



Serviço Público Federal

Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química



**IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DE *ANNONA DIOICA* COM
ATIVIDADE IXODICIDA FRENTE AO CARRAPATO BOVINO,
RHIPICEPHALUS (BOOPHILLUS) MICROPLUS.**

Jeferson Macedo Nazaro

Orientador Walmir Silva Garcez

Campo Grande – 2013

Unidade XI – Instituto de Química – UFMS
Cidade Universitária, s/n *Caixa Postal 549 Fone/Fax 067xx 3345-7009 Fone 067xx 3345-7010
79070-900 * Campo Grande (MS) *
<http://www.ufms.br> e-mai: pgquimica.propp@ufms.br



Serviço Público Federal

Ministério da Educação

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Instituto de Química

Programa de Pós-graduação em Química



**IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS DE *ANNONA DIOICA* COM
ATIVIDADE IXODICIDA FRENTE AO CARRAPATO BOVINO,
RHIPICEPHALUS (BOOPHILLUS) MICROPLUS.**

Jeferson Macedo Nazaro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química – Nível de Mestrado – da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do grau de Mestre em Química.

Orientador Prof. Dr. Walmir Silva Garcez

Campo Grande – 2013

Dedicatória

Aos amores da minha vida: Hellen Kariny, Leticia e Mateus.

Aos meus pais, Valdete e Claudomiro.

A minha irmã, Cláudia.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Walmir Silva Garcez, pelas oportunidades, de estar em contato com este fantástico campo da Química (*QUÍMICA DE PRODUTOS NATURAIS*) e principalmente pela oportunidade de trabalhar com um pesquisador com tanta *CIÊNCIA* para transmitir.

Aos meus professores, da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, por todos os ensinamentos que tentaram me transmitir, os quais, são de extrema importância para a minha vida acadêmica e outros tantos, “simplesmente” para a vida.

Aos técnicos da UFMS, Edilene, Joaquim, Luciana e Luis Leonardo, por todos os experimentos adquiridos, conselhos durante a pesquisa, e não foram poucos, mas isso não foi o mais importante para mim, afinal, para qualquer outro eles fariam as mesmas coisas e com a mesma competência. Meu principal agradecimento é pelo privilégio que me deram de desfrutar da amizade que eles expressam com todos, e acredito que comigo também.

A toda a minha família, que sempre esteve “por perto” para me fortalecer nos momentos que precisei, e dentro desta destaco os MEUS AMIGOS, que também são parte da minha família, e por muitas vezes eles é que transmitiram os conhecimentos necessários para transpor essa etapa, não só com conceitos de ciência, mas principalmente com ensinamentos de vida, por isso eu parablenizo-os, por serem pessoas tão sábias e tão jovens ao mesmo tempo e agradeço por estarem ao meu lado.

RESUMO

A atividade pecuária movimenta de forma significativa a economia do Brasil, sendo diretamente afetada pelas diversas doenças incidentes nos rebanhos de bovinos. Entre os parasitas comumente observados está o carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, responsável pela transmissão de vários agentes etiológicos causadores de enfermidades nos seus hospedeiros. Entre os métodos de controle deste ectoparasita está a utilização de extratos vegetais, técnica já conhecida pela população e fundamental para a descoberta de princípios ativos. As raízes de *Annona dioica* foram selecionadas após uma triagem dos seus extratos com teleóginas de *R. (B.) microplus*, realizada pela Embrapa – Gado de Corte, onde os mesmos se mostraram promissores no controle do carrapato bovino. Os ensaios com extratos das raízes desta planta, bem como de fases originadas do fracionamento do extrato etanólico por partição, mostraram que tanto a fase acetato de etila, quanto algumas frações do extrato diclorometânico foram significativamente ativas, com resultados superiores a 70% de eficiência do produto. Estes resultados tornaram essas amostras potencialmente promissoras para a bioprospecção de metabólitos para o estudo proposto. Os estudos fitoquímicos mostraram a presença de duas classes de substâncias, alcalóides e acetogeninas, sendo esta última uma particularidade das anonáceas, com comprovada atividade contra diversos tipos de artrópodes. Paralelamente ao ensaio com *R. (B.) microplus*, o teste de citotoxicidade para *Artemia salina*, realizado para amostras resultantes do fracionamento da fase acetato de etila, mostrou que as substâncias destas amostras possuem uma excelente atividade frente ao teste, e que, como esperado, as frações que continham acetogeninas apresentaram maior atividade que as frações ricas em alcalóides. O estudo fitoquímico deste material resultou no isolamento de quatro alcalóides, a liriodenina e a anomontina, já conhecidas, e outros dois alcalóides inéditos: 5,6,7-trimetóxi-1-(4-metóxi-benzil)-2-metil-tetra-hidroisoquinolína e (5,6,7-trimetóxi-1-(4-metóxi-benzil)-2-óxido-3,4-di-hidroisoquinolína. O perfil das atividades biológicas associadas às classes de compostos às quais estas substâncias pertencem sugere que, possivelmente, estas substâncias tenham a atividade em relação ao estudo proposto e isso é corroborado pelos resultados dos ensaios com teleóginas de *R. (B.) microplus*.

Palavras chave: *Annona dioica*, fitoquímica, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

ABSTRACT

The livestock activity moves significantly Brazil's economy, which is directly affected by various diseases incident in herds of cattle. Among the parasites commonly observed in cattle that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, responsible for the transmission of various etiologic agents of disease in their hosts. Among the methods to control this ectoparasite, is the use of plant extracts, technique already known by the population and fundamental for the discovery of active principles. The roots of *Annona dioica* were selected after a triage with engorged females of *R. (B.) microplus*, conducted by EMBRAPA – Gado de Corte, where the same if shown promise in the control of cattle tick. The trials with extracts and phases of the roots of this plant showed that both the ethyl acetate phase, coming from the ethanol extract, as of some fractions of the dichloromethane extract were significantly active, with results higher than 70% efficiency of the product, what makes these samples potentially promising for the bioprospecting of metabolites for the proposed study. The phytochemical studies showed the presence of two classes of substances, alkaloids and acetogenins, this last, a particularity of Annonaceae, with proven activity against various types of arthropods. In parallel to the test with *R. (B.) microplus*, the cytotoxicity test with *Artemia salina* substances showed that these samples have excellent activity front of the test, and that, as expected, the fractions containing acetogenins showed greater activity than the fractions rich in alkaloids. The phytochemical studies resulted in the isolation of four alkaloids, the liriodenine and anomontina, known in the literature, and two other alkaloids unpublished, the compound 3 (5,6,7-trimethoxy-1-(4-methoxy-benzyl)-2-methyl-tetrahydroisoquinoline) and substance 4 (5,6,7-trimethoxy-1-(4-methoxy-benzyl)-2-oxide-3,4-dihydroisoquinoline). The profile of the biological activities associated with the classes of compounds which these belong shows that, possibly, these substances have activity in relation to the proposed study and this is corroborated by the results of the tests with engorged females of *R. (B.) microplus*.

Keywords: *Annona dioica*, phytochemistry, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT	II
SUMÁRIO.....	III
LISTA DE FIGURAS	V
LISTA DE TABELAS	IX
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Annonaceae	5
1.2 Annona.....	9
2. OBJETIVOS.....	14
2.1 Objetivo geral	14
2.2 Objetivo específico.....	14
3. PARTE EXPERIMENTAL	15
3.1 Coleta do material botânico;	15
3.2 Preparo dos extratos;	15
3.2.1 Fracionamento dos extratos;	18
3.3 Ensaios biológicos;	19
3.3.1 Teste de imersão de teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i> ;	19
3.3.2 Teste de citotoxicidade para <i>Artemia salina</i> ;	21
3.4 Análise qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada Analítica; ...	22
3.5 Identificação e/ou elucidação dos compostos;	22
3.6 Estudo fitoquímico da fase acetato de etila.....	23
3.6.1 Isolamento das substâncias 1 e 2.....	24
3.6.2 Isolamento substância 3.	27
3.7 Estudo fitoquímico do extrato diclorometânico.....	28
3.7.1 Isolamento da substância 3	28
3.7.2 Isolamento da substância 4	31
3.8 Acetogeninas	32
3.8.1 Extrato diclorometânico	32
3.8.2 Fase Acetato de Etila.....	32

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 Ensaios biológicos com <i>A. salina</i> e teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i>	33
4.2 Estudo fitoquímico da fase acetato de etila.....	36
4.2.1 Elucidação estrutural.....	36
4.2.1.1 Caracterização da substância 1	36
4.2.1.2 Caracterização da substância 2.....	48
4.3 Estudo fitoquímico do extrato diclorometânico.....	58
4.3.1.1 Caracterização da substância 3.....	58
4.3.1.2 Caracterização da substância 4.....	68
4.4 Acetogeninas	79
5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	82
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição do rebanho brasileiro em %, segundo o do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, realizado no período de 2007.	1
Figura 2: Imagem de um espécime do gênero <i>Annona</i> , a <i>Annona muricata</i> , Graviola.	5
Figura 3: Mapa dos domínios fitogeográficos onde podemos encontrar espécies de anonáceas. Nas áreas coloridas pode ser observada a ocorrência de anonáceas ²⁸	6
Figura 4: Alguns compostos isolados de espécies de anonáceas.	7
Figura 5: Acetogenina (4-desoxi-anoreticuina) isolada de um espécime de <i>Annona squamosa</i>	7
Figura 6: Núcleo oxoaporfinico.	8
Figura 7: Frutos de <i>Annona sylvatica</i> ³⁶	9
Figura 8: Esqueletos de alcalóides mais comuns em anonáceas.	10
Figura 9: Rota biossintética dos principais esqueletos de alcalóides derivados da Fenilalanina/Tirosina, frequentemente encontrados em espécies de anonáceas.	11
Figura 10: Alguns alcalóides encontrados em espécies do gênero <i>Annona</i>	12
Figura 11: Rota biossintética do núcleo $\square$ -carbolínico ⁴¹	13
Figura 12: Esquema do processo de obtenção dos extratos de raízes de <i>Annona dioica</i>	17
Figura 13: Esquema de fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico.	18
Figura 14: Sequência das operações descritas na Metodologia para realização do teste de imersão de teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i>	20
Figura 15: Sequência das operações descritas na metodologia para realização do teste de toxicidade para <i>Artemia salina</i> . Para o controle positivo foi utilizado o sulfato de quinidina.	21
Figura 16: Esquema de obtenção das frações do extrato acetato de etila, com número das frações reunidas e massa após o agrupamento.	23
Figura 17: Fluxograma detalhado da obtenção das substâncias 1 e 2.	26
Figura 18: Esquema de obtenção das frações do extrato diclorometânico e classificação das mesmas de AD-2-A a AD-2-F.	28

Figura 19: Esquema de fracionamento para obtenção da Substância 3, 4 e obtenção da amostra rica em acetogeninas.....	30
Figura 20: Resultado do teste de atividade com teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i> com os extratos etanólico (AD-3), diclorometânico (AD-2) e hexânico (AD-1). 33	33
Figura 21: Resultado do teste de atividade com teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i> para o extrato etanólico e suas fases acetato de etila (AD-3-AcOEt) e hidrometanólica (AD-3-HMeOH).	34
Figura 22: Resultado do teste de atividade com teleóginas de <i>R. (B.) microplus</i> , para frações resultantes do extrato diclorometânico.	34
Figura 23: Resultado do teste de atividade com <i>Artemia salina</i> , utilizando como controle positivo o sulfato de quinidina.....	35
Figura 24: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 1, em CDCl_3	37
Figura 25: Expansão do espectro de RMN de ^1H , com valores de deslocamento químico.....	38
Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da Substância 1, em metanol- d_4	40
Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância1, em metanol- d_4	42
Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° da substância 1 em metanol- d_4 ,	43
Figura 29: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° da substância 1 em metanol- d_4 , expansão.	44
Figura 30: Espectro de massas de baixa resolução da Substância 1.	45
Figura 31: Liriodenina, alcalóide marcador quimiotaxonômico de anonáceas, isolado das raízes de <i>Annona dioica</i>	46
Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 2, em $\text{DMSO}-\text{D}_6$	49
Figura 33: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 2, em $\text{DMSO}-\text{D}_6$	50
Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 2, em $\text{DMSO}-\text{d}_6$. 52	52
Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 2, em metanol com capilar de D_2O	53
Figura 36: Espectro de RMN de DEPT 135° da substância 2, em metanol com capilar de D_2O	53

Figura 37: Espectro de massas de baixa resolução (EM-IE) da substância 2.	54
Figura 38: Estrutura da Substância 3, a Anomontina, um alcalóide pirimidínico-β-carbolínico.....	56
Figura 39: Proposta de biossíntese para a substância 2, Anomontina.....	57
Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 3, em CDCl_3	59
Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 3, em CDCl_3 , expansão 1.....	60
Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 3, em CDCl_3 , expansão 2.....	61
Figura 43: Espectro de massas de alta resolução (Eletrospray) da substância 3, obtido no modo positivo.	62
Figura 44: Estrutura da Substância 3, alcalóide N-óxido-benzil-diidroisoquinolínico.....	62
Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3, em CDCl_3	63
Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT da substância 3, em CDCl_3	64
Figura 47: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT da substância 3, em CDCl_3 , expansão 1.....	65
Figura 48: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT da substância 3, em CDCl_3 , expansão 2.....	66
Figura 49: Proposta de biossíntese para a substância 3, alcalóide N-óxido-benzil-diidroisoquinolínico inédito.....	67
Figura 50: Espectros de RMN de ^1H da substância 4, em Piridina- d_6 (A) e CDCl_3 (B).....	69
Figura 51: Expansão dos espectros de RMN de ^1H da substância 4, em Piridina- d_6 (A) e (B), em CDCl_3 (C).....	70
Figura 52: Espectro de RMN ^1H (300 MHz) da Substância 4, em CDCl_3	72
Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 4, em CDCl_3	75
Figura 54: Espectro de RMN de DEPT 135° da substância 4, em CDCl_3	76
Figura 55: Expansão da Figura 61, RMN de ^{13}C e DEPT 135° da substância 4, em CDCl_3	77
Figura 56: Proposta de biossíntese para a substância 4, alcalóide benzil-tetraidroisoquinolínico.	78

Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C da amostra AD-2-24-C-131-134, em CDCl_3 com uma mistura de acetogeninas, mostrando os principais grupos funcionais que existem esta classe de compostos..... 79

Figura 58: Espectro de RMN de ^1H da amostra AD-2-24-C-131-135°, em CDCl_3 com uma mistura de acetogeninas, com os principais grupos funcionais que existem esta classe de compostos..... 80

Figura 59: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da amostra AD-3-AE-B-B-37. 80

Figura 60: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da amostra AD-3-AE-C-B-49. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado do processo cromatográfico da amostra AD-3-AE-E.....	24
Tabela 2: Resultado do processo cromatográfico da amostra AD-3-AE-E-B. ...	24
Tabela 3: Resultado do processo cromatográfico da amostra AD-3-AE-E-C... ..	25
Tabela 4: Frações originadas dos processos cromatográficos da amostra AD-2-24, para a obtenção da Substância 3.	29
Tabela 5: Resultado dos processos cromatográficos da amostra AD-2-24, para a obtenção da Substância 4.	31
Tabela 6: Dados de RMN de ^1H da Substância 1 em metanol- d_4	39
Tabela 7: Dados de RMN de ^1H (300 MHz) ($^1\text{H}_{\text{Amostra}}$) e ^{13}C (75 MHz) ($^{13}\text{C}_{\text{Amostra}}$) da Substância 1 em metanol- d_4 , e dados da literatura ($^1\text{H}_{\text{Referência}}$)	47
Tabela 8: Dados de RMN de ^1H da substância 2, adquiridos em DMSO-D_6	48
Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C da substância 2, adquiridos em DMSO-D_6 . .	51
Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C da substância 2, adquiridos em DMSO-D_6 . Os valores de RMN de ^{13}C na referência foram adquiridos em DMSO-D_6 (400 MHz).	55
Tabela 11: Dados de RMN de ^1H da substância 3, adquiridos em CDCl_3 . Os valores (*) podem estar trocados.	58
Tabela 12: Dados de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 4, adquiridos em Piridina- d_6	71
Tabela 13: Dados de RMN de ^1H (Piridina- d_6) e ^{13}C (CDCl_3), da Substância 4.	74

1. INTRODUÇÃO

A atividade pecuária no Brasil é muito intensa e movimenta de forma significativa a economia do país.

Os dados oficiais do último levantamento agropecuário do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) retrataram que o efetivo do rebanho bovino brasileiro é de 204.260.154 cabeças, sendo o rebanho da região Centro-Oeste de 70.659.695 cabeças e que o estado de Mato Grosso do Sul detinha um rebanho de 22.325.663 animais¹(Figura 1).

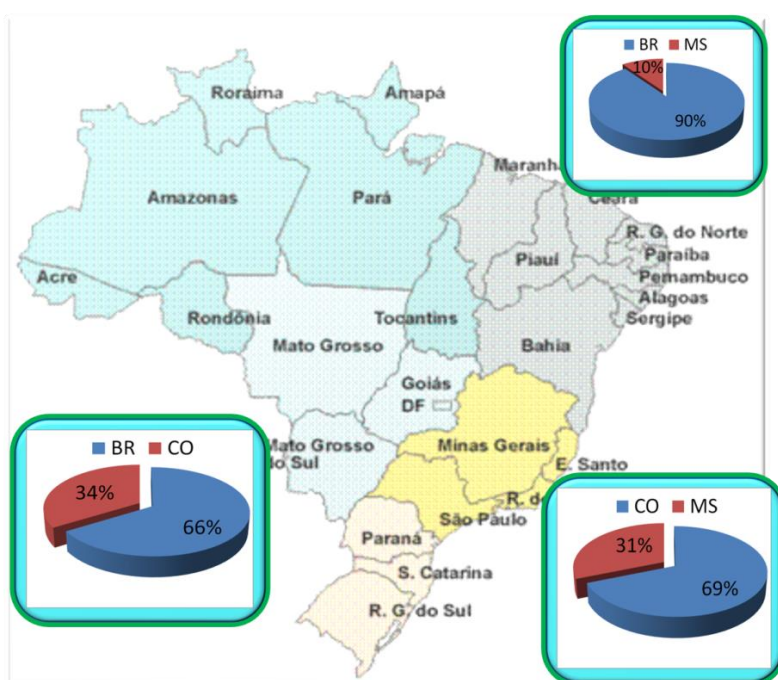


Figura 1: Distribuição do rebanho brasileiro em %, segundo o do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE, realizado no período de 2007.

A produção de leite e carcaça de bovinos, em 2012, movimentou um montante de aproximadamente 63 bilhões de reais². Deste total, 30% é referente à produção leiteira, com mais de 22 bilhões de litros de leite, e o restante, 70%, corresponde à produção de 7 milhões de toneladas de carcaça, oriunda do abate de mais de 31 milhões de cabeças^{2a}.

Tanto a produção de leite quanto a produção de carne são diretamente afetadas pelas diversas doenças que são observadas nos bovídeos. Segundo

a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE), as dez doenças mais comuns são: Anaplasmosse bovina, Babesiose bovina, Campilobacteriose genital bovina, Dermatose nodular contagiosa, Diarreia viral bovina, Encefalopatia espongiiforme bovina, Leucose bovina enzoótica, Pleuropneumonia contagiosa bovina, Septicemia hemorrágica, Teileriose, Tricomonose, Tripanosomose (transmitida por tsetse) e Tuberculose bovina. Entre essas, duas enfermidades são muito comuns em regiões tropicais e de grande incidência no Brasil, as quais podem ser transmitidas pelo mesmo vetor, desencadeando um quadro clínico conhecido como *Tristeza Parasitária Bovina*. São essas: a Anaplasmosse Bovina – que tem como agente etiológico o protozoário *Anaplasma marginale* – e a Babesiose bovina – desencadeada pelas bactérias *Babesia bovis* e *Babesia bigliana* – ambas transmitidas pelo carrapato bovino, o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*³.

De origem asiática, o carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, é um ectoparasita que se distribui entre os paralelos 32 Norte e 32 Sul, abrangendo extensas áreas das América do Sul e Central, África e Oceania⁴. A presença deste parasita é observada por todo o território brasileiro, e a intensificação da sua ocorrência é um fenômeno sazonal, de maior incidência nos meses mais quentes do ano⁵. O *R. (B.) microplus* se estabeleceu em países tropicais e subtropicais da América pela importação de gado do continente asiático⁶, sendo um dos principais parasitas de bovinos.

Existem diversos métodos de controle para a infestação destes carrapatos. Os métodos físicos envolvem a retirada do parasita por catação, no animal ou nas pastagens, neste caso, arrastando um pano aonde o carrapato vai se fixar e o produtor poderá exterminá-lo da forma que for mais conveniente, com agentes químicos ou queimando. Entretanto as formas mais comuns de profilaxia são: a utilização de agentes químicos diretamente no animal hospedeiro por aspersão ou banho em valas com solução carrapaticida, a aplicação de soluções injetáveis ou ainda soluções oleosas no dorso do animal (Método POUR ON)⁴.

A eficiência de produtos com ação carrapaticida que circulam no mercado depende intimamente de fatores como condições de manejo do produto e do rebanho ao qual está sendo aplicado o ixodicida, dosagem e genética tanto do parasita quanto do hospedeiro entre outros^{7, 8}. Esses fatores, associados à constante utilização, desencadeiam uma resistência desta espécie em relação aos produtos comerciais, como pôde ser observado no caso dos piretróides, os quais surgiram como inovação na década de 70, sendo de fundamental importância para o controle do carrapato bovino⁹⁻¹¹.

Os piretróides passaram a apresentar menor eficiência no controle do *R. (B.) microplus*¹²⁻¹⁶. Esta resistência torna a produção pecuária onerosa, à medida em que dosagens mais expressivas ou produtos com maior eficiência carrapaticida devem ser utilizados para apresentar efeito. Em contraposição a isto, a ausência do controle pode acarretar em perdas significativas, tanto na produção leiteira¹⁷ quanto na produção de gado de corte¹⁸. Estima-se que os prejuízos à pecuária decorrentes deste parasita cheguem a valores maiores que dois bilhões de reais por ano no Brasil.

A substituição dos produtos comerciais utilizados no controle do *R. (B.) microplus* e a redução no intervalo entre as aplicações são estratégias utilizadas pelos produtores para minimizar o problema da resistência do carrapato-do-boi nos seus rebanhos. Porém, estas estratégias representam um controle apenas temporário dessas populações, além de causar um desequilíbrio ecológico uma vez que a comunidade instalada no local também pode ser sensível aos produtos aplicados que contaminam o ambiente¹⁹.

O uso de plantas para contornar estes problemas é uma boa alternativa, tendo em vista a grande diversidade de produtos, com comprovada ação carrapaticida, existentes nas espécies vegetais. Esta opção, que representa um método alternativo no controle do *R. (B.) microplus*⁴, já é conhecida pela população, sendo um conhecimento etnobotânico comprovadamente eficaz, uma vez que diversas plantas, utilizadas pelos produtores na forma de solução ou como forrageiras na pastagem, sintetizam *metabólitos secundários* com atividade repelente ou tóxica frente ao *R. (B.) microplus*. Também é esperada

uma menor potencialidade ecotóxica, já que estas substâncias foram extraídas do próprio ambiente no qual serão inoculadas, e podem resultar em produtos de baixo custo, maior biodegradabilidade e alta disponibilidade.

Os *metabólitos secundários*, antes considerados produtos de excreção, são compostos de ocorrência restrita a alguns grupos de organismos, além de serem extremamente úteis para defesa e proteção, principalmente para plantas, que são organismos fixos, susceptíveis às mudanças e aspectos do ambiente. Algumas das funções relatadas são: proteções contra herbívoros e infecção microbiana, atração de polinizadores, agentes alelopáticos, proteção contra raios UV entre outras²⁰.

Através de um levantamento quantitativo de plantas medicinais da vegetação da caatinga do Brasil²¹, confirmou-se que muitas plantas nativas dessa região apresentaram alvos potenciais para futuros estudos farmacológicos e fitoquímicos. Os extratos de várias plantas originárias de regiões tropicais e subtropicais têm sido testados e alguns demonstraram atividade acaricida contra certas espécies de carrapatos²².

Compostos naturais que apresentam bioatividade foram isolados a partir de espécies como *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Trev.), *Nicotiana tabacum* L., *Derris* sp. e *Azadirachta indica* A. Juss., no caso do piretro, nicotina, rotenona e azadiractina, respectivamente. Outros princípios ativos, oriundos de plantas, com atividade carrapaticida são observados em espécies como *Melia azedarach* e *Azadirachta indica*, ambas da família Meliaceae^{24, 22}.

Estudos revelam a eficiência de terpenos no controle deste ectoparasita²³, os quais são provenientes do metabolismo secundário de vegetais e foram previamente isolados de plantas como *Xylopia aromática*, *Xylopia sericea*, da família Annonaceae. Extratos de plantas desta família demonstraram diversos tipos de atividades, entre elas, larvicida, inseticida e moluscicida²⁵.

1.1 Annonaceae

A família Annonaceae é representada por mais de 2300 espécies divididas em 130 gêneros. São plantas predominantemente de clima tropical²⁹, características de regiões com alto índice de precipitação, apresentando espécimes de diversos portes e variada distribuição topográfica⁴⁰.



Figura 2: Imagem de um espécime do gênero *Annona*, a *Annona muricata*, Graviola.

No Brasil, dentre as mais de 32 mil espécies de angiospermas catalogadas, aproximadamente 386 são anonáceas, que se encontram amplamente distribuídas pelo território brasileiro (Figura 3), não sendo observadas apenas nos Pampas. Os dois gêneros mais expressivos, em termos de espécies, são os gêneros *Annona* (Figura 2), com 81 espécies, e *Guatteria*, com 88 espécies. O cerrado abriga 12,2% das 386 espécies citadas acima, sendo que no estado de Mato Grosso do Sul podem ser encontradas 17 espécies o que corresponde a 4,4% das espécies desta família encontradas no

Brasil. Essa família é encontrada em cinco dos seis domínios fitogeográficos brasileiros, Caatinga, Mata Atlântica, Amazônia, Cerrado e Pantanal²⁸.



Figura 3: Mapa dos domínios fitogeográficos onde podemos encontrar espécies de anonáceas. Nas áreas coloridas pode ser observada a ocorrência de anonáceas²⁸.

A fitoquímica das anonáceas é muito diversificada, podendo ser encontrados compostos de diversas origens biossintéticas: terpenos, flavonóides, alcalóides e acetogeninas. A Figura 4 mostra alguns compostos encontrados em anonáceas, como flavonóide isolado de *Porcelia macrocarpa* (1)³⁰; sesquiterpeno isolado de *Duguetia glabriuscula* (2)³¹; alcalóide isolado de *Unonopsis lindmanii*(3)³³; acetogenina isolada de *Annona muricata*(4)³⁴. No entanto, a maioria dos relatos encontrados na literatura, sobre estudos fitoquímicos com espécimes representantes desta família, tratam principalmente da ocorrência de duas classes de metabólitos, as acetogeninas e os alcalóides.

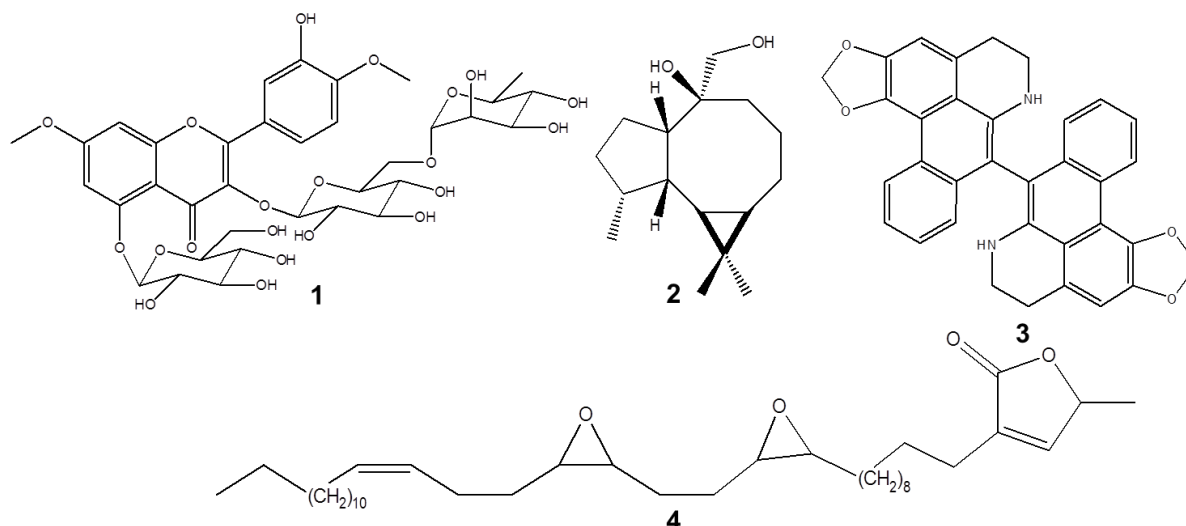


Figura 4: Alguns compostos isolados de espécies de anonáceas.

As acetogeninas são compostos derivados de ácidos graxos com cadeias carbônicas com 32 ou 34 unidades de carbono, combinadas com uma unidade de 3 carbonos, para formação dos anéis γ -lactônicos, dando origem a compostos derivados de cadeias carbônicas com 35 ou 37 carbonos, impreterivelmente (Figura 5). Essa classe de compostos se restringe às anonáceas, não sendo observada em nenhuma outra família³⁵.

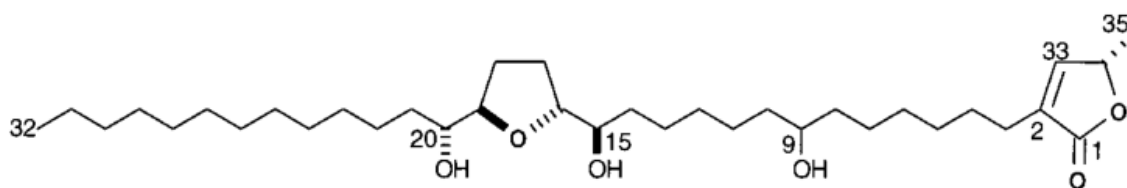


Figura 5: Acetogenina (4-desoxi-anorecticuina) isolada de um espécime de *Annona squamosa*.

Os alcalóides de anonáceas são, na maioria dos casos, derivados da rota biossintética da fenilalanina/tirosina, esta rota pode originar alcalóides derivados dos núcleos tetrahydroisoquinolínicos (Figura 8). Muitos dos alcalóides observados nesta família são resultados da reação entre uma unidade derivada da dopamina com uma unidade C_6C_2 . Entre os derivados

desta rota de biossíntese, estão os alcalóides oxoaporfínicos, que são considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família (Figura 6).

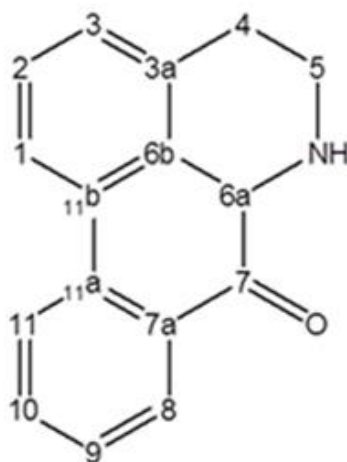


Figura 6: Núcleo oxoaporfínico.

1.2 *Annona*

O gênero *Annona* é o segundo maior da família em número de espécies no Brasil, ocorrendo por todo o território nacional.

Esse gênero se destaca pelo fato de que muitos dos seus representantes produzem frutos comestíveis, cultiváveis e comercializados, como no caso das espécies, não nativas, *Annona silvatica*, (Figura 7) *A. muricata* e *A. squamosa*, conhecidas popularmente por araticum do mato, graviola e fruta do conde, respectivamente.



Figura 7: Frutos de *Annona silvatica*³⁶.

