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

Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos
alcalóides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.

Maria Valéria Nani Rinaldi

Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE

ORIENTADOR:
PROF. DR. PAULO ROBERTO HRIHOROWITSCH MORENO

São Paulo
2007

Maria Valéria Nani Rinaldi

Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcalóides
isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestrado

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
orientador/presidente

Prof. Dr. Dominique Corinne Hermine Fischer

Prof.Dr. Maria Claudia Marx Young

São Paulo, 04 de outubro de 2007.

Aos meus queridos pais, Luis Antonio e Maria Luiza e ao meu irmão Luis Henrique

Aos meus amados, Mateus e Giulia

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno pela orientação, apoio, estímulo e amizade dedicada durante o tempo de realização deste trabalho.

À Professora Dra. Ivana B. Suffredini da Universidade Paulista - UNIP, por ter me iniciado na pesquisa. Obrigada pela dedicação, amizade e por todo o apoio no mestrado.

Ao Dr Drauzio Varella, diretor do Centro de Pesquisas Oncológicas da Universidade Paulista - UNIP, pela oportunidade de desenvolver um projeto de mestrado com a espécie *Annona hypoglauca* Mart, proporcionando o desenvolvimento deste trabalho e no meu crescimento pessoal.

À Prof. Dra. Maria Cláudia Marx Young do Instituto Botânico pela disciplina marcante “Metabólitos Secundários: Aspectos Ecológicos” e pela sua colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Leila, Ângelo e Adriana e a todos os funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas da Universidade de São Paulo, pela organização e solicitude na busca de referências bibliográficas.

À Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo auxílio durante todo esse tempo.

Aos meus pais pela compreensão e apoio financeiro durante todo este tempo.

Aos Professores da disciplina de Biofarmacognosia do Departamento de Farmácia da FCF/USP.

À Dra. Maria Inês Gonçalves, pela obtenção dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C .

À Ingrid, companheira e amiga de todas as horas por compartilhar ideais e por ter contribuído com as análises de RMN e elucidação estrutural dos compostos isolados e pela sua disponibilidade de transmitir conhecimentos de práticas de laboratório que contribuíram muito no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Mateus Paciência curador do herbário da Universidade Paulista – UNIP, pela identificação botânica da espécie em estudo, e pelos ensinamentos de botânica na Amazônia.

À Daniela da Universidade Paulista – UNIP, pela sua dedicação na realização dos ensaios de atividade antibacteriana, e pela amizade que compartilhamos há um bom tempo.

Ao Sergio da Universidade Paulista – UNIP, pela realização dos ensaios citotóxicos e pela amizade.

À Jeanine, amiga e companheira de todas as horas, por compartilhar idéias e ideais.

À Erica, parceira das disciplinas de pós-graduação, pela amizade e companheirismo de irmã durante todo esse tempo.

À Amanda, pelo auxílio na realização das análises por CG-EM e, sobre tudo, pela amizade e companheirismo.

À Sabrina, companheira de laboratório que acrescentou conhecimentos práticos no desenvolvimento desse trabalho.

Aos colegas de trabalho, Elvis, Sergio, Marcos, Ana Flavia, Rosilene e Bruno pelo convívio agradável durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Elizangela, pela sua dedicação à casa e aos cuidados com o Mateus.

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

“No próximo milênio, os países que tiverem mais florestas e culturas primitivas preservadas serão beneficiados na pesquisa científica e na alimentação.”

Orlando Villas Bôas, 1998

“No final, conservamos somente o que amamos,
Amaremos somente o que compreendemos,
Compreendemos somente o que nos é ensinado.”

Bada Dioum

“Cada homem é seu próprio absoluto legislador, o dispensador de glória ou escuridão para si mesmo, o decretador de sua vida, sua recompensa, sua punição”

Autor desconhecido

RESUMO

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

Annona hypoglauca Mart. foi coletada em área inundada da Floresta Amazônica, próximo à Manaus (Brasil). Os alcalóides foram obtidos do extrato bruto do caule por partição ácido-base, e a partir do resíduo dessa extração foi realizada a partição com solventes de diferentes polaridades, originando as frações livres de alcalóides. A partir da análise de CG-EM dos alcalóides totais foi possível caracterizar sete alcalóides aporfínicos (actinodafinina, anonaina, glaucina, isoboldina, isodomeesticina, nornuciferina e roemerina) e possivelmente duas protoberberinas (esculerina e caseadina). Os alcalóides totais foram fracionados em coluna cromatográfica e posteriormente purificados em placa cromatográfica preparativa permitindo o isolamento de dois alcalóides aporfínicos: actinodafinina e isoboldina. As estruturas desses produtos naturais foram definidos com base em espectros de dados, incluindo ^1H RMN, ^{13}C RMN, ^{13}C DEPT e CG-EM. Pela primeira vez a ocorrência da actinodafinina esta sendo reportada em uma espécie de *Annona*. O extrato bruto, as frações livres de alcalóides, os alcalóides totais e suas frações foram submetidos a avaliação da atividade antibacteriana por microdiluição e atividade citotóxica *in vitro* frente a células de tumores humanos. Para todos os extratos testados, somente os alcalóides totais e suas frações apresentaram atividade frente a bactérias Gram +. No ensaio de citotoxicidade com linhagens de células de tumores, o extrato bruto foi capaz de inibir o crescimento de todas as linhagens celulares testadas, apresentando efeito letal para a linhagem de Câncer de Cólon (KM-12), enquanto as frações livres de alcalóides demonstraram baixa atividade. Por outro lado, as frações livres de alcalóides apresentaram atividade mais pronunciada para a linhagem de Câncer de Pulmão (NCIH-460) do que os alcalóides. Assim, a atividade citotóxica encontrada no extrato bruto é decorrente do sinergismo ou complementação entre os componentes das frações alcaloídicas e não alcaloídicas, isto é, nenhuma das frações isoladamente é responsável pela atividade observada no extrato bruto.

Palavras-chaves: Annonaceae; *Annona hypoglauca*; atividade antibacteriana; atividade citotóxica; alcalóides isoquinolínicos.

ABSTRACT

RINALDI, M.V.N. Antibacterial and cytotoxic evaluation of isoquinoline alkaloids from *Annona hypoglauca* Mart. Dissertation, Master Degree- Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

Annona hypoglauca Mart. was collected in the flooded areas of the Amazonian Forest near Manaus (Brazil). The alkaloids were obtained from the stems crude extract by acid-base partitioning and the remaining alkaloid-free extract was partitioned with organic solvents of different polarity. The GC/MS analysis of the total alkaloids allowed the identification of seven aporphine alkaloids (actinophanine, anonaine, glaucine, isoboldine, isodomeesticine, nornuciferine and roemerine) and possibly two proberberine alkaloids (scoulerine and caseadine). The total alkaloids were fractionated by column chromatography and further purified by preparative thin-layer chromatography allowing the isolation of two aporphine alkaloids: actinodaphnine and isoboldine. The structures of these natural products were defined based on their spectral data, including ^1H NMR, ^{13}C NMR, ^{13}C DEPT and CG/MS. This is the first report for the occurrence of actinodaphnine in *Annona* species. The crude extract, alkaloid-free organic extracts, total alkaloids and its fractions were tested for their antibacterial activity by the microdilution broth assay and cytotoxic activity against *in vitro* tissue culture cells of human. From all the extracts assayed, only the total alkaloids and their fractions showed a relevant antibacterial activity against Gram positive organisms.

In the cytotoxicity assay with human tumor cell lines, the crude extract was able to inhibit the growth of all cell lines tested, with a lethal effect for the colon cancer (KM-12) cell line. The evaluation of this activity with the total alkaloid and alkaloid-free fractions indicated selectivity for the different cellular lines. The alkaloid fraction presented high growth inhibition for the colon cancer cell line (KM-12), while the alkaloid-free fractions displayed lower activity. On the other hand, the alkaloid-free fractions showed a higher activity for the lung cancer cell line (NCIH-460) than the total alkaloids. Thus, the cytotoxic activity found in the crude extract is the result of the synergism or complementary activity among the components of the alkaloid and alkaloid-free fractions, e.g, none of the fractions separately is responsible for the activity observed in the crude extract.

Keywords: Annonaceae; *Annona hypoglauca*; antibacterial activity; cytotoxic activity; isoquinoline alkaloids.

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribuição geográfica de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	26
Figura 2. Flor de <i>A. hypoglauca</i> Mart. Fonte: Missouri Botanical Garden, 2007.....	27
Figura 3. Fruto de <i>A. hypoglauca</i> Mart. Fonte: Missouri Botanical Garden, 2007.....	27
Figura 4. Rotas biossintéticas, para a formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir do <i>L</i> -tirosina (DEWICK, 1997).....	31
Figura 5. Origem biossintética dos alcalóides isoquinolínicos a partir do esqueleto benzilisoquinolínico (CAVÉ, 1985).....	32
Figura 6. Alcalóides fenantrênicos encontrados em <i>A. montana</i> e <i>A. muricata</i> (LEBOEUF <i>et al.</i> , 1982).....	50
Figura 7. Exsicata de <i>A. hypoglauca</i> Mart. depositada no herbário da UNIP	59
Figura 8. Esquema da metodologia empregada na obtenção do extrato bruto de <i>A. hypoglauca</i>	62
Figura 9. Esquema da metodologia empregada na obtenção dos alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	64
Figura 10. Cromatografia a gás da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	76
Figura 11. Alcalóides caracterizados por CG-EM na fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	77
Figura 12. Espectro de massas do composto TR=20,1 min, obtido da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	77
Figura 13. Íon (a) característico do espectro de aporfínas (OHASHI <i>et al.</i> , 1963) e produto do fragmento (b) retro-Diels-Alder (JACKSON; MARTIN, 1966)....	78

Figura 14.	Mecanismo de fragmentação da nornuciferina (OHASHI et al., 1963)...	79
Figura 15.	Espectro de massas do composto TR=21 min, obtido da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	80
Figura 16.	Mecanismo de fragmentação da roemerina.....	80
Figura 17.	Espectro de massas do composto TR=21,31 min, obtido da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	81
Figura 18.	Mecanismo de fragmentação da anonaina.....	82
Figura 19.	Espectro de massas do composto TR=25,8 min, obtido da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	82
Figura 20.	Mecanismo de fragmentação da isodomeesticina.....	83
Figura 21.	Espectro de massas do composto TR=26,6 min, obtido da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	84
Figura 22.	Mecanismo de fragmentação da glaucina (JACKSON; MARTIN, 1966)..	85
Figura 23.	Espectro de massas do composto TR=27,4 min, obtido da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	86
Figura 24.	Mecanismo de fragmentação da actinodafinina (JACKSON; MARTIN, 1966)....	86
Figura 25.	Espectro de massas do composto TR=27,9 min, obtido da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	87
Figura 26.	Mecanismo de fragmentação da isoboldina (JACKSON; MARTIN, 1966)....	88
Figura 27.	Espectro de massas do composto TR=28,5 min, obtido da fração de alcalóides totais de <i>A. hypoglauca</i>	89
Figura 28.	Mecanismo de fragmentação da esculerina (BATTERSBY et al., 1966).....	90
Figura 29.	Mecanismo de fragmentação da caseadina (BUDZIKIEWICZ; DJERASSI; WILLIAMS, 1964; CHEN; MACLEAN, 1968).....	91

	Página
Figura 30. Cromatograma da sub-fração FA5.2 pelo Método 2.....	94
Figura 31. Espectro ^1H -RMN do alcalóide 1 (300MHz, CDCl_3).....	95
Figura 32. Espectro ^{13}C -RMN do alcalóide 1 (75MHz, CDCl_3).....	97
Figura 33. Cromatograma a gás da sub-fração FA5.3 como Método 1 (CG-EM). ..	99
Figura 34. Espectro de ^1H -RMN de FA5.3 (200MHz, CDCl_3).....	100
Figura 35. Espectro ^1H -RMN de FA5.3 (200MHz, CDCl_3).....	101
Figura 36. Espectro de ^1H -RMN do alcalóide 5 (300MHz, CDCl_3).....	104
Figura 37. Espectro ^{13}C -RMN do alcalóide 5 (75MHz, CDCl_3).....	105
Figura 38. Espectro de DEPT-135 do alcalóide 5 (75MHz, CDCl_3).....	106

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Ocorrência de alcalóides isoquinolínicos simples no gênero <i>Annona</i>	33
Tabela 2. Ocorrência de alcalóides benzilisoquinolínicos no gênero <i>Annona</i> ...	34
Tabela 3. Ocorrência de alcalóides tetra-hidroprotoberberinas no gênero <i>Annona</i>	37
Tabela 4. Ocorrência de alcalóides pró-aporfínicos no gênero <i>Annona</i>	40
Tabela 5. Ocorrência de alcalóides aporfínicos no gênero <i>Annona</i>	41
Tabela 6. Ocorrência de alcalóides oxoaporfínicos no gênero <i>Annona</i>	48
Tabela 7. Alcalóides isoquinolínicos que apresentam atividade farmacológica e biológica.....	51
Tabela 8. Atividades biológicas descritas para alcalóides aporfínicos encontradas em espécies de <i>Annona</i> (RIOS; SIMEON; VILLAR, 1989).	54
Tabela 9. Condições de Análise por CG-EM.....	66
Tabela 10. Fases Movéis utilizadas na coluna para a fração de alcalóides totais de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	67
Tabela 11. Rendimento do extrato bruto e da fração de alcalóides totais de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	74
Tabela 12. Rendimento das frações obtidas da torta após partição com solventes..	75
Tabela 13. Rendimento das frações obtidas no fracionamento por coluna cromatográfica dos alcalóides totais de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	92
Tabela 14. Atribuições dos valores do espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) do alcalóide 1 isolado de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	95

Tabela 15.	Atribuições dos valores do espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) do alcalóide 1 isolado de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	96
Tabela 16.	Atribuições dos valores do espectro de ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) dos alcalóides presentes na FA5.3 (mistura) de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	101
Tabela 17.	Atribuições dos valores do espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 presente na FA6.2 isolado de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.	103
Tabela 18.	Atribuições dos valores do espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 presente na FA6.2 isolado de <i>Annona hypoglauca</i> Mart...	107
Tabela 19.	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bacteriostática mínima (CBM) dos extratos e dos alcalóides de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	108
Tabela 20.	Atividade citotóxica frente à células de tumor humano dos extratos e frações de <i>A. hypoglauca</i>	111

LISTA DE ABREVIACÕES

Abreviações	Significado
ATCC	<i>American type culture collection</i>
CBM	Concentração bactericida mínima
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG-EM	Cromatografia o gás acoplada a espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
DMSO	Dimetilsulfido
DNA	cido desoxirribonucléico
FA	Fração de alcalóides
HeLa	Linhagem celular humana maligna derivada do carcinoma cervical de Herietta Lacks
5-HT	5-Hidrxi-triptamina (serotonina)
<i>j</i>	Constante de acoplamento
KM-12	Linhagem celular de câncer de cólon
Mart.	Carl Friedrich Philipp von Martius (botânico)
m/z	Ração massa/carga
NCIH-460	Linhagem celular de câncer de pulmão
PC-3	Linhagem celular de câncer de próstata
R _f	Fator de retenção
¹³ C - RMN	Ressonância magnética nuclear de nuclídeo de carbono 13

Abreviações	Significado
^1H - RMN	Ressonância magnética nuclear de nuclídeo de hidrogênio 1
RPMI-8226	Linhagem celular de câncer de leucemia
SF-268	Linhagem celular de câncer do sistema nervoso central
SNC	Sistema nervoso central
TR	Tempo de retenção
UFC	Unidade formadora de colônia
UNIP	Universidade Paulista
UV	Ultra-violeta
V/V	Proporção Volume/Volume

SUMÁRIO

	Página
1 INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Família Annonaceae.....	22
1.1.1 Dados botânicos e quimiotaxonômicos.....	22
1.2 Gênero <i>Annona</i>	25
1.2.1. <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	26
1.3 Metabólitos secundários em <i>Annona</i>	28
1.3.1 Acetogeninas.....	29
1.3.2 Alcalóides isoquinolínicos de <i>Annona</i>	30
1.3.2.1 Alcalóides isoquinolínicos simples.....	33
1.3.2.2 Alcalóides benzilisoquinolínicos.....	33
1.3.2.3 Protoberberinas.....	36
1.3.2.4 Pró-aporfínicos.....	39
1.3.2.5 Alcalóides aporfínicos.....	39
1.3.2.6 Alcalóides oxoaporfínicos.....	48
1.3.2.7 Fenantrênicos.....	50
1.4 Atividades farmacológicas dos alcalóides isoquinolínicos.....	51
2 OBJETIVOS.....	57
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	58
3.1 Coleta da planta.....	58
3.2 Análise química.....	60
3.2.1 Material vegetal.....	60
3.2.2 Reagentes e solventes.....	60
3.2.3 Equipamentos	60

3.2.4 Obtenção dos extratos.....	61
3.2.4.1 Extrato bruto do caule de <i>Annona hypoglauca</i> Mart.....	61
3.2.4.2 Extração de alcalóides totais (AT).....	63
3.2.4.3 Fracionamento da torta.....	65
3.2.4.4 Análise dos alcalóides por CG-EM.....	66
3.2.4.5 Isolamentos dos compostos da fração de alcalóides totais (AT).....	66
3.2.4.5.1 Fracionamento dos alcalóides totais (AT) em coluna cromatográfica.....	66
3.2.4.5.2 Análise cromatográfica das frações alcaloídicas	68
3.2.4.4.3 Isolamento e purificação dos alcalóides.....	68
3.3 Ensaios biológicos.....	69
3.3.1 Atividade antibacteriana.....	69
3.3.1.1 Preparo das amostras.....	69
3.3.1.2 Obtenção do inóculo.....	70
3.3.1.3 Ensaio antibacteriano.....	70
3.3.2 Teste de citotoxicidade frente a células de tumores humanos.....	71
3.3.2.1 Preparo das amostras.....	71
3.3.2.2 Atividade citotóxica.....	72
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	74
4.1 Análise química.....	74
4.1.1 Rendimento dos extratos.....	74
4.1.2 Isolamento dos alcalóides.....	75
4.1.2.1 Fracionamento dos alcalóides totais (AT) por coluna cromatográfica.....	91

4.1.2.2 Caracterização e identificação dos compostos isolados	93
4.1.2.2.1 Fração FA5.....	93
4.1.2.2.2 Fração FA6.....	102
4.2 Ensaio biológico.....	108
4.2.1 Resultados obtidos na atividade antibacteriana.....	108
4.2.2 Resultados obtidos na atividade citotóxica frente a células de tumores humanos.....	110
5 CONCLUSÕES.....	113
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115
ANEXO	123

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios o homem busca na natureza recursos para melhora de sua condição de vida e sobrevivência. O uso de plantas medicinais na recuperação da saúde tem evoluído desde as formas mais simples de tratamento, como infusões, emplastros, elixires, etc, até as formas sofisticadas de fabricação industrial (LORENZI, 2002).

