UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

**Contribuição à farmacognosia de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) -
Acompanhamento da variação sazonal de constituintes, aspectos botânicos e
avaliação da atividade antileishmania *in vitro***

MARIA CAROLINA ERDELYI

**Dissertação para obtenção do grau de
MESTRE**

Orientadora
Profa. Dra. DOMINIQUE CORINNE HERMINE FISCHER

São Paulo

2008

19482

DEDALUS - Acervo - CQ

30100015124

Ficha Catalográfica

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

E66c	<p>Erdelyi, Maria Carolina</p> <p>Contribuição à farmacognosia de <i>Annona squamosa</i> L. (Annonaceae) – Acompanhamento da variação de sazonal de constituintes, aspectos botânicos e avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> / Maria Carolina Erdelyi. -- São Paulo, 2008.</p> <p>231p.</p> <p>Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.</p> <p>Orientador: Fischer, Dominique Corinne Hermine</p> <p>1. Farmacognosia 2. Annonaceae : Farmacognosia I. T. II. Fischer, Dominique Corinne Hermine, orientador.</p> <p>615.321 CDD</p>
------	---

Contribuição à farmacognosia de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) -
Acompanhamento da variação sazonal de constituintes, aspectos botânicos e
avaliação da atividade antileishmania *in vitro*

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção do grau de Mestre

Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer
orientador/presidente

1º. examinador

2º. examinador

São Paulo, _____ de _____

*Dedico este trabalho a todas as pessoas
que me ajudaram a concretizar este projeto.*

*Dedico especialmente aos meus amigos
e familiares pela compreensão e paciência.*

*Ao meu namorado, que sempre me
incentivou e apoiou.*

AGRADECIMENTOS

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

Ao (CNPq) pela bolsa concedida.

Ao Programa de Apoio à Pós-Graduação (PROAP) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo auxílio financeiro na aquisição de parte do material utilizado no desenvolvimento do trabalho.

À Diretoria da FCF e ao Setor de Transportes pelas excursões de coleta à Getulina, SP.

Agradeço aos meus pais, sem eles este trabalho não teria deixado de ser apenas um sonho.

À minha irmã Cames.

Agradeço a minha orientadora, Prof^ª Dr^ª Dominique Corinne Hermine Fischer, com quem aprendi muito.

Agradeço à minha grande amiga Fabiana Lima Silva.

Agradeço à todos os professores que colaboraram direta e indiretamente com este trabalho, Prof Elizabeth Igne Ferreira, Prof^ª Dr^ª Berta Lange de Morretes, Prof^º Dr. Humberto Gomes Ferraz, Prof^ª Dr^ª Carlota Oliveira Rangel Yagui, Prof^º Dr. Adalberto Pessoa Junior, Prof^º Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno, docentes das disciplinas cursadas, com os quais aprofundi os meus conhecimentos. Prof^ª Dr^ª Melânia Lopes Cornélio e Prof^º Vicente de Oliveira Ferro, que contribuíram muito como membros da banca no exame de qualificação. Prof^ª Dr^ª Silvia Reni Bertolin Uliana, Prof^ª Dr^ª Valentina Porta, Prof^ª Dr^ª Maria Inês Rocha Miritello Santoro, Prof^ª Dr^ª Erika Rosa Maria Kedor pelo trabalho em conjunto. Pela ajuda técnico-científica, agradeço à Prof^ª Dr^ª Maria Luiza Faria Salatino e Prof^º Antonio Salatino, Prof^º Dr. José Rubens Pirani, Prof^º Dr. Renato de Mello-Silva que sempre estiveram à disposição e prontos para ajudar. À Prof^ª Dr^ª Silvia Berlanga de Moraes Barros pela disponibilização de equipamentos.

Agradeço pelo apoio técnico a Roberto de Jesus Honório, Gledson Manso Guimarães, José Alexandre Coelho Pimentel, Katia Cirlene Alves Botelho, Charles de Lima Brito, pelo apoio e ajuda de sempre.

Agradeço aos funcionários, Elaine Midori Ychico, Jorge Alves de Lima, Kelma Lydis Oliveira Alves Guitman, Susy Ramos, Luiz Carlos Caous, Auriluce Missiano de Oliveira, Luís Alberto Vilarinho Gioso, Renato Flamini, Adriana de Almeida Barreiros, Ângelo Antonio A. Correa da Cruz, Leila Aparecida Bonadio, Adalto S. de Oliveira, pela ajuda e boa vontade.

Agradeço ao Sr. Antonio Carlos Franco Barbosa pela ajuda técnica na preparação de corte histológicos para o trabalho botânico.

Agradeço aos estagiários Felipe Murro Capeli, Solange Bianchi Constantino, Simone Rachid Pfannemuller, Eduardo Castilho da Silva.

Aos amigos Pedro López García, Fábio Pereira Gomes, Eunice Kazue Kano, pelo trabalho em conjunto.

Agradeço aos meus amigos Josseara, André, Gil, Leandro, Alberto, Carlos, Fernando, Alessandro, Danilo, Rogéria, Marcel e Angel pela amizade e companheirismo.

“A natureza não faz nada em vão”

(Aristóteles 384 a.C. - 322 a.C.)

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

RESUMO

As doenças tropicais endêmicas representam um grave problema sócio-econômico, no Brasil e no mundo. A leishmaniose insere-se neste quadro. Considerando o surgimento da resistência dos parasitas e a séria toxicidade da terapêutica convencional, a busca de novas alternativas é urgente. A família Annonaceae tem mostrado ser rica fonte de compostos com atividade antiprotozoária. Neste contexto, *Annona squamosa* L. foi selecionada. Sendo mais conhecida como “fruta-do-conde”, apresenta uso na medicinal popular, como: antihelmíntica e no combate aos ectoparasitas. Entre os principais metabólitos secundários da espécie, citam-se: alcalóides isoquinolínicos, acetogeninas, flavonóides e óleo volátil. A atividade biológica de *A. squamosa* tem sido investigada, entretanto, aquela referente à ação antileishmania permaneceu inexplorada, até o presente trabalho, no qual foram avaliadas amostras referentes aos alcalóides totais, ao extrato hidroetanólico, aos infusos e frações orgânicas dos extratos obtidos, a partir de: folhas, pericarpos, sementes e arilos, coletados em quatro fases anuais. Os ensaios *in vitro* foram realizados frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, tendo-se realizado, em paralelo, avaliação da citotoxicidade *in vitro* frente a células epiteliais humanas. Os mesmos extratos foram submetidos ao estudo químico para acompanhamento da variação sazonal qualitativa e quantitativa de classes de componentes e seus marcadores, selecionados por sua ação antileishmania potencial. As análises abrangeram alcalóides, flavonóides, polifenóis totais e taninos, tendo-se empregado as técnicas cromatográficas (CLAE, CCD) e a espectrofotométrica. Em complementação, efetuou-se o estudo morfoanatômico de folha. Os resultados serviram de estímulo para a continuidade do estudo visando ao isolamento de compostos bioativos.

Palavras-chave: *Annona squamosa* L., alcalóides isoquinolínicos, atividade antileishmania *in vitro*, citotoxicidade *in vitro*, variação sazonal.

ERDELYI, M.C. Pharmacognosy of *Annona squamosa* L. (Annonaceae) - Seasonal variation of constituents, botanical aspects and *in vitro* antileishmanial activity. 2008. 231f. Dissertation, Master Degree – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

ABSTRACT

Leishmaniasis, as well as other protozoal tropical endemic diseases, remains a serious Public Health problem all over the world. New alternatives for their treatment are urgently needed, since the parasite resistance is increasing and the high toxicity of the conventional medicines reduces its patient adherence. In last decades, several vegetal species from the Annonaceae family showed to be a rich source of potential antiprotozoal metabolites. Therefore, *Annona squamosa* L. was selected. Although is largely known for its fleshy and flavourous fruits called “pinhas” and “fruta do conde”, some medicinal properties have been attributed to different plant parts including the antihelminthic and against ectoparasites. The main secondary metabolites found in the species were: isoquinoline alkaloids, acetogenins, flavonoids and volatil oil. In this work, the *in vitro* antileishmanial activity was investigated for the total alkaloid and hidroalcoholic extracts, infuses and organic fractions from leaves, fruits, seeds and arils of *A.squamosa* collected in the four annual phases. *In vitro* tests were also performed to evaluate the cytotoxic activity of extracts. Qualitative or quantitative analyses of alkaloids, total phenolics, total flavonoids and tannins were done by HPLC, spectrophotometric and TLC methods. The morphoanatomical study of leaves was also presented and illustrated by photos and photomicrographies. The results have encouraged deeper researches and further isolation of bioactive compounds

KEYWORDS: *Annona squamosa* L., isoquinoline alkaloids, antileishmanial *in vitro*, activity, cytotoxicity *in vitro*, seasonal variation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea (esquerda) e visceral (direita) no mundo, de acordo com OMS.....	23
Figura 2-	Vetores de leishmaniose – mosquitos dos gêneros <i>Phlebotomus</i> e <i>Lutzomyia</i>	24
Figura 3-	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	27
Figura 4-	Estrutura química dos antimoniais mais utilizados no tratamento das leishmanioses.....	30
Figura 5-	Estrutura química dos não-antimoniais mais utilizados no tratamento de leishmanioses.....	31
Figura 6-	Estrutura química da miltefosina.....	32
Figura 7-	Núcleos estruturais das principais classes de alcalóides isoquinolínicos encontrados em <i>Annona</i>	38
Figura 8-	Estrutura química do monoterpene cânfora e do sesquiterpene germacreno D.....	68
Figura 9-	Distribuição geográfica da família Annonaceae no mundo.....	69
Figura 10-	Mapa de distribuição de <i>A. squamosa</i> no mundo.....	71
Figura 11-	Esquema de procedimento usado na extração de alcalóides totais de <i>A. squamosa</i> L.....	85
Figura 12-	Esquema de procedimento usado para o fracionamento dos extratos brutos de <i>A. squamosa</i> L.....	87
Figura 13 -	Curva de Ringbom do padrão de quercetina.....	106
Figura 14 -	Curva de calibração do padrão de quercetina.....	106
Figura 15 -	Curva de Ringbom do padrão de ácido.....	108
Figura 16 -	Curva de calibração do padrão de ácido gálico.....	108
Figura 17 -	Cromatograma CLAE/UV obtido do padrão rutina.....	113
Figura 18 -	Cromatograma CLAE/UV obtido obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas Coleta 1.....	114
Figura 19 -	Cromatograma CLAE/UV obtido obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas Coleta 2.....	114

Figura 20 -	Cromatograma CLAE/UV obtido obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas Coleta 3.....	115
Figura 21 -	Cromatograma CLAE/UV obtido obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas Coleta 4.....	115
Figura 22 -	Cromatogramas CLAE/UV obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas e detecção de isocoridina.....	116
Figura 23 -	Curva de calibração de isocoridina (área x concentração), equação da reta e R^2	117
Figura 24 –	<i>Annona squamosa</i> L. Hábito de exemplar frutificado e demarcado para o estudo.....	134
Figura 25 -	<i>Annona squamosa</i> L. Detalhe de ramo frutificado.....	135
Figura 26 -	<i>Annona squamosa</i> L. Folha. 26A. Face adaxial. 26B. Face abaxial.....	136
Figura 27-	<i>A. squamosa</i> L – Folhas (droga). 27A. Aspecto geral da droga 27B. Face abaxial. Detalhe de tricomas, sobre as nervuras, observados à lupa estereoscópica.....	137
Figura 28-	<i>A.squamosa</i> L. Folha. Secção transversal de mesofilo. 28 A. Detalhe de célula oleífera. 28 B. Detalhe de célula oleífera na região do parênquima paliádico.....	140
Figura 29-	<i>A. squamosa</i> L. Folha. Epiderme. 29A. Face adaxial. 29B. Face abaxial. Detalhe de estômatos paracíticos e geminados 29C. Epiderme da face abaxial. Detalhe de cutícula granulosa.....	141
Figura 30-	<i>A. squamosa</i> L. Nervura mediana. Secção transversal. Disposição geral dos tecidos.....	142
Figura 31-	<i>A. squamosa</i> L. Nervura mediana. Secção transversal. Detalhe do sistema vascular. Faixa de células obliteradas.....	143
Figura 32-	<i>A. squamosa</i> L. Nervura mediana. Secção transversal. (não clarificada) Localização das células oleíferas no tecido fundamental e no floema	144
Figura 33 -	<i>A. squamosa</i> L. Pecíolo. Secção transversal. Disposição geral dos tecidos. Sistema vascular em arco. Detalhe de tricoma tector.....	145
Figura 34-	<i>A. squamosa</i> L. Pecíolo. Secção transversal. 34A. Detalhe de epiderme 34B. Detalhes de feixe vascular. Xilema, compostos fenólicos, fibras de paredes celulósicas, floema 34C. Detalhe de elementos de vaso contendo substâncias fenólicas.....	146

Figura 35 -	<i>A. squamosa</i> L. Pecíolo. A. Detalhe de secção transversal (não clarificada). Tecido fundamental. Região interna ao xilema. Drusas. B. Cristais prismáticos de oxalato de cálcio.....	147
Figura 36-	<i>A. squamosa</i> L. Pecíolo. Secção transversal (não clarificada). Grupos de fibras dispersos no parênquima fundamental e células oleíferas.....	148
Figura 37-	Dados da triagem preliminar dos alcalóides totais (AT) de <i>A. squamosa</i> mais ativos frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	151
Figura 38 -	Comparação dos rendimentos dos extratos hidroetanólicos e aquosos, obtidos de folha, pericarpo(sem sementes), semente (sem arilo) e arilo de <i>A. squamosa</i> L., em quatro épocas anuais.....	160
Figura 39 -	Comparação dos teores de alcalóides totais obtidos de folha, pericarpo (sem sementes), semente (sem arilo) e arilo de <i>A. squamosa</i> L., em quatro épocas anuais.....	162
Figura 40 -	Comparação dos teores de flavonóides totais, compostos polifenólicos totais e de taninos (% m/m) de folha, pericarpo (sem sementes), semente (sem arilo) e arilo de <i>A. squamosa</i> L., em quatro épocas anuais.....	165
Figura 41 -	Estrutura química da isocoridina.....	166

LISTA DE QUADROS

Quadro 1-	Alcalóides de núcleo isoquinolínico simples encontrados no gênero <i>Annona</i>	39
Quadro 2-	Alcalóides aporfínicos encontrados no gênero <i>Annona</i>	40
Quadro 3-	Alcalóides benziltetrahidroisoquinolínicos encontrados no gênero <i>Annona</i>	51
Quadro 4-	Alcalóides tetrahidroprotoberberínicos encontrados no gênero <i>Annona</i>	53
Quadro 5-	Alcalóides proaporfínicos encontrados no gênero <i>Annona</i>	55
Quadro 6-	Alcalóides fenantrênicos encontrados no gênero <i>Annona</i>	56
Quadro 7-	Alcalóides pirimidina β -carbolínicos encontrados no gênero <i>Annona</i>	57
Quadro 8-	O-heterosídeos de flavonóis encontrados no gênero <i>Annona</i>	59
Quadro 9-	Geninas de flavonóis e de flavonas encontradas no gênero <i>Annona</i>	64
Quadro 10-	Alcalóides aporfínicos e oxaporfínicos encontrados em <i>A. squamosa</i> L.....	67
Quadro 11-	O-heterosídeos de flavonóis encontrados em <i>A. squamosa</i> L.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Material vegetal destinado ao preparo de extratos para o estudo químico e a avaliação de atividade biológica.....	83
Tabela 2-	Variação do fluxo da fase móvel (mL/min), durante a análise qualitativa de quercetina, quercitrina e rutina nos extratos hidroetanólicos de <i>A.squamosa</i> , por CLAE.....	94
Tabela 3-	Programação do gradiente de eluição na análise qualitativa de quercetina, quercitrina e rutina nos extratos hidroetanólicos de <i>A.squamosa</i> , por CLAE.....	94
Tabela 4 -	Rendimentos dos extratos aquosos (EA) e hidroetanólicos (HE) de órgãos e/ou partes aéreas de <i>A. squamosa</i> L. , coletados em quatro épocas anuais.....	103
Tabela 5 -	Teor de alcalóides totais em órgãos e/ou partes aéreas de <i>A. squamosa</i> L. coletados em quatro épocas anuais.....	104
Tabela 6-	Rendimentos de frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos e aquosos de <i>A. squamosa</i> mais ativos frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	105
Tabela 7-	Valores dos teores de flavonóides totais em µg/mL, expressos em concentração de quercetina, e em percentual (% m/m) na droga, a partir de órgãos aéreos de <i>A.squamosa</i> L., coletados em quatro épocas anuais.....	107
Tabela 8-	Valores dos teores de compostos polifenólicos totais em µg/mL, expressos em concentração de ácido gálico e em percentual (% m/m) na droga a partir de órgãos aéreos de <i>A.squamosa</i> L., coletados em quatro épocas anuais.....	109
Tabela 9 -	Valores dos teores de taninos em percentual (% m/m), expressos em relação aos compostos polifenólicos totais e à droga, a partir de órgãos aéreos de <i>A.squamosa</i> , coletados em quatro época anuais	110
Tabela 10-	Detecção de alcalóides e dos padrões boldina e isocoridina nos extratos mais ativos, por CCD, empregando o sistema cromatográfico SC-1	112
Tabela 11 -	Valores dos teores de AT (%m/m) nas folhas (droga) e dos teores de isocoridina relativos aos AT e às folhas (droga) de <i>A.squamosa</i> L., em µg/mL e em percentual (% m/m), nas quatro épocas anuais.....	118
Tabela 12-	Precisão do método de quantificação de isocoridina nos AT de <i>A.squamosa</i>	119

Tabela 13-	Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos extratos aquosos e hidroetanólicos de partes aéreas de <i>A. squamosa</i> L., coletadas em quatro épocas anuais, frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	121
Tabela 14-	Atividade antileishmania <i>in vitro</i> das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos e aquoso de <i>A. squamosa</i> L mais ativos, frente às formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	123
Tabela 15-	Atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos alcalóides totais de <i>A. squamosa</i> L. (300, 100 e 30 µg/mL), frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	125
Tabela 16-	Concentrações efetivas de 50% (CE ₅₀) e de 90% (CE ₉₀) das frações orgânicas mais ativas, provenientes de extratos de <i>Annona squamosa</i> L., frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	127
Tabela 17-	Concentrações efetivas de 50% (CE ₅₀) e de 90% (CE ₉₀) dos alcalóides totais de <i>Annona squamosa</i> L., frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	128
Tabela 18 -	Concentrações efetivas de 50% (CE ₅₀) e de 90% (CE ₉₀) para a atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos padrões: isocoridina, quercetina, quercitrina e rutina, frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	129
Tabela 19-	Concentração citotóxica <i>in vitro</i> de 50% (CC ₅₀) das frações orgânicas <i>A. squamosa</i> L. selecionadas para os testes frente às células epiteliais HEP-2	130
Tabela 20-	Concentração citotóxica de 50% (CC ₅₀) dos alcalóides totais de <i>A. squamosa</i> L. selecionados para os testes frente às células epiteliais HEP-2	131
Tabela 21-	Concentração citotóxica de 50% (CC ₅₀) dos alcalóides totais de <i>A. squamosa</i> L. selecionados para os testes frente às células epiteliais HEP-2	133

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abreviações	Significado
μg	micrograma
$\mu\text{g/g}$	proporção micrograma/grama
$\mu\text{g/L}$	proporção micrograma/litro
μm	micrômetro
AT	alcalóides totais
ATCC	<i>american type culture collection</i>
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
DMSO	dimetilsulfóxido
g/mL	proporção grama/mililitro
m/m	proporção massa/massa
mg	miligrama
mL	mililitro
nm	nanômetro
UV	ultra-violeta
v/v	proporção volume/volume
ICH	International Conference on Harmonization

SUMÁRIO

1. Introdução.....	20
2. Revisão bibliográfica.....	23
2.1 Leishmaniose.....	23
2.1.1 <i>Leishmania amazonensis</i>	25
2.1.2 Ciclo de vida dos parasitas.....	26
2.1.3 Manifestações clínicas.....	27
2.1.3.1 Forma cutânea.....	28
2.1.3.2 Forma cutânea difusa.....	28
2.1.3.3 Forma mucocutânea.....	28
2.1.3.4 Forma visceral.....	29
2.1.4 Quimioterapia da leishmaniose.....	29
2.1.4.1 Medicamentos antimoniais.....	29
2.1.4.2 Medicamentos não-antimoniais.....	30
2.1.5 Produtos naturais ativos em leishmaniose.....	33
2.1.6 Espécies do gênero <i>Annona</i> e prospecção de atividade antileishmania.....	35
2.2 Aspectos químicos	36
2.2.1 Família Annonaceae	36
2.2.2 Gênero <i>Annona</i>	37
2.2.2.1 Alcalóides.....	37
2.2.2.2 Flavonóides.....	58
2.2.2.3 Outros componentes encontrados no gênero <i>Annona</i>	66
2.2.3 <i>Annona squamosa</i> L.....	66
2.3 Aspectos botânicos.....	69
2.3.1 Generalidades.....	69
2.3.2 Família Annonaceae.....	71
2.3.2.1 Caracteres morfológicos.....	71
2.3.2.2 Caracteres anatômicos.....	72
2.3.3 Gênero <i>Annona</i>	74
2.3.3.1 Caracteres morfológicos.....	74
2.3.3.2 Caracteres anatômicos.....	75
2.3.4 <i>Annona squamosa</i> L.....	76

2.3.4.1 Caracteres morfológicos.....	76
2.3.4.2 Caracteres anatômicos.....	77
2.4 Usos de <i>A. squamosa</i> L.....	78
2.5 Atividades farmacológica, biológica e toxicidade de <i>A. squamosa</i> L.....	79
3. Objetivos.....	81
3.1 Objetivos gerais.....	81
3.2 Objetivos específicos.....	81
4. Material e métodos.....	82
4.1 Material botânico.....	82
4.2 Material vegetal estudado.....	82
4.3 Métodos.....	83
4.3.1 Secagem do material vegetal.....	83
4.3.2 Pulverização do material vegetal.....	84
4.3.3 Obtenção dos extratos.....	84
4.3.3.1 Extratos aquosos.....	84
4.3.3.2 Extratos hidroetanólicos.....	84
4.3.3.3 Extratos alcaloídicos.....	84
4.3.3.4 Frações orgânicas dos extratos mais ativos frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	86
4.3.4 Estudo químico.....	87
4.3.4.1 Análises espectrofotométricas.....	87
4.3.4.1.1 Determinação do teor de flavonóides totais.....	88
Preparo das amostras.....	88
Curva de Ringbom do padrão de quercetina.....	88
Reta de calibração de quercetina.....	89
Análise quantitativa de flavonóides totais nos diferentes órgãos vegetais de <i>A. squamosa</i> L., nas quatro épocas anuais.....	89
4.3.4.1.2 Determinação dos teores de polifenólicos totais e taninos em <i>A. squamosa</i>	89
Preparo das amostras.....	89
Curva de Ringbom do padrão de ácido gálico.....	90
Reta de calibração do ácido gálico.....	90

Análise quantitativa de polifenólicos totais e taninos, nos diferentes órgãos vegetais de <i>A. squamosa</i> , nas quatro épocas anuais.....	90
Polifenóis totais.....	90
Taninos.....	91
4.3.4.2 Análise cromatográficas.....	92
4.3.4.2.1 Cromatografia em camada delgada.....	92
Preparo das amostras.....	92
Sistema cromatográfico.....	92
4.3.4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	93
4.3.4.2.2.1 Análise qualitativa dos extratos hidroetanólicos para avaliação da presença de quercetina, quercitrina e rutina, por CLAE	93
Preparo de amostra	93
Condições analíticas.....	93
4.3.4.2.2.2 Análise quantitativa de isocoridina nos extratos alcaloídicos, por CLAE.....	95
Preparo das amostras.....	95
Condições analíticas.....	95
Validação do método.....	96
Curva de calibração e linearidade.....	96
Precisão.....	96
Exatidão.....	97
Seletividade.....	97
Limite de detecção e quantificação.....	97
4.3.5 Avaliação da atividade biológica.....	98
4.3.5.1 Atividade antileishmania <i>in vitro</i>	98
Parasitas.....	98
Amostras.....	98
Testes de sensibilidade dos parasitas.....	99
4.3.5.2 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i>	100
Células.....	100
Amostras.....	100
Teste de citotoxicidade.....	101
4.3.6 Estudo botânico.....	102
5. Resultados.....	103

5.1 Estudo químico.....	103
5.1.1 Rendimentos dos extratos e teor de alcalóides totais.....	103
5.1.2 Rendimentos das frações orgânicas.....	104
5.1.3 Teores de flavonóides totais.....	105
Reta de calibração de quercetina.....	105
5.1.4 Teores de compostos polifenólicos totais.....	108
Reta de calibração de ácido gálico.....	108
5.1.4.1 Teores de taninos.....	110
5.1.5 Pesquisa e detecção de alcalóides e marcadores nos extratos e frações bioativas, por CCD.....	111
5.1.6 Pesquisa e detecção de padrões de flavonóides nos extratos hidroetanólicos, por CLAE.....	113
5.1.7 Caracterização dos AT de <i>A.squamosa</i> , por CLAE, com base em isocoridina.....	116
5.1.7.1 Teores de isocoridina em folhas nas quatro épocas anuais.....	117
5.2 Atividade biológica.....	120
5.2.1 Avaliação da atividade antileishmania <i>in vitro</i> dos extratos de <i>A. squamosa</i> e das substâncias-padrão.....	120
5.2.1.1 Triagem dos extratos e frações bioativos.....	120
5.2.1.2 Determinação das concentrações efetivas de 50% (CE ₅₀) de frações orgânicas e alcalóides totais mais ativos de <i>A. squamosa</i> L.....	126
5.2.1.3 Determinação das concentrações efetivas de 50% (CE ₅₀) e de 90% (CE ₉₀) dos padrões alcaloídicos e flavonoídicos.....	129
5.2.2 Avaliação da citotoxicidade <i>in vitro</i> de frações orgânicas e de alcalóides totais de maior atividade antileishmania.....	130
5.3 Estudo botânico.....	134
5.3.1 Caracterização morfológica de folha (droga).....	135
5.3.3 Anatomia de folha.....	138
5.3.3.1 Limbo foliar.....	140
5.3.3.2 Epiderme.....	141
5.3.3.3 Nervura mediana.....	141
5.3.4 Pecíolo.....	135
6. Discussão.....	149
7. Conclusão.....	158
8. Referências bibliográficas.....	177

1. INTRODUÇÃO

A espécie *Annona squamosa* L., pertencente à família Annonaceae, é originária das Antilhas, sendo cultivada e consumida por seus frutos em todas as regiões tropicais e subtropicais do mundo, onde é conhecida como “custard-apple”, “sugar apple”, “chirimoyo” e “guanabano” (CRUZ, 1985; PENA, 1946; WIERSEMA, 1999).

No Brasil, o cultivo da “fruta-do-conde”, “pinha” ou “ata”, como é conhecida popularmente (PENA, 1946; CRUZ, 1985), está difundido nos estados de Alagoas e Bahia, além de São Paulo, onde se encontram os maiores produtores, totalizando cerca de 6.625 hectares de área cultivada. As principais regiões produtoras no estado de São Paulo localizam-se ao oeste, citando-se Jales e Lins como responsáveis por respectivamente 54 e 18% da produção do estado (ALMEIDA *et al*, 1987; IBGE, 2003; PONTES *et al*, 2004; NOGUEIRA *et al*, 2005).

Os frutos possuem alto valor alimentício, sendo consumidos *in natura* e na forma de sucos, doces, geléias, sorvetes, cremes e licores (NOBRE *et al*, 2003).

Além do uso como alimento, a aplicação medicinal desperta o interesse, sendo utilizada em diversos países em função das propriedades antihelmíntica, febrífuga, antitumoral, analgésica e antiespasmódica. Há também relatos de seu emprego em infestações por piolhos e outros ectoparasitas e como tônica, digestiva, antiinflamatória e emenagoga (MORTON, 1997; LORENZI, 2002).

Do ponto de vista biológico, diversas atividades foram comprovadas, tais como: escabicida (GRITSANAPAN, KLAYMONGKOL e WANNASAWAGE, 2007), antiprotozoária (BETTARINI *et al*, 1993; EL TAHIR, SATTI e KHALID, 1999), fungicida (MUKHLESUR *et al*, 2006), antibacteriana (SHANKER *et al*, 2006), antitumoral (PARDHASARADHI *et al*, 2004; ZHANG, 2006a), antioxidante (SINGH e JAYAPRAKASHA, 2006a; SINGH e JAYAPRAKASHA, 2006b), antiviral (YANG, 2000), antidiabética (SHIRWAIKAR *et al*, 2004; KALEEM *et al*, 2006), antihelmíntica (CHOUDHARY, 2007; SOUZA *et al*, 2008), antiinflamatória (YANG *et al*, 2008), entre outras.

Estudos fitoquímicos de *A. squamosa* revelaram a presença de diversos constituintes bioativos, destacando-se entre os principais: alcalóides de núcleos isoquinolínico, flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos, além de acetogeninas e terpenos.

A presença de alcalóides é uma das características mais importantes da família Annonaceae, da qual foram isolados mais de oitocentos (LEBOEUF, 1982; CORDELL *et al*, 2001). Na pesquisa de novos fármacos, tais compostos representam rica fonte de moléculas potencialmente bioativas. Mais de um terço dos alcalóides submetidos a ensaios biológicos apresentaram atividade biológica significativa (CORDELL, 2001).

A importância dos produtos naturais na terapêutica atual é reconhecida. Estima-se que mais de cento e vinte substâncias de origem natural foram isoladas, a partir de noventa espécies vegetais, constituindo cerca de 25% dos medicamentos industrializados (HOSTETTMANN e MARSTON, 2007).

De forma geral, os produtos naturais respondem por 44% das pesquisas envolvendo o desenvolvimento de novos fármacos (HOSTETTMANN e MARSTON, 2007). Neste sentido, a biodiversidade da flora brasileira oferece rica contribuição em metabólitos secundários, podendo originar protótipos para novas moléculas bioativas (FERREIRA, 1997).

Na prospecção sistemática de espécies vegetais brasileiras e compostos com atividade antiprotozoária, por parte do Grupo de Pesquisa no qual se ingressou, com ênfase na família Annonaceae, selecionou-se a espécie *A. squamosa*, por não ter sido explorada anteriormente, quanto ao seu potencial de atividade antileishmania.

A leishmaniose constitui uma das doenças negligenciadas que, nas suas diferentes formas, acomete o maior número de pessoas nos países tropicais em desenvolvimento, atingindo cerca de 12 milhões de pessoas por ano, no mundo (WHO, 2007). A doença é causada por protozoários do gênero *Leishmania*, sendo transmitida por mosquitos dos gêneros *Lutzomia* e *Phlebotomus* (ROCHA *et al*, 2005).

Embora a leishmaniose tenha grande incidência, a terapêutica é muito limitada, sendo que as drogas disponíveis apresentam muitos efeitos colaterais (SOARES-BEZERRA *et al*, 2004). Além disso, a acentuada resistência desenvolvida pelos diferentes agentes causadores de doenças parasitárias aos fármacos convencionais torna urgente a busca de novos fármacos mais ativos e menos tóxicos para maior adesão ao tratamento (WHO, 2002, SOARES-BEZERRA *et al*, 2004).

Neste contexto, o estudo de *A. squamosa* é promissor uma vez que diversos alcalóides e flavonóides, muitos deles presentes na espécie, apresentaram atividade antileishmania (MAHIOU *et al*, 1994; QUEIROZ *et al*, 1996; WAECHTER *et al*, 1999; KAM *et al*, 1999; MITRA *et al*, 2000; TALEB-CONTINI *et al*, 2004; ERCIL *et al*, 2005; MISHRA *et al*, 2005; MUZITANO *et al*, 2006; TADESMIR *et al*, 2006; FOURNET *et al*, 2007; DEVKOTA *et al*, 2007; PONTE-SUCRE *et al*, 2007).

Em estudos anteriores, foram realizados isolamentos de compostos pertencentes a estas classes a partir de *A. squamosa* (CHEN, 1970; VILLAR *et al*, 1984; WU *et al*, 1994; KOTKAR *et al*, 2002; KOTAKE *et al*, 2004), o que a torna possível candidata à obtenção de novos compostos antiprotozoários.

A pesquisa bibliográfica realizada acerca da espécie selecionada revelou que, a mesma foi amplamente investigada nas áreas agrônômica, biológica e química. Entretanto, alguns dos aspectos, ainda não abordados foram estudados no presente trabalho, visando contribuir para o conhecimento científico da espécie, com enfoque voltado para o aspecto farmacognóstico.

Com base nos dados disponíveis foi embasada a proposta do presente estudo, no qual se avaliou a variação sazonal de componentes alcaloídicos e polifenólicos (flavonóides e taninos) de *A. squamosa*, por meio de análises qualitativas e/ou quantitativas destas classes de componentes e de compostos selecionados como marcadores, empregando-se técnicas cromatográficas e a espectrofotométrica, nas análises de: folhas, pericarpos (em fases diferentes de maturação), respectivas sementes e seus arilos.

Avaliaram-se as atividades antileishmania *in vitro* frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e citotóxica *in vitro* em células epiteliais humanas, para a determinação da seletividade da ação antiprotozoária, quando presente, nos órgãos aéreos analisados. Complementou-se o estudo com a análise morfoanatômica de folha.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença infecciosa não contagiosa, que acomete mais de 12 milhões de pessoas, no mundo, e apresenta alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina, afetando 88 países (**Figura 1**) (DUJARDIN, 2006; WHO, 2007). No Brasil, atinge todos os estados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Fonte: Public Health Mapping Group Communicable Diseases (CDS) World Health Organization, October, 2003. Acesso em 15/12/2007.

Figura 1- Distribuição geográfica da leishmaniose cutânea (esquerda) e visceral (direita) no mundo, de acordo com OMS.

Os agentes causadores dessa doença são parasitas unicelulares do gênero *Leishmania* que apresentam duas formas morfológicas no seu ciclo de vida: a promastigota e a amastigota (MICHALICK, 2003). As formas promastigotas caracterizam-se por serem fusiformes e com longo flagelo; são extracelulares e vivem no trato digestório do inseto vetor. As formas amastigotas, por sua vez, são arredondadas e com curto flagelo que não se exterioriza; são intracelulares obrigatórias e parasitam, principalmente, os macrófagos do hospedeiro vertebrado (GILLES, 1999; REY, 2001).

Os vetores (**Figura 2**) são dípteros da família Psychodidae, hematófagos pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), com vasta distribuição nos climas quentes e temperados. São chamados comumente de “moscas da areia”. Somente as fêmeas são hematófagas. Geralmente, são dípteros de pequeno porte, que apresentam o corpo e as patas cobertos de cerdas longas e muito numerosas, freqüentemente misturadas com escamas. Possuem asas longas, densamente revestidas de cerdas, assemelhando-se a uma minúscula mariposa. Pertencem ao tipo dos dípteros de atividade crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares úmidos, sombrios e bem protegidos dos ventos. São encontrados em tocas de animais silvestres, orifícios em madeira, ou ocos de bambu. Os ovos são depositados em locais cobertos por musgos. A evolução da doença leva pouco mais de um mês (GILLES, 1999; REY, 2001).

http://www.afpmb.org/pubs/Field_Guide/field_guide.htm/ Scientific American Brasil

Figura 2- Vetores de leishmaniose – mosquitos dos gêneros *Phlebotomus* (esquerda) e *Lutzomyia* (direita).

Essa parasitose compreende formas clínicas podendo ser divididas em dois grupos principais: a forma cutânea ou tegumentar e a forma visceral. A forma cutânea apresenta variantes e pode ser subdivida em leishmaniose cutânea localizada, cutânea difusa e cutâneo-mucosa (REY, 2001).

Existem pelo menos sete espécies de *Leishmania* descritas estando associadas à doença humana sendo que, no Brasil, *Leishmania braziliensis* (Viannia) e *Leishmania amazonensis* (*Leishmania*) são as espécies mais amplamente distribuídas (GRIMALDI, DAVID e MCMAHON-PRATT, 1987; AMATO *et al*, 2007).

A leishmaniose cutânea está amplamente distribuída, no país, com registros de casos autóctones em todos os estados da federação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A ocorrência de casos de leishmaniose cutânea e cutâneo-mucosa está relacionada à ocupação de áreas florestais onde proliferam os vetores e reservatórios da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.1.1 *Leishmania amazonensis*

A espécie *L. amazonensis* empregada neste estudo, nos testes da atividade biológica de *A. squamosa*, está inserida no subgênero *Leishmania*, fazendo parte do complexo *Leishmania mexicana*. É uma espécie peculiar à Bacia Amazônica, sendo encontrada nas regiões Nordeste, Centro-oeste e Sudeste do Brasil. Distribuída pelas florestas primárias e secundárias da Amazônia (Amazonas, Pará, Rondônia Tocantins e sudoeste do Maranhão), particularmente em áreas de igapó e de floresta tipo “várzea”. Sua presença amplia-se para o Nordeste (Bahia), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Centro-Oeste (Goiás).

Tem como hospedeiros naturais vários marsupiais, principalmente, o roedor “rato-soiá” (*Proechymis*), além do *Oryzomys*, que às vezes apresenta o parasita na pele sem lesões cutâneas. Seus principais vetores, os *Lutzomyia flaviscutellata*, *Lutzomyia reducta* e *Lutzomyia olmeca nociva* (Amazonas e Rondônia) têm hábitos noturnos e vôo baixo. São pouco antropofílicos, o que justifica uma menor frequência de infecção humana por esta *Leishmania* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

O principal vetor, *L. flaviscutellata*, apresenta ampla distribuição geográfica, sendo encontrado em diferentes *habitats* de países fronteiriços ao Brasil e nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins, Bahia, Ceará, Maranhão, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Espírito Santo, Minas Gerais e São Paulo, ocorrendo em matas úmidas, onde apresenta densidade elevada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

L. amazonensis produz um amplo espectro de formas clínicas, sendo primariamente responsável pela leishmaniose cutânea, com relatos ocasionais de leishmaniose cutânea difusa e visceral na América do Sul (BARRAL *et al*, 1986, 1991; LEON *et al*, 1990).

A lesão causada por *L. amazonensis* apresenta grande infiltração na lesão, com densa massa de macrófagos vacuolares. A derme fica repleta de amastigotas, causando a aparência de um granuloma macrofágico (MORAES e SILVEIRA, 1994). Alguns indivíduos podem desenvolver o quadro clássico da leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizado por: infiltrações, pápulas e tubérculos, envolvendo extensas áreas cutâneas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000).

2.1.2 Ciclo de vida dos parasitas

Ao picar um indivíduo infectado ou um hospedeiro-reservatório, o inseto vetor retira macrófagos parasitados ou formas amastigotas livres no sangue ou mesmo em tecidos, juntamente com sangue ou linfa intersticial. Ao atingirem o intestino médio do inseto, as formas amastigotas de *Leishmania* transformam-se em promastigotas (**Figura 3**). Estas formas flageladas, após rápida multiplicação, convertem-se em formas promastigotas infectantes e migratórias, que são regurgitadas em função de uma obstrução mecânica e introduzidas na pele do próximo hospedeiro quando o inseto tenta fazer o repasto sanguíneo (PETERS e KILLICK-HENDRICK, 1987; REY, 2001).

Nos mamíferos, as espécies do gênero *Leishmania* aparecem sob a forma de amastigotas arredondadas que ocorrem em macrófagos da pele ou de vísceras, onde se reproduzem por divisão binária. A manutenção da infecção no hospedeiro ocorre em consequência da ruptura de células altamente infectadas, quando as amastigotas livres são fagocitadas por macrófagos que chegam ao foco inflamatório ou simplesmente pela divisão de macrófagos já colonizados pelo parasita (PETERS e KILLICK-HENDRICK, 1987; REY, 2001).

Fonte: http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/factsht_leishmania.htm (figura modificada)

Figura 3 – Ciclo de vida de *Leishmania*

2.1.3 Manifestações clínicas

No continente Americano, a leishmaniose é causada por diferentes espécies de *Leishmania*, e particularmente, a infecção por *L. amazonensis* produz um amplo espectro de formas clínicas (BARRAL *et al*, 1991).

Além da leishmaniose cutânea, *L. amazonensis* é o principal agente causador de leishmaniose cutânea difusa (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; ROSA *et al*, 2003). *L. amazonensis* foi isolada de pacientes com leishmaniose visceral e mucocutânea, apesar destas formas clínicas estarem associadas a *L. chagasi* e *L. braziliensis*, respectivamente (OLIVEIRA *et al*, 2007).

2.1.3.1 Forma cutânea

Caracteriza-se pelo surgimento de pápulas eritematosas no local da picada do inseto vetor. As pápulas crescem formando nódulos, podendo evoluir a ulcerações (MARKLE e MAKHOUL, 2004).

2.1.3.2 Forma cutânea difusa

Constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania*. Inicia de maneira insidiosa, com lesão única e evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações não ulceradas recobrimdo grandes extensões cutâneas. As áreas mais frequentemente afetadas são face (nariz, regiões malares, lábio superior, pavilhão auricular e membros (braço, antebraço, pernas, pés) (COSTA *et al*, 1998). A resposta à terapêutica é pobre ou ausente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.1.3.3 Forma mucocutânea

Estima-se que 3 a 5% dos casos de leishmaniose cutânea desenvolvam lesão mucosa. Clinicamente, a leishmaniose mucocutânea se expressa por lesões destrutivas localizadas nas mucosas das vias aéreas superiores. Acredita-se que a lesão mucosa metastática ocorra por disseminação hematogênica ou linfática. Geralmente surge após a cura clínica da leishmaniose cutânea, com início insidioso e pouca sintomatologia. Na maioria dos casos, esta forma clínica resulta da forma cutânea de evolução crônica e curada sem tratamento ou com tratamento inadequado. Pacientes com lesões cutâneas múltiplas, lesões extensas e com mais de um ano de evolução, localizadas acima da cintura, são o grupo com maior risco de desenvolver metástases para a mucosa. Acomete com mais frequência o sexo masculino e faixas etárias usualmente mais altas do que a leishmaniose cutânea, o que provavelmente se deve ao seu caráter de complicação secundária (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

2.1.3.4 Forma visceral

Manifesta-se por febre pouco elevada, mas diária e constante, marcado emagrecimento e grande aumento do baço e fígado, pigmentação da pele e pancitopenia (PISCOPO e MALLIA, 2006).

Todas as manifestações descritas dependem da espécie do parasita, bem como da resposta imune do indivíduo infectado (HERWALDT, 1999).

2.1.4 Quimioterapia da leishmaniose

O arsenal terapêutico disponível para o tratamento da leishmaniose é bastante reduzido existindo, até o presente momento, dois grupos de medicamentos em uso: os antimoniais e os não-antimoniais (GIL *et al*, 2007).

2.1.4.1 Medicamentos antimoniais

Os antimoniais ainda são os fármacos de primeira escolha, mesmo apresentando eficácia limitada, toxicidade elevada e efeitos adversos (AMATO *et al*, 2000).

Os antimoniais pentavalentes [Sb(V)] apresentam maior uso terapêutico em relação aos antimoniais trivalentes, Sb(III), que apresentam cardiotoxicidade e intolerância gastrointestinal. Entre os primeiros, os mais utilizados são: o estibogluconato de sódio (Pentostan[®]) e o antimoniato de *N*-metilglucamina (Glucantime[®]) (**Figura 4**) (SERENO *et al*, 2000; RATH *et al*, 2003). No Brasil, este último é o medicamento de escolha. Entretanto, em tratamento ministrado em baixas doses e de forma descontínua leva ao aparecimento de formas de parasitas resistentes (RATH *et al*, 2003).

Figura 4 – Estruturas químicas dos fármacos antimoniais mais utilizados no tratamento das leishmanioses.

A ação dos antimoniais está relacionada à inibição tanto da glicólise como da β -oxidação de ácidos graxos (TRACY, WEBSTER JÚNIOR, 1996), pela inibição do ciclo do ácido cítrico e da glicólise por meio da inibição adenosina trifosfato (ATP) e da guanosina trifosfato (GTP), bem como da ativação e conversão do composto antimonial para a forma trivalente (SbIII) (LIMA *et al*, 2007). Entretanto, outros estudos indicam que o mecanismo de ação estaria mais associado à toxicidade do que a uma atividade específica (DZAMITIKA *et al*, 2006).

Entre os efeitos adversos dos antimoniais, citam-se: A disfunção gastrointestinal, as dores musculares difusas, o enrijecimento das articulações, arritmias e pancreatite (GASSER *et al*, 1994). As dificuldades quanto à administração e a duração do tratamento, paralelamente aos efeitos colaterais, têm estimulado pesquisadores do mundo todo a buscar novas formas farmacêuticas para este fármaco. Uma tentativa é o encapsulamento dos antimoniais em lipossomas (TRACY, WEBSTER JÚNIOR, 1996).

2.1.4.2 Medicamentos não-antimoniais

Os medicamentos não antimoniais são considerados de segunda escolha, sendo eles: anfotericina B e as pentamidinas isotionato de pentamidina (Pentamidina®) e mesilato de pentamidina (Lomodine®) (**Figura 5**). A anfotericina B é um antibiótico macrolídico que interage com o ergosterol da membrana celular, formando poros que alteram a permeabilidade

celular e o balanço iônico, causando morte celular (COHEN, 1998). Seu uso é limitado pelos efeitos adversos (LIMA *et al*, 2007), além disso algumas espécies de *Leishmania* apresentam resistência (CROFT, SUNDAR e FAIRLAMB, 2006).

As pentamidinas são diamidinas, que se unem ao DNA do cinetoplasto do parasita, entretanto, o mecanismo de ação primário é desconhecido (LIMA *et al*, 2007). A teoria mais aceita tem sido a inibição da topoisomerase mitocondrial (KRAMP *et al*, 2005). Entretanto, as pentamidinas apresentam inconvenientes relacionados à toxicidade, custo elevado, difícil administração e podem, igualmente, levar à resistência do parasita (RATH *et al*, 2003; CROFT e COOMBS 2003; GREVELINK e LERNER, 1996; SERENO *et al*, 2000).

Figura 5 - Estruturas químicas dos fármacos não-antimoniais mais utilizados no tratamento das leishmanioses.

Usadas no tratamento da leishmaniose cutânea, as pentamidinas - isotionato de pentamidina (Pentamidina®) e mesilato de pentamidina (Lomodine®) - são menos tóxicas do que os antimoniais pentavalentes (BERMAN, 1997). A toxicidade desta classe de fármacos, inclusive com relatos de morte repentina, é um fator limitante de seu emprego terapêutico. São relatados

ainda, efeitos adversos, como: hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas e nefrotoxicidade (RATH *et al*, 2003).

Novos fármacos, como a miltefosina, uma hexadecil-fosfocolina (**Figura 6**), têm sido efetivos no tratamento da leishmaniose visceral (SINDERMAN *et al*, 2004), além das infecções resistentes aos antimoniais (MURRAY *et al*, 2005). Tem sido considerada como a melhor alternativa para o tratamento dessa leishmaniose, uma vez que pode ser administrada por via oral, ao contrário de outros (FISCHER *et al*, 2001).

Figura 6 - Estrutura química da miltefosina.

A miltefosina constitui-se de edelfosina e ilmofofina, derivados alquil-lisofosfolipídicos, antiproliferativos, sintetizados para tratar câncer. O mecanismo de ação antileishmania é desconhecido. Possivelmente, inibem o mecanismo de éster-remodelação, na síntese de fosfatidilcolina, na transdução de sinal e homeostase do cálcio (LIMA *et al*, 2007). Os efeitos colaterais afetam o sistema gastrointestinal, causando vômitos e diarreia, além de levar a um possível aumento dos níveis sanguíneos de transaminases, bem como da uremia e creatininemia (FISCHER *et al*, 2001). Além disto, há relatos de que diferentes espécies de *Leishmania* são resistentes a esta droga (CROFT e SUNDAR, 2006).

O tratamento de doenças causadas por esses protozoários é difícil, por serem organismos eucarióticos, compartilhando muitas das características das células de mamíferos. Assim, a atuação dos agentes antiparasitários ocorre em vias ou alvos comuns ao parasita e ao hospedeiro. Além disso, a internação prolongada, a administração parenteral e os efeitos adversos, como as alterações cardíacas, renais, pancreáticas e hepáticas dificultam a adesão ao tratamento (MURRAY *et al*, 2000).

A melhor alternativa seria a profilaxia por meio de vacina. Apesar de muitos grupos estarem trabalhando na tentativa de desenvolvê-la (CONVIT *et al*, 2004; TEWARY *et al*, 2004) ainda há vários fatores que dificultam a sua obtenção como os mecanismos efetores da resposta imune no homem, além de obstáculos de ordem política e econômica (HANDMAN, 1997).

Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas alternativas terapêuticas, estando os fitoterápicos (ANTHONY, FYFE, SMITH, 2005; CARVALHO e FERREIRA, 2001; PAULA *et al*, 2003; NAKAMURA *et al*, 2006) e os produtos naturais entre as mais promissoras.

2.1.5 Produtos naturais ativos em leishmaniose

As dificuldades apresentadas no tratamento convencional das leishmanioses motivam a busca por novos agentes quimioterápicos. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (TDR, 2004), as espécies vegetais são a mais importante fonte de fármacos.

Metabólitos secundários como: alcalóides, flavonóides, terpenos, lignanas, chalconas e lactonas sesquiterpênicas são descritos na literatura como sendo eficazes leishmanicidas (IWU *et al*, 1994; QUEIROZ *et al*, 1996; TORRES-SANTOS, 1999; KAM *et al*, 1999; ROCHA *et al*, 2005, TEMPONE *et al*, 2005).

Particularmente, em relação aos alcalóides e flavonóides, principais classes de substâncias relacionadas ao presente trabalho, a atividade antileishmania vem sendo comprovada.

Segundo ROCHA *et al* (2005), de 239 moléculas isoladas de produtos naturais que apresentaram atividade antileishmania, cerca de 68 são alcalóides, incluindo diversos da classe dos isoquinolínicos, que foram encontrados em representantes da família Annonaceae, particularmente, no gênero *Annona* e na própria espécie em estudo (QUEIROZ *et al*, 1996, ROCHA *et al*, 2005).

Os alcalóides isoquinolínicos encontrados em anonácea do gênero *Guatteria*, levaram à morte (100%) das formas promastigotas de *L. donovani* e *L. amazonensis* à concentração de 100 µg/ml. (MAHIOU *et al*, 1994).

Os alcalóides aporfinicos anonaína [17] e liriodenina [27], isolados de *Annona spinescens*, foram ativos frente às formas promastigotas de *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani* (QUEIROZ *et al*, 1996).

A atividade antileishmania de liriodenina [27], isolada de *A. spinescens* (QUEIROZ *et al*, 1996) e *A. squamosa* foi verificada em diferentes espécies de *Leishmania* (QUEIROZ *et al*, 1996 EMMANOEL *et al*, 2006, WAECHTER *et al*, 1999). Igualmente encontrada em *A. squamosa*, coridina mostrou atividade leishmanicida em promastigotas de *L. donovani* (CE₅₀ 26,7 µg/mL) (CAMACHO *et al*, 2000b).

Embora não se conheça o mecanismo de ação exato dos alcalóides aporfinicos na atividade antileishmania, existem evidências de sua relação com a inibição da enzima DNA topoisomerase (STÉVIGNY, BAILLY e QUETIN-LECLERCQ, 2005), que é uma das vias metabólicas vitais e específicas do parasita (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA (2004). Estudos estão sendo direcionados para estas vias metabólicas, na pesquisa de novos quimioterápicos com atividade antileishmania (SOARES-BEZERRA, LEON e GENESTRA (2004).

Entre os flavonóides, a atividade antileishmania de rutina, quercetina e quercitrina, anteriormente isoladas de *A. squamosa* (KOTKAR *et al*, 2002; SEETHARAMAN, 1986), foi avaliada (MONTENEGRO *et al*, 2007, TASDEMIR *et al*, 2006). Particularmente, com relação à rutina, TASDEMIR e colaboradores (2006) verificaram atividade em promastigotas de *L. donovani* (CE₅₀ > 30µg/mL), entretanto, não mostrou atividade em formas amastigotas do mesmo parasita (MONTENEGRO *et al*, 2007).

No caso de quercetina, o flavonóide apresentou atividade inibitória em formas amastigotas de *L. donovani* (TASDEMIR *et al*, 2006) (CE₅₀: 1.0 µg/mL), porém, em relação às promastigotas de *L. amazonensis*, a atividade foi reduzida (CE₅₀: 123,50 µg/mL) (TALEB-CONTINI *et al*, 2004).

Em ensaios semelhantes, quercitrina apresentou alta atividade em formas promastigotas de *L. amazonensis* (CE₅₀: 8 µg/mL) (MUZITANO, 2006), diferentemente daquela verificada em formas amastigotas (CE₅₀>200 µg/mL) por TALEB-CONTINI e colaboradores (2004).

Embora o mecanismo de ação antileishmania dos flavonóides ainda não tenha sido esclarecido, SEN e colaboradores (2008) propuseram recentemente, que a interação da quercetina com íons metálicos como o ferro, leva à formação de quelatos, impedindo a replicação do

parasita. Esta interação ocorre devido à presença simultânea dos grupos catecol, no anel B, e 3-hidroxi, no anel C.

2.1.6. Espécies do gênero *Annona* e prospecção de atividade antileishmania

Nas duas últimas décadas, diferentes extratos de espécies do gênero *Annona* foram avaliados frente às diferentes formas parasitárias e espécies de *Leishmania*.

Waechter e colaboradores (1998) avaliaram frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani*, extratos de diclorometano e hexano de sementes de *A. glauca* apresentando CE_{50} : 25 $\mu\text{g/mL}$ e $CE_{100} > 100 \mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Extratos etanólicos de cascas de caule e raiz de *A. crassiflora* apresentaram CE_{50} de 3,7 a 12,4 $\mu\text{g/mL}$ frente a formas promastigotas de *L. donovani* (MESQUITA *et al*, 2005).

Os alcalóides totais de folhas de *A. crassiflora* frente às formas promastigotas (CE_{50} : 24,89 $\mu\text{g/mL}$) e amastigotas (CE_{50} : 86,1 $\mu\text{g/mL}$) de *L. chagasi*, foram mais ativos que os extratos hidretanólicos ($CE_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). O mesmo foi observado em *A. coriacea*, tendo os alcalóides totais de folhas apresentando CE_{50} : 41,6 $\mu\text{g/mL}$ (promastigotas) e CE_{50} : 27,2 $\mu\text{g/mL}$ (amastigotas) (TEMPONE *et al*, 2005).

Extratos em *n*-hexano, acetato de etila e metanol do pericarpo de *A. muricata* apresentaram atividade leishmanicida quando testados *in vitro* em formas promastigotas de *L. panamensis* e *L. braziliensis*, sendo o extrato de acetato de etila mais ativo (CE_{50} : 0,1mg/mL) em *L. braziliensis* (JARAMILO *et al*, 2000). A mesma espécie foi avaliada por OSORIO e colaboradores (2007). Foram testados extratos em *n*-hexano, acetato de etila e metanol de caule e folhas frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani*. O extrato mais ativo foi aquele de folhas em acetato de etila, apresentado CE_{50} : 25 $\mu\text{g/mL}$. Ainda, as sementes foram ativas contra amastigotas de *L. panamensis* (CE_{50} : 2,1 mg/mL) (ARANGO, *et al* 1999).

COSTA e colaboradores (2006) avaliaram a atividade leishmanicida de extratos alcaloídicos de cascas de *A. foetida* em promastigotas de *L. braziliensis* (CE_{50} : 18,3 $\mu\text{g/mL}$) e *L. guyanensis* (CE_{50} : 10,3 $\mu\text{g/mL}$).

Os extratos alcaloídicos de cascas do caule de *A. impressivenia* apresentaram CE_{50} : 12,1 mg/mL (SANTOS *et al*, 2006).

O extrato em diclorometano de caule de *A. aff. excellens* apresentou significativa atividade contra *L. guyanensis* (CE₅₀: 12,1 µg/mL) e *L. amazonensis* (CE₅₀: 11,3 µg/mL) (OLIVEIRA *et al*, 2002).

A lactona argetilactona, isolada de raízes de *A. haematantha*, foi testada *in vivo* frente a *L. amazonensis* e apresentou atividade significativa na concentração de 10 µg/mL (WAECHTER *et al*, 1997).

2.2 Aspectos químicos

2.2.1 Família Annonaceae

Os representantes da família Annonaceae apresentam em sua composição, diferentes classes de metabólitos secundários, como: alcalóides, flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos, terpenóides, lactonas, entre outros. Os alcalóides são os constituintes mais freqüentes. Neste táxon, predominam aqueles de núcleo isoquinolínico (LEBOEUF *et al*, 1982; SANTOS, 2000; ANDRADE *et al*, 2003; BERMEJO *et al*, 2005; FOURNIER, 1999), sendo que, entre as classes de isoquinolinas encontradas (**Figura 7**), predominam aquelas de núcleos aporfínico, oxoaporfínico e benzilisoquinolínico, sendo característicos da subclasse Magnoliidae, à qual pertence a família (GOTTSLIEB *et al*, 1993).

Nas últimas décadas, muitos dos estudos fitoquímicos da família foram direcionados ao isolamento de substâncias bioativas, não somente da classe dos alcalóides, mas também das acetogeninas (CARVALHO, 1997; BERMEJO *et al*, 2005), dos terpenos (MENG *et al*, 2007) e dos flavonóides (VEGA *et al*, 2007). Entre estes, predominam os flavonóis, mas também são encontradas flavonas, chalconas, flavononas, entre outras classes bioativas (GOTTSLIEB *et al*, 1993; LEBOEUF, 1982).

Isoquinolínico simples **aporfínico** **noraporfínico** **oxoaporfínico** **benzilisoquinolínico** **tetrahidroprotoberberínico** **proaporfínico** **fenantrênico**

Figura 7- Núcleos estruturais das principais classes de alcalóides isoquinolínicos encontrados em *Annona*

2.2.2 Gênero *Annona*

A pesquisa bibliográfica compreendeu o período referente a 1912 - 2008 e foi centralizada nos alcalóides isoquinolínicos e flavonóides presentes no gênero *Annona*, em função de seu potencial como agentes antileishmania.

2.2.2.1 Alcalóides

No gênero *Annona*, predominam os alcalóides isoquinolínicos (MANN, 1987; CAVÉ, 1985; PADMA, 1995) (**Quadros 1 a 6**), entretanto a ocorrência de pirimidina- β -carbolínicos (**Quadro 7**), também, foi registrada (LEBOEUF *et al*, 1982b; COSTA *et al*, 2006).

Até o momento, foram isolados alcalóides de dezenove espécies de *Annona*, apresentando em suas estruturas os núcleos: isoquinolínico simples (**Quadro 1**), aporfínico, (**Quadro 2**), benzilisoquinolínico (**Quadro 3**), tetrahidroprotoberberínico (**Quadro 4**), proaporfínico (**Quadro 5**) e fenantrênico (**Quadro 6**).

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

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
cherianoina [1]		<i>Annona cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN <i>et al</i> , 2001
salsolinol [2]		<i>A. reticulata</i> L.	caule e folha	FORGACS <i>et al</i> , 1981
talifolina [3]		<i>A. cherimolia</i> Mill. <i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal <i>A. squamosa</i> L.	caule	CHEN <i>et al</i> , 1999 CHANG <i>et al</i> , 2000 YANG, CHANG, WU, 2004; CHEN <i>et al</i> , 1998

Quadro 2- Alcalóides aporfínicos encontrados no gênero *Ammona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
N-metil-actinodafina [4]		<i>Ammona glabra</i> L.	(-)	YANG; CHEN; KUAN, 1971
bracteolina [5]		<i>A. spinescens</i> Mart.	raiz	QUEIROZ <i>et al</i> , 1996
coridina [6]		<i>A. cherimolia</i> Mill. <i>A. reticulata</i> L. <i>A. squamosa</i> L.	casca de caule folha "	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989 CHANG <i>et al</i> , 1995 BHAKUNI; TEWARI; DAHR, 1972
glaucina [7]		<i>A. cherimolia</i> Mill. <i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal <i>A. reticulata</i> L. <i>A. squamosa</i> L.	caule folha caule, folha " "	CHEN, CHANG e WU, 1997b CHANG <i>et al</i> , 1998a CHANG <i>et al</i> , 2000b CHANG <i>et al</i> , 1995 BHAKUNI, TEWARI e DAHR, 1972

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
isoboldina [8]		<i>Annona cherimolia</i> Mill.	casca de caule, folha	VILLAR <i>et al</i> , 1985SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989
		<i>A. glabra</i> L.	caule e casca	YANG; CHEN, 1973 YANG; CHENG, 1974
		<i>A.salzmannii</i> A. DC.	casca	PAULO <i>et al</i> , 1992
		<i>A. senegalensis</i> Pers.	(-)	PHILPOV; KANDE; MACHEV, 1995
isocoridina [9]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN, CHANG e WU, 1997b CHEN <i>et al</i> , 1999
		<i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	casca	SONNET; JACOBSON, 1971 CHANG <i>et al</i> , 2000b
		<i>A. senegalensis</i> Pers.	(-)	PHILPOV; KANDE; MACHEV, 1995
deidrolirindina [10]		<i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	"	CHANG <i>et al</i> , 1998a
nuciferina [11]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	casca de caule	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
O-demetilpurpureina [12]		<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	(-)	SONNET; JACOBSON, 197
N-formil-purpureina [13]		<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	folha	CHANG <i>et al</i> , 1998a
talbaicalidina [14]		<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	folha, caule	CHANG <i>et al</i> , 1998a CHANG <i>et al</i> , 2000b
talicpureina [15]		<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	folha	CHANG <i>et al</i> , 1998a

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
Noraporfínico				
anolobina [16]		<i>Annona cherimolia</i> Mill.	folha, caule, casca de caule	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989 YANG; LIN; WANG, 1991 CHEN; CHANG; WU, 1997 CHEN; WU, 2001
		<i>A. glabra</i> L.	caule e casca	YANG; CHENG, 1974
		<i>A. squamosa</i> L.	raiz	YANG; CHEN, 1970
		<i>A. bullata</i> Rich.	folha	SANDOVAL; RIPPERGER, 1986
anonaina [17]				URZUA; CASSELS, 1977 VILLAR; RIOS, 1983 VILLAR <i>et al.</i> , 1985
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	folha, semente, caule, casca de caule e raiz	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989 YANG; LIN; WANG, 1991 CHULIA <i>et al.</i> , 1995a CHEN; CHANG; WU, 1997b
		<i>A. crassiflora</i> Mart.	folha e casca de caule	HOCQUEMILLER <i>et al.</i> , 198
		<i>A. glabra</i> L.	casca de caule, caule, fruto	YANG; CHENG, 1974 YANG; CHEN, 1973 CHANG <i>et al.</i> , 2000a
		<i>A. hayesii</i> Saff.	casca de caule	RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987
		<i>A. montana</i> Macfad.	casca de caule e folha	YANG; CHENG, 1979
		<i>A. muricata</i> L.	fruto	HASRAT <i>et al.</i> , 1997a HASRAT <i>et al.</i> , 1997b

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
Noraporfinico				
anonaína [17]		<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	caule	CASTRO <i>et al</i> , 1996
		<i>A. reticulata</i> L.	raiz, casca de raiz, casca de caule	TRIMURTI, 1924 YANG; YANG; CHEN; KONG, 1970 YANG; CHEN; KONG, 1973 CHENG, 1987
		<i>A. salzmanii</i> A. DC	casca de caule	PAULO <i>et al</i> , 1992
		<i>A. senegalensis</i> Pers	(-)	PHILPOV; KANDE; MACHEV, 1995
		<i>A. spinescens</i> Mart.	casca de caule	QUEIROZ <i>et al</i> , 1996
N-formil-anonaína [18]		<i>A. squamosa</i> L.	folha, raiz e fruto verde	BHAKUNI; TEWARI; DAHR, 1972 YANG; CHEN, 1970 ; WU <i>et al</i> , 1994
		<i>A. glabra</i> L.	fruto e caule	CHANG <i>et al</i> , 2000a
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN; CHANG; WU, 1997e
asimilobina [19]		<i>A. cacas</i> Warm.	(-)	SAITO; ALVARENGA, 199. CHEN; WU, 2001
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	folha, caule, casca de caule	CHEN; CHANG; WU, 1997e YANG; LIN; WANG, 1991 SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989
		<i>A. crassiflora</i> Mart.	folha e casca de caule	HOCQUEMILLER <i>et al</i> , 198

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
Noraporfinico				
asimilobina [19]		<i>Annona glabra</i> L.	caule e fruto	YANG; CHENG, 1974 YANG; CHEN, 1973 CHANG <i>et al</i> , 2000a CHEN <i>et al</i> , 1999
		<i>A. hayesii</i> Saff.	casca	RASAMIZAFY <i>et al</i> , 1987
		<i>A. muricata</i> L.	fruto	HASRAT <i>et al</i> , 1997a HASRAT <i>et al</i> , 1997b
		<i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	folha	CHAN'G <i>et al</i> , 1998b
		<i>A. reticulata</i> L.	folha, casca de caule, raiz e rizoma	RASAMIZAFY <i>et al</i> , 1987 CHANG <i>et al</i> , 1995 XU <i>et al</i> , 1992
michelalbina (norushinsunina) [20]		<i>A. squamosa</i> L.	fruto verde	WU <i>et al</i> , 1994
		<i>A. cacans</i> Warm.	(-)	SAITO; ALVARENGA, 1992 URZUA; CASSELS, 1977 SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	YANG; LIN; WANG, 1991 CHULIA <i>et al</i> , 1995b CHEN; CHANG; WU, 1997b
		<i>A. reticulata</i> L.	raiz, casca de raiz, casca de caule e rizoma	YANG; CHEN; KONG, 1970 YANG; CHEN; KONG, 1973 YANG; CHENG, 1987 XU <i>et al</i> , 1992
		<i>A. glabra</i> L.	casca de caule	YANG; CHEN, 1973 YANG; CHENG, 1974
		<i>A. squamosa</i> L.	raiz	YANG; CHEN, 1970
		<i>A. spinescens</i> Mart.	"	QUEIROZ <i>et al</i> , 1996
		<i>A. hayesii</i> Saff.	(-)	RASAMIZAFY <i>et al</i> , 1987

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
Noraporfínico				
norcoridina [21]		<i>Annona reticulata</i> L.	folha	CHANG <i>et al</i> , 1995
		<i>A. squamosa</i> L.	"	BHAKUNI; TEWARI; DAHI 1972
		<i>A. muricata</i> L.	frutos	HASRAT <i>et al</i> , 1997a HASRAT <i>et al</i> , 1997b
nordomesticina [22]		<i>A. montana</i> Macfad.	folha	WU <i>et al</i> , 1993
		<i>A. squamosa</i> L.	fruto verde	WU <i>et al</i> , 1994
norisocoridina [22]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN; CHANG; WU, 1997b CHEN <i>et al</i> , 1999
		<i>A. squamosa</i> L.	folha	BHAKUNI; TEWARI; DAHI 1972

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
Noraporfínico				
normuciferina [23]		<i>A. glabra</i> L.	fruto e caule	CHANG <i>et al</i> , 2000a
		<i>A. glabra</i> L.	caule e casca	YANG; CHEN, 1973 YANG; CHENG, 1974
		<i>A. hayesii</i> Saff.	casca	RASAMIZAFY <i>et al</i> , 1987
		<i>A. muricata</i> L.	frutos	HASRAT <i>et al</i> , 1997a HASRAT <i>et al</i> , 1997b
		<i>A. montana</i> Macfad.	folha	WU <i>et al</i> , 1993
		<i>A. squamosa</i> L.	fruto verde	WU <i>et al</i> , 1994
norpurpureina [24]		<i>Ammonia purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	folha, caule	CHANG <i>et al</i> , 1998b CHANG <i>et al</i> , 2000b

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
Noraporfínico				
xilopina [25]		<i>Annona cherimolia</i> Mill.	folha, caule, casca de caule	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989 CHEN; CHANG; WU, 1997b CHEN; WU, 2001
		<i>A. reticulata</i> L.	folha	CHANG <i>et al</i> , 1995
		<i>A. squamosa</i> L.	"	BHAUMIK <i>et al</i> , 1979
Oxoaporfínico				
aterospermidina [26]		<i>A. montana</i> Macfad.	folha e casca de caule	YANG, CHENG, 1979
		<i>A. muricata</i> L.	casca de caule	AQUILAR-SANTOS, LIBREA, SANTOS, 1967
			folha, casca de caule e raiz	LEBOEUF <i>et al</i> , 1981
		<i>A. cacas</i> Warm.	(-)	SAITO; ALVARENGA, 1994
liriodenina (oxoshinsunina) [27]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	folha, caule e casca de caule	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989 YANG; LIN; WANG, 1991 CHULIA <i>et al</i> , 1995b CHEN; WU, 2001
		<i>A. dioica</i> A. St.-Hil.	lenho	DOS SANTOS <i>et al</i> , 2003
		<i>A. foetida</i> Mart.	casca	COSTA <i>et al</i> , 2006
		<i>A. glabra</i> L.	lenho, fruto, caule e casca	YANG; CHEN, 1973, CHANG <i>et al</i> , 2000a
		<i>A. hayesii</i> Saff.	casca	RASAMIZAFY <i>et al</i> , 1987

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
Oxoaporfinico				
liriodenina (oxoshinsunina) [27]		<i>Annona montana</i> Macfad.	folha e casca de caule	YANG; CHENG, 1979 WU <i>et al.</i> , 1994
		<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	caule e lenho	CASTRO <i>et al.</i> , 1996 CHANG <i>et al.</i> , 2000b
		<i>A. reticulata</i> L.	raiz, casca de caule e raiz, rizoma	YANG; CHEN; KONG, 1970 YANG; CHEN; KONG, 1973 YANG; CHENG, 1987 XU <i>et al.</i> , 1992 CHANG <i>et al.</i> , 1995
		<i>A. senegalensis</i> Pers.	(-)	PHILIPPOV; KANDE; MACHEV, 1994
		<i>A. spinescens</i> Mart.	raiz	QUEIROZ <i>et al.</i> , 1996
lisicamina [28]		<i>A. squamosa</i> L.	caule e fruto verde	CHEN <i>et al.</i> , 1998 WU <i>et al.</i> , 1994 YANG; CHANG; WU, 2004
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule e casca	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989
		<i>A. glabra</i> L.	fruto e caule	CHEN; CHANG; WU, 1997b
		<i>A. hayesii</i> Saff.	(-)	CHANG <i>et al.</i> , 2000a
		<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	caule	RASAMIZAFY <i>et al.</i> , 1987 CHANG <i>et al.</i> , 2000b

Quadro 2- continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referências
Oxoaporfínico				
oxonantenina [30]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	folha	CHEN; WU, 2001
		<i>A. reticulata</i> L.	"	CHANG <i>et al</i> , 1995
oxoxilopina (lanusinogina) [31]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	folha, caule e casca de caule	CHEN; WU, 2001 CHEN; CHANG; WU, 1997b SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989 VILLAR <i>et al</i> , 1985
		<i>A. reticulata</i> Mill.	folha	CHANG <i>et al</i> , 1995
		<i>A. squamosa</i> L.	folha e frutos verdes	WU <i>et al</i> , 1994 BHAUMIK <i>et al</i> , 1979

(-): dado não especificado

Quadro 3 - Alcalóides benzilisoquinólicos encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécies	Órgão vegetais	Referências
anomuricina [32]		<i>Annona muricata</i> L.	folha, raiz e casca de caule	LEBOEUF <i>et al</i> , 1980 LEBOEUF <i>et al</i> , 1981
anionurina [33]		<i>A. muricata</i> L. (-)		LEBOEUF <i>et al</i> , 1980 LEBOEUF <i>et al</i> , 1981
coclaurina [34]		<i>A. cristalensis</i> Borhidi e Moncada <i>A. muricata</i> L. <i>A. squamosa</i> L.	orgãos aéreos folha, raiz e casca de caule pericarpo verde	FAUST <i>et al</i> , 1981 LEBOEUF <i>et al</i> , 1981 WU <i>et al</i> , 1994
O-metilarmepavina [35]		<i>A. squamosa</i> L.	folha	BHAUMIK <i>et al</i> , 1979

Quadro 3 – continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécies	Órgãos vegetais	Referências
higenamina [36]		<i>Annona squamosa</i> L. (-)		WAGNER; REITER; FRESTL, 1980 LEBOEUF <i>et al</i> , 1981
reticulina [37]		<i>A. glabra</i> L.	lenho e casca	YANG; CHEN, 1973
			folha	YANG; CHEN; KUAN, 1971
			casca de caule	YANG; CHENG, 1974
		<i>A. montana</i> Macfad.	folha e casca de caule	YANG; CHENG, 1979
			casca de caule	AQUILAR-SANTOS; LIBREA; SANTOS, 1967
		<i>A. muricata</i> L.	folha, casca de caule e raiz	LEBOEUF <i>et al</i> , 1981
		<i>A. muricata</i> L.	pericarpo (exceto polpa e sementes)	DOS SANTOS <i>et al</i> , 2003
		<i>A. reticulata</i> L.		KOTAKE <i>et al</i> , 2004
		<i>A. squamosa</i> L.		
		<i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	caule	CHANG <i>et al</i> , 2000b
			casca de caule e raiz	YANG; CHENG, 1987
		<i>A. reticulata</i> L.	casca de raiz	GOPINATH; GOVINDACHARI; VISWANATHAN, 1959 YANG; CHEN; KONG, 1973
		<i>A. salzmanii</i> A. DC.	casca	PAULO <i>et al</i> , 1992
		<i>A. spinescens</i> Mart.	casca de caule	QUEIROZ <i>et al</i> , 1996
			raiz	YANG; CHEN, 1970
		<i>A. squamosa</i> L.	pericarpo verde	WU <i>et al</i> , 1994

(-): dado não especificado

Quadro 4 - Alcalóides tetrahidroprotoberberínicos encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécies	Órgãos vegetais	Referências
aequalina (discretamina) [38]		<i>Annona reticulata</i> L.	rizoma	XU <i>et al.</i> , 1992
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	casca de caule	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989
coritenchina [39]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	folha	MARTINEZ-VÁZQUEZ <i>et al.</i> , 2005
coreximina [40]		<i>A. muricata</i> L.	folha, casca de caule e raiz	LEBOEUF <i>et al.</i> , 1981
		<i>A. muricata</i> L. <i>A. reticulata</i> L. <i>A. squamosa</i> L.	partes pericarpo	KOTAKE <i>et al.</i> , 2004
isocoreximina [41]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	raiz	MARTINEZ-VÁZQUEZ <i>et al.</i> , 2005

Quadro 4 - continuação

Alcalóide	Estrutura química	Espécies	Órgão vegetais	Referências
pessoina [42]		<i>Annona spinescens</i> Mart.	casca de caule	QUEIROZ <i>et al</i> , 1996
quiquemanina [43]		<i>A. cherimola</i> Mill. <i>A. glabra</i> L.	caule pericarpo e caule	CHEN; CHANG; WU, 1997b CHANG <i>et al</i> , 2000a

Quadro 5 - Alcalóides proaporfínicos encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide proaporfínico	Estrutura química	Espécies	Órgãos vegetais	Referências
estefarina [44]		<i>Annona cacans</i> Warm.	(-)	SAITO; ALVARENGA, 1994
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN; CHANG; WU, 1997b
		<i>A. glabra</i> L.	caule e pericarpo	CHANG <i>et al</i> , 2000a
		<i>A. hayesii</i> Saff.	casca	RASAMIZAFY <i>et al</i> , 1987
		<i>A. muricata</i> L.	folha, casca de caule e raiz	LEBOEUF <i>et al</i> , 1981
glaziovina [45]		<i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	(-)	SONNET; JACOBSON, 1971
			caule	CHANG <i>et al</i> , 2000b
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	casca de caule	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1989
oxoglaucina(O-metilatreolina) [46]		<i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	(-)	SONNET; JACOBSON, 1971
			folha	CHANG <i>et al</i> , 1998a
		<i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	caule, folha	CHANG <i>et al</i> , 1998a CHANG <i>et al</i> , 2000b
		<i>A. glabra</i> L.	(-)	TIAN <i>et al</i> , 2001
		<i>A. cherimolia</i> Mill.	caule	CHEN; CHANG; WU, 1997b

(-): dado não especificado

Quadro 6 - Alcalóides fenantrênicos encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide fenantrênico	Estrutura química	Espécies	Órgãos vegetais	Referências
argentininina [47]		<i>Annona montana</i> Macfad.	folha e casca de caule	YANG; CHENG, 1979
			folha	WU <i>et al</i> , 1993

Quadro 7 - Alcalóides pirimidina- β -carbolínicos encontrados no gênero *Annona*

Alcalóide	Estrutura química	Espécies	Órgãos vegetais	Referências
anomontina [48]		<i>Annona foetida</i> Mart.	casca	COSTA <i>et al</i> , 2006
n-hidroxi-anomontina [49]		<i>A. montana</i> Macfad.	lenho e raiz	LEBOEUF <i>et al</i> , 1982b
		<i>A. foetida</i> Mart.	folha e casca de caule	COSTA <i>et al</i> , 2006
		<i>A. montana</i> Macfad.	lenho e raiz	LEBOEUF <i>et al</i> , 1982b

2.2.2.2 Flavonóides

O número de flavonóides isolados a partir de espécies do gênero *Annona* (**Quadros 8 e 9**) é reduzido, comparado ao número de alcalóides. Entre os compostos isolados, predominam os O-heterosídeos (**Quadro 8**) em relação às geninas (**Quadro 9**), assim como a classe dos flavonóis (**Quadros 8 e 9**).

Quadro 8 –O-Heterosídeos de flavonóis encontrados no gênero *Annona*

O-Heterosídeos de flavonóis	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
3-O-[3'',6''-di-O-p-hidroxicinamoil]-β-galactopiranosil-canferol [50]		<i>Annona dioica</i> A. St.-Hil	folhas	VEGA <i>et al</i> , 2007
6''-O-p-hidroxicinamoil-β-galactopiranosil-canferol [51]		<i>A. dioica</i> A. St.-Hil	"	VEGA <i>et al</i> , 2007

Quadro 8 - Continuação

O-Heterosídeos de flavonóis	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
<p>3-O-β-galactopiranosil- canferol</p> <p>[52]</p>		<p><i>Annona dioica</i> A. St.-Hil</p>	<p>folhas</p>	<p>VEGA <i>et al</i>, 2007</p>
<p>3-O-galactosídeo - miricetina</p> <p>[53]</p>		<p><i>A. squamosa</i> L.</p>	<p>"</p>	<p>KOTKAR <i>et al</i>, 2002</p>

Quadro 8 - Continuação

O-Heterosídeos de flavonóis	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
3-O-β-D-galactosídeo- quercetina [54]		<i>Annona squamosa</i> L.	folhas	SEETHARAMAN, 1986
3-O-glicosídeo -quercetina [55]		<i>A. squamosa</i> L.	"	KOTKAR <i>et al.</i> , 2002

Quadro 8 - Continuação

O-Heterosídeos de flavonóis	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
3-O-ramnosídeo- isoramnetina [56]		<i>Annona purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	"	CHANG <i>et al.</i> , 1998
3-O-ramnosídeo -quercetina [57]		<i>A. purpurea</i> Moc. & Sessé ex Dunal	"	CHANG <i>et al.</i> , 1998 a

Quadro 8 – continuação

O-Heterosídeos de flavonóis	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
<p>3-O-ramnosídeo - tanarixetina</p> <p>[58]</p>		<p><i>Annona purpurea</i> loc. & Sessé ex Dunal</p>	<p>folhas</p>	<p>CHANG <i>et al</i>, 1998 a</p>
<p>3-O-rutinosídeo - quercetina</p> <p>[59]</p>		<p><i>A.squamosa</i> L. <i>A. cherimolia</i> Mill.</p>	<p>folhas</p>	<p>SEETHARAMAN,1986; KOTKAR <i>et al</i>, 2002; VILLAR <i>et al</i>, 1984</p>

Quadro 9 - Geninas de flavonóis e de flavonas, encontrados no gênero *Annona*

Geninas de flavonóis	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
canferol [60]		<i>Annona warmingiana</i> Mello-Silva & Pirani <i>A. tomentosa</i> R.E. Fr <i>A. dioica</i> A. St.-Hil	folhas	SANTOS, SALATINO, 2000 VEGA <i>et al</i> , 2007
isoramnetina [61]		<i>A. monticola</i> Mart	"	SANTOS, SALATINO, 2000
isoquercitrina [62]		<i>A. cherimolia</i> Mill.	"	VILLAR <i>et al</i> , 1984

Quadro 9 - continuação

Geninas de flavonóis	Estrutura química	Espécie	Órgão vegetal	Referência
quercetina [63]		<i>Annona cherimolia</i> Mill. <i>A. crassiflora</i> Mart. <i>A. monticola</i> Mart. <i>A. squamosa</i> L. <i>A. warningiana</i> R.E. Fr	folhas	SEETHARAMAN, 1986; VILLAR <i>et al</i> , 1984
3,7- éter-dimetílico -quercetina [64]		<i>A. squamosa</i> L.	"	KOTKAR <i>et al</i> , 2002
Geninas de flavonas				
luteolina [65]		<i>A. tomentosa</i> R.E. Fr.	"	SANTOS, SALATINO, 2000

2.2.2.3 Outros componentes encontrados no gênero *Annona*

Além de alcalóides e flavonóides, outras classes de compostos bioativos de grande interesse foram isolados de espécies de *Annona*, entre as quais citam-se: acetogeninas (ARAYA *et al*, 2002), ligninas (YANG, CHAN e WU, 2005), saponinas (SALUJA e SANTANI, 1990) e terpenos (GARG e GUPTA, 2005).

As acetogeninas possuem um esqueleto de ácidos graxos, formado por 32 a 34 carbonos, com ligações duplas e triplas, sem ramificações e no final uma γ -lactona. De 417 acetogeninas isoladas até 2005, 293 pertencem ao gênero *Annona* (BERMEJO *et al*, 2005).

As ligninas e saponinas também estão presentes no gênero, porém de forma menos expressiva (LEBOEUF *et al*, 1982).

Entre os terpenos presentes no gênero, foram identificados cerca de 53 componentes no óleo volátil de cinco espécies de *Annona*, sendo β -cariofileno o componente majoritário em *A. muricata*, *A. reticulata* e *A. squamosa*, e terpinen-4-ol, em *A. cherimola* e *A. senegalensis* (WELE *et al*, 2004). No óleo volátil de *A. cherimolia* foram encontrados α -terpinoleno, β -pineno, β -fenchila e germacreno, igualmente, majoritários (RIOS *et al.*, 2003). Em *A. glabra*, a presença de limoneno, α -felandreno e β -ocimeno foi reportada por SANTOS *et al* (1998) e de blumenol A, nas folhas (LIU *et al*, 1999).

2.2.3 *Annona squamosa* L.

A. squamosa é uma das mais estudadas espécies do gênero do ponto de vista químico, apresentando alcalóides (**Quadro 10**), flavonóides (**Quadro 11**), além de acetogeninas, terpenos, saponinas, ligninas e neoligninas (LEBOEUF *et al*, 1982; SEETHARAMAN, 1986; GARG e GUPTA, 2005; YU *et al*, 2005; YU-LIANG *et al*, 2005; CHAVAN, SHINDE e NIRMAL, 2006; MORITA *et al*, 2000; YANG, CHANG e WU, 2005; SALUJA e SANTANI, 1990).

Os alcalóides isoquinolínicos estão entre os compostos mais freqüentes de *A. squamosa*. Até a presente revisão, foi relatado o isolamento de 19 deles (**Quadro 10**). A grande maioria deles consitui-se de alcalóides aporrfínicos, seguida pela subclasse dos oxoaporrfínicos.

Quadro 10 - Alcalóides aporfínicos e oxoaporfínicos encontrados em *Annona squamosa* L.

Alcalóide	Órgãos vegetais	Referências
Aporfínicos		
anonaína [17]	raiz	YANG e CHEN, 1970
	semente	REYES e SANTOS, 1931
asimilobina [19]	pericarpo verde	WU <i>et al</i> , 1994
coclaurina [34]	"	WU <i>et al</i> , 1994
coreximina [40]	pericarpo (partes)	KOTAKE <i>et al.</i> , 2004
coridina [6]	(-)	BHAKUNI <i>et al</i> , 1972
	pecíolo	LEBOEUF <i>et al</i> , 1981;
higenamina [36]	(-)	WAGNER, REITER, FRESTL, 1980
isocoridina [9]	raiz e caule	BHAKUNI <i>et al</i> , 1972 ; RAO <i>et al</i> , 1978
glaucina [7]	(-)	BHAKUNI <i>et al</i> , 1972
lanuginosina [31]	folha	BHAUMIK <i>et al</i> , 1979
Oxoaporfínicos		
	fruto verde	WU <i>et al</i> , 1994
liriodenina [27]	raiz	YANG e CHEN, 1970
[oxoushinsuina]	caule	YANG; CHANG; WU, 2004
O-metilarmepavina [35]	folha	BHAUMIK <i>et al</i> , 1979
michelalbina [20]	raiz	YANG; CHEN, 1970
norcoridina [21]	(-)	BHAKUNI <i>et al</i> , 1972
norisocoridina [22]	(-)	BHAKUNI <i>et al</i> , 1972
nornuciferina [23]	pericarpo verde	WU <i>et al</i> , 1994
oxoxilopina [31]	"	WU <i>et al</i> , 1994
	raiz	YANG e CHEN, 1970
reticulina [37]	pericarpo verde	WU <i>et al</i> , 1994
	caule	YANG; CHANG; WU, 2004, CHEN <i>et al</i> , 1998
talifolina [3]	caule	
xilopina [25]	folha	BHAUMIK <i>et al</i> , 1979

(-): órgão vegetal não especificado

No tocante aos flavonóides, foi relatado número reduzido de isolamentos a partir desta espécie (**Quadro 11**), sendo a maioria de *O*- heterosídeos.

Quadro 11 – *O*-heterosídeos de flavonóis e genina encontrados em *Annona squamosa* L.

Flavonóide	órgão vegetal	Referências
<i>O</i>- heterosídeo		
3,7-éter-dimetil-quercetina [64]	folha	KOTKAR <i>et al</i> , 2002
3-O-galactosídeo – miricetina [53]		"
3-O-glicosídeo –quercetina [55]		"
3-O-β-D-galactosídeo quercetina [54]		SEETHARAMAN,1986
3-O-rutinosídeo –quercetina (rutina)[59]		SEETHARAMAN,1986; KOTKAR <i>et al</i> , 2002;
Genina		
quercetina [63]	folha	SEETHARAMAN, 1986

Muito freqüentes, na família Annonaceae, e em todo o gênero *Annona* (CARVALHO, 1997; BERMEJO *et al*, 2005), as acetogeninas também estão presentes em *A. squamosa* L. e foram isoladas em grande parte, a partir da semente, totalizando 75, até o momento.

No óleo volátil de *A. squamosa* L. obtido de diferentes órgãos vegetais, foram identificados cerca de 38 compostos terpênicos sendo, que entre os majoritários, encontraram-se: o monoterpene cânfora (**Figura 8 A**) (MARTA *et al.*, 1997; RAO, MURTY e RAO, 1978) e o sesquiterpene germacreno D (**Figura 8 B**) (GARG e GUPTA , 2005; CHAVAN, SHINDE, NIRMAL, 2006).

Figura 8- Estruturas químicas de terpenos majoritários identificados em *A.squamosa* L. A. monoterpene cânfora. B. sesquiterpene germacreno D.

2.3 ASPECTOS BOTÂNICOS

2.3.1 Generalidades

A família Annonaceae ocorre em regiões subtropicais e tropicais, em ambos os hemisférios, principalmente, em florestas tropicais de baixa elevação na América do Sul, América do Norte, oeste da África e norte da Austrália (**Figura 9**). O gênero *Asimina* é uma exceção, desenvolvendo-se na América do Norte, região dos Grandes Lagos e áreas de zona temperada. No Brasil, há representantes ocorrendo em maiores altitudes, chegando no máximo a 1.300 metros. O gênero *Xylopia* é o único que ocorre nos dois hemisférios (HUTCHINSON, 1973; KESSLER, 1993).

A família Annonaceae é uma das mais uniformes quanto ao hábito, habitat e aos aspectos anatômicos. Compreende 135 gêneros e aproximadamente 2500 espécies, sendo o gênero *Annona* constituído por 150 espécies. Os principais gêneros são: *Guatteria*, *Uvaria*, *Polyalthia*, *Artabotrys*, *Rollinia* e *Annona*. No Brasil, estão registrados 29 gêneros e 260 espécies, com ampla distribuição, principalmente no norte do país (BARROSO, 1978; JOLY, 1987; JUDD *et al*, 2002; MAAS *et al*, 2002; SMITH *et al*, 2004).

Figura 9- Distribuição geográfica da família Annonaceae no mundo (HEYWOOD, 1993).

Do ponto de vista econômico, a família destaca-se pela produção de frutos comestíveis, nos gêneros *Rollinia* e *Annona*. O óleo aromático, extraído das pétalas de *Cananga odorata* (“ylang-ylang”) e *Mkilua fragrans*, é utilizado pela indústria, em produtos cosméticos. *Xylopia aethiopica*, conhecida como pimenta negra no oeste africano, é utilizada como condimento, bem como *Monodora myristica*, que é utilizada como sucedâneo da noz-moscada (HUTCHINSON, 1973; HEYWOOD, 1993; JUDD *et al*, 2002).

Os representantes do gênero *Annona* possuem hábito variando de arbóreo a arbustivo, podendo ocorrer, de forma rara, arbustos anões, com altura de 10 a 15 cm (*Annona pygmaea*) e ramos espinescentes (*Annona spinences* e *A. puniceifolia*) (KESSLER, 1993; JUDD *et al*, 2002).

A origem da espécie *A. squamosa*, selecionada para o presente estudo, é controversa, mas reconhece-se que é americana, sobretudo, das Antilhas. Sendo importante do ponto de vista frutícola, foi rapidamente levada para outros países tropicais (**Figura 10**), de modo que, três séculos, depois do seu descobrimento, encontrava-se distribuída em muitos países na América do Sul (CORRÊA, 1984; CRUZ, 1995).

A.squamosa foi descrita, pela primeira vez, por Linnaeus (1753). A espécie possui hábito arbóreo ou arbustivo, com ramos castanhos, tricomas esparsos, simples e longos (CORRÊA, 1984; PONTES, BARBOSA e MASS, 2004; LIMA-BRITO *et al*, 2006; MASS *et al*, 2001).

A.squamosa L. apresenta as seguintes sinonímias científicas: *Annona asiatica* L., *Guanabanus squamosus* M. Gómez, *A. cinerea* Dunal e *Xylopia frutescens* Sieb. (CORRÊA, 1984; LORENZI, 2002).

A espécie apresenta diversas denominações vulgares, como: “fruta-do-conde”, “fruta de conde”, “pinha” “fruta de condessa”, “ata”, “ateira”, “fruteira-de-conde”, “pinha-da-Bahia”, “pinheira-da-Bahia” (PENA, 1946; CRUZ, 1985; TORKELSON, 1996 MARTINS *et al*, 2002; LORENZI, 2002; MORS, 2000), “araticutitaia” e “ati”, entre os indígenas (CRUZ, 1985).

[Fonte: http://mobot1.mobot.org/website/map_post.asp]

Figura 10- Mapa da distribuição de *A. squamosa* no mundo.

2.3.2 Família Annonaceae

2.3.2.1 Caracteres morfológicos

A maioria dos representantes da família Annonaceae é constituída por plantas lenhosas (árvores, arbustos e lianas), com folhas inteiras, simples, disposição alterna, dística e desprovidas de estípulas (HUTCHINSON, 1967; HUTCHINSON, 1973; JUDD *et al*, 2002; MASS e WESTRA, 1993; KESSLER, 1993).

Geralmente, as flores são verdes, amareladas ou roxas. Apresentam-se de forma isolada ou estão reunidas em inflorescências, com duas ou mais flores, grandes ou pequenas. Estas são andróginas, diclamídeas, actinomorfas, terminais, axilares e opositifólias. O perianto amarelado, esverdeado ou purpúreo, é diferenciado em cálice e corola. O cálice é formado por três sépalas livres ou concrecidas na base, podendo ser glabras ou pilosas. A corola, imbricada ou valvar, em geral, é formada por seis pétalas bisseriadas ou 3 pétalas livres unisseriadas, geralmente carnosas, glabras ou pilosas. Verifica-se a presença de numerosos estames, dispostos em espiral, raramente laminares e de anteras biloculares. O ovário é constituído de numerosos carpelos, dispostos em espiral, sendo livres entre si, e apresentando um ou muitos óvulos (HUTCHINSON, 1967; HUTCHINSON, 1973; BARROSO, 1978; JOLY, 1987; JUDD *et al*, 2002; PONTES, 2004; KESSLER, 1993).

Os frutos são apocárpicos, pseudosincárpicos ou sincárpicos, com número variável de carpídios. São, ainda, sésseis ou estipitados, secos ou carnosos, deiscentes ou indeiscentes. Mostram disposição livre entre si ou podem estar reunidos em formato estrobiliforme. Possuem sementes com endosperma ruminado e embrião diminuto, estando presas aos funículos longos, sendo freqüentemente ariladas (SIMPSON, 1953; HUTCHINSON, 1973; BARROSO, 1978; BARROSO *et al*, 1999; BHATTACHARYA e JOHRI, 1998, LOBÃO, 2005; KESSLER, 1993).

2.3.2.2 Caracteres anatômicos

Na família Annonaceae, geralmente, as folhas apresentam epiderme unisseriada, podendo ser plurisseriada em alguns gêneros, como em: *Cleistopholis*, *Ellipeia*, *Miliusa*, *Mitrephora*, *Pachypodanthium* e *Xylopia*. Em algumas espécies, a epiderme foliar distribui-se em duas camadas, sendo que alguns autores denominam a mais interna de hipoderme (METCALFE e CHALK, 1979).

As células epidérmicas são poligonais ou irregulares, no contorno, apresentando, às vezes, papilas na face adaxial. A cutícula pode ser espessa a moderadamente espessa e estriada, com estrias visíveis sobre as células-guarda e os tricomas (METCALFE e CHALK, 1979; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998).

A presença de cristais, na epiderme, é comum sendo mais freqüentes, neste tecido, do que ao redor dos feixes vasculares e mesofilo. Podem ocorrer cristais prismáticos, isolados ou em bainha cristalífera, e drusas (METCALFE e CHALK, 1979).

Em algumas espécies, as células epidérmicas da face abaxial, apresentam papilas interligadas por cutícula rugosa (CRONQUIST, 1981).

Os estômatos são numerosos e encontram-se na face abaxial. Em espécies tropicais de *Artabotrys* e em espécies de *Deerigothamnus*. podem ser observados na face adaxial. Em espécies de *Artabotrys* e *Guatteria* podem ser vistos na epiderme da nervura mediana na face adaxial.

Embora sejam, geralmente, paracíticos, há registro de estômatos anisocíticos, em *Miliusa tomentosa*, com células anexas comuns a dois estômatos (METCALFE e CHALK, 1979; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998).

Os estômatos encontram-se no mesmo nível das demais células epidérmicas, exceto quando ocorre sobreposição pela papila. Em alguns casos, podem ser observados em nível inferior àquele das demais células epidérmicas, como ocorre em *Cleistopholis* e *Xylopia*, podendo ser observados em criptas contendo numerosos tricomas, em *Annona arenaria* Thonn (METCALFE e CHALK, 1979; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998; CRONQUIST, 1981).

O mesofilo é tipicamente dorsiventral, com uma a duas camadas de células de parênquima paliádico, sendo raro o mesofilo isobilateral. A presença, neste, de esclereídeos é comum, dando origem a máculas transparentes (CRONQUIST, 1981).

As estruturas secretoras mostram aspecto semelhante à maioria daquelas encontradas em Magnoliales, sendo freqüentemente observadas células oleíferas, podendo ocorrer também, células contendo mucilagens e resinas. Estas células podem ser vistas como manchas translúcidas nos tecidos (CRONQUIST, 1981).

Tricomas, geralmente, simples ocorrem, embora também possam ser encontrados tricomas estrelares e peltados, em ambas as faces (METCALFE e CHALK, 1950; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998; CRONQUIST, 1981).

Os feixes vasculares são envolvidos freqüentemente por bainhas de fibras que se estendem pelo mesofilo, principalmente, nos feixes de menor porte. Os elementos de vaso do xilema possuem dimensões reduzidas, com diâmetro inferior a 50 µm em algumas espécies de *Malmea*, *Orophea*, *Oxandra* e *Popowia*, podendo ser maiores, com mais de 200 µm de diâmetro, em espécies de *Cananga*, *Guatteria* e *Rollinia*. Apresentam, mais raramente, pontoações simples. Elementos de vaso imperfurados são freqüentes, com reduzidas pontoações areoladas (METCALFE e CHALK, 1979).

