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

Aspectos químicos, botânicos e avaliação de atividades
antiprotozoárias de *Duguetia lanceolata* St. Hil.
(Annonaceae)

SONIA VALÉRIA BONOTTO

Dissertação para a obtenção do grau de
MESTRE

ORIENTADORA:
PROFª. DRª. DOMINIQUE CORINNE
HERMINE FISCHER

SÃO PAULO
2005

(Nota da BCQ: Não foi possível capturar fielmente a imagem das figuras desta dissertação)

DEDALUS - Acervo - CQ

30100011031

Ficha Catalográfica

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

Bonotto, Sonia Valéria

B719a Aspectos químicos, botânicos e avaliação de atividades
antiprotzoárias de *Duguetia lanceolata* St.Hil. (Annonaceae). /
Sonia Valéria Bonotto. -- São Paulo, 2005.
112p.

Dissertação (mestrado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia.

Orientador: Fischer, Dominique Corinne Hermine

1. Annonaceae : Farmacognosia 2. *Duguetia lanceolata* St.
Hil. : Farmacognosia I. T. II. Fischer, Dominique Corinne
Hermine, orientador.

615.323115 CDD

Sonia Valéria Bonotto

Aspectos químicos, botânicos e avaliação de atividades
antiprotzoárias de *Duguetia lanceolata* St. Hil. (Annonaceae)

Comissão Julgadora
da
Dissertação para obtenção o grau de Mestre

Profa. Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer
Orientadora/presidente

André Gustavo Tempone Cardoso
1º. examinador

Melânia Lopes Cornélio
2º. Examinador

São Paulo, 17 de Agosto de 2005.

*O segredo de uma vida empolgante não está em
descobrir maravilhas, mas em procurá-las.*

Augusto Ruschi

*Aos meus pais
Odair e Aparecida, pelo amor e auxílio dedicado durante
toda a minha vida.*

*Ao Cláudio, pelo amor, paciência e auxílio durante o
desenvolvimento deste trabalho.
Às nossas pequenas, Larissa e Ana Lara que nos ensinam a
perceber a cada dia a grandeza e a beleza da vida.*

AGRADECIMENTOS

À professora Dra. Dominique Corinne Hermine Fischer pela orientação, apoio e amizade dedicada durante o tempo de realização deste trabalho.

À Coordenação e Secretaria do Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP, pelo auxílio e apoio durante todo o período do curso.

Aos professores da disciplina de Biofarmacognosia do Departamento de Farmácia da FCF/USP, em especial ao Prof. Dr. Vicente de Oliveira Ferro pelo aceite como orientador provisório.

Ao Prof. Dr. Renato de Mello e Silva do Instituto de Biociências da USP, pela identificação botânica da espécie vegetal em estudo.

Às pesquisadoras Silvia di Santi, Karin Kirchgatter e à auxiliar Priscilla E. Avila do Núcleo de Estudos em Malária da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), pelos testes de atividade antimalárica *in vitro*.

À Dra. Maria Inês Gonçalves, pelo registro dos espectros de RMN ^1H e RMN ^{13}C e pelas sugestões na interpretação do espectro no IV.

Ao Dr. Carlos Alberto Brandt do Instituto Butantã, pelo dedicado auxílio na determinação estrutural do composto isolado.

Ao Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. e ao pesquisador Dr. André Gustavo Tempone do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, pelos ensaios de atividade anti-leishmania, anti-tripanosoma e de citotoxicidade.

À Professora Dra. Berta Lange de Morretes do Instituto de Biociências, pelos ensinamentos acadêmicos e lições de vida, transmitidos durante nossa convivência.

À Vilma Mezo, companheira e amiga de todas as horas por compartilhar idéias e ideais. Obrigada por sua grande generosidade.

Aos amigos e colegas de trabalho, Tatí, Biba, Raquel, Thaís, Andréia, Roberto, André, Cristiano, Carlindo pela amizade.

Aos funcionários Roberto de Jesus Honório pelo auxílio técnico em laboratório, juntamente com sua amizade; Lúcia pelos bate-papos descontraídos e conversas “astrológicas” e à Elisabete Paiva pela eficiência, interesse e, principalmente, carinho pelos alunos da pós-graduação.

A todos os funcionários da Biblioteca do Conjunto das Químicas, pelo auxílio prestados na realização das pesquisas e pela revisão bibliográfica.

À FAPESP, pela concessão do Auxílio à Pesquisa, que permitiu a aquisição de todo o material de consumo e a aquisição de aparelhos, sem os quais o projeto não teria sido viável.

À família Razaboni, em especial à “tia Dulce”, pelo apoio emocional e pelos serviços de “baby care” dedicado às nossas pequenas.

A todos não mencionados, mas que direta ou indiretamente auxiliaram na conclusão deste trabalho.

CONTEÚDO

1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Aspectos botânicos.....	03
1.1.1. Generalidades	03
1.1.2. Sinonímia científica.....	04
1.1.3. Sinonímia vulgar	04
1.1.4. Características morfológicas da família Annonaceae Jussieu.....	05
1.1.5. Características morfológicas do gênero <i>Duguetia</i> Saint Hilaire.....	06
1.1.6. Caracteres anatômicos foliares da família Annonaceae Jussieu	08
1.1.7 Caracteres anatômicos foliares do Gênero <i>Duguetia</i> Saint Hilaire	09
1.2. Aspectos químicos	10
1.2.1. Família Annonaceae	10
1.2.2. Gênero <i>Duguetia</i>	12
1.2.3. <i>D. lanceolata</i>	24
1.3. Usos de espécies da família Annonaceae	24
1.4. Aspectos de atividade biológica relacionados à família Annonaceae e ao gênero <i>Duguetia</i>	26
2. OBJETIVOS	30
3. MATERIAL E MÉTODOS	32
3.1. Material botânico	33
3.2. Estudo botânico	33
3.3. Estudo químico	34
3.3.1. Preparo do material vegetal	34
3.3.2. Extração	34
3.3.2.1. Extração do material vegetal	34
3.3.2.2. Obtenção dos alcalóides totais e determinação do teor	35
3.3.3. Acetilação dos alcalóides totais.....	35
3.4. Análises cromatográficas	37
3.4.1. Cromatografia em camada delgada	37
3.4.2. Cromatografia em camada delgada (CP)	37
3.4.2.1. Fração DL-3	37

3.4.3. Coluna filtrante(CF) à pressão reduzida	38
3.5. Análise espectroscópica do alcalóide isolado	39
3.6. Avaliação da atividade biológica	39
3.6.1. Avaliação da atividade antimalárica <i>in vitro</i>	39
3.6.2. Avaliação da atividade anti-leishmania frente as formas promastigotas.....	40
3.6.3. Avaliação da atividade anti-tripanosoma	42
3.6.4. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i>	43
3.6.5. Avaliação da atividade citotóxica sobre <i>Artemia salina</i>	43
4. RESULTADOS	45
4.1. Estudo botânico.....	46
4.1.1. Caracterização macroscópica de folha transformada em droga	47
4.1.2. Caracterização microscópica.....	49
4.1.2.1. Lâmina foliar	49
4.1.2.2. Nervura mediana.....	57
4.1.2.3. Pecíolo	60
4.2. Estudo químico	64
4.2.1. Teor de alcalóides totais	64
4.2.2. Análise cromatográfica dos alcalóides de <i>D. lanceolata</i>	64
4.2.3. Determinação da massa dos resíduos das frações	66
4.2.4. Separação de componentes da fração alcaloídica total acetilada	66
4.2.5.Dados espectrais da substância DL-3/5	68
4.3. Avaliação de atividade biológica	72
4.3.1. Avaliação da atividade antimalárica <i>in vitro</i>	72
4.3.2. Avaliação da atividade anti-leishmania, anti-tripanosoma e citotóxica sobre células de camundongos	72
4.3.3. Avaliação da atividade citotóxica <i>in vitro</i> sobre <i>Artemia salina</i>	74
5. DISCUSSÃO.....	75
5.1. Estudo botânico	76
5.2. Estudo químico.....	80
5.3. Atividade biológica.....	86
6 CONCLUSÕES	91
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Alcalóides isoquinolínicos isolados a partir de espécies do gênero <i>Duguetia</i>	13
Tabela 2 - Componentes não alcaloídicos isolados a partir de espécies <i>Duguetia</i> e suas atividades biológicas.	23
Tabela 3 - Atividades antiparasitária e citotóxica de alcalóides isolados e alcalóides totais de Annonaceae.....	27
Tabela 4 - Atividades antiparasitária e citotóxica de outras frações orgânicas de Annonaceae.....	29
Tabela 5 - Sistemas cromatográficos (SC) empregados, nas análises, por CCD de extratos alcaloídicos e fração DL3 de <i>D.lanceolata</i>	37
Tabela 6 - Seqüência de eluentes utilizados na separação dos alcalóides totais acetilados, por coluna filtrante (CF), à pressão reduzida.	38
Tabela 7 - Cromatograma em camada delgada comparativo entre os alcalóides totais (AT) e alcalóides totais acetilados (ATacet) de <i>D. lanceolata</i> [SC-2:diclorometano-metanol (93,5:6,5)]	64
Tabela 8 - Cromatograma em camada delgada comparativo entre a fração de alcalóides totais acetilados (ATacet), fração DL-3 e o alcalóide isolado DL3/5 de <i>D. lanceolata</i> [SC-3:diclorometano-metanol (92,5:7,5)]	65
Tabela 9 - Valores de massa (mg) dos resíduos das frações de alcalóides totais acetilados (DL), obtidas pelo fracionamento, por CF.	66
Tabela 10 - Concentração Inibitória de 50% dos parasitas (CI ₅₀) para o extrato etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados de <i>Duguetia lanceolata</i> , frente às cepas de <i>P. falciparum</i> sensível (PA) e resistente (K-1) à cloroquina	72
Tabela 11 - Avaliação da atividade dos extratos de <i>D. lanceolata</i> (etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados) sobre <i>Leishmania (L.) chagasi</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e citotoxicidade frente a células RAW-264.7 de camundongos.	73
Tabela 12 - Avaliação da atividade citotóxica dos extratos (etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados) de <i>D. lanceolata</i> sobre <i>Artemia salina</i>	74
Tabela 13 - Valores de absorção (n, cm ⁻¹), na região do infravermelho, referentes ao registro de espectro de DL3/5 (Figura 22) e de N-acetilanonaína (GUINAUDEAU et al., 1979)	83
Tabela 14 - Dados espectrais de RMN 1H dos isômeros Z e E da substância DL3/5 (Figura 23) (400 MHz, CDCl ₃) e de N-acetilanonaína (GUINAUDEAU et al, 1994; NONATO et al., 1990).....	84
Tabela 15 - Dados espectrais de RMN de 13C dos isômeros Z e E da substância DL-3/5 (Figura 24) (75 MHz, CDCl ₃) e de N-acetilanonaína (GUINAUDEAU et al, 1994; NONATO et al., 1990).....	85

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da espécie <i>D. lanceolata</i> (HE e MAAS, 1993) (modificado)	04
Figura 2 - Núcleos estruturais de classes de alcalóides isoquinolínicos de ocorrência mais freqüente na família Annonaceae.....	12
Figura 3 - Estruturas de alcalóides isoquinolínicos isolados de espécies de <i>Duguetia</i>	18
Figura 4 - Estruturas de componentes não-alcaloídicos isolados de espécies de <i>Duguetia</i>	24
Figura 5 - Esquema de obtenção dos alcalóides totais de <i>Duguetia lanceolata</i> St. Hil	36
Figura 6 - <i>Duguetia lanceolata</i> St. Hil. - 6A. Hábito. 6B. Detalhe da casca de caule. 6C - Ramo com fruto (seta).....	46
Figura 7 - <i>Duguetia lanceolata</i> St. Hil. Droga. 7A. Aspecto geral (escala= 10mm). 7B. Folhas distendidas. 7C. Padrão de venação (escala= 5mm). 7D. Face abaxial. Presença de escamas (pontos claros) (escala= 5mm)	48
Figura 8 - <i>Duguetia lanceolata</i> St. Hil. Lâmina foliar. Secção transversal. 8A. Mesofilo dorsiventral. Detalhe de escama lignificada na face abaxial (seta) e presença de substâncias de natureza fenólica nos feixes vasculares de menor porte (conteúdo escuro). 8B. Detalhe de mesofilo e de célula secretora de óleo essencial (sc). 8C. Secção transversal. Detalhe de face adaxial com presença de drusas nas células epidérmicas (uma por célula) (seta).....	51
Figura 9 - <i>Duguetia lanceolata</i> St.Hil. Folha. Vista frontal da face adaxial. 9A. Células epidérmicas de paredes anticlinais sinuosas. 9B. Detalhe de paredes celulósicas espessas e de drusas distribuídas em número de uma por célula (setas)	52
Figura 10 - <i>Duguetia lanceolata</i> St.Hil. Folha. Vista frontal da face abaxial 10A. Detalhe de estômatos paracíticos. 10B. Detalhe de escamas lignificadas inteira (int) e estrelada (est).....	53
Figura 11 - <i>Duguetia lanceolata</i> St.Hil. Indumento. Escamas lignificadas com diferentes graus de soldadura das células. 11A e 11B. Detalhe de escamas inteiras. 11C a 11F. Escamas estreladas.....	54
Figura 12 - <i>Duguetia lanceolata</i> St.Hil. Folha. Secção transversal de lâmina foliar. 12A. Detalhe de bainha do feixe vascular lignificada (bf) e extensão de bainha do feixe com duas fileiras de células (seta) 12B. Detalhe de extensão de bainha do feixe com uma fileira de células (seta) 12C. Detalhe de células coletoras no mesofilo (seta)	55

- Figura 13 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Secção transversal de lâmina foliar (não clarificada). 13A. Detalhe de célula secretora (cs) no parênquima paliçádico. 13B. Presença de substâncias de natureza fenólica (conteúdo celular escuro reagindo com cloreto férrico), no parênquima clorofiliano e na epiderme..... 56
- Figura 14 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Secção transversal de nervura mediana. 14A. Disposição do tecido vascular. Detalhe de escama lignificada na face abaxial (seta) 14B. Detalhe de feixes vasculares colaterais..... 58
- Figura 15 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Secção transversal de nervura mediana. 15A . Face adaxial. Detalhe de colênquima (col) e de extratos de fibras (f), na extremidade do arco vascular. 15B. Secção não clarificada. Presença de amiloplastos, evidenciada, como conteúdo celular escuro com reativo de lugol, na região do sistema vascular e interna a este. x= xilema; f= floema 59
- Figura 16 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Secção transversal de pecíolo. 16A. Aspecto geral. 16B. Detalhe de face adaxial com tricomas tectores estrelares (seta) e de região da face abaxial com escama lignificada (e). 16C. Detalhe de região da face abaxial, com grupo de esclereídes (escl) e escama na superfície (e) 61
- Figura 17 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Secção transversal de pecíolo. 17A. Detalhe de tricomas tectores estrelados (seta) na face adaxial. 17B. Secção não clarificada, mostrando a presença de drusas dispersas no tecido parenquimático na região da face abaxial (seta)..... 62
- Figura 18 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Secção transversal de pecíolo. 18A. Detalhe do sistema vascular e de célula secretora na região de xilema (seta) 18B. Detalhe de feixe vascular colateral e de células da região perivascular contendo grãos de amido (a) 63
- Figura 19 - Esquema geral do fracionamento dos alcalóides totais acetilados de *Duguetia lanceolata* St. Hil..... 67
- Figura 20 - *D. lanceolata* St. Hil. – Espectro na região do IV da substância DL-3/5 (pastilhas de NaCl) 69
- Figura 21 - *D. lanceolata* St. Hil. – Espectro de RMN de ^1H da substância DL-3/5 (300 MHz, CDCl_3) 70
- Figura 22 - *D. lanceolata* St. Hil. – Espectro de RMN de ^{13}C da substância DL-3/5 (75 MHz, CDCl_3) 71
- Figura 23 - Percentual de sobrevivência de *T. cruzi* frente ao tratamento com os alcalóides totais de *D. lanceolata* em relação ao Benznidazol (fármaco de referência)..... 73
- Figura 24 - Equilíbrio conformacional da *N*-acetilanonaína 83

RESUMO

No presente trabalho, realizou-se o estudo químico da fração alcaloídica total de *Duguetia lanceolata* St. Hil. (Annonaceae), espécie proveniente do cerrado paulista, tendo-se obtido o perfil cromatográfico e a separação de componentes da fração alcaloídica, que resultou na obtenção do alcalóide aporfínico majoritário *N*-acetilanonaína, isolado da espécie, pela primeira vez. No estudo botânico de folhas, foram descritas as características da morfologia externa e interna, tendo sido ilustradas por fotografias e fotomicrografias dos itens mais importantes para a diagnose da droga caracteres xeromórficos, como: consistência coriácea, cutícula espessa, escamas e tricomas tectores estelares nas epidermes, presença de bainhas e grandes grupos de células esclerenquimáticas freqüentes, na nervura mediana e no pecíolo. Entre outros elementos de destaque encontram-se: a distribuição de drusas na epiderme e a presença de células oleíferas dispersas no mesofilo. A avaliação da atividade antiprotozoária mostrou, de forma geral, que frente ao *Plasmodium falciparum*, os alcalóides totais são mais ativos sobre a cepa resistente à cloroquina (K-1) (CE_{50} :2,0 μ g/mL) o que também foi observado para os mesmos componentes acetilados (CE_{50} :3,0 μ g/mL). Tanto o extrato etanólico, quanto os alcalóides totais (100 μ g/mL) da espécie, demonstraram elevados níveis de atividade frente às formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*, tendo apresentado percentual de morte de cerca de 100% e 66%, respectivamente. Este último, foi comparável ao benznidazol, fármaco usado como referência. Tais resultados são promissores tendo em vista que, os extratos não apresentaram citotoxicidade sobre as células de camundongos (RAW 264.7), até a maior concentração testada (120 μ g/mL). No ensaio de citotoxicidade sobre *Artemia salina*, os extratos etanólico e alcaloídico foram ambos inativos (DL_{50} >1000 μ g/mL), em contraste com os alcalóides totais acetilados que demonstraram nível de toxicidade comparável ao do sulfato de atropina (DL_{50} :867,60 μ g/mL) utilizado como referência, no ensaio.

ABSTRACT

In this work, some chemical, botanical and pharmacological aspects of the brazilian *Duguetia lanceolata* St. Hil (Annonaceae) were considered. The plant specimen was collected from the cerrado biome, at São Paulo, Brazil. The isoquinoline alkaloid fraction was extracted and then acetylated. After performed the chromatographic profile, the column fractionation led to the first isolation of the major aporphine *N*- acetyl-anonaine from this specie. Morphological and anatomical characters of the leaves were described and illustrated by photographs and photomicrographies. Some xeromorphic characters, typical from cerrado species, were recognized: coriaceous leaves, thick cuticle, scales, stellate non-glandular trichomes, sclerenchymatic vascular sheaths and scattered sclerenchymatic cell groups in the median nervure and petiole. Other important features were observed: isolated druses of calcium oxalate in each epidermal cells and oil cells scattered in the mesophyll. Evaluation of the antiprotozoal activity showed that the total alkaloid fraction (EC_{50} :2,0 μ g/mL) and the same acetylated fraction (EC_{50} :3,0 μ g/mL), were more active against the chloroquine resistant strain (K-1) of *Plasmodium falciparum*. The total acetylated alkaloids and the ethanolic extract (100 μ g/mL) were highly active (0% of survival) against trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. In the same test, non acetylated alkaloids (100 μ g/mL) killed about 66% of the parasite forms, having an activity comparable to Benznidazole, the standard drug. Those results were promising, considering the low cytotoxicity showed by the plant extracts (ethanol and total alkaloid) over mice macrophages RAW 264.7, at the maximum tested concentration (120 μ g/mL). The ethanol and total alkaloid extracts showed, also, low levels of cytotoxicity (LD_{50} >1000 μ g/mL), when assayed against the *Artemia salina* while the acetylated alkaloids had a LD_{50} value (843,2 μ g/mL) comparable to the atropine sulphate.

Introdução

1. INTRODUÇÃO

As doenças parasitárias encontram-se entre aquelas de maior ocorrência no mundo, estando amplamente distribuídas. Aproximadamente três bilhões de indivíduos são afetados por protozoários ou helmintos patogênicos (TRACY e WEBSTER, 1996). Dentre estas doenças, destacam-se a malária (ROLL BACK MALÁRIA, 2004; BREMAN, 2001), a leishmaniose (LAINSON e SHAW, 1978) e a doença de Chagas (DIAS e JATENE, 1992) trazendo sérias conseqüências à saúde pública e grande impacto sócio-econômico.

O surgimento da resistência dos vetores destas parasitoses (ADDAE-KYEREME *et al.*, 2001; PHILLIPSON e WRIGHT, 1991; CARVALHO e FERREIRA, 2001) leva, freqüentemente, à ineficácia da terapêutica convencional além de, que, em muitos casos, os fármacos empregados exibem alta toxicidade (PHILLIPSON e COLLIN, 1991; SEPÚLVEDA-BOZA *et al.*, 1996), tornando necessária e urgente a busca de novos agentes terapêuticos.

Uma das fontes mais importantes para a obtenção de novos fármacos é a Natureza, tendo em vista a sua riqueza em componentes que, possuem, potencialmente, as mais diferentes atividades biológicas. Particularmente, considerando a flora brasileira, com a sua grande biodiversidade, constituindo cerca de 50% da flora mundial em plantas superiores, cerca de 5%, somente, foi estudada (KOROLKOVAS e BURCKHALTER, 1982), representando, ainda, vasto campo para a busca de novas moléculas bioativas e/ou de protótipos de interesse.

Neste contexto, a família Annonaceae, que compreende cerca de 2300 espécies (KESSLER, 1993; SCHATZ, 2001), distribuídas em 128 gêneros, entre os quais *Duguetia*, produz metabólitos secundários como: alcalóides, compostos polifenólicos, terpenóides, acetogênicas e esteróis. A presença de alcalóides, inclusive, é uma das características mais importantes da família, sendo a maioria deles de estrutura isoquinolínica (LEBOEUF *et al.*, 1982). Tais compostos, também presentes, no gênero em questão, despertaram particular interesse, em função de sua atividade antiprotozoária, demonstrada em diversas pesquisas, sobretudo, nos últimos 20 anos.

O espectro de ação antiparasitária dos alcalóides isoquinolínicos abrange, entre outras, as atividades antimalárica (IWASA *et al.*, 2001; WRIGHT *et al.*, 2000; ANGERHOFER *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 1993; GUINAUDEAU *et al.*, 1997; SAEZ; VALENTIN *et al.*, 1997; GABUNJU *et al.*, 1995), anti-leishmania

(CAMACHO *et al.*, 2002; CAZORLA *et al.* 2001; BRINGMANN *et al.* 2000; AKEDENGUE *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 1996; FOURNET *et al.*, 1988) e anti-tripanosoma (FOURNET *et al.*, 1988, 1997, 2000; MAHIOU *et al.*, 1994; ROJAS DE A. *et al.*, 1994), o que motivou este projeto.

Considerando a atividade antiprotozoária dos alcalóides isoquinolínicos e a presença destes, no gênero *Duguetia*, selecionou-se a espécie *D. lanceolata* St. Hil. (Annonaceae) conhecida popularmente como pindaíva, pindabuna, corticeira, perovana, pindaúva, cortiça, pinda-uba (LORENZI, 1998), ocorrendo nos estados de São Paulo, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul, na floresta semidecídua de altitude e na mata pluvial atlântica (LORENZI, 1998), permanecendo pouco estudada, até o momento.

Desta forma, buscou-se ampliar o conhecimento acerca desta espécie averiguando, especialmente, sua fração alcaloídica, do ponto de vista químico e do potencial de atividade biológica, incluindo a antiparasitária e a citotóxica e, complementando-se com a caracterização botânica, com vistas a contribuir para a sua identificação.

