

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

MARÍLIA FONTES BARBOSA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA
DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DA CASCA DO FRUTO DE *Annona crassiflora***

**UBERLÂNDIA
2018**

MARÍLIA FONTES BARBOSA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA
DOS ALCALÓIDES ISOLADOS DA CASCA DO FRUTO DE *Annona crassiflora***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

UBERLÂNDIA

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

B238e
2018 Barbosa, Marília Fontes, 1991-
 Estudo químico e avaliação da atividade anticolinesterásica dos
 alcalóides isolados da casca do fruto de *Annona crassiflora* [recurso
 eletrônico] / Marília Fontes Barbosa. - 2018.

 Orientador: Marcos Pivatto.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
 Modo de acesso: Internet.
 Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1239>
 Inclui bibliografia.
 Inclui ilustrações.

 1. Química. 2. Anonacea. 3. Alcalóides. 4. Alzheimer, Doença de. I.
Pivatto, Marcos (Orient.) II. Universidade Federal de Uberlândia.
Programa de Pós-Graduação em Química. III. Título.

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro - CRB6/1262



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 289/PPQUI.

DATA: 31/10/2018

DISCENTE: Marília Fontes Barbosa

MATRÍCULA: 11622QMI004

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo químico e avaliação da atividade anticolinesterásica dos alcaloides presentes na casca do fruto de *Annona crassiflora* (Annonaceae).

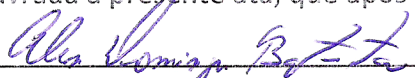
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

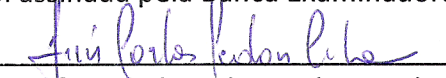
LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

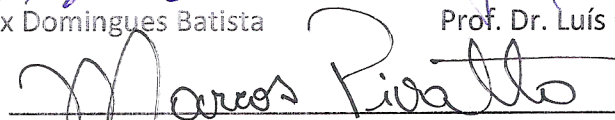
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Prospecção química de espécies nativas do Cerrado Brasileiro visando a descoberta de novos compostos bioativos.

Às oito horas do dia trinta e um de outubro do ano de dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 5I no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Prof. Dr. Alex Domingues Batista, Universidade Federal de Uberlândia, Prof. Dr. Luís Carlos Scalon Cunha, Instituto Federal do Triângulo Mineiro e Prof. Dr. Marcos Pivatto, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA DOS ALCALOIDES ISOLADOS DA CASCA DO FRUTO DE ANNONA CRASSIFLORA.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Prof. Dr. Alex Domingues Batista


Prof. Dr. Luís Carlos Scalon Cunha


Prof. Dr. Marcos Pivatto

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Antonio e Silvana, pelo incentivo e apoio incondicional.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia – UFU, por tornar possível a realização deste trabalho de Mestrado em Química de Produtos Naturais.

Ao professor Dr. Marcos Pivatto, pela orientação, incentivo, conhecimento, paciência e sobretudo pela amizade e confiança.

A professora Dra. Amanda Danuello, do Núcleo de Desenvolvimento de Compostos Bioativos (NDCBio) da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), pela contribuição permitindo o aprimoramento desse trabalho.

Ao professor Dr. Ronaldo J. de Oliveira, do Laboratório de Biofísica Teórica da UFTM, pelos ensaios *in silico*.

Ao professor Dr. Foued Salmen Espindola, do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU, pela disponibilidade bem como seu aluno Allisson Benatti Justino, pela realização do ensaio de atividade anticolinesterásica.

Aos professores do Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) pelos ensinamentos que contribuíram na realização desse trabalho.

Ao colega Dr. Mário, por todos os ensinamentos e dicas, pelos experimentos realizados sempre em cima dos prazos e pela amizade.

As minhas irmãs científicas, Thamires, Rose, Michelle, Karina e Roberta além das amigas Vanessa, Tiara e Gáveni, pelo convívio, apoio e amizade, deixando essa etapa mais leve e agradável.

A CAPES pela bolsa concedida e a FAPEMIG pelo apoio financeiro aos projetos.

E a todos que direta ou indiretamente fizeram parte dessa etapa, o meu muito obrigado!

“A viagem não acaba nunca. Só os viajantes acabam. E mesmo estes podem prolongar-se em memória, em lembrança, em narrativa. Quando o visitante sentou na areia da praia e disse: “Não há mais o que ver”, sabia que não era assim. O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na primavera o que se vira no verão, ver de dia o que se viu de noite, com o sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre.”

(José Saramago)

RESUMO

Annona crassiflora, conhecida popularmente como marolo ou araticum, é uma árvore nativa do Cerrado, comumente utilizada na culinária e medicina tradicional para o tratamento de infecções do couro cabeludo, diarreia e no combate a piolhos. Esta espécie pertence à família Annonaceae, que é reconhecida pela presença de flavonoides, acetogeninas e alcaloides, principalmente do tipo benzilisoquinolínicos. *Annona* é um dos gêneros mais relevantes da família, por apresentar uma grande diversidade de alcaloides aporfínicos, de reconhecido potencial farmacológico. Neste trabalho foi realizado o estudo químico das cascas do fruto de *Annona crassiflora*. Inicialmente foi preparado o extrato etanólico, que foi submetido a extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. As frações foram avaliadas por CCD e reveladas com iodocloroplatinado que permitiu observar maior concentração de alcaloides na fração CH₂Cl₂. Essa fração foi submetida a diferentes procedimentos cromatográficos (CC e CLAE), que resultou no isolamento dos alcaloides aporfínicos estefalagina (I), liriodenina (II) e aterospermidina (III), que tiveram suas estruturas elucidadas através de técnicas espectrométricas (EM) e espectroscópicas (RMN). Além dos compostos isolados, foram identificados a dehidroeroemerina (IV), a dehidroestefalagina (V) e a xilopina (VI), através das análises por EM-IES e EM-IE. Desse modo o extrato etanólico, a fração alcaloídica e I foram submetidos ao ensaio anticolinesterásico *in vitro*, em que I exibiu bons resultados com as enzimas AChE (IC₅₀ 39,8 ± 6,3 µM) e BChE (IC₅₀ 104,2 ± 20,6 µM), quando comparado com o controle positivo galantamina (IC₅₀ 5,0 ± 0,3 µM e 162,7 ± 28,8 µM). Os compostos isolados foram avaliados no ensaio *in silico* (*docking* molecular), que mostrou que os alcaloides aporfínicos interagem com a AChE e BChE na mesma região que inibidores como a huprina W e galantamina. Estes resultados mostram a importância destes compostos como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central como a doença de Alzheimer.

Palavras chave: *Annona crassiflora*, alcalóides aporfínicos, *docking* molecular, doença de Alzheimer

ABSTRACT

Annona crassiflora, popularly known as marolo or araticum, is a native Cerrado tree commonly used in cookery and traditional medicine for the treatment of scalp infections, diarrhea and combating lice. This species belongs to the Annonaceae family, which is recognized by the presence of flavonoids, acetogenins and alkaloids, mostly of the benzylisoquinolinic type. *Annona* is one of the most relevant genera of the family, because it presents a great diversity of alkaloids, of recognized pharmacological potential. In this work was made the chemical study of the *Annona crassiflora* fruit peels. Initially the ethanolic extract was prepared, which was subjected to liquid-liquid extraction with solvents of increasing polarity. The fractions were evaluated by CCD and revealed with iodocloroplatinate, noting that higher concentration of alkaloids in the CH₂Cl₂ fraction. This fraction was subjected to different chromatographic procedures (CC and CLAE), which resulted in the isolation of the aporphine alkaloids stephalagine (**I**), liriodenine (**II**) and atherospermidine (**III**), that have their structures elucidated by spectrometric (MS) and spectroscopic techniques (NMR). In addition to the isolated compounds, dehydrooemerine (**IV**), dehydroestephalagine (**V**) and xylopine (**VI**) were identified through ESI-MS and MS-IE analyzes. Thus the ethanolic extract, the alkaloid fraction and **I** were submitted to the *in vitro* anticholinesterase assay, in which **I** showed good results with the enzymes AChE (IC₅₀ 39.8 ± 6.3 μM) and BChE (IC₅₀ 104.2 ± 20, 6 μM) when compared to the positive control galantamine (IC₅₀ 5.0 ± 0.3 μM and 162.7 ± 28.8 μM). The isolated compounds were evaluated in the *in silico* assay (molecular docking), which showed that aporphine alkaloids interact with AChE and BChE in the same region as inhibitors such as huprin W and galantamine. These results reveal the importance of these compounds as models for the development of new drugs for the treatment of diseases related to the central nervous system as Alzheimer's disease.

Keywords: *Annona crassiflora*, aporphine alkaloids, molecular docking, Alzheimer's disease

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Classificação dos fármacos aprovados entre 1981–2014	20
Figura 2.	Área demarcada do Cerrado no Brasil	21
Figura 3.	Alcaloides tetrahydroisoquinolina (1, 2), benziltetrahydroisoquinolina (3), protoberberina (4) e aporfina (5)	23
Figura 4.	<i>Annona crassiflora</i> Mart (A): folhas e flores (B), frutos (C) e sementes (D)	26
Figura 5.	Alcaloide verdadeiro (6), protoalcaloide (7) e pseudoalcaloide (8)	29
Figura 6.	Alcaloides cujos precursores biossintéticos são aminoácidos (Tabela 3)	30
Figura 7.	Precursor (I) e núcleo central dos alcaloides aporfínicos (II)	31
Figura 8.	Biossíntese da (S)-reticulina, precursora do núcleo aporfínico	32
Figura 9.	Biossíntese dos alcaloides aporfínicos	33
Figura 10.	Síntese da ACh	34
Figura 11.	Hidrólise da ACh	34
Figura 12.	Hipótese colinérgica e atuação dos inibidores da AChE	35
Figura 13.	Fármacos inibidores da AChE aprovados pelo FDA para o tratamento da DA	36
Figura 14.	Alcaloides palmatina (20) e coridamina (21)	38
Figura 15.	Alcaloides aporfínicos isolados de <i>Stephania epigaea</i>	38
Figura 16.	Alcaloides aporfínicos isolados de <i>Beilshmeidia alloiophylla</i>	39
Figura 17.	Estrutura química da nantenina, isolada das folhas de <i>U. stipitata</i>	40
Figura 18.	Extração líquido-líquido do extrato etanólico	48
Figura 19.	CCD da prospecção fitoquímica; revelador IC ℓ Pt (A) e Dragendorff (B)	53
Figura 20.	Procedimentos cromatográficos da fração CH ₂ Cl ₂ para o isolamento dos alcaloides	54
Figura 21.	CCD da fração MMe01 (FE: sílica, FM: CH ₂ Cl ₂ :MeOH:NH ₄ OH (9: 1:0,25) e revelador: IC ℓ Pt)	55

Figura 22.	CCD da fração MMe02 (FE: sílica, FM: CH ₂ Cl ₂ :MeOH:NH ₄ OH (9: 1:0,25) e revelador: ICℓPt)	55
Figura 23.	EM-IES-(+) em alta resolução da fração MMe02-F ₂₅₋₄₀	56
Figura 24.	Cromatograma da fração MMe02-F ₂₅₋₄₀ em coluna analítica (UV 254 nm)	57
Figura 25.	Cromatograma da fração MMe02-F ₂₅₋₄₀ em coluna analítica (ELSD)	58
Figura 26.	Cromatograma da fração MMe02-F ₂₅₋₄₀ em coluna semipreparativa (UV 254 nm)	59
Figura 27.	Cromatograma do alcaloide I em coluna analítica (UV 254 nm). CCD do mesmo composto (FM: CH ₂ Cl ₂ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: ICℓPt).	60
Figura 28.	Cromatograma do composto I em coluna analítica (ELSD)	61
Figura 29.	CCD da fração MMe03 (FE: sílica, FM: CH ₂ Cl ₂ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: ICℓPt (A) e Dragendorff (B))	62
Figura 30.	EM-IES-(+) em alta resolução da fração MMe03-F ₁₈₇₋₂₁₀	62
Figura 31.	Cromatograma da fração MMe03-F ₁₈₇₋₂₁₀ em coluna analítica (UV 254 nm)	63
Figura 32.	Cromatograma da fração MMe03-F ₁₈₇₋₂₁₀ em coluna analítica (ELSD)	64
Figura 33.	Cromatograma da fração MMe03-F ₁₈₇₋₂₁₀ em coluna semipreparativa (UV 254 nm)	65
Figura 34.	Cromatograma do alcaloide II em coluna analítica (UV 254 nm) CCD do mesmo composto (FM: CH ₂ Cl ₂ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: ICℓPt).	66
Figura 35.	Cromatograma do alcaloide II em coluna analítica (ELSD)	67
Figura 36.	Cromatograma do alcaloide III em coluna analítica (UV 254 nm). CCD do mesmo composto (FM: CH ₂ Cl ₂ :MeOH:NH ₄ OH (9:1:0,25) e revelador: ICℓPt).	68
Figura 37.	Cromatograma do alcaloide III em coluna analítica (ELSD)	69
Figura 38.	EM-IES-(+) em alta resolução da fração MMe01-F ₂₀₅₋₂₂₀	70
Figura 39.	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide I	71
Figura 40.	EM/EM-IES-(+) do alcaloide I	72

Figura 41.	Espectro de RMN de ^1H do alcaloide I (400 MHz, CDCl_3)	73
Figura 42.	Ampliação do espectro 41 (δ 2,4–3,25) do alcaloide I	73
Figura 43.	Ampliação do espectro 41 (δ 7,05–7,95) do alcaloide I	74
Figura 44.	Mapa de contorno COSY do alcaloide I	74
Figura 45.	Mapa de contorno COSY (δ 2,5–3,6) do alcaloide I	75
Figura 46.	Mapa de contorno COSY (δ 5,8–6,0) do alcaloide I	75
Figura 47.	Mapa de contorno COSY (δ 6,0–8,0) do alcaloide	76
Figura 48.	Mapa de contorno COSY (δ 7,0–8,0) do alcaloide I	76
Figura 49.	Espectro de RMN de ^{13}C do alcaloide I (100 MHz, CDCl_3)	77
Figura 50.	Ampliação do espectro 49 (δ 10–160) do alcaloide I	78
Figura 51.	Ampliação do espectro 49 (δ 125–146) do alcaloide I	78
Figura 52.	Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl_3) do alcaloide I	79
Figura 53.	Mapa de contorno HSQC (δ 2,6–4,2) do alcaloide I	79
Figura 54.	Mapa de contorno HSQC (δ 6,0–8,0) do alcaloide I	80
Figura 55.	Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl_3) do alcaloide I	81
Figura 56.	Mapa de contorno HMBC (δ 2,5–4,5) do alcaloide I	81
Figura 57.	Mapa de contorno HMBC (δ 2,6–3,3) do alcaloide I	82
Figura 58.	Mapa de contorno HMBC (δ 3,95–4,15) do alcaloide I	82
Figura 59.	Mapa de contorno HMBC (δ 5,8–6,2) do alcaloide I	83
Figura 60.	Mapa de contorno HMBC (δ 7,0–7,6) do alcaloide I	83
Figura 61.	Mapa de contorno HMBC (δ 6,5–8,5) do alcaloide I	84
Figura 62.	Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de I	84
Figura 63.	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide II	87
Figura 64.	EM/EM-IES-(+) do alcaloide II	88
Figura 65.	Espectro de RMN de ^1H do alcaloide II (600 MHz, CD_3OD)	89
Figura 66.	Ampliação do espectro 65 (δ 7,51–7,71) do alcaloide II	90
Figura 67.	Ampliação do espectro 65 (δ 7,85–8,65) do alcaloide II	90
Figura 68.	Espectro de RMN de TOCSY 1D (600 MHz, CD_3OD), irradiando 8,33 (H-8) do alcaloide II	91
Figura 69.	Espectro de RMN de TOCSY 1D (600 MHz, CD_3OD), irradiando δ 7,86 (H-4) do alcaloide II	92
Figura 70.	Espectro de RMN de NOESY 1D (600 MHz, CD_3OD),	93

	irradiando δ 7,24 (H-3) do alcaloide II	
Figura 71.	Mapa de contorno COSY do alcaloide II	93
Figura 72.	Mapa de contorno COSY (δ 6,4–8,8) do alcaloide II	94
Figura 73.	Mapa de contorno COSY (δ 6,8–8,9) do alcaloide II	94
Figura 74.	Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ do alcaloide II (150 MHz, CD_3OD)	95
Figura 75.	Ampliação do espectro 74 (δ 105–180) do alcaloide II	96
Figura 76.	Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD_3OD) do alcaloide II	96
Figura 77.	Mapa de contorno HSQC (δ 6,8–9,0) do alcaloide II	97
Figura 78.	Mapa de contorno HSQC (δ 6,4–7,4) do alcaloide II	97
Figura 79.	Mapa de contorno HSQC (δ 7,6–8,7) do alcaloide II	98
Figura 80.	Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD_3OD) do alcaloide II	99
Figura 81.	Mapa de contorno HMBC (δ 6,4–8,8) do alcaloide II	99
Figura 82.	Mapa de contorno HMBC (δ 6,4–7,4) do alcaloide II	100
Figura 83.	Mapa de contorno HMBC (δ 7,5–8,75) do alcaloide II	100
Figura 84.	Mapa de contorno HMBC (δ 8,3–8,8) do alcaloide II	101
Figura 85.	Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de II	101
Figura 86.	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide aterospermidina (III)	104
Figura 87.	EM/EM-IES-(+) do alcaloide III	105
Figura 88.	Espectro de RMN de ^1H do alcaloide III (600 MHz, CD_3OD)	106
Figura 89.	Ampliação do espectro 88 (δ 7,5–7,78) do alcaloide III	106
Figura 90.	Ampliação do espectro 59 (δ 8,1–8,75) do alcaloide III	107
Figura 91.	Espectro de RMN de TOCSY 1D (600 MHz, CD_3OD), irradiando δ 8,48 (H-11) do alcaloide III	108
Figura 92.	Espectro de RMN de TOCSY 1D (600 MHz, CD_3OD), irradiando δ 8,69 (H-5) do alcaloide III	109
Figura 93.	Mapa de contorno COSY do alcaloide III	110
Figura 94.	Mapa de contorno COSY (δ 7,5–8,9) do alcaloide III	110
Figura 95.	Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ do alcaloide III (150 MHz, CD_3OD)	111
Figura 96.	Ampliação do espectro 95 (δ 59–185) do alcaloide III	112

Figura 97.	Ampliação do espectro 95 (δ 101–152) do alcaloide III	112
Figura 98.	Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD ₃ OD) do alcaloide III	113
Figura 99.	Mapa de contorno HSQC (δ 4,2–8,7) do alcaloide III	113
Figura 100.	Mapa de contorno HSQC (δ 4,0–4,6) do alcaloide III	114
Figura 101.	Mapa de contorno HSQC (δ 6,2–6,8) do alcaloide III	114
Figura 102.	Mapa de contorno HSQC (δ 7,5–8,7) do alcaloide III	115
Figura 103.	Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD ₃ OD) do alcaloide III	116
Figura 104.	Mapa de contorno HMBC (δ 4,2–8,8) do alcaloide III	116
Figura 105.	Mapa de contorno HMBC (δ 6,0–6,5) do alcaloide III	117
Figura 106.	Mapa de contorno HMBC (δ 8,1–8,7) do alcaloide III	117
Figura 107.	Mapa de contorno HMBC (δ 4,1–4,5) do alcaloide III	118
Figura 108.	Mapa de contorno HMBC (δ 8,1–8,6) do alcaloide III	118
Figura 109.	Mapa de contorno HMBC (δ 8,5–8,7) do alcaloide III	119
Figura 110.	Mapa de contorno HMBC (δ 7,4–8,0) do alcaloide III	119
Figura 111.	Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de III	120
Figura 112.	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide IV	122
Figura 113.	EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide V	123
Figura 114.	Cromatograma obtido por CG-EM da fração MMe03-F _{187–210}	123
Figura 115.	EM-IE (70 eV) do pico com t_R 38,5 min	124
Figura 116.	EM-IE (70 eV) do pico com t_R 42,1 min	125
Figura 117.	Atividades inibitórias de AChE (A e B) e BChE (C e D) do extrato etanólico, fração alcaloidal (CH ₂ Cl ₂) e estefalagina (I) analisadas pelo ensaio de microplacas	127
Figura 118.	Estrutura química da litebamina	128
Figura 119.	Estefalagina no sítio ativo da AChE humana (A e B), sobreposição dos modos de ligação da huprina W e estefalagina no sítio ativo da AChE (C) e sobreposição dos modos de ligação da galantamina e estefalagina no sítio ativo da AChE (D)	129
Figura 120.	Liriodenina complexada com AChE	130
Figura 121.	Aterospermidina complexada com AChE	131
Figura 122.	Estefalagina complexada com BChE	133

Figura 123. Liriodenina complexada com BChE	134
Figura 124. Aterospermidina complexada com BChE	135
Figura 125. Galantamina complexada com BChE	136
Figura 126. Huprina W complexada com BChE	137

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Espécies do gênero <i>Annona</i> utilizadas na medicina popular	25
Tabela 2.	Atividades biológicas de alguns metabólitos secundários relatados em <i>A. crassiflora</i>	28
Tabela 3.	Alcaloides e precursores biossintéticos	30
Tabela 4.	Inibidores da AChE aprovados pelo FDA e seus efeitos colaterais	37
Tabela 5.	Equipamentos disponíveis para realização desse trabalho	46
Tabela 6.	Massas obtidas da extração líquido-líquido do extrato etanólico	52
Tabela 7.	Dados de RMN da estefalagina (I) em CDCl ₃	86
Tabela 8.	Dados de RMN da liriodenina (II) em CD ₃ OD	103
Tabela 9.	Dados de RMN da aterospermidina (III) em CD ₃ OD	121
Tabela 10.	Atividade anticolinesterásica do extrato etanólico, fração alcaloidica (CH ₂ Cl ₂) e estefalagina (I)	126

LISTA DE ABREVIATURAS

Acetil-CoA – Acetil coenzima A

AChE – Acetilcolinesterase

ACh – Acetilcolina

AcOEt – Acetato de etila

BuCh – Butirilcolina

BChE – Butirilcolinesterase

CC – Cromatografia em coluna

CCD – Cromatografia em camada delgada

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

COSY – *Correlation spectroscopy*

d – Duplete

DA – Doença de Alzheimer

DAD – Detector de arranjo de diodo

ELSD – *Evaporative light scattering detector*

EM – Espectrometria de massas

EM-IES – Espectrometria de massas com ionização por *electrospray*

FDA – *Food and drug administration*

FE – Fase estacionária

FM – Fase móvel

HMBC – *Heteronuclear multiple bond correlation*

HMQC – *Heteronuclear multiple quantum correlation*

IC₅₀ – Concentração necessária para inibição de 50% do parasita

IClPt – Revelador iodocloroplatinato

IQ – Instituto de química

J – Constante de acoplamento (em Hertz)

m – Multiplete

MAO – Monoamina Oxidase

NuPpEN – Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais

PLP – Transaminação

PN – Produtos naturais

PNCM – Política nacional sobre mudança do clima

PPCerrado – Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas no Cerrado

RDA – Retro-Diels-Alder

RMN de ^1H – Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

RMN de ^{13}C – Ressonância Magnética Nuclear de Carbono

s – Singleto

t – Tripleto

δ – Deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	CERRADO	20
1.2	FAMÍLIA ANNONACEAE	22
1.3	<i>ANNONA CRASSIFLORA</i>	26
1.4	BIOSSÍNTESE DOS ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS	28
1.5	DOENÇA DE ALZHEIMER E OS ALCALOIDES INIBIDORES DA ACHE	33
2	OBJETIVO GERAL	41
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
3	MATERIAIS E MÉTODOS	42
3.1	SOLVENTES	42
3.2	CROMATOGRAFIA	42
3.2.1	<i>Cromatografia em camada delgada</i>	42
3.2.2	<i>Preparo do revelador de iodo-cloro-platinato</i>	42
3.2.3	<i>Preparo do revelador Dragendorff</i>	43
3.2.4	<i>Cromatografia em coluna</i>	43
3.2.5	<i>Cromatografia líquida de alta eficiência</i>	43
3.2.6	<i>Cromatografia à gás</i>	44
3.3	ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS	44
3.4	EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	45
4	PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	47
4.1	COLETA, PREPARO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO	47
4.2	FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DO FRUTO DE <i>A. CRASSIFLORA</i>	47
4.3	ATIVIDADE BIOLÓGICA	48
4.3.1	<i>Atividade anticolinesterásica</i>	49
4.4	ESTUDO <i>IN SILICO</i>	49
4.4.1	<i>Estudo in silico (docking molecular)</i>	50
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1	FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE <i>A. CRASSIFLORA</i>	52

5.2	ANÁLISE QUALITATIVA DOS ALCALOIDES NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE <i>A. CRASSIFLORA</i>	52
5.3	ISOLAMENTO DOS ALCALOIDES DA FRAÇÃO CH ₂ Cl ₂	53
5.4	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALOIDES	70
5.4.1	<i>Elucidação estrutural do alcaloide I</i>	71
5.4.2	<i>Elucidação estrutural do alcaloide II</i>	87
5.4.3	<i>Elucidação estrutural do alcaloide III</i>	104
5.4.4	<i>Elucidação estrutural do alcaloide IV e V</i>	122
5.4.5	<i>Elucidação estrutural do alcaloide VI</i>	125
5.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA	126
5.6	ENSAIOS <i>IN SILICO</i> (DOCKING MOLECULAR)	128
5.6.1	<i>Ensaio in “silico” utilizando a AChE</i>	128
5.6.2	<i>Ensaio in “silico” utilizando a BChE</i>	132
6	CONCLUSÕES	138
	REFERÊNCIAS	140

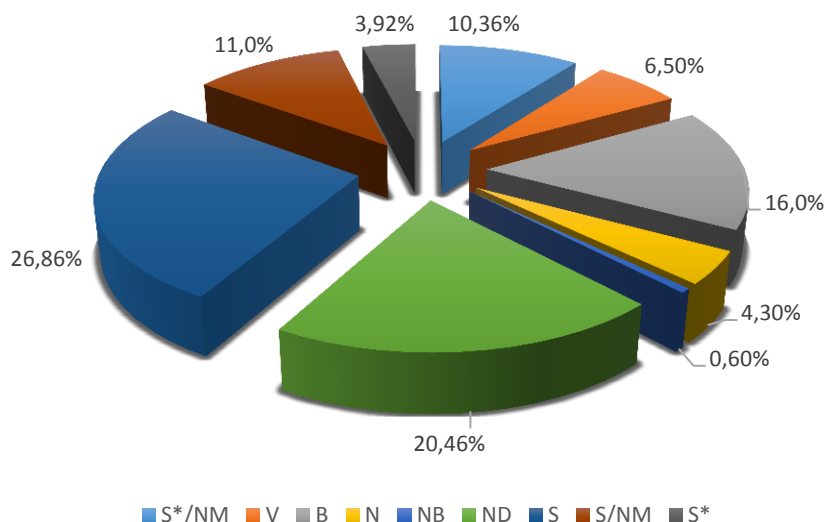
1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios os produtos naturais (PN) vêm sendo utilizados pelo homem na busca pelo alívio e cura das doenças, sendo que uma das primeiras formas de utilização foi através da ingestão de ervas e folhas. Há muitos exemplos da utilização destes recursos naturais na cultura popular ou na medicina ao longo da história do desenvolvimento das civilizações, seja para o controle de pragas ou para o tratamento de doenças. Dentro deste contexto a natureza sempre foi uma fonte de inspiração para o desenvolvimento científico, levando o homem a uma busca incessante pela compreensão das leis naturais e também do conhecimento químico que pudesse ser usado a seu favor para superar as barreiras da sobrevivência (VIEGAS JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

No contexto histórico, existem relatos do uso das plantas medicinais mesmo antes da era cristã. Nessa época, dentro da civilização grega já se destacavam os filósofos, detentores do conhecimento, que escreviam livros sobre a história e utilização das plantas. Mas foi somente no século XVIII que foram isoladas as primeiras substâncias de origem natural. Já o século XIX foi marcado pelo desenvolvimento de processos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcaloides. No século XX são introduzidos os métodos espectroscópicos de identificação estrutural, promovendo progresso na determinação de estruturas complexas (PINTO et al., 2002).

Por muito tempo as plantas medicinais foram a única opção para o tratamento de várias doenças, favorecendo a disseminação dos conhecimentos tradicionais e ampliando assim o conhecimento das plantas. A difusão do conhecimento tradicional despertou o interesse de muitos pesquisadores de várias áreas para o desenvolvimento de estudos científicos, que comprovassem a eficácia dos extratos preparados de plantas utilizados na medicina popular (MACIEL et al., 2002).

Assim, com o desenvolvimento através dos anos e a evolução dos métodos de separação, purificação e elucidação, a química de PN foi se destacando como uma das áreas mais consolidadas da química orgânica, sendo notória sua importância na sociedade moderna (BERLINCK et al., 2017). Nos últimos anos, um número crescente de artigos publicados enfatiza que os PNs continuam desempenhando um papel significativo na descoberta de compostos bioativos importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Ao longo dos últimos anos, há uma grande porcentagem de fármacos aprovados pelos órgãos regulatórios que são PNs ou tiveram sua origem em PNs (Figura 1) (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Figura 1. Classificação dos fármacos aprovados entre 1981–2014.

Nota: S*/NM – sintético com grupo farmacofórico de produto natural/ mimético de produto natural, V – vacinas e B – biológico, N – produto natural (isolado de fonte natural), NB – produto natural (medicamento botânico), ND – derivado semissintético de produto natural, S – sintético, S/NM – sintético/mimético de produto natural e S* – sintético com grupo farmacofórico de produto natural.

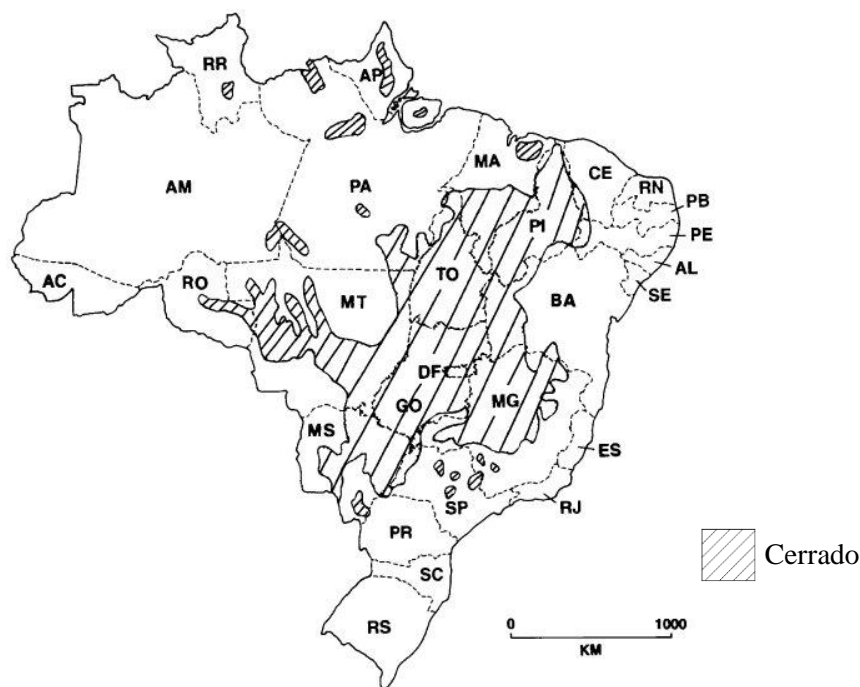
Fonte: adaptado de Newman e Cragg (2016).

Dentro deste contexto, visando a busca por novos fármacos de origem vegetal, o Brasil dispõe de uma posição privilegiada devido à riqueza da sua biodiversidade (BERLINCK et al., 2017), sendo detentor de uma variedade de biomas, incluindo o Cerrado, um dos seus principais representantes.

1.1 CERRADO

O Cerrado é declarado o segundo maior bioma brasileiro, ocupando grande parte do território nacional (22%), com cerca de 2 milhões de km² (MMA, 2018; KLIN; MACHADO, 2005), estendendo-se por todo o Brasil central, abrangendo os estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins, Goiás, Bahia, Maranhão, Piauí, Paraná, São Paulo, Distrito Federal (SANO et al., 2008) (Figura 2). Este bioma é composto por diferentes tipos de vegetação, cada uma com as suas particularidades, como: mata ciliar, mata de galeria, mata seca, cerradão, cerrado sentido restrito, parque do cerrado, vereda, campo sujo, campo rupestre e campo limpo (AQUINO; AGUIAR, 2007).

Figura 2. Área demarcada do Cerrado no Brasil.



Fonte: adaptado de Novaes et al. (2013).

O clima da região é estacional, com temporadas secas, de abril a setembro, e temporadas úmidas, de outubro a março. Com precipitação pluvial média anual de 1500 a 1800 mm, as temperaturas costumam ser agradáveis em todo o período (SILVA; BATES, 2002; KLIN; MACHADO, 2005; NOVAES et al., 2013). Tempestades elétricas decorrem espontaneamente em curtos períodos nas temporadas úmidas, o que pode gerar focos de incêndio. Essas variações fazem com que a fisionomia da flora se acomode para sofrer menores danos. Ademais, o fogo durante a estação chuvosa pode auxiliar na germinação das sementes e no desenvolvimento da flora (NOVAES et al., 2013).

Considerada a única região predominante por savanas tropicais, impressiona pela biodiversidade de mais de 13.000 espécies de plantas, e numerosas espécies de mamíferos, aves, répteis e anfíbios (SILVA; BATES, 2002). O resultado da biodiversidade presente no Cerrado pode ser visto pela crescente popularização da utilização da fauna e da flora, para uso alimentar, medicinal, artesanal, madeireiro, entre outros. Espécies como o pequi, a gueroba, o baru, a manguaba, a arnica e muitas outras tem gerado renda para famílias da região, significando frequentemente a base de sustento familiar (AQUINO; AGUIAR, 2007).

Inúmeras plantas do Cerrado, através de estudos que comprovam cientificamente suas potencialidades, são utilizadas como alternativa terapêutica em diversas patologias, abrangendo desde doenças infecciosas, parasitárias até o câncer (COSTA et al., 2008;

NOVAES et al., 2013; MESQUITA et al., 2007).

Mesmo ultrapassando as 12 mil espécies com potencial alimentício e medicinal, o conhecimento sobre a flora desse bioma ainda é limitado (GUARIM NETO; MORAIS, 2003), uma vez que diversas espécies não foram exploradas do ponto de vista científico (JOLY et al., 2011). Além disso, independente de todo potencial presente nesse bioma, a fauna e a flora estão constantemente sendo devastadas devido a crescente expansão antropológica, seja para o aumento da produção agrícola, de atividades industriais, ou relacionado ao crescimento das zonas urbanas (OLIVEIRA et al., 2015).

Até o ano de 2008, uma área de 47,8% do Cerrado já havia sido desmatada, com estimativa de destruição completa até 2030 (MMA, 2011). Desse modo em 2009 foi criado o Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado (PPCerrado), no qual encontra-se na 3ª fase (2016–2020) e apresenta redução no desmatamento no Cerrado desde sua criação (MMA, 2018), o que favorece a não perder espécies endêmicas com potencial químico farmacológico, como espécies da família Annonaceae.

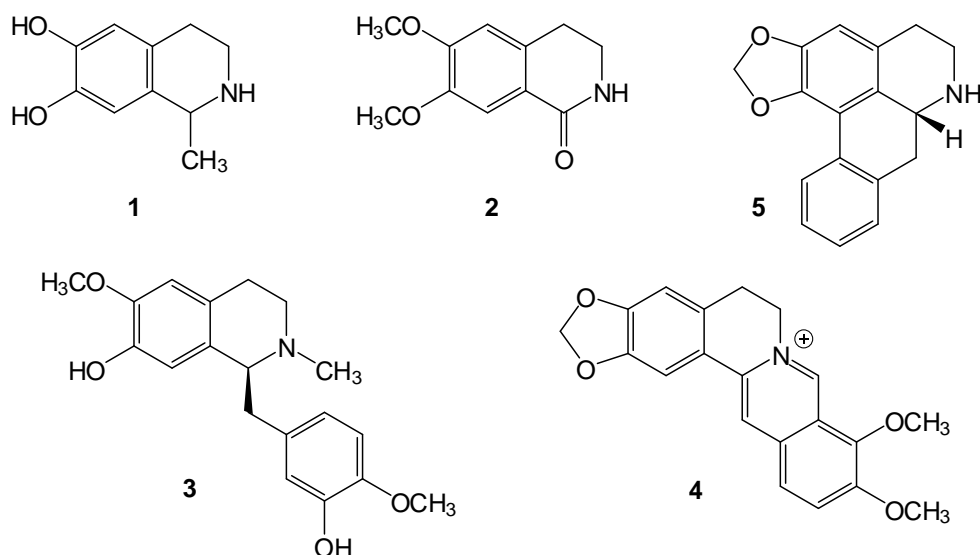
1.2 FAMÍLIA ANNONACEAE

Catalogada em 1789 por Jussieu, a família Annonaceae (LÚCIO et al., 2015), conhecida como família das maçãs doces, compreende cerca de 130 gêneros e mais de 2.000 espécies, distribuídas em sua maioria em regiões tropicais, e algumas em regiões temperadas (LOPES; SILVA, 2014; LEBOEUF et al., 1982; SOUZA et al., 2015). Estão espalhadas nas Américas, África, Ásia e Oceania (ARAYA, 2004; LÚCIO et al., 2015), e segundo dados fitogeográficos existem evidências que relacionam sua origem à América do Sul ou África (LEBOEUF et al., 1982).

Esta família, uma das maiores dentre as Angiospermas, está subdividida em quatro subfamílias: Anaxagoreoideae (1 gênero e 30 espécies), Ambavioideae (9 gêneros e 50 espécies) e Malmeoideae (7 tribos e 870 espécies) e Annonoideae (7 tribos e 1755 espécies) (CHATROU et al., 2012). São espécies de árvores, arbustos ou trepadeiras que possuem folhas dispostas alternadamente, ao longo de todo o ramo. As flores são perfumadas, trímeras, abundantes e brotam antes do desenvolvimento final das outras partes. O fruto habitualmente é unido em bagas, que se aglutinam com uma grande porção comestível e as sementes exibem um endosperma ruminado (LEBOEUF et al., 1982; LÚCIO et al., 2015).

Quimicamente, diversos metabólitos secundários foram identificados na família, tais como, flavonoides, polifenóis e acetogeninas, embora seja descrito a predominância de alcaloides aporfínicos e protoberberinas (LEBOEUF et al., 1982; AMINIMOGHADAMFAROUJA; NEMATOLLAHIA; WIART, 2011). Existem cerca de 150 alcaloides de diferentes núcleos, dos quais os mais recorrentes na família são as benziltetrahydroisoquinolinas, as tetrahydroisoquinolinas simples, as protoberberinas e os aporfínicos (Figura 3). Dentre as tetrahydroisoquinolinas isoladas até o momento, duas são consideradas promissoras no tratamento da doença de Parkinson, como o salsolinol (1), isolado das folhas de *Annona reticulata* e coridaldina (2), isolada das cascas de *Enantia polycarpa*. Grande parte das benziltetrahydroisoquinolinas foram isoladas dos gêneros *Annona* e *Xylopia*, um exemplo é a reticulina (3). Já as protoberberinas possuem um esqueleto principal como a berberina (4), relatada nos gêneros *Xylopia* e *Rollinia*. Dentre os alcaloides aporfínicos, a anonaína (5), isolada das raízes de *Annona cherimoya*, é frequentemente citada na família, do mesmo modo como derivados contendo o grupo 1,2-metilenodioxí, são mais potentes contra linhagens celulares de cancro (AMINIMOGHADAMFAROUJA; NEMATOLLAHIA; WIART, 2011).

Figura 3. Alcaloides tetrahydroisoquinolina (1, 2), benziltetrahydroisoquinolina (3), protoberberina (4) e aporfina (5).



Fonte: autora.

Os gêneros mais significantes da família no Brasil pertencem à subfamília Annonoideae, sendo eles os gêneros *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia*. O gênero *Annona*, mais

importante da família devido aos frutos comestíveis e com potencial farmacológico (LOPES; SILVA, 2014), detém aproximadamente 244 espécies, sendo que 44 destas eram do gênero *Rollinia*, que foram reclassificados taxonomicamente. Algumas espécies desse gênero são utilizadas na medicina popular, no tratamento de uma variedade de doenças (Tabela 1) (BARBALHO et al., 2012).

Tabela 1. Espécies do gênero *Annona* utilizadas na medicina popular.

Espécie	Atividade biológica
<i>A. cherimolia</i>	Antiparasitária, antiprotozoária, tratamento de câncer, emética, imunossupressora, combate de náusea e vômito, erupção cutânea doenças da pele, feridas, infestações de vermes (sementes); antiespasmódica (raízes); antidepressiva, digestiva (folhas); cempreventiva (planta inteira).
<i>A. reticulata</i>	Adstringente (fruto); anti-diarreica (cascas); contra percevejos/piolhos (folhas, sementes, polpa); tratamento de câncer (folhas, sementes, cascas); cempreventiva (planta inteira); imunossupressora, contra infestações de vermes (sementes).
<i>A. muricata</i>	Antibacteriana, antidepressiva, antidiabética, digestiva, problemas reumatológicos (folhas); cempreventiva (planta inteira); doença hepática (polpa); antiparasitária, antiprotozoária, antiespasmódica (sementes, folhas); antimalárica, diurética, contra edemas, erupções cutâneas, cólicas (frutos); imunossupressora (raízes, folhas, sementes); emética (sementes).
<i>A. squamosa</i>	Abortiva, hemolítica, contra percevejos/piolhos, imunossupressora (sementes); antibacteriana, cempreventiva, anti-diarreica, anti-pneumocócica, contra doenças venéreas (planta inteira); princípio anti-HIV (frutos); tratamento de câncer (cascas); antidepressiva, purgativa (raízes); contra feridas, erupções cutâneas, doenças de pele, inchaço (folhas).
<i>A. senegalensis</i>	Abortiva (sementes); antiulcerativa, contra tripanossomíase, inflamação ocular (folhas); tratamento de câncer, cempreventiva, emética (planta inteira); anticonvulsivo, contra filariose, doenças venéreas (raízes, folhas); febrífuga, anti-pneumocócica, contra picada de cobra (cascas).

Fonte: adaptado de Pinto et al. (2005).

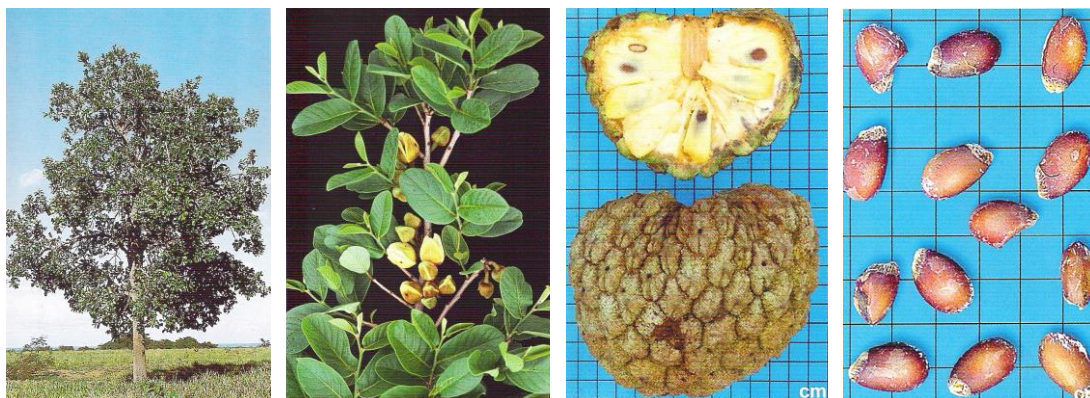
Dentre as diversas espécies do gênero *Annona* utilizadas na medicina popular, *Annona crassiflora* Mart. tem sido relatada em vários estudos pelo grande potencial químico-

farmacológico (PEREIRA et al., 2017).

1.3 *Annona crassiflora*

Annona crassiflora Mart. (Figura 4), é uma espécie nativa do Cerrado e popularmente conhecida como marolo, araticum-cortiça, araticum-de-boia, araticum-do-campo, cabeça de negro e pinha-do-cerrado (LORENZI, 2002; EGYDIO et al., 2013; SOARES et al, 2009). É uma árvore encontrada nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, Goiás, Bahia e Tocantins, e ocorre preferencialmente em terrenos arenosos. Os frutos do marolo são consumidos “in natura” pela população, em forma de suco, sorvete, geleia, doces, licores e recheios para bolos, porém as cascas são descartadas por não apresentarem importância econômica (LORENZI, 2002; SOARES et al., 2009; ROESLER et al, 2007). Com altura de 4–8 m e tronco de 20–30 de diâmetro possui casca grossa e áspera, com folhas alternas. As flores são isoladas com pétalas grossas e carnosas. O fruto é unido em bagas, com cerca de 15 cm de diâmetro, com polpa cheirosa e doce (SOARES et al, 2009). Produz anualmente grande quantidade de sementes. Floresce no período de dezembro-abril e os frutos amadurecem desde janeiro a fevereiro (LORENZI, 2002).

Figura 4. *Annona crassiflora* Mart. (A): folhas e flores (B), frutos (C) e sementes (D).



Fonte: Lorenzi (2002).

Na medicina tradicional, *Annona crassiflora* é utilizada para o tratamento de infecções do couro cabeludo, diarreia e como antitumoral (ROESLER et al, 2007; VILA VERDE; PAULA; CARNEIRO, 2003; RODRIGUES; CARVALHO, 2001), além da planta ser utilizada como inseticida, antimicrobiana, antirreumática e ao combate a piolhos, bem como no tratamento de feridas, doenças venéreas e picada de cobra (VILAR et al., 2008; SILVA;

RABELO; ENOQUE, 2015). As avaliações biológicas dos extratos das diferentes partes da planta, comprovam as atividades: antioxidante (JUSTINO et al., 2016; LUZIA; JORGE, 2013; ROESLER et al., 2007), antifúngica (SILVA et al., 2001), moluscicida (SANTOS; SANT'ANA, 2001), leishmanicida (MESQUITA et al., 2005), antibacteriana (TAKAHASHI, 2006), larvicida (OMENA, 2007), nematicida (MACHADO et al., 2015), inibidora de α -amilase (SOUZA et al., 2012), antimutagênica (VILAR et al., 2008) e antitumoral (MESQUITA et al., 2009; FORMAGIO et al., 2015).

Em *Annona crassiflora*, os metabólitos secundários já relatados são as acetogeninas (SANTOS; BOAVENTURA; OLIVEIRA, 1994), flavonóides (LAGE et al., 2014) e alcaloides benzilisoquinolínicos, aporfínicos, fenantrênicos, noraporfínicos e oxoaporfínicos (Tabela 2) (HOCQUIMILLER et al., 1982; EGYDIO et al., 2013; PEREIRA et al., 2017).

Tabela 2. Atividades biológicas de alguns metabólitos secundários relatados em *A. crassiflora*.

Metabólitos	Atividade biológica	Referências
cassiflorina ^a	Citotóxica (células A-549, MCF-7, HT-29, RPMI-7951, U-251)	(SANTOS et al., 1994) ^g
(-)-epicatequina ^b	Antimicrobiana (<i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i>)	(LAGE et al., 2014) ^d
anonaina ^c	Inibidora da proteína tirosina fosfatase CD45 Anti-depressiva Antimicrobiana (<i>Bacillus cereus</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>S. epidermidis</i>)	(MISKI et al., 1995) ^h (HASRAT et al., 1997) ^e (PAULO et al., 1992) ^h
anoretina ^c	Citotóxica (células RB, P-388, A-549 e HT-29)	(WU et al., 1993) ^d
asimilobina ^c	Anti-depressiva Antimicrobiana (<i>S. epidermidis</i> , <i>C. dubliniensis</i> e <i>K. rhizophila</i>)	(HASRAT et al., 1997) ^e (COSTA et al., 2013) ^f
estefalagina ^c	Inibitória da lipase pancreática	(PEREIRA et al., 2017) ^f
liriodenina ^c	Inibidora da tirosinase e redutora do teor de melanina em B16F10 Citotóxica (células KB, A-549, P-388 e L-1210) Inibora de acetilcolinesterase e anti- α -glucosidase Antimicrobiana (<i>S. epidermidis</i> e <i>C. dubliniensis</i>) Antiprotozoária (<i>L. donovani</i> e <i>F. falciparum</i>)	(CHU et al., 2015) ^j (WU et al., 1993) ^d (MOLLATAGHI et al., 2012) ^f (COSTA et al., 2013) ^f (CAMACHO et al., 2000) ^d
reticulina ^c	Antimicrobiana (<i>C. albicans</i> , <i>C. dubliniensis</i> e <i>C. parapsilosis</i>) Bloqueadora do receptor de dopamina Antiagregante plaquetária	(COSTA et al., 2013) ^f (BANNING et al., 1980) (CHEN et al., 2000) ⁱ
xilopina ^c	Atividade leishmanicida (<i>L. mexicana</i> e <i>L. panamensis</i>)	(MONTENEGRO et al., 2003) ^d
aterospermidina ^c	Citotóxica (células Hep G2, Hep 2,2,15) Anticâncer Atividade relaxante nas contrações uterinas de ratos induzidas por KCl Atividade relaxante em contrações rítmicas induzidas pela ocitocina na presença de Ca	(HSIEH et al., 2001) ^j (WIJERATNE et al., 1995) ⁱ (CORTES et al., 1990) ^f

^aAcetogenina; ^bFlavonoide; ^cAlcaloide; ^dFolhas; ^eFrutos; ^fCasca; ^gSementes; ^hCaule; ⁱTronco; ^jRaizes.

Fonte: autora.

1.4 BIOSSÍNTESE DOS ALCALOIDES ISOQUINOLÍNICOS

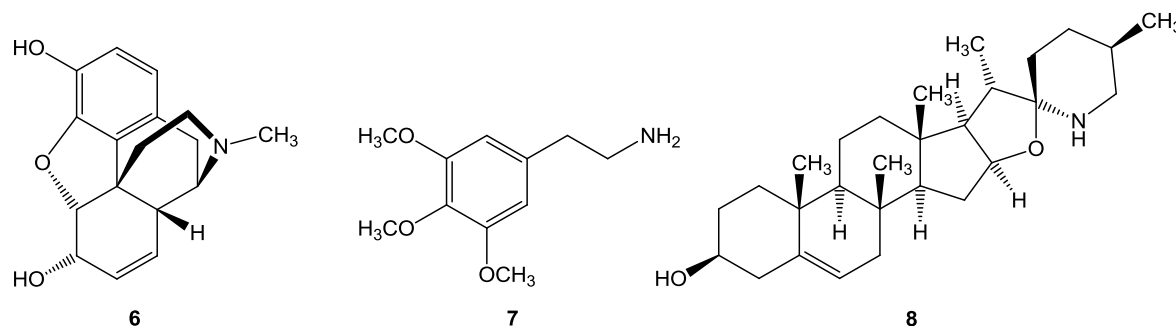
Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas, encontradas principalmente em plantas, bem como em microrganismos e animais em menores níveis (DEWICK, 2009). O termo alcaloide é derivado da palavra árabe *alquali*, nome comum dado a planta na qual o hidróxido de sódio foi obtido originalmente (HENRIQUES et al., 2007). Possuem átomos de nitrogênio, particularmente como aminas primárias, secundárias ou terciárias, conferindo

certo grau de basicidade ao metabólito, que pode variar de acordo com a estrutura e posição de outros grupos funcionais (DEWICK, 2009).

Os alcaloides podem ser classificados de três maneiras: pelas atividades biológicas e ecológicas, pela estrutura química ou pela via biossintética (ANISZEWSKI, 2007). Pelo enfoque estrutural eles podem ser classificados em verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides.

- ✓ Verdadeiros: são compostos heterocíclicos em que o átomo de nitrogênio foi advindo de um aminoácido, que são classificados de acordo com seu sistema anelar. São substâncias reativas, de sabor amargo, que geralmente formam sais insolúveis em água, como a morfina (**6**) (Figura 5).
- ✓ Protoalcaloides: são compostos em que o átomo de nitrogênio é derivado de um aminoácido, não pertencente a um sistema heterocíclico. Formam um número restrito de metabólitos, como a mescalina (**7**) (Figura 5) (ANISZEWSKI, 2007).
- ✓ Pseudoalcaloides: são compostos nitrogenados com ou sem anéis heterocíclicos, que não são derivados de aminoácidos, como por exemplo a solanidina (**8**) (Figura 5).

Figura 5. Alcaloide verdadeiro (**6**), protoalcaloide (**7**) e pseudoalcaloide (**8**).



Fonte: autora.

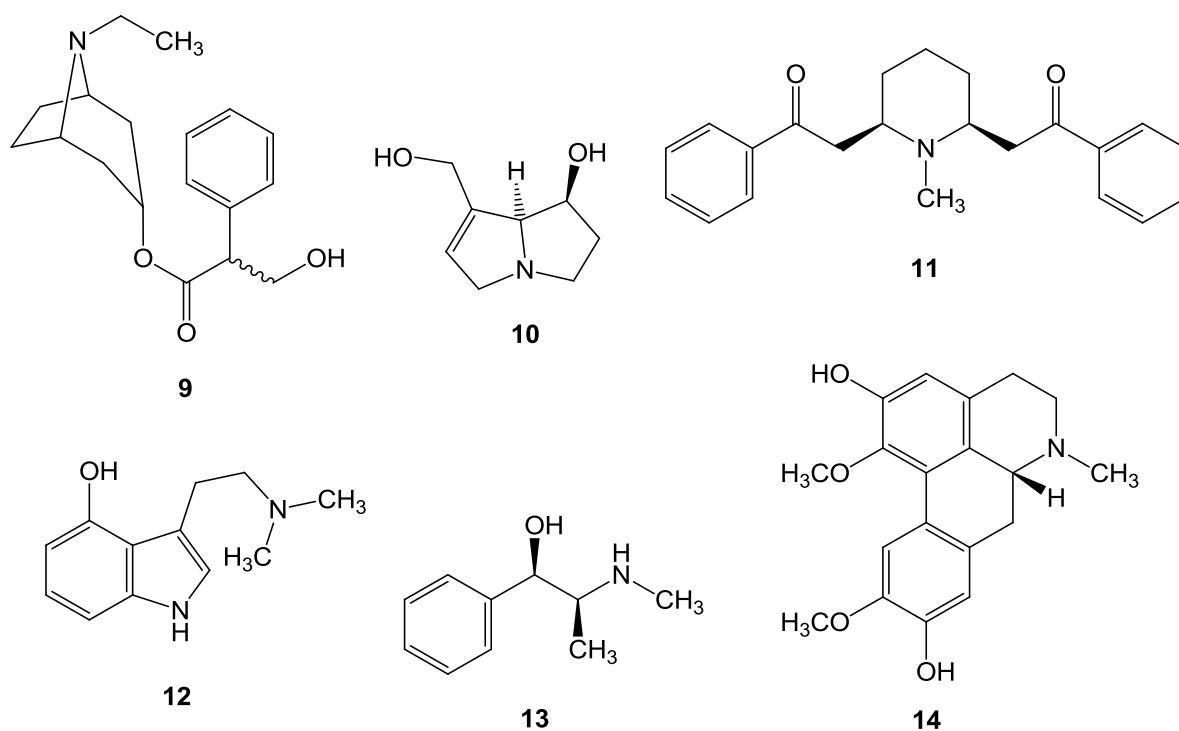
Os alcaloides também podem ser classificados de acordo como o aminoácido precursor na biossíntese (Tabela 3), tal como ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico, histidina entre outros (DEWICK, 2009).

Tabela 3. Alcaloides e os precursores biossintéticos.

Classe	Aminoácido precursor	Exemplos ^a
Tropânicos	Ornitina	atropina (9)
Pirrolidínicos	Ornitina	retronescina (10)
Piperidínicos	Lisina	lobelanina (11)
Indólicos	Triptofano	psilocina (12)
Feniletilaminas	Fenilalamina	efedrina (13)
Aporfinicos	Tirosina	boldina (14)
Protoberberinas	Histidina	berberina (4)

^aEstruturas na Figura 6.

Fonte: adaptado de Henriques et al. (2007).

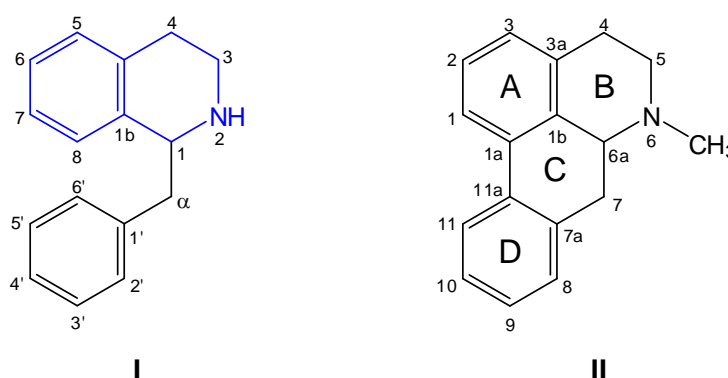
Figura 6. Alcaloides cujos precursores biossintéticos são aminoácidos (Tabela 3).

Fonte: autora.

Dentro desse contexto, *Annona crassiflora* merece atenção por apresentar alcaloides aporfínicos, cujo precursor biossintético é o núcleo benziltetrahydroisoquinolina (azul) (Figura 7-I) (DEWICK, 2009). Estes compostos integram um grupo com mais de 500 compostos isolados e identificados em um vasto número de espécies de diferentes famílias de plantas. São bases tetracíclicas constituídas por quatro anéis (A, B, C e D), sendo dois aromáticos (A e D), conectados pelo anel C e um heterociclo nitrogenado B (Figura 7-II). O

átomo de nitrogênio pode ser secundário e o alcaloide é chamado de noraporfínico, terciário ou quaternário (sal de amônio quaternário), sendo os substituintes metil, acetil ou formil. Dentro deste grupo também foi relatada a presença de *N*-óxidos, além de metabólitos com substituintes como hidroxila, metoxila e o grupo metilenodioxi, que geralmente ocupa as posições 1 e 2, do anel aporfínico. Esse núcleo também apresenta atividade óptica, uma vez que o C-6a é um centro estereogênico, tornando a polarimetria uma ferramenta importante para a identificação destes compostos (STÉVIGNY; BAILLY; LECLERCQ, 2005).

