

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA *in vitro*
DE *Xylopiya amazonica* R. E. Fries (Annonaceae).

JAKELINE MYLELIS PINHEIRO DOS SANTOS

MANAUS – AM
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

JAKELINE MYLELIS PINHEIRO DOS SANTOS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA *in vitro*
DE *Xylopia amazonica* R. E. Fries (Annonaceae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Dr. Adrian Martin Pohlit

Coorientadora: Dra. Zelina E. dos Santos Torres

MANAUS - AM
2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237c Santos, Jakeline Mylelis Pinheiro dos
Composição química e avaliação antimalárica in vitro de *Xylopia amazonica* R. E. Fries (Annonaceae) / Jakeline Mylelis Pinheiro dos Santos. 2017
83 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Adrian Martin Pohlit
Coorientador: Zelina Estevam dos Santos Torres
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. Antimaláricos. 2. Alcaloides. 3. *Xylopia amazonica*. 4. Annonaceae. 5. Nornanterina. I. Pohlit, Adrian Martin II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JAKELINE MYLELIS PINHEIRO DOS SANTOS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO ANTIMALÁRICA
IN VITRO DE *Xylopia amazonica* R. E. Fries (Annonaceae).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito final para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 23 de janeiro de 2017

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Dr. Adrian Martin Pohlit
Centro de Biotecnologia da Amazônia/Instituto Nacional de Metrologia,
Qualidade e Tecnologia.

Avaliadora: Dra. Katia Solange Cardoso Rodrigues dos Santos
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Avaliadora: Dra. Danielle Cardoso de Alencar
Centro de Biotecnologia da Amazônia - CBA

Dedico este trabalho a Deus, pois sem Ele nada seria possível. Aos meus pais Maria Sandra Pinheiro dos Santos e Eduardo Lelis dos Santos por todo o apoio e incentivo. E ao meu amado noivo, Túlio Alves de Azevedo, por estar ao meu lado me auxiliando e apoiando durante todo esse percurso.

AGRADECIMENTOS

A Deus por estar sempre ao meu lado, me ajudando a caminhar e colocando pessoas dispostas a ajudar em minha vida.

Ao meu orientador Dr. Adrian Martin Pohlit por ter me aceitado em seu grupo de pesquisa mesmo eu não tendo experiência nenhuma e pela paciência, conselhos e ensinamentos.

Ao Dr. Felipe Silva, pela grande ajuda com as nas análises no CLAE junto ao CBA, pelo apoio e paciência.

Aos Doutorandos Edizon Veiga e Abraão Alexandre por toda a paciência ao me ajudar, pelos ensinamentos sobre fitoquímica e RMN e pela amizade.

À Dr. Zelina Estevam pelas análises espectrométricas junto ao CTQPN/INPA.

Ao Dr. Luis Francico Silva e equipe do Laboratório de Malária e Dengue pelos testes *in vitro* e pela amizade

À minha amada mãe Maria Sandra, por sempre me incentivar aos estudos desde os primeiros anos escolares, por nunca me deixar desistir e por estar ao meu lado acreditando em mim mesmo quando nem eu mesma acreditava.

Ao meu pai, Eduardo Lelis, por todo o apoio, o auxílio e a força.

Aos meus queridos irmãos e sobrinhos, pelo auxílio, amizade, atenção e compreensão nos momentos de ausência.

Às minhas amadas sobrinhas Alice e Beatriz, por alegrarem meus dias e sempre me fazerem sorrir apesar das dificuldades.

Ao meu amado noivo Túlio, por estar ao meu lado, por toda a parceria e companheirismo no LAPAAM e na vida, pelo apoio, amizade, incentivo, dedicação, auxílio e paciência em todos os momentos difíceis que passamos durante esse desafio, por nunca me deixar desistir e por me mostrar os motivos pelos quais devo continuar.

À minha segunda família, Stephan, Soraya, Andrezza, Emanuel, Anne, Asaph, Anthony e Samuel, por toda a amizade, o incentivo e o apoio, por sempre acreditarem nessa conquista.

À minha grande amiga Ledjane, por todos os momentos que compartilhamos durante o mestrado, com certeza uma amizade que levarei para sempre.

À Rita e ao Jhony por todo o apoio e conselhos durante essa etapa final. Sem vocês com certeza tudo seria bem mais difícil.

À amizade de todos os colegas do LAPAAM/CPPN, Paula, Lídia, Andreia, Thiago, Karla, Yara, Magno e Gustavo por todos os momentos de descontração e ensinamentos e experiências compartilhadas.

Aos guardas do INPA, em especial ao sr. Amarildo, por ser sempre solícito quando precisei de ajuda.

Foram tantos que me ajudaram, direta e indiretamente, a realizar este trabalho que seria impossível citar todos. Fica aqui a minha eterna gratidão a todos eles.

AGRADEÇO.

RESUMO

O surgimento de cepas de *Plasmodium* resistentes aos antimaláricos habitualmente utilizados tem motivado a busca por novas drogas antimaláricas. Os produtos naturais isolados de plantas amazônicas e seus derivados semissintéticos têm se mostrado fontes promissoras de compostos antimaláricos. Diversas plantas do gênero *Xylopi*a (família Annonaceae) são utilizadas pela medicina popular para o tratamento de malária e seus sintomas. O gênero apresenta uma grande variedade de compostos químicos com importantes propriedades farmacológicas, destacando-se os alcaloides, terpenos e as acetogeninas. O presente trabalho tem como objetivo a descoberta de novos antimaláricos através de análise da composição química e avaliação da atividade antimalárica de *Xylopi*a *amazonica* R.E Fries, tendo como ponto de partida estudos prévios realizados pelo grupo de pesquisa Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) no Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) evidenciando atividade antimalárica em extratos brutos. Para a realização do trabalho foram coletados galhos finos e folhas de *X. amazonica* na Reserva Florestal Adolpho Ducke. Os materiais vegetais foram levados ao LAPAAM/INPA, aonde foram pesados, secos e moídos. Foram realizadas extrações por meio de maceração com uso de ultrassom e solventes em ordem de polaridade crescente, além de extração ácido-base para a obtenção de extratos ricos em alcaloides. Submeteram-se os extratos obtidos a testes antimaláricos *in vitro* realizados no Laboratório de Malária e Dengue do INPA. Por fim, aplicaram-se técnicas cromatográficas aos extratos considerados ativos para o isolamento e/ou purificação de frações e/ou substâncias e técnicas espectroscópicas para a identificação ou elucidação estrutural das substâncias ativas. Utilizando Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) isolaram-se duas substâncias (nornantenina e anonaina) ativas contra cepas K1 de *P. falciparum* resistentes a cloroquina com CI_{50} de 5.23 $\mu\text{g/mL}$ e 4.8 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Descritores: Antimaláricos, Alcaloides, *Xylopi*a *amazonica*, Annonaceae, nornantenina, anonaina.

ABSTRACT

The emergence of Plasmodium strains resistant to antimalarials commonly used has motivated the search for new antimalarial drugs. Natural products isolated from Amazonian plants and their semi-synthetic derivatives have been shown to be promising sources of antimalarial compounds. Several plants of the genus *Xylopia* (family Annonaceae) are used by folk medicine for the treatment of malaria and its symptoms. The genus presents a great variety of chemical compounds with important pharmacological properties, emphasizing alkaloids, terpenes and acetogenins. The present work has the objective of discovering new antimalarials through analysis of the chemical composition and evaluation of the antimalarial activity of *Xylopia amazonica* RE Fries, starting from previous studies carried out by the Laboratory of Active Principles of the Amazon (LAPAAM) Antimalarial activity in crude extracts. For the accomplishment of the work, fine branches and leaves of *X. amazonica* were collected in the Adolpho Ducke Forest Reserve. The thin branches and leaves were taken to LAPAAM / INPA, where they were weighed, dried and ground in a knife mill. Afterwards, extractions were carried out by means of maceration using ultrasound and solvents in order of increasing polarity, in addition to acid-base extraction to obtain extracts rich in alkaloids. The extracts obtained from in vitro antimalarial tests performed at the Malaria and Dengue Laboratory of the National Research Institute of the Amazon were submitted. Finally, chromatographic techniques were applied to the extracts considered active for the isolation and / or purification of fractions and / or substances and spectroscopic techniques for the identification or structural elucidation of the active substances. Using high performance liquid chromatography (HPLC) two active substances (nornantenin and anonaine) were isolated against chloroquine resistant *P. falciparum* K1 strains with IC₅₀ of 5.23 g / mL and 4.8 g / mL, respectively.

Keywords: Antimalarials, Alkaloids, *Xylopia amazonica*, Annonaceae, nornantenin, anonaine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Ciclo de vida do parasita da malária.....	19
Figura 2:	Principais frutos da família Annonaceae Juss.....	24
Figura 3:	Obtenção de extratos a partir de maceração com sonicação, com solventes em ordem crescente de polaridade.....	41
Figura 4:	Espectro de massas (modo positivo) da fração alcaloídica XaF1-E.....	51
Figura 5:	Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a amostra XaF1E.....	52
Figura 6:	Espectros de DAD dos picos majoritários (A-B) presentes na amostra XaF1-E e esqueleto de alcaloide aporfinico.....	52
Figura 7:	Espectros de <i>full scan</i> dos picos majoritários (A-D) presentes na amostra da fração alcaloídica XaF1-E.....	53
Figura 8:	Espectro de massas de alta resolução (MS^+) da amostra FAF0.....	54
Figura 9:	Espectro de UV da amostra FAF0.....	54
Figura 10:	Espectro de massas MS^4 da amostra FAF0.....	55
Figura 11:	Estrutura do alcaloide Nornantenina.....	56
Figura 12:	Espectro de massas de alta resolução (MS^+) da amostra FAF12.....	58
Figura 13:	Espectro de UV da amostra FAF12.....	58
Figura 14:	Espectro de massas MS^4 da amostra FAF12.....	59
Figura 15:	Estrutura do alcaloide Anonaína.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Peso dos materiais vegetais após exaustão com hexano.....	43
Tabela 2:	Frações submetidas à análises de NMR 1D e 2D.....	47
Tabela 3:	Resultados dos testes <i>in vitro</i> contra cepas do <i>P. falciparum</i> realizados com extratos de <i>X. amazonica</i>	50
Tabela 4:	Resultados dos testes <i>in vitro</i> contra cepas do <i>P. falciparum</i> (screening e CI_{50}) realizados com frações alcaloídicas de <i>X. amazonica</i>	50
Tabela 5:	Dados de RMN de 1H e ^{13}C da amostra FAF0.....	57
Tabela 6:	Dados de RMN de 1H e ^{13}C da amostra FAF12.....	61

LISTA DE QUADROS

Quadro 1:	Usos na medicina popular de algumas espécies da família Annonaceae.....	24
Quadro 2:	Exemplos de alcaloides isolados de <i>Xylopi</i> a.....	27
Quadro 3:	<i>Xylopi</i> a spp. com atividade antiplasmódica <i>in vitro</i> contra <i>P. falciparum</i>	29
Quadro 4:	Exemplos de diterpenos isolados de <i>X. amazonica</i> R.E. Fries.....	30
Quadro 5:	Alcaloides isolados de <i>X. amazonica</i> R.E.Fries.....	31
Quadro 6:	Propriedades farmacológicas das substâncias encontradas em <i>X. amazonica</i> R.E.Fries. isoladas de outras espécies.....	32

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1:	Espectro de RMN de H^+ da norantenina (amostra FAF0)	72
Anexo 2:	Espectro de HSQC da norantenina (amostra FAF0)	73
Anexo 3:	Ampliação da região δ_H 3,5 - 8 \times δ_C 40 – 100 do espectro de HSQC da norantenina (amostra FAF0)	74
Anexo 4:	Espectro de HMBC da norantenina (amostra FAF0)	75
Anexo 5:	Ampliação da região δ_H 2,9 - 4,7 \times δ_C 60 - 220 do espectro de HMBC da norantenina (amostra FAF0)	76
Anexo 6:	Ampliação da região δ_H 5,7 - 7,5 \times δ_C 62 - 42 do espectro de HMBC da norantenina (amostra FA0)	77
Anexo 7:	Ampliação da região δ_H 5,6 - 8,3 \times δ_C 92 - 1582do espectro de HMBC da norantenina (amostra FAF0)	78
Anexo 8:	Espectro de RMN de H^+ da anonaína (amostra FAF12)	79
Anexo 9:	Espectro de HSQC da anonaína (amostra FAF12)	80
Anexo 10:	Ampliação da região δ_H 3,5 – 8 \times δ_C 20 – 140 do espectro de HSQC da anonaína (amostra FAF12)	81
Anexo 11:	SISBIO – Comprovante de registro para coleta de material botânico.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ACT	Terapia combinada à base de artemisinina
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CI₅₀	Concentração que inibe 50% o crescimento do parasita
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COTI	Coordenação de Tecnologia e Inovação
DSER	Divisão de Suporte às Estações e Reservas
ESI-MS	Ionização por electrospray acoplado a espectrometria de massas
FTM - AM	Fundação de Medicina Tropical do Amazonas
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
LAPAAM	Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia
LC/MS	Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas
MS	Espectrometria de massas
<i>m/z</i>	razão massa / carga
OMS	Organização Mundial da Saúde
RBM	<i>Roll Back Malária</i>
RMN	Ressonância magnética nuclear
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1. ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA	18
2.1.1. Agentes causadores e vetores da malária	18
2.1.2. Epidemiologia da malária no mundo	19
2.1.3. Malária no Brasil	20
2.2. PLANTAS MEDICINAIS E ANTIMALÁRICOS	21
2.3. RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS	22
2.4. FAMÍLIA ANNONACEAE JUSS	23
2.4.1. O gênero <i>Xylopia</i>	25
2.4.1.1. Alcaloides em <i>Xylopia</i>	26
2.4.1.2. <i>Xylopia</i> e uso tradicional para malária	28
2.4.1.3. <i>Xylopia</i> e ensaios biológicos para malária	29
2.4.2. <i>Xylopia amazonica</i> R. E. Fries	29
3. OBJETIVOS	34
3.1. GERAL	34
3.2. ESPECÍFICOS	34
4. MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1. EQUIPAMENTOS	35
4.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS	35
4.2.1. Cromatografia em camada delgada	35
4.2.2. Cromatografia em coluna	35
4.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência	36
4.2.4. Solventes e reveladores	36
4.3. MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS E ESPECTROMÉTRICOS	37
4.3.1. Ressonância magnética nuclear	37
4.3.2. Espectrometria de massas	37
4.4. ÁREA DE COLETA	37
4.5. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	38

4.6. PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	38
4.7. EXTRAÇÃO	38
4.7.1. Maceração com auxílio de ultrassom e solventes em ordem de polaridade crescente	39
4.7.1.1. Extração com Hexano	39
4.7.1.2. Extração com clorofórmio	39
4.7.1.3. Extração com acetato de etila	40
4.7.1.4. Extração com etanol	40
4.7.2. Maceração com auxílio de ultrassom empregando-se apenas etanol	42
4.7.3. Maceração com auxílio de ultrassom empregando-se apenas hexano	42
4.7.4. Partição ácido-base	43
4.7.4.1. Metodologia A	43
4.7.4.2. Metodologia B	44
4.7.4.3. Metodologia A. em escala preparativa	45
4.7.4.4. Perfil alcaloídico e fracionamento cromatográfico da fração 35XFALC	45
4.7.4.5. Análise por ESI-MS da fração alcaloídica XaF1-E	46
4.7.4.6. Investigação da fração XaF1-E por HPLC-DAD-MS	46
4.7.4.7. Fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica XaF1-E de <i>X. amazonica</i> por CLAE semi-preparativa	47
4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA <i>IN VITRO</i>	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
5.1. SCREENING DOS EXTRATOS E FRAÇÕES	48
5.2. PERFIL ALCALOÍDICO DE <i>X. amazonica</i>	50
5.3. ANÁLISES DE ESI-MS^N E HPLC-DAD-MS DA AMOSTRA XAF1-E ...	50
5.4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA AMOSTRA FAF0	53
5.5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA AMOSTRA FAF12	58
6. CONCLUSÃO	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
8. ANEXOS	71

1. INTRODUÇÃO

A malária é definida como uma doença infecciosa não contagiosa, parasitária, de evolução crônica, caracterizada por febre aguda acompanhada de calafrios, sudorese e dor de cabeça. A transmissão ocorre pela picada de mosquitos do gênero *Anopheles* Meigen, infectados por *Plasmodium* spp. (FERREIRA, 1997).

No ano de 2015 foi registrado 214 milhões de casos de malária no mundo e 438 mil mortes. Aproximadamente metade das pessoas no planeta correm o risco de se infectarem com a doença, principalmente na região da África Subsaariana (MALÁRIA, 2015). No Brasil, os casos de malária ocorrem principalmente na Amazônia (BRASIL, 2015a; b; WHO, 2015).

Com o surgimento de cepas de plasmódio resistentes, as buscas por novos agentes quimioterápicos oriundos de plantas vêm ocorrendo a nível mundial. Os principais antimaláricos existentes, os quais são: quinina e artemisinina, devem suas origens às plantas, sendo a floresta amazônica uma fonte promissora para o desenvolvimento desses novos fármacos (ANDRADE-NETO *et al.*, 2007; WHO, 2014c).

O gênero *Xylopi*a é comumente utilizado pela medicina popular para tratar malária e seus sintomas (FRAUSIN *et al.*, 2014). Em 2015 foi demonstrado por Lima e colaboradores que a espécie *Xylopi*a *amazonica*, até aquele momento descrita como sendo utilizada por indígenas como sonífero, apresenta atividade antimalárica *in vitro* e *in vivo*.

Visando dar continuidade às pesquisas de Lima e colaboradores (2015) no LAPAAM/INPA, este trabalho se propôs a testar *in vitro* extratos e/ou frações contra parasitas da malária, isolar, purificar, identificar e/ou elucidar estruturas de uma ou mais substâncias responsáveis pela atividade antimalárica de *X. amazonica*, com o intuito de descobrir novas substâncias antimaláricas.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. ASPECTOS GERAIS DA MALÁRIA

A malária é uma doença infecciosa não contagiosa, parasitária, de evolução crônica que assola a humanidade desde os primórdios até os dias de hoje, transmitida pela picada de mosquitos fêmeas do gênero *Anopheles*, infectados por *Plasmodium sp.* Caracteriza-se por febre aguda acompanhada de calafrios, suor e dor de cabeça (FERREIRA, 1997; BRASIL, 2000).

2.1.1. Agentes causadores e vetores da malária

Cinco espécies de *Plasmodium* são capazes de provocar a doença em humanos: *P. falciparum*, *P. knowlesi*, *P. malariae*, *P. ovale* e *P. vivax* (WHO, 2014c). Contudo, em 2014, um caso de malária humana foi associado ao *P. cynolmogi*, espécie até então conhecida por causar a doença apenas em macacos, sugerindo que outras espécies de *Plasmodium* sejam capazes de provocar a doença em humanos (TA *et al.*, 2014).

A infecção ocorre durante a alimentação sanguínea da fêmea do gênero *Anopheles*, que infecta o hospedeiro com esporozoítos presentes em suas glândulas salivares. O seu desenvolvimento ocorre somente após invadir os hepatócitos onde os esporozoítos diferenciam-se em trofozoítos pré-eritrocíticos e por meio de multiplicação assexuada originam os esquizontes hepáticos que, ao se romperem, liberaram milhares de merozoítos na corrente sanguínea (ciclo pré-eritrocítico ou tissular) (BRASIL, 2006; FRANÇA *et al.*, 2008; BRAGA e FONTES, 2010).

Uma vez na corrente sanguínea, os merozoítos invadem as hemácias e iniciam um processo de maturação intra-eritrocítico, originando trofozoítos (jovens e maduros) que, por multiplicação assexuada, formam esquizontes, que mais tarde se rompem liberando merozoítos na corrente sanguínea e estes infectam novas hemácias. Após sucessivas repetições deste ciclo alguns merozoítos sofrem gametogênese em que se diferenciam em macrogametócitos (feminino) e microgametócitos (masculino), e permanecem na corrente sanguínea (membrana das hemácias) sendo as formas infectantes para o mosquito. As infecções causadas por *P. vivax* e *P. ovale* apresentam formas de esporozoítos que

permanecem no interior dos hepatócitos em estado de latência, denominadas de hipnozoítos, responsáveis pelas recidivas da doença (Figura 1) (FERREIRA, 1997; BRASIL, 2006; FRANÇA *et al.*, 2008; BRAGA e FONTES, 2010).

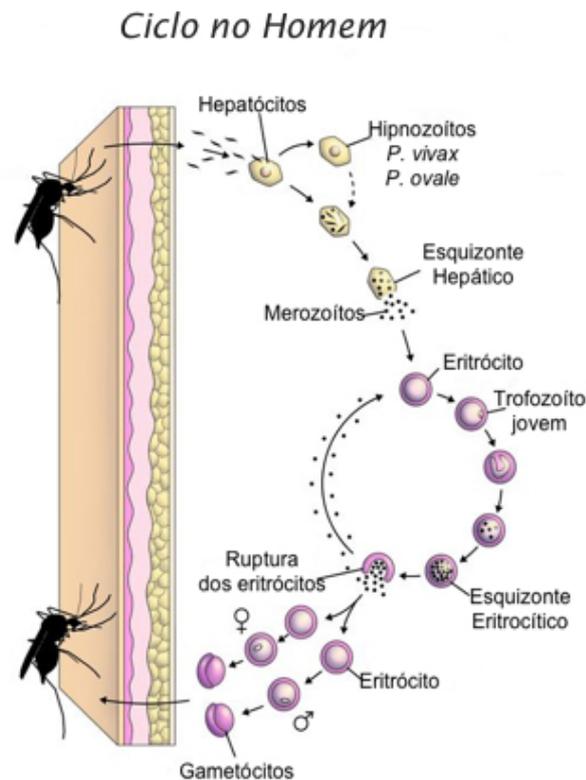


Figura 1. Ciclo de vida do parasita da malária. Fonte: Adaptado de Malária site (KAKKILAYA, 2004)

2.1.2. Epidemiologia da malária no mundo

De acordo com a Organização Mundial de Saúde - OMS, no ano de 2015 estimaram-se 214 milhões de casos de malária no mundo e 438 mil mortes, sendo que a maioria desses casos e mortes ocorreu em países em desenvolvimento. Dessas mortes, 90% ocorreram na região africana e as principais vítimas foram crianças menores de 5 anos de idade. Estima-se ainda que 3,2 bilhões de pessoas correm o risco de se infectarem com a doença, principalmente na região da África Subsaariana (WHO, 2014c; MALARIA, 2015)

Em 2014, 97 países apresentavam transmissão de malária, com destaque para a África Subsaariana, Índia, Indonésia e Mianmar, e apesar de todo o esforço para sua erradicação, existem milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, sem acesso aos meios de prevenção e tratamento contra a malária (MALARIA, 2015).