1.1. Aspectos botânicos

1.1.1. Generalidades

A família Annonaceae A. L. Jussieu possui cerca de 128 gêneros e 2300 espécies apresentando distribuição pantropical (KESSLER, 1993; SCHATZ, 2001). No Brasil, encontra-se representada por cerca de 290 espécies, distribuídas em 27 gêneros. Os representantes desta família habitam florestas quentes e úmidas, em baixas altitudes, sendo raramente encontrados a mais de 1500 m (KESSLER, 1987; HEYWOOD, 1993). O gênero *Duguetia* A.F.C.P. de Saint Hilaire, com cerca de 90 espécies (KOEK-NOORMAN e MAAS, 2003), juntamente com *Guatteria* (250 espécies), *Annona* (cerca de 100 espécies), *Rollinia* (60 espécies), *Xylopia* (160 espécies) (MAAS, 1985), é considerado os mais importantes entre as Annonaceae da região neotropical (MAAS, 1985).

A distribuição das espécies de *Duguetia*, nas Américas, dá-se, desde o Paraguai e Bolívia até a Nicarágua. Ocorrem, igualmente, em Trinidad e Tobago, no mar do Caribe. Na região amazônica, está presente principalmente, desde o Brasil central até o sudoeste e oeste da bacia amazônica e, também, nas Guianas. De forma semelhante, o leste e sudeste brasileiros representam importante centro de ocorrência de espécies endêmicas (ROOSMALEN, 2003).

nas Guianas. De forma semelhante, o leste e sudeste brasileiros representam importante centro de ocorrência de espécies endêmicas (ROOSMALEN, 2003).

Duguetia lanceolata St. Hil., a espécie-tipo (HE e MAAS, 1993), distribui-se pelos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul até o Rio Grande do Sul (Figura 1), habitando, principalmente, a floresta semidecídua de altitude e a mata pluvial Atlântica (LORENZI, 1998).

Figura 1 - Distribuição geográfica da espécie *D. lanceolata* (HE e MAAS, 1993) (modificado).

O termo *Duguetia* foi criado por Saint Hilaire em homenagem ao abade Jacob Joseph Duguet, tendo sido o primeiro a descrever o gênero, bem como a espécie *D. lanceolata* - Saint Hilaire, 1825 – *Flora Brasiliae Meridionalis*, 1:35 t.7. 1825, (ZÁCHIA, 1994) nomenclatura esta, mantida até os dias atuais.

1.1.2. Sinonímia científica

Conforme descrito por Záchia (1994), a denominação *Duguetia* utilizada por St. Hilaire (1825 B) e, posteriormente, por Schlechtendal (1835) e Martius (1841), não foi adotada por Baillon que, em 1868, preferiu usar o nome *Aberemoa* para o gênero, tendo-o aplicado a diversas espécies. Posteriormente, Warming (1873), empregou esta nomenclatura para a espécie *D. lanceolata* (*A. lanceolata* (Saint-Hilaire) E. Warming). Entretanto, em 1934, Fries preferiu manter o binômio *D. lanceolata*, inicialmente empregado, tendo colocado *A. lanceolata* sob sinonímia.

1.1.3. Sinonímia vulgar

Diversas denominações populares são atribuídas a *D. lanceolata*, incluindo: pindaíba-branca, pindaibuna, pindaíba-de-folha-grande (PIO CORRÊA,

1984), cabreúva-vermelha, pindabuna, pindahiba, pindaíba, pindaibuna (DIAS e KINOSHITA, 1996), pindaíva, pindabuna, corticeira, perovana, cortiça, pinda-uba (LORENZI, 1998) e pindaúva (DIAS e KINOSHITA, 1996; LORENZI, 1998).

O nome pindaíba é também aplicado a outras duguetias, como *D. bahiensis* e *D. chrysocarpa* (KOEK-NOORMAN e MAAS, 2003) bem como às espécies provenientes de outros gêneros como *Xylopiá brasiliensis* (MANIERI e CHIMELO, 1989), *Guatteria vilosissima* e *Rollinia emarginata* (PIO CORRÊA, 1984).

A origem da expressão popular “estar na pindaíba”, parece estar relacionada ao fato da polpa da fruta ser muito fina e sem consistência. Diz-se que uma pessoa “está na pindaíba” quando se encontra tão sem recursos que não tem outra alternativa a não ser se alimentar dos frutos desta planta, mesmo sabendo que lhe oferecerá pouco alimento (SILVA e TASSARO, 1996).

1.1.4. Características morfológicas da família Annonaceae Jussieu

A maioria dos representantes desta família é constituída por árvores e arbustos, sendo raramente lianas (CRONQUIST, 1981; RIBEIRO 1999; HEYWOOD, 1993; SPICHIGER e MASCHERPA, 1983; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998), apresentando folhas simples, de margem inteira, com disposição alterna ou dística, sem estípulas e, geralmente, coriáceas (FREIRE, 1943; JOLY, 1979; STEYERMARK *et al.*, 1995; PIO CORRÊA, 1984; CRONQUIST, 1981; SPICHIGER e MASCHERPA, 1983). O indumento é constituído de tricomas simples, estrelados ou escamiformes (STEYERMARK *et al.*, 1995; SPICHIGER e MASCHERPA, 1983; BHATTACHARYYA e JOHRI).

As flores são monóicas, terminais, axilares, opostas ou extra-axilares por concaulescência ou recaulescência, dispostas em fascículos ou em panículas caulinares (CRONQUIST, 1981). O perianto é carnoso, amarelado, esverdeado ou purpúreo, diferenciado em cálice e corola (JOLY, 1979). As brácteas podem estar presentes ou ausentes. O cálice é, geralmente, dialissépalo, imbricado ou valvar e o receptáculo é alongado. Há numerosos estames, raramente laminares (SPICHIGER e MASCHERPA, 1983; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998). As anteras extrorsas ou introrsas, biloculares possuem lóculos alongados, rimosos ou com locelos transversais, sendo freqüentemente terminadas por conectivo expandido e truncado. Os carpelos são livres entre si e dispõem-se laxa ou densamente, formando, em alguns gêneros, um pseudosincarpo com um a dois óvulos basais.

O estilete pode, ou não, estar presente (SCHATZ, 2001; STEYERMARK *et al.*, 1995; HEYWOOD, 1993).

O fruto é apocárpico ou sincárpico constituído de carpídios (1-400), sésseis ou estipitados, secos ou carnosos, deiscentes ou indeiscentes, livres entre si, ou reunidos em massa estrobiliforme. (DIAS e KINOSHITA, 1996; HUTCHINSON, 1964; SCHATZ, 2001;).

As sementes (uma a mais de 20 por carpídio) elipsóides a obovóides com testa brilhante podem, ou não, apresentar arilo. O endosperma é ruminado e o embrião basal muito reduzido (BARROSO, 1978; HUTCHINSON, 1964; BHATTACHARYA e JOHRI, 1998; DIAS e KINOSHITA, 1996; SPICHIGER e MASCHERPA, 1983;).

1.1.5. Características morfológicas do gênero *Duguetia* Saint Hilaire

As espécies do gênero *Duguetia* são arbóreas ou arbustivas (MAAS, *et al.*, 2003; ZÁQUIA, 1994; SETTEN e KOEK-NOORMAN, 1992; HE e MAAS, 1993), com inflorescências (sub) oposifólias, organizadas em ripídios paucifloros a plurifloros ou, em inflorescências terminais, ou ainda com flores simples (ZÁQUIA, 1994; HE e MAAS, 1993).

As flores apresentam três sépalas de pré-floração valvar, livres ou levemente unidas na base; seis pétalas, imbricadas, algumas vezes valvares, livres; As flores inteiras apresentam androceu sem estaminódios, muitos estames (mais de 25), anteras não loceladas, conectivo com ápice proeminente, sendo cônico ou achatado sobre a antera. Gineceu com muitos carpelos livres, cada ovário com um óvulo basal ereto. (MAAS *et al.*, 2003; ZÁCHIA, 1994; HEUSDEN, 1992) A textura do perianto é membranácea a coriácea (ZÁQUIA, 1994); indumento formado de tricomas estrelados e/ou escamas peltadas adpressas, formadas a partir de tufos de tricomas que saem de um mesmo ponto, sendo que as células que compoem os tufos (raios) são soldados na base compondo uma estrutura circular radial (HE e MASS, 1993; ZÁQUIA, 1994, MAAS *et al.*, 2003).

O fruto é formado por vários carpelos separados, por vezes, levemente fundidos pela base, formando um conjunto de monocarpós justapostos, e livres entre si, podendo ser destacados sem produzir rupturas. Os carpídios, muitas

vezes, são lenhosos, sempre sésseis e contêm uma única semente (HEUSDEN, 1992; HE e MAAS, 1993; MAAS *et al.*, 2003).

As folhas são simples, inteiras, pecioladas e estipuladas. O contorno da lâmina foliar é, geralmente, elíptico, oval a oboval e a consistência varia de cartácea a coriácea. A superfície é normalmente lisa, o comprimento varia entre 3-45 cm e a largura de 1,5 a 16cm. A base da lâmina foliar pode ser aguda, atenuada, obtusa ou rotunda. O ápice pode ser agudo, acuminado a obtuso. No caso de ápice acuminado, o comprimento da extremidade afilada varia de alguns milímetros até 30mm e, excepcionalmente, pode atingir cerca de 60mm. O padrão de venação foliar é homogêneo e camptódromo, sendo que, em muitas espécies, as nervuras primárias estão impressas na face adaxial. As nervuras secundárias são uniformes ou abruptamente curvas, salientes em ambas as faces.

A face adaxial da lâmina pode ser desde glabra até densamente coberta por tricomas estelares adpressos ou eretos, esbranquiçados ou amarelados, tornando-se glabra com a idade. A face abaxial é esparsa a densamente coberta por escamas fimbriadas a estelares.

O pecíolo reduzido, apresenta comprimento variando entre 0,5 a 15mm e diâmetro de 0,5 a 5mm (HE e MAAS, 1993; MAAS *et al.*, 2003).

Em *Duguetia*, o indumento e a estrutura individual dos tricomas é importante para a delimitação e a identificação das espécies. Segundo He e Maas (1993), os tricomas, presentes no gênero, podem ser classificados, basicamente, em dois tipos: escamas e tricomas estelares. Os mesmos autores referiram-se, ainda, à morfologia diferente de cada um destes tricomas, tendo classificado as escamas segundo o grau de soldadura de suas células (raios), em escamas inteiras ou estelares, e os tricomas estelares em relação à disposição dos raios em relação à superfície do vegetal, em adpressos, eretos e curviformes.

Ainda, segundo He e Maas (1993) a densidade do indumento, também é item a ser observado, em *Duguetia*, variando, nas diferentes espécies e em conformidade com a idade.

1.1.6. Caracteres anatômicos foliares da família Annonaceae Jussieu

Nas anonáceas, de forma geral, os tricomas encontrados são tectores estrelados e peltados (escamas) (METCALFE e CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981; KESSLER, 1993; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998; KESSLER, 1993).

As células epidérmicas, especialmente, as foliares, contêm cristais isolados ou agrupados, sendo que, em muitos gêneros, a sua distribuição possui valor diagnóstico (METCALFE e CHALK, 1950; KESSLER, 1993; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998). A presença de inclusões celulares, na forma de cristais, é mais freqüente, no tecido epidérmico, do que no mesofilo e ao redor dos feixes vasculares das nervuras (METCALFE e CHALK, 1950).

Células secretoras estão presentes, nos parênquimas. Esclereídes, dispostos em grupo à forma de diafragmas são encontrados, geralmente, na região interna aos feixes vasculares, na nervura mediana, enquanto que, células lignificadas de diferentes tipos ocorrem, também, em outras regiões do tecido parequimático (METCALFE e CHALK, 1950; CRONQUIST, 1981).

Geralmente, a epiderme, mostra-se unisseriada, podendo ser plurisseriada, em alguns gêneros, como: *Cleistopholis*, *Ellipeia*, *Miliusa*, *Mitrephora*, *Pachypodanthium* e *Xylopia*. Em algumas espécies, a epiderme da face abaxial apresenta papilas interligadas por cutícula rugosa (METCALFE e CHALK, 1950). Os estômatos são quase sempre paracíticos (CRONQUIST, 1981) e ocorrem, na maioria das vezes, na face abaxial (KESSLER, 1993). O indumento consiste, principalmente, de tricomas com pequeno número de células. Em muitos gêneros, possuem de 3 a 4 células, e em *Asimina* e *Annona*, somente, duas. Os tricomas podem ser lignificados, ou não, chegando a alcançar até 2 a 3mm de comprimento, em *Monanthotaxis poggei*. O indumento pode ser constituído de tricomas tectores estrelados ou tricomas lepidotos, podendo, também, ocorrer tricomas simples, em gêneros como: *Uvaria*, *Duguetia*, *Meiocarpidium*, *Tetrapetalum*, *Anomianthus*, *Annona*, entre outros (KESSLER, 1993).

Geralmente, o mesofilo é dorsiventral (METCALFE e CHALK, 1950; BHATTACHARYYA e JOHRI, 1998). O parênquima paliçádico é formado por duas camadas celulares (KESSLER, 1993). Células secretoras ou células contendo mucilagens podem ser encontradas no parênquima paliçádico (KESSLER, 1993; METCALFE e CHALK, 1985). O parênquima esponjoso é atravessado por

esclereídes, como: astroesclereídes, osteoesclereídes ou outros tipos intermediários. Neste mesmo tecido, podem ocorrer idioblastos contendo cristais de oxalato de cálcio e sílica, bem como células oleíferas (KESSLER, 1993; METCALFE e CHALK, 1985).

Em secção transversal, o pecíolo, na região distal, possui feixes vasculares colaterais distribuídos em arco, amplamente distanciados, sendo que o número de grupos de feixes varia de acordo com o gênero e a espécie (METCALFE e CHALK 1950). Grandes esclereídes podem ser vistos de forma isolada no tecido parenquimático de algumas espécies (METCALFE e CHALK 1950).

1.1.7 Caracteres anatômicos foliares do Gênero *Duguetia* Saint Hilaire

A lâmina foliar, na face abaxial, possui indumento sempre presente, sendo constituído, geralmente, de escamas, freqüentemente acompanhadas de tricomas estrelados adpressos. As células epidérmicas possuem paredes anticlinais retas ou distintamente onduladas.

As paredes periclinais externas são achatadas (sem papilas). Ambas as paredes, anticlinais e periclinais, podem apresentar algum grau de lignificação, sendo mais ou menos espessadas. Os estômatos paracíticos, distribuídos de forma dispersa, na maioria das vezes, encontram-se dispostos no mesmo nível das demais células epidérmicas, sendo que, em algumas espécies, estão posicionados em nível inferior a estas (BAKKER, 2003).

Na face adaxial, o indumento está quase sempre ausente. As células epidérmicas, levemente lignificadas, possuem paredes anticlinais retas na base, e onduladas nas proximidades da superfície foliar. Às vezes, as paredes anticlinais mostram ondulações e/ou espessamentos (BAKKER, 2003).

Em secção transversal, o mesofilo de *Duguetia* mostra-se isofacial ou dorsiventral. A epiderme é uniestratificada, mostrando cutícula lisa mais espessa na face adaxial. A hipoderme está presente em algumas espécies. As células epidérmicas da face adaxial são quadrangulares a tabulares sendo, geralmente, maiores do que aquelas da face abaxial. Por vezes, as paredes periclinais externas são espessadas (BAKKER, 2003).

Ainda, nas células epidérmicas da face adaxial, relata-se a presença de drusas (METCALFE e CHALK, 1950; BAKKER, 2003), sendo que, *Duguetia* foi

incluído, por METCALFE e CHALK (1950), entre os 25 gêneros que apresentam padrão de distribuição de inclusões inorgânicas, na forma de um único cristal isolado ou de cristais agrupados, em cada célula epidérmica.

No mesofilo, há 1 ou 2 camadas de parênquima paliçádico na face adaxial. Nas folhas de mesofilo isofacial ocorre uma camada abaxial. No parênquima esponjoso, as células mostram um arranjo compacto a frouxo. O mesofilo e os feixes vasculares, geralmente, contêm cristais pequenos (aciculares, fusiformes e/ou romboidais) (BAKKER, 2003).

Na nervura mediana, os feixes vasculares dispõem-se em arco e encontram-se separados por faixas de parênquima lignificado. O sistema vascular é fechado, na região adaxial, por uma grande bainha de esclerênquima e, na região abaxial, por células parenquimáticas com paredes de espessura variável (BAKKER, 2003).

Células oleíferas estão presentes no parênquima paliçádico (face adaxial) e, freqüentemente, no parênquima esponjoso, podendo ocorrer no parênquima paliçádico localizado na face abaxial, nas folhas de mesofilo isofacial (BAKKER, 2003).

Na região dos feixes vasculares e na parte mais externa das nervuras primárias, geralmente, observam-se braquiesclereídes dispersos. Em algumas espécies de mesofilo isofacial, há macroesclereídes distribuídos, regularmente, no parênquima paliçádico da face adaxial (BAKKER, 2003).

1.2. Aspectos químicos

1.2.1. Família Annonaceae

Diversos constituintes químicos são encontrados na família Annonaceae. Leboeuf *et al.* (1982) classificaram-nos em alcaloídicos e não-alcaloídicos.

Entre os componentes não alcaloídicos isolados de anonáceas, citam-se: flavonóides, taninos e outros compostos fenólicos, óleo volátil (LEBOEUF *et al.*, 1982) terpenóides (mono, sesqui, di e triterpenos) (HAMONNIÈRE *et al.*, 1977; LEBOEUF *et al.*, 1982; WATERMAN e MUHAMMAD, 1985; BIN JANTAN e BIN AHMAD, 2002) esteróis, carboidratos, lipídeos, aminoácidos e proteínas (LEBOEUF *et al.*, 1982).

Nos últimos anos, as acetogeninas, derivados biossintéticos do ácido acético, têm sido um dos grupos de metabólitos secundários mais pesquisados de Annonaceae (CARVALHO, 1997), sendo que foram isoladas a partir dos gêneros: *Annona*, *Asimina*, *Goniothalamus*, *Rollinia*, *Uvaria* (JOLAD *et al.*, 1982; RIOS, *et al.*, 1989^b; RUPRECHT, HUI e MACLAUGHLIN, 1990; FANG, *et al.*, 1993; RIESER, *et al.*, 1996; JOSSANG, *et al.*, 1991; DABRAH e SNEDEN, 1983; SAEZ *et al.*, 1993; NASCIMENTO *et al.*, 2003), *Xylopia* (COLMAN-SAIZARBITORIA *et al.*, 1994, 1995) e *Porcelia* (CHAVES, 1996).

Entre os triterpenos, o policarpol foi considerado um marcador quimiotaxonômico da família (LEBOEUF *et al.*, 1982), parecendo ocorrer, exclusivamente, neste táxon (JUNG *et al.*, 1990).

Os alcalóides constituem a classe de metabólitos secundários mais freqüentes, na família Annonaceae (GIBBS, 1974), na qual encontram-se diferentes grupos estruturais de núcleo isoquinolínico (Figura 1) entre os quais estão os mais amplamente distribuídos, na família, como: aporfínicos (LEBOEUF *et al.*, 1982; GUINAUDEAU *et al.*, 1975, 1979, 1983, 1988, 1994; HAMONNIÈRE *et al.*, 1977; RASAMIZAFY *et al.*, 1986, 1987) oxoaporfínicos, (VILLAR *et al.*, 1985; LAVAUULT *et al.*, 1990; WU *et al.*, 1993; ACHENBACH e SCHWINN, 1995; SANTOS *et al.*, 2003), protoberberínicos, benzilisoquinolínicos, bisbenzilisoquinolínicos (GIBBS, 1974; HAMONNIÈRE *et al.*, 1977; SCHULTES, 1990), benziltetraisoquinolínicos (RASAMIZAFY *et al.*, 1986) e morfinânicos (LEBOEUF *et al.*, 1982).

aporfínico **benzilisoquinolínico** **bisbenzilisoquinolínico** **protoberberínico** **morfinânico**

Figura 2 - Núcleos estruturais de classes de alcalóides isoquinolínicos de ocorrência mais freqüente na família Annonaceae.

1.2.2. Gênero *Duguetia*

Na literatura, são relativamente escassos os dados sobre a composição química de espécies de *Duguetia* (SIQUEIRA *et al.*, 2001). Entre as classes de componentes isolados no gênero, citam-se os alcalóides isoquinolínicos de núcleos: aporfínico, oxoaporfínico, noraporfínico, tetrahidroprotoberberínico, fenantrênico (Tabela 1, Figura 3), além de esteróides (GOTTLIEB *et al.*, 1978; DIAZ *et al.*, 1985), benzenóides (GOTTLIEB *et al.*, 1978; WANG *et al.*, 1988), sesquiterpenos (LIMA *et al.*, 1997; SIQUEIRA *et al.*, 1997, 2001; PEREIRA, *et al.*, 2003) e flavonóides (SANTOS e SALATINO, 2000)(Tabela 2, Figura 4).

Tabela 1. Alcalóides isoquinolínicos isolados a partir de espécies do gênero *Duguetia*

Classe/alcalóides	Espécies	Referências
aporfínico		
anolobina (1)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
anonaina (2)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
<i>N</i> -metil-asimilobina (3)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^a
buxifolina (4)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
<i>N</i> -formil-buxifolina (5)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
<i>N</i> -metil-buxifolina (6)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
caliclnina (7)	<i>D. obovata, D. flagellaris, D. calycina</i>	Roblot et al., 1983; Navarro et al., 2001; Roblot et al., 1978
<i>N</i> -metil-calicinina (8)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
duguecalina (9)	<i>D. calycina</i>	Roblot et al., 1981
duguenaina (10)	<i>D. calycina</i>	Roblot et al., 1981
duguevanina (11)	<i>D. obovata, D. flagellaris</i>	Roblot et al., 1983; Navarro et al., 2001
<i>N</i> -formil-duguevanina (12)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
<i>N</i> -metil- duguevanina (13)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
hidroxil-3 normuciferina (14)	<i>D. spixiana</i>	Roblot et al., 1983; Rasamizafy et al., 1987 ^a
isolaurelina (15)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
isopilina (16)	<i>D. flagellaris</i>	Navarro et al., 2001

Tabela 1. Alcalóides isoquinolínicos isolados a partir de espécies do gênero *Duguetia* (continuação).

Classe/alcalóides	Espécies	Referências
aporfínico		
O-metilsopilina (17)	<i>D. flagellaris</i> , <i>D. spixiana</i>	Navarro et al., 2001; Rasamizafy et al, 1987 ^a
normuciferina (18)	<i>D. flagellaris</i> , <i>D. spixiana</i>	Navarro et al., 2001; Rasamizafy et al, 1987 ^a
obovanina (19)	<i>D. calycina</i>	Roblot et al., 1978
pollaltina (20)	<i>D. glabriuscula</i>	Siqueira et al., 2001
probovatina (21)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al, 1980
puterina (22)	<i>D. calycina</i>	Roblot et al., 1978
N-metil-puterina (23)	<i>D. calycina</i>	Roblot et al., 1978
xilopina (24)	<i>D. obovata</i> , <i>D. calycina</i>	Roblot et al., 1978, 1983
N-formil-xilopina (25)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
7-hidroxi-aporfínico		
duguetina (26)	<i>D. flagellaris</i> ; <i>Duguetia</i> sp	Navarro et al., 2001; Casagrande e Ferrar 1970
duguxina (27)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a ; Debourses et al., 1987 ^b
N-oxiduguxina (28)	<i>D. spixiana</i>	Debourses et al., 1987 ^b
normuciferidina (29)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
norolliveridina (30)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a ; Debourses et al., 1987 ^b
oliveridina (31)	<i>D. flagellaris</i> , <i>D. glabriuscula</i> , <i>D. spixiana</i> , <i>D. vallicola</i>	Navarro et al., 2001; Siqueira et al., 2001; Rasamizafy et al, 1987 ^a ; Debourses et al., 1987 ^b ; Perez et al., 2004
N-oxiloliveridina (32)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al, 1987 ^a ; Debourses et al., 1987 ^b

Tabela 1. Alcalóides Isoquinolínicos isolados a partir de espécies do gênero *Duguetia* (continuação).

