UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro* dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)

JOCIMAR OLIANI

**Dissertação para obtenção do grau
de MESTRE**

**Orientador:
Profa. Dra. Dominique C H Fischer**

**São Paulo
2012**

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármacos e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro* dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)

JOCIMAR OLIANI

**Dissertação para obtenção do grau
de MESTRE**

**Orientador:
Profa. Dra. Dominique C H Fischer**

**São Paulo
2012**

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Jocimar Oliani

Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro* dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae)

**Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre**

**Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer
Orientador/presidente**

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, __ de _____ de 2012.

Aos meus pais, por seu amor, carinho e incentivo durante meus estudos e minha vida.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pela oportunidade de realização do curso de Farmácia e do curso de Mestrado.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo e sua Secretaria, pelas orientações e auxílios prestados ao longo do período do curso.

À Coordenação e à Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, pelo auxílio durante o período do Mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de Mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro à realização de Projeto de maior âmbito ao qual esteve vinculado este subprojeto.

À Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer, pela atenção, orientação, paciência e apoio durante o período do Mestrado, que muito me ensinou, contribuindo para meu aprendizado como pesquisador.

Ao Dr. André G. Tempone, pesquisador do Instituto Adolfo Lutz, pela colaboração na realização dos ensaios das atividades anti- *Leishmania* e anti- *Trypanosoma in vitro*.

À Dra. Ingrid Collantes Diaz, pesquisadora da Universidade Paulista, pelo auxílio à elucidação estrutural dos alcalóides isolados e por seus ensinamentos.

Ao Prof. Dr. Mário H. Hirata e ao doutorando Joas Lucas da Silva, do Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pela colaboração nos ensaios de atividade antimicobacteriana *in vitro*.

À Dra. Carmen Lucia Queiroga, pesquisadora do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), pela colaboração na análise de óleo volátil.

Aos professores da disciplina de Farmacognosia, pela colaboração ao longo da realização deste trabalho.

Ao técnico de laboratório, sr. Roberto de Jesus Honório, por todo auxílio prestado para a realização do trabalho experimental.

Ao colega Carlos Alberto Theodoro Siqueira, pelo que me ensinou durante o seu período de mestrado.

***“Em algum lugar, em alguma parte, algo
incrível aguarda para ser descoberto.”***

Carl Sagan

OLIANI, J. Estudo químico e avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro* dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae). 2012. 228p. Dissertação de mestrado – Orientador: Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer. E-mail: jocimar.oliani@usp.br

RESUMO

Considerando o grave quadro das doenças negligenciadas, no Brasil e no mundo, e as limitações do tratamento empregado, na atualidade, torna-se urgente a pesquisa de novos fármacos, que sejam mais ativos e seguros. Para tanto, a busca de moléculas-protótipo, a partir de espécies vegetais, tem sido importante estratégia. Neste contexto, foi realizado o estudo de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae), cujos alcalóides totais (AT) demonstraram promissora atividade antiprotozoária *in vitro*, em estudo anterior. Em paralelo, outras espécies de *Annona* mostraram atividade antimicobacteriana *in vitro*, igualmente, tendo motivado o presente estudo. Cinco das vinte frações alcaloídicas obtidas, por cromatografia em coluna, a partir dos AT das folhas, apresentaram atividade anti-*Leishmania* *in vitro*, tendo causado 100% de morte das formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*. Além disto, três delas foram ativas frente ao *Mycobacterium tuberculosis*. O isolamento de dois alcalóides noraporfínicos foi realizado, por fracionamento biomonitorado em coluna cromatográfica, seguido de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) semipreparativa. As estruturas dos compostos isolados foram elucidadas empregando-se as análises espectroscópicas de ressonância magnética nuclear, mono e bidimensionais, e por CLAE acoplada à espectrometria de massas (CLAE-IES-EM²). Um dos alcalóides foi identificado pela primeira vez, nesta espécie, sendo que o outro apresentou estrutura inédita. Ambos demonstraram significativa atividade anti-*Leishmania* *in vitro* ($CE_{50} \leq 10 \mu\text{g/ mL}$) frente às formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* [MHOM/BR/1972/LD]. O primeiro teve maior índice de seletividade (IS: 7,4), em relação à citotoxicidade em células do tecido conjuntivo NCTC Clone 929 de camundongos. Frente ao *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294) e ao *M. smegmatis* (ATCC 35798), os alcalóides isolados foram inativos ($CIM \geq 128 \mu\text{g/ mL}$). O óleo volátil das folhas foi analisado por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM), tendo sido identificados 41 constituintes, prevalecendo os sesquiterpenos (81,7%) em relação aos monoterpenos (0,8%). Entre os compostos majoritários encontrados no óleo, citam-se os sesquiterpenos α -amorfeno (43,6%), *E*-cariofileno (17,7%) e o germacreno (5,3%). Nos testes de atividade anti-*Leishmania* *in vitro* frente às formas promastigotas de quatro espécies do parasita, o óleo foi mais ativo em *L. (L.) infantum chagasi* (CE_{50} : 25,97 $\mu\text{g/ mL}$). Nas formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi* mostrou atividade 8,5 vezes superior àquela do fármaco-padrão benznidazol (CE_{50} : 5,31 $\mu\text{g/ mL}$). Os resultados obtidos ratificaram a importância da prospecção da flora, em particular de *A. crassiflora*, como fonte potencial de compostos bioativos, que venham a constituir novos fármacos, como alternativa à restrita terapêutica existente para o tratamento das doenças negligenciadas.

Palavras-chave: *Annona crassiflora* Mart.; Annonaceae; alcalóides aporfínicos; óleo volátil; *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*; *Leishmania* (L.) *amazonensis*; *Leishmania* (V.) *braziliensis*; *Leishmania* (L.) *major*; *Trypanosoma cruzi*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium smegmatis*; citotoxicidade *in vitro*

OLIANI, J. Chemical studies and evaluation of *in vitro* antiprotozoal and antimycobacterial activities of isoquinoline alkaloids and volatile oil from *Annona crassiflora* Mart (Annonaceae). 2012. 228p. Dissertation, Master's degree – Supervision master: Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer. E-mail: jocimar.oliani@usp.br

ABSTRACT

Neglected diseases are a serious health problem in Brazil and worldwide. The available drugs are limited in effectiveness with a high toxicity. There is an urgent need of more safe and bioactive compounds. The search of new molecules from plant species is a well known and important strategy to achieve this goal. In a previous work, *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) showed a promising antiprotozoal activity. Beside this, other *Annona* species presented an interesting antimycobacterial action. In this bio-guided study, after the column fractionation of the leaves total alkaloids, *in vitro* tests were performed and five from twenty fractions were highly active (100% deaths) against promastigotes of *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*, and only three were active against *Mycobacterium tuberculosis*. After purification of the bioactive fractions, two noraporphine alkaloids were isolated by HPLC and identified by the usual mono and bidimensional spectroscopic techniques. One of them was isolated from the first time from this species. The other one is a novel chemical entity. Both compounds presented anti- *Leishmania* activity ($CE_{50} \leq 10 \mu\text{g/ mL}$) against *L. (L.) infantum chagasi* [MHOM/BR/1972/LD]. The first one showed a higher selectivity index (SI: 7.4) considering its mice connective tissue cells toxicity [NCTC Clone 929]. However, both were inactive against *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294) and *M. smegmatis* (ATCC 35798) ($CIM \geq 128 \mu\text{g/ mL}$). In the leaves volatile oil 41 compounds were identified. The sesquiterpenes were in majority (81.7%), followed by monoterpenes (0.8%). The sesquiterpenes α -amorphene (43.6%), *E*-caryophyllene (17.7%) and germacrene (5.3%) were the main constituents. The oil was little effective against the four tested *Leishmania* species and slightly more active against *L. (L.) infantum chagasi* (CE_{50} : $25.97 \mu\text{g/ mL}$). However, it was highly active against the trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* (CE_{50} : $5.31 \mu\text{g/ mL}$) showing to be 8.5 times more active than benznidazol. These results stimulate a deeper investigation of those alkaloids as antiprotozoal agents, confirming the importance of the plant species metabolites as a source of new bioactive molecules and their potential as future drugs.

Keywords: *Annona crassiflora* Mart.; Annonaceae; aporphine alkaloids; volatile oil; *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*; *Leishmania* (L.) *amazonensis*; *Leishmania* (V.) *braziliensis*; *Leishmania* (L.) *major*; *Trypanosoma cruzi*; *Mycobacterium tuberculosis*; *Mycobacterium smegmatis*; *in vitro* cytotoxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo	22
Figura 2 - Distribuição da leishmaniose visceral no mundo.....	23
Figura 3 - Flebotomíneo [<i>Lutzomyia longipalpis</i> (Lutz & Neiva, 1912)] vetor da leishmaniose no Novo Mundo.....	24
Figura 4 - Formas dos parasitas de <i>Leishmania</i> 4A. Formas promastigotas. 4B. Formas amastigotas	28
Figura 5 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	28
Figura 6 - Leishmaniose cutânea. Lesão ulcerosa.	30
Figura 7 - Leishmaniose cutânea difusa. Lesão infiltrada com áreas descamativas (paciente com tempo de doença de 12 anos).....	31
Figura 8 - Leishmaniose mucocutânea. Edema nasal com áreas de ulceração e crostas no local e edema no lábio superior	32
Figura 9 - Leishmaniose visceral. Paciente no período final.....	34
Figura 10 - Estrutura química dos fármacos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose	35
Figura 11 - Estrutura química da anfotericina B	37
Figura 12 - Estrutura química da pentamidina	38
Figura 13 - Estrutura química da miltefosina	39
Figura 14 - Estrutura química da paromomicina	40
Figura 15 - Estrutura química da sitamaquina	40
Figura 16 - Estrutura química dos triazóis e do imidazol	41
Figura 17 - Estrutura química da azitromicina	42
Figura 18 - Distribuição mundial de doença de Chagas	43
Figura 19 - Hemácias infectadas por <i>Trypanosoma cruzi</i>	44
Figura 20 - Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	45
Figura 21 - Estrutura química do benznidazol	47
Figura 22 - Estrutura química do nifurtimox.....	48
Figura 23 - Estrutura química da amiodarona	49
Figura 24 - Estrutura química do posaconazol	50
Figura 25 - Estrutura química do albaconazol	50
Figura 26 - Estrutura química do TAK-187	51
Figura 27 - Estrutura química do ravuconazol.....	51
Figura 28 - Estrutura química do fármaco K-777	52
Figura 29 - Estruturas químicas dos inibidores de cisteína sintase derivados da tiosemicarbazona.....	52
Figura 30 - Estruturas químicas dos inibidores de tripanotiona redutase	53

Figura 31 – Estruturas químicas dos bisfosfonatos	53
Figura 32 - Estrutura química do alopurinol	54
Figura 33 - Estrutura química do sal de violeta de genciana	54
Figura 34 - Taxa de incidência estimada da tuberculose em 2010.....	56
Figura 35 - <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	57
Figura 36 - Estruturas químicas dos fármacos de primeira linha para o tratamento da tuberculose	62
Figura 37 - Estruturas químicas dos fármacos do Grupo 2 para o tratamento da tuberculose	65
Figura 38 - Estruturas químicas dos fármacos do Grupo 3 para o tratamento da tuberculose	66
Figura 39 - Estrutura química da terizidona	67
Figura 40 - Estrutura química da cicloserina	67
Figura 41 - Estrutura química da etionamida e protionamida	68
Figura 42 - Estrutura química do ácido para-aminossalicílico	68
Figura 43 - Estruturas químicas dos fármacos do grupo 5 para o tratamento da tuberculose	69
Figura 44 - Principais núcleos estruturais de alcalóides isoquinolínicos encontrados no gênero <i>Annona</i>	79
Figura 45 - Estruturas dos sesquiterpenos mais freqüentemente encontrados nos óleos voláteis das espécies de <i>Annona</i> estudadas, até o momento	128
Figura 46 - Estruturas dos monoterpenos mais freqüentemente encontrados nos óleos voláteis das espécies de <i>Annona</i> estudadas, até o momento....	129
Figura 47 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Hábito arbóreo.....	145
Figura 48 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Esquema de obtenção dos alcalóides totais por partição ácido-base.	147
Figura 49 - Cromatograma em camada delgada (CCD), dos alcalóides totais (AT) de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	160
Figura 50 - Cromatograma em CCD do óleo volátil (OV) de folha de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	161
Figura 51 - Esquema de fracionamento dos alcalóides totais de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	162
Figura 52 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. - Cromatograma da fração alcaloídica A17	163
Figura 53 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Cromatograma obtido da CLAE do composto isolado A17-3	164
Figura 54 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Cromatograma obtido da CLAE do composto isolado A17-6	164
Figura 55 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de RMN ¹ H do composto A17-3	

(CD ₃ OD, δ , 300 MHz)	165
Figura 56 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de RMN ¹³C do composto A17-3 (CD ₃ OD, δ , 75,5 MHz)	166
Figura 57 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Cromatograma de íons da molécula A17-3, por CLAE-IES-EM².	166
Figura 58 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de massas (EM) da molécula do composto A17-3	167
Figura 59 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de massas da segunda fragmentação (EM²) do íon molecular [M+H]⁺ m/z 282 da molécula do composto A17-3	167
Figura 60 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de RMN ¹H do composto A17-6 (CD ₃ OD, δ , 300 MHz)	168
Figura 61 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de RMN ¹³C do composto A17-6 (CD ₃ OD, δ , 75,5 MHz)	169
Figura 62 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de RMN ¹³C (DEPT 135) do composto A17-6 (CD ₃ OD, δ , 75,5 MHz)	170
Figura 63 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de HSQC do composto A17-6 (CD ₃ OD, δ , 300MHz)	171
Figura 64 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de HMQC do composto A17-6, (CD ₃ OD, δ , 300 MHz)	172
Figura 65 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Cromatograma de íons da molécula do composto A17-6, por CLAE-IES-EM².	173
Figura 66 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de massas (EM) da molécula do composto A17-6	173
Figura 67 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Espectro de massas (EM) da segunda fragmentação (EM²) do íon molecular [M+H]⁺ m/z 312 da molécula do composto A17-6	174
Figura 68 - <i>Annona crassiflora</i> Mart. Cromatograma do óleo volátil das folhas, por CG, nas condições descritas no item 4.2.3.3.	175
Figura 69 - <i>Annona crassiflora</i> Mart - Estrutura química da anolobina [37].	190
Figura 70 - Fragmentos da molécula A17-3 (anolobina)	193
Figura 71 - Formas de ressonância relativas ao pico m/z 265 observado no espectro de massas da segunda fragmentação (EM²) do íon molecular de A17-3 (anolobina).	193
Figura 72 - Estrutura química da cissaglaberrimina	194
Figura 73 - Fragmentos da molécula A17-6	195
Figura 74 - Formas de ressonância relativas ao pico m/z 295 observado no espectro de massas da segunda fragmentação (EM²) do íon molecular de A17-6.	196
Figura 75 - <i>Annona crassiflora</i> Mart - Estrutura química do alcalóide inédito (6,7,7a,8-tetrahydro-10-metoxi-5H-benzo[g]-1,3-benzodioxolo[6,5,4,-de]quinolin-4-ol) (A17-6)	196

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequência de eluentes e volumes empregados no fracionamento dos AT de <i>Annona crassiflora</i> Mart., por CC	149
Tabela 2 - Massas dos resíduos (mg) das frações alcaloídicas (A1 - A20) de <i>A. crassiflora</i> obtidas fracionamento, por CC	158
Tabela 3 - Massas dos resíduos (mg) das frações de A17 , obtidas por fracionamento, por CLAE	159
Tabela 4 - Constituintes químicos (%) do óleo volátil de folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	176
Tabela 5 - Atividade antileishmania <i>in vitro</i> (% morte) dos alcalóides totais (AT) de folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart. e das frações A1 - A20 , frente às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (L.) <i>infantum chagasi</i> [MHOM/BR/1972/LD].....	179
Tabela 6 - Concentração efetiva (CE₅₀) (µg/mL/ µM) dos alcalóides totais de folha de <i>Annona crassiflora</i> Mart. e dos compostos isolados A17-3 e A17-6, frente às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (L.) <i>infantum chagasi</i> [MHOM/BR/1972/LD] e citotoxicidade frente às células de tecido conjuntivo de camundongo NCTC clone 929 (ATCC)	181
Tabela 7 - Concentração efetiva de 50% (CE₅₀) (µg/mL) do óleo volátil de <i>Annona crassiflora</i> Mart. frente às formas promastigotas de <i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i> (WHO/BR/00/LT0016), <i>L.</i> (V.) <i>braziliensis</i> (MHO/BR/75/M2903), <i>L.</i> (L.) <i>infantum chagasi</i> (MHOM/BR/1972/LD) e <i>L.</i> (L.) <i>major</i> (MHOM/1L/80/Fredlin) e às formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> (cepa Y).....	183
Tabela 8 - Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/ mL) dos alcalóides totais de <i>A. crassiflora</i> Mart. e das frações alcaloídicas (A1-A20) frente ao <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (ATCC 27294) e ao <i>M. smegmatis</i> (ATCC 35798).....	184
Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (CIM) (µg/ mL) dos compostos A17-3 e A17-6 isolados de <i>Annona crassiflora</i> Mart., frente ao <i>M. tuberculosis</i> (ATCC 27294) e ao <i>Mycobacterium smegmatis</i> (ATCC 35798).....	186
Tabela 10 - Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹H do composto isolado A17-3 (300 MHz, CD ₃ OD) e da anolobina	191
Tabela 11 - Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ¹³C do composto isolado A17-3 (75 MHz, CD ₃ OD) e da anolobina.....	192
Tabela 12 - Deslocamentos químicos (δ) do composto isolado A17-6 (CD ₃ OD) e correlações dos espectros de RMN para o hidrogênio (300 MHz) e para carbono (75 MHz)	195

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AT	- alcalóides totais
BCM	- Baylor College of Medicine
C₅D₅N	- piridina deuterada
CC	- cromatografia em coluna
CC₅₀	- concentração citotóxica em 50%
CDCl₃	- clorofórmio deuterado
CD₃OD	- metanol deuterado
CCD	- cromatografia em camada delgada
CDC	- Center for Disease Control (Centro para Controle de Doenças)
CE₅₀	- concentração efetiva em 50%
CG-EM	- cromatografia gasosa-espectrometria de massa
CIM	- concentração inibitória mínima
CLAE	- cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-IES-EM²	- cromatografia líquida de alta eficiência-espectrometria de massa por ionização por <i>eletrospray</i>
DEPT	- intensificação de sinal sem distorção por transferência de polarização
DNDi	- Iniciativa em Drogas para Doenças Negligenciadas
DMSO	- dimetilsulfóxido
DOPS	- Directly Observed Treatment Short-Course (Tratamento de Curta Duração Diretamente Observado)
ET	- extrato etanólico
HMBC	- correlação heteronuclear a múltiplas ligações
HSQC	- correlação heteronuclear de único quantum
IR	- índice de retenção
LC	- leishmaniose cutânea
LCD	- leishmaniose cutânea difusa
LM	- leishmaniose mucocutânea
LTA	- leishmaniose tegumentar americana
LV	- leishmaniose visceral
m/m	- proporção massa/massa
MDR-TB	- tuberculose resistente aos fármacos
MeOD	- metanol deuterado
O.V.	- óleo volátil
R_f	- fator de retenção
RMN	- ressonância magnética nuclear
XDR-TB	- tuberculose extremamente resistente aos fármacos
WHO	- World Health Organization (Organização Mundial da Saúde)

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alcalóides isoquinolínicos simples isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	81
Quadro 2 - Alcalóides espiroisoquinolínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	82
Quadro 3 - Alcalóides apofinícos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	83
Quadro 4 - Alcalóides noraporfínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	92
Quadro 5 - Alcalóides aporfínicos 7-substituídos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	99
Quadro 6 - Alcalóides oxoaporfínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	101
Quadro 7 - Alcalóides dioxoaporfínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	107
Quadro 8 - Alcalóides dehidroaporfínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	108
Quadro 9 - Alcalóides proaporfínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	109
Quadro 10 - Alcalóides benzilisoquinolínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	110
Quadro 11 - Alcalóides morfinandienônicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	114
Quadro 12 - Alcalóides protoberberínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	115
Quadro 13 - Alcalóides tetrahidroprotoberberínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	116
Quadro 14 - Alcalóides dihidroprotoberberínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	119
Quadro 15 - Alcalóides fenantrênicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	120
Quadro 16 - Alcalóides azaantracênicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	122
Quadro 17 - Alcalóides pirimidina- β -carbolínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i>	124
Quadro 18 - Alcalóides não isoquinolínicos isolados a partir do gênero <i>Annona</i> ...	125
Quadro 19 - Classes de alcalóides isoquinolínicos isolados a partir de <i>Annona crassiflora</i> Mart	131
Quadro 20 - Acetogeninas isoladas a partir de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	134
Quadro 21 - Flavonóides isolados a partir de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	136
Quadro 22 - Compostos fenólicos isolados a partir de <i>Annona crassiflora</i> Mart. ...	140

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 Considerações gerais	20
1.2 Leishmaniose	22
1.2.1 Aspectos gerais	22
1.2.2 Vetores	23
1.2.3 Agentes etiológicos	24
1.2.3.1 <i>Leishmania</i> (L.) <i>infantum chagasi</i>	25
1.2.3.2 <i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i>	25
1.2.3.3 <i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i>	26
1.2.3.4 <i>Leishmania</i> (L.) <i>major</i>	27
1.2.4 Ciclo de vida do parasita	27
1.2.5 Manifestações clínicas	29
1.2.5.1 Forma cutânea	30
1.2.5.2 Forma cutânea difusa	30
1.2.5.3 Forma mucocutânea	31
1.2.5.4 Forma visceral	33
1.2.6 Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose	34
1.2.6.1 Fármacos de primeira escolha	34
1.2.6.2 Fármacos de segunda escolha	36
1.2.6.3 Fármacos em estudo	39
1.3 Doença de Chagas	43
1.3.1 Aspectos gerais	43
1.3.2 Agente etiológico e vetores	44
1.3.3 Ciclo de vida do parasita	44
1.3.4 Manifestações clínicas	46
1.3.4.1 Fase aguda	46
1.3.4.2 Fase crônica	46
1.3.5 Fármacos empregados no tratamento da doença de Chagas	47
1.3.5.1 Fármacos em uso	47
1.3.5.2 Fármacos em estudo	48
1.3.6 Agente profilático	54
1.4 Tuberculose	56
1.4.1 Aspectos gerais	56

1.4.2	Agente etiológico.....	57
1.4.3	Manifestações clínicas	58
1.4.3.1	Tuberculose latente	58
1.4.3.2	Tuberculose pulmonar	59
1.4.3.3	Tuberculose extrapulmonar	59
1.4.4	Fármacos utilizados no tratamento da tuberculose.....	61
1.4.4.1	Grupo 1 - Medicamentos de primeira linha.....	62
1.4.4.2	Grupo 2 - Medicamentos de segunda linha, contendo antibióticos aminoglicosídicos	64
1.4.4.3	Grupo 3 – Medicamentos de segunda linha, contendo fluoroquinolonas	65
1.4.4.4	Grupo 4 – Outros medicamentos de segunda linha.....	66
1.4.4.5	Grupo 5 – Medicamentos de menor eficácia ou não recomendados para uso de rotina	68
1.5	Importância dos metabólitos de origem natural e das espécies vegetais na obtenção de novos fármacos	70
1.5.1	Espécies do gênero <i>Annona</i> e atividade antiprotozoária <i>in vitro</i>	72
1.5.2	Espécies do gênero <i>Annona</i> e atividade antimicobacteriana <i>in vitro</i>	74
1.5.3	Usos e atividades biológica e farmacológica de <i>Annona crassiflora</i> Mart.	75
1.6	Aspectos químicos da família Annonaceae e do gênero <i>Annona</i>	76
1.6.1	Família Annonaceae	76
1.6.2	Gênero <i>Annona</i>	78
1.6.2.1	Alcalóides	78
1.6.2.2	Óleo volátil	126
1.6.3	<i>Annona crassiflora</i> Mart.	130
2	OBJETIVOS	144
2.1	Objetivo geral	144
2.2	Objetivos específicos	144
3	MATERIAL E MÉTODOS	145
3.1	Material botânico	145
3.2	Métodos.....	145
3.2.1	Secagem e pulverização.....	145
3.2.2	Obtenção dos extratos e do óleo volátil	146

3.2.2.1 Extrato etanólico	146
3.2.2.2 Alcalóides totais.....	146
3.2.2.3 Obtenção do óleo volátil	147
3.2.3 Análises cromatográficas	147
3.2.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	147
3.2.3.2 Cromatografia em coluna (CC)	148
3.2.3.3 Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (CG-EM)	150
3.2.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	151
3.2.3.5 Determinação estrutural dos compostos isolados da fração A17 .	152
3.2.3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por <i>eletrospray</i> (CLAE-IES-EMⁿ²)	152
3.2.3.5.2 Espectroscopia de ressonância magnética nuclear.....	152
3.2.4 Avaliação da atividade antiprotozoária <i>in vitro</i>	153
3.2.4.1 Avaliação da atividade anti- <i>Leishmania</i>	153
3.2.4.1.1 Parasitas.....	153
3.2.4.1.2 Avaliação da viabilidade dos parasitas frente aos alcaloides	153
3.2.4.1.3 Determinação da concentração efetiva de 50% (CE₅₀) dos alcalóides e do óleo volátil	154
3.2.4.2 Avaliação da atividade anti- <i>Trypanosoma</i>	155
3.2.4.2.1 Parasitas.....	155
3.2.4.2.2 Determinação da concentração efetiva de 50% (CE₅₀) do óleo volátil.....	155
3.2.4.3 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> dos alcalóides	156
3.2.4.3.1 Células	156
3.2.4.3.2 Determinação da concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) dos alcalóides e frações	156
3.2.5 Análise estatística	156
3.2.6 Avaliação da atividade antimicobacteriana dos AT, das frações alcaloídicas e dos compostos isolados.....	157
4 RESULTADOS	158
4.1 Rendimento das extrações e teor de óleo volátil.....	158
4.1.1 Extrato etanólico (ET)	158
4.1.2 Alcalóides totais (AT)	158

4.1.3 Frações alcaloídicas	158
4.1.4 Óleo volátil	159
4.2 Perfil cromatográfico dos alcalóides totais e do óleo volátil de folhas de A. crassiflora , por cromatografia em camada delgada (CCD)	159
4.2.1 Alcalóides totais	159
4.2.2 Óleo volátil	161
4.3 Fracionamento dos alcalóides de A. crassiflora	161
4.4 Registros de espectros dos compostos purificados	165
4.4.1 Registros de espectros do composto A17-3	165
4.4.2 Registros de espectros do composto A17-6	168
4.5 Dados espectroscópicos e físico-químicos dos compostos isolados	174
4.5.1 Composto A17-3	174
4.5.2 Composto A17-6	174
4.6 Composição do óleo volátil de folha de A. crassiflora	175
4.7 Atividades antiprotozoária e antimicobacteriana <i>in vitro</i>	178
4.7.1 Atividade anti- <i>Leishmania in vitro</i> dos alcalóides totais de folhas de A. crassiflora e das frações originadas do seu fracionamento	178
4.7.2 Concentração efetiva de 50% (CE ₅₀) dos alcalóides totais de folhas de Annona crassiflora Mart. e dos compostos isolados A17-3 e A17-6 , frente às formas promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum chagasi</i> e toxicidade frente às células de tecido conjuntivo de camundongo	180
4.7.3 Concentração efetiva de 50% (CE ₅₀) do óleo volátil de folhas de Annona crassiflora Mart. frente às formas promastigotas de quatro espécies de <i>Leishmania</i> e às formas tripomastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	182
4.7.4 Atividade antimicobacteriana dos alcalóides totais e das frações alcaloídicas de A. crassiflora	184
5 DISCUSSÃO	187
6 CONCLUSÕES	204
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	206

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações gerais

Atualmente, cerca de um bilhão de pessoas são afetadas pelas enfermidades conhecidas como “doenças negligenciadas” ou “doenças tropicais”, principalmente a população dos países menos desenvolvidos, localizados na Ásia, África, América do Sul e América Central e, em menor proporção, aquela dos países da Europa e da América do Norte. Sob esta denominação, estão incluídas enfermidades como: leishmaniose, doença de Chagas, malária, tuberculose, tripanossomíase africana, esquistossomose, dengue, hanseníase, filariose, cisticercose, entre outras (WHO, 2010).

As doenças negligenciadas afetam populações pobres, que vivem em condições precárias ou inexistentes de higiene, lesando os indivíduos por toda a vida, causando alto grau de morbidade e incapacidade física, podendo levar, até mesmo, a desfiguração (WHO, 2010), como no caso da leishmaniose.

Considerando o baixo nível de influência política destas populações, quase sempre não recebem atenção dos governos dos seus países, havendo carência de programas de combate específico à estas enfermidades (WHO, 2010, IOSET, 2008).

Somam-se, a este quadro, problemas relacionados à terapêutica usualmente adotada. Os medicamentos comumente empregados apresentam, geralmente, alta toxicidade, podendo causar a morte. O uso prolongado, a necessidade de internação para aqueles de administração parenteral e o alto custo dos fármacos são fatores limitantes à manutenção do tratamento que, quase sempre, é abandonado (AHMAD, 2011, WHO, 2010, CLAYTON, 2010^a, SANTOS et al., 2008).

Em função do montante de investimento necessário ao desenvolvimento de novos medicamentos, além da expectativa de baixo retorno financeiro, as empresas farmacêuticas, de forma geral, têm demonstrado pouco interesse na investigação e produção de novos fármacos com atividade antiprotozoária (CHATELAIN; IOSET, 2011, WHO, 2010).

A estatística do período de 1975 a 2004 revela que dos 1556 novos medicamentos registrados, somente 21 destinaram-se às doenças negligenciadas.

Número, este, inexpressivo ao considerar-se que estas enfermidades representam 11,4% do total de doenças ocorrentes, no mundo (CHIRAC; TORREELE, 2006).

Aproximadamente 25% dos fármacos empregados na terapêutica atual originaram-se, direta ou indiretamente, a partir de espécies vegetais (GURIB-FAKIM, 2006, SIMÕES et al., 2004), tendo-se tornado um dos principais alvos na pesquisa de novos compostos bioativos (GURIB-FAKIM, 2006, CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUES, 2001).

Espécies do gênero *Annona* apresentam, em sua composição, entre outras classes de compostos, os alcalóides e o óleo volátil os quais demonstraram possuir atividades biológicas de interesse, como a antiprotozoária e a antimicobacteriana *in vitro* (COSTA et al., 2011, SIQUEIRA et al., 2011, SIQUEIRA, 2010, COSTA et al., 2009, GAUTAM et al., 2007, COSTA et al., 2006, TEMPONE et al., 2005, FISCHER et al., 2004, GRAHAM et al., 2003, QUEIROZ et al., 1996).

Em triagem prévia, os alcalóides totais de *Annona crassiflora* Mart. apresentaram significativas atividades em agentes etiológicos da leishmaniose e da doença de Chagas (TEMPONE et al., 2005). Em relação ao óleo volátil da espécie, não há registro de estudo prévio sobre sua composição e atividades antiprotozoária e antimicobacteriana. Tais lacunas despertaram o interesse para a presente investigação.

1.2 Leishmaniose

1.2.1 Aspectos Gerais

A leishmaniose é a antropozoonose causada por protozoários do gênero *Leishmania* sendo endêmica, em cerca de 88 países, e considerada uma das seis endemias prioritárias no mundo (WHO, 2010).

No mundo, 12 milhões de pessoas estão infectadas pela doença ocorrendo, aproximadamente, 1,6 milhões de novos casos por ano (WHO, 2010).

Cerca de 500 mil pessoas apresentam a leishmaniose visceral. Entre elas, 90% situam-se em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão. Na sua forma cutânea, afeta 1,1 milhão sendo que 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Irã, Peru, Arábia Saudita, Sudão, Síria, Peru e Bolívia (WHO, 2010). Estima-se que a população em risco seja de 350 milhões (DNDi, 2011^a) (**Figuras 1 e 2**).

Figura 1 – Distribuição da leishmaniose cutânea no mundo [fonte: WHO, 2011^a]

Figura 2 – Distribuição da leishmaniose visceral no mundo [fonte: WHO, 2011^b]

Os fatores que colocam as populações em risco de contrair a doença são as mudanças sócio-econômicas relacionadas aos processos de urbanização e de globalização, como: êxodo rural, favelas, desemprego, entre outros, que as mantêm em condições de pobreza (WHO, 2010, NEVES et al., 2009, DESJEUX, 2001).

O Brasil representa o país de maior endemicidade da doença, com 97% dos casos relatados no continente americano, sendo que há maior incidência das formas: cutânea (**LC**), também chamada tegumentar americana (**LTA**), e visceral (**LV**), que ocorrem em todo o território nacional, exceto na Região Sul (BRASIL, 2007).

No período de 1989 a 2009, a média anual de casos registrados, no país, foi de 29.021 da leishmaniose cutânea (BRASIL, 2011^a) enquanto, no período de 2003 a 2009, foram registrados 34.583 casos da leishmaniose visceral (BRASIL, 2011^b).

1.2.2 Vetores

Os vetores da leishmaniose são insetos dípteros denominados flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, no continente americano, e ao gênero *Phlebotomus*, na Europa, África e Ásia, ambos pertencentes à família Psychodidae.

Conforme a região onde ocorrem são conhecidos, popularmente, como “mosquito-palha”, “birigui”, “tatuquira”, entre outros (**Figura 3**).

Figura 3 - Flebotomíneo [*Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva, 1912)] vetor da leishmaniose no Novo Mundo [Fonte: BRASIL, 2007]

Os insetos do gênero *Lutzomyia* habitam lugares úmidos, sombrios, protegidos do vento e têm o hábito crepuscular e pós-crepuscular. São pequenos, com comprimento de 1 a 3 mm e corpo de coloração castanho-clara ou cor de palha, revestido por pelos. São reconhecidos, facilmente, pela forma de voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas. Somente as fêmeas são hematófagas, tendo longevidade estimada em 20 dias (NEVES et al., 2009, BRASIL, 2007, REITHINGER et al., 2007, RATH et al., 2003).

1.2.3 Agentes etiológicos

Os agentes etiológicos da leishmaniose são protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*, pertencentes à família Trypanosomatidae, podendo causar diversas formas da doença, no homem (CDC, 2011^a, NEVES et al., 2009, BADARÓ; SCHOOLEY, 2008, CHAPPIUS et al., 2007, BRASIL, 2007, 2006).

São parasitas obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear, com duas formas principais: uma flagelada encontrada no tubo digestivo do inseto, chamada de promastigota, e uma forma sem flagelo, chamada de amastigota, que ocorre nos tecidos dos hospedeiros vertebrados.

No Brasil, as principais espécies responsáveis pela leishmaniose tegumentar, em suas diferentes formas, são: *Leishmania* (V.) *braziliensis*, *L.* (L.) *amazonensis*, *L.*

(V.) *guyanensis* (cutânea) (**LC**), *L. (V.) braziliensis* (mucocutânea) (**LM**) e *L. (L.) amazonensis* (cutânea difusa) (**LCD**). A leishmaniose visceral (**LV**) é causada, principalmente, pela *L. (L.) infantum chagasi* (BRASIL, 2007, 2006).

No presente trabalho, as espécies de *Leishmania* empregadas na avaliação da atividade *in vitro*, foram: *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) major*, tendo sido abordadas, a seguir.

1.2.3.1 *Leishmania (L.) infantum chagasi*

Leishmania (L.) infantum chagasi é o agente etiológico da **LV**, ocorrendo em todo o território brasileiro, exceto na região Sul, sendo os principais vetores deste protozoário o flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, igualmente, presente em todo o país, e o *Lu. cruzi*, ocorrente no estado do Mato Grosso do Sul (NEVES et al., 2009, BRASIL, 2007, 2006).

Na área urbana, o reservatório é o cão, enquanto que na natureza; são as raposas e os marsupiais (SOUZA et al., 2010, NEVES et al., 2009, BRASIL, 2006).

Embora a transmissão pelo *Lu. longipalpis* seja a principal via, há relatos de contaminação por transfusão sanguínea e por compartilhamento de seringas descartáveis, por usuários de drogas ilícitas (NEVES et al., 2009, IVERSSON et al., 1982).

1.2.3.2 *Leishmania (V.) braziliensis*

Amplamente distribuído por todo o território nacional, *Leishmania (V.) braziliensis* é considerado o principal agente etiológico da **LTA** em toda a América Latina (BRASIL, 2007).

Esta espécie de *Leishmania* apresenta grande variação de vetores e reservatórios de acordo com sua distribuição geográfica no Brasil, afetando os estados do Pará, Ceará, Amapá, Paraíba, Bahia, Espírito Santo, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso. Ocorre em regiões que foram impactadas pela destruição de florestas e pela invasão do ambiente peridoméstico, pelos vetores (NEVES et al., 2009).

Os vetores da *L. (V.) braziliensis*, no Pará, são *Lutzomyia complexa* e *Lu. wellcomei*, sendo este último responsável pela transmissão no ambiente florestal no Ceará, juntamente com *Lu. migonei*. O parasita, também, foi isolado do vetor *Lu. whitmani*, nos estados da Bahia, Ceará, Mato Grosso do Sul e Paraná. Nos estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Minas Gerais, o vetor é *Lu. intermedia*, que é encontrado em plantações, áreas de florestas e, mesmo, em domicílios (BRASIL, 2007).

Entre os reservatórios de *Leishmania (V.) braziliensis* destacam-se: roedores silvestres e sinantrópicos em Pernambuco, gatos no Rio de Janeiro, cães no Rio de Janeiro, São Paulo, Espírito Santo, Bahia e Ceará, cavalos e asnos no Rio de Janeiro, Bahia e Ceará.

1.2.3.3 *Leishmania (L.) amazonensis*

Normalmente, *Leishmania (L.) amazonensis* causa úlceras cutâneas localizadas, entretanto, alguns indivíduos podem vir a desenvolver quadro de **LCD** (BRASIL, 2007).

As espécies *Lutzomyia flavisculatta*, *Lu. reducta* e *Lu. olmeca nociva* são pouco antropofílicas e apresentam atividade noturna, levando à infecção pelo parasita, com menor frequência, nas regiões de florestas primárias e secundárias da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Maranhão). Esta espécie também é encontrada nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Paraná (BRASIL, 2007).

O seu principal vetor é *Lu. flavisculatta*, que apresenta densidade elevada em matas úmidas e ampla distribuição geográfica, não apenas em habitats nos países fronteiriços ao Brasil, mas também, nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Goiás, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal (BRASIL, 2007).

Os prováveis reservatórios de *Leishmania (L.) amazonensis* são os roedores silvestres do gênero *Proechymis* e *Oryzomys* (BRASIL, 2007).

1.2.3.4 *Leishmania (L.) major*

Segundo o Ministério da Saúde, no país, não há o registro de casos de infecção por *Leishmania (L.) major*, agente etiológico responsável pela LT do Velho Mundo, também conhecida por “botão-do-orientes” ou “botão-de-Bagdá”. Apesar disso, brasileiros que trabalharam no Oriente, apresentaram diagnóstico de infecção por este parasita, o que demonstra a possibilidade dessa espécie e outras serem introduzidas no Brasil (NEVES et al., 2009).

Possui período de incubação inferior a quatro meses, causando a formação de úlceras normalmente indolores, evoluindo para úlceras úmidas, que se multiplicam, principalmente, em imigrantes não-imunes. Seu diagnóstico é similar àquele da *Leishmania (L.) braziliensis* (NEVES et al., 2009).

Entre os vetores prováveis estão as fêmeas de *Phlebotomus papatasi*, *P. caucasicus*, *P. andrejevi*, *P. mongolensis* e *P. dubosqui* e, como reservatórios, encontram-se várias espécies de roedores silvestres e cães, nos casos ocorrentes na Arábia Saudita (NEVES et al., 2009).

1.2.4 Ciclo de vida do parasita

No ciclo de vida dos protozoários do gênero *Leishmania* há diferentes estágios ou formas de desenvolvimento do parasita, sendo as principais as promastigotas e amastigotas.

As formas promastigotas são alongadas, com um flagelo livre emergindo da região anterior e apresentando tamanho bastante variável (**Figura 4A**), inclusive na mesma espécie. Suas dimensões, incluindo o flagelo, normalmente variam entre 16 e 40 µm de comprimento por 1,5 a 3,0 µm de largura. São extracelulares e possuem núcleo arredondado ou oval. Desenvolvem-se no vetor e são transmitidas ao hospedeiro vertebrado, por meio de picada (NEVES et al., 2009).

Após serem fagocitadas pelos macrófagos, as formas promastigotas desenvolvem-se no vacúolo fagocitário e passam a amastigotas, adaptadas a este meio fisiológico (NEVES et al., 2009). Estas formas são, normalmente, ovóides ou esféricas, com tamanho variando de 1,5 - 3,0 µm, por 3,0 - 6,5 µm, de acordo com a espécie (**Figura 4B**).

Figura 4 - Formas dos parasitas de *Leishmania* **4A.** Formas promastigotas. **4B.** Formas amastigotas [Fonte: BRASIL, 2006]

O ciclo de vida de *Leishmania* (**Figura 5**) inicia-se com a picada de um indivíduo ou mamífero contaminado, pela fêmea de um flebotomíneo do gênero *Lutzomyia*, no continente americano. Em seguida, o inseto ingere as formas amastigotas do parasita com o sangue e/ou linfa intersticial, durante o repasto sanguíneo (CDC, 2011^a, NEVES et al., 2009, REITHINGER et al., 2007).

Figura 5 - Ciclo de vida de *Leishmania* [Figura modificada de: CDC, 2011^a]

No intestino médio do mesmo, as formas amastigotas se transformam em formas flageladas pequenas, ovóides e pouco móveis, que por divisão binária intensa, transformam-se em formas promastigotas (flageladas) delgadas e longas.

Enquanto migram para a faringe e esôfago do inseto, as promastigotas maturam para a forma promastigota metacíclica infectante, na qual o corpo está em seu menor tamanho e o flagelo mais longo.

Quando as fêmeas de *Lutzomyia* realizam outro repasto sanguíneo, em um hospedeiro humano ou outro mamífero, liberam as formas promastigotas metacíclicas, juntamente com a saliva do inseto contendo o anticoagulante maxidilan, que exerce a função vasodilatadora e a ação quimiotática sobre os monócitos, que interagem com os macrófagos, aumentando sua proliferação e impedindo sua atividade contra os parasitas.