Felizmente, o Programa Mundial de Controle a Malária está conseguindo reduzir mundialmente as taxas de incidência e mortalidade, que do ano 2000 até 2015 diminuíram em 60 e 65%, respectivamente. Exemplos são países como Azerbaijão e Sri Lanka, que entre 2000 a 2013 reduziram para zero o número de casos de malária em áreas indígenas; além desses, a Argélia, Cabo Verde, Costa Rica e El Salvador notificaram menos de 10 casos locais anualmente. Em 2014, 19 países iniciaram a fase de pré-eliminação ou eliminação e 7 iniciaram fase de prevenção contra a reintrodução da malária (WHO, 2014c).

2.1.3. Malária no Brasil

No Brasil, a malária é conhecida como paludismo, impaludismo, febre palustre, febre intermitente, febre terçã benigna, febre terçã maligna, entre outros, causando perdas sociais e econômicas na população sob risco (BRASIL, 2014).

Três espécies de *Plasmodium* são responsáveis por causar malária humana no Brasil: *P. falciparum*, *P. malariae* e *P. vivax*. Entre estes, os que se destacam são o *P. vivax* (mais prevalente, responsável por cerca de 80% dos casos nacionais da doença) e o *P. falciparum* (responsável praticamente pelos 20% restantes das notificações) (WHO, 2014c).

De acordo com a OMS, entre os anos de 2000 e 2014, houve uma redução dos casos de malária na Região das Américas de 1,2 milhões para 390 mil. Em 2014, o Brasil foi responsável por 42% dos casos registrados nas Américas e metade das mortes ocorridas na região (WHO, 2014c; 2015).

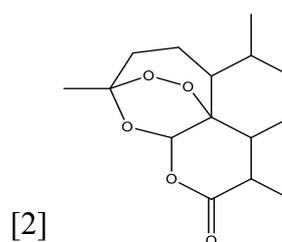
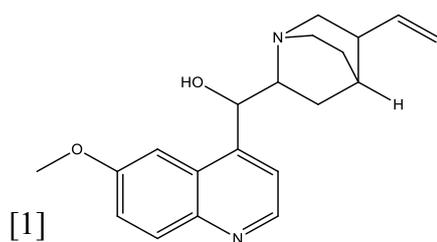
No Brasil, 99% dos casos de infecção de malária concentram-se na Região Amazônica, formada pelos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Maranhão, Mato Grosso, Pará, Rondônia, Roraima e Tocantins (BRASIL, 2015a).

Dados do Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica demonstram que entre janeiro a agosto de 2015, de 84 mil casos confirmados de malária, aproximadamente 72% ocorreram nos estados do Amazonas (55% - cerca de 47 mil casos) e Acre (17% - 14 mil casos). Outros estados com números significativos de casos de malária são Amapá (8%), Pará (6%), Rondônia (5%) e Roraima (6%) (BRASIL, 2015b).

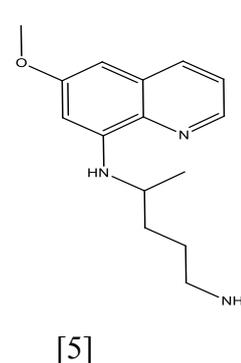
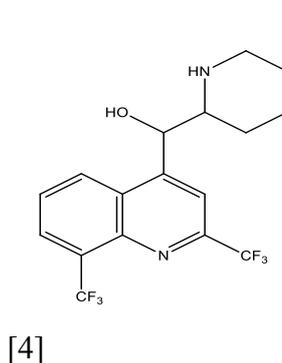
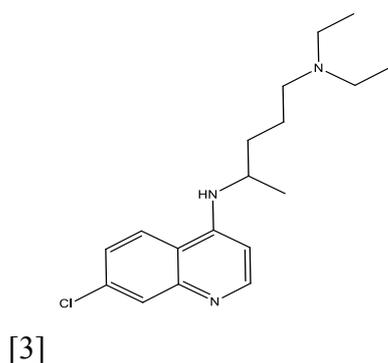
2.2. PLANTAS MEDICINAIS E ANTIMALÁRICOS

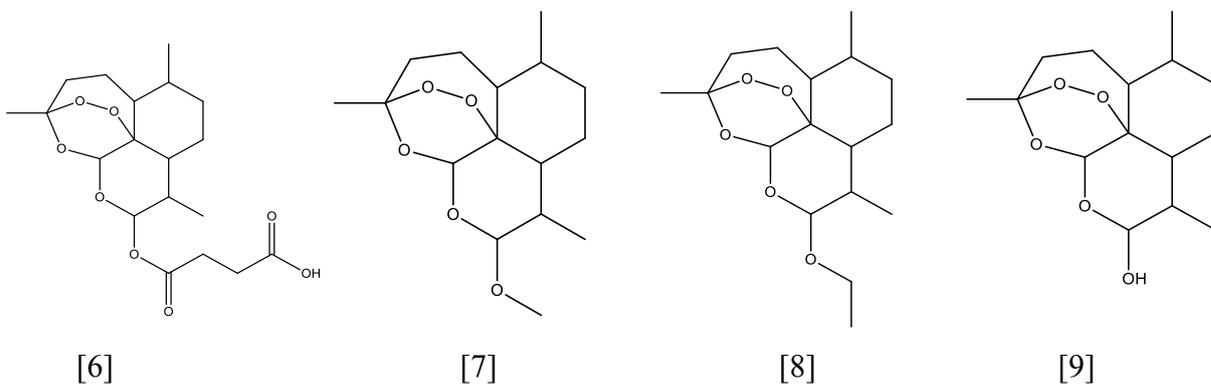
Desde os primórdios, a humanidade vem utilizando os recursos do ambiente em que vive, sendo as plantas a principal fonte de alimentos e remédios para a cura ou alívio de doenças que a aflige. Pode-se afirmar que o uso de plantas medicinais começou com a própria história do homem (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002). Com relação aos registros antigos que comprovam essa afirmação, os registros de argila Mesopotâmicos (2600 a.C.) e o Papiro de Ebers (1500 a.C.) são os mais importantes e antigos documentos. O primeiro contém mais de 1000 prescrições com plantas medicinais e o segundo, aproximadamente 700 (CRAGG e NEWMAN, 2005).

A medicina tradicional é usada para direcionar estudos químicos e farmacológicos, facilitando assim a descoberta de plantas com princípios ativos e originando novos fármacos (BRANDAO *et al.*, 2008). Exemplos bem sucedidos, são os medicamentos antimaláricos quinina [1] e artemisinina [2] extraídos de *Cinchona* spp. e *Artemisia annua*, respectivamente (CRAGG e NEWMAN, 2013).



Baseado nesses dois fármacos naturais, desenvolveu-se análogos sintéticos de quinina, menos tóxicos e mais efetivos, os quais são, a cloroquina [3], a mefloquina [4] e a primaquina [5], entre outros, e derivados semi-sintéticos da artemisinina, devido a mesma apresentar baixa solubilidade em água e óleo. Alguns exemplos de derivados da artemisinina são: artesunato [6], artemeter [7], arte-éter [8], e diidroartemisinina [9] (FRANCO *et al.*, 2009; POHLIT *et al.*, 2013).





2.3. RESISTÊNCIA AOS ANTIMALÁRICOS

A resistência de parasitas causadores da malária à cloroquina e outras drogas é um dos principais desafios na erradicação da malária e estimula a busca por novos agentes quimioterápicos com mecanismos de ação diferentes. Duas espécies de parasitas apresentam resistência aos tratamentos convencionais: *P. falciparum* e *P. vivax* (PETERSEN *et al.*, 2011; POHLIT *et al.*, 2013).

Das duas espécies de parasitas resistentes, o *P. falciparum* é a espécie que mais sofre mutações, originando cepas tão resistentes aos antimaláricos, que todas as classes de medicamentos utilizados como monoterapia para o seu tratamento, tornam-se ineficazes. Já o *P. vivax* apresenta cepas resistentes à cloroquina, sulfadoxina-pirimetamina (tratamento combinado) e primaquina (WHITE, 2004; WHO, 2010).

Devido à resistência do *P. falciparum* à monoterapia, a OMS determinou a utilização de terapia combinada de artemisinina e seus derivados com outros antimaláricos (ACTs – do inglês artemisinin-based combination therapies) para o tratamento desses casos. Essa terapia consiste na combinação de uma droga de rápida ação (artemisinina ou seus derivados) com uma droga de meia-vida longa (mefloquina, amodiaquina, piperquina, pirimetamina / sulfadoxina ou lumefantrina), a ser administrada ao paciente sob medidas de controle e monitoramento da eficácia dos mesmos, para que não ocorra resistência a esse tratamento (POHLIT *et al.*, 2013; WHO, 2014a; b).

A resistência aos antimaláricos existentes é iminente e uma das formas de encontrar e desenvolver novas drogas consiste no estudo das plantas com potencial antimalárico, principalmente aquelas conhecidas pela medicina popular.

2.4. FAMÍLIA ANNONACEAE JUSS.

A família Annonaceae Juss., descrita por Antoine Laurent de Jussieu, pertence ao grupo das angiospermas, classe Equisetopsida, e ordem Magnoliales (CHATROU *et al.*, 2004; LORENZI e SOUZA, 2008; TROPICOS, 2015). A família divide-se em quatro subfamílias, as quais são, Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae e Malmeoideae, compreendendo aproximadamente 2.500 espécies e 135 gêneros distribuídos principalmente em regiões tropicais e subtropicais (CHATROU *et al.*, 2004; CHATROU *et al.*, 2012).

Mundialmente, a família Annonaceae Juss. está distribuída entre a Ásia e a Austrália, com cerca de 950 espécies e 51 gêneros, na África e Madagascar, com cerca de 450 espécies e 40 gêneros, e no continente americano, com cerca de 740 espécies e 38 gêneros (LEBOEUF *et al.*, 1980). No Brasil, a família Annonaceae encontra-se representada por 29 gêneros e 392 espécies, com predominância para a subfamília Annonoideae e para seus gêneros *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia*. A Região Norte do país abriga 284 espécies desta família e deste total, 203 espécies encontram-se no estado do Amazonas (LOPES e MELLO-SILVA, 2014; MAAS *et al.*, 2015).

As espécies da família Annonaceae Juss., conhecidas popularmente por envira, geralmente apresentam-se como árvores, destacando-se por apresentarem um odor forte oriundo do corte de troncos e ramos (característica marcante da família) (JOLY, 2002; MAAS *et al.*, 2007; LORENZI e SOUZA, 2008). Representantes dessa família são encontradas em diversos ambientes, como matas alagadas (várzeas e igapós), restingas, regiões montanhosas, caatinga, savana, entre outros (OLIVEIRA, 2007).

A família Annonaceae Juss., possui grande importância econômica. Espécies do gênero *Annona* são cultivadas em diversas partes do mundo em pomares comerciais ou coletados de forma extrativista e produzem frutos comestíveis de interesse industrial para a fabricação de doces, sucos e sorvetes (Figura 2). As sementes de *Xylopia* spp. são utilizadas como condimento em regiões da África e Malásia (BERNARDI e SPICHIGER, 1980; JOSÉ *et al.*, 2014). Há também espécies de valor para a fabricação de cordas, indústria de perfumes e construção civil (BERNARDI e SPICHIGER, 1980; MURILLO-A, 2001; LOBÃO *et al.*, 2005).

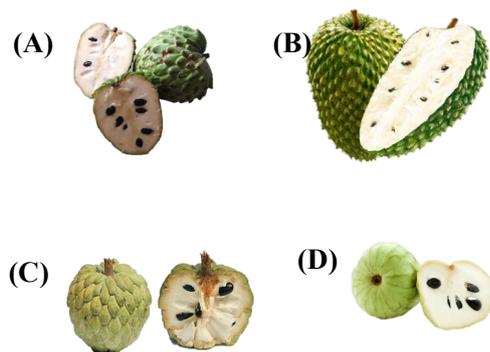


Figura 2: Principais frutos de interesse industrial da família Annonaceae Juss.: (A) Atemóia (híbrido de *Annona squamosa* × *A. cherimola*). (B) Graviola (*A. muricata* L.) (C) Fruta do conde (*A. squamosa*) (D) Cherimólia (*A. cherimola*). **Fonte:** <https://adaptado.de.google/frutos/Annonaceae>.

Além de sua importância industrial a família Annonaceae Juss. é muito utilizada na medicina popular como, analgésico, anti-inflamatório, antimicrobiano, antineoplásico, antiplaquetário, antiparasitário (principalmente contra leishmaniose, malária e doença de chagas), entre outros, incluindo também o uso como inseticida (Quadro 1) (LIMA *et al.*, 2012; FRAUSIN *et al.*, 2014; GONZÁLEZ-ESQUINCA *et al.*, 2014; ISMAN e SEFFRIN, 2014; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015).

Quadro 1: Usos na medicina popular de algumas espécies da família Annonaceae.

Espécie	Uso Popular	Fonte
<i>Annona muricata</i>	Tratamento da malária e febre, antiparasitário, antineoplásico, analgésico e inseticida.	(FRAUSIN <i>et al.</i> , 2014; ISMAN e SEFFRIN, 2014; MOGHADAMTOUSI <i>et al.</i> , 2015)
<i>Annona squamosa</i>	Utilizado como inseticida e no Tratamento de úlceras e malária.	(YANG <i>et al.</i> , 2002; KAOU <i>et al.</i> , 2008; FRAUSIN <i>et al.</i> , 2014; ISMAN e SEFFRIN, 2014)
<i>Guatteria boliviana</i>	Antiparasitário e antipirético.	(MAHIOU <i>et al.</i> , 2000)
<i>Pseudoxandra cuspidata</i>	Tratamento da malária.	(BERTANI <i>et al.</i> , 2005)
<i>Unonopsis floribunda</i>	Tratamento de malária, inflamações e diarreia.	(JOVEL <i>et al.</i> , 1996; KVIST <i>et al.</i> , 2006)

Quadro 1: Usos na medicina popular de algumas espécies da família Annonaceae (continuação).

Espécie	Uso Popular	Fonte
<i>Unonopsi glaucopetala</i>	Tratamento de picada de cobra.	(VAN ANDEL, 2000)
<i>Xylopi aethiopica</i>	Tratamento da malária, infecções bacterianas, inflamações e distúrbios estomacais.	(BOYOM <i>et al.</i> , 2003; FRAUSIN <i>et al.</i> , 2014; WOGUEM <i>et al.</i> , 2014)
<i>Xylopi a cf. frutescens</i>	Analgésico e anti-inflamatório	(DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002)
<i>Xylopi a parviflora</i>	Inflamações e distúrbios estomacais.	(WOGUEM <i>et al.</i> , 2014)

O uso de espécies de Annonaceae na medicina tradicional intensificou o interesse de estudos fitoquímicos para a descoberta de seus componentes ativos. Observou-se então que a maioria das espécies são ricas em metabólitos secundários, tais como terpenos, alcaloides, acetogeninas, carboidratos, lipídios, fenilpropanóides, flavonóides, taninos, entre outros. (LEBOEUF *et al.*, 1980; FOONG e HAMID, 2012; HAMID *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2013; MOGHADAMTOUSI *et al.*, 2015; SILVA *et al.*, 2015).

As atividades farmacológicas dessa família são atribuídas aos seus metabólitos secundários, principalmente as classes de alcaloides isoquinolínico do tipo aporfínico e oxaporfínico e acetogeninas, sendo este último, um constituinte específico da família (ALALI *et al.*, 1999; FISCHER *et al.*, 2004; BERMEJO *et al.*, 2005; BOYOM *et al.*, 2009; HAMID *et al.*, 2012; LIMA *et al.*, 2012), tais classes de substâncias podem ser encontradas nas folhas, cascas, sementes, frutos e raízes, variando em quantidade de acordo com a época do ano e a região onde foi coletada (GONZÁLEZ-ESQUINCA *et al.*, 2014).

2.4.1. O gênero *Xylopi a*

O gênero *Xylopi a* é um dos maiores gêneros da família Annonaceae Juss. É o único que pode ser encontrado em regiões tropicais de todos os continentes, ocorrendo principalmente nos continentes americano, asiático e africano (CHATROU, 1999; MAAS,

2009; CHATROU *et al.*, 2012). Possui aproximadamente 160 espécies e desse total, 33 ocorrem no Brasil, sendo endêmicas na Amazônia (LOBÃO e JOHNSON, 2007; MELLO-SILVA e LOPES, 2014; MAAS *et al.*, 2015).

Espécies do gênero *Xylopia* são representadas por árvores ou arbustos e seus frutos geralmente tem mais de uma semente. Crescem em ambientes arenosos, capoeiras, campinas, igarapés e orla de matas do litoral; são conhecidas popularmente por diversos nomes, tais como, bananinha, cedro-do-campo, envireira, imbiriba, pimenteira e pindaíba (DIAS, 1988; PONTES e MELLO-SILVA, 2005; LOPES e MELLO-SILVA, 2014). O gênero é conhecido por apresentar diversas classes de metabólitos secundários, predominando alcalóides, acetogeninas, diterpenos e sesquiterpenos (MOREIRA *et al.*, 2013).

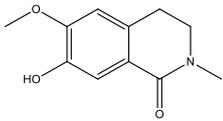
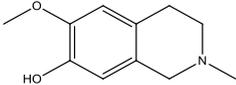
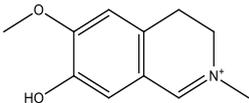
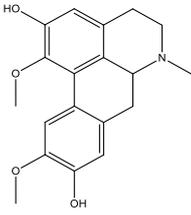
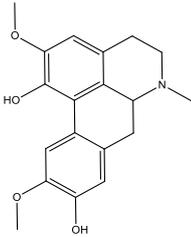
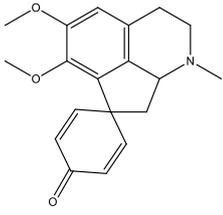
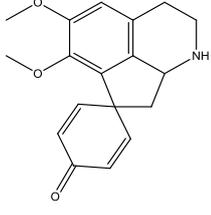
2.4.1.1. Alcaloides em *Xylopia*

O termo alcaloide foi proposto por W. Meissner em 1819 para designar substâncias derivadas de plantas que agem similarmente a bases (MEISSNER, 1819). Entretanto, novas definições foram surgindo a medida que novos alcaloides foram descobertos. Como exemplo temos a proposta de Pelletier em 1818, a qual define alcaloides como substâncias orgânicas contendo nitrogênio em estado de oxidação negativo (PELLETIER, 1818; HESSE, 2002).

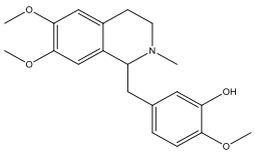
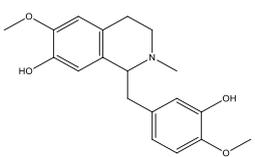
Encontram-se na literatura estudos quanto aos constituintes químicos de diversas espécies de *Xylopia*, em especial os alcaloides, sendo descrito até 2013 o isolamento de cerca de 116 representantes desta classe, destacando-se os do tipo isoquinolínico, os com núcleo benzilisoquinolínico e aporfínico. Dentre as principais espécies de *Xylopia* estudadas estão: *X. aethiopica*, *X. amazonica*, *X. aromatica*, *X. brasilienses*, *X. emerginata*, *X. frutescens*, *X. langsdorffiana*, *X. papuana*, *X. parviflora*, e *X. viellardi* (MOREIRA *et al.*, 2013).

De acordo com dados apresentados no quadro 2, alcaloides isoquinolínicos foram isolados de *X. parviflora* e *X. viellardi*, como exemplos temos a talifolina, coripalina e picnarrina (JOSSANG *et al.*, 1991; NISHIYAMA *et al.*, 2004; NISHIYAMA *et al.*, 2006). Outros exemplos de alcaloides isolados de *Xylopia* spp. são os aporfínicos (+)-boldina, (+)-isoboldina, (HOCQUEMILLER *et al.*, 1981; NISHIYAMA *et al.*, 2006; PUVANENDRAN *et al.*, 2010); proaporfínicos, temos a pronuciferina e estefarina (HOCQUEMILLER *et al.*, 1981; NISHIYAMA *et al.*, 2006); e os benzilisoquinolínicos (+)-laudanidina, (+)-reticulina, (JOHNS *et al.*, 1968; NISHIYAMA *et al.*, 2006; PUVANENDRAN *et al.*, 2010).

Quadro 2: Exemplos de alcaloides isolados de *Xylopi* spp.

ALCALOIDES	ESTRUTURA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
talifolina		<i>X. parviflora</i>	(NISHIYAMA <i>et al.</i> , 2006)
coripalina		<i>X. viellardi</i>	(JOSSANG <i>et al.</i> , 1991)
picnarrina		<i>X. parviflora</i> <i>X. viellardi</i>	(JOSSANG <i>et al.</i> , 1991; NISHIYAMA <i>et al.</i> , 2004)
(+)-boldina		<i>X. parviflora</i>	(NISHIYAMA <i>et al.</i> , 2006)
(+)-isoboldina		<i>X. danguyella</i> <i>X. parviflora</i> <i>X. viellardi</i>	(HOCQUEMILLER <i>et al.</i> , 1981; JOSSANG <i>et al.</i> , 1991; NISHIYAMA <i>et al.</i> , 2006)
pronuciferina		<i>X. buxifolia</i>	(HOCQUEMILLER <i>et al.</i> , 1981)
estefarina		<i>X. parviflora</i>	(NISHIYAMA <i>et al.</i> , 2006)

Quadro 2: Exemplos de alcaloides isolados de *Xylopia* spp. (continuação)

ALCALOIDES	ESTRUTURA	ESPÉCIE	REFERÊNCIA
(+)-laudanidina		<i>X. championii</i> <i>X. pancheri</i> <i>X. parviflora</i>	(NIÉTO, M. <i>et al.</i> , 1976; NISHIYAMA <i>et al.</i> , 2006)
(+)-reticulina		<i>X. frutescens</i> <i>X. nigricans</i> <i>X. pancheri</i> <i>X. papuana</i> <i>X. parviflora</i> <i>X. viellardi</i>	(JOHNS <i>et al.</i> , 1968; NIÉTO, M <i>et al.</i> , 1976; LEBOEUF <i>et al.</i> , 1982; JOSSANG <i>et al.</i> , 1991; NISHIYAMA <i>et al.</i> , 2006; PUVANENDRAN <i>et al.</i> , 2010)

2.4.1.2. *Xylopia* e uso tradicional para malária

Estudos demonstram o uso medicinal de *Xylopia* spp. em diversas culturas. Exemplos são: *X. aethiopica*, *X. aromatica*, *X. emerginata*, *X. frutescens*, *X. laevigata* e *X. langsdorffiana* usadas no tratamento de febre, dores, inflamações, prisão de ventre e doenças parasitárias (DI STASI e HIRUMA-LIMA, 2002; HERNÁNDEZ C *et al.*, 2005; MESQUITA *et al.*, 2007; QUINTANS *et al.*, 2013).

