria* sp. pertence ao grupo estrutural das isoquinolinas (CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989). A origem biossintética dos alcaloides isoquinolínicos se inicia pela rota do ácido chiquímico a partir de carboidratos. O ácido chiquímico é responsável pela formação dos aminoácidos aromáticos como a *L*-fenilalanina e *L*-tirosina, sendo esses os precursores dos alcaloides isoquinolínicos. A formação biossintética do esqueleto benzilisoquinolínico tem início com a reação de condensação de duas unidades fenólicas, ambas derivadas do aminoácido *L*-tirosina, a dopamina e o *p*-hidróxi-fenilacetaldeído. A rota biossintética a partir de *L*-tirosina para formação de estrutura benzilisoquinolínica é mostrada na Figura 4 (RINALDI, 2007).

Figura 4. Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir da *L*-tirosina

A - dopamina, B - *p*-hidróxifenilacetaldeído, C - (R) ou (S)-norcoclaurina, D - (R) ou (S)-coclaurina, E - (R) ou (S)-N-metilcoclaurina, F - (R) ou (S)-5-hidróxi-N-metilcoclaurina, G - (R) ou (S)-reticulina (RINALDI, 2007)

Alcaloides isoquinolínicos do tipo benzilisoquinolínico são encontrados frequentemente em *Guatteria*, distribuídos nas seguintes séries: berberinas, aporfínas, morfinandienonas e bisbenzilisoquinolinas (CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989). A origem desses alcaloides, a partir de seu provável precursor, a reticulina, é mostrada na Figura 5 (RINALDI, 2007).

O tipo de esqueleto aporfínico (Figura 6) é o mais comum em *Guatteria* (CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989). Os alcaloides aporfínicos são encontrados somente em

espécies das famílias: Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae, Papaveraceae e Rhamnaceae (RINALDI, 2007).

Figura 5. Origem biossintética dos alcaloides isoquinolínicos a partir do esqueleto benzilisoquinolínico

A-benzilisoquinolina, B-protoberberina; C-isoquinolona, D-morfinadienona, E-cularina, F-aporfina, G-oxoaporfina, H-fenantreno, I-bisbenzilisoquinolina (CAVÉ, 1985)

Figura 6 Tipos e numeração de esqueleto aporfínico

a-aporfina *sensu stricto*, b-desidro-aporfina, c-7-hidróxi-aporfina, d-oxo-aporfina, e-4,5-dioxo-aporfina, f-7-alquil-aporfina (CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989)

Alcaloides apresentados no Quadro 3 foram selecionados a partir da literatura pesquisada, sem restrições de tempo no SciFinder Scholar®. Nessa base de dados foram encontradas cerca 60 referências para alcaloides de *Guatteria*. O quadro consiste cerca de 150 alcaloides desse gênero com as espécies de onde foram isolados e suas atividades biológicas (se conhecidas). Pode-se verificar que o tipo de esqueleto mais difundido é o aporfínico (cerca de 110 alcaloides) responsável por cerca de 70 % das estruturas encontradas. Outros tipos de esqueletos bastante comuns são as bisbenzilisquinolinas (cerca de 20 alcaloides) e as protoberberinas (cerca de 15 alcaloides). O alcaloide que ocorre na maioria das espécies é a liriodenina, pertencente ao grupo das aporfinas. Outros alcaloides que frequentemente ocorrem nas espécies e também pertencem a esse grupo foram: *O*-metilmoschatolina, lisicamina e coridina. Muitos alcaloides de *Guatteria* listados no Quadro 3 também foram encontrados em espécies brasileiras como: *G. australis* A.St.-Hill., *G. boliviana* H.J.P.Winkl., *G. discolor* R.E.Fr., *G. elata* R.E.Fr., *G. foliosa* Benth., *G. friesiana* (W.A.Rodrigues) Erkens & Maas, *G. goudotiana* Triana & Planch., *G. guianensis* (Aubl.) R.E.Fr., *G. hispida* (R.E.Fr.) Erkens & Maas, *G. megalophylla* Diels, *G. modesta* Diels, *G. ouregou* Dunal, *G. poeppigiana* Mart., *G. scandens* Ducke, *G. schomburgkiana* Mart. e *G. subsessilis* Mart. (MAAS et al., 2013). Dentre essas espécies, *G. australis*, *G. elata*, *G. friesiana*, *G. hispida* e *G. poeppigiana* são endêmicas do Brasil (MAAS et al., 2013).

Apesar da atividade biológica de grande parte dos alcaloides ainda ser desconhecida, é fato que vários são biologicamente ativos e desempenham uma função importante na ecologia vegetal, como defesa química contra herbívoros, insetos, vírus, bactérias e fungos, ou como meio de interação com outras plantas. Para cumprir essa função, eles devem interagir com alvos bioquímicos específicos, inibindo ou desregulando processos vitais dos organismos. A compreensão desses mecanismos é importante para o uso racional de alcaloides na medicina e farmacologia. Um dos modos de ação dos alcaloides é a interação com biomembranas, formando complexos com o colesterol e interferindo na transmissão de sinais. Além disso, alguns alcaloides interagem com canais (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^-) e bombas (Na^+/K^+ -ATPase e Ca^{2+} -ATPase) iônicas ou neurotransmissores (noradrenalina, serotonina, dopamina, histamina, glicina, GABA, acetilcolina). Uma outra maneira de atuação dos alcaloides é afetar o citoesqueleto (microtúbulos ou microfilamentos). Ademais, os alcaloides podem se ligar com o DNA/RNA, podendo prevenir os processos de replicação e transcrição (WINK, 1998).

Quadro 3. Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
actinodafnina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER, RASAMIZAFY; CAVÉ., 1982b)
anisociclina	protoberberina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(RODRÍGUEZ; BASTIDAS; HASEGAWA., 2007)
anolobina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ., 1982b)
(-)-anolobina	aporfina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch. <i>G. schomburgkiana</i> Mart. <i>G.tonduzii</i> Diels		(CASTEDO <i>et al.</i> , 1991; CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a; LÓPEZ <i>et al.</i> , 1990)
oxo-anolobina	aporfina	<i>G. melosma</i> Diels		(ABD-EL_ATTI <i>et al.</i> ; 1982; PHOEBE <i>et al.</i> , 1980)
(-)-anonaina	aporfina	<i>G. oliviformis</i> Donn. Sm. <i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a; LÓPEZ <i>et al.</i> , 1990)
argentinina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr. <i>G. foliosa</i> Benth. <i>G.goudotiana</i> Triana & Planch.	antiparasitário	(CASTEDO <i>et al.</i> , 1991; HOCQUEMILLER <i>et al.</i> , 1984a; MAHIOU <i>et al.</i> , 1994)
asimilobina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER <i>et al.</i> , 1982b)
aterolina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
aterospermidina	aporfina	<i>G. psilopus</i> Mart.		(CORDELL et al., 1989; HARRIS; GEISSMAN., 1965)
<i>N</i> -oxi-aterosperminina	protoberberina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr.		(HOCQUEMILLER et al., 1984a)
(-)-antioquina	bisbenzilisquinolina	<i>G. boliviana</i> H.J.P. Winkl.	antiparasitário antitumoral	(MAHIOU et al., 2000)
belemina	aporfina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(ABD-EL-ATTI, 1984; CORTES et al., 1984)
coclaurina	benzilisquinolina	<i>G. poeppigiana</i> Mart.		(LIMA et al., 2004)
12- <i>O</i> -desmetil-coclobina	bisbenzilisquinolina	<i>G. guianensis</i> (Aubl.) R.E.Fr.		(BERTHOU; LEBOEUF; CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989)
coreximina	protoberbinico	<i>G. fresiana</i> W.A. Rodrigues <i>G. hispida</i> R.E. Fr.	antioxidante	(CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; CORDELL et al., 1989; COSTA et al., 2009; COSTA et al., 2010)
(-)-coreximina	protoberberina	<i>G. ouregou</i> Dunal <i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a; CORTES et al., 1986, CORTES; ARBAOUI; PROTAIS, 1993)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
coridina	aporfina	<i>G. amplifolia</i> Triana & Planch. <i>G. cubensis</i> Bisse <i>G. schomburgkiana</i> Mart.	antimalárico	(CALVALHO BAYMA et al., 1987; DIAZ; SCHREIBER; RIPPERGER, 1981; WENIGER et al., 2000)
coripalmina	protoberberina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr. <i>G. fresiana</i> W.A. Rodrigues		(CAVÉ; LEOEUF; CASSELS, 1989; COSTA et al., 2009; HOCQUEMILLER et al., 1984a)
(-)-coritenchina	protoberberina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORDELL et al., 1989; CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a)
(+)-corituberina	aporfina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991)
criptodorina	aporfina	<i>G. dumetorum</i> R.E.Fries	leishmanicida	(MONTENEGRO et al., 2003)
(<i>R,R</i>)-12'- <i>O</i> -metil-curina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. megalophylla</i> Diels		(GALEFFI; MARINI-BETTOLO; VECCHI, 1975)
(<i>R,R</i>)- <i>O,O</i> -dimetil-curina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. megalophylla</i> Diels		(GALEFFI; MARINI-BETTOLO; VECCHI, 1975)
4,5-di-oxo-desidro-dicentrina	aporfina	<i>G. stenopetala</i> R.E. Fr.	anti-Alzheimer e anti-Parkinson	(RODRÍGUEZ et al., 2008)
dicentrinona	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke <i>G. stenopetala</i> R.E. Fr.	anti-Alzheimer e anti-Parkinson	(HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b; RODRÍGUEZ et al., 2008)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
Dielsina	azafluorena	<i>G. dielsiana</i> R.E. Fr.		(GOULART et al., 1986; TADIC et al., 1987)
dielsiquinona	azaantraquinona	<i>G. dielsiana</i> R.E. Fr.		(CORDELL et al., 1989; GOULART et al., 1986)
discoguatina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr.		(CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; HOCQUEMILLER et al., 1984a)
discretamina	protoberberina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr. <i>G. scandens</i> Ducke		(CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; HOCQUEMILLER et al., 1984a)
discretina	protoberberina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr. <i>G. scandens</i> Ducke		(CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; HOCQUEMILLER et al., 1984a; HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b)
dragabina	aporfina	<i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.		(CASSELS et al., 1986)
N-metil-elmerillicina	aporfina	<i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.		(RASAMIZAFY; HOCQUEMILLER; CAVÉ., 1986)
desidro-estefalagina	aporfina	<i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.		(RASAMIZAFY; HOCQUEMILLER; CAVÉ., 1986)
oxo-estefanina	aporfina	<i>G. calva</i> R.E. Fr.	antitumoral	RODRÍGUEZ et al., 1999
filogalina	bisbenziloquinolina	<i>G. boliviana</i> H.J.P. Winkl.		(MAHIOU et al., 2000)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
(-)-formouregina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
desidro-formouregina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
guacolidina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr.		(HOCQUEMILLER et al., 1984a)
guacolina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr.		(HOCQUEMILLER et al., 1984a)
guadiscidina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr.		(CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; HOCQUEMILLER et al., 1984a; ZHANG et al; 2002)
guadiscina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr. <i>G. multivenia</i> Diels <i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a; HOCQUEMILLER et al., 1984a; HOCQUEMILLER et al., 1982a)
desmetóxi-guadiscina	aporfina	<i>G. fresiana</i> W.A. Rodrigues		(COSTA et al., 2009)
guadiscolina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr.		(HOCQUEMILLER et al., 1982a),
goudotianina	aporfina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991)
gouregina	isoquinolonico	<i>G. ouregou</i> Dunal		(LEBOEUF et al., 1982b)
(+)-guatamina	bisbenzilisquinolina	<i>G. guianensis</i> (Aubl.) R.E.Fr.		(BERTHOU et al., 1988)
(+)-guataminona	bisbenzilisquinolina	<i>G. guianensis</i> (Aubl.) R.E.Fr.		(BERTHOU et al., 1988)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
(+)-guatebolina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. boliviana</i> H.J.P. Winkl.	antiparasitário antitumoral	(MAHIOU et al., 2000)
guategaumerina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. gaumeri</i> Greenman	tratamento da hipercolesterolemia e colelitíase	(DEHAUSSY; TITS; ANGENOT, 1983)
guaterina	aporfina	<i>G. psilopus</i> Mart.		(HARRIS; GEISSMAN., 1965)
guateriopsiscina	aporfina	<i>G. fresiana</i> W.A. Rodrigues		(COSTA et al., 2009)
guatescidina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER et al., 1982c)
(+)-3-metóxi-guatescidina	aporfina	<i>G. foliosa</i> Benth.		(MAHIOU et al., 1994)
guatescina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke, <i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ., 1982c)
guatouregina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(LEBOEUF et al., 1982a)
desidro-guattescina	aporfina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(ABD-EL-ATTI, 1984; CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a)i
guattouregidina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(LEBOEUF et al., 1982a)
homomoschatolina	aporfina	<i>G. subsessilis</i> Mart.		(CORDELL et al., 1989; HASEGAWA et al., 1972)
isoboldina	aporfina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CARVALHO-BAY MA et al., 1987)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
(+)-isoboldina	aporfina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991)
isocalicinina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr.		(HOCQUEMILLER et al., 1984a)
oxo-isocalicinina	aporfina	<i>G. discolor</i> R.E. Fr.		(HOCQUEMILLER et al., 1984a)
(<i>R,R</i>)-isochondodendrina	bisbenzilisquinolina	<i>G. megalophylla</i> Diels		(GALEFFI; MARINI-BETTOLO; VECCHI, 1975)
isocoreximina	protoberberina	<i>G. hispida</i> R.E. Fr.	antioxidante	(COSTA et al., 2010)
(+)-isocoridina	aporfina	<i>G. oliviformis</i> Donn. Sm.		(LÓPEZ et al., 1990)
isocorituberina	benzilisquinolina	<i>G. amplifolia</i> Triana & Planch.	antimicrobiana	(WENIGER et al., 2000)
(+)-isodomesticina	aporfina	<i>G. dumetorum</i> R.E.Fr. <i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.	antiparasitário	(CASTEDO et al., 1991; CORREA et al., 2006)
isoguattouregidina	aporfina	<i>G. foliosa</i> Benth.	leishmanicida	(CARVALHO - BAY MA et al., 1987)
(-)-isoguattouregidina	aporfina	<i>G. foliosa</i> Benth.	antiparasitário	(MAHIOU et al., 1994)
isomoschatolina	aporfina	<i>G. melosma</i> Diels <i>G. dielsiana</i> R.E. Fr.	antimicrobiana	(ABD-EI-ATTI et al., 1982; GOULART et al., 1986)
(-)-isopilina	aporfina	<i>G. diospyroides</i> Baill. <i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986; LÓPEZ et al., 1992)
<i>O</i> -metil-desidro-isopilina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
<i>O</i> -metil-isopilina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b)
(-)- <i>N</i> -metil-isopilina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
(-)- <i>O</i> -metil-isopilina	aporfina	<i>G. diospyroides</i> Baill. <i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986; LÓPEZ et al., 1992)
(-)-juzifina	benzilisoquinolina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991)
kikemanina	protoberberina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CAVÉ; LEOEUF; CASSELS, 1989; CARVALHO-BAYM A et al., 1987)
lanuginosina	aporfina	<i>G. multivenia</i> Diels <i>G. scandens</i> Ducke <i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a; HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ 1982b; ZHANG et al., 2002)
laudanosina	benzilisoquinolina	<i>G. amplifolia</i> Triana & Planch.		(MONTENEGRO et al., 2003)
lauterina	aporfina	<i>G. elata</i> R.E. Fr.		(HSU et al., 1977a)
laurotetanina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b)
(+)-laurotetanina	aporfina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991; CAVÉ et al., 1989)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
(+)- <i>N</i> -metil-laurotetanina	aporfina	<i>G. foliosa</i> Benth. <i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		CASTEDO et al., 1991; MAHIOU et al., 1994)
lincangenina	protoberberina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(RODRÍGUEZ; BASTIDAS; HASEGAWA., 2007)
(-)-lirinidina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
<i>O,N</i> -dimetil-liriodendronina	aporfina	<i>G. chrysopetala</i> (Steud.) Miq.		(HOCQUEMILLER et al., 1984b)
liriodenina	aporfina	<i>G. amplifolia</i> Triana & Planch. <i>G. cubensis</i> Bisse <i>G. dielsiana</i> R.E. Fr. <i>G. discolor</i> R.E. Fr. <i>G. fresiana</i> W.A. Rodrigues <i>G. goudotiana</i> Triana & Planch. <i>G. hispida</i> R.E. Fr. <i>G. melosma</i> Diels <i>G. modesta</i> Diels <i>G. multivenia</i> Diels <i>G. oliviformis</i> Donn. Sm. <i>G. scandens</i> Ducke <i>G. schomburgkiana</i> Mart.	antimicrobiana antimalárica	(ABD-EL_ATTI et al., 1982; AMMAR ; SCHIFF; SLATKIN., 1983; CASTEDO et al., 1991; CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a; COSTA et al., 2009; COSTA et al., 2010; DE CARVALHO BAYMA et al., 1987; GOULART et al., 1986; GOULART et al., 1987; HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ; 1982b; LÓPEZ et al., 1990; PHOEBE et al., 1980; WENIGER et al., 2000; ZHANG et al., 2002)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
lisi camina	aporfina	<i>G. amplifolia</i> Triana & Planch. <i>G. hispida</i> R.E. Fr. <i>G. multivenia</i> Diels <i>G. ouregou</i> Dunal <i>G. poeppigiana</i> Mart. <i>G. saffordiana</i> Pittier	antioxidante antimicrobiana	(CALVÉ et al, 1989; CORTES et al., 1986; COSTA et al., 2010; LIMA et al., 2004; GARBARINO; PETZALL; SALAZAL, 1984; MONTENEGRO et al, 2003; ZHANG et al., 2002)
<i>N</i> -meti-llaurotetanina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b)
melosmidina	aporfina	<i>G. melosma</i> Diels		(ZABEL et al., 1982)
melosmina	aporfina	<i>G. melosma</i> Diels		(ZABEL et al., 1982)
<i>O</i> -metil-moschatolina	aporfina	<i>G. amplifolia</i> Triana & Planch. <i>G. dielsiana</i> R.E. Fr. <i>G. diospyroides</i> Baill. <i>G. hispida</i> R.E. Fr. <i>G. ouregou</i> Dunal <i>G. poeppigiana</i> Mart. <i>G. tonduzii</i> Diels	antimicrobiana antimalárica	(CORTES et al., 1986; GOULART et al., 1986; LIMA <i>et al.</i> , 2004; LÓPEZ et al., 1990; LÓPEZ et al., 1992; WENIGER et al., 2000)
desidro-nantenina	aporfina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991)
desidro-neolistina	aporfina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
(+)-neolitsina	aporfina	<i>G. dumetorum</i> R.E.Fr. <i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991; CORREA et al., 2006)
norcefaradiona	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
norcoridina	aporfina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CARVALHO-BAYMA et al., 1987)
nordicentrina	aporfina	<i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b)
nordragabina	aporfina	<i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.		(CASSELS et al., 1986)
(+)-2'-norfuniferina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. guianensis</i> (Aubl.) R.E.Fr.		(BERTHOU et al., 1988)
(+)-2,2'-bis-norguataguanina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. guianensis</i> (Aubl.) R.E.Fr.		(BERTHOU et al., 1988)
(+)-2'-norguataguanina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. guianensis</i> (Aubl.) R.E.Fr.		(BERTHOU et al., 1988)
(+)-norguatevalina	aporfina	<i>G. foliosa</i> Benth.		(MAHIOU et al., 1994)
(+)-norisodomestica	aporfina	<i>G. dumetorum</i> R.E.Fr. <i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO et al., 1991; CORREA et al., 2006)
norlaurelina	aporfina	<i>G. elata</i> R.E. Fr.		(HSU et al., 1977)
	aporfina	<i>G. dumetorum</i> R.E.Fries	leishmanicida	(MONTENEGRO et al., 2003)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
	aporfina	<i>G. amplifolia</i> Trina & Planch. <i>G. blepharophylla</i> Mart. <i>G. chrysopetala</i> (Steud.) Miq. <i>G. diospyroides</i> Baill. <i>G. hispida</i> R.E. Fr. <i>G. lehmannii</i> R.E. Fr. <i>G. ouregou</i> Dunal <i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.	leishmanicida	(COSTA et al., 2010; COSTA et al, 2012; CORTES et al., 1986; HOQUEMILLER et al., 1984b; LÓPEZ et al., 1992; MONTENEGRO et al., 2003; SAEZ; BLAIR; SAEZ, 1997; RASAMIZAFY et al., 1986)
(-)-nornuciferina	aporfina	<i>G. diospyroides</i> Baill. <i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986; LÓPEZ et al., 1992)
desidro-nornuciferina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
3-hidróxi-nornuciferina	aporfina	<i>G. melosma</i> Diels		(ABD-EL ATTI et al., 1982)
(-)-hidróxi-3-nornuciferina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
(-)-3-hidróxi-nornuciferina	aporfina	<i>G. foliosa</i> Benth. <i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.	antiparasitário	(CASTEDO et al., 1991; MAHIOU et al., 1994; TADIC et al., 1987)
(-)-N-formil-nornuciferina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
norpredicentrina	aporfina	<i>G. juruensis</i> Diels <i>G. scandens</i> Ducke		(HOCQUEMILLER, RASAMIZAFY; CAVÉ., 1982b; LIMA et al., 2003)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
nuciferidina	aporfina	<i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.		(RASAMIZAFY; HOCQUEMILLER; CAVÉ., 1986)
(-)-nuciferina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES <i>et al.</i> , 1986)
(-)-hidróxi-3-nuciferina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES <i>et al.</i> , 1986)
(-)-metóxi-3-nuciferina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES <i>et al.</i> , 1986)
(+)-2'-nortiliageina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. guianensis</i> (Aubl.) R.E.Fr.		(BERTHOU <i>et al.</i> , 1988)
onichina	aporfina	<i>G. dielsiana</i> R.E. Fr.		(CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; GOULART <i>et al.</i> , 1986;)
6-metóxi-onichina	azafluorena	<i>G. dielsiana</i> R.E. Fr.		(GOULART <i>et al.</i> , 1986; TADIC <i>et al.</i> , 1987)
ouregidiona	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES <i>et al.</i> , 1986)
(-)-oureguatina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES <i>et al.</i> , 1986)
pallidina	aporfina	<i>G. melosma</i> Diels		(ABD-EI_ATTI <i>et al.</i> , 1982)
(-)-pallidina	aporfina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		(CASTEDO <i>et al.</i> , 1991)
palmatina	protoberberina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(RODRÍGUEZ; BASTIDAS; HASEGAWA., 2007)
(-)-tetra-hidro-palmatina	protoberberina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
pentouregina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al, 1985b)
(-)-pentouregina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal		(CORTES et al., 1986)
puertogalina-a	bisbenzilisoquinolina	<i>G. boliviana</i> H.J.P. Winkl.	antiparasitário	(MAHIOU et al., 2000)
puertogalina-b	bisbenzilisoquinolina	<i>G. boliviana</i> H.J.P. Winkl.	antiparasitário antitumoral	(MAHIOU et al., 2000)
puterina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. discolour</i> R.E. Fr. <i>G. elata</i> R.E. Fr. <i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CARVALHO-BAY MA et al., 1987; HSU et al., 1977b); RODRÍGUEZ et al., 1984)
(-)-puterina	aporfina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a)
(-)-3-metóxi-puterina	aporfina	<i>G. foliosa</i> Benth.		(MAHIOU et al., 1994)
3-metóxi-oxo-puterina	aporfina	<i>G. foliosa</i> Benth.	antiparasitário	(MAHIOU et al., 1994)
(-)-N-formil-puterina	aporfina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a)
(-)-N-metil-puterina	aporfina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES et al., 1985a)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
oxo-puterina	aporfina	<i>G. calva</i> R.E. Fr. <i>G. elata</i> R.E. Fr. <i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CARVALHO-BAYMA et al., 1987 CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a; HSU et al., 1977a; RODRÍGUEZ et al., 1999)
reticulina	benzilisoquinolínico	<i>G. juruensis</i> Diels <i>G. poeppigiana</i> Mart. <i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CARVALHO-BAYMA et al., 1987; LIMA et al., 2004; LIMA et al., 2003)
(+)-reticulina	benzilisoquinolina	<i>G. goudotiana</i> Triana & Planch.		CASTEDO et al., 1991;
(-)-roemerina	aporfina	<i>G. oliviformis</i> Donn. Sm. <i>G. modesta</i> Diels		(AMMAR; SCHIFF; SLATKIN, 1983; LÓPEZ et al., 1990)
(-)-roemerolina	aporfina	<i>G. tonduzii</i> Diels		(LÓPEZ et al., 1990)
subsessilina	aporfina	<i>G. ouregou</i> Dunal <i>G. subsessilis</i> Mart.		(HASEGAWA et al., 1972)
taicanina	protoberberina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(RODRÍGUEZ; BASTIDAS; HASEGAWA., 2007)
(+)-tiliageina	bisbenzilisoquinolina	<i>G. guianensis</i> (Aubl.) R.E.Fr.	antitumoral	(BERTHOU et al., 1988, MAHIOU et al., 2000)
trichoguatina	aporfina	<i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.		(RASAMIZAFY; HOCQUEMILLER; CAVÉ., 1986)

continua

continuação **Quadro 3.** Ocorrência de alcaloides no gênero *Guatteria* e as atividades biológicas reportadas

alcaloide	tipo de esqueleto	espécie	atividade biológica	referência
xilopina	aporfina	<i>G. amplifolia</i> Triana & Planch. <i>G. scandens</i> Ducke	leishmanicida	(CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ 1982b; MONTENEGRO et al., 2003)
(-)-xilopina	aporfina	<i>G. schomburgkiana</i> Mart.		(CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a)
xilopinina	protoberberina	<i>G. scandens</i> Ducke		(CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b)
oxo-xilopina	aporfina	<i>G. calva</i> R.E. Fr.		RODRÍGUEZ et al., 1999
alcaloides totais		<i>G. australis</i> A.St.-Hill	antimalárico	(FISCHER et al., 2004)
alcaloides totais		<i>G. lehmannii</i> R.E. Fr.	antimalárico	(SAEZ; BLAIR; SAEZ, 1997)

Pode-se observar (Quadro 3) que vários alcaloides isolados de *Guatteria* spp. apresentaram atividade antimicrobiana, antitumoral, antioxidante, antimalárica e antiparasitária, entre outras. Alguns deles são utilizados para tratamento da hipercolesterolemia, colelitíase e da doença de Alzheimer e de Parkinson. Os exemplos das estruturas dos alcaloides de *Guatteria* biologicamente ativos são mostradas no Quadro 4.

Quadro 4. Estruturas e atividades biológicas de alcaloides encontrados em espécies de *Guatteria*

alcaloide	estrutura	atividade	referência
antioquina		antitumoral	(MAHIOU et al., 2000)
oxo-estefanina		antitumoral	(GUINAUDEAU, 1988; GUINAUDEAU.; LEBOEUF; CAVÉ, 1994; RODRÍGUEZ et al., 1999)
guatebolina		antiparasitário antitumoral	(MAHIOU et al., 2000)
isocorituberina		antimicrobiana	(GUINAUDEAU, 1983; SUESS; STERMITZ., 1981; WENIGER et al., 2000)

continua

continuação **Quadro 4.** Estruturas e atividades biológicas de alcaloides encontrados em espécies de *Guatteria*

alcaloide	estrutura	atividade	referência
liriodenina		antimicrobiana antimalárica	(ABD-EL_ ATTI et al., 1982; AMMAR; SCHIFF; SLATKIN, 1983; CARVALHO-BAYMA et al., 1987; CASTEDO et al., 1991; CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a; COSTA et al., 2009; COSTA et al., 2010; GOULART et al., 1986; GOULART et al., 1987; GUINAUDEAU.; LEBOEUF; CAVÉ, 1979, 1994; HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ 1982b; LÓPEZ et al., 1990; PHOEBE et al., 1980; WENIGER et al., 2000; ZHANG et al., 2002)
lisicamina		antioxidante antimicrobiana	(CALVÉ et al, 1989; CORTES et al., 1986; COSTA et al., 2010; GARBARINO; PETZALL; SALAZAL, 1984; GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ 1979; LIMA et al., 2004; MONTENEGRO et al, 2003; ZHANG et al., 2002)
O-metil-moschatolina		antimicrobiana antimalárica	(CORTES et al., 1986; GOULART et al., 1986; LIMA et al., 2004; LÓPEZ et al., 1990, LÓPEZ et al., 1992; WENIGER et al., 2000)
puertogalina-b		antitumoral antiparasitário	(MAHIOU et al., 2000; MISHRA et al., 2009)

1.3.2. Flavonoides de *Guatteria*

Outra classe importante de fármacos de origem vegetal é constituída pelos compostos fenólicos. Esses compostos possuem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamentos hidroxila, associados diretamente ao anel aromático. Compostos fenólicos constituem uma variedade de formas químicas e podem ser classificados, de acordo com o tipo do esqueleto básico, em fenóis simples, ácidos fenólicos, acetofenonas, ácidos cinâmicos,

cumarinas, cromonas, xantonas, estilbenos, flavonoides, lignanas, ligninas e taninos, entre outros (ZUANAZZI e MONTHANA, 2010).

Os compostos fenólicos são sintetizados de várias maneiras. A maior parte dos compostos fenólicos são biossintetizados a partir da via do ácido chiquímico. Já os flavonoides apresentam uma biossíntese mista sendo também derivados do ácido malônico (Figura 7). Existe ainda uma classe de substâncias fenólicas, a traquinonas, que são derivadas do acetato-malonato. A via do ácido chiquímico se inicia com condensação de eritrose-4-fosfato com ácido fosfo-enolpirúvico. A fenilalanina é derivada dessa rota, sendo utilizada para geração de flavonoides. O ácido cinâmico é formado a partir da fenilalanina através da enzima fenilalanina amônialiase. Os ácidos fenilpropanoídicos são formados a partir dos aminoácidos aromáticos, os quais são os precursores dos flavonoides, que possuem uma biossíntese mista. As antocianinas são as últimas formadas, concluindo a rota de formação dessas substâncias (SARTORI, 2011; DEWICK, 2009).

Figura 7. Origem biossintética de fenóis simples e flavonoides

(SARTORI, 2011; DEWICK, 2009)

Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides (flavonas, flavonóis, taninos condensados e antocianinas) são amplamente distribuídos no reino vegetal, tendo mais de 8000 compostos conhecidos. Eles atuam em plantas como antioxidantes, antimicrobianos, fotorreceptores, atratores visuais e repelentes, entre outros. Muitos estudos sugeriram que os flavonoides possuem atividades biológicas, incluindo antialérgica, antiviral e antiinflamatória. Entretanto, na maioria das vezes, esse grupo de metabólitos é associado com atividade antioxidante por sua capacidade de reduzir a formação e de sequestrar radicais livres (PIETTA, 2000).

Existem poucos relatos sobre flavonoides em espécies de Annonaceae. Santos e Salatino (2000) listaram 76 flavonas e flavonóis das folhas de Annonaceae, sendo a maior parte glicosídeos. De acordo com esse estudo, todos os fenóis encontrados foram glicosídeos de flavonas (apigenina, escutelareina, hispidulina e luteolina) ou de flavonóis (canferol, ramnocitrina, 6-hidróxi-ramnocitrina, quercetina, isoramnetina e ramnetina), com predominância da quercetina (Figura 8). Vários desses flavonoides foram também isolados de *Guatteria* spp. (Quadro 5). A variedade de estruturas encontradas corresponde a presença de mono-, di- e triglicosídeos de diferentes açúcares e a glicosilação nas posições 3, 3/7 ou 3/ 7/ 3'. Além disso, pode ser observada em algumas espécies a oxigenação nas posições 6 e O-metilação dos anéis A e B (SANTOS E SALATINO, 2000).

Alguns dos flavonoides encontrados em *Guatteria* são biologicamente ativos. As estruturas dos flavonoides com atividades biológicas, isolados de espécies de *Guatteria*, estão mostrados no Quadro 6.

Figura 8. Ocorrência das geninas que dão origem aos flavonoides isolados de espécies de Annonaceae

(NUNES et al., 2012)

Quadro 5. Ocorrência de flavonóis no gênero *Guatteria*

nome	espécies
Canferol-3- <i>O</i> -arabinosídeo	<i>G. rupestris</i> Mello-Silva & Pirani , <i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Canferol-3- <i>O</i> -galactosilglicosídeo	<i>G. australis</i> A.St.-Hill
Canferol-3- <i>O</i> -glicosilglicosídeo	<i>G. australis</i> A.St.-Hill
Canferol-3- <i>O</i> -glicosídeo	<i>G. rupestris</i> Mello-Silva & Pirani, <i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Canferol-3- <i>O</i> -glicosilramnosídeo	<i>G. rupestris</i> Mello-Silva & Pirani
Canferol-3- <i>O</i> -ramnosilglicosídeo	<i>G. rupestris</i> Mello-Silva & Pirani
Canferol-3- <i>O</i> -glicose-ramnose-ramnose	<i>G. australis</i> A.St.-Hill
Canferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo	<i>G. rupestris</i> Mello-Silva & Pirani
Isoramnetina-3- <i>O</i> -glicosilglucosídeo	<i>G. sellowiana</i> Schldtl., <i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Isoramnetina-3- <i>O</i> -ramnosilglicosídeo	<i>G. sellowiana</i> Schldtl., <i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.

continua

continuação **Quadro 5.** Ocorrência de flavonóis no gênero *Guatteria*

nome	espécies
Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo	<i>G. australis</i> A.St.-Hill, <i>G. notabilis</i> Mello-Silva & Pirani , <i>G. rupestris</i> Mello-Silva & Pirani, <i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Quercetina-3- <i>O</i> - glicosilglicosídeo	<i>G. australis</i> A.St.-Hill
Quercetina-3- <i>O</i> -glicosídeo-7- <i>O</i> -glicosídeo	<i>G. australis</i> A.St.-Hill,
Quercetina-3- <i>O</i> -arabinosídeo	<i>G. sellowiana</i> Schltdl., <i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Quercetina-3- <i>O</i> -arabinosilglucuronídeo	<i>G. notabilis</i> Mello-Silva & Pirani
Quercetina-3- <i>O</i> -arabinosilramnosídeo	<i>G. notabilis</i> Mello-Silva & Pirani
Quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo	<i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo-7- <i>O</i> -galactosídeo	<i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Quercetina-3- <i>O</i> -glicosilglicosídeo	<i>G. notabilis</i> Mello-Silva & Pirani
Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo	<i>G. pogonopus</i> Mart., <i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosilglicosídeo	<i>G. rupestris</i> Mello-Silva & Pirani, <i>G. sellowiana</i> Schltdl., <i>G. villosissima</i> A.St.-Hil.
Quercetina-3- <i>O</i> -arabinosídeo-7- <i>O</i> -arabinosídeo	<i>G. pogonopus</i> Mart.
Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo-7- <i>O</i> - ramnosídeo	<i>G. pogonopus</i> Mart.
Quercetina-3- <i>O</i> -glicosilramnosídeo	<i>G. rupestris</i> Mello-Silva & Pirani, <i>G. sellowiana</i> Schltdl.
Quercetina-3- <i>O</i> -arabinosídeo-7- <i>O</i> -arabinosídeo--3'- <i>O</i> -arabinosídeo	<i>G. pogonopus</i> Mart.
Quercetina-3-7- <i>O</i> -(arabinose-glucose)	<i>G. sellowiana</i> Schltdl.
Quercetina-3-7- <i>O</i> -(arabinose-xilose)	<i>G. sellowiana</i> Schltdl.