Após a fagocitose pelos macrófagos, a promastigota metacíclica encontra-se no vacúolo parasitóforo, onde o parasita transforma-se em amastigota, sendo capaz de desenvolver-se no meio ácido do vacúolo. Esta multiplica-se por divisão binária, até o rompimento da parede celular do macrófago, que as libera sendo, novamente, fagocitadas por outros macrófagos.

O ciclo se completa quando o vetor realiza novo repasto sanguíneo (CDC, 2011^a, NEVES et al., 2009, REITHINGER et al., 2007, BRASIL, 2007).

1.2.5 Manifestações clínicas

A leishmaniose é uma doença parasitária cujas manifestações clínicas são distintas, podendo ocorrer a leishmaniose tegumentar americana (**LTA**), com as formas cutânea, mucocutânea e cutânea difusa, e a leishmaniose visceral (**LV**).

Na **LTA**, a forma cutânea pode evoluir para mucocutânea, sendo caracterizada por ulcerações de pele e destruição das membranas mucosas, levando à desfiguração (NUNES et al., 2011, WHO, 2010, NEVES et al., 2009, LESSA et al., 2007, REITHINGER et al., 2007, GONTIJO; CARVALHO, 2003).

A forma visceral causa febre alta, grande perda de peso, inchaço do baço e do fígado e anemia, com 100% de fatalidade quando não tratada (WHO, 2010, NEVES et al., 2009, GONTIJO; MELO, 2004).

1.2.5.1 Forma cutânea

A leishmaniose cutânea é a manifestação mais freqüente da doença. Apesar de poder apresentar cura espontânea, não é menos perigosa.

Nesta forma, as lesões são exclusivamente cutâneas, únicas ou em pequeno número, com tendência à cicatrização. As lesões assumem a forma leishmaniótica típica (**Figura 6**), sendo a úlcera indolor, arredondada ou oval, com base eritematosa, consistência firme, bordos definidos e granulação grosseira (BRASIL, 2007, REITHINGER et al., 2007, GONTIJO; MELO, 2003).

Figura 6 - Leishmaniose cutânea. Lesão ulcerosa. [Fonte: BRASIL, 2007]

A densidade de parasitas presentes nas bordas da úlcera é grande nas fases iniciais da infecção, com diminuição nas úlceras crônicas. Podem ocorrer dor e produção de exsudato seropurulento, em caso de infecção bacteriana no local (NEVES et al., 2009, BRASIL, 2007, GONTIJO; MELO, 2003).

No Velho Mundo, a espécie *Leishmania* (L.) *major* é a responsável por esta forma da doença, enquanto no Brasil o principal agente etiológico é a *L. (V.) braziliensis*, que produz úlceras únicas ou múltiplas, com disseminação por via hematogênica como a principal complicação, evoluindo para a leishmaniose mucocutânea (BRASIL, 2007).

1.2.5.2 Forma cutânea difusa

Caracterizada pela formação de lesões difusas não-ulceradas por toda a pele do paciente, com numerosas erupções papulares ou nodulares (**Figura 7**), esta

forma da doença está associada à imunodeficiência do paciente (NEVES et al., 2009, BRASIL, 2007, LESSA et al., 2007, GONTIJO; MELO, 2003).

Figura 7 - Leishmaniose cutânea difusa. Lesão infiltrada com áreas descamativas (paciente com tempo de doença de 12 anos) [Fonte: BRASIL, 2007]

Aparentemente, nesta forma da enfermidade, causada pelo *L. (L.) amazonensis*, o agente interfere, de forma negativa, em vários mecanismos necessários à resposta imune efetiva, levando à elevada proliferação dos parasitas e, desta forma, à ocorrência de metástases do parasita de um sítio para o outro através dos vasos linfáticos ou da migração de macrófagos parasitados (NEVES et al., 2009, BRASIL, 2007, GONTIJO; MELO, 2003).

1.2.5.3 Forma mucocutânea

Conhecida como “úlcerade-Bauru”, “espúndia”, “nariz de tapir ou de anta”, esta forma grave da doença ocorre como resultado do desenvolvimento secundário da **LC**. Cerca de 3 a 5% dos casos da forma cutânea podem evoluir para a forma mucocutânea (BRASIL, 2007).

Caracteriza-se pela reação imunológica exagerada, provocando a destruição dos tecidos. Embora o principal agente etiológico seja *L. (V.) braziliensis*, foram relatados casos causados por *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (BRASIL, 2007).

Normalmente, a forma mucocutânea da doença surge a partir da **LC** de evolução crônica e de cura espontânea sem tratamento ou que recebeu tratamento inadequado, desenvolvendo lesões secundárias destrutivas em mucosas e cartilagens, afetando nariz, faringe, boca e laringe e levando à destruição das vias aéreas superiores (NUNES et al., 2011, NEVES et al., 2009, BRASIL, 2007, MARDSEN, 1986).

Este processo, que começa indolor e com discreto infiltrado inflamatório no septo nasal, evolui para a formação de crostas, epistaxe, disfagia, odinofagia, rouquidão e tosse (**Figura 8**), causando dificuldades respiratórias, em consequência das mutilações e das infecções secundárias, além de dificultar a fala e a alimentação do doente. Tal quadro pode levar o paciente a óbito (NUNES et al., 2011, NEVES et al., 2009, BRASIL, 2007, MARDSEN, 1986).

Figura 8 - Leishmaniose mucocutânea. Edema nasal com áreas de ulceração e crostas no local e edema no lábio superior [Fonte: BRASIL, 2007]

A leishmaniose mucocutânea, também, pode atingir as conjuntivas oculares, e as mucosas dos órgãos genitais e ânus (NEVES et al., 2009, BRASIL, 2007, MARDSEN, 1986).

O grupo de maior risco é representado pelos pacientes com lesões cutâneas múltiplas, extensas e com mais de um ano de evolução, atingindo com maior frequência os homens e de faixas etárias mais altas, comparando-se à **LC**, provavelmente, devido ao seu caráter secundário (BRASIL, 2007).

1.2.5.4 Forma visceral

A leishmaniose visceral (**LV**) é uma doença grave, crônica e de alta letalidade, afetando principalmente crianças, idosos e pessoas imunodeprimidas (NEVES et al., 2009, BRASIL, 2006, GONTIJO; CARVALHO, 2004).

Os sintomas da enfermidade incluem: febre irregular de intensidade média e de longa duração, anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, hepatomegalia, anorexia e icterícia. Posteriormente, a ocorrência de emagrecimento, edema, hemorragias e debilidade progressiva contribuem para o óbito (ALVARENGA et al., 2010, NEVES et al., 2009, BRASIL, 2006, GONTIJO; CARVALHO, 2004).

A doença apresenta os três estágios seguintes:

Período inicial

Este período caracteriza o início dos sintomas, que incluem febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepatoesplenomegalia (**Figura 9**). O estado geral do paciente permanece estável e o baço, normalmente, não ultrapassa 5 cm do rebordo costal esquerdo. Muitas vezes os pacientes apresentam histórico de tosse e diarreia.

Período de estado

O paciente apresenta quadro de febre irregular e emagrecimento progressivo, palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepatoesplenomegalia. Os sintomas prolongam-se, geralmente, por mais de dois meses, havendo comprometimento do estado geral do paciente.

Período final

Caso o paciente não seja tratado, a doença evolui de forma progressiva para um estado de febre contínua e comprometimento intenso do estado geral, com desnutrição grave, edema nos membros inferiores, que pode evoluir para todo o corpo (anarsaca), cefaléia, icterícia e ascite. A ocorrência de hemorragias e de infecções oportunistas leva o paciente ao óbito (NEVES et al., 2009, BRASIL, 2006).

Figura 9 - Leishmaniose visceral. Paciente no período final. [Fonte: BRASIL, 2006]

1.2.6 Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose

O tratamento da leishmaniose é realizado empregando-se fármacos denominados de primeira e segunda escolha.

No Brasil, o fármaco de primeira escolha é o antimoniato de N-metilglucamina, enquanto os derivados da anfotericina B são considerados fármacos de segunda escolha (PELLISARI et al., 2011, ALVARENGA et al., 2011, GRAEBIN et al., 2009, BRASIL, 2006, 2007, GONTIJO; CARVALHO, 2004, GONTIJO; MELO, 2003, WHO, 1996).

1.2.6.1 Fármacos de primeira escolha

O primeiro composto antimonial pentavalente utilizado no tratamento da leishmaniose foi a estibamina uréia, desenvolvida em 1920, seguida do estibogluconato de sódio, em 1936. Este último é comercializado com o nome de Pentostam[®], nos países de língua inglesa, onde é empregado como medicamento de primeira escolha (RATH et al., 2003).

No Brasil, o medicamento de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose cutânea e visceral apresenta o antimoniato de N-metilglucamina, em

sua composição. O composto foi desenvolvido, durante a Segunda Guerra Mundial, sendo comercializado sob o nome Glucantime® (**Figura 10**) (PELLISARI et al., 2011, BRASIL, 2006, 2007, GONTIJO; MELO, 2003, RATH et al., 2003).

Figura 10 – Estrutura química dos fármacos antimoniais pentavalentes utilizados no tratamento da leishmaniose

Embora o antimoniato de N-metilglucamina seja eficaz contra as formas cutânea, mucocutânea e visceral da doença, levando à regressão das manifestações clínicas, são necessárias altas doses e regime terapêutico contínuo.

Foram registrados os seguintes efeitos colaterais associados ao seu uso: artralgias, mialgias, anorexia, náuseas, vômitos, azia, nefrites, dores abdominais, cefaléia, tontura, edema, alterações hepáticas, problemas cardiológicos, respiratórios e insuficiência renal aguda (NUNES et al., 2011, REITHINGER et al., 2007, BRASIL, 2007, RATH et al., 2003, GONTIJO; MELO, 2003).

As doses baixas, inadequadas, ou a descontinuidade do tratamento podem causar desenvolvimento da resistência do parasita (HALDAR et al., 2011, RATH et al., 2003).

O mecanismo de ação dos fármacos antimoniais pentavalentes não foi estabelecido, entretanto, há evidências de que o antimônio trivalente [Sb (III)] é muito mais potente que o antimônio pentavalente [Sb (V)] contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania*.

Sugeriu-se a possibilidade de que o antimônio pentavalente agisse como um pró-fármaco, sendo convertido em antimônio trivalente, no interior dos macrófagos infectados, vindo a interferir na atividade glicolítica e na via oxidativa dos ácidos graxos do parasita e levando à depleção do ATP intracelular (HALDAR et al., 2011, BRASIL, 2006, RATH et al., 2003).

Outro mecanismo de ação proposto está relacionado à substituição do zinco de uma metaloprotease zinco-dependente, pelo antimônio, de forma a causar a inativação desta enzima essencial para as formas amastigotas do parasita (HALDAR et al., 2011, RATH et al., 2003).

1.2.6.2 Fármacos de segunda escolha

Quando o paciente apresenta efeitos colaterais graves em consequência do tratamento com fármacos antimoniais, ao ponto de ser necessário interromper o tratamento, ou quando o paciente apresenta recidiva, pela segunda vez, após o uso de antimoniais por um período mínimo de 40 dias, utilizam-se fármacos alternativos, que não contêm antimônio pentavalente. São os denominados fármacos de segunda escolha, como a anfotericina B, o isotionato e o mesilato de pentamidina, e a miltefosina (HALDAR et al., 2011, PELLISARI et al., 2011, TIUMAN et al., 2011, GRAEBIN et al., 2009, LA PAPE, 2008, BRASIL, 2006, 2007, GONTIJO; CARVALHO, 2004, GONTIJO; MELO, 2003, RATH et al., 2003).

A anfotericina B (**Figura 11**) é um dos fármacos de segunda escolha empregados no Brasil. É um antibiótico antifúngico derivado da cultura da cepa *Streptomyces nodosus*, sendo o leishmanicida mais potente disponível no comércio, altamente eficaz no tratamento das leishmanioses cutânea e mucocutânea. Em gestantes, é o fármaco de primeira escolha (HALDAR et al., 2011, BRASIL, 2006, GONTIJO; MELO, 2003, RATH et al., 2003).

Figura 11 - Estrutura química da anfotericina B

A droga é administrada, por via endovenosa, na forma de desoxicolato sódico, em doses de 1 mg/ kg/ dia, em dias alternados, sendo a dose máxima de 3 g (BRASIL, 2006, GONTIJO; MELO, 2003).

Apresenta efeitos colaterais sendo, vários deles, dose-dependentes, como: flebite, cefaléia, febre, calafrios, astenia, dores musculares e articulares, vômitos, hipotensão e leucopenia. Nos casos em que a administração da infusão é rápida, ocorre hiperpotassemia. Ao longo do tratamento, podem ocorrer, ainda, sobrecarga hídrica e hipopotassemia, além de desconforto respiratório, dispnéia, cianose e comprometimento dos rins (BRASIL, 2006, 2007, FILIPPIN; SOUZA, 2006, GONTIJO; MELO, 2003).

O mecanismo de ação do fármaco está relacionado à sua ligação preferencial ao ergosterol da membrana plasmática de *Leishmania*, formando poros, aumentando a permeabilidade da membrana e levando ao extravasamento de material celular do parasita (BRASIL, 2006, FILIPPIN; SOUZA, 2006, COHEN, 1998).

Visando a redução da nefrotoxicidade da anfotericina B, foi desenvolvida formulação (Ambisome[®]) na qual o fármaco é incorporado a lisossomos. Estes são absorvidos pelo sistema retículo-endotelial, atingindo os parasitas nos macrófagos onde se encontram. Esta forma farmacêutica demonstrou ser consideravelmente menos tóxica que a forma convencional, por apresentar baixa absorção renal. Outras especialidades farmacêuticas foram desenvolvidas, como o complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet[®]) e o sulfato de colesterol-anfotericina (Amphotec[®]) (PELLISARI et al., 2011, FILIPPIN; SOUZA, 2006, BRASIL, 2006, RATH et al., 2003, BERMAN, 1998).

O inconveniente das especialidades lipossomais relaciona-se aos custos altos, impossibilitando seu uso em rotina, sendo administradas, somente, a pacientes com quadros graves de leishmaniose visceral, que desenvolveram insuficiência renal ou toxicidade cardíaca com o uso do antimoníato de N-metilglucamina, sem ter ocorrido melhora do quadro clínico (TIUMAN et al., 2011, BRASIL, 2007, 2006).

As pentamidinas são diaminas aromáticas (**Figura 12**) com carga positiva, tendo demonstrado grande eficácia no tratamento da leishmaniose visceral, especialmente, nos casos em que não houve resposta ao tratamento-padrão com antimoniais ou em pacientes hipersensíveis a estes (GRAEBIN et al., 2009, RATH et al., 2003).

Figura 12 - Estrutura química da pentamidina

As pentamidinas são comercializadas nas formas de isotionato (Pentamidina[®]) e de mesilato (Lomidina[®]), a segunda encontra-se disponível, somente, nos Estados Unidos.

Relatos de seus efeitos colaterais revelam a alta toxicidade, levando a quadros de hipoglicemia, hipotensão, dor abdominal, vômitos, taquicardia, nefrotoxicidade e possível desenvolvimento de diabetes *mellitus* e, até, óbitos (OLIVEIRA et al., 2011, BRASIL, 2007, RATH et al., 2003).

O mecanismo de ação das pentamidinas não foi elucidado, uma vez que, frente a diferentes parasitas, apresentaram efeitos e mecanismos distintos. Possivelmente, com o acúmulo do fármaco, ocorre desintegração do cinetoplasto causando colapso da membrana mitocondrial (BRUNETON et al., 2011, COSTA, 1993).

O alquilfosfolipídico hexadecilfosfocolina (**Figura 13**), comumente denominado de miltefosina, é empregado como fármaco no tratamento do câncer. Na Índia, constitui medicamento de uso oral aprovado e empregado no tratamento da leishmaniose visceral (HALDAR et al., 2011, TIUMAN et al., 2011, GRAEBIN et al., 2009, MONZOTE, 2009).

Figura 13 – Estrutura química da miltefosina

Entre os efeitos colaterais relatados para a miltefosina estão: vômito, diarreia e nefrotoxicidade, sendo reversíveis, com o fim do tratamento. O seu uso é contraindicado na gestação, por ser teratogênica (HALDAR et al., 2011, RAMESH et al., 2011, GRAEBIN et al., 2009, MONZOTE, 2009).

Há indicações de que o mecanismo de ação deste fármaco envolve o estímulo do sistema hematopoiético e imunológico, com a ativação das células T e o aumento da produção de interferon-gama (MISHRA et al., 2009, SANTOS et al., 2008).

1.2.6.3 Fármacos em estudo

A paromomicina (**Figura 14**), antibiótico aminoglicosídico usado no tratamento das infecções por *Entamoeba histolytica*, apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* contra agentes da leishmaniose visceral (HALDAR et al., 2011, DAVIDSON et al., 2009, GRAEBIN et al., 2009, SOTO et al., 2004, RATH et al., 2003).

A administração via intramuscular, em doses de 11 mg/ kg/ dia, por 21 dias, apresentou o mesmo nível de eficácia que o tratamento com anfotericina B, por 30 dias, na leishmaniose visceral (TIUMAN et al., 2011).

Figura 14 - Estrutura química da paromomicina

Na Guatemala, foi utilizada de forma tópica em casos de leishmaniose cutânea, tendo havido resultados satisfatórios, com alta percentagem de cura (ALMEIDA; SANTOS, 2011, MITROPOULOS et al., 2010).

O mecanismo de ação da paromomicina é o mesmo da neomicina e da kanamicina, inibindo a síntese proteica pela ligação com a subunidade 30S do ribossomo (HALDAR et al., 2011, DAVIDSON et al., 2009, JHINGRAN et al., 2009).

Os efeitos adversos relatados para o fármaco são: dores, náusea, diarreia, edema, eritema, ototoxicidade e nefrotoxicidade (DAVIDSON et al., 2009, MONZOTE, 2009).

A sitamaquina (**Figura 15**) é fármaco, de uso oral, derivado da 8-aminoquinolina, tendo apresentado resultados promissores no tratamento da leishmaniose visceral, na África (GRAEBIN et al., 2009). No tratamento de 28 dias de 62 pacientes quenianos infectados com *L. donovani*, foi eficaz e bem tolerado (TIUMAN et al., 2011, LA PAPE, 2008).

Figura 15 - Estrutura química da sitamaquina

Entretanto, o seu emprego deve ser mais bem avaliado, uma vez que foram descritos diversos efeitos adversos, como: dor abdominal, dor de cabeça, vômito,

dispepsia, cianose, diminuição dos níveis de albumina, além de problemas renais (TIUMAN et al., 2011, MISHRA et al., 2009).

Os triazóis itraconazol e fluconazol, assim como o imidazol cetoconazol (**Figura 16**) são fármacos antifúngicos, cujo mecanismo de ação se mostrou relacionado à inibição de passos da síntese de ergosterol e de DNA (MITROPOULOS et al., 2010, LA PAPE, 2008, LIMA et al., 2007, REITHINGER et al., 2007, SINGH et al., 2004, AMATO et al., 2000).

Figura 16 - Estrutura química dos triazóis e do imidazol

O emprego do itraconazol, na leishmaniose, cutânea mostrou eficácia terapêutica de até 70% (AMATO et al., 2000). Em associação com o ativador imunológico imiquimod, em cremes de uso tópico, levou à cura em 70% dos casos (AL-MUTAIRI et al., 2009), embora o seu uso isolado tenha apresentado menor eficácia em relação ao reportado por AMATO et al. (2000).

O fluconazol apresentou eficácia de 59%, na cura dos pacientes com *L. major* em relação aos 22% do grupo placebo (ALRAJHI et al., 2002)

Por sua vez, a eficácia do tratamento com cetoconazol, na leishmaniose cutânea, causada por *L. mexicana*, foi de 89% (MITROPOULOS et al., 2010) e de 70%, para *L. major* (LIMA et al., 2007).

Entre os efeitos colaterais relatados para estes medicamentos, estão: hepatotoxicidade, disfunção endócrina, redução dos níveis de cortisol e de resposta à corticotrofina e, mais raramente, insuficiência renal, hiponatremia, confusão e hipoadrenalismo (SINGH et al., 2004).

A azitromicina (**Figura 17**), antibiótico macrolídico, levou a 85% de cura ao ser testada para leishmaniose cutânea (LIMA et al., 2007), porém teve baixa eficácia contra *L. (V.) braziliensis* (TEIXEIRA et al., 2007) e apresentou efeitos colaterais, como: diarreia, dor abdominal, cefaléia e náuseas.

Figura 17 - Estrutura química da azitromicina

O mecanismo de ação deste composto consiste na inibição da síntese proteica (SAMPAIO et al., 2009).

1.3 Doença de Chagas

1.3.1 Aspectos gerais

A doença de Chagas, também conhecida por tripanossomíase americana, é uma antroponose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. É endêmica na América Latina (WHO, 2011^c, DNDi, 2011^b). Estima-se que 8 a 10 milhões de pessoas estão infectadas pelo protozoário e de 75 a 100 milhões estão expostas à infecção (WHO, 2011^c, DNDi, 2011^c, COURA; DIAS, 2009).

Figura 18 - Distribuição mundial de doença de Chagas [WHO, 2011^d]

No Brasil, cerca de três milhões de indivíduos apresentam a forma crônica da doença. No período entre os anos 2000 e 2010, foram registrados 1086 casos da forma aguda da enfermidade (BRASIL, 2011^c).

Nas últimas décadas, houve aumento do número de casos da doença, fora em áreas externas à América Latina, devido à migração de pessoas contaminadas para outros países e, mais raramente, em decorrência de transfusão de sangue, da transmissão a partir de mães infectadas para os filhos ou por doação de órgãos (WHO, 2011^c, CLAYTON, 2010^a, COURA; VIÑAS, 2010).

1.3.2 Agente etiológico e vetores

O agente etiológico da doença de Chagas é o protozário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (**Figura 19**), da família dos cinetoplastídeos (BRASIL, 2011^d, CDC, 2011^b, BIGATÃO, 2010).

Figura 19 - Hemácias infectadas por *Trypanosoma cruzi* [fonte: CDC, 2011^b]

Os vetores da doença de Chagas são os insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiros”, pelo fato de picarem na região do rosto.

No Brasil, o principal vetor é o *Triatoma infestans*, porém outras quatro espécies de triatomíneos assumiram importância na transmissão da doença: *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata*, *T. sordida* e *Panstrongylus megistus* (BRASIL, 2011^d, BIGATÃO, 2010).

Além da transmissão por vetor, considerada a principal, outras formas de contaminação são a transfusão de sangue, doação de órgãos, congênita e, mais recentemente descoberta, por consumo de alimentos contaminados (BRASIL, 2011^d, WHO, 2011^c, CLAYTON, 2010^a, BIGATÃO, 2010, COURA; DIAS, 2009, CASTRO et al., 2006).

1.3.3 Ciclo de vida do parasita

O ciclo de vida do *T. cruzi* (**Figura 20**) inicia-se quando a fêmea de um triatomíneo (gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*) pica um indivíduo ou mamífero contaminado, ingerindo as formas tripomastigotas do parasita com o sangue ou linfa intersticial, durante o repasto sanguíneo (CDC, 2011^c, BIGATÃO, 2010, NEVES et al., 2009, ANDRADE; ANDREWS, 2005).

Figura 20 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* [fonte: CDC, 2011^c- modificado]

No intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas se transformam em epimastigotas, onde se multiplicam rapidamente. Ao chegarem no intestino reto, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas.

Após o repasto sanguíneo, os triatomíneos liberam as formas tripomastigotas metacíclicas ao defecarem perto do local da picada. Em seguida, os parasitas entram na corrente sanguínea, por meio do ferimento, no momento em que o indivíduo coça o local, ou por membranas mucosas intactas, como a conjuntiva.

Logo após a infecção, as formas tripomastigotas começam a multiplicar-se, por divisão binária simples, e diferenciam-se em amastigotas intracelulares, assim que invadem as células próximas, como macrófagos e fibroblastos. Posteriormente, os protozoários diferenciam-se nas formas tripomastigotas sanguíneas e são liberados na corrente circulatória, passando a infectar vários tecidos, onde se transformam em formas amastigotas intracelulares.

O ciclo completa-se, quando o triatomíneo realiza um repasto sanguíneo, infectando-se com o parasita (CDC, 2011^c, BIGATÃO, 2010, NEVES et al., 2009, ANDRADE; ANDREWS, 2005).

1.3.4 Manifestações clínicas

A doença de Chagas caracteriza-se por duas fases: a aguda e a crônica.

1.3.4.1 Fase aguda

A fase aguda tem duração aproximada de dois meses, após a infecção pelo protozoário, podendo ser assintomática, ou não, apresentando sintomas, que tendem a desaparecer espontaneamente ao final do período, como: febre, dor de cabeça, aumento dos gânglios, palidez, dor muscular, dificuldade de respiração, edema facial, nos membros inferiores, ou generalizado, tosse, hepatomegalia, esplenomegalia, diarreia, miocardite e, mais raramente, meningoencefalite, nos casos mais graves (BRASIL, 2011^d, WHO, 2011^c, WHO, 2011^e, PRATA, 2001).

Outras manifestações da enfermidade, como lesões de pele (chagoma) ou inflamação da pálpebra de um dos olhos (sinal de Romanã), ocorrem em menos de 50% dos casos de pessoas picadas pelo triatomíneo (BRASIL, 2011^d, WHO, 2011^e).

Quando o tratamento é realizado na fase aguda da enfermidade, em que há grande quantidade de parasitas circulantes no sangue do paciente, o tratamento é quase 100% eficaz (BRASIL, 2011^d, WHO, 2011^e).

1.3.4.2 Fase crônica

Durante a fase crônica da doença de Chagas, os protozoários se alojam, principalmente, no coração e na musculatura digestiva lisa, podendo ocorrer sob diferentes formas clínicas.

Na fase crônica, a forma assintomática ou indeterminada ocorre no início da mesma e pode durar por toda a vida do paciente e evoluir para as formas cardíaca, digestiva ou associada. Outra forma da enfermidade é a cardíaca, acometendo 30% dos pacientes, que apresentam arritmia, cardiomiopatia dilatada, tromboembolismo secundário e insuficiência cardíaca congestiva, respondendo em grande parte pela mortalidade.

Ainda, na etapa crônica, pode ocorrer a forma digestiva, na qual o aparelho digestivo torna-se comprometido, apresentando lesões, como megaesôfago e megacólon, e acometendo 10% dos pacientes.

Há o caso em que as formas cardíaca e digestiva ocorrem simultaneamente, sendo denominada de forma associada (BRASIL, 2011^d, WHO, 2011^c, WHO, 2011^e, PRATA, 2001).

1.3.5 Fármacos empregados no tratamento da doença de Chagas

1.3.5.1 Fármacos em uso

Atualmente, dois fármacos são aprovados para o tratamento da doença de Chagas, o benznidazol e o nifurtimox, cuja eficácia de cura é de aproximadamente 100% quando utilizados na fase aguda da doença (PEDRA et al., 2011, COURA et al., 2011, BRASIL, 2011^d, WHO, 2011^c, WHO, 2011^e, CLAYTON, 2010^a, URBINA, 2010^a, PRATA, 2001).

O composto nitroimidazólico benznidazol (**Figura 21**) é o principal fármaco utilizado no tratamento da doença de Chagas, único disponível no Brasil, sendo utilizado nos casos agudos e congênitos, com eficácia de mais de, respectivamente, 60% e 95% e de 50% a 60% para casos crônicos recentes (PEDRA et al., 2011, BRASIL, 2011^d, URBINA, 2010^b).

Figura 21 - Estrutura química do benznidazol

Seu mecanismo de ação consiste na nitro-redução de macromoléculas e na ligação com o DNA, lipídios e proteínas do protozoário (COURA et al., 2011, PEDRA et al., 2011, URBINA, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009).

Os efeitos colaterais registrados são: dermatia alérgica, neuropatia periférica, náuseas, vômitos, diarreia, falta de paladar e, mais raramente, hipoplasia de medula, agranulocitose, polineuropatia, parestesia e polineurite dos nervos periféricos (BRASIL, 2011^d, PEDRA et al., 2011, URBINA, 2010^a, CASTRO et al., 2006).

O nifurtimox (**Figura 22**) é um fármaco nitrofurânico usado nos casos de intolerância ou resistência do parasita ao benznidazol (PEDRA et al., 2011, WHO, 2011^e, URBINA, 2010^a).

Figura 22 - Estrutura química do nifurtimox

O mecanismo de ação do fármaco consiste na formação de ânions radicais nitro que, em presença de oxigênio, interferem no processo de detoxificação dos radicais livres, no parasita (PEDRA et al., 2011, COURA et al., 2011, URBINA, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009).

Os efeitos colaterais relatados do nifurtimox foram: anorexia, náusea, vômitos, insônia, irritabilidade e polineuropatia periférica (PEDRA et al., 2011, URBINA, 2010^a, CASTRO et al., 2006), sendo contraindicado o seu uso em pacientes com histórico de doenças neurológicas ou psiquiátricas (WHO, 2011^c).

1.3.5.2 Fármacos em estudo

Considerando o reduzido número de fármacos disponíveis para o tratamento da doença de Chagas, outras classes de fármacos têm sido testadas na tentativa de acrescentar novas possibilidades.

A amiodarona (**Figura 23**) é um antiarrítmico normalmente usado nos casos da forma cardíaca da doença de Chagas crônica, ao qual foi atribuída atividade intrínseca contra o *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo*. PANIZ-MONDOLFI et al. (2009) relataram a cura de um paciente com comprometimento cardíaco avançado, em tratamento conjugado com itraconazol (URBINA, 2010^a, 2010^b, BENAİM et al., 2006).

Figura 23 - Estrutura química da amiodarona

O mecanismo de ação deste fármaco consiste na interferência na homeostase de Ca^{+2} e na síntese de ergosterol do parasita, sendo que a última explica seu efeito sinérgico com o posaconazol e itraconazol (CLAYTON, 2010^b, URBINA, 2010^a, 2010^b, APT, 2010, PANIZ-MONDOLFI et al., 2009, BENAÏM et al., 2006).

Entre os efeitos colaterais deste fármaco estão: pneumonite, bradicardia, disfunção de tireóide (hipotireoidismo e hipertireoidismo), neurite ótica, neuropatia periférica, tremores, ataxia, tontura, dor de cabeça, náusea, perda de apetite, hepatotoxicidade e pigmentação da pele, indicando que seu uso, por longo período, deve ser cuidadosamente avaliado (PANIZ-MONDOLFI et al., 2009, HILLEMANN et al., 1998).

Outra classe de medicamentos, em estudo, para o tratamento específico da doença de Chagas são os inibidores da biossíntese do ergosterol.

Enquanto os fármacos da primeira geração, desta classe, como o itraconazol e o cetoconazol, demonstraram diminuição da parasitemia e resultados anômalos em testes eletrocardiográficos, levando à cura parasitológica em alguns casos (BIGATÃO, 2010, URBINA, 2010^b, APT, 2010, APT et al., 1998), o posaconazol (**Figura 24**), fármaco de geração recente, demonstrou ser capaz de eliminar amastigotas intracelulares de cardiomiócitos, além de levar à cura da doença, na fase aguda, em camundongos com baixos níveis de interleucina-12 e interferon-gama, o que indica seu uso em pacientes imunocomprometidos, (BIGATÃO, 2010, URBINA, 2010^a, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009). Assim, no tratamento de uma paciente acometida de doença de Chagas crônica e em tratamento concomitante de lupus eritromatoso, com fármacos imunossupressores, o posaconazol levou à cura parasitológica. A sua administração foi realizada tendo em vista que, anteriormente,

o uso do benznidazol havia reduzido a parasitemia, porém, não havia levado à cura (PINAZO et al., 2010, APT, 2010, CLAYTON, 2010^b, URBINA, 2010^a).

Figura 24 - Estrutura química do posaconazol

No entanto, a administração do posaconazol apresentou efeitos colaterais, no trato gastro-intestinal, como: dor abdominal, náusea e diarreia, além de dor de cabeça, hiperreflexia e alopecia. Além disto, outro inconveniente é o seu alto custo (CLAYTON, 2010^b, BIGATÃO, 2010, STEVENS et al., 2007).

Outros inibidores do ergosterol, igualmente, demonstraram atividade contra *T. cruzi*, como o albaconazol, o TAK-187 e o ravuconazol.

O albaconazol (**Figura 25**), triazol antifúngico de amplo espectro, apresentou CIM de 30 nM contra epimastigotas de *T. cruzi in vitro*. Estudos com o modelo canino de Chagas demonstraram a capacidade de cura deste fármaco (GRAEBIN et al., 2009, GUEDES et al., 2004).

Figura 25 - Estrutura química do albaconazol

O composto TAK-187 (**Figura 26**) é um triazol antifúngico de amplo espectro cuja atividade anti-*Trypanosoma in vitro* foi demonstrada. Levou à cura de infecções,

nas fases aguda e crônica, em murinos, mesmo frente a parasitas resistentes ao benznidazol (CORRALES et al., 2005). Trabalhos mais recentes indicaram que o mesmo previne os danos cardíacos causados pelo protozoário (URBINA, 2010^a, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009).

Figura 26 - Estrutura química do TAK-187

O antifúngico ravuconazol (**Figura 27**) apresentou atividade contra formas amastigotas do *T. cruzi in vitro*, com CIM de 1 nM. Em camundongos, apresentou atividade limitada, provavelmente, em consequência da farmacocinética inadequada para este modelo (URBINA, 2010^a, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009, URBINA et al., 2003).

Figura 27 - Estrutura química do ravuconazol

Outro alvo de estudo, na pesquisa de novos fármacos tripanocidas, são as enzimas do parasita. Entre elas citam-se a cisteína protease (cruzipaína), responsável pela atividade proteolítica, durante todos os estágios do ciclo de vida do *T. cruzi*. Moléculas de fármacos visando esta enzima induzem ao acúmulo da mesma no complexo de Golgi das células do parasita (BIGATÃO, 2010, COURA; CASTRO, 2002).

O composto K-777 (N-metil-piperazina-uréia-Phe-homoPhe-vinil-fenil-sulfona) (**Figura 28**) inibiu 100% do desenvolvimento das formas amastigotas intracelulares,

à concentração de 20 μM , e prolongou a sobrevivência de murinos, com as formas aguda e crônica da doença de Chagas. No entanto, a hepatotoxicidade da molécula levou à descontinuidade de seu estudo (CLAYTON, 2010^b, URBINA, 2010^a, 2010^b, APT, 2010, GRAEBIN et al., 2009).

Figura 28 - Estrutura química do fármaco K-777

Como inibidores de cisteína sintase, os derivados linear e cíclico da tiosemicarbazona (**Figura 29**) apresentaram atividade tripanocida *in vitro* contra formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi*, nas concentrações de 100 nM e 200 nM (URBINA, 2010^a, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009).

Figura 29 - Estruturas químicas dos inibidores de cisteína sintase derivados da tiosemicarbazona

Outro alvo de investigação é a enzima tripanotiona redutase, responsável por manter a tripanotiona na forma reduzida. Um derivado de naftoquinona (**Figura 30**) inibiu a enzima significativamente ($\text{CI}_{50} < 5 \mu\text{M}$), enquanto a tioridazina (**Figura 30**) reduziu a parasitemia, aumentou a sobrevivência e preveniu os danos cardíacos em modelos de murinos, na fase aguda da doença de Chagas (URBINA, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009).

Figura 30 - Estruturas químicas dos inibidores de tripanotona redutase

Foram estudados, também, os bisfosfonatos, inibidores nitrogenados da enzima farnesil-pirofosfato sintase, que sintetiza o farnesil-pirofosfato, composto inicial da síntese de isoprenóides e esteróis. Entre eles, o risedronato (**Figura 31**), inibiu a enzima, à concentração de 123 μM , e a proliferação das formas epimastigotas *in vitro*. No caso do ibandronato (**Figura 31**), este composto diminuiu a parasitemia em camundongos infectados e inibiu a replicação intracelular *in vitro* das formas amastigotas (APT, 2010, URBINA, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009, COURA; CASTRO, 2002).

Figura 31 - Estruturas químicas dos bisfosfonatos

Em relação às pesquisas de novos fármacos, direcionadas para a enzima trans-sialidase, que catalisa a transferência de ácido siálico do hospedeiro para as glicoproteínas mucinas da superfície do *T. cruzi*, considera-se que a mesma é importante para a viabilidade, infectividade e propagação do parasita, e pelo fato de não estar presente nas células do hospedeiro, é um alvo importante para o desenvolvimento de novos fármacos que inibam sua ação. Atualmente, alguns compostos estão sendo testados *in vitro* com este objetivo (GRAEBIN et al., 2009, NERES et al., 2008).

Os inibidores de recaptura de purina, como o alopurinol (**Figura 32**), usado no tratamento da gota, também estão sendo estudados. O fármaco age como um análogo da purina, incorporando-se ao DNA do parasita, por ação da enzima hipoxantina-guanina fosforibosil transferase, e interferindo com a síntese de RNA e das proteínas. Mostrou ser ativo em modelos murinos da doença de Chagas aguda (BIGATÃO, 2010, APT, 2010, URBINA, 2010^b, GRAEBIN et al., 2009, COURA; CASTRO, 2002).

Figura 32 - Estrutura química do alopurinol

APT et al. (1998) verificaram que 44% dos 104 pacientes crônicos de Chagas, tratados com o alopurinol, apresentaram cura parasitológica. Também é indicado em casos de reativação da infecção após transplante cardíaco, em decorrência da imunossupressão pós-cirúrgica (COURA; CASTOR, 2002).

1.3.6 Agente profilático

Nos bancos de sangue, usa-se violeta de genciana, antisséptico e antimicótico também chamado de cloreto de pararosanilina, (**Figura 33**) como agente profilático na prevenção da transmissão da doença de Chagas, por transfusão sanguínea, eliminando as formas tripomastigotas do sangue humano infectado.

Figura 33 – Estrutura química do sal de violeta de genciana

Entretanto, esta prática apresenta inconvenientes tais como: a microaglutinação do sangue, a alteração morfológica das mitocôndrias das plaquetas e a coloração violeta adquirida pela pele e mucosas dos pacientes que recebem transfusão (GRAEBIN et al., 2009, WENDEL; GONZAGA, 1993).

O mecanismo de ação do sal de violeta de genciana consiste na geração de radicais livres por metabolismo redutivo (MORAES-SOUZA; BORDIN, 1996).

1.4 Tuberculose

1.4.1 Aspectos gerais

A tuberculose é uma doença infecto-contagiosa e, provavelmente, uma das mais antigas enfermidades crônicas e debilitantes que afligem a humanidade (LUK,1999).

Em 2010, foram registrados 8,8 milhões de casos de infecção, tendo levado à morte cerca de 1,4 milhões de pessoas, com incidência maior nos países da Ásia (59%) e da África (26%) (WHO, 2011^f) (**Figura 34**).

Figura 34 – Taxa estimada de incidência da tuberculose em 2010
[Fonte: WHO, 2011^g]

Dados de 2006 revelaram que a doença atingiu o número de 2 bilhões de infectados de forma latente pelo *Mycobacterium tuberculosis*, o que representa um terço da população mundial (WHO, 2011^g, AHMAD, 2011). Enquanto que, no Brasil, foram registrados 85 mil casos, no ano de 2011 (BRASIL, 2011^e).

Entre os fatores que contribuem para o quadro preocupante da doença estão o padrão de vida das populações afetadas e o surgimento de cepas do *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos de primeira escolha. Muitas vezes, ocorre como consequência da interrupção do tratamento, pelos pacientes, em função da longa duração e alto custo do mesmo (LUK, 1999).

Verificou-se o desenvolvimento de formas de *M. tuberculosis* resistentes aos fármacos (**MDR-TB** - *Multidrug resistant tuberculosis*) e daquelas extremamente resistentes aos fármacos (**XDR-TB** - *Extensively drug-resistant tuberculosis*) (WHO, 2011^f, 2011^h, AHMAD, 2011).

A tuberculose resistente aos fármacos (**MDR-TB**) é caracterizada pela não-eficácia dos fármacos de primeira linha, como a isoniazida e a rifampicina, levando à necessidade de uso dos fármacos de segunda linha, que são mais tóxicos. Esta forma da doença chegou a apresentar 490 mil novos casos, ao ano, levando à morte 130 mil indivíduos (WHO, 2011^f, 2011^h, 2008).

Tal quadro pode evoluir para a tuberculose extremamente resistente (**XDR-TB**), tendo ocorrido 40 mil casos anuais, em 2008, os quais igualmente, não foram tratáveis com os fármacos de segunda linha (WHO, 2008).

1.4.2 Agente etiológico

O principal agente etiológico da tuberculose, no homem, é o *M. tuberculosis*, porém, outras micobactérias do denominado “complexo *Mycobacterium*” causaram a doença, em pacientes imunodeprimidos, como *M. bovis* e *M. avium* (CDC, 2011^d, AHMAD, 2011, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, KIRK et al., 2000).

O bacilo causador é um microrganismo aeróbio estrito, fracamente Gram-positivo, com diâmetro de 0,3 a 0,6 μm e comprimento de 1,0 a 4,0 μm (**Figura 35**).

Figura 35 – *Mycobacterium tuberculosis* [Fonte: BCM, 2011]

A transmissão do bacilo dá-se por meio de contaminação por partículas infectantes, principalmente a partir de tosse, espirro e perdigotos de pacientes com tuberculose ativa (WHO, 2011^f, CDC, 2011^d, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, CAPONE et al., 2002).

O processo de infecção começa quando, após a inalação, os bacilos são fagocitados pelos macrófagos dos alvéolos pulmonares e começam a desenvolver-se em lesões conhecidas como tubérculos. Cerca de duas a seis semanas após a infecção primária, começa a resposta imune do organismo, causando uma necrose sólido-esponjosa característica (granuloma), na qual alguns bacilos se refugiam (AHMAD, 2011, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

Caso a resposta imune predomine sobre a infecção, a sequela manifesta-se na forma de cicatrizes residuais no pulmão, muitas vezes diagnosticadas por radiografias. Porém, se a reação necrótica crescer e atingir o brônquio, uma cavidade no pulmão se formará, permitindo a disseminação dos bacilos pela tosse. Este processo é responsável pelos sintomas da tuberculose pulmonar (AHMAD, 2011, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, CAPONE et al., 2002).

Muitas vezes o bacilo pode permanecer no corpo, sem manifestação dos sintomas, tornando esses indivíduos um reservatório bacteriano. Segundo dados da OMS, aproximadamente um terço da população mundial apresenta este tipo de infecção (WHO, 2011^f, AHMAD, 2011).

1.4.3 Manifestações clínicas

As manifestações clínicas da tuberculose apresentam três formas: latente, pulmonar e extrapulmonar.