Pesquisas etnobotânicas em regiões do Brasil, Camarões, Colômbia, Guiana Francesa, Peru, Nigéria, Togo e outros lugares da África mostram que espécies de *Xylopia* são comumente utilizadas para tratar malária e seus sintomas (ODUGBEMI *et al.*, 2007; FRAUSIN *et al.*, 2014). Como exemplos de espécies utilizadas popularmente para malária temos a *X. aethiopica*, *X. aromatica*, *X. emarginata*, *X. parviflora*, *X. phloiodora* e *X. staudtii*, das quais são feitos chás ou banhos utilizando suas folhas, frutos, sementes, casca do tronco e raízes (BOYOM *et al.*, 2003; IJI *et al.*, 2006; MESQUITA *et al.*, 2007; ODUGBEMI *et al.*, 2007; TITANJI *et al.*, 2008; ASASE *et al.*, 2012; TSABANG *et al.*, 2012).

2.4.1.3. *Xylopi*a e ensaios biológicos para malária

Diversos estudos vêm sendo realizados com extratos de espécies de *Xylopi*a spp. para avaliação de suas atividades antimaláricas. Alguns exemplos de testes *in vitro* realizados estão apresentados no Quadro 3.

Quadro 3: *Xylopi*a spp. com atividade antiplasmódica *in vitro* contra *P. falciparum* (PF).

Espécie	Extrato		PF Cepa	CI50 (ug/mL)	Fonte
	Parte da Planta	Solvente			
<i>X. aethiopica</i>	Folha	Metanol	W2	3,75	(BOYOM <i>et al.</i> , 2011)
<i>X. africana</i>	Folha	Metanol		5,83	
	Galho	Metanol		3,56	
	Casca do tronco	Metanol		1,07	
	Raiz	Metanol		1,32	
<i>X. aromatica</i>	Partes aéreas	Etanol	FcB2*	< 2,1	(GARAVITO <i>et al.</i> , 2006)
<i>X. emarginata</i>	Folha	Etanol	Palo alto	3,3	(FISCHER <i>et al.</i> , 2004)
	Raiz	Hexano	FcB1*	4,9	(MESQUITA <i>et al.</i> , 2007)
<i>X. parviflora</i>	Folha	Metanol	W2	3,81	(BOYOM <i>et al.</i> , 2011)
	Casca do tronco	Metanol		3,44	

*Cepa cloroquina resistente.

2.4.2. *Xylopi*a *amazonica* R. E. Fries

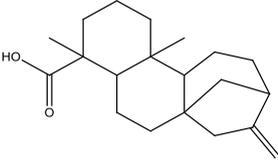
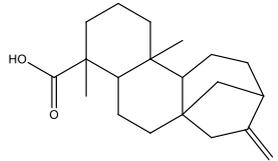
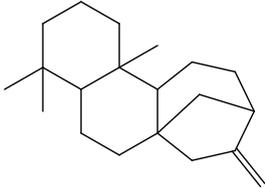
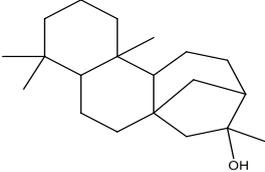
A espécie *X. amazonica* é representada por árvores de pequeno e médio porte com bastante ramificações, cresce em solo arenoso de florestas não inundadas e sua origem é Amazônica, sendo encontrada na região Amazônica da Venezuela, Suriname e Brasil (REVILLA, 2002)

X. amazonica apresenta um período de floração de 3 meses que ocorre entre julho e setembro, com flores aromáticas, pequenas (aproximadamente 1 cm de comprimento) e de cor creme amarelada. Seus frutos amadurecem em torno de sete meses após a floração e suas folhas são estreitas, de forma elíptica e possuem pelos brancos em sua parte inferior (WEBBER e GOTTSBERGER, 1999; RIOS e PASTORE JÚNIOR, 2011).

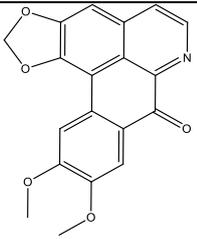
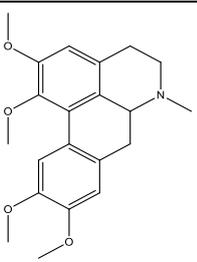
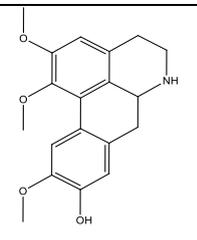
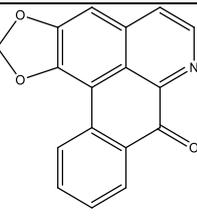
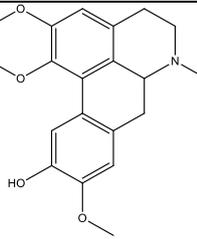
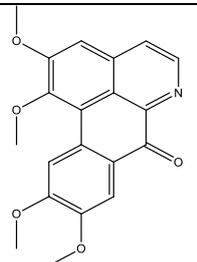
A *X. amazonica* é conhecida popularmente por envirataia-sarassará, envirataia-vermelha, envira-sarassará ou envira/envireira vermelha. A espécie é utilizada por comunidades indígenas do rio Apaporis como sonífero através do preparo de infusão de folhas e caule. Sua madeira é utilizada na fabricação de caibros para construção de casas (REVILLA, 2002; MAAS *et al.*, 2007; RIOS e PASTORE JÚNIOR, 2011).

Trabalhos anteriores sobre a composição química de *X. amazonica* relatam o isolamento de 6 diterpenos (ácido caurenóico, ácido 4-*epi*-caurenóico, beireno, diterpeno aduto A, diterpeno aduto C e *ent*-cauran-16 β -ol) e 6 alcaloides aporfínicos (dincentrinona, (+)-glaucina, (+)-laurotetanina, liriodenina, lirioferina e oxoglaucina,) de cascas do caule e de seus galhos (MOREIRA *et al.*, 2013). Nos Quadros 4 e 5 são apresentados exemplos de diterpenos e alcaloides isolados de *X. amazonica* R.E. Fries.

Quadro 4: Exemplos de diterpenos isolados de *X. amazonica* R.E. Fries (MARTINS *et al.*, 1995; MOREIRA *et al.*, 2013)

Diterpeno	Estrutura
<p>Ácido caurenóico (<i>ent</i>-caur-16-en-19-óico)</p>	
<p>ácido 4-<i>epi</i>-caurenóico</p>	
<p>Beireno</p>	
<p><i>ent</i>-cauran-16β-ol</p>	

Quadro 5: Alcaloides isolados de *X. amazonica* R.E.Fries.

Alcaloide	Estrutura	Referência
dicentrinona		(ARANGO <i>et al.</i> , 2004)
(+) -glaucina		(MARTINS <i>et al.</i> , 1995)
(+) -laurotetanina		(MARTINS <i>et al.</i> , 1995)
liriodenina		(ARANGO <i>et al.</i> , 2004)
lirioferina		(MARTINS <i>et al.</i> , 1995)
oxoglaucina		(MARTINS <i>et al.</i> , 1995)

As propriedades farmacológicas de *X. amazonica* são pouco estudadas. Os seus componentes químicos ocorrem em outras espécies. Através de ensaios realizados, diversas atividades farmacológicas foram atribuídas a esses compostos, tais como: anticâncer, antimicrobiana, antiplasmódica, leishmanicida e tripanocida (Quadro 6) (LIMA *et al.*, 2015).

Quadro 6: Propriedades farmacológicas das substâncias encontradas em *X. amazonica* R.E.Fries., isoladas de espécies de Annonaceae e espécies de outras famílias.

Substancia	Propriedade Farmacológica	Espécie vegetal	Referência
beireno	Atividade antimicrobiana	<i>Plectranthus barbatus</i> <i>Plectranthus caninus</i> (Lamiaceae).	(GELMINI <i>et al.</i> , 2015)
dicentrinona	Atividade antiplasmódica e leishmanicida	<i>Dasymaschalon acuminatum</i> Jing Wang & R.M.K. Saunders (Annonaceae) <i>Duguetia furfuracea</i> (Annonaceae)	(SILVA <i>et al.</i> , 2009; CHOKCHAISIRI <i>et al.</i> , 2015)
(+)-glaucina	Inibe o crescimento do cancro de mama	<i>Corydalis turtschaninovii</i> tuber (Papaveraceae)	(KANG <i>et al.</i> , 2015)
(+)-laurotetanina	Atividade antiplasmódica	<i>Nectandra salicifolia</i> (H.B.K.) Nees (Lauraceae)	(BÖHLKE <i>et al.</i> , 1996)
liriodenina	Atividade antiplasmódica	<i>Liriodendron tulipifera</i> L. (Magnoliaceae). <i>Glossocalix brevipes</i> Benth. (Monimiaceae)	(MBAH <i>et al.</i> , 2004; GRAZIOSE <i>et al.</i> , 2011)
lirioferina	Atividade leishmanicida	<i>Guatteria dumentorum</i> (Annonaceae)	(CORREA <i>et al.</i> , 2006)
oxoglaucina	Atividade antiplasmódica	<i>Liriodendron tulipifera</i> L. (Magnoliaceae)	(GRAZIOSE <i>et al.</i> , 2011)

Recentemente, o LAPAAM, através dos estudos realizados por LIMA e colaboradores (2015), demonstrou que extratos brutos de *X. amazonica* possuem satisfatória atividade

antimalárica. Os extratos mais ativos *in vitro* (cepas K1 cloroquina-resistentes) foram o clorofórmico da folha (CI₅₀ 7,3 µg/mL) e o etanólico do galho (CI₅₀ 9,8 µg/mL). No ensaio *in vivo* contra *P. berghei*, o extrato clorofórmico inibiu o crescimento parasitário em 52% em 5 dias na dose de 250 mg/Kg/dia por via oral.

Tendo em vista o crescente surgimento de cepas de plasmódio resistentes e os promissores resultados com extratos de *X. amazonica*, o presente estudo tem o intuito de dar continuidade às pesquisas com essa espécie, a fim de testar extratos brutos obtidos por métodos extrativos diferentes dos já testados e isolar as substâncias ativas presentes nos mesmos.

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Contribuir para o conhecimento da composição química de *X. amazonica* (Annonaceae) e avaliar a sua atividade antimalárica.

3.2. ESPECÍFICOS

- Isolar substâncias a partir de extratos de *X. amazonica*.
- Avaliar o perfil químico de frações alcalóidicas de *X. amazonica*.
- Identificar ou elucidar as substâncias isoladas através de métodos espectroscópicos e espectrométricos.
- Determinar a concentração das substâncias isoladas que inibe 50% do crescimento do parasito (IC₅₀) *in vitro* contra *P. falciparum*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. EQUIPAMENTOS

- Balança analítica: MARTER, modelo AY220.
- Balança semi-analítica: ADVENTURER, modelo ARC120.
- Estufa de secagem: FANEM, modelo 320-SE.
- Lampada UV: CHROMATO-VUE CARBINRT, modelo CC-10 (comprimentos de onda: 365 e 254 nm).
- Moinho de 4 facas: MARCONI, modelo MA 340.
- Rotaevaporador: FISATOM, modelo 802.
- Banho de ultrassom: UNIQUE, modelo USC-1800A.
- Chapa aquecedora: FISATOM, modelo 753A.

4.2. ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

4.2.1. Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises em CCD foram realizadas em cromatoplasmas de alumínio com tamanho 20 × 20 cm e 0,25 mm de espessura com indicador de fluorescência (TLC sílica gel 60 F₂₅₄ Merck).

4.2.2. Cromatografia em coluna (CC)

Utilizaram-se colunas de vidro com comprimentos e diâmetros variados. Como fase estacionária, utilizou-se sílica de fase reversa C18 (LiChroprep Rp18- Merck, 40-63 µm) e sílica flash gel 60 (0,040-0,0063 mm mesh, Merck). Como fase móvel, utilizaram-se os solventes metanol e acetato de etila.

4.2.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Esta metodologia foi realizada no Laboratório de Cromatografia do Centro de Biotecnologia da Amazonia (CBA) em colaboração com o Dr. Felipe Moura Araújo da Silva e o doutorando Abraão Alexandre de Souza.

As análises em CLAE analítico foram realizadas em cromatógrafo Surveyor Plus[®] (Thermo Scientific) equipado com bomba Surveyor LC Pump Plus, autoamostrador Surveyor Autosampler Plus, válvula de injeção Rheodyne (25 µL), operando simultaneamente com detector de arranjo de diodos (DAD) Surveyor PDA Plus Detector e de espectrometria de massas (EM) (TSQ Quantum Access).

As análises em CLAE semi-preparativo foram realizadas em cromatógrafo modelo UFLC[®] (Shimadzu) equipado com bomba LC-6AD (sistema binário), degaseificador DGU-20A₅, detector de ultravioleta (UV) SPD-20AV, modulo de comunicação CBM-20A e válvula de injeção Rheodyne (200 µL).

4.2.4. Solventes e reveladores

Os solventes utilizados para realizar CCD, CC e extrações, foram previamente purificados por destilação. Os solventes utilizados em CLAE e EM eram grau de pureza CLAE da marca Tedia. Para obtenção dos espectros de ressonância magnética nuclear (RMN), foram utilizados solventes deuterados da marca Merck. A água ultrapura foi obtida a partir de um sistema Milli-Q, modelo *Synthesis* (Millipore).

As placas de CCD foram reveladas com luz UV (254 e 365 nm) e com reagentes de Dragendorff e anisaldeído.

4.3. MÉTODOS EPECTROSCÓPICOS E ESPECTROMÉTRICOS

4.3.1. Ressonância magnética nuclear

As análises de RMN foram realizadas na Central Analítica do Laboratório Temático de Química de Produtos Naturais (CA-LTQPN) no INPA, em colaboração com a Dra Zelina Estevam dos Santos Torres. Os espectros de uma e duas dimensões (1D e 2D) foram adquiridos em equipamento Bruker Ultrashield Fourier (300 MHz). As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado (CDCl_3) ou acetona deuterada ($((\text{CD}_3)_2\text{CO})$). Os deslocamentos químicos foram expressos em ppm (δ) e as constantes de acoplamento (J) registradas em Hertz (Hz).

4.3.2. Espectrometria de Massas

As análises de EM foram realizadas no laboratório de espectrometria de massas da UFAM. Os espectros foram registrados em equipamento do tipo *ion-trap*, modelo LCQ Fleet[®] (Thermo Scientific), operando com fonte de *electrospray* (ESI). As análises de CL-EM foram realizadas no CA-LTQPN no INPA, em equipamento Bruker Daltonics, modelo MicroTOF-QII.

4.4. ÁREA DE COLETA

A coleta de *X. amazonica* R.E. Fries foi realizada na Reserva Florestal Adolpho Ducke, localizada no quilômetro 26 da rodovia AM-010, Amazonas. Para acesso à reserva para fins de coleta, foi solicitada autorização ao Setor de Reservas do INPA (DSER) e ao Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO (4), e para auxílio na coleta foi contratado serviços de um identificador botânico.

4.5. OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Coletaram-se folhas e galhos finos de *X. amazonica* R.E. Fries de um único espécime previamente localizado e identificado na Reserva Florestal Adolpho Ducke, cuja exsicata encontra-se depositada no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob o número INPA 183108. As folhas e galhos finos foram acondicionados em sacos plásticos e transportados para o Laboratório de Princípios Ativos da Amazônia (LAPAAM) localizado no campus I do INPA.

4.6. PREPARAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Após a chegada do material ao LAPAAM, foi realizada a limpeza do mesmo para a retirada de sujidades ou contaminantes (fungos, insetos, etc) e realizou-se separação das folhas dos galhos finos. As diferentes partes da planta foram pesadas e levadas para uma estufa de secagem, em temperatura de 45°C por 1 semana, sendo em seguida triturados em moinho elétrico de facas. O material seco e moído foi acondicionado em sacos plásticos distintos, pesados e identificados.

4.7. EXTRAÇÃO

O material seco e moído (folhas e galhos finos) foi submetido à extração, empregando-se maceração com auxílio de banho de ultrassom, com 1) solventes em ordem de polaridade crescente (Figura 3), 2) extração somente com etanol e 3) partição ácido-base. Após cada procedimento, retirou-se 1 mg de cada extrato ou fração após evaporação, para a realização dos testes *in vitro* (descritos mais adiante)

4.7.1. Maceração com auxílio de ultrassom e solventes em ordem de polaridade crescente (Figura 3)

4.7.1.1. Extração com hexano

O primeiro extrato preparado foi o hexânico de folha. Para tanto pesaram-se 10,08 g de folhas. As folhas foram acondicionadas a um erlenmeyer de 125 mL. Ao erlenmeyer foram vertidos 80 mL de hexano, seguido de sonicação e aquecimento (faixa entre 43 a 47°C) em banho de ultrassom, por 4 h.

Após, deixaram-se as folhas macerando à temperatura ambiente por aproximadamente 18 h. O conteúdo do erlenmeyer foi então filtrado. O material filtrado foi concentrado em rotaevaporador. Posteriormente, o resíduo resultante foi transferido para um frasco previamente pesado, deixando-o aquecer em banho de areia para evaporar todo o solvente e obter-se assim os extratos hexânicos de folhas (JFH). Realizou-se repetidamente o processo de extração com hexano a fim de exaurir o material vegetal.

Ao final as folhas exauridas com hexano foram secas à temperatura ambiente por 72 h e após a secagem pesaram-se as mesmas obtendo-se 8,93 g de material vegetal. Esse último foi dividido em duas partes que foram acondicionadas em erlenmeyers distintos, o primeiro (1) continha 4,07 g de folhas pulverizadas e o segundo 4,8 g (Figura 3).

A extração de duas porções, a primeira com clorofórmio, solvente que produziu extratos ativos em Lima et al. (2015), e a segunda com acetato etila foi para avaliar a possibilidade de eliminar os solventes clorados e manter a atividade antiplasmódica.

4.7.1.2. Extração com clorofórmio

Para a preparação dos extratos clorofórmicos (JFCL) utilizou-se o erlenmeyer 1, que continha 4,07 g de folhas pulverizadas (previamente exauridas com hexano) e 40 mL de clorofórmio (CHCl_3). Os procedimentos foram os mesmos descritos na extração com hexano acima (Figura 3).

4.7.1.3. Extração com acetato de etila

Para a preparação dos extratos de acetato de etila (JFAC) utilizou-se o erlenmeyer 2, que continha 4,8 g de folhas pulverizadas (previamente exauridas com hexano) e 40 mL de acetato de etila (AcOEt). Os procedimentos foram os mesmos descritos na extração com hexano (Figura 3).

4.7.1.4. Extração com etanol

Após a exaustão das folhas com clorofórmio, esperou-se evaporar todo o solvente em temperatura ambiente, em uma capela, por 72 h. Em seguida, adicionaram-se 40 mL de etanol. Os procedimentos foram os mesmos descritos na extração com hexano, obtendo assim o extrato etanólico (JFET) (Figura 3).

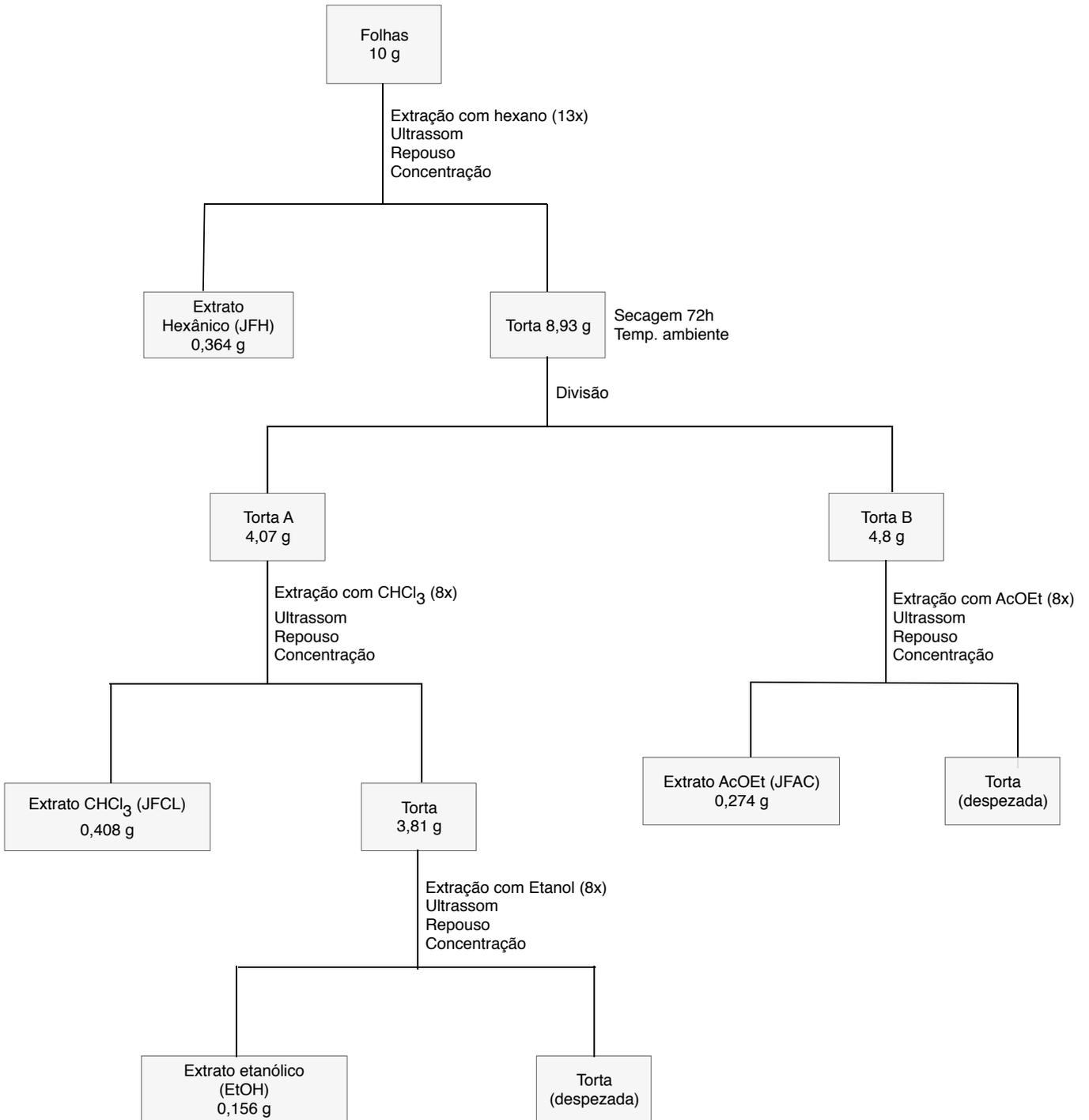


Figura 3. Obtenção de extratos a partir de maceração com ultrassom, usando solventes em ordem crescente de polaridade.