Classe/alcalóides	Espécies	Referências
7-hidroxi-aporfínico		
oliverolina (33)	<i>D. flagellaris</i> , <i>D. vallicola</i>	Navarro et al., 2001; Perez et al., 2004
β -N-óxido- oliverolina (34)	<i>D. flagellaris</i>	Navarro et al., 2001
pachiconfina (35)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b
norpachiconfina (36)	<i>D. spixiana</i>	Debourges, et al., 1987 ^b
N-oxipachiconfina (37)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b
pachipodantina (38)	<i>D. flagellaris</i>	Navarro et al., 2001
roemeroldina (39)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
rurrebanidina (40)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
rurrebanina (41)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
spixianina (42)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b
N-oxispixianina (43)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b
7-metil-aporfínico		
duguespixinina (44)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b

Tabela 1. Alcalóides isoquinolínicos isolados a partir de espécies do gênero *Duguetia* (continuação).

Classe/alcalóides	Espécies	Referências
oxoaporfínico		
duguevallina (45)	<i>D. vallicola</i>	Perez et al., 2004
lanuginosina (46)	<i>D. spixiana</i> , <i>D. spixiana</i> , <i>D. glabriuscula</i>	Rasamizafy, et al., 1987 ^a ; Debouges et al., 1987 ^b ; Siqueira et al., 2001
lisicamina (47)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
oxobuxifolina (48)	<i>D. glabriuscula</i> , <i>D. obovata</i>	Siqueira et al., 2001; Roblot et al., 1983
O-metilmoschatolina (49)	<i>D. spixiana</i> , <i>D. vallicola</i> , <i>D. eximia</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a ; Perez, et al., 2004; Gottlieb et al., 1978
oxoaporfínico		
oxopukateina (50)	<i>D. eximia</i>	Gottlieb et al, 1978
oxoputerina (51)	<i>D. eximia</i> , <i>D. calicina</i>	Gottlieb et al, 1978
aзаaporfínico		
4,5-dioxo-aзаaporfínico		
hadrantina A (52)	<i>D. hadranta</i>	Muhammad et al, 2001
hadrantina B (53)	<i>D. hadranta</i>	Muhammad et al., 2001
imbilina-1 (54)	<i>D. hadranta</i>	Muhammad et al., 2001
benzilisquinolínico		
N-oxicodamina (55)	<i>D. spixiana</i>	Debouges et al., 1987 ^a
cleistofolínico		
cleistofolina (56)	<i>D. vallicola</i>	Perez et al., 2004

Tabela 1. Alcalóides isoquinolínicos isolados a partir de espécies do gênero *Duguetia* (continuação).

Classes/alcalóides	Espécies	Referências
fenantrênico		
aterosperminina (57)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b
metoxi-aterosperminina (58)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b
<i>N</i> -oxiaterosperminina (59)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b
morfínico		
sebiferina (60)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
mistos		
sampangina (61)	<i>D. hadrantha</i>	Muhammad et al., 2001
3-metoxi-sampangina (62)	<i>D. hadrantha</i>	Muhammad et al., 2001
morfínico		
spiguetina (63)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
spiguetidina (64)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
protoberberínicos		
discretina (65)	<i>D. obovata</i>	Roblot et al., 1983
discretamina (66)	<i>D. calycina</i>	Roblot et al., 1978
spiduxina (67)	<i>D. spixiana</i>	Debourges et al., 1987 ^b
3-hidroxi-2-9,10-trimetoxi-tetrahidroprotoberberina (68)	<i>D. stelichantha</i>	Diaz et al., 1985
tetrahidropalmatina (69)	<i>D. spixiana</i>	Rasamizafy et al., 1987 ^a
xiloplinina (70)	<i>D. obovata</i> ,	Roblot et al., 1983; Rasamizafy et al., 1987 ^b

Figura 3 - Estruturas de alcalóides isoquinolínicos isolados de espécies de *Duguetia*.

Figura 3 - Estruturas de alcalóides isoquinolínicos isolados de espécies de *Duguetia* (continuação).

Figura 3 - Estruturas de alcalóides isoquinolínicos isolados de espécies de *Duguetia* (continuação).

Figura 3 - Estruturas de alcalóides isoquinolínicos isolados de espécies de *Duguetia* (continuação).

Figura 3 - Estruturas de alcalóides isoquinolínicos isolados de espécies de *Duguetia* (continuação).

Tabela 2. Componentes não alcaloídicos isolados a partir de espécies *Duguetia* e suas atividades biológicas.

Classe/componente	Espécie	Atividade biológica	Referência
benzenóide			
2,4,5-trimetoxi-estireno (71)	<i>D. eximia</i> , <i>D. panamensis</i>	citotoxicidade, em linhagens de células 9KB e 9PS	Gottlieb et al., 1978; Wang et al 1988
esteróide			
β-sitosterol (72)	<i>D. stellchantha</i> , <i>D. eximia</i>	nt	Diaz et al, 1985; Gottlieb et al., 1978
flavonóide			
canferol (73)	<i>D. bahiensis</i> , <i>D. crysocarpa</i> , <i>D. furfuracea</i>	nt	Santos e Salatino, 2000
óleo essencial (componentes)			
β-elemeno (74)	<i>D. lanceolata</i>	antinociceptiva, antiinflamatória, bacterlostática e toxicidade sobre <i>A. salina</i>	Souza, 2003
β-selineno (75)			
óxido de carlofileno (76)			
sesquiterpeno			
(+)-allo-aromadendrano-10β,14diol-	<i>D. glabriuscula</i>	antimicrobiana	Lima et. al., 1997; Siqueira et. al., 2001; Pereira et al., 2003
(+)-α-santal-en-9-ol			
α-santal-11-en-9,10-diol			
(+)-α-santalan-10,11-epoxi-9-ol			
(+)-α-santalan-9-11-epoxi-10-ol			
triterpeno			
poli-carpol	<i>D. glabriuscula</i>	nt	Pereira et al, 2003

nt = não testado no trabalho referenciado.

Figura 4 - Estruturas de componentes não-alcaloídicos isolados de espécies de *Duguetia*.

1.2.3. *D. lanceolata*

Em triagem fitoquímica, realizada por Souza (2003), foi detectada a presença de alcalóides, flavonóides, taninos, saponinas, triterpenóides, esteróides e de óleos fixo e volátil, em cascas de caule de *D. lanceolata*. Na mesma pesquisa, foram analisados os componentes do óleo essencial, tendo-se verificado a presença de três componentes majoritários: β -elemeno, β -selineno e óxido de cariofileno (Figura 3).

1.3. Usos de espécies da família Annonaceae

A família Annonaceae é conhecida, principalmente, pelos frutos comestíveis (HEYWOOD, 1993) de certas espécies como: *Annona crassiflora* ("araticum"), *A. cherimolia* ("cherimoia"), *A. squamosa* ("fruta-do-conde"), *A. muricata* ("graviola") (KESSLER, 1993). Os frutos destas espécies são utilizados *in natura* ou fornecem polpas que são empregadas na produção de doces, sorvetes, geléias, sucos, entre outros (MORTON, 1966). Os frutos de *Xylopia aromática*, conhecida como "pimenta de macaco", são usados como tempero (PIO CORRÊA, 1978). A espécie *Cananga odorata*, cuja fragrância é denominada comercialmente "ylang-ylang", é utilizada em perfumaria (WATERMAN, 1986; KESSLER, 1993; HEYWOOD, 1993). No México, a anonácea *Cymbopetalum penduliflorus*, o "xochinacatzli", enfeitou os parques e os jardins do Império Asteca, tendo sido utilizada na aromatização de chocolates (KESSLER, 1993).

Na medicina popular, são inúmeros os usos atribuídos a muitas das espécies desta família. Encontram-se descritas propriedades eméticas, febrífugas, adstringentes, inseticidas, narcóticas, sendo utilizadas em casos de diarreias crônicas, epilepsia, contra piolhos (MORTON, 1966), em leishmaniose cutânea e na malária (VENNERSTROM *et al.*, 1988).

Menciona-se o emprego de espécies de *Unonopsis*, pelos índios da floresta Amazônica, no tratamento de demência senil, como anticonceptivos e como veneno, em pontas de flechas (SCHULTE, 1993). No Suriname, os índios utilizam os frutos e folhas de *Annona muricata* como tranquilizante (HASRAT *et al.*, 1997). Em algumas regiões de floresta tropical do oeste da África, a casca fibrosa do caule de *Cleistopholis patens* é empregada, em infecções hepáticas, enquanto que, as cascas das raízes são vermífugas (WATERMAN e MUHAMMAD, 1985).

O infuso das raízes de *Uvaria moluccana* é empregado nas febres. As cascas de caule de *Polyantria corinti* são muito adstringentes e as folhas de *Artabotrys suaveolens* são usadas contra a cólera (LOFGREN, 1917). Na América Central, *Guatteria gaumeri* é utilizada como diurético, no tratamento da gonorréia e na expulsão de cálculos biliares e renais. Na Amazônia peruana, emprega-se o extrato de cascas de caule de *G. modesta* em função de suas propriedades contraceptivas (LOPEZ *et al.*, 1993).

Diversos usos têm sido relatados para espécies do gênero *Annona*. *A. cherimolia* é usada tradicionalmente, em alguns países tropicais, como inseticida (VILLAR DEL FRESNO e CANAVATE, 1983) e, também, como antitumoral, sendo empregada no tratamento de vários tipos de câncer. Frutos e folhas de *A. dioica* são indicados para o reumatismo e as sementes, utilizadas em diarreias (SANTOS *et al.* 2003).

No gênero *Duguetia*, algumas espécies apresentam uso, na medicina popular, para a malária (MUHAMMAD *et al.*, 2001). As sementes de *D. furfuracea* são utilizadas como parasiticida sendo, especialmente, mencionada a utilização contra piolhos (SILBERBAUER-GOTTSBERBER, 1981/1982). Cita-se, ainda, o emprego desta, no reumatismo (RODRIGUES e CARVALHO, 2001).

Embora não haja referência ao uso de *D. lanceolata*, na medicina tradicional, a espécie tema do presente estudo, é conhecida pelos frutos comestíveis consumidos pela fauna, em geral. Além disto, é utilizada, em áreas degradadas de preservação permanente. A madeira é recomendada para uso, na

construção civil e, na confecção de vigas, caibros, batentes de portas e janelas, postes, moirões, assim como, de móveis (LORENZI, 1998).

1.4. Aspectos de atividade biológica relacionados à família Annonaceae e ao gênero *Duguetia*

Apesar do número restrito de pesquisas realizadas sobre as atividades biológicas e/ou farmacológicas de representantes da família Annonaceae, há estudos indicando que, algumas espécies apresentam atividade antiparasitária *in vitro*, contra diferentes protozoários, além de citotoxicidade de frações alcalóidicas e de outras frações orgânicas (Tabelas 3 e 4).

Particularmente, considerando o gênero a que pertence a espécie em estudo e a atividade biológica pesquisada, há cinco espécies de *Duguetia* estudadas sob este aspecto (Tabelas 3 e 4), até o presente, sendo: *D. flagellaris*, *D. furfuracea*, *D. hadrantha*, *D. spixiana*, *D. vallicola* (FOURNET *et al.*, 1994; MUHAMMAD *et al.*, 2001; NAVARRO *et al.*, 2001; PEREZ *et al.*, 2004; FISCHER *et al.*, 2004; TEMPONE *et al.*, 2005) (Tabelas 3 e 4).

Outras atividades foram testadas para alcalóides e frações orgânicas de *Duguetia*, como: antinociceptiva, antimicrobiana, antifúngica, anti-agregante plaquetária (MUHAMMAD *et al.*, 2001; SIQUEIRA *et al.*, 2001; SOUZA, 2003). Nestes estudos, encontra-se *D. lanceolata*, cujo óleo essencial foi testado quanto às atividades antinociceptiva, antibacteriana e citotóxica sobre *Artemia salina* (SOUZA, 2003).

Tabela 3 - Atividades antiparasitária e citotóxica de alcalóides isolados e alcalóides totais de Annonaceae

Alcalóides/alcalóides totais	Espécies	Atividades antiparasitária/ citotóxica	Referências
annoretina	<i>Annona montana</i>	CITOX KB, P-388, A-549 e HT-29	Wu et al., 1993
antioquina	<i>Guatteria boliviana</i>	ATcr	Mahiou et al., 2000
cleistofolina (56)	<i>Duguetia vallicola</i>	AMalar	Perez et al., 2004
coridina	<i>G. amplifolia</i>	AMalar	Weniger et al., 2000
criptodorina	<i>G. dumetorum</i>	ALmex	Montenegro et al., 2003
curina	<i>Isolona ghesquiereina</i>	AMalar	Mambu et al., 2000
funiferina	<i>G. boliviana</i>	ATcr	Mahlou et al., 2000
guatibolina	<i>G. boliviana</i>	ATcr	Mahlou et al., 2000
hadrantina A (52)	<i>D. hadrantha</i>	AntIM	Muhammad et al., 2001
isochondodendrina	<i>I. ghesquiereina</i>	AMalar	Mambu et al., 2000
isocorituberina	<i>G. amplifolia</i>	AMalar	Weniger et al., 2000
lanuginosina (46)	<i>G. boliviana, D. glabriuscula</i>	ATcr, TAS	Mahlou et al., 2000; Siqueira et al., 2001
liriodenina	<i>Unonopsis buchtienii, G. amplifolia</i>	ALmaj, ALdon; AMalar	Waechter et al., 1999; Weniger et al., 2000
O-metil moschatolina (49)	<i>U. buchtienii, G. amplifolia</i>	ATcr, ATbr; AMalar	Waechter et al., 1999; Weniger et al., 2000
nornantenina	<i>G. dumetorum</i>	ALmex	Montenegro et al., 2003
nornuciferina (18)	<i>G. amplifolia</i>	ALmex; ALpan	Montenegro et al., 2003
oliverollina (33)	<i>D. flagellaris, D. vallicola</i>	AMalar	Navarro et al., 2001; Perez et al., 2004
oxobuxifolina (48)	<i>D. glabriuscula</i>	TAS	Siqueira et al., 2001
pangkorimina	<i>G. boliviana</i>	ATcr	Mahlou et al., 2000
puertogalina A	<i>G. boliviana</i>	AL; ATcr	Mahlou et al., 2000
puertogalina B	<i>G. boliviana</i>	AL; ATcr	Mahlou et al., 2000

Tabela 3 - Atividades antiparasitária e citotóxica de alcalóides isolados e alcalóides totais de Annonaceae (continuação).

Alcalóides/alcalóides totais	Espécies	Atividades antiparasitária/citotóxica	Referências
3-metoxi-sampangina (62)	D. hadrantha	AMalar	Muhammad et al., 2001
sepeerina	<i>G. boliviana</i>	AL, ATcr	Mahiou et al, 2000
tillageina	<i>G. boliviana</i>	ATcr	Mahiou et al., 2000
urbanaína	<i>Piptostigma fugax</i>	TAS	Achenbach et al., 1995
N,N'-dimetil-urbanaína	<i>P. fugax</i>	TAS	Achenbach et al., 1995
3-metoxi-sampangina (62)	D. hadrantha	AMalar	Muhammad et al., 2001
sepeerina	<i>G. boliviana</i>	AL, ATcr	Mahiou et al., 2000
tillageina	<i>G. boliviana</i>	ATcr	Mahiou et al., 2000
urbanaína	<i>P. fugax</i>	TAS	Achenbach et al., 1995
N,N'-dimetil-urbanaína	<i>P. fugax</i>	TAS	Achenbach et al., 1995
xilopina (24)	<i>G. amplifolia</i>	ALmex	Montenegro et al., 2003
ATot	D. spixiana	AL, ATcr	Fournet et al, 1994
ATot	<i>G. lehmannii</i>	AMalar	Saez et al, 1997
ATTot	<i>G. schomburkiana</i>	AL, ATcr	Fournet et al, 1994
ATot	<i>Oxandra espinosa</i>	AL, ATcr	Fournet et al, 1994
ATot	D. furfuracea	AMalar, ATcr	Fischer et al., 2004; Tempone et al., 2005

ATot = alcalóides totais; **CITOX KB** = atividade citotóxica *in vitro* frente às células KB; **CITOX P-388** = atividade citotóxica *in vitro* frente às células P-388; **CITOX A-549** = atividade citotóxica *in vitro* frente às células A-549; **CITOX HT-29** = atividade citotóxica *in vitro* frente às células HT-29; **ATcr** = atividade anti-tripanosoma *in vitro* frente a *Trypanosoma cruzi*; **AMalar** = atividade antimalárica *in vitro*, frente ao *Plasmodium falciparum*; **ALmex** = atividade anti-leishmaniasis *in vitro* frente a *L. mexicana*; **ALmaj** = atividade anti-leishmaniasis *in vitro* frente a *Leishmania major*; **ALdon** = atividade anti-leishmaniasis *in vitro* frente a *Leishmania donovani*; **ATbr** = atividade anti-tripanosoma *in vitro* frente a *Trypanosoma brucei*; **ALpan** = atividade anti-leishmaniasis *in vitro* frente a *Leishmania panamensis*; **AL** = atividade anti-leishmaniasis *in vitro* frente a *Leishmania sp.*; **TAS** = toxicidade sobre *Artemia salina*;

Tabela 4. Atividades antiparasitária e citotóxica de frações orgânicas de espécies da família Annonaceae.

Frações	Espécies	Atividade antiparasitária/citotóxica	Referência
EEP	<i>Oxandra espiptana</i>	AL, ATcr	Fournet et al, 1994
EE	<i>Duguetia spixiana</i>	AL, ATcr	Fournet et al, 1994
EE	<i>Guatteria amplifolia</i>	AMalar	Hostettmann et al, 1997
EEP	<i>Unonopsis buchtienii</i>	ALmaj, ALdon, ATcr, ATbr	Waechter et al., 1999
ED	<i>U. buchtienii</i>	ATcr, ATbr	Waechter et al., 1999
EM	<i>Uvaria chamae</i>	AMalar, TAS	Addae-Kyereme et al., 2001

Frações orgânicas: **EEP** = extrato éter de petróleo; **EE** = extrato etanólico; **ED** = extrato diclorometano; **EM** = extrato metanólico; **Atividade:** **AL** = anti-leishmania *in vitro* frente a *Leishmania* sp; **ATcr** = anti-tripanosoma *in vitro* frente a *Tripanosoma cruzi*; **AMalar** = atividade antimalárica *in vitro* frente ao *P. falciparum*; **ALmaj** = atividade anti-leishmania *in vitro* frente a *Leishmania major*; **ALdon** = atividade anti-leishmania *in vitro* frente *Leishmania donovani*; **ATbr** = atividade anti-tripanosoma *in vitro* frente a *Tripanosoma brucei*; **TAS** = toxicidade sobre *Artemia salina*;

Objetivos

2. OBJETIVOS

Considerando a presença de alcalóides isoquinolínicos na família Annonaceae e a constatação da atividade antiprotozoária, destes, por diversos pesquisadores no mundo todo, selecionou-se a espécie *Duguetia lanceolata* St. Hil., para o presente trabalho, visando caracterizá-la sob os aspectos químico, botânico e de atividade biológica, na busca de agentes potencialmente ativos frente às principais parasitoses existentes, realizando-se:

- Estudo químico dos alcalóides isoquinolínicos de folhas de *D. lanceolata* St. Hil., com vistas à caracterização cromatográfica e ao isolamento de alcalóides;

- Caracterização morfológica externa e interna de folha;

- Avaliação de frações alcaloídicas e do extrato etanólico frente às atividades antimalárica *in vitro*, anti-tripanosoma e anti-leishmania;

- Avaliação de frações alcaloídicas e do extrato etanólico quanto às atividades citotóxica *in vitro* com células RAW 264.7 de camundongo e sobre larvas do microcrustáceo *Artemia salina* Leach.

Material e Métodos

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material botânico

As folhas de *D. lanceolata* foram coletadas na Reserva Biológica e Estação Experimental de Mogi-Guaçu, no estado de São Paulo. A exsicata de ramos aéreos foi depositada no Herbário do Instituto de Biociências da USP (SPF), sob a denominação Fischer 9 (SPF).

3.2. Estudo botânico

O espécime estudado de *D. lanceolata* foi fotografado, no local de coleta.

O estudo botânico foi realizado empregando-se folhas secas (droga) e folhas conservadas em etanol 70% (v/v) (JOHANSEN, 1940).

Parte do material botânico seco foi separada para a caracterização macroscópica da droga e registro fotográfico. Procedeu-se à análise de amostra constituída de 30 folhas adultas, que foram observadas à vista desarmada e com auxílio de lupa estereoscópica (Wild Heerbrugg®), tendo-se efetuado as mensurações com auxílio de régua milimetrada comum. No caso da droga, previamente à tomada de medidas, efetuou-se a reidratação da folha, para a distensão da lâmina foliar.

Adotaram-se as terminologias de Rizzini (1960), na descrição dos caracteres gerais da folha, e de He e Maas (1993), para a classificação do indumento.

Na caracterização da morfologia interna, foram considerados: epidermes, mesofilo, nervura mediana e pecíolo.

A partir do material fixado, elaboraram-se secções, à mão-livre (KRAUS e ARDUIN, 1997), no sentido transversal (lâmina foliar, nervura mediana e pecíolo) na região do terço médio inferior da lâmina foliar plenamente desenvolvida e da porção mediana do pecíolo, e no sentido longitudinal tangencial (paradérmico), para observação frontal da epiderme da lâmina foliar.

As secções foram clarificadas com solução de hipoclorito de sódio 50% (v/v) (KRAUS e ARDUIN, 1997), e lavadas, em água destilada. A seguir, foram transferidas para solução de ácido acético 1% (v/v). A coloração foi realizada com fucsina básica (0,5% em solução hidroalcólica 50%) (caracterização de parede lignificada), seguida de azul de Astra (caracterização de parede

celulósica) (ROESER, 1962), somente, com azul de astra ou, ainda, com azul de astra seguido de safranina (BERLYN e MIKSCHE, 1976). Na montagem das preparações semipermanentes empregou-se solução glicerinada 50% (v/v) (KRAUS e ARDUIN, 1997).

Parte das secções não foi submetida às etapas de clarificação e coloração.

A epiderme, em vista frontal, foi analisada realizando-se cortes paradérmicos das faces adaxial e abaxial, corados com azul de astra.

Os reativos histoquímicos e corantes utilizados foram: Sudam III para substâncias lipofílicas (SASS, 1951), cloreto férrico 2% (m/v) para compostos de natureza fenólica (JOHANSEN, 1940) e lugol, para a caracterização de amido (JENSEN, 1962).

As estruturas, observadas em microscópio de luz (Olympus®-CH2), tiveram os registros fotomicrográficos efetuados em microscópio Nikon® (Eclipse-E-600), equipado com sistema automático de fotodocumentação (H-III).

As escalas que acompanham as figuras foram obtidas nas mesmas condições óticas.

3.3. Estudo químico

3.3.1. Preparo do material vegetal

O material coletado foi seco à sombra e em estufa de circulação de ar, à temperatura de 40°C, por 24 h. Em seguida, as folhas foram pulverizadas, em moinho de facas e martelos, tendo-se obtido pó semifino (tamises nºs355/180) (Farmacopéia Brasileira, 1988).

3.3.2. Extração

3.3.2.1. Extração do material vegetal

As folhas pulverizadas (1047,2g) foram deixadas em maceração, durante 24 horas, em etanol 95% (v/v) e submetidas à extração exaustiva, por percolação a frio, com o mesmo solvente.

O extrato etanólico obtido (28,2L) foi filtrado e concentrado, à pressão reduzida, em evaporador rotatório e, posteriormente, o extrato concentrado foi levado à secura, em banho de água. Determinou-se a massa do resíduo etanólico.