O floema apresenta-se, geralmente, estratificado no sentido tangencial. Neste, alternam-se faixas de fibras e de parênquima, com raios em formato cuneiforme. Em secção transversal, na nervura mediana, na região próxima à base da lâmina foliar, o sistema vascular tem formato de uma faixa em forma de arco inteiro ou descontínuo, encerrado por uma bainha de esclerênquima na região adaxial. Em algumas espécies, o sistema vascular, em arco, é estreito.

A faixa vascular pode assumir o formato de anel, sendo achatado, na região adaxial, e freqüentemente descontínuo. O formato do sistema vascular da nervura mediana é freqüentemente característico do gênero sendo difícil estabelecer a diferença entre as espécies (METCALFE e CHALK, 1950; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998; CRONQUIST, 1981).

O pecíolo comumente apresenta feixes vasculares espaçados.

Na maioria das anonáceas, há um único arco vascular, na base do pecíolo, dividindo-se posteriormente em três. No pecíolo distal, é comum observarem-se idioblastos no parênquima fundamental externo aos feixes vasculares, além de fibras envolvendo o sistema vascular (CRONQUIST, 1981; METCALFE e CHALK, 1950).

Em relação às sementes, segundo a classificação proposta por Corner (1976), baseada na diferenciação e estrutura dos tegumentos, a família Annonaceae apresenta semente mesotestal, onde a principal camada mecânica encontra-se na região mediana da testa, entre a camada externa e interna.

O endosperma é caracteristicamente ruminado, apresentando profundas dobras ou invaginações dos tecidos externos, para o interior (BELTRATI, 1994). SMOVA (1988) descreveu a presença de camada de células taníferas formando um U, dividindo a parte interna da semente em duas câmaras, cuja forma e tamanho variam conforme a espécie. Segundo o autor, durante o desenvolvimento da semente, a câmara externa apresenta-se preenchida por amido, que pode ser conduzido para a câmara interna por meio destas células taníferas. Dependendo da espécie, as sementes maduras, contêm óleo ou grãos de amido, no endosperma.

2.3.3 Gênero *Annona*

2.3.3.1 Caracteres morfológicos

Os representantes do gênero *Annona* são providos de folhas simples, terminais e opostas (KESSLER, 1993).

As flores podem ser simples ou dispostas em inflorescências. Possuem três sépalas pequenas, valvares, conectadas ou livres e seis pétalas bisseriadas livres ou conectadas na base. Possuem estames numerosos, freqüentemente conectados. O óvulo é único, basal e ereto (BARROSO, 1999; HUTCHINSON, 1967; FRIES, 1931).

Os frutos são carnosos, múltiplos, estrobiliformes ou globosos e compostos de muitos carpelos com numerosas sementes (BARROSO, 1999; HUTCHINSON, 1967; LOBÃO, 2006).

2.3.3.2 Caracteres anatômicos

Na folha, é relatada a presença de células esclerenquimáticas com pontoações ramiformes, além de epiderme pluriestratificada. Em algumas espécies, as fibras dispõem-se em sentido paralelo à superfície foliar. A ocorrência de células mucilaginosas é relatada (METCALFE e CHALK, 1950).

Geralmente, a epiderme da face adaxial é glabra, embora ocorram tricomas tectores bicelulares em *A. cherimolia*. Quando presentes, na face abaxial, os tricomas tectores são bicelulares e geralmente curtos, diferentemente daqueles de *A. cherimolia*. Quando há papilas, na epiderme da face abaxial os estômatos dispõem-se em nível inferior àquele das demais células epidérmicas, entre as mesmas. Em *A. muricata*, cristais diminutos ocorrem, de forma rara, na epiderme (METCALFE e CHALK, 1950).

A nervura mediana apresenta faixa simples de tecido vascular. Geralmente, grupos de esclereídeos dispõem-se paralelamente à superfície, exceto em *A. coriacea* e *A. foetida*, onde apresentam disposição no sentido anticlinal (METCALFE e CHALK, 1950).

Segundo VAN DER HEIJDEN e BOUMAN (1988), o tegumento interno das espécies deste gênero, não é lignificado e não apresenta cristais, o que o diferencia, por exemplo, daquele do gênero *Rollinia*.

Nas sementes do gênero *Annona*, a região micropilar transforma-se em um anel pluriestratificado e nas sementes imaturas, forma um cone estreitamente envolto pelo tegumento médio fibroso (METCALFE e CHALK, 1950).

O arilo origina-se a partir da região subepidérmica externa do tegumento, sendo revestido por células epidérmicas de tamanho reduzido (METCALFE e CHALK, 1950).

SMOVA (1988) verificou que, o tegumento interno apresenta-se, em parte multisseriado e em outra, unisseriado sendo que, o primeiro apresenta prolongamento em direção à região de micrópila. As células do tegumento mais externo apresentam as paredes uniformemente lignificadas e espessadas, enquanto que, o tegumento interno unisseriado apresenta espessamento lignificado, nas paredes radiais e tangenciais externas. Não há cristais. Na extremidade da micrópila, há massa gordurosa de parênquima formando um opérculo incipiente que fecha parcialmente a abertura do tegumento fibroso.

Segundo SMOVA (1998), o tecido que preenche a micrópila, em espécies do gênero *Annona*, *Xylopia aromatica* and *X. emarginata*, origina-se da região interna do tegumento

externo, enquanto CORNER (1949, 1976) atribuem sua origem à região interna, em *Annona squamosa* e em espécies de *Xylopia*.

VAN DER HELRDEN & BOUMAN (1988) atribuíram a origem da micrópila, no gênero *Annona*, bem como no *Rollinia*, ao tecido externo presente nesta região.

2.3.4 *Annona squamosa* L.

2.3.4.1 Caracteres morfológicos

As folhas, alternas dísticas, apresentam pecíolo sulcado, com cerca de 0,7 de largura por 1,5 cm de comprimento, sendo glabro a glabrescente. O formato da lâmina foliar é lanceolado ou oblongo-lanceolado. As dimensões variam de 3,5 a 8,5 cm de comprimento por 2 a 5 cm de largura. A lâmina é membranácea, possui base e ápice agudos, com margem plana. As folhas apresentam de 6 a 11 pares de nervuras secundárias, e tricomas esparsos, simples, hialinos ocorrendo, principalmente, sobre a superfície das nervuras. (SOUZA, 2003; CORRÊA, 1984; PONTES, BARBOSA e MASS, 2004).

As flores são isoladas, axilares, com dimensões variando de 3,5 cm de comprimento a 1,5 cm de largura; tendo tricomas simples, raros e hialinos. As sépalas possuem formato ovado. São concrecidas na base, ciliadas, possuem ápice agudo, tricomas simples e hialinos, na face externa. As pétalas ocorrem em número de três e são unisseriadas, livres, estreito-oblongas, pubescentes na face externa e glabrescentes na face interna. Os estames são papilosos no ápice. O estilete é estreitado no ápice e pubescente. Os carpelos são numerosos, o ovário pubescente, contendo um óvulo basal.

O fruto é sincárpico, ovado a cordado, com aréolas proeminentes e desprovidas de ápico. As sementes pretas são oblongas, nítidas e glabras, medindo aproximadamente 1,5 cm de largura por 1 cm de comprimento. Possuem tegumento rígido, com formação (rudimentar) de arilóide em forma de rim ao redor do hilo e da micrópila (MASS, 2002; PONTES, BARBOSA e MASS, 2004; LIMA-BRITO *et al*, 2006).

2.3.4.2 Caracteres anatômicos

Na Índia, KUMAR *et al* (2005) descreveram a anatomia de folha. A semente, igualmente, foi descrita (SVOMA, 1998; HAYAT, 1963).

A epiderme das folhas de *A.squamosa* é uniestratificada, apresentando cristais prismáticos de oxalato de cálcio. A folha é hipoestomática. Na epiderme da face abaxial ocorrem tricomas simples e estelares (KUMAR *et al*, 2005).

O mesofilo é dorsiventral e apresenta duas camadas de parênquima paliçádico.

Na nervura mediana, o parênquima fundamental apresenta dutos secretores, contendo mucilagem. Na região adaxial, são encontrados grupos de esclereídeos (KUMAR *et al*, 2005). Na região subepidérmica, há uma a duas camadas de células colenquimáticas. O sistema vascular é do tipo colateral.

A semente apresenta tegumento espesso e fortemente lignificado (HAYAT, 1963).

SMOVA (1998) estudou a região micropilar e em contraste com CORNER (1949, 1976), afirmou que a micrópila origina-se a partir da região interna do tegumento externo e não da sua região interna como afirmaram os últimos.

Segundo a literatura disponível até o momento, a anatomia de pericarpo de *A. squamosa* não foi estudada previamente.

2.4 Usos de *A. squamosa*

Na medicina popular, verificou-se o emprego dos diferentes órgãos vegetais de *A. squamosa*, com aplicações diversas.

Foram relatados os usos como antidepressivo (CHAO-MING *et al*, 1997), sedativo (MORS, 2000) e contraceptivo (RAO *et al*, 1979; FARNSWORTH *et al*, 1975).

Às folhas de *A. squamosa* são atribuídas propriedades sudoríficas, carminativas, estomáquicas, anti-reumáticas, antidisépicas (MORS, 2000; CORRÊA, 1984) e antihelmínticas (LORENZI, 2002). No sul do Vietnã (NGUYEN-POUPLIN *et al*, 2007), são utilizadas como antimaláricas. Na Índia, empregam-se em diarreia e diabetes (DAS, DASH e PADHY, 2003; ATIQUÊ, IQBAL, GHOSH, 1985). Em Cuba, são consideradas anti-catarrais (BEYRA *et al*, 2004).

No Brasil, o decocto das folhas é aplicado em banhos, no combate ao reumatismo, (PENNA, 1946; CRUZ, 1985; CORRÊA, 1984). Na República Dominicana, o mesmo possui emprego nas afecções do baço e, como colutório, no alívio das odontalgias e tratamento de estomatites. As folhas são também mencionadas como febrífugas, emenagogas e tonificantes (MORTON, 2007).

Os infusos das folhas são empregados em doenças respiratórias e gastrointestinais, no sul do México (GARCÍA-ALVARADO, VERDE-STAR e HEREDIA, 2001) e na Guatemala (LORENZI, 2002; CÁCERES *et al*, 1991). Na forma de cataplasma, são utilizadas no tratamento de furúnculos e úlceras, para induzir a supuração (LORENZI, 2002).

As folhas maceradas são aplicadas sobre a cabeça, para estimular o sono, em casos de insônia, além de serem conhecidas por aliviar a enxaqueca. As mesmas repelem insetos e larvas, quando colocadas sobre ferimentos e úlceras (MORS, 2000; CORREA, 1984).

Ainda, na Índia, as folhas são usadas no diabetes (KUMAR *et al*, 2005).

Aos frutos desta espécie são atribuídos usos diferentes, conforme o estágio de maturação (MORS, 2000; MORTON, 1997). Os frutos verdes são empregados por suas propriedades adstringente e laxativa. Quando secos, são aplicados externamente para a supuração de feridas da pele (MORS, 2000; CHAMRATPAN e HOMCHUEN, 2005).

Os frutos maduros são macerados, misturados com sal e aplicados em tratamento de tumores, na Índia (MORTON, 2007). No Ceará, o fruto é utilizado em pó, pelos índios, na forma de emplastro, para estancar o sangue (MORAIS *et al*, 2005).

Tanto os frutos como as sementes, são utilizados como inseticidas (SCHULTES e REIS, 1995), sendo que as sementes são usadas na indução de aborto (SCHULTES e REIS, 1995). O infuso apresenta emprego no combate aos piolhos e outros ectoparasitas (LIMA-BRITO *et al*, 2006; GRITSANAPAN, KLAYMONGKOL, WANNASAWAGE, 2007). Além disto, as sementes são tidas como tóxicas e podem causar cegueira (CORRÊA, 1984; LORENZI, 2002).

Tanto as cascas de caule como as raízes são indicadas em acidose metabólica e em problemas urinários, como a cistite (CABRERA, 1971).

Às raízes são atribuídas ainda, propriedades purgativas, havendo relatos de seu uso em problemas na coluna vertebral (CORRÊA, 1984; LORENZI, 2002).

2.5 Atividades farmacológica, biológica e toxicidade de *A.squamosa*

O uso tradicional de *A. squamosa* por povos de diversas partes do mundo e com diversas finalidades despertou o interesse para o estudo farmacológico, tendo sido avaliada em diferentes modelos experimentais.

Até o momento, registram-se pesquisas referentes às seguintes atividades: antimalárica (EL TAHIR *et al*, 1999), anti-helmíntica (CHOUDHARY, 2007), escabícida (INTARANONGPAI *et al*, 2006), vasorelaxante (MORITA *et al*, 2006), antibacteriana (WIART *et al*, 2005), antioxidante (SHIRWAIKAR *et al*, 2004 a), antifúngica (AHMAD e SULTANA, 2003), citotóxica frente às células tumorais de cólon e de pulmão (HATANO *et al*, 2003), entre outras.

Em estudo publicado em 2005, folhas de *A. squamosa* revelaram ser eficazes contra rota-vírus (GONÇALVES *et al*, 2005).

Semelhantemente, o extrato metanólico do fruto de *A. squamosa* levou à significativa inibição da replicação do vírus HIV em linfócitos (WU *et al*, 1996).

A atividade antioxidante das sementes de *A. squamosa* motivou o recente lançamento de produto cosmético, no qual foram incluídas como agente antioxidante (PAUFIQUE, 2007; SINGH e JAYAPRAKASHA, 2006).

O uso tradicional das sementes, em função de sua atividade inseticida (SCHULTES e REIS, 1995), incentivou pesquisas (SAMPA *et al*, 2006; MAHESHWARI, KOTKAR e

MENDKI, 2006; SIKDAR, 2006) e resultou no desenvolvimento de novos produtos, com esta finalidade.

Outra ação confirmada das sementes, a partir de indicação de uso popular, foi a atividade antitumoral (MORTON, 2007). Em estudos em células de carcinoma hepático humano, apresentaram atividade superior ao 5-fluorouracil, composto usado como referência, tendo levado à produção de medicamento antitumoral (ZHANG, 2006 a,b,c).

Os alcalóides totais de *A. squamosa* demonstraram diferentes atividades, como: larvicida, frente ao mosquito *Anopheles stephensis* (SAXENA *et al*, 1993), antihelmíntica (CHOUDHARY, 2007), antiespasmódica, antihistamínica (GARG e GUPTA, 2005) e ação inotrópica positiva sobre o coração (WAGNER *et al*, 1980).

Frente ao ectoparasita humano *Pediculus humanus*, vulgarmente conhecido como piolho (INTARANONGPAI, CHAVASIRI e GRITSANAPAN, 2006), as sementes demonstraram atividade escabícida.

A atividade antiinflamatória de caules foi comprovada por YEH e colaboradores (2005), tendo isolado o componente terpênico bioativo.

Extratos aquosos de folhas de *A. squamosa* tiveram a atividade antidiabética comprovada em modelos experimentais *in vivo* (KESARI *et al*, 2004), tendo sido elucidado o mecanismo de ação (KALEEM *et al*, 2006).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

A presente pesquisa teve por metas realizar o estudo de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) para a avaliação do potencial antileishmania de extratos aquosos, hidroetanólicos e dos alcalóides totais de folhas e de pericarpos, coletados em diferentes épocas anuais e estágios de maturação do fruto.

3.2 Objetivos específicos

- Obtenção dos alcalóides totais e dos extratos brutos hidroetanólico e aquoso de folha, pericarpo (verde e maduro), semente e arilo,
- Obtenção das frações orgânicas dos extratos bioativos,
- Pesquisa e detecção de marcadores alcaloídicos e flavonoídicos selecionados, nos extratos e frações bioativos,
- Determinação dos teores de classes de metabólitos secundários (alcalóides totais, polifenóis totais, flavonóides totais e taninos) e quantificação de marcador específico (isocoridina) nos alcalóides totais,
- Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* dos alcalóides totais, extratos e frações orgânicas frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/73/M2269),
- Avaliação da citotoxicidade *in vitro* dos alcalóides totais e frações orgânicas em células epiteliais humanas HEP2,
- Estudo morfoanatômico de folha.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

O material botânico foi coletado a partir de espécimes de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) cultivados em propriedade rural particular em área localizada entre as seguintes coordenadas: 49° 59' 3" de latitude Oeste, 21° 45' 602" de longitude Sul situada no município de Getulina (SP), a 447 Km de São Paulo.

As coletas dos ramos aéreos de cinco espécimes de *A. squamosa* foram realizadas nas quatro épocas anuais: verão (21 de fevereiro de 2006), outono (09 de maio de 2006), inverno (11 de agosto de 2006) e primavera (15 de novembro de 2006). Os exemplares foram demarcados para o acompanhamento sazonal, sendo que nas três primeiras coletas os espécimes encontraram-se na fenofase de frutificação, enquanto que, na última coleta estavam em fase de floração.

Os frutos (pericarpos) foram coletados a partir de 10 exemplares, selecionados aleatoriamente nas três primeiras coletas, tendo sido considerados em conjunto ("pool"), representando cada época de coleta para fins de estudo químico.

Exsicatas de ramos aéreos foram identificadas pelo Prof. Dr. Renato de Mello-Silva do Departamento de Botânica do IB-USP e depositadas no Herbário (SPF) do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (IB-USP), sob a denominação de Erdelyi 1.

Parte do material vegetal foi submetida ao processo de secagem (item 4.3.1), para o estudo químico e outra parte, foi conservada em etanol 70% (v/v), para o estudo botânico.

4.2 Material vegetal estudado

O material vegetal destinado ao estudo químico e avaliação da atividade biológica de *A. squamosa*, constituiu-se de folhas e pericarpos, coletados nas 4 épocas (coletas 1, 2, 3 e 4) e, estes últimos, nos estágios de maturação verde (V) e maduro (M), tendo sido utilizados no preparo de extratos.

As partes do pericarpo consideradas, no presente estudo, foram: pericarpo sem sementes, semente sem arilo e arilo.

Neste trabalho, folhas, pericarpos e suas partes, após o processo de secagem, foram genericamente denominados droga. (Tabela 1)

Tabela 1- Material vegetal destinado ao preparo de extratos para o estudo químico e a avaliação de atividade biológica

ÓRGÃO	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	COLETA	
		NÚM	MÊS
FOLHA	n.a.	1	FEV
		2	MAI
		3	AGO
		4	NOV
PERICARPO SEM SEMENTES	V	1	FEV
		2	MAI
		3	AGO
	M	1	FEV
		2	MAI
		3	AGO
SEMENTE SEM ARILO	V	1	FEV
		2	MAI
		3	AGO
	M	1	FEV
		2	MAI
		3	AGO
ARILO	V	1	FEV
		2	MAI
		3	AGO
	M	1	FEV
		2	MAI
		3	AGO

Coletas/ NUM: Coleta 1: em 21/02/06 (frutificação), coleta 2: em 09/05/06 (frutificação), coleta 3: em 11/08/06 (frutificação), coleta 4: em 15/11/06 (floração). Mês: FEV= fevereiro, MAI= maio, AGO= agosto, NOV= novembro. Estágios de maturação do fruto: maduro(M), verde (V). (n.a.) = não se aplica. OBS: denominação estendida para sementes (sem e com arilo) obtidas de frutos nos dois estágios.

4.3 Métodos

4.3.1 Secagem do material vegetal

Os diferentes órgãos aéreos receberam tratamento diferenciado. As folhas de *A. squamosa* foram dispostas sobre esteira de secagem, à sombra e à temperatura ambiente, durante 10 dias. O pericarpo foi fragmentado e seco, em estufa sob circulação de ar (FABBE®), à temperatura de 40°C, por quatro dias. As sementes e os arilos foram separados e desidratados em liofilizador (Edwards®) e, posteriormente, foram conservados, em frascos hermeticamente fechados.

4.3.2 Pulverização do material

O material seco (droga), incluindo folha, pericarpo sem sementes, semente sem arilo e arilo, foi reduzido a pó semifino (tamises n^{os} 355/180) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 1988).

4.3.3 Obtenção de extratos

A partir da droga *A. squamosa* (**Tabela 1**) foram preparados os extratos aquosos, hidroetanólicos e alcaloídicos (alcalóides totais).

4.3.3.1 Extratos aquosos

Os extratos aquosos a partir 2 g de droga (**Tabela 1**), foram preparados adicionando-se 250 mL de água destilada fervente, seguindo-se de filtração após 10 minutos, conforme a técnica de preparo de infusos de LOGGIA (1993). Posteriormente, os extratos aquosos foram liofilizados (Edwards do Brasil[®], modelo Pirani 501), com determinação do rendimento e conservação em dessecador, ao abrigo da luz.

4.3.3.2 Extratos hidroetanólicos

Os extratos hidroetanólicos foram obtidos a partir da droga (**Tabela 1**), por percolação exaustiva a frio, com etanol 96 °GL, após maceração prévia por 24 h. Em seguida, foram concentrados à pressão reduzida, em evaporador rotatório (Büchi[®]), desidratados em liofilizador (Edwards do Brasil[®], modelo Pirani 501) e conservados em dessecador ao abrigo da luz, com determinação do rendimento.

4.3.3.3 Extratos alcaloídicos

Os alcalóides totais foram obtidos dos diferentes órgãos ou suas partes, provenientes das quatro épocas de coleta, segundo o esquema representado na **Figura 11**. Cerca de 2 g de extrato hidroetanólico concentrado (**item 4.3.3.2**) foram solubilizados em ácido fosfórico 10% (v/v) (Synth[®]), com posterior filtração (FISCHER *et al*, 2004).

A solução ácida resultante, foi submetida à partição com 3 alíquotas de *n*-hexano (Synth[®]). Após a lavagem, foi alcalinizada, até pH 9,0-10,0, com solução de hidróxido de amônio (Synth[®]) e submetida à partição com alíquotas de diclorometano (Carlo Erba[®]) (FISCHER *et al*, 2004), até a verificação de reação negativa com reativo de Dragendorff (WAGNER e BLADTT, 1996).

As fases diclorometano foram reunidas, filtradas através de filtro contendo sulfato de sódio anidro (Ecibra[®]) e concentradas, em evaporador rotatório, à pressão reduzida, até a secura. Após estágio em dessecador, determinou-se a massa de alcalóides totais (g) e mantiveram-se em refrigerador, ao abrigo da luz.

Figura 11 - Esquema de procedimento usado na extração de alcalóides totais de *A. squamosa* L.

4.3.3.4 Frações orgânicas dos extratos mais ativos frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Cerca de 1g dos quatro extratos aquosos e hidroetanólicos mais ativos frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (item 5.2.1.1), foram deixados em contato com 20 mL de *n*- hexano p.a. (Merck®) durante 5 minutos, à temperatura ambiente com posterior agitação. Repetiu-se o procedimento, por 4 vezes e reuniram-se as alíquotas que foram, posteriormente, filtradas e concentradas em evaporador rotatório (Büchi®), até a secura.

O resíduo insolúvel foi submetido ao processo, anteriormente descrito, empregando-se, sucessivamente, os seguintes solventes: diclorometano p.a. (Carlo Erba®), acetato de etila p.a. (Synth®) e metanol p.a. (Merck®). O esquema do fracionamento encontra-se representado na **Figura 12**.

Determinou-se a massa dos respectivos extratos orgânicos, que foram conservados em frascos fechados, em congelador à -6°C, ao abrigo da luz, em frascos hermeticamente fechados. Posteriormente, foram submetidos às análises cromatográficas e à avaliação da atividade antileishmania.

Figura 12 - Esquema de procedimento usado para o fracionamento dos extratos brutos de *A. squamosa* L.

4.3.4 Estudo químico

4.3.4.1 Análises espectrofotométricas

As determinações espectrofotométricas de flavonóides totais, polifenólicos e taninos presentes em *A. squamosa* foram realizadas na droga (**Tabela 1**).

4.3.4.1.1 Determinação do teor de flavonóides totais

Realizou-se a quantificação de flavonóides totais presentes na droga, com base no teor de quercetina.

Preparo das amostras

Preparou-se uma amostra referente a cada órgão vegetal, ou parte deste, em cada época anual e grau de maturação (pericarpo sem semente, semente sem arilo, arilo), considerados 22 extratos.

Adicionaram-se cerca de 15 mL de metanol p.a. (Merck®) a 1,25g de droga. A mistura foi mantida em refluxo a 50°C, por 30 minutos. A torta foi extraída novamente com 10 mL de metanol, nas mesmas condições. Os extratos em metanol foram reunidos e filtrados para balão volumétrico de 25 mL, tendo-se completado o volume com metanol (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

Curva de Ringbom do padrão de quercetina

A curva de Ringbom foi obtida (FUNARI, 2005; GARCIA, 2004), para garantir a linearidade da reta de calibração do padrão de quercetina.

A solução inicial de quercetina diidratada (95 % de pureza, Sigma-Aldrich®) foi preparada em metanol p.a. (Merck®) à concentração de 50 µg/ mL. Posteriormente, alíquotas de 1,0 a 20mL (com diferenças de volume de 1 mL da solução inicial) foram transferidas para balões volumétricos de 25mL. A seguir, 1,0 mL de solução de cloreto de alumínio em metanol 2,5% (m/v) foram adicionados a cada balão, ajustando-se o volume com metanol e agitando-se. O branco foi preparado da mesma forma exceto quanto à adição da solução de quercetina.

As determinações das soluções de quercetina foram realizadas, em espectrofotômetro UV/VIS (Beckman®, DU-70), no comprimento de onda de 425 nm, exatamente, após 30 minutos do início da reação. Na curva de Ringbom, os dados da absorbância (100-%T) foram dispostos em função do logaritmo da concentração de quercetina (µg/ mL).

Reta de calibração de quercetina

Na elaboração da reta de calibração de quercetina foram consideradas as concentrações do padrão situadas entre 12 e 20 µg/mL, correspondendo à faixa de linearidade das

determinações, segundo a curva de Ringbom. Os valores de absorbância foram dispostos em função da concentração de quercetina ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

Análise quantitativa de flavonóides totais nos diferentes órgãos vegetais de *A. squamosa* L. , nas quatro épocas anuais

Alíquotas de 1 mL de extratos da droga obtidos em metanol, conforme anteriormente descrito (Preparo das amostras), foram transferidas, em triplicata, para balões volumétricos de 25 mL, tendo-se adicionado 0,5 mL de solução de cloreto de alumínio em metanol 2,5% (m/v). O volume foi ajustado com metanol p.a. (Merck®) (método de FUNARI *et al*, 2006 modificado). Para o branco, procedeu-se de forma semelhante sem adicionar a solução de cloreto de alumínio. Após 30 minutos de reação, determinaram-se os valores de absorbância, nas mesmas condições que o padrão. O teor de flavonóides totais, nos extratos de *A.squamosa*, foi determinado por meio da equação da reta da curva do padrão de quercetina e expresso (% m/m) como média e desvio-padrão (DP) da concentração de quercetina presente ($\mu\text{g}/\text{mL}$).

4.3.4.1.2 Determinação dos teores de polifenólicos totais e de taninos em *A.squamosa*

A determinação do teor de polifenóis totais e de taninos foi realizada de acordo com o método farmacopêico modificado (FARM.BRAS IV, 2002), em extratos aquosos (22) de *A. squamosa* preparados, a partir da droga (**Tabela 1**), conforme descrito, a seguir.

Preparo das amostras

Cerca de 150 mL de água destilada foram adicionados a 0,75g de droga pulverizada. A mistura foi mantida sob refluxo, a 90°C, durante 30 minutos.

Após o resfriamento, a mistura foi filtrada e transferida para balão volumétrico de 250mL, tendo-se ajustado o volume com água destilada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002).

Curva de Ringbom do padrão de ácido gálico

A solução aquosa inicial de ácido gálico (98,5% de pureza, Sigma-Aldrich®) foi preparada à concentração de 100µg/mL. Aliquotas de 1 a 20mL (com volume variando de 1 em 1 mL) foram transferidas para balões volumétricos de 100mL, contendo 70mL de água destilada. Em seguida, adicionaram-se 5mL de reagente Folin-Denis (WAGNER e BLADTT, 1996) e, após 2 minutos, 10mL de solução saturada de carbonato de sódio. O volume final foi ajustado com água destilada, seguindo-se de agitação (FUNARI, 2005).

Após 30 minutos da adição do último reagente, foram determinadas as absorbâncias das soluções de ácido gálico, a 760nm, em espectrofotômetro UV/VIS (Beckman®, DU-70) (FUNARI, 2005).

A curva de Ringbom foi elaborada (FUNARI, 2005; GARCIA, 2004) plotando-se as absorbâncias (100-%T) em função do logaritmo da concentração de ácido gálico.

Reta de calibração do ácido gálico

A faixa de concentração de maior linearidade (de 4 à 8 µg/mL), foi selecionada, a partir da curva de Ringbom. A reta de calibração foi construída dispondo-se as absorbâncias em função das concentrações das soluções do ácido gálico (µg/mL).

Análise quantitativa de polifenóis totais e de taninos, nos diferentes órgãos vegetais de *A. squamosa*, nas quatro épocas anuais

Polifenóis totais

Aliquotas de 5mL de extratos aquosos da droga foram transferidas, em triplicata, para balões volumétricos de 25mL, tendo-se completado o volume com água destilada.

Posteriormente, 5mL desta solução foram adicionados a 2mL do reagente Folin-Denis e o volume foi ajustado para 50mL, com solução saturada de carbonato de sódio. Exatamente 3 minutos após a adição do último reagente, efetuaram-se as medidas de absorbância no comprimento de onda de 760nm, tendo-se utilizado água destilada como branco (FUNARI, 2005).

O teor de polifenóis totais presentes nas amostras foi expresso em percentagem média (% m/m) e respectivo desvio-padrão (DP).

Taninos

Cerca de 0,5g de pó-de-pele (Merck®) foram adicionados a 50mL de cada um dos extratos aquosos da droga (**item Preparo das amostras**), sob agitação constante, durante 1 hora, em agitador magnético. O precipitado foi filtrado através de lã de vidro.

O filtrado foi transferido, em triplicatas de 3,0 mL, para balão volumétrico de 100mL, tendo-se completado o volume com água destilada. Seguiu-se a adição de 5,0mL de reagente Folin-Denis e, após 2 minutos, de 10mL de solução saturada de carbonato de sódio. Completou-se o volume do balão e homogeneizou-se. Decorridos 30 minutos, realizou-se a leitura a 760 nm (FUNARI, 2005).

Por meio da reta de calibração do ácido gálico, calculou-se a concentração de substâncias fenólicas, que não foram adsorvidas pelo pó-de-pele. O cálculo da porcentagem de substâncias adsorvidas ao pó de pele (taninos) foi realizado utilizando-se a expressão seguinte:

$$AD = \frac{(C1 - C2)}{C1} \times 100$$

AD: Porcentagem de adsorção ao pó-de-pele;

C1: Concentração de substâncias fenólicas, antes da reação com pó-de-pele;

C2: Concentração de substâncias fenólicas, após a reação com pó-de-pele.

4.3.4.2 Análises cromatográficas

4.3.4.2.1 Cromatografia em camada delgada

A análise, por cromatografia em camada delgada (CCD), dos extratos alcaloídicos e das frações orgânicas de *A. squamosa* foi realizada para aqueles que se mostraram mais ativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (item 5.2.1.2).

Preparo das amostras

Os extratos alcaloídicos e as frações orgânicas foram solubilizados em metanol à concentração de 1mg/mL (WAGNER E BLADT, 1996). As soluções foram aplicadas em volumes de cerca de 300 µL por placa.

Os padrões de alcalóides foram: isocoridina (98% de pureza, Sigma-Aldrich®) [9]

e boldina (98% de pureza, Sigma-Aldrich®). As soluções dos alcalóides foram preparadas e aplicadas à semelhança das amostras referentes à droga. Ambas as soluções foram aplicadas em volumes variando de cerca de 10 µL/ placa.

Sistema cromatográfico

Nas análises dos extratos alcaloídicos e das frações orgânicas por CCD, foram empregados, respectivamente, os seguintes adsorventes: sílica gel GF₂₅₄ (Merck®), em cromatoplasmas com espessura de 300µm. A saturação da cuba foi total. e o percurso foi de 12,5 cm. O sistema de solventes empregado na análise de AT e das frações foi diclorometano-metanol-acetona (86:13:1).

As cromatoplasmas foram visualizadas à luz natural e sob luz UV 254 nm e 266 nm. Em seguida, foram reveladas com reativo de Dragendorff (HARBORNE, 1998) para a detecção de alcalóides.

4.3.4.2.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

4.3.4.2.2.1 Análise qualitativa dos extratos hidroetanólicos para avaliação da presença de quercetina, quercitrina e rutina, por CLAE

Preparo de amostra

Os extratos hidroetanólicos de *A.squamosa* (item 4.3.3.2) (250 mg) foram solubilizados em alíquotas de 1mL de tolueno (p.a Merck®), em triplicata. Posteriormente, a mistura foi aquecida a 67°C, em banho-de-água, por 5 minutos, e centrifugada (5000 r.p.m), durante 5 minutos. O sobrenadante foi separado. Repetiu-se o mesmo procedimento por três vezes, para cada extrato.

O resíduo seco foi suspenso em metanol (1 mL) e homogeneizado. Após o aquecimento, a 67°C, por 5 minutos, centrifugou-se nas mesmas condições anteriores. Separou-se o sobrenadante, contendo os flavonóides totais. Repetiu-se o procedimento por três vezes. As soluções foram reunidas e levadas à secura, em evaporador rotatório.

O resíduo foi retomado em 1 mL de metanol (HPLC, Tedia®), com posterior filtração através de membrana (13 x 0,45 µm Millipore®) (FURLAN *et al*, 2004).

As soluções dos padrões de quercetina (95%, Aldrich®), quercitrina (98%, Aldrich®) e rutina (98%, Aldrich®), foram preparadas dissolvendo-se 1 mg em 1 mL metanol (HPLC, Tedia®), tendo sido filtradas à semelhança das amostras.

Condições analíticas

As condições de análise foram baseadas na metodologia utilizada por SCHIEBER (2001) e modificada por (FURLAN, 2004).

A análise das amostras dos extratos hidroetanólicos de *A. squamosa* foi realizada, em coluna analítica-C18 (Phenomenex® 150x4,60mm Gemini 5µ 80A), acoplada a cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu® SPD-M10AVP) O fluxo da fase móvel foi variável e ajustado segundo a **Tabela 2**. Os volumes injetados de amostras (extratos e padrões) foram de 50µL. A detecção foi realizada em comprimento de onda de 254 nm e as determinações, em triplicata.

Tabela 2 - Variação do fluxo da fase móvel (mL/min), durante a análise qualitativa de quercetina, quercitrina e rutina nos extratos hidroetanólicos de *A.squamosa*, por CLAE

Tempo de análise (min)	Fluxo de fase móvel (mL/min)
0-40	0,5
40-55	1,0
56-60	0,5

A fase móvel foi preparada com mistura de solventes (A/B), constituída de solução de ácido acético 0,1% (v/v) (solvente A), em água ultrapura (miliQ-plus[®]) e acetonitrila (grau HPLC - Merck[®]) (solvente B). A separação foi realizada utilizando-se gradiente de eluição, programado, segundo a **Tabela 3**.

Tabela 3 - Programação do gradiente de eluição na análise qualitativa de quercetina, quercitrina e rutina nos extratos hidroetanólicos de *A.squamosa*, por CLAE.

Tempo (min)	Fase móvel	
	Solvente A	Solvente B
0-5	88	12
6-8	88-80	12-20
9-28	80	20
29-38	80-50	20-50
39-48	50-35	50-65
49-50	35-0	65-100
51-55	0	100
56-60	88	12

Solvente A: solução de ácido acético 0,1% (v/v), **Solvente B:** acetonitrila.

4.3.4.2.2 Análise quantitativa de isocoridina nos extratos alcaloídicos, por CLAE

Preparo das amostras

Os extratos alcaloídicos (10 mg) dos diferentes órgãos vegetais de *A.squamosa* e de partes destes foram solubilizados em 10 mL de solução constituída de metanol (grau HPLC - Tedia®) e água ultrapura (miliQ-plus®), à proporção de 20:80. As soluções foram homogeneizadas e submetidas a aparelho de ultra-som, (Thornton®, modelo T-14) e, em seguida, filtradas através de membrana (13,00 x 0,45 µm Millipore®). O padrão de isocoridina (98% de pureza, Sigma-Aldrich®) foi solubilizado em metanol (grau HPLC - Tedia®) à concentração de 10mg/mL.

Condições analíticas

As condições analíticas empregadas para a determinação de isocoridina nos extratos alcaloídicos de *A.squamosa* foram previamente otimizadas a partir da metodologia modificada de YAN *et al* (2004).

A determinação de isocoridina nas amostras dos AT de *A. squamosa* foi realizada empregando-se como fase estacionária, a coluna analítica C18 (Phenomenex® Synergi HydroRP 80 (250x 4,6mm, 5µm).] acoplada ao cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu®), equipado com detector UV (SPD-M 10A), sistema de bombas (LC-10AD), degaseificador (DGU-14A), injetor automático (SIL-10AD) e forno de coluna (CTO-10AS). O fluxo da fase móvel foi ajustado para 1,0 mL/min, à temperatura de 25°C.

Os volumes injetados de amostras dos extratos alcaloídicos e das soluções de isocoridina foram, respectivamente, de: 50 e 20µL.

A fase móvel foi preparada com solução de ácido fórmico (pH 3,5) (solvente A), em água ultrapura (miliQ-plus®), e metanol (grau HPLC - Tedia®) (solvente B). A separação foi efetuada de forma isocrática, com sistema de solventes constituído de mistura de A/B, na proporção 60:40. O comprimento de onda de detecção foi de 254 nm e o tempo de análise; de 15 minutos. As análises foram realizadas em triplicata.

Validação do método

A validação do método, anteriormente descrito, foi realizada segundo o compêndio de Validação de Procedimentos Analíticos - ICH Q2 (R1), (2005). As análises de variância foram calculadas com auxílio do programa ANOVA.

Curva de calibração e linearidade

A curva de calibração foi construída plotando-se as médias das áreas do pico de isocoridina de cinco soluções-padrão, em relação às respectivas do mesmo composto.

A solução estoque de isocoridina foi preparada com, exatamente, 12,5 mg de padrão transferidos para balão volumétrico de 25 mL. Adicionaram-se 20 mL de metanol e submetido a ultra-som, durante 10 minutos. Posteriormente, o volume foi completado com o mesmo solvente. Aliquotas desta solução foram transferidas para balão volumétrico de 10 mL e o volume foi completado com a fase móvel. As concentrações finais das soluções foram 5,0; 10,0; 50,0; 100,0 e 150,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de isocoridina, tendo sido filtradas antes da injeção (13 x 0,45 μm , Millipore®).

Precisão

A precisão do método foi determinada intra e inter-dia, por meio da análise de soluções do padrão de isocoridina em três diferentes concentrações, injetadas cinco vezes consecutivas, durante três dias seguidos. As soluções analisadas foram obtidas a partir de solução inicial preparada com cerca de 12,5 mg, transferidos para balão volumétrico de 25 mL, seguindo-se a adição de 20 mL de metanol, com posterior agitação, em ultra-som, durante 10 minutos. O volume foi completado com o mesmo solvente.

Três alíquotas desta solução (0,5; 1,0 e 1,5 mL) foram transferidas para balões volumétricos (10 mL), tendo-se obtido soluções de 25,0; 50,0 e 75,0 $\mu\text{g} / \text{mL}$, tendo sido filtradas antes da injeção (13 x 0,45 μm , Millipore®).

Exatidão

A exatidão foi avaliada pela concordância entre as determinações do padrão e das concentrações das amostras.

As amostras foram fortificadas com quantidade conhecida de padrão e filtradas antes da injeção (13 x 0,45 μ m, Millipore®).

A solução-padrão em metanol (500 μ g/ mL) foi preparada conforme descrito na avaliação da linearidade. Alíquotas de 0,5, 1,0 e 1,5 mL desta solução foram transferidas para três balões volumétricos de 10 mL, para fortificar 0,5 mL de amostra, em três balões volumétricos de 10 mL. A concentração final destas soluções fortificadas foi calculada por regressão linear.

Seletividade

A resposta do sistema foi examinada em função da presença de interferências ou sobreposições com o pico de isocoridina e pelo perfil espectrofotométrico no tempo de retenção que corresponde a mesma.

Limite de detecção e quantificação

O limite de detecção e a reprodutibilidade do sistema cromatográfico foram avaliadas, a partir de, exatamente, 12,5 mg de isocoridina em balão volumétrico de 25 mL, tendo-se completado o volume, com a fase móvel, anteriormente descrita. Transferiu-se uma alíquota de 1 mL desta solução, para balão volumétrico de 10 mL e ajustou-se o volume com a fase móvel. A solução (50,0 μ g/mL) foi injetada cinco vezes, tendo-se calculado a média e o desvio padrão relativo.

4.3.5 Avaliação da atividade biológica

Os ensaios para avaliação das atividades antileishmania e citotóxica *in vitro* foram realizados sob a supervisão da Profa. Dra. Silvia Reni Bortolin Uliana, no Departamento de Parasitologia, do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo (ICB-USP).

4.3.5.1 Atividade antileishmania *in vitro*

A avaliação da atividade antileishmania *in vitro* de extratos e frações orgânicas de *A.squamosa* foi realizada frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* [MHOM/BR/73/M2269]. Na primeira etapa dos testes, foram avaliados os alcalóides totais e os extratos hidroetanólicos e aquosos. Após a obtenção destes resultados, a etapa seguinte destinou-se ao testes das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos ou aquosos, que demonstraram pronunciada atividade antileishmania, tendo-se determinado as concentrações efetivas, que levaram à inibição de 50% dos parasitas (CE₅₀).

Parasitas

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (linhagem MHOM/BR/73/M2269) foram cultivadas, em meio 199 (Gibco-BRL[®]), preparado com água destilada e adicionado de HEPES (ácido 4-(2-hidroxietil) piperazina-etanosulfônico) 40 mM, [pH 7,4] além de adenina 0,1 mM e hemina 0,005%(m/v) (ARRUDA *et al*, 2005). O meio de cultura foi suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Sigma[®]) 10% (v/v) e solução de penicilina/estreptomicina (100µg/ mL), submetido à com posterior filtração através de membrana (0,22 µm - Millipore[®]), para esterilização e mantido sob prova de esterilidade, durante 18 h, a 37°C, em estufa.

Amostras

A solubilidade dos extratos e frações de *A.squamosa* foi determinada em metanol, água purificada e dimetilsulfóxido (DMSO), tendo-se selecionado aquele mais adequado aos ensaios (DMSO). Em seguida, os AT (0,75mg e 0,25mg) e os extratos aquosos (4 mg),

hidroetanólicos (4mg), e as frações orgânicas (0,75mg) de *A. squamosa* foram solubilizados em 100µL de DMSO p.a. (Merck®.).

As soluções dos padrões de: isocoridina (98% Sigma-Aldrich®), quercetina diidratada (95%, Sigma-Aldrich®), quercitrina (98% Sigma-Aldrich®) e rutina (Sigma-Aldrich®) foram preparadas em diferentes concentrações seguindo idêntico procedimento usado para os extratos.

Testes de sensibilidade dos parasitas

Os testes de sensibilidade de *L. amazonensis* foram realizados, segundo a técnica de ARRUDA e colaboradores (2005).

As formas promastigotas do parasita foram contadas, em câmara de Neubauer, e semeadas, em microplacas de 96 poços, com 5×10^6 promastigotas por poço, cujo volume final foi de 150µL.

Os extratos alcaloídicos, extratos aquosos, extratos hidroetanólicos e frações de *A. squamosa* foram testados, nas concentrações finais de 1600 µg/ mL, por poço. Os padrões o foram, em concentrações variando de 0,06 à 1,6 µg/ mL, por poço, e as frações orgânicas à 300 µg/ mL. Efetuaram-se controles, com DMSO, e sem os extratos. Empregou-se a anfotericina 0,3 µg/ mL, como substância de referência.

Alíquotas de 150 µL de meio de cultura, semeado com parasitas, foram transferidas, por poço, aos quais adicionaram-se 6µL das soluções de extratos, frações orgânicas e padrões. As placas foram incubadas, a 25°C, por 24h. (ARRUDA *et al*, 2005). Após este período, foram adicionados 30 µL de MTT [brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio] a cada poço. O MTT foi previamente dissolvido em tampão A (NaCl 116mM; KCl 5,4mM; MgSO₄ 0,8mM; glicose 5,5mM; MOPS 10mM) (pH 7,2) e esterilizado por filtração em membrana (0,22 µm - Millipore®).

Após 2 horas, foi feita a extração da formazana, das mitocôndrias dos parasitas, com adição de 50µL, por poço de dodecil sulfato de sódio 20% (m/v) (SDS) (Merck®), à temperatura ambiente.

A determinação das porcentagens de inibição das formas promastigotas, frente às amostras, foi realizada, em leitor de ELISA (Multiskan-EX Labsystems®), pela medida da

absorbância a 595 nm, usando como referência, as determinações efetuadas a 690 nm (MOREIRA *et al*, 1996).

A determinação do IC₅₀ foi realizada com auxílio do programa Origin 7.5 (Scientific Graphing and Analysis Software).

4.3.5.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro*

Os alcalóides totais e frações de de *A. squamosa*, que se mostraram mais ativos frente às formas promastigotas de *Leishmania* (L.) *amazonensis* (item 6.1), foram considerados nesta etapa dos testes *in vitro*.

Células

Os ensaios para avaliação da atividade citotóxica *in vitro* foram realizados com células epiteliais humanas HEP-2 (ATCC: CCL 23). As culturas foram mantidas em estufa de CO₂ (5% CO₂ a 37°C).

As células foram submetidas ao descongelamento acelerado, sob agitação em banho-de-água, a 37 ± 0 °C.

A suspensão de células foi transferida para um tubo contendo 10% de soro fetal bovino. Após a homogeneização, foi transferida para garrafa de cultura, contendo 5mL de meio completo (ARRUDA *et al*, 2005). As células aderidas ao vidro foram lavadas com PBS e retiradas utilizando-se 1,5 mL de tripsina. Cerca de 1 mL de suspensão da cultura celular foi transferido para 8 garrafas de repique contendo 9mL de meio RPMI cada.

Amostras

A toxicidade dos solventes metanol e dimetilsulfóxido (DMSO) foi previamente determinada para a seleção do diluente.

Os AT e as frações orgânicas de *A. squamosa*, foram solubilizados em metanol (3000µg/mL) e, posteriormente, a solução foi misturada ao meio RPMI, à proporção de 1:1. A partir desta solução foram feitas diluições, na proporção de 1:10, até a concentração de 3

µg/mL O mesmo procedimento foi seguido para o preparo das amostras referentes aos padrão de isocoridina, partindo-se de uma solução de 4,8 µg/ mL.

Teste de citotoxicidade

Os testes foram realizados, segundo a técnica de ARRUDA e colaboradores (2005), utilizada para macrófagos e adaptada à cultura de HEP-2 (ATCC: CCL 23).

As células foram contadas em câmara de Neubauer, e inoculadas em meio RPMI, de forma a obter 5×10^6 células/ por poço, em microplacas de 96 poços, com volume final de 150µL cada.

As placas foram incubadas, por 24h, em estufa de CO₂ (5% CO₂ a 37°C). Posteriormente, foram inoculadas com os extratos e as frações mais ativos, em cinco diferentes concentrações, variando de 30 a 3000 µg/ mL. No caso do padrão de isocoridina, as concentrações variaram de 0,0016 a 4,8 µg/mL

Efetuaram-se controles sem os extratos. A anfotericina B, foi empregada como substância de referência. As placas foram incubadas, durante 24h, em estufa de CO₂ (5% CO₂ a 37°C) (ARRUDA *et al*, 2005).

Após este período, empregou-se o MTT, nas mesmas condições do item 6.6, no que se refere ao preparo do reativo, adição ao meio e extração da formazana. Os ensaios foram realizados em triplicata

A determinação das porcentagens de viabilidade das células, frente às amostras, foi realizada em leitor de ELISA (Multiskan-EX Labsystems®), tendo-se determinado a absorbância, a 595 nm, usando como referência, as determinações efetuadas a 690 nm (MOREIRA *et al*, 1996). A determinação da CE₅₀ foi realizada com auxílio do programa Origin 7.5 (Scientific Graphing and Analysis Software).

O índice de seletividade (IS) foi calculado calculando-se a razão: CE₅₀/CC₅₀.

4.3.6 Estudo botânico

Realizou-se o estudo morfoanatômico de folha. Para a descrição morfológica, foram utilizadas cerca de 20 folhas. As mensurações foram realizadas com paquímetro.

