

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA
DE *Annona impressivenia* Safford (ANNONACEAE)

ADRIANE GAMA DOS SANTOS

MANAUS

2007

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ADRIANE GAMA DOS SANTOS

ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA
DE *Annona impressivenia* Safford (ANNONACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química de Produtos Naturais.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Maria Lúcia Belém Pinheiro

Universidade Federal do Amazonas

MANAUS

2007

Santos, Adriane Gama dos

Estudo Fitoquímico e Atividade Leishmanicida de *Annona impressivenia* Safford (Annonaceae) / Adriane Gama dos Santos – Manaus/AM, 2007.

Dissertação (Mestrado) – UFAM/2007

101 p. il.

1. Annonaceae 2. *Annona impressivenia* 3. Leishmaniose 4. Alcalóides

I. Título

*“ Mestre não é aquele que sempre ensina,
mas quem de repente aprende.”*

Guimarães Rosa

ADRIANE GAMA DOS SANTOS

**ESTUDO FITOQUÍMICO E ATIVIDADE LEISHMANICIDA
DE *Annona impressivenia* Safford (ANNONACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química, área de concentração Química de Produtos Naturais.

Aprovada em 09 de Fevereiro de 2007

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Maria Lúcia Belém Pinheiro

Orientadora – Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Prof. Dr. Andersson Barison

Membro – Universidade Federal do Paraná (UFPR)

Prof^a. Dr^a. Maria da Paz

Membro – Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA)

Dedico este trabalho...

“À Deus, meu Senhor, que guia-me mansamente a águas tranquilas;

À minha família, pelo apoio, amor e paciência”.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por sua luz divina que ilumina meu caminho todos os dias;

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM), pela oportunidade de aprimoramento de profissionais na área de Química;

Ao CNPq, pela bolsa de estudos que me concedeu durante os dois anos de mestrado;

À minha orientadora Dra. Maria Lúcia Belém Pinheiro, pela sua valiosíssima orientação, apoio e confiança durante todos os anos em que trabalhamos juntas;

Ao Dr. Andersson Barison, à Dra. Francinete R. Campos e ao Msc. Emmanoel Vilaça, pela excelente colaboração nas análises espectrométricas realizadas na UFPR;

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA), pela colaboração nas análises espectrométricas;

Ao nosso mateiro Edmilson “Movido”, pela coleta do material botânico.

À Carmem Lúcia Machado, Diego Rabelo e Verônica Maria, pela colaboração nas análises de IV realizadas na Central Analítica da UFAM;

À Dra. Maria da Paz e à Dra. Ana Lúcia Galota, pelas sugestões no Exame de Conhecimento para a realização final deste trabalho;

À Fundação Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro, pela possibilidade de realização dos testes leishmanicidas.

Ao Dr Jefferson Rocha de Andrade Silva, pela oportunidade de realizar o treinamento (testes biológicos) na Fiocruz – RJ;

À Dra. Ana Cláudia Fernandes Amaral, pelo apoio durante a estadia na Casa Amarela e realização dos testes biológicos na Fiocruz-RJ;

À Dra. Leonor Leon e à Dra. Marilene Cavalheiro, pela oportunidade de realização dos testes leishmanicidas no laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz e pelas sugestões;

Aos colegas do laboratório de Bioquímica de Tripanossomatídeos Gércia, Rosa, Daniela, Vanessa, Carla, Renata e Denise, pela amizade, paciência e pela concessão de referências bibliográficas;

Aos amigos que fiz na Fiocruz, mais precisamente na Casa Amarela-RJ Patrícia, Giuliana, Janaína, Dani, Carol, Taís, Cristiano, Igor, Yamille, Maria Liz, Magali, Eduardo e Maurício, pelos momentos de descontração, dicas, amizade, união e carinho;

À Amélia, nossa adorável secretária da pós-graduação, pelas dicas e amizade.

Ao amigo Emmanoel da Costa Vilaça, por suas dicas valiosas e pela sua grande contribuição a este trabalho;

Aos amigos Verônica, Léia, Geone e Marycleuma, companheiros inseparáveis de estudos, juntamente com os demais colegas do curso de pós-graduação Giese, Izandina, Radamés, Licéia e Franklin, pelo apoio e companheirismo;

Aos colegas dos laboratórios de produtos naturais da UFAM Verônica, Danielle, Jaqueline, Diego Rabelo, Diego Fares, Jeferson, Geone, Giese, Fátima, Dominique, Júnior Ribeiro, Livia e aos demais que passaram por lá (Pibic, Estágio), pela ajuda, companheirismo e apoio;

Aos meus amigos de Graduação em Química da UFAM Junior, Jane, Joyce e Joelma, pelo apoio durante meu curso de mestrado;

Às minhas amigas Samia, Adriana Hiasmini, Adriana Lopes e Nubya, pelos momentos de descontração, apoio e companheirismo;

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Química, pelas excelentes aulas e dedicação ao curso;

Enfim, agradeço a todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

RESUMO

Annona impressivenia Safford (Annonaceae) é uma espécie conhecida popularmente como “graviola-brava”. É uma árvore rara distribuída da Guiana venezuelana à Amazônia Central. Este trabalho descreve os resultados obtidos a partir do estudo fitoquímico e de atividade leishmanicida dos extratos da casca e cerne do caule frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. guyanensis*. Entre as amostras avaliadas, o extrato diclorometânico e a fração diclorometânica neutra da casca e, ainda, a fração clorofórmica alcaloídica do cerne, provenientes de marcha química para obtenção de alcalóides, apresentaram significativa atividade leishmanicida *in vitro* contra *L. guyanensis*, enquanto que o extrato diclorometânico do cerne apresentou atividade contra *L. amazonensis*. A análise fitoquímica do extrato diclorometânico da casca revelou a presença do alcalóide oxoaporfínico liriodenina, comumente encontrado em espécies da família Annonaceae, e o alcalóide do tipo pirimidino- β -carbolínico conhecido como metoxiannomontina. Do extrato diclorometânico do cerne, além do alcalóide liriodenina, foi isolado o alcalóide do tipo aza-antraquinona cleistofolina. A provável presença de acetogeninas nos extratos hexânicos (casca e cerne) também foi detectada. A identificação das substâncias isoladas foi realizada por meio de análises espectroscópicas (IV, RMN de ^1H e de ^{13}C 1D e 2D) e por comparações com dados da literatura.

Palavras-chaves:

Annonaceae, *Annona impressivenia*, atividade leishmanicida, alcalóides.

ABSTRACT

Annona impressivenia Safford (Annonaceae) it is a species known popularly as "graviola-brava". It is a rare tree distributed of Guyana Venezuelan to the Amazonian Central. This work describes the results obtained from the phytochemical study and the anti-leishmanial assay of the extracts of the heartwood and stem bark of this plant against promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and *L. guyanensis*. The botanical material was submitted to conventional analysis to separation of alkaloids. Among the investigated samples, the dichloromethane extracts and the dichloromethane neutral fraction of the stem bark and chloroform alkaloid fraction of the heartwood presented significant antileishmanial activity *in vitro* against *L. guyanensis*. Just the dichloromethane extract of the heartwood presented activity against promastigote form *L. amazonensis*. The phytochemical analysis of the dichloromethane extract of the stem bark revealed the presence of the oxoaporphine alkaloid liriodenine, commonly found in species of the family Annonaceae, and the pyrimidine- β -carboline-type alkaloid known as methoxyannomontine. From the dichloromethane extract of the heartwood, besides the alkaloid liriodenine, the azaanthraquinone-type alkaloid cleistofoline was isolated. The probable presence of the acetogenins in the hexane extracts (heartwood and stem bark) it was also detected. The identification of the isolated substances was accomplished through spectroscopic analyses (IR, ^1H and ^{13}C NMR 1D and 2D) and by comparisons with data of the literature.

Key words:

Annonaceae, *Annona impressivenia*, antileishmanial activity, alkaloids.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	05
2.1 Considerações Gerais Sobre a Família Annonaceae.....	05
2.2 O gênero <i>Annona</i> Linnaeus.....	10
2.2.1 Distribuição Geográfica e Ocorrência.....	10
2.2.2 Características Botânicas.....	10
2.2.3 Importância Econômica e Etnobotânica.....	11
2.2.4 Principais Constituintes Químicos e Algumas Atividades Biológicas.....	12
2.2.4.1 Alcalóides.....	12
2.2.4.2 Acetogeninas de Anonáceas.....	16
2.3 A espécie <i>Annona impressivenia</i> Safford ex R. E. Fries, 1931.....	20
2.4 Leishmaniose.....	21
3. OBJETIVOS.....	27
3.1 Geral.....	27
3.2 Específicos.....	27
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	28
4.1 Métodos Cromatográficos.....	28
4.1.1 Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).....	28
4.1.2 Cromatografia em Coluna (CC).....	28
4.1.3 Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).....	29

4.2 Métodos Espectrométricos.....	29
4.3 Outros Equipamentos.....	30
4.4 Material Botânico.....	31
4.4.1 Coleta do Material.....	31
4.4.2 Secagem e Moagem.....	31
4.5 Obtenção de Óleos Essenciais.....	31
4.6 Preparação dos Extratos Brutos (MATOS, 1997).....	32
4.7 Marcha química para Obtenção de Alcalóides.....	33
4.7.1 Tratamento dos Extratos Diclorometânicos da Casca (EDCA) e do Cerne (EDCE).....	33
4.7.2 Tratamento dos Extratos Metanólicos da Casca (EMCA) e do Cerne (EMCE).....	35
4.8 Marcha Química para Obtenção de Acetogeninas de Anonáceas.....	36
4.8.1 Tratamento dos Extratos Hexânicos da Casca (EHCA) e do Cerne (EHCE).....	36
4.9 Análises e Fracionamentos Cromatográficos da Casca de <i>A. impressivenia</i>	37
4.9.1 Fração Diclorometânica Neutra (FDNCA).....	37
4.9.2 Fração Diclorometânica Alcalóidica (FALCA).....	38
4.9.3 Fração Hidrometanólica (EMA).....	39
4.10 Análises e Fracionamentos Cromatográficos do Cerne de <i>A. impressivenia</i>	39
4.10.1 Fração Diclorometânica Alcalóidica (FALCE).....	39
4.10.2 Fração Diclorometânica Neutra (FDNCE).....	40
4.11 Testes in vitro para Atividade Leishmanicida.....	40
4.11.1 Parasitas.....	40
4.11.2 Cultivo “in vitro” dos Promastigotas.....	41
4.11.3 Avaliação da Atividade Leishmanicida.....	41
4.11.3.1 Triagem (<i>screening</i>).....	42
4.11.3.1.1 Ajuste da Concentração Parasitária.....	43
4.11.3.1.2 Montagem da Placa de Microtitulação.....	45
4.11.3.1.3 Leitura das Placas.....	46
4.11.3.2 Diluição Seriada (Faixa de Concentração de 160 a 0,16 µg/mL).....	48
5. RESULTADOS FINAIS.....	49