(NUNES et al., 2012; SANTOS e SALATINO, 2000)

Quadro 6. Estruturas e atividades biológicas de flavonoides encontrados em espécies de *Guatteria*

composto	estrutura	atividade	referência
Canferol-3- <i>O</i> -ramnosídeo		antidiabética antiglicação	(LAL SHYAULA et al., 2012; NUNES et al., 2012; HABTEMARIAM, 2011; SANTOS e SALATINO, 2000)
Quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo		antioxidante	(NUNES et al., 2012; RAZAVI et al., 2009; SANTOS e SALATINO, 2000)
Quercetina-3- <i>O</i> -ramnosídeo		antioxidante	(NUNES et al., 2012; FREITAS, 2010; SANTOS e SALATINO, 2000)

1.3.3. Óleos essenciais de *Guatteria*

Óleos essenciais possuem papel importante na indústria farmacêutica e cosmética pela razão de suas atividades biológicas. Os óleos essenciais têm uma composição complexa e contêm uma variedade de moléculas voláteis, como terpenos, terpenoides, compostos aromáticos derivados de fenol e alifáticos. Os terpenos, os compostos de óleos essenciais mais comuns, podem ser classificados de acordo com o número de isoprenos que os constituem: hemiterpenóides (C_5), monoterpenoides (C_{10}), sesquiterpenoides (C_{15}), diterpenoides (C_{20}), triterpenoides (C_{30}), tetraterpenoides (C_{40}) e politerpenoides ($>C_{40}$).

Esses compostos são biossintetizados por via do ácido mevalônico ou do metileritritol fosfato (Figura 9). Na rota do ácido mevalônico, três moléculas de acetil CoA se ligam para formar o ácido mevalônico. A seguir, essa molécula é difosforilada, descarboxilada e desidratada para formar o difosfato de isopentenila, a unidade básica na formação dos terpenos. Esse composto pode também ser formado a partir de intermediário da glicose ou do ciclo de redução

fotossintética do carbono, através da via do metileritritol fosfato. O gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato se combinam para formar um intermediário, o qual forma na sequência o difosfato de isopenenila. O difosfato de isopenenila e seu isômero, o difosfato dimetil-alila, são as unidades de 5 carbonos envolvidas na biossíntese dos terpenos (JAKIEMIU, 2008).

Os óleos essenciais têm funções ecológicas como inibidores da germinação, proteção contra predadores, atração de polinizadores, proteção contra a perda de água e aumento da temperatura. Os óleos de algumas espécies de *Guatteria* já foram pesquisados quimicamente. A revisão de compostos majoritários (>5%) (FOURNIER et al., 1997) de óleos essenciais de *Guatteria* spp. está apresentada no Quadro 7.

Além das funções biológicas e ecológicas para o vegetal, os óleos essenciais também apresentam atividades farmacológicas, podendo atuar como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e herbicidas. Desde da Idade Média, os óleos essenciais foram amplamente utilizados por causa de suas atividades biológicas (SIMÕES e SPITZER, 2010, BAKKALI et al., 2008). De acordo com os estudos anteriores, os óleos de *Guatteria* spp., também, apresentaram atividades biológicas: *G. diospyroides*, *G. oliviformis* e *G. pogonopus* (antitumoral e antibacteriana), *G. hispida* (antitumoral), e *G. australis* (antiparasita) (SIQUEIRA et al., 2015; FONTES et al., 2013; PALAZZO et al., 2009). Adicionalmente, vários dos compostos isolados de óleos essenciais de espécies de *Guatteria* foram biologicamente ativos (Quadro 8).

Figura 9. Origem biossintética de terpenos

(JAKIEMIU, 2008)

Quadro 7. Principais compostos encontrados nos óleos essenciais de espécies de *Guatteria*

composto	tipo de esqueleto	espécies	referência
α -cadinol	sesquiterpeno	<i>G. ouregou</i> Aubl.	(FOURNIER et al., 1997)
α -eudesmol	sesquiterpeno	<i>G. friesiana</i> W.A. Rodrigues	(COSTA et al., 2008)
α -humuleno	sesquiterpeno	<i>G. wachenheim</i> Benoist	(FOURNIER et al., 1997)
α -pineno	monoterpeno	<i>G. costaricensis</i> R.E. Fr., <i>G. microcalyx</i> R.E. Fr.	(MAIA et al., 2005; PALAZZO et al., 2009)
β -cariofileno	sesquiterpeno	<i>G. wachenheim</i> Benoist, <i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.	(FOURNIER et al., 1997)
β -eudesmol	sesquiterpeno	<i>G. friesiana</i> W.A. Rodrigues	(COSTA et al., 2008)
β -pineno	monoterpeno	<i>G. costaricensis</i> R.E. Fr., <i>G. pogonopus</i> Mart., <i>G. microcalyx</i> R.E. Fr.	(FONTES et al., 2013; MAIA et al., 2005; PALAZZO et al., 2009)
γ -eudesmol	sesquiterpeno	<i>G. friesiana</i> W.A. Rodrigues	(COSTA et al., 2008)
γ -patchouleno	sesquiterpeno	<i>G. pogonopus</i> Mart.	(FONTES et al., 2013)
γ -terpineno	monoterpeno	<i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.	(FOURNIER et al., 1997)
δ -3-careno	monoterpeno	<i>G. wachenheim</i> Benoist	(FOURNIER et al., 1997)
(E)-cariofileno	sesquiterpeno	<i>G. pogonopus</i> Mart., <i>G. australis</i> A.St.-Hill., <i>G. dispyroides</i> Baill., <i>G. costaricensis</i> R.E. Fr.	(FONTES et al., 2013; PALAZZO et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2015)
(E)- β -Ocimeno	monoterpeno	<i>G. dispyroides</i> Baill.	(PALAZZO et al., 2009)
p-cimeno	monoterpeno	<i>G. sagotiana</i> R.E. Fr.	(FOURNIER et al., 1997)
(Z)- β -Ocimeno	monoterpeno	<i>G. dispyroides</i> Baill.	(PALAZZO et al., 2009)
Borneol	monoterpeno	<i>G. wachenheim</i> Benoist	(FOURNIER et al., 1997)
Epóxido de humuleno II	sesquiterpeno	<i>G. blepharophylla</i> Mart.	(MAIA et al., 2005)
Espatulenol	sesquiterpeno	<i>G. juruensis</i> Diels., <i>G. poeppigiana</i> Mart., <i>G. schomburkiana</i> Mart., <i>G. wachenheim</i> Benoist, <i>G. ouregou</i> Aubl.	(FOURNIER et al., 1997; MAIA et al., 2005; TRIGO et al., 2007)
Germacreno B	sesquiterpeno	<i>G. australis</i> A.St.-Hill.	(SIQUEIRA et al., 2015)
Germacreno D	sesquiterpeno	<i>G. oliviformis</i> Donn.Sm., <i>G. dispyroides</i> Baill., <i>G. australis</i> A.St.-Hill.,	(PALAZZO et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2015)

continua

continuação **Quadro 7.** Principais compostos encontrados nos óleos essenciais de espécies de *Guatteria*

composto	tipo de esqueleto	espécies	referência
Limoneno	monoterpeno	<i>G. wachenheim</i> Benoist	(FOURNIER et al., 1997)
Óxido de cariofileno	sesquiterpeno	<i>G. blepharophylla</i> Mart., <i>G. microcalyx</i> R.E. Fr., <i>G. ouregou</i> Aubl., <i>G. schomburkiana</i> Mart., <i>G. sagotiana</i> R.E. Fr., <i>G. wachenheim</i> Benoist	(FOURNIER et al., 1997; MAIA et al., 2005; TRIGO et al., 2007)
Khusinol	sesquiterpeno	<i>G. poeppigiana</i> Mart.	(MAIA et al., 2005)

Quadro 8. Estruturas e atividades biológicas de compostos encontrados em óleos essenciais de espécies de *Guatteria*

composto	estrutura	atividade	referência
(<i>E</i>)-cariofileno		antitumoral	(FONTES et al., 2013; PALAZZO et al., 2009; SIQUEIRA et al., 2015)
α -eudesmol		antitumoral	(BRITTO et al., 2012; COSTA et al., 2008)
β -eudesmol		antitumoral	(BRITTO et al., 2012)
γ -eudesmol		antitumoral	(BRITTO et al., 2012)

continua

continuação **Quadro 8.** Estruturas e atividades biológicas de compostos encontrados em óleos essenciais de espécies de *Guatteria*

composto	estrutura	atividade	referência
Germacreno D		antitumoral	(PALAZZO et al., 2009)
α -pineno		antitumoral, larvicida	(PALAZZO et al., 2009; SIMAS et al., 2004)
β -pineno		antitumoral, larvicida	(PALAZZO et al., 2009; SIMAS et al., 2004)

1.4. *Guatteria elliptica* R. E Fries

G. elliptica R. E. Fries é uma das espécies endêmicas do Brasil, tendo seu domínio fitogeográfico na Mata Atlântica e Amazônia, mas sua distribuição geográfica exata não é conhecida (MAAS et al., 2016; MAAS et al., 2013). Essa espécie é uma árvore ou arbusto de altura desconhecida, com folhas elípticas verdes, 10-15 x 5-6 cm, com muitos tricomas dourados na parte inferior (MAAS et al., 2001).

Na literatura pesquisada, não foram encontrados relatos sobre fitoquímica de *G. elliptica*. Porém, um estudo anterior indicou que o extrato bruto das folhas (10 mg/mL) dessa espécie, coletada na Estação Ecológica (Juréia Itatins, SP, Brasil), foi inativo frente às bactérias *Staphylococcus aureus* (gram positivo), *Escherichia coli* (gram negativo) e levedura *Candida albicans* (método de difusão em ágar), assim como em um ensaio de bioautografia com *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*. O extrato apresentou atividade antitumoral em um ensaio de reparo do DNA com cepas mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (AGRIPINO et al., 2004).

Embora a atividade antitumoral foi testada anteriormente (AGRIPINO et al., 2004), este estudo não indicou qual grupo de metabólitos secundários ou compostos seriam responsáveis pela atividade antitumoral, ou se essa atividade foi devida ao efeito sinérgico entre os componentes do extrato. Além disso, este estudo avaliou a atividade somente do extrato bruto das folhas, omitindo outras amostras de *G. elliptica* (óleo essencial, alcaloides, frações, etc.) No ensaio antimicrobiano, os resultados negativos observados frente à bactéria e à levedura podem ter ocorrido devido a uma falha do método de difusão em ágar. Nesse método, a desvantagem é que ele depende da difusão da substância testada em ágar. Como as várias substâncias presentes no extrato têm difusibilidade diferente, é possível que alguns dos compostos presentes no extrato tivessem uma difusibilidade baixa em ágar (OSTROSKY et al., 2008). O melhor método para testar a atividade antimicrobiana seria o método turbidimétrico, considerado como quantitativo. Sua vantagem é que a substância testada é diluída em meio líquido e cada microrganismo tem contato com o fármaco. Desse modo, o teste não é mais afetado pela difusibilidade da substância testada. Além disso, o método é 30 vezes mais sensível que outros encontrados na literatura e requer menor quantidade de amostras, o que permite maior número de repetições. Além disso, a leitura da inibição do crescimento de células é medida pelo método fotométrico, dando resultados mais precisos (MORENO et al., 2013; OSTROSKY et al., 2008).

2. OBJETIVOS

O objetivo desse projeto foi analisar a composição dos alcaloides e do óleo essencial de *G. elliptica* e avaliar esse material para atividades biológicas que já foram identificadas no gênero, como antioxidante, anticolinesterásica, antimicrobiana e citotóxica (células tumorais e normais).

Os metabólitos secundários do gênero *Guatteria* apresentam efeitos farmacológicos importantes, justificando um estudo mais aprofundado de *G. elliptica* que pode resultar na descoberta de novos compostos com atividades biológicas.

2.1. Objetivos específicos

- Analisar e identificar os alcaloides presentes nas folhas e nos galhos,
- Analisar o óleo essencial das folhas e identificar as estruturas secretoras,
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos, das frações e do óleo essencial utilizando o método de DPPH (qualitativo e quantitativo),
- Avaliar atividade anticolinesterásica dos extratos e das frações por bioautografia,
- Avaliar atividade antimicrobiana dos extratos, das frações e do óleo essencial por bioautografia e método turbidimétrico,
- Avaliar atividade citotóxica dos extratos, das frações, das amostras isoladas e do óleo essencial pelo ensaio da Sulforodamina B à frente de células tumorais humanos de próstata e de mama,
- Avaliar a segurança dos extratos, das frações, das amostras isoladas e do óleo essencial por teste de citotoxicidade *in vitro* utilizando células normais de fibroblastos de camundongos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Folhas e galhos de *G. elliptica* (Figura 10) foram coletados sob autorização da Prefeitura Municipal de Santo André, Subprefeitura de Paranapiacaba e Parque Andreense (Ofício 142/05–GRN–DP) em julho de 2010 e 2012 no Parque Natural Municipal das Nascentes de Paranapiacaba, uma região da Mata Atlântica localizada em Paranapiacaba, Santo André, SP, Brasil.

Figura 10. Ramo folhar e os frutos (no início de frutificação) de *Guatteria elliptica* coletados no Parque Natural Municipal Nascentes de Paranapiacaba

(P.R.H. Moreno[®])

O Parque Natural Municipal das Nascentes de Paranapiacaba, criado em 2003, é uma área de conservação ambiental da Mata Atlântica e faz limite com o Parque Estadual da Serra do Mar–Núcleo Cubatão e próximo à Reserva Biológica do Alto da Serra. O Parque é localizado nas coordenadas 23° 46' 41'' S e 46° 18' 16'' W, possuindo uma área total de aproximadamente 400 ha e com altitudes que variam entre 780 m a 1174 m (Figura 11) (LIMA, 2007).

No Parque cresce uma Floresta Ombrófila Densa Montana, que é uma mata sempre verde (perenifólia), com dossel de 20 a 30 m, árvores emergentes de até 40 m de altura e densa

As folhas e os galhos foram coletados sob supervisão do biólogo Dr. Marcos E. L. Lima em pequena quantidade de cada árvore para não causar danos ao indivíduo. Os números de árvores e parcelas onde as plantas foram coletadas são listados no Quadro 9. Diferentes partes da planta foram coletadas para a pesquisa porque, de acordo com estudos anteriores, podem conter alcaloides, e outros metabólitos secundários, diversos (CASTEDO et al., 1991).

Todos os indivíduos foram taxonomicamente confirmados pela Dra. Inês Cordeiro e depositados no herbário do Instituto de Botânica de São Paulo como um voucher espécime LIMA 1790.

O material vegetal fresco foi limpo de impurezas e depois seco em temperatura ambiente durante três semanas. Posteriormente, o material foi moído usando um Moinho de Facas, tipo Croton (Tecnal TE-625), localizado no Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

Quadro 9. Parcelas e subparcelas do Parque Natural Municipal das Nascentes de Paranapiacaba, e números de árvores de *Guatteria elliptica* coletadas

parcela	subparcela	nº árvore	comentário
P1	A0	12	coletado em julho de 2010 e 2012
P1	A0	14	coletado em julho de 2010 e 2012
P1	E0	1250	coletado em julho de 2012
P1	E0	1258	coletado em julho de 2012
P1		1274	coletado em julho de 2012
P2	G0	1624	coletado em julho de 2012,
fora de parcela E0	-	prox. 1250	árvore 1 sem identificação
fora de parcela E0	-	prox. 1250	coletado em julho de 2012, árvore 2 sem identificação
fora de parcela	-	100 m da entrada da Água Fria	coletado em julho de 2012, árvore 3 sem identificação

3.2. Análise química

3.2.1. Extração de óleo essencial

Óleo essencial foi extraído a partir das folhas secas por método de hidrodestilação (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

Cerca 100 g das folhas secas e 1,5 L de água destilada foram colocadas em balão de fundo redondo, com capacidade de 3 L. A hidrodestilação ocorreu durante 4 h, em sistema de vidro do tipo Clevenger, acoplado a um sistema de refrigeração. O óleo foi recolhido sobre a água, e depois seco com sulfato de sódio anidro. O óleo foi pesado e seu rendimento foi calculado em comparação com material vegetal seco. Após a pesagem, o óleo foi armazenado em freezer, na temperatura -25 °C. O procedimento foi repetido 4 vezes, utilizando um total de 403,2 g das folhas secas.

O estudo anatômico das folhas foi realizado para identificar as estruturas secretoras. Os cortes histológicos transversais foram feitos à mão livre. Os cortes obtidos foram descoloridos em solução água/água sanitária (1:1) por 5 minutos e depois lavados com água destilada. Posteriormente, os cortes foram submetidos a processo de coloração com Azul de Astra 0,5% em ácido tartárico, Sudam III e Safranina (RIO et al, 2014; OLIVEIRA, AKISUE, 2009). Depois, os cortes foram observados no microscópio óptico e fotografados.

3.2.2. Extração de alcaloides

Alcaloides foram extraídos a partir do material vegetal seco em pó usando etanol (CASTEDO et al., 1991; CORTES et al., 1985b; COSTA et al., 2010; DJILANI et al., 2006; MAHIOU et al., 1994; ZHANG et al., 2002).

O pó obtido das folhas e dos galhos moídos foi extraído separadamente com álcool etílico hidratado (92,8° INPM) por meio de aparelho *Accelerated Solvent Extractor*, ASE 300, marca DIONEX (ASE), localizado no Instituto de Botânica, São Paulo, SP, colocando aproximadamente 30 g de material em cada cela. A extração ocorreu à pressão, temperatura e tempo controlados, e durou 15 minutos por cela à 60 °C. As condições da extração são resumidas no Quadro 10.

Após, a solução etanólica foi concentrada sob pressão reduzida em evaporador rotatório (BUCHI, Mod. R-114) para obtenção do extrato bruto (EB). Posteriormente, o EB foi ressuspensionado com uma solução de ácido clorídrico (10 % v/v) e, em seguida, filtrado resultando uma solução aquosa ácida (SAA) e torta (T) para futura partição. SAA foi lavada três vezes com *n*-hexano para a remoção de substâncias lipofílicas, resultando em uma solução aquosa ácida lavada (SAAL) e retirando o resíduo hexânico (RH). RH foi seco, concentrado e armazenado. SAAL foi ajustada até pH 9 com uma solução de hidróxido de amônio (25 % v/v), o que gerou a solução aquosa lavada alcalizada (SALA). Em seguinte, SALA foi extraída com clorofórmio até que o teste com Reagente de Dragendorff desse negativo (esgotamento dos alcaloides), resultando na fase clorofórmica (FC) e na fase aquosa alcalina (FAA). A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro e o solvente foi eliminado sob pressão reduzida dando origem os alcaloides totais (AT) (FISHER et al., 2004; GOULART et al., 1986; RINALDI, 2007; RODRÍGUEZ et al., 2007; ZABEL et al., 1982). O processo de extração está apresentado na Figura 12.

Quadro 10. As condições da extração dos extratos brutos das folhas e galhos de *Guatteria elliptica* por meio de aparelho Accelerated Solvent Extractor

parâmetros	condições
solvente	álcool etílico hidratado (92,8° INPM)
material por cela	30 g
pressão	1500 psi
temperatura	60 °C
tempo por cela	15 minutos

Figura 12. Esquema do processo da extração de alcaloides totais dos folhas e dos galhos de *Guatteria elliptica*

3.2.3. Fracionamento da torta

A parte do EB livre de alcaloides, que não foi solúvel em ácido clorídrico na extração de AT, foi denominada de Torta (T) e submetida a fracionamento pelo método de partição com solventes de polaridade crescente.

Parte das tortas das folhas (24,53 g) e dos galhos (16,40 g) foram separadamente colocadas em um béquer de 300 mL com 100 mL de *n*-hexano sob agitação, por 30 minutos. O procedimento foi repetido três vezes. As frações foram combinadas, concentradas e pesadas, dando frações hexânicas da torta das folhas (THF) e dos galhos (THG). Depois, o mesmo processo foi reproduzido para os solventes clorofórmio e acetato de etila, dando as frações: clorofórmica da torta das folhas (TCF) e dos galhos (TCG), e de acetato de etila da torta das folhas (TAF) e dos galhos (TAG). No final, o restante do resíduo foi solubilizado em solução hidroalcoólica 20 % e, depois, colocado em um béquer de 300 mL com 100 mL de *n*-butanol sob agitação por 30 minutos. O procedimento foi repetido três vezes. As frações foram combinadas, concentradas e pesadas, dando frações butanólica da torta das folhas (TBF) e dos galhos (TBG).

3.2.4. Pesquisa de flavonoides

As frações da partição da torta (THF, THG, TCF, TCG, TAF, TAG, TBF, TBG), os extratos brutos (EBF e EBG) foram analisados para a presença de flavonoides através de cromatografia em camada delgada (CCD) pelo reagente visualizador NP-PEG (difenilboriloxietilamina 1,0% em metanol, seguida de solução de polietilenoglicol 4000 5,0% em etanol) (WAGNER e BLADT, 2001).

As frações da partição da torta (100 µg em 5 µL de solvente) e os extratos brutos (200 µg em 5 µL de solvente) foram submetidos à CCD em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), utilizando sistemas de solventes adequados (Quadro 11) e quercetina (2,5 µg) como controle positivo. Após a eliminação do solvente, os cromatogramas foram revelados com a solução NP/PEG. As manchas fluorescentes observadas em luz ultravioleta UV-360 nm foram indicativas da presença de flavonoides (WAGNER; BLADT, 2001). Os resultados foram registrados fotograficamente.

Quadro 11. Sistemas de solventes de cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ usados para determinar de presença de flavonoides nos extratos e frações de *Guatteria elliptica*

amostra	sistema de solventes (v/v)
EBF e EBG	clorofórmio-metanol (95:5)
THF e THG	hexano-acetona (8:2)
TCF e TCF	clorofórmio-acetato de etila-metanol (6:3:1)
TAF e TAG	clorofórmio-acetato de etila-metanol (6:3:1)
TBF e TBG	acetato de etila-ácido fórmico-água (100:20:26)

EBF-extrato bruto das folhas, **EBG**-extrato bruto dos galhos, **THF**-fração hexânica da torta das folhas, **THG**-fração hexânica da torta dos galhos, **TCF**-fração clorofórmica de torta das folhas, **TCG**-fração clorofórmica de torta dos galhos, **TAF**-fração de acetato de etila da torta das folhas, **TAG**-fração de acetato de etila da torta dos galhos, **TBF**-fração butanólica da torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos (WAGNER e BLADT, 2001).

3.2.5. Isolamento e purificação de alcaloides

Os alcaloides totais (ATF e ATG) de *G. elliptica* foram submetidos ao fracionamento por meio de cromatografia em coluna sobre gel de sílica, gradualmente aumentando a polaridade do eluente.

3.2.5.1. Isolamento e purificação de alcaloides das folhas

Foi realizado fracionamento de ATF de *G. elliptica* por meio de cromatografia em coluna sobre gel de sílica, gradualmente aumentando a polaridade do eluente, semelhante ao método descrito por RINALDI (2007). Para esse procedimento, foi usada como suporte uma coluna de vidro (altura: 29 cm, diâmetro: 3 cm) e 100 g de sílica gel 60 (Merck; 0,063-0,200 mm), como fase estacionária.

ATF (cerca de 1 g) foi dissolvida em 5 mL de metanol e adicionada no topo da coluna seca, sob pressão (Coluna 1). Os solventes usados como eluente estão listados no Quadro 12. As frações foram coletadas a cada 200 mL, secas e guardadas.

Quadro 12. Sistema de solventes usados para fracionamento de alcaloides totais das folhas de *Guatteria elliptica* por meio de cromatografia em coluna sobre gel de sílica (Coluna 1)

sistema de solvente (v/v)	volume (mL)	frações
clorofórmio (100%)	400	F1, F2
clorofórmio-metanol (9:1)	800	F3, F4, F5, F6
clorofórmio-metanol (8:2)	800	F7, F8, F9, F10
clorofórmio-metanol (7:3)	800	F11, F12, F13, F14
clorofórmio-metanol (1:1)	800	F15, F16, F17, F18
metanol (100%)	400	F19, F20

As frações F4 (0,0834 g), F5 (0,1571 g), F6 (0,0654 g) apresentaram presença de vários compostos e por isso foram adicionalmente fracionadas por meio de cromatografia em coluna seca, sob pressão (Coluna 2). A quantidade de sílica gel 60 e os volumes das frações coletadas foram calculados proporcionalmente à massa da amostra (1:100 m/m) em comparação da Coluna 1. Cada fração, que foi adicionalmente fracionada (F4, F5 e F6) resultou em 40 frações novas (F4/5/6.1*-F4/5/6.40*) (Quadro 13). As frações foram secas e guardadas.

Quadro 13. Sistema de solventes usados para fracionamento das frações F4, F5 e F6 (obtidas da Coluna 1) dos alcaloides totais das folhas de *Guatteria elliptica* por meio de cromatografia em coluna sobre gel de sílica (Coluna 2)

sistema de solvente (v/v)	ATF
clorofórmio (100%)	F4/5/6.1*-F4/5/6.10*
clorofórmio-metanol (95:5)	F4/5/6.11*-F4/5/6.30*
clorofórmio-metanol (90:10)	F4/5/6.31*-F4/5/6.35*
clorofórmio-metanol (85:15)	F4/5/6.36*
clorofórmio-metanol (80:20)	F4/5/6.37*
clorofórmio-metanol (60:40)	F4/5/6.38*
clorofórmio-metanol (1:1)	F4/5/6.39*
metanol (100%)	F4/5/6.40*

ATF- alcaloides totais das folhas, *-frações obtidas por fracionamento adicional na coluna cromatográfica 2

O procedimento de fracionamento de ATF de *G. elliptica* por meio de cromatografia em coluna foi repetido três vezes, utilizando-se um total de 2,81 g de ATF. Os alcaloides das folhas foram isolados e purificados utilizando cromatoplasas (20 x 20 cm) com 1 mm de camada de sílica gel 60 com indicador de fluorescência F₂₅₄ da Merck. Cada fração obtida na extração por coluna cromatográfica foi submetida a cromatografia de camada delgada preparativa (CCDp). As amostras foram solubilizadas em solvente orgânico e aplicadas na placa. Uma mistura de clorofórmio/metanol foi utilizada como eluente dependendo da polaridade da fração (Quadro 14). As placas foram eluídas em cuba de vidro saturada, contendo uma mistura de solventes adequada. O procedimento de purificação por meio de CCDp foi repetido até obter a purificação satisfatória.

Quadro 14. Sistema de solventes usados como eluente na cromatografia em camada delgada preparativa em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ para isolar e purificar alcaloides das folhas de *Guatteria elliptica*

sistema de solvente (v/v)	frações
clorofórmio-metanol (97:3)	F1-F3, F7
clorofórmio-metanol (85:15)	F8-F20, F4/5/6.31*-F4/5/6.40*
clorofórmio-metanol (9:1)	F4/5/6.1*-F4/5/6.30*

* frações obtidas por fracionamento adicional na coluna cromatográfica 2

Depois da eluição, as placas foram visualizadas sob luz ultravioleta (254 e 360 nm) para identificação das faixas que absorveram a luz e os alcaloides foram revelados com reagente Dragendorff. As faixas foram raspadas da placa e extraídas com clorofórmio. Os compostos isolados foram filtrados, concentrados e transferidos para um vidro âmbar. Os mesmos compostos das frações diferentes foram juntados. Foi isolada uma pequena quantidade de 8 amostras das folhas (Amostra 1-8) de *G. elliptica*. As amostras foram submetidas às análises: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN-¹H) e Cromatografia à Gás acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). O processo do isolamento e purificação de alcaloides das folhas por meio de cromatografia em coluna e CCDp está resumido no Quadro 15.

Quadro 15. Isolamento e purificação de alcaloides das folhas de *Guatteria elliptica* por meio de cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa (sílica gel 60 F₂₅₄)

amostra inicial*	Coluna 1	frações	Coluna 2	frações	CCDp	amostras isoladas
alcaloides totais das folhas	CHCl ₃ (100%)	F1	NA	NA	CHCl ₃ -MeOH (97:3)	Amostra 1 Amostra 2 Amostra 3 Amostra 4 Amostra 5 Amostra 6 Amostra 7 Amostra 8
		F2	NA	NA		
		F3	NA	NA		
	CHCl ₃ -MeOH (9:1)	F4	CHCl ₃ (100%)	F4.1*-F4.10*	CHCl ₃ -MeOH (9:1)	
			CHCl ₃ -MeOH (95:5)	F4.11*-F4.30*		
			CHCl ₃ -MeOH (9:1)	F4.31*-F4.35*	CHCl ₃ -MeOH (85:15)	
			CHCl ₃ -MeOH (85:15)	F4.36*		
			CHCl ₃ -MeOH (8:2)	F4.37*		
			CHCl ₃ -MeOH (6:4)	F4.38*		
			CHCl ₃ -MeOH (1:1)	F4.39*		
			MeOH (100%)	F4.40*		
		F5	CHCl ₃ (100%)	F5.1*-F5.10*	CHCl ₃ -MeOH (9:1)	
			CHCl ₃ -MeOH (95:5)	F5.11*-F5.30*		
			CHCl ₃ -MeOH (9:1)	F5.31*-F5.35*	CHCl ₃ -MeOH (85:15)	
			CHCl ₃ -MeOH (85:15)	F5.36*		
			CHCl ₃ -MeOH (8:2)	F5.37*		
			CHCl ₃ -MeOH (6:4)	F5.38*		
			CHCl ₃ -MeOH (1:1)	F5.39*		
			MeOH (100%)	F5.40*		
		F6	CHCl ₃ (100%)	F6.1*-F6.10*	CHCl ₃ -MeOH (9:1)	
			CHCl ₃ -MeOH (95:5)	F6.11*-F6.30*		
			CHCl ₃ -MeOH (9:1)	F6.31*-F6.35*	CHCl ₃ -MeOH (85:15)	
			CHCl ₃ -MeOH (85:15)	F6.36*		
			CHCl ₃ -MeOH (8:2)	F6.37*		
			CHCl ₃ -MeOH (6:4)	F6.38*		
			CHCl ₃ -MeOH (1:1)	F6.39*		
			MeOH (100%)	F6.40*		
	CHCl ₃ -MeOH (8:2)	F7	NA	NA	CHCl ₃ -MeOH (97:3)	
	CHCl ₃ MeOH (8:2)	F8	NA	NA	CHCl ₃ -MeOH (85:15)	
		F9	NA	NA		
F10		NA	NA			
CHCl ₃ -MeOH (7:3)	F11	NA	NA			
	F12	NA	NA			
	F13	NA	NA			
	F14	NA	NA			
CHCl ₃ -MeOH (1:1)	F15	NA	NA			
	F16	NA	NA			
	F17	NA	NA			
	F18	NA	NA			
MeOH (100%)	F19	NA	NA			
	F20	NA	NA			

NA- não aplicável, * frações obtidas por fracionamento adicional na Coluna 2, CCDp- cromatografia em camada delgada preparativa

3.2.5.2. Isolamento e purificação de alcaloides dos galhos por meio de cromatografia em coluna

Foi realizado fracionamento de pequena quantidade (0,10 g) de ATG de *G. elliptica* por meio de cromatografia em colunaseca sob pressão sobre gel de sílica, gradualmente aumentando a polaridade do eluente, semelhante ao método descrito por RINALDI (2007). Para esse procedimento, foi usada uma coluna de vidro (altura: 50 cm, diâmetro: 1 cm) como suporte e 2 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) como fase estacionária.

ATG (0,0960 g) foi dissolvida em 0,3 mL de metanol e adicionada no topo da coluna seca. Os solventes usados como eluente estão listados no Quadro 16. As frações foram coletadas a cada 8 mL, secas e guardadas.

Quadro 16. Sistema de solventes usados para fracionamento de alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* por meio de cromatografia em coluna sobre gel de sílica

sistema de solvente (v/v)	volume (mL)	frações
clorofórmio (100%)	8	F1
clorofórmio-metanol (9:1)	16	F2, F3
clorofórmio-metanol (8:2)	16	F4, F5
clorofórmio-metanol (7:3)	16	F6, F7
clorofórmio-metanol (1:1)	16	F8, F9
metanol (100%)	8	F10

Depois, as frações (F1-F10 de ATG) foram aplicados em cromatoplasas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência F₂₅₄ da Merck. Os solventes usados como eluente estão listados na Quadro 17. Em alguns casos, vapor de amônia foi adicionado para melhorar a separação (+NH₃).

Quadro 17. Sistema de solventes usados como eluente na cromatografia em camada delgada preparativa em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ para isolar e purificar alcaloides dos galhos de *Guatteria elliptica*

sistema de solvente (v/v)	frações
clorofórmio-metanol (98:2), +NH ₃	F1 - F3
clorofórmio-metanol (9:1), +NH ₃	F4 - F10

+NH₃ - vapor de amônia adicionado para melhorar a separação

3.2.5.3. Isolamento e purificação de alcaloides dos galhos por meio de extração em fase sólida

Foi realizado fracionamento de 0,91 g (em total) de ATG de *G. elliptica* por meio de extração em fase sólida (EFS). Para esse procedimento foi usado cartucho de fase reversa C18 (Pekin Elmer, N9306479). Condições de pré-condicionamento e de eluição foram estabelecidos de acordo com as informações do fornecedor e a literatura pesquisada (TAVEIRA et al., 2012).