4.7.2. Maceração com auxílio de ultrassom empregando-se apenas etanol

Para a preparação dos extratos etanólicos utilizaram-se 10 g de galhos finos e 80 mL de etanol 95%. O material vegetal foi acondicionado em um erlenmeyer de 125 mL, ao qual foram vertidos 80 mL de etanol, seguido de sonicação e aquecimento (faixa entre 43 a 47°C) em banho de ultrassom por 2 h. Após, deixaram-se os galhos finos macerando à temperatura ambiente por aproximadamente 18 h. O conteúdo do erlenmeyer foi então filtrado e concentrado em rotaevaporador, sendo transferido para um frasco previamente pesado, deixando-o em banho de areia para evaporar todo o solvente e obter-se assim o extrato etanólico de galhos finos (JGFET). Realizou-se repetidamente o processo de extração com etanol a fim de exaurir o material vegetal.

4.7.3. Maceração com auxílio de ultrassom empregando-se apenas hexano

Para a preparação dos extratos hexânicos utilizaram-se 10 g de folhas e 10,7 g de galhos finos ambos previamente pulverizados, os quais foram acondicionados em erlenmeyers distintos de 125 mL cada. Aos erlenmeyers foram vertidos 80 mL de hexano, seguido de sonicação e aquecimento (faixa entre 43 a 47°C) em banho de ultrassom, por 4 h.

Após, esse período deixaram-se as folhas e galhos finos macerando à temperatura ambiente por aproximadamente 18 h. O conteúdo de cada erlenmeyer foi então filtrado separadamente, e os filtrados foram concentrados em rotaevaporador e transferidos para frascos previamente pesados, deixando-os em banho de areia para evaporar todo o solvente e obter-se assim os extratos hexânicos de folhas (JFH-A) e galhos finos (JGFH). Realizou-se repetidamente o processo de extração com hexano a fim de exaurir os materiais vegetais.

Ao final, as folhas e galhos finos exauridos com hexano foram secos à temperatura ambiente por 72 h e após a secagem pesaram-se os mesmos, obtendo-se as massas apresentadas na Tabela 1. Em seguida utilizou-se esse material para as extrações ácido-base.

Tabela 1: Peso dos materiais vegetais após exaustão com hexano.

Parte da planta	Peso (g)
Folhas	9,80
Galhos finos	9,94

4.7.4. Partição ácido-base

A partição ácido-base foi realizada em escala analítica, utilizando duas metodologias distintas, a primeira, uma adaptação de Soares *et al.* (2015) que será descrita como metodologia A e a segunda, de acordo com Valente *et al.* (2006), a qual será descrito como metodologia B. Após as partições, pesou-se 1 mg de cada fração para a realização dos testes *in vitro*. A partir dos resultados dos mesmos (ensaio antiplasmódico *in vitro* e análise por CCD), preparou-se uma partição ácido-base em escala preparativa, para o isolamento de alcaloides.

4.7.4.1. Metodologia A

Aos erlenmeyers contendo 9,94gg de galhos finos e 9,80 g de folhas, ambos previamente exauridos com hexano e secos, foram adicionados 70 mL de hidróxido de amônio (NH₄OH) 10% e 70 mL de diclorometano (CH₂Cl₂), após levou-se os mesmos para a sonicção em banho de ultrassom por 3 h e em seguida os frascos ficaram em repouso por 72 horas.

Passadas as 72 h, filtraram-se ambos os extratos separadamente com o auxílio de um funil e papel filtro, transferindo-os para distintos funis de separação, de maneira que as fases ficaram bem definidas (aquosa básica e orgânica).

Separando-as, adicionaram-se 70 mL de ácido acético 10% (CH₃CO₂H) por duas vezes nos distintos funis contendo a fase orgânica de cada extrato, agitando-os vigorosamente. Foram deixados em repouso até formação de duas fases, orgânica e aquosa ácida. As fases foram separadas e as fases aquosas ácidas foram basificadas com NH₄OH até alcançar pH 10, sendo o mesmo aferido com fita indicadora de pH.

Após isso, transferiram-se as mesmas para funis de separação distintos e adicionaram-se 30 mL de CH_2Cl_2 (duas vezes). Ambos funis foram agitados novamente e formaram fases. As fases orgânicas foram acondicionadas em balões distintos e concentrados em evaporador rotatório, e secos em banho de areia para evaporar todo o solvente. Obtiveram-se assim as frações alcaloídicas de folhas e galhos finos de *X. amazonica*, sendo estas codificadas como XFALDCM e XGFALDCM.

4.7.4.2. Metodologia B

Por meio de CCD, foi observado que os extratos etanólicos evidenciaram a presença de alcaloides quando revelado com o reagente Dragendorff (indicativo dessa classe de substância). Então, esses extratos foram submetidos à extração ácido-base.

Pesaram-se 508 mg de extrato etanólico bruto de galhos finos e dissolveram-se com 76 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,1N (0,15 mL HCl 0,1N para 1 mg de extrato). Levou-se ao banho de ultrassom por 5 min. Após esse período, a solução foi transferida para um funil de separação e adicionaram-se 76 mL de acetato de etila por 3 vezes (sendo o volume de acetato de etila utilizado, igual ao do ácido clorídrico). Agitou-se cuidadosamente e deixou-se em repouso formando assim duas fases (aquosa ácida e orgânica) de acordo com Valente *et al.* (2006).

A fase orgânica foi concentrada em evaporador rotatório e seca em banho de areia para retirar todo o solvente, obtendo-se uma fração AcOEt de galhos finos de *X. amazonica*, sendo esta codificada como FAAC-GF.

A fase aquosa ácida foi basificada com hidróxido de amônia (NH_4OH) até alcançar pH entre 9 e 10. Em seguida, transferiu-se a mesma para um funil de separação e adicionou-se acetato de etila por 3 vezes, agitando-a cuidadosamente e aguardando o repouso para que as fases fossem formadas (aquosa básica e orgânica).

A fração orgânica foi concentrada em evaporador rotatório e seca em banho de areia para retirar todo o solvente obtendo-se a fração alcaloídica de galhos finos de *X. amazonica*, sendo esta codificada como FBAC-GF.

A fração aquosa básica restante, foi lavada 3 vezes com clorofórmio, seguindo o mesmo procedimento utilizado na fração aquosa ácida com acetato de etila. E a fase orgânica resultante foi concentrada, seca e codificada como FBCL-GF.

4.7.4.3. Metodologia A, em escala preparativa

Para a obtenção das frações alcaloídicas em escala preparativa, repetiu-se a metodologia A, conforme o descrito a seguir: Maceraram-se 340 g de folhas (previamente exauridas com hexano), com 2 L de NH_4OH a 10%, seguida da adição de 2 L de clorofórmio (CHCl_3), sonicação por 3 h e repouso por 72 h. Observou-se a formação de 3 fases (folhas, fase orgânica e fase aquosa básica). A fase orgânica foi transferida para um funil de separação e realizou-se 2 extrações com uma solução de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 10%. Posteriormente, transferiu-se a fração ácida para um erlenmeyer e foi acrescentado volume de NH_4OH suficiente para elevação do pH até 10, mediu-se o pH com fita indicadora de pH. Em seguida realizou-se a extração com 300 mL de CHCl_3 por 2 vezes, concentrou-se a fase orgânica em evaporador rotatório e o resíduo foi dissolvido com metanol (MeOH). Observou-se a formação de precipitado, transferiu-se então o extrato para um funil de separação e separaram-se as fases, obtendo-se 2 amostras: 35XFALC (0,2950g) e 35XFALCP (0,2325g).

4.7.4.4. Perfil alcaloídico e fracionamento cromatográfico da fração 35XFALC.

A fração alcaloídica 35XFALC, foi submetida a análises por CCD tendo como eluente vários solventes ou misturas de solventes. As cromatoplasas foram eluídas com luz UV (254 e 365 nm) e com reagentes de Dragendorff e anisaldeído, para avaliar o seu perfil alcaloídico. Em seguida, com o intuito de separar os compostos que não revelaram em Dragendorff, daqueles que foram revelados, 0,2920 g da fração 35XFALC foi submetido à cromatografia em coluna ($\phi \times h$ de 1,2 \times 37 cm) com sílica de fase reversa C18 (LiChroprep Rp18-MERCK, 40-63 μm) e como eluente utilizou-se MeOH 100%, obtendo-se 46 frações que foram analisadas por CCD e reunidas em 3 frações: XaF1 (0,2476 g), XaF2 (0,0163 g) e XaF3 (0,0101 g)

Foi fracionado 0,1416 g da amostra XaF1 por cromatografia em coluna ($\phi \times h$ de 2,2 \times 28 cm) com sílica gel 60 (0,040-0,0063 mm *mesh*, Merck), como eluente utilizou-se os seguintes de solventes na ordem apresentada: AcOEt (100%), AcOEt/MeOH (7:3) e MeOH (100%). Obtiveram-se 24 frações que foram analisadas por CCD e reunidas em 7 frações:

XaF1-A (0,0113 g), XaF1-B (0,0100 g), XaF1-C (0,0062 g), XaF1-D (0,0289 g), XaF1-E (0,0480 g), XaF1-F (0,0101 g) e XaF1-G (0,0089 g), dessas, escolheu-se a fração com maior quantidade de massa para a realização das análises, a fim de ter material para todas as análises e testes.

4.7.4.5. Análise por ESI-MS da fração alcaloídica XaF1-E

Pesou-se 1 mg da fração alcaloídica XaF1-E para o preparo de solução estoque (1 mg/mL) com metanol grau CLAE. Posteriormente, retiraram-se 5 μ L da solução estoque e diluiu-se para 5 μ g/mL. A solução resultante foi analisada por infusão direta no espectrometro de massas.

Todos os espectros de massas foram registrados em modo de monitoramento contínuo (Thermo LCQ Fleet Tune application) utilizando-se um equipamento LCQ Fleet, equipado com fonte de ESI e operando no modo positivo de aquisição para as análises de ESI-MS e ESI-MSⁿ. As amostras foram infusas na fonte de ESI através da bomba seringa do equipamento (10 μ L/min), e os espectros de ESI-MSⁿ foram obtidos a partir da aplicação de energia de 20 a 30% da capacidade do equipamento.

4.7.4.6. Investigação da fração XaF1-E por HPLC-DAD-MS.

10 μ L da solução estoque (1 mg/mL) foram analisados em sistema HPLC-DAD-MS, tal como descrito no item 4.2.3. Foi utilizada durante a análise uma coluna C18 (Luna) (5 μ m, 250 \times 4,60 mm) da Phenomenex. Como fases móveis foram utilizadas uma solução aquosa ácida (0,1% ácido fórmico) (A) e metanol (B), com gradiente de eluição de 20-100% (B) em 20 min (1 mL/min), seguido de 100% (B) por mais 10 min e o detector de DAD monitorou a faixa de 200-400 nm.

4.7.4.7. Fracionamento cromatográfico da fração alcaloídica XaF1-E de *X. amazonica* por CLAE semi-preparativa

Cerca de 20 mg da amostra XaF1-E foram dissolvidos em 200 μ L de DMSO e submetidos a fracionamento em cromatógrafo semi-preparativo, tal como descrito no item 4.2.3. Nesta etapa, utilizou-se uma coluna C18 (Luna) (5 μ m, 250 \times 10,00 mm) da Phenomenex. As fases móveis, assim como o gradiente de eluição, foram as mesmas utilizadas no item 4.7.4.6. sendo monitorados os comprimentos de onda de 250 e 280 nm. O fluxo utilizado em ambas as análises foi de 4.7 mL/min. O fracionamento de XaF1-E resultou em 18 frações em quantidades muito pequenas. Após análises por MS e MS² em equipamento LCQ Fleet, duas frações (Tabela 2) foram encaminhadas para análises de RMN 1D e 2D.

Tabela 2. Frações submetidas a análises de RMN 1D e 2D.

Código	Massa obtida (mg)
FAF0	2,3
FAF12	2,0

4.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMALÁRICA *IN VITRO*

Foi realizada a avaliação da atividade antimalárica *in vitro* de cada extrato, fração e substância obtido. Os testes foram realizados no Laboratório de Malária e Dengue no INPA sob a responsabilidade do Dr. Luiz Francisco Rocha e Silva e equipe.

A realização do teste consiste no cultivo *in vitro* de *P. falciparum*, o qual baseia-se no método de cultura contínua, que consiste na reprodução em laboratório do ciclo eritrocitário do parasito. Para tal, serão utilizadas cepas de *P. falciparum* cloroquina-resistente (K1) criopreservadas. O cultivo foi realizado em garrafas de poliestireno com adição do meio de cultura RPMI 1640, 10% de plasma humano inativado e hemácias humanas do tipo A⁺ não parasitada. Foi adicionada uma combinação de gases (com o intuito de manter uma atmosfera pobre em oxigênio) os quais são: 3% de oxigênio (O₂), 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 92% de nitrogênio (N₂). Em seguida os parasitos serão incubados nesse meio a 37°C, por 48 h

(TRAGER e JENSEN, 1976). Passado as 48 h foi feita a contagem dos parasitas por meio de esfregaço sanguíneo, a parasitemia ideal está entre 1,5 % e 2,5% e hematócrito de 3%.

A avaliação da atividade antimalárica *in vitro* por microteste foi realizada utilizando microplaca com 96 poços (RIECKMANN *et al.*, 1978). Primeiramente foi realizada a triagem (*screening*) das amostras em duas concentrações (50 e 5 µg/mL). Para tal, as amostras foram dissolvidas em DMSO (solução estoque) e posteriormente foram diluídas em meio RPMI-1640 (enriquecido em glicose e hipoxantina). Adicionaram-se, em seguida, 20 µL das amostras diluídas (extrato, fração e/ou substância pura isolada) em poços da microplaca, contendo 180 µL de suspensão de hemácias parasitadas. Cada concentração foi testada em triplicata, tendo a cloroquina como controle positivo. A parasitemia foi expressa em porcentagem de formas eritrocíticas viáveis observadas durante a contagem de 2000 hemácias e a inibição expressa em porcentagem, de acordo com a equação:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{(\text{parasitemia do controle} - \text{parasitemia com amostra})}{\text{parasitemia do controle}} \times 100$$

Extratos que inibiram o crescimento do parasita por $\geq 80\%$ em concentrações de 50 µg/mL foram considerados ativos e em seguida, foi avaliada a concentração inibitória a 50% (CI₅₀).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o levantamento bibliográfico e descrição da atividade antiplasmódica dos alcaloides *X. amazonica* participei do artigo publicado de Lima et al, 2015.

5.1. SCREENING DOS EXTRATOS E FRAÇÕES

Após a obtenção dos extratos, os mesmos foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) para avaliação do perfil químico. Os extratos hexânico (JFH e JGFH) e clorofórmico (JFCL) apresentaram uma leve coloração laranja quando revelados com revelador químico Dragendorff e o extrato de acetato de etila foi negativo (sem detecção de alcaloides).

Os extratos alcaloídicos de galhos finos (XGFALDCM) e folhas (XFALDCM) obtidos pela metodologia A, a fração básica com acetato de etila (FBAC-GF) obtido pela metodologia B e o extrato etanólico de galhos finos obtido por maceração com auxílio de ultrassom (JGFET) apresentaram coloração alaranjada quando revelados com reagente de Dragendorff, corroborando a presença de alcaloides.

Todos os extratos e frações foram encaminhados para ensaios de atividade antimalárica *in vitro* contra cepas K1 cloroquina-resistente de *P. falciparum*, foi realizado primeiramente *screening* de cada amostra. Aquelas que inibiram o crescimento do parasita por $\geq 80\%$ em concentrações de 50 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados ativas e avaliou-se a concentração inibitória a 50% (Tabela 3 e 4).

Tabela 3: Resultados dos testes *in vitro* contra cepas do *P. falciparum* realizados com extratos de *X. amazonica*.

Parte	Código da Amostra	Solvente ¹	Screening % inibição (Pf K1) ²		CI ₅₀ (µg/mL) ³	Classificação da Atividade ⁴
			50 µg/mL	5 µg/mL		
Galhos finos	JGFH	Hex	99,5	54	11,2	A
	JGFET	EtOH	85,3	27,5	8,8	A
Folhas	JFH	Hex	100	0	16,4	AM
	JFCL	CHCl ₃	99,4	54,6	3,1	A
	JFAC	AcOEt	100	10	4,3	A
	JFET	EtOH	83,7	0	> 50	I

¹ Hex – hexano; EtOH – etanol; CHCl₃ – clorofórmio; AcOEt – acetato de etila. ² Screening de todos os extratos em duas concentrações 50 e 5 µg/mL contra a cepa K1 do *P. falciparum* (Pf K1) por microscopia óptica. ³ Os valores CI₅₀ foram determinados utilizando sete concentrações do extrato contra a cepa K1 *P. falciparum* (Pf K1). ⁴ Classificação da atividade considerando CI₅₀: Muito Ativo (MA) < 0,1 µg/mL; ativo (A) 0,1 a 15 µg/mL; atividade moderada (AM) 16 a 30 µg/mL e inativo (I) > 30 µg/mL.

Tabela 4: Resultados dos testes *in vitro* contra cepas do *P. falciparum* (*screening* e CI₅₀) realizados com frações alcaloídicas de *X. amazonica*.

Parte	Código da amostra ¹	Screening % inibição (Pf K1) ²		CI ₅₀ (µg/mL)	Classificação da atividade
		50 µg/mL	5 µg/mL		
Folha	XFALDCM	100	86	10,19	A
	XGFALDCM	99	29	6,42	A
Galhos Finos	FAAC-GF	72	0	18,53	AM
	FBAC-G	94	7	42,93	I

¹ O solvente utilizado para as amostras XFALDCM e XGFALDCM foi o CH₂Cl₂ e para as amostras FAAC-GF e FBAC-G foi o AcOEt. ² *Screening* de todos os extratos em duas concentrações 50 e 5 µg/mL contra a cepa K1 do *P. falciparum* (Pf K1) por microscopia óptica. ³ Os valores CI₅₀ foram determinados utilizando sete concentrações do extrato contra a cepa K1 *P. falciparum* (Pf K1). ⁴ Classificação da atividade considerando CI₅₀: muito ativo (MA) < 0,1 µg/mL; ativo (A) 0,1 a 15 µg/mL; atividade moderada (AM) 16 a 30 µg/mL e inativo (I) > 30 µg/mL.

5.2. PERFIL ALCALOÍDICO DE *X. amazonica*

A análise do perfil alcaloídico (*fingerprint*) por infusão direta da fração das folhas (XaF1-E) revelou íons de m/z par (Figura 4), sugerindo potencial presença de alcaloides. Esta proposta foi baseada em literaturas com estudos realizados em outras espécies de anonáceas, com diferentes alcaloides derivados do esqueleto isoquinolínico, tais como aporfínicos, tetrahidroprotoberberínicos, benzilisoquinolínicos e proaporfínicos, onde o processo de protonação ocorre em maiores proporções quando comparados a outras reações (SILVA *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2014; SOARES, 2015). O pico mais intenso foi verificado em m/z 326 ($[M+H]^+$). Diversos outros íons foram observados, como por exemplo m/z 328 e m/z 330, apontando para amostra complexa com alta diversidade de alcaloides.

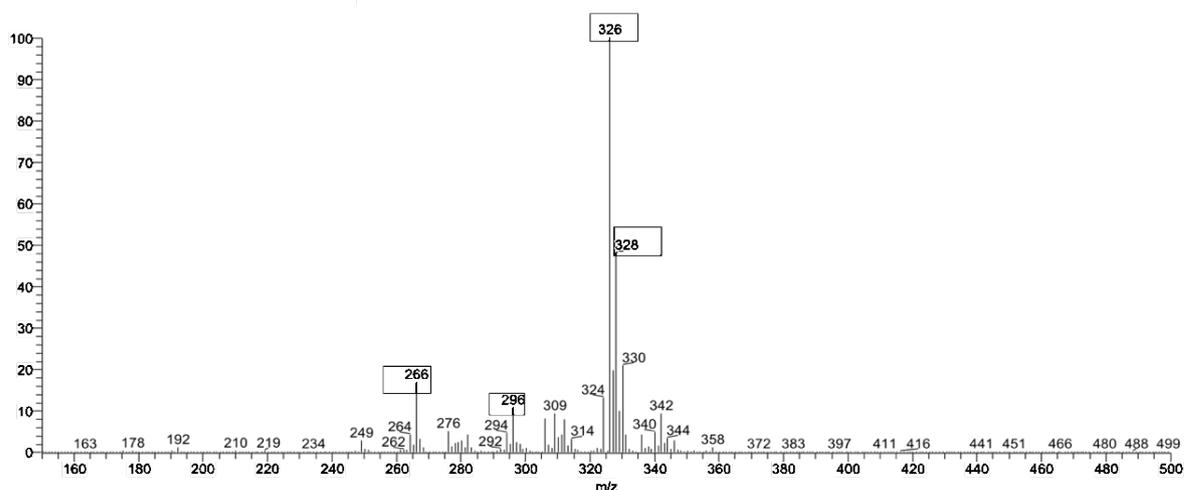


Figura 4. Espectro de massas (modo positivo) da fração alcaloídica XaF1-E por infusão direta (Equipamento: LCQ Fleet® - Thermo Scientific).

5.3. ANÁLISES DE ESI-MS^N E HPLC-DAD-MS DA AMOSTRA XAF1-E

Conforme apresentado no item 5.2, a análise do perfil alcaloídico da fração XaF1-E por ESI-MSⁿ evidenciou a presença de diversos alcaloides.