5.1 Obtenção de Óleos Essenciais das Folhas.....	49
5.2 Resultados das Análises da Casca de <i>Annona impressivenia</i>	49
5.2.1 Caracterização do sólido S134.....	49
5.2.2 Identificação de AGA3-34.....	51
5.2.3 Identificação de AGA3-35A e AGA3-35B.....	63
5.2.4 Caracterização do Extrato Bruto EHCA.....	73
5.2.4.1 Caracterização da Fração EMA.....	74
5.3 Resultados das Análises do Cerne de <i>Annona impressivenia</i>	75
5.3.1 Identificação de AGE-35 e AGE-78.....	75
5.3.2 Caracterização de Frações de FDNCE.....	86
5.3.3 Caracterização do Extrato Bruto EHCE.....	86
5.4 Ensaio Biológico.....	88
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.	Estrutura da Argentilactona.....	03
FIGURA 2.	Distribuição geográfica da família Annonaceae.....	06
FIGURA 3.	Ata.....	07
FIGURA 4.	Graviola.....	07
FIGURA 5.	Biribá.....	07
FIGURA 6.	Pindaíba.....	07
FIGURA 7.	Cherimólia.....	07
FIGURA 8.	Atemóia.....	07
FIGURA 9.	<i>Xylopi</i> <i>brasiliensis</i>	08
FIGURA 10.	<i>Cananga odorata</i>	08
FIGURA 11.	Alcalóide do tipo isoquinolínico simples.....	09
FIGURA 12.	Liriodenina.....	13
FIGURA 13.	Anonaína.....	13
FIGURA 14.	Annoretina.....	13
FIGURA 15.	Argentinina.....	13
FIGURA 16.	7-hidróxi-desidrothalicsimidina.....	14
FIGURA 17.	Thalicsimidina.....	14
FIGURA 18.	Norpurpureína.....	14
FIGURA 19.	Lirinidina.....	14
FIGURA 20.	<i>N</i> -metilasimilobina.....	14
FIGURA 21.	Reticulina.....	15

FIGURA 22. Laurelliptina.....	15
FIGURA 23. Isoboldina.....	15
FIGURA 24. <i>N</i> -hidróxiannomontina.....	15
FIGURA 25. Annomontina.....	15
FIGURA 26. <i>O</i> -metilmoschatolina.....	15
FIGURA 27. Uvaricina.....	16
FIGURA 28. Cherimolina.....	17
FIGURA 29. Desidrocherimolina.....	17
FIGURA 30. Annonacina.....	18
FIGURA 31. Annonacinona.....	18
FIGURA 32. Murisolina.....	18
FIGURA 33. Corossolina.....	18
FIGURA 34. Corossolona.....	19
FIGURA 35. Espécie <i>A. impressivenia</i> : (a) folhas; (b) caule (c) árvore com 15 m de altura.....	20
FIGURA 36. Mosquito do gênero <i>Phlebotomus</i>	21
FIGURA 37. Forma promastigota.....	22
FIGURA 38. Forma amastigota.....	22
FIGURA 39. Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> spp.....	23
FIGURA 40. Antimoniato de meglumina.....	24
FIGURA 41. Estibogliconato de sódio.....	24
FIGURA 42. Anfotericina B.....	24
FIGURA 43. Pentamidina.....	25
FIGURA 44. Miltefosina.....	25
FIGURA 45. Extração a frio em frasco Mariotte da casca e do cerne.....	32
FIGURA 46. Fração 134 de FDNCA.....	37
FIGURA 47. CCDP de AGA3-35: (a) amostra recém aplicada; (b) cromatoplaça após eluição.....	38
FIGURA 48. Placa de microtitulação de 96 poços.....	45
FIGURA 49. Leitor espectrofotométrico de placas.....	46

FIGURA 50. Placa com os cristais de formazan dissolvidos em DMSO.....	47
FIGURA 51. Espectro no IV de S134 em KBr.....	50
FIGURA 52. Espectro no IV de AGA3-34 em KBr.....	52
FIGURA 53. (a) Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz em CD_3OD de AGA3-34; (b) Ampliação da região entre δ 8,60 e 7,30.....	53
FIGURA 54. Ampliação do mapa de correlação COSY- ^1H - ^1H de AGA3-34.....	54
FIGURA 55. (a) Espectro de RMN de ^{13}C a 125 MHz em CD_3OD de AGA3-34; (b) Ampliação da região entre δ 152,3 a 103,1.....	56
FIGURA 56. Ampliação do espectro DEPT 135 de AGA3-34.....	57
FIGURA 57. Ampliação do mapa de correlação HSQC de AGA3-34.....	57
FIGURA 58. Ampliação do mapa de correlação HMBC de AGA3-34.....	59
FIGURA 59. Espectro no IV de AGA3-35B em KBr.....	63
FIGURA 60. (a) Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz em $(\text{CD}_3)_2\text{CD}$ de AGA3-35B; (b) Ampliação da região aromática.....	65
FIGURA 61. Mapa de correlação HSQC de AGA3-35B.....	66
FIGURA 62. Ampliação da região aromática do mapa de correlação de HSQC de AGA3-35B.....	67
FIGURA 63. (a) Mapa de correlação HMBC de AGA3-35B; (b) Ampliação da região de correlações dos hidrogênios aromáticos.....	68
FIGURA 64. Metoxiannomontina.....	72
FIGURA 65. Espectro no IV de EHCA.....	73
FIGURA 66. CCD de EMA: (a) Revelação com reagente de Kedde; (b) Revelação com reagente de Dragendorff.....	74
FIGURA 67. Espectro no IV de AGE-78 em KBr.....	75
FIGURA 68. Espectro de RMN de ^1H a 400 MHz em CDCl_3 de AGE-78.....	76
FIGURA 69. (a) Ampliação da região aromática; (b) Ampliação da região entre δ 8,40 e δ 8,25.....	77
FIGURA 70. Mapa de correlação HSQC de AGE-78.....	78
FIGURA 71. Ampliação do mapa de correlação HSQC de AGE-78.....	79
FIGURA 72. Mapa de correlação HMBC de AGE-78.....	80
FIGURA 73. (a) Ampliação da região de correlações dos hidrogênios aromáticos; (b) Ampliação das correlações dos hidrogênios do grupo metila (δ 2,93).....	81

FIGURA 74. Cleistofolina.....	85
FIGURA 75. Espectro no IV de EHCE.....	86
FIGURA 76. CCD de EME: (a) Revelação com reagente de Kedde; (b) Revelação com reagente de Dragendorff.....	87
FIGURA 77. Atividade leishmanicida na concentração de 320 µg/mL contra formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	88
FIGURA 78. Atividade leishmanicida na concentração de 320 µg/mL contra formas promastigotas de <i>L. guyanensis</i>	89

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1. Amostras sujeitas a teste leishmanicida “ <i>in vitro</i> ”	42
QUADRO 2. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC AGA3-34 (CD_3OD , 500 MHz).....	60
QUADRO 3. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C AGA3-34 com a literatura.....	61
QUADRO 4. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC para AGA3-35B [$(\text{CD}_3)_2\text{CO}$, 400 MHz].....	70
QUADRO 5. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de AGA3-35B com a literatura.....	71
QUADRO 6. Dados de RMN de ^1H , HSQC e HMBC de AGE-78 (CDCl_3 , 400 MHz).....	83
QUADRO 7. Comparação dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C de AGE-78 com a literatura.....	84

LISTA DE ESQUEMAS

ESQUEMA 1.	Obtenção dos extratos brutos da casca e cerne de <i>A. impressivenia</i>	33
ESQUEMA 2.	Fluxograma da extração das bases presentes no extrato diclorometânico.....	34
ESQUEMA 3.	Fluxograma da extração das bases presentes no extrato metanólico.....	35
ESQUEMA 4.	Fluxograma do tratamento para a obtenção de acetogeninas de anonáceas.....	36
ESQUEMA 5.	Ajuste para a concentração de 4×10^6 parasita/mL.....	44

1. INTRODUÇÃO

Escritos antigos citam o uso de espécies vegetais em diversas formas de tratamento de doenças e sintomas. A Bíblia documenta e registra a utilização de raízes, cipós, folhas, sementes e frutos em diferentes funções, tanto na alimentação quanto na cura de doenças e ferimentos. Outro registro é o papiro de Ebers, descoberto e publicado por Georg Ebers, que foi encontrado nas proximidades da casa mortuária de Ramsés II, mas pertence à época da dinastia XVIII. Este papiro enumera cerca de 100 doenças e descreve um grande número de drogas de natureza animal e vegetal (VILELA apud PINTO *et al.*, 2002).

O conhecimento popular sobre plantas vem se acumulando durante séculos, principalmente sobre as que apresentam fins terapêuticos. Esse conhecimento vem se perpetuando na história da civilização humana, em grande parte, por meio da tradição oral, contribuindo na cura e prevenção de muitas enfermidades. Nos dias atuais, diversas espécies ainda são utilizadas pela população mundial, sendo muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades (DI STASI, 1996).

Pesquisadores que estudam espécies vegetais, em sua grande maioria, procuram isolar e determinar a estrutura de compostos ativos de plantas muito bem conhecidas e com propriedades terapêuticas indicadas pelo uso popular e, geralmente, incorporadas em diversas farmacopéias. Dessa forma, o isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal ocorreu a partir do século XVIII, sendo caracterizado pelos trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e alcalóides (PINTO *et al.*, 2002).

