UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos

Área de Insumos Farmacêuticos

**Aspectos químicos e atividade antiprotozoária *in vitro* de *Annona coriacea*
Mart. (Annonaceae)**

Carlos Alberto Theodoro Siqueira

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientador:

Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer

São Paulo

2010

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP

Siqueira, Carlos Alberto Theodoro
S618a Aspectos químicos e atividade antiprotozoária *in vitro* de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) / Carlos Alberto Theodoro Siqueira. -- São Paulo, 2010.
178p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.
Orientador: Fischer, Dominique Corinne Hermine

1. Insumos farmacêuticos 2. Farmacognosia 3. Produtos naturais : Controle de qualidade : Farmacognosia I. T. II. Fischer, Dominique Corinne Hermine, orientador.

615.19 CDD

Carlos Alberto Theodoro Siqueira

Aspectos químicos e atividade antiprotozoária *in vitro* de *Annona coriacea*
Mart. (Annonaceae)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de MESTRE

Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer
Orientador/presidente

1°. examinador

2°. examinador

São Paulo, _____ de _____

AGRADECIMENTOS

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

A (CAPES) pela bolsa concedida.

À Diretoria da FCF.

Ao pesquisador Dr. André Gustavo Tempone e a pós-graduanda Juliana Quero Reimão, do Laboratório de Toxinologia do Departamento de Parasitologia do Instituto Adolfo Lutz de São Paulo, pelos ensaios de atividade antileishmania e antitrypanosoma *In vitro* dos alcalóides e do óleo volátil.

À Dra Carmem Lúcia Queiroga e ao Dr. Adilson Sartoratto da Divisão de Fitoquímica, do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA), pelas análises CG-EM dos alcalóides e do óleo volátil.

Ao Prof. Dr. Renato de Mello-Silva do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, pela identificação da espécie vegetal estudada.

Agradeço a minha esposa que desde o primeiro momento do mestrado sempre me apoiou.

Agradeço aos meus pais pelo amor, dedicação e apoio em todos os momentos de minha vida.

Agradeço aos meus irmãos, companheiros deste sonho, obrigado.

Agradeço ao Dr. Eduardo Ramires, o primeiro que me incentivou a fazer o Mestrado.

Agradeço a minha cunhada Christina, braço forte e companheiro, sempre ao meu lado e ao Tonho um grande companheiro.

Agradeço ao Dr. Benjamin e Adelina por sempre acreditarem em meu potencial.

Agradeço ao Sr. Carlos Ramires (*in memoriam*) e Dalila Novais e familiares pelo apoio até este momento.

Agradeço aos meus demais familiares pelo apoio.

Agradeço a minha orientadora, Profª Drª Dominique Corinne Hermine Fischer, sempre disposta a ensinar e com quem aprendi muito nestes anos de convivência durante o mestrado, muito obrigado.

Agradeço aos meus amigos Gilberto e Alberto pela paciência e companheirismo.

Agradeço a todos os professores que colaboraram direta e indiretamente com este trabalho, Prof. Paulo Chancel Deodato de Freitas e Prof. José Paschoal Batistuti, pela participação como membros da banca no exame de Qualificação. Aos Profª Tit. Elfriede Marianne Bacchi, Profª Drª Edna Tomiko Myiake Kato, Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch, Drª Ingrid Collantes, Prof. Dr. José de Abrão Neto, Prof. Dr. Mauricio Yonamine pela disposição do laboratório, Prof. Vicente de Oliveira Ferro, Prpfª Drª Maria Luiza Faria Salatino, Prof. Renato de Mello-Silva e demais professores que auxiliaram no desenvolvimento de meu aprendizado.

Agradeço aos funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas da USP e a bibliotecária Simone da UNICAMP.

Agradeço pelo apoio técnico a Roberto de Jesus Honorário, Edgar Muniz M. Jr., Newton de M. Bloise pela amizade e ajuda prestada durante o mestrado.

Agradeço aos funcionários do Departamento de Farmacognosia, Kelma L. O. A. Guitman, Elizabeth C. de S. Paiva, Alexandre Spitalere, Angela Costa.

Agradeço a estagiária Erika pelo trabalho durante o mestrado.

Aos meus amigos Josseara, André, Leandro, Peki, Carol, Fabiana, Jocimar, Marque, Charles pelo apóio e amizade.

A todas as pessoas que não estão nesta lista, mas que de alguma forma me ajudaram para que este sonho se realiza.

“Sucesso é a soma de pequenos
esforços, repetidos o tempo todo”

Robert Collier

SIQUEIRA, C.A.T. Aspectos químicos e atividade antiprotozoária *in vitro* de *Annona coriacea* Mart. 2010. 128 f. Dissertação de Mestrado – Orientador: Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer. e-mail: carlos_alberto_siqueira@yahoo.com.br

RESUMO

Estudos anteriores dos alcalóides totais (AT) de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) revelaram atividade antiprotozoária promissora. No presente trabalho, realizou-se o fracionamento biomonitorado dos AT de folha e selecionaram-se duas frações ativas (100% morte), frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi in vitro*, para a caracterização dos alcalóides, por CG-EM. Os AT bioativos de caule (100% morte) foram analisados sem fracionamento prévio. Em paralelo, efetuou-se amostragem de três exemplares de *A. coriacea*, analisados em conjunto, para o acompanhamento da variação do rendimento em AT e da atividade leishmanicida, por 12 meses. Nas frações bioativas de folha, foram caracterizados: estefarina (proaporfínico) e nornuciferina (noraporfínico) e nos AT de caule: pronuciferina (proaporfínico), assimilobina (noraporfínico) e boldina (aporfínico). A presença de boldina foi confirmada pela análise CG-EM do padrão, nas mesmas condições dos AT. Os resultados mostraram-se inéditos para a espécie e a ocorrência de pronuciferina e boldina constituiu o primeiro relato, no gênero *Annona*. Os dados referentes ao rendimento em AT (folha e caule) e à atividade antipromastigota *in vitro* indicaram comportamento, praticamente, constante dos parâmetros ao longo do ano. O óleo volátil de folha foi analisado, por CG-EM, tendo-se identificado 60 compostos, em mistura complexa de sesquiterpenos (76,7%) e monoterpenos (23,3%). O constituinte majoritário foi o sesquiterpeno biciclogermacreno (39,8%). O óleo volátil foi avaliado *in vitro* e apresentou atividade frente às formas promastigotas de quatro espécies de *Leishmania* e nas formas tripomastigotas de *T. cruzi*. A determinação e obtenção dos compostos bioativos motiva a continuidade da pesquisa.

Palavras-chave: *Annona coriacea* Mart.. Alcalóides isoquinolínicos. Óleo volátil. *Leishmania*. *Trypanosoma cruzi*.

SIQUEIRA, C.A.T. Chemical aspects and activity antiprotozoal *in vitro* of *Annona coriacea* Mart. 2010. 128f. Dissertation, Master Degree – Supervision master: Dominique Corinne Hermine Fischer. e-mail: carlos_alberto_siqueira@yahoo.com.br

ABSTRACT

Previous studies of total alkaloids (TA) from *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) have revealed potential antiprotozoal activity. In this study a bioguided fractionation of leaves TA was conducted and two fractions were active *in vitro* against *Leishmania* (L.) *chagasi* promastigotes (100% death) and selected in order to identify the alkaloid constituents, by GC-MS analysis. Stem bioactive TA (100% death) were also analyzed, without previous fractionation. Parallel to that, a sample of three combined specimens of *A. coriacea* (leaves and stem) was evaluated for the annual variation of TA production and the leishmanicide activity. Stefarine (proaporphine) and nornuciferine (noraporphine) were identified in the bioactive fractions of leaves while pronuciferine (proaporphine), asimilobine (noraporphine) and boldine (aporphine) were identified in stem TA. Boldine was confirmed by the GC-MS evaluation of the standard, under the same conditions of the TA. It was the first report of those alkaloids in this species and for pronuciferine and boldine occurrence in *Annona* genus. The TA yields (leaves and stem) and the *in vitro* antipromastigote activity remained almost unaltered throughout the year. The volatile oil of leaves was also analyzed by GC-MS. Sixty compounds were indentified in a complex mixture of sesquiterpenes (76.7%) and monoterpenes (23.3%). Byciclogermacrene was its major component (39.8%). The volatile oil was evaluated *in vitro* and was active against four species of *Leishmania* promastigotes and also against *T. cruzi* tripomastigotes. The identification of the bioactive constituents and their isolation are promising for further studies.

Key-words: *Annona coriacea* Mart.. Isoquinoline alkaloids. Volatile oil. *Leishmania*. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURA

Figura 1 - Distribuição mundial da Leishmaniose cutânea (esquerda) e visceral (direita) no mundo.....	22
Figura 2 - Formas dos parasitas de <i>Leishmania</i> sp. responsáveis pela transmissão da leishmaniose. 2A. Formas promastigotas flageladas. 2B Formas amastigotas não flageladas	27
Figura 3 - Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp	28
Figura 4 - Lesão ulcerosa no braço de paciente com leishmaniose cutânea	30
Figura 5 - Lesão infiltrada, com áreas descamativas na orelha, em paciente com leishmaniose cutânea difusa, infectado há 12 anos	31
Figura 6 - Lesão na mucosa nasal, com ulceração das asas do nariz e diversas lesões nódulo-infiltrativas e algumas com crostas na face, em paciente com leishmaniose mucocutânea.....	32
Figura 7 - Período final da LV em paciente com leishmaniose visceral	33
Figura 8 - Estrutura química dos primeiros fármacos antimoniais empregados em leishmaniose, por Gaspar de Oliveira Viana em 1912	34
Figura 9 - Principais fármacos administrados na leishmaniose contendo antimônio pentavalente (Sb^{5+})	35
Figura 10 – Estrutura química da anfotericina B	37
Figura 11 – Estrutura química da pentamidina	38
Figura 12 – Estrutura química da paromomicina	38
Figura 13 – Estrutura química da miltefosina.....	39
Figura 14 – Estrutura química da sitamaquina	41
Figura 15 – Estrutura química do itraconazol.....	41
Figura 16 - Principais monoterpênos e sesquiterpênos encontrados no óleo volátil da família Annonaceae	46

Figura 17- <i>Annona coriacea</i> Mart. [Escala: 0,5 m].....	108
Figura 18- Esquema geral de obtenção dos alcalóides totais de <i>Annona coriacea</i> Mart.	110
Figura 19 - Organograma do Fracionamento biomonitorado dos alcalóides totais de folha de <i>Annona coriacea</i>	117
Figura 20 - Cromatogramas dos alcalóides totais de <i>Annona coriacea</i> , folha - fm: diclorometano-metanol (95:5), 20A -visualização sob luz UV: λ 366nm. 20B - Revelação com reativo de Dragendorff	122
Figura 21- Cromatogramas dos alcalóides totais de <i>Annona coriacea</i> , caule - fm: diclorometano-metanol (90:10), 21A -visualização sob luz UV: λ 366nm. 21B - Revelação com reativo de Dragendorff.....	123
Figura 22 -Cromatograma do óleo volátil de folha de <i>A. coriacea</i>. padrões: car: <i>E</i> - cariofileno (R_f :0,94), hum: α -humuleno (R_f :0,42), pin: β -pineno (R_f :0,69) [fm: n-hexano-diclorometano (1:1) - revelação: anisaldeído sulfúrico].....	124
Figura 23 - Cromatograma do óleo volátil obtido das folhas frescas de <i>A.coriacea</i> obtido, por CG, sob condições cromatográficas descritas no item 4.2.4.3.2. identificados na Tabela 17	125
Figura 24 - <i>A.coriacea</i> Mart. Cromatograma da fração alcaloídica S10 de folha [T_R : 20,3 min: estefarina]	129
Figura 25- <i>A.coriacea</i> Mart. - Espectro de massas da fração alcaloídica S10 de folha - Pico em T_R :20,3 min (estefarina)	130
Figura 26 - Estrutura química da estefarina	130
Figura 27 - <i>A.coriacea</i> Mart. - Cromatograma da fração alcaloídica S11 de folha [T_R : 19,1 min: nornuciferina]	131
Figura 28 - <i>A.coriacea</i> Mart. - Espectro de massas da fração alcaloídica S11 de folha - Pico em T_R :19,1 min (nornuciferina)	132
Figura 29- Estrutura química da nornuciferina.....	132
Figura 30 - <i>A.coriacea</i> - Cromatograma dos alcalóides totais de caule [T_R : 13,2 min: assimilobina, T_R :14,0 min: pronuciferina, T_R :17,0 min: boldina]	133

Figura 31 - Estrutura química da asimilobina.....	134
Figura 32- <i>A.coriacea</i> Mart. Espectro de massas dos alcalóides totais de caule - Pico em T _R :13,2 min (asimilobina).....	134
Figura 33 - Estrutura química da pronuciferina.....	135
Figura 34- <i>A.coriacea</i> Mart. Espectro de massas dos alcalóides totais de caule - Pico em T _R :14,0 min (pronuciferina)	136
Figura 35 - Estrutura química da boldina	136
Figura 36- <i>A.coriacea</i> Mart. Espectro de massas dos alcalóides totais de caule - Pico em T _R :17,0 min (boldina).....	136
Figura 37 - Cromatograma do padrão de boldina [T _R :17,1 min]	137
Figura 38- Fragmentação característica dos alcalóides aporfínicos (a)-(M ⁺ -1) (OHASHI et al., 1963); (b)- íon resultante da fragmentação por retro-Diels-Alder (SHAMMA, 1972)	148
Figura 39 - Mecanismo de fragmentação da estefarina, segundo TOMITA et al.(1965)	149
Figura 40 - Mecanismo de fragmentação da nornuciferina,segundo OHASHI et al.(1963).....	151
Figura 41 – Alcalóides caracterizados por CG-EM noo AT de caule: asimilobina, pronuciferina e boldina. Em folha frações estefarina (S10) e nornuciferina (S11), ambas em <i>Annona coriacea</i> Mart.....	154
Figura 42 – Estrutura química do espatulenol.....	157

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Alcalóides de núcleo isoquinolínico simples encontrados no gênero <i>Annona</i>	49
Tabela 2 - Alcalóides de núcleo aporfínico encontrados no gênero <i>Annona</i>	50
Tabela 3 - Alcalóides de núcleo oxoaporfínico encontrados no gênero <i>Annona</i>	72
Tabela 4 - Alcalóides de núcleo dioxoaporfínico encontrados no gênero <i>Annona</i>	81
Tabela 5 - Alcalóides de núcleo proaporfínico encontrados no gênero <i>Annona</i>	82
Tabela 6 - Alcalóide de núcleo dehidroaporfínico encontrado no gênero <i>Annona</i>	84
Tabela 7 - Alcalóides de núcleo benzilisoquinolínico encontrados no gênero <i>Annona</i>	85
Tabela 8 - Alcalóides de núcleo tetrahidroprotoberberínico encontrados no gênero <i>Annona</i> ...	90
Tabela 9 - Alcalóides de núcleo dehidroprotoberberínico encontrados no gênero <i>Annona</i>	95
Tabela 10 - Alcalóides de núcleo fenantrênico encontrados no gênero <i>Annona</i>	96
Tabela 11 - Alcalóides de núcleo pirimidina- β -carbolínico encontrados no gênero <i>Annona</i>	99
Tabela 12 - Alcalóides de núcleo azaantracênico encontrado no gênero <i>Annona</i>	100
Tabela 13 - Alcalóides de núcleo azaantraquinônico encontrados no gênero <i>Annona</i>	101
Tabela 14 - Atividade antiparasitária de alcalóides encontrados no gênero <i>Annona</i>	105
Tabela 15 - Rendimentos do extrato etanólico dos alcalóides totais de folha e de caule de <i>Annona coriacea</i> Mart.....	120
Tabela 16 - Rendimentos de alcalóides totais (AT) (% m/m) em folhas e caules de <i>Annona coriacea</i> Mart., no período de junho de 2007 a maio de 2008.....	121
Tabela 17 - Composição química (%) do óleo volátil de <i>A. coriacea</i>	127
Tabela 18 - Alcalóides isoquinolínicos caracterizados, por CG-EM e porcentagem, nas frações S10 e S11 de folhas e nos alcalóides totais (AT) de caules de <i>A. coriacea</i> Mart....	137
Tabela 19 – Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> (%morte) dos alcalóides totais (AT) de folha e de caule e das frações alcaloídicas de folhas de <i>A. coriacea</i> Mart. frente às formas promastigotas de <i>L. (L.) chagasi</i> [MHOM/BR/1972/LD]	138

Tabela 20 - Atividade leishmanicida *in vitro* (% morte) dos alcalóides totais (AT) de folha e de caule de *A. coriacea* Mart., coletados no período de junho de 2007 a maio de 2008, frente às formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* [MHOM/BR/1972/LD]139

Tabela 21 - Concentrações efetivas de 50% (CE₅₀) do óleo volátil de *A. coriacea* Mart. frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) e às formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *L. (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903) *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) e *L. (L.) major* (MHOM/1L/80/Fredlin).....140

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviações	Significado
AT	alcalóide total
CC	cromatografia em coluna aberta
CCD	cromatografia em camada delgada
CP	cromatografia preparativa
D	Diclorometano
DNDi	Iniciativa em Drogas para Doenças Negligenciadas
Ø	diâmetro interno
IR	índice de retenção
LC	leishmaniose cutânea
LMC	leishmaniose mucocutânea
LTA	leishmaniose tegumentar americana
LV	leishmaniose visceral
M	Metanol
m/m	proporção massa/massa
O.V	óleo volátil
R _f	fator de retenção

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1- <i>A.coriacea</i> Mart. Variação mensal do rendimento em alcalóides totais (AT) de folhas e de caules, no período de junho de 2007 a maio de 2008	143
--	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Leishmaniose.....	22
2.1.2 Aspectos gerais.....	22
2.1.2 Agentes etiológicos e vetores	23
2.1.2.1 <i>Leishmania</i> (L.) <i>chagasi</i>.....	24
2.1.2.2 <i>Leishmania</i> (V.) <i>braziliensis</i>.....	24
2.1.2.3 <i>Leishmania</i> (L.) <i>amazonensis</i>.....	25
2.1.2.4 <i>Leishmania</i> (L.) <i>major</i>	25
2.1.3 Ciclo de vida dos parasitas.....	26
2.1.4 Manifestações clínicas.....	29
2.1.4.1 Forma cutânea	29
2.1.4.2 Forma cutânea difusa	30
2.1.4.3 Forma mucocutânea	31
2.1.4.4 Forma visceral	32
2.2 Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose	34
2.2.1 Fármacos de uso convencional	34
2.2.2 Fármacos de “segunda escolha”	36
2.3 Fármacos de origem natural e espécies vegetais como fonte potencial de novos medicamentos.....	42
2.3.1 Produtos naturais como fonte de novos fármacos	42
2.3.2 Espécies do gênero <i>Annona</i> e constituintes com potencial atividade antileishmania.....	43
2.4 Aspectos Químicos	45

2.4.1 Família Annonaceae	45
2.4.2 Gênero <i>Annona</i>	47
2.4.2.1 Alcalóides.....	48
2.4.2.2 Óleo volátil.....	102
2.4.3 <i>Annona coriacea</i> Mart.	102
2.5 Usos medicinais de espécies do gênero <i>Annona</i>	102
<i>Annona coriacea</i>	102
2.6 Atividades biológicas de <i>A. coriacea</i>	103
3. OBJETIVOS.....	107
3.1 Objetivos gerais.....	107
4.1 Material botânico	108
4.2 Métodos.....	109
4.2.1 Secagem e pulverização.....	109
4.2.2 Obtenção dos extratos	109
4.2.2.1 Extrato etanólico	109
4.2.2.2 Alcalóides totais	109
4.2.3 Obtenção do óleo volátil	111
4.2.4 Análises cromatográficas.....	111
4.2.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)	111
4.2.4.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CP)	111
4.2.4.3 Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas (CG-EM)	112
4.2.4.3.1 Alcalóides e frações	112
4.2.4.3.2 Óleo volátil.....	113
4.2.5 Fracionamento biomonitorado dos AT de folha	113
4.2.5.1 Fração ACORI 10	114

4.2.5.2 Fração ACORI 11	115
4.2.6 Avaliação da atividade antiprotozoária <i>in vitro</i>	115
4.2.6.1 Avaliação da atividade leishmanicida dos AT e das frações alcalóidicas ...	115
4.2.6.2 Determinação da Concentração Efetiva de 50% (CE ₅₀) do óleo volátil	118
5. RESULTADOS	120
5.1 Estudo químico.....	120
5.1.1 Rendimentos do extrato etanólico e dos alcalóides totais	120
5.1.2 Rendimentos em alcalóides totais por período de um ano	120
5.1.3 Teor de óleo volátil	121
5.1.4 Perfil cromatográfico dos alcalóides totais de folha e de caule, em CCD	121
5.1.5 Perfil cromatográfico do óleo volátil, em CCD	124
5.1.6 Composição do óleo volátil de folha de <i>A.coriacea</i>	124
5.1.7 Caracterização dos alcalóides de folha e de caule	129
5.1.7.1 Frações alcalóidicas de folhas	129
5.1.7.1.1 Fração S10.....	129
5.1.7.1.2 Fração S11.....	131
5.1.7.2 Alcalóides totais de caule	133
5.1.8 Atividade antiprotozoária <i>in vitro</i>	138
5.1.8.1 Atividade leishmanicida dos alcalóides totais de folha e de caule e frações alcalóidicas de folha de <i>A.coriacea</i>	138
5.1.8.2 Atividade leishmanicida dos alcalóides totais de folha e de caule de <i>A.coriacea</i> durante período de um ano.....	139
5.1.8.3 Concentração efetiva de 50% (CE ₅₀) do óleo volátil de <i>A.coriacea</i> frente a <i>Trypanosoma cruzi</i> e quatro espécies de Leishmania	140

6. DISCUSSÃO	141
7. CONCLUSÃO	160
8. BIBLIOGRAFIA.....	163

ANEXO A

- Rendimento das frações obtidas no fracionamento dos alcalóides totais
- **Tabela 1** - Massa das frações alcaloídicas (**ACORI**) provenientes das 8 etapas de fracionamento dos alcalóides totais de *A.coriacea* em coluna cromatográfica

1 INTRODUÇÃO

As doenças conhecidas como “negligenciadas” ou “tropicais” são enfermidades que atingem os países menos desenvolvidos, estando situados, em sua maioria, abaixo da linha do equador (MELLO-SILVA, 2005, PADMA et al., 1995). Incluem-se, nesta classificação as seguintes enfermidades: leishmaniose, doença de Chagas, malária, tuberculose, doença do sono, esquistossomose, dengue, tuberculose e hanseníase, entre outras.

Estas doenças atingem uma em cada seis pessoas, no mundo, e cerca de um bilhão de pessoas entre os seis bilhões que vivem no planeta (WHO, 2009).

As populações mais afetadas encontram-se nos continentes Asiático, Africano, América do sul e América Central, atingindo a Europa e a América do Norte em menores proporções (OSORIO et al., 2008).

As doenças negligenciadas possuem características comuns, em relação ao contexto em que ocorrem como as condições precárias ou inexistentes de higiene, quase sempre, não recebendo atenção preventiva. Os fármacos empregados usualmente no tratamento são providos de tal toxicidade, que podem levar à morte do paciente ou ser ineficazes na cura completa da doença (OSORIO et al. 2008).

Outros fatores contribuem para o quadro existente, como a negligência dos governos que não realizam programas de combate e destinam verbas insuficientes para a pesquisa de novos fármacos. Igualmente, as empresas farmacêuticas multinacionais, não têm interesse no desenvolvimento de novos fármacos para tais doenças, uma vez que, demandam grandes investimentos e apresentam retorno inexpressivo (WHO, 2009).

Em relação ao desenvolvimento de novos fármacos, no período de 1975 a 2004 foram registrados 1556, entretanto, somente 18 foram destinados ao tratamento das doenças tropicais (DNDi, 2009). Face a este dado e à gravidade do quadro, torna-se urgente a pesquisa de novos compostos ativos.

Entre as doenças negligenciadas, a leishmaniose despertou particular interesse, sendo abordada, neste trabalho. No mundo, há mais de 12 milhões de pessoas infectadas, sendo endêmica em 88 países (WHO, 2009). Prevê-se que, cerca de dois milhões de novos casos venham a surgir, anualmente. A população em risco de contrair a doença é de

aproximadamente 350 milhões, podendo atingir letalidade de até mais de 50.000 pessoas ao ano (OSORIO et al. 2008).

Atualmente, há cerca de 600 mil novos casos ao ano, no mundo e, desde 1993, a distribuição geográfica da doença vem se expandindo, bem como o número de casos (WHO, 2009). No Brasil, houve aumento da incidência da leishmaniose visceral (LV), desde 1999 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005)

A pesquisa de novos compostos bioativos, a partir de espécies vegetais e de forma sustentável é uma das principais estratégias da atualidade (SIMÕES et al., 2007; COSTA et al., 2006). Cerca de 25% dos fármacos empregados advêm, de forma direta ou indireta, dos recursos vegetais (QUEIROZ et al., 1996).

Considerando a promissora atividade antileishmania *in vitro*, anteriormente, verificada para os alcalóides isoquinolínicos (MESQUITA et al., 2005; TEMPONE et al, 2005), inclusive aqueles provenientes da espécie *Annona coriacea* Mart. (TEMPONE et al, 2005) que mostraram, inclusive atividades antimalárica (FISCHER et al, 2004) e anti-chagásica (TEMPONE et al, 2005) assim como de outras espécies do gênero (CAMACHO et al., 2003), o presente estudo visou investigar os compostos responsáveis pela atividade constatada para os alcalóides totais da mesma.

De forma complementar, as atividades leishmanicida e tripanosomicida verificada para os óleos voláteis de outras espécies do gênero como *Annona foetida* (COSTA et al., 2009) serviu de estímulo à realização dos testes com esta espécie.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose

2.1.1 Aspectos gerais

Ao longo de toda a história da humanidade, os seres humanos conviveram com parasitas, sendo o número atual estimado em 90 espécies, algumas das atuais causam as doenças parasitárias mais graves, como a leishmaniose, em suas varias formas clínicas (Cox, 2002).

As leishmanioses são consideradas primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem, quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antroponose. Atualmente, encontra-se entre as seis endemias consideradas prioritárias no mundo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

No mundo, a doença distribui-se principalmente nos trópicos, a maioria dos casos ocorre em apenas seis países: Bangladesh, Índia, Nepal, Sudão, Ethiopia e Brasil (CHAPPUIS et al., 2007) (**Figura 1**).

Fonte: Public Health Mapping Group Communicable Diseases (CDS)- World Health Organization, October 2003

Figura 1 – Distribuição mundial da Leishmaniose cutânea (esquerda) e visceral (direita) no mundo

No continente americano, o Brasil representa o país de maior endemicidade, respondendo por 97% de todos os casos no continente (MINISTÉRIO DE SAÚDE, 2007; MORAN et al., 2009).

Em todo o país são registradas ocorrências exceto na região sul sendo que, as formas de maior incidência são a cutânea (LC) e a visceral (LV), causando o maior número de óbitos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). No período de 1985 a 2003, o número de casos de leishmaniose cutânea ou leishmaniose tegumentar americana (LTA) e suas variáveis, cutânea difusa e mucocutânea, oscilaram entre 10,4 a 21,2 para cada 100 mil habitantes, sendo que entre os anos de 1994 e 1995 houve aumento do número de casos para 22,8 a 22,9 por 100 mil habitantes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Em 2008, foram notificados cerca de 2.352 novos casos de leishmaniose no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

2.1.2 Agentes etiológicos e vetores

Os vetores da leishmaniose são conhecidos, popularmente, como: “mosquito-palha”, “tatuquiras”, “birigui”, “moscas-da-areia”, entre outros, sendo dípteros hematófagos dos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), pertencentes à família Psychodidae. Apenas as fêmeas são hematófagas. Habitam ambientes úmidos e quentes tendo os hábitos, predominantemente, noturno e crepuscular, embora possam estar ativos durante o dia, em locais úmidos e escuros ou sombreados.