A fitoquímica das anonas é bastante conhecida e apresenta uma vasta e diversificada gama de constituintes, no entanto, como citado para a família de forma mais ampla, os principais relatos da literatura são sobre alcalóides, principalmente os de núcleo descritos na Figura 8 e acetogeninas.

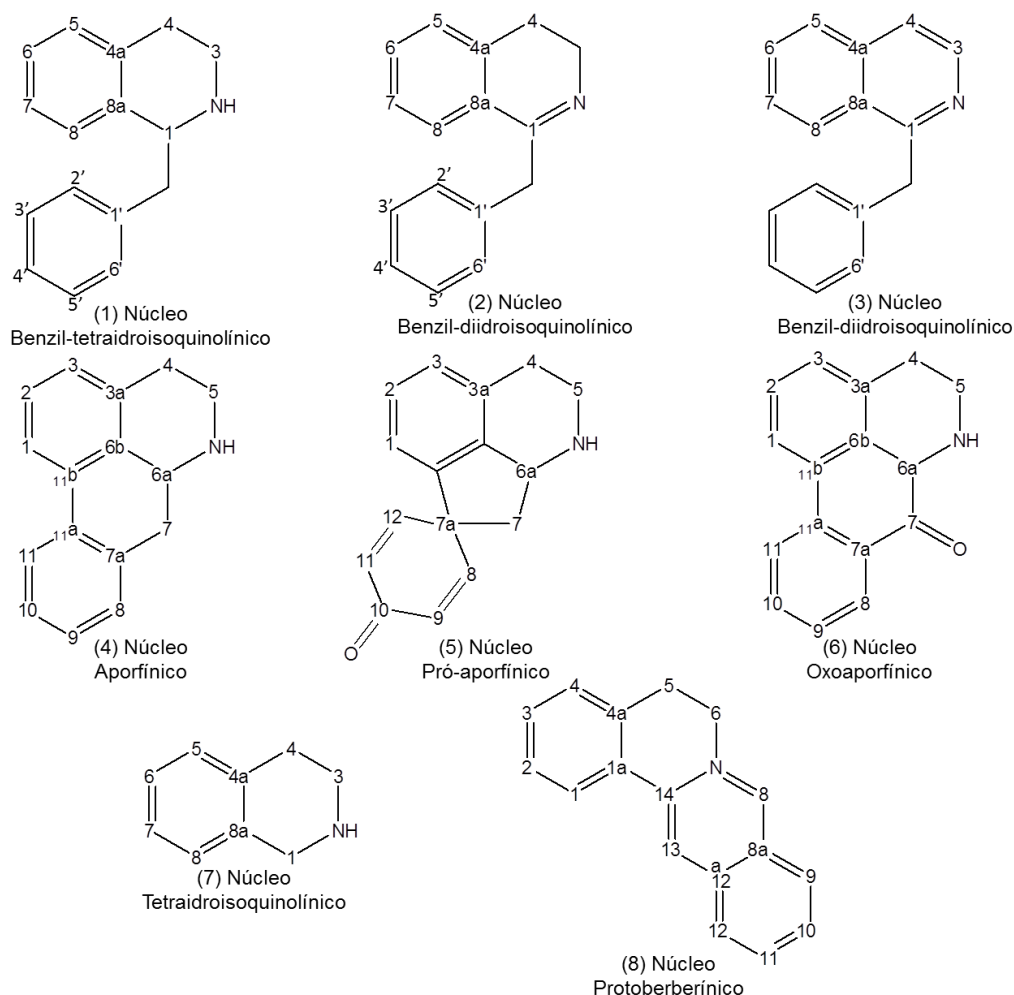


Figura 8: Esqueletos de alcalóides mais comuns em anonáceas.

A biossíntese dos alcalóides de núcleos benzil-tetrahidroisoquinolínicos (BTHIQ) envolve a participação de duas unidades derivadas dos aminoácidos fenilalanina ou tirosina. A partir destes alcalóides são originados os núcleos benzil diidroisoquinolínicos (BDHIQ), benzil-isoquinolínicos (BIQ), aporfínicos, pro-aporfínicos, protoberberinas e oxoaporfínicos (Figura 9).

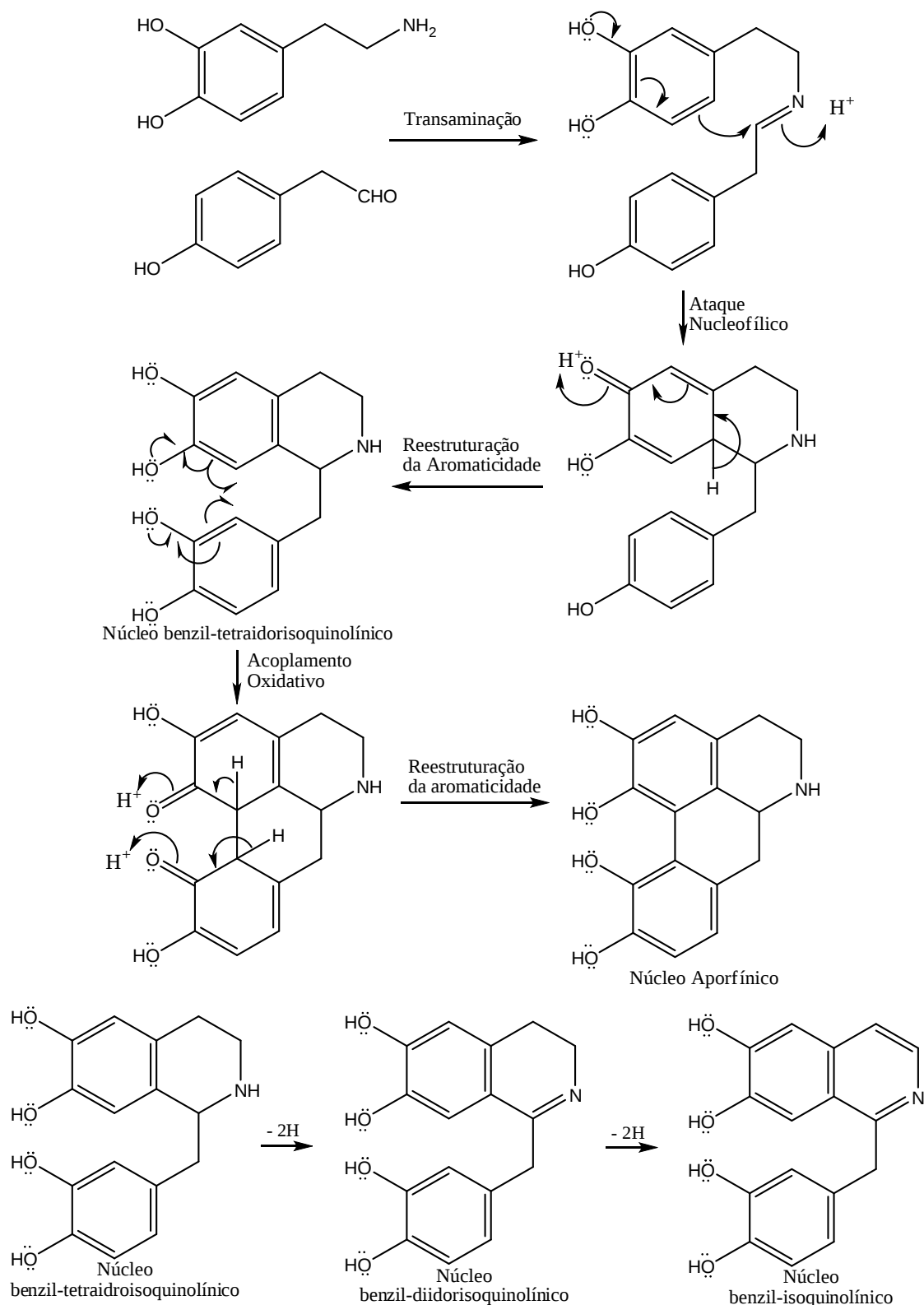


Figura 9: Rota biossintética dos principais esqueletos de alcalóides derivados da Fenilalanina/Tirosina, frequentemente encontrados em espécies de anonáceas.

Alcalóides com núcleo benzil-tetrahydroisoquinolínico e seus derivados são frequentemente isolados de espécies do gênero *Annona*. Alguns exemplos destes alcalóides são os encontrados em *Annona muricata*, anonurina, anomuricina, reticulina, coclaurina³⁷; de *Annona cherimola*, anocherina A e anocherina B³⁸; de *Annona elliptica*, anoneleptina³⁹ (Figura 10).

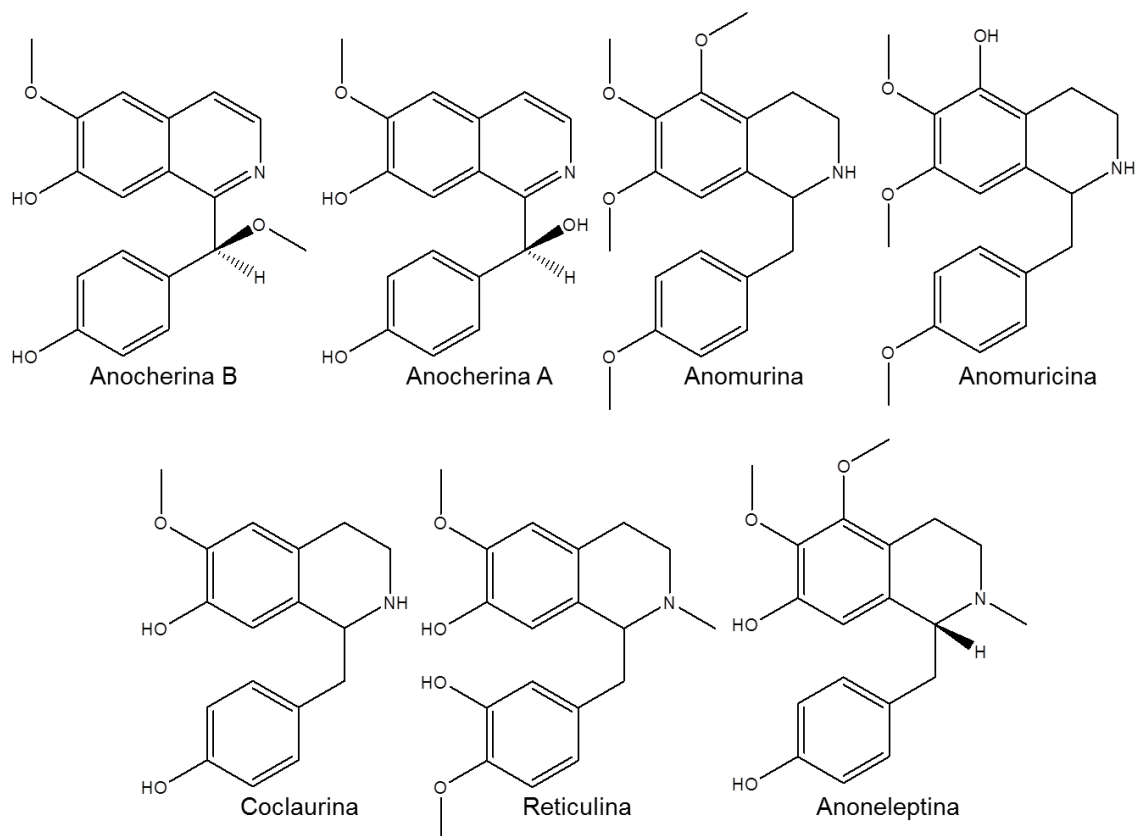


Figura 10: Alguns alcalóides encontrados em espécies do gênero *Annona*.

A classe de alcalóides mais encontrada na literatura para este gênero é a dos derivados de núcleos benzil-tetrahydroisoquinolínicos (BTHIQ),

entretanto, de forma mais restrita, a literatura relata a ocorrência de alcalóide de núcleo β -carbólico, este, derivado da rota biossintética da triptanina (Figura 11).

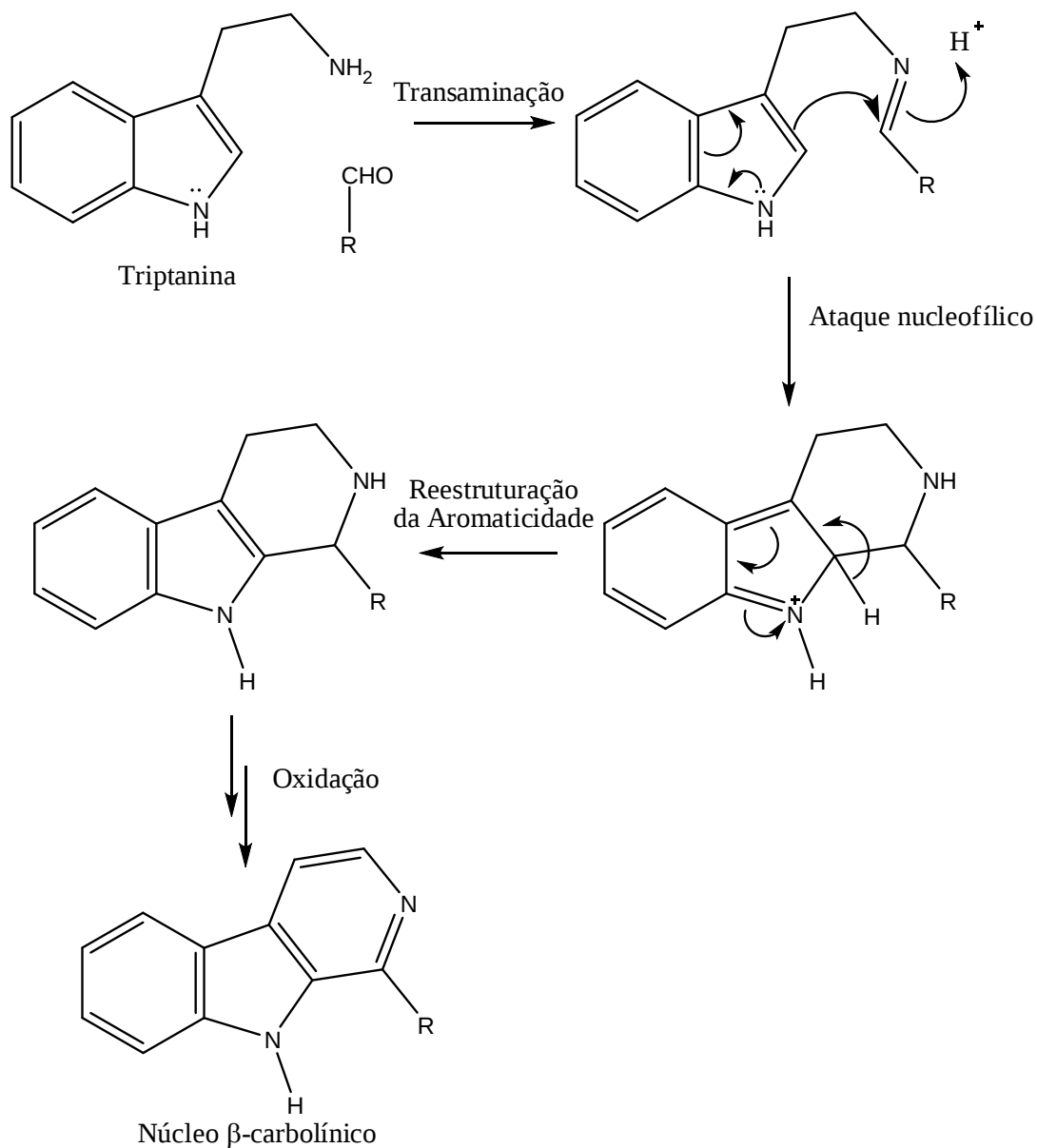


Figura 11: Rota biossintética do núcleo β -carbólico⁴¹.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química das raízes de *Annona dioica* e avaliar a atividade ixodicida dos extratos e frações.

2.2 Objetivo específico

- Realizar o estudo fitoquímico biomonitorado para caracterização das frações bioativas frente ao *R. (B.) microplus* e *A. salina* e isolar e identificar seus principais constituintes.

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Coleta do material botânico;

As raízes de *Annona dioica* foram coletadas no primeiro semestre de 2011 pelo Dr. João Batista Catto, na região do Pantanal da Nhecolândia, Corumbá-MS e a identificação foi realizada pelo Dr. Arnildo Pott, da UFMS.

3.2 Preparo dos extratos;

As raízes de *A. dioica* foram selecionadas para estudo após uma triagem com diversas plantas do Cerrado e Pantanal sul-mato-grossense, buscando a identificação de atividade contra o carrapato bovino. Este estudo foi realizado pelo Dr. João Batista Catto da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) – Gado de Corte – MS, utilizando o método de imersão teleóginas de *R. (B.) microplus*⁴².

A proposta de trabalho originou-se na informação de que o extrato diclorometânico das raízes de *A. dioica* apresentava atividade contra o aracnídeo da família Ixodidae, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Essa problemática foi sugerida pelo pesquisador da Embrapa – Gado de Corte, Dr. João Batista Catto.

Em função da perspectiva de atividade na fase diclorometânica, o processo de extração foi realizado através da extração, por polaridade, direta no material vegetal, utilizando, primeiramente, hexano. Ao retirar o hexano do material vegetal foi acrescentado diclorometano e após retirar o diclorometano foi adicionado etanol como descrito na Figura 12.

Após secagem, em ambiente sombreado, as raízes (2,8 kg) foram pulverizadas e submetidas à extração em hexano, diclorometano e etanol, respectivamente como descrito na Figura 12. Após a filtração, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida, gerando os extratos hexânico (10g), diclorometânico (90 g) e etanólico (100 g). Os extratos hexânico, diclorometânico e etanólico, bem como as amostras resultantes do

primeiro fracionamento do extrato diclorometânico, foram submetidos a teste com teleóginas, simultaneamente, conforme descrito na Figura 14.

O resultado desta bateria de ensaios revelou duas possibilidades de estudo fitoquímico biomonitorado: o estudo da composição do extrato etanólico, que mostrou maior atividade entre os extratos testados (Figura 20), contrariando as expectativas iniciais, e o estudo de uma fração do extrato diclorometânico, que também apresentou atividade frente às teleóginas do *R. (B.) microplus* (Figura 22).

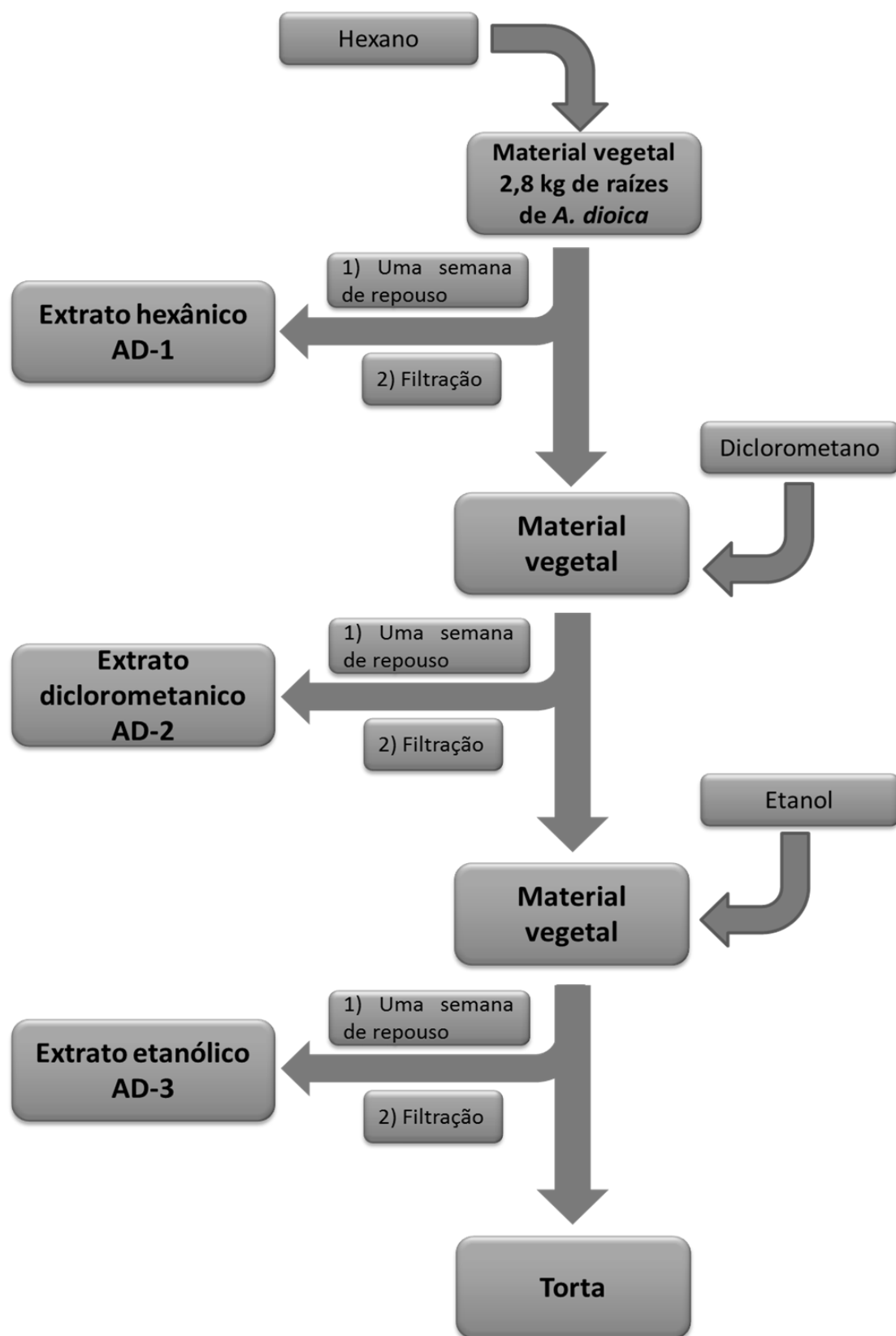


Figura 12: Esquema do processo de obtenção dos extratos de raízes de *Annona dioica*.

3.2.1 Fracionamento dos extratos;

Para os fracionamentos foram realizadas: partições líquido-líquido (extrato etanólico – AD-3) com acetato de etila:metanol:água, sendo primeiramente, acrescentado CH_3OH para solubilizar a amostra e posteriormente acrescentado H_2O até a proporção 1:1 de $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}$. O acetato de etila foi adicionado aos poucos em porções de 100 mL para a extração, conforme mostra a Figura 13; cromatografias por adsorção com sílica gel (70-230 mesh e 230-400 mesh, Sigma Aldrich) e por exclusão com Sephadex LH 20 (malha 25-100 micrometros, Sigma Aldrich) (Extratos AD-2 e AD-3).

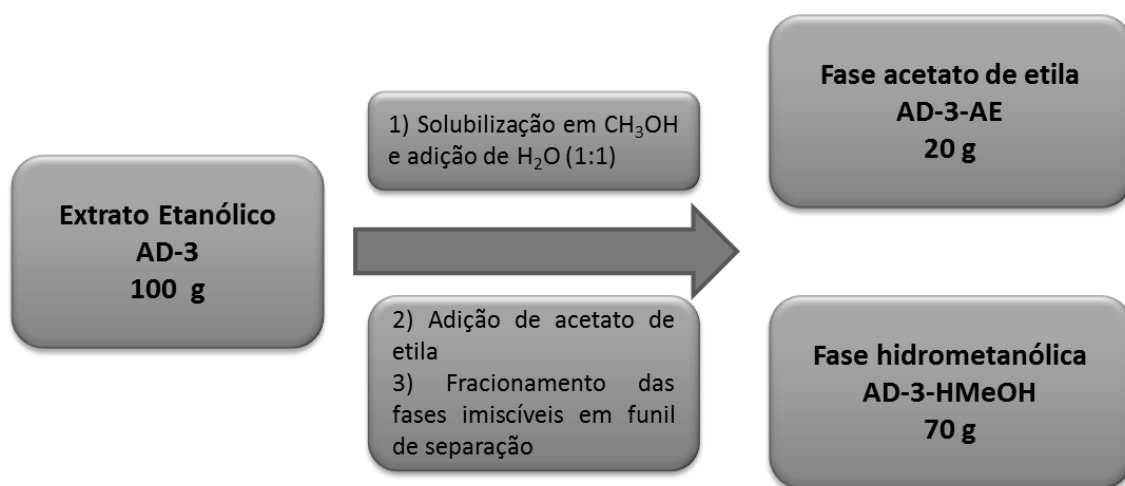


Figura 13: Esquema de fracionamento líquido-líquido do extrato etanólico.

3.3 Metodologias para os ensaios biológicos;

3.3.1 Teste de imersão de teleóginas de *R. (B.) microplus*;

Estes ensaios foram efetuados na Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – EMBRAPA – Gado de Corte – MS, de acordo com a metodologia (Figura 14), sob a supervisão do Dr. João Batista Catto. O resultado do ensaio é registrado como *Índice de Eficiência (IE)*, que é a razão entre a diferença da *eficiência reprodutiva observada no controle negativo* ($ER_{controle\ negativo}$) e na *amostra* ($ER_{amostra}$) pela eficiência reprodutiva observada no controle negativo, conforme a equação:

$$(IE = \frac{(ER_{controle\ negativo} - ER_{amostra})}{ER_{controle\ negativo}} \cdot 100)^{45}.$$

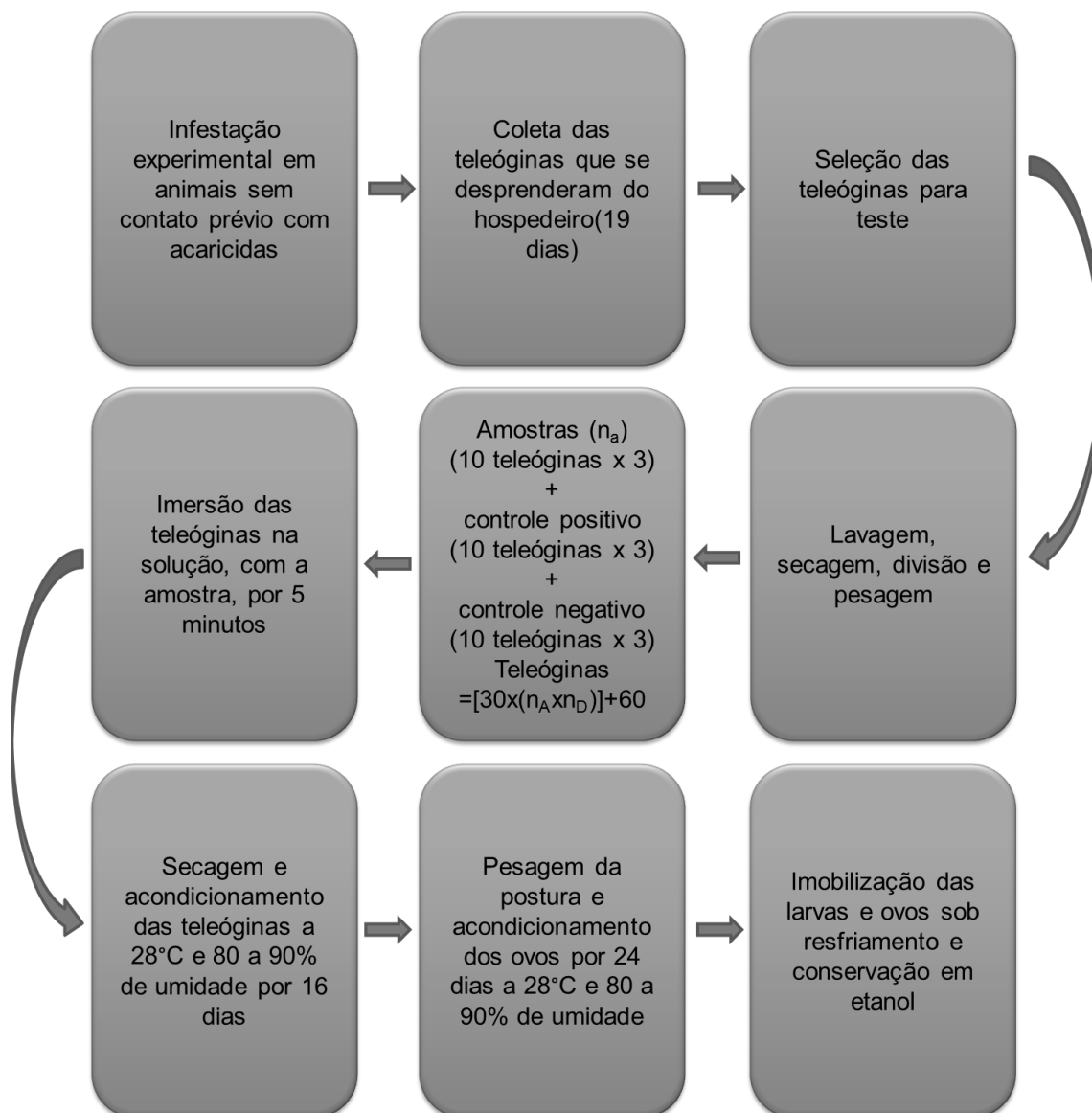


Figura 14: Sequência das operações descritas na Metodologia para realização do teste de imersão de teleóginas de *R. (B.) microplus*.

3.3.2 Teste de citotoxicidade para *Artemia salina*;

Os ensaios foram realizados no laboratório de pesquisa da UFMS, de acordo com a metodologia descrita na Figura 15. A bioprospecção utilizando *Artemia salina* é uma metodologia eficaz para chegar às substâncias biologicamente ativa (citotóxicas)⁴⁶, além de ser um teste mais rápido e de melhor reprodutibilidade que o ensaio com teleóginas.

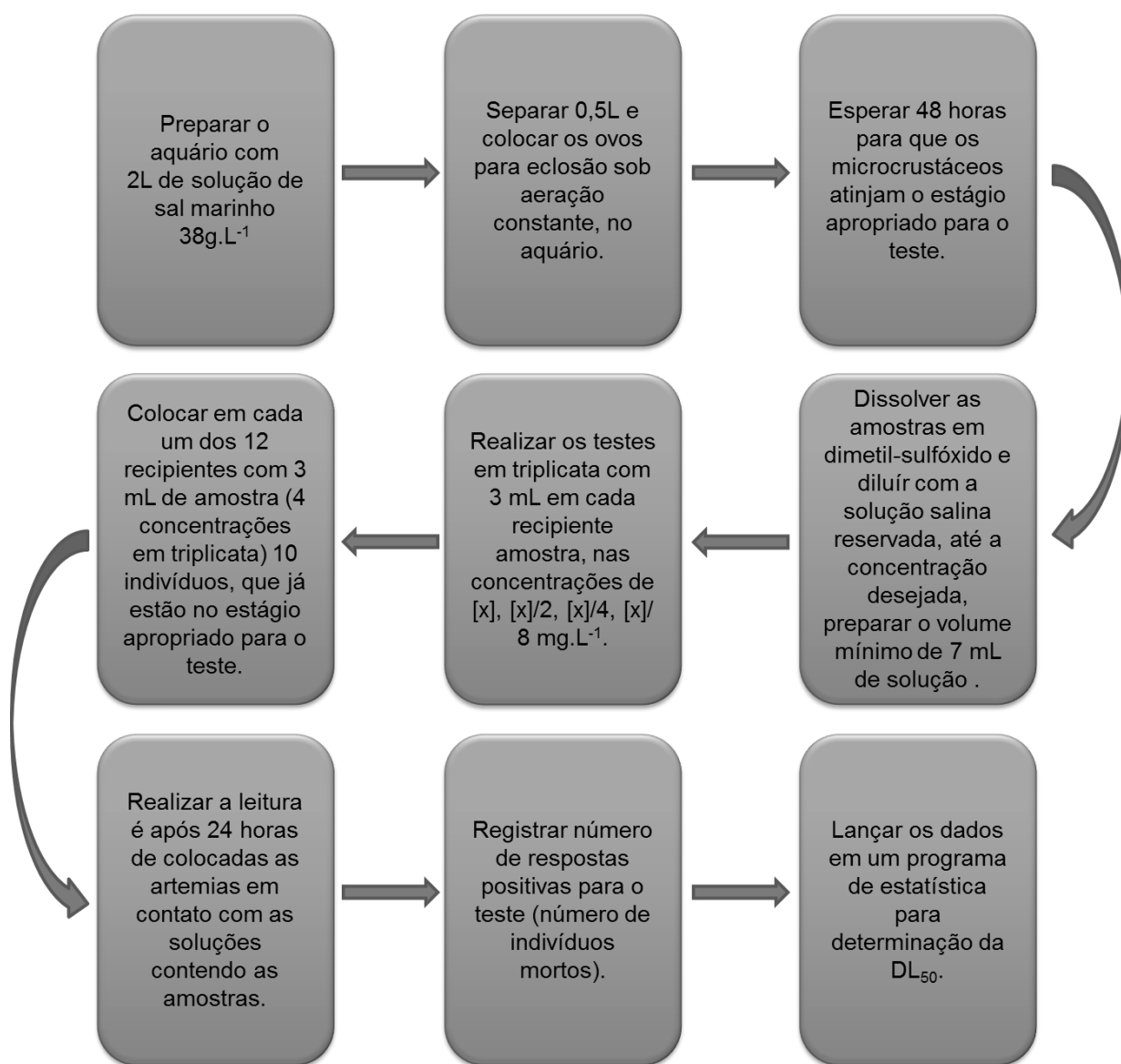


Figura 15: Sequência das operações descritas na metodologia para realização do teste de toxicidade para *Artemia salina*. Para o controle positivo foi utilizado o sulfato de quinidina.