De uma forma geral, uma diversidade de compostos químicos tem sido obtida de espécies vegetais. Estes compostos, além de possuírem aplicação na produção de medicamentos, têm emprego na produção de alimentos, cosméticos, agroquímicos e, sobretudo, se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos (GUERRA e NODARI, 2004).

A Amazônia destaca-se como fonte promissora de novos constituintes químicos por ser considerada uma das regiões detentoras de maior biodiversidade do planeta, apresentando uma incrível variedade de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. Entretanto, mesmo possuindo um considerável número de espécies vegetais, poucas são submetidas a uma investigação química e menor ainda é a porcentagem referente ao estudo da potencialidade farmacológica.

Um grupo de plantas da família Annonaceae se destaca por sua importância econômica, devido a seus apreciáveis frutos comestíveis. Além disso, muitas espécies desta família são usadas na medicina popular para vários propósitos. Particularmente, espécies do gênero *Annona*, *Guatteria* e *Uvaria* têm demonstrado atividade antiprotozoário, especialmente contra parasitas causadores da malária, doença de Chagas e leishmaniose (LEBOEUF *et al.*, 1982).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) considera a leishmaniose uma das cinco doenças tropicais mais disseminadas no planeta. A situação é preocupante, visto que anualmente cerca de 2 milhões pessoas em todo o mundo são infectadas (ROCHA *et al.*, 2005). Especialmente comum na Amazônia e Nordeste, a doença ainda não foi erradicada das demais regiões brasileiras. De acordo com dados da FUNASA, órgão do Ministério da Saúde, uma média de 28 mil novos casos apareceu por ano no Brasil, durante as décadas de 1980 e 1990.

O tratamento inicial desta doença feito com antimoniais pentavalentes causa sérios efeitos colaterais, incluindo danos aos rins, coração, circulação e cérebro. Quando este

tratamento não é efetivo, outras medicações são incluídas dentre elas pentamidina e anfotericina B, sem, contudo, eliminar estes efeitos. Todas essas medicações requerem administração injetável sob supervisão médica ou hospitalização durante o tratamento devido à severidade dos efeitos colaterais (CHAN-BACAB e PEÑA-RODRIGUEZ, 2001).

Por outro lado, avanços em pesquisas imunológicas para produção de vacinas não superaram os obstáculos que tornam complexa a obtenção de um antígeno eficaz. Dessa forma, existe uma urgência de novos agentes terapêuticos mais eficientes e menos tóxicos que combatam a leishmaniose e é neste contexto que a investigação de fitoconstituintes se torna importante.

Um grande número de espécies tem sido investigado e várias classes de substâncias têm mostrado atividade leishmanicida, estando entre elas, alcalóides isoquinolínicos, chalconas, quinonas, terpenos (WRIGHT E PHILLIPSON, 1990), diarilheptanóides e isoflavonóides (ARAÚJO *et al.*, 1998), neolignananas (BARATA *et al.*, 2000) e δ -lactonas α , β -insaturadas (SAEED *et al.*, 2001). Dentre as espécies se destaca a *Annona haematantha*, pertencente à família Annonaceae, de cujo óleo essencial e extrato hexânico das raízes foi isolada a substância R-(-)-Argentilactona (FIGURA 1), a qual revelou significativa atividade anti-leishmania (WAECHTER *et al.*, 1997).

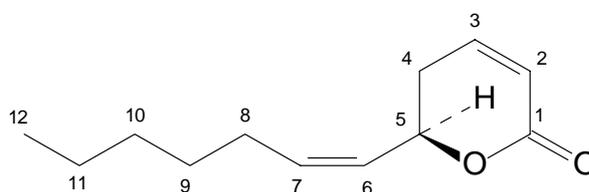


FIGURA 1. Estrutura da Argentilactona

Mais recentemente, outras espécies do gênero *Annona* tais como *A. foetida* (COSTA *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2003), *A. sericea* (XAVIER *et al.*, 2003) e *A. amazonica* (XAVIER

et al., 2004) também tiveram resultados promissores quanto à atividade leishmanicida “*in vitro*” de extratos brutos e substâncias isoladas.

A potencialidade químico-farmacológica de espécies da família Annonaceae, referente à atividade leishmanicida, aliada à carência de estudos químicos sobre o gênero *Annona*, levaram à investigação da espécie *Annona impressivenia*, para a qual não são registrados estudos químicos-biológicos.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações Gerais Sobre a Família Annonaceae

De acordo com Barroso (1978), a subclasse Magnoliidae subdivide-se em seis ordens: Magnoliales, Piperales, Aristolochiales, Nymphaeales, Ranunculales e Papaverales. Nesta subclasse, encontram-se as famílias com características consideradas as mais primitivas das Angiospermas, tais como as Magnoliaceae, Winteraceae e Annonaceae, entre outras.

A ordem Magnoliales, uma das maiores das Angiospermas, consiste de 19 famílias, com cerca de 5.600 espécies. No Brasil, é representada pelas famílias Annonaceae, Winteraceae, Magnoliaceae, Cannelaceae, Myristicaceae, Monnimiaceae, Hernandiaceae e Lauraceae (BARROSO, 1978).

A família Annonaceae Jussieu compreende aproximadamente 135 gêneros, que englobam 2.500 espécies, com distribuição marcadamente tropical e subtropical em todo o mundo (LOBÃO *et al*, 2005; JOLY, 1993) (FIGURA 2, PÁGINA 6).

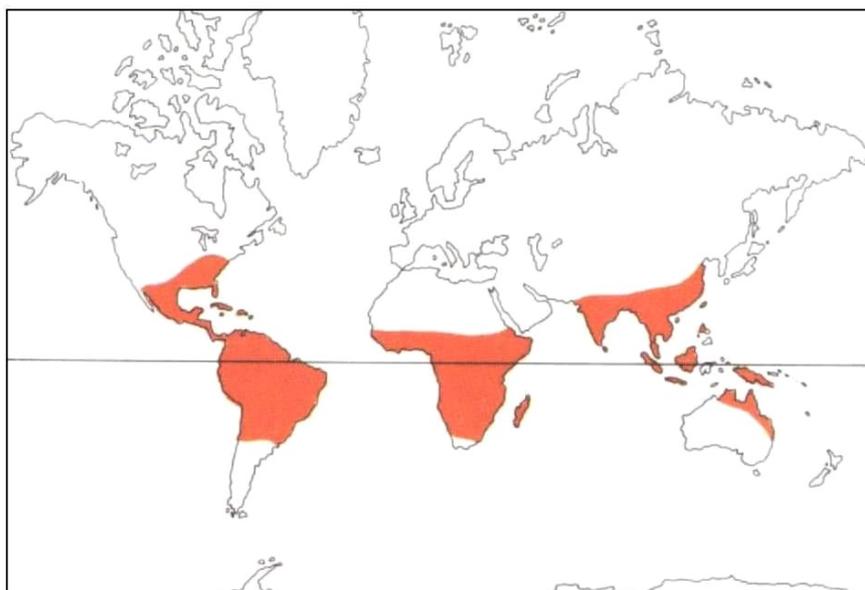


FIGURA 2. Distribuição geográfica da família Annonaceae

Fonte: Heywood, 1978

Nos neotrópicos está representada por cerca de 40 gêneros e aproximadamente de 900 espécies, com centros de distribuição na região Amazônica e nas Guianas (LOBÃO *et al*, 2005; RIBEIRO *et al*, 1999). No Brasil, é representada por 29 gêneros, sendo sete endêmicos, e com cerca de 260 espécies, tendo presença marcante nas florestas e no cerrado (LOBÃO *et al*, 2005; PAULINO NETO e OLIVEIRA, 2006).

Nos trópicos do Velho Mundo, as plantas desta família são escandentes e ocorrem em matas pouco densas, porém na América tropical são arbustivas ou arbóreas e crescem nos campos ou em lugares abertos. Geralmente apresentam lenho e folhas aromáticos (BARROSO, 1978).

Em geral, as espécies desta família são polinizadas por insetos tais como moscas, abelhas e até mesmo baratas. Porém, a grande maioria, inclusive as cultivadas, é polinizada exclusivamente por besouros. Este tipo de polinização é conhecido como cantarofilia e é uma característica considerada primitiva entre as angiospermas (PAULINO NETO e OLIVEIRA, 2006).

A família Annonaceae é conhecida principalmente por possuir frutos comestíveis, tais como ata, pinha ou fruta-do-conde (*Annona squamosa*) (FIGURA 3), graviola (*Annona muricata*) (FIGURA 4), biribá (*Rollinia mucosa*) (FIGURA 5), pindaíba (*Duguetia lanceolata*) (FIGURA 6), cherimólia (*Annona cherimolia*) (FIGURA 7), araticum (nome de muitas espécies nativas do Brasil), atemóia (híbrido de *A. squamosa* e *A. cherimolia*) (FIGURA 8) e outras (PAULINO NETO e OLIVEIRA, 2006).



FIGURA 3. Ata



FIGURA 4. Graviola



FIGURA 5. Biribá



FIGURA 6. Pindaíba

Fonte: www.rarefruit.org



FIGURA 7. Cherimólia

Fonte: www.provincia.rc.it



FIGURA 8. Atemóia

Algumas espécies desta família fornecem madeira própria para carpintaria. Desta forma, a madeira de *Duguetia sessilis* é utilizada para construção, geralmente como suporte

do telhado das casas, enquanto que a espécie *Xylopia sericea* fornece madeira para mastros de pequenas construções (LOBÃO *et al*, 2005).

Para o condimento alimentar são aproveitados os frutos ou as sementes de diversas espécies de *Xylopia*, tais como a *X. sericea*, cujas sementes substituem a pimenta do reino ou a pimenta da Índia; e a *X. aromatica*, cujos frutos colhidos não inteiramente maduros são usados como substituto de pimenta malagueta (LOBÃO *et al*, 2005; GEMTCHÚJNICOV, 1976; HOEHNE *et al*, 1941).

Espécies arborescentes são usadas para a ornamentação e sombreamento de parques e jardins como, por exemplo, *Xylopia brasiliensis* (FIGURA 9) e *Cananga odorata* (FIGURA 10), sendo que esta última é utilizada também na produção de perfumes (HOEHNE *et al*, 1941).