1.4.3.1 Tuberculose latente

Nesta forma, o bacilo está em estado latente após a resposta imune da infecção primária, com seu metabolismo reduzido. A infecção é assintomática e não há estado infeccioso, porém o paciente atua como reservatório do bacilo, podendo vir a desenvolver a doença, no futuro (WHO, 2011^f, AHMAD, 2011, PEREZ-CAMACHO et al., 2011, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, JASMER et al., 2002).

1.4.3.2 Tuberculose pulmonar

A tuberculose pulmonar representa mais de 85% dos casos nos países com alta incidência da doença e afeta, principalmente, os pulmões (AHMAD, 2011).

Os sintomas comuns da tuberculose pulmonar são: tosse persistente com produção, ou não, de muco e mesmo sangue, enfraquecimento, febre vespertina, perda de peso, sudorese noturna, dor no peito e insuficiência respiratória (BRASIL, 2011^f, CDC, 2011^d, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, MARAIS et al., 2005, LONG et al., 2002).

Na forma mais grave da doença, ocorre hepatomegalia, em 35% dos casos, e alterações do sistema nervoso central, em 30% dos pacientes, além de eritemas e vesículas na pele (BRASIL, 2011^f, CAPONE et al., 2002).

1.4.3.3 Tuberculose extrapulmonar

A tuberculose extrapulmonar é comum em países onde é baixa a incidência de tuberculose, especialmente, na população de imigrantes de países com endemia de tuberculose e pacientes infectados com HIV (AHMAD, 2011, BRASIL, 2011^f).

Esta manifestação da doença caracteriza-se pela disseminação do bacilo além dos pulmões, através da corrente sanguínea e demonstra várias formas sendo que, as principais encontradas no Brasil, são mencionadas a seguir (BRASIL, 2011^f, TRABULSI; ALTERTHUM, 2008, LOPES et al., 2006, CAPONE et al., 2002, CAMPOS, 2006^b, SHARMA; MOHAN, 2004).

Forma pleural

Ocorre em indivíduos mais jovens. Os sintomas são dor torácica, astenia, emagrecimento, anorexia, febre com tosse seca, dispnéia e assemelha-se, clinicamente, à pneumonia bacteriana aguda. A ruptura de uma cavidade tuberculosa para o espaço pleural leva ao desenvolvimento do empiema pleural tuberculoso, causando falta de ar, febre, tosse com expectoração, dor torácica e anemia (BRASIL, 2011^f, LOPES et al., 2006, CAMPOS, 2006^b, SHARMA; MOHAN, 2004).

Forma ganglionar periférica

A tuberculose ganglionar periférica afeta, principalmente, pacientes abaixo dos quarenta anos, sendo mais freqüente em crianças.

Além dos sintomas da tuberculose pulmonar, anteriormente mencionados, a doença leva ao aumento subagudo, indolor e assimétrico das cadeias ganglionares cervical anterior, posterior e supraclavicular. Esses gânglios podem apresentar-se amolecidos ou endurecidos, aderentes entre si e aos planos profundos, flutuando ou fistulando espontaneamente, com a ocorrência de inflamação da pele adjacente (BRASIL, 2011, LOPES et al., 2006, CAMPOS, 2006^a, SHARMA; MOHAN, 2004).

Forma meningoencefálica

Na tuberculose meningoencefálica, o sintoma mais comum é a meningite basal exsudativa, especialmente em crianças menores que 6 anos (BRASIL, 2011^f).

Na forma subaguda, os sintomas causados são: cefaléia holocraniana, irritabilidade, alterações de comportamento, sonolência, anorexia, vômitos, dor abdominal, febre, fotofobia e rigidez da nuca, por um tempo superior a duas semanas, podendo ocorrer hipertensão intracraniana (edema de papila) e sinais de síndromes isquêmicas locais ou de envolvimento de pares cranianos (pares II, III, IV, VI e VII) (BRASIL, 2011^f, CAMPOS, 2006^a, 2006^b, SHARMA; MOHAN, 2004).

Na forma crônica, na qual os sintomas apresentam duração superior a quatro semanas, o paciente passa várias semanas com cefaléia, havendo até a suspeita de meningite crônica, em função do acometimento de pares cranianos. Nestes casos, ocorre acometimento simultâneo da tuberculose pulmonar em 59% dos casos (BRASIL, 2011^f, CAMPOS, 2006, SHARMA; MOHAN, 2004).

Outra forma, em que a tuberculose extrapulmonar pode afetar o sistema nervoso central, é pela formação de tuberculomas, cujo quadro clínico é de um processo expansivo intracraniano com lento crescimento, demonstrando sintomas de hipertensão intracraniana (BRASIL, 2011^f, SHARMA; MOHAN, 2004).

Forma pericárdica

A tuberculose pericárdica pode ocorrer concomitantemente à tuberculose pleural, provocando dor torácica, tosse seca, dispnéia, podendo causar febre,

emagrecimento, astenia, tontura, edema de membros inferiores, dor no hipocôndrio direito (congestão hepática) e aumento do volume abdominal (ascite) (BRASIL, 2011^f, LOPES et al., 2006, CAMPOS, 2006^a, SHARMA; MOHAN, 2004).

Forma óssea

A tuberculose óssea ocorre, principalmente, em crianças (10% a 20% das lesões extrapulmonares) e em adultos, entre 40 e 60 anos. Afeta a coluna vertebral (doença de Pott), especialmente, a parte torácica baixa e a lombar, e as articulações coxo-femoral e do joelho, podendo ocorrer em outros locais. Os sintomas apresentados são: dor lombar, dor à palpação e sudorese noturna (BRASIL, 2011^f, LOPES et al., 2006, CAMPOS, 2006^a, 2006^b, SHARMA; MOHAN, 2004, LUK, 1999).

A tuberculose na coluna corresponde a até 50% dos casos de tuberculose óssea (BRASIL, 2011^f, LUK, 1999).

1.4.4 Fármacos utilizados no tratamento da tuberculose

O avanço mais importante para o tratamento da tuberculose foi a introdução dos antibióticos, após a Segunda Guerra Mundial, especialmente a estreptomicina, e dos quimioterápicos, como a isoniazida e o ácido para-aminosalicílico, que reduziram grandemente a mortalidade associada à doença.

Porém com o tempo, surgiram cepas de *M. tuberculosis* resistentes a estes medicamentos, levando à necessidade de encontrar novos fármacos e aplicar outros protocolos de tratamento para a doença.

Atualmente, a estratégia para o tratamento da doença baseia-se na classificação dos medicamentos, em 5 grupos (**Grupos 1 a 5**), segundo a efetividade e toxicidade dos fármacos que contêm (WHO, 2011^h, BRASIL, 2011^f). Desta forma, inicia-se o tratamento com os medicamentos do Grupo 1, que são os mais efetivos e menos tóxicos. Em seguida, em função da ocorrência da resistência microbiana, no caso das tuberculoses **MDR-TB** e **XDR-TB**, passam a ser empregados, subsequentemente, os medicamentos denominados de segunda linha, pertencentes aos Grupos 2 a 5.

1.4.4.1 Grupo 1 - Medicamentos de primeira linha

A Organização Mundial da Saúde padronizou o tratamento primário da doença por meio do esquema terapêutico denominado “tratamento de curta duração diretamente observado” (*directly observed treatment short course* - DOPS), no qual quatro medicamentos são administrados em conjunto, sendo eles: rifampicina, isoniazida, pirazinamida e etambutol (**Figura 36**) (WHO, 2011^h, BRASIL, 2011^f, PEREZ-CAMACHO et al., 2011).

Figura 36 - Estruturas químicas dos fármacos de primeira linha para o tratamento da tuberculose

O tratamento consiste na administração dos quatro fármacos, nos dois primeiros meses, na denominada fase intensiva do mesmo. Posteriormente, administra-se rifampicina e isoniazida, durante quatro meses (WHO, 2011^h, BRASIL, 2011^f). Este esquema foi desenvolvido com o intuito de ser o mais efetivo, no menor período de tempo possível. Mesmo assim, muitas vezes, o paciente abandona o tratamento, em função dos efeitos colaterais e do custo.

A rifampicina (**Figura 36**) é um antibiótico macrocíclico bactericida de administração oral, cujo mecanismo de ação está relacionado à ligação da molécula com a subunidade B da RNA-polimerase DNA-dependente, inibindo a síntese de

RNA do microrganismo (SOUZA, 2005, ROSSETTI et al., 2002, SOMOSKOVI et al., 2001). É utilizada no tratamento da tuberculose latente (PEREZ-CAMACHO et al., 2011).

Embora seja, geralmente, bem tolerado, pode causar erupções cutâneas, febre, náusea e vômito. Há registro de problemas hepáticos, em pacientes com problemas renais pré-existentes ou que receberam outros fármacos hepatotóxicos.

O desenvolvimento da hipersensibilidade ao fármaco pode levar à hemólise, hemoglobinúria, hematúria, insuficiência renal e falha renal aguda, entretanto, raramente, observam-se tais sintomas (BRASIL, 2011^f, FRYDENBERG; GRAHAM, 2009, SOUZA, 2005).

A isoniazida (hidrazida de ácido isonicotínico) (**Figura 36**) é um dos medicamentos principais no tratamento da tuberculose sendo, também, usada na forma latente (BRASIL, 2011^f, PEREZ-CAMACHO et al., 2011).

Este fármaco atua inibindo a síntese do ácido mucólico, componente da parede celular do *M. tuberculosis*, além da formação de radicais livres e de adutos que interferem na síntese dos ácidos nucléicos (TIMMINS; DERETIC, 2006, ROSSETTI et al., 2002, SOMOSKOVI et al., 2001, JOHNSON et al., 1995).

A isoniazida é hepatotóxica, tendo a sua toxicidade potencializada pela ação da rifampicina. Efeitos neurológicos como neurite, neurite periférica, convulsões em pacientes com tendência a este sintoma, atrofia óptica, tontura, ataxia, parestesia, estupor, encefalopatia tóxica, e sintomas mentais como euforia, problemas temporários de memória, separação do pensamento da realidade e psicose, podem ocorrer. A maioria dos efeitos neurais pode ser prevenida com a administração simultânea de piridoxina (BRASIL, 2011^f, FRYDENBERG; GRAHAM, 2009, STEICHEN et al., 2006, GOLDMAN; BRAMAN, 1972).

Outros efeitos adversos relatados incluem secura da boca, distúrbios epigástricos, retenção urinária e, em casos de pessoas com predisposição, anemia por deficiência de piridoxina. Caso o paciente desenvolva hipersensibilidade ao medicamento, podem ocorrer reações hematológicas e artrite (BRASIL, 2011^f, FORGET & MENZIES, 2006, GOLDMAN & BRAMAN, 1972).

A pirazinamida (**Figura 36**) é um análogo sintético da nicotinamida, cujo mecanismo de ação ainda não foi totalmente esclarecido, porém foram sugeridos

três possíveis modos de ação, como a inibição da síntese do ácido mucólico, inibição da enzima ácido graxo sintase tipo I, por redução do pH intracelular e a interferência do transporte de membrana (ZHANG et al., 2003, SOMOSKOVI et al., 2001).

Os efeitos adversos relatados foram os seguintes: hepatotoxicidade, hiperuricemia, episódios de gota, anorexia, náusea, mal-estar vômitos e febre (BRASIL, 2011^f, FRYDENBERG; GRAHAM, 2009, PAPASTAVROS et al., 2002).

Ainda, entre os fármacos de primeira escolha, cita-se o etambutol (**Figura 36**), que inibe a enzima arabinosil transferase III, interferindo na composição da parede celular do bacilo (ROSSETTI et al., 2002, TAKAYAMA; KILBURN, 1989).

O principal efeito adverso do etambutol é a neurite óptica, causando a diminuição da acuidade visual e a perda da habilidade de diferenciação entre o vermelho e o verde, sendo esta reação proporcional à dose recebida (LAI et al., 2011, FRYDENBERG; GRAHAM, 2009, GRAHAM et al., 1998).

Outros efeitos observados foram: prurido, dor nas articulações, distúrbio gastrointestinal, dor abdominal, dor de cabeça, mal-estar, confusão mental, desorientação e alucinações. A ocorrência de anafilaxia e de leucopenia foi relatada, porém, é rara (BRASIL, 2011^f, LAI et al., 2011, GRAHAM et al., 1998, TREBUCQ, 1997).

1.4.4.2 Grupo 2 - Medicamentos de segunda linha, contendo antibióticos aminoglicosídicos

Os antibióticos aminoglicosídicos são administrados por via parenteral, nas formas intramuscular ou endovenosa. São utilizados no tratamento da **MDR-TB**, tendo-se adotado a seguinte sequência de preferência de uso: estreptomicina, amicacina, canamicina e capreomicina (**Figura 37**) (WHO, 2011^h, BRASIL, 2011^f).

Estes fármacos agem pela inibição da síntese proteica do bacilo, quando se ligam à subunidade 30S do ribossomo, causando leitura errônea e finalização prematura da tradução do RNA (ROSSETTI et al., 2002, DAVIS, 1987).

A capreomicina é um antibiótico peptídico cíclico, porém, foi agrupada com os medicamentos do Grupo 2, por sua via de administração parenteral, mostrando

eficácia e efeitos adversos similares (JOHANSEN et al., 2006, HEIFETS; LINDHOLM-LEVY, 1989).

Os aminoglicosídeos são nefrotóxicos e ototóxicos, podendo causar perda da audição. Além disto, podem levar ao surgimento de erupções cutâneas e, até mesmo, à anafilaxia (LAI et al., 2011, FRYDENBERG; GRAHAM, 2009, WALKER, 2006).

Figura 37 - Estruturas químicas dos fármacos do **Grupo 2** para tratamento da tuberculose

1.4.4.3 Grupo 3 - Medicamentos de segunda linha, contendo fluoroquinolonas

As fluoroquinolonas são antibióticos derivados do ácido nalidíxico, com ampla atividade antimicrobiana e efetivos por via oral (WHO, 2011^h, PEREZ-CAMACHO et al., 2011, BOLON, 2009) (**Figura 38**).

Embora a levofloxacin seja o medicamento de escolha, por sua maior

2010, FENG; BARLETTA, 2003).

Figura 39 - Estrutura química da terizidona

Os efeitos colaterais relatados, para ambos os fármacos, foram: náusea, vômito, erupções cutâneas e, em doses mais altas, distúrbios renais, congestão cardíaca, convulsões, coma, tontura, fala lenta, dor de cabeça e tendência suicida (VORA, 2010).

A cicloserina (**Figura 40**) é um antibiótico de amplo espectro, conhecido por causar efeitos neuropsiquiátricos, dores de cabeça, sonolência, psicose severa, ataques epiléticos e idéias suicidas, não sendo recomendado para pacientes com histórico de epilepsia ou depressão (LAI et al., 2011, RITCHIE et al., 1958).

Figura 40 - Estrutura química da cicloserina

A etionamida e a protionamida (**Figura 41**) apresentam mecanismo de ação similar àquele da isoniazida (WANG et al., 2007, JOHNSSON et al., 1995), com a qual podem apresentar resistência cruzada. São mal toleradas, em decorrência de seus efeitos adversos, entre os quais estão: anorexia, náusea, vômitos, irritação gástrica, hipotensão postural, depressão, astenia, sonolência, distúrbios olfativos, diplopia, tontura, parestesias, dor de cabeça, nervosismo, tremores, erupções cutâneas alérgicas severas, estomatite, ginecomastia, impotência, menorragia, acne, alopecia e hepatite. Apesar de raros, houve relatos de convulsão e de neuropatia periférica (BRASIL, 2011, BRUNETON et al., 2011).

Figura 41 – Estruturas químicas da etionamida e protionamida

O ácido para-aminossalicílico (**Figura 42**) foi um dos primeiros fármacos efetivos no tratamento da tuberculose. É um análogo estrutural do ácido para-aminobenzóico, que é substrato da enzima dihidropteroato sintase. Acredita-se que, aja como um inibidor competitivo da enzima (MATHYS et al., 2009).

Este fármaco causa séria irritação gastrointestinal, febre e hepatomegalia, podendo levar à leucocitose e eosinopenia (SIMPSON; WALKER, 1960).

Figura 42 – Estrutura química do ácido para-aminossalicílico

1.4.4.5 Grupo 5 – Medicamentos de menor eficácia ou não recomendados para uso de rotina

Os medicamentos do **Grupo 5** são utilizados em último caso, na ocorrência de resistência, considerando os efeitos colaterais, a reduzida eficácia e seu alto custo (WHO, 2011^h, BRASIL, 2011, PEREZ-CAMACHO et al., 2011). Fazem parte deste grupo, os medicamentos contendo seguintes fármacos: clofazimina, claritromicina, amoxicilina, linezolida, tioacetozona e inipenem (**Figura 43**).

Figura 43 - Estruturas químicas dos fármacos do **Grupo 5** para o tratamento da tuberculose

Entre os efeitos colaterais dos fármacos do **Grupo 5** estão: dor abdominal, diarreia, náusea, vômito, deposição cristalina na mucosa intestinal, fígado e baço, formação de linfonodos abdominais, descoloração das secreções corporais, dos olhos e da pele, depressão, leucopenia, pancitopenia, trombocitopenia, neuropatia periférica, neurite óptica, erupções cutâneas, colite, sensibilidade à luz e ao som, coceira, ansiedade, arritmias cardíacas, febre, eosinofilia, visão embaçada e diplopia (CHOLO et al., 2012, SEDDON et al., 2012, XU et al., 2011, SCHECTER et al., 2010, MIGLORI et al., 2009, RODLOFF et al., 2006, NUNN et al., 1993, WHITMAN & TUNKEL, 1992).

1.5 Importância dos metabólitos de origem natural e das espécies vegetais na obtenção de novos fármacos

Desde a antiguidade, os produtos de origem natural têm sido utilizados no tratamento das mais diversas doenças. Atualmente, compõem mais de 50% de todos os medicamentos em uso clínico, sendo que as plantas superiores contribuem com 25% deste total (GURIB-FAKIM, 2006).

Cerca de 80% da população mundial depende da medicina tradicional, utilizando diversas espécies vegetais, principalmente, as nações mais pobres (WHO, 2011^b). Além disto, o uso tradicional das espécies representa valiosa fonte de informação para o direcionamento das pesquisas que visam encontrar novas moléculas bioativas.

Nos Estados Unidos, a análise das prescrições médicas emitidas, no período de 1959 a 1980, indicou que, pelo menos, 25% das formulações prescritas continham princípios ativos ou extratos de origem vegetal, sendo que 119 compostos, presentes em 90 delas, foram considerados medicamentos de relevância. Destes compostos, 74% foram descobertos por meio de estudos químicos voltados para o isolamento de princípios ativos de plantas de uso tradicional (GURIB-FAKIM, 2006).

Considerando os 230 fármacos registrados entre 1981 e 2002, especificamente, para a terapêutica anti-infecciosa (antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antiviral), 69,8% originaram-se, direta ou indiretamente, de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2007).

Particularmente, em relação às doenças negligenciadas, dos 1556 novos fármacos desenvolvidos, no período de 1975 a 2004, somente 21 o foram para elas, evidenciando o baixo nível de interesse das empresas farmacêuticas, em pesquisas desta área (IOSET, 2008).

Desta forma, o desenvolvimento de novos fármacos mostra-se urgente, considerando a gravidade do quadro destas enfermidades, entre as quais se encontram a leishmaniose, a doença de Chagas e a tuberculose. Tal necessidade é reforçada pela baixa efetividade dos medicamentos da terapêutica atual, da sua toxicidade, da necessidade de internação, do desenvolvimento de resistência pelo agente infeccioso e do custo dos medicamentos utilizados no seu tratamento.

Neste sentido, desde 1975, a Organização Mundial da Saúde (OMS) realiza um importante trabalho de investigação das plantas medicinais usadas na medicina tradicional visando ao tratamento de doenças negligenciadas, de forma a pesquisar novas moléculas bioativas, cuja toxicidade seja reduzida. Para tanto, o referido órgão atua por intermédio de programa específico denominado *Tropical Diseases Research* (TDR) (CHAPPIUS et al., 2007, CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUES, 2001).

Entre os metabólitos secundários vegetais, que apresentaram possibilidade de fornecer moléculas, com atividades antiprotozoária e antimicobacteriana, estão os alcalóides e os óleos voláteis (MISHRA et al., 2009, KISHORE et al., 2009, BAKKALI et al., 2008, TEMPONE et al., 2007, ANTHONY et al., 2001).

Considerando os alcalóides, particularmente, aqueles de núcleo isoquinolínico, mais exatamente, das classes aporfínica, oxoaporfínica, noraporfínica, tetrahidroprotoberberínica e aqueles de estrutura pirimidina- β -carbolínica, demonstraram importantes atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma in vitro* (VILA-NOVA et al., 2011, FERNANDEZ et al., 2010, SILVA et al., 2009, MISHRA et al., 2009, COSTA et al., 2006, QUEIROZ et al., 1996).

Por sua vez, a atividade antimicobacteriana *in vitro* foi demonstrada por alcalóides aporfínicos, oxoaporfínicos, tetrahidroprotoberberínicos e azaantracênicos (GARCÍA et al., 2012, KISHORE et al., 2009, OKUNADE et al., 2004).

Óleos voláteis, provenientes de famílias botânicas diversas, igualmente, têm demonstrado atividade em diferentes espécies de *Leishmania* e em *Trypanosoma cruzi*, podendo-se citar aqueles obtidos de espécies de *Annona* (SIQUEIRA et al., 2011, COSTA et al., 2009) e outras dos gêneros: *Lippia* (MEDEIROS et al., 2011, ESCOBAR et al., 2010), *Baccharis* (VANNINI et al., 2012, PARREIRA et al., 2010), *Pinus* (SARIEGO et al., 2008), *Piper* (MARQUES et al., 2010, SARIEGO et al., 2008), *Ambrosia* (SULSEN et al., 2008), *Artemisia* (TARIKU et al., 2011, MONZOTE et al., 2004), *Ocimum* (SANTORO et al., 2007, UEDA-NAKAMURA et al., 2006), *Croton* (ROSA et al., 2003), *Cymbopogon* (SANTIN et al., 2009), *Nepeta* (SAEIDNIA et al., 2008), *Syzygium* e *Achillea* (SANTORO et al., 2007), entre outros.

1.5.1 Espécies do gênero *Annona* e atividade antiprotozoária *in vitro*

Os extratos alcaloídicos brutos, alcalóides isolados e o óleo volátil de espécies de *Annona* mostraram atividade antiprotozoária *in vitro*.

Os alcalóides totais das folhas de *A. coriacea* Mart. revelaram atividade em formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, tendo estado entre os mais ativos das nove espécies testadas por TEMPONE et al. (2005), com **CE₅₀** de 41,6 µg/ mL. Em formas amastigotas, causaram a morte de 27,2% dos parasitas, à concentração de 20 µg/ mL.

Em estudo posterior, no qual foi avaliada a variação sazonal da atividade anti-*Leishmania* dos alcalóides totais daquela espécie, foi verificado que o extrato alcaloídico das folhas causou a morte de 100% das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, à concentração de 200 µg/ mL, porém, houve redução da atividade, com 50% de morte, durante um mês, enquanto que, para o extrato de caule houve perda total da atividade, por dois meses, no período de um ano (SIQUEIRA, 2010).

A fração alcaloídica, obtida a partir dos extratos em diclorometano e em metanol de *A. foetida* Mart., apresentou atividade frente às formas promastigotas de *L. braziliensis* e de *L. guyanensis* tendo sido mais ativo, nestas últimas (COSTA et al., 2006).

O número de estudos referentes às atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma in vitro* dos alcalóides das espécies do gênero *Annona* é muito reduzido.

QUEIROZ et al. (1996) isolaram a oxoaporfina liriodenina [59] e a noraporfina anonaína [38] a partir das cascas de caule e das raízes de *A. spinescens* Mart. Testada em formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani*, anonaína foi mais ativa do que liriodenina, frente às duas primeiras espécies, tendo causado 100% de morte, respectivamente, nas concentrações de 50 e 25 µg/ mL, enquanto a liriodenina apresentou o mesmo nível de atividade, frente às 3 espécies, à concentração de 100 µg/ mL. A anonaína [38], também, foi mais ativa que o fármaco de referência Glucantime®, para os mesmos parasitas.

O alcalóide liriodenina [59] foi encontrado, igualmente, em cascas da espécie

A. foetida (COSTA et al., 2006), tendo sido o mais ativo em *L. guyanensis* (CE_{50} : $21,5 \pm 0,4 \mu M$), em relação aos três outros alcalóides obtidos. Enquanto isto, anomontina [115], alcalóide pirimidina- β -carbolínico, foi o mais ativo em *L. braziliensis* (CE_{50} : $34,8 \pm 1,5 \mu M$).

Em 2011, VILA-NOVA et al. isolaram o alcalóide benzilisoquinolínico O-metilarmepavina [86] de folhas de *A. muricata* L., além de 3 acetogeninas. O alcalóide teve valores similares de CE_{50} , frente às formas circulantes e teciduais de *L. (L.) infantum chagasi in vitro*. Além disto, foi menos citotóxico que as acetogeninas e os fármacos pentamidina e Glucantime[®], em células RAW 264,7 de mamífero.

Na investigação dos alcalóides de *Annona* com atividade anti-*Trypanosoma*, o estudo de QUEIROZ et al. (1996) revelou a atividade dos alcalóides pessoína (tetraprotoberberínico) [100] e anonaína [38] em formas tripomastigotas de *T. cruzi*, causando a morte de, respectivamente, 55 e 99% dos parasitas, quando testados à concentração de 250 $\mu g/mL$.

Os alcalóides totais de *A. crassiflora* e de *A. coriacea* inibiram totalmente as tripomastigotas de *T. cruzi*, à concentração de 100 $\mu g/mL$ (TEMPONE et al, 2005).

COSTA et al. (2011) isolaram, mais recentemente, quatro alcalóides a partir dos caules de *A. foetida*. Entre estes, as duas oxoaporfina liriodenina [59], O-metilmoschatolina [61] e o alcalóide pirimidina- β -carbolínico anomontina [115] apresentaram alta atividade, frente às tripomastigotas de *T. cruzi*, com CE_{50} de, respectivamente, 4,0; 3,8 e 4,2 $\mu g/mL$.

Diferentes hipóteses foram arroladas para explicar os mecanismos envolvidos na atividade antiprotozoária destes alcalóides.

CHAN-BACAB e PENA-RODRÍGUEZ (2001) propuseram o estímulo à atividade de macrófagos contra os parasitas, a destruição de mitocôndrias e a inibição da topoisomerase, enzima relacionada ao metabolismo dos parasitas.

FOURNET et al (2000) relacionaram a atividade anti-*Trypanosoma* dos alcalóides isoquinolínicos à inibição da enzima tripanotiona redutase, a qual apresenta ação antioxidante no parasita, protegendo-os das espécies reativas de oxigênio geradas pelas células de defesa do hospedeiro.

HOET et al. (2004) sugeriram que a atividade anti-*Trypanosoma* dos

alcalóides aporfínicos pode estar relacionada a sua interação com o DNA dos parasitas, possivelmente, intercalando-se na dupla hélice do DNA, inibindo de forma inespecífica as topoisomerasas I e II e interferindo na sua atividade catalítica.

No que se refere ao óleo volátil, somente duas espécies de *Annona* foram testadas para a atividade anti-*Leishmania in vitro*.

O óleo volátil de *A. foetida* demonstrou atividade frente às formas promastigotas de quatro espécies de *Leishmania*, tendo sido mais ativo em *L. guyanensis* (CE₅₀: 4,1 µg/ mL) (COSTA et al., 2009).

O óleo volátil de *A. coriacea* mostrou-se mais ativo nas formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (CE₅₀: 39,93 µg/ mL) em comparação com aquelas de *L. (L.) amazonensis* (CE₅₀: 160,2 µg/ mL), *L. (V.) braziliensis* (CE₅₀: 261,2 µg/ mL) e de *L. (L.) major* (CE₅₀: 305,2 µg/ mL) (SIQUEIRA et al., 2011, SIQUEIRA, 2010).

No caso dos óleos voláteis, a atividade anti-*Leishmania* foi atribuída à presença de sesquiterpenos oxigenados (COSTA et al., 2009).

No tocante à atividade anti-*Trypanosoma*, somente o óleo volátil de *A. coriacea* foi analisado, tendo apresentado CE₅₀ de 168,5 µg/ mL, à concentração de 500 µg/ mL (SIQUEIRA et al., 2011, SIQUEIRA, 2010).

1.5.2 Espécies do gênero *Annona* e atividade antimicobacteriana *in vitro*

À semelhança da atividade antiprotzoária, a pesquisa do potencial antimicobacteriano do gênero *Annona* foi realizada frente a número reduzido de espécies, como: *A. glabra* L., *A. muricata* L. e *A. hypoglauca* Mart. (GAUTAM et al., 2007, GRAHAM et al., 2003).

A fração diclorometano do extrato etanólico bruto das cascas de caule de *A. hypoglauca* causou 51% de inibição do *Mycobacterium tuberculosis*, à concentração de 50 µg/ mL (GRAHAM et al., 2003).

Os extratos etanólicos das folhas de *A. muricata* e do caule de *A. glabra* (100 µg/ mL) causaram distintos níveis de inibição do *M. tuberculosis* tendo sido de, respectivamente, 75% e 43% dos bacilos (GAUTAM et al., 2007).

1.5.3 Usos e atividades biológica e farmacológica de *Annona crassiflora* Mart.

Na medicina tradicional brasileira foi relatado o uso de *A. crassiflora* Mart. como antiparasitário, no combate à diarreia, no reumatismo, no tratamento de feridas, picadas de cobra, piolhos e doenças venéreas (VILAR et al., 2008, TEMPONE et al., 2005, CRUZ, 1995).

Nas pesquisas realizadas acerca das atividades biológicas de *A. crassiflora*, foram verificadas as atividades moluscicida, antiprotozoária, antibacteriana, antioxidante, inseticida e antimutagênica.

SANTOS e SANT'ANA (2001) avaliaram a atividade moluscicida dos extratos etanólicos de diferentes órgãos de *A. crassiflora* e constataram que aqueles da polpa do fruto, das sementes, do lenho e da casca de raiz causaram a morte de 100% dos moluscos *Biomphalaria glabrata*, quando testados à concentração de 60 ppm. Enquanto que, o extrato do epicarpo mostrou mortalidade de 60%, em maior concentração (100 ppm).

Em trabalho anterior do grupo de pesquisa, TEMPONE et al. (2005) verificaram que o extrato etanólico de folhas de *A. crassiflora* foi pouco ativo frente às promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e às tripomastigotas de *T. cruzi*, enquanto que os alcalóides totais foram ativos frente ao primeiro (**CE₅₀** de 24,89 µg/ mL) e causaram total inibição das formas tripomastigotas, à concentração de 100 µg/ mL.

A atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos etanólicos de folha, fruto e sementes foi verificada, em *Staphylococcus aureus*, por LIMA et al (2006).

ROESLER et al. (2006) constaram a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos etanólicos de polpa do fruto, do epicarpo e das sementes.

Extratos etanólicos de diversas partes de *A. crassiflora* mostraram atividade frente às larvas de *Aedes aegypti*, sendo que o mais ativo foi o extrato de casca da raiz (**CE₅₀**: 0,71 µg/ mL), seguido daquele do lenho da raiz (**CE₅₀**: 8,94 µg/ mL) e do caule (**CE₅₀**: 16,1 µg/ mL) (OMENA et al., 2007).

O extrato etanólico das folhas apresentou atividade antimutagênica, em ratos Swiss Webster (VILAR et al., 2008).

1.6 Aspectos químicos da família Annonaceae e do gênero *Annona*

1.6.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae compreende aproximadamente 109 gêneros e 2440 espécies, estando amplamente distribuída no mundo. É, predominantemente, tropical (COUVREUR et al., 2012, JOLY, 2002, HEYWOOD, 1993).

No Brasil, a família é representada por 33 gêneros e 250 espécies (LORENZI & SOUZA, 2005, JOLY, 2002).

As anonáceas mostram grande diversidade química, produzindo várias classes de metabólitos secundários, como: alcalóides (PRADO et al., 2008, TEMPONE et al., 2005, MAHIOU et al., 1994, 2000, SCHIFF, 1991, LEBOEUF et al., 1982^a), acetogeninas (YANG et al., 2009, BERMEJO et al., 2005, BRINGMANN et al., 1999), flavonóides (PRADO et al., 2008, PIZZOLATI et al., 2003, LEBOEUF et al., 1982^a), óleo essencial, compostos aromáticos (FOURNIER et al., 1999, EKUNDAYO, 1989, LEBOEUF et al., 1982^a) e taninos (PRADO et al., 2008, PIZZOLATI et al., 2003, LEBOEUF et al., 1982^a).

As acetogeninas encontram-se, predominantemente, nesta família, sendo constituídas por longas cadeias carbônicas e de um ou dois anéis tetrahydrofurânicos, além de uma γ -lactona (saturada ou insaturada) (YANG et al., 2009, MCLAUGHLIN, 2008, BRINGMANN et al., 1999, RUPPRECHT et al., 1990).

Uma das características mais importantes desta família é a presença de alcalóides, que ocorrem na maioria das espécies, sendo a maior parte provida de estrutura isoquinolínica (LEBOEUF et al., 1982^a), pertencendo às classes dos isoquinolínicos simples, benziltetrahydroisoquinolínicos, bisbenzylisoquinolínicos e bisbenziltetrahydroisoquinolínicos, protoberberínicos, tetrahydroprotoberberínicos, (SAITO, 1990, LEBOEUF et al., 1982^a), aporfinóides *sensu lato*, incluindo aporfinas *sensu stricto*, aporfinas 7-substituídas, oxoaporfinas, fenantrenos (“aporfinas abertas”) e alcalóides isoquinolínicos mistos (SAITO, 1990, LEBOEUF et al., 1982^a).

Outra classe de alcalóides encontrados em Annonaceae é aquela dos azaantracênicos (CRUZ et al., 2011, ALIAS et al., 2011, LAN et al., 2006, WU et al., 2005, DOS SANTOS et al., 2003, CHAVES et al., 2001, TUCHINDA et al., 2000, CHANG et al., 2000^a, RIOS et al., 1989, OLIVEIRA et al., 1987, RASAMIZAFY et al.,

1987, TADIC et al., 1987, WATERMAN; MUHAMMAD, 1985), sendo isoquinolínicos, derivados biogeneticamente das oxoaporfinas (GUINAUDEAU, 1994, TALIC et al., 1987).

Entre os demais alcalóides, ocorrentes na família, e que não possuem núcleo isoquinolínico, citam-se os quinolínicos, os naftiridínicos, os isopreno-indólicos, os sesquiterpeno-indólicos e os β -carbolínicos (COSTA et al., 2006, RATNAYAKE et al., 1992, WATERMAN; MUHAMMAD, 1985, LEBOEUF et al., 1982^a).

Grande parte das anonáceas é odorífera, pelo fato de conter óleos essenciais.

Os óleos voláteis da família Annonaceae tornaram muitas de suas espécies conhecidas pelo odor aromático característico, assim como o óleo das flores de *Cananga odorata* (Lam.) Hook.f. & Thomson, utilizado em perfumaria e denominado “ylang ylang” e o perfume de *Mkilua fragrans* Verdc., usado por muitas mulheres árabes e africanas. Os frutos da espécie *Xylopia aethiopica* A.Rich. são conhecidos como “pimenta africana” e empregados como condimento, bem como aqueles de *Monodora myristica* Dunal (HEYWOOD, 1993, EKUNDAYO, 1989, LEBOEUF et al., 1982^a).

Os constituintes destes óleos são, geralmente, monoterpenos, sesquiterpenos ou compostos aromáticos (FOURNIER et al., 1999, EKUNDAYO et al., 1989, LEBOEUF et al., 1982^a). Entretanto, verificou-se a predominância das duas primeiras classes (FOURNIER et al., 1999, EKUNDAYO, 1989).

Mais de 200 constituintes foram identificados nos óleos essenciais de espécies de Annonaceae. Certos compostos foram considerados típicos, neste táxon, como os monoterpenos α e β -pineno, mirceno, linalol, 1,8-cineol, limoneno e os sesquiterpenos *E*-cariofileno e óxido de cariofileno, além do aromático p-cimeno, (FOURNIER et al., 1999, EKUNDAYO, 1989). Outros constituintes minoritários mostraram ser mais específicos em determinados gêneros (FOURNIER et al., 1999).

Segundo FOURNIER et al. (1999), nos óleos de determinados órgãos vegetais da família alguns componentes mostraram-se mais frequentes. Desta forma, aqueles de frutos e sementes apresentaram como principais constituintes

hidrocarbonetos monoterpênicos, nas folhas; os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e naqueles de casca e raízes; os sesquiterpenos oxigenados.

1.6.2 Gênero *Annona*

O gênero *Annona* é um dos principais da família Annonaceae, apresentando cerca de 140 espécies na região tropical, sendo encontradas trinta e três, no Brasil (LORENZI & SOUZA, 2005, JOLY, 2002).

Em *Annona*, foi relatada a ocorrência de diversas classes de metabólitos secundários, tais como: alcalóides (RINALDI, 2007, TEMPONE et al., 2005, HASHAT et al., 1997^a, 1997^b, DIAS et al., 1990, LEBOEUF et al., 1982^a), acetogeninas (YANG et al., 2009, BERMEJO et al., 2005, BRINGMANN et al., 1999, RUPPRECHT et al., 1990), flavonóides (PRADO et al., 2008, PIZZOLATI et al., 2003, LEBOEUF et al., 1982^a), terpenos, óleos essenciais (FERREIRA et al., 2009, FOURNIER et al., 1999, EKUNDAYO, 1989, LEBOEUF et al., 1982^a) e taninos (PRADO et al., 2008, PIZZOLATI et al., 2003).

No presente trabalho, deu-se atenção particular aos alcalóides e ao óleo volátil de *A. crassiflora* tendo sido, por isso, enfocados na presente revisão bibliográfica.

1.6.2.1 Alcalóides

Os alcalóides são compostos nitrogenados de baixo peso molecular, normalmente, com anel heterocíclico e um ou mais átomos de nitrogênio, conferindo-lhes, geralmente, caráter básico e sendo encontrados, principalmente, em espécies vegetais (DEWICK, 2009).

No gênero *Annona*, bem como na família Annonaceae, predominam os alcalóides isoquinolínicos, ocorrendo alcalóides de outras classes, porém em número menor (LEBOEUF et al., 1982^a).

Os alcalóides isoquinolínicos são derivados da reticulina [88], uma benzilisoquinolina formada a partir da condensação (reação de Mannich) de dois derivados do aminoácido *L*-tirosina: dopamina e 4-hidroxifenilacetaldeído (DEWICK, 2009).

Considerando a origem biossintética, os núcleos principais encontrados, no gênero, foram: isoquinolínico simples, proaporfínico, aporfínico, benzilisoquinolínico, protoberberínico e fenantrênico (CHEN et al., 1996, SCHIFF, 1991, CAVÉ, 1985, LEBOEUF et al., 1982^a) (**Figura 44**).

Figura 44 - Principais núcleos estruturais de alcalóides isoquinolínicos encontrados no gênero *Annona*.

Os compostos encontrados nas espécies de *Annona* estudadas, até o presente trabalho, foram reunidos, por classe química, nos **Quadros 1 a 18**. Aqueles de núcleos isoquinolínicos, estão dispostos nos **Quadros 1 a 16** e os não isoquinolínicos, como os pirimidina- β -carbolínicos e de outros núcleos; nos **Quadros 17 e 18**.

Entre os alcalóides isoquinolínicos não aporfínóides de *Annona* estão as isoquinolinas simples (**Quadro 1**) e a espiroisoquinolina, anosqualina [7] (**Quadro 2**), isolada de caule de *A. squamosa*, por YANG et al. (2004), representando estrutura única no gênero e na família Annonaceae. O esqueleto deste alcalóide foi registrado previamente na família Fumariaceae, em duas espécies dos gêneros *Fumaria* e *Corydalis* (KIM et al., 2000, MOLLOV et al., 1972).

Para a classificação dos alcalóides de estrutura aporfínóide, como as aporfinas *stricto sensu* e os demais relacionados biogeneticamente, tomou-se por base os trabalhos de GUINAUDEAU (1994) (**Quadros 3 a 9**).

No total, foram arrolados 120 alcalóides, isolados a partir de 27 espécies deste gênero, os quais foram apresentados por classe química, nos **Quadros 1 a 18**, em ordem alfabética, tendo sido numerados em ordem crescente [1-120].

Entre as classes de alcalóides de núcleo isoquinolínico, presentes no gênero *Annona*, encontraram-se aquelas dos: isoquinolínicos simples (6 compostos) (**Quadro 1**), espiroisoquinolínicos (1) (**Quadro 2**), aporfínicos (*stricto sensu*) (28) (**Quadro 3**), noraporfínicos (17) (**Quadro 4**), aporfínicos 7-substituídos (4) (**Quadro 5**), oxoaporfínicos (12) (**Quadro 6**), dioxoaporfínicos (2) (**Quadro 7**), dehidroaporfínicos (3) (**Quadro 8**), proaporfínicos (3) (**Quadro 9**), benzilisoquinolínicos (12) (**Quadro 10**), morfinandienônicos (2) (**Quadro 11**), protoberberínicos (1) (**Quadro 12**), tetrahidroprotoberberínicos (11) (**Quadro 13**), dihidroprotoberberínicos (1) (**Quadro 14**), fenantrênicos (5) (**Quadro 15**) e azaantracênicos (6) (**Quadro 16**).

Os demais alcalóides encontrados, em *Annona*, foram das classes dos pirimidina- β -carbolínicos (3) (**Quadro 17**) e de outras mostradas no **Quadro 18**.

Os estudos, referentes ao presente gênero, permitiram verificar a prevalência dos alcalóides aporfínicos, noraporfínicos, benzilisoquinolínicos e tetrahidroprotoberberínicos.