3.4 Análise qualitativa por Cromatografia em Camada Delgada Analítica;

O perfil cromatográfico foi obtido por cromatografia de camada delgada analítica (CCDA), com placas comerciais de sílica gel F₂₅₄ (Merck) em placas de alumínio e placas preparadas em lâminas de vidros 7x5 cm com sílica gel PF₂₅₄ (Merck). Para visualização dos perfis cromatográficos das placas de CCDA foram utilizados reveladores como câmara escura com luz ultravioleta, vapores de iodo, reagente de Dragendorff (seletivo para alcalóides) e/ou solução de sulfato de cério em ácido sulfúrico.

3.5 Identificação e/ou elucidação dos compostos;

As substâncias foram elucidadas e/ou identificadas por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), em espectrômetro da marca Bruker DPX-300, operando na faixa de 300.13 MHz para ¹H e 74.47 MHz para ¹³C, executando experimentos unidimensionais (RMN ¹H e ¹³C e DEPT) e bidimensionais (HSQC, HMBC). Os espectros de massas de baixa resolução foram obtidos em equipamento SHIMADZU QP-2010 PLUS com coluna Rtx® (crossbond – 5% difenilpolisiloxano/ 95% dimetilpolisiloxano) de 30 m de comprimento, diâmetro de 0,25 mm e espessura do filme de 0,25 µm. Os espectros de massas de alta resolução HRESI-MS – microTOF-QII, Bruker Compass (os espectros de massas de alta resolução foram adquiridos em parceria com a Universidade de São Paulo, USP-Ribeirão Preto). Os dados de rotação óptica foram obtidos com polarímetro digital Perkin-Elmer 341 EM.

3.6 Estudo fitoquímico da fase acetato de etila

Parte da fase AD-3-AE (5g), obtida da partição do extrato etanólico, foi submetida a um processo de cromatografia em coluna com 5 cm de diâmetro e 35 cm de altura, empacotada com Sephadex LH 20 e eluída em sistema isocrático com CH₃OH (100%). Deste procedimento foram obtidas 150 frações, de 10 mL cada. As frações foram analisadas em placas de CCDA, eluídas com CH₂Cl₂:CH₃OH (9:1) e reveladas em câmara escura de luz ultravioleta, vapores de iodo e sulfato de cério. De acordo com o perfil cromatográfico observado, as frações foram agrupadas em 6 grupos de AD-3-AE-A a AD-3-AE-F (Figura 16), para facilitar o biomonitoramento.

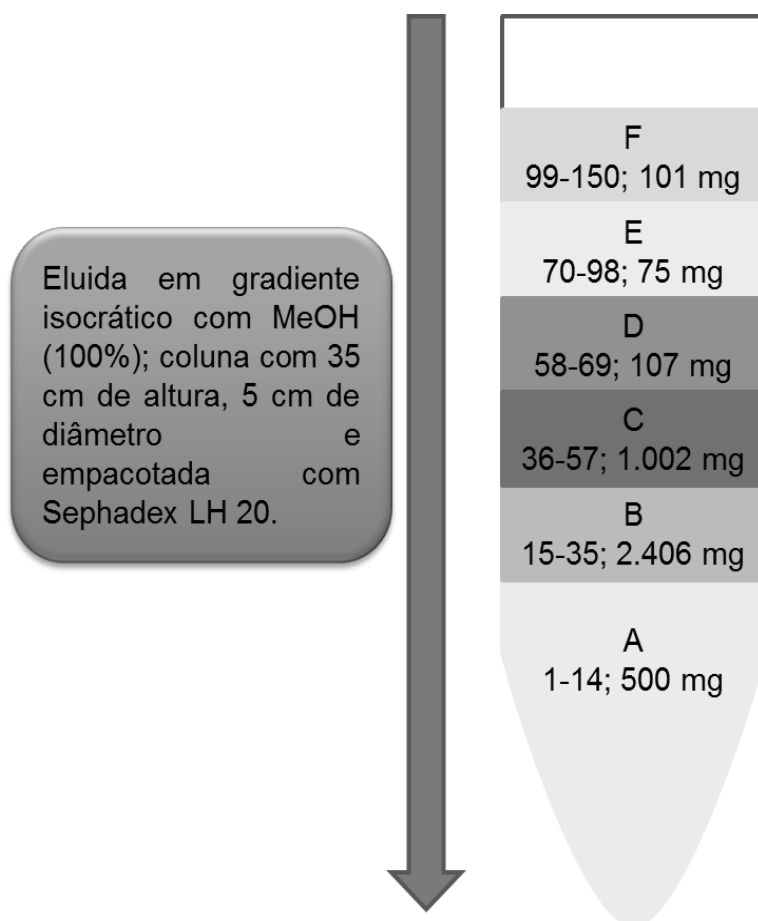


Figura 16: Esquema de obtenção das frações do extrato acetato de etila, com número das frações reunidas e massa após o agrupamento.

3.6.1 Isolamento das substâncias 1 e 2

Com a fração AD-3-AE-E (75 mg) foi realizada uma cromatografia em coluna com 1,75 cm de diâmetro e 35 cm de altura, utilizando Sephadex LH 20 e eluída em sistema isocrático, com CH₃OH. Deste procedimento foram obtidas 40 frações, de aproximadamente 5 mL cada, as quais foram agrupadas em 4 grupos de A a D, como descrito na Tabela 1.

Tabela 1: Resultado do processo cromatográfico da amostra AD-3-AE-E.

Amostra AD-3-AE-E		
Frações	Massa	
AD-3-AE-E-1 a AD-3-AE-E-11	20 mg	AD-3-AE-E-A
AD-3-AE-E-12 a AD-3-AE-E-20	18 mg	AD-3-AE-E-B
AD-3-AE-E-21 a AD-3-AE-E-30	21 mg	AD-3-AE-E-C
AD-3-AE-E-31 a AD-3-AE-E-40	10 mg	AD-3-AE-E-D

Substância 1

A fração AD-3-AE-E-B (18 mg) foi uma das selecionadas para prosseguir com estudo fitoquímico, por apresentar um perfil cromatográfico com manchas mais definidas e em menor número nas placas de CCDA, em comparação com as demais. Esta fração foi submetida a um novo processo de separação em coluna de sílica gel 230-400 *mesh* com leito de 2,5 cm de diâmetro e 15 cm de altura, utilizando, eluída com CHCl₃:CH₃OH, em gradiente crescente de polaridade, sendo coletados 50 frações de 10 mL cada, dando origem a amostra AD-3-AE-E-B-B (Tabela 2), que corresponde ao agrupamento das frações AD-3-AE-E-B-27 a AD-3-AE-E-B-39.

Tabela 2: Resultado do processo cromatográfico da amostra AD-3-AE-E-B.

Amostra AD-3-AE-E-B (18 mg)		
Frações	Massa	
AD-3-AE-E-B-1 a AD-3-AE-E-B-26	-	AD-3-AE-E-A
AD-3-AE-E-B-27 a AD-3-AE-E-B-39	7,4 mg	AD-3-AE-E-B
AD-3-AE-E-B-40 a AD-3-AE-E-B-50	-	AD-3-AE-E-C

A amostra AD-3-AE-E-B-B (7,4 mg) foi purificada utilizando coluna com 25 cm de altura, 1,75 cm de diâmetro, empacotada com Sephadex LH 20 e eluída com CH₃OH. Neste procedimento foram coletadas 30 frações de 10 mL cada, levando à obtenção da **substância 1 (4 mg)** (Figura 17) nas frações AD-3-AE-E-B-B-11 a AD-3-AE-E-B-B-17. Nestas frações pôde ser observado um resultado positivo para alcalóide, com revelador de Dragendorff.

Substância 2

A fração AD-3-AE-E-C (21 mg) apresentou um perfil cromatográfico com manchas mais definidas e menor número nas placas de CCDA, sendo, em função destas características, selecionada para prosseguir com o isolamento dos seus constituintes. Esta fração foi submetida a um processo de separação em coluna com 1,75 cm de diâmetro e 25 cm de altura, utilizando Sephadex LH 20 e eluída com CH₃OH (Figura 17), sendo coletadas 40 frações de aproximadamente 10 mL cada, das quais foi originada a amostra AD-3-AE-E-C-C (11,7 mg) (Tabela 3).

Tabela 3: Resultado do processo cromatográfico da amostra AD-3-AE-E-C.

Amostra AD-3-AE-E-C (21 mg)		
Frações	Massa	
AD-3-AE-E-C-1 a AD-3-AE-E-C-9	-	AD-3-AE-E-A
AD-3-AE-E-C-10 a AD-3-AE-E-C-14	-	AD-3-AE-E-B
AD-3-AE-E-C-15 a AD-3-AE-E-C-25	11,7 mg	AD-3-AE-E-C
AD-3-AE-E-C-25 a AD-3-AE-E-C-30	-	AD-3-AE-E-D

A **substância 2 (5 mg)**, que também apresentou resultado positivo para o teste com reagente de Dragendorff, foi obtida da fração AD-3-AE-E-C-C (11,7 mg), esta fração foi submetida a um processo de cromatografia em coluna com Sephadex LH 20, com 1,75 cm de diâmetro e 25 cm de altura e eluída com CH₃OH. Deste procedimento foram coletadas 30 frações de 10 mL cada, sendo observada a presença da substância 2 nas frações AD-3-AE-E-C-C-12 a AD-3-AE-E-C-C-19 (Figura 17).

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

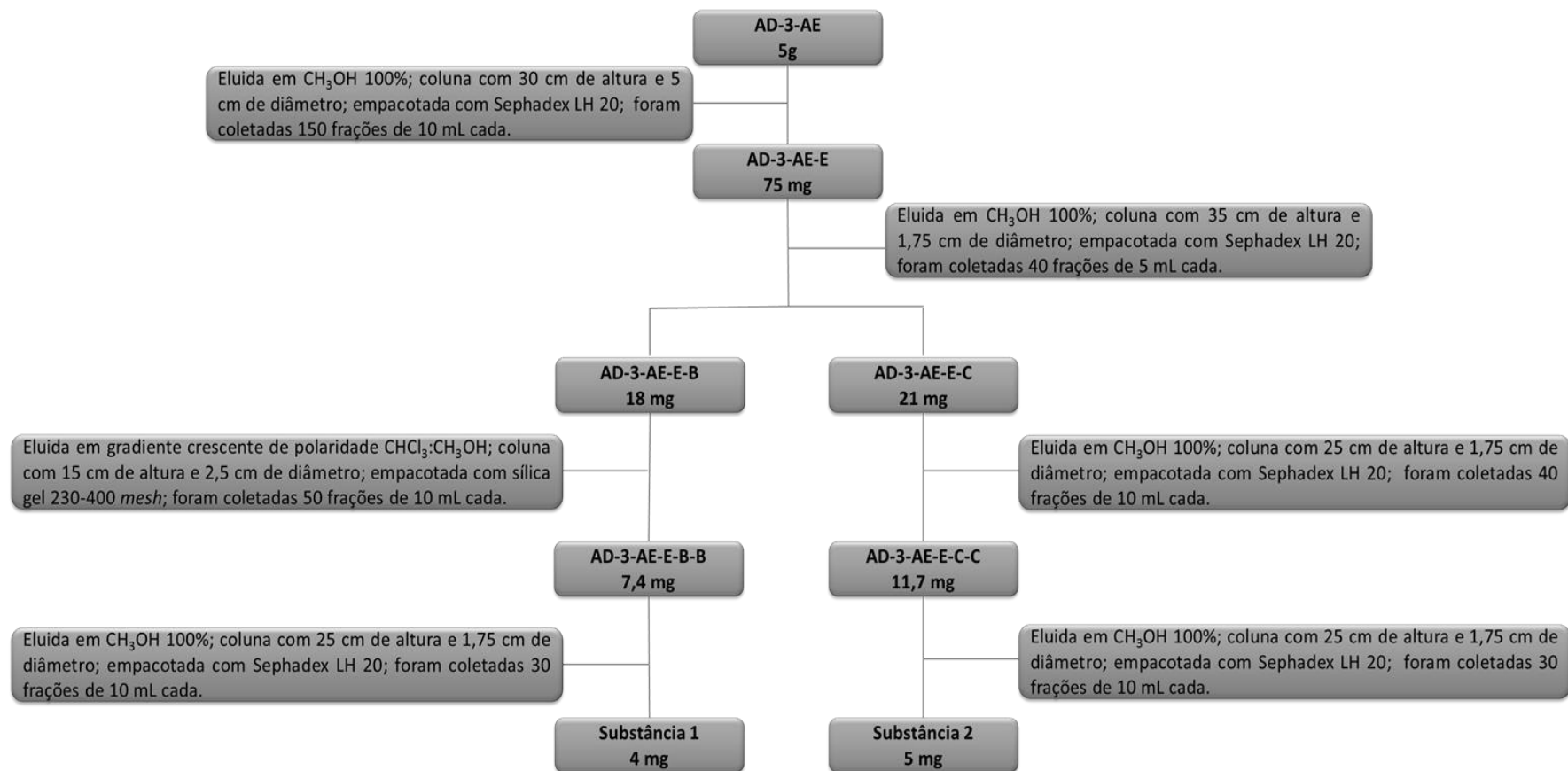


Figura 17: Fluxograma detalhado da obtenção das substâncias 1 e 2.

3.6.2 Isolamento substância 3.

A **substância 3** (2 mg), obtida da fração AD-3-AE-F (12 mg), apresentou um resultado positivo para alcalóide, sendo detectada nas frações AD-3-AE-F-20 a AD-3-AE-F-24. As frações nas quais a substância 3 foi detectada foram obtidas após um processo de cromatografia em coluna de 1,75 cm de diâmetro e 20 cm de altura, tendo como fase estacionária sílica gel 230-400 *mesh*, eluída em gradiente crescente de polaridade $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$, sendo coletadas 40 frações de 10 mL cada.

Após aquisição dos dados de RMN de ^1H e ^{13}C desta amostra, pôde ser observado que o componente majoritário é o composto previamente identificado na fração diclorometânica (substância 3).

3.7 Estudo fitoquímico do extrato diclorometânico

3.7.1 Isolamento da substância 3

O extrato AD-2 (Extrato Diclorometânico) foi submetido à CCDA com vários tipos de eluentes, sendo o que apresentou melhor resolução foi $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$. Este extrato foi então submetido à cromatografia em coluna de sílica gel (70-230 mesh, 90 g) eluída com $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ em gradiente crescente de polaridade, obtendo-se 44 frações, as quais foram classificadas em 6 grupos (Figura 18), devido a similaridades no perfil cromatográfico em CCDA, para facilitar o biomonitoramento.

Para realizar o biomonitoramento foi retirada uma porção de cada uma das frações resultantes da coluna descrita acima, isso observando os seis grupos como descrito anteriormente, preservando as 44 frações da forma como as mesmas foram obtidas do procedimento cromatográfico descrito na Figura 18.

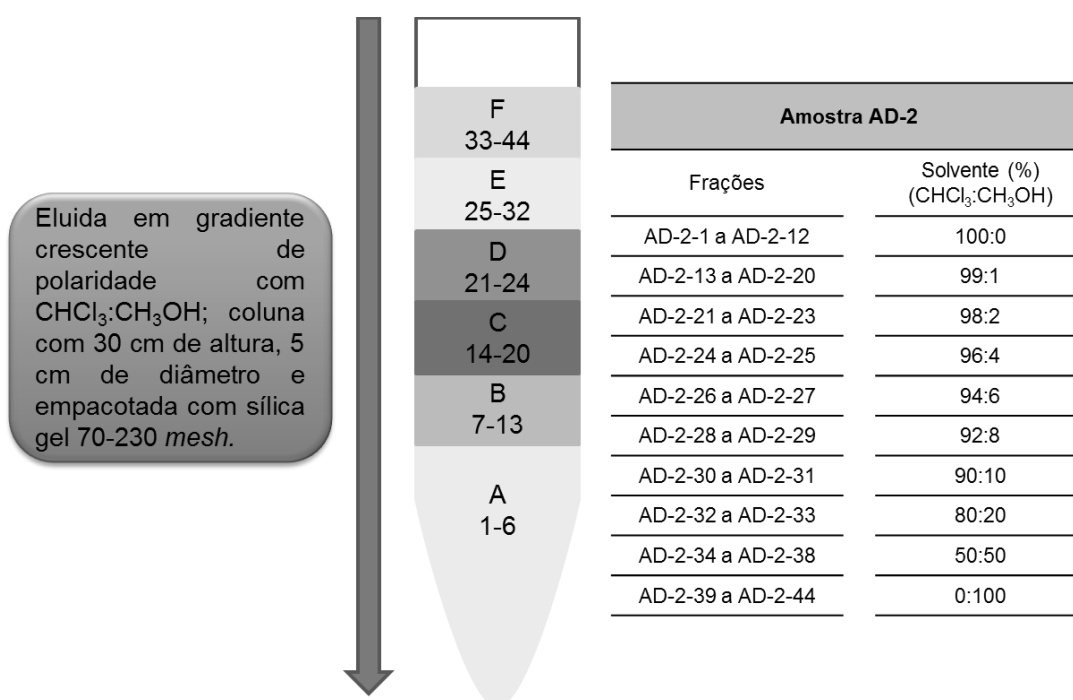


Figura 18: Esquema de obtenção das frações do extrato diclorometânico e classificação das mesmas de AD-2-A a AD-2-F.

A fração de número 24 (1 g), obtida do processo cromatográfico descrito na Figura 18, foi selecionada para prosseguir com estudo fitoquímico, pois

apresentava manchas definidas no perfil cromatográfico em CCDA, utilizando sulfato de cério como revelador. Uma parte da mesma (500 mg) foi submetida a um processo cromatográfico em coluna com Sephadex LH 20, resultando em 60 frações, as quais foram analisadas por CCDA. Em função desta análise foram selecionadas e agrupadas as frações AD-2-24-43 a AD-2-24-50 (Fração AD-24-A, 12,7 mg) para prosseguir o isolamento e caracterização dos seus constituintes. Foram realizados três processos de purificação com sílica gel 230-400 mesh (Figura 19), no intuito de isolar uma mancha, visível a olho nu e que apresentou resultado positivo para alcalóides com reagente de Dragendorff. Destes procedimentos foi obtida a substância 3 (Tabela 4).

Tabela 4: Frações originadas dos processos cromatográficos da amostra AD-2-24, para a obtenção da Substância 3.

Amostra AD-2-24 (500 mg)		
Frações	Massa	
AD-2-24-1 a AD-2-24-20	-	-
AD-2-24-21 a AD-2-24-29	-	-
AD-2-24-30 a AD-2-24-35	167 mg	AD-2-24-C
AD-2-24-36 a AD-2-24-42	30 mg	AD-2-24-B
AD-2-24-43 a AD-2-24-50	27,2 mg	AD-2-24-A
AD-2-24-51 a AD-2-24-60	-	-
Amostra AD-2-24-A (27,2 mg)		
Frações	Massa	
AD-2-24-A-1 a AD-2-24-A-42	-	-
AD-2-24-A-43 a AD-2-24-A-50	12,7 mg	AD-2-24-A-B
AD-2-24-A-51 a AD-2-24-A-80	-	-
Amostra AD-2-24-A-B (12,7 mg)		
Frações	Massa	
AD-2-24-A-B-1 a AD-2-24-A-B-20	-	-
AD-2-24-A-B-21 a AD-2-24-A-B-24	6 mg	AD-2-24-A-B-D
AD-2-24-A-B-25 a AD-2-24-A-B-40	-	-
Amostra AD-2-24-A-B-D (6 mg)		
Frações	Massa	
AD-2-24-A-B-D-1 a AD-2-24-A-B-D-5	-	-
AD-2-24-A-B-D-6 a AD-2-24-A-B-D-8	4 mg	Substância 3
AD-2-24-A-B-D-9 a AD-2-24-A-B-20	-	-

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophillus) microplus*.

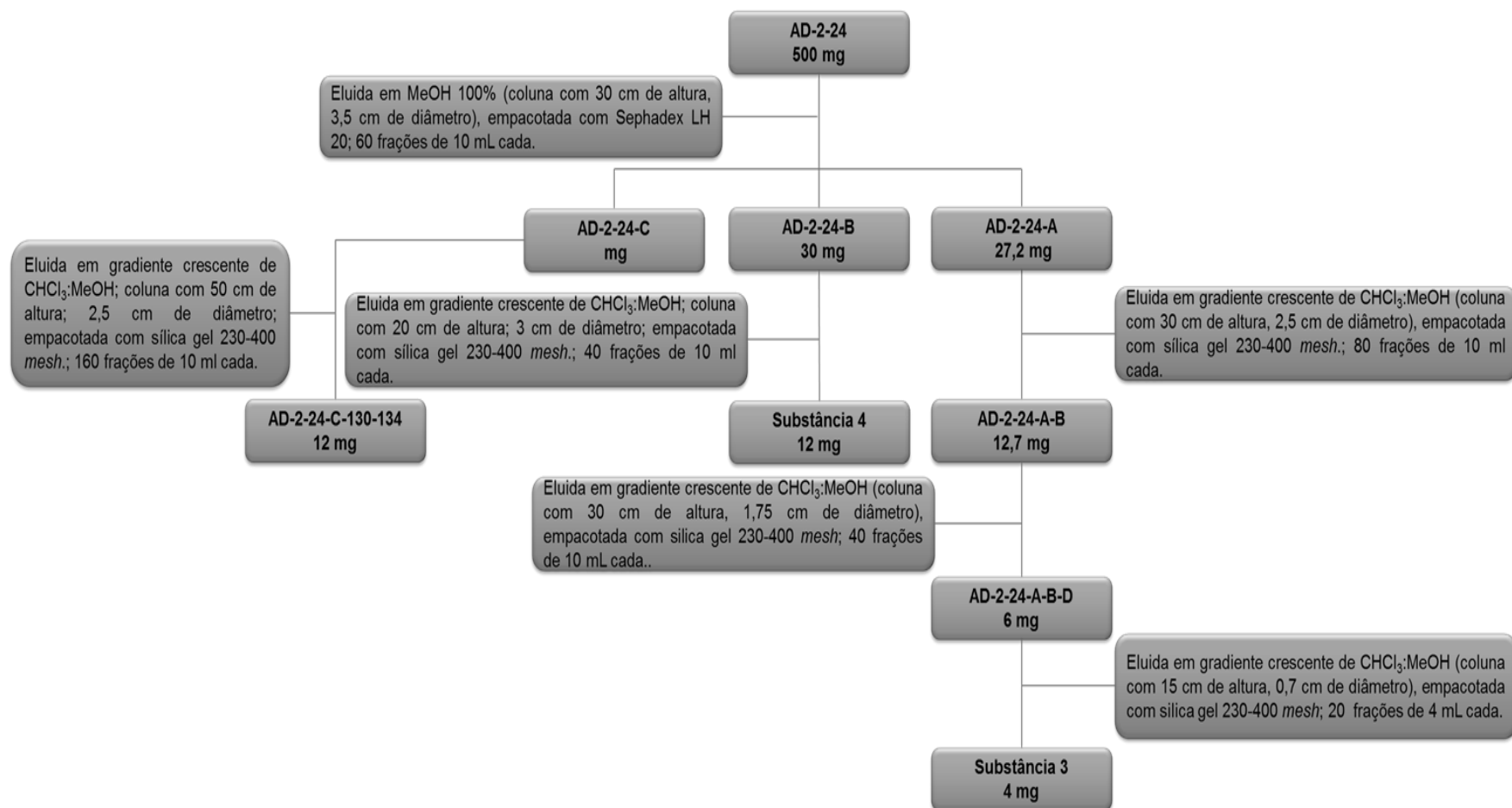


Figura 19: Esquema de fracionamento para obtenção da Substância 3, 4 e obtenção da amostra rica em acetogeninas.

Este composto foi observado em CCDA nas frações AD-2-24-A-B-D-6, AD-2-24-A-B-D-7 e AD-2-24-A-B-D-8, as quais foram reunidas para obtenção de espectros de RMN ^1H , DEPT 135° e ^{13}C .

3.7.2 Isolamento da substância 4

A **substância 4** foi isolada após dois processos de cromatografia em coluna da amostra AD-2-24, como descrito na Figura 19, sendo observada nas frações AD-2-24-B-22 a AD-2-24-B-25 (Tabela 5).

Tabela 5: Resultado dos processos cromatográficos da amostra AD-2-24, para a obtenção da Substância 4.

Amostra AD-3-AE-E-C (21 mg)		
Frações	Massa	
AD-2-24-B-1 a AD-2-24-B-22	-	AD-2-24-B-A
AD-2-24-B-22 a AD-2-24-B-25	12 mg	Substância 4
AD-2-24-B-25 a AD-2-24-B-40	-	AD-2-24-B-D

3.8 Acetogeninas

As acetogeninas foram observadas nas frações resultantes do extrato diclorometânico e também nas frações da fase acetato de etila, proveniente do extrato etanólico.

3.8.1 Extrato diclorometânico

A partir da fração AD-2-24, foi obtida a fração AD-2-24-C, após um novo procedimento cromatográfico em Sephadex LH 20, eluído com CHCl₃, do qual foram coletadas 60 frações. Deste total de frações foram reunidas as frações AD-2-24-30 a AD-2-24-34 (Fração AD-2-24-C), e estas foram novamente submetidas a cromatografia em coluna conforme ilustra a Figura 19.

3.8.2 Fase Acetato de Etila

As amostras AD-3-AE-B e AD-3-AE-C provenientes da fase acetato de etila também demonstraram a presença de acetogeninas, a metodologia de fracionamento para a obtenção destas amostras esta descrita na Figura 16.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Ensaios biológicos com *A. salina* e teleóginas de *R. (B.) microplus*

Após obtenção dos extratos (AD-1, AD-2 e AD-3), os mesmos foram preparados para teste de atividade com teleóginas do *R. (B.) microplus*. Destes o mais ativo foi o AD-3 (extrato etanólico) (Figura 20), com índice de eficiência de 34%.

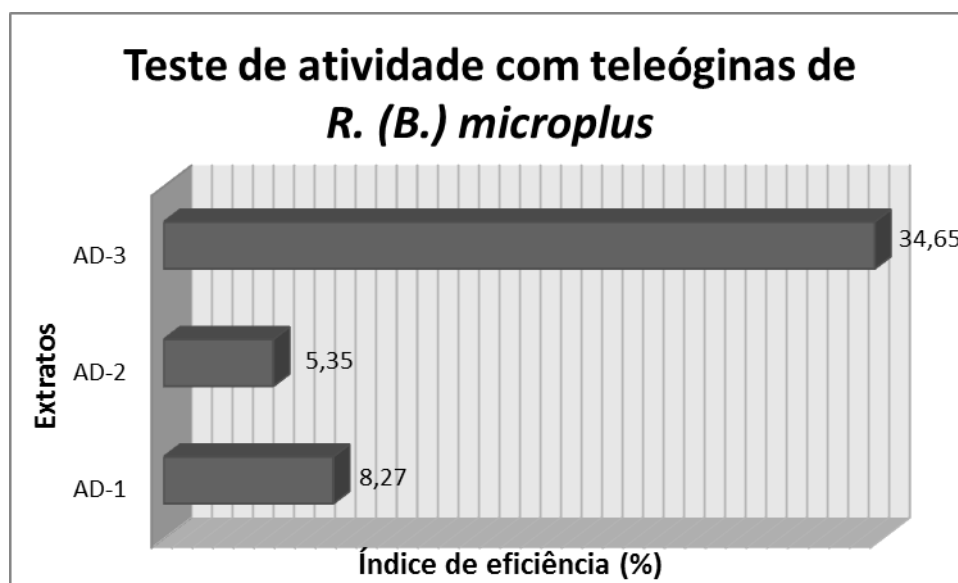


Figura 20: Resultado do teste de atividade com teleóginas de *R. (B.) microplus* com os extratos etanólico (AD-3), diclorometânico (AD-2) e hexânico (AD-1).

Em função deste resultado foi realizada uma partição líquido-líquido com acetato de etila, metanol e H_2O , como descrito anteriormente na Figura 13, dando origem às fases acetato de etila (AD-3- AE) e hidrometanólica (AD-3- HMeOH). Estas também foram submetidas ao bioensaio, e o resultado mostrou que a atividade concentrava-se na fase AD-3-AE (Figura 21).

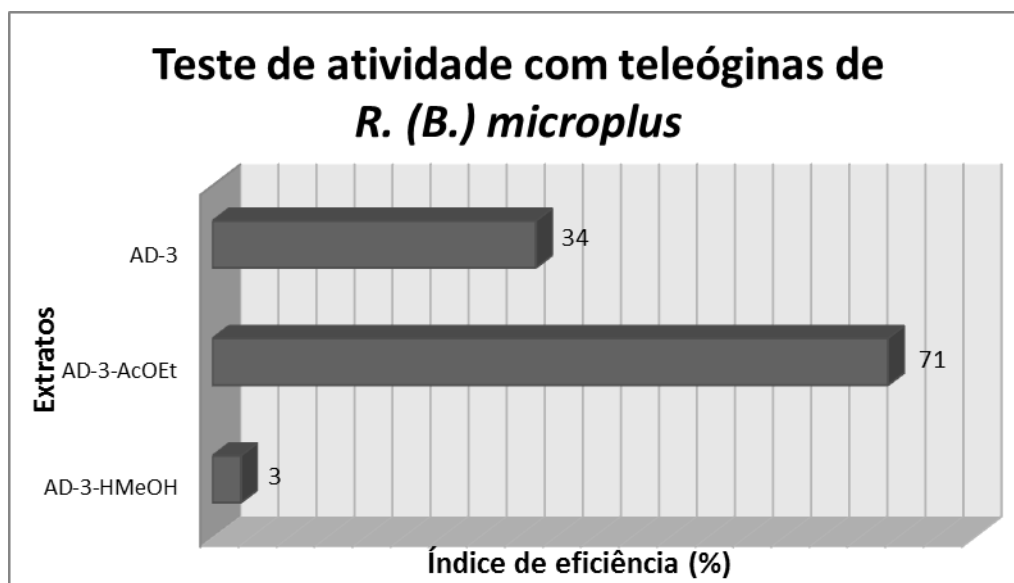


Figura 21: Resultado do teste de atividade com teleóginas de *R. (B.) microplus* para o extrato etanólico e suas fases acetato de etila (AD-3-AcOEt) e hidrometanólica (AD-3-HMeOH).

O teste de atividade com teleóginas, para as frações obtidas do extrato diclorometânico, como descrito na Figura 17, mostrou os maiores valores para a amostra AD-2-D (Figura 22), nesta foram identificados alcalóides e acetogeninas.