FIGURA 9. *Xylopia brasiliensis*

Fonte: www.plantarum.com.br



FIGURA 10. *Cananga odorata*

Fonte: www.da-academy.org

Muitas espécies de Annonaceae destacam-se pelo amplo número de utilidade na medicina popular. Assim, as sementes reduzidas a pó de *Rollinia mucosa* são usadas contra enterocolite, enquanto que seu fruto (biribá) é tido como analéptico e antiescorbútico. Os frutos ainda verdes de *Xylopia aromatica* são conhecidos como vermífugos e tônicos para

estômago e intestino (PRANCE, 1975). Outras espécies são também utilizadas como antitumoral, parasiticida e antidiarréica (PIMENTA *et al.*, 2003).

Quanto à investigação química de plantas desta família, Leboeuf *et al.* (1982) fizeram uma extensiva relação dos principais constituintes encontrados. Dentre estes se destacam os alcalóides, principalmente do tipo isoquinolínico (FIGURA 11), o que motivou inicialmente o interesse por espécies desta família.

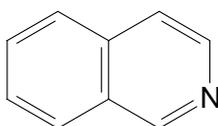


FIGURA 11. Alcalóide do tipo isoquinolínico simples

Além disso, ainda podem ser encontrados carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas, polifenóis, óleos essenciais, terpenos e compostos aromáticos. Nos últimos anos, a descoberta de acetogeninas de anonáceas, uma classe química encontrada somente nesta família, tem atraído grande interesse devido a sua crescente lista de atividade biológica e estruturas especiais (CHANG *et al.*, 1999).

2.2 O gênero *Annona* Linnaeus

2.2.1 Distribuição Geográfica e Ocorrência

O gênero *Annona*, estabelecido por Carl Linnaeus em 1753, é constituído por cerca de 110 espécies. Elas ocorrem como árvores, arvoretas, arbustos e lianas e podem ser encontradas em regiões tropicais e subtropicais, particularmente no Sul dos Estados Unidos (Flórida), México, América Central, Oeste da Índia, Brasil, Colômbia, Venezuela, Trinidad, Guiana, Suriname, Guiana Francesa, Equador, Peru, Bolívia, Paraguai e Chile e na África tropical (apenas 4 espécies) (LOBÃO *et al.*, 2005; RAINER, 1995).

2.2.2 Características Botânicas

As espécies do gênero *Annona* possuem folhas alternadas, curto-pecioladas, elípticas ou curtas e obtusamente acuminadas e arredondadas no ápice. As flores ou inflorescências são terminais e podem estar solitárias, geminadas ou em blocos; possuem três sépalas, livres ou unidas; seis pétalas, raramente três, livres ou conatas na base, as externas valvares, as internas valvares ou imbricadas; numerosos estames, conectivo dilatado em forma de disco, raramente apiculado ou semi-orbicular; anteras não septadas transversalmente, estaminódios ausentes; e, ainda, numerosos carpelos e um óvulo basal. O fruto é sincárpico, carnoso, indeiscente; possuem muitas sementes, sem arilo (LOBÃO *et al.*, 2005; MAAS *et al.*, 2001; PIMENTA, 1995).

2.2.3 Importância Econômica e Etnobotânica

Espécies deste gênero possuem várias aplicações na etnobotânica. As raízes de *A. crassiflora* e *A. glabra*, por serem muito leves, são utilizadas para confecção de rolhas e bóias. A madeira de *A. glabra*, *A. cacas* e *A. coriacea*, por ser bem flexível, é usada na fabricação de ripas, caixotes, forros e confecção de brinquedos. As espécies *A. crassiflora*, *A. cacas* e *A. coriacea*, devido a suas qualidades ornamentais, são utilizadas na arborização urbana (BRAGA, 1960).

Este gênero possui várias espécies selvagens conhecidas por cabeça-de-negro, pinha, e outras cultivadas por possuírem frutos apreciáveis, tais como araticum, anona, ata, cherimólia, marolo, fruta-de-conde, pinha-azedada, graviola e condessa (JOLY, 1993).

Além da importância econômica, muitas espécies desse gênero são usadas na medicina popular para várias enfermidades. Desta forma, os frutos ainda verdes de *A. muricata* e *A. cherimolia* são usados como antidiarréicos, enquanto que suas sementes são usadas como inseticida e parasiticida. Além disso, suas folhas são sedativas e ansiolíticas (BORIES *et al*, 1991). No Senegal, folhas e cascas do caule de *A. senegalensis* são usadas como antidiarréicos; enquanto raízes e folhas são utilizadas em complicações respiratórias (SAHPAZ *et al*, 1994). As folhas de *A. squamosa*, em infusão, são estomacais e, esmagadas, são usadas para dores de cabeça e nevralgias; suas sementes são inseticidas quando reduzidas a pó (BRAGA, 1960).

2.2.4 Principais Constituintes Químicos e Algumas Atividades Biológicas

A família Annonaceae tem demonstrado ser importante fonte de novos compostos químicos devido à diversidade biogenética e estrutural de metabólitos secundários que podem ser encontrados em suas espécies. Muitas destas, particularmente as do gênero *Annona*, são caracterizadas pela ocorrência de alcalóides e acetogeninas de anonáceas. Outros compostos químicos, tais como os diterpenos, triterpenos, lactonas, flavonóides, e esteróides também podem ser encontrados com frequência nas espécies deste gênero (COSTA, 2004; CAVÉ *et al.*, 1987).

Mediante os estudos baseados no uso popular, espécies do gênero *Annona* tiveram suas atividades biológicas comprovadas, atribuídas a suas principais classes de substâncias químicas tais como alcalóides, acetogeninas de anonáceas e diterpenos. Dentre as atividades biológicas destacam-se as atividades antitumoral, antifúngica, antibacteriana, tripanomicida e leishmanicida (COSTA, 2004).

2.2.4.1 Alcalóides

De acordo com Leboeuf (1982), a família Annonaceae se destaca pela ocorrência de alcalóides do tipo isoquinolínico, tais como os alcalóides isoquinolínicos simples; benziltetraisoquinolínicos; bisbenzilisquinolínicos e bisbenziltetraisoquinolínicos; protoberberínicos e tetrahidroprotoberberínicos; e aporfínóides, incluindo todos os alcalóides com o núcleo aporfínico verdadeiro e os alcalóides baseados em seu núcleo, porém com esqueleto modificado (CAVÉ *et al.*, 1987).

A diversidade de atividades biológicas atribuídas aos alcalóides é conhecida há muito tempo. Na família Annonaceae, esta diversidade está relacionada, principalmente, à variedade estrutural dos alcalóides do tipo aporfínico e seus derivados.

Dentre estes, destacam-se os alcalóides lirioidenina (oxoaporfínico) (FIGURA 12) e anonaína (aporfínico) (FIGURA 13), que são os mais encontrados nas espécies do gênero *Annona*, podendo ainda serem considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família (COSTA, 2004; ACHENBACH e HEMRICH, 1991).

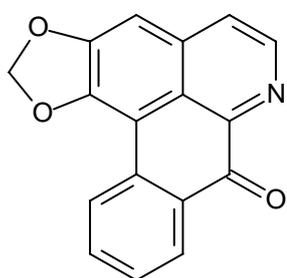


FIGURA 12. Lirioidenina

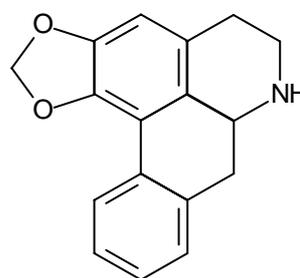


FIGURA 13. Anonaína

Pesquisas com o extrato metanólico das folhas de *Annona montana* revelaram significativa citotoxicidade *in vitro* contra diferentes tipos de tumores. O fracionamento biomonitorado deste extrato levou à identificação dos alcalóides annoretina (até então, um novo alcalóide fenantreno) (FIGURA 14), junto com argentinina (FIGURA 15) e lirioidenina (FIGURA 12) como compostos ativos (WU *et al.*, 1993).

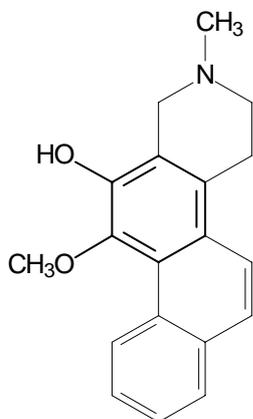


FIGURA 14. Annoretina

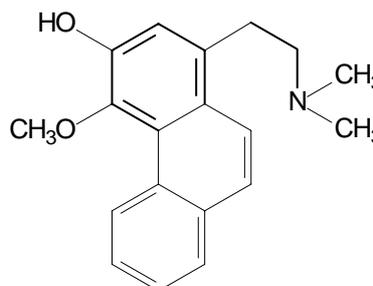


FIGURA 15. Argentinina

O extrato metanólico das folhas de *Annona purpurea* apresentou significativo efeito inibitório de agregação plaquetária induzido por vários agentes de agregação, cujo fracionamento mostrou a presença de alcalóides como substâncias bioativas. A elucidação estrutural levou à identificação dos alcalóides 7-hidróxi-desidrothalicsimidina (FIGURA 16), thalicsimidina (FIGURA 17), norpurpureína (FIGURA 18), lirinidina (FIGURA 19) e *N*-metilasimilobina (FIGURA 20), os quais foram responsáveis pela atividade biológica (CHANG *et al.*, 1998).