A forma adulta possui 2 a 3 mm, cabeça posicionada para baixo, asas lanceoladas e corpo recoberto de pilosidades, tendo um ciclo de vida de aproximadamente 30 dias (UFRGS, 2009). (NEVES et al., 2009). No Brasil, a espécie relacionada com a transmissão da doença é *Lutzomyia longipalpis*, podendo também ser, mas com menor frequência, *L. cruzi* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

Os agentes causadores da leishmaniose são protozoários parasitas intracelulares, que provocam diversas formas de leishmaniose, no homem (BADARÓ & SCHOOLEY, 2007). As espécies causadoras da enfermidade, no país, pertencem aos subgêneros Viannia e Leishmania, como: *Leishmania* (Viannia) *braziliensis*, *Leishmania* (V.) *guyanensis*, *Leishmania* (V.) *lainsoni*, *Leishmania* (V.) *shawii*, *Leishmania* (Viannia) *naiffi* e *Leishmania* (L.) *amazonensis* (NEVES et al.,

2009) sendo consideradas, como principais agentes etiológicos, *L.(V.) braziliensis* e *Leishmania (L.) amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

As espécies utilizadas nos testes *in vitro* do presente estudo, para a avaliação da atividade antiprotozoária foram: *L. (L.) chagasi*, *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *L. (V.) major*, sendo abordadas, na sequência.

2.1.2.1 *Leishmania (L.) chagasi*

Leishmania (L.) chagasi é o agente etiológico, no Novo Mundo, para a forma mais letal da doença, chamada de leishmaniose visceral (LV), “calazar americano” ou “febre dun-dun”, ocorre do México até a Argentina. No Brasil, apresentou características rurais, até os movimentos de migração para as cidades, que é fato atual, resultante das mudanças ambientais promovidas pelo ser humano, além das condições de migração e dos fatores epidemiológicos (NEVES et al., 2009).

O protozoário é, obrigatoriamente, intracelular e se replica em macrófagos parasitados, que estimulam e são estimulados pelos linfócitos, incentivando as células Th1 a produzir fatores macrófago-ativantes, como os interferon gama (IFN- γ) (NEVES et al., 2009).

O reservatório, nas cidades, é o cão e, na natureza, são as raposas (*Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous*) e os marsupiais (*Didelphis albiventris*).

No Brasil, os principais vetores responsáveis pela transmissão da LV, são os flebotomíneos *Lutzomyia longipalpis* e *L. cruzi*, mas também pode ocorrer por transfusão sanguínea (BADARÓ & SCHOOLEY, 2008). *L. longipalpis* é encontrado em todo o território nacional, sendo o principal vetor desta forma da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

2.1.2.2 *Leishmania (V.) braziliensis*

Leishmania (V.) braziliensis é encontrada em todo o território nacional, do Sul do Pará ao Nordeste, chegando ao Centro-Sul até o Paraná, e em algumas áreas da Amazônia oriental. A infestação ocorreu como resultado da intervenção humana, na destruição das florestas primárias e na ocupação irregular do homem (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Na maioria das regiões do país, esta é a espécie mais encontrada, havendo diversas espécies de flebotomíneos envolvidos na sua transmissão. Possui características

epidemiológicas próprias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). No Pará, os hospedeiros naturais são desconhecidos, e o único vetor conhecido é *Psychodopigus wellcomei* encontrado na Serra dos Carajás.

Lutzomyia intermedia é um dos vetores mais adaptados às mudanças ambientais, sendo a espécie transmissora *L.(V) braziliensis* mais importante, principalmente, nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais e Espírito Santo, havendo outros, como: *L. fisheri*, *L. migonei* e *L. whitmani*, todos agindo à luz do dia ou à noite (NEVES et al., 2009).

Os reservatórios naturais podem ser pacas, cotias e várias espécies de pequenos roedores, e os reservatórios domésticos podem ser cães, cavalos e muare (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

2.1.2.3 *Leishmania (L.) amazonensis*

Geralmente, *Leishmania (L.) amazonensis* se desenvolve bem no homem, mas é pouco freqüente, o vetor possui hábitos noturnos e não é antropofílico, embora, ocasionalmente, possa ocorrer a infecção. O principal é *Lutzomyia flaviscutellata*, sendo secundários *L. reducta* e *L. olmeca nociva*. O último está restrito aos estados do Amazonas e de Rondônia.

Normalmente, o vetor habita florestas primárias e secundárias dos estados do Amazonas, Pará, Rondônia, Tocantins e Sudoeste do Maranhão, em áreas de igapó e de florestas do tipo “várzea”. Têm presença em outras regiões, como no Nordeste da Bahia, Sudeste de Minas Gerais e São Paulo, no Centro-Oeste em Goiás. Ocorre também, no Peru, Colômbia e na Venezuela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2005).

Os reservatórios silvestres do agente etiológico são, em geral, pequenos roedores dos gêneros *Proechimys* (“rato-soia”), *Oryzomys* e *Nectomys*, entretanto, alguns marsupiais, cotias e raposas são reservatórios secundários (NEVES et al., 2009).

2.1.2.4 *Leishmania (L.) major*

Segundo o MINISTÉRIO DA SAÚDE, no Brasil, atualmente, não são registrados casos de leishmaniose denominada murina, causada pela *Leishmania (L.) major*, sendo considerada uma forma cutânea, que atinge o “Velho Mundo” (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Igualmente chamada “botão do Oriente”, esta leishmaniose pode ocorrer nas formas “úmida” ou rural, sendo que *Leishmania (L.) major* causa a forma úmida.

A doença ocorre, normalmente, entre roedores e o homem, sendo uma zoonose rural, nas áreas áridas e semi-áridas das regiões Oriental, Etiópia e na Paleártica.

Assim como em outras formas de leishmaniose, os reservatórios são roedores silvestres e rurais. Os transmissores são fêmeas de *Phlebotomus papatasi*, *P. duboscqi* e *P. selechi*. O diagnóstico é realizado de forma semelhante àquele de *L. braziliensis* (NEVES et al., 2009), no Brasil.

2.1.3 Ciclo de vida dos parasitas

Atualmente, reconhecem-se três formas fundamentais no ciclo de vida dos parasitas da leishmaniose, são elas: amastigotas, paramastigotas e promastigotas metacíclicas ou infectantes (NEVES et al, 2009).

A forma promastigota (**Figura 2.A**) possui flagelo sendo, necessariamente, extracelular e desenvolve-se, no tubo digestivo das fêmeas do hospedeiro invertebrado (flebotômo), sendo introduzidas, no hospedeiro mamífero, por meio da picada.

A forma amastigota (**Figura 2.B**) é intracelular e não possui movimento. Após a picada, multiplica-se e desenvolve-se, no interior dos vacúolos parasitóforos, em macrófagos de diferentes tecidos, onde origina a doença nas formas, cutânea, muco-cutânea e visceral (RATH et al.,2003).

A forma paramastigota é arredondada ou oval, de flagelo curto, e na parte externa do corpo do parasita o núcleo se encontra próximo à região central. O cinetoplasto é ligado ao núcleo. Adere-se ao epitélio do trato digestivo do inseto vetor (NEVES et al., 2009).

Figura 2- Formas dos parasitas de *Leishmania* sp. responsáveis pela transmissão da leishmaniose. **2A.** Formas promastigotas flageladas. **2B** Formas amastigotas não flageladas [Fonte: Secretaria de Vigilância em Saúde-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006]

O ciclo de vida (**Figura 3**) dos parasitas é comum aos agentes de todas as formas de leishmaniose e seus diferentes hospedeiros. A fêmea do vetor (gênero *Lutzomyia*, no Novo Mundo), se infecta ao picar um mamífero contaminado na natureza com alguma espécie de *Leishmania*, que ao sugar o sangue e linfa intersticial, ingere macrófagos parasitados com formas amastigotas (não flageladas).

No tubo digestivo anterior do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando estas formas, que por divisão binária, se transformam em formas promastigotas (flageladas).

Estas podem permanecer aderidas à parede do tubo digestivo do vetor ou ficar livres na luz do mesmo, passando a multiplicar-se, por divisão binária.

As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas, as quais migram para a faringe e esôfago do vetor, permanecendo aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes promastigotas metacíclicas.

O ciclo do parasita no inseto se completa em 72 h. Após este período, ao realizarem novo repasto sanguíneo, no hospedeiro (mamífero vertebrado, homem), as fêmeas liberam as formas promastigotas metacíclicas junto à saliva do inseto.

Na pele, o parasita de *Leishmania* é fagocitado pelo macrófago, cuja atividade respiratória aumenta, libera radicais, como óxidos, hidroxilas, hidróxidos e superóxidos,

altamente tóxicos. Em decorrência disto, o parasita produz moléculas de glicoproteínas e glicofosforoglicano que recobrem sua membrana.

Após a interiorização no macrófago, o mesmo promove a fusão dos lisossomos com o fagossomo e o parasita se adapta ao novo ambiente, onde agora possui a forma amastigota. A forma amastigota se multiplica por divisão binária, e o processo se repete intensamente até o rompimento da parede celular do macrófago, liberando a forma amastigota que será fagocitada por novos macrófagos, completando o ciclo, quando o vetor fizer um novo repasto sanguíneo (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; CHAPPUIS et al., 2007; NEVES et al., 2009).

Fonte: http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm. acesso em 03.03.2010, figura modificada

Figura 3 - Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

2.1.4 Manifestações clínicas

A leishmaniose é doença parasitária causada por diferentes espécies de *Leishmania*. Há aquelas com tropismo visceral e outras com dermatotropismo, sendo responsáveis pelas manifestações clínicas distintas existentes.

No Brasil, as principais espécies de protozoários que causam a leishmaniose em suas diferentes formas cutânea, difusa ou mucocutânea, e visceral são *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). No país, *L. chagasi* é o principal agente etiológico da leishmaniose visceral (LV) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006). Esta forma, igualmente denominada calazar, tem como alvo dos parasitas, o sistema fagocítico mononuclear (SFM). Os órgãos atingidos são o baço, o fígado, os tecidos linfóides e a medula óssea.

A forma cutânea ou tegumentar pode levar à leishmaniose mucocutânea ou “úlceras de Bauru”, na qual os parasitas atingem a parte externa da pele, levando a dilacerações nas mucosas da boca, nariz e laringe (NEVES et al., 2009).

A forma cutânea difusa acomete pacientes com resposta imunológica deficiente, ou aqueles infectados com a forma visceral e que, mesmo tendo sido tratados, após certo período de tempo, passam a desenvolver a forma difusa (NEVES et al., 2009).

2.1.4.1 Forma cutânea

De um modo geral, a leishmaniose cutânea (LC) é a forma mais simples de leishmaniose, mas não menos perigosa. Na maioria dos casos, os pacientes são acometidos de lesões exclusivamente cutâneas ulceradas e limitadas, ou não (**Figura 4**) (NEVES et al., 2009), sendo únicas e ricas em formas amastigotas na margem.

O MINISTÉRIO DA SAÚDE (2007) descreveu a úlcera típica como indolor e se encontra em áreas externas da pele, possui forma arredondada ou oval, com dimensões variando de milímetros à centímetros, com base eritematosa, infiltrada, de consistência firme, bordos bem definidos e elevados, fundo avermelhado e com granulações grosseiras.

Caso haja infecção bacteriana no local, com formação de exsudato seropurulento, pode surgir dor (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A espécie *Leishmania* (L.) *major* ocorre, somente, no Velho Mundo, onde é responsável pela forma cutânea da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Leishmania (V) *braziliensis* produz lesões únicas, às vezes de grandes extensões ou várias pequenas. O desenvolvimento é crônico, com necrose dos tecidos. A cura pode ser espontânea. Em alguns casos, pode atingir as mucosas (mucocutânea). As partes mais afetadas são: membros inferiores (59,7%), braços (15,9%), tronco (5,9%), cabeça (11,2%), face (7,3%) (NEVES et al., 2009). A principal complicação é a metástase por via hematogênica, para as mucosas da nasofaringe, com destruição desses tecidos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

Figura 4 -Lesão ulcerosa no braço de paciente com leishmaniose cutânea [Fonte: Secretária de Vigilância em Saúde/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007]

2.1.4.2 Forma cutânea difusa

Esta forma de leishmaniose ocorre em pacientes com resposta imunológica deficiente, ou em pacientes que já foram infectados por calazar e tratados, mas depois de algum tempo manifestaram a forma difusa (NEVES et al., 2009).

No Brasil, o agente etiológico é *Leishmania* (L.) *amazonensis*. A doença constitui uma forma grave e rara, que ocorre em pessoas com deficiência imune celular a antígenos do parasita. Inicia-se, no homem de maneira pífida, com formação de lesões únicas e com

baixa resposta ao tratamento inicial. A evolução é lenta, havendo a formação de placas e múltiplos nódulos não ulcerados em grandes extensões da pele (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) (**Figura 5**).

Figura 5 – Lesão infiltrada, com áreas descamativas na orelha, em paciente com leishmaniose cutânea difusa, infectado há 12 anos [Fonte: Secretária de Vigilância em Saúde-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007]

2.1.4.3 Forma mucocutânea

Também chamada de “úlceras de Bauru”, a doença se desenvolve em áreas descobertas da pele, ocorrendo com maior frequência na boca, nariz e faringe sendo uma forma secundária da LC (NEVES et al., 2009).

O agente etiológico causador no Brasil é a *Leishmania* (L.) *braziliensis*, mas também há casos com *L.*(L.) *amazonensis* e *L.*(V.) *guyanensis*. Há estimativas que corresponde a 2 a 3% dos casos , havendo destruição localizada de mucosas das vias aéreas superiores.

O desenvolvimento da doença em 90% dos casos deu-se, em pacientes que desenvolveram primeiro a leishmaniose cutânea (LC), mas após de 10 anos desta primeira infecção por LC e em 50% dos casos, ocorreu, após a cicatrização da LC, mas após 2 anos respectivamente a primeira.No início, a doença apresenta poucos sintomas, o que é resultado da evolução crônica da LC que foi tratada de maneira incorreta ou desapareceu sem tratamento.

Pertencem ao grupo de risco, pacientes com lesões cutâneas múltiplas, extensas, nas partes superiores do corpo, possuindo um longo período de evolução (1 ano ou mais).

Geralmente, ocorre em homens adultos, que são acometidos de lesões cutâneas e das mucosas. Estas, em geral, iniciam-se no septo nasal anterior, cartilaginoso, próximo ao intróito nasal e são indolores. Raramente, afetam os olhos e as mucosas dos órgãos genitais e do ânus. Somente 1% desenvolve-se, na laringe.

Pode levar à obstrução nasal, eliminação de crostas, epistaxe, disfagia, odiofagia, rouquidão e tosse (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007) (**Figura 6**).

Figura 6 – Lesão na mucosa nasal, com ulceração das asas do nariz e diversas lesões nódulo-infiltrativas e algumas com crostas na face, em paciente com leishmaniose mucocutânea [Fonte: Secretária de Vigilância em Saúde/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007]

2.1.4.4 Forma visceral

A leishmaniose visceral tem como característica a evolução lenta, no homem, dá-se de dez dias a dois anos, com média de dois a seis meses. A doença afeta, principalmente, crianças, infanto-juvenis e idosos. É uma doença crônica, sistêmica, causando febre persistente, anemia, astenia, adinamia e perda de peso. Quando não tratada ocorre óbito, em 90% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; NEVES et al., 2009). A forma visceral apresenta três estágios, conforme são apresentados a seguir.

Período inicial “ou fase aguda”

O início dos sintomas inclui febre intermitente com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo-mucosa e hepato-esplenomegalia, porém o estado inicial do paciente se mantém estável.

Período de estado

O quadro febril é irregular e associado com o emagrecimento progressivo do paciente, que apresenta palidez cutâneo-mucosa e aumento da hepato-esplenomegalia. Os sintomas podem prolongar-se, por até dois meses, e o estado geral do paciente é comprometido.

Período final

O não tratamento do paciente pode levar a óbito, sendo a evolução rápida e contínua. O estado de desnutrição se torna grave, há edema inicial nos membros inferiores que pode progredir para todo o corpo (anarsaca), ocorrem hemorragias, icterícia e ascite. O quadro infeccioso instalado com bactérias oportunistas e o sangramento levam ao óbito, na fase terminal da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006) (**Figura 7**).

Figura 7 – Período final da LV em paciente com leishmaniose visceral [**Fonte:** Secretária de Vigilância em Saúde/MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006]

2.2 Fármacos empregados no tratamento da leishmaniose

O tratamento das leishmanioses é realizado a partir dos fármacos de primeira e segunda escolha, sendo as vantagens e desvantagens dos mesmos abordadas, a seguir.

2.2.1 Fármacos de uso convencional

O tratamento da leishmaniose com formulações contendo compostos antimoniais foi realizado, pela primeira vez, por Gaspar de Oliveira Viana, em 1912, que administrou o denominado “tártaro emético”, contendo compostos antimoniais trivalentes (Sb^{3+}) (**Figura 8**), contra formas cutâneas de leishmaniose e, posteriormente, contra a forma visceral, na Itália. Após a administração foram relatados efeitos colaterais graves, relacionados à cardiotoxicidade e problemas gastrointestinais, entre outros (RATH et al., 2003).

Tartarato de antimônio e
potássio (Tartarato emético)

Antimoniato de bis-catecol-3,5
dissulfonato sódico

Tioglicolato de
sódio e antimônio

Figura 8 – Estrutura química dos primeiros fármacos antimoniais empregados em leishmaniose, por Gaspar de Oliveira Viana em 1912

Após o descobrimento dos primeiros fármacos antimoniais trivalentes (Sb^{3+}) os quais apresentaram efeitos colaterais graves, à urgência no desenvolvimento de novos compostos antimoniais, mas menos agressivos ao paciente.

Na França, na década de 40, a partir das pesquisas de compostos menos agressivos aos pacientes, surgiram formulações contendo os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), como o antimoniato de N-metil glucamina, conhecido comercialmente como Glucantime®, e o estilbogluconato de sódio (Pentostan®) (**Figura 9**), tendo sido introduzidos, na terapêutica

da leishmaniose. O Pentostan® não é comercializado no Brasil, mas nos países de língua inglesa (RATH et al., 2003, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006, 2007).

No Brasil, ainda hoje, os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), administrados no tratamento da leishmaniose visceral e da leishmaniose cutânea (ou leishmaniose tegumentar Americana). Entretanto, fatores como administração de doses baixas e a descontinuidade no tratamento contribuem para a resistência do parasita (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006, 2007).

Além dos efeitos cardiotóxicos e gastrointestinais a terapêutica produz artralgias, anorexia, dor no local da administração por via intra-muscular, aumento da diurese, arritmia, mialgia, inapetência, náuseas, vômitos, febre, pancreatite, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; NEVES et al., 2009).

As pesquisas posteriores, levaram ao estudo de formulações, nas quais o antimônio pentavalente (Sb^{5+}) foi encapsulado com lipossomas, visando teoricamente diminuir, os efeitos colaterais, com direcionamento melhor do fármaco aos sítios de ação, além de permitir o controle da concentração e sua velocidade de liberação no local da infecção (TRACY & WEBSTER, 1996).

Figura 9 – Principais fármacos administrados na leishmaniose contendo antimônio pentavalente (Sb^{5+})

Desde o emprego dos antimoniais na forma trivalente e pentavalente, não houve consenso entre os pesquisadores sobre o seu mecanismo de ação nos parasitas causadores da leishmaniose. Surgiram hipóteses relacionadas à conversão metabólica do antimônio

pentavalente (Sb^{5+}) em antimônio trivalente (Sb^{3+}), no interior dos macrófagos infectados, eliminando as formas amastigotas. A transformação dos compostos contendo antimônio pentavalente (Sb^{5+}) em antimônio trivalente (Sb^{3+}) interferiria no mecanismo de β -oxidação de ácidos graxos e glicólise na membrana do parasita, inibindo a síntese de ATP e GTP, vitais para a célula.

Outro mecanismo de ação sugerido foi da substituição do zinco por antimônio, sendo que o zinco faz parte da constituição da metaloprotease enzima essencial para a sobrevivência de *Leishmania* sp. (RATH et al., 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.2.2 Fármacos de “segunda escolha”

O tratamento da leishmaniose com medicamentos que não contêm antimônio pentavalente (Sb^{5+}) é realizado nos casos em que o paciente apresenta efeitos colaterais graves, que o impeçam de dar continuidade ao tratamento com antimoniais e nos casos de recidiva, após o uso de antimoniais, pela segunda vez, em período mínimo de quarenta dias.

O número de fármacos empregados em “segunda escolha” limita-se aos compostos derivados do desoxicolato sódico de anfotericina B, havendo formulações em forma de lipossomas e dispersões coloidais, além do sulfato e mesilato de pentamidina e dos imunomoduladores gama-*interferon* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A anfotericina B (**Figura 10**) é um fármaco antifúngico resultante da cultura da cepa *Streptomyces nodosus*, sendo altamente eficaz.

Em estudos clínicos, praticamente, 100% dos casos de leishmaniose visceral foram curados (RATH et al. 2003), entretanto, mostrou-se ineficiente contra casos de leishmaniose cutânea ou da forma mucocutânea, provavelmente, devido a razões farmacocinéticas.

A anfotericina B inibe as formas promastigota e amastigota do parasita (RATH et al. 2003), sendo um dos fármacos mais potentes disponíveis, comercialmente.

O mecanismo de ação é resultado da interação do fármaco na membrana plasmática de *Leishmania*, onde existem ésteres (ergosterol ou episterol). A anfotericina B complexa-se com os precursores de um grupo esterol, primariamente ao ergosterol, formando poros ou canais, que aumentam a permeabilidade da membrana, permitindo o extravasamento de pequenas moléculas (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Figura 10 – Estrutura química da anfotericina B

O desoxilato de anfotericina B causa efeitos colaterais, como: flebite, cefaléia, febre, calafrios, astenia, vômitos e hipotensão, dores musculares e articulares, sendo os efeitos renais os mais graves, em consequência da vasoconstrição renal, que pode levar aos vários graus de comprometimento do órgão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007). Após os relatos destes efeitos colaterais, foram desenvolvidas novas formulações, como: a anfotericina B lipossômica (Ambisome[®]), o sulfato de colesterol-anfotericina B (Amphotec[®]) e complexo lipídico de anfotericina B (Abelcet[®]) (BERMAN et al., 1998).

O uso da anfotericina B lipossômica reduziu os efeitos colaterais em relação ao desoxicolato de anfotericina B e ao complexo lipídico de anfotericina B, entretanto, não os suprimiu. A anfotericina B lipossômica é absorvida pelo sistema reticulo-endotelial, onde se localizam os parasitas de *Leishmania*, sendo pouco absorvida pelos rins. Ao ser administrada, por via endovenosa, produz nefrotoxicidade e diminuição dos níveis de potássio e magnésio no organismo (RATH et al., 2003, DNDi, 2007). O emprego de anfotericina B lipossômica tem alto custo, impossibilitando seu uso em regiões endêmicas, onde residem as populações afetadas mais carentes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Outra classe de fármacos, empregados como sucedâneos dos antimoniais, são as pentamidinas. As formulações encontradas contêm-nas, nas formas de isotionato de pentamidina (Pentamidina[®]) e de mesilato de pentamidina (Lomodine[®]) (BERMAN et al., 1998).

As pentamidinas são diaminas aromáticas com carga positiva (**Figura 11**). Foram descobertas, em 1937. A sua estabilidade, a facilidade de administração e baixa toxicidade

estão a favor de seu uso terapêutico quando os antimonias já foram usados (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Figura 11 – Estrutura química da pentamidina

O mecanismo de ação das pentamidinas não está elucidado ao certo. Exibem diversos efeitos e parecem agir por mecanismos diferentes para cada parasita.

Entre as hipóteses possíveis está o acúmulo da pentamidina, nas mitocôndrias, levando à desintegração do cinetoplasto e ao colapso do potencial eletrônico da membrana mitocondrial (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Os efeitos colaterais atribuídos ao uso do sulfato e do mesilato de pentamidina são: hipoglicemia, hipotensão, cardiotoxicidade, nefrotoxicidade havendo, até mesmo, relatos de casos de óbitos repentinos (RATH et al., 2003).

A paromomicina (Humatin®) (**Figura 12**) é um aminoglicosídeo usado no tratamento oral da infecção por *Entamoeba histolytica*, mas também, no tratamento de leishmaniose visceral, por via parenteral. O seu emprego, na Índia, levou à cura em 73% dos casos (SOTO et al., 2004).

Figura 12 – Estrutura química da paromomicina

O mecanismo de ação da paromomicina consiste na leitura errônea do RNA mensageiro, com inibição de síntese protéica pela ligação às proteínas dos ribossomos

(ligação à subunidade 30S do ribossomo). Não havendo a formação de peptídeos não se, e ocorre a quebra dos polissomos, em monômeros (monossomos), que não são funcionais.

Na Índia o seu emprego mostrou resultados clínicos positivos, no tratamento da leishmaniose visceral. No Quênia a associação com estilbogluconato de sódio obteve bons resultados e a um custo baixo (BERMAN et al., 1997, 1998; DNDi, 2008).

A associação de paromicina com cloreto de metilbenzetônio 12%, demonstrou resultados variáveis quando testados clinicamente em leishmaniose cutânea. A administração por via parenteral (doses de 16 a 18 mg/Kg/dia) obteve 89% de cura.

Quando empregada em associação com antimoniais mostrou 94% de cura na forma visceral da doença, enquanto que, com a administração de antimoniais isoladamente, a porcentagem de cura foi de 69% (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Os efeitos colaterais apresentados com a administração de paromomicina são nefrotoxicidade, ototoxicidade e problemas motores.

Em função da interrupção na produção, pela indústria, a disponibilidade de entrega tornou-se precária. Entretanto, há necessidade da realização de estudos mais aprofundados dos efeitos colaterais e da resistência dos parasitas ao fármaco (BERMAN et al., 1998).

A miltefosina ou hexadecilfosfocolina (**Figura 13**) é um fármaco análogo da alquilfosfocolina, desenvolvido, originalmente, para o tratamento do câncer. Em 1992, foram realizados os primeiros testes no tratamento da leishmaniose visceral, na Índia (GOODMAN & GILMAN, 2006).

Figura 13 – Estrutura química da miltefosina

Possivelmente, o mecanismo de ação da miltefosina está relacionado à atuação sobre a biossíntese do ergosterol e inibição da formação de fosfolipídios, podendo alterar o metabolismo éter-lipídico, a sinalização celular ou a biossíntese de glicosilfosfatidilinositol (PEREZ-VICTORIA et al., 2003).

Estudos clínicos, nas fases II e III, realizados na Índia com miltefosina, apresentaram sucesso em 97% dos casos em que foi utilizada no tratamento da forma visceral, por via oral, em doses de 2,5 mg/Kg/dia, durante quatro semanas (SOTO et al., 2004).

A miltefosina apresentou diferentes graus de atividade frente às diferentes formas de *Leishmania*. Estudos com *L.donovani* mostraram a alta sensibilidade das formas amastigotas ao fármaco (DE_{50} : 1,2 a 5 μ M), enquanto que, as mesmas formas de *L. major* apresentaram sensibilidade inferior (DE_{50} de 8 a 40 μ M).

Em testes de fase II e fase III, CROFT et al.(2003) mostraram que houve uma taxa de cura de 95 a 98%, empregando doses orais de 100 mg/dia, por 28 a 42 dias. Ainda, na Índia, testes em fase III, apresentaram índices de cura de até 95%, mesmo em casos resistentes a antimônio e em imunocomprometidos (SUNDAR et al., 2002; JHA et al., 1999).

Os efeitos colaterais da miltefosina relatados, em estudos clínicos, estão relacionados com distúrbios no sistema gastrointestinal, causando vômitos e diarreia. É contra-indicado para gestantes (teratogenicidade), diminui o nível de fertilidade masculina e pode elevar a uremia e creatininemia (FISCHER et al., 2001).

A sitamaquina (**Figura 14**) é um fármaco derivado da 8-aminoquinolina, tendo sido utilizada no tratamento de leishmaniose visceral. Testes de fase II efetuados, na Índia, Quênia e Brasil, apresentaram resultados promissores.

A administração, por via oral, foi, de forma geral, bem tolerada com exceção da Índia, onde os resultados para a forma acima citada da doença não ofereceram dado conclusivo, necessitando estudos complementares.