3.3.2.2. Obtenção dos alcalóides totais e determinação do teor

O extrato etanólico concentrado (244,6 g) foi solubilizado em solução de ácido fosfórico 10% (v/v), com auxílio de agitador magnético e, em seguida, filtrado (Figura 5).

Alíquotas de cerca de 150 mL da solução ácida foram, posteriormente, extraídas, por três vezes com *n*-hexano (100 mL). A solução foi alcalinizada com solução concentrada de hidróxido de amônio, até pH entre 9,0 e 10,0.

Posteriormente, alíquotas de 100 mL do extrato alcalinizado foram submetidas à partição com diclorometano (50 mL). Repetiu-se o procedimento, até verificar teste negativo com o reativo de Dragendorff (STAHL, 1970).

As fases orgânicas reunidas foram secas, em funil contendo sulfato de sódio anidro, e concentradas até a secura, sob pressão reduzida, em evaporador rotatório. Determinou-se a massa total de alcalóides (HARBONE, 1998).

3.3.3. Acetilação dos alcalóides totais

A fração de alcalóides totais (2,76g) foi acetilada empregando-se para cada 100mg as seguintes proporções de reagentes: 0,5mL de piridina e 1mL de anidrido acético (MORENO, 1989).

A mistura reacional foi deixada ao abrigo da luz e à temperatura ambiente, por um período de 24 horas. Posteriormente, adicionou-se metanol, em excesso, tendo-se evaporado, à secura, até a eliminação total da piridina.

Figura 5– Esquema de obtenção dos alcalóides totais de *Duguetia lanceolata* St. Hil.

3.4. Análises cromatográficas

3.4.1. Cromatografia em camada delgada

Foram submetidos às análises cromatográficas em camada delgada (CCD), os alcalóides totais (AT), os alcalóides totais acetilados (ATacet) e a subfração alcaloídica (DL-3), resultante do fracionamento, por coluna filtrante (CF), à pressão reduzida (item 3.4.3).

Testaram-se diversos sistemas cromatográficos (SC), em que se variaram os sistemas de solventes, tendo mantido constantes as demais características, como: percurso (12,5cm), adsorvente [sílica gel GF₂₅₄ (Merck®)], espessura do adsorvente (300µm), sentido de desenvolvimento (ascendente) e saturação da cuba (total).

Os cromatogramas resultantes foram submetidos à visualização, sob luz natural e à luz UV nos comprimentos de onda de 254 nm e 366nm. A revelação dos cromatogramas, relativos ao desenvolvimento dos AT, ATacet e da fração DL-3, foi feita por nebulização com reativo de Dragendorff (STAHL, 1970).

Os sistemas de solventes testados que possibilitaram a melhor separação de componentes encontram-se, na Tabela 5.

Tabela 5 - Sistemas cromatográficos (SC) empregados, nas análises, por CCD dos extratos alcaloídicos e da fração DL-3 de *D. lanceolata*

SC	Sistemas de solventes	Extratos/fração
	diclorometano-metanol	
1	(97:3)	AT, ATacet
2	(93,5:6,5)	ATacet
3	(92,5:7,5)	DL-3
4	(25:75)	ATacet

AT: alcalóides totais; ATacet: alcalóides totais acetilados; DL-3: fração alcaloídica 3.

3.4.2. Cromatografia em camada delgada preparativa (CP)

3.4.2.1. Fração DL-3

Na análise cromatográfica da fração DL-3, por CP, empregaram-se as mesmas condições do item 3.4.1, tendo-se utilizado o adsorvente sílica gel PF₂₅₄,

com espessura de camada de 400 µm e sistema de solventes constituído de diclorometano-metanol (92,5:7,5).

3.4.3. Coluna filtrante (CF) à pressão reduzida

Cerca de 800mg de alcalóides totais (ATacet), previamente acetilados (item 3.3.3), foram submetidos ao fracionamento, por CF, à pressão reduzida, tendo sido homogeneizados com cerca de 2g de adsorvente (óxido de alumínio-Merck®). Em seguida, foram dispostos sobre 37g do adsorvente, previamente colocados, em filtro de vidro provido de placa sinterizada (h: 6,0cm, ϕ_{int} 3,5 cm).

Coletaram-se 17 frações (DL-1 a DL-17), de cerca de 200-300mL, empregando-se eluentes, em seqüência de polaridade crescente, conforme a Tabela 6. Posteriormente, concentraram-se as frações, em evaporador rotatório, à pressão reduzida, tendo-se determinado a massa dos resíduos (mg).

Tabela 6 - Seqüência de eluentes utilizados na separação dos alcalóides totais acetilados, por coluna filtrante (CF), à pressão reduzida

Frações alcaloídicas (DL)	Eluentes	Volume (mL)
<i>n</i> -hexano-diclorometano		
1	(1:1)	300
2	(3:7)	200
3	diclorometano	300
diclorometano-metanol		
4	(99:1)	200
5	(98:2)	"
6	(97:3)	"
7	(95:5)	"
8	(9:1)	"
9	(8:2)	"
10	(7:3)	"
11	(6:4)	"
12	(1:1)	"
13	(4:6)	"
14	(3:7)	"
15	(2:8)	"
16	(1:9)	"
17	metanol	300

3.5. Análise espectroscópica do alcalóide isolado

O alcalóide isolado DL-3/5 foi submetido às análises espectroscópicas, por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (R.M.N. de ^1H) e de carbono 13 (R.M.N. ^{13}C), em espectrômetro de Brucker DPX, operando na frequência de 300MHz e 75,5 MHz, respectivamente. O composto foi previamente dissolvido em clorofórmio deuterado (Merck®), contendo 0,01% de tetrametilsilano (TMS). Utilizaram-se os sinais do solvente, como padrão de referência interna.

A análise, na região do infravermelho (IV), foi realizada com espectrofotômetro FTIR Bomen®, em pastilhas de cloreto de sódio de grau espectrofotométrico.

3.6. Avaliação da atividade biológica

3.6.1. Avaliação da atividade antimalárica *in vitro*

Os testes com os extratos de *D. lanceolata* foram realizados junto ao Núcleo de Estudos em Malária da SUCEN (Superintendência de Controle de Endemias).

Os ensaios foram realizados frente a duas cepas de *Plasmodium falciparum*, para a determinação da Concentração Efetiva que leva à inibição de 50% dos parasitas (CE_{50}).

A cultura contínua das cepas de *P. falciparum* K-1, (CE_{50} para a cloroquina 0,025 $\mu\text{g}/\text{mL}$) resistente à cloroquina, e Palo Alto, sensível à cloroquina (CE_{50} para a cloroquina 0,009 $\mu\text{g}/\text{mL}$), utilizadas nos testes, foi realizada segundo o método de Traeger e Jensen (1976). Os valores de CE_{50} frente ao difosfato de cloroquina foram conferidos a cada 2 meses, sem ter havido variações significativas.

Os extratos de *D. lanceolata* (extrato etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados) foram dissolvidos em água milliQ e dispensados em microplacas de cultura de tecidos com 96 poços, em diluições seriadas, à razão de 2, com concentrações iniciais de 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (extrato etanólico) e de 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (alcalóides totais e alcalóides totais acetilados).

Utilizou-se difosfato de cloroquina, como fármaco-padrão, nas concentrações de 1, 2, 4, 6, 8, 16 e 32 pM, para a determinação da CE_{50} . As placas foram mantidas à temperatura de 37°C, até a secagem e, posteriormente, conservadas a 4°C, até o momento de sua utilização. A atividade antimalárica foi

avaliada, em duplicata, segundo o método de Rieckmann *et al.* (1978), utilizando-se uma placa para cada cepa.

As cepas descongeladas, foram sincronizadas duas vezes, por tratamento com D-sorbitol, quando os parasitas encontraram-se predominantemente na fase de trofozoítos jovens (anéis) (LAMBROS e VANDERBERG, 1979). Em seguida, foram ressuspensos, em meio de cultura completo (com bicarbonato de sódio e soro humano), a hematócrito 5%. Esta suspensão foi transferida, para as microplacas contendo os extratos, previamente doseados.

Acompanhou-se o crescimento dos parasitas, durante 24-48 h, no poço-controle (sem os extratos em análise), até o estágio de esquizonte. Neste momento, realizaram-se gotas espessas coradas com Giemsa, com sangue retirado de cada cavidade. Verificou-se o número de esquizontes, em 200 parasitas, para cada diluição dos extratos.

Os valores das concentrações efetivas de 50% (CE₅₀) (µg/mL) foram determinadas, considerando a média dos ensaios realizados em duplicata, utilizando a análise de probitos (FINNEY, 1964), com intervalo de confiança de 95%.

Os ensaios descritos, na sequência (3.6.2, 3.6.3 e 3.6.4, foram realizados, junto ao Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo.

3.6.2. Avaliação da atividade anti-leishmania frente às formas promastigotas

Realizou-se a etapa inicial de triagem dos extratos de *D. lanceolata* para a atividade anti-leishmania (extrato etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados) frente às formas extracelulares (promastigotas) do parasita.

Parasitas

As formas amastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* (cepa MHOM/BR/1972/LD) foram mantidas em hamsters golden (*Mesocricetus auratus*), extraídas do baço e separadas por centrifugação diferencial, após período de 60-70 dias, a partir da infecção (STAUBER *et al.*, 1958). As formas promastigotas foram obtidas a partir das formas amastigotas purificadas e

mantidas em meio M199, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 5 % de urina humana masculina, à temperatura de 24°C.

Atividade anti-leishmania

O ensaio de sensibilidade aos extratos foi realizado de acordo com a técnica descrita por Tempone *et al.* (2001). Para determinar a concentração efetiva de 50% (CE 50%) dos extratos frente às formas promastigotas de *Leishmania*, os mesmos foram dissolvidos, previamente, em dimetilsulfóxido (DMSO) e diluídos com o meio M199, em microplacas de 96 poços, até a maior concentração de 100 µg/mL. Cada extrato foi testado, em duplicata, em 8 concentrações preparadas por diluição seriada, em base 2.

As formas promastigotas foram contadas em hemocitômetro de Neubauer e semeadas (1×10^6 células/poço), em volume final de 100 µL/poço. Foram realizados controles com DMSO e sem os extratos. Utilizou-se a pentamidina (Eurofarma®) como fármaco-padrão.

As placas foram incubadas por 24 horas, à temperatura de 24°C, e a viabilidade das formas promastigotas foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de oxidação mitocondrial do MTT (brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol]-2-il)-2,5 difeniltetrazólio) (TADA *et al.*, 1986)

O MTT (5mg/mL) foi dissolvido em tampão fosfato-salina (PBS) e esterilizado por filtração (membranas de 0,22µm), tendo-se adicionado 20µL/poço. As microplacas foram incubadas a 37°C, por 4h. As formas promastigotas, incubadas sem os extratos, foram usadas como controle de viabilidade.

A extração da formazana foi realizada com dodecil sulfato de sódio - SDS 10%, por 18 horas (100 µL/poço), à temperatura de 24°C. A densidade óptica (D.O.) foi determinada em espectrofotômetro Multiskan MS (Uniscience), à 570 nm e correlacionada com o número de promastigotas viáveis, devidamente padronizado para cada placa. A viabilidade 100% foi expressa com base na densidade óptica das formas promastigotas controle, após a normalização. A análise dos dados foi realizada com auxílio do programa Graph Pad Prism 3.0, a partir da média dos resultados obtidos em duplicata.

Considerou-se a Concentração Efetiva de 50% (CE₅₀) dos extratos testados como sendo aquela que resultou na morte de 50% das formas

promastigotas. Extratos cujo valor de CE_{50} foi superior a 100 $\mu\text{g/mL}$ foram considerados inativos.

3.6.3. Avaliação da atividade anti-tripanosoma

Nos testes para avaliação de atividade anti-tripanosoma dos extratos de *D. lanceolata* (extrato etanólico, alcalóides totais, alcalóides totais acetilados e alcalóide isolado DL3/5), foram utilizadas formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Parasitas

As formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepas Y) foram mantidas em células LLC-MK2, no meio RPMI-1640, sem vermelho de fenol suplementado com 2% de soro fetal bovino, a 37°C, incubado, em estufa, sob atmosfera de umidade com 5% de CO_2 . (KESPER *et al.*, 2000).

Atividade anti-tripanosoma

Para avaliar o efeito antiparasitário sobre culturas de tripomastigotas de *T. cruzi*, os extratos em teste foram previamente dissolvidos em DMSO e diluídos em meio RPMI-1640, conforme descrito no ensaio para a atividade anti-leishmania.

Formas tripomastigotas livres obtidas de culturas de LLC-MK2 foram contadas em hemocítmetro de Neubauer e semeadas (1×10^6 /poço) em microplacas de 96 poços.

Os extratos testados foram incubados até a concentração maior de 100 $\mu\text{g/mL}$, por 48 horas, a 37°C, sob atmosfera úmida e 5% CO_2 . O benznidazol foi usado como fármaco-padrão, à concentração fixa de 100 $\mu\text{g/mL}$ e em diferentes concentrações (diluição seriada, em base 2).

A viabilidade das formas tripomastigotas baseou-se na conversão celular do sal de tetrazólio solúvel (MTT) em formazana insolúvel, pelas enzimas mitocondriais (LANE *et al.*, 1996). A extração da formazana foi realizada com SDS 10%, por 18 horas (100 μL /poço), a 24°C conforme descrito, anteriormente.

A análise dos resultados foi feita à semelhança do item 3.6.2, considerando a média dos ensaios realizados em duplicata.

3.6.4 Avaliação da atividade citotóxica *in vitro*

A avaliação da atividade citotóxica dos extratos de *D. lanceolata* (extrato etanólico e alcalóides totais) foi realizada frente a células de camundongos.

Células

Os macrófagos de camundongos (células RAW 264.7) [ATCC TIB-71] foram mantidos em meio RPMI-1640, sem vermelho de fenol, e suplementados com 10% de soro fetal bovino, a 37°C, e incubados em atmosfera umidificada e com 5% de CO₂.

Ensaio de citotoxicidade

As células-RAW 264.7(ATCC TIB-71) foram semeadas (4x10⁴/poço), em microplacas de 96 poços, por 48h, a 37°C, juntamente com os extratos, previamente dissolvidos em DMSO e diluídos no meio RPMI-1640, até a maior concentração de 120 µg/mL.

As microplacas foram incubadas, por 48 horas, à temperatura de 37°C, sob atmosfera de umidade e com 5% de CO₂. Células-controle foram incubadas, na presença de DMSO, e sem os extratos (ou fármaco-padrão).

A viabilidade dos macrófagos foi determinada pelo ensaio de MTT, conforme a descrição anterior, e confirmada por comparação da morfologia do grupo-controle, ao microscópio óptico.

A análise da curva sigmóide dose-resposta foi feita usando o programa Graph Pad Prism 3.0, considerando a média dos ensaios realizados, em duplicata.

3.6.5. Avaliação da atividade citotóxica sobre *Artemia salina*

Os testes foram realizados no Laboratório de Biofarmacognosia, junto ao Departamento de Farmácia da Universidade de São Paulo.

Empregou-se a metodologia de Meyer *et al.* (1982) modificada e cistos de *Artemia salina* Leach (Maramar®).

Para a eclosão dos cistos, utilizou-se cerca de 5mg (~1000) de cistos, que foram dispersos, em cuba de vidro contendo solução salina (38g/L NaCl),

sob condições controladas de temperatura (26 ± 1 °C), além de aeração e iluminação constantes. Náuplios de 48 horas foram utilizados, no ensaio.

Cerca de 30mg de cada extrato foram utilizados para a preparação da diluição maior testada (1000 µg/mL) utilizando etanol (96° GL), como diluente. As demais concentrações testadas foram 100 e 10µg/mL, em frascos-ampola de vidro, com cerca de 15 mL de capacidade.

Os ensaios foram realizados, com o extrato etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados de *D. lanceolata*, em réplicas de 3.

O solvente foi evaporado à secura, em banho de água a 38 ± 2 °C. Em seguida, adicionou-se solução salina (5mL) e transferiram-se 10 náuplios, por frasco da réplica de concentração testada. Os frascos foram cobertos com tela de nylon e mantidos à temperatura ambiente, por 24 h.

Para verificar a viabilidade dos náuplios, efetuou-se, em réplica de 3,0, controle contendo solução salina (sem os extratos) e, utilizou-se, como fármaco de referência, sulfato de atropina (Merck®) (DL₅₀: 867,6 µg/mL) (MEYER *et al*, 1982).

A contagem dos náuplios sobreviventes foi feita com auxílio de lupa de pequeno aumento, após 24 horas. O cálculo da dose letal de 50% (DL₅₀) foi realizado, a partir da média de 3 réplicas. Os dados foram analisados pelo método de probitos (FINNEY, 1964), por regressão linear, considerando o intervalo de confiança de 95%.

Os extratos foram considerados tóxicos para o microcrustáceo, quando apresentaram DL₅₀<1000µg/mL (MEYER *et al*, 1982).

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Estudo botânico

O espécime utilizado, no presente estudo, foi encontrado, em ambiente de cerrado, apresentando: porte arbóreo, altura de cerca de 5m e diâmetro de

Figura 6- *Duguetia lanceolata* St. Hil. - **6A.** Hábito. **6B.** Detalhe da casca de caule. **6C** - Ramo com fruto (seta).

cerca de 25cm (Figura 6A), estando em fase inicial de frutificação (mês de outubro de 2001) (Figura 6C). O tronco possui coloração castanho-acinzentada, com casca rugosa, apresentando musgos e líquens na sua superfície (Figura 6B).

4.1.1. Caracterização macroscópica de folha transformada em droga

A folha é simples, inteira, coriácea a subcoriácea, elíptica a ovado ou oblongo-elíptica, de ápice agudo a acuminado, base aguda a atenuada. A lâmina foliar mede de 6,8 a 11,5 cm de comprimento e de 3,8 a 5,4 cm de largura.

A face adaxial da lâmina foliar é glabra, verde-escura, luzidia e a face abaxial é verde-acinzentada a verde-amarelada, áspera, luzidia e possui numerosos pontos acinzentados, regularmente, distribuídos sobre a superfície.

O padrão de venação é peninérveo, com nervura mediana mais saliente na face abaxial, sendo castanho-clara a castanho-amarelada e levemente amarelada, na face adaxial.

O pecíolo curto, medindo até cerca de 6 mm de comprimento, é curvo, levemente torcido, canaletado, alargado na porção distal, castanho-esverdeado, possuindo superfície abaxial irregular e áspera. Observado à lupa estereoscópica, notam-se escamas cobrindo a face abaxial, e tricomas estrelados, na concavidade da face adaxial.

A droga apresenta lâmina foliar, geralmente, dobrada em direção à face adaxial (Figura 7A). Possui odor aromático e sabor ligeiramente adstringente.

Figura 7 - *Duguetia lanceolata* St. Hil. Droga. **7A.** Aspecto geral (escala= 10mm). **7B.** Folhas distendidas (escala= 10mm). **7C.** Padrão de venação (escala= 5mm). **7D.** Face abaxial. Presença de escamas (pontos claros) (escala= 5mm)

4.1.2. Caracterização microscópica

4.1.2.1. Lâmina foliar

Em secção transversal, a epiderme da lâmina foliar apresenta-se uniestratificada, mostrando células alongadas no sentido periclinal, com dimensões variáveis e providas de paredes espessas (Figura 8A). Drusas podem ser observadas em número de uma, por célula epidérmica (Figura 8C), em secções não clarificadas, bem como substâncias de natureza fenólica (Figura 8A). Na epiderme da face abaxial, encontram-se escamas e tricomas tectores estrelados lignificados (Figuras 8A), juntamente com estômatos, que estão situados no mesmo nível das demais células epidérmicas.

Em vista frontal, as células epidérmicas de ambas as faces apresentam paredes espessas e contorno sinuoso (Figuras 9A e 10A), estando revestidas por cutícula lisa (Figuras 9A e 10A). Na face abaxial, observam-se estômatos paracíticos (Figuras 10A e 10B) bem como escamas inteiras e escamas estreladas (Figura 10B) ambas lignificadas. Estes tricomas, distribuídos por toda a epiderme da face abaxial, apresentam número de células e graus variáveis de soldadura das mesmas, observando-se um tipo, com menos de um terço dos raios livres (escamas inteiras) (Figuras 11A e 11B) ou o outro; com um a dois terços do comprimento do raio livres (escamas estreladas) (Figuras 11C a 11F).

Em algumas secções, é possível verificar remanescências destes tricomas e, por vezes, cicatrizes relativas ao local de inserção dos mesmos.

O mesofilo apresenta estrutura isofacial, sendo o parênquima paliçádico, em ambas as faces, constituído por um estrato de células alongadas no sentido anticlinal. Na face adaxial possui paredes delgadas e arranjo compacto e; na abaxial, as células apresentam extremidades alargadas com espaços intercelulares evidentes (meatos ou lacunas).

O parênquima lacunoso é constituído por quatro a seis estratos de células com formatos arredondado (Figura 8A e 8B) e alongado no sentido periclinal, estando dispostas de forma compacta.

Na região mediana do mesofilo, entre as células do parênquima paliçádico e do lacunoso, observam-se células coletoras (Figura 12C).

Células oleíferas de diferentes dimensões são encontradas dispersas no parênquima paliçádico (Figura 13A) e no parênquima lacunoso.

Substâncias de natureza fenólica (reagem com cloreto férrico) encontram-se, dispersas, em células dos parênquimas paliçádico e lacunoso (Figura 13B), na região dos feixes vasculares de menor porte (Figura 8A) e em células próximas à epiderme da face abaxial (Figura 13B) (conteúdo escuro).

O sistema vascular é caracterizado por feixes de pequeno e médio portes. Estes últimos, geralmente, estão envoltos por bainha esclerenquimática (Figura 12A). Frequentemente, possuem extensão de bainha composta de uma a duas fileiras de células, estando voltadas para a face adaxial (Figuras 12A e 12B)

Figura 8 - *Duguetia lanceolata* St. Hil. Lâmina foliar. Secção transversal. **8A.** Mesofilo isofacial. Detalhe de escama lignificada na face abaxial (seta) e presença de substâncias de natureza fenólica nos feixes vasculares de menor porte (conteúdo escuro). **8B.** Detalhe de mesofilo e de célula secretora de óleo essencial (sc). **8C.** Secção transversal. Detalhe de face adaxial com presença de drusas nas células epidérmicas (uma por célula) (seta).

Figura 9 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Vista frontal da face adaxial. **9A.** Células epidérmicas de paredes anticlinais sinuosas. **9B.** Detalhe de paredes celulósicas espessas e de drusas distribuídas em número de uma por célula epidérmica (setas).

Figura 10 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Vista frontal da face abaxial
10A. Detalhe de estômatos paracíticos. **10B.** Detalhe de escamas
lignificadas inteira (int) e estrelada (est).

Figura 11 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Indumento. Escamas lignificadas com diferentes graus de soldadura das células. **11A e 11B**. Detalhe de escamas inteiras. **11C a 11F**. Escamas estreladas.

Figura 12 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Secção transversal de lâmina foliar. **12A.** Detalhe de bainha do feixe vascular lignificada (bf) e extensão de bainha do feixe com duas fileiras de células (seta) **12B.** Detalhe de extensão de bainha do feixe com uma fileira de células (seta) **12C.** Detalhe de células coletoras no mesofilo (seta).

Figura 13 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Secção transversal de lâmina foliar (não clarificada). **13A.** Detalhe de célula secretora (cs) no parênquima paliádico. **13B.** Presença de substâncias de natureza fenólica (conteúdo celular escuro reagindo com cloreto férrico), no parênquima clorofiliano e na epiderme.

4.1.2.2. Nervura mediana

Na região do terço médio inferior, a secção transversal da nervura mediana apresenta contorno côncavo-convexo (Figura 14A).

A epiderme é uniestratificada (Figuras 14A) sendo revestida de cutícula espessa. Na face adaxial, as células epidérmicas são alongadas no sentido periclinal e, proporcionalmente, menores em relação àquelas observadas na região do mesofilo. Na face abaxial, as células epidérmicas são, geralmente, alongadas no sentido periclinal e quadrangulares, observando-se a presença de escamas lignificadas (Figura 14A).