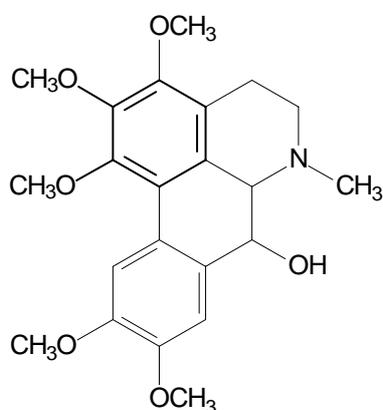


FIGURA 16. 7-hidróxi-desidrothalicsimidina

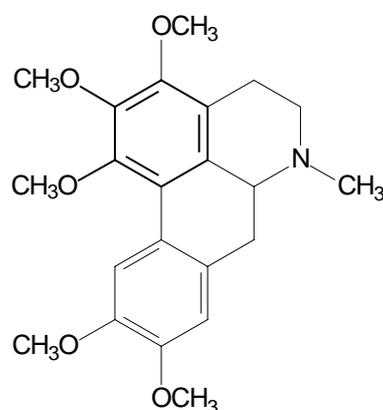


FIGURA 17. Thalicsimidina

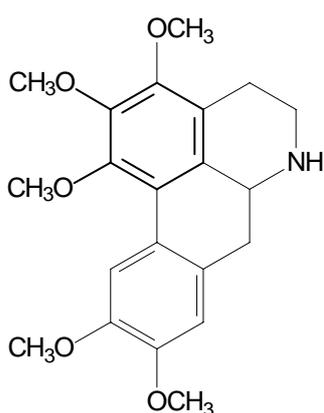


FIGURA 18. Norpurpureína

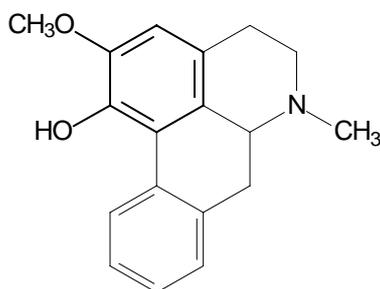


FIGURA 19. Lirinidina

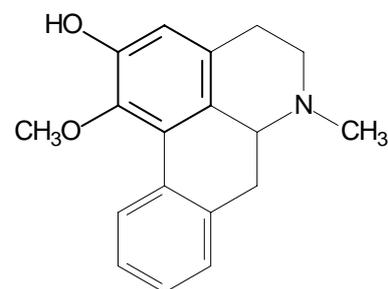


FIGURA 20. *N*-metilasimilobina

Da casca do tronco de *Annona salzmanii*, foram isolados quatro alcalóides: reticulina (FIGURA 21), anonaína (FIGURA 13, PÁGINA 13), laurelliptina (FIGURA 22) e isoboldina (FIGURA 23). Estes foram submetidos a testes antimicrobianos e somente a anonaína apresentou atividade antibacteriana, enquanto que todos os quatro alcalóides demonstraram atividade antifúngica (PAULO *et al.*, 1992).

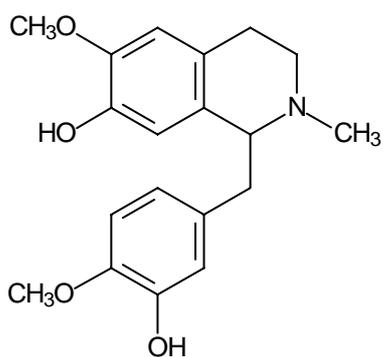


FIGURA 21. Reticulina

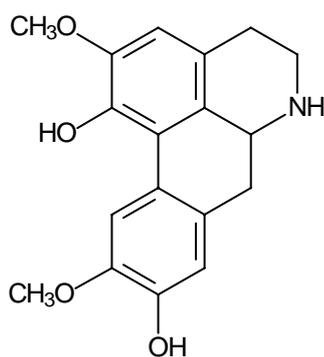


FIGURA 22. Laurelliptina

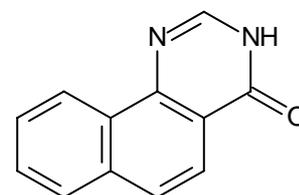


FIGURA 23. Isoboldina

A investigação fitoquímica da casca de *Annona foetida* levou ao isolamento e identificação dos alcalóides *N*-hidróxiannomontina (FIGURA 24), annomontina (FIGURA 25), *O*-metilmoschatolina (FIGURA 26) e liriodenina (FIGURA 12, PÁGINA 13). Estes compostos revelaram significativa atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania brasiliensis* e *L. guyanensis* (COSTA *et al.*, 2006).

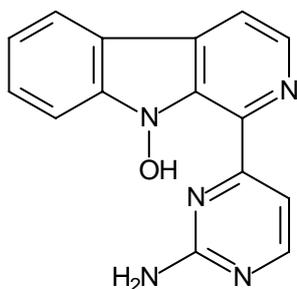


FIGURA 24. *N*-hidróxiannomontina

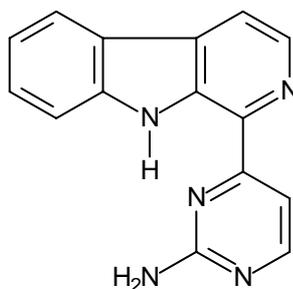


FIGURA 25. Annomontina

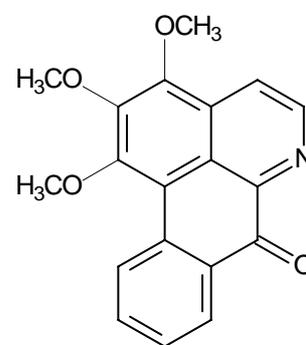


FIGURA 26. *O*-metilmoschatolina

2.2.4.2 Acetogeninas de Anonáceas

Acetogeninas de anonáceas são compostos naturais de origem policetídica que contêm uma cadeia com 35 a 37 átomos de carbono. São usualmente caracterizadas por uma longa cadeia alifática ligando um grupo metil terminal a um anel δ -lactona α,β -insaturado, e pela presença de um a três anéis tetrahydrofurânicos ao longo da cadeia. Podem possuir ainda hidroxilas, acetoxilas, cetonas, epóxidos e/ou ligações duplas (ALALI *et al.*, 1999; RUPPRECHT *et al.*, 1990).

Acetogeninas de anonáceas são relatadas em diversos artigos como uma classe exclusiva da família Annonaceae. Desde a descoberta da uvaricina (FIGURA 27) em 1982, houve um aumento no interesse por estudos de espécies desta família, devido à ampla variedade de atividades biológicas, dentre elas estão as atividades antitumoral, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária e pesticida (ALALI *et al.*, 1999).

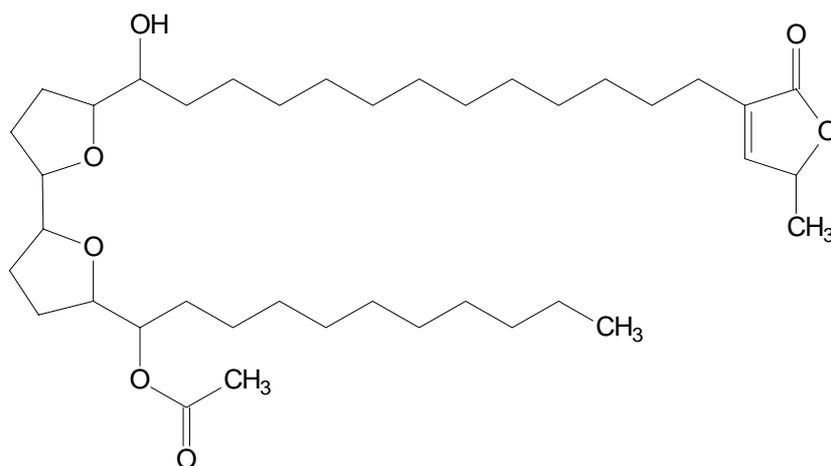


FIGURA 27. Uvaricina

A uvaricina, isolada do extrato etanólico de *Uvaria accuminata* (Annonaceae), é o primeiro exemplo de uma classe de compostos extremamente bioativos. Desta forma, esta

substância revelou significativa atividade antitumoral *in vivo* contra células leucêmicas em ratos (JOLAD *et al.*, 1982; RUPPRECHT *et al.*, 1990).

As acetogeninas de anonáceas têm sido encontradas, até então, em apenas cinco gêneros: *Annona*, *Asimina*, *Goniothalamus*, *Rollinia* e *Uvaria* (PIMENTA, 1995), sendo que, neste aspecto, o gênero *Annona* é um dos mais estudados.

Sendo assim, Bories *et al.* (1991) submeteram extratos metanólicos de sementes de *Annona muricata* e *Annona cherimolia* a alguns testes antiparasitários. As acetogeninas de anonáceas isoladas desses extratos foram as substâncias responsáveis pela importante atividade sobre a larva infectiva *Molinema dessetae*. O fracionamento biomonitorado conduziu ao isolamento e à identificação de sete acetogeninas. Da espécie *A. cherimolia* foram isoladas duas acetogeninas bis-tetrahidrofurânicas δ -lactonas cherimolina (FIGURA 28) e desidrocherimolina (FIGURA 29). De *A. muricata* foram obtidas cinco acetogeninas do tipo mono-tetrahidrofurânicas δ -lactonas: annonacina (FIGURA 30, PÁGINA 18), annonacinona (FIGURA 31, PÁGINA 18), murisolina (FIGURA 32, PÁGINA 18), corossolina (FIGURA 33, PÁGINA 18) e corossolona (FIGURA 34, PÁGINA 19).