Quadro 1 - Alcalóides isoquinolínicos simples isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides isoquinolínicos simples	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
cherianoina [1]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 2001 ^b
N-metilcoridaldina [2]			caule	YADAY et al., 2011
N-metil-6,7-dimetoxi-isoquinolona [3]		<i>A. squamosa</i> L.	caule	YADAY et al., 2011
6,7-dimetoxi-2-metilisoquinolínio [4]			caule	YADAY et al., 2011
salsolinol [5]		<i>A. reticulata</i> L.	folha e caule	FORGACS et al., 1981
talifolina [6]		<i>A. cherimolia</i> Mill., <i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal, <i>A. squamosa</i> L.	caule	YANG et al., 2004; CHANG et al., 2000; CHEN et al., 1999

Quadro 2 - Alcalóides espiroisoquinolínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides espiroisoquinolínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anosqualina [7]		<i>A. squamosa</i> L.	caule	YANG et al., 2004

Quadro 3 - Alcalóides aporfínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides aporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
apoglaziovina [8]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	CHANG et al., 2000, 1998, 1988
apormorfina [9]			caule	CHANG et al., 2000, 1998, 1988
bracteolina [10]		<i>A. spinescens</i> Mart.	folha e caule	QUEIROZ et al., 1996
cassitecina [11]		<i>A. amazonica</i> R.E.Fries	caule	PINHEIRO et al., 2009

Quadro 3 - continuação

Alcalóides aporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
coridina [12]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	SIMEON et al., 1989
		<i>A. reticulata</i> L.	folha	CHANG et al., 1995
		<i>A. squamosa</i> L.	folha e caule	RAO et al., 1986, 1978; BHAKUNI et al., 1972
corituberina [13]		<i>A. cherimolia</i> Mill., <i>A. montana</i> Macfad.	folha	TSAI et al., 1989, VILLAR et al., 1987, 1985
dehidoroemerina [14]		<i>A. cherimolia</i> Mill., <i>A. senegalensis</i> Pers.	raiz	D'ÓCON et al., 1995, CHULIA et al., 1995, YOU et al., 1995
glaucina [15]		<i>A. cherimolia</i> Mill., <i>A. hypoglauca</i> Mart.	caule	RINALDI, 2007, CHEN et al., 1997
		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal, <i>A. reticulata</i> L., <i>A. squamosa</i> L.	folha e caule	CHANG et al., 2000, 1998, 1995, BHAKUNI et al., 1972

Quadro 3 - continuação

Alcalóides aporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
isoboldina [16]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	casca e folha	SIMEON et al., 1990, VILLAR et al., 1985
		<i>A. glabra</i> L.	caule e raiz	YANG et al., 1974, 1973
		<i>A. hypoglauca</i> Mart.	caule	RINALDI, 2007
		<i>A. montana</i> Macfad.	caule e raiz	LEBOEUF et al., 1982
		<i>A. salzmännii</i> L.	casca	PAULO et al., 1992
		<i>A. senegalensis</i> Pers.	n.i.	PHILIPPOV et al., 1995
		<i>A. sericea</i> Dunal	folha	CAMPOS et al., 2008
isocoridina [17]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 1997
		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule e casca de caule	CHANG et al., 2000, SONNET et al., 1971
		<i>A. senegalensis</i> Pers.	folha	YOU et al., 1995
isodomecicina [18]		<i>A. squamosa</i> L.	folha e lenho	YADAY et al., 2011, BHAKUNI et al., 1972
		<i>A. hypoglauca</i> Mart.	caule	RINALDI, 2007

Quadro 3 - continuação

Alcalóides aporfinicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
isolaurelina [19]		<i>A. muricata</i> L.	folha	FOFANA et al., 2011
lirinidina [20]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha	CHANG et al., 2000, 1998
N-formil-anonaína [21]		<i>A. cherimolia</i> Mill. <i>A. glabra</i> L.	caule fruto e caule	CHEN et al., 1997 CHANG et al., 2000

Quadro 3 - continuação

Alcalóides aporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
N-formil-purpureína [22]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha	CHANG et al., 1998
N-metil-actinodafnina [23]		<i>A. glabra</i> L.	folha	YANG et al., 1973, 1971
N-metil-asimilobina [24]		<i>A. glabra</i> L. <i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	fruto e caule folha	CHANG et al., 2000 CHANG et al., 1998

Quadro 3 - continuação

Alcalóides aporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
N-metil-laurotetanina [25]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha	CHANG et al., 1998
nuciferina [26]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	casca de caule	SIMEON et al., 1990, 1989
		<i>A. hayesii</i> Saff.	caule	RASAMIZAFY et al., 1987
O-metil-purpureína [27]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	WU et al., 2000, CASTRO et al., 1996, LEBOEUF et al., 1982, SONNET et al., 1971

Quadro 3 - continuação

Alcalóides aporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
predicentrina [28]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha	CHANG et al., 1997
purpureína [29]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha e caule	CHANG et al., 2000, 1998, LEBOEUF et al., 1982, SONNET et al., 1971
roemerina [30]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	raiz	CHULIA et al., 1995
		<i>A. glabra</i> L.	caule e raiz	LEBOEUF et al., 1982
		<i>A. hayesii</i> Saff.	caule	SANTOS et al., 2003, RASAMIZAFY et al., 1987
		<i>A. hypoglauca</i> Mart.	caule	RINALDI, 2007
		<i>A. paludosa</i> Aublet	casca de caule	LAPREVOTE et al., 1988, LEBOEUF et al., 1982
		<i>A. senegalensis</i> Pers.	folha	MAGADULA et al., 2009, YOU et al., 1995
		<i>A. squamosa</i> L.	folha e caule	LEBOEUF et al., 1982, BHAUMIK et al., 1979, YANG et al., 1973, BHAKUNI et al., 1972

Quadro 3 - continuação

Alcalóides aporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
romucosina F [31]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	CHANG et al., 2000
romucosina G [32]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	CHANG et al., 2000
romucosina H [33]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 2001

Quadro 3 - continuação

Alcalóides aporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
talbaicalidina [34]		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule e folha	CHANG et al., 1998
1,2,3-trimetoxi-9,10-metilenodioxiaporfinina [35]		<i>A. spraguei</i> Saff.	n.i.	DIAS et al., 1990

n.i.: não informado

Quadro 4 - Alcalóides noraporfínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides noraporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
actinodafnina [36]		<i>A. hypoglauca</i> Mart.	caule	RINALDI, 2007
anolobina [37]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule e casca de caule	SIMEON et al., 1990, 1989; CHEN et al., 1997, YANG et al., 1991
		<i>A. glabra</i> L.	caule e casca de caule	LEBOEUF et al., 1982, YANG et al., 1974 ^a , 1973
		<i>A. squamosa</i> L.	raiz	LEBOEUF et al., 1982, YANG et al., 1970 ^b
		<i>A. bullata</i> A. Rich.	folha	KUTSCHABSKY et al., 1985
anonaína [38]		<i>A. classiflora</i> Mart.	folha e caule	HOCQUEMILLER et al., 1982
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	raiz, caule, semente e folha	CHULIA et al., 1995, SIMEON et al., 1990, RIOS et al., 1989, VILLAR et al., 1985, VILLAR DEL FRESNO et al., 1983
		<i>A. glabra</i> L.	fruto e folha	HASHAT el al., 1997 ^b ; YANG et al., 1973
		<i>A. hayesii</i> Saff.	lenho	RASAMIZAFY et al., 1987

Quadro 4 - continuação

Alcalóides noraporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anonaína [38]		<i>A. hypoglauca</i> Mart.	caule	RINALDI, 2007
		<i>A. montana</i> Macfad.	fruto	HASHAT et al., 1997 ^b
		<i>A. muricata</i> L.	fruto e folhas	FOFANA et al., 2011, HASHAT et al., 1997 ^a
		<i>A. paludosa</i> Aublet	raiz	LAPROVOTE et al., 1988
		<i>A. reticulata</i> L.	caule, raiz, fruto e folha	YANG et al., 1987
		<i>A. salzmannii</i> L.	casca de caule	CRUZ et al., 2011, PAULO et al., 1992
		<i>A. senegalensis</i> Pers.	n.i.	SIMEON et al., 1990
asimilobina [39]		<i>A. squamosa</i> L.	semente e folha	MAGADULA et al., 2009; BETTARINI et al., 1993; BHAUMIK et al., 1979; BHAKUNI et al., 1972
		<i>A. cacans</i> Warm.	folha	SAITO, 1994
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	folha	CHEN et al., 2001
		<i>A. crassiflora</i> Mart.	folha e caule	HOCQUEMILLER et al., 1982
		<i>A. glabra</i> L.	fruto e folha	HASHAT et al., 1997 ^a ; YANG et al., 1973
		<i>A. hayesii</i> Saff.	lenho	RASAMIZAFY et al., 1987

Quadro 4 - continuação

Alcalóides noraporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
asimilobina [39]		<i>A. montana</i> Macfad.	fruto	HASHAT et al., 1997 ^a
		<i>A. muricata</i> L.	folha	HASHAT et al., 1997 ^b
		<i>A. reticulata</i> L.	folha	CHANG et al., 1995
		<i>A. paludosa</i> Aublet	raiz	LAPRAVOTE et al., 1988
		<i>A. salzmännii</i> L.	casca de caule	CRUZ et al., 2011
laureliptina [40]		<i>A. salzmännii</i> L.	casca de caule	PAULO et al., 1992
laurolitsina [41]		<i>A. squamosa</i> L.	folha	SAITO, 1995

Quadro 4 - continuação

Alcalóides noraporfinicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
litseferina [42]		<i>A.hayesii</i> Saff.	casca de caule	RASAMIZAFY et al., 1987
norcoridina [43]		<i>A.squamosa</i> L.	folha e caule	LEBOEUF et al., 1982, BHAKUNI et al., 1972
		<i>A.reticulata</i> L.	folha	CHANG et al., 1995
		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha	SONNET et al., 1971
		<i>A.cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 1999; 1997
nordomestacina [44]		<i>A.hayesii</i> Saff.	casca de caule	SAITO, 1995, 1990, RASAMIZAFY et al., 1987
		<i>A.glabra</i> L.	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
		<i>A.spinescens</i> Mart.	casca de caule	QUEIROZ et al., 1996

Quadro 4 - continuação

Alcalóides noraporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
norisocoridina [45]		<i>A.squamosa</i> L.	folha	BHAKUNI et al., 1972

norlaurelina [46]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	folha	SAITO, 1995, 1990, VILLAR et al., 1985

nornantenina [47]		<i>A.sericea</i> Dunal	folha	CAMPOS et al., 2008

Quadro 4 - continuação

Alcalóides noraporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
nornuciferina [48]		<i>A. glabra</i> L.	fruto, caule e casca de caule	CHANG et al., 2000 ^a ; YANG et al., 1974, 1973
		<i>A. hayesii</i> Saff.	casca de caule	RASAMIZAFY et al., 1987
		<i>A. hypoglauc</i> a Mart.	caule	RINALDI, 2007
		<i>A. montana</i> Macfad.	folha	WU et al., 1993
		<i>A. muricata</i> L.	fruto	HASHAT et al., 1997 ^a , 1997 ^b
		<i>A. sericea</i> Dunal.	folha	CAMPOS et al., 2008
norpurpureína [49]		<i>A. squamosa</i> L.	fruto	WU et al., 1994
		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha e caule	CHANG et al., 2000, 1998 ^a ; SAITO, 1995; SONNET et al., 1971
		<i>A. inconformis</i> Pittier	folha	SANCHEZ et al., 2011

Quadro 4 - continuação

Alcalóides noraporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
nortalbaicalidina [50]		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	CHANG et al., 2000
3-hidroxinornuciferina [51]		<i>A.hayesii</i> Saff.	lenho	RASAMIZAFY et al., 1987
		<i>A.reticulata</i> L.	raiz e casca de caule da raiz	CAMPOS et al., 2008
		<i>A.sericea</i> Dunal	folha	CAMPOS et al., 2008
xilopina [52]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	folha e caule	CHEN et al.,2001; SIMEON et al., 1990; 1989
		<i>A.montana</i> Macfad.	casca da raiz	SAITO, 1990, LEBOEUF et al., 1982
		<i>A.muricata</i> L.	folhas	FOFANA et al., 2011
		<i>A.reticulata</i> L.	folha	CHANG et al., 1995
		<i>A.salzmännii</i> L.	casca de caule	CRUZ et al., 2011
		<i>A.squamosa</i> L.	folha e caule	LEBOEUF et al., 1982; BHAKUNI et al.,1979; BHAUMIK et al., 1979

Quadro 5 - Alcalóides aporfínicos 7-substituídos a partir do gênero *Annona*

Alcalóides aporfínicos 7-substituídos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
artabonatina B [53]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 2001
michelalbina [54]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	caule	SAITO, 1990; VILLAR et al., 1985; BALBAA et al., 1979; URZUA et al., 1977
		<i>A.glabra</i> L.	folha, semente e caule	SAITO, 1990; BALBAA et al., 1979; YANG et al., 1973
		<i>A.hayesii</i> Saff.	caule	SAITO, 1990; RASAMIIZAFY et al., 1987
		<i>A.muricata</i> L.	folha, semente e caule	SAITO, 1990; BALBAA et al., 1979
		<i>A.reticulata</i> L.	raiz	FORGACS et al., 1981
noroliverolina [55]		<i>A.squamosa</i> L.	folha, semente e caule	BALBAA et al., 1979; BHAUMIK et al., 1979
		<i>A.senegalensis</i> Pers.	folha	FALL et al., 2008

Quadro 5 - continuação

Alcalóide aporfínicos 7-substituídos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
usinshunina [56]		<i>A.cherimolia Mill.</i>	casca	CHEN et al., 1997

Quadro 6 - Alcalóides oxoaporfínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides oxoaporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anolatina [57]		<i>A. montana</i> Macfad.	folha	WU <i>et al.</i> , 1993
aterospermidina [58]		<i>A. crassiflora</i> Mart.	lenho	GONÇALVES <i>et al.</i> , 2009
liriodenina [59]		<i>A. acuminata</i> Saff.	folha e caule	BORUP <i>et al.</i> , 1982
		<i>A. amazonica</i> R.E.Fries	caule	PINHEIRO <i>et al.</i> , 2009
		<i>A. ambotay</i> Aublet	lenho	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1987
		<i>A. bullata</i> A.Rich	casca e folha	HUI <i>et al.</i> , 1992; KUTSCHABSKY <i>et al.</i> , 1985
		<i>A. cacans</i> Warm.	n.i.	SAITO, 1994
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	folha, caule, casca de caule e semente	CHEN <i>et al.</i> , 2001, 1997, VILLAR <i>et al.</i> , 1996, CHULIA <i>et al.</i> , 1995; YANG <i>et al.</i> , 1991; SIMEON <i>et al.</i> , 1991, 1990, RIOS <i>et al.</i> , 1989, SANDOVAL <i>et al.</i> , 1986; VILLAR DEL FRESNO <i>et al.</i> , 1983; URZUA <i>et al.</i> , 1977

Quadro 6 - continuação

Alcalóides oxoaporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
liriodenina [59]		<i>A.cristalensis</i> (Alain) Borhidi & Moncada	partes aéreas	FAUST et al., 1981
		<i>A.crassiflora</i> Mart.	folha, casca de caule e lenho	GONÇALVES et al., 2009, HOCQUEMILLER et al., 1982
		<i>A.dioica</i> St. Hill	lenho	SANTOS et al., 2003
		<i>A.foetida</i> Mart.	casca	COSTA et al., 2006
		<i>A.glabra</i> L.	caule de casca, caule, folha e semente	HSIEH et al., 2004 ; TIAN et al., 2003 ; WU et al., 2000; HAGGAG et al., 1983, YANG et al., 1974 ^a , 1973, WARTHEN et al., 1969
		<i>A.hayesii</i> Saff.	lenho	RASAMIZAFY et al., 1987
		<i>A.montana</i> Macfad.	folha, caule, raiz e casca de caule	ERDELYI, 2008, WU et al., 1993; YANG et al., 1979;
		<i>A.muricata</i> L.	semente, folha, caule, raiz e casca de caule	ERDELYI, 2008; PHILIPOV et al., 1994
		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	CHANG et al., 2000; CASTRO et al., 1996
		<i>A.reticulata</i> L.	fruto, caule, folha, casca, raiz, casca da raiz e de caule e rizoma	CHANG et al., 2000 ^a ; CHANG et al., 1995; XU et al., 1992; SAAD et al., 1991; FORGACS et al., 1981, KONG et al., 1973;; YANG et al., 1987, 1974 ^a , 1973 ^b , 1970 ^a ;
		<i>A.salzmannii</i> L.	casca de caule	CRUZ et al., 2011
		<i>A.senegalensis</i> Pers.	raiz e caule	FALL et al., 2008, PHILIPOV et al., 1995

Quadro 6 - continuação

Alcalóides oxoaporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
liriodenina [59]		<i>A.spinescens</i> Mart.	casca de caule	QUEIROZ et al., 1996
		<i>A.squamosa</i> L.	folha, caule e semente, fruto, casca de caule e raiz	YANG et al., 2004, 1992, 1970 ^a , 1970 ^b ; MORITA et al., 2000, WU et al., 1994; HI et al., 1990, BHAUMIK et al., 1979
		<i>A.acuminata</i> Saff.	folha	BORUP et al., 1982
lisicamina [60]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	fruto e caule	CHEN et al., 1997, SIMEON et al., 1990, 1989
		<i>A.glabra</i> L.	folha	CHANG et al., 2000 ^a
		<i>A.hayesii</i> Saff.	caule e casca de caule	RASAMIZAFY et al., 1987
		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	lenho	CHANG et al., 2000, 1998 ^a
O-metil-moschatolina [61]		<i>A.acuminata</i> Saff.	folha	OLIVEIRA et al., 1987, BORUP et al., 1982
		<i>A.ambotay</i> Aublet	casca de caule	OLIVEIRA et al., 1987
		<i>A.foetida</i> Mart.	casca	COSTA et al., 2006

Quadro 6 - continuação

Alcalóides oxoaporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
oxoanolobina [62]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	casca de caule	CHEN et al., 1997
oxofoebina [63]		<i>A.spraguei</i> Saff.	casca de caule	DIAZ et al., 1988
oxoglaucina [64]		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha e caule	CHANG et al., 2000, 1998 ^a ; LEBOEUF et al., 1982; SONNET et al., 1971
		<i>A.glabra</i> L.	n.i.	TIAN et al., 2001
		<i>A.cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 1997

Quadro 6 - continuação

Alcalóides oxoaporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
oxolaurelina [65]		<i>A.salzmannii</i> L.	casca de caule	CRUZ et al., 2011
oxonantenina [66]		<i>A.reticulata</i> L.	n.i.	CHANG et al., 1995
		<i>A.sericea</i> Dunal	folha	CAMPOS et al., 2008
		<i>A.cherimolia</i> Mill.	n.i.	CHEN et al., 2001
oxopurpureína [67]		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha e caule	CHANG et al., 2000, 1998 ^a ; SONNET et al., 1971

Quadro 6 - continuação

Alcalóides oxoaporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
oxoxilopina [68]		<i>A.squamosa</i> L.	folha, fruto e lenho	YADAY et al., 2011; WU et al., 1994; LEBOEUF et al., 1982; BHAUNIK et al., 1979
		<i>A.reticulata</i> L.	folha	CHANG et al.,1995
		<i>A.cherimolia</i> Mill.	folha, caule e semente	SIMEON et al.,1990, 1989; CHEN et al.,2001; 1997, RIOS et al.,1989, VILLAR et al.,1985

n.i.: não informado

Quadro 7 - Alcalóides dioxoaporfínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides dioxoaporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anobraína [69]		<i>A.glabra</i> L.	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
		<i>A.squamosa</i> L.	caule	YANG et al., 2005
norcefaradiona A [70]		<i>A.hayesii</i> Saff.	lenho	RASAMIZAFY et al., 1987

Quadro 8 - Alcalóides dehidroaporfínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides dehidroaporfínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
7-hidroxi-dehidrotalicsimidina [71]		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha	CHANG et al., 1998 ^b
7-formil-dehidrotalicsimidina [72]			folha	CHANG et al., 1998 ^b
demetilsonodiona [73]		<i>A. squamosa</i> L.	caule	YANG et al., 2004

Quadro 9 – Alcalóides proaporfínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóide proaporfínico	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
estefarina [74]		<i>A.cacans</i> Warm.	n.i.	SAITO et al., 2000
		<i>A.cherimola</i> Mill.	caule	CHEN et al., 1997; SIMEON et al., 1989
		<i>A.glabra</i> L.	fruto e caule	TIAN et al., 2001, CHANG et al., 2000 ^a
		<i>A.hayesii</i> Saff.	n.i.	RASAMIZAFY et al., 1987
		<i>A.muricata</i> L.	folha	LEBOEUF et al., 1981 ^a ; 1981 ^c
		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule, folha e raiz	CHANG et al., 1998 ^a ; LEBOEUF et al., 1982; SONNET et al., 1971
glaziovina [75]		<i>A.cherimola</i> Mill.	casca do caule	QUEIROZ et al., 1996
		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha	CHANG et al., 1998 ^a ; LEBOEUF et al., 1982, SONNET et al., 1971
promucosina [76]		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	CHANG et al., 2000

n.i.: não informado

Quadro 10 - Alcalóides benzilisoquinolínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides benzilisoquinolínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anocherina A [77]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 2001
anocherina B [78]			caule	CHEN et al., 2001
anomuricina [79]		<i>A.muricata</i> L.	folha,raiz e caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a ; 1981 ^c
	<i>A.squamosa</i> L.	lenho	YADAY et al., 2011
anomurina [80]		<i>A.muricata</i> L.	folha, raiz e caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a ; 1981 ^c

Quadro 10 - continuação

Alcalóides benzilisoquinólicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anoneliptina [81]		<i>A. elliptica</i> R.E.Fries	folha e caule	SANDOVAL et al., 1985
		<i>A. cristalensis</i> (Alain) Bordihi & Moncada	partes aéreas	FAUST et al., 1981
		<i>A. montana</i> Macfad.	caule e raiz	LEBOEUF et al., 1982 ^c
coclaurina [82]		<i>A. muricata</i> L.	raiz e folha	FOFANA et al., 2011; LEBOEUF et al., 1981 ^a ; 1981 ^c FAUST et al., 1981; AWAN et al., 1980
		<i>A. reticulata</i> L.	folha e caule	FORGACS et al., 1981; LEBOEUF et al., 1981 ^a
		<i>A. squamosa</i> L.	fruto	WU et al., 1994
higenamina [83]		<i>A. squamosa</i> L.	folha	LEBOEUF et al., 1982, 1981 ^b ; WAGNER et al., 1980

Quadro 10 - continuação

Alcalóides benzilisoquinólicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
N-metilcocclaurina [84]		<i>A.sericea</i> Dunal	folha	CAMPOS et al., 2008
norreticulina [85]		<i>A.montana</i> Macfad.	folha	GUINAUDEAU et al.,1975; KOICHI et al.,1997
O-metil-armepavina [86]		<i>A.squamosa</i> L.	folha e lenho	VILA-NOVA et al., 2011, YADAY et al., 2011, TSAI et al.,1989, LEBOEUF et al.,1982, BHAUMIK et al.,1979
orientalina [87]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 1997

Quadro 10 - continuação

Alcalóides benzilisquinolínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
reticulina [88]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule e folha	YANG et al., 1991; VILLAR et al., 1985; LEBOEUF et al., 1982
		<i>A. crassiflora</i> Mart.	caule e folha	LEBOEUF et al., 1982; HOCQUEMILLER et al., 1982
		<i>A. glabra</i> L.	caule e folha	LEBOEUF et al., 1982, YANG et al., 1973; 1971
		<i>A. montana</i> Macfad.	caule e folha	LEBOEUF et al., 1982 ^c ; YANG et al., 1979
		<i>A. muricata</i> L.	caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a ; AGUILAR-SANTOS et al., 1967;
		<i>A. paludosa</i> Aublet	casca da raiz	LAPREVOTE et al., 1988, LEBOEUF et al., 1982
		<i>A. purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule e casca de caule	CRUZ et al., 2011, CHANG et al., 2000 ^b
		<i>A. reticulata</i> L.	casca da raiz	YANG et al., 1973 ^a , 1970, LEBOEUF et al., 1982, 1980; GOPINATH et al., 1959
		<i>A. salzmännii</i> L.	casca	PAULO et al., 1992
		<i>A. sericea</i> Dunal	folha	CAMPOS et al., 2008
		<i>A. spinescens</i> Mart.	casca de caule secundário e raiz	QUEIROZ et al., 1996
		<i>A. squamosa</i> L.	raiz e fruto	WU et al., 1994; LEBOEUF et al., 1982; BHAUMIK et al., 1979; YANG et al., 1970 ^b

Quadro 11 - Alcalóides morfinandienônicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides morfinandienônicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
palidina [89]		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	CHANG et al., 2000
norpalidina [90]			caule	CHANG et al., 2000

Quadro 12 - Alcalóides protoberberínicos isolados do gênero *Annona*

Alcalóides protoberberínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
dehidrocoridalmina [91]		<i>A. glabra</i> L.	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a

Quadro 13 - Alcalóides tetrahidroprotoberberínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides tetrahidroprotoberberínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
caseadina [92]		<i>A.hypoglauca</i> Mart.	caule	RINALDI, 2007
coreximina [93]		<i>A.montana</i> Macfad.	caule e casca de caule de raiz	LEBOEUF et al., 1982 ^c ; CAVE et al., 1988
		<i>A.muricata</i> L.	folha, raiz, caule e casca de caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a ; 1981 ^c
		<i>A.paludosa</i> Aublet	casca de caule de raiz	LAPREVOTE et al., 1988
coritenchina [94]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	raiz	MARTINEZ-VAZQUEZ et al., 2005
discretamina [95]		<i>A.cherimolia</i> Mill.	casca de caule	SIMEON et al., 1990, 1989

Quadro 13 - continuação

Alcalóides tetrahidroprotoberberínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
esculerina [96]		<i>A. paludosa</i> Aublet	casca de caule de raiz	CAVE et al., 1988; LAPREVOTE et al., 1988
espinosina [97]		<i>A. spinescens</i> Mart.	casca de caule de raiz	QUEIROZ et al., 2005
estefolidina [98]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	casca de caule e folhas	SIMEON et al., 1990, 1989, VILLAR et al., 1985
isocoreximina [99]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	raiz	MARTINEZ-VAZQUES et al., 2005

Quadro 13 - continuação

Alcalóides tetrahidroprotoberberínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
peçoína [100]		<i>A.spinescens</i> Mart.	casca de caule e raiz	QUEIROZ et al., 2005
quiquemanina [101]		<i>A.glabra</i> L.	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
		<i>A.cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN et al., 1997
tetrahidropalmatina [102]		<i>A.paludosa</i> Aublet	casca de caule de raiz	LAPREVOTE et al., 1988
		<i>A.cherimolia</i> Mill.	casca de caule	SIMEON et al., 1989; CAVE et al., 1988

Quadro 14 - Alcalóides dihidroprotoberberínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides dihidroprotoberberínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
dihidropalmatina [103]		<i>A. paludosa</i> Aublet	raiz	CAVE et al., 1988

Quadro 15 - Alcalóides fenantrênicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides fenantrênicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anoretina [104]		<i>A. montana</i> Macfad.	folha	WU et al., 1993
argentinina [105]		<i>A. montana</i> Macfad.	folha	WU et al., 1993; YANG et al., 1979
		<i>A. montana</i> Macfad.	casca de caule e raiz	LEBOEUF et al., 1982 ^c
aterosperminina [106]		<i>A. montana</i> Macfad.	folha e semente, caule e casca de raiz	YANG et al., 1987; LEBOEUF et al., 1982 ^c
		<i>A. muricata</i> L.	folha, raiz e casca de caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a , 1981 ^c ; AGUILAR-SANTOS et al., 1967

Quadro 15 - continuação

Alcalóides fenantrênicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
talicpureína [107]		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	folha	CHANG et al., 1998 ^a
5,6,9,10-tetrahidro-5-(4-hidroxi-3.5,-dimetoxifenil)-(5S)(9Cl), 7H-[1,3]dioxolo[3,4]fenantro[9,10,1-ija]quinolizin-7-ona [108]		<i>A.dioica</i> St.Hill	lenho	DOS SANTOS et al., 2003

Quadro 16 - Alcalóides azaantracênicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides azaantracênicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anofolina [109]		<i>A.hayesii</i> Saff.	lenho	RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987
atemoína [110]		<i>A.atemoya</i> Mabb.	semente	WU <i>et al.</i> , 2005
cleistofolina [111]		<i>A.atemoya</i> Mabb.	semente	WU <i>et al.</i> , 2005
		<i>A.cherimolia</i> Mill.	semente	RIOS <i>et al.</i> , 1989
		<i>A.dioica</i> St.Hill	lenho	DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2003
		<i>A.hayesii</i> Saff.	casca	RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987
geovanina [112]		<i>A.salzmannii</i> L.	casca de caule	CRUZ <i>et al.</i> , 2011
		<i>A.ambotay</i> Aublet	lenho	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 1987
		<i>A.dioica</i> St.Hill	lenho	DOS SANTOS <i>et al.</i> , 2003
		<i>A.hayesii</i> Saff.	lenho	RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987

Quadro 16 - continuação

Alcalóides azaantracênicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
marcanina A [113]		<i>A. glabra</i> L.	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
1-aza-5,9,10-trimetoxi-4-metil-2-oxo-1,2-dihidro antracenodiona [114]		<i>A. dioica</i> St.Hill	lenho	DOS SANTOS et al., 2003

Quadro 17 - Alcalóides pirimidina- β -carbolínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides pirimidina- β -carbolínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
anomontina [115]		<i>A.foetida</i> Mart.	casca	COSTA et al., 2006
		<i>A.montana</i> Macfad.	caule, casca de raiz e lenho	LEBOEUF et al., 1982 ^b , 1982 ^c
		<i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	n.i.	REJÓN-ORANTES et al., 2010
		<i>A.reticulata</i> L.	raiz e casca de raiz	YANG et al., 1987
metoxianomontina [116]		<i>A.montana</i> Macfad.	caule e casca de raiz	LEBOEUF et al., 1982 ^b , 1982 ^c
		<i>A.reticulata</i> L.	raiz e casca de raiz	YANG et al., 1987
N-hidroxianomontina [117]		<i>A.foetida</i> Mart.	casca de caule	COSTA et al., 2006, YANG et al., 1987
n.i.: não informado				

Quadro 18 – Alcalóides não isoquinolínicos isolados a partir do gênero *Annona*

Alcalóides não isoquinolínicos	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referências
cherimolina [118]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN <i>et al.</i> , 1997
esquamolona [119]		<i>A. squamosa</i> L. <i>A.purpurea</i> Mocino & Sessé ex-Dunal	caule	YANG <i>et al.</i> , 2004 CHANG <i>et al.</i> , 2000
samoquasina A [120]		<i>A.squamosa</i> L.	semente	MORITA <i>et al.</i> , 2000

Considerando as 27 espécies de *Annona* estudadas, até o momento, os registros indicaram maior frequência de isolamento de alguns alcalóides isoquinolínicos. Desta forma, o alcalóide encontrado no maior número daquelas estudadas (20) foi o alcalóide oxoaporfínico liriodenina [59] (**Quadro 6**).

O alcalóide benzilisoquinolínico reticulina [88], precursor dos demais isoquinolínicos, foi encontrado em 12 espécies (**Quadro 10**). A noraporfina anonaína [38] foi reportada em 13 espécies (**Quadro 4**).

A proaporfina estefarina [74] e as aporfinas isoboldina [16] e roemerina [30] foram isoladas a partir de sete diferentes espécies (**Quadros 3 e 9**).

1.6.2.2 Óleo volátil

Os óleos voláteis são misturas líquidas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas e geralmente odoríferas, constituídas predominantemente de compostos terpênicos e fenilpropanóides (BAKKALI et al., 2008, SIMÕES et al., 2004).

No vegetal, os compostos terpênicos são biossintetizados a partir de dois derivados da acetil-CoA: o isopentil-pirofosfato e o dimetilalil-pirofosfato.

Inicialmente, ambos os precursores condensam-se para formar o geranil-pirofosfato, precursor do geraniol, a partir do qual derivam os monoterpenos.

O geranil-pirofosfato, por sua vez, passa por reação de condensação com outra molécula de isopentil-pirofosfato, formando o farnesil-pirofosfato, que forma o farnesil, que é o precursor dos sesquiterpenos (DEWICK, 2009, ROBBERS et al., 1996).

Os fenilpropanóides são biossintetizados a partir da tirosina e da fenilalanina, tendo como intermediários, o ácido cinâmico e o ácido p-hidroxicinâmico, respectivamente (DEWICK, 2009, ROBBERS et al., 1996).

No gênero *Annona*, a composição do óleo essencial de diferentes órgãos vegetais de 11 espécies foi determinada, sendo elas: *Annona ambotay* Aublet, *A. atemoya* Mabb., *A. cherimolia* Mill., *A. coriacea* Mart., *A. cuneata* L., *A. densicoma* Mart., *A. foetida* Mart., *A. muricata* L., *A. reticulata* L., *A. senegalensis* Pers. e *A. squamosa* L. (SIQUEIRA et al., 2011, SIQUEIRA, 2010, CELESTINE et al., 2010, COSTA et al., 2009, ANDRADE et al., 2007, OGUNWANDE et al., 2006,

KOSSOUOH et al., 2005, GARG;GUPTA, 2005, RIOS et al., 2003, KHALLOUKI et al., 2002, FOURNIER et al., 1999, JIROVETZ et al., 1998, BOYOM et al., 1996, BARTLEY, 1987, WYLLIE et al., 1987, EKUNDAYO; OGUNTIEN, 1986, MACLEOD; PIERIS, 1981).

Na maioria das espécies analisadas de *Annona*, os sesquiterpenos foram os constituintes majoritários em relação aos monoterpenos.

Em alguns casos, verificou-se o perfil inverso como nas cascas de caule de *A. senegalensis* (KHALLOUKI et al., 2002), nos frutos de *A. squamosa* (ANDRADE et al., 2001), *A. reticulata*, *A. cherimolia* (FOURNIER et al., 1999) e de *A. atemoya* (WYLLIE et al., 1987), além das cascas de caule de *A. cuneata* (KHALLOUKI et al., 2002).

A presença de outros componentes como ésteres alifáticos foram relatados em concentrações consideráveis (51%) nos frutos de *A. muricata* (FOURNIER et al., 1999, JIROVETZ et al., 1998, MACLEOD; PIERIS, 1981).

O teor de óleo volátil, nas espécies avaliadas, foi variável, nos diferentes órgãos vegetais analisados. Em folhas, encontraram-se valores indo de 0,01% (m/m), em *A. foetida*, a 1,42%, em *A. reticulata* (COSTA et al., 2009, OGUNWANTE et al., 2006).

Nos frutos, o teor de óleo foi de 0,08% (m/m), em *A. senegalensis*, e de 0,83%, em *A. cherimolia* (RIOS et al., 2003, BOYOM et al., 1996).

Nas sementes, encontraram-se teores de óleo de 0,2% (m/m), em *A. senegalensis* (CELESTINE et al., 2010). As cascas de caule de *A. cuneata* apresentaram 0,16% de óleo, enquanto aquelas de *A. senegalensis*, tiveram 0,3% (KHALLOUKI et al., 2002). Em cascas de raiz de *A. senegalensis*, o teor chegou a 1% (m/m) (CELESTINE et al., 2010).

Entre os constituintes terpênicos mais freqüentes nos óleos voláteis do gênero *Annona*, encontraram-se os sesquiterpenos δ -cadineno, γ -cadineno, α -cadinol, *E*-cariofileno, óxido de cariofileno, β -elemeno, elemol, espatulenol, germacreno D e α -humuleno (SIQUEIRA et al., 2011, SIQUEIRA, 2010, CELESTINE et al., 2010, COSTA et al., 2009, ANDRADE et al., 2007, OGUNWANTE et al., 2006, KOSSOUOH et al., 2005, GARG;GUPTA, 2005, RIOS et al., 2003, KHALLOUKI et al., 2002, FOURNIER et al., 1999, JIROVETZ et al.,

1998, BOYOM et al., 1996, BARTLEY, 1987, EKUNDAYO; OGUNTIEN, 1986) (Figura 45).

Figura 45 - Estruturas dos sesquiterpenos mais freqüentemente encontrados nos óleos voláteis das espécies de *Annona* estudadas, até o momento.

Entre os monoterpenos, os mais comumente encontrados foram: α-pineno, β-pineno, α-terpineol, 1,8-cineol, mirceno, limoneno e linalol (SIQUEIRA et al., 2011, SIQUEIRA, 2010, CELESTINE et al., 2010, COSTA et al, 2009, ANDRADE et al., 2007, KOSSOUOH et al., 2005, GARG et al., 2005, OGUNWANDE et al., 2006, RIOS et al., 2003, KHALLOUKI et al., 2002, FOURNIER et al., 1999, JIROVETZ et al., 1998, BOYOM et al., 1996, BARTLEY, 1987, EKUNDAYO; OGUNTIEN, 1986) (Figura 46).

Figura 46 - Estruturas dos monoterpenos mais frequentemente encontrados nos óleos voláteis das espécies de *Annona* estudadas, até o momento.

É importante notar que, entre os constituintes presentes no óleo volátil das espécies estudadas do gênero *Annona*, foi verificada a presença predominante de alguns deles, como o *E*-cariofileno e o óxido de cariofileno, tendo sido considerados marcadores do táxon. De forma similar, o sesquiterpeno espatulenol foi reconhecido como marcador, em Annonaceae (COSTA et al., 2009).

1.6.3 *Annona crassiflora* Mart.

A. crassiflora Mart. é conhecida, popularmente, como: “araticum”, “articum”, “cabeça-de-negro”, “coração de boi”, “marolo” (LORENZI & SOUZA, 2005, CRUZ, 1995, CORREA, 1969) sendo uma das 33 espécies de anonáceas que ocorrem no Brasil, nos estados de São Paulo, Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Piauí e no Distrito Federal (CRUZ, 1995, CORREA, 1969).

A espécie foi, relativamente, pouco investigada do ponto de vista químico.

Diferentes classes de metabólitos secundários foram, nela, reportadas, entre as quais citam-se: os alcalóides (**Quadro 19**) (EGYDIO, 2009, GONÇALVES et al., 2009, HOCQUEMILLER et al., 1982, LEBOEUF et al., 1982^a), as acetogeninas (**Quadro 20**) (PIMENTA et al., 1999, SANTOS et al., 1996^a, SANTOS et al., 1994), os flavonóides (ROESLER et al., 2007, SANTOS; SALATINO, 2000) (**Quadro 21**) e outros compostos fenólicos, predominantemente, da classe das lignanas (ROESLER et al., 2007, SANTOS et al., 1996^b) (**Quadro 22**).

Os constituintes isolados, até o presente, foram agrupados por classe química e dispostos nos **Quadros 19 a 22**.

Quadro 19 - Classes de alcalóides isoquinolínicos isolados a partir de *Annona crassiflora* Mart.

Alcalóides isoquinolínicos	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
aporfínicos			
romucosina [31]		folha	EGYDIO*, 2009
benzylisoquinolínicos			
reticulina [88]		folha e caule	HOCQUEMILLER et al., 1982; LEBOEUF et al., 1982
fenantrênicos			
anoretina [104]		lenho	GONÇALVES et al., 2009

Quadro 19 - continuação

Alcalóides isoquinolínicos	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
noraporfínicos			
anonaína [38]		folha e caule	HOCQUEMILLER et al., 1982, EGYDIO*, 2009
asimolobina [39]		folha e caule	HOCQUEMILLER et al., 1982, EGYDIO*, 2009
xilopina [52]		folha	EGYDIO*, 2009

Quadro 19 - continuação

Alcalóides isoquinolínicos	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
oxoaporfínicos			
aterospermidina [58]		lenho	GONÇALVES et al., 2009
liriodenina [59]		folha e caule	HOCQUEMILLER et al., 1982
		lenho	GONÇALVES et al., 2009

* Alcalóides caracterizados (não isolados)

Quadro 20 - Acetogeninas isoladas a partir de *Annona crassiflora* Mart.

Acetogeninas	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
almunequina			PIMENTA et al., 1999
anonina I			PIMENTA et al., 1999
araticulina		semente	PIMENTA et al., 1999, SANTOS et al., 1996 ^a
bulatacina			PIMENTA et al., 1999
crassiflorina			PIMENTA et al., 1999, SANTOS et al., 1996 ^a , 1994

Quadro 20 - continuação

Acetogeninas	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
4-dioxocrassiflorina		semente	PIMENTA et al., 1999
muricatetrocina B			PIMENTA et al., 1999

Quadro 21 - Flavonóides isolados a partir de *Annona crassiflora* Mart.

Flavonóides	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
canferol-3-O-galactosídeo		folha	SANTOS; SALATINO, 2000
canferol-3-O-galactosilglicosídeo			SANTOS; SALATINO, 2000
canferol-3-O-glicosídeo			SANTOS; SALATINO, 2000
canferol-3-O-glicosilglicosídeo			SANTOS; SALATINO, 2000

Quadro 21 - continuação

Flavonóides	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
quercetina-3-O-arabinosídeo			SANTOS; SALATINO, 2000
quercetina-3-O-arabinosilarabinosídeo		folha	SANTOS; SALATINO, 2000
quercetina-3-O-arabinsilgalactosídeo			SANTOS; SALATINO, 2000

Quadro 21 - continuação

Flavonóides	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
quercetina-3-O-galactosídeo			SANTOS; SALATINO, 2000
quercetina-3-O-galactosilramnosídeo		folha	SANTOS; SALATINO, 2000
quercetina-3-O-glicosídeo			SANTOS; SALATINO, 2000

Quadro 21 - continuação

Flavonóides	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
quercetina-3-O-ramnosilglicosídeo		folha	SANTOS; SALATINO, 2000
hidrato de rutina		fruto	ROESLER et al., 2007

Ara: arabinose, **Gal:** galactose, **Gli:** glicose, **Ram:** ramnose

Quadro 22 - Compostos fenólicos isolados a partir de *Annona crassiflora* Mart.

Compostos fenólicos	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
lignana			
grossamida		semente	SANTOS et al., 1996 ^b
ácidos fenólicos			
ácido cafeico		fruto	ROESLER et al., 2007
ácido cafeoil-tartárico

Quadro 22 - continuação

Compostos fenólicos	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
ácidos fenólicos			
ácido ferúlico		fruto	ROESLER et al., 2007
ácido quínico
Outros compostos fenólicos			
N-metil-cafeoil-tiramina		semente	SANTOS et al., 1996 ^b

Quadro 22 - continuação

	Estrutura química	Órgão vegetal	Referências
Outros compostos fenólicos			
xantoxilina			ROESLER et al., 2007
cafeoil-glicose		fruto	ROESLER et al., 2007

Tendo em vista o grande impacto sócio-econômico e a gravidade do quadro das doenças negligenciadas, no Brasil e no mundo, bem como as limitações da terapia atualmente usada no seu tratamento, é urgente a busca de novos fármacos.

Na triagem preliminar de espécies vegetais potencialmente bioativas, *A. crassiflora* Mart. (Annonaceae) mostrou resultados promissores no que se refere à atividade antiprotozoária *in vitro* (TEMPONE et al., 2005).

A atividade antimicobacteriana verificada, para outras espécies de *Annona* (GAUTAM et al., 2007, GRAHAM et al., 2003), igualmente, despertou o interesse para a realização da presente pesquisa.