Na face adaxial, verifica-se a presença de cerca de duas a quatro camadas de células colenquimáticas e geralmente alongadas no sentido periclinal (Figura 15A), com espessamento regular das paredes. Na face abaxial, observam-se de dois a quatro estratos de colênquima angular, mostrando células de contorno arredondado e tamanhos irregulares (Figura 13A).

O parênquima fundamental é constituído de células arredondadas de paredes espessas, delimitando espaços intercelulares pequenos. Na face adaxial, verifica-se o prolongamento do parênquima paliádico. Numerosos amiloplastos são evidenciados, com lugol, na região do sistema vascular e internamente a este (Figura 15B).

Os feixes vasculares colaterais (Figuras 14A e 14B), em número que varia de doze a quatorze, dispõem-se em semi-círculo, na região central da nervura (Figura 14A). Na região externa ao floema (Figuras 14A e 14B), observa-se calota espessa de fibras e, na face adaxial, de seis a nove extratos de fibras, dispostos na extremidade do arco delimitado pelos feixes vasculares (Figuras 14A e 15A).

Na região abaxial da nervura mediana observam-se esclereídes dispersos de forma isolada (Figura 14A). Células oleíferas podem ser evidenciadas, em montagem direta de material não clarificado, encontrando-se, no floema, no xilema, na região entre os feixes vasculares consecutivos, e no parênquima da face abaxial. Neste mesmo material, substâncias de natureza fenólica podem ser caracterizadas, na epiderme da face adaxial e no xilema.

Figura 14 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Secção transversal de nervura mediana. **14A.** Disposição do tecido vascular. Detalhe de escama lignificada na face abaxial (seta) **14B.** Detalhe de feixes vasculares colaterais.

Figura 15 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Folha. Secção transversal de nervura mediana. **15A**. Face adaxial. Detalhe de colênquima (col) e de estratos de fibras (f), na extremidade do arco vascular. **15B**. Secção não clarificada. Presença de amiloplastos, evidenciada, como conteúdo celular escuro com reativo de lugol, na região do sistema vascular e interna a este. x= xilema; f= floema

4.1.2.3. Pecíolo

Em secção transversal de região mediana, o pecíolo exhibe contorno côncavo-convexo, em forma de letra "V" (Figura 16A).

As células epidérmicas da face adaxial são menores do que na face abaxial, sendo, geralmente isodiamétricas e alongadas no sentido anticlinal. Na face abaxial, as células da epiderme são, geralmente, alongadas no sentido periclinal (Figura 16A).

Na face adaxial observam-se tricomas tectores estrelados eretos (Figura 16B) e, na face abaxial, vêem-se escamas lignificadas (Figuras 16B e 16C). Compostos de natureza fenólica encontram-se dispersos nas células epidérmicas, sendo observados em secções não clarificadas.

O colênquima angular apresenta cerca de seis a doze estratos de células, estando alinhadas no sentido anticlinal (Figura 16A), na face adaxial. Neste tecido, ocorrem células oleíferas dispersas.

O sistema vascular apresenta disposição central, em semi-círculo (Figura 16A), sendo constituído por cerca de seis a oito feixes vasculares colaterais, que possuem bainha de fibras (Figuras 16A e 16B). Os feixes colaterais consecutivos são separados por cerca de uma a duas fileiras de células parenquimáticas alongadas e dispostas no sentido anticlinal (Figuras 18A e 18B).

Na região perivascular, verifica-se a presença de bainha amilífera (Figura 18B) e, no tecido vascular, podem ser encontradas células oleíferas (Figura 18A). Em cortes não clarificados, é possível observar drusas diminutas dispersas no parênquima (Figura 17B).

Grandes grupos de esclereídes, com diferentes graus de lignificação da parede celular, são encontrados, na face abaxial, com disposição concêntrica (Figura 16C) podendo , também, ser vistos, na face adaxial, na região adjacente aos feixes vasculares (Figura 16A e 16C). Ainda, na face abaxial, ocorrem esclereídes isolados dispersos (Figuras 16A e 16B).

Figura 16 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Secção transversal de pecíolo. **16A.** Aspecto geral. **16B.** Detalhe de face adaxial com tricomas tectores estrelares (seta) e de região da face abaxial com escama lignificada (e). **16C.** Detalhe de região da face abaxial, com grupo de esclereídes (escl) e escama na superfície (e).

Figura 17 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Secção transversal de pecíolo. **17A.** Detalhe de tricomas tectores estrelados (seta) na face adaxial. **17B.** Secção não clarificada, mostrando a presença de drusas dispersas no tecido parenquimático na região da face abaxial (seta).

Figura 18 - *Duguetia lanceolata* St.Hil. Secção transversal de pecíolo. **18A.** Detalhe do sistema vascular e de célula secretora na região de xilema (seta) **18B.** Detalhe de feixe vascular colateral e de células da região perivascular contendo amiloplastos (a)

4.2 Estudo químico

4.2.1 Teor de alcalóides totais

O teor avaliado de alcalóides totais (2,8 g), em folhas (1047,2 g) do exemplar coletado de *D. lanceolata* foi de 0,27% (m/m).

4.2.2 Análise cromatográfica dos alcalóides de *D. lanceolata*

Pela análise cromatográfica, por CCD, o cromatograma que apresentou a melhor separação de componentes e que representa o perfil cromatográfico comparativo entre os alcalóides totais (não acetilados) e os alcalóides totais acetilados (ATacet) de *D. lanceolata*, encontra-se na Tabela 7.

Na tabela 8, encontra-se o resultado da análise da fração de alcalóide total acetilado (ATacet), que originou a sub-fração DL-3 e o composto isolado DL3/5.

Tabela 7. Cromatograma em camada delgada comparativo entre os alcalóides totais (AT) e alcalóides totais acetilados (ATacet) de *D. lanceolata* [SC-2:diclorometano-metanol (93,5:6,5)].

AT						ATacet				
Rf	Forma	UV 254	UV 366	Intens	Drg	Forma	UV 254	UV 366	Intens	Drg
0,92						arred	roxa	-	+	(-)
0,91	arred	roxa	-	+	(-)					
0,65						arred	roxa	-	+	(-)
0,58						"	"	azul	+++ / +	(-)
0,57	arred	roxa	-	++	(-)					
0,54						along	-	amarela	+++	(-)
0,47	arred	-	amarela	+++	(-)					
0,46						arred	roxa	-	+++	(+)
0,41						"	"	-	+++	(+)
0,36	arred	roxa	-	+++	(+)					
0,17	"	"	-	++	(+)					
0,08	"	-	Esverdeada	++	(-)					
0,04	"	-	azul	++	(-)					
0	"	roxa	-	+++	(+)	ogival	roxa	-	++	(+)

AT= alcalóides totais, ATacet= alcalóides totais acetilados, Intens= intensidade de mancha: +++=forte, ++= média, +=fraca, - = ausência de mancha, --/--= 254/366nm; Drg= reação com reativo de Dragendorff: (+) = reage (coloração alaranjada); UV 254= visualização à luz UV-λ=254nm, UV 366= visualização à luz UV-λ=366nm, Forma: arred= arredondada, along.= alongada.

Tabela 8- Cromatograma em camada delgada comparativo entre a fração de alcalóides totais acetilados (ATacet), fração DL-3 e o alcalóide isolado DL-3/5 de *D. lanceolata* [SC-3:diclorometano-metanol (92,5:7,5)].

ATacet						fração DL-3				alcalóide DL-3/5					
Rf	forma	UV 254	UV 366	Int	Drg	forma	UV 254	UV 366	Int	Drg	forma	UV 254	UV 366	Int	Dgr
0,88	arred	roxa	azulada	++/++	(-)										
0,85											arred	roxa	-	+++	(+)
0,72	ogival	roxa	azulada	+/+	(-)										
0,68						arred	roxa	-	+++	(+)					
0,62	ogival	roxa	-	+++	(+)										
0,60						arred	roxa	azul	++/++	(-)					
0,52						arred	-	amarela	+++	(-)					
0,43						arred	-	amarela	+++	(-)					
0,34						arred	roxa	-	+++	(+)					
0,26	ogival	-	azulada	+	(-)										
0,16	along	roxa	-	++	(+)										
0	arred	roxa	-	+++	(+)										

Intens= intensidade de mancha: +++ = forte, ++ = média, + = fraca, - = ausência de mancha, visualização no UV: --/--= 254/366 nm;
Drq= reação com reativo de Dragendorff: (+): reage (coloração alaranjada); (-); UV254= visualização à luz UV-λ=256nm, UV366= visualização à luz UV-λ=366nm, Forma: arred= arredondada, along= alongada.

4.2.3 Determinação da massa dos resíduos das frações.

Os valores de massa dos resíduos das frações (DL), obtidas por coluna filtrante (CF) dos alcalóides totais acetilados, foram dispostos na Tabela 9.

Tabela 9 - Valores de massa (mg) dos resíduos das frações alcaloídicas (DL) obtidas por CF.

frações alcaloídicas (DL)	massa (mg)
1	98,5
2	5,1
3	142,6
4	82,3
5	21,6
6	12,2
7	7,8
8	6,7
9	6,3
10	3,2
11	1,5
12	1,0
13	2,2
14	4,3
15	9,8
16	20,2
17	22,7

4.2.4- Separação de componentes da fração alcaloídica total acetilada

O fracionamento, por CF, dos alcalóides totais acetilados de *D. lanceolata*, resultou em 17 frações (Figura 19) (Tabela 9).

Determinou-se o perfil cromatográfico das frações DL. A fração DL-3 de maior teor em massa (142,6mg) (Tabela 9) apresentou reação Dragendorff positiva e foi selecionada para o fracionamento. Obteve-se a melhor separação de componentes utilizando o SC-3 [diclorometano-metanol (92,5:7,5)] (Tabela 5).

Após a cromatografia preparativa (CP) de DL-3, utilizando idêntico sistema de solventes e as condições descritas, em 3.4.2.1 obtiveram-se 5 subfrações, denominadas DL-3/1 a DL-3/5 (Figura 19). Entre estas, somente, DL-3/5 apresentou mancha majoritária e massa suficiente (14,3mg) para efetuar as análises posteriores.

Na análise cromatográfica, por CCD, utilizando o sistema SC-3, o composto DL-3/5, amorfo e de coloração acastanhada, mostrou mancha única, com R_f : 0,85, coloração roxa à luz UV 254 nm, ausência de fluorescência, e reação de Dragendorff positiva (Tabela 8) tendo sido submetido às análises espectroscópicas.

Figura 19- Esquema geral de fracionamento dos alcalóides totais acetilados de *D. lanceolata*.

4.2.5 –Dados espectrais da substância DL-3/5

Pelo registro de espectro na região do infravermelho (IV) (Figura 20), em pastilha de NaCl, o composto DL-3/5 mostrou as seguintes absorções:

IV (NaCl, cm^{-1}): 2922 (ν - CH ar), 2850 (ν - CH ar), 1735 (ν - C=O), 1627 (ν - C=O amida), 1554 (ν - C=C ar), 1505 (ν - C=C ar), 1462 (ν - CH ar), 1420 (ν - CH ar), 1371 (ν -CH metilenodioxí), 1243 (ν =C-O-C metilenodioxí), 1041 (ν =C-O-C metilenodioxí), 949 (ν - C-O metilenodioxí).

Na análise por ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ^1H) (Figura 21) e de carbono 13 (RMN ^{13}C) (Figura 22), verificaram-se os deslocamentos químicos seguintes:

RMN ^1H (CDCl_3 , ppm):

Isômero Z: 2,22 (3H, s, COCH_3), 2,50-2,80 (H4 *anti*, H4 *gauche* e H7 *anti*, m), 3,16 (H7 *gauche*, dl, $J=10,3$ Hz), 3,30 (H5 *gauche*, tl, $J=12,0$ Hz), 4,01 (H5 *anti*, dl, $J=13,5$ Hz), 5,20 (H6a, bd, $J=10,5$ Hz), 5,97/ 6,09 (1H, sl, OCH_2O), 6,58 (H3, s), 7,24-7,32 (H8, H9 e H10, m), 8,11 (H11, dl, $J=8,0$ Hz).

Isômero E: 2,17 (3H, s, COCH_3), 2,50-2,80 (H4 *anti*, H4 *gauche* e H7*anti*, m), 3,16 (H7 *gauche*, dl, $J=10,3$ Hz), 3,30 (H5 *anti*, tl, $J =12,0$ Hz), 4,69 (H6a, dl, $J=12,8$ Hz), 4,95 (H5 *gauche*, m, $J =9,0$ Hz), 5,97/6,09 (1H, sl, OCH_2O), 6,61 (H3, s), 7,24-7,32 (H8, H9 e H10, m), 8,11 (H11, dl, $J=8,0$ Hz).

RMN ^{13}C (CDCl_3 , ppm):

Isômero Z: 22,5 (CH_3CO), 29,5 (C4), 33,5 (C7), 42,0 (C5), 50,5 (C6a), 101,0 (OCH_2O), 107,5 (C3), 127,0* (C11), 127,5* (C10), 128,0* (C9), 128,5* (C8), 128,8* (C3a), 130,0 (C11a), 136,0 (C7a), 143,2 (C1), 147,0 (C2), 167,0 (C=O).

Isômero E: 21,5 (CH_3CO), 30,0 (C4), 36,0 (C7), 36,5 (C5), 54,0 (C6a), 100,0 (OCH_2O), 108,0 (C3), 127,0* (C11), 127,5* (C10), 128,0* (C9), 128,5* (C8), 128,8* (C3a), 131,0 (C11a), 135,5 (C7a), 143,0 (C1), 147,5 (C2), 167,5 (C=O).

Figura 20 - *D. lanceolata* St. Hil. – Espectro na região do IV da substância DL3/5 (NaCl)

Figura 21 - *D. lanceolata* St. Hil. - Espectro de RMN de ^1H da substância DL3/5 (300 MHz, CDCl_3)

Figura 22 - *D. lanceolata* St. Hil. – Espectro de RMN de ^{13}C da substância DL3/5 (75 MHz, CDCl_3)

4.3. Avaliação da atividade biológica

4.3.1. Avaliação da atividade anti-malária *in vitro*

As concentrações efetivas, que levam à inibição de 50% dos parasitas (CE_{50}) referentes ao extrato etanólico (ET), aos alcalóides totais (AT) e aos alcalóides totais acetilados (ATacet) de *D. lanceolata*, frente às cepas de *P. falciparum* resistente (K-1) e sensível (Palo Alto) à cloroquina encontram-se, na Tabela 10.

Tabela 10. Concentração Efetiva de 50% dos parasitas (CE_{50}) para o extrato etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados de *Duguetia lanceolata*, frente às cepas de *P. falciparum* sensível (PA) e resistente (K-1) à cloroquina

<i>D. lanceolata</i>		
CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
<i>P. falciparum</i>		
Extratos/ fármaco-padrão	PA	K-1
ET	7,2	10,1
AT	5,0	2,0
ATacet	16,7	3,0
difosfato de cloroquina	0,009	0,025

CE_{50} : valores relativos à média de ensaios realizados em duplicata (n=2), Intervalo de confiança:95%, ET= extrato etanólico, AT= alcalóides totais, ATacet = alcalóides totais acetilados

4.3.2. Avaliação das atividades anti-leishmania, anti-tripanosoma e citotóxica sobre células de camundongos

Os resultados da avaliação dos extratos etanólico e alcaloídico de *D. lanceolata* frente aos parasitas *Leishmania (L.) chagasi* e *Trypanosoma cruzi*, em confronto com a citotoxicidade sobre células RAW-264.7 de camundongos estão expressos na Tabela 11.

O extrato etanólico, os alcalóides totais e os alcalóides totais acetilados de *D. lanceolata* não apresentaram atividade frente às formas promastigotas de *Leishmania (L.) chagasi* ($CE_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 11).

Tabela 11. Avaliação da atividade dos extratos de *D. lanceolata* (etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados) sobre *Leishmania (L.) chagasi*, *Trypanosoma cruzi* e da citotoxicidade frente as células RAW-264.7 de camundongos.

Extratos/ componente isolado	<i>D. lanceolata</i>		células RAW 264.7 CE ₅₀ (µg/ mL) (LC:95%)
	<i>L. chagasi</i>	<i>T. cruzi</i>	
	Promastigotas CE ₅₀ (µg/ mL) (LC:95%)	Tripomastigotas % sobrevivência com 100 µg/ mL (± DP)	
ET	> 100	0 ± 0	> 120
AT	> 100	34,01 ± 12,1	> 120
ATacet	> 100	0 ± 0	nd
DL-3/5	nd	>100	nd

Pentamidina = 1,69 µg/mL (14,1-20,27), Toxicidade = 18,83 µg/mL (13,1-26,9); *Benznidazol* (100 µg/mL) = 31,79% ± 1,7, Toxicidade = 57,86 µg/mL (45,4-73,7); ± DP = desvio padrão; LC = limite de confiança; ET = extrato etanólico (95% v/v); AT = alcalóides totais; ATacet = alcalóides totais acetilados; DL3/5 = alcalóide isolado; nd = não determinado.

Frente ao *Trypanosoma cruzi*, o extrato etanólico e os alcalóides totais acetilados de *D. lanceolata* causaram 100% de morte das formas tripomastigotas em comparação com o grupo controle (sem fármaco) (Tabela 11). Para os alcalóides totais (não acetilados), o percentual de morte verificado mostrou ordem de grandeza semelhante (66%) àquela provocada pelo benznidazol (fármaco de referência) (68,2%), (Tabela 11) (Figura 20) que, por sua vez, apresentou maior nível de citotoxicidade (57,86 µg/mL) do que a fração alcaloídica (CE₅₀ > 120 µg/ mL).

Figura 23 – Percentual de sobrevivência de *T. cruzi* frente ao tratamento com os alcalóides totais de *D. lanceolata* em relação ao benznidazol (fármaco de referência).

O composto isolado (DL-3/5) foi inativo, frente às formas tripomastigotas até a máxima concentração testada ($CE_{50} > 100 \mu\text{g/mL}$).

Com relação aos ensaios frente aos macrófagos RAW 264.7, ambos os extratos de *D. lanceolata* (etanólico e alcalóides totais), mostraram ausência de toxicidade, até a maior concentração testada ($120 \mu\text{g/mL}$) (Tabela 11).

Os compostos usados como referência nos testes (pentamidina e benznidazol) foram mais tóxicos para as células de mamífero do que os extratos testados do vegetal (Tabela 11).

4.3.3. Avaliação da atividade citotóxica sobre *Artemia salina*

A avaliação da atividade citotóxica sobre *Artemia salina* (dose letal sobre 50% dos náuplios (DL_{50})) do extrato etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados frente ao microcrustáceo *A. salina*, estão demonstrados na Tabela 12.

Tabela 12 - Avaliação da atividade citotóxica dos extratos (etanólico, alcalóides totais e alcalóides totais acetilados) de *D. lanceolata* sobre *Artemia salina*.

<i>D.lanceolata</i> Extratos	<i>Artemia salina</i> DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$), IC:95%
ET	>1000
AT	>1000
Atacet	843,2

ET= extrato etanólico; AT= alcalóides totais; ATacet= alcalóides totais acetilados; IC= intervalo de confiança de 95%; DL_{50} : = dose letal sobre 50% dos náuplios; sulfato de atropina: DL_{50} : 867,60 $\mu\text{g/mL}$.

Discussão

5. DISCUSSÃO

A família Annonaceae é conhecida pela presença de alcalóides, entre outros componentes (LEBOEUF, 1982; SHAMMA, 1972; WATERMAN, 1986), especialmente aqueles de estrutura isoquinolínica e a constatação da atividade antiprotozoária destes compostos, por diversos pesquisadores, no mundo todo (ANGERHOFER *et al.*, 1999; GABUNJU *et al.*, 1995; RASOANAIVO *et al.*, 1999; GUINAUDEAU *et al.*, 1997; SAEZ *et al.*, 1997; SEPÚLVEDA-B. *et al.*, 1996; MERSCHJOHANN *et al.*, 2001; BRINGMANN *et al.*, 2000; PHILLIPSON, 1995; PHILLIPSON e WRIGHT, 1991; RIOS *et al.*, 1989; CAMACHO *et al.*, 2002; CAZORLA *et al.*, 2001; BRINGMANN *et al.*, 2000; AKEDENGUE *et al.*, 1999; QUEIROZ *et al.*, 1996; FOURNET *et al.*, 1988), motivaram o estudo de *D. lanceolata*.

Desta forma, o critério utilizado na seleção da espécie, em questão, foi o quimiotaxonômico, considerando a presença dos componentes alcaloídicos de interesse, ao nível da família (Annonaceae) e do gênero (*Duguetia*) aos quais pertence o vegetal (LEBOEUF, 1982; WATERMAN, 1986; ROBLOT *et al.*, 2003). Entretanto, outro critério, muito empregado na busca de novas moléculas farmacologicamente ativas, baseia-se no estudo etnobotânico prévio das espécies a serem estudadas, (BENOIT *et al.*, 1996; LEAMAN *et al.*, 1995; GESSLER *et al.*, 1994; BRANDÃO *et al.*, 1992).

5.1 – Estudo botânico

Com relação ao hábito do espécime coletado, apesar de ser arbóreo, sabe-se que a espécie, igualmente, pode ser encontrada na forma arbustiva (KOEK-NOORMAN e MAAS, 2003), conforme ocorre com outras espécies de *Duguetia* (MAAS *et al.*, 2003)

Na análise macroscópica de folhas de *D. lanceolata*, caracteres da família e gênero a que pertence foram reconhecidos, como: consistência coriácea (FREIRE, 1943; JOLY, 1966; STEYERMARK *et al.*, 1995) e presença de indumento constituído de escamas e tricomas tectores estrelados (STEYERMARK *et al.*, 1995). Na espécie avaliada, os tricomas tectores estrelados e as escamas apresentam distribuição característica sendo observados, respectivamente, na face adaxial da região de nervura foliar e na face abaxial, tanto na região de nervura como de lâmina foliar.

À vista desarmada, as escamas aparecem, como pontos claros (Figura 7D; p.48), sendo que também podem ser registrados, ao nível microscópico, conforme demonstram as micrografias (Figuras 10B e 11; pp.53 e 54).

O dobramento, por vezes, muito pronunciado, das margens foliares para o lado da face adaxial (Figura 7A; p.48), mostrou-se característico, na análise macroscópica da droga.

No gênero *Duguetia*, verifica-se a existência de representantes que possuem folhas de consistência cartácea embora, em *D. lanceolata*, mostre-se coriácea. Semelhantemente, as lâminas foliares, no mesmo gênero, podem ser de glabras a densamente cobertas por tricomas peltados (escamas) estrelares (HE e MAAS, 1993; MAAS *et al.*, 2003), apontando, assim, para a importância das peculiaridades observadas em *D. lanceolata*, para a correta diagnose da espécie.

Em *Duguetia*, o indumento representa caractere de importância sistemática (MAAS *et al.*, 1993; KOEK-NOORMAN e MAAS, 2003), sendo constituído, na maior parte das espécies deste táxon, de tricomas tectores e tricomas peltados (escamas) estrelares, apresentando peculiaridades morfológicas, de tal forma, que receberam uma classificação específica (HE, MAAS, 1993). Nesta, as escamas estrelares, são classificadas de acordo com o grau de soldadura dos raios (células com disposição radial) que as compõem. Assim sendo, escamas com raios livres atingindo menos de um terço de seu comprimento foram denominadas escamas inteiras (HE e MAAS, 1993). No caso das escamas cujos raios são livres, na extensão de um a dois terços do comprimento total, foram chamadas escamas estrelares.

