

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**Estudo Fitoquímico e Biológico de
Duguetia riparia (Annonaceae)**

Livia Melo Arruda Cunha

Manaus, 13 de fevereiro de 2009

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

Livia Melo Arruda Cunha

**Estudo Fitoquímico e Biológico de
Duguetia riparia (Annonaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Amazonas como requisito para obtenção de Grau de Mestre em Química (área de Concentração Produtos Naturais).

Orientadora: Dra. Ana Lúcia Queiroz de Assis Galotta

Manaus, 13 de fevereiro de 2009

C972t Cunha, Livia Melo Arruda
Estudo fitoquímico e biológico de *Duguetia riparia* (Annonaceae) / Livia
Melo Arruda Cunha. ____ 2009.
156f. : il. ; 27 cm.

Dissertação de Mestrado (Programa de Pós-Graduação em Química, área
de concentração Produtos Naturais da Universidade Federal do Amazonas).

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lúcia Queiroz de Assis Galotta.

1. Annonaceae - estudo. 2. *Duguetia riparia*. 3. Liriodenina.
4. Lisicamina. 5. Oxoputerina. 6. Assimilobina. I. Título.

CDU: 633.88 (811)

Livia Melo Arruda Cunha

**Estudo Fitoquímico e Biológico de
Duguetia riparia (Annonaceae)**

BANCA EXAMINADORA



.....

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lucia Queiroz de Assis Galotta – Orientador
Universidade Federal do Amazonas - UFAM



.....

Prof^ª. Dr^ª. Milade dos Santos Carneiro Cordeiro – Membro
Universidade do Estado do Amazonas - UEA



.....

Prof. Dr. Túlio de Orleans Gadelha Costa – Membro
Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Manaus, 13 de fevereiro de 2009

À PROFESSORA ANA LÚCIA QUEIROZ DE ASSIS GALOTTA
Pela orientação realizada,

A EBERTE FRANCISCO DA SILVA CUNHA
Pelo apóio incondicional, incentivo, paciência e compreensão

Agradeço.

**A Deus e minha Mãe pela vida,
À Professora Maria Lúcia Belém Pinheiro pela ajuda e incentivo,
Ao Professor Afonso Leão Duarte pelo apóio em todas as horas,**

**A Emanuel Costa pela ajuda incondicional no estudo fitoquímico,
À Dra. Leonor Laura Pinto Leon pela análise leishmanicida,
Ao Dr. Wanderli Pedro Tadei pela análise larvicida,**

**À Dominique Moura e Júnior Ribeiro pela ajuda incondicional,
À Equipe do Laboratório B08 por tomar nossos dias mais amenos**

Agradeço.

RESUMO

A família Annonaceae é composta por 135 gêneros; 34 podem ser encontrados na América do Sul, onde predominam os gêneros *Annona*, *Guatteria*, *Rollinia*, *Xylopia* e *Duguetia*. Dentre estes, 29 podem ser encontrados no Brasil, incluindo o gênero *Duguetia* com 50 das 70 espécies catalogadas. A espécie estudada, *D. riparia*, conhecida popularmente como “araticum da mata”, “envira”, “envira-preta”, “envira-tai” e “makahy-myra”, ocorre na Amazônia Colombiana, Suriname, Guiana Francesa, Bolívia e Brasil, em florestas não inundadas, periodicamente inundadas ou em savanas, freqüentemente ao longo dos rios com produção de frutos durante praticamente todo o ano. Com intuito de isolar possíveis metabólitos secundários presentes nesta espécie e determinar a capacidade capturadora de radicais livres, concentração de fenóis, toxicidade frente ao estágio larval de *Artemia salina*, cepas de *Leishmania amazonensis* e larvas do mosquito *Aedes aegypti* de seus extratos e frações, 678 g dos galhos finos de *D. riparia* foram macerados com hexano, metanol e metanol/H₂O (80%). Estes extratos, após sucessivas partições, originaram, respectivamente, uma fração hidroalcoólica, uma fração rica em alcalóides e o extrato metanólico solúvel 80%. Os sucessivos fracionamentos cromatográficos dos extratos metanólico, metanólico aquoso 80% e metanólico solúvel, bem como da fração hidroalcoólica e da fração de alcalóides originaram amostras relativamente puras que foram investigadas quanto à presença de substâncias bioativas. Os extratos hexânico, metanólico e metanólico solúvel, juntamente com a fração hidroalcoólica e a fração de alcalóides, foram testados quanto à capacidade capturadora de radicais livres, concentração de fenóis, toxicidade frente ao estágio larval de *Artemia salina*, cepas de *Leishmania amazonensis* e larvas do mosquito *Aedes aegypti*. O estudo fitoquímico se mostrou satisfatório, pois resultou no isolamento e identificação dos alcalóides liriodenina, oxoputerina, lisicamina e assimilobina. Os demais ensaios realizados evidenciaram ser a espécie estudada uma matéria-prima promissora na obtenção de novos medicamentos a base de plantas, haja vista que o extrato hexânico apresentou, pelo teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, DL₅₀ compatível com uma possível atividade antitumoral (DL₅₀ = 4,9 µg/mL); resultado inibitório significativo frente às cepas de *Leishmania amazonensis* (DL₅₀ = 46,4 µg/mL) e boa atividade antioxidante (CE₅₀ = 6,99 µg/mL). Também se observou que os extratos metanólico e metanólico solúvel, bem como a fração de alcalóides apresentaram, além da atividade inibitória frente às cepas de *Leishmania amazonensis*, resultados significativos quanto à capacidade capturadora de radicais livres, destacando-se entre eles a fração de alcalóides, com CE₅₀ igual a 1,15 µg/mL e o extrato metanólico, com CE₅₀ igual a 1,22 µg/mL.

Palavras-Chave: *Annonaceae*, *Duguetia riparia*, Liriodenina, Lisicamina, Oxoputerina, Assimilobina.

ABSTRACT

The Annonaceae family is made up by 135 kind; 34 of these can be found in South America, where prevail the *Annona*, *Guatteria*, *Rollinia*, *Xylopia* and *Duguetia* genus. Among these, 29 take place in Brazil, including the *Duguetia* genus with 50 of the 70 classified species. The species selected for this study was *D. riparia*, known popularly as "araticum of the forest", "envira", "black-envira", "envira-tai" and "makahy-myra", occur in the Colombian Amazonian, Surinam, French Guiana, Bolivia and Brazil, in forests no flooded, periodically flooded or in savannas, frequently along the rivers with production of fruits during practically the whole year. This study has isolated possible secondary metabolites and determined the capacity of capture of the free radicals, concentration of phenols, toxicity onto larval stage of *Artemia salina*, stumps of *Leishmania amazonensis* and larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. Starting of 678g of the fine branches of *D. riparia* were removed extracts and fractions, being softened with hexane, methanol and methanol/H₂O (80%). These extracts, after successive partitions, originated, respectively, a hydroalcoholic fraction, a rich fraction in alkaloids and the soluble methanolic extract 80%. The successive chromatographical divisions of the methanolic extracts, aqueous methanolic to 80% and soluble methanolic, as well as, of the hydroalcoholic and alkaloids fraction originated samples that were investigated as for the presence of bioactives substances. The hexanic, methanolic and soluble methanolic extracts, together with hydroalcoholic and alkaloids fraction, were tested for the capacity of arresting free radicals, their concentration of phenol and toxicity onto larval stage of *Artemia salina*, stumps of *Leishmania amazonensis* and larvae of the *Aedes aegypti* mosquito. The phytochemistry study was revealed suitable response, once it resulted in the isolation and identification of the liriodenine, oxoputerine, lisycamine and asimilobine alkaloids. Secondary assay evidenced for this species, a promising raw material in the obtaining of new medicines of plants, because the hexanic extract obtained, for the test against *Artemia salina*, a DL₅₀ compatible with a possible anti-tumoral activity (DL₅₀ = 4,9 µg/mL); significant result against the stumps of *Leishmania amazonensis* (DL₅₀ = 46,4 µg/mL) and good quality of antioxidant activity (CE₅₀ = 6,99 µg/mL), in addition, to confine free radicals; among them, the alkaloid fraction with CE₅₀ equivalent to 1,15 µg/mL and the methanolic extract, with CE₅₀ equal to 1,22 µg/mL.

Key-words: *Annonaceae*, *Duguetia riparia*, Liriodenine, Lisycamine, Oxoputerine, Asimilobine.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	11
LISTA DE TABELAS	14
LISTA DE ESQUEMAS	17
LISTA DE QUADROS	19
INTRODUÇÃO	20
CAPÍTULO I	
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	25
1. 1 – A FAMÍLIA ANNONACEAE	26
1. 1. 1 – Distribuição geográfica	26
1. 1. 2 – Aspectos botânicos	27
1. 1. 3 – Utilização	28
1. 1. 4 – Principais constituintes	29
1. 1. 5 – Substâncias isoladas e bioatividades	32
1. 2 – O GÊNERO DUGUETIA	36
1. 2. 1 – Substâncias isoladas e bioatividades	36
1. 3 – A ESPÉCIE DUGUETIA RIPARIA	42
1. 3. 1 – Distribuição geográfica	42
1. 3. 2 – Aspectos botânicos	43
CAPÍTULO II	
PARTE EXPERIMENTAL – FITOQUÍMICA	44
2. 1 – MATERIAIS, MÉTODOS E EQUIPAMENTOS	45
2. 1. 1 – Métodos cromatográficos	45
2. 1. 1. 1 – Cromatografia em camada delgada	45
2. 1. 1. 2 – Cromatografia em coluna	45
2. 1. 1. 3 – Cromatografia em camada delgada preparativa	46
2. 1. 2 – Reagentes para revelação cromatográfica	46
2. 1. 3 – Equipamento utilizado na identificação espectroscópica	47

2. 2 – COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	47
2. 3 – PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS	48
2. 4 – TESTES DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA	49
2. 4. 1 – Fenóis e taninos	49
2. 4. 2 – Antocianinas, antocianidinas e flavonóides	50
2. 4. 3 – Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	50
2. 4. 4 – Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	51
2. 4. 5 – Esteróides e triterpenóides	51
2. 4. 6 – Alcalóides	52
2. 5 – FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS	52
2. 5. 1 – Fracionamento e purificação do extrato hexânico	52
2. 5. 2 – Fracionamento e purificação do extrato metanólico	55
2. 5. 3 – Fracionamento e purificação do extrato metanólico aquoso 80%	66
CAPÍTULO III	
PARTE EXPERIMENTAL – TESTES	76
3. 1 – TOXICIDADE FRENTE À ARTEMIA SALINA LEACH	77
3. 1. 1 – Procedimento	78
3. 2 – ATIVIDADE LEISHMANICIDA	79
3. 2. 1 – Procedimento	85
3. 3 – ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO MOSQUITO AEDES AEGYPTI	88
3. 3. 1 – Procedimento	89
3. 4 – CAPACIDADE CAPTURADORA DE RADICAIS LIVRES	90
3. 4. 1 – Método qualitativo	92
3. 4. 2 – Método quantitativo	92
3. 5 – DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS	93
3. 5. 1 – Procedimento	94
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
4. 1 – FITOQUÍMICA	97
4. 1. 1 – Prospecção fitoquímica dos extratos brutos	97

4. 1. 2 – Identificação dos constituintes químicos de <i>Duguetia riparia</i>	98
4. 1. 2. 1 – Fração RMG ₈	98
4. 1. 2. 2 – Fração RMG ₉	103
4. 1. 2. 2. 1 – Identificação do alcalóide oxoputerina	104
4. 1. 2. 2. 2 – Identificação do alcalóide lisicamina	111
4. 1. 2. 3 – Fração RMG ₁₃	118
4. 2 – TESTES	133
4. 2. 1 – Toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> Leach	133
4. 2. 2 – Atividade leishmanicida	134
4. 2. 3 – Atividade larvicida frente ao mosquito <i>Aedes aegypti</i>	137
4. 2. 4 – Capacidade capturadora de radicais livres	138
4. 2. 4. 1 – Método qualitativo	138
4. 2. 4. 2 – Método quantitativo	139
4. 2. 5 – Determinação de fenólicos totais	140
CONSIDERAÇÕES FINAIS	143
REFERÊNCIAS	145

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Distribuição geográfica da família Annonaceae	26
Figura 02: Algumas espécies da família Annonaceae	27
Figura 03: Estrutura de uma acetogenina (Uvaricina)	30
Figura 04: Alcalóides tipo isoquinolínico encontrados na família Annonaceae	31
Figura 05: Alcalóides isolados de espécies do gênero <i>Annona</i>	32
Figura 06: Dois dos alcalóides isolados da espécie <i>Annona montana</i>	32
Figura 07: Alcalóides isolados da espécie <i>Annona purpúrea</i>	33
Figura 08: Três dos alcalóides isolados da espécie <i>Annona salzmanii</i>	34
Figura 09: Acetogeninas isoladas da espécie <i>Annona muricata</i>	35
Figura 10: Acetogeninas isoladas da espécie <i>Annona cherimólia</i>	35
Figura 11: Alcalóides isolados da espécie <i>Duguetia spixiana</i>	37
Figura 12: Substância bioativa isolada de <i>Duguetia panamensis</i>	38
Figura 13: Alcalóides isolados da espécie <i>Duguetia hadrantha</i>	39
Figura 14: Alcalóides isolados da espécie <i>Duguetia trunciflora</i>	39
Figura 15: Alcalóides isolados da espécie <i>Duguetia vallicola</i>	40
Figura 16: Alcalóides isolados da espécie <i>Duguetia furfuraceae</i>	41
Figura 17: Alcalóides isolados da espécie <i>Duguetia gardneriana</i>	41
Figura 18: <i>Duguetia riparia</i>	43
Figura 19: Preparação dos extratos	48
Figura 20: Teste de toxicidade frente à <i>Artemia salina</i>	79
Figura 21: Formas de vida do parasita do gênero <i>Leishmania</i>	82
Figura 22: Ciclo de vida do parasita <i>Leishmania</i> spp	83
Figura 23: Ajuste da concentração parasitária a ser utilizada no teste <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida	87
Figura 24: Placa de microtitulação de 96 poços utilizada no teste <i>in vitro</i> da atividade leishmanicida	88
Figura 25: Estrutura química do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)	92
Figura 26: Expansão entre δ_H 8,75 e 6,25 do espectro de RMN de 1H (400	

MHz, CD ₃ OD) de RMG ₈	99
Figura 27: Expansão entre δ_H 8,75 e 7,50 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₈	99
Figura 28: Expansão entre δ_H 8,75 e 7,60 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₈	101
Figura 29: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₈	103
Figura 30: Estrutura do alcalóide liriodenina	104
Figura 31: Expansão entre δ_H 8,75 e 7,80 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	105
Figura 32: Expansão entre δ_H 7,75 e 7,40 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	106
Figura 33: Expansão entre δ_H 6,52 e 4,05 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	107
Figura 34: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	109
Figura 35: Espectro de TOCSY-Seletivo (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	110
Figura 36: Estrutura do alcalóide lisicamina	111
Figura 37: Expansão entre δ_H 9,20 e 8,50 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	112
Figura 38: Expansão entre δ_H 8,75 e 7,80 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	113
Figura 39: Expansão entre δ_H 7,75 e 4,05 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	114
Figura 40: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	116
Figura 41: Espectro de TOCSY-Seletivo (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₉	117
Figura 42: Espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₁₃	118
Figura 43: Expansão entre δ_H 8,33 e 6,67 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₁₃	119
Figura 44: Expansão entre δ_H 3,75 e 2,70 do espectro de RMN de ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₁₃	120
Figura 45: Espectro de RMN de ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) de RMG ₁₃	122

Figura 46: Expansão entre δ_C 150 e 30 do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	123
Figura 47: Mapa de contornos HSQC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	125
Figura 48: Expansão entre δ_H 8,40 e 7,10 do mapa de contornos HSQC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	126
Figura 49: Expansão entre δ_H 6,65 e 2,50 do mapa de contornos HSQC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	127
Figura 50: Mapa de contornos HMBC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	129
Figura 51: Expansão entre δ_H 8,36 e 7,20 do mapa de contornos HMBC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	130
Figura 52: Expansão entre δ_H 6,65 e 6,60 do mapa de contornos HMBC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	131
Figura 53: Expansão entre δ_H 6,65 e 3,52 do mapa de contornos HMBC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	132
Figura 54: Expansão entre δ_H 2,85 e 2,65 do mapa de contornos HMBC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG ₁₃	133
Figura 55: Curvas de inibição dos extratos brutos dos galhos finos de <i>Duquetia riparia</i> testados frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	135
Figura 56: Curvas de inibição das frações dos galhos finos de <i>Duquetia riparia</i> testadas frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	136
Figura 57: Cromatoplacas das amostras testadas logo após contato com DPPH, indicando a presença de compostos antioxidantes	138
Figura 58: Curva de calibração utilizada no teste de determinação de fenólicos totais	141

LISTA DE TABELAS

Tabela 01: Uso popular e atividades farmacológicas comprovadas de espécies de Annonaceae	29
Tabela 02: Alcalóides isolados de algumas espécies de Annonaceae	36
Tabela 03: Alcalóides isolados de algumas espécies do gênero <i>Duguetia</i>	42
Tabela 04: Classificação taxonômica da espécie <i>Duguetia riparia</i> St. Hil.	42
Tabela 05: Rendimento das frações oriundas da fração hidrometanólica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	53
Tabela 06: Rendimento dos subgrupos obtidos da fração hidrometanólica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	54
Tabela 07: Rendimento das frações obtidas do fracionamento do subgrupo 6 originado da fração hidrometanólica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	55
Tabela 08: Rendimento dos subgrupos obtidos da cromatografia em coluna da fração F ₁	57
Tabela 09: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 2 proveniente do fracionamento da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	58
Tabela 10: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 9 proveniente da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	59
Tabela 11: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 25 proveniente do fracionamento da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	59
Tabela 12: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 13 proveniente da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	60
Tabela 13: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 4 proveniente da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	61
Tabela 14: Rendimento dos subgrupos obtidos da cromatografia em coluna da fração F ₃	62
Tabela 15: Rendimento das frações originadas do subgrupo 2 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	63
Tabela 16: Rendimento das frações originadas do subgrupo 3 oriunda da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	63

Tabela 17: Frações obtidas após cromatografia em coluna da fração metanólica solúvel	65
Tabela 18: Grupos provenientes do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	68
Tabela 19: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 3 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	68
Tabela 20: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 4 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	70
Tabela 21: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 5 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	70
Tabela 22: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 6 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	71
Tabela 23: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 7 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	71
Tabela 24: Frações obtidas após cromatografia em coluna da fração metanólica solúvel	73
Tabela 25: Frações obtidas após cromatografia em coluna das frações 1, 2, 3, 6 e 7	74
Tabela 26: Resultado da prospecção fitoquímica realizada nos extratos brutos da espécie <i>Duguetia riparia</i>	97
Tabela 27: Comparação dos deslocamentos químicos (δ_H), multiplicidades e constante de acoplamento (J) dos sinais dos hidrogênios de RMG ₈ com aqueles do alcalóide liriodenina	102
Tabela 28: Comparação dos deslocamentos químicos (δ_H), multiplicidades e constante de acoplamento (J) dos sinais dos hidrogênios de RMG ₉ com aqueles do alcalóide oxoputerina	108

Tabela 29: Comparação dos deslocamentos químicos (δ_H), multiplicidades e constante de acoplamento (J) dos sinais dos hidrogênios de RMG ₉ com aqueles do alcalóide lisicamina	115
Tabela 30: Comparação dos deslocamentos químicos (δ_H), multiplicidades e constante de acoplamento (J) dos sinais dos hidrogênios de RMG ₁₃ com aqueles do alcalóide assimilobina	121
Tabela 31: Dados comparativos dos deslocamentos químicos (δ_C) dos espectros de RMN ¹³ C da fração RMG ₁₃ com os do alcalóide assimilobina	124
Tabela 32: Resultado da toxicidade frente à <i>Artemia salina</i> dos extratos e frações de <i>Duquetia riparia</i>	134
Tabela 33: Resultado da DL ₅₀ das amostras testadas frente às formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	136
Tabela 34: Percentagem média de mortalidade das larvas de <i>Aedes aegypti</i> frente aos extratos e frações testados	138
Tabela 35: Valores relativos às médias do percentual de redução de DPPH dos extratos e frações estudados, em três distintas concentrações	139
Tabela 36: Concentração efetiva necessária para descolorir 50% da solução de DPPH (CE ₅₀)	140
Tabela 37: Concentração de fenólicos totais presentes nas amostras testadas	141
Tabela 38: Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante (CE ₅₀) das amostras testadas	142

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 01: Fluxograma de obtenção dos extratos dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	49
Esquema 02: Fluxograma de obtenção da fração hidrometanólica do extrato hexânico dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	53
Esquema 03: Obtenção da fração RHG ₁	53
Esquema 04: Subgrupos obtidos da fração hidrometanólica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	54
Esquema 05: Frações obtidas do fracionamento do subgrupo 6 originado da fração hidrometanólica dos galhos finos de <i>Duguetia riparia</i>	54
Esquema 06: Marcha completa da obtenção da fração RHG ₁	55
Esquema 07: Fluxograma de obtenção da fração diclorometano alcaloídica do extrato metanólico dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	56
Esquema 08: Subgrupos de frações originados da cromatografia em coluna da fração F ₁	56
Esquema 09: Fracionamento do subgrupo 2 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	57
Esquema 10: Obtenção das frações RMG ₁ e RMG ₂	59
Esquema 11: Obtenção da fração RMG ₃	60
Esquema 12: Fracionamento do subgrupo 13 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	61
Esquema 13: Fracionamento do subgrupo 4 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	61
Esquema 14: Subgrupos de frações originados da cromatografia em coluna da fração F ₃	62
Esquema 15: Frações oriundas do subgrupo 2 originado da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	62
Esquema 16: Frações oriundas do subgrupo 3 originado da fração alcaloídica dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	63
Esquema 17: Obtenção da fração metanólica solúvel dos galhos de	

<i>Duguetia riparia</i>	64
Esquema 18: Fracionamento cromatográfico em sílica gel impregnada com ácido oxálico a 12,1% da fração metanólica solúvel	64
Esquema 19: Marcha completa da obtenção das frações RMG ₁ , RMG ₂ e RMG ₃	66
Esquema 20: Fluxograma da partição do extrato metanólico aquoso 80% dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	67
Esquema 21: Fracionamento em coluna de sílica gel do extrato metanólico solúvel	67
Esquema 22: Fracionamento do subgrupo 3 oriundo do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	69
Esquema 23: Fracionamento do subgrupo 4 oriundo do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	69
Esquema 24: Fracionamento do subgrupo 5 oriundo do extrato metanólico solúvel dos galhos de <i>Duguetia riparia</i>	70
Esquema 25: Obtenção da fração RMG ₇	71
Esquema 26: Obtenção da fração metanólica solúvel do extrato metanólico aquoso 80%	72
Esquema 27: Fracionamento cromatográfico em sílica gel impregnada com ácido oxálico a 12,1% da fração metanólica solúvel	72
Esquema 28: Fracionamento cromatográfico em sílica C18 das frações 1, 2, 3, 6 e 7	74
Esquema 29: Obtenção das frações RMG ₄ , RMG ₅ , RMG ₆ e RMG ₇	75
Esquema 30: Obtenção das frações RMG ₈ , RMG ₉ , RMG ₁₀ , RMG ₁₁ , RMG ₁₂ , RMG ₁₃ , RMG ₁₄ e RMG ₁₅	75

LISTA DE QUADROS

Quadro 01: Descrição das possíveis características observadas no teste de fenóis e taninos	50
Quadro 02: Colorações indicativas da presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides	50
Quadro 03: Colorações indicativas da presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas	51
Quadro 04: Colorações indicativas da presença de esteróides e triterpenóides	51



Duguetia riparia
Fonte: Livia Cunha /Socorro Teodora

INTRODUÇÃO

O uso de plantas para fins terapêuticos vem se perpetuando na história da civilização humana, em grande parte, por meio da tradição oral, contribuindo na cura e prevenção de muitas enfermidades. A própria Bíblia documenta e registra a utilização de raízes, cipós, folhas, sementes e frutos para a cura de doenças e ferimentos. Outro registro é o papiro da época da dinastia XVIII, encontrado e publicado por Georg Ebers. Este papiro, conhecido como papiro de Ebers, enumera cerca de 100 doenças e descreve um grande número de substâncias de natureza animal e vegetal utilizadas para combatê-las (VILELA apud PINTO et al., 2002).