Desta forma, o trabalho enfocou o estudo químico dos alcalóides e do óleo volátil de *A. crassiflora*, com avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro*.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho visou ao estudo químico biomonitorado e à avaliação das atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro* dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de folhas de *Annona crassiflora* Mart.

2.2 Objetivos específicos

- Fracionamento biomonitorado dos alcalóides totais de folhas de *Annona crassiflora* Mart. por meio da avaliação da atividade anti-*Leishmania in vitro* do extrato bruto e das frações frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* com seleção das frações ativas,
- Avaliação da atividade antimicobacteriana *in vitro* das frações selecionadas frente ao *Mycobacterium smegmatis* e ao *M. tuberculosis*,
- Obtenção do óleo volátil das folhas e análise da composição por cromatografia líquida e espectroscopia de massas (CG-EM),
- Avaliação da atividade antiprotozoária do óleo volátil frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*, *L.* (L.) *amazonensis*, *L.* (V.) *braziliensis* e *L.* (L.) *major* e às formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi*,
- Avaliação das atividades antiprotozoária, antimicobacteriana e citotóxica *in vitro* dos alcalóides isolados.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

As folhas de *Annona crassiflora* Mart. (Annonaceae) (**Figura 47**) foram coletadas, a partir de cinco exemplares da espécie, junto ao Horto Florestal Andrade Silva, situado no município de Avaré, no estado de São Paulo, em agosto de 2009.

Figura 47 - *Annona crassiflora* Mart. Hábito arbóreo [Escala:0,5 m]

As exsicatas das partes aéreas, em fenofase de frutificação, foram depositadas no Herbário (SPF) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), sob a denominação **Siqueira 3** e identificadas pelo Professor Dr. Renato de Mello-Silva do Departamento de Botânica do mesmo Instituto.

3.2 Métodos

3.2.1 Secagem e pulverização

As folhas de *A. crassiflora* foram secas, à sombra, à temperatura ambiente, por 7 dias.

O material seco foi pulverizado (SIMÕES et al., 2004), em moinho de facas e martelos, com obtenção de pó semifino (tamises 355/ 180) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

3.2.2 Obtenção dos extratos e do óleo volátil

3.2.2.1 Extrato etanólico

As folhas (2,1 kg) foram submetidas à maceração, em etanol 96° GL, por 24 horas. Após este período, procedeu-se à percolação exaustiva, à frio, empregando o mesmo solvente (FISCHER et al., 2004). As alíquotas obtidas foram reunidas e concentradas, à pressão reduzida, em evaporador rotatório (Büchi®), a 40 °C, até a secura.

A massa do resíduo etanólico foi determinada tendo sido conservado, ao abrigo da luz e sob refrigeração, em frascos hermeticamente fechados.

3.2.2.2 Alcalóides totais

Alíquotas de 16 g de extrato etanólico (**item 3.2.2.1**) foram solubilizadas em 400 mL de solução de ácido fosfórico 10% (v/ v) (Labsynth®) e, em seguida, foram filtradas através de funil de Büchner.

A fase ácida foi submetida à partição com *n*-hexano (Labsynth®) (10:1), em funil de separação. Posteriormente, a mesma foi alcalinizada com hidróxido de amônio (Labsynth®), até pH 9-10 (FISCHER et al., 2004).

Realizou-se a partição da fase alcalina resultante com diclorometano (Labsynth®) (10:1), até verificar reação negativa com o reativo de Dragendorff [mistura da solução de 0,85 mg de subnitrato de bismuto em 40 mL de água, 10 mL de ácido acético glacial e solução de 8 mg de iodeto de potássio em 20 mL de água] (WAGNER & BLADT, 1996).

As fases em diclorometano foram reunidas, filtradas sobre sulfato de sódio anidro (Ecibra®) e, posteriormente, concentradas à 40 °C, sob pressão reduzida, em evaporador rotatório. Determinou-se a massa do resíduo, após estágio de 24 h em dessecador, a qual correspondeu à massa dos alcalóides totais (**AT**) de *A. crassiflora*. Posteriormente, foram conservados ao abrigo da luz, sob refrigeração, em frascos hermeticamente fechados.

Figura 48 - *Annona crassiflora* Mart. Esquema de obtenção dos alcalóides totais por partição ácido-base

3.2.2.3 Obtenção do óleo volátil

O óleo volátil de *A. crassiflora* foi obtido a partir de 537,6 g de folhas frescas, por processo de hidrodestilação, em aparelho de Clevenger, por 4 horas (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988). Antes da extração, as folhas foram fragmentadas com gelo seco, em triturador Ametek® (modelo 36BL54).

O óleo volátil obtido foi seco com sulfato de sódio anidro e, posteriormente, conservado em frasco de vidro âmbar e em refrigerador, à -15 °C. Determinou-se o rendimento (m/ m).

3.2.3 Análises cromatográficas

3.2.3.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Os alcalóides totais foram submetidos à análise, por **CCD**, em placas de alumínio cobertas com sílica gel 60 F₂₅₄ (Merck®), após a solubilização em metanol, à concentração de 1 mg/ mL. O volume aplicado da amostra foi de cerca de 40 µL/

placa. As placas de alumínio foram seccionadas e utilizadas, nas dimensões 5 x 4 cm, com percurso de 4 cm. Realizou-se desenvolvimento múltiplo na seguinte sequência de eluição: diclorometano, diclorometano-metanol (96:4), (94:6), (92:8) e (90:10).

Os compostos isolados foram empregados como substâncias de referência, tendo sido solubilizados em metanol. **A17-3** (0,6 mg/ mL) e **A17-6** (1,0 mg/ mL) foram aplicados nos volumes respectivos de: 160 e 40 µL/ placa.

No processo inicial de fracionamento, a análise por **CCD** das frações alcaloídicas (**A1-A20**), resultantes da **CC** (item **3.2.3.2**), foi realizada em placas de vidro (20 x 12 cm), preparadas com sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck®), na espessura de 300 µm, e o desenvolvimento deu-se, com percurso de 12,5 cm, utilizando fases móveis constituídas de *n*-hexano, diclorometano e metanol e misturas destes solventes.

O óleo volátil foi analisado, empregando diclorometano, como fase móvel, e demais condições idênticas àquelas descritas anteriormente. O óleo foi solubilizado em tolueno (3,5 mg/ mL) e foi aplicado volume de cerca de 240 µL/ placa. Os padrões utilizados foram: *E*-cariofileno (sesquiterpeno) e β-pineno (monoterpeno) da marca Fluka®, solubilizados em tolueno, à concentração, 20µL/ 100 µL, tendo sido aplicados cerca de 120 µL/ placa.

Os cromatogramas referentes aos alcalóides totais, frações e compostos isolados foram visualizados à luz natural, sob luz ultravioleta, nos comprimentos de onda de 254 nm e 366 nm, tendo sido posteriormente nebulizados com o reativo de Dragendorff (WAGNER & BLADT, 1996).

Os cromatogramas relativos ao óleo volátil foram visualizados após a nebulização com reagente anisaldeído sulfúrico (WAGNER & BLADT, 1996).

3.2.3.2 Cromatografia em coluna (CC)

O fracionamento dos alcalóides totais de *A. crassiflora* Mart. (1,2 g), por **CC**, foi realizado em coluna de vidro [h: 74 cm, φ interno: 4 cm]. A coluna foi empacotada com cerca de 394,0 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) (Merck®).

Os alcalóides totais foram solubilizados em diclorometano (3-5 mL), homogeneizados com 4 g do mesmo adsorvente e, posteriormente, o solvente foi evaporado.

A eluição foi realizada utilizando misturas de *n*-hexano-diclorometano (50:50), diclorometano, misturas de diclorometano-metanol (95:5, 90:10, 50:50) e metanol, em ordem crescente de polaridade, tendo-se coletado 20 frações (**A1-A20**), com volumes de 200 a 300 mL (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Seqüência de eluentes e volumes empregados no fracionamento dos **AT** de *Annona crassiflora* Mart., por CC

eluyente	solvente (%)			Volume (mL)
	<i>n</i> -hexano	diclorometano	metanol	
1	50	50	-	250
2	50	50	-	200
3	50	50	-	250
4	50	50	-	250
5	-	100	-	450
6	-	100	-	200
7	-	95	5	250
8	-	95	5	250
9	-	90	10	250
10	-	90	10	300
11	-	80	20	250
12	-	80	20	250
13	-	50	50	200
14	-	50	50	75
15	-	50	50	250
16	-	50	50	210
17	-	50	50	250
18	-	50	50	250
19	-	-	100	250
20	-	-	100	650

Após a eluição, as frações foram concentradas, em evaporador rotatório, à pressão reduzida, até a secura e a massa do resíduo foi determinada.

3.2.3.3 Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (CG-EM)

A análise por **CG-EM** do óleo volátil foi realizada na Divisão de Fitoquímica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), sob a supervisão da pesquisadora Dra. Carmen Lúcia Queiroga.

Alíquota de cerca de 20 mg do óleo volátil das folhas de *A. crassiflora* foi solubilizada, em diclorometano p.a. (Synth[®]), à concentração de 12 mg/ mL e, posteriormente, analisada em cromatógrafo a gás da marca Agilent[®] (modelo HP-6890) utilizando a coluna HP-5MS (5% fenilmetilpolisiloxano) (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm d.i. e filme fino 0,10 µm) (J & W Scientific, UK), acoplado ao espectrômetro de massas da marca Agilent[®] (modelo HP-5975), no modo de ionização por impacto de elétrons (IE), de 70 eV, com varredura na faixa de massa/ carga (m/z) de 29-400 e taxa de aquisição de 1,0 scan/ s.

As condições de análise basearam-se no procedimento modificado de MAGGI et al. (2009).

O volume de óleo injetado foi de 1,0 µL, no modo *scan*, com divisão de fluxo (*split*) 1: 20. As temperaturas do injetor e do detector foram de 220 e 250 °C, respectivamente. A temperatura da coluna variou de 60 a 250 °C, por 60 minutos, com taxa de aquecimento de 3°C/ min, empregando hélio como gás de arraste e vazão de 1 mL/ min.

Os mesmos procedimentos foram utilizados para os padrões de *E*-cariofileno, β-pineno e globulol da marca Fluka[®].

A identificação dos compostos do óleo volátil foi realizada por comparação dos espectros de massas, com os bancos de dados do aparelho (NIST, 2005) e da literatura (ADAMS, 2007) e por comparação dos índices de retenção (IR), determinados com base em série homóloga de n-alcanos (ADAMS, 2007).

3.2.3.4 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A fração alcaloídica **A17** foi purificada, sob a supervisão da Dra. Ingrid Elida Collantes Diaz, pesquisadora da Universidade Paulista (UNIP).

A análise por CLAE foi efetuada utilizando-se o cromatógrafo Shimadzu[®], com bombas LC-20A, loop de 20 µL, equipado com detector PDA (*Photodiode Array*) e coluna C-18 (Gemini - Phenomenex[®] 250 mm x 4,6 mm, 5 µm).

A análise inicial da fração **A17** foi realizada empregando mistura constituída de solução de ácido trifluoracético (Merck[®]) (TFA) em água Milli-Q[®] 0,1% (v/v) e acetonitrila (grau HPLC Tedia[®]) (81:19), com eluição no modo isocrático, por 60 min, com fluxo de 1 mL/ min. Posteriormente, a eluição foi realizada, no modo gradiente, até 100% de acetonitrila, por 10 minutos. Em seguida, retornou-se à condição inicial, em 15 minutos. O comprimento de onda de detecção foi de 254 nm.

Posteriormente, o fracionamento de **A17** foi efetuado em sistema CLAE semipreparativo, empregando o cromatógrafo Shimadzu[®], equipado com bomba LC-6AD, loop de 1000 µL, detector UV-Vis SPD-20A, fluxo de 10 mL/ min e coluna C-18 (Gemini - Phenomenex[®] 250 mm x 21,2 mm, 5 µm). A separação foi realizada de forma isocrática, utilizando as demais condições idênticas, àquelas descritas para o modo analítico, no que se refere ao sistema de solventes e comprimento de onda de detecção, com tempo de eluição de 60 minutos.

Após a evaporação do solvente, as 7 frações resultantes, denominadas **A17-1**, **A17-2**, **A17-3**, **A17-(4+5)**, **A17-5/1**, **A17-6** e **A17-7**, foram liofilizadas, tendo-se determinado as massas dos resíduos (pós amorfos) obtidos.

As frações foram submetidas à análise por CLAE, empregando condições idênticas àquelas descritas para o modo analítico, de forma a verificar o grau de pureza dos compostos eluídos. Aquelas que apresentaram constituinte majoritário e em nível de pureza adequado foram encaminhadas às análises espectroscópicas para a determinação estrutural.

3.2.3.5 Determinação estrutural dos compostos isolados da fração A17

3.2.3.5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas com ionização por *eletrospray* (CLAE-IES-EM²)

Após a separação dos compostos majoritários das frações **A17-3** e **A17-6**, denominados com a mesma sigla da fração de origem, estes foram encaminhados à análise, por **CLAE-IES-EM²**, junto à Central Analítica do Instituto de Química da USP.

As análises foram efetuadas em cromatógrafo líquido da marca Shimadzu[®] (modelo SLC-10A vp; bombas modelo LC-10AD; detector UV-Vis: SPD-M10A vp; e injetor automático: SIL-10AF) acoplado a espectrômetro de massas IES-EM_n Bruker Daltonics[®], série Esquire 3000 Plus, equipado com fonte de ionização por *eletrospray* e analisador de captura de íons. O controle do equipamento e a aquisição dos dados foram realizados com auxílio do programa *Esquire* 5.2.

As condições da análise, por **CLAE**, foram idênticas àsquelas empregadas no item **3.2.3.4**.

Nas análises por espectroscopia de massas (**IES-EM/EM**), a temperatura da fonte de íons foi de 320 °C, mantendo-se a voltagem do capilar a 4000V e, na saída, a 500V. O nitrogênio (N₂) foi utilizado como gás de nebulização, à pressão de 27 psi e fluxo de 7 L/ min. O fluxo para massa foi de 90 µL/ min.

3.2.3.5.2 Espectroscopias de ressonância magnética nuclear

Os compostos **A-17-3** e **A-17-6** foram solubilizados, em metanol deuterado (CD₃OD) (Merck[®]), e foi empregado capilar de tetrametilsilano (TMS), em tetracloreto de carbono, como referência externa.

Os registros de espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (**RMN ¹H**), de carbono (**RMN ¹³C**) e de intensificação de sinal sem distorção por transferência de polarização (**DEPT**) foram obtidos em espectrômetro Bruker[®], modelo DPX 300, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP operando, respectivamente, nas frequências de 300, 75,5 e 75,5 MHz.

As análises bidimensionais de correlação heteronuclear de único *quantum* (**HSQC**) e de correlação heteronuclear a múltiplas ligações (**HMBC**) foram realizadas no mesmo aparelho, à frequência de 300 MHz.

3.2.4 Avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro*

Os ensaios para a avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro* foram realizados no Laboratório de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz (SP) do pesquisador Dr. André Gustavo Tempone.

3.2.4.1 Avaliação da atividade anti-*Leishmania*

Os alcalóides totais de *A. crassiflora*, suas frações e os compostos isolados foram submetidos aos testes *in vitro* frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*.

O óleo volátil foi testado frente às formas promastigotas da espécie citada, de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis*.

3.2.4.1.1 Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* (cepa MHOM/BR/1972/LD) foram isoladas de baço de hamster dourado, enquanto *L. (L.) amazonensis* (cepa WHO/BR/00/LT0016), *L. (L.) major* (cepa MHOM/1L/80/Fredlin) e *L. (V.) braziliensis* (cepa MHO/BR/75/M2903) foram isoladas de lesões cutâneas de camundongos BALB/c, após um período de infecção de 60-70 dias (STAUBER et al., 1958). Em seguida, foram mantidas, a 24° C, em meio M119, com 10% de soro fetal bovino e 5% de urina humana masculina (TEMPONE et al., 2005).

3.2.4.1.2 Avaliação da viabilidade dos parasitas frente aos alcalóides

Os parasitas, contados em hemocitômetro de Neubauer, foram semeados (1×10^6 células/ poço) em microplacas de 96 poços, até o volume final de 100µL/ poço. Cerca de 1 mg dos **AT** de *A. crassiflora* e das frações originadas do fracionamento, por **CC** (item 3.2.3.2), foram solubilizados em metanol p.a. e diluídos com o meio M199 (sem vermelho de fenol) à concentração de 200 µg/ mL.

Cada amostra foi testada em duplicata. A pentamidina foi utilizada como fármaco de referência à concentração de 100 µg/ mL.

Efetuaram-se controles em poços contendo pentamidina, sem formas promastigotas (controle de esterilidade), com formas promastigotas incubadas no meio M-199 (100% de sobrevivência) e poços com metanol (sem os AT ou frações) à maior proporção empregada (0,5%, v/ v) por poço, na solubilização dos alcalóides.

As placas foram incubadas, por 24 h, à temperatura de 24° C. A viabilidade das formas promastigotas foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de oxidação mitocondrial do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2-il)-2,5 difeniltetrazólio) (TADA et al., 1986). O MTT (5 mg/ mL) foi dissolvido em tampão fosfato-salina (PBS) e esterilizado por filtração (membrana 0,22 µm, Millipore®), tendo-se adicionado 20 µL/ poço. As microplacas foram incubadas a 37° C, por 4 h.

A extração da formazana foi realizada com dodecil sulfato de sódio-SDS 10%, por 18 h (100 µL/ poço), à temperatura de 24 °C. A densidade ótica (D.O) foi determinada em espectrofotômetro Multiscan MS (Uniscience®), a 570 nm. Calculou-se a porcentagem média de mortes das formas promastigotas causadas pelos AT e frações.

3.2.4.1.3 Determinação da concentração efetiva de 50% (CE₅₀) dos alcalóides e do óleo volátil

Os alcalóides totais foram solubilizados em metanol p.a. e diluídos com o meio M199 (sem vermelho de fenol), com as formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, em microplacas de 96 poços, até a máxima concentração de 150 µg/ mL, enquanto os compostos isolados **A17-3** e **A17-6** foram até a concentração máxima de 150 µM. O fármaco de referência (pentamidina) foi solubilizado à concentração de 100 µg/ mL.

O óleo volátil foi diluído, até a concentração máxima de 500 µg/ mL, com as formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis* transferidas para os poços (1x10⁶ células/ poço).

Os demais procedimentos foram idênticos àqueles descritos no item **3.2.4.1.2**. Determinaram-se as concentrações dos alcalóides totais, dos compostos **A17-3** e

A17-6 e do óleo volátil que causaram a morte de 50% (**CE₅₀**) dos parasitas de *Leishmania*.

3.2.4.2 Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma*

O óleo volátil foi testado *in vitro* frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

3.2.4.2.1 Parasitas

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidas em células renais LLC-MK2 de macacos *Rhesus* (ATCC CCL 7), no meio RPMI-1640 com suplemento de soro fetal bovino 2%, à 37°C (GRECCO et al., 2012).

3.2.4.2.2 Determinação da concentração efetiva de 50% (CE₅₀) do óleo volátil

O óleo volátil foi solubilizado em metanol p.a. e diluído com o meio RPMI-1640 (sem vermelho de fenol), em microplacas de 96 poços, à concentração máxima de 500 µg/ mL, com formas tripomastigotas de *T. cruzi* transferidas para os poços (1x10⁶ células/ poço).

Cada amostra foi testada em duplicata. O benznidazol foi utilizado como fármaco de referência à concentração de 100µg/ mL.

Efetuaram-se controles em poços contendo benznidazol (0% de sobrevivência), sem formas tripomastigotas (controle de esterilidade do meio), com formas tripomastigotas incubadas no meio RPMI-1640 (100% de sobrevivência) e poços com metanol (sem o óleo volátil).

As placas foram incubadas, por 24 h, à temperatura de 37° C, em incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂. Os demais procedimentos seguiram conforme descrito para a determinação da **CE₅₀** de *Leishmania* (item **3.2.4.1.2**). Determinou-se a concentração que levou à morte de 50% das formas tripomastigotas de *T. cruzi*.

3.2.4.3 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos alcalóides

Os alcalóides totais de *A. crassiflora* e os compostos isolados **A17-3** e **A17-6** foram submetidos aos testes *in vitro* frente às células de tecido conjuntivo de camundongos, no Laboratório de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz (SP), sob supervisão do pesquisador Dr. André Gustavo Tempone.

3.2.4.3.1 Células

Células do tecido conjuntivo de camundongo NCTC clone 929 (ATCC) foram mantidas em meio RPMI-1640 (sem vermelho de fenol) e suplementados com 10% de soro fetal bovino, a 37 °C, em uma incubadora umidificada com atmosfera de 5% de CO₂ (MORAIS et al., 2012). Posteriormente, foram semeadas 4x10⁴ células/poço, que foram testadas com os **AT** e compostos isolados.

3.2.4.3.2 Determinação da concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) dos alcalóides e frações

Os **AT** (1 mg) de *A. crassiflora* e os compostos **A17-3** e **A17-6** foram solubilizados, em metanol p.a. e, em seguida, foram diluídos com o meio M199 (sem vermelho de fenol) em microplacas de 96 poços, à concentração de 200 µg/ mL (**AT**) e de 200 µM (compostos). Os testes foram realizados em duplicata. As substâncias usadas como referência foram pentamidina e Glucantime®.

As placas foram incubadas, por 48 h, à temperatura de 37 °C e, posteriormente, realizou-se a determinação da viabilidade pelo ensaio colorimétrico de oxidação mitocondrial do MTT, conforme descrito no item **3.2.4.1.2**.

Determinou-se a concentração citotóxica de 50% (**CC₅₀**), que levou à morte as células de camundongos.

3.2.5 Análise estatística

As determinações efetuadas, nos ensaios das atividades anti-*Leishmania*, anti-*Trypanosoma* e citotóxica *in vitro*, foram analisados utilizando-se o programa *Graph Pad Prism* 5.0 (MORAIS et al., 2012), considerando a média dos resultados obtidos em duplicata.

3.2.6 Avaliação da atividade antimicobacteriana dos AT, das frações alcaloídicas e dos compostos isolados

Os ensaios de atividade antimicobacteriana foram efetuados no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, sob a supervisão do Prof. Dr. Mario Hiroyuki Hirata e auxílio do pós-graduando Joas Lucas da Silva.

Os alcalóides totais, 17 frações provenientes do fracionamento dos **AT (A1-A10 e A14-A20)**, por **CC**, e os compostos isolados **A17-3** e **A17-6** foram submetidos aos testes da atividade antimicobacteriana, frente às espécies *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 35798) e *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC 27294), empregando o teste de resazurina (MARTIN et al., 2005, MONTORO et al., 2004) para a determinação da concentração inibitória mínima (**CIM**).

O inóculo de *M. smegmatis*, originalmente cultivado em meio LJ (Difco®), foi suspenso em meio 7H9 (Difco®), ajustado para um tubo de MacFarland No.1 e diluído 1:20, sendo que 100 µL foram diluídos com meio 7H9, por um fator de 4, em relação à concentração mais alta testada, com diluições, à razão de 2, que foram aplicadas, diretamente, na placa de 96 poços.

A substância utilizada como referência foi a isoniazida (Sigma®), tendo sido testada na faixa de concentração de 0,03-1,0 mg/ mL. O controle negativo foi realizado com os inóculos sem antibióticos.

Foi aplicada água esterilizada, em todos os poços perimetrais, para evitar a evaporação durante incubação.

A placa foi coberta, selada em sacos plásticos, e incubada, a 37° C. Após a incubação, por 7 dias, foram transferidos 30 µL de solução de resazurina, em cada poço, tendo sido incubada, novamente, por uma noite.

Nos poços em que ocorreu a mudança da cor azul para a rosa, considerou-se ter havido crescimento bacteriano. A **CIM** determinada foi definida como a menor concentração de amostra em que não se verificou alteração da coloração.

4 RESULTADOS

4.1 Rendimento das extrações e teor de óleo volátil

4.1.1 Extrato etanólico (ET)

O rendimento do extrato etanólico de *A. crassiflora* Mart. foi de 23,8% (m/ m).

4.1.2 Alcalóides totais (AT)

A massa de alcalóides totais obtida de *A. crassiflora* Mart. foi de 1,3 g, correspondendo ao rendimento de 1,65% (m/m).

4.1.3 Frações alcaloídicas

As massas das frações alcaloídicas, obtidas a partir do fracionamento inicial (item 3.2.3.2) dos alcalóides totais de *A. crassiflora* Mart., por **CC**, foram dispostas na Tabela 2.

Tabela 2 - Massas dos resíduos (mg) das frações alcaloídicas (**A1** - **A20**) de *Annona crassiflora* obtidas por fracionamento, por **CC**.

<i>Annona crassiflora</i> Mart. frações alcaloídicas			
Fração	massa (mg)	Fração	Massa (mg)
A1	52,9	A11	4,1
A2	10,2	A12	2,5
A3	35,8	A13	1,9
A4	112,5	A14	219,0
A5	261,0	A15	45,2
A6	38,6	A16	94,3
A7	23,9	A17	103,8
A8	9,2	A18	1,7
A9	25,5	A19	7,7
A10	16,0	A20	25,7

CC: cromatografia em coluna (item 3.2.3.2)

A massa das sete frações obtidas a partir do fracionamento de **A17**, por **CLAE** (item 3.2.3.4) foram dispostas na **Tabela 3**.

Tabela 3 - Massas dos resíduos (mg) das frações de **A17**, obtidas por fracionamento, por **CLAE**

<i>Annona crassiflora</i> Mart.	
fração A17	massa (mg)
A17-1	17,4
A17-2	7,4
A17-3	4,0
A17-(4+5)	8,6
A17-5/1	17,4
A17-6	23,6
A17-7	7,9

CLAE: Cromatografia líquida de alta eficiência (condições de análise ver: item 3.2.3.4)

4.1.4 Óleo volátil

O teor de óleo volátil das folhas de *A. crassiflora* Mart. foi de 0,06% (m/ m).

4.2 Perfil cromatográfico dos alcalóides totais e do óleo volátil de folhas de *A. crassiflora*, por cromatografia em camada delgada (CCD)

4.2.1 Alcalóides totais

Os alcalóides totais (**AT**) de *A. crassiflora* apresentaram melhor separação dos constituintes, por **CCD**, com o sistema cromatográfico que empregou desenvolvimento múltiplo, com a sequência de fases móveis: diclorometano, diclorometano-metanol (96:4), (94:6), (92:8) e (90:10).

Figura 49 - Cromatograma em camada delgada (CCD) dos alcalóides totais (AT) de *Annona crassiflora* Mart. [fase móvel: diclorometano, diclorometano-metanol (96:4), (94:6), (92:8) e (90:10) **49A** - Visualização sob luz UV 254nm. **49B** Visualização sob luz UV 366nm. **49C** - Revelação com reativo de Dragendorff, visualização à luz natural. **Padrões** (compostos isolados): **A17-3**- Rf: 0,38, **A17-6**- Rf: 0,43]

O cromatograma dos alcalóides totais apresentou seis manchas de maior intensidade, nos Rf: 0, 0,38, 0,45, 0,50, 0,55, 0,63, 0,88 (**Figura 49A**), tendo reagido com o reativo de Dragendorff (**Figura 49C**), mostrando coloração laranja. Além destas, o cromatograma apresentou manchas fluorescentes situadas, principalmente, na região de alta a média polaridade (Rf: 0-0,5), sob luz UV 366 nm (**Figura 49B**), que não reagiram com o reativo mencionado, caracterizando a presença de constituintes de natureza não alcalóidica.

Os compostos isolados **A17-3** e **A17-6** apresentaram mancha única de cor laranja, após a reação com reativo de Dragendorff, nos **Rf**: 0,38 e **Rf**: 0,43, respectivamente (**Figura 49C**).

4.2.2 Óleo volátil

Na análise do óleo volátil das folhas de *A. crassiflora*, por **CCD**, o sistema cromatográfico que permitiu separação mais adequada dos constituintes foi aquele que empregou fase móvel constituída de diclorometano (**Figura 50**). O óleo apresentou manchas correspondentes àquelas dos padrões de *E*-cariofileno (**Rf**: 0,55) e β -pineno (**Rf**: 0,35) (**Figura 50**).

Figura 50 - Cromatograma em **CCD** do óleo volátil (**OV**) de folhas de *Annona crassiflora* Mart. [fm: diclorometano. **Revelação**: reativo anisaldeído sulfúrico. **Padrões**: *E*-cariofileno (**car**) - **Rf**: 0,55, β -pineno (**pin**) - **Rf**: 0,35]

4.3 Fracionamento dos alcalóides de *A. crassiflora*

Os alcalóides totais de *A. crassiflora* foram ativos nas formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Resultaram 20 frações (**A1-A20**) do seu fracionamento, por **CC** (item 3.2.3.2) (**Figura 51**).

Figura 51 - Esquema de fracionamento dos alcalóides totais de *Annona crassiflora* Mart.

Entre as frações obtidas, 5 frações foram ativas (**Tabela 5**) (**item 4.7.1**). A fração **A17** (103,8 mg) apresentou cristalização abundante e um pico majoritário, no tempo de retenção de 45 minutos, no cromatograma (**Figura 52**).

Figura 52 - *Annona crassiflora* Mart. - Cromatograma da fração alcaloídica **A17**. Pico majoritário (↑) - tempo de retenção (t_R): 45min [coluna: Gemini- Phenomenex® (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Eluente: solução de ácido trifluoracético 0,1% (v/v) e acetonitrila (81:19). Detecção: UV 254 nm]

O fracionamento de **A17**, por **CLAE** semipreparativa (**item 3.2.3.4**), resultou em sete subfrações, que foram denominadas **A17-1** a **A17-7** (**Figura 51**).

As frações **A17-3** (4,0 mg) e **A17-6** (23,6 mg) corresponderam, respectivamente, a um composto minoritário e ao composto majoritário isolados da fração **A17**. Na

denominação dos compostos isolados manteve-se o nome das subfrações, tendo apresentado tempos de retenção de, respectivamente, 25,8 e de 45 min, conforme verificado nos cromatogramas (**Figuras 53 e 54**).

Figura 53 - *Annona crassiflora* Mart. Cromatograma CLAE do composto isolado **A17-3**. Pico com tempo de retenção (t_R) de 25,8 min ($\uparrow$) [coluna: Gemini - Phenomenex® (250 x 4,6 mm, 5 μ m). Eluente: solução de ácido trifluoracético 0,1% (v/v) - acetonitrila (81:19). Detecção: UV 254 nm]

Figura 54 – *Annona crassiflora* Mart. Cromatograma obtido da CLAE do composto isolado **A17-6**. Pico com tempo de retenção (t_R) de 45,0 min ($\uparrow$) [coluna: Gemini - Phenomenex® (250 x 4,6 mm, 5 μ m). eluente: solução de ácido trifluoracético 0,1% (v/v) - acetonitrila (81:19). Detecção: UV 254 nm]

4.4 Registros de espectro dos compostos purificados

4.4.1 Registros de espectros do composto A17-3

Os registros dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) e de carbono 13 (RMN ^{13}C) do composto **A17-3** encontram-se, respectivamente, nas Figuras 55 e 56.

Figura 55 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de RMN ^1H do composto **A17-3** (CD_3OD , δ , 300 MHz)

Figura 56 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de RMN ^{13}C do composto **A17-3** (CD_3OD , δ , 75,5 MHz)

Na análise do cromatograma do composto **A17-3** (**Figura 57**), obtido por **CLAE-IES-EM²**, no modo positivo, o pico entre 7,9 e 8,3 min, apresentou a fragmentação observada, no espectro de massas disposto na **Figura 58**.

Figura 57 - *Annona crassiflora* Mart. Cromatograma de íons da molécula do composto **A17-3**, por **CLAE-IES-EM²**. [coluna: Gemini - Phenomenex[®] (250 x 4,6 mm, 5 μm). eluente: solução de ácido trifluoracético 0,1% (v/v) - acetonitrila (81:19). Detecção: UV 254 nm]

O padrão de fragmentação de **A17-3** mostrou a ocorrência de sinal de íon molecular $[M+H]^+$ com valor de m/z de 282 e de fragmento com m/z de 265 (**Figura 58**).

Figura 58 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de massas (EM) da molécula do composto **A17-3**

Na **Figura 59**, observa-se uma segunda fragmentação EM^2 do pico m/z 282 apresentando pico intenso de m/z 265.

Figura 59 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de massas da segunda fragmentação (EM^2) do íon molecular $[M+H]^+$ m/z 282 da molécula do composto **A17-3**

4.4.2 Registros de espectros do composto A17-6

Os registros dos espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e de carbono 13 (RMN ^1H , RMN ^{13}C) e de intensificação de sinal sem distorção por transferência de polarização (DEPT), referentes ao composto isolado **A17-6**, foram dispostos nas **Figuras 60 a 62**, respectivamente.

Figura 60 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de RMN ^1H do composto **A17-6** (CD_3OD , δ , 300 MHz)

Figura 61 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de RMN ^{13}C do composto A17-6 (CD_3OD , δ , 75,5 MHz)

Figura 62 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de RMN ^{13}C (DEPT 135) do composto A17-6 (CD_3OD , δ , 75,5 MHz)

Os espectros de correlação heteronuclear de único *quantum* (**HSQC**) e de correlação heteronuclear a múltiplas ligações (**HMBC**) da fração **A17-6** foram apresentados nas **Figuras 63 e 64**.

Figura 63 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de **HSQC** do composto **A17-6** (CD₃OD, δ , 300 MHz)

Figura 64 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de **HMBC** do composto **A17-6**, (CD₃OD, δ , 300 MHz)

Na análise da fração alcaloídica **A17-6** por **CLAE-IES-EM²**, o pico entre 13,3 e 15 min, no cromatograma (**Figura 65**), apresentou as fragmentações verificadas nos espectros de massas mostrados nas **Figuras 66 e 67**.

Figura 65 - *Annona crassiflora* Mart. Cromatograma de íons da molécula do composto **A17-6**, por **CLAE-IES-EM²**. [coluna: Gemini - Phenomenex[®] (250 x 4,6 mm, 5 µm). eluente: solução de ácido trifluoracético 0,1% (v/v) - acetonitrila (81:19). Detecção: UV 254 nm]

O padrão de fragmentação da fração **A17-6** (pico: 13,3 -15 min) apresentou sinal de íon molecular com valor de m/z de 312 (**Figura 66**), e dois fragmentos com m/z de 263 e 295 (**Figuras 66 e 67**).

Figura 66 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de massas (**EM**) da molécula do composto **A17-6**

Na **Figura 67**, observa-se uma segunda fragmentação **EM²** do pico m/z 295 apresentando pico intenso de m/z 263.

Figura 67 - *Annona crassiflora* Mart. Espectro de massas da segunda fragmentação (EM^2) do íon molecular $[M+H]^+$ m/z 312 da molécula do composto **A17-6**

4.5 Dados espectroscópicos e físico-químicos dos compostos isolados

4.5.1 Composto A17-3

Fórmula molecular: $C_{17}H_{14}O_3N$

Massa molecular: 281

RMN 1H (CD_3OD , ppm): 7,97 (*d*, CH); 6,79 (CH); 6,78 (*d*, CH); 6,75 (*d*, CH); 6,65 (*s*, CH); 6,12 (*s*, CH); 5,99 (CH) (O-CH₂-O); 4,4 (*m*, CH), 3,71 (*m*, CH); 3,22 (*m*, CH)

RMN ^{13}C (CD_3OD , ppm): 158,90; 150,01; 144,06; 134,90; 130,11; 125,29; 123,03; 117,72; 116,09; 115,74; 107,56; 102,67; 54,43; 42,91; 34,71; 26,47

4.5.2 Composto A17-6

Fórmula molecular: $C_{18}H_{17}O_3N$

Massa molecular: 311

RMN 1H (CD_3OD , ppm): 7,83 (*d*, CH), 6,72 ppm (*d*, CH), 6,71 ppm (*s*, CH); 6,08 (*s*, CH), 5,95 (*s*, CH) (O-CH₂-O); 4,29 (*m*, CH), 4,04 (*s*, 3H) (OCH₃), 3,73 (*m*, CH), 3,25 (*m*, CH), 2,94 (*m*, 4H)

RMN ^{13}C (MeOD, ppm): 102,63; 60,12; 54,55; 50,16; 49,97; 49,59; 49,30; 49,02; 48,74; 48,45; 42,80; 34,79; 21,76

4.6 Composição do óleo volátil de folha de *A. crassiflora*

O cromatograma do óleo volátil, obtido das folhas de *A. crassiflora*, por hidrodestilação (item 3.2.2.3), foi disposto na **Figura 68**.

Figura 68 - *Annona crassiflora* Mart. - Cromatograma do óleo volátil das folhas, por **CG**, nas condições descritas no item 4.2.3.3. [Compostos majoritários: picos: *E*-cariofileno (10) (t_R : 23,1 min), α -amorfeno (19) (t_R : 25,7 min), β -germacreno (30) (t_R : 28,4 min) (ver Tabela 4)]

Os 41 constituintes identificados no óleo volátil de *A. crassiflora*, elencados em ordem crescente de eluição, corresponderam a 83,2% da sua composição (**Tabela 4**). Seis deles encontraram-se na forma de traços (<0,1 %).

Os sesquiterpenos foram os constituintes predominantes no óleo de *A. crassiflora* (81,7%), sendo que os compostos majoritários foram o α -amorfeno (19) (43,6%), seguido de: *E*-cariofileno (10) (17,7%) e β -germacreno (30) (5,3%). Os demais sesquiterpenos (15,9%) ocorreram em proporção inferior a 5%.

Tabela 4 - Constituintes químicos (%) do óleo volátil de folhas de *Annona crassiflora* Mart.

Nº	constituente ^a	tempo de retenção** (min)	IR ^b	IR ^c	%
1	α -tujeno	5,1	933	930	0,2
2	β -pineno*	6,2	977	979	0,6
3	δ -elemeno	19,7	1336	1338	0,8
4	α -cubebeno	20,2	1347	1348	tr
5	α -ylangeno	21,2	1373	1375	0,6
6	β -bourboneno	21,6	1382	1388	1,8
7	β -cubebeno	21,8	1388	1388	0,6
8	β -elemeno	22,0	1390	1390	0,7
9	β -isocomeno	22,6	1406	1408	0,2
10	<i>E</i> -cariofileno*	23,1	1417	1419	17,7
11	β -copaeno	23,4	1426	1432	0,6
12	isobutanoato de isobornila	23,6	1431	1433	0,2
13	trans- α - bergamoteno	23,8	1435	1434	tr
14	α -guaieno	24,0	1441	1439	0,1
15	espirolepechineno	24,4	1450	1451	2,2
16	α -patchuleno	24,7	1457	1456	0,4
17	allo- aromadendreno	24,8	1460	1460	tr
18	cis-cadina-1,6,4- dieno	24,9	1463	1463	0,2
19	α -amorfeno	25,7	1482	1484	43,6
20	aristoloqueno	25,8	1484	1488	tr
21	eudesmadieno	25,9	1489	1490	0,2
22	biciclogermacreno	26,2	1496	1500	0,2

Tabela 4 - continuação

	constituente ^a	tempo de retenção* (min)	IR ^b	IR ^c	%
23	γ-amorfenos	26,3	1498	1495	0,3
24	premnaspirodieno	26,4	1502	1506	0,9
25	α-cupreneno	26,5	1504	1505	0,2
26	δ-amorfenos	26,8	1511	1512	0,2
27	β-curcumenos	27,1	1518	1515	0,4
28	7-epi-α-selineno	27,2	1521	1522	1,4
29	naftaleno	27,7	1535	1534	0,1
30	β-germacreno	28,4	1554	1561	5,3
31	espatulenol	29,2	1574	1578	0,7
32	hidrato de trans- sesquisabineno	29,4	1579	1579	0,8
33	globulol*	29,7	1588	1590	0,2
34	rosifoliol	30,1	1598	1600	0,1
35	4a(2H)- naftalenol	31,1	1625	1631	0,1
36	1,7-diepi-α- cedrenal	31,5	1634	1641	tr
37	epi-α-cadinol	31,6	1639	1640	0,5
38	hinesol	31,8	1643	1641	0,1
39	1-α-cadinol	32,1	1651	1654	0,7
40	kusinol	33,2	1682	1680	tr
41	éster de fenilmetila	36,2	1766	1760	0,3

^a Identificação por comparação com espectro de **CG-EM**, **IR** com a biblioteca **NIST** e com Adams (2007), **IR^b** (índice de retenção obtido em coluna capilar HP-5MS com base na série de alcanos e calculado de acordo com Van Den Dool e Kratz (1963), **IR^c**: de acordo com Adams (2007), * substância de referência, **na coluna HP-5MS, tr: traços (< 0,1 %)

O óleo apresentou, ainda, os dois monoterpenos α -tujeno (**1**) (0,2%) e β -pineno (**2**) (0,6%), que corresponderam a 0,8 % dos constituintes (**Tabela 4**).

Os demais compostos identificados e de natureza não terpênica (**Tabela 4**) somaram 0,7% do óleo.

4.7 Atividades antiprotozoária e antimicobacteriana *in vitro*

Os resultados da avaliação das atividades anti-*Leishmania*, anti-*Trypanosoma* e antimicobacteriana *in vitro*, dos **AT** de *A. crassiflora* Mart., das frações alcalóidicas **A1-A20**, dos compostos isolados **A17-3**, **A17-6** e do óleo volátil foram apresentados, nos itens seguintes.

4.7.1 Atividade anti-*Leishmania in vitro* dos alcalóides totais de folhas de *A. crassiflora* e das frações originadas do seu fracionamento

A **Tabela 5** mostra os resultados da avaliação da atividade anti-*Leishmania in vitro* dos alcalóides totais de *A. crassiflora* Mart. e das frações (**A1-A20**), frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*.

Os alcalóides totais, bem como as frações **A14**, **A15**, **A16**, **A17** e **A19**, testados à concentração de 200 $\mu\text{g/ mL}$, levaram à morte de 100% dos parasitas. As demais frações foram em sua maioria inativas ou demonstraram atividade reduzida (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Atividade anti-*Leishmania in vitro* (% morte) dos alcalóides totais (AT) de folhas de *Annona crassiflora* Mart. e das frações A1 - A20, frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* [MHOM/BR/1972/LD]

<i>Annona crassiflora</i> Mart. AT/ fração alcaloídica (A) (200 µg/ mL)	<i>Leishmania</i> (L.) <i>infantum chagasi</i> formas promastigotas % morte
AT	100
A1	0
A2	0
A3	0
A4	0
A5	0
A6	0
A7	<50
A8	0
A9	0
A10	0
A11	0
A12	0
A13	50
A14	100
A15	100
A16	100
A17	100
A18	0
A19	100
A20	50
Substância de referência	
pentamidina	100

A1- A20: frações alcaloídicas originadas do fracionamento dos AT, por CC,
Concentrações testadas: AT/ frações A1-A20: 200 µg/ mL/ pentamidina: 100 µg/ mL

4.7.2 Concentração efetiva de 50% (CE_{50}) dos alcalóides totais de folhas de *Annona crassiflora* Mart. e dos compostos isolados A17-3 e A17-7, frente às formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* e toxicidade frente às células de tecido conjuntivo de camundongo

A **Tabela 6** mostra as concentrações efetivas dos alcalóides totais (**AT**) das folhas de *A. crassiflora* e das frações originadas do fracionamento de **A17**, que causaram a morte de 50% das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* (CE_{50}).