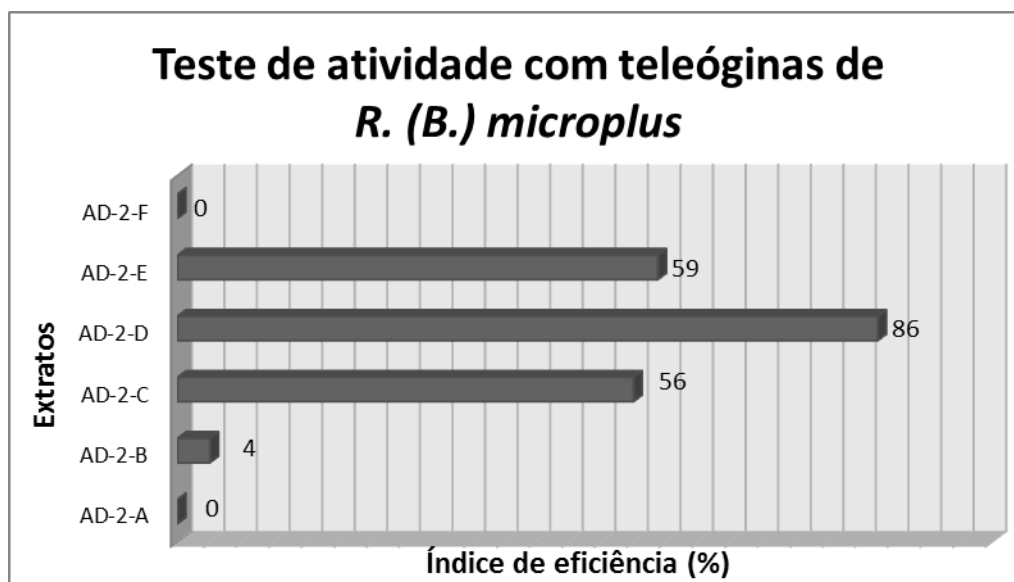


Figura 22: Resultado do teste de atividade com teleóginas de *R. (B.) microplus*, para frações resultantes do extrato diclorometânico.

Sabendo que a fase mais ativa era a acetato de etila, a mesma foi submetida a um procedimento cromatográfico que resultou em seis frações

como mencionado anteriormente. Estas fases foram submetidas, simultaneamente aos testes de citotoxicidade com *Artemia salina* e contra teleóginas de *R.(B.) microplus*.

Devido a contratempos ocorridos com o teste de atividade contra o carrapato bovino o mesmo teve que ser realizado duas vezes, sendo que o primeiro ensaio, não apresentou resultados passíveis de serem interpretados, pois a incubadora, onde estavam estocadas as larvas, superaqueceu e isso coloca em dúvida o resultado obtido. No segundo ensaio com estas mesmas amostras o resultado mostrou a ausência de atividade para todas as amostras testadas.

O teste com *Artemia salina* mostrou que todas as frações apresentaram significativa atividade, principalmente, as frações AD-3-AcOEt-B e AD-3-AcOEt-C (Figura 23), nas quais após estudo fitoquímico preliminar, identificou-se a presença de acetogeninas.

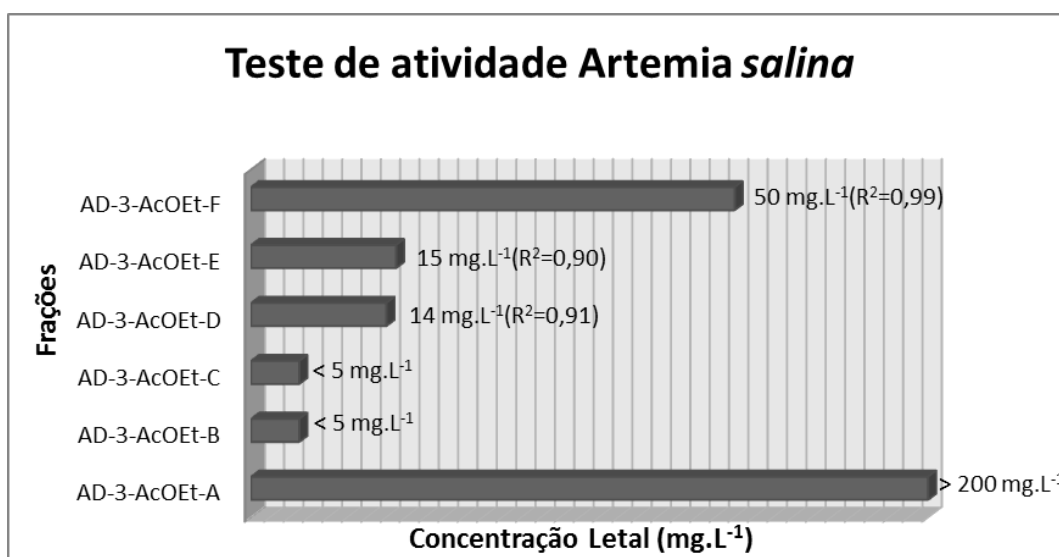


Figura 23: Resultado do teste de atividade com *Artemia salina*, utilizando como controle positivo o sulfato de quinidina.

4.2 Estudo fitoquímico da fase acetato de etila

4.2.1 Elucidação estrutural

4.2.1.1 Caracterização da substância 1

No espectro de RMN de ^1H (Figuras 24 e 25), em CDCl_3 , da substância 1 observa-se a presença de um simpleto com integração proporcional a dois hidrogênios em 6,35 ppm.

Também podem ser observados dois dupletos em 8,87 ppm (H-5, 1H) e em 7,75 ppm (H-4, 1H) com $J = 5,2$ Hz, constante de acoplamento característica de anel aromático com heteroátomo e outros cinco sinais na região de hidrogênios de anel aromático, sendo quatro com, no mínimo, um acoplamento típico de relação orto: 8,64 ppm, 8,57 ppm, 7,75 ppm, 7,56 ppm e um simpleto em 7,18 ppm. Esses dados indicam portanto, que além do anel heterocíclico, a estrutura da substância 1 apresenta de mais dois anéis aromáticos, sendo um dissustituído em *orto* e o outro pentassustituído.

Os sinais referentes ao anel dissustituído, em CDCl_3 , não possibilitam a interpretação de todas as constantes de acoplamentos dos mesmos.

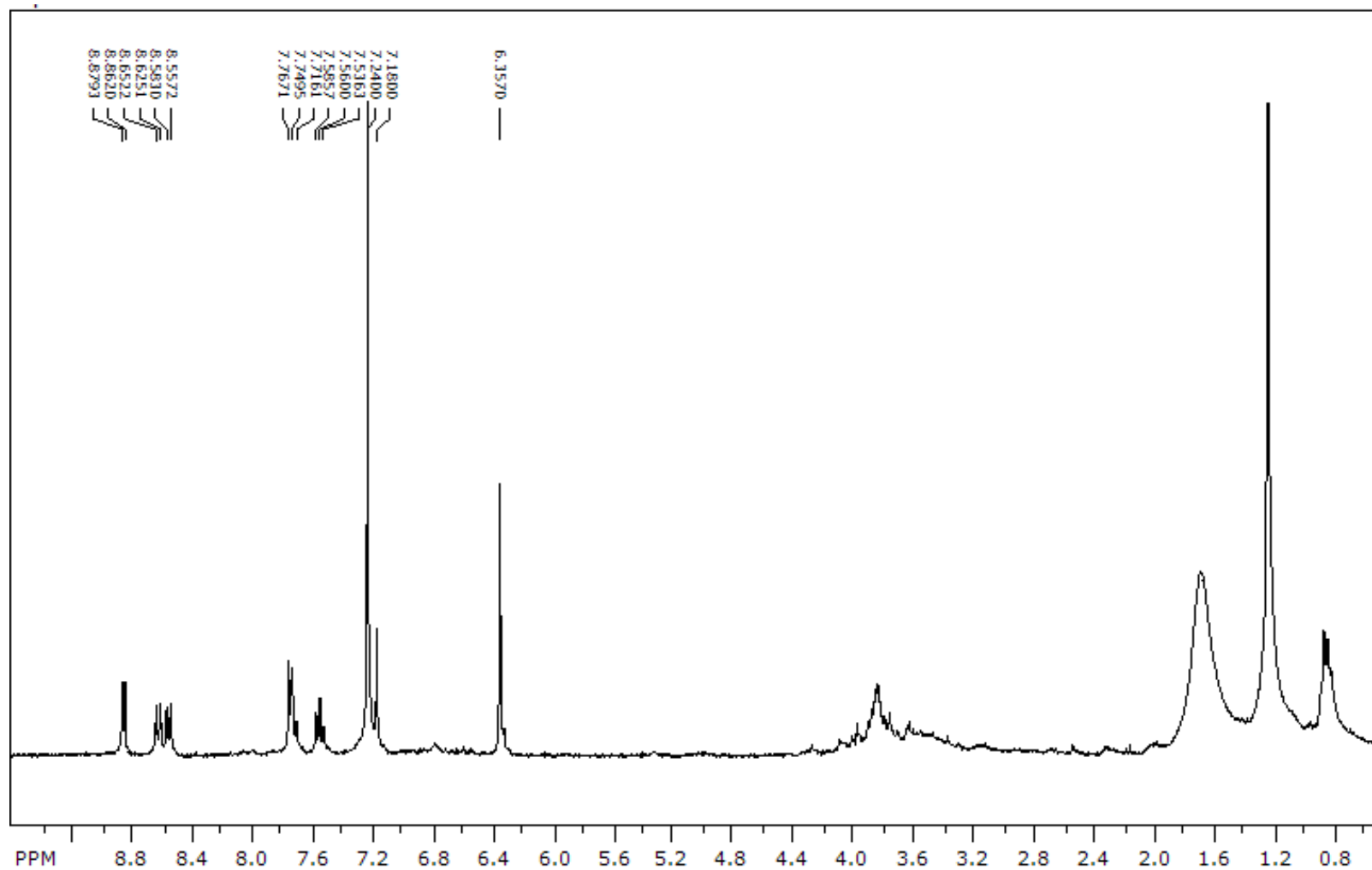


Figura 24: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 1, em CDCl_3 .

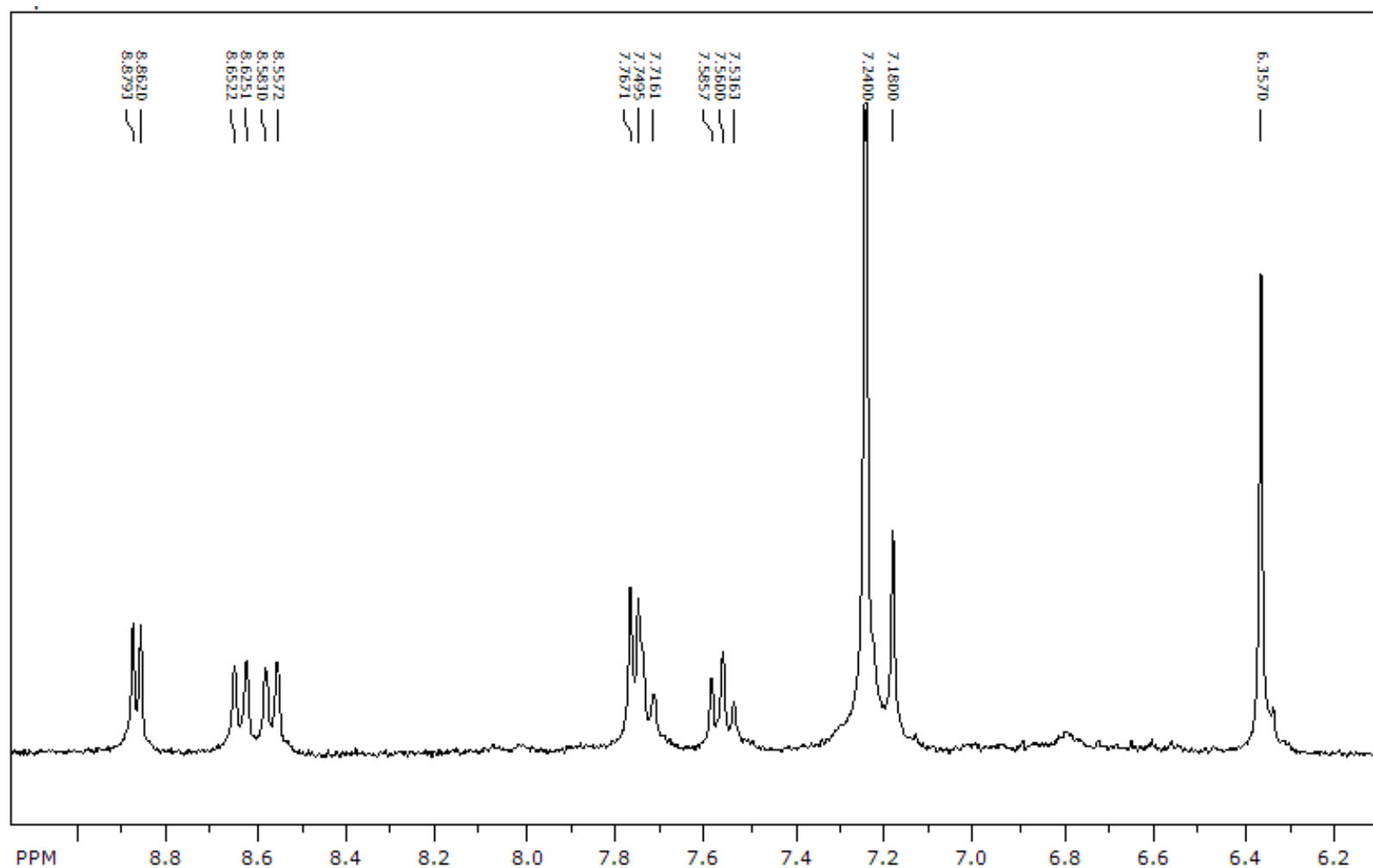


Figura 25: Expansão do espectro de RMN de ^1H , com valores de deslocamento químico.

Como pode ser observado na Figura 24, dois sinais entre 7,7 e 7,8 ppm ficaram sobrepostos no experimento de RMN de ^1H com CDCl_3 . A mudança de solvente (metanol- d_4) provocou um deslocamento nestes sinais (Figura 26), facilitando a atribuição dos mesmos, e a determinação das constantes de acoplamentos. Com base nos resultados do experimento de RMN de ^1H , em metanol- d_4 , foi possível atribuir todas as constantes de acoplamento para os sinais da substância 1, como mostra a Tabela 6. Os hidrogênios em 8,23 ppm e em 7,46 ppm estão acoplando com $J = 7,8 \text{ Hz}$, mostrando que esses hidrogênio são vicinais. O hidrogênio em 7,60 ppm apresentou-se como *ddd*, com duas constantes características de acoplamento do tipo orto, uma de $8,1 \text{ Hz}$, com o H em 8,28 ppm e uma de $7,2 \text{ Hz}$ com o H em 7,46 ppm, caracterizando a presença do anel benzênico dissustituído em *orto*.

Tabela 6: Dados de RMN de ^1H da Substância 1 em metanol- d_4 .

Substância 1	
	Valores de RMN ^1H (deslocamento e acoplamento)
1	-
2	-
3	7,04 ppm (1H; s)
3a	-
4	7,71 ppm (1H; <i>d</i> ; 5,2 Hz)
5	8,55 ppm (1H; <i>d</i> ; 5,2 Hz)
6a	-
6b	-
7	-
7a	-
8	8,23 ppm (1H; <i>dd</i> ; 7,8 Hz e 1,6 Hz)
9	7,46 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 7,8 Hz, 7,2 Hz e 1,2 Hz)
10	7,60 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 8,1 Hz, 7,2 Hz e 1,6 Hz)
11	8,28 ppm (1H; <i>dd</i> ; 8,1 Hz e 1,2 Hz)
11a	-
11b	-
12	6,29 ppm (3H; s)

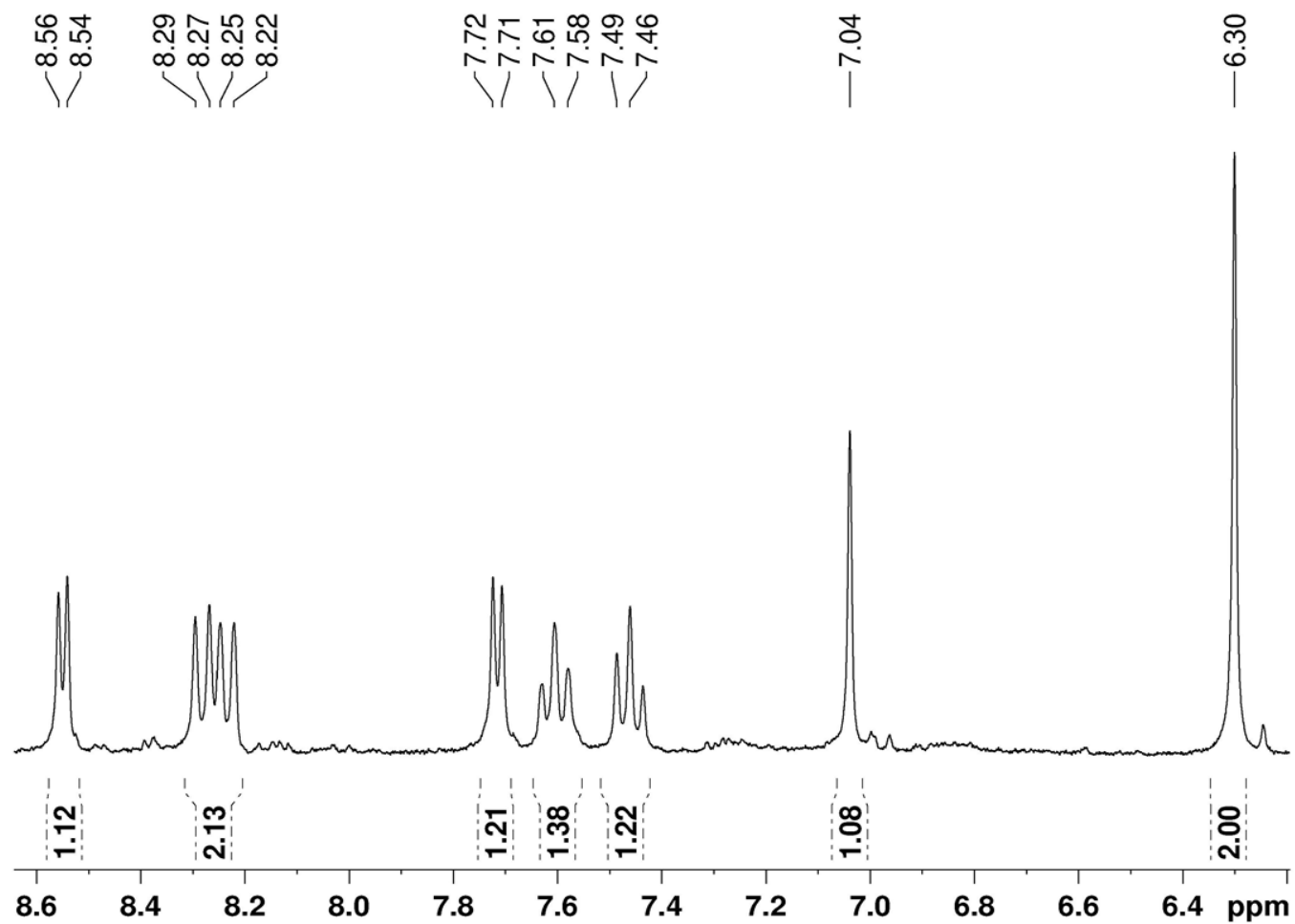


Figura 26: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da Substância 1, em metanol- d_4 .

No espectro de RMN de ^{13}C em metanol- d_4 foram listados 17 sinais entre 100 e 190 ppm (Figura 27). Entre esses, pela análise do experimento DEPT 135°, foram identificados: um de carbono metilênico, em 104,6 ppm sete sinais de metínicos, e nove sinais de carbonos tetrassubstituídos, entre eles uma carbonila em 183,2 ppm (Figuras 28 e 29)

Esses dados corroboram com a idéia inicial discutida para os espectros de RMN de ^1H , com a presença de três anéis aromáticos, sendo um com um heteroátomo, com dois grupos de carbonos metínicos aromáticos vizinhos, para os quais os hidrogênios apresentaram constante de acoplamento de 5,2 Hz; um pentassubstituído, com apenas um sinal de carbono de metínico aromático, no qual o H apresentou um simpleto em 7,04 ppm; e outro dissustituído, proposto em função da presença de quatro sinais de carbonos metilênicos, aliado aos quatro sinais no espectro de RMN de ^1H , onde todos apresentaram, no mínimo, uma constante de acoplamento maior que 7 ppm, evidenciando a relação do tipo *orto* entre estes.

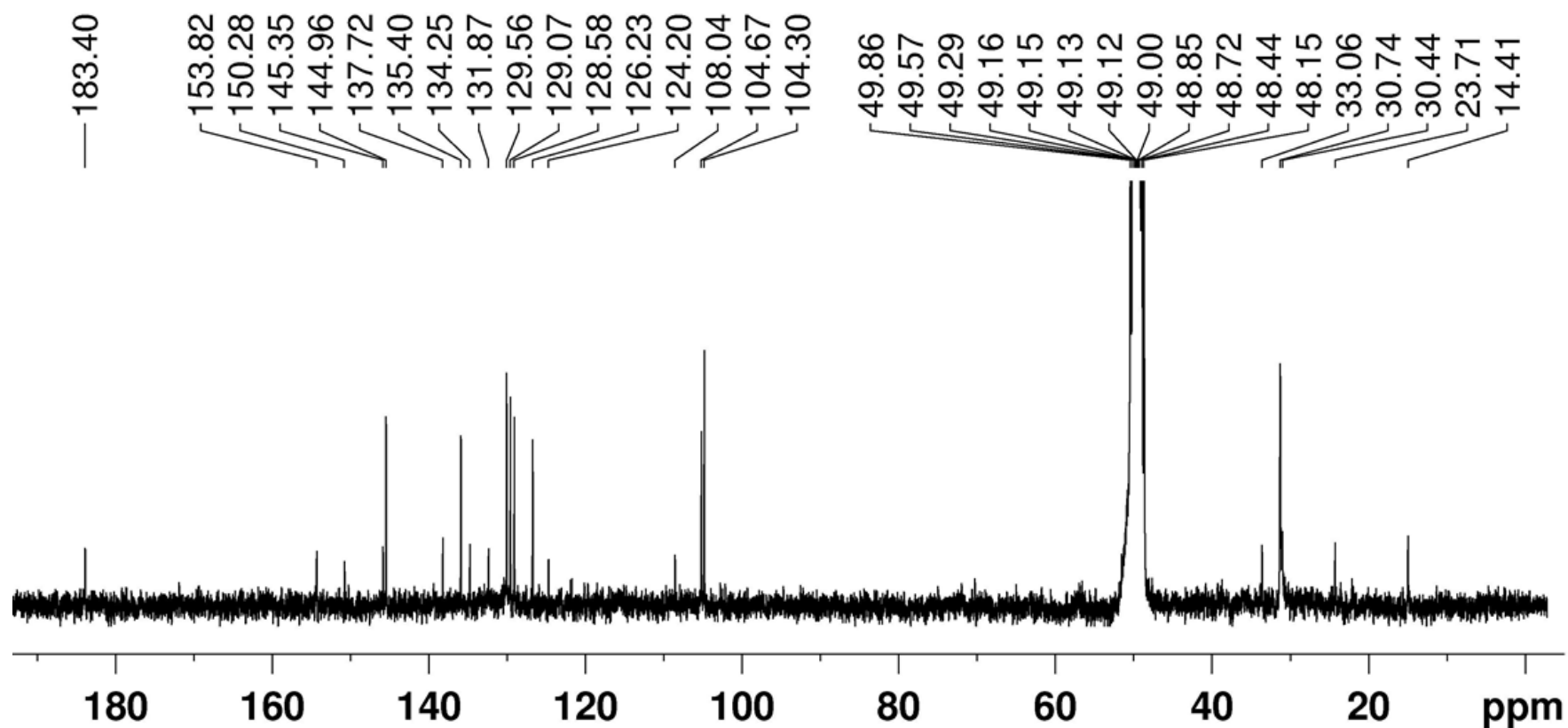


Figura 27: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância1, em metanol- d_4 .

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

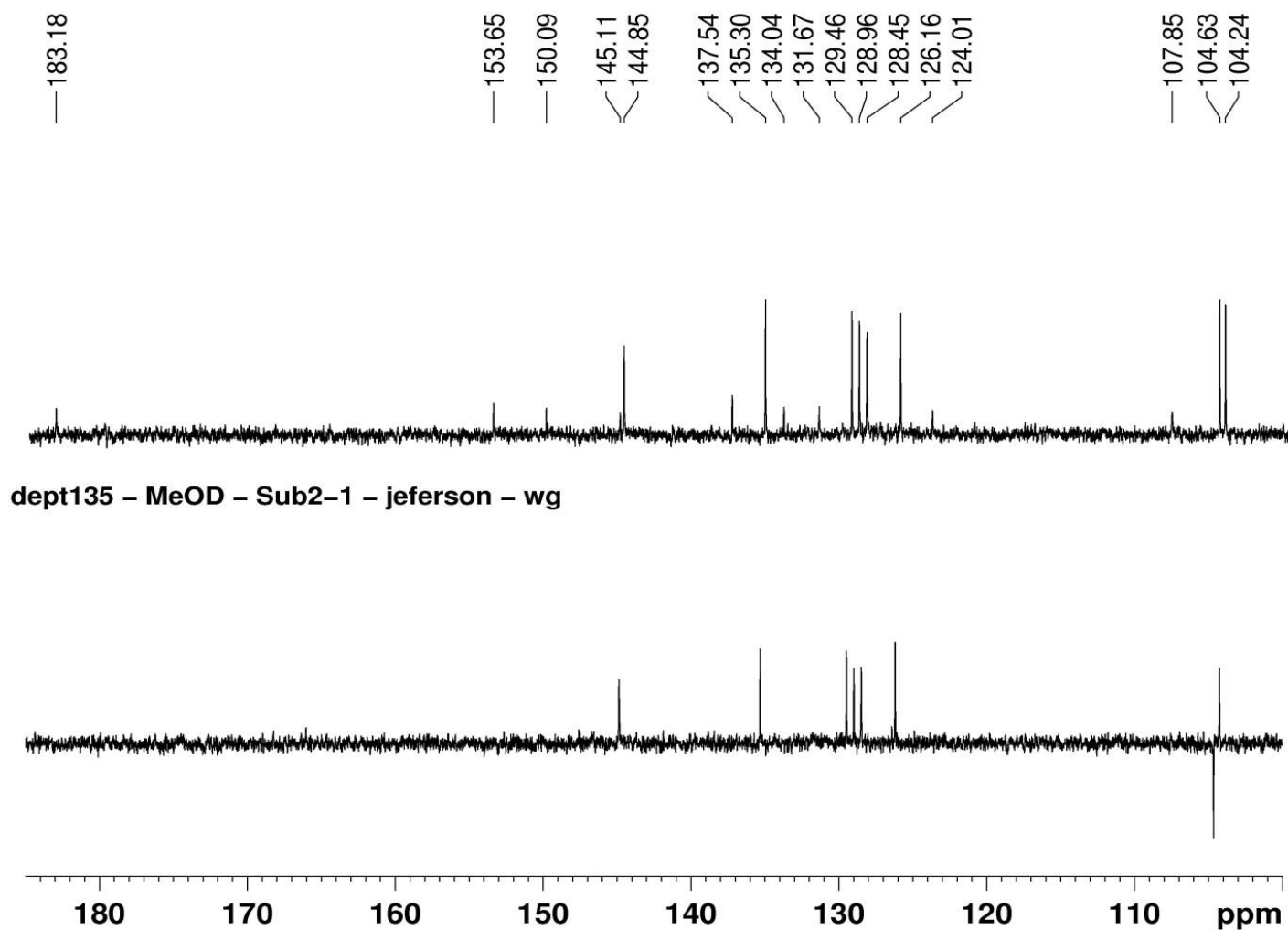


Figura 28: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT 135° da substância 1 em metanol- d_4 .

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

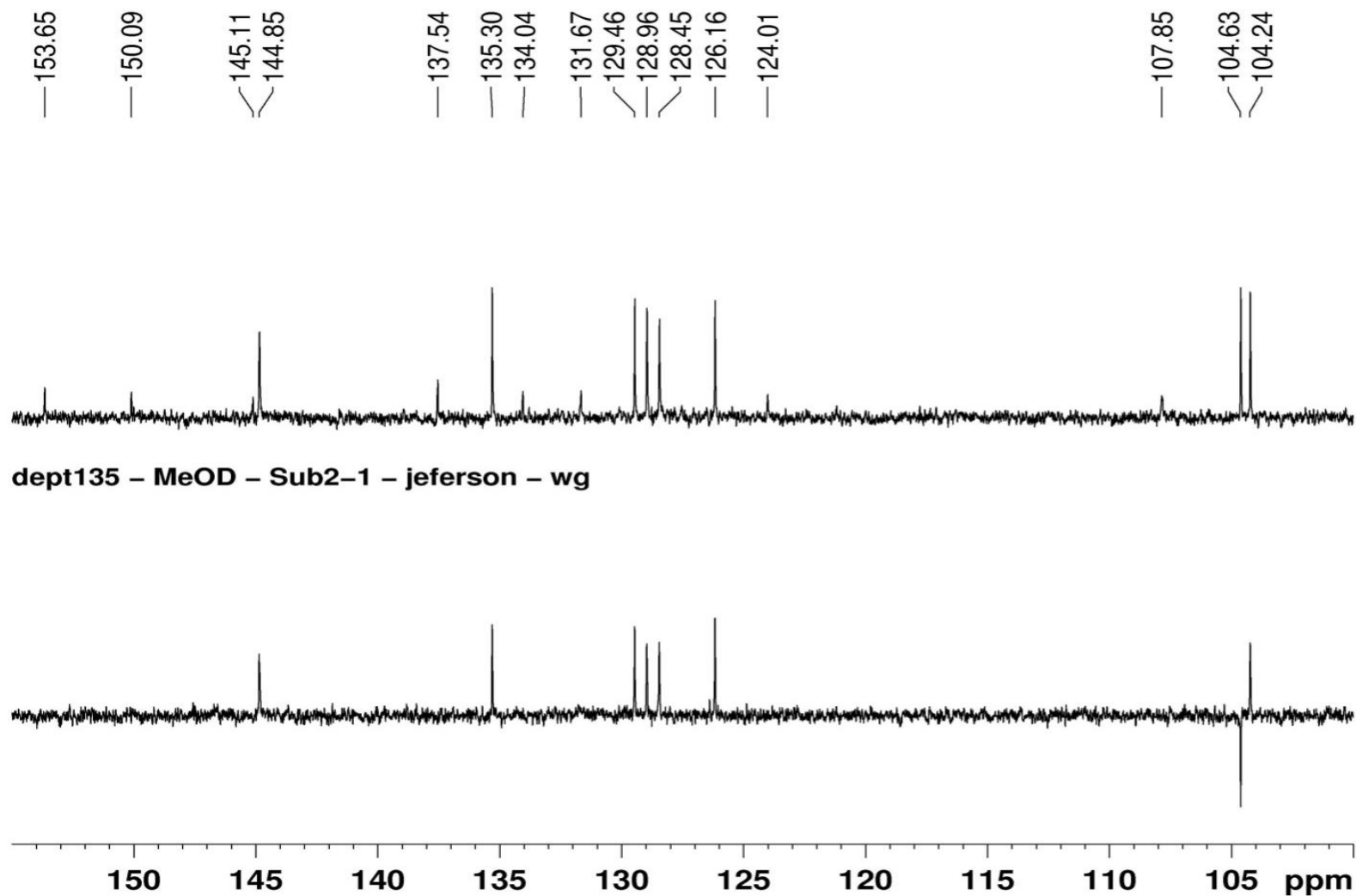


Figura 29: Espectro de RMN de ¹³C e DEPT 135° da substância 1 em metanol-d₄, expansão.