A consolidação do emprego de plantas para cura e prevenção de doenças se deu a partir do século XVIII, quando as primeiras substâncias puras do reino vegetal foram isoladas. Os compostos mais facilmente isolados nesta época foram os ácidos orgânicos e alcalóides (PINTO et al., 2002).

Os alcalóides, que representam cerca de 20% das substâncias naturais descritas, constituem-se em um vasto grupo de metabólitos com grande diversidade estrutural. Esse grupo químico tem apresentado um grande impacto, através dos tempos, na economia, medicina e em outros setores sociais e políticos. O uso de extratos vegetais contendo alcalóides como medicamentos, venenos e em porções mágicas, pode ser traçado desde os primórdios da civilização. Como exemplo desses usos, podemos citar o emprego de certas plantas contendo alcalóides em execuções na Grécia antiga, como no caso do filósofo Sócrates, executado pela ingestão de uma bebida preparada à base de cicuta contendo o alcalóide coniina. Durante o Império Romano, a esposa do Imperador Augusto, eliminava seus inimigos e adversários políticos assassinando-os em banquetes com o uso secreto de beladona, fonte do alcalóide atropina, adicionada aos alimentos (HENRIQUES et al., 1999).

Atualmente, a função natural de muitos metabólitos secundários tem sido reavaliada, reconhecendo-se que estes são, de fato, essenciais para a existência dos vegetais. Tem sido

observado que muitas plantas que produzem alcalóides são evitadas por animais ou insetos em sua dieta, isto certamente devido à sua toxicidade ou ao fato de a maioria dos alcalóides terem gosto amargo. Porém não se pode afirmar que as plantas produzam tais substâncias apenas para sua proteção, pois se esse fosse o caso, plantas que não produzissem alcalóides teriam sido extintas, causando uma predominância daquelas produtoras desses compostos. Outras hipóteses têm sido levantadas, como, por exemplo, de que os alcalóides seriam produtos de detoxificação de substâncias nocivas geradas pelo metabolismo primário vegetal. Contudo, essa hipótese não é compatível com a complexidade metabólica envolvida na biossíntese dessas substâncias. Outras hipóteses sugerem que tais substâncias funcionariam como uma forma de reserva de nitrogênio, embora existam poucas evidências nesse sentido. Também foi sugerido que os alcalóides poderiam atuar como hormônios reguladores de crescimento, muito provavelmente inibidores de germinação, devido ao seu poder quelante e/ou citotóxico. Essas substâncias poderiam, também, auxiliar na manutenção do equilíbrio iônico devido ao seu caráter alcalino. Assim como outros metabólitos secundários, os alcalóides também possuem um comprovado papel na defesa contra a invasão de microrganismos e vírus. Outra possível função dessas substâncias seria a proteção contra a irradiação UV, devido ao fato de, em sua maior parte, serem compostos com núcleos aromáticos altamente absorventes dessa radiação (HENRIQUES et al., 1999).

Apesar da história da humanidade confundir-se com a história do uso de plantas no combate a certas enfermidades, o potencial de plantas superiores como fonte de novos fármacos ainda não foi bem explorado. Estima-se a existência de mais de dois milhões de espécies de plantas no planeta, dentre essas a flora brasileira é estimada em aproximadamente 500.000 espécies nativas, das quais 55.000 catalogadas, e somente uma pequena fração desse imenso acervo foi explorado fitoquimicamente e ainda uma menor parte teve esse estudo monitorado por testes biológicos (GOTTIELIEB; MORS, 1980; SIMÕES, 2001).

Em meio à diversidade Amazônica, a família Annonaceae destaca-se por apresentar importância econômica considerável e por ser empregada na medicina tradicional (LEBOEUF et al., 1982). Entre os metabólitos secundários isolados de espécies de Annonaceae podem-se destacar os flavonóides com propriedades antimicrobiana e antitumoral; diterpenos, com atividades antitumoral, antibacteriana e antifúngica; acetogeninas com atividades antitumoral, antibacteriana, antiparasitária e inseticida e os alcalóides benzilisoquinolínicos, com propriedades antiparasitária, antitumoral, inseticida e antibacteriana (ALALI et al., 1999; LEBOEUF et al., 1982).

Vale destacar que, apesar do grande número de metabólitos secundários isolados de espécies de Annonaceae apresentarem atividades biológicas comprovadas, muitos, inclusive, bioativos contra parasitas causadores da malária, doença de chagas e leishmanioses, o número de espécies investigadas dessa família ainda é muito reduzido. Dentre as 2500 espécies distribuídas em 135 gêneros, apenas 150 espécies em 41 gêneros foram estudadas até o momento (CASTEDO et al., 1991; CRONQUIST, 1981; HUTCHINSON, 1964; JOLY, 1993; LOBÃO et al., 2005; RIBEIRO et al., 1999; SANTOS, 1995).

Por essa razão objetivou-se com esse trabalho realizar o estudo fitoquímico e biológico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia* St. Hil. (Annonaceae) e assim contribuir na consolidação das pesquisas de plantas amazônicas como fonte de novos fármacos.

Para isso foram estabelecidas as seguintes ações:

- a) Determinar as estruturas químicas dos metabólitos isolados dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*, através de métodos cromatográficos e espectrométricos (RMN de ^1H e ^{13}C , COSY ^1H - ^1H , TOCSY-Seletivo e técnicas correlatas);
- b) Avaliar a capacidade capturadora de radicais livres dos extratos e frações obtidos dos galhos finos de *Duguetia riparia*, utilizando o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH);

- c) Determinar a concentração de compostos fenólicos presentes nos extratos e frações dos galhos finos de *Duguetia riparia*;
- d) Testar a toxicidade dos extratos e frações obtidos dos galhos finos de *Duguetia riparia*, frente ao estágio larval de *Artemia salina* Leach (TAS);
- e) Testar os extratos e frações dos galhos finos de *Duguetia riparia* contra cepas de *Leishmania amazonensis* e
- f) Testar os extratos e frações dos galhos finos de *Duguetia riparia*, frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti*.



Folhas

Frutos

Galhos

Duguetia riparia
Fonte: Livia Cunha/Socorro Teodora

CAPÍTULO I: Revisão Bibliográfica

1. 1 – A FAMÍLIA ANNONACEAE

1. 1. 1 – Distribuição geográfica

A ordem Magnoliales, uma das mais primitivas das angiospermas, é constituída de quase 3000 espécies pertencentes a 10 famílias, algumas com amplo número de espécies no Brasil como Magnoliaceae, Myristicaceae, Lauraceae e Annonaceae (CRONQUIST, 1981).

Dentre estas, a família Annonaceae, descrita por Antoine Laurent de Jussieu, por apresentar uma combinação de caracteres marcantes, é uma das mais uniformes tanto do ponto de vista anatômico como estrutural. É constituída por aproximadamente 135 gêneros e 2500 espécies distribuídas principalmente pelas regiões tropicais e subtropicais do globo terrestre (Figura 01), ocorrendo como árvores aromáticas, arvoretas ou lianas (CRONQUIST, 1981; HUTCHINSON, 1964; JOLY, 1993; LOBÃO et al., 2005; RIBEIRO et al., 1999; SANTOS, 1995).

Dos gêneros que compõem esta família, 34 podem ser encontrados na América do Sul, onde predominam os gêneros *Annona* Linne, *Guatteria* Ruiz et Pavon, *Rollinia* St. Hil., *Xylopia* Linne e *Duguetia* St. Hil. Dos 34 gêneros que ocorrem na América do Sul, 29 podem ser encontrados no Brasil, incluindo *Duguetia* com 50 das 70 espécies catalogadas (RIBEIRO et al., 1999; SANTOS, 1995).

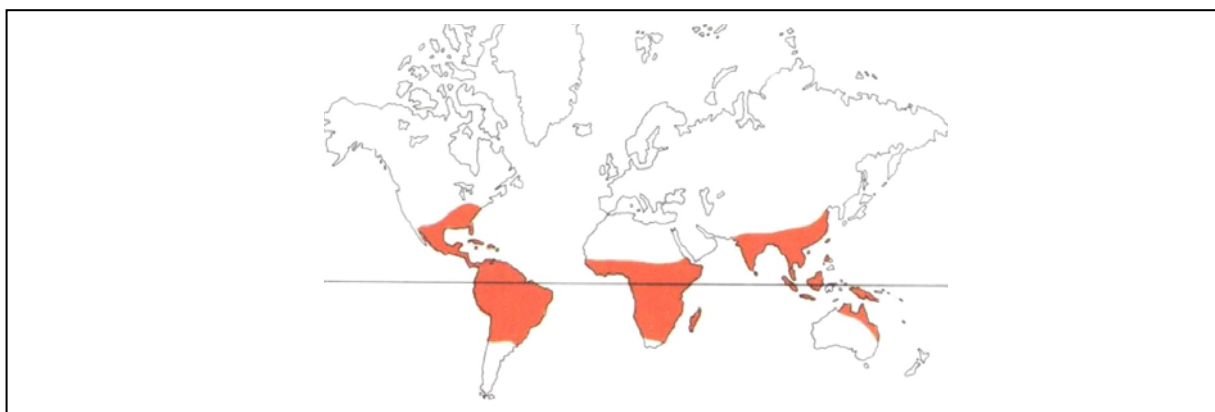


Figura 01: Distribuição geográfica da família Annonaceae.
FONTE: HEYWOOD, 1978.

1. 1. 2 – Aspectos botânicos

No que tange à descrição botânica, destaca-se que as espécies dessa família são constituídas em sua maioria por plantas lenhosas (árvores ou arbustos), apresentando folhas inteiras, de disposição alternada dística, sem estípulas. As flores são isoladas ou reunidas em inflorescências, grandes ou de tamanho pequeno, hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado em cálice e corola, em geral trímeras com três sépalas e três pétalas carnosas. Estames muito numerosos, dispostos, geralmente, espiraladas, livres entre si, apocárpicos, com um a muitos óvulos (JOLY, 1993). O fruto geralmente é apocárpico baciforme, porém frutos sincárprios podem ser encontrados em gêneros como *Annona*, *Fusae*, *Rollinia* e *Duguetia*. As sementes, caracteristicamente, apresentam endosperma com período de germinação curto (Figura 02) (JOLY, 1993; RIBEIRO et al., 1999).

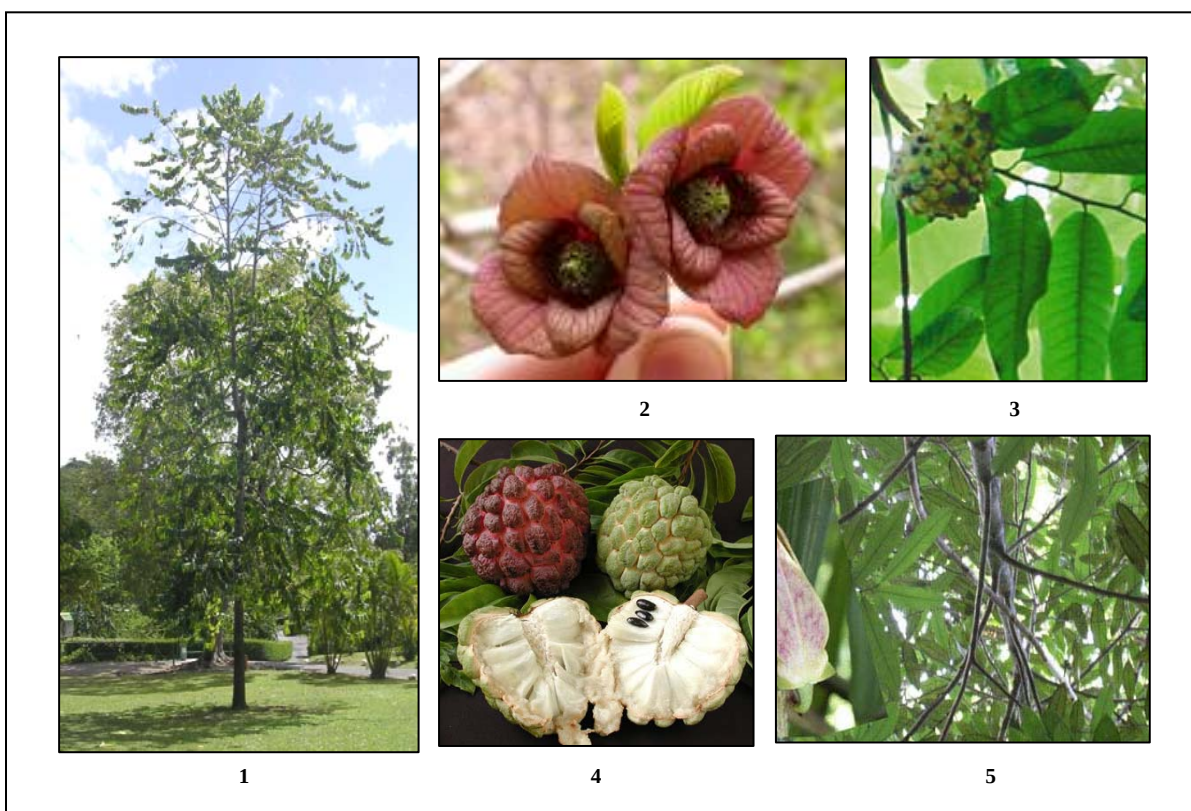


Figura 02: Algumas espécies da família Annonaceae: *Cananga odorata* (1), *Asimina triloba* (2), *Annona cacans* (3), *Annona squamosa* (4) e *Goniothalamus tavoyensis* (5).

FONTE: (Foto 1): <http://www.da-academy.org>. (Foto 2): <http://www.dendronetcetera.blogspot.com>. (Foto 3): <http://www.sindareia.com.br>. (Foto 4): <http://www.tropicalfruitnursery.com>. (Foto 5) <http://www.gibbonproject.org>. Acessado em 03 de março de 2008.

1. 1. 3 – Utilização

O principal valor econômico da família Annonaceae é o fornecimento de frutos comestíveis, tais como: graviola (*Annona muricata*), pinha, fruta-do-conde ou ata (*Annona squamosa*), biribá (*Rollinia mucosa*), pindaíba (*Duguetia lanceolata*), cherimólia (*Annona cherimólia*) e araticum (nome de muitas espécies nativas do Brasil) (HUTCHINSON, 1964; LEBOEUF et al., 1982; PAULINO NETO; OLIVEIRA, 2006).

Porém, algumas espécies, como *Bocageopsis* spp, *Fusae longifolia*, *Guatteria megalophylla*, *Guatteria stipitata* e *Oxandra polyantha*, são de grande importância em madeiras (MURILO; RESTREPO, 2000; SÁNCHEZ, 1997). Desta forma, a madeira de *Duguetia sessilis* é utilizada, geralmente, como suporte de telhados de casas, enquanto que a espécie *Xylopia sericea* fornece madeira para mastros de pequenas embarcações (LOBÃO et al., 2005).

Na alimentação, os frutos e sementes de diversas espécies de *Xylopia* são aproveitados como condimentos. Assim, as sementes da *X. sericea* podem substituir a pimenta do reino ou a pimenta da índia, enquanto os frutos, ainda não maduros, da *X. aromática*, podem ser substitutos da pimenta malagueta (GEMTCHÚJNICOV, 1976; HOEHNE et al., 1941; LOBÃO et al., 2005).

Outras espécies são utilizadas como plantas ornamentais (*Xylopia brasiliensis* e *Cananga odorata*) e na obtenção de perfumes, óleos comestíveis, sabões, álcool e papel (HOEHNE et al., 1941; HUTCHINSON, 1964; LEBOEUF et al., 1982).

Essa família também se destaca pelo amplo número de utilidades na medicina popular (Tabela 01). Assim, as sementes reduzidas a pó de *Rollinia mucosa* são usadas contra enterocolite, enquanto que seu fruto (biribá) é tido como analéptico e antiescorbútico e os

frutos ainda verdes de *Xylopia aromática* são utilizados como vermífugo e tônico para o estômago e intestino (PRANCE, 1975).

Espécie	Uso popular	Atividade comprovada	Referência
<i>Annona</i> spp.	Antiparasitário, antitumoral, inseticida, antiviral, antimicrobiano e antifúngico	Antitumoral, Leishmanicida, Antimalárica	LEBOEUF et al., 1982 SAHPAZ et al., 1994*
<i>Artabotrys hexapetalus</i>	Antimalárico	Antimalárica, Antitumoral	WONG & BROW, 2002* LI et al., 1997*
<i>Enantia chlorantha</i>	Tuberculose, infecções hepáticas e úlceras	Anti-HIV	WAFO et al., 1999*
<i>Enantia polycarpa</i>	Anti-séptico	-	IRVINE, 1961*
<i>Goniothalamus velutinus</i>	Analgésico, intoxicação alimentar e repelente	-	OMAR et al., 1992
<i>Guatteria amplifolia</i>	Antiparasitário	Antimalárica	PAREDES et al., 2001*
<i>Guatteria boliviana</i>	Antitérmico e vermífugo	Antiparasitária	MAHIOU et al., 2000
<i>Guatteria foliosa</i>	Antiparasitário e inseticida	Antiparasitária, Antiviral	PAREDES et al., 2001*
<i>Miliusa balansae</i>	Gastropatia e glomerulonefropatia	-	KAMPERDICK et al., 2002
<i>Miliusa tomentosa</i>	-	Analgésica, Antibacteriana	JUMANA et al., 2000* LEBOEUF et al., 1982
<i>Mnodora myristica</i>	Inseticida e analgésico	-	IRVINE, 1961*
<i>Monodora tenuifolia</i>	Antitumoral	-	IRVINE, 1961*
<i>Pachypodanthium staudtii</i>	Inseticida	-	IRVINE, 1961*
<i>Polyalthia nemoralis</i>	-	Hepatite, Antimalárica	LEBOEUF et al., 1982
<i>Popowia diclina</i>	Edema	-	IRVINE, 1961*
<i>Rollinia mucosa</i>	Antitumoral, enterocolite e antiescorbútica	Antitumoral, Antimicrobiana, Antifúngica	KUO et al., 2001* SHI et al., 1997
<i>Uvária dependens</i>	Antiparasitário	Antimalárica	NKUNYA et al., 1993*
<i>Uvária klaineana</i>	Antiparasitário	Leishmanicida	AKENDENGUE et al., 1999
<i>Xylopia quitashi</i>	Edema	-	IRVINE, 1961*
<i>Xylopia vielana</i>	Reumatismo, analgésico e antimalárico	-	KAMPERDICK et al., 2002
<i>Xylopia frutescens</i>	Diurético e reumatismo	-	TAKAHASHI et al., 1995*

Tabela 01: Uso popular e atividades farmacológicas comprovadas de espécies de Annonaceae.

(*) apud COSTA, 2004.

1. 1. 4 – Principais constituintes

Segundo Leboeuf et al. (1982), os alcalóides, compostos nitrogenados em sua maioria farmacologicamente ativos, são os principais constituintes químicos das espécies pertencentes à família Annonaceae. Além dos alcalóides, também estão presentes: carboidratos, lipídeos, aminoácidos, proteínas, polifenóis, diterpenos, triterpenos, lactonas, flavonóides e esteróides

(CAVÉ et al., 1987; COSTA, 2004). Nos últimos anos, a descoberta de acetogeninas de Annonaceae tem atraído grande interesse dos pesquisadores devido ao elevado número de atividades biológicas atribuídas a essa classe de substâncias (CHANG et al., 1998). Dentre as bioatividades relatadas, destacam-se as atividades antitumoral, antimalárica, antimicrobiana, antiprotozoária, pesticida, vermicida, abortiva, imunossupressora e inibidora do apetite (ALALI et al., 1999; NASCIMENTO et al., 2003).

As acetogeninas de Annonaceae são compostos de origem policetídica que contêm uma cadeia com 35 a 37 átomos de carbono. São usualmente caracterizadas por uma longa cadeia alifática ligando um grupo metil terminal a um anel δ -lactona α,β -insaturado, e pela presença de um a três anéis tetrahydrofurânicos (THF) ao longo da cadeia. Podem possuir ainda hidroxilas, acetoxilas, cetonas, epóxidos e/ou ligações duplas (ALALI et al., 1999; RUPPRECHT et al., 1990) (Figura 03).

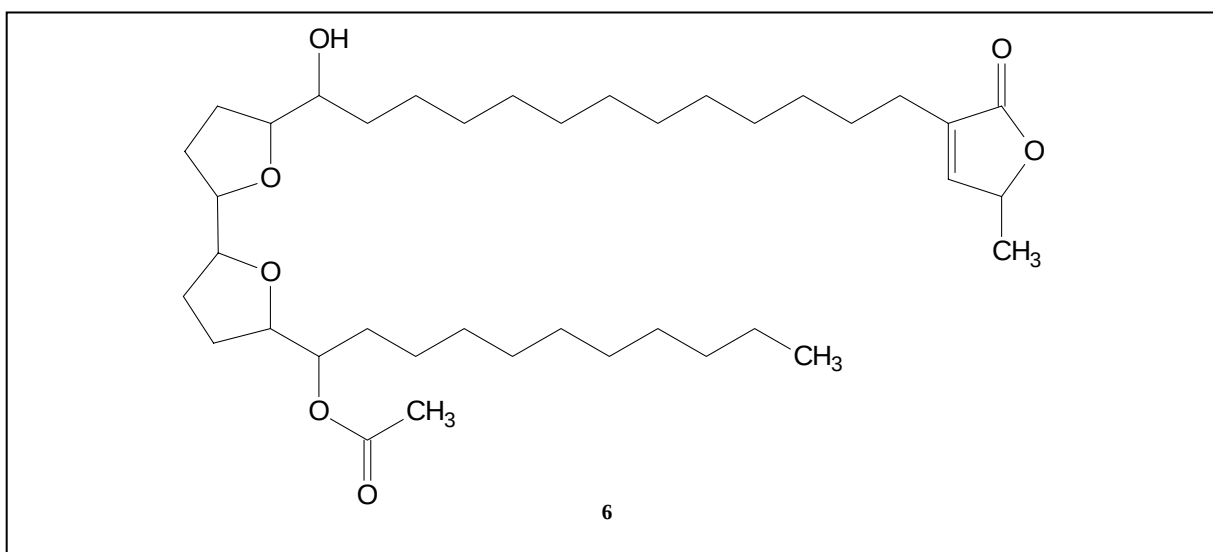


Figura 03: Estrutura de uma acetogenina (Uvaricina).