O estudo anatômico de folha foi realizado a partir do material conservado em etanol 70% (v/v). (JOHANSEN, 1940). Foram consideradas folhas plenamente desenvolvidas, coletadas a partir do terceiro nó, de 10 exemplares de *A. squamosa*. As secções foram feitas, à mão-livre, no sentido transversal (lâmina foliar, nervura mediana e pecíolo), na região do terço médio inferior da lâmina foliar e da porção mediana do pecíolo, bem como no sentido longitudinal tangencial (paradérmico), das faces abaxial e adaxial.

As secções foram clarificadas com solução de hipoclorito de sódio 50% (v/v), lavadas em água destilada e, posteriormente, coradas. Para a caracterização de paredes celulósicas e lignificadas, empregou-se mistura de azul de Astra e safranina (70:30) (BURGER e RICHTER, 1991) e para corar as paredes suberificadas e substâncias lipofílicas, utilizou-se Sudam III (KRAUS e ARDUIN, 1997). A montagem das lâminas semi-permanentes foi feita em solução aquosa de glicerina 50% (v/v) (KRAUS e ARDUIN, 1997). Foram empregados reativos histoquímicos para caracterizar a presença de inclusões celulares: Sudam III, para substâncias lipofílicas (SASS, 1951); lugol, para amido (BERLYN e MIKSCHE, 1976); cloreto férrico, para compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940); reativo de Dragendorff (JOHANSEN, 1940), para compostos nitrogenados (alcalóides) e azul de metileno, para mucilagens (LANGERON, 1949).

5. RESULTADOS

5.1 Estudo químico

5.1.1 Rendimentos dos extratos e teor de alcalóides totais

Os rendimentos dos extratos aquosos e hidroetanólicos (% m/m) de *A. squamosa* L. obtidos a partir dos diferentes órgãos aéreos e/ou suas partes, coletados nas quatro diferentes épocas anuais, estão apresentados na **Tabela 4**. Os teores de alcalóides totais correspondentes encontram-se na **Tabela 5**.

Tabela 4 - Rendimentos dos extratos aquosos (AQ) e hidroetanólicos (HE) de órgãos vegetais de *Annona squamosa* L. e de partes destes, obtidos de coletas em quatro épocas anuais

ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	COLETA		Rendimentos dos extratos (%, m/m)	
		NÚM	ÉPOCA ANUAL	AQ	HE
FOLHA	n.a.	1	VER	26,8	15,9
		2	OUT	27,9	15,7
		3	INV	33,3	21,1
		4	PRI	19,3	10,3
PERICARPO (sem sementes)	V	1	VER	27,8	15,2
		2	OUT	28,1	13,7
		3	INV	21,5	24,5
	M	1	VER	28,2	12,9
		2	OUT	32,5	17,7
		3	INV	25,4	18,8
SEMENTE (sem arilo)	V	1	VER	13,3	15,2
		2	OUT	19,0	17,0
		3	INV	9,3	18,5
	M	1	VER	16,8	11,3
		2	OUT	13,7	16,2
		3	INV	10,2	30,2
ARILO	V	1	VER	39,2	13,3
		2	OUT	52,5	52,5
		3	INV	42,3	33,9
	M	1	VER	57,6	59,1
		2	OUT	55,9	55,9
		3	INV	35,0	11,7

Extratos : AQ: aquoso, HE: hidroetanólico. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono-OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

Tabela 5 - Teor de alcalóides totais (%m/m) em órgãos vegetais de *Annona squamosa* L. e partes destes (droga), obtidos de coletas em quatro épocas anuais

ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	COLETA		ALCALÓIDES TOTAIS Teor (%, m/m)
		NÚM	ÉPOCA ANUAL	HE
FOLHA	n.a.	1	VER	1,46
		2	OUT	0,57
		3	INV	1,22
		4	PRI	0,83
PERICARPO (sem sementes)	V	1	VER	1,60
		2	OUT	0,44
		3	INV	0,65
	M	1	VER	2,20
		2	OUT	0,63
		3	INV	1,95
SEMENTE (sem arilo)	V	1	VER	1,44
		2	OUT	0,29
		3	INV	1,08
	M	1	VER	1,20
		2	OUT	0,24
		3	INV	1,94
ARILO	V	1	VER	1,48
		2	OUT	0,09
		3	INV	1,17
	M	1	VER	1,16
		2	OUT	0,15
		3	INV	0,04

Valores de teor expressos com base no extrato hidroetanólico (HE) (10 g) e na droga (50g)
Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

5.1.2 Rendimentos das frações orgânicas

Os rendimentos das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos (HE) e aquosos (AQ) de *A. squamosa* L., que apresentaram maior atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* estão na **Tabela 6**.

Tabela 6- Rendimentos das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos e aquosos de *A. squamosa* L. mais ativos frente às formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*

EXTRATO	ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	COLETAS	ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	FRAÇÃO ORGÂNICA	Rendimento (% m/m)
HE	FOLHA	1	VER	n.a.	H	18,7
					D	3,6
					AE	2,4
					M	37,6
	PERICARPO (sem sementes)	"	"	V	H	8,2
					D	7,3
					AE	7,9
					M	68,1
	SEMENTE (sem arilo)	3	INV	M	H	5,4
					D	5,8
					AE	8,4
					M	73,8
AQ	ARILO	"	"	M	H	64,0
					D	11,5
					AE	5,0
					M	16,0

Frações orgânicas: H: *n*-hexano, D: diclorometano, AE: acetato de etila, M: metanol. Extratos: HE: hidroetanólico, AQ: aquoso. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

5.1.3 Teores de flavonóides totais

Os teores de flavonóides totais, em *A. squamosa* L., foi determinado e expresso em relação à quercetina (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2002), presente na droga.

Reta de calibração de quercetina

A reta de calibração do padrão de quercetina (**Figura 14**) foi construída a partir da curva de Ringbom, apresentada na **Figura 13**.

T= transmitância

Figura 13 - Curva de Ringbom do padrão de quercetina [concentrações: 2- 40 µg/mL, reagente: AlCl₃ 2,5% (m/v), λ:425 nm]

A reta de calibração da quercetina (**Figura 14**) foi elaborada com base na faixa de concentração (0,8 e 1,4 µg/mL), que possibilitou maior linearidade dos dados da determinação de absorbância.

Figura 14 - Curva de calibração do padrão de quercetina. [concentrações : 12 - 20 µg/mL), λ 425 nm]

Os valores médios dos teores de quercetina em *A. squamosa* L., encontrados em folhas, pericarpos (sem sementes), verdes e maduros, e suas respectivas sementes (sem arilos) e arilos isolados, em relação às quatro épocas anuais, encontram-se na **Tabela 7**.

Os maiores níveis dos teores de flavonóides totais foram encontrados em folha seguidos do pericarpo maduro (**Tabela 7**).

Os maiores teores de flavonóides totais de *A. squamosa* L., foram observados em folha, pericarpo (sem semente) e arilo provenientes da terceira coleta (inverno). Enquanto, as sementes não tiveram o mesmo padrão de comportamento e não mantiveram uniformidade quanto ao órgão verde e o maduro (Tabela 7).

Tabela 7- Valores dos teores de flavonóides totais (média $\pm$ DP), ($\mu\text{g/mL}$), expressos em concentração de quercetina e em percentual (% , m/m) na droga (n=3), preparada a partir de órgãos vegetais de *Annona squamosa* L. e de partes destes , obtidos de coletas em quatro épocas anuais

ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	COLETA		Flavonóides totais Teores	
		NÚM	ÉPOCA ANUAL	M $\pm$ D.P. ($\mu\text{g/mL}$)	% (m/m)*
FOLHA	n.a.	1	VER	13,74 $\pm$ 0,15	0,68
		2	OUT	11,80 $\pm$ 0,02	0,59
		3	INV	19,66 $\pm$ 0,04	0,98
		4	PRI	9,84 $\pm$ 0,01	0,49
PERICARPO (sem sementes)	V	1	VER	0,56 $\pm$ 0,06	0,03
		2	OUT	0,60 $\pm$ 0,03	0,03
		3	INV	0,85 $\pm$ 0,02	0,04
	M	1	VER	1,02 $\pm$ 0,01	0,05
		2	OUT	0,73 $\pm$ 0,03	0,04
		3	INV	8,70 $\pm$ 0,01	0,44
SEMENTE (sem arilo)	V	1	VER	0,77 $\pm$ 0,01	0,04
		2	OUT	0,44 $\pm$ 0,02	0,02
		3	INV	0,61 $\pm$ 0,01	0,03
	M	1	VER	0,41 $\pm$ 0,05	0,02
		2	OUT	0,49 $\pm$ 0,03	0,03
		3	INV	0,45 $\pm$ 0,01	0,02
ARILO	V	1	VER	0,46 $\pm$ 0,03	0,02
		2	OUT	0,48 $\pm$ 0,01	0,02
		3	INV	0,62 $\pm$ 0,10	0,03
	M	1	VER	0,57 $\pm$ 0,05	0,03
		2	OUT	0,45 $\pm$ 0,01	0,02
		3	INV	0,60 $\pm$ 0,02	0,03

Valores determinados por espectrofotometria (AlCl_3 , λ : 425 nm). M: valores médios (n=3), D.P: desvio-padrão. Coletas: NUM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V = verde, M = maduro. n.a.: não se aplica.

5.1.4 Teores de compostos polifenólicos totais

Os teores de polifenólicos totais, em *A.squamosa* L., foram expressos em teor de ácido gálico na droga.

Reta de calibração de ácido gálico

A reta de calibração do padrão de ácido gálico (**Figura 16**) foi construída a partir da curva de Ringbom, apresentada na **Figura 15**.

Figura 15 - Curva de Ringbom do padrão de ácido gálico [concentrações: 1-20µg/mL, reativo de Folin- Denis λ :760 nm]

Figura 16- Curva de calibração do padrão de ácido gálico [λ 760 nm].

Os valores médios dos teores de polifenólicos totais de *A.squamosa*, presentes em folhas, pericarpos (sem sementes), verdes e maduros, e suas respectivas sementes (sem arilos) e arilos isolados, provenientes de quatro épocas anuais, encontram-se na **Tabela 8**. De acordo com os dados obtidos, todos os órgãos e/ ou partes destes, apresentaram maiores teores de compostos polifenólicos totais, na coleta 3, que correspondeu àquela do período de inverno, mesmo em estágios distintos de maturação do fruto (**Tabela 8**). Os maiores valores de teores foram encontrados em folha e pericarpo verde (7,68- 11,08 %, m/m).

Tabela 8 - Valores dos teores de compostos polifenólicos totais (média $\pm$ D.P.) ($\mu\text{g/mL}$), expressos em concentração de ácido gálico (n=3) e em percentual (% m/m), na droga preparada a partir de órgãos vegetais de *Annona squamosa* L. e de partes destes obtidos de coletas em quatro épocas anuais

ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	COLETA		Compostos polifenólicos totais (PF) Teores	
		NÚM	ÉPOCA ANUAL	média $\pm$ D.P. ($\mu\text{g/mL}$)	droga* %(m/m)
FOLHA	n.a.	1	VER	3,71 $\pm$ 0,06	9,27
		2	OUT	3,99 $\pm$ 0,08	9,98
		3	INV	4,43 $\pm$ 0,03	11,08
		4	PRI	3,07 $\pm$ 0,08	7,68
PERICARPO (sem sementes)	V	1	VER	3,49 $\pm$ 0,08	8,73
		2	OUT	3,41 $\pm$ 0,08	8,53
		3	INV	3,61 $\pm$ 0,06	9,03
	M	1	VER	2,67 $\pm$ 0,02	6,68
		2	OUT	2,19 $\pm$ 0,10	5,48
		3	INV	3,12 $\pm$ 0,08	7,80
SEMENTE (sem arilo)	V	1	VER	2,49 $\pm$ 0,06	6,23
		2	OUT	0,21 $\pm$ 0,03	0,53
		3	INV	3,02 $\pm$ 0,11	7,55
	M	1	VER	2,24 $\pm$ 0,08	5,60
		2	OUT	2,22 $\pm$ 0,02	5,55
		3	INV	2,79 $\pm$ 0,01	6,98
ARILO	V	1	VER	1,99 $\pm$ 0,01	4,98
		2	OUT	1,69 $\pm$ 0,02	4,23
		3	INV	2,16 $\pm$ 0,04	5,40
	M	1	VER	1,50 $\pm$ 0,01	3,75
		2	OUT	0,31 $\pm$ 0,04	0,78
		3	INV	1,78 $\pm$ 0,01	4,45

Teores de compostos polifenólicos totais (PF): média:valores médios (n=3), D.P: desvio-padrão, droga*: valores calculados em relação à droga. Determinações por espectrofotometria (reativo de Folin-Denis, λ : 760 nm). Coletas: NUM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V = verde, M = maduro. n.a.: não se aplica.

5.1.4.1 Teores de taninos

Os valores médios dos teores de taninos, em *A. squamosa*, presentes em folhas, pericarpos (sem sementes), verdes e maduros, e suas respectivas sementes (sem arilos) e arilos isolados, nas quatro épocas anuais estudadas, encontram-se na **Tabela 9**.

Tabela 9 - Valores dos teores de taninos em percentual (% m/m), expressos em relação aos compostos polifenólicos totais e à droga, preparada a partir de órgãos vegetais de *A.squamosa* L., e de partes destes, obtidos de coletas em quatro épocas anuais

ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	COLETA		Teores de Taninos % (m/m)	
		NÚM	ÉPOCA ANUAL	PF*	droga**
FOLHA	n.a.	1	VER	69,40	6,43
		2	OUT	82,17	8,20
		3	INV	74,32	8,23
		4	PRI	62,34	4,78
PERICARPO	V	1	VER	87,08	7,60
		2	OUT	40,41	3,45
		3	INV	93,34	8,43
	M	1	VER	94,58	6,33
		2	OUT	82,99	4,55
		3	INV	90,22	7,05
SEMENTE SEM ARILO	V	1	VER	89,81	5,58
		2	OUT	-	-
		3	INV	96,72	7,30
	M	1	VER	83,73	4,70
		2	OUT	-	-
		3	INV	50,22	3,50
ARILO	V	1	VER	-	-
		2	OUT	90,85	3,85
		3	INV	92,84	5,03
	M	1	VER	-	-
		2	OUT	-	-
		3	INV	-	-

Teores de taninos: PF*: valores calculados em relação aos teores de compostos polifenólicos totais (PF) (n=3), droga**: valores calculados em relação à droga. Determinações por espectrofotometria (reativo de Folin-Denis λ : 760 nm) (n=1) **Coletas:** NUM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V = verde, M = maduro. n.a.: não se aplica.

5.1.5 Pesquisa e detecção marcadores alcaloídicos nas frações orgânicas e alcalóides totais bioativos, por CCD

Na **Tabela 10**, foram dispostos os resultados referentes à pesquisa de isocoridina e boldina e de compostos Dragendorff positivos, por CCD, no extrato de alcalóides totais e nas frações orgânicas que apresentaram maior atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (item 5.2.1.2).

Tabela 10 - Detecção dos marcadores boldina e isocoridina, nos extratos alcaloídicos totais (AT) e frações orgânicas mais ativos, por CCD, empregando o sistema cromatográfico SC-1

Amostra /solvente	ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	Coleta/época anual	Estágio de maturação	Detecção		Manchas D+	
				boldina	isocoridina	N	N
AT	FOLHA	1/VER	-	-	+		4
	PERICARPO (sem sementes)	2/OUT	V	+	-		5
	SEMENTE (sem arilo)	1/VER	M	-	-		2
	ARILO	1/INV	M	-	-		-
Frações orgânicas (extrato de origem)	diclorometano (HE)	1 / VER	-	-	+		1
	<i>n</i> -hexano (HE)	1/VER	V	-	-		2
	diclorometano (HE)	3/INV	M	-	-		1
	metanol (AQ)	3/INV	M	-	-		-

Resultados da análise por CCD, com uso do SC-1: diclorometano - metanol -acetona (86:13:1).boldina- R_f: 0,43, isocoridina -R_f: 0,81 AT= alcalóides totais; Detecção: (+) = presença, (-) = não detectado; Manchas D+, N= número de manchas que reagiram com reativo de Dragendorff; Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRD). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.

5.1.6 Pesquisa e detecção dos marcadores flavonoídicos nos extratos hidroetanólicos, por CLAE

Nas condições cromatográficas empregadas (item 4.3.4.2.1) na análise qualitativa dos extratos hidroetanólicos de *A. squamosa*, o máximo de absorção para todos os marcadores, incluindo rutina, quercetina e quercitrina, foi observado, em 254 nm, tendo apresentado resolução definida dos picos. No sistema cromatográfico empregado, os tempos de retenção (Tr) para estes mesmos compostos foi de, respectivamente: 15,58; 37,07 e 20,37 min.

A análise dos cromatogramas (CLAE) relativos aos 22 extratos hidroetanólicos de *A. squamosa*, preparados a partir da droga constituída de folhas, pericarpos sem sementes, sementes sem arilo e arilos (cromatogramas não apresentados), coletados nas quatro épocas anuais, mostrou que, somente aqueles das folhas, apresentaram o pico no tempo de retenção (Tr: 15,58 min) correspondente ao padrão de rutina (Figura 17). Nestes, o flavonóide foi detectado em todas as fases anuais (Figura 18, 19, 20, 21).

Nas mesmas condições analíticas, os padrões de quercetina (Tr: 37,07 min.) e de quercitrina (Tr: 20,37 min.) não foram detectados, em nenhum dos extratos, não tendo sido apresentados os cromatogramas correspondente

Figura 17 - Cromatograma CLAE/UV obtido do padrão rutina (Sigma-Aldrich®), (10mg/mL), (Tr: 15,58 min) a $\lambda = 352$ nm, [Eluição em gradiente. coluna: analítica-C18 (Phenomenex® 150x4,60mm Gemini 5 μ 80A). Fase móvel: sol. ácido acético 0,1% (v/v) (solvente A), e acetonitrila (solvente B). injeção: 50 μ L.

Figura 19 - Cromatograma CLAE/UV obtido obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas Coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono), (10mg/mL), (Tr: 15,58 min) a $\lambda = 352$ nm, [Eluição em gradiente. coluna: analítica-C18 (Phenomenex® 150x4,60mm Gemini 5 μ 80A). Fase móvel: sol. ácido acético 0,1% (v/v) (solvente A), e acetonitrila (solvente B). injeção: 50 μ L.

Figura 20 - Cromatograma CLAE/UV obtido obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas Coleta 3: 11/08/06 (frutificação/inverno), (10mg/mL), (Tr: 15,58 min) a $\lambda = 352$ nm, [Eluição em gradiente. coluna: analítica-C18 (Phenomenex® 150x4,60mm Gemini 5 μ 80A). Fase móvel: sol. ácido acético 0,1% (v/v) (solvente A), e acetonitrila (solvente B). injeção: 50 μ L.

Figura 21 - Cromatograma CLAE/UV obtido obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas Coleta 4: 15/11/06 (floração/primavera), (10mg/mL), (Tr: 15,58 min) a $\lambda = 352$ nm, [Eluição em gradiente. coluna: analítica-C18 (Phenomenex® 150x4,60mm Gemini 5 μ 80A). Fase móvel: sol. ácido acético 0,1% (v/v) (solvente A), e acetonitrila (solvente B). injeção: 50 μ L.

5.1.7 Quantificação de isocoridina nos AT de *A.squamosa*, por CLAE

O resultado da caracterização quali- e quantitativa dos AT de *A.squamosa*, empregando isocoridina, como marcador, revelou que, o alcalóide está presente, somente, nos extratos provenientes de folha e em todas as épocas consideradas (**Figura 22**).

Figura 22 - Cromatogramas CLAE/UV obtidos dos extratos hidroetanólicos de folhas e detecção de isocoridina. 14A. Padrão de isocoridina (Sigma-Aldrich®). 14 (B-E). Alcalóides totais de folha. 14B. Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER). 14C. coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono-OUT). 14D. coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV). 14E coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). [Eluição isocrática. fase móvel: (A) solução de ácido fórmico (pH 3,5) e (B) metanol (60/40) (v/v), Fluxo 1,0 mL/min, T: 15 min. °C, Tr da isocoridina = 5,5 min; λ = 254 nm].

5.1.7.1 Teores de isocoridina em folhas nas quatro épocas anuais

A curva de calibração de isocoridina foi disposta na **Figura 23**.

A curva de calibração, construída com dados referentes às cinco soluções-padrão de isocoridina, em cinco níveis, variando de 5 a 150 µg / mL, teve coeficiente de correlação de 0,9999.

A concentração de isocoridina, nas amostras de AT, foi calculada e expressa, em relação ao total de alcalóides, em µg/ mL e em percentagem relativa à droga (% , m/m) (**Tabela 11**), com base na equação da reta: $y=74110x - 73034$, sendo que x corresponde à área e y, à concentração do alcalóide (**Figura 23**).

Figura 23 - Curva de calibração de isocoridina (área x concentração), equação da reta e R^2

Tabela 11 - Valores dos teores de AT (%m/m) nas folhas (droga) e dos teores de isocoridina (média $\pm$ D.P.) relativos aos AT e às folhas (droga) de *A.squamosa* L., em $\mu\text{g/mL}$ e em percentual (% m/m), nas quatro épocas anuais

COLETA		Teores de AT*	Teores de isocoridina		
			AT	droga**	
NÚM	ÉPOCA ANUAL	% (m/m)	C $\pm$ DP ($\mu\text{g/mL}$)	% $\pm$ DP (m/m)	% ($\times 10^{-3}$) (m/m)
1	VER	1,46	35,40 $\pm$ 1.60	2,25 $\pm$ 0.10	2,82
2	OUT	0,57	17,73 $\pm$ 1.76	2,22 $\pm$ 0.35	2,07
3	INV	1,22	33,58 $\pm$ 3.21	1,90 $\pm$ 0.20	3,60
4	PRI	0,83	20,05 $\pm$ 0.75	2,25 $\pm$ 0.08	1,37

Teores de AT*: valores dos teores (%) de alcalóides totais presentes na droga (folhas). Teores de isocoridina: AT: valores médios determinados (n=3), por CLAE, em relação aos alcalóides totais, C: teores médios, em $\mu\text{g/mL}$, e, em % relativa. D.P: desvio-padrão; droga**: valores calculados, em relação à massa de folhas (droga). Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI).

O método foi considerado preciso, sendo que, a análise de variâncias ANOVA foi utilizada para estimar a variabilidade total, em cada dia e entre os dias de análise. Os dados basearam-se em análises de três diferentes concentrações (25,0; 50,0; 75,0 $\mu\text{g/mL}$) de isocoridina, em três dias consecutivos e os resultados mostraram desvio-padrão relativo (DPR) inferior a 2% (Tabela 12).

Tabela 12 - Precisão do método de quantificação de isocoridina nos AT de *A.squamosa*

Precisão	Concentração		
	isocoridina ($\mu\text{g/ mL}$)		
	25,00	50,00	75,00
Intra-dia (n=5)			
DPR (%)	0,68	0,51	0,17
Inter-dia (n=15)			
DPR (%)	1,73	1,40	0,74

Valores de precisão correspondentes às análises, por CLAE, de três concentrações de isocoridina (25,0; 50,0; 75,0 $\mu\text{g/mL}$), em três dias consecutivos. n= número de injeções, DPR = desvio-padrão relativo

A reprodutibilidade e a confiabilidade dos resultados foi confirmada. A partir de 5 injeções de solução contendo 50,0 $\mu\text{g/mL}$ de isocoridina, obteve-se desvio-padrão relativo de 0,12%, estando dentro do limite fixado pela Farmacopéia Americana (2008). O coeficiente de correlação foi de 0,9999.

O resultado da avaliação da exatidão do método foi expresso em porcentagem média de isocoridina recuperada nas amostras de AT e determinada, a partir de 3 níveis de concentração diferentes, tendo sido de 97,2% -108,6%.

Em relação à seletividade, a absorção dos espectros dos picos foi obtida com auxílio de detector UV e os dados foram comparados com o espectro padrão de isocoridina. Os resultados mostraram perfis espectrofotométricos equivalentes para este alcalóide, nas folhas de diferentes coletas (**Figura 24**).

5.2 Avaliação da atividade biológica

5.2.1 Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* dos extratos, alcalóides totais (AT), frações de *A. squamosa* e dos padrões

5.2.1.1 Triagem dos extratos e frações bioativos

Os resultados da primeira etapa dos testes de atividade antileishmania *in vitro* de *A. squamosa* foram relativos à triagem de extratos e frações que apresentaram maior nível de atividade, frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Na **Tabela 13** apresentam-se os resultados relativos à atividade antileishmania dos extratos hidroetanólicos e aquosos das partes aéreas, coletadas, nas quatro épocas anuais. Na **Tabela 14**, constam dados da atividade antileishmania das frações orgânicas obtidas a partir dos extratos, que apresentaram maior nível de atividade, segundo a **Tabela 13**.

Os resultados relativos aos alcalóides totais dos diferentes órgãos e/ou partes vegetais, nas diferentes épocas anuais, encontram-se dispostos na **Tabela 15**.

Tabela 13 - Avaliação da atividade antileishmania *in vitro* dos extratos aquosos e hidroetanólicos de órgãos vegetais de *A. squamosa* L. e de partes destes, coletados em quatro épocas anuais, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* [MHOM/BR/73/M2269]

ÓRGÃO/PARTE VEGETAL	COLETAS	ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	<i>Leishmania amazonensis</i> % morte (média ± D.P)	
				EXTRATO AQUOSO	EXTRATO HIDROETANÓLICO
C: 1.600µg/mL					
FOLHA	1	VER	n.a.	7,4 ± 3,1	61,3±0,8
	2	OUT		5,1 ± 1,4	36,1±0,2
	3	INV		4,1 ± 0,3	43,9±0,7
	4	PRIM		15,3 ± 0,1	18,9±1,3
PERICARPO sem sementes	1	VER	M	(-)	72,7 ± 2,7
			V	(-)	81,1 ± 0,7
	2	OUT	M	(-)	72,3 ± 0,7
			V	(-)	54,2± 1,8
	3	INV	M	(-)	68,6 ± 3,0
			V	(-)	66,8 ± 4,3
SEMENTE sem arilo	1	VER	M	75,9± 5,7	75,5 ± 1,5
			V	78,1 ± 7,0	74,9± 0,2
	2	OUT	M	61,7 ± 1,5	61,7 ± 2,2
			V	52,3 ± 1,4	78,3 ± 0,3
	3	INV	M	11,2 ± 0,4	90,4 ± 0,7
			V	13,2 ± 1,2	79,8 ± 1,0
ARILO	1	VER	M	(-)	(-)
			V	(-)	(-)
	2	OUT	M	(-)	12,1 ± 0,8
			V	(-)	6,9 ± 0,5
	3	INV	M	20,7 ± 1,3	(-)
			V	9,2 ± 1,2	(-)
Substância de referência					
anfotericina (0,3 µM)				100± 0	

Determinações: média dos valores ± D.P (n= 3) para concentrações de 1.600 µg/mL de cada extrato. anfotericina (0,3 µM); D.P. = desvio-padrão, (-): 0% de mortes. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PR). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

Os resultados (Tabela 13) indicaram, de forma geral, menor nível de atividade leishmanicida dos extratos aquosos de *A. squamosa* em relação aos extratos hidroetanólicos preparados nas mesmas condições e testados à concentração alta (1.600 µg/mL), na triagem inicial dos mais ativos.

Entre os extratos inativos, o maior número (10) foi de extratos aquosos, enquanto, somente 4 extratos hidroetanólicos, referentes ao arilo, não apresentaram qualquer sinal de inibição dos parasitas (0% morte).

Os extratos aquosos que se mostraram inativos, foram todos aqueles do pericarpo e 4 daqueles obtidos a partir do arilo da semente (**Tabela 13**) sendo que, no primeiro caso, mostraram-se inativos, indistintamente, em relação à época anual e ao grau de amadurecimento do fruto.

Somente, no caso do extrato aquoso do arilo da coleta 3 (inverno), ocorreu atividade dos extratos aquosos, sendo que o extrato hidroetanólico correspondente não apresentou atividade (0% morte).

Os maiores percentuais de morte foram observados a partir dos extratos hidroetanólicos de pericarpo sem sementes ($81,1 \pm 0,7\%$) e de semente sem arilo ($90,4 \pm 0,7\%$) (**Tabela 13**).

Em relação aos extratos aquosos, os mais ativos foram aqueles obtidos das sementes sem arilo ($52,3 \pm 1,4 \leq \% \text{ morte} \leq 78,1 \pm 7,0$)

A partir dos resultados (**Tabela 13**), foram selecionados os seguintes extratos, entre os mais ativos de cada parte ou órgão vegetal de *A. squamosa*: Hidroetanólico (HE) de folha (verão, coleta 1) ($61,3 \pm 0,8\%$ morte), HE de pericarpo sem sementes (verão, coleta 1) ($81,1 \pm 0,7\%$ morte), HE de semente sem arilo (inverno, coleta 3) ($90,4 \pm 0,7\%$ morte) e o extrato aquoso de arilo (inverno, coleta 3) ($20,7 \pm 1,3\%$ morte) o qual, apesar de ter apresentado baixo nível de atividade foi o mais ativo entre os extratos do arilo.

Após o fracionamento, com solventes orgânicos, obtiveram-se quatro frações, para cada extrato de origem, as quais foram submetidas à nova etapa de testes *in vitro*.

Os níveis de atividade das frações orgânicas foram, em sua maioria, iguais ou superiores a 70% (**Tabela 14**), sendo que as frações originadas do extrato HE das sementes foram as mais ativas, quase todas, apresentando 100% de inibição dos parasitas (**Tabela 13**). O mesmo percentual de atividade foi verificado para a fração diclorometano do HE de folha e a fração *n*-hexano do HE de pericarpo.

Apesar do extrato aquoso do arilo ter demonstrado reduzido nível de atividade (Tabela 13), todas as suas frações foram mais ativas que o mesmo, especialmente, as frações em diclorometano ($71,7 \pm 6,2 \leq \%$) e em metanol ($75,6 \pm 0,6 \leq \%$) (Tabela 14).

De forma semelhante, os outros três extratos, provenientes de folha, pericarpo sem semente e semente sem arilo, selecionados para a avaliação da atividade leishmanicida de suas frações, apresentaram uma ou mais frações com nível de atividade superior (Tabela 14) àquele do extrato de origem (Tabela 13). No tocante às frações do HE de semente (sem arilo), três das quatro frações chegaram ao nível de inibição de 100%, sendo que a fração em metanol alcançou percentual próximo a este valor, mostrando a excepcional atividade das sementes (sem arilo) (Tabela 14).

Tabela 14 - Atividade antileishmania *in vitro* das frações orgânicas dos extratos hidroetanólicos e aquoso de *A. squamosa* L mais ativos, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* [MHOM/BR/73/M2269]

ÓRGÃO/ PARTE VEGETAL	EXTRATO *	COLETA / ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	FRAÇÃO ORGÂNICA média $\pm$ D.P.(%) C: 300 μ g/mL			
				<i>n</i> -hexano	diclorometano	acetato de etila	metanol
FOLHA	HE	1/VER	n.a.	72,3 $\pm$ 2,8	100,0 $\pm$ 0,0	77,8 $\pm$ 3,7	17,3 $\pm$ 6,2
PERICARPO (sem sementes)	"	"	V	100,0 $\pm$ 0,0	69,5 $\pm$ 6,2	89,5 $\pm$ 0,5	87,5 $\pm$ 0,5
SEMENTE (sem arilo)	"	3/ INV	M	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	100,0 $\pm$ 0,0	95,7 $\pm$ 1,2
ARILO	AQ	"	"	58,0 $\pm$ 10,2	71,7 $\pm$ 6,2	61,2 $\pm$ 2,5	75,6 $\pm$ 0,6
Substância de referência							
anfotericina (0,3 μ M)				100 $\pm$ 0			

Determinações: média= porcentagem média de mortes $\pm$ D.P (n= 3) para concentrações de 300 μ g/mL de cada fração orgânica. D.P. = desvio-padrão. Extrato*: de origem, HE: hidroetanólico, AQ: aquoso. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

À concentração de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$, os alcalóides totais (AT) mais ativos foram aqueles obtidos de sementes (sem arilo), tendo levado à morte todos os parasitas, independentemente da época anual. Embora tenha havido, aparentemente influência do estágio de maturação do fruto de origem, no caso da coleta do inverno, quando as sementes provenientes do fruto verde foram menos ativas ($88,2 \pm 0,6\%$ de mortes) do que aquelas do fruto maduro (**Tabela 15**).

Para o pericarpo sem sementes, constatou-se que os AT, provenientes das duas primeiras coletas, levaram a 100% de mortes, enquanto que aqueles originados da coleta 3 (inverno), houve redução do nível de atividade sobretudo para o verde ($93,9\%$ de morte). O pericarpo maduro apresentou porcentagem com valor muito próximo de 100%.

No tocante aos AT das folhas, os valores das porcentagens de mortes foram , igualmente altos, excetuando-se aqueles da coleta realizada no inverno (coleta 3) ($77,7 \pm 3,6\%$).

Quanto aos AT dos arilos verdes, todos levaram ao percentual de morte de 100%, sendo que os maduros apresentaram igual valor percentual, quando provenientes da coleta realizada no inverno (coleta 3). No outono, o nível de inibição foi muito próximo deste valor ($99,9 \pm 0,03 \%$) (**Tabela 15**).

Os testes com os AT de *A.squamosa* em concentrações inferiores a 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (100 e 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) permitiram a diferenciação dos níveis de atividade entre os diferentes extratos alcaloídicos. À medida em que a concentração testada diminuiu, observou-se redução da atividade sendo que, somente os AT provenientes de folha (coletas 1 e 2/ verão, outono) e de frutos verdes (coleta 2, outono), mostraram percentual de mortes superior a 60%, na menor concentração testada (30 $\mu\text{g}/\text{mL}$) (**Tabela 15**).

A partir dos resultados, foram selecionados os AT mais ativos, à concentração de 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, para a etapa seguinte de determinação das CE_{50} .

Tabela 15 - Atividade antileishmania *in vitro* dos alcalóides totais de *A. squamosa* L. (300, 100 e 30 µg/mL), frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* [MHOM/BR/73/M2269]

ÓRGÃO/ PARTEVEGETAL	COLETAS	ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	<i>Leishmania. amazonensis</i>		
				% morte		
				(média ± D.P)		
				AT (µg/mL)		
				300	100	30
FOLHA	1	VER	n.a.	99,5 ± 0,3	95,4 ± 0,9	67,2 ± 4,5
	2	OUT		100,0 ± 0	95,8 ± 0,9	60,5 ± 1,1
	3	INV		77,7 ± 3,6	49,8 ± 5,1	(-)
	4	PRI		100,0 ± 0	56,1 ± 1,8	42,1 ± 3,6
PERICARPO (sem sementes)	1	VER	V	100,0 ± 0	50,9 ± 5,9	11,5 ± 1,8
			M	100,0 ± 0	49,2 ± 3,7	4,1 ± 0,2
	2	OUT	V	100,0 ± 0	94,6 ± 2,4	63,6 ± 2,4
			M	100,0 ± 0	76,6 ± 1,8	44,3 ± 2,9
	3	INV	V	93,9 ± 0	75,0 ± 6,3	33,5 ± 2,3
			M	99,7 ± 0,3	91,0 ± 7,5	51,1 ± 5,4
SEMENTE (sem arilo)	1	VER	V	100,0 ± 0	73,3 ± 7,5	23,1 ± 2,4
			M	100,0 ± 0	86,3 ± 7,6	57,8 ± 5,2
	2	OUT	V	100,0 ± 0	62,8 ± 5,5	39,9 ± 3,2
			M	100,0 ± 0	49,5 ± 3,2	19,3 ± 1,3
	3	INV	V	88,2 ± 0,6	86,6 ± 8,5	40,2 ± 3,6
			M	100,0 ± 0	93,0 ± 8,9	47,8 ± 2,3
ARILO	1	VER	V	100,0 ± 0	72,2 ± 4,3	43,4 ± 1,7
			M	61,4 ± 2,0	48,1 ± 0,9	14,6 ± 0,1
	2	OUT	V	100,0 ± 0	51,3 ± 3,6	17,2 ± 3,5
			M	99,9 ± 0,03	76,8 ± 5,0	15,1 ± 2,6
	3	INV	V	100,0 ± 0	63,9 ± 5,2	11,7 ± 0,7
			M	100,0 ± 0	46,9 ± 1,06	(-)
Substância de referência						
anfotericina (0,3 µM)				100,0 ± 0		

AT: alcalóides totais. Determinações: valores médios de porcentagem de mortes (n= 3), para concentrações de 300, 100 e 30 µg/mL de cada fração. D.P. =desvio padrão, (-): 0% de mortes. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

5.2.1.2 Determinação das concentrações efetivas de 50% (CE₅₀) e de 90% (CE₉₀) das frações orgânicas e dos alcalóides totais mais ativos de *A. squamosa* L.

Após as etapas de triagem, nas quais foram selecionadas as frações orgânicas e alcalóides totais mais ativos, foram determinadas as concentrações efetivas de 50% frente aos mesmos parasitas (CE₅₀) (Tabelas 16 e 17).

Verificou-se que, entre as frações dos HE, aquelas que apresentaram menor concentração efetiva de 50% foram, as seguintes: diclorometano (CE₅₀ < 3 µg/mL) e acetato de etila (CE₅₀: 3,565 ± 0,09 µg/mL) de semente sem arilo (inverno), bem como a fração diclorometano de folha (verão) (CE₅₀: 11,323 ± 1,611 µg/mL) (Tabela 16). Destas, selecionou-se uma fração de cada órgão/parte, para a determinação da CC₅₀: frações diclorometano de folha (verão, coleta 1) e de semente sem arilo (inverno, coleta 3), além da fração *n*-hexano do pericarpo sem sementes (inverno) (CE₅₀: 45,152 ± 4,171 µg/mL) e a fração em metanol do arilo (CE₅₀: 20,411 ± 2,213 µg/mL) (Tabela 16).

Tabela 16 - Concentrações efetivas de 50% (CE₅₀) e de 90% (CE₉₀) das frações orgânicas mais ativas, provenientes de extratos de *Annona squamosa* L., frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* [MHOM/BR/73/M2269]

<i>A. squamosa</i> L.						
ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	EXTRATO *	COLETA/ ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	FRAÇÃO ORGÂNICA		
				solvente	CE ₅₀ ± D.P. (µg/mL)	CE ₉₀
FOLHA	HE	1/VER	n.a.	diclorometano	11,323 ± 1,611	88,210
PERICARPO (sem sementes)			V	n-hexano	45,152 ± 4,171	80,899
		3/ INV	M	n-hexano	24,200 ± 1,9517	86,809
				diclorometano	<3,0	n.d.
SEMENTE (sem arilo)				acetato de etila	3,565 ± ,009	94,917
				metanol	24,421 ± 1,230	82,270
ARILO	AQ	3/ INV	M	metanol	20,411 ± 2,213	55,630

CE₅₀, CE₉₀: concentrações efetivas que levaram a 50 e 90% de mortes dos parasitas, respectivamente. CE₅₀: valores médios (n= 3), D.P desvio-padrão. Determinações realizadas nas concentrações de: 300, 100, 30, 10 e 3µg/mL de cada fração orgânica. n.d.: valor não determinado. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica. Extrato*: de origem.

Entre os extratos alcaloídicos testados, as concentrações efetivas de 50% apresentaram valores superiores (Tabela 17), àquelas observadas para as frações dos extratos (Tabela 16), sendo que a menor CE₅₀ foi constatada para os AT do pericarpo sem sementes (coleta 1, verão), provenientes do pericarpo verde (CE₅₀: 11,975 ± 1,1221 µg/mL) e a maior foi aquela de folhas (CE₅₀: 48,273 ± 9,905 µg/mL), provenientes da mesma coleta (Tabela 17).

Tabela 17- Concentrações efetivas de 50% (CE₅₀) e de 90% (CE₉₀) dos alcalóides totais de *Annona squamosa* L., frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* [MHOM/BR/73/M2269]

ÓRGÃO VEGETAL/ PARTE	COLETA/ ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	<i>A. squamosa</i> L.	
			AT	
			CE ₅₀ ± D.P.	CE ₉₀
			(µg/mL)	
FOLHA	1/VER	n.a.	48,273 ± 9,905	71,446
PERICARPO (sem sementes)	2/OUT	V	11,975 ± 1,221	93,70
SEMENTE (sem arilo)	1/ VER	M	40,031±4,268	63,854
ARILO		V	41,534 ± 6,875	72,276

AT: alcalóides totais. CE₅₀, CE₉₀: concentrações efetivas que levaram a 50 e 90% de mortes dos parasitas, respectivamente. CE₅₀: valores médios (n= 3), D.P: desvio-padrão. Determinações realizadas nas concentrações de: 300, 100, 30, 10 e 3µg/mL de cada extrato alcaloídico. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

Notou-se, ainda, que para as folhas, a fração orgânica (diclorometano) do HE (CE₅₀: 11,323±1,611 µg/mL) (Tabela 16) e os AT (CE₅₀: 48,273±9,905 µg/mL) (Tabela 17) mais ativos (menor CE₅₀) foram provenientes, coincidentemente, da mesma coleta (coleta 1), realizada no verão. Enquanto que, para o pericarpo (sem semente), semente sem arilo e arilo, as frações orgânicas e os AT mais ativos foram obtidos de materiais coletados em épocas anuais distintas (Tabelas 16 e 17).

No caso do pericarpo (sem semente), a fração *n*-hexano (Tabela 16) originou-se do HE preparado a partir de material proveniente da coleta 1 (verão) e os AT mais ativos originaram-se da coleta realizada no outono (coleta 2) (Tabela 17). Para a semente sem arilo, a fração diclorometano do HE (CE₅₀ <3 µg/mL) e os AT (CE₅₀: 40,031±4,268 µg/mL) originaram-se, respectivamente, de material vegetal coletado, no inverno (coleta 3) e no verão (coleta 1) (Tabelas 16 e 17). No tocante aos arilos, a fração do extrato aquoso em metanol foi obtida de

arilos coletados no período do inverno (coleta 3), enquanto que os AT foram provenientes da coleta do verão (coleta 1).

Entre as frações e os AT, mais ativos, dos diferentes órgãos vegetais pôde-se constatar que, somente os alcalóides totais dos pericarpos apresentaram maior nível de atividade antiprotozoária (CE_{50} : $11,975 \pm 1,221 \mu\text{g/mL}$), em relação à fração orgânica (*n*-hexano) (CE_{50} : $45,152 \pm 4,171 \mu\text{g/mL}$) (Tabelas 16 e 17), tendo-se verificado comportamento inverso para os demais órgãos considerados.

5.2.1.3 Determinação das concentrações efetivas de 50% (CE_{50}) e de 90% (CE_{90}) dos padrões alcaloídicos e flavonoídicos

Na determinação das concentrações inibitórias de 50% das formas promastigotas de *L. amazonensis*, para as substâncias empregadas como padrões (quercetina, rutina, quercitrina e isocoridina) e pertencentes às classes dos alcalóides aporfínicos e dos flavonóides, tendo sido anteriormente isoladas de *A.squamosa* (Quadros 2, 8 e 9), verificou-se que o alcalóide isocoridina apresentou elevada atividade leishmanicida (CE_{50} : $0,048 \pm 0,007 \mu\text{g/mL}$), enquanto que os flavonóides quercetina, quercitrina e rutina, tiveram baixo nível de atividade leishmanicida ($CE_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 18).

Tabela 18 - Concentrações efetivas de 50% (CE_{50}) e de 90% (CE_{90}) para a atividade antileishmania *in vitro* dos padrões: isocoridina, quercetina, quercitrina e rutina, frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* [MHOM/BR/73/M2269]

PADRÃO	<i>Leishmania amazonensis</i>	
	$CE_{50} \pm \text{D.P.}$	EC_{90}
	($\mu\text{g/mL}$)	
isocoridina [9]	$0,048 \pm 0,007$	0.25077
quercetina [63]	$>100 \mu\text{g/mL}$	n. d.
quercitrina [57]	$>100 \mu\text{g/mL}$	n. d.
rutina [59]	$>100 \mu\text{g/mL}$	n. d.

CE_{50} , CE_{90} : concentrações efetivas que levaram à morte, respectivamente, 50 e 90% dos parasitas. CE_{50} : valores médios ($n = 3$) –D.P.: desvio-padrão. n.d.: valor não determinado. Padrões: isocoridina (alcaloídico), quercetina, quercitrina, rutina (flavonoídicos)

5.2.2 Avaliação da citotoxicidade *in vitro* das frações orgânicas e dos alcalóides totais selecionados e Índice de Seletividade (IS)

Os resultados da determinação da concentração citotóxica em 50% (CC₅₀) das células epiteliais humanas (HEP-2) para as frações orgânicas e os AT de *A.squamosa*, que foram anteriormente selecionados, entre os mais ativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, e cujas CE₅₀ foram obtidas (item 5.2.1.2), encontram-se dispostos nas Tabelas 19 e 20.

Entre as frações orgânicas testadas, a fração em metanol, proveniente do extrato aquoso do arilo (inverno, coleta 3), apresentou citotoxicidade *in vitro* marcadamente reduzida frente às células HEP-2, tendo apresentado CC₅₀ superior a 3.000 µg/mL (Tabela 19).

Tabela 19 - Concentração citotóxica *in vitro* de 50% (CC₅₀) das frações orgânicas *A. squamosa* L. selecionadas para os testes frente às células epiteliais HEP-2 (ATCC:CCL 23)

ÓRGÃO VEGETAL	EXTRATO*	COLETA / ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	FRAÇÃO	HEP-2 CC ₅₀ ± D.P (µg/mL)
FOLHA	HE	1/VER	n.a	diclorometano	45,51±4,77
PERICARPO (sem sementes)			V	n-hexano	343,01±32,15
SEMENTE (sem arilo)		3/ INV	M	diclorometano	379,15±34,85
ARILO	AQ		M	metanol	>.3000
Substância de referência e padrão					
anfotericina					>0,6 µM
isocoridina					>0,48

CC₅₀: concentração citotóxica de 50% das células epiteliais HEP-2 (ATCC:CCL 23). CC₅₀: valores médios (n= 3). D.P.: desvio-padrão. Extrato: de origem: HE: hidroetanólico, AQ: aquoso. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica. (*) extrato de origem.

Para as demais frações testadas, obtidas a partir dos diferentes extratos hidroetanólicos, verificou-se que, tanto aquela em *n*-hexano do pericarpo verde (sem sementes) (verão, coleta 1) (CC_{50} 343,01±32,15 µg/mL), quanto aquela em diclorometano de semente sem arilo (inverno, coleta 3) (CC_{50} 379,15±34,85 µg/mL) apresentaram níveis de citotoxicidade superior (Tabela 19) àquela do arilo. A fração diclorometano do HE de folhas foi a mais tóxica, entre aquelas testadas (CC_{50} : 45,51±4,77 µg/mL).

Os AT de folhas (coleta 1, verão) (CC_{50} : 1010,50±71,00µg/mL) e dos arilos de pericarpos verdes (inverno, coleta 3) mostraram baixos níveis de citotoxicidade (CC_{50} > 1.000 µg/mL). Enquanto que, aqueles de pericarpos verdes (sem sementes) (coleta 2, outono) e de sementes de frutos maduros (sem arilo) (verão, coleta 1) tiveram graus superiores de citotoxicidade *in vitro*, com valores de CC_{50} aproximando-se de 500µg/mL (Tabela 20).

Tabela 20 - Concentração citotóxica de 50% (CC_{50}) dos alcalóides totais de *A. squamosa* L. selecionados para os testes frente às células epiteliais HEP-2 (ATCC:CCL 23)

AT	COLETA/ ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	HEP-2
ÓRGÃO/PARTE VEGETAL			CC ₅₀ ± D.P (µg/mL)
FOLHA	1/VER	n.a.	1.010,50±71,0
PERICARPO (sem sementes)	2/OUT	V	462,33 ± 9,54
SEMENTE (sem arilo)	1/ VER	M	470,89±10,0
ARILO		V	>1000
Substância de referência e padrão			
anfotericina			>0,6 µM
isocoridina			>0,48

AT: alcalóides totais. CC_{50} : concentração citotóxica de 50% das células epiteliais HEP-2 (ATCC:CCL 23). CC_{50} : valores médios (n= 3). D.P.: desvio-padrão. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PR). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

Os AT de folhas, pericarpos sem sementes e sementes sem arilo (**Tabela 20**) apresentaram valores de CC_{50} maiores, em comparação àqueles das frações orgânicas testadas para os órgãos correspondentes (**Tabela 19**). No que se refere aos arilos, tanto a fração em metanol ($CC_{50} > 3.000 \mu\text{g/mL}$), quanto os AT ($CC_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$) apresentaram os maiores valores de CC_{50} do que aqueles dos demais órgãos (**Tabelas 19 e 20**), sendo que a fração orgânica mostrou a menor citotoxicidade *in vitro* em relação àquela de todas outras frações e AT avaliados.