Uma grande parte desses fármacos, ainda hoje, é extraída de fontes naturais, sendo o Brasil, promissor em substâncias bioativas por apresentar uma diversidade biológica que é estimada em 19 % do total terrestre (GIULIETTI et al., 2005). A possibilidade de se identificar produtos naturais com possível utilização terapêutica aumenta com a diversidade das espécies (SUFFREDINI, 2000).

Algumas substâncias bioativas isoladas de fontes naturais, após alguns anos de estudo, acabam se tornando modelos para novos fármacos. Um exemplo disso é o paclitaxel, composto antitumoral isolado de *Taxus brevifolia* Nutt (Taxaceae), descoberto em um programa de triagem de extratos vegetais na década de 60 (WALL; WANI, 1995). Em função do crescente interesse terapêutico na molécula, era necessário que sua síntese fosse realizada, porém, devido à sua complexidade estrutural, isto só foi possível 30 anos após seu isolamento (NICOLAOU et al., 1994) e, ainda hoje, sua síntese total ainda é comercialmente inviável.

Um outro exemplo é a espécie vegetal *Catharanthus roseus* (L.) G.Don (Apocynaceae), originária de Madagascar. Essa espécie é fonte de pelo menos sessenta alcalóides, entre os quais a vincristina e vimblastina, que são efetivos no tratamento da leucemia (NODARI; GUERRA, 2001).

A maioria dos princípios ativos de importância farmacológica encontrada

nos extratos vegetais, de modo geral, é oriunda de uma variedade de metabólitos secundários que conferem às plantas, entre outras funções, proteção a herbívoros, a infecções por microrganismos e aos raios UV. A atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e alelopatia, também são exemplos das funções destes metabólitos. Dentre as diversas classes de metabólitos secundários podemos destacar os alcalóides que se encontram distribuídos nas Angiospermas.

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

Em 1870 foi elucidada a primeira estrutura de um alcalóide, a coniina, e, mais tarde, foi também o primeiro a ser sintetizado com sucesso (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001). Cerca de 1000 alcalóides foram caracterizados em plantas em 1950, e em 1973 cerca de 3300 foram elucidadas. Após o surgimento de técnicas espectroscópicas, ocorreu um avanço na elucidação das estruturas, e recentemente foi feito uma análise (em um banco de dados NAPRALERTsm indicando 26.900 estruturas de alcalóides já conhecidas de fontes variadas (plantas, fungos, organismos marinhos, mamíferos e etc.) que foram isoladas a partir de 150.000 produtos naturais caracterizados (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001). Desse total, 21.120 alcalóides foram isolados de plantas na sua maior parte nas Angiospermas com distribuição restrita

em Pteridófitas e nas Gimnospermas (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

Dentro das plantas superiores, das 83 ordens de plantas, segundo Cronquist (1981), 16 não contêm alcalóides. Recentemente, foi feito um levantamento no NAPRALERTsm, indicando que os alcalóides estão distribuídos em 7.231 espécies de plantas superiores em 1.730 gêneros (14,2 %) pertencentes a 186 famílias (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001).

1.1 Família Annonaceae

1.1.1 Dados botânicos e quimiotaxonômicos

A família Annonaceae é considerada em alguns sistemas de classificação tradicionais como Angiosperma basal por apresentar atributos considerados primitivos como hábito lenhoso; perianto bem desenvolvido, muitas vezes sem diferenciação em cálice e corola (tépalas); polinização por coleópteros; numerosos estames, gineceu apocárpico, pólen monossulcados (CRONQUIST, 1981; APG, 2003).

A classificação taxonômica, segundo Cronquist (1981), é a seguinte:

Reino - Plantae

Divisão – Magnoliophyta

Classe - Magnoliopsida

Subclasse – Magnoliidae

Ordem – Magnoliales

Família - Annonaceae Juss.

Segundo a classificação filogenética das Angiospermas, baseada no Grupo de Filogenia das Angiospermas II (APG, 2003). A família Annonaceae pertence ao grupo das Eudicotiledôneas, no clado das Magnoliídeas (arbóreas), esse clado é constituído por quatro ordens (Canellales, Laurales, Magnoliales e Piperales). A ordem Magnoliales é constituída por três famílias as Magnoliaceae, Myristicaceae e Annonaceae (LORENZI; SOUZA, 2005).

A família Annonaceae é muito diversa, possuindo espécies com hábitos: arbóreo, arbustivo, subarbustivo e raramente na forma de liana. Esta família compreende aproximadamente 1.300 gêneros e 2.300 espécies que se distribuem nas regiões pantropicais com predomínio nos trópicos do Velho e Novo Mundo (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001; HEYWOOD, 1993). Nos neotrópicos a família é representada por 40 gêneros e cerca de 650 espécies, com centro de distribuição na Região Amazônica e Guianas. No Brasil ocorrem 33 gêneros e cerca de 250 espécies. Os gêneros mais comuns são *Annona*, *Guatteria*, *Xylopia* e *Rollinia*.

Algumas características botânicas relevantes para a identificação de Annonaceae são o odor forte do corte do tronco ou ramos, presença de fibras longas e resistentes na casca do caule, conhecida popularmente como envira e pela aparência de marcas de chamas no corte transversal do tronco. As folhas são dísticas (exceto em *Tetrameranthus*, com folhas espiraladas) alternas, simples, sem estípulas e margem inteira. Flores isoladas ou reunidas em inflorescências, hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado no cálice e corola, em geral são trímeras e carnosas; estames numerosos, dispostos de forma espiralada; ovário súpero com numerosos carpelos apocárpicos com um a muitos óvulos (JOLY, 2002).

As Annonaceae têm flores de tamanhos que variam de pequeno, como em *Bocageopsis multiflora* e *Xylopia amazônica*, a grande com em *Cymbopetalum euneurum* e *Duguetia ulei*. As cores variam, podendo ser esbranquiçadas, creme-amarelas, esverdeadas, alaranjadas e até cor-de-vinho. A antese acontece em duas etapas, a receptividade dos estigmas ocorre num dia, e a liberação do pólen no dia seguinte. As flores que estão em funcionamento emitem um odor que varia muito nas espécies e muitas delas imitam o odor de frutos maduros. Os compostos odoríferos emitidos pelas flores volatilizam com o aumento da temperatura na antese (termogênese) que pode atingir até 12° acima da temperatura do ambiente.

Os frutos podem ser apocárpicos e sincápicos, carnosos e indeiscentes ou deiscentes (JOLY, 2002). A dispersão das sementes na família se dá principalmente por meio de animais, com pássaros, peixes, répteis e mamíferos.

Tradicionalmente, nos estudos quimiotaxonômicos, as distribuições dos metabólitos secundários são comparadas com classificações e hipóteses filogenéticas baseadas em dados morfológicos e moleculares com o objetivo de avaliar a congruência entre os conjuntos de informações.

Espécies de Annonaceae têm sido intensivamente investigadas, com motivação inicial gerada pelo isolamento de 849 alcalóides de 201 espécies em 59 gêneros (CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001), estruturalmente derivados da isoquinolina, seguindo a ordem das isoquinolinas simples; benzilisoquinolinas; bisbenzilisoquinolinas; protoberberinas; aporfinas; oxoaporfinas (LEBOUEUF et al, 1982) e, posteriormente, devido à detecção de acetogeninas (BERMEJO et al., 2005).

A diversidade estrutural destas classes de produtos naturais e sua ampla atividade biológica, como efeito citotóxico, antitumoral e pesticida (CAVÉ et al., 1997), tem estimulado estudos fitoquímicos de alguns gêneros desta família, especialmente nos gêneros *Annona*, *Guatteria*, *Rollinia*, *Gonianthalamus* e *Uvaria*.

1.2 Gênero *Annona*

O gênero *Annona* inclui aproximadamente 140 espécies tropicais com várias espécies nativas sendo conhecidas popularmente por fruta-do-conde, pinha, graviola, beribá e cabeça-de-negro. As espécies mais comuns no Brasil são *A. muricata*, *A. cherimola*, *A. coriacea*, *A. reticulata*, *A. tenuiflora* e *A. squamosa* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2003).

Economicamente, espécies de *Annona* têm grande importância como fonte de frutos comestíveis, sendo amplamente cultivadas e comercializadas, inclusive no Brasil, como *A. squamosa* (fruta-do-conde, pinha ou ata), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimóia), todas não nativas. Essas espécies de interesse comercial são consideradas importantes, principalmente, devido às propriedades nutricionais dos frutos. Seus frutos são usados *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (LORENZI; MATOS, 2002).

Estudos de etnobotânica realizados na Amazônia têm trazido dados da medicina tradicional dos povos da região. Dentre esses, podemos destacar a utilização do suco do fruto da espécie *A. muricata*, que é usado em bochechos no combate às aftas, internamente como antitérmico, diurético e no combate de insônias leves; a infusão das folhas secas é usada contra insônias graves, dores de cabeça e como emagrecedor, o decocto das folhas contém o óleo essencial com ação parasitocida, antirreumática e antinevrálgica (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2003).

1.2.1 *Annona hypoglauca* Mart.

A espécie *A. hypoglauca* Mart ocorre em florestas inundadas do Suriname, da Amazônia Brasileira e Boliviana. Sua distribuição geográfica está centrada na parte norte da América do Sul, especialmente na região da Amazônia e Guianas (Figura 1).

Figura 1. Distribuição geográfica de *Annona hypoglauca* Mart.
Fonte: Missouri Botanical Garden, 2007.

Suas árvores crescem em região de igapó, apresentando hábito arbóreo ou de liana com até 9 metros de altura, folhas pecioladas, ovado-oblonga, agudas membranosas, glaucas ou cinzentas na parte abaxial, flores amarelas por fora e brancas por dentro com uma mácula púrpura na base das pétalas e dispostas em racimos de 2 a 4 e presença de fibras resistentes e longas nas cascas chamada de envira (MARTIUS, 1841). Nas Figuras 2 e 3 estão ilustradas fotos da flor e do fruto de *A. hypoglauca* Mart. que foram registradas por Gentry (1979) em uma coleta realizada na cidade de Loreto, no Rio Nanay/Peru. No fruto, suas sementes são de cor preta, com presença de arilo esbranquiçado consistente e carnososo (GOTTSBERGER, 1978).

Figura 2. Flor de *A.hypoglauca* Mart.

Fonte: Missouri Botanical Garden, 2007.

Figura 3. Fruto de *A.hypoglauca* Mart.

Fonte: Missouri Botanical Garden, 2007.

A dispersão das sementes dessa espécie se dá principalmente por meio de peixes, no mês de março, quando o nível da água sobe, onde podemos observar frutos verdes que amadurecem em suas árvores dentro da água, até atingir cor amarela (maduro) com odor característico de fruta. O fruto maduro cai na superfície da água e flutua, aonde alguns peixes como tambaqui, jatuarana, pacu branco, pacu e sardinha comem o fruto engolindo as sementes sem quebrá-las (GOTTSBERGER, 1978).

Na Amazônia o fruto de *A. hypoglauca* é conhecido como beribá, sendo consumido de forma comestível pelos habitantes da região, não sendo cultivada, mas com importância econômica local nos mercados da região.

1.3 Metabólitos secundários em *Annona*

Constituintes químicos com valor nutricional e importância econômica foram encontrados no gênero *Annona*, como açúcares, proteínas, lipídios, taninos, ácido ascórbico, pectinas, aminoácidos, polifenóis e vitaminas do tipo beta-caroteno e do complexo B (DI STASI; LIMA, 2003; LORENZI; MATOS, 2002).

Os açúcares obtidos nas espécies de *Annona* como sacarose na polpa dos frutos de *A. cherimolia* e *A. squamosa*, glicose no fruto de *A. squamosa* e na folha de *A. muricata*, frutose no fruto de *A. squamosa*, enquanto, em *A. muricata* foi encontrado sacarose, glicose e frutose. (LEBOUEF et al., 1982a)

As classes de flavonóides encontradas no gênero *Annona* foram flavonas (luteolina) e flavonóis (canferol, quenferol, quercetina, ramnetina, rutina e isorramnetina) descritos para as espécies *A. crassiflora*, *A. tomentosa*, *A. monticola*, *A. warmingiana*, *A. dolichocharpa* (SANTOS; SALATINO, 2000).

Outros constituintes como a lignana (*L*-siringaresinol), um aldeído aromático (siringaldeído) e dois esteróides foram isolados do caule de *A. montana*. Em *A. squamosa* e *A. senegalensis* foram isolados monoterpenos, enquanto diterpenos foram descritos em *A. squamosa* e sesquiterpenos em *A. bullata* inúmeros compostos terpenóides foram isolados do fruto de *A. muricata* e de *A. reticulata* (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2003).

1.3.1 Acetogeninas

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

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

Em uma revisão, compreendendo o período de 1998 a 2004, Bermejo et al. (2005) reportam o isolamento de 417 acetogeninas em espécies desta família, sendo que a predominância dos compostos descritos era para espécies de *Annona*.

As espécies de *Annona* mais estudadas até o momento são: *A. muricata*, onde foram isoladas inúmeras acetogeninas tetra-hidrofurânicas com atividade antiparasitária (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2003; PARDHASARADHI et al., 2005). Os extratos (orgânico e aquoso) das sementes de *A. squamosa* exibiram potente atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais de mama (MCF-7) e leucemia (K-562), sendo as acetogeninas responsáveis pela indução da morte celular

(apoptose) dessas células (PARDHASARADHI et al., 2005). Desta classe, esquamocina, isolada de *A. squamosa*, foi capaz de induzir a apoptose da linha celular HL-60 de leucemia. Outras espécies como *A. coriaceae*, *A. nutans*, *A. reticulata*, *A. bullata*, *A. montana*, *A. glabra*, *A. crassiflora*, tiveram vários tipos de acetogeninas isoladas, alguns compostos que apresentam atividade biológica. (BERMEJO et al., 2005).

1.3.2 Alcalóides isoquinolínicos de *Annona*

Quimicamente, os alcalóides são definidos como baixo peso molecular com caráter básico com um ou mais átomos de nitrogênio em um sistema cíclico (HARBORNE, 1984).