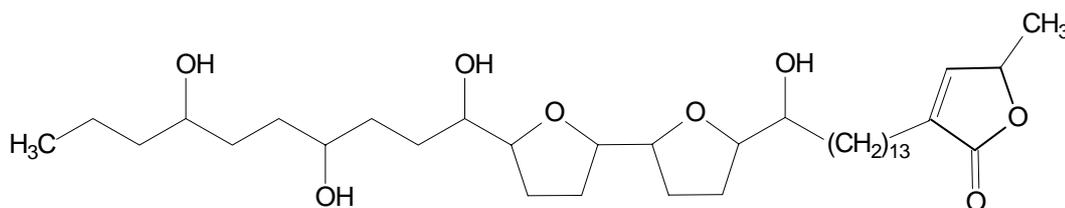


FIGURA 28. Cherimolina

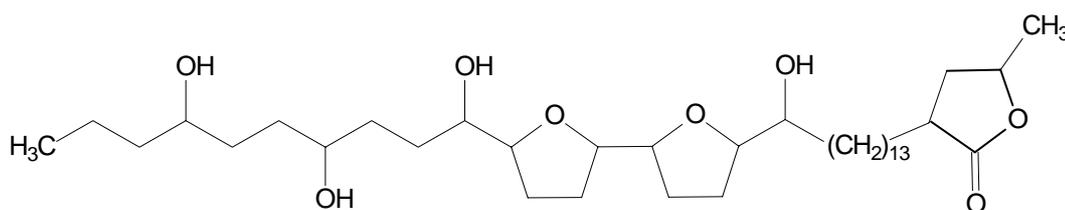


FIGURA 29. Desidrocherimolina

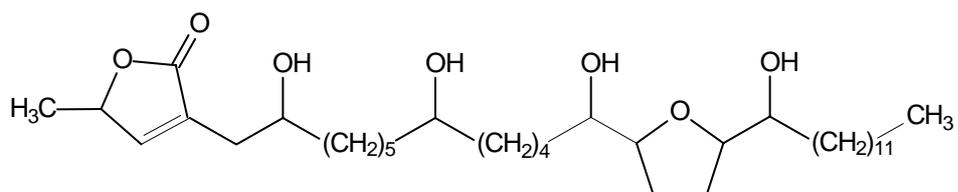


FIGURA 30. Annonacina

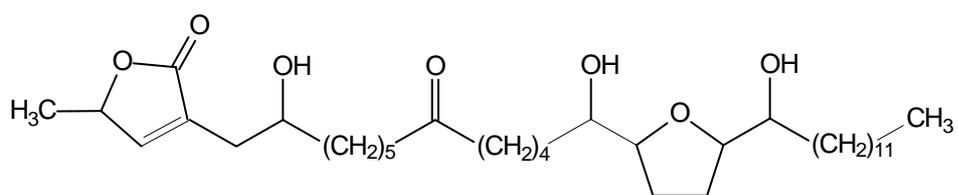


FIGURA 31. Annonacinona

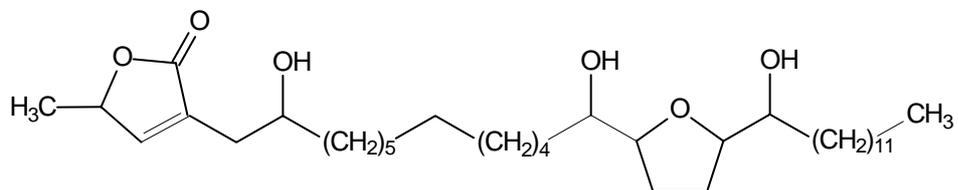


FIGURA 32. Murisolina

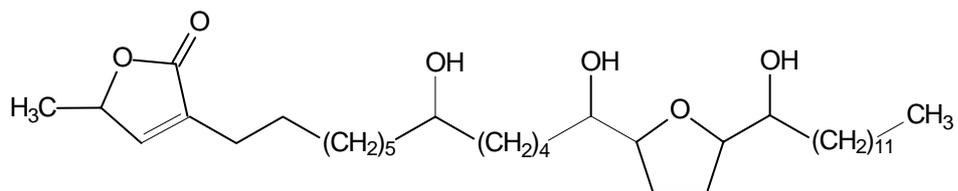


FIGURA 33. Corossolina

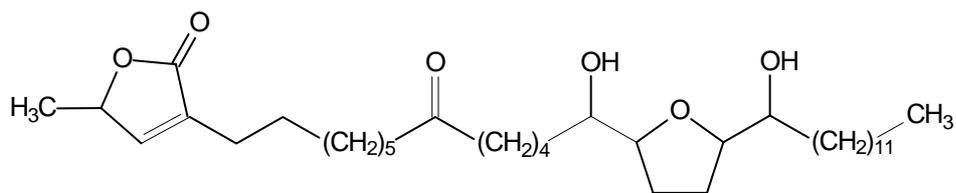


FIGURA 34. Corossolona

Particularmente, várias outras acetogeninas de anonáceas têm sido submetidas a ensaios anti-leishmania, tanto contra as formas promastigotas quanto as amastigotas, e seus resultados tem sido promissores (GRANDIC *et al.*, 2004). Outras atividades como citotóxica, vermícida, abortiva, antimicrobiana, imunossupressora e inibidora de apetite, também foram atribuídas às acetogeninas de anonáceas (NASCIMENTO *et al.*, 2003).

2.3 A espécie *Annona impressivenia* Safford ex R. E. Fries, 1931

A espécie *Annona impressivenia* Saff. ex R. E. Fries (FIGURA 35) é uma árvore baixa e rara, com ocorrência em capoeira de terra firme e conhecida popularmente como graviola-brava. Suas flores têm cor amarelo-queimado e seus frutos são pequenos, muricados, semelhantes aos de *A. muricata*, porém de tamanho muito menor (SILVA, 1977). Distribuiu-se da Guiana venezuelana à Amazônia Central (RIBEIRO *et al*, 1999).

Esta espécie não apresenta registros na literatura de estudos etnofarmacológicos, químicos e/ou biológicos. Entretanto, o potencial químico-farmacológico da família Annonaceae e principalmente do gênero *Annona*, referente à atividade leishmanicida, estimulam o estudo da espécie *A. impressivenia*.



FIGURA 35. Espécie *A. impressivenia*: (a) folhas; (b) caule; (c) árvore

2.4 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença tropical considerada um grave problema de saúde pública, infectando aproximadamente 2 milhões de pessoas anualmente em todo o mundo (ROCHA *et al.*, 2005), causada por espécies de parasitas protozoários do gênero *Leishmania*. Os principais reservatórios naturais para esses parasitas têm sido identificados como sendo animais domésticos e silvestres, enquanto que os vetores da doença são os mosquitos fêmeas do gênero *Phlebotomus* (leishmaniose no Velho Mundo) (FIGURA 36) e *Lutzomyia* (leishmaniose no Novo Mundo) (CHAN-BACAB *et al.*, 2001), denominados flebotomíneos e conhecidos popularmente como birigui ou mosquito-palha.



FIGURA 36. Mosquito do gênero *Phlebotomus*

Fonte: www.infektionsbiologie.ch

O gênero *Leishmania* pertence biologicamente a um grupo de parasitas flagelados da família *Trypanosomatidae*, sendo que a maioria das espécies é patogênica. Em humanos, a *Leishmania* spp. causa uma variedade de doenças clínicas e suas manifestações são usadas como base para classificar a doença. Desta forma, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são classificadas em 4 formas clínicas: visceral; mucocutânea; cutânea difusa ou disseminada; e cutânea ou tegumentar.

A leishmaniose visceral é a forma clínica mais grave da doença e ataca principalmente crianças desnutridas, podendo ser fatal quando não tratada (BARATA *et al.*, 2000). Caracteriza-se por seus efeitos em órgãos internos, particularmente o fígado, baço e medula óssea. Já a leishmaniose mucocutânea resulta na desfiguração facial, devido à erosão em locais mucocutâneos da boca e do nariz, enquanto que a leishmaniose cutânea difusa ou disseminada caracteriza-se pela formação de nódulos, placas ou caroços múltiplos, especialmente na face e em braços e pernas. Por outro lado, a leishmaniose cutânea ou tegumentar é a forma clínica menos severa da doença, considerada como uma infecção autolimitada.

Os parasitas do gênero *Leishmania* existem em duas formas: uma forma extracelular designada promastigota e uma intracelular conhecida como amastigota. A forma promastigota (FIGURA 37) é a que infecta tanto o homem quanto seus hospedeiros e são caracterizados por um flagelo na parte frontal e vivem no trato digestivo do mosquito transmissor. Já a forma amastigota (FIGURA 38) é localizada dentro do macrófago do hospedeiro e possui um flagelo rudimentar.



FIGURA 37. Forma promastigota

Fonte: www.ufrgs.br

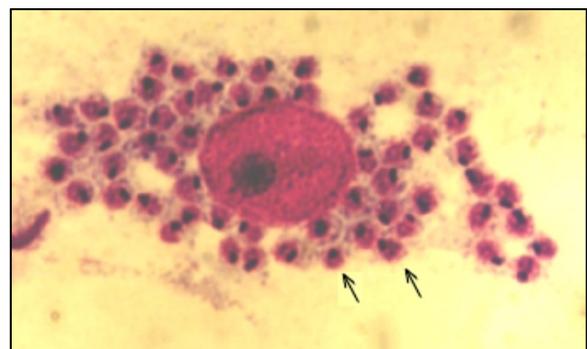


Figura 38. Forma amastigota

Fonte: www.ufrgs.br

A transmissão da doença ocorre quando o flebótomo pica um indivíduo infectado ou um hospedeiro reservatório e aspira macrófagos parasitados ou amastigotas livres no sangue ou mesmo em tecidos. As amastigotas, ao atingirem o intestino médio do inseto, se transformam em promastigotas. Estas formas flageladas, após rápida multiplicação, se convertem nos promastigotas infectantes e migratórios, sendo em seguida regurgitadas ou introduzidas na pele do próximo hospedeiro quando o inseto novamente se alimenta de sangue (FIGURA 39).