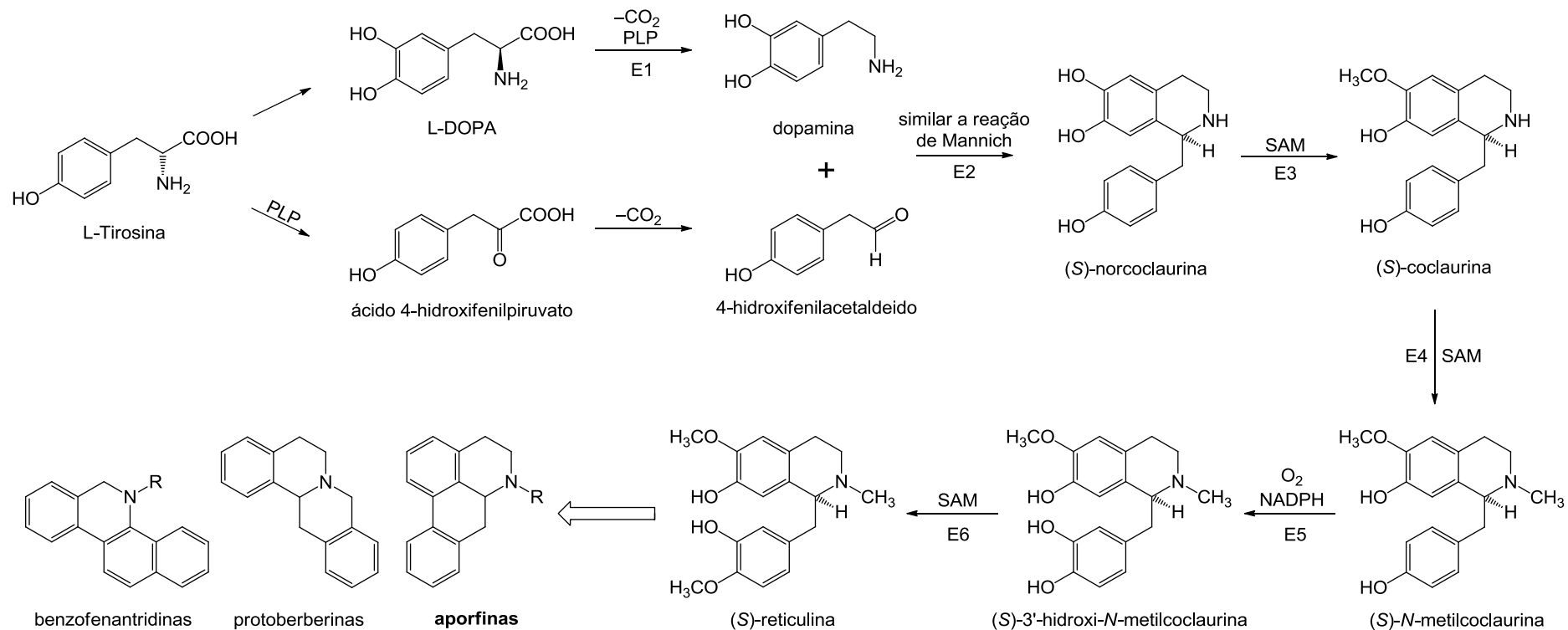
Figura 7. Precursor (I) e núcleo central dos alcaloides aporfínicos (II).



Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

A biossíntese dos alcaloides aporfínicos (benziltetraidroisoquinolínicos, benzilisoquinolínicos e isoquinolínicos) tem início a partir de duas moléculas de L-tirosina (Figura 8). Uma delas sofre oxidação seguida de descarboxilação (E1), para se transformar em dopamina, e a outra perde o grupo $-NH_2$ por uma reação de transaminação para formar o ácido 4-hidroxifenilpiruvato, que posteriormente sofre descarboxilação para formar o 4-hidroxifenilacetaldeído. A condensação entre a dopamina e o 4-hidroxifenilacetaldeído é mediada pela enzima norcoclaurina sintase (E2), através de uma reação semelhante à de Mannich, para formação do enantiômero (*S*)-norcoclaurina. Em seguida, reações de *O*-metilação na (*S*)-norcoclaurina, mediadas por enzimas (E3 e E4) e o cofator (*S*)-adenosilmetionina (SAM), dão origem a (*S*)-coclaurina e a (*S*)-*N*-metilcoclaurina. Na sequência, uma oxidação (E5) seguida de uma metilação (E6) leva ao intermediário (*S*)-reticulina, precursor das aporfinas, protoberberinas e benzofenantridinas (DEWICK, 2009; STÉVIGNY; BAILLY; LECLERCQ, 2005).

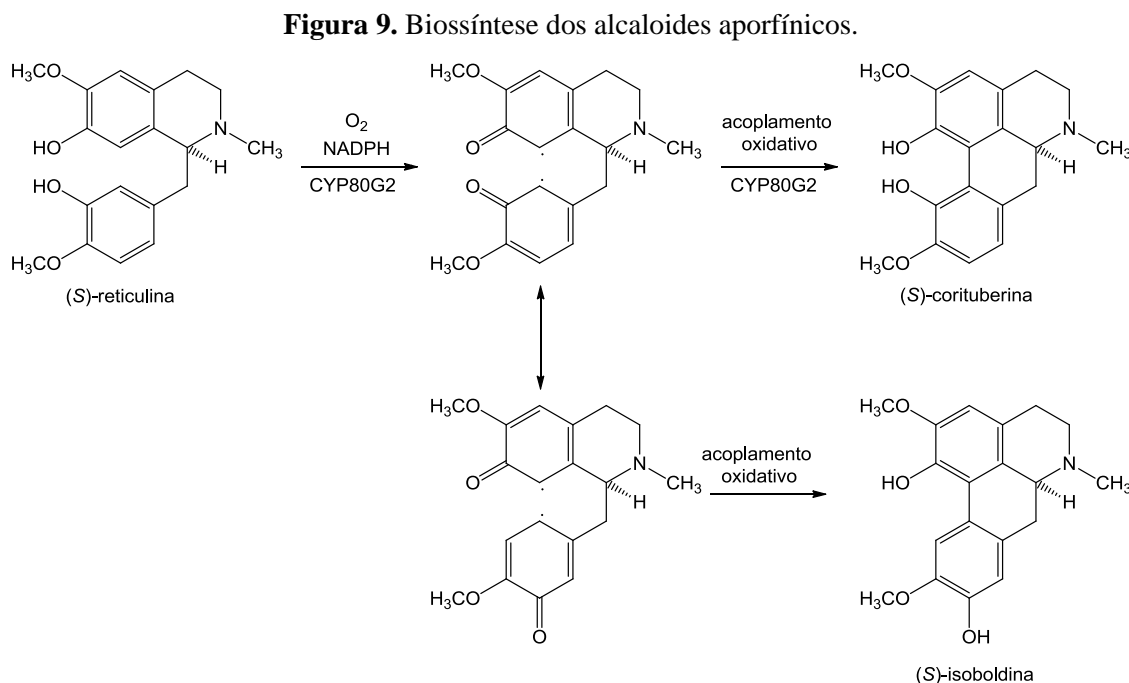
Figura 8. Biossíntese da (*S*)-reticulina, precursora do núcleo aporfínico.



- E1: aminoácido descarboxilase aromática (DOPA descarboxilase)
 E2: norcoclaurina sintase
 E3: norcoclaurina 6-*O*-metiltransferase
 E4: (*R,S*)-coclaurina *N*-metiltransferase
 E5: (*S*)-*N*-metilcoclaurina 3'-hidroxilase
 E6: (*R,S*)-3'-hidroxi-*N*-metilcoclaurina 4'-*O*-metiltransferase
 PLP: piridoxal 5'-fosfatase coenzima

Fonte: adaptado de Dewick (2009).

Os alcaloides aporfínicos são biossintetizados em plantas por meio de um acoplamento oxidativo intramolecular na (*S*)-reticulina, através de um mecanismo radicalar entre as bisdienonas (Figura 9) (STÉVIGNY; BAILLY, LECLERCQ, 2005).



Fonte: adaptado de Dewick (2009).

1.5 DOENÇA DE ALZHEIMER E OS ALCALOIDES INIBIDORES DA ACHE

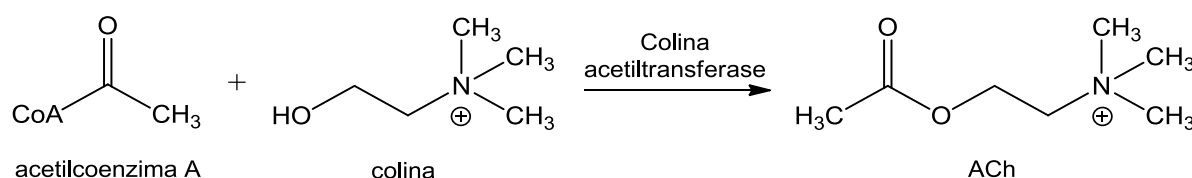
A doença de Alzheimer (DA) é uma patologia neurodegenerativa progressiva, caracterizada pela perda de memória e comprometimento das funções cognitivas e emocionais, prejudicando sobre tudo idosos (60 a 70% dos casos), sendo considerada a forma mais comum de demência (ADAMS; GMUNDER; HAMBURGER, 2007; DANUELLO et al., 2012). Estima-se que a DA afeta cerca de 50 milhões de indivíduos, das quais 60% vivem em países de renda baixa ou média, e que a cada ano surgem cerca de 10 milhões de novos casos. Devido ao aumento da expectativa de vida, é esperado que até 2030 esta demência acometa cerca de 82 milhões de pessoas, (WHO, 2017).

As características fisiopatológicas comuns da DA são a deposição de placas amiloides, formação de emaranhados neurofibrilares, processos inflamatórios e deficiência de neurotransmissores, no sistema nervoso central (DALL'ACQUA, 2013), que se revelam sobretudo na desorientação, demência e variação na personalidade e nas interações sociais dos indivíduos. Ainda não há cura para a DA, somente alternativas terapêuticas baseadas no

conhecimento de sua fisiopatologia que levam a melhora sintomática e podem evitar a sua progressão (ADAMS; GMUNDER; HAMBURGER, 2007).

A DA é multifatorial e de origem complexa, sendo que existem diferentes possibilidades de intervenção terapêutica. De acordo com a hipótese colinérgica, a diminuição dos níveis do neurotransmissor acetilcolina (ACh) no córtex cerebral, é responsável pela deficiência de memória (ADSERSEN et al., 2007; PAGLIOSA et al., 2010). A ACh é biossintetizada nos neurônios pela ação da enzima colina-acetiltransferase, a partir da acetilcoenzima A (acetil-CoA) e colina (Figura 10) (VIEGAS JUNIOR et al., 2004; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

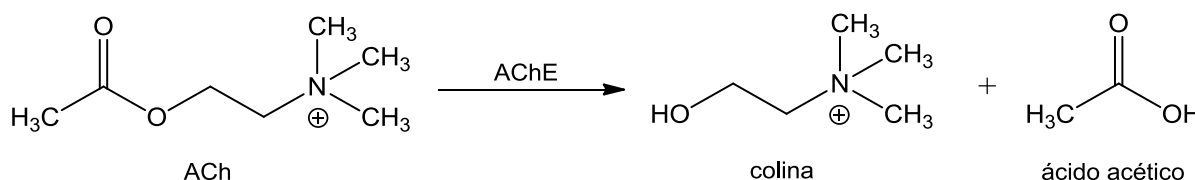
Figura 10. Síntese da ACh.



Fonte: Araújo; Santos; Gonsalves (2016).

A acetilcolinesterase (AChE) é a enzima responsável pela hidrólise da acetilcolina (Figura 11), regulando seus níveis, ao passo que a butirilcolinesterase (BChE), hidrolisa tanto a ACh como a butirilcolina (BuCh) (ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016; SILVA et al., 2010). Assim, a inibição destas enzimas tem sido a alternativa terapêutica mais utilizada no tratamento da DA (ADSERSEN et al., 2007; IRANSHAHY; QUINN; IRANSHAHI, 2014).

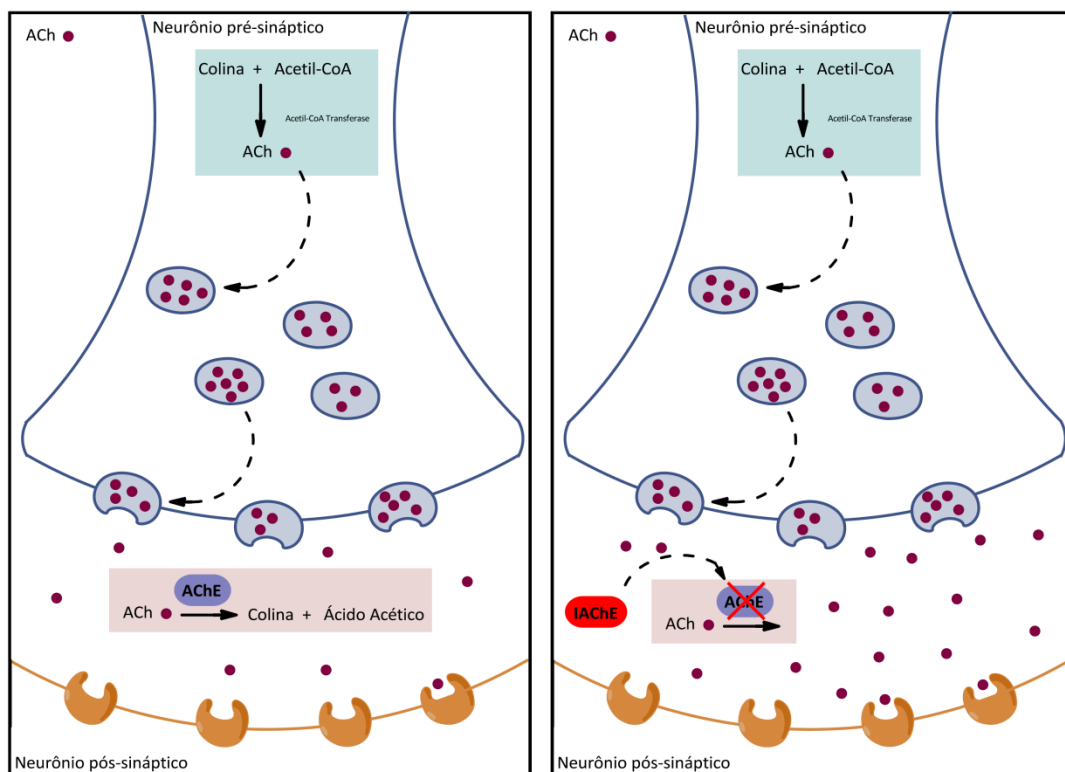
Figura 11. Hidrólise da ACh.



Fonte: Adaptado de Araújo, Santos e Gonsalves (2016).

Fármacos que inibem a AChE são designados como anticolinesterásicos, e tem como função retardar a degradação da ACh, aumentando seus níveis nas fendas sinápticas e assim prolongar sua ação (Figura 12).

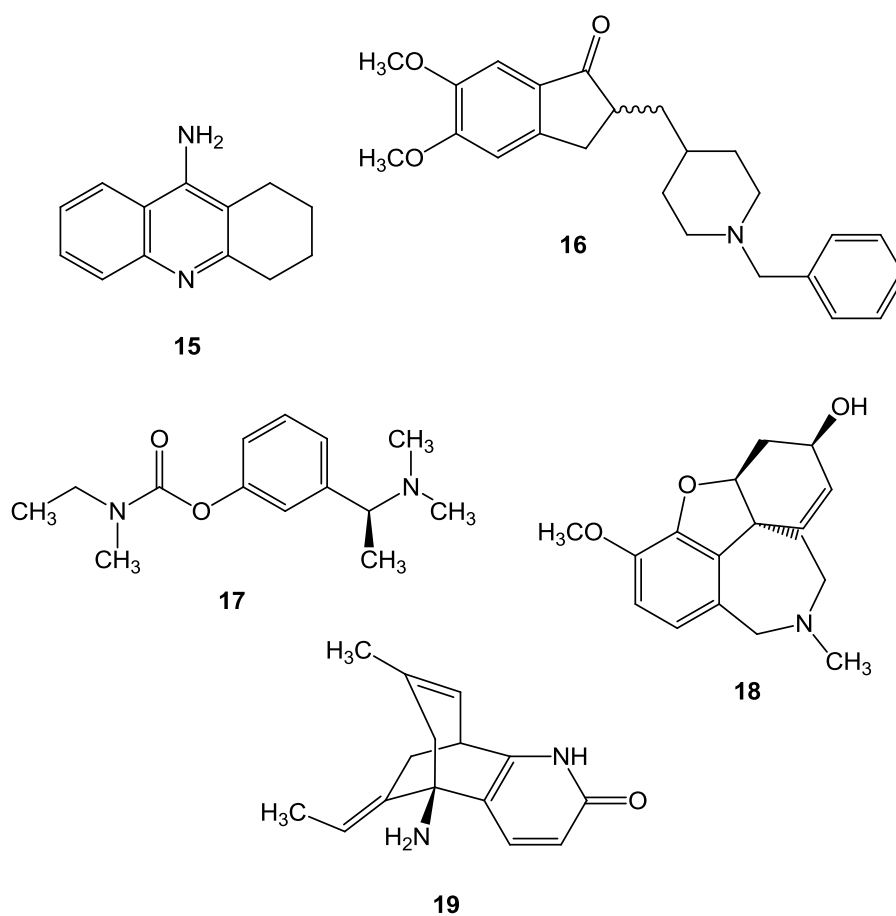
Figura 12. Hipótese colinérgica e a atuação dos inibidores da AChE.



Fonte: Araújo, Santos e Gonsalves (2016).

O primeiro medicamento sintético anticolinesterásico aprovado pelo FDA (*Food and Drug Administration*) no tratamento da DA, foi a tacrina (**15**) em 1993, seguido do donepezil (**16**), rivastigmina (**17**) e galantamina (**18**), aprovados nos anos seguintes (PARK, 2010; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016), ademais a (-)-huperzina A (**19**) (Figura 13), tem sido considerada promissora e utilizada clinicamente para melhorar a cognição e memória, sendo comercializada como um suplemento alimentar nos EUA (DAMAR et al., 2017).

Figura 13. Fármacos inibidores da AChE aprovados pelo FDA para o tratamento da DA.



Fonte: autora.

Grande parte dos inibidores da AChE apresentam baixa biodisponibilidade, diversos efeitos colaterais além de atuar somente no tratamento sintomático, não impedindo ou retardando a progressão da doença (Tabela 4) (PARK, 2010; ARAÚJO; SANTOS; GONSALVES, 2016).

Tabela 4. Inibidores da AChE aprovados pelo FDA e seus efeitos colaterais.

Nome	Marca	Efeitos colaterais
Tacrina (15)	Cognex [®]	Hepatotoxicidade, náusea, indigestão, vômito, diarreia, dor abdominal e erupção cutânea.
Donepezil (16)	Aricept [®]	Dor de cabeça, dor generalizada, fadiga, tontura, náuseas, vômitos, diarreia, anorexia, perda de peso, câibras musculares e insônia.
Rivastigmina (17)	Exelon [®]	Perda de peso, anorexia e tontura.
Galantamina (18)	Razadine [®]	Náusea, vômitos, diarreia, anorexia, perda de peso e doenças vasculares (ataque cardíaco e derrame cerebral).

Fonte: adaptado de Park (2010).

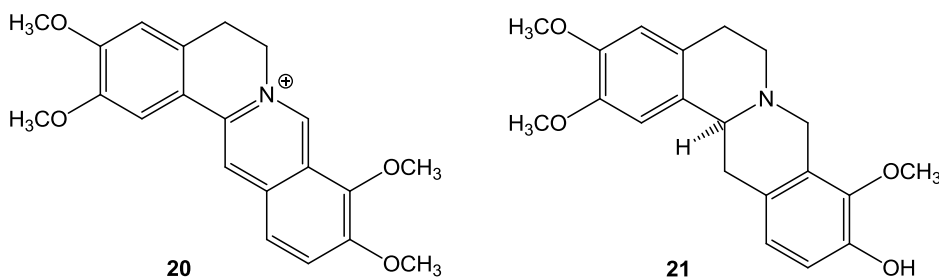
Dentre os fármacos aprovados pelo FDA, para o alívio dos sintomas da DA, alguns são de origem natural, como a galantamina (**18**), isolada de algumas espécies da família Amaryllidaceae como a *Narcissus* L. (LOPEZ et al., 2002); a rivastigmina, resultado da modificação estrutural da fisostigmina, que é um PN isolado das raízes de *Luffa operculata* (FEITOSA et al., 2011) e a huperzina A, isolada de *Huperzia serrata* (VIEGAS JUNIOR et al., 2004; DAMAR et al., 2017).

Existem vários relatos de inibidores de AChE e BChE isolados de fontes naturais, no entanto estes compostos foram pouco eficientes nas fases pré-clínicas, principalmente na avaliação farmacocinética, que avalia a capacidade do fármaco em atravessar a barreira hemato-encefálica para alcançar os alvos biológicos presentes no cérebro. Das diferentes classes de compostos, os alcaloides são candidatos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos inibidores de AChE, por apresentarem nas suas estruturas o elemento nitrogênio, que pode ser um ponto importante de interação dos antagonistas de AChE, visto que o substrato natural (ACh) também apresenta o mesmo elemento, porém carregado positivamente (KONRATH et al., 2013).

Alcaloides de diferentes classes foram relatados como inibidores da AChE como os isoquinolínicos, esteroidais, quinolizidínicos, indólicos e os aporfínicos (KONRATH et al., 2013; DALL'ACQUA, 2013; KAPADIA; HARDING, 2016). Estudo com alcaloides protoberberínicos (Figura 14) isolados de tubérculos de *Stephania venosa*, como a berberina (**4**) (IC₅₀ 0,58 µM) e palmartina (**20**) (IC₅₀ 0,26 µM), que contêm nitrogênio quaternário, apresentaram atividade bastante promissora, quando comparados com o controle positivo galantamina (**18**) (IC₅₀ 0,59 µM), enquanto que a coridamina (**21**) (IC₅₀ 100,09 µM), que

apresenta nitrogênio terciário foi considerada inativa (INGKANINAN et al., 2006). A berberina (**4**) se destacou por apresentar atividade sobre as enzimas humanas (AChE e BChE), de camundongo e de ratos, exibindo aproximadamente a mesma potência, além de ter efeito sobre a monoaminoxidase, que também é uma enzima envolvida na patologia da DA (KONRATH et al., 2013).

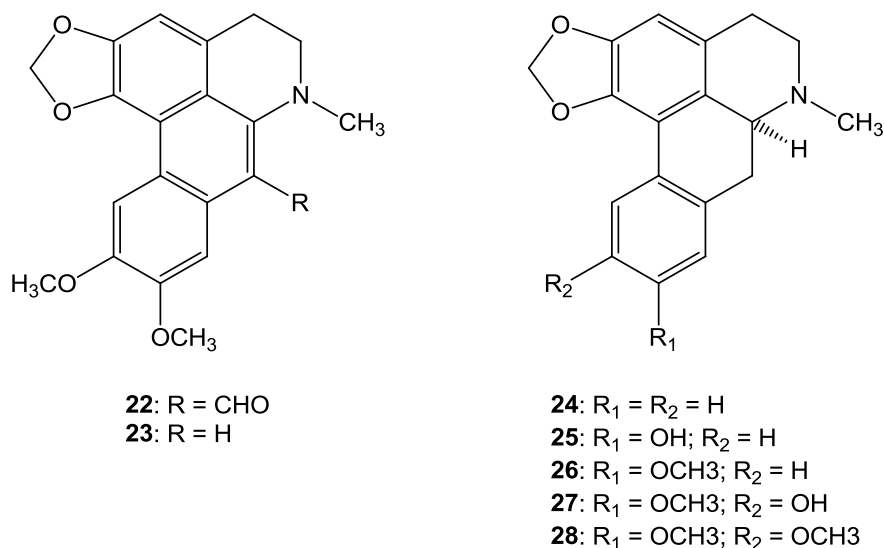
Figura 14. Alcaloides palmatina (**20**) e coridalmina (**21**).



Fonte: autora.

Alcaloides aporfínicos, isolados das raízes de *Stephania epigaea*, como a epiganina B (**22**) (IC_{50} 4,36 μ M) e dehidrodicentrina (**23**) (IC_{50} 2,98 μ M), apresentaram resultados bastante promissores, enquanto a romerina (**24**) (IC_{50} 8,32 μ M), a romelina (**25**) (IC_{50} 13,90 μ M), a *N*-metilcalinina (**26**) (IC_{50} 20,40 μ M), a fanostenina (**27**) (IC_{50} 15,50 μ M) e a dicentrina (**28**) (IC_{50} 6,60 μ M), apresentaram resultados menos expressivos, quando comparados com a tacrina (**15**) (IC_{50} 0,25 μ M), utilizada como padrão positivo (Figura 15) (DONG et al., 2015).

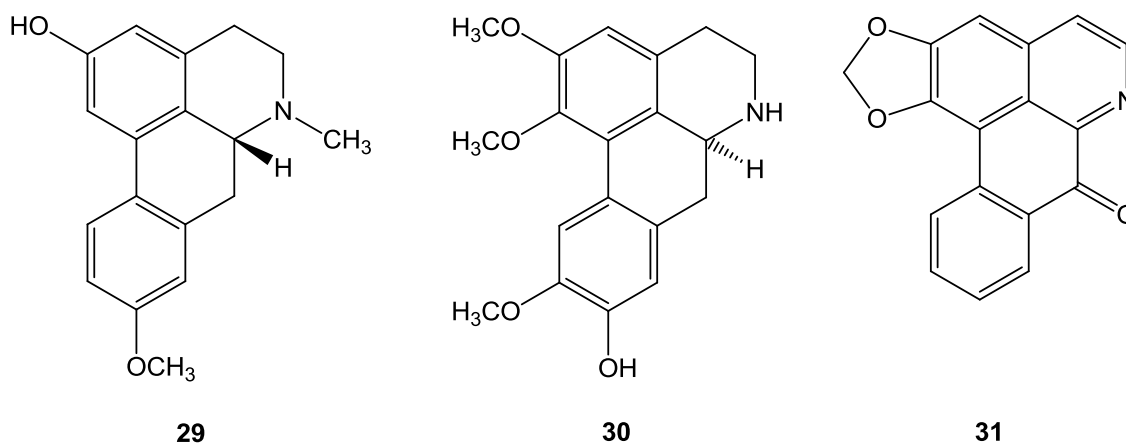
Figura 15. Alcaloides aporfínicos isolados de *Stephania epigaea*.



Fonte: autora.

Um estudo realizado com as cascas de *Beilschmiedia alloiophylla*, relatou o isolamento e a avaliação da atividade inibidora da AChE para os alcaloides aporfínicos: 2-hidroxi-9-metoxi-oxiporfina (**29**) (IC_{50} 2,0 μ M), laurotetanina (**30**) (IC_{50} 3,2 μ M) e a liriodenina (**31**) (IC_{50} 3,5 μ M) (Figura 16). Estes resultados são da mesma ordem que o padrão positivo huperzina A (**19**) (IC_{50} 1,8 μ M), utilizado nos ensaios biológicos, e mostram a importância dessa classe de compostos como inibidores de AChE (MOLLATAGHI et al., 2012).

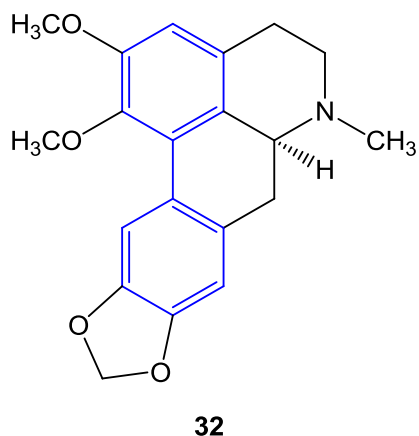
Figura 16. Alcaloides isolados de *Beilschmiedia alloiophylla*.



Fonte: autora.

Outro estudo biológico para a avaliação da atividade inibidora da AChE, realizado com o alcaloide nantetina (**32**) (Figura 17), isolado das folhas de *U. stipitata* e posteriormente sintetizado, mostrou que o sistema rígido bifenílico (azul) é importante para a atividade anticolinesterásica (PRADO-PRADO et al., 2011). Este dado é importante já que vários alcaloides aporfínicos possuem essa subunidade internalizada nas suas estruturas, o que pode vir a ser um ponto de partida para estudos de modelagem molecular para entender como estes compostos se ligam no sítio catalítico da enzima (PECIC, MCANUFF, HARDING, 2011).

Figura 17. Estrutura química da nantenina, isolada das folhas de *U. stipitata*.



Fonte: autora.

Desse modo, fica evidente que os inibidores da AChE e BChE ainda são a melhor alternativa de tratamento para pacientes portadores da DA. Assim, alcaloides aporfínicos são uma importante classe de compostos que podem ser utilizados como modelos para o planejamento e desenvolvimento de novos fármacos inibidores de AChE. Dentro deste contexto as cascas dos frutos de *Annona crassiflora* chamou nossa atenção devido a presença de uma série de alcaloides aporfínicos. Assim, foi proposto o estudo químico direcionado para o isolamento dessa classe de metabólitos para posterior avaliação da atividade inibidora de AChE.

2 OBJETIVO GERAL

Isolar os alcaloides presentes na casca dos frutos de *Annona crassiflora*, avaliar a atividade inibidora da acetilcolinesterase e realizar o ensaio *in silico* (docking molecular).

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coleta, secagem e preparo do extrato etanólico a partir das cascas dos frutos de *Annona crassiflora*;
- Extração líquido-líquido do extrato etanólico com solventes de polaridade crescente (hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-butanol, respectivamente);
- Estudo químico da fração alcaloídica (CH₂Cl₂) visando o isolamento de novos metabólitos;
- Avaliação da atividade anticolinesterásica dos compostos isolados.
- Ensaio *in silico* (docking molecular).

3 MATERIAIS

3.1 SOLVENTES

- Metanol (MeOH): Synth P.A. ACS
- Metanol (MeOH): Sigma-Aldrich HPLC
- Hexano: Vetec P.A.
- Acetato de etila: Vetec P.A.
- Cloreto de metileno (CH_2Cl_2): Vetec P.A.ACS
- Hidróxido de amônio (NH_4OH): Synth P.A. ACS
- Solventes de grau analítico (P.A.), purificados por destilação fracionada: etanol, hexano, acetato de etila.
- Ácido acético glacial (CH_3COOH): Synth P.A. ACS
- Ácido hexacloroplatínico IV: Vetec P.A.
- Iodeto de potássio: Vetec P.A.
- *n*-butanol: Vetec P.A.

3.2 CROMATOGRAFIA

3.2.1 Cromatografia em camada delgada

Os experimentos de cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) foram realizados utilizando placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV_{254}) 0,20 mm de espessura Macherey-Nagel.

3.2.2 Preparo do revelador de iodo-cloroplatinato

Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m), de ácido hexacloroplatinico (IV)($\text{H}_2(\text{PtCl}_6).6\text{H}_2\text{O}$).

Solução B: Solução aquosa a 10% (m/m), de iodeto de potássio (KI).

Solução spray: Mistura da solução A, solução B e H_2O (1:9:10).

3.2.3 Preparo do revelador Dragendorff

Solução A: 0,85 g de nitrato de bismuto ($\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$) em solução de 10,0 mL de ácido acético glacial ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$) e 40,0 mL de água, sob aquecimento.

Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio (KI) em 30,0 mL de água de destilada.

Solução estoque: Mistura da solução A e solução B (1:1).

Reagente: Solução estoque, ácido acético e água (1:2:10).

3.2.4 Cromatografia em coluna

Para as separações por cromatografia em coluna (CC) aberta foram utilizadas as seguintes fases estacionárias (FE):

- Sílica gel (SiO_2) para cromatografia (63–200 μm , diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich;
- Sílica gel (SiO_2) para cromatografia *flash* (40–63 μm , diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich;
- C18 sílica gel, premium grade (40–63 μm , 230–400 mesh, diâmetro de poro 60 Å) Sorbent Technologies.

3.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência

Para as análises de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), foi utilizado um cromatógrafo do laboratório do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQ-UFU), campus de Santa Mônica:

- Cromatógrafo à líquido de alta eficiência Shimadzu[®], modelo LC-6AD, composto pelos seguintes módulos: bombas LC-6AD, degaseificador DGU-20A_{5R}, forno CTO-20A, coletor de frações FRC-10A, autoinjeter SIL-10AF e detectores de arranjo de diodo (DAD) SPD-M20A e evaporativo por espalhamento de luz (ELSD – *evaporative light scattering detector*) LT II, controlados pelo software LC Solutions.

Para o desenvolvimento dos métodos de separação foram utilizadas as colunas:

- Coluna analítica Phenomenex[®] Lunna C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm) protegida pela respectiva pré-coluna. Como fase móvel (FM), foi utilizado um gradiente constituído de água com ácido acético (0,1%) (A) e metanol (B). O gradiente consistiu de 5–100% de B (30 min), e em seguida foi mantido 100% de B (10 min). O fluxo utilizado foi de 1,0 mL/min e o volume injetado foi de 50 μL (C = 1,0 mg/mL, utilizando MeOH como solvente). As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 μm.
- Coluna semipreparativa Phenomenex[®] Luna C18 (250,0 × 10,0 mm, 10 μm). Como fase móvel (FM), foram utilizados dois gradientes constituídos de água com ácido acético (0,1%) (A) e metanol (B). O primeiro gradiente consistiu de 5–100% de B (30 min), e em seguida foi mantido 100% de B (10 min). O segundo gradiente consistiu de 65–100% de B (40 min), e em seguida foi mantido 100% de B (10 min). O fluxo utilizado foi de 2,0 mL/min e o volume injetado foi de 50 μL (C = 10,0 mg/mL (primeiro gradiente) e 20,0 mg/mL (segundo gradiente), utilizando MeOH como solvente). As amostras foram previamente filtradas em membrana de politetrafluoretileno (PTFE) 0,45 μm.

3.2.6 Cromatografia à gás

Cromatógrafo à gás acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu QP2010, com potencial ionizante de 70 eV, com as seguintes condições: gás transportador hélio a fluxo constante de 1,0 mL/min; coluna SPB-5 (30,0 m × 0,25 mm d.i.) capilar de sílica fundida com 5% fenil e 95% dimetilpolisiloxano como a fase estacionária; temperatura do injetor ajustada a 220 °C, com uma proporção de divisão de 1:20; temperatura do forno inicialmente mantida a 60 °C e depois aumentada a uma velocidade de 6 °C/min a 280 °C, mantida durante 24 min; tempo de execução 60 min. O intervalo de massa escaneada foi de 40–650 amu.

3.3 ANÁLISES ESPECTROMÉTRICAS E ESPECTROSCÓPICAS

As análises espectroscópicas e espectrométricas foram realizadas utilizando os seguintes equipamentos:

- Espectrômetro de massas de alta resolução QTOF, marca Agilent®, modelo 6520 B, com fonte de ionização por electrospray no Laboratório de Nanobiotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia (IGB-UFU). As amostras foram solubilizadas em metanol/água (4:1) e introduzidas utilizando seringa (100,0 µL), adaptada a uma bomba de infusão direta com fluxo de 200,0 µL/h. A ionização foi realizada com gás nebulizante a 58 psi, o gás secante aquecido a 200 °C com fluxo de 8,0 L/min e no capilar foi aplicado 4,5 KV. Os dados foram adquiridos no modo positivo.

As massas obtidas do espectrômetro de massas em alta resolução foram acuradas e comparadas com aquelas obtidas do programa ChemDraw Ultra 12.0 (massas exatas), utilizadas para calcular o erros em ppm. Para isso foi utilizada a equação abaixo:

$$\text{Erro}_{(\text{ppm})} = \left[\frac{\text{massa experimental} - \text{massa exata}}{\text{massa exata}} \right] \times 10^6$$

- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker Ascend™ 400 Avance III HD (9,2 Tesla) do laboratório multiusuário do Instituto de Química da UFU, operando em frequências de 400 MHz para os núcleos de hidrogênio e 100 MHz para o carbono. Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando TMS como padrão.
- Espectrômetro de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker Ascend™ 600 Avance III HD (14,1 Tesla) do laboratório II do Instituto de Química da Unesp, Araraquara, operando em frequências de 600 MHz para os núcleos de hidrogênio e 150 MHz para o carbono. Os experimentos foram realizados a 25 °C, utilizando TMS como padrão.

3.4 EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

O Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais (NuPPeN) – IQ/UFU, também conta com alguns equipamentos básicos (Tabela 5).

Tabela 5. Equipamentos disponíveis para realização desse trabalho.

Equipamento	Marca	Modelo
Balança analítica	Shimadzu	AUW220D
Rotaevaporador	Ika	RV 10
Liofilizador	Terroni	LS3000
Linha de secagem de amostras a pressão reduzida	Bomba Edwards	RV5

Fonte: autora.

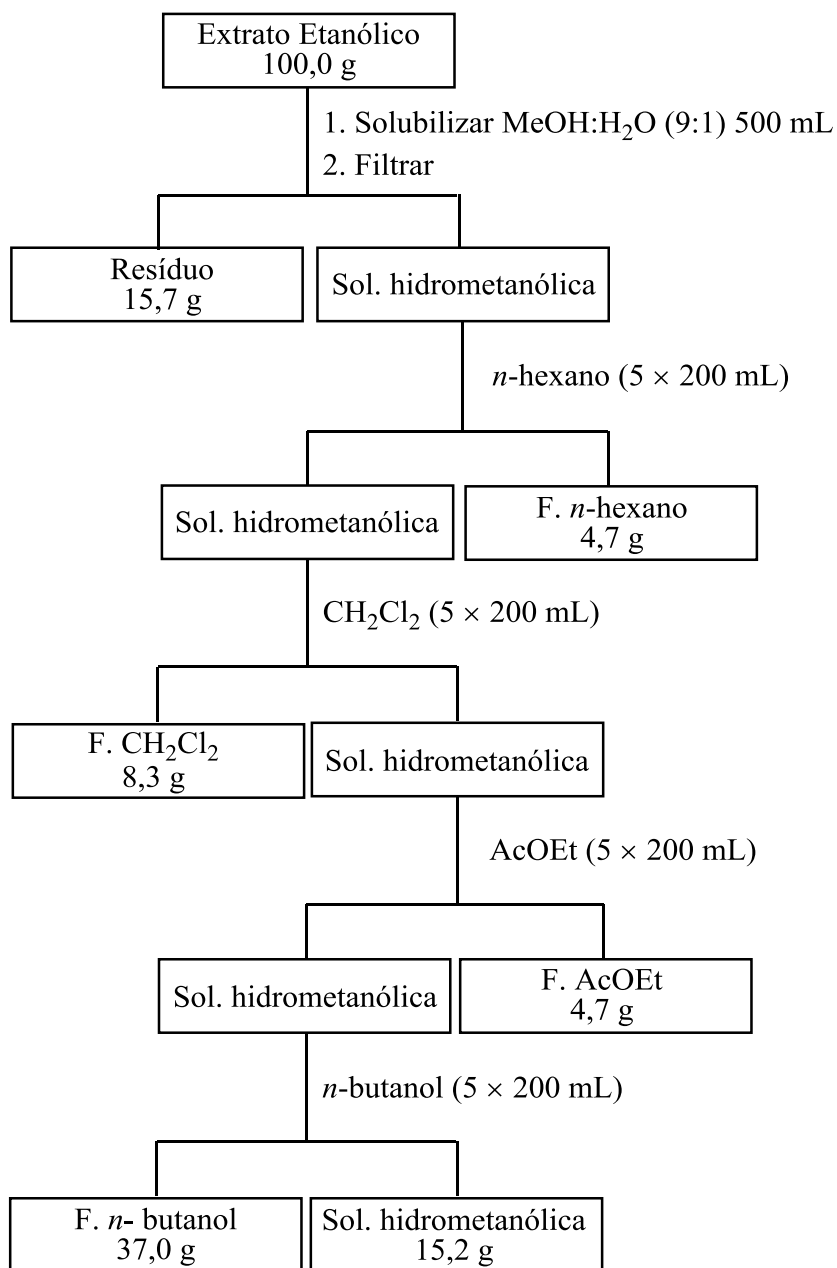
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 COLETA, PREPARO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO

O extrato etanólico das cascas dos frutos de *Annona crassiflora* foi obtido a partir do material vegetal coletado na região do norte de Minas Gerais em março de 2015, sendo que uma exsicata (SP 384 109) foi depositada no Herbário Uberlandense (HUFU). As cascas foram secas (7,0 Kg) em estufa com circulação de ar (35 °C) por 3 dias, trituradas em moinho de facas e submetidas à extração com etanol (6 × 18,0 L). O extrato etanólico foi monitorado por CCD para verificar a extração total dos alcaloides.

4.2 FRACIONAMENTO DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DO FRUTO DE *A. crassiflora*

Parte do extrato etanólico (100,0 g) dos frutos de *A. crassiflora* foi solubilizado em 500,0 mL de solução metanol/água (9:1), filtrado e em seguida submetido à extração líquido-líquido com hexano (5 × 200 mL), diclorometano (5 × 200 mL), acetato de etila (5 × 200 mL) e *n*-butanol (5 × 200 mL), respectivamente (Figura 18) (PEREIRA et al., 2017). Os solventes foram removidos por destilação em evaporador rotativo sob pressão reduzida, utilizando banho de aquecimento a 40 °C. A fração hidrometanólica foi submetida à destilação e em seguida liofilizada para remoção da água remanescente. As frações obtidas foram analisadas por CCD para verificar a presença dos alcaloides e avaliar a eficiência do procedimento. As placas foram reveladas com o iodocloroplatinato (IClPt) e Dragendorff.

Figura 18. Extração líquido-líquido do extrato etanólico.

Fonte: autora.

4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os ensaios para determinar a atividade anticolinesterásica foram realizados no Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular do Instituto de Genética e Bioquímica da UFU em Uberlândia aos cuidados do Prof. Dr. Foued Salmen Espindola. A metodologia utilizada foi adaptada a partir dos ensaios realizados por Marston et al. (2002), Ellman et al. (1961) e Rhee et al. (2001).

4.3.1 Atividade anticolinesterásica

As atividades inibitórias de AChE e BChE do extrato etanólico, da fração CH_2Cl_2 e alcalóide **I** foram avaliadas usando o método de microplaca de 96 poços (MARSTON et al., 2002; ELLMAN et al., 1961; RHEE et al., 2001). Neste método, as enzimas hidrolisam os substratos acetiltiocolina ou butiriltiocolina, para produzir tiocolina que reage com 5,5-ditiobis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB), para produzir 2-nitrobenzoato-5-mercaptopiocolina e 5-tio-2-nitrobenzoato, que podem ser detectados a 405 nm. Para os experimentos, 25 μL de solução aquosa de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina (3 mM), 125 μL de DTNB (3 mM) em tampão C, 50 μL de tampão B e 25 μL da amostra diluída em tampão A foram adicionados a microplaca de 96 poços, para dar concentrações de iodeto de acetiltiocolina ou iodeto de butiriltiocolina variando de 3,0 a 300 $\mu\text{g/mL}$ para o composto puro e 30 a 2000 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato etanólico e a fração CH_2Cl_2 . A seguir, foram adicionados 25 μL de solução de enzima (AChE ou BChE) de 0,2 U/mL e a absorbância foi imediatamente medida a 405 nm a cada 30 s, por 20 min (a temperatura foi mantida a 30 °C). Qualquer aumento na absorbância devido à hidrólise espontânea do substrato (ou aos cromóforos presentes nas amostras) que pode ter ocorrido antes da leitura das absorbâncias, foi corrigido subtraindo-se a taxa de reação medida antes do início do experimento (isto é, antes da leitura a cada 30s por 20 min) a partir dos valores obtidos após o início do experimento. A percentagem de inibição foi calculada em comparação com um branco (MeOH a 10% em tampão A) e o controle positivo utilizado foi a galantamina, no mesmo intervalo de concentração para compostos puros. Foram utilizados os seguintes tampões: tampão A: Tris-HCl 50 mM (pH 8); tampão B: Tris-HCl 50 mM (pH 8) contendo fração de albumina de soro bovino a 0,1%; tampão C: Tris-HCl 50 mM (pH 8) contendo NaCl 0,10 M e $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 20 mM. Todos os reagentes foram adquiridos da Sigma-Aldrich.

4.4 ESTUDO *IN SILICO*

Os estudos *in silico* para prever as interações entre os compostos e os alvos biológicos, foram realizados no Laboratório de Biofísica Teórica do Instituto de Ciências Exatas, Naturais e Educação da UFTM em Uberaba, aos cuidados do Prof. Dr. Ronaldo Junio de Oliveira.

4.4.1 Estudo *in silico* (docking molecular)

Os dados cristalográficos da acetilcolinesterase humana (AChE) e butirilcolinesterase humana (BChE) foram obtidos do *Protein Data Bank* (PDB, código ID 4BDT) e (PDB, código ID 4BDS), respectivamente.

A estrutura cristalina da AChE estava complexada com os inibidores huprina W e fasciculina 2 (FAS-2). Todas as moléculas de água, heteroátomos e FAS-2 foram removidas do arquivo de entrada do PDB. As moléculas de água presentes no sítio ativo não interferem com o complexo huprina-AChE. O FAS-2 foi necessário para fins de cristalização e não interfere com o sítio ativo que se sobrepõe ao local de ligação da huprina W (NACHON et al., 2013). Além disso, o desvio quadrático médio da raiz (RMSD) da AChE (4BDT) sem FAS-2 em relação à sua forma apo (PDB código ID 4PQE) e à AChE complexada com galantamina (PDB código 4EY6) (CHEUNG et al., 2012) foram insignificantes (ambos inferiores a 0,4 Å).

Simulações de docking foram realizadas no GOLD (Genetic Optimization for Ligand Docking) versão 5.6. As estruturas dos ligantes estefalagina, liriodenina e aterospermidina foram preparadas utilizando o programa Marvin Sketch da ChemAxon, versão 17.1.27 (<http://www.chemaxon.com>). A estrutura e as ligações de átomos foram verificadas e os hidrogênios foram adicionados com o software Mercury da versão GOLD. A visualização pré e pós-docking e a configuração interativa foram executadas com o software Hermes da GOLD. Resíduos de aminoácidos dentro de 6,0 Å em torno do sítio ativo da huprina W da AChE foram usados como cavidade de ligante para o local de ligação de ancoragem. Algoritmo genético (GA) executou os cálculos (VERDONK et al., 2003), a flexibilidade total foi permitida ao ligante através da realização de um máximo de 100.000 operações GA com um tamanho de população de 100 indivíduos. Foram geradas diversas soluções com cantos arredondados e várias conformações que podem ser exploradas. Nenhuma restrição foi aplicada nas simulações. A função de aptidão ChemPLPScore combinada com ChemScore como recurso foram escolhidas para prever o modo de ligação dos compostos com a enzima. O ChemPLPScore com o ChemScore retornou o menor RMSD nos estudos de redocking da huprina W (0,3 Å). A estrutura de maior classificação para o complexo AChE-Composto foi escolhida para a análise de interação. As figuras foram preparadas com PyMOL (Molecular Graphics System, versão 1.8 Schrödinger, LLC) e os diagramas de interação bidimensional foram analisados pelo servidor PoseView 2D (STIERAND et al., 2010). A estrutura cristalina

da BChE está complexada com o inibidor tacrina, removido para que as simulações de docking fossem feitas nesse sitio com protocolo análogo ao da AChE. Um protocolo teórico semelhante foi empregado em trabalhos anteriores (GONÇALVES et al., 2017; LOPES et al., 2018; RETTONDIN et al., 2016).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 FRACIONAMENTO DO EXTRATO DE *A. crassiflora*

O extrato etanólico (345,0 g) obtido a partir das cascas dos frutos de *A. crassiflora*, foi submetido (100,0 g) a extração líquido-líquido com *n*-hexano, CH₂Cl₂, AcOEt e *n*-BuOH, respectivamente (Tabela 6).

Tabela 6. Massas obtidas da extração líquido-líquido do extrato etanólico.

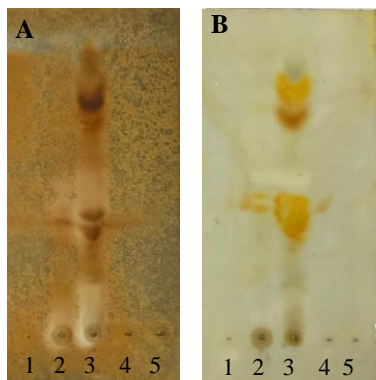
Fração	Massa (g)
Resíduo	15,7
<i>n</i> -Hexano	4,7
CH ₂ Cl ₂	8,3
AcOEt	4,7
<i>n</i> -BuOH	37,0
Hidrometanólica	15,2
Massa total	85,6

Fonte: autora.

5.2 ANÁLISE QUALITATIVA DE ALCALOIDES NOS EXTRATOS E FRAÇÕES DE *A. crassiflora*

O extrato etanólico e as frações obtidas da extração líquido-líquido foram analisadas por CCD utilizando como FE sílica gel e como FM uma mistura de CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25). Foi necessário adicionar hidróxido de amônio a fase móvel, para reduzir a retenção dos alcaloides pelos grupos silanóis (caráter ácido), já que o hidróxido de amônio atua como uma amina competidora (PIVATTO et al., 2014). As cromatoplacas foram inspecionadas em câmara de UV (254 e 365 nm) e reveladas com IClPt e Dragendorff, que são reagentes específicos para alcaloides (Figura 19). A partir da avaliação das placas, foi possível constatar que o maior número de alcaloides foi observado na fração CH₂Cl₂, assim ela foi submetida a cromatografia em coluna para purificação destes metabólitos.

Figura 19. CCD da prospecção fitoquímica; reveladores IC ℓ Pt (A) e Dragendorff (B).



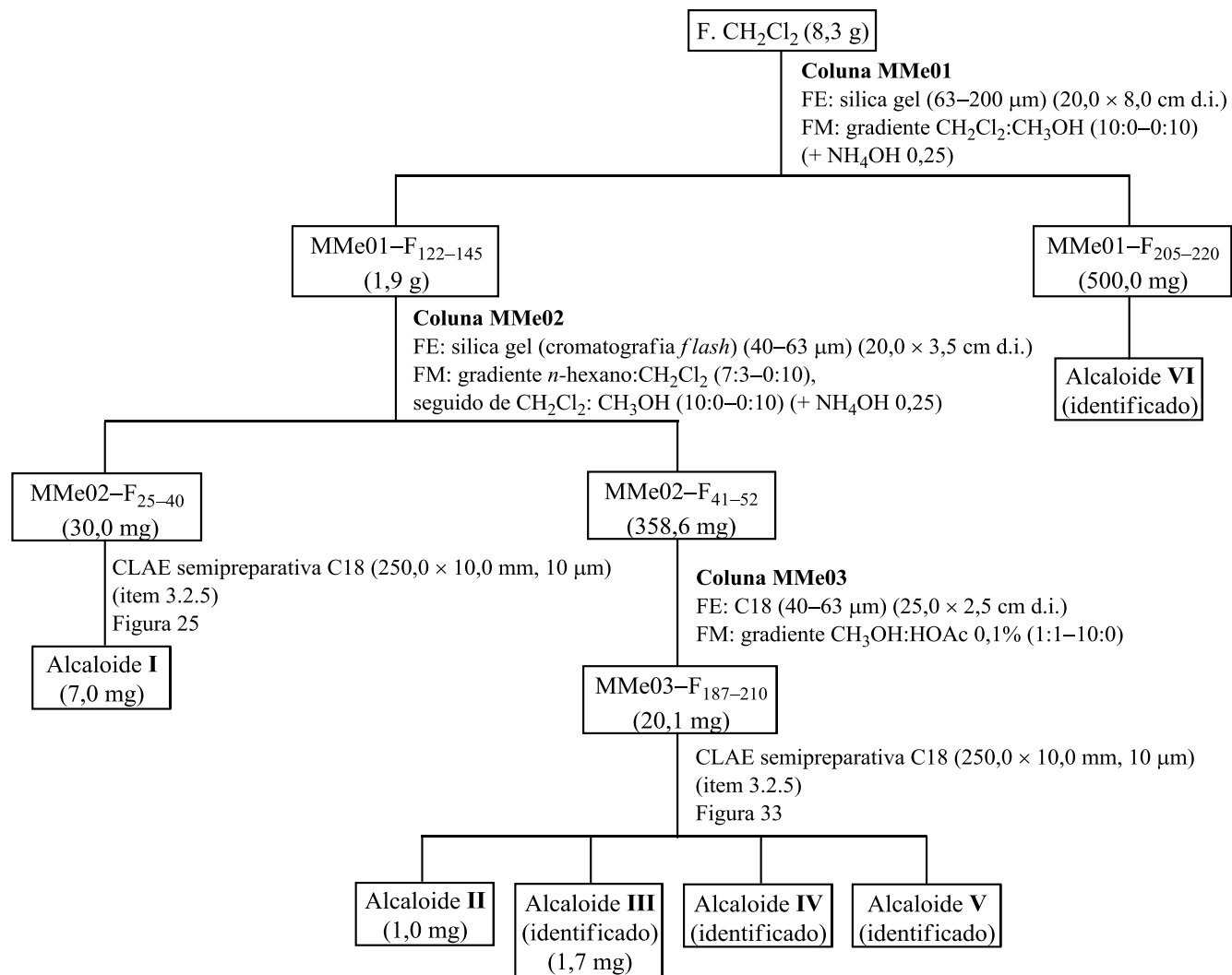
Nota: extrato EtOH (1); frações: *n*-hexano (2), CH₂Cl₂ (3), AcOEt (4) e *n*-butanol (5).

Fonte: autora.

5.3 ISOLAMENTO DOS ALCALOIDES DA FRAÇÃO CH₂Cl₂

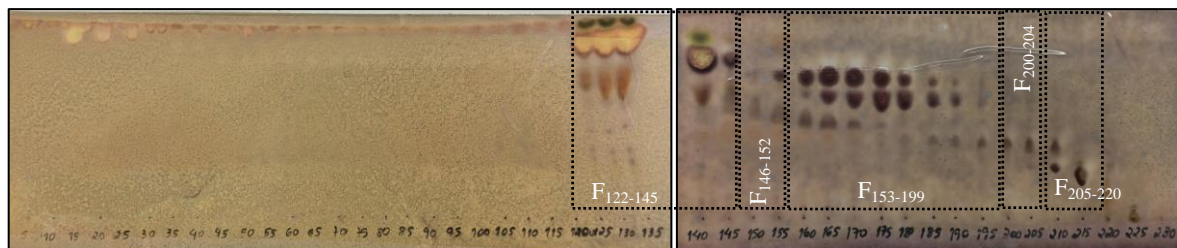
A fração CH₂Cl₂ (8,3 g) foi submetida à CC (428,8 g, 20,0 × 8,0 cm d.i.), utilizando como FE sílica gel (63–200 μm) (Figura 20), e eluição em modo gradiente, utilizando como FM um sistema de solventes iniciando com CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) até 100% de MeOH. As frações coletadas (231) foram avaliadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f (Figura 21). Depois de reunidas, as frações foram denominadas: MMe01-F₁₋₁₄ (430,0 mg), MMe01-F₁₅₋₁₂₁ (1,6 g), MMe01-F₁₂₂₋₁₄₅ (1,9 g), MMe01-F₁₄₆₋₁₅₂ (100,0 mg), MMe01-F₁₅₃₋₁₉₉ (50,0 mg), MMe01-F₂₀₀₋₂₀₄ (30,0 mg), MMe01-F₂₀₅₋₂₂₀ (500,0 mg) e MMe01-F₂₂₁₋₂₃₁ (2,5 g).

Figura 20. Procedimentos cromatográficos da fração CH_2Cl_2 para isolamento dos alcaloides.



Fonte: autora.

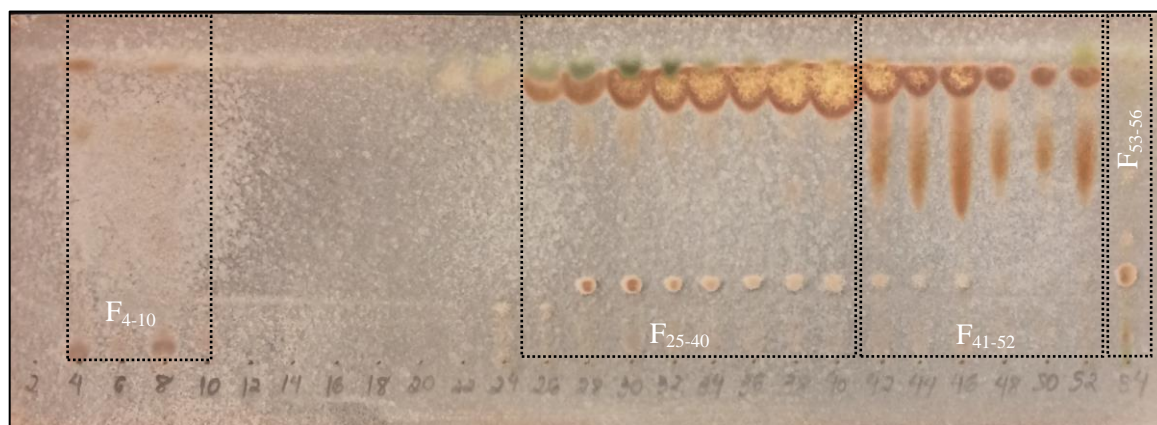
Figura 21. CCD da fração MMe01 (FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador: ICℓPt).



Fonte: autora.

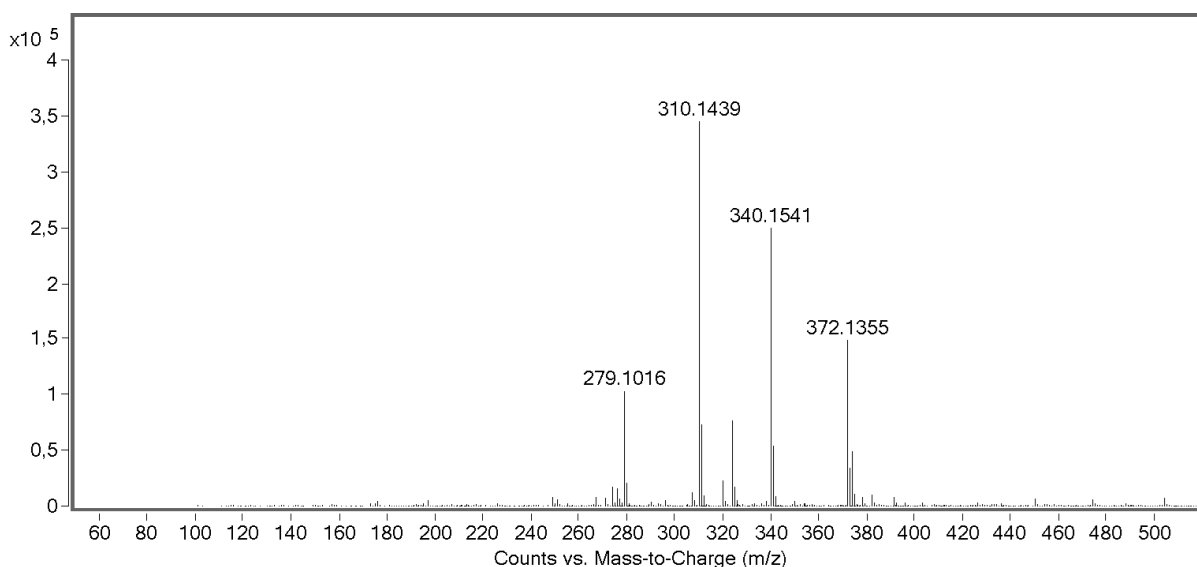
A fração MMe01-F₁₂₂₋₁₄₅ (1,9 g) foi submetida à CC *flash* (75,7 g, 20,0 cm × 3,5 cm d.i.), utilizando como FE sílica gel (40–63 μm), e FM um gradiente, iniciando com *n*-hexano:CH₂Cl₂:NH₄OH (7:3:0,25) até 100% de CH₂Cl₂, seguido de CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) até 100% de MeOH. As frações (74) coletadas foram avaliadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de *R_f*: MMe02-F₁₋₃ (4,5 mg), MMe02-F₄₋₁₀ (30,0 mg), MMe02-F₁₁₋₂₄ (130,8 mg), MMe02-F₂₅₋₄₀ (584,0 mg), MMe02-F₄₁₋₅₂ (358,6 mg), MMe02-F₅₃₋₅₆ (406,6 mg) e MMe02-F₅₇₋₇₄ (168,8 mg) (Figura 22).

Figura 22. CCD da fração MMe02 (FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador: ICℓPt).



Fonte: autora.