Os alcalóides mais comumente encontrados nesta família são do tipo isoquinolínico, tais como os isoquinolínicos simples (7), bisbenziloquinolínicos (8), benziltetraisoquinolínicos (9), bisbenziltetraisoquinolínicos (10), protoberberínicos,

tetrahidroprotoberberínicos (11) e aporfinóides, incluindo os alcalóides com núcleo aporfinico verdadeiro e alcalóides com núcleo modificado (12) (Figura 04) (CAVÉ et al., 1987).

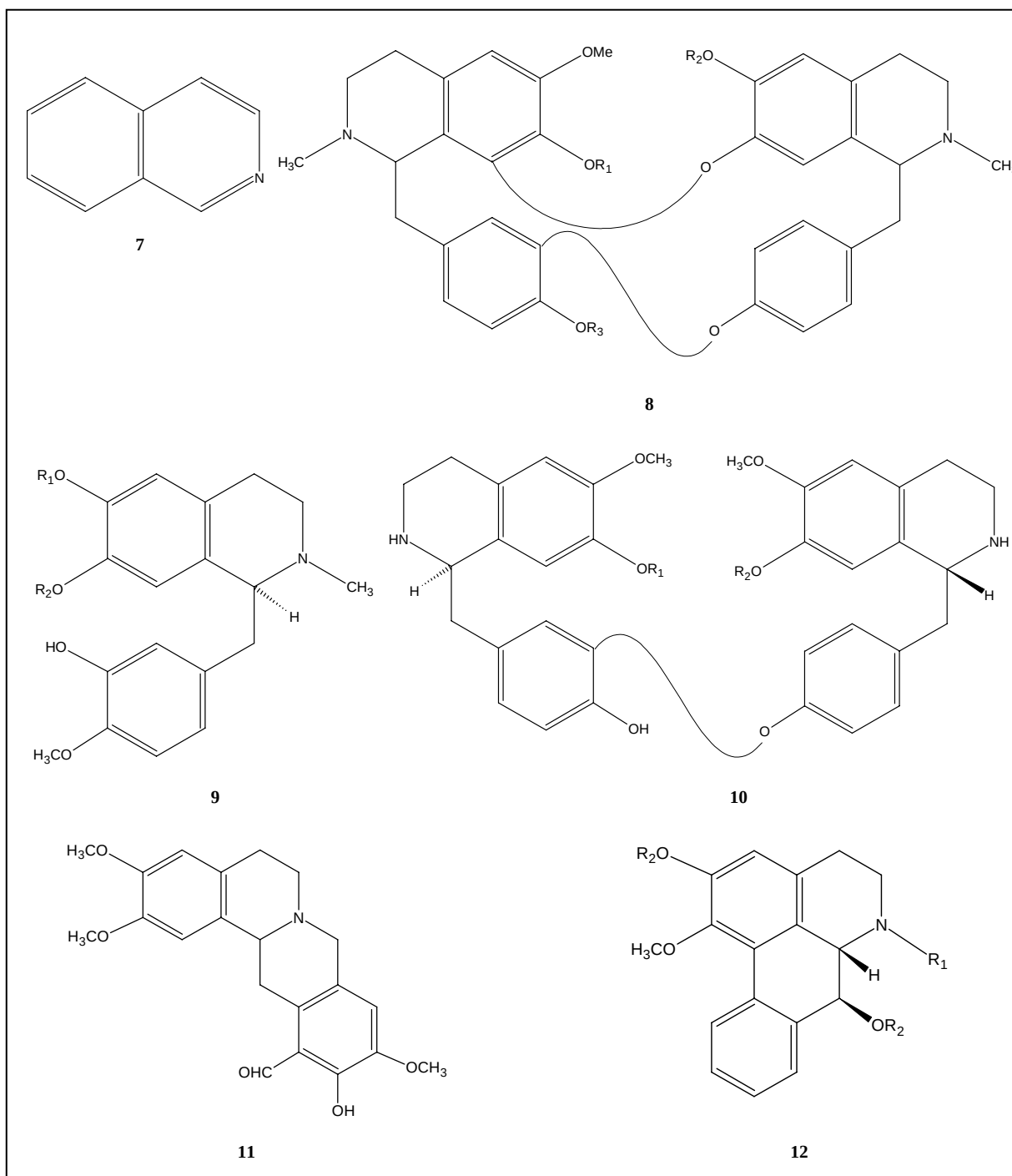


Figura 04: Alcalóides tipo isoquinolínico encontrados na família Annonaceae: isoquinolínicos simples (7), bisbenzylisoquinolínicos (8), benziltetraisoquinolínicos (9), bisbenziltetraisoquinolínicos (10), tetrahidroprotoberberínicos (Spiduxina) (11) e aporfinóide com núcleo modificado (12).

1. 1. 5 – Substâncias isoladas e bioatividades

Dentre os alcalóides isoquinolínicos, destacam-se os compostos liriodenina, um alcalóide do tipo oxoaporfínico (13) e anonaína, tipo aporfínico (14), os mais encontrados nas espécies do gênero *Annona* (Figura 05), sendo ainda considerados marcadores quimiotaxonômicos desta família (ACHENBACH; HEMRICH, 1991; COSTA, 2004).

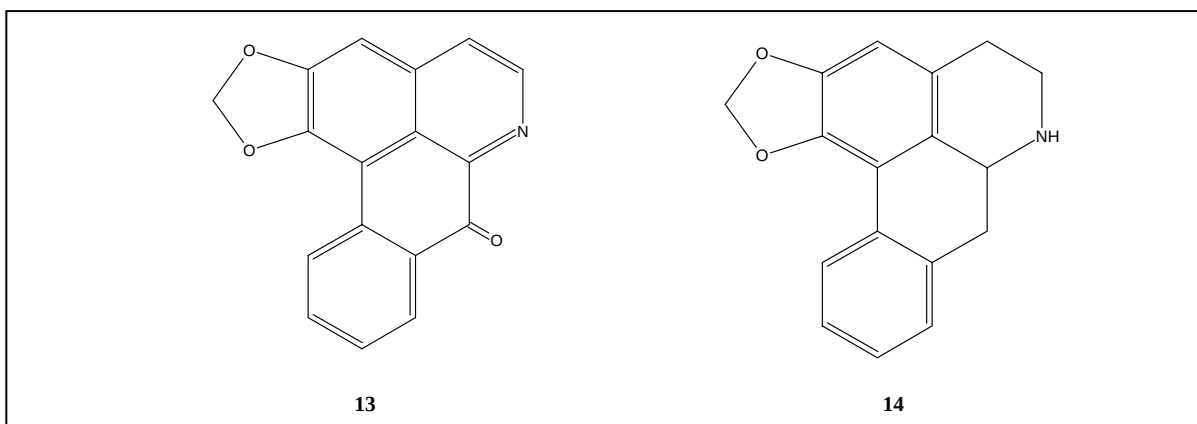


Figura 05: Alcalóides isolados de espécies do gênero *Annona*: Liriodenina, alcalóide oxoaporfínico (13) e Anonaína, alcalóide aporfínico (14).

Pesquisas com o extrato metanólico das folhas de *Annona montana* revelaram significativa citotoxicidade *in vitro* contra diferentes tipos de tumores. O fracionamento biomonitorado deste extrato levou à identificação dos alcalóides liriodenina (13) (Figura 05), annoretina (15) e argentinina (16) como compostos ativos (Figura 06) (WU et al., 1993).

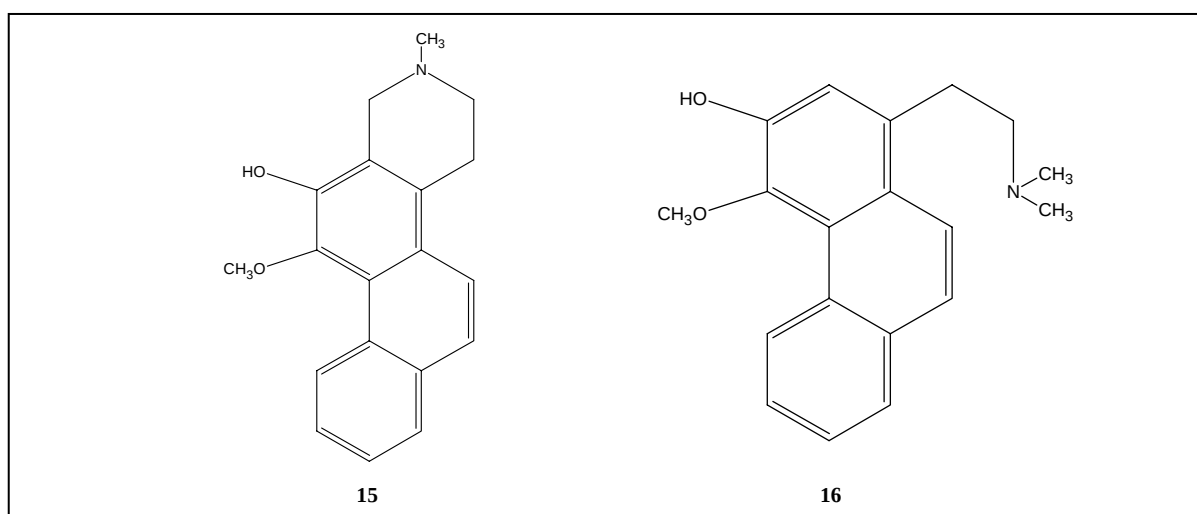


Figura 06: Dois dos alcalóides isolados da espécie *Annona montana*: Annoretina (15) e Argentinina (16).

Segundo Chang et al. (1998), o extrato metanólico das folhas de *Annona purpurea* apresentou efeito inibitório de agregação plaquetária induzido por vários agentes de agregação, cujo fracionamento mostrou a presença de alcalóides como substâncias bioativas. A elucidação estrutural levou à identificação dos alcalóides 7-hidróxi-desidrothalicsimidina (17), thalicsimidina (18), norpurpureína (19), lirinidina (20) e N-metilasimilobina (21), aos quais foi atribuída a atividade biológica (Figura 07).

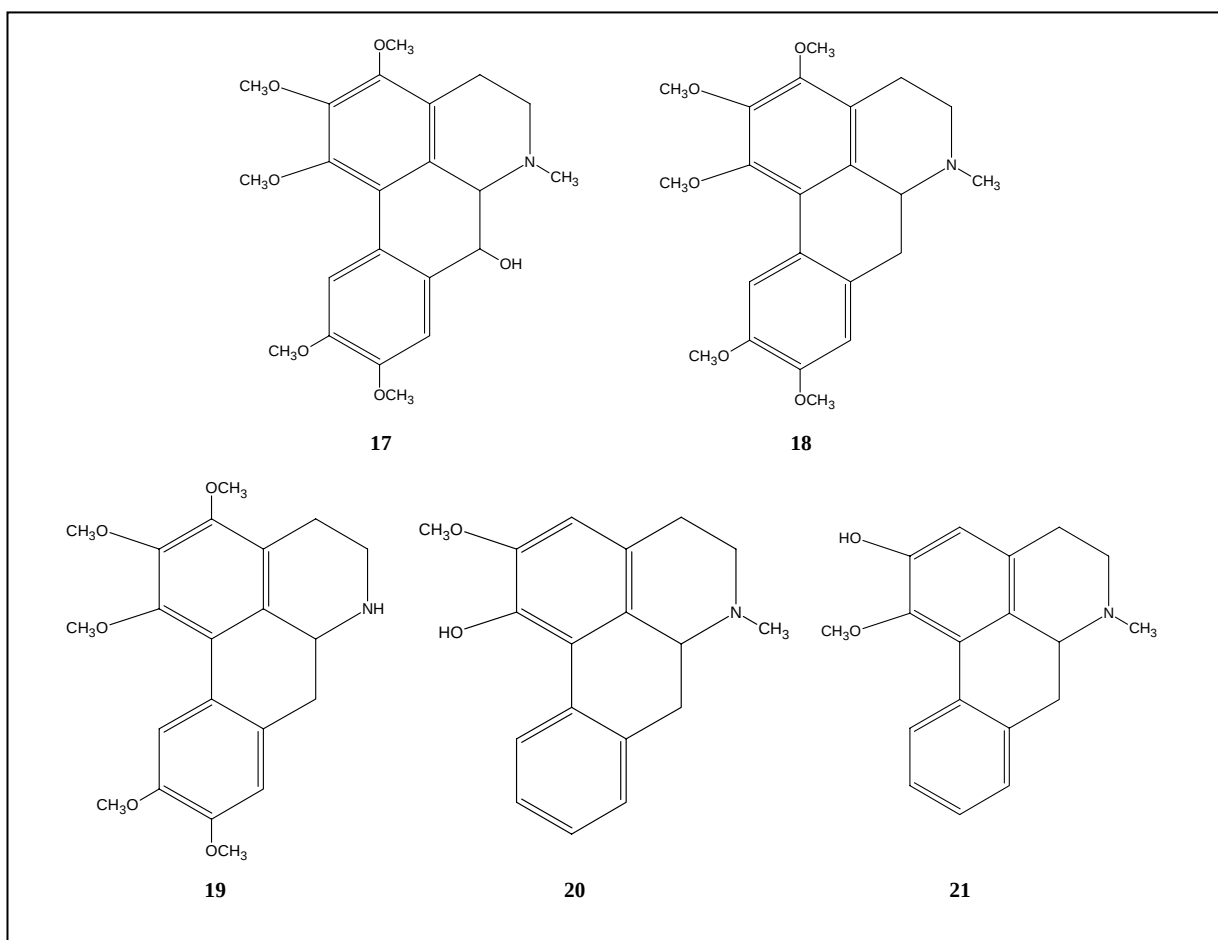


Figura 07: Alcalóides isolados da espécie *Annona purpurea*: 7-hidróxi-desidrothalicsimidina (17), Thalicsimidina (18), Norpurpureína (19), Lirinidina (20) e N-metilasimilobina (21).

Da casca do tronco de *Annona salzmanii*, foram isolados quatro alcalóides: anonaína (14) (Figura 05), reticulina (22), laurelliptina (23) e isoboldina (24) (Figura 08). Estes foram submetidos a testes antimicrobianos e somente a anonaína apresentou atividade antibacteriana, enquanto que todos os quatro alcalóides demonstraram atividade antifúngica (PAULO et al., 1992).

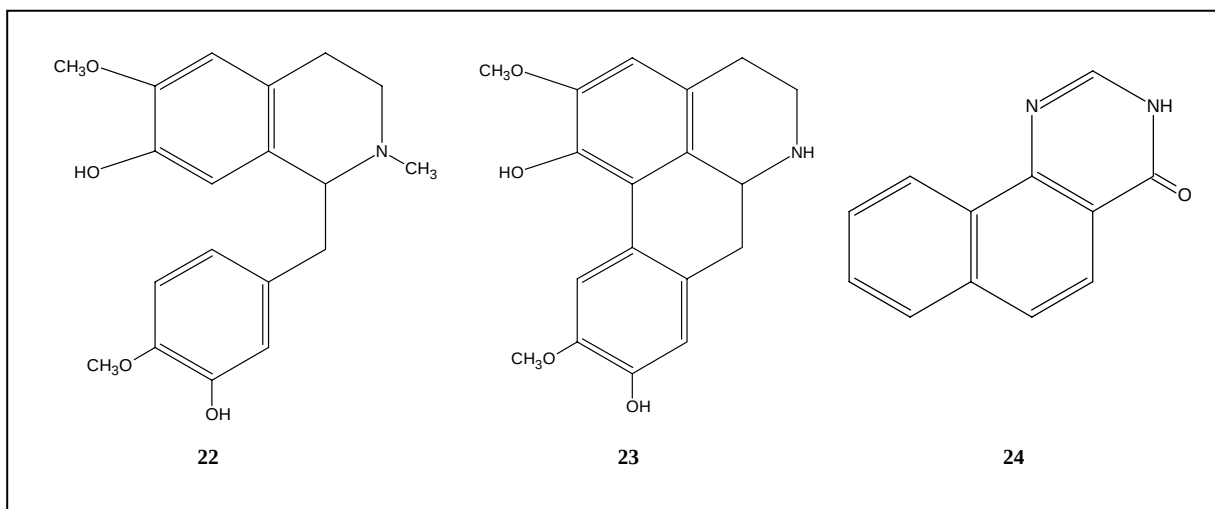


Figura 08: Três dos alcalóides isolados da espécie *Annona salzmanii*: Reticulina (22), Laurelliptina (23) e Isoboldina (24).

A uvaricina (6) (Figura 03), primeira acetogenina de Annonaceae, foi isolada do extrato etanólico de *Uvaria accuminata* em 1982 e apresentou significativa atividade antitumoral *in vivo* contra células leucêmicas de ratos (JOLAD et al., 1982; RUPPRECHT et al., 1990).

No trabalho de Bories et al. (1991), a atividade antiparasitária foi atribuída as acetogeninas isoladas de *Annona muricata* e *Annona cherimolia*. Da espécie *A. muricata* foram obtidas cinco acetogeninas do tipo mono-tetrahydrofurânicas δ -lactonas: annonacina (25), annonacinona (26), murisolina (27), corossolina (28) e corossolona (29) (Figura 09) e da espécie *A. cherimolia* foram isoladas duas acetogeninas bis-tetrahydrofurânicas δ -lactonas: cherimolina (30) e desidrocherimolina (31) (Figura 10).

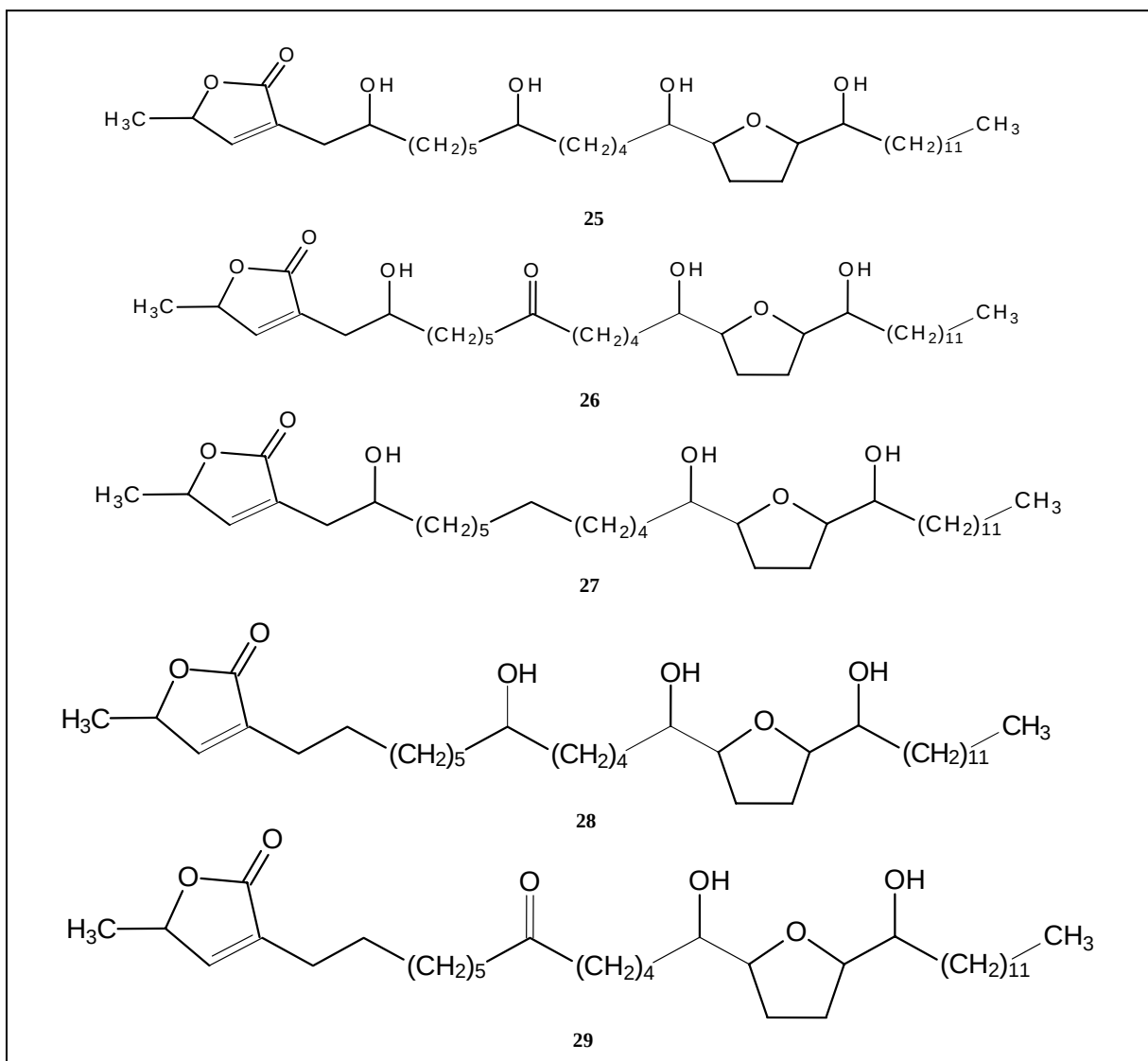


Figura 09: Acetogeninas isoladas da espécie *Annona muricata*: Annonacina (25), Annocinona (26), Mursolina (27), Corossolina (28) e Corossolona (29).