Na etapa de pré-condicionamento, 100 mL da solução metanol-ácido acético 5% (1:1) e depois 100 mL da solução de metanol 5% em amônia 2,5% aq. foram passados pelo cartucho para ativar o suporte e grupos funcionais. Traços de solventes foram evaporados por circulação de ar durante 2 minutos. Em seguida, aproximadamente 0,25 g da amostra foi dissolvida em pequena quantidade de metanol e aplicada na parte superior do sorvente. As frações foram eluídas com as soluções de metanol em hidróxido de amônio 2,5% aq. adequadas (Quadro 18).

Quadro 18. Sistema de solventes usado como eluente na extração de alcaloides dos galhos de *Guatteria elliptica* em fase sólida, utilizando cartucho de fase reversa C18

sistema de solvente (v/v)	volume (mL)	frações
metanol-NH ₄ OH 2,5% aq. (5:95)	20	F1
metanol-NH ₄ OH 2,5% aq. (10:90)	20	F2
metanol-NH ₄ OH 2,5% aq. (20:80)	20	F3
metanol-NH ₄ OH 2,5% aq. (30:70)	20	F4
metanol-NH ₄ OH 2,5% aq. (40:60)	20	F5
metanol-NH ₄ OH 2,5% aq. (50:50)	20	F6
metanol-NH ₄ OH 2,5% aq. (70:30)	20	F7
metanol (100%)	20	F8

Depois da eluição, todas as frações (exceto Fração 8) foram extraídas com clorofórmio (3 x 10 mL). Posteriormente, as amostras foram concentradas e secas. Todo o procedimento de EFS foi repetido 4 vezes e as frações adequadas foram reunidas.

Posteriormente, as frações (F1 – F8) obtidas por meio de EFS foram submetidas a CCDp. As amostras foram solubilizadas em solvente orgânico e aplicada na placa. Uma mistura de clorofórmio/metanol foi utilizada como eluente dependendo da polaridade da fração (Quadro 19). As placas foram eluídas em cuba de vidro saturada com as misturas de solventes adequadas.

Quadro 19. Sistema de solventes usado como eluente na cromatografia de camada delgada preparativa em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ para isolar e purificar alcaloides dos galhos de *Guatteria elliptica* obtidos depois da extração em fase sólida

frações	sistema de solvente (v/v)
F1	clorofórmio-metanol (9:1)
F2	clorofórmio-metanol (9:1)
F3	clorofórmio-metanol (9:1)
F4	clorofórmio-metanol (9:1)
F5	clorofórmio-metanol (95:5)
F6	clorofórmio-metanol (98:2)
F7	clorofórmio-metanol (98:2)
F8	clorofórmio-metanol (98:2)

Frações assim obtidas foram purificadas por meio de cromatografia de camada delgada preparativa até obter a purificação satisfatória, utilizando clorofórmio metanol (9:1v/v). As frações F2, F3 e F4 apresentaram composição muito parecida e por isso foram agrupadas. As duas amostras, Amostra 9 e 10, foram isoladas de frações F6 e F7 dos galhos. A purificação final dessas amostras foi obtida usando clorofórmio-acetato de etila (7:3 v/v) como solvente.

3.2.6. Análise dos alcaloides por Cromatografia a Gás acoplada a Espectrômetro de Massas (CG-EM)

Os alcaloides totais (ATF e ATG) e as amostras isoladas das folhas (Amostra 1-8) foram analisadas no Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), utilizando um cromatógrafo a gás, (Agilent Technologies modelo 6890N), equipado com uma coluna capilar HP5-MS (espessura do filme: 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m), acoplado ao espectrômetro de massas Agilent Technologies modelo 5975.

Amostras isoladas dos galhos (Amostra 9 e 10) foram analisadas no Instituto de Química da USP, utilizando um cromatógrafo a gás da Shimadzu modelo 2010 Plus, acoplado ao espectrômetro de massas da Shimadzu modelo QP2010 SE, equipado com a mesma coluna descrita anteriormente.

Todas as amostras foram dissolvidas em metanol (cerca 20 mg/mL) e analisadas em condições descritas no Quadro 20. Os volumes de injeção dos alcaloides totais e das amostras isoladas foram 1 e 2 μ L, respectivamente. Os resultados obtidos foram comparados com o banco de dados Wiley 25.

Quadro 20. Condições de análise de alcaloides de *Guatteria elliptica* por CG-EM, utilizando coluna capilar HP5-MS

parâmetro	
temperatura do injetor	290 °C
temperatura inicial	100 °C (1 min)
temperatura final	290 °C (10 min)
taxa de aquecimento	15 °C/min
fluxo do gás de arraste (He)	1 mL/min
divisão de fluxo	1:40
faixa de massas	40,0 - 650,0 Da
tempo do scan	1,25 scan/s

3.2.7. Análises de óleo essencial

A análise quantitativa do óleo essencial das folhas de *G. elliptica* foi realizada no laboratório do Instituto de Botânica, São Paulo, SP, utilizando cromatógrafo a gás (Varian CP-3380) equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 mm) e um detector de ionização de chama (FID). A composição relativa dos diferentes componentes do óleo foi obtida através da integração eletrônica, sem o uso do fator de resposta.

Para a identificação dos componentes, os óleos essenciais foram submetidos a análise de GC-EM no laboratório do Instituto de Botânica, São Paulo, SP, utilizando um cromatógrafo Agilent (6890 Series) acoplado com detector de massas com sistema de quadrupolo MS (5973), equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Os espectros de massas foram obtidos por impacto eletrônico a 70 eV, faixa de massas 40,0-650,0 Da e tempo do scan 1,25 scan/s. A amostra (1,0 µL) foi dissolvida em acetona (0,1%) e analisada em condições descritas no Quadro 21.

Quadro 21. Condições de análise de óleo essencial das folhas de *Guatteria elliptica* por CG-FID e CG-EM, utilizando coluna capilar DB-5

parâmetro	CG-FID	CG-EM
temperatura do injetor	220 °C	250 °C
temperatura do detetor	290 °C	250 °C
temperatura inicial	40 °C (1 min)	40 °C (1 min)
temperatura final	240 °C (10 min)	240 °C (10 min)
taxa de aquecimento	3 °C/min	3 °C/min
fluxo do gás de arraste (He)	1 mL/min	1 mL/min
divisão de fluxo	1:20	splitless

Os componentes foram identificados através da comparação dos seus espectros de massas e índices de retenção de Kóvats (KI), com os de substâncias padrão (série homóloga dos *n*-alcanos), substâncias existentes na biblioteca do sistema (Wiley 25), e com dados da literatura (ADAMS, 2007).

O índice de retenção (KI) das diferentes substâncias foi obtido pela Equação 1.

Equação 1. Índice de retenção de Kóvats

$$KI = 100z + 100(\log t'RX - \log t'RZ)/(\log t'R(Z+1) - \log t'RZ)$$

Onde:

KI-índice de retenção de Kóvats, **Z**-número de átomos de carbono com menor peso molecular, **t'RX**-tempo de retenção do composto x, sendo que t'RX é intermediário a t'RZ e t'R(Z+1), **t'RZ** e **t'R(Z+1)**-tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal.

3.2.8. Análise dos alcaloides por RMN-¹H

As amostras isoladas (Amostra 1-10) foram analisadas na Central Analítica do Instituto de Química da Universidade do São Paulo, em espectrômetro de RMN Inova (Varian), 300 MHz. Os resultados foram processados utilizando programa ACDLabs 12.0® e comparados com os dados da literatura.

3.2.9. Análise dos alcaloides por LC-EM/EM

A Amostra 10 foi analisada no Laboratório Thomson de Espectrometria de Massas, Instituto de Química da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), utilizando sistema Accurate-Mass Quadrupole Time-of-Flight (Q-TOF) LC/MS (G6550A) de Agilent Technologies, equipado com o amostrador HiP (G4226A) e a bomba binária (G4220A).

A separação cromatográfica foi realizada utilizando a coluna Zorbax Extend C18 (2,1 x 50 mm; 1,8 μ m; Agilent Technologies). O volume de injeção foi de 1 μ L. A fase móvel A consistiu de água e a B – metanol. O gradiente foi programado como seguido: 0-7 min. 60 % A, 7-10 min. 95 % A, 10-14 min. 20 % A e 14-16 min. 95 % A. A taxa de fluxo da fase móvel foi 0,2 mL/min.

Espectros de massas, no modo positivo, foram adquiridos utilizando fonte de íons duplo AJS-ESI e as condições descritas no Quadro 22. Os espectros obtidos foram comparados com os dados da literatura e os padrões de fragmentação foram propostos baseado na fragmentação de alcaloides aporfínicos e protoberberínicos.

Quadro 22. Condições de análise de alcaloides (Amostra 10) obtidos dos galhos de *Guatteria elliptica* por LC-EM/EM, utilizando coluna Zorbax Extend C18

parâmetro	
temperatura do gás	250 °C
fluxo do gás	11 mL/min
nebulizer	35 psig
temperatura do gás de nebulização	325 °C
fluxo do gás de nebulização	10 mL/min
tempo de análise	1,0 espectros/sec
masa mínima	50 m/z
masa máxima	1500 m/z

3.3. Análises biológicas

3.2.1. Atividade antioxidante – método qualitativo

Para determinar a atividade antioxidante, os extratos brutos (EBF e EBG), os alcaloides totais (ATF e ATG), as tortas (TF e TG) e as frações da partição da torta (THF, THG, TCF, TCG, TAF, TAG, TBF, TBG) foram submetidos a ensaio qualitativo por autografia em CCD no laboratório do Instituto de Botânica, São Paulo, SP.

As frações da partição da torta (100 µg em 5 µL de solvente), os extratos brutos (200 µg em 5 µL de solvente) e os alcaloides totais (200 µg em 5 µL de solvente) foram submetidos à CCD em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), utilizando sistemas de solventes adequados (Quadro 23) e quercetina (2,5 µg) como controle positivo. Após a eliminação do solvente, as cromatoplasmas foram nebulizadas com uma solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (0,2 %, DPPH, Sigma). A coloração roxa apareceu em aproximadamente 30 minutos e as manchas claras foram indicativas de atividade antioxidante (CUENDT; HOSTETTMAN; POTTERAT, 1997). Os resultados foram observados e fotografados.

Quadro 23. Sistema de solventes usados como eluente na cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄, usados para determinar atividade antioxidante dos extratos, alcaloides totais e frações de *Guatteria elliptica*

amostra	sistema de solventes (v/v)
EBF e EBG	clorofórmio-metanol (95:5)
ATF e ATG	clorofórmio-metanol (95:5)
THF e THG	hexano-acetona (8:2)
TCF e TCF	clorofórmio-acetato de etila-metanol (6:3:1)
TAF e TAG	clorofórmio-acetato de etila-metanol (6:3:1)
TBF e TBG	acetato de etila-ácido fórmico-água (100:20:26)

EBF-extrato bruto das folhas, **EBG**-extrato bruto dos galhos, **ATF**- alcaloides totais das folhas, **ATG**- alcaloides totais dos galhos, **THF**-fração hexânica da torta das folhas, **THG**-fração hexânica da torta dos galhos, **TCF**-fração clorofórmica de torta das folhas, **TCG**-fração clorofórmica de torta dos galhos, **TAF**-fração de acetato de etila da torta das folhas, **TAG**-fração de acetato de etila da torta dos galhos, **TBF**-fração butanólica da torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos (WAGNER e BLADT, 2001).

3.2.2. Atividade antioxidante - método quantitativo

Adicionalmente, a avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método quantitativo de sequestro do radical livre DPPH (SHARMA e BHAT, 2009; VICHITPHAN et al., 2007) no Laboratório de Pesquisa de Controle Biológico de Qualidade da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo.

Para o teste preliminar, as amostras (EBF, EBG, ATF, ATG, TF, TG, THF, THG, TCF, TCG, TAF, TAG, TBF, TBG e óleo essencial) foram diluídas em metanol até à concentração final de 100 µg/mL no poço e foram aplicadas em microplacas de 96 poços. A atividade de sequestro do radical livre foi determinada pelo monitoramento da absorbância em 492 nm usando o leitor de placas Polaris® (Celer). Cada poço continha 50 µL de amostra dissolvida em metanol e 150 µL de DPPH (200 µmol/L) dissolvido no mesmo solvente. Os brancos de amostras apropriadas (50 µL de amostra e 150 µL de metanol), controles (50 µL de metanol e 150 µL de solução de DPPH) e brancos de controle (200 µL de metanol) foram também testados. Após a adição da solução de DPPH aos poços, as placas foram incubadas à temperatura ambiente e ao abrigo da luz durante 20 minutos. As amostras que não apresentaram redução foram consideradas inativas e não foram mais avaliadas. As amostras ativas foram diluídas em série e cada concentração foi testada em triplicata. Os resultados foram tratados estatisticamente pelo software Origin 9.1®. A curva de inibição de dose-resposta foi obtida para cada amostra e cada repetição ($R^2 > 0,98$) e a equação da curva (Equação 2) foi usada para determinar a concentração de amostra necessária para sequestrar 50 % da concentração inicial de DPPH (EC_{50}). A média, desvio padrão (DP) de EC_{50} e intervalo de confiança de 95% (CI_{95}), obtidos a partir de cada repetição, foram calculados. Os resultados foram submetidos à análise da variância one-way ANOVA com nível de significância de 5%, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, utilizando software Minitab®. A quercetina (controle positivo) foi testada utilizando a mesma metodologia e sua EC_{50} foi comparada com outras amostras. O sequestro do radical livre DPPH foi calculada utilizando a Equação 3.

Equação 2. Equação geral de curva do tipo de dose-resposta (Origin 9.1®)

$$y = A1 + \frac{A2 - A1}{(1 + 10)^{(\log x0 - x)p}}$$

Onde,

$A1 < A2$

$p > 0$

assíntota inferior:

$A1 = 1$

assíntota superior:

$A2 = 2$

centro: $\text{LOG}x0 = -1$

inclinação: $p = 0.2$

(Origin 9.1®)

Equação 3. Sequestro do radical livre DPPH

$$\% \text{ redução DPPH} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs branco de controle}) - (\text{Abs amostra} - \text{Abs branco de amostra})}{(\text{Abs controle} - \text{Abs branco de controle})} * 100$$

Onde,

Abs_{controle} - absorvância de controle, **Abs_{branco de controle}** - absorvância de branco de controle, **Abs_{amostra}** - absorvância de amostra ou quercetina e **Abs_{branco de amostra}** - absorvância de branco de amostra ou quercetina.

3.2.3. Atividade anticolinesterásica – método qualitativo

Para determinar a atividade anticolinesterásica, as frações da partição da torta (THF, THG, TCF, TCG, TAF, TAG, TBF, TBG), os extratos brutos (EBF e EBG) e os alcaloides totais (ATF e ATG) foram analisados qualitativamente por autografia em CCD para testar atividade anticolinesterásica.

Para o ensaio enzimático foram preparadas duas soluções:

- solução 1: 30 mL de água deionizada foi misturada com 0,157 g de Tris/HCl (T-6666, Sigma) e o pH foi ajustado com a solução de NaOH até 7,8. Depois, 25 mL dessa solução foi adicionada a 0,025 g de albumina (A4503-10g, Sigma) e 84 µL de acetilcolinesterase (2000 v/mL, C3389-2 KV, Sigma)

- solução 2: 10 mL de água deionizada foi misturada com 0,021 g de Fast Blue B (D9805-10g, Sigma). Depois, 2 mL de etanol foi adicionado a 0,005 g acetato de α -naftila (N-8505-25g, Sigma). As soluções de Fast Blue B e acetato de α -naftila foram misturadas.

Para a avaliação da atividade anticolinesterásica, as frações das tortas (100 μ g em 5 μ L de solvente), os extratos brutos (EBF e EBG) (200 μ g em 5 μ L de solvente) e os alcaloides totais (ATF e ATG) (200 μ g em 5 μ L de solvente) foram submetidos à CCD, em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), utilizando sistemas de solventes adequados (Quadro 24) e a fisostigmina (0,05 μ g) como controle positivo. Após a eliminação completa dos solventes, as cromatoplasmas foram borrifadas com a solução 1 e foram incubadas em estufa a 37 °C, por 20 min, em atmosfera úmida. Após esse período, as placas foram reveladas com a solução 2. A coloração roxa apareceu em aproximadamente 1-2 minutos e a presença de manchas claras indicou a ocorrência de compostos com atividade anticolinesterásica (MARSTON et al., 2002). Os resultados foram observados e fotografados.

Quadro 24. Sistema de solventes de cromatografia em camada delgada usado para determinar atividade anticolinesterásica dos extratos, alcaloides totais e frações de *Guatteria elliptica*

amostra	sistema de solventes (v/v)
EBF e EBG	clorofórmio-metanol (95:5)
ATF e ATG	clorofórmio-metanol (95:5)
THF e THG	hexano-acetona (8:2)
TCF e TCF	clorofórmio-acetato de etila-metanol (6:3:1)
TAF e TAG	clorofórmio-acetato de etila-metanol (6:3:1)
TBF e TBG	tolueno-acetato de etila-dietilamina (70:20:10)

EBF-extrato bruto das folhas, **EBG**-extrato bruto dos galhos, **ATF**- alcaloides totais das folhas, **ATG**- alcaloides totais dos galhos, **THF**-fração hexânica da torta das folhas, **THG**-fração hexânica da torta dos galhos, **TCF**-fração clorofórmica de torta das folhas, **TCG**-fração clorofórmica de torta dos galhos, **TAF**-fração de acetato de etila da torta das folhas, **TAG**-fração de acetato de etila da torta dos galhos, **TBF**-fração butanólica da torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos (WAGNER e BLADT, 2001)

3.2.4. Atividade antifúngica - método qualitativo

Para determinar a atividade antifúngica, as frações da partição da torta (THF, THG, TCF, TCG, TAF, TAG, TBF, TBG) os extratos brutos (EBF e EBG) e os alcaloides totais (ATF e

ATG) foram submetidos a ensaio qualitativo por bioautografia em CCD para testar atividade antifúngica.

O fungo filamentoso *Cladosporium sphaerospermum* Penzing (CCIBt 491) foi utilizado como revelador nos bioensaios de detecção de substâncias fungitóxicas. Para a obtenção das culturas, *C. sphaerospermum* foi mantido em placas com meio de cultura BDA (batata-dextrose-ágar), incubadas a 27 °C, no escuro, por 14 dias. As suspensões de conídios do fungo foram obtidas em solução de sais (Czapek) e glicose 30 % na proporção 6:1 e armazenadas em freezer.

As frações da partição das tortas (200 µg em 5 µL de solvente), os extratos brutos (ATF e ATG) (400 µg em 5 µL de solvente), os alcaloides totais (ATF e ATG) (400 µg em 5 µL de solvente) foram submetidos à CCD em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ (0,2 mm, Merck), utilizando sistemas de solventes adequados (Quadro 25) e a Nistatina (1 µg) como controle positivo. Após a eliminação dos solventes, as cromatoplasmas foram borrifadas com a suspensão de conídios do fungo ($>2 \times 10^6$ conídios/mL) e incubadas em câmara úmida a 27 °C, por 48 horas, no escuro (HOMANS; FUCHS, 1970). Após esse período, a presença de manchas claras de inibição no fundo cinza indicou a ocorrência de compostos com atividade antifúngica. Os resultados foram observados e registrados.

Quadro 25. Sistemas de solventes de cromatografia em camada delgada usados para determinar atividade antifúngica dos extratos, alcaloides totais e frações de *Guatteria elliptica*

amostra	sistema de solventes (v/v)
EBF e EBG	clorofórmio-metanol (95:5)
ATF e ATG	clorofórmio-metanol (95:5)
THF e THG	hexano-acetona (8:2)
TCF e TCF	clorofórmio-acetato de etila-metanol (6:3:1)
TAF e TAG	clorofórmio-acetato de etila-metanol (6:3:1)
TBF e TBG	tolueno-acetato de etila-dietilamina (70:20:10)

EBF-extrato bruto das folhas, **EBG**-extrato bruto dos galhos, **ATF**- alcaloides totais das folhas, **ATG**-alcaloides totais dos galhos, **THF**-fração hexânica da torta das folhas, **THG**-fração hexânica da torta dos galhos, **TCF**-fração clorofórmica de torta das folhas, **TCG**-fração clorofórmica de torta dos galhos, **TAF**-fração de acetato de etila da torta das folhas, **TAG**-fração de acetato de etila da torta dos galhos, **TBF**-fração butanólica da torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos (WAGNER e BLADT, 2001).

3.2.5. Atividade antimicrobiana - método quantitativo

A atividade antimicrobiana (método turbidimétrico) foi avaliada no Laboratório de Pesquisa de Controle Biológico de Qualidade da FCF, da Universidade de São Paulo. Neste teste, o método turbidimétrico foi utilizado de acordo com a literatura pesquisada (BROWN, 1966; MORENO *et al.*, 2009; RINALDI, 2007).

Durante o teste, os extratos brutos (EBF e EBG), as tortas (TF e TG), os alcaloides totais (ATF e ATG) e as frações das folhas e dos galhos potencialmente antimicrobianos (THF, THG, TCF, TCG, TAF, TAG, TBF, TBG) foram diluídos em solução de DMSO:MeOH (50:50) (LIMA *et al.*, 2006) para a concentração de cerca de 20 mg/mL, dando concentração final em poço 1 mg/mL. O óleo essencial das folhas foi diluído na mesma solução até concentração final 3 mg/mL (MORENO *et al.*, 2011).

A atividade antimicrobiana foi testada contra os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (gram-positivo), *Escherichia coli* ATCC 8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (gram-negativo). Além disso, as amostras foram testadas frente à levedura *Candida albicans* ATCC 10231 e fungo filamentoso *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404. Cada cepa bacteriana foi repicada na superfície do TSA (ágar de soja-caseína) e incubada a 37 °C durante 24 h. Os fungos foram repicados na superfície do SDA (ágar sabouraud dextrose) e incubados a 25 °C durante 48 h para *C. albicans* e durante 7 dias para *A. brasiliensis*. A massa celular resultante do crescimento foi recolhida em 9 mL de solução salina estéril 0,85 % (v/v) e a suspensão obtida foi padronizada através de diluições decimais seriadas até a concentração final de 2×10^3 UFC/mL. A concentração final da suspensão designada para teste foi confirmada por transferência de 1 mL da respectiva diluição para placa de Petri. A solução foi homogeneizada com cerca de 15 mL do ágar adequado para cada tipo de microrganismo. Depois da incubação, as colônias de microrganismo foram contadas. Para recolher *A. brasiliensis* foi utilizado Polissorbato 80 (1% v/v) e pérolas de vidro na solução salina. No final de cada experimento foi feito o plaqueamento da diluição microbiana para confirmar a viabilidade do inóculo.

Todas as culturas foram na fase *log*, porque nesta fase uma cultura é relativamente homogênea, e a taxa de divisão é aproximadamente a mesma para cada célula. Portanto, quando o agente é adicionado, qualquer alteração na taxa de crescimento será o resultado da ação

antimicrobiana das amostras. Todos os testes foram feitos em TSB (caldo de soja-caseína), com exceção de fungos, que foram realizadas em SDB (caldo sabouraud dextrose).

Durante o ensaio, 190 µL da suspensão de microrganismos (meio de cultura inoculado) foram colocados em cada poço de uma microplaca e depois 10 µL de amostras foram adicionadas. Parte dos poços de cada microplaca foi reservada para controle positivo (10 µL da solução de antibiótico e 190 µL de meio de cultura inoculado), controle de meio da cultura (200 µL de meio de cultura não inoculado TSB ou SDB), controle de solvente (10 µL da solução DMSO:MeOH e 190 µL de meio de cultura inoculado), controle de crescimento (200 µL de meio de cultura inoculado) e controle de amostra (10 µL de amostra e 190 µL de meio de cultura não inoculado TSB ou SDB). Como controle positivo, as soluções de antibióticos (1 mg/mL) foram utilizadas (Nistatina para fungos; Amicacina, Cloranfenicol, Ciprofloxacina e Eritromicina para bactérias).

As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 24 h para as bactérias, a 25 °C durante 48 h para a levedura e durante 72-120 h para o fungo. A alteração na taxa de crescimento foi avaliada pela alteração na turvação da suspensão bacteriana contra os controles, e a medição foi feita por análise fotométrica (630 nm, Leitor de microplacas LM-LGC, LGC Biotecnologia) (BROWN, 1966; MORENO et al., 2009). O crescimento microbiano foi calculado utilizando a Equação 4.

Equação 4. Crescimento microbiano

$$\% \text{ Crescimento} = \frac{(Abs \text{ amostra} - Abs \text{ meio})}{(Abs \text{ controle} - Abs \text{ meio})} * 100$$

Onde,

Abs_{amostra} - absorbância de amostra ou antibiótico, **Abs_{meio}** - absorbância de meio da cultura, **Abs_{controle}** - absorbância de controle de crescimento

As amostras com inibição de crescimento de 100 % foram diluídas seriadamente e, depois, a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada. Os testes preliminares foram feitos em triplicatas e testes para determinação de CIM em quadruplicadas. Dessa maneira, os testes para avaliar a CIM foram repetidos três vezes para cada amostra.

Os resultados foram estaticamente tratados pelo programa Origin 9.1[®]. No começo, uma

curva de inibição do tipo dose-resposta (Equação 2) foi obtida para cada amostra e cada repetição ($R^2 > 0,98$) separadamente. A equação da curva assim obtida foi usada para calcular a CIM ($y \geq 99\%$). A seguir, média, DP e CI_{95} foram calculados (PAGANO; GAUVREAU, 2004). Os resultados obtidos foram submetidos à análise da variância one-way ANOVA com nível de significância de 5%, seguida pelo teste *post hoc* de Tukey, utilizando software Minitab®.

As amostras ativas foram submetidas em triplicatas ao teste em placas de Petri, para determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) (SUFFREDINI et al., 2007). As amostras com meio de cultura inoculado sem crescimento microbiano foram incorporadas na superfície do TSA (bactérias) ou SDA (fungos), utilizando alça de 10 μ L. As placas foram incubadas a 37 °C durante 24 h para bactérias e a 25 °C durante 48 h para fungo. Depois desse período, a leitura de crescimento foi feita visualmente. A menor concentração das amostras sem crescimento microbiano foi determinada como a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Nesse jeito, os testes para avaliar a CBM foram repetidos três vezes para cada amostra.

3.2.6. Teste de atividade antitumoral *in vitro*

O teste de atividade antitumoral frente a diferentes linhagens de células tumorais humanas foi avaliado pelo ensaio da Sulforodamina B (SRB) no Laboratório de Extração da Universidade Paulista. Neste teste, a avaliação da atividade citotóxica foi realizada em microplacas de 96 poços segundo a metodologia descrito por Monks et al. (1991).

Para esse teste, os extratos e frações das folhas e dos galhos (EBF, EBG, ATF, ATG, TF, TG, THF, THG, TCF, TCG, TAF, TAG, TBF, TBG), e as amostras isoladas foram diluídos em DMSO para a concentração de cerca de 80 mg/mL e em água destilada na concentração de cerca de 40 mg/mL. O óleo essencial foi diluído em DMSO para a concentração de 72 mg/mL. Em seguida, as amostras foram diluídas em serie resultando na concentração final em poço de 100,0; 10,0; 1,0; 0,1; 0,01 μ g/mL (extratos, alcaloides totais, frações e compostos isolados) e 180; 18,0; 1,80; 0,18; 0,018 μ g/mL (óleo essencial).

Teste de citotoxicidade foi avaliado à frente de células de câncer humano isoladas de próstata (PC-3) e de mama (MCF-7). As células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Bio Whittaker) acrescido de 10 % de soro fetal bovino e 1 % de *L*-glutamina (Sigma) por período de 24 h. As células foram visualizadas no microscópio óptico invertido Axiovert 25 (Carl

Zeiss) e contadas no microscópio Axiostar (Carl Zeiss). A seguir, a massa celular resultante do crescimento foi padronizada para a concentração de 7500 células/poço e 10000 células/poço para PC-3 e MCF-7, respectivamente.

Uma alíquota de 10 μ L foi retirada da amostra a ser testada (diluída a 40 mg/mL) e adicionada a 1990 μ L de meio de cultura em um tubo de vidro, para se obter uma diluição de 1:200. Depois disso, uma diluição seriada em outros 4 tubos de vidro foi realizada para que seja obtida uma série de cinco diluições logarítmicas. Alíquotas de 100 μ L dessas suspensões foram transferidos para cada poço correspondente, contendo as células tumorais em 100 μ L de meio de cultura. Cada diluição foi testada em sextuplicata. As concentrações finais das amostras correspondentes a extratos, frações ou compostos isolados foram de 100,0; 10,0; 1,0; 0,1; 0,01 μ g/mL, enquanto que para óleos essenciais as concentrações finais foram de 180; 18,0; 1,80; 0,18; 0,018 μ g/mL. Parte dos poços da microplaca foi reservada para controle (branco) de amostra (100 μ L de meio de cultura e 100 μ L de amostra), controle de crescimento (100 μ L de meio de cultura e 100 μ L de suspensão celular) e controle do meio (tempo zero) (200 μ L de meio de cultura). Como controle positivo, a solução de Doxorrubicina foi utilizada (100 μ L de meio de cultura e 100 μ L de Doxorrubicina).

As microplacas foram incubadas a 37 °C durante 48 h. Depois deste período, as células viáveis foram fixadas com solução de ácido tricloroacético 50% por 1 h, sob refrigeração. As microplacas foram lavadas com água corrente até remoção completa das células não fixadas. Seguidamente, as placas foram secas ao ar por 24 h. As células viáveis foram coradas utilizando 100 μ L da solução de SRB 0,4 % em ácido acético 1 %, durante 10 minutos. O excesso de SRB foi retirado com solução de ácido acético 1% durante 50 segundos, utilizando lavadora de microplacas EL 405 (Bio-Tek Instruments, Inc.). Após a remoção do excesso, as placas foram novamente expostas ao ar para secagem. O corante foi dissolvido com 100 μ L de tampão Tris (1,2 g/L) e, depois, a microplaca foi agitada por 10 minutos, utilizando Mini Orbital Shaker (Bello Glass, Inc.). Posteriormente, a alteração na taxa de crescimento foi avaliada pela análise fotométrica (515 nm) utilizando leitor de microplacas EL 800 (Bio-Tek Instruments, Inc.).

Depois do teste, os resultados foram estaticamente tratados. O programa Excel foi usado para calcular o crescimento, utilizando a Equação 5.

Equação 5. Crescimento celular

$$\% \text{ Crescimento} = \frac{(Tr \text{ amostra} - Tr 0)}{(Tr \text{ controle de crescimento} - T0)} * 100$$

Onde,

$Tr_{amostra}$ – transmitância de amostra ou antibiótico, Tr_0 – transmitância do meio (tempo zero), $Tr_{controle \text{ de crescimento}}$ - transmitância de controle de crescimento.

Os resultados foram estaticamente tratados pelo programa GraphPad Prism 5.0. No começo, regressão não linear foi obtida para cada amostra. A equação da curva assim obtida foi usada para calcular Índice de toxicidade para 50% da população das células em estudo (IC_{50}). Posteriormente, o erro padrão (EP) foram calculados (PAGANO; GAUVREAU, 2004).

3.2.7. Teste de toxicidade *in vitro*

O teste de toxicidade *in vitro* validado utilizou culturas celulares de fibroblastos de camundongos e foi realizado de acordo com as recomendações do *Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests* (OECD DC 129) no Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelo método colorimétrico MTS “*CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assays* (PROMEGA CORPORATION, 2012).

Para esse teste, os extratos e frações das folhas e dos galhos (EBF, EBG, ATF, ATG, TF, TG, THF, THG, TCF, TCG, TAF, TAG, TBF, TBG), o óleo essencial e as amostras isoladas foram diluídos em DMSO para a concentração de cerca 40 mg/mL, e depois, as amostras foram diluídas em série a fim de incluir as concentrações com atividade antitumoral (IC_{50}), utilizando os fatores de diluição 1,47; 1,78; 2,15 e 3,16, segundo o *APPENDIX F - Decimal Geometric Concentration Series* (NIH, 2001).

As amostras foram avaliadas frente à linhagem celular BALB/c 3T3 (ATCC CCL-163). Para o crescimento celular foi utilizado meio de cultura DMEM (Dubelcco’s Modified Eagle Medium), acrescido de antibiótico e antimicótico (penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 mg/mL e anfotericina 0,025 mg/mL), 4 mmol/L de glutamina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (ISO 10993-5, 2009). Os ensaios foram realizados em condições assépticas (OECD, 1998). A

incubação celular ocorreu a 37 °C em atmosfera úmida e 5% de CO₂, até atingir a sub-confluência (aproximadamente 80%) na placa de cultura. Para processo de descolamento celular foi utilizada a solução de tripsina 0,05% (m/v)/ EDTA 0,02% (m/v) em tampão fosfato de pH 7,4 (ICCVAM, 2006).

As células foram semeadas (2×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Durante o ensaio, 50 µL da solução, contendo amostra em concentração adequada (incluindo IC₅₀ e IC₁₀ antitumoral frente a PC-3 e MCF-7) (NIH, 2001), e 50 µL do meio foram adicionados em cada poço. Parte dos poços de microplaca foi reservada para controle (branco) de meio (100 µL de meio de cultura), controle de crescimento (50 µL de meio de cultura e 50 µL de suspensão celular). Como controle positivo, o solvente DMSO foi utilizado (50 µL de DMSO e 50 µL de suspensão celular).

Após 24 horas da adição de amostras, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com a solução de salina (0,9 %). Em seguida, foi adicionada 100 µL da solução do corante vital MTS/PMS (5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazólio / meta-sulfato de fenazina). Depois da adição do corante, as placas foram incubadas durante 3 horas (37 °C, CO₂ 5%).