A origem biossintética dos alcalóides isoquinolínicos inicia pela rota do ácido chiquímico a partir de carboidratos. O ácido chiquímico é responsável pela formação dos aminoácidos aromáticos como a *L*-fenilalanina e *L*-tirosina, sendo esses os precursores dos alcalóides isoquinolínicos.

Todos os alcalóides isoquinolínicos são derivados dos benzilisoquinolínicos, a formação biossintética desse esqueleto tem início com a reação de condensação de duas unidades fenólicas, ambas derivadas do aminoácido *L*-tirosina, a dopamina e dos 3,4-di-hidróxi-fenilacetaldeído. A Figura 4 mostra a rota biossintética a partir de *L*-tirosina, para a formação da estrutura benzilisoquinolínica. (DEWICK, 1997).

Figura 4. Rota biossintética para a formação da estrutura benzilisoquinolínica a partir do L-tirosina (DEWICK, 1997)

Os alcalóides isoquinolínicos do tipo benzilisoquinolínico são encontrados com grande frequência na família Annonaceae distribuídos nas seguintes séries: berberinas, aporfínicos, oxoaporfínicos, fenantrenos, cularinas, morfinandienonas, isoquinolonas e os bisbenzilisoquinolínicos, o esquema da figura 5 ilustra a origem desses alcalóides a partir de seu provável precursor a reticulina, constituinte das várias espécies de *Annona* (CAVÉ, 1985).

Figura 5. Origem biossintética dos alcalóides isoquinolínicos a partir do esqueleto benzilisoquinolínico (CAVÉ, 1985)

1.3.2.1 Alcalóides isoquinolínicos simples

No gênero *Annona* foram encontradas, até o momento, apenas três estruturas de isoquinolinas simples (Tabela 1).

Tabela 1. Ocorrência de alcalóides isoquinolínicos simples no gênero *Annona*.

Alcalóides	Espécie	Referência
<p>cherianoine</p>	<i>A. cherimola</i>	CHEN et al., 2001.
<p>salsolinol</p>	<i>A. reticulata</i>	LEBOEUF et al., 1982a.
<p>thalifoline</p>	<i>A. squamosa</i>	YANG; CHANG; WU, 2004

1.3.2.2 Alcalóides benzilisoquinolínicos

Podemos observar na Tabela 2, nove benzilisoquinolínicos que foram isolados de várias espécies de *Annona*, o mais freqüente é a reticulina que foi isolada pela primeira vez nesse gênero por Meyer (1941), sendo denominado de “muricinina” e, mais tarde, foi comprovado de que se tratava de fato da reticulina. Os compostos anomuricina, anomurina e anoneliptina são especiais por

possuírem um substituinte a mais no C-5 (LEBOUEF et al., 1981.; SANDOVAL et al 1985) e outras observações como OH e OMe na posição R (CHEN et al., 2001).

Tabela 2 Ocorrência de alcalóides benzilisoquinolínicos no gênero *Annona*.

Alcalóides	Espécie	Referência
<p>annocherina A</p>	<i>A. cherimola</i>	CHEN et al., 2001.
<p>annocherina B</p>	<i>A. cherimola</i>	CHEN et al., 2001.
<p>anoneiptina</p>	<i>A. elliptica</i>	SANDOVAL et al., 1985.
<p>anomuricina</p>	<i>A. muricata</i>	LEBOEUF et al., 1981; LEBOEUF et al., 1982a.

Tabela 2(Cont.).Ocorrência de alcalóides benzilisoquinólicos no gênero *Annona*.

Alcalóides	Espécie	Referência
<p>anomurina</p>	<i>A. muricata</i>	LEBOEUF et al., 1981; LEBOEUF et al., 1982a.
<p>coclaurina</p>	<i>A. cristalensis</i> <i>A. montana</i> <i>A. muricata</i> <i>A. reticulata</i>	FAUST et al., 1981 LEBOUEF et al., 1982b. LEBOEUF et al., 1981. LEBOEUF et al., 1982a.
<p>higenamina</p>	<i>A. squamosa</i>	LEBOEUF et al., 1982a.
<p>O-metilarmepavina</p>	<i>A. squamosa</i>	BHAUMIK et al., 1979; LEBOEUF et al., 1982a.

Tabela 2(Cont.). Ocorrência de alcalóides benzilisoquinolínicos no gênero *Annona*

Alcalóides	Espécie	Referência
<i>A. chemolia</i>	LEBOEUF et al., 1982a.
	<i>A. glabra</i>	LEBOEUF et al., 1982a.
	<i>A. muricata</i>	LEBOEUF et al., 1981
	<i>A. montana</i>	LEBOEUF et al., 1982b.
	<i>A. paludosa</i>	LAPREVOTE et al., 1988.
	<i>A. purpurea</i>	WU et al., 2000.
	<i>A. reticulata</i>	LEBOEUF et al., 1982a.
	<i>A. squamosa</i>	LEBOEUF et al., 1982a.
	<i>A. spinescens</i>	QUEIROZ; ROBLOT; CAVÉ, 1996.
reticulina		

1.3.2.3 Protoberberinas

Na Tabela 3 podemos observar a presença dos alcalóides tetra-hidroprotoberberinas em cinco espécies de *Annona*, sendo *A. paludosa* à espécie com maior ocorrência desse tipo de alcalóide (LAPREVOTE et al., 1988). Enquanto, coreximina foi considerado um dos alcalóides majoritários, com rendimento de 10 % dos alcalóides totais de *A. muricata*. Os compostos, pessoina e espinosina foram isolados pela primeira vez de *A. spinescens* (QUEIROZ; ROBLOT; CAVÉ, 1996).

Tabela 3. Ocorrência de alcalóides tetra-hidroprotoberberinas no gênero *Annona*

Alcalóides	Espécie	Referência
<p>coreximina</p>	<i>A. montana</i> <i>A. muricata</i>	LEBOUÉF et al. 1981. LEBOUÉF et al. 1981.
<p>coritencina</p>	<i>A. cherimola</i>	MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2005.
<p>di-hidropalmatina</p>	<i>A. paludosa</i>	LAPREVOTE et al., 1988.
<p>escoulerina</p>	<i>A. paludosa</i>	LAPREVOTE et al., 1988.
<p>espinosina</p>	<i>A. spinescens</i>	QUEIROZ; ROBLLOT; CAVÉ, 1996.

Tabela 3 (Cont.). Ocorrência de alcalóides tetra-hidroprotoberberinas no gênero *Annona*

Alcalóides	Espécie	Referência
<p>isocoreximina</p>	<i>A. cherimola</i>	MARTÍNEZ-VÁZQUEZ et al., 2005.
<p>pessoina</p>	<i>A. spinescens</i>	QUEIROZ; ROBLLOT; CAVÉ, 1996.
<p>tetra-hidropalmatina</p>	<i>A. paludosa</i>	LAPREVOTE et al., 1988.
<p>xilopina</p>	<i>A. spinescens</i>	QUEIROZ; ROBLLOT; CAVÉ, 1996.
<p>anosqualina</p>	<i>A. squamosa</i>	YANG; CHANG; WU, 2004.

1.3.2.4 Pró-aporfínicos

Os alcalóides pró-aporfínicos são encontrados com menor frequência na família Annonaceae, apenas cinco foram isolados. Na Tabela 4 podemos observar três pró-aporfínicos presentes no gênero *Annona* (LEBOEUF et al., 1982a).

1.3.2.5 Alcalóides aporfínicos

Os aporfínicos têm uma ampla representação dentro do grupo dos alcalóides isoquinolínicos, encontrados somente em plantas das famílias Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae (ordem Ranales), Papaveraceae (ordem Rhodales) e Rhamnaceae (ordem Rhamnales) (GUINAUDEAU; LEBUEF; CAVÉ, 1975). Na família Annonaceae a presença dos alcalóides aporfínicos são constante em espécies do gênero *Annona*, muitas das atividades farmacológicas dessas espécies são atribuídas a estes alcalóides.

Na Tabela 5 podemos observar a ocorrência e a variedade desse grupo, anonaina, aporfínico mais freqüente nas espécies de *Annona*.

Tabela 4. Ocorrências de alcalóides pró-aporfínicos no gênero *Annona*

Alcalóides	Espécies	Referências
<p>estefarina</p>	<i>A. hayesii</i> <i>A. muricata</i> <i>A. purpurea</i> <i>A. spinescens</i>	RASAMIZAFY et al., 1987. LEBOEUF et al., 1981. CHANG et al., 2000. QUEIROZ; ROBLLOT; CAVÉ, 1996.
<p>glaziovina</p>	<i>A. cherimola</i> <i>A. purpurea</i>	SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. LEBOEUF et al., 1982a.
<p>promucosina</p>	<i>A. purpurea</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. purpurea</i>	CHANG et al., 2000. WU et al., 2004. Chang et al., 2000.

Tabela 5. Ocorrência de alcalóides aporfínicos no gênero *Annona*.

Alcalóide	Espécies	Referências
<i>A. cherimola</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. glabra</i>	SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. BHAUMIK et al., 1979. LEBOEUF et al., 1982a.
anolobina
<i>A. cherimola</i> <i>A. glabra</i> <i>A. montana</i> <i>A. paludosa</i> <i>A. reticulata</i> <i>A. salzmanni</i> <i>A. senegalensis</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. spinescens</i>	SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990 LEBOEUF et al., 1982a. LEBOEUF et al., 1982a. GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994. LEBOEUF et al., 1982a. GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994. PHILIPPOV; KANDÉ; MACHAEV, 1994. BHAUMIK et al., 1979. QUEIROZ; ROBLLOT; CAVÉ, 1996.
anonaina
<i>A. purpurea</i>	CHANG et al., 2000.
apoglaziovina
<i>A. cherimola</i> <i>A. glabra</i> <i>A. hayesii</i> <i>A. montana</i> <i>A. paludosa</i>	SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. LEBOEUF et al., 1982a. RASAMIZAFY et al., 1987. LEBOEUF et al., 1982b. GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994.
asimilobina		

Tabela 5 (Cont.). Ocorrência de alcalóides aporfínicos no gênero *Annona*

Alcalóide	Espécies	Referências
<p>bractiolina</p>	<i>A. spinescens</i>	QUEIROZ; ROBLOT; CAVÉ, 1996.
<p>coridina</p>	<i>A. cherimola</i> <i>A. squamosa</i>	BHAKUNI et al., 1972; SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. LEBOEUF et al., 1982a.
<p>corituberina</p>	<i>A. cherimolia</i>	VILLAR et al., 1985.
<p>O-dimetilpurpuraina</p>	<i>A. purpurea</i>	SONNET et al., 1971.
<p>3-hidróxi-nornuciferina</p>	<i>A. hayesii</i>	RASAMIZAFY et al., 1987.

Tabela 5 (Cont.). Ocorrência de alcalóides aporfínicos no gênero *Annona*

Alcalóide	Espécies	Referências
<p>glaucina</p>	<i>A. squamosa</i>	BHAKUNI; TEWARI; DHAR, 1972; LEBOUEF et al., 1982a.
<p>isoboldina</p>	<i>A. glabra</i> <i>A. montana</i> <i>A. cherimola</i> <i>A. salzmanni</i> <i>A. senegalensis</i>	LEBOUEF et al., 1982a. LEBOUEF et al., 1982b. SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. GUINAUDEAU; LEBOUEF; CAVÉ, 1994. PHILIPPOV; KANDÉ; MACHAEV, 1994.
<p>isocoridina</p>	<i>A. purpurea</i> <i>A. squamosa</i>	CHANG et al., 2000. BHAUMIK et al., 1979; LEBOUEF et al., 1982.
<p>lirinidina</p>	<i>A. purpurea</i>	CHANG et al., 2000.
<p>litseferina</p>	<i>A. hayesii</i>	RASAMIZAFY et al., 1987.

Tabela 5 (Cont.). Ocorrência de alcalóides aporfínicos no gênero *Annona*.

Alcalóide	Espécies	Referências
<p><i>N</i>-metilactinodafina</p>	<i>A. glabra</i>	LEBOEUF et al., 1982a.
<p>norbractiolina</p>	<i>A. spinescens</i>	QUEIROZ; ROBLOT; CAVÉ, 1996.
<p>norcoridina</p>	<i>A. squamosa</i>	BHAUMIK et al., 1979; LEBOEUF et al., 1982a.
<p>nordomesticina</p>	<i>A. hayesii</i> <i>A. spinescens</i>	RASAMIZAFY et al., 1987. QUEIROZ; ROBLOT; CAVÉ, 1996.

Tabela 5 (Cont.). Ocorrência de alcalóides aporfínicos no gênero *Annona*.

Alcalóide	Espécies	Referências
<p>norglaucina</p>	<i>A. purpurea</i>	Chang et al., 2000.
<p>norisocoridina</p>	<i>A. squamosa</i>	BHAUMIK et al., 1979; LEBOEUF et al., 1982a.
<p>norlaurelina</p>	<i>A. squamosa</i>	BHAKUNI et al., 1972.
<p>normantenina</p>	<i>A. cherimolia</i>	Villar et al., 1985.
<p>norruciferina</p>	<i>A. glabra</i> <i>A. hayesii</i>	LEBOEUF et al., 1982a. RASAMIZAFY et al., 1987.

Tabela 5 (Cont.). Ocorrência de alcalóides aporfínicos no gênero *Annona*.

Alcalóide	Espécies	Referências
<p>norushinsunina (michelalbina)</p>	<i>A. cherimola</i> <i>A. glabra</i> <i>A. reticulata</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. spinescens</i>	SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. LEBOEUF et al., 1982a. LEBOEUF et al., 1982a. LEBOEUF et al., 1982a. QUEIROZ; ROBLLOT; CAVÉ, 1996.
<p>nuciferina</p>	<i>A. cherimola</i>	SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990.
<p>norpurpleina</p>	<i>A. purpurea</i>	LEBOEUF et al., 1982a; CHANG et al., 2000.
<p>purpleina</p>	<i>A. purpurea</i>	LEBOEUF et al., 1982a; CHANG et al., 2000.
<p>roemerina</p>	<i>A. hayesii</i> <i>A. glabra</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. paludosa</i>	RASAMIZAFY et al., 1987. LEBOEUF et al., 1982a. BHAUMIK et al., 1979. LAPREVOTE et al., 1988.

Tabela 5 (Cont.). Ocorrência de alcalóides aporfínicos no gênero *Annona*.

Alcalóide	Espécies	Referências
<i>A. purpurea</i>	CHANG et al., 2000.
romucosina F
<i>A. purpurea</i>	CHANG et al., 2000.
romucosina G
<i>A. cherimola</i>	CHEN et al., 2000.
romucosine H
<i>A. cherimola</i> <i>A. squamosa</i>	SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. LEBOEUF et al., 1982a.
xilopina		

1.3.2.6 Alcalóides oxoaporfínicos

Como podemos observar na Tabela 6 alguns alcalóides oxoaporfínicos isolados de *Annona*, e dentre esses liriodenina ocorre em grande parte das espécies de *Annona* estudadas até o presente.

Tabela 6. Ocorrência de alcalóides oxoaporfínicos em *Annona*

Alcalóide	Espécie	Referência
<p>homomoscatoлина</p>	<i>A. acuminata</i>	BORUP-GROCHTMANN et al., 1982.
<p>lanuginosina(oxoxilopina)</p>	<i>A. cherimolia</i> <i>A. squamosa</i>	SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. BHAUMIK et al., 1979.
<p>liriodenina</p>	<i>A. acuminata</i> <i>A. ambotay</i> <i>A. bullata</i> <i>A. cherimolia</i> <i>A. cristalensis</i> <i>A. dioica</i> <i>A. hayesii</i> <i>A. montana</i>	BORUP-GROCHTMANN et al., 1982. OLIVEIRA et al., 1987 GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994. LEBOEUF et al., 1982a. FAUST et al., 1981. SANTOS; MORAIS; BRAZ-FILHO, 2003. RASAMIZAFY et al., 1987. LEBOEUF et al., 1982b.

Tabela 6 (Cont.). Ocorrência de alcalóides oxoaporfínicos em *Annona*

Alcalóide	Espécie	Referência
<p>liriodenina (Cont.)</p>	<i>A. reticulata</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. glabra</i> <i>A. purpurea</i> <i>A. senegalensis</i> <i>A. spinescens</i>	LEBOEUF et al., 1982a. LEBOEUF et al., 1982a. SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. CHANG et al., 2000. PHILIPPOV; KANDÉ; MACHAEV, 1994. QUEIROZ; ROBLOT; CAVÉ, 1996.
<p>lisicamina (oxonuciferina)</p>	<i>A. acuminata</i> <i>A. hayesii</i> <i>A. cherimola</i> <i>A. purpurea</i>	BORUP-GROCHTMANN et al., 1982. RASAMIZAFY et al., 1987. SIMEÓN; RÍOS; VILLAR, 1990. CHANG et al., 2000.
<p>O-metil moscatolina</p>	<i>A. ambotay</i>	OLIVEIRA et al., 1987.
<p>O-metil aterolina (oxoglaucina)</p>	<i>A. purpurea</i>	LEBOEUF et al., 1982; CHANG et al., 2000.