O composto isolado **A17-3** foi 2,5 vezes mais ativo (CE_{50} : 3,63 µg/ mL), que **A17-6** (CE_{50} : 9,34 µg/ mL), tendo mostrado nível de atividade superior, também, em relação aos **AT** da espécie (CE_{50} : 18,85 µg/ mL).

No tocante à toxicidade, **A17-3** foi menos citotóxico (CC_{50} : 27,01 µg/ mL) que **A17-6** (CC_{50} : 18,28 µg/ mL), em células de camundongos. Ambos os compostos apresentaram maior nível de citotoxicidade que os **AT** (**Tabela 6**).

Por sua vez, os **AT** e **A17-3** apresentaram menor nível de citotoxicidade, em relação à pentamidina (CC_{50} : 18,83 µg/ mL), enquanto que **A17-6** teve nível equivalente ao composto de referência (CC_{50} : 18,28 µg/ mL) (**Tabela 6**).

Relacionou-se a atividade citotóxica (CC_{50}) à atividade anti-*Leishmania* (CE_{50}), calculando-se o índice de seletividade ($IS = CC_{50} / CE_{50}$). Os valores foram mostrados na **Tabela 6**.

O maior **IS** foi da pentamidina (**IS**: 11,1), seguido daquele de **A17-3** (**IS**: 7,4), de **A17-6** (**IS**: 1,9) e dos **AT** (**IS**: 2,2), que tiveram os mais baixos índices.

Tabela 6 - Concentração efetiva (**CE₅₀**) (µg/mL/ µM) dos alcalóides totais de folha de *Annona crassiflora* Mart. e dos compostos isolados **A17-3** e **A17-6**, frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* [MHOM/BR/1972/LD], e citotoxicidade frente às células de tecido conjuntivo de camundongo NCTC clone 929 (ATCC)

<i>Annona crassiflora</i> Mart.	<i>Leishmania</i> (L.) <i>infantum</i> <i>chagasi</i>		Células de tecido conjuntivo de camundongo NCTC clone 929		Índice de Seletividade
AT (150 µg/mL)/ compostos isolados (150 µM)	formas promastigotas CE ₅₀ (IC: 95%)		CC ₅₀ (IC: 95%)		IS
	(µg/ mL)	µM	(µg/ mL)	µM	
AT	18,85 (15,97 - 22,94)	-	42,23 (31,93 - 55,86)	-	2,2
A17-3	3,63 (3,51 - 3,76)	12,93 (12,50 - 13,37)	27,01 (18,61 - 39,20)	96,12 (66,22 - 139,50)	7,4
A17-6	9,34 (8,49 - 10,27)	30,03 (27,30 - 33,03)	18,28 (14,60 - 22,89)	58,79 (46,96 - 73,60)	1,9
Substância de referência pentamidina (*)	1,69 (14,10 - 20,27)	4,96 (41,42 - 59,55)	18,83 (13,1 - 26,9)	55,32 (33,48 - 79,02)	11,1

CE₅₀: concentração efetiva que causou a morte de 50% dos parasitas; **CC₅₀**: concentração efetiva que diminuiu, em 50%, a viabilidade das células **NCTC clone 929**, **IC**: intervalo de confiança de 95%, **AT**: alcalóides totais, **A17-3** e **A17-6**: compostos isolados; **(*)**: concentração testada: 100 µg/ mL; [-]: não calculável; **IS**: Índice de Seletividade = CC₅₀/ CE₅₀

4.7.3 Concentração efetiva de 50% (CE₅₀) do óleo volátil de folhas de *Annona crassiflora* Mart. frente às formas promastigotas de quatro espécies de *Leishmania* e às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*

As concentrações efetivas do óleo volátil das folhas de *A. crassiflora*, que causaram a morte de 50% (CE₅₀) das formas promastigotas das espécies *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *L. (V.) braziliensis*, (L.) *infantum chagasi*, *L. (L.) major* e das formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram dispostas na **Tabela 7**.

Tabela 7 - Concentração efetiva de 50% (**CE₅₀**) (µg/mL) do óleo volátil de *Annona crassiflora* Mart. frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *L.* (V.) *braziliensis* (MHO/BR/75/M2903), *L.* (L.) *infantum chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) e *L.* (L.) *major* (MHOM/1L/80/Fredlin) e às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y)

<i>Annona crassiflora</i> Mart. (500 µg/ mL)	CE ₅₀ (µg/ mL) (IC 95%)				
	<i>L.</i> (L.) <i>amazonensis</i>	<i>L.</i> (V.) <i>braziliensis</i>	<i>L.</i> (L.) <i>infantum chagasi</i>	<i>L.</i> (L.) <i>major</i>	<i>T. cruzi</i>
	promastigotas			tripomastigotas	
óleo volátil*	39,19 (36,08 - 42,56)	31,69 (26,75 - 37,53)	25,97 (20,87 - 32,32)	28,62 (23,37 - 35,06)	5,31 (3,99 - 7,05)
Substância de referência **					
pentamidina	0,16 (0,15 - 0,16)	0,06 (0,05 - 0,06)	0,22 (0,17 - 0,27)	0,16 (0,15 - 0,18)	-
benzonidazol	-	-	-	-	45,02 (29,31 - 68,42)

CE₅₀: concentração efetiva 50%; **IC 95%**: intervalo de confiança de 95%; (**) **Substância de referência** (concentração-teste): 100 µg/ mL ; (-): não determinado

Os resultados mostraram que o óleo volátil de *A. crassiflora* apresentou nível moderado de atividade, frente às quatro espécies de *Leishmania*, com **CE₅₀** variando de 25,97 a 39,19 µg/ mL. O menor valor de **CE₅₀** foi verificado em *L. (L.) infantum chagasi* (**CE₅₀**: 25,97 µg/ mL) (**Tabela 7**).

Comparado ao padrão de benznidazol (**CE₅₀**: 45,02 µg/ mL), o nível de atividade do óleo foi alto, nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*, tendo mostrado **CE₅₀** de 5,31 µg/ mL (**Tabela 7**).

4.7.4 Atividade antimicobacteriana dos alcalóides totais e das frações alcaloídicas de *A. crassiflora*

As concentrações inibitórias mínimas (**CIM**) dos **AT** de *A. crassiflora* e das frações alcaloídicas, provenientes do fracionamento, destes, por **CC** (item 3.2.3.2.), determinadas frente ao *M. tuberculosis* e ao *M. smegmatis*, foram dispostas na **Tabela 8**.

Tabela 8 - Concentração inibitória mínima (**CIM**) (µg/ mL) dos alcalóides totais de *Annona crassiflora* Mart. e das frações alcaloídicas (**A1-A20**) frente ao *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294) e ao *M. smegmatis* (ATCC 35798).

<i>Annona crassiflora</i> Mart. AT/ Fração	CIM (µg/ mL)	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
AT	64	>128
A1	>128	>128
A2	>128	>128
A3	>128	>128
A4	>128	>128
A5	>128	>128
A6	>128	>128
A7	>128	>128

Tabela 8 - continuação

<i>Annona crassiflora</i> Mart. AT/ Fração alcaloídica	CIM ($\mu\text{g/ mL}$)	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
A8	>128	>128
A9	>128	>128
A10	>128	>128
A11	nd	nd
A12	nd	nd
A13	nd	nd
A14	32	128
A15	128	>128
A16	64	>128
A17	64	>128
A18	128	>128
A19	>128	>128
A20	>128	>128
Substância de referência (*)		
isoniazida	0,25	8

AT: alcalóides totais; **A17-3** e **A17-6**: compostos isolados a partir da fração **A17**, **CIM**: Concentração inibitória mínima, **nd**: **CIM** não determinada, (*): faixa de concentração-teste: 0,03 - 128 $\mu\text{g/ mL}$

Frente ao *M. tuberculosis*, a fração **A14** foi a mais ativa (**CIM**: 32 $\mu\text{g/ mL}$), com metade do **CIM** apresentado pela fração alcaloídica total (**AT**).

Os **AT** e as frações **A16** e **A17** apresentaram idêntico **CIM** (64 $\mu\text{g/ mL}$) (**Tabela 8**), enquanto que as demais frações tiveram **CIM** de valor muito alto ($\geq 128 \mu\text{g/ mL}$).

No caso do *M. smegmatis*, tanto os **AT**, quanto as frações alcaloídicas testadas valores de **CIM** iguais ou superiores a 128 $\mu\text{g/ mL}$ (**Tabela 8**).

As **CIM** dos compostos isolados **A17-3** e **A17-6** avaliadas frente às duas espécies de *Mycobacterium* encontram-se, na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Concentração inibitória mínima (**CIM**) ($\mu\text{g/ mL}$) dos compostos **A17-3** e **A17-6** isolados de *Annona crassiflora* Mart., frente ao *Mycobacterium tuberculosis* (ATCC 27294) e ao *Mycobacterium smegmatis* (ATCC 35798)

<i>A.crassiflora</i> Mart. compostos isolados (128 $\mu\text{g/ mL}$)	CIM ($\mu\text{g/ mL}$)	
	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium smegmatis</i>
A17-3	128	>128
A17-6	>128	>128
Substância de referência*		
isoniazida	0,25	8

A17-3 e **A17-6**: compostos isolados, a partir da fração **A17**, **CIM**: Concentração inibitória mínima, * faixa de concentração-teste: 0,03-128 $\mu\text{g/ mL}$

Os **AT** foram mais ativos (64 $\mu\text{g/ mL}$) (**Tabela 8**), que os dois compostos isolados, cujos valores de **CIM** foram iguais ou superiores a 128 $\mu\text{g/ mL}$ frente às duas espécies do *Mycobacterium* (**Tabela 9**).

5 DISCUSSÃO

A espécie *Annona crassiflora* Mart. foi selecionada, para o presente estudo, em função das atividades anti-*Leishmania* e anti-*Trypanosoma in vitro* verificadas em triagem realizada anteriormente (TEMPONE et al., 2005), tendo despertado o interesse no conhecimento mais aprofundado acerca dos constituintes bioativos.

Adicionalmente, a revisão bibliográfica mostrou reduzido número de publicações referentes à composição alcaloídica da espécie, havendo registro do isolamento de oito alcalóides, desde a década de 80 (EGYDIO, 2009, GONÇALVES et al., 2009, HOCQUEMILLER et al., 1982, LEBOEUF et al., 1982).

No tocante à composição do óleo volátil, constatou-se não haver registro de análise anterior, na literatura. O mesmo podendo ser dito em relação a sua atividade antiprotozoária.

O rendimento da extração dos alcalóides totais (1,65% m/ m) das folhas foi superior àquele obtido, para a mesma espécie, em trabalho realizado anteriormente (0,45% m/ m) (TEMPONE et al., 2005). Tal diferença pode ser atribuída a fatores relacionados com as variações edáfico-climáticas (HARBORNE & DEY, 1997, ROBBERS et al., 1996), uma vez que os exemplares foram coletados em épocas anuais e locais distintos. No presente estudo, o material vegetal foi obtido no Horto Florestal Andrade Silva, no município de Avaré, SP, enquanto que, no trabalho anterior, a coleta deu-se na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, SP (TEMPONE et al., 2005).

No detalhamento dos possíveis fatores implicados na variação do teor e dos metabólitos presentes, nas espécies vegetais, estão: temperatura, composição e pH do solo, altitude, presença de microrganismos, e outros fatores que podem influenciar na biossíntese vegetal (OLIVEIRA et al., 2005, SIMÕES et al., 2004, HARBORNE & DEY, 1997, ROBBERS et al., 1996).

No gênero *Annona*, o rendimento dos alcalóides nas folhas mostrou-se variável. Em *A. squamosa*, ERDELYI (2008), constatou a variação sazonal do rendimento, o qual foi de 1,46%, no verão e 0,57%, no outono, enquanto que, no outono, EGYDIO (2009) verificou ter sido muito inferior, tanto nos exemplares de *A. crassiflora* coletados em Mogi-Guaçu, SP (0,02% m/ m), quanto naqueles de Brasília

(0,30% m/ m).

Nos caules, em geral, foram reportados rendimentos inferiores àqueles encontrados nas folhas como, por exemplo, naqueles de *A. hypoglauca* Mart. (0,28% m/ m) (RINALDI, 2007) e, até mesmo, da própria *A. crassiflora* (0,11% m/ m) (HOCQUEMILLER et al., 1982). Nos caules de *A. coriacea*, ao longo de um ano, os teores variaram entre 0,06 e 0,38% (SIQUEIRA et al., 2011, SIQUEIRA, 2010).

Igualmente, em outros órgãos de *Annona*, como em raiz e cascas de lenho, os rendimentos em alcalóides foram baixos (QUEIROZ et al., 1996).

A produção de alcalóides no vegetal está relacionada à defesa contra a herbivoria e os microrganismos, sendo as folhas, um dos órgãos mais críticos, quanto à necessidade de defesa em relação a esse tipo de dano, produzindo-os em maior teor, seguidas das sementes, que garantem a dispersão durante a reprodução da planta. Entretanto, nos frutos os teores foram baixos (HARBORNE & DEY, 1997).

Entre os mecanismos de proteção das plantas, por meio dos alcalóides, estão: a diminuição da palatabilidade, a ação antimicrobiana e a absorção da radiação solar pelos núcleos aromáticos de suas moléculas (HARBORNE, 1993, WINK, 1993).

Além dos fatores peculiares à espécie e ao local de coleta, a variação no rendimento dos alcalóides, também, pode ser atribuída ao processo empregado na sua obtenção.

Considerando o óleo volátil das folhas de *A. crassiflora*, o teor foi reduzido (0,06% m/ m). Entretanto, folhas de outras espécies apresentaram valores de teor ainda inferiores (0,01% m/m), como as folhas de *A. foetida* e de *A. muricata* (COSTA et al., 2009, BOYOM et al, 1996). Em contraste, *A. senegalensis*, *A. cherimolia* e *A. reticulata* tiveram teores superiores, tendo alcançado 1,42% m/ m, nesta última (CELESTINE et al., 2010, OGUNWANDE et al., 2006, RIOS et al., 2003).

Comparativamente as outras oito espécies analisadas, e, em relação a outros órgãos vegetais, *A. crassiflora* situou-se entre aquelas de menor teor em óleo (CELESTINE et al., 2010, ANDRADE et al., 2007, RIOS et al., 2003, ANDRADE et al., 2001, FOURNIER et al., 1999, JIROVETZ et al., 1998, BOYOM et al., 1996, BARTLEY, 1987, WYLLIE et al., 1987, MACLEOD; PIERIS, 1981). Nas cascas de raiz, o maior teor constatado foi em *A. senegalensis* (1 %) (BOYOM et al., 1996), enquanto que, em frutos e flores; foi de 0,83 % e 0,39 %, em *A. cherimolia* (RIOS et

al., 2003), respectivamente.

Na família e no gênero em questão, o mesofilo foliar apresenta, como estruturas secretoras, as células oleíferas (METCALFE & CHALK, 1988, CRONQUIST, 1981), entretanto, em espécies que foram estudadas mais detalhadamente, do ponto de vista anatômico, verificou-se a sua ocorrência, em número reduzido (ERDELYI, 2008, BEIGUELMAN, 1961), o que possivelmente, explique o baixo rendimento em óleo, encontrado nestas espécies.

Os alcalóides representam uma das classes mais importantes de metabólitos presentes, na família Annonaceae e no gênero *Annona* (RINALDI, 2007, GUINAUDEAU, 1994, LEBOEUF et al., 1982^a). Em ambos os táxons, predominaram aqueles de núcleo isoquinolínico (**Quadros 1-16**) (GUINAUDEAU, 1994, LEBOEUF et al., 1982^a).

Considerando a pesquisa sistemática dos alcalóides bioativos do gênero *Annona*, o estudo químico das folhas de *A. crassiflora* foi direcionado para a obtenção dos alcalóides totais, com vistas ao isolamento de constituintes com atividade antiprotozoária e antimicobacteriana e, adicionalmente, para a obtenção do óleo volátil, visando à identificação dos componentes e realização dos testes biológicos *in vitro*.

O processo de isolamento de constituintes dos **AT** foi biomonitorado pela avaliação da atividade anti-*Leishmania in vitro* frente às formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*. Além disso, as frações e os compostos isolados foram avaliados quanto à atividade antimicobacteriana *in vitro*.

Em linhas gerais, uma vez confirmada a atividade anti-*Leishmania in vitro* dos **AT** de *A. crassiflora*, efetuou-se o fracionamento em coluna cromatográfica, sendo que cinco frações resultantes foram as mais ativas (100% morte). Destas, somente três (**A14**, **A16** e **A17**) apresentaram massa suficiente para o refracionamento.

O fracionamento de **A14** e de **A16** originou subfrações de massa reduzida e composição complexa, tendo inviabilizado o prosseguimento do trabalho com elas, ainda que por técnicas instrumentais.

Sendo assim, a investigação foi realizada com a fração **A17**, cujo refracionamento mostrou-se compatível com a massa disponível e o grau de

complexidade acusado, na CLAE analítica, além de ter cristalizado de forma espontânea. A partir dela foram separados os dois compostos (**A17-3** e **A17-6**), com maior grau de pureza.

Pelo espectro de **RMN ^1H** constatou-se que o composto minoritário **A17-3** (4 mg) possui um dubleto em 7,97 ppm, com constante de acoplamento (J) de 8,4 Hz correspondente ao **H-11**, um dubleto em 6,79 ppm, com J 2,4 Hz do **H-8**, um dubleto em 6,78 ppm com J 8,7 Hz do **H-10**, um singlete em 6,65 ppm do **H-3**, bem como os singletos em 6,12 e 5,99 ppm correspondentes aos hidrogênios do grupo metilenodioxí $\text{O}-\text{CH}_2-\text{O}$; conforme se verificou, igualmente, pela análise por **RMN ^{13}C** .

Os valores dos deslocamentos químicos obtidos nos registros de espectros de **RMN ^1H** e de **RMN ^{13}C** do composto isolado **A17-3**, em metanol deuterado, foram compatíveis com a estrutura da noraporfina anolobina (**Figura 69**).

Figura 69 - *Annona crassiflora* Mart - Estrutura química da anolobina [37].

A comparação destes dados, com aqueles descritos na literatura para a anolobina [37] (GUO et. al., 2011, ROBLOT et. al., 1983) corroborou com a indicação anterior (**Tabelas 10 e 11**).

Tabela 10 - Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de RMN ^1H do composto isolado **A17-3** (300 MHz, CD_3OD) e da anolobina (ROBLOT et. al., 1983, GUO et. al., 2011)

H	A17-3	anolobina		
	CD_3OD	$\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$ (1:1)	$\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$	DMSO
	Roblot et. al., 1983			Guo et. al., 2011
	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)	δ (ppm), J (Hz)
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3	6,65 s	6,51 s	6,57 s	6,55 s
3 ^a	-	-	-	-
4	2,9 - 3,1 m	ni	ni	ni
	2,9 - 3,1 m	ni	ni	ni
5	3,22 m	ni	ni	ni
	3,71 m	ni	ni	ni
6	4,4 m	ni	ni	3,68 dd $J=4,8, 14,1$
7	2,9 - 3,1 m	ni	ni	ni
	2,9 - 3,1 m	ni	ni	ni
7 ^a	-	-	-	-
8	6,79 d $J=2,4$	6,72 d $J=3$	7,13 d $J=3$	6,68 s
9	-	-	-	-
10	6,78 d $J=8,7$	6,80 dd $J=9,3$	7,2 dd $J=8,3$	6,69 br d $J=8,1$
11	7,97 d $J=8,4$	7,95 d $J=9$	8,26 d $J=8$	7,78 d $J=8,1$
11 ^a	-	-	-	-
11b	-	-	-	-
11c	-	-	-	-
O-CH ₂ -O	6,12 s	6,06 d $J=1,5$	6,12 d $J=1,5$	6,07 s
	5,99 s	5,92 d $J=1,5$	5,97 d $J=1,5$	5,93 s

ni: deslocamentos químicos não informados, na literatura consultada

Tabela 11 - Comparação dos deslocamentos químicos (δ) de **RMN ^{13}C** do composto isolado **A17-3** (75 MHz, CD_3OD) e da anolobina (ROBLOT et. al., 1983, GUO et. al., 2011)

C	A17-3	anolobina	
	CD ₃ OD	DMSO	
	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	Roblot et. al., 1983	Guo et. al., 2011
		δ (ppm), <i>J</i> (Hz)	δ (ppm), <i>J</i> (Hz)
1	144,06	141,0	141,3
2	150,01	146,1	146,5
3	107,56	106,8	107,0
3 ^a	125,29	127,0	128,0
4	26,47	29,0	29,3
5	42,91	42,8	43,2
6	54,43	53,2	55,3
7	34,71	36,7	37,0
7 ^a	134,90	137,3	137,6
8	115,74	113,7	114,0
9	158,90	157,0	157,3
10	116,09	115,1	115,4
11	130,11	128,1	128,4
11 ^a	123,03	121,9	122,2
11b	117,72	115,9	116,2
11c	130,11	127,7	127,4
O-CH ₂ -O	102,67	100,4	100,7

A estrutura foi confirmada, ainda, pela análise por **CLAE-IES-EM²**, tendo-se verificado a presença do íon molecular de m/z 282, estando de acordo com aquele esperado para a molécula proposta. Além deste pico, observou-se outro de m/z 265, provavelmente, originado a partir da perda de um grupo hidroxila ou de amônia.

Na **Figura 70**, ilustrou-se a formação dos picos de m/z 282 e de m/z 265, a partir da perda de uma molécula de amônia.

Figura 70 - Fragmentos da molécula **A17-3** (anolobina)

No espectro de massas da segunda fragmentação (EM^2) do íon molecular $[\text{M}+\text{H}]^+$ m/z 282, o pico intenso de m/z 265 é formado por perda de metanol, a partir do fragmento m/z 295.

Na **Figura 71**, foram apresentadas as formas de ressonância do íon referente ao pico de m/z 265.

Figura 71 - Formas de ressonância relativas ao pico m/z 265 observado no espectro de massas da segunda fragmentação (EM^2) do íon molecular de **A17-3** (anolobina)

Este representa o primeiro relato do isolamento de anolobina, a partir de *A. crassiflora*. A sua ocorrência no gênero foi anteriormente reportada, a partir das espécies: *A. squamosa*, *A. cherimolia* e *A. glabra* (**Quadro 4**) (CHEN et al., 1997; YANG et al., 1991, 1974^a, 1973, 1970^b, SIMEON et al., 1990, 1989, LEBOEUF et al., 1982), tendo sido isolado de caule, cascas de caule e raiz.

No tocante à fração **A17-6**, verificou-se corresponder ao composto majoritário de **A17**. A sua análise por **RMN** ^1H mostrou tratar-se de molécula que apresenta: 3 hidrogênios aromáticos, tendo em vista a presença de um dubleto em 7,83 ppm com $J = 8,7$ Hz (1H), um dubleto em 6,72 ppm (1H) que se sobrepõe com o singlete em 6,71 ppm (1H); um sistema metilenodioxí constituído de um singlete em 6,08 ppm (1H) e outro singlete em 5,95 ppm (1H).

Na região alifática, estão presentes um multipeto em 4,29 ppm, que por integração representa 1H, um singeto em 4,04 ppm, que por integração representa 3H, característico de metoxila, um multipeto em 3,73 ppm, um multipeto em 3,25 ppm, que se sobrepõe com o sinal do metanol deuterado, e um multipeto em 2,94 ppm, que por integração, representa 4H.

No registro de espectro de RMN ^{13}C observa-se que **A17-6** apresenta 18 carbonos, com 12 carbonos aromáticos e 5 carbonos na região alifática, sendo um alcalóide e de núcleo noraporfínico.

Notam-se, ainda, um sinal em 60,12 ppm, característico de metoxila, e o sinal em 102,63 ppm, característico de carbono de ponte metilenodioxí.

Frente a estes dados, a pesquisa na literatura apontou para as estruturas da xilopina [52] e da cissaglaberrimina (**Figura 72**) (DA SILVA et al., 2009, BARBOSA-FILHO et al., 1997), que auxiliaram na elucidação estrutural da nova molécula.

Figura 72 - Estrutura química da cissaglaberrimina

O espectro DEPT 135 (**Figura 62**) mostrou a presença dos seguintes carbonos: **CH** aromáticos, pelos deslocamentos químicos em 115,36 ppm, 115,68 ppm e 129,10 ppm, um **CH** não aromático em 54,01 ppm, carbonos **CH₂** com deslocamentos químicos em 21,21 ppm, 34,25 ppm, 42,26 ppm, 102,29 ppm correspondente ao carbono do sistema metilenodioxí e um carbono **CH₃** em 59,84 ppm correspondente à metoxila.

Na elucidação estrutural do composto **A17-6**, os deslocamentos químicos e as correlações dos espectros de RMN, tanto para os hidrogênios quanto para os carbonos, foram dispostos na **Tabela 12**.

Tabela 12 - Deslocamentos químicos (δ) do composto isolado **A17-6** (CD_3OD) e correlações dos espectros de RMN, para o hidrogênio (300 MHz) e para o carbono (75 MHz)

Posição	RMN ^{13}C CD_3OD ppm	DEPT 135	RMN ^1H CD_3OD ppm	HSQC (H $\rightarrow$ C)	HMBC (H $\rightarrow$ C)
1	145,79	C	-	-	-
2	137,65	C	-	-	-
3	140,49	C	-	-	-
3 ^a	117,43	C	-	-	-
4	21,50	CH_2	2,8-3,18m	21,50	
			2,8-3,18m	21,50	
5	42,55	CH_2	3,73	42,55	OCH_3
			3,25m	42,55	
6	54,29	CH	4,29m	54,29	OCH_3 , C11c
7	34,54	CH_2	2,8-3,18m	34,54	C6, C8, C11c, C7a
			2,8-3,18m		
7a	134,26	C	-	-	-
8	115,64	CH	6,71s	115,64	C10, C11a
9	158,15	C	-	-	-
10	115,97	CH	6,72m	115,97	C11a
11	129,39	CH	7,83d $J=8,7$	129,39	C11b, C7a, C9
11a	123,15	C	-	-	-
11b	112,11	C	-	-	-
11c	122,10	C	-	-	-
O- CH_2 -O	102,63	CH_2	6,08s	102,63	C2, C1
			5,95s	102,63	C2, C1
OCH_3	60,12	CH_3	4,04s	60,12	C3

Na análise por **CLAE-IES-EM²** do composto **A17-6**, o íon molecular de m/z 312 é compatível com aquele da estrutura provável para a molécula. O pico observado de m/z 295, provavelmente, é relativo à perda de um grupo hidroxila ou amônia.

Na **Figura 73**, ilustrou-se a formação do pico de m/z 312 e daquele de m/z 295, pela perda de uma molécula de amônia.

Figura 73 - Fragmentos da molécula **A17-6**

O pico intenso de m/z 295, verificado no espectro de massas da segunda fragmentação (EM^2) do íon molecular $[M+H]^+$ m/z 312, origina o pico de m/z 263, cujas formas de ressonância foram mostradas na **Figura 74**.

Figura 74 - Formas de ressonância relativas ao pico de m/z 295 observado no espectro de massas da segunda fragmentação (EM^2) do íon molecular de **A17-6**.

O pico de m/z 263, presente naquele mesmo espectro, origina-se a partir do fragmento m/z 295, por perda de metanol.

Considerando a análise realizada, chegou-se à conclusão de que a estrutura química do composto isolado **A17-6** é consistente com a proposta da estrutura do alcalóide 6,7,7a,8-tetrahidro-10-metoxi-5H-benzo[g]-1,3-benzodioxolo[6,5,4,-de]quinolin-4-ol (**Figura 75**), sendo composto caracterizado pela primeira vez na literatura. A denominação química do mesmo foi efetuada com base nas orientações de nomenclatura química da IUPAC (IUPAC, 2011, SCIFINDER, 2011).

Figura 75 - *Annona crassiflora* Mart - Estrutura química do alcalóide inédito (6,7,7a,8-tetrahidro-10-metoxi-5H-benzo[g]-1,3-benzodioxolo[6,5,4,-de]quinolin-4-ol) (**A17-6**).

Até o presente trabalho, haviam sido isolados oito alcalóides isoquinolínicos de quatro diferentes classes: romucosina [31], reticulina [88], anoretina [101], anonaína [38], assimilobina [39], xilopina [52], aterospermidina [58] e liriodenina [59] (**Quadro 19**) (EGYDIO, 2009, HOCQUEMILLER et al, 1982, LEBOEUF et al., 1982), tendo predominado aqueles de núcleo noraporfínico (anonaína, assimilobina e xilopina), seguidos dos dois oxoaporfínicos.

Com o isolamento de anolobina [37] e do outro alcalóide noraporfínico (**Figura 75**), inéditos em *A. crassiflora*, esta passa a ser a classe de alcalóides isoquinolínicos mais reportada, nesta espécie.

Para efeito da facilidade de citação, o alcalóide de estrutura inédita, cujo nome químico é extenso, continuará a ser denominado sob o código **A17-6** originado do processo de isolamento.

Na análise prévia dos alcalóides totais de *A. crassiflora*, por **CCD**, o perfil dos **AT** havia demonstrado tratar-se de fração de composição complexa, o que se confirmou, posteriormente, por **CLAE**.

O cromatograma (CCD) apresentou cerca de seis bandas principais, distinguíveis à luz UV, em comprimento de onda de 254 nm, e cuja reação Dragendorff positiva, indicou a sua natureza alcaloídica. Neste perfil cromatográfico, foi possível verificar, ainda, que o composto inédito (**A17-6**) correspondeu às bandas predominantes, conforme ratificado por **CLAE**.

O processo de partição ácido-base, usualmente empregado na obtenção da fração alcaloídica, permite a eliminação de pigmentos, substâncias lipofílicas, entre outras impurezas. Entretanto, é comum a presença de outras classes de metabólitos não alcaloídicos, junto aos **AT**. Isto ocorreu também, em *A. crassiflora*, o que se caracterizou pelas bandas de fluorescência branca observadas, em região de maior polaridade (Rf: 0-0,9) e que não reagiram com o reativo de Dragendorff.

Considerando a complexidade dos **AT**, à semelhança do que se constatou com aqueles das folhas de *A. crassiflora*, e a presença de metabólitos, em geral, em baixa concentração nas frações, como ocorreu com a anolobina [37] em **A17**, o trabalho de isolamento pelas técnicas convencionais, quase sempre, mostra-se inviável, havendo risco de se perderem compostos bioativos de grande interesse do ponto de vista da atividade.

Entretanto, até mesmo com o uso das técnicas sofisticadas, há necessidade de obtenção de quantidades suficientes dos compostos, tanto visando aos testes biológicos e completa elucidação estrutural, quanto à exploração futura das espécies que os contêm.

Uma vez confirmado o interesse pelo composto, a repetição do processo pode ser realizada para a obtenção quantitativa da substância de interesse, no entanto, é prática morosa. Sendo um protótipo em potencial, estudos posteriores para produção em maior escala podem ser desenvolvidos com auxílio da Química Farmacêutica ou, ainda, com a aplicação das técnicas mais modernas que interferem diretamente no aparato celular biossintético de forma a produzi-lo em maior quantidade (SARKER, NAHAR, 2012).

No que tange ao óleo volátil, nas folhas de *A. crassiflora*, houve predominância de sesquiterpenos em relação aos monoterpenos, à semelhança de: *A. cherimolia* (RIOS et al., 2003), *A. coriacea* (SIQUEIRA et al., 2010), *A. densicoma* (ANDRADE et al., 2007), *A. foetida* (COSTA et al., 2006), *A. muricata* (FOURNIER et al., 1999, BOYOM et al., 1996), *A. senegalensis* (BOYOM et al., 1996) e *A. squamosa* (GARG; GUPTA, 2005, FOURNIER et al., 1999).

Perfil oposto foi registrado em: *A. senegalensis*, *A. reticulata*, *A. cherimolia*, *A. atemoya*, *A. cuneata* e *A. squamosa* (KHALLOUKI et al., 2002, ANDRADE et al., 2001, FOURNIER et al., 1999, WYLLIE et al., 1987). Tal contraste encontra explicação nas diferenças bioquímicas entre as espécies, entretanto, não há qualquer proposta estabelecida com tal propósito, na literatura.

Os três constituintes sesquiterpênicos principais das folhas de *A. crassiflora*, foram: α -amorfeno (43,6%), *E*-cariofileno (17,7%) e β -germacreno (5,3%), tendo sido encontrados, igualmente, em outras espécies de *Annona* (item 1.6.2.2).

Desta forma, o α -amorfeno, componente majoritário do óleo está presente, igualmente, em *A. coriacea*, *A. cherimolia* e *A. muricata* (SIQUEIRA et al., 2011, RIOS et al., 2003, KOSSOUOH et al., 2007) porém, em concentrações muito inferiores àquelas da espécie estudada. A análise de espécimes de outras procedências talvez venha a confirmá-lo como potencial marcador químico da mesma.

A presença do outro sesquiterpeno majoritário, o *E-cariofileno*, igualmente, foi relatada em diferentes órgãos de nove outras espécies do gênero e, em teores inferiores àquele verificado em *A. crassiflora*, mostrando ser outro constituinte característico desta espécie. O mesmo composto foi reportado, ainda, em folhas de *A. coriacea* (4,9%) (SIQUEIRA et al., 2010), cascas de caule de *A. cuneata* (0,9%) (KHALLOUKI et al., 2002), *A. glabra* (SANTOS et al., 1998), *A. muricata* (12,7%) (KOSSOUOH et al., 2007, JIROVETZ et al., 1998, BOYOM et al., 1996), folhas de *A. foetida* (14,2%) (COSTA et al., 2009), folhas (1,1%), frutos (2,3%) e cascas de caule (1,7%) de *A. reticulata* (OGUNWANDE et al., 2006, KHALLOUKI et al., 2002, BOYOM et al., 1996), folhas (4,9%), cascas de caule (1,4%), raiz (7,6%), fruto (2,4%) e sementes (14,9%) de *A. senegalensis* (CELESTINE et al., 2010), além das folhas (22,9%) e frutos (0,5%) de *A. squamosa* (GARG; GUPTA, 2005, ANDRADE et al., 2001). Por ter sido encontrado, nesta variedade de espécies, *E-cariofileno* foi considerado marcador taxonômico do gênero *Annona* (COSTA et al., 2009, VALTER et al., 2008).

Outro constituinte do óleo, o sesquiterpeno β -germacreno (5,3%), também foi identificado no óleo essencial das cascas de caule de *A. cuneata* (0,4%) (KHALLOUKI et al., 2002), das folhas de *A. foetida* (0,8%) (COSTA et al., 2009), das folhas e frutos de *A. reticulata* (0,6%) (BOYOM et al., 1996) e das cascas de raízes (1,3%) e sementes (0,2%) de *A. senegalensis* (CELESTINE et al., 2010).

Ainda que presente em concentração reduzida (0,2%) (**Tabela 4**), é interessante notar que o espatulenol, sesquiterpeno oxigenado derivado do biciclogermacreno, foi um dos constituintes encontrados no óleo de *A. crassiflora*. Além de ser marcador quimiotaxonômico da família Annonaceae (COSTA et al., 2009), mostrou ser um dos compostos mais frequentes no gênero.

No óleo volátil de *A. crassiflora*, os monoterpenos apresentaram teores muito reduzidos em relação às demais espécies. Entre aqueles de maior concentração nesta espécie, citam-se o β -pineno e o α -tujeno.

A presença de α -tujeno (0,2%) foi constatada, igualmente, nos óleos de: folhas de *A. coriacea* (0,7%) (SIQUEIRA et al., 2011), cascas de caule de *A. cuneata* (1,4%) (KHALLOUKI et al., 2002), cascas de caule (3,9%), frutos (2,0%), além das folhas (2,2 e 1,3%) e sementes (1,3%) de *A. senegalensis* (KHALLOUKI et al., 2002, BOYOM et al., 1996).

Por sua vez, o β -pineno (0,6%) foi identificado no óleo essencial de diferentes órgãos vegetais de outras seis *Annona*: *A. coriacea*, *A. cuneata*, *A. cherimolia*, *A. muricata*, *A. reticulata* e *A. senegalensis* (SIQUEIRA et al., 2011, CELESTINE et al., 2010, OGUNWANDE et al., 2006, RIOS et al., 2003, KHALLOUKI et al., 2002, JIROVETZ et al., 1998, BOYOM et al., 1996, EKUNDAYO & OGUNTMEIN, 1986).

Nas análises cromatográficas, por **CCD** e **CG-EM**, tanto o β -pineno, quanto o *E*-cariofileno foram usados como substância de referência, representando as respectivas classes dos mono e sesquiterpenos, tendo sido selecionados, por estarem entre os constituintes mais freqüentes do gênero.

O cromatograma em CCD é ferramenta valiosa e ágil na caracterização de produtos de origem vegetal. No registro de medicamentos fitoterápicos, o perfil cromatográfico é um dos itens de análise requeridos pela ANVISA (BRASIL, 2010), para efeito do relatório de controle de qualidade, conforme a RDC 14/2010. E, de forma semelhante, encontra-se entre os requisitos de controle de qualidade da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1998).

A atividade anti-*Leishmania* dos **AT** dos exemplares de *A. crassiflora* coletados, para este trabalho, no Horto Florestal Andrade Silva, no município de Avaré, demonstraram nível de atividade semelhante ao encontrado naqueles de Mogi-Guaçu, avaliados no estudo preliminar (TEMPONE et al., 2005), tendo incitado a presente investigação mais aprofundada dos seus constituintes.

Com o fracionamento, foi possível verificar que, frente a *L. (L.) infantum chagasi*, as frações mais ativas (**A14-A17** e **A19**) (100 % morte, à concentração de 200 μ g/ mL) situaram-se entre as mais polares. Observação similar foi feita, em relação àquelas com atividade frente ao *M. tuberculosis*.

A fração **A17**, que originou os isolamentos, esteve entre as mais ativas, frente aos dois modelos experimentais empregados, embora os sistemas biológicos sejam distintos. Isto ocorreu, também, com a maioria das demais frações ativas. A fração **A19** foi exceção, tendo em vista que não teve atividade no referido bacilo.

Frente ao *M. smegmatis*, tanto os **AT**, quanto as frações foram inativos (CIM > 128 μ g/ mL). Possivelmente, diferenças bioquímicas estejam envolvidas no mecanismo de resistência das duas espécies de *Mycobacterium* testadas.

Considerando os alcalóides isolados de *A. crassiflora*, este trabalho corresponde ao primeiro relato da atividade anti-*Leishmania* de anolobina, enquanto que, **A17-6** é de todo inédito. No tocante à atividade antimicobacteriana, os testes frente ao *M. tuberculosis* e *M. smegmatis* foram realizados pela primeira vez, igualmente, para os **AT**.

Na literatura, até o momento, consta somente a atividade antimicrobiana da anolobina, sendo que, entre outros 13 alcalóides isoquinolínicos, foi a mais ativa em bactérias Gram-positivas testadas por VILLAR et al. (1987), entre as quais o *Mycobacterium phlei*.

É interessante notar que, se considerarmos o critério de OSÓRIO et al. (2007), ainda que seja referente a extratos brutos, o nível de atividade de ambos os alcalóides, frente às formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, foi alto ($CE_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$) e superior àquele dos **AT**, caracterizando a importância do fracionamento de extratos brutos, na busca de compostos bioativos.

A anolobina foi, aproximadamente, 2,5 vezes mais ativa do que o alcalóide **A17-6**, 5,2 vezes mais ativa do que o extrato bruto de alcalóides (**AT**) e, somente, duas vezes menos ativa que a pentamidina.

Tendo em vista a atividade verificada para a anolobina, e que esta foi um dos alcalóides minoritários da fração de origem **A17**, pode-se dizer que, em procedimentos de triagem, deve-se tomar o cuidado de não considerar de forma errônea e apressada, como destituídos de interesse extratos vegetais e frações iniciais pouco ativos, uma vez que podem conter substâncias altamente ativas porém, em concentração reduzida, não sendo possível, em um primeiro momento, detectar o seu potencial ou, ainda que, estando na presença de outros constituintes possam ter sua ação reduzida.

Quanto ao nível de citotoxicidade, frente às células do tecido conjuntivo de camundongos, anolobina foi menos citotóxica que **A17-6**, inclusive em relação à pentamidina. Porém, foi mais citotóxico que os **AT**. Enquanto que, **A17-6** teve citotoxicidade equivalente ao composto usado na terapêutica e foi o mais citotóxico em relação aos **AT**.

Adicionalmente, a anolobina mostrou maior seletividade (**IS**: 7,4) para as formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em relação a **A17-6** e aos **AT**. É possível

que, submetida a modificação molecular, origine compostos com índice de seletividade superior.

Por sua vez, o alcalóide **A17-6** apresentou nível de seletividade equivalente àquele dos **AT**, frente às formas promastigotas.

No tocante ao mecanismo de ação anti-*Leishmania*, FOURNET et al (2000) sugeriu que a atividade dos alcalóides isoquinolínicos estaria relacionada à inibição da enzima antioxidante tripanotiona-redutase, a qual protege o parasita das espécies reativas de oxigênio geradas pelas células de defesa do hospedeiro.

Na avaliação da atividade antimicobacteriana, verificou-se o comportamento distinto dos dois *Mycobacterium* frente aos alcalóides de *A. crassiflora*.

Considerando o critério adotado por YOUNES et al. (2007), para identificar frações de interesse para o estudo químico ($CIM \leq 100 \mu\text{g/ mL}$), pode-se dizer que, os **AT** e as frações alcaloídicas da espécie estudada foram inativos no *M. smegmatis*, uma vez que prevaleceram valores de $CIM \geq 128 \mu\text{g/ mL}$.

Confrontando-se tal critério com os resultados obtidos para o *M. tuberculosis*, verifica-se que as frações alcaloídicas **A14**, **A16** e **A17** e os **AT** foram ativos. Entretanto, os constituintes isolados a partir de **A17** foram inativos. Sendo assim, constatou-se perda da atividade ao realizar-se o fracionamento. Tal observação sugere a ocorrência de ação sinérgica entre os constituintes da fração.