Com esses dados em mãos, aliados a presença de um íon molecular de m/z de 275 no espectro de massas de baixa resolução (Figura 30), foi proposto que a substância possui esqueleto oxoaporfínico.

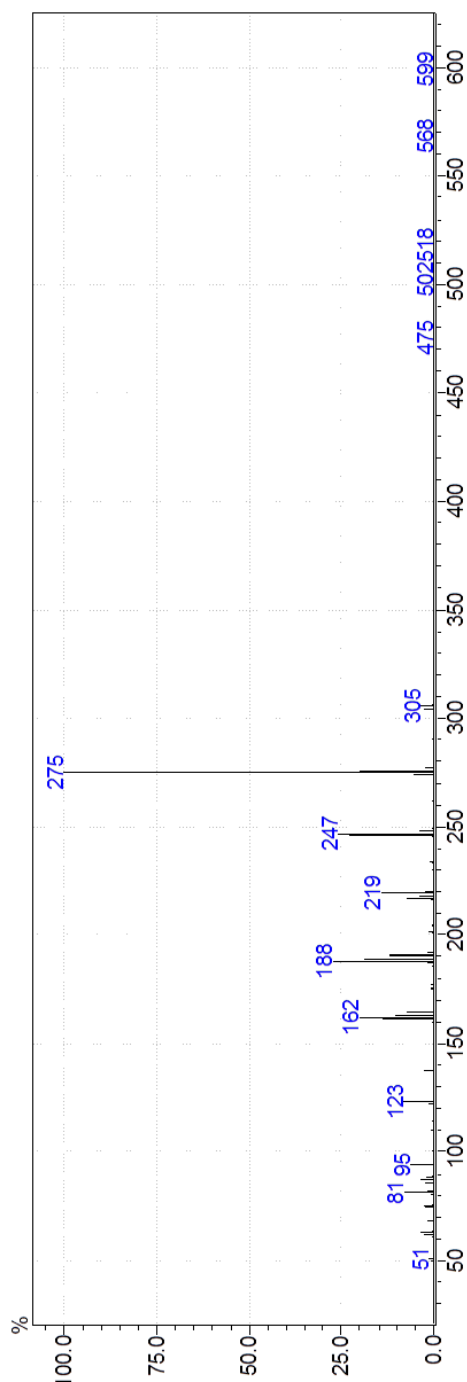


Figura 30: Espectro de massas de baixa resolução da Substância 1.

Após comparação com dados da literatura⁴³(Tabela 7), a **Substância 1**, um sólido amarelo, pôde ser identificada como sendo o alcalóide oxoaporfínico **Liriodenina** (Figura 31), frequentemente encontrado em espécies de Annonaceae e considerado um marcador quimiotaxonômico da família.

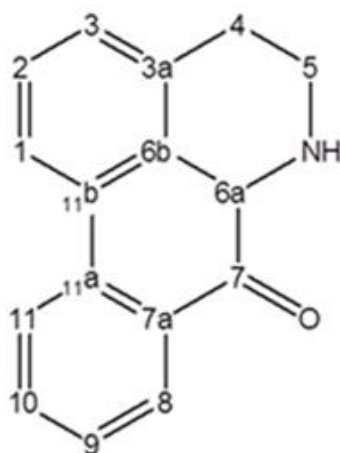


Figura 31: Liriodenina, alcalóide marcador quimiotaxonômico de anonáceas, isolado das raízes de *Annona dioica*.

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Tabela 7: Dados de RMN de ^1H (300 MHz) ($^1\text{H}_{\text{Amostra}}$) e ^{13}C (75 MHz) ($^{13}\text{C}_{\text{Amostra}}$) da Substância 1 em metanol- d_4 , e dados da literatura ($^1\text{H}_{\text{Referência}}$) com constantes de acoplamento.⁴³

Substância 1			
	$^1\text{H}_{\text{Amostra}}$	$^1\text{H}_{\text{Referência}}$	$^{13}\text{C}_{\text{Amostra}}$
1	-	-	153,6 ppm (C)
2	-	-	150,1 ppm (C)
3	7,04 ppm (1H; s)	7,18 ppm (1H; s)	104,2 ppm (CH)
3a	-	-	137,5 ppm (C)
4	7,71 ppm (1H; d; 5,2 Hz)	7,76 ppm (1H; d; 5,3 Hz)	126,2 ppm (CH)
5	8,55 ppm (1H; d; 5,2 Hz)	8,87 ppm (1H; d; 5,3 Hz)	144,8 ppm (CH)
6a	-	-	145,1 ppm (C)
6b	-	-	107,8 ppm (C)
7	-	-	183,2 ppm (C)
7a	-	-	131,7 ppm (C)
8	8,23 ppm (1H; dd; 7,8 Hz e 1,6 Hz)	8,57 ppm (1H; dl; 8,0 Hz)	135,3 ppm (CH)
9	7,46 ppm (1H; ddd; 7,8 Hz, 7,2 Hz e 1,2 Hz)	7,56 ppm (1H; td; 7,8 Hz e 2,0 Hz)	128,5 (CH)
10	7,60 ppm (1H; ddd; 8,1 Hz, 7,2 Hz e 1,6 Hz)	7,73 ppm (1H; td; 7,8 Hz e 2,0 Hz)	129,5 ppm (CH)
11	8,28 ppm (1H; dd; 8,1 Hz e 1,2 Hz)	8,64 ppm (1H; dl; 8,0 Hz)	129,0 ppm (CH)
11a	-	-	124,0 ppm (C)
11b	-	-	134,0 ppm (C)
12	6,29 ppm (2H; s)	6,38 ppm (2H; s)	104,6 ppm (CH_2)

4.2..1.2 Caracterização da substância 2

O espectro de RMN de ^1H mostrou que esta amostra apresentava, em princípio, apenas uma substância (Figura 32). Dois conjuntos de dupletos foram importantes para a identificação desta substância, o observado para os hidrogênios H-3 (8,49 ppm) e H-4 (8,30 ppm), que acoplam com $J = 4,8$ Hz e o referente aos H-5' (7,67 ppm) e H-6' (8,43 ppm), que apresentam $J = 5,1$ Hz (Tabela 8). Esses quatro sinais indicaram a presença de dois anéis com heteroátomo na estrutura.

Outros quatro sinais, sendo dois tripletos e dois dupletos (Figura 33), dos H-6 e H-7, H-5 e H-8, respectivamente, com constante de acoplamento maior que 7 Hz, acoplando entre si, indicaram a presença de um anel dissustituído em posição orto (Tabela 8). Também podem ser observados dois simpletos referentes aos H-9 (NH), em 11,89 ppm e H-7' (NH₂), em 7,07 ppm (Figura 33).

Tabela 8: Dados de RMN de ^1H da substância 2, adquiridos em DMSO-D₆.

Substância 2	
Valores de deslocamento de RMN ^1H (constantes de acoplamento)	
1	-
1a	-
3	8,49 ppm (1H; <i>d</i> ; 4,8 Hz)
4	8,30 ppm (1H; <i>d</i> ; 4,8 Hz)
4a	-
5a	-
5	8,31 ppm (1H; <i>d</i> ; 8,3 Hz)
6	7,30 ppm (1H; <i>dd</i> ; 8,3 Hz e 7,4 Hz)
7	7,61 ppm (1H; <i>dd</i> ; 8,2 Hz e 7,4 Hz)
8	7,76 ppm (1H; <i>d</i> ; 8,2 Hz)
8a	-
9	11,86 ppm (1H; <i>s</i>)
2'	-
4'	-
5'	7,67 ppm (1H; <i>d</i> ; 5,2 Hz)
6'	8,43 ppm (1H; <i>d</i> ; 5,2 Hz)
10	7,06 ppm (2H; <i>s</i>)

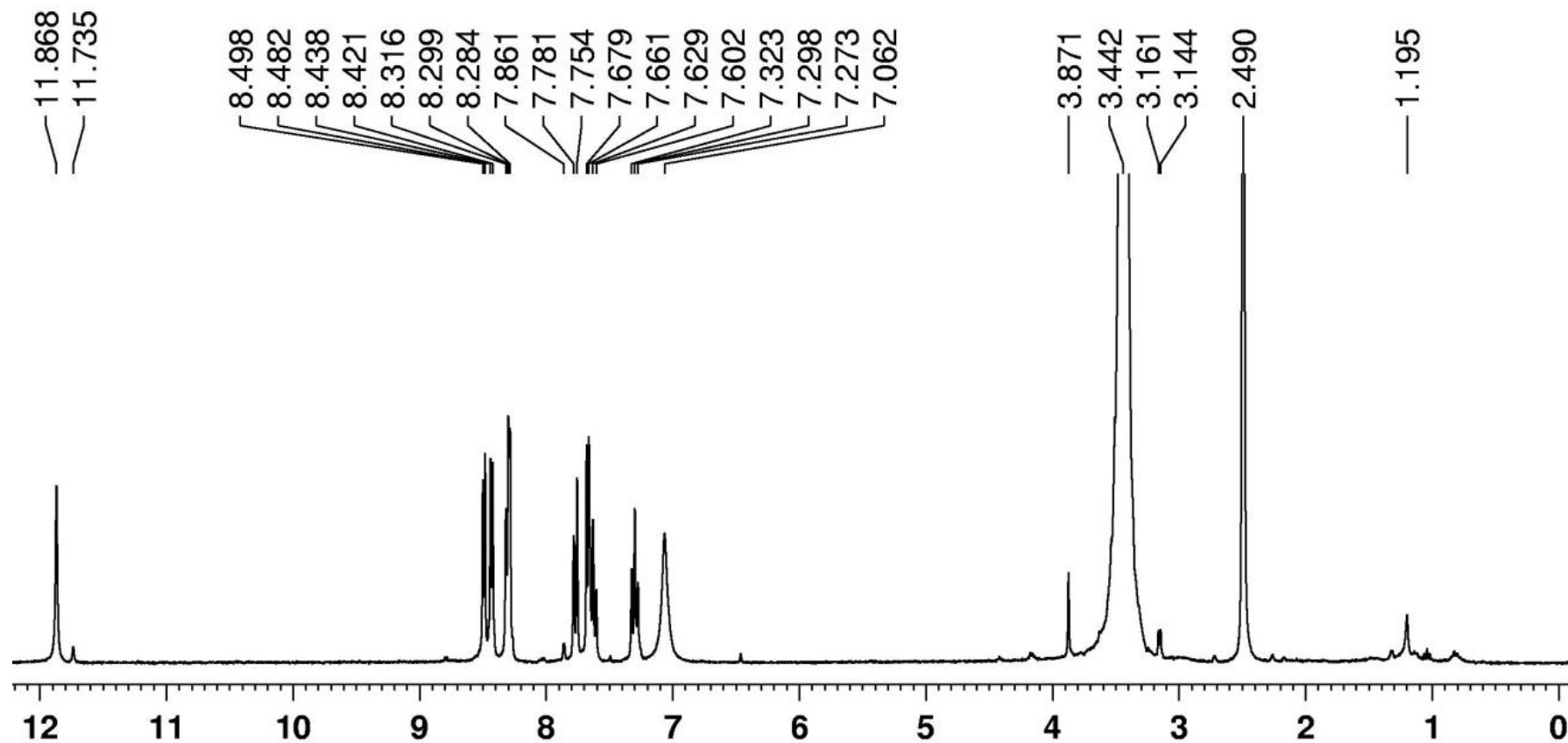


Figura 32: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 2, em DMSO-D_6 .

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

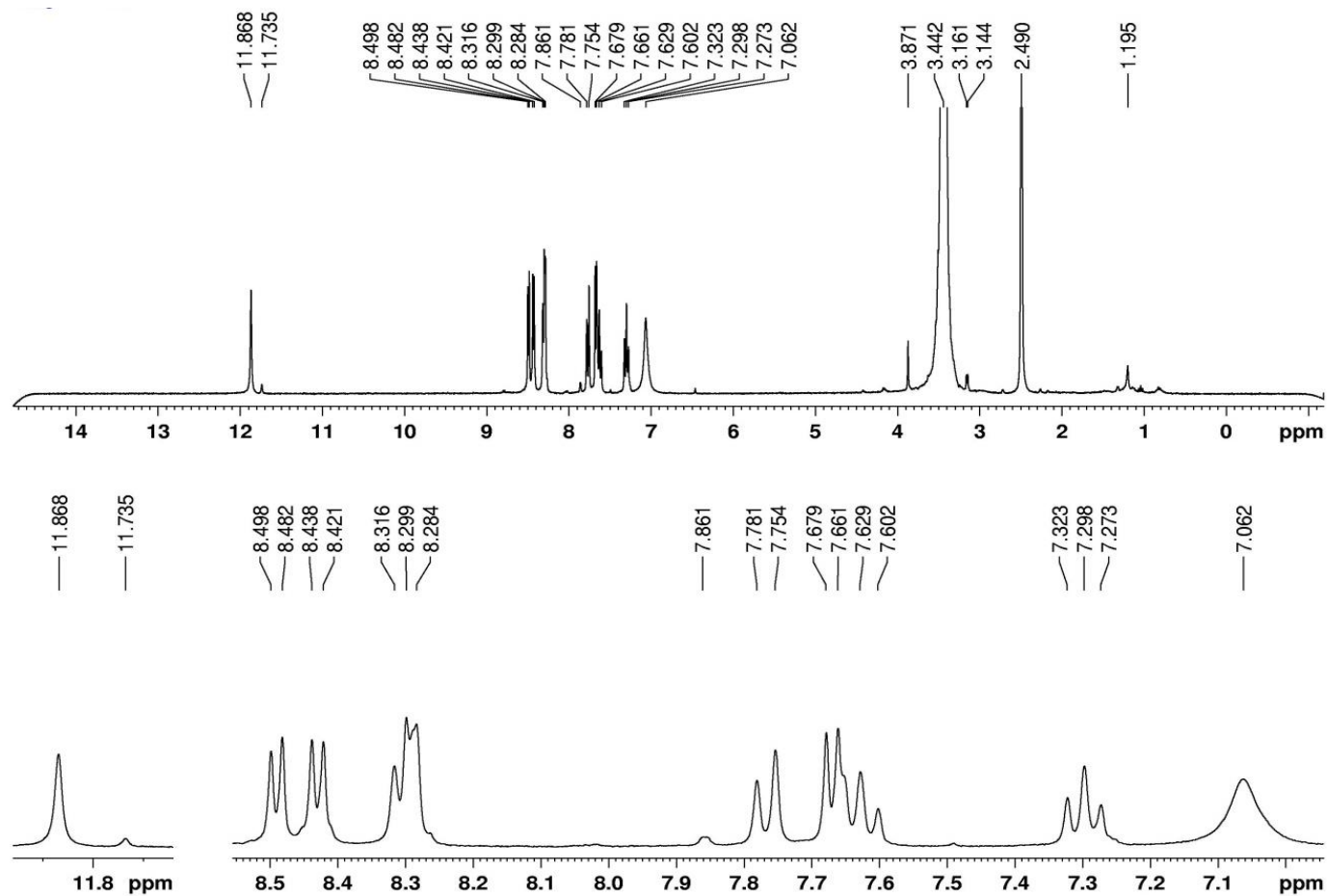


Figura 33: Expansão do espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 2, em $\text{DMSO}-\text{D}_6$.

O espectro de RMN de ^{13}C , em DMSO- d_6 (Figuras 34) mostra a presença de 15 sinais entre 100 ppm e 170 ppm. No experimento de DEPT 135° desta amostra com CH_3OH em capilar de D_2O , podemos notar a presença de 8 CH e a ausência de outros 7 sinais de carbonos quaternários (Figuras 35 e 36).

Os sinais observados no espectro de RMN de ^1H mostraram a presença de no mínimo, três anéis aromáticos, esses dados aliados aos dados de RMN de ^{13}C , indicam a presença de três átomos diferentes de carbono fazendo parte da estrutura dos anéis, uma vez que para corresponder a expectativa dos três anéis benzênicos é necessário que estejam presentes no espectro de RMN de ^{13}C 18 sinais (Tabela 9).

Tabela 9: Dados de RMN de ^{13}C da substância 2, adquiridos em DMSO- D_6 .

Substância 2	
	Valores de deslocamento químico de RMN de ^{13}C
1	136,2 ppm (C)
1a	134,4 ppm (C)
3	138,0 ppm (CH)
4	116,9 ppm (CH)
4a	130,4 ppm (C)
5a	120,3 ppm (C)
5	122,0 ppm (CH)
6	119,9 ppm (CH)
7	128,9 ppm (CH)
8	112,4 ppm (CH)
8a	140,9 ppm (C)
9	-
2'	163,5 ppm (C)
4'	164,4 ppm (C)
5'	105,7 ppm (CH)
6'	159,2 ppm (CH)
10	-

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

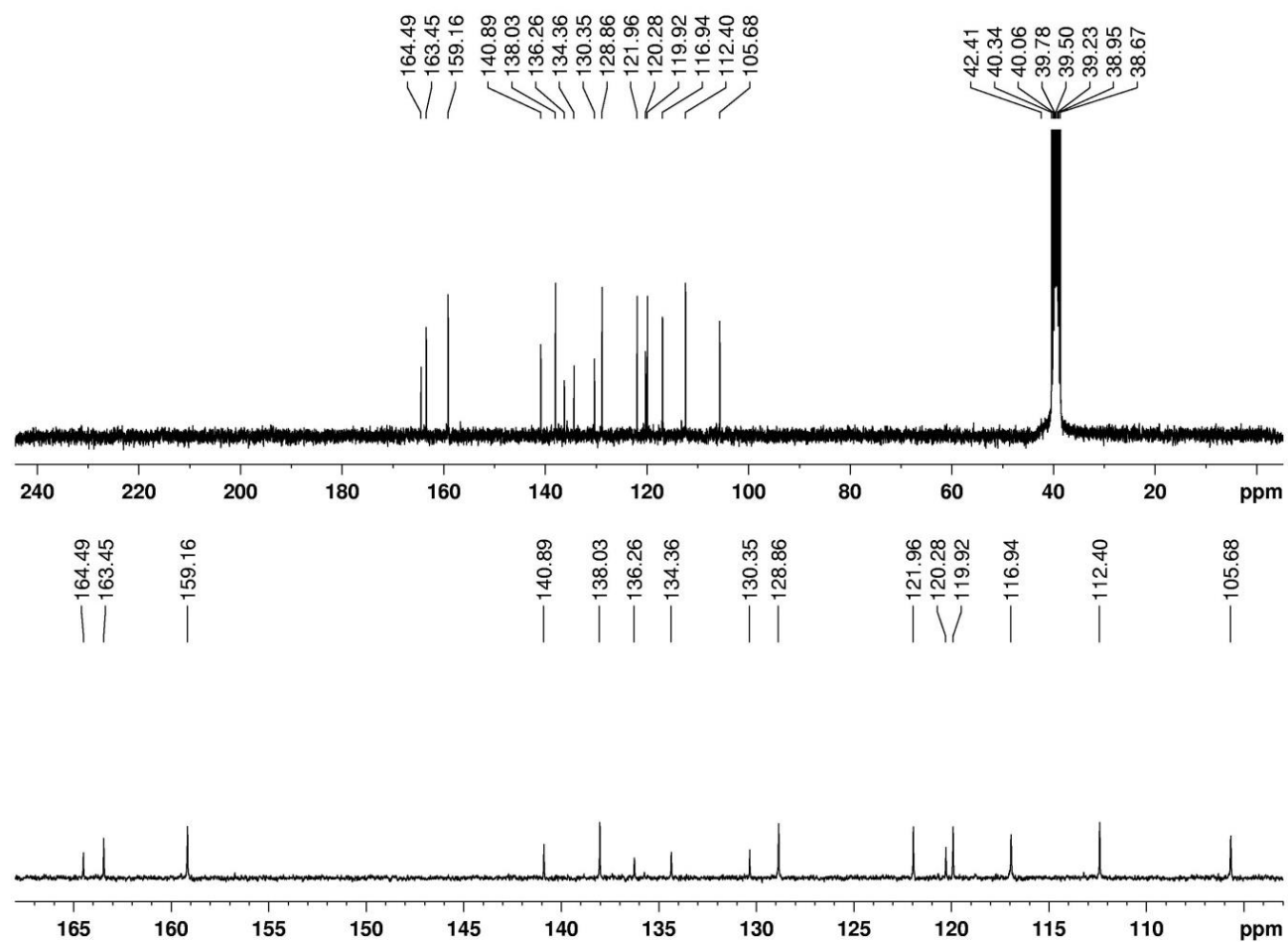


Figura 34: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 2, em DMSO-d_6 .

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

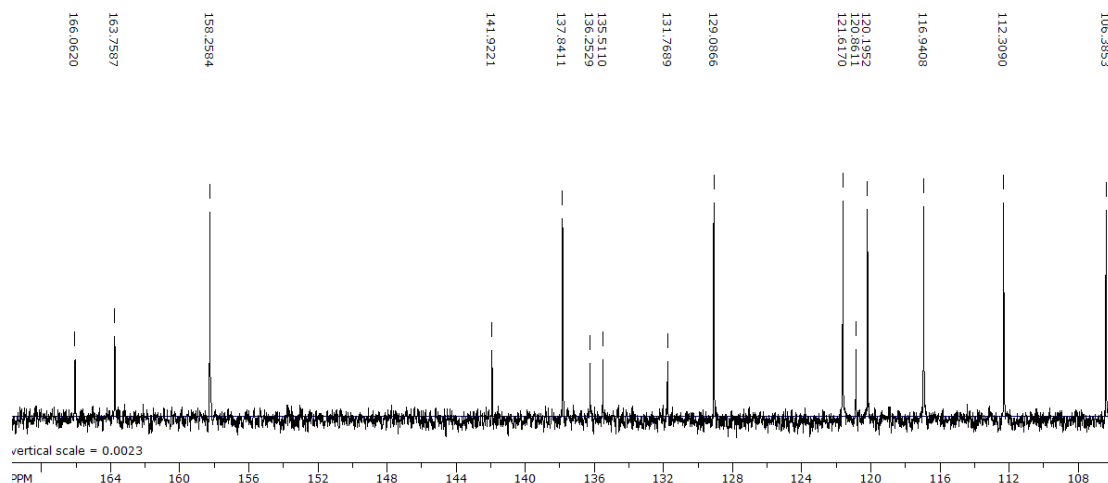


Figura 35: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 2, em metanol com capilar de D_2O .

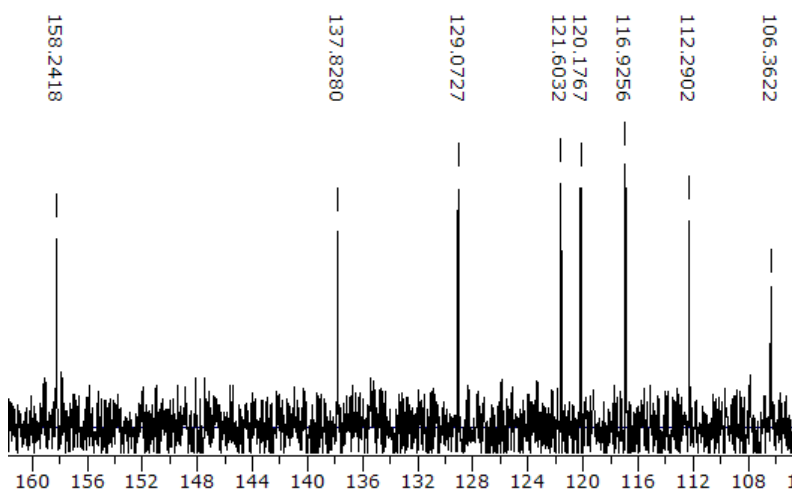


Figura 36: Espectro de RMN de DEPT 135° da substância 2, em metanol com capilar de D_2O .

O espectro de massas de baixa resolução, obtido por inserção direta, desta substância apresentou um íon molecular com $m/z = 261$, compatível com a fórmula molecular $C_{15}H_{10}N_5$ (Figura 37).

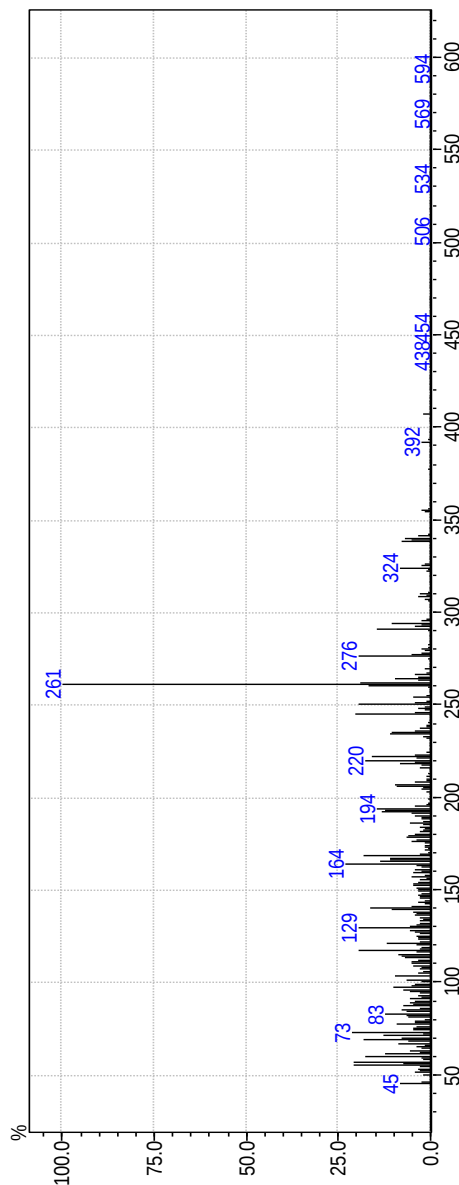


Figura 37: Espectro de massas de baixa resolução (EM-IE) da substância 2.

Com a comparação com os dados da literatura²⁶ (Tabela 10), a **Substância 2**, foi identificada como sendo a **Anomontina**, um alcalóide pirimidínico- β -carbolínico, sólido cristalino e amarelado (Figura 38).

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Tabela 10: Dados de RMN de ^{13}C da substância 2, adquiridos em DMSO- D_6 . Os valores de RMN de ^{13}C na referência foram adquiridos em DMSO- D_6 (400 MHz)²⁶.

Substância 2				
	$^1\text{H}_{(\text{Amostra})}$	$^1\text{H}_{(\text{Referência})}$	$^{13}\text{C}_{(\text{Amostra})}$	$^{13}\text{C}_{(\text{Referência})}$
1	-	-	136,2 ppm (C)	136,1 ppm (C)
1a	-	-	134,4 ppm (C)	134,2 ppm (C)
3	8,49 ppm (1H; d; 4,8 Hz)	8,51 ppm (1H; d; 5,0 Hz)	138,0 ppm (CH)	137,9 ppm (CH)
4	8,30 ppm (1H; d; 4,8 Hz)	8,32 ppm (1H; d; 5,0 Hz)	116,9 ppm (CH)	116,8 ppm (CH)
4a	-	-	130,4 ppm (C)	130,2 ppm (C)
5a	-	-	120,3 ppm (C)	120,1 ppm (C)
5	8,31 ppm (1H; d; 8,3 Hz)	8,33 ppm (1H; ddd; 7,9 Hz, 1,2 Hz e 0,8 Hz)	122,0 ppm (CH)	121,8 ppm (CH)
6	7,30 ppm (1H; dd; 8,3 Hz e 7,4 Hz)	7,32 ppm (1H; ddd; 7,9 Hz, 7,1 Hz e 1,0 Hz)	119,9 ppm (CH)	119,8 ppm (CH)
7	7,61 ppm (1H; dd; 8,2 Hz e 7,4 Hz)	7,65 ppm (1H; ddd; 8,3 Hz, 7,1 Hz e 1,2 Hz)	128,9 ppm (CH)	128,7 ppm (CH)
8	7,76 ppm (1H; d; 8,2 Hz)	7,81 ppm (1H; ddd; 8,3 Hz, 1,2 Hz e 1,0 Hz)	112,4 ppm (CH)	112,3 ppm (CH)
8a	-	-	140,9 ppm (C)	140,8 ppm (C)
9	11,86 ppm (1H; s)	11,9 ppm (1H; s)	-	-
2'	-	-	163,5 ppm (C)	163,3 ppm (C)
4'	-	-	164,4 ppm (C)	164,4 ppm (C)
5'	7,67 ppm (1H; d; 5,2 Hz)	7,70 ppm (1H; d; 5,2 Hz)	105,7 ppm (CH)	105,6 ppm (CH)
6'	8,43 ppm (1H; d; 5,2 Hz)	8,45 ppm (1H; d; 5,2 Hz)	159,2 ppm (CH)	159,0 ppm (CH)
10	7,06 ppm (2H; s)	7,09 ppm (2H; s)	-	-

Este alcalóide já foi encontrado em três espécies da família Annonaceae, *Annona purpurea*²⁷, *Annona montana*⁴⁴, *Annona foetida*²⁶ e agora *Annona dioica*. Entretanto, em função das espécies que a literatura relata como portadoras deste alcalóide observa-se que sua ocorrência se limita, até o momento, ao gênero *Annona*, o que mostra a relevância deste alcalóide para quimiotaxinomia do gênero e também da família, uma vez que não há relatos deste alcalóide em outras famílias.

A estrutura deste composto possui semelhança com duas unidades bem conhecidas, uma é a do aminoácido triptofano, precursor dos alcalóides de núcleo β -carbolínicos, como mostrado na Figura 11, e a outra porção é semelhante à base nitrogenada uracila, da qual pode ser proveniente. Uma proposta de biossíntese é apresentada na Figura 39.

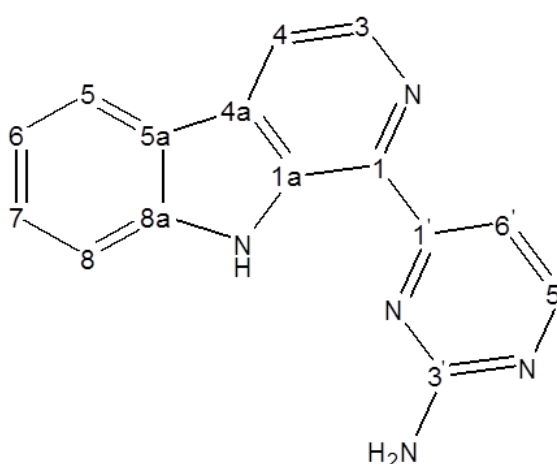


Figura 38: Estrutura da *Substância 3*, a *Anomontina*, um alcalóide pirimidínico- β -carbolínico.