Tabela 6 (Cont.). Ocorrência de alcalóides oxoaporfínicos em *Annona*.

Alcalóide	Espécie	Referência
oxopurpureina	<i>A. purpurea</i>	CHANG et al., 2000

1.3.2.7 Fenantrênicos

Os fenantrenos, aterospermina e argentinina (Figura 6) foram encontrados em *A. montana* e *A. muricata*, fazem parte de um grupo derivado dos aporfínicos que apresentam abertura no anel B, aminoetilfenantreno.

Figura 6. Alcalóides fenantrênicos encontrados em *A. montana* e *A. muricata* (LEBOEUF et al., 1982a).

1.4 Atividades farmacológicas dos alcalóides isoquinolínicos

A humanidade vem fazendo uso de plantas contendo alcalóides isoquinolínicos para fins medicinais e outros, o que consolidou um aprendizado ao longo de milhares de anos. A pesquisa no campo dos alcalóides teve sua provável origem na classe dos isoquinonílicos, cujas principais espécies vegetais representantes são *Papaver somniferum*, *Glaucim flavum* (Papaveraceae) e *Peumus boldo* (Monimiaceae) (BISSET, 1985).

A Tabela 7 a seguir resume alguns dados históricos obtidos da literatura para atividade farmacológica de alguns alcalóides isoquinolínicos isolados a partir de plantas, alguns desses se tornaram medicamentos.

Tabela 7. Alcalóides isoquinolínicos que apresentam atividade farmacológica e biológica

Alcalóide	Espécie (Família)	Atividade farmacológica/biológica	Referência
berberina	<i>Berberis vulgaris</i> (Berberidaceae)	Infecção dos olhos, dor de barriga.	CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001.
boldina	<i>Peumus boldo</i> (Monimiaceae)	Estomacal	CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001.

Tabela 7 (Cont.). Alcalóides isoquinolínicos que apresentam atividade farmacológica e biológica

Alcalóide	Espécie (Família)	Atividade farmacológica/biológica	Referência
codeína	<i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)	Antitussígeno e analgésico	CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001 BISSET, 1985.
glaucina	<i>Glaucim flavum</i> (Papaveraceae)	Antitussígeno	CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001.
glaziovina	<i>Ocotea glaziovii</i> (Lauraceae)	Antidepressivo	CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001.
morfina	<i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)	Analgésico	CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001. BISSET, 1985

Tabela 7 (Cont.). Alcalóides Isoquinolínicos que apresentam atividade farmacológica e biológica

Alcalóide	Espécie (Família)	Atividade farmacológica/biológica	Referência
<p>papaverina</p>	<i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)	Relaxante muscular	CORDELL; QUINN- BEATTIE; FARNSWORTH, 2001 BISSET, 1985
<p>tebaína</p>	<i>Papaver somniferum</i> (Papaveraceae)	Analgésico	BISSET, 1985.

Os alcalóides encontrados no gênero *Annona* merecem uma atenção especial, pois mostram efeitos farmacológicos importantes, como demonstrado por Warthen, Gooden e Jacobson (1969) que verificaram atividade inibitória do crescimento de células de carcinoma humano de nasofaringe pela liriodenina, um alcalóide aporfínico. Mais tarde, Sonnet e Jacobson (1971) isolaram diversos outros alcalóides (pró-aporfínicos, aporfínicos, oxoaporfínicos) de *A. purpurea* que apresentaram atividade citotóxica e antitumoral, sendo os pró-aporfínicos os mais ativos.

Alcalóides do tipo tetra-hidroprotoberberina como coritencina e isocoreximina isolados de *A. cherimólia*, demonstraram atividade citotóxica contra linhagens de culturas de células tumorais, sendo a coritencina a mais ativa (MARTINEZ-VAZQUEZ et al.,2005).

Paulo e colaboradores (1992) verificaram a atividade antimicrobiana do

extrato etanólico da casca de *A. salzmanii* a qual foi atribuída aos alcalóides benzilisoquinolínicos. Essa atividade também foi observada nos extratos metanólico e etanólico de *A. squamosa* (SHOKEEN et al., 2005).

Trabalhos de triagem com alcalóides isoquinolínicos isolados de espécies de *Annona* apresentaram atividades biológicas em receptores de 5-HT (HASRAT et al., 1997), antiprotozoário (FISCHER et al., 2004; TEMPONE et al., 2005), atividade citotóxica contra artemia salina (PIMENTA et al., 2003) e antiplaquetária (CHANG et al., 1998a; CHANG et al., 1998b).

Rios, Simeon e Villar (1989) fizeram um levantamento das atividades biológicas observadas para os alcalóides aporfínicos, na Tabela 8 encontram-se listados os alcalóides já isolados de espécies de *Annona*.

Tabela 8. Atividades farmacológicas descritas para alcalóides aporfínicos encontradas em espécies de *Annona* (RIOS; SIMEON; VILLAR, 1989).

ALCALÓIDES	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA
anolobina	Antimicrobiana.
anonaina	Antimicrobiana, citotóxica, hipotensor.
asimilobina	Antagonista de serotonina, antimicrobiano.
boldina	Antialérgico, antiviral, hipotensor, inibidor da enzima microssomal hepática, parassimpaticomimético e sedativo.
coridine	Adrenérgico, antimicrobiano, antitumoral, antitussígeno, bloqueador muscular, catalepsia, diminuição da força vascular e hipotensor.
corituberina	Hipotensor, bloqueador muscular e sedativo.
estefarina	Hipotensor, inibidor de acetilcolinesterase, agonista de DA ₂ , parassimpaticolítico, serotominérgico.

Tabela 8 (Cont.). Atividades biológicas descritas para alcalóides aporfínicos encontradas em espécies de *Annona* (RIOS; SIMEON; VILLAR, 1989).

ALCALÓIDES	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA
glaucina	Adrenérgico, analgésico, antialérgico, antiinflamatório, antitrombínico, antitussígeno, depressor do SNC, citotóxico, espectorante, hipoglicemiante, hipotensor, hipotérmico, aumento dos níveis de dopamina, parassimpaticomimético, sedativo, espasmódico e teratogenico.
glaziovina	Ansiolítico, antidepressivo, antimicrobiano, citotóxico, hipotensor, psicotrópico, tranqüilizante.
isoboldina	Hipotensor, hipotérmico, inibidor de aldose redutase, inseticida e espasmódico.
isocoridina	Adrenérgico, antiarrítmico, antimicrobiano, antitussígeno, catalepsia, depressor do SNC, diminuição da força vascular, hipotensor, aumento do fluxo sangüíneo, aumento da secreção de lagrimas e saliva, estimulante respiratório, parassimpaticomimético e espasmódico.
lanuginosina	Antileucêmico e antimicrobiano.
lirinidina	Antagonista de serotonina, hipotensor e espasmódico.
liriodenina	Analgésico, antileucêmico, antimicrobiano, antitumoral, citotóxico, hipotensor, estimulante respiratório e sedativo.
N-metilactinodafinina	Antimicrobiano e citotóxico.
norcoridine	Hipotensor, hipotérmico e espasmódico.
nornantenina	Antimicrobiano
nuciferina	Analgésico, anticonvulsivante, antiinflamatório, antimicrobiano, antagonista de serotonina, antitetânico, antitussígeno, depressor do SNC, agonista dopaminérgico, antagonista dopaminérgico e sedativo.
oxoglaucina	Antimicrobiano e citotóxico.

Tabela 8 (Cont.). Atividades biológicas descritas para alcalóides aporfínicos encontradas em espécies de *Annona* (RIOS; SIMEON; VILLAR, 1989).

ALCALÓIDES	ATIVIDADE FARMACOLÓGICA
oxopurpureina	Citotóxico
roemerina	Analéptico (restaurativo).
xilopina	Analgésico, antimicrobiano, antiparasitário, hipotensor, inotrópico negativo, sedativo e espasmódico.

2 OBJETIVOS E JUSTIFICATIVA

Este trabalho teve como metas a extração, purificação e identificação de alcalóides obtidos do caule de *Annona hypoglauca* Mart. Além da análise fitoquímica, foi investigada a atividade antibacteriana e citotóxica.

Conforme o exposto, os alcalóides isoquinolínicos encontrados no gênero *Annona* merecem uma atenção especial, pois apresentam efeitos farmacológicos importantes, sugerindo um estudo mais aprofundado da espécie *A. hypoglauca* Mart. que pode resultar na descoberta de novos compostos para o arsenal terapêutico com novas atividades e/ou mecanismos de ação.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta da planta

A coleta foi feita pelo grupo de pesquisa “Triagem de plantas brasileiras com atividade antitumoral”, da Universidade Paulista (UNIP), sendo esta uma das plantas do seu banco de extratos vegetais. Uma parte do caule de *Annona hypoglauca* Mart., que possui hábito de liana, foi coletada em região de floresta de igapó, cidade de Manaus (AM), Brasil. Foi retirada da floresta quantidade suficiente de matéria-prima para o estudo presente, de modo que a planta possa regenerar seus órgãos coletados para a sua recomposição no habitat. A planta apresenta-se submersa nas águas do rio Negro na maior parte do ano, sendo possível visualizá-la somente nas épocas de seca.

Uma amostra do vegetal na fenofase reprodutiva foi enviada para o Herbário da UNIP, onde foi identificada pelo botânico Mateus Paciência, através das exsicatas montadas (Figura 7) e catalogadas sob número M.B.Paciência *et al.* 768.

Annona hypoglauca Mart.

Figura 7. Exsicata de *A. hypoglauca* Mart. sob número 768, depositada no herbário da UNIP.

3.2 Análise química

3.2.1 Material vegetal

O material vegetal fresco do caule de *A. hypoglauca* Mart. foi encaminhada para o Laboratório de Extração da UNIP (São Paulo), onde foi limpo retirando-se impurezas (fragmentos de outros órgãos, poeira, areia, inseto, etc.), seco em estufa com circulação de ar a 40 °C. Em seguida, foi moído em moinho de martelo (Holmes 201 X), o qual está localizado dentro de uma capela com sucção de ar. A droga já processada foi armazenada em um saco plástico e rotulada.

3.2.2 Reagentes e solventes

Os reagentes utilizados neste trabalho foram os seguintes: ácido fosfórico, hidróxido de amônio.

Foram utilizados os seguintes solventes: acetato de etila, *n*-butanol, *n*-hexano, clorofórmio, diclorometano e metanol todos de grau P. A. da marca Synth. Todos os solventes usados para extração, partições e sistemas cromatográficos foram submetidos à destilação fracionada antes do uso.

3.2.3. Equipamentos

O cromatograma e os espectros de massas por impacto eletrônico foram registrados utilizando-se o equipamento de cromatografia a gás Agilent série 6890 com coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm e filme de 0,25 µm) acoplada a espectrômetro

de massas Agilent série 5973 (CG/EM), fonte com temperatura de 230 °C e ionização por impacto eletrônico de 70 elétrons volts.

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio e carbono foram realizados em solução de deuteroclorofórmio, em espectrômetro, Bruker AVANCE DPX 300 (300 MHz para hidrogênio e 75 MHz para carbono) ou Varian Gemini 200 (200 MHz para hidrogênio).

Foram utilizados rotaevaporador Bühler, balança analítica (Bioprecisa), modelo FA2104 N; estufa de secagem e esterilização (FANEM), modelo 315 SE; lâmpada ultravioleta 254 e 366 nm.

3.2.4 Obtenção dos extratos

3.2.4.1 Extrato bruto do caule de *Annona hypoglauca* Mart.

A técnica utilizada para obtenção do extrato foi descrita por Younes *et al.* (2000).

O material pulverizado (1074g) foi extraído em percolador de vidro, no qual o pó da planta foi colocado em contato com diclorometano/metanol 1:1 (V/V), em quantidade suficiente para não faltar solvente quando a planta intumescer. O material permaneceu em maceração por 24 horas e em seguida foi drenado para um balão de fundo chato com a ajuda de uma bomba de vácuo. O extrato bruto assim obtido foi concentrado em rota-evaporador até retirada total do solvente orgânico. O extrato seco foi registrado e armazenado em câmara fria a -20 °C, conforme esquema ilustrado na Figura 8.

Figura 8. Esquema da metodologia empregada na obtenção do extrato bruto de *A. hypoglauca*

3.2.4.2 Extração de alcalóides totais (AT)

A partir do extrato bruto foi feita a extração de alcalóides totais pelo método ácido-base com solvente orgânico em funil de separação (HENRIQUES et al., 2004).

Foram realizadas dez extrações de alcalóides totais com 4,6 g de extrato bruto cada. O extrato bruto seco foi colocado em um béquer com 30 mL de H_3PO_4 0,1 mol/L sob agitação durante 30 minutos e após filtrado, o processo foi repetido por quatro vezes. Recolheram as soluções aquosas de ácidos minerais em um funil de separação, onde os alcalóides se encontram na forma de sal e o que restou do extrato bruto (torta) foi separado para futuras partições. A solução aquosa foi então extraída três vezes com 50 mL de *n*-hexano para a remoção de substâncias lipofílicas, tais como ceras epicuticulares, terpenos e pigmentos que podem interferir no processo extrativo. As fases hexânicas foram reunidas, e seca com sulfato de sódio anidro e, subsequentemente, o solvente foi eliminado sob pressão reduzida dando origem a fração hexânica 1. A fase ácida desengordurada foi alcalinizada até o pH 9 -10 com hidróxido de amônio e extraída com porções de 50 mL de clorofórmio até o que o teste com reagente Dragendorff desse negativo, indicando o esgotamento dos alcalóides. A fase clorofórmica foi se seca com sulfato de sódio anidro e concentrada em rota-evaporador até a retirada total do solvente orgânico dando origem à fração de alcalóides totais (AT) que foi armazenada em um frasco ambar (Figura 9).

Figura 9. Esquema da metodologia empregada na obtenção dos alcalóides totais de *A. hypoglauca*

3.2.4.3 Fracionamento da torta

Foi considerado como torta o material do extrato bruto que não foi solúvel em ácido fosfórico na extração dos alcalóides totais. O fracionamento foi realizado utilizando-se processo de partição, determinado conforme a quantidade de material disponível.

A torta foi colocada em um béquer de 100 mL com 30 mL de *n*-hexano. O sistema permaneceu sob agitação por 30 minutos, decantado e filtrado em papel filtro para um balão de fundo redondo onde foi concentrado em rota-evaporador, esse procedimento foi repetido três vezes. O concentrado foi diluído com pequena quantidade do mesmo solvente usado na extração desta fração e com pipeta Pasteur foi transferido para um frasco âmbar etiquetado e pesado. A fração foi chamada de fração hexânica 2. O resíduo que sobrou da extração anterior no béquer e no papel de filtro foi evaporado e reaproveitado para o próximo fracionamento. Foram colocados (3 x 30 mL) de solvente diclorometano/metanol (1:1, V/V), o sistema foi deixado sob agitação por 30 minutos, decantado e filtrado por papel de filtro para um balão de fundo redondo, o qual foi evaporado em rota-evaporador e transferido com pipeta Pasteur para um frasco âmbar, etiquetado e pesado, obtendo-se a fração diclorometano/metanol. Para a obtenção da fração de acetato de etila, utilizou-se o mesmo procedimento, só que usando solvente acetato de etila. O resíduo da torta e do papel de filtro foi reaproveitado para o próximo fracionamento que foi solubilizado em 80 mL de uma solução hidroalcoólica 20% e posteriormente foi adicionado (3 x 30 mL) do solvente *n*-butanol, sendo extraída a fração butanólica pelo método de partição.

3.2.4.4 Análises dos alcalóides por CG-EM

Os alcalóides foram analisados em um cromatógrafo Agilent série 6890 com coluna HP-5 (30 m x 0,25 mm e filme de 0,25 μ m) acoplada a espectrômetro de massas Agilent série 5973 (CG/EM) com a temperatura da fonte a 230 °C e ionização por impacto eletrônico de 70 elétrons volts. Utilizou-se como gás de arraste hélio ultrapuro. O extrato foi dissolvido em metanol, sendo o volume de injeção de 3 μ L. As amostras foram analisadas em duas condições diferentes descritas na Tabela 9. Os resultados obtidos foram comparados com o banco de dados do próprio aparelho (Wiley).