No que se refere ao óleo volátil, *A. crassiflora* apresentou nível de atividade moderado nas quatro espécies testadas de *Leishmania*, tendo sido mais ativo sobre as formas promastigotas *L. (L.) infantum chagasi*.

Ao confrontar-se os resultados com dados da literatura, escassos para o gênero *Annona*, verificou-se que o óleo da espécie teve nível de atividade inferior àquele de *A. foetida*, o qual foi mais ativo em *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis* (COSTA et al., 2009). Enquanto que, apresentou nível de atividade equivalente frente ao *L. (L.) infantum chagasi*. Adicionalmente, o óleo essencial de *A. coriacea* foi o menos ativo entre estas espécies (SIQUEIRA et al., 2011).

É interessante notar que, nos testes com *L. (L.) infantum chagasi*, o agente etiológico da leishmaniose visceral no Brasil, as três anonas apresentaram níveis moderados de atividade, com valores de CE_{50} de mesma ordem de grandeza.

Considerando as 140 espécies descritas do gênero *Annona* (LORENZI; SOUZA, 2005, JOLY, 2002, HEYWOOD, 1993), além do presente estudo, somente as outras duas, anteriormente mencionadas, foram analisadas quanto à atividade antiprotozoária do óleo volátil, indicando haver vasto campo de pesquisa a ser explorado.

O óleo de *A. crassiflora* revelou, igualmente, possuir atividade anti-*Trypanosoma* (**CE**₅₀: 5,3 µg/ mL) tendo sido 9 vezes mais ativo do que o fármaco de referência (benznidazol) sobre o *T. cruzi*. Em relação ao óleo de *A. coriacea*, avaliada em trabalho anterior, foi 31 vezes mais ativo (SIQUEIRA et al., 2011). Contudo, por não haver dados acerca da citotoxicidade do óleo, nada se pode afirmar quanto à seletividade da ação.

De forma geral, os resultados obtidos, além de inéditos, mostraram que *A. crassiflora* pode oferecer importante contribuição, como fonte de novos compostos dotados de atividade antiprotozoária.

O presente trabalho ratificou a importância da estratégia de pesquisa de novos fármacos a partir de espécies vegetais na obtenção de moléculas, que possam vir a participar do limitado elenco de medicamentos destinados ao tratamento das doenças negligenciadas.

6 CONCLUSÕES

- O alcalóide noraporfínico 6,7,7a,8-tetrahidro-10-metoxi-5H-benzo[g]-1,3-benzodioxolo [6,5,4,-de]quinolin-4-ol (**A17-6**), isolado de *A. crassiflora*, é um composto inédito, sendo ativo frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi* (CE₅₀: 9,34 µg/ mL).
- A noraporfina anolobina isolada, pela primeira vez, a partir de *A. crassiflora*, apresentou nível de atividade considerável (CE₅₀: 3,63 µg/ mL) frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*, bem como nível de citotoxicidade inferior àquele do fármaco de referência pentamidina, frente às células do tecido conjuntivo de camundongo NCTC 929.
- O alcalóide anolobina apresentou maior nível de seletividade nas formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* em relação ao **A17-6** e aos alcalóides totais (**AT**).
- Os **AT** foram ativos frente ao *M. tuberculosis* (CIM< 100 µg/ mL) e inativos em *M. smegmatis*.
- Os alcalóides isolados foram inativos (CIM> 100 µg/ mL) frente ao *M. tuberculosis* e ao *M. smegmatis*.
- A atividade antimicobacteriana dos **AT** e de suas frações, frente ao *M. tuberculosis* deve estar associada, muito provavelmente, à ação sinérgica de seus constituintes.
- Os **AT** foram menos ativos em *L. (L.) infantum chagasi* do que os alcalóides isolados.
- As frações alcaloídicas com atividade anti-*Leishmania* e antimicobacteriana *in vitro*, nos modelos testados, corresponderam àquelas de maior polaridade.
- *A. crassiflora* apresentou baixo teor de óleo volátil nas folhas (0,06 % m/ m)
- Entre os 41 constituintes identificados, no óleo volátil de folhas de *A. crassiflora*, a maioria é representada por sesquiterpenos (81,7%), seguidos dos monoterpenos (0,8%), perfil semelhante àquele encontrado na maioria das espécies estudadas

do gênero *Annona*.

- Os constituintes majoritários do óleo volátil das folhas de *A. crassiflora* foram: α -amorfeno (43,6%), *E*-cariofileno (17,7%) e β -germacreno (5,3%), sendo o segundo considerado marcador quimiotaxonômico do gênero.
- O sesquiterpeno espatulenol, marcador quimiotaxonômico da família Annonaceae, está presente no óleo volátil das folhas de *A. crassiflora* em baixo teor (0,7%).
- O óleo volátil de *A. crassiflora* apresentou ação anti-*Leishmania in vitro* contra as formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*, *L.* (L.) *amazonensis*, *L.* (V.) *braziliensis* e *L.* (L.) *major*, tendo sido mais ativo frente à primeira espécie (CE₅₀: 25,97 μ g/mL).
- O óleo volátil de *A. crassiflora* apresentou atividade anti-*Trypanosoma*, frente às formas tripomastigotas do *T. cruzi* (CE₅₀: 5,31 μ g/ mL), tendo sido 9 vezes mais ativo do que o benznidazol.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4.ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.
- AGUILAR-SANTOS, G.; LIBREA, J.R.; SANTOS, A.C. Alkaloids of *Annona muricata*. **Philippine Journal of Science**, v.96,n.4, p.399-410, 1967.
- AHMAD, S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. **Clinical and developmental immunology**, p.814-943, 2011.
- AL-MUTAIRI, N., ALSHILTAWY, M., KHALAWANY, M., JOSHI, A, EASSA, B.I., MANCHANDA, Y., GOMAA, S., DARWISH, I., RIJHWANI, M. Treatment of Old World cutaneous leishmaniasis with dapsone, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. **International Journal of Dermatology**, v.48, p.862-869, 2009
- ALIAS, A., AWANG, K., LI, A., BIHUD, N., KASIM, N., ISMAIL, N. Alkaloids from *Meiogyne virgata* (Annonaceae). **Planta medica**, v.12, p.54, 2012
- ALMEIDA, O.L.S. & SANTOS, J.B., Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.86. n.3., 497-506
- ALRAJHI, A.A., IBRAHIM, E.A., DE VOL, E.B., KHAIRAT, M., FARIS, R.M., MAGUIRE, J.H. Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. **New England Journal of Medicine**, v.346, n.12, p.891-895, 2002
- ALVARENGA, D.G., ESCALDA, P.M.F., COSTA, A.S.V., MONREAL, M.T.F.D. Leishmaniose visceral: estudo retrospectivo de fatores associados à letalidade. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.2, p.194-197, 2010
- AMATO, V.S.,PADILHA, A.R.S., NICODEMO, A.C., DUARTE, M.I.S., VALENTINI, M., UIP, D.E., BOULOS, M., AMATO NETO, V. Use of Itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. **International Journal of Infectious Diseases**, v.4, n.3.,p.153-157, 2000
- ANDRADE, E.H.A., ZOGHBI, M.G.B., MAIA, J.G.S., FABRICIUS, H., MARX, F. Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.14, p.227-232, 2001
- ANDRADE, E.H.A., OLIVEIRA, J., ZOGHBI, M.G.B. Volatiles of *Anazagorea dolichocarpa* Spreng. & Sandw. and *Annona densicoma* Mart. Growing wild in the State of Pará, Brazil. **Flavour and fragrance journal**, v.22, p.1578-160, 2007
- ANTHONY, J.-P., FYFE, L., SMITH, H. Plant active components - a resource for antiparasitic agents? **Trends in Parasitology**, v.21, n. 10, p. 462-468, 2005
- APT, W. Current and developing therapeutic agents in the treatment of Chagas disease. **Drug Design, Development and Therapy**, v.4, p.243-253, 2010
- APT, W., AGUILERA, X., ARRIBADA, A., PÉREZ, C., MIRANDA, C., SÁNCHEZ, G., ZULANTAY, I., CORTÉS, P., RODRIGUEZ, J., JURI, D. Treatment of chronic Chagas Disease with itraconazole and allopurinol. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.59, n.1, p.133-138, 1998
- AWAN, J.A.; KAR, A.; UDOUDOH, P.J. Preliminary studies on the seeds of *Annona muricata* Linn. **Qualitas Plantarum - Plant Foods Human nutrition**, v.30, p.163-168, 1980.
- BADARÓ, R., SCHOOLEY, R.T. **Enviromental and human leishmaniasis risk factors. Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research: final report**, Pan American Health Organization / World Health Organization (PAHO/WHO) /

- Sociedade de Pediatria do Estado do Rio de Janeiro (SOPERJ), p.111-169, 2008
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - a review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, p. 446-475, 2008
- BALBAA, S.I.; HAGGAG, M.Y.; TAHA, K.F. Phytochemical study of certain *Annona* species cultivated in Egypt. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.20, n.1/4, p.53-62, 1979.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; DA CUNHA, E.V.L.; CORNÉLIO, L.M.; DIAS, C. DA S.; GRAY, A.I. Cissaglaberrimine, an Aporphine Alkaloid from *Cissampelos glaberrima*. **Phytochemistry**, v.44, n.5, p.959-961, 1997
- BARTLEY, J.P. Volatile Constituents of Custard Apple. **Chromatographia**, v.23, n.2, p.129-131 1987
- BCM, 2011. Baylor College of Medicine – Department of Molecular Virology and Microbiology – Tuberculosis. Disponível em <http://www.bcm.edu/molvir/tuberculosis> Acesso em 1 de dezembro de 2011
- BEIGUELMAN, B. **A vegetação oligotrófica do Cerrado e alguns problemas de anatomia vegetal**. Tese apresentada na obtenção de título de doutor pela Faculdade de Filosofia Ciências e Letras da USP, 1961.235 p
- BENAIM, G., SANDERS, J.M., GARCIA-MARCHÁN, Y., COLINA, C., LIRA, R., CALDERA, A.R., PAYARES, G., SANOJA, C., BURGOS, J.M., LEON-ROSSELL, A., CONCEPCION, J.L., SCHIJMAN, A.G., LEVIN, M., OLDFIELD, E., URBINA, J.A. Amiodarone has intrinsic anti-*Trypanosoma cruzi* activity and acts synergistically with posaconazole. **Journal of Medical Chemistry**, v.49, p.892-899, 2006
- BERMAN, J.D. Chemotherapy for leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Curriculum Opinium Disease**, v.11, p.707-710, 1998
- BERMEJO, A.; FIGADÉRE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Products Reporter**. v.22, p.269-303, 2005.
- BETTARINI, F.; BORGONOV, G.E.; FIORANI, T.; GAGLIARDI, I.; CAPRIOLI, V.; MASSARDO, P.; OGOCHÉ, J.I.J.; HASSANALI, A.; NYANDAT, E.; CHAPAYA, A. Antiparasitic compounds from East African plants: isolation and biological activity of anonaine, matricarianol, canthin-6-one and caryophyllene oxide. **Insect Science and its Application**, v.14, n.1, p.93-99, 1993.
- BHAKUNI, D.S.; TEWARI, S.; DHAR, M.M. Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v.11, n.5, p.1819-1822, 1972.
- BHAKUNI, D.S.; MUKHERJEE, B.; JUNEAU, J.P.; BHACCA, N.S.; MUKERJEE, R. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v.18, n.9, p.1584-1586, 1979.
- BLONDEAU, J.M. Flouroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. **Survey of Ophthalmology**, v.49, s.2, p.73-78, 2004
- BOLON, M.K. The Newer flouroquinolones. *Infectious Disease Clinics of North America*, v.23, n.4, p.1027-1051, 2009
- BORUP, G.; KINGSTON, D.G.I. Aporphine alkaloids from *Annona acuminata*. **Journal of Natural Products**, v.45, n.1, p.102, 1982.
- BOYOM, F. F., AMVAM ZOLLO, P.H., MENUT, C., LAMATY, G., BESSIÈRE, J.M. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XXVII. Comparative study of the volatile constituents of five *Annonaceae* species growing in Cameroon. **Flavour and Fragrance Journal**, v.11, p.333-338, 1996
- BRASIL, 2007 **Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana**. 2 ed.

Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_lta_2ed.pdf Acesso em 3 de outubro de 2011

BRASIL, 2010 ANVISA – Resolução RDC 14/2010. Disponível em <http://www.crfma.org.br/site/arquivos/legislacao/resolucoeseinstrucoesnormativasdaanvisa/RDC%2014%202010.pdf>. Acesso em 2 de novembro de 2011

BRASIL, 2011^a **Portal da Saúde – Glossário – Leishmaniose Tegumentar**. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31927 Acesso em 2 de novembro de 2011

BRASIL, 2011^b. **Portal da Saúde – Glossário – leishmaniose visceral**. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31941. Acesso em 2 de novembro de 2011.

BRASIL, 2011^c. **Portal da Saúde – Chagas – Aspectos Epidemiológicos**. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454 . Acesso em 4 de novembro de 2011

BRASIL, 2011^d – **Doença de Chagas**. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/gve_7ed_web_atual_doenca_de_chagas.pdf. Acesso em 4 de novembro de 2011

BRASIL, 2011^e. **Portal da Saúde – Tuberculose**. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1527 Acesso em 2 de novembro de 2011

BRASIL, 2011^f – **Manual de recomendações para o controle da tuberculose no Brasil**. Disponível em http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_de_recomendacoes_controle_tb_novo.pdf Acesso em 14 de novembro de 2011

BRINGMANN, G.; RÜCKERT, M. MESSER, K.; SCHUPP, O. ; LOUIS, A.M. Acetogenic isoquinoline alkaloids CXXI. Use of on-line high-performance liquid chromatography- nuclear magnetic resonance spectrometry coupling in phytochemical screening studies: rapid identification of metabolites in *Dioncophyllum thollonii*. **Journal of Chromatography A**, v.837, p.267-272, 1999.

BRUNTON, L., CHABER, B., KNOLLMAN, B. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 12.ed. McGraw-Hill Medical, 2084p., 2011

CAMACHO, M.D.R., KIRBY, G.C., WAHURST, D.C., CROFT, S.L., PHILLIPSON, J.D. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, v. 66, p.478-480, 2000

CAMACHO, M.D.R. PHILLIPSON, J.D., CROFT, S.L., ROCK, P., MARSHALL, S.J., SCHIFF JR., P.L. *In vitro* activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Tripanosoma brucei brucei*. **Phytotherapy Research**, v.16, p.432-436, 2002

CAMPOS, F.R.; BATISTA, R.L.; BATISTA, C.L.; COSTA, E.V.; BARISON, A.; Dos Santos, A.G.; PINHEIRO, M.L.B. Isoquinoline alkaloids from leaves of *Annona sérica* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.36, n.10, p.804-806, 2008.

CAMPOS, H.S. Diagnóstico da tuberculose. **Pulmão RJ**, v.15, n.2, p.92-99, 2006^a

CAMPOS, H.S. Etiopatologia da tuberculose e formas clinicas. **Pulmão RJ**, v.15, n.1, p.29-35, 2006^b

CAPONE, D., MOGAMI, R., SKINNER, L.F., ROSEMBERG, S. Tuberculose extra-pulmonar. In: TARANTINO, A.B. Doenças pulmonares. 5a.ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2002. p.324-334.

- CARBON, C. Comparison of Side Effects of Levofloxacin versus other flouroquinolones. **Chemotherapy**, v.47, s.3, p.9-14, 2001
- CASTRO, I.; VILLEGAS, J.R.; SOEDER, B.; CASTRO, O.; SOEDER, B. Oxoaporphine alkaloids from *Annona purpurea* wood. **Fitoterapia**, v.67, n.2, p.181-182, 1996.
- CASTRO, J.A., MECCA, M.M., BARTEL, L.C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). **Human and Experimental Toxicology**, v.25, p.471-479, 2006
- CAVÉ, A. Annonaceae Alkaloids. In : PHILLIPSON, J.D., ROBERTS, M.F., ZENK, M.K., eds. **The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids**. Berlin, New York : Springer-Verlag, 1985. P.79-101
- CAVÉ, A.; LAPRÉVOTE, O.; LEBOEUF, M., Alcaloides des Annonacées 88: Alcaloides de *Annona paludosa* Aublet. **Plantes médicinales et phytothérapie**. Tome XXXII, v.22 n.3, p.159-164, 1988.
- CDC, 2011^a. Disponível em <http://www.cdc.org/parasites/leishmaniasis/biology.html>. Acesso em 21 de outubro de 2011
- CDC, 2011^b – Disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/diagnosis.html>. Acesso em 22 de outubro de 2011
- CDC, 2011^c - disponível em <http://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html>. Acesso em 22 de outubro de 2011
- CDC, 2011^d – Disponível em <http://www.cdc.gov/tb/topic/basics/default.htm>. Acesso em 25 de outubro de 2011
- CÉLESTINE, N.-L., TSIBA, G., YAYA, M., MURPHY, E.N.A., JEAN-MAURILLE, O., CHALCHAT, J.-C., GILLES, F. Comparative study of the chemical composition of the essential oil from organs of *Annona senegalensis* Pers. *outotricha* le Thomas subspecies (Annonaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.9, n.6, p.887-891, 2010
- CHAN-BACAB, M.J., PENA-RODRÍGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Products Reports**, v.18, p.674-678, 2001
- CHANG, F.R., CHEN, K.S., KO, F.N., TENG, C.M., WU, Y.C. Bioactive alkaloids from *Annona reticulata*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v.47, n.5., p. 483-491, 1995
- CHANG, F.R., WEI, J.L., TENG, C.M., WU, Y.C. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v.61, n.12, p.1457-1461, 1998^a
- CHANG, F.R., WEI, J.L., TENG, C.M., WU, Y.C. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from leaves of *Annona purpurea*. **Phytochemistry**, v.49, n.7, p.2015-2018, 1998b
- CHANG, F.R., CHEN, C.Y., WU, P., KUO, R., CHANG, Y., WU, Y.C. New alkaloids from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.6, p.746-748, 2000^a
- 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, n.4b, p.913-920, 2000^b.
- CHAPPIUS, F., SUNDAR., S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJALS, S., PEELING, R.W., ALVAN, J., BOELAERT, M. Visceral Leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control. **Nature Reviews, Microbiology**, v.5, p. 873-882, 2007
- CHATELAIN, E. IOSET, J.-R. Drug discovery and development for neglected diseases: the DNDi model. **Drug design, development and therapy**, v.5, p.175-181, 2011
- CHAVES, M.H., SANTOS, L.A., LAGO, J.H.G., ROQUE, N.F. Alkaloids from *Porcelia macrocarpa*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.240-242, 2001
- CHEN, K.-S., KO, F.-N., TENG, C.-M., WU, Y.-C. Antiplatelet and vasorelaxing actions of

some aporphinoids. **Planta Médica**, v.62,p.133-136,1996.

CHEN, C.-Y., CHANG, F.-R., TANG, C., WU, Y.-C. Cheritamine, a new n-fatty acyl tryptamine and other constituents from the stems of *Annona cherimolia*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.46, n.1., p.77-86, 1999

CHEN, C.-Y., CHANG, F.-R., PAN, W.B., WU, Y.C. Four alkaloids from *Annona cherimolia*. **Phytochemistry**, v.56, n.7, p.753-757, 2001b

CHEN, C.-Y.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C. The constituents from the stems of *Annona cherimolia*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.44, n.3, p.313-319, 1997.

CHEN, C.-Y.; WU, Y.-C. Annocherine C, a new C- α hydroxyl benzylisoquinoline and other constituents from the leaves of *Annona cherimolia*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.48, n.6B, p.1203-1206, 2001.

CHEN, C-Y.; CHANG, F-R.; CHO, C-P.; WU, Y-C., Ent-kaurane diterpenoids from *Annona glabra*. **Journal of Natural Products**. v.63 n.7,p.1000-1003,2000.

CHENG, P.; YUN-BAO, M.; YAO, S-Y.; ZHANG,Q.; WANG, E-J.; YAN, M-H.; ZHANG, X-M.; ZHANG, F-X.; CHEN, J-J., Two new alkaloids and anti-hepatitis B virus constituents from *Hypserpa nitida*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v.17,p.5136-5320,2007.

CHIRAC, P., TORREELE, E. Global framework on essential health R&D. **The Lancet**, v.367, p.1560-1561, 2006

CHOLO, M.C., STEEL, H.C., FOURIE, P.B., GERMISHUIZEN, W.A., ANDERSON, R. Clofazimine: current status and future prospects. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.67, p.290-298, 2012

CHULIA, S., IVORRA, M.D., CAVÉ, A, CORTES, D., NOGUEIRA, M.A., D'OCON, M.P. Relaxant activity of three aporphine alkaloids from *Annona cherimolia* on isolated aort of rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.47, n.8. P,647-650, 1995

CLAYTON, J. Chagas disease 101. **Nature**, v.465, s4-5, 2010a

CLAYTON, J. Chagas disease: pushing through the pipeline, **Nature**, v.465, s12-15, 2010b

COHEN, B.E. Amphotericin B toxicity and lethality : a tale of two channels. **International Journal of Pharmaceutics**, v.162, n.1-2, p.95-106, 1998

CRONQUIST, A. **New integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981. p.53-55.

CORRALES, M., CARDOZO, R., SEGURA, M.A., URBINA, J.A., BASOMBRÍO, M.A. Comparative efficacies of TAK-187, a long-lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' Disease. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.49, n.4, p.1556-1560, 2005

CORREA, M.P. **Dicionário de Plantas Uteis**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal, v.2, p.233-257. 1969

COSTA, J.M.L. O Uso clínico das pentamidinas com especial referência nas leishmanioses. **Acta Amazonica**, v.23, p.163-172, 1993

COSTA, E.V., PINHEIRO, M.L.B., XAVIER, C.M., SILVA, J.R.A., AMARAL, A.C.F., SOUZA, A.D.L., BARISON, A., CAMPOS, F.R., FERREIRA, A.G., MACHADO, G.M.C., LEON, L.L.P. A pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **Journal of Natural products**, v.69, p.292-294, 2006

COSTA, E.V; TEIXEIRA, S.D; MARQUES, F.A; DUARTE, M.C.T; DELARMELINA, C.; PINHEIRO, M.A.L.B.; TRIGO, J.R; SALES, M.B.H.L.N. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils of the Amazon Guatteropsis species. **Phytochemistry**, v.69 n.9,p.1895-1899,2008.

- COSTA, E.V., PINHEIRO, M.L.B., SILVA, J.R.A., MAIA, B.H.L.N.S., DUARTE, M.C.T., AMARAL, A.C.F., MACHADO, G.M.C., LEON, L.L. Antimicrobial and antileishmanial activity of essential oil from the leaves of *Annona foetida* (Annonaceae). **Química Nova**, v.32, n.1, p.78-91, 2009
- COSTA, E.V., PINHEIRO, M.L.B., SOUZA, A.D.L., BARISON, A., CAMPOS, F.R., VALDEZ, R.H., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P. NAKAMURA, C.V. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v.16, p.9714-9720, 2011
- COURA, J.R., CASTRO, S.L. A Critical review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, n.1, p.3-24, 2002
- COURA, J.R., DIAS, J.C.P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease – 100 years after its discovery, **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104, supl.1, p.31-40, 2009
- COURA, J.R., VIÑAS, P.A. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature Outlook*, S6-7, 2010
- COUVREUR, T.L.P., MAAS, P.J.M., MEINKE, S., JOHNSON, D.M., KEBLER, P.J.A. Keys to the genera of Annonaceae. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.169, p.74-83, 2012
- CROFT, S.L., COOMBS, G.H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v.19, n.11, p.502-508, 2003
- CRUZ, G.L. *In: Dicionário de Plantas Úteis do Brasil*. Rio de Janeiro: Bertrand Brazil, 1995.
- CRUZ, P.E.O., COSTA, E.V., MORAES, V.R.S., NOGUEIRA, P.C.L., VENDRAMIN, M.E., BARISON, A., FERREIRA, A.G., PRATA, A.P.N. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmanii* (Annonaceae). **Biochemical systematics and ecology**, p.1-4, 2011
- DAVIDSON, R.N., BOER, M., RITMEIJER, K. Paromomycin. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.103, p.653-660, 2009
- DAVIS, B.D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides, **Microbiological Reviews**, v.51, n.3, p.341-350, 1987
- DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.95, p.239-243, 2001
- DEWICK, P.L. Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach. 3ed. John Wiley & Sons, 2009. 539p.
- DIAZ, M.N.; FERNANDO, H.C.; GUNATILAKA, A.A.L.; TEZUKA, Y.; KIKUCHI, T. Studies on terpenoids and steroids. Part 20. Isolation and NMR analysis of 15,22-dihydroxytingenone: a probable biosynthetic precursor of 14(15)-ene-quinone-methide triterpenoids. **Journal of Chemical Research, Synopses**, v.8, p.238-239, 1990.
- DIAZ, A.M.P.; DIAZ, P.D.; JOSEPH-NATHAN, P. Diterpenoids and alkaloids from *Annona spraguei* Safford. **Revista Latino Americana de Química**, v.19 n.2, p.58-60, 1988.
- DNDi, 2011^a. Disponível em [HTTP://www.dndi.org/diseases/vl.html](http://www.dndi.org/diseases/vl.html). Acesso em 3 de novembro de 2011.
- DNDi, 2011^b. Disponível em <http://www.dndi.org/diseases/chagas.html>. Acesso em 4 de novembro de 2011.
- D'OCÓN, M.P.; CHULIA, S.; IVORRA, M.D.; CAVE, A.; CORTES, D.; NOGUEIRA, M.A. Relaxant activity of three aporphine alkaloids from *Annona cherimolia* on isolated aorta of rat. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.47, n.8, p.647-650, 1995.
- DA SILVA; M.S. TAVARES, J.F.; QUEIROGA M.F.A.; BARBOSA-FILHO, J.M.; ALMEIDA, J.R.G. DA S.; DA SILVA, S.A.S. Alcaloides e outros Constituintes de *Xilopia Langsdorffiana*,

Química Nova, v.32, n.6, p.1566-1570, 2009

EGYDIO, A.P.M. Análises das variações fitoquímicas, estrutura genética e importância econômica de *Annona crassiflora* Mart., no cerrado. São Paulo, 2009. 67p. Tese de Doutorado – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

EKUNDAYO, O, A review of the volatiles of Annonaceae. **Journal of essential oil research**, v.1, p.223-245, 1989

EKUNDAYO, O, OGUNTIN, B. Composition of the essential oil of *Annona senegalensis* var. *senegalensis*. **Planta medica**, v.52, n.3, p.202-204, 1986

ERDELYI, M.C. **Contribuição à farmacognosia de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) – Acompanhamento da variação sazonal de constituintes, aspectos botânicos e avaliação da atividade antileishmania *in vitro***. São Paulo, 2008. 231p. Dissertação de mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo

ESCOBAR, P., LEAL, S.M., HERRERA, L.V., MARTINEZ, J.R., STASHENKO, E. Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippia* spp essential oils and their major components. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n.2, p.184-190, 2010

FALL, D.; SAMBOU, B.; SECK, M.; WELE, A.; NDOYE, I.; GLEYE, C.; LAURENS, A. Enhancing the anthelmintic activity roots of *Annona senegalensis*. **Dakar Médical**, v.53, n.1, p.61-67, 2008.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988

FAUST, J.; PREISS, A.; RIPPERGER, H.; SANDOVAL, D.; SHREIBER, K. Alkaloids from *Annona cristalensis*. **Pharmazie**, v.36, n.10, p.713, 1981.

FENG, Z., BARLETTA, R.G. Roles of Mycobacterium smegmatis D-Alanine:D-Alanine Ligase and D-Alanine Racemase in the mechanism of action of and resistance to the peptidoglycan inhibitor D-Cycloserine. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.47, n.1, p.283-291, 2003

FERNANDEZ, L.S., SYKES, M.L., ANDREWS, K.T., AVERY, V.M. Antiparasitic activity of alkaloids from plant species of Papua New Guinea and Australia. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.36, p.275-279, 2010

FERREIRA, J. S.; FERREIRA, L.; PERESTRELO, R., Comparative analysis of the volatile fraction from *Annona cherimola* Mill. cultivars by solid-phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry detection. **Talanta**, v.77 n.3, p.1087-1096, 2009.

FILLIPIN, F.B., SOUZA, L.C. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p.167-194, 2006

FISCHER, D.C.H., GUALDA, N.C.de AMORIN, BACHIEGA, D., CARVALHO, C.S., LUPO, F.N., BONOTTO, S.V., ALVES, M. de OLIVEIRA, YOGI, ÁLVARO, DI SANTI, S.M., ÁVILA, P.E., KIRCHGATTER, Karin, MORENO, P.R.H. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, v.92, p.261-266, 2004.

FOFANA, S., ZIYAEV, R., ABDUSAMATOV, A, ZAKIROV, S.K., Alkaloids from *Annona muricata* leaves. **Chemistry of natural compounds**, v.47, n.2, p.321, 2011

FORGACS, P.; DESCONCLOIS, J.F.; MANSARD, D.; PROVOST, J.; TIBERGIE, R.; TOCQUER, J.; TOUCHEA, A. Dopamine et alcaloïdes tétrahydroisoquinoléiques D' *Annona reticulata* L. **Annonaceae**. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v.15, n.1, p.10-15, 1981.

FORGET, E.J., MENZIES, D. Adverse reactions to first-line antituberculosis drugs. **Expert opinion on drug safety**, v.5, n.2, p.231-249, 2006

FOURNET, A., ARIAS, A.R., FERREIRA, M.E., NAKAYAMA, H., ORTIZ, S.T., SCHININI, A.,

- SAMUDIO, M., BILBAO, N.V. LAVALT, M., BONTÉ, F. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.13, p.189-195, 2000
- FOURNIER, G., LEBOEUF, M., CAVÉ, A. Annonaceae essential oils: a review. **Journal of Essential Oil Research**, v.11, p.131-142, 1999
- FRYDENBERG, A.R., GRAHAM, S.M. Toxicity of first-line drugs for treatment of tuberculosis in children: review. **Tropical Medicine and International Health**, v.14, n.2, p.1329-1339, 2009
- GARCÍA, A., BOCANEGRA-GARCÍA, V., PALMA-NICOLÁS, J.P., RIVERA, G. Recent advances in antitubercular natural products. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.49, p.1-23, 2012
- GARG, S.N., GUPTA, D. Composition of the leaf oil of *Annona squamosa* L. from the North Indian Plains. **Journal of essential oil research**, v.17, p.257-258, 2005
- GAUTAM, R., SAKLANI, A., JACHAK, S.M. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.110, p.200-234, 2007
- GENTRY, E.J., JAMPANI, H.B., KESHAVARZ-SHOKRI, A., MORTON, M.D., VANDER VELTE, D., TELIKEPALLI, H., MITSCHER, L.A., SHAWAR, R., HUMBLE, D., BAKER, W. Antitubercular natural products: Berberine from the roots of commercial *Hydrastis Canadensis* Powder. Isolation of Inactive 8-oxotetrahydrothalifendine, canadine, b-Hydrastine, and two new quinic acid esters, hycandinic acid esters-1 and -2. **Journal of Natural Products**, v.61, n.10, p.1187-1193, 1998
- GONÇALVES, M. A.; LARA, T. A.; PIMENTA L. P. S. Alcalóides oxaporfínicos da madeira de *Annona crassiflora* Mart. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, 2009, Água de Lindóia. **Anais...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Química
- GOLDMAN, A.L., BRAMAN, S.S. Isoniazid: a review with emphasis on adverse effects. **Chest**, v.62, p.71-77, 1972
- GONTIJO, B., CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana, **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p.71-80, 2003
- GONTIJO, C.M.F., MELO, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.338-349, 2004
- GONZALEZ-TRUJANO, M.E., MARTIZEZ, A.L., REYES-RAMIREZ, A., REYES-TREJO, B., NAVARRETE, A., Palmatione isolated from *Annona diversifolia* induces an anxiolytic-like effect in mice. **Planta Médica**, v.72, n.8, p.703-707, 2006.
- GOPINAT, K.W.; GOVINDACHARI, T.R.; PAI, B.R.; VISWANATHAN, n. The structure of reticuline, a new alkaloid from *Annona reticulata*. **Chemische Berichte**, v.92, p.776-779, 1959.
- GRAEBIN, C.S., UCHOA, F.D., BERNARDES, L.S.C., CAMPO, V.L., CARVALHO, I., EIFLER-LIMA, V.L. Antiprotozoal agents: an overview. **Anti-infective agents in medicinal chemistry**, v.8, p.345-336, 2009
- GRAHAM, J.G., PENDLAND, S.L., PRAUSE, J.L., DANZINGER, L.H., SCHUNKE VIGO, J., CABIESES, F., FARNSWORTH. Antimycobacterial evaluation of Peruvian plants. **Phytomedicine**, v.10, p.528-535, 2003
- GRAHAM, S.M., DALEY, H.M., BANERJEE, A., SALANIPONI, F.M., HARRIES, A.D. Ethambutol in tuberculosis: time to reconsider? **Archives of Disease in Childhood**, v.79, p.274-278, 1998
- GRECCO, S.S., REIMÃO, J.Q., TEMPONE, A.G., SARTORELLI, P., CUNHA, R.L.O.R., ROMOFF, P., FERREIRA, M.J.P., FÁVERO, O.A., LAGO, J.H.G. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavonones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae).

Experimental Parasitology, v.130, p.141-145, 2012

GUEDES, P.M.M., URBINA, J.A., LANA, M., AFONSO, L.C.C., VELOSO, V.M., TAFURI, W.L., MACHADO-COELHO, G.L.L., CHIARI, E., BAHIA, M.T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Scrivotrypanum) cruzi* in dog hosts. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.48, n.11, p.4286-4292, 2004

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Aporphine Alkaloids II. **Lloydia**, v.38, n.4, p.275-337, 1975.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids II. **Journal of Natural Products**, v.42 n.4, p.325-360, 1979.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids III. **Journal of Natural Products**, v.46 n.6, p.761-835, 1983.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids IV. **Journal of Natural Products**, v.51 n.3, p.389-474, 1988.

GUINAUDEAU, H. Aporphinoid Alkaloids, V. **Journal of Natural Products**, v.57, n.8, p.1033-1135, 1994

GUO, Z.F.; WANG, X.B.; LUO, J.G.; LUO, J.; WANG, J.S.; KONG, L.Y. A Novel Aporphine alkaloid from *Magnolia officinalis*, **Fitoterapia**, 2011, v.82, p.637-641, 2011

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v.27, p1-93, 2006

HAGGAG, M.Y.; TAHA, K.F. Isolation and determination of liriodenine from *Annona glabra* L. growing in Egypt. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.22, n.1/4, p.153-157, 1983.

HALDAR, A.K., SEN, P., ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions. **Molecular Biology International**, disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3196053/> Acesso em 15 de novembro de 2011

HARBORNE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 4 ed. London, Academic Press, 1993

HARBORNE, J.B., DEY, P.M. **Plant Biochemistry**, London, Academic Press, 1997

HASRAT, J.A.; DE BRUYNE, T.; DE BACKER, J.P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A.J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.49, n.11, p.1145-1149, 1997a.

HASRAT, J.A.; PIETERS, L.; DE 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, 1997b.

HEIFETS, L., LINDHOLM-LEVY, L. Comparison of bacterial activities of streptomycin, amikacin, kanamycin, and capreomycin against *Mycobacterium avium* and *M. tuberculosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, n.8, p.1298-1301, 1989

HEYWOOD, V.H. **Flowering plants of the world**. New York: Oxford University Press, 1993

HILLEMAN, D., MILLER, M.A., PARKER, R., DOERING, P., PIEPER, J.A. Optimal Management of Amiodarone therapy: efficacy and side effects. **Pharmacotherapy**, v.18, n.6, p.138-145, 1998

HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; JACQUEMIN, H.; TOUCHE, A.; FORGACS, P. Alkaloids of Annonaceae. XXXVI. Alkaloids from *Annona crassiflora* Mart. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.16, n.1, p.4-6, 1982.

HOET, S., STÉVIGNY, C., BLOCK, S., OPPERDOES, F., COLSON, P., BALDEYROU, B.,

- LANSIAUX, A., BAILLY, C., QUÉTIN-LECLERCQ, J. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. **Planta Medica**, v.70, p. 407-413, 2004
- HSIEH, T.J.; WU, Y.C.; CHEN, S.C.; HUANG, C.S.; CHEN, C.Y. Chemical constituents from *Annona glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.51, n.4, p.869-876, 2004.
- HUI, Y.H.; WOOD, K.V.; MACLAUGHLIN, J.L. Bullatencin, 4-deoxyasimicin, and the uvariamicins: additional bioactive annonaceous acetogenins from *Annona bullata* Rich. (Annonaceae). **Natural Toxins**, v.1, n.1, p.4-14, 1992.
- IOSET, J.-R. Natural products for Neglected Diseases: A Review. **Current Organic Chemistry**, v.12, p.643-666, 2008
- IUPAC, 2011. IUPAC Blue Book. Disponível em <http://www.acdlabs.com/iupac/nomenclature>. Acesso em 19 de dezembro de 2011.
- IVERSSON, L.B., PIRES, R.B.R., RIBEIRO, M.A., TAKEDA, A.K., ESCRIVÃO JR., A., TOLEZANO, J.E., BURALLI, G.M. Investigação epidemiológica de um novo caso de leishmaniose visceral ocorrido na Grande São Paulo, Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.16, n.4, 1982
- JARAMILLO, M.C., ARANGO, G.J., GONZÁLEZ, M.C., ROBLEDO, VELEZ, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. **Fitoterapia**, v.17, p.183-186, 2000
- JASMER, R.M., NAHID, P., HOPEWELL, P.C. Latent tuberculosis infection. **The New England Journal of Medicine**, v.347, n.23, p.1860-1866, 2002
- JHINGRAN, A., CHAWLA, B., SAXENA, S., BARRETT, M.P., MADHUBALA, R. Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.164, p.111-117, 2009
- JIROVETZ, L., BUCHBAUER, G., NGASSOUM, M.B. Essential Oil Compounds of the *Annona muricata* Fresh Fruit pulp from Cameroon. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.46, p.3719-3720, 1988
- JOLY, A.B. **Botânica, Introdução a taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 2002
- JOHANSEN, S.K., MAUS, C.E., PLIKAYTIS, B.B., DOUTHWAITE, S. Capreomycin binds across the ribosomal subunit interface using *tlyA*-Encoded 2'-O-Methylations in 16S and 23S rRNAs. **Molecular Cell**, v.23, p.173-182, 2006
- JOHNSSON, K., KING, D.S., SCHULTZ, P.G. Studies on the mechanism of action of isoniazid and ethionamide in the chemotherapy of tuberculosis. **Journal of American Chemical Society**, v.117, p.5009-5010, 1995
- KHALLOUKI, F., YOUNOS, C., SOULIMANI, R., BESSIERE, J.M. Chemical composition of the essential oils of *Annona cuneata* L. and *Annona senegalensis* Pers. Stem barks. **Flavour and fragrance journal**, v.17, p.398-400, 2002
- KIM, D.-K., SHIN, T.-Y. Spirobenzyloquinoline alkaloids from *Corydalis ochotensis*. **Archives of Pharmacal Research**, v.23, n.5, p.459-460, 2000
- KIRK, O., GATELL, J.M., MOCROFT, A., PEDERSEN, C., PROENCA, R., BRETTLE, R.P. BARTON, S.E., SUDRE, P., PHILLIPS, A.N., LUNDGREN, J.D. Infections with *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium* among HIV-infected patients after the introduction of highly active antiretroviral therapy. **American Journal of Respiratory and critical care medicine**, v.162, p.865-872, 2000
- KISHORE, N., MISHRA, B.B., TRIPATHI, V., TIWARI, V.K. Alkaloids as potential anti-tubercular agents. **Fitoterapia**, v.80, p.149-163, 2009
- KOICHI, N.; HIDEKAZU, N.; TAKAO, T., Norreticuline and reticuline as possible new agents

for hair growth acceleration. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.20, n.5, p.586-588, 1997.

KONG, H.H.; YANG, T.H.; CHEN, C.M., Constituents of anonaceous plants. I. Alkaloids of *Annona reticulata*. **Beiyi Xuebao**, v.3, p.130-135, 1973.

KOSSOUOH, C., MAOUDACHIROU, M., ADJAKIDJE, V., CHALCHAT, J.-C., FIGUÉREDO, G. Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. Leaves from Benin. **Journal of Essential Oil Research**, v.19, p.307-309, 2007

KUTSCHABSKY, L., SANDOVAL, D., RIPPERGER, H. Bullantatriol, a sesquiterpene from *Annona bullata*. **Phytochemistry**, v.24, n.11, p.2724-2725, 1985

LA PAPE, P. Development of new antileishmanial drugs - current knowledge and future prospects. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.23, n.5, p.708-718, 2008

LAI, H.M., MAZIAN, N.A., MOHAMED YUSOFF, S., HARUN, S.N., WEE, L.J., MOHD THAMBRIN, F. Management of side effects and drug interactions of anti-mycobacterial in tuberculosis – Disponível em http://www.webmedcentral.com/wmcpdf/Article_WMC002749.pdf Acesso em 7 de novembro de 2011

LAN, Y.-H., CHANG, F.-R., YANG, Y.-L., WU, Y.-C. New constituents from stems of *Goniiothalamus amuyon*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.54, n.7, p.1040-1043, 2006

LAPREVOTE, O.; LEBOEUF, M.; CAVE, A.; PROVOST, J.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of the Annonaceae. 88. Alkaloids of *Annona paludosa* Aublet. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.22, n.3, p.159-164, 1988.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; PROVOST, J.; CHIARONI, A.; RICHE, C. Alkaloids of the Annonaceae. Part 33. Annomontine and methoxyannomontine, two new pyrimidine- β -carboline-type alkaloids from *Annona Montana*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry**, v.5, p.1205-1208, 1982^b.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; PROVOST, J.; TOUCHE, A. Isolation of the alkaloid higenamine from *Annona squamosa*; importance of macromolecular absorbant resins in extractive plant chemistry. **Journal of Natural Products**, v.44, n.1, p.115-121, 1981^b.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; TIBERGHIE, R.; PROVOST, J.; TOUCHE, A.; JACQUEMIN, H. Alcaloides des *Annonaceae*. XL. Étude chimique et pharmacologique des alcaloides de 1'*Annona Montana* Macf. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.16, n.3, p.169-184, 1982^c.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVE, 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^a.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVE, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of Annonaceae. XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*. **Planta Medica**, v.42, n.5, p.37-44, 1981^c.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVE, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FORGACS, P. Anomurine et anomuricine, deux nouveaux alcalóides isoquinoléiques de 1'*Annona muricata*. **Planta Medica**, v.39, n.3, p.204-205, 1982.