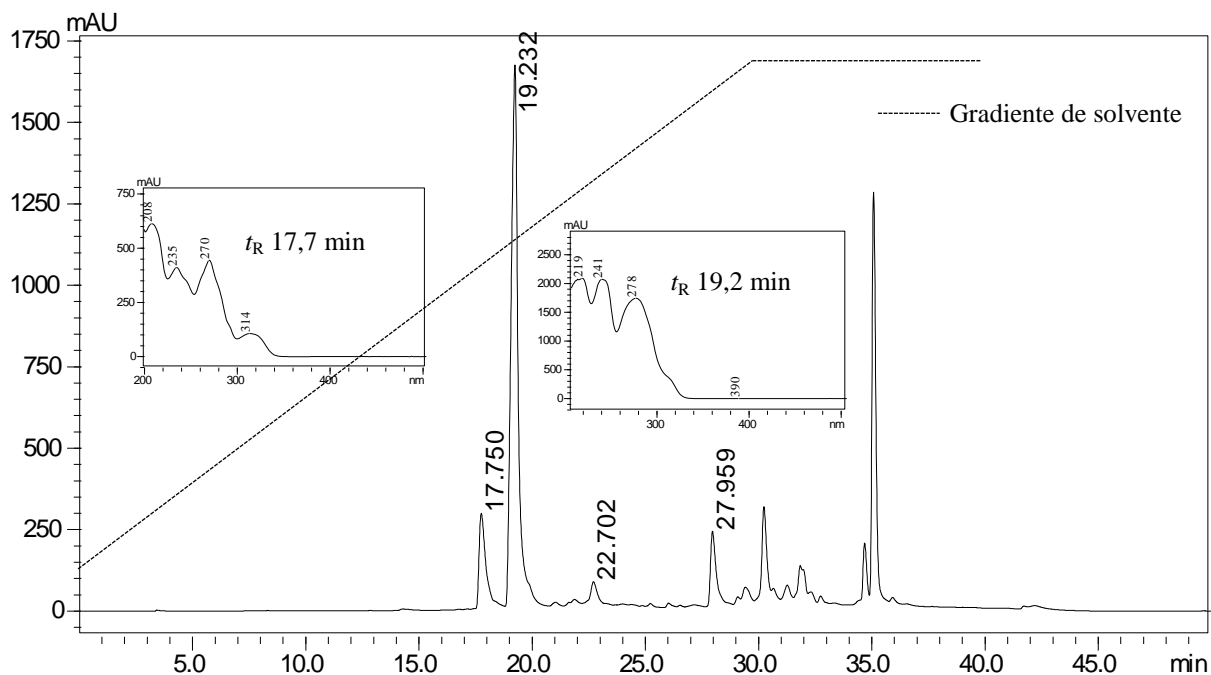
A fração MMe02-F₂₅₋₄₀ foi analisada por EM-IES-(+), em alta resolução, que permitiu verificar a presença dos sinais de *m/z* 279,1016, 310,1439, 340,1541 e 372,1355, que foram correlacionados às moléculas protonadas [M + H]⁺ (Figura 23). Nesse ponto foi possível constatar a presença de alcaloides nessa fração, sendo que o sinal de *m/z* 279 é o único de massa ímpar, sugerindo que não seja referente a um alcaloide ou que tenha número par de nitrogênios.

Figura 23. EM-IES-(+) em alta resolução da fração MMe02-F₂₅₋₄₀.

Fonte: autora.

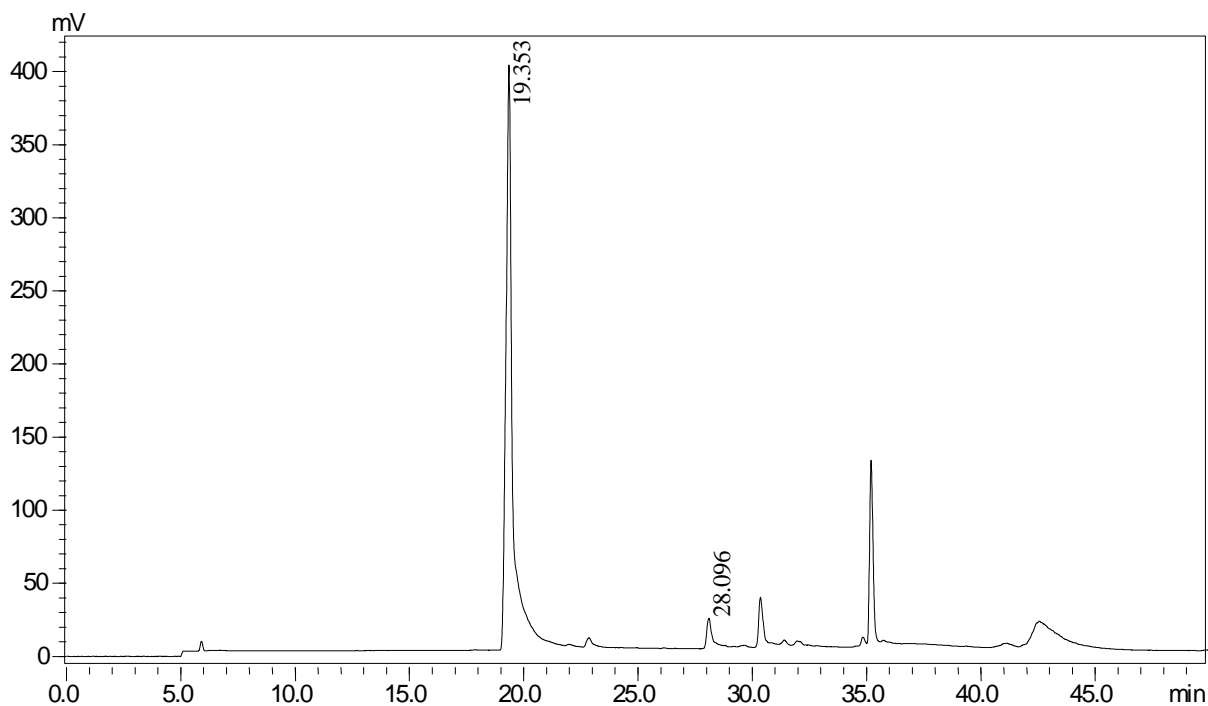
A fração MMe02-F₂₅₋₄₀ foi analisada por CLAE-DAD (Figura 24) e ELSD (Figura 25), que permitiu observar uma mistura de compostos, sendo o majoritário com t_R 19,2 min (I). Nesta fração, foi observado no espectro de UV do composto com t_R 19,2 min. (absorções máximas em λ 219, 241 e 278 nm), que as principais bandas apresentam um deslocamento batocrômico em relação aos sinais observados no espectro de UV do composto com t_R 17,7 min. (absorções máximas em λ 208, 235 e 270 nm). Vale ressaltar que esse padrão espectral é compatível com aqueles apresentados por alcaloides aporfínicos já descritos na família Annonaceae (PEREIRA et al., 2017; BHAKUNI; TEWARI; DHAR, 1971).

Figura 24. Cromatograma da fração MMe02-F₂₅₋₄₀ em coluna analítica (UV 254 nm).



Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, $V_{inj.}$ = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector DAD.

Fonte: autora.

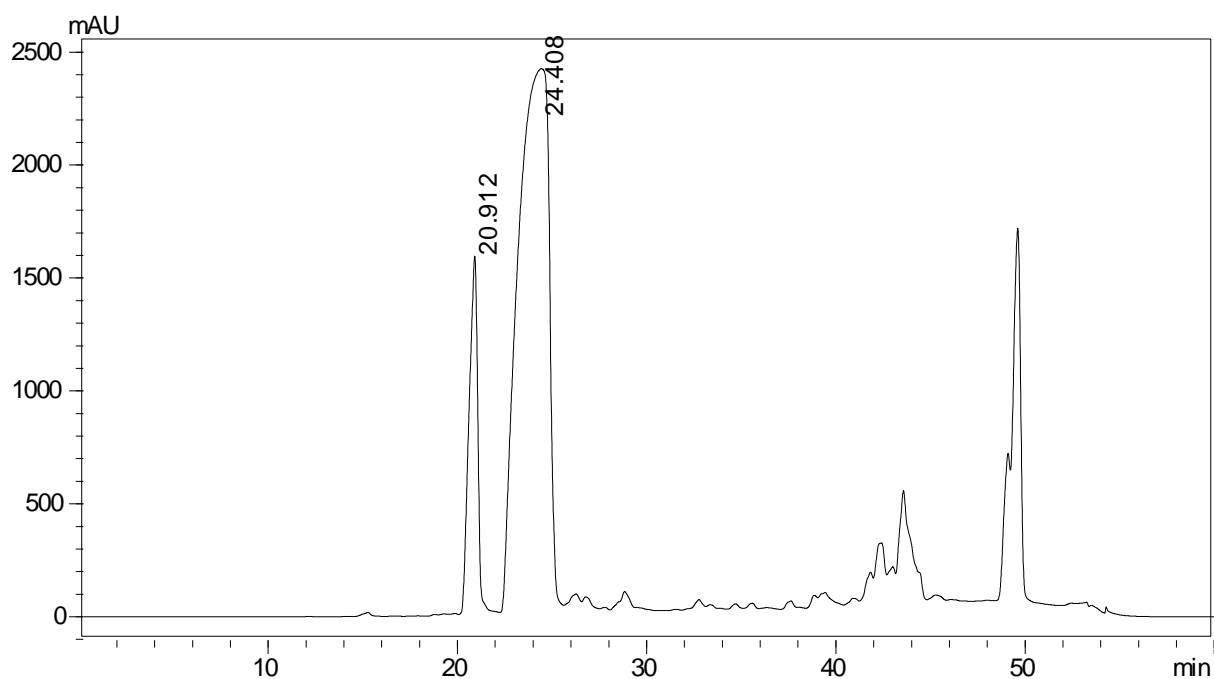
Figura 25. Cromatograma da fração MMe02-F₂₅₋₄₀ em coluna analítica (ELSD).

Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

Fonte: autora.

Em seguida a fração MMe02-F₂₅₋₄₀ foi submetida a CLAE semipreparativa (Figura 26), de onde foi possível separar o composto **I** (7,0 mg, t_R 24,4 min). Depois de isolado este composto foi analisado em CLAE analítico para avaliar a separação (t_R 19,2 min) (Figura 27 e 28).

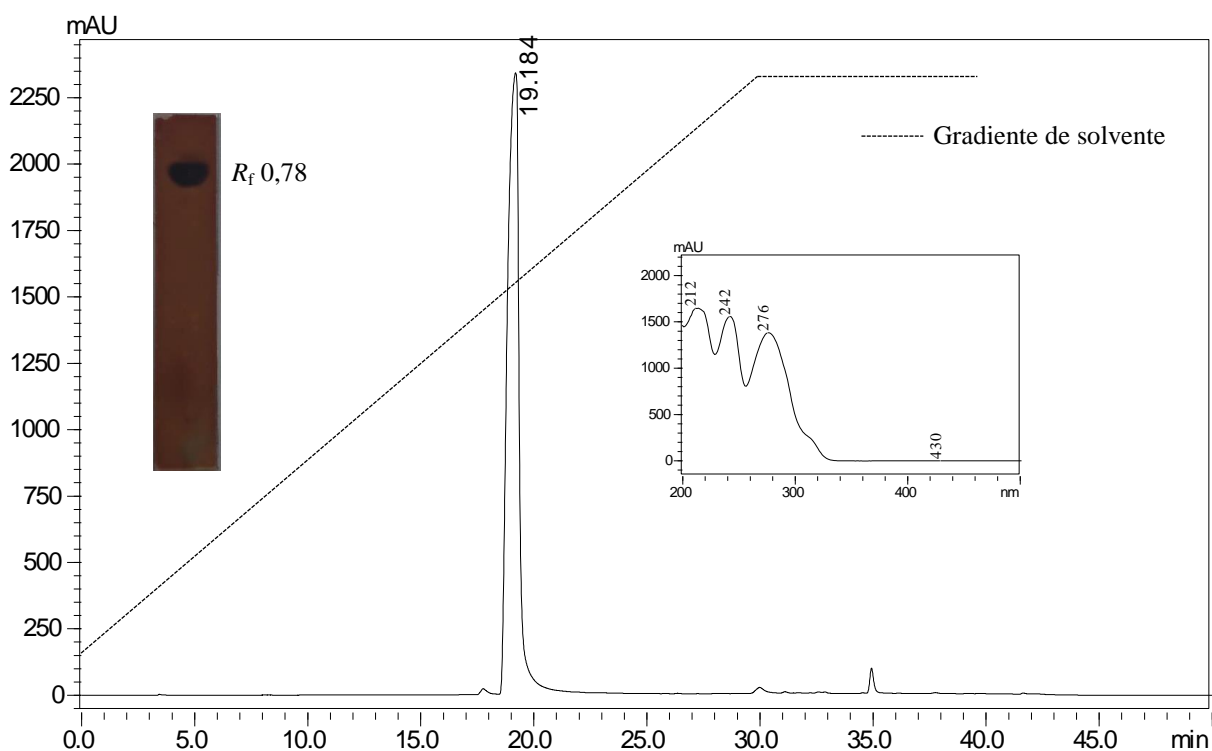
Figura 26. Cromatograma da fração MMe02-F₂₅₋₄₀ em coluna semipreparativa (UV 254 nm).



Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 10,0 mm, 5 μm), gradiente (40 min), 15–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 10,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 2,0 mL/min e detector DAD.

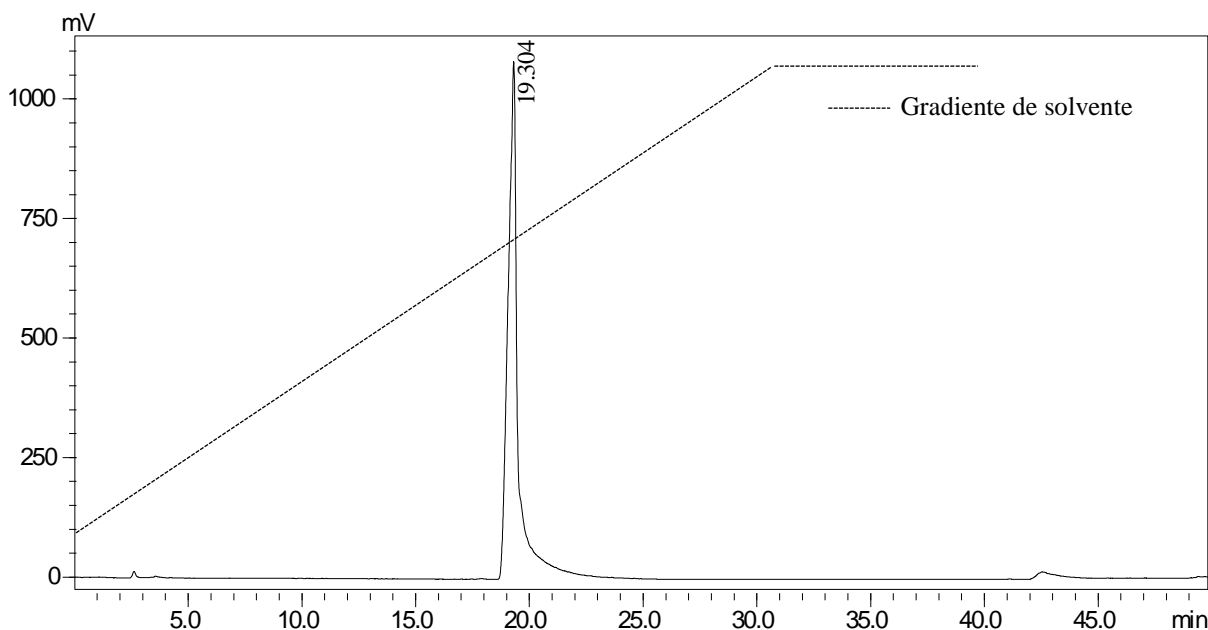
Fonte: autora.

Figura 27. Cromatograma do alcaloide **I** em coluna analítica (UV 254 nm). CCD do mesmo composto (FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador: IC₁Pt).



Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector DAD.

Fonte: autora.

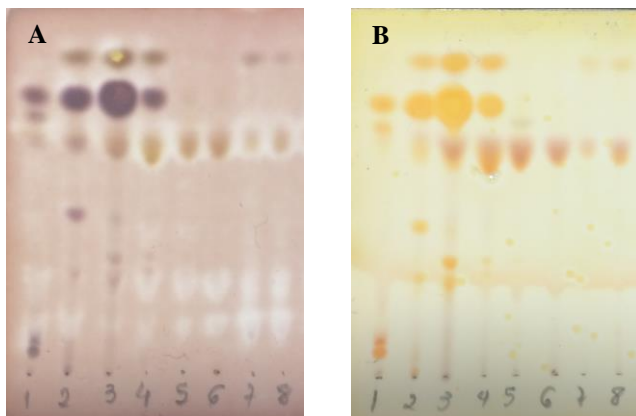
Figura 28. Cromatograma do alcaloide **I** em coluna analítica (ELSD).

Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

Fonte: autora.

A fração MMe02-F_{41–52} (358,6 g) foi submetida à CC em fase reversa (58,9 g, 25,0 cm × 2,5 cm d.i.), utilizando como FE C18 (40–63 μm), que foi eluída utilizando um gradiente iniciando com CH₃OH:HOAc 0,1% (1:1) até 100% de MeOH. As frações coletadas foram avaliadas por CCD e reagrupadas de acordo com a similaridade dos valores de R_f: MMe03-F_{1–5} (9,4 mg), MMe03-F_{6–21} (49,3 mg), MMe03-F_{22–40} (92,5 mg), MMe03-F_{41–67} (111,0 mg), MMe03-F_{68–88} (9,6 mg), MMe03-F_{89–186} (43,3 mg), MMe03-F_{187–210} (20,1 mg) e MMe03-F_{211–351} (15,5 mg) (Figura 29).

Figura 29. CCD da fração MMe03 (FE: sílica, FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador: IClPt (A) e Dragendorff (B).

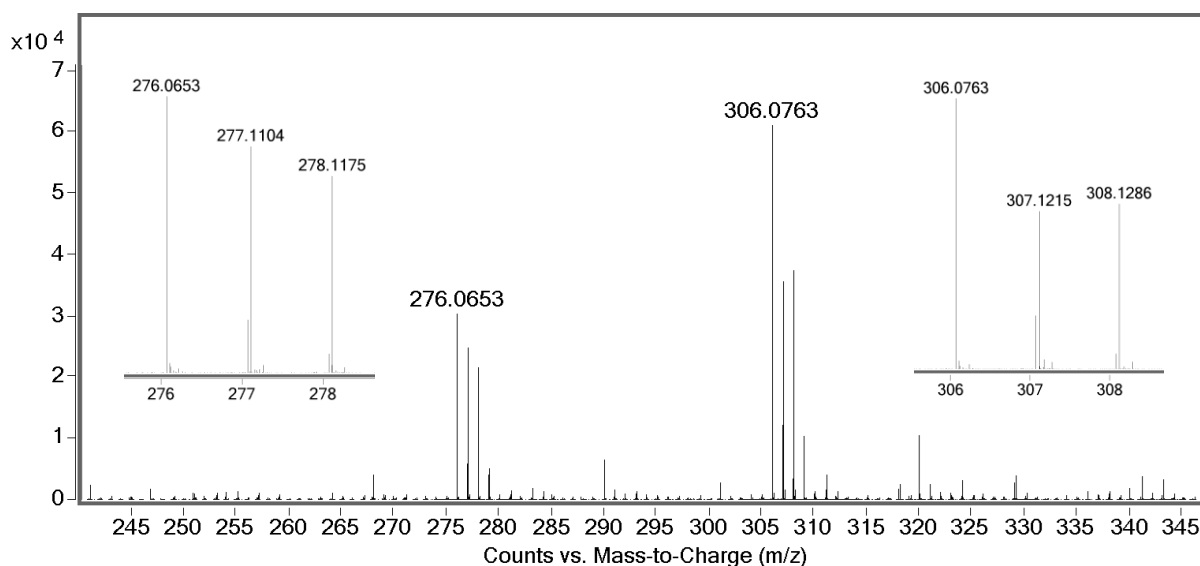


Nota: MMe03: F₁₋₅ (1), F₆₋₂₁ (2), F₂₂₋₄₀ (3), F₄₁₋₆₇ (4), F₆₈₋₈₈ (5), F₈₉₋₁₈₆ (6), F₁₈₇₋₂₁₀ (7) e F₂₁₁₋₃₅₁ (8).

Fonte: autora.

A fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀ foi analisada por EM-IES-(+), em alta resolução, que permitiu verificar a presença dos sinais de m/z 276,0653, 277,1104, 278,1175, 306,0763, 307,1215 e 308,1286 que foram correlacionados às moléculas protonadas $[M + H]^+$ (Figura 30).

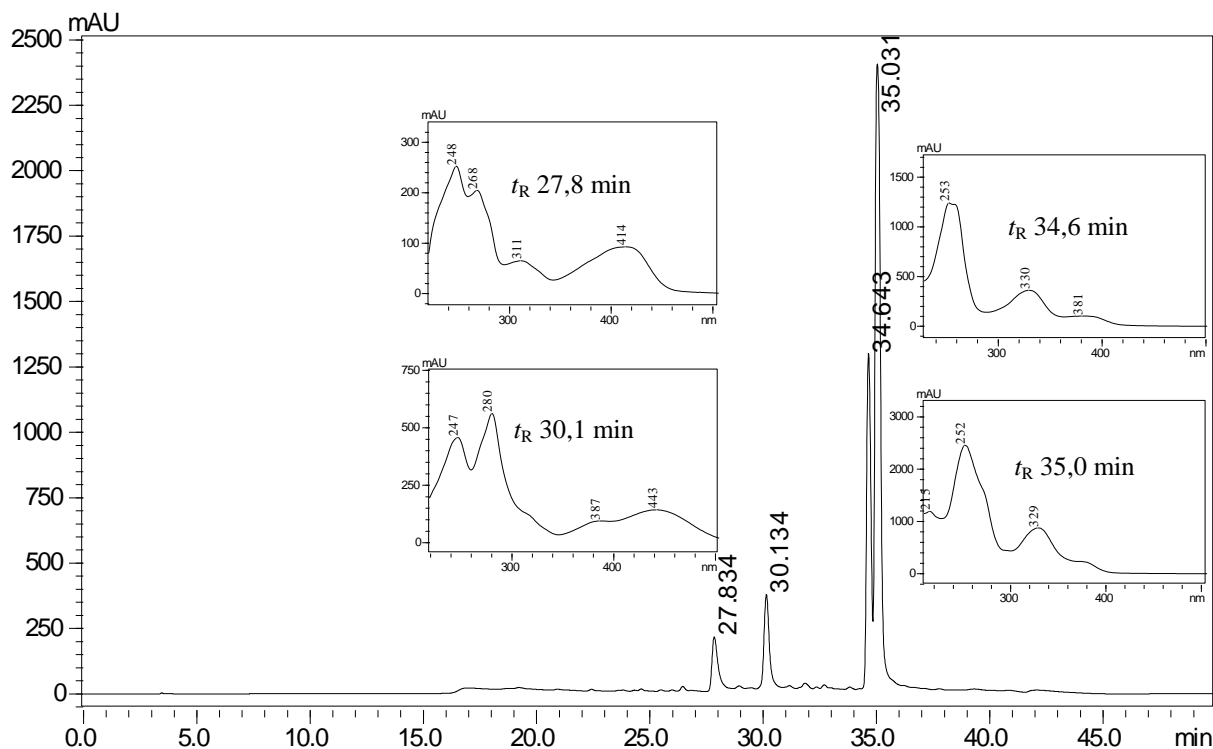
Figura 30. EM-IES-(+) em alta resolução da fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀.



Fonte: autora.

A análise da fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀ por CLAE com detector DAD (Figura 31) e ELSD (Figura 32) permitiu observar quatro bandas principais, sendo duas majoritárias com t_R 34,6 e 35,0 min.

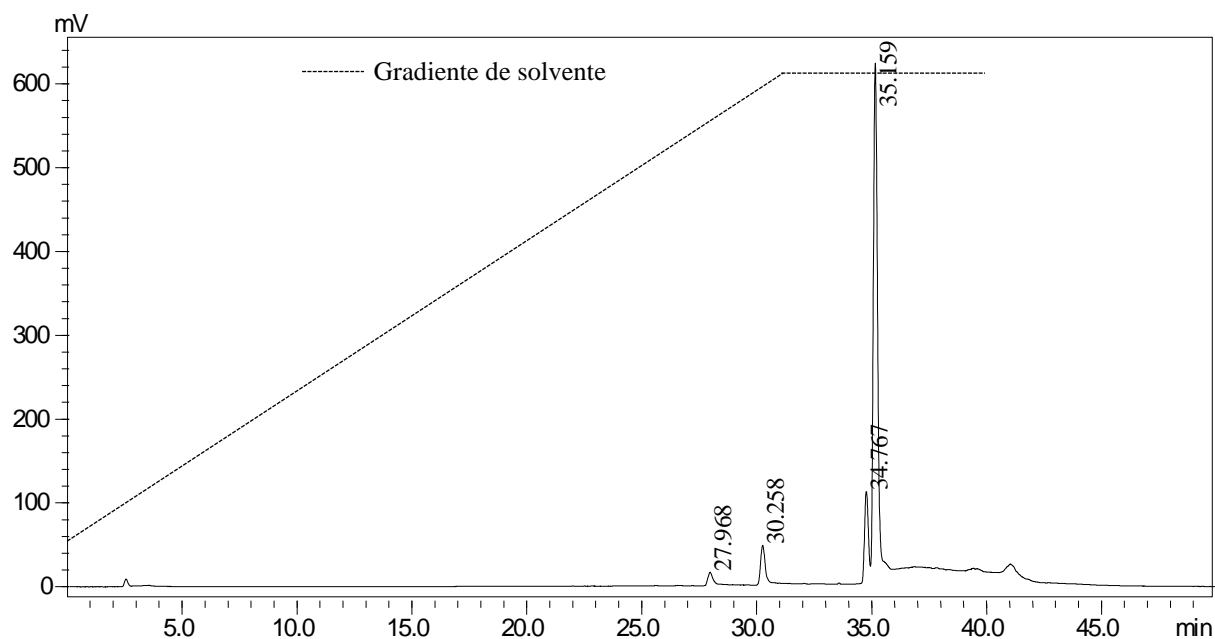
Figura 31. Cromatograma da fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀ em coluna analítica (UV 254 nm).



Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min) C = 1,0 mg/mL, $V_{inj.}$ = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector DAD.

Fonte: autora.

Nesta fração foi observado que os picos relativos aos constituintes minoritários com t_R 27,8 e 30,1 min. apresentam espectro de UV similares. Mesma característica foi observada para os constituintes majoritários com t_R 34,6 e 35,0 min. Estes dados sugerem similaridade estrutural entre os constituintes minoritários, assim como entre os majoritários, no entanto sugere que exista maior diferença estrutural entre os compostos minoritários e os majoritários.

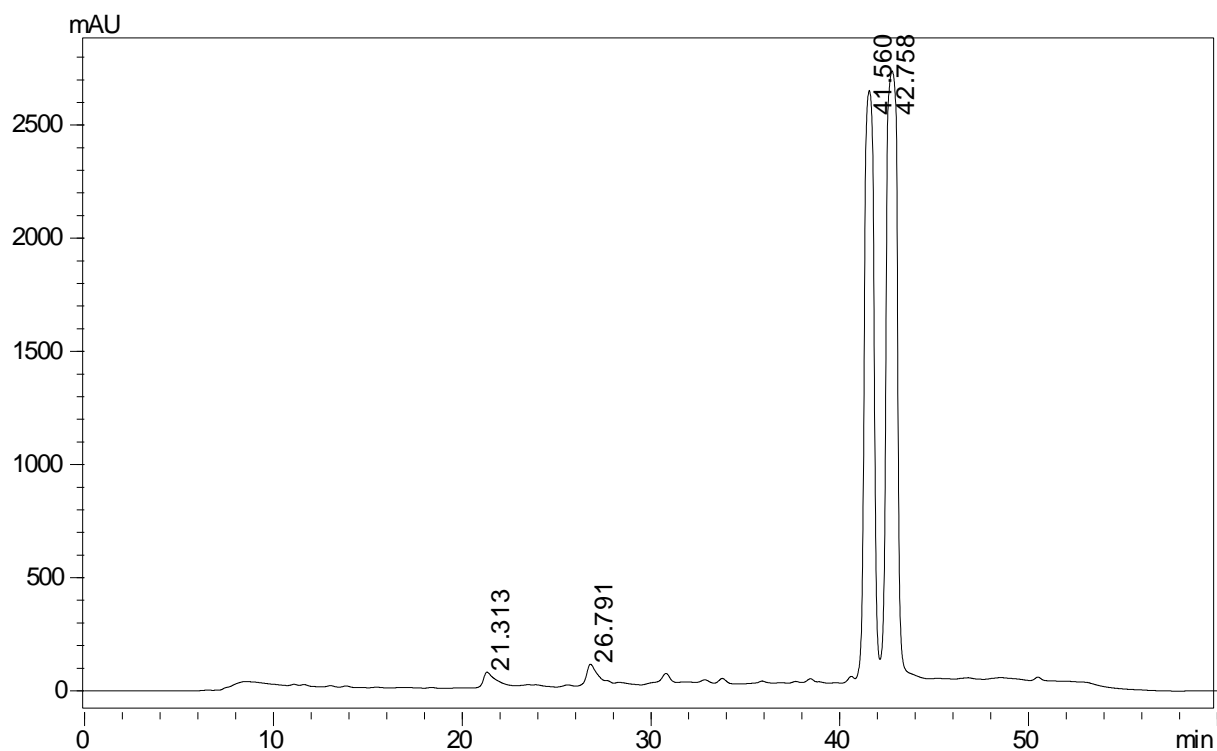
Figura 32. Cromatograma da fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀ em coluna analítica (ELSD).

Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min e detector ELSD.

Fonte: autora.

Em seguida a fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀ foi submetida a CLAE semipreparativa (Figura 33), de onde foi possível separar os compostos **II** (1,0 mg, t_R 21,3 min) e **III** (1,7 mg, t_R 26,8 min). Depois de isolados estes compostos foram analisados por CLAE analítico para confirmar a separação (**II**, t_R 27,8 min) (Figura 34 e 35) (**III**, t_R 30,1 min) (Figura 36 e 37).

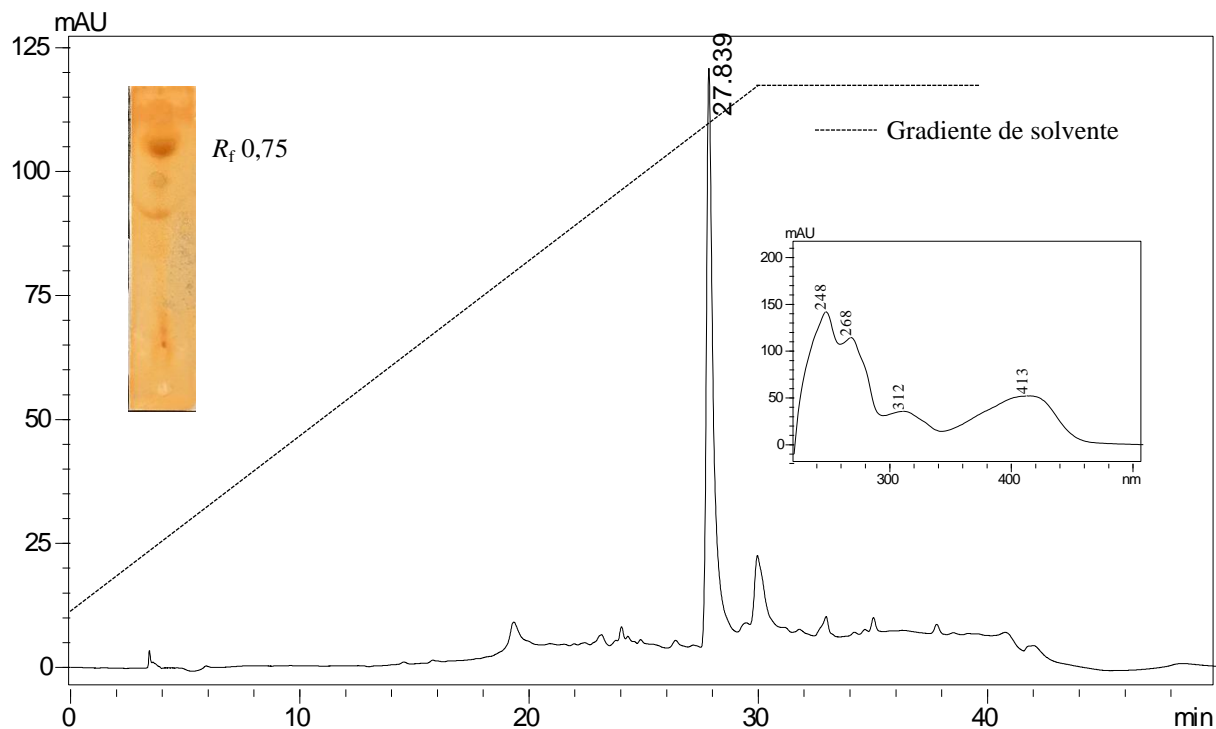
Figura 33. Cromatograma da fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀ em coluna semipreparativa (UV 254 nm).



Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 10,0 mm, 5 μm), gradiente (40 min), 65–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 20,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 2,0 mL/min e detector DAD.

Fonte: autora.

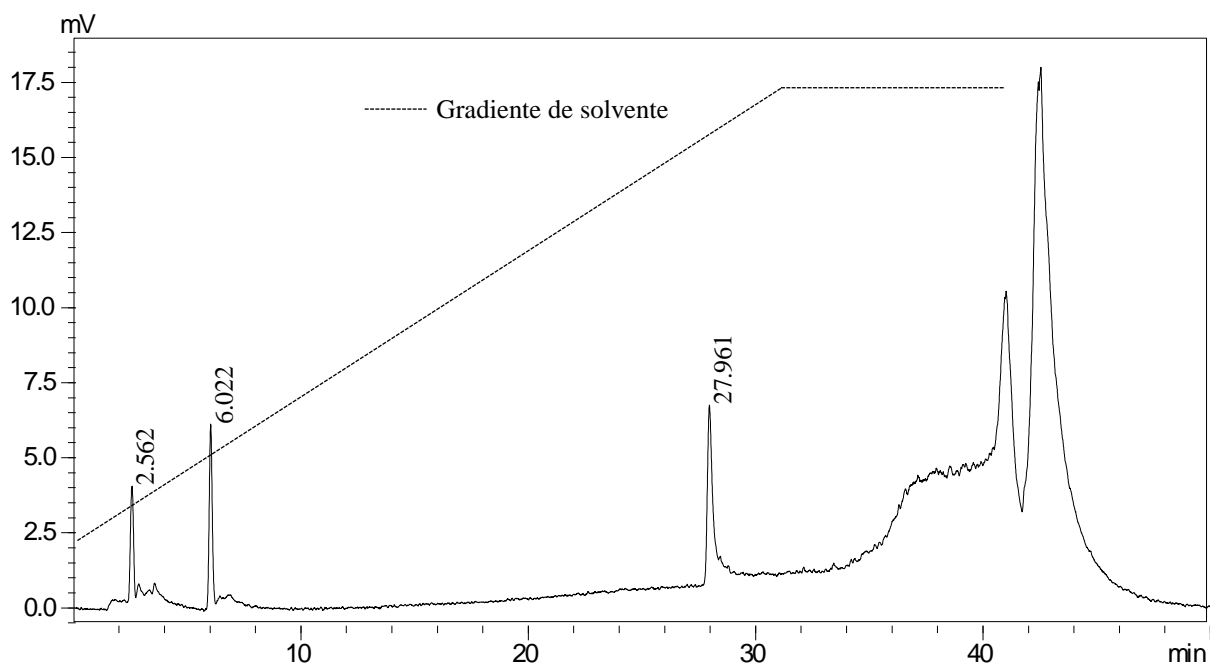
Figura 34. Cromatograma do alcaloide **II** em coluna analítica (UV 254 nm). CCD do mesmo composto (FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador: IC_lPt).



Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min. e detector DAD.

Fonte: autora.

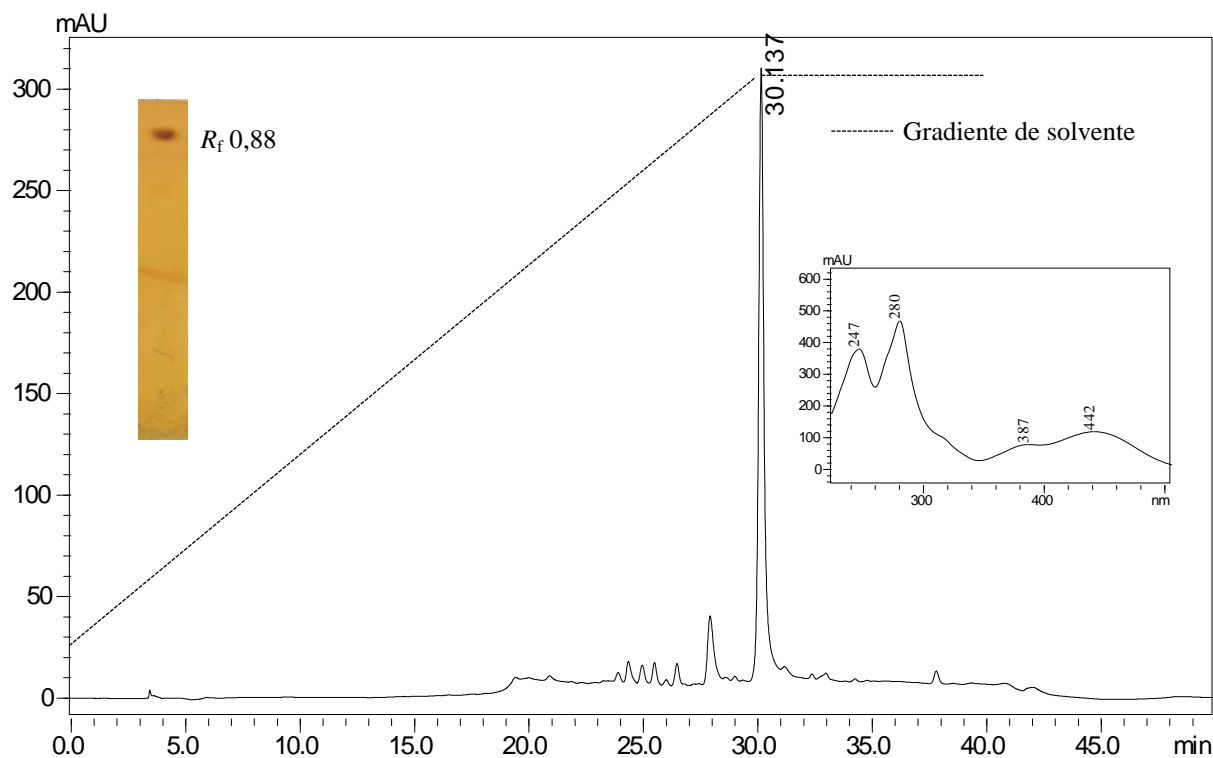
Figura 35. Cromatograma do alcaloide **II** em coluna analítica (ELSD).



Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min. e detector ELSD.

Fonte: autora.

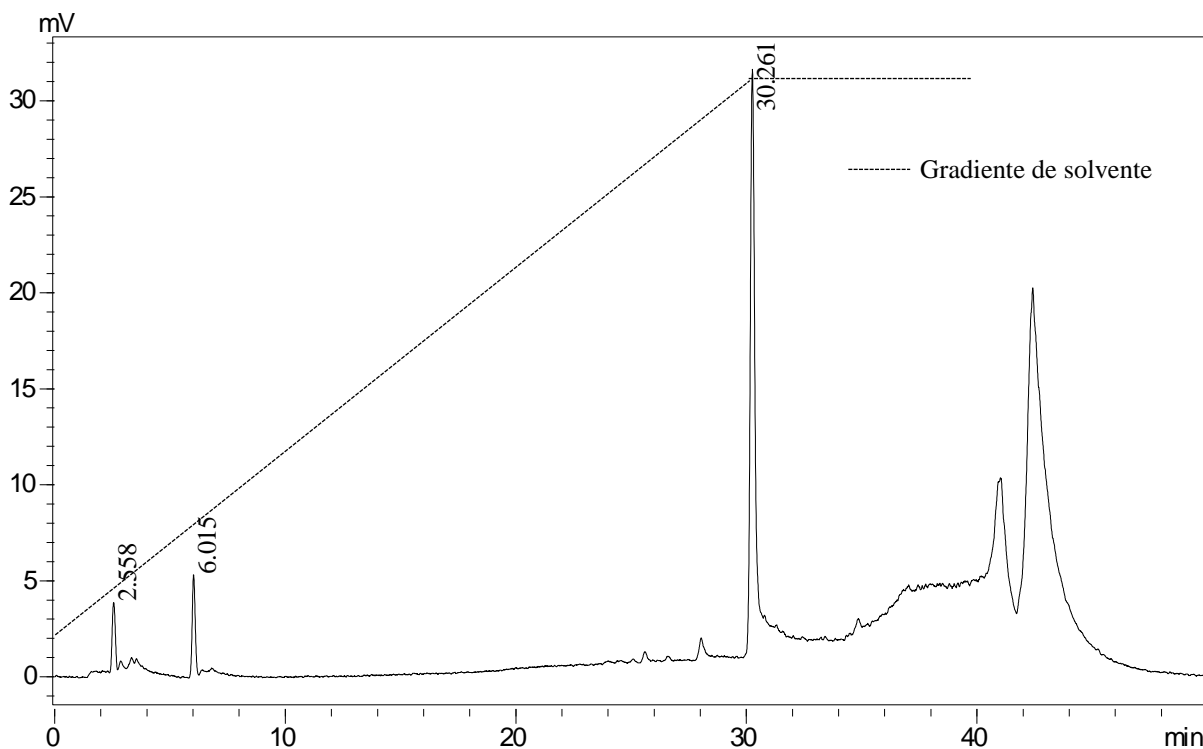
Figura 36. Cromatograma do alcaloide **III** em coluna analítica (UV 254 nm). CCD do mesmo composto (FM: CH₂Cl₂:MeOH:NH₄OH (9:1:0,25) e revelador: IC₁Pt).



Condições: Coluna Phenomenex[®] C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, V_{inj.} = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min. e detector DAD.

Fonte: autora.

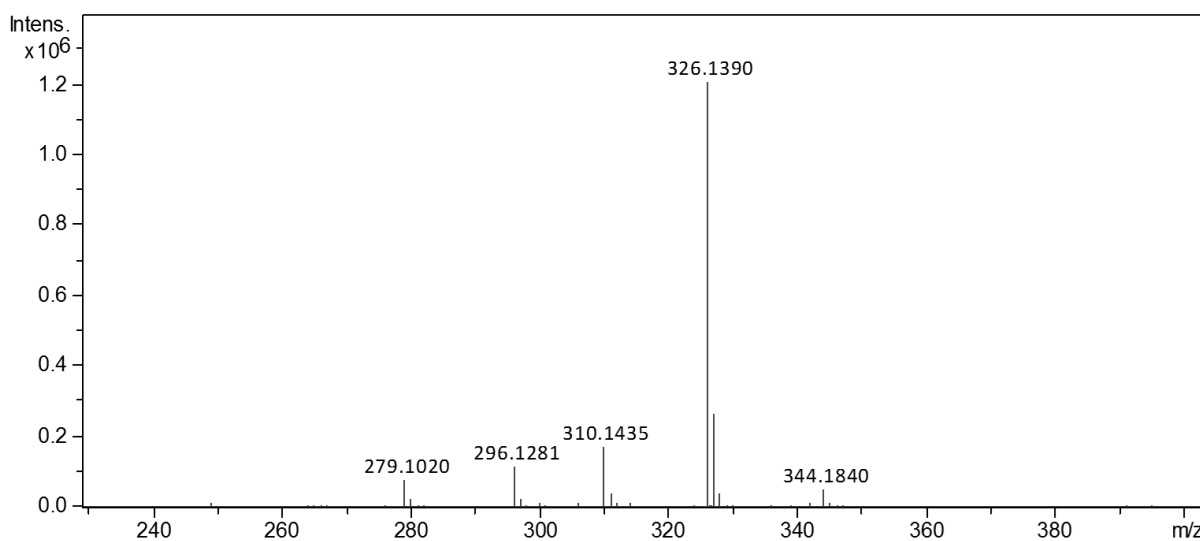
Figura 37. Cromatograma do alcaloide **III** em coluna analítica (ELSD).



Condições: Coluna Phenomenex® C18 (250,0 × 4,6 mm, 5 μm), gradiente (30 min), 5–100% de MeOH–HOAc 0,1%, e em seguida foi mantido 100% de MeOH (10 min); C = 1,0 mg/mL, $V_{inj.}$ = 50,0 μL, fluxo: 1,0 mL/min. e detector ELSD.

Fonte: autora.

A fração MMe01-F_{205–220} (500,0 mg) foi analisada por EM-IES-(+), em alta resolução, por infusão direta, que permitiu verificar a presença dos sinais de m/z 279,1020 [M + H]⁺, m/z 296,1281 [M + H]⁺, m/z 310,1435 [M + H]⁺ (**I**), m/z 326,1390 [M + H]⁺ e m/z 344,1840 [M + H]⁺ (Figura 38).

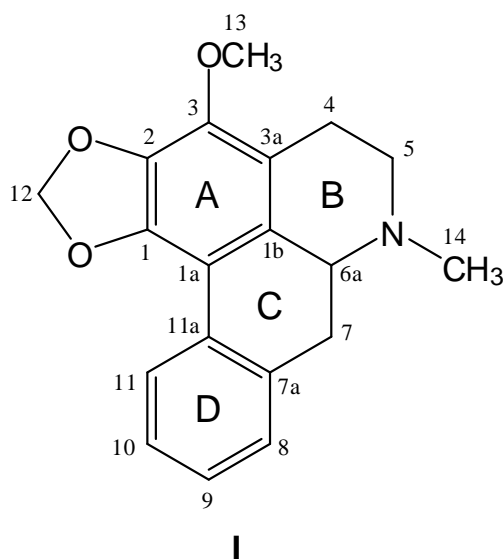
Figura 38. EM-IES-(+) em alta resolução da fração MMe01-F₂₀₅₋₂₂₀.

Fonte: autora.

5.4 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DOS ALCALOIDES

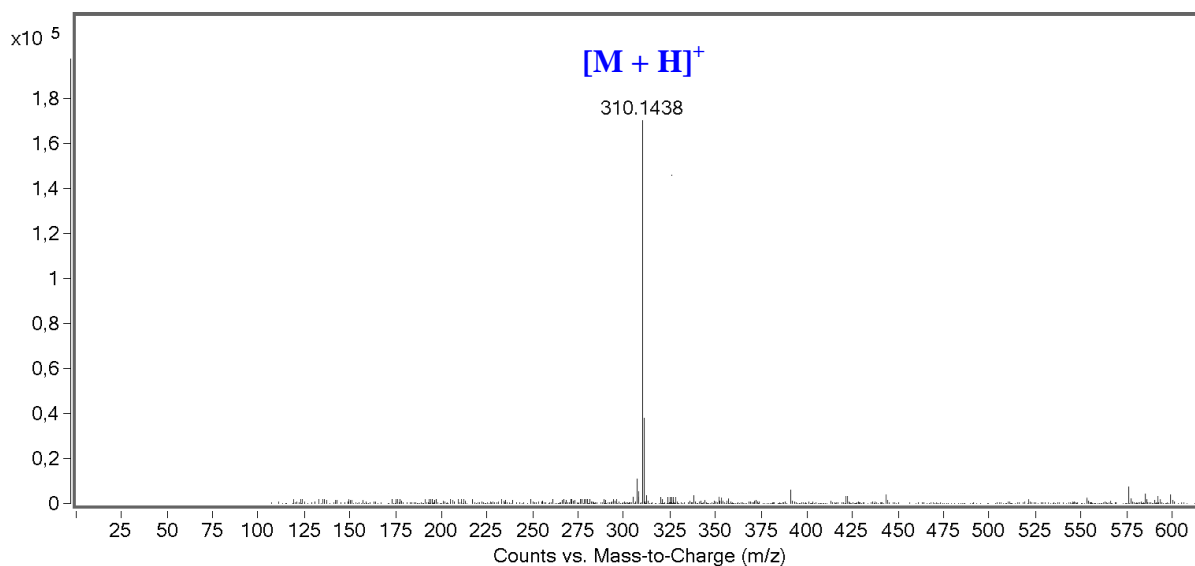
O estudo químico da fração alcaloídica (CH₂Cl₂) das cascas do fruto de *A. crassiflora*, resultou no isolamento de dois alcaloides, um aporfínico e outro oxoaporfínico, e na identificação de outros quatro alcaloides aporfínicos, já descritos anteriormente na família Annonaceae. Os compostos isolados foram identificados por técnicas espectroscópicas (RMN ¹H e ¹³C, DEPTQ, NOESY, TOCSY, COSY, HSQC e HMBC) e espectrométricas (EM-ESI em alta resolução), assim como a comparação dos dados com aqueles descritos na literatura.

5.4.1 Elucidação estrutural do alcaloide I



O alcaloide **I** (7,0 mg), foi isolado como um sólido marrom (pf 130,7–132,2 °C), que apresentou teste positivo quando revelado com o reagente IC₁Pt (R_f 0,78) (Figura 27). Foi submetido à análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{19}H_{19}NO_3$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a onze. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 310,1438 $[M + H]^+$, calculado para $C_{19}H_{20}NO_3^+$, 310,1438 (Δ 0,0 ppm) (Figura 39).

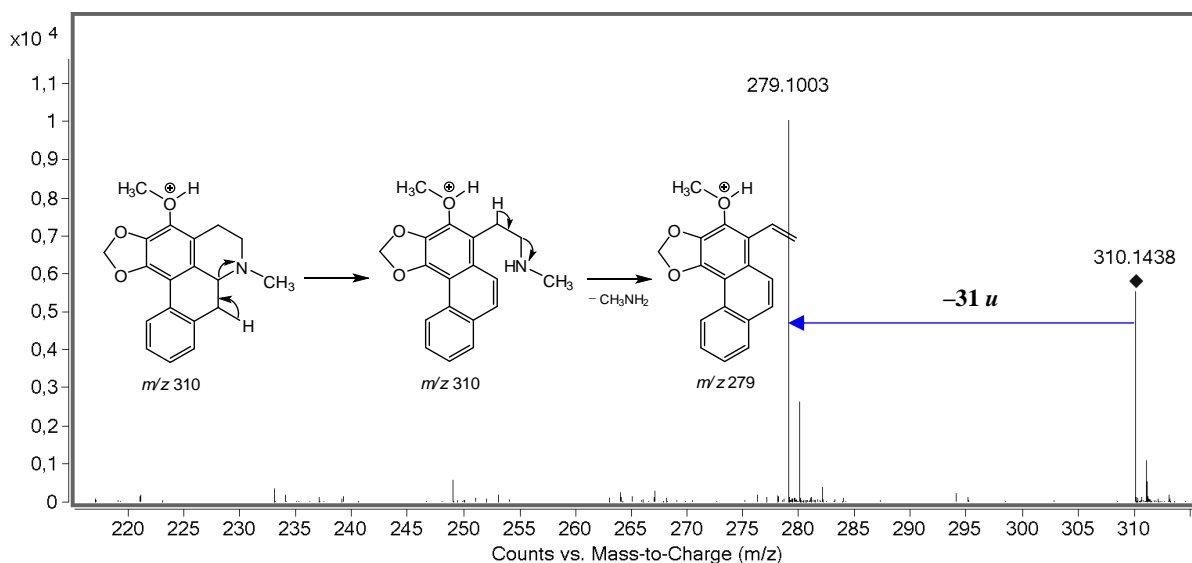
Figura 39. EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **I**.



Fonte: autora.

O sinal de m/z 310, ao ser submetido à análise por EM/EM, produziu o íon fragmento de m/z 279, que foi correlacionado com uma clivagem heterolítica do anel B, promovida pela transferência do H-7 para o nitrogênio, formação de uma dupla ligação entre C-7–C-6a e consequente quebra da ligação entre C-6a–N. Em seguida a transferência do H-4 para o nitrogênio e a formação da dupla ligação entre C-4–C-5 resulta na eliminação do grupo CH_3NH_2 (31 u) (Figura 40).

Figura 40. EM/EM-IES-(+) do alcaloide I.



Fonte: autora.

A análise dos espectros de RMN ^1H de I (Tabela 7) (Figuras 41–43), permitiu observar a presença de quatro sinais na região de hidrogênios aromáticos em δ 7,92 (1H, dd, $J = 7,3$ e 1,1 Hz), δ 7,20 (1H, ddd, $J = 7,3$; 7,3 e 1,1 Hz), δ 7,16 (1H, dd, $J = 7,3$ e 1,1 Hz) e δ 7,11 (1H, ddd, $J = 7,3$; 7,3 e 1,1 Hz), relativos aos hidrogênios H-11, H-10, H-8 e H-9, respectivamente, do anel D. Foram observados oito sinais em δ 2,81 (1H, m), 2,75 (1H, m), 2,45 (1H, ddd, $J = 12,0$; 12,0 e 4,0 Hz), 3,09 (1H, ddd, $J = 12,0$ e 4,0 Hz), 2,65 (1H, dd, $J = 14,0$ e 14,0 Hz), 3,09 (1H, m), 5,99 (1H, d, $J = 1,4$ Hz), e 5,84 (1H, d, $J = 1,4$ Hz), relativos aos hidrogênios geminais H-4/H-4'; H-5/H-5', H-7/H-7', e H-12/H-12', cujas correlações foram confirmadas no mapa de contorno COSY (Figuras 44–48). Também foi observada a presença de dois singletos em δ 3,94 (3H) e δ 2,51 (3H), característicos dos hidrogênios H-13 e H-14, da metoxila ligada ao anel A e da metila ligada ao nitrogênio do anel B, respectivamente.

Figura 41. Espectro de RMN de ^1H do alcaloide **I** (400 MHz, CDCl_3).

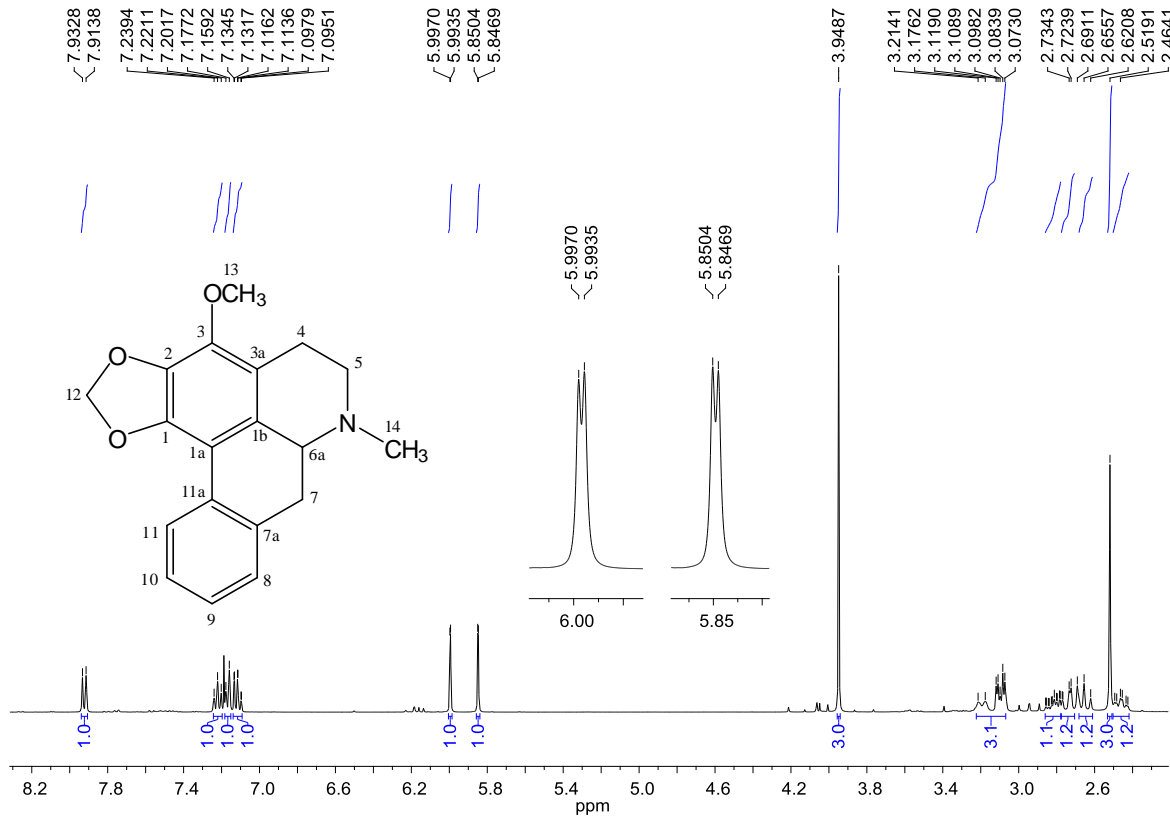


Figura 42. Ampliação do espectro 41 (δ 2,4–3,25) do alcaloide **I**.