Os índices de seletividade (IS) para a atividade antiprotozoária *in vitro*, ou seja, a razão entre as concentrações efetivas de 50% (CE_{50}) frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (**Tabela 19**) e a concentração citotóxica *in vitro* frente às células epiteliais humanas (HEP-2) de 50% (CC_{50}) (**Tabela 20**), foram dispostos, na **Tabela 21**.

No tocante às folhas, conforme foi visto anteriormente, a fração diclorometano (CE_{50} : $11,323 \pm 0,611 \mu\text{g/mL}$) mostrou-se, comparativamente, mais ativa que os AT (CE_{50} : $48,273 \pm 9,905 \mu\text{g/mL}$) (**Tabelas 16 e 17**). Entretanto, o nível de citotoxicidade *in vitro* dos AT foi extremamente reduzido (CC_{50} : $1.010,5 \pm 71,0 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 20**), em relação à fração diclorometano (CC_{50} : $45,51 \pm 4,77 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 19**), tendo apresentado índice de seletividade (IS) quatro vezes inferior (0,06), em relação àquela da referida fração (0,24) (**Tabela 21**).

Para os pericarpos (sem sementes), foi constatada situação inversa àquela das folhas, uma vez que, os AT foram mais ativos (CE_{50} : $11,975 \pm 1,221 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 17**), frente aos parasitas *L. amazonensis*, do que a fração orgânica testada (*n*-hexano) (CE_{50} : $45,152 \pm 4,171 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 16**). Quanto ao grau de citotoxicidade dos AT do pericarpo (CC_{50} : $462,33 \pm 9,54 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 20**), mostrou-se inferior àquela da fração *n*-hexano (CC_{50} : $343,01 \pm 32,15 \mu\text{g/mL}$) (**Tabela 19**).

Comparativamente, o nível de citotoxicidade *in vitro* da fração orgânica do pericarpo foi inferior àquela de folhas, enquanto que o comportamento inverteu-se para os AT dos primeiros, sendo que foram mais citotóxicos em relação àqueles das folhas (**Tabelas 19 e 20**).

O IS da fração *n*-hexano do pericarpo foi cerca de seis vezes superior para a fração orgânica (*n*-hexano) do HE da coleta 1, efetuada no verão (IS: 0,13), em relação aos AT (coleta 2, outono) (IS: 0,02) (**Tabela 21**).

Em relação à semente sem arilo e ao arilo, não foi possível a determinação do IS, por terem apresentado valores não exatamente definidos referentes, respectivamente, à CE_{50} ($< 3,0 \mu\text{g/mL}$) e à CC_{50} ($> 3.000 \mu\text{g/mL}$).

Considerando os IS de folha e pericarpo, verificou-se que os AT mostraram, unanimemente, valores inferiores àqueles das frações orgânicas selecionadas, obtidas dos mesmos órgãos (Tabela 21).

Tabela 21- Índice de seletividade (IS) da atividade antileishmania *in vitro* das frações orgânicas e alcalóides totais selecionados de *A. squamosa* L.

ÓRGÃO/PARTE VEGETAL	AT / FRAÇÃO	COLETA/ÉPOCA ANUAL	ESTÁGIO DE MATURAÇÃO	IS
FOLHA	AT	1/VER	n.a.	0,04
	diclorometano (HE)			0,24
PERICARPO (sem sementes)	AT	2/OUT	V	0,02
	n-hexano (HE)	1/VER		0,13
SEMENTE (sem arilo)	AT	1/ VER	M	0,08
	diclorometano (HE)	3/ INV		n.d.

I.S. (índice de seletividade): razão CE_{50}/CC_{50} : concentração efetiva de 50% frente aos parasitas de *L. amazonensis* / concentração citotóxica de 50% das células epiteliais HEP-2 (ATCC:CCL 23). n.d.: não determinado. AT: alcalóides totais. Fração: do extrato hidroetanólico (HE) de origem. Coletas: NÚM: cronologia e data de coleta (fase do vegetal): Coleta 1: 21/02/06 (frutificação/verão-VER), coleta 2: 09/05/06 (frutificação/outono- OUT), coleta 3: 11/08/06 (frutificação inverno-INV), coleta 4: em 15/11/06 (floração/primavera-PRI). Estágios de maturação do fruto (e sementes correspondentes): V : verde, M : maduro.n.a.: não se aplica.

5.3 Estudo botânico

O material botânico de *A. squamosa* foi coletado a partir de exemplares demarcados, para garantir o estudo de um grupo definido de espécimes, ainda que tenham sido considerados em conjunto, para o estudo químico e da atividade biológica, nas diferentes épocas anuais.

Os exemplares coletados apresentaram hábito arbóreo, pequeno porte e alturas variáveis entre 1,5 e 2,0 m (**Figura 24**).

Figura 24 – *Annona squamosa* L. Hábito de exemplar frutificado e demarcado para o estudo. [Escala: 0,25 m]

Em todas as épocas anuais, em que foram realizadas as coletas dos espécimes de *A.squamosa*, na área rural de cultivo, em Getulina, os exemplares apresentaram-se em fase reprodutiva.

Na maioria das coletas, ou seja, naquelas realizadas no verão (coleta 1), outono (coleta 2) e no inverno (coleta 3), os exemplares mostraram-se, em fenofase de frutificação (**Figura 25**), enquanto que, na coleta efetuada na primavera (coleta 4), os exemplares estavam em floração.

Figura 25 - *Annona squamosa* L. Detalhe de ramo frutificado [Escala: 3,4 cm]

5.3.1 Caracterização morfológica de folha (droga)

As folhas de *A. squamosa*, na forma de droga (**Figura 26A**), foram reidratadas e distendidas para possibilitar a descrição de seus caracteres, tendo-se mostrado simples e inteiras (**Figura 26**), providas de contorno lanceolado a lanceolado-elíptico, base aguda, simétrica, ápice agudo a atenuado (**Figura 26B**) e superfície lisa, quando observadas à lupa. O limbo é verde-escuro com máculas avermelhadas, na face adaxial (**Figura 26A**) e verde mais claro, na face abaxial (**Figura 26B**).

A partir das 150 folhas adultas analisadas, provenientes dos 5 exemplares de *A. squamosa*, verificou-se que, o comprimento das folhas variou entre 10,5 e 13 cm e a largura ficou situada entre 3,0 e 4,5cm.

Quanto à nervação, as folhas mostraram-se peninérveas, sendo as nervuras mais salientes na face abaxial (**Figura 26B**) e de coloração castanho-amarelada (**Figura 26B**) a ferrugínea (**Figura 26B**).

Observadas sob lupa estereoscópica, e sob ampliação de cerca de 40 vezes, a superfície, que se apresentou lisa, à lupa comum, revelou-se pubescente. Os pêlos delicados, longos e esbranquiçados, foram encontrados sobre as nervuras, sendo mais freqüentes, na nervura mediana e naquelas de primeira e segunda ordem, e mostraram-se raros sobre a superfície do limbo (**Figura 26B**). Neste último, quando presentes, ocorreram nas regiões próximas às nervuras.

Figura 26 - *Annona squamosa* L. Folha. 26A. Face adaxial. 26B. Face abaxial. [Escala: 1 cm]

O pecíolo, curto, possui inserção marginal (**Figura 27**), sendo achatado, canaletado e alargado na porção distal, medindo cerca de 0,8 a 1,2 cm. À lupa estereoscópica, é possível notar superfície abaxial irregular, além da presença de pêlos de características, semelhantes àqueles observados nas nervuras. A droga apresenta odor aromático, quando triturada.

A lâmina foliar da droga mostra-se recurvada, ou totalmente dobrada, ao nível da nervura mediana, para o lado da face adaxial, podendo assumir aspecto enrolado (**Figura 27A**).

Figura 27 - *Annona squamosa* L – Folhas (droga). 27A. Aspecto geral da droga [Escala: 1,1 cm] 27B. Face abaxial. Detalhe dos tricomas (setas) sobre as nervuras, observados à lupa estereoscópica [Escala = 0,5 mm]

5.3.2 Anatomia de folha

O estudo anatômico das folhas de *A. squamosa* L. foi subdividido na análise de limbo foliar, nervura mediana e pecíolo.

5.3.2.1 Limbo foliar

Em secção transversal, a lâmina foliar apresenta mesofilo heterogêneo assimétrico (**Figura 28 A**), com dois estratos de parênquima paliádico, cujas células alongadas no sentido anticlinal, ocupam cerca da metade da espessura do mesofilo. O estrato celular mais próximo da epiderme possui maior comprimento em relação àquele mais interno.

O parênquima lacunoso, compacto apresenta de três a oito estratos celulares. Na região mediana do mesofilo observa-se a presença de células coletoras.

Células oleíferas com paredes espessadas e cujo conteúdo lipofílico, reage com Sudam III, produzindo coloração vermelha a alaranjada, ocorrem em toda a extensão do mesofilo, localizando-se, geralmente, no parênquima paliádico.

Células oleíferas apresentando conteúdo lipofílico, Sudam III, produzindo coloração vermelha a alaranjada, ocorrem mesofilo, localizando-se, geralmente, na região mediana ou junto à camada celular mais externa do parênquima paliádico. Apresentam formatos alongado, no sentido anticlinal, ou arredondado, sendo providas de paredes espessadas.

Carol, revendo as fotos e a revisão, acho que seria melhor diferenciarmos as células oleíferas das mucilaginosas!!! As mucilaginosas, em todas as plantas mostram-se alongadas e grandes. Portanto, provavelmente, deve ser o caso aqui também. Se optar por isto, sugiro a seguinte redação para este trecho: Além de citar a **Figura 28A e B**:

Células oleíferas de formato arredondado (**Figura 28B**), paredes espessadas e conteúdo lipofílico reagente ao Sudam III, produzindo coloração vermelha a alaranjada, ocorrem na região do parênquima paliádico.

Na região mediana do mesofilo, vêem-se células mucilaginosas grandes, dispersas alongadas (50-60µm) no sentido anticlinal (**Figura 28 A**).

Os feixes vasculares de menor porte apresentam extensão de bainha, geralmente, com células de parede celulósica.

Em secção transversal, as células epidérmicas da face adaxial possuem, geralmente, contorno alongado no sentido periclinal, havendo regiões em que se observam até dois estratos celulares. A espessura da epiderme, na face adaxial, pode alcançar até quatro vezes aquela da face abaxial, sendo que, na face adaxial há espessamento celulósico pronunciado das paredes periclinais externas.

Em secções com montagem direta, é possível verificar a presença de substâncias que reagem com o reativo de cloreto férrico, produzindo precipitado escuro nas células localizadas na epiderme, nervura central e no parênquima do mesofilo. Reação positiva para alcalóides, frente ao reativo de Dragendorff foi detectada no conteúdo presente nas células próximas à epiderme e por toda extensão do parênquima paliçádico do mesofilo.

Frente ao reativo de Sudam III, observou-se coloração alaranjada, nas células epidérmicas da lâmina foliar, indicando a presença de conteúdo lipofílico nas células epidérmicas.

Figura 28 - *Annona squamosa* L. Folha. Secção transversal de mesofilo. 28 A. Detalhe do mesofilo. célula oleífera (seta), c. muc.: célula mucilaginosa. [Escala: 50µm] 28 B. Detalhe de célula oleífera (c.ol.), na região do parênquima paliádico [Escala: 6µm]

Epiderme

Em vista frontal, as células da epiderme mostram contorno poligonal e paredes celulares retas a levemente sinuosas (**Figuras 29A e 29C**). Na epiderme sobre as nervuras, as células de paredes retas possuem contorno alongado em relação às internevurais.

A epiderme é geralmente glabra, podendo ocorrer tricomas tectores longos na face abaxial, junto à região das nervuras. Os tricomas observados são unicelulares, de paredes delgadas e celulósicas.

Figura 29 - *Annona squamosa* L. Folha. Epiderme. 29A. Face adaxial. [Escala: 25 μ m] 29B. Face abaxial. Detalhe de estômatos paracíticos e geminados (seta) [Escala:25 μ m]. 21C. Epiderme da face abaxial. Detalhe de cutícula granulosa. [Escala: 25 μ m]

A folha hipoestomática (**Figura 29C**) apresenta cutícula granulosa (**Figuras 29 A e 29 C**). Os estômatos são paracíticos (**Figuras 29 B e C**), sendo observados, com menor frequência, estômatos geminados (**Figura 29 B**).

Nervura mediana

A secção transversal da nervura mediana de folhas adultas de *A.squamosa* L., na região mediana do terço inferior, mostra-se plana na face adaxial e convexa na face abaxial, onde o contorno apresenta formato irregular (**Figura 30**).

A epiderme, unisseriada, é composta por células isodiamétricas. Na região subepidérmica encontram-se de um a dois estratos de células colenquimáticas com espessamento celulósico angular.

O tecido fundamental apresenta células parenquimáticas de contorno arredondado e dimensões irregulares. Na região abaxial, o tecido parenquimático delineia uma linha mais escura de tecido celulósico obliterado, com disposição concêntrica ao tecido vascular (**Figura 30**). Na região periférica da face abaxial, são observadas células parenquimáticas maiores (**Figuras 22 e 23**). Igualmente, nesta região e, mais raramente, na face adaxial da nervura, encontram-se células oleíferas arredondadas, dispersas e distribuídas de forma concêntrica,

apresentando conteúdo lipofílico que se cora em alaranjado, com reativo de Sudam III (**Figura 32**). Observa-se, também nesta região, a presença de drusas e de cristais prismáticos dispersos.

Figura 30- *A. squamosa* L. Nervura mediana. Secção transversal. Disposição geral dos tecidos. [Escala: 200µm]

O sistema vascular colateral encontra-se disposto em arco, estando os feixes separados por faixas parenquimáticas, dispostas radialmente e constituídas de duas a quatro fileiras de células (**Figura 30 e 31**). No floema, ocorrem células oleíferas (**Figura 32**) Externamente ao floema, há bainha descontínua de fibras (**Figuras 30 e 31**). Na porção superior do arco vascular, observa-se a presença de grupo de fibras que forma faixa celular descontínua, constituída de um a cinco estratos, com disposição tangencial à epiderme da face adaxial.

Figura 31 – *A. squamosa* L. Nervura mediana. Secção transversal. Detalhe do sistema vascular. Estrato de células obliteradas (setas) [Escala:100 μ m]

Figura 32 - *A. squamosa* L. Nervura mediana. Secção transversal. (não clarificada)
Localização das células oleíferas no tecido fundamental (seta) e no floema
(círculo) [Escala = 100µm]

Nas secções não clareadas, verifica-se a presença de compostos fenólicos, produzindo precipitado escuro com solução de cloreto férrico, em células epidérmicas e nas células parenquimáticas da nervura mediana e do mesofilo. O conteúdo das células da região subepidérmica, na nervura mediana e do parênquima paliádico reage com o reativo de Dragendorff, indicando a presença de alcalóides. Substâncias de natureza lipofílica, de coloração alaranjada a castanha-clara são observadas nas células oleíferas dispersas no floema, no parênquima da nervura mediana e no mesofilo. Células grandes, dispersas na região da nervura mediana e no mesofilo, apresentam conteúdo de mucilagem, verificado pela reação com azul de metileno.

5.3.3 Anatomia de pecíolo

A região mediana do pecíolo de *A. squamosa* L., possui secção transversal de contorno convexo, na face abaxial, e com reentrância na região central da face adaxial (**Figura 33**).

Figura 33 - *Annona squamosa* L. Pecíolo. Secção transversal da região mediana. Disposição geral dos tecidos. Sistema vascular em arco. Detalhe de tricoma tector (seta). (Escala: 200 μ m)

A epiderme uniestratificada, mostra células isodiamétricas e alongadas no sentido anticlinal (**Figura 34A**). Na droga, os tricomas tectores são raros e, quando presentes, são observados, na face adaxial (**Figura 33**).

O colênquima apresenta de duas a seis camadas celulares, sendo providas de espessamento celulósico angular (**Figuras 34 B**), dispondo-se de forma contínua. O sistema vascular apresenta feixes colaterais (**Figuras 34 B e 34 C**), organizados de forma concêntrica e formando arco constituído de 5 a 6 feixes maiores (**Figuras 33**), separados por 2 a 3 faixas de células dispostas no sentido radial. No xilema, são observados compostos de natureza fenólica, (**Figuras 34B e 34C**), geralmente localizados, nos elementos de vaso (**Figuras 34B e 34 C**).

Figura 34 - *Annona squamosa* L. Pecíolo. Secção transversal. 34A. Detalhe da epiderme (Escala: 10 μ m) 34B. Detalhes do feixe vascular. fib.:fibras, flo.: floema, x.: xilema, compostos fenólicos (seta) (Escala: 25 μ m). 34C. Detalhe de elemento de vaso contendo compostos fenólicos (seta). (Escala: 15 μ m)

Externamente ao floema, observa-se calota de fibras (**Figuras 34 e 34B**) descontínua. Na região interna ao xilema drusas de oxalato de cálcio são freqüentemente observadas (**Figura 34 A**). As fibras xilemáticas concentram-se na região interna aos elementos de vaso, formando estrato celular voltado para o parênquima fundamental (**Figura 34B**).

Figura 35 - *Annona squamosa* L. Pecíolo. Secção transversal não clarificada. Detalhe da região interna ao xilema. Presença de cristais de oxalato de cálcio 35A. dr: drusas. 35B. Detalhe de calota de fibras xilemáticas. Disposição na região externa do xilema. fib.:fibras, c.pr.: cristais prismáticos (Escala: 25µm)

O tecido fundamental apresenta células arredondadas e com dimensões regulares, e espaços intercelulares pequenos (meatos). Nele, drusas e cristais prismáticos de oxalato de

cálcio são encontrados (**Figuras 35A e B**), sendo mais freqüentes na região interna ao xilema (**Figura 25**) e externa ao floema.

Ainda, no tecido fundamental, elementos esclerenquimáticos como **esclereídeos** isolados ou agrupados encontram-se dispersos na região interna (**Figura 36**) e externa aos feixes vasculares.

Na região externa do parênquima fundamental, encontram-se dispersas, grandes células mucilaginosas, (**Figura 36-c.muc.**) e células oleíferas (**Figura 36-c.ol.**) com conteúdo amarelado, que reage com o reativo de Sudam III.

Figura 36 - *Annona squamosa* L. Pecíolo. Secção transversal (não clarificada). Elementos celulares dispersos no parênquima fundamental. Grupos de esclereídeos (setas), c.muc.: células mucilaginosas, c.ol.: células oleíferas (Escala: 25µm)

6. DISCUSSÃO

O grave quadro sócio-econômico causado pelas doenças tropicais endêmicas é preocupante, considerando as dificuldades no tratamento das populações atingidas, seja no acesso à medicação ou pelo surgimento de resistência dos parasitas aos medicamentos convencionais. Neste contexto, muitas espécies vegetais têm sido estudadas, visando à pesquisa de novas moléculas e opções terapêuticas, que ofereçam menor grau de toxicidade ao tratamento da leishmaniose (MURRAY *et al*, 2005), doença cujos parasitas foram considerados neste trabalho.

Nas últimas décadas, diversas espécies do gênero *Annona* (Annonaceae) têm demonstrado importante potencial antiprotozoário (OSÓRIO *et al*, 2006, CAMACHO *et al*, 2003, WAECHTER *et al*, 1998) e têm sido alvos de estudo, inclusive, do Grupo de Pesquisa no qual se trabalhou (Grupo de Pesquisa de espécies vegetais e substâncias potencialmente ativas em doenças tropicais endêmicas).

O grupo de pesquisa dedica-se, principalmente, à busca de metabólitos secundários da classe dos alcalóides isoquinolínicos (FISCHER *et al*, 2004, TEMPONE *et al*, 2005), presentes em espécies de anonáceas, os quais se mostraram ativos em agentes de doenças endêmicas, acenando como compostos promissores no fornecimento de protótipos de moléculas bioativas. Neste contexto, *Annona squamosa* L. foi selecionada para o presente estudo.

A espécie muito conhecida do ponto de vista alimentício (NOBRE *et al*, 2003) é uma das mais intensamente estudadas do gênero, entretanto, aspectos específicos relacionados à variação da composição química em metabólitos secundários presentes nos órgãos aéreos, das atividades antileishmania e citotóxica *in vitro* de diferentes extratos e órgãos aéreos, obtidos nas quatro épocas anuais, mostraram-se inéditos e foram abordados, nesta pesquisa. O estudo anatômico de folha de espécimes brasileiros foi realizado, com o intuito de comparação com caracteres dos espécimes indianos (KUMAR *et al*, 2005).

Avaliação de atividade biológica

Em busca de espécies vegetais com atividade antiprotozoária, especialmente aquelas apresentando atividade antileishmania, *A. squamosa* foi selecionada como candidata aos testes *in vitro*, com base em resultados promissores obtidos anteriormente, com outras espécies do gênero *Annona* por FISCHER *et al*, 2004 e TEMPONE *et al*, 2005), bem como nos estudos de EL TAHIR, SATTI e KHALID (1999), que demonstraram a atividade antiprotozoária do extrato metanólico das folhas de *A. squamosa* frente ao *Plasmodium falciparum*. Além disto, a avaliação da atividade antileishmania de *A. squamosa* não foi realizada, anteriormente, conforme verificado na revisão bibliográfica realizada em bases de dados internacionais.

Neste trabalho, avaliou-se a atividade antileishmania *in vitro* de *A. squamosa*, considerando diferentes parâmetros, como: órgão vegetal e/ou parte dele, fase anual de obtenção do material vegetal, estágio de maturação do pericarpo e formas extrativas, buscando verificar condições de obtenção mais adequadas, para favorecer a atividade biológica e inferir acerca de classes de compostos, possivelmente envolvidos, na mesma.

Tanto na triagem de extratos, como no isolamento de componentes, o uso das técnicas *in vitro* mostra-se vantajoso, em função da necessidade de quantidade reduzida de amostra para a realização dos testes, em relação àquela empregada para aqueles *in vivo*.

Nos ensaios efetuados, foram utilizados parasitas na forma promastigota devido à facilidade de manutenção das culturas *in vitro*, além de ser procedimento usual, nesta fase do estudo (QUEIROZ *et al*, 1996; CAMACHO *et al*, 2000b).

Na primeira etapa dos testes *in vitro*, efetuou-se a triagem preliminar abrangendo todos os extratos obtidos: AT, hidroetanólicos (HE) e aquosos (AQ) preparados a partir da droga, nas quatro épocas anuais. Nesta fase, visou-se a detecção dos extratos mais ativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados mostraram níveis de atividade muito variáveis entre os diferentes extratos (**Tabelas 13 a 15**).

Em relação aos extratos AQ e HE, valores superiores a 60% de morte dos parasitas foram observados, em geral, a partir dos HE de pericarpos (sem sementes), de sementes (sem arilo) e folha (verão)(**Tabela 13**). Portanto, é importante, que futuras pesquisas se aprofundem no estudo químico destas partes vegetais, de forma a identificar os compostos responsáveis pela atividade antiprotozoária.

Na maioria dos casos, os extratos hidroetanólicos foram mais ativos que os aquosos, indicando que os compostos bioativos devem ser mais solubilizados na mistura hidroetanólica

do que na água, mesmo sob aquecimento (extrato aquoso). Ou, ainda, pode ser que o processo de extração a quente interfira na estabilidade dos mesmos.

A realização dos testes dos AT em três concentrações diferentes serviu de orientação para a avaliação do nível de atividade antileishmania dos mesmos (**Figura 37**).

Figura 37 - Dados da triagem preliminar dos alcalóides totais (AT) de *A. squamosa* mais ativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*

Comparando-se os resultados obtidos para os AT, na concentração de 300 µg/ mL (**Tabela 15**) com aqueles dos EH e AQ, testados à concentração de 1.600 µg/ mL (**Tabela 13**), constata-se que, os primeiros tiveram níveis de atividade muito superiores, mesmo tendo sido avaliados em concentração menor. Isto está relacionado ao fato de que os AT representam extratos enriquecidos com esta classe de componentes bioativos, em relação aos extratos brutos (AQ e HE) nos quais ocorrem em menor concentração.

Entretanto, de acordo com os valores das percentagens de morte (**Tabela 15**), pode-se dizer que, os níveis de atividade antileishmania *in vitro* dos AT, à concentração de 100µg/ mL, ainda permaneceram altos (**Tabela 15**).

A partir dos resultados da atividade dos extratos AQ e dos HE, selecionaram-se os mais ativos (**Tabela 13**) para a continuidade dos testes. Desta forma, foram testados: os HE de folha (verão, coleta 1), pericarpo verde (sem sementes) (verão, coleta 1), sementes (sem arilo) (inverno, coleta 3) e o aquoso de arilo (inverno, coleta 3). Estes foram fracionados com solventes orgânicos, de polaridades crescentes, e as frações resultantes; submetidas aos testes de atividade antileishmania, à mesma concentração usada para os AT (300 µg/ mL).

Entre as frações orgânicas, sete foram mais ativas, a maior parte delas apresentando 100% de mortes à concentração testada (**Tabela 14**), podendo-se enumerar: diclorometano de folha (verão), *n*- hexano de pericarpo verde (sem sementes) (verão), as quatro frações de semente (sem arilo), retirada de frutos maduros da coleta do inverno e, por fim, a fração metanol do arilo de fruto maduro (inverno). Esta última foi a única representante dos extratos aquosos e foi considerada, nos testes, apesar de ter apresentado porcentagem de inibição inferior a 100%, para que se pudesse obter dado acerca do arilo. Sendo assim, esta foi a fração selecionada entre as mais ativas do arilo (**Tabela 14**).

As CE_{50} das frações e dos AT mais ativos foram determinadas (**Tabelas 16 e 17**). No caso das frações orgânicas, apresentaram os menores valores de CE_{50} : duas referentes à semente (sem arilo) de fruto maduro (coleta 3) e uma de folha. Entre todas estas, a fração diclorometano de semente foi a mais ativa ($<3,0$ µg/mL), seguida da acetato de etila ($3,567 \pm 0,09$ µg/mL) e da diclorometano de folha ($11,323 \pm 1,611$ µg/mL) (**Tabela 16**).

Em relação à semente (sem arilo) de fruto maduro, coletada no inverno, o estudo químico revelou que foi, nesta época, que apresentou o maior teor de AT (1,94 %, m/m) (**Tabela 5**). Sendo assim, a atividade da fração diclorometano, que apresentou alcalóides em sua composição (**Tabela 10**) pode ser atribuída, muito provavelmente, à presença destes metabólitos, nela solubilizados, em sua forma molecular. Em contraste, os teores dos demais metabólitos quantificados, nesse órgão, na época anual considerada, como: flavonóides totais, compostos polifenólicos totais e taninos, não estiveram entre os mais altos (**Figura 40**), portanto não devem ter contribuído significativamente para a alta atividade da fração acetato de etila correspondente. Portanto, é necessário que a composição desta fração seja investigada (**Tabela 16**).

O teor de AT no pericarpo verde (sem sementes), coletado no verão, situou-se entre os mais altos dos órgãos e partes estudados de *A.squamosa* (**Figura 39**). No entanto, a fração mais ativa foi aquela em *n*-hexano (**Tabela 16**). Neste caso, a menor polaridade da mesma

sugere que, outros constituintes sejam responsáveis pela atividade como, por exemplo, as acetogeninas ou terpenos, cuja ocorrência é comum, no gênero *Annona* (BERMEJO *et al*, 2005; WELE *et al*, 2004; LIU *et al*, 1999).

No tocante à fração orgânica mais ativa de folha (diclorometano) (CE_{50} : $11,323 \pm 1,611$ $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 16**), obtida de material vegetal da coleta do verão (coleta 1), constatou-se que, nesta época, ocorreram os maiores teores de alcalóides (**Figura 39**) neste órgão, além dos compostos polifenólicos totais (**Figura 40**), em comparação aos demais considerados. Sendo solúveis no diclorometano, muito provavelmente, estavam presentes na fração tendo contribuído para o nível de atividade constatado.

Entre as demais frações orgânicas, para a maioria, que mostrou menor nível de atividade, os valores médios das CE_{50} variaram de 20,4 e 24,4 $\mu\text{g/mL}$, sendo que a fração *n*-hexano de pericarpo, anteriormente comentada, foi a menos ativa de todas (CE_{50} : 45,1 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 16**). Ainda que, estas frações sejam quimicamente complexas os níveis de atividade encontrados mostraram-se promissores, incentivando a investigação dos compostos bioativos.

De forma geral, os AT selecionados, entre os mais ativos, apresentaram maiores valores de CE_{50} (**Tabela 17**) em relação àqueles das frações orgânicas (**Tabela 16**) mais ativas correspondentes dos mesmos órgãos ou partes vegetais.

No caso das folhas, tanto a fração orgânica (diclorometano) (CE_{50} : $11,323 \pm 1,611$ $\mu\text{g/mL}$) quanto os alcalóides totais mais ativos (CE_{50} : $48,273 \pm 9,905$ $\mu\text{g/mL}$), mostraram coincidência, quanto à época de coleta, que se deu no verão. Segundo a análise cromatográfica realizada, a fração diclorometano das folhas apresentou alcalóides (**Tabela 10**) em sua composição, sugerindo que os mesmos contribuíram para a atividade da fração. Entretanto, outros metabólitos, de polaridade compatível ao solvente da mesma, devem ter agido sinergicamente, levando ao excelente nível de atividade leishmanicida verificado ($CE_{50} < 3,0$ $\mu\text{g/mL}$).

Em relação às frações (**Tabela 16**) e AT (**Tabela 17**) dos demais órgãos e partes vegetais analisados, os mais ativos não foram obtidos de materiais vegetais provenientes da mesma coleta.

O menor valor de CE_{50} ($11,975 \pm 1,221$ $\mu\text{g/mL}$), entre os AT, foi aquele do pericarpo verde sem sementes provenientes da coleta do outono. As CE_{50} determinadas para os AT dos demais órgãos e partes vegetais de *A. squamosa*, tiveram valores médios variando de 40,03 a 48,27 $\mu\text{g/mL}$ (**Tabela 17**). Ainda assim, estes extratos alcaloídicos brutos podem ser

considerados de interesse, uma vez que constituintes em menor concentração, no extrato bruto, podem apresentar alta atividade, quando isolados, conforme foi verificado para o aporfinico isocoridina (**Tabela 18**), cuja presença foi confirmada, nas folhas da espécie tendo apresentado atividade excepcional (CE_{50} : $0,048 \pm 0,007 \mu\text{g/mL}$). Entretanto, não foi objetivo deste trabalho o isolamento de componentes, estando em desenvolvimento.

É interessante notar que, a maioria dos AT selecionados entre os mais ativos, e para os quais foi determinada a CE_{50} , originaram-se dos órgãos coletados no verão, tendo coincidido com a época em que ocorreram os maiores teores destes metabólitos, exceto no caso do pericarpo sem sementes (outono) (**Figura 39, Tabela 17**). Tal constatação é de interesse para a obtenção dos alcalóides bioativos a partir desta espécie e para o desenvolvimento dos estudos futuros.

Ainda em relação aos AT, apesar dos valores numericamente próximos das CE_{50} dos órgãos e partes vegetais coletados na mesma época (verão), aqueles das sementes sem arilo (CE_{50} : $40,031 \pm 4,268 \mu\text{g/mL}$) e dos seus correspondentes arilos (CE_{50} : $41,534 \pm 6,875 \mu\text{g/mL}$) foram mais ativos do que de folha (CE_{50} : $48,273 \pm 9,905 \mu\text{g/mL}$). É provável que as sementes tenham apresentado maior concentração dos componentes responsáveis pela atividade antileishmania, nesta época. Adicionalmente, o nível semelhante de atividade da semente (sem arilo) e do arilo mostrou-se em acordo com o fato deste ser um apêndice (excrecência carnosa) da primeira, sendo que os teores do(s) componente(s) bioativo(s) deve(m) ter sido similares, nestas partes.

Considerando o fato de que a semente sem arilo, obtida de fruto maduro, foi mais ativa que o arilo de fruto verde, sugere que o processos de biossíntese dos alcalóides nos órgãos maduros estavam mais ativado em relação aos verdes. Entretanto, a influência do estágio de maturação deverá ser averiguada de forma mais aprofundada.

Em estudo anterior, os AT de folhas de duas espécies do gênero: *A. coriacea* e *A. crassiflora* foram avaliadas frente às formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e outros protozoários (TEMPONE *et al*, 2005), pelo mesmo grupo de pesquisa. As CE_{50} foram, respectivamente, de: 42,60 e 24, 89 $\mu\text{g/mL}$, sendo similares do valor médio encontrado para as folhas de *A. squamosa* (48, 273 $\mu\text{g/mL}$) frente a *L. amazonensis* (**Tabela 17**).

No que tange aos compostos avaliados, em paralelo, como marcadores químicos, somente, isocoridina mostrou atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (**Tabela 18**), enquanto que, os flavonóides (rutina, quercetina e quercitrina) foram inativos

($CE_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$). Apesar de não ser majoritário, entre os demais alcalóides das folhas (**Tabela 11**), o excelente nível de atividade antieishmania deste aporfínico revelou sua importância no uso, como marcador biológico.

No caso dos flavonóides testados, os resultados do presente estudo, foram, em sua maioria, compatíveis com aqueles de outros autores. Assim, a rutina teve CI_{50} maior que $30 \mu\text{g/mL}$ em formas promastigotas (TASDEMIR *et al*, 2006), tendo sido inativa, contra formas amastigotas de *L. donovani*, à concentração de $100 \mu\text{g/mL}$ (MONTENEGRO *et al*, 2007).

Em contraste, a quercitrina foi ativa frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* (CI_{50} : $8 \mu\text{g/mL}$) e inativa nas formas amastigotas do mesmo parasita ($CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$) (MUZITANO, 2006).

Quanto à quercetina, frente às formas promastigotas do mesmo protozoário testado, neste trabalho, igualmente mostrou baixa atividade (CI_{50} : $123,50 \mu\text{g/mL}$) (TALEB-CONTINI *et al*, 2004). Entretanto, o flavonóide apresentou CI_{50} de $1,0 \mu\text{g/mL}$, em formas amastigotas de *L. donovani* (TASDEMIR *et al*, 2006).

A citotoxicidade *in vitro* em células HEP-2 foi investigada, para melhor avaliar a ação antieishmania dos extratos (EH e AQ) e frações de *A. squamosa*, sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* (**Tabelas 19 e 20**), buscando identificar os mais promissores, para a continuidade da pesquisa e desenvolvimento de novos estudos.

De forma geral, os resultados mostraram que, os AT apresentaram menor citotoxicidade em relação às frações orgânicas selecionadas (**Tabelas 19 e 20**), excetuando-se a fração metanol de arilo (inverno, coleta 3) proveniente de extrato AQ, que apresentou o menor nível de citotoxicidade ($CC_{50} > 3.000 \mu\text{g/mL}$) de todos os órgãos avaliados, inclusive com relação aos alcalóides correspondentes.

No modelo experimental usado, os alcalóides totais menos citotóxicos foram aqueles das folhas (coleta verão) (CC_{50} : $1.010,5 \pm 71,0 \mu\text{g/mL}$) e do arilo (coleta verão/verdes) ($CC_{50} > 1.000 \mu\text{g/mL}$). Neste caso, é interessante notar a diferença de citotoxicidade apresentada pelos arilos e sementes coletados, em uma mesma época (**Tabela 20**), apesar de terem apresentado os mesmos níveis de atividade antieishmania (**Tabela 17**). É provável que as diferenças no estágio de maturação das duas partes vegetais tenham interferido, uma vez que a semente e o arilo provieram de frutos, respectivamente, maduros e verdes (**Tabela 20**). A toxicidade das sementes de *A. squamosa* foi reconhecida popularmente (LORENZI, 2002, CORRÊA, 1984).

O índice de seletividade (IS), referente à determinada atividade biológica, constitui ferramenta importante na avaliação do potencial de novos compostos, como sendo mais promissores, futuramente, podendo resultar em novos fármacos.

Para a avaliação do nível de seletividade das frações e AT mais ativos de *A. squamosa*, em relação à atividade antileishmania *in vitro*, considerou-se que, quanto menor a citotoxicidade sobre as células epiteliais humanas HEP-2, maior a especificidade de ação sobre os parasitas de *L. amazonensis*. Sendo assim, considerando as frações orgânicas (Tabela 20) e AT (Tabela 21) selecionados, entre os mais ativos, e para os quais foi possível determinar o IS, os resultados sugeriram que, as frações orgânicas foram menos seletivas para a ação antileishmania (IS maiores), em relação aos alcalóides dos órgãos e partes correspondentes.

Particularmente, em relação às folhas, este dado foi confirmado, tendo em vista que a fração diclorometano (Tabela 19) e os AT (Tabela 20) foram obtidos, a partir de material vegetal coletado na mesma época (verão). A primeira, igualmente, mostrou-se menos seletiva para a ação antiprotozoária, quando comparada à fração *n*-hexano do pericarpo (verão, verde) (Tabela 19).

Ainda, com relação aos AT mais ativos selecionados, verificaram-se diferenças no nível de seletividade da ação antileishmania dos diferentes órgãos (Tabela 20), sendo que este se mostrou decrescente, na seguinte sequência: pericarpo sem sementes (outono, verde), folha (verão), semente sem arilo, originada de fruto maduro (verão).

Desta forma, os resultados forneceram importantes indicações acerca dos órgãos e partes vegetais de *A. squamosa* referentes às épocas anuais e estágios de maturação mais adequados à obtenção de metabólitos, com maior seletividade para a ação frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, representando ponto de partida para novos estudos.

Na busca por novas drogas vegetais e fármacos bioativos, ainda que a amostragem tenha sido constituída de partes e órgãos vegetais reunidos, provenientes de espécimes coletados em uma mesma área de cultivo, estes dados confirmam a influência dos diferentes parâmetros relacionados à variabilidade de fatores intrínsecos ao vegetal, como: órgão vegetal, estágio de maturação dos frutos, época de coleta, na composição e na atividade biológica de uma espécie vegetal. Tais considerações, entre outras, estão estreitamente relacionadas à obtenção racional de drogas, devendo-se determinar, com maior precisão, os metabólitos responsáveis pela atividade e a influência destes parâmetros na sua biossíntese.

Adicionalmente, o maior nível de detalhamento das pesquisas é desejável de forma a, igualmente, fazer o acompanhamento da variação dos fatores extrínsecos (OLIVEIRA *et al*, 1998), por meio de determinações que relacionem as condições do solo, de cultivo e a variabilidade, entre cultivos de áreas diferentes, estabelecendo-se, estatisticamente, a influência de todos as variáveis sobre a produção dos metabólitos bioativos e, em última análise, sobre sua atividade.

Confirmou-se, portanto, o potencial dos AT e das frações orgânicas de *A. squamosa* na obtenção de compostos bioativos, particularmente, com atividade frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* cujo isolamento, poderá resultar em fármacos alternativos, tão urgentes, no tratamento de doenças protozoárias endêmicas.

À semelhança do que se verificou para outras espécies de *Annona*, anteriormente avaliadas (FISCHER *et al*, 2004, TEMPONE *et al*, 2005), os alcalóides isoquinolínicos de *A. squamosa*, certamente, poderão contribuir para a mesma finalidade.

Estudo químico

No estudo de constituintes alcaloídicos e flavonoídicos de *A. squamosa*, foi investigada a variação quantitativa destas classes de componentes e dos compostos polifenólicos totais, bem como de isocoridina (marcador alcaloídico), além da variação qualitativa dos marcadores alcaloídicos e flavonoídicos selecionados, nas quatro épocas anuais, representadas por amostras obtidas de materiais vegetais dos cinco exemplares demarcados coletados, nas seguintes datas: 21/02/06, 09/05/06, 11/08/06 e 15/11/06 correspondentes, respectivamente, às seguintes fases anuais: verão (coleta 1), outono (coleta 2), inverno (coleta 3) e primavera (coleta 4).

Nas quatro coletas realizadas, os exemplares estavam em fenofases reprodutivas, tendo predominado aquela da frutificação, ocorrente, nas três primeiras.

[Em nenhuma das etapas de coleta, foram encontrados exemplares em fenofase vegetativa. Tal fato relaciona-se, muito provavelmente, aos procedimentos de cultivo adotados pelo produtor, de forma a favorecer a frutificação (DIAS *et al*, 2003), visando à produção comercial. Além disto, a fenofase vegetativa deve ter ocorrido, no período entre as coletas, tendo em vista o regime trimestral das mesmas.

O estudo dos extratos hidroetanólicos e aquosos de *A.squamosa* fundamentou-se na busca de aplicação futura como medicamento, com potencial ação antileishmania, tendo em vista a facilidade de obtenção e o uso consagrado destas formas extrativas. Lembrando que, na Índia, a espécie vem sendo usada tradicionalmente como antidiabético (KUMAR *et al*, 2005). Adicionalmente, o preparo destes extratos implica no uso de solventes que não agredem o meio ambiente, além de apresentarem baixo custo e solubilizarem os constituintes químicos bioativos.

Os rendimentos dos extratos hidroetanólicos obtidos dos três órgãos vegetais variaram de 10,3 a 59,1 % (m/m), enquanto que aqueles dos extratos aquosos situaram-se entre 9,3 e 57,6 % (m/m) (**Tabela 4**).

Os extratos aquosos de folha e de pericarpo sem sementes apresentaram valores de rendimento superiores àqueles do extrato hidroetanólico em, praticamente, todas as épocas anuais (**Figura 38**), exceto para o pericarpo verde, referente ao período do inverno. Deve haver, portanto, predominância, nestes órgãos, de componentes hidrossolúveis de maior polaridade, como por exemplo, alcalóides e glicosídeos flavonoídicos (**Quadros 1 à 11**), independentemente da época de coleta.

No tocante aos extratos obtidos, a partir de sementes sem arilo, geralmente, observou-se perfil inverso (rendimento maior do extrato hidroetanólico), em duas das épocas de coleta, sendo que uma delas coincidiu (inverno, coleta 3), para ambos os estágios de maturação, (**Figura 38**). Neste caso, deve ter havido a produção de metabólitos de menor polaridade, que se solubilizaram em maior extensão, na mistura hidroetanólica (etanol 96° GL), em relação à água fervente (infuso).

Adicionalmente, a época anual em que o extrato aquoso da semente (sem arilo) apresentou maior rendimento que o extrato hidroetanólico variou conforme o estágio de maturação considerado, tendo correspondido, ao outono e ao verão, respectivamente, para os extratos aquosos de sementes dos frutos verde e maduro (**Figura 38**).

Para os arilos, a coleta do outono (coleta 2) apresentou valores coincidentes para os rendimentos de extração, independentemente do estágio de maturação do fruto de origem (**Figura 38**). Os rendimentos dos extratos de arilos maduros foram superiores àqueles dos arilos verdes, conforme o esperado, tendo em vista o enriquecimento desta excrescência carnosa da semente (OLIVEIRA *et al*, 1998), em carboidratos e outros componentes

nutritivos, sendo a parte comestível do fruto de *A. squamosa* e que se torna succulenta com a maturação.

Em relação aos rendimentos dos extratos, nas diferentes épocas, pode-se dizer que, para os extratos de pericarpo sem sementes e das sementes sem arilo, não houve uma tendência uniforme no comportamento entre as duas formas extrativas obtidas, considerando um ou ambos os estágios de maturação (**Figura 38**). Entretanto, para uma mesma forma extrativa, foram verificadas coincidências das épocas em que ocorreram os maiores rendimentos. Sendo assim, no caso dos extratos obtidos dos pericarpos sem sementes, os maiores rendimentos foram constatados no período do outono (coleta 2) e do inverno (coleta 3), respectivamente, para os aquosos e hidroetanólicos, independentemente do estágio de maturação (**Figura 38**). Para os extratos de sementes sem arilo, os maiores rendimentos dos extratos hidroetanólicos foram obtidos no inverno (coleta 3), independentemente do estágio de maturação do fruto de origem (**Figura 38**). Enquanto que, as épocas em que se obtiveram os maiores teores em extrativos, a partir dos extratos aquosos das sementes, variaram de acordo com o estágio de maturação, tendo sido, no outono (coleta 2) e no verão (coleta 1), respectivamente, para sementes provenientes dos frutos verdes e maduros (**Figura 38**). Este mesmo comportamento foi observado tanto para os extratos aquosos, quanto para os hidroetanólicos correspondentes dos arilos (**Figura 38**).

Desta forma, os arilos mostraram perfil similar àquele das sementes de origem, nas fases anuais em que houve maior rendimento do extrato aquoso, com enriquecimento em componentes hidrossolúveis, no outono (coleta 2) (arilos de frutos verdes) e verão (coleta 1) (arilos de frutos maduros), tendo-se concentrado tanto nos extratos do órgão (semente) quanto de sua parte (arilo).

Entretanto, os extratos hidroetanólicos dos arilos, diferentemente daqueles dos demais órgãos e partes estudados, apresentaram discordância em relação à época de maior teor de extrativos, nos diferentes estágios de maturação evidenciando, muito possivelmente, a alteração do perfil de componentes de caráter menos hidrofílico, nestes dois estágios. Tal alteração pode estar relacionada, do ponto de vista da ecologia química (HARBORNE, 1993) ao processo de atração de polinizadores para disseminação das sementes e propagação da espécie.

Em contraste, ambos os extratos dos arilos, provenientes de frutos em mesmo estágio de maturação, tiveram padrão de comportamento similar, para as duas formas extrativas, sendo que os extratos hidroetanólicos e aquosos, preparados com os arilos de frutos verdes,

apresentaram maior rendimento, no período do outono (coleta 2) (**Figura 38**), enquanto que, aqueles obtidos dos arilos de frutos maduros, mostraram os maiores rendimentos no verão (coleta 1), seguidos daqueles do outono (**Figura 38**).

Figura 38 - Comparação dos rendimentos dos extratos hidroetanólicos e aquosos obtidos de folha, pericarpo(sem sementes), semente (sem arilo) e arilo de *A. squamosa* L., em quatro épocas anuais

De forma semelhante, os extratos aquosos e hidroetanólicos das folhas, apresentaram valores de rendimento com a mesma tendência, facilmente perceptível, na **Figura 38**, sendo que os maiores rendimentos foram obtidos na coleta do inverno (coleta 3), seguindo-se de queda drástica nos valores até alcançar o mínimo, na época imediatamente posterior (primavera, coleta 4), para ambas as formas extrativas (**Figura 38**), indicando que para a obtenção de maior teor em extrativos, deve-se realizar a coleta das folhas no inverno.

No tocante às formas extrativas dos pericarpos (sem sementes) considerando-se as similares, nos dois estágios de maturação estudados, mostraram tendências semelhantes para os valores de rendimentos, sendo que os extratos aquosos tiveram os rendimentos mínimos e máximos, respectivamente: no inverno (coleta 3) e no outono (coleta 2) enquanto que, para os extratos hidroetanólicos, as épocas correspondentes foram: verão (coleta 1)(mín.) e inverno (coleta 3) (máx.) (**Figura 38**). É possível, portanto, que no outono, os pericarpos apresentem biossíntese acentuada de componentes mais polares do que no inverno.

Os alcalóides totais, uma das mais importantes classes de compostos bioativos de *A. squamosa* L., receberam atenção especial, em função do interesse na atividade antiprotozoária que têm demonstrado (COSTA *et al*, 2006; DI GIORGIO *et al*, 2006; DEVKOTA *et al*, 2007; PONTE-SUCRE *et al*, 2007), sobretudo no gênero *Annona* (JARAMILO *et al*, 2000; FISCHER, 2004; TEMPONE *et al*, 2005; SANTOS *et al*, 2006; OSORIO *et al*, 2007;).

Em relação aos alcalóides totais (AT) de *A. squamosa* L., os maiores teores encontrados variaram, nos diferentes órgãos vegetais e partes destes, de 1,46 a 2,2% (m/m). Mais especificamente, os pericarpos maduros (2,2 %,m/m) e as sementes (de pericarpos maduros) (1,9 %,m/m) apresentaram os maiores conteúdos, seguidos dos pericarpos verdes (1,6 %%, m/m), arilos (de frutos verdes) (1,48 %,m/m) e folhas (1,46%, m/m) (**Tabela 5**).

Os maiores níveis dos teores de AT (%) ocorreram em órgãos e partes vegetais provenientes da primeira coleta, que correspondeu ao período do verão (**Figura 39**), exceto no caso das sementes sem arilo extraídas de frutos maduros, quando o maior teor foi observado no período do inverno (coleta 3).

Os níveis aumentados no verão, são compatíveis com a necessidade de maior proteção da planta contra a radiação UV, nesta época, em que os níveis de insolação estão aumentadossendo que os alcalóides apresentam predominantemente núcleos aromáticos, garantindo a intensa absorção desta radiação (SAMUELSSON, 1992).