Tabela 9. Condições de Análise por CG-EM

Parâmetros	Método 1	Método 2
Temperatura do injetor (°C)	290	310
Temperatura inicial (°C)	100	250
Temperatura Final (°C)	290	310
Taxa de Aquecimento (°C/min)	15	15
Fluxo do gás de arraste (He) (mL/min.)	1	1

3.2.4.5 Isolamento dos compostos da fração de alcalóides totais (AT)

3.2.4.5.1 Fracionamento dos alcalóides totais (AT) em coluna cromatográfica

Para a realização do fracionamento inicial dos alcalóides totais (AT) de *A. hypoglauca* Mart. foi utilizada uma coluna cromatográfica de vidro com as seguintes características: altura 7,0 cm e diâmetro 4,0 cm, servindo de suporte para a fase estacionária composta por 50 g de sílica gel 60 (0,063-0,200 mm) para coluna cromatográfica preparativa (Merck). A fase móvel foi selecionada conforme a

polaridade da amostra, utilizando um gradiente de concentração de diclorometano e metanol conforme a Tabela 10.

O fracionamento na coluna foi feito em quatro vezes, utilizando-se um total de 2 g de AT. A amostra foi dissolvida em metanol e incorporada cerca de pequena porção de sílica gel que posteriormente foi adicionada no topo da coluna para a execução da separação. As separações foram realizadas com as proporções descritas na Tabela 10. As frações foram coletadas a cada 200 mL, dando origem a um total de 10 frações (FA1, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6, FA7, FA8, FA9, FA10).

Tabela 10. Fases Móveis utilizadas na coluna para a fração de alcalóides totais de *Annona hypoglauca* Mart.

Proporções	Volume utilizado	Frações
CH₂Cl₂ (100%)	200 mL	FA1
CH₂Cl₂ : MeOH		
9 : 1	400 mL	FA2, FA3
8 : 2	400 mL	FA4, FA5
7 : 3	400 mL	FA6, FA7
1 : 1	400 mL	FA8, FA9
MeOH (100%)	200 mL	FA10

3.2.4.5.2 Análise cromatografica das frações alcaloídicas

As análises por CCDC foram realizadas em cromatoplasas de sílica gel 60 com indicador de fluorescência F_{254} da Merck, comercializadas em tamanho de 20x20 cm. As placas foram visualizadas à luz UV(254 e 366 nm) e reagente Dragendorff (VERPOORTE, 1986).

3.2.4.5.3 Isolamento e purificação dos alcalóides

Para o isolamento e purificação dos alcalóides foram utilizadas cromatoplasas de tamanho de 20x20 cm, preparadas de modo que a espessura da camada de gel de sílica fosse de aproximadamente 1,0 mm. Essas foram preparadas usando sílica gel 60 com indicador de fluorescência F_{254} da Merck.

As frações FA5 e FA6 obtidas na extração por coluna cromatográfica apresentaram massa suficiente e facilidade no isolamento dos compostos. As frações foram submetidas à cromatografia de camada delgada preparativa. Aproximadamente 20 mg da amostra de cada fração foi aplicada por placa, previamente solubilizada em uma pequena quantidade de solvente orgânico. Foi utilizado como eluente uma mistura de clorofórmio/ metanol (92:8, V/V) em cuba de vidro saturada, onde as placas foram colocadas para eluir. Após a iluição, as placas foram submetidas ao método de detecção de luz ultravioleta (254 e 366 nm) para a identificação das faixas que absorveram a luz, auxiliando na separação dos compostos. No término de cada separação por placa uma das extremidades laterais foi utilizada para a revelação com reagente Dragendorff, localizando os alcalóides nas faixas que também absorveram luz ultravioleta. As faixas foram

raspadas da placa e colocadas em contato com solvente diclorometano. Posteriormente, os compostos isolados foram filtrados e transferido para um vidro âmbar pesado e identificado.

Os compostos isolados foram submetidos a análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogenio (^1H) e de Carbono (^{13}C).

3.3 Ensaios biológicos

Os experimentos para avaliação de atividade antibacteriana e citotoxicidade à células tumorais dos extratos e frações de alcalóides totais de *Annona hypoglauca* foram realizados no Laboratório de Extração da Universidade Paulista (UNIP).

3.3.1 Atividade Antibacteriana

3.3.1.1 Preparo das Amostras

O extrato Bruto (EB), as frações obtidas da torta (hexânica 2, diclorometano:metanol, 1:1 (V/V), acetato de etila e *n*-butanol) e as frações: hexânica 1, fração de alcalóides totais (AT) e de seu fracionamento (FA2, FA3, FA4, FA5 e FA6) foram diluídos em DMSO até a concentração de 4 mg/mL, sendo que essa solução foi diluída com água até que a concentração do extrato fosse de 2 mg/mL.

3.3.1.2 Obtenção do inóculo

O inóculo foi feito com uma suspensão de concentração de 0,5 McFarland (ou 10^8 UFC/mL), preparado a partir de colônias bacterianas recém obtidas e diluídas a uma concentração de 300 UFC/mL (SUFFREDINI *et al.*, 2004). *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Escherichia coli* ATCC 25922, e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 foram as cepas de bactérias utilizadas. O inóculo bacteriano de cada cepa foi obtido de colônias frescas, cultivadas em placas de Petri em meio ágar Müeller Hinton. Inicialmente obteve-se a suspensão de bactérias em soro fisiológico até concentração de 0,5 McFarland, ou $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, sendo essa concentração conferida através da técnica de contagem bacteriana.

3.3.1.3 Ensaio antibacteriano

Para o ensaio 190 μ L da suspensão de microrganismos, de concentração de 300 UFC/mL de meio, foram colocados em cada poço de uma microplaca. Em seguida, 10 μ L de solução de extrato foram adicionados aos poços, completando o volume para 200 μ L. As placas foram colocadas em incubadora a 35° C por 18 a 20 horas. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Essa triagem inicial objetivou selecionar os extratos ativos em concentrações inferiores a 100 μ g/mL. Os resultados foram analisados visualmente.

Os resultados são considerados relevantes quando o extrato tem capacidade de inibir o crescimento bacteriano em doses ≤ 100 μ g/mL. A partir daí, os extratos selecionados, ou seja, os que não apresentaram crescimento, são

submetidos a uma subcultura em meio Ágar Müller-Hinton (Oxoid[®], Basingstoke, Hampshire, England), para que seja feita a avaliação do crescimento para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). As determinações de CIM e de CBM foram feitas utilizando-se concentrações de extratos que variaram segundo uma escala pré-determinada para cada caso, superiores e inferiores àquela na qual foi observado meio límpido (SUFFREDINI *et al.*, 2004).

Seguindo o mesmo critério de avaliação, considerou-se a CIM como aquela em cuja subcultura houve crescimento bacteriano, e CBM como aquela que não houve crescimento bacteriano na sub-cultura em Müller-Hinton agar (SUFFREDINI *et al.*, 2004).

3.3.2 Teste de citotoxicidade à célula tumoral humana

3.3.2.1 Preparo das amostras

As amostras (extrato bruto (EB), as frações obtidas da torta (hexânica 2, diclorometânonica, acetato de etila e *n*-butanol) e as frações: hexânica 1, fração de alcalóides totais (AT) foram diluídas em DMSO até que fosse atingida a concentração de aproximadamente 80 mg/mL, que foram em seguida diluídas com água destilada até uma concentração próxima de 40 mg/mL.

3.3.2.2 Atividade citotóxica

O conjunto de células empregado nos ensaios é composto por tumores isolados de próstata (PC-3), pulmões (NCIH-460), cólon (KM-12), sistema nervoso central (SF-268) e células leucêmicas (RPMI-8226). A avaliação da atividade citotóxica foi realizada segundo a metodologia descrita por Monks *et al.* (1991).

Previamente ao ensaio, as células foram cultivadas em meio de cultura RPMI-1640 (Bio Whittaker) acrescido de 5 % de soro fetal bovino e 1 % de L-glutamina (Sigma) por um período de 24 horas.

Ao final desse período, fez-se a adição de 10 μ L da solução H₂O:DMSO (1:1, V/V) contendo a amostra a ser ensaiada em 3990 μ L de cada uma das suspensões celulares PC-3, NCIH-460, KM-12, SF-268 e RPMI-8226, sendo a concentração final da amostra de aproximadamente 100 μ g/mL. A suspensão resultante foi incubada a 37 °C por um período de 48 horas ao final das quais, fez-se a leitura dos resultados de acordo com a metodologia descrita a seguir.

As células viáveis foram fixadas em placas de 96 poços com solução de ácido tricloroacético 50% (80% para células não aderentes) mantida em contato com as células por uma hora, sob refrigeração. As microplacas foram lavadas 5 vezes com água corrente até remoção completa das células não fixadas. As placas foram mantidas ao ar por 24 horas, para secarem. A solução de sulforodamina B (SRB, se liga a proteínas de células viáveis) 0,4 % em ácido acético 1 % foi adicionada às células, que foram coradas. O excesso de SRB foi retirado com solução de ácido acético (1 %). Após a remoção do excesso, as placas foram novamente expostas ao ar para secarem. O corante foi então ressuspensão com tampão Tris e a placa lida em leitor espectrofotométrico de placas (Biotech) em

515 nm, no qual as atividades ópticas foram obtidas. A porcentagem de inibição (% IC) foi obtida a partir da fórmula:

$$\% \text{ IC} = [(T - T_o) / (T_o)] * 100$$

sendo:

T e To: os valores de transmitância final e inicial, respectivamente.

4 RESULTADOS e DISCUSSÃO

4.1 Análise química

4.1.1 Rendimentos dos extratos

Os rendimentos obtidos para o extrato bruto e os alcalóides totais do caule de *A. hypoglauca* Mart. encontram-se na Tabela 11.

Tabela 11. Rendimentos do extrato bruto e da fração de alcalóides totais do caule *Annona hypoglauca* Mart.

Parte da planta	Material seco moído (Kg)	Extrato Bruto (g)/ rendimento (%)	Fração de alcalóides totais (g)/ rendimento (%)
Caule	1,074	46,14/ 4,29	3,07/ 0,28

O rendimento para o extrato bruto, diclorometano/metanol (1:1, V/V) foi de 4,29%, a partir desse foi realizada a extração para alcalóides totais (MORENO et al., 2004) que proporcionou um rendimento de 0,28 % de alcalóides com relação ao caule da planta seca (droga).

Estudos anteriores apresentaram rendimentos de alcalóides totais para caule de *Duguetia spixiana* (Annonaceae) em 0,3 % e 0,2 % (DEBOURGUES et al., 1987; RASAMIZAFY; HOCQUEMILLER; CAVÉ, 1987), contudo para *Annona* foi encontrado dados de folha com rendimento de 0,5 % de alcalóides totais (FISCHER et al., 2004).

Na Tabela 12, são apresentados os resultados dos rendimentos encontrados para o fracionamento da torta pelo método de partição com solventes orgânicos.

Tabela 12. Rendimento das frações obtidas da torta após partição com solventes

Frações da Torta	Massa (g)	Rendimento (%) *
Hexano 2	2,6406	0,25
Diclorometano/Metanol (1:1, V/V)	1,7091	0,16
Acetato de Etila	0,2095	0,02
<i>n</i> -Butanol	0,6542	0,06

* Rendimento calculado em relação ao material vegetal de partida

Nas frações não alcalóidicas, obtidas a partir da torta com solventes de diferente polaridade, podemos separar diferentes classes de compostos tais como cumarinas, acetogeninas, lipídios, proteínas, aminoácidos, terpenos, flavonóides (LEBOUEF et al., 1982a).

4.1.2 Isolamento dos alcalóides

Antes de iniciar o isolamento dos alcalóides foi realizada a análise por cromatografia a gás acoplada a espectrômetro de massas (CG-EM) da fração de alcalóides totais (AT), sendo possível detectar a presença de alcalóides isoquinolínicos. O cromatograma da fração de AT obtido a partir da análise de cromatografia a gás pelo Método 1 se encontra na Figura 10.

Figura 10. Cromatografia a gás da fração de alcalóides totais pelo Método 1.

Podemos observar no cromatograma (Figura 10) a presença de pelo menos 25 substâncias na fração de alcalóides totais sendo, portanto, considerados como uma mistura complexa. Os espectros de massas foram comparados com a literatura e com a base de dados do equipamento (CG/EM) sendo possível caracterizar nove alcalóides isoquinolínicos, sendo sete aporfínicos: nornuciferina, roemerina, anonaina, isodomeesticina, glaucina, actinodafinina, isoboldina e dois protoberberínicos, esculerina e caseadina. As estruturas químicas desses compostos estão representadas na Figura 11.

Figura 11. Alcalóides caracterizados por CG-EM na fração de alcalóides totais de *A. hypoglauca* Mart.

O composto majoritário foi aquele com TR= 20,1 minutos, o qual apresentou padrão de fragmentação $m/z = 281(M^+)$, $280(M^+-1)$, $266(M^+-15)$, $250(M^+-31)$, $252(M^+-29)$, 237, 221, 178, 165, 152 (Figura 12) compatível ao da normuciferina (Figura 11).

Figura 12. Espectro de massas do composto TR=20,1 min, obtido da fração de alcalóides totais de *A. hypoglauca*.

O pico em $m/z = 280$ com intensidade 100% correspondente à perda de um átomo de hidrogênio adjacente ao nitrogênio (M-1), originando o íon (a) representado na Figura 13 que é característico do espectro de aporfínas (OHASHI et al., 1963).

O fragmento M-29 presente no espectro de massas da Figura 12, caracteriza esta substância como sendo uma noraporfina. Este produto é resultante de uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder, a partir do íon molecular no qual a carga positiva está localizada no sistema aromático (Figura 13). Para alcalóides aporfínicos típicos este fragmento corresponde ao pico M-43, podendo ocorrer subseqüentes perdas de radicais metilas ou metoxilas para a formação de um fragmento com número par de elétrons (OHASHI et al., 1963).

Figura 13. Íon (a) característico do espectro de aporfínas (OHASHI et al., 1963) e produto do fragmento (b) retro-Diels-Alder (JACKSON; MARTIN, 1966).

A origem dos fragmentos no espectro de massas da nornuciferina pode ser explicada através do mecanismo de fragmentação ilustrado na Figura 14, com íon molecular em $m/z = 281$, compatível a fórmula molecular $C_{18}H_{19}O_2N$.

Os fragmentos $m/z = 266$ e 250 são formados pela perda posterior dos radicais metila e metoxila. A estabilização dos íons resultantes é provocada pela cisão inicial da ligação benzílica seguida de reciclagem (OHASHI et al., 1963).

Figura 14. Mecanismo de fragmentação da nornuciferina (OHASHI et al., 1963)

Nornuciferina foi isolada do caule de *A. hayessi* como o segundo alcalóide majoritário que apresentou rendimento de 20% de alcalóides totais (RASAMIZAFY et al. 1987). Esse alcalóide também foi relatado em *A. glabra* e em outros gêneros de Annonaceae como na *Enantia polycarpa*, *Guatteria ouregou*, *Isolona campanulata*, *I. pilosa*, *Pseuduvaria grandifolia* e *Xylopia buxifolia* (LEBOEUF et al., 1982; LEBOEUF, et al., 1983).

Já, o composto com TR = 21 minutos, apresentou fragmentação em $(m/z) = 279(M^{+*})$, $278(M^{+} - 1)$ e $236 (M^{+} - 43)$, conforme Figura 15, sendo caracterizado com roemerina, devido ao seu mecanismo de fragmentação (Figura 16).

Figura 15. Espectro de massas do composto TR=21 min obtido da fração de alcalóides totais de *A. hypoglauca*.

Figura 16. Produto do fragmento retro-Diels-Alder (BHAKUNI; TEWARI, DHAR, 1972).

Roemerina foi caracterizado por apresentar fragmentação típica para alcalóides aporfínicos conforme Figura 14, com produto do fragmento ($M-43$) (BHAKUNI; TEWARI, DHAR, 1972).

A roemerina se encontra em pequena quantidade dentro da mistura de alcalóides totais de *A. hypoglauca*. No gênero *Annona*, esse alcalóide aporfínico foi encontrado em *A. squamosa* (BHAKUNI; TEWARI, DHAR, 1972; BHAUMIK et al.,1979), *A. glabra* (LEBOEUF et al.,1982a) e *A. hayessi* (RASAMIZAFY et al.,1987).