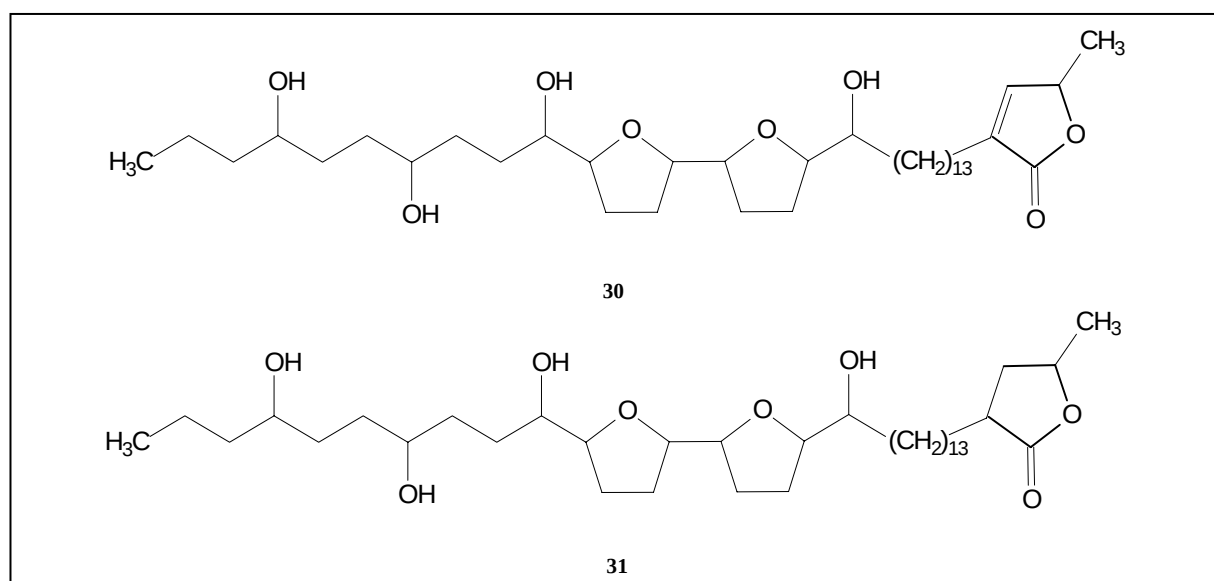


Figura 10: Acetogeninas isoladas da espécie *Annona cherimolia*: Cherimolina (30) e Desidrocherimolina (31).

Além destes trabalhos, muitos outros foram realizados com o objetivo de identificar o maior número possível de fitoconstituintes, sobretudo alcalóides, presentes em várias espécies de Annonaceae. Alguns deles encontram-se de maneira resumida na tabela 02.

Espécie	Alcalóides isolados	Referência
<i>Unonopsis lindimani</i>	Liriodenina e lisicamina	SILVA et al., 2007
<i>Rollinia pittieri</i>	O-metilmoschatolina, liriodenina, anonaina e normuciferina	TORRES et al., 2007
<i>Annona dioica</i>	1-aza-4-metilantraquinona, lasiodiplodina, liriodenina, geovanina e 1,2-metilenodioxo-6 α ,7-desidroaporfina-4(S)-(4-hidroxi-3,5-dimetoxifenil)-3,4-diidro-2(1H)-piridinona	SANTOS et al., 2003
<i>Hornschuchia obliqua</i>	Roemerina, guadiscina, liriodenina e cleistopholina	FECHINE et al., 2002
<i>Annona glabra</i>	Annobrainina, liriodenina, lisicamina, normuciferina, anonaina, N-formilanonaina, assimilobina, nordomesticina, stepharina, kikemonina, deidrocoridalmina e 1-aza-4-metil-2-oxo-1,2-diidro-9,10-antracenediona	CHANG et al., 2000
<i>Guatteria calva</i>	Oxostephanina, oxoxylopina e oxoputerina	RODRÍGUEZ et al., 1999
<i>Unonopsis lindimani</i>	Unonopsina, liriodenina e lisicamina	SIQUEIRA et al., 1998

Tabela 02: Alcalóides isolados de algumas espécies de Annonaceae.

1. 2 – O GÊNERO DUGUETIA

1. 2. 1 – Substâncias isoladas e bioatividades

O gênero *Duguetia* está representado, até o momento, por 70 espécies, mas não está entre os mais estudados fitoquimicamente. O estudo fitoquímico tem se concentrado nos gêneros *Annona* (120 espécies catalogadas), *Goniothalamus* (115 espécies catalogadas), *Monodora* (20 espécies catalogadas), *Rollinia* (65 espécies catalogadas), *Uvaria* (150 espécies catalogadas) e *Xylopia* (100-150 espécies catalogadas). Porém, apesar da escassez de trabalhos realizados com o gênero *Duguetia*, diversos compostos, principalmente alcalóides, já foram isolados de algumas espécies deste gênero (CAVÉ et al.; LEBOEUF et al. apud SIQUEIRA et al., 2001).

Debourges et al. (1987) isolaram da Annonaceae Colombiana *Duguetia spixiana*, 18 alcalóides, sendo 9 deles inéditos: um benziltetrahidroisoquinolínico: N-oxicodamina (32);

um tetraidroprotoberberino: spiduxina (33); três fenantrenos: aterosperminina, N-oxiaterosperminina e metoxiaterosperminina; um aporfínico stricto: N-metilasimilobina; um oxoaporfínico: lanuginosina; dez hidróxi-7-aporfínicos: noroliveridina (34), oliveridina (35), N-oxioliveridina (36), norpaciconfina (37), paciconfina (38), N-oxipaciconfina (39), spixianina (40), N-oxispixianina (41), duguexina (42) e N-oxiduguexina (43) e um metil-7-aporfínico: duguespixinina (44) (Figura 11).

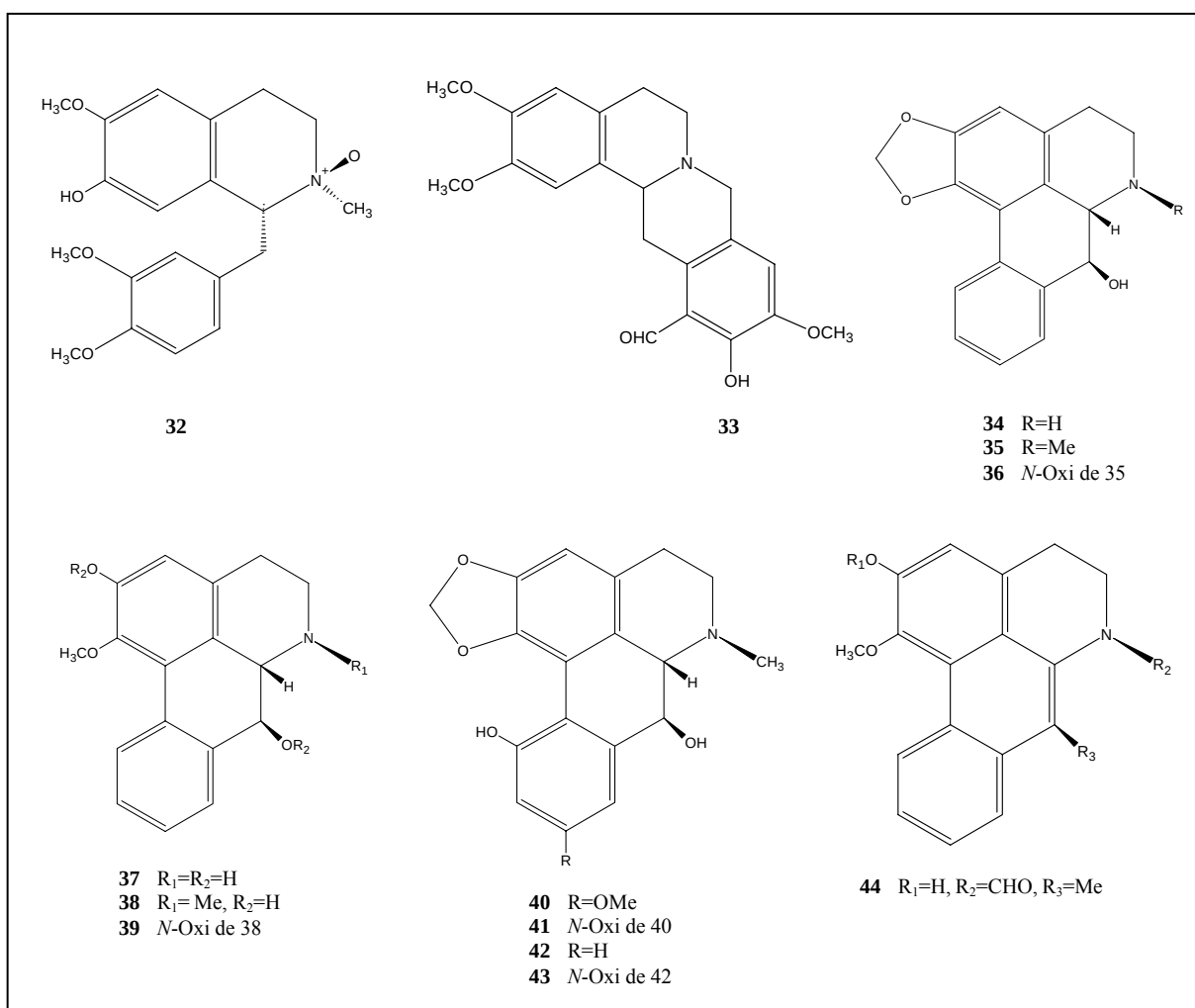


Figura 11: Alcalóides isolados da espécie *Duguetia spixiana*: N-oxicodamina (32), Spiduxina (33), Noroliveridina (34), Oliveridina (35), N-oxioliveridina (36), Norpaciconfina (37), Paciconfina (38), N-oxipaciconfina (39), Spixianina (40), N-oxispixianina (41), Duguexina (42), N-oxiduguexina (43) e Duguespixinina (44).

NOTA: Alcalóides inéditos: 32, 33, 37, 39, 40, 41, 42, 43 e 44.

Em 1988, Wang et al. isolaram da *Duguetia panamensis* a substância ativa 2,4,5-trimetoxilestireno (45) (Figura 12), através do estudo fitoquímico biomonitorado utilizando o

microcrustáceo *Artemia salina*. No mesmo trabalho verificaram uma correlação positiva entre a baixa toxicidade ao microcrustáceo utilizado no teste e a baixa atividade antitumoral.

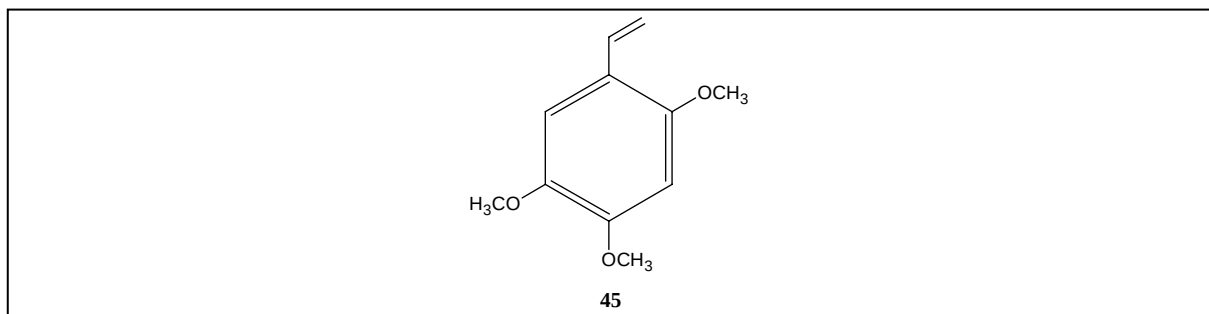


Figura 12: Substância bioativa isolada de *Duguetia panamensis*: 2,4,5-trimetoxilestireno.

Muhammad et al. (2001), isolaram dois novos alcalóides do tipo 4,5-dioxo-1-azaaporfinóides de *Duguetia hadrantha*, denominados de hadrantina A (46) e hadrantina B (47). Além destes dois alcalóides inéditos, os autores também isolaram três outros alcalóides conhecidos: imbilina-1 (48), sampangina (49) e 3-metoxisampangina (50). O referido estudo também se destaca por ser o primeiro trabalho onde se isolou os alcalóides 49 e 50, bem como um alcalóide do tipo imbilina em uma espécie do gênero *Duguetia* (Figura 13). Os compostos 46, 49 e 50 apresentaram positividade contra o *Plasmodium falciparum*, os compostos 47 e 49 foram tóxicos sobre células cancerígenas humanas e o composto 49 foi capaz de inibir a agregação de células.

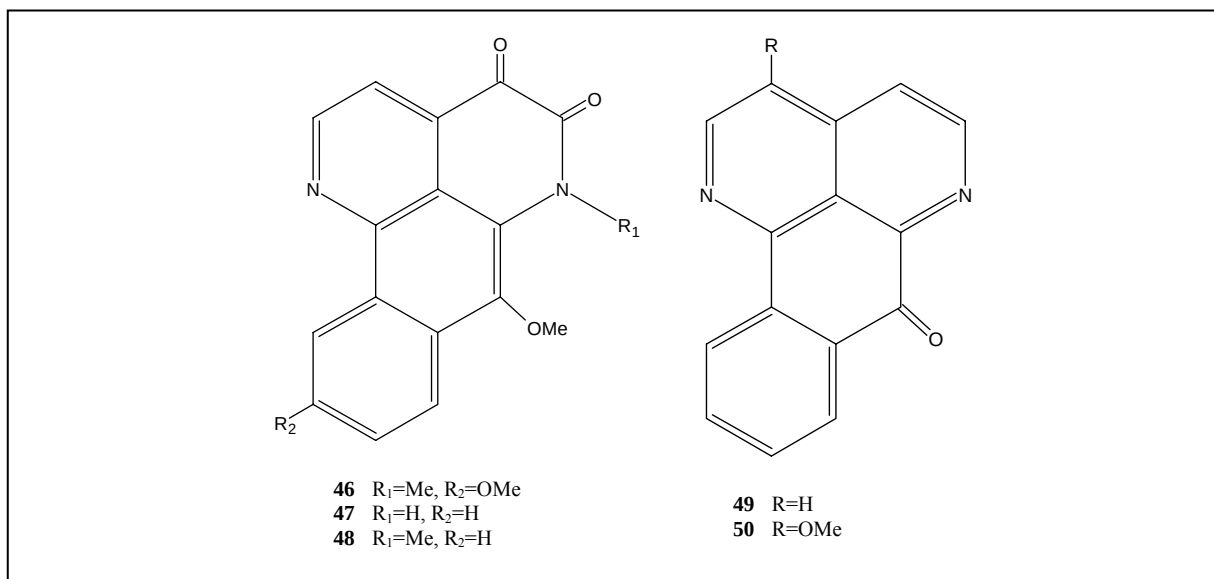


Figura 13: Alcalóides isolados da espécie *Duguetia hadrantha*: Hadrantina A (**46**), Hadrantina B (**47**), Imbilina-1 (**48**), Sampangina (**49**) e 3-metoxisampangina (**50**).

NOTA: Alcalóides inéditos: 46 e 47.

No ano de 2002, Fachine et al. isolaram e identificaram seis alcalóides das folhas e galhos finos de *Duguetia trunciflora*, sendo um do tipo benzilisoquinolínico: reticulina (**51**); quatro tetraidroprotoberberínicos: tetraidropalmatina (**52**), tetraidrojathrorrizina (**53**), discretamina (**54**) e thaicanina (**55**) e um do tipo berberínico: jathrorrizina (**56**) (Figura 14).

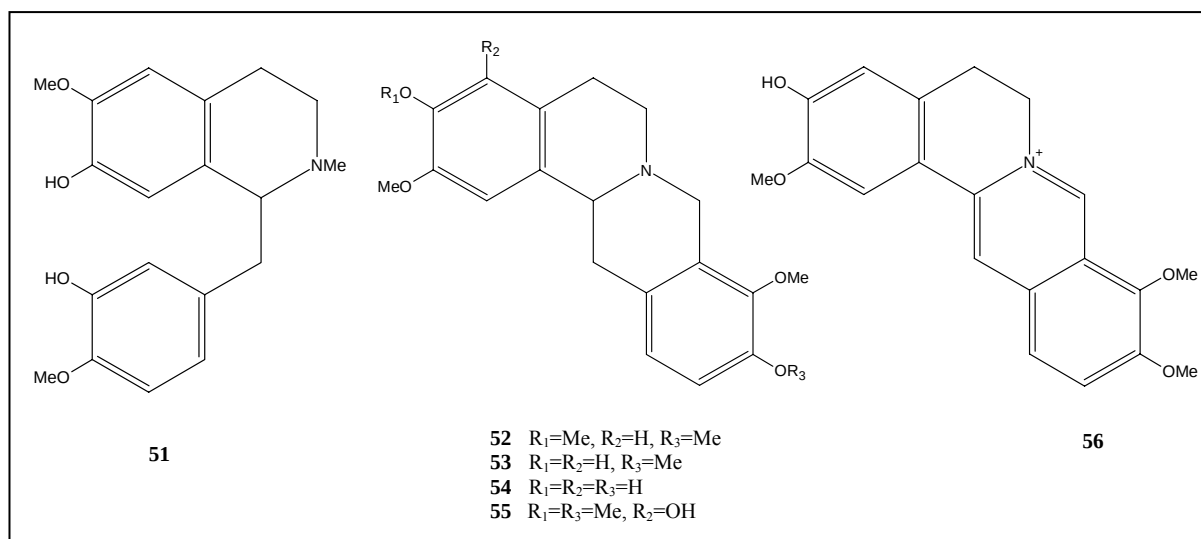


Figura 14: Alcalóides isolados da espécie *Duguetia trunciflora*: Reticulina (**51**), Tetraidropalmatina (**52**), Tetraidrojathrorrizina (**53**), Discretamina (**54**), Thaicanina (**55**) e Jathrorrizina (**56**).

Em 2004, Pérez et al. isolaram um novo alcalóide aporfinoíde da espécie *Duguetia vallicola*, a duguevallina (**57**). Ainda no mesmo trabalho, isolaram quatro outros alcalóides

conhecidos: cleistofolina (58), O-metilmoscatolina (59), oliverolina (60) e oliveridina (61) (Figura 15). Além do isolamento dos referidos alcalóides, os autores verificaram que dois deles, cleistofolina e oliverolina, apresentaram resultado positivo ao teste de atividade antimalária contra o *Plasmodium falciparum*.

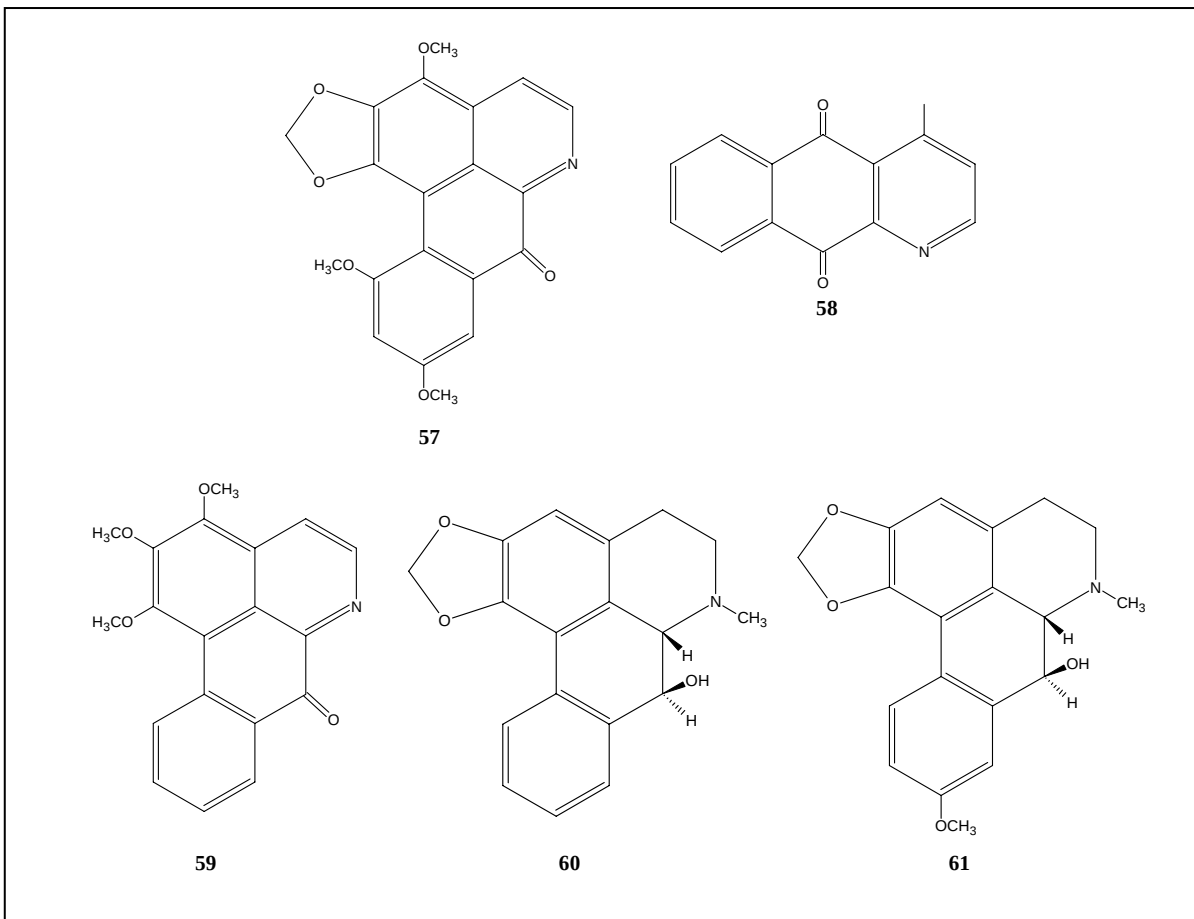


Figura 15: Alcalóides isolados da espécie *Duguetia vallicola*: Duguevallina (57), Cleistofolina (58), O-metilmoscatolina (59), Oliverolina (60) e Oliveridina (61).

Trabalhando com a espécie *Duguetia furfuraceae*, Carollo et al. (2006) isolaram dois novos alcalóides aporfinicos: N-nitrosoanonaina (62) e N-nitrosoxilopina (63) (Figura 16).

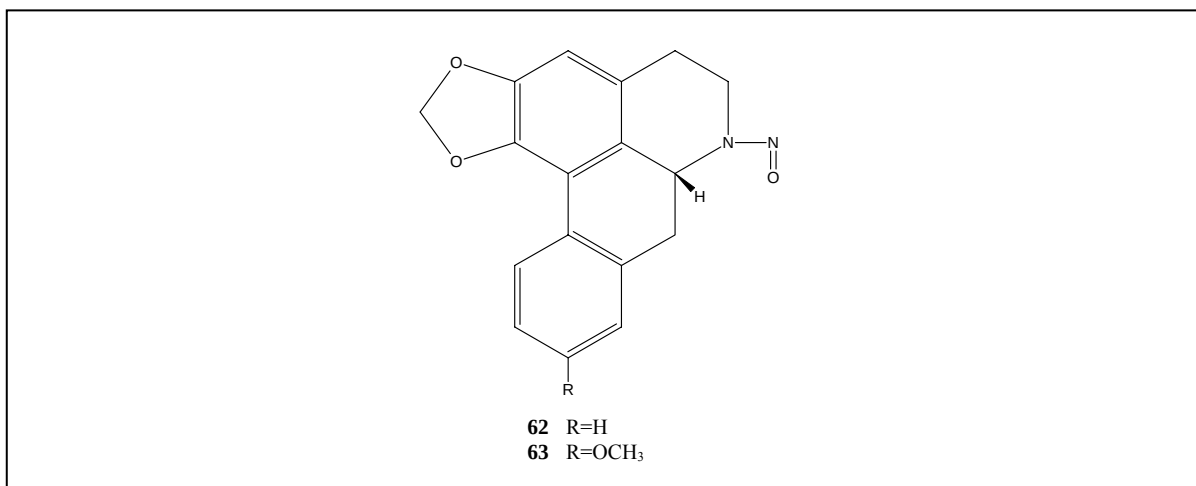


Figura 16: Alcalóides isolados da espécie *Duguetia furfuraceae*: N-nitrosoanonaina (**62**) e N-nitrosoxilopina (**63**).