He e Maas (1993) consideram, ainda, que em *Duguetia*, existem tricomas estrelares com raios livres, na extensão de mais de dois terços do seu comprimento. Neste caso, poderiam ser adpressos; sendo peltados (escamas), eretos; com raios estreitos e quase perpendiculares à superfície da planta (tricomas tectores estrelares) ou curviformes, quando os raios apresentarem-se curvados. Os tricomas adpressos, segundo esses autores, podem ser encontrados, no gênero, em ambas as faces foliares, enquanto que os eretos são mais freqüentes na face adaxial da lâmina, no ovário e estigma. Os tricomas estrelares curviformes parecem ser mais encontrados na face mais interna das brácteas, sépalas e pétalas, de todas as espécies, e, por vezes, nos estigmas.

A ocorrência de dois tipos de escamas de acordo com o grau de soldadura de suas células (raios) foi verificada, na espécie em estudo, o que pode ser considerado de valor diagnóstico (HE e MAAS, 1993).

Desta forma, segundo a classificação destes autores, *D. lanceolata* mostrou, na epiderme da face abaxial da região do limbo, nervura mediana e pecíolo, a presença de escamas inteiras, nas quais o grau a soldadura das células alcança cerca de dois terços do comprimento da mesma (raio) (Figuras 11A e 11B; p.54). Em menor frequência, também, foram encontradas escamas estelares, com as células livres em uma extensão que compreende de um a dois terços do seu comprimento (Figuras 11C a 11F; p.54). De forma geral, as escamas apresentaram número de células variáveis (Figuras 10B e 11; pp. 53 e 54).

Adicionalmente, na face adaxial do pecíolo, foi constatada a presença de tricomas tectores estelares, pouco numerosos, apresentando morfologia do tipo ereta (HE e MAAS, 1993) (Figuras 16B e 17A; pp. 61 e 62).

Pode-se dizer que, no aspecto da anatomia foliar de *Duguetia*, este trabalho situa-se entre os raros existentes sobre o tema, tendo sido Bakker o pioneiro (BAKKER e VISSER, 1994; BAKKER, 2003), neste estudo. Em 2003, o mesmo autor estudou 46 espécies do gênero. Entretanto, o estudo de *D. lanceolata* permaneceu inédito, até o presente.

A presença de peculiaridades, na região abaxial do mesófilo de *D. lanceolata*, e a ocorrência de mesófilos dorsiventral e isofacial, no gênero (BAKKER, 2003), geraram dificuldades, no momento da sua classificação como isofacial considerando, principalmente, a morfologia do estrato celular diretamente relacionado à epiderme da face abaxial, sendo que apesar de possuir células de contorno alongado no sentido anticlinal e dispostas em paliçada (Figuras 8A e 8B; p.51), apresenta espaços intercelulares maiores do que a camada paliçada relacionada à face adaxial (Figuras 8A e 8B; p.51) e possui, em relação a esta, comprimento celular menor e contorno alargado nas extremidades.

Considerando o ambiente de cerrado, de onde proveio o exemplar coletado de *D. lanceolata*, constatou-se, nas folhas, a presença de características consideradas como freqüentes em espécies xeromórficas, entre estas, citam-se: a ocorrência de tricomas tectores pluricelulares e de escamas abundantes, nas superfícies foliares. A presença deste anexos epidérmicos está relacionada à

diminuição da transpiração (FERRI, 1955) bem como ao isolamento do mesófilo do calor excessivo (ESAU, 1977).

Outros caracteres encontrados em xerófitas (FERRI, 1955) foram observados, na espécie estudada, como: cutícula espessa, cristais, células oleíferas, numerosos elementos de sustentação na nervura mediana e no pecíolo. Tais características estão em acordo com a função protetora do revestimento de cutina, que promove a redução da transpiração da epiderme (LARCHER, 1995), assim como a presença de células oleíferas que é considerada como sendo de natureza adaptativa, em plantas de ambientes secos (FAHN e CUTLER, 1992). O mesmo pode ser dito com relação aos numerosos elementos de sustentação (FERRI, 1955) observados na nervura mediana e no pecíolo de *D. lanceolata*.

A constatação da ocorrência, na espécie, de bainhas de fibras esclerificadas associadas ao sistema vascular, no mesófilo e na nervura mediana (Figuras 12 e 14; pp.55 e 58), igualmente, pode ser considerada como caractere relacionado ao ambiente seco em que medra o vegetal (ESAU, 1977; FAHN e CUTLER, 1992). Segundo Cunningham (1999), isto permite que se mantenha a integridade estrutural da lâmina foliar, quando há possibilidade de murchamento por perda de água.

Ainda, acerca do sistema vascular, verificou-se, no mesófilo, que os feixes vasculares de maior calibre apresentam extensão de bainha do feixe em direção à epiderme da face adaxial (Figuras 12A e 12B; p.55). Foram atribuídas a estas estruturas funções relativas à sustentação da folha, além de transporte de água e outras substâncias para a epiderme (WYLIE, 1943; RAVEN, 1996).

De forma geral, na anatomia de *D. lanceolata* identificaram-se alguns caracteres importantes, porém, igualmente, encontrados em outras anonáceas e/ou duguetias (METCALFE e CHALK, 1950), como: drusas isoladas nas células epidérmicas (Figuras 8C e 9B; pp.51 e 52), células oleíferas dispersas no mesófilo (Figuras 8B e 13A; pp.51 e 56), esclereídes dispersos na face abaxial da região de nervura mediana (Figura 14A; p.58), estômatos paracíticos com localização restrita à epiderme da face abaxial (Figuras 8A e 10; pp. 51 e 53) e arco de feixes vasculares, na região da nervura, limitado por faixa de fibras na região adaxial (Figuras 14A e 15A; pp.58 e 59).

Considerando as particularidades constatadas na análise da espécie em questão pode-se citar, como caracteres de valor diagnóstico, para a mesma, a

presença de: paredes anticlinais e periclinais externas espessas (Figuras 8A, 8B e 12; pp.51 e 55); drusas na epiderme da face adaxial e não em ambas as faces como descrito para outros gêneros e espécies (METCALFE e CHALK, 1950; BAKKER, 2003); ausência de inclusões cristalinas no mesofilo, mesmo nas secções não clarificadas, em contraste com a descrição do gênero (BAKKER, 2003); parênquima clorofiliano lacunoso compacto (Figuras 8A e 8B; p.51) além de células secretoras, geralmente, alongadas no sentido anticlinal (Figura 8B e 13A; pp.51 e 56) e arredondadas, presentes, respectivamente, nas regiões do parênquima paliádico da face adaxial e na região mediana do mesofilo.

No pecíolo, foram observados de 5 a 8 feixes colaterais distribuídos em arco (Figura 16A; p.61), sendo que o número destes feixes foi considerado importante na diagnose das espécies e gêneros de Annonaceae, por Metcalfe e Chalk (1950). As demais características desta parte foliar não encontraram parâmetro de comparação, na literatura, frente à família e gênero, sendo sua descrição inédita para a espécie.

A presença de compostos de natureza fenólica, evidenciada com o auxílio de solução de cloreto férrico (KRAUS e ARDUIN, 1997) mostrou-se abundante nos parênquimas foliares e na região dos tecidos vasculares de *D. lanceolata* (Figura 13B; p.56), podendo tratar-se de compostos polifenólicos (ácidos fenólicos, catequinas, proantocianidinas, taninos, flavonóides), componentes fenólicos do óleo essencial ou, mesmo, de alcalóides isoquinolínicos fenólicos encontrados, na família Annonaceae (LEBOEUF, 1982, WATERMAN, 1985; ROBLOT *et al.*, 2003).

5.2 – Estudo químico

O estudo químico de *D. lanceolata* foi direcionado para a obtenção da fração alcaloídica e, eventualmente, de componentes da mesma, visando a avaliação da atividade biológica deste grupo de constituintes.

Ainda que, a parte considerada da planta, o local, a época de coleta e outros parâmetros influenciem no teor de metabólitos secundários (FALKENBERG *et al.*, 1999, ROBBERS *et al.*, 1996; CASAMADA, 1977; OLIVEIRA e AKISUE, 1989), a ordem de grandeza do teor obtido de alcalóides de *D. lanceolata* (0,27% m/m) foi próxima ou inferior àquela encontrada em outras espécies de *Duguetia*, como: *D. spixiana* (0,2% m/m) (RASAMIZAFY *et al.*, 1987^b), (0,3%

m/m) (DEBOURGES *et al.*, 1987^a, 1987^b), *D. obovata* (1% m/m) (ROBLOT *et al.*, 1983) e *D. vallicola* (1,1% m/m) (PÉREZ *et al.*, 2004).

Apesar de não ter sido o objetivo deste trabalho, a determinação comparativa dos teores de alcalóides nos diversos órgãos vegetais de diferentes espécimes coletados, em diferentes condições edáficas, é extremamente importante e representa tema de grande utilidade prática para futuras pesquisas.

A presença de alcalóides é uma das características mais importantes da família Annonaceae, possuindo predominantemente estrutura isoquinolínica (LEBOUEF, 1982).

Conforme verificado em literatura, diversas classes de alcalóides isoquinolínicos são encontradas no gênero *Duguetia* (Tabela 1; p.13.), além de outros componentes como: benzenóides, esteróides, óleos essenciais, sesquiterpenos, triterpenos e flavonóides (Tabela 2; p.23).

A presença de hidroxilas fenólicas, na estrutura dos componentes de diferentes classes de alcalóides isoquinolínicos (Figura 2; p.12), torna-os facilmente degradáveis e/ou oxidáveis. Considerando este fato, que interfere diretamente nos resultados do trabalho experimental, realizou-se a acetilação da fração alcaloídica total, logo após a sua obtenção. Com este procedimento, houve a redução de polaridade dos componentes alcaloídicos de *D. lanceolata* que pode ser percebida na Tabela 7 (p.64), o que permitiu a utilização de sistemas de solventes de polaridade inferior, comparativamente, àqueles que seriam usados na separação dos mesmos alcalóides não acetilados, tendo facilitado os procedimentos e reduzido o tempo de análise.

Com o fracionamento dos alcalóides totais acetilados (Figura 19; p.67), verificou-se pela análise, por CCD, que a fração majoritária (DL-3) (142,6 mg), foi aquela que mostrou melhor separação de componentes e que indicou a presença de alcalóides (reação Dragendorff positiva), o que levou à seleção, desta, para o processo de isolamento.

As demais frações foram, igualmente, submetidas à análise cromatográfica, sendo que tanto para aquelas que acusaram a presença de alcalóides de menor polaridade (DL-2), quanto para as de maior polaridade (DL-7 a DL-11) em relação à DL-3, o maior fator limitante para o seu isolamento foi o teor reduzido (Tabela 9; p.66), o que inviabilizou a continuidade de seu estudo.

No desenvolvimento cromatográfico do componente separado DL-3/5 (Tabela 8, p. 65) verificou-se a presença de mancha única, reativa ao reagente de Dragendorff, tendo sido encaminhado às análises espectroscópicas para a determinação estrutural.

O espectro no infravermelho (Figura 20; p.69) mostra absorções em 2922, 1554 e 1420 cm^{-1} , características de anel aromático e uma banda, em 1627 cm^{-1} , indica a presença carbonila de grupamento amida, o que se confirma com os dados do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 22; p.71), que exhibe um sinal típico em 167,5 ppm.

Pela análise dos dados do espectro de RMN de ^1H da substância DL-3/5 (Figura 21; p.70) verificou-se que há um dubleto atribuído ao próton aromático de dois isômeros (*Z* e *E*), em H-11, com constante de acoplamento (*J*) de 8,0 Hz.

Observaram-se, ainda, três sinais de hidrogênios aromáticos, na região de δ 7,24-7,32 ppm, referentes aos hidrogênios aromáticos do anel D, pela multiplicidade dos sinais. Os singletos em δ 6,58 e 6,61 ppm foram observados e atribuídos aos prótons H-3 (Isômeros *Z* e *E*). Finalmente, verificou-se a presença do grupo metilenodioxí em C-1/C-2, que ocorre na forma de dois sinais, em δ 5,97 e 6,09 ppm (Figura 21; p.70). A presença deste grupo é, igualmente, indicada pelos dados do espectro no IV (Figura 20; p.69), sendo que as absorções, em 1041 e 949 cm^{-1} , podem ser atribuídas, respectivamente, aos estiramentos de $=\text{C}-\text{O}-\text{C}$ e $\text{C}-\text{O}$ do referido grupamento (NAKANISHI e SOLOMON, 1977).

No isômero *Z*, o próton H-6 absorve na forma de um dubleto largo em 5,20 ppm ($J=10,5\text{Hz}$), enquanto que, no isômero *E*, absorve em 4,69 ppm ($J=12,8\text{Hz}$). O próton H-5 *anti* evidenciado pelas constantes de acoplamento (dubletos largos) absorve em campos mais baixo (4,95 ppm), no isômero *E*, e em campo mais alto (4,01 ppm), no isômero *Z*.

No espectro de RMN de ^{13}C , observa-se que há duas metilas do grupo acetila, em 21,5 e 22,5 ppm (Figura 22; p.71), também encontradas nos espectros de RMN de ^1H em 2,17 e 2,22 ppm (Figura 21; p.70). O carbono do grupo metilenodioxí apresenta sinais em 100,0 e 101,0 ppm (Figura 22; p.71).

Desta forma, sugere-se, para o composto isolado, a estrutura da *N*-acetilanonaína, sendo que o grupamento carbonila ligado ao átomo de nitrogênio

Tabela 14 - Dados espectrais de RMN ^1H dos isômeros *Z* e *E* da substância DL3/5 (Figura 23) (400 MHz, CDCl_3) e de *N*-acetilanonaína (GUINAUDEAU *et al.*, 1994; NONATO *et al.*, 1990).

H	DL-3/5		<i>N</i> -acetilanonaína	
			Guinaudeau <i>et al.</i> 1994; Nonato <i>et al.</i> , 1990	
	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>
	δ (ppm); <i>J</i> (Hz)		δ (ppm); <i>J</i> (Hz)	
3	6,58 s	6,61 s	6,58 s	6,61 s
4 <i>anti</i>				
4 <i>gauche</i>	2,50 – 2,80 m		2,58-2,77 m*	
7 <i>anti</i>			2,78-2,86 m*	3,16 dd (14;4) *
7 <i>gauche</i>	3,16 dl (10,3)	3,16 dl (10,3)	3,16 dd (14;4)*	2,78-2,86 m*
5 <i>anti</i>	4,01 dl (13,5)	4,95 m (9,90)	3,98 dd (12;1)	4,95 dd (12;1)
5 <i>gauche</i>	3,30 tl (12,0)	3,30 tl (12,0)	3,28 td (12;1)*	2,58-2,77 m*
6a	5,20 dl (10,5)	4,69 dl (12,8)	5,20 dd (10;4)	4,69 dd (14;5)
8,9,10	7,24-7,32 m	7,24-7,32 m	7,24-7,32 m	7,24-7,32 m
11	8,11dl (8,0)	8,11 dl (8,0)	8,11 dd (8;1)	8,11dd (8;1)
COCH_3	2,22 s	2,17 s	2,22 s	2,19 s
OCH_2O	6,09/ 5,97 sl	6,09/ 5,97 sl	6,09/ 5,97 d	6,09/ 5,97 d

Espectro a 300 MHz, em CDCl_3/TMS | dd=duplo dubleto; dl=dubleto largo; tl =tripleto largo; sl =singleto largo; s = singleto; m =multipleto; td = triplo dubleto

*= dados exclusivos de Nonato *et al.*, 1990.

Tabela 15 - Dados espectrais de RMN de ^{13}C dos isômeros *Z* e *E* da substância DL-3/5 (Figura 24) (75 MHz, CDCl_3) e de *N*-acetilanonaína (GUINAUDEAU *et al.*, 1994; NONATO *et al.*, 1990).

C	DL-3/5		<i>N</i> -acetilanonaína	
			Guinaudeau <i>et al.</i> , 1994; Nonato <i>et al.</i> , 1990	
	<i>Z</i>	<i>E</i>	<i>Z</i>	<i>E</i>
	δ (ppm)		δ (ppm)	
1	143,2	143,0	143,2	143,0
1a	118,0	117,0	118,0	117,0
1b	125,0	125,0	126,0	125,0
2	147,0	147,5	147,0	147,5
3	107,5	108,0	107,5	108,0
3a	128,8*	128,8	128,8*	-
4	29,5	30,0	29,5	30,0
5	42,0	36,5	42,0	36,5
6a	50,5	54,0	50,5	54,0
7	33,5	36,0	33,5	36,0
7a	136,0	135,5	136,0	135,5
8	128,5*	128,5	128,5*	
9	128,0*	128,0	128,0*	
10	127,5*	127,5	127,5*	
11	127,0*	127,0	127,0*	
11a	130,0	131,0	130,5*	131,0
CH ₃ -CO	22,5	21,5	22,5	21,5
OCH ₂ O	101,0	100,0	101,0	100,0
C=O, amida	167,0	167,5	167,0	167,5

* = valores intercambiáveis

5.3 – Atividade biológica

Na busca de novos agentes antiparasitários, alcalóides isoquinolínicos, de diversos grupos estruturais demonstraram atividade sobre diferentes protozoários entre os quais encontram-se os agentes da malária.

Todos os extratos testados (etanólico, alcaloídico e alcaloídico acetilado) de *D. lanceolata* mostraram atividade inibitória frente ao *P. falciparum* (Tabela 10, p.72) ainda que em diferentes níveis.

Os alcalóides totais foram os mais ativos de todos os extratos, tanto frente à cepa sensível à cloroquina (Palo Alto), quanto frente à resistente (K-1), sendo que, neste último caso, demonstraram, o maior nível de atividade observado em todos os ensaios (CE_{50} : 2,0 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 10; p.72).

De forma semelhante, verificou-se que os alcalóides totais acetilados tiveram maior nível de atividade sobre a cepa resistente (K-1) (CE_{50} : 3,0 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 10; p.72).

Entretanto, comparativamente, pode-se verificar que a acetilação reduziu o grau de atividade dos alcalóides totais frente a ambas as cepas, com uma redução sensivelmente maior para a cepa Palo Alto, da ordem de 3,4 vezes, contra 1,5 vezes frente à K-1 (Tabela 10; p.72). É possível que tal redução esteja relacionada à interferência do processo de acetilação sobre o aumento da massa molecular dos compostos, o que serviria de barreira à passagem destes pela membrana citoplasmática dos parasitas. Outra hipótese pode estar relacionada à alteração da polaridade dos alcalóides ou do pH, modificando a solubilidade destes e, por conseguinte, reduzindo sua ação.

Em confronto, verificou-se que o extrato etanólico de *D. lanceolata* foi mais ativo sobre a cepa sensível, sendo que dos três extratos testados foi o que apresentou menor nível de atividade frente à cepa K-1.

É interessante notar que, em ensaios similares com outra espécie de *Duguetia* (*D. furfuracea*), os alcalóides totais foram inativos frente à cepa K-1 (FISCHER *et al.*, 2004).

No reduzido número de espécies do gênero que foram submetidas aos ensaios de atividade antimalárica insere-se *D. hadrantha*, cujo extrato etanólico, à semelhança de *D. lanceolata*, foi ativo frente ao *P. falciparum* (MUHAMMAD *et al.*, 2001).

Apesar de não existirem critérios universalmente adotados para delimitar o nível de atividade antimalárica de compostos, Rasoanaivo *et al.* (1999) estabeleceu o valor de CE_{50} : 5 $\mu\text{g/mL}$, na análise dos resultados e discussão acerca sobre a atividade de extratos vegetais, por eles, analisados.

Considerando este parâmetro para os dados dos ensaios realizados com *D. lanceolata*, pode-se dizer que a continuidade do estudo dos alcalóides, desta espécie, é promissora, pelo menos, frente à cepa K-1 (CE_{50} : 2,0 $\mu\text{g/mL}$) (Tabela 10, p.72). Mesmo sendo, este valor, analisado em comparação à CE_{50} de compostos antimaláricos isolados, como a própria cloroquina (0,025 $\mu\text{g/mL}$ [K-1]) (Tabela 10; p. 72), faz-se necessário lembrar que o valor da CE_{50} para os alcalóides de *D.lanceolata* refere-se ao extrato alcaloídico total, o que indica a grande possibilidade deste apresentar constituintes isolados que possuam alto grau de atividade, o que justifica a realização futura de isolamento biomonitorado de seus componentes.

Desta forma, confirma-se o potencial de atividade antimalárica destes compostos, anteriormente constatado por diversos pesquisadores (IWASA *et al.*, 2001; WENIGER *et al.*, 2000; WRIGHT *et al.*, 2000; ANGERHOFER *et al.*, 1999; STEELE *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 1993; GUINAUDEAU *et al.*, 1997; SAEZ *et al.*, 1997; VALENTIN *et al.*, 1997; GABUNJU *et al.*, 1995; PHILLIPSON e WRIGHT, 1991.)

Na avaliação da atividade antiparasitária de *D. lanceolata* frente à *Leishmania (L.) chagasi*, os resultados dos testes com o extrato etanólico e alcalóides totais (acetilados e não acetilados), mostraram que, nenhum deles, é ativo (Tabela 11; p.73).

Diferentemente, verificou-se, de forma clara, a potente atividade anti-tripanosoma do extrato etanólico e dos alcalóides totais acetilados de *D. lanceolata* (Tabela 11;p.73), o que antevê um futuro promissor para estudos mais aprofundados, em que se complementem os ensaios *in vitro* e se iniciem testes *in vivo*, em camundongos infectados, para a determinação da Concentração Efetiva de 50%. Confirmou-se, ainda, pelo resultado dos testes sobre as células RAW, em que nenhum dos dois extratos citados demonstrou atividade citotóxica, na concentração testada (Tabela 11;p.73), o grande potencial para fornecerem compostos isolados que venham a ser protótipos (CARVALHO e FERREIRA, 2001) para novos agentes anti-tripanosoma.

No tocante aos alcalóides totais (não acetilados), constatou-se que o nível de atividade anti-tripanosoma foi inferior àquele dos outros dois extratos, tendo causado cerca de 66% de mortes (Tabela 11;p.73), permitindo supor que o processo de acetilação tenha potencializado a ação dos alcalóides frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Além disto, considerando o extrato etanólico, pode-se deduzir que outros constituintes estejam contribuindo para o excelente nível de atividade verificado (Tabela 11;p.73).

Mesmo tendo sido menos ativos, os alcalóides totais não acetilados, considera-se que apresentaram nível razoável de atividade anti-tripanosoma, visto que foi equivalente àquela do fármaco de referência usado no ensaio (benznidazol), com a vantagem de ter exibido grau inferior de citotoxicidade (Tabela 11; p.73).

Com relação ao alcalóide isolado *N*-acetilanonaína, não foi verificada qualquer atividade anti-tripanosoma, apesar de ter sido isolado da potente fração alcaloídica acetilada (Tabela 11;p.73). Tal fato corrobora para a importância da realização do estudo químico biomonitorado. Apesar deste resultado, *N*-acetilanonaína demonstrou, anteriormente, atividade biológica relacionada à inibição da agregação plaquetária (CHEN *et al.*, 1994; JANTAN *et al.*, 2000) e a forma não acetilada de anonaína apresentou atividade *in vitro* sobre *P. falciparum* (CE₅₀=129µg/mL para a cepa D-6 e 190µg/mL para a cepa W-2) (LIKHITWITAYAWUID *et al.*, 1993).

De forma geral, a diferença de comportamento dos extratos frente a *L. chagasi* e *T. cruzi*, encontra explicação nas diferenças metabólicas e celulares destes parasitas (TEMPONE, 2001) sendo que, *Leishmania* vive em vacúolos parasitóforos dentro de macrófagos, sob pH variando de 4 a 5 (BURCHMORE e BARRET, 2001), enquanto que *T. cruzi* encontra-se livre no citoplasma das células (COURA e CASTRO, 2002).

Os resultados encontrados, no presente estudo, confirmam o potencial dos alcalóides isoquinolínicos como agentes anti-tripanosoma de origem natural, igualmente, constatado por outros pesquisadores. Diversas classes de alcalóides isoquinolínicos demonstraram atividade inibitória sobre diferentes formas de *T. cruzi*, entre eles os bisbenzilisquinolínicos, aporfínicos, protoberberínicos e aporfínóides (*sensu lato*) (FOURNET *et al.*, 1988, 1997; MAHIOU *et al.*, 1994).