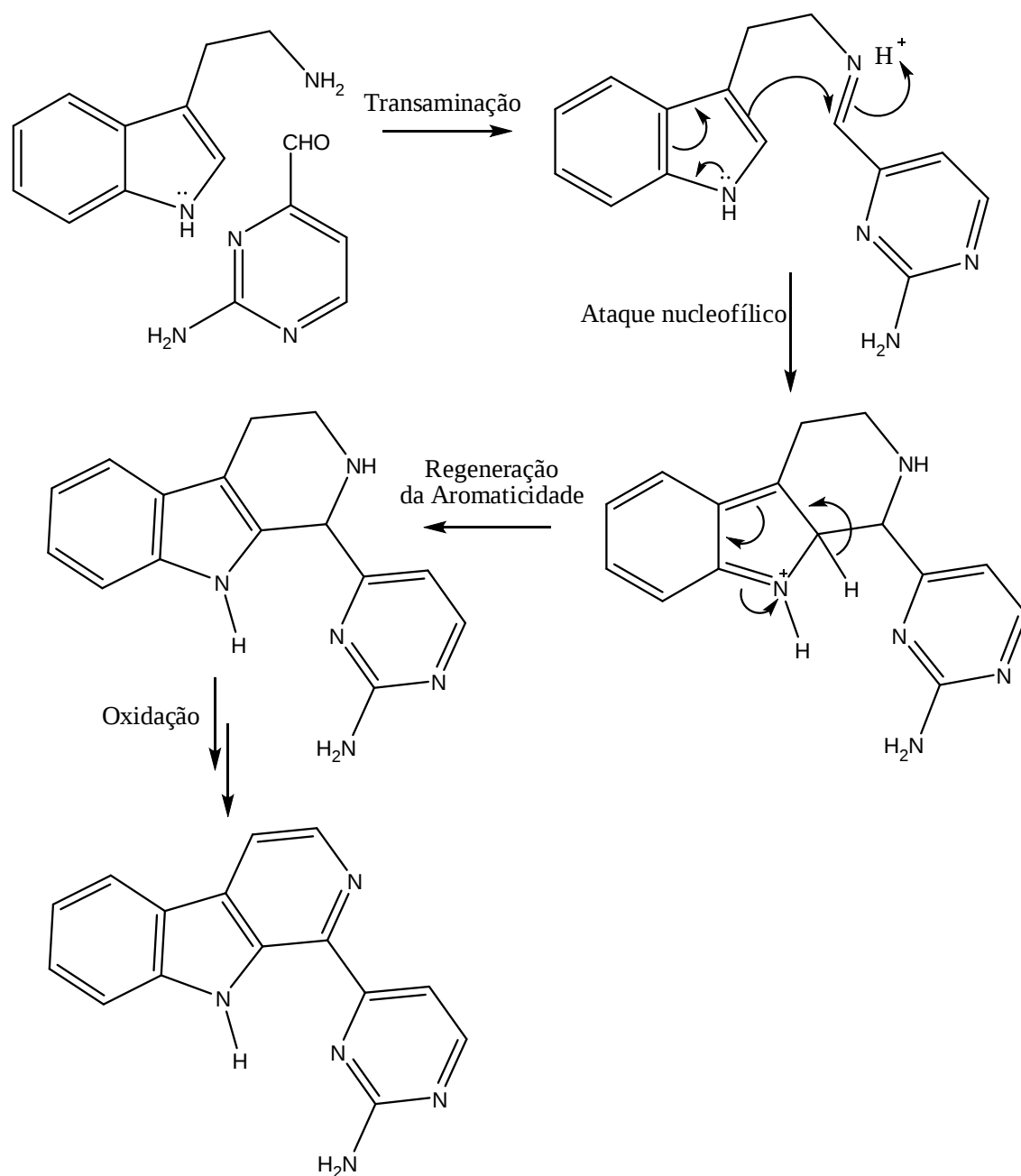


Figura 39: Proposta de biossíntese para a substância 2, Anomontina.

4.3 Estudo fitoquímico do extrato diclorometânico

4.3.1 Elucidação estrutural

4.3.1.1 Caracterização da substância 3

Os dados espectrais de RMN de ^1H da substância 3 mostram a presença de três simpletos, em 3,70 ppm, 3,77 ppm e 3,80 ppm, sendo que o sinal em 3,77 ppm apresentou o dobro da integração dos demais indicando a existência de dois hidrogênios equivalentes, com integração proporcional a 3, 6 e 3 hidrogênios, respectivamente (Figura 41). Simpletos, nesta faixa de deslocamento químico são característicos de hidrogênios ligados a carbonos oxigenados, logo são quatro metoxilas sendo duas com o mesmo valor de deslocamento químico. Também foram observados três sinais acima de 6 ppm: 6,23 ppm (s), 6,78 ppm (d, $J = 8,4$ Hz) e 7,03 ppm (d, $J = 8,4$ Hz) (Tabela 11).

A integração da área de cada sinal mostrou uma proporção de dois hidrogênios para os sinais em dupletos (7,03 e 6,78 ppm) e um hidrogênio para o simpleto (6,23 ppm). A constante de acoplamento evidencia uma relação do tipo *orto* entre os hidrogênios referentes aos dupletos (7,03 e 6,78 ppm) e a integração para dois hidrogênios em cada sinal denota uma equivalência entre os dois hidrogênios de cada sinal em um sistema AABB.

Tabela 11: Dados de RMN de ^1H da substância 3, adquiridos em CDCl_3 . Os valores (*) podem estar trocados.

Substância 3	
	Valores de deslocamento químicos de ^1H .
3b	2,88 ppm (1H; <i>dddd</i> ; 12,3 Hz, 9,4 Hz, 3,6 Hz e 2,8 ppm)
3 α	5,01 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 9,4 Hz, 5,9 Hz e 1,5 Hz)
4 β	3,34 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 13,2 Hz, 5,9 Hz e 3,6 Hz)
4 α	3,21 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 13,2 Hz, 12,3 Hz e 1,5 Hz)
8	6,22 ppm (1H; s)
$\alpha\alpha$	2,37 ppm (1H; <i>dd</i> ; 17,1 Hz e 2,8 Hz)
$\alpha\beta$	2,88 ppm (1H; <i>dd</i> ; 17,1 Hz e 2,8 Hz)
2' e 6'	7,03 ppm (2H; <i>d</i> ; 8,4 Hz)
3' e 5'	6,77 ppm (2H; <i>d</i> ; 8,4 Hz)
5 _m e 7 _m	3,76 ppm (6H; s)*
6 _m	3,80 ppm (3H; s)*
4' _m	3,70 ppm (3H; s)*

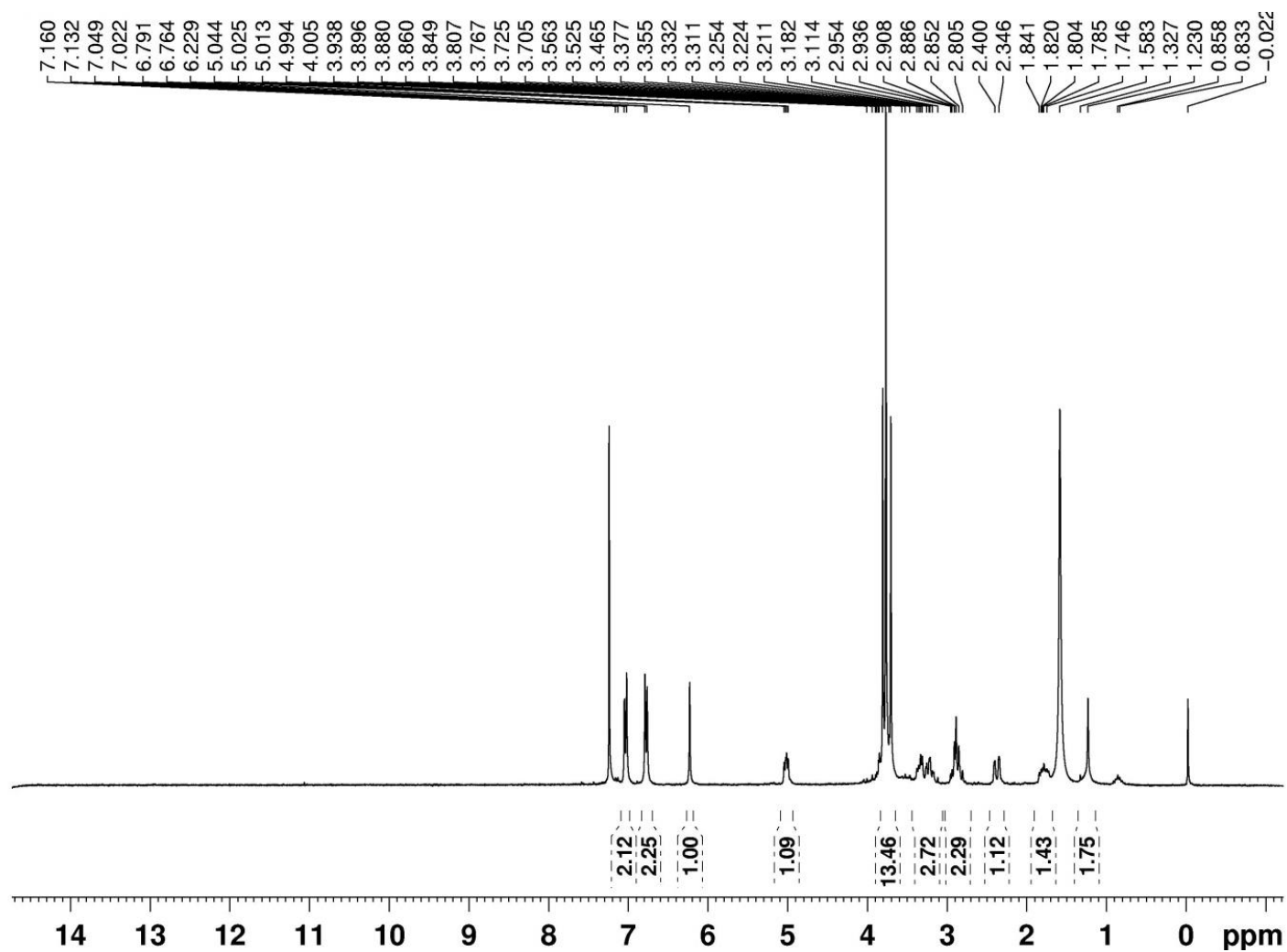


Figura 40: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 3, em CDCl_3 .

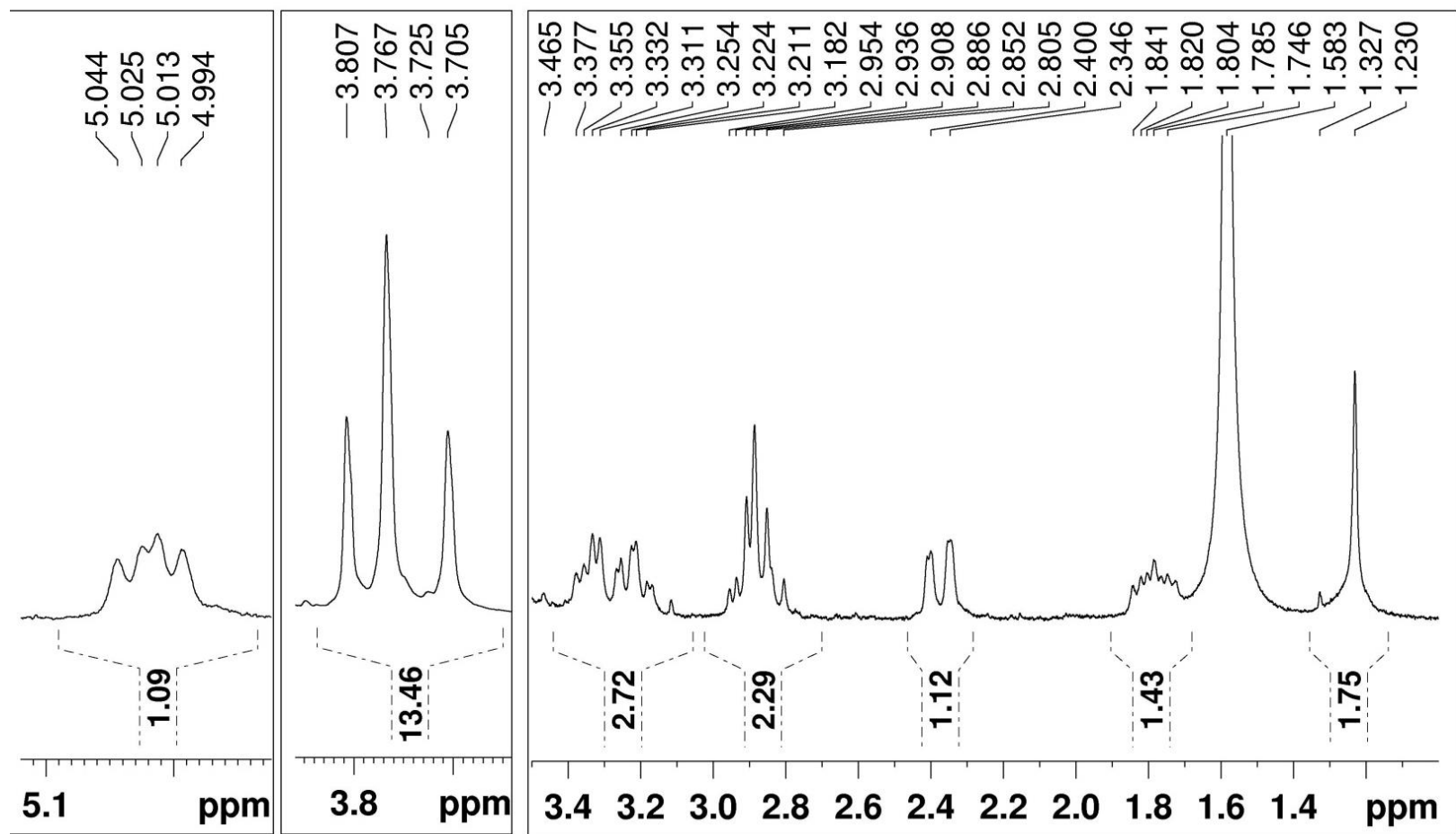


Figura 41: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 3, em CDCl_3 , expansão 1.

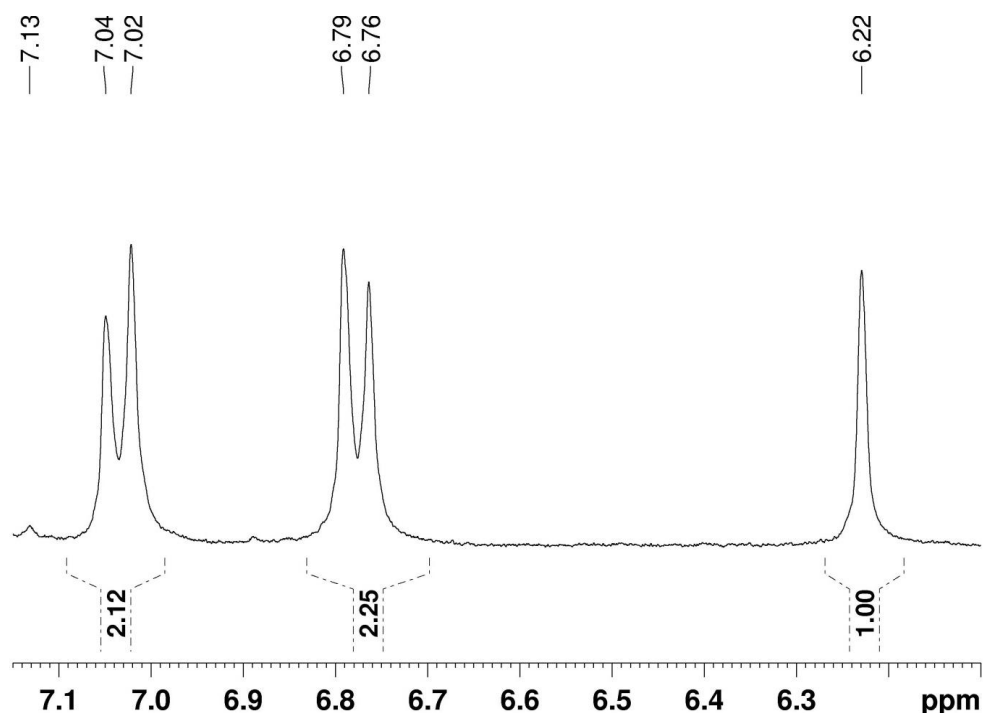


Figura 42: Espectro de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 3, em CDCl_3 , expansão 2.

O espectro de ^{13}C apresentou sinais para 20 carbonos (Figura 45), sendo 4 CH_3 , 3 CH_2 , 5 CH e 8 C , observados com auxílio do experimento DEPT 135° (Figura 46 à 48). A presença de dois sinais, referentes a CH , muito intensos em 130,85 e 113,76 ppm, em conjunto com os dupletos em 7,03 e 6,78 ppm no espectro de RMN de hidrogênio, mais dois sinais de carbonos tetrassubstituídos, um em 130,85 ppm e outro em 158,22 ppm (carbono aromático ligado a O), levaram à identificação de um anel aromático 1,4-dissubstituído.

Outros 6 sinais foram observados na região entre 130 e 160 ppm indicando a presença de outro anel aromático (Figura 48). Esses dados aliados à presença de 3 CH_2 e um C (164 ppm), os dados já descritos por RMN de ^1H e a presença do íon pseudomolecular de $m/z = 358$, compatível com a fórmula molecular $\text{C}_{20}\text{H}_{23}\text{NO}_5$ (Figura 43), levaram a identificação de um alcalóide do tipo N-óxido-benzil-diidroisoquinolínico, inédito (Figura 44). Com base na

biossíntese dos núcleos tetrahydroisoquinolínicos, como mostra a Figura 9, foi elaborada uma proposta para a biossíntese da substância 3, descrita na Figura 49.

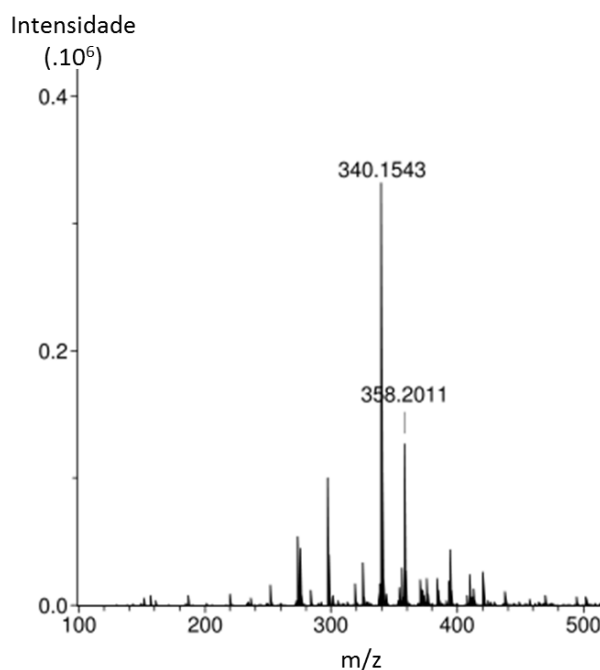


Figura 43: Espectro de massas de alta resolução (Eletrospray) da substância 3, obtido no modo positivo.

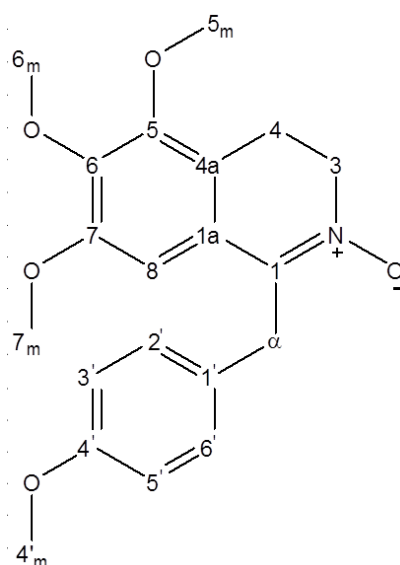


Figura 44: Estrutura da Substância 3, alcalóide N-óxido-benzil-diidroisoquinolínico.

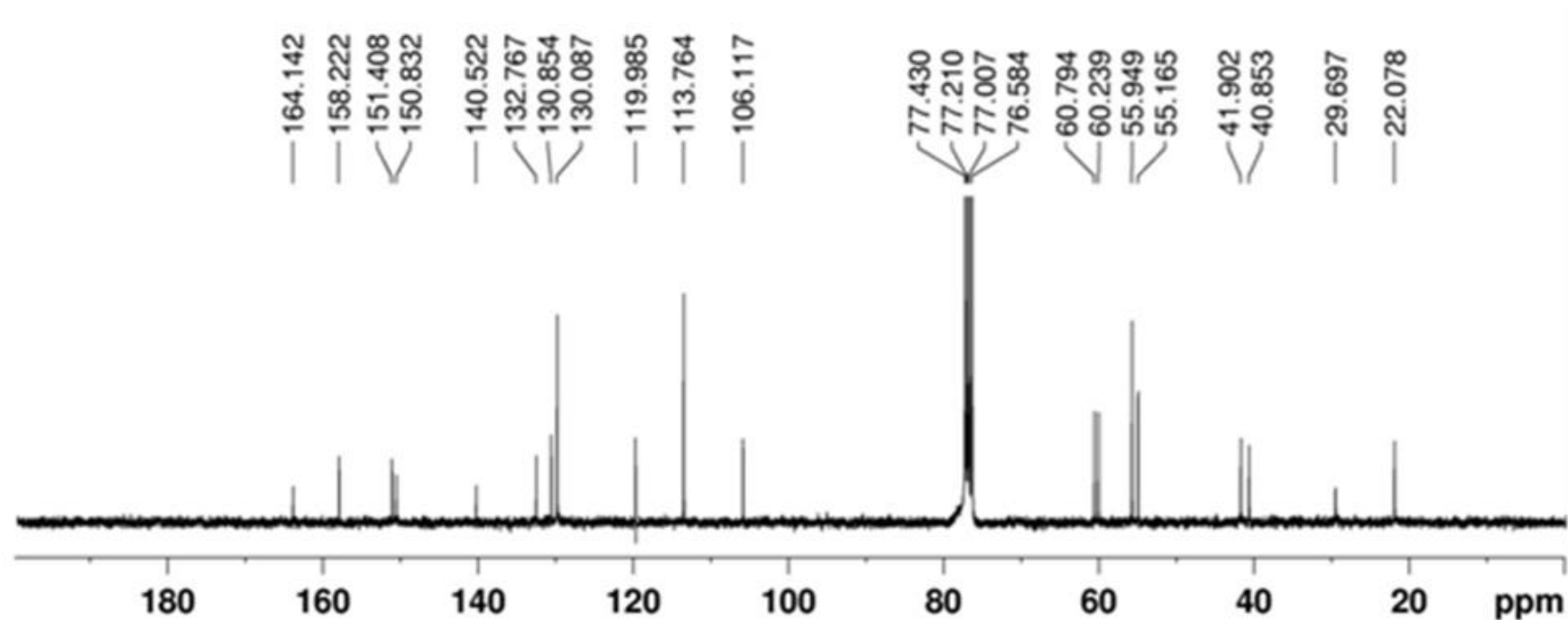


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C da substância 3, em CDCl_3 .

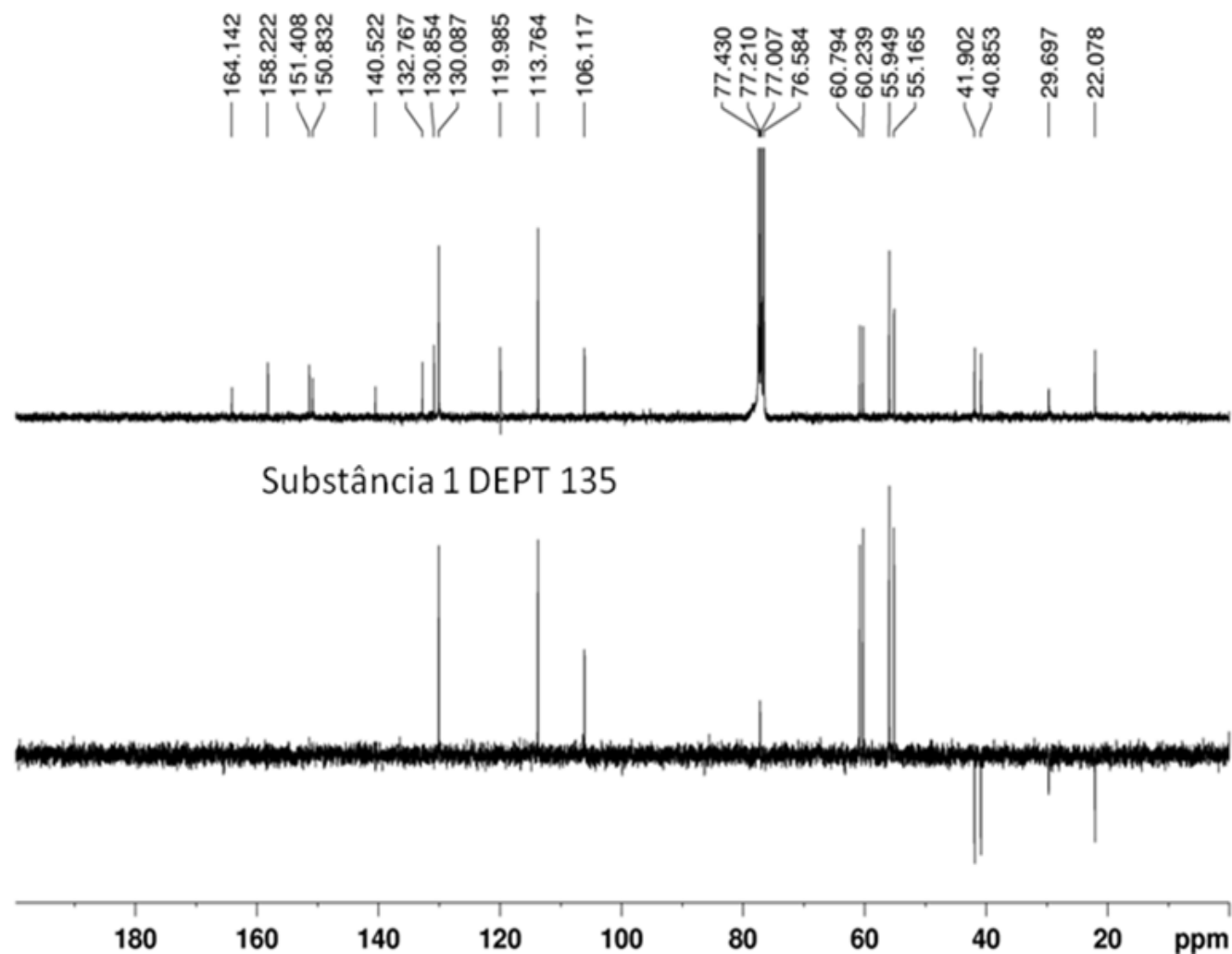


Figura 46: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT da substância 3, em CDCl_3 .

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

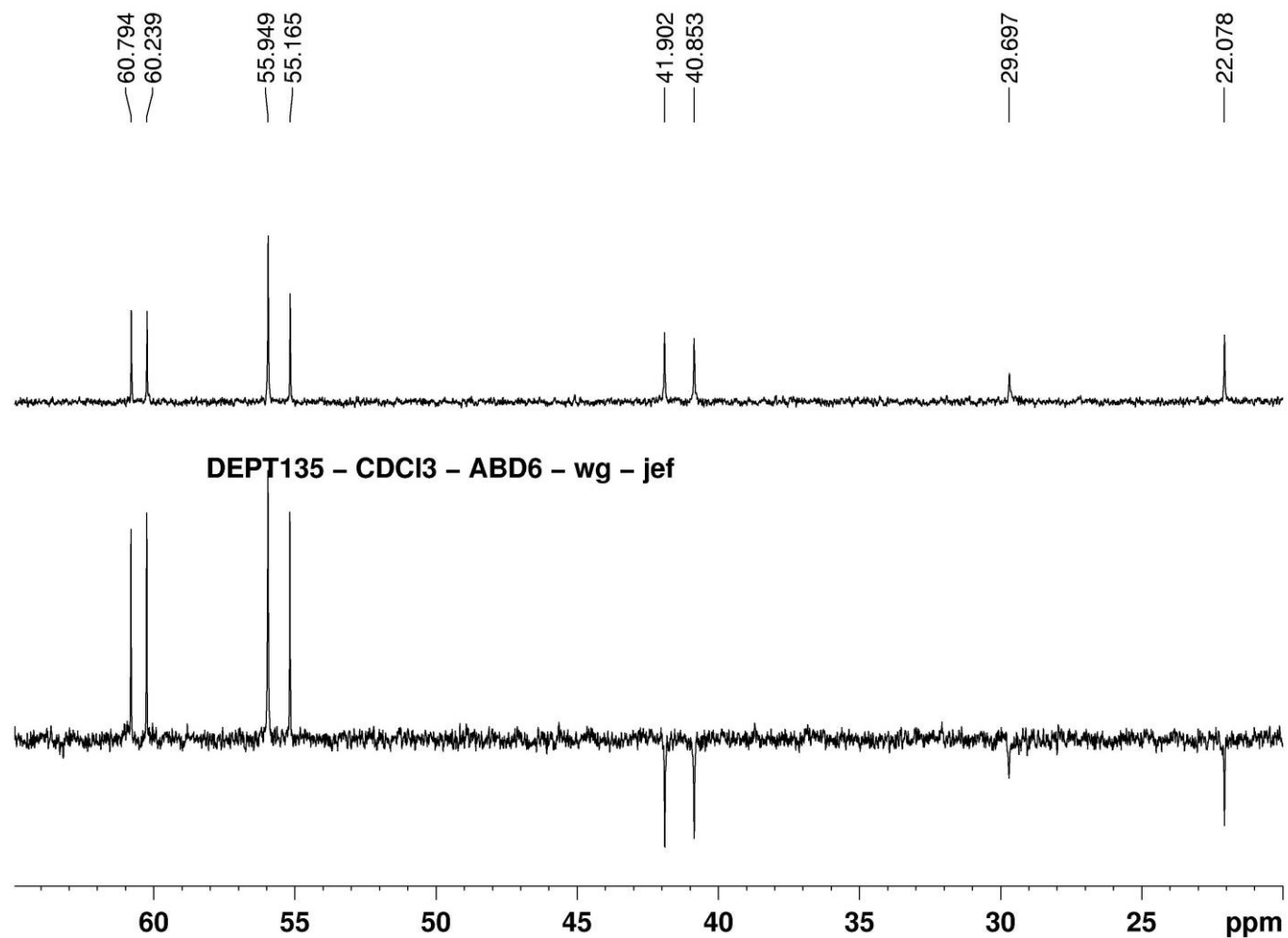


Figura 47: Espectro de RMN de ^{13}C e DEPT da substância 3, em CDCl_3 , expansão 1.

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

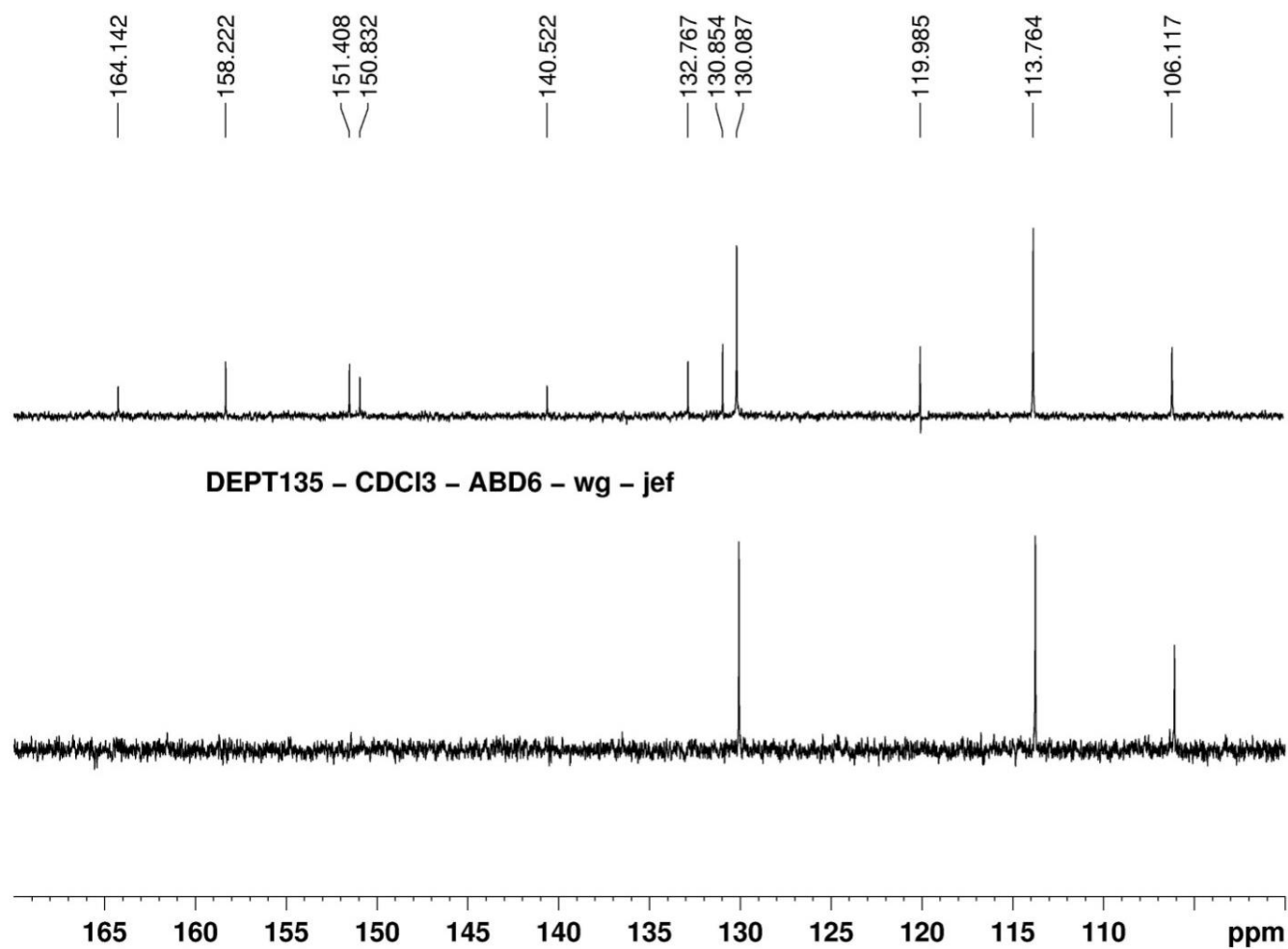


Figura 48: Espectro de RMN de ¹³C e DEPT da substância 3, em CDCl₃, expansão 2.