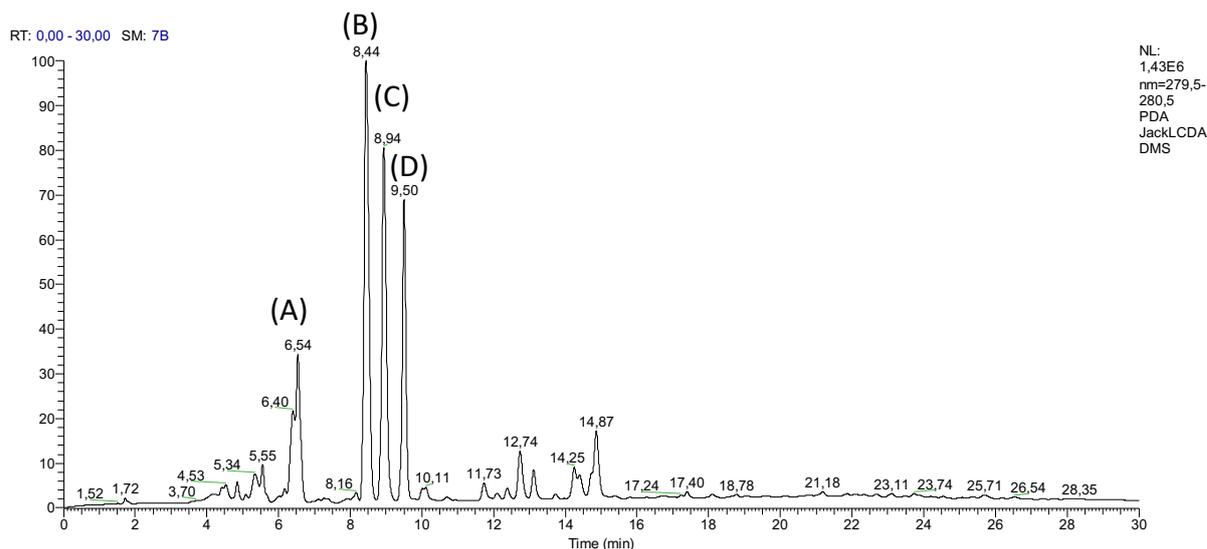


Figura 5. Cromatograma obtido por CLAE-DAD para a amostra XaF1-E. Gradiente de eluição: 30-100% de B em 24 min (1 mL/min). Fases móveis: solução aquosa ácida (0,1% ácido fórmico) (A) e metanol (B). DAD: 200-400 nm. Coluna: C18 (5 μ m, 250 \times 4,60 mm).

Através da análise do cromatograma obtido por CLAE-DAD da amostra XaF1-E (Figura 5), observaram-se 4 picos cromatográficos mais intensos A, B, C e D correspondendo o pico B à substância de m/z 326 (Figura 4), enquanto os demais picos A, C e D foram atribuídos às substâncias protonadas de m/z 328, 266 e 296 $[M+H]^+$, respectivamente (Figura 4).

A análise do perfil DAD dos picos majoritários na região do UV (200-400 nm) evidenciou similaridades espectrais entre as substâncias A e B, e C e D, além de revelar importantes características de absorções para determinar estruturas aporfínicas (SANGSTER e STUART, 1965; STEVIGNY *et al.*, 2004).

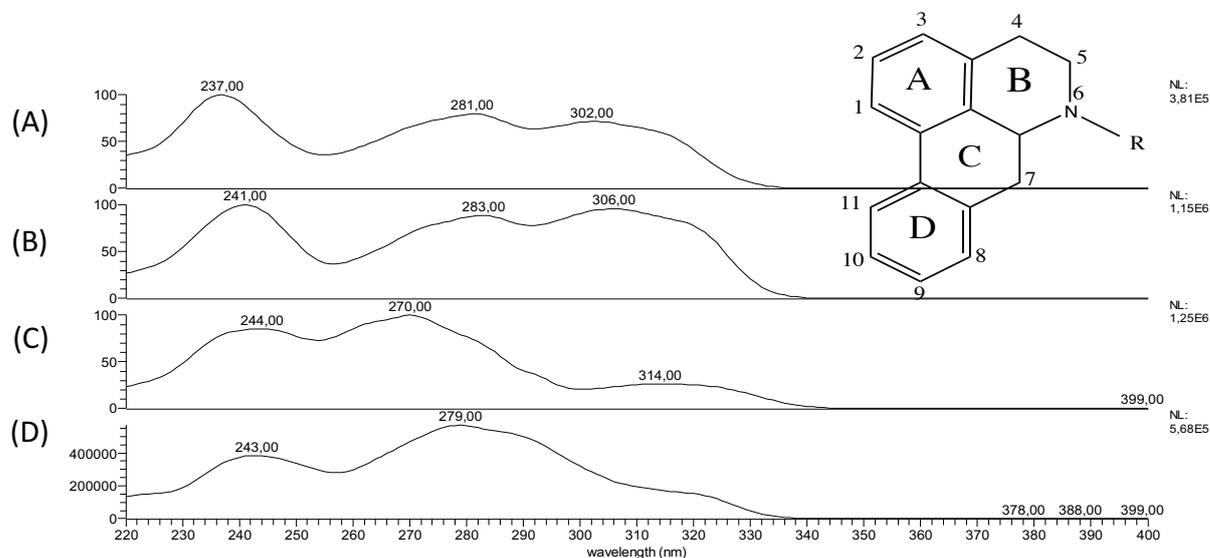


Figura 6. Espectros de DAD dos picos majoritários (A-B) presentes na amostra XaF1-E e esqueleto de alcaloide aporfínico.

Segundo SANGSTER e STUART (1965), quando as posições 10 e 11 de esqueletos aporfínicos não estão substituídas, o espectro apresenta um máximo de absorção entre 270-280 nm e pode apresentar um pico de absorção menor entre 310-320 nm. Embora a substituição nas posições 10 e/ou 11 não sejam recorrentes, todos os alcaloides aporfínicos são invariavelmente substituídos nas posições 1 e 2. Substâncias com ausência de substituição na posição 11 apresentam máximo de absorção em 282 e 303-310 nm, ambos com intensidade equivalente, enquanto as substâncias substituídas nesta posição apresentam um máximo de absorção entre 268-272 nm e outra absorção de menor intensidade entre 303-310 nm. Em geral, diversos alcaloides aporfínicos apresentam um máximo de absorção em torno de 220 nm e dois na região de 270-310 nm, sendo a forma da curva e a intensidade dos últimos dois máximos dependente das substituições no anel D.

Considerando as informações apresentadas anteriormente acerca das absorções características de alcaloides aporfínicos, juntamente com a observação de similaridade espectral entre as substâncias A e B e C e D (Figura 6), propõe-se que as substâncias A e B apresentem substituição na posição 10, e possivelmente na 9 e ausência de substituição na posição 11.

Os máximos de absorção observados para as substâncias C (270 nm) e D (279 nm) estão entre 270 a 280 nm e em menor intensidade entre 310 a 320 (substância C, 314 nm), o que sugere ausência de substituição nas posições 10 e 11 (SANGSTER e STUART, 1965).

No espectro de varredura completa (*full scan*) da amostra XaF1-E, é possível verificar separadamente os picos de maior intensidade da amostra (Figura 7).

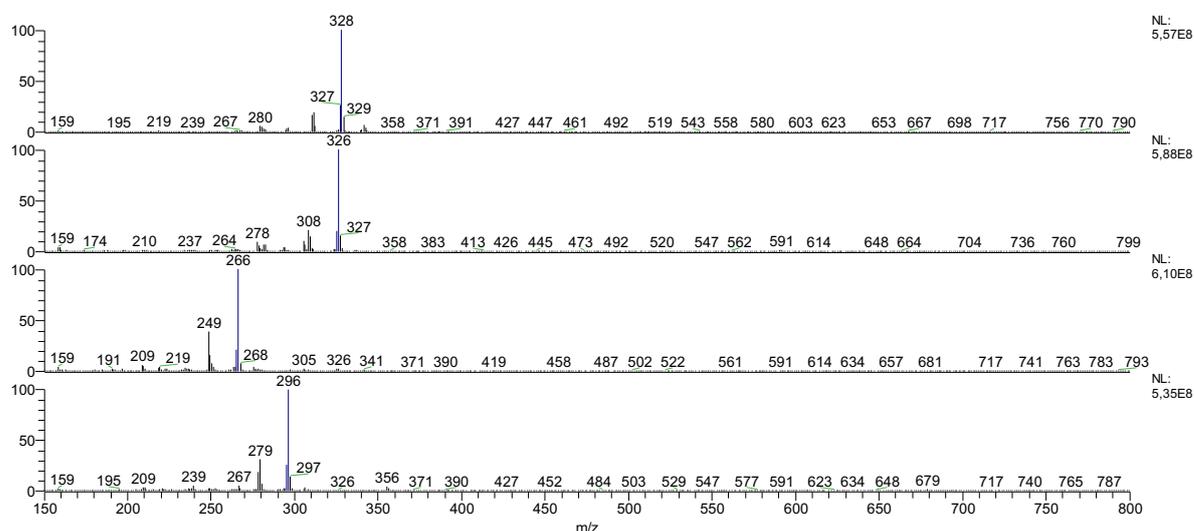


Figura 7. Espectros de *full scan* dos picos majoritários (A-D) presentes na amostra da fração alcaloídica XaF1-E

5.4. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA AMOSTRA FAF0

A amostra codificada como FAF0 foi isolada como um sólido amorfo de coloração marrom. O espectro de massas de alta resolução (MS^+) apresentou o pico mais intenso com m/z 326.1398 e fórmula molecular $C_{19}H_{20}NO_4$ (Figura 8). No espectro de UV (Figura 9) observa-se um máximo de absorção em 212 nm (muito próximo à 220 nm) e outra com menor absorção em 282 nm (intensidade alta em torno de 280 a 300 nm), conforme descrito anteriormente, essas absorções são comuns em alcaloides aporfínicos, sendo que a menor absorção (intensidade 282nm) sugere ausência de substituição na posição 11 (SANGSTER e STUART, 1965).

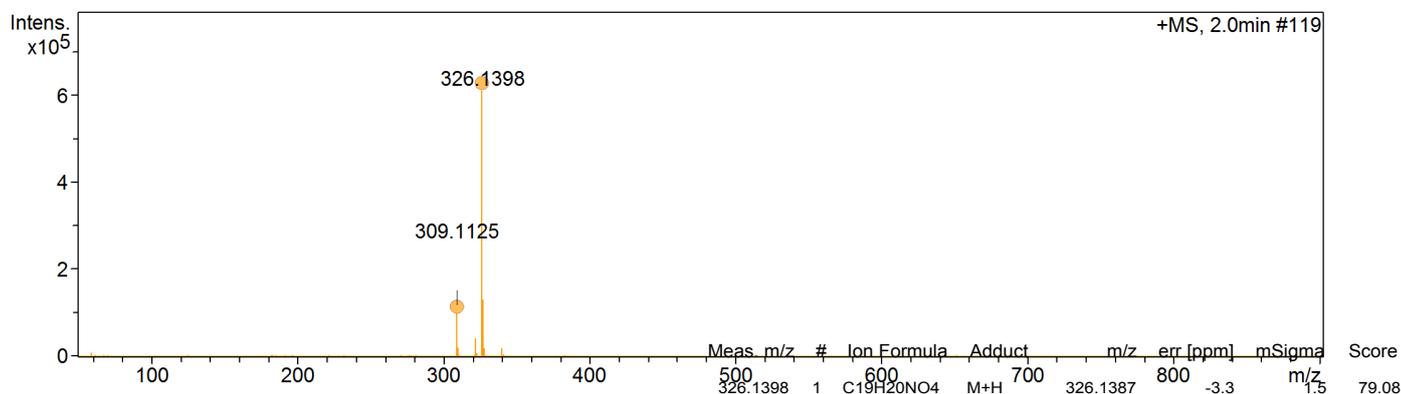


Figura 8. Espectro de massas de alta resolução (MS^+) da amostra FAF0.

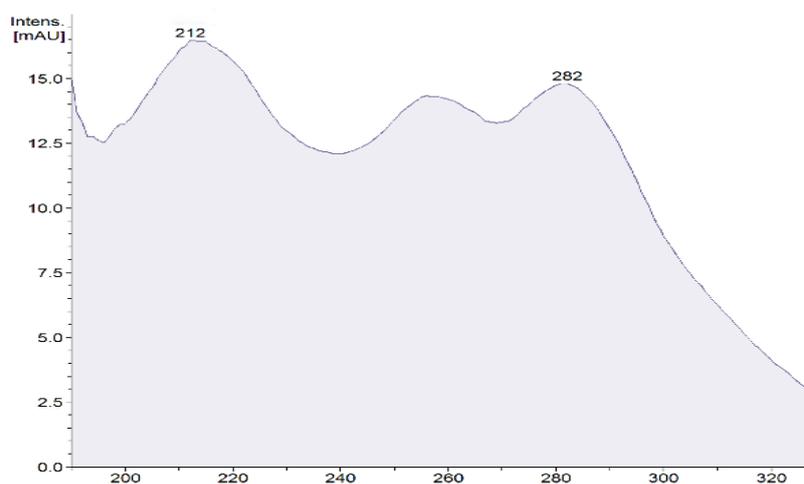


Figura 9. Espectro de UV da amostra FAF0.

No espectro de massas de baixa resolução MS^4 foi observado um pico base de m/z 326 $[M+H]^+$ indicando fortes evidências de esqueleto aporfínico, pois quando submetido à fragmentação, este íon apresentou perda inicial de 17 Da (m/z 326 \rightarrow 309), perda de 31 Da (m/z 309 \rightarrow 278) e perdas de 15 Da seguidamente (m/z 309 \rightarrow 294 e m/z 294 \rightarrow 279) o que indica a presença de grupos metoxila adjacentes, ligados ao anel aromático A (STEVIGNY *et al.*, 2005) (Figura 10).

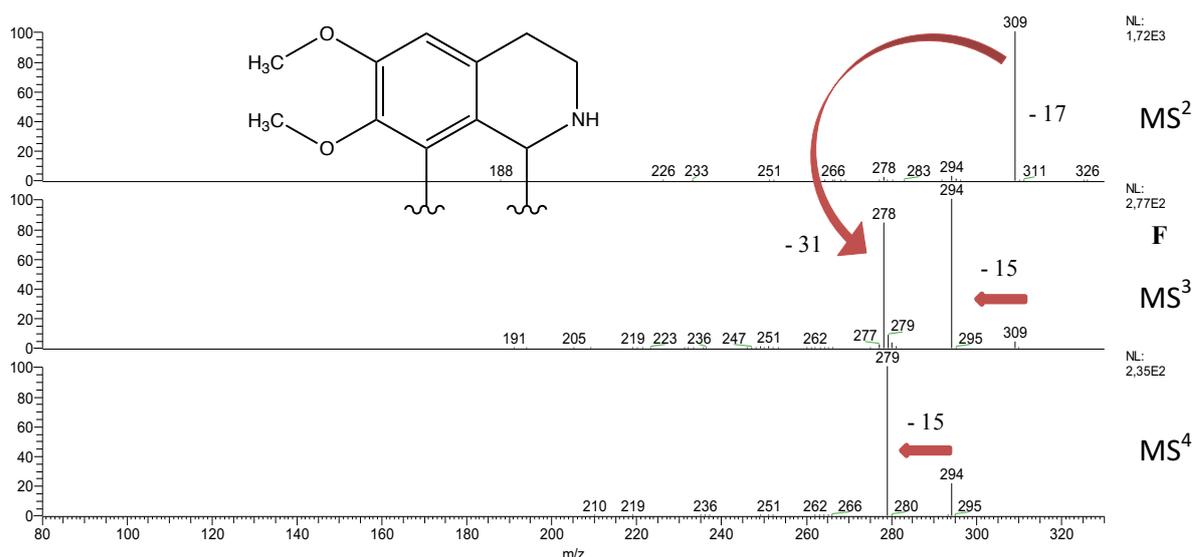


Figura 10: Espectro de massas MS^4 da amostra FAF0.

No espectro de RMN de 1H (anexo 1) foi possível observar a presença de hidrogênios aromáticos em δ 6,61 (1H, s), 6,72 (1H, s) e 7,95 (1H, s), hidrogênios de metoxilas em δ 3,63 (3H, s) e 3,86 (3H, s), hidrogênios típicos de ponte metileno dióxido em δ 5,99 (2H, s). Como discutido anteriormente, este padrão de multiplicidade para hidrogênios aromáticos é tipicamente observado em estruturas aporfínicas tetrasubstituídas nas posições 1, 2, 9 e 10 (SANGSTER e STUART, 1965; STEVIGNY *et al.*, 2005)

Através dos mapas de contorno HSQC e HMBC foi possível observar para o hidrogênio H-3 em δ 6,61 (1H, s), correlação 1J com o carbono em δ 110,4 (C-3), e a longa distância com os carbonos em δ 145,4 (C-1), 153,6 (C-2), 120,7 (C-3b) e 25,5 (C-4). Ainda através dos mapas de contorno foram observadas as correlações 1J dos hidrogênios das metoxilas em δ 3,63 e 3,86 com os carbonos em δ 60,2 e 55,9, e 3J com os carbonos em δ 145,4 (C-1) e 153,6 (C-2), respectivamente, confirmando assim o padrão de substituição do anel A (Anexos 2-7).

Através da análise das correlações observadas para os demais hidrogênios aromáticos no mapa de contorno HMBC foi possível atribuir os substituintes do anel D. A identificação do hidrogênio em δ 6,72 como sendo o hidrogênio H-8 foi possível através da correlação 3J com o carbono em δ 34,2 (C-7), sendo ainda observada correlação com o carbono em δ 125 (C-11a). Para o hidrogênio em δ 7,93 (H-11) foram observadas correlações com os carbonos em δ 127,3 (C-7a) e 147,1 (C-10). A confirmação da presença da ponte metileno dióxido no anel D foi obtida a partir das correlações 1J e 3J dos hidrogênios em δ 5,99 com os carbonos em δ 101,2 (C do metileno dióxido) e 147,1 (C-10), respectivamente. A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 5) com dados da literatura (FIENENA *et al.*, 2016) foi confirmada a estrutura do alcaloide nornantenina. Sendo este o primeiro relato desse alcaloide aporfínico na espécie *X. amazonica*.

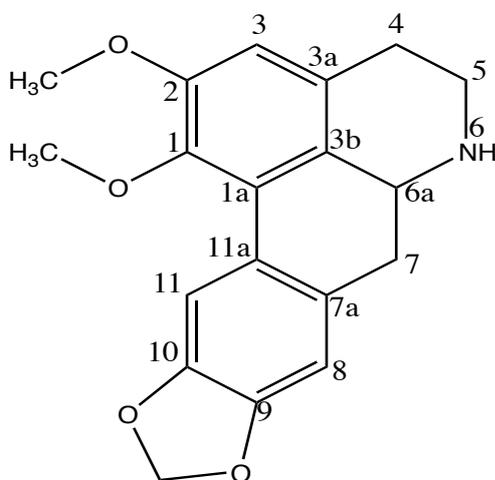


Figura 11. Estrutura do alcaloide Nornantenina.

Tabela 5: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra FAF0.

FAF0 (nornantenina)						
Posição	$^{13}\text{C}^{\text{a,c}}$	$^{13}\text{C}^{\text{b}}$	HSQC	HMBC	^1H δ (mult.) ^a	^1H δ (mult.) ^b
1	145,4	144,9	-	3,63 e 6,61	-	-
1a	-	-	-	-	-	-
2	153,6	152,5	-	3,86 e 6,61	-	-
3	110,4	111,2	6,61	-	6,61 (1H, s)	6,6
3a	-	126,9	-	-	-	-
3b	120,7	-	-	6,61	-	-
4	25,5	-	-	6,61	-	-
5	-	-	-	-	-	-
6a	-	-	-	-	-	3,85
7	34,2	-	-	6,72	-	-
7a	127,3	130,1	-	7,93	-	-
8	108,3	108,4	6,72	-	6,72 (1H, s)	6,73
9	-	146,7	-	-	-	-
10	147,1	146,8	-	5,99; 6,72 e 7,93	-	-
11	109	109,1	7,93	-	7,93 (1H, s)	7,95
11a	125	126,9	-	6,72	-	-
1-OCH ₃	60,2	60,4	3,63	-	3,63 (3H, s)	3,66
2-OCH ₃	55,9	56,1	3,86	-	3,86 (3H, s)	3,87
O-CH ₂ -O	101,2	101,1	5,99	-	5,99 (2H, s)	5,97

^aO experimento foi realizado a 300 MHz para ^1H e 75 MHz em CD_3COCD_3 .

^bDados da literatura de acordo com FIENENA et al., 2016 (^1H - 500 MHz E ^{13}C 125 MHz, δ ppm)

^cCarbonos protonados e quaternários foram assinalados através dos dados de HSQC e HMBC, respectivamente.

O teste de atividade antiplasmódica *in vitro* para a substância nornantenina apresentou inibição do parasita com CI_{50} 16 μM .

5.5. DETERMINAÇÃO ESTRUTURAL DA AMOSTRA FAF12

A amostra codificada como FAF12 foi isolada como um sólido amorfo de coloração marrom. No espectro de massas de alta resolução (MS^+) observa-se que a amostra está em mistura, no entanto o pico majoritário apresenta m/z 266.1181 com fórmula molecular $C_{17}H_{16}NO_2$ (Figura 12). No espectro de UV (Figura 13) observa-se um máximo de absorção em 206 nm (intensidade baixa em torno de 210 a 220 nm) e outra com menor absorção em 271 nm (intensidade alta em torno de 270 a 280 nm), conforme descrito anteriormente, essas absorções são comuns em alcaloides aporfínicos, sendo que a menor absorção (intensidade 271 nm) sugere ausência de substituição nas posições 10 e 11 (SANGSTER e STUART, 1965).

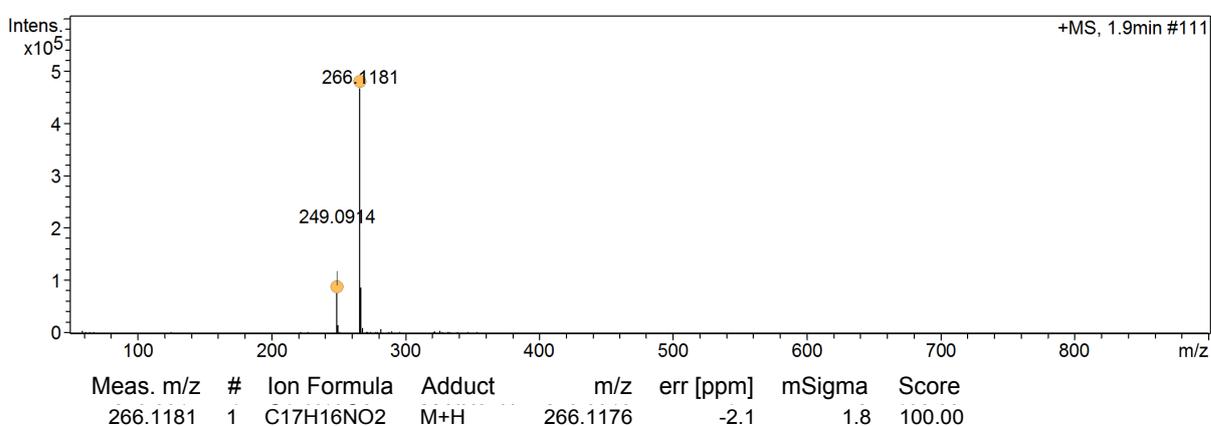


Figura 12: Espectro de massas de alta resolução (MS^+) da amostra FAF12.