Após, o conteúdo de cada poço foi retirado e os poços foram lavados com a 100 µL da solução de salina (0,9%). Em seguida, foi adicionada 150 µL da solução de dessorção (ácido acético 1%, água 49%, etanol 50%) e as placas foram agitadas durante 10 min, utilizando Compact Rocker OR300 (MecLab). Posteriormente, a alteração na taxa de crescimento foi avaliada pela medida de absorbância (490 nm), utilizando espectrofotômetro de placa Leitor BioTek (Synergy HT) (NIH, 2001; ICCVAM, 2006).

Os resultados, obtidos a partir da leitura da absorbância, foram avaliados pelo programa Phototox[®]: Statistical Software Phototox Version 2.0. As curvas dose-resposta de viabilidade celular foram determinadas. A partir das curvas, os valores de IC₁₀ e IC₅₀, que correspondem respectivamente à concentração máxima não tóxica (com 90% de viabilidade celular) e ao potencial citotóxico da amostra foram calculados (DOYLE e GRIFFITHS, 2000). Os valores de IC₅₀ foram utilizados para determinar a toxicidade oral aguda por meio da dose letal mediana (DL₅₀), segundo a Equação 6 (NIH, 2001; ICCVAM, 2006). Baseado em valores de DL₅₀ assim obtidos, toxicidade das amostras foi agrupada, usando a sistema de classificação de *United Nations Globally Harmonised System* (GHS) em cinco categorias (Quadro 26) (ESTEVEZ-PEDRO, 2013;

BULGHERONI et al., 2009).

Equação 6. Determinação da dose letal mediana (DL_{50})

$$\log DL_{50}(\text{mg/kg}) = 0,372 \times \log IC_{50}(\mu\text{g/mL}) + 2,024$$

Onde,

DL_{50} - dose letal mediana, **IC_{50}** - Índice de toxicidade para 50% da população das células em estudo (NIH, 2001; ICCVAM, 2006)

Quadro 26. Sistema de classificação de *Globally Harmonised System* baseada em dose letal

Categorias de GHS	LD_{50} mg/kg	efeito para a saúde humana
1	<5	fatal se ingerido
2	5-50	fatal se ingerido
3	50-300	tóxico se ingerido
4	300-2000	perigoso se ingerido
5	2000-5000 ou >5000	pode ser perigoso se ingerido ou não classificado

GHS-*Globally Harmonised System*, **DL_{50}** - dose letal mediana (BULGHERONI et al., 2009)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise química

4.1.1. Óleo essencial

4.1.1.1. Extração de óleo essencial

Para obter o óleo essencial, as folhas secas foram submetidas à hidrodestilação. Após a destilação, foi coletado 0,80 g de um óleo com coloração amarela intensa que representou um rendimento de 0,20% (m/m), calculado em relação à massa de planta seca.

De acordo com a literatura pesquisada, o rendimento de óleo extraído das folhas de *G. pogonopus* foi maior (0,28 % v/m) (FONTES et al., 2013). Contudo, outros estudos mostraram que rendimento dos óleos extraídos das folhas e dos pedúnculos de *G. poeppigiana* e *G. juruensis* foi menor (0,1 %), nas duas espécies (LIMA et al., 2004, LIMA et al., 2003).

Para identificar as estruturas secretoras do óleo nas folhas de *G. elliptica*, foi realizado um estudo anatômico. Os cortes histológicos transversais foram feitos à mão livre e submetidos a processo de coloração com Azul de Asta, Sudam III e Safranina. Depois, os cortes foram observados no microscópio óptico (aumento de 40, 100 e 200 vezes) e fotografados.

Em Annonaceae, a ocorrência de dois tipos de células secretórias, oleíferas e mucilaginosas, foi relatada na lâmina foliar. Nessa família, as células oleíferas são ovais, com um diâmetro entre 25-100 µm (SETTEN e KOEK-NOOIMAN, 1986). Essas células podem ser "vazias" ou "preenchidas" com conteúdo de cor amarelo ou castanha, como foi observado no caso de *G. elliptica* (Figura 13A). No caso de células vazias observadas, o conteúdo pode ter sido extravasado durante a preparação dos cortes e/ou do processo de coloração.

Na maioria de espécies da família, as células secretórias ocorrem no parênquima esponjoso e, ocasionalmente, na zona de transição entre o parênquima esponjoso e paliçádico. Em algumas espécies, as células também podem ser encontradas no parênquima paliçádico (SETTEN e KOEK-NOOIMAN, 1986). Nas folhas de *G. elliptica*, essas células foram localizadas no parênquima esponjoso (Figura 13B). Em alguns gêneros, outro tipo de idioblasto pode ocorrer, com células grandes, na maior parte angulosas, cheias com uma substância amorfa (principalmente de sílica), dando uma coloração azul ou amarela quando coradas com a Safranina e o Azul de Astra (SETTEN e KOEK-NOOIMAN, 1986). Esse último tipo de idioblasto não foi

observado nas folhas de *G. elliptica*, pois, as células foram ovais, com conteúdo rosado depois da coloração.

Como apontado em um estudo da literatura, às vezes parece difícil indicar qual tipo de células secretórias (células oleíferas ou células mucilaginosas) está presente (MAAS et al., 2007; SETTEN e KOEK-NOORMAN, 1986). Nas folhas de *G. elliptica*, o conteúdo das células secretoras coloriu em rosa com Sudan III, sugerindo a presença de substâncias não polares e, então, indicando as células oleíferas. Outro tipo de células secretoras podem ser encontrados em plantas formando canais, de forma alongada (DICKISON, 2000). Entretanto, essas estruturas não foram encontradas nas folhas de *G. elliptica*, uma vez que os canais secretores não são característicos em Annonaceae. (SETTEN e KOEK-NOORMAN, 1986).

Dessa maneira, as estruturas responsáveis pelo armazenamento de óleo nas folhas de *G. elliptica* foram caracterizadas como unicelulares e ovais, e identificadas como células oleíferas. As células "vazias" e preenchidas, com conteúdo de cor rosa depois de coloração com Sudan III, foram localizadas no parênquima esponjoso (Figura 13).

Figura 13. Cortes transversais da folha de *Guatteria elliptica*, coradas utilizando Azul de Astra e Sudam III, com as células oleíferas (aumento de 200 vezes)

A- células oleíferas, **B-** células oleíferas localizadas no parênquima esponjoso; **a-** células oleíferas sem óleo essencial, **b-** células oleíferas com óleo essencial

Nesse trabalho, as células secretoras do óleo essencial foram descritas pela primeira vez para uma espécie de *Guatteria*. Na literatura, não foi encontrado nenhum outro estudo sobre a anatomia foliar de *Guatteria* spp. e, em geral, existem poucos relatos sobre a anatomia de Annonaceae. Assim sendo, há uma necessidade de estudos anatômicos mais aprofundados para *G. elliptica*.

4.1.1.2. Composição química do óleo essencial

O óleo essencial das folhas foi analisado por cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas. O cromatograma do óleo essencial das folhas está apresentado na Figura 14.

Figura 14. Cromatograma obtido para óleo essencial das folhas de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar DB-5

No cromatograma, observa-se (Figura 14) a presença de pelo menos 34 substâncias, sendo duas majoritárias: RT=37,12 min (53,90 %) e RT= 37,23 min (6,8 %).

Os espectros de massas foram comparados com base de dados e com os dados da literatura. A identificação de compostos também foi realizada comparando os índices de retenção (KI) com relação aos tempos de retenção de uma série de *n*-alcanos.

No óleo essencial de *G. elliptica* foram identificados 34 compostos (Tabela 1), sendo em maioria sesquiterpenos oxigenados (91,5 %). O óleo apresentou como constituintes majoritários espatulenol (53,9 %) e óxido de cariofileno (6,8 %) (Figura 15). Dentre os compostos minoritários identificados no óleo de *G. elliptica* os outros compostos mais representativos foram mustakona (4,0 %), γ -cadineno (3,5 %) e epóxido de humuleno II (2,4 %), entre outros.

Figura 15. Estruturas dos compostos majoritários identificados no óleo das folhas de *Guatteria elliptica*

A-óxido de cariofileno, B- espatulenol

Tabela 1. Composição de óleo essencial das folhas de *Guatteria elliptica* obtida por CG-EM utilizando coluna capilar DB-5

composto	KI ^A	KI ^B	%
α -Copaeno	1376	1374	0,4
β -Bourboneno	1384	1383	0,3
β -Elemene	1391	1391	0,7
Cipereno	1398	1395	0,6
Rotundeno	1457	1457	0,6
β -E-Ionona	1485	1487	0,5
<i>trans</i> -Muuro-la-4(14),5-dieno	1493	1493	1,4
γ -Cadineno	1513	1515	3,5
δ -Cadineno	1524	1524	0,6
Norpatchulenol	1553	1553	0,6
1,5-epóxi-Salvial-4(14)-eno	1572	1566	1,6
Espatulenol	1576	1582	53,9
Óxido de cariofileno	1581	1585	6,8

continua

continuação **Tabela 1.** Composição de óleo essencial das folhas de *Guatteria elliptica* obtida por CG-EM utilizando coluna capilar DB-5

composto	KI ^A	KI ^B	%
β -Copaen- α -ol	1584	1591	1,0
Ledol	1565	1602	1,7
Epóxido de humuleno II	1606	1609	2,4
1-desoxi-capsidiol	1613	1613	1,4
1- <i>epi</i> -Cubenol	1627	1627	1,8
Muurola-4,10(14)-dieno-1- β -ol	1625	1639	0,9
<i>epi</i> - α -Cadinol	1640	1643	1,0
α -Muurolol	1645	1648	1,3
β -Eudesmol	1649	1650	0,8
α -Eudesmol	1652	1654	1,6
Valerianol	1655	1658	1,0
<i>cis</i> -Calameneno-10-ol	1660	1660	0,8
<i>trans</i> -Calameneno-10-ol	1668	1670	1,0
Cadaleno	1674	1674	1,4
Mustakona	1676	1680	4,0
Ciperotundona	1695	1694	1,4
<i>cis</i> -Tujopsenal	1708	1704	0,6
(<i>Z</i>)- α -Atlantona	1717	1719	1,5
Khusimol	1736	1748	0,7
Ciclocolorenona	1759	1773	1,7
14-oxi- α -Muuroleno	1764	1780	0,6
Sesquiterpenos	-	-	8,1
Sesquiterpenos oxigenados	-	-	91,5
Outros	-	-	0,5
Total de identificados	-	-	100,1

KI^A-Kóvats Index encontrado na literatura, KI^B-Kóvats Index calculado (RAJČEVIĆ et al., 2015; SANTOS et al., 2015; CICCIO e CHAVERRI, 2008; ADAMS, 2007)

Espatuleno foi encontrado no óleo de *G. elliptica* em teor elevado (53,9 %) em comparação aos outros componentes, pois óxido de cariofileno, o segundo composto mais abundante, representava apenas 6,8 % dos componentes totais. De acordo com alguns pesquisadores, esses dois sesquiterpenos oxigenados poderiam ser considerados como marcadores quimiotaxonômicos devido a sua ocorrência comum em espécies de *Guatteria* (COSTA et al., 2011; TRIGO et al., 2007; MAIA et al., 2005).

De acordo com essa afirmação, grandes quantidades de espatulenol também foram registradas para os óleos das partes aéreas de *G. juruensis* (77,1 %) e *G. poeppigiana* (52,9 %) (MAIA et al., 2005; LIMA et al., 2004, 2003). Esse sesquiterpeno foi registrado em quantidades menores, mas ainda significativas, nos óleos de *G. schomburgkiana*, 23,7 %, 21,6 % e 18,5 % respectivamente para folhas, caules e caules finos (TRIGO et al., 2007), e 11,4 % no óleo das folhas de *G. wachenheimi* (FOURNIER et al. 1997).

O óxido de cariofileno foi encontrado em grande quantidade no óleo das folhas de *G. microcalyx*, representando 44,2 % do total dos compostos do óleo (MAIA et al., 2005). Esse composto também foi encontrado em outras espécies, mas não de forma tão abundante, como nos óleos de *G. ouregou* (raiz), *G. wachenheimi* (folhas) e *G. sagotiana* (frutos) nas respectivas proporções de 24,8 %, 12,3 % e 8,4 % (FOURNIER et al. 1997).

Alguns dos compostos minoritários encontrados em *G. elliptica* também foram identificados em outras espécies. Epóxido de humuleno II foi encontrado em óleos das folhas, caule e caule fino de *G. schomburgkiana* (1,7-2,5 %) (TRIGO et al., 2007) e nas folhas de *G. microcalyx* (5,7 %) (MAIA et al., 2005). Análise de óleos de *G. diospyroides* e *G. oliviformis* mostraram presença de γ -cadineno (0,3 e 0,9 %, respectivamente) (PALAZZO et al., 2009).

As folhas de *G. elliptica* produzem um óleo essencial com alto rendimento (0,2 %), em comparação com outras *Guatteria* spp., rico em sesquiterpenos oxigenados. Os principais constituintes são os sesquiterpenos considerados marcadores químicos do gênero (espatulenol e óxido de cariofileno). A composição química do óleo pode sugerir atividades biológicas semelhantes aos óleos de outras espécies de *Guatteria*, o que foi investigado e relatado posteriormente nesse projeto.

4.1.2. Extratos e frações

4.1.2.1. Extração de alcaloides

No total, 1704,2 g das folhas e 4263,5 g dos galhos secos moídos foram submetidos a extração para obter os extratos brutos e, depois, os alcaloides totais. A partir do material seco, os extratos brutos foram obtidos com o rendimento de 12,6 % para as folhas e 4,3 % para os galhos. Com relação aos alcaloides totais, as folhas apresentaram um teor de 0,4 % de alcaloides em

relação à planta seca, enquanto os galhos apresentaram um rendimento de 0,1 %. As quantidades e os rendimentos para os extratos brutos e os alcaloides totais das folhas e dos galhos, estão listadas na Tabela 2.

Tabela 2. Quantidade e rendimento dos extratos brutos e alcaloides totais das folhas e dos galhos de *Guatteria elliptica*

amostra	massa (g)	rendimento (%)
EBF	215,5	12,6
EBG	183,0	4,3
ATF	6,7	0,4
ATG	4,5	0,1

EBF-extrato bruto das folhas, **EBG**-extrato bruto dos galhos, **ATF**- alcaloides totais das folhas, **ATG**- alcaloides totais dos galhos

De acordo com a literatura pesquisada, os alcalóides são encontrados tanto nas folhas como nos galhos de espécies de *Guatteria*. Segundo os dados da literatura, o rendimento encontrado para os alcaloides das folhas de *G. elliptica* (0,4 %) foi semelhante aos reportados para outras espécies de *Guatteria*: *G. australis* 0,29 % (TEMPONE et al., 2005), *G. ouregou* 0,39 % (CORTES et al., 1986), *G. scandens* 0,4 % (HOQUEMILLER et al., 1982b). Porém, o rendimento dos alcaloides nos galhos (0,1 %) foi menor daquele já descrito para as outras espécies estudadas: *G. guianensis* 0,5 % (BERTHOU; LEBOEUF; CAVÉ, 1989), *G. discolor* 0,38 % (HOCQUEMILLER et al., 1984a), *G. scandens* 0,62 % (HOCQUEMILLER; RASAMIZAFY; CAVÉ, 1982b) e *G. schomburgkiana* 0,4% (CORTES; RAMAHATRA; CAVÉ 1985a).

4.1.2.2. Fracionamento da torta

Obteve-se um total de 73,3 g da torta das folhas com rendimento de 4,3% e 42,2g da torta dos galhos com rendimento de 1,0%. em relação ao material vegetal seco.

Somente uma parte das tortas das folhas (24,53 g) e dos galhos (16,40 g) foi usada para fracionamento por solventes orgânicos de polaridade crescente. Os rendimentos das frações, calculados em relação ao material vegetal seco, estão listados na Tabela 3.

Tabela 3. Rendimento das frações obtidas das tortas das folhas e dos galhos de *Guatteria elliptica* depois do fracionamento pelo método de partição

amostra	massa (g)	rendimento (%)
THF	0,97	0,17
THG	0,99	0,06
TCF	2,51	0,44
TCG	0,51	0,03
TAF	0,29	0,05
TAG	0,69	0,04
TBF	6,35	1,11
TBG	3,13	0,18

THF-fração hexânica de torta das folhas, **THG**- fração hexânica de torta das folhas, **TCF**-fração clorofórmica de torta das folhas, **TCG**-fração clorofórmica de torta dos galhos, **TAF**-fração de acetato de etila da torta das folhas, **TAG**-fração de acetato de etila da torta dos galhos, **TBF**-fração butanólica da torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos

O fracionamento por partição, envolvendo uma dissolução seletiva em solventes orgânicos, permitiu a separação dos principais metabólitos (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2010). Nas frações menos polares (hexânicas) é esperado encontrar os compostos apolares, principalmente hidrocarbonetos, terpenos, ácidos graxos, lipídeos, clorofila, pigmentos, e outras substâncias lipofílicas. As frações clorofórmicas deveriam conter os componentes fracamente polares, como cumarinas, ácidos fenólicos simples e flavonoides metoxilados. Normalmente, os alcaloides também são encontrados nessa fração. Contudo, nesse estudo, esses metabólitos foram removidos previamente pela extração específica para alcaloides totais. As frações de acetato de etila contêm predominantemente substâncias polares, como flavonoides e polifenóis. Para as frações butanólicas, principalmente saponinas e flavonoides glicosídeos são específicos (FERNANDES, 2012).

O maior rendimento foi obtido para a frações butanólicas das folhas e dos galhos, o que pode indicar que as tortas contém grandes quantidades de substâncias polares. Em um estudo anterior com caule de *Annona hypoglauca* Mart (Annonaceae), o maior rendimento (0,25 %) foi obtido para a fração hexânica da torta (RINALDI, 2007).

4.1.2.3. Pesquisa de flavonoides

No teste, a presença de manchas fluorescentes (verdes, azuis, amarelas e laranjas) observadas sob luz ultravioleta UV-360 nm foi indicativa para a ocorrência de flavonoides (Figura 16). Os EBF e EBG apresentaram várias manchas fluorescentes. A TAF mostrou uma mancha verde ($R_f \sim 0,6$). A TAG teve duas manchas azuis ($R_f \sim 0,4$ e $R_f \sim 0,5$). A TBF apresentou uma mancha verde ($R_f \sim 0,4$). A TBG mostrou duas manchas verdes ($R_f \sim 0,1$ e $R_f \sim 0,4$).

Pode ser observado, que os extratos brutos das folhas e dos galhos contém diversos flavonoides. Depois do fracionamento, os flavonoides foram encontrados nas frações butánolicas e de acetato de etila, de acordo com a polaridade dos solventes. Algumas amostras apresentaram as manchas com o R_f parecido com o padrão, porém com coloração diferente, o que pode indicar a ausência da quercetina nas amostras. Existe possibilidade, que os flavonoides encontrados em *G. elliptica* são glicosídeos. Para justificar essa afirmação, de acordo com a literatura pesquisada, somente flavonoides glicosídeos foram relatados em 31 espécies de Annonaceae nativas do Brasil. Em *Guatteria* esses flavonoides foram descritos para seis espécies: *G. australis*, *G. notabilis*, *G. pogonopus*, *G. rupestris*, *G. sellowiana* e *G. villosissima*. (SANTOS; SALATINO, 2000).

Figura 16. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ para pesquisa de flavonoides nos extratos e frações de *Guatteria elliptica* pelo reagente visualizador NP-PEG

A-placas antes de ensaio em luz ultravioleta UV-360 nm, B-depois da aspersão de reagente NP-PEG em luz ultravioleta UV-360 nm; 1-extrato bruto das folhas (EBF), 2-extrato bruto dos galhos (EBG), 3-fração hexânica da torta das folhas (THF), 4-fração hexânica da torta dos galhos (THG), 5-fração clorofórmica de torta das folhas (TCF), 6-fração clorofórmica de torta dos galhos (TCG), 7-fração de acetato de etila da torta das folhas (TAF), 8-fração de acetato de etila da torta dos galhos (TAG), 9-fração butanólica da torta das folhas (TBF), 10-fração butanólica da torta dos galhos (TBG), P-padrão (quercetina)

4.1.3. Alcaloides

4.1.3.1. Alcaloides totais

Os alcaloides totais das folhas e dos galhos foram submetidos a CCD, utilizando clorofórmio-metanol (9:1) como eluente. Após a eliminação dos solventes, as cromatoplasmas foram observadas sob luz ultravioleta UV-251 (Figura 17 A) e 360 nm (Figura 17B). Foi observado que os ATF e ATG contém diversas substâncias com polaridade diferentes. As placas de cromatografia em camada delgada dos ATF e ATG têm aparência semelhante (Figura 17 A, B). Posteriormente, as placas foram borrifadas com o reagente Drangendorff (Figura 17C) para confirmar a presença de alcaloides (WAGNER e BLADT, 2001).

Figura 17. Placas de cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ dos alcaloides totais das folhas e dos galhos de *Guatteria elliptica*

A-placas em luz ultravioleta UV-254 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **B**-placas em luz ultravioleta UV-360 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **C**-placas em luz visível depois da aspersão de reagente Dragendorff; **1**-alcaloides totais das folhas (ATF), **2**-alcaloides totais dos galhos (ATG)

O teste com o reagente de Drangendorff confirmou a presença de vários alcaloides nas folhas e nos galhos de *G. elliptica*. Essa observação levou a uma investigação mais aprofundada, por meio de GC-MS, dos alcaloides totais das folhas e dos galhos.

4.1.3.2. Análise dos alcaloides totais por CG-EM

Na revisão da literatura, observou-se que os alcaloides aporfínicos são mais difundidos em *Guatteria*. Outros tipos de esqueletos bastante comuns são as bisbenzilisquinolinas e as protoberberinas (Quadro 3). Foi encontrado, que para esses tipos de alcaloides, a análise por GC-EM é adequada e frequentemente utilizada (GUINAUDEAU, 1994; OHASHI et al., 1963)

4.1.3.3. Análise dos alcaloides totais das folhas por CG-EM

Os alcaloides totais das folhas foram analisados por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas. O cromatograma de ATF está apresentado na Figura 18. No cromatograma, observa-se (Figura 18) a presença de pelo menos 22 substâncias, sendo dois compostos majoritários: RT=14,14 min (38,50 %) e RT= 14,75 min (20,72 %).

Figura 18. Cromatograma obtido para os alcaloides totais das folhas de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

O composto majoritário (RT = 14,1 min) mostrou padrão de fragmentação $m/z = 281$ (M^+), 280 (M^+-1), 266 (M^+-15), 252 (M^+-29), 250 (M^+-31), 237, 221, 178, 165 (Figura 19 A), sendo compatível com o padrão de fragmentação da norcuciferina (Figura 36 E). Como o espectro de massas da norcuciferina na base de dados Wiley 25 não está completa (Figura 19 B), foi usado um espectro encontrado na literatura (RINALDI, 2007) para comparar melhor o padrão da fragmentação (Figura 19 C).

Figura 19. Espectro de massas do composto TR = 14,1 min obtido dos alcaloides totais das folhas de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 14,1 min, B-espectro de massas da nornuciferina encontrado na base de dados Wiley 25, C- espectro de massas da nornuciferina encontrado na literatura (RINALDI, 2007)

O íon molecular em $m/z = 281$ é compatível com a fórmula $C_{18}H_{19}O_2N$. O pico com intensidade 100 % em $m/z = 280$ (M-1) é característico do espectro de aporfínas e corresponde à perda de um átomo de hidrogênio adjacente ao nitrogênio. Os fragmentos $m/z = 266$ e 250 são originados após a abertura do anel C (Figura 6a) do esqueleto aporfínico, seguindo de uma nova ciclização pela perda dos radicais metila ou metoxila, respectivamente (OHASHI et al., 1963; RINALDI, 2007). O mecanismo de fragmentação da nornuciferina está apresentado na Figura 20.

Figura 20. Mecanismo de fragmentação da nornuciferina

(OHASHI, 1963)

Nornuciferina foi previamente isolada de outras espécies de *Guatteria*. Em estudos fitoquímicos prévios, esse alcaloide foi isolado das cascas de *G. blepharophylla* (COSTA et al., 2012), *G. hispida* (COSTA et al., 2010) e *G. lehmannii* (SAEZ; BLAIR; SAEZ, 1997). Nas folhas, nornuciferina foi encontrada em *G. diospyroides* (LOPEZ et al., 1992), *G. ouregou* (CORTES et al., 1986) e *G. amplifolia*, (MONTENEGRO et al., 2003), sendo também relatada atividade antiparasitária para esse alcaloide contra *Leishmania mexicana* e *Leishmania panamensis* (MONTENEGRO et al., 2003). A nornuciferina foi encontrada nas cascas e folhas de *G. sagotiana* (RASAMIZAFY et al., 1986) e de *G. chrysopetala* (HOCQUEMILLER et al., 1984b). Este alcaloide, comumente encontrado em *Guatteria*, é considerado marcador quimiotaxonômico de Annonaceae (SANTOS et al., 2015).

O segundo composto majoritário (RT=14,7 min) mostrou padrão de fragmentação $m/z = 297$ (M^+), 296 (M^+-1 , 100%), 282 (M^+-15), 266 (M^+-31), 237, 210, 181, 165 (Figura 21). Para esse composto não foi encontrado o espectro de massas na base de dados Wiley 25, nem na literatura pesquisada. No futuro estudo, esse composto deveria ser isolado e ter sua estrutura elucidada.

Figura 21. Espectro de massas do composto TR = 14,7 min obtido dos alcaloides totais das folhas de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

Figura 22. Espectro de massas do composto TR = 15,1 min obtido dos alcaloides totais das folhas de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 15,1 min, B-espectro de massas da estefarina encontrado na base de dados Wiley 25

Figura 23. Mecanismo de fragmentação da estefarina

(TOMITA et al., 1965)

O composto com RT = 15,1 min mostrou padrão de fragmentação $m/z = 297$ (M^+), 296 ($M^+ + 1$), 281 ($M^+ + 17$), 269 ($M^+ + 29$), 268 (Figura 22), sendo compatível com a estefarina (Figura 36 F).

O íon molecular em $m/z = 297$ (100 %) é compatível com a fórmula $C_{18}H_{19}NO_3$. O pico em $m/z = 296$ corresponde à perda de um átomo de hidrogênio adjacente ao nitrogênio. O pico $m/z = 268$ é resultado da perda de CO a partir da quinona presente no anel D. O mecanismo de fragmentação da estefarina está apresentado na Figura 23.

A estefarina não foi previamente isolada de espécies de *Guatteria*, porém foi isolada de outros gêneros de Annonaceae. Um estudo fitoquímico resultou na identificação da estefarina nas cascas e raízes de *Xylopia parviflora* (NISHIYAMA et al., 2006). O alcaloide também está presente nos galhos de *Desmos dumosus* (SULAIMAN et al., 2003), nas sementes de *Monodora brevipes* (ETSE et al., 1989), cascas de *Alphonsea sclerocarpa* (TADIC et al., 1987) e nas folhas, raízes e cascas de *Annona muricata* (LEBOEUF et al., 1981).

Outro composto minoritário (RT = 18,9 min) mostrou padrão de fragmentação $m/z = 327$, 296, 178 (100 %), 151, 150 e 135 (Figura 24) e foi compatível com discretamina (Figura 36 D).

Figura 24. Espectro de massas do composto TR = 18,9 min obtido dos alcaloides totais das folhas de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 18,9 min, B-espectro de massas da discretamina encontrado na base de dados Wiley 25

O íon molecular em $m/z = 327$ é compatível com a fórmula $C_{19}H_{21}O_4N$. O pico em $m/z = 178$ resulta de uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder, característica para alcaloides protoberberínicos (OHASHI et al., 1963). Os fragmentos obtidos da fragmentação do tipo retro-Diels-Alder da discretamina estão mostrados na Figura 25.

A discretamina foi previamente isolada de *G. discolor* e *G. scandens* (CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989; HOCQUEMILLER et al., 1984a). Esse alcaloide foi também isolado de *Duguetia moricandiana* Mart. (Annonaceae) onde foi indicada propriedade antinociceptiva para esse alcalóide (ALMEIDA et al., 2011). Ainda existem indicações de que (-)-discretamina é um antagonista seletivo do α -adrenoreceptor e do receptor 5-HT no músculo liso vascular (KO et al., 1993). Discretamina possui esqueleto protoberberínico, comum em espécies de *Guatteria*, para o qual já foram relatadas cerca de 15 estruturas no gênero (Quadro 3).

Figura 25. Fragmentos obtidos da fragmentação do tipo retro Diels Alder da discretamina

4.1.3.4. Análises por CG-EM de alcaloides totais dos galhos

Os alcaloides totais dos galhos foram analisados por cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas. O cromatograma de ATG está apresentado na Figura 26. No cromatograma, observa-se (Figura 26) a presença de pelo menos 33 substâncias, sendo quatro compostos majoritários: RT=13,92 min (13,53 %), RT=14,11 min (16,09 %), RT=14,68 min (13,23 %) e RT=14,73 min (8,35 %).

Figura 26. O cromatograma obtido para os alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

Os espectros de massas mostraram, que três compostos encontrados nos galhos possuem padrão de fragmentação muito parecido aos compostos já detectados nas folhas. Esses compostos foram identificados como: norruciferina (RT=14,1 min; Figura 36 E), estefarina (RT=15,1 min; Figura 36 F) e discretamina (RT=18,4 min; Figura 36 D). Os espectros de massas desses compostos estão mostrados nas Figuras 27-29. O composto (RT = 14,73 min) mostrou padrão de fragmentação igual ao composto desconhecido observado nas folhas (RT = 14,73 min).

Figura 27. Espectro de massas do composto TR = 14,1 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 14,1 min, B-espectro de massas da nornuciferina encontrado na base de dados Wiley 25

Figura 28. Espectro de massas do composto TR = 15,1 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 15,1 min, B-espectro de massas da estefarina encontrado na base de dados Wiley 25

Figura 29. Espectro de massas do composto TR = 18,4 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 18,4 min, **B-**espectro de massas da discretamina encontrado na base de dados Wiley 25

A descrição e mecanismo de fragmentação dos alcaloides discretamina, estefarina e norcuciferina, bem como a ocorrência em *Guatteria*, foram apresentados anteriormente na parte de análises por CG-EM de alcaloides totais das folhas.

O composto com RT = 13,9 min mostrou o padrão de fragmentação $m/z = 267$ (M^+), 266 ($M^+ - 1$) (100 %), 252 ($M^+ - 15$), 250 ($M^+ - 17$), 236 ($M^+ - 31$), 224 ($M^+ - 43$) e 193 ($M^+ - 74$) (Figura 30) e foi compatível com a asimilobina (Figura 36 A).

O íon molecular em $m/z = 267$ foi compatível com a fórmula $C_{17}H_{17}NO_2$. O pico em $m/z = 266$ (100 %) é característico do espectro de aporfinas e corresponde à perda de um átomo de hidrogênio adjacente ao nitrogênio. Os fragmentos $m/z = 252$, 250 e 236 são resultados da perda dos radicais metila, hidroxila e metoxila, respectivamente (JACKSON; MARTIN, 1966; OHASHI et al.; 1963). O mecanismo de fragmentação da asimilobina está apresentado na Figura 31. A asimilobina foi previamente isolada de *G. scandens* (HOCQUEMILLER et al., 1983).

Figura 30. Espectro de massas do composto TR=13,9 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 13,9 min, B-espectro de massas da assimilobina encontrado na base de dados Wiley 25

Figura 31. Mecanismo de fragmentação da assimilobina

Um dos compostos minoritários (RT = 16,8 min) mostrou padrão de fragmentação $m/z = 327$ (M^+), 326 (M^+-1), 312 (M^+-15), 310 (M^+-17), 296 (M^+-31), 284 (M^+-43), 281, 269, (M^+-58), 253 (M^+-74), 207 (Figura 32) e foi compatível com a corituberina (Figura 36 C).

O íon molecular em $m/z = 327$ (100 %) é compatível com a fórmula $C_{19}H_{21}NO_4$. O pico em $m/z = 326$ é característico do espectro de aporfinas e corresponde à perda de um átomo de hidrogênio adjacente ao nitrogênio. Os fragmentos $m/z = 310$ e 296 são resultados da perda dos radicais hidroxila e metoxila, respectivamente (JACKSON; MARTIN, 1966; OHASHI et al.; 1963). Pequenas variações em intensidade de picos da amostra e do padrão de fragmentação encontrado no Wiley 25 poderiam ser explicadas pela co-eluição com outras substâncias por se tratar de um composto presente em menor quantidade. O mecanismo de fragmentação da corituberina está apresentado na Figura 33.

Figura 32. Espectro de massas do composto TR = 16,8 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 16,8 min, **B-**espectro de massas da corituberina encontrado na base de dados Wiley 25

Figura 33. Mecanismo de fragmentação da corituberina

A corituberina foi previamente isolada nos galhos de *G. goudotiana* (CASTEDO et al., 1991). Em um ensaio *in vivo*, esse alcaloide inibiu a atividade exploratória em ratos, provocou ptose palpebral, catalepsia e hipotermia, e prolongou anestesia (ZETLER, 1988). Corituberina também tem outras atividades farmacológicas, como aceleração da respiração e diminuição do pulso (SHAMMA, 1972). Nishiyama et al. (2010) comprovaram a atividade antinociceptiva desse alcaloide.

Para o composto com RT = 19,2 min o padrão de fragmentação foi $m/z = 341$ (M^+), 340 (M^+-1), 178, 176, 164 (100 %) (Figura 34), o qual foi compatível com aquele da caseadina (Figura 36 B). O íon molecular em $m/z = 341$ é compatível com a fórmula $C_{20}H_{23}NO_4$. O pico em $m/z = 164$ é resultante de uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder, a partir do íon molecular, com a carga positiva localizada no sistema aromático, indicando que o composto RT = 19,2 min seja caseadina (JACKSON; MARTIN, 1966). O mecanismo de fragmentação da caseadina está apresentado na Figura 35.

Figura 34. Espectro de massas do composto TR = 19,2 min obtido dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

A- espectro de massas do composto TR = 19,2 min, **B-**espectro de massas da caseadina encontrado na base de dados Wiley 25

Figura 35. Mecanismo de fragmentação da caseadina

(RINALDI, 2007)

A caseadina não foi previamente isolada de espécies de *Guatteria*, porém já foi isolada da família Annonaceae. O alcaloide está presente nas folhas de *Dasymaschalon sootepense* (SINZ et al., 1998). Adicionalmente, a caseadina foi isolada da espécie *Annona hypoglauca* (RINALDI, 2007).