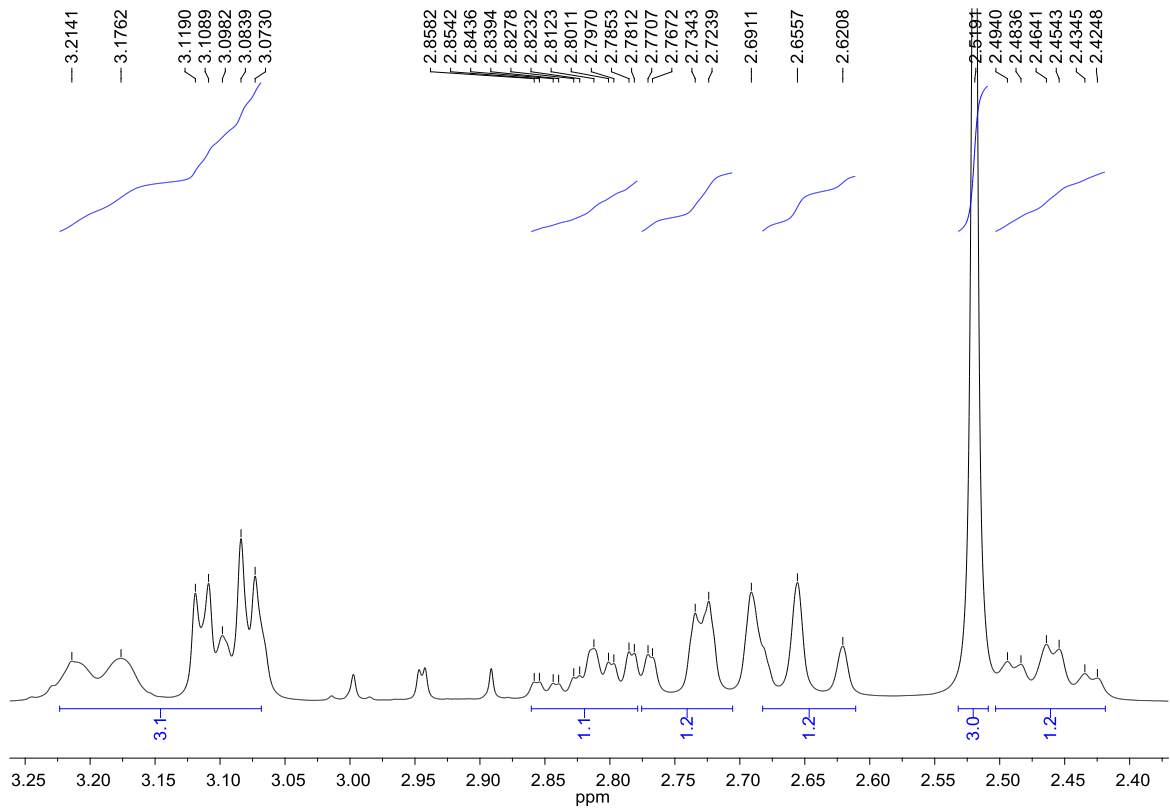


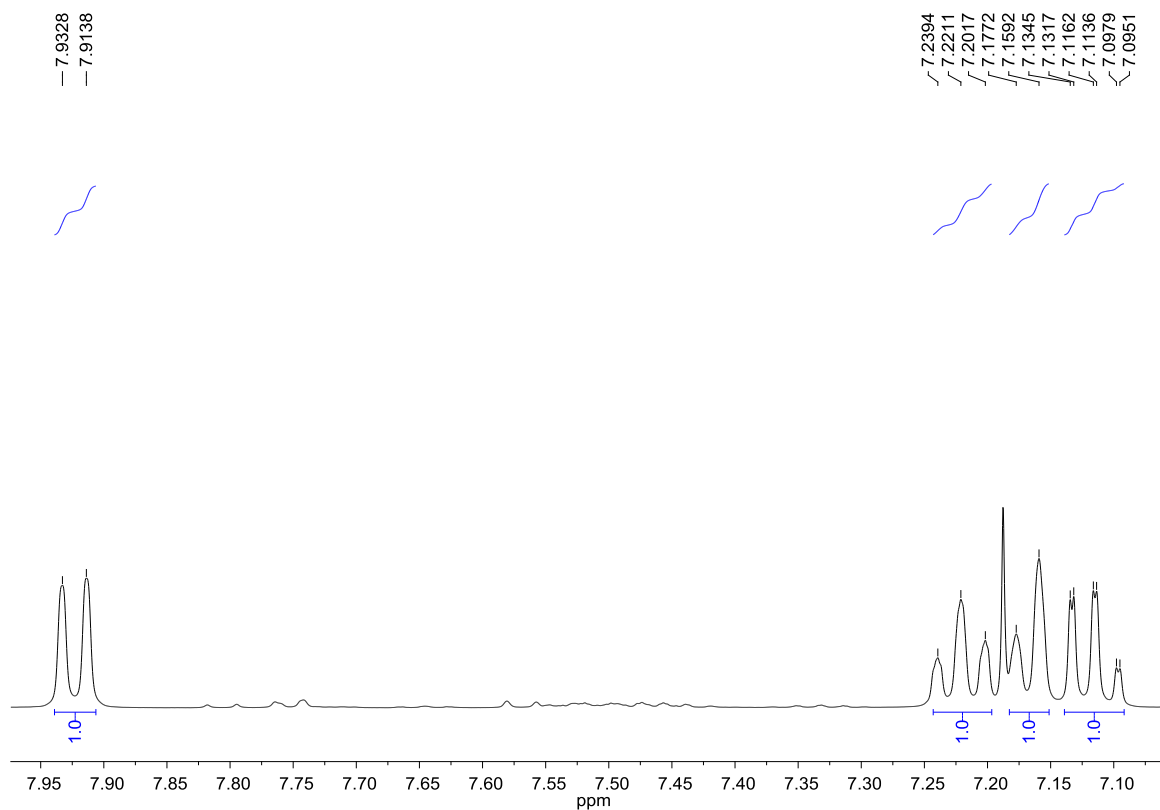
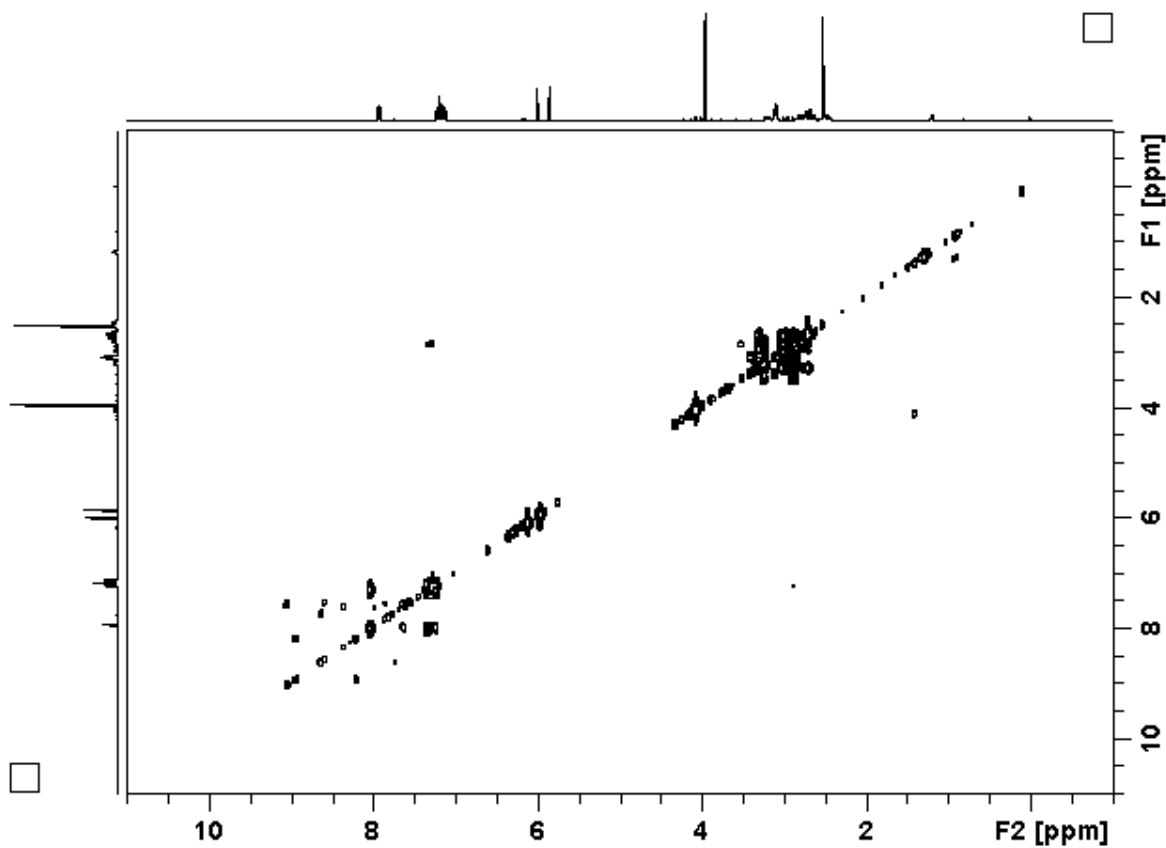
Figura 43. Ampliação do espectro 41 (δ 7,10–7,95) do alcaloide I.**Figura 44.** Mapa de contorno COSY do alcaloide I.

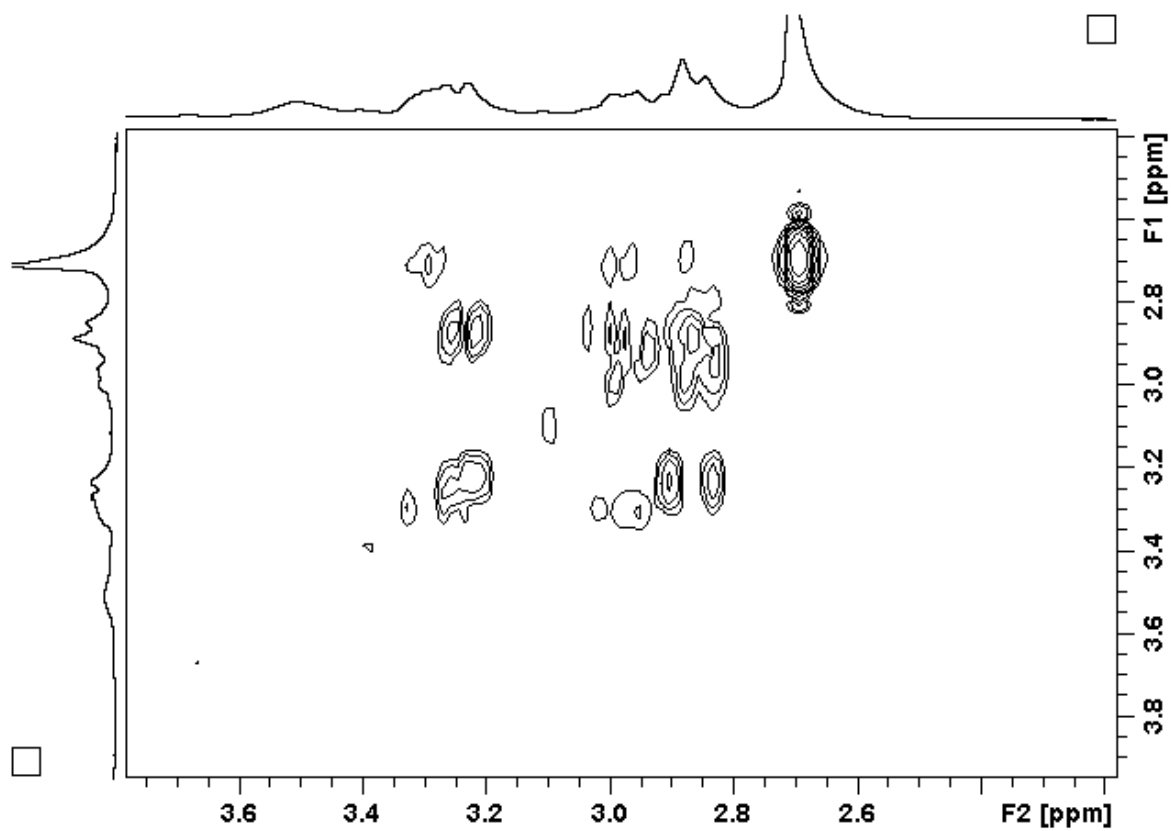
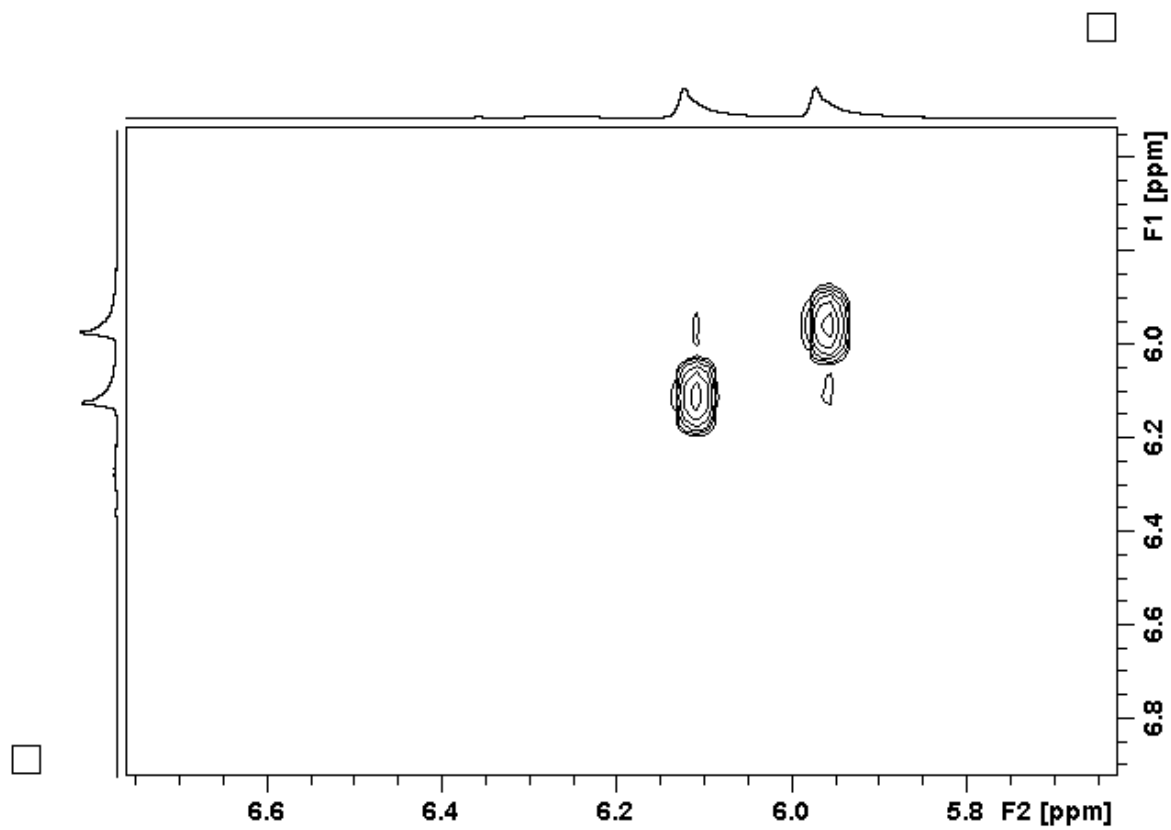
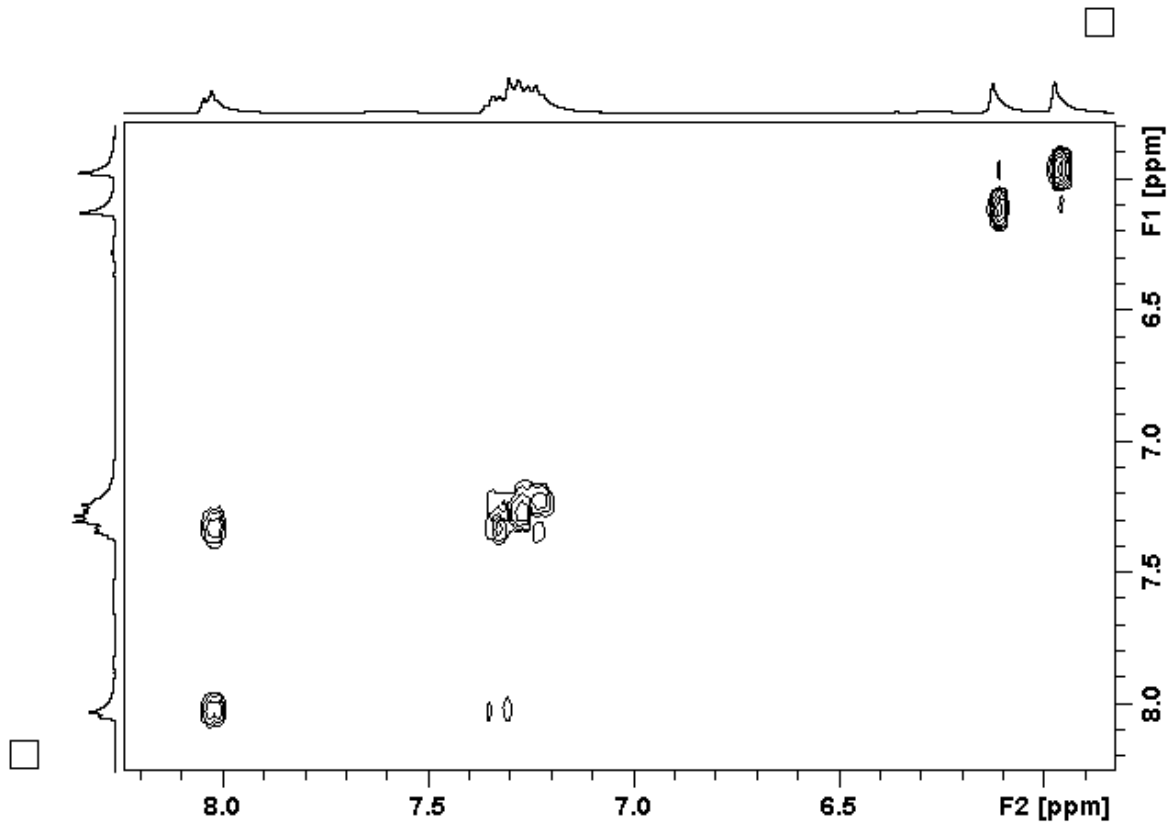
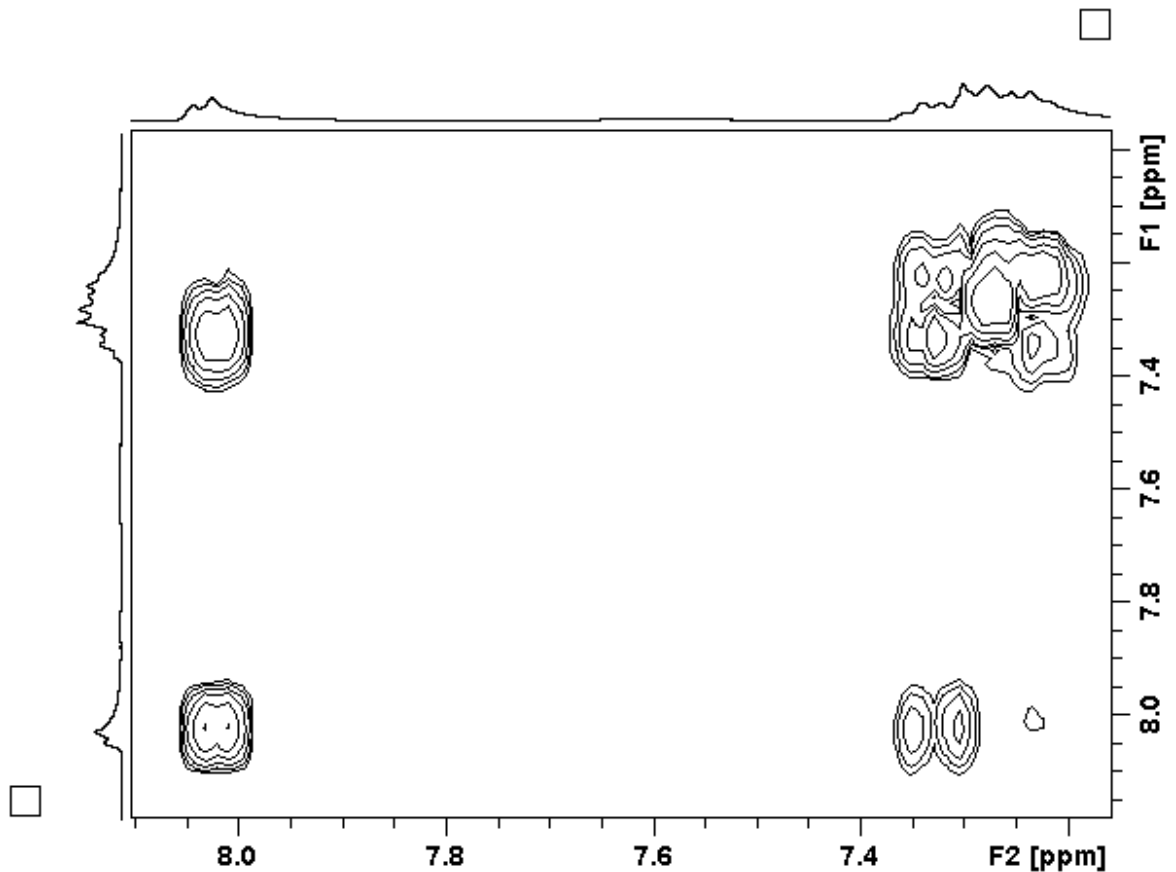
Figura 45. Mapa de contorno COSY (δ 2,5–3,6) do alcaloide I.**Figura 46.** Mapa de contorno COSY (δ 5,8–6,6) do alcaloide I.

Figura 47. Mapa de contorno COSY (δ 6,0–8,0) do alcaloide I.**Figura 48.** Mapa de contorno COSY (δ 7,0–8,0) do alcaloide I.

No espectro de RMN de ^{13}C (Figuras 49–51) foram observados dezenove sinais, que foram correlacionados aos respectivos hidrogênios através do mapa de contorno HSQC (Figuras 52–54).

Figura 49. Espectro de RMN de ^{13}C do alcaloide I (100 MHz, CDCl_3).

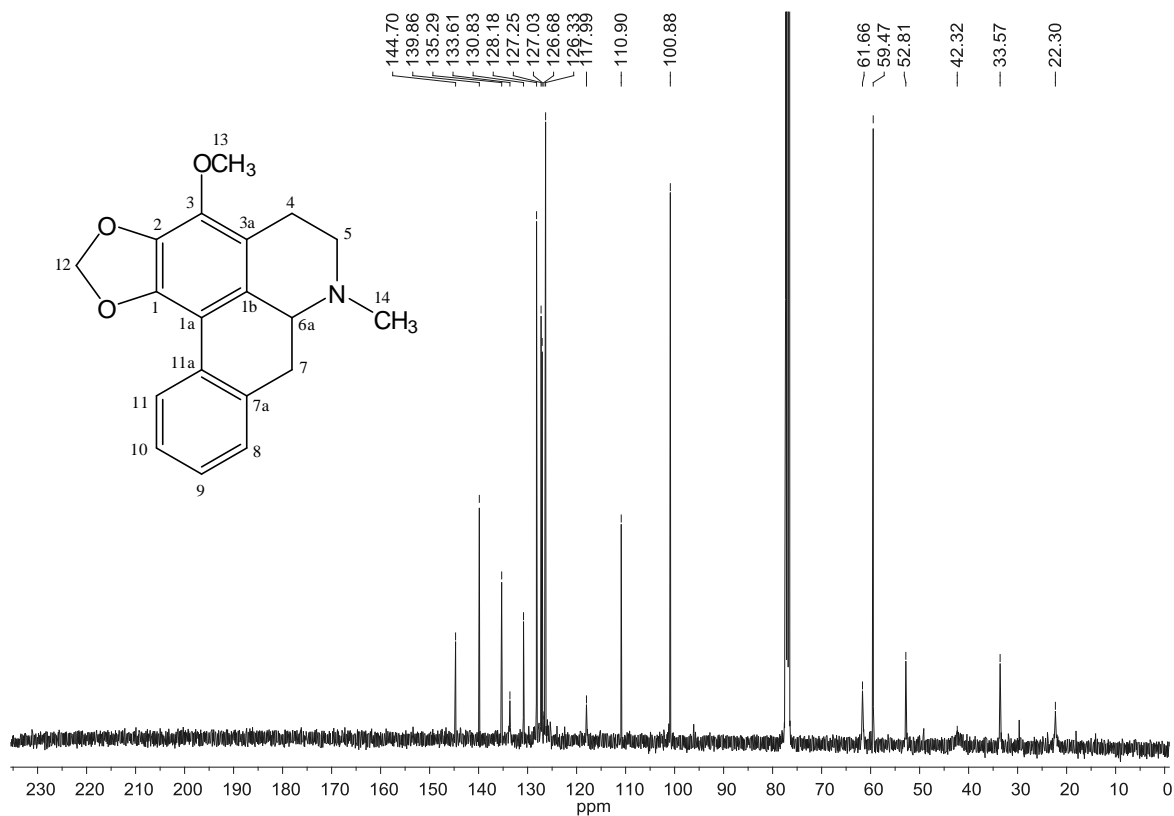


Figura 50. Ampliação do espectro 49 (δ 10–160) do alcaloide I.

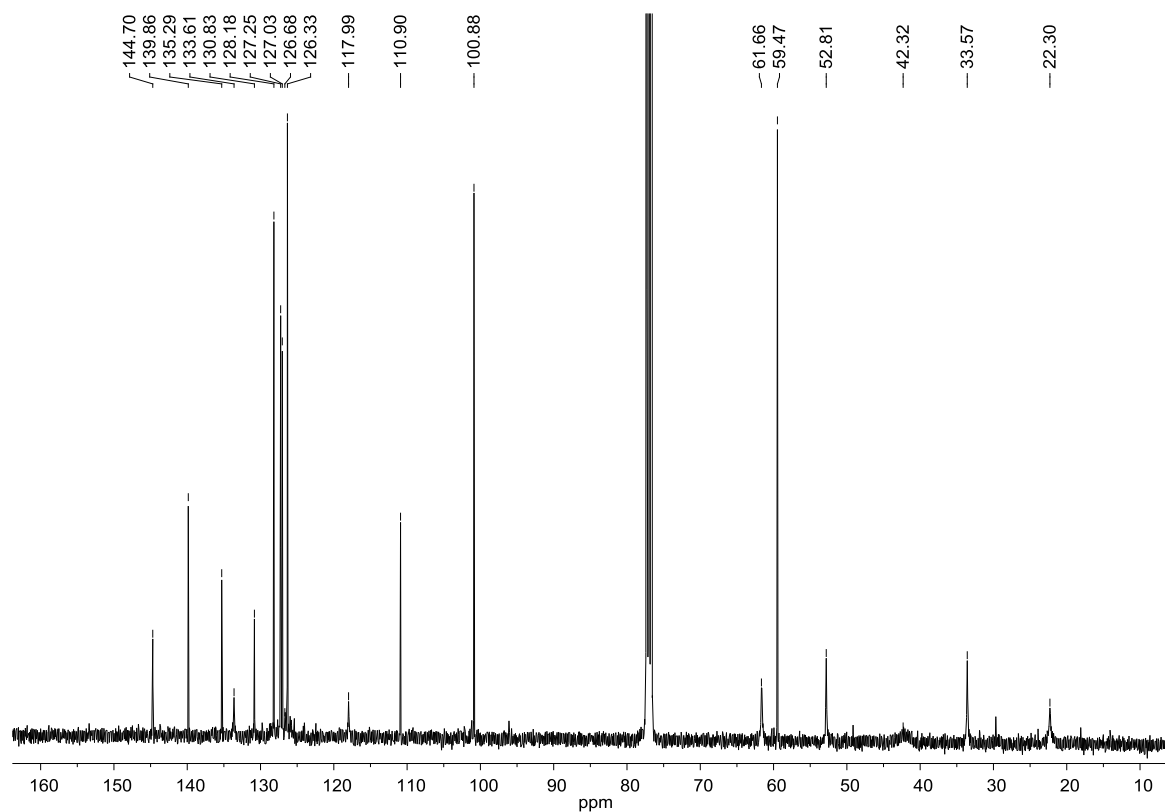


Figura 51. Ampliação do espectro 49 (δ 125–146) do alcaloide I.

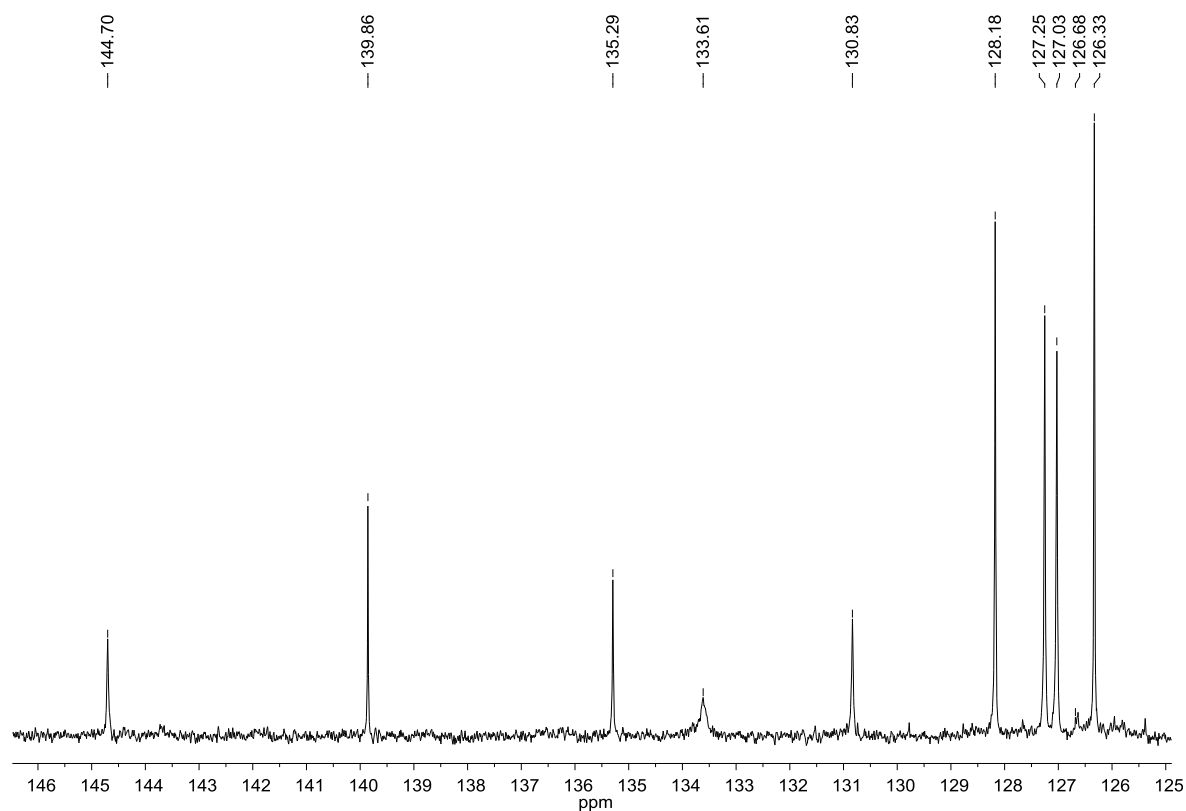


Figura 52. Mapa de contorno HSQC (400 MHz, CDCl₃) do alcaloide I.

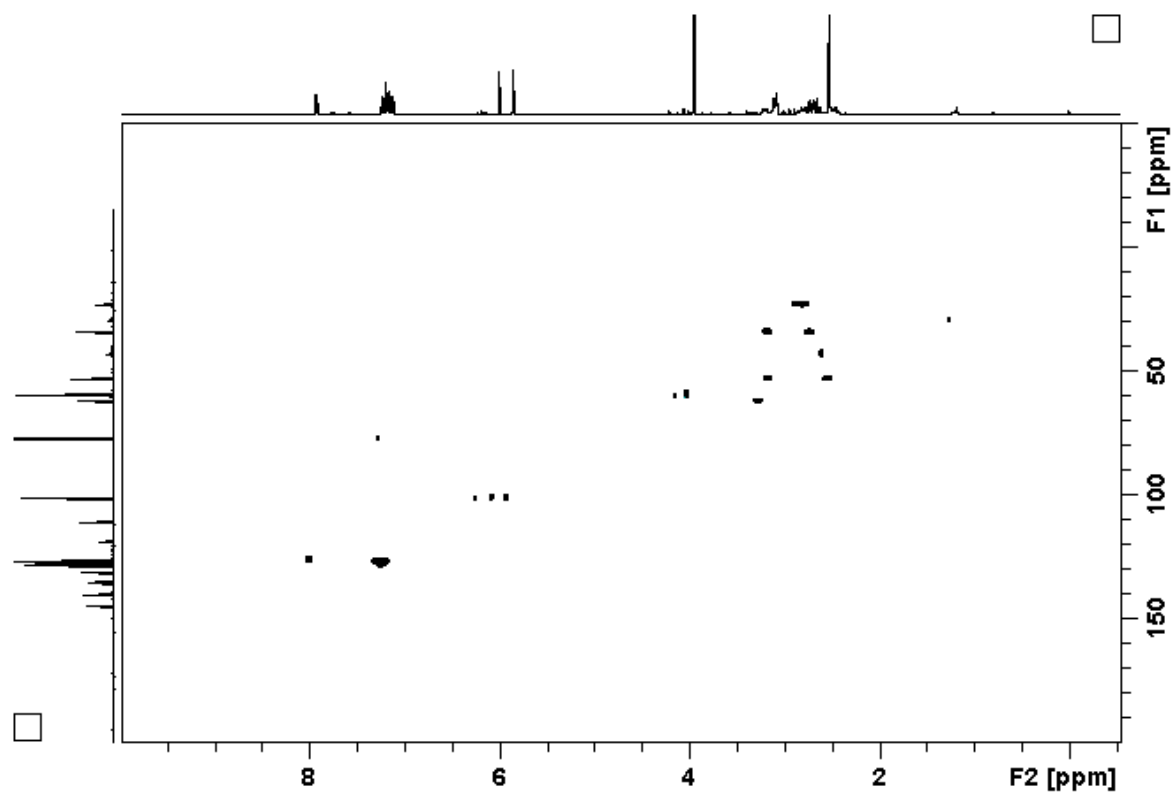


Figura 53. Mapa de contorno HSQC (δ 2,6–4,2) do alcaloide I.

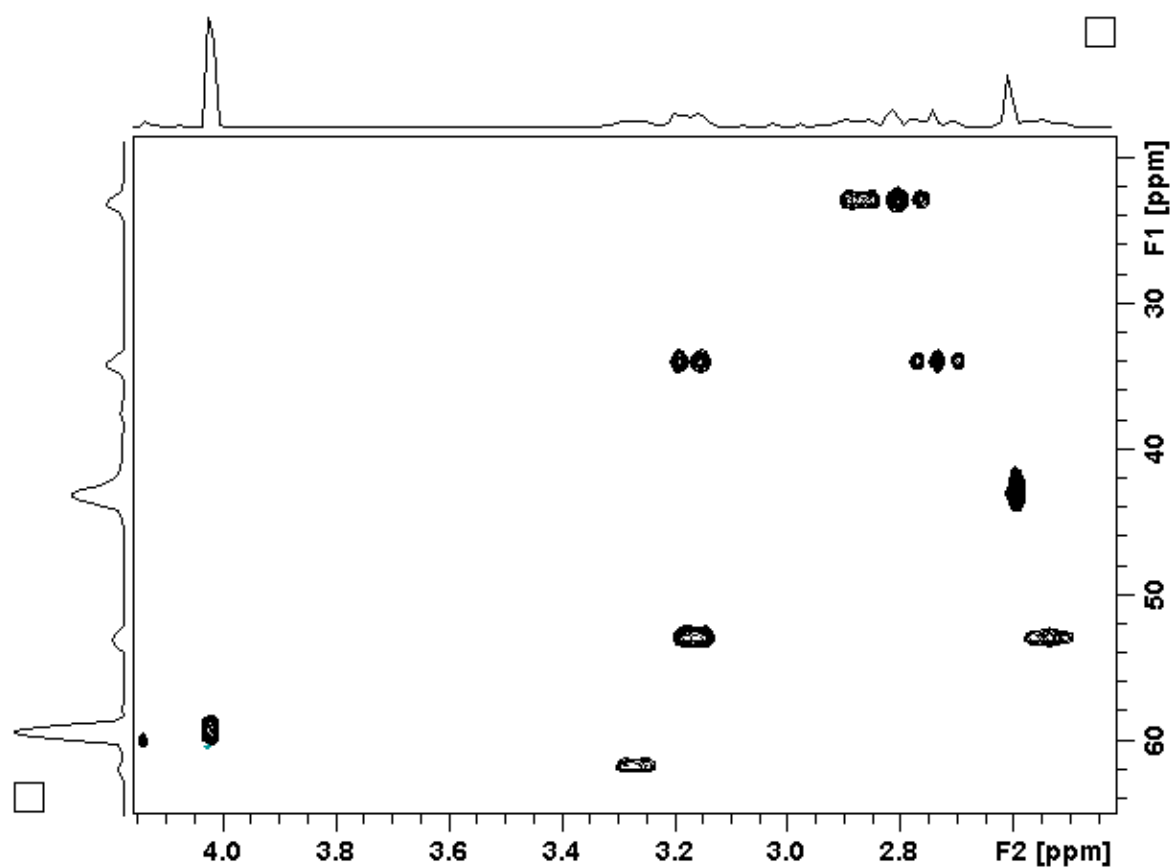
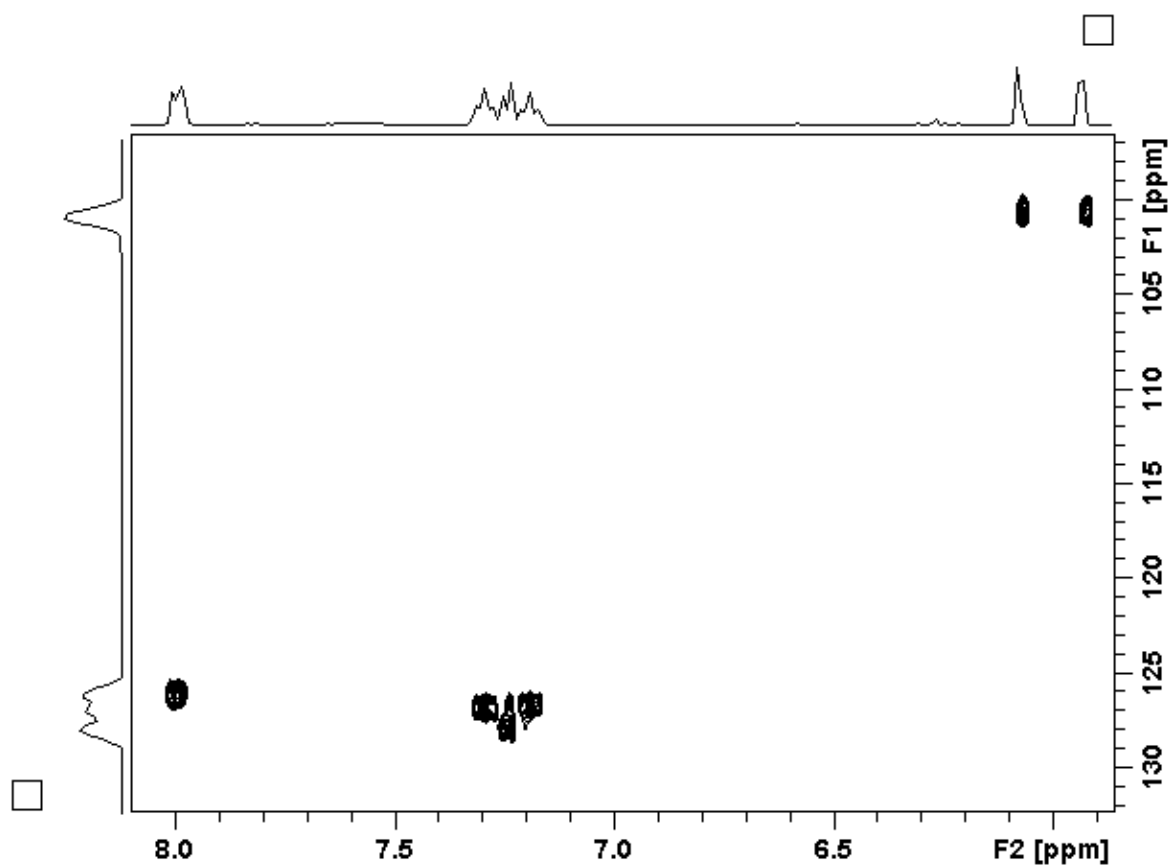


Figura 54. Mapa de contorno HSQC (δ 6,0–8,0) do alcaloide **I**.

A análise do mapa de contorno HMBC (Figuras 55–61) permitiu observar a correlação entre os sinais δ 3,94 (H-13) e 139,9 (C-3), indicando de forma inequívoca a posição da metoxila (Figura 58) (Tabela 7). As principais correlações foram representadas na Figura 62.

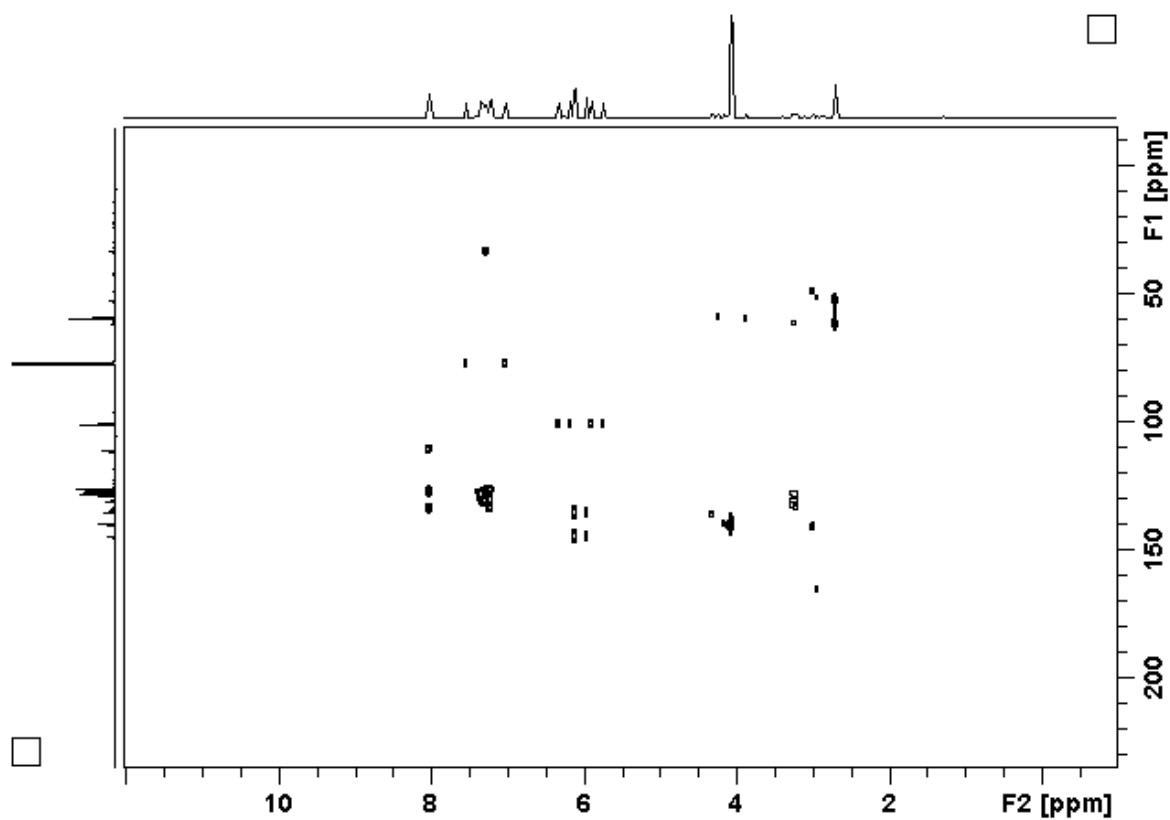
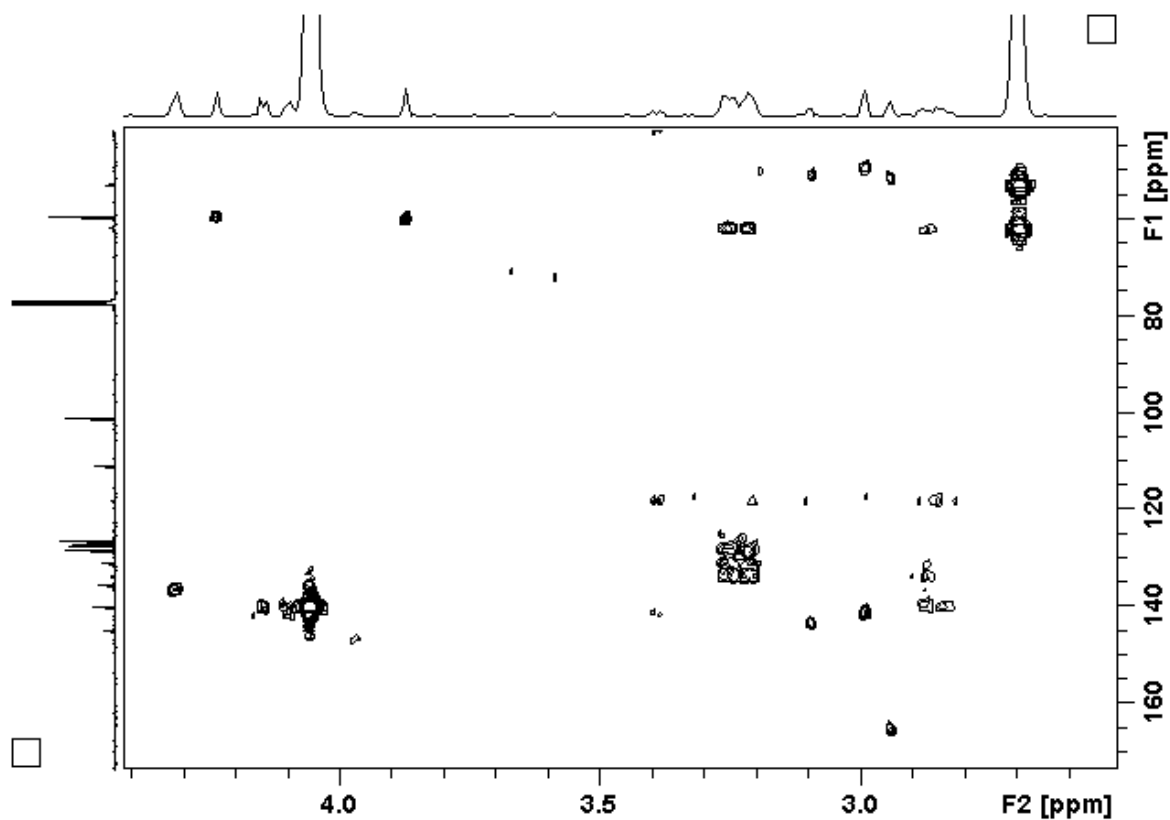
Figura 55. Mapa de contorno HMBC (400 MHz, CDCl₃) do alcaloide I.**Figura 56.** Mapa de contorno HMBC (δ 2,5–4,5) do alcaloide I.

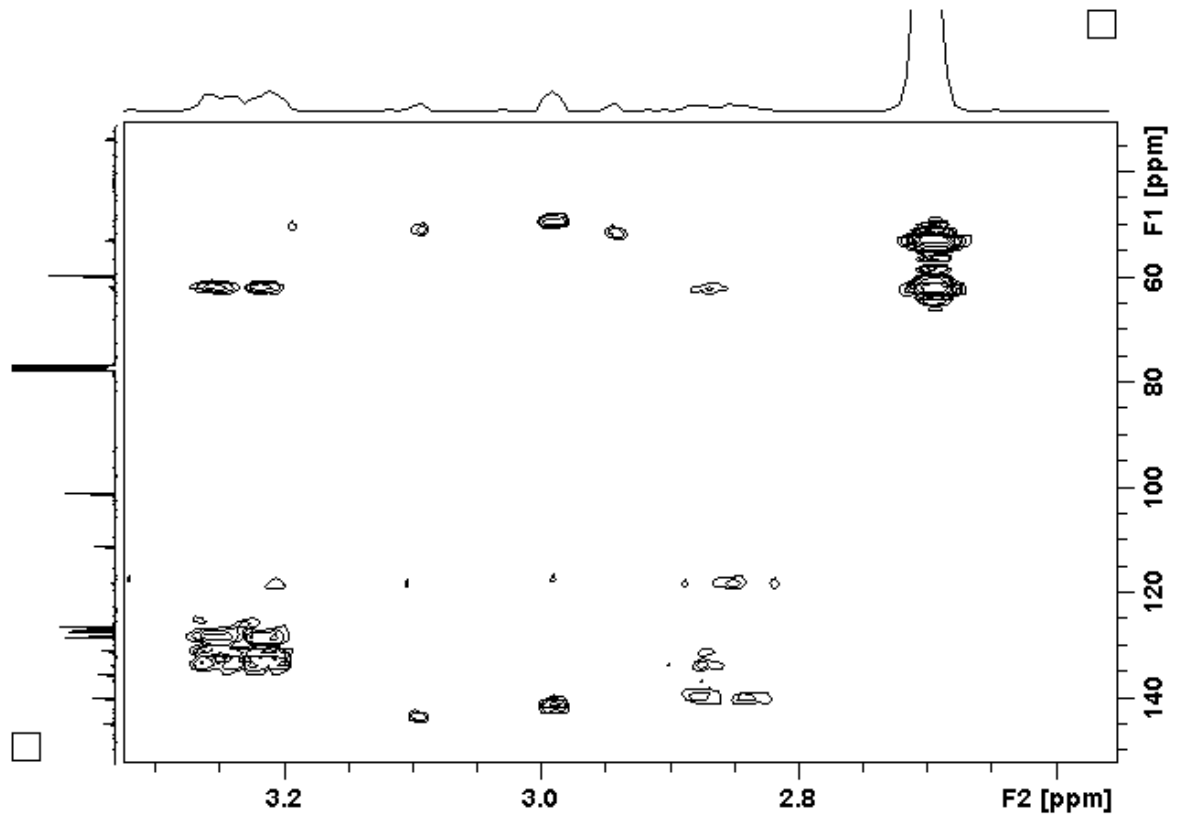
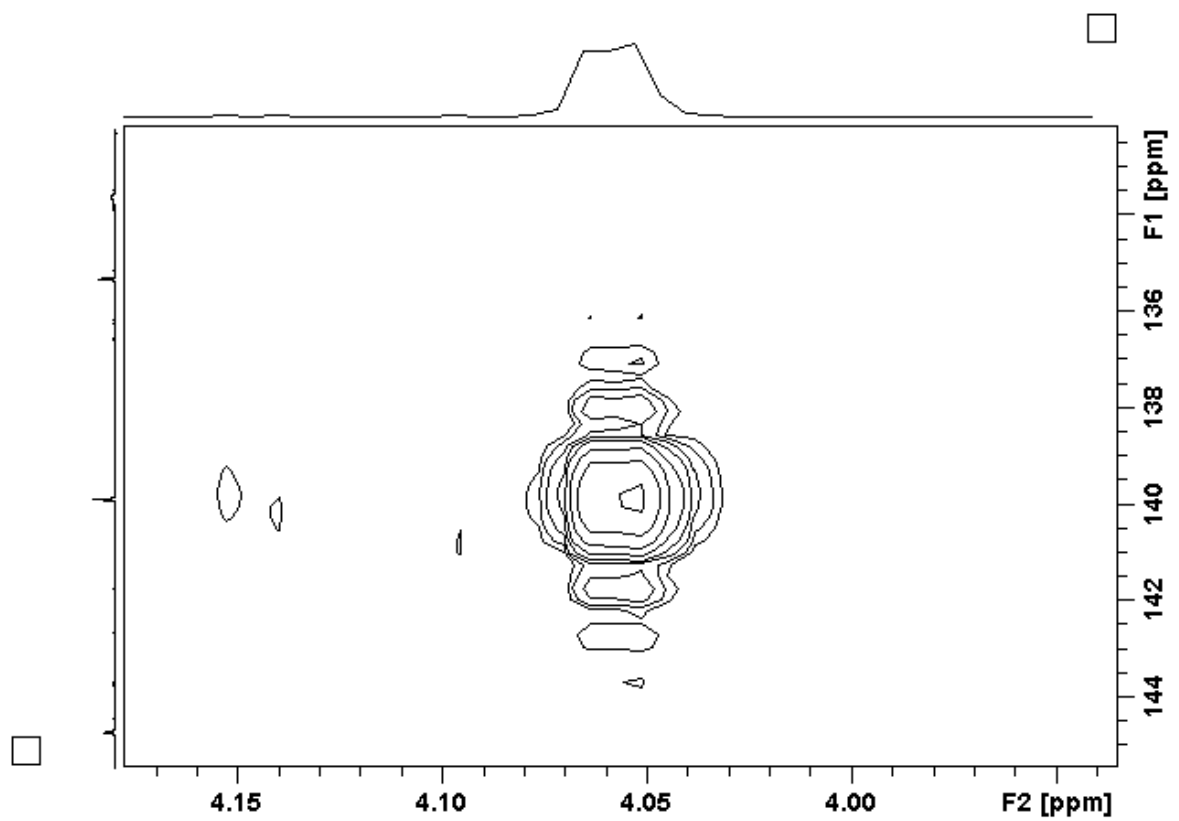
Figura 57. Mapa de contorno HMBC (δ 2,6–3,3) do alcaloide I.**Figura 58.** Mapa de contorno HMBC (δ 3,95–4,15) do alcaloide I.

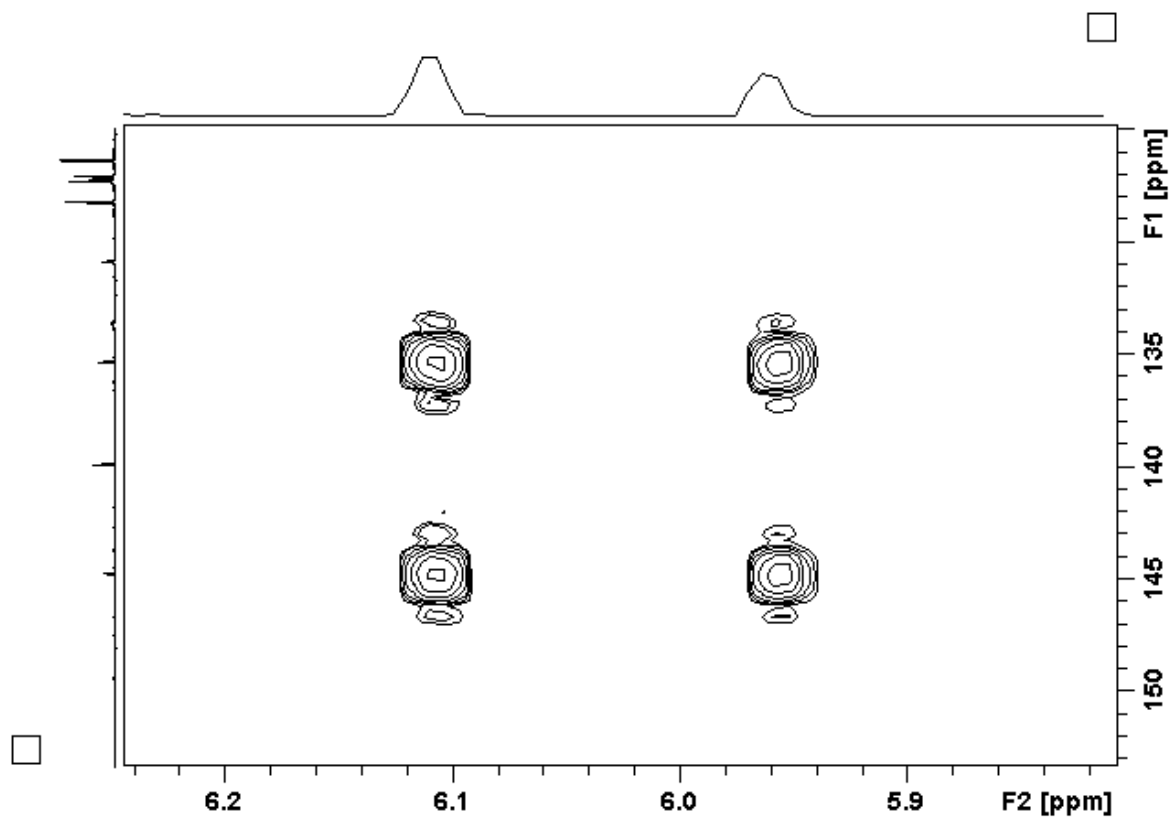
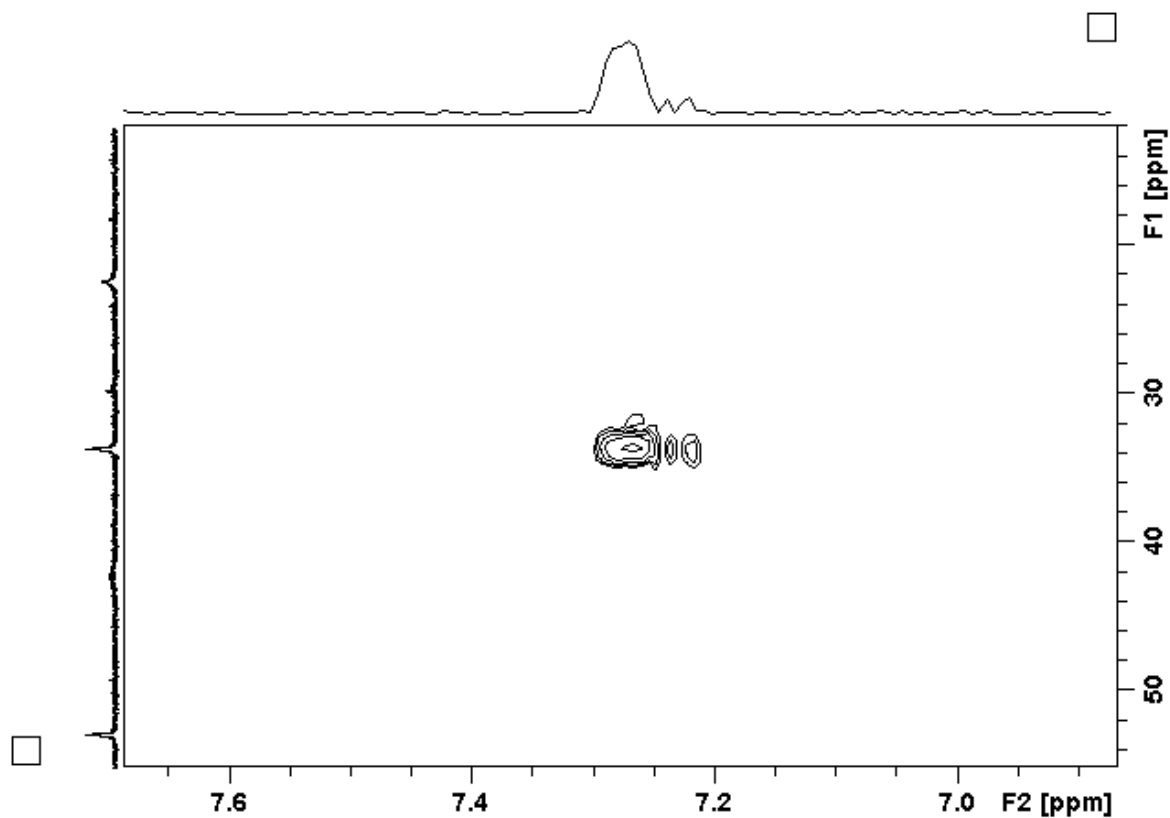
Figura 59. Mapa de contorno HMBC (δ 5,8–6,2) do alcaloide I.**Figura 60.** Mapa de contorno HMBC (δ 7,0–7,6) do alcaloide I.

Figura 61. Mapa de contorno HMBC (δ 6,5–8,5) do alcaloide **I**.

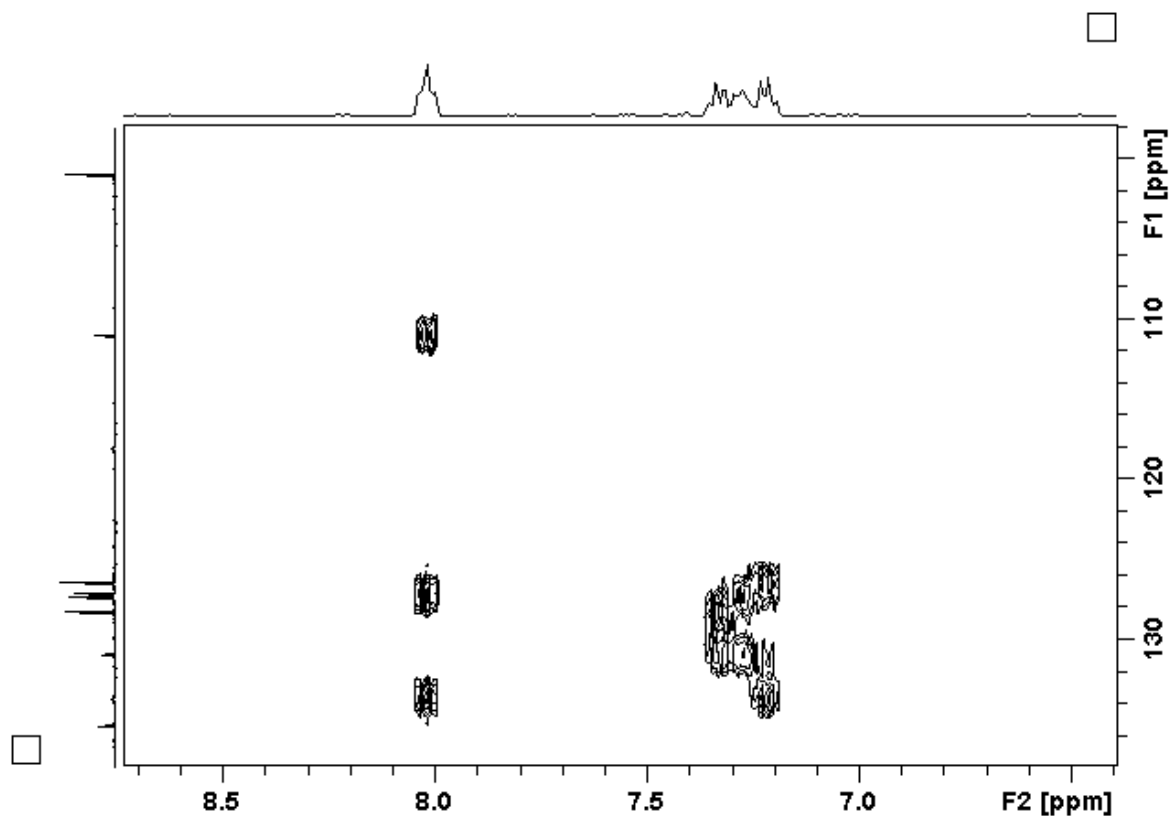
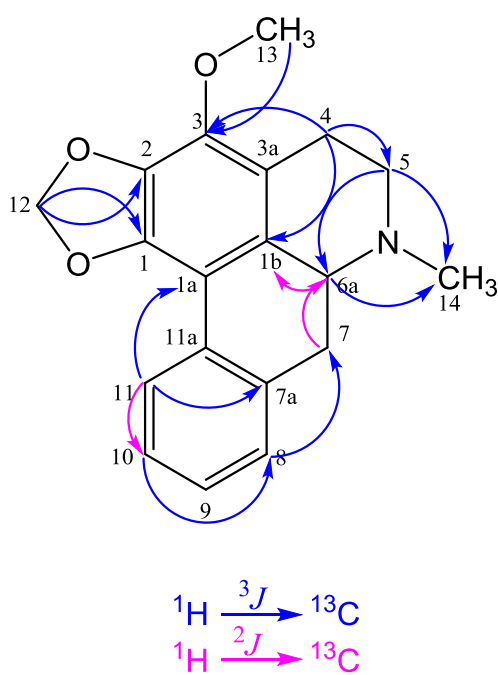


Figura 62 – Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **I**.