Os segundos maiores níveis de AT foram constatados no inverno (coleta 3) para a maioria dos órgãos e partes destes, exceto para as sementes (sem arilo) provenientes de frutos maduros para as quais, foi a época de maior teor (**Figura 39**). Nesta fase anual, de maior estresse para a planta, a presença destes metabólitos, em maior concentração deve estar associada aos mecanismos de defesa do vegetal (HARBORNE, 1993).

Figura 39 - Comparação dos teores de alcalóides totais obtidos de folha, pericarpo (sem sementes), semente (sem arilo) e arilo de *A. squamosa* L., em quatro épocas anuais

Na determinação dos flavonóides totais na droga, ao longo das 4 épocas anuais, e com concentrações expressas em relação à quercetina, os valores de concentração, nas folhas, revelaram-se excepcionalmente elevados, quando comparados àqueles dos demais órgãos vegetais e partes analisados. A máxima concentração (19,66 $\mu\text{g/mL}$) ocorreu nas folhas coletadas no inverno (coleta 3) (Figura 31, Tabela 7).

Os teores de flavonóides totais (% m/m), em relação à droga, foram extremamente reduzidos (Figura 31), tendo-se situado entre 0,02 a 0,05 % (m/m), na maioria das determinações, excetuando-se aquelas referentes às folhas (0,49-0,98%, m/m). De forma geral, estes percentuais foram inferiores, inclusive, àqueles correspondentes da maioria dos teores de alcalóides totais (Tabela 5).

À semelhança das folhas, os teores de flavonóides totais, no pericarpo (sem sementes) e no arilo, foram maiores no inverno, considerando os dois estágios de maturação (Figura 31), embora os valores tenham sido inferiores àquelas (Tabela 7).

Neste aspecto, é interessante notar a maior influência do estágio de maturação do pericarpo, em relação ao arilo, sendo que os níveis de concentração dos flavonóides no

primeiro foram superiores ao segundo. No pericarpo, a diferença chegou a dez vezes entre o pericarpo (sem sementes) maduro (8,7 $\mu\text{g/mL}$) e o verde (0,85 $\mu\text{g/mL}$) enquanto que não houve, praticamente, diferença na concentração de flavonóides do arilo verde (0,62 $\mu\text{g/mL}$) para o maduro (0,60 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 7**).

Com relação à semente sem arilo, o comportamento dos valores dos teores de flavonóides totais foi diferente dos outros órgãos estudados, e inclusive do próprio arilo, sendo que, o maior teor de flavonóides foi encontrado nas sementes referentes à coleta do verão (coleta 1) e provenientes de frutos verdes (0,77 $\mu\text{g/mL}$ /mL). Enquanto que, aquelas obtidas dos frutos maduros, apresentaram maior teor no período do outono (coleta 2) (0,49 $\mu\text{g/mL}$) (**Tabela 7**).

No doseamento dos flavonóides, o uso do reativo de cloreto de alumínio está relacionado à propriedade destes metabólitos, solubilizados em metanol, formarem complexos estáveis com o cátion alumínio, dando origem a um grupo cromóforo amarelo, que intensifica a absorção do composto na região do UV, permitindo a sua quantificação (WOLLENWEBER e JAY, 1988).

Além disto, a metodologia empregada na quantificação dos flavonóides totais foi selecionada de forma a permitir avaliação da classe dos flavonóis encontrados na espécie (**Quadro 11**) e cuja atividade antileishmania havia sido comprovada, anteriormente (TASDEMIR *et al*, 2006), como quercetina e quercitrina.

Com relação aos teores de compostos polifenólicos totais, foi possível verificar que, os flavonóides representaram a menor parcela do total (**Figura 31**), mesmo em relação à folha que apresentou as maiores concentrações (**Tabela 7**). Entretanto a maior contribuição foi dada pelos taninos, cujos teores acompanharam, de perto, a tendência dos polifenóis totais (**Figura 31**). Entre outros compostos fenólicos que podem ter contribuído na somatória geral, encontram-se os alcalóides aporfinicos, muitos deles apresentando grupamentos fenólicos, além dos ácidos fenólicos (LEBOEUF *et al*, 1972) e de constituintes do óleo volátil (CHAVAN, SHINDE, NIRMAL, 2006), entre outros.

Os maiores valores dos teores de taninos na droga (5,03 a 8,43%, m/m), foram encontrados no pericarpo, nas folhas e nas sementes (sem arilo) e arilo, estes dois últimos, provenientes de frutos verdes (**Figura 31, Tabela 9**), sendo que a época anual de maior produção, nestes casos, foi o inverno (coleta 3). Muito provavelmente, nesta época anual, o

estresse maior serve de estímulo adicional à produção destes componentes de defesa (HARBORNE, 1993).

As sementes sem arilo e o arilo em separado foram as partes analisadas para as quais em, pelo menos, uma das épocas anuais não foram encontrados os taninos (**Figura 31**). A ausência destes componentes foi verificada, no outono (coleta 2), para as primeiras. Além disto, nas épocas correspondentes, verificou-se diminuição do conteúdo com a maturação.

Nos arilos, a ausência de taninos foi observada em épocas variáveis para os dois estágios de maturação. Assim, os taninos não ocorreram no verão (coleta 1), nos arilos dos frutos verdes, enquanto que não foram encontrados nos arilos dos frutos maduros (**Figura 31**).

A redução do teor de taninos, com a maturação, é compatível com este processo, uma vez que sendo compostos de defesa, a rota biossintética é ativada, em função das necessidades de proteção e defesa do vegetal (HARBORNE, 1993). Sendo assim, com a evolução do processo de maturação, o objetivo de atração de polinizadores e disseminação das sementes deve prevalecer, ocorrendo o enriquecimento do arilo em material nutritivo e a redução e/ou interrupção da biossíntese dos taninos.

Nas folhas, no outono e inverno, a concentração dos taninos, praticamente, não sofreu alteração, tendo-se mantido entre os níveis mais altos (8,2; 8,23%, m/m), sendo que a menor proporção ocorreu na primavera (coleta 4) (**Figura 31** (4,78%, m/m) (**Tabela 9**), época da floração. Nesta fase, é provável que, os taninos tenham sido deslocados para os órgãos reprodutivos, visando à proteção de gemas e das flores, requerendo maior proteção contra a herbivoria (HARBORNE, 1993).

Figura 40 - Comparação dos teores de flavonóides totais, compostos polifenólicos totais e de taninos (% m/m) de folha, pericarpo(sem sementes), semente (sem arilo) e arilo de *A. squamosa* L., em quatro épocas anuais

Quanto aos teores de compostos polifenólicos totais (PF), todos os órgãos e partes destes, apresentaram maior concentração, no período do inverno (coleta 3) (Figura 31). Este perfil, similar àquele dos taninos, está relacionado à predominância destes últimos entre os PF (Tabela 9, Figura 31). O mesmo pode ser dito para o fato de que, nos órgãos reprodutivos, houve maior teor de PF, nos órgãos e partes verdes em comparação àqueles maduros (Tabela 8).

É interessante notar, ainda que, as concentrações mais altas de PF ($\mu\text{g/mL}$) ocorreram de forma decrescente, nos órgãos e partes estudados, na seguinte sequência: folhas ($4,43 \pm 0,03 \mu\text{g/mL}$), pericarpos (sem sementes) ($3,61 \pm 0,06$; $3,12 \pm 0,08 \mu\text{g/mL}$), semente sem arilo ($3,02 \pm 0,11$; $2,79 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) e arilo ($2,16 \pm 0,04$; $1,78 \pm 0,01 \mu\text{g/mL}$) (Figura 31, Tabela 8), inclusive, considerando os estágios de maturação, na sequência cronológica (verde para maduro).

No doseamento dos compostos polifenólicos, foram empregados o reativo de Folin-Denis e o carbonato de sódio (**item 4.3.4.1.2**). O fundamento deste método de quantificação está relacionado à oxidação do íon fenolato, em meio alcalino (carbonato de cálcio), e à redução do complexo fosfotúngstico-fosfomolibdico, formando um grupo cromóforo azul, cuja caracterização e quantificação é possível empregando-se a análise espectrofotométrica, no comprimento de onda de 760nm.

Na metodologia da quantificação dos taninos, foi considerada a propriedade dos mesmos de formarem complexos com proteínas, por meio de pontes de hidrogênio intra ou intermoleculares (CARVALHO, GOSMANN, SCHENKEL, 2004), justificando-se o uso de pó-de-pele, que representa o substrato proteico utilizado visando à formação de precipitado e permitindo a separação de taninos dos demais compostos, inclusive polifenólicos, em solução.

Considerando a possibilidade futura de uso de *A. squamosa*, como fitoterápico e a atividade antiprotozoária de alcalóides e flavonóides presentes na espécie, efetuaram-se determinações qualitativas e/ou quantitativas de substâncias de natureza alcaloídica e flavonoídica, buscando empregá-las como possíveis marcadores químicos, considerando os requisitos preconizados pela ANVISA, para o registro de medicamentos fitoterápicos (Resolução RDC, nº 48, de 16 de março de 2004 - ANVISA).

Entre os candidatos a marcadores da classe dos alcalóides foi selecionada a isoquinolina isocoridina de núcleo aporfínico (**Figura 41**), por ter sido reportada a presença, anteriormente, no caule e raiz da espécie (BHAKUNI *et al*, 1972, RAO *et al*, 1978) e, adicionalmente, por ser um dos poucos alcalóides, desta classe, disponíveis no mercado, e em grau analítico de pureza.

Figura 41 – Estrutura química da isocoridina

O alcalóide isocoridina está presente em alguns medicamentos patenteados, entre os quais citam-se: uma formulação oftálmica, outra empregada no tratamento de disfunções vasculares e outras, com efeitos anti-hipertensivo e antihemorrágico (SU e LEE, 2006; WANG e GUO, 2006; ZHANG, 2005).

A análise quantitativa de isocoridina, por CLAE, foi acompanhada de validação do método analítico, para garantir a confiabilidade dos resultados.

Segundo a validação realizada, o desvio-padrão relativo (DPR) foi de 0,12%, indicando que o sistema está perfeitamente ajustado, uma vez que este valor foi inferior a 2%, indicando que a precisão do método enquadrou-se dentro do limite fixado pela Farmacopéia Americana (2008). Além disto, o coeficiente de correlação de 0,9999 demonstrou a excelente linearidade, considerando o mínimo de 0,99, preconizado pela ANVISA (2003).

Nas determinações do padrão de isocoridina, realizadas por CLAE, detectou-se o alcalóide, somente nas folhas (**Figura 14**), ao longo do período de um ano, não tendo sido encontrado, no pericarpo ou na semente. O maior teor de isocoridina, nas folhas, ocorreu no período do inverno (coleta 3) (**Figura 32, Tabela 11**).

É interessante notar que não houve relato anterior de sua presença nas folhas (**Quadro 11**), sendo portanto, dado inédito acerca da espécie.

Apesar de isocoridina não ter se mostrado alcalóide majoritário, nas folhas, (**Tabela 11**), representando cerca de $1,90 \pm 0,20$ a $2,25 \pm 0,08$ % (m/m) dos AT, a sua ocorrência, durante as quatro épocas anuais, e em níveis perfeitamente detectáveis, e de forma precisa, pela metodologia empregada, mostra que é viável o uso desta aporfina, como marcador químico, entre os demais alcalóides de *A. squamosa*.

Entretanto, há que se verificar a viabilidade de outros marcadores alcaloídicos para *A. squamosa*, considerando que não foi detectada a isocoridina, nos órgãos reprodutivos avaliados neste estudo, mesmo tendo sido analisados extratos obtidos em diferentes épocas anuais e estágios de maturação do fruto. Adicionalmente, a avaliação da atividade de outros compostos é importante, à semelhança do que foi realizado para a isocoridina, de forma a encontrar marcadores biológicos.

Considerando o teor de alcalóides de *A. squamosa*, nos pericarpos (sem sementes), é possível dizer que, poderão igualmente, vir a ser rica fonte de AT, lembrando que são, normalmente, descartados após o consumo da parte succulenta comestível (arilo) sendo que,

com a atividade constatada (**Tabela 15**) surge novo potencial de uso e de reaproveitamento desta outra parte do mesmo órgão vegetal.

Na caracterização dos alcalóides totais, por CCD, o sistema cromatográfico SC-1, com fase móvel constituída de diclorometano-metanol-acetona (86:13:1), foi selecionado entre vários outros testados, por ter possibilitado separação e visualização adequadas dos componentes dos AT de *A. squamosa*.

A revelação das cromatoplasas com reativo de Dragendorff (WAGNER e BLADT, 1996), permitiu a distinção das manchas de compostos nitrogenados daquelas de outros não-nitrogenados, quando da mudança de coloração das manchas para as cores alaranjada a laranja-acastanhada, após a nebulização do mesmo, neste caso, havendo maior probabilidade e indício da natureza alcaloídica do(s) composto(s) constituintes das manchas observadas.

Os cromatogramas, em CCD, dos AT e frações analisados mostraram que, entre os mais ativos frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, somente aqueles referentes aos arilos não apresentaram manchas de alcalóides (e/ou compostos nitrogenados) (**Tabela 10**).

O fato de que, durante a partição ácido-base do extrato etanólico, outros compostos não-alcaloídicos sejam retidos na fração bruta obtida (AT), é comum, no processo de extração empregado, sendo que, outras classes de substâncias podem acompanhá-los, como: flavonóides, proteínas, acetogeninas, entre outras. Entretanto, é provável, que a biossíntese dos alcalóides tenha sido reduzida nos arilos, nesta época, tendo em vista o baixo rendimento (0,05%, m/m) obtido do extrato hidroetanólico para a fração AT, referente ao período de inverno (**Tabela 5**). Desta forma, possivelmente, a concentração dos alcalóides propriamente ditos, na cromatoplasa, não alcançou o limite de detecção da análise, por CCD, não sendo detectados.

A detecção dos alcalóides, nas frações bioativas de folhas (diclorometano), pericarpo (sem sementes) (*n*-hexano) e semente (sem arilo) (diclorometano) (**Tabela 10**) sugeriu que, os alcalóides bioativos, presentes nestes órgãos, devem ser de média a baixa polaridade.

Nas cromatografias, por CCD, somente, parte das épocas de coleta foram abrangidas (**Tabela 10**), uma vez que foram analisados AT e frações selecionados, entre os mais ativos, nos testes *in vitro* realizados. Portanto, unicamente por meio destes resultados, não se pode tecer conclusões sobre o uso de boldina e de isocoridina, como possíveis marcadores de *A. squamosa*, assim como a respeito das possíveis influências do período de coleta e dos estágios

de maturação, na ocorrência destes compostos. Entretanto, pode-se dizer que, entre as amostras (bioativas) analisadas, boldina foi encontrada somente entre os AT de pericarpos sem sementes coletados no outono (coleta 2) (**Tabela 2**), enquanto que na fração *n*-hexano destes mesmos órgãos obtidos no verão, não foi detectada a presença, apesar de ter havido solubilização de alcalóides, nesta fração, indicada pela reação das manchas com o reativo de Dragendforff (**Tabela 10**).

Embora, tenha-se pesquisado a presença de boldina em *A. squamosa*, não foi registrado isolamento deste alcalóide, na espécie (**Quadro 10**) e, nem mesmo, no gênero (**Quadro 2**), entretanto, considerando a presença do isômero isoboldina [8] nas espécies: *A. cherimolia*, *A. glabra*, *A. salzmanii* e *A. senegalensis* (**Quadro 2**) e a disponibilidade comercial da boldina, realizou-se a pesquisa deste composto, por CCD, sendo este o primeiro relato de sua ocorrência. Estudos com técnica cromatográfica mais sensível dos alcalóides totais de *A. squamosa*, obtidos a partir de todas as épocas anuais e órgãos vegetais, são de interesse para futuras pesquisas visando à complementação dos dados e ao aprofundamento do conhecimento.

Quanto à isocoridina, os cromatogramas (CCD) confirmaram a sua ocorrência em folhas (**Tabela 10**), não tendo sido detectada, nem nos AT e nem nas frações mais ativos dos demais órgãos vegetais, o que está em conformidade com o que foi constatado por meio de CLAE (item 5.1.6).

Considerando a pesquisa de outros possíveis marcadores químicos, distintos dos alcalóides, como os flavonóides, e presentes em *A. squamosa* (**Quadro 11**) ou, ao menos, no gênero *Annona* (**Quadros 8 e 9**), para uso na avaliação dos órgãos aéreos de *A. squamosa*, foi feita a análise dos extratos hidroetanólicos (HE), por CLAE. Para tanto, foram empregados padrões de três flavonóis (*O*-heterosídeos e genina), comercialmente disponíveis: rutina [59], quercitrina [57] e quercetina [63].

Adicionalmente, a seleção destes flavonóides visou ao possível uso, igualmente, como marcadores biológicos, uma vez que, a atividade antileishmania de dois dos compostos foi verificada, anteriormente. Sendo assim, a quercetina apresentou CI_{50} de 1,0 $\mu\text{g/mL}$, frente às formas amastigotas de *L. donovani* (TASDEMIR *et al*, 2006) e CI_{50} de 123,50 $\mu\text{g/mL}$ para as formas promastigotas de *L. amazonensis* (TALEB-CONTINI *et al*, 2004). A quercitrina foi testada frente às formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, tendo apresentando CI_{50} de, respectivamente, 8 $\mu\text{g/mL}$ (MUZITANO, 2006) e maior que 200 $\mu\text{g/mL}$ (TALEB-CONTINI *et al*, 2004).

A pesquisa desses compostos flavonoídicos, nos extratos hidroetanólicos de folhas, pericarpo (sem sementes), semente (sem arilo) e arilo, por CLAE, mostrou que, nas condições analíticas empregadas (**item 5.1.6**), somente, o *O*-heterosídeo rutina foi detectado e, unicamente nas folhas, coletadas ao longo das quatro épocas anuais consideradas.

Estudo botânico

A possibilidade do emprego futuro de *A. squamosa*, como droga ou fonte de metabólitos bioativos, torna necessário o conhecimento dos caracteres botânicos mais relevantes, que permitam a identificação da espécie, sobretudo quando se consideram as normas para o registro de fitoterápicos ((Resolução RDC, nº 48, de 16 de março de 2004 - ANVISA) ou mesmo, normas de âmbito internacional (WHO, 2000, 2007).

Com o uso consagrado de folhas de *A. squamosa* no tratamento dos mais diversos males (KUMAR *et al*, 2005; MORS, 2000; MORTON, 1997), a preocupação com a qualidade da droga levou ao estudo de suas características botânicas. Neste contexto, KUMAR *et al* (2005), na Índia, realizaram a descrição da morfoanatomia de folha. Entretanto, espécimes brasileiros não foram estudados, anteriormente. No presente trabalho, foram avaliados exemplares cultivados no Brasil, visando, confrontar os diferentes caracteres, o que levou à complementação da descrição autores indianos (KUMAR *et al*, 2005), tendo em vista que, não abordaram a anatomia do pecíolo foliar.

A presença de estômatos geminados (**Figura 29B**) observados nos exemplares coletados, em Getulina, S.P., não foi registrada no trabalho de KUMAR *et al*, 2005 e, ao que consta, nem mesmo no gênero *Annona* (METCALFE e CHALK, 1950).

Caracteres como: a ocorrência de estômatos paracíticos (**Figuras 29B e 29C**), cutícula granulosa (**Figura 29C**), tricomas tectores simples (**Figura 27**) e a presença de cristais foram, anteriormente observados, igualmente, em outras espécies do gênero *Annona* (PONTES, BARBOSA e MAAS 2004).

Em contraste, as folhas de *A. squamosa* não apresentaram cristais, nas células epidérmicas, epiderme pluriestratificada, assim como, não foram vistos grupos de esclereídeos na nervura mediana, conforme descritos para outras espécies do gênero (METCALFE e CHALK, 1950).

Idioblastos de dois formatos, sendo um arredondado e outro alongado no sentido anticlinal, apresentaram localizações características e conteúdos de naturezas distintas. Os primeiros, na região do parênquima paliçádico, com parede celular espessada e conteúdo que reagiu com Sudam III (KRAUS E ARDUIN, 1997) caracterizaram-se como células oleíferas. Enquanto que, na porção mediana do mesofilo, as células grandes e com formato alongado no sentido anticlinal, apresentaram conteúdo que se corou, em azul, com o reativo de azul de metileno, indicando tratar-se de células mucilaginosas, conforme descritas, no gênero *Annona*, por METCALFE e CHALK (1950). Possivelmente, tenham correspondido aos dutos secretores contendo mucilagem, relatados por KUMAR et al (2005). Entretanto, no presente estudo, realizaram-se secções da lâmina foliar, no sentido longitudinal em diferentes níveis do mesofilo, e não foram observados dutos secretores, mas células de comprimento grande (50-60µm) com este mesmo conteúdo, confirmando a presença das células mucilaginosas reportadas por METCALFE e CHALK (1950).

Em *A.squamosa*, KUMAR et al (2005) relataram, ainda, a presença de tricomas tectores simples e estrelares e de cristais prismáticos nas células epidérmicas. Entretanto, estes caracteres não foram encontrados, nos exemplares brasileiros analisados.

O número de feixes vasculares no pecíolo foi considerado, por METCALFE e CHALK (1950), como característica de valor diagnóstico, no gênero *Annona*, bem como a presença de cristais isolados nas células epidérmicas.

No tocante às características de destaque para a identificação das folhas de *A. squamosa* constatadas no limbo, nervura mediana e pecíolo, citam-se: a presença dos estômatos exclusivamente na face abaxial do limbo (**Figuras 29B e 29C**), a localização dos tricomas tectores (unicelulares) sobre as nervuras (**Figura 27B**) da face abaxial, a presença de estômatos geminados (**Figura 29B**) e a ocorrência de 5 a 6 feixes vasculares, distribuídos em arco, na região mediana do pecíolo (**Figura 33**). Cita-se, também, a presença de idioblastos de dimensões e formatos diferentes, podendo ser alongados em sentido anticlinal (células mucilaginosas) ou arredondados (células oleíferas), situando-se no limbo foliar, na região mediana do mesofilo e ao nível do parênquima paliçádico. Na nervura mediana, a presença de células oleíferas, distribuídas de forma concêntrica na parte periférica da região abaxial e dispersas no floema, são características importantes para a identificação.

No pecíolo, mostra-se relevante, para a diagnose: a presença de tricomas, na face abaxial, além de cristais prismáticos e drusas de oxalato de cálcio localizados no parênquima

fundamental, internamente ao tecido xilemático, além da camada bicelular de colênquima angular disposta de forma contínua.

Os tricomas compridos, vistos em *A. squamosa*, são um caractere diferencial desta espécie, visto que as outras, como *A. muricata*, *A. montana* e *A. glabra*, possuem tricomas curtos, porém não a diferenciam da espécie adulterante *A. reticulata*.

A diferenciação entre *A. squamosa* L e *A. reticulata* pode ser feita observando-se as células epidérmicas, que são maiores nesta última, ocorrendo na epiderme da face adaxial, a qual contém mais de um cristal de oxalato de cálcio (METCALF e CHALK, 1979; LIU, CHEN e HU, 2004; KUMAR *et al*, 2005).

Os estômatos paracíticos e a cutícula granulosa, descritos em *A. squamosa*, são de ocorrência comum no gênero *Annona*, tanto na epiderme da face abaxial quanto na adaxial, entretanto, na espécie estudada, foram observados somente na abaxial. A presença de estômatos geminados, por sua vez, não foi mencionada em outras espécies do gênero sendo, possivelmente, caractere de valor diagnóstico (METCALFE e CHALK, 1950; KUMAR *et al*, 2005; PARÉS-MARTÍNEZ *et al*, 2004).

O tecido fundamental da nervura apresenta células parenquimáticas de contorno arredondado e dimensões irregulares. Na região abaxial da nervura mediana, verifica-se a ocorrência de linha espessada constituída de fileiras de células parenquimáticas obliteradas, ou amassadas, comumente relatadas, no gênero *Annona* (METCALFE e CHALK, 1979).

7. CONCLUSÕES

1. À concentração de 1.600 µg/mL os extratos hidroetanólicos de folha e de pericarpo sem semente de *A. squamosa* L. foram mais ativos frente às formas promastigotas de *L. amazonensis* do que os correspondentes extratos aquosos, independentemente da época anual e do estágio de maturação do fruto, tendo direcionado o estudo, para os primeiros.
2. Todos os extratos aquosos do pericarpo sem sementes foram inativos, à concentração de 1.600 µg/mL, independentemente da época anual e do estágio de maturação do fruto, de forma que os compostos bioativos não foram solubilizados nestes extratos.
3. De forma semelhante aos extratos hidroetanólicos de folha e de pericarpo (sem sementes), à concentração de 1.600 µg/mL, a maioria dos extratos hidroetanólicos de semente sem arilo foi mais ativa que os extratos aquosos, exceto no verão quando o perfil se inverteu.
4. Os extratos hidroetanólicos e aquosos do arilo, coletado no verão, foram inativos independentemente do estágio de maturação do fruto de origem, sendo que no outono e no inverno, somente um dos extratos apresentou baixa atividade, tendo sido, respectivamente: o hidroetanólico e o aquoso, indicando grande variação do perfil de componentes bioativos do arilo, ao longo das épocas consideradas.
5. Os extratos aquosos mais ativos, entre todos os órgãos vegetais estudados, foram aqueles das sementes sem arilo, provenientes das coletas do verão e outono.
6. À concentração de 300 µg/mL, os alcalóides totais de *A. squamosa* apresentaram maior nível de atividade do que os extratos aquosos e hidroetanólicos (1.600 µg/mL) obtidos a partir dos mesmos órgãos, épocas anuais e estágios de maturação do fruto.
7. À concentração de 300 µg/mL, a maioria dos alcalóides totais levaram a 100% de morte das formas promastigotas de *L. amazonensis*, sendo que mesmo à concentração três vezes inferior, mantiveram níveis de atividade altos (>60% morte), indicando ser metabólitos promissores como antiprotozoários.
8. A maioria das frações orgânicas dos extratos (3 hidroetanólicos e 1 aquoso) selecionados entre os mais ativos de cada órgão e/ou parte vegetal considerados, segundo a triagem inicial (1.600 µg/mL), apresentou maior elevado nível de atividade, sendo superior àquele do extrato de origem.

9. Entre as frações orgânicas dos extratos mais ativos, cinco delas apresentaram 100% de inibição das formas promastigotas de *L. amazonensis*, à concentração de 300 µg/mL, indicando o potencial de obtenção de compostos bioativos, a partir de: semente (sem arilo) (3 frações), folha (1 fração) e pericarpo (sem sementes) (1 fração).
10. Os alcalóides, selecionados entre os mais ativos à concentração de 30 µg/mL, para os quais se determinaram as CE₅₀, a maioria foi obtida dos órgãos e/ou parte vegetais, coletados no verão (folha, semente sem arilo, arilo), enquanto que um (pericarpo sem sementes) originou-se do outono (pericarpo sem sementes), sugerindo serem as épocas anuais mais propícias à obtenção dos compostos bioativos.
11. Entre as frações orgânicas mais ativas dos extratos hidroetanólicos, selecionadas à concentração de 30 µg/mL, as menores CE₅₀ foram originadas de semente (sem arilo) (inverno) e de folhas (verão), com valores inferiores àqueles dos respectivos alcalóides totais, indicando haver outros componentes bioativos nestas frações.
12. Os extratos hidroetanólicos originaram o maior número de frações orgânicas com maior nível de atividade, frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.
13. Os alcalóides totais de *A. squamosa* foram mais seletivos para a ação antipromastigota de *L. amazonensis*, em relação às frações orgânicas equivalentes quanto aos órgãos vegetais, épocas de coleta e estágio de maturação.
14. Quanto aos alcalóides com maior nível de seletividade em relação à atividade antileishmania mostrou-se decrescente, na seqüência seguinte: pericarpo sem sementes (coleta do outono, fruto verde), folha (coleta do verão), semente sem arilo, originada de fruto maduro (coleta do verão).
15. O alcalóide aporfinico isocoridina, encontrado nas quatro épocas anuais nas folhas de *A. squamosa*, apresentou potente atividade antileishmania em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e pode ser empregado, como marcador químico e biológico, deste órgão vegetal, frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*.
16. A rutina pode ser empregada como marcador químico das folhas de *A. squamosa*, estando presente nas quatro épocas anuais.
17. Em geral, o rendimento dos extratos aquosos (AQ), obtidos pelo processo de infusão, foi maior do que dos hidroetanólicos (HE), preparados por percolação a frio.

18. Em todas as épocas anuais, foram encontrados alcalóides, flavonóides e taninos nas folhas e pericarpos de *A. squamosa*.
19. Os compostos polifenólicos totais ocorreram em todos os órgãos e partes vegetais analisados tendo apresentado o maior teor na coletada realizada no inverno, época em que o vegetal necessita de metabólitos de defesa.
20. Os taninos foram encontrados nas folhas e pericarpos sem sementes, em todas as épocas, sendo que no inverno, seguindo a tendência dos demais compostos polifenólicos, apresentaram o maior teor.
21. Nas sementes sem arilo, os taninos não foram encontrados no outono, independentemente do estágio de maturação do fruto
22. No arilo de frutos coletados no verão, não ocorrem taninos, independentemente do estágio de maturação do fruto
23. Os taninos não foram detectados no arilo maduro.
24. O conteúdo em flavonóides totais foi baixo em todos os órgãos, sendo que nas folhas os maiores teores alcançaram o valor máximo (0,98%, m/m) no outono, enquanto nos demais órgãos e partes vegetais estudados, em todas as épocas anuais, não superaram 0,05% (m/m).
25. Nas folhas, pericarpos (sem sementes), sementes (sem arilo) de frutos verdes e no arilo, os maiores teores de alcalóides totais ocorreram, geralmente, no verão.
26. Os maiores teores de alcalóides totais, nas sementes (sem arilos) de frutos maduros, foram registrados naquelas coletadas, no inverno.
27. Os menores teores de alcalóides totais ocorreram no período do outono, em todos os órgãos e partes vegetais analisados, exceto no arilo maduro, quando o menor teor foi constatado no inverno.
28. Os maiores teores de isocoridina e de alcalóides totais, nas folhas de *A. squamosa*, ocorreram, coincidentemente, no verão.
29. Mostraram-se características de destaque, para a identificação anatômica da folha de *A. squamosa*: hipostomática, tricomas tectores unicelulares sobre as nervuras da face abaxial, cinco a seis feixes vasculares distribuídos em arco na região mediana do pecíolo, presença de células oleíferas e mucilaginosas no mesofilo, nervura mediana e pecíolo.

Localização diferencial destes idioblastos. Presença das células oleíferas dispersas na região do parênquima paliçádico, na parte periférica da região abaxial e floema da nervura mediana, na região externa do parênquima fundamental do pecíolo. Ocorrência de células mucilaginosas dispersas na região mediana do parênquima paliçádico, nervura mediana e região externa do parênquima fundamental do pecíolo.

30. Diferentemente dos exemplares descritos, na Índia, não foram encontrados tricomas tectores estelares, nos exemplares brasileiros de *A. squamosa*.
31. A presença de tricomas unicelulares compridos em folhas de *A. squamosa*, sugere ser um caractere diferencial, desta espécie, em relação a outras estudadas no gênero.
32. A presença de estômatos geminados é característica de diagnose da espécie, não tendo sido relatada, anteriormente, para a espécie ou em outras do gênero *Annona*.
33. Os espécimes estudados de *A. squamosa* não apresentaram epiderme pluriestratificada, cristais, nas células epidérmicas, e grupos de esclereídeos na nervura mediana, caracteres freqüentemente encontrados no gênero *Annona*,
34. Os espécimes estudados não apresentaram cristais prismáticos nas células epidérmicas e tricomas estelares, diferentemente dos espécimes analisados na Índia.

Ainda que preliminares, os dados deste trabalho apontaram para diversas condições que influenciaram na atividade antiprotozoária de *A. squamosa* L., frente às formas promastigotas de *L. amazonensis*, à semelhança de outras drogas vegetais. Foram avaliadas as diferenças de potencial de uso de folha, pericarpo (sem semente), semente (sem arilo) e arilo, quando considerados na forma de droga e nas formas extrativas simples e de uso comum em fitoterapia, além de terem sido considerados diferentes épocas anuais de coleta e estágios de maturação do fruto e de suas partes. Os dados obtidos constituem ponto de partida para estudos mais aprofundados e direcionados, de forma estratégica, com o objetivo de obter e caracterizar os compostos responsáveis pela promissora atividade antileishmania, demonstrada por mais esta espécie do gênero *Annona*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABREU, P.M.; MARTINS, E.S.; KAYSER, O.; BINDSEIL, K.U.; SIEMS, K.; SEEMANN, A.; FREVET, J. Antimicrobial, antitumor and antileishmanial screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. *Phytomedicine*, v.6, p.187–195, 1999.

AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; BARBOSA-FILHO, J.M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in northeast of Brazil. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 17, n. 1, p.114-140, 2007.

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

AHMAD, K. F.; SULTANA, N. Biological studies on fruit pulp and seeds of *Annona squamosa*. *Journal of the Chemical Society of Pakistan*, v. 24, n. 4, p. 331-334, 2003.

ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A.; RIBEIRO, J.F. Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos Cerrados: araticum, baru, cagaita e jatobá. Brasília: EMBRAPA. 1987.

AMADOR, M.C.V.; RODRÍGUEZ, F.M.; RODRÍGUEZ, Z.M.; GUERRA, M.J.M.; BARREIRO, M.L. Tamizaje fitoquímico, actividad antiinflamatoria y toxicidad aguda de extractos de hojas de *Annona squamosa* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. v. 11, n. 1, p. 1-12, 2006.

AMATO, V. S.; TUON, F.F.; SIQUEIRA, A.M.; NICODEMO, A.C.; AMATO NETO, V. Treatment of Mucosal Leishmaniasis in Latin America: Systematic Review. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 77, n.2, p. 266-274, 2007.

ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; MAIA, J. G. S.; FABRICIUS, H.; MARX, F. Studies of edible Amazonian plants. Part 4. Chemical characterization of the fruit of *Annona squamosa* L. occurring in the Amazon. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 14, n.2, p.227-232, 2001.

ANDRADE, N.C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M.F.; LEITAO, E.V.C.; SOBRAL, M.S. Terpenoids of the Annonaceae: Distribution and compilation of ¹³C NMR data. *Recent Research Developments in Phytochemistry*, v.7, p.81-85, 2003.

ANTHONY, J.; FYFE, L.; SMITH, H. Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends in Parasitology*, v.21, n.10, p.462-468, 2005.

ANVISA, Resolução RDC, nº 48, de 16 de março de 2004 .

ARANGO, A.; GABRIEL, J.; DICKSON, J.S.; VÉLEZ, B.; IVÁN, D.; MUÑOZ, D. L., Actividad Leishmanicida de Annonacina, Aislada de *Annona muricata* contra *Leishmania panamensis* / Activity against Leishmaniosis panamensis of Annonacina obtained from *Annona muricata*. v. 7, n.1/2, p.38-42, 1999.

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

ARAYA, H.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; SAHAI, M. Squamostanal-A, apparently derived from tetrahydrofuranic acetogenin, from *Annona squamosa*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, v.58, n.6, p.146-147, 1994.

ARAYA, H.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y.; SRIVASTAVA, A.; SAHAI, M. Squamosten-A, a novel mono-tetrahydrofuranic acetogenin with a double bond in the hydrocarbon chain, from *Annona squamosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.42, n.2, p.388-391, 1994.

ARAYA, H.; SAHAI, M.; SINGH, S.; SINGH, A.; YOSHIDA, M.; HARA, N.; FUJIMOTO, Y. Squamocin-O1 and squamocin-O2, new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*. v.61, n.8, p.999-1004, 2002.

ARAYA, H. Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds. *Nogyo Kankyo Gijutsu Kenkyusho Hokoku*, v. 23, p. 77-149, 2004.

ARRIAGA, A.; MARTA C.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; DOURADO, R.C. M Composition of the root oil of *Annona squamosa* L. from Brazil. *Journal of Essential Oil Research*, v. 8, n. 4, p. 439-440, 1996.

ARRUDA, D. C.; D'ALEXANDRI, F. L.; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. B. Antileishmanial Activity of the Terpene Nerolidol. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.49, n.5, p. 1679-1687, 2005.

ASHFORD, R.W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int. J. Parasitol.* v. 30, p.1269–1281, 2000.

ATIQUE, A.; IQBAL, M.; GHOUSE, A.K.M. Use of *Annona squamosa* and *Piper nigrum* against diabetes. *Fitoterapia*, v.56, p.190-2, 1985.

AVILA, J.L.; ROJAS, T.; MONZON, H.; CONVIT, J. Sinefungin as treatment for American Leishmania in sensitive BALB/c and resistant c57BL/6 mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 43, p.139–145, 1990.

BALANA, F.R.; REGUERA, R.; CUBRIA, J.C.; ORDONEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. *Gen. Pharmacol.*, v.30, p.435–443, 1998.

BALBAA, S. I.; HAGGAG, M. Y.; TAHA, K. F. Study of volatile oil content of the leaves of *Annona squamosa* L. growing in Egypt. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.18, n.1, p. 1-8, 1979.

BARATA, L.E.S.; SANTOS, L.S.; FERRI, P.H.; PHILLIPSON, F.J.D.; PAINE, A.; CROFT, S.L. Antileishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. *Phytochemistry*, v.55, n.589–595, 2000.

BARGER, G.; WEITNAUER, G. Constitution and synthesis of the alkaloid anonaine. *Helvetica Chimica Acta*, v.22, p.1036-47, 1939.

BARRAL, A.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; GRIMALDI JR., G.; MOMEM, H.; CARVALHO, E. M. Isolation of *Leishmania mexicana amazonensis* from the bone marrow in a case of American visceral leishmaniasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.35, p.732–734, 1986.

BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JUNIOR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; RIBEIRO DE JESUS, A.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E. M. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 44, p.536–546, 1991.

BARRAL-NETO, M.; VON SOHSTEN, R.L.; TEIXEIRA, M.; CONRADO DOS SANTOS, W.L.; POMPEU, M.L.; MOREIRA, R.A.; OLIVEIRA, J.T.A.; CAVADA, B.S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. In vivo protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* of BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.*, v.60, p.237-250, 1996.

BARROSO, G. M. *Sistemática de Angiospermas do Brasil*. Rio de Janeiro: São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, USP, 1978. v.1, p.28-30.

BARROSO, G.M.; MORIM, M.P.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F. Frutos e sementes: morfologia aplicada à sistemática de dicotiledôneas. Viçosa: Editora da Universidade Federal de Viçosa, 1999. 443p.

BASKAR, R.; RAJESWARI, V.; KUMAR, T. Sathish. In vitro antioxidant studies in leaves of *Annona* species. *Indian Journal of Experimental Biology*, v. 45, n. 5, p. 480-485, 2007.

BEHARI, M.; SHARMA, R. Isolation of 16-hentriacontanone, alcohols and sterols from the leaves of *Annona squamosa*. *Journal of the Indian Chemical Society*, v.63, n. 2, p. 255-256, 1986.

BELTRATI, C.M. Morfologia e Anatomia das sementes. Rio Claro, UNESP, Departamento de Botânica / Instituto de Biociências. 1994

BERGER, I.; PASSREITER, C.M.; CÁCERES, A.; KUBELKA, W. Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. *Phytother. Res.* v.15, p.327–330, 2001.

BERLYN, G.P.; MIKSCH, J.P. Botanical microtechnique and cytochemistry. Ames: The Iowa State Press, 1976. 365 p.

BERMAN, J.D.; WEBSTER, H.K. In vitro effects of mycophenolic acid and allopurinol against *Leishmania tropica* in human macrophages. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.21, p. 887–891, 1982.

BERMAN, J. BRYCESON, A.D.M.; CROFT, S.; ENGEL, J.; GUTTERIDGE, W.; KARBWANG, J.; SINDERMAN, H.; SUNDAR, J. S.; URBINA, J.A. Miltefosine: issues to be addressed in the future. *Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 2006.

BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from annonaceae. Recent progress in isolation, synthesis, and mechanisms of action. *Natural Product Reports*, v.22, n.2, p.269-303, 2005.

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

BEYRA, A.; LÉON, M.C.; IGLESIAS, E.; FERRÁNDIZ, D.; HERRERA, R.; VOLPATO, G.; GODÍNEZ, D.; GUIMARAIS, M.; ÁLVAREZ, R. Estudios etnobotánicos sobre plantas medicinales en la provincia de Camagüey (Cuba). *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, v.61, n.2, 185-204. ANO

BISSING, D.R. Haupt's gelatin adhesive mixed with formalin for affixing paraffin sections to slides. *Stain Technol.* v.49, n.2, p.116-117, 1974.

BHADRA, R. Antileishmanial agents. *Drugs Future*, v.18, p.451-463, 1993.

BHAKUNI, D.S.; TEWARI, S.; DAHR, M.M. Aporphine alkaloids of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, v.11, n.5, p.1819-22, 1972.

BHAKUNI, D.S.; GOEL, A.K.; JAIN, S.; MEHROTRA, B.N.; PATNAIK, G.K.; PRAKASH, V. Screening of Indian plants for biological activity. Part XIII. *Indian J. Exp. Biol.*, v.26, p.883-904, 1988.

BHATTACHARYYA, B.; JOHRI, B.M. *Flowering plants: taxonomy and phylogeny*. New Delhi: Narosa Publishing House, p.127, 1998.

BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; JUNEAU, J. P.; BHACCA, N. S.; MUKERJEE, R. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, v.18, n.9, p.1584-6, 1979.

BODLEY, A.L.; SHAPIRO, T.A. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor on Trypanosomes and Leishmania. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.92, p.3726-3730, 1995a.

BODLEY, A.L.; MC GARRY, M.W.; SHAPIRO, T.A. Drug cytotoxicity assay for African Trypanosomes and Leishmania species. *J. Infect. Dis.*, v.172, p.1157-1159, 1995b.

BOHLMANN, F.; RAO, N. Naturally occurring terpene derivatives. XXI. Constituents of *Annona squamosa*. *Chemische Berichte*, v.106, n.3, p.841-844, 1973.

BONOTTO, S.V. Aspectos químicos, botânicos e avaliação de atividades antiprotozoárias de *Duguetia lanceolata* St. Hil. (Annonaceae). São Paulo, 2005. 122 p. Tese de mestrado - Faculdade de Farmácia – Universidade de São Paulo.

BORELLA, J.C.; DUARTE, D.P.; NOVARETTI, A.A.G.; MENEZES JÚNIOR, A.; FRANÇA, S.C.; RUFATO, C.B.; SANTOS, P.A.S.; VENEZIANI, R.C.S.; LOPES, N.P. Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) DC (Carqueja) e isolamento de flavona. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.4, p.557-561, 2006.

BORN, L.; LIEB, F.; LORENTZEN, J. P.; MOESCHLER, H.; NONFON, M.; SOELLNER, R.; WENDISCH, D. The relative configuration of acetogenins isolated from *Annona squamosa*: annonin I (squamocin) and annonin VI. *Planta Medica*, v.56, n.3, p.312-316, 1990.

BURGER L.M.; RICHTER H.G. 1991. *Anatomia da madeira*. São Paulo: Livraria Nobel SA, 160 pp.

BOU HABIB, D.C.; FERRARO, G.A.; BOU HABIB, E.M.S.; DELORENZI, J.C.M.O.B.; PINTO, A.D.C.; MORAES DE REZENDE, C.; TEIXEIRA DE ANDRADE, M. Alkaloids of *Peschiera australis* for use in treatment of leishmaniasis. Patent Brazil 98 04,032, 49, 1998.

BRAVO, J.A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, A.; MUNOZ, V.; CALLAPA, J.; LE MEN-OLIVIER, L.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. *Phytochemistry*, v.50, p.71–74, 1999.

BRAVO, J.A.; SAUVAIN, M.; GIMENEZ, T.A.; BALANZA, E.; SERANI, L.; LAPREVOTE, O.; MASSIOT, G.; LAVAUD, C. Typanocidal withanolides and withnolide glycosides from *Dunalia brachyacantha*. *J. Nat. Prod.* v.64, p. 720–725, 2001.

BRINGMAN, G.; HAMM, A.; GUNTHER, C.; MICHEL, M.; BRUN, R.; MUDOGO, V. Ancistrocalaines A and B, two new bioactive naphthlisoquinolines, and related naphthoic acids from *Ancistrocladus ealaensis*. *J. Nat. Prod.*, v. 63, p.1465–1470, 2000.

CABRERA, L. *El Monte*. Miami: Collection Chichereku, 1971 *apud* SANTERIA, G. B. The Uses of Plants in Healing in an Afro-Cuban Religion, *Journal of Black Studies*, v.22, n. 1, p. 55-76, 1991.

CÁCERES, A.; ALVAREZ, A.V.; OVANDO, A.E.; SAMAYOA, B.E.. Plants used in Guatemala for the treatment of respiratory diseases. 1. Screening of 68 plants against gram-positive bacteria. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 31, p.193-208, 1991.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*, v.33, p.179-189, 2000.

CALLAN, T.; TUTIN, F. Chemical Examination of the Leaves of *Annona muricata*. *Pharmaceutical Journal*, v.87, p.743-5, 1912.

CAMACHO, M.D.R.; MATA, R.; CASTANEDA, P.; KIRBY, G.C.; WARHUST, D.C.; CROFT, S.L.; PHILLIPSON, J.D. Bioactive compounds from *Celaenodredon mexicanum*. *Planta Med.*, v. 66, p.462-468, 2000a.

CAMACHO, M.D.R.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C.; CROFT, S.L.; PHILLIPSON, J.D. Oxoaporphine alkaloids and quinines from *Stephanina dinklagei* and evaluation of their antiprozoal activities. *Planta Med.*, v.66, p.478-480, 2000b.

CAMACHO, M. R.; PHILLIPSON, J. D.D; CROFT, S.L.; MARLEY, D.; KIRBY, G.C.; WARHURST, D.C. Assessment of the Antiprotozoal Activity of *Galphimia glauca* and the Isolation of New Nor-secofriedelanes and Nor-friedelanes. *Journal of Natural Products*, v. 65, n.10, p.457-1461, 2002 a.

CAMACHO, M. DEL R.; PHILLIPSON, J. D.; CROFT, S. L.; ROCK, P.; MARSHALL, S. J.; SCHIFF, P. L., JR. In vitro activity of *Triclisia patens* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei brucei*. *Phytotherapy Research*, v.16, n.5, p. 432-436, 2002 b.

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

CARIBBEAN PARKINSONISM STUDY GROUP. Possible relation of atypical parkinsonism in the French West Indies with consumption of tropical plants: a case-control study. *Lancet*, v.354, n.9175, p.281-286, 1999.

CARSON, D.A.; CHANG, K.P. Phosphorylation and antileishmanial activity of formycin B. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.100, p.1377-1383, 1981.

CARVALHO, P.B. Acetogeninas anonaceas: isolamento, caracterização, atividade biológica, biossíntese e síntese. São Paulo, 1997. 137p. Dissertação de mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo.

CARVALHO, P.B.; ARRIBAS, M.A.G.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis. What do we know about its chemotherapy? *Rev. Bras. Ci. Farm*, v.36 (Supl. 1), p.69-96, 2000.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, v.72, p.599-618, 2001.

CASTILLO, A. V.; JAVIER, F. P. A physicochemical investigation on *Annona squamosa* Linne (Fam. Anonaceae). *NRCP Research Bulletin*, v. 36, n. 2, p. 316-27, 1981.

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

CAVÉ, A.; HADI, A.; HAMID, A. Alkaloids of the Annonaceae. Part 94. Norstephalagine and atherospermidine, two smooth muscle-relaxing aporphines from *Artabotrys maingayi*. *Journal of Natural Products*, v.53, n.2, p.503-8, 1990.

CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; LAPROVOTE, O. Isolation of acetogenins and their use as antiparasitic agents. Patent-Fr Demande-2,634,123, 1990.

CHALCAT, P.; COLAS BELCOUR, J.; DESTOMBES, P.; DROUHET, E.; FROMENTIN, H.; MARTIN, L.; RAVISSE, P.; SILVERIE, J. A case of mucus skin leishmaniasis resistant to antimony compounds and cleared by amphotericin B. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* v.58, p.73-80, 1965.

CHAN-BACAB, M.J.; PENA-RODRIGUEZ, L.M. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* v.18, p.674-688, 2001.

CHANCE, M.L. New developments in the chemotherapy of leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v. 89, p.37-43, 1995.

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

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

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

CHANG, F.; CHEN, K.; KO, F.; TENG, C.; WU, Y. Bioactive alkaloids from *Annona reticulata*. *Chinese Pharmaceutical Journal*, v. 47, n. 5, p. 483-91, 1995.

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

CHAMRATPAN, S.; HOMCHUEN, S. Ethnobotany in upper northeastern thailand. *Acta Horti* n.675, p.67-74, 2005.