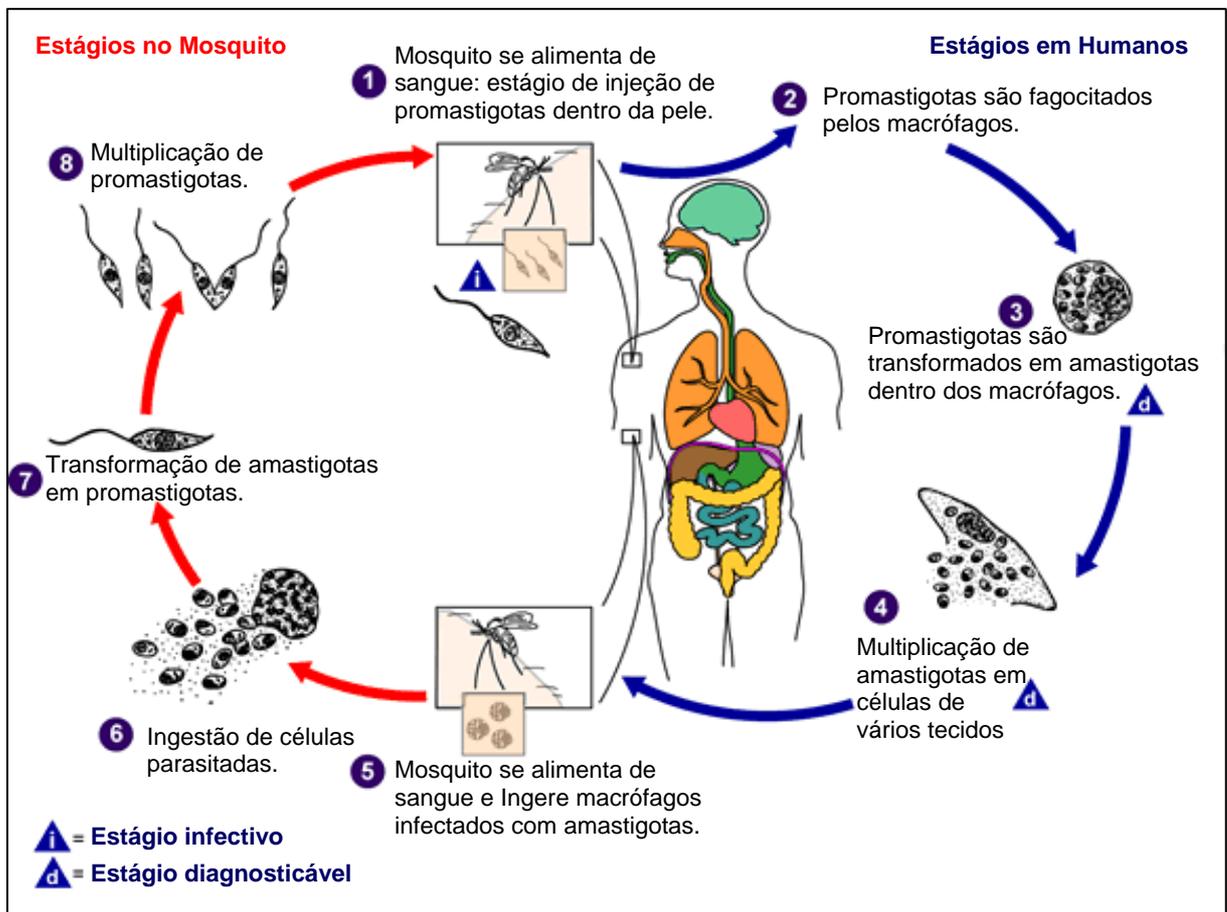


FIGURA 39. Ciclo de vida do parasita *Leishmania* spp.

Fonte: www.dpd.cdc.gov/dpdx

O tratamento das leishmanioses é feito inicialmente com compostos de antimônio, tais como o antimoniato de meglumina (Glucantime®) (FIGURA 40) e o estibogliconato de sódio (Pentostam®) (FIGURA 41) (CROFT e COOMBS, 2003; CHAN-BACAB *et al.*, 2001). Entretanto, ambos possuem severos efeitos colaterais (BARATA *et al.*, 2000), que incluem problemas gastrointestinais, cardiotoxicidade e, em alguns casos, insuficiência renal e hepática. Além disso, esses produtos possuem custo alto e requerem longos tratamentos.

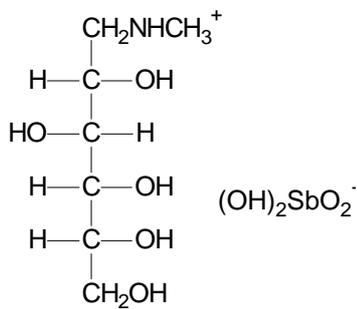


FIGURA 40. Antimoniato de meglumina

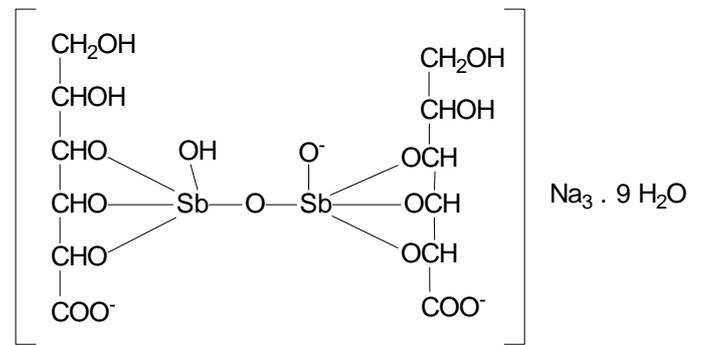


FIGURA 41. Estibogliconato de sódio

Quando este tratamento não é eficaz, outras medicações são usadas, tais como o antibiótico polieno anfotericina B (FIGURA 42) e sua formulação lipídica Ambisome®, e a diamina pentamidina (FIGURA 43, PÁGINA 25). Entretanto, estes produtos farmacêuticos possuem também sérios efeitos colaterais, incluindo disfunção renal em torno de 80% dos indivíduos tratados (CHAN-BACAB *et al.*, 2001).

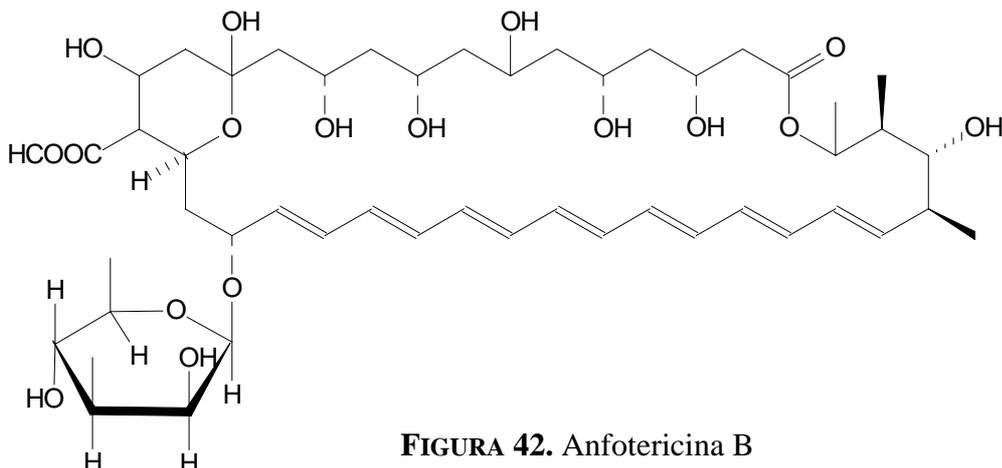


FIGURA 42. Anfotericina B

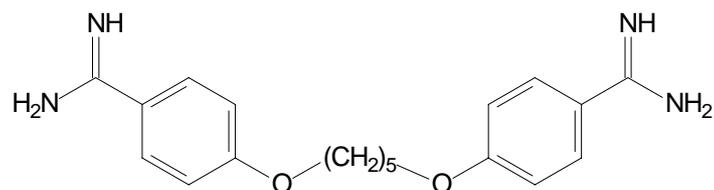


FIGURA 43. Pentamidina

Os antimoniais foram primeiramente introduzidos em 1945 e permanecem até hoje como tratamento efetivos para algumas formas de leishmaniose, porém é exigida administração parenteral por mais de 28 dias. A eficácia variável para leishmaniose visceral e cutânea e o surgimento de resistência significativa são fatores que limitam a utilidade das drogas (CROFT e COOMBS, 2003).

Um avanço importante na busca por novos compostos leishmanicidas foi o tratamento oral efetivo de leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral usando miltefosina (FIGURA 44), um derivado alquilfosfocolínico, desenvolvido originalmente como uma droga anticâncer. Entretanto, este composto também proporciona severos problemas gastrointestinais. Além disso, há certa limitação no uso de miltefosina devido à teratogenicidade e isso exclui sua utilização em mulheres grávidas (CROFT e COOMBS, 2003; MELLO *et al.*, 2004).

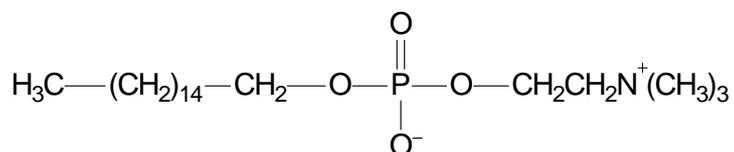


FIGURA 44. Miltefosina

Apesar desses avanços, a maioria das pessoas de áreas endêmicas de leishmaniose ainda procura tratamentos populares para aliviar os sintomas. Isso se deve, principalmente, aos graves efeitos colaterais de alguns medicamentos ou até mesmo a pouca disponibilidade.

Alguns dos métodos populares consistem em procedimentos de cauterização usando sulfato de cobre ou aplicação de uma fonte quente, tal como água ou mesmo objetos metálicos, sobre a ferida. Apesar de tais métodos serem severos, tem sido demonstrado que amastigotas do gênero *Leishmania* são termosensíveis e que aplicando calor em torno de 40°C no local ou utilizando ultra-som para induzir altas temperaturas, faz com que a cura da úlcera se acelere, sendo também tão eficaz quanto o Glucantime®. Entretanto, essas terapias alternativas também possuem indesejáveis efeitos colaterais, podendo até agravar as úlceras (CHAN-BACAB *et al.*, 2001).

Ainda na medicina tradicional, algumas culturas fazem uso de plantas nativas para o tratamento da leishmaniose. Esse tratamento consiste em administração oral de extratos brutos de plantas frescas para a forma sistêmica da doença e de uso tópico dos correspondentes extratos para o tratamento de infecções na pele. Alguns constituintes químicos como alcalóides, terpenos e quinonas foram obtidos de várias plantas usadas na medicina popular para o tratamento de doenças causadas por parasitas protozoários (CHAN-BACAB *et al.*, 2001). Como exemplo, da espécie *A. haematantha* foi isolado a Argemilactona, uma γ -lactona α,β -insaturada, que é o constituinte majoritário do óleo essencial e do extrato hexânico das raízes, como mencionado anteriormente (PÁGINA 3), a qual revelou atividade leishmanicida e citotóxica contra células leucêmicas de camundongos (WAECHTER *et al.*, 1997).

Apesar de uma variedade de compostos com atividade antileishmania estar em várias fases de desenvolvimento, a pesquisa por novos compostos ativos de origem natural é ainda fortemente encorajado. Desta forma, o uso de espécies vegetais se torna uma alternativa na busca por novos agentes terapêuticos, mais eficazes e com baixo custo, e é assim que a investigação de fitoconstituintes se torna importante.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

- ✓ Produzir dados científicos de forma a contribuir para o conhecimento das potencialidades medicinais de plantas amazônicas, fornecendo subsídios para um melhor aproveitamento de recursos naturais da Amazônia como fitoterápicos ou modelo para síntese de fármacos.