Os dados de RMN e EM foram comparados com aqueles encontrados na literatura (PEREIRA et al., 2017) e são consistentes com a estrutura da 1,2-metilenedioxi-3-metoxiaporfina (**I**), também conhecida como estefalagina. Esse alcaloide foi identificado pela primeira vez em 1955 por Paris e Le Men, na espécie *Stephania dinkladei* Diels da família Menispermaceae (OLIVER-BEVER, 1986), e isolado posteriormente dos seus galhos (GOREN et al., 2003). Na família Annonaceae, foi relatado nas cascas do fruto de *Xilopia aromática* Sam (MARTINS et al., 1995) e em *Annona crassiflora* Mart (PEREIRA et al., 2017).

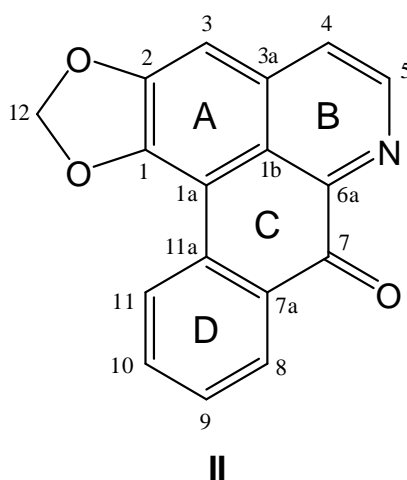
Tabela 7. Dados de RMN da estefalagina (**I**) em CDCl₃.

Posição	δ_{H}^a mult. ^b (J em Hz)	δ_{C}^a	DEPT	COSY	HSQC	HMBC
1		144,7	C			H-12; H-12'
1a		110,9	C			H-11
1b		118,0	C			H-6a; H-4
2		133,6	C			H-12; H-12'
3		139,9	C			H-13; H-4
3a		128,2	C			
4	2,81 m			H-4'; H-5'	H-4	
4'	2,75 m	22,3	CH ₂	H-4; H-5; H-5'	H-4'	
5	2,45 ddd (12,0; 12,0; 4,0)			H-4'; H-5'	H-5	
5'	3,09 ddd (12,0; 4,0)	52,8	CH ₂	H-5; H-4; H-4'	H-5'	H-6a; H-4'
6a	3,19 dd (14,0)	61,7	CH	H-7; H-7'	H-6a	H-5; H-7
7	2,65 dd (14,0; 14,0)			H-6a; H-7'	H-7	H-8
7'	3,09 m	33,6	CH ₂	H-7; H-6a	H-7'	
7a		135,3	C			H-11
8	7,16 dd (7,3; 1,1)	127,3	CH	H-9	H-8	H-10
9	7,11 ddd (7,3; 7,3; 1,1)	126,7	CH	H-8; H-10 H-11	H-9	
10	7,20 ddd (7,3; 7,3; 1,1)	127,0	CH	H-9; H-11	H-10	H-11; H-8
11	7,92 dd (7,3; 1,1)	126,3	CH	H-9; H-10	H-11	H-9
11a		130,8	C			H-8; H-10
12	5,99 d (1,4)			H-12'	H-12	
12'	5,85 d (1,4)	100,9	CH ₂	H-12	H-12'	
13	3,94 s	59,5	CH ₃		H-13	
14	2,51 s	42,3	CH ₃		H-14	H-6a; H-5

^aExperimentos de RMN realizados a 400 e 100 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bMultiplicidade: s (singlete); d (dublete); dd (duplo dublete); ddd (duplo duplo dublete); m (multiplete).

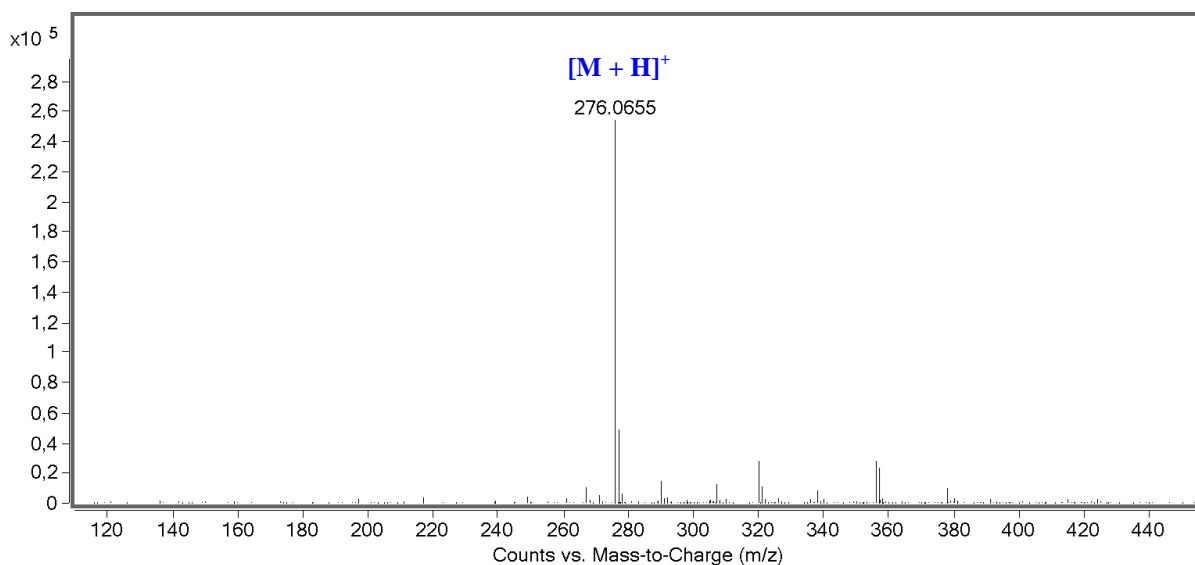
Fonte: autora.

5.4.2 Elucidação estrutural do alcaloide **II**



O alcaloide **II** (1,0 mg), foi isolado como um sólido amarelo que também apresentou teste positivo com o revelador IC β Pt (R_f 0,75) (Figura 34). Foi submetido a análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $C_{17}H_9NO_3$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a quatorze. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 276,0655 $[M + H]^+$, calculado para $C_{17}H_{10}NO_3^+$, 276,0655 (Δ 0,0 ppm) (Figura 63).

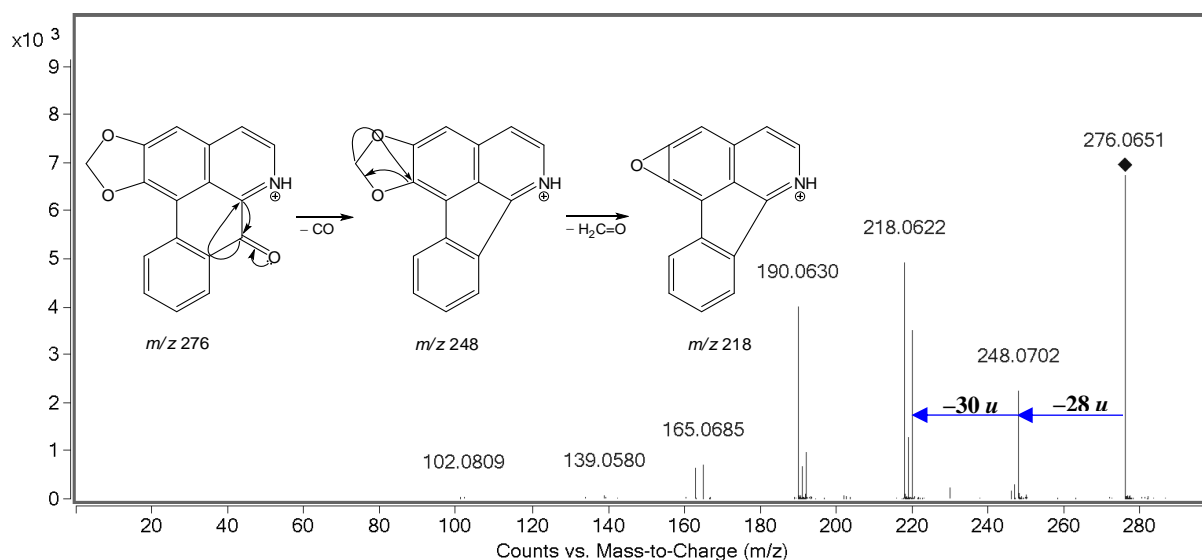
Figura 63. EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **II**.



Fonte: autora.

Quando o sinal de m/z 276 foi submetido à análise por EM sequencial (EM/EM), foram observados os fragmentos de m/z 248 e m/z 218, atribuídos às eliminações neutras de CO (28 u) e H₂C=O (30 u), por meio de contrações dos anéis como mostra a proposta de mecanismo (Figura 64) (SILVA et al., 2017).

Figura 64. EM/EM-IES-(+) do alcaloide **II**.



Fonte: autora.

Pela análise do espectro de RMN ¹H de **II** (Tabela 8) (Figuras 65–67), foi possível observar um padrão de substituição do anel aromático (D), similar ao do alcaloide **I**, cujos sinais de hidrogênios foram observados em δ 8,58 (1H, dd, $J = 8,0$ e $1,0$ Hz), 8,33 (1H, dd, $J = 8,0$ e $1,0$ Hz), 7,70 (1H, ddd, $J = 8,0$; $8,0$ e $1,0$ Hz) e 7,51 (1H, ddd, $J = 8,0$; $8,0$ e $1,0$ Hz), relativos aos hidrogênios H-11, H-8, H-10 e H-9, respectivamente do anel D. Quando irradiado o sinal δ 8,33 (H-8) através do experimento de RMN de TOCSY 1D, foi observada a transferência de polarização através de δ 8,58 (H-11), 7,70 (H-10) e 7,51 (H-9) (Figura 68), indicando que estes hidrogênios estão ligados no mesmo anel aromático e em sequência. Os sinais observados em δ 7,86 (1H, d, $J = 5,2$ Hz) e 8,61 (1H, d, $J = 5,2$ Hz), foram correlacionados à H-4 e H-5, respectivamente (anel B). A partir do experimento de TOCSY 1D, irradiando o sinal δ 7,86 (H-4) foi observada a transferência de polarização para δ 8,61 (H-5), confirmando que são hidrogênios vicinais (Figura 69). Também foi observado um singlete em δ 6,34 (1H, H-3), cuja análise do espectro de NOESY 1D, permitiu confirmar sua posição, uma vez que apresentou correlação com o sinal δ 7,86 (H-4), devido a proximidade espacial (~ 4 Å) (Figura 70). Foi observado ainda um singlete em δ 6,34 (2H), referente ao

grupo metileno (H-12). A análise do mapa de contorno COSY confirma as correlações entre os sinais supracitados (Figuras 71–73).

Figura 65. Espectro de RMN de ^1H do alcaloide **II** (600 MHz, CD_3OD).

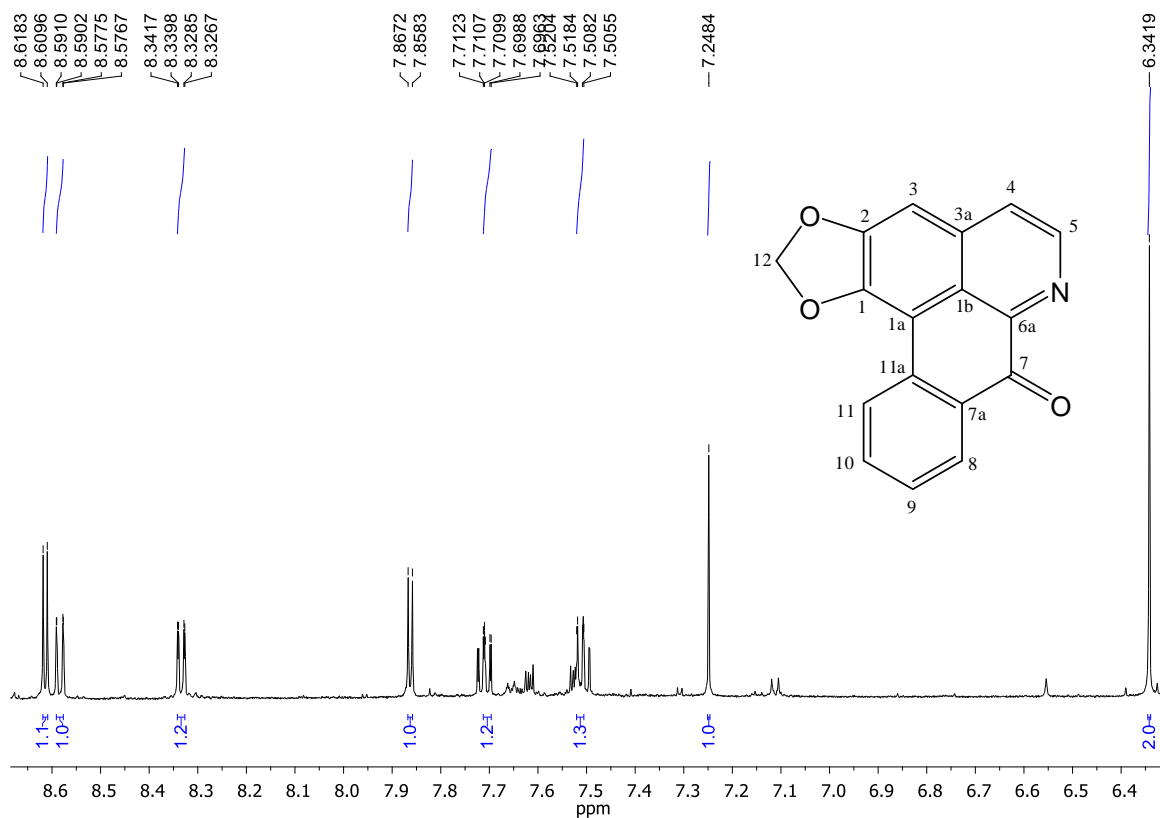


Figura 66. Ampliação do espectro 65 (δ 7,51–7,71) do alcaloide **II**.

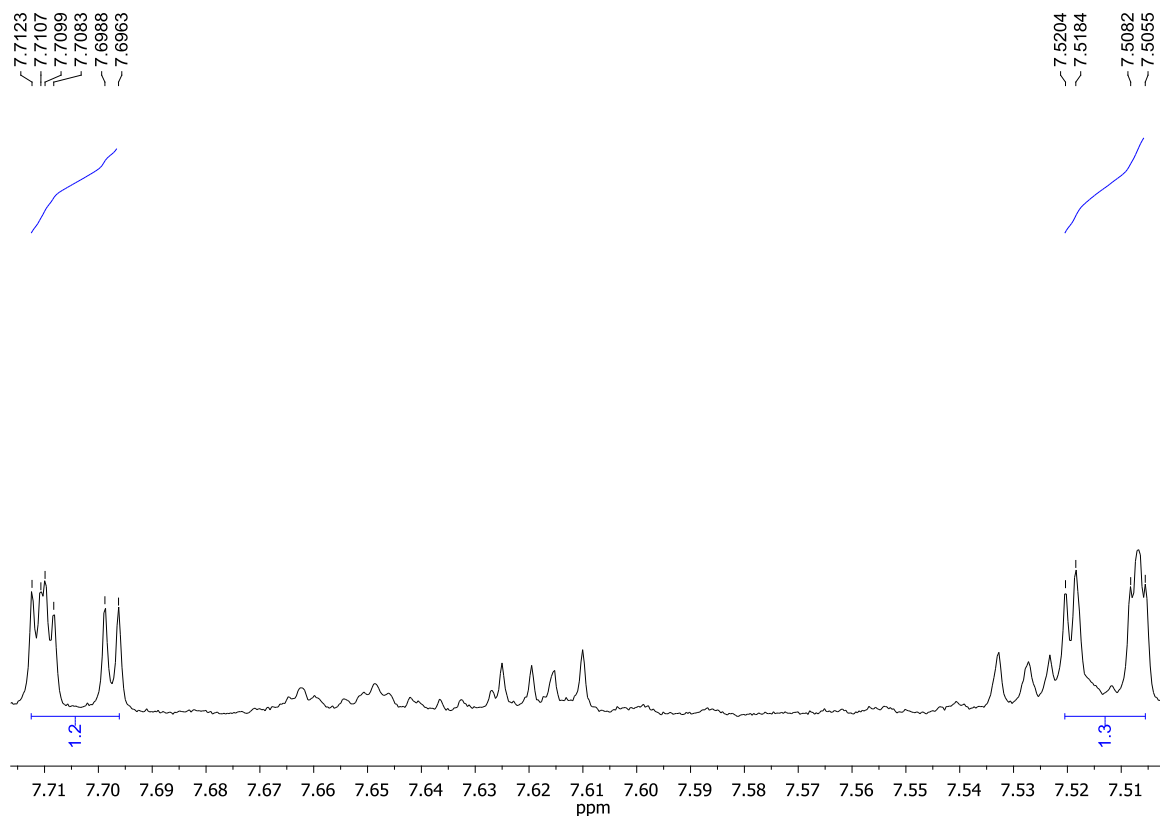


Figura 67. Ampliação do espectro 65 (δ 7,85–8,65) do alcaloide **II**.

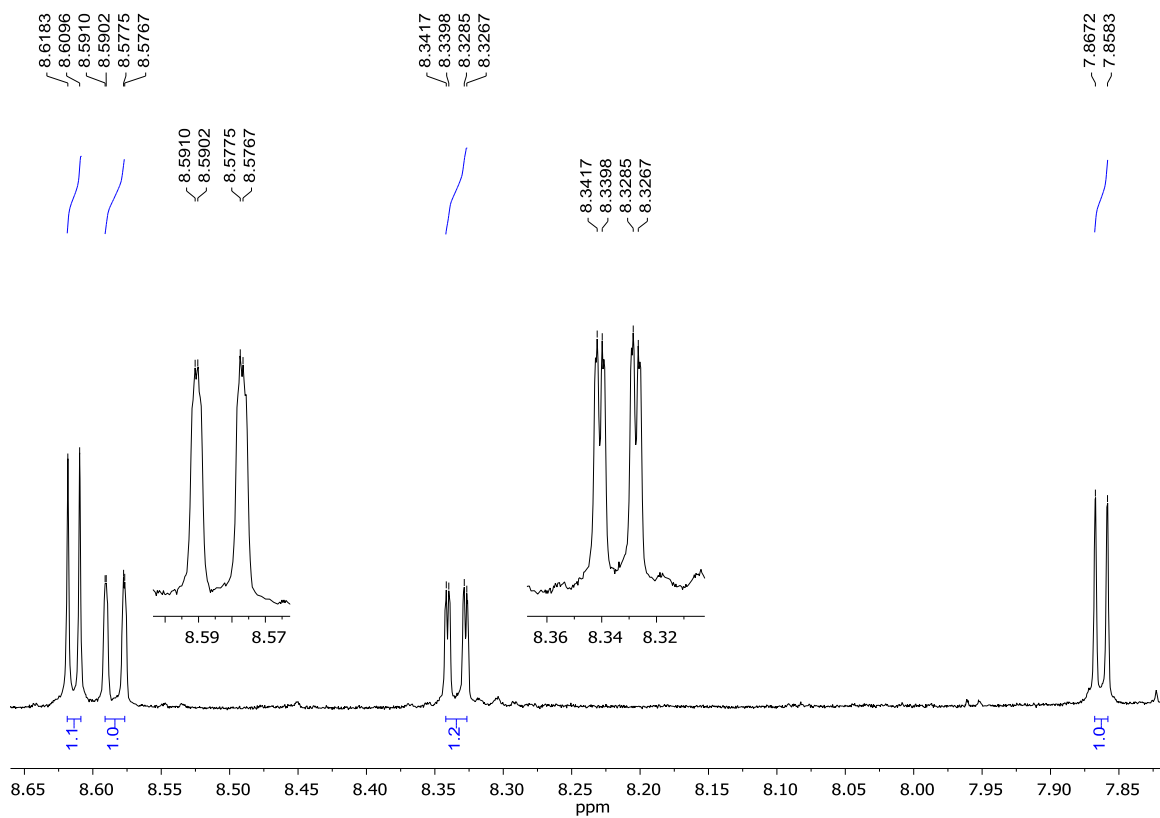


Figura 68. Espectro de RMN de TOCSY 1D (600 MHz, CD₃OD), irradiando 8,33 (H-8) do alcaloide **II**.

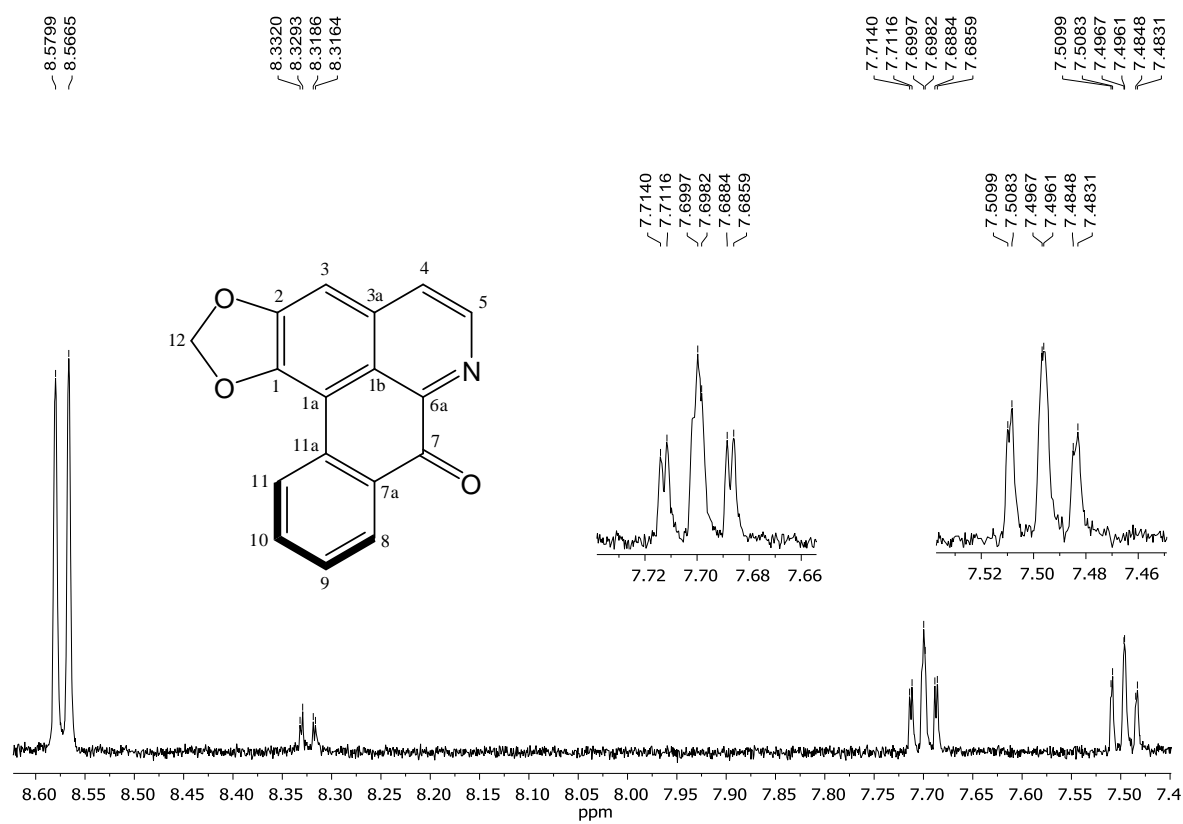


Figura 69. Espectro de RMN de TOCSY 1D (600 MHz, CD₃OD), irradiando δ 7,86 (H-4) do alcaloide **II**.

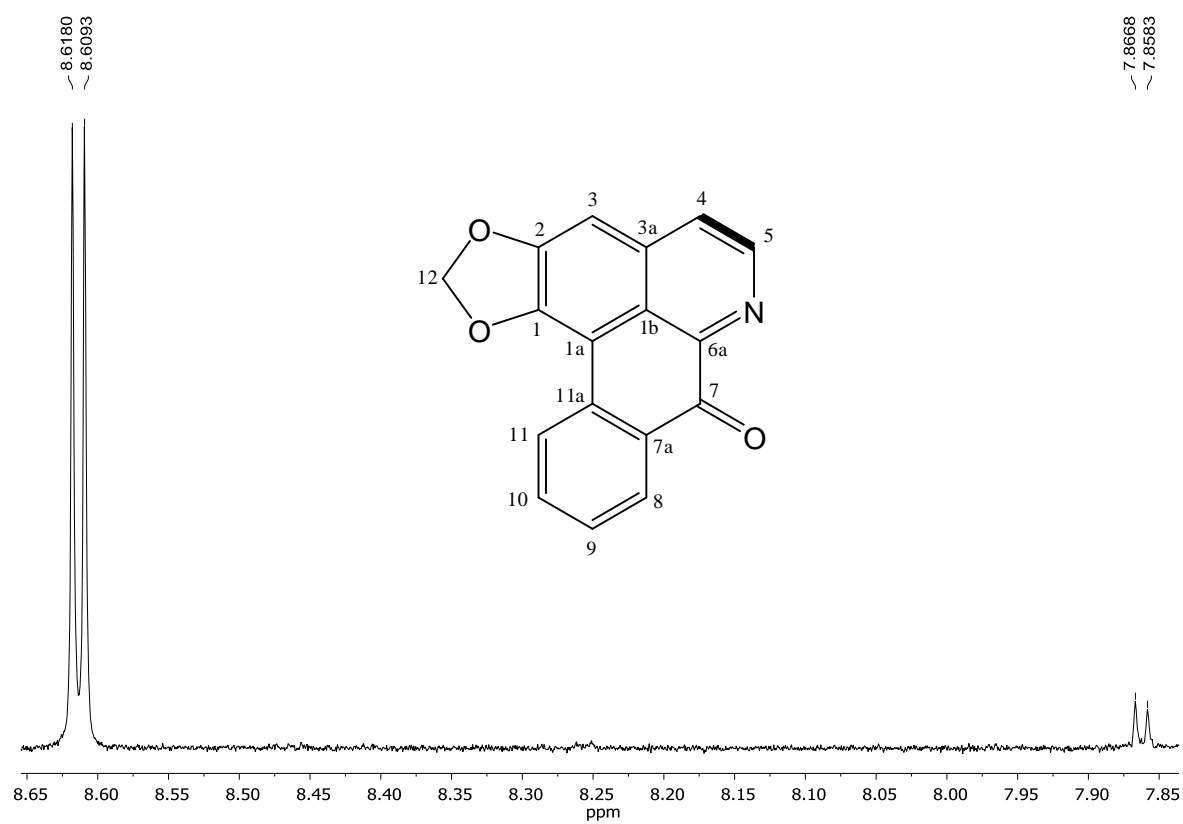


Figura 70. Espectro de RMN de NOESY 1D (600 MHz, CD₃OD), irradiando δ 7,24 (H-3) do alcaloide **II**.

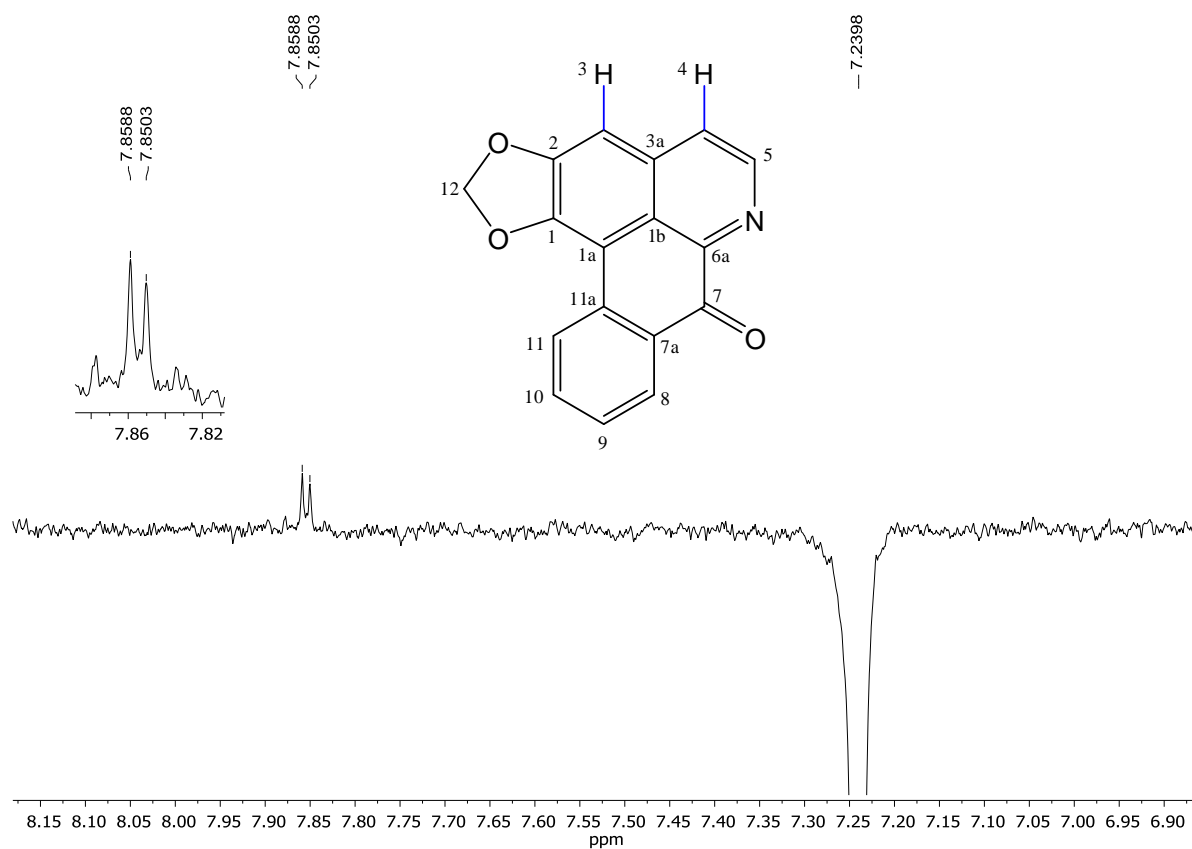


Figura 71. Mapa de contorno COSY do alcaloide **II**.

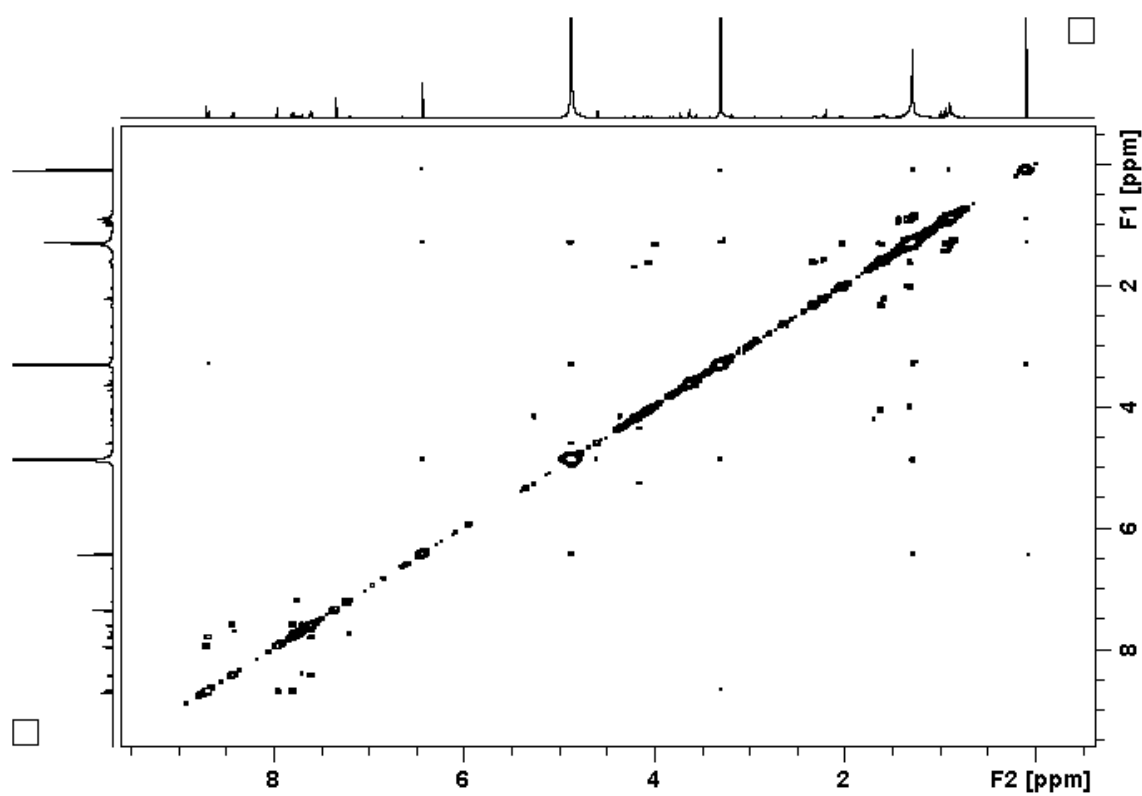


Figura 72. Mapa de contorno COSY (δ 6,4–8,8) do alcaloide II.

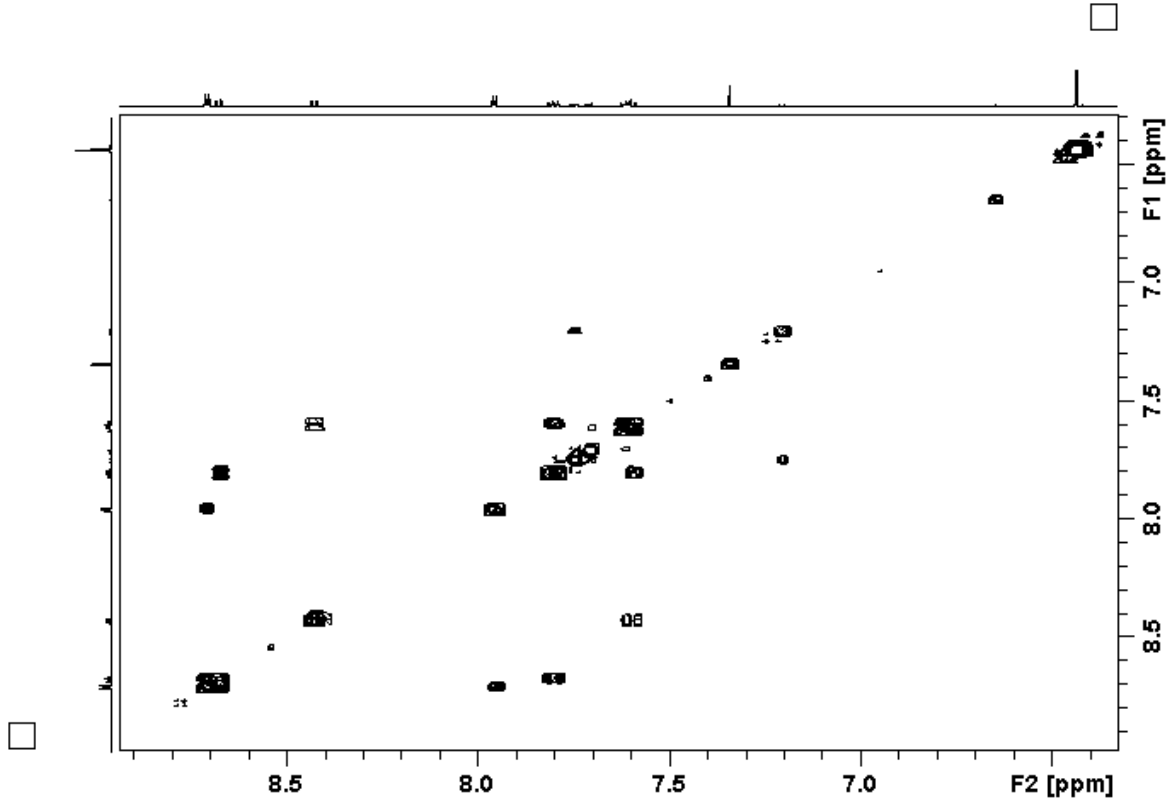
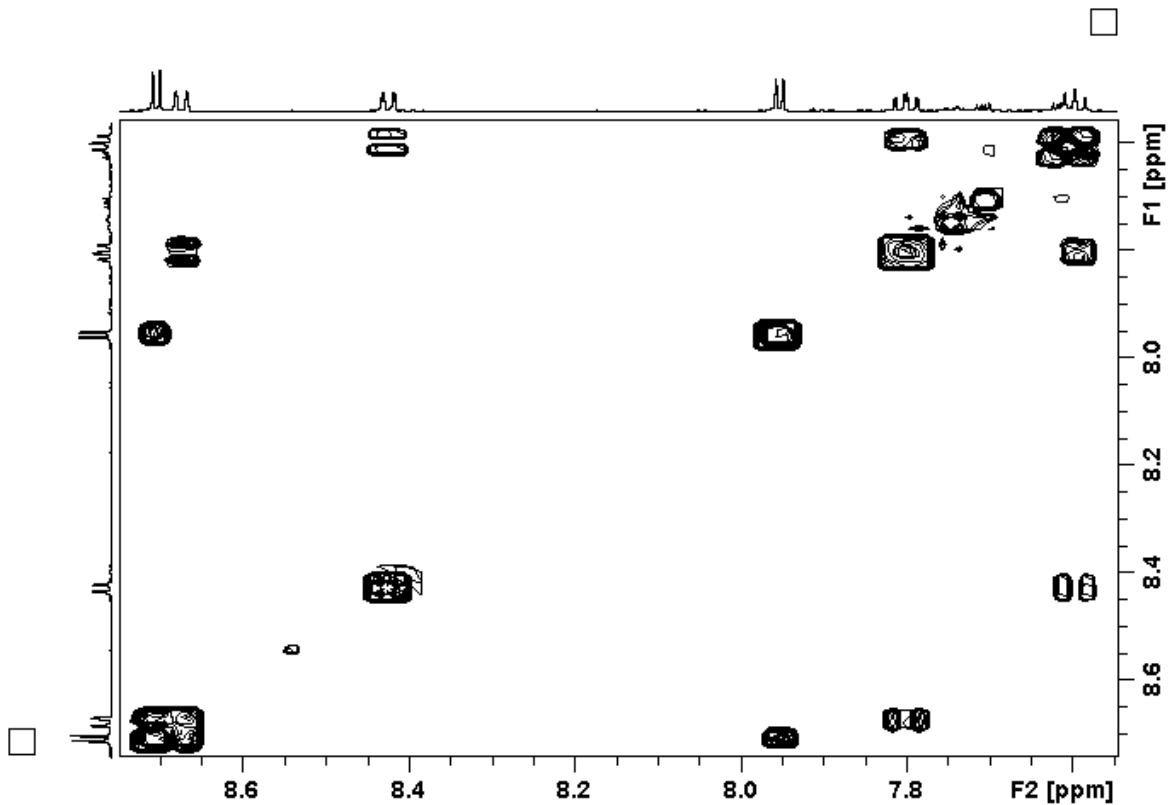


Figura 73. Mapa de contorno COSY (δ 6,8–8,9) do alcaloide II.



No espectro de DEPTQ (Figuras 74–75) e no mapa de contorno HSQC (Figuras 76–79), foram observados dezessete sinais de carbonos, que foram correlacionados aos respectivos hidrogênios (Tabela 8).

Figura 74. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ do alcaloide **II** (150 MHz, CD_3OD).

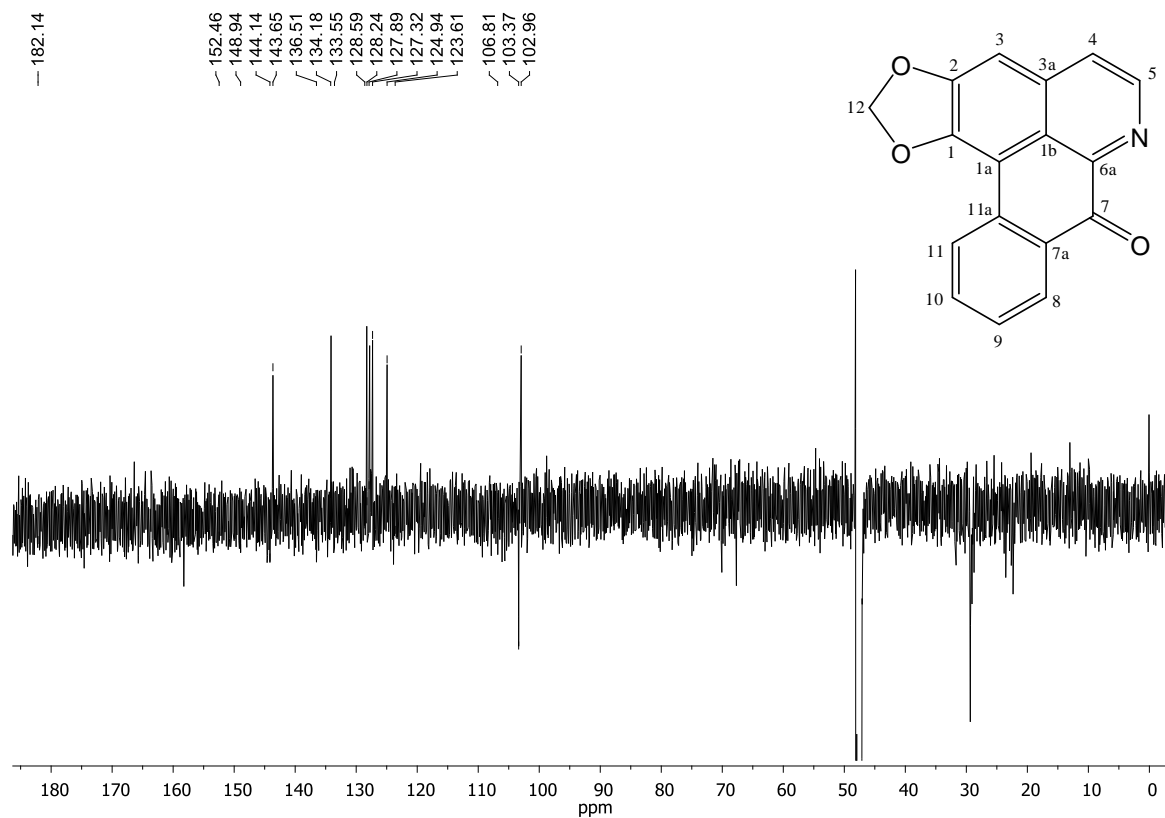


Figura 75. Ampliação do espectro 74 (δ 105–180) do alcaloide **II**.

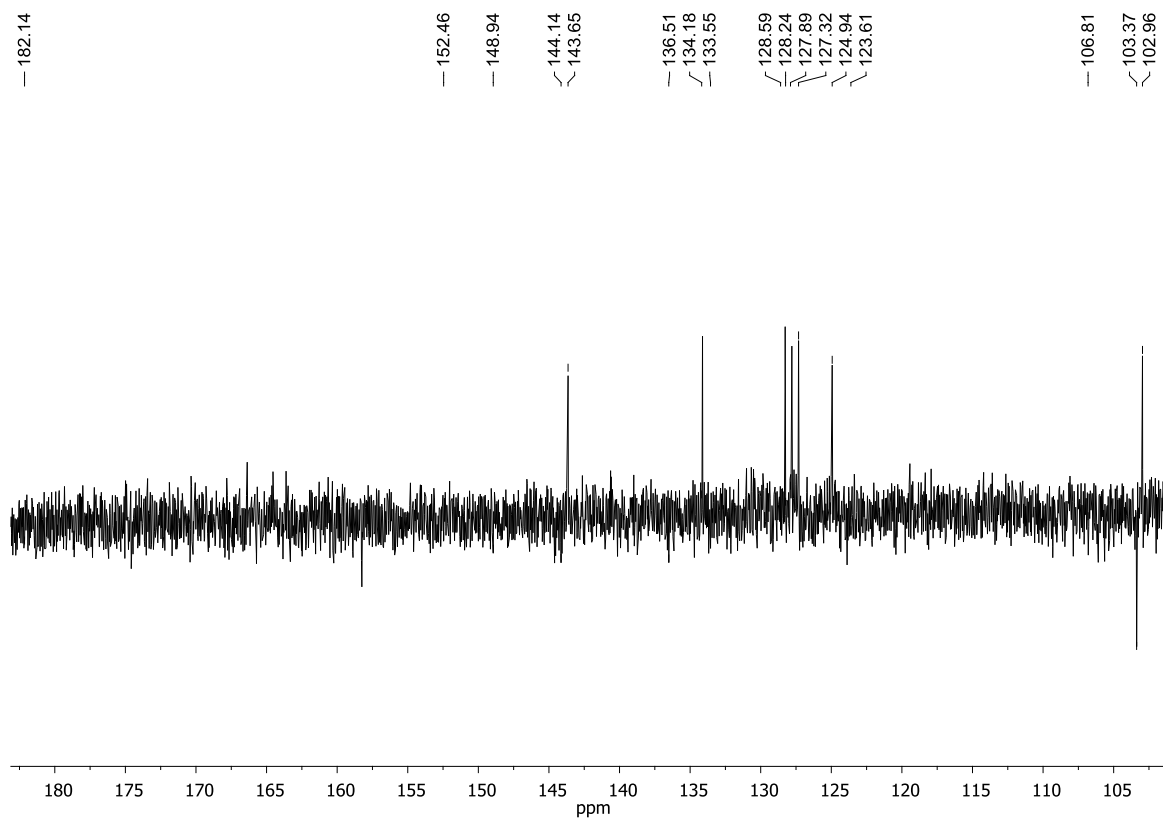


Figura 76. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD_3OD) do alcaloide **II**.

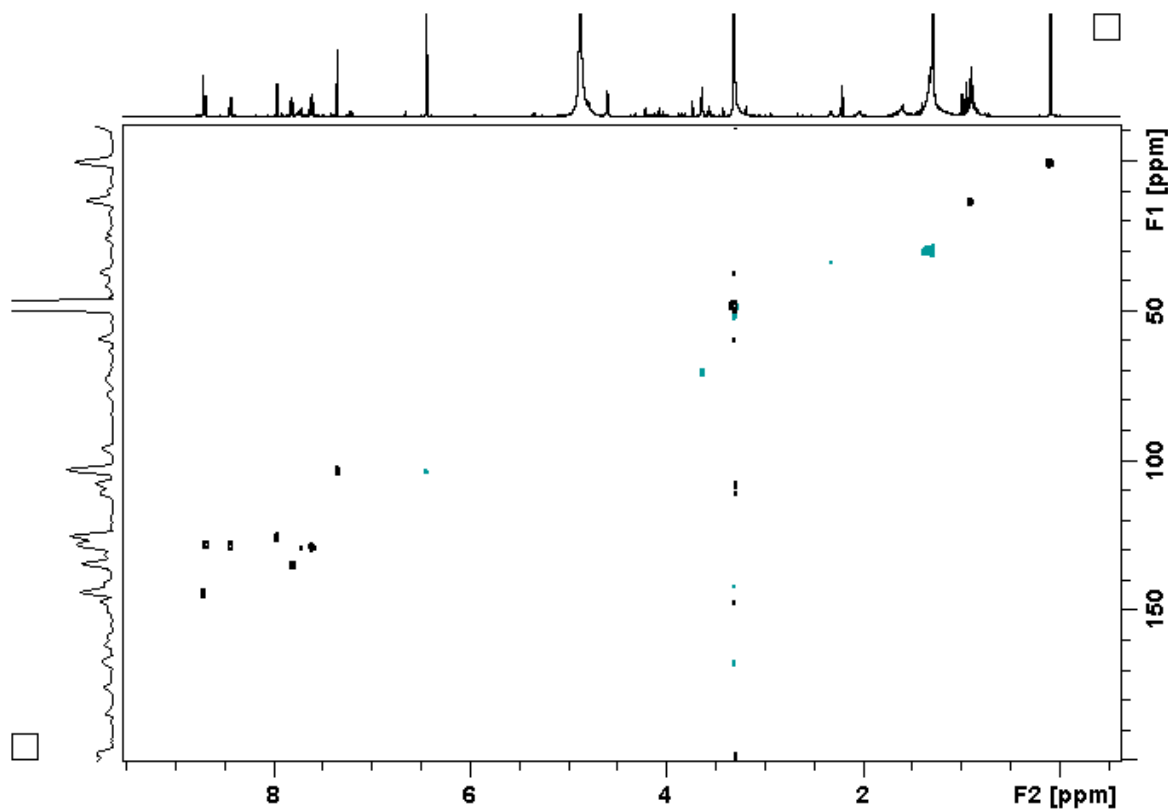


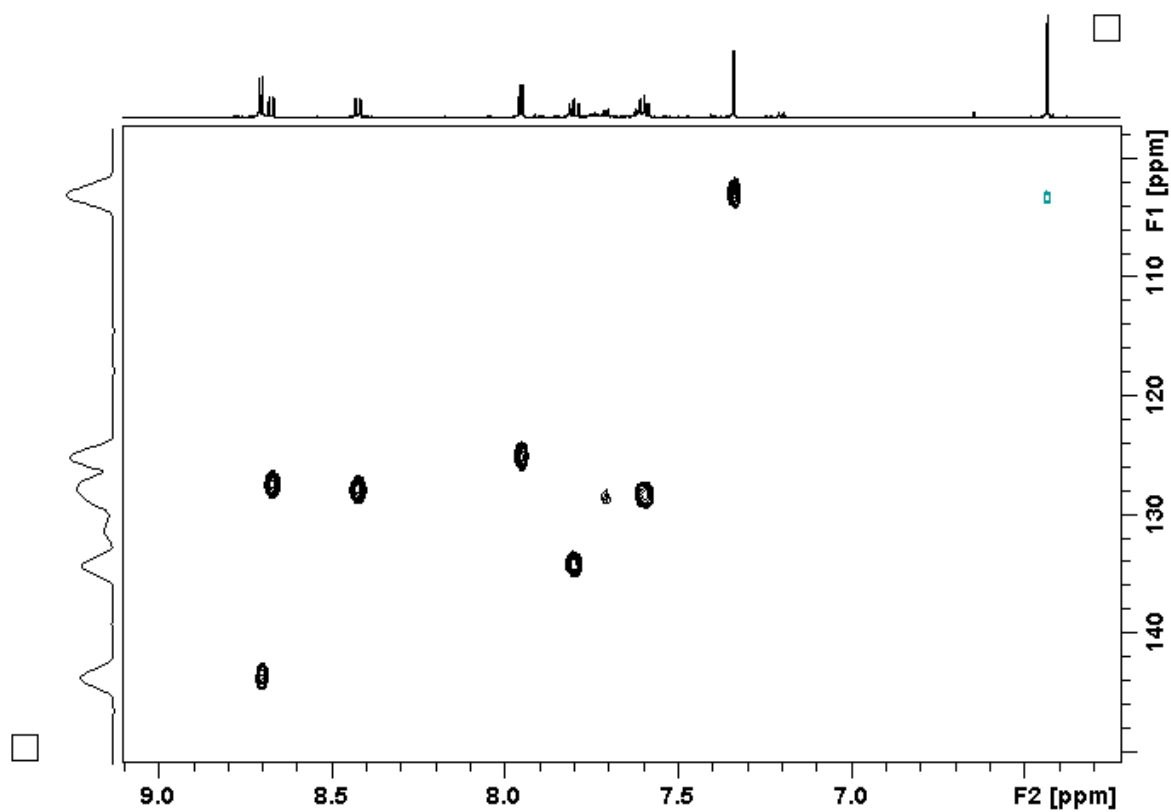
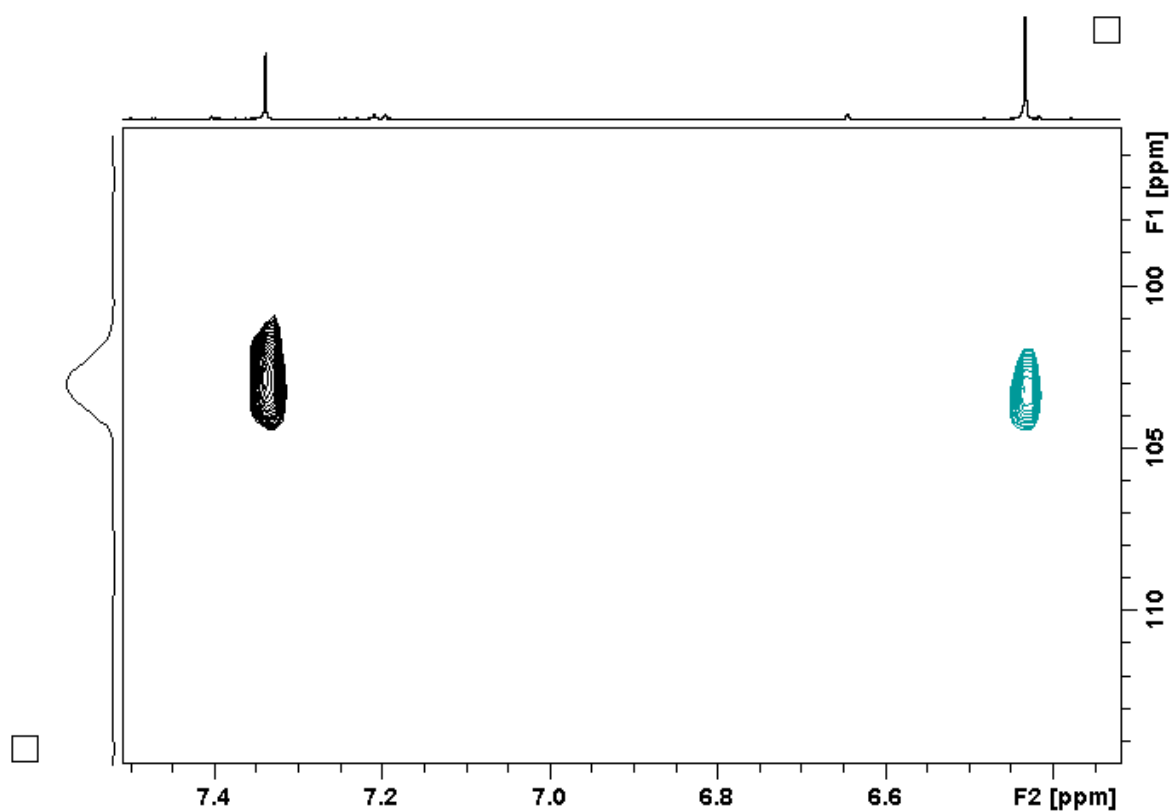
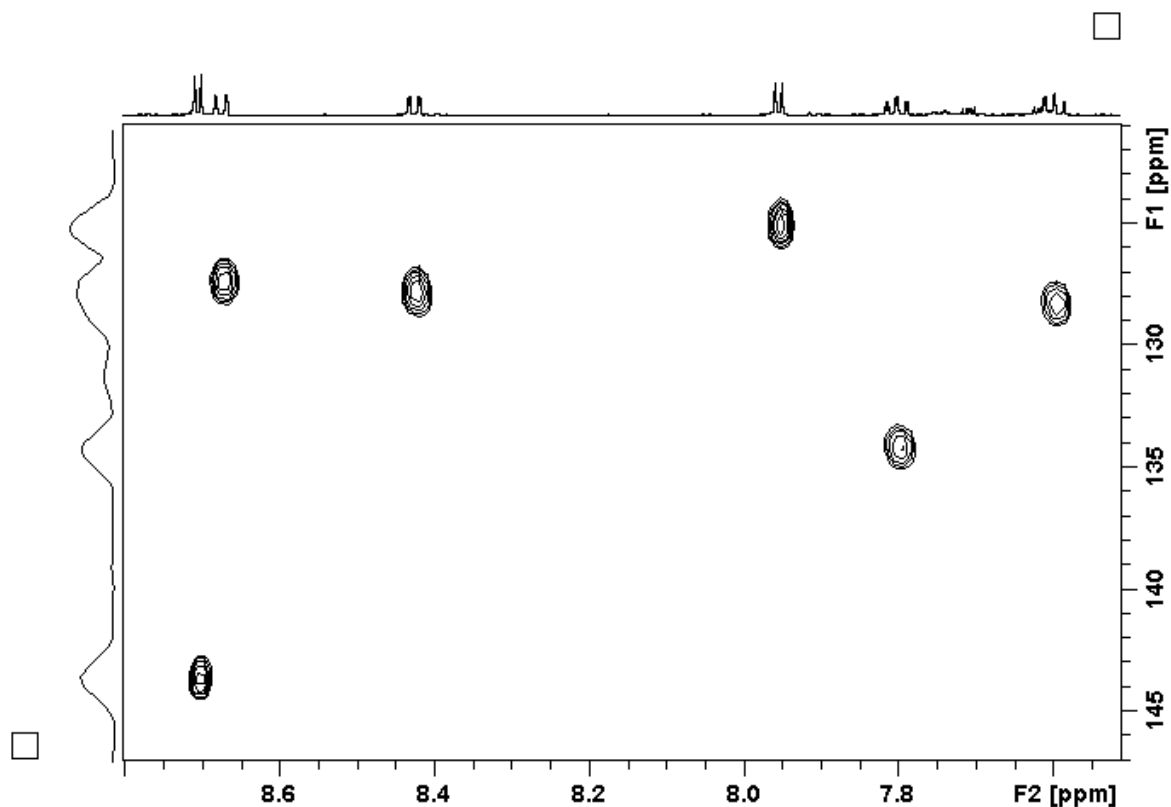
Figura 77. Mapa de contorno HSQC (δ 6,8–9,0) do alcaloide II.**Figura 78.** Mapa de contorno HSQC (δ 6,4–7,4) do alcaloide II.

Figura 79. Mapa de contorno HSQC (δ 7,6–8,7) do alcaloide **II**.

A análise do mapa de contorno HMBC (Figuras 80–85) permitiu observar a correlação entre o sinal δ 6,34 (H-12) com os sinais 148,9 (C-1) e 152,5 (C-2) do anel aromático (anel A), confirmando a posição do grupo metilendioxi, além de correlacionar o sinal δ 8,33 (H-8) com o sinal δ 182,1 (C-7), característico da carbonila presente na estrutura de alcaloides do tipo oxoaporfínicos.