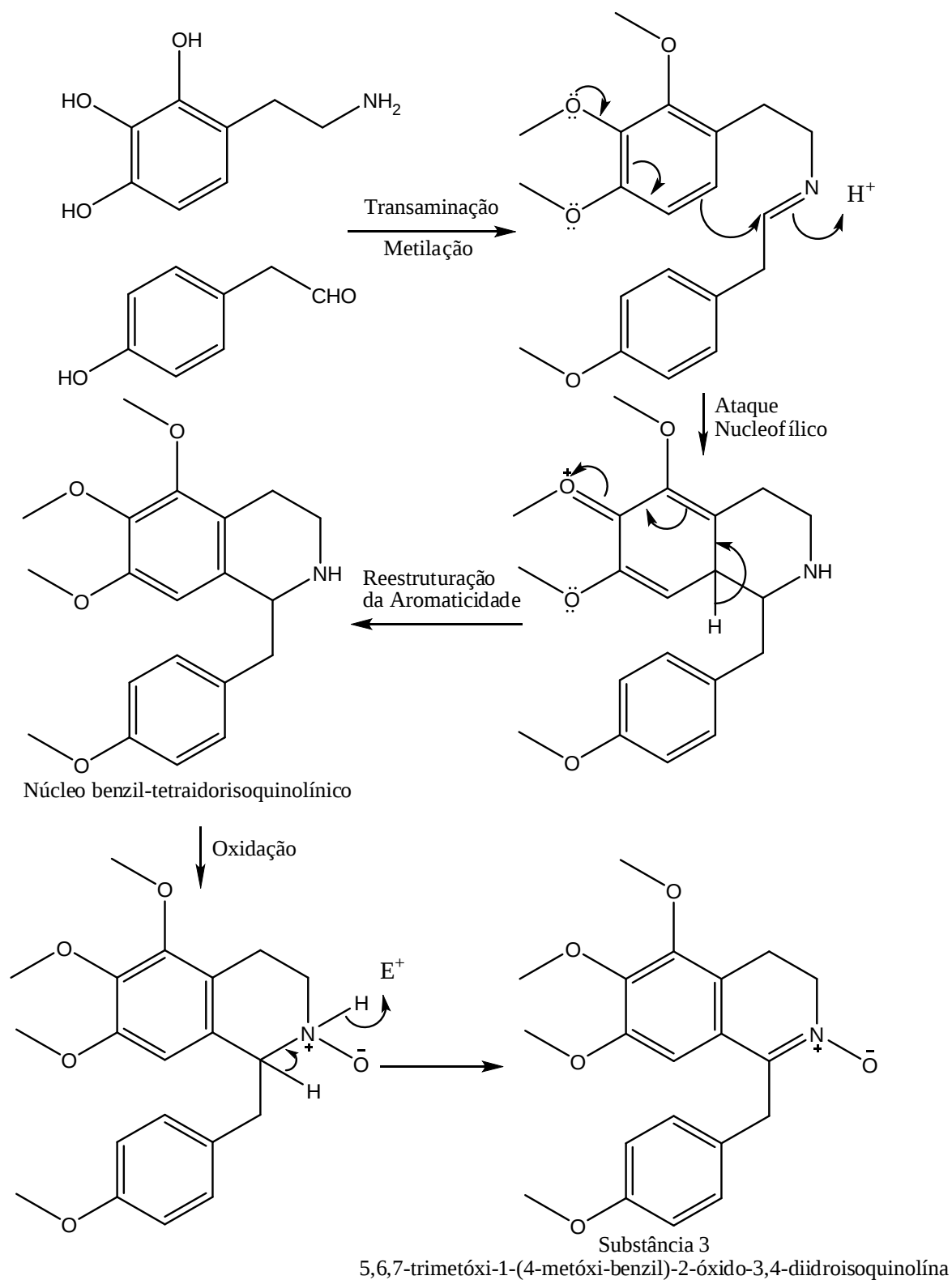


Figura 49: Proposta de biossíntese para a substância 3, alcalóide N-óxido-benzil-diidroisoquinolínico inédito.

4.3.1.2 Caracterização da substância 4

No espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , desta substância (Figura 52), podemos observar a presença de dois dupletos em 6,98 ppm (2H) e 6,78 ppm (2H), acoplando com $J = 8,1$ Hz, característico de um sistema aromático *p*-substituído. Outros 5 simpletos podem ser observados, em 3,82 ppm (6H), 3,75 ppm (3H), 3,52 ppm (3H) referentes a quatro metoxilas, sendo que duas apresentaram o mesmo valor de deslocamento químico (3,82 ppm) e um em 2,48 ppm (3H) valor relativamente baixo para metoxila ($\delta \approx 3,5$ ppm) e muito alto para metila ($\delta < 2$ ppm), indicando a possibilidade de um grupo N-CH_3 , o qual apresenta deslocamento nesta faixa. Também pode ser observado um simpleto em 5,84 ppm, proporcional a um hidrogênio.

Os sinais descritos acima indicam a presença de um alcalóide de núcleo benzil-tetrahidroisoquinolínico, com o anel A pentassubstituído, apresentando apenas um hidrogênio (5,84 ppm) na forma de simpleto e dois dupletos em 6,98 ppm e 6,78 ppm, proporcionais a dois hidrogênios cada, com acoplamento do tipo *orto*, indicando a presença de um grupo benzil.

Os sinais dos hidrogênios metilênicos e metínicos, ficaram sobrepostos no experimento de RMN ^1H em CDCl_3 , impossibilitando a definição dos padrões de acoplamento entre os mesmos, pela análise do experimento 1D.

Para contornar esse problema, oriundo da sobreposição de alguns sinais, uma alternativa foi a mudança do solvente, de CDCl_3 para Piridina- d_6 . Essa mudança foi o suficiente para identificar todos os padrões de acoplamento entre os prótons.

Dois hidrogênios ficaram sobrepostos, no entanto, mesmo com essa sobreposição, foi possível, em comparação com os demais sinais, observar qual o padrão que eles apresentavam. A troca do solvente provocou dois efeitos, uma pequena mudança nos deslocamentos químicos dos hidrogênios e uma melhora significativa na resolução dos sinais (Figura 50 e 52).

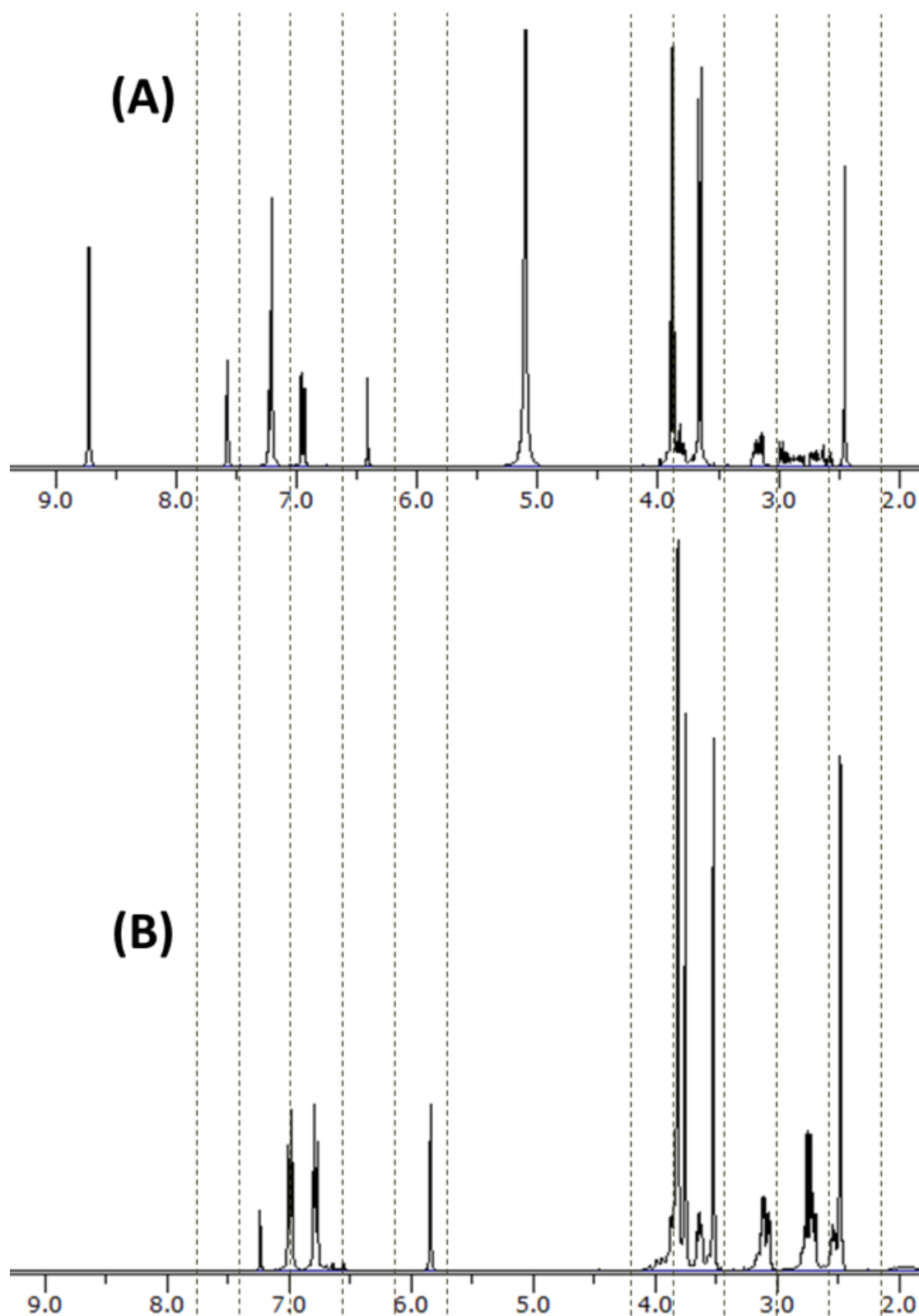


Figura 50: Espectros de RMN de ^1H da substância 4, em Piridina- d_6 (A) e CDCl_3 (B).

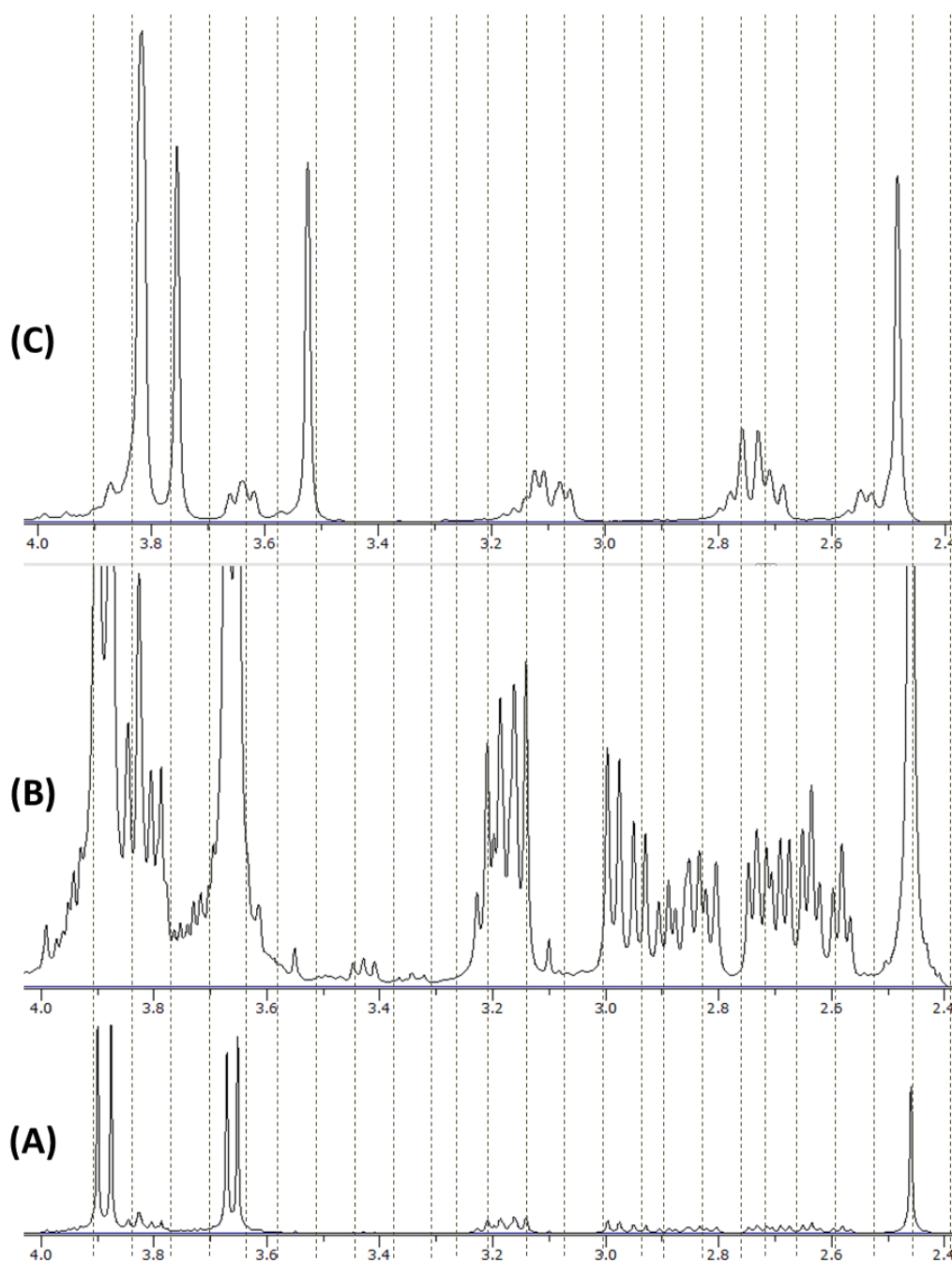


Figura 51: Expansão dos espectros de RMN de ^1H da substância 4, em Piridina- d_6 (A) e (B), em CDCl_3 (C).

Com resultado do espectro de RMN de ^1H em Piridina- d_6 , podemos observar a presença de um duplo duplete em 3,82 ppm, referente ao H-1, acoplando com outros dois hidrogênios metilênicos, H- α_α (2,96 ppm) e H- α_β (3,17 ppm) com $J = 6,3$ e $6,6$ Hz, respectivamente. Estes, por sua vez, são pró-quirais e apresentaram constante de acoplamento geminal de 14,0 Hz.

Os acoplamentos de 6,6 e 6,3 Hz (entre o H-1 e os H α), valores típicos de acoplamentos vicinais, indicam que os dois hidrogênios α estão dispostos de forma equivalente, com relação ao ângulo diedro, em relação ao H-1. Isso pode ser observado pelo fato de que as constantes de acoplamento entre H-1 $\rightarrow$ H- α_α e H-1 $\rightarrow$ H- α_β , tiveram valores semelhantes.

Os outros dois grupos metilênicos também apresentam constantes de acoplamento geminais, de 12,1 e 16,2 Hz, para os H-3 e H-4, respectivamente.

Um acoplamento de 8,9 Hz, típico de acoplamento *axial-axial*, em sistemas de rotação impedida, pode ser observado entre H-3 β e o H-4 α . O H-3 α ainda apresenta dois acoplamentos, típicos de relação *equatorial-equatorial*; *equatorial-axial* com H-4 β e H-4 α , de 4,1 e 5,4 Hz, respectivamente.

O acoplamento, de 5,1 Hz, observado entre H-3 β e H-4 β , também é típico de acoplamento *axial-equatorial* (Tabela 12).

Tabela 12: Dados de RMN de ^1H (300 MHz) da substância 4, adquiridos em Piridina-d₆.

Substância 4	
	^1H
1	3,82 ppm (1H; <i>dd</i> ; 6,6 Hz e 6,3 Hz)
3 $\square$	3,18 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 12,1 Hz, 8,9 Hz e 5,1 Hz)
3 α	2,71 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 12,1 Hz, 5,4 Hz e 4,1 Hz)
4 $\square$	2,61 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 16,2 Hz, 5,1 Hz e 4,1 Hz)
4 α	2,86 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 16,2 Hz, 8,9 Hz e 5,4 Hz)
8	6,41 ppm (1H; <i>s</i>)
α_α	2,96 ppm (1H; <i>dd</i> ; 14,0 Hz e 6,3 Hz)
$\alpha_\square$	3,17 ppm (1H; <i>dd</i> ; 14,0 Hz e 6,6 Hz)
2' e 6'	7,22 ppm (2H; <i>d'</i> ; 8,6 Hz)
3' e 5'	6,95 ppm (2H; <i>d'</i> ; 8,6 Hz)
5 _m	3,86 ppm (3H; <i>s</i>)
6 _m	3,65 ppm (3H; <i>s</i>)
7 _m	3,89 ppm (3H; <i>s</i>)
4' _m	3,67 ppm (3H; <i>s</i>)
2 _m	2,65 ppm (3H; <i>s</i>)

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

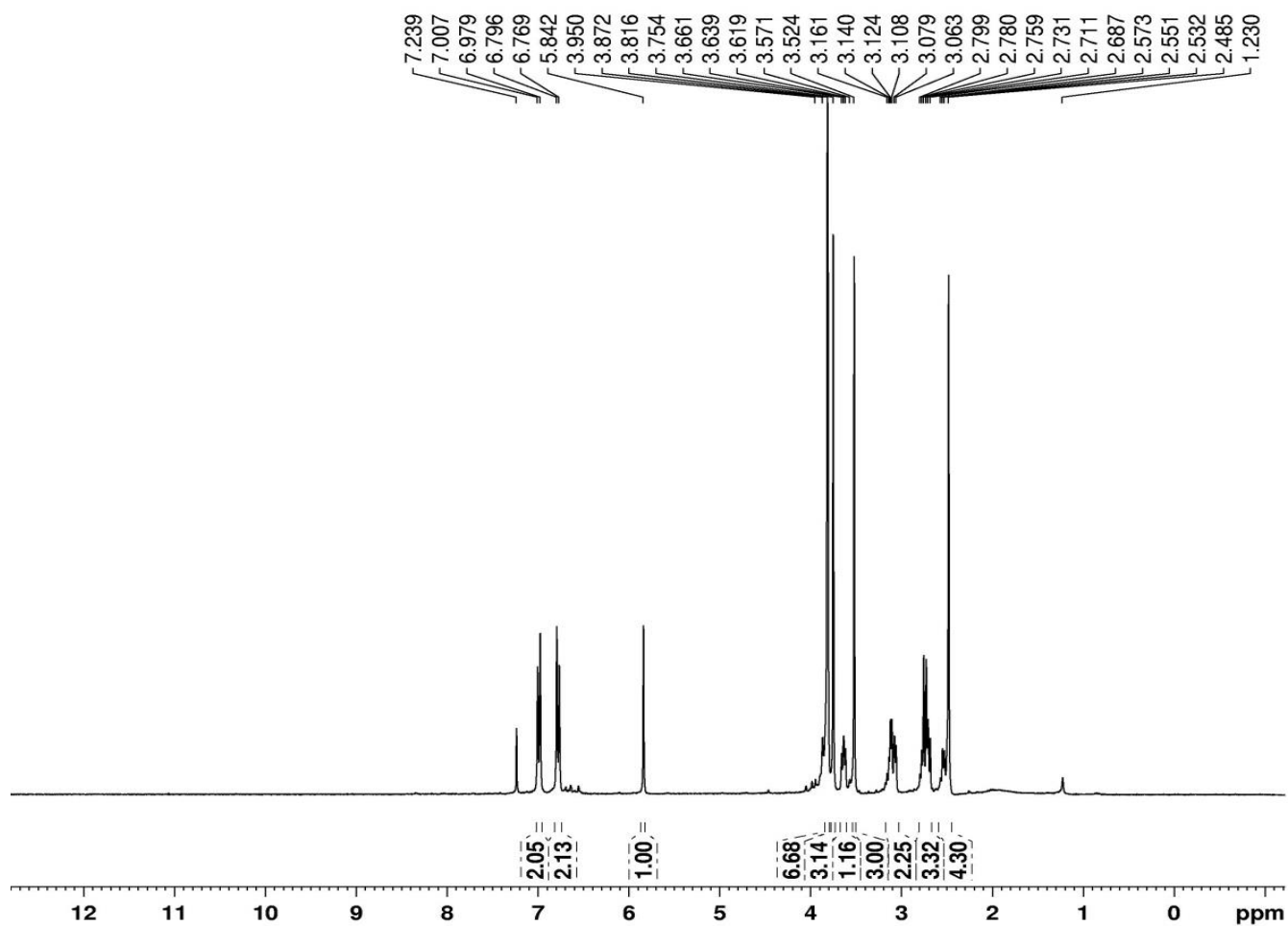


Figura 52: Espectro de RMN^1H (300 MHz) da Substância 4, em CDCl_3 .

No espectro de RMN de ^{13}C da Substância 4 (Figura 54), foram observados 19 sinais, referentes a 21 carbonos. Através da análise do experimento DEPT 135° podemos distinguir os 21 sinais como sendo, 3 carbonos metilênicos, 5 carbonos metílicos e 6 metínicos (Figura 55 e 56). Sete sinais de carbonos aromático, sendo três terciários oxigenados, 150,6 ppm (C-5), 150,7 ppm (C-7), 120,0 ppm (C-6), outros dois em 132,9 ppm (C-1a) e 132,0 ppm (C-4a) e um metínico em 107,0 ppm (C-8), foram observados. Esses sinais, em conjunto com as 3 metoxilas, duas em 55 ppm e a outra em 60 ppm, formam um sistema aromático frequentemente observado em alcalóides de núcleo benzil-tetrahydroisoquinolínicos de anonáceas.

A presença de um grupo benzil *para*-dissubstituído pode ser observada em função dos dois sinais de carbonos metínicos aromáticos, em 113,5 ppm (C-3' e C-5') e 130,6 ppm (C-2' e C-6'). O sinal em 157,9 ppm (C-4') é referente ao carbono aromático tetrassubstituído com uma metoxila, ratificando o padrão observado no espectro de RMN de ^1H descrito anteriormente.

Um sinal de metila (C-2_m) em 42,5 ppm, valor abaixo do esperado para carbonos metílicos oxigenados e acima do esperado para metilas primárias, o que indica a presença de um grupo N-CH₃. O sinal no espectro de RMN de ^1H , em CDCl₃, em 2,4 ppm (H-2_m), com integração proporcional a 3 H corrobora com a presença deste grupo.

Os dados de RMN de ^1H e ^{13}C (Tabela 13) mostram que a Substância 4, é um alcalóide de núcleo benzil-tetrahydroisoquinolínico, inédito na literatura (Figura 56).

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Tabela 13: Dados de RMN de ^1H (Piridina- d_6) e ^{13}C (CDCl_3), da Substância 4.

Substância 4		
	^1H	^{13}C
1	3,82 ppm (1H; <i>dd</i> ; 6,6 Hz e 6,3 Hz)	65,1 ppm (CH)
1a	-	133,0 ppm (C)
3 _b	3,18 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 12,1 Hz, 8,9 Hz e 5,1 Hz)	46,1 ppm (CH ₂)
3 _α	2,71 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 12,1 Hz, 5,4 Hz e 4,1 Hz)	
4 _b	2,61 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 16,2 Hz, 5,1 Hz e 4,1 Hz)	19,8 ppm (CH ₂)
4 _α	2,86 ppm (1H; <i>ddd</i> ; 16,2 Hz, 8,9 Hz e 5,4 Hz)	
4a	-	132,0 ppm (C)
5	-	150,6 ppm (C)
6	-	120,0 ppm (C)
7	-	150,7 ppm (C)
8	6,41 ppm (1H; <i>s</i>)	107,0 ppm (CH)
α _α	2,96 ppm (1H; <i>dd</i> ; 14,0 Hz e 6,3 Hz)	39,9 ppm (CH ₂)
α _b	3,17 ppm (1H; <i>dd</i> ; 14,0 Hz e 6,6 Hz)	
1'	-	140,1 ppm (C)
2' e 6'	7,22 ppm (2H; <i>d</i> ; 8,6 Hz)	130,6 ppm (CH)
3' e 5'	6,95 ppm (2H; <i>d</i> ; 8,6 Hz)	113,5 ppm (CH)
4'	-	157,9 ppm (C)
5 _m	3,86 ppm (3H; <i>s</i>)	60,4 ppm (CH ₃)
6 _m	3,65 ppm (3H; <i>s</i>)	60,8 ppm (CH ₃)
7 _m	3,89 ppm (3H; <i>s</i>)	55,2 ppm (CH ₃)
4' _m	3,67 ppm (3H; <i>s</i>)	55,5 ppm (CH ₃)
2 _m	2,65 ppm (3H; <i>s</i>)	42,5 ppm

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophillus) microplus*.

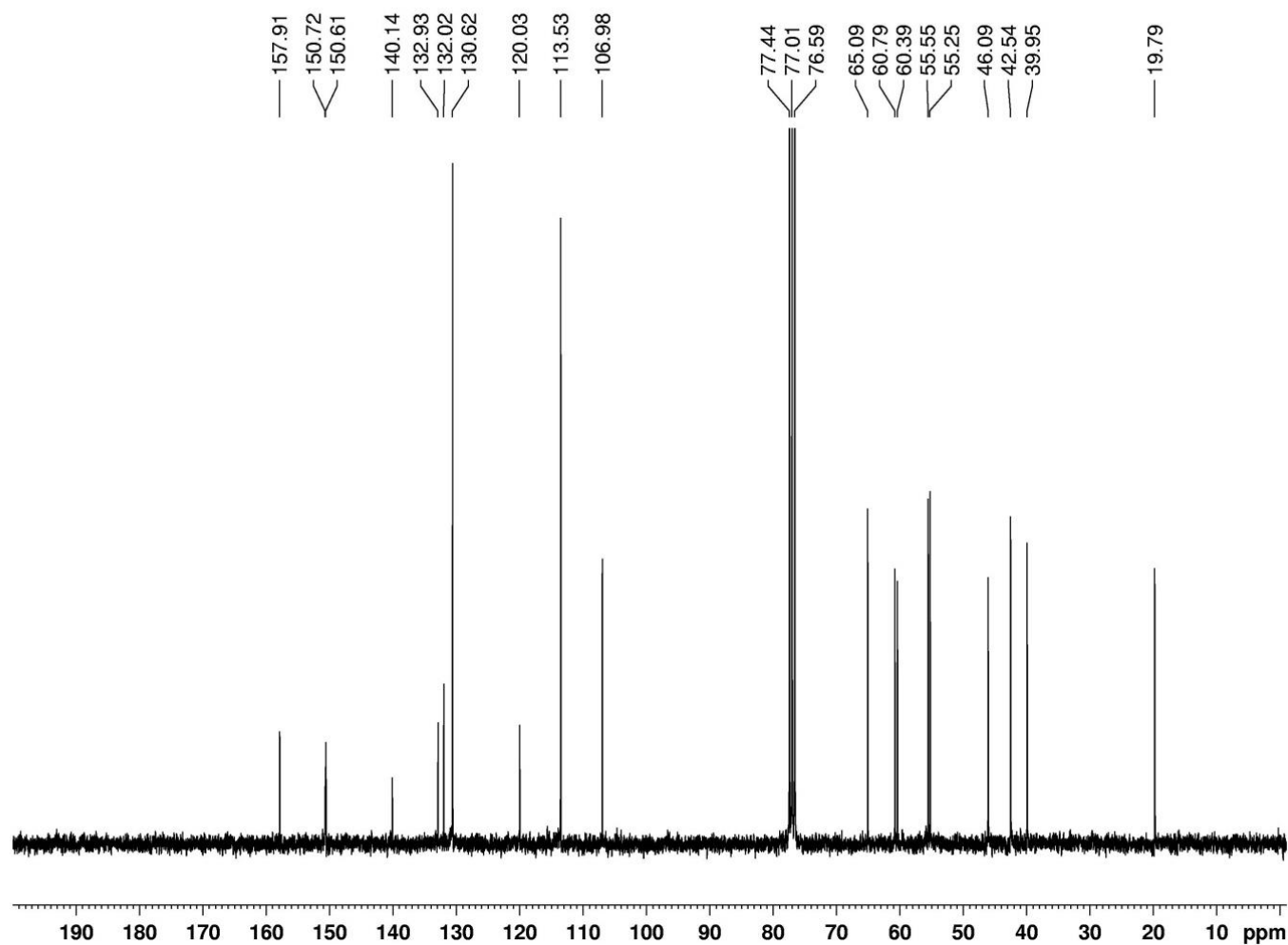


Figura 53: Espectro de RMN de ^{13}C (75 MHz) da substância 4, em CDCl_3 .

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

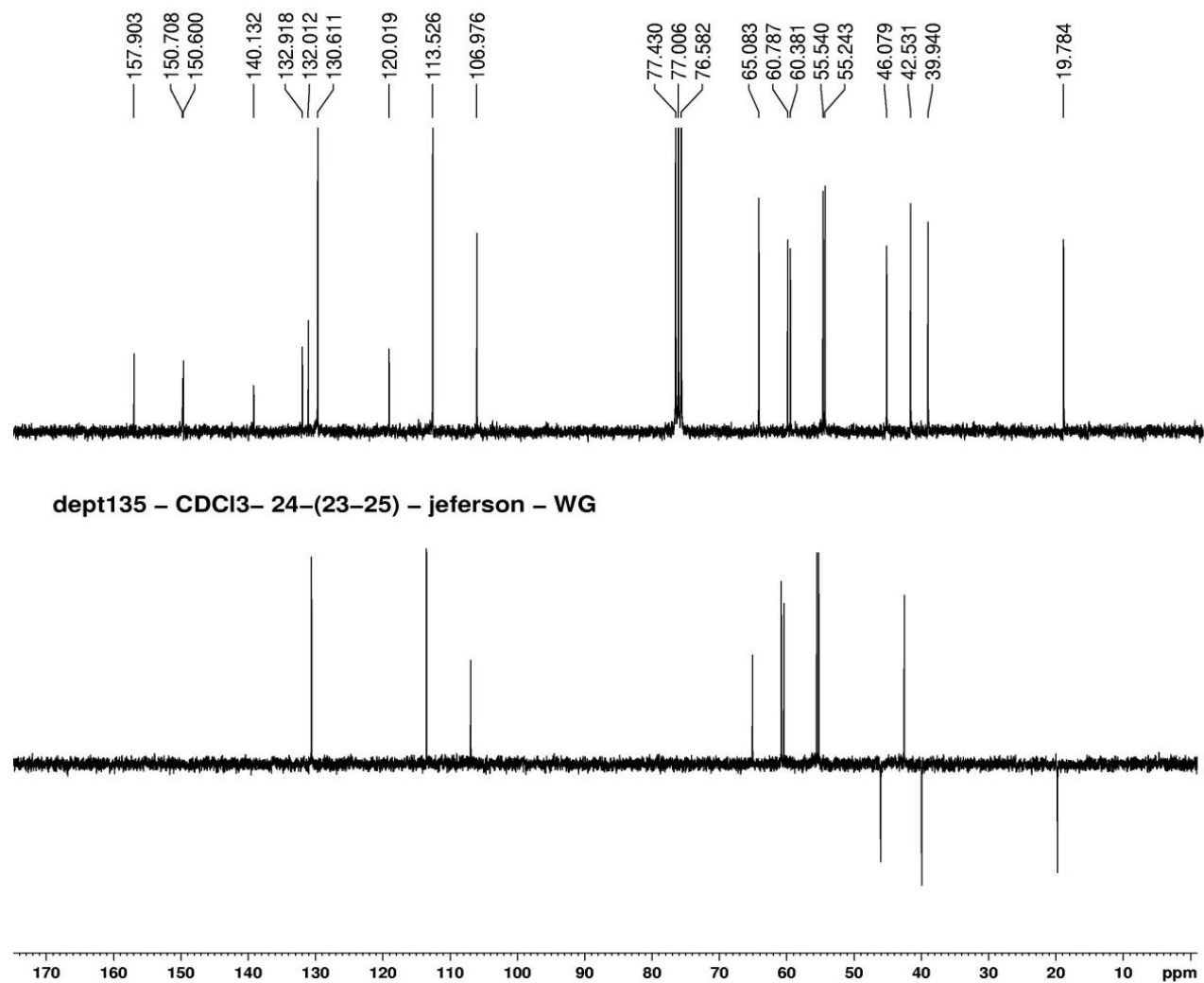


Figura 54: Espectro de RMN de DEPT 135° da substância 4, em CDCl₃.