Almeida et al. (2005), trabalhando com o extrato etanólico bruto das cascas do caule da espécie *Duguetia gardneriana*, conseguiram isolar e identificar os seguintes alcalóides: tetraidrojathrorrizina (**64**) e tetraidropalmatina (**65**) (Figura 17).

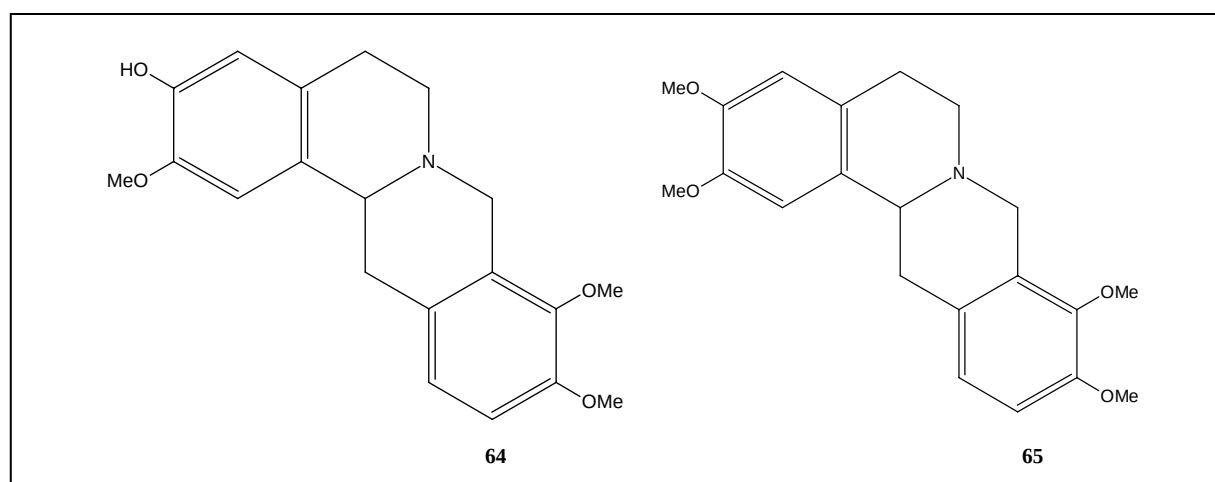


Figura 17: Alcalóides isolados da espécie *Duguetia gardneriana*: Tetraidrojathrorrizina (**64**) e Tetraidropalmatina (**65**).

A tabela 03 descreve, resumidamente, cinco outros trabalhos onde seus autores conseguiram o isolamento e identificação de alcalóides de algumas espécies do gênero *Duguetia*.

Espécie	Alcalóides isolados	Referência
<i>Duguetia furfuracea</i>	Liriodenina e lanuginosina	SILVA et al., 2007
<i>Duguetia glabriúscula</i>	Lanuginosina, oxobuxifolina e O-metilmoscatolina	SILVA et al., 2007
<i>Duguetia flagellaris</i>	Nornuciferina, isopilina, O-metilisopilina, calicinina, duguevanina, pachipodantina, oliverolina, oliverolina β -N-oxide, oliveridina e duguetina	FECHINE et al., 2002
<i>Duguetia pycnastera</i>	O-metilmoschatolina, lisicamina, liriodenina e oxoputerina	SILVEIRA, 1994
<i>Duguetia obovata</i>	Isolaram 18 alcalóides sendo 8 inéditos nesta espécie: N-formilxilopina, N-metilbuxifolina, N-formilbuxifolina, oxobuxifolina, N-metil-calicinina, duguevanina, N-formilduguevanina e N-metilduguevanina	ROBLOT et al., 1983

Tabela 03: Alcalóides isolados de algumas espécies do gênero *Duguetia*.

1. 3 – A ESPÉCIE DUGUETIA RIPARIA

1. 3. 1 – Distribuição geográfica

A espécie *Duguetia riparia* St. Hil., cuja classificação taxonômica encontra-se na tabela 04, é popularmente conhecida como “araticum da mata”, “envira”, “envira-preta”, “envira-tai” e “makahy-myra”. Encontra-se distribuída na Amazônia Colombiana, Suriname, Guiana Francesa, Bolívia e Brasil, ocorrendo em florestas não inundadas, periodicamente inundadas ou em savanas, frequentemente ao longo dos rios com produção de frutos durante praticamente todo o ano (MASS et al., 2003).

REINO	Vegetal
DIVISÃO	<i>Magnoliophyta</i>
CLASSE	<i>Magnoliopsida</i>
SUBCLASSE	<i>Magnolidae</i>
ORDEM	<i>Magnoliales</i>
FAMÍLIA	<i>Annonaceae</i>
SUBFAMÍLIA	<i>Annonoideae</i>
TRIBO	<i>Uvarieae</i>
GÊNERO	<i>Duguetia</i>
ESPÉCIE	<i>Riparia</i>

Tabela 04: Classificação taxonômica da espécie *Duguetia riparia* St. Hil.
FONTE: FRIES, 1959.

1. 3. 2 – Aspectos botânicos

Os indivíduos desta espécie são arbustos ou árvores variando de 3 a 10 metros de comprimento e de 2,5 a 15 cm de diâmetro; ramos, quando novos, cobertos por pêlos estrelados; folhas com nervura central impressa na face superior de onde saem veias secundárias; inflorescências infra e supra-axilares frequentemente opostas às folhas e raramente terminal com 1 a 4 flores; pétalas de 12 a 34 mm de comprimento e de 10 a 19 mm de largura, obovada ou elíptico obovada e coloração amarelo vivo. Os frutos, que medem em torno de 2 a 6 cm de comprimento e de 2 a 4 cm de diâmetro, apresentam formato que variam de ovóide a elipsóide e coloração marron vivo; suas sementes, com coloração que varia de creme a marron pálido e formato obovóide, chegam a medir de 7 a 13 mm de comprimento e de 4 a 8 mm de diâmetro (Figura 18) (MASS et al., 2003).

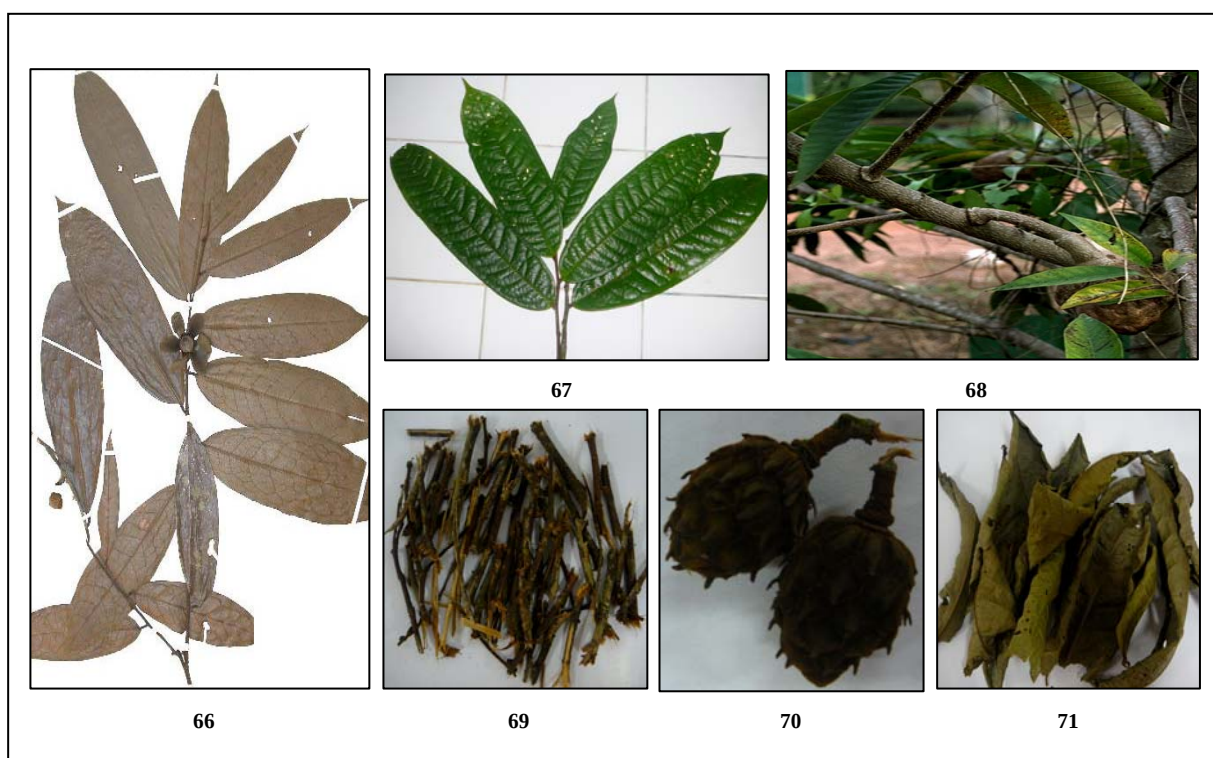


Figura 18: *Duguetia riparia*: Excicata com folhas e frutos (66), folhas frescas (67), arbusto (68), galhos secos (69), frutos frescos (70) e folhas secas (71).

FONTE: (Foto 66): <http://www.bio.uu.nl> (Acessado em 03 de março de 2008). (Fotos 67 a 71): Livia Cunha e Socorro Teodora.



Duguetia riparia
Fonte: Livia Cunha /Socorro Teodora

CAPÍTULO II:

Parte Experimental - Fitoquímica

2. 1 – MATERIAIS, MÉTODOS E EQUIPAMENTOS

2. 1. 1 – Métodos cromatográficos

Para a separação e purificação dos fitoconstituintes existentes no material botânico estudado foram utilizados três métodos cromatográficos: cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada preparativa.

2. 1. 1. 1 – Cromatografia em camada delgada (CCD)

As análises em CCD foram realizadas em cromatofolhas de sílica gel da Merck e cromatofolhas de sílica C18 da Sorbent, ambas com indicador de fluorescência F₂₅₄ com suporte de alumínio. A revelação dos cromatogramas em camada fina foi feita por exposição à luz ultravioleta de 254 e 365 nm, vapores de iodo (revelador universal) e/ou mediante borrifação de soluções reveladoras.

2. 1. 1. 2 – Cromatografia em coluna (CC)

Os fracionamentos cromatográficos foram realizados em coluna de vidro, utilizando como fase estacionária quatro tipos de suporte: Sílica Gel 60 0,040-0,063 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck, Sílica Gel 60 0,040-0,063 mm (70-230 mesh ASTM) da Merck, impregnada com ácido oxálico a 12,1% (SILVA et al., 2007, adaptado), sílica C18 da Aldrich e Sephadex LH-20 da Sigma-Aldrich. O comprimento e o diâmetro das colunas utilizadas variaram de acordo com as quantidades de amostra a serem cromatografadas.

2. 1. 1. 3 – Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP)

As análises em escala preparativa foram desenvolvidas em cromatoplasas de tamanho 20 x 20 e 10 x 10 cm e espessura de 1,0 mm. As placas foram preparadas usando 20 g de Sílica Gel 60 GF₂₅₄ da Merck e 50 mL de água destilada. Após a evaporação da água à temperatura ambiente, as placas foram ativadas em estufa a 100 °C. As faixas foram reveladas com luz UV (254 e 365 nm) e a recuperação das amostras foram realizadas com solventes específicos previamente testados.

2. 1. 2 – Reagentes para revelação cromatográfica

a) Sulfato cérico/ácido sulfúrico (MATTOS, 1998). Solução de 1% de sulfato cérico IV em ácido sulfúrico a 10%. As cromatoplasas foram borrifadas e aquecidas a 100°C por alguns minutos (revelador universal).

b) Vanilina sulfúrica (MATTOS, 1998). Solução (A): 5-10% de ácido sulfúrico em etanol. Solução (B): solução a 1% de vanilina em etanol. As cromatoplasas foram borrifadas com uma mistura da solução A e B na proporção 1:1 e aquecida a 100°C por alguns minutos (revelador universal).

c) NP/PEG (WAGNER et al., 1996). Duas soluções foram preparadas: (A) 0,5g de NP (difetilboroximetilamina), dissolvido em 10 mL de etanol, e (B) 1g de PEG (polietilenoglicol 400), dissolvido em 10 mL de etanol. Inicialmente, as cromatoplasas foram borrifadas com a solução A e após a secagem, com a solução B, e em seguida visualizadas em lâmpada UV a 365 nm.

d) Reagente de Dragendorff modificado por Munier (MUNIER apud MERCK, 1971). Solução (A): 1,7 g de nitrato de bismuto III e 20 g de ácido tartárico dissolvidos em 80

mL de água destilada. Solução (B): 16 g de iodeto de potássio dissolvidos em 40 mL de água destilada. A mistura de partes iguais (1:1) destas soluções constituiu a solução estoque. Para borrifamento das placas, 5 mL da solução estoque foram adicionados a 10 g de ácido tartárico, dissolvidos em 50 mL de água destilada (revelador de alcalóides e peptídeos, cicloexilaminas, polietilenoglicóis e derivados, compostos de óxido polietileno, lactamas, lipídeos e esteróides α,β -insaturados e anti-histamínicos).

e) Reagente de Keddy. Solução (A): 1,5 g de ácido 3,5-dinitrobenzóico em 50 mL de metanol. Solução (B): KOH aquoso 2N. As placas foram pulverizadas com a solução A, seguida imediatamente da solução B (revelador de lactonas α,β -insaturadas de 5 membros).

2. 1. 3 – Equipamento utilizado na identificação espectroscópica

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , COSY $^1\text{H} - ^1\text{H}$, TOCSY-Seletivo e técnicas correlatas, obtidos no Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná, foram registrados em espectrômetro Bruker AVANCE 400 de 9,4 Tesla. As amostras foram solubilizadas em CD_3OD e os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz (Hz). As multiplicidades dos sinais foram indicadas segundo a convenção: s (simpleto), d (duplete), dd (duplete duplo), ddd (duplo duplete duplo), t (triplete) e m (multiplete).

2. 2 – COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico, galhos finos de *Duguetia riparia* St. Hil., foi coletado no Mini Campus da Universidade Federal do Amazonas às 07:00 horas da manhã do dia 24 de julho de 2006. Após a identificação da amostra botânica pelo Prof. Dr. Antônio Carlos Weber, uma

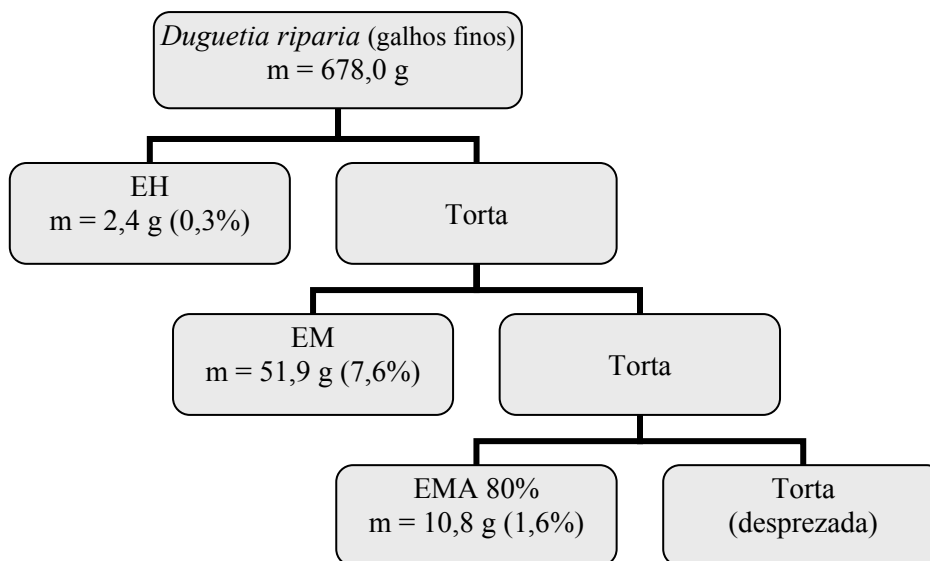
exsicata da mesma foi depositada no Herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (ICB/UFAM).

2.3 – PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

Os galhos finos de *Duguetia riparia* foram secos em estufa de ar circulante à temperatura de 45 a 50°C, triturados em moinho de quatro facas e submetidos à maceração em Mariotte. Após as macerações realizadas com hexano, metanol e solução aquosa de metanol 80%, foram obtidos, respectivamente, os extratos hexânico (EH), metanólico (EM) e metanólico aquoso 80% (EMA80%). Os extratos hexânico e metanólico foram concentrados em evaporador rotativo sob pressão reduzida a uma temperatura de 50°C, e em seguida armazenados em dessecador. O extrato metanólico aquoso 80%, por sua vez, foi submetido, após completa eliminação do solvente orgânico em evaporador rotativo, aos processos de congelamento e liofilização (Figura 19, Esquema 1).



Figura 19: Preparação dos extratos: Estufa de ar circulante (72), moinho de quatro facas (73), galhos moídos em maceração (74) e evaporador rotativo sob pressão reduzida (75).



Esquema 01: Fluxograma de obtenção dos extratos dos galhos de *Duguetia riparia*.

2. 4 – TESTES DE PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os extratos hexânico, metanólico e metanólico aquoso 80% do material botânico foram submetidos a testes de prospecção fitoquímica descritos por Mattos (1998) para a determinação da presença das seguintes classes de compostos: fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, leucoantocianidinas, catequinas, flavanonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, esteróides, triterpenóides e alcalóides.

2. 4. 1 – Fenóis e taninos

Foram transferidos 3 mL dos extratos dissolvidos a três tubos de ensaio e em seguida, foram adicionadas em cada um deles 3 gotas de uma solução alcoólica de FeCl_3 . Após agitação dos mesmos, a mudança de coloração e/ou formação de precipitado foram comparados com o teste em branco (tubo contendo apenas água e a solução alcoólica de FeCl_3) e com as cores descritas no quadro 1.

Características Observadas	Classes de Compostos Prováveis
Coloração variável entre o azul e o vermelho e o teste em branco negativo	Indicativo de fenóis
Precipitado escuro de tonalidade azul	Indicativo de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis)
Precipitado escuro de tonalidade verde	Indicativo de taninos flobafênicos (taninos condensados ou catéquicos)

Quadro 01: Descrição das possíveis características observadas no teste de fenóis e taninos.

2. 4. 2 – Antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Foram transferidos 3 mL de cada extrato dissolvido a três tubos de ensaio. Os extratos presentes nos primeiros tubos tiveram o pH corrigido a 3, os presentes nos segundos tubos tiveram o pH elevado a 8,5 e os presentes nos terceiros tubos elevado a 11. A mudança de coloração ocorrida nos tubos citados foi comparada com a descrição do quadro 2.

Constituintes	Cor em Meio		
	Ácido (3)	Alcalino (8,5)	Alcalino (11)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelho	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	–	–	Amarelo
Chalconas e auronas	Vermelho	–	Vermelho-púrpura
Flavononóis	–	–	Vermelho-laranja

Quadro 02: Colorações indicativas da presença de antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

2. 4. 3 – Leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas

Em dois outros tubos de ensaio foram transferidos 4 mL de cada extrato dissolvido. Nos primeiros tubos foram adicionadas gotas de HCl até pH 1 a 3 e nos segundos gotas de NaOH até pH 11. Após aquecimento dos mesmos durante 2 a 3 minutos, as mudanças ocorridas foram comparadas com o quadro 3.

Constituintes	Cor em Meio	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	–
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-vermelha	–
Flavanonas	–	Vermelho-laranja

Quadro 03: Colorações indicativas da presença de leucoantocianidinas, catequinas e flavanonas.

2. 4. 4 – Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Em tubos de ensaio contendo 4 mL de cada extrato dissolvido foram adicionados alguns centigramas de magnésio granulado (podendo também ser utilizado magnésio em fita) e 0,5 mL de HCl concentrado. Após término da reação, o aparecimento ou intensificação da cor vermelha indicou a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou em forma de heterosídeos.

2. 4. 5 – Esteróides e triterpenóides

Cada extrato bruto foi dissolvido em 1 a 2 mL de clorofórmio. Em seguida cada solução foi filtrada para um tubo de ensaio seco com auxílio de um funil contendo algodão e alguns decigramas de Na_2SO_4 anidro. A esses novos tubos foram adicionados 1 mL de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico concentrado tendo o cuidado de se agitar suavemente os tubos entre as duas operações e depois da adição do ácido. Em seguida as colorações formadas foram comparadas com a descrição do quadro 4.

Características Observadas	Classes de Compostos Prováveis
Coloração azul evanescente seguida de verde permanente	Indicativo da presença de esteróides livres
Coloração parda até vermelha	Indicativo de triterpenóides pentacíclicos livres

Quadro 04: Colorações indicativas da presença de esteróides e triterpenóides.

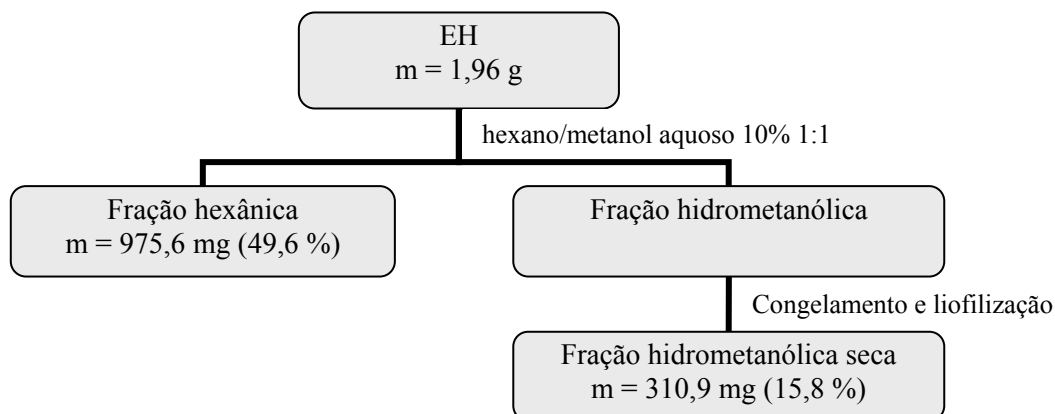
2. 4. 6 – Alcalóides

O pH dos extratos foram corrigidos para 11 utilizando NH_4OH . Em seguida, cada solução obtida foi submetida a uma extração líquido-líquido utilizando três porções sucessivas de 30, 20 e 10 mL de uma mistura éter-clorofórmio 3:1. As fases éter-clorofórmio obtidas foram tratadas com Na_2SO_4 anidro para eliminação de água e misturadas com 3 pequenas porções sucessivas de HCl diluído para extração das bases orgânicas existentes. As soluções aquosas ácidas obtidas foram distribuídas em 3 tubos de ensaio, e a cada tubo foram adicionadas, respectivamente, 3 gotas dos reagentes de precipitação de alcalóides: Hager, Mayer e Dragendorff. A presença de alcalóides foi caracterizada pela formação de um precipitado floculoso e pesado em pelo menos 2 tubos dos 3 utilizados.