3.2 Específicos

- ✓ Estudo fitoquímico de um espécime da família Annonaceae do gênero *Annona* de ocorrência no Estado do Amazonas;
- ✓ Determinar as estruturas moleculares dos metabólitos isolados através de métodos cromatográficos e espectrométricos;
- ✓ Realizar testes biológicos antileishmania nos extratos e nos fitoconstituintes isolados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

▪ O estudo fitoquímico do caule (casca e cerne) da espécie *Annona impressivenia*, a partir do extrato diclorometânico, forneceu os alcalóides: oxoaporfínico liriodenina, pirimidino- β -carbolínico metoxiannomontina e aza-antraquinônico cleistofolina. Suas estruturas moleculares foram determinadas por métodos espectrométricos avançados (IV/FT, RMN 1D e 2D) e comparações com dados da literatura.

▪ A provável presença de acetogeninas pôde ser detectada em extratos brutos hidrometanólicos, tanto da casca quanto do cerne, por meio de CCD e absorções no IV.

▪ Foram realizados testes antileishmania nos extratos brutos contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. guyanensis*. Os extratos EDCA, FDNCA, EDCE, FDNCE e FALCE 2 se mostraram ativos na concentração de 320 $\mu\text{g/mL}$ contra *L. amazonensis*; os extratos EDCA, FDNCA e FALCE 2 foram ativos contra *L. guyanensis*. A concentração inibitória foi obtida na faixa de concentração de 160 a 0,075 $\mu\text{g/mL}$, com valores de $\text{IC}_{50}/24\text{ h}$ iguais a $11,7 \pm 5,2\ \mu\text{g/mL}$ (EDCE) para *L. amazonensis*; e $12,1 \pm 5,8\ \mu\text{g/mL}$ (EDCA), $12,9 \pm 5,5\ \mu\text{g/mL}$ (FDNCA) e $12,9 \pm 6,1\ \mu\text{g/mL}$ (FALCE 2) para *L. guyanensis*.

▪ Os estudos químico e biológico desta espécie são inéditos e seus resultados incentivam a continuação da pesquisa fitoquímica, a fim de se obter compostos dos demais extratos brutos e realizar testes antileishmania com as substâncias isoladas, com vistas a obter em pesquisas posteriores, agentes bioativos contra leishmaniose.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHENBACH, H.; HEMRICH, H. Alkaloids, flavonoids and phenylpropanoids of the west African plant *Oxymitra velutina*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1265-1267, 1991.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MACLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRO, L. V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, v. 49, p. 751-754, 1998.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; SIMON, L. C. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, 2000.

BARROSO, G. M. Sistemática e angiospermas do Brasil. Volume 1. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1978.

BORIES, C.; LOISEAU, P.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P. ; CAVÉ, A.; LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Medica**, v. 57, p. 434-436, 1991.

BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brasil, 1960.

CAVÉ, A.; LÉBOEUF, M.; WATERMAN, P. G. The aporphinoid alkaloids of the Annonaceae. **In:** Pelletier, S. W. Alkaloids: chemical and biological perspectives. Volume 5. John Wiley, New York, p. 134-270, 1987.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 674-688, 2001.

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

CHANG, F. R.; CHEN, J. L.; LIN, C. Y.; CHIU, H. F.; WU, M. J.; WU, Y. C. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 883-889, 1999.

CHEN, K. S.; CHANG, F. R.; CHIA, Y. C.; WU, T. S.; WU, Y. C. Chemical constituents of *Neolitsea parvigemma* and *Neolitsea konishii*. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 45, p. 103-110, 1998.

COSTA, E. V.; XAVIER, C. M.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; LEON, L. L. Atividade leishmanicida dos constituintes voláteis das folhas de *Annona foetida* (Annonaceae). **In:** XXV RESEM, 2003, Campos do Jordão/SP. XXV Reunião Anual Sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares, 2003.

COSTA, E. V. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). Dissertação de Mestrado em Química de Produtos Naturais (UFAM), 2004.

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

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CRONQUIST, A. An integrated system of classifications of flowering plants. Columbia University Press. New York, 1262 p., 1981.

DI STASI, L. C. Plantas medicinais: arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. Editora Unesp, 1996.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **Journal of Immunological Methods**, v. 89, p. 271-277, 1986.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1976.

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

GRANDIC, S. R. L.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 58, p. 388-392, 2004.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. **In:** SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M; CAVE, A. Aporphine Alkaloids. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 4, p.325-360, 1983.

HOEHNE, F. C.; KUHLMANN, M.; HANDRO, O. O Jardim Botânico de São Paulo. Secretaria da agricultura, indústria e comércio de São Paulo, Brasil, 1941.

HEYWOOD, V. H. Flowering Plants of the World. University Press, Oxford, p 30-31, 1978.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3151-3153, 1982.

JOLY, A. B. Botânica. Introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.

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

LEBOEUF, M.; CAVÉ, 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**, p. 1205-1208, 1982a.

LOBÃO, A. Q.; ARAÚJO, D. S. D.; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 85-96, 2005.

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

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.-van de; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R. de; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 65-98, 2001.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. Universidade Federal do Ceará. Edições UFC: Fortaleza, 1997.

MELLO, H.; ECHEVARRIA, A.; BERNARDINO, A. M.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; LEON, L. L. Antileishmanial pyrazolopyridine derivatives: synthesis and structure-activity relationship analysis. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, p. 5427-5432, 2004.

MOMEN, H. Parasite characterization by zimodeme analysis. **In:** Genes and antigens of parasites. A laboratory manual, 2nd edition, C.M. Morel editor. UNDP/World BANK/WHO-Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases-Finep, CNPq, FIOCRUZ, cap. 2.2, p.111-120, 1984.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

NASCIMENTO, F. C.; BOAVENTURA, M. A. D.; ASSUNÇÃO, A. C. S.; PIMENTA, L. P. S. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 319-322, 2003.

PAULINO NETO, H. F.; OLIVEIRA, P. E. A. M. As anonáceas e os besouros. **Revista Ciência Hoje**, v. 38, p. 59-61, março, 2006.

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

PÉREZ, E.; SÁEZ, J.; BLAIR, S.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B. Isoquinoline alkaloids from *Duguetia vallicola* stem bark with antiplasmodial activity. **Letters in Organic Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 102-104, 2004.

PIMENTA, L. P. S. Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora* objetivando o isolamento de acetogeninas tetra-hidrofurânicas. Tese de Doutorado em Ciências-Química (UFMG), 1995.

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

PINTO, C. A.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, suplemento 1, p. 45-61, 2002.

PRANCE, G. T. Árvores de Manaus. Manaus, INPA, 1975.

RAINER, H. *Annona*. In: STEYERMARK, J. A.; MAAS, P. J. M.; BERRY, P. E.; JOHNSON, D. M.; MURRAY, N. A.; RAINER, H. Flora do Guayana venezuelan. Jardim Missouri, Saint Luis e imprensa botanical da madeira, v. 2, Portland, p. 418-427, 1995.

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

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. Flora da Reserva Ducke. Guia de identificação das plantas vasculares uma floresta de terra-firme na Amazônia Central. INPA, Manaus – AM, 816 p. il., 1999.

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

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R. G. S.; MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514-535, 2005.

RUPPRECHT, J. K., HUI, Y-H; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

SAEED, M.; ILG, T.; SCHICK, M.; ABBAS, M.; VOELTER, W. Total synthesis and anti-leishmanial activity of R-(-)-argentilactone. **Tetrahedron Letters**, v. 42, p. 7401-7403, 2001.

SAHPAZ, S.; BORIES, C.; LOISEAU, P. M.; CORTÈS, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVÉ, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Medica**, v. 60, p. 538-540, 1994.

SEIDEL, V.; BAILLEUL, F.; WATERMAN, P. G. Novel Oligorhamnosides from the stem bark of *Cleistopholis glauca*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 6-11, 2000.

SILVA, A. C. Triagem da potencial atividade antiviral de produtos marinhos: esponjas coletadas na costa brasileira e compostos de organismos marinhos. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 112 p., 2005.

SILVA, M. F. Nomes vulgares de plantas amazônicas. Belém, INPA, p. 98, 1977.

TADIC, D.; CASSELS, B. K.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Kinabaline and the aporphinoid biogenesis of azaanthracene and azafluorene alkaloids. **Phytochemistry**, v. 26, n. 2, p. 537-541, 1987.

VILELA, J. D. **Revista Paulista de Medicina**, n. 89, p. 115, 1977. In: PINTO, C. A.; SILVA, D. H, S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, suplemento 1, p. 45-61, 2002.

WAECHTER, A. I.; FERREIRA, M. E.; FOURNET, A.; ARIAS, A. R.; NAKAYAMA H.; TORRES, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Experimental treatment cutaneous leishmaniasis with argentilactone isolated from *Annona haematantha*. **Planta Medica**, v. 63, n. 05, p. 433-435, 1997.

WATERMAN, P. G.; MUHAMMAD, I. Sesquiterpenes and alkaloids from *Cleistopholis patens*. **Phytochemistry**, vol. 24, n. 3, p. 523-527, 1985.

WIJERATNE, E. M. K.; HATANAKA, Y.; KIKUCHI, T.; TEZUKA, Y.; GUNATILAKA, A. A. L. A dioxoaporphine and other alkaloids of two annonaceous plants of Sri Lanka. **Phytochemistry**, v. 42, n. 6, p. 1703-1706, 1996.

WRIGHT, C. W.; PHILLIPSON, J. D. Medicinal plants against protozoal diseases. **Phytotherapy Research**, v. 4, p. 127-139, 1990.

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

XAVIER, C. M., BELÉM PINHEIRO, M. L., COSTA, E. V., SILVA, J. R. A., SOUZA, A. D. L.; AMARAL, C. F. Avaliação química e biológica de *Annona sericea* (Annonaceae) contra leishmaniose. Livro de Resumos. IV Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, AB35, 2003.

XAVIER, C. M.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L.; AMARAL, A. C. F.; BARISON, A.; COSTA, E. V.; CAMPOS, F. R.; SILVA, J. R. A.; PINTO, A. C.; LACERDA JUNIOR, O. Estudo químico e biológico do caule de *Annona amazonica*. Livro de Resumos. XVIII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, v. 1, p. 393, 2004.