Resumindo a análise dos alcaloides totais das folhas e dos galhos por CG-EM, foram identificados 4 alcaloides aporfínicos: nornuciferina (folhas e galhos), estefarina (folhas e galhos), corituberina (galhos) e assimilobina (galhos), e dois alcaloides protoberberínicos: discretamina (folhas e galhos) e caseadina (galhos) em *G. elliptica* (Figura 36). Três alcaloides (nornuciferina, estefarina e discretamina) foram encontrados tanto nas folhas como nos galhos, confirmando a observação anterior na CCD de que a composição de ATF e ATG era semelhante (Figura 17 A, B). Os alcaloides identificados em *G. elliptica* pertencem aos esqueletos aporfínico e protoberberínico, o que é frequentemente encontrado em *Guatteria* (CAVÉ; LEBOEUF; CASSELS, 1989).

Figura 36 Estruturas dos alcaloides identificados nas folhas e nos galhos de *Guatteria elliptica*

A-asimilobina, B-caseadina, C-corituberina, D-discretamina, E-nornuciferina, F-estefarina

4.1.3.5. Isolamento e purificação dos alcaloides das folhas

No total, 2,81 g dos alcaloides totais das folhas foram submetidos ao fracionamento por meio de cromatografia em coluna de gel de sílica (Coluna 1), gradualmente aumentando a polaridade do eluente: clorofórmio (100%) para obter F1 e F2, cloróformio-metanol (9:1) para F3-F6, cloróformio-metanol (8:2) para F7-F10, cloróformio-metanol (7:3) para F11-F14, cloróformio-metanol (1:1) para F15-F18 e metanol

(100%) para F19 e F20. Esse procedimento foi apresentado anteriormente no Quadro 12. Como resultado, 20 frações (F1-F20) foram obtidas.

Os alcaloides majoritários de ATF foram observados principalmente nas frações F4, F5 e F6 ($R_f \sim 0,76; 0,65; 0,47; 0,59$), utilizando cloróformio-metanol (9:1) como eluente (Figura 37 A e B). A presença dos alcaloides foi confirmada (Figura 37 C), utilizando o reagente Dragendorff.

Figura 37. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ das frações F1-F7 dos alcaloides totais das folhas de *Guatteria elliptica* obtidos por meio de cromatografia em coluna observadas em luz ultravioleta luz e visível

A- luz ultravioleta UV-254 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, B- luz ultravioleta UV-360 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, C-luz visível depois da aspersão de reagente Dragendorff

As frações F4, F5 e F6 apresentaram vários compostos e essas frações foram adicionalmente fracionadas por cromatografia em coluna (Coluna 2). Para fracionamento pela Coluna 2, foram usados solventes com polaridade crescente: cloróformio (100%) para obter F4/5/6.1*-F4/5/6.10*, cloróformio-metanol (95:5) para F4/5/6.11*-F4/5/6.30*, cloróformio-metanol (90:10) para F4/5/6.31*-F4/5/6.35*, cloróformio-metanol (85:15) para F4/5/6.36*, cloróformio-metanol (80:20) para F4/5/6.37*, cloróformio-metanol (60:40) para F4/5/6.38*, cloróformio-metanol (1:1) para F4/5/6.39* e metanol (100%) para F4/5/6.40* (Quadro 13). Fracionamento pela Coluna 2 resultou em 40 frações adicionais para F4 F5 e F6 (F4/5/6.1*-F4/5/6.40*) e essas frações foram marcadas com o asterisco (*).

As frações obtidas por meio de fracionamento na coluna cromatografica, foram posteriormente submetidas a isolamento e purificação, utilizando cromatografia em camada

delgada preparativa. Como eluente na CCDp, foram usados sistemas de solvente com polaridade diferente: cloróformio-metanol (97:3) para F1-F3 e F7, cloróformio-metanol (85:15) para F8-F20 e F4/5/6.31*-F4/5/6.40*, cloróformio-metanol (9:1) para F4/5/6.1*-F4/5/6.30* (Quadro 14). Todo procedimento de fractionamento e isolamento de alcaloides das folhas por meio de coluna cromatografica (Coluna 1 e Coluna 2) e CCDp foi resumido anteriormente no Quadro 15.

As substâncias com resultado positivo do teste com reagente de Dragendorff foram identificadas como alcaloides. Essas substancias foram raspadas da placa de CCDp e extraídas com cloróformio. Os compompostos com R_f e coloração parecidos foram reunidos. Isolamento e purificação , das folhas por meio de CCDp resultaram em pequena quantidade de 8 amostras (Tabela 4).

Tabela 4. Massas de amostras de alcaloides isoladas das folhas de *Guatteria elliptica*

amostra	massa (g)	R_f
1	0,0115	0,5
2	0,0059	0,5
3	0,0035	0,6
4	0,0041	0,6
5	0,0048	0,5
6	0.0048	0,4
7	0,0051	0,6
8	0,0009	0,4

O método de separação e purificação dos alcaloides por meio da coluna e CCDp foi escolhido como preferível por que é econômico e, na maioria dos casos, satisfatório (FALKENBERG, SANTOS e SIMÕES, 2010). Entretanto, o isolamento de alcaloides das folhas de *G. elliptica* por meio desses métodos não foi concluído com êxito por causa de rápida degradação dos alcaloides em contato com o gel de sílica. A degradação de aporfina, alcaloides mais comuns de *G. elliptica*, é conhecida na literatura. A via mais comum da degradação desses alcaloides acontece através de quaternização do nitrogênio básico, seguido de eliminação de Hofmann. Depois, pode ocorrer clivagem oxidativa da ligação dupla (C-9,10; C-5,6 ou C-6a,7).

Além disso, é possível a oxidação do anel B, através do intermediário 4,5-dioxoaporfina, ou fissão oxidativa dos anéis A e B (Figura 6a) (SHAMMA, 1985). Por isso, a análise e identificação desses compostos não foi possível. Em estudos futuros, abordagem diferente deve ser tomada para isolamento de alcaloides das folhas de *G. elliptica*. Um dos métodos, que poderiam ser sugeridos para a separação e purificação do alcaloides das folhas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Preparativa (CLAEp). Esse método, já utilizado para isolamento de alcaloides de *Guatteria* (MAHIOU et al.1994), é mais robusto, preciso e eficiente do que CCDp, porém demorado, caro e nem sempre disponível em todos os laboratórios. Outro método usual empregado para isolamento de compostos bioativos é Extração em Fase Solida (EFS), sendo mais barata, rápida e acessível do que HPLCp (TAVEIRA et al., 2012).

4.1.3.6. Isolamento e purificação dos alcaloides dos galhos

No começo, uma pequena quantidade (0,10 g) dos alcaloides totais dos galhos foram submetidos ao fracionamento por meio de cromatografia em coluna (50 x 1 cm) sobre gel de sílica, gradualmente aumentando a polaridade do eluente: clorofórmio (100%) para obter F1, cloróformio-metanol (9:1) para F2-F3, cloróformio-metanol (8:2) para F4-F5, cloróformio-metanol (7:3) para F6-F7, cloróformio-metanol (1:1) para F8-F9 e metanol (100%) para F10. Esse procedimento foi apresentado anteriormente no Quadro 16. Como resultado, 10 frações (F1-F10) foram obtidas (Figura 38 A e B), utilizando clorofórmio-metanol (9:1) como eluente e a presença dos alcaloides foi confirmada (Figura 38 C). Os alcaloides majoritários de ATG foram observados principalmente nas frações F2 e F3 (Figura 38).

Figura 38. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ das frações F1-F10 dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* obtidos por meio de cromatografia em coluna observadas em luz visível e ultravioleta

A- luz ultravioleta UV-254 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **B-** luz ultravioleta UV-360 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **C-** luz visível depois da aspersão de reagente Dragendorff

As frações obtidas por meio de fracionamento na coluna cromatografica, foram posteriormente submetidas a isolamento e purificação, utilizando cromatografia em camada delgada preparativa. Como eluente na CCDp, foram usados sistemas de solvente com polaridade diferente: cloróformio-metanol (98:2) para F1-F3 e cloróformio-metanol (9:1) para F4-F10. Nesse caso, vapor de amônia foi adicionado para melhorar a separação. O procedimento de fractionamento e isolamento de alcaloides dos galhos por meio de CCDp foi resumido anteriormente no Quadro 17.

Isolamento de alcaloides dos galhos por meio da coluna e CCDp não foi possível por causa de rápida degradação dos alcaloides em contato com gel de sílica (PHILLIPSON et al, 1985), já observada para os alcaloides das folhas. Para não arriscar perda da amostra (ATG) e superar o problema da degradação, foi empregado o método de Extração em Fase Sólida (EFS) (MAHIOU et al.1994).

No total, foi realizado a fracionamento por meio de EFS de 0,91 g de ATG. Condições de pré-condicionamento e de eluição foram estabelecidos de acordo com as informações de fornecedor e a literatura pesquisada, e se encontram descritas na metodologia desse trabalho. Foram usados sistemas de solvente com polaridade diferentes: metanol-NH₄OH 2,5% aq. (5:95) para F1, metanol-NH₄OH 2,5% aq. (10:90) para F2, metanol-NH₄OH 2,5% aq. (20:80) para F3, metanol-NH₄OH 2,5% aq. (30:70) para F4, metanol-NH₄OH 2,5% aq. (40:60) para F5, metanol-NH₄OH 2,5% aq. (50:50) para F6, metanol-NH₄OH 2,5% aq. (70:30) para F6 e metanol (100%)

para F8 metanol (Quadro 18). Esse procedimento resultou em 8 frações (F1 – F8) e as massas dessas frações estão listadas na Tabela 5. As frações foram observadas na cromatoplas de CCD, utilizando clorofórmio-metanol (9:1) como eluente (Figura 39 A e B). A presença dos alcaloides foi confirmada, utilizando o reagente Dragendorff (Figura 39 C).

Figura 39. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ das frações F1-F8 dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* obtidos por meio da extração em fase sólida (cartucho de fase reversa C18) observadas em luz ultravioleta e visível

A- luz ultravioleta UV-254 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **B-** luz ultravioleta UV-360 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **C-** luz visível depois da aspersão de reagente Dragendorff

Tabela 5. Massas de frações obtidas dos galhos de *Guatteria elliptica* por meio da extração em fase sólida

frações	massa (g)
F1	0,3496
F2	0,0247
F3	0,0454
F4	0,0470
F5	0,0661
F6	0,0541
F7	0,3106
F8	0,0600

As frações obtidas por meio de SPE foram submetidas a CCDp, utilizando uma mistura de clorofórmio-metanol como eluente: clorofórmio-metanol (9:1) para F1-F4, clorofórmio-metanol (95:5) para F5 e clorofórmio-metanol (98:2) para F6-F8 (Quadro 19).

As amostras 9 (0,0110 g) e 10 (0,0230 g) foram isoladas das frações F6 e F7 dos galhos. Essas amostras foram adicionalmente purificadas na placa de CCDp, utilizando tolueno-acetona-metanol (7:2:1) e clorofórmio-acetato de etila (7:3) como eluente Posteriormente, essas amostras (9 e 10) foram analisadas por meio de RMN-¹H, CG-EM e/ou LC-EM/EM.

4.1.3.7. Identificação da Amostra 9

Amostra 9 (0,0110 g) foi visualizada como banda roxa (UV-360 nm) com R_f=0,3 na placa CCDp, utilizando clorofórmio-metanol (9:1) como eluente (Figura 40 A e B). A presença de alcaloide foi confirmada nessa amostra, dando resultado positivo com o reagente Dragendorff (Figura 40 C).

Figura 40. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Amostra 9 obtida dos galhos de *Guatteria elliptica* observada em luz ultravioleta e visível

A- luz ultravioleta UV-254 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **B-** luz ultravioleta UV-360 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **C-** luz visível depois da aspersão de reagente Dragendorff

A amostra foi analisada por CG-EM e RMN-¹H. Análise de CG-EM mostrou a presença de dois compostos (RT=16,42 min e RT=17,07 min) na Amostra 9 (Figura 41), em proporção da área de 72:21 %.

Figura 41. Cromatograma da Amostra 9 isolada dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

Os compostos RT = 16,42 min (Figura 42 A) e RT = 17,0 min (Figura 42 B) mostraram padrão de fragmentação compatível com nornuciferina (Figura 36 E) e assimilobina (Figura 36 A), apresentados anteriormente na parte de análise dos alcaloides totais por CG-EM desse trabalho de ATF e ATG.

Figura 42. Espectro de massas dos compostos TR = 16,4 min (A) e TR=17,0 min (B) presentes na Amostra 9 obtida dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna capilar HP5-MS

Adicionalmente, a amostra 9 foi analisada por RMN-¹H para confirmar as estruturas identificadas. O espectro está mostrado na Figura 43. As principais atribuições dos valores do espectro de RMN-¹H encontradas para Amostra 9 e os dados da literatura estão descritas na Tabela 6

Figura 43. Espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (300 MHz, CDCl_3) da Amostra 9 obtida dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica*

Tabela 6. Atribuições dos valores do espectro de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (300 MHz, CDCl_3) da Amostra 9 obtida de alcaloides totais dos galhos e da nornuciferina

posição do H	Amostra 9	nornuciferina*
--------------	-----------	----------------

11	8,40 (d); J=7,8 Hz, (1H)	8,41 (d); J=7,8 Hz
10, 9, 8	7,24-7,35 (m)	7,25-7,40 (m)
6a	-	3,83 (dd); J=12,5 Hz; J=5,8 Hz
3	6,66 (s), (1H)	6,68 (s)
1 OCH_3	3,68 (s) (3H)	3,67 (s)
2 OCH_3	3,90 (s) (3H)	3,91 (s)

* CDCl_3 , 400 MHz (HASRAT et al., 1997)

Shamma (1972) relatou que, em espectros de $\text{RMN-}^1\text{H}$ de aporfina, a metoxila em C-1 é normalmente encontrada entre δ 3,4-3,7 ppm e se diferencia das metoxilas nas posições 2, 9 e 10, que aparecem normalmente entre δ 3,8-3,9 ppm, devido a não planaridade dos anéis aromáticos. No espectro da Amostra 9, foram observados dois sinais característicos de metoxilas: um sinal em δ 3,68 ppm (3H) que pôde ser atribuído a metoxila localizada no C-1, e o outro em δ 3,90 ppm (3H) àquela na posição C-2.

Na região dos hidrogênios aromáticos, a Amostra 9 apresentou dois sinais importantes, um em δ 6,66 ppm (1H) e outro em δ 8,40 ppm (1H). O primeiro sinal é característico para o hidrogênio aromático na posição C-3 das aporfina, normalmente encontrado entre δ 6,5-6,7 ppm (SHAMMA, 1972). Já o sinal em δ 8,40 ppm pode ser atribuído a presença de um hidrogênio aromático na posição C-11, o qual normalmente se encontra em um campo mais baixo (δ 7,6-8,2 ppm) devido aos efeitos anisotrópicos do substituinte oxigenado na posição C-1 e aos efeitos dos anéis aromáticos A e D (SHAMMA, 1972). Para a molécula da nornuciferina, esse hidrogênio teve sua absorção anteriormente descrita em δ 8,41 ppm (HASRAT et al., 1997). O fato desse sinal se apresentar com um dubleto com J= 7,8 Hz indica a presença de um outro hidrogênio

aromático vizinho (*orto*) a ele (PAVIA et al., 2010). Portanto, a posição C-10 não se encontra substituída, como seria esperado para a nornuciferina. Nessa região, o espectro da Amostra 9 apresenta ainda um conjunto de sinais menos definidos entre δ 7,24-7,35 ppm que correspondem a presença de hidrogênios aromáticos adicionais nas posições C-10, C-9 e C-8, como já descrito para a nornuciferina (CHANG et al., 2000; HASRAT et al., 1997).

A comparação entre os dados de RMN- ^1H da literatura e obtidos para a Amostra 9, mostrou que os principais sinais observados no espectro estão muito próximos dos valores atribuídos ao alcaloide nornuciferina. Os sinais correspondentes a assimilobina, o outro alcalóide presente na Amostra 9, não puderam ser distinguidos no espectro, provavelmente devido a sua menor concentração na mistura e/ou sobreposição destes com outros componentes minoritários.

4.1.3.8. Identificação da Amostra 10

A Amostra 10 (0,0230 g) foi visualizada como banda amarela (UV-360 nm) com $R_f=0,6$ na placa CCDp utilizando sistema de solvente clorofórmio-metanol (9:1) (Figura 44 A e B). Foi confirmada a presença de alcaloide nessa amostra, dando resultado positivo com o reagente Dragendorff (Figura 44 C)

Figura 44. Cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ da Amostra 10 obtida dos galhos de *Guatteria elliptica* observada em luz ultravioleta e visível

A- luz ultravioleta UV-254 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **B-** luz ultravioleta UV-360 nm antes da aspersão de reagente Dragendorff, **C-** luz visível depois da aspersão de reagente Dragendorff

Inicialmente, a Amostra 10 foi analisada por CG-EM. Entretanto, a Amostra 10 não foi eluída da coluna cromatográfica, portanto deve-se tratar de uma amostra com baixa volatilidade. Consequentemente, essa amostra foi submetida a análises de LC-EM/EM para identificação do(s) seu(s) componente(s) (Figura 45).

Figura 45. Cromatograma obtido para a Amostra 10 isolada dos alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna Zorbax Extend C18

No cromatograma, observa-se (Figura 45) a presença de pelo menos 11 substâncias, sendo seis delas mais predominantes (RT=5,0 min; RT=5,4 min; RT=6,3 min; RT=6,8 min; RT=7,6 min e RT=8,2 min, RT=13,2 min e RT=14,4 min), com quatro picos majoritários (RT=6,8 min; RT=8,2 min, RT=13,2 min e RT=14,4 min).

Os espectros de massas foram comparados com os padrões de fragmentação encontrados na literatura (MEYER et al., 2013; JEONG et al., 2012; MA et al., 2008; WU e HUANG, 2006). Na amostra, os compostos foram identificados a partir de seus padrões de fragmentação.

O espectro de massas do pico com RT=5,00 min apresentou uma série de fragmentos $m/z=374, 365, 349, 342, 330, 308, 273, 247, 232, 210, 189, 178, 157, 140$ e 121 (Figura 46 A). O íon $m/z=342$, correspondente à massa de alcaloides isoquinolínicos, foi selecionado para fragmentação adicional (Figura 46 B), mostrando padrão de fragmentação $m/z=342, 327, 192,$

178 e 165. O íon $m/z=342$ ($M+H$)⁺ foi compatível com a fórmula $C_{20}H_{23}O_4N$, que corresponde à caseadina (Figura 58 A). O pico $m/z=327$ foi resultado da perda de radical metila. Os fragmentos $m/z=165$ e 178 são originados após à abertura do anel C. O mecanismo proposto de fragmentação da caseadina está apresentado na Figura 47 e foi baseado no mecanismo de fragmentação de alcaloide protoberberínico (MA et al., 2008).

Caseadina foi previamente identificada, neste trabalho, nos alcaloides totais dos galhos por GC-EM. Porém, no caso da Amostra 10, caseadina não foi eluída da coluna cromatográfica. Isso pode ser explicado pela presença de uma mistura de compostos polares na amostra. Além disso, pode-se suspeitar que caseadina fosse na forma de sal ou formasse complexo com outro composto da amostra, devido a presença de solventes e/ou contaminantes no processo de extração e purificação, resultando substâncias menos voláteis e não detectáveis por CG-EM.

Figura 46. Espectro de massas total do pico TR=5,00 min (A) e espectro de massas obtido pela fragmentação adicional do íon $m/z=342$ (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna Zorbax Extend C18

Figura 47. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da caseadina

(MA et al., 2008)

O pico em $RT=5,40$ min apresentou como íons mais importante $m/z=477$, 436, 393, 356, 342, 330, 308, 247, 232, 189, 140, entre outros (Figura 48 A). O íon em $m/z=356$, correspondente à massa de alcaloides isoquinolínicos, foi selecionado para fragmentação adicional (Figura 48 B), mostrando padrão de fragmentação $m/z=356$, 340 e 192. O íon $m/z=356$ ($M+H$)⁺ foi compatível com a fórmula $C_{20}H_{21}O_5N$, que corresponde ao *N*-óxido de oliverina (Figura 58 E). O mecanismo proposto para a fragmentação do *N*-óxido de oliverina está apresentado na Figura 49 e foi baseado no mecanismo de fragmentação de alcaloides aporfínicos (MA et al., 2008). A partir desse mecanismo, foi possível propor que o fragmento em $m/z=340$ foi originado após a perda de metano depois da formação do íon molecular. O fragmento $m/z=192$ é o resultado de várias etapas de rearranjos e fragmentações.

O alcalóide *N*-óxido de oliverina não foi previamente isolado de espécie de *Guatteria*, porém foi isolado da família Annonaceae das cascas de *Greenwayodendron* (*Polyalthia suaveolens*) (HASAN et al., 1982). Esse alcaloide é metoxilado no C-7 (Figura 6 A), cuja substituição nessa posição é exclusiva para espécies de Annonaceae (GUINAUDEAU et al., 1982).

Figura 48. Espectro de massas do pico de TR=5,40 min (**A**) e espectro de massas do íon $m/z=356$ min (**B**) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna Zorbax Extend C18

Figura 49. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM do *N*-óxido de oliverina

(MA et al., 2008)

No pico com $RT=6,27$ min, os principais íons detectados foram $m/z=437$, 393, 365, 338, 330, 308, 296, 285, 261, 247, 227, 219, 197, 178, 157, 140 (Figura 50 A). O íon $m/z=338$, correspondente à massa de alcaloides isoquinolínicos, foi selecionado para fragmentação adicional (Figura 50 B), mostrando padrão de fragmentação $m/z=338$, 323 e 294. O íon $m/z=338$ ($M+H$)⁺ foi compatível com a fórmula $C_{20}H_{19}O_4N$, que corresponde à desidronantenina (Figura 58 B). Essa estrutura foi proposta com base do mecanismo de fragmentação de alcaloides aporfínicos, como mostrado na Figura 51 (JEONG et al., 2012; MA et al., 2008). O pico $m/z=323$ foi originado pela perda de radical metila, a partir do íon formado pela ionização da metoxila na posição C-1. Já o fragmento $m/z=294$, foi formado após abertura do anel B e perda de um radical $\bullet CH_2NHCH_3$.

A desidronantenina foi previamente isolada das folhas de *G. goudotiana* (CASTEDO et al., 1991). Esse alcaloide não foi encontrado em outras espécies de Annonaceae, porém é comum em Papaveraceae: *Corydalis bulbosa*, *Corydalis marschalliana* e *Corydalis slivenensis* (KIRYAKOV et al., 1982; KIRYAKOV et al., 1981a; KIRYAKOV et al., 1981b).

Figura 50. Espectro de massas do pico RT=6,27 min (A) e espectro de massas do íon $m/z=338$ (B) encontrado na Amostra 10 isolada dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna Zorbax Extend C18

Figura 51. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da deidronantenina

(JEONG et al., 2012; MA et al., 2008)

O pico em RT=6,80 min apresentou fragmentos de massas em $m/z=657$, 613, 352, 247, 157, entre outros (Figura 52 A). O íon em $m/z=352$, correspondente à massa de alcaloides isoquinolínicos, foi selecionado para fragmentação adicional (Figura 52 B), mostrando padrão de fragmentação $m/z=352$, 336 e 308. O íon $m/z=352$ $(M+H)^+$ é compatível com a fórmula $C_{20}H_{17}O_5N$, que corresponde à glaunidina (Figura 58 C). O pico $m/z=336$ é originado após a perda de metano, a partir do grupo *N*-metila, depois da formação do íon molecular. O mecanismo proposto para a fragmentação da glaunidina está apresentado na Figura 53 e foi baseado no mecanismo de fragmentação anteriormente proposto para esse tipo de alcaloides aporfínicos (MEYER et al., 2013).

A ocorrência de glaunidina não foi previamente reportada em espécies de *Guatteria* nem mesmo em Annonaceae. Entretanto, esse alcaloide foi isolado anteriormente de *Aconitum leucostomum* (Ranunculaceae) (ZHAMIERASHVILI, et al., 1980) e *Glaucium fimbriigerum* (Papaveraceae) (KARIMOVA et al., 1980). Como se trata de um alcaloide iônico polar, seu isolamento pelos métodos usuais não é tão comum. Na literatura pesquisada, não foram encontrados relatos sobre atividades biológicas para a glaunidina isolada. Em estudos futuros, esse composto deveria ser isolado em quantidades adequadas para avaliação de suas propriedades biológicas.

Figura 52. Espectro de massas do pico TR=6,80 min (A) e espectro de massas do íon $m/z=352$ (TR=6,80 min) (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna Zorbax Extend C18

Figura 53. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da glaunidina

(MEYER et al., 2013)

Os principais fragmentos observados para o pico em RT=7,63 min foram: $m/z=441$, 379, 330, 308, 247, 219, 178 (Figura 54 A). O íon $m/z=308$, correspondente à massa de alcaloides isoquinolínicos, foi selecionado para fragmentação adicional (Figura 54 B), mostrando padrão de fragmentação $m/z=308$, 307, 275 e 195. O íon $m/z=308$ ($M+H$)⁺ foi compatível com a fórmula molecular da telkovina ($C_{18}H_{13}O_4N$) (Figura 58 F). O mecanismo proposto de fragmentação da telkovina está apresentado na Figura 55 e foi baseado na fragmentação de alcaloides oxo-aporfinicos (MA et al., 2008). O pico $m/z=307$ pode ter sido originado após perda de um radical de hidrogênio. A perda de um radical de hidrogênio em conjunto com a de uma molécula de metanol, caso a ionização aconteça na metoxila, pode dar origem ao fragmento $m/z=275$. O pico $m/z=195$ pode ter sido originado após a perda de uma série de fragmentos a partir da abertura dos anéis B e D. Telkovina também não havia sido previamente reportada para *Guatteria* spp. nem para Annonaceae. Entretanto, esse alcaloide foi isolado de *Telotoxicum krukovi* (Menispermaceae) (GUINAUDEAU et al., 1994).

Figura 54. Espectro de massas do pico TR=7,63 min (A) e espectro de massas do íon $m/z=308$ (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna Zorbax Extend C18

Figura 56. Espectro de massas do pico TR=8,23 min (A) e espectro de massas do íon $m/z=276$ (B) encontrado na Amostra 10 isolada de alcaloides totais dos galhos de *Guatteria elliptica* utilizando coluna Zorbax Extend C18

Figura 57. Mecanismo de fragmentação LC-EM/EM da liriodenina

(JEONG et al., 2012)

Na Amostra 10, a partir de seus padrões de fragmentação, foram identificados cinco alcaloides aporfínicos (desidronantenina, glaunidina, liriodenina, *N*-óxido de oliverina e telikovina) e um alcaloide protoberberínico (caseadina) (Figura 58).

Figura 58. Estruturas dos alcaloides identificados na Amostra 10 isolada dos galhos de *Guatteria elliptica*

A – caseadina, **B** – desidronantenina, **C** – glaunidina, **D** – liriodenina, **E** - *n*-óxido de oliverina, **F** - telikovina

4.2. Análise biológica

4.2.1. Atividade antioxidante - método qualitativo

Nesse ensaio, a presença de manchas claras de inibição nas placas cromatográficas contra um fundo roxo é indicativa da ocorrência de compostos com atividade antioxidante (Figura 59). O extrato bruto das folhas e dos galhos apresentaram uma mancha clara junto ao ponto de aplicação das amostras, sugerindo que os compostos com atividade não foram eluídos no sistema cromatográfico empregado. Como os extratos brutos contêm várias substâncias com polaridades distintas, desde muito apolares a muito polares, assim o sistema empregado de polaridade média não foi capaz de eluir os compostos mais polares. Essa variedade de substâncias com polaridade distintas acontece por que todas as substâncias encontradas nas folhas e nos galhos de *G. elliptica*

se encontram nos extratos brutos. As substâncias de diferentes polaridades foram separadas só posteriormente, durante da extração dos alcaloides totais e fracionamento das tortas. Assim, não é possível identificar uma classe de metabólitos secundários responsável pela atividade antioxidante. Uma pesquisa anterior mostrou que os extratos brutos de outras espécies de *Guatteria* também possuem substâncias com atividade antioxidante, como, por exemplo, extrato bruto das folhas e cascas de *G. megalophylla* e *G. modesta* (LOCK et al., 2005).

Os alcaloides totais das folhas e dos galhos apresentaram muitas substâncias com atividade antioxidante. Vários alcaloides de *Guatteria* possuem atividade antioxidante, o que foi apresentado na Introdução (Quadro 3). Por exemplo, essa atividade foi confirmada para alcaloides: coreximina (*G. fresiana* e *G. hispida*), isocoreximina (*G. hispida*) e lisicamina (*G. amplifolia*, *G. hispida*, *G. multivenia* e *G. ouregou*) (COSTA et al., 2010; COSTA et al., 2009; LIMA et al., 2004; MONTENEGRO et al., 2003; ZHANG et al., 2002; CAVÉ et al., 1989; CORDELL et al., 1989; CORTES et al., 1986; GARBARINO; PETZALL; SALAZAR, 1984;).

Figura 59. Ensaio de atividade antioxidante utilizando cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ das amostras de *Guatteria elliptica* em luz visível

1-extrato bruto das folhas (EBF), 2-extrato bruto dos galhos (EBG), 3- alcaloides totais das folhas (ATF), 4- alcaloides totais dos galhos (ATG), 5-fração hexânica da torta das folhas (THF), 6-fração hexânica da torta dos galhos (THG), 7-fração clorofórmica de torta das folhas (TCF), 8-fração clorofórmica de torta dos galhos (TCG), 9-fração de acetato de etila da torta das folhas (TAF), 10-fração de acetato de etila da torta dos galhos (TAG), 11-fração butanólica da torta das folhas (TBF), 12-fração butanólica da torta dos galhos (TBG), P-padrão (quercetina)

A fração clorofórmica da tora dos galhos apresentou muitas substâncias com a atividade antioxidante. Porém, a presença de flavonoides não era esperada nessa fração, pois a maioria desses compostos isolados eram glicosídeos (SANTOS; SALATINO, 2000) e o teste de NP-PEG (Figura 16) confirmou ausência desses metabólitos. A atividade encontrada nessa fração pode ser

devida a presença de outros compostos fenólicos simples, como cumarinas di-hidroxiladas e outros ácidos fenilpropanoídicos, que possuem atividade antioxidante comprovada (CARVALHO, GOSMANN e SCHENKEL, 2010).

A fração de acetato de etila dos galhos apresentou uma substância ($R_f \sim 0,5$) com atividade antioxidante e a butanólica das folhas e dos galhos contém diversas substâncias com essa atividade. A atividade dessas frações (TAG e TBG) foi provavelmente causada por flavonoides. A presença dessa classe foi confirmada pelo teste de NP-PEG (Figura 16). As frações hexânicas (THF e THG) não apresentaram nenhuma mancha com atividade antioxidante.

4.2.2. Atividade antioxidante – método quantitativo

Como a maioria dos extratos e frações apresentaram compostos com atividade antioxidante, o próximo passo foi verificar seus potenciais antioxidantes.

No teste preliminar, as amostras foram testadas em concentração final de 100 $\mu\text{g/mL}$ no poço. Nessa concentração, as frações THF e THG não apresentaram uma redução do radical livre DPPH, confirmando resultados obtidos pelo método qualitativo. Essas amostras foram consideradas inativas e não tiveram seus estudos continuados. As amostras ativas foram diluídas em série e cada concentração foi testada em triplicata. A curva de inibição foi obtida para cada repetição e a equação da curva foi usada para calcular a EC_{50} (Figura 60). Depois, a média, desvio padrão (DP) e o intervalo de confiança (CI_{95}) foram calculados para cada amostra (Tabela 7).

Análise de variância ANOVA (one-way) e o teste de Tukey (Minitab[®]) foram realizados para todas as amostras (extratos, frações e óleo essencial) a fim de obter a diferença entre as médias das amostras, com nível de significância de 0,05 % (Tabela 7). Entretanto, o valor de EC_{50} do óleo foi diferenciado do que para as outras amostras e, por isso, outra análise de variância ANOVA e o teste de Tukey foram executados para mostrar diferença somente entre os extratos e as frações (Tabela 7).

Figura 60. Curvas de redução do DPPH obtidas para amostras ativas de *Guatteria elliptica*

A-extrato bruto das folhas, B-extrato bruto dos galhos, C- alcaloides totais das folhas, D- alcaloides totais dos galhos, E-torta das folhas, F-torta das galhos, G-fração clorofórmica de torta das folhas, H-fração clorofórmica de torta dos galhos, I-fração de acetato de etila da torta das folhas, J-fração de acetato de etila da torta dos galhos, K-fração butanólica da torta das folhas, L-fração butanólica da torta dos galhos, M-óleo essencial, N-quercetina (controle positivo)

Tabela 7. Atividade antioxidante dos extratos, alcaloides totais, frações e óleo essencial de *Guatteria elliptica* pelo método quantitativo e comparação das médias pelo teste de Tukey

amostra		EC ₅₀ (µg/mL)
	DP	média±CI ₉₅
EBF	1,82	48,92±4,53 ^{C,D}
EBG	2,53	42,00±6,29 ^{D,E}
ATF	1,02	42,48±2,54 ^{D,E}
ATG	2,62	52,11±6,51 ^C
TF	3,30	38,90±8,20 ^E
TG	1,69	26,23±4,20 ^F
TCF	4,64	100,54±11,53 ^A
TCG	0,46	24,25±1,14 ^F
TAF	0,66	69,14±1,63 ^B
TAG	5,66	109,58±14,07 ^A
TBF	2,32	56,03±5,76 ^C
TBG	3,78	48,22±9,38 ^{C,D}
Q	0,11	3,61±0,26 ^G
		EC ₅₀ (mg/mL)
OE	1,03	7,24±2,57 ^H

CI₉₅ - intervalo de confiança de 95%, DP-desvio padrão, EBF-extrato bruto das folhas, EBG-extrato bruto dos galhos, ATF- alcaloides totais das folhas, ATG- alcaloides totais dos galhos, TF-torta das folhas, TG-torta dos galhos, TCF-fração clorofórmica de torta das folhas, TCG-fração clorofórmica de torta dos galhos, TAF-fração de acetato de etila da torta das folhas, TAG-fração de acetato de etila da torta dos galhos, TBF-fração butanólica da torta das folhas, TBG-fração butanólica da torta dos galhos, óleo-óleo essencial das folhas, OE-óleo essencial, Q-quercetina (controle positivo), amostras que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (p<0.05%)

Os EBF e EBG apresentaram EC₅₀ = 48,92±4,53 e 42,00±6,29 µg/mL, respectivamente. Essa diferença não foi estaticamente significativa. A atividade de ATF e ATG foram semelhantes aos extratos brutos (EC₅₀=42,48±2,54 e 52,11±6,51 µg/mL, respectivamente). A diferença observada para os alcaloides totais das folhas e dos galhos foi significativa. As tortas, apresentaram valores de EC₅₀=38,90±8,20 µg/mL para as folhas e 26,23±4,20 µg/mL para os galhos. Esses valores foram menores do que os EC₅₀ encontrados para os extratos brutos e alcaloides totais, indicando uma maior atividade para os compostos não alcaloídicos. As menores atividades foram encontradas para TCF, TAF, TAG, TBF e TBG (EC₅₀=100,54±11,53, 69,14±1,63, 109,58±14,07, 56,03±5,76 e 48,22±9,38 µg/mL, respectivamente). Estes resultados

podem sugerir, que os flavonoides glicosídeos e/ou outros compostos fenólicos, possuem atividade antioxidante fraca. O grupamento hidroxila dos glicosídeos é conjugado com uma ou mais moléculas de açúcar e isso pode explicar a atividade mais fraca desses compostos (ALVES et al., 2007). A melhor atividade encontrada nas frações foi obtida para a TCG com $EC_{50}=24,25\pm1,14$ $\mu\text{g/mL}$. A fração clorofórmica pode conter outros compostos fenólicos simples com a atividade, os quais devem ser caracterizados em estudos futuros.