2. 5 – FRACIONAMENTO E PURIFICAÇÃO DOS EXTRATOS

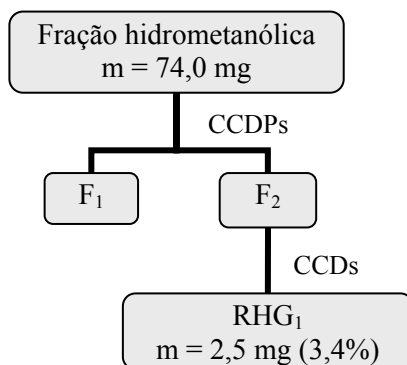
2. 5. 1 – Fracionamento e purificação do extrato hexânico (EH)

O extrato hexânico foi submetido à partição líquido-líquido com hexano/metanol aquoso (10%) na proporção de 1:1 para obtenção da fração hidrometanólica. A referida fração foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a temperatura de 50°C , congelada, liofilizada e pesquisada quanto à presença de acetogeninas de Annonaceae com auxílio do reagente de Keddy (Esquema 2). À semelhança do extrato hexânico e antes de ser cromatografada, a fração hidrometanólica foi submetida a testes, *in vitro*, de toxicidade frente à *Artemia salina*, atividade leishmanicida, atividade larvicida, atividade antioxidante e capacidade capturadora de radicais livres e determinação do teor de compostos fenólicos totais.



Esquema 02: Fluxograma de obtenção da fração hidrometanólica do extrato hexânico dos galhos de *Duguetia riparia*.

Parte da fração hidrometanólica (74,0 mg) foi submetida à cromatografia de camada delgada preparativa de sílica (CCDPs), utilizando-se como eluente a solução hexano/acetato de etila 8:2 e revelação sob luz UV de 254 e 365 nm. Foram obtidas duas frações (Esquema 03, Tabela 05), das quais apenas a fração 2, codificada como RHG₁, mostrou grau de pureza satisfatório, quando analisada em camada delgada de sílica revelada em lâmpada UV, vapores de iodo e vanilina.

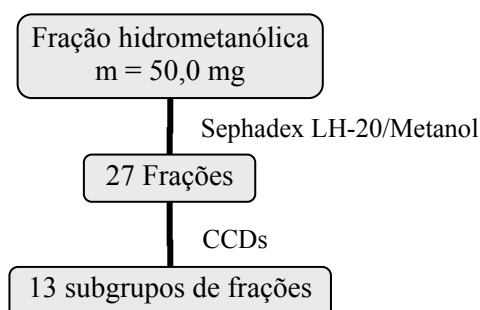


Esquema 03: Obtenção da fração RHG₁.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	11,3	15,3
2	2,5	3,4

Tabela 05: Rendimento das frações oriundas da fração hidrometanólica dos galhos de *Duguetia riparia*.

50,0 mg da fração hidrometanólica também foram cromatografadas em coluna de gel Sephadex LH-20 em metanol. Foram recolhidas 27 frações que após análise em CCD de sílica foram reunidas em 13 subgrupos de frações (Esquema 04, Tabela 06).

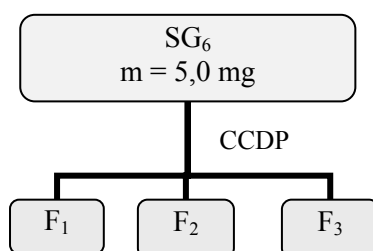


Esquema 04: Subgrupos obtidos da fração hidrometanólica dos galhos de *Duguetia riparia*.

Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1	<1	0,0	8	22	<1	0,0
2	2	1,0	2,0	9	23	<1	0,0
3	3	1,4	2,8	10	24	<1	0,0
4	4	2,3	4,6	11	25	<1	0,0
5	5	2,9	5,8	12	26	<1	0,0
6	6-20	5,0	10,0	13	27	<1	0,0
7	21	<1	0,0				

Tabela 06: Rendimento dos subgrupos obtidos da fração hidrometanólica dos galhos de *Duguetia riparia*.

O subgrupo 6 (5,0 mg) foi submetido à CCDPs (hexano/acetato de etila 8:2, revelação sob luz UV de 254 e 365 nm). As três frações obtidas (Esquema 05, Tabela 07) não apresentaram grau de pureza satisfatório. Os demais subgrupos não foram trabalhados devido o baixo rendimento apresentado.

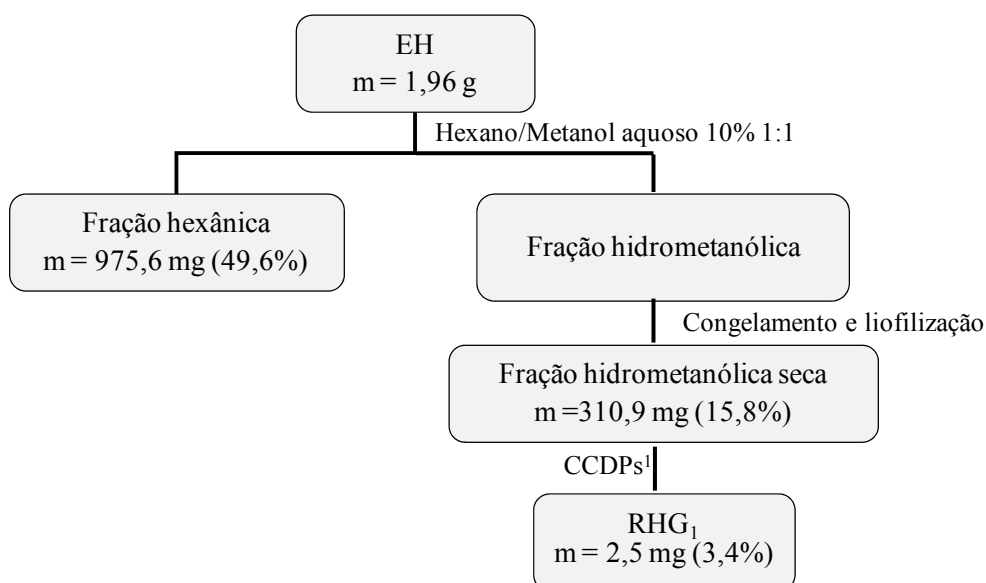


Esquema 05: Frações obtidas do fracionamento do subgrupo 6 originado da fração hidrometanólica dos galhos finos de *Duguetia riparia*.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1,1	22,0
2	<1	0,0
3	1,0	20,0

Tabela 07: Rendimento das frações obtidas do fracionamento do subgrupo 6 originado da fração hidrometanólica dos galhos de *Duguetia riparia*.

O esquema 06 mostra, de maneira resumida, os passos que o extrato hexânico foi submetido para obtenção da primeira fração separada para o estudo fitoquímico, fração RHG₁.



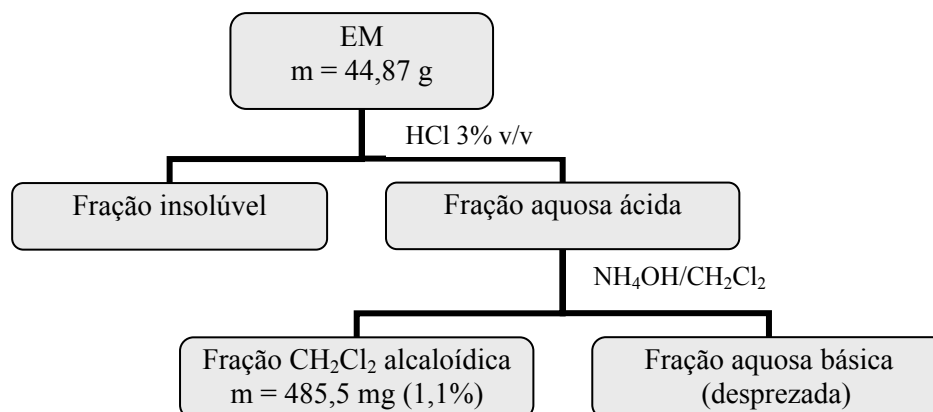
Esquema 06: Marcha completa da obtenção da fração RHG₁.

(¹) 74,0 mg, hexano/acetato de etila 8:2, revelação UV.

2. 5. 2 – Fracionamento e purificação do extrato metanólico (EM)

O extrato metanólico dos galhos de *Duguetia riparia* foi tratado com solução de ácido clorídrico a 3% v/v, durante 30 minutos, sob agitação constante. O precipitado formado foi separado da fração aquosa ácida através de filtração à pressão reduzida e esta, por sua vez, basificada até pH 10 com NH₄OH concentrado, e em seguida, extraída com diclorometano (CH₂Cl₂). Desta extração duas novas frações foram obtidas: a fração aquosa básica, desprezada, e a fração diclorometano alcaloídica, que à semelhança do extrato metanólico e fração hidrometanólica, foi submetida aos testes, *in vitro*, de toxicidade frente à *Artemia*

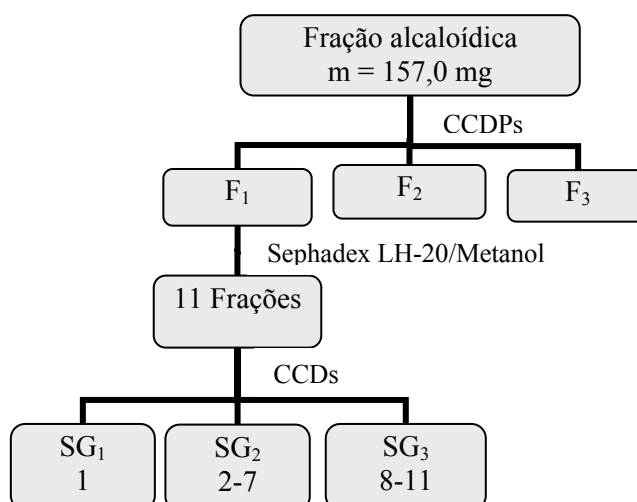
salina, atividade leishmanicida, atividade larvicida, atividade antioxidante e capacidade capturadora de radicais livres e determinação do teor de compostos fenólicos totais (Esquema 07).



Esquema 07: Fluxograma de obtenção da fração diclorometano alcaloídica do extrato metanólico dos galhos de *Duguetia riparia*.

NOTA: Metodologia descrita por Chang et al. (1998).

Parte da fração alcaloídica (157,0 mg) foi submetida à CCDPs (butanol/água 5,1:0,4, revelação sob luz UV de 254 e 365 nm). Foram obtidas três frações: F₁ (105,0 mg), F₂ (4,0 mg) e F₃ (31,0 mg). A fração F₁ foi submetida à CC de Sephadex LH-20 em metanol e foram recolhidas 11 frações. Após análise comparativa por CCD de sílica, as frações semelhantes foram reunidas em três subgrupos de frações (Esquema 08, Tabela 08).

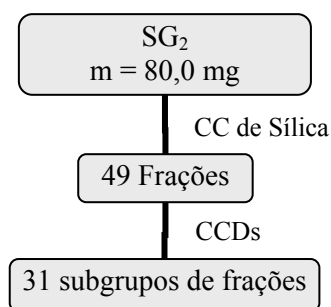


Esquema 08: Subgrupos de frações originados da cromatografia em coluna da fração F₁.

Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1	<1	0,0
2	2-7	80,0	76,2
3	8-11	1,5	1,4

Tabela 08: Rendimento dos subgrupos obtidos da cromatografia em coluna da fração F₁.

O subgrupo 2 (80,0 mg) foi cromatografado em coluna de sílica empacotada com a solução hexano/acetato de etila 1:1. Foram utilizados os seguintes sistemas de solventes: hexano/acetato de etila 1:1, acetato de etila, acetato de etila/metanol em polaridades crescentes (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1) e metanol. Após análise em CCD de sílica das 49 frações recolhidas, 31 subgrupos foram obtidos (Esquema 09, Tabela 09).



Esquema 09: Fracionamento do subgrupo 2 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1	<1	0,0	17	29	<1	0,0
2	2	<1	0,0	18	30	<1	0,0
3	3	<1	0,0	19	31	<1	0,0
4	4	<1	0,0	20	32	<1	0,0
5	5	<1	0,0	21	33	1,0	1,2
6	6	<1	0,0	22	34	<1	0,0
7	7	<1	0,0	23	35	<1	0,0
8	8	<1	0,0	24	36	<1	0,0
9	9-12	6,0	7,5	25	37-43	8,0	10,0
10	13	<1	0,0	26	44	<1	0,0
11	14	<1	0,0	27	45	<1	0,0
12	15	<1	0,0	28	46	16,3	20,4
13	16-25	17,0	21,2	29	47	2,0	2,5
14	26	<1	0,0	30	48	<1	0,0
15	27	<1	0,0	31	49	<1	0,0
16	28	<1	0,0				

Tabela 09: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 2 proveniente do fracionamento da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

Dos 31 subgrupos de frações, apenas os subgrupos de frações 9, 13 e 25 foram trabalhados. Os subgrupos 9 (6,0 mg) e 25 (8,0 mg), após CCDPs (clorofórmio/metanol 9,5:0,5, para o subgrupo 9 e clorofórmio/metanol 7:3, para o subgrupo 25, revelação sob luz UV de 254 e 365 nm), originaram, respectivamente, seis e duas frações (Tabelas 10 e 11).

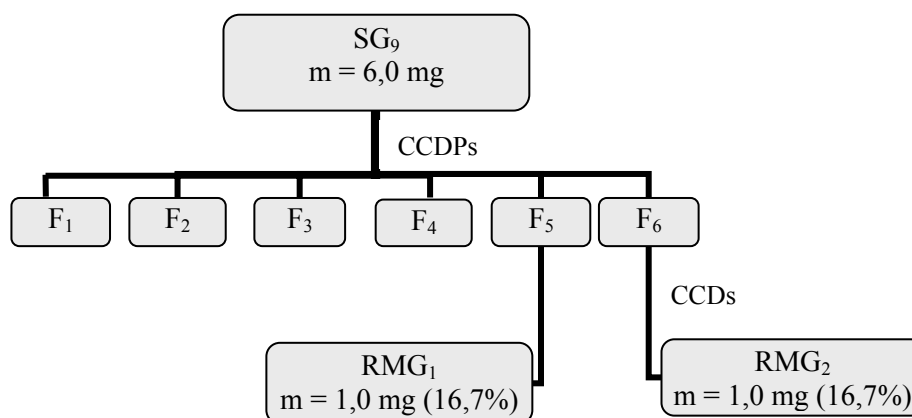
Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1,3	21,7
2	<1	0,0
3	<1	0,0
4	<1	0,0
5	1,0	16,7
6	1,0	16,7

Tabela 10: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 9 proveniente da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

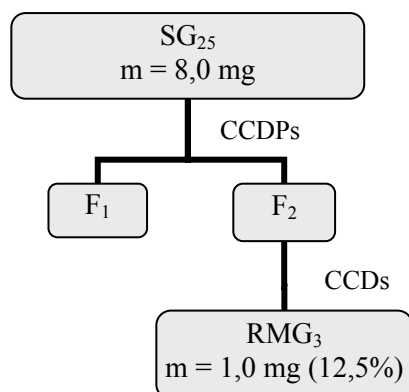
Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1,2	15,0
2	1,0	12,5

Tabela 11: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 25 proveniente do fracionamento da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

As frações 5 e 6 do subgrupo 9 e a fração 2 do subgrupo 25, após CCD de sílica, apresentaram grau de pureza satisfatório sob luz UV de 254 e 365 nm, vapores de iodo e reagente de Dragendorff. Após completa evaporação do solvente, as referidas frações foram codificadas, respectivamente, como RMG₁, RMG₂ e RMG₃ e armazenadas para o estudo fitoquímico (Esquemas 10 e 11).



Esquema 10: Obtenção das frações RMG₁ e RMG₂.

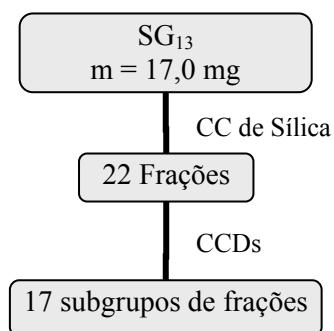


Esquema 11: Obtenção da fração RMG₃.

O subgrupo 13 (17,0 mg), por sua vez, foi fracionado em coluna de sílica gel empacotada com diclorometano/metanol 8:2 e eluída no mesmo sistema solvente em polaridades crescentes (8:2, 7:3, 6,5:3,5, 6,4:3,6 e 6:4). Foram coletadas 22 frações, reunidas em 17 subgrupos, mediante análise comparativa por CCD de sílica (Tabela 12, Esquema 12).

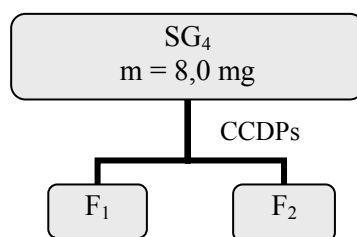
Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1	1	5,9	10	15	<1	0,0
2	2	<1	0,0	11	16	<1	0,0
3	3	2,3	13,5	12	17	<1	0,0
4	4-9	8,0	47,0	13	18	<1	0,0
5	10	<1	0,0	14	19	<1	0,0
6	11	<1	0,0	15	20	<1	0,0
7	12	<1	0,0	16	21	<1	0,0
8	13	<1	0,0	17	22	<1	0,0
9	14	1,5	8,8				

Tabela 12: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 13 proveniente da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.



Esquema 12: Fracionamento do subgrupo 13 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

Apenas o subgrupo 4 (8,0 mg) foi cromatografado em CCDPs (diclorometano/acetona/ácido fórmico 8:16,5:8,5, revelação UV). Foram obtidas duas frações (Esquema 13, Tabela 13) que devido à grande quantidade de impurezas não foram trabalhadas.

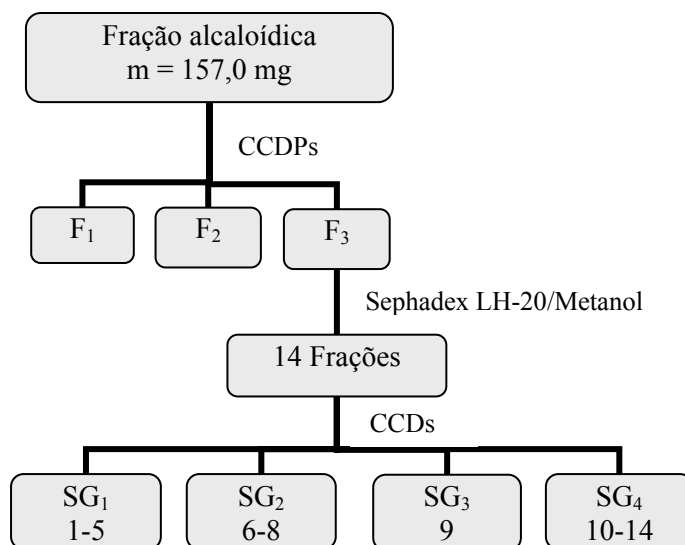


Esquema 13: Fracionamento do subgrupo 4 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	4,0	50,0
2	1,5	18,7

Tabela 13: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 4 proveniente da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

A fração F₃, à semelhança da fração F₁, também foi incorporada em coluna de Sephadex LH-20 em metanol originando 14 frações das quais deu origem a quatro subgrupos de frações (Esquema 14, Tabela 14).

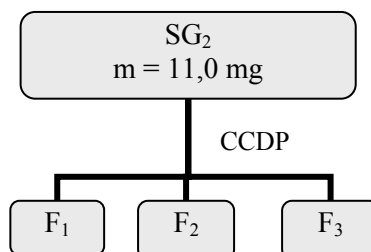


Esquema 14: Subgrupos de frações originados da cromatografia em coluna da fração F₃.

Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1-5	2,6	8,4
2	6-8	11,0	35,5
3	9	15,0	48,4
4	10-14	<1	0,0

Tabela 14: Rendimento dos subgrupos obtidos da cromatografia em coluna da fração F₃.

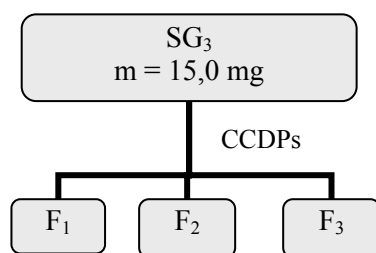
Os subgrupos 2 (11,0 mg) e 3 (15,0 mg) foram submetidos a CCDP de sílica gel (clorofórmio/metanol 9,5:0,5, revelação UV) originando três frações cada (Esquema 15, Tabela 15, Esquema 16, Tabela 16). Essas frações, por apresentarem baixo rendimento não foram trabalhadas.



Esquema 15: Frações oriundas do subgrupo 2 originado da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	3,7	33,6
2	1,5	13,6
3	3,5	31,8

Tabela 15: Rendimento das frações originadas do subgrupo 2 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

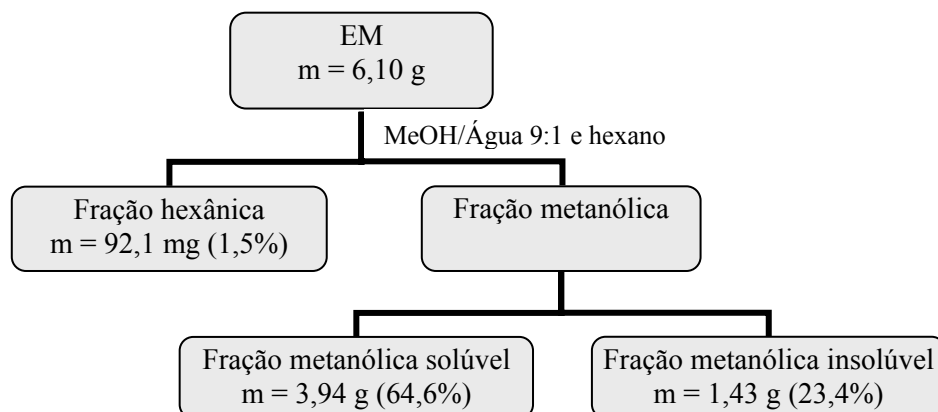


Esquema 16: Frações oriundas do subgrupo 3 originado da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1,9	12,7
2	4,7	31,3
3	3,1	20,7

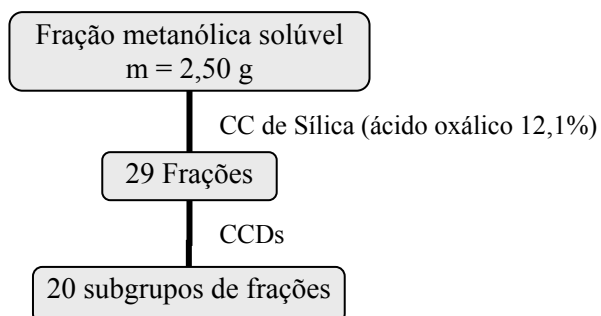
Tabela 16: Rendimento das frações originadas do subgrupo 3 oriundo da fração alcaloídica dos galhos de *Duguetia riparia*.