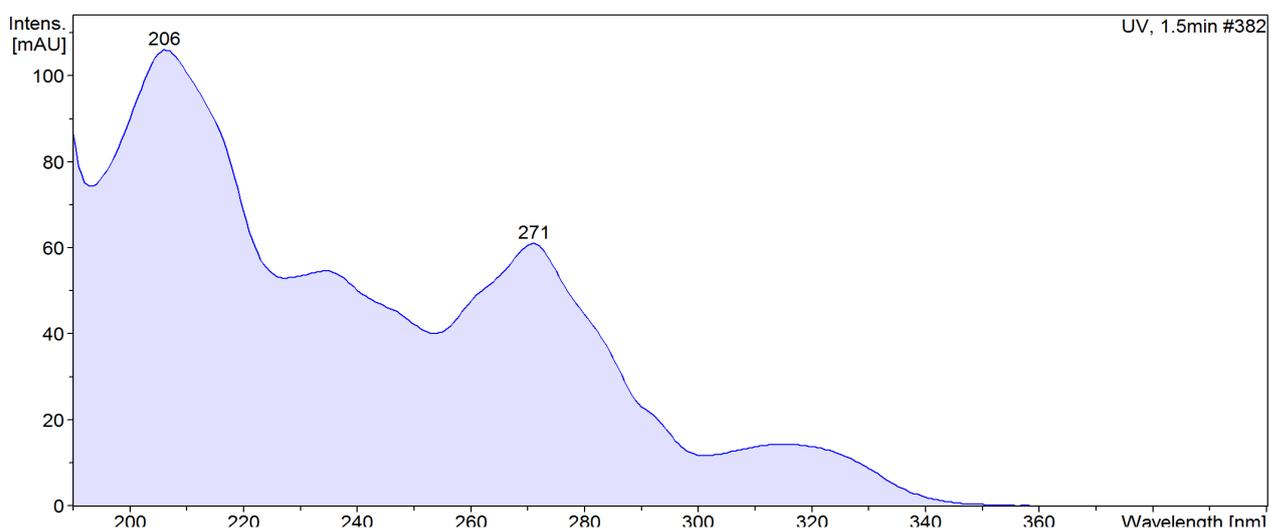


Figura 13: Espectro de UV da amostra FAF12.

No espectro de massas de baixa resolução MS⁴ foi observado um pico base de m/z 266 [M+H]⁺ (Figura 14), apresentando perdas sequencias de 17 Da (m/z 266→249), 30 Da (m/z 249→219) e 28 Da (m/z 219→191) quando submetido à fragmentação, caracterizando substâncias aporfinicas contendo uma ponte metileno dióxido no anel A, e ausência de *N*-metila, essas observações estão de acordo com a estrutura do alcaloide anonaína (STEVIIGNY *et al.*, 2005; SILVA *et al.*, 2012; SOARES, 2015).

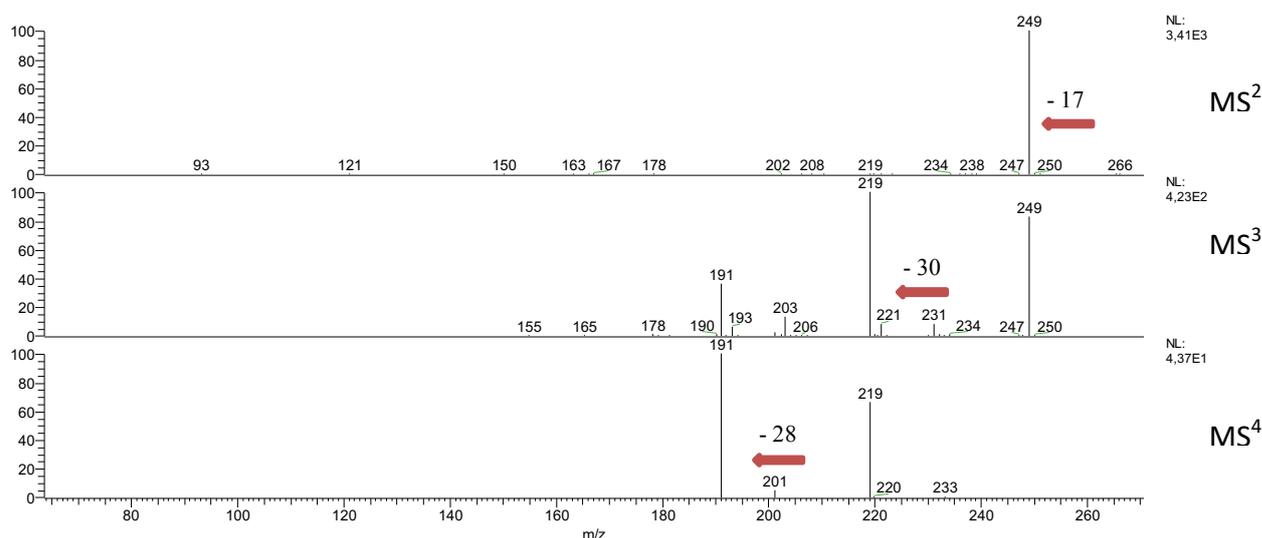


Figura 14: Espectro de massas MS⁴ da amostra FAF12.

No espectro de RMN de ¹H (anexo 8) observa-se sinais em δ 8,08 (1H, *d*, 7,7 Hz), 7,35 (1H, *m*) e 7,24 (2H), característicos de hidrogênios aromáticos do anel D não substituído, além do sinal em δ 6,61 (1H, *s*), característico de hidrogênio aromático H-3 no anel A. Pode-se observar também sinais dos hidrogênios de ponte metilenodióxido em δ 5,99 (1H, *d*, 1,2 Hz) e 6,15 (1H, *d*, 1,2 Hz), o sinal de hidrogênio metínico H-6a em δ 4,43 (1H, *m*), e hidrogênios metilênicos em δ 2,91 (1H, *dd*, 3,34, 3,45, H-4), δ 3,27 (1H, *m*, H-5), δ 3,38 (1H, *d*, 13,8, H-7), δ 3,51 (1H, *m*, H-4) e δ 3,87 (1H, *m*, H-5), sendo atribuídos aos seus respectivos carbonos a partir da análise do mapa de contorno HSQC (anexos 9 e 10). A partir da comparação dos dados obtidos (Tabela 6) com dados da literatura (SOARES *et al.*, 2015) foi confirmada a estrutura do alcaloide anonaína (Figura 15), sendo este alcaloide amplamente isolado de espécies família Annonaceae, sendo apontado como um marcador quimiotaxonômico (LEBOEUF *et al.*, 1982)

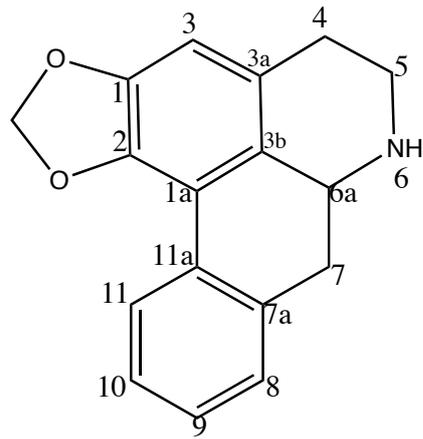


Figura 15: Estrutura do alcaloide Anonáina

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H e ^{13}C da amostra FAF12.

FAF12 (Anonaina)			
Posição	^1H δ (mult., J em Hz)^a	^1H δ (mult., J em Hz)^b	^{13}C^{a,c}
1	-	-	-
1 ^a	-	-	-
2	-	-	-
3	6,61 (1H, s)	6,58 (1H, s)	107,5
3 ^a	-	-	-
3b	-	-	-
4	2,91 (1H, dd, 3,34, 3,45) e 3,51 (1H, m)	2,78 (1H, m) e 2,81 (1H, m)	25,5
5	3,27 (1H, m) e 3,87 (1H, m)	3,08 (1H, m) e 3,51 (1H, m)	41,8
6 ^a	4,43 (1H, m)	4,09 (1H, dd, 13,9 e 5,2)	53,3
7	3,38 (1H, d, 13,8) e 3,45 (1H, d, 4,79)	2,92 (1H, t, 14,3 Hz) e 3,08 (1H, m)	33,6
7 ^a	-	-	-
8	7,25 (1H)	7,24 (1H, m)	128,4
9	7,25 (1H)	7,24 (1H, m)	128,4
10	7,35 (1H, m)	7,32 (1H, m)	127,9
11	8,08 (1H, d, 7,7)	8,08 (1H, d, 7,9)	127,3
11 ^a	-	-	-
O-CH ₂ - O	5,99 (1H, d, 1,2) e 6,15 (1H, d, 1,2)	5,96 (1H, d, 1,3) e 6,10 (1H, d, 1,3)	101,3

^aO experimento foi realizado a 300 MHz para ^1H e 75 MHz para ^{13}C em CDCl_3 .

^bDados da literatura de acordo com SOARES et al., 2015 (600 MHz)

^cCarbonos protonados assinalados através dos dados de HSQC.

O teste de atividade antiplasmódica *in vitro* para a substância anonaina apresentou inibição do parasita com CI_{50} 15 μM . Este resultado está de acordo com a literatura, Gaziose e colaboradores (2011) descreveram atividade antiplasmódica de anonaina com CI_{50} 19,6 μM para cepas cloroquina resistentes.

6. CONCLUSÃO

Os extratos e frações alcaloídicas de *X. amazonica* demonstraram atividade contra as cepas de *P. falciparum* resistentes à cloroquina, confirmando atividade antiplasmódica *in vitro* observada anteriormente para esta espécie, sendo que os extratos mais promissores são: clorofórmico (JFCL) e de acetato de etila (JFAC) de folhas, e as frações alcaloídicas diclorometânica de folha e galho fino (XFALDCM e XGFALDCM).

Este trabalho contribuiu para a ampliação do conhecimento fitoquímicos de *X. amazonica* já que as substâncias normantenina e anonaína estão sendo descritas pela primeira vez na espécie.

Resultado preliminares mostraram que a normantenina e a anonaína apresentaram inibição *in vitro* de *P. falciparum* ($CI_{50} = 16 \mu\text{M}$ e $15 \mu\text{M}$) respectivamente. Portanto, os resultados deste trabalho confirmam o potencial antimalárico dos constituintes alcaloídicos, como já descritos na literatura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 3, p. 504-540, 1999.
- ANDRADE-NETO, V. F. D. et al. *In vitro* inhibition of *Plasmodium falciparum* by substances isolated from Amazonian antimalarial plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 3, p. 359-366, 2007.
- ARANGO, O. et al. Inhibición de la peroxidación lipídica y capacidad atrapadora de radicales libres de alcaloides aislados de dos Annonaceae, *Xylopiya amazonica* cf. y *Duguetia vallicola*. **Actualidades Biológicas**, v. 26, n. 81, p. 105-110, 2004.
- ASASE, A.; HESSE, D. N.; SIMMONDS, M. S. Uses of multiple plants prescriptions for treatment of malaria by some communities in southern Ghana. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 2, p. 448-452, 2012.
- BERMEJO, A. et al. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, v. 22, n. 2, p. 269-303, 2005.
- BERNARDI, A. L.; SPICHIGER, R. Las anonáceas del Arborétum Jenaro Herrera (provincia de Requena, departamento de Loreto, Perú). **Candollea**, v. 35, 1980.
- BERTANI, S. et al. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1-2, p. 45-54, 2005.
- BÖHLKE, M. et al. Costaricine, a new antiplasmodial bisbenzylisoquinoline alkaloid from *Nectandra salicifolia* trunk bark. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 6, p. 576-580, 1996.
- BOYOM, F. F. et al. Potent antiplasmodial extracts from Cameroonian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 3, p. 717-724, 2011.
- BOYOM, F. F. et al. Antiplasmodial activity of extracts from seven medicinal plants used in malaria treatment in Cameroon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 483-488, 2009.
- BOYOM, F. F. et al. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry** v. 64, p. 1269–1275, 2003.
- BRAGA, É. M.; FONTES, C. J. F. *Plasmodium* - Malária. In: NEVES, D. P. (Ed.). **Parasitologia humana**. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2010. cap. 17, p.143-162.
- BRANDAO, M. G. L. et al. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the official pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 141-148, 2008.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Doenças infecciosas e parasitárias : aspectos clínicos, de vigilância epidemiológica e de controle - Guia de bolso 2 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ações de controle da malária : manual para profissionais de saúde na atenção básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

_____. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância em Saúde. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

_____. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Situação epidemiológica da malária no Brasil, 2012 a 2013. Brasília: Ministério da Saúde, 2015a. v. 44.

_____. Ministério da Saúde. Sistema de Informação de Vigilância Epidemiológica-Malária. Resumo Epidemiológico por local de notificação na região endêmica, entre janeiro a agosto de 2015. Brasília: Ministério da Saúde, 2015b. Disponível em: < <http://portalsaude.saude.gov.br/> >. Acesso em: 30 ago, 2015.

CHATROU, L. W. Las Annonaceae y el proyecto Annonaceae: una breve revisión de su estado actual. . **Acta Horticulturae**, v. 497, p. 51-57, 1999.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.

CHATROU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. Annonaceae. In: SMITH, N. M., S.A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V (Ed.). **Flowering plants of the neotropics**. New York: Princeton University Press, 2004. p. 18-20.

CHOKCHASIRI, R. et al. Potent antiplasmodial alkaloids and flavonoids from *Dasymaschalon acuminatum*. **Records of Natural Products**, v. 9, p. 243-246, 2015.

CORREA, J. E. et al. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. **Planta Medica**, v. 72, n. 3, p. 270-272, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: A continuing source of novel drug leads. **Pure and Applied Chemistry**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: UNESP, 2002.

DIAS, M. C. **Estudos taxonômicos do gênero *Xylopia* L. (Annonaceae) no Brasil extra-amazônico**. 1988. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

FERREIRA, M. S. Malária: Conceito, etiologia e ciclo evolutivo. In: VERONESI, R., FOCACCIA, R. (Ed.). **Tratado de infectologia**. 9 ed. São Paulo: Ateneu, 1997.

FIENENA, R. F. O. et al. Isoquinoline alkaloids from stem bark of *Colubrina decipiens* (Baill.) Capuron. **International Journal of Chemical Studies** 2016.

FISCHER, D. C. et al. *In vitro* screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta Tropica**, v. 92, n. 3, p. 261-266, 2004.

FOONG, C. P.; HAMID, R. A. Evaluation of anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Annona muricata* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 1301-1307, 2012.

FRANÇA, T. C.; SANTOS, M. G. D.; FIGUEROA-VILLAR, J. D. Malária: aspectos históricos e quimioterapia. **Química Nova**, v. 31, 2008.

FRANCO, L. L. et al. Síntese de tetraoxanos, candidatos a antimaláricos. **Sociedade Brasileira de Química** v. 32, p. <http://sec.sbq.org.br/cdrom/32ra/resumos/T1611-1.pdf>, 2009.

FRAUSIN, G. et al. Plants of the Annonaceae traditionally used as antimalarials: a review. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 315-337, 2014.

GARAVITO, G. et al. Antimalarial activity of some Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 107, n. 3, p. 460-462, 2006.

GELMINI, F. et al. GC-MS characterisation and biological activity of essential oils from different vegetative organs of *Plectranthus barbatus* and *Plectranthus caninus* cultivated in north Italy. **Natural Product Research**, v. 29, n. 11, p. 993-998, 2015.

GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. et al. Alkaloids and acetogenins in Annonaceae development: biological considerations. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 1-16, 2014.

GRAZIOSE, R. et al. Antiplasmodial activity of aporphine alkaloids and sesquiterpene lactones from *Liriodendron tulipifera* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 26-30, 2011.

HAMID, R. A. et al. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, p. 630-641, 2012.

HERNÁNDEZ C, J. E. et al. Evaluación de la actividad leishmanicida de los extractos etanólicos de *Rollinia rufinervis* sobre *Leishmania chagasi*. **Vitae**, v. 12, p. 37-43, 2005.

HESSE, M. Introduction. The term "alkaloid". In: (Ed.). **Alkaloids: nature's curse or blessing?** Switzerland: John Wiley & Sons, 2002.

HOCQUEMILLER, R.; CAVÊ, A.; RAHARISOLALALAO, A. Alcaloïdes des annonacees. XXX. Alcaloïdes de *Xylopi buxifolia* et de *Xylopi danguyella*. **Journal of Natural Products**, v. 44, n. 5, p. 551-556, 1981.

IJI, E. M. et al. Formulation of tablets of *Xylopi parviflora* Benth (Annonaceae) leaves a potential antimalarial drug. **Nigerian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 5, p. 79-84, 2006.

ISMAN, M. B.; SEFFRIN, R. Natural insecticides from the Annonaceae: A unique example for developing biopesticides. In: SINGH, D. (Ed.). **Advances in Plant Biopesticides**: India Springer 2014. cap. 2, p.21-33.

JOHNS, S. R.; LAMBERTON, J. A.; SIOUMIS, A. A. Alkaloids of *Xylopiya papuana* Diels (family Annonaceae). **Australian Journal of Chemistry**, v. 21, n. 5, p. 1383-1386, 1968.

JOLY, A. B. **Botânica – Introdução à taxonomia vegetal**. 13 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

JOSÉ, A. R. S. et al. Atualidades e perspectivas das anonáceas no mundo. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 86-93, 2014.

JOSSANG, A. et al. Alcaloïdes des annonacées, 96. Déhydroxylopine et déhydrocorytenchine, nouveaux alcaloïdes isoquinoléiques isolés de *Xylopiya vieillardii*. **Journal of Natural Products**, v. 54, n. 2, p. 466-472, 1991.

JOVEL, E. M.; CABANILLAS, J.; TOWERS, G. H. An ethnobotanical study of the traditional medicine of the Mestizo people of Suni Mirano, Loreto, Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 149-156, 1996.

KAKKILAYA, B. S. Parasites and Disease - Life Cycle. Malaria site.com, 2004. Disponível em: < <https://www.malariasite.com/life-cycle/> >. Acesso em: 8 jul, 2015.

KANG, H. et al. Glaucine inhibits breast cancer cell migration and invasion by inhibiting MMP-9 gene expression through the suppression of NF-κB activation. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 403, n. 1-2, p. 85-94, 2015.

KAOU, A. M. et al. Antimalarial activity of crude extracts from nine African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 1, p. 74-83, 2008.

KVIST, L. P. et al. Identification and evaluation of Peruvian plants used to treat malaria and leishmaniasis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 390-402, 2006.

LEBOEUF, M. et al. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1980.

LEBOEUF, M. et al. Alcaloïdes des annonacées: 43. Alcaloïdes du *Xylopiya frutescens* Aubl. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v. 16, n. 4, p. 253-259, 1982.

LIMA, L. A. R. S. et al. Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 629-634, 2012.

LIMA, R. B. S. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-malarial activity of plants from the Brazilian Amazon. **Malaria Journal**, v. 14, n. 1, p. 1-14, 2015.

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

LOBÃO, A. Q.; JOHNSON, D. M. *Xylopi* *decorticans* (Annonaceae), a new cauliflorous species from Brazil. **Contributions from the University of Michigan Herbarium**, v. 25, p. 207-211, 2007.

LOPES, J. D. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 36, p. 125-131, 2014.

LORENZI, H.; SOUZA, V. C. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. 2 ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2008.

MAAS, P. J. M. Neotropical Annonaceae. **Neotropikey - Interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics**, Virginia, 2009. Disponível em: < <http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Annonaceae.htm> >. Acesso em: 21 mai 2016.

MAAS, P. J. M.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, Rio de Janeiro, 2015. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110219> >. Acesso em: 07 Jul 2016.

MAAS, P. J. M. et al. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Annonaceae. **Rodriguésia**, v. 58, n. 3, p. 617-662, 2007.

MAHIOU, V. et al. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v. 54, n. 7, p. 709-716, 2000.

MALARIA, R. B. Key malaria facts. Geneva, 2015. Disponível em: < <http://www.rollbackmalaria.org/microsites/gmap/keyfacts.html> >. Acesso em: 25 fev. 2016.

MARTINS, D. et al. Diterpenes and alkaloids from Brazilian *Xylopi* species. **Química Nova**, v. 18, p. 14-16, 1995.

MBAH, J. A. et al. Antiplasmodial agents from the leaves of *Glossocalyx brevipes*. **Planta medica**, v. 70, n. 5, p. 437-440, 2004.

MEISSNER, C. F. W. Über ein neues Pflanzenalkali (Alkaloid). **Journal of Chemical Physics**, v. 25, p. 379, 1819.

MELLO-SILVA, R.; LOPES, J. D. C. *Xylopi* *atlantica* (Annonaceae), new species from the coastal forest of Bahia, Brazil. **Phytotaxa**, v. 188, p. 28-42, 2014.

MESQUITA, M. L. D. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 165-170, 2007.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of Its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625-15658, 2015.

MOREIRA, I. C. et al. Genus *Xylopi* (Annonaceae): chemical and biological aspects. **Chemistry & biodiversity**, v. 10, n. 11, p. 1921-1943, 2013.

- MURILLO-A, J. Las Annonaceae de Colombia. **Biota Colombiana**, v. 2, 2001.
- NIÉTO, M. et al. PLANTES DE NOUVELLE CALEDONIE XL1 ALCALOÏDES DES ANNONACEES: ALCALOÏDES DU XYLOPIA PANCHERI. **Planta Medica**, v. 30, n. 05, p. 48-58, 1976.
- NIÉTO, M. et al. Plantes de Nouvelle Calédonie XL1 Alkaloids des Annonacees: Alkaloids du *Xylopiapancheri*. **Planta Medica**, v. 30, p. 48-58, 1976.
- NISHIYAMA, Y. et al. Secondary and tertiary isoquinoline alkaloids from *Xylopiaparviflora*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 24, p. 2671-2675, 2006.
- NISHIYAMA, Y. et al. Quaternary isoquinoline alkaloids from *Xylopiaparviflora*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 939-944, 2004.
- ODUGBEMI, T. O. et al. Medicinal plants useful for malaria therapy in Okeigbo, Ondo State, southwest Nigeria. **African Journal of Traditional, Complementary, and Alternative Medicines**, v. 4, n. 2, p. 191-198, 2007.
- OLIVEIRA, J. A. A família Annonaceae Juss., na Reserva Mocambo, Belém, Pará. In: GOMES, J. I.; MARTINS, M. B., et al (Ed.). **Mocambo: Diversidade e dinâmica biológica da área de pesquisa ecológica do Guamá (APEG)**. Belém - Pará: Museu Paraense Emílio Goeldi/ Embrapa Amazônia Oriental, 2007. p.454.
- PELLETIER, S. W. Alkaloids: Chemical and biological perspectives. In: PELLETIER, S. W. (Ed.). **The nature and definition of an alkaloid**. New York: John Wiley & Sons, 1983.
- PETERSEN, I.; EASTMAN, R.; LANZER, M. Drug-resistant malaria: Molecular mechanisms and implications for public health. **FEBS Letters**, v. 585, n. 11, p. 1551-1562, 2011.
- POHLIT, A. M. et al. Amazonian plant natural products: perspectives for discovery of new antimalarial drug leads. **Molecules**, v. 18, n. 8, p. 9219-9240, 2013.
- PONTES, A. F.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica**, v. 23, p. 71-84, 2005.
- PUVANENDRAN, S. et al. Alkaloids from *Xylopiaparvifolia* and *Xylopianigricans* (Annonaceae). **Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka**, v. 38, n. 1, p. 75-76, 2010.
- QUINTANS, J. D., S et al. Chemical constituents and anticancer effects of the essential oil from leaves of *Xylopiarlaevigata*. **Planta Med**, v. 79, n. 2, p. 123-130, 2013.
- REVILLA, J. **Plantas úteis da Bacia Amazônica**. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/SEBRAE, 2002.
- RIECKMANN, K. H. et al. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*. An *in-vitro* microtechnique. **Lancet**, v. 1, n. 8054, p. 22-23, 1978.