Os efeitos adversos relacionados à administração da sitamaquina são semelhantes àqueles dos outros agentes utilizados no tratamento, sendo alguns relacionados à dose administrada. Podem ocorrer vômito, dispepsia, cianose, diminuição dos níveis de albumina no sangue e, em cerca de 2 % dos pacientes tratados relatam-se síndrome nefrótica e granulonefrite (TARAK et al., 2005).

Figura 14 – Estrutura química da sitamaquina

Outro fármaco de segunda linha é o itraconazol, sendo um agente antifúngico sintético obtido da mistura racêmica e equimolar de quatro diastereoisômeros, exibindo, cada um, três centros quirais, sendo a fórmula estrutural semelhante àquela do cetoconazol (**Figura 15**).

Figura 15 – Estrutura química do itraconazol

O itraconazol é empregado nas formas cutânea e mucocutânea de leishmaniose, que representam mais de 84% dos casos, sendo administrado por via oral.

A monoterapia e a associação com outro antifúngico foram testadas sendo que, a administração isolada de itraconazol obteve a cura em 56,4% dos casos, enquanto que a associação com dapsona, em creme, foi efetiva em 69,6% dos casos (AL-MATAIRI et al., 2009).

Para alguns pacientes com leishmaniose cutânea tratados com cetoconazol, o uso de dose de 600 mg ao dia, via oral, por 28 dias, levou à cura de 65 a 100% dos casos. Entretanto, comparativamente, o mesmo tratamento com itraconazol não ofereceu resultados satisfatórios (5 a 73%) (VIDAL-PUIG et al., 1994).

2.3 Fármacos de origem natural e espécies vegetais como fonte potencial de novos medicamentos

2.3.1 Produtos naturais como fonte de novos fármacos

O uso de produtos naturais no combate a diversas enfermidades é prática antiga e remonta a milhares de anos atrás (CARVALHO, 2009).

Na década de 90, BERGMANN et al. (1998), estimaram que, 25% dos produtos farmacêuticos provenientes de espécies vegetais eram derivados ou usados como protótipos de novas moléculas.

O uso tradicional das plantas medicinais é usado como fonte de informação para a prospecção de novas moléculas com atividade farmacológica, contribuindo com o estudo direcionado sobre determinada espécie vegetal (PECK et al., 1992).

Nas nações industrializadas, ou comumente referidas como sendo do “primeiro mundo”, do total de drogas prescritas cerca de 50%, em média, são originadas de produtos naturais.

Estimativas da Organização Mundial da Saúde, mostraram que para a população de 3,4 bilhões de pessoas (até 1998), vivendo em países do terceiro mundo, as plantas medicinais representaram, em grande parte, a fonte primária de medicamentos (MAHIDO et al., 1998).

Entre os anos 1983 e 1994, o órgão americano responsável pelo registro de alimentos e medicamentos (Food and Drug Administration-FDA), nos EUA, aprovou 520 novos medicamentos dos quais cerca de 5,8% foram de origem natural, 55,6% foram produtos de síntese obtidos, a partir de protótipos de origem natural sem modificação, 24,4% foram produtos de origem natural modificados por semi-síntese, 8,8% dos fármacos foram obtidos por síntese total, mas com sítio farmacofórico semelhante àquele do composto natural de origem e 5,4 % foram obtidos por processos biotecnológicos (CRAGG et al., 1997). Neste período, verificou-se que nenhum composto com ação antiprotozoária foi registrado.

Em revisão similar, realizada posteriormente, abrangendo o período de 1981 a 2002 mostrou-se que, no período de 21 anos, houve algum avanço, sendo que do total de 868

novos medicamentos registrados, 13 foram antiparasitários, representando 1,5% do total (CRAGG et al,2003, NEWMAN et al.,2003).

Posteriormente, estudos similares de NEWMAN et al. (2007), compreendendo período maior de 25 anos (1981 a 2006), continuaram a mostrar evidências do grau de contribuição significativa dos produtos naturais entre os medicamentos novos registrados, embora tenha havido somente acréscimo de um medicamento antiparasitário, em relação ao período abrangido na pesquisa anterior (NEWMAN et al, 2003), demonstrando o baixo nível de interesse da indústria farmacêutica em relação a estes produtos.

No período que abrange os meados da década de 80 até 2000, foram dados os primeiros passos na pesquisa de novas moléculas ativas de origem natural, principalmente, advindas de plantas medicinais (GRAGG et al., 2007).

Em 2007, CHAPIUS e colaboradores descrevem a importância de trabalhos como o da Organização Mundial de Saúde que atuam em programa contra doenças negligenciadas, denominado “Tropical Diseases Research Program” (TDR), especialmente voltado à investigação de plantas medicinais usadas pela medicina tradicional, no tratamento de doenças negligenciadas, com a finalidade de encontrar espécies vegetais e novas moléculas bioativas destinadas à cura de doenças tropicais, tendo considerado este objetivo prioritário (CHAN-BACAB & PENA-RODRÍGUES, 2001).

Particularmente, em relação à leishmaniose, cujo enfoque foi dado neste trabalho, até o ano de 2008, foram computadas 239 moléculas isoladas de diversas espécies vegetais com atividade antileishmania. Destas, 68 foram alcalóides, incluindo a classe dos alcalóides isoquinolínicos, encontrados em representantes da família Annonaceae e do gênero *Annona* (ERDELYI, 2008, PHILLIPSON et al., 1985).

2.3.2 Espécies do gênero *Annona* e constituintes com potencial atividade antileishmania

Espécies do gênero *Annona* foram reportadas, na literatura, por seu uso como antiparasitário, na medicina tradicional tendo sido investigadas, assim como outras, cujo uso popular não foi reportado. Além disso, constituintes de parte delas mostraram-se ativos nos testes *in vitro*, frente a agentes protozoários distintos, como aqueles causadores das

leishmanioses, conforme revelou a revisão bibliográfica realizada. Entre estes constituintes, destacaram-se, principalmente, os alcalóides (**Tabela 18**) e o óleo volátil.

As cinco espécies do gênero cujos alcalóides isoquinolínicos foram testados e apresentaram atividade antiparasitária *in vitro* (**Tabela 14**) foram *A.cherimolia*, *A.foetida*, *A.montana*, *A.senegalensis* e *A.spinescens*. Entre estas, *A.foetida* e *A.spinescens* apresentaram atividade antileishmania, enquanto que para outras duas não foi especificado o agente protozoário (*A.cherimolia* e *A.montana*)

Alcalóides isolados de *A.montana*, *A.senegalensis* e *A.spinescens* possuem, ainda, atividades amebicida, antihelmíntica e antitripanosoma, respectivamente (**Tabela 14**).

Considerando as 250 espécies de *Annona* encontradas no Brasil (MELLO-SILVA, 2005) e aquela das espécies avaliadas para a atividade antiprotozoária (**Tabela 14**) restam muitas a serem a serem investigadas, com este propósito.

Extratos brutos de espécies do referido táxon foram, igualmente, avaliados para a atividade leishmanicida.

A atividade antileishmania do extrato em diclorometano das sementes de *Annona glauca* e do extrato em acetato de etila do pericarpo de *A.muricata* foi testada tendo sido, ambos, ativos frente às formas promastigotas de *L.braziliensis*, *L.amazonensis* e *L.donovani* (ROCHA et al., 2005). O extrato em diclorometano das sementes de *A.senegalensis* foi testado em formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania*, assim como o extrato em clorofórmio de *A.spraguei* foi testado em formas promastigotas de *L.braziliensis*, *L.infantum* e *L.panamensis* e foram ambos ativos (GODMAM & GILMAN, 2006).

A atividade leishmanicida dos alcalóides totais de folhas de *A.crassiflora* e de *A.coriacea* foi comprovada, anteriormente, frente às formas promastigotas e amastigotas de *L.chagasi*. Os alcalóides mostraram maior atividade em relação ao extrato etanólico bruto, demonstrando o potencial destas espécies como fontes de alcalóides bioativos (TEMPONE et al., 2005).

As hipóteses sugeridas para a explicação do mecanismo de ação dos alcalóides, nos parasitas, foram o estímulo à atividade dos macrófagos contra *Leishmania*, além da destruição das mitocôndrias dos parasitas e, também, a inibição da enzima topoisomerase,

importante na síntese dos metabólitos destes protozoários (CHAN-BACAB & PENA-RODRÍGUES, 2001)

No tocante ao óleo volátil do gênero *Annona*, foram raros os estudos relativos à atividade antileishmania do mesmo havendo, também, muito a ser estudado, o que constitui campo aberto para novas pesquisas.

O óleo volátil de folhas da espécie *A. foetida* apresentou atividade leishmanicida, tendo se mostrado mais ativo nas formas promastigotas de *L. guyanensis* (CI₅₀ de 4,1 µg/mL) em relação às outras três espécies testadas: *L. braziliensis* (CI₅₀:9,9 µg/mL), *L. amazonensis* (CI₅₀:16,2 µg/mL) e *L. chagasi* (CI₅₀:27,2 µg/mL). A atividade leishmanicida foi atribuída à mistura de sesquiterpenos oxigenados presentes na sua composição (COSTA et al., 2009).

2.4 Aspectos químicos

As principais classes de metabólitos secundários encontrados na família Annonaceae e no gênero *Annona* foram relatadas, na seqüência, tendo-se dado maior atenção aos alcalóides e ao óleo volátil, que foram os constituintes de interesse, neste trabalho.

2.4.1 Família Annonaceae

A família Annonaceae, à qual pertence à espécie *A. coriacea* Mart., abordada no presente trabalho, possui cerca de 135 gêneros e mais de 2500 espécies distribuídas no mundo (LEBOEUF et al., 1982).

A família apresenta grande variedade de constituintes químicos pertencendo às diferentes classes de metabólitos secundários, como: alcalóides (SIQUEIRA et al., 2007), flavonóides (LEBOEUF et al., 1982; PRADO et al., 2008), acetogeninas (BRINGMANN et al., 1999; YANG, et al., 2009), taninos (LEBOEUF et al., 1982; PIZZOLATI et al., 2003), óleos voláteis, resinas, ligninas (FERREIRA et al., 2009; BRITO et al., 2008), terpenos e compostos aromáticos variados (SOBRAL DA SILVA et al., 2007).

Entre os compostos alcaloídicos presentes na família, em sua maioria, ocorrem alcalóides de núcleo isoquinolínico (GUINAUDEAU et al., 1994), entretanto, também foram encontrados, em menor proporção, alcalóides das classes dos beta-carbonílicos e indólicos (COSTA et al., 2006).

O óleo volátil obtido de representantes de Annonaceae mostrou, em sua composição, a presença de monoterpenos e de sesquiterpenos (FOURNIER et al. 1999), estando os principais dispostos na **Figura 16**.

Figura 16 – Principais monoterpenos e sesquiterpenos encontrados no óleo volátil da família Annonaceae (continuação)

Figura 16 – continuação

2.4.2 Gênero *Annona*

Particularmente, em relação ao gênero *Annona*, ao qual pertence à espécie estudada, no presente trabalho, representa um dos 33 gêneros de Annonaceae, apresentando cerca de 250 espécies, no Brasil (LORENZI & SOUZA, 2008). Entre os principais grupos químicos de metabólitos presentes, neste táxon, citam-se: alcalóides, acetogeninas,

óleo volátil, flavonóides, entre outros (SIQUEIRA et al., 2007; PRADO et al., 2008; FERREIRA et al., 2009). O gênero é mais conhecido pelas acetogeninas, em função da forte atividade antitumoral revelada (YANG, et al., 2009; BRINGMANN et al., 1999). Estas são compostos em que os átomos de carbono ligam-se entre si formando as cadeias com extremos livres ou ciclos, cuja ocorrência se dá exclusivamente na família Annonaceae, e apresenta-se em diversos gêneros (BERMEJO et al., 2005).

2.4.2.1 Alcalóides

Os alcalóides do gênero, igualmente, foram extensamente estudados, conforme revelou a revisão bibliográfica, cujo período de varredura abrangeu os anos de 1912 a 2009.

A grande maioria dos 95 alcalóides isolados, a partir de 25 espécies de *Annona*, apresentou núcleo isoquinolínico, entretanto, foram encontrados, igualmente, alcalóides com outros núcleos, como os pirimidina- β -carbonílicos (3) (**Tabela 11**), além dos azaantraquinônicos (2) (**Tabela 13**) e azaantracênicos (3) (**Tabela 12**).

No gênero *Annona*, os alcalóides isolados mostraram, em sua maioria, estrutura isoquinolínica. Destes, foram predominantes compostos com núcleos aporfínico (42) (**Tabela 2**), oxoaporfínico (11) (**Tabela 3**), benzilisoquinolínico (9) (**Tabela 7**) e tetrahidroprotoberberínico (12) (**Tabela 8**).

Ainda, entre os isoquinolínicos, foram encontradas as seguintes classes de alcalóides, nas espécies de *Annona* estudadas: fenantrênicos (5) (**Tabela 10**), dioxoaporfínicos (2) (**Tabela 4**) proaporfínicos (2) (**Tabela 5**), dehidroaporfínicos (1) (**Tabela 6**) e dehidroprotoberberínicos (1) (**Tabela 9**).

Nas classes predominantes, alguns alcalóides destacaram-se por terem sido isolados de número significativo de espécies, como liriodenina, que foi o oxoapofínico mais frequente entre os isolados do gênero, tendo ocorrido em 16 espécies (**Tabela 2**), seguido de lisicamina que ocorreu em 6 espécies (**Tabela 2**). Entre os benzilisoquinolínicos, reticulina foi registrada em 12 espécies (**Tabela 7**), sendo precursor biossintético dos alcalóides isoquinolínicos. Os dois proaporfínicos, estefarina e glaziovina, foram encontrados em 6 espécies distintas do gênero (**Tabela 5**).

Tabela 1 - Alcalóides de núcleo isoquinolínico simples encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
isoquinolínico simples				
cherianoina	<p>(1)</p>	<i>A.cherimolia</i>	caule	CHEN et al., 2001 ^b
salsolinol	<p>(2)</p>	<i>A.reticulata</i>	folha e caule	FORGACS et al., 1981
talifolina	<p>(3)</p>	<i>A.cherimolia</i>		CHEN et al., 1999
		<i>A.purpurea</i>	caule	CHANG et al., 2000
		<i>A.squamosa</i>		YANG et al., 2004

Tabela 2 - Alcalóides de núcleo aporfinico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
aporfinico				
apomorfina	<p>(4)</p>	<i>A.purpurea</i>	n.i.	CHANG et al., 1998
bracteolina	<p>(5)</p>	<i>A.spinescens</i>	folha e caule	QUEIROZ et al., 1996

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
corituberina	<p>(6)</p>	<i>A. montana</i>	n.i.	VILLAR et al., 1987; TSAI et al., 1989
		<i>A. cherimolia</i>	folha	VILLAR et al., 1985
coridina	<p>(7)</p>	<i>A. reticulata</i>	folha	CHANG et al., 1995
		<i>A. cherimolia</i>	caule	SIMEON et al., 1989
		<i>A. squamosa</i>	caule secundário	RAO et al., 1986
		<i>A. squamosa</i>	caule secundário e raiz	RAO et al., 1978
		<i>A. squamosa</i>	folha e caule	BHAKUNI et al., 1972

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
aporfinico				
dehidroroemerina		<i>A.cherimolia</i>	raiz	D'ÓCON et al., 1995; CHULIA et al., 1995
		<i>A.senegalensis</i>	n.i.	YOU et al., 1995
(8)				
glaucina		<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al., 1997
		<i>A.squamosa</i>	folha e caule folha e caule	CHANG et al., 2000 ^b BHAKUNI et al., 1972
(9)				

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
glaucina	<p>(9)</p>	<i>A.cherimolia</i>	caule	CHEN et al., 1997
		<i>A.reticulata</i>	caule e folha	CHANG et al., 1995
		<i>A.hypoglauca</i>	caule	RINALDI, 2007
isoboldina	<p>(10)</p>	<i>A.serica</i>	folha	CAMPOS et al., 2008
		<i>A.senegalensis</i>	n.i.	PHILIPPOV et al., 1995
		<i>A.salzmani</i>	casca de caule	PAULO et al., 1992
		<i>A.cherimolia</i>	casca de caule	SIMEON et al., 1990
		<i>A.montana</i>	caule e raiz	LEBOEUF et al., 1982 ^c
		<i>A.glabra</i>	caule	YANG et al., 1974
			raiz	YANG et al., 1973
		<i>A.hypoglauca</i>	caule	RINALDI, 2007

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
isocoridina		<i>A.cherimolia</i>	caule	CHEN et al., 1997
		<i>A.senegalensis</i>	folha	YOU et al., 1995
		<i>A.squamosa</i>	folha	BHAKUNI et al., 1972
		<i>A.purpurea</i>	casca de caule	SONNET et al., 1971; CHENG et al., 2000 ^b
	(11)			
isodomeesticina		<i>A.hypoglauca</i>	caule	RINALDI, 2007
	(12)			

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
lirinidina	<p>(13)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al., 1998 ^b
nuciferina	<p>(14)</p>	<i>A.cherimolia</i>	casca de caule de caule	SIMEON et al., 1989; SIMEON et al., 1990
		<i>A.hayesii</i>	caule secundário	RASAMIIZAFY et al., 1987

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
N-formil-purpureína	<p>(15)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al, 1998 ^a
N-metil-actinodafinina	<p>(16)</p>	<i>A.glabra</i>	folha	YANG et al., 1971 ^a

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
N-metil-laurotetanina	<p>(17)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	WU et al., 1998
N-metil-asimilobina	<p>(18)</p>	<i>A.glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al., 2000

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
aporfinico				
N-formil-anonaina	<p>(19)</p>	<i>A. cherimolia</i>	caule	CHAN et al., 1997
		<i>A. glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
O-dimetil-purpureina	<p>(20)</p>	<i>A. purpurea</i>	caule	SONNET et al., 1971; LEBOEUF et al., 1982; WU et al., 2000; Castro et al., 1996

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
purpureína	<p>(21)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	SONNET et al., 1971; CHANG et al., 1998; LEBOEUF et al., 1982
predicentrina	<p>(22)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al., 1997

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
roemerina	<p>(23)</p>	<i>A. glabra</i> <i>A. squamosa</i> <i>A. paludosa</i> <i>A. hayesii</i> <i>A. cherimolia</i> <i>A. senegalensis</i> <i>A. hypoglauca</i>	caule e raiz folha e caule casca de caule de caule caule secundário raiz folha caule	LEBOEUF et al., 1982; LEBOEUF., 1982; BHAKUNI et al., 11972 LEPRAVOTE et al., 1988; LEBOEUF et al., 1982 SANTOS et al., 2003; RASAMIIZAFY et al. 1987 CHULIA et al., 1995 YOU et al., 1995 RINALDI, 2007
talbaicalidina	<p>(24)</p>	<i>A. purpurea</i>	caule e folha	CHANG et al., 1998 ^a

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
aporfínico				
xilopina	<p>(25)</p>	<i>A.squamosa</i>	folha e caule	LEBOEUF et al., 1982; BHAKUNI et al.,1979
		<i>A.montana</i>	casca de caule da raiz	LEBOEUF et al., 1982; SAITO., 1990
		<i>A.cherimolia</i>	folha e caule	CHEN et al.,2001; SIMEON et al., 1990; SIMEON et al., 1989
		<i>A.reticulata</i>	folha	CHANG et al., 1995
1,2,3-trimetoxi-9,10-metilenodioxi-aporfina	<p>(26)</p>	<i>A.spraguei</i>	n.i.	DIAS et al., 1990

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
aporfinico				
7-formil- dehidro talicsimidina	<p>(27)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al., 1998 ^b

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
anonaina	<p>(28)</p>	<i>A.reticulata</i> <i>A.squamosa</i> <i>A.crassiflora</i>	caule,raiz,fruto e folha semente folha e caule	YANG et al., 1987 BETTARINI et al., 1993 HOCQUEMILLER et al., 1982

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
anonaina	<p>(28)</p>	<i>A.paludosa</i>	raiz	LAPREVOTE et al., 1988
		<i>A.hayesii</i>	lenho	RASAMIIZAFY et al., 1987
		<i>A.muricata</i>	fruto	HASHAT et al., 1997 ^a
		<i>A.cherimolia</i>	raiz,caule	CHULIA et al, 1995; SIMEON et al., 1990
		<i>A.glabra</i>	fruto	HASHAT et al., 1997 ^b
		<i>A.hypoglauca</i>	caule	RINALDI, 2007
		<i>A.montana</i>	fruto	HASHAT et al., 1997 ^b
		<i>A.senegalensis</i>	n.i.	SIMEON et al., 1990

Tabela 2 – continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
asimilobina	<p>(29)</p>	<i>A.glabra</i>	fruta	HASHAT et al., 1997 ^a
		<i>A.montana</i>	fruta	HASHAT et al., 1997 ^a
		<i>A.crassiflora</i>	folha e caule	HOCQUEMILLER et al., 1982
		<i>A.hayesii</i>	caule secundário	RASAMIZAFY et al., 1987
		<i>A.paludosa</i>	raiz	LAPREVOTE et al., 1988
		<i>A.cherimolia</i>	folha	CHEN et al., 2001
		<i>A.muricata</i>	folha	HASHAT et al., 1997
		<i>A.reticulata</i>	folha	CHANG et al., 1995
		<i>A.cacans</i>	folha	SAITO, 1994

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
anolobina	<p>(30)</p>	<i>A. cherimolia</i>	caule	SIMEON et al., 1989; YANG et al 1991; CHEN et al 1997
			casca de caule de caule	SIMEON et al., 1989; 1990
		<i>A. glabra</i>	casca de caule de caule e casca de caule de caule	YANG et al., 1974 ^a ; LEBOEUF et al., 1982
		<i>A. squamosa</i>	raiz	YANG et al., 1970 ^b ; LEBOEUF et al., 1982
actinodafina	<p>(31)</p>	<i>A. hypoglauca</i>	caule	RINALDI, 2007

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
laureliptina	<p>(32)</p>	<i>A.salzmanii</i>	casca de caule	PAULO et al., 1992
litseferina	<p>(33)</p>	<i>A.hayesii</i>	casca de caule	RASAMIZAFY et al., 1987
laurolitsina	<p>(34)</p>	<i>A.squamosa</i>	folha	SAITO, 1995

Tabela 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
michelalbina	<p>(35)</p>	<i>A. reticulata</i>	raiz	FORGACS et al., 1981
		<i>A. squamosa</i>	folha, semente e caule	BALBAA et al., 1979
		<i>A. muricata</i>	folha, semente e caule	BALBAA et al., 1979; SAITO, 1990
		<i>A. hayesii</i>	caule secundário	RASAMIZAFY et al., 1987 SAITO, 1990
		<i>A. glabra</i>	folha, semente e caule	BALBAA et al., 1979; SAITO, 1990
		<i>A. cherimolia</i>	caule	BALBAA et al., 1979; URZUA et al., 1977; VILLAR et al., 1985
norlaurelina	<p>(36)</p>	<i>A. squamosa</i>	folha	SAITO, 1995, 1990

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
norpurpureina	<p>(37)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al., 1998 ^a ; 1998 ^b ; SAITO, 1995
			n.i.	SONNET et al., 1971
nornantenina	<p>(38)</p>	<i>A.cherimolia</i>	folha	VILLAR et al., 1985; SAITO, 1995, 1990
		<i>A.serica</i>	folha	CAMPOS et al., 2008

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
nordomestacina	<p>(39)</p>	<i>A.hayesii</i>	casca de caule	RASAMIZAFY et al.,1987; SAITO, 1990, 1995
		<i>A.glabra</i>	fruta e caule	CHANG et al., 2000 ^a
		<i>A.spinescens</i>	casca de caule do caule secundário	QUEIROZ et al., 1996
norlaurelina	<p>(40)</p>	<i>A.squamosa</i>	folha e caule	SAITO,1990

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
nornuciferina	<p>(41)</p>	<i>A. glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
			caule e casca de caule	YANG et al., 1973,1974
		<i>A. hayesii</i>	casca de caule	RASAMIIZAFY et al., 1987
		<i>A. muricata</i>	frutos	HASHAT et al., 1997 ^a , 1997 ^b
		<i>A. montana</i>	folha	WU et al., 1993
		<i>A. squamosa</i>	fruto verde	WU et al., 1994
		<i>A. sericea</i>	folha	CAMPOS et al., 2008
		<i>A. hypoglauca</i>	caule	RINALDI, 2007
norcoridina	<p>(42)</p>	<i>A. squamosa</i>	folha e caule	BHAKUNI et al., 1972; LEBOEUF et al., 1982
		<i>A. reticulata</i>	folha	CHANG et al., 1995
		<i>A. purpurea</i>	folha	SONNET et al., 1971
		<i>A. cherimolia</i>	caule	CHEN et al., 1999, 1997

Tabela 2 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
noraporfinico				
noroliverolina	<p>(43)</p>	<i>A.senegalensis</i>	raiz	FALL et al., 2008
3-hidroxinornuciferina	<p>(44)</p>	<i>A.hayesii</i> <i>A.sericea</i> <i>A.reticulata</i>	caule secundário folha raiz e casca de caule da raiz	RASAMIZAFY et al., 1987 CAMPOS et al., 2008 YANG et al., 1987
n.i: não informado				

Tabela 3 - Alcalóides de núcleo oxoaporfínico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
liriodenina (45)		<i>A.amazonica</i>	caule	PINHEIRO et al., 2009
		<i>A.foetida</i>	casca de caule	COSTA et al., 2006
		<i>A.acuminata</i>	folha e caule	BORUP et al., 1982
		<i>A.ambotay</i>	caule secundário	OLIVEIRA et al., 1987
		<i>A.crassiflora</i>	folha e casca de caule de caule	HOCQUEMILLER et al., 1982
		<i>A.cristalensis</i>	partes aéreas	FAUST et al., 1981
		<i>A.hayesii</i>	caule secundário	RASANIZAFY et al., 1987
		<i>A.dioica</i>	caule secundário	SANTOS et al., 2003
		<i>A.montana</i>	folha, caule, raiz e casca de caule de caule	YANG et al., 1979; WU et al., 1993; ERDELYI, 2008
		<i>A.purpurea</i>	caule secundário	CASTRO et al., 1996
		<i>A.spinescens</i>	casca de caule de caule	QUEIROZ et al., 1996
		<i>A.senegalensis</i>	raiz	FALL et al., 2008
			caule	PHILIPPOV et al., 1995

Tabela 3 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
liriodenina	<p>(45)</p>	<i>A.muricata</i>	semente	PHILIPPOV et al., 1994
			folha, caule, raiz e casca de caule	ERDELYI, 2008
		<i>A.cacans</i>	n.i.	SAITO, 1994
		<i>A.bullata</i>	casca de caule	HUI et al., 1992
		<i>A.cherimolia</i>	folha	SANDOVAL et al., 1986
			caule	URZUA et al., 1977; CHEN et al., 1997
			casca de caule de caule	SIMEON et al., 1990; YANG et al., 1991; SIMEON et al., 1989
			folha	CHEN et al., 2001; CHEN et al., 1997
			n.i.	CHULIA et al., 1995
			semente	RIOS et al., 1989
			folha	VILLAR et al., 1996

Tabela 3 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
liriodenina	<p>(45)</p>	<i>A. glabra</i>	n.i.	HSIEH et al., 2004
			n.i.	TIAN et al., 2003
			caule de casca de caule	WU et al., 2000; YANG et al., 1973
			caule	YANG et al., 1974 ^a
			caule secundário e casca de caule de caule	WARTHEN et al., 1969
			folha, semente e casca de caule de caule	HAGGAG et al., 1983
		<i>A. reticulata</i>	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
			folha	KONG et al., 1973
			casca de caule e raiz	FORGACS et al., 1981; YANG et al., 1970 ^a
			casca de caule da raiz	YANG et al., 1973 ^b

Tabela 3 – continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
liriodenina	<p>(45)</p>	<i>A. reticulata</i>	folha	CHANG et al., 1995; XU et al., 1992; SAAD et al., 1991; YANG et al., 1987, 1973 ^b , 1974 ^a
			rizoma	CHANG et al., 1995
			casca de caule	SAAD et al., 1991
			raiz e casca de caule de caule	YANG et al., 1987
		<i>A. squamosa</i>	folha, caule e semente	YANG et al., 1970 ^a
			folha	YANG et al., 2004
			caule	YANG et al., 1992
			fruto	WU et al., 1994
			casca de caule de caule	Hi et al., 1990
			semente	MORITA et al., 2000
			raiz	YANG et al., 1970 ^b