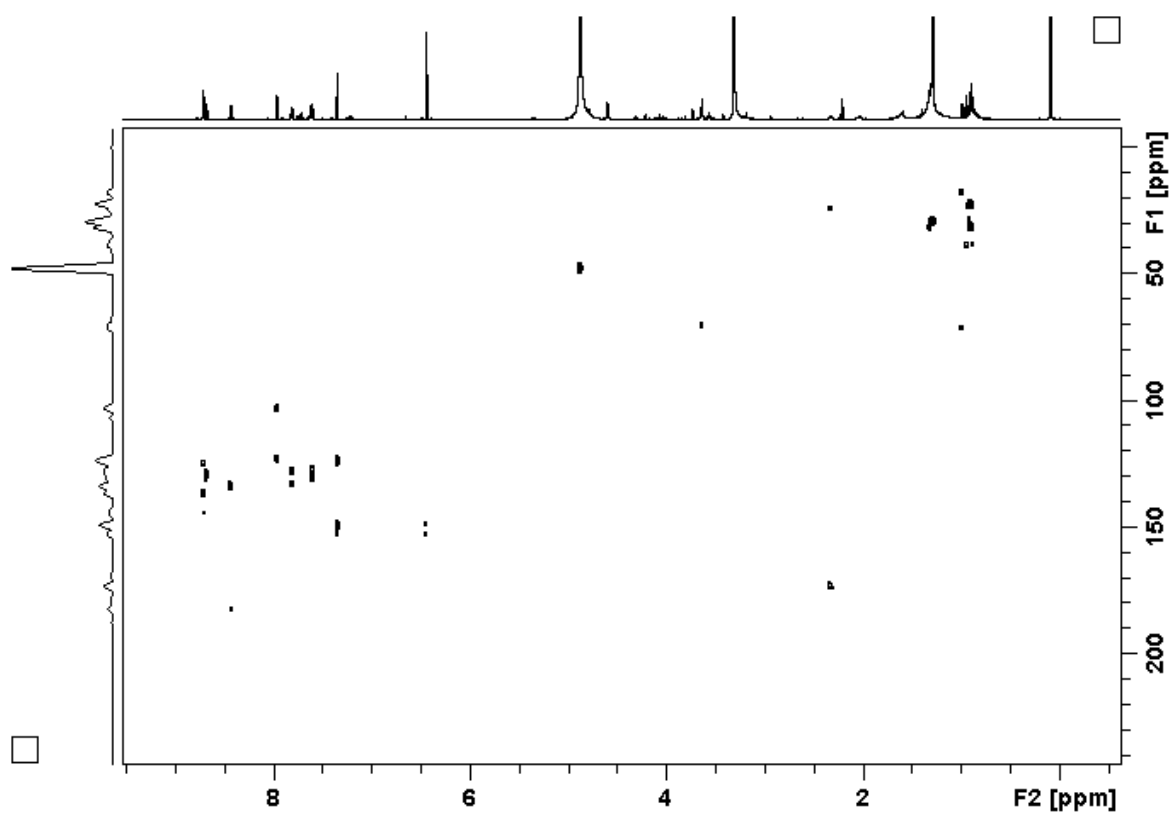
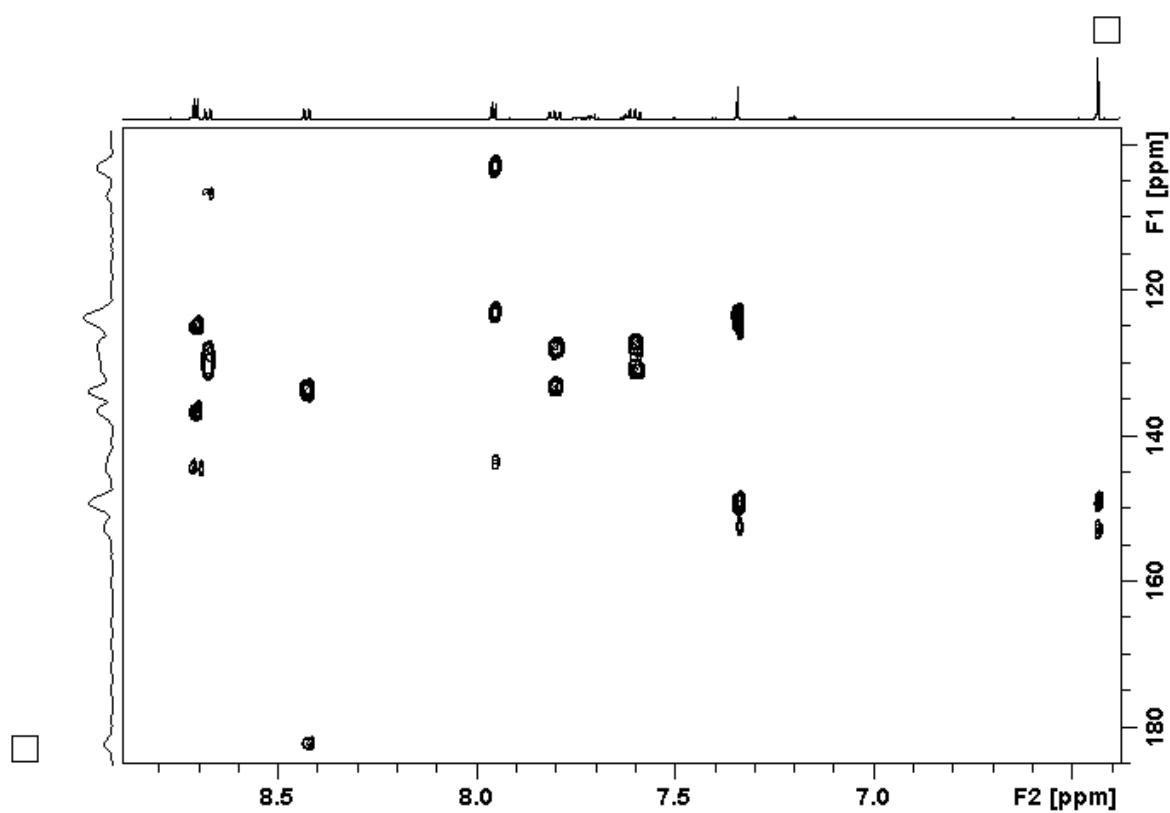
Figura 80. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD₃OD) do alcaloide II.**Figura 81.** Mapa de contorno HMBC (δ 6,4–8,8) do alcaloide II.

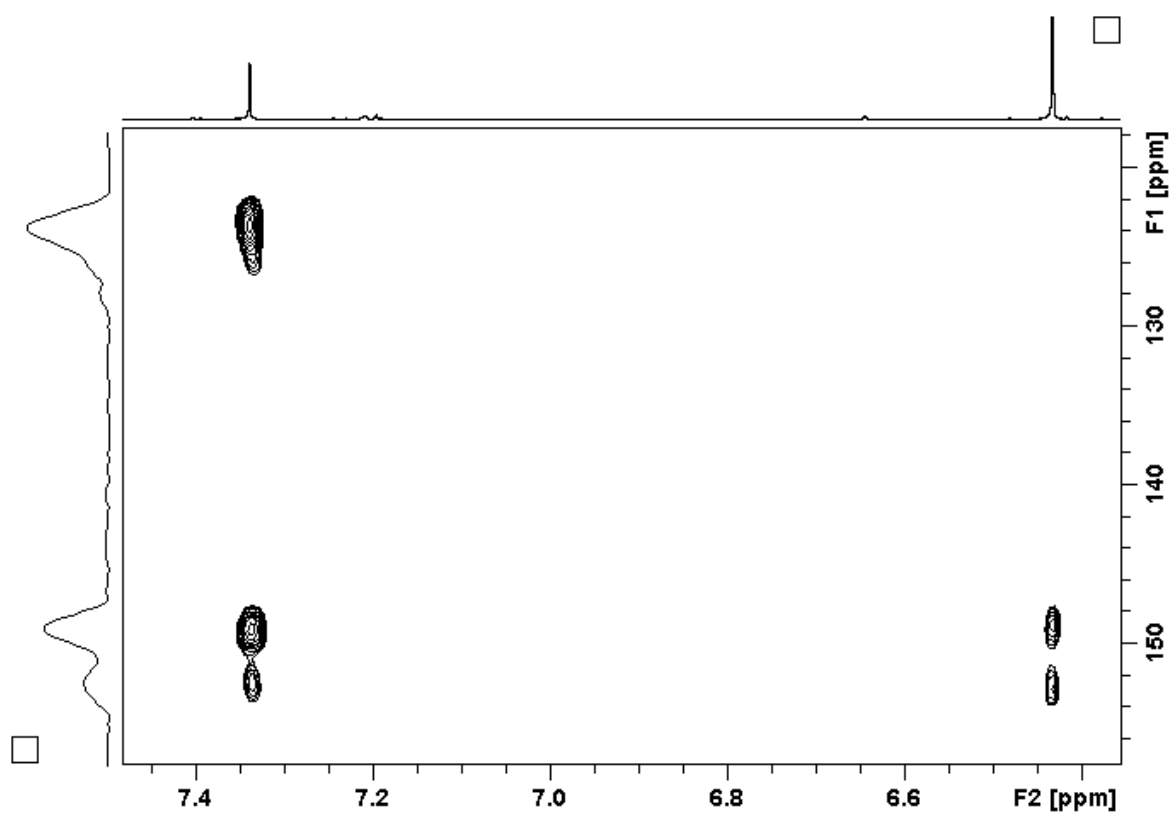
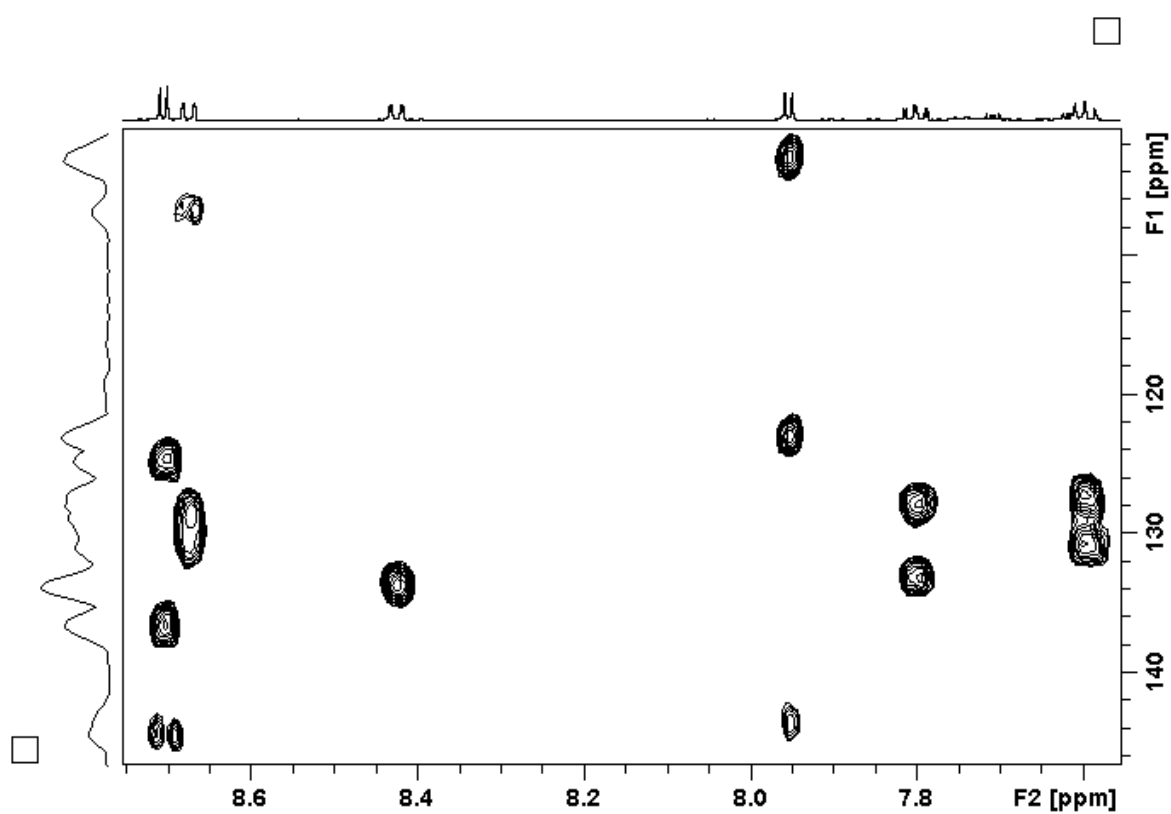
Figura 82. Mapa de contorno HMBC (δ 6,4–7,4) do alcaloide **II**.**Figura 83.** Mapa de contorno HMBC (δ 7,5–8,75) do alcaloide **II**.

Figura 84. Mapa de contorno HMBC (δ 8,3–8,8) do alcaloide **II**.

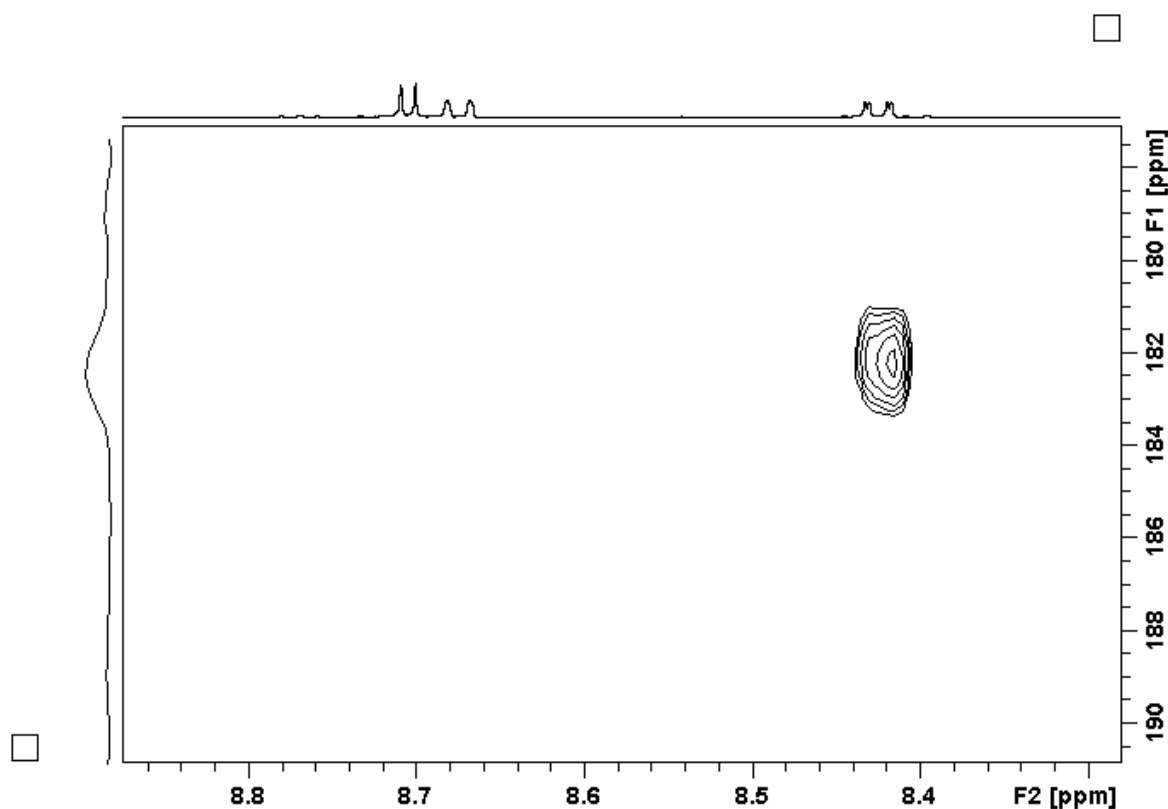
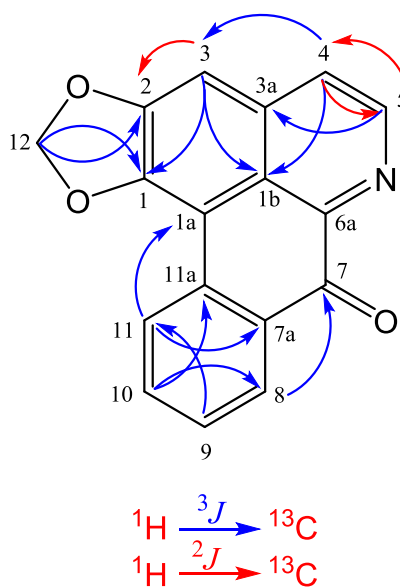


Figura 85. Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **II**.



Os dados obtidos foram comparados com aqueles encontrados na literatura (Tabela 8) (ORTIZ; SUARES; PATINO, 2007; CHEN et al., 2013), o que permitiu confirmar a estrutura deste composto como sendo do alcaloide liriodenina (**II**). Este metabólito já foi isolado de espécies da família Annonaceae, inclusive descrito em estudo realizado com as folhas e

casca de *A. crassiflora* (EGYDIO et al., 2013; HOCQUEMILLER et al., 1982; GONÇALVES et al., 2010).

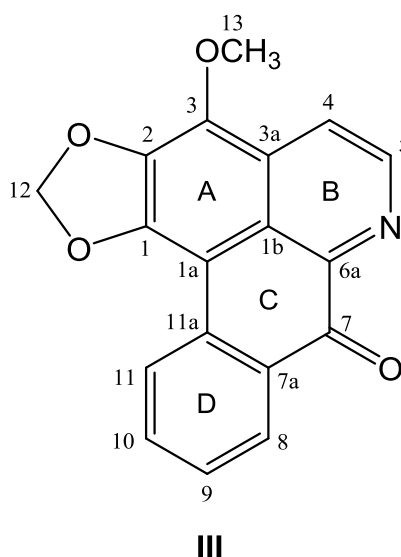
Tabela 8. Dados de RMN da lirioidenina (**II**) em CD₃OD.

Posição	δ_{H}^a mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	δ_{C}^a	DEPT	COSY	HSQC	HMBC
1		148,9	C			H-12; H-3
1a		106,8	C			H-11
1b		123,6	C			H-3; H-4
2		152,5	C			H-12; H-3
3	7,24 s	102,9	CH		H-3	H-4
3a		136,5	C			H-5
4	7,86 d (5,2)	124,9	CH	H-5	H-4	H-5
5	8,61 d (5,2)	143,6	CH	H-4	H-5	H-4
6a		144,1	C			
7		182,1	C			H-8
7a		128,6	C			H-11
8	8,33 dd (8,0; 1,0)	127,9	CH	H-9	H-8	H-10
9	7,51 ddd (8,0; 8,0; 1,0)	128,2	CH	H-8; H-10	H-9	
10	7,70 ddd (8,0; 8,0; 1,0)	134,2	CH	H-9; H-11	H-10	
11	8,58 dd (8,0; 1,0)	127,3	CH	H-10	H-11	H-9
11a		133,5	C			H-10
12	6,34 s	103,4	CH ₂			

^aExperimentos de RMN realizados a 600 e 150 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bMultiplicidade: s (singlete); d (dubleto); dd (duplo dubleto), ddd (duplo duplo dubleto).

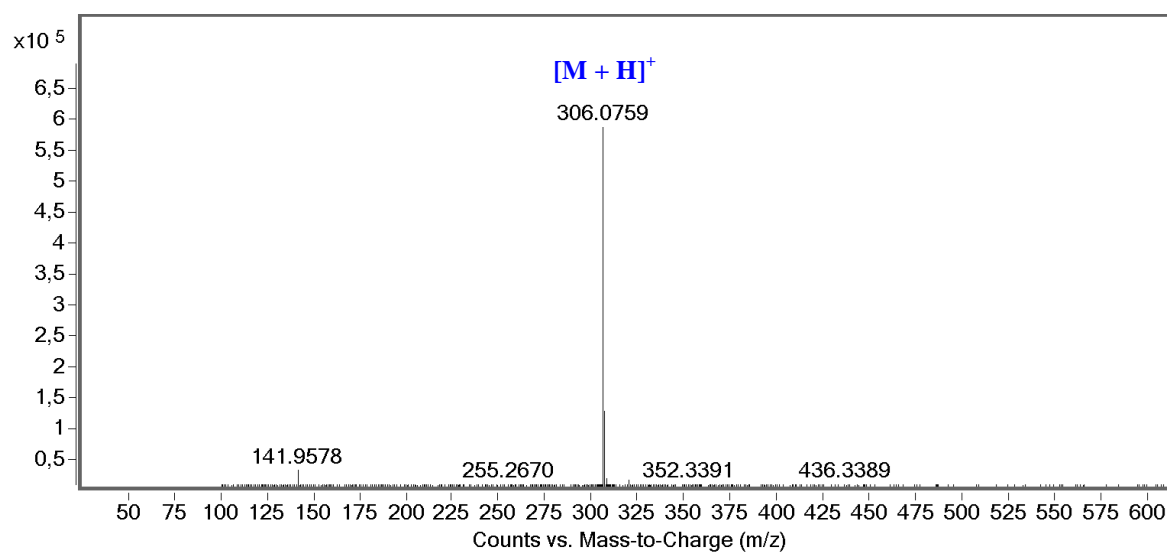
Fonte: autora.

5.4.3 Elucidação estrutural do alcaloide **III**



O alcaloide **III** (1,7 mg), foi isolado como um sólido alaranjado, que apresentou teste positivo quando revelado com o reagente IClPt (R_f 0,88) (Figura 36). Foi submetido à análise por EM-IES-(+) em alta resolução, que possibilitou estabelecer a fórmula molecular $\text{C}_{18}\text{H}_{11}\text{NO}_4$, com índice de deficiência de hidrogênio igual a quatorze. O sinal referente à molécula protonada foi observado em m/z 306,0759 $[\text{M} + \text{H}]^+$, calculado para $\text{C}_{18}\text{H}_{12}\text{NO}_4^+$, 306,0761 (Δ 0,6 ppm) (Figura 86).

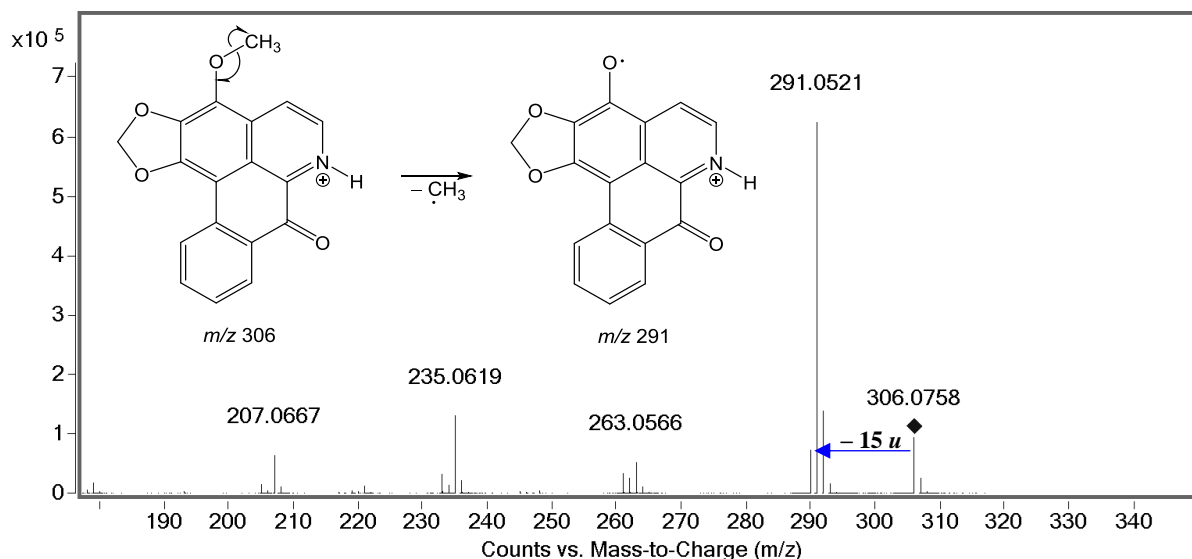
Figura 86. EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide aterospermidina (**III**).



Fonte: autora.

Ao ser submetido à análise por EM/EM, o sinal de m/z 306,0758 produziu o íon fragmento de m/z 291, que foi correlacionado a eliminação de uma metila (15 u), através de uma clivagem homolítica, como mostra a proposta de fragmentação sobre a Figura 87.

Figura 87. EM/EM-IES-(+) do alcaloide **III**.



Fonte: autora.

A análise do espectro de RMN ¹H de **III** (Tabela 9) (Figuras 88–90), permitiu observar uma grande similaridade dos sinais com àqueles do alcaloide **II**. No entanto foi observada a presença adicional de um sinal em δ 4,30 (3H, H-13), atribuído a metoxila ligada ao C-3. Adicionalmente, foi observada a ausência do sinal referente ao H-3, o que sugere a posição da metoxila. A análise dos espectros de RMN de TOCSY 1D, permitiu confirmar o padrão de substituição dos anéis B e D, a partir da irradiação dos sinais δ 8,48 (H-11) e δ 8,69 (1H, d, $J = 4,9$ Hz, H-5), cujas transferências de magnetização mostram correlações com os sinais em δ 8,34 (H-8), 7,72 (H-10) e 7,52 (H-9) (anel B), e δ 8,14 (1H, d, $J = 4,9$ Hz, H-4), respectivamente (Figuras 91 e 92). A análise do mapa de contorno COSY confirma as correlações entre os sinais supracitados (Figuras 93 e 94).

Figura 88. Espectro de RMN de ^1H do alcaloide **III** (600 MHz, CD_3OD).

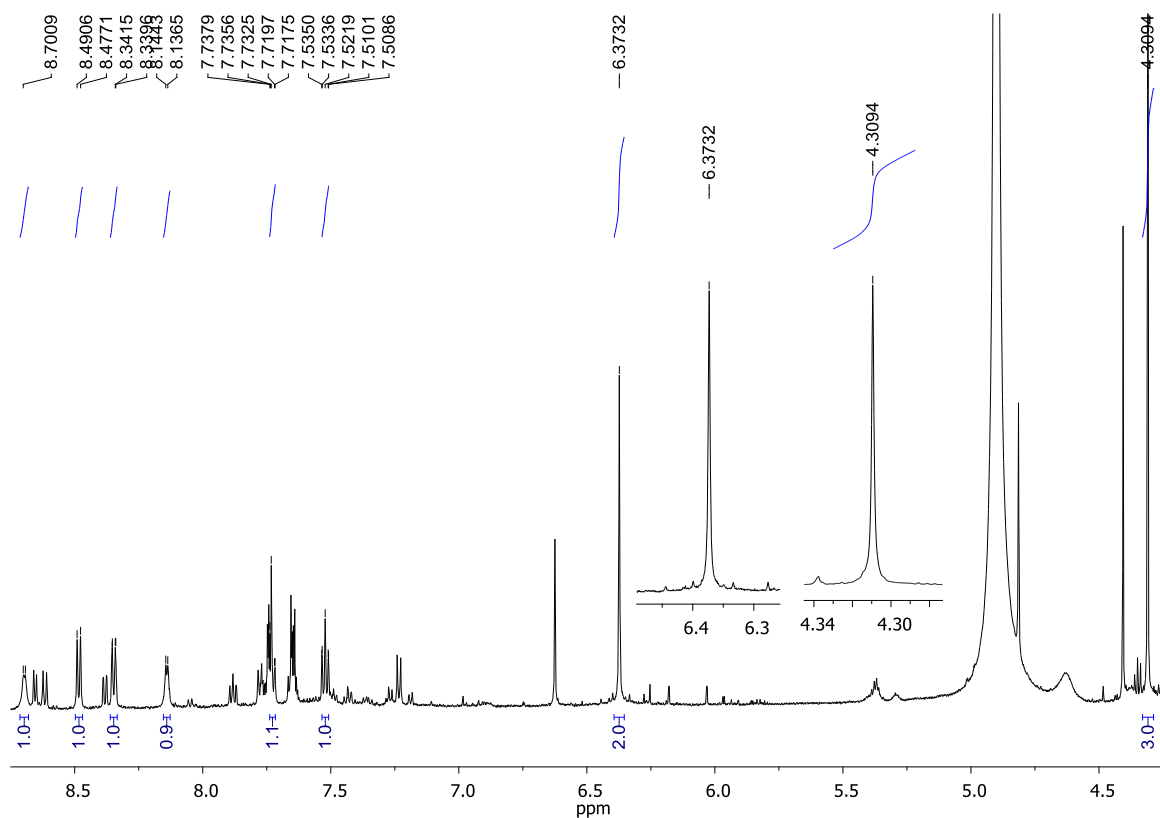


Figura 89. Ampliação do espectro 88 (δ 7,5–7,78) do alcaloide **III**.

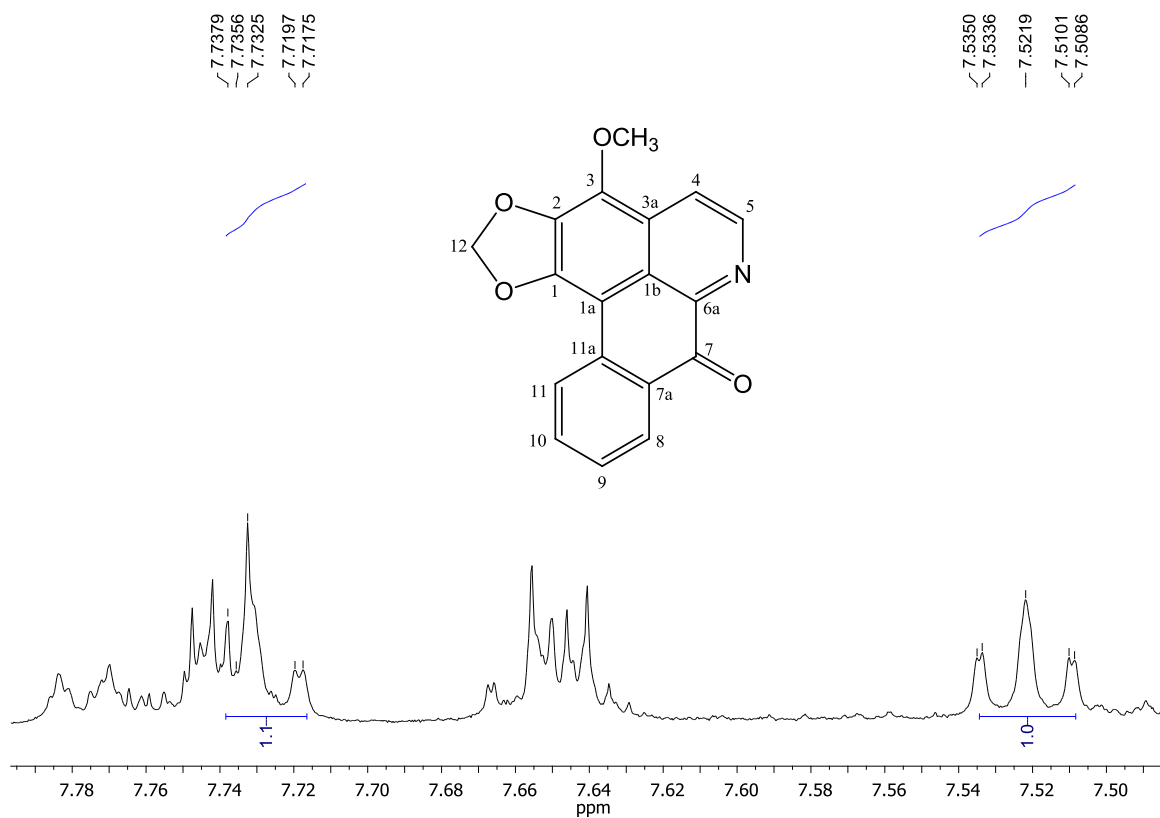


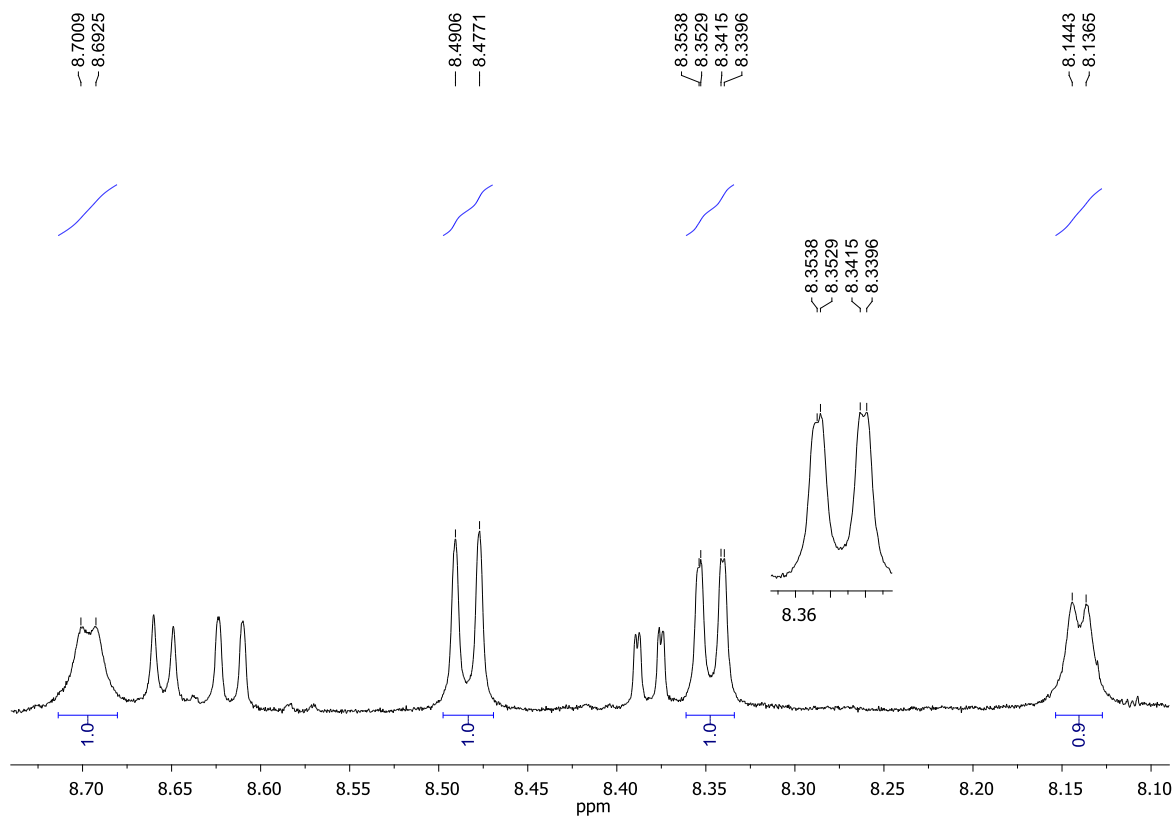
Figura 90. Ampliação do espectro 88 (δ 8,1–8,75) do alcaloide **III**.

Figura 91. Espectro de RMN de TOCSY 1D (600 MHz, CD₃OD), irradiando δ 8,48 (H-11) do alcaloide **III**.

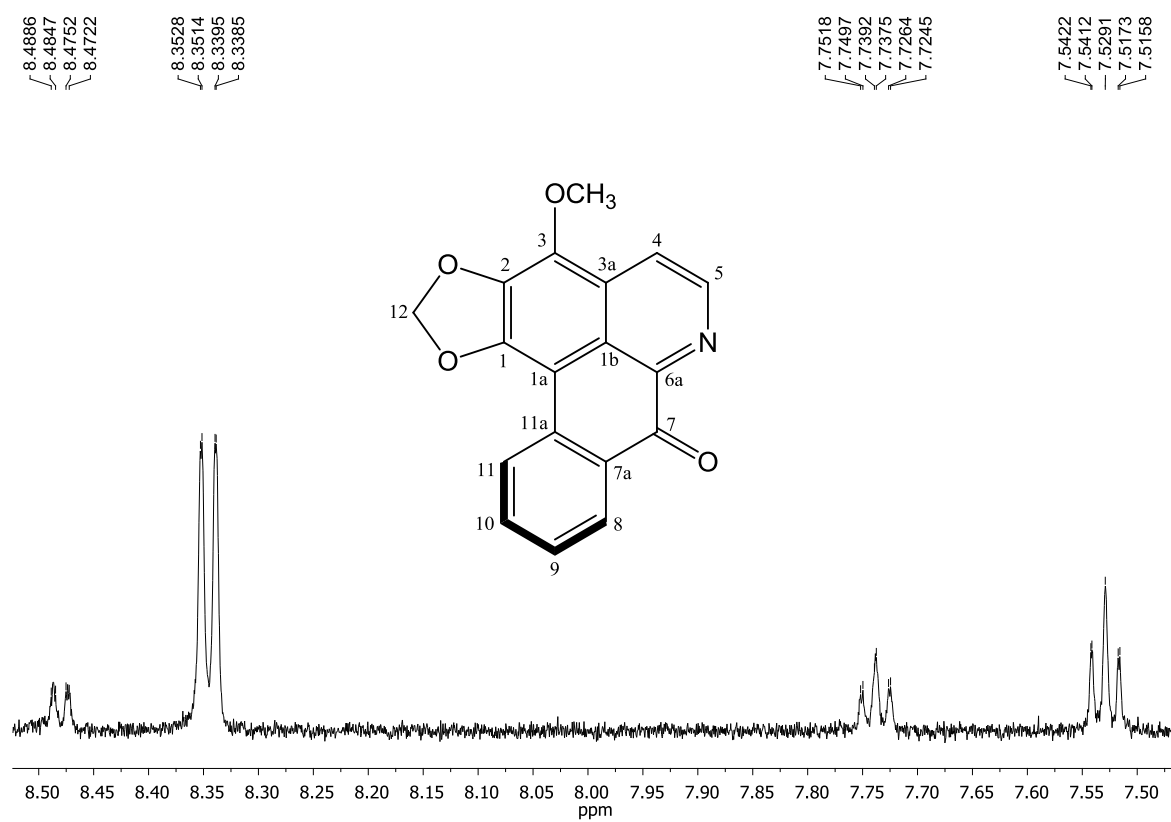


Figura 92. Espectro de RMN de TOCSY 1D (600 MHz, CD₃OD), irradiando δ 8,69 (H-5) do alcaloide **III**.

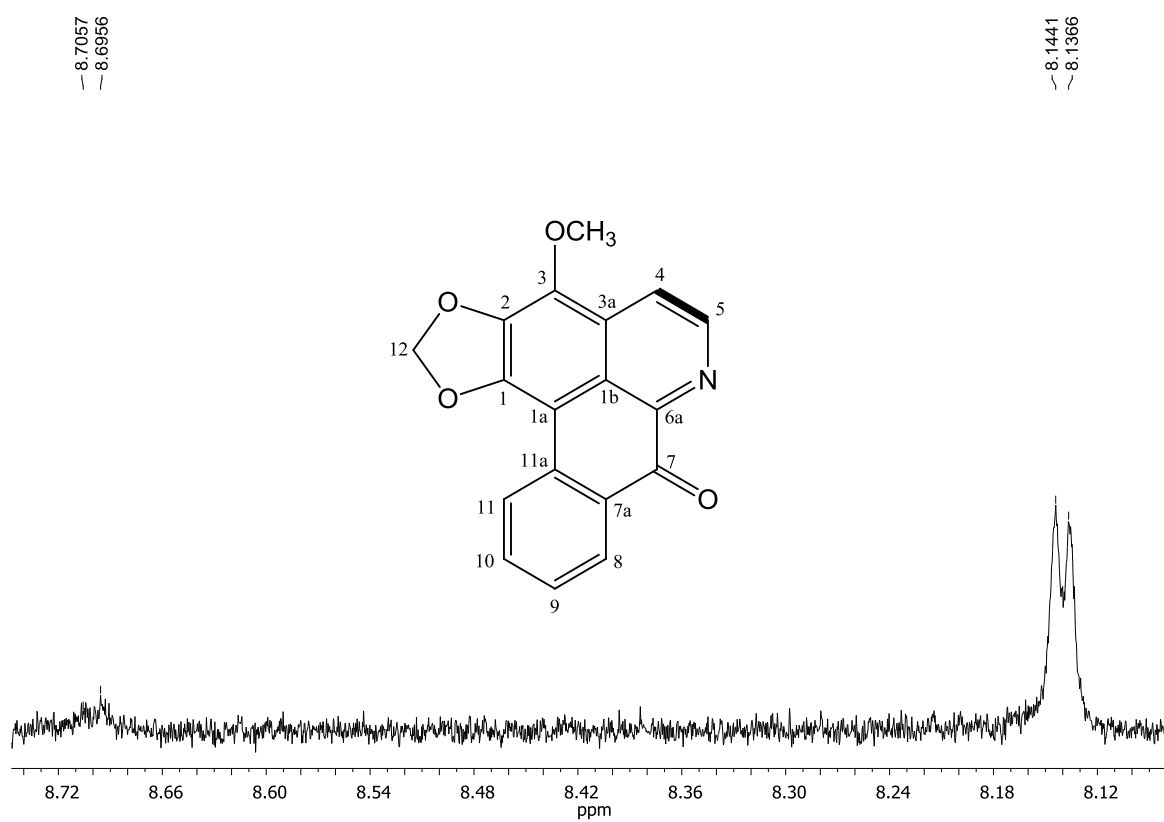
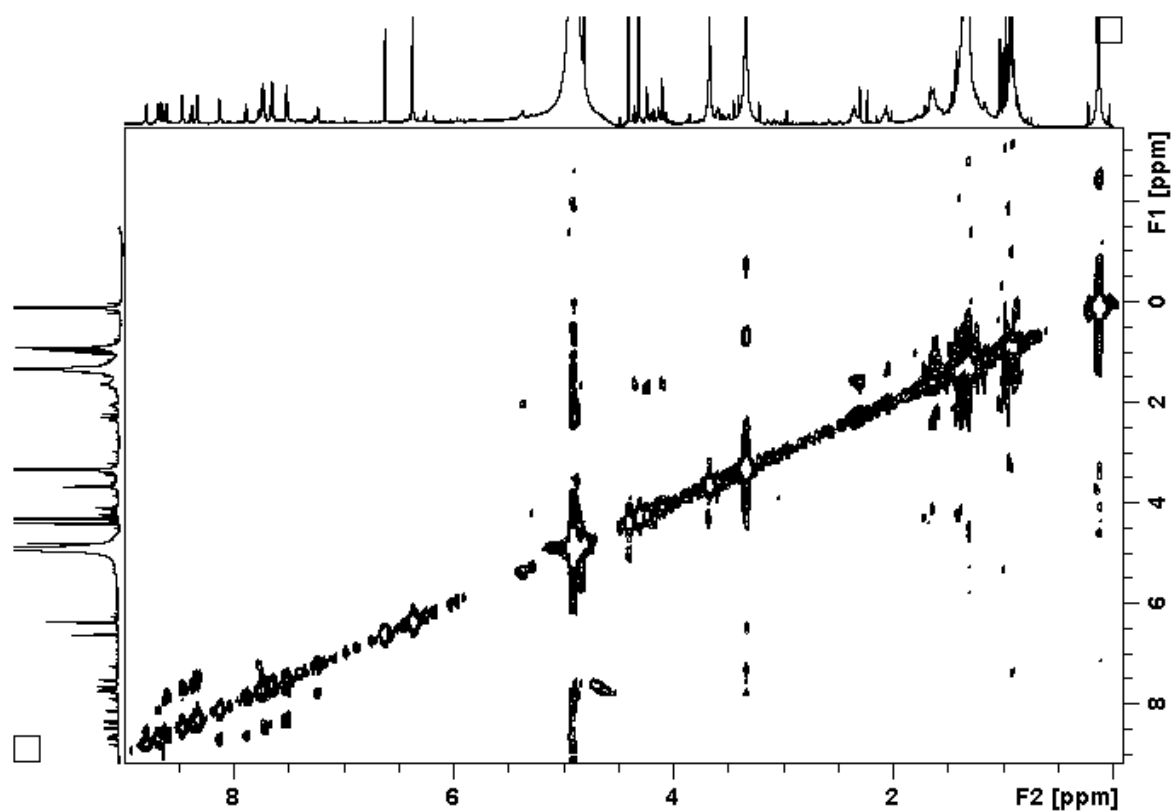
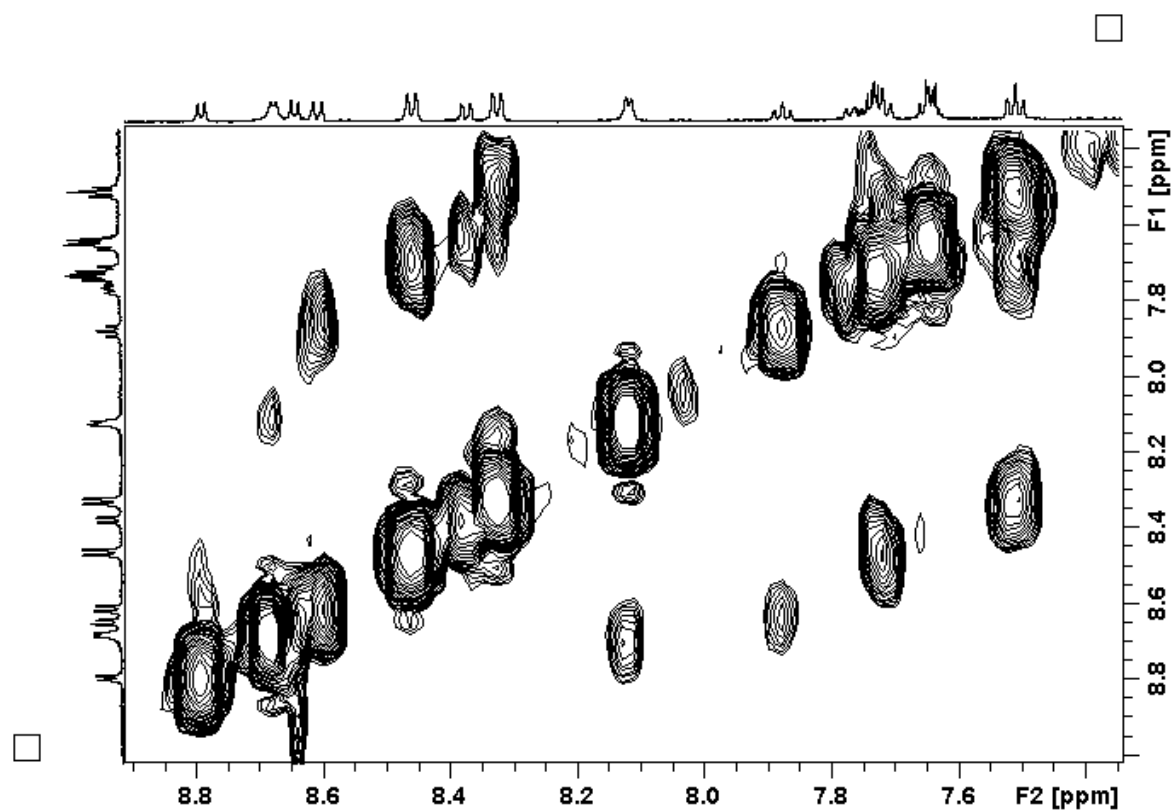


Figura 93. Mapa de contorno COSY do alcaloide III.

Figura 94. Mapa de contorno COSY (δ 7,5–8,9) do alcaloide III.

No espectro de RMN de DEPTQ foram observados dezoito sinais de carbonos (Figuras 95-97), que foram correlacionados com os respectivos hidrogênios através do mapa de contorno HSQC (Figuras 98-102).

Figura 95. Espectro de RMN ^{13}C DEPTQ do alcaloide **III** (150 MHz, CD_3OD).

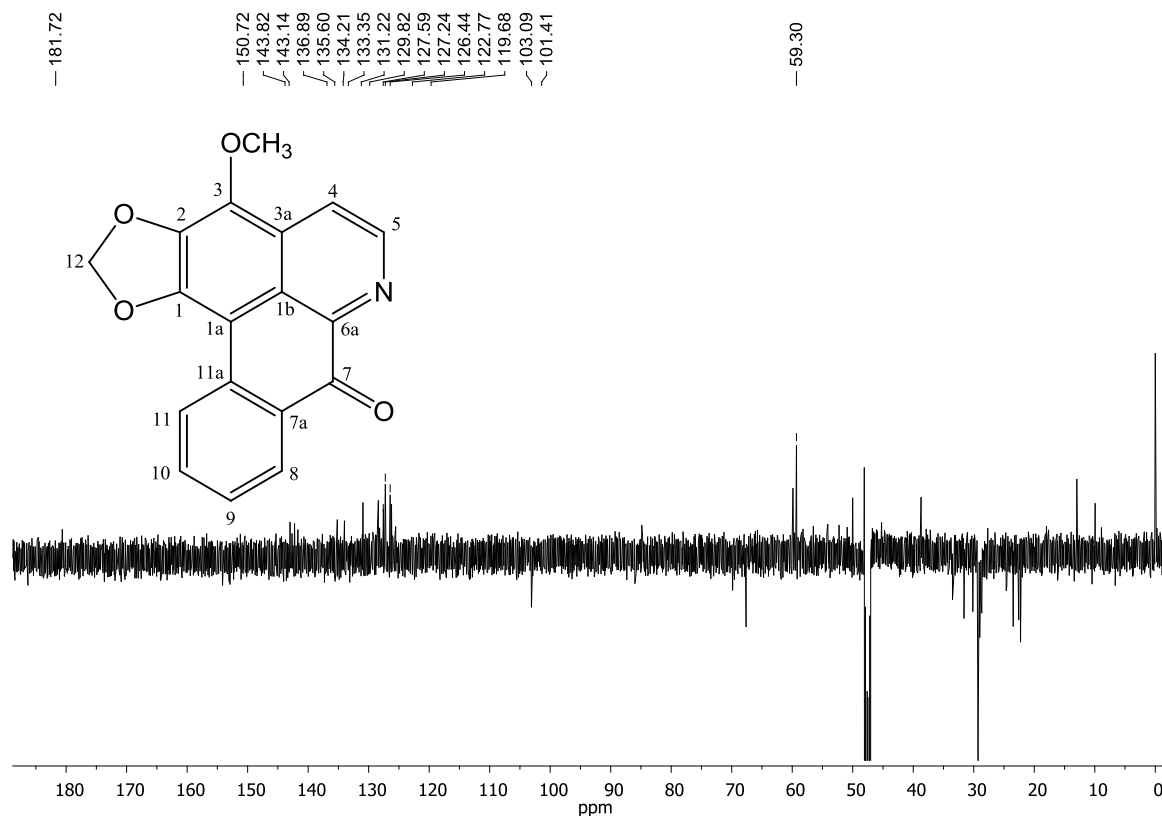


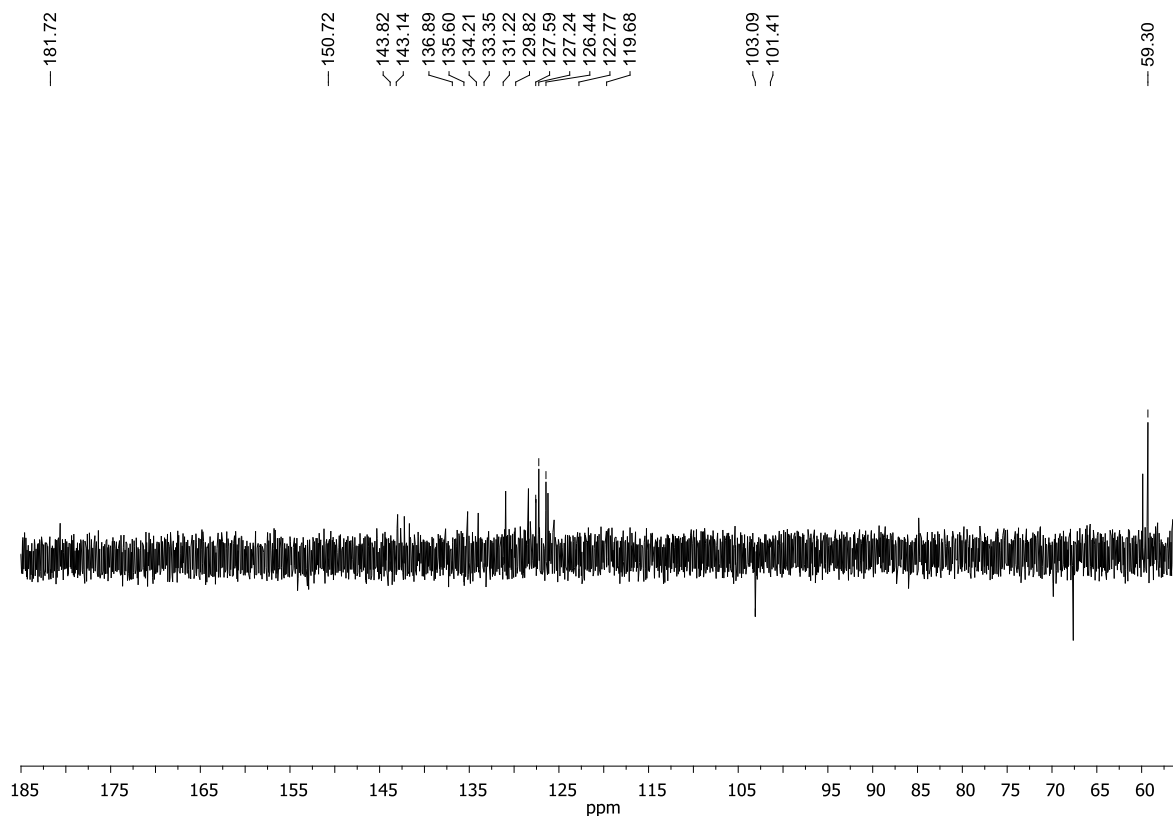
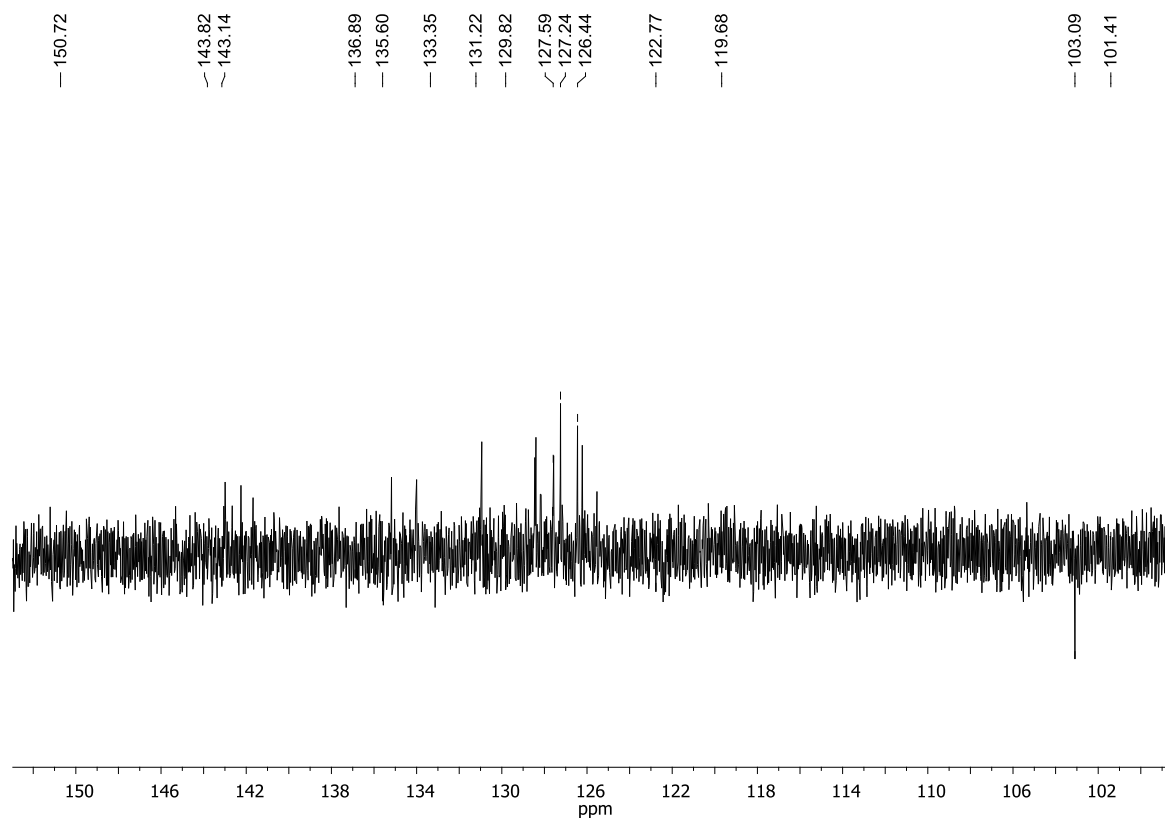
Figura 96. Ampliação do espectro 95 (δ 59–185) do alcaloide **III**.**Figura 97.** Ampliação do espectro 95 (δ 101–152) do alcaloide **III**.

Figura 98. Mapa de contorno HSQC (600 MHz, CD₃OD) do alcaloide **III**.

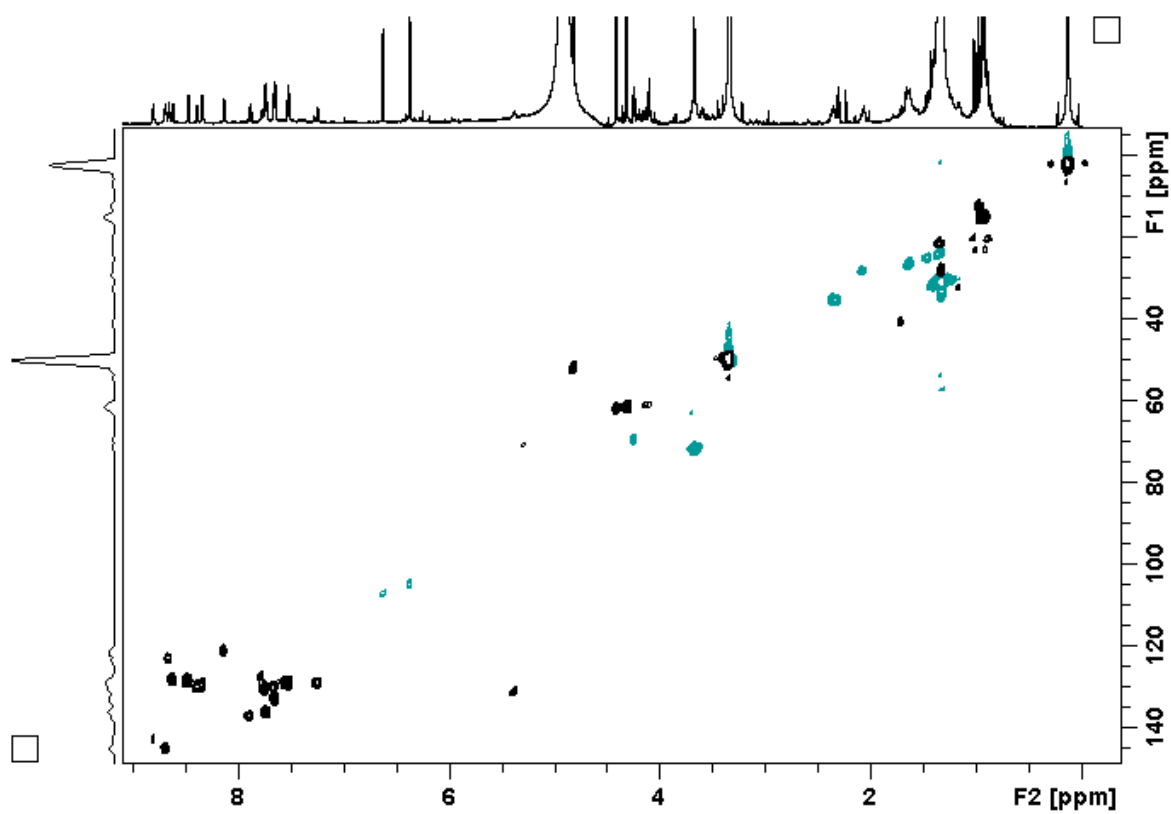


Figura 99. Mapa de contorno HSQC (δ 4,2–8,7) do alcaloide **III**.