CHATTOPADHYAY, T.K.; GHATAK, S.N.; BHADURI, N.A.; GHOSH, D.K. Antileishmanial activity of mycobacillin. *J. Antibiot.* v.30, p.262-266, 1976.

CHAVAN, M. J.; SHINDE, D. B.; NIRMAL, S. A. Major volatile constituents of *Annona squamosa* L. Bark. *Natural Product Research*, Part A: Structure and Synthesis, v. 20, n.8, p. 754-757, 2006.

CHEN, M. Antileishmanial and antimalarial activities of licochalcone A. *Dan. Med. Bull.* v.42, 378-380, 1995.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S.B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L.; FICH, K.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of Leishmania. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.37, p.2550-2556, 1993.

CHEN, M.; CHRISTENSEN, S.B.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.38, p.1339-1344, 1994.

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

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

CHEN, C.; CHANG, F.; WU, Y. Cherimoline, a novel alkaloid from the stems of *Annona cherimola*. *Tetrahedron Letters*, v.38, n.35, p.6247-6248, 1997.

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

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

CHOUDHARY, G. P. Anthelmintic activity of *Annona squamosa*. *Asian Journal of Chemistry*, v.19, n.1, p.799-800, 2007.

CHRISTENSEN, S.B.; MING, C.; ANDERSEN, L.; HJORNE, U.; OLSEN, C.E.; CORNETT, C.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. An antileishmanial chalcone from *Chinese licorice* roots. *Planta Med.* v.60, p.121-123, 1994..

CHULIA, S.; NOGUERA, M. A.; IVORRA, M. D.; CORTES, D.; D'OCON, M. P. Vasodilator effects of liriodenine and norushinsunine, two aporphine alkaloids isolated from *Annona cherimolia*, in rat aorta. *Pharmacology*, v.50, n.6, p.380-7, 1995.

COMPAGNONE, R.S.; PINA, I.C.; RANGEL, H.R.; DAGGER, F.; SUAREZ, A.I.; REDDY, M.V.R.; FAULKNER, D.J. Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis aff. angulospiculatus*. *Tetrahedron*, v.54, p.3057-3068, 1998.

COMPAGNONE, R.S.; OLIVERI, M.C.; PINA, I.C.; MARQUES, S.; RANGEL, H.R.; DAGER, F.; SUAREZ, A.L.; GOMEZ, M. 5- Alkylpyrrole-2-carboxaldehydes from the Caribbean sponges *Mycale microsigmatosa* and *Desmapsamma anchorata*. *Nat. Prod. Lett.* v.13, p.203-211, 1999.

CONVIT, J.; ULRICH, M.; POLEGRE, M.A.; AVILA, A.; RODRIGUEZ, N.; MAZZEDO, M.I.; BLANCO, B. Therapy of Venezuelan patients with severe mucocutaneous or early lesions of diffuse cutaneous leishmaniasis with vaccine containing pasteurized *Leishmania* promastigotes and *Bacillus calmett-guerin* - Preliminary report. *Mem I Oswaldo Cruz*, v.99, v.57-62, 2004.

COOK, J.A.; HOLBROOK, T.W.; PARKER, B.W. Visceral leishmaniasis in mice: protective effect of glucan. *J. Reticuloendothel. Soc.* v.27, p.567–573, 1980.

COSTA, V.E.; PINHEIRO, M.L.B.; XAVIER, C.M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. A Pyrimidine- β -carboline and Other Alkaloids from *Annona foetida* with Antileishmanial Activity. *J. Nat. Prod.*, v.69, p.292-294, 2006.

COSTA, J.M.L.; GAMA, M.E.A.; CUNHA, A.K.; SALDANHA, A.C.R. Leishmaniose cutânea difusa (LCD) no Brasil: revisão. *An. Bras.Dermatol.*, v.73, n.6, p.565-576, 1998.

COHEN, B.E Amphotericin B toxicity and lethality: a tale of two channels. *International Journal of Pharmaceutics*, v.162, p. 95-106, 1998.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The Potential of Alkaloids in Drug Discovery. *Phytotherapy research*, v.15, p.183-205, 2001.

CORREA, J.E.; RIOS, C. H.; CASTILLO, A. DEL R.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRIA, E.; COLEY, P.D.; KURSAR, T. A.; HELLER, M. V.; GERWICK, W. H.; RIOS, L.C. Minor alkaloids from *Guatteria dumetorum* with antileishmanial activity. *Planta Medica*, v.72, n. 3, p. 270-272, 2006.

CORREA, M.P. *Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas*. v.3. Rio de Janeiro: Instituto de Desenvolvimento Florestal, 1984. p.319.

CORNER, E.J.H. The annonaceous seed and its four integuments. - *New Phytol.*, n.48, p. 332-364, 1949.

CORNER, E.J.H. *The seeds of dicotyledons*. v. 1, v. 2. Cambridge: Cambridge University Press, 1976.

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

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. *Clinical Microbiology Reviews*, v.19, n.1, p.111–126, 2006.

CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981, p.53-55.

CRUZ, G.L. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 3.ed. Rio de Janeiro: Civilização Brasileira, 1985, p. 359.

CRUZ, G.L. *Dicionário das plantas úteis do Brasil*. 5.ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1995, p. 319.

CUBUKCU, B.; GASQUET, M.; DELMAS, F.; FAVEL, A.; MERICLI, A.H.; BALANSARD, G. Evaluation of antiprotozoal and antigungal activities of Turkish *Artemisia santonicum*. *J. Fac. Pharm. Istanbul Univ.* v.32, p.20–22, 1998.

CUNNINGHAM, L.V.; KAZAN, B.H.; KUWAHARA, S.S. Effect of long-chain fatty acids on some trypanosomatid flagellates. *J. Gen. Microbiol.* v.70, p.491–496, 1972.

DAS, S.; DASH, S.K.; PADHY, S.N. Ethnomedicinal information from Orissa State, India - A review. *J. Hum. Ecol.*, v.14, n.3, p.165-227, 2003.

DAVIS, A.J.; KEDZIERSKI, L. Recent advances in antileishmanial drug development. *Current Opinion in Investigational Drugs*, v.6, n.2, 2005.

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

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

DELORENZI, J.C.; ATTIAS, M.; GATTASS, C. R.; ANDRADE, M.; REZENDE, C.; DA CUNHA PINTO, A.; HENRIQUES, A.T.; BOU-HABIB, D.C.; SARAIVA, E. M. B. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.45, n.5, p.1349-1354, 2001.

DELORENZI, J.C.; FREIRE-DE-LIMA, L.; GATTASS, C.; COSTA, D. A.; HE, L.; KUEHNE, M. E.; SARAIVA, E. M. B. In Vitro Activities of Iboga Alkaloid Congeners Coronaridine and 18-Methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis* Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Planta medica*, v.72, p. 270-272, 2006.

DEMIRCI, F.; DEMIRCI, B.; ALI, S.A.; SHOUDARY, M.I.; BASER, K.H.C. Bioassays on *Periploca graeca* L. (Silk Vine). *Acta Pharm. Turc*, v.40, p.145–149, 1998.

DEVKOTA, K.P.; CHOUDHARY, M. I.; RANJIT, R.; SAMREEN; SEWALD, N. Structure activity relationship studies on antileishmanial steroidal alkaloids from *Sarcococca hookeriana*. *Natural Product Research, Part B: Bioactive Natural Products*, v.21, n.4, p. 292-297, 2007.

DI GIORGIO, C.; DELMAS, F.; OLLIVIER, E.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; TIMON-DAVID, P. In vitro activity of the β -carboline alkaloids harmane, harmine, and harmaline toward parasites of the species *Leishmania infantum*. *Experimental Parasitology*, v.106, n. 3/4, p.67-74, 2004.

DI GIORGIO, C.; LAMIDI, M.; DELMAS, F.; BALANSARD, G.; OLLIVIER, E. Antileishmanial activity of quinovic acid glycosides and cadambine acid isolated from *Nauclea diderrichii*. *Planta Medica*, v.72, n.15, p.1396-1402, 2006.

DIAS, N.O.; MATSUMOTO, S.N.; REBOUÇAS, T.N.H.; VIANA, A.E.S.; JOSÉ, A.R.S.; SOUZA, I.V.B. Influência da poda de produção em ramos de diferentes diâmetros no desenvolvimento vegetativo e reprodutivo da pinheira (*Annona squamosa* L.) *Revista Brasileira de Fruticultura*, v.25, n.1, p.100-103, 2003.

DOHERTY, T.M.; SHER, A.; VOGEL, S.N. Paclitaxel (Taxol)-induced killing of *Leishmania major* in murine macrophages. *Infect Immun.*, v.66, p.4553–4556, 1998.

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

DUJARDIN, J.C. Risk factors in the spread of leishmaniases: towards integrated monitoring? *Trends in Parasitology*, v.22, p.4-6, 2006.

DZAMITIKA, S.A.; FALCÃO, C.A.B.; DE OLIVEIRA, F.B.; MARBEUF, C.; GARNIERSUILLEROT, A.; DEMICHELI, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; FRÉZARD, F., Role of residual Sb(III) in meglumine antimoniate cytotoxicity and MRP1-mediated resistance, *Chemico-Biological Interactions*, v. 160, n.3, p. 217-224, 2006.

EDWARD, J.A.M.; AMADOR, A.T.; LUIS, G.P.; STELL, T.D.Y.; SANTIAGO, N. In vivo activity of berberine chloride towards cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania mexicana* 856/INS. *Rev. Colomb. Quim.*, v.24, p.55-64, 1995.

EL-ON, J.; WEINRAUCH, L.; LIVSHIN, R.; EVEN-PAZ, Z.; JACOBS, G.P. Topical treatment of recurrent cutaneous leishmaniasis with ointment containing paromomycin and methylbenzethonium chloride. *Br. Med. J.*, n.291, p.704-705, 1985.

EMAM, A.M.; MOUSSA, A.M.; ESSA, M.A.; FAURE, R.; ELIAS, R.; BALANSARD, G.; BOUDON, G. Isolation of phenyl propanoid glycosides from *Buddleja madagascariensis* Lam. leaves. *Pharm. Pharmacol. Lett.*, n.5, p.177-178, 1995.

EMAM, A.M.; MOUSSA, A.M.; FAURE, R.; FAVEL, A.; DELMAS, F.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. Isolation and biological study of a triterpenoid saponin, mimengoside A, from the leaves of *Buddleja madagascariensis*. *Planta Med.*, v.62, p.92-93, 1996.

EL TAHIR, A.; SATTI, G M.; KHALID, S. A. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis* *Journal of ethnopharmacology*, v. 64, n.3, p.227-233, 1999.

ERCIL, D.; KALOGA, M.; RADTKE, O. A.; SAKAR, M. K.; KIDERLEN, A. F.; KOLODZIEJ, H. O-galloyl flavonoids from *Geranium pyrenaicum* and their in vitro antileishmanial activity. *Turkish Journal of Chemistry*, v.29, n.4, p.437-443, 2005.

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

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2002.

FARNSWORTH, R.N.; BINGEL, A.S.; CORDELL, G.A.; CRANE, F.A.; FONG, H.H.S. Potential value of plants as source of new antifertility agents. *Indian J Pharm Sci*, v.64, p.535-98, 1975.

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

FERREIRA, E. I. *Planejamento de quimioterápicos, antimaláricos e antichagásicos*. São Paulo. 1997. [Texto apresentado para concurso de livre-docência, Faculdade de Ciências Farmacêuticas -USP].

FEUCHT, W.; SCHMID, P.P.S.; MARTINS, R.P. Distribution of flavonols in meristematic and mature tissues of *Prunus avium* shoots. *Journal of Plant Physiology*, v.125, p.1-8, 1986.

FEVRIER, A.; FERREIRA, M.E.; FOURNET, A.; YALUFF, G.; INCHAUSTI, A.; ARIAS, A.R.; HOCQUEMILLER, R.; WAECHTER, A.I. Acetogenins and other compounds from *Rollinia emarginata* and their antiprotozoal activities, *Planta Med.* v.65, p.47-49, 1999.

FISCHER, D.C.H.; GUALDA, N.C.A.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C.S.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; ALVES, M.D.; YOGI, A.; DI SANTI, S.M.; AVILA, P.E.; KIRCHGATTER, K.; MORENO, P.R.H. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. *Acta Tropica*, v.92, n.3, p.261-266, 2004.

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

FORGACS, P.; DESCONCLOIS, J. F.; MANSARD, D.; PROVOST, J.; TIBERGHIE, R.; TOCQUER, J.; TOUCHE, A. Dopamine and tetrahydroisoquinoline alkaloids of *Annona reticulata* L. (Annonaceae). *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v.15, n.1, p.10-15, 1981.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Effect of natural naphthoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. *Trop. Med. Parasitol.*, v.43, p.219-222, 1992a.

FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUNOZ, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Biological and chemical studies of *Pera benensis*, a Bolivian plant used in folk medicine as treatment of cutaneous leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.*, v.37, p.159-164, 1992b.

FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Chimanines, novel substituted quinoleines, isolated from Bolivian antiparasitic plant, *Galipea longiflora*. *J. Nat. Prod.*, v.56, p.1547-1552, 1993a.

FOURNET, A.; MUÑOZ, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; GANTIER, J.C., Antiprotozoal activity of dehydrozalanin C a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (Asteraceae). *Phytother. Res.*, v.7, p.111-115, 1993b.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; BRUNETON, J. 2-Substituted quinoline alkaloids as potential antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 37, p.859-863, 1993c.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Effect of some bisbenzylisoquinoline alkaloid on American *Leishmania* sp. in BALB/c mice. *Phytother. Res.*, v.7, p.281-284, 1993d.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUÑOZ, V.; HOCQUEMILLER, R.; ROBLLOT, F.; CAVÉ, A.; RICHOMME, P.; BRUNETON, J. Antiprotozoal activity of quinoline alkaloids isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as a treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytother. Res.*, v.8, p.174-178, 1994a.

FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUÑOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, v.41, p.19-37, 1994b.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ARIAS, A.R.; FUENTES, S.; TORRES, S.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, A.; NAKAYAMA, H.; MAHIOU, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. In vitro and in vivo leishmanicidal studies of *Peperomia galioides* (Piperaceae). *Phytomedicine*, v.3, p.271-275, 1996.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ARIAS, A.R.; ORTIZ, S.T.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, M.E. Activity of compounds isolated from *Chilean lichens* against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comp. Biochem. Physiol. Ser.C.*, v.116, p.51-54, 1997.

FOURNET, A.; MUÑOZ, V. Natural products as trypanocidal, antileishmanial, and antimalarial drugs. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, v.2, n.11, p.1215-1237, 2002.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; GUY, I.; GUINAUDEAU, H.; HEINZEN, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*, v. 78, p.382-384, 2007.

FOURNIER, G.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Annonaceae essential oils: a review. *Journal of Essential Oil Research*, v.11, n.2, p.131-142, 1999.

FRANÇA, F.; CUBA, C.A.; MOREIRA, E.A.; ALMEIDA, M.; VIRGENS, M.L.; MARSDEN, P.D. Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentale*) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v.26, p.151-155, 1993.

FRIES, R.E. Revision der Arten einiger Anonaceen-Gattungen II. *Acta Horti Berg.*, v.10, n.2, p.197-341, 1931.

FUCHINO, H.; KOIDE, T.; TAKAHASHI, M.; SEKITA, S.; SATAKE, M. New sesquiterpene lactones from *Elephantopus mollis* and their leishmanicidal activities. *Planta Med.*, v. 67, p. 647-653, 2001.

FUJIMOTO, Y.; EGUCHI, T.; KAKINUMA, K.; IKEKAWA, N.; SAHAI, M.; GUPTA, Y. K. Squamocin, a new cytotoxic bis-tetrahydrofuran containing acetogenin from *Annona squamosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.36, n.12, p.4802-4806, 1988.

FUJIMOTO, Y.; MURASAKI, C.; KAKINUMA, K.; EGUCHI, T.; IKEKAWA, N.; FURUYA, M.; HIRAYAMA, K.; IKEKAWA, T.; SAHAI, M. Squamostatin A: unprecedented bis-tetrahydrofuran acetogenin from *Annona squamosa*. *Tetrahedron Letters*, v. 31, n.4, p.535-538, 1990.

FUJIMOTO, Y.; MURASAKI, C.; SHIMADA, H.; NISHIOKA, S.; KAKINUMA, K.; SINGH, S.; SINGH, M.; GUPTA, Y. K.; SAHAI, M. Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. Non-adjacent bis-tetrahydrofuranic acetogenins. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v.42, n.6, p.1175-1184, 1994.

FUNARI, C.S. Análise de própolis da Serra do Japi, determinação de sua origem botânica e avaliação de sua contribuição em processos de cicatrização. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, f.124, 2005.

FUNARI, C.S.; FERRO, V. Análise de própolis. *Ciência e tecnologia de alimentos*, v.26, n.1, p.171-178, 2006.

FURLAN, C. M. Efeitos de poluentes atmosféricos na composição química de indivíduos jovens de *Tibouchina pulchra* (Cham.) Cogn e *Psidium guajava* L. Tese de doutorado - Instituto de Botânica - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

FURTADO, T.A.; CISALPINO, E.O.; SANTOS, U.M. In vitro studies of effect of amphotericin B on *Leishmania brasiliensis*. *Antibiot. Chemother*, n.10, p.692–693, 1960.

GARCIA, P.L. Desenvolvimento de metodologias analíticas para determinação de Hidroquinona em cosméticos e medicamentos. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Ciências Farmacêuticas - Universidade de São Paulo, São Paulo, f.100, 2004.

GARCÍA-ALVARADO, J. S.; VERDE-STAR, M. J.; HEREDIA, N. L. Traditional Uses and Scientific Knowledge of Medicinal Plants from Mexico and Central America. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, v. 8, n.2/3, 2001.

GARCIA-GRANADOS, A.; LINAN, E.; MARTINEZ, A.; RIVAS, F.; MESA-VALLE, C.; CASTILLA-CALVENTE, J.J.; OSUNA, A. In vitro action of ent-manoyl oxydes against *Leishmania donovani*. *J. Nat. Prod.*, v.60, p.13-16, 1997.

GARG, S. N.; GUPTA, D. Composition of the leaf oil of *Annona squamosa* L. from the North Indian Plains. *Journal of Essential Oil Research*, v.17, n.3, p.257-258, 2005.

GATEMBY, J.B. The microtometist's vademecum: a handbook of the methods of animal and plant microscopic anatomy. 10 ed. London: J.& A. Churchill, 784p. 1937.

GHAZANFARI, T.; HASSAN, Z.M.; EBTEKAR, M.; AHMADIANI, A.; NADERI, G.; AZAR, A. Garlic induces a shift in cytokine in *Leishmania major* - infected balb/mice. *Scand. J. Immunol.*, v.52, p.491-495, 2000.

GHOSH, B.K. Action of an antifungal antibiotic, nystatin, on the protozoa *Leishmania donovani*. Studies on the cytological and cytochemical changes. *Ann. Biochem. Exp. Med.*, v. 23, p.193-200, 1963a.

GHOSH, B.K. Action of an antifungal antibiotic, nystatin, on the protozoa, *Leishmania donovani*. Investigations concerning the effect on isolated member and the isolation of antibiotic-rich cell portions of *L. donovani*. *Ann. Biochem. Exp. Med.*, v.23, p.337-344, 1963b.

GHOSH, B.K.; CHATERJEE, A.N. Action of an antifungal antibiotic, nystatin, on the protozoa *Leishmania donovani*. Studies on the metabolism of *Leishmania donovani*. *Ann. Biochem. Exp. Med.*, v.21, p.307-322, 1961.

GHOSH, B.K., CHATERJEE, A.N. Action of an antifungal antibiotic, nystatin, on the protozoa *Leishmania donovani*. Studies on the lysis of the cells of *Leishmania donovani*. *Ann. Biochem. Exp. Med.*, v. 23, p.173-186, 1963.

GIL, E.S.; CUNHA, L.C.; DE PAULA, J.R.; BEZERRA, J.C.B.; AGUIAR, F.A. Leishmaniose: Arsenal Terapêutico e Alvos Moleculares. *Vita et Sanitas*, v. 1, n. 01, 2007.

GILLES, H. M. Protozoal diseases. London; New York, Arnold: Oxford University Press, 1999, p.421.

GONÇALVES, J.L.S.; LOPES, R.C.; OLIVEIRA, D.B.; COSTA, S.S.; MIRANDA, M.M.F.S.; ROMANOS, M.T.V.; SANTOS, N.S.O. ; WIGG, M.D. In vitro anti-rotavirus activity of some medicinal plants used in Brazil against diarrhea. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 99, p.403-407, 2005.

GONTIJO, C.M.F. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, v.7, n.3, p.338-349, 2004.

GONZALEZ, P.; MARIN, C.; RODRIGUEZ-GONZALEZ, I.; HITOS, A.B.; ROSALES, M. J.; REINA, M.; DIAZ, J.G.; GONZALEZ-COLOMA, A.; SANCHEZ-MORENO, M. In vitro activity of C20-diterpenoid alkaloid derivatives in promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania infantum*. *International Journal of Antimicrobial Agents*, v.25, n.2, p.136-141, 2005.

GOPINATH, K. W.; GOVINDACHARI, T. R.; PAI, B. R.; VISWANATHAN, N. The structure of reticuline, a new alkaloid from *Anona reticulata*. *Chemische Berichte*, v.92, p.776-9, 1959.

GOTTLIEB, O.R.; KAPLAN, M.A.C.; ZOCHER, D.H.T. A chemosystematic overview of Magnoliidae, Ranunculidae, Caryophyllidae and Hamamelidae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. The families and genera of vascular plants. *Flowering plants - Dicotyledons*. Berlim: Springer-Verlag, v.2, 1993.

GRANADOS, H.; SAE, J.; SILDARRIAGA, N.; MORENO, M. E.; PELAEZ, C.; BRUN, N.; ARBELAEZ, C.; CORTES, D. In vitro insecticidal activity of the *Annona spraguei* seeds (Annonaceae) on two biological models of Diptera order: *Drosophila melanogaster* and *Aedes aegypti*. *Afinidad*, v.58, n.491, p.44-48, 2001.

GREVELINK, S.A.; LERNER, E.A. Leishmaniasis. *J. Am. Acad. Dermatol.*, v.34, p.257-272, 1996.

GRIMALDI, J.R.G.; DAVID, J.R.; McMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World Leishmania species characterized by serademe analysis using monoclonal antibodies. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v.36, p.270-287, 1987.

GRITSANAPAN, W.; KLAYMONGKOL, C.; WANNASAWAGE, C. Antiparasitic activity against headlice and headlouse nits of *Annona squamosa* seed preparation. *Planta Medica*, v.73, n.9, 2007.

GUERRERO, C.; TABOADA, J.; BIAZ, J.B.; OLIVA, A.; ORTEGA, A. Incomptins A and B, two heliangolides from *Decachaeta incompta*. Preliminary studies on the biological activity of incomptin B. *Rev. Latinoam. Quim.*, v.23, p.142-147, 1995.

GYPSER, A.; BUELOW, C.; SCHARF, H. Determination of the absolute configuration of annonin I, a bioactive natural acetogenin from *Annona squamosa*. *Tetrahedron*, v.51, n.7, p.1921-1930, 1995.

HADI, S.; BREMNER, J. B. Initial studies on alkaloids from Lombok medicinal plants. *Molecules*, v.6, n.2, p.117-129, 2001.

HAGGAG, M. Y.; TAHA, K. F. Isolation and determination of liriodenine from *Annona glabra* L. growing in Egypt. *Egyptian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.22, n.1-4, p. 153-7, 1983.

HANDMAN, E. Leishmania vaccines: Old and new. *Parasitol Today*, v.13, p. 236-238, 1997.

HARBORNE, J.B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis* .3 ed., London, New York: Chapman and Hall, 1998, p.63.

HASRAT, J. A.; DE BRUYNE, T.; DE BACKER, J. -P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. Isoquinoline derivatives isolated from the fruit of *Annona muricata* as 5-HTergic 5-HT1A receptor agonists in rats: unexploited antidepressive (lead) products. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v.49, n.11, p.1145-1149, 1997.

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

HATIMI, S., BOUDOUMA, M., BICHICHI, M., CHAIB, N., IDRISSE, N.G. In vitro evaluation of antileishmania activity of *Artemisia herba alba*. *Asso. Bull. Soc. Pathol. Exot.* v.94, p.29-31, 2001.

HAUGHAN, P.A., CHANCE, M.L., GOAD, L.J. Effects of sinefungin on growth and sterol composition of *Leishmania* promastigotes. *Exp. Parasitol.*, v.77, p.147-154, 1993.

HAYAT, M.A. Morphology of seed germination and seedling in *Annona squamosa*. *Botanical Gazette*, v.124, n.5, p.360-362, 1963.

HAZRA, B., GHOSH, R., BANERJEE, A., KIRBY, G.C., WARHURST, D.C., PHILLIPSON, J.D. In vitro antiplasmodial effects of diospyrin, a plant-derived naphthoquinoid, and a novel series of derivatives. *Phytother. Res.*, v.9, p.72-74, 1995.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. *Lancet*, v.354, p.1191-1199, 1999.

HESSE, M. Alkaloids: nature's curse or blessing? *Verlag Helvetica Chimica Acta: Zuerich*, p.303-310, 2002.

HEYWOOD, V. H. *Flowering plants of the world*. Oxford: University Press, 1993, p.30-31.

HIRAOKA, O.; SATAKE, H.; IGUCHI, S.; MATSUDA, A.; UEDA, T.; WATAYA, Y. Carbocyclic inosine as a potent antileishmanial agent: the metabolism and selective cytotoxic effects of carbocyclic inosine in promastigotes of *Leishmania tropica* and *Leishmania donovani*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.134, p.1114-1121, 1986.

HIRAYAMA, K.; AKASHI, S.; YUJI, R.; NIITSU, U.; FUJIMOTO, Y. Structural studies of polyhydroxybis (tetrahydrofuran) acetogenins from *Annona squamosa* using the combination of chemical derivatization and precursor-ion scanning mass spectrometry. *Organic Mass Spectrometry*, v.28, n.12, p.1516-1524, 1993.

HOET, S., STÉVIGNY, C., BLOCK, S. Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Med.*, v. 70, n.5, p. 407-413, 1994.

HIROSHI, H.; RITSUO, A.; SACHIKO, M.; FUKIKO, N.; MASATO, N.; KAZUMASA; TAKASHI, M.; YOSHIYUKI, S.; TAKESHI, M.; SHUSUKE, H. Cytotoxic constituents in the branches of *Annona squamosa* grown in Philippines. *Yakuruto Kenkyusho Kenkyu Hokokushu*, v.22, p.5-9, 2002.

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

HOCQUEMILLER, R.; CORTEX, D.; ARANGO, G.J.; MYINT, S.H.; CAVÉ, A.; ANGEL, A.; MUNOS, V.; FOURNET, A. Isolation and synthesis of espintanol, a novel antiparasitic monoterpene. *J. Nat. Prod.*, v.54, p.443-452, 1991.

HOOKE, J. D.; JACKSON, B.D. *Index kewensis*. Oxford: Clarendon Press, 1895, v.1, p.141.

HOPP, D. C.; CONWAY, W. D.; MCLAUGHLIN, J. L. Using countercurrent chromatography to assist in the purification of new annonaceous acetogenins from *Annona squamosa*. *Phytochemical Analysis*, v.10, n.6, p.339-347, 1999.

HOPP, D. C.; ZENG, L.; GU, Z.; KOZLOWSKI, J. F.; MCLAUGHLIN, J.L. Novel Mono-Tetrahydrofuran Ring Acetogenins, from the Bark of *Annona squamosa*, Showing Cytotoxic Selectivities for the Human Pancreatic Carcinoma Cell Line, PACA-2. *Journal of Natural Products*, v.60, n.6, p.581-586, 1997.

HOPP, D. C.; ZENG, L.; GU, Z.; MCLAUGHLIN, J. L. Squamotacin: an annonaceous acetogenin with cytotoxic selectivity for the human prostate tumor cell line (PC-3). *Journal of natural products*, v.59, n.2, p.97-99, 1996.

HOSTETTMANN, K.; MARSTON, A. The search for new drugs from higher plants. *Chimia*, v.61, p.322-326, 2007.

HUTCHINSON, J. *Families of flowering plants: arranged according to a new system based on their probable phylogeny*, 3.ed. Oxford: Clarendon, 1973, p. 25-168.

HUTCHINSON, J. *The Genera of Flowering Plants*. Oxford: Clarendon, 1967, v.1, p.71-76.

IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) Censo agropecuário. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/agric/default.asp?z=t&o=11>>. Acesso em: 16/07/2007.

INTARANONGPAI, J.; CHAVASIRI, W.; GRITSANAPAN, W. Anti-head lice effect of *Annona squamosa* seeds. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, v. 37, n.3, p.532-535, 2006.

INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; ARIAS, A.R.; TORRES, S.; FERREIRA, M.E.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A.; LORENZEN, K.; ANKE, T.; FOURNET, A. Leishmanicidal and trypanocidal activity of extracts and secondary metabolites from Basidiomycetes. *Phytother. Res.*, n.11, p.193-197, 1997.

INTERNATIONAL CONFERENCE ON HARMONIZATION, GUIDANCE FOR INDUSTRY: ICH-Q2R1. 2005 Validation of analytical Procedures: Methodology for validation of analytical methods.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. *Parasitol Today*, v. 10, p. 65-68, 1994.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; TALLY, J.D.; KLAYMAN, D.L. Evaluation of plant extracts for antileishmanial activity using a mechanism-based radiorespirometric microtechnique (RAM). *Planta Med*, n.58, p.436-441, 1992.

JARAMILLO, M.C.; ARANGO, G.J.; GONZALEZ, M.C.; ROBLEDO, S.M.; VELEZ, I.D. Cytotoxicity and antileishmanial activity of *Annona muricata* pericarp. *Fitoterapia*, n.21, 183-186, 2000.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P. A process for the preparation of antioxidants from *Annona squamosa* peel. (Council of Scientific and Industrial Research, India). *Indian Pat. Appl.*, 11pp, 2006b.

JENSEN, W.A. *A botanical histochemistry, principles and practice*. San Francisco: H.W.Freeman, 1962.

JEWELL, F.F. Softening slash pine tissues for serial sectioning. *Stain Technol.* v.33, n.4, p.191-192, 1958.

JI, X.; LIANG, X. Total synthesis of squamosamide. *Chinese Chemical Letters*, v. 4, n. 4, p. 297-298, 1993.

JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw-Hill, 1940, p.532.

JOLY, A.B. *Botânica, Introdução a Taxonomia Vegetal*. 8ed., São Paulo: Nacional, 1987.

JOY, B.; RAO, J. M. Essential oil of the leaves of *Annona squamosa* L. *Journal of Essential Oil Research*, v.9, n.3, p.349-350, 1997.

JUDD, W.; CAMPBELL, C.S.; KELLOG, E.A.; STEVENS P.F. & DONOGAHUE, M.J., 2ed., *Plant Systematic: a phylogenetic approach*. New York: Sinauer, 2002, p.576.

KALEEM, M.; ASIF, M.; AHMED, Q.U.; BANO, B. Antidiabetic and antioxidant activity of *Annona squamosa* extract in streptozotocin-induced diabetic rats. *Singapore Medical Journal*, v.47, n.8, p.670-675, 2006.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; KOMIYAMA, K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. *Phytochemistry*, v.50, p.75-79, 1999.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASHI, M.; KOMIYAMA, K., Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*, *J. Nat. Prod.*, n.61, p.1332-1336, 1998.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; KOMIYAMA, K. Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. *Phytochemistry*, v.50, p.75-79, 1999.

KAPIL, A. Piperine: a potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes in vitro. *Planta Med.*, v.59, p.474, 1993.

KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. *Mol. Cell. Biol.*, v. 10, p. 1084-1094, 1990.

KAWAZU, K.; ALCANTARA, J. P.; KOBAYASHI, A. Search for insect development inhibitors in plants. Part IX. Isolation and structure of neoannonin, a novel insecticidal compound from the seeds of *Annona squamosa*. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 53, n. 10, p. 2719-2722, 1989.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F. Leishmanicidal activity of aurones. *Tokai J. Exp. Clin. Med.*, v.23, p.423-426, 1999a.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; FOLKENS, U.; KOLDZIEJ, H. In vitro leishmanicidal activity of aurones. *Planta Med.*, v.65, p.316-319, 1999b.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F. In vitro leishmanicidal activity of naturally occurring chalcones. *Phytother. Res.*, v.15, p.148-152, 2001.

KAYSER, O.; KOLODZIEJ, H.; KIDERLEN, A.F. Immunomodulatory principles of elargonium sidioides. *Phytother. Res.*, v.15, p.122-126, 2001a.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; BERTELS, S.; SIEMS, K. Antileishmanial activities of phidicolin and its semisynthetic derivatives. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.45, p.288-292, 2001b.

KELLINA, O.I. Chemotherapeutic activity of certain preparations in experimental cutaneous leishmaniasis of white mice. *Probl. Med. Parazitol. i Profilaktiki Infeksii Moscow*, p.317-338, 1964.

KESARI, A.N.; WATAL, G.; GUPTA, R.K.; TANDON, V. Mechanism of action of Antidiabetic Effect of the aqueous extract of *Annona squamosa* leaves. *Abstracts of Papers, 227th ACS National Meeting, Anaheim, CA, United States*, Publisher: American Chemical Society, Washington, D. C., March 28-April 1, 2004.

KIM, D. H.; FANG, Z.; LEE, Y. E.; WOO, M. H. Xylomaticin and gonionenin, cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona cherimolia* Testing and Analysis Team, Korea Food and Drug Administration, Taegu, S. Korea. *Natural Product Sciences*, v.13, n4, p.355-358, 2007.

KHALID, S.A.; FRIEDRICHSEN, G.M.; KHARAZMI, A.; THEANDER, T.G.; OLSEN, C.E.; CHRISTENSEN, S.B. Limonoids of *Khaya senegalensis*. *Phytochemistry*, v.49, p.1769-1772, 1998.

KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H.; HUFFMAN, M.A. Use of *Vernonia amygdalina* by wild chimpanzee: possible roles of its bitter and related constituents. *Physiol. Behav.*, v.56, p.1209-1216, 1994.

KOTAKE, Y.; OKUDA, K.; KAMIZONO, M.; MATSUMOTO, N.; TANAHASHI, T.; HARA, H.; CAPARROS-LEFEBVRE, D.; OHTA, S. Detection and determination of reticuline and N-methylcoculaurine in the Annonaceae family using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography. B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*, v.806, n.1, p.75-78, 2004.

KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; SADAN, S. V. G. S.; JHA, S. R.; UPASANI, S. M.; MAHESHWARI, V.Y. L. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. *Pest Management Science*, v.58, n.1, p.33-37, 2002.

KRAMP, K.L.; DEWITT, K.; FLORA, J.W.; MUDDIMAN, D.C.; SLUNT, K.M.; HOUSTON, T.A. Derivatives of pentamidine designed target the *Leishmania* lipophosphoglycan. *Tetrahedron Letters*, v. 46, p. 695-698, 2005.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. *Manual Básico de Métodos em Morfologia Vegetal*. Soropédica: EDUR, 1997, p.48-137.

KUMAR, C. D.; RAJENDRAN, K.; LOBO, R.; SHIRWAIKAR, A. An identity based pharmacognostical profile of folium *Annona squamosa*. *Natural Product Sciences*, v.11, n.4, p.213-219, 2005.

KUO, R.; CHEN, C.; LIN, A.; CHANG, F.; WU, Y. A new phenanthrene alkaloid, romucosine I, from *Rollinia mucosa* Baill. Zeitschrift fuer Naturforschung, B: *Chemical Sciences*, v.59, n.3, p.334-336, 2004.

LALA, S.; PRAMANICK, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; BASU, M. K. Harmine: Evaluation of its Antileishmanial Properties in Various Vesicular Delivery Systems. *Journal of Drug Targeting*, v.12, n.3, p.165-175, 2004.

LANGERON, M. *Précis de microscopie*. Paris, Masson e Cia., p.1430, 1949.

LANNUZEL, A.; MICHEL, P.P.; CAPARROS-LEFEBVRE, D.; ABAUL, J.; HOCQUEMILLER, R.; RUBERG, M. Toxicity of Annonaceae for dopaminergic neurons: potential role in atypical parkinsonism in Guadeloupe. *Official journal of the Movement Disorder Society*, v.17, n.1, p.84-90, 2002.

LAPREVOTE, O.; LEOEUF, M.; CAVE, A.; PROVOST, J.; FORGACS, P.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of the Annonaceae. 88. Alkaloids of *Annona paludosa* Aublet. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v.22, n.3, p.159-64, 1988.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BARRERA, J.B.; MORETIL, C.; LE MEN- OLIVER, L. Triterpene saponins from *Myrsine pellucida*. *Phytochemistry*, v.37, p.1671-1677, 1994.

LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; VASQUEZ, C.; MORETIL, C.; SAUVAIN, M.; BALDERRAMA, L. 4-Quinolinone alkaloids from *Dictyoloma peruviana*. *Phytochemistry*, v.40, p.317-320, 1995.

LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Distribution of macromolecular methylations in promastigotes of *Leishmania donovani* and impact of sinefungin. *J. Eukaryot. Microbiol.*, v.40, p.581-589, 1993.

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

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; TIBERGHEN, R.; PROVOST, J.; TOUCHE, A.; JACQUEMIN, H. Alkaloids of the genus *Annona*. XL. Chemical and pharmacological study of alkaloids from *Annona montana* Macf. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v. 16, n. 3, p. 169-84, 1982b.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; TOUCHE, A.; PROVOST, J.; FORGACS, P. Isolation of higenamine from *Annona squamosa*; significance of adsorbent macromolecular resins in extractive plant chemistry. *Journal of Natural Products*, v.44, n.1, p.53-60, 1981.

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

LEBOEUF, M.; LEGUEUT, C.; DESCONCLOIS, J. F.; FORGACS, P. Anomurine et anomuricine, deux nouveaux alcaloïdes isoquinoléiques de l'*Annona muricata*. *Planta Medica*, v. 39, n. 3, p. 204-205, 1980.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; FORGACS, P.; PROVOST, J.; CHIARONI, A.; RICHE, C. Alkaloids of the Annonaceae. Part 33. Annomontine and methoxyannomontine, two new pyrimidine- β -carboline-type alkaloids from *Annona montana*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-Organic Chemistry (1972-1999)*, v. 5, p. 1205-8, 1982.
LEMMA, A., MAXWELL, A., BRODY, G. Antimicrobial and anthelmintic activities of endod (Phytolacca dodecandra). *Research Report*, v. 12, p. 6-10, 1972.

LEON, L.L.; MACHADO, G.M.C.; CARVALHO-PAES, L.E.; GRIMALDI JR., G., *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.84, p.678-680, 1990.

LI, X. H.; HUI, Y. H.; RUPPRECHT, J. K.; LIU, Y. M.; WOOD, K. V.; SMITH, D. L.; CHANG, C. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Bullatacin, bullatacinone, and squamone, a new bioactive acetogenin, from the bark of *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*, v. 53, n. 1, p. 81-86, 1990.

LIEB, F.; NONFON, M.; WACHENDORFF-NEUMANN, U.; WENDISCH, D. Annonacins and annonastatin from *Annona squamosa*. *Planta Medica*, v. 56, n. 3, p. 317-319, 1990.

LINDOSO, J.A.L.; GOTO, H. Leishmaniose Visceral: situação atual e perspectivas futuras. *Boletim Epidemiológico Paulista*, n.26, 2006.

LIMA, E.B.L.; PORTO, C. MOTTA, J.O.C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. *An Bras Dermatol*, v.82, n.2, p.111-124, 2007.

LIMA-BRITO, A.; BELLINTANI, M.C.; RIOS, A.P.S.; SILVA, J.R.S.; DORNELLES, A.L.C. Morfologia de fruto e plântula de três espécies de *Annona* (Annonaceae). *Sitientibus Série Ciências Biológicas*, v.6, n.2, p.119-128, 2006.

LIU Shi Biao; CHEN, Qing; HU, Zheng Hai. Studies on the relationship between leaf structure and cold resistance of 7 species of Annonaceae fruit trees. *Journal of Fruit Science*, v. 21, n. 3, p. 241-246, 2004.

LIU, H.; NOLAN, L. Antileishmanial mode of action of derivatives of the quinoline alkaloid (quinine) from the bark of *Cinchona ledgeriana*. *Acta Horticulturae*, n.426

LIU, X.; TIAN, F.; ZHANG, H.; PILARINOU, E.; MCLAUGHLIN, J. L. Biologically active blumenol A from the leaves of *Annona glabra*. *Natural Product Letters*, v.14, n.1, p.77-81, 1999.

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

LOBÃO, A.Q.; FORZZA, R.C.; MELLO-SILVA, R. Annonaceae da reserva biológica da Represa do Gramma, Descoberto, Minas Gerais, Brasil, com uma nova espécie, *Unonopsis bauxitae*. *Rodriguésia*, v. 57, n. 1, p. 137-147, 2006.

LOCKMAN, Y.; VARDY, D.; OHAYON, D.; EL-ON, J. The failure of traditionally used desert plants to act against cutaneous leishmaniasis in experimental animals. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* n.85, p.499–501. 1991.

LOGGIA, R.D. *Piante officinali per infuse e tisane. Manuale per farmacisti e medici.* Milano: OEMF, 1993. p. 27-109.

LORENZI, H. *Plantas medicinais do Brasil: nativas e cultivadas.* Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. p. 62.

LYUBIMOVA, L.K., FATEEVA, L.I., SERGEEVA, L.A. Experimental characteristics of the antileishmaniasis action of amphotericin B. *Antibiotiki*, v.24, p.281–284, 1979.

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

MAAS, P.J.M.; KAMER, H.M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae of eastern and south-eastern Brazil (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo & Rio de Janeiro). *Rodriguésia*, v. 52, n. 80, p. 61-94, 2002.

MAHESHWARI, V.L.; KOTKAR, H.M.; MENDKI, P.S. A process for preparing a botanical pesticide from seeds of *annona squamosa*. North Maharashtra University, India. Indian Pat. Appl., 2006.

MAHIOU, V., ROBLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVE, A., ARIAS, R., INCHAUSTI, A., YALUFF, G., FOURNET, A., ANGELO, A.,. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *Journal of Natural products*, v. 57, p. 890–895, 1994.

MAHIOU, V., ROBLOT, F., HOCQUEMILLER, R., CAVE', A., ARIAS, R., INCHAUSTI, A., YALUFF, G., FOURNET, A., ANGELO, A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *J. Nat. Prod.* v.57, p.890–895, 1994.

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE', A.; BARRIOS, A.A.; FOURNET, A.; DUCROT, P.H. Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galioides*. *J. Nat. Prod.* 58, 324–328, 1995.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE', A.; ARIAS, A.R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A. New prenylated quinones from *Peperomia galioides*. *J. Nat. Prod.* 59, 694–697, 1996.

MAHIOU, V.; ROBLLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisabenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). *Phytochemistry*, v.54, p.709–716, 2000.

MANN, J. *Secondary metabolism*. 2.ed.Oxford: Oxford Science Pubs. 1987. 374p.

MANN, J.; DAVIDSON, R.S.; HOBBS, J.B.; BANTHORPE, D.V.; HARBORNE, J.B. *Natural products : their chemistry and biological significance*. Essex : Longman, 1994.

MARION, C.; PELISSIER, Y.; DEZEURE, A.; KONE, D.; BESSIERE, J. M.; CASADEBAIG, J. Volatile components of *Annona squamosa*. *Rivista Italiana EPPOS*, v. 4, p. 713-718, 1993.

MARKLE, W.H. ; MAKHOUL, K.2004. Cutaneous leishmaniasis: recognition and treatment. *American Family Physician*. v.69, n.6, 2004.

MARTA, A.; ARRIAGA, C.; IRACEMA, M.; MACHADO, L.; CRAVEIRO, A. A.; DOURADO, R. C. M. Volatile constituents of *Annona squamosa* L. roots. *Rivista Italiana EPPOS*, p. 535-538, 1997.

MARTIN, T.; VILLAESCUSA, L.; GASQUET, M.; DELMA, F.; BARTOLOME, C.; DIAZ-LANZA, A.M.; OLLIVIER, E.; BALANSARD, G. Screening for protozoocidal activity of Spanish plants. *Pharm. Biol.* v.36, p.56–62, 1998.

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

MARTINS, L.; COUTINHO, E.L.; PANZANI, C.R.; XAVIER, J.D. *Fruteiras nativas do Brasil e exóticas*. CATI: Campinas, 2002. p. 49.

MCCLURE, C.D.; NOLAN, L.L.; ZATYRKA, S.A. Antileishmanial properties of *Allium sativum* extracts and derivatives. *Acta Hort.* v. 426, p.183–191, 1996.

MEDDA, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BASU, M.K. Evaluation of the in vivo activity and toxicity of amarogentin, an antileishmanial agent, in both liposomal and niosomal forms. *J. Antimicrob. Chemother.* v.44, p.791–794, 1999.

MENG, D.; XU, Y.; CHEN, W.; ZOU, J.; LOU, L.; ZHAO, W. Anti-tumour clerodane-type diterpenes from *Mitrephora thorelii*. *Journal of Asian Natural Products Research*, v.9, n.7, p. 679-684, 2007.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; DE PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPINDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.100, n.7, 2005.

METCALF, C.R.; CHALK, L. An anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses. Oxford: Claredon Press, p. 44-50, 1950.

METCALF, C.R.; CHALK, L. An anatomy of the dicotyledons: Magnoliales, illiciales, and laurales, v. 3. Oxford: Claredon Press, p. 34-44, 1979.

MATHIAS, L.A; EMILY, A.. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará - Brazil. *J Ethnopharmacol*, v. 40, p.53-75, 1993.

MEYER, Th. M. The alkaloids of *Annona muricata* Linn. *Ing. Nederland.-Indie*, v. 8, n. 6, p. 64-6, 1941.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana, Centro Nacional de Epidemiologia, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2000, p.13.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de Incidência, Sistema Nacional de Agravos de Notificação, Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2001.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Relatório de Incidência, Sistema Nacional de Agravos de Notificação. Fundação Nacional de Saúde, Brasília, 2002.

Ministério da saúde. Manual de vigilância leishmaniose tegumentar americana Brasília 2.ed. 2007.

MISHRA, P. K.; SINGH, N.; AHMAD, G.; DUBE, A.; MAURYA, R. Glycolipids and other constituents from *Desmodium gangeticum* with antileishmanial and immunomodulatory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, v. 15, n. 20, p. 4543-4546, 2005.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U.; RASTOGI, A.K. Protective effect of picroliv from *Picrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. *Life Sci.* v.63, p.1823-1834, 1998.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A.R.; PAL, C.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H.K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol. Med.*, v.6, p.527-541, 2000.

MOIDEEN, S.V.K.; HOUGHTON, P.J.; CROFT, S.L. Antileishmanial activity of *Kigelia pinnata* root bark constituents. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.49, p.114, 1997.

MORALES, G.; SIERRA, P.; BORQUEZ, J.; LOYOLA, LA. Rigidusine, a new glycoditerpenoid from *Haplopappus rigidus*. *Bol. Soc. Chil. Quim.*, v.45, p.611-614, 2000.

MORAES, M.A.P.; SILVEIRA, F.T. Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 36: 459-463, 1994.

MORAIS, S.M.; DANTAS, J.D.P.; SILVA, A.R.A.; MAGALHÃES, E.F. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 2, p. 169-177, 2005.

MOREIRA, M.E.; DEL PORTILLO, H.A.; Milder, R.V.; BALANCO, J.M.; BARCINSKI, M.A. Heat shock induction of apoptosis in promastigotes of the unicellular organism *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *J Cell Physiol.*, v. 167, n. 2, p. 350-313, 1996.

MOREIRA, R.C.R.; REBÊLO, J.M.M.; GAMA, M.E.A; COSTA, J.M.L. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. *Cad Saúde Pub*, v. 18, p.187-195, 2002.

MORETII, C.;SAUVAIN, M.; LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BRAVO, J.A.; MUNOZ, V. A novel antiprotozoal aminosteroid from *Saracha punctata*. *J. Nat. Prod.* v.61, p.1390-1393, 1998.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.

MORITA, H.; SATO, Y.; CHAN, KI-LAM; CHOO, CHEE-YAN; ITOKAWA, H.; TAKEYA, K.; KOBAYASHI, J. Samoquasine A, a Benzoquinazoline Alkaloid from the Seeds of *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*, v. 65, n. 11, p.1748, 2002.