Tabela 3 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
lisicamina	<p>(46)</p>	<i>A.serica</i>	folha	CAMPOS et al., 2008
		<i>A.glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al.,2000 ^a
		<i>A.acuminata</i>	folha	BORUP et al.,1982
		<i>A.cherimolia</i>	caule e casca de caule de caule	SIMEON et al.,1989; SIMEON et al.,1990; CHEN et al.,1997
		<i>A.hayesii</i>	caule secundário	RASAMIZAFY et al.,1987
		<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al.,1998 ^a
anolatina	<p>(47)</p>	<i>A.montana</i>	folha	WU et al.,1993

Tabela 3 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
oxoxilopina	<p>(48)</p>	<i>A.squamosa</i>	folha e fruto	BHAUNIK et al., 1979; WU et al., 1994; LEBOEUF et al., 1882
		<i>A.reticulata</i>	folha	CHANG et al.,1995
		<i>A.cherimolia</i>	folha e semente	SIMEON et al.,1989; SIMEON et al.,1990
			folha	CHEN et al.,2001; VILLAR et al.,1983
			caule	CHEN et al.,1997
			semente	VILLAR et al.,1985
O-metil-homoscatoлина	<p>(49)</p>	<i>A.foetida</i>	casca de caule	COSTA et al., 2006
		<i>A.acuminata</i>	folha	BORUP et al.,1982; OLIVEIRA et al.,1987
		<i>A.ambotay</i>	casca de caule de caule	OLIVEIRA et al.,1987

Tabela 3 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
oxopurpureína	<p>(50)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al.,1998 ^a
			n.i.	SONNET et al.,1971
oxoglaucina	<p>(51)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG et al., 1998 ^a ; LEBOEUF et al.,1982; SONNET et al.,1971
		<i>A.glabra</i>	n.i.	TIAN et al.,2001
		<i>A.cherimolia</i>	caule	CHEN et al.,1997

Tabela 3 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
oxonantenina	<p>(52)</p>	<i>A.reticulata</i>	folha	CHANG et al., 1995
		<i>A.serica</i>		CAMPOS et al.,2008
		<i>A.cherimolia</i>		CHEN et al.,2001
oxoanlobina	<p>(53)</p>	<i>A.cherimolia</i>	casca de caule	CHEN et al., 1997

Tabela 3 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
oxoaporfínico				
oxofoebina	<p>(54)</p>	<i>A.spraguei</i>	casca de caule de caule	DIAZ et al., 1988
ushinsunina	<p>(55)</p>	<i>A.cherimolia</i>	casca de caule	CHEN et al., 1997
n.i.: não informado				

Tabela 4 - Alcalóides de núcleo dioxoaporfínico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
dioxoaporfínico				
anobraína	<p>(56)</p>	<i>Annona glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
norcefadiona A	<p>(57)</p>	<i>A.hayesii</i>	caule secundário	RASAMIZAFY et al., 1987

Tabela 5 - Alcalóides de núcleo proaporfínico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
proaporfínico				
estefarina	<p>(58)</p>	<i>A.glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al.,2000 ^a ; TIAN et al., 2001
		<i>A.cherimolia</i>	caule	CHEN et al., 1997; SIMEON et al., 1989
		<i>A.spinescens</i>	casca de caule do caule	Queiroz et al. ,1996
		<i>A.cacans</i>	n.i.	SAITO et al.,1990
		<i>A.muricata</i>	folha	LEBOEUF et al.,1981 ^a ; LEBOEUF et al.,1981 ^c
		<i>A.purpurea</i>	caule e raiz	LEBOEUF et al.,1982; SONNET et al.,1971
			folha	LEBOEUF et al.,1982; SONNET et al.,1971; CHANG et al., 1998 ^a ; SONNET et al.,1971

Tabela 5 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
proaporfinico				
glaziovina	<p>(59)</p>	<i>A.cherimolia</i>	caule de casca de caule	SIMEON et al., 1990
		<i>A.purpurea</i>	folha	SONNET et al., 1971; CHANG et al., 1998 ^a ; LEBOEUF et al., 1982

n.i.: não informado

Tabela 6 - Alcalóide de núcleo dehidroaporfínico encontrado no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
dehidroaporfínico				
7-hidroxi-dehidro talicsimidina	<p>(60)</p>	<i>A.purpurea</i>	folha	CHANG <i>et al.</i> , 1998 ^b

Tabela 7 - Alcalóides de núcleo benzilisoquinolínico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
benzylisoquinolínico				
anomurina	<p>(61)</p>	<i>A. muricata</i>	folha, raiz e caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a , 1981 ^c
anomuricina	<p>(62)</p>	<i>A. muricata</i>	folha, raiz e caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a , 1981 ^c

Tabela 7 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
benzilisoquinólico				
anoneliptina	<p>(63)</p>	<i>A. elliptica</i>	folha e caule	SANDOVAL et al., 1985
cocclaurina	<p>(64)</p>	<i>A. muricata</i>	raiz e folha	FAUST et al., 1981; AWAN et al., 1980; LEBOEUF et al., 1981 ^a , 1981 ^c
		<i>A. reticulata</i>	folha e caule	FORGARCS et al., 1981; LEBOEUF et al., 1981 ^a
		<i>A. montana</i>	caule e raiz	LEBOEUF et al., 1982 ^c
		<i>A. cristalensis</i>	partes aéreas	FAUST et al., 1981
		<i>A. squamosa</i>	fruto	WU et al., 1994

Tabela 7 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
benzilisoquinólico				
higenamina	<p>(65)</p>	<i>A.squamosa</i>	folha	LEBOEUF et al.,1981 ^b ; 1982; WAGNER et al.,1980
nor-reticulina	<p>(66)</p>	<i>A.montana</i>	folha	GUINAUDEAU et al.,1975; KOICHI et al.,1997
orientalina	<p>(67)</p>	<i>A.cherimolia</i>	caule	CHEN et al., 1997

Tabela 7 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
benzilisoquinólico				
o-metil-armepavina	<p>(68)</p>	<i>A.squamosa</i>	folha	BHAUMIKET al.,1979; LEBOEUF et al.,1982; TSAI et al.,1989
reticulina	<p>(69)</p>	<i>A.cherimolia</i>	caule e folha	YANG et al., 1991; LEBOEUF et al., 1982;; VILLAR et al., 1985;
		<i>A.glabra</i>	caule e folha	YANG et al., 1971; LEBOEUF et al., 1982
		<i>A.montana</i>	caule e folha	LEBOEUF et al., 1982 ^c ; YANG et al., 1979
		<i>A.muricata</i>	caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a ; AGUILAR-SANTOS et al., 1967;

Tabela 7 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
benzilisquinolínico				
reticulina	<p>(69)</p>	<i>A.reticulata</i>	casca de cauleda raiz	LEBOEUF et al.,1980,1982; GOPINATH et al.,1959; YANG et al.,1970,1973 ^b
		<i>A.squamosa</i>	raiz e fruto	LEBOEUF et al.,1982; YANG et al.,1970 ^b ; BHAUMIK et al.,1979; WU et al.,1994
		<i>A.paludosa</i>	casca de cauleda raiz	LEBOEUF et al.,1982; LAPREVOTE et al.,1988
		<i>A.crassiflora</i>	folha e caule	LEBOEUF et al.,1982; HOCQUEMILLER et al.,1982
		<i>A.serica</i>	folha	CAMPOS et al.,2008
		<i>A.spinescens</i>	casca de caulede caule e raiz	QUEIROZ et al.,1996
		<i>A.salzmanii</i>	casca de caulede caule	PAULO et al.,1992
		<i>A.purpurea</i>	caule	CHANG et al.,2000 ^b

Tabela 8 - Alcalóides de núcleo tetrahidroprotoberberínico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
tetrahidroprotoberberínico				
coreximina	<p>(70)</p>	<i>A. montana</i>	casca de caule de raiz, caule	LEBOEUF et al., 1982 ^c ; CAVE et al., 1988
		<i>A. muricata</i>	folha, raiz, caule, casca de caule de caule	LEBOEUF et al., 1981 ^a ; LEBOEUF et al., 1981 ^c
		<i>A. paludosa</i>	casca de caule de raiz	LAPREVOTE et al., 1988
coritenchina	<p>(71)</p>	<i>A. cherimolia</i>	raiz	MARTINEZ-VAZQUES et al., 2005

Tabela 8 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
tetrahidroprotoberberínico				
caseadina	<p>(72)</p>	<i>A.hypoglauca</i>	caule	RINALDI, 2007
discretamina	<p>(73)</p>	<i>A.cherimolia</i>	casca de caule de caule	SIMEON et al., 1989; 1990
dehidrocoridalmina	<p>(74)</p>	<i>A.glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a

Tabela 8 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
tetrahidroprotoberberínico				
espinosina	<p>(75)</p>	<i>A.spinescens</i>	casca de caule de caule e raiz	QUEIROZ et al., 2005
estefolidina	<p>(76)</p>	<i>A.cherimolia</i>	casca de caule de caule	SIMEON et al., 1989; 1990
esculerina	<p>(77)</p>	<i>A.paludosa</i>	casca de caule da raiz	CAVE et al., 1988; LAPREVOTE et al., 1988
		<i>A.hypoglauca</i>	caule	RINALDI, 2007

Tabela 8 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
tetrahidroprotoberberínico				
isocoreximina	<p>(78)</p>	<i>A. cherimolia</i>	raiz	MARTINEZ-VAZQUES et al., 2005
pessoína	<p>(79)</p>	<i>A. spinescens</i>	casca de caule de caule e raiz	QUEIROZ et al., 1996

Tabela 8 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
tetrahidroprotoberberínico				
quiquemanina	<p>(80)</p>	<i>A. glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
		<i>A. cherimolia</i>	caule	CHEN et al., 1997
tetrahidropalmatina	<p>(81)</p>	<i>A. paludosa</i>	casca de caule de raiz	LAPREVOTE et al., 1988

Tabela 9 - Alcalóides de núcleo dehidroprotoberberínico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
dehidroprotoberberínico				
dehidropalmatina	<p>(82)</p>	<i>A. paludosa</i>	raiz	CAVE et al., 1988

Tabela 10 - Alcalóides de núcleo fenantrênico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
fenantrênico				
anoretina	<p>(83)</p>	<i>A. montana</i>	folha	WU et al., 1993
argentinina	<p>(84)</p>	<i>A. montana</i>	casca de caule e raiz	LEBOEUF et al., 1982 ^c
			folha	WU et al., 1993; Yang et al., 1979

Tabela 10 - continuação[illegible]

Tabela 10 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
fenantrênico				
7-H- [1,3] dióxido [3,4] fenantreno [9,10,1-ij] quinolizina- 7-one-5,6, 9,10-tetrahidro-5-(4-hi droxi-3,5-dimetoxifenil	<p>(87)</p>	<i>A.dioica</i>	lenho	DOS SANTOS et al., 2003

Tabela 11 - Alcalóides de núcleo pirimidina- β -carbolínico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
pirimidina-β-carbolínico				
anomontina	(88)	<i>A.foetida</i>	casca de caule	COSTA et al., 2006
		<i>A.reticulata</i>	raiz e casca de raiz	YANG et al., 1987
		<i>A.montana</i>	caule, casca de raiz e lenho	LEBOEUF et al., 1982 ^c , 1982 ^b
metoxianomontina	(89)	<i>A.montana</i>	caule e casca da raiz	LEBOEUF et al., 1982 ^b , 1982 ^c
		<i>A.reticulata</i>	raiz e casca da raiz	YANG et al., 1987
N-hidroxianomontina	(90)	<i>A.foetida</i>	n.i.	YANG et al., 1987

n.i.: não informado

Tabela 12 - Alcalóides de núcleo azaantracênico encontrado no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência	
azaantracênico					
anofolina	<p>(91)</p>	<i>A.hayesii</i>	caule secundário	RASAMIZAFY et al., 1987	
1-aza-5,9,10-trimetoxi-4-metil-2-oxo-1,2-dihidroantracenenadiona	<p>(92)</p>	<i>A.dioica</i>	lenho	DOS SANTOS et al., 2003	
		<i>A.atemoya</i>	semente	WU et al., 2005	
		<i>A.dioica</i>	lenho	DOS SANTOS et al., 2003	
geovanina	<p>(93)</p>	R,R1=H = CH ₃	<i>A.hayesii</i>	caule secundário	RASAMIZAFY et al., 1987

Tabela 13 - Alcalóides de núcleo azaantraquinônico encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie vegetal	Órgão vegetal	Referência
azaantraquinonas				
1-aza-4-metil-2-oxo- 1,2-dihidro-9,10-antracene diona	<p>(94)</p>	<i>A.glabra</i>	fruto e caule	CHANG et al., 2000 ^a
1-aza-5,9,10-trimetoxi-4-metil-2-oxo-1,2-dihidro antracenenadiona 1-aza-5,9,10-trimetoxi-4-metil-2-oxo-1,2-dihidro antracenenadiona	<p>(95)</p>	<i>A.dioica</i>	lenho	DOS SANTOS et al., 2003

2.4.2.2 Óleo volátil

A composição de diferentes óleos voláteis do gênero *Annona* foi avaliada entre espécies selecionadas, de forma a estabelecer comparações em relação aos constituintes de 6 espécies. A análise dos componentes majoritários de *Annona senegalensis* (folha), *Annona muricata* (folha), *Annona glabra* (fruto), *Annona cuneata* (casca de caule), *Annona squamosa* (folha), *Annona foetida* (folha) indicou a presença de terpenos comuns entre elas, como: α -pineno, mirceno, (E)- β -ocimeno, δ -cadineno, β -elemeno, β -cariofileno, limoneno e germacreno D. Tais constituintes foram majoritários sendo encontrados em outras espécies do gênero em diferentes teores (GARG et al. 2005; KHALLOUKI et al. 2002; SANTOS et al. 1998; BOYOM et al., 1996; KOSSOUOH et al. 2007).

Particularmente, em relação a *A. coriacea*, não foram encontrados estudos anteriores relatando a sua composição.

2.4.3 *Annona coriacea* Mart.

Em geral, *A. coriacea* Mart. recebeu pouca atenção nas pesquisas do ponto de vista químico, até o presente. Entre os seus metabólitos secundários, foram isolados somente acetogeninas (DA SILVA et al., 1997; BERMEJO et al., 2005) e diterpenos (ORSINI & PELLIZONI, 1977).

Em estudos anteriores, a espécie foi avaliada quanto às atividades antimalárica, antileishmania e antitrypanosoma *in vitro* (FISCHER et al., 2004; TEMPONE et al., 2005) de seus extratos bruto e alcaloídico total, o que motivou o aprofundamento da investigação, tendo em vista os resultados, que demonstraram o potencial destes alcalóides como agentes antiprotozoários.

2.5 Usos medicinais de espécies do gênero *Annona*

Às cascas, folhas e frutos verdes de espécies do gênero *Annona* (*A. squamosa*, *A. foetida*) foram atribuídas propriedades adstringentes, antidiarréicas e febrífugas (CORRÊA, 1969), sendo empregados popularmente, na forma de infuso ou fervidas no óleo. Há, também, indicações de uso em doenças de pele, irritações cutâneas, febre, malária, úlcera péptica e em cólicas (SONNET et al., 1971).

Na medicina tradicional, há relatos, do uso de folhas, raízes, cascas de caules e sementes de *A. squamosa* no tratamento de doenças venéreas e diarreias. As cascas de caules são utilizadas em acidentes ofídicos e como vermífugo. Os infusos de folhas de *A. muricata* são aplicados em doenças dos olhos, estômago e intestino (PEZZUTO et al., 1995).

2.5.1 *Annona coriacea* Mart.

O uso medicinal de *A. coriacea* foi relatado no tratamento de parasitoses, úlceras, inflamações (AGRA, 1977), reumatismo e como anti-helmíntico (CRUZ, 1985).

2.6 Atividades biológicas de *A. coriacea*

A pesquisa bibliográfica evidenciou que, igualmente, do ponto de vista da atividade biológica pouco foi estudado, até o momento, com relação à espécie selecionada para estudo. As pesquisas existentes foram realizadas mais recentemente.

Em 1996, DA SILVA e colaboradores verificaram a atividade citotóxica das acetogeninas obtidas de raízes de *A. coriacea* em células tumorais da nasofaringe.

Em 2002, MACEDO e colaboradores comprovaram a atividade do extrato etanólico como inseticida na espécie. Em 2004, FISCHER e colaboradores submeteram os extratos brutos, etanólico e alcaloídico total, de *A. coriacea* aos testes *in vitro* frente a duas cepas de *Plasmodium*, sendo uma resistente (K1) e outra sensível (Palo Alto) à cloroquina. O extrato alcaloídico total (CI₅₀: 5,8 µg/mL) apresentou nível de atividade equivalente àquele do extrato etanólico (CI₅₀: 4,4 µg/mL) quando testado com a cepa sensível à cloroquina, enquanto que frente à cepa resistente, o extrato alcaloídico (CI₅₀: 1,6 µg/mL) foi significativamente mais ativo que o etanólico (CI₅₀: 28,6 µg/mL).

Em 2005, FAGUNDES e colaboradores avaliaram o efeito genotóxico do extrato etanólico de sementes de *A. coriacea*. Os testes foram realizados em camundongos em doses do extrato variando de 50 a 400 mg/Kg e utilizando a ciclofosfamida como controle positivo (250 mg/Kg). Segundo os resultados observados, o extrato mostrou-se agente potencialmente genotóxico, embora o tenha sido, em menor grau, em relação à ciclofosfamida, além de ter causado mutações no DNA dos animais, com potencial de desencadamento de carcinogênese.

No mesmo ano, dando continuidade aos estudos de FISCHER e colaboradores (2004) relacionados à pesquisa de espécies potencialmente ativas em protozoários, TEMPONE e colaboradores (2005) avaliaram a atividade dos extratos etanólico e alcaloídico da espécie frente às formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi* e às formas tripomastigotas de *Trypanossoma cruzi*. Os alcalóides totais da espécie causaram a morte de 100% das formas tripomastigotas e foram ativas em ambas as formas de *Leishmania* (L.) *chagas* (TEMPONE et al. 2005).

O extrato etanólico de *A. coriacea* foi ativo contra as formas promastigotas de *L.*(L.) *chagasi* com EC₅₀ de 41,60 µg/mL, contra as formas tripomastigotas (extracelulares) de *Trypanossoma cruzi* o mesmo extrato etanólico à uma concentração de 100 µg/mL, levou a morte de 100% das formas tripomastigotas (flageladas).

Em 2006, COELHO e colaboradores isolaram o composto **lectina**, a partir das sementes de *A.coriacea*, e testaram a resposta inflamatória em camundongos.

Tabela 14 - Atividade antiparasitária de alcalóides encontrados no gênero *Annona*

Espécie de <i>Annona</i>	Alcalóide	Atividade antiparasitária <i>in vitro</i>	Referência
<i>A. cherimolia</i>	xilopina (25)	p.n.i	SIMEON et al., 1989; LEBOEUF et al., 1982; SAITO, 1990
<i>A. foetida</i>	anamontina (88)		
	liriodenina (45)	anti-leishmania	COSTA et al., 2006
	o-metil-homoscatoлина (49)		
	n-hidroxianamontina (90)		
<i>A. montana</i>	argentinina (84)	amebicida	LEBOEUF et al., 1982 ^c
	aterosperminina (85)	p.n.i	LEBOEUF et al., 1982 ^c ; YANG et al., 1987
	coclaurina (64)	p.n.i	LEBOEUF et al., 1982 ^c
	coreximina (70)	p.n.i	LEBOEUF et al., 1982 ^c
	metoxianamontina (89)	p.n.i	LEBOEUF et al., 1982 ^c ; YANG et al., 1987
	reticulina (69)	p.n.i	LEBOEUF et al., 1982 ^c ; YANG et al., 1979
<i>A. senegalensis</i>	noroliverolina (43)	anti-helmíntico	FALL et al., 2008
	liriodenina (45)	anti-leishmania, anti-tripanosoma	QUEIROZ et al., 1996

Tabela 14 - continuação

Espécie de <i>Annona</i>	Alcalóide	Atividade antiparasitária <i>in vitro</i>	Referência
<i>A.senegalensis</i>	bracteolina (5)	anti-tripanosoma	QUEIROZ et al., 1996
	estefarina (58)	anti-leishmania, anti-tripanosoma	
	nordomestacina (39)	anti-leishmania, anti-tripanosoma	
	pessoína (79)	anti-tripanosoma	

p.n.i: parasita não informado

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O presente trabalho visou à obtenção de dados relacionados aos aspectos químicos e da atividade antiprotozoária *in vitro* da espécie *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). Para tanto, buscou-se conhecer o perfil cromatográfico dos alcalóides totais e de frações alcaloídicas, presentes nas folhas, selecionando-se, para o estudo, as frações com atividade leishmanicida *in vitro*. Pretendeu-se, ainda, determinar a composição do óleo volátil das folhas e a sua potencial atividade leishmanicida e antichagásica *in vitro*, bem como investigar a variação do teor e da atividade leishmanicida *in vitro* de alcalóides totais de folha e de caule, durante período de um ano.

3.2 Objetivos específicos

- Fracionamento do extrato alcaloídico bruto de folhas e avaliação da atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L) *chagasi in vitro* com seleção de frações ativas para análise, por CG-EM.
- Obtenção do óleo volátil de folhas para análise por CG-EM e avaliação da atividade *in vitro* frente às formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) major* e às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.
- Avaliação do rendimento em alcalóides totais de folhas e de caules, coletados mensalmente, por período de um ano, acompanhada de avaliação da atividade frente às formas promastigotas de *L. (L.) chagasi in vitro*.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

O material botânico estudado constituiu-se de folhas e de caules de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) (**Figura 17**), coletados na Reserva Ecológica do Instituto Florestal de São Paulo, em Águas de Santa Bárbara, SP, situada a 345 Km da cidade de São Paulo, entre as coordenadas: 49° 14' 40" de latitude Oeste e 22° 46' 91" de longitude Sul, à altitude de 765 m.

O material destinado ao estudo foi coletado a partir de três espécimes. Para a obtenção do perfil dos alcalóides, as folhas foram coletadas em setembro de 2007 e os caules; em janeiro de 2008. Para a avaliação do rendimento mensal em alcalóides totais foram realizadas 12 coletas de folhas e de caules, no período de julho de 2007 a julho de 2008. Para a obtenção do óleo volátil de folhas, a coleta foi realizada em agosto de 2009.

Figura 17- *Annona coriacea* Mart. [Escala: 0,5 m]

Foram preparadas exsicatas dos ramos aéreos, tendo sido identificadas pelo Prof. Dr. Renato de Mello-Silva do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP) e depositadas no Herbário (SPF) do mesmo Instituto, sob a denominação **Siqueira 4**.

4.2 Métodos

4.2.1 Secagem e pulverização

Após a coleta, as folhas e caules de *A. coriacea* foram secos à sombra, à temperatura ambiente, e dispostos em esteira própria, por 7 dias. Posteriormente, os caules foram transferidos para estufa com circulação de ar, à temperatura de 35°C, onde permaneceram por 3 dias.

O material seco foi pulverizado em moinho de facas e martelos, tendo-se obtido pó semifino (tamises 355/180) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.2.2 Obtenção dos extratos

4.2.2.1 Extrato etanólico

O extrato etanólico foi preparado a partir de 1,3 Kg de folhas e 500 g de caule e, no caso das coletas mensais, procedeu-se à extração das 12 alíquotas de 50 g de caules e de folhas.

O material pulverizado foi deixado em maceração em etanol 96° GL, por 24 horas e, em seguida, submetido à percolação a frio, até a exaustão, com o mesmo solvente. Após a filtração, o extrato etanólico foi concentrado, à pressão reduzida, em evaporador rotatório (BÜchi®). Determinou-se a massa seca do resíduo, que foi conservado em frasco hermeticamente fechado, ao abrigo da luz e sob refrigeração.

4.2.2.2 Alcalóides totais

Os extratos etanólicos secos de folhas (alíquotas de 50 g) e de caules (alíquotas de 0,15 g) foram solubilizados em ácido fosfórico 10% (v/v) (Labsynth®) (FISCHER et al., 2004).

As soluções ácidas resultantes foram filtradas e submetidas à partição com *n*-hexano (100 mL) (Carlo Erba®). Posteriormente, foram alcalinizadas com hidróxido de amônio (Lablabsynth®) (50 mL) até pH 9,0 (FISCHER et al., 2004).

As soluções alcalinas foram submetidas à partição com diclorometano (50 mL) (Lablabsynth®), até verificar reação negativa com o reativo de Dragendorff (WAGNER & BRADT, 1996). As fases em diclorometano foram reunidas e filtradas sob sulfato de sódio anidro (Ecibra®), tendo sido concentradas à pressão reduzida, em evaporador rotatório, até a secura.

Determinaram-se as massas dos alcalóides totais (AT) que foram, posteriormente, conservados em frascos hermeticamente fechados, ao abrigo da luz. O processo de obtenção dos AT foi esquematizado na **Figura 18**.

Figura 18– Esquema geral de obtenção dos alcalóides totais de *Annona coriacea* Mart.

4.2.3 Obtenção do óleo volátil

O óleo volátil foi obtido por hidrodestilação de 260,4 g de folhas secas em aparelho de Clevenger, por 4 horas (Farmacopéia Brasileira, 1988). O óleo volátil foi seco com sulfato de sódio anidro e conservado ao abrigo da luz e umidade. Previamente à extração, as folhas foram trituradas com auxílio de gelo seco em blender (Ametek®-36BL54-18.000 rpm) por 3 min. Determinou-se o rendimento (m/m), tendo sido transferido para vidro âmbar e conservado em refrigerador (15°C).

4.2.4 Análises cromatográficas

4.2.4.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises dos AT, de frações (amostras) destes e do óleo volátil, por cromatografia em camada delgada (**CCD**), foram realizadas, empregando placas de vidro (8x 15 cm) preparadas com sílica gel 60 GF₂₅₄ (Merck®) (300µm). Após o desenvolvimento cromatográfico, as placas foram visualizadas à luz UV (254 e 366 nm) e reveladas com reativo de Dragendorff (WAGNER & BLADT, 1996). As amostras foram solubilizadas em metanol (1mg/mL) e o volume aplicado variou de 120-200 µL/ placa. Os solventes empregados foram *n*-hexano, diclorometano e metanol (Labsynth®), tendo sido destilados. As fotografias dos cromatogramas foram obtidas com câmara Cyber-Shot (Sony®)-10.1 Mpixels e as escalas tiveram as mesmas condições óticas.

4.2.4.2 Cromatografia em camada delgada preparativa (CP)

O fracionamento por cromatografia em camada delgada preparativa (**CP**), foi realizado em placas cromatográficas de vidro (20 x 15 cm) preparadas com sílica gel 60 PF₂₅₄ (500µm). Os solventes empregados foram os mesmos utilizados na CCD (**item 4.3.1**), além de tolueno e clorofórmio. Nos sistemas eluentes foram empregados, ainda, ácido nítrico e propanona.

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

As análises, por CG-EM, foram realizadas, na Divisão de Fitoquímica do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) da Unicamp, sob a supervisão da Pesquisadora Dra. Carmen Lucia Queiroga.

4.2.4.3.1 Alcalóides e frações

Foram analisadas frações provenientes do fracionamento biomonitorado dos alcalóides totais (AT) de folhas (**S10 e S11**) e os AT de caule.

Os alcalóides e frações foram previamente solubilizados em diclorometano, à concentração de 20mg/mL. Posteriormente, foram centrifugados (4000 rpm), por 4 min., filtrados e agitados em sonificador, por 1 min.

As análises foram efetuadas em cromatógrafo a gás Agilent HP-6890, equipado com coluna HP-5MS (5% fenilmetilpolisiloxano) (30m x 0,25mm x 0,25 μ m i.d. e filme fino 0,1 μ m) (J&W Scientific®) acoplada ao espectrômetro de massas Agilent HP-5975, com ionização por impacto de elétrons (IE) de 70 e⁻V, com base nas condições empregadas.