Além do fracionamento descrito anteriormente, o extrato metanólico dos galhos finos de *Duguetia riparia* (6,10 g) foi submetido a uma nova partição. Inicialmente foi solubilizado com quantidades suficientes de metanol e transferido a um balão de separação com auxílio de uma solução metanol/água 9:1. Em seguida, a solução remanescente foi submetida a sucessivas extrações com hexano, originando as frações hexânica, concentrada e guardada sob refrigeração, e a fração metanólica. A fração metanólica, por sua vez, antes de ser concentrada em evaporador rotatório, foi submetida à filtração sob pressão reduzida para separação do precipitado formado durante a etapa de extração (Esquema 17).



Esquema 17: Obtenção da fração metanólica solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.

Parte da fração metanólica solúvel obtida (2,50 g) foi cromatografada em coluna de sílica gel impregnada com ácido oxálico a 12,1% (SILVA et al., 2007, adaptado) com auxílio dos seguintes sistemas de solvente: hexano, hexano/acetato em polaridade crescente (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1), acetato, acetato/metanol em polaridade crescente (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1) e metanol. Foram coletadas 29 frações, reunidas em 20 subgrupos, mediante análise comparativa por CCD de sílica (Esquema 18, Tabela 17).



Esquema 18: Fracionamento cromatográfico em sílica gel impregnada com ácido oxálico a 12,1% da fração metanólica solúvel.

Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1-5	29,6	1,2
2	6	3,5	0,1
3	7	9,0	0,4
4	8	8,0	0,3
5	9	4,8	0,2
6	10	4,6	0,2
7	11	5,8	0,2
8	12	6,9	0,3
9	13-17	32,0	1,3
10	18	7,7	0,3
11	19	4,3	0,2
12	20	5,0	0,2
13	21	7,4	0,3
14	22	3,4	0,1
15	23	10,0	0,4
16	24	14,5	0,6
17	25	9,6	0,4
18	26	11,6	0,5
19	27-28	23,0	1,0
20	29	16,0	0,6

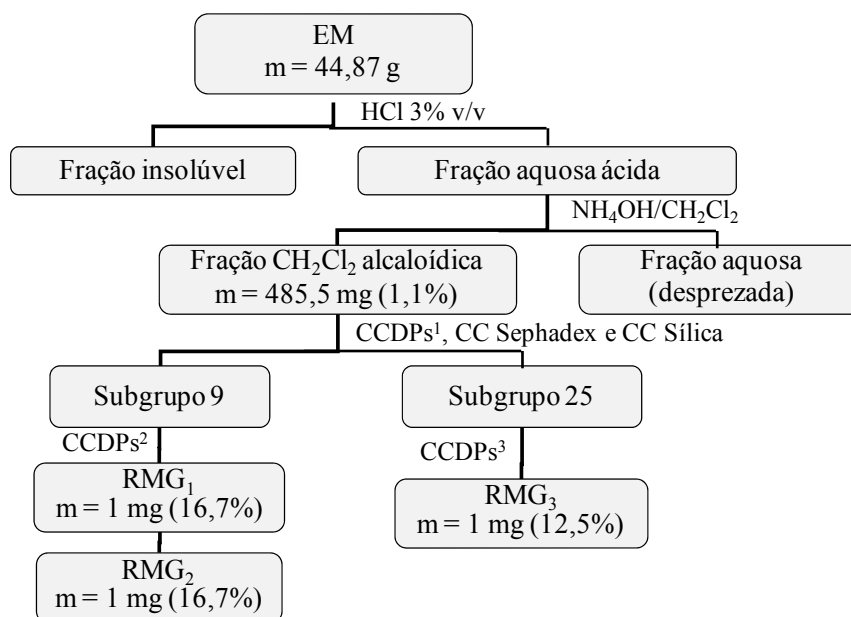
Tabela 17: Frações obtidas após cromatografia em coluna da fração metanólica solúvel.

Os 20 subgrupos descritos na tabela 17, por terem sido fracionados em coluna de sílica gel impregnada com ácido oxálico, apresentaram como artefato a formação de oxalato. Com objetivo de eliminar o artefato indesejado, os 20 subgrupos foram submetidos a uma partição utilizando uma solução aquosa de acetato de etila, neutralização do sistema com Na_2CO_3 a 10% e congelamento.

Em seguida, as porções não congeladas de cada subgrupo foram recolhidas, concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, a uma temperatura de 50° C e analisadas em cromatoplas de sílica C18 com auxílio da lâmpada de UV, vapores de iodo, reagente de Dragendorff e vanilina sulfúrica.

A grande quantidade de impurezas encontradas nos subgrupos em questão contribuiu para o insucesso do isolamento e elucidação estrutural dos possíveis constituintes presentes nas misturas obtidas.

O esquema 19 mostra, de maneira resumida, os passos que o extrato metanólico foi submetido para obtenção das frações RMG₁, RMG₂ e RMG₃, separadas para o estudo fitoquímico.

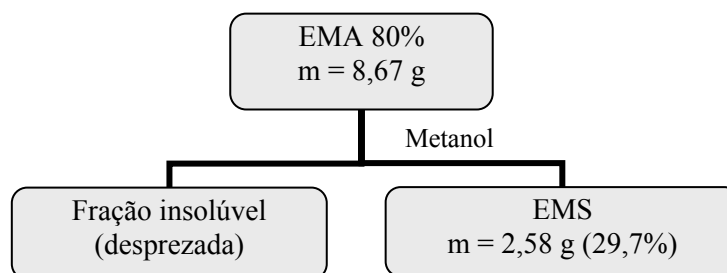


Esquema 19: Marcha completa da obtenção das frações RMG₁, RMG₂ e RMG₃.

(¹) Butanol/água 5,1:0,4, revelação UV. (²) 6,0 mg, clorofórmio/MeOH 9,5:0,5, revelação UV e (³) 8,0 mg, clorofórmio/MeOH 7:3, revelação UV.

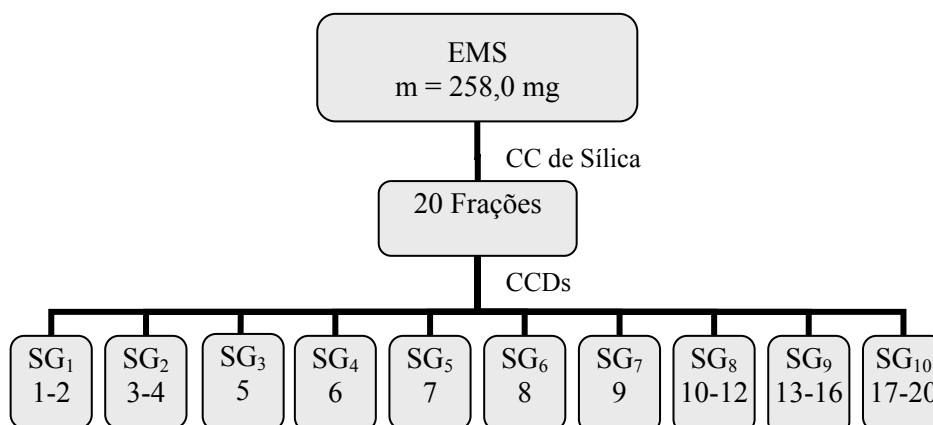
2. 5. 3 – Fracionamento e purificação do extrato metanólico aquoso 80% (EMA 80%)

O extrato metanólico aquoso 80% foi solubilizado em quantidades suficientes de metanol e agitado constantemente por cerca de 30 minutos. Em seguida, o precipitado formado foi separado da fração líquida através de filtração a pressão reduzida e o filtrado concentrado em evaporador rotativo a uma temperatura de 50°C, originando o extrato metanólico solúvel (EMS) (Esquema 20).



Esquema 20: Fluxograma da partição do extrato metanólico aquoso 80% dos galhos de *Duguetia riparia*.

O EMS (258,0 mg) foi submetido ao fracionamento em coluna de sílica gel empacotada com sistema solvente hexano/acetato de etila 1:1. A coluna foi eluída utilizando hexano/acetato de etila 1:1, acetato de etila, acetato de etila/metanol em polaridades crescentes (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1) e metanol. Foram recolhidas 20 frações que, após análise comparativa por CCD de sílica, foram reunidas em dez subgrupos de frações (Esquema 21, Tabela 18).



Esquema 21: Fracionamento em coluna de sílica gel do extrato metanólico solúvel.

Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)	Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1-2	<1	0,0	6	8	10,0	3,9
2	3-4	<1	0,0	7	9	6,0	2,3
3	5	18,0	7,0	8	10-12	19,7	7,6
4	6	15,0	5,8	9	13-16	33,8	13,1
5	7	16,4	6,3	10	17-20	20,0	7,7

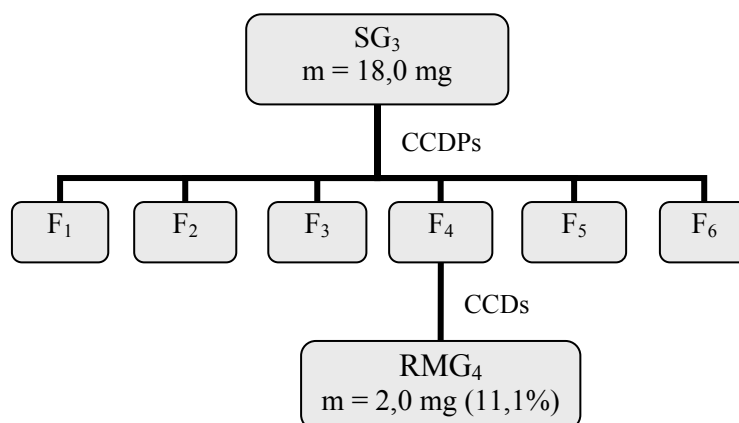
Tabela 18: Grupos provenientes do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.

Os subgrupos 3, 4, 5, 6 e 7 mediante análise em cromatografia de camada delgada de sílica apresentaram resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff e foram posteriormente cromatografados.

O subgrupo 3 (18,0 mg) foi submetido a CCDP de sílica tendo como sistema eluente clorofórmio/metanol 9,5:0,5 e revelação em UV. As seis frações obtidas foram recuperadas com metanol, filtradas em filtro poroso, concentradas a 50°C em evaporador rotativo a pressão reduzida e secas em dessecador com sílica. Após cálculo de rendimento (Tabela 19), as frações foram submetidas à CCD de sílica (clorofórmio/metanol 9,5:0,5) e reveladas com lâmpada UV, vapores de iodo e reagente de Dragendorff. Destas frações, apenas a fração 4 apresentou grau de pureza satisfatório e foi codificada como RMG₄ (Esquema 22).

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	2,6	14,4
2	1,5	8,3
3	1,1	6,1
4	2,0	11,1
5	1,4	7,8
6	1,5	8,3

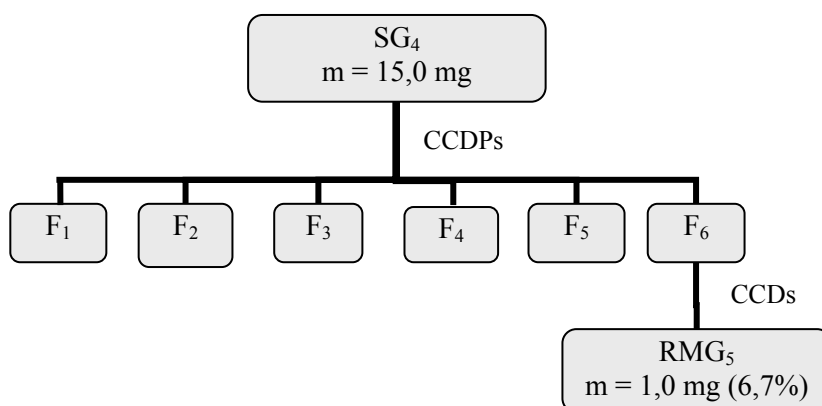
Tabela 19: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 3 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.



Esquema 22: Fracionamento do subgrupo 3 oriundo do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.

À semelhança do subgrupo 3, os demais subgrupos trabalhados, subgrupo 4 (15,0 mg), subgrupo 5 (16,4 mg), subgrupo 6 (10,0 mg) e subgrupo 7 (6,0 mg), também foram cromatografados em CCDP de sílica (clorofórmio/metanol 9,5:0,5, revelação UV). Dos subgrupos 4 e 5 foram obtidas, respectivamente, seis e cinco frações (Esquemas 23 e 24), cuja porcentagem de rendimento e pesos obtidos estão distribuídos nas tabelas 20 e 21.

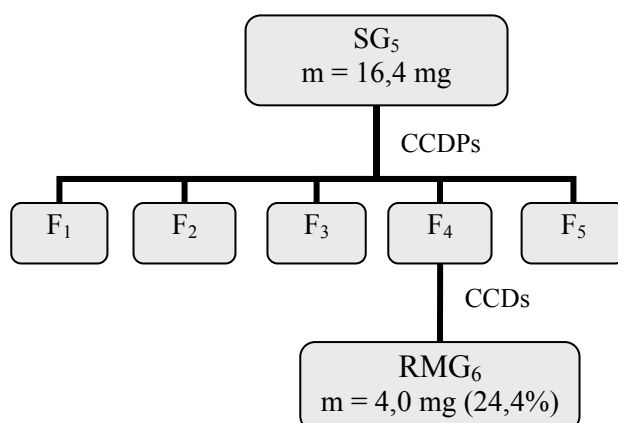
Após análise comparativa por CCD de sílica gel (clorofórmio/metanol 9,5:0,5) verificou-se grau de pureza satisfatório e revelação positiva frente ao reagente de Dragendorff da fração 6 do subgrupo 4 (fração codificada como RMG₅) e da fração 4 do subgrupo 5 (fração codificada como RMG₆).



Esquema 23: Fracionamento do subgrupo 4 oriundo do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1,7	11,3
2	1,3	8,7
3	2,1	14,0
4	3,5	23,3
5	2,5	16,7
6	1,0	6,7

Tabela 20: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 4 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.



Esquema 24: Fracionamento do subgrupo 5 oriundo do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1,8	11,0
2	1,9	11,6
3	1,7	10,4
4	4,0	24,4
5	1,7	10,4

Tabela 21: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 5 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.

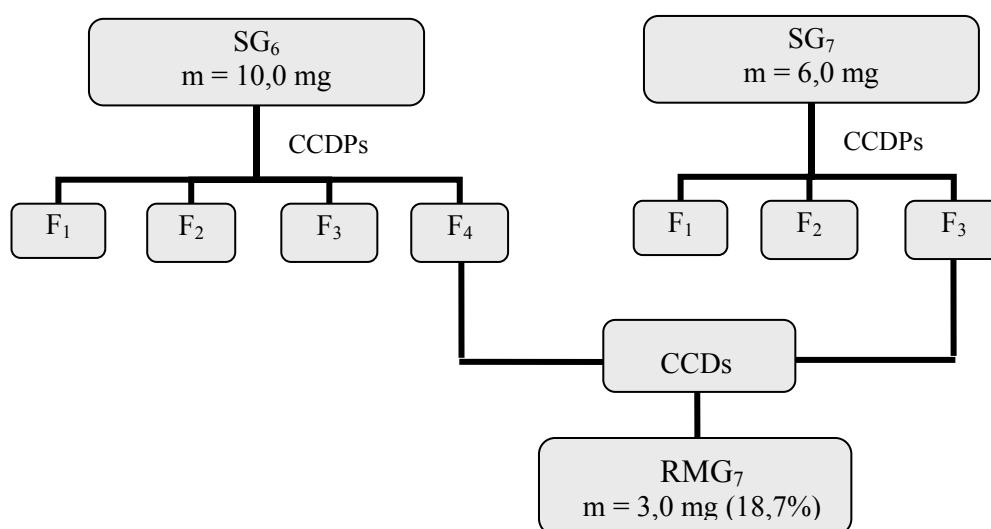
Os subgrupos 6 e 7, após CCDP de sílica gel, realizada sob as mesmas condições usadas nos subgrupos 3, 4 e 5, originaram, respectivamente, quatro e três frações (Tabelas 22 e 23). A fração 4 do subgrupo 6 e a fração 3 do subgrupo 7, após análise em CCD de sílica gel, apresentaram mesmo valor de Rf e portanto reunidas e codificadas como RMG₇ (Esquema 25).

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1,4	14,0
2	1,6	16,0
3	2,5	25,0
4	1,0	10,0

Tabela 22: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 6 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.

Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1,1	18,3
2	1,0	16,7
3	2,0	33,3

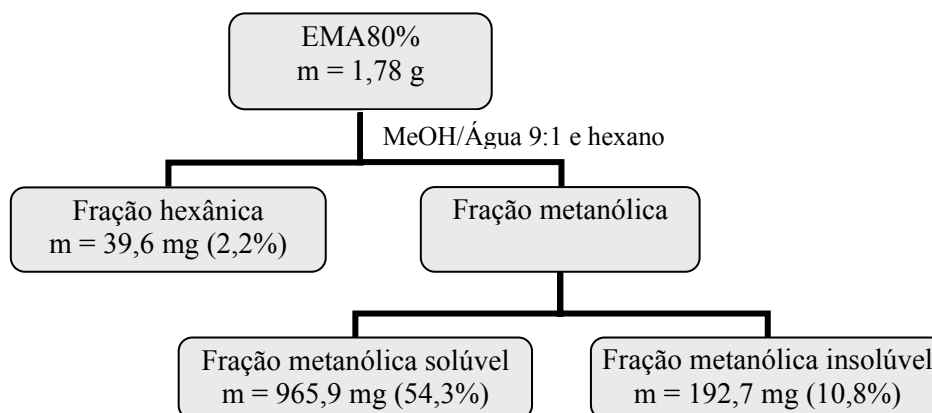
Tabela 23: Rendimento das frações obtidas do subgrupo 7 proveniente do fracionamento do extrato metanólico solúvel dos galhos de *Duguetia riparia*.



Esquema 25: Obtenção da fração RMG₇.

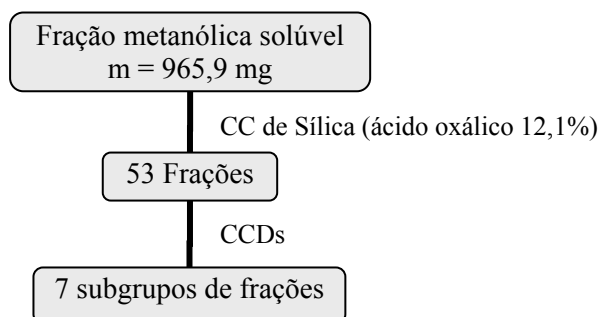
O extrato metanólico aquoso 80% (EMA 80%), a semelhança do extrato metanólico (EM), também foi submetido a uma nova partição. Inicialmente foi solubilizado com quantidades suficientes de metanol e transferido a um balão de separação com auxílio de uma solução metanol/água 9:1. Em seguida, a solução remanescente foi submetida a sucessivas extrações com hexano, originando as frações hexânica, concentrada e guardada sob refrigeração, e a fração metanólica. A fração metanólica, por sua vez, antes de ser concentrada

em evaporador rotatório, foi submetida à filtração sob pressão reduzida para separação do precipitado formado durante a etapa de extração (Esquema 26).



Esquema 26: Obtenção da fração metanólica solúvel do extrato metanólico aquoso 80%.

A fração metanólica solúvel obtida (965,9 mg) foi cromatografada em coluna de sílica gel impregnada com ácido oxálico a 12,1% (SILVA et al., 2007, adaptado) com auxílio dos seguintes sistemas de solvente: hexano, hexano/acetato em polaridade crescente (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1), acetato, acetato/metanol em polaridade crescente (9:1, 8:2, 7:3, 6:4 e 1:1) e metanol. Foram coletadas 53 frações, reunidas em 7 subgrupos, mediante análise comparativa por CCD de sílica (Esquema 27, Tabela 24).



Esquema 27: Fracionamento cromatográfico em sílica gel impregnada com ácido oxálico a 12,1% da fração metanólica solúvel.

Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1-26	5,7	0,6
2	27-28	1,2	0,1
3	29	1,5	0,1
4	30	1,8	0,2
5	31	1,5	0,1
6	32-46	10,2	1,0
7	47-53	5,0	0,5

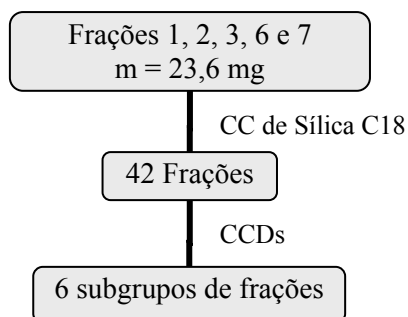
Tabela 24: Frações obtidas após cromatografia em coluna da fração metanólica solúvel.

Para eliminação do oxalato formado durante o processo de fracionamento em coluna, todos os subgrupos de frações foram submetidos a um tratamento prévio às análises detalhadas de seu grau de pureza em cromatoplasas de sílica C18.

O citado tratamento consistiu em uma partição utilizando uma solução aquosa de acetato de etila, neutralização do sistema com Na_2CO_3 a 10% e recolhimento da fração superior do tubo após congelamento.

As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida, a uma temperatura de 50° C e em seguida, analisadas em cromatoplasas de sílica C18 com auxílio da lâmpada de UV, vapores de iodo, reagente de Dragendorff e vanilina sulfúrica.

Com exceção das frações 4 e 5, codificadas como RMG₈ e RMG₉, respectivamente, todas as demais apresentaram grande quantidade de impureza nas revelações das cromatofolhas. Então foram reunidas e cromatografadas em coluna de sílica C18 com auxílio de metanol. Foram coletadas 42 frações, reunidas em 6 subgrupos, mediante análise comparativa por CCD de sílica (Esquema 28, Tabela 25).