Em estudos mais aprofundados constatou-se a atividade tripanocida de alcalóides bisbenzilisquinolínicos sobre *T. cruzi* (ROJAS DE A. *et al.*, 1994;

FOURNET *et al.*, 1997; FOURNET *et al.*, 2000), sendo que face aos resultados favoráveis do tratamento oral de camundongos infectados, com daphnolina (alcalóide bisbenzilisquinolínico), Fournet *et al.* (2000), chegaram a sugeri-lo para o tratamento da doença de Chagas.

A avaliação da atividade citotóxica é uma importante ferramenta na determinação do Índice de Seletividade (IS) das diferentes ações antiparasitárias, permitindo avaliar a capacidade de inibição dos diferentes parasitas pelos compostos em teste, sem causar toxicidade ao hospedeiro. Apesar dos valores numéricos deste índice (IS) não permitirem projeções, ao nível de significado clínico, este, mostra ser um parâmetro de valor, no adequado direcionamento de fracionamentos biomonitorados (ANGERHOFER *et al.*, 1999).

Nos ensaios com o microcrustáceo *Artemia salina*, o extrato etanólico e os alcalóides totais de *D. lanceolata* mostraram-se isentos de toxicidade, de acordo com o critério de Meyer *et al.* (1982) uma vez que, apresentaram valores de DL₅₀ inferiores a 1000 µg/mL (Tabela 12;p.74), nas condições dos testes. Porém, deduz-se que, a acetilação dos alcalóides totais levou ao aumento da toxicidade, visto que apresentaram resultado comparável àquele do sulfato de atropina (DL₅₀: 867,60 µg/ml), fármaco empregado como padrão no ensaio (Tabela 12;p.74).

Nos últimos trinta anos, o ensaio de toxicidade da *A. salina* foi considerado uma ferramenta útil na avaliação preliminar da toxicidade e vem sendo utilizado, em triagens de teratogênia e ecotoxicologia (CARBALLO *et al.*, 2002), bem como na validação do uso de plantas medicinais e/ou de sua toxicidade, destacando-se que os resultados com este teste, podem servir de sustentação para informações etnobotânicas motivando, assim, a realização de estudos mais aprofundados (BELOZ, 1992). Nos laboratórios de fitoquímica, tem sido empregado na detecção de compostos com atividade antitumoral (MEYER *et al.*, 1982; SOLIS *et al.*, 1993; MACKEENN *et al.*, 2000; JIMENEZ *et al.*, 2001, KINGHORN *et al.*, 1977), tripanocida (ZANI *et al.*, 1995), antimalárica (SOLIS *et al.*, 1993), garantindo rapidez, facilidade de execução, baixo custo e reprodutibilidade (MEYER *et al.*, 1982).

No entanto, a maior limitação deste bioensaio são as diferenças enzimáticas entre os modelos humano e marinho (microcrustáceo) sendo que, em muitos casos, pode até falsear resultados (SOLIS *et al.*, 1993).

Apesar de existirem diferenças metabólicas, entre os dois modelos, verificou-se baixo nível de toxicidade dos extratos (etanólico e alcaloídico), em ambos (Tabelas 11 e 12; pp. 73 e 74), confirmando assim a utilidade do teste com *Artemia*, em laboratórios de fitoquímica, que não dispõem de condições necessárias para a utilização de modelos biológicos mais elaborados para realizar o fracionamento biomonitorado de extratos.

No que se refere à acetilação, pode-se dizer que, frente ao microcrustáceo, houve um aumento da toxicidade dos alcalóides (Tabela 12; p.74), entretanto, não é possível estabelecer relação comparativa com o teste com células de murinos (RAW), por não terem sido avaliados neste modelo experimental.

Conclusões

6 – CONCLUSÕES

- São importantes caracteres da morfologia externa da lâmina foliar de *Duguetia lanceolata* transformada em droga: recurvamento ou dobramento das margens foliares em direção à face adaxial, constituição coriácea, superfície da face adaxial lisa e lúida e superfície da face abaxial áspera, com presença de numerosos “pontos” acinzentados, destacáveis, pecíolo alargado na porção distal, canaletado e encurvado;
- São caracteres anatômicos de valor diagnóstico e peculiares à lâmina foliar da espécie considerada: escamas inteiras e escamas estelares na face abaxial da lâmina foliar e do pecíolo e raros tricomas tectores estelares eretos, na superfície da face adaxial do pecíolo; parênquima paliádico da face abaxial constituído de células de menor comprimento em relação ao estrato correspondente da face adaxial e com contorno alargado nas extremidades; presença de drusas restrita à epiderme da face adaxial, distribuindo-se em número de uma por célula; células secretoras dispersas no mesofilo.
- Em folha de *Duguetia lanceolata*, são caracteres relativos ao gênero e família: presença de tricomas peltados com diferentes graus de soldadura de suas células dispostas radialmente (raios), tricomas tectores estelares, lâmina hipostomática, inclusões celulares na epiderme da lâmina, grupos de esclereídes dispersos na nervura mediana e no pecíolo, sistema vascular disposto em arco fechado por faixa larga de células esclerenquimáticas presente na nervura.
- No exemplar coletado de *Duguetia lanceolata*, em ambiente de cerrado para o presente estudo, é possível reconhecer caracteres anatômicos de plantas xeromórficas, como: cutícula espessa, células oleíferas dispersas no mesofilo, tricomas tectores pluricelulares e escamas, bainha de fibras esclerificadas associadas ao sistema vascular do mesofilo e nervura mediana, extensão de bainha do feixe em direção à epiderme adaxial.
- O alcalóide *N*-acetilanonaína, isolado a partir da fração alcaloídica acetilada de *Duguetia lanceolata* foi o componente majoritário, no exemplar e nas condições em que foi coletado para este estudo.
- O isolamento de *N*-acetilanonaína é inédito na espécie.

- Os extratos etanólico e alcaloídico (acetilado e não acetilado) de *Duguetia lanceolata* possuem diferentes graus de atividades antimalárica e anti-tripanosoma.
- Todos os extratos testados (etanólico e alcaloídico total acetilado e não acetilado) são inativos frente às formas promastigotas de *Leishmania chagasi*.
- O extrato alcaloídico (não acetilado) de *Duguetia lanceolata* apresenta o maior nível de atividade antimalárica em comparação com os alcalóides totais (acetilados e não acetilados).
- O extrato etanólico de *Duguetia lanceolata* possui baixo nível de atividade frente às cepas de *Plasmodium falciparum* resistente (K-1) e sensível (Palo Alto) à cloroquina.
- Os alcalóides totais de *D. lanceolata* foram os extratos de maior atividade antimalárica, entre os extratos testados, além de revelar baixo nível de citotoxicidade sobre as células RAW 264.7, merecendo estudos mais aprofundados para o isolamento dos componentes bioativos.
- A acetilação dos alcalóides totais de *Duguetia lanceolata* reduziu a atividade antimalárica e aumentou a atividade anti-tripanosoma.
- O alcalóide *N*-acetilanonaína isolado de *Duguetia lanceolata* é inativo frente às formas tripomastigotas de *Tripanosoma cruzi*.
- O extrato etanólico foi mais ativo frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi* e menos citotóxico sobre células RAW 264.7, que o benznidazol utilizado no ensaio, como fármaco-padrão.
- Os alcalóides totais acetilados foram mais ativos frente às formas tripomastigotas de *T. cruzi*, em comparação com o benznidazol.
- Os alcalóides totais não acetilados de *D. lanceolata* tiveram nível de atividade anti-tripanosoma comparável ao benznidazol e com citotoxicidade inferior a este, em células RAW 264.7.
- Os alcalóides totais (não acetilados) e o extrato etanólico de *Duguetia lanceolata* não são tóxicos para *Artemia salina* e em células RAW 264.7.
- Nos testes com os extratos de *Duguetia lanceolata* houve boa correlação entre os modelos de citotoxicidade *in vitro* e sobre o microcrustáceo *Artemia salina*.

Referências Bibliográficas

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACHENBACH, H.; SCHWINN, A. Aporphinoid alkaloids and terpenoids from *Piptostigma fugax*. *Phytochem.*, New York, v.38, n.4, p.1037-1048, 1995.
- ADDAE-KYEREME, J.; CROFT, S.L.; KENDRICK, H.; WRIGHT, C.W. Antiplasmodial activities of some Ghanaian plants traditionally used for fever/malaria treatment and of some alkaloids isolated from *Pleiocarpa mutica*; *in vivo* antimalarial activity of pleiocarpine. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.76, n.1, p.99-103, 2001.
- AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. *Parasite*, Paris, v.6, n.1, p.3-8, 1999.
- ANGERHOFER, C.K.; GUINAUDEAU, H.; WONGPANICH, V.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A. Antiplasmodial and cytotoxic activity of natural bisbenzylisoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.62, p.50-66, 1999.
- BAKKER, M.E. Leaf anatomy. In: MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T.H.; CHATROU, L.W. *Duguetia* (Annonaceae). New York: Botanical Garden, 2003. p.16-25. (Flora Neotropica Monograph, 88).
- BAKKER, M.E.; VISSER, W.J. Studies in Annonaceae XIX. Leaf anatomy of *Duguetia* St. Hil. (Annonaceae) *Bot. Jahrb.Syst.* v.116, p.83-111, 1994.
- BARROSO, G.M. *Sistemática de angiosperma do Brasil*. Rio de Janeiro: São Paulo: Livros Técnicos e Científicos, USP, c1978. p.28-30.
- BELOZ, A. Brine shrimp bioassay screening of two plants used as medicines by the Warao: *Solanum straminifolium* and *Virola surinamensis*. *J. of Ethnopharmacol*, Amsterdam, v.37, p.225-227, 1992.
- BENOIT, F.; VALENTIN, A; PELISSIER, Y.; DRAFOUKA, F.; MARION, C.; KONE-BAMBA, D.; KONE, M.; MALLIE, M.; YAPO, A; BASTIDE, J.M. *In vitro* antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.54, n.1, p.67-71, 1996.
- BERLIN, G.P.; MIKSCH, J.P. *Botanical microtechnique and cytochemistry*. Ames: Iowa State University Press, 1976. 326p.
- BHATTACHARYYA, B.; JOHRI, B.M. *Flowering plants: taxonomy and phylogeny*. New Delhi: Narosa Publishing House, 1998. p.126-128.

- BIN JANTAN, I.; BIN AHMAD, F. Chemical constituents of the essential oils of *Goniothalamus malayanus* Hook. f. and Thoms. *Flav. Frag. J.*, Bognor Regis, v.15, n.5, p.372-374, 2002.
- BRANDÃO, M.G.; GRANDI, T.S.; ROCHA, E.M.; SAWYER, D.R.; KRETTLI, A.V. Survey of medicinal plants used as antimalarials in the Amazon. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.36, p.175-182, 1992.
- BREMAN, J.G. The ears of the hippopotamus: manifestations, determinants and estimates of the malaria burden. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.64, p.1-11, 2001.
- BRINGMANN, G.; HAMM, A.; GUNTHER, C.; MICHEL, M.; BRUN, R.; MUDOGO, V. Ancistroealaines A and B, two new bioactive naphthylisoquinolines, and related naphtoic acids from *Ancistrocladus ealaensis*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.63, n.11, p.1465-1470, 2000.
- BUCHMORE, R.J.S.; BARRET, M.P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*. *Int. J. Parasitol.*, Amsterdam, v.31, n.12, p.311-320, 2001.
- CAMACHO, M.D.R.; PHILLIPSON, J.D.; CROFT, S.L.; ROCK, P.; MARSHAL, S.J.; SCHIFF Jr., P.L. *In vitro* activity of *Triclisia patents* and some bisbenzylisoquinoline alkaloids against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei*. *Phytother. Res.*, Bognor Regis, v.16, p.432-436, 2002.
- CARBALLO, J.L.; HERNANDEZ-INDA, Z.L.; PÉREZ, P.; GÁRCIA-GRÁVALOS, M.D. A comparison between two brine shrimp assays to detect *in vitro* cytotoxicity in marine natural products. *BMC Biotechnol.*, London, v.2, n.2., p.17, 2002.
- 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.; FERREIRA, E.I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. *Fitoterapia*, Amsterdam, v.72, p.599-619, 2001.

- CASAGRANDE, C.; FERRARI, G. Studies in aporphine alkaloids. I. Alkaloids of a Brazilian *Duguetia*. *Farmaco, Ed. Sci.*, Pavia, v.25, n.6, p.442-448, 1970.
- CASAMADA, S.M. *Tratado de Farmacognosia*. Barcelona: Editorial Científico-Médica, 1977. p.11-23.
- CAZORLA, D.; YEPEZ, J.; ANEZ, N.; SANCHEZ DE MIRT, A. Effect of intralesional treatment with emetine hydrochloride on *Leishmania (Viannia) Braziliensis* in hamsters. *Invest. Clin.*, Maracaibo, v.42, n.1, p.5-21, 2001.
- CHAVES, M.H. *Estudo químico da Porcelia macrocarpa (WARM.) R. E. FRIES (ANNONACEAE)*. São Paulo, 1996. 176p. Tese de Doutorado – Instituto de Química - Universidade de São Paulo.
- CHEN, I-S.; WU, S-J.; LIN, Y-C.; TSAI, I-L; SEKI, H.; KO, F-N.; TENG, C-M. Dimeric 2-quinoline alkaloid and antiplatelet aggregation constituents of *Zanthoxylum simulans*. *Phytochem.*, New York, v.36, n.1, p.237-239, 1994.
- COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; GU, Z.-M.; ZHAO, G.-X.; ZENG, L.; KOZLOWSKI, J.F.; MACLAUGHLIN, J.L. Venezenin: a new bioactive Annonaceous acetogenin from the bark of *Xylopia aromatica*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.58, n.4, p.532-539, 1995.
- COLMAN-SAIZARBITORIA, T.; ZAMBRANO, J.; FERRIGNI, C.; GU, Z.-M.; NG, J.H.; SMITH, D.L.; MACLAUGHLIN, J.L. Bioactive annonaceous acetogenins from the bark of *Xylopia aromatica*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.57, n.4, p.486-493, 1994.
- COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v.97, n.1, p.3-24, 2002.
- CRONQUIST, A. *An integrated system of classification of flowering plants*. New York: Columbia University Press, 1981. p.53-55.
- CUNNINGHAM, S.A.; SUMMERHAYER, B.; WESTOBY, M. Evolutionary divergences in leaf structure and chemistry comparing rainfall and soil nutrient gradients. *Ecology*, v.69, n.4, p.569-588, 1999.
- DABRAH, T.T.; SNEDEN, A. Oxoaporphine alkaloids from *Rollinia papilionella*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.46, n.3, p.436-437, 1983.

- DEBOURGES, D.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. *N*-oxycodamine, alcaloide de *Duguetia spixiana*, synthese et RMN ^1H de *n*-oxydes des benzyltetrahydroisoquinoleines. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.50, n.5, p.852-859, 1987a.
- DEBOURGES, D.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonaceae 77, Alcaloide de *Duguetia spixiana*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.50, n.4, p.664-673, 1987b.
- DIAS, J.C.P.; JATENE, A.D. Doença de Chagas no Brasil: situação atual e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, Rio de Janeiro, v.25, supl.3, p.6-8, 1992.
- DIAS, M.C.; KINOSHITA, L.S. Flora farenogâmica da reserva do Parque Estadual das fontes do Ipiranga (São Paulo, Brasil), *Hoehnea*, São Paulo, n.23, v.2, p.107-111, 1996.
- DIAZ, D.P.P.; DIAZ, A.M.P.; JOSEPH-NATHAN, P. Constituyentes de *Duguetia stelichantha* Diels. *Rev. Latinoam. Quim.*, Naucalpan de Juarez, v.16., n.2, p.107-108, 1985.
- ESAU, K. Anatomy of seed plants. 2ed. New York: John Wiley & Sons, 1977. 550p.
- FAHN, A.; CUTLER, D.F. *Xerophytes*. Stuttgart: Gebr. Borntraeger, 1992. 176p.
- FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCKENKEL, E.P.; GROSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 1999. cap.10, p.163-179.
- FANG, X.-P.; RIESER, M.J.; GU, Z.-M.; ZHAO, G.-X.; McLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: an updated review. *Phytochem. Anal.*, Bognor Regis, v.4, p.27-48, 1993.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.
- FERRI, M. G. Contribuição ao conhecimento da ecologia do cerrado e da caatinga. São Paulo, 1955. 170p. Provimto de Cátedra. Instituto de Biociências – Universidade de São Paulo.
- FINNEY, D.J. Statistical methods in biological assay. 2.ed. London: C. Griffin, 1964. p.631-641.

- 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 Trop.*, Basel, v.92/93, p.261-266, 2004.
- FOURNET, A.; BARRIOS, A.A.; MUÑOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.41, p.19-37, 1994.
- FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; ROJAS de ARIAS, A. The effect of bisbenzylisoquinoline alkaloids on *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Int. J. Antimicrob. Agents*, Amsterdam, v.8, p.163-170, 1997.
- FOURNET, A.; MUÑOZ, V.; MANHON, A.M.; ÂNGELO, A.; HOCQUEMILLER, R.; CORTES, D.; CAVÉ, A.; BRUNETON, J. Active antihelmintic alkaloids: active *in vitro* against *Leishmania tropica* the protozoa involved in leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.24, n.2/3, p.327-335, 1988.
- FOURNET, A.; ROJAS DE ARIAS, A.; FERREIRA, M.E.; NAKAYAMA, H.; TORRES de ORTIS, S.; SCHININI, A.; SAMUDIO, M.; VERA de BILBAO, N.; LAVALT, M.; BONTE, F. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. *Int. J. Antimicrob. Agents*, Amsterdam, v.13, n.3, p.189-195, 2000.
- FREIRE, C.V. *Chaves analíticas: para a determinação das famílias das plantas pteridófitas, gimnosperma e angiosperma brasileiras ou exóticas cultivadas no Brasil*. 3ªed. Rio de Janeiro: s.n., 1943. p.195.
- GABUNJU, D.M.; MBERU, E.K.; DOSSAJI, S.F.; GRAY, A.I.; WAIGH, R.D.; WATERMAN, P.G.; WATKINS, W.M. Potent antimalarial activity of the alkaloid nitidine, isolated from a kenyan herbal remedy. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.39, p.2606-2609, 1995.
- GESSLER, M.C.; NKUNYA, M.H.; MWASUMBI, L.B.; HEINRICH, M.; TANNER, M. Screening Tanzanian medicinal plants for antimalarial activity. *Acta Trop.*, Amsterdam, v.56, p.65-77, 1994.
- GIBBS, R.D. *Chemotaxonomy of flowering plants*. Montreal: McGill-Queen's University Press, 1974. v.1, p.237-260.

- GOTTLIEB, O.R.; MAGALHÃES, A.F.; MAGALHÃES, E.G.; MAIA, J.G.S.; MARSAIOLI, A.J. The chemistry of Brazilian annonaceae. Part 3 Oxoaporphine alkaloids from *Duguetia eximia*, Annonacea. *Phytochem.*, New York, v.17, n.4, p.837-838, 1978.
- GUINAUDEAU, H.; BOHLKE, M.; LIN, L.Z.; ANGERHOFER, C.K.; CORDELL, G.A.; RUANGRUNGSI, N. Angchibangkine, a new type of bisbenzylisoquinoline alkaloid, and other dimers from *Pachygone dasycarpa*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.60, p.258-260, 1997.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.38, n.4, p.275-338, 1975.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids, II. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.42, n.4, p.325-360, 1979.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, III. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.46, n.6, p.761-835, 1983.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, IV. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.51, n.3, p.389-474, 1988.
- GUINAUDEAU, H.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Aporphinoid alkaloids, V. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.57, n.8, p.1033-1135, 1994.
- HAMONNIERE, M.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Alcaloides aporfiniques et composés terpéniques du *Polyalthia oliveri*. *Phytochem.*, New York, v.16, p.1029-1034, 1977.
- HARBONE, J.B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. 3.ed. London: Chapman and Hall, 1998. 302p.
- HASRAT, J.A.; PIETERS, L.; 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*. *Phytochem.*, New York, v.4, n.2, p.133-140, 1997.
- HE, P.; MAAS, P.J.M. Studies in Annonaceae XVI: a taxonomic revision of *Duguetia* A.F.C.P. de Saint-Hilaire Sect. *Duguetia* (Annonaceae) in eastern Brazil. *Bol. Mus. Paraense Emilio Goeldi: Bot.*, Belém, v.9, p.143-205, 1993.
- HEUSDEN, E.C.H. Flowers of Annonaceae: morphology, classification and evolution. *Blumea*, v.7, p.1-218, 1992.

- HEYWOOD, V. H. *Flowering plants of the world*. Oxford: University Press, 1993. p.30-31.
- HOSTETTMANN, K.; GUPTA, M.P.; MARSTON, A. *Chemistry, biological and pharmacological properties of medicinal plants from the Americas*. Netherlands: Harwood Academic Publishers, 1997.p.72-78.
- HUTCHINSON, J. *The genera of flowering plants*. Oxford: Clarendon Press, 1964. p.71-107.
- IWASA, K.; MORIYASU, M.; TACHIBANA, Y.; KIM, H.S.; WATAYA, Y.; WIEGREBE, W.; BASTOW, K.F.; CONSENTINO, L.M.; KOZUKA, M.; LEE, K.H. Simple isoquinoline and benzylisoquinoline alkaloids as potential antimicrobial, antimalarial, cytotoxic, and anti-HIV agents. *Bioorg. Med. Chem.*, Amsterdam, v.9, p.2871-2884, 2001.
- IWASA, K.; MORIYASU, M.; YAMORI, T.; TURUO, T.; LEE, D.-U.; WIEGREBE, W. *In vitro* cytotoxicity of the protoberberine-type alkaloids. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.64, n.7, p.896-898, 2001.
- JANTAN, I.; FAFI, I.A.A.; JALIL, J. Inhibition of Platelet-activating factor receptor binding by aporphine and phenanthrenoid alkaloids from *Aromadendron elegans*. *Planta Med.*, Stuttgart, v.67, p.466-467, 2001.
- JENSEN, W. A. *Botanical histochemistry, principles and practice*. San Francisco: W.H.Freeman, 1962. p.201.
- JIMENEZ, G.; HASEGAWA, M.; RODRIGUEZ, M.; ESTRADA, O.; MÉNDEZ, J.; CASTILLO, A.; GONZALEZ-MUJICA, F.; MOTTA, N.; VÁSQUEZ, J.; ROMERO-VECCHIONE, E. Biological screening of plants of the Venezuelan Amazons. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.77, p.77-83, 2001
- JOHANSEN, D.A. *Plant microtechnique*. New York: Mc Graw-Hill, 1940. 532p.
- JOLAD, S.D.; HOFFMANN, J.J.; SCHRAM, K.H.; COLE, J.R. Uvaricin: a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *J. Org. Chem.*, Columbus, n.47, p.3151-3153, 1982.
- JOLY, A.B. *Botânica: introdução à taxonomia vegetal*. 5ed. São Paulo: Ed.Nacional, 1979. p.286-288.