RIOS, M. N. D. S.; PASTORE JÚNIOR, F. **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral**. 2011.

SANGSTER, A. W.; STUART, K. L. Ultraviolet spectra of alkaloids. **Chemical Reviews**, v. 65, n. 1, p. 69-130, 1965.

SILVA, F. M. et al. Phytochemical study of the alkaloidal fractions of *Unonopsis duckei* R. E. Fr. guided by electrospray ionisation ion-trap tandem mass spectrometry. **Phytochem Analysis**, v. 25, n. 1, p. 45-49, Jan-Feb 2014.

SILVA, F. M. A. D. et al. Desreplicação de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos de *Unonopsis guatterrioides* por ESI-IT-MS. **Química Nova**, v. 35, p. 944-947, 2012.

SILVA, J. C. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) in rodents. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, p. (197), 2015.

SILVA, M. S. D. et al. Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, v. 32, p. 1566-1570, 2009.

SOARES, E. R. D. S., F. M. DE ALMEIDA, R. A. DE LIMA, B. R. DA SILVA FILHO, F. A. BARISON, A. KOOLEN, H. H. PINHEIRO, M. L. DE SOUZA, A. D. Direct infusion ESI-IT-MSn alkaloid profile and isolation of tetrahydroharman and other alkaloids from *Bocageopsis pleiosperma* Maas (Annonaceae). **Phytochemical analysis**, v. 26, n. 5, p. 339-345, 2015.

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

STEVIGNY, C. et al. Key fragmentation patterns of aporphine alkaloids by electrospray ionization with multistage mass spectrometry. **Rapid communications in mass spectrometry** v. 18, n. 5, p. 523-528, 2004.

TA, T. H. et al. First case of a naturally acquired human infection with *Plasmodium cynomolgi*. **Malaria journal**, v. 13, p. 13-68, 2014.

TITANJI, V. P. K.; ZOFOU, D.; NGEMENYA, M. N. The antimalarial potential of medicinal plants used for the treatment of malaria in Cameroonian folk medicine. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 5, n. 3, p. 302-321, 2008.

TRAGER, W.; JENSEN, J. B. Human malaria parasites in continuous culture. **Science**, v. 193, n. 4254, p. 673-675, 1976.

TROPICOS. Annonaceae Juss. . Missouri, 2015. Disponível em: < <http://www.tropicos.org/Name/42000007> >. Acesso em: 26 mai, 2015.

TSABANG, N. et al. Ethnopharmacological survey of Annonaceae medicinal plants used to treat malaria in four areas of Cameroon. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 171-180, 2012.

VAN ANDEL, T. **Non-timber forest products of the North-West District of Guyana.** . 2000.

WEBBER, A. C.; GOTTSBERGER, G. Phenological patterns of six *Xylopia* (Annonaceae) species in Central Amazonia. **Phyton - Annales Rei Botanicae**, v. 39, n. 2, p. 293-302, 1999.

WHITE, N. J. Antimalarial drug resistance. **Journal of Clinical Investigation**, v. 113, n. 8, p. 1084-1092, 2004.

WHO. **Global report on antimalarial drug resistance: 2000-2010.** Geneva: World Health Organization 2010.

_____. **Emergence and spread of artemisinin resistance calls for intensified efforts to withdraw oral artemisinin-based monotherapy from the market.** Geneva: World Health Organization 2014a.

_____. OVERVIEW of malaria treatment. Geneva, 2014b. Disponível em: < <http://www.who.int/malaria/areas/treatment/overview/en/> >. Acesso em: 20 jun 2015.

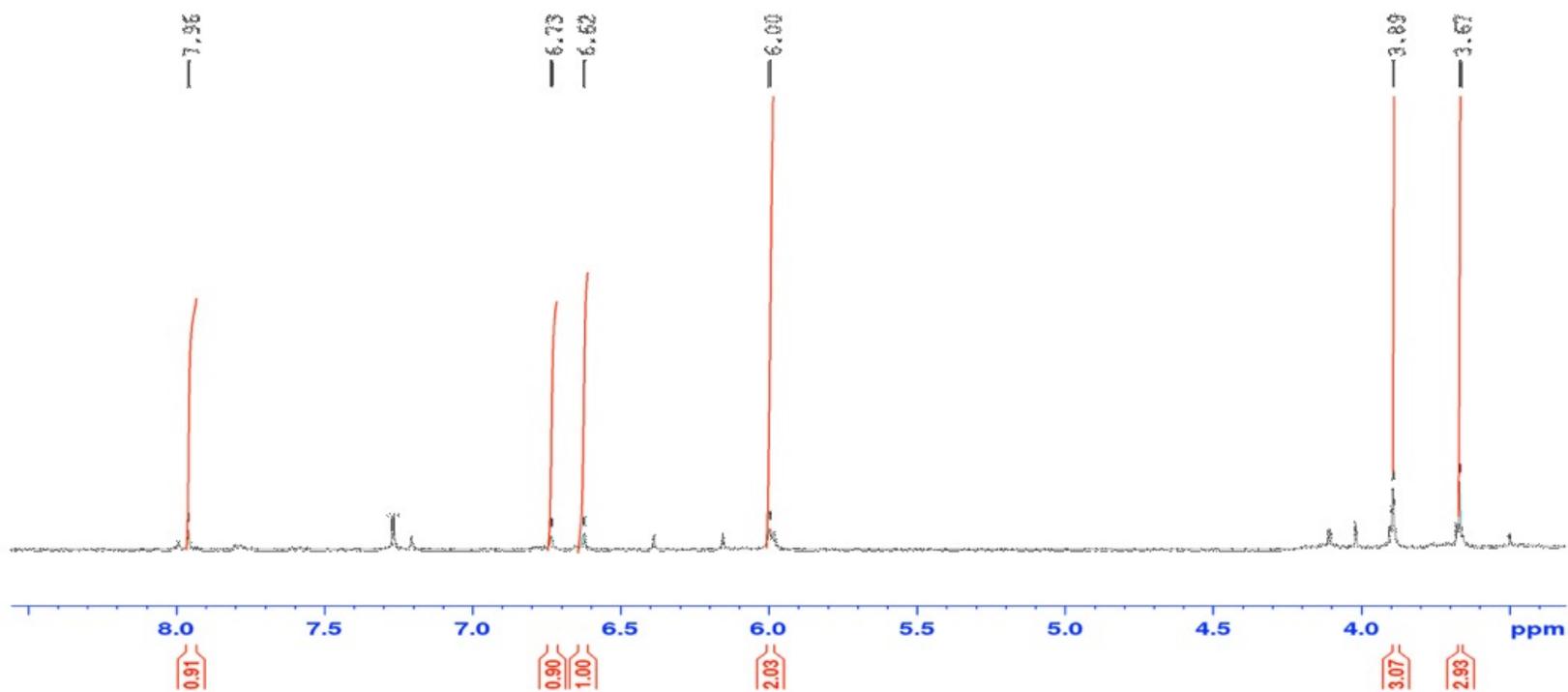
_____. **World Malaria Report 2014.** Geneva: World Health Organization: 01-242 p. 2014c.

_____. **World Malaria Report 2015.** Geneva: World Health Organization: 01-280 p. 2015.

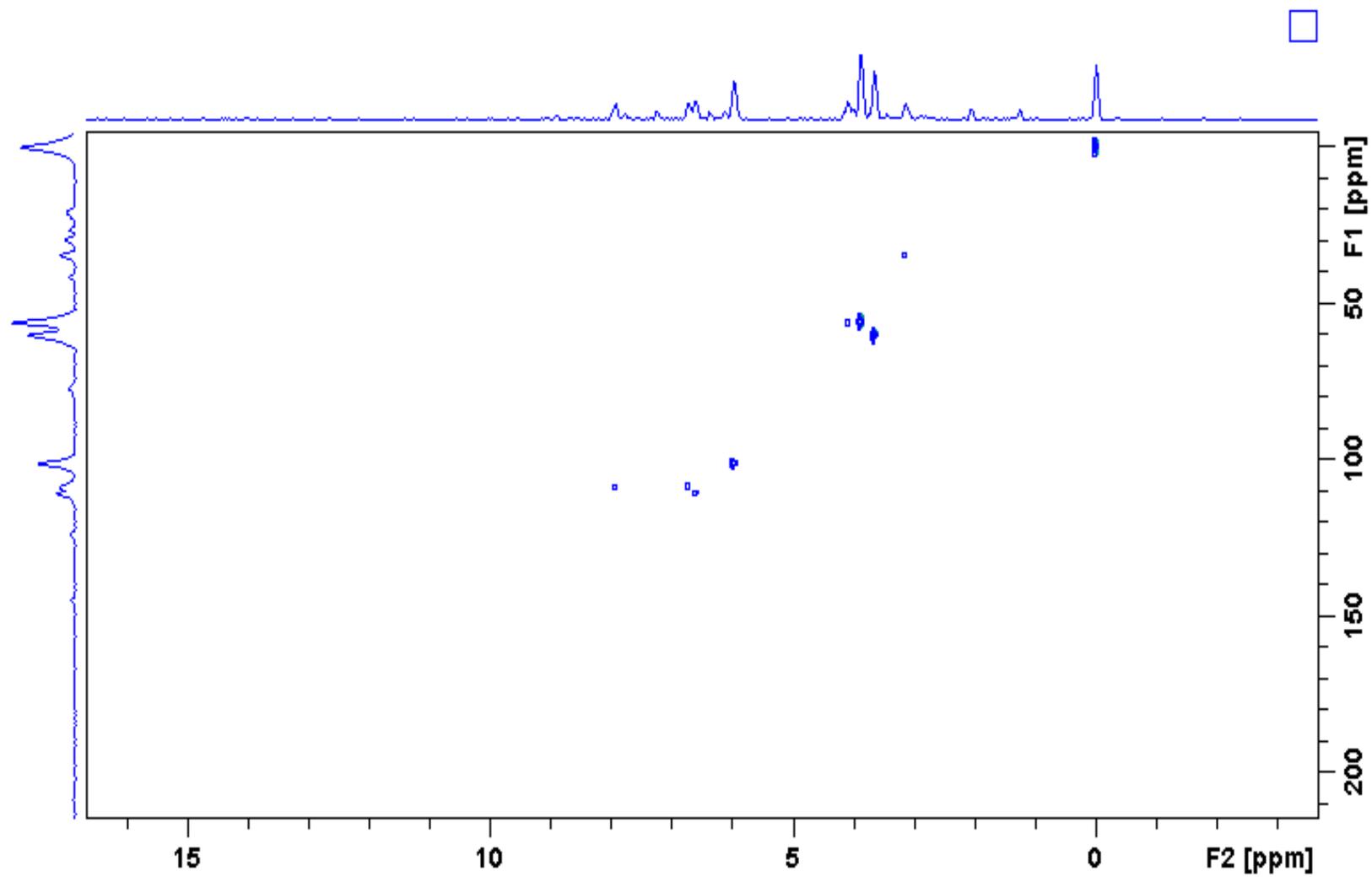
WOGUEM, V. et al. Volatile oil from striped African pepper (*Xylopia parviflora*, Annonaceae) possesses notable chemopreventive, anti-inflammatory and antimicrobial potential. **Food chemistry**, v. 149, p. 183-189, 2014.

YANG, Y. L. et al. New ent-kaurane diterpenoids with anti-platelet aggregation activity from *Annona squamosa*. **Journal of natural products**, v. 65, n. 10, p. 1462-1467, 2002.

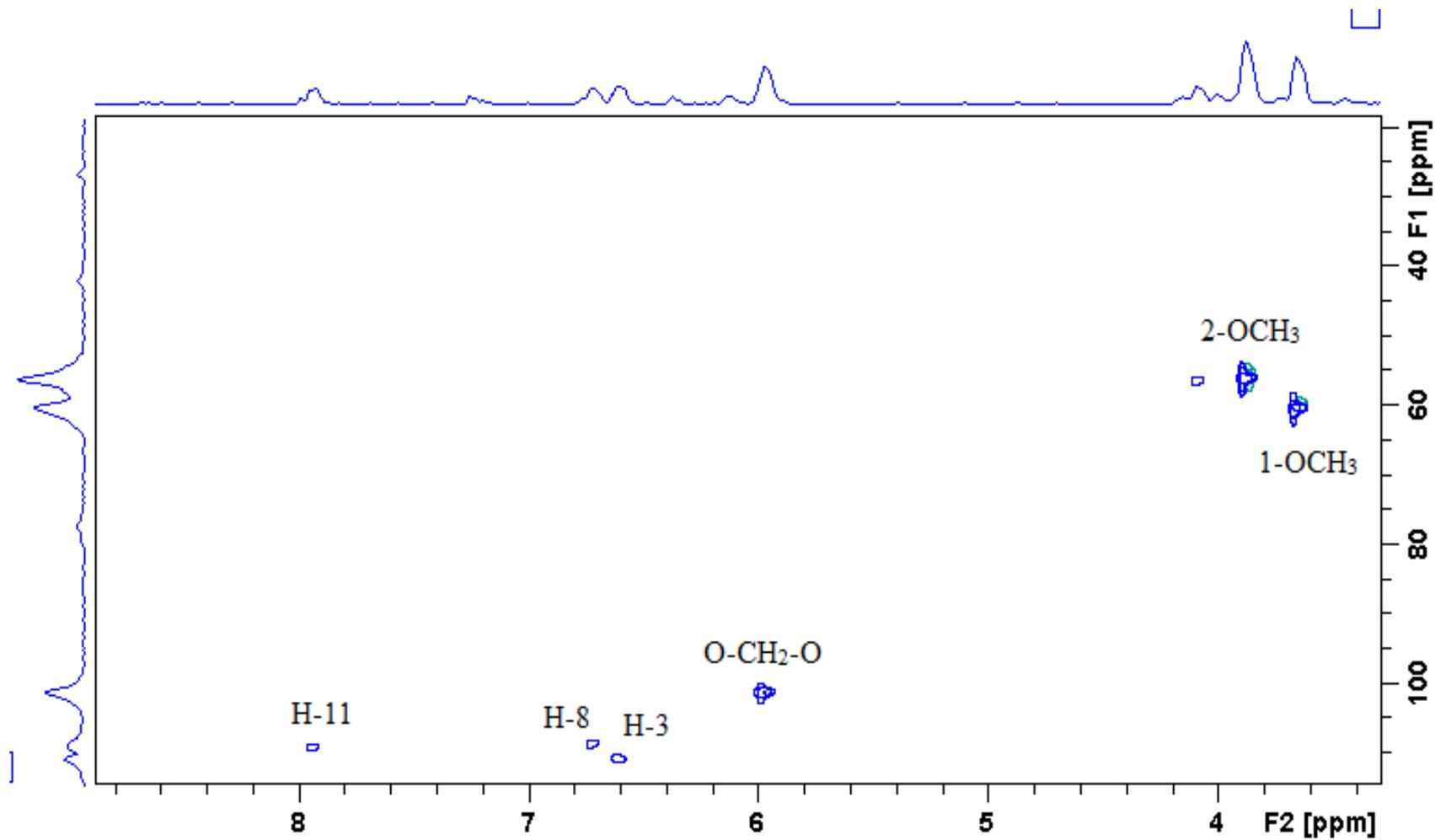
8. ANEXOS

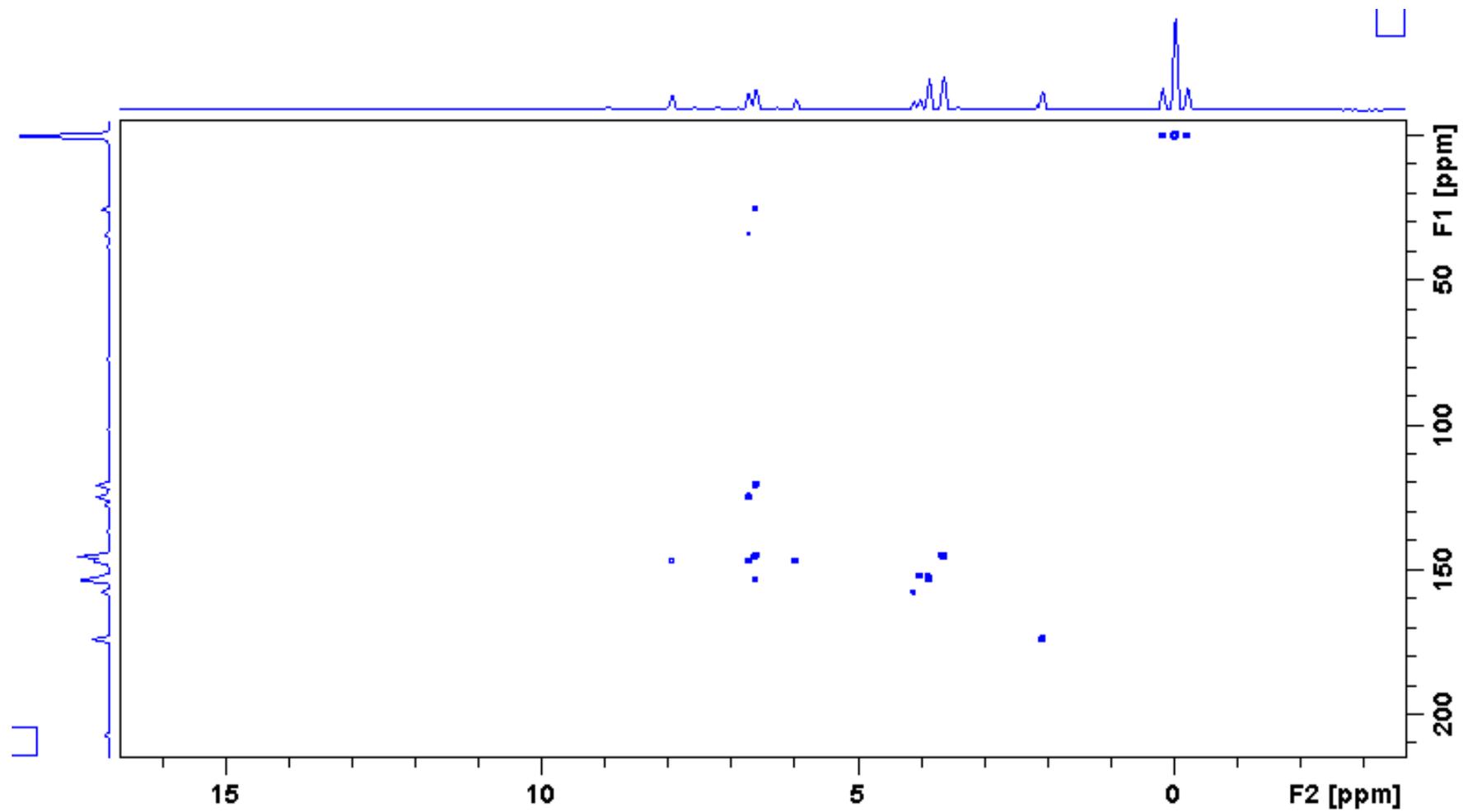
ANEXO 1. Espectro de RMN de H⁺ da normantenina (amostra FAF0)Jakeline_JFAF0 (acetona-d₆; 1H)

ANEXO 2. Espectro de HSQC da nornantenina (amostra FAF0) (Solvente: CD_3COCD_3 , 300 MHz ^1H ; 75 MHz ^{13}C).