Outro composto com TR = 21,3 minutos, foi caracterizado como anonaina pelo seu padrão de fragmentação (m/z) = 265(M^{+}), 264($M^{+}-1$), 236($M^{+}-29$), conforme Figura 17.

Figura 17. Espectro de massas do composto TR=21,31 min
Obtido da fração de alcalóides totais de *A. hypoglauca*.

O fragmento $M^{+}-29$, $m/z=236$ presente no espectro (Figura 17) é característico de um alcalóide noraporfina, conforme Figura 18.

Figura 18. Produto do fragmento retro-Diels-Alder (BHAKUNI et al., 1972).

Anonaina é dos alcalóides do tipo aporfínico que ocorre com maior frequência em espécies de *Annona* (Tabela 5).

O composto com TR= 25,8 minutos, encontramos um padrão de fragmentação $m/z = 325$ (M^+), 324 ($M^+ - 1$), 310 ($M^+ - 15$), 294 ($M^+ - 31$), conforme Figura 19.

Figura 19. Espectro de massas do composto TR=25,8 min obtido da fração de alcalóides totais.

A origem dos fragmentos observada no espectro de massas desse composto pode ser explicada através do mecanismo de fragmentação ilustrado na Figura 20, compatível com o da isodomesticina.

Figura 20. Mecanismo de fragmentação da isodomeesticina (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994).

Em Annonaceae esse alcalóide foi reportado em *Guatteria goudotiana* (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1994).

Ao compararmos o espectro de massas do composto com TR= 26,6 minutos da amostra com o da glaucina, vemos que ambos apresentam os mesmos fragmentos principais em $m/z = 355$ (M^{+}), 354 ($M^{+}-1$), 340 ($M^{+}-15$), 324 ($M^{+}-31$), 281 ($M^{+}-74$), conforme Figura 21.

Figura 21. Espectro de massas do composto TR=26,6 min obtido da fração de alcalóides totais.

Jackson e Martin (1966) e Pereira et al. (1999) demonstraram o mecanismo de fragmentação da glaucina, sendo possível explicar a formação dos principais fragmentos que estão representados na Figura 22.

A glaucina foi encontrada em quatro espécies diferentes de Annonaceae, sendo uma dessas *A. squamosa* (BHAKUNI; TEWARI; DHAR, 1972; LEBOUF et al., 1982).

Figura 22 Mecanismo de fragmentação da glaucina (JACKSON; MARTIN,1966)

O espectro de massas do composto com TR=27,4 min, cujo padrão de fragmentação $m/z = 311(M^+)$, $310(M^+-1)$, $282 (M^+-29)$, $279 (M^+-31)$, 251 , 181 foi identificado pela base de dados do aparelho como a actinodafinina, conforme Figura 23.

Figura 23. Espectro de massas do composto TR=27,4 min obtido da fração de alcalóides totais.

O mecanismo de fragmentação da actinodafinina já havia sido discutido anteriormente (TEWARI; BHAKUNI; DHAR, 1972; MCLAFFERTY; STAUFFER, 1989). O intenso pico M-1 em $m/z = 310$ e o fragmento $M^+ - 29$, em $m/z = 282$ presente no espectro (Figura 23) caracterizam esta substância como uma noraporfína, como podemos observar no mecanismo de fragmentação na Figura 24.

Figura 24. Produto do fragmento retro-Diels-Alder da actinodafinina (JACKSON; MARTIN, 1966).

Já, o alcalóide isoboldina que apresentou TR=27,9 minutos, também foi identificado pelo banco de dados do aparelho com o padrão de fragmentação m/z = 327(M^+), 326(M^+-1), 310(M^+-17), 284(M^+-43), 269(M^+-58), 253(M^+-74), no espectro de massas ilustrado na Figura 25.

Na Figura 26 podemos observar o mecanismo de fragmentação da isoboldina discutido por Jackson e Martin (1966). O fragmento M^+-17 , m/z = 310 é formado pela perda de uma hidroxila na posição C-1, enquanto m/z = 284, 269, 253 são resultantes da uma fragmentação do tipo retro-Diels-Alder em núcleo aporfínico, com subseqüentes perdas de radicais metila e metoxila.

Figura 25. Espectro de massas do composto TR=27,9 min obtido da fração de alcalóides totais.

Figura 26. Mecanismo de fragmentação da isoboldina (JACKSON; MARTIN, 1966).

A isoboldina foi reportada em cinco espécies do gênero *Annona*: *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. montana*, *A. salzmanni* e *A. senegalensis* (LEBOUEF et al., 1982; SIMÉON; RÍOS; VILLAR, 1990; PAULO et al., 1992; PHILIPOV; KANDÉ; MACHEV, 1994), além de estar presente em outros gêneros desta família.

O espectro de massas da amostra com TR=28,5 min, representado na Figura 27 apresentou muitos fragmentos, pois o pico do tempo de retenção no cromatograma de AT (Figura 10) não está totalmente resolvido. Os fragmentos observados nesse espectro não são característicos para alcalóides aporfínicos. O banco de dados do equipamento caracterizou apenas um alcalóide protoberberina, esculerina que apresentou padrão de fragmentação m/z=327 (M⁺), 326 (M⁺-1), 178 (100% de intensidade), 150, 135 que esta representada na Figura 27.

Figura 27. Espectro de massas do composto TR=28,5 min obtido da fração de alcalóides totais.

Devido à presença de outros fragmentos, buscou-se dados de massas de outros protoberberínicos, dentre esses a caseadina apresentou padrão de fragmentação $m/z = 341$ (M^{+*}), 340 ($M^{+} - 1$), 176, 164 (100% intensidade), esses fragmentos também foram observados no espectro de massas da amostra representado na Figura 27 (CHEN; MACLEAN, 1968), havendo a possibilidade da caseadina ser o outro composto presente no espectro de massas juntamente com a esculerina.

Os alcalóides protoberberínicos apresentam mecanismo de fragmentação do tipo retro-Diels-Alder (BUDZIKIEWICZ; DJERASSI; WILLIAMS, 1964), podendo ser observado na Figura 28 os produtos obtidos da fragmentação da esculerina (CHEN; MACLEAN, 1968; BATTERSBY et al., 1966) e na Figura 29 da caseadina (BUDZIKIEWICZ; DJERASSI; WILLIAMS, 1964; CHEN; MACLEAN, 1968).

Figura 28. Fragmentos obtidos por retro-Diels-Alder da esculerina (BATTERSBY et al., 1966)

Figura 29. Fragmentos obtidos por retro-Diels-Alder da caseadina (BUDZIKIEWICZ; DJERASSI; WILLIAMS, 1964; CHEN; MACLEAN 1968)

Desses dois possíveis alcalóides protoberberínicos, esculerina e caseadina, caracterizados por CG-EM do extrato de AT de *A. hypoglauca*, a esculerina foi reportada em *A. paludosa* (LAPREVOTE et al., 1988) e em algumas espécies de *Papaver* (Papaveraceae), dentre essas *P. somniferum* (BROCHMANN-HANSSEN; NIELSEN, 1966; BHAKUNI; JAIN, 1986). Por outro lado, a caseadina foi encontrada na espécie *Corydalis caseana* da família Fumariaceae (MACLEAN; SNIECKUS, 1998), não tendo relato de sua ocorrência na família Annonaceae.

4.1.2.1 Fracionamento dos alcalóides totais (AT) por coluna cromatográfica

O fracionamento dos alcalóides totais por coluna cromatográfica originou 10 frações (FA1, FA2, FA3, FA4, FA5, FA6, FA7, FA8, FA9, FA10) cujos rendimentos

encontram-se na Tabela 13.

Tabela 13. Rendimento das frações obtidas no fracionamento por coluna cromatográfica dos alcalóides totais de *Annona hypoglauca* Mart.

Frações	Massa (g)	Rendimento (%) *
FA1	0,0076	0,0011
FA2	0,0004	0,00005
FA3	0,7384	0,1055
FA4	0,1614	0,0231
FA5	0,1761	0,0252
FA6	0,3958	0,0565
FA7	0,0434	0,0062
FA8	0,0269	0,0038
FA9	0,0221	0,0031
FA10	0,016	0,0023

* Rendimento calculado em relação ao material vegetal de partida

Na Tabela 13 podemos observar que as frações FA3, FA4, FA5 e FA6 foram as que apresentaram maior rendimentos. Dessas frações, FA5 e FA6 foram selecionadas para a realização do isolamento dos alcalóides por cromatografica em camada delgada preparativa.

4.1.2.2 Caracterização e identificação dos compostos isolados

4.1.2.2.1 Fração FA5

A fração FA5 deu origem a três sub-frações (FA5.1, FA5.2, FA5.3), a fração FA5.1 apresentou-se na forma de uma mistura, não sendo possível separar nenhum composto por CCD preparativa, enquanto, na FA5.2 foi possível isolar um composto majoritário que se apresentou na forma de uma linha a verde no visível com $R_f = 0,25$ que absorveu no UV 254 nm e reagiu com reagente Dragendorff, esse composto majoritário foi nomeado como Alcalóide 1.

A Figura 30 traz a análise do cromatograma por CG-EM da sub-fração FA5.2, onde se vê a presença de um composto majoritário, confirmando as análises prévias da FA5.2 por CCD analítica. O composto majoritário apresentou $TR = 17,89$, com íon molecular $M^{+•} = 327$ e padrão de fragmentação compatível com a isoboldina, que já havia sido observada no extrato de AT (Figura 26). O TR da isoboldina na FA5.2 apresentou valor diferente devido à mudança das condições de análise do aparelho CG-EM para o Método 2.

Figura 30. Cromatograma da sub-fração FA5.2 pelo Método 2

O Alcalóide 1 apresentou massa de 3,7mg na forma de um sólido marrom esverdeado, sendo possível fazer a caracterização da estrutura deste composto por análise espectroscópica de ^1H e ^{13}C RMN. As atribuições dos espectros de ^1H RMN (Figura 31) encontram-se descritas na Tabela 14, enquanto o espectro de ^{13}C RMN (Figura 32) e suas atribuições na Tabela 15

Tabela 14. Atribuições dos valores do espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) do alcalóide 1 isolado de *Annona hypoglauc* Mart.

Posição do H (relativa ao esqueleto carbônico)	Alcalóide 1 (ppm)	Isoboldina (JACKSON; MARTIN, 1966)
--	----------------------	---------------------------------------

3	6.46 (s)	6,46 (s)
8	6.73 (s)	6.72 (s)
11	7.93 (s)	7,95 (s)
2 OMe	3.84 – 3.83	3,86
10 OMe	3.84 – 3.83	3,86
6 NCH ₃	2.48 (s)	2.52 (s)

Figura 31. Espectro ^1H -RMN do alcalóide 1 (300MHz, CDCl_3)

Jackson e Martin (1966) atribuíram os valores ^1H -RMN para o composto isoboldina (Tabela 14), esse alcalóide foi isolado pela primeira vez do tronco de *Nandina domestica* (BOCHMANN-HANSSEN; NIELSEN; HIRAI, 1967). Os valores de absorção encontrados para o alcalóide 1 estão muito próximos dos valores atribuídos a isoboldina podendo-se atribuir essa estrutura para o Alcalóide 1.

Tabela 15. Atribuições dos valores do espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) do alcalóide 1 isolado de *Annona hypoglauca* Mart.

Posição do Carbono	Alcalóide 1 (ppm)	Isoboldina (JACKMAN et al., 1979)
1	140,4	140,8
1a	119,7	119,6
1b	123,7	126,5
2	145,7	146,5
3	108,6	109,3
3a	127,2	123,1
4	28,7	28,6
5	53,3	51,1
6-NCH ₃	43,7	43,8
6a	62,5	62,6
7	33,9	33,9
7a	129,7	129,2
8	111,5	115,1
9	144,9	145,4
10	144,4	145,2
11	113,8	113,7
11a	124,4	123,6
2 OMe	56,1	55,8
10 OMe	56	55,8

Figura 32. Espectro ^{13}C -RMN do alcalóide 1 (75 MHz, CDCl_3)

A comparação entre os dados de Jackman et al. (1979) e os obtidos na análise de ^{13}C RMN do Alcalóide 1 apresentada na Tabela 15 confirmaram os dados de CG-EM e ^1H RMN, sendo a isoboldina o composto majoritário da FA5.2.

Já, na sub-fração FA5.3 que apresentou massa 2 mg, observou-se uma mancha larga que absorveu no UV 254 nm, sendo essa uma mistura de três alcalóides aporfínicos que não se separaram por CCD preparativa. Posteriormente foi analisada por CG-EM pelo Método 1, cujo cromatograma encontra-se na Figura 33, indicando a presença de três compostos majoritários com tempos de retenção 19,9 min, 21,14 min e 25,72 min, cujos espectros de massas foram compatíveis com os alcalóides aporfínicos, nornuciferina, anonaina e isodomeesticina, respectivamente.

Figura 33. Cromatograma a gás da sub-fração FA5.3 pelo Método 1 (CG-EM).

Para confirmar a presença desses três compostos, a fração FA5.3 foi analisada por ^1H RMN (Figuras 34 e 35).

Figura 34. Espectro de RMN ^1H de FA5.3 (200MHz, CDCl_3)

Figura 35. Espectro de RMN ^1H de FA5.3 (200MHz, CDCl_3)

Hasrat et al (1997), atribuíram dados na literatura de RMN de ^1H para nornuciferina e anonaina, sendo possível observar esses sinais no espectro de RMN ^1H (Figuras 34 e 35) da FA5.3, enquanto, Guinaudeau, Lebouef e Cavé (1975), listaram em sua revisão valores para isodomeesticina. As principais absorções encontradas para estes alcalóides na mistura (FA5.3) e dados da literatura estão descritas na Tabela 16.

Tabela 16. Atribuições dos valores do espectro de ^1H -RMN (200 MHz, CDCl_3) dos alcalóides presentes na FA5.3 de *Annona hypoglauca* Mart.

Posição do H (relativa ao esqueleto carbônico)	Alcalóide 2 de FA5.3 (ppm)	nornuciferina (Hasrat et al.,1997)	Alcalóide 3 de FA5.3 (ppm)	anonaina (Hasrat et al.,1997)	Alcalóide 4 de FA5.3 (ppm)	isodomeesticina (Guinaudeau; Lebouef,;Cavé, 1975)

11	8,40(d) j =7,8 Hz	8,41(d) j = 7,8 Hz	8,10(d) j =7,8 Hz	8,11(d) j =7,8 Hz	7,95 (s)	7,83 (s)
10,9,8	7,36 - 7,20 (m)	7,40 - 7,20 (m)	7,36-7,20 (m)	7,40 - 7,20 (m)	—	—
9	—	—	—	—	6,73 (s)	6,76 (s)
3	6,65 (s)	6,68 (s)	6,75 (s)	6,76 (s)	6,60 (s)	6,62 (s)
1 OCH ₃	3,67 (s)	3,67 (s)	—	—	—	-
2 OCH ₃	3,91 (s)	3,91 (s)	—	—	—	3,57 (s)
1,2 O-CH2-O	—	—	6,09 (s) não observado	6,04 (d) j = 0,8 Hz 6,19 (d) j =0,8 HZ	—	—
9,10 O-CH2-O	—	—	—	—	5,97 (s)	5,95 (s)
6 N-CH ₃	—	—	—	—	2,56 (s)	2,50 (s)

Assim, com base na comparação entre as informações da literatura e os dados obtidos através de CG-EM e de RMN ^1H , os valores atribuídos no espectro (^1H -RMN) estão muito próximos dos valores atribuídos aos alcalóides nornuciferina, anonaina e isodomeesticina como observados na análise de CG-EM.

4.1.2.2.2 Fração FA6

O fracionamento por CCD preparativa de FA6 deu origem a seis novas sub-frações com massas reduzidas, sendo possível fazer a análise de apenas uma sub-fração que apresentou R_f 0,16 com absorção no UV 254 nm e a mesma mancha reagiu com Dragendorff.

O composto isolado apresentou massa de 7,8 mg na forma de cristais marrons, sendo denominada como Alcalóide 5. A identificação desse alcalóide foi feita por análise espectroscópica de ^1H RMN (Figura 37). As principais absorções encontradas para este alcalóide analisado e dados da literatura estão descritas na Tabela 17.

Tabela 17. Atribuições dos valores do espectro de ^1H -RMN (300 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 composto presente na FA6.2 isolado de *Annona hypoglauca* Mart.