- JOSSANG, A.; DUBAELE, B.; CAVÉ, A.; BARTOLI, M.H.; BÉRIEL, H. Annomontacine: une nouvelle acétogénine γ -lactone-monotetrahydorrannique citotoxique de *L'Annona montana*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.54, n.4, p.967-971, 1991.
- JUNG, J.H.; PUMMANGURA, S.; CHAICHANTIPYUTH, C.; PATARAPANICH, C.; MCLAUGHLIN, J.L. Bioactive constituents of *Melodorum fruticosum*. *Phytochemistry*, New York, v.29, n.5, p.1667-1670, 1990.
- KESPER Jr., N.; DE ALMEIDA, K.A.; STOLF, A.M.; UMEZAWA, E.S. Immunoblot analysis of trypomastigote excreted-secreted antigens as a tool for the characterization of *Trypanosoma cruzi* strains and isolates. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.86, n.4, p.862-867, 2000.
- KESSLER, P.A. Some interesting distribution patterns in Annonaceae. *Annonaceae Newsl.*, n.6, p.14-23, 1987.
- KESSLER, P.J.A. Annonaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V., eds. *The families and genera of vascular plants: dicotyledons: magnoliid, hamamelid and caryophyllid families*. Berlin: Springer-Verlag, 1993. v.2, p.93-129. (Flowering Plants, v.2).
- KINGHORN, A.D.; HARJES, K.K.; DOORENBOS, N.J. Screening procedure for phobol ester using brine shrimp (*Artemia salina*) larvae. *Journal of Pharmaceutical Science*, v.66, n.9, p.1362-1363, 1977.
- KITAGAWA, I.; MINAGAWA, K.; ZHANG, R.-S.; HORI, K.; DOI, M.; INOVE, M.; ISHIDA, T.; KIMURA, M.; UJI, T.; SHIBUYA, H. Dehatrine, an antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloid from the Indonesian medicinal plant *Belischiamedia madang*, isolated as a mixture of two rotational isomers. *Chem. Pharm. Bull.*, Tokyo, v.41, n.5, p.997-999, 1993.
- KOEK-NOORMAN, J.; MAAS, P.J.M. Internal relationships in *Duguetia*. In: MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T.H.; CHATROU, L.W. *Duguetia* (Annonaceae). New York: Botanical Garden, 2003. p.59-227. (Flora Neotropica Monograph, 88).
- KOROLKOVAS, A., BURCKHALTER, J.H. *Química farmacêutica*. Rio de Janeiro: Guanabara Dois, 1982. p.47.
- KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. *Manual básico de métodos em morfologia vegetal*. Seropédica: EDUR, 1997. p.9, 115, 117-118.

- LAINSON, R.; SHAW, J.J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature*, London, v.273, p.595-600, 1978.
- LAMBROS, C.; VANDERBERG, J.P. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.*, Lawrence, v.65, p.418-420, 1979.
- LANE, J.E.; RIBEIRO-RODRIGUES, R.; SUAREZ, C.C.; BOGITSH, B.J.; JONES, M.M.; SINGH, P.K.; CARTER, C.E. *In vitro* trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, Northbrook, v.55, n.3, p.263-266, 1996.
- LARCHER, W. Physiological plant ecology. 3ed. Springer, 1995. 506p.
- LAVAUULT, M.; GUINAUDEAU, H.; BRUNETON, J.; SEVENET, T.; HADI, A. (-)-Thaipetaline, a tetrahydroprotoberberine from a Malayan Annonaceae. *Phytochem.*, New York, v.29, n.12, p.3845-3847, 1990.
- LEAMAN, D.J.; ARNASON, J.T.; YUSUF, R.; SANGAT-ROEMANTYO, H.; SOEDJITO, H.; ANGERHOFER, C.K.; PEZZUTO, J.M. Malaria remedies of the Kenyah of the Apokayan, East Kalimantan, Indonesian Borneo: a quantitative assessment of local consensus as an indicator of biological efficacy. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.49, p.1-16, 1995.
- LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P.K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochem.*, New York, v.21, n.12, p.2783-2813, 1982.
- LIKHITWITAYAWUID, K.; ANGERHOFER, C.K.; HEEBYUNG, C.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A. Citotoxic and antimalarial alkaloids from the tubers of *Stephania pierrei*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.56, n.9, p.1468-1478, 1993.
- LIMA, D.P.; BEATRIZ, A.; RAMOS, A.A.; SIQUEIRA, J.M.; OLIVEIRA, C.C.; MARQUES, M.R. Transformações químicas do (+)-10 β ,14-diol-allo-aromadendrano, isolado de *Duguetia glabriuscula* R.E. Fries (Annonaceae) e avaliações biológicas de alguns derivados obtidos. *Quim. Nova*, São Paulo, v.20, n.6, 1997.
- LIN, L.-Z.; SHIEH, H.-L.; ANGERHOFER, C.K.; PEZZUTO, J.M.; CORDELL, G.A.; XUE, L.; JOHNSON, M.E.; RUANGRUNGSI, N. Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Cyclea barbata*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.56, p.22-29, 1993.

- LOFGREN, A. *Manual das famílias naturais phanerogamas: com chaves dicotômicas das famílias e generos brasileiros*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1917. p.195-199.
- LÓPEZ, J.A.; LAURITO, J.G.; LIN, F.-T.; SHARAF, M.; WONG, L.K.; SCHIFF Jr., P.L. Alkaloids of *Guatteria diospyroides*. *Planta Med.*, Stuttgart, n.59, p.191, 1993.
- LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil*. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1998. p.15.
- MAAS, P.J.M. Neotropical genera of Annonaceae. *Annonaceae Newsl.*, n.1, p.1-2, 1985.
- MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T.H.; CHATROU, L.W. *Duguetia* (Annonaceae). New York: Botanical Garden, 2003. p.6-8. (Flora Neotropica Monograph, 88).
- MACKEENN, M.M.; ALI, A.M.; LAJIS, N.H.; KAWASU, K.; HASSAN, Z.; AMRAN, M.; HABSAH, M.; MOOI, L.Y.; MOHAMED, S.M. Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.72, p.395-402, 2000.
- MAHIO, V.; ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A.; ROJAS de ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO, A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.57, n.7, p.890-895, 1994.
- MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; HOQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). *Phytochemistry*, New York, n.54. p.709-716, 2000.
- MAINIERI, C.; CHIMELO, J.P. *Fichas de características das madeiras brasileiras*. 2.ed. São Paulo: Instituto de Pesquisas Tecnológicas, 1989. p.339.
- MAMBU, L.; MARTIN, M.-T.; RAZAFI-MAHEFA, D.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; RASOANAINO, P.; FRAPPIER, F. Spectral characterization and antiplasmodial activity of bisbenzylisoquinolines from *Isolona ghesquiereina*. *Planta Med.*, Stuttgart, v.66, p.537-540, 2000.
- MERSCHJOHANN, K.; SPORER, F.; STEVERDING, D.; WINK M. *In vitro* effect of alkaloids on bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* and *T. congolense*. *Planta Med.*, Stuttgart, v.67, n.7, p.623-627, 2001.

- METCALFE, C.R.; CHALK, L. *An anatomy of the dicotyledons: leaves, stem and wood in relation to taxonomy with notes on economic uses*. Oxford: Clarendon Press, 1950. p.44-50.
- METCALFE, C.R.; CHALK, L. *Anatomy of the dicotyledons*. 2 ed. Oxford: Clarendon Press, 1985. p.181-226.
- MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MCLAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Med.*, Stuttgart, v.45, p.31-34, 1982.
- MONTENEGRO, H.; GUTIERREZ, M.; ROMENO, L.I.; ORTEGA-BARRIA, E.; CAPSON T.L.; RIOS L.C. Aporphine alkaloids from *Guatteria spp.* with leishmanicidal activity. *Planta Med.*, Stuttgart, v.69, p.677-679, 2003.
- MORENO, P.R.H. *Alcalóides de Nectandra grandiflora Nees et Mart ex. Nees: análise química e biológica*. Porto Alegre, 1989. 155p. Dissertação de Mestrado - Faculdade de Farmácia - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MORTON, J.F. The soursop or guanábana (*Annona muricata* L.). *Proc. Fla. State Hortic. Soc.*, Winter Haven, v.79, p.355-366, 1966.
- MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D.C.; TAKAMATSU, S.; WALKER, L.A.; CLARK A.M. Antimalarial, cytotoxic, and antifungal alkaloids from *Duguetia hadrantha*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.64, p.559-562, 2001.
- NAKANISHI, K.; SOLOMON, P.H. *Infrared absorption spectroscopy*. San Francisco: Holden-day, 1977. p.10-56.
- NASCIMENTO, F.C.; BOAVENTURA, M.A.D.; ASSUNÇÃO, A.C.S.; PIMENTA, L.P.S. Acetogeninas de Anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. *Quim. Nova*, São Paulo, v.26, n.3, p.319-322, 2003.
- NAVARRO, V.R.; SETTE, I.M.F.; DA-CUNHA, E.V.L.; SILVA, M.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; MAIA, J.G.S. Alcaloides de *Duguetia flagellaris* Huber (Annonaceae). *Rev. Bras. Plant. Med.*, Botucatu, v.3, n.2, p.23-29, 2001.
- NKUNYA, M.H.H.; JONKER, S.A.; MAKANGARA, J.J.; WAIBEL, R.; ACHENBACH, H. Aporphinoid alkaloids and other constituents from *Lettwianthus stellatus*. *Phytochem.*, New York, v.53, p.1067-1073, 2000.

- NONATO, M.G.; GARSON, M.J.; TRUSCOTT, R.J.W.; CARVER, J.A. $^1\text{H-NMR}$ assignments of anonaine and xylopin derivatives from *Talauma gitingensis*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.53, n.6, p.1623-1627, 1990.
- OLIVEIRA, F., AKISUE, G. *Fundamentos de Farmacobotânica*. São Paulo: Atheneu, 1989. p.15.
- PEREIRA, N.F.G.; CAROLLO, C.A.; GARCEZ, W.S. Novel Santalane sesquiterpenoids from the stem bark of *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae. *Quim. Nova*, São Paulo, v.26, n.4, p.512-516, 2003.
- PÉREZ, E.; SÁEZ, J.; BLAIR, S.; FRANCK, X.; FIGADÈRE, B. Isoquinoline alkaloids from *Duguetia Vallicola* stem bark with antiparasmodial activity. *Lett. Org. Chem.*, Sharjah, v.1, n.1, p.102-104, 2004.
- PHILLIPSON, J.D. A matter of some sensitivity. *Phytochem.*, New York, v.38, p.1319-1343, 1995.
- PHILLIPSON, J.D.; COLLIN, B. Antiprotozoal agents from plant sources. *Planta Med.*, Stuttgart, v.57, n.1, 1991.
- PHILLIPSON, J.D.; WRIGHT, C.W. Can ethnopharmacology contribute to the development of antimalarial agents? *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.32, p.155-165, 1991.
- PIO CORRÊA, M. *Dicionário da plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas*. 2.ed. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1978. 6v.
- PIO CORRÊA, M. *Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas*. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. v.5, p.481.
- QUEIROZ, E.F.; ROBLLOT, F.; CAVE, A.; PAULO, M.D.; FOURNET, A. Pessoine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona spinescens*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.59, n.4, p.438-440, 1996.
- RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacées LXXII. Alcaloides du *Guatteria sagotiana*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.49, n.6, p.1078-1085, 1986.
- RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacées, 78. Alcaloides des écorces d'un *Duguetia spixiana* de Bolivie. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.50, p.674-670, 1987a.
- RASAMIZAFY, S.; HOCQUEMILLER, R.; CASSELS, B.K.; CAVÉ, A. Alcaloides des *Annona hayesii*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.50, n.4, p.759-761, 1987b.

- RASOANAIVO, P.; RATSIMAMANGA-URVERG, S.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; RAFRATO, H.; RAKOTO-RATSIMAMANGA, A. Criblage d'extraits de plantes de Madagascar pour recherche d'activité antipaludique et d'effet potentialisateur de la chloroquine. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.64, n.2, p.117-126, 1999.
- RAVEN, P.H.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. *Biologia vegetal*. 5ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. p.460-473.
- RIBEIRO, J.E.L.S. *Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Cental*. Manaus: INPA/DFID, 1999. 816p.
- RIECKMANN, K.H.; SAX, L.J.; CAMPBELL, G.H.; MRENA, J.E. Drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: an *in vitro* microtechnique. *Lancet*, London, v.1, p.22-23, 1978.
- RIESER, M.J.; GU, Z.-M.; FANG, X.-P.; ZENG, L.; WOOD, K.V.; MCLAUGHLIN, J.L. Five novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins from the seeds of *Annona muricata*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.59, n.2, p.100-108, 1996.
- RIOS, J.L.; SIMEON, S.; VILLAR, A. Pharmacological activity of aporphinoid alkaloid: a review. *Fitoterapia*, Amsterdam, v.60, n.5, p.387-412, 1989a.
- RIZZINI, C.T. Sistematização terminológica da folha. *Rodriguesia*, Rio de Janeiro, v.23/24, p.193-212, 1960/1.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M.K.; TYLER, V. E. *Farmacognosy and Pharmacobiotechnology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996. p.10-11.
- ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Duguecalyne and duguenaine. Aporphinic alkaloids originally from *Duguetia calycina* Benoist, Annonaceae. *C. R. Acad. Sci., Ser. II: Mec., Phys., Chim., Sci. Terre Univers*, Paris, v.293, n.5, p.373-376, 1981.
- ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. La probovatine, première neoproaporphine naturelle. *Planta Med.*, Stuttgart, v.39, n.3, p.206A, 1980.
- ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; MORETTI, C. Alkaloids of Annonaceae 44. Alkaloids of *Duguetia obovata*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.46, n.6, p.862-873, 1983.

- ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; JACQUEMIN, H.; CAVÉ, A. Alcaloides des Annonacees. 24. Alcaloides de *Duguetia calycina* Benoist, Annonacee guyanaise. *Plant. Med. Phytother.*, Paris, v.12, n.4, p.259-266, 1978.
- ROBLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; LEBOEUF, M.; CAVÉ, A. Chemistry. In: MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T.H.; CHATROU, L.W. *Duguetia (Annonaceae)*. New York: Botanical Garden, 2003. p.44-50. (Flora Neotropica Monograph, 88).
- RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na Região do Alto do Rio Grande – Minas Gerais. *Cienc. Agrotecnol.*, Lavras, v.25, n.1, p.102-123, 2001.
- ROESER, K.R. Die Nadel der Schwarzkiefer. Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. *Mikrokosmos*, Stuttgart, v.61, n.2, p.33-36, 1962.
- ROJAS de ARIAS, A.; INCHAUSTI, A.; ASCURRAT, M.; FREITAS, N.; RODRIGUEZ, E.; FOURNET, A. *In vitro* activity and mutagenicity of bisbenzylisoquinolines and quinones against *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Phytother. Res.*, Bognor Regis, v.8, p.141-144, 1994.
- ROOSMALEN, M.G.M. Dispersal In: MAAS, P.J.M.; WESTRA, L.Y.T.H.; CHATROU, L.W. *Duguetia (Annonaceae)*. New York: Botanical Garden, 2003. p.53-54. (Flora Neotropica Monograph, 88).
- RUPPRECHT, J.K.; HUI, Y.H.; MCLAUGHLIN, J.L. Annonaceous acetogenins: a review. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.53, n.2, p.237-238, 1990.
- SAEZ, A.; BLAIR, S.; SAEZ, J. Aporphine alkaloids from *Guatteria lehmanii* bark and evaluation of their antimalarial activity *in vitro*. *Rev. Colomb. Quim.*, Bogota, v.26, p.43-49, 1997.
- SAEZ, J.; SAHPAZ, S.; VILLAESCUSA, L.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; CORTES, D. Rioclarine et membranacine, deux nouvelles acetogenines bis-tetrahydrofuraniques des graines de *Rollinia membranacea*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.56, n.3, p.351-356, 1993.
- SANTOS, D.Y.A.C.; SALATINO, M.L.F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, New York, v.55, p.565-573, 2000.
- SANTOS, P.R.; MORAIS, A.A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dioica*. *J. Braz. Chem. Soc.*, São Paulo, v.14, n.3, p.396-400, 2003.

- SASS, J.E. *Botanical microtechnique*. 2.ed. Ames: Iowa State College Press, 1951. 228p.
- SCHATZ, G.E. Generic tree flora of Madagascar. Richmond: Royal Botanic Garden: Kew: Missouri Botanical Garden, Great Britain: The Cromwell Press, 2001. p.45-48.
- SCHULTES, R.E. Plantas in treating senile dementia in the northwest Amazon. *J. Ethnopharmacol.*, Amsterdam, v.38, p.129-135, 1993.
- SCHULTES, R.E.; RAFFAUF, R.F. *The healing forest: medicinal and toxic plants of the northwest Amazonia*. Portland: Dioscorides Press, 1990. p.57-58. (Historical, ethno- & economic botany series, v.2).
- SEPÚLVEDA-BOZA, S.; CASSELS, B.K. Plant metabolites active against *Trypanosoma cruzi*. *Planta Med.*, Stuttgart, v.62, n.2, p.98-105, 1996.
- SETTEN, A.K.; KOEK-NOORMAN, J. Studies in Annonaceae. XVII. Fruits and seeds of Annonaceae: morphology and its significance for classification and identification. *Biblioth. Bot.*, v.142, p.1-152, 1992.
- SHAMMA, M. *Isoquinoline alkaloids*. New York: Academic Press, 1972. 594p. (Organic Chemostry: a series of monographs, 25).
- SILBERBAUER-GOTTSBERGER, I. O cerrado como potencial de plantas medicinais e tóxicas. *Oréades*, Belo Horizonte, n.8, v.14/15, p.15-30, 1981/1982.
- SILVA, S.; TASSARO, H. *Frutas no Brasil*. São Paulo: Empresa das Artes, 1996. p.75.
- SIQUEIRA, J.M. *Estudo fitoquímico de Duguetia glabriúscula e Unonopsis lindmanii – Annonaceae – biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre Artemia salina*. Belo Horizonte, 1999. 251p. Tese de Doutorado – Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas – Universidade Federal de Minas Gerais.
- SIQUEIRA, J.M.; OLIVEIRA, C.C.; BOAVENTURA, M.A.D. Bioactive sesquiterpenoid from *Duguetia grabriuscula*. *Fitoterapia*, Amsterdam, v.68, n.1, p.89-90, 1997.

- SIQUEIRA, J.M.; BOMM, M.D.; PEREIRA, N.F.G.; GARCEZ, W.S.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* –Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. *Quim. Nova*, São Paulo, v.21, n.5, p.557-559, 1998.
- SIQUEIRA, J.M.; ZIMINIANI, M.G.; RESENDE, U.M.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. *Quim. Nova*, São Paulo, v.24, n.2, p.185-187, 2001.
- SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GUPTA, M.P.; PHILLIPSON, D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine shrimp). *Planta Med.*, Stuttgart, v.59, p.250-252, 1993.
- SOUZA, O.V. *Atividades farmacológicas de produtos obtidos de Duguetia lanceolata e Annona coriacea – Annonaceae*. Rio de Janeiro, 2003. 143p. Tese de Doutorado – Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- SPICHIGER, R.; MASCHERPA, J-M. *Flora del Paraguay – Annonaceae*. Saint-Louis: Missouri Botanical Garden, 1983. p.2.
- STAHL, E. *Analyse chromatographique et microscopique des drogues: manuel pratique pour les pharmacopees Europeenes*. Paris: Technique et Documentation, 1970. p.236-238.
- STAUBER, L.A.; FRANCHINO, E.M.; GRUN, J. An eight-day method for screening compounds against *Leishmania donovani* in golden hamsters. *J. Protozool.*, Lawrence, v.5, p.269-273, 1958.
- STEELE, J.C.P.; SIMMONDS, M.S.J.; VEITCH, N.C.; WARHURST, D.C. Evaluation of the anti-plasmodial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Abuta grandifolia*. *Planta Med.*, Stuttgart, n.65, p.413-416, 1999.
- STEYERMARK, J.A.; MAAS, P.J.M.; BERRY, P.E.; JOHNSON, D.M.; MURRAY, N.A.; RAINER, H. Annonaceae. In: BERRY, P.E.; HOLST, B.K.; YATSKIEVYCH, K., eds. *Flora of the Venezuelan Guayana*. St. Louis, Missouri Botanical Garden, 1995. p.413-433.
- TADA, H.; SHIHO, O.; KUROSHIMA, K.; KOYAMA, M.; TSUKAMOTO, K. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J. Immunol. Methods*, Amsterdam, v.93, p.157-165, 1986.

- TEMPONE, A.G.; ANDRADE, H.F.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. Bothrops moojeni venom kills *Leishmania spp.* with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, Orlando, v.280, p.620-624, 2001.
- 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. *Phytomed.*, Chicago, v.12, p.382-390, 2005.
- TRACY, J.W.; WEBSTER Jr., L.T. Chemotherapy of parasitic infections. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E.; MOLINOFF, P.B.; RUDDON, R.W.; GILMAN, A.G., eds. *Goodman & Gilman's. the pharmacological bases of therapeutics*. 9.ed. New York: McGraw Hill, 1996. p.955-1007.
- TRAGER, W.; JENSEN, J.B. Human malaria parasites in continuous culture. *Science*, Washington, v.193, p.673-675, 1976.
- VALENTIN, A.; BENOIT-VICAL, F.; MOULIS, C.; STANISLAS, E.; MALLIR, M.; FOURASTE, I.; BASTIDE, J.M. *In vitro* antimalarial activity of penduline, a bisbenzylisoquinoline from *Isopyrum thalictroides*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, Washington, v.41, p.2305-2307, 1997.
- VENNERSTROM, J.L.; KLAYMAN, D. Protoberberine alkaloids as antimalarials. *J. Med. Chem.*, Columbus, v.31, n.6, p.1084-1087, 1988.
- VILLA DEL FRESNO, A.V.; CANAVATE, J.L.R. Alkaloids from *Annona cherimolia* seed. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.46, n.3, p.438-439, 1983.
- VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J.L. Alkaloids from *Annona cherimolia* leaves. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.48, n.1, p.151-152, 1985.
- WAECHTER, A.-I.; CAVÉ, A.; HOCQUEMILLER, R.; BORIES, C.; MUÑOZ, V.; FOURNET, A. Antiprotozoal activity of aporphine alkaloids isolated from *Unonopsis buchtienii* (Annonaceae). *Phytother. Res.*, Bognor Regis, v.13, p.175-177, 1999.
- WANG, Z.-W.; MA, W.-W.; MCLAUGHLIN, J.L. 2,3,4-Trimethoxystyrene, a bioactive component of the bark of *Duguetia panamensis*. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.51, n.2, p.382-384, 1988.

- WATERMAN, P.G. A phytochemistry in the African rain forest. *Phytochem.*, New York, v.25, n.1, p.3-17, 1986.
- WATERMAN, P.G.; MUHAMMAD, I. Sesquiterpenes and alkaloids from *Cleistopholis patens*. *Phytochem.*, New York, v.24, n.3, p.523-527, 1985.
- WENIGER, B.; ARAGON, R.; DEHARO, E.; BASTIDA, J.; CODINA, C.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antimalarial constituents from *Guatteria amplifolia*. *Pharmazie*, Eschborn, v.55, p.867-868, 2000.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Roll Back Malaria. A global partnership. Disponível em: www.rbm.who.int. Acessado em 10/01/2004.
- WRIGHT, C.L.; MARSHALL, S.J.; RUSSEL, P.F.; ANDERSON, M.M.; PHILIPSON, J.D.; KIRBY, G.C.; WAHRHURST, D.C.; SCHIFF Jr., P.L. *In vitro* antiplasmodial, antiamebic, and cytotoxic activities of some monomeric isoquinoline alkaloids. *J. Nat. Prod.*, Columbus, v.63, n.12, p.1638-1640, 2000.
- WU, Y.-C.; CHANG, G.-Y.; DUH, C.-Y.; WANG, S.-K. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. *Phytochem.*, New York, v.33, n.2, p.497-500, 1993.
- WYLIE, R.B. The role of the epidermis in foliar organization and its relations to the minor venation. *Am. J. Bot.*, v.30, p.273-280, 1943.
- ZÁCHIA, R.A. *Estudos taxonômicos na família Annonaceae Juss: no Rio Grande do Sul, Brasil*. Porto Alegre, 1994. 367pag. Dissertação de Mestrado – Instituto de Biociências – Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- ZANI, C.L.; CHAVES, P.P.G.; QUEIROZ, R.; DE OLIVEIRA, A. B.; CARDOSO, J.E.; ANJOS, A.M.G.; GRANDI, T.S.M. Brine shrimp lethality assay as a prescreening system for anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *Phytomed.*, Chicago, v.2, n.1, p.47-50, 1995.