As temperaturas do injetor e do detector foram de, respectivamente, 280°C e 300°C. A programação da temperatura na coluna variou de 80 até 280°C (40 min), à razão de aquecimento de 10°C/ min, temperatura da fonte de íon de 200 °C. O tempo de aquisição foi de 1-40 min, com intervalo de 0,5 s, no modo scan. O volume injeção foi de 1 μ L e split de 1/20. A faixa de massa/carga considerada foi 29-400 m/z . Utilizou-se Hélio como gás de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min.

Os mesmos procedimentos foram seguidos para o padrão de boldina (Sigma-Aldrich®), empregado como referência interna.

Nos cromatogramas das amostras dos alcalóides de *A.coriacea* foram considerados somente os picos referentes às substâncias nitrogenadas. Tendo-se constatado a presença de alcalóides, a caracterização foi efetuada, com base na comparação de seus espectros de massas com os bancos de dados do aparelho (**NIST, 2005**) e da literatura (TOMITA et al., 1965; OHASHI et al., 1963). Os índices de retenção (IR) foram determinados com base em série homóloga de *n*-alcanos (**ADAMS, 2007**).

4.2.4.3.2 Óleo volátil

O óleo volátil das folhas (20 mg) foi solubilizado, em diclorometano p.a., à concentração de 12 mg/mL.

A análise foi realizada no mesmo equipamento e em condições idênticas às aquelas descritas no item 4.2.4.3.1, exceto em relação à programação de temperatura, tendo-se baseado no procedimento modificado de MAGGI et al (2009). As análises foram realizadas com ionização por impacto de elétrons (IE). As temperaturas do injetor e do detector foram de, respectivamente, 220°C e 250°C. A temperatura da coluna variou de 60 a 240°C, à razão de 3°C/ min, tendo permanecido por 40 min, na temperatura final.

As análises foram realizadas, nas mesmas condições do óleo volátil, com os padrões de *E*-cariofileno, α -humuleno e β -pineno (Sigma-Aldrich®).

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

4.2.5 Fracionamento biomonitorado dos AT de folha

Os alcalóides totais (AT) das folhas de *A. coriacea* foram testados quanto à atividade antileishmania *in vitro*, frente às formas promastigotas de *L. chagasi*. Confirmada a atividade leishmanicida, constatada em estudo anterior (TEMPONE et al, 2005), procedeu-se ao fracionamento.

Cerca de 5,2 g de AT foram submetidos à cromatografia em coluna, em 8 etapas, partindo-se de alíquotas de massas variando de 0,85 a 1,2 g. As alíquotas foram solubilizadas, previamente, em diclorometano (2-5 mL), e homogeneizadas com cerca de 3 g de sílica gel 60 para coluna (0,063-0,200 mesh- ASTM, Merck®). Após a evaporação do solvente, os AT foram depositados sobre o mesmo adsorvente, previamente, empacotado (182,1 g) em coluna de vidro (h: 1 m, $\emptyset$: 3,5 cm). Em seguida, realizou-se a eluição com os seguintes solventes e/ou misturas, sucessivamente: *n*-hexano , *n*-hexano-diclorometano [30% , 70 %], diclorometano , diclorometano-metanol [1% , 2%, 3% , 4%, 5% , 7%, 10% , 15%, 30%, 50% metanol) e metanol. Foram coletadas 15 frações (**ACORI 1-ACORI 15**)

(Figura 19, **ORGANOGRAMA 1**) de 300 mL, que foram concentradas à secura, à pressão reduzida, em evaporador rotatório, com determinação da massa (mg) (**ANEXO A**). As frações provenientes das 8 etapas de fracionamento foram analisadas, por CCD (**item 4.3.4.1**), empregando diclorometano-metanol (95:5), tendo sido reunidas aquelas de comportamento cromatográfico semelhante. Posteriormente, as frações foram submetidas aos ensaios *in vitro* (**Figura 19**). As frações **ACORI 10** e **ACORI 11** passaram por etapas adicionais de fracionamento (**Figura 19**).

4.2.5.1 Fração ACORI 10

A fração bioativa (**Tabela 19**) **ACORI 10** (488,5 mg) foi fracionada (**Figura 19**), em coluna cromatográfica de vidro, nas mesmas condições descritas para os AT (**item 4.2.5**), tendo-se empregado, sucessivamente, eluentes constituídos de: *n*-hexano (mL), *n*-hexano-diclorometano [30%), (70%) diclorometano), diclorometano, diclorometano-metanol [1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20% metanol] e metanol. Foram obtidas 12 frações de 150 mL, denominadas **ACORI10/1** a **ACORI10/12** e concentradas à secura, sob pressão reduzida, em evaporador rotatório. Na análise das frações, por CCD [fm: diclorometano:metanol (96:4)], **ACORI10/7** (89,1 mg) apresentou reação Dragendorff positiva e foi fracionada em coluna cromatográfica de vidro (h:0,8 m, Ø: 2,5 cm), empacotada com o mesmo adsorvente (100,1 g), anteriormente descrito (**item 3.2.5**). O preparo da amostra e a sequência de eluentes foram idênticos à fração **ACORI10**, sendo que o volume das 15 frações coletadas foi de 100 mL, tendo sido denominadas **ACORI10/7/1- ACORI10/7/15** (**Figura 19**).

As frações **ACORI10/7/5** e **ACORI10/7/6** apresentaram comportamento cromatográfico semelhante [fm: diclorometano-metanol (95:5)] e reação Dragendorff positiva, tendo sido reunidas, na fração **ACORI10/7/5-6** (33,6 mg), que foi submetida à purificação, por CP (**item 4.2.4.2**), empregando sistema de solventes constituído de tolueno-clorofórmio-metanol-ácido nítrico (0,02M) (5:90:4:1).

A subfração resultante, que reagiu com o reativo de Dragendorff, foi denominada S10 (8,8 mg) e, em seguida, testada *in vitro*, frente às formas promastigotas de *L. chagasi* (**item 4.2.6.1**) e analisada por CG-EM (**item 4.2.4.3.1**).

4.2.5.2 Fração ACORI 11

A fração bioativa (**Tabela 19**) **ACORI11** (436,5 mg), foi submetida à cromatografia em coluna de vidro, sob condições idênticas às aquelas utilizadas para a fração **ACORI10** (**item 4.2.5.1**), sendo que as 12 frações originadas, foram denominadas **ACORI11/1** a **ACORI11/12** (**Figura 18**). Na análise, por CCD (fm: diclorometano-metanol (98:2)), a fração **ACORI11/8** (50,1 mg) apresentou reação Dragendorff positiva e passou-se à etapa adicional de fracionamento em coluna cromatográfica, utilizando as mesmas condições empregadas para a fração **ACORI10/7** (**item 4.2.5.1**), tendo resultado em 15 frações denominadas **ACORI11/8/1** a **ACORI11/8/15**. A análise por CCD [fm: diclorometano-metanol (95:5)], revelou semelhança de perfis entre as frações **ACORI11/8/1** a **ACORI11/8/4**, **ACORI11/8/5** a **ACORI11/8/6** e **ACORI11/8/7** a **ACORI11/8/15**, tendo sido reunidas em três maiores. A fração reunida **ACORI11/8/5-6** apresentou reação Dragendorff positiva, tendo-se procedido à purificação, por CP (**item 4.2.4.2**) [fm: tolueno-diclorometano-propanona-metanol (5:80:10:5)]. A fração resultante, que reagiu com Dragendorff, foi denominada S11 (8,2 mg), tendo sido submetida aos testes *in vitro* (**item 3.2.6.1**) e, analisada por CG-EM.

4.2.6 Avaliação da atividade antiprotozoária *in vitro*

Os ensaios para a avaliação da atividade leishmanicida e tripanocida *in vitro* foram realizadas no Laboratório de Parasitologia, do Instituto Adolfo Lutz, SP, pela equipe do Pesquisador Dr. André G. Tempone.

4.2.6.1 Avaliação da atividade leishmanicida dos AT e das frações alcalóidicas

A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos alcalóides totais (AT) de folha e de caule e das frações daqueles de folhas de *A. coriacea* orientou etapas do fracionamento biomonitorado dos alcalóides (**item 4.2.5**).

Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) foram cultivadas em meio M-199, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,25% de hemina, à temperatura de 24°C, sem a adição de antibióticos.

Avaliação da viabilidade dos parasitas frente aos alcalóides

Os alcalóides totais de folhas e de caule, as frações alcaloídicas [S10 e S11-1] de folha e a pentamidina (fármaco de referência) foram solubilizados em metanol p.a. e, posteriormente, diluídos no meio M-199.

Os AT (folha e caule) e as frações alcaloídicas de folha foram testados, em duplicata, à concentração de 200 µg/mL, frente às formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (1×10^6 /poço), em placas de 96 poços contendo meio M-199. Em seguida, realizou-se a incubação em estufa, a 24°C, por 24 horas (TEMPONE et al. 2005), após a qual foi feita a contagem dos parasitas viáveis por observação ao microscópio ótico.

Os controles foram realizados em poços contendo pentamidina, poços sem as formas promastigotas (0% de sobrevivência), poços contendo promastigotas incubadas com meio M-199 (100% de sobrevivência) e poços com metanol, à proporção máxima utilizada de 0,05% (v/v), em relação ao volume total do poço, conforme utilizado na solubilização dos alcalóides.

Calculou-se a porcentagem média de mortes das formas promastigotas causadas pelos AT e frações.

Testes *in vitro* - formas promastigotas de *Leishmania* (L.)

100% morte

Figura 19 – Organograma do Fracionamento biomonitorado dos alcalóides totais de folha de *Annona coriacea*

4.2.6.2 Determinação da Concentração Efetiva de 50% (CE₅₀) do óleo volátil

A concentração que causou a morte de 50% dos parasitas testados (CE₅₀) foi determinada para o óleo volátil de *A.coriacea*, frente às formas promastigotas de quatro espécies de *Leishmania* e às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi* (MHOM/BR/1972/LD), *L. (L.) amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *L. (L.) major* (MHOM/1L/80/Fredlin) e *L. (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903) foram cultivadas de forma idêntica àquela descrita, no item 4.2.6.1.

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y) foram mantidas em células LLC-MK2 (células renais de macacos *Rhesus*) (ATCC CCL 7), em meio RPMI-1640 suplementado com 2% de soro fetal bovino, à 37°C.

Determinação das CE₅₀ frente às formas promastigotas e tripomastigotas

O óleo volátil das folhas de *A.coriacea* foi solubilizado em metanol p.a. e, posteriormente, diluído no meio M-199 (sem vermelho de fenol), até a máxima concentração de 500 µg/mL. e aplicado às placas de 96 poços. As formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major* e *L. (V.) braziliensis* foram transferidas para os poços (1x10⁶ parasitas/poço).

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram aplicadas (1x10⁶ parasitas/poço), em placas de 96 poços, com meio RPMI-1640 (sem vermelho de fenol).

Em seguida, as microplacas contendo as formas promastigotas e tripomastigotas foram incubadas a, respectivamente, 24 °C e a 37 °C, sob atmosfera de 5% de CO₂, por período de 24 horas.

A viabilidade dos parasitas foi determinada por meio do ensaio colorimétrico com o sal solúvel de tetrazólio - MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] (TADA et al., 1986 TEMPONE et al, 2005). Os parasitas foram incubados, por 4 horas, com 20 µL de MTT (5 mg/mL) e, posteriormente, foi extraída a formazana, com a adição de 100 µL/poço de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% (v/v) e incubação a 24°C, por 18 h.

As microplacas foram transferidas para o leitor de placas do espectrofotômetro Multiskan MS (Uniscience), onde foram realizadas as leituras do sobrenadante, a 550 nm. Como controles do ensaio, foram utilizados poços contendo os fármacos de referência pentamidina e benzonidazol, poços sem parasitas (0% de sobrevivência) e poços contendo parasitas incubados somente com meio de cultura (100% de sobrevivência).

Análise estatística

As CE_{50} das substâncias analisadas foram determinadas por meio de curvas dose-resposta sigmoidais, utilizando-se o software Graph Pad Prism 5.0. Os intervalos de confiança 95% e respectivos coeficientes lineares foram analisados. As diferenças entre amostras foram comparadas com os fármacos de referência (pentamidina e benzonidazol) e avaliadas, estatisticamente, por meio dos valores de p com base em dois.

5 RESULTADOS

5.1 Estudo químico

5.1.1 Rendimentos do extrato etanólico e dos alcalóides totais

O rendimento dos extratos etanólicos (70%, v/v) de folha e de caule, a partir dos quais foram obtidos os alcalóides totais, posteriormente analisados, foram dispostos, na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Rendimentos do extrato etanólico dos alcalóides totais de folha e de caule de *Annona coriacea* Mart.

<i>Annona coriacea</i> Mart.					
Órgão vegetal	Droga* (Kg)	Extrato etanólico		Alcalóides Totais	
		Massa (g)	rendimento % m/m)	massa (g)	rendimento % (m/m)
folha	1,3	325,0	25,0	5,2	0,40
caule	0,5	52,50	10,5	0,75	0,15

Droga*: material pulverizado

5.1.2 Rendimentos em alcalóides totais por período de um ano

Os rendimentos em alcalóides totais de folha e de caule de *A. coriacea*, no período de junho de 2007 a maio de 2008, encontram-se na **Tabela 16**. Em folhas, os rendimentos foram ligeiramente maiores, tendo variado de 0,08 a 0,31% (m/m) e, nos caules, de 0,06 a 0,26% (m/m), sendo que o máximo de rendimento não se deu, nos mesmos meses, para os dois órgãos.

Tabela 16 - Rendimentos de alcalóides totais (AT) (% m/m) em folhas e caules de *Annona coriacea* Mart., no período de junho de 2007 a maio de 2008

<i>Annona coriacea</i> Mart			
AT			
(% m/m)			
ano	mês	folha	caule
2007	06	0,10	0,15
	07	0,08	0,08
	08	0,28	0,30
	09	0,40	0,38
	10	0,10	0,10
	11	0,10	0,12
	12	0,19	0,12
2008	01	0,31	0,12
	02	0,08	0,06
	03	0,10	0,11
	04	0,17	0,10
	05	0,13	0,10

mês: 01-12: janeiro-dezembro

5.1.3 Teor de óleo volátil

O teor de óleo volátil nas folhas de *A. coriacea* Mart. foi de 0,05 % (m/m).

5.1.4 Perfil cromatográfico dos alcalóides totais de folha e de caule, em CCD

Nas **Figuras 20** e **21** apresentaram-se, respectivamente, os cromatogramas referentes aos alcalóides totais de folha e de caule de *A. coriacea*. Os sistemas de solventes foram constituídos de diclorometano e metanol. A separação mais adequada dos alcalóides

foi obtida, com proporção maior de metanol (10%, v/v) para caule, em relação aquela de folha (5%, v/v).

Figura 20 –Cromatogramas dos alcalóides totais de *Annona coriacea*, folha - fm: diclorometano-metanol (95:5), **20A** -visualização sob luz UV: λ 366nm. **20B** – Revelação com reativo de Dragendorff

Figura 21 – Cromatogramas dos alcalóides totais de *Annona coriacea*, caule - fm: diclorometano-metanol (90:10), **21A** - visualização sob luz UV: λ 366nm. **21B** – Revelação com reativo de Dragendorff

5.1.5 Perfil cromatográfico do óleo volátil, em CCD

O cromatograma do óleo volátil de folha de *A. coriacea*, que melhor representou o perfil dos constituintes do mesmo, foi obtido com *n*-hexano-diclorometano (1:1) e encontra-se registrado na **Figura 22**. Constatou-se a presença de manchas correspondentes aos padrões utilizados de *E*-cariofileno (R_f : 0,94), α -humuleno (R_f :0,42) e β -pineno (R_f :0,69) (**Figura 22**).

Figura 22 - Cromatograma do óleo volátil de folha de *A. coriacea*. padrões: **car:** *E*-cariofileno (R_f :0,94), **hum:** α -humuleno (R_f :0,42), **pin:** β -pineno (R_f :0,69) [fm: *n*-hexano-diclorometano (1:1) -revelação: anisaldeído sulfúrico]

5.1.6 Composição do óleo volátil de folha de *A. coriacea*

O cromatograma do óleo volátil, obtido por hidrodestilação das folhas frescas de *A. coriacea*, foi disposto na **Figura 23**. A (**Tabela 17**) apresenta os principais compostos identificados (60), sendo que 16 não o foram e cinco foram traços (<0,1%).

Figura 23 – Cromatograma do óleo volátil obtido das folhas frescas de *A.coriacea* obtido, por CG, sob condições cromatográficas descritas no item 4.2.4.3.2. identificados na Tabela 17

Os constituintes identificados, no óleo, foram terpenos das classes dos sesquiterpenos e monoterpenos.

Os sesquiterpenos foram os compostos predominantes (76,7%), sendo que o biciclogermacreno (35) foi o componente majoritário (39,8%). Outros sesquiterpenos, que mostraram teores significativos, no óleo, foram: γ -muuroleno (31) (7,9%), δ -cadineno (38) (6,0%), *E*-cariofileno (20) (4,9%), espatulenol (44) (4,2%), α -patchouleno (27) (2,7%), hidrato de sesquisabineno (45) (2,47%) e α -humuleno (25) (2,4%) (**Tabela 17**).

Em relação aos monoterpenos, os compostos de maior abundância foram: β -pineno (3) (1,6%), pseudolimoneno (5) (1,6%) e β -cis-ocimeno (6) (1,2%) (**Tabela 17**). Os demais constituintes, apresentaram abundância inferior a 1%, tendo representado 78,6% dos componentes desta classe.

As soluções dos padrões de *E*-cariofileno, α -humuleno e de β -pineno confirmaram a identidade dos componentes do óleo volátil, cujos dados cromatográficos e espectrais (CG-EM) mostraram-se compatíveis.

Tabela 17 – Composição química (%) do óleo volátil de *A.coriacea*

Pico	Composto	IR ^a	%
1	α -tujeno	933	0,69
2	sabineno	973	tr
3	β -pineno ^b	977	1,60
4	mirceno	992	0,17
5	pseudolimoneno	1000	1,59
6	β -cis-ocimeno	1036	0,18
7	β -trans-ocimeno	1047	0,41
8	nonanal	1105	0,11
9	verbenona	1199	0,14
10	β -ciclocitral	1219	0,14
11	δ -elemeno	1335	0,21
12	bezil-butanoato	1344	0,23
13	α -cubebeno	1348	tr
14	ciclosativeno	1362	0,25
15	α -ylangeno	1373	1,73
16	β -bourboneno	1382	1,61
17	α -isocomeno	1388	0,39
18	β -elemeno	1390	0,74
19	β -isocomeno	1406	0,29
20	<i>E</i> -cariofileno ^b	1417	4,92
21	α -guaiano	1426	0,42
22	gurjuneno	1435	0,47
23	aromadendreno	1441	0,16
24	seicheleno	1447	0,16
25	α -humuleno ^b	1450	2,40
26	trans-prenil-limoneno	1452	0,24
27	α -patchouleno	1457	2,71
28	ageratocromeno	1463	0,37
29	carota-1,4-dieno	1471	0,18

Tabela 17 – continuação

Pico	Composto	IR ^a	%
30	10 β -h-cadina-1,6,4dieno	1475	0,74
31	α -muuroleno	1479	7,89
32	α -amorfeno	1483	0,15
33	trans- β -ionona	1485	0,43
34	β -selineno	1489	0,18
35	biciclogermacreno	1497	39,83
36	acifileno	1503	0,65
37	δ -amorfeno	1511	0,58
38	δ -cadineno	1522	6,03
39	zonareno	1529	tr
40	α -calacoreno	1540	0,12
41	selina-3,7,11-dieno	1548	tr
42	eremophila cetona	1563	0,35
43	cis-3-hexenilbenzoato	1569	0,12
44	espatulenol	1574	4,20
45	Hidratode esquisabineno	1580	2,47
46	globulol	1588	1,05
47	viridiflorol	1590	0,29
48	rosifoliol	1598	0,81
49	etanona	1605	0,25
50	β -oplopenona	1608	0,29
51	4a(2h)-naftalenol	1625	0,58
52	isocedrenona	1631	tr
53	epóxido de aloaromadendreno	1635	0,90
54	α -epi-cadinol	1638	1,37
55	hisenol	1643	0,48
56	β -eudesmol	1646	1,09
57	α -eudesmol	1649	0,98
58	α -cadinol	1651	1,59
59	α -betulenol	1666	0,28
60	kusinol	1652	0,27

Componentes identificados com base no IR e CG-EM e listados de acordo com a ordem de eluição na coluna HP-5MS (30m). IR^a: Índice de Retenção, baseado em série homóloga de n-alcanos, ^b: solução padrão analisada para confirmar a identidade, **tr**: traços (< 0,1 %)

5.1.7 Caracterização dos alcalóides de folha e de caule

Os cromatogramas e espectros de massas das frações alcaloídicas de folha e dos AT de caules de *A. coriacea* foram apresentados nos itens **5.1.7.1** e **5.1.7.2**.

Ao final deste item, foram sintetizados os resultados das análises, por CG-EM, na **Tabela 18**.

5.1.7.1 Frações alcaloídicas de folhas

Na análise das frações alcaloídicas de folha de *A. coriacea*, por CG-EM, foram selecionados e caracterizados, somente, os picos referentes aos alcalóides.

5.1.7.1.1 Fração S10

No cromatograma da fração **S10** (8,8 mg) foi caracterizado 1 único pico de alcalóide (**Figura 24**). A obtenção desta fração foi esquematizada na **Figura 18** (item **4.2.5.1**).

Figura 24 - *A. coriacea* Mart. Cromatograma da fração alcaloídica **S10** de folha [T_R : 20,3 min: estefarina]

No espectro de massas do pico no tempo de retenção T_R : 20,3 min (**Figura 25**), observaram-se os seguintes íons: 297 , 296 , 268 , 253 , 237, 225, tendo demonstrado padrão de fragmentação idêntico àquele do espectro de massas do alcalóide proaporfínico estefarina (**Figura 26**) (NIST,2005; TOMITA et al., 1965).

Figura 26 - Estrutura química da estefarina

Figura 25- *A. coriacea* Mart. - Espectro de massas da fração alcaloídica **S10** de roina - Pico em T_R :20,3 min (estefarina)

5.1.7.1.2 Fração S11

No cromatograma da fração **S11** (8,2 mg), obtida conforme a **Figura 18** (item **4.2.5.2**), foi caracterizado 1 pico de alcalóide (**Figura 27**).

Figura 27 - *A.coriaceae* Mart. - Cromatograma da fração alcaloídica **S11** de folha [T_R : 19,1 min: nornuciferina]

Figura 29 - Estrutura química da nornuciferina

No espectro de massas do pico no tempo de retenção T_R : 19,1 min (**Figura 28**) observaram-se os seguintes íons: 281, 280, 266, 252, 250, 237, 221, 178, 165, 152, sendo padrão de fragmentação idêntico àquele encontrado no espectro de massas da aporfina nornuciferina (**Figura 29**) (NIST,2005; OHASHI et al., 1963).

Figura 28- *A.coriacea* Mart. - Espectro de massas da fração alcaloídica **S11** de folha - Pico em T_R :19,1 min (nornuciferina)

5.1.7.2 Alcalóides totais de caule

Na análise dos alcalóides totais de caule de *A. coriacea*, por CG-EM, foram selecionados e caracterizados, somente, os picos referentes aos alcalóides.

A partir do cromatograma dos alcalóides totais de caule foram caracterizados 3 picos de alcalóides (**Figura 30**). O cromatograma do padrão de boldina foi apresentado, na **Figura 37**.

Figura 30 - *A.coriacea* - Cromatograma dos alcalóides totais de caule [T_R : 13,2 min: asimilobina, T_R :14,0 min: pronuciferina, T_R :17,0 min: boldina]

Os espectros de massas dos picos nos tempos de retenção T_R : 13,2 min (**Figura 32**), T_R : 14,0 min (**Figura 34**), T_R : 17,0 min (**Figura 36**) apresentaram o mesmo padrão de fragmentação observado, respectivamente, nos espectros de massas dos alcalóides: asimilobina [267, 266, 252, 238, 236, 224, 206, 178, 152, 127, 103] (**Figura 31**) (NIST, 2005; CHEN-LOUNG et al., 1976), pronuciferina [311, 310, 296, 282, 267, 253, 224] (**Figura 33**) (NIST, 2005; TOMITA et al., 1965) e boldina [327, 326, 312, 296, 285, 284, 264, 236, 224, 204, 176] (**Figura 35**) (NIST, 2005; OHASHI et al., 1963).

Figura 31 - Estrutura química da asimilobina

Figura 32- *A.coriacea* Mart. Espectro de massas dos alcalóides totais de caule - Pico em T_R :13,2 min (asimilobina)

Figura 33 - Estrutura química da pronuciferina

Figura 34- *A.coriacea* Mart. Espectro de massas dos alcalóides totais de caule - Pico em T_R :14,0 min (pronuciferina)

Figura 35 - Estrutura química da boldina

Figura 36- *A. coriacea* Mart. Espectro de massas dos alcalóides totais de caule - Pico em T_R : 17,0 min (boldina)

O cromatograma do padrão de boldina foi disposto na **Figura 37**. O espectro de massas de boldina apresentou o mesmo padrão de fragmentação (**Figura 36**) do pico no tempo de retenção 17 min., observado no cromatograma dos alcalóides totais de caules de *A. coriacea* (**Figura 30**), confirmando, a presença da boldina, nos AT de caule.

Figura 37 - Cromatograma do padrão de boldina [T_R :17,1 min]

Na **Tabela 18**, foram resumidos os resultados das análises, por CG-EM, referentes aos alcalóides caracterizados em folhas e em caules.

Tabela 18 - Alcalóides isoquinolínicos caracterizados, por CG-EM e porcentagem, nas frações **S10** e **S11** de folhas e nos alcalóides totais (AT) de caules de *A. coriacea* Mart.

Fração/AT	alcalóide	IR	%	Ions (m/z)
FOLHA				
S10	estefarina	1350	9,86	297*,296,268,253,237,225
S11	nornuciferina	1321	32,10	281*,280,266,252,250,237,221,178 165,152
CAULE				
AT	asimilobina	1088	6,93	267*,266,252,238,236,224,206,178,152, 127,103
	pronuciferina	1099	2,35	311*,310,282,268,253,225
	boldina ^a	1271	4,81	327*,326,296,284,264,236,232,221,204, 176

AT: alcalóides totais. Condições analíticas CG-EM segundo o item 4.2.4.3.1, **IR:** índice de retenção, baseado em série homóloga de n-alcenos, **%:** intensidade relativa (cromatograma), ^a: solução-padrão (**boldina**), analisada nas mesmas condições dos AT. *: íon molecular

5.1.8 Atividade antiprotozoária *in vitro*

Os resultados da avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos alcalóides totais (AT) de folha e de caule de *A. coriacea* e das frações originadas do fracionamento biomonitorado de *A. coriacea* bem como dos AT, obtidos ao longo de um ano, e as concentrações efetivas do óleo volátil frente às formas promastigotas de quatro espécies de *Leishmania* e às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram apresentados, a seguir.

5.1.8.1 Atividade leishmanicida dos alcalóides totais de folha e de caule e frações alcaloídicas de folha de *A. coriacea*

A **Tabela 19** mostra os dados de viabilidade das formas promastigotas de *L. chagasi* frente aos alcalóides totais de folha e de caule e das frações alcaloídicas obtidas no fracionamento biomonitorado (**Figura 19**) dos alcalóides totais de *A. coriacea*.

Tabela 19 – Atividade leishmanicida *in vitro* (%morte) dos alcalóides totais (AT) de folha e de caule e das frações alcaloídicas de folhas de *A. coriacea* Mart. frente às formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* [MHOM/BR/1972/LD]

<i>A. coriacea</i> AT (frações) (200 µg/ml)	<i>Leishmania (L.) chagasi</i> % morte
folha/caule	100
1	0
2	0
3	0
4	100
5	0
6	0
7	0
8	100
9	100
10	100
11	100
12	100
13	0
14	0
15	0
ACORI10/1/7/5-6	100
S10	100
S11	100

AT*:alcalóides totais de *A. coriacea* provenientes das coletas de junho de 2007 (folha) e setembro de 2008 (caule) e submetidos às análises por CG-EM

5.1.8.2 Atividade leishmanicida dos alcalóides totais de folha e de caule de *A. coriacea* durante período de um ano

Os resultados da avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos AT de folhas e caules de *A. coriacea*, no período de junho de 2007 a maio de 2008, frente às formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*, encontram-se na **Tabela 20**.