Posição do H (relativa ao esqueleto carbônico)	Alcalóide 5 (ppm)	Actinodafinina (ppm) (STÉVIGNY et al., 2002)

1,2 OCH_2O	5.85 (s)	5.92 (s)
	6.01 (s)	6.00 (s)
3	6.45 (s)	6.45 (s)
8	6.72 (s)	6.72 (s)
11	7.56 (s)	7.57 (s)
10 OMe	3.84 (s)	3.85 (s)

No espectro de ^1H -RMN (Figura 36) do alcalóide 5 pode-se observar a presença de dois singletos aparentes em $\delta = 5,85$ e $6,01$, os quais foram atribuído aos hidrogênios do grupamento metilenodióxido na posição 1,2. A presença de um singlete referente a 3 H em $\delta = 3,84$ corresponderia a uma metoxila como substituinte no carbono 10. No espectro obtido para o Alcalóide 5, não observamos um singlete com integração para 3 H próximo a $\delta = 2,5$ eliminando, assim, a possibilidade deste possuir um grupo NCH_3 . Desta forma, podemos confirmar que esse composto se trata de uma noraporfina. Essas observações permitem atribuir para o Alcalóide 5 a estrutura da actinodafinina. Esse composto foi isolado anteriormente em Annonaceae da espécie *G. scandens* na forma de cristais com coloração marrom, a mesma observada para o Alcalóide 5 (GUINAUDEAU; LEBOUF; CAVÉ, 1983; HOCQUEMILLER ET AL., 1983).

Figura 36. Espectro ^1H -RMN do alcalóide 5 (300MHz, CDCl_3)

Devido à pureza e a quantidade do material disponível, fez-se então a análise desta substância por ^{13}C RMN totalmente desacoplado e o DEPT-135, para a confirmação da sua estrutura (Figura 37 e Figura 38). As atribuições dos deslocamentos químicos analisados por RMN de ^{13}C da amostra e dos dados obtidos na literatura por Stévigny et al. (2002), do composto actinodafinina estão descritos na Tabela 18.

Figura 37. Espectro ^{13}C -RMN do alcalóide 5 (75 MHz, CDCl_3)

Figura 38. Espectro de DEPT-135 ($\uparrow$ CH e CH_3 , $\downarrow$ CH_2) do alcalóide 5 (75 MHz, CDCl_3)

Tabela 18 - Atribuições dos valores do espectro de ^{13}C -RMN (75 MHz, CDCl_3) do alcalóide 5 isolado de *Annona hypoglauca* Mart.

Posição do Carbono	Alcalóide 5 (ppm)	Actinodafinina (STÉVIGNY et al., 2002)
1	141,7	141,5
1a	116,5	116,5
1b	126	127,7
2	146,9	146,6
3	106,9	107,1
3a	125,6	126,8
4	28,3	29,4
5	42,55	43,4
6a	53,3	53,7
7	35,4	36,5
7a	128	129
8	114,4	114,3
9	145,3	145,1
10	145,6	145,4
11	110,1	110,1
11a	122,7	123,1
O-CH ₂ -O	100,6	100,5
10 OMe	56,1	56,1

Continuando a análise do alcalóide 5 por ^{13}C -DEPT 135 (75 MHz, CDCl_3), vemos a presença de cinco deslocamentos químicos para cima no espectro (Figura 38) que são referentes aos valores para CH e CH₃, valores para CH em δ 114,4; 110,1; 106,9 para os aromáticos e para o carbono alicíclico na posição 6a com o valor de 53,3 ppm, o carbono da metoxila (CH₃) em 56 ppm; já, para os valores referentes a CH₂ se apresentam para baixo no espectro (δ 100,6; 42,55; 35,4; 28,3).

Os dados espectroscópicos obtidos com esta fração e somando-se o fato da presença da actinodafinina ter sido caracterizada nos AT, podemos conferir a presença desse alcalóide na FA6 de *A. hypoglauca*.

4.2 Ensaios biológicos

4.2.1 Resultados obtidos na atividade antibacteriana

O extrato bruto (EB) e as frações hexânica 1 e 2, diclorometano/metanol, acetato de etila, *n*-butanol e os alcalóides totais e as suas frações de coluna (FA3, FA4, FA5, FA6 e FA7) foram avaliados quanto a sua atividade antibacteriana pelo método de diluição seriada em microplaca para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Escherichia coli* (ATCC 25922). Os resultados obtidos encontram-se na Tabela 19.

Tabela 19. Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos e dos alcalóides de *Annona hypoglauca* Mart.

AMOSTRAS	<i>S.aureus</i>		<i>E.faecalis</i>		<i>E. coli</i>
	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)	CIM (µg/mL)
EXTRATOS					
Extrato Bruto	>100	>100	>100	>100	>100
Fração hexânica 1	>100	>100	>100	>100	>100
Fração hexânica 2	>100	>100	>100	>100	>100
Fração diclorometano/metanol	>100	>100	>100	>100	>100
Fração acetato de etila	>100	>100	>100	>100	>100
Fração butanólica	>100	>100	>100	>100	>100

Tabela 19 (Cont.). Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos e dos alcalóides de *Annona hypoglauca* Mart.

	<i>S.aureus</i>		<i>E.faecalis</i>		<i>E. coli</i>
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM
AMOSTRAS	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)	($\mu\text{g/mL}$)
ALCALÓIDES					
Alcalóides Totais	60	70	50	50	>100
FA3	60	60	80	80	>100
FA4	100	100	90	90	>100
FA5	70	70	40	40	>100
FA6	70	80	40	40	> 90
FA7	70	70	40	40	>100
Gentamicina	0,20	0,20	8	8	0,40
Tetraciclina	0,50	0,50	32	32	2

Os resultados dos ensaios antibacterianos (Tabela 19) demonstraram que tanto o extrato bruto como as frações não alcaloídicas (hexânica 1 e 2, diclorometono/metanol, acetato de etila e *n*-butanol) não podem ser consideradas ativas uma vez que os valores determinados de CIM e CBM foram superiores a 100 $\mu\text{g/mL}$. Em programas de triagem para busca de novas substâncias bioativas, são considerados ativos os extratos com capacidade de inibir o crescimento bacteriano em doses $\leq 100 \mu\text{g/mL}$ (SUFFREDINI *et al.*, 2004).

Contudo, a fração de alcalóides totais apresentou atividade frente a *S. aureus* (CIM= 60 $\mu\text{g/mL}$ e CBM= 70 $\mu\text{g/mL}$) e *E. faecalis* (CIM e CBM=50 $\mu\text{g/mL}$). Tanto os alcalóides totais bem com suas frações apresentaram atividade somente para bactérias Gram +. Em estudos anteriores, foi relatada a atividade frente bactérias Gram + para alcalóides isoquinolínicos (ABBASOGLU *et al.*, 1990).

As frações (FA5, FA6 e FA7) apresentaram resultados idênticos com CIM=70 µg/mL para *S. aureus*. e para *E. faecalis* CIM e CBM= 40 µg/mL. A atividade observada para FA6 pode ser relacionada com a presença de actinodafinina nesta fração, pois foi descrita na literatura a sua atividade frente a *S. aureus* (BANDARA et al., 1989), enquanto a isoboldina, componente majoritário de FA5, não apresenta atividade antibacteriana (SIMÉON; RIOS; VILLAR, 1990; PAULO et al., 1992).

A relação estrutura-atividade de vários alcalóides isoquinolínicos contra bactérias Gram + foi anteriormente analisada, demonstrando maior atividade para as noraporfínas que continham um grupamento 1,2 metilenodióxido, as protoberberinas também foram consideradas ativas (VILLAR et al., 1987; ABBASOGLU et al., 1991; PAULO et al., 1992).

A. hypoglauca acumulou dois alcalóides noraporfínicos substituídos por um metilenodióxido, actinodafinina e anonaina, a presença desses compostos pode ser responsável pela atividade obtida.

4.2.2 Resultados obtidos na atividade citotóxica frente a células de tumores humanos

A Tabela 20 apresenta os resultados dos ensaios citotóxicos para o extrato bruto (EB) as frações hexânica 2, diclorometano/metanol, acetato de etila e *n*-butanol e os alcalóides totais (AT).

Tabela 20. Atividade citotóxica frente à células de tumores humanos dos extratos e frações alcaloídicas de *A. hypoglauca*.

AMOSTRAS (100 µg/mL)	Inibição de Crescimento (%)				
	Linhagem Celular				
	PC-3	NCIH-460	KM-12	SF-268	RPMI-8226
Extrato Bruto	88,61	98,73	- 2,56	41,55	82,71
Fração hexânica 2	22,63	51,93	0	0	46,55
Fração diclorometano/metanol	40,4	55,15	0	6,34	46,62
Fração acetato de etila	32,9	61,43	0	22,6	70,29
Fração butanólica	53,43	34,41	0	0	16,23
Fração alcalóides totais	82,96	28,26	67,61	26,66	70,26

PC-3: Linhagem celular de câncer de próstata; NCIH-460: Linhagem celular de câncer de pulmão; KM-12: Linhagem celular de câncer de cólon; SF-268: Linhagem celular de câncer do sistema nervoso central; RPMI-8226: Linhagem celular de câncer de leucemia

Vemos na Tabela 20 que o extrato bruto inibiu o crescimento celular de todas as linhagens celulares, causando letalidade para a linhagem de células de câncer de cólon (KM-12). Para as frações livres de alcalóides foi observado baixo ou nenhum efeito sobre o crescimento das linhagens KM-12 e SF-268, não sendo considerado ativos para essas duas linhagens celulares, já para as outras três linhagens ocorreu uma inibição do crescimento considerável.

A fração de alcalóides totais inibiu o crescimento da linhagem celular de câncer de cólon (KM-12) em 67,61 %, enquanto as frações livres de alcalóides não apresentaram essa atividade. Com base nesses resultados podemos concluir que

os alcalóides foram os que mais contribuíram para a toxicidade sobre essa linhagem celular. Os alcalóides totais apresentaram boa inibição (>70 %) de crescimento para as linhagens de leucemia (RPMI-8226) e câncer de próstata (PC-3). As frações livres de alcalóides também foram capazes de inibir consideravelmente o crescimento celular dessas duas linhagens. O resultado obtido com extrato bruto nessas duas linhagens celulares pode ser devido a um sinergismo entre os alcalóides com os outros metabólitos presentes nesse extrato.

Por outro lado, as frações livres de alcalóides apresentaram uma maior inibição de crescimento para a linhagem de câncer de pulmão (NCIH-460) do que os alcalóides, principalmente a fração acetato de etila. O efeito total do extrato bruto sobre essa linhagem celular também parece ser o resultado do sinergismo entre os diferentes metabólitos presentes nessa espécie.

Alguns dos alcalóides majoritários presentes em *A. hypoglauca*, actinodafinina, glaucina, isoboldina, anonaina, podem ser os responsáveis pela atividade citotóxica observada. A atividade citotóxica de alcalóides aporfínicos frente a células de tumores foi anteriormente comprovada com alcalóides extraídos de *A. montana* (WU et al., 1993). Mais especificamente, Hoet et al (2004) demonstraram atividade citotóxica para glaucina e actinodafinina frente à linhagem celular HeLa. Nesse estudo a atividade foi atribuída à capacidade dos alcalóides aporfínicos se ligarem com a fita dupla do DNA e as enzimas topoisomerasas I e II, esse complexo resulta em quebra do DNA bifilamentar.

5 CONCLUSÕES

- Com a espécie *A. hypoglauca* obteve-se um rendimento de 0,28 % em alcalóides totais a partir dos caules da planta seca. A análise por CG-EM indicou que essa fração era constituída por pelo menos 25 compostos, sendo possível caracterizar sete alcalóides aporfínicos, nornuciferina, roemerina, anonaina, isodomeesticina, glaucina, actinodafinina e isoboldina, e possivelmente duas protoberberinas, esculerina e caseadina. A presença de alcalóides do tipo aporfínico no gênero *Annona* já se encontra bem documentada na literatura, contudo a presença dos alcalóides protoberberínicos deve ainda ser confirmada. Dois dos alcalóides aporfínicos majoritários foram isolados e tiveram sua estrutura confirmada como isoboldina, com ampla distribuição no gênero *Annona*, e actinodafinina, isolada aqui pela primeira vez em uma espécie desse gênero.

- No ensaio para atividade antibacteriana, somente os alcalóides totais e suas frações apresentaram atividade frente a bactérias Gram +. A presença de dois alcalóides noraporfínicos substituídos por um grupamento metilenodióxido, actinodafinina e anonaina, pode ter sido o fator mais importante para atividade observada.

- No ensaio de citotoxicidade com linhagens de células tumorais, o Extrato bruto de *A. hypoglauca* foi capaz de inibir o crescimento de todas as linhagens celulares testadas, apresentando efeito letal para a linhagem de Câncer de Cólon (KM-12). A avaliação dessa atividade com os alcalóides totais e as frações não-alcaloídicas indicou uma seletividade dessas frações frente às diferentes linhagens

celulares. A fração de alcalóides apresentou uma elevada inibição do crescimento da linhagem celular de câncer de cólon (KM-12), enquanto que as frações livres de alcalóides apresentaram baixa atividade. Por outro lado, as frações livres de alcalóides apresentaram atividade mais pronunciada para a linhagem de Câncer de Pulmão (NCIH-460) do que os alcalóides. Assim, a atividade citotóxica encontrada no extrato bruto é decorrente do sinergismo ou complementação entre os componentes das frações alcaloídicas e não-alcaloídicas, isto é, nenhuma das frações isoladamente é responsável pela atividade observada no extrato bruto.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASOGLU, U.; SENER, B.; GUNAY, Y.; TEMIZER, H. Antimicrobial activity of some isoquinoline alkaloids. *Archiv der Pharmazie*, v.324, p.379-380, 1991.

BREMER, B.; BREMER, K.; CHESE, M.W.; REVEAL, J.L.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; STEVENS, P.F.; ANDERBERG, A.A.; FAY, M.F.; GOLDBLATT, P.; JUDD, W.S.; KALLERSJO, M.; KAREHED, J.; KRON, K.A.; LUNDBERG, J.; NICKRENT, D.L.; OLMSTEAD, R.G.; OXELMAN, B.; PIRES, J.C.; RODMAN, J.E.; RUDALL, P.J.; SAVOLAINEN, V.; SYTSMA, K.J.; VAN DER BANK, M.; WURDACK, K.; XIANG, J.Q.Y.; ZMARZTY, S. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.141, p.399-436, 2003.

BANDARA, B.M.; CORTES, D.; JAYASINGLE, U.L.B.; KARUNARATNE, V.; SOTHEEWARAN, S.; WANNIGAMA, G.P. Aporphine alkaloids from *Litsea gardneri* and *Actinodaphne speciosa*. *Planta Medica*, v.55, p.393, 1989.

BATTERSBY, A.R.; SOUTHGATE, R.; STAUNTON, J.; HIRST, M. Synthesis of (+) – and (-)-Scoulerine and (+) – and (-)-Coreximine. *Journal of Chemical Society [Section] C: Organic*, v.11, p.1052-1057, 1966.

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

BHAKUNI, D.S.; JAIN, S. Protoberberine alkaloids. In: BROSSI, A. *The alkaloids: chemistry and pharmacology*. San Diego: Academic Press, 1986. v.28, p.95-103.

BHAKUNI, D.S.; TEWARI, S.; DHAR, M.M. Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, v.11, p.1819-1822, 1972.

BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; JUNEAU, J.P.; BHACCA, N.S.; MUKHERJEE, R. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, v.18, p.1584-1586, 1979.

BISSET, N.G. Plants as a source of isoquinoline alkaloids. In: PHILLIPSON, J.D.; ROBERTS, M.F.; ZENK, M.H. *The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids*. 8.ed. Berlin, New York: Springer-Verlag, 1985. p.79-101.

BLANCHFIELD, J.T.; SANDS, D.P.A.; KENNARD, C.H.L.; BYRIEL, W.K. Characterisation of alkaloids from some Australian *Stephania* (Menispermaceae) species. *Phytochemistry*, v.63, p.711-720, 2003.

BORUP-GROCHTMANN, I.; KINGSTON, G.I. Aporphine alkaloids from *Annona acuminata*. *Journal of Natural Products*, v.45, p.102, 1982.

BROCHMANN-HANSEN, E.; NIELSEN, B. The isolation of (-)-scoulerine from opium. *Tetrahedron Letters*, v.20, p.2261-2263, 1966.

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

BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D.H. Isoquinoline alkaloids. In: BUDZIKIEWICZ, H.; DJERASSI, C.; WILLIAMS, D.H., eds. *Structure elucidation of natural products by mass spectrometry: alkaloids*. San Francisco: Holden-Day, 1964. v.1, p.175-185. (Holden-Day series in physical techniques in chemistry).