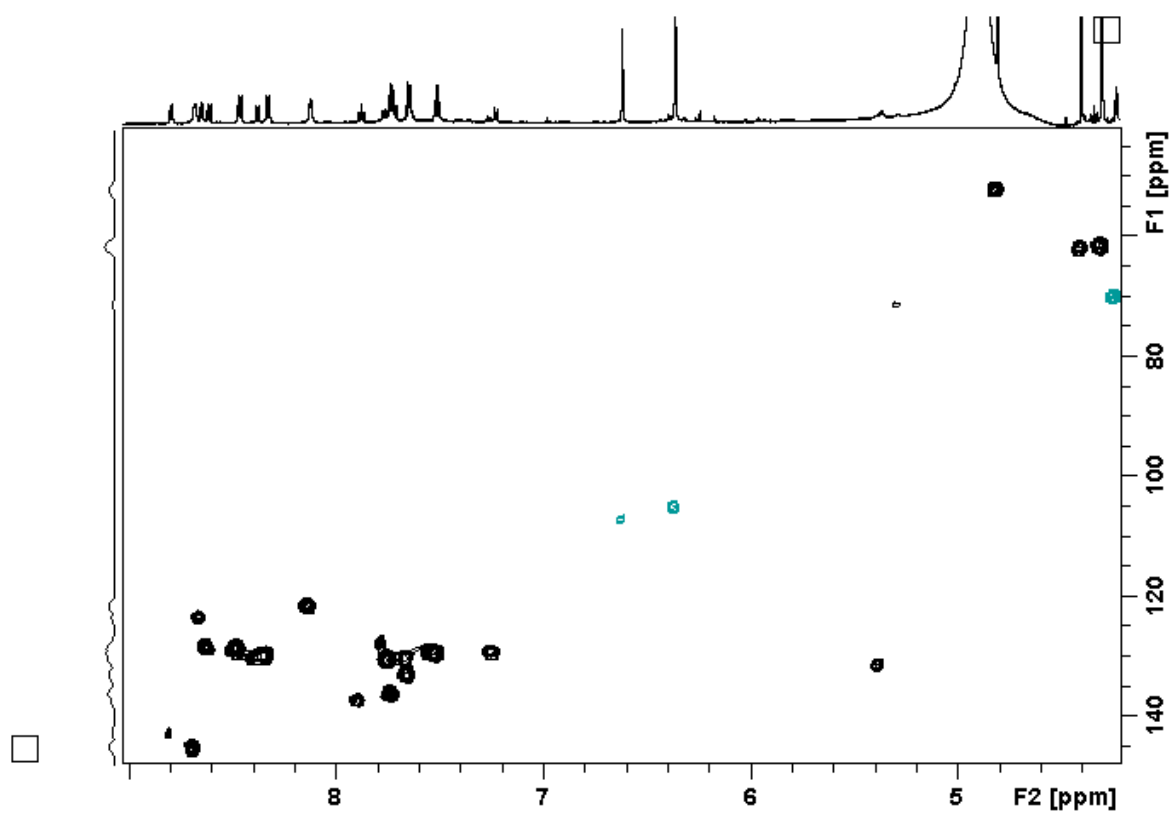


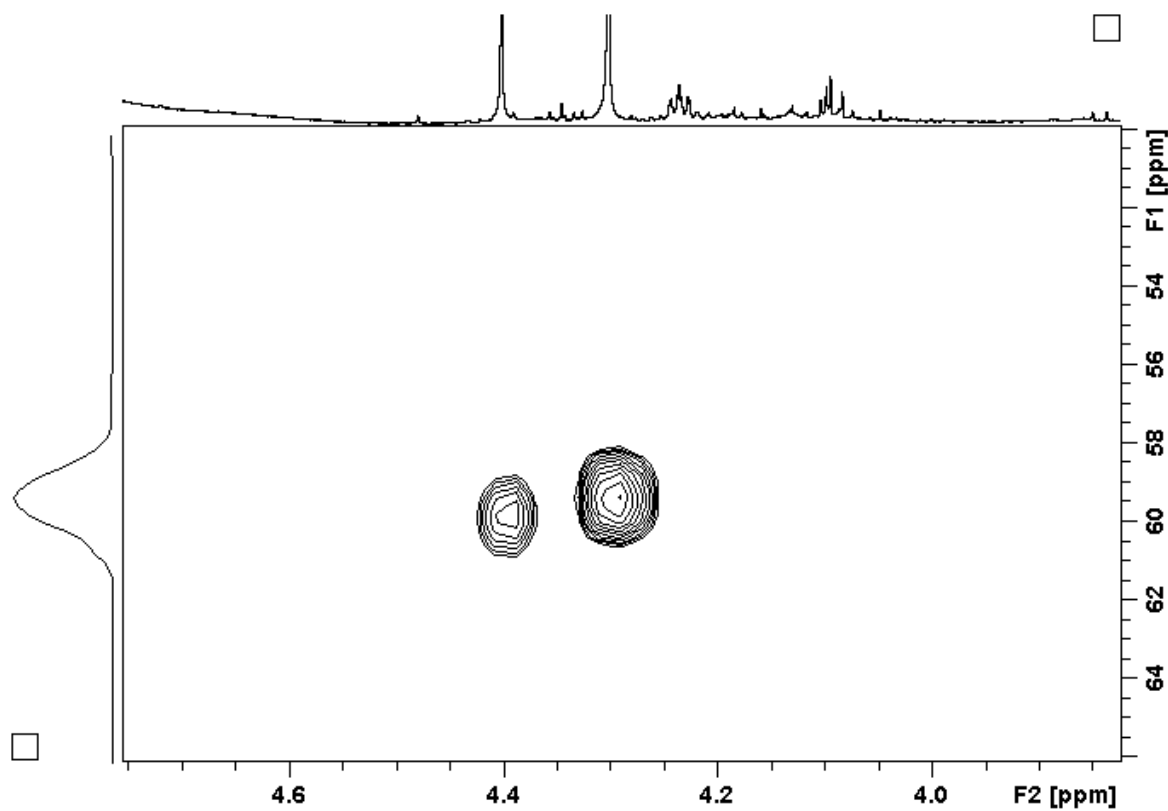
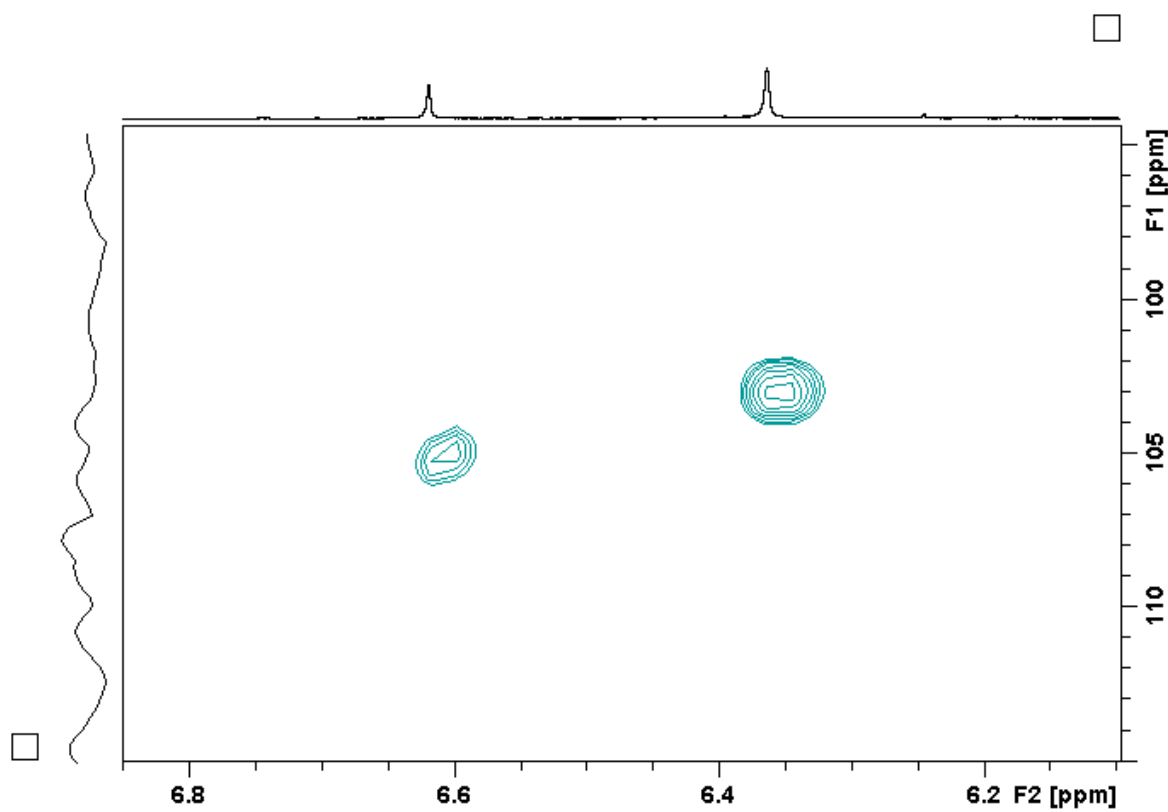
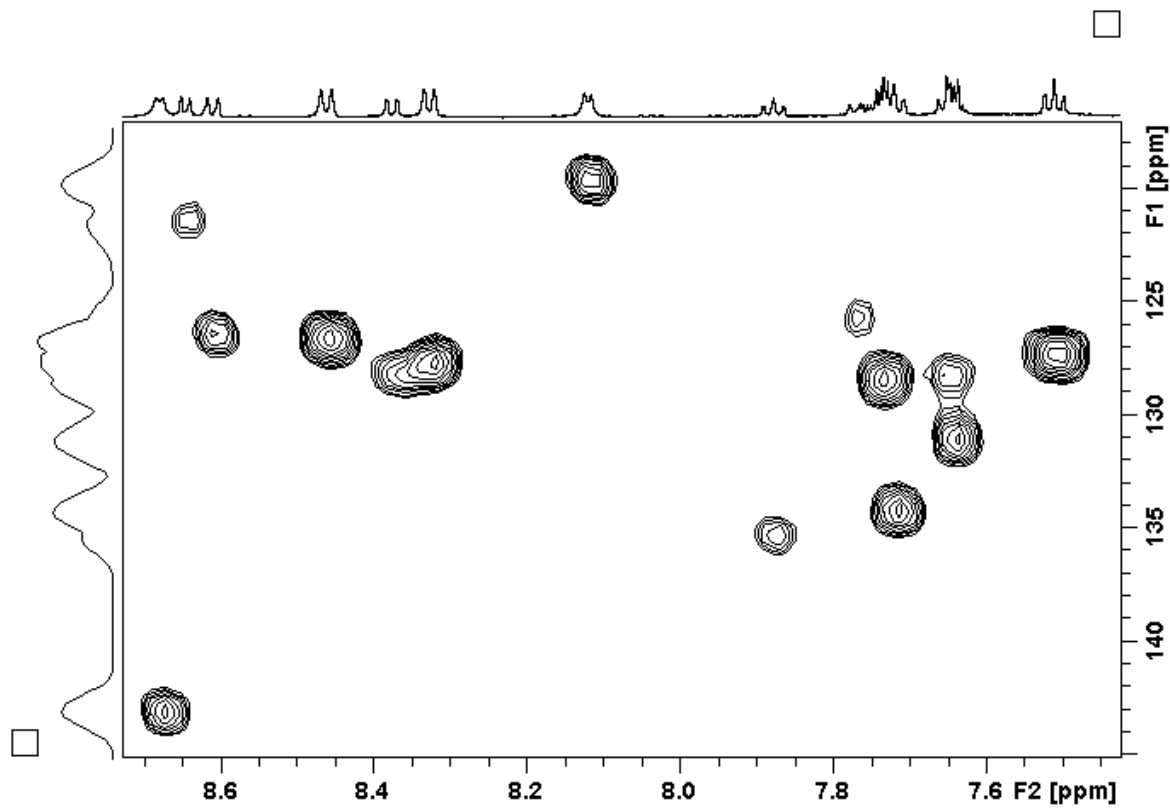
Figura 100. Mapa de contorno HSQC (δ 4,0–4,6) do alcaloide **III**.**Figura 101.** Mapa de contorno HSQC (δ 6,2–6,8) do alcaloide **III**.

Figura 102. Mapa de contorno HSQC (δ 7,5–8,7) do alcaloide **III**.



Na análise do mapa de contorno HMBC (Figuras 103–111), foi confirmada a posição da metoxila, através da correlação entre os sinais δ 4,30 (H-13) e 135,6 (C-3).

Figura 103. Mapa de contorno HMBC (600 MHz, CD₃OD) do alcaloide III.

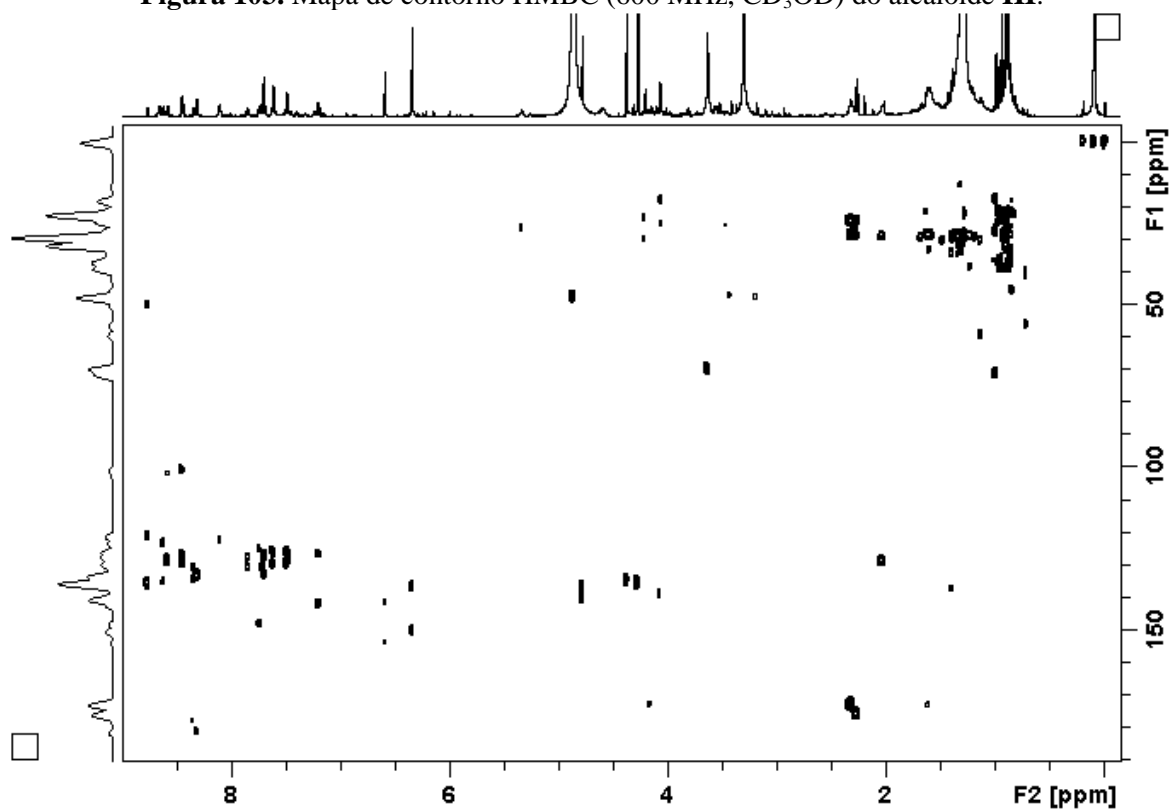


Figura 104. Mapa de contorno HMBC (δ 4,2–8,8) do alcaloide III.

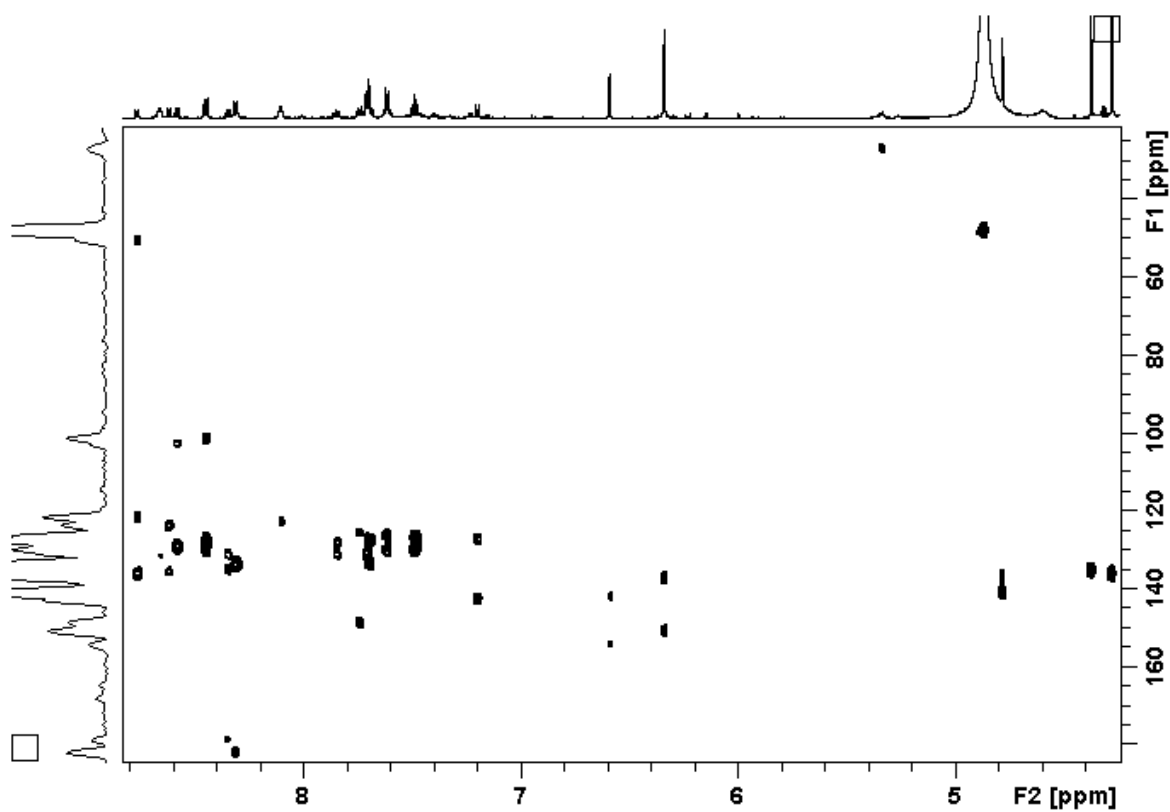


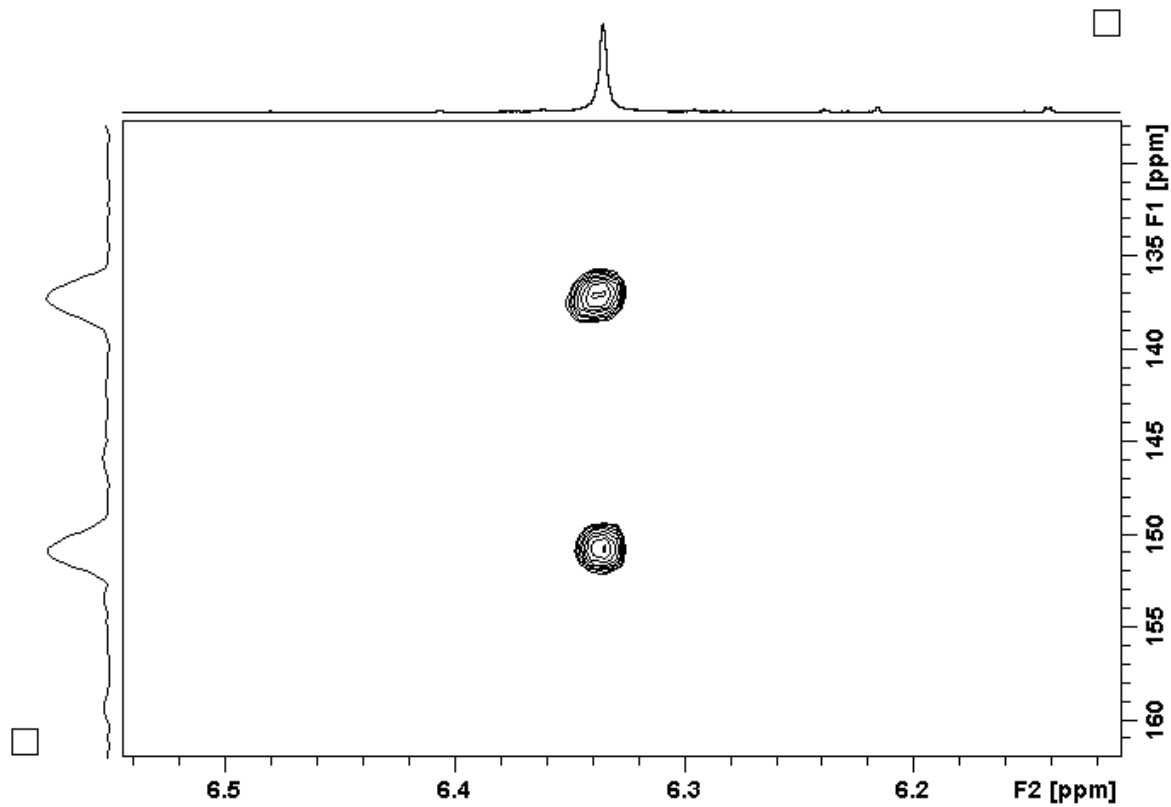
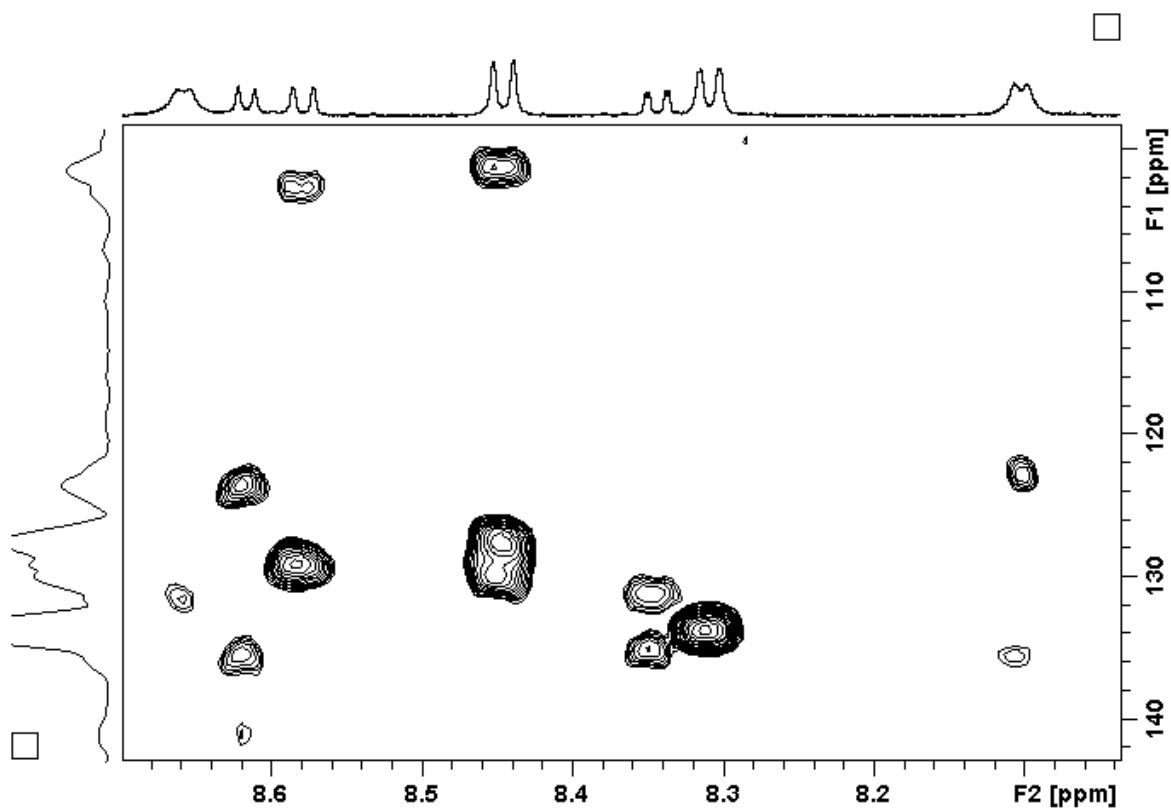
Figura 105. Mapa de contorno HMBC (δ 6,0–6,5) do alcaloide **III**.**Figura 106.** Mapa de contorno HMBC (δ 8,1–8,7) do alcaloide **III**.

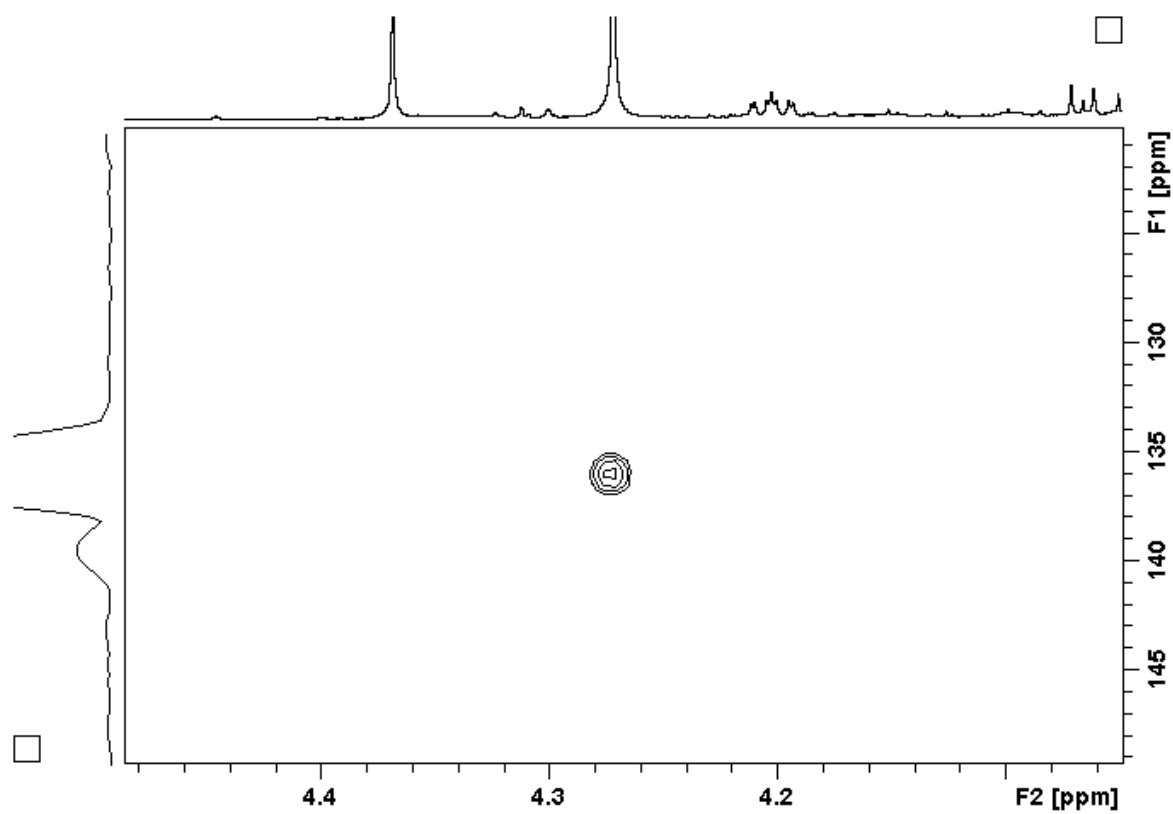
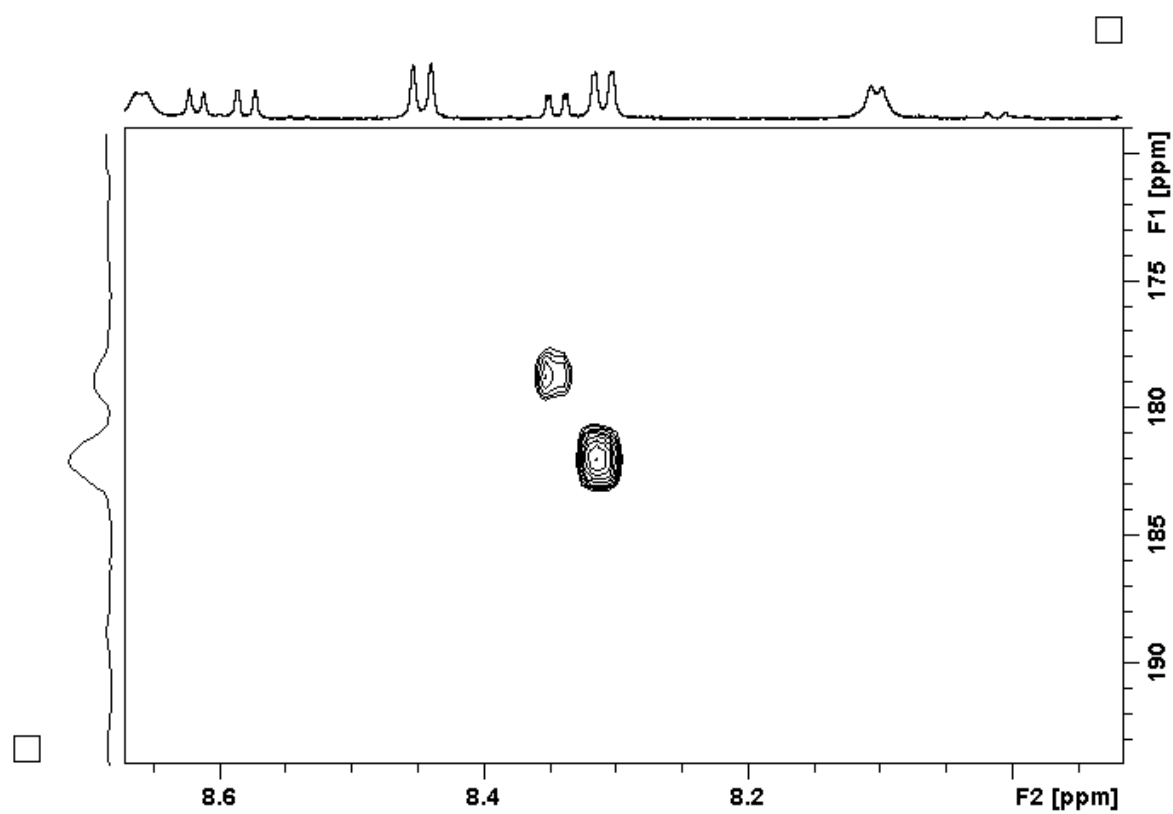
Figura 107. Mapa de contorno HMBC (δ 4,1–4,5) do alcaloide **III**.**Figura 108.** Mapa de contorno HMBC (δ 8,1–8,6) do alcaloide **III**.

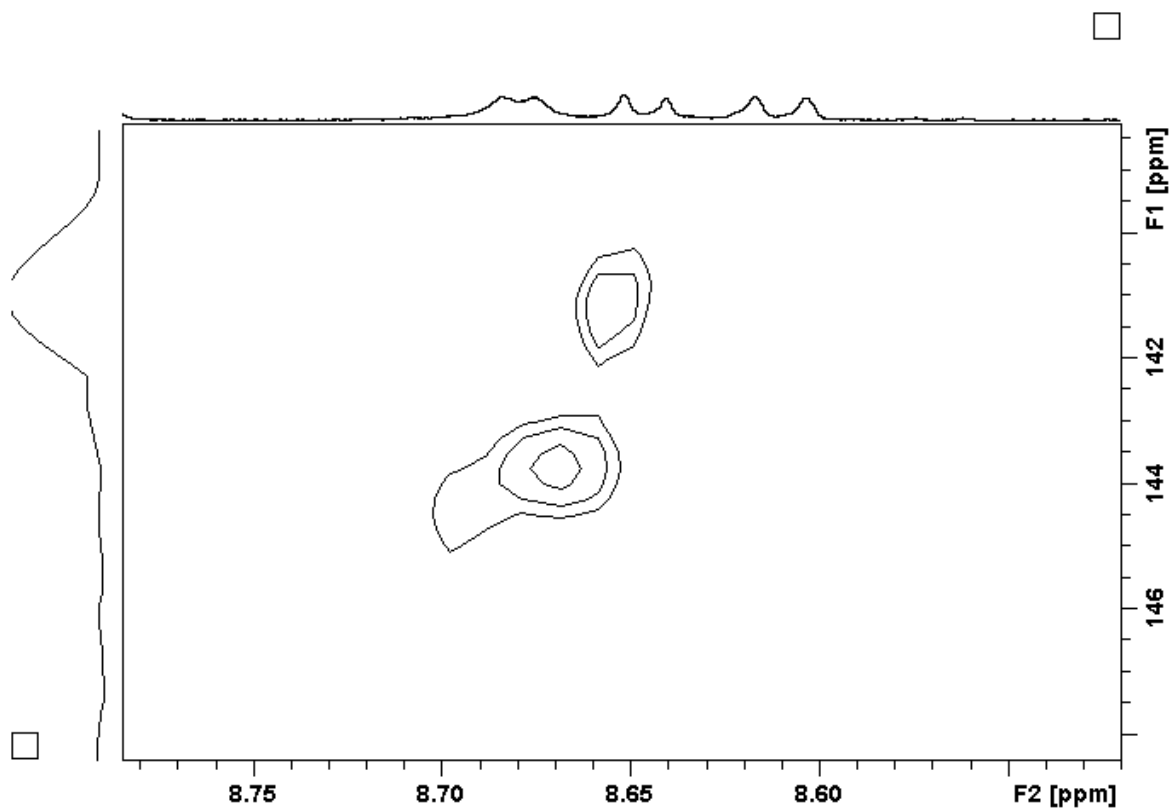
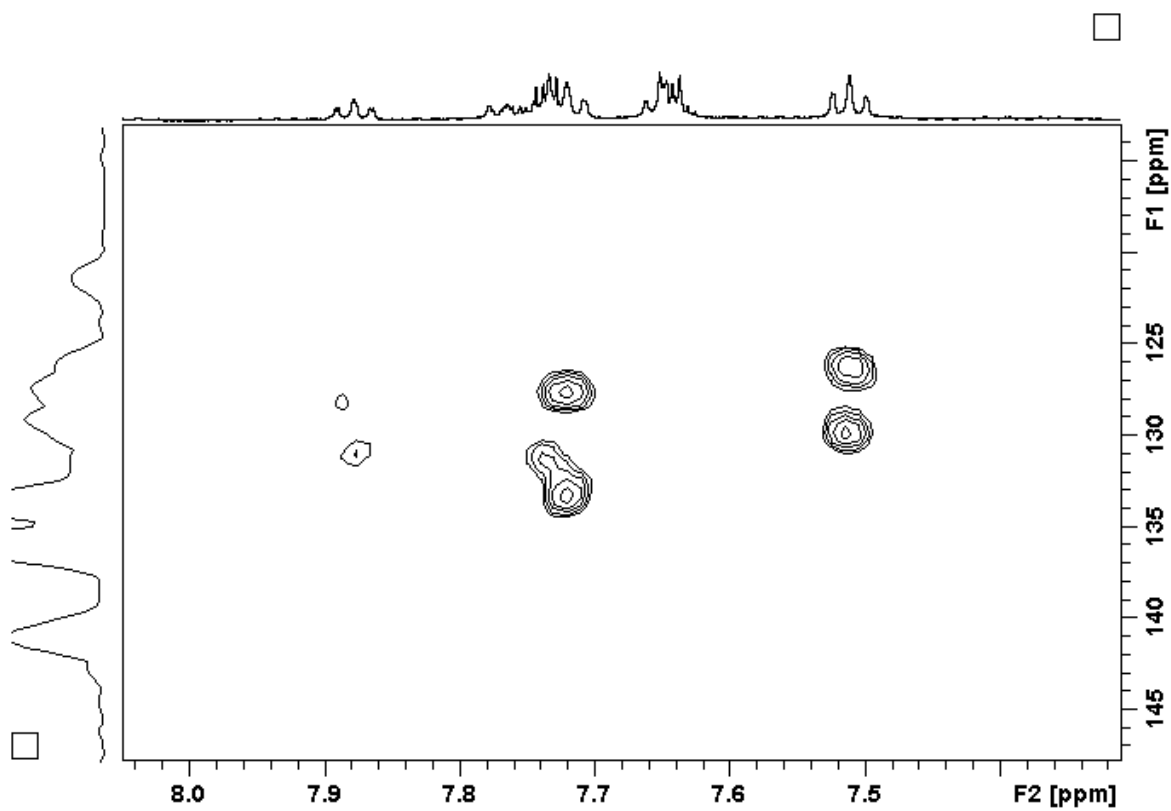
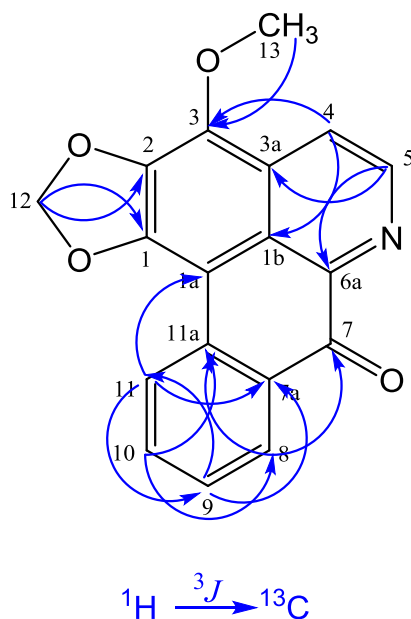
Figura 109. Mapa de contorno HMBC (δ 8,5–8,7) do alcaloide **III**.**Figura 110.** Mapa de contorno HMBC (δ 7,4–8,0) do alcaloide **III**.

Figura 111. Principais correlações (H–C) observadas no mapa de contorno HMBC de **III**.



Os dados obtidos (Tabela 9) foram comparados com os da literatura (WIJERATNE et al., 1995; COSTA et al., 2011) e são consistentes com a estrutura do alcaloide aterospermidina (**III**), já relatado nas folhas e cascas do tronco de *A. crassiflora* (GONÇALVES et al., 2010), sendo descrita pela primeira vez nas cascas do fruto desta espécie.

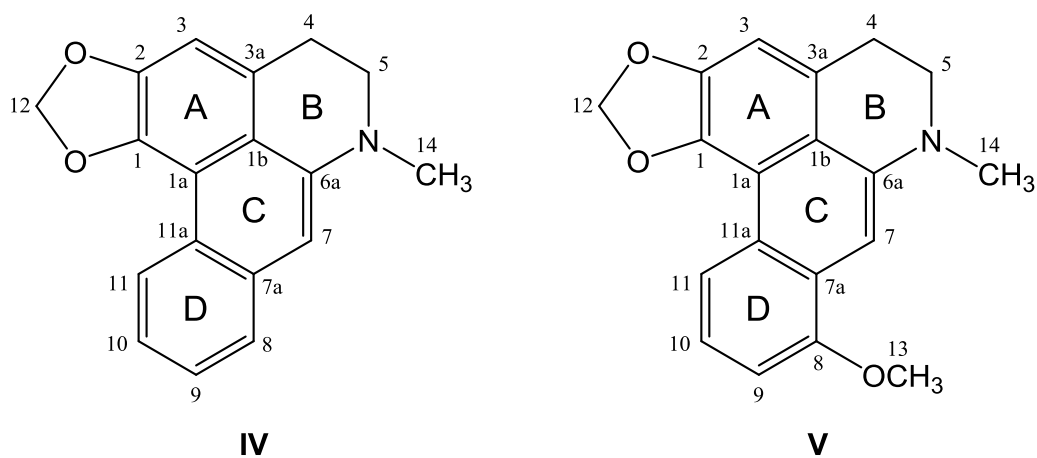
Tabela 9. Dados de RMN da aterospermidina (**III**) em CD₃OD.

Posição	δ_{H}^a mult. ^b (<i>J</i> em Hz)	δ_{C}^a	DEPT	COSY	HSQC	HMBC
1		150,7	C			H-12
1a		101,4	C			H-11
1b		122,7	C			H-4
2		136,8	C			H-12
3		135,6	C			H-4; H-13
3a		131,2	C			H-5
4	8,14 d (4,7)	119,6	CH	H-5	H-4	
5	8,69 d (4,7)	143,1	CH	H-4	H-5	
6a		143,8	C			H-5
7		182,7	C			H-8
7a		129,8	C			H-9; H-11
8	8,34 dd (7,9; 1,1)	127,5	CH	H-9	H-8	H-10
9	7,52 ddd (7,9; 7,9; 1,1)	127,2	CH	H-8	H-9	H-11
10	7,72 ddd (7,6; 7,9; 1,1)	134,2	CH	H-11	H-10	
11	8,48 dd (7,9; 1,1)	126,4	CH	H-10	H-11	H-9
11a		133,3	C			H-8; H-10
12	6,37 s	103,0	CH ₂		H-12	
13	4,30 s	59,3	CH ₃		H-13	

^aOs experimentos de RMN foram realizados a 600 e 150 MHz para ¹H e ¹³C, respectivamente e deslocamentos químicos (δ) estabelecidos em relação ao padrão interno TMS (δ_{TMS} 0,00). ^bMultiplicidade: s (singleto); d (dubleto); dd (duplo dubleto), ddd (duplo duplo dubleto).

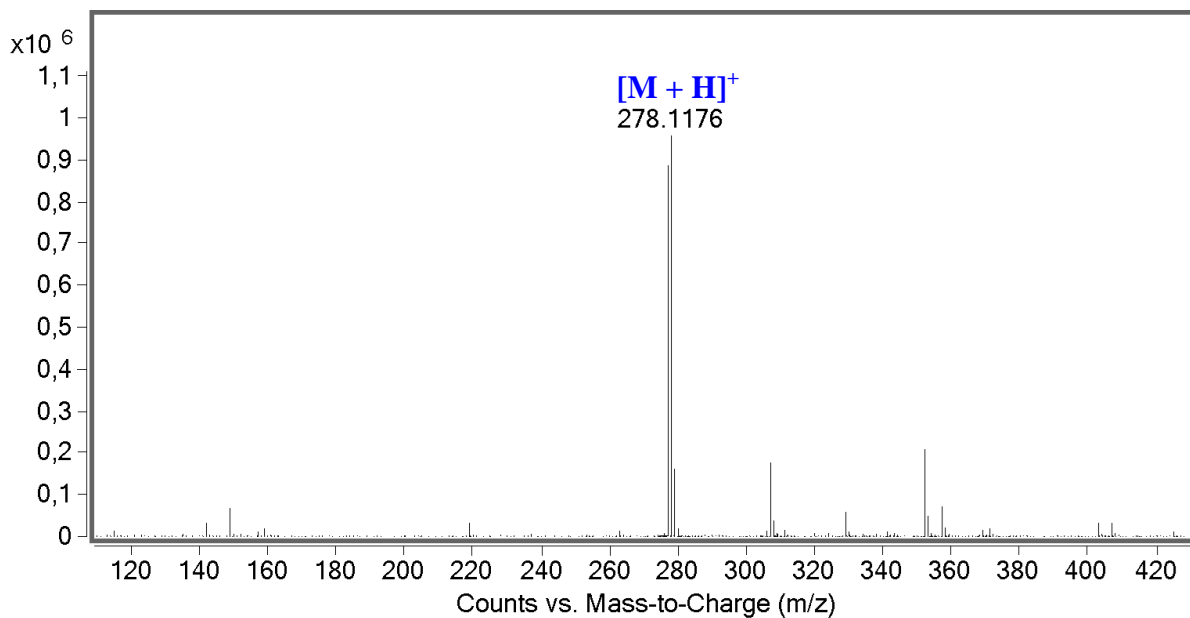
Fonte: autora.

5.4.4 Identificação dos alcaloides IV e V

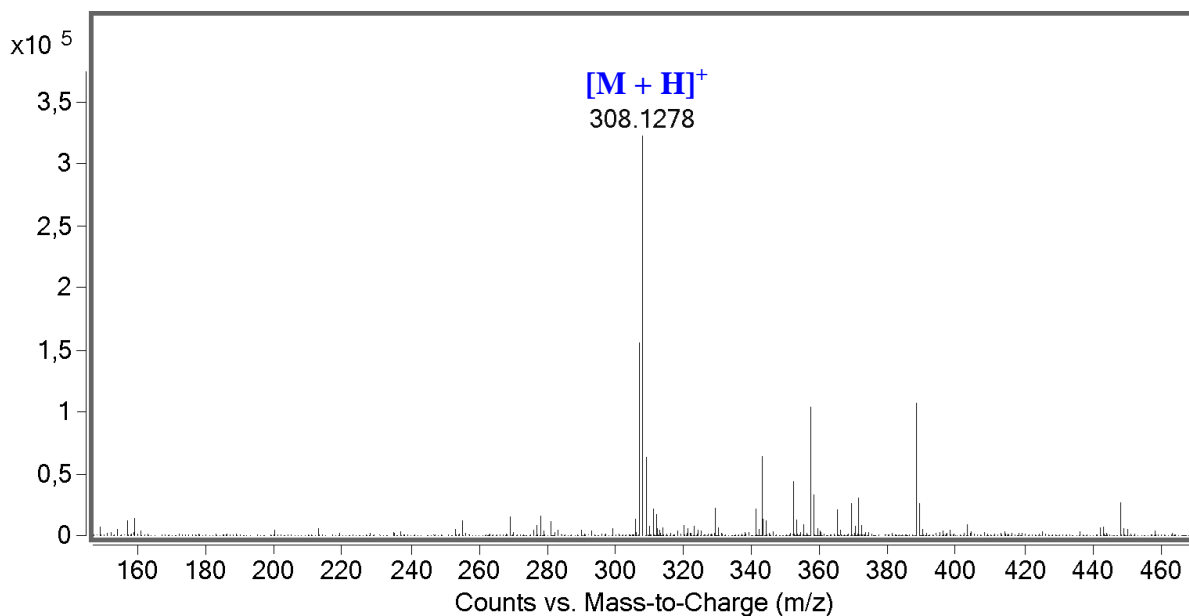


A análise da fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀ por CLAE-EM-IES-(+), em alta resolução, permitiu observar a presença dos sinais de m/z 278,1176 $[M + H]^+$ (t_R 34,6 min) e 308,1278 $[M + H]^+$ (t_R 35,0 min) (Figuras 30 e 31), que foram correlacionados com as fórmulas moleculares C₁₈H₁₅NO₂ (**IV**) e C₁₉H₁₇NO₃ (**V**), calculadas para C₁₈H₁₆NO₂⁺, 278,1176 (Δ 0,0 ppm) e C₁₉H₁₈NO₃⁺, 308,1281 (Δ 0,9 ppm), respectivamente (Figuras 112 e 113).

Figura 112. EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **IV**.

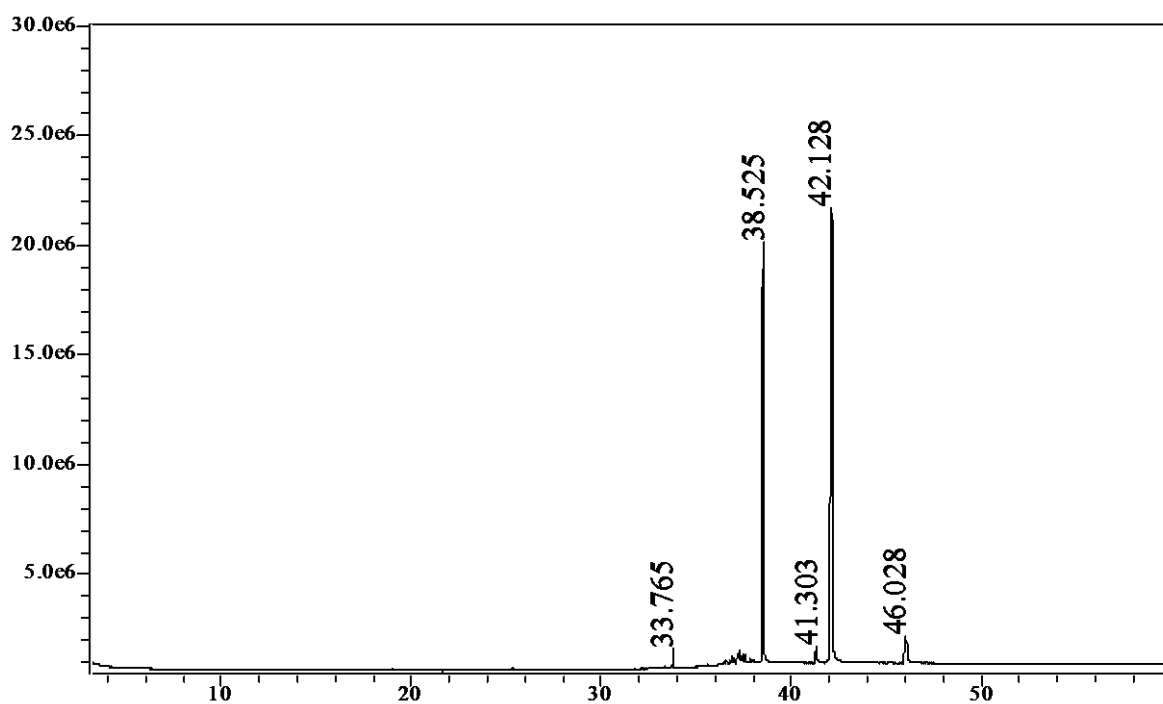


Fonte: autora.

Figura 113. EM-IES-(+) em alta resolução do alcaloide **V**.

Fonte: autora.

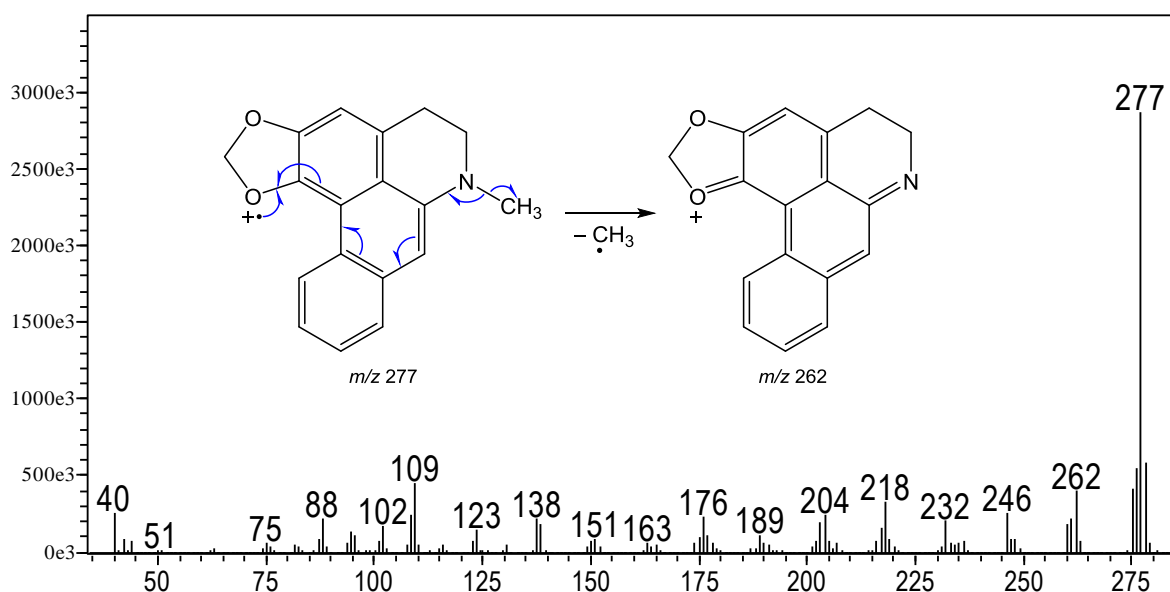
A análise da fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀ por CG-EM (Figura 114), permitiu observar a presença de dois sinais majoritários com t_R 38,5 e t_R 42,1 min, que a partir da análise dos espectros de massas (IE) foram correlacionados aos alcaloides **IV** e **V**, respectivamente.

Figura 114. Cromatograma obtido por CG-EM da fração MMe03-F₁₈₇₋₂₁₀.

Fonte: autora.

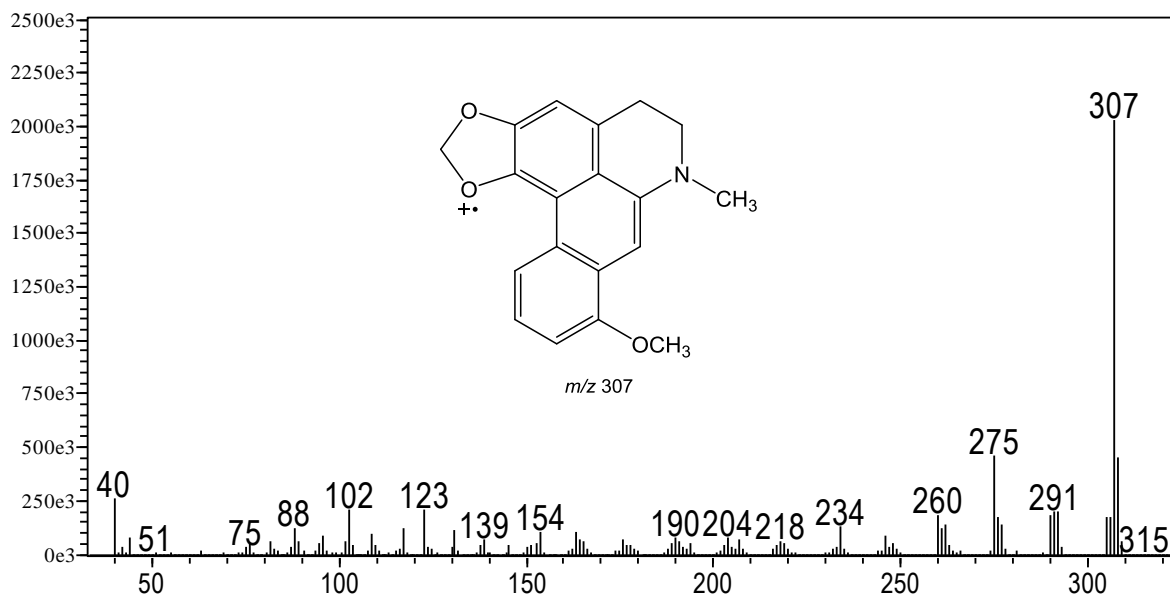
O EM-IE do pico com t_R 38,5 min (Figura 115) apresentou o sinal do íon molecular $[M]^{++}$ (100%) ímpar em m/z 277, o que sugere a presença de um nitrogênio na estrutura, sendo compatível com a fórmula molecular $C_{18}H_{15}NO_2$. A análise dos íons fragmentos permitiu observar um sinal de m/z 262, que pode ser relacionado à eliminação da metila (15 u), através de uma clivagem homolítica, como mostra a proposta de mecanismo sobre a Figura 115. Os demais íons fragmentos apresentaram similaridade com aqueles da literatura para o alcaloide dehidroemerina (**IV**) (GUINAUDEAU; LEBOEUF; CAVÉ, 1979).

Figura 115. EM-IE (70 eV) do pico com t_R 38,5 min.



Fonte: autora.

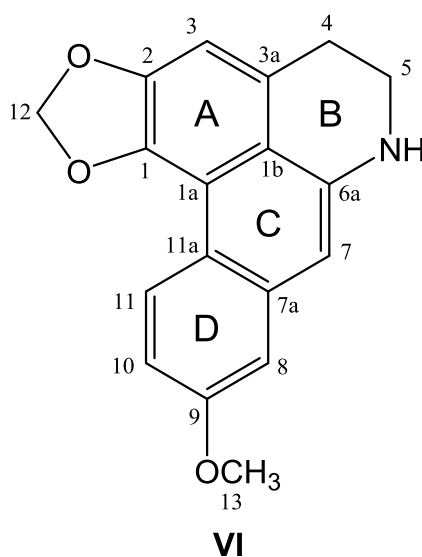
O EM-IE do pico com t_R 42,1 min (Figura 116) apresentou o sinal do íon molecular $[M]^{++}$ (100%) ímpar em m/z 307, sendo compatível com a fórmula molecular $C_{19}H_{17}NO_3$. A análise dos íons fragmentos apresentou similaridade com aqueles da literatura para o alcaloide dehidroestefalagina (**V**) (RASAMIZAFYR; HOCQUEMILLER; CAVÉ, 1986).

Figura 116. EM-IE (70 eV) do pico com t_R 42,1 min.

Fonte: autora.

O alcaloide dehidroemerina, foi isolado das raízes de *A. cherimolia* (CHULIA et al., 1995), enquanto o alcaloide dehidroestefalagina, foi isolado das folhas de *Guatteria sagotiana* (RASAMIZAFYR; HOCQUEMILLER; CAVÉ, 1986). Entretanto, ambos nunca foram reportados em *A. crassiflora*. As 6a-7-hidroaporfina são um subtipo de dehidroaporfina relatadas em várias espécies da família Annonaceae, sendo a maioria no gênero *Guatteria* (LÚCIO et al., 2015).

5.4.5 Identificação do alcaloide VI



A análise da fração MMe01-F₂₀₅₋₂₂₀ por EM-IES(+), em alta resolução, permitiu observar a presença do sinal de m/z 296,1281 $[M + H]^+$, que foi correlacionado com a fórmula molecular $C_{18}H_{17}NO_3$, calculada para $C_{18}H_{18}NO_3^+$, 296,1281 (Δ 0,0 ppm) (Figura 38). A partir da proposta de fórmula molecular, aliada a análise dos compostos relatados na literatura, foi possível chegar na estrutura do alcaloide xilopina (**VI**), já isolado das folhas de *A. crassiflora* (EGYDIO et al., 2013).

5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTICOLINESTERÁSICA

O extrato etanólico, a fração alcaloidal (CH_2Cl_2) e o alcaloide **I** foram avaliados no ensaio de inibição da AChE e BChE por meio do ensaio em microplacas (Tabela 10).