Os alcalóides totais de folha causaram 100% de morte dos parasitas, exceto quando obtidos de material vegetal coletado no mês de junho, quando a atividade foi reduzida para 50%. Enquanto que os alcalóides totais de caule chegaram a ser inativos quando obtidos de material coletado em setembro e, no mês de agosto, a percentagem de morte foi superior a 50% (**Tabela 20**).

Tabela 20 - Atividade leishmanicida *in vitro* (% morte) dos alcalóides totais (AT) de folha e de caule de *A. coriacea* Mart., coletados no período de junho de 2007 a maio de 2008, frente às formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* [MHOM/BR/1972/LD]

		<i>Leishmania (L.) chagasi</i>	
		% morte	
coleta		<i>A. coriacea</i> * AT	
ano	mês	folha	caule
2007	junho	50	100
	julho	100	100
	agosto	100	>50
	setembro	100	0
	outubro	100	100
	novembro	100	100
	dezembro	100	100
2008	janeiro	100	100
	fevereiro	100	100
	março	100	100
	abril	100	100
	maio	100	100

* concentração-teste: 200 µg/mL

5.1.8.3 Concentração efetiva de 50% (CE₅₀) do óleo volátil de *A.coriacea* frente a *Trypanosoma cruzi* e quatro espécies de *Leishmania*

As concentrações efetivas que causaram a morte de 50% (CE₅₀) das formas tripomastigotas de *T.cruzi* e das formas tripomastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis*, *L.(L.) braziliensis* e *Leishmania* (L.) *chagasi* foram dispostas na **Tabela 21**.

Os resultados mostraram que o nível de atividade do óleo volátil de *A. coriacea* foi decrescente em relação às formas promastigotas das diferentes espécies de *Leishmania*, na seguinte seqüência: *L. chagasi* (CE₅₀: 39,93 µg/mL), *L.(L.) amazonensis* (CE₅₀: 160,2 µg/mL), *L.(L.) braziliensis* (261,2 µg/mL) e *L.(L.) major* (305,2 µg/mL) (**Tabela 21**). O óleo volátil mostrou-se ativo, igualmente, frente aos tripomastigotas de *T. cruzi* (CE₅₀: 168,5 µg/mL) (**Tabela 21**).

Tabela 21 – Concentrações efetivas de 50% (CE₅₀) do óleo volátil de *A.coriacea* Mart. frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (cepa Y) e às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* (WHO/BR/00/LT0016), *L. (V.) braziliensis* (MHO/BR/75/M2903) *L. (L.) chagasi* (MHOM/BR/1972/LD) e *L. (L.) major* (MHOM/1L/80/Fredlin)

	EC ₅₀ : µg/mL (95% CI)				
	formas promastigotas				formas tripomastigotas <i>T. cruzi</i>
	<i>L.(L.) amazonensis</i>	<i>L.(L.) braziliensis</i>	<i>L.(L.) chagasi</i>	<i>L.(L.) major</i>	
<i>A.coriacea</i> óleo volátil*	160,2 (117,70 a 218,10)	261,2 (179,50 a 380,10)	39,93 (28,00 a 56,95)	305,2 (189,20 a 492,30)	168,5 (99,10 a 286,60)
fármaco de referência					
pentamidina**	0,16 (0,15 a 0,16)	0,06 (0,05 a 0,06)	0,22 (0,17 a 0,27)	0,16 (0,15 a 0,18)	-
benznidazol***	-	-	-	-	45,02 (29,31 a 68,42)

CE₅₀ : concentração efetiva 50%; 95% CI= intervalo de confiança de 95%; (*)concentração- teste: 500 µg/mL,(-): não determinado

6 DISCUSSÃO

Considerando o grave quadro das doenças negligenciadas, que incapacitam ou levam à morte 350 milhões de pessoas por ano, no mundo (OSORIO et al., 2008), bem como as numerosas limitações e a toxicidade dos medicamentos convencionalmente empregados, no seu tratamento (CRAGG & NEWMAN, 2007) torna-se urgente a pesquisa de novos fármacos, mais acessíveis, mais facilmente administrados e, sobretudo, mais seguros.

Atualmente, uma das estratégias mais empregadas na busca de novos fármacos é a investigação de espécies vegetais, que possam ser fonte de novas moléculas bioativas a serem empregadas como modelos na sua obtenção. Nos últimos anos, os alcalóides isoquinolínicos têm demonstrado atividade antiprotozoária (CAMACHO et al., 2003), sendo matéria de estudo do grupo de pesquisa do qual se participou, particularmente, aqueles encontrados em espécies do gênero *Annona*.

Tendo em vista os estudos anteriores (FISCHER et al, 2004, TEMPONE et al, 2005), que apontaram para a espécie *A.coriacea* como sendo uma das mais promissoras, uma vez que os alcalóides totais demonstraram possuir significativas atividades antimalárica, antileishmania e antitrypanosoma *in vitro*, decidiu-se dar continuidade ao estudo, procurando caracterizar constituintes, possivelmente, responsáveis pela atividade constatada. Posteriormente, despertou-se o interesse em avaliar o potencial de atividade do óleo volátil da mesma espécie e tendo sido constatada, passou-se à determinação, igualmente inédita, da composição do mesmo.

A revisão bibliográfica referente à espécie selecionada para o estudo mostrou que, até o momento, não há registros de pesquisas anteriores abordando a composição da fração de alcalóides totais e do óleo volátil, o mesmo ocorrendo em relação à atividade antiprotozoária de seus respectivos constituintes.

O rendimento obtido em alcalóides totais, a partir de 1,3 Kg de folhas (massa seca) de *A.coriacea* (0,4% m/m) (**Tabela 15 - item 5.1.1**), coletadas na Reserva Ecológica de Águas de Santa Bárbara-SP, foi razoável, considerando trabalho anterior (0,5% m/m), no qual a mesma espécie foi coletada na Reserva de Mogi-Mirim, São Paulo (FISCHER et al, 2004).

O rendimento dos caules (0,5 Kg) foi, numericamente, inferior (0,15% m/m) (**Tabela 15-item 5.1.1**) ao de folha, entretanto, não há base comum de comparação, tendo em vista que, as coletas se deram em meses e épocas anuais distintas (**item 4.1**).

As diferenças no teor de metabólitos secundários e na composição química, em uma mesma espécie vegetal obtida de locais distintos, podem ser atribuídas às variações de temperatura, pH e composição do solo, microrganismos, altitude, entre outros fatores que interferem na sua biossíntese (OLIVEIRA et al., 2005; ROBBERS et al., 1996).

Em relação às outras espécies de *Annona*, os dados relativos ao teor de alcalóides totais são raros. E, os poucos, de que se tem registro, independentemente do órgão considerado, denotam discrepâncias notáveis entre os valores de rendimentos para espécies diferentes, como no caso de *A.squamosa* (ERDELYI, 2008), *A.hypoglauca* Mart. (RINALDI, 2007) e *A.crassiflora* (HOCQUEMILLER et al., 1982), que foram, respectivamente, de: 1,02 m/m (folhas), 0,28 m/m (caules) e 0,11% m/m (caules). No entanto, é mais provável que as determinações refiram-se aos rendimentos da extração, e não aos teores reais, e, neste caso, os diferentes graus de esgotamento da droga e procedimentos poderiam levar às variações observadas nos dados obtidos da literatura, entre as espécies diferentes de *Annona*.

As determinações mensais dos alcalóides totais foram realizadas nas folhas e caules de *A. coriacea* a partir, exclusivamente, de população restrita à Reserva Florestal de Águas de Santa Bárbara e considerando 3 exemplares. Ainda que se considere a amostragem restrita, estes dados permitiram verificar a ocorrência de diferenças quantitativas na produção destes metabólitos, nos dois órgãos vegetais, e conhecer os meses em que esta se encontrou favorecida.

De forma geral, tal informação é de utilidade na seleção do melhor período de coleta das espécies vegetais e do órgão vegetal mais rico em metabólitos, para a obtenção de maior rendimento final daqueles de interesse, sobretudo nos casos em que não são componentes majoritários no vegetal.

Em *Annona*, possivelmente, as rotas biossintéticas priorizadas sejam aquelas relacionadas à produção de acetogeninas, tendo em vista os rendimentos baixos

apresentados para a maioria daquelas de que se têm registros (HOCQUEMILLER et al., 1982, FISCHER et al, 2004, TEMPONE et al, 2005, RINALDI, 2007).

Muitas das limitações encontradas na busca pelo isolamento dos alcalóides de *A. coriacea*, por técnicas não instrumentais, conforme se realizou, estão associadas ao baixo teor de alcalóides totais. Além disto, as observações feitas ao longo do processo de fracionamento mostraram que os constituintes se encontraram em misturas complexas e, por sua vez, em baixa concentração, quando considerados de forma individualizada.

Na determinação dos rendimentos em alcalóides totais de folhas e de caules de *A. coriacea*, ao longo do período de um ano (**Gráfico 1, Tabela 16**), deve-se ressaltar que, os valores encontrados foram obtidos a partir dos 3 espécimes considerados em conjunto (“pool”).

Gráfico 1 - *A. coriacea* Mart. Variação mensal do rendimento em alcalóides totais

(AT) de folhas e de caules, no período de junho de 2007 a maio de 2008.

Os resultados permitiram verificar que, tanto folhas, quanto caules apresentaram a produção de alcalóides aumentada no mês de setembro (2007), quando foram observados os picos máximos de, respectivamente, 0,40 e 0,38%, m/m, no anual, **Gráfico 1**.

Adicionalmente, as folhas apresentaram outro pico de rendimento de alcalóides (0,31%,m/m), no mês de janeiro de 2008 (**Gráfico 1, Tabela 16**), não observado em caules.

Do ponto de vista da ecologia química, a produção de alcalóides está relacionada à proteção do vegetal (HARBORNE, 1993) sendo que, as épocas anuais em que se constatou o aumento destes metabólitos em *A. coriacea* mostrou-se compatível com os períodos em que, reconhecidamente, o vegetal necessitaria de maior proteção, isto é, verão e inverno. Tais observações vêm de encontro àquelas realizadas para *A. squamosa* L., por ERDELYI (2008).

Desta forma, no verão, com o aumento da intensidade dos raios UV, a planta torna-se mais vulnerável às patologias, uma vez que, com o aumento da transpiração há maior perda de água, o que estimularia a produção de alcalóides (WINK, 1993), sendo que os núcleos aromáticos presentes, em sua estrutura, absorvem a radiação que incide no vegetal. Enquanto que, no inverno, à necessidade de proteção estaria relacionada à falta de água, à baixa luminosidade e à perda das folhas e servindo de estímulo à biossíntese de alcalóides, para atuarem na defesa contra microrganismos e vírus (HARBORNE, 1993).

Os resultados quantitativos antecipam o interesse na realização da análise qualitativa para investigar as variações dos componentes alcaloídicos, ao longo do período de um ano. E, também, em estudo mais aprofundado, que envolva maior amostragem de exemplares de *A. coriacea*, além de análises comparativas de espécimes encontrados em diferentes localidades.

O perfil cromatográfico dos alcalóides totais das folhas e dos caules de *A. coriacea*, por CCD, demonstrou maior polaridade daqueles provenientes de caules em relação aos de folhas (Figuras 19 e 20). Os solventes empregados seguiram orientação convencional para as análises de alcalóides isoquinolínicos, tendo demonstrado separação adequada dos componentes (SIQUEIRA et al., 2001; COSTA et al., 2006). Segundo os cromatogramas obtidos (Figuras 19 e 20), os alcalóides totais dos dois órgãos vegetais analisados representam mistura complexa de componentes, em sua maioria alcaloídicos, tendo mostrado reação positiva com reativo de Dragendorff. A complexidade dos AT de *A. coriacea* foi confirmada, posteriormente, nas análises por CG-EM.

Apesar das técnicas analíticas avançadas existentes, a análise por CCD permanece como ferramenta rápida, versátil, sensível, barata e simples (HARBORNE, 1998), para a separação de constituintes nos estudos químicos e durante o processo de isolamento de constituintes. A OMS (WHO, 1998) reconhece-o como método valioso nas determinações

qualitativas e semi-quantitativas de amostras em pequenas quantidades, determinando que sejam obtidos os “fingerprints” (impressões digitais) das espécies vegetais de reconhecido uso farmacêutico, ou seja, os cromatogramas em CCD. No Brasil, tal procedimento está previsto pela legislação que regulamenta o registro de produtos fitoterápicos, desde 2004, quando a ANVISA elaborou a RDC Nº48 de 16 de março (BRASIL, 2004).

A avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos alcalóides totais de folha de *A.coriacea* foi confirmada, previamente, ao início do fracionamento (**Tabela 19**) e para os AT de caules foi comprovada, pela primeira vez (**Tabela 19**), ambos, tendo causado 100% de morte das formas promastigotas de *Leishmania* (L.)*chagasi in vitro*, à concentração de 200 µg/mL.

O mesmo nível de atividade foi mantido nas frações mais purificadas (**Figura 19**) (**Tabela 19**), confirmando *A.coriacea* como espécie promissora na obtenção de moléculas-protótipo de novos fármacos leishmanicidas, devendo-se prosseguir nas investigações em busca do isolamento dos alcalóides bioativos.

O processo de fracionamento e purificação de alcalóides é abrangente e complexo, tendo-se optado, a princípio, pelo trabalho com os AT de folha. O fracionamento monitorado (**Figura 19**), permitiu selecionar as frações alcaloídicas com maior potencial leishmanicida para as etapas posteriores de fracionamento e purificação. Nas fases mais adiantadas do processo de purificação, a seleção de subfrações baseou-se naquelas que apresentaram reação positiva frente ao reativo de Dragendorff (WAGNER & BLADT, 1996).

Nas etapas iniciais do fracionamento de alcalóides são empregadas, em geral, as formas promastigotas em função da facilidade de manutenção das culturas e do seu manuseio (QUEIROZ et al, 1996). É procedimento comumente seguido, no monitoramento da atividade leishmanicida *in vitro*. Adicionalmente, à medida que o fracionamento progride, as massas das frações resultantes são reduzidas, sendo da ordem de alguns microgramas o que torna, quase sempre, inviáveis os testes *in vivo*.

As dificuldades no isolamento e purificação de alcalóides isoquinolínicos de espécies do gênero *Annona* foram relatadas por SILVA e colaboradores (2007), envolvendo diversas etapas e requerendo o uso de equipamentos mais sofisticados.

No tocante ao gênero *Annona*, a variedade de classes de alcalóides isoquinolínicos presentes (**Tabelas 1 a 13**) torna difícil a separação dos constituintes, havendo interações moleculares entre os diferentes substituintes. Os métodos clássicos empregados na separação dos AT de *A. coriacea*, como CCD e cromatografia em coluna não são suficientemente sensíveis para possibilitar a resolução destas misturas complexas, bem como de constituintes de estruturas parecidas, que apresentam comportamento cromatográfico semelhante. Além disto, as subfrações que apresentam misturas complexas de alcalóides em baixa concentração e a possível ocorrência de alcalóides de núcleos não-isoquinolínicos (LEBOEUF et al, 1982; SHAMMA & RAHIMIZADEH, 1986; ZHOU et al., 2009), são fatores limitantes adicionais ao processo de isolamento.

Caracterização de alcalóides em folha e caule de *A. coriacea*

Nas análises, por CG-EM, das frações alcaloídicas de folhas e dos alcalóides totais de caules de *A. coriacea* a caracterização dos alcalóides foi realizada comparando-se os dados dos espectros de massas com as bibliotecas do aparelho, do banco de dados NIST (NIST, 2005) e com dados da literatura. No caso da boldina, foi possível a análise do padrão, uma vez que se encontrou disponível no comércio.

Na análise, por CG-EM, das frações mais purificadas de folha, obtidas e selecionadas para o fracionamento (**Figura 19**), foi possível verificar a presença de dois alcalóides. Na fração S10, caracterizou-se estefarina (**Figura 26**) (**Tabela 18**) e na fração S11; nornuciferina (**Figura 29**) (**Tabela 18**), alcalóides, respectivamente, proaporfínico e aporfínico.

Na análise dos alcalóides totais de caule, por CG-EM, três foram caracterizados, sendo eles: asimilobina (**Figura 31**), pronuciferina (**Figura 33**) e boldina (**Figura 35**) (**item 5.1.7.2**), apresentando, respectivamente, os núcleos aporfínico, proaporfínico e noraporfínico, em suas estruturas.

Considerando as frações dos alcalóides de folha, o fracionamento foi realizado, a partir das frações **ACORI 10** e **ACORI 11**, selecionadas entre as 6 ativas das 15 frações inicialmente obtidas (**Figura 18**), tendo causado 100% de morte das formas promastigotas de *L.chagasi* (**Tabela 19**) e estando entre aquelas de maior rendimento, visando à obtenção quantitativa de compostos purificados.

Após os diversos procedimentos (**item 4.2.5**), as frações resultantes S8 e S10 apresentaram massas reduzidas de, respectivamente, 8,8 e 8,2 mg e, tendo mantido o alto nível de atividade (100% morte das formas promastigotas) (**Tabela 19**), foram submetidas à análise por CG-EM, visando conhecer os componentes responsáveis pela atividade constatada.

Com as análises CG-EM, verificou-se que, apesar de terem passado por extenso processo de fracionamento e purificação, ambas as frações, apresentaram, numerosos picos, em seus cromatogramas (**Figuras 20 e 21**). E, havendo massa reduzida, o isolamento de componentes ficou inviabilizado. Os picos referentes aos compostos nitrogenados foram pesquisados e, confirmou-se a presença dos alcalóides que foram, então, caracterizados.

O perfil complexo das frações em fase adiantada de fracionamento, foi característica marcante das frações bioativas, indicando que, possivelmente, o efeito sinérgico de constituintes diversos, levou à significativa atividade observada. Considerando o método de obtenção da fração alcaloídica (**item 4.2.2**), é provável que compostos como geninas flavonoídicas e terpenos (ERDELYI, 2008; LEBOEUF et al., 1982; PRADO et al., 2008; FERREIRA et al., 2009), estivessem presentes, entre estes outros constituintes.

Igualmente, no fracionamento dos alcalóides de *A. hypoglauca*, RINALDI (2007) constatarem o alto grau de complexidade dos AT, sendo compatível com a diversidade em constituintes (LEBOEUF et al., 1982) e em classes alcaloídicas (**Tabelas 1 a 13**) presentes no gênero e família (BERMEJO et al., 2005).

Desta forma, os processos de separação, não instrumentais, empregados, não foram suficientemente sensíveis para a resolução de misturas tão complexas, tendo-se buscado, ao menos, caracterizar os alcalóides presentes.

Na análise CG-EM da fração alcaloídica **S8** de folha, os picos do composto, que apresentou tempo de retenção T_R : 20,3 min e padrão de fragmentação m/z : 297(M^+), 296(M^+-1), 268 ($M-29$), 253 (M^+-44), 237, 225 (**Tabela 18**), foram compatíveis com aqueles da estefarina (NIST, 2005; TOMITA et al., 1965) (**item 5.1.7.1.1**).

O pico em m/z 297 ($M^{+\bullet}$), com intensidade 100%, corresponde ao íon molecular, formado a partir da ionização da molécula neutra que perde um radical e se torna um cátion radical. A fragmentação característica em m/z 296 (M^+-1) (a) ocorre em consequência da

perda de um átomo de hidrogênio, sendo, o íon estabilizado por ressonância do anel aromático (**Figura 38**). A perda de uma molécula (neutra) de monóxido de carbono e de um átomo de hidrogênio a partir do íon m/z 296, no anel onde se encontra o dieno, origina o íon m/z 268 (M-29).

Outra possibilidade para a origem deste íon é por fragmentação do tipo retro-Diels-Alder, no anel aromático onde se encontra a carga positiva, a partir do íon molecular, com perda de um radical [$\cdot\text{CH}_3\text{N}$], sendo típica da fragmentação dos alcalóides aporfínicos (TOMITA et al., 1965) (**Figura 38**).

Figura 38 – Fragmentação característica dos alcalóides aporfínicos (a)- ($M^{\bullet}-1$) (OHASHI et al., 1963); (b)- íon resultante da fragmentação por retro-Diels-Alder (SHAMMA, 1972)

Os demais fragmentos m/z 253 (M^+-44), 237, 225 podem ser explicados pela fragmentação do íon m/z 268. Ou ainda, o elétron desemparelhado no íon m/z 268 é estabilizado com a eliminação de uma metila, o que gera o fragmento m/z 253, ou a perda de um radical metoxila, gerando o íon m/z 237.

A formação do íon m/z 225 dá-se com a perda de uma molécula neutra de monóxido de carbono, a partir do íon m/z 253 (**Figura 39**).

Figura 39 - Mecanismo de fragmentação da estefarina, segundo TOMITA et al.(1965)

O alcalóide proaporfínico estefarina (**Figura 26**), caracterizado na fração **S10** de *A.coriacea*, mostrou ser um dos mais freqüentes, no gênero (**Tabela 5**), tendo sido isolado de outras 6 espécies: *A. muricata* (folha), *A.purpurea* (folha, caule e raiz), *A.glabra* (fruto) e *A.spinescens* (casca de caule), *A.cacans* (SAITO,2000) e *A.cherimolia* (CHEN et al., 1997; SIMEON et al., 1989). É, portanto, é a primeira vez que é caracterizado em *A.coriacea*.

Em estudo de 1996, estefarina mostrou atividade frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, causando a lise celular de 65% dos parasitas, à concentração de 250 µg/mL (QUEIROZ et al., 1996). Mesmo não tendo sido isolado na fração **S10** de *A.coriacea*, possivelmente, o alcalóide tenha contribuído para a alta porcentagem de morte (100%) (**Tabela 19**) apresentada por **S10** (200 µg/mL) nas formas promastigotas de *L. (L.) chagasi*.

Na análise por CG-EM da fração alcaloídica **S11** de folha, o pico com tempo de retenção T_R :19,1 min originou os seguintes fragmentos 281($M^{+•}$), 280 (100), 266 (M^{+} -15), 252 (M^{+} -29), 250 (M^{+} -31), 237, 221, 178, 165, 152 (**Tabela 18**), que coincidiram com o padrão de fragmentação da nornuciferina (RINALDI, 2007; OHASHI et al., 1963) (**item 5.1.7.1.1**).

O mecanismo de fragmentação da nornuciferina foi apresentado por OHASHI et al. (1963) (**Figura 40**). O pico em m/z 280, com intensidade 100%, origina-se da perda de um átomo de hidrogênio adjacente ao nitrogênio ($M^{+•}$ -1), característico dos alcalóides aporfínicos (**Figura 38**), enquanto que, o íon molecular m/z 281 apresenta intensidade de 52,24% (**Figura 40**). Posteriormente, são gerados os fragmentos m/z 266 e m/z 250 pela perda dos radicais metila e metoxila (**Figura 40**). O íon m/z 252 corresponde ao fragmento típico dos aporfínicos (**Figura 40**) (OHASHI et al., 1963), correspondendo ao pico (M-29) (**Figura 40**).

Figura 40 - Mecanismo de fragmentação da nornuciferina, segundo OHASHI et al. (1963)

O alcalóide aporfínico nornuciferina (**Figura 29**) foi isolado, anteriormente, em seis espécies do gênero *Annona* (**Tabela 2**), sendo elas: *A. glabra* (fruto, casca de caule, caule) , *A. squamosa* (fruto), *A. muricata* (fruto), *A. hayesii* (casca de caule), *A. montana* e *A. sericea* (folha).

À semelhança de **S10**, a fração **S11** causou 100% de morte das formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* (**Tabela 19**). Como constituinte alcaloídico desta fração (**Tabela 18**), nornuciferina apresentou, igualmente, atividade *in vitro* nas formas promastigotas de *L. mexicana*, *L. panamensis*, em pesquisa realizada por MONTENEGRO et al. (2003), igualmente, comprovaram a atividade *in vitro* contra as formas promastigotas de *L. mexicana*, *L. panamensis*.

O cromatograma dos alcalóides totais do caule de *A. coriacea* (**item 5.1.7.1.2**) (**Figura 30**) apresentou numerosos picos, evidenciando sua complexidade e confirmando as observações feitas por meio do perfil cromatográfico em CCD (**Figura 21**) (**item 5.1.4**). Além disto, permitiu verificar a baixa intensidade relativa dos picos correspondentes aos alcalóides caracterizados (**Tabela 18**), à semelhança do que foi verificado nas folhas (**Tabela 18**) sendo que, nos alcalóides de ambos os órgãos, a complexidade dos AT ou frações foi notada, havendo prevalência de compostos não nitrogenados e concentração reduzida dos constituintes alcaloídicos individuais. Tais características oferecem dificuldades no isolamento dos mesmos, o que foi verificado em outras espécies do gênero *Annona* (RINALDI, 2007; SHAMMA & RAHIMIZADEH, 1986; ZHOU et al., 2009), conforme comentado, anteriormente.

Na análise dos alcalóides totais de caule, os espectros de massas dos picos nos tempos de retenção 13,2, 14,0 e 17,0 minutos apresentaram padrões de fragmentação idênticos, respectivamente, àqueles dos alcalóides assimilobina, pronuciferina e boldina (**Tabela 18**) (**item 5.1.7.1.2**).

Os principais fragmentos do espectro de massas da assimilobina foram: 267 (M^+), 266 (100), 252 (M^+-15), 238 (M^+-29), 236 (M^+-31), 224 (M^+-43), 206, 178, 152, 127, 103, tendo sido compatíveis com o mecanismo de fragmentação, proposto por CHEN-LOUNG et al. (1976), para este alcalóide.

O fragmento m/z 267 corresponde ao íon molecular, sendo que o pico m/z 266 ($M^{+\bullet}-1$), com intensidade 100%, é característico de aporfinas (OHASHI et al., 1963; SHAMMA, 1972) (**Figura 38**). Os demais picos foram em menor intensidade, estando relacionados a fragmentações, igualmente, típicas desta classe de alcalóides (OHASHI et al., 1963; CHEN-LONG et al, 1976) (**Tabela 18**) (**Figura 38**).

Entre os alcalóides caracterizados, em *A. coriacea*, asimilobina foi o mais isolado, a partir de outras espécies do gênero *Annona* (**Tabela 2**), tendo sido reportada em 9 delas. Cita-se nos frutos de *A. glabra* e *A. montana*, no caule secundário de *A. hayesii*, na raiz de *A. paludosa* e nas folhas de *A. cacans*, *A. crassiflora*, *A. cherimolia*, *A. muricata* e *A. paludosa*. O mesmo alcalóide ocorre em outros gêneros da família Annonaceae, como em *Duguetia*, tendo sido reportada a atividade antitripomastigota, frente ao *T. cruzi*, após isolamento, a partir de folha e caule de *D. furfuracea*, tendo levado à morte 72% dos parasitas (CAROLLO et al., 2006).

Ainda, na análise dos AT de caule de *A. coriacea* os íons referentes à fragmentação da pronuciferina foram m/z : 311 ($M^{+\bullet}$) (100%), 310 ($M^+ - H$), 282 ($M^+ - 29$), 268 ($M^+ - 43$), 253, 225 (**Figura 34**) (**item 5.1.7.1.2**) (**Tabela 18**). O pico em m/z : 311 apresenta intensidade 100%, correspondendo ao pico-base. Havendo outro pico intenso em m/z 282 (82,93%), relativo à perda de um radical [$\bullet CH_3N$] (**TOMITA et al., 1965**).

A caracterização do alcalóide proaporfínico pronuciferina representa o primeiro registro de sua ocorrência, não somente em *A. coriacea*, mas também no gênero (**Tabela 5**), sendo que até o momento, igualmente, não houve relato de estudo de sua atividade antiprotozoária.