CAVÉ, A.; CHABOCHE, C.; FIGADERE, B.; HARMANGE, H.J.; LAURENS, A.; PEYRAT, J.F.; PICHON, M.; SZLOSEK, M.; COTTE-LAFITTE, J.; QUÉRO, A. Study of the structure-activity relationships of the acetogenin of Annonaceae, muricatacin and analogues. *European Journal of Medicinal Chemistry*, v.32, p.617-623, 1997.

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

CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; WU, P.H.; KUO, R.Y.; CHANG, Y.C.; WU, Y.C. New alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, v.63, p.746-748, 2000.

CHANG, F.R.; WEI, J.L.; TENG, C.M.; WU, Y.C. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. *Journal Natural Products*, v.61, p.1457-1461, 1998a.

CHANG, F.R.; WEI, J.L.; TENG, C.M.; WU, Y.C. Two new 7-Dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*, v.49, n.7, p.2015-2018, 1998b.

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

CHEN, C.Y.; MACLEAN, D.B. Mass spectra and proton magnetic resonance spectra of some tetrahydroprotoberberine alkaloids. *Canadian Journal of Chemistry*, v.46, p.2501-2506, 1968.

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

CRAGG, G.M.; NEWMAN, D.J.; SNADER, K.M. Natural products in drug discovery and development. *Journal of Natural Products*, v.60, p.52-60, 1997.

CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. 18.ed. New York: Columbia University Press, 1981. 1262p.

DEBOURGES, D.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; Alkaloids of the Annonaceae. Part 77. Alkaloids of *Duguetia spixiana*. *Journal of Natural Products*, v.50, n.4, p.664-673, 1987.

DEWICK, P.M. Alkaloids. In: DEWICK, P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*. Chichester, New York: John Wiley, 1997. p.270-371.

FARNSWORTH, N.R.; MORRIS, R.W. Higher plants - the sleeping giant of drug development. *American Journal of Pharmacy and the Sciences Supporting Public Health*, v.148, n.2, p.46-52, 1976.

FAUST, J.; PREISS, A.; RIPPERGER, H.; SANDOVAL, D.; SCHREIBER, K. Alkaloide aus *Annona cristalensis*. *Pharmazie*, v.36, n.10, p.713-713, 1981.

FISCHER, D.C.H.; GUALDA, N.C.A.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C.S.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; ALVES, M.O.; YOGI, A.; DI SANTI, S.M.; AVILA, P.E.; KIRCHGATTER, K.; 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.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P.; WANDERLEY, M.G.L.; BERG, C.V.D. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conservation Biology*, v.19, n.3, p.632-639, 2005.

GOTTSBERGER, G. Seed dispersal by fish in inundated regions of Humaita, Amazonia. *Biotropica*, v.10, p.170-183, 1978.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine Alkaloids, III. *Journal of Natural Products*, v.46, p.761-835, 1983.

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

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine Alkaloids. *Lloydia*, v.38, p.275-338, 1975.

HARBORNE, J.B. *Plant chemosystematics*. London, Orlando: Academic Press, 1984. p.159-163.

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

HENRIQUES, A.T.; KERBER, V.A.; LIMBERGER, R.P., MORENO, P.R. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., orgs. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2004. p.765-791.

HEYWOOD, V.H., ed. *Flowering plants of the world*. New York: Oxford University Press, 1993. p.30-31.

HIRUMA-LIMA, C.A.; DI STASI, L.C. Magnoliales medicinais. In: GUIMARÃES, M.E.; SANTOS, M.N.; DI STASI, L.C.; HIRUMA-LIMA, C.A. *Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. 2.ed. São Paulo: UNESP, 2003. p.89-109.

HOCQUEMILLER, R.; RASAMIZAFY, S.; CAVÉ, A.; MORETTI, C. Alcaloïdes des Annonacées. XXXVII. Alcaloïdes du *Guatteria scandens*. *Journal of Natural Products*, v.46, p.335-341, 1983.

HOET, S.; STÉVIGNY, C.; BLOCK, S.; OPPERDOES, F.; COLSON, P.; BALDEYROU, B.; LANSIAUX, A.; BAILLY, C.; QUETIN-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.

JACKMAN, L.M.; THEWELLA, J.C.; MONIOT, J.L.; SHAMMA, M.; STEPHENS, R.L.; WENKERT, E. The Carbon-13 NMR spectra of aporphine alkaloids. *Journal of Natural Products*, v.42, p.437-449, 1979.

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

JOLY, A.B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 13.ed. São Paulo: Nacional, 2002. p. 286.

LAPREVOTE, O.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Alcaloides des Annonacees 88: alcaloides de *Annona paludosa* Aublet. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v.22, p.159-164, 1988.

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

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

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMILK, P.K.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, v.21, n.12, p.2783-2813, 1982a.

LEBOUEF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; TIBERGHEN, R.; PROVOST, J.; TOUCHE, A.; JACQUEMIN, H. Alcaloides des annonacees XL: étude chimique et pharmacologique des alcaloides de l'Annona montana Macf. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v.16, p.169-184, 1982b.

LORENZI, H.; MATOS, F.J., eds. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p.60-63.

MARTINEZ-VÁZQUEZ, M.; LOZANO, D.G.C.; ESTRADA-REYES, R.; GONZÁLEZ-LUGO, N.M.; APAN, T.R.; HEINZE, G. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. *Fitoterapia*, v.76, p.733-736, 2005.

MACLEAN, D.B.; SNIECKUS, V. R.H.F. Manske fifty years of alkaloids chemistry. *Alkaloids*, v.50, p.1-59, 1998.

MARTIUS, C.F.P. *Flora Brasiliensis: enumeration plantarum in Brasília*. Monachii: R. Oldenbourg, 1841. v.13, part.1, fasc.2, p.13-14.

MCLAFFERTY, F.W.; STAUFFER, D.B. *The Wiley/NBS registry of mass spectral data*. New York: Wiley-Interscience, 1989. v.3, p.3078.

MENDELSON, R.; BALICK, M.J. The value of undiscovered pharmaceuticals in tropical forests. *Economic Botany*, v.49, p.223-228, 1995.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. Research. Trópicos. Search. *A. hypoglauca* Mart. Disponível em: <http://mobot.mobot.org/W3T/Search/vast.html>. Acesso em: 07 jul. 2007.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, H.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *Journal of the National Cancer Institute*, v.83, p.757-766, 1991.

MONTANHA, J.A.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J.; GIRRE, L. Anti-herpes vírus activity of aporphine alkaloids. *Planta Medica*, v.61, p.416-424, 1995.

NICOLAOU, K.C.; YANG, Z.; LIU, J.J.; UENO, H.; NANTERMET, P.G.; GUY, R.K.; CLAIRBORNE, C.F.; RENAUD, J.; COULADOUROS, E.A.; PAULVANNAN, K.; SORENSEN, E.J. Total synthesis of paclitaxel. *Nature*, v.367, p.630-634, 1994.

NODARI, R.O.; GUERRA, M.P. Aspectos genéticos e moleculares da produção vegetal. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R., eds. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. 5.ed. Florianópolis: UFSC; Porto Alegre: UFRGS, 2004. p.27-43.

O'NEILL, M.J.; LEWIS, J.A. The renaissance of plant research in the pharmaceutical industry. In: KINGHORN, A.D.; BALANDRIN, M.F., eds. *Human medicinal agents from plants*. Washington: American Chemical Society, 1993, p.48-55. (ACS Symposium Series, 534).

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

OLIVEIRA, A.B.; OLIVEIRA, G.G.; CARAZZA, F.; MAIA, J.G. Geovanine, a new azaanthracene alkaloids from *Annona ambotay* Aubl. *Phytochemistry*, v.26, p.2650-2651, 1987.

PADMA, P.; CHANSOURIA, J.P.N.; KHOSAL, R.L. Effect of some indigenous drugs on cold immobilization stress induced gastric ulcer. *Phytotherapy Research*, v.12, p.127-128, 1998.

PARDHASARADHI, B.V.V.; REDDY, M.; MUBARAK ALI, A.; KUMARI, A.L.; KHAR, ASHOK. Differential cytotoxic effects of *Annona squamosa* seed extracts on human tumour cell lines: role of reactive oxygen species and glutathione. *Journal of Biosciences*, v.30, p.237-244, 2005.

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

PEREIRA, A.S.; AMARAL, A.C.F.; BARNES, R.A.; CARDOSO, J.N.; NETO, F.R.A. Identification of Isoquinoline alkaloids in crude extracts by high temperature gas chromatography-mass spectrometry. *Phytochemical Analysis*, v.10, p.254-258, 1999.

PHILIPPOV, S.; KANDÉ, K.M.; MACHEV, K. Alkaloids of *Annona senegalensis*. *Fitoterapia*, v.66, p.275-276, 1994.

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

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Pessoine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*, v.59, p.438-440, 1996.

RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CASSELS, B.K.; CAVÉ, A. Alkaloids de *Annona hayesii*. *Journal of Natural Products*, v.50, p.759-761, 1987.

RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; FOURNET, A. Alcaloïdes des Annonacées. 78. Alcaloïdes des écorces d'un *Duguetia spixiana* de Bolivie. *Journal of Natural Products*, v.50, p.674-679, 1987.

RIOS, J.L.; SIMEON, S.; VILLAR, A. Pharmacological activity of aporphinoid alkaloids: a review. *Fitoterapia*, v.60, n.5, p.387-412, 1989.

SANDOVAL, D.; PREISS, A.; SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H. Annonelliptine, an alkaloid from *Annona elliptica*. *Phytochemistry*, v.24, p.375-376, 1985.

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

SANTOS, P.R.D.; MORAIS, A.A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dióica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, vol.14, n.3, p.396-400, 2003.

SHAMMA, M.; SLLUSARCHYK, A. The problem of the 1,2,9,10-tetraoxygenated aporphines and the structure of the quarternary aporphine from *Fagara tinguassoiba*. *Tetrahedron*, v.23, p.2563-2570, 1967.

SHOKEEN, P.M.S.C.; RAY, K.M.D.; BALA, M.M.D.; TANDON, V. Preliminary studies on activity of *Ocimum sanctum*, *Drynaria quercifolia*, and *Annona squamosa* against *Neisseria Gonorrhoeae*. *Sexually Transmitted Diseases*, v.32, p.106-111, 2005.

SIMEÓN, S.; RÍOS, J.L.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of *Annona cherimolia* stem bark alkaloids. *Pharmazie*, v.45, p.442-443, 1990.

SONNET, P.E.; JACBSON, M. Tumor inhibitors II: Cytotoxic alkalids from *Annona purpurea*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.60, p.1254-1256, 1971.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005. p.82-84.

STÉVIGNY, C.; BLOCK, S.; PAUW-GILLET, M.C.; HOFFMAM, E.; LLABRES, G.; ADJAKIDJÉ, V.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*. *Planta Medica*, v.68, p.1042-1044, 2002.

SUFFREDINI, I.B. *Avaliação citotóxica, antiviral e antimicrobiana de Apocynaceae amazônicas*. São Paulo, 2000. 220p. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

SUFFREDINI, I.B.; SADER, H.S.; GONÇALVES, A.G.; REIS, A.O.; VARELLA, A.D.; YOUNES, R.N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon rain forest and Atlantic forest. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v.37, p.379-384, 2004.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE, H.F.J.; AMORIM-GUALDA, N.C.; 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.

VERPOORTE, R. Methods for the structure elucidation of alkaloids. *Journal of Natural Products*, v.49, n.1, p.1-25, 1986.

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J.L.; CANTON, E.; GOBERNADO, M. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids. *Pharmazie*, v.42, p.248-250, 1987.

VILLAR, R.; CALLEJA, J.M.; MORALES, C.; CÁCERES, A. Screening of 17 Guatemalan medicinal plants for platelet antiaggregant activity. *Phytotherapy Research*, v.11, p.441-445, 1997.

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J.L. Alkaloids from *Annona cherimolia* leaves. *Journal of Natural Products*, v.48, p.151-152, 1985.

WALL, M.E.; WANI, M.C. Camptothecin and taxol: discovery to clinic – thirteenth Bruce F. Cain Memorial award lecture. *Cancer Research*, v.55, n.4, p.753-760, 1995.

WARTHEN, D.; GOODEN, E.L.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloids from *A. glabra*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.58, p.637-638, 1969.

WU, Y.C. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *Phytochemistry*, v.33, n.2, p.497-500, 1993.

YANG, Y.L.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. Annosqualine: a novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa*. *Helvetica Chimica Acta*, v.87, p.1392-1399, 2004.

Curriculum Vitae

Maria Valéria Nani Rinaldi

Data de nascimento: 24/01/1973

Correio eletrônico: val_rinaldi@hotmail.com ou marianani@uol.com.br

Formação Acadêmica

2007 - Mestrado em Fármaco e Medicamentos pela Universidade de São Paulo, orientador Prof. Dr. Paulo Roberto H. Moreno.

2000-2002 – Iniciação Científica no Centro de Pesquisas Oncológicas da Universidade Paulista – UNIP, orientador: Prof. Dra. Ivana B. Suffredini.

1998-2002 - Graduação em Farmácia e Bioquímica pela Universidade Paulista – UNIP.

Disciplinas Extracurriculares

2006 - Metabólitos Secundários: Aspectos Ecológicos oferecida pelo Instituto Botânico.

2004 - Morfologia e Anatomia de Plantas Vasculares oferecida pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, departamento de Botânica.

2002 - Princípios Ativos de Plantas Medicinais e Tóxicas pelo Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, departamento de Botânica.

2002 - Bioquímica do Câncer oferecido pelo Instituto de Química da Universidade de São Paulo.

Experiência Profissional

2007 – Monitor da disciplina de Farmacobotânica para o curso de Farmácia da Universidade de São Paulo.

2006 - Monitor da disciplina de Farmacobotânica para o curso de Farmácia da Universidade de São Paulo.

2004 – Farmacêutica Responsável da empresa RCR Rinaldi Com. e Rep. de Produtos Médicos Hospitalares LTDA.

1994 - 2002 - Vendedora de produtos para Laboratório de Análises Clínicas.

2000 - Membro da Comissão Organizadora da I Semana Farmacêutica da Universidade Paulista – UNIP, Campus Marquês.

Estágios

2002- Estágio no Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da Universidade de São Paulo.

2002 – Estágio no Departamento de Patologia Clínica no Serviço de Laboratório Clínico do Hospital A. C. Camargo da Fundação Antônio Prudente.

2002 – Estágio no Departamento da Farmácia Hospitalar: Central de Distribuição das Unidades de Internação e Quimioterapia do Hospital A. C. Camargo da Fundação Antônio Prudente.

Resumos Publicados em Anais de Eventos

RINALDI, M.V.N., SUFFREDINI, I.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N., MORENO, P.R.H. (2007): Antibacterial and cytotoxic evaluation of isoquinoline alkaloids from *Annona hypoglauca* Mart. In: VI Simpósio Internacional de Química de Productos Naturales y sus Aplicaciones, Chillán, Chile. – Libro de Resúmenes 2007.

RINALDI, M.V.N., SUFFREDINI, I.B., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N., MORENO, P.R.H. (2006): Atividade Antimicrobiana dos Alcalóides Isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* (Mart.) Annonaceae. In: XIX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Salvador - Resumos de XIX Simpósio Brasileiro de Plantas Medicinais 2006.

RINALDI, M.V.N., SUFFREDINI, I.B., PACIÊNCIA, M., VARELLA, A.D., YOUNES, R.N., LIMA, M.E.L., MORENO, P.R.H. (2005): Estudo Fitoquímico do Caule de *Annona hypoglauca* (MART.) Annonaceae. In: Reunión de La Sociedade Latinoamericana de Fitoquímica “ Prof.. Emer. Patrick Moyna”, I Congresso de Fitoterapicos del Mercosur, Montividéu. Libro de Resumens V Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Fitoquímica: Editora da Universidade do Uruguai, 2005. p.166.

RINALDI, M.V.N., VARELLA, A.D., SUFFREDINI, I.B., LIMA, M.E.L., MORENO, P.R.H., YOUNES, R.N. (2004): Atividade Antimicrobiana de Extrato Bruto e Fração de Alcalóides Ttais de *Annona hypoglauca* Mart. In: XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Manaus - XVIII Livro de Resumo do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, v.1.p.74, 2004.

RINALDI, M.V.N., VARELLA, A.D., SUFFREDINI, I.B., YOUNES, R.N., GONÇALVES, A. G., REIS, A. O., SADER, H. S. (2002): Atividade citotóxica e antimicrobiana de *Annona* sp. In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, Cuiabá. - XVII Livro de Resumos do Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil., 2002.