Identificação de metabólitos de *Annona dioica* com atividade ixodicida frente ao carrapato bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

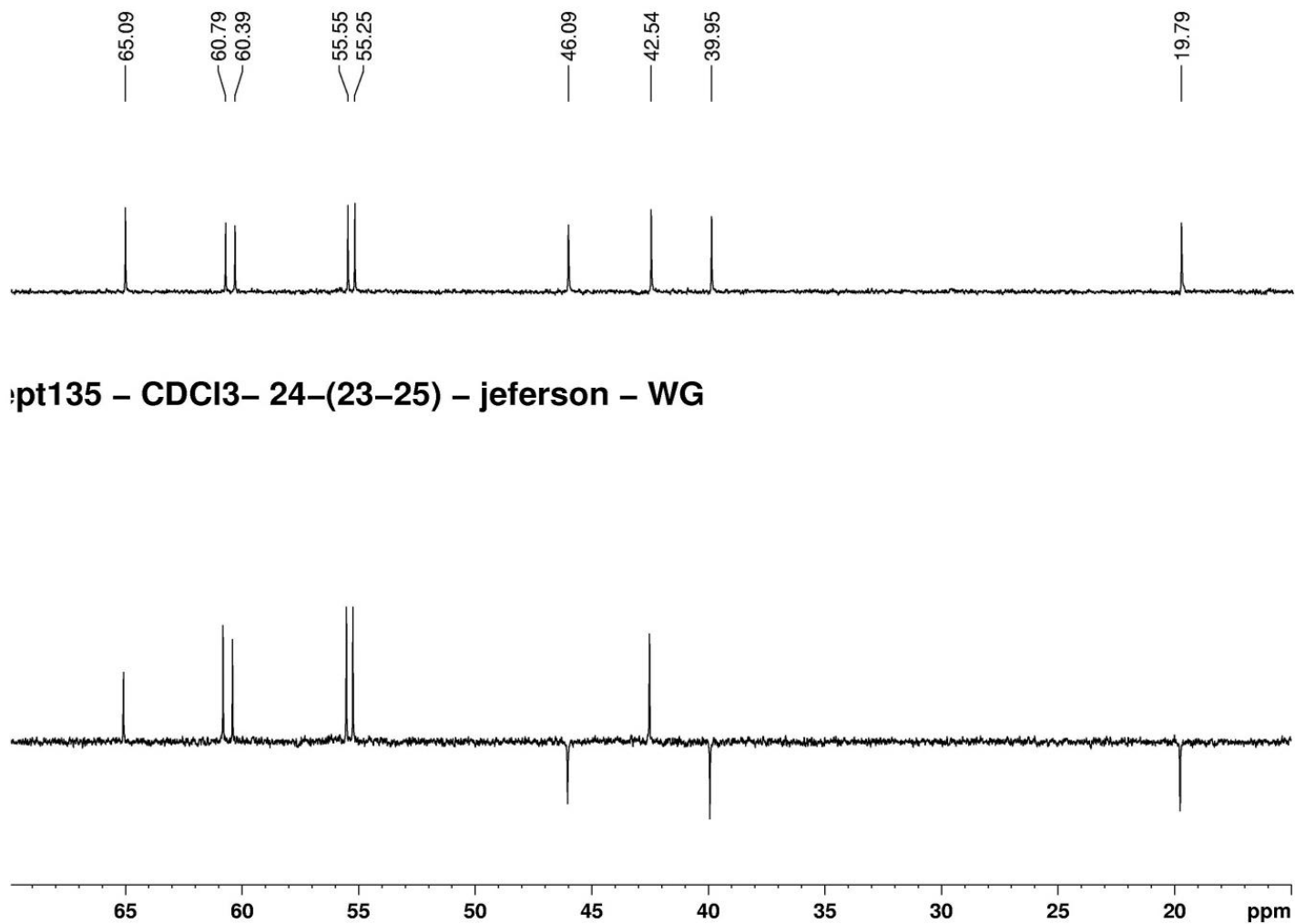


Figura 55: Expansão da Figura 61, RMN de ¹³C e DEPT 135° da substância 4, em CDCl₃.

O núcleo desta substância já é conhecido na literatura, e sua biossíntese também, entretanto não existe nenhuma proposta para este composto na literatura. A Figura 56 mostra uma proposta de biossíntese para este alcalóide.

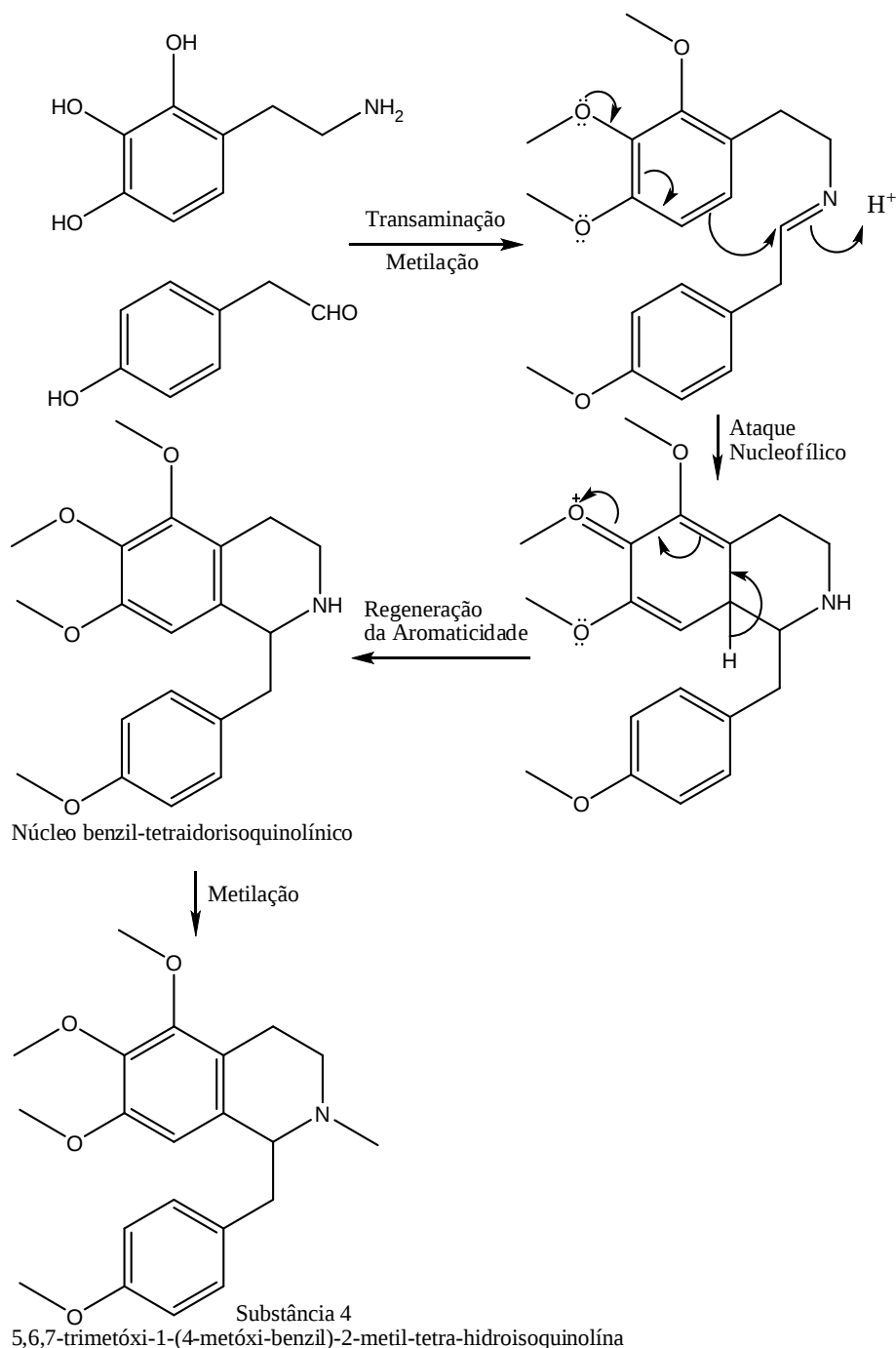


Figura 56: Proposta de biossíntese para a substância 4, alcalóide benzil-tetrahidroisoquinólico.

4.4 Acetogeninas

A ocorrência de acetogeninas pode ser identificada pela presença de alguns grupos funcionais característicos de suas estruturas, como sinais de RMN de ^{13}C de carboxilas de anéis lactônicos, que caem na região de 170 ppm, carbonos α e β -carbonílicos, que apresentam deslocamentos em torno de 130 e 150 ppm, respectivamente, CH de epóxidos, THF (tetrahydrofurano) e THP (tetrahidropirano) que caem entre 60 e 80 ppm, além da presença de CH_2 de cadeias alquílicas (Figura 58).

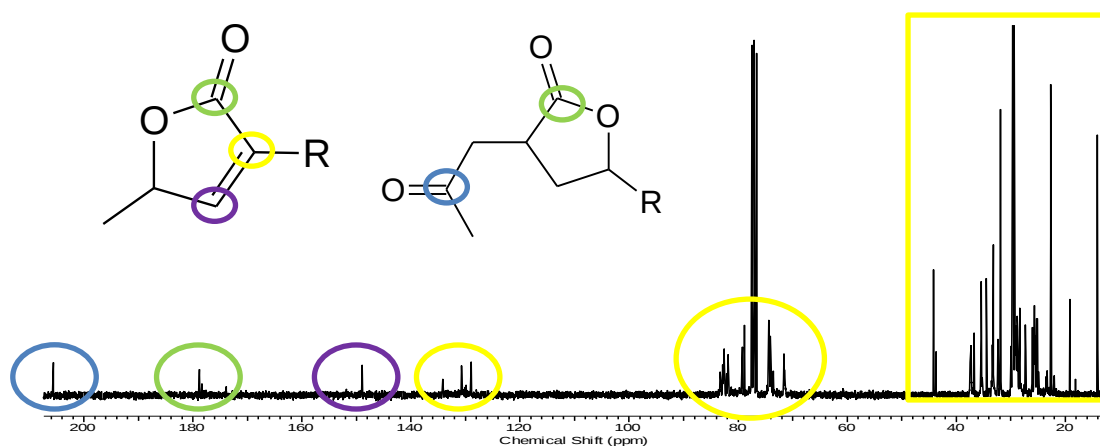


Figura 57: Espectro de RMN de ^{13}C da amostra AD-2-24-C-131-134, em CDCl_3 com uma mistura de acetogeninas, mostrando os principais grupos funcionais que existem esta classe de compostos.

Nos espectro de RMN de ^1H (Figura 59) os principais grupos de prótons que podem ser observados são dos hidrogênios beta carbonílicos, do anel lactônicos, que aparecem próximos de 7 ppm, a presença de um duplete entre 1,0 e 1,5 ppm dos hidrogênios da metila 35 ou 37. Também é comum a presença de vários multipletos dos CH oxigenados e de hidrogênios de hidroxilas. Nas acetogeninas que não possuem o grupo lactônico com a insaturação entre o carbono 2 e 33/35 é comum a presença de um singlete referente aos hidrogênios da metila 35 ou 37, acima de 2 ppm.

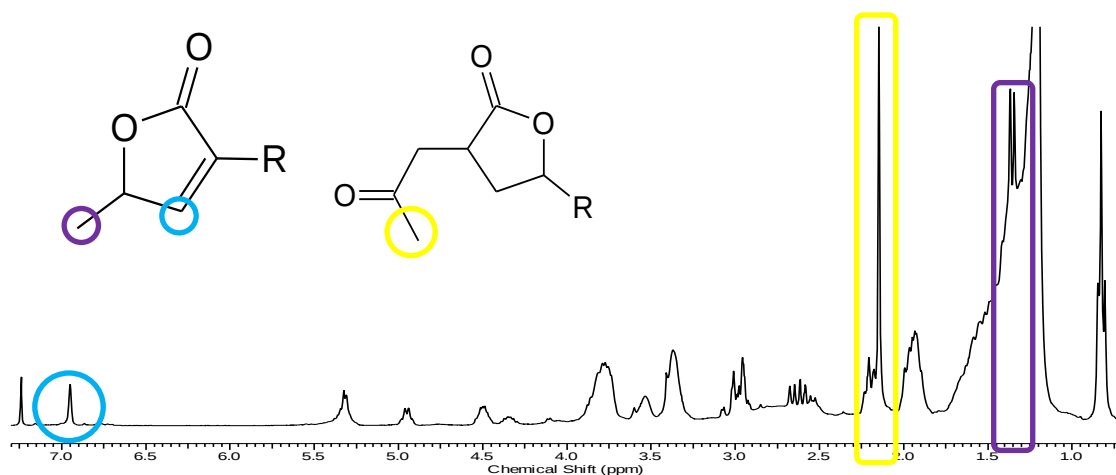


Figura 58: Espectro de RMN de ^1H da amostra AD-2-24-C-131-135°, em CDCl_3 com uma mistura de acetogeninas, com os principais grupos funcionais que existem esta classe de compostos.

As acetogeninas foram identificadas na fração de maior atividade do extrato diclorometânico (Figuras 64 e 65) e nas duas amostras de maior atividade da fase acetato de etila (AD-3-AE-B E AD-3-AE-C), como observado nos espectros das Figuras 60 e 61.

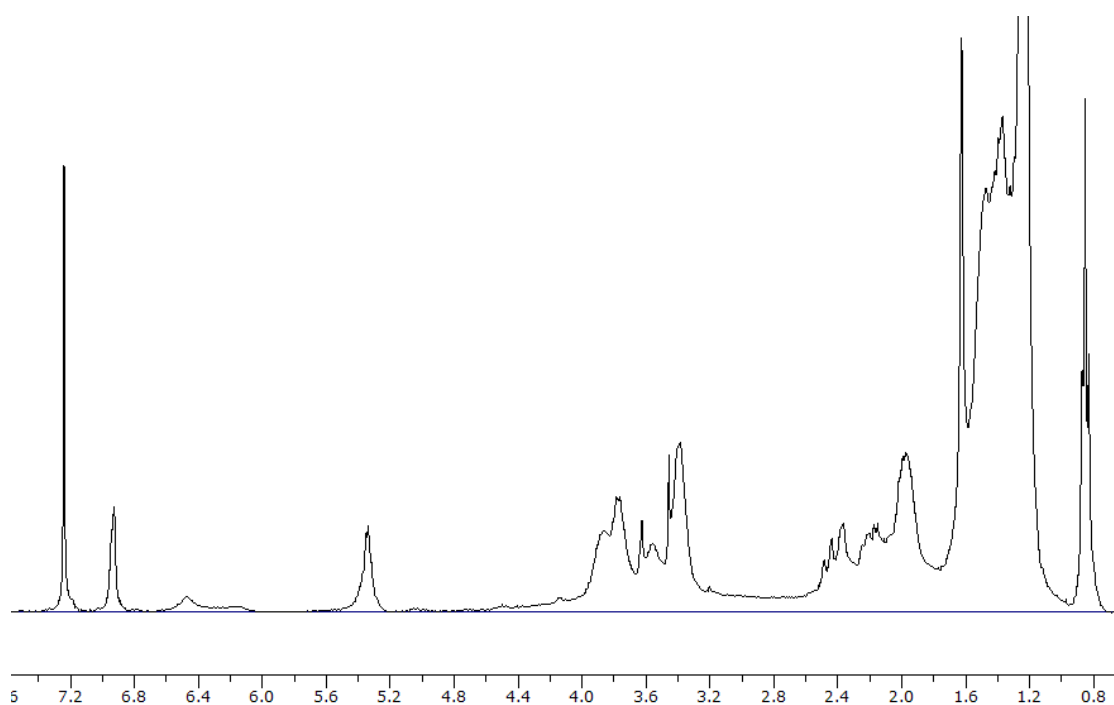


Figura 59: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da amostra AD-3-AE-B-B-37.

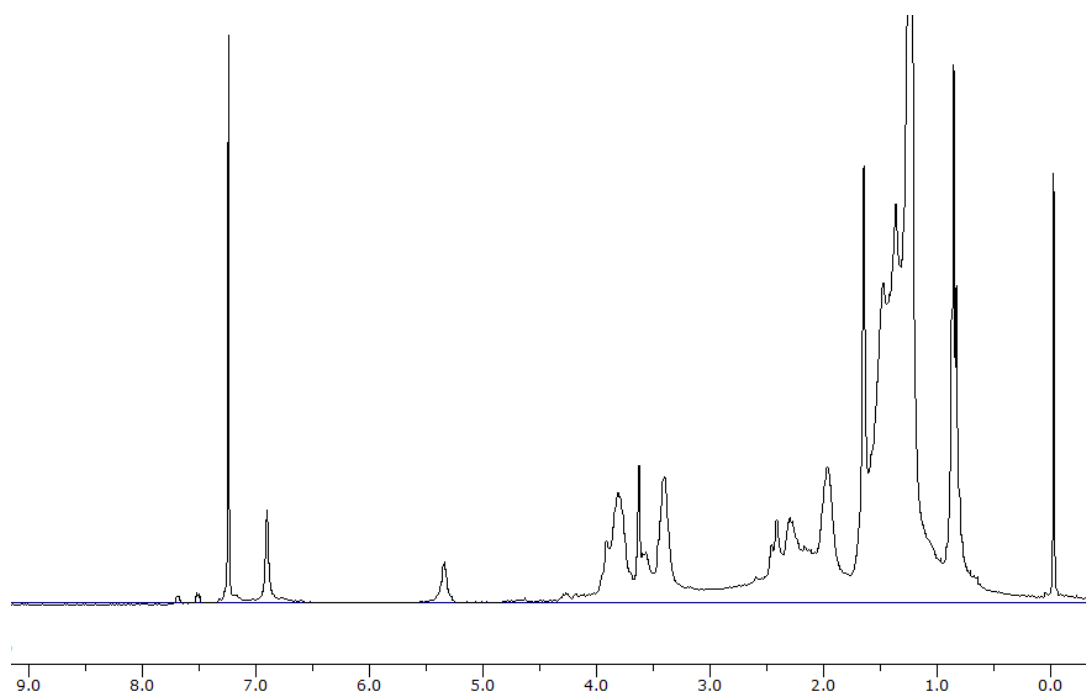


Figura 60: Espectro de RMN de ^1H , em CDCl_3 , da amostra AD-3-AE-C-B-49.

Como pôde ser observado nos espectros acima e nas altas atividades observadas para estas amostras, as acetogeninas realmente estão presentes nas amostras de maior atividade para as raízes desta planta, entretanto as tentativas de isolamento das mesmas não foram bem sucedidas, o que demanda novos estudos e técnicas mais cuidadosas e melhor elaboradas para a obtenção destas substâncias.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das raízes de *Annona dioica* resultou no isolamento e caracterização de quatro alcalóides, a Liriodenina (Substância 1), a Anomontina (Substância 2) e os alcalóides de núcleos N-óxido-benzil-tetrahidroisoquinolínico (Substância 3) e benzil-tetrahidroisoquinolínico (Substância 4), ambos inéditos.

Correlacionando o estudo fitoquímico com os ensaios biológicos preliminares, com teleoginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e com *Artemia salina*, fica evidente a convergência entre a presença de duas classes de metabólitos secundários e a atividade das raízes desta planta, tanto no extrato diclorometânico quanto no etanólico.

A detecção de acetogeninas e a identificação de alcalóides nestas frações (com maior atividade) denota uma potencial atividade com relação ao estudo proposto, a qual pode estar ligada a uma destas classes ou a associação das mesmas. Uma hipótese a ser alçada é a de sinergismo, entre as acetogeninas e os alcalóides, uma vez que os testes com as frações oriundas da fase acetato de etila, fase biomonitorada com maior atividade, não mostraram o mesmo potencial observado para a fase, pelo contrário, nenhuma das frações teve atividade significativa, resultado que, sumariamente, não era esperado.

A ocorrência da **Substância 2, Anomontina**, nesta espécie, associada aos relatos da mesma na literatura induz a levantar a hipótese de que se trata de um marcador quimiotaxômico de anonáceas, e mais especificamente do gênero *Annona*, uma vez que todos os relatos se restringem ao mesmo.

Todas as substâncias isoladas ou detectadas são particularmente interessantes, uma vez que a literatura mostra que as classes de metabólitos a que elas pertencem possuem uma grande diversidade de aplicações se tratando de atividades biológicas, tais como, anticancerígena, antileishmania, moluscicida, **larvícida e acarícida**, o que torna a bioprospecção de metabólitos

com esta espécie um potencial foco de interesse para as atividades relacionadas.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Disponível em http://seriesestatisticas.ibge.gov.br/series.aspx?no=1&op=0&v_codigo=PPM01&t=efetivo-rebanhos-tipo-rebanho, acesso em junho de 2013.
- 2 Disponível em <http://www.pecuaria.com.br>, acesso em junho de 2013.
- 2a *Indicadores IBGE: Estatística da Produção Pecuária*; Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, março de 2013.
- 3 **ANDREOTTI, R.**; *Documento 180 ISSN 1983-974X, Campo Grande,-MS,2010.*
- 4 **GONZALES, J. C.**; *O controle do carrapato do boi.* 3. ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo, 2003. 128p.
- 5 **FONSECA, A. H., et.al.**; *Dinâmica populacional do carrapato Boophilus microplus em São Miguel do Anta-MG, Brasil.* Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, v. 6, n. 2, supl. 1, p. 121, 1997.
- 6 **OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G., AMARANTE, A. F. T.**; *Parasitologia animal: animais de produção.* Rio de Janeiro: Editora de Publicações Biomédicas Ltda, 2002. 148 p.
- 7 **GEORGHIOU, G. P., TAYLOR, C. E.**; *Genetic and biological influence in the evolution of insecticide resistance.* Journal Economic Entomology, College Park, v.10, n. 3, p. 319-323, 1977a.
- 8 **GEORGHIOU, G. P., TAYLOR, C. E.**; *Operacional influence in evolution of insecticide resistance.* Journal Economic Entomology, College Park, v.10, n. 5, p. 653-658, 1977b.
- 9 **MASSARD, C.L., et.al.**; *Efeito da Decametrina sobre Boophilus microplus (Canestrini) em teste de campo, estábulo e in vitro.* In: CONGRESSO DA SOCIEDADE DE PARASITOLOGIA, 7, 1982, Porto Alegre. Resumos... Porto Alegre: CBP, 1982. p.12.
- 10 **ROCHA, E. M., GRISI, L.**; *Characterization of alphasmethrin as a new tickicide for use cattle in Brazil.* In: CONFERENCE OF WORLD ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF VETERINARY PARASITOLOGY, 11, 1985. Rio de Janeiro. Abstract.... Rio de Janeiro: W.A.A.V.P., 1985. p. 9.
- 11 **SOSA, E.**; *Evolution of the efficacy and residual effect of flumethrin pour on against Boophilus microplus in cattle in Uruguai.* Ver. Med. Res., v. 23, p. 126-131, 1985.
- 12 **LEITE, R. C.**; *Boophilus microplus (Canestrini, 1887): susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticida em propriedades da região fisiogeográficas da baixada do Grande-Rio e Rio de Janeiro, uma abordagem*

epidemiológica. 1988. 122 p. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária) – Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.

13 **PEREIRA, M. C., LUCAS, R.**; *Estudo in vitro da eficiência de carrapaticidas linhagem de Boophilus microplus, proveniente de Jacarei, Estado de São Paulo, Brasil*. Rer. Fac. Med. Vet. Zootec. Univ. São Paulo, São Paulo, v. 24, n.1, p. 7-11. 1987.

14 **LARANJA, R. J., et. al.**; *Identificação de uma estirpe de Boophilus microplus resistente a carrapaticidas piretróides no Estado do Rio Grande do Sul*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 6., 1989, Bagé. Anais... Bagé: CBPV, 1989. p.83.

15 **GLÓRIA, M. A., et. al.**; *Atividade in vitro de Piretróides em combinação com butóxido de piperomina em teleóginas de Boophilus microplus*. Arq. Uni. Rural Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. v. 13, n. 1, p. 71-7, 1990.

16 **FLAUSINO, J. R. N., et. al.**; *Avaliação da resistência do carrapato R. (B.) microplus a Piretróides no município de Seropédica, Rio de Janeiro*. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 8, 1995, Campo Grande. Anais ... Campo Grande: CBPV, 1995. p.45.

17 **JOHSSON, N.N., et. al.**; *Production effects of cattle tick (Boophilus microplus) infestation of high yielding dairy cows*. Vet. Parasitol., Amsterdam, v. 78, p. 65-77, 1998.

18 **ALVES-BRANCO, F.P.J, et. al.**; *Prevalência Estacional do Boophilus microplus em bovinos das raças Hereford e Ibagé*. I. In: COLETÂNEA de pesquisas: medicina veterinária e parasitologia. Bagé: EMBRAPA/CNPq., 1987. p. 223-228.

19 **HEIMERDINGER, A.**; *Extrato alcoólico de capim-cidreira (Cymbopogon citratus) no controle do carrapato (Boophilus microplus) de bovinos leiteiros*. Santa Maria, 2005. 78 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

20 **SIMÕES C. M. O., et. al.**; *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS. Editora da UFSC. 2000; 323-354.

21 **ALBUQUERQUE, U. P., et. al.**; *Medicinal plants of the caatinga (Semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach*. Journal Ethnopharmacology, v. 114, p. 325-354, 2007.

22 **OLIVEIRA, M. C. S.**; *Uso de Extratos de Nim (Azadirachta indica) no Controle do Carrapato Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Comunicado técnico, ISSN 1981-206X São Carlos, SP Dezembro, 2009.

- 23 **De-Oliveira, A. C., et. al.**; *Toxicol. Lett.* 1997, 92, 39; Enam, E. E.; *Annual Meeting of the Entomological Society of America*, San Diego, USA, 2001; Ryan, M. F.; Byrne, O.; *J. Chem. Ecol.* 1988, 14, 1965.
- 24 **VIVAN, M. P.**; *Uso do cinamomo (Melia azedarach) como alternativa aos agroquímicos no controle do carrapato bovino (Boophilus microplus)*. Florianópolis, 2005. 72p. Dissertação (Mestrado em Agroecossistemas) – Curso de Pós-Graduação em Agroecossistemas, Universidade Federal de Santa Catarina.
- 25 **SAXENA, R. C.; et.al.**; *Larvicidal and chemosterilant activity of Annona squamosa alkaloids against Anopheles stephensi*. *Journal American Mosquito Control Association* 9: 84-7, 1993.
- 26 **EMANOEL V. C., et.al.**; *Full RMN analysis of annomontine, metoxy-annomontine and N-hidroxyannomontine pyrimidine- β -carboline alkaloids*. *Magnetic Ressonance in Chemistry*, 46: 69-74, 2008.
- 27 **REJÁN-ORANTES, J. del C., et. al.**; *Annomontine, an Alkaloid Isolated from Annona purpurea, Has Anxiolytic-Like Effects in the Elevated Plus-Maze*. *Planta Med*, 2011; 77: 322-327.
- 28 **MAAS, P., RAINER, H., LOBÃO, A.** 2012. *Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB110373>).
- 29 **PINHEIRO, M. L. B., et.al.**; *Acanthoic acid and other constituents from the stem of Annona amazonica (Annonaceae)*. *J. Braz. Chem. Soc.*, Vol. 20, N°. 6, 1095-1102, 2009.
- 30 **CHAVES, M. H., et.al.**; *Separação e identificação de constituintes químicos polares dos galhos de Porcelia macrocarpa*. *Química Nova*, 23 (3), 2000.
- 31 **SIQUEIRA, J. M., et.al.**; *Estudo fitoquímico das cascas do caule de Duguetia glabriuscula – Annonaceae – biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a Artemia salina Leach*. *Quim. Nova*, Vol. 24, No. 2, 185-187, 2001.
- 33 **SIQUEIRA, J. M., et.al.**; *Estudo fitoquímico de Unonopsis lindmanii – Annonaceae – biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a Artemia salina Leach*. *Quim. Nova*, 21(5) 1998.
- 34 **GLEYE, C., et.al.**; *Coronin from roots of Annona muricata, a putative intermediate in acetogenin biosynthesis*. *Planta med.* (67) 570-572, 2001.
- 35 **ALALI, F. Q., et.al.**; *Annonaceous acetogens: recente progress*. *Journal Natural Product* (62) 504-540, 1999.

36 Disponível em :
www.sementesplantas.blogspot.com.br/2010_09_01_archive.html, acesso em
30 de janeiro de 2013.

37 **LEBOEUF, M., et. al.**; *Alkaloids of Annonaceae. XXIX. Alkaloids of Annona muricata*. Planta Medica, vol. 42, pag. 37-44, 1981.

38 **CHEN, CHUNG-YI, et. al.**; *Four alkaloids from Annona cherimola*. Phytochemistry, 56, 753-757, 2000.

39 **SANDOVAL, D., et. al.**; *Annonelliptine, an alkaloid from Annona elliptica*. Phytochemistry, Vol. 24, n° 2, pp 375-376, 1985.

40 **MAAS, P., RAINER, H., LOBÃO, A.** 2012. *Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB110219>).

41 **DEWICK, PAUL M.**; *Medicinal natural products : a biosynthetic approach*. 2nd ed. John Wiley & Sons Ltd, ISBN 0 471 49640 5 (cased) – ISBN 0 471 49641 3 (pbk.), Baffins Lane, Chichester, West Sussex, PO19 1UD, England, 2002.

42 **CATTO, J. B, et. al.**; *Efeito acaricida in vitro de extratos de plantas do pantanal no carrapato de bovinos Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 26. ISSN 1983-9715, Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, 2009.

43 **FEITOSA E. M. A., et. al.**; *Chemical Composition and Larvicidal Activity of Rollinia leptopetala (Annonaceae)*. J. Braz. Chem. Soc., Vol. 20, No. 2, 375-378, 2009.

44 **LEBOEUF, M., et. al.**; *The phytochemistry of the annonaceae*. Phytochemistry, Vol. 21, No. 12, pp. 2783-2813, 1982.

45 **DRUMMOND, R. O. et.al.**; *Boophilus annulatus and B. microplus: laboratory tests of insecticides*. Journal Economic Entomology, College Park, v. 66, n. 1, p. 130-133, Feb. 1973.

46 **MEYER, B. N. et. al.**; Planta Medica, 1982, 45, 31.