As principais fragmentações da boldina, que foi caracterizada nos AT de caule, foram: 327 ($M^{+\bullet}$), 326 (100%), 296 ($M^+ - 31$), 284 ($M^+ - 43$), 264, 236, 232, 221, 204 e 176, (**Figura 36**) (**item 5.1.7.1.2**) (**Tabela 18**). Neste caso, além da comparação dos espectros com os dados de bibliotecas, foi possível a comparação com o padrão de boldina analisado sob as mesmas condições dos AT, confirmando, portanto a presença do alcalóide no caule de *A. coriacea*. A fragmentação da boldina segue o padrão de fragmentação dos aporfínicos, apresentando o íon molecular em 327 ($M^{+\bullet}$) e o íon base em m/z 326($M^+ - 1$). E, por perda de

um radical metoxila, dá origem ao fragmento m/z 296 ou, com a perda de um radical metila, forma o fragmento m/z 312 (OHASHI e colaboradores, 1963). Os demais picos apresentam intensidades menores. Mostra-se os alcalóides caracterizados em folha e caule de *A.coriaceae*. Na **figura 41** alcalóides caracterizados por CG-EM em *A.coriaceae* Mart..

Figura 41– Alcalóides caracterizados por CG-EM no AT de caule: asimilobina, pronuciferina e boldina. Em folha frações estefarina (S10) e nornuciferina (S11), ambos em *Annona coriacea* Mart.

A presença de boldina em *A. coriacea*, confirmada pelo respectivo padrão, representa dado inédito para a espécie e, também, para o gênero.

O alcalóide aporfínico está presente na espécie *Peumus boldus* (Mol.)Lions, conhecida e utilizada no mundo inteiro como “boldo do Chile”, principalmente, nos problemas e hepáticos (DUKE, 1985). A sua ocorrência é reportada, em diversas outras famílias vegetais, além da Annonaceae, como: Magnoliaceae, Lauraceae, Rhamnaceae e Monimiaceae (GUINAUDEAU et al., 1975, 1979, 1983, 1988).

Em 2003, HUNG et al. Constataram a atividade leishmanicida da boldina nas formas promastigotas de *L. mexicana* (CL₅₀ de 122 mM) (HUNG et al., 2003), contra as formas tripomastigotas de *T. brucei* (CI₅₀ >25 µM).

Segundo HOET et al. (2004), a explicação da relação estrutura-atividade dos alcalóides aporfinicos poderia estar relacionada com o grupo metilenodioxo presente, no anel aromático, causando a modulação da atividade biológica dos alcalóides aporfinicos.

Considerando o alto nível de atividade dos AT dos caules (100% de morte) frente às formas promastigotas (**Tabela 19**) e, com base na literatura (TOMITA et al., 1965; NIST, 2005; CHEN-LONG et al., 1976; OHASHI et al., 1963) pode-se inferir que, os três alcalóides neles caracterizados, asimilobina, pronuciferina e boldina, tenham contribuído para a atividade leishmanicida da fração, ainda que se tenham apresentado em baixa concentração, segundo mostra a intensidade relativa (**Figura 30**) dos picos correspondentes, em relação aos demais constituintes não-alcaloídicos presentes na fração AT bruta.

A investigação das variações possíveis, no nível de atividade leishmanicida dos AT de folhas e caules (**Tabela 20**) de *A. coriacea*, no período de um ano, foi efetuada (**item 5.1.8.2**). E, os dados mensais comparativos, revelaram, em geral, que o nível de atividade antipromastigota foi mantido na maior parte do período considerado, tanto para folhas quanto para caules (**Tabela 20**). O que pode indicar que a concentração utilizada para os testes (200 µg/mL) tenham sido suficientemente alta para permitir que não houvesse influência significativa das diferenças de variação na composição, ao longo do ano. Ou, podendo-se inferir, ainda, que o conjunto de compostos que constituem a fração AT seja, realmente, muito ativo.

Adicionalmente, observou-se que, no caso de folha, somente no mês de junho de 2007, houve redução de 50% do nível de mortes causadas pelos AT, enquanto que os AT de caules chegaram a ser inativos, no mês de setembro de 2007, sendo que no mês anterior tiveram a atividade reduzida (>50% mortes) (**Tabela 20**). Ao confrontar-se estes dados com os dados quantitativos da produção dos AT de *A. coriacea* (**Gráfico 1**) (**Tabela 16**), no caso dos caules, é possível verificar que a redução da atividade leishmanicida ocorreu coincidentemente, nos meses em que a produção dos AT foi mais baixa. Estas observações confirmariam a influência dos alcalóides no nível de atividade leishmanicida.

O mesmo foi constatado para os AT de folhas uma vez que, a redução no nível de atividade (**Tabela 20**) ocorreu em um dos meses de menor rendimento em alcalóides totais (0,10 %, m/m) (**Gráfico 1**) (**Tabela 16**).

De qualquer forma, pode-se verificar que, seja como dado pontual, representado pelos alcalóides obtidos em maior teor para o fracionamento, seja no acompanhamento da atividade, durante o período de um ano, os AT e as frações alcaloídicas de folha e de caule de *A.squamosa* confirmaram o alto nível de atividade leishmanicida, sendo de grande interesse na pesquisa de compostos com atividade antileishmania ou antiprotozoária. Portanto, a continuidade dos estudos é promissora, restando muito a ser explorado.

No tocante às classes químicas dos cinco alcalóides caracterizados, em folha e caule de *A. coriacea*, constatou-se seguirem a tendência observada para o gênero (**Tabelas 1 a 13**), sendo que os aporfínicos predominaram (3/5) (nornuciferina, assimilobina e boldina). Entretanto, foram caracterizadas 2 proaporfina, incluídas entre as classes minoritárias encontradas no táxon (**Tabela 5**), tendo sido uma inédita em *Annona* (pronuciferina).

Óleo volátil de *A.coriacea*

O teor em óleo volátil, nas folhas de *A. coriacea*, foi reduzido (0,05 %, m/m) (**item 5.1.3**), embora não tenha sido o menor valor encontrado, no gênero. Considerando o total de seis espécies avaliadas, até o momento, o teor variou de 0,0002 a 0,73% (m/m), em relação a órgãos vegetais distintos (COSTA et al., 2009, ANDRADE et al., 2007, KASSOUOH et al., 2007, GARG et al., 2005, NEBIE et al., 2005, KHALLOUKI et al., 2002, FOURNIER et al., 1999, BOYAM et al., 1996, 2003).

Particularmente, em relação à folha, o teor de óleo volátil em *A. coriacea* (**item 5.1.3**) mostrou-se compatível com outras espécies analisadas, como: *A. densicoma* (0,1% m/m) (ANDRADE et al., 2007), *A. muricata* (0,0002%, 0,01% m/m) (KASSOUOH et al., 2007, FOURNIER et al., 1999), *A.squamosa* (0, 12% m/m) (GARG et al., 2005) e *A. foetida* (0,01% m/m) (COSTA et al., 2009). Em relação a todos os órgãos vegetais, o maior teor encontrado foi em *A. senegalensis*, que apresentou 0,73% m/m (NEBIE et al., 2005).

O perfil cromatográfico do óleo volátil, em CCD, acusou a predominância de constituintes de baixa a média polaridade, demonstrada pelos valores de R_f, razoavelmente

altos, verificados no desenvolvimento, com a fase móvel constituída da mistura de *n*-hexano-diclorometano (1:1) (**Figura 22**). Além disso, foi constatada a presença, no óleo, das manchas correspondentes aos padrões de E-cariofileno (20) (R_f :0,94), α -humuleno (25) (R_f :0,42) e de β -pineno (3) (R_f :0,69) (**Figura 22**). Estes constituintes apresentaram abundância relativa, respectivamente, de: 4,9, 2,4 e 1,6%, na análise CG-EM, e estão entre os constituintes mais freqüentes no óleo de *A. coriacea* (**Tabela 17**).

Os sessenta componentes identificados, na análise CG-EM do óleo volátil de *A. coriacea* (**Tabela 17**), foram de natureza terpênica, mono e sesquiterpenos, tendo predominado os sesquiterpenos (76,7%) (**item 5.1.6**).

A composição química do óleo volátil de *A. coriacea* mostrou-se compatível com os constituintes voláteis encontrados no gênero *Annona* e na família Annonaceae (COSTA et al, 2009, NEBIÉ et al.2007, ANDRADE et al, 2007, FOURNIER et al.,1999, FEKAN et al, 1996).

O sesquiterpeno biciclogermacreno, o composto majoritário (39,8%) (**Tabela 17**), em *A. coriacea*, é o precursor do espatulenol, um sesquiterpeno oxigenado (**Figura 42**) dos mais freqüentes (4,2%) (**Tabela 17**) e considerado marcador quimiotaxonômico, na família Annonaceae, pelo fato de estar presente em espécies dos diferentes gêneros (COSTA et al, 2008).

Figura 42 – Estrutura química do espatulenol

Outros três compostos encontrados, no óleo volátil analisado, *E*-cariofileno (4,9%), δ -cadineno (6,0%) e β -elemeno (0,29%) (**Tabela 17**), mostraram ser, também, comuns na família Annonaceae (PALAZZO et al., 2009), sendo razoável em relação ao fato de que, os dois primeiros estiveram entre os sesquiterpenos predominantes no óleo da espécie estudada.

Informação adicional registrou que, o *E-cariofileno*, igualmente, foi considerado marcador do gênero *Annona* (VALTER et al., 2008).

Perfil similar em relação à abundância relativa dos sesquiterpenos biciclogermacreno e de *E-cariofileno* foi constatado, anteriormente, no óleo essencial da espécie *A.foetida* (COSTA et al, 2009).

Entre os constituintes sesquiterpênicos mais abundantes do óleo de *A. coriacea*, α -humuleno (2,4%) (**Tabela 17**) foi, anteriormente, reportado em *A. senegalensis* (NEBIÉ et al, 2005)

No tocante aos monoterpenos do óleo volátil de *A. coriacea* apresentaram menor concentração em relação aos sesquiterpenos (**Tabela 17**), sendo que a maioria de seus constituintes teve percentagem inferior a 1%. Em comparação, o óleo volátil de *A. foetida*, cujo perfil de sesquiterpenos apresentou semelhanças, não acusou a presença de monoterpenos em sua composição (COSTA et al, 2009).

Os componentes monoterpênicos majoritários em *A. coriacea* foram: β -pineno (1,6%), pseudolimoneno (1,6%) e β -cis-ocimeno (1,2%) (**Tabela 17**), sendo somente este último, oxigenado.

Constatou-se que, 23,3% dos monoterpenos encontrados no óleo analisado foram oxigenados.

A atividade anti-chagásica frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* foi, anteriormente, atribuída aos monoterpenos oxigenados do óleo volátil de *Cymbopogum citratus* (SANTORO et al., 2007). E, por estarem em menor proporção no óleo de *A. coriacea*, podem ter contribuído com outros constituintes para a atividade verificada (CE_{50} de 168.5 μ g/mL) (**Tabela 21**). Os mesmos autores relacionaram a atividade ao processo de rompimento da parede celular, com o extravasamento do citoplasma e do núcleo do parasita.

De forma semelhante, diversas pesquisas atribuíram aos sesquiterpenos oxigenados a atividade frente a diferentes espécies de *Leishmania* (COSTA et al, 2009). Em *A. coriacea*, estes constituíram cerca de 36,9% dos compostos sesquiterpênicos. Desta forma, pode-se inferir que, estes componentes, juntamente, com os monoterpenos oxigenados, ainda que em menor porcentagem, no óleo, tenham respondido pela atividade leishmanicida constatada frente às espécies de *Leishmania* testadas, no presente trabalho (**Tabela 21**).

Não há relatos da atividade dos sesquiterpenos não-oxigenados (COSTA et al, 2009) e os mecanismos de ação dos oxigenados ainda devem ser estudados, com maior profundidade. BOYOM et al (2003) sugeriram que, a baixa densidade dos óleos voláteis e a sua pronta difusão, através das membranas, teriam contribuído para melhorar o direcionamento intracelular do mesmo para os parasitas da malária. Entretanto, estudos mais aprofundados serão necessários para elucidar as interações envolvidas, inclusive, em relação à atividade leishmanicida (BOYOM et al., 2003).

Entre as quatro espécies de *Leishmania* testadas, *L.(L.) chagasi* foi a mais sensível ao óleo volátil de *A. coriacea* (CE₅₀: 39,93 µg /mL) (**Tabela 21**). Comportamento similar foi observado com o óleo de *A. foetida* (COSTA et al, 2009), tendo apresentado CE₅₀, ainda, inferior (CE₅₀: 27,2 µg/mL) ao da espécie estudada. Entretanto, frente às outras duas mesmas espécies de *Leishmania*, o óleo volátil de *A. foetida* apresentou nível de atividade muito superior àquele de *A. coriacea*.

Frente aos parasitas de *L(V.) braziliensis* e de *L(L.) amazonensis*, os CE₅₀ de *A. coriacea* e de *A.foetida* foram, respectivamente: 261,2; 9,9 µg /mL e 160,2; 16,2µg/mL.

7 CONCLUSÃO

- As análises dos alcalóides isoquinolínicos e do óleo volátil de *A. coriacea* Mart. (Annonaceae), bem como os ensaios de antileishmania *in vitro* forneceram dados inéditos acerca da espécie
- A caracterização dos alcalóides asimilobina, nornuciferina e boldina, em *A. coriacea* Mart. é compatível com os registros de ocorrência predominante de alcalóides aporfínicos, no gênero *Annona*, sendo que o relato da presença de boldina é inédito, não somente na espécie, mas também, no gênero.
- A caracterização das proaporfina estefarina e pronuciferina, respectivamente, em folha e caule de *A. coriacea* é inédita, na espécie, enquanto que a ocorrência da segunda é inédita, igualmente em relação ao gênero, que passou a ter três alcalóides registrados, desta classe.
- Os alcalóide aporfínico boldina, mais conhecido por sua ocorrência na espécie *Peumus boldus* (Mol.) Lions, é constituinte do caule de *A. coriacea* Mart. havendo relatos, na literatura, reportando a atividade antileishmania *in vitro*.
- À concentração de 200 µg/mL, os alcalóides totais de folha e de caule de *A. coriacea* Mart. e as frações alcaloídicas de folha S10 e S11 (purificadas), possuem potente atividade leishmanicida *in vitro*, frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *chagasi*, , causando a morte de 100% dos parasitas.
- O nível de atividade das frações alcaloídicas de folha de *A. coriacea* Mart. (**S10 e S11**) foi mantido, mesmo após as diversas etapas de fracionamento e purificação que passaram as frações que as originaram.
- As análises, por CG-EM, das frações alcaloídicas S10 e S11 de *A. coriacea* demonstraram que, as mesmas, representaram misturas complexas de compostos, nas quais os alcalóides são minoritários, quali- e quantitativamente, impossibilitando o seu isolamento, por técnicas analíticas não-instrumentais.
- De forma geral, o alto nível de atividade leishmanicida *in vitro* apresentada pelos alcalóides totais de folha e de caule de *A. coriacea*, frente às formas promastigotas de

Leishmania (L.) *chagasi*, manteve-se constante, ao longo do período de um ano, indicando reduzida interferência das épocas anuais, na produção dos metabólitos responsáveis pela atividade.

- Os curtos períodos em que houve redução do nível de atividade leishmanicida *in vitro* dos alcalóides totais ocorreram, coincidentemente, nos períodos de menor rendimento em alcalóides totais, tanto em folha quanto em caule de *A. coriacea*, confirmando, possivelmente, a influência destes metabólitos na atividade verificada.
- Os resultados obtidos, neste trabalho, confirmaram a importância da continuidade do estudo das frações alcaloídicas de *A. coriacea* e do isolamento de constituintes, na determinação dos metabólitos responsáveis pela atividade apresentada.
- Tendo em vista o alto nível de atividade leishmanicida *in vitro* demonstrado pelos alcalóides totais, confirmou-se a importância da espécie na busca de novos agentes antileishmaniais.
- O teor de óleo volátil em folha de *A. coriacea* foi reduzido (0,05% m/m), porém compatível com aquele reportado para outras espécies do gênero.
- O óleo volátil de folha da espécie *A. coriacea* é constituído de sesquiterpenos e monoterpenos, estando de acordo com o perfil dos constituintes voláteis encontrados na família Annonaceae e no gênero *Annona*, em geral.
- Os constituintes sesquiterpênicos do óleo essencial de *A. coriacea* (folha) foram predominantes (76,7%), sendo vários deles comuns à família Annonaceae e a outras espécies do gênero *Annona*.
- Os sesquiterpenos espatulenol e *E*- cariofileno são constituintes do óleo volátil de folha de *A. coriacea*, sendo considerados marcadores quimiossistemáticos, da família Annonaceae e do gênero *Annona*, respectivamente.
- O óleo volátil de folha de *A. coriacea* apresentou atividade *in vitro* frente às formas promastigotas de *Leishmania chagasi*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*, tendo sido, significativamente, mais ativo naquelas de *L. chagasi* (CE₅₀: 39,92 µg/mL).

- O óleo volátil de folha de *A. coriacea* foi ativo frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CE₅₀: 168,5 µg/mL)
- O sesquiterpeno oxigenado biciclogermacreno foi o composto majoritário (39,83%), entre os sessenta identificados, no óleo essencial de folha de *A. coriacea*
- A maior parte dos constituintes monoterpênicos (78,6%) ocorreu em porcentagem inferior a 1%, no óleo volátil de folha de *A. coriacea*.
- O β -pineno foi o monoterpreno de maior abundância relativa, tendo mostrado porcentagem de 1,6%, no óleo volátil de folha de *A. coriacea*.
- Os sesquiterpenos e monoterprenos oxigenados constituíram 36, 9% e 23,3% de suas respectivas classes sendo, possivelmente, responsáveis pelas atividades antiprotozoárias do óleo essencial de folha de *A. coriacea*, segundo atividade relatada na literatura para estas classes de compostos.

8. BIBLIOGRAFIA

ADAMS, R.P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804p.

AGRA, M.de F. 1977. **Farmacopéia Popular da Paraíba**. Universidade Federal da Paraíba (MEC), João Pessoa

AGUILAR-SANTOS, G.; LIBREA, J.R.; SANTOS, A.C. Alkaloids of *Annona muricata*. **Philippine Journal of Science**, v.96,n.4, p.399-410, 1967.

AL-MUTAIRI,N.; ALSHILTAWY,M.; ELKLALAWANY,M.; JOSHI,A.; EASSA,B.I.; MANCHANDA,Y.; GOMAA,S.; DARWISH,I.; RIJHWANI, M.. Treatement of old world cutaneous leishmanis with dapsona, itraconazol, cryotherapy, and imiquinod, alone in combination. **International Journal of Dermatology**. v.48 n 8,p.862-869,2009

AWAN, J.A.; KAR, A.; UDOUDOH, P.J. Preliminary studies on the seeds of *Annona muricata* Linn. **Qualitas Planttarum - Plant Foods Human nutrition**, v.30, p.163-168, 1980.

BADARÓ,R.; SCHOOLEY,R.T.. Environmental and human Leishmaniasis risk factors.Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis Control and Research: final report, Pan American Health Organization / World Health Organization (PAHO/WHO)/ Sociedade de Pediatria do Estado de Rio de Janeiro (SOPERJ),p.111-169,2008

BALBAA, S.I.; HAGGAG, M.Y.; TAHA, K.F. Phytochemical study of certain *Annona* species cultivated in Egypt. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.20, n.1/4, p.53-62, 1979.

BERMAN,J.D.. Chemotherapy for leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Curriculum Opinium Disease**. v.11,p.707-710, 1998^a

BERMAN,J.D.. Human leishmaniasis: chinal, diagnostic and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infected Disease**. v.24,p.684-703, 1997

BERMAN,J.D..Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. **Review Infected Disease**. v.10,p.560-586, 1988

BERMEJO,A.; FIGADÉRE,B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA,I. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Products Reporter**. v.22,p.269-303,2005

BETTARINI, F.; BORGONOV, G.E.; FIORANI, T.; GAGLIARDI, I.; CAPRIOLI, V.; MASSARDO, P.; OGOCH, J.I.J.; HASSANALI, A.; NYANDAT, E.; CHAPAYA, A. Antiparasitic compounds from East African plants: isolation and biological activity of anonaine, matricarianol, canthin-6-one and caryophyllene oxide. **Insect Science and its Application**, v.14, n.1, p.93-99, 1993.

BHAKUNI, D.S.; MUKHERJEE, B.; JUNEAU, J.P.; BHACCA, N.S.; MUKERJEE, R. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v.18, n.9, p.1584-1586, 1979.

BHAKUNI, D.S.; TEWARI, S.; DAHR, M.M. Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v.11, n.5, p.1819-1822, 1972.

BORUP, G.; KINGSTON, D.G.I. Aporphine alkaloids from *Annona acuminata*. **Journal of Natural Products**, v.45, n.1, p.102, 1982.

BOYOM, F.F.; ZOLLO, P.H.A.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BESSIÈRE, J.M.. Aromatic plants of Tropical Central Africa. Part XXVII. Comparative study of the volatile constituents of five Annonaceae species growing in Cameroon. **Flavour and Fragrance Journal**. v.11, p.333-338, 1996

BOYOM, F.F.; NGOUANA, V.; ZOLLO, P.H.A.; MENUT, C.; BESSIÈRE, J.M.; GUT, J.; ROSENTHAL, P.J. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**. v.64 n.7, p.1269-1275, 2003.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância em Saúde. Leishmaniose visceral. *In*: Guia de vigilância epidemiológica. 6.Ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2005, p.467

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

BRITO, B.; RODRIGUEZ, M.; SAMANIEGO, I. JARAMILLO, M. I.; VAILLANT, F. Characterising polysaccharides in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.) puree and their enzymatic liquefaction. **European Food Research and Technology**. v.226(3), p.355-361, 2008

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

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

CAROLLO, C.A.; HELLMANN-CAROLLO, A.R.; DE SIQUEIRA, J.M.; ALBURQUERQUE, S. Alkaloids and flavonoid from aerial parts (leaves and twigs) of *Duguetia furfuraceae*- Annonaceae. **Journal of the Chilean Chemical Society**. v.51 n.2, p.837-841, 2006

CARVALHO, P.L. de.. A proteção da biodiversidade brasileira: o caso das plantas medicinais. 2009. Disponível em: http://www.infobibos.com/artigos/2009_2/biodiversidade/index.htm. acesso em 30/4/2009. 9h.

CASTRO, I.; VILLEGAS, J.R.; SOEDER, B.; CASTRO, O.; SOEDER, B. Oxoaporphine alkaloids from *Annona purpurea* wood. **Fitoterapia**, v.67, n.2, p.181-182, 1996.

CAVÉ,A.; CORTES,D.; FIGADÉRE,B.; HOCCQUEMILLER,R.; LAPRÉVOTE,O.; LAURENS,A.; LEBOEUF,M. Recent advances in the acetogenins of Annonaceae. In: **Phytochemical Potential of tropical plants**. New York: Plenum Press, 1993. Chapter eighth,p.167-202

CAVÉ,A.;LAPRÉVOTE,O.;LEBOEUF,M., Alcaloides des Annonacées 88: Alcaloides de *Annona paludosa* Aublet. **Plantes médicinales et phytothérapie**. Tome XXXII, v.22 n.3,p.159-164,1988

CHAN-BACAB,M.J.; PENA-RODRÍGUEZ,L.M..Plant Natural products with leishmanicidal activity. **Natural Product Reporter**. v.18.p.674-688,2001

CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; HSIEH, T.J.; CHO, C.P.; WU, Y.C. Chemical constituents from *Annona glabra* III. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.47, n.4b, p.913-920, 2000a.

CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; WU, P.; KUO, R.; CHANG, Y.; WU, Y.C. new alkaloids from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v.63, n.6, p.746-748, 2000b.

CHANG, F.R.; CHEN, K.S.; KO, F.n.; TENG, C.M.; WU, Y.C. Bioactive alkaloids from *Annona reticulata*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v.47, n.5, p.483-491, 1995.

CHANG, F.R.; WEI, J.L.; TENG, C.M.; WU, Y.C. Antiplatelet aggregation constituents from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v.61, n.12, p.1457-1461, 1998a.

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

CHANG,F-R; WEI,J-J.; 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.2015-2018,1998.

CHAPPUIS,F.; SUNDAR,S.; HAILU,A.; GHALIB,H.; RIJAL,S.; PEELING,R.W.; ALVAN,J.; BOELAERT,M..Visceral Leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control. **Nature Reviews, Microbiology**. v.5,p.873-882, 2007

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

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

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

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

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

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

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

COELHO,M.B.; FREIRE,M. das G.M.; DESOUZA,I.A.; MARANGOnI,S.; ANTUNES,E.; MACEDO,M.L.R.. neutrophil miigration in mice induced by a mannose-binding lectin isolated from *Annona coriacea* seeds. **Toxicon**. v.48,p.529-535,2006.

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

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

COSTA, E.V.; PINHEIRO, M.L.B.; XAVIER, C.M.; SILVA, J.R.A.; AMARAL, A.C.F.; SOUZA, A.D.L.; BARISON, A.; CAMPOS, F.R.; FERREIRA, A.G.; MACHADO, G.M.C.; LEOn, L.L.P. A pyrimidine – β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with anti-leishmanial activity. **Journal of Natural Products**, v.69, n.2, p.292-294, 2006.

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

COX, F.E.G. Hiistory of human parasitology. **Clinical Microbiology Reviews**, v.15, n.4, p.595-612, 2002.

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

CRUZ,G.L., 1985.**In:Dicionário de plantas úteis do Brasil**.Rio de Janeiro:Bertrand Brasil

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

DA SILVA, E.L.M.; ROBLot,F.; LAPRÉVOTE,O.; SÉRANI,L.; CAVE,A.. Coriaheptocins A and B, the first heptahydroxylated acetogenins, isolated from the roots of *Annona coriacea*. **Journal Natural Products**. v.60,p.162-167, 1997

DA SILVA, E.L.M.; ROBLLOT,F.; MAHUTEAU,J.; CAVE,A.. Coriadienin, the first Annonaceous acetogenins with two double bonds isolated from *Annona coriacea*. **Journal Natural Products**. v.59,p.528-530,1996

DIAZ, M.N.; FERNANDO, H.C.; GUNATILAKA, A.A.L.; TEZUKA,Y.; KIKUCHI,T. Studies on terpenoids and steroids. Part 20. Isolation and NMR analysis of 15,22-dihydroxytingenone: a probable biosynthetic precursor of 14(15)-ene-quinone-methide triterpenoids. **Journal of Chemical Research, Synopses**.v.8,p.238-239,1990.

DIAZ,A.M.P.; DIAZ,P.D.; JOSEPH-NATHAN,P. Diterpenoids and alkaloids from *Annona spraguei* Safford. **Revista Latino Americana de Química**. v.19 n.2,p.58-60,1988.

DUKE,J.A.; **CRC handbook of medicinal herbs**. Boca Raton: CRC Press, 1985,p.358-359.

ERDELYI, M.C. **Contribuição à farmacognosia de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) – Acompanhamento da variação de sazonal de constituintes, aspectos botânicos e avaliação da Atividade antileishmania *in vitro***. São Paulo, 2008. 231p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

FAGUNDES, F.A.; DE OLIVEIRA,L.B.; CUNHA,L.C.; VALADARES,M.C.. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**. v.2 n.1,p.24-29, 2005.

FALL, D.; SAMBOU, B.; SECK, M.; WELE, A.; NDOYE, I.; GLEYE, C.; LAURENS, A. Enhancing the anthelmintic activity roots of *Annona senegalensis*. **Dakar Médical**, v.53, n.1, p.61-67, 2008.

FARMACOPÉIA Brasileira. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FAUST, J.; PREISS, A.; RIPPERGER, H.; SANDOVAL, D.; SHREIBER, K. Alkaloids from *Annona cristalensis*. **Pharmazie**, v.36, n.10, p.713, 1981.

FERREIRA, J. S.; FERREIRA, L.; PERESTRELO, R., Comparative analysis of the volatile fraction from *Annona cherimola* Mill. cultivars by solid-phase microextraction and gas chromatography-quadrupole mass spectrometry detection. **Talanta**, v.77 n.3,p.1087-1096,2009.

FISCHER, D.C.H.; GUALDA, n.C.A.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C.S.; LUPO, F.n.; BONOTO, S.V.; ALVES, M.O.; YOGI, A.; DI SANTI, S.M.; ÁVILA, P.E.; KIIRCHGATTER, K.; MORENO, P.R.H. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, v.72, n.8, p.703-707, 2004.