Um resultado semelhante foi encontrado em um estudo com plantas medicinais peruanas, onde os flavonoides não apresentaram a maior atividade antioxidante quando comparados com outras substancias fenólicas presentes nas plantas (LOCK et al., 2005). Outra pesquisa associou a quantidade de compostos fenólicos com a atividade antioxidante observada para duas espécies de Annonaceae (*Anaxagorea dolichocarpa* e *Duguetia chrysocarpa*). *A. dolichocarpa* apresentou a melhor atividade antioxidante ($EC_{50}=55,64\pm5,24$ $\mu\text{g/mL}$) e o maior conteúdo de fenólicos totais ($252,50\pm7,02$ mg) também no extrato clorofórmico (ALMEIDA et al., 2011).

A atividade antioxidante mais fraca de todas as amostras testadas foi encontrada para o óleo essencial das folhas de *G. elliptica* com $EC_{50}=7,24\pm2,57$ mg/mL. Contudo, o óleo foi muito mais ativo do que as frações hexânicas, que contém principalmente hidrocarbonetos e ácidos graxos. O óleo continha um alto teor de espatulenol, um sesquiterpeno oxigenado, que possui um grupo hidroxila o qual poderia ter um potencial antioxidante maior do que os hidrocarbonetos e ácidos graxos. Essa hidroxila poderia doar um radical hidrogênio para o radical DPPH emparelhando o elétron livre desse radical (MUKHERJEE et al., 2011). Entretanto, esse efeito deve ser mais pronunciado se o grupo for uma hidroxila fenólica. O óleo essencial das folhas de *G. australis* também apresentou uma baixa atividade antioxidante (SIQUEIRA et al., 2015), com espatulenol como o composto majoritário (40,29%) (SANTOS, 2014), porém em menor quantidade do que encontrado para *G. elliptica*.

Duas das amostras de *G. elliptica* (TCG e TG) apresentaram uma importante atividade antioxidante. Extratos contendo substâncias com essa atividade, sendo capazes de eliminar radicais livres, podem prevenir doenças que resultam de danos celulares causados por radicais livres, como câncer, doenças cardíacas e declínio do sistema imunológico, entre outros (MIGUEL, 2010). No futuro estudo, os compostos das amostras mais ativas deveriam ser isolados, identificados e avaliados para essas atividades.

4.2.3. Atividade anticolinesterásica

Atividade anticolinesterásica foi avaliada qualitativamente por autografia em CCD, sendo o método rápido, eficaz, baixo custo e, portanto, frequentemente utilizado para identificar compostos bioativos de extratos vegetais (DEWANJEE et al., 2015). Essa atividade foi testada para os extratos e frações de *G. elliptica* pois os estudos indicaram a atividade para várias classes de compostos, tais como alcaloides, cumarinas, flavonóides, xantonas, entre outros (CARDOSO-LOPES et al., 2008). Além disso, essa atividade já foi comprovada para outras espécies de *Guatteria* (*G. scandens* e *G. stenopetala*) (RODRÍGUEZ et al., 2008; HOCQUEMILLER, RASAMIFAZY, CAVE, 1982b).

Os compostos com atividade anticolinesterásica possuem importância no tratamento da Doença de Alzheimer. Essas substâncias podem interagir com o sistema colinérgico central para melhorar a memória e deficiências cognitivas dos pacientes, diminuindo a degradação da acetilcolina do local sináptico no cérebro (ZAROTSKY, SRAMEK e CUTLER, 2003).

No ensaio por autografia em CCD a presença de manchas claras de inibição no fundo roxo foi indicativa para a ocorrência de compostos com atividade anticolinesterásica (Figura 61). Os EBG e ATG contiveram várias substâncias ativas. O EBF não apresentou nenhuma mancha clara. Porém ATF, obtido do EBF, mostrou a presença de muitas substâncias com atividade anticolinesterásica. Isso poderia ter acontecido porque a concentração de alcaloides no extrato bruto foi menor do que na fração de alcaloides totais. A capacidade de inibir a enzima AchE foi comprovada para alguns alcaloides de *Guatteria*: 4,5-di-oxo-desidrocentrina (*G. stenopetala*) e dicentrinona (*G. scandens* e *G. stenopetala*) (RODRÍGUEZ et al., 2008; HOCQUEMILLER, RASAMIFAZY, CAVE, 1982b).

Figura 61. Ensaio de atividade anticolinesterásica utilizando cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ em luz visível das amostras de *Guatteria elliptica*

1-extrato bruto das folhas (EBF), 2- alcaloides totais das folhas (ATF), 3- alcaloides totais dos galhos (ATG), 4- extrato bruto dos galhos (EBG), 5-fração hexânica da torta das folhas (THF), 6-fração hexânica da torta dos galhos (THG), 7-fração clorofórmica de torta das folhas (TCF), 8-fração clorofórmica de torta dos galhos (TCG), 9-fração de acetato de etila da torta das folhas (TAF), 10-fração de acetato de etila da torta dos galhos (TAG), 11-fração butanólica da torta das folhas (TBF), 12-fração butanólica da torta dos galhos (TBG), P-padrão (fisostigmina)

Um estudo anterior, com óleos voláteis obtidos de dois indivíduos de *G. elliptica* coletados em diferentes regiões (Caraguatatuba e Paranapiacaba), mostrou que esses óleos possuem atividade anticolinesterásica muito fraca (BRUMATTI et al., 2007). O extrato bruto dos ramos de *G. australis* também apresentou atividade anticolinesterásica fraca, não sendo capaz de inibir a enzima em 50% (CARDOSO-LOPES et al., 2008).

Embora amostras de *G. elliptica* tenham apresentado atividade anticolinesterásica, essa não foi avaliada como considerável. Em vista disso, um estudo pelo método quantitativo não foi realizado nesse projeto. Entretanto, em estudos futuros a atividade anticolinesterásica poderia ser avaliada pelo método quantitativo.

4.2.4. Atividade antifúngica - método qualitativo

No ensaio, a presença de manchas claras de inibição no fundo cinza foi indicativa para a ocorrência de compostos com atividade frente ao fungo filamentoso *Cladosporium sphaerospermum* (Figura 62). Os EBF e EBG mostraram a presença de uma substância ($R_f \sim 0,6$) com atividade antifúngica muito fraca, o que confirma os resultados da pesquisa anterior (AGRIPINO et al., 2004). O ATF também mostrou a presença de uma substância ($R_f \sim 0,6$) com atividade antifúngica fraca. Adicionalmente, o ATG também apresentou uma mancha ($R_f \sim 0,6$) com atividade antifúngica muito fraca, e outra ($R_f \sim 0,3$) com atividade moderada. As frações

clorofórmicas e de acetato de etila não apresentaram nenhuma mancha clara. As TBF e TBG mostraram duas substâncias com atividade antifúngica ($R_f \sim 0,3$ e $R_f \sim 0,5$).

Figura 62. Ensaio de atividade antifúngica utilizando cromatografia em camada delgada em placas de sílica gel 60 F₂₅₄ em luz visível das amostras de *Guatteria elliptica*

1-extrato bruto das folhas (EBF), 2-extrato bruto dos galhos (EBG), 3-alcaloides totais das folhas (ATF), 4-alcaloides totais dos galhos (ATG), 5-fração hexânica da torta das folhas (THF), 6-fração hexânica da torta dos galhos (THG), 7-fração clorofórmica de torta das folhas (TCF), 8-fração clorofórmica de torta dos galhos (TCG), 9-fração de acetato de etila da torta das folhas (TAF), 10-fração de acetato de etila da torta dos galhos (TAG), 11-fração butanólica da torta das folhas (TBF), 12-fração butanólica da torta dos galhos (TBG), P-padrão (nistatina)

Para *G. elliptica*, a atividade antifúngica frente a *C. sphaerospermum* foi avaliada como muito fraca, confirmando estudo anterior com o extrato bruto das folhas (AGRIPINO, 2004). A atividade do extrato bruto dos ramos de *G. australis*, também foi considerada fraca frente ao mesmo microrganismo (CARDOSO-LOPES et al., 2008). Outra espécie de Annonaceae, *Rollinia sericea*, também apresentou uma atividade fraca frente a esse fungo. Porém, a atividade antifúngica de *Xylopia langsdorfiana* (Annonaceae) foi considerável (AGRIPINO, 2004), assim como a atividade dos ésteres metílicos de ácidos graxos das sementes de *Annona cornifolia* (Annonaceae) (SANTOS LIMA et al., 2011).

Como atividade de *G. elliptica* frente a *C. sphaerospermum* foi fraca, o teste com esse fungo foi descontinuado. Portanto, os testes antimicrobianos posteriores foram realizados frente a microrganismos diferentes (*A. brasiliensis*, *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*)

4.2.5. Atividade antimicrobiana - método quantitativo

Durante os testes preliminares, a concentração final das amostras foi 1 mg/mL em cada poço, com a exceção do óleo essencial (3 mg/mL). A inibição de crescimento foi calculada para todas as amostras testadas (Tabela 8).

A leitura da inibição de crescimento de *A. brasiliensis* foi feita visualmente depois de 3 e 5 dias de incubação. Nenhuma das amostras apresentou inibição de crescimento de 100 % (Figura 63). A CIM dos extratos e frações para *A. brasiliensis* foi considerada como >1 mg/mL e do óleo essencial >3 mg/mL.

Figura 63. Crescimento de *Aspergillus brasiliensis* depois de 5 dias de incubação observado para extratos, alcaloides totais e frações de *Guatteria elliptica*

1A-1C-controle positivo, 1D-1E-controle de solvente, 1G-2A-controle de crescimento, 2B-2D- controle de meio, 2E-2G-extrato bruto das folhas, 2H-3B-alcaloides totais das folhas, 3C-3E-torta das folhas, 3F-3H- fração hexânica da torta das folhas, 4A-4C-fração clorofórmica de torta das folhas, 4D-4F-fração de acetato de etila da torta das folhas, 4G-5A-fração butanólica da torta das folhas, 5B-5D-extrato bruto dos galhos, 5E-5G- alcaloides totais dos galhos, 5H-6B-torta dos galhos, 6C-6E-fração hexânica da torta dos galhos, 6F-6H- fração clorofórmica de torta dos galhos, 7A-7C- fração de acetato de etila da torta dos galhos, 7B-7F-fração butanólica da torta dos galhos, 7G-8A-controle do extrato bruto das folhas, 8B-8D- controle de alcaloides totais das folhas, 8E-8G-controle da torta das folhas, 8H-9B-fração hexânica da torta das folhas, 9C-9E-controle da fração clorofórmica de torta das folhas, 9F-9H- controle da fração de acetato de etila da torta das folhas, 10A-10C- controle da fração butanólica da torta das folhas, 10D-10F- controle do extrato bruto dos galhos, 10G-11A- controle de alcaloides totais dos galhos, 11B-11D- controle da torta dos galhos, 11E-11G- controle da fração hexânica da torta dos galhos, 11H-12B- controle da fração clorofórmica de torta dos galhos, 12C-12E-controle da fração de acetato de etila da torta dos galhos, 12F-12H- controle da fração butanólica da torta dos galhos

Tabela 8. Inibição de crescimento de *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* pelos extratos, alcaloides totais, frações e óleo essencial de *Guatteria elliptica*

amostra	inibição de crescimento (%)				
	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i> *	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EBF	100,0	-	58,1	59,5	45,0
EBG	83,8	-	98,8	42,9	55,3
ATF	100,0	-	100,0	100,0	100,0
ATG	100,0	-	100,0	100,0	100,0
TF	100,0	-	78,9	45,9	59,8
TG	89,6	-	0,0	49,6	70,0
THF	71,9	-	100,0	73,6	82,6
THG	94,6	-	97,2	48,1	59,2
TCF	100,0	-	100,0	100,0	51,7
TCG	100,0	-	99,4	46,1	48,0
TAF	100,0	-	100,0	66,0	57,8
TAG	100,0	-	0,0	89,2	58,5
TBF	97,5	-	88,7	41,8	54,6
TBG	100	-	79,5	50,5	59,9
OE	89,0	-	88,0	5,0	13,0
Nistatina	100	+	na	na	na
Ciprofloxacina	na**	na	95,0	100,0	100,0
Eritromicina	na	na	98,1	96,8	99,4
Cloranfenicol	na	na	89,0	90,0	na
Amicacina	na	na	na	na	98,0

EBF-extrato bruto das folhas, **EBG**-extrato bruto dos galhos, **ATF**- alcaloides totais das folhas, **ATG**-alcaloides totais dos galhos, **TF**-torta das folhas, **TG**-torta dos galhos, **THF**-fração hexânica da torta das folhas, **THG**-fração hexânica da torta dos galhos, **TCF**-fração clorofórmica de torta das folhas, **TCG**-fração clorofórmica de torta dos galhos, **TAF**-fração de acetato de etila da torta das folhas, **TAG**-fração de acetato de etila da torta dos galhos, **TBF**-fração butanólica da torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos; **OE**-óleo essencial das folhas, *-ensaio não-qualitativo, - -sem inibição, + -inibição total; **na -não aplicável

As amostras que não foram capazes de inibir 100% do crescimento microbiano na concentração de 1 mg/mL (3 mg/mL para óleo) foram consideradas inativas (MORENO et al., 2013) e não tiveram seu estudo continuado. Aquelas que apresentaram 100 % de inibição do

crescimento foram diluídas em série para obtenção de uma concentração final 1,00; 0,75; 0,50; 0,25; 0,12 e 0,05 mg/mL em cada poço, sendo determinadas suas CIMs nos microrganismos suscetíveis.

4.2.5.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

No teste preliminar, as amostras EBF, ATF, ATG, TF, TCF, TCG TAF, TAG e TBG foram capazes de inibir em 100 % o crescimento de *C. albicans*. Essas amostras foram diluídas em série e os resultados foram estatisticamente tratados. A curva de inibição foi obtida para cada repetição e a equação da curva foi usada para calcular a CIM (Figura 64). A média, DP e CI₉₅ foram calculados para cada amostra (Tabela 9). Depois de tratamento estatístico dos dados, somente ATF, ATG, TF e TBG apresentaram CIM < 1 mg/mL. As amostras que inibiram totalmente o crescimento do microrganismo foram submetidas repicadas em meio TSB para avaliar a atividade bactericida e determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Das amostras testadas, os ATF foram os únicos que apresentaram uma atividade bactericida mais relevante com CBM=0,66 mg/mL. As outras amostras tiveram sua CBM considerada como > 1mg/mL (Tabela 9). Análise de variância ANOVA (one-way) e o teste de Tukey (Minitab[®]) mostraram as diferença entre as médias das CIM obtidas para as amostras frente a *C. albicans*, com nível de significância de 0,05 % (Tabela 9). Nessa tabela, pode ser observado que a torta das folhas e a fração butanólica dos galhos foram estatisticamente iguais, mas diferentes das amostras ATG e ATF.

Tabela 9. Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima contra *Candida albicans* para amostras ativas de *Gatteria elliptica* e comparação das médias usando o teste de Tukey

amostra	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)
	DP	média±CI ₉₅	
ATF	0,02	0,58±0,06 ^B	0,66
ATG	0,06	0,84±0,14 ^A	> 1
TF	0,04	0,31±0,10 ^C	> 1
TBG	0,08	0,42±0,20 ^C	> 1

CIM-Concentração Inibitória Mínima, **CBM**-Concentração Bactericida Mínima, **DP**-desvio padrão, **CI₉₅**-intervalo de confiança de 95%, **ATF**-alcaloides totais das folhas, **ATG**- alcaloides totais dos galhos, **TF**-torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos, amostras que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($p<0.05\%$)

Figura 64. Curvas de inibição de crescimento contra *Candida albicans* obtidas para amostras ativas de *Guatteria elliptica*

A-alcaloides totais das folhas, **B**- alcaloides totais dos galhos, **C**-torta das folhas, **D**-fração butanólica da torta dos galhos

Para *S. aureus* as amostras ATF, ATG, THF, TCF e TAF foram ativas, inibindo o crescimento microbiano em 100 %. As curvas de inibição obtidas para cada dessas repetição são mostradas na Figura 65, e a partir destas foram calculadas suas respectivas CIM. A maior atividade frente a *S. aureus* para *G. elliptica* foi obtida para os alcaloides totais das folhas e dos

galhos, mostrando CIM/MBC=0,21±0,01/0,28 e 0,12±0,01/0,26 mg/mL, respectivamente. Para THF a CIM foi determinada como 0,24±0,02, porém a CBM foi >1 mg/mL (Tabela 10). Os resultados para todas as amostras (THF, ATF e ATG) foram estatisticamente diferentes.

Tabela 10. Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima contra *Staphylococcus aureus* para amostras ativas de *Gatteria elliptica* e comparação das médias usando o teste de Tukey

amostra		CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
	DP	média±CI ₉₅	
ATF	0,01	0,21±0,01 ^B	0,28
ATG	0,01	0,12±0,01 ^C	0,26
THF	0,01	0,24±0,02 ^A	> 1

CIM-Concentração Inibitória Mínima, **CBM**-Concentração Bactericida Mínima, **DP**-desvio padrão, **CI₉₅**-intervalo de confiança de 95%, **ATF**- alcaloides totais das folhas, **ATG**- alcaloides totais das folhas, amostras que não compartilham uma letra são significativamente diferentes (p<0.05%)

Figura 65. Curvas de inibição de crescimento contra *Staphylococcus aureus* obtidas para amostras ativas de *Guatteria elliptica*

A- alcaloides totais das folhas, **B-** alcaloides totais dos galhos, **C-** fração hexânica da torta das folhas

No caso de *E. coli*, somente os alcaloides totais e a fração clorofórmica das folhas (ATF, ATG, TCF) foram capazes de inibir em 100 % o crescimento desse microrganismo. As curvas de inibição foram obtidas (Figura 66). O tratamento estatístico mostrou CIM < 1 mg/mL somente para alcaloides totais das folhas ($0,31 \pm 0,01$ mg/mL) e dos galhos ($0,44 \pm 0,02$ mg/mL). A diferença entre essas amostras foi estatisticamente significativa. Os ATG mostraram CBM = 0,62 mg/mL enquanto para os ATF essa foi considerada como > 1 mg/mL (Tabela 11).

Tabela 11. Determinação da Concentração Inibitória Mínima, Concentração Bactericida Mínima contra *Escherichia coli* para amostras ativas de *Guatteria elliptica* e comparação das médias usando o teste de Tukey

amostra	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)
	DP	média $\pm$ CI ₉₅	
ATF	0,00	$0,31 \pm 0,01^B$	> 1
ATG	0,01	$0,44 \pm 0,02^A$	0,62

CIM-Concentração Inibitória Mínima, CBM-Concentração Bactericida Mínima, DP-desvio padrão, CI₉₅-intervalo de confiança de 95%, ATF- alcaloides totais das folhas, ATG- alcaloides totais das folhas, amostras que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($p < 0.05\%$)

Figura 66. Curvas de inibição de crescimento contra *Escherichia coli* obtidas para amostras ativas de *Guatteria elliptica*

A- alcaloides totais das folhas, B- alcaloides totais dos galhos

No teste contra *P. aeruginosa*, as amostras ATF e ATG foram capazes de inibir totalmente o crescimento. Pode-se observar que essas amostras inibiram também o crescimento

de *E. coli*. É interessante notar que esses dois microrganismos pertencem ao grupo das bactérias gram-negativas e por isso possuem a mesma estrutura da parede celular. Depois do tratamento estatístico dos dados, CIM < 1 mg/mL foi obtido somente para ATF (0,85 mg/mL). Para essa amostra a CBM foi determinada como > 1mg/mL (Figura 67, Tabela 12).

Tabela 12. Determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima contra *Pseudomonas aeruginosa* para amostra ativa de *Gatteria elliptica*

amostra	CIM (mg/mL)		MBC (mg/mL)
	DP	média±CI ₉₅	
ATF	0,14	0,85±0,35	> 1

CIM-Concentração Inibitória Mínima, **CBM**-Concentração Bactericida Mínima, **DP**-desvio padrão, **CI₉₅**-intervalo de confiança de 95%, **ATF**- alcaloides totais das folhas

Figura 67. Curva de inibição de crescimento contra *Pseudomonas aeruginosa* obtida para amostra ativa de *Guatteria elliptica*

A- alcaloides totais das folhas

Tabela 13. Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima das amostras de *Guatteria elliptica* testadas contra *Aspergillus brasiliensis*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*

amostra*	CIM / CBM (mg/mL)				
	<i>C. albicans</i>	<i>A. brasiliensis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>
EBF	>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
EBG	>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
ATF	0,58±0,06/0,66	>1,00/>1,00	0,21±0,01/0,28	0,31±0,01/>1,00	0,85±0,35/>1,00
ATG	0,84±0,14/1,00	>1,00/>1,00	0,12±0,01/0,26	0,44±0,02/0,62	>1,00/>1,00
TF	0,31±0,10/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
TG	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
THF	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	0,24±0,02/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
THG	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
TCF	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
TCG	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
TAF	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
TAG	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
TBF	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
TBG	0,42±0,20/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00	>1,00/>1,00
óleo	>3,00/>3,00	>3,00/>3,00	>3,00/>3,00	>3,00/>3,00	>3,00/>3,00

CIM-Concentração Inibitória Mínima, **CBM**-Concentração Bactericida Mínima, **EBF**-extrato bruto das folhas, **EBG**-extrato bruto dos galhos, **ATF**- alcaloides totais das folhas, **ATG**- alcaloides totais dos galhos, **TF**-torta das folhas, **TG**-torta dos galhos, **THF**-fração hexânica da torta das folhas, **THG**-fração hexânica da torta dos galhos, **TCF**-fração clorofórmica de torta das folhas, **TCG**-fração clorofórmica de torta dos galhos, **TAF**-fração de acetato de etila da torta das folhas, **TAG**-fração de acetato de etila da torta dos galhos, **TBF**-fração butanólica da torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos, **OE**-óleo essencial

As CIM e CBM das amostras contra *C. albicans*, *A. brasiliensis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* estão resumidas na Tabela 13. As frações de ATF e ATG foram ativas contra os três microrganismos testados: *C. albicans*, *S. aureus* e *E. coli*, com as respectivas CIM/CBM para folhas e galhos de 0,58±0,06/0,66 e 0,84±0,14/1 mg/mL, 0,21±0,01/0,28 e 0,12±0,01/0,26 mg/mL e 0,31±0,01/>1 e 0,44±0,02/0,62 mg/mL. A atividade contra *P. aeruginosa* foi encontrada só para ATF, mostrando CIM/CBM=0,85±0,35/>1 mg/mL.

Esses resultados mostraram que os alcaloides totais de *G. elliptica* foram mais ativos do que fração de alcaloides dos galhos de *G. fresiana* contra *C. albicans* (CIM>1 mg/mL), *E. coli* (CIM=0,75 mg/mL) e *S. aureus* (CIM=0,75 mg/mL). Porém, alcaloides totais de *G. fresiana*

foram mais ativos contra *P. aeruginosa* com CIM de 0,375 mg/mL (COSTA et al., 2009). Além disso, os alcaloides totais de *G. elliptica* foram mais ativos do que alcaloides isolados (*O*-metilmoschatolina, lisicamina e liriodenina) de *G. hispida*, que apresentaram CIM > 1 mg/mL para *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (COSTA et al., 2010). Um alcaloide isolado de *G. multiviena* foi mais ativo contra *C. albicans* e *S. aureus* com CIM=6,25 e 3,13 µg/mL, respectivamente (ZHANG et al., 2002). Isomoschatolina, isolada da casca de *G. blepharophylla*, apresentou atividade (MIC=50,81 µmol/L) parecida com o controle positivo nistatina (MIC=54,00 µmol/L) (COSTA et al., 2011).

A TF mostrou atividade contra *C. albicans* (CIM/CBM = 0,31±0,10/>1,00 mg/mL). Entretanto, observa-se que depois do fracionamento da TF, as TAF, THF, TCF e TBF não apresentaram a atividade contra o microrganismo. A atividade contra *C. albicans* da TF maior do que das frações, pode sugerir o sinergismo de componentes da torta. A atividade sinérgica é comumente encontrada em plantas porque uma única planta sintetiza muitas substâncias relacionadas que diferem na estereoquímica ou em grupos funcionais. Como consequência, as plantas geralmente apresentam defesa como um conjunto de compostos, e não individuais (PALACIOS, CARPINELLA, MAGGI, 2008).

A TF não mostrou atividade contra *S. aureus*, porém a atividade contra o microrganismo foi encontrada, depois do fracionamento, na THF (CIM/CBM = 0,24±0,02/>1,00 mg/mL). A atividade antimicrobiana da THF pode ser causada por substâncias apolares, normalmente encontradas nas frações hexânicas.

Da mesma maneira, a TG não demonstrou atividade contra *C. albicans*, porém sua fração butanólica apresentou atividade com CIM/CBM = 0,42±0,20/>1,00 mg/mL. A atividade antimicrobiana da TBG pode ser explicada pela presença de flavonoides nessas frações, o que foi confirmado pelo teste de NP-PEG. De acordo com a literatura pesquisada, flavonoides possuem relatos de atividade antimicrobiana. Os exemplos de flavonoides com atividade antimicrobiana incluem galangina, pinocembrina, baicaleina, tri-hidróxi-3,5-dimetóxi-flavona, ponciretina, genkwanina e naringenina, entre outros. Os flavonoides glicosilados, que podem estar presentes na fração butanólica da torta, também possuem atividade antimicrobiana (CUSHNIE; LAMB, 2005). Os flavonoides glicosilados, como apigenina-7-*O*-glucosídeo, luteolina-7-*O*-glucosídeo, canferol-3-*O*-glucosídeo e quercetina-3-*O*-glucosídeo, entre outros, já foram identificados em

Annonaceae (SANTOS; SALATINO, 2000) e foram relacionados com atividade antimicrobiana (GNIEWOSZ et al., 2014; SOUSA et al., 2006).

De acordo com literatura, só amostras com valores CIM inferiores a 100 µg/mL podem ser consideradas promissoras para desenvolvimento de novos antibióticos (MORENO et al., 2013). Todas as amostras de *G. elliptica* apresentaram os valores CIM > 100 µg/mL o que não está satisfatório para desenvolvimento de novos fármacos. Porém, as amostras ativas podem ser utilizadas em cosméticos, substituindo conservantes sintéticos por matérias primas de origem vegetal.

Resumindo a atividade antimicrobiana, os alcaloides totais das folhas e dos galhos mostraram atividade melhor que todas as amostras testadas de *G. elliptica* frente a *S. aureus*, apresentando também potencial bactericida relevante. Alta inibição do crescimento foi avaliada para THF (*S. aureus*), ATF (*E. coli*) e TF (*C. albicans*), porém atividade bactericida não foi observada nessas amostras.

4.2.6. Teste de atividade antitumoral *in vitro*

O teste de citotoxicidade frente às células tumorais humanas, isoladas de próstata (PC-3) e de mama (MCF-7), foi feito em sextuplicadas. Durante o teste, as concentrações finais das amostras nos poços foram 100,0; 10,0; 1,0; 0,1; 0,01 µg/mL para extratos, frações e compostos isolados, e 180; 18,0; 1,80; 0,18; 0,018 µg/mL para o óleo essencial.

Os dados foram estatisticamente tratados para calcular a IC₅₀, o EP e os resultados foram comparados com o controle positivo Doxorrubicina. Os valores de IC₅₀ e EP obtidos para as amostras de *G. elliptica* consideradas ativas (IC₅₀<30 µg/mL) (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990) frente às células tumorais (MCF-7 e PC-3) e comparação das médias para as amostras ativas (IC₅₀<30 µg/mL) pelo teste de Tukey estão listados na Tabela 14.

Tabela 14. Índice de citotoxicidade para 50% da população de linhagens tumorais humanas de mama e próstata para extratos, frações, alcaloides totais, alcaloides isolados e óleo essencial de *Guatteria elliptica* e comparação das médias para as amostras ativas ($IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$), usando o teste de Tukey

amostra	$IC_{50} \pm EP \mu\text{g/mL}$	
	MCF-7	PC-3
EBF	$27,00 \pm 0,27^A$	>30
EBG	>30	>30
ATF	$9,32 \pm 0,36^K$	$22,06 \pm 0,14^B$
ATG	$21,66 \pm 0,15^B$	$18,08 \pm 0,24^E$
TF	>30	>30
TG	>30	>30
THF	>30	>30
THG	$20,77 \pm 0,18^C$	$20,44 \pm 0,33^{C,D}$
TCF	$15,18 \pm 0,24^H$	$15,76 \pm 0,20^{G,H}$
TCG	$13,19 \pm 0,18^{LJ}$	>30
TAF	$4,47 \pm 0,40^M$	>30
TAG	$19,82 \pm 0,04^D$	$15,88 \pm 0,27^{G,H}$
TBF	$16,03 \pm 0,20^{G,H}$	$16,31 \pm 0,35^{F,G}$
TBG	$17,12 \pm 0,25^F$	>30
OE	$7,01 \pm 0,23^L$	$5,32 \pm 0,35^M$
A9	$13,66 \pm 0,34^I$	$12,77 \pm 0,25^J$
A10	$2,28 \pm 0,18^N$	$1,37 \pm 0,36^O$
Doxo	$0,07 \pm 0,15^P$	$0,30 \pm 0,08^P$

IC_{50} - Índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo, **EP**-erro padrão, **PC-3**-células de câncer humano isoladas de próstata, **MCF-7**- células de câncer humano isoladas de próstata, na-não aplicável; **EBF**-extrato bruto das folhas, **EBG**-extrato bruto dos galhos, **ATF**- alcaloides totais das folhas, **ATG**-alcaloides totais dos galhos, **TF**-torta das folhas, **TG**-torta dos galhos, **THF**-fração hexânica da torta das folhas, **THG**-fração hexânica da torta dos galhos, **TCF**-fração clorofórmica de torta das folhas, **TCG**-fração clorofórmica de torta dos galhos, **TAF**-fração de acetato de etila da torta das folhas, **TAG**-fração de acetato de etila da torta dos galhos, **TBF**-fração butanólica da torta das folhas, **TBG**-fração butanólica da torta dos galhos, **OE**-óleo essencial das folhas, **A9**-Amostra 9, **A10**-Amostra 10, **Doxo**-.Doxorrubicina (controle), amostras que não compartilham uma letra são significativamente diferentes ($p < 0.05\%$)

Como apontado anteriormente (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990), amostras que apresentam $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ podem ser consideradas promissoras para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Tendo isso em vista, ATF, ATG, THG, TCF, TAG, TBF, as amostras isoladas (Amostra 9 e 10) e o óleo essencial foram ativos frente às duas linhagens celulares (MCF-7 e PC-3). Por outro lado, EBF, TCG, TAF e TBG foram ativos somente frente à MCF-7. As outras amostras não foram ativas frente as mesmas linhagem de células tumorais testadas, segundo o critério empregado.

Considerando os extratos brutos, somente EBF foi considerado ativo, mas apenas frente às células de tumor de mama ($IC_{50} = 27,00 \pm 0,27 \mu\text{g/mL}$). De acordo com uma pesquisa anterior, os extratos etanólicos de quatro espécies de Annonaceae foram mais ativos frente à MCF-7, mostrando $IC_{50} = 3,43 \mu\text{g/mL}$ (*Annona cherimola*), $3,89 \mu\text{g/mL}$ (*A. squamosa*), $4,34 \mu\text{g/mL}$ (*A. muricata*) e $18,20 \mu\text{g/mL}$ (*A. glabra*) (ELHAWARY et al., 2013). Levando esses dados em consideração, o EBF foi ativo, porém essa atividade foi fraca em comparação aos extratos brutos de outras espécies da família.

Os alcaloides totais mostraram uma atividade maior do que os extratos brutos. IC_{50} para ATF foi menor do que para ATG ($9,32 \pm 0,36$ e $21,66 \pm 0,15 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) frente a MCF-7, indicando maior atividade dos alcaloides das folhas. Frente a PC-3, a maior atividade foi obtida para ATG ($18,08 \pm 12,59 \mu\text{g/mL}$), enquanto ATF apresentou um $IC_{50} = 22,06 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$. Um estudo anterior mostrou que a fração de alcaloides isolada das folhas de *G. pagonopus* possui atividade antitumoral, porém contra as linhagem de células diferentes das testadas no estudo atual: melanoma murino (B16-F10), carcinoma hepatocelular (HepG2), leucemia mielocítica crônica (K562) e leucemia promielocítica (HL6000) apresentando respectivos IC_{50} de 9,97; 13,02; 17,09 15,32 $\mu\text{g/mL}$ (FONTES, 2014). A fração de alcaloides totais de *G. fresiana* também mostrou atividade antitumoral contra linhagem de células PC-3 e MCF-7.