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

LESSA, M.M., LESSA, H.A., CASTRO, T.W.N., OLIVEIRA, A.O., SCHERIFER, A., MACHADO, P., CARVALHO, E.M., Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. **Revista Brasileira de otorrinolaringologia**, v.73, n.6, p.843-7, 2007

- LIMA, M.R.F., LUNA, J.S., SANTOS, A.F., ANDRADE, M.C.C., SANT'ANA, A.E.G., GENET, J.-P., MARQUEZ, B., NEUVILLE, L., MOREAU, N. Anti-bacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.105, p.137-147, 2006
- LIMA, E.B., PORTO, C., MOTTA, J.O.C., SAMPAIO, R.N.R., Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.2, p.111-124, 2007
- LONG, N.H., DIWAN, V.K., WINKVIST, A. Difference in symptoms suggesting pulmonary tuberculosis among men and woman. **Journal of clinical epidemiology**, v.55, p.115-120, 2002
- LOPES, A.J., CAPONE, D., MOGAMI, R., TESSAROLLO, B., CUNHA, D.L., CAPONE, R.B., SIQUEIRA, H.R., JANSEN, J.M. Tuberculose extrapulmonar: aspectos clínicos e de imagem. **Pulmão RJ**, v.15, n.4, p.253-261, 2006
- LORENZI, H., SOUZA, V.C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.
- LUK, K.D.K. Tuberculosis of the spine in the new millennium. **European Spine Journal**, v.8, p.338-345, 1999
- MACLEOD, A.J., PIERIS, N.M. Volatile Flavor components of Soursop (*Annona muricata*). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.29, p.488-490, 1981
- MAGGI, F., TIRILLINI, B., PAPA, F., SAGRATINI, G., VITTORI, S., CRESCI, A., COMAN, M.M., CHECCHINI, C. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Furelago camprestis* (Besser) Grecescu growing in Central Italy. **Flavour and fragrance journal**, v.24, n.6, p.309-315, 2009
- MAGADULA, J.J., INNOCENT, E., OTIENO, J.N. Mosquito larvicidal and cytotoxic activities of 3 *Annona* species and isolation of active principles. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.3, n.9, p.674-680, 2009
- MAHIOU, V., ROBLOT, F., FOURNET, A., HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana*. **Phytochemistry**, v. 54, p. 709-716, 2000
- MAHIOU, V., ROBLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVÉ, A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **Journal of Natural Products**, v. 57, n. 7, p.890-895, 1994
- MARAIS, B.J., GIE, R.P., OBIHARA, C.C., HESSELING, A.C., SCHAAF, H.S., BEYERS, N. Well defined symptoms are of value in the diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis. **Archives of Disease in Childhood**, v.90, p.1162-1165, 2005.
- MARDSSEN, P.D. Mucosal leishmaniasis ("espundia" Escomel, 1911). **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.80, p.859-876, 1986
- MARQUES, A.M., BARRETO, A.L., BATISTA, E.M., CURVELO, J.A., VELOZO, L.S., MOREIRA, D.L., GUIMARAES, E.F., SOARES, R.M., KAPLAN, M.A. Chemistry and biological activity of essential oils from *Piper clausenianum* (Piperaceae). **Natural Product Communications**, v.5, n.11, p.1837-1840, 2010
- MARTINEZ-VAZQUEZ, M.; DE LA CUEVA LOZANO, D.G.; ESTRADA-REYES, R.; GONZALEZ-LUGO, N.M.; RAMIREZ APAN, T.; HEINZE, G. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. **Fitoterapia**, v.76, n.7/8, p.733-736, 2005.
- MARTIN, A., MORCILLO, N., LEMUS, D., MONTORO, E., DA SILVA TELLES, M.A., SIMBOLI, N., PONTINO, M., PORRAS, T., LEÓN, C., VELASCO, M., CHACON, L., BARRERA, L., RITACCO, V., PORTAELS, F., PALOMINO, J.C., Multicenter study of MTT and resazurin assays for testing susceptibility to first-time anti-tuberculosis drugs, **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.9, n.8, p.901-906, 2005

- MCLAUGHLIN, J.L. Paw Paw and Cancer: Annonaceous Acetogenins from Discovery to Commercial Products. **Journal of Natural Products**, v.71, p.1311-1321, 2008
- MEDEIROS, M.G.F., SILVA, A.C., CITO, A.M., BORGES, A.R., LIMA, S.G., LOPES, J.A., FIGUEIREDO, R.C. *In vitro* antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitology International**, v.60, n.3, p.237-241, 2011
- MELLO-SILVA, R., PONTES, A.F. Annonaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Boletim Botânico da Universidade de São Paulo**, v.23, n.1, p.71-84, 2005
- METCALFE, C.R., CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons**, Oxford at the Clarendon Press, London. 276p.
- MESQUITA, M.L., DESRIVOT, J., BORRIES, C., FOURNET, A, PAULA, J.E., GRELIER, P., ESPINDOLA, L.S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, n.7, p.783-787, 2005
- MIGLORI, G.B., EKER, B., RICHARDSON, M.D., SOTGIU, G., ZELLWEGER, J.-P., SKRAHINA, A., ORTMANN, J., GIRARDI, E., HOFFMANN, H., BESOZZI, G., BEVILACQUA, N., KIRSTEN, D., CENTIS, R., LANGE, C. A retrospective TBNET assessment of linezolid safety, tolerability and efficacy in multidrug-resistant tuberculosis. **European Respiratory Journal**, v.34 n.2, p.387-393, 2009
- MISHRA, B.B., KALE, R.R., SINGH, R.K., TIWARI, V.K. Alkaloids: future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v.80, p.81-90, 2009
- MITROPOULOS, P., KONIDAS, P., DURKIN-KONIDAS, M. New world cutaneous leishmaniasis: updates review of current and future diagnosis and treatment. **Journal of American Academy of Dermatology**, v.63, n.2, p.309-322, 2010
- MOLLOV, N.M., KIRJAKOV, H.G., YAKIMOV, G.I. Two new spiroisoquinoline alkaloids from *Fumaria*. **Phytochemistry**, v.11, p.2331-2332, 1972
- MONTENEGRO, H., GUTIÉRREZ, M., ROMERO, L.I., ORTEGA-BARRÍA, E., CAPSON, T.L., RIOS, L.C. Aporphine alkaloids from *Guatteria spp.* with leishmanicidal activity. **Planta Medica**, v.69, p. 677-679, 2003
- MONTORO, E., LEMUS, D., ECHEMENDIA, M., MARTIN, A., PORTAELS, F., PALOMINO, J.C. Comparative evaluation of nitrate reduction assay, the MTT test and the resazurin microtitre assay for the drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. **J. Antimicrobial Chemotherapy**, v.55, n.4,p. 500-505, 2004
- MONZOTE, F.L., SARRIEGO, R.I., MONTALVO, A.A., GARRIDO, L.N., SCULL, L.R., ABREU, P.J. Propiedades antiprotozoarias de aceites esenciales extraídos de plantas cubanas. **Revista Cubana de Medicina Tropical**, v.56, n.3, p.230-233, 2004
- MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A review. **Open Antimicrobial Journal**, v.1, p.9-19, 2009
- MORAES-SOUZA, H., BORDIN, J.O. Strategies for Prevention of Transfusion-Associated Chagas' Disease. **Transfusion Medicine Reviews**, v.10, n.3, p.161-170, 1996
- MORAIS, T.R., ROMOFF, P., FÁVERO, O.A., REIMÃO, J.Q., LOURENÇO, W.C., TEMPONE, A.G., HRISTOW, A.D., DI SANTI, S.M., LAGO, J.H.G., SARTORELLI, P., FERREIRA, M.J.P. Anti-malarial, anti-trypanosomal, and anti-leishmanial activities of jacaranone isolated from *Pentacalia desiderabilis* (Vell.) Cuatrec. (Asteraceae). **Parasitology Research**, v. 110, p.95-101, 2012
- MORITA, H.; SATO, Y.; CHAN, K.L.; CHOO, C.Y.; ITOKAWA, H.; TAKEYA, K.; KOBAYASHI, J. Samoquasine A, a benzoquinazoline alkaloid from the seeds of *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v.63 n.12, p.1707-1708, 2000.

- NERES, J., BRYCE, R.A., DOUGLAS, K.T. Rational drug design in parasitology: trans-sialidase as a case study for Chagas disease. **Drug Discovery Today**, v.13, n.3/4, p.110-117, 2008
- NEVES, D.P., GOMES, C.F.L., IGLÉSIAS, J.J.F., BARÇANTE, J.M.P., DOS SANTOS, R.L.C. **Parasitologia Dinâmica**, 3.ed., São Paulo: Atheneu, 2009
- NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v.70,p,461-477, 2007
- NIST (2005). NIST/EPA/HHF Mass Spectral Library, NIST Mass Spectral Search Program (NIST 05, Version 2.0d), The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, MD, USA, 2005
- NUNES, C.S., YOSHIZAWA, J.K., OLIVEIRA, R.Z., LIMA, A.P., OLIVEIRA, L.Z., LIMA, M.V.N. Leishmaniose mucosa: considerações epidemiológicas e de tratamento. **Revista Brasileira de Medicina Familiar e Comunidade**, v.6, n.18, p.52-56, 2011
- NUNN, P., PORTER, J., WINSTANLEY, P. Thiacetazone – avoid like poison or use with care? **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.87, p.578-582, 1993
- OGUNWANDE, I.A., EKUNDAYO, O, OLAWORE, O, N., KASALI, A.A, Essential oil of *Annona reticulata* L. Leaves from Nigeria, **Journal of essential oil research**, v.18, p.374-376, 2006
- OKUNADE, A.L., ELVIN-LEWIS, M.P.F., LEWIS, W.H. Natural antimycobacterial metabolites: current status. **Phytochemistry**, v.65, p.1017-1032, 2004
- OLIVEIRA, A.B.; OLIVEIRA, G.G.; CARAZZA, F.; MAIA, J.G. Geovanine, a new azaanthracene alkaloid from *Annona ambotay* Aubl. **Phytochemistry**, v.26, n.9, p.2650-2651, 1987.
- OLIVEIRA, F. De, AKISUE, G., AKISUE, M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 415p.
- OLIVEIRA, L.F., SCHUBACH, A.O., MARTINS, M.M., PASSOS, S.L., OLIVEIRA, R.V., MARZOCHI, M.C., ANDRADE, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v.118, p.87-96, 2011
- OMENA, M.C., NAVARRO, D.M.A.F., PAULA, J.E., LUNA, J.S., LIMA, M.R.F., SANT'ANA, A.E.G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, v.98, n.13, 2549-2556, 2007
- OSORIO, E., ARANGO, G.J., JIMÉNEZ, N., ALZATE, F., RUIZ, G., GUTIÉRREZ, D., PACO, M.A. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.630-635, 2007
- PANIZ-MONDOLFI, A.E., PÉREZ-ÁLVAREZ, A.M., LANZA, G., MÁRQUEZ, E., CONCEPCIÓN, J.L. Amiodarone and itraconazole: a rational therapeutic approach for the Treatment of Chronic Chagas' Disease. **Chemotherapy**, v.55, p.228-233, 2009
- PAPASTAVROS, T., DOLOVICH, L.R., HOLBROOK, A., WHITEHEAD, L., LOEB, M. Adverse events associated with pyrazinamide and levofloxacin in the treatment of latent multidrug-resistant tuberculosis. **Canadian Medical Association Journal**, v.167, n.2, p.131-136, 2002
- PARREIRA, N.A., MAGALHÃES, L.G., MORAIS, D.R., CAIXETA, S.C., SOUSA, J.P.B., BASTOS, J.K., CUNHA, W.R., SILVA, M.L.A., NANAYAKKARA, N.P.D., RODRIGUES, V., SILVA FILHO, A.A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v.7, p.993-1001, 2010
- PAULO, M.Q.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LIMA, E.O.; MAIA, R.F.; BARBOSA, R.C.B.B.;

- KAPLAN, M.A.C. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.36, n.1, p.39-41, 1992.
- PEDRA, R.A., OLIVEIRA, R.A., BEYRODT, C.G.P., FRANÇA, H.H. Desafio em saúde pública: tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. **Revista da Faculdade de Ciências Médicas de Sorocaba**, v.13, n.2, p.5-9, 2011
- PELLISSARI, D.M., CECHINEL, M.P., SOUZA-GOMES, M.L., LIMA JR, F.E.F. Tratamento da Leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.20, n.1., p.107-110, 2011
- PÉREZ-CAMACHO, I., RIVERO-JUÁREZ, A., KINDELÁN, J.M., RIVERO, A. Present-day treatment of tuberculosis and latent tuberculosis infection. **Enfermedades infecciosas y microbiología clínica**, v.29, supl.1, p.41-46, 2011
- PIMENTA, L.P.S., BOAVENTURA, M.A.D., CASSADY, J.M., PRATES, H.T., VIANA, P.A., OLIVEIRA, A.B. Acetogenins from *Annona crassiflora* seeds. **2nd IUPAC International Conference on Biodiversity**, Belo Horizonte, Brasil, 1999
- PINAZO, M.-J., ESPINOSA, G., GÁLLEGO, M., LÓPEZ-CHEJADE, P.L., URBINA, J.A., GASCÓN, J. Case report: successful treatment with posaconazole of a patient with chronic Chagas Disease and systemic lupus erythematosus. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.82, n.4, p.583-587, 2010
- PINHEIRO, M.L.B., XAVIER, C.M., SOUZA, A.D.L., RABELO, D.M., BATISTA, C.L., BATISTA, R.L., COSTA, E.V., CAMPOS, F.R., BARISON, A, VALDEZ, R,H, UEDA-NAKAMURA, T., CELSO, V. Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazonica* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20, n.6, p.1095-1105, 2009
- PIZZOLATTI, M.G., MOREIRA, F. de P.M.; COUTINHO, V.; MONTANHER, A.B.P.; CARO, M.S.B.; BRIGHENTE, I.M.C.; Flavonóides e Triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*-Bioatividade sobre *Artemia salina*. **Química Nova**, v.26, n.3, p.309-311,2003
- PHILIPPOV, S.; KANDE, K.M.; MACKEV, K. Alkaloids of *Annona senegalensis*. **Fitoterapia**, v.66, n.3, p.275-276, 1995.
- PHILIPPOV, S.; MACKEV, K.; TSANKOVA, E.; RODRIGUES, n.H. Liriodenine from *Annona muricata* seeds. **Fitoterapia**, v.65 n.6, p.555, 1994.
- PRADO, M.S.-A.; BRITO, H.O.; NORONHA, E.P.; FRANCA, L.M.; BRITO, L.M.O., Phytochemical analysis composition from *Annona squamosa* (ATA) leaf ethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmácia**. v.89, n.3,p.180-184, 2008
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v.1, p.92-100, 2001
- QUEIROZ, E.F., ROBLLOT, F., CAVÉ, A, PAULO, M. DE Q., FOURNET, A, Pessoaine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v.59, p.438-440, 1996
- RAMESH, V., KATARA, G.K., VERMA, S., SALOTRA, P. Miltefosine as an effective choice in the treatment of post-kala-azar dermal leishmaniasis. **British Journal of Dermatology**, v.165, p.411-414, 2011
- RAO, R.V.K.; KRISHNA, M.; MURTY, n.; RAO, J.V.L.n.S. Occurrence of borneol and canphor and a new terpene in *Annona squamosa*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40 n.5, p.170-171, 1978.
- RAO, R.V.K.; SATYANARAYANA, T. Occurrence of kaurenoic acid in *Annona squamosa*. **Indian Journal of Natural Products**, v.2 n.2, p.8-9, 1986.
- RASAMIZAFY, S.; HOQUEMILLER, R.; CASSELS, B.K.; CÂVE, A. Alkaloids of the

- Annonaceae. Part 81. Alkaloids of *Annona hayesii*. **Journal of Natural Products**, v.50, n.4, p.759-761, 1987.
- RATH, S., TRIVELIN, L.A., IMBRUNITO, T.R., TOMAZELA, D.M., JESÚS, M.N., MARZAL, P.C. Antimoniais empregados no tratamento de leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v.26, n.4, p.550-555, 2003
- RATNAYAKE, S., FANG, X.-P., ANDERSON, J.E., MCLAUGHLIN, J.L. Bioactive constituents from the twigs of *Asimina parviflora*. **Journal of Natural Products**, v.55, n.10. p.1462-1467, 1992
- REITHINGER, R., DUJARDIN, J.-C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, v.7, p.581-596, 2007
- REJÓN-ORANTES, J.C., GONZÁLEZ-ESQUINCA, A.R., MORA, M.P., RÓLDAN, G.R., CORTES, D. Annonomontine, an alkaloid isolated from the *Annona purpurea*, has anxiolytic-like effects in the elevated plus-maze. **Planta Medica**, v.77, p.322-327, 2011
- RIBEIRO, J.F., BRITO, M.A. **Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) (Série Frutas Nativas,12)** Jaboticabal: Funep, 2000
- RINALDI, M.V.N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** São Paulo, 2007. 125p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo
- RIOS, J.L.; CORTES, D.; VALVERDE, S. Acetogenins, aporphinoids, and azaanthraquinone from *Annona cherimólia* seeds. **Planta Medica**, v.55, n.3, p.321-323, 1989.
- RIOS, M.Y., CASTREJÓN, F., ROBLEDO, N., LEÓN, I., ROJAS, G., NAVARRO, V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimolia* (Annonaceae). **Revista de la Sociedad Química de México**, v.47, n.2, p.139-142, 2003
- RITCHIE, J.A., CAMPBELL, A.E.R., CUTHBERT, J., BRUCE, L.G. Treatment of Drug-resistant cases of pulmonary tuberculosis with cycloserine and pyrazinamide. **Tubercle**, v.39, p.298-295, 1958
- ROBBERS, J.E., SPEEDIE, M.K., TYLER, V.E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Williams & Wilkins, 1996. 337p.
- ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; MORETT, C. Alcaloides des Annonacées, XLIV. Alcaloides de *Duguetia obovata*, **Journal of Natural Products**, v.46, n.6, p.862-873., 1983
- ROCHA, D.P., PINTO, G.F.P., RUGGIERO, R., OLIVEIRA, C.A., GUERRA, W., FONTES, A.P.S., TAVARES, T.T., MARZANO, I.M., PEREIRA-MAIA, E.C. Coordenação de metais a antibióticos como uma estratégia de combate à resistência bacteriana. **Química nova**, v.34, n.1, p.111-118, 2011
- RODLOFF, A.C., GOLDSTEIN, E.J.C., TORRES, A. Two decades of imipenem therapy, **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.58, p.916-929, 2006
- ROESLER, R., MALTA, L.G., CARRASCO, L.C., PASTORE, G., Evaluation of the antioxidant properties of brazilian cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, São Paulo, v.71, n.2, p.102-107, 2006.
- ROESLER, R., CATHARINO, R.R., MALTA, L.G., EBERLIN, M.N., PASTORE, G. Antioxidant activities of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food chemistry**, 104, 1048-1054, 2007
- ROSSETTI, M.L.R., VALIM, A.R.M., SILVA, M.S.N., RODRIGUES, V.S. Tuberculose resistente: revisão molecular. *Revista de Saúde Pública*, v.36, n.4, p.525-532, 2002
- RUPPRECHT, J.K., HUI, Y.-H., MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v.53, n.2, p.237-278, 1990

- SAAD, J.M.; HUI, Y.H.; RUPPRECHT, J.K.; ANDERSON, J.E.; KOZLOWSKI, J.F.; ZHAO, G.X.; WOOD, K.V.; MACLAUGHLIN, J.L. Reticulatacin: a new bioactive acetogenin from *Annona reticulata* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v.47, n.16/17, 2751-2756, 1991.
- SAEIDNIA, S., GOHARI, A.R., HADJIAKHOONDI, A. Trypanocidal activity of oil of the young leaves of *Nepeta cataria* L. obtained by solvent extraction. **Journal of Medicinal Plants**, v.7, n.4, p.54-57, 2008
- SAITO, M.L. **Fitoquímica de *Annona cacans* Warming e Quimiossistemática de Annonaceae JUSSIEU**. São Paulo, 1990. 222p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.
- SAITO, M.L. Review of phytochemistry of *Annonaceae* Jussieu. **Lecta-USF**, v.13, n.1/2, p.101-186, 1995.
- SAITO, M.L., ALVARENGA, M.A. Alkaloids from *Annona cacans*. **Fitoterapia**, v.65, n.1., p.87, 1994
- SAMPAIO, R.B.R., LUCAS, I.C., COSTA FILHO, A.V. O uso da associação azitromicina e N-metil-glucamina no tratamento da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania (Leishmania) amazonensis* em camundongos C57BL6. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.82, n.2, p.125-128, 2009
- SANCHEZ, G., ACHA, ESTRADA, O., CARDOZO, A., RUIZ, M.C., FERNANDEZ, A.Z., ALVARADO-CASTILLO, C.P. Norpurpurine, alkaloid isolated from the leaves of *Annona inconformis*, has anti-aggregating effects on human platelets. **Atherosclerosis supplements**, v.12, n.1., p.154, 2011
- SANDOVAL, D.; PREISS, A.; SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H. Annonelliptine, an alkaloid from *Annona elliptica*. **Phytochemistry**, v.24, n.2, p.375-376, 1985.
- SANTIN, R.M., OLIVEIRA, S.A., NAKAMURA, V.C., PRADO, D.F.B., PILOTO, F.I.C., UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus*. **Parasitology research**, v.105, p.1489-1496, 2009
- SANTORO, G.F., CARDOSO, M.G., GUIMARÃES, L.G.L., FREIRE, J.M., SOARES, M.J. Antiproliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v.134, n.11, p.1649-1656, 2007
- SANTORO, G.F., CARDOSO, M.G., GUIMARÃES, L.G.L., MENDONÇA, L.Z., SOARES, M.J. *Trypanosoma cruzi*: activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L., and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v.116, p.283-290, 2007
- SANTOS, L.P., BOAVENTURA, M.A.D. Classiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). **Química Nova**, v.17, n.5, 387-391, 1994
- SANTOS, L.P., BOAVENTURA, M.A.D., SUN,N,-J, CASSADY, J.M., OLIVEIRA, A.B. Araticulin, a bis-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. **Phytochemistry**, v.42, n.3, 705-707, 1996a
- SANTOS, L.P., BOAVENTURA, M.A.D., OLIVEIRA, A.B., CASSADY, J.M. Grossamide and N-trans-caffeoyltyramine from *Annona crassiflora* Seeds. **Planta medica**, v.62, p.76 ,1996^b
- 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, A.F., SANT'ANA, A.E.G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v.8, n.2, p.115-120, 2001
- SANTOS, P.R.D.dos; MORAIS, A.A.; BRAZ-FILHO,R.. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.14, n.3, p.396-400, 2003

SANTOS, D.O.; COUTINHO, C.E.R., MADEIRA, M.F.; BOTTINO, C.G. VIEIRA, R.T.; NASCIMENTO, S.B.; BERNARDINO, A; BOURGUIGNON, S.C.; CORTE-REAL, S.; PINHO, R.T.; RODRIGUES, C.R.; CASTRO, H.C. Leishmaniasis treatment – a challenge that remains: a review. **Parasitology Research**, v.103, p1-10, 2008.

SARIEGO, I., MONZOTE, L., SCULL, R., DIAZ, A., CABALLERO, Y. Activity of essential oils from cuban plants against *Leishmania donovani* and *Trichomonas vaginalis*. **International Journal of Essential Oil Therapeutics**, v.2, n.4, p.172-174, 2008

SCHECTER, G.F., SCOTT, C., RAFTERY, A., FLOOD, J., MASE, S. Linezolid in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. **Clinical Infectious Diseases**, v.50, p.49-55, 2010

SCHIFF, P.L. Jr. Bisbenzylisoquinoline alkaloids., **Journal of Natural Products**, v.54, n.3, p.645-749, 1991

SCIFINDER. Disponível em <http://scifinder.cas.org>. Acesso em 18 de dezembro de 2011.

SEDDON, J.A., HESSELING, A.C., MARAIS, B.J. McILLERON, H. PELOQUIN, C.A., DONALD, P.R., SCHAFF, H.S. Paediatric use of second-line anti-tuberculosis agents: review. *Tuberculosis*, v.92, n.1, p.9-17, 2012

SHARMA, S.K., MOHAN, A. Extrapulmonary tuberculosis. **Indian Journal of Medical Research**, v.120, p.316-353, 2004

SILVA, D.B., TULLI, E.C.O., MILITÃO, G.C.G., COSTA-LOTUFO, L.V., PESSOA, C., MORAES, M.O., ALBUQUERQUE, S., SIQUEIRA, J.M. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine**, v.16, p.1059-1063, 2009

SIMEON, S.; RIOS, J.L.; VILLAR, A. Alkaloids from *Annona cherimolia* (Mill.) stem bark. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.23, n.3, p.159-161, 1989.

SIMEON, S.; RIOS, J.L.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of *Annona cherimolia* (Mill.) stem bark alkaloids. **Pharmazie**, v.45, n.6, p.442-443, 1990.

SIMÕES, C.M.O.S., SCHENKEL, E.L., GOSMANN, G., MELLO, J.C.P., PETROVICK, P.R., **Farmacognosia: da planta ao medicamento**; Porto Alegre/Florianópolis:Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2004.

SIMPSON, D.G., WALKER, J.H. Hypersensitivity to Para-aminosalicylic Acid. **The American Journal of Medicine**, v.29, n.2, p.297-306, 1960

SINGH, S., SIVAKUMAR, R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v.10, p.307-315, 2004

SIQUEIRA, C.A.T. **Aspectos químicos e atividade antiprotozoária in vitro de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)**. São Paulo, 2010. 178p. Dissertação de Mestrado – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo

SIQUEIRA, C.A.T., OLIANI, J., SARTORATTO, A., QUEIROGA, C.L., MORENO, P.R.H., TEMPONE, A.G., REIMÃO, J.Q., FISCHER, D.C.H. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* Mart., Annonaceae, and in vitro antiprotozoal activity. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.1, p.33-40, 2011

SOMOSKOVI, A., PARSONS, L.M., SALFINGER, M. The Molecular basis of resistance to isoniazid, rifampin, and pyrazinamide in *Mycobacterium tuberculosis*. **Respiratory research**, v.2, n.3, p. 164-168, 2001

SONNET, P.E.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors. II. Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.60, n.8, p.1254-1256, 1971.

SOTO, J., ARANA, B.A., TOLEDO, J., RIZZO, N., VEGA, J.C., DIAZ, A., LUZ, M., GUTIERREZ, P., ARBOLEDA, M., BERMAN, J.D., JUNGE, A.K., ENGEL, J., SINDERMAN, N.

- H. Miltefosine for the new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p. 1266-1272, 2004
- SOUZA, M.V.N. Rifampicina, um importante fármaco no combate à tuberculose. **Revista Brasileira de Farmacia**, v.86, n.3, p.92-94, 2005
- SOUZA, N.P., ALMEIDA, A.B.P.F., FREITAS, T.P.T., PAZ, R.C.R., DUTRA, NAKAZATO, L., SOUZA, V.R.F. Leishmania (Leishmania) infantum chagasi em canídeos silvestres mantidos em cativeiro, no Estado de Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.43, n.3., p.333-335, 2010
- STAUBER, L.A., FRANCHINO, E.M., GRUN, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in the golden hamster. **Journal of Protozoology**, v.5, p.269-273, 1958
- STEICHEN, O., MARTINEZ-ALMOYNA, L., DE BROUCKER, T., Isoniazid induced neuropathy: consider prevention. **Revue des Maladies Respiratoires**, v.23, n.2, p.157-160, 2006
- STEVENS, D.A., RENDON, A., GAONA-FLORES, V., CATANZARO, A., ANSTEAD, G.M., PEDICONE, L., GRAYBILL, J.R. Posaconazole therapy for chronic refractory coccidioidomycosis. **Chest**, v.132, n.3, p.952-958, 2007
- SULSEN, V.P., CAZORLA, S.I., FRANK, F.M., DI LEO RILA, P.M.R., ANESINI, C.A., YAPU, G.D., TURBA, A.G., BANDONI, A.L., MALCHIODI, E.L., MUSCHIETTI, L.V., MARTINO, V.S. *In vitro* antiprotozoal activity and chemical composition of *Ambrosia tenuifolia* and *A.scabra* essential oils. **Natural Product Communications**, v.3, n.4, p.557-562, 2008
- TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K.-K., KOYAMA, M., TSUKAMOTO, K. An Improved colorimetric assay for interleukin 2. **Journal of Immunological Methods**, v.93, n.2, p. 157-165, 1986
- TADIC, D., CASSELS, B.K., LEBOEUF, M., CAVÉ, A. Kinbaline and the aporphine biogenesis of azaanthracene and azafluorene alkaloids. **Phytochemistry**, v.26, n.2, p.537-541, 1987
- TAKAHASHI, J.A., VIEIRA, H.S., SILVA, E.A.B., MARIA, A.D., OLIVEIRA, A.B.de., CHIARI, E. Preparation and activity of diterpenoids against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, supl., p.118-120, 2002.
- TAKAYAMA, K., KILBURN, J.O. Inhibition of synthesis of arabinogalactan by ethambutol in *Mycobacterium smegmatis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.33, n.9, p.1493-1499, 1989
- TARIKU, Y., HYMER, A., HAILU, A., ROHLOFF, J. *In vitro* evaluation of antileishmanial activity and toxicity of essential oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. **Chemistry & Biodiversity**, v.8, n.4, p.614-623, 2011
- TEIXEIRA, A.C., PAES, M.G., GUERRA, J.O., PRATA, A., SILVA-VERGARA, M.L. Low efficacy of azithromycin to treat cutaneous leishmaniasis in Manaus, AM, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.49, n.4, p.235-238, 2007
- TEMPONE, A.G., BORBOREMA, S.E.T., DE ANDRADE, H.F.Jr., GUALDA, N.C.de., YOGI, A., CARVALHO, C.S., BACHIEGA, D., LUPO, F.N., BONOTTO, S.V., FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v.12, p.382-390, 2005.
- TEMPONE, A.G., SARTORELLI, P., MADY, C., FERNANDES, F. Natural products to anti-trypansomal drugs: an overview of new drug prototypes for American trypanosomiasis. **Cardiovascular & Hematological Agents in Medicinal Chemistry**, v.5, p.222-235, 2007
- TIAN, L.; HAN, Y.; MENG, Z.; XIA, C.; ZHANG, J. Study on chemical constituents of *Annona glabra*. **Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao**, v.32, n.1, p.10-12, 2001.

- TIAN, L.; YANG, N.; MENG, Z.; HAN, Y. Studies on chemical constituents of *Annona glabra*. **Zhongguo Yaoxue Zazhi**, v.38, n.4, p.258-260, 2003.
- TIMMINS, G.S., DERETIC, V. Mechanisms of action of isoniazid. **Molecular microbiology**, v.62, n.5, p.1220-1227, 2006
- TIUMAN, T.S., SANTON, A.O., UEDA-NAKAMURA, T., DIAS FILHO, B.P., NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v.15, p.525-532, 2011
- TRABULSI, L.R. & ALTHERUM, F. **Microbiologia**. 5ed.São Paulo:Atheneu, 2008 760p.
- TREBUCQ, A. Should ethambutol be recommended for routine treatment of tuberculosis in children? A Review of the literature. **International Journal of Tuberculosis and Lung Disease**, v.1, n.1, p.12-15, 1997
- TSAI, I.L., LIOU, Y.F., LU, S.T. Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities. **Gaoxiong Yixue Kexue Zazhi**, v.5, n.3, p.132-145, 1989
- TUCHINDA, P., POHMAKOTR, M., MUNYOO, B., REUTRAKUL, V., SANTISUK, T. An azaanthracene alkaloid from *Polyalthia suberosa*. **Phytochemistry**, v.53, p.1079-1082, 2000
- UEDA-NAKAMURA, T., MENDONÇA-FILHO, R.R., MORGADO-DÍAZ, J.A., MAZA, P.K., DIAS FILHO, B.P., CORTEZ, D.A.G., ALVIANDO, D.S., ROSA, M.S.S., LOPES, A.H.C.S., ALVIANO, C.S., NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v.55., p.99-105, 2006
- URBINA, J.A., PAYARES, G., SAJONA, C., LIRA, R., ROMANHA, A.J. *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.21, p.27-38, 2003
- URBINA, J.A. New insights in Chagas' disease treatment. **Drugs of the future**, v.35, n.5, p.409-419, 2010^a
- URBINA, J.A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. **Acta Tropica**, v.115, p.55-68, 2010^b
- URZUA, A.; CASSELS, B.K. Preliminary study of *Annona cherimolia* alkaloids. **Revista Latinoamericana de Química**, v.8, n.3, p.133-134, 1977.
- WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis : A thin layer chromatography atlas.**, 2. ed, Berlin : Springer, 1997.
- WAGNER, H.; REITER, M.; FERSTL, W. new drugs with cardiotoxic activity. I. Chemistry and pharmacology of the cardiotoxic active principle of *Annona squamosa* L. **Planta Medica**, v.40, n.1, p.77-85, 1980.
- WALKER, C.B. Selected antimicrobial agents: mechanism of action, side effects and drug interactions. **Periodontology 2000**, v.10, p.12-28, 1996
- WANG, F., LANGLEY, R., GULTEN, G., DOVER, L.G., BESRA, G.S., JACOBS JR.,W.R., SACCHETTINI, J.C. Mechanism of thiomide drug action against tuberculosis and leprosy. **Journal of experimental medicine**, v.204, n.1, p.73-78, 2007
- WARTHEN, D.; GOODEN, E.L.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, n.5, p.637-638, 1969.
- WATERMAN, P.G., MUHAMMAD, I. Sesquiterpenes and alkaloids from *Cleistopholis patens*. **Phytochemistry**, v.24, n.3, p.523-527, 1985
- WENDEL, S., GONZAGA, A.L. Chagas' Disease and Blood Transfusion: a New World Problem? **Vox Sanguinea**, v.64, p.1-12, 1993

WHITMAN, M.S., TUNKEL, A.R. Azithromycin and Clarithromycin: overview and comparison with erythromycin, **Infection Control and Hospital Epidemiology**, v.13, n.6, p.357-368, 1992

WHO, 1996 **Manual on Visceral Leishmaniasis Control**. Disponível em http://www.who.int/leishmaniasis/surveillance/training/en/WHO_LEISH_96.40.pdf Acesso em 10 de outubro de 2011.

WHO. 2008 **Tuberculosis Facts**. Disponível em http://www.who.int/tb/publications/2008/factsheet_abril08.pdf Acesso em 13 de julho de 2011

WHO, 2010. **First WHO report on neglected tropical diseases**. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf Acesso em 1 de novembro de 2011

WHO, 2011^a Disponível em http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_cutaneous_2009.png. Acesso em 15 de outubro de 2011.

WHO, 2011^b – Disponível em http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_leishmaniasis_visceral_2009.png Acesso em 15 de outubro de 2011

WHO, 2011^c - Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em 16 de outubro de 2011

WHO, 2011^d – Disponível em http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_chagas_2009.png Acesso em 16 de outubro de 2011

WHO, 2011^e – Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/chagas/en/index.html Acesso em 16 de outubro de 2011

WHO, 2011^f WHO – Global Tuberculosis Report 2011. Disponível em http://www.who.int/entity/tb/publications/global_report/2011/gtbr11_full.pdf Acesso em 2 de novembro de 2011.

WHO, 2011^g – Disponível em http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Global_TB_incidence_2010.png Acesso em 18 de outubro de 2011.

WHO, 2011^h – Guidelines for the programmatic management of drug-resistant tuberculosis – 2011 update. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241501583_eng.pdf. Acesso em 4 de novembro de 2011.

WINK, M. **Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids**. In: BROSSI, A. (ed.). The Alkaloids. San Diego: Academic, v.43, p.1-118, 1993

WIRASATHIEN, L., PENGSUPARP, T., MORIYASU, M., KAWANISHI, K., SUTTISRI, R. Cytotoxic C-Benzylated Chalcone and Other Constituents of *Ellipeiopsis cherreensis*. **Archives of Pharmacal Research**. Vol.6, n.6, p.497-502, 2006

WU, Y.C.; CHANG, F.R.; CHEN, C.Y. Tryptamine-derived amides and alkaloids from the seeds of *Annona atemoya*. **Journal of Natural Products**, v.68, n.3, p.406-408, 2005.

WU, Y.C.; CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; HSIEH, T.J.; CHO, C.P. Chemical constituents from *Annona glabra* III. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.47, n.4B, p.913-920, 2000.

WU, Y.C.; CHANG, F.R.; CHEN, K.S.; KO, F.N.; TENG, C.M. Bioactive alkaloids from *Annona squamosa*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v.46, n.5, p.439-460, 1994.

WU, Y.C.; CHANG, F.R.; WEI, J.L.; TENG, C.M. Two new 7-dehydroaporphine alkaloids and

antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. **Phytochemistry**, v.49, n.7, p.2015-2018, 1998.

WYLLIE, S.G., COOK, D., BROPHY, J.J., RICHTER, K.M. Volatile Flavor Components of *Annona atemoya* (Custard Apple). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.35, p.768-770, 1987

VALTER, J.L., ALENCAR, K.M.C., SARTORI, A.L.B., NASCIMENTO, E.A., CHANG, R., MORAIS, S.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, p.373-378, 2008

VAN DEN DOOL, H., KRATZ, D.J. A generalization of the retention index system including liner temperature programmed gás-liquid chromatography. **Journal of Chromatography**, v.11, p.463-467, 1963

VANNINI, A.B., SANTOS, T.G., FLEMING, A.C., PURNHAGEN, L.R.P., LOURENÇO, L.A., BUTZKE, E.T.B., KEMPT, M., BEGNINI, I.M., REBELO, R.A., DALMARCO, E.M. Chemical characterization and antimicrobial evaluation of the essential oils from *Baccharia uncinella* D.C. and *Baccharis semiserrata* D.C. (Asteraceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.24, n.6., p.547-554, 2012

VILA-NOVA, N.S., MORAIS, S.M., FALCÃO, M.J.C., MACHADO, L.K.A., BEVILÁQUA, C.M.L., COSTA, I.R.S., BRASIL, N.V.G.P.S., ANDRADE JR., H.R. Atividade leishmanicida e citotoxicidade of compounds from two Annonaceae species cultivated in Northeastern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.5, p.567-571, 2011

VILAR, J.B., FERREIRA, F.L., FERRI, P.H., GUILLO, L.A., CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v.68, n.1, p.141-147, 2008

VILLAR, A, MARES, M., RIOS, J.L., CORTES, D. Alkaloids from *Annona cherimolia* leaves. **Journal of Natural Products**, v.48, n.1., p.1510-152, 1985

VILLAR, A, MARES, M. RIOS, J.L., CANTON, E., GOBERNADO, M. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids. **Pharmazie**, v.42, n.4, p.248-250, 1987

VILLAR DEL FRESNO, R.; RIOS CANAVATE, J.L. Alkaloids from *Annona cherimolia* seed. **Journal of Natural Products**, v.46, n.3, p.438, 1983.

VORA, A **Drug Review – Terizidone**. **Journal of Association Physician of India**, v.58, p.267-268, 2010

XU, H.-B., JIANG, R.-H., XIAO, H.-P. Clofazimine in the treatment of multidrug-resistant tuberculosis. *Clinical Microbiology and Infection*, 2011 in press

YADAY, D.K., SINGH, N., DEV, K., SHARMA, R., SAHAI, M., PALIT, G., MAURYA, R. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. **Fitoterapia**, v.82, p.666-675, 2011

YANG, Y.L., CHANG, F.R., WU, Y.C. Annosqualine: a novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa*. **Helvetica Chimica Acta**, v.87, n.6, p.1392-1399, 2004

YANG, B.; YANG, H.; LI, X.; TANG, Y.; ZHANG, N.; CHEN, J., Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC-DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v 49, n.1,p.140-144, 2009.

YANG, T.H.; CH'En, C.M.; KONG, H.H. Constituents of anonaceous plants grow in Taiwan. I. Alkaloids of *Annona reticulata*. **Taiwan Kexue**, v.24, n.3/4, p.99-104, 1970a.

YANG, T.H.; CHEN, C.M. Constituents of *Annona squamosa*. **Journal of Chinese Chemical**

Society, v.17, n.4, p.343-350, 1970

YANG, T.H.; CHEN, C.M. Studies on the alkaloids of *Annona glabra* II. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v.25, n.1/2, p.1-7, 1973.

YANG, T.H.; CHEN, C.M.; KONG, H.H. Constituents of anonaceous plants I. Alkaloids of *Annona reticulata*. **Beiyi Xuebao**, v.3, p.130-135, 1973

YANG, T.-H., CHEN, C.-M. Studies on the alkaloids of *Annona glabra* L. (II) **Journal of the Taiwan pharmaceutical Association**, v.25, n.1/2, p.266-272, 1973

YANG, T.H.; CHENG, M.Y. The alkaloids of *Annona reticulata* L. II. **Taiwan Yaoxue Zazhi**, v.39, n.3, p.195-201, 1987.

YANG, T.H.; CHEN, C.M. Studies on the alkaloids of *Annona glabra* L. II. **Proceedings of the national Science Council: Part 2. Biological, Medical and Agricultural Sciences**, v.7, p.177-184, 1974

YANG, T.H.; CHEN, C.M. Studies on the alkaloids of *Annona Montana* Macf. **Proceedings of the national Science Council, Republic of China**, v.3, n.1, p.63-66, 1979.

YANG, T.H.; LIN, S.J.; WANG, H.C. Studies on the constituents of *Annona cherimola*, structure of anomoline. **Zhonghua Yaoxue Zazhi**, v.43, n.6, p.457-463, 1991.

YANG, X.J.; XU, L.Z.; SUN, N.J.; WANG, S.C.; ZHENG, Q.T. Chemical constituents of *Annona squamosa*. **Yaoxue Xuebao**, v.27, n.3, p.185-190, 1992.

YOU, M., WICKRAMARATNE, D.B.M., SILVA, G.L., CHAI, H., CHAGWEDERA, T.E., FARNSWORTH, N.R., CORDELL, G.A., KINGHORN, A.D., PEZZUTTO, J.M. (-)-Roemerine, an aporphine alkaloid from *Annona senegalensis* that reverses the multidrug-resistance phenotype with cultured cells. **Journal of Natural Products**, v.58, n.4, p.598-604, 1995

ZHANG, Y. WADE, M.M., SCORPIO, A., ZHANG H., SUN, Z. Mode of action of pyrazinamide: disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v.52, p.790-795, 2003

ZHELJAZKOV, V.D., CANTRELL, C.L., TEKWANI, B., KHAN, S.I. Content, composition, and bioactivity of the essential oils of three basil genotypes as a function of harvesting. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v.56, p.380-385, 2008