MORITA, H.; IIZUKA, T.; CHOO, C.; CHAN, K.; TAKEYA, K.; KOBAYASHI, J. Vasorelaxant activity of cyclic peptide, cyclosquamosin B, from *Annona squamosa* *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. v. 16, n. 17, p. 4609-4611, 2006

MORITA, Hiroshi; SATO, Yumiko; CHAN, Kit-Lam; CHOO, Chee-Yan; ITOKAWA, Hideji; TAKEYA, Koichi; KOBAYASHI, Jun'ichi. Samoquasine A, a Benzoquinazoline Alkaloid from the Seeds of *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*, v. 63, n. 12, p. 1707-1708, 2000.

MORS, W.B. *Medicinal plants of Brazil*. Algonac: Reference Publications. 2000. p. 13-14.

MORTON, J. 1987. Sugar Apple. In: Fruits of warm climates. p. 69–72. Julia F. Morton, Miami,FL. Available: http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/sugar_apple.html. [fevereiro, 10, 2007].

MOSKALENKO, N.Y.; PERSHIN, G.N. Comparative chemotherapeutic effects of paromomycin and monomycin in induced leishmaniasis of mouse skin. *Farmakol. Toksikol.* v.29, p.90–94, 1996.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of immunological methods*, v. 16, p.55-63, 1983.

MSHVILDADZE, V.; FAVELA, A.; DELMAS, F.; ELIAS, R.; FAURE, R.; DECANOSIDZE, G.; KEMERTELIDZE, E.; BALANSARD, G. Antifungal and antiprotozoal activities of saponis from *Hedera colchica*. *Pharmazie*, v. 55, p.325–326, 2000.

MONTENEGRO, H.; GONZALEZ, J.; ORTEGA-BARRIA, E.; CUBILLA-RIOS, L. Antiprotozoal Activity of Flavonoid Glycosides Isolated from *Clidemia sericea* and *Mosquitoxylon jamaicense*. *Pharmaceutical Biology*, v.45, n.5, p.376-380, 2007.

MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; COSTA-LOTUFO, L.V.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A.; *Arquivos brasileiros de fitomedicina científica*, v.1, p.30, 2003.

MOULAY, L.; ROBERT-GERO, M. Leishmania donovani: enhanced expression of soluble acid phosphatase in the presence of sinefungin, an antiparasitic agent. *Exp. Parasitol.* v.80, p.8–14, 1995.

MUKHERJEE, T.; ROY, K.; BHADURI, A. Acivicin: a highly active potential chemotherapeutic agent against visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v.170, p.426–432, 1990.

MUNOS, M.H.; MAYRARGUE, J.; FOURNET, A.; GANTIER, J.C.; HOCQUEMILLER, R.; MOSKOWITZ, H. Synthesis of an antileishmanial alkaloid isolated from *Galipea longiflora*, a Bolivian plant used as treatment for cutaneous leishmaniasis. *Phytother. Res.* v.8, p.174–178, 1994.

MUÑOZ, V.; MORETH, C.; SAUVAIN, M.; CARON, C.; PROZEL, A.; MASSIOT, G.; RICHARD, B.; LE MEN-OLIVIER, L. Isolation of bis-indole alkaloids with antileishmanial and antibacterial activities from *Peschiera var heurkii* (Syn. *Tabernaemontana var heurkii*). *Planta Med.*, v.60, p.455–459, 1994.

MUKHERJEE, T.; ROY, K.; BHADURI, A. Acivicin: a highly active potential chemotherapeutic agent against visceral leishmaniasis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v. 170, p.426–432, 1990.

MUKHLESUR, R.M.; PARVIN, S.; EKRAMUL, H.M.; EKRAMUL, I. M.; MOSADDIK, M. A. Antimicrobial and cytotoxic constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Fitoterapi*, v.76, n.5, p.484–489, 2005.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; KOBAYASHI, G.S.; PFALLER, M.A. *Microbiologia médica*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

MURRAY, H.W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. *The Lancet*, v. 366, 2005.

MUZITANO, M.F.; TINOCO, L.W.; GUETTE, C.; KAISER, C.R.; BERGMANN, B.R.; COSTA, S.S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*, v.67, n.18, 2006.

MUZITANO, M.F.; TINOCO, L.W.; GUETTE, C.; KAISER, C.R.; BERGMANN, B.R.; COSTA S.S. Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. *Planta Medica* v.72, p.81-83, 2006b.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, O.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallesces* (C. DC.) Yunck. *Rev Bras Farmacogn.*, v.16, p.61-66, 2006.

NEAL, R.A. The effect of antibiotics of the neomycin group on experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.62, p.54-62, 1968.

NEAL, R.A. Effect of emetine and related compounds on experimental cutaneous leishmaniasis. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.64, p.159-165, 1970.

NEAL, R.A.; CROFT, S.L. An in vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v.14, p.463-475, 1984.

NEAL, R.A.; CROFT, S.L.; NELSON, D.J. Antileishmanial effect of allopurinol ribonucleoside and the related compounds, allopurinol, thiopurinol, thiopurinol ribonucleoside, and of formycin B, sinefungin and the lepidine WR6026. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.79, p.122-128, 1985.

NEAL, R.A.; IWOB, M.V.; ROBERT-GERO, M.; Antileishmanial effect of free and encapsulated sinefungin against *Leishmania donovani* infections in BALB/c mice. *C. R. Acad. Sci. Ser.*, n.III, v.308, p.485-488, 1989.

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

NGUYEN-POUPLIN, J.; TRAN, HOP; TRAN, H.; PHAN, T. A.; DOLECEK, C.; FARRAR, J.; TRAN, T.H.; CARON, P.; BODO, B.; GRELLIER, P. Antimalarial and cytotoxic activities of ethnopharmacologically selected medicinal plants from South Vietnam. *Journal of Ethnopharmacology*, v.109, p.417-427, 2007.

NOBRE, R.G.; FERNANDES, P.D.; HANS, R.G.; SANTOS, F.J.S.; BEZERRA, I.; GUKGEL, M.T.. Germinação e formação de mudas de graviola sob estresse salino. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. v.38, n.12, p.1365-1371, 2003.

NOGUEIRA, E.A.; MELLO, N.T.C.; MAIA, M.L. Produção e comercialização de Anonáceas em São Paulo - Brasil. *Informações Econômicas*, v.35, n.2, p.51-54, 2005.

NONFON, M.; LIEB, F.; MOESCHLER, H.; WENDISCH, D. Four annonins from *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, v.29, n.6, p.1951-1954, 1990.

OKETCH-RABAH, H.A.; LEMMICH, E.; DOSSAJI, S.F.; THEANDER, T.G.; OLSEN, C.E.; CORNETT, C.; KHARAZMI, A.; CHRISTENSEN, S.B. Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*. *J. Nat. Prod.*, v.60, p.458-461, 1997a.

OKETCH-RABAH, H.A.; LEMMICH, E.; DOSSAJI, S.F.; THEANDER, T.G.; OLSEN, C.E.; CORNETT, C.; KHARAZMI, A.; CHRISTENSEN, S.B. Antiprotozoal compounds from *Sparagus africanus*. *J. Nat. Prod.*, v.60, p.1017-1023, 1997b.

OKETCH-RABAH, H.A.; CHRISTENSEN, S.B.; FRYDENVANG, K.; DOSSAJI, S.F.; THEANDER, T.G.; CORNETT, C.; WATKINS, W.M.; KHARAZMI, A.; LEMMICH, E. Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalyxolide from *Vernonia brachycalyx*. *Planta Med.*, v.64, p.559-562, 1998.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M.K. *Farmacognosia*. São Paulo: Atheneu, 1998.

OLIVEIRA, J. P. C; FERNANDES, F.; CRUZ, A. K; TROMBELA, V., MONTEIRO, E, CAMARGO, A. A.; BARRAL, A.; OLIVEIRA C. Genetic diversity of *Leishmania amazonensis* strains isolated in northeastern Brazil as revealed by DNA sequencing, PCR-based analyses and molecular karyotyping *Kinetoplastid Biology and Disease*, v.6, n.5, 2007.

OLIVEIRA, V. M.; PINHEIRO, M. L. B.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; LEON, L. L.; MACHADO, G.M.C.; PINHEIRO, L. Constituintes Químicos e Atividade Leishmanicida de *Annona aff.excellens* Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.

OLIVEROS-BELARDO, L. The predominant terpenes in the fruit peel oil of *Annona squamosa* L. *Philippine Journal of Science*, v.106, n.1-2, p.37-47, 1977.

OSORIO, E.A.; ARANGO G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, GRACE; GUTIERREZ, D.; PACO, M.A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S.C. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. *Journal of Ethnopharmacology*, v.111, p.630-635, 2007.

PADMA, P.; KHOSA, R. L.; SAHAI, M. Alkaloids from genus *Annona*. *Indian Journal of Natural Products*, v.11, n.2, p.3-15, 1995.

PAOLANTONACCI, P.; LAWRENCE, F.; NOLAN, L.L.; ROBERT-GERO, M. Inhibition of leishmanial DNA synthesis by sinefungin. *Biochem. Pharmacol.*, v.36, p.2813-2820, 1987.

PARDHASARADHI, B. V. V.; REDDY, MADHURIMA; ALI, A. MUBARAK; KUMARI, A. LEELA; KHAR, ASHOK. Antitumour activity of *Annona squamosa* seed extracts is through the generation of free radicals and induction of apoptosis. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics*. v. 41, n. 4, p. 167-172, 2004.

PARÉS-MARTÍNEZ, J.; ARIZALETA, M.; SANABRIA, M.E.; BRITO, L. Características de los estomas, densidad e índice estomático y su variación en función a la injertación en *Annona muricata* L. y *Annona montana* MADFAC. *Bioagro*, v.16, n.3, p. 213-218, 2004.

PARNHAM, M.J. Benefit–risk assessment of the squeezed sap of the purple coneflower (*Echinacea purpurea*) for long-term oral immunostimulation. *Phytomedicine*, v.3, p.95–102, 1996.

PATZ, J.A.; GRACZYK, T.K.; GELLER, N.; VITTOR, A.Y. Effects of environmental change on emerging parasitic diseases. *Int. J. Parasitol.* v.30, p.1395–1405, 2000.

PAUFIQUE, J. Active principle resulting from *annona squamosa*, process of obtaining and cosmetic use a visée anti-age [Machine Translation].Societe Industrielle Limousine D'Application Biologique,Ditesilab, 2007.

PAULA, C.D.R.; SAMPAIO, J.H.D.; CARDOSO, D.R.C.; SAMPAIO, R.N.R. Estudo comparativo da eficácia de isotionato de pentamidina administrada em três doses durante uma semana e de *N*-metil-glucamina 20mgSbV/Kg/dia durante 20 dias para o tratamento da forma cutânea da leishmaniose tegumentar americana. *Rev Soc Brás Med Trop*, v. 36, p.365-371, 2003.

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

PELLISSIER, Y.; MARION, C.; DEZEUZE, A.; BESSIERE, J. Volatile components of *Annona squamosa* L. *Journal of Essential Oil Research*, v. 5, n. 5, p. 557-560, 1993.

PENA, M. *Dicionário brasileiro de plantas medicinais*. 3. ed. Rio de Janeiro: Kosmos, 1946. p. 34-35.

PEREZ-VICTORIA, J.M., TINCUSI, B.M., JIMENEZ, I.A., BAZZOCCHI, I.L., GUPTA, M.P., CASTANYS, S., GAMARRO, F., RAVELO, A.G. New natural sesquiterpenes as modulators of daunomycin resistance in a multidrug-resistant *Leishmania tropica* line. *J. Med. Chem.* v.42 p.4388–4393, 1999.

PERSHIN, G.N., MOSKALENKO, N.Y. 1963. Chemotherapeutic activity of monomycin in induced cutaneous leishmaniasis. *Farmakol. Toksikol.* v. 26, p.97–101, 1963.

PETERS, W.; KILLICK- HENDRICK, R. The leishmaniasis in biology and medicine. Vol.1 London: Academic Press, 1987.

PHELOUZAT, M.A., BASSELIN, M., LAWRENCE, F., ROBERT-GERO, M. Sinefungin shares adomet-uptake system to enter *Leishmania donovani* promastigotes. *Biochem. J.* v.305, p.133–137, 1995.

PHILIPPOV, S.; KANDE, K. M.; MACHEV, K. Alkaloids of *Annona senegalensis*. *Fitoterapia* v. 66, n. 3, p. 275–6, 1995.

PLOCK, A., SOKOLOWSKA-KOHLER, W., PRESBER, W. Application of flow cytometry and microscopical methods to characterize the effect of herbal drugs on *Leishmania* spp. *Exp. Parasitol.* v.97, p.141–153, 2001.

PINTO, A.C.Q.; CORDEIRO, M.C.R.; ANDRADE, S.R.M.; FERREIRA, F.R.; FILGUEIRAS, H.A.C.; ALVES, R.E.; KINPARA, D.I. *Annona* Species. Southampton: University of Southampton, 2005. 284p.

PISCOPO, T.V.; MALLIA, A.C.. Leishmaniasis. *Postgrad. Med. J.*, v82 p.649–657, 2006.

PONTES, A.F.; BARBOSA, M.R. DE V.; MAAS, P.J.M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss *Acta Botânica Brasílica*, v. 18, n. 2, p. 281–193, 2004.

PONTE-SUCRE, A.; FABER, J. H.; GULDER, T.; KAJAHN, I.; PEDERSEN, S. E. H.; SCHULTHEIS, M.; BRINGMANN, G.; MOLL, H. Activities of naphthylisoquinoline alkaloids and synthetic analogs against *Leishmania major*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, n. 1, p. 188–194, 2007.

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE', A.; BARRIOS, A.A.; FOURNET, A.; DUCROT, P.H. Pessoaine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. *Journal of Natural Products*, v.59, p. 438–440, 1996.

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; CAVÉ, A. Pessoaine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. *J Nat Prod*, v. 59, p.438–440, 1996.

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

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

RAO, V.S.N; DASARADHAN, P.; KRISHNAIAH, K.S. Antifertility effect of some indigenous plants. *Indian J. Med. Res.*, v.70, p.517–520, 1979.

RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CASSELS, B. K.; CAVE, A. Alkaloids of the Annonaceae. Part 81. Alkaloids of *Annona hayesii*. *Journal of Natural Products*, v. 50, n. 4, p. 759–61, 1987.

RASMUSSEN, H.B.; CHRISTENSEN, S.B.; KVIST, L.P.; KARAZMI, A.A. simple and efficient separation of the curcumins, the antiprotozoal constituents of *Curcuma longa*. *Planta Med.*, v.66, p.393–398, 2000a.

RASMUSSEN, H.B.; CHRISTENSEN, S.B.; KVIST, L.P., KHARAZMI, A.; HUANSI, A.G. Absolute configuration and antiprotozoal activity of minquartynoic acid. *J. Nat. Prod.*, v.63, p.1295–1296, 2000b.

RATH, S; TRIVELIN, L.A., IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; JESUS, M.N.; MARZAL, P.C.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; TEMPONE, A.G.. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. *Química Nova*, v. 26, p.550– 553, 2003.

RATHORE, A.; JUNEJA, R.K.; TANDON, J.S. An iridoid glucoside from *Nyctanthes arbortristis*. *Phytochemistry*, v.28, p.1913–1917, 1989.

RAYNAUD-LE GRANDIC, S.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v.58, n.6–7, p.388–392, 2004.

REY, L. Parasitologia : parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África.3. ed. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2001. p.215-245.

REZZANO, S. DE RAFFO; MORENO, G.; GARCIA, J.; SCORZA, J.V. Efficacy of paromomycin-I against *Leishmania garnhami* in heterozygous albino mice. *Rev. Cubana Med. Trop.* v.37, p.55–65, 1985.

RICHOMME, P.; GODET, M.C.; FOUSSARD, F.; TOUPET, L.; SEVENET, T.; BRUNETON, J. A novel leishmanicidal labdane from *Polyalthia macropoda*. *Planta Med.* v.57, p.552–554, 1991

RIDOUX, O., DI GIORGIO, C., DELMAS, F., ELIAS, R., MSHVILDADZE, V., DEKANOSIDZE, G., KEMERTELIDZE, E., BALANSARD, G., TIMON-DAVID, P., In vitro antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, alpha-hederin, betahederin and hederacolchiside A1, in association with pentamidine and amphotericin B. *Phytother. Res.* v.15, p.298–301, 2001.

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

RIOS, M. Y.; CASTREJON, F.; ROBLEDO, N.; LEON, I.; ROJAS, G.; NAVARRO, V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from *Annona cherimola* (Annonaceae. *Revista de la Sociedad Quimica de Mexico*, v.47, n.2, p.139-142, 2003.

ROBERT-GERO, M., BACHRACH, U., BAATNAGAR, S., POLONSKY, J., Inhibition in vitro of the growth of *Leishmania donovani* promastigotes by quassinoids. *C. R. Acad. Sci. Ser. II* v.300, p.803–806, 1985.

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

ROSA, M. S. S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; RODRIGUES, I. A.; SOARES, R. M. A.; SOUTO-PADRON, T.; ALVIANO, C.S.; LOPES, A.H.C.S. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v.47, n.6, p.1895-1901, 2003.

ROSSI, B.R., TORRES-SANTOS, E.C., SANTOS, A.P.P.T., ALMEIDA, A.P., COSTA, S.S., DA-SILVA, S.A.G. Treatment of cutaneous leishmaniasis with *Kalanchoe pinnata*: experimental and clinical data. *Phytomedicine*, v.7, p.115, 2000.

ROY, R., BHATTACHARYA, G., SIDDIQUI, K.A.I., BHADRA, R. Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.34, p.918–92, 1990.

SAEZ, J., GRANADOS, H., TORRES, B., VELEZ, I.D., MUNOZ, D. Leishmanicidal activity of *Annona aff. spraguei* seeds. *Fitoterapia*, v.69, p.478–479, 1998.

SAHAI, M.; SINGH, S.; SINGH M.; GUPTA, Y. K.; AKASHI, S.; YUJI, R.; HIRAYAM, K.; ASAKI, H.; ARAYA, H. Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, v. 42, n. 6, p. 1163–1174, 1994.

SAHPAZ, S.; BORIES, CH.; LOISEAU, P. M.; CORTÈS, D.; HOCQUEMILLER, R.; LAURENS, A.; CAVE, A. Cytotoxic and Antiparasitic Activity from *Annona senegalensis* Seeds. *Planta Med*, v.60, p.538–540, 1994.

SAHPAZ, S., BORIES, C.H., LOISEAU, P.M., CORTES, D., HOCQUEMILLER, R., LAUERNS, A., CAVE, A. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. *Planta Med*, v.60, p.538–540, 1994

SAHPAZ, S., GONAZALEZ, M.C., HOCQUEMILLER, R., ZAFRA-POLO, M.C., CORTES, D. Annosenegalin and annogalene: two cytotoxic mono-tetrahydrofuran acetogenins from *Annona senegalensis* and *Annona cherimolia*. *Phytochemistry*, v.42, p.103–107, 1996.

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

SALEM, M. M; WERBOVETZ, K. A. Natural products from plants as drug candidates and lead compounds against leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current Medicinal Chemistry*. v. 13, n. 21, p. 2571–2598, 2006

SALUJA, A. K.; SANTANI, D. D. Phytochemical study of *Annona squamosa*. Dep. Pharm. Sci., Dr. Harisingh Gour Vishwavidyalaya, Sagar, India. *Fitoterapia*, v. 61, n .4, p. 359–360, 1990.

SAMPA, Das; SANTANU, Banerjee; INDRAJIT, Dutta; PRALAY, Majumdar; ANINDYA, Sarkar. A new mannose binding insecticidal lectin isolated from seeds of *annona squamosa*, and process for its preparation. *Indian Pat. Appl.*, 2006.

SANDOVAL LOPEZ, D.; RIPPERGER, H. Chemical studies in Cuban species of the genus *Annona*. I. *Annona bullata* Rich. *Revista Cubana de Farmacia*, v. 20, n.1, p. 83-6, 1986.

SANDOVAL, D.; PREISS, Alfred; SCHREIBER, Klaus; RIPPERGER, Helmut. Annonelliptine, an alkaloid from *Annona elliptica*. *Phytochemistry*, v. 24, n. 2, p. 375-6, 1985.

SANTO, W.R., BERNARDO, R.R., PECANHA, L.M.T., PALATNIK, M., PARENTE, J.P., SOUSA, C.B.P. Haemolytic activities of plant saponins and adjuvants. Effect of *Periandra mediterranea* saponin on the humoral response to the fml antigen of *Leishmania donovani*. *Vaccine*, v.15, p.1024–1029, 1997.

SANTOS A.G.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; AMARAL, A. C. F.; LEON, L.L.; MACHADO, G.M.C. Constituintes Químicos e Atividade Leishmanicida de *Annona impressivenia*. *29a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*.

SANTOS A.G.; PINHEIRO, M.L.B.; SILVA, J.R.A.; AMARAL, A. C. F.; LEON, L.L.; MACHADO, G.M.C.; PIMENTA, L.P. Constituintes Químicos e Atividade Leishmanicida de *Annona aff.excellens*, 2002.

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, v. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.

SANTOS, L. A. R.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona cornifolia* A.St. - Hil. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.9, n.3, p.48-51, 2007.

SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. H.; ZOGHBI, M. Das G. B.; MAIA, J. G. S. Volatile constituents of fruits of *Annona glabra* L. from Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, v.13, n.3, p.148-150, 1998.

SANTOS, M.D.; BLATT, C.T.T. Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado. *Revista Brasileira de Botânica*, v. 21, n. 2, p.135-140, 1998.

SANTOS, S.C.; COSTA, W.F.; BATISTA, F.; SANTOS, L.R.; FERRI, P.H.; FERREIRA, H. D.; SERAPHINS, J.C. Sazonal variation in the content of tannins in barks of barbatimão species. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 552-556, 2006.

SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. 2. ed. Ames: Iowa State College Press, 1951. 228p.

SAVORNIN, B.M, ELIAS, R., DIAZ-LANZA, A.M, BALANSARD, G., GASQUET, M., DELMAS, F. Saponins of the ivy plant, *Hedera helix*, and their leishmanicidal activity. *Planta Med.*, v.57, p.260–262, 1991.

SAUVAIN, M., DEDET, J.P., KUNESCH, N., POISSON, J., GANTIER, J.C., GAYRAL, P., KUNESCH, G. In vitro and in vivo leishmanicidal activities of natural and synthetic quinoids. *Phytother. Res.*, v. 7, p.161–171, 1993.

SAUVAIN, M., DEDET, J.P., KUNESCH, N., POISSON, J. Isolation of flavans from the amazonian shrub *Faramaea guianensis*. *J. Nat. Prod.*, v.57, p.403–406, 1994.

SAUVAIN, M., KUNESCH, N., POISSON, J., GANTIER, J.C., GAYRAL, P., DEDET, J.P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (Dilleniaceae). *Phytother. Res.*, v.10, p.1–4, 1996.

SAXENA, R. C.; HARSHAN, V.; SAXENA, A.; SUKUMARAN, P.; SHARMA, M. C.; KUMAR, M. L.. Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. *Journal of the American Mosquito Control Association*, v. 9, n. 1, p. 84–87, 1993.

SCHIEBER, A.; KELLER, P.; CARLE, R. Determination of phenolic acids and flavonoids of apple and pear by high-performance liquid chromatography. *Journal of chromatography A*. v.920, p.265–273, 2001.

SCHLEIN, Y. Mortality of *Leishmania major* in *Phlebotomus papatasi* caused by plant feeding of the sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.50, p.20–27, 1994

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., RAZMILIC, I., SAUVAIN, M., MORETTI, C., RUIZ, E., BALANZA, E., FOURNET, A. Antiprotozoal activity of jatrogrossidione from *Jatropha grossidentata* and jatrophone from *Jatropha isabellii*. *Phytother. Res.*, v.10, p.375–378, 1996.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G., ASTUDILLO, L., BASTIDA, J., CODINA, C., DE ARIAS, A.R., FERREIRA, M.E., INCHAUSTTI, A., YALUFF, G. Cryptofolione derivatives from *Cryptocarya alba* fruits. *J. Pharm. Pharmacol.*, v.53, p.563–567, 2001

SCHROEDER, C. A. Fruit Morphology and Anatomy of the Cherimoya. *Botanical Gazette*, vol. 112, n.4, p. 436–446. 1951

SCHULTES, R.E; REIS, S. *Ethnobotany: evolution of a discipline*. London: Chapman & Hall, 1995. p. 241.

SEETHARAMAN, T. R. Flavonoids from the leaves of *Annona squamosa* and *Polyalthia longifolia*. *Fitoterapia*, v. 57, n. 3, p. 198-9, 1986.

SEN, G.; MUKHOPADHYAY, S.; RAY, M.; BISWAS, T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 61, p.1066–1075, 2008.

SENECA, H., HENDERSON, E., HARVEY, M. Effect of hyaluronidase and of hyaluronic acid on cultures of Trypanosomes, *Leishmania*, and Ameba. *Science*, v.108, p.714–715, 1948

SERENO, D; HOLZMULLER, P AND LEMESTRE, J. L, Efficacy of second line drugs on antimonyl- resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. *Acta Tropica*, v.74, p. 25- 31, 2000.

SHANKARAM, A. V.B.; MURTHY, M. M.; AKKEWAR, D. M.; SUBRAMANYAM, M.; RAO, A.N. Isosquamocin insecticide from *Annona squamosa* seeds. (Council of Scientific & Industrial Research, India). *U.S. Pat. Appl. Publ.* (2003), 25 pp

SHANKER, K. S.; KANJILAL, S.; RAO, B. V. S. K.; KISHORE, K. H.; MISRA, S.; PRASAD, R. B. N. Isolation and antimicrobial evaluation of isomeric hydroxy ketones in leaf cuticular waxes of *Annona squamosa*. *Phytochemical Analysis*. v. 18, n. 1, p. 7-12, 2007.

SHARMA, R. K.; BEHARI, M. Screening of the compounds isolated from the leaves of *Annona squamosa* for antibacterial activity. *Acta Ciencia Indica Chemistry*, v. 18, n. 3, p. 249-252, 1992.

SHIRWAIKAR, A; RAJENDRAN, K.; KUMAR, D.C. Oral Antidiabetic Activity of *Annona squamosa* Leaf Alcohol Extract in NIDDM Rats. *International Journal of Pharmacognosy*. v. 42, n. 1, p. 30-35, 2004.

SHIRWAIKAR, ANNIE; RAJENDRAN, K.; KUMAR, C. DINESH. In vitro antioxidant studies of *Annona squamosa* Linn. leaves *Indian Journal of Experimental Biology*. v.42, n.8, p.803-807, 2004 a.

SIKDAR, D. C. A process for extraction and preparation of eco-friendly bio-pesticide from custard apple seeds containing pesticidal compositions. *Dayanand Sagar Collage of Engineering, India. Indian Pat. Appl.*, 2006.

SILVA, C.C.; FERREIRA, I.C.P.; G.M.C. MACHADO, LEON, L.L.; DE OLIVEIRA, A.J.B.; TANAKA, J.C.A. Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*, *Phytomedicine*, v.27, p. 377-380, 2007.

SILVA, S.A.G.; COSTA, S.S.; MENDONÇA, A.S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.G.; ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. *Acta Trop.* v.60, p.201–210, 1995.

SIMEON, S.; RIOS, J. L.; VILLAR, A. Alkaloids from *Annona cherimolia* (Mill.) stem bark. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v. 23, n. 3, p. 159-61, 1989.

SIMEON, S.; RIOS, J. L.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of *Annona cherimolia* stem bark alkaloids. *Pharmazie*, v. 45, n. 6, p. 442-3, 1990.

SIMPSON, M.G. *Plant systematics*. Amsterdam; Boston : Elsevier/Academic Press, 1953. p. 146-149.

SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G.K. Preparation of antioxidants from *Annona squamosa* seeds. (Council of Scientific and Industrial Research, India). *Indian Pat. Appl.* 2006a, 12pp.

SINGH, Raveendra Pratap; JAYAPRAKASHA, Guddadarangavvanhally Krishnareddy. A process for preparation of antioxidants from annona squamosa seeds. Council of Scientific and Industrial Research, India. *Indian Pat. Appl.*, 2006.

SINGHA, U.K., GURU, P.Y., SEN, A.B., TANDON, J.S. Antileishmanial activity of traditional plants against *Leishmania donovani* in golden hamsters. *Int. J. Pharmacog* , v.30, p.289–295, 1992.

SITTIE, A.A., LEMMICH, E., OLSEN, C.E., HVIDD, L., KHARAZMI, A., NKRUMAH, FK., CHRISTENSEN, S.B. Structure– activity studies: in vitro antileishmanial and antimalarial activities of anthraquinones from *Morinda lucida*. *Planta Med.*, v.65, p.316–319,1999.

SMITH, N.; MORI, S.A; HENDERSON, A.; STEVENSON, D.W.; HEALD, S.V. *Flowering plants of the Neotropics*. Princeton : *Princeton University Press*, p.18, 2004.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 40, n. 2, 2004.

SOUZA, L.A. Morfologia e anatomia vegetal. Ponta Grossa: Editora UEPG, 2003, 103p.

SOUZA, M. M. C.; BEVILAQUA, C. M. L.; MORAIS, S. M.; COSTA, C. T. C.; SILVA, A. R. A.; BRAZ-FILHO, R. Anthelmintic acetogenin from *annona squamosa* L. seeds. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v.80, n.2, p.271-277, 2008.

SONNET, Philip E.; JACOBSON, Martin. Tumor inhibitors. II. Cytotoxic alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 60, n. 8, p. 1254-6, 1971.

STAERK, D., LEMMICH, E., CHRISTENSEN, J., KHARAZMIL, A., OLSEN, C.E., JAROSZEWSKI, J.W. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. *Planta Med*, v.66, p.531–536, 2000.

STAERK, D.; LEMMICH, E.; CHRISTENSEN, J.; KHARAZMIL, A.; OLSEN, C.E.; JAROSZEWSKI, J.W. Leishmanicidal, antiplasmodial and cytotoxic activity of indole alkaloids from *Corynanthe pachyceras*. *Planta Medica*. v.66, p. 531–536, 2000.

STAHL, E. Thin-layer chromatography: A laboratory handbook. 2. ed. Heidelberg: Springer, 1969. 1041 p.

STÉVIGNY, C.; BAILLY, C.; QUETIN-LECLERCQ, J. Cytotoxic and Antitumor Potentialities of Aporphinoid Alkaloids. *Curr. Med. Chem. - Anti-Cancer Agents*, v.5, p.173-182, 2005.

SU, MINGJAI; LEE, SHOEISHENG. 2006. Aporphine and oxoaporphine compounds and pharmaceutical use thereof. *U.S. Patent* N° 817,641.

SUN, L.; YU, J.; LI, D.; LI, J.; YANG, X.; YANG, S. Determination of annonaceous acetogenins in Annonaceae plants by HPLC. *Yaoxue Xuebao*, v. 36, n. 9, p. 683-685, 2001.

SVOMA, E. Seed morphology and anatomy in some Annonacea. *Plant systematic and evolution*, v. 209, p.177-204, 1997.

TADESMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 50, n. 4, p. 1352–1364, 2006.

TAHIR, A.E.; SATTI, G.M.H.; KHALID, S.A. Antiplasmodial activity of selected Sudanese medicinal plants with emphasis on *Maytenus senegalensis*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 64, p. 227-233, 1999.

TAHIR, A.E., IBRAHIM, A.M., SATTI, G.M.H., THEANDER, T.G., KHARAZMI, A., KHSLID, A.S. The potential antileishmanial activity of some Sudanese medicinal plants. *Phytother. Res*, v.12, p.576–579, 1998.

TALEB-CONTINI, S. H.; SALVADOR, M. J.; BALANCO, J. M. F.; ALBUQUERQUE, S.; DE OLIVEIRA, D. C. R. Antiprotozoal effect of crude extracts and flavonoids isolated from *Chromolaena hirsuta* (Asteraceae). *Phytotherapy Research*, v. 18, n. 3, p. 250-254, 2004.

TANDON, V.; WATAL, G.; CHANDRA, R.; GUPTA, K. R.; KASHARI, N. A. *A process of preparing an extract of Annona squamosa for the treatment of diabetes*. PCT Int. Appl. 2004, 18 pp.

TANDON, J.S., SRIVASTAVA, V., GURU, P.Y. Iridoids: a new class of leishmanicidal agents from *Nyctanthes arbortristis*. *J. Nat. Prod*, v.54, p.1102–1104, 1991.

TATTERSFIELD, F.; POTTER, C. The insecticidal properties of certain species of *Annona* and of an Indian strain of *Mundulea sericea* ("Supli"). *ANNALS OF APPLIED BIOLOGY*, v. 27, p. 262-73, 1940.

TDR. Natural products for the treatment of parasitic diseases. *TDR news*, n.62, 2000.

TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.E.T.; ANDRADE Jr.; H.F.; GUALDA, N.C.A.; YOGI, A.; CARVALHO, C.S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D.C.H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloids producing families. *Phytomedicine*, v. 12, p. 382-390, 2005.

TEWARY, P.; SUKUMARAN, B.; SAXENA, S.; MADHUBALA, R. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides are potent enhancers of protective immunity in mice immunized with recombinant ORFF leishmanial antigen. *Vaccine*, v. 22, p. 3053-3060, 2004.

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

TIANGDA, C.H.; GRITSANAPAN, W.; SOOKVANICHSILP, N.; LIMCHALEARN, A. Anti-headlice activity of a preparation of *Annona squamosa* seed extract. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, v. 31, 2000.

TITOV, S. Antioxidant activities of some local Bangladeshi fruits (*Artocarpus heterophyllus*, *Annona squamosa*, *Terminalia bellirica*, *Syzygium samarangense*, *Averrhoa carambola* and *Olea europaea*. *Shengwu Gongcheng Xuebao*, v. 23, n. 2, p. 257-261, 2007.

TORKELSON, A.R. *The cross name index to medicinal plants: scientific names*. v. 3. Boca Raton: CRC Press, 1996. p.772.

TORRES-SANTOS, E.C; MOREIRA, D.L.; KAPLAN, M.A.C; MEIRELLES, M.N.; BERGMANN, B.R. Selective effect of 2,6-dihydroxy- 4-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* on *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Ch*, v. 43, p. 1234-1241, 1999.

TRACY, J.B.; WEBSTER JUNIOR, L.T. Drugs used in the chemotherapy of protozoal infections: Trypanosomiasis, Leishmaniasis, Amebiasis, Giardiasis, Trichomoniasis and other protozoal infection. In: HARDMAN, J.G.; GILMAN A.G.; LIMBIRD L.E., eds. *Goodman & Gilman's. The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9. ed. McGraw-Hill Companies, 1996. p. 987-100

TRIMURTI, N. Alkaloid from *Annona squamosa* leaves. *Journal of the Indian Institute of Science*, v. 7, p. 232-4, 1924.

URZUA, A.; CASSELS, B. K. Preliminary study of *Annona cherimolia* alkaloids. *Revista Latinoamericana de Quimica*, v. 8, n. 3, p. 133-4, 1977.

VALLEJOS, G.; CASSELS, B.K.; REZENDE, M.C.i; SEPULVEDA, S., Total synthesis of annofolin. *Synthetic Communications*, v. 29, n. 5, p. 809-814, 1999.

VEGA, M.R. G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L; BRAZ-FILHO, ECHEVARRIA, R.A. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. *J. Braz. Chem. Soc.*, v. 18, n. 8, p.1554-1559, 2007.

VENNERSTROM, J.L., LOVELACE, J.K., WAITS, V.B., HANSON, W.L., KLAYMAN, D.L. Berberine derivatives as leishmanial drugs. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.34, p.918-921, 1990.

VILLAESCUSA, L., DIAZ-LANZA, A.M., MARTIN, T., GASQUET, M., DELMAS, F., BALANSARD, G. Preliminary screening of antiprotozoal activity of *Jasonia glutinosa* aerial parts. *Int. J. Pharmacogn.*, v.34, p.303–304, 1996.

VILLAESCUSA, L., DIAZ-LANZA, A.M., GASQUET, M., DLEMAS, F., OLLIVIER, E., BERNABE, M., FAURE, R., ELISA, R., GALANSARD, G. Antiprotozoal activity of sesquiterpene from *Jasonia glutinosa*. *Pharm. Biol.*, v.38, n.3, 176–180, 2000.

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

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J. L. Flavonoids from *Annona cherimolia* Mill. Leaves. *Plantes Medicinales et Phytotherapie*, v. 18, n. 4, p. 233-6, 1984.

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J. L.; CORTES, D. Fac. Alkaloids from *Annona cherimolia* leaves. *Journal of Natural Products*, v. 48, n.1, p. 151-2, 1985.

VOHORA, S. B.; KUMAR, I.; NAQVI, S. A. H. Phytochemical, pharmacological, antibacterial and antiovolatory studies on *Annona squamosa*. *Planta Medica*, v. 28, n. 1, p. 97-100, 1975.

WAECHTER, A.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; BORIES, C.; MUÑOZ, V.; FOURNET Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytotherapy Research*, v. 13, p.175-177, 1999.

WAECHTER, A I : FERREIRA, M E : FOURNET, A : ROJAS DE ARIAS, A : NAKAYAMA, H : TORRES, S : HOCQUEMILLER, R : CAVE, A Experimental treatment of cutaneous leishmaniasis with argetilactone isolated from *Annona haematantha*. *Planta Med.*, v.63, n.5, p.433-435, 1997.

WAECHTER, A.I., FERREIRA, M.E., FOURNET, A., ARIAS, A.R., NAKAYAMA, H., TORRES, S., HOCQUEMILLER, R., CAVE', A., Experimental treatment of cutaneous leishmaniasis with argetilactone isolated from *Annona haematantha*., *Planta Med.*, V.63, P.433–435, 1997.

WAECHTER, A.I., CAVE', A., HOCQUEMILLER, R., BORIES, C., MUNOZ, V., FOURNET, A., 1999. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytother. Res.* 13, 175–177.

WAECHTER, A.; YALUFF, G.; INCHAUSTI, A.; ARIAS, A. R.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; FOURNET, A. Leishmanicidal and Trypanocidal Activities of Acetogenins Isolated from *Annona glauca* *Phytotherapy Research*, vol. 12, 541–544, 1998.

WAECHTER, A.; FERREIRA, M. E.; FOURNET, A.; ARIAS, A. R.; NAKAYAMA, H.; TORRES, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Experimental Treatment of Cutaneous Leishmaniasis with Argentilactone Isolated from *Annona haematantha*. *Planta Med*, v.63, p.433-435, 1997.

WAGNER, H., BLADT, S. *Plant drug analysis : a thin layer chromatography atlas*. Berlin: Springer, 1996. p. 195-196.

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

WANG, N.; GUO, S. 2006. Preparation of isocorydine ophthalmic formulations. *CN Patent No.1739508 A* 20060301

WARTHEN, D.; GOODEN, E.L.; JACOBSON, M., Tumor inhibitors: liriodenine, a cytotoxic alkaloid from *Annona glabra*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 58, n. 5, 637-8, 1969.

WEEKLY EPIDEMIOLOGICAL RECORD, NO. 44, 1 NOVEMBER 2002

WEI, X.; XIE, H.; WU, S.; ZHENG, X.; LIU, M.; YANG, R. Annonaceous acetogenins with antitumor activity and its preparing. (Huanan Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Peop. Rep. China). *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2002. 12 pp.

WEINMAN, D. Effects of gramicidin and tyrocidine on pathogenic protozoa and a spirochete. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v.54, p.38–40, 1943.

WELE, A.; NDOYE, I.; BADIANE, M. Fatty acid and essential oil compositions of the seed oil of five *Annona* species. *Nigerian Journal of Natural Products and Medicine*, v. 8, p. 62-65, 2004.

WENIGER, B.; VONTHRON-SENECHEAU, C.; ARANGO, G. J.; KAISER, M.; BRUN, R.; ANTON, R. A bioactive biflavonoid from *Camptosperma panamense*. *Fitoterapia*, v. 75, n. 7-8, p. 764-767, 2004.

WENIGER, B., ROBLEDO, S., ARANGO, G.J., DEHARO, E., ARAGON, R., MUNOZ, V., CALLAPA, J., LOBSTEIN, A., ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J. Ethnopharmacol.* v.78, p.193–200, 2001.

WERBEL, L.M.; WORTH, D.F. Antiparasitics agents protozoal disease. *Ann. Rep. Med. Chem.*, p.120–129, 1980.

WIART, C.; AU, T.S.; MOHD, Y.; HAMIMAH, H.; SULAIMAN, M., 16- α -Hydroxy-(-)-kauran-19-oic acid: An antibacterial diterpene from sweet apple (*Annona squamosa* L., Annonaceae) *International Journal of Pharmacology*, v. 1, n. 3, p. 296-298, 2005.

WIERSEMA, J.H.; LEÓN, B. World economic plants: a Standard reference. *Boca Raton: CRC Press*, 1999. p. 43.

WHO, Report of the Fifth Consultative Meeting on *Leishmania*/HIV Coinfection Addis Ababa, 2007

WHO. World Health Organization 2002. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis (<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>). Acessado em 04/02/2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Urbanization: an increasing risk factor for leishmaniasis. *Weekly Epidemiological Record*. v. 77, n. 44, p. 365-372, 2002. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en/> Acessado em 05/03/2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Division of control of tropical disease. Leishmaniasis control. Geographical distribution. 2005. WHO/CTD. Disponível em: <http://www.who.int/ctd/html/leisgeo.html>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION 2000. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. Geneva. Document No. WHO/EDM/TRM/2000.1

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 2007. *Quality assurance of pharmaceuticals. A compendium of guidelines and related materials Good manufacturing practices and inspection. vol.2 (2nd edn)* Geneva.

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

WU, Y.-C.; CHANG, F.-R.; CHEN, C.-Y., Tryptamine-Derived Amides and Alkaloids from the Seeds of *Annona atemoya*. *Journal of Natural Products*, v. 68, n. 3, p. 406-408, 2005.

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

WU, Y.-C.; HUNG, Y.-C.; CHANG, F.-R.; COSENTINO, M.; WANG, H.-K.; LEE, K.-H., Identification of ent-16 β , 17-Dihydroxykauran-19-oic Acid as an Anti-HIV Principle and Isolation of the New Diterpenoids Annosquamosins A and B from *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*, v. 59, n. 6, p. 635-637, 1996.

XIE, H. H.; WEI, X. Y.; WANG, J. D.; LIU, M. F.; YANG, R. Z. A new cytotoxic acetogenin from the seeds of *Annona squamosa*. *Chinese Chemical Letters*, v. 14, n. 6, p. 588-590, 2003.

XU, L.; LI, K.; SUN, N.; KONG, J., Alkaloids of *Annona reticulata*. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, v. 17, n. 5, p. 295-6, 1992.

YAN, T.; YANG, Y.; AI, T. Determination of protopine and isocorydine in root of *Dactylicapnos scandens* by HPLC. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, v. 29, n. 10, p. 61-963, 2004.

YANG, R. Polyacetyl acetogenins for eliminating HIV virus and treating AIDS. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2000, 14 pp.

YANG, R.; ZHENG, X.; QIN, G.; XU, R. Squamosinin A: a novel para-tris-tetrahydrofuranyl annonaceous acetogenins. *Zhiwu Xuebao*, v. 36, n. 10, p. 809-8012, 1994.

YANG, R.; ZHENG, X.; WU, S.; WEI, Q. Annonsilin A - a novel seco-tris-tetrahydrofuranyl annonaceous acetogenin. *Zhiwu Xuebao*, v. 37, n. 6, p. 492-495, 1995.

YANG, R.; ZHENG, X.; WU, S.; XIE, H.; WEI, X. Study on chemical constituent of *Annona squamosa*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, v. 22, n. 1, p. 71-74, 2000.

YANG, R.; ZHENG, X.; XIE, H.; WU, S.; WEI, X. Study on chemical constituents of *Annona squamosa*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, v. 21, n. 3, p. 381-385, 1999.

YANG, R.; ZHENG, X.; WU, S.; WEI, X.; XIE, H. Study on chemical constituents of *Annona squamosa*. *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, v. 21, n. 4, p. 517-520, 1999.

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

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

YANG, D.M., LIEW, F.Y., Effects of qinghaosu (artemisinin) and its derivatives on experimental cutaneous leishmaniasis., *Parasitology*, v.106, p.7-11, 1993.

YANG, T.H.; LIN, S.J.; WANG, H.C., Studies on the constituents of *Annona cherimola*, structure of anomoline, *Zhonghua Yaoxue Zazhi*, v. 43, n. 6, p. 457-63, 1991.

YANG, T.H.; CHEN, C.-M., Studies on the alkaloids of *Annona glabra* L. II Proceedings of the National Science Council, Part 2 *Biological, Medical and Agricultural Sciences*, v. 7, p. 177-84, 1974.

YANG, T.; CHEN, C. Structure of squamolone, a novel diazepine from *Annona squamosa*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 19, n.3, p. 149-51, 1972.

YANG, T.; CHEN, C. Studies on the alkaloids of *Annona glabra*. II. *Taiwan Yaoxue Zazhi*, v. 25, n. 1-2, p. 1-7, 1973.

YANG, T.; CHEN, C. Constituents of *Annona squamosa*. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 17, n. 4, p. 243-50, 1970.

YANG, T.; CHEN, C. Studies on the alkaloids of *Annona montana* Macf. *Proceedings of the National Science Council, Republic of China*, v. 3, n.1, p. 63-6, 1979.

YANG, T.; CHEN, C.; KONG, H. Constituents of anonaceous plants grown in Taiwan. I. Alkaloids of *Annona reticulata*. *Taiwan Kexue*, v. 24, n. 3-4, p. 99-104, 1970.

YANG, T.; CHEN, C.; KONG, H. Constituents of anonaceous plants. I. Alkaloids of *Annona reticulata*. *Beiyi Xuebao*, v. 3, p. 130-5, 1973.

YANG, T.; CHEN, C.; KUAN, S. Alkaloids of *Annona glabra*. I. Isolation of (-)-N-methylactinodaphnine. *Journal of the Chinese Chemical Society*, v. 18, n. 3, p. 133-6, 1971.

YANG, Y.; CHANG, F.; WU, Y. Squadinorlignoside: A novel 7,9'-dinorlignan from the stems of *Annona squamosa*. *Helvetica Chimica Acta*, v. 88, n. 10, p. 2731-3737, 2005.

YANG, Y.; CHANG, F.; WU, C.; WANG, W.; WU, Y. New ent-Kaurane Diterpenoids with Anti-Platelet Aggregation Activity from *Annona squamosa*. *Journal of Natural Products*, v. 65, n.10, p. 1462-1467, 2002.

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

YANG, Y.; HUA, K.; CHUANG, P.; WU, S.; WU, K.; CHANG, F.; WU, Y.. New Cyclic Peptides from the Seeds of *Annona squamosa* L. and Their Anti-inflammatory Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.2, p.386-392, 2008.

YEH, S.; CHANG, F.; WU, Y.; YANG, Y.; ZHUO, S. HWANG, T. An anti-inflammatory ent-kaurane from the stems of *Annona squamosa* that inhibits various human neutrophil functions. *Planta Medica*, v. 71, n. 10, p. 904-909, 2005.

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

YU, J.; LUO, X.; SUN, L.; LI, D.; HUANG, W.; LIU, C.. Chemical constituents from the seeds of *Annona squamosa*. *Yaoxue Xuebao*, v. 40, n. 2, p. 153-158, 2005.

YU, J.; LUO, X.; SUN, L.; LIU, C.; HONG, S.; MA, L. Squamostatin-B, a new polyketide from *Annona squamosa* (Annonaceae). *Chinese Chemical Letters*, v. 4, n. 5, p. 423-426, 1993.

YU, J.; WANG, D.; LUO, X.; WANG, Y.; SUN, L. Antineoplastic and insecticidal total annonacin and preparing process thereof. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 1999. 9 pp.

ZHAI, L.; BLOM, J., CHEN, M., CHRISTENSEN, S.B.; KHARAZMI, A., The antileishmanial agent licochalcone A interferes with the function of parasite mitochondria, *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.39, p.2742-2748, 1995.

ZHANG, H., Dactylicapnos scandens injection preparation and its preparation method. *CN Patent No.* 1686464 A 20051026, 2005

ZHANG, Y. *Annona squamosa* expoxyrolin B for cancer therapy. (Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Peop. Rep. China). *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2006, 7pp.

ZHANG, Y. *Annona squamosa* expoxyrolin B for cancer therapy. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2006 b. 7pp.

ZHANG, Y. Method for preparation of intrabin from *annona squamosa* linn and its application in preparation of anticarcinogen. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2006c. 7pp.

ZHANG, Y. Preparation of *Annona squamosa* lactone antitumor monomer compound and its application for preparing antitumor agent. *Faming Zhuanli Shenqing Gongkai Shuomingshu*, 2006.

ZHENG, X.; YANG, R.; QUIN, G.; XU, R.; FAN, D. Three novel chemical compounds of annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. *Zhiwu Xuebao*, v. 37, n. 3, p. 238-243, 1995.