A atividade antitumoral pôde ser aumentada frente à MCF-7 para os alcaloides isolados dos galhos de *G. elliptica* (Amostra 10, $IC_{50} = 2,28 \pm 0,18 \mu\text{g/mL}$) em comparação aos alcaloides totais. A atividade dessa amostra frente à PC-3 ($IC_{50} = 1,37 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$) foi ainda mais alta. Para a Amostra 9 também foi observado um incremento na atividade frente à MCF-7 ($IC_{50} = 13,66 \pm 0,34 \mu\text{g/mL}$) e PC-3 ($IC_{50} = 12,77 \pm 0,25 \mu\text{g/mL}$) comparando com o resultado obtido para os respectivos alcaloides totais. Os dois alcaloides encontrados na Amostra 9 (nornuciferina e asimilobiba) e cinco dos seis alcaloides identificados na Amostra 10 (desidronantenina,

glaunidina, liriidenina, *N*-óxido de oliverina e telikovina) possuem um esqueleto aporfínico, frequentemente encontrado em *Guatteria* spp. Alcaloides aporfínicos são conhecidos por suas atividades antitumorais pela de inibição de enzimas que atuam na transcrição do DNA, tais como polimerases e topoisomerases. Além disso, esses compostos podem se ligar ao DNA e intercalar as fitas do DNA impedindo sua replicação (STÉVIGNY et al., 2005) e podem, também, reduzir a proliferação celular ou induzir apoptose (LIU et al., 2013). Um dos alcaloides encontrados na Amostra 10 foi identificado como uma protoberberina, sendo esse grupo também relacionado com atividade antitumoral frente à MCF-7 (COSTA et al., 2013).

As TF e TG foram consideradas inativas, pois apresentaram $IC_{50} > 30 \mu\text{g/mL}$ frente às duas linhagem. Após o fracionamento das tortas, THF foi a única que não pode ser considerada ativa. As frações THG ($IC_{50}=20,77\pm0,18$ e $20,44\pm0,33 \mu\text{g/mL}$), TCF ($IC_{50}=15,18\pm0,24$ e $15,76\pm0,20 \mu\text{g/mL}$), TAG ($IC_{50}=19,82\pm0,04$ e $15,88\pm0,27 \mu\text{g/mL}$) e TBF ($IC_{50}=16,03\pm0,20$ e $16,31\pm0,35 \mu\text{g/mL}$) apresentaram uma alta atividade frente ambas linhagens celulares, MCF-7 e PC-3, respectivamente. Por outro lado, as frações TCG ($IC_{50}=13,19\pm0,18 \mu\text{g/mL}$), TAF ($IC_{50}=4,47\pm0,40 \mu\text{g/mL}$) e TBG ($IC_{50}=17,12\pm0,25 \mu\text{g/mL}$) foram ativas somente frente à MCF-7.

Alta atividade frente a MCF-7, encontrada para TAF, não pode ser explicada pela presença de flavonoides, pois teste NP-PEG encontrou flavonoide. Essa amostra é possivelmente rica em polifenóis que possuem atividade comprovada em diversos sistemas fisiológicos. Mais de 8000 polifenóis de origem natural, incluindo curcumina, resveratrol e genisteína, possuem atividade antitumoral. O mecanismo antitumoral destes polifenóis é atribuído a remoção de agentes cancerígenos, modulação da sinalização intracelular e indução da apoptose, pela interação com proteínas reguladoras (DAMIÃO, 2014).

Óleo essencial extraído das folhas de *G. elliptica* mostrou atividade frente às MCF-7 e PC-3 com $IC_{50}=7,01\pm0,23$ e $5,32\pm0,35 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. A capacidade dos óleos em agir como um agente citotóxico pode ser explicada pela presença de substâncias lipofílicas. Devido esta característica, os compostos podem provocar o rompimento de membrana citoplasmática da célula, que conduz à apoptose (GRECCO et al., 2015). Entretanto, os compostos majoritários desse óleo, espatulenol (53,9%) e óxido de cariofileno (6,8 %) não apresentaram atividade antitumoral frente às linhagens MCF-7 e PC-3 (COSTA et al., 2011; LEGAULT et al., 2003). Portanto, o efeito sinérgico, comumente encontrado em extratos vegetais, entre componentes de óleo de *G. elliptica* pode ter sido responsável pela atividade observada. Por exemplo, a atividade

antitumoral do óleo essencial de *Abies balsamea* (Pinaceae) foi avaliada em relação a diversas linhas celulares de tumores, incluindo MCF-7 e PC-3. O óleo bruto foi ativo contra todas as linhagens testadas, porém a maioria dos compostos isolados, incluindo óxido de cariofileno, foram inativos (LEGAULT et al., 2003). O óleo essencial completo das folhas de *G. pogonopus* apresentou citotoxicidade contra PC-3 e outras linhagens, mas não os componentes majoritários (*E*)-cariofileno e β -pineno isoladamente (FONTES et al., 2013).

Os resultados mostraram que várias amostras de *G. elliptica* apresentaram $IC_{50} < 30 \mu g/mL$ e foram consideradas ativas contra MCF-7 e/ou PC-3. Porém, essas amostras podem ser tóxicas também para as células normais, o que poderia causar efeitos indesejados. Portanto, a citotoxicidade frente a células normais foi verificada, como a próxima etapa dessa pesquisa, com finalidade de avaliar a segurança das amostras. Para ampliar o conhecimento sobre a atividade antitumoral dos compostos de *G. elliptica*, futuros estudos deveriam empregar um painel mais abrangente de linhagens tumorais.

4.2.7. Teste de toxicidade *in vitro*

A citotoxicidade frente às células normais foi verificada *in vitro*, sendo um método alternativo cientificamente válido e aceito internacionalmente, com finalidade de avaliar a segurança (RENAMA, 2016). Os métodos alternativos foram desenvolvidos para promover o alívio ou minimização da dor e o estresse dos animais, diminuição no número de animais utilizados para obter a mesma qualidade de informações dos testes clássicos *in vivo* e substituição do uso de animais vertebrados vivos (RUSSEL; BURCH, 2009).

As amostras foram diluídas em série, de maneira a incluir as concentrações com atividade antitumoral (IC_{50}), utilizando os fatores de diluição 1,47; 1,78; 2,15 e 3,16. As curvas de crescimento para a cultura celular de fibroblasto de camundongo (BALB/C, ATCC CCL 163), obtidas com os extratos, frações e compostos isolados de *G. elliptica*, podem ser vistos na Figura 68. A partir dessas curvas de viabilidade celular, os valores de IC_{50} e IC_{10} foram calculados para as amostras nas concentrações testadas (Tabela 15). Os valores de IC_{50} foram utilizados para determinar a toxicidade oral aguda por meio da dose letal mediana e a toxicidade oral aguda das amostras foi agrupada, usando a sistema de classificação de *United Nations Globally Harmonised System* (Tabela 15) (BULGHERONI et al., 2009).

Figura 68. Curvas de viabilidade celular para cultura de fibroblasto murino (BALB/C, ATCC CCL 163) dos extratos, alcaloides totais, amostras isoladas, frações e óleo essencial de *Guatteria elliptica* na faixa de concentrações testada

A-extrato bruto das folhas, B- alcaloides totais das folhas, C-torta das folhas, D-fração hexânica da torta das folhas, E-fração clorofórmica de torta das folhas, F-fração de acetato de etila da torta das folhas, G-fração butanólica da torta das folhas, H-extrato bruto dos galhos, I- alcaloides totais dos galhos, J-torta dos galhos, K-fração hexânica da torta dos galhos, L-fração clorofórmica de torta dos galhos, M-fração de acetato de etila da torta dos galhos, N-fração butanólica da torta dos galhos, O-óleo essencial das folhas, P-Amostra 9, R-Amostra 10, S-DMSO (controle)

Tabela 15. Índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo, Índice de citotoxicidade para 10% da população celular em estudo, estimativa da LD₅₀ e a classificação da toxicidade oral aguda para as amostras de *Guatteria elliptica* obtidos para cultura celular de fibroblasto murino (BALB/C, ATCC CCL 163)

amostra	IC ₅₀ ±DP	IC ₁₀ ±DP	LD ₅₀	Categoria de toxicidade oral aguda
	µg/mL		mg/kg	
EBF	63,53±9,49	49,45±1,71	495,12	4
EBG	>453,36	293,09±49,11	>1028,48	4 ou 5*
ATF	44,61±2,52	8,48±1,80	434,10	4
ATG	>68,80	27,03± 0,36	>510,01	4 ou 5*
TF	>1962,20	>1962,20	>1773,78	4 ou 5*
TG	>6665,65	>6665,65	>2795,56	5
THF	199,26±7,26	0,01 ± 0,00	757,50	4
THG	>65,98	>65,98	>502,14	4
TCF	>50,07	>50,07	>453,15	4 ou 5*
TCG	44,15±2,90	17,64±5,33	432,43	4
TAF	>144,76	0,01±0,01	>672,61	4 ou 5*
TAG	>42,83	>42,83	>427,57	4 ou 5*
TBF	>51,80	34,87±1,32	>458,91	4 ou 5*
TBG	>157,36	>157,36	>693,82	4 ou 5*
OE	>22,27	18,55 ± 1,89	>335,24	4 ou 5*
A9	>43,39	3,76 ± 0,92	>429,64	4 ou 5*
A10	>4,92	2,78 ± 0,12	>191,17	4 ou 5*
DMSO	>465,60	>465,60	>1038,73	4 ou 5*

IC₅₀-Índice de citotoxicidade para 50% da população celular em estudo, IC₁₀-Índice de citotoxicidade para 10% da população celular em estudo, DP-desvio padrão, DL₅₀ - dose letal mediana, EBF-extrato bruto das folhas, EBG-extrato bruto dos galhos, ATF-alcaloides totais das folhas, ATG- alcaloides totais dos galhos, TF-torta das folhas, TG-torta dos galhos, THF-fração hexânica da torta das folhas, THG-fração hexânica da torta dos galhos, TCF-fração clorofórmica de torta das folhas, TCG-fração clorofórmica de torta dos galhos, TAF-fração de acetato de etila da torta das folhas, TAG-fração de acetato de etila da torta dos galhos, TBF-fração butanólica da torta das folhas, TBG-fração butanólica da torta dos galhos, OE-óleo essencial das folhas, DMSO- dimetilsulfóxido (control); Categorias: 1 e 2 - fatal se ingerido, 3-tóxico se ingerido, 4-perigoso se ingerido, 5-pode ser perigoso se ingerido ou não classificado (BULGHERONI et al., 2009), *-categoria estimada aproximadamente baseada em valor LD₅₀ impreciso

Pode-se observar que o controle (DMSO) não apresentou citotoxicidade nas concentrações testadas, apresentando viabilidade celular acima de 90% (Figura 68 S). Seis amostras (TF, TCF, TG, THG, TAG, TBG) não atingiram uma inibição de 50% de crescimento,

apresentando uma inibição menor que 10%, em todas as concentrações testadas (Figura 68 C, E, J, M e N, respectivamente). Portanto, essas amostras não foram consideradas tóxicas para os fibroblasto até a maior concentração testada. Considerando-se essa baixa toxicidade, THG, TCF e TAG possuem uma atividade antitumoral promissora para o desenvolvimento de fármacos antitumorais, mostrando $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990) para as células de câncer de mama e próstata (Tabela 14).

Da mesma maneira, TBF (Figura 68 G) possui $IC_{50} > 51,80$ e $IC_{10} = 34,87 \pm 1,32 \mu\text{g/mL}$. IC_{50} antitumoral da TBF na faixa de $16 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 14) e falta de toxicidade nessa concentração mostrou potencial dessa amostra. Similarmente, o óleo essencial das folhas mostrou $IC_{50} = 7,01 \pm 0,23$ e $5,32 \pm 0,35 \mu\text{g/mL}$ para as células de mama e próstata, respectivamente. Nessa concentração, o óleo não mostrou citotoxicidade ($IC_{50} > 22,27$ e $IC_{10} = 18,55 \pm 1,89 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 15).

A Amostra 10 mostrou a maior atividade frente a MCF-7 e PC-3 ($IC_{50} = 2,28 \pm 0,18$ e $1,37 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$). Para essa amostra, o IC_{50} para os fibroblastos foi determinado como $> 4,92 \mu\text{g/mL}$, mas o IC_{10} pôde ser calculado como $2,78 \pm 0,12 \mu\text{g/mL}$. O conjunto desses resultados demonstram que a amostra apresentou a viabilidade celular acima de 90% para os fibroblastos na concentração com atividade antitumoral à frente de células de mama e próstata.

A amostra EBF apresentou citotoxicidade com $IC_{50} = 63,53 \pm 9,49$ e $IC_{10} = 49,45 \pm 1,71 \mu\text{g/mL}$ (Tabela 15). O IC_{50} antitumoral dessa amostra foi $27,00 \pm 0,27$ e $> 130 \mu\text{g/mL}$ à frente de MCF-7 e PC-3, respectivamente. Esses resultados mostram que a amostra pode ser considerada segura na concentração com atividade antitumoral á frente das células de câncer de mama, pois IC_{50} e IC_{10} citotóxicos foram maiores do que IC_{50} antitumoral. A amostra, não foi segura na concentração com atividade antitumoral frente às células de câncer de próstata. Entretanto, essa amostra foi considerada inativa frente à PC-3.

Por outro lado, ATG não possui IC_{50} citotóxico nas concentrações testadas ($IC_{50} > 68,80 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, a viabilidade celular foi maior do que 90% ($IC_{10} = 27,03 \pm 0,36 \mu\text{g/mL}$) na faixa das concentrações com atividade antitumoral frente a MCF-7 e PC-3 ($21,66 \pm 0,15$ e $18,08 \pm 0,24 \mu\text{g/mL}$, respectivamente). ATF mostrou também uma certa citotoxicidade frente aos fibroblastos ($IC_{50} = 44,61 \pm 2,52$ e $IC_{10} = 8,48 \pm 1,80 \mu\text{g/mL}$) na faixa de concentrações ativas frente às células de câncer de mama e próstata ($IC_{50} = 9,32 \pm 0,36$ e $22,06 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) (Tabela 14).

A Amostra 9 mostrou alta atividade antitumoral à frente de MCF-7 e PC-3 ($IC_{50}=13,66\pm0,34$ e $12,77\pm0,25$ $\mu\text{g/mL}$). Para essa amostra IC_{50} citotóxico foi determinado como $>43,39$ $\mu\text{g/mL}$ e $IC_{10}=3,76\pm0,92$ $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 15). Esses resultados mostraram que a viabilidade de células normais foi menor que 90% nas concentrações com atividade antitumoral.

A TF não possui citotoxicidade nas concentrações testadas, porém atividade antitumoral dessa amostra não é promissora (>30 $\mu\text{g/mL}$). Para THF, IC_{50} citotóxico foi $199,26\pm7,26$ $\mu\text{g/mL}$ e viabilidade celular menor do que 90% em todas as concentrações testadas. Porém essa amostra não possui atividade antitumoral satisfatória ($IC_{50}>30$ $\mu\text{g/mL}$). O EBG mostrou baixa citotoxicidade ($IC_{50}>453,36$ e $IC_{10}=293,09\pm0,92$ $\mu\text{g/mL}$) e, também, baixa atividade antitumoral ($IC_{50}>30$) (Tabela 14 e 15).

Agentes citotóxicos utilizados em terapias contra o câncer frequentemente apresentam efeitos colaterais devido à atividade citotóxica não seletiva, resultando em danos para as células normais. Portanto citotoxicidade frente às células normais sempre deveria ser verificada para as substâncias antitumorais (SAWADA et al., 2009). Esse fato foi confirmado pela pesquisa com os óleos essenciais das folhas de *G. blepharophylla* e de *G. hispida*. Ambos os óleos foram ativos frente ao carcinoma hepatocelular (HEPG2) e a leucemia mielocítica crônica (K562). Entretanto, esses óleos foram tóxicos frente às células de linfócitos normais (PBMCs) na concentração onde foi observada a atividade antitumoral (FERRAZ, 2012). De acordo com outro estudo, os alcaloides protoberberínicos, lincangenina e thaicanina, isolados das folhas de *G. schomburgkiana* apresentaram atividade antitumoral, porém são citotóxicos para as células humanas normais (ORFILA et al., 2000). O extrato metanólico, a fração de diclorometano com alcaloides e a fração de diclorometano sem alcaloide das folhas de *G. fresiana* mostraram citotoxicidade similar frente as células tumorais, MCF-7 e PC-3, e normais HaCat. Entretanto, os compostos isolados (9-desidroxi-1-metoxi-di-hidroguattouregidina e palmatina) possuem alta atividade antitumoral frente a MCF-7 e baixa citotoxicidade para células normais humanas (COSTA et al., 2013).

Pode-se observar que para todas as amostras de *G. elliptica*, a toxicidade oral aguda, pelos valores de DL_{50} estimados, foi avaliada como pertencendo às Categorias 4 e/ou 5. Com essa classificação, há uma forte indicação sobre a segurança do uso dessas amostras em humanos pela via oral (ESTEVES-PEDRO, 2013). Para amostras EBG, ATG, TF, TG, TCF, TAF, TAG, TBF, TBG, OE, A9 e A10 não foi possível obter o valor IC_{50} exato e, portanto, a categoria foi somente

estimada por proximidade. Essas amostras deveriam ter os valores DL_{50} avaliados em um estudo futuro. Para acessar melhor a segurança desses extratos e frações, o painel de ensaios *in vitro* deve ser ampliado incluindo métodos para a avaliação da toxicidade órgão específica e sistêmica, tais como hemato-, neuro-, nefro e hepatotoxicidade, bem como a absorção intestinal, distribuição e o metabolismo seguindo uma série de estratégias pré-definidas (KINSNER-OVASKAINEN et al., 2013).

Algumas amostras de *G. elliptica* apresentaram altas propriedades antitumorais ($IC_{50} < 30$ $\mu\text{g/mL}$) e não foram tóxicas para células de fibroblastos nas concentrações relevantes à atividade antitumoral. Essas amostras tem potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais. Entretanto mais estudos deveriam ser realizados, como estudos adicionais de toxicidade, atividade antitumoral frente a outras linhagens bem como isolamento e elucidação estrutural das substâncias ativas.

5. CONCLUSÕES

Depois da realização deste trabalho, foi possível a elaboração dos seguintes conclusões:

- *G. elliptica* contém alcaloides nas folhas e nos galhos. Maioria dos alcaloides pertencem ao tipo aporfínico, o que é característico para o gênero
- As folhas contêm óleo essencial, que foi encontrado nas estruturas unicelulares e ovais (células oleíferas), localizadas no parênquima esponjoso. Os compostos majoritários desse óleo, espatulenol e óxido de cariofileno, são considerados marcadores fitoquímicos para *Guatteria*.
- A melhor atividade antioxidante pelo método quantitativo foi encontrada para a fração clorofórmica dos galhos e as tortas dos galhos e das folhas.
- Os alcaloides totais dos galhos e das folhas apresentaram a atividade antimicrobiana a mais alta pelo método turbidimétrico contra *S. aureus*. Uma alta atividade foi também encontrada para a fração hexânica das folhas frente a mesmo microrganismo.
- A atividade antitumoral frente à MCF-7 foi muito alta para a Amostra 10, a fração de acetato de etila, o óleo essencial e os alcaloides totais. A melhor atividade contra PC-3 foi obtida para a Amostra 10 e para o óleo essencial.
- A toxicidade oral aguda, pelo valores de DL_{50} estimados, foi avaliada como pertencendo às Categorias 4 e/ou 5 para todas as amostras. Há uma forte indicação sobre a segurança do uso dessas amostras em humanos pela via oral

6. REFERÊNCIAS

ABD-EL ATTI, S.; AMMAR, H.A.; PHOEBE, JR., C.H.; SCHIFF, JR. P.L.; SLATKIN, D.J. Alkaloids of *Guatteria melosma* and *Cleistopholis patens*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 4, p. 476-480, 1982.

ABD-EL-ATTI, S.M. The isolation and characterization of alkaloids from *Guatteria melosma* Diels (Annonaceae). Pittsburgh, 120 p. Dissertation-University Pittsburgh, 1984.

ADAMS, R. P. Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectrometry, 4 ed., Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL., 2007.

AGRIPINO, D.G.; LIMA, M.E.L.; DA SILVA, M. R.; MEDA, C.I.; DA SILVA BOLZANI, V.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C.M.; MORENO, P.R.H. Screening of Brazilian plants for antimicrobial and DNA-damaging activities. I. Atlantic rain forest – Ecological station Jureia-Itatins. **Biota Neotropica**, v. 4, n. 2, p. 1-15, 2004.

AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishaniasis with natural products. **Parasite**, v. 6, n. 1, p. 3-8, 1999.

ALMEIDA, J.R.; LIMA, J.T.; OLIVEIRA, H.R.; OLIVEIRA, M.R.; MEIRA, P.R.; LÚCIO, A.S.; BARBOSA FILHO, J.M.; QUINTANS JÚNIOR, L.J. Antinociceptive activity of discretamine isolated from *Duguetia moricandiana*. **Natural Product Research**, v. 25, n. 20, p. 1908-1915, 2011.

ALMEIDA, J.R.G.S.; RIBEIRO DE OLIVEIRA, M.; GUIMARAES, A.L.; DE OLIVEIRA, A.P.; RIBEIRO, L.A.A.; LUCIO, A.S.S.C.; QUINTANS, L.J.Jr.. Phenolic quantification and antioxidant activity of *Anaxagorea dolichocarpa* and *Duguetia chrysocarpa* (Annonaceae). **International Journal of pharma and bio sciences**, v. 2, n. 4, p. 367-374, 2011.

ALVES, C.Q.; BRANDÃO, H.N.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P.; LIMA L.S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonoides. **Diálogos & Ciência – Revista da Rede de Ensino FTC**. Ano V, n.12, 2007.

AMMAR, H.A.; SCHIFF, JR., P.L., SLATKIN, D.J. Alkaloids of *Guatteria modesta*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 392, 1983.

ARAUJO, R.C.P.; NEVES, F.A.R.; FORMAGIO, A.S.N.; KASSUYA, C.A.L.; STEFANELLO, M.E.A.; SOUZA, V.V.; PAVAN, F.R.; CRODA, S. Evaluation of the anti-

mycobacterium tuberculosis activity and in vivo acute toxicity of *Annona sylvatic*. **Complementary & Alternative Medicine**, v. 14, n.209, p. 1-10, 2014.

BALANDRIN, M.F.; KLOCKE, J.A.; WURTELE, E.S.; BOLLINGER, W.H. Natural plant chemicals: Sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, p. 1154-60, 1985.

BARREIRO, E.J.; SILVA-BOLZANI, V. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de farmacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BERTHOU, S.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Alcaloides des *Annonacees*, 89: bisbenzyloquinoleines de *Guatteria guianensis*. **Journal of Natural Products**, v. 52, n. 1, p. 95-98, 1989.

BERTHOU, S.; JOSSANG, A.; GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Bis(benzyloquinoline)biphenyl alkaloids from *Guatteria guianensis*. **Tetrahedron**, v. 44, n. 8, p. 2193-2201, 1988.

BOUGATSOS, C.; NGASSAPA, O.; RUNYORO, D.K.B.; CHINOU, I.B. Chemical composition and in vitro antimicrobial activity of the essential oils of two *Helichrysum* species from Tanzania. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, v. 59, p. 368-372, 2004.

BRITTO, A.C.; OLIVEIRA, A.C.; HENRIQUES, R.M.; CARDOSO, G.M.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, A.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; PINHEIRO, M.L.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. *In vitro* and *in vivo* antitumor effects of the essential oil from the leaves of *Guatteria friesiana*. **Planta Medica**, v. 78, n. 5, p. 409-414, 2012.

BROWN, M.R.W. Turbidimetric method for the rapid evaluation of antimicrobial agents. Inactivation of preservatives by nonionic agents. **Journal of the Society of Cosmetic Chemists**, v. 17, p. 185-195, 1966.

BRUMATTI, F.; LOPES, E.M.C.; SILVA, M.C.; CORDEIRO, I.; MORENO, P.R.H.; YOUNG, M.C.M. Composição química e atividade anticolinesterásica do óleo volátil de *Guatteria elliptica* R. E. Fries. In: IV Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, 07-08 Novembro, 2007, Fortaleza.

BULGHERONI, A.; KINSNER-OVASKAINEN, A.; HOFFMANN, S.; HARTUNG, T.; PRIETO, P. Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level

(NOAEL) from the 28 day repeated dose toxicity studies in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology** v. 53, p. 16–19, 2009.

CABRAL, R.S.; SARTORI, M. C.; CORDEIRO, I.; QUEIROGA, C.L.; EBERLIN, M.N.; LAGO, J.H.G.; MORENO, P.R.H.; YOUNG, M.C.M. Anticholinesterase activity evaluation of alkaloids and coumarin from stems of *Conchocarpus fontanesianus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 2, p. 374-380, 2012.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M.; BURGOS-MORÓN, E.; PÉREZ-GUERRERO, C.; LÓPEZ-LÁZARO, M. A review on the dietary flavonoid kaempferol. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, p. 298-344, 2011.

CARDOSO-LOPES, E.M.; CARREIRA, R.C.; AGRIPINO, D.G.; TORRES, L.M.B.; CORDEIRO, I.; BOLZANIL, V.S.; DIETRICH, S.M.C.; YOUNG, M.C.M. Screening for antifungal, DNA-damaging and anticholinesterasic activities of Brazilian plants from the Atlantic Rainforest - Ilha do Cardoso State Park. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 0, 2008.

CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of the major components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 3, p. 264–269, 1995.

CARVALHO, J.C.T.; GOSSMAN, G.; SCHENKEL, E.P., Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFRGS, 2010, 1104 p.

CARVALHO-BAYMA, J.; OLIVEIRA, A.B.; CAVÉ, A.; DADOUN, H. Aporphinoid alkaloids from *Guatteria schomburgkiana* leaves (1). **Letters**, 1987.

CASSELLS, B.K.; CAVÉ, A.; DAVOUST, D.; HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; TADIC, D. Alkaloids of the Annonaceae. 71. Azahomoaporphines: a new heterocyclic skeleton from Annonaceae. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, p.1481-1483, 1986.

CASTEDO,L.; GRANJA,J.A.; DE LERA, A.R.; VILLAYERDE, M.C. Alkaloids from *Guatteria goudotiana*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2781-2783, 1991.

CAVÉ, A. Annonacea alkaloids. In: PHILIPSO, J.D.; ROBERTS, M.F.; ZENK, M.H. The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. Berlin, New York: Springer-Verlag, p. 79-101, 1985.

CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; CASSELS, B.K. Alkaloids from *Guatteria*. In BROSII, A. The Alkaloids, v. 35. Academic press, INC. cap. 1, p. 1-73, 1989.

CICCIÓ, J.F.; CHAVERRI, C. Volatile constituents of the oils from *Povedadaphne quadripurata* (Lauraceae) from "Alberto M. Brenes" Biological Preserve, Costa Rica. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 605-609, 2008.

FANG-RONG CHANG, F.R., CHEN, C.Y., HSIEH, T.J., CHO, C.P., WU, Y.C. Chemical Constituents from *Annona glabra* III. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 47, p. 913-920, 2000.

CHOUDHURY, D.; GANGULI, A.; DASTIDAR, D.G.; ACHARYA, B.R.; DAS, A.; CHAKRABARTI, G. Apigenin shows synergistic anticancer activity with curcumin by binding at different sites of tubulin. **Biochimie**, v. 95, n. 6, p. 1297-309, 2013.

CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drug discovery. **Phytotherapy Research**, v.15, p.183-205, 2001.

CORDELL, G.A.; SHAMMA, M.; SAXTON, J.E.; SMITH, G.F. Dictionary of alkaloids. London; New York: Chapman and Hall, 1989.

CORREA, J. E.; RIOS, C.H.; DEL ROSARIO CASTILLO, A.; ROMERO, L.I.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLEY, P.D.; KURSAR, T.A.; HELLER, M.V. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. **Planta Medica Letter**, v. 72, p. 270-272, 2006.

CORTES, D.; ARBAOUI, J.; PROTAIS, P. High affinity and selectivity of some tetrahydroprotoberberine alkaloids for rat striatal 3H-raclopride binding sites. **Natural Products Letters**, v. 3, n. 3, p. 233-238, 1993.

CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Alcaloides des *Annonacees*, 68: alcaloides des feuilles de *Guatteria ouregou*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 5, p. 878-884, 1986.

CORTES, D.; RAMAHATRA, A.; CAVÉ, A. Alcaliodes des *Annonacees*, LVIII. Alcaloides des écorces de *Guatteria schomburgkiana*. **Journal of Natural Products**, v. 48, n. 2, p. 254-259, 1985a.

CORTES, D.; RAMAHATRA, A.; DADOUN, H.; CAVÉ, A. Alkaloids from Annonaceae. LVI. Belamine, possible biogenetic intermediate in the biosynthesis of 7-metilaporphines. **Sciences de la Terra et de l'Univers.**, v. 299, n. 7, p. 311-314, 1984.

CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Pentouregine, an aporphine alkaloid with a metileneoxy bridge from *Guatteria ouregou*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 11, p. 2776-2777, 1985b.

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

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

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; SALVADOR, M.J.; MAIA, B.H.L.N.S.; CABRAL, E.C.; EBERLIN, M.N. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, p. 1180-1183, 2010.

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

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

CRITICAL ECOSYSTEM PARTNERSHIP FUND, Ecosystem profile, Atlantic Forest biodiversity hotspot, Brazil, 2001. Disponível em: <http://www.cepf.net/Documents/final.atlanticforest.ep.pdf>. Acesso em: 30 jul. 2015.

CUENDT, M.; HOSTETTMAN, K.; POTTERAT, O. Iridoid glucosides with free radical scavenging properties from *Fagraea blumei*. **Helvetica Chimica Acta**, Basel, v. 80, p.1144-1152, 1997.

CUSHNIE, T.P.T.; LAMB, A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, p. 343–356, 2005.

DEHAUSSY, H.; TITS, M.; ANGENOT, L. Guattegaumerine, a new bis(benzylisoquinoline) alkaloid from *Guatteria gaumeri*. **Planta Medica**, v. 49, n. 1, p. 25-27, 1983.

DAMIÃO, M.C.F.C.B. Planejamento e síntese de análogos da capsaicina e avaliação da atividade antitumoral.. São Paulo, 153 p. Dissertação de Mestre - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2014.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3 ed. John Wiley & Sons Ltd, 2009, 539 p.

DIAZ, M.; SCHREIBER, C.; RIPPERGER, H. *Guatteria moralesi* and *Guatteria cubensis* alkaloids. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 15, n. 1, p. 93-96, 1981.

DICKISON, W.C. Integrative plant anatomy. Academic Press, London - an imprint of Elsevier Science, USA, 533 p., 2010.

DJILANI, A.; LEGSEIR, B.; SOULIMANI, R.; DICKO, A.; YOUNOS, C. New extraction technique for alkaloids. Journal of the **Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 518-520, 2006.

DOYLE, A., GRIFFITHS, J.B. Cell and Tissue Culture for Medical Research. New York: Willey-Liss, p. 403-409, 2000.

ELHAWARY, S.S.; TANTAWY, M.E.E.; RABEH, M.A.; FAWAZ, N.E. DNA fingerprinting, chemical composition, antitumor and antimicrobial activities of the essential

oils and extractives of four annona species from Egypt. **Journal of Natural Sciences Research**, v.3, n.13, p. 59-69, 2013.

ERKENS, R.H.J.; CHATROU, L.W.; MAAS, J.W.; NIET, T.V.D.; SAVOLAINEN, V. A rapid diversification of rainforest trees (*Guatteria*; Annonaceae) following dispersal from Central into South America. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 44, p. 399–411, 2007.

ESTEVEZ-PEDRO, N.M. Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos, 134 p. Dissertação para obtenção do grau de mestre. Faculdade de Ciências Farmacêuticas-Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

ETSE, J.T.; GRAY, A.I.; THOMAS, D.W.; WATERMAN, P.G., Chemistry of the Annonaceae Part 28. Terpenoid and alkaloid compounds from the seeds of *Monodora brevipes*. **Phytochemistry**, v. 28, n. 9, p. 2489-92, 1989.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O., Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFRGS, 2010, 1104 p.

Farmacopeia Brasileira, ed. 5. Agência Nacional de Vigilância Sanitária / Fundação Oswaldo Cruz. Brasília, 2010.

FERNANDES, E.S. Isolamento, caracterização e bioatividade de compostos na raiz da *Jatropha ribifolia* (Pohl) Baill. Dourados, 87 p. Dissertação de Mestre - Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais - Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul - Universidade de São Paulo, 2012.

FERRAZ, R.P.C.; BOMFIM, D.S.; CARVALHO, N.C.; SOARES, M.B.P.; PINHEIRO, M.L.B.; COSTA, E.V.; BEZZERRA, D.P. Cytotoxic properties of the leaf essential oils of *Guatteria blepharophylla* and *Guatteria hispida* (Annonaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, publicado online DOI.10.1002/ffj.3199, 2014.

FISCHER, D.C.H.; DE AMORIM GUALDA, N.C.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, S.C.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; DE OLIVEIRA ALVES, M.; YOGI, A.; DI SANTI, S.M.; AVILA, P.E.; KIRCHGATTER K.; MORENO, P.R.M.H. *In vitro* screening for

antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, v. 92, p. 261-266, 2004.

FONTES, J.E.N. Estudo fotoquímico e inventigação da atividade citotóxica das folhas de *Guatteria pogonopus* MART. (Annonaceae). São Cristóvão-Sergipe, 146 p. Dissertação de Mestre – Instituto de Química, Universidade Federal de Sergipe, 2014.

FONTES, J.E.N.; FERRAZ, R.P.C.; BRITTO, A.C.S.; CARVALHO, A.A.; MORAES, M.O.; PESSOA, C.; COSTA, E.V.; BEZERRA, D.P. Antitumor effect of the essential oil from leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 4, p. 722-729, 2013.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; CHARLES, B. Essential oils of Annonaceae. Part VIII. Volatile constituents of the essential oils from three *Guatteria* species. **Journal of Essential Oil Research**, v. 9, n. 3, p. 275-278, 1997.