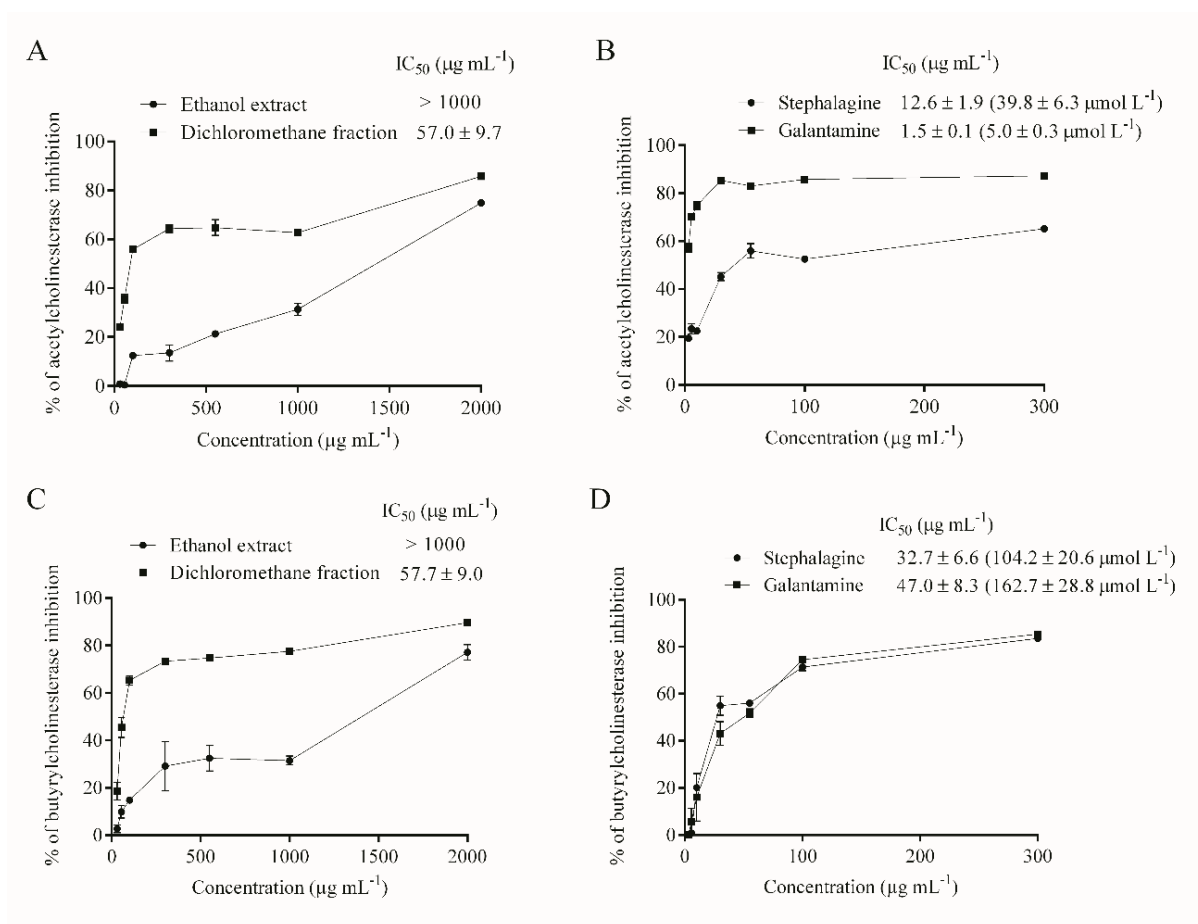
Tabela 10. Atividade anticolinesterásica do extrato etanólico, fração alcaloidica (CH_2Cl_2) e estefalagina (**I**).

Amostras	IC ₅₀			
	AChE		BChE	
	$\mu g/mL$	$\mu mol/L$	$\mu g/mL$	$\mu mol/L$
EtOH	> 1000	–	> 1000	–
CH_2Cl_2	57.0 ± 9.7	–	57.0 ± 9.7	–
I	12.6 ± 1.9	39.8 ± 6.3	32.7 ± 6.6	104.2 ± 20.6
Galantamina ^a	1.5 ± 0.1	5.0 ± 0.3	47.0 ± 8.3	162.7 ± 28.8

^aControle positivo.

O extrato etanólico e a fração CH_2Cl_2 apresentaram baixo potencial de inibição das enzimas, enquanto a estefalagina (**I**) apresentou alta atividade inibitória contra BChE (IC₅₀ $104,2 \pm 20,6 \mu mol/L$), quando comparada ao controle positivo galantamina (IC₅₀ $162,7 \pm 28,8 \mu mol/L$) (Figura 113). Foi possível observar uma crescente atividade inibitória, quando comparados os resultados de inibição do extrato etanólico, da fração CH_2Cl_2 e do composto puro **estefalagina**, sugerindo que este metabólito seja realmente o responsável pela atividade anticolinesterásica.

Figura 117. Atividades inibitórias de AChE (A e B) e BChE (C e D) do extrato etanólico, fração alcaloidal (CH_2Cl_2) e estefalagina (**I**) analisadas pelo ensaio de microplacas.



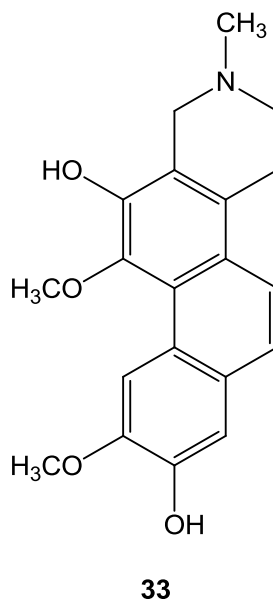
Nota: IC_{50} é a concentração da amostra que inibe 50% das enzimas ($\mu\text{g/mL}$ ou $\mu\text{mol/L}$); galantamina foi usada como controle positivo.

Fonte: autora.

A seleção do ensaio de inibição da AChE e BChE foi feita a partir de relatos na literatura que descrevem os alcaloides aporfínicos como potenciais inibidores destas enzimas (KONRATH et al., 2013; DONG et al., 2015; NAVABI et al., 2018), sendo que o metabólitos isolados e identificados em *A. crassiflora* exibem grande semelhança estrutural com aqueles descritos na literatura. Dentre os alcaloides identificados e isolados, a liriodenina, a aterospermidina e a xilopina apresentam nitrogênio secundário no anel B, enquanto a estefalagina, a dehidroemerina e a dehidroestefalagina apresentam nitrogênio terciário. No estudo realizado por Chiou et al. (1998), que preparou uma série de homólogos *N*-alquilados da litebamina (**33**) (Figura 118), foi observado que os homólogos quaternários *N*-metil ou *N*-propil são mais potentes que os demais compostos no ensaio de avaliação da

anticolinesterase. Estes resultados sugerem que os alcaloides **I**, **IV** e **V** devem ser melhores inibidores que os demais compostos.

Figura 118. Estrutura química da litebamina



Fonte: autora.

5.6 ENSAIOS *IN SILICO* (DOCKING MOLECULAR)

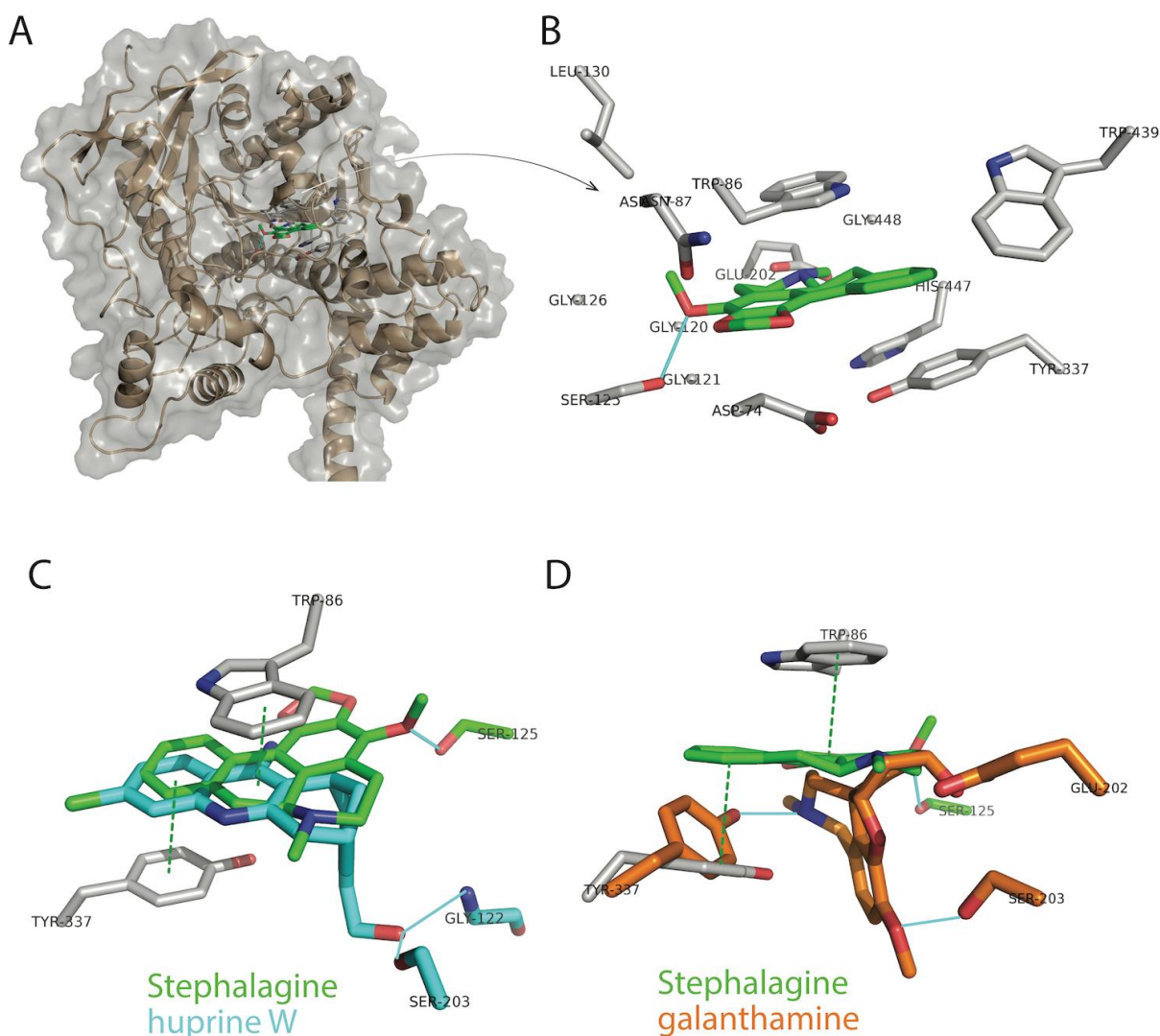
Estudos *in silico* são usuais nos estágios iniciais de desenvolvimento e avaliação de compostos bioativos para estimar as possíveis interações entre os compostos e os alvos biológicos (CHEUNG et al., 2012). Assim, ensaios de *docking* molecular foram realizados para prever o modo de ligação dos alcaloides **I–III** à AChE e BChE humanas.

5.6.1 Ensaios “*in silico*” utilizando a AChE

De acordo com os estudos de *docking* molecular é possível verificar que os alcaloides **I–III** se ancoram no sítio ativo da AChE de modo semelhante ao inibidor huprina W. O local de ligação da AChE é predominantemente hidrofóbico e os três compostos mostraram esse tipo de interação com os resíduos de aminoácidos no sítio catalítico da AChE. A estefalagina (Figuras 119a e 119b), liriodenina (Figura 120), aterospermidina (Figura 121) e a huprina W (Figura 119c) fazem interações do tipo π - π / π - β com o mesmo par de resíduos aromáticos da AChE (Trp86 e Tyr337). Sabe-se que a interação com Tyr337 é crucial para a inibição da AChE humana (ASHANI et al., 1994) na estreita cavidade aromática da enzima, que é

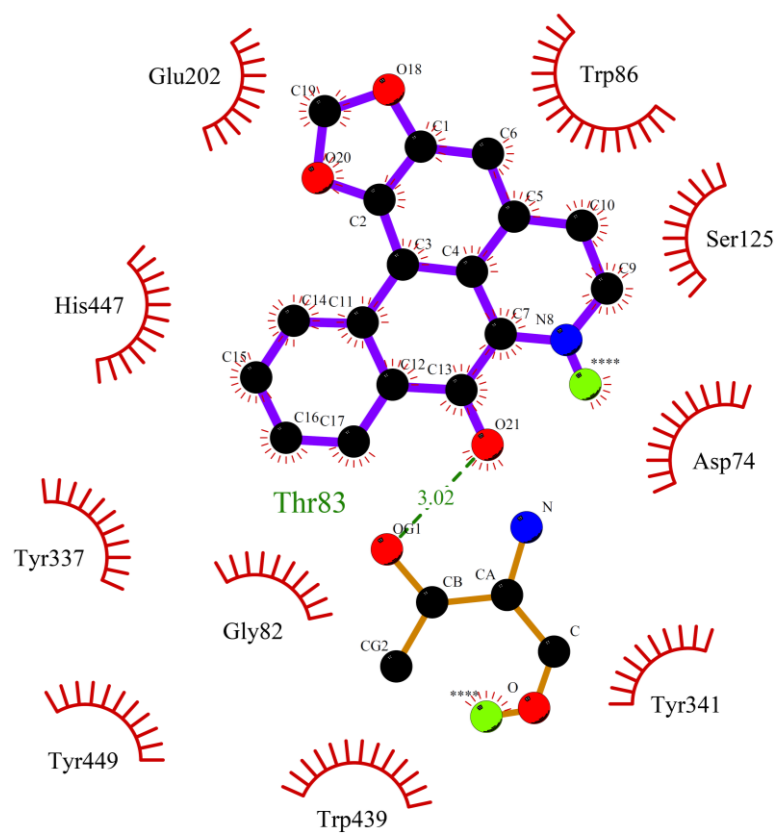
fundamental na orientação do ligante para atingir o sítio ativo da enzima (CHEUNG et al., 2012). Além disso, os inibidores **I** e **III** exibiram uma ligação de hidrogênio com Ser125, os inibidores **II** e **III** exibiram uma ligação de hidrogênio com Thr83, enquanto a huprina W realiza uma ligação de hidrogênio extra com a cadeia principal de Gly122 (Figura 119c).

Figura 119. Estefalagina no sítio ativo da AChE humana (A e B), sobreposição dos modos de ligação da huprina W e estefalagina no sítio ativo da AChE (C) e sobreposição dos modos de ligação da galantamina e estefalagina no sítio ativo da AChE (D).



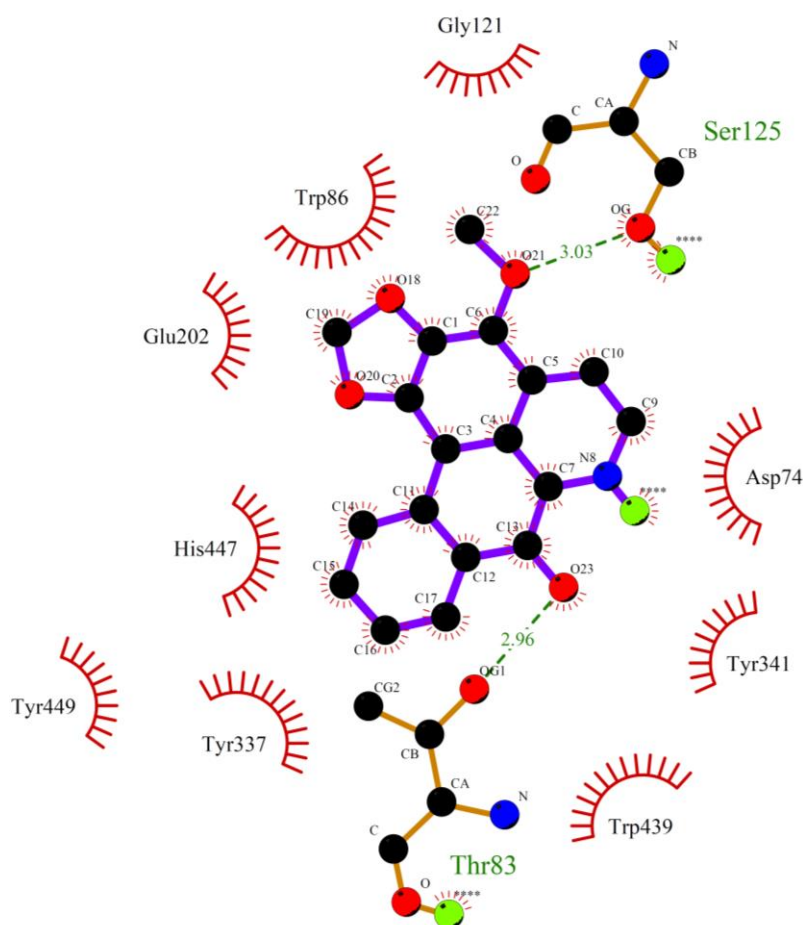
Nota: AChE é na figura tridimensional e inibidores em bastões. Em destaque as ligações de hidrogênio entre os inibidores e os resíduos de aminoácidos da enzima (linha contínua ciano). Linhas tracejadas verdes representam interações π - π / π -cátion.

Fonte: autora.

Figura 120. Liriodenina complexada com AChE.

Fonte: autora.

Figura 121. Aterospermidina complexada com AChE.



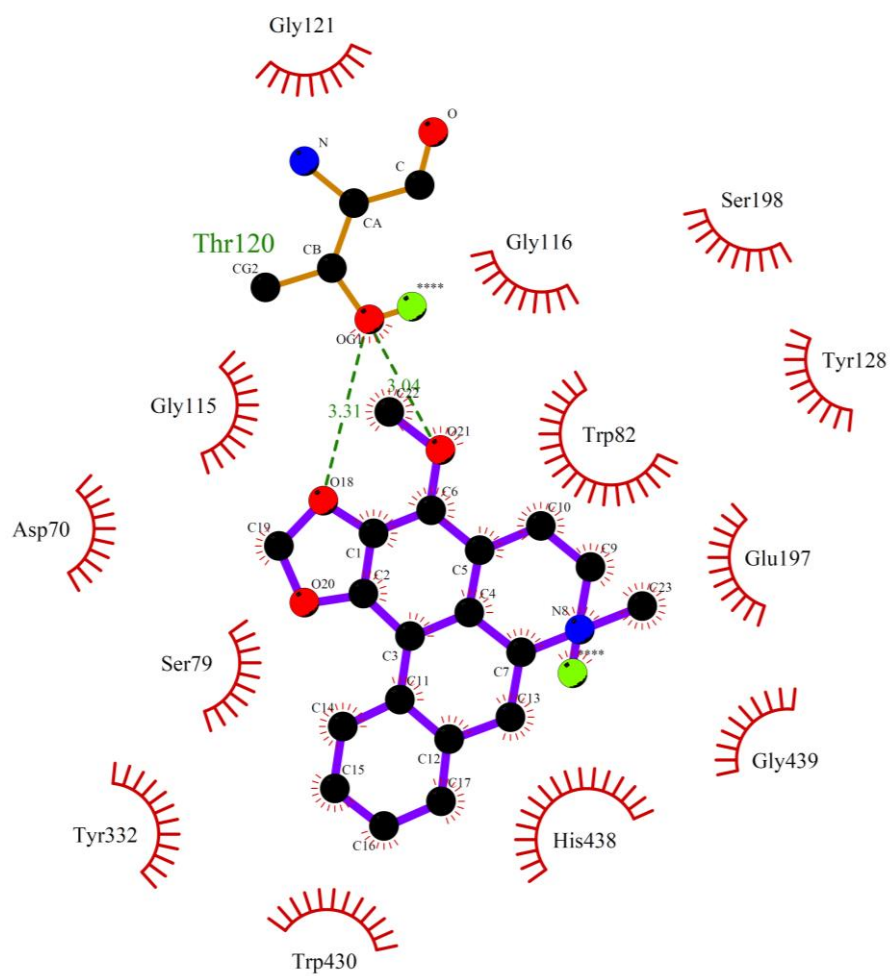
Fonte: autora.

Vale a pena mencionar que, em uma estrutura cristalográfica da galantamina com AChE humana recombinante (CHEUNG et al., 2012), este inibidor (padrão no ensaio biológico) tem número menor de interações hidrofóbicas do que **I–III** e a galantamina não apresenta interações π - π / π -cátion com Trp86 e Tyr337 (Figura 119d). No entanto, a galantamina interage com os dois resíduos através de uma interação hidrofóbica (Trp86) e uma ligação de hidrogênio (Tyr337). O resíduo crucial Tyr337 na estrutura cristalográfica da galantamina com a AChE recombinante é levemente rotacionado para o plano formado pelo anel Tyr337 na estrutura cristalográfica da huprina W com AChE, não paralela ou próxima o suficiente para formar uma interação π - π / π -cátion, e ainda perto o suficiente para formar uma ligação de hidrogênio. As simulações computacionais permitiram rotações dos anéis, que possibilitou observar a interação entre a Tyr337 com a estefalagina em uma orientação que favoreceu a interação π - π / π -cátion. Além disso, os inibidores **I** e **III** exibiram uma ligação de hidrogênio com um resíduo de serina e a galantamina apresentou uma ligação de hidrogênio

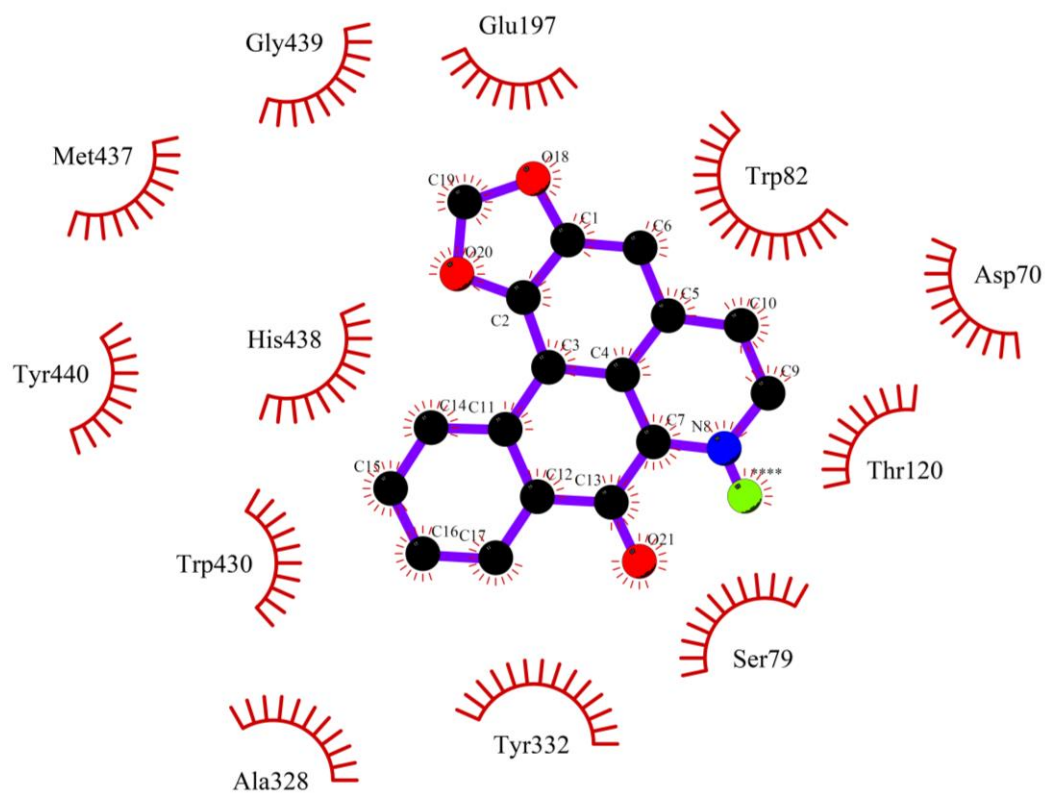
extra formada com Glu202 (Figura 119d). Essa diferença no nível molecular das interações sugere que a estefalagina e a aterospermidina exibem um perfil de inibição diferente da galantamina e similar à huprina W.

5.6.2 Ensaio “*in silico*” utilizando a BChE

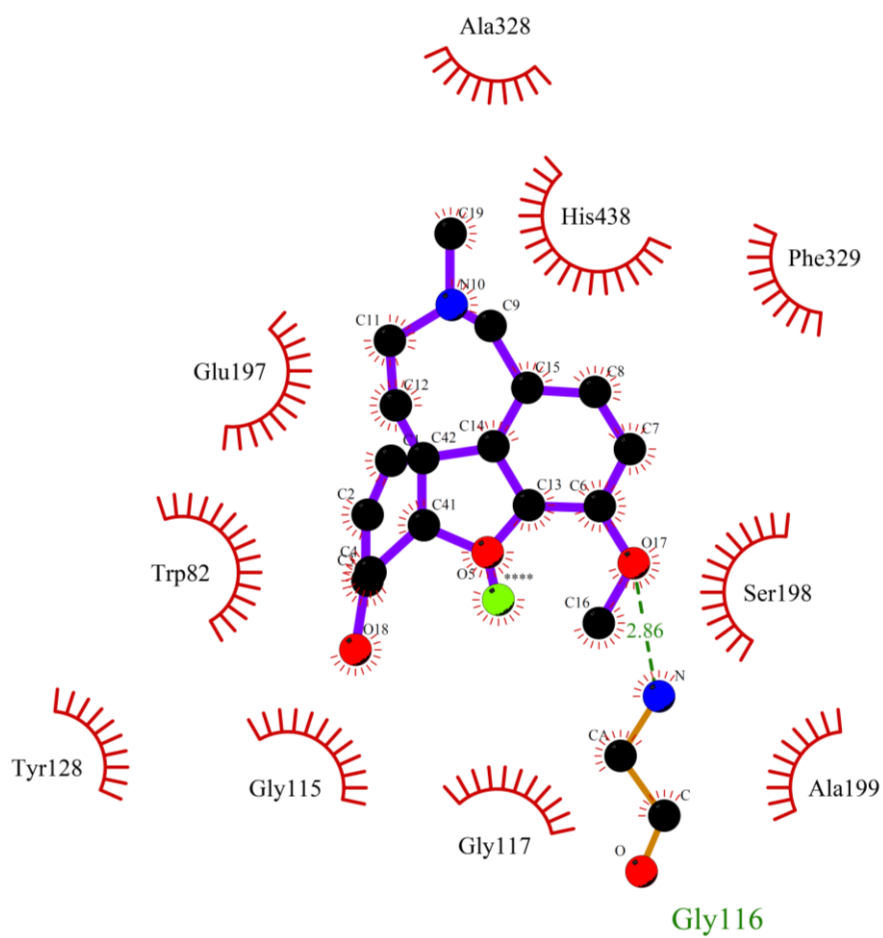
A estrutura da BChE é semelhante a AChE, diferindo apenas em dois resíduos de aminoácidos presentes na cavidade aromática da AChE (Phe288 e Phe290), substituídos por resíduos menos volumosos na BChE (Leu286 e Val288) (PAN et al., 2008). Os principais resíduos funcionais são Asp70 e Tyr332, estão posicionados na entrada da cavidade aromática, e estão envolvidos em ligações dos resíduos do sítio aniônico periférico com substratos carregados positivamente, além de controlar a arquitetura funcional do sítio ativo da enzima (NAWAZ et al., 2011). Todos os inibidores (I-III) (Figuras 122–124) formam interações com o mesmo par de resíduos da BChE (Asp70 e Tyr332), além dos compostos **I** e **III** apresentarem uma ligação de hidrogênio com o resíduo de treonina 120 (Figuras 122 e 124). A galantamina, inibidor utilizado como padrão positivo no ensaio biológico também apresentou menor número de interações hidrofóbicas do que **I–III** (Figura 125), assim como a huprina W (Figura 126). No entanto a galantamina interage através de uma ligação de hidrogênio com o resíduo de Gly116 e a huprina W interage com os resíduos Tyr128 e Gly115.

Figura 122. Estefalagina complexada com BChE.

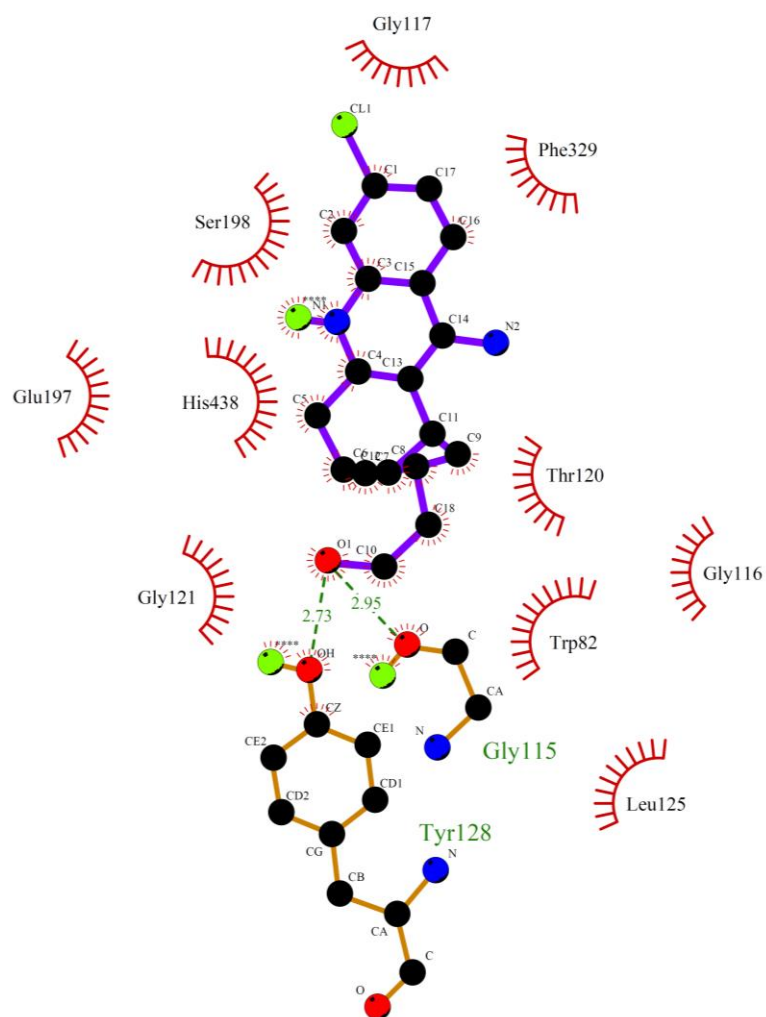
Fonte: autora.

Figura 123. Liriodenina complexada com BChE.

Fonte: autora.

Figura 125. Galantamina complexada com BChE.

Fonte: autora.

Figura 126. Huprina W complexada com BChE.

Fonte: autora.

6 CONCLUSÕES

O fruto conhecido como araticum é bastante utilizado pelas comunidades tradicionais que vivem em regiões do Cerrado. Com a expansão do conhecimento tradicional, o araticum passou a ser comercializado em maior escala, assim sua polpa é utilizada no preparo de doces, sucos e sorvetes. No entanto as cascas são descartadas por não apresentar utilidade. A árvore que produz o araticum é cientificamente conhecida como *Annona crassiflora* e pertence à família Annonaceae, reconhecida pela presença de alcaloides benzilisoquinolínicos com comprovadas atividades biológicas.

O estudo químico do extrato etanólico das cascas de *A. crassiflora* resultou no isolamento dos alcaloides estefalagina (**I**), liriodenina (**II**) e aterospermidina (**III**) e identificação da dehidrooemerina (**IV**), dehidroestefalagina (**V**), e xilopina (**VI**), sendo que destes somente **I** já havia sido isolada das cascas do fruto da espécie. Os alcaloides oxoaporfínicos **II** e **III** foram relatados anteriormente nas folhas e cascas do tronco, enquanto o alcaloide **VI** foi relatado nas folhas, porém estes compostos estão sendo descritos pela primeira vez na casca dos frutos de *A. crassiflora*. Além disso, é a primeira vez que se relata a presença dos alcaloides dehidroaporfínicos **IV** e **V** em *A. crassiflora*. Estes metabólitos já haviam sido relatados em outras espécies do gênero *Annona*.

A EM-IES e a EM-IE provaram ser ferramentas importantes para a elucidação e identificação das estruturas dos alcaloides.

Relatos na literatura sobre a atividade inibidora da AChE nos motivaram para a avaliação da desta atividade para o alcaloide **I**, isolado em quantidade suficiente para realização dos ensaios. Adicionalmente o composto **I** também foi avaliado quanto a capacidade de inibição da BChE, sendo observado resultado comparável com o controle positivo galantamina.

O estudo *in silico* (docking molecular) mostrou que os alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos interagem com a AChE e BChE na mesma região que inibidores como a huprina W e galantamina. Todos os inibidores (**I-III**) apresentaram interações com os principais resíduos das duas enzimas. Na AChE, **I** e **III** exibiram ligação de hidrogênio com Ser125, enquanto **II** e **III** exibiram ligação de hidrogênio com Thr83. Na BChE, **I** e **III** apresentaram ligação de hidrogênio com o resíduo Thr120. Além disso, dados descritos na literatura a respeito de **II**, evidenciam o potencial anticolinesterásico deste composto (IC_{50} 3,5 μ M), quando comparado com o padrão positivo huperzina A (IC_{50} 1,8 μ M). Estes resultados mostram a importância destes compostos como modelos para o desenvolvimento

de novos fármacos para o tratamento de doenças relacionadas ao sistema nervoso central com a DA.

O potencial biológico observado no ensaio de inibição da AChE e BChE, assim como os resultados do estudo de *docking* molecular ressaltam o potencial químico e farmacológico de *A. crassiflora*.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, M.; GMUNDER, F.; HAMBURGER, M. Plants traditionally used in age related brain disorders—A survey of ethnobotanical literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 363–381, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.07.016>
- ADSERSEN, A.; KJØLBYE, A.; DALL, O.; JAGER, A. K. Acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitory compounds from *Corydalis cava* Schweigg. & Kort. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 113, p. 179–182, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.05.006>
- AMINIMOGHADAMFAROUJA. N.; NEMATOLLAHIA. A.; WIART, C. Annonaceae: bio-resource for tomorrow's drug discovery. **Journal of Asian Natural Products Research**, n. 5, v. 13, p. 465–476, 2001. <https://doi.org/10.1080/10286020.2011.570265>
- ANISZEWSKI, T. **Alkaloids – secrets of life**. Alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Holanda, Elsevier: 2007, 334 p.
- AQUINO, F. G.; AGUIAR, L. M. S. Caracterização e conservação da biodiversidade do bioma Cerrado. In: FALEIRO, F. G.; SOUZA, E. S. Pesquisa, desenvolvimento e inovação para o Cerrado. Planaltina, DF: **Embrapa Cerrados**, 2007. p. 27–32.
- ARAYA, H. Studies on Annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds. **Bulletin - National Institute of Agro-Environmental Science**, v. 23, p. 77–149, 2004.
- ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. A.; GONSALVES A. A. Acetilcolinesterase – AChE: uma enzima de interesse farmacológico. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 6, p. 1818–1834, 2016. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20160122>
- ASHANI, Y.; GRUNWALD, J.; KRONMAN, C.; VELAN, B.; SHAFFERMAN, A. Role of tyrosine 337 in the binding of huperzine A to the active site of human acetylcholinesterase. **Molecular Pharmacology**, v. 45, n. 3, p. 555–560, 1994.
- BHAKUNI, D. S.; TEWARI, S.; DHAR, M. M. Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 1819–1822, 1972. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(72\)85042-8](https://doi.org/10.1016/0031-9422(72)85042-8)
- BANNING, J. W.; URETSKY, N. J.; PATIL, P. N.; BEAL, J. L. Reticuline: a dopamine receptor blocker. **Life Sciences**, v. 26, n. 24, p. 2083–2091, 1980. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(80\)90593-7](https://doi.org/10.1016/0024-3205(80)90593-7)
- BARBALHO, S. M.; GOULART, R. A.; MACHADO, F. M. V. F.; SOUZA, M. S. S.; BUENO, P. C. S.; GUIGUER, E. L.; ARAÚJO, A. C.; GROppo, M. *Annona* sp: plants with multiple applications as alternative medicine – a review. **Current Bioactive Compounds**, v. 8, p. 277–286, 2012. <https://doi.org/10.2174/157340712802762500>
- BERLINK, R. G. S.; BORGES, W. S.; SCOTTI, M. T.; VIEIRA, P. C. A química de produtos naturais do Brasil no século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170070>

CAMACHO, M. D. R.; KIRBY, G. C.; WARHURST, D. C.; CROFT, S. L.; PHILLIPSON, J. D. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, v. 66, n. 5, 478–480, 2000.

<https://doi.org/10.1055/s-2000-8597>

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. 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, p. 5–40, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.2012.01235.x>

CHEN, J. J.; CHANG, Y. L.; TENG, C. M.; CHEN, I. S. Anti-platelet aggregation alkaloids and lignans from *Hernandia nymphaeifolia*. **Planta Médica**, v. 66, 251–256, 2000.

CHEN, J.; GAO, K.; LIU, T.; ZHAO, H.; WANG, J.; WU, H.; LIU, B.; WANG, W. Aporphine alkaloids: a kind of alkaloid's extract source, chemical constitution and pharmacological actions in different botany. **Asian Journal of Chemistry**, v. 25, n. 18, p. 10015–10027, 2013. <https://doi.org/10.14233/ajchem.2013.15890>

CHEUNG, J.; RUDOLPH, M. J.; BURSHTEYN, F.; CASSIDY, M. S.; GARY, E. N.; LOVE, J.; FRANKLIN, M. C.; HEIGHT, J. J. Structures of human acetylcholinesterase in complex with pharmacologically important ligands. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, p. 10282–10286, 2012. <https://doi.org/10.1021/jm300871x>

CHIOU, C.-M.; KANG, J.-J.; LEE, S.-S. Litebamine *N*-Homologues: Preparation and anti-acetylcholinesterase activity. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 1, p. 46–50, 1998. <https://doi.org/10.1021/np970298f>

CHU, C. W.; LIU, C. M.; CHUNG, M. I.; CHEN, C. Y. Biofunctional constituents from *Michelia compressa* var. *lanyuensis* with anti-melanogenic properties. **Molecules**, v. 20, p. 12166–12174, 2015. <https://doi.org/10.3390/molecules200712166>

CHULIA, S.; IVORRA, M. D.; CAVE, A.; CORTES, D.; NOGUERA, M. A.; D'OCÓN, M. P. Relaxant activity of three Aporphine alkaloids from *Annona cherimolia* on isolated aorta of rats. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 47, p. 647–650, 1995. <https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1995.tb05852.x>

CORTES, D.; YOLANDA-TORRERO, M.; PILAR-D'OCÓN, M.; LUZ-CANDENAS, M.; CAVÉ, A.; HADI, A. H. A. J. Norstephalagine et atherospermidine, deux aporphines D'Artabotrys maingai relaxantes du muscle lisse. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 503–508, 1990. <https://doi.org/10.1021/np50068a039>

COSTA, E. S.; LIMA, C. A. H.; LIMA, E. O.; SUCUPIRA, G. C.; BERTOLIN, A. O.; LOLIS, S. F.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the Cerrado, Brazil. **Phytotherapy Research**, v. 22, p. 705–707, 2008. <https://doi.org/10.1002/ptr.2397>

COSTA, E. M.; CRUZ, P. E. O.; LOURENÇO, C. C.; MORAES, V. R. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; SALVADOR, M. J. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other

alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural Product Research**, v. 27, n. 11, p. 1002–1006, 2013. <https://doi.org/10.1080/14786419.2012.688044>

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, p. 9714–9720, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules16119714>

DALL'ACQUA, S. Plant-derived acetylcholinesterase inhibitory alkaloids for the treatment of Alzheimer's disease. **Botanics: Targets and Therapy**, v. 3, p. 19–28, 2013. <https://doi.org/10.2147/BTAT.S17297>

DAMAR, U.; GERSNER, R.; JOHNSTONE, J. T.; SCHACHTER, S.; ROTENBERG, A. Huperzine A: a promising anticonvulsant, disease modifying, and memory enhancing treatment option in Alzheimer's disease. **Medical Hypotheses**, v. 99, p. 57–62, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2016.12.006>

DANUELLO, A.; ROMEIRO, N. C.; GIESEL, G. M.; PIVATTO, M.; VIEGAS JR, C.; VERLI, H.; BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; CASTRO, N. G.; BOLZANI, V. S. Molecular docking and molecular dynamic studies of semi-synthetic piperidine alkaloids as acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 1, p. 163–170, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532012000100023>

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3 ed., John Wiley & Sons Ltd, 2009. 546 p.

DONG, J. W.; CAI, L.; FANG, Y. S.; XIAO, H.; LI, Z. J.; DING, Z. T. Proaporphine and aporphine alkaloids with acetylcholinesterase inhibitory activity from *Stephania epigaea*. **Fitoterapia**, v. 104, p. 102–107, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2015.05.019>

EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from Cerrado, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 145–151, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.bse.2012.08.006>

ELLMAN, G. L.; COURTNEY, K. D.; ANDRES JUNIOR, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemistry Pharmacology**, v. 7, p. 88–95, 1961. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

FEITOSA, C. R. S.; SILVA, R. C.; BRAZ-FILHO, R.; MENEZES, J. E. S. A.; SIQUEIRA, S. M. C.; MONTE, F. J. Q. Characterization of chemical constituents of *Luffa operculata* (Cucurbitaceae). **American Journal of Analytical Chemistry**, v. 2, p. 989–995, 2011. <https://doi.org/10.4236/ajac.2011.28116>

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. I.; CARDOSO, C. A. L.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 4, p. 308–315, 2015. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20144127>

GONÇALVES, A. C. R.; CARNEIRO, Z. A.; OLIVEIRA, C. G.; DANUELLO, A.; GUERRA, W.; OLIVEIRA, R. J.; FERREIRA, F. B.; VELOSO-SILVA, L. W.; BATISTA, F. A. H.; BORGES, J. C.; ALBUQUERQUE, S.; DEFLON, V. M.; MAIA, P. I. S. PtII, PdII and AuIII complexes with a thiosemicarbazone derived from diacetylmonooxime: Structural analysis, trypanocidal activity, cytotoxicity and first insight into the antiparasitic mechanism of action. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 141, p. 615–631, 2017.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.10.013>

GONÇALVES, M. A.; MOSQUEIRA, V. C. F.; PIMENTA, L. P. S. 2010. *Annona crassiflora* wood constituents: antimalarial efficacy, larvicidal and antimicrobial activity. In: Gupta V. K.; **Comprehensive bioactive natural products**. Houston: Studium Press, p. 293–305.

GÖREN, A. C., ZHOU, B. N., KINGSTON, D. G. I. Cytotoxic and DNA damaging activity of some aporphine alkaloids from *Stephania dinklagei*. **Planta Medica**, v. 69, n. 9, p. 867–868, 2003. <https://doi.org/10.1055/s-2003-43224>

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561–584, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S0102-33062003000400009>

GUINAUDEAU, H.; LÉBOEUF, M.; CAVE, A. Aporphine alkaloids II. **Journal of Natural Products**, v. 42, n. 4, p. 325–360, 1979. <https://doi.org/10.1021/np50004a001>

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

<https://doi.org/10.1111/j.2042-7158.1997.tb06058.x>

HENRIQUES, A. T.; LIMBERGER, R. P.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre, 2003, p. 765–791.

HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; JACQUEMIN, H.; TOUCHÉ, A.; FORGACS, P. Alcaloides des Annonacées. XXXVI (*): alcaloides de *L'Annona crassiflora* Mart. **Plantes médicinales et phytothérapie**, v. 16, n. 1, p. 4–6, 1982.

HSIEH, T-J.; CHANG, F-R.; CHIA, V-C.; CHEN, C-Y.; LIN, H-C.; CHIU, H-F., WU, Y-C. The Alkaloids of *Artabotrys uncinatus*. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1157–1161, 2001. <https://doi.org/10.1021/np010036k>

INGKANINAN, K.; PHENGPA, P.; YUENYONGSAWAD, S.; KHORANA, N. Acetylcholinesterase inhibitors from *Stephania venosa* tuber. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, p. 695–700, 2006. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.5.0015>

- IRANSHAHY, M.; QUINN, A. R. J.; IRANSHAHI, M. Biologically active isoquinoline alkaloids with drug-like properties from the genus *Corydalis*. **The Royal Society of Chemistry**, v. 4, p. 15900–15913, 2014. <https://doi.org/10.1039/C3RA47944G>
- JOLY, C.; HADDAD, C.; VERDADE, L.; OLIVEIRA, M.; BOLZANI, V.; BERLINCK, R. Diagnóstico da pesquisa em biodiversidade no Brasil. **Revista USP**, v. 89, p. 114–133, 2011. <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9036.v0i89p114-133>
- JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; SILVA, N. M.; SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, A.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, n. 69, p. 167–182, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>
- KAPADIA, N.; HARDING, W. Aporphine alkaloids as ligands for serotonin receptors. **Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 4, p. 241–249, 2016. <https://doi.org/10.4172/2161-0444.1000353>
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, 2005.
- KONRATH, E. L.; PASSOS, C. S.; KLEIN-JÚNIOR, L.C; HENRIQUES, A. T. Alkaloids as a source of potential anticholinesterase inhibitors for the treatment of Alzheimer's disease. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 2013. <https://doi.org/10.1111/jphp.12090>
- LAGE, G. A.; MEDEIROS, F. S.; FURTADO, W. L.; TAKAHASHI, J. A.; FILHO, J. D. S.; PIMENTA, L. P. S. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, 2014. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.885518>
- LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, 1982. [https://doi.org/10.1016/0031-9422\(80\)85046-1](https://doi.org/10.1016/0031-9422(80)85046-1)
- LOPES, C. D.; GASPARI, A. P. S.; OLIVEIRA, R. J.; ABRAM, U.; ALMEIDA, J. P. A.; MAIA, P. I. S.; SILVA, J. S.; ALBUQUERQUE, S.; CARNEIRO, Z. A. Organometallic gold(III) [Au(Hdamp)(L14)]Cl (L1 = SNS-donating thiosemicarbazone) complex protects mice against acute *T. cruzi* infection. **BioRxiv**, v. 312702, 2018. <https://doi.org/10.1101/312702>
- LOPES, J. C.; SILVA, R. M. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. **Palestra Anonáceas**, v. 36, p. 125–131, 2014. <https://doi.org/10.1590/S0100-29452014000500015>
- LOPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and *Narcissus* extracts. **Life Sciences**, v. 71, p. 2521–2529, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(02\)02034-9](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(02)02034-9)
- LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas do Brasil**. 2ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002, v. 2, 384 p.

- LUCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G.; CUNHA, E. V. L.; TAVARES, J. F.; FILHO, J. M. B. Alkaloids of the Annonaceae: occurrence and a compilation of their biological activities. **The alkaloids: chemistry and biology**, v. 74, p. 233–409, 2015. <https://doi.org/10.1016/bs.alkal.2014.09.002>
- LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 231–235, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.027>
- MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>
- MACHADO, A. R. T.; FERREIRA, S. R.; MEDEIROS, F. S.; FUJIWARA, R. T.; SOUZA FILHO, J. D.; PIMENTA, L. P. S. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 113, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0708-6>
- MARSTON, A.; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A Rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 51–54, 2002. <https://doi.org/10.1002/pca.623>
- MARTINS, D., ALVARENGA, M. A., ROQUE, N. F., FELICIO, J. D. Diterpenes and alkaloids from Brazilian *Xylopi*a species. **Química Nova**, v. 18, n. 1, p. 14–16, 1995.
- MESQUITA, M. L.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165–170, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.09.015>
- MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L. V. C.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 439–445, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.018>
- MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783–787, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762005000700019>
- MISKI, M.; SHEN, X.; COOPER, R.; GILLUM, A. M.; FISHER, D. K.; MILLER, R. W.; HIGGINS, T. J. Aporphine alkaloids, CD45 protein tyrosine phosphatase inhibitors, from *Rollinia ulei*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, n. 14, p. 1519–1522, 1995. [https://doi.org/10.1016/0960-894X\(95\)00250-W](https://doi.org/10.1016/0960-894X(95)00250-W)
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em 02 de janeiro de 2018.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. Disponível em:
<<http://www.mma.gov.br/informma/item/618-ppcarrado>>. Acesso em 10 de abril de 2018.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Disponível em:
<<http://combateaodesmatamento.mma.gov.br/>>. Acesso em 10 de abril de 2018.

MMA - MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE. Plano de ação para prevenção e controle do desmatamento e das queimadas: cerrado. Brasília: MMA, 2011. 200 p. Disponível em <http://www.mma.gov.br/estruturas/201/_arquivos/ppc cerrado_201.pdf>. Acesso em: 02 de janeiro de 2018.

MOLLATAGHI, A.; COUDIERE, E.; HADI, A. H. A.; MUKHTAR, M. R.; AWANG, K.; LITAUDON, M.; ATA, A. Anti-acetylcholinesterase, anti- α -glucosidase, anti-leishmanial and anti-fungal activities of chemical constituents of *Beilschmiedia* species. **Fitoterapia**, v. 83, p. 298–302, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2011.11.009>

MONTENEGRO, H.; GUTIERREZ, M.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; CAPSON, T. L.; CUBILLA-RIOS, L. Aporphine alkaloids from *Guatteria* spp. with leshmanicidal activity. **Planta Medica**, v. 69, p. 677–679, 2003. <https://doi.org/10.1055/s-2003-41126>

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, p. 853–858, 2000. <https://doi.org/10.1038/35002501>

NABAVI, S. M.; URIARTE, E.; RASTRELLI, L.; SOBARZO-SANCHEZ, E. Aporphines and Alzheimer's disease: towards a medical approach facing the future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 25, p. 1–7, 2018. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180514102933>

NACHON, F.; CARLETTI, E.; RONCO, C.; TROVASLET, M.; NICOLET, Y.; JEAN, L.; RENARD, P-W. Crystal structures of human cholinesterases in complex with huprine W and tacrine: elements of specificity for anti-Alzheimer's drugs targeting acetyl- and butyrylcholinesterase. **Biochemical Journal**, v. 453, p 393–399, 2013. <https://doi.org/10.1042/BJ20130013>

NAWAZ, S. A.; AYAZ, M.; BRANDT, W.; WESSJOHANN, L. A.; WESTERMANN, B. Cation- π and π - π stacking interactions allow selective inhibition of butyrylcholinesterase by modified quinine and cinchonidine alkaloids. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 404, p. 935–940, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.12.084>

NEWMAN, D. J; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 629–661, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

NOVAES, P.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; MACIAS, F. A. Ecological phytochemistry of Cerrado (brazilian savanna) plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 12, n. 4, p. 839–855, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11101-013-9315-3>

OLIVEIRA, M. C.; RIBEIRO, J. F.; PASSOS, F. B.; AQUINO, F. G.; OLIVEIRA, F. F.; SOUSA, S. R. Crescimento de especies nativas em um plantio de recuperação de Cerrado

sentido restrito no Distrito Federal, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 13, n. 1, p. 25–32, 2015.

OLIVER-BEVER, B. *Medicinal Plants in Tropical West Africa*. Cambridge University Press, United States of America. 376 p., 1986. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511753114>

OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M. A. F.; PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, n. 98, p. 2549–2556, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.040>

ORTIZ, A. A.; SUARES, L. E. C.; PATINO, G. S. Aporfinoides en hojas de *Oxandra Longipetala* r. e. fr. (Annonaceae). **Scientia et Technica**, n. 33, 2007. <https://doi.org/10.22517/23447214.5821>

PAGLIOSA, L. B.; MONTEIRO, S. C.; SILVA, K. B.; ANDRADE, J. P.; DUTILH, J.; BASTIDA, J.; CAMMAROTA, M.; ZUANAZZI, J. A. S. Effect of isoquinoline alkaloids from two *Hippeastrum* species on *in vitro* acetylcholinesterase activity. **Phytomedicine**, v. 17, p. 698–701, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.10.003>

PAN, L.; TAN, J-L.; HOU, J-Q.; HUANG, S-L.; GU, L-Q.; HUANG, Z-S. Design, synthesis and evaluation of isaindigotone derivatives as acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 18, p. 3790–3793, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.05.039>

PARK, S. Y. Potential therapeutic agents against Alzheimer's disease from natural sources. **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 10, p. 1589–1609, 2010. <https://doi.org/10.1007/s12272-010-1010-y>

PAULO, M. Q.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; BARBOSA, R. C. B. B. C.; KAPLAN., M. A. C. Antimicrobial activity of benzylisoquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* DC . **Sabouraudia**, v. 36, p. 39–41, 1992. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(92\)90058-Y](https://doi.org/10.1016/0378-8741(92)90058-Y)

PECIC, S.; MCANUFF, M. A.; HARDING, W. W. Nantenine as an acetylcholinesterase inhibitor: SAR, enzyme kinetics and molecular modeling investigations. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 1, p. 46–55, 2011. <https://doi.org/10.3109/14756361003671078>

PEREIRA, M. N.; JUSTINO, A. B.; MARTINS, M. M.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; SANTOS, P. S.; TEIXEIRA, T. L.; SILVA, C. V.; GOULART, L. G.; PIVATTO, M.; ESPINDOLA, F. S. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 324–329, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.038>

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, supl. 1, p. 45–61, 2002. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422002000800009>

PINTO, A. C. Q.; CORDEIRO, M. C. R.; ANDRADE, S. R. M.; FERREIRA, F. R.; FILGUEIRAS, H. A. C.; ALVES, R. E.; KINPARA, D. I. *Annona* species. **International Centre for Underutilised Crops**, University of Southampton, Southampton, UK, 2005.

PIVATTO, M.; BACCINI, L. R.; SHARMA, A.; NAKABASHI, M.; DANUELLO, A.; VIEGAS JÚNIOR, C.; GARCIA, C. R.; BOLZANI, V. S. Antimalarial activity of piperidine alkaloids from senna spectabilis and semisynthetic derivatives.

Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 25, n. 10, p. 1900–1906, 2014.

<https://doi.org/10.5935/0103-5053.20140195>

PRADO-PRADO, F.; GARCÍA-MERA, X.; ESCOBAR, M.; SOBARZO-SÁNCHEZ, E.; YAÑEZ, M.; RIERA-FERNANDEZ, P.; GONZÁLEZ-DÍAZ, H. 2D MI-DRAGON: A new predictor for proteine ligands interactions and theoreticexperimental studies of US FDA drug-target network, oxoisoaporphine inhibitors for MAO-A and human parasite proteins.

European Journal of Medicinal Chemistry, v. 46, p. 5838–5851, 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.09.045>

RASAMIZAFYR, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Alcaloides des Annonacees LXXII, alcaloides du *Guatteria sagotiana*. **Journal of Natural Products**, v. 49, n. 6, p. 1078–1085, 1986. <https://doi.org/10.1021/np50048a018>

RETTONDIN, A. R.; CARNEIRO, Z. A.; GONÇALVES, A. C. R.; FERREIRA, V. F.; OLIVEIRA, C. G.; LIMA, A. N.; OLIVEIRA, R. J.; ALBUQUERQUE, S.; DEFLON, V. M.; MAIA, P. I. S. Gold(III) complexes with ONS-tridentate thiosemicarbazones: toward selective trypanocidal drugs. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 120, p. 217–226, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.05.003>

RHEE, I. K.; VAN DE MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. J. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin-layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of Chromatography A**, v. 915, p. 217–223, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(01\)00624-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(01)00624-0)

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 25, n. 1, p. 102–123, 2001.

<https://doi.org/10.1590/S1516-05722012000200010>

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major componentes by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 104, p. 1048–1054, 2007.

<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.017>

SANO, E. E.; ROSA, R.; BRITO, J. L. S.; FERREIRA, L. G. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do bioma cerrado. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 43, n. 1, p. 153–156, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-204X2008000100020>

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A. D.; OLIVEIRA, A. B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (Araticum). **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 387–391, 1994.

- SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, v. 8, n. 2, p. 115–120, 2001. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00008>
- SILVA, J. M. C.; BATES, J. M. Biogeographic patterns and conservation in the south american cerrado: a tropical savanna hotspot. **BioScience**, v. 52, n. 3, p. 225–234, 2002. [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2002\)052\[0225:BPACIT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2002)052[0225:BPACIT]2.0.CO;2)
- SILVA, M. V.; COSTA, T. R.; COSTA, M. R.; FERREIRA, E. C.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SILVA, M. R. R. Growth inhibition effect of Brazilian Cerrado plant extracts on *Candida* species. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 2, p. 138–141, 2001. <https://doi.org/10.1076/phbi.39.2.138.6248>
- SILVA, A. F.; RABELO, M. F. R.; ENOQUE, M. M. Diversidade de angiospermas e espécies medicinais de uma área de Cerrado. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 17, n. 4, supl. 3, p.1016–1030, 2015. https://doi.org/10.1590/1983-084x/14_115
- SILVA, F. M. A.; BATAGLION, G. A.; ALMEIDA, R. A.; HEERDT, G.; SOUSA, I. L.; FILHO, F. A. S.; ALENCAR, D. C.; COSTA, E. V.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; MORGON, N. H.; KOOLEN, H. H. F. Positive electrospray ionization ion trap mass spectrometry and *ab initio* computational studies of the multi-pathway fragmentation of oxoaporphine alkaloids. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 418, p. 30–36, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2016.12.004>
- SILVA, D. H. S.; VIEGAS JR., C.; SANTOS, L. A.; GAMBOA, I. C.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; PIVATTO, M.; YOUNG, M. C. M.; CASTRO, N. G.; ROCHA, M. S.; FRAGA, C. A. M.; BARREIRO, E. J. Espectralina, cassina e análogos semissintéticos como potenciais candidatos a fármacos para o tratamento da doença de Alzheimer. **Revista Virtual de Química**, v. 2, n. 1, p. 38–46, 2010. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20100005>
- SOARES, F. P.; PAIVA, R.; NOGUEIRA, R. C.; STEIN, V. C.; SANTANA, J. R. F. Marolo: uma frutífera nativa do Cerrado. **Boletim Técnico da Universidade Federal de Lavras – Departamento de Biologia**, Lavras, n. 82, p. 1–17, 2009.
- SOUZA, J. M.; GONDIM JR, M. G. C.; LOFEGO, A. C.; MORAES, G. J. Mites on Annonaceae species in northeast Brazil and in the state of Para. **Acarologia**, v. 55, n. 1, p. 5–18, 2015. <https://doi.org/10.1051/acarologia/20152147>
- SOUZA, P. M.; SALES, P. M.; SIMEONI, L. A.; SILVA, E. C.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P. O. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Planta Medica**, v. 78, p. 393–399, 2012. <https://doi.org/10.1055/s-0031-1280404>
- STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; LECLERQ, J. Q. Cytotoxic and antitumor potentialities of aporphinoid alkaloids. **Current Medicinal Chemistry-Anti Cancer Agents**, v. 5, n. 2, p. 173–182, 2005.
- STIERAND, K.; RAREY, M. Drawing the PDB: Protein–ligand complexes in two dimensions. **ACS Medicinal Chemistry Letter**, v. 1, p. 540–545, 2010. <https://doi.org/10.1021/ml100164p>

TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D.; SILVA, L. G. F. E. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Natural Product Research**, v. 20, n. 1, p. 21–26, 2006.

<https://doi.org/10.1080/14786410412331280087>

VERDONK, M. L.; COLE, J. C.; HARTSHORN, M. J.; MURRAY, C. W.; TAYLOR, R. D. Improved protein-ligand docking using GOLD. **Proteins**, v. 52, p. 609–623, 2003.

<https://doi.org/10.1002/prot.10465>

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

<https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; FURLAN, M. Produtos naturais como candidatos a fármacos úteis no tratamento do mal de Alzheimer. **Química Nova**, v. 27, n. 4, p. 655–660, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000400021>

VILA VERDE, G. M.; PAULA, J. R.; CARNEIRO, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do cerrado utilizadas pela população de Mossâmedes (GO). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, supl. , p. 64–66, 2003.

<https://doi.org/10.1590/S0102-695X2003000300024>

VILAR, J.; FERREIRA, F.; FERRI, P.; GUILLO, L.; CHEN, L. C. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 1, p. 141–147, 2008. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000100020>

WHO. World Health Organization. Demência. WHO; 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs362/es/>>. Acesso em: 15 de fevereiro de 2018.

WIJERATNE, E. M. K.; GUNATILAKA, A. A. L.; KINGSTON, D. G. I.; HAKIWANGER, R. C.; EGGLESTON, D. S. Artabotrine: a novel bioactive alkaloid from *Arttiotrys zeylanicus*. **Tetrahedron**, v. 51, n. 29, p. 7877–7882, 1995.

[https://doi.org/10.1016/0040-4020\(95\)00422-5](https://doi.org/10.1016/0040-4020(95)00422-5)

WU, Y. C.; CHANG, G. Y.; CHANG-YIH, D.; SHANG-KWEI, W. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 497–500, 1993.

[https://doi.org/10.1016/0031-9422\(93\)85547-5](https://doi.org/10.1016/0031-9422(93)85547-5)