FISCHER,C.; VOSS,A.; ENGEL,J.. Development status of miltefosine as first oral drug in visceral and cutaneous leishmaniasis. **Medical Microbiology Immunology**. v.190,p.85-87,2001

FORGACS, P.; DESCONCLOIS, J.F.; MANSARD, D.; PROVOST, J.; TIBERGIEN, R.; TOCQUER, J.; TOUCHEA, A. Dopamine et alcalóides tetrahydroisoquinoleiques D' *Annona reticulata* L. *Annonaceae*. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v.15, n.1, p.10-15, 1981.

FOURNIER,G.; LEBOEUF,M.; CAVE,A.. Annonaceae essential oils: a review. **Journal Essential Oil Research**. v.11,p.131-142,1999

GARG,S.N.; GUPTA,D.. Composition of the leaf oil of *Annona squamosa* L. from the north Indian plains. **Journal Essential Oil Research**. v.17,p.257-258,2005

GOODMAN,L.S.; GILMAN,A.. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill Interamericana do Brasil,2006,1821p.

GOPINAT, K.W.; GOVINDACHARI, T.R.; PAI, B.R.; VISWANATHAN, n. The structure of reticuline, a new alkaloid from *Annona reticulata*. **Chemische Berichte**, v.92, p.776-779, 1959.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVE, A. Aporphine Alkaloids II. **Lloydia**, v.38, n.4, p.275-337, 1975.

GUINAUDEAU,H.; LEBOEUF,M.; CAVÉ,A. Aporphine alkaloids II. **Journal of Natural Products**. v.42 n.4,p.325-360,1979.

GUINAUDEAU,H.; LEBOEUF,M.; CAVÉ,A. Aporphine alkaloids III. **Journal of Natural Products**. v.46 n.6,p.761-835,1983.

GUINAUDEAU,H.; LEBOEUF,M.; CAVÉ,A. Aporphine alkaloids IV. **Journal of Natural Products**. v.51 n.3,p.389-474,1988.

HAGGAG, M.Y.; TAHA, K.F. Isolation and determination of liriodenine from *Annona glabra* L. growing in Egypt. **Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.22, n.1/4, p.153-157, 1983.

HARBORNE, J.B. Introduction to ecological biochemistry. 4 ed. London, Academic Press, 1993

HARBORNE,J.B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plants analysis**. 3 ed., London, new York: Chapman and Hall, 1998. 302p.

HASRAT, J.A.; DE BRUYNE, T.; DE BACKER, J.P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A.J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HT_{1A} receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.49, n.11, p.1145-1149, 1997a.

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

HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; JACQUEMIN, H.; TOUCHE, A.; FORGACS, P. Alkaloids of Annonaceae. XXXVI. Alkaloids from *Annona crassiflora* Mart. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.16, n.1, p.4-6, 1982.

HSIEH, T.J.; WU, Y.C.; CHEN, S.C.; HUANG, C.S.; CHEN, C.Y. Chemical constituents from *Annona glabra*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.51, n.4, p.869-876, 2004.

[http://Ministério da Saúde.dtr2004.saude.gov.br/sinanweb.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/chagas/bases/chagabrnet](http://Ministério_da_Saúde.dtr2004.saude.gov.br/sinanweb.gov.br/sinanweb/tabnet/tabnet?sinanet/chagas/bases/chagabrnet). Acesso em 26/02/2010

<http://genomeold.wustl.edu/genome.cgi?genome=Phlebotomus%20papatasi>. Acesso em 02/03/2010

<http://UFRGS.br/para-site/siteantigo/imagensatlas/arthropoda/Lutzomyia>. Acesso em 02/03/2010

http://www.DnDi.org.br/portugues/doencas_negligenciadas.aspx.2007. Acesso em: 12 março 2010

http://www.DnDi.org.br/portugues/doencas_negligenciadas.aspx.2009. Acesso em: 29 março 2010

http://www.WHO.int/features/factfiles/neglected_tropical_diseases/en/index.html. 2009. Acesso em: 02 janeiro 2010

HUI, Y.H.; WOOD, K.V.; MACLAUGHLIN, J.L. Bullatencin, 4-deoxyasimicin, and the uvariamicins: additional bioactive annonaceous acetogenins from *Annona bullata* Rich. (Annonaceae). **Natural Toxins**, v.1, n.1, p.4-14, 1992.

JHA, T.K.; SUNDAR, S.; THAKUR, C.P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.. Miltefosine, an oral agent for treatment of Indian visceral leishmaniasis. **new England Journal Medicine**. v.341, p.1795-1800, 1999

KHALLOUKI, F.; YOUNOS, C.; SOULIMANI, R.; BESSIÈRE, J.M.. Chemical composition of the essential oils of *Annona cuneata* L. and *Annona senegalensis* Pers. Stem barks. **Flavour and Fragrance Journal**. v.17, p.398-400, 2002

KOICHI, n.; HIDEKAZU, n.; TAKAO, T. norreticuline and reticuline as possible new agents for hair growth acceleration. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v.20, n.5, p.586-588, 1997.

KONG, H.H.; YANG, T.H.; CHEN, C.M. Constituents of anonaceous plants. I. Alkaloids of *Annona reticulata*. **Beiyi Xuebao**, v.3, p.130-135, 1973.

KOSSOUOH, C.; MOUDACHIROU, M.; ADJAKIDJE, V.; CHALCHAT, J-C.; FIGUÉRÉDO, G.. Essential oil chemical composition of *Annona muricata* L. leaves from Benin. **Journal Essential Oil Research**. v.19, p.307-309, 2007

LAPREVOTE, O.; LEBOEUF, M.; CAVE, A.; PROVOST, J.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of the Annonaceae. 88. Alkaloids of *Annona paludosa* Aublet. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.22, n.3, p.159-164, 1988.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; PROVOST, J.; CHIARONI, A.; RICHE, C. Alkaloids of the Annonaceae. Part 33. Annomontine and methoxyannomontine, two new pyrimidine- β -

carboline-type alkaloids from *Annona Montana*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry**, v.5, p.1205-1208, 1982b.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; PROVOST, J.; TOUCHE, A. Isolation of the alkaloid higenamine from *Annona squamosa*; importance of macromolecular absorbant resins in extractive plant chemistry. **Journal Natural Products**, v.44, n.1, p.115-121, 1981b.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; TIBERGHIE, 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, n.3, p.169-184, 1982c.

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

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVE, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of Annonaceae. XXIX. Alkaloids of *Annona muricata*. **Planta Medica**, v.42, n.5, p.37-44, 1981c.

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; CAVE, A.; DESCONCLOIS, J.F.; FORGACS, P. Anomurine et anomuricine, deux nouveaux alcaloïdes isoquinoléiques de l'*Annona muricata*. **Planta Medica**, v.39, n.3, p.204-205, 1982.

LORENZI, H.; SOUZA, V.C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para a identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. 2 ed. nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MACEDO, M.L.R.; FREIRE, M.G.M.; NOVELLO, J.C.; MARANGONI, S.; Talisia esculenta lectin and larval development of *Callosobruchus maculatus* and *Zabrotes subfasciatus* (Coleoptera: Bruchidae). **Biochemistry Biophysics Acta**.v.1571, p.83-88, 2002

MAGGI, F.; TIRILLINI, B.; PAPA, F.; SAAGRATINI, G.; VITTORI, S.; CRESCI, A.; COMAN, M.M.; CECCHINI, C. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ferulago campestris* (Besser) Grecescu growing in central Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, v.24, n.6, p.309-315, 2009.

MARTINEZ-VAZQUEZ, M.; DE LA CUEVA LOZANO, D.G.; ESTRADA-REYES, R.; GONZALEZ-LUGO, N.M.; RAMIREZ APAN, T.; HEINZE, G. Bio-guided isolation of the cytotoxic corytenchine and isocoreximine from roots of *Annona cherimolia*. **Fitoterapia**, v.76, n.7/8, p.733-736, 2005.

MELLO-SILVA, R.; PONTES, A.F. **Annonaceae do Parque nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil**. Boletim Botânico da Universidade de São Paulo. vol.23 n.1, p.71-84. 2005.

MESQUITA, M.L. de.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J.E. de.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L.S.. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.100 n.7, p.783-787, 2005

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro nacional de Epidemiologia – Fundação nacional de Saúde, Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana / Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e antroponoses. Brasília (DF) – 2000,62 p.il.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasil. Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007. 180 p.: il. – (Série A. normas e Manuais Técnicos)

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância e Controle de Leishmaniose Visceral. Brasília (DF), 2006

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretária de Vigilância em Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica. Ministério da Saúde. Secretária de Vigilância as Saúde – 6 ed. – Brasília (DF): Ministério da Saúde,2005. 816p. Série A. normas e Manuais Técnicos

MORAM, M.; GUZMAN, J.; ROPARS, AL.; McDONNALD, A.; JAMESON, n. neglected disease research and development: how much are we really spending? **PLoS Medicine**, v.6, n.2, p.137-146, 2009.

MORITA, H.; SATO, Y.; CHAN, K.L.; CHOO, C.Y.; ITOKAWA, H.; TAKEYA, K.; KOBAYASHI, J. Samoquasine A, a benzoquinazoline alkaloid from the seeds of *Annona squamosa*. **Journal of Natural Products**, v.63 n.12, p.1707-1708, 2000.

NEVES, D.P.; GOMES,C.F.L.; IGLÉSIAS,J.J.F.; BARÇANTE,J.M. de P.; DOS SANTOS,R.L.C.. **Parasitologia Dinâmica**. 3 ed., São Paulo: Atheneu, 2009

NEWMAN,D.J.; CRAGG,G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal Natural Products**. v.70,p.461-477,2007

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

NIST (2005). NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library, Nist Mass Spectral Search Program (NIST 05, Version 2.0d), The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, MD, USA, 2005.

OHASHI, M.; WILSON, J.M.; BUDZIKIEWICZ, H.; SHAMMA, M.; SLUSARCHYK, W.A.; DJERASSI, C. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXI. Aporphine 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 alkaloid from *Annona ambotay* Aubl. **Phytochemistry**, v.26, n.9, p.2650-2651, 1987.

OLIVEIRA, F. de.; AKISUE,G.; AKISUE,M.K. **Farmacognosia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2005. 412p.

ORSINI,F.; PELLIZONI,F..The structure of annonalide. **Tetrahedron Letters**. v.12,p.1085-1088,1977

OSORIO, E.J.; ROBLEDO, S.M.; BASTIDA,J. Alkaloids with antiprotozoal activity. In_____ **Alkaloids**. New York: Academic Press,2008.cap.2 v.66, p-113-179.

PADMA,P.; KHOSA,R.L.; SAHAI, M.. Alkaloids from genus *Annona*: a review. **Indian Journal Natural Products**. v.11 n2,p.3-15,1995

PAULO, M.Q.; BARBOSA-FILHO, J.M.; LIMA, E.O.; MAIA, R.F.; BARBOSA, R.C.B.B.; KAPLAN, M.A.C. Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.36, n.1, p.39-41, 1992.

PECK,C.C.; BARR,W.H.; BENET,L.Z.; COLLINS,J.; DESJARDINS,R.E.; FUURST,D.E. Ppportunities for integration of pharmacokinetics pharmacodynamics, and toxicokinetics in rational drug development. **Pharmaceutical Res**. v.9,p.826-833,1992

PEREZ-VICTORIA,F.J.; GAMARRO, F.; OUELLETTE,M.; CASTANYS,S.. Functional cloning of the miltefosine transporter: a novel P-type phospholipid translocase from *leishmania* involved in drug resistance. **Journal Biology Chemical**. v.278,p.49965-49971,2003

PHILIPPOV, S.; KANDE, K.M.; MACKEV, K. Alkaloids of *Annona senegalensis*. **Fitoterapia**, v.66, n.3, p.275-276, 1995.

PHILIPPOV, S.; MACKEV, K.; TSANKOVA, E.; RODRIGUES, n.H. Liriodenine fromf *Annona muricata* seeds. **Fitoterapia**, v.65 n.6, p.555, 1994.

PHILLIPSON,J.D.; ROBERTS,M.F.; ZENK,M.H.. **The chemistry and biology of isoquinoline alkaloids**. Berlin, Heidelberg,Germany: Springer-Verlag,1985,304p.

PINHEIRO, M.L.B.; XAVIER, C.M.; SOUZA, A.D.L.; RABELO, D.M.; BATISTA, C.L.; BATISTA, R.L.; COSTA, E.V.; CAMPOS, F.R.; BARISON, A.; VALDEZ, R.H.; UEDA-NAKAMURA, T.; CELSO, V. Acanthoic acid and other constituents from the stem of *Annona amazônica* (Annonaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.20 n.6, p.1095-1102, 2009.

PIZZOLATTI,,M.G.;MOREIRA,F de P.M.; COUTINHO,V.; MONTANHER,A.B.P.; CARO,M.S.B.; BRIGHENTE,I.M.C.; Flavonóides e Triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia*- Bioatividade sobre *Artemia salina*.**Química Nova**,v.26(3), p.309-311,2003

PRADO, M.S.-A.; BRITO, H.O.; NORONHA, E.P.; FRANCA, L.M.; BRITO, L.M.O., Phytochemical analysis composition from *Annona squamosa* (ATA) leaf ethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmácia**. V.89(3),p.180-184, 2008

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; CAVE, A.; MARCAL, Q.P.; FOURNET, A. Pessoaine and Spinosine, two catecholic berbenes from *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v.59 n.4, p.438-440, 1996.

RAO, R.V.K.; KRISHNA, M.; MURTY, n.; RAO, J.V.L.n.S. Occurrence of borneol and canphor and a new terpene in *Annona squamosa*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40 n.5, p.170-171, 1978.

RAO, R.V.K.; SATYANARAYANA, T. Occurrence of kaurenoic acid in *Annona squamosa*. **Indian Journal of Natural Products**, v.2 n.2, p.8-9, 1986.

RASAMIZAFY, S.; HOQUEMILLER, R.; CASSELS, B.K.; CÁVE, A. Alkaloids of the Annonaceae. Part 81. Alkaloids of *Annona hayesii*. **Journal o Natural Products**, v.50, n.4, p.759-761, 1987.

RATH,S.; TRIVELIN,L.A.; IMBRUNITO,T.R.; TOMAZELA,D.M.; DE JESÚS,M.N.; PERCY,C.M.. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química nova**. v.26 n.4,p.550-555,2003

RINALDI, M.V.N. **Avaliacao da atividade antibacteriana e citotoxica dos alcaloides isoquinolinicos de *Annona hypoglauca* Mart.** São Paulo,2007. 125p. Dissertacao de Mestrado – Faculdade de Ciencias Farmaceuticas, Universidade de São Paulo

RIOS, J.L.; CORTES, D.; VALVERDE, S. Acetogenins, aporphinoids, and azaanthraquinone from *Annona cherimólia* seeds. **Planta Medica**, v.55, n.3, p.321-323, 1989.

ROBBERS, J.E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V.E.. **Farmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Baltimore: Ed. Williams & Wilkins, 1996. P.10-11.

SAAD, J.M.; HUI, Y.H.; RUPPRECHT, J.K.; ANDERSON, J.E.; KOZLOWSKI, J.F.; ZHAO, G.X.; WOOD, K.V.; MACLAUGHLIN, J.L. Reticulatacin: a new bioactive acetogenin from *Annona reticulata* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v.47, n.16/17, 2751-2756, 1991.

SAITO, M.L. **Fitoquimica de *Annona cacans* Warming e Quimiossistemática de Annonaceae JUSSIEU**. São Paulo, 1990. 222p. Tese de Doutorado - Instituto de Química - Universidade de São Paulo.

SAITO, M.L. Review of phytochemistry of Annonaceae Jussieu. **Lecta-USF**, v.13, n.1/2, p.101-186, 1995.

SAITO, M.L.; ALVARENGA, M.A. Alkaloids from *Annona cacans*. **Fitoterapia**, v.65, n.1, p.87, 1994.

SANDOVAL LOPES, D.; RIPPERGER, H. CHEMICAL STUDIES IN CUBAN SPECIES OF THE GENUS *Annona*. I. *Annona bullata* Rich. **Revista Cubana de Farmacia**, v.20, n.1, p.83-86, 1986.

SANDOVAL, D.; PREISS, A.; SCHREIBER, K.; RIPPERGER, H. Annonelliptine, an alkaloid from *Annona elliptica*. **Phytochemistry**, v.24, n.2, p.375-376, 1985.

SANTOS, D.Y.A.C. **Implicações taxonômicas dos flavonóides de Annonaceae**. São Paulo, 1998. 108p. Tese de Doutorado - Instituto de Biociências -Universidade de São Paulo.

SANTOS, P.L.P.; 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, n.2/3, p.209-212, 2003.

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

SHAMMA, M.; RAHIMIZADEH, M. the identity of chileninone with berberrubine. The problem of true natural products vs. artifacts of isolation. **Journal of Natural Products**. v.49 n.3, p.398-405, 1986.

SIMEON, S.; RIOS, J.L.; VILLAR, A. Alkaloids from *Annona cherimolia* (Mill.) stem bark. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v.23, n.3, p.159-161, 1989.

SIMEON, S.; RIOS, J.L.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of *Annona cherimolia* (Mill.) stem bark alkaloids. **Pharmazie**, v.45, n.6, p.442-443, 1990.

SIMÕES *et al.*, **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. In: organizado por Cláudia Maria Oliveira Simões...[*et al.*]. 6.ed.- Porto Alegre: Editora da UFRGS: Editora da UFRGS, 2007, p.1104

SIQUEIRA de, J.M.; SILVA da, D.B.; MATOS, M. de F. C.; NAKASHITA, S.T.; MIISU, C.K.; YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C.A.; FABRI, J.R.; MIGLIO, H. da S.. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **QUÍMICA . NOVA**, v. 30(8), p.1809-1812, 2007

SOBRAL DA SILVA, M.; TAVARES, J.F.; SILVA, M.V.B.; QUEIROGA, K.F.; MELO, D., MARGARETH, F. F.; BARBOSA F.; JOSE, M.; HAUN, M.; MELO, P.S., **Xylodiol, a new atisane diterpenoid from *Xylopia Langsdorffiana* St.-Hil. & Tul. (Annonaceae) Zeitschrift fuer Naturforschung, B: Chemical Sciences**. v.62(5), p.742-744, 2007

SONNET, P.E.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors. II. Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.60, n.8, p.1254-1256, 1971.

SOTO, J.; ARANA, B.A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J.C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J.D.; JUNGE, A.K.; ENGEL, J.; SINDERMANN, H.. Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v.38, p.1266-1272, 2004

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; THAKUR, C.P.. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. **new England Journal Medicine**. v.347, p.1739-1746, 2002

TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin-2. **Journal of Immunological Methods**, v.93, n.2, p.157-165, 1986.

TEMPONE, A.G.; TREIGER BORBOREMA, S.E.; ANDRADE Jr., H.F.; AMORIM GUALDA, N.C.; YOGI, A.; SALERNO CARVALHO, C.; 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, n.5, p.382-390, 2005.

TIAN, L.; HAN, Y.; MENG, Z.; XIA, C.; ZHANG, J. Study on chemical constituents of *Annona glabra*. **Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao**, v.32, n.1, p.10-12, 2001.

TIAN, L.; YANG, N.; MENG, Z.; HAN, Y. Studies on chemical constituents of *Annona glabra*. **Zhongguo Yaxue Zazhi**, v.38, n.4, p.258-260, 2003.

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

TRACY, J.B.; WEBSTER-JUNIOR, L.T.. **Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infection.** In: The Pharmacological Basis of Therapeutics. Peergamon-Press, new York; 1996, p.965-985

TSAI, I.L.; LIOU, Y.F.; LU, S.T. Screening of isoquinoline alkaloids and their derivatives for antibacterial and antifungal activities. **Gaoxiong Yixue Kexue Zazhi**, v.5, n.3, p.132-145, 1989.

URZUA, A.; CASSELS, B.K. Preliminary study of *Annona cherimolia* alkaloids. **Revista Latinoamericana de Química**, v.8, n.3, p.133-134, 1977.

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

VIDAL-PUIG, A.J.; MUNOZ-TORRES, M.; JODAR-GIMENO, E.; GARCIA-CALVANTE, C.J.; LARDELLI, P. Ketoconazole therapy: hormonal and clinical effects in non-tumoral hyperandrogenisms. **European Journal Endocrinology**. v.130, p.333-338, 1994.

VILLAR DEL FRESNO, R.; RIOS CANAVATE, J.L. Alkaloids from *Annona cherimolia* seed. **Journal of Natural Products**, v.46, n.3, p.438, 1983.

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J.L.; CANTON, E.; GOBERNADO, M. Antimicrobial activity of benzyloisoquinoline alkaloids. **Pharmazie**, v.42, n.4, p.248-250, 1987.

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J.L.; CORTES, D. Alkaloids from *Annona cherimolia* leaves. **Journal of Natural Products**, v.48, n.1, p.151-152, 1985.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2.ed. Berlin: Springer, 1996. 384p.

WAGNER, H.; REITER, M.; FERSTL, W. new drugs with cardiotonic activity. I. Chemistry and pharmacology of the cardiotonic active principle of *Annona squamosa* L. **Planta Medica**, v.40, n.1, p.77-85, 1980.

WARTHEN, D.; GOODEN, E.L.; JACOBSON, M. Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.58, n.5, p.637-638, 1969.

WHO. **Quality control methods for medicinal plant materials**. England: WHO Library, 1998, p.115

WINK, M.. **Allelochemical properties or the raison d'être of alkaloids**. In: BROSSI, A. (ed). The alkaloids. San Diego: Academic, v.43, p.1-118, 1993

WU, Y.C.; CHANG, F.R.; CHEN, C.Y. Tryptamine-derived amides and alkaloids from the seeds of *Annona atemoya*. **Journal of Natural Products**, v.68, n.3, p.406-408, 2005.

WU, Y.C.; CHANG, F.R.; CHEN, C.Y.; HSIEH, T.J.; CHO, C.P. Chemical constituents from *Annona glabra* III. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.47, n.4B, p.913-920, 2000.

WU, Y.C.; CHANG, F.R.; CHEN, K.S.; KO, F.N.; TENG, C.M. Bioactive alkaloids from *Annona squamosa*. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v.46, n.5, p.439-460, 1994.

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

WU, Y.C.; CHANG, G.Y.; DUH, C.Y.; WANG, S.K. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. **Phytochemistry**, v.33, n.2, p.497-500, 1993.

XAVIER-GOMES, L.M.; COSTA, W.B.; DO PRADO, P.F.; OLIVEIRA-CAMPOS, M.; LEITE, M.T. de S.. Características clínicas e epidemiológicas da leishmaniose visceral em crianças internadas em um hospital universitário de referência no norte de Minas Gerais, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v.12 n°4, p.549-555, 2009.

YANG, T.H.; CH'EN, C.M.; KONG, H.H. Constituents of anonaceous plants grow in Taiwan. I. Alkaloids of *Annona reticulata*. **Taiwan Kexue**, v.24, n.3/4, p.99-104, 1970a.

YANG, T.H.; CHEN, C.M. Constituents of *Annona squamosa*. **Journal of Chinese Chemical Society**, v.17, n.4, p.343-350, 1970b.

YANG, T.H.; CHEN, C.M. Studies on the alkaloids of *Annona glabra* II. **Chinese Pharmaceutical Journal**, v.25, n.1/2, p.1-7, 1973.

YANG, T.H.; CHEN, C.M. Studies on the alkaloids of *Annona Montana* Macf. **Proceedings of the national Science Council, Republic of China**, v.3, n.1, p.63-66, 1979.

YANG, T.H.; CHEN, C.M. Studies on the alkaloids of *Anona glabra* L. II. **Proceedings of the national Science Council: Part 2. Biological, Medical and Agricultural Sciences**, v.7, p.177-184, 1974a.

YANG, T.H.; CHEN, C.M.; CHANG, J.L.; CHUNG, K.W. Constituents of *Annona squamosa* II. Isolation of (-)-Kaur-16-en-19-oic acid. **Taiwan Yaoxue Zazhi**, v.23, n.1, p.8-11, 1971a.

YANG, T.H.; CHEN, C.M.; KONG, H.H. Constituents of anonaceous plants I. Alkaloids of *Annona reticulata*. **Beiyi Xuebao**, v.3, p.130-135, 1973b.

YANG, T.H.; CHEN, C.M.; KUAN, S.S. Alkaloids of *Annona glabra* I. Isolation of (-)-n-methylactinodaphnine **Journal of the Chinese Chemical Society**, v.18, n.3, p.133-136, 1971b.

YANG, T.H.; CHENG, M.Y. The alkaloids of *Annona reticulata* L. II. **Taiwan Yaoxue Zazhi**, v.39, n.3, p.195-201, 1987.

YANG, T.H.; LIN, S.J.; WANG, H.C. Studies on the constituents of *Annona cherimola*, structure of anomoline. **Zhonghua Yaoxue Zazhi**, v.43, n.6, p.457-463, 1991.

YANG, X.J.; XU, L.Z.; SUN, N.J.; WANG, S.C.; ZHENG, Q.T. Chemical constituents of *Annona squamosa*. **Yaoxue Xuebao**, v.27, n.3, p.185-190, 1992.

YANG, Y.L.; CHANG, F.R.; WU, Y.C. Annosqualine: a novel alkaloid from the stems of *Annona squamosa*. **Helvetica Chimica Acta**, v.87, n.6, p.1392-1399, 2004.

YANG, B.; YANG, H.; LI, X.; TANG, Y.; ZHANG, N.; CHEN, J., Supercritical fluid CO₂ extraction and simultaneous determination of eight annonaceous acetogenins in *Annona* genus plant seeds by HPLC-DAD method. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 49(1), p.140-144, 2009.

YANG, T.H.; CHEN, C.M.. Studies on the alkaloids of *Annona glabra* L. II. **Proceedings National Sciences Council (parte 2) Biological Medical and Agricultural Sciences (Taiwan)**, v.7, p.177, 1974.

YANG, T.H.; CHEN, C.M.; KONG, H.H.. **Journal Chinique Chemistry Society (taipei)**, v.17, p.243, 1970.

YOU, M.; WICKRAMARATNE, D.B.M.; SILVA, G.L.; CHAI, H.; CHAGWEDERA, T.E.; FARNSWORTH, N.R.; CORDELL, G.A.; KINGHORN, A.D.; PEZZUTO, J.M. (-)- Roemerine, an aporphine alkaloid from *Annona senegalensis* that reverses the multidrug-resistance phenotype with cultured cells. **Journal of Natural Products**, v.58, n.4, p.598-604, 1995.

ZHOU, Y.; MENG, Z.; DONG, M. Application of molecular imprinting technology in the separation and purification of active ingredients from Natural products. **Sepu**, v.27 n.3, p.359-363, 2009.

ANEXO A

Rendimento das frações obtidas no fracionamento dos alcalóides totais

As massas das frações alcaloídicas de *A. coriacea* provenientes das oito etapas de fracionamento dos alcalóides totais, em coluna cromatográfica (item 4.2.5) encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 – Massa das frações alcaloídicas (**ACORI**) provenientes das 8 etapas de fracionamento dos alcalóides totais de *A. coriacea* em coluna cromatográfica

Fração ACORI-	massa (mg)							
	Etapa							
	1	2	3	4	5	6	7	8
1	44,92	52,40	47,43	49,87	61,76	65,21	46,50	77,00
2	20,10	45,70	56,90	57,89	52,90	51,70	46,60	38,90
3	27,20	15,10	6,50	29,50	7,50	16,40	17,17	28,30
4	29,20	25,80	20,20	35,00	42,70	28,10	25,60	47,96
5	28,20	15,60	44,90	26,30	20,80	35,50	20,20	35,89
6	33,10	6,70	35,40	24,40	30,50	53,90	60,20	29,78
7	63,50	22,20	51,20	45,70	78,30	64,60	95,30	35,21
8	32,20	39,20	26,90	55,20	51,80	7,20	86,90	18,75
9	48,00	40,70	43,50	55,90	62,20	74,70	52,30	29,21
10	32,20	59,90	42,60	56,90	59,20	36,80	83,40	37,54
11	40,20	47,50	46,90	64,65	55,70	40,10	67,90	29,53
12	70,38	72,50	69,40	43,90	47,80	31,50	92,80	39,87
13	44,20	51,00	58,90	68,76	62,40	33,50	49,30	56,23
14	44,30	11,80	44,50	21,74	20,80	12,20	13,90	39,00
15	50,10	54,30	55,98	73,43	53,00	64,40	64,40	30,93