FREITAS, L.B.O. Estudo fitoquímico e da atividade biológica de *Banisteriopsis anisandra* (A.Juss) B. Gates e síntese de amidas indólicas para avaliação da atividade alelopática. Belo Horizonte, 236 p. Dissertação de Mestre - Departamento de Química - Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

GALEFFI, C.; MARINI-BETTOLO, G.B.; VECCHI, D. (R,R) (-,-)-12'-*O*-metilcurine and (R,R) (-,-)-*O,O*-dimetilcurine, two new natural alkaloids from Diels. **Gazzetta Chimica Italiana**, v. 105, n. 11-12, p. 1207-1213, 1975.

GARBARINO, J.A.; PETZALL, W.; SALAZAR, J. Alkaloids from *Guatteria saffordiana*. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 15, n. 2, p. 67-68, 1984.

GNIEWOSZ, M.; SYNOWIEC, A.; KRASNIEWSKA, K.; PRZYBYL, J.; BACZEK, K.; WEGLARZ, Z. The antimicrobial activity of pullulan film incorporated with meadowsweet flower extracts (*Filipendulae ulmariae flos*) on postharvest quality of apples. **Food Control**, v. 37, p. 351-361, 2014.

GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G.; DE OLIVEIRA, A.B.; GEOVANE, G.; MAIA, J.G.S. In: Dep. Quim., Univ. Fed. Alagoas, Maceio-Alagoas. Guatteric acid a new constituent of *Guatteria CF discolor* R. E. Fries (Annonaceae). F.E.C.S. Third International Conference on Chemistry and Biotechnology of Biologically Active Natural Products, [Proc.], v. 4, p 367-71, 1987.

GUINAUDEAU, H. Aporphinoid alkaloids, III. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 6, p. 761-835, 1983.

GUINAUDEAU, H. Aporphinoid alkaloids, IV. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 3, p. 389-474, 1988.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, II. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 4, p. 326-360, 1979.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, V. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 8, p. 1033-1135, 1994.

GUINAUDEAU, H.; SHAMMA, M.; TANTISEWIE, B.; PHARADAI, K. Aporphine alkaloids oxygenated at C-7. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 3, p. 355-357, 1982.

GOULART, M.O.F.; SANT'ANA, A.E.G.; DE OLIVEIRA, A.B.; DE OLIVEIRA, G.G.; MAIA, J.G.S. Azafluorenones and azaanthraquinone from *Guatteria dielsiana*. **Phytochemistry**, v. 25, n. 7, p. 1691-1695, 1986.

GRECCO, S.S.; MARTINS, E.G.A.; GIROLA, N.; FIGUEIREDO, C.R.; MATSUO, A.L.; SOARES, M.G.; BERTOLDO, B.C.; SARTORELLI, P.; LAGO, J.H. Chemical composition and *in vitro* cytotoxic effects of the essential oil from *Nectandra leucantha* leaves. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 1, p. 133-137, 2015.

HABTEMARIAM, S. A-glucosidase inhibitory activity of kaempferol-3-*O*-rutinoside. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 2, p. 201-203, 2011.

HARRIS, W.H.; GEISSMAN, T.A. Alkaloids of *Guatteria psilopus* Mart. Guatterine and atherospermidine. **Journal of Organic Chemistry**, v. 30, n. 2, p. 432-434, 1965.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug discovery today**, v. 13, n. 19/20, p. 894-901, 2008.

HASEGAWA, M.; SOJO, M.; LIRA, A.; MARQUEZ, C. Structure of homomoschatoline and subessiline. **Acta Cientifica Venezolana**, v. 23, n. 5, p. 165-167, 1972.

HASRAT, J.A.; PIETERS, L.; BACKER, J.P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A.J. Screening of medicinal plants from Suriname for 5-HT_{1A} ligands: Bioactive isoquinoline alkaloids from the fruit of *Annona muricata*. **Phytomedicine**, v. 4, n.2, p. 133-140, 1997.

HASAN, C.M.; HEALEY, T.M.; WATERMAN, P.G. Chemical Studies on the Annonaceae. Part 9.' Indolosesquiterpene and Aporphine Alkaloids from Greenwayodendron (Polyalthia) suaveolens Stem Bark. X-Ray Crystal Structure of Greenwayodendrin-3-one. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, p. 2807-2812, 1982.

HENRIQUES, A.T.; LIMBERGER, R.P.; KERBER, V.A.; MORENO, P.R.H., Alcáloides: generalidade e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFRGS, 2010, 1104 p.

HOCQUEMILLER, R.; DEBITUS, C.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A. Alkaloids of the Annonaceae. Part XXXVIII. Guadiscine and guadiscoline, aporphyrin alkaloids from *Guatteria discolor*, *Annonaceae*. **Tetrahedron letters**, v. 23, n. 42, p. 4247-4250, 1982a.

HOCQUEMILLER, R.; DEBITUS, C.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A. JACQUEMIN, H. Alkaloids from Annonaceae. XLVIII. Alkaloids from the bark of *Guatteria discolor*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 353-362, 1984a.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIFAZY, S.; MORETTI, C.; CAVÉ, A. Alkaloids from Annonaceae. 54: alkaloids from *Guatteria chrysopetala* Miq. **Plantas Medicinas et Phytotherapie**, v. 18, n. 3, p. 165-169, 1984b.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacees XXXVII: alcaloides du *Guatteria scandens*. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v. 46, n. 3, p. 335-341, 1982b.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; CAVÉ, A. Guattescine et guattescidine, nouveaux alcaloides aporphiniques de *Guatteria scandens*, Annonacees (1). **Tetrahedron**, v. 38, n.7, p. 911-915, 1982c.

HOMANS, A.L.; FUCHS, A. Direct bioautography on thin layer chromatograms as method for detecting fungitoxic substances. **Journal of Chromatography**, v. 51, p. 327-329, 1970.

HSU, C.C.; DOBBERSTEIN, R.H.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Isolation of lauterine and oxoputerine, two new oxoaporphine alkaloids from *Guatteria elata*. **Lloydia**, v. 40, n. 2, p. 152-156, 1977a.

HSU, C.C.; DOBBERSTEIN, R.H.; CORDELL, G.A.; FARNSWORTH, N.R. Structure elucidation of norlaureline and puterine, new noraporphine alkaloid from *Guatteria elata*. **Lloydia**, v. 40, n. 5, p. 505-507, 1977b.

ICCVAM. Interagency Coordinating Committee on the Validation of Alternative Methods. Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Peer review panel report: The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. NIH publication n°: 07-4519. Research Triangle Park: National Toxicology Program, 2006. Disponível em: https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/atpanelrpt06/atpanelrpt.pdf. Acesso em: 01 dezembro 2015.

ISO 10993-5 (International Organization For Standardization) Biological evaluation of medical devices – Part 5: Tests for cytotoxicity: in vitro methods. Switzerland, 2009.

JACKSON, A.H.; MARTIN, J.A. Steric effects in the mass spectra of aporphine alkaloids, *Journal of Chemical Society [Section] C: Organic*, v. 23, p. 2181-2183, 1966.

JAKIEMIU, E.A.R. Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de Tomilho (*Thymus vulgaris* L.). Curitiba, 90 p. Dissertação de Mestrado, Setor de Tecnologia, Curso de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos – Universidade Federal do Paraná, 2008.

JEONG, E.K.; LEE, S.Y.; YU, S.M.; PARK, N.H.; LEE, H.S.; YIM, Y.H.; HWANG, G.S.; CHEONG, C.; JUNG, J.H.; HONG, J. Identification of structurally diverse alkaloids in *Corydalis* species by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 26, p. 1661-1674, 2012.

KARIMOVA, S. U.; ISRAILOV, I. A.; YUNUSOV, M. S.; YUNUSOV, S. YU. Alkaloids of *Glaucium fimbriigerum*. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**, v. 2, p. 224-228, 1980.

KINSNER-OVASKAINEN, A.; PRIETO, P.; STANZE, S.; KOPP-SCHNEIDER, A. Selection of test methods to be included in a testing strategy to predict acute oral toxicity: An approach based on statistical analysis of data collected in phase 1 of the ACuteTox project. **Toxicology in Vitro**, v. 27, p. 1377-1394, 2013.

KIRYAKOV, H.G.; ISKRENOVA, E.; KUZMANOV, B.; EVSTATIEVA, L. Alkaloids of *Corydalis slivenensis*. **Planta Medica**, v.44, n. 3, p. 168-170, 1982.

KIRYAKOV, H.G.; ISKRENOVA, E.; KUZMANOV, B.; EVSTATIEVA, L. Alkaloids from *Corydalis bulbosa*. **Planta Medica**, v. 43, n. 1, p. 51-55, 1981a.

KIRYAKOV, H.G.; ISKRENOVA, E.; KUZMANOV, B.; EVSTATIEVA, L. Alkaloids from *Corydalis marschalliana*. **Planta Medica**, v. 41, n. 3, p. 298-302, 1981b.

KO, F.N.; YU, S.M.; SU, M.J.; WU, Y.C.; TENG, C.M. Pharmacological activity of (-)-discretamine, a novel vascular alpha-adrenoceptor and 5-hydroxytryptamine receptor antagonist, isolated from *Fissistigma glaucescens*. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 2, p. 882-888, 1993.

LAL SHYAULA, S.; ABBAS, G.; SIDDIQUI, H.; SATTAR, S.A.; CHOUDHARY, M.I.; BASHA, F.Z. Synthesis and antiglycation activity of kaempferol-3-O-rutinoside (nicotiflorin). **Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 3, p. 415-420, 2012.

LEBOEUF, M.; CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alkaloids from Annonaceae. XLVII: Alkaloids of *Guatteria ouregou*. **Planta Medica**, v. 48, n. 4, p. 234-245, 1983.

LEBOEUF, M.; CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Guattouregidine, guattouregine and dihidromelosmine, three new aporphine-type alkaloids from *Guatteria ouregou* Dun., Annonaceae. **Sciences de la Terre**, v. 295, n. 2, p. 191-194, 1982a.

LEBOEUF, M.; CORTES, D.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Structure de la gouregine, alcaloide original apparente aux cularines. **Tetrahedron**, v. 38, n. 19, p. 2889-2896, 1982b.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVÉ, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of Annonaceae. XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*. **Planta Medica**, v. 42, n. 1, p. 37-44, 1981.

LEE, S.K.; MBWAMBO, Z.H.; CHUNG, H.; LUYENGI, L.; GAMEZ, E.J.; MEHTA, R.G.; KINGHORN, A.D.; PEZZUTO, J.M. Evaluation of the antioxidant potential of natural products. **Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening**, v. 1, n.1, p. 35-46, 1998.

LEGAULT, J.; DAHL, W.; DEBITON, E.; PICHETTE, A.; MADELMONT, J.C. Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action. **Planta Medica**, v. 69, n. 5, p. 402-407, 2003.

LIMA, M.E.L. Estudo florístico do componente arbóreo de um trecho de floresta ombrófila densa montana do Parque Natural Municipal Nascentes de Santo André – São Paulo. Universidade Federal de Lavras, 2007.

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

LIMA, M.E.L.; CORDEIRO, I; YOUNG, M.C.M.; SOBRA, M.E.G.; MORENO, P.R.H.M. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo state – Brazil. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 589-593, 2006.

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

LIU, H.; MOU, Y., ZHAO, J.; 1, WANG, J.; LIGANG ZHOU, L.; WANG, M.; WANG, D.; HAN, J.; YU, Z.; YANG, F. Flavonoids from *Halostachys caspica* and their antimicrobial and antioxidant activities. **Molecules**, v. 15, n. 11, 7933-7945, 2010.

LIU, Y.; LIU, J.; DI, D.; LI, M.; FEN, Y. Structural and mechanistic bases of the anticancer activity of natural aporphinoid alkaloids. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 2116-2126, 2013.

LOBÃO, A.Q.; MELLO-SILVA, R. *Guatteria* (Annonaceae) do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguesia**, v. 58, n. 4, p. 859-884, 2007.

LOCK, O.; CASTILLO, P.; DOROTEO, V.; ROJAS, R. Antioxidant activity *In Vitro* of selected Peruvian medicinal plants. III WOCMAP Congress on Medicinal and Aromatic Plants-v.1: Bioprospecting and Ethnopharmacology. ISHS Acta Horticulturae, 675, 2005.

LÓPEZ-ALARCÓN, C; DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica Chimica Acta**, v. 763, p. 1–10, 2013.

LÓPEZ, J.A.; LAURITO, J.G.; BRENES, A. M.; LIN, F. T.; SHARAF, M.; WONG L.K.; SCHIFF, P.L. Aporphinoid alkaloids of *Guatteria oliviformis* and *G. Tonduzii*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1899-1901, 1990.

LÓPEZ, J.A.; LAURITO, J.G.; LIN, F.T.; SHARAF, M.; WONG, L.K.; SCHIFF, JR., P.L. Alkaloids of *Guatteria diospyroides*. **Phytochemical Notes**, 1992.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and biological activities of the flavonoid luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 31-59, 2009.

MA, C.; FAN, M.; TANG, Y.; LI, Z.; SUN, Z.; YE, G.; HUANG, C. Identification of major alkaloids and steroidal saponins in rat serum by HPLC-diode array detection-MS/MS following oral administration of Huangbai-Zhimu herb-pair Extract. **Biomedical Chromatography**, v. 22, p. 835-850, 2008.

MAAS, P.; RAINER, H.; LOBAO, A. 2013. Annonaceae in Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Available in: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>>. Access on: 25 Abr. 2016.

MAAS, P.J.M.; MAAS-VAN DE KAMER, H.; JUNIKKA, L.; DE MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from central-eastern Brazil. **Rodriguesia**, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.

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

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

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO, A. Alkaloids of the *Annonaceae*. 98. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 7, p. 890-895, 1994.

MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A Rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51–54, 2002.

MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.T.H.; VERMEER, M. Revision of the neotropical genera *Bocageopsis*, *Onychopetalum*, and *Unonopsis* (Annonaceae). **Blumea**, v. 52, p. 413–554, 2007.

MEDIMAGH, S.; DAAMI-REMADI, M.; JABNOUN-KHIAREDDINE, H.; JANNET, H.B.; HAMZA, M.A. Chemical composition, antimicrobial and antyacetylcholinesterase activities of essential oils from the Tunisian *Asteriscus maritimus* (L.) Less. **Mediterranean Journal of Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 459-470, 2012.

MEYER, G.M.J.; MEYER, M.R.; WISSENBAACH, D.K.; MAURER, H.H. Studies on the metabolism and toxicological detection of glaucine, an isoquinoline alkaloid from *Glaucium flavum* (Papaveraceae), in rat urine using GC-MS, LC-MSⁿ and LC-high-resolution MSⁿ. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 48, p.24-41, 2013.

MIGUEL, M.G.; Antioxidant and anti-Inflammatory activities of essential oils: **A short review**. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MISHRA, B.B.; SINGH, R.K.; SRIVASTAVA, A.; V.J. TRIPATHI, V.J. TIWARI, V.K. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. **Medicinal Chemistry**, v. 9, n. 1, 2009.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, 1991.

MONTENEGRO, H.; GUTIERREZ, M.; ROMERO, L.I.; ORTEGA-BARRIA, E.; CAPSON, T.L.; RIOS, L.C. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with leishmanicidal activity. **Planta Medica**, v. 69, n. 7, p. 677-679, 2003.

MORENO, P.R.H.; COSTA-ISSA, F.I.; RAJCA-FERREIRA, A.K.; PEREIRA, M.A.A.; KANEKO, T.M. Native brazilian plants against nosocomial infections: a critical review on

their potential and the antimicrobial methodology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 24, p. 3040-3078, 2013.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R.A.; MITTERMEIER, C.G.; FONSECA, G.A.B; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, 2000.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629-661, 2016.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NIH: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity, NIH Publication n. 01-4500, ago. 2001. Disponível em: http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf. Acesso em: 16 janeiro 2016.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S.G.; MUTISO, P.B.C.; JUMA, F.D. Antinociceptive effects of the extracts of *Xylopia parviflora* bark and its alkaloidal components in experimental animals. **Journal of Natural Medicines**, v. 64, n. 1, p. 9-15, 2010.

NISHIYAMA, Y.; MORIYASU, M.; ICHIMARU, M.; IWASA, K.; KATO, A.; MATHENGE, S.G.; MUTISO, P.B.C.; JUMA, F.D. Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopia parviflora*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2671-2675, 2006.

NUNES, C.R.; BERNARDES, C.R.; GLÓRIA, L.L.; OLIVEIRA, D.B. Flavonoides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **Vértices**, v. 14, n. 1, p. 39-57, 2012.

OECD, Organization for Economic Co-operation and Development. OECD Series on Principles of Good Laboratory Practice and Compliance monitoring, n.1, 1998. Disponível em: [http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem\(98\)17&doclanguage=en](http://www.oecd.org/officialdocuments/publicdisplaydocumentpdf/?cote=env/mc/chem(98)17&doclanguage=en). Acesso em: 01 dezembro 2015.

OECD DC 129, Guidance Document on Using Cytotoxicity Tests to Estimate Starting Doses for Acute Oral Systemic Toxicity Tests, ENV/JM/MONO(2010)20. Disponível em:

<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/suppdocs/feddocs/oecd/oecd-gd129.pdf>. Acesso em: 02 maio 2016.

OHASHI, M.; WILSON, J.M.; BUDZIKIEWICZ, H.; SHAMMA, M.; SLUSARCHYK, W.A.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXI. Aporphines and related alkaloids. **Journal of the American Chemical Society**, v. 85, n. 18, p. 2807-2810, 1963.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal. 3. ed, São Paulo: Atheneu, 2009, 216 p.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V., Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFRGS, 2010, 1104 p.

ORFILA, L.; RODRÍGUEZ, M.; COLMAN, T.; HASEGAWA, M.; MERENTES, E.; ARVELO, F. Structural modification of berberine alkaloids in relation to cytotoxic activity in vitro. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 71, p. 449–456, 2000.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; FREITAS, B.R. Metodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitoria (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PALACIOS, S.M.; CARPINELLA, M.C.; MAGGI, M.E. Synergism between natural products: are two better than one? **Recent Progress in Medicinal Plants**, v. 21, p. 233-247, 2008.

PALAZZO, M.C.; WRIGHT, H.L.; AGIUS, B.R.; WRIGHT, B.S.; MORIARITY, D.M.; HABER, W.A.; SETZER, W.N. Chemical compositions and biological activities of leaf essential oils of six species of Annonaceae from Monteverde, Costa Rica. **Records of Natural Products**, v. 3, n. 3, p. 153-160, 2009.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. Introdução à espectroscopia. Tradução da 4 edição norte-americana. Editora de Desenvolvimento: Ligia Cantarelli, 700 p., 2010.

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

PHILLIPSON, J.D.; ROBERTS, M.F.; ZENK, M.H. The Chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. Berlin: Springer-Verlag, New York, 1985, 304 p.

PHOEBE, Jr., C.H.; SCHIFF, JR., P.L.; KNAPP, J.E.; SLATKIN, D.J. Oxoanolobine, a new oxoaporphine alkaloid from *Guatteria melosma*. **Heterocycles**, v. 14, n. 12, p. 1977-19978, 1980.

PHOTOTOX®: Statistical Software Phototox Version 2.0 for OECD Test Guideline 432. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/section4software.htm>. Acesso em: 01 dezembro 2015.

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63 n. 7, p. 1035–1042, 2000.

PROMEGA CORPORATION, CellTiter 96® “Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay”, Technical Bulletin, 2012. Disponível em: <http://www.promega.com.br/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20non-radioactive%20cell%20proliferation%20systems%20protocol.pdf>. Aceso em: 19 Nov. 2015.

RABELO, D.M.; PINHEIRO, M.L.B.; BARISON, A.; SALOMÉ, K.S.; COSTA, E.V.; SILVA, F.M.A.; CHAVES, Y.O.; BASTOS, I.S. Alcaloides isoquinolínicos e investigação das atividades antiplasmódica e antibacteriana de *Guatteria citriodora* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 37, n. 9, p. 1453-1458, 2014.

RAJČEVIĆ, N.; MARIN, P.D.; VUJISIĆ, L.; KRIVOŠEJ, Z.; VAJS, V.; JANAČKOVIĆ, P. Chemical composition of *Aster albanicus* Deg. (Asteraceae) essential oil: taxonomical implications. **Archives of Biological Science Belgrade**, v. 67, n. 3, p. 1055-1061, 2015.

RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacees LXXII, alcaloides du *Guatteria sagotiana*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 6, p. 1078-1085, 1986.

RAZAVI, S.M.; ZAHRI, S.; ZARRINI, G.; NAZEMIYEH, H.; MOHAMMADI, S. Biological activity of quercetin-3-O-glucoside, a known plant flavonoid. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, v. 35, n. 3, p. 414-416, 2009.

RENAME: REDE NACIONAL DE MÉTODOS ALTERNATIVOS. Métodos alternativos. Disponível em: <http://renama.org.br/>. Acesso em: 16 janeiro 2016.

RINALDI, M.V.N. Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart. São Paulo, 125 p. Dissertação de Mestre - Faculdade Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, 2007.

RIO, S., ÀLVAREZ, R.; CANDELAZ, A.; GONZÁLEZ-SIERRA, S.; HERRERO, L.; PENAS, A. Preliminary study on taxonomic review using histological section of some Iberian species from the genus *Quercus* L. (Fagaceae). **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 2773-2789, 2014.

RODRÍGUEZ, M.; BASTIDAS, E.; HASEGAWA, M. Protoberberine alkaloids isolated of *Guatteria schomburgkiana* (*G. sessilis*). **Ciencia**, v. 15, n. 1, p. 105-110, 2007.

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

RODRÍGUEZ, M.; BASTIDAS, E.; RODRÍGUEZ, M.; LUCENA, E.; CASTILLO, A.; HASEGAWA, M. Aporphine alkaloids from *Guatteria stenopetala* (Annonaceae). **Natural Products Communications**, v. 3, n. 4, p. 515-518, 2008.

RUSSEL, W.M.S.; BURCH, R.L. An abridge version of: the principles of humane experimental technique. In: BALLS, M. The three Rs and the humanity criterion: reduction, refinement, replacement. Nottingham: FRAME, 2009. p. 1-111.

SAEZ, A.; BLAIR, S.; SAEZ, J. Aporphine alkaloids from *Guatteria lehmannii* bark and evaluation of their antimalarial activity *in vitro*. **Revista Colombiana de Química**, v. 26, n. 1, p. 43-49, 1997.

SANTOS, A.R. M.V.N. Alcaloides e constituintes voláteis de três espécies de *Guatteria*, avaliação das atividades antiproliferativa e antimicrobiana e estudos de biotransformação de um alcaloide oxoaporfínico e seus precursores sintéticos. Curitiba, 131 p. Tese de Doutorado, Departamento De Química - Universidade Federal Do Paraná, 2014.

SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SANTOS, M.F.C.; DUTRA, L.M.; MORAES, V.R.S.; BARISON, A.; COSTA, E.V. aporphine alkaloids from the stem bark of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 60, p. 106-109, 2015.

SANTOS, D.L.; FERREIRA, H.D.; BORGES, L.L.; PAULA, J.R.; TRESVENZOL, L.M.F.; SANTOS, P.A.; FERRI, P.H.; SÁ, S.; FIUZA, T.S. Chemical composition of essential oils of leaves, flowers and fruits of *Hortia oreadica*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 23–28, 2016.

SANTOS LIMA, L.A.R.; JOHANN, S.; CISALPINO, P.S.; PIMENTA L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Atividade antifúngica in vitro dos ésteres metílicos de ácidos graxos das sementes de *Annona cornifolia* A.St.-Hil. (Annonaceae) sobre o fungo patogênico *Paracoccidioides brasiliensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 777-780, 2011.

SARTORI, G.V. Maturação fenólica de uvas tintas cultivada no Rio Grande do Sul. Santa Maria, 73 p. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos – Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

SAWADA, N.O.; NICOLUSSI, A.C.; OKINO, L.; CARDOZO, F.M.C.; ZAGO, M.M.F. Avaliação da qualidade de vida de pacientes com câncer submetidos à quimioterapia. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 43, n. 3, 2009.

SELLES, C.; DIB, M.E.A.; DJABOU, N.; BEDDOU, F.; MUSELLI, A.; TABTI, B.; COSTA, J.; HAMMOUTI, B. Antimicrobial activity and evolution of the composition of essential oil from Algerian *Anacyclus pyrethrum* L. through the vegetative cycle. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, v. 27, n. 23, p. 2231-2234, 2013.

SETTEN, A.K.V, KOEK-NOORMAN, J. Studies in Annonaceae VI. A leafanatomical survey of genera of Annonaceae in the Neotropics. **Botanische Jahrbücher für**, v. 108, p. 17—50, 1986.

SIMAS, N.K.; LIMA, E.C; CONCEIÇÃO, S.R.; KUSTER, R.M.; FILHO, A.M.O. Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *Myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides. *Quimica Nova*, v. 27, n. 1, p. 46-49, .

SHAMMA, M. Degradation of aporphines. In: PHILIPSO, J.D.; ROBERTS, M.F.; ZENK, M.H. The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids. Berlin, New York: Springer-Verlag, p. 79-101, 1985.

SHAMMA, M. The isoquinoline alkaloids – chemistry and pharmacology. Academic Press New York and London, 594 p., 1972.

SHARMA, O.P.; BHAT, T.K. DPPH antioxidant assay revisited. **Food Chemistry**, v. 113, p. 1202-1205, 2009.

SIQUEIRA, C.A.T.; SERAIN, A.F.; PASCOAL, A.C.R.F.; ANDREAZZA, N.L.; LOURENÇO, C.C.; RUIZ, A.L.T.G.; CARVALHO, J.E.; SOUZA, A.C.O.; MESQUITAD, J.T.; TEMPONE, A.G.; SALVADORA, M.J. Bioactivity and chemical composition of the essential oil from the leaves of *Guatteria australis* A.St.-Hil. **Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters**, Publicado online DOI:10.1080/14786419.2015.1015017, 2015.

SINZ, A.; MATUSCH, R.; WITTE, L.; SANTISUK, T.; CHAICHANA, S.; REUTRAKUL, V.; WANGCHAROENTRAKUL, S. Alkaloids from *Dasydaschalon*, **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 26, p. 933-34, 1998.

SOUSA, A.; FERREIRA, I.C.F.R.; CALHELHA, R.; ANDRADE, P.B.; VALENTÃO, P.; SEABRA, R.; ESTEVINHO, L.; BENTO, A.; PEREIRA, J.A. Phenolics and antimicrobial activity of traditional stoned table olives ‘alcaparra’. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, p. 8533–8538, 2006.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry - Anti-Cancer Agents**, v. 5, n. 2, p. 173-182, 2005.

SUESS, T.R.; STERMITZ, F.R. Synthesis of (±)-isocorytuberine and (±)-*N*-methylisocorytuberine. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 6, p. 688–692, 1981.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. Assays related to cancer drug discovery. In: Hosteffmant K, editora. Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity. London, Academic Press, p. 71-133, 1990.

SUFFREDINI, I.B.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de três extratos vegetais antibacterianos selecionados da Floresta Amazônica e da Mata Atlântica brasileiras. **Revista do Instituto de Ciências da Saúde**, v. 25, n. 2, p. 127-129, 2007.

SULAIMAN, M.; HAMID, A.; HADI, A.; AWANG, K. Alkaloids and flavones from *Desmos dumosus*, Roxb. Saff. (Annonaceae). **Malysian Journal of Science**, v. 22, n. 1, p. 87-93, 2003.

TADIC, D.; CASSELS, B.K.; CAVÉ, A.; GOULART, M.O.F.; DE OLIVEIRA, A.B. Revised structure of the azafluorenone alkaloids from *Guatteria dielsiana*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 5, p. 1551-1552, 1987.

TADIC, D.; WANNIGAMA, G.P.; CASSELS, B.K.; CAVÉ, A. Alkaloids of the Annonaceae. Part 75. Alkaloids of *Alphonsea sclerocarpa*. **Journal of Natural Products**, v. 50, n. 3, p. 518-19, 1987.

TAVEIRA, M.; FERRERES, F.; GIL-IZQUIERDO, A.; OLIVEIRA, L.; VALENTÃO, P. Fast determination of bioactive compounds from *Lycopersicon esculentum*. **Food Chemistry**, v. 135, p. 748-755, 2012.

TENG, B.S.; LU, Y.H.; WANG, Z.T.; TAO, X.Y.; WEI, D.Z. In vitro anti-tumor activity of isorhamnetin isolated from *Hippophae rhamnoides* L. against BEL-7402 cells. **Pharmacological Research**, v. 54, n. 3, p.186-194, 2006.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; DE ANDRADE, JR., H.F.; DE AMORIM GUALDA, N.C.; YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extract from isoquinoline alkaloid - producing famielies. **Phytomedicine**, v. 12, p. 382-390, 2005.

TOMITA, M.; KATE, A.; IBUKA, T.; FURUKATIA, H. Mass spectra of pronuciferine and stepharine. **Tetrahedron Letters**, n. 32, p. 2825-2829, 1965.

TRIGO, J.R.; OLIVEIRA, J.; ANDRADE, E.H.A.; ZOGHBI, M.G.B. Óleos essenciais de espécies de Annonaceae que ocorrem no Pará: *Guatteria schomburgkiana* Mart. e *Pseudoxandra cuspidata* Maas. **Revista Brasileira de Plantas Medicinaiis, Botucatu**, v.9, n.3, p.113-116, 2007.

VALGAS, C.; DE SOUZA, S.M.; SMANIA, E.F.A.; SMANIA, JR., A. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

VALTER, J.L.; ALENCAR, K.M.C.; SARTORI, Â.L.B.; NASCIMENTO, E.A.; SÉRGIO, R.C.; MORAIS, A.L.; LAURA, V.A.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A. SILVA, D.B.; GRASSI, R.F.; FABRI, J.R.; SIQUEIRA, J.M. Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 373-378, 2008.

VAN SETTEN, A.K.; KOEK-NOORMAN, J. Studies in Annonaceae VI. A leaf anatomical survey of genera of Annonaceae in the Neotropics. **Botanische Jahrbücher**, Bd. 108, 1986.

VICHITPHAN, S.; VICHITPHAN, K.; SIRIKHANSAENG, P., 2007. Flavonoid content and antioxidant activity of krachai-dum (*Kaempferia parviflora*) wine. **KMITL Science and Technology Journal**, v. 7, n. S2, p. 97-105, 2007.

VUORELA, P.; LEINONEN, M.; SAIKKU, P.; TAMMELA, P.; RAUHA, J.- P.; WENNERBERG, T.; VUORELA, H. Natural Products in the Process of Finding New Drug Candidates. **Current Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1375-1389, 2004.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis. A thin layer chromatography atlas. 2 ed. Springer, 384 p., 2001.

WINK, M. Modes of action of alkaloids: In: Alkaloids: Biochemistry, ecology and medicinal applications, M.F. Roberts, & M. Wink, eds., Plenum, New York, p. 301-326, 1998.

WENIGER, B.; ARAGON, R.; DEHARO, E.; BASTIDO, J.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antimalarial constituents from *Guatteria amplifolia*. **Fuer Medizin Pharmazi**, v. 55, n. 11, p. 867-868, 2000.

WU, W.N.; HUAG, C.H. Structural elucidation of isoquinoline, isoquinolone, benzyloisoquinoline, aporphine, and phenanthrene alkaloids using API-ionspray Tandem Mass Spectrometry . **The Chinese Pharmaceutical Journal**, v. 58, p. 41-55, 2006.

ZABEL, V; WATSON, W.H.; PHOEBE, JR., C.H.; KNAPP, J.E.; SCHIFF, JR., P.L.; SLATKIN, D.J. Melosmine and melosmidine, 7,7-dimetiltetradhydroaporphine alkaloids from *Guatteria melosma*. **Journal of Natural Products**, v. 45, n. 1, p. 94-101, 1982.

ZAROTSKY, V.; SRAMEK, J.; CUTLER, N.R. Galanthamine hydrobromide: an agent for Alzheimer's disease. *American Journal of Health-System Pharmacy*, v. 60, p. 446-452, 2003.

ZETLER, G. Neuroleptic-like, anticonvulsant and antinociceptive effects of aporphine alkaloids: bulbocapnine, corytuberine, boldine and glaucine. **Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie**, v. 296, p. 255-281, 1988.

ZHAMIERASHVILI, M. G.; TEL'NOV, V. A.; YUNUSOV, M. S.; YUNUSOV, S. YU.; NIGMATULLAEV, A.; TAIZHANOV, K. Dynamics of the accumulation of alkaloids in the aboveground part of *Aconitum leucostomum*. **Khimiya Prirodnikh Soedinenii**, v. 6, p. 805-808, 1980.

ZHANG, Z; ELSOHLY, H.N.; JACOB, M.R.; PASCO, D.S; WALKER, L.A; CLARK , A.M. New sesquiterpenoids from the root of *Guatteria multivenia*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 6, p. 856-859, 2002.

ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A., Flavonóides. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre, Florianópolis: Editora da UFRGS, 2010, 1104 p.

7. CURRICULUM VITAE

Formação acadêmica

2000-2005	Graduação e Mestrado em Biotecnologia, com especialização em Química Ambiental, Politécnica de Wroclaw, Polonia
-----------	---

Artigo publicado

MORENO, P.R.H.; COSTA-ISSA, F.I.; RAJCA-FERREIRA, A.K.; PEREIRA, M.A.A.; KANEKO, T.M. Native Brazilian plants against nosocomial infections: a critical review on their potential and the antimicrobial methodology. Current Topics in Medicinal Chemistry, v. 13, p. 3040-3078, 2013.
--

Resumos publicados em Anais de Eventos

RAJCA-FERREIRA, A.K.; KANEKO, T.M.; MORENO, P.R.H. Antimicrobial activity from <i>Guatteria elliptica</i> R. E. Fries (Annonaceae). Book of Abstracts, International Federation of Societies of Cosmetic Chemist 28th Congress, 27-30 th October, Paris, França, v.1, p. 1844, 2014.
RAJCA-FERREIRA, A.K.; LOURENÇO, F.R.; BABY, A.R.; KATO, E.T.M.; YOUNG, M.C.M.; LIMA, M.E.L.; CORDEIRO, I.; MORENO, P.R.H. Antioxidant activity and chemical composition of essential oils from two <i>Guatteria elliptica</i> R. E. Fries (Annonaceae) specimens. Natural Volatiles & Essential Oils, 46 th International Symposium on Essential Oils, Lublin, 13-16 th September 2015.