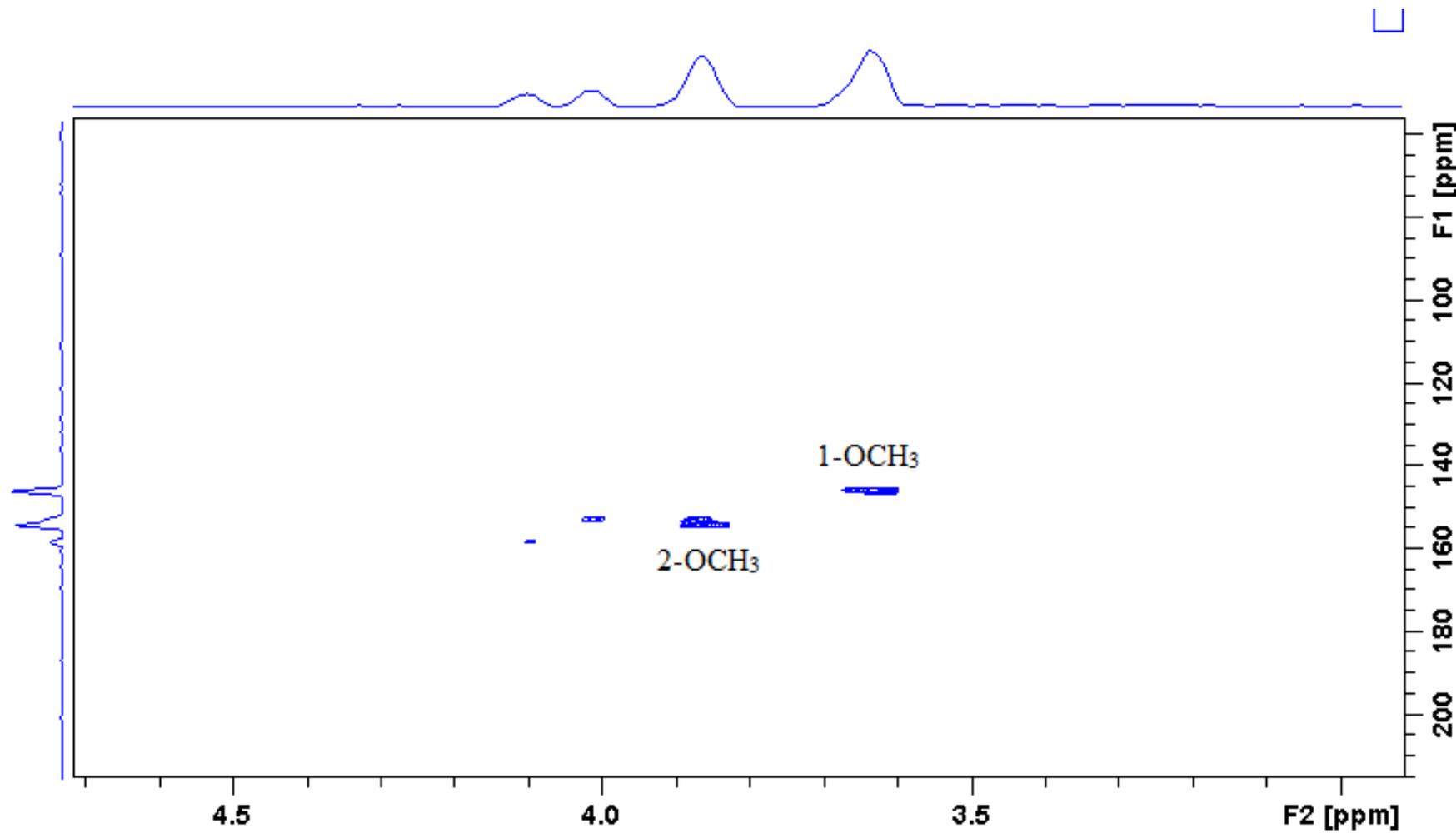


ANEXO 3. Ampliação da região δ_H 3,5 - 8 \times δ_C 40 - 100 do espectro de HSQC da nornantenina (amostra FAF0)
(Solvente: CD_3COCD_3 , 300 MHz 1H ; 75 MHz ^{13}C)

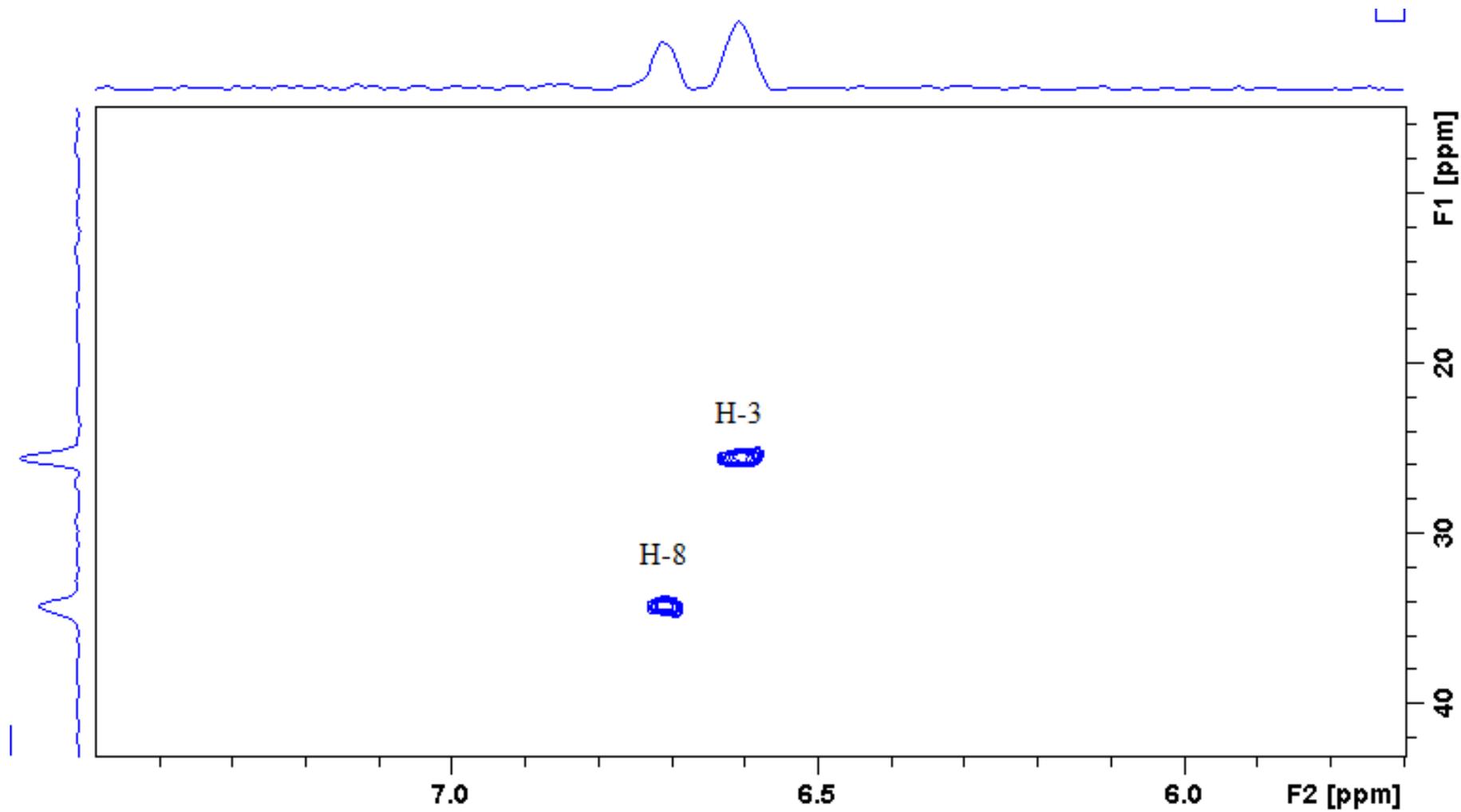


ANEXO 4. Espectro de HMBC da norantenina (amostra FAF0) (Solvente: CD_3COCD_3 , 300 MHz ^1H ; 75 MHz ^{13}C).

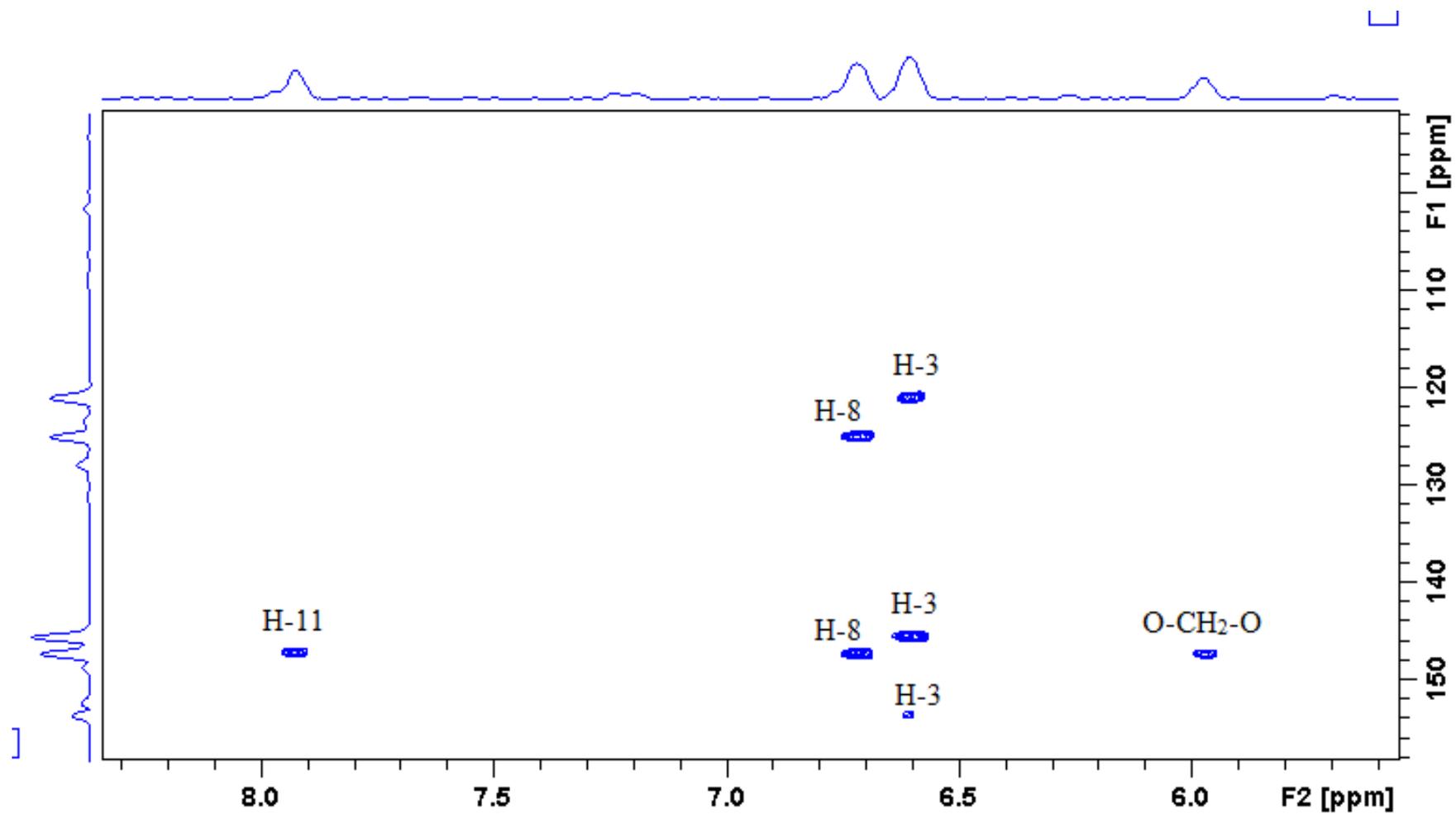
ANEXO 5. Ampliação da região $\delta_{\text{H}} 2,9 - 4,7 \times \delta_{\text{C}} 60 - 220$ do espectro de HMBC da normentenina (amostra FAF0) (Solvente: CD_3COCD_3 , 300 MHz ^1H ; 75 MHz ^{13}C).

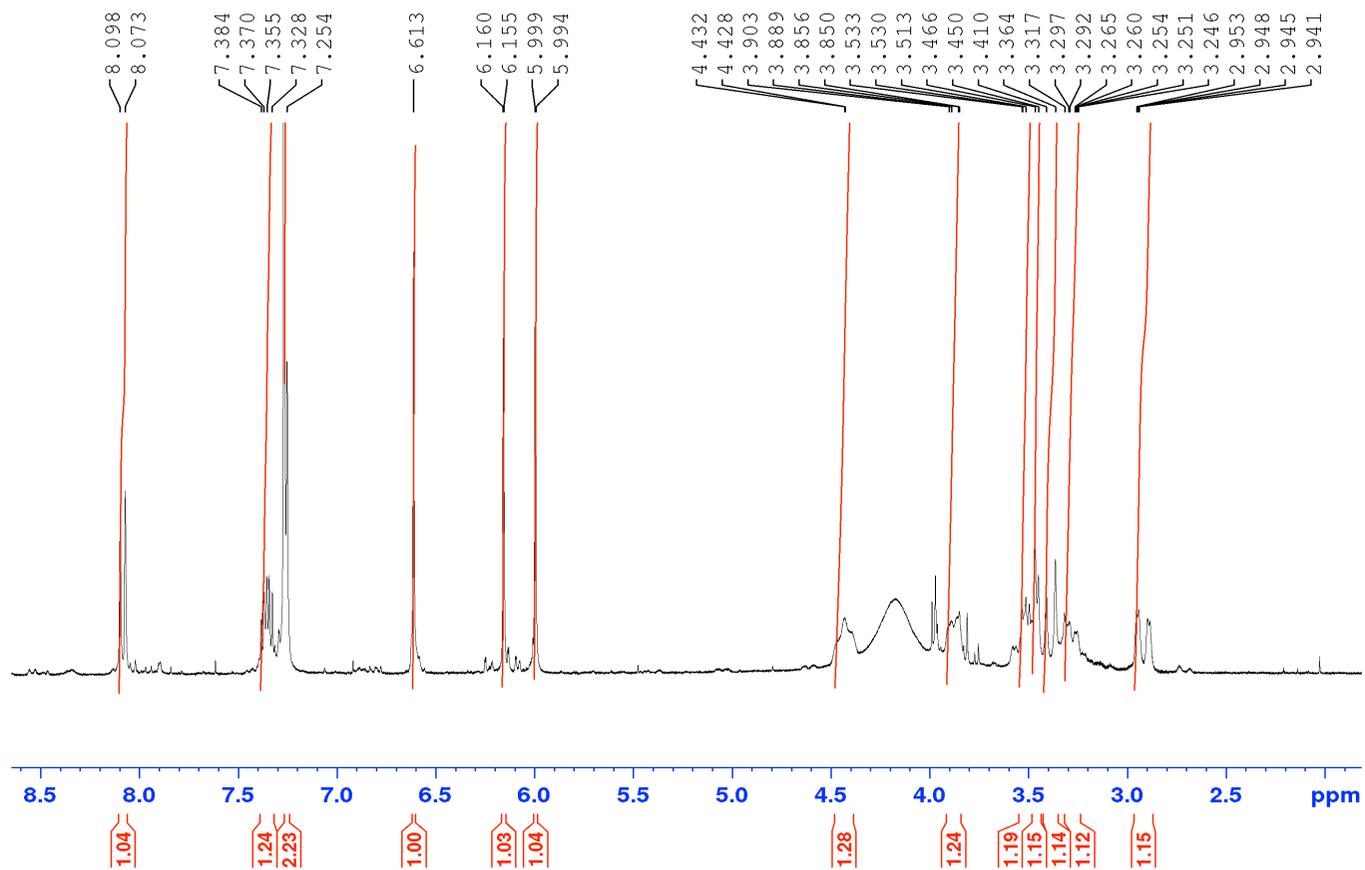


ANEXO 6. Ampliação da região $\delta_{\text{H}} 5,7 - 7,5 \times \delta_{\text{C}} 62 - 42$ do espectro de HMBC da nornantenina (amostra FAF0) (Solvente: CD_3COCD_3 , 300 MHz ^1H ; 75 MHz ^{13}C).

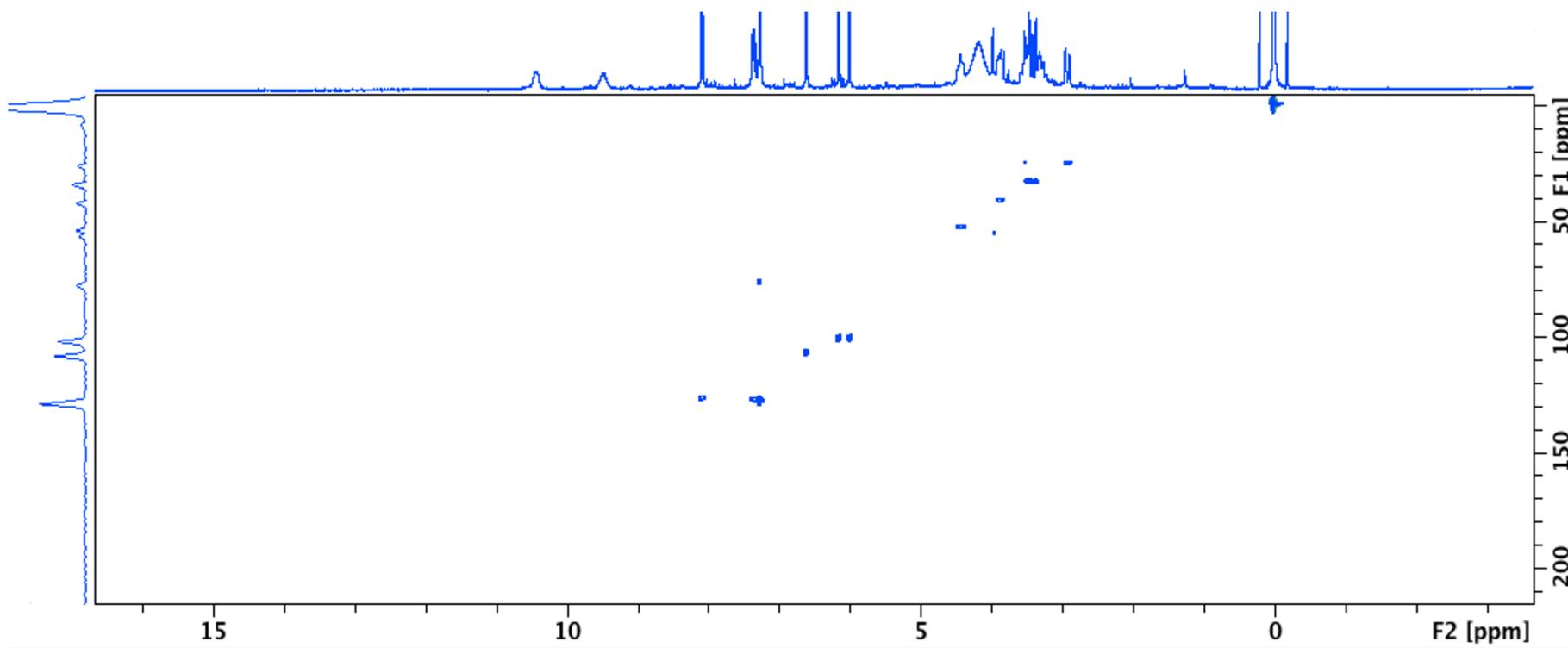


ANEXO 7. Ampliação da região $\delta_H 5,6 - 8,3 \times \delta_C 92 - 1582$ do espectro de HMBC da normantenina (amostra FAF0)
(Solvente: CD_3COCD_3 , 300 MHz 1H ; 75 MHz ^{13}C).

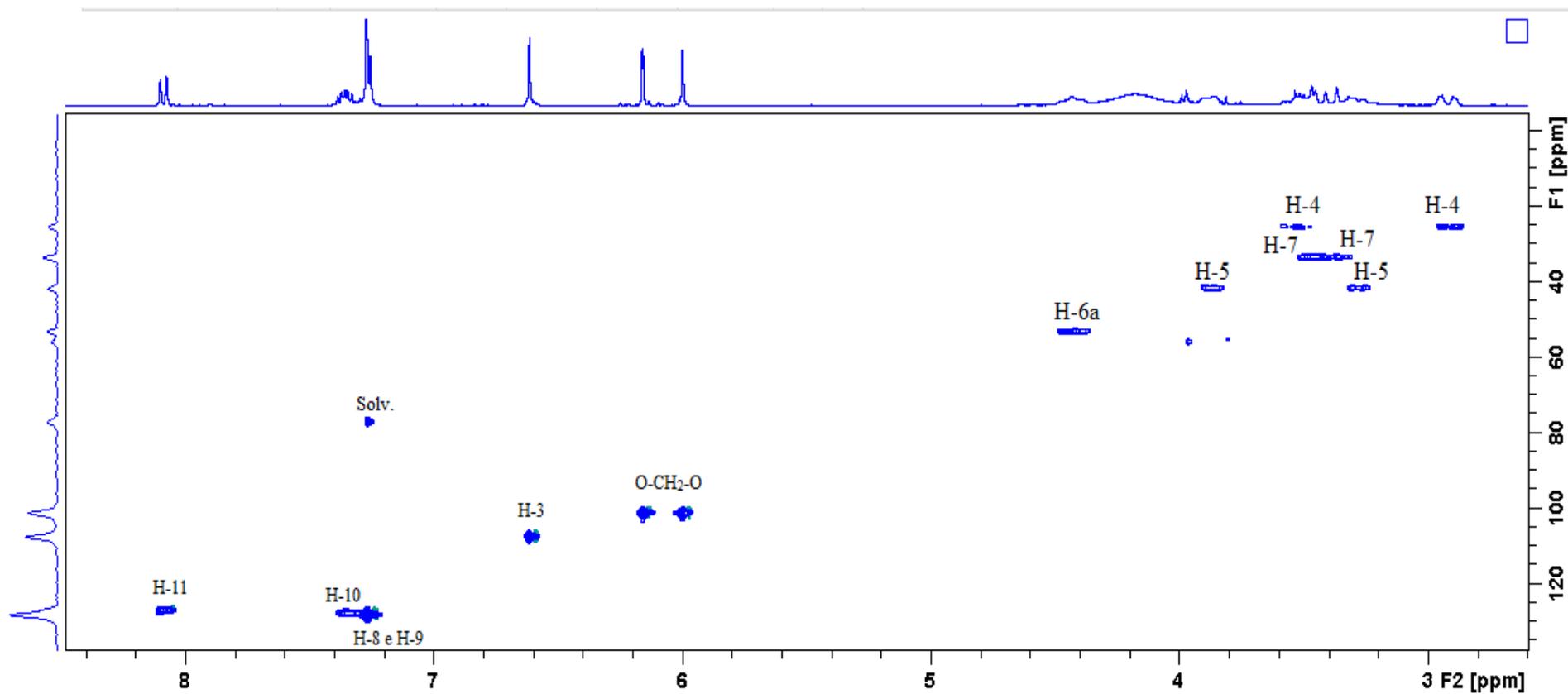


ANEXO 8. Espectro de RMN de H⁺ da anonáina (amostra FAF12).Jakeline_FAF12 (CDCl₃; 1H)

ANEXO 9. Espectro de HSQC da anonaína (amostra FAF12) (Solvente: CDCL, 300 MHz ^1H ; 75 MHz ^{13}C).



ANEXO 10. Ampliação da região δ_H 3,5 – 8 \times δ_C 20 – 140 do espectro de HSQC da anonaína (amostra FAF12)
(Solvente: CDCL₃, 300 MHz ¹H; 75 MHz ¹³C).



ANEXO 11. SISBIO – Comprovante de registro para coleta de material botânico



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Extrato da solicitação Nº 46445 em PDF - Gerado em: 02/10/2014 as 14:10:44 horas

Dados básicos da Solicitação

Nº da solicitação: 46445	Situação atual: Documento concedido	Data da situação atual: 02/10/2014
Tipo da solicitação: Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico		

Dados do pesquisador

Nome: Jakeline Mylelis Pinheiro dos Santos	Nacionalidade: Brasileira	CPF: 91350239291	E-mail: jakeline.pinheiro@hotmail.com	Identidade: 2033643-8 SSP AM
Endereço: Rua Visconde de Porto Alegre nº 475 casa 30				
Bairro: Centro	CEP: 69020-130	Município: MANAUS	UF: AM	Fone: (0xx92) 9131-2479 Fax:
Profissão: Estudante do ensino superior		Nível escolar: Mestrado		

Atividades da solicitação

Descrição das atividades/substrato	Tipo do item
Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	Atividades

Táxon(s)

Táxon	Grupo taxonômico
Espécie <i>Xylopia amazonica</i>	Plantas

Histórico da Solicitação

Data/hora	Nome do funcionário	Unidade	Descrição da situação	Observação
02/10/2014 14:21			Autorização/Licença liberada	
02/10/2014 14:21			Documento concedido	
02/10/2014 10:32			Em elaboração	