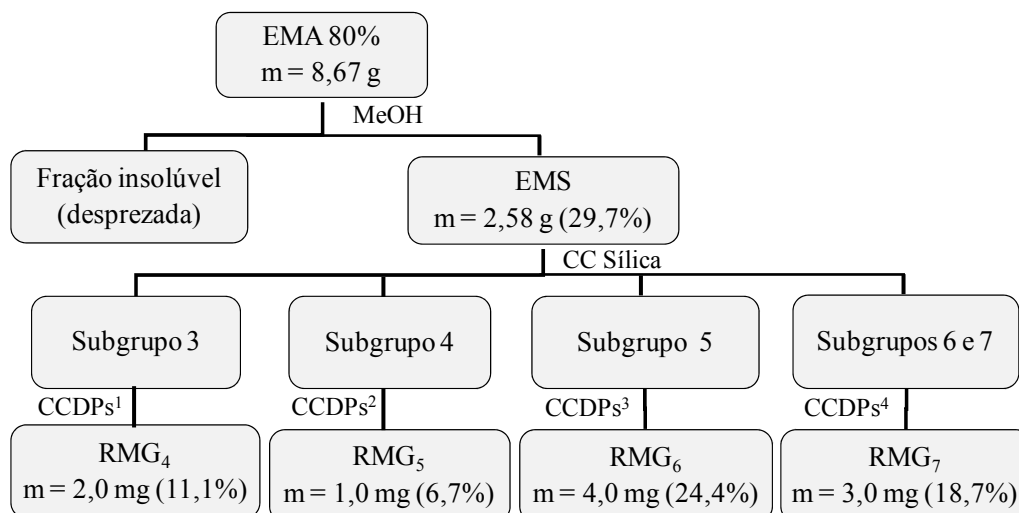
Esquema 28: Fracionamento cromatográfico em sílica C18 das frações 1, 2, 3, 6 e 7.

Subgrupos	Frações	Peso (mg)	Rendimento (%)
1	1-9	2,0	8,5
2	10-20	2,5	10,6
3	21-34	3,4	14,4
4	35-40	2,6	11,0
5	41	1,7	7,2
6	42	1,0	4,2

Tabela 25: Frações obtidas após cromatografia em coluna das frações 1, 2, 3, 6 e 7.

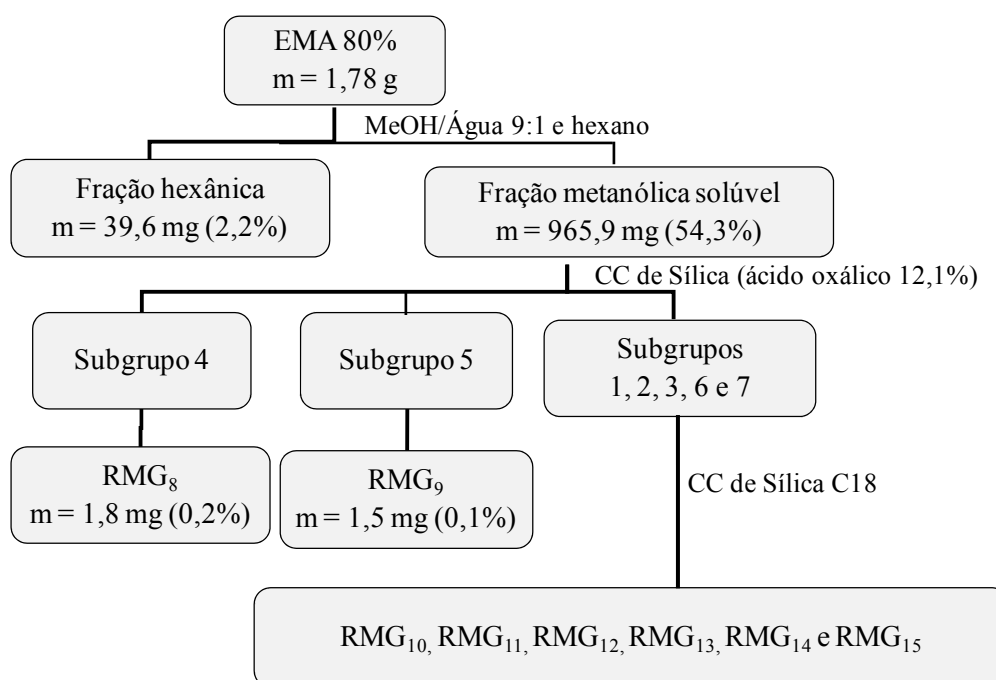
Os subgrupos de frações obtidos deste último fracionamento foram codificados, respectivamente, como RMG₁₀, RMG₁₁, RMG₁₂, RMG₁₃, RMG₁₄ e RMG₁₅ e em seguida, armazenados para estudo fitoquímico.

Os esquemas 29 e 30 descrevem, sucintamente, as marchas que o extrato metanólico aquoso 80% foi submetido para obtenção das frações RMG₄, RMG₅, RMG₆, RMG₇, RMG₈, RMG₉, RMG₁₀, RMG₁₁, RMG₁₂, RMG₁₃, RMG₁₄ e RMG₁₅.



Esquema 29: Obtenção das frações RMG₄, RMG₅, RMG₆ e RMG₇.

(¹) 18,0 mg, clorofórmio/MeOH 9,5:0,5, revelação UV. (²) 15,0 mg, clorofórmio/MeOH 9,5:0,5, revelação UV. (³) 16,4 mg, clorofórmio/MeOH 9,5:0,5, revelação UV e (⁴) 16,0 mg, clorofórmio/MeOH 9,5:0,5, revelação UV.



Esquema 30: Obtenção das frações RMG₈, RMG₉, RMG₁₀, RMG₁₁, RMG₁₂, RMG₁₃, RMG₁₄ e RMG₁₅.



Duguetia riparia
Fonte: Livia Cunha/Socorro Teodora

CAPÍTULO III: ***Parte Experimental – Testes***

3. 1 – TOXICIDADE FRENTE À *Artemia salina* LEACH (TAS)

Os testes de toxicidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas, sob a orientação da professora Dra. Ana Lúcia Queiroz de Assis Galotta.

Esses microcrustáceos são bastante utilizados em testes de bioensaios porque apresentam grande sensibilidade ao meio que se encontram. Possuem coloração rosa a vermelho-claro, comprimento entre 8 a 10 mm, ciclo de reprodução rápido e podem viver em soluções salinas artificiais, além de lagos de água salgada (VINATEA, 1994).

O teste de toxicidade frente ao estágio larval da *A. salina* vem sendo cada vez mais utilizado como indicador da bioatividade de extratos e produtos obtidos em estudos fitoquímicos, visto que se trata de um ensaio simples, barato e não exige medidas assépticas para o seu desenvolvimento (VINATEA, 1994).

Este ensaio determina a potência de uma substância através da medida da resposta biológica, expressa pela morte dos metanúplios de *A. salina*. Com este teste, selecionam-se produtos naturais com habilidade de destruir ou inibir o crescimento de culturas de células tumorais, destruir ou inibir o desenvolvimento de insetos e ainda exercer uma larga faixa de efeitos farmacológicos (MEYER et.al., 1982).

A consolidação da técnica e sua utilização sistemática, como meio de se obter substâncias ativas de extratos vegetais, se deram a partir da década de 80, quando McLaughlin e colaboradores iniciaram uma triagem sistemática em extratos de diferentes espécies de famílias vegetais à procura de substâncias com atividades pesticida e antitumoral (McLAUGHLIN et al., 1993; McLAUGHLIN, 1991).

A partir desta data, diversos outros estudos foram realizados utilizando o TAS como biomonitoramento de bioatividades. Muitos destes sugerem que, para se dar continuidade ao

estudo das atividades biológicas, estes extratos devem apresentar uma $DL_{50} < 1000 \mu\text{g/mL}$ (FERRIGNI et al., 1984; MEYER et al., 1982). Mais recentemente Dolabela (1997), demonstrou que substâncias com uma DL_{50} entre 80 e 250 $\mu\text{g/mL}$ no bioensaio frente à *A. salina* podem apresentar atividade anti-*Tripanossoma cruzi*, e substâncias com toxicidade de $DL_{50} < 145 \mu\text{g/mL}$ podem apresentar atividade antitumoral.

3. 1. 1 – Procedimento (DOLABELA, 1997)

Em um aquário de vidro, contendo aproximadamente 100 mL de solução salina (38 g de sal marinho sintético dissolvidos em 1 L de água destilada), foram adicionados cerca de 10 mg de ovos de *Artemia salina* e deixados sob iluminação artificial a 28°C. Após 24 horas foram transferidos os náuplios do microcrustáceo (primeiros estágios larval) para outro aquário contendo 100 mL de solução salina limpa. Este segundo aquário, à semelhança do primeiro, também foi mantido em incubação por mais 24 horas, sob iluminação artificial a 28°C, para obtenção de uma cultura pura do estágio larval de metanúplios (Figura 20).

Em seguida, foram preparadas, em triplicata, soluções de lapachol, cuja DL_{50} sobre *Artemia salina* é de 70 $\mu\text{g/mL}$ ($61 < DL_{50} < 81$) e das amostras-teste (extratos e frações) em cinco concentrações diferentes, expressas em $\mu\text{g/mL}$, utilizando-se o dimetilsulfóxido (DMSO), além de uma solução controle, utilizando-se apenas a solução salina com DMSO a 1%. Essas soluções foram adicionadas em tubos contendo 5 mL de solução salina com aproximadamente 10 a 15 larvas de *A. salina* em estágio de metanúplios (Figura 20).

Após 24 horas de incubação em local fresco, foi realizada a contagem do número de microcrustáceos mortos (indivíduos imóveis e/ou depositados no fundo do tubo) e vivos (Figura 20). Com os valores dos números de microcrustáceos vivos e mortos em cada

concentração testada, determinou-se a DL_{50} (com intervalo de confiança de 95%) através do método probitos de análise (FINNEY, 1974).

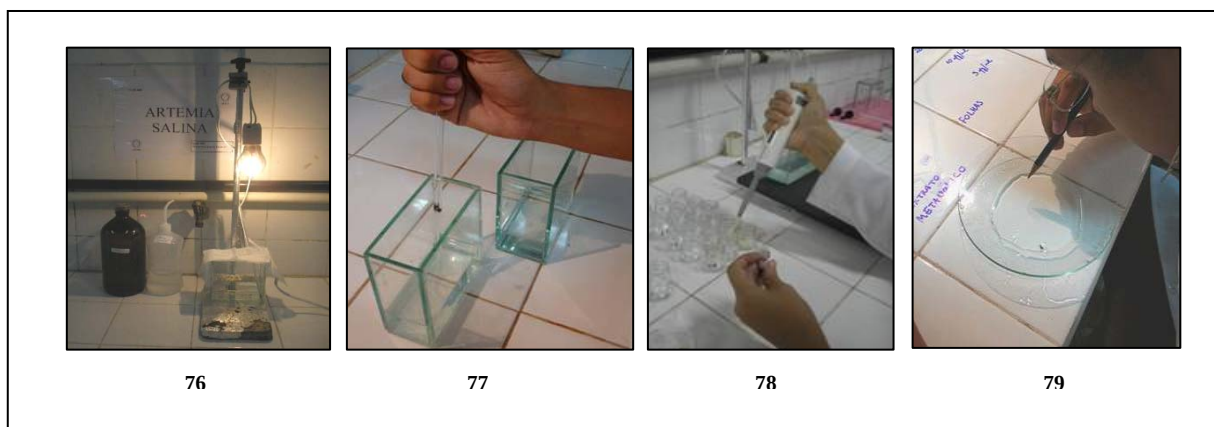


Figura 20: Teste de toxicidade frente à *Artemia salina*: Obtenção do primeiro estágio larval do microcrustáceo (náuplios) (76), transferência dos náuplios para aquário limpo para obtenção do estágio larval de metanáuplios (77), adição das amostras em 5 concentrações diferentes (78) e contagem, após 24 horas, dos microcrustáceos vivos e mortos (79).

3. 2 – ATIVIDADE LEISHMANICIDA

A atividade leishmanicida foi realizada no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos, do Departamento de Imunologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ-RJ), sob a orientação da Dra. Leonor Laura Pinto Leon.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as leishmanioses apresentam-se como a segunda doença causada por protozoários de maior importância em saúde pública, superada apenas pela malária (RATH et al., 2003). São consideradas doenças endêmicas em 16 países desenvolvidos e 72 países em desenvolvimento, totalizando uma incidência anual de 600.000 e uma prevalência de 12 milhões de casos (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; MARCONDES, 2001).

A rigor, as leishmanioses são zoonoses, isto é, doenças infecciosas propagadas entre animais das quais o homem não é um elo obrigatório, mas eventual. Dessa forma, as leishmanioses têm um ciclo natural que não depende do homem. Porém, quando o homem

entra em contato com os vetores da doença pode adquiri-la (CAMARGO; BARCINSKI, 2003). Por isto, a doença é particularmente freqüente entre trabalhadores e habitantes das florestas e mesmo entre visitantes esporádicos das mesmas, como pescadores, turistas e soldados. É muito freqüente, ainda, em agentes de desmatamento e madeireiros visto que, derrubada a floresta, os mosquitos vetores das várias espécies de *Leishmania*, privados dos animais silvestres, que se afastam das florestas desmatadas, vêm alimentar-se no homem (CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

As leishmanioses são classificadas em três formas principais: a forma visceral ou calazar, causada principalmente pelo protozoário *Leishmania donovani*, mas também pelos *L. infantum* e *L. chagasi*, e é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia, com aproximadamente 100% de taxa de mortalidade em indivíduos não tratados; a forma mucocutânea, geralmente causada por *L. braziliensis*, compreendendo lesões que destroem parcial ou totalmente a mucosa nasal e oral, gerando deformidades e a forma cutânea, causada geralmente por *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. major*, sendo caracterizada por lesões ulcerativas em áreas expostas, como braços e pernas (CAMARGO; BARCINSKI, 2003; GRIMALDI; TESH, 1993; LAINSON; SHAW, 1987).

Na realidade, as formas mucocutânea e cutânea, por afetarem principalmente a estrutura da pele, da face e das mucosas superiores e não atingirem os órgãos internos, como acontece com a forma visceral, são consideradas variedades da leishmaniose tegumentar. Essa por sua vez, por se tratar de uma doença autóctone do continente americano, é conhecida pelo nome de Leishmaniose Tegumentar Americana (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003), que de acordo com a OMS, encontra-se entre as oito doenças infecto-parasitárias listadas como de maior prevalência no mundo (PEREIRA; FONSECA, 1994).

Os parasitas causadores das leishmanioses foram agrupados em dois subgêneros, *Viannia* e *Leishmania*, baseados em caracteres biológicos, bioquímicos e imunológicos

associados aos critérios clássicos de morfologia, desenvolvimento biológico nos hospedeiros e em meio de cultura e distribuição geográfica (LAINSON; SHAW, 1987; LAINSON et al., 1981).

As espécies *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*; *L. (V.) guyanensis*; *L. (V.) shawi*; *L. (V.) naiffi*; *L. (V.) lindenbergi*; *L. (Leishmania) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* são responsáveis pelos casos de leishmaniose notificados no Brasil (MIRANDA et al., 2002). Segundo Grimaldi e Tesh (1993), as espécies envolvidas nos casos notificados na região Amazônica são *Leishmania (V.) guyanensis*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) shawi*, *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (V.) lindenbergi*.

Os reservatórios naturais para as várias espécies de *leishmanias* têm sido identificados como sendo animais domésticos e silvestres, enquanto que os mosquitos vetores da doença são flebotomíneos fêmeas pertencentes aos gêneros *Phlebotomus*, vetores das leishmanioses no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, envolvidos no ciclo de transmissão desses parasitas no Novo Mundo (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

Esses mosquitos, de aproximadamente 0,5 cm de comprimento, pernas longas e delgadas e corpo densamente piloso, são facilmente identificados por voarem aos saltos e manter as asas eretas mesmo em repouso. Por essa razão, dependendo da região do Brasil, recebem vários apelidos, tais como mosquito palha, asa dura, asa branca, tatuquira, birigui, cangalha, cangalhinha, ligeirinho, péla-égua, arrupiado e arrepiado (CAMARGO; BARCINSKI, 2003).

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam dois diferentes estágios em seu ciclo de vida: uma forma móvel, possuidora de um flagelo anterior e que se aloja no lúmen do trato digestivo do mosquito vetor, denominada promastigota, e uma forma conhecida como amastigota (Figura 21), caracterizada por não apresentar flagelo e infectar células do sistema

fagocítico mononuclear do homem, principalmente macrófagos (BATES, 1994; RATH et al., 2003; SOARES-BEZERRA et al., 2004).

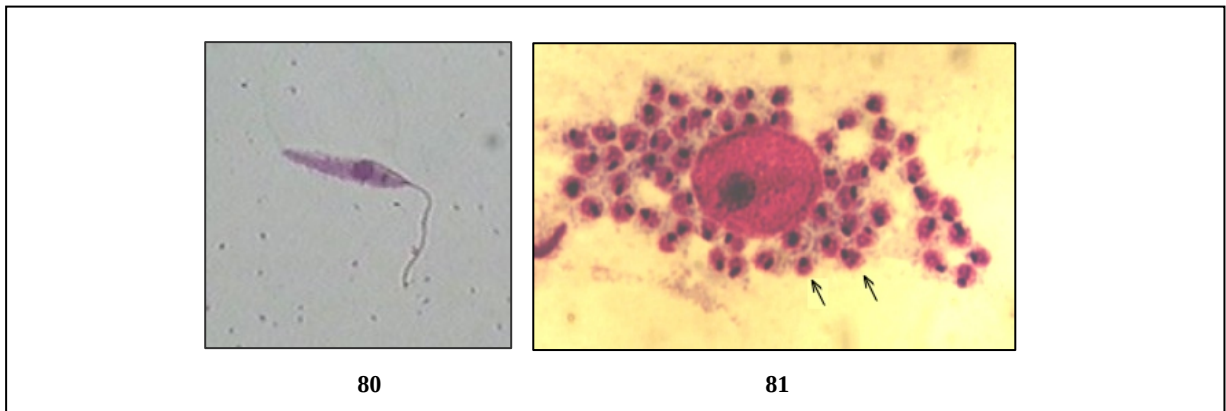


Figura 21: Formas de vida do parasita do gênero *Leishmania*: Forma promastigota (80) e forma amastigota (81).
FONTE: Sinclair Stammers/TDR/OMS.

Segundo Camargo e Barcinski (2003) e Soares-Bezerra et al. (2004), a transmissão da leishmaniose para o homem ocorre quando os mosquitos vetores sugam o sangue de um hospedeiro vertebrado infectado ou de um hospedeiro reservatório e ingerem macrófagos parasitados por *leishmanias* em sua forma amastigota ou, ainda, amastigotas livres, presentes no sangue ou nos tecidos dos mesmos. As formas amastigotas, ao atingirem o intestino médio do inseto, se diferenciam em promastigotas. Estas formas flageladas, após rápida multiplicação, se convertem nos promastigotas infectantes e migratórios que do intestino anterior do inseto são regurgitadas ou introduzidas na pele do próximo hospedeiro no momento que o vetor se alimentar novamente de sangue (Figura 22).

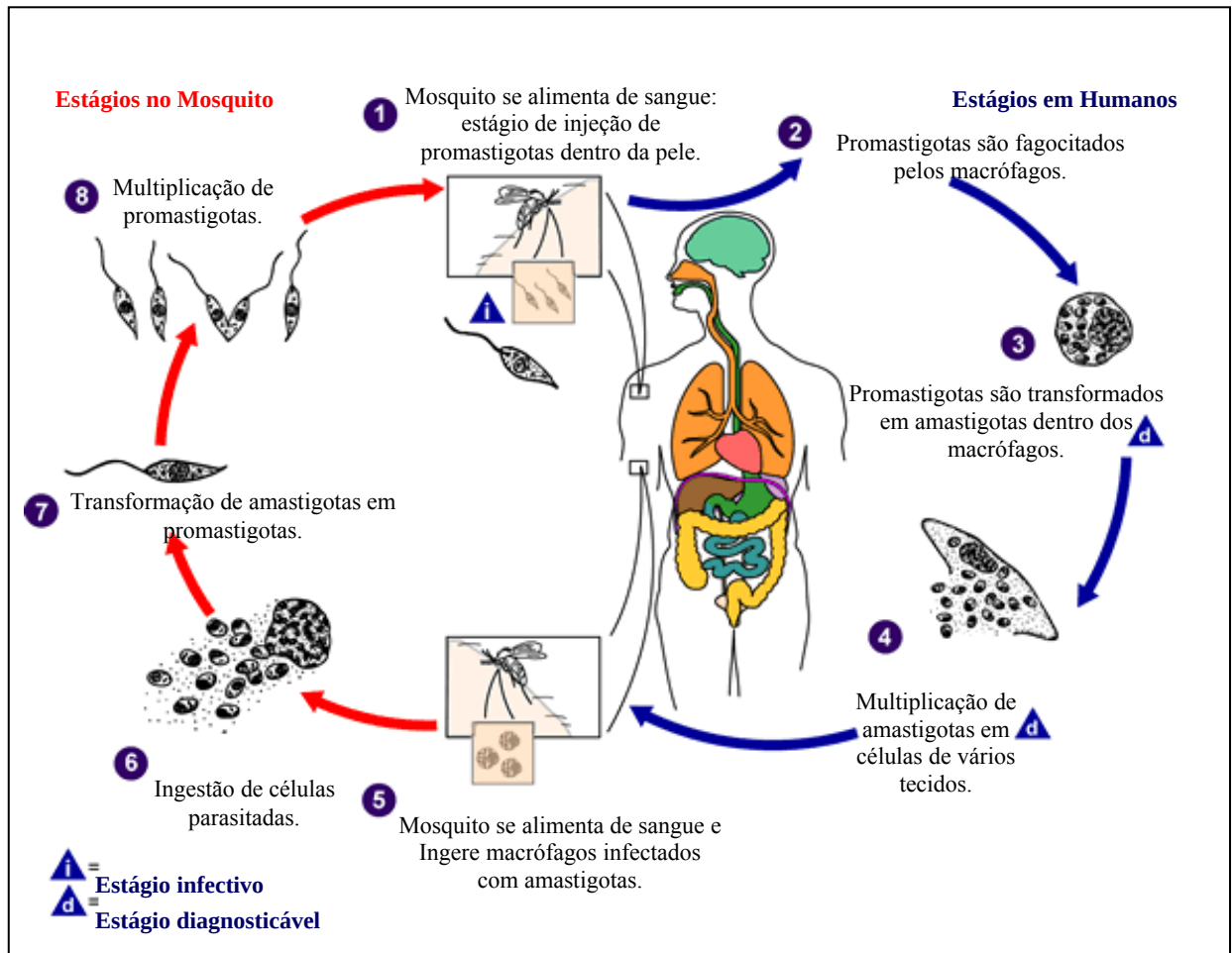


Figura 22: Ciclo de vida do parasita *Leishmania* spp.

FONTE: www.dpd.cdc.gov/dpdx.

Os fármacos de primeira escolha para o tratamento de todas as formas de leishmanioses têm sido até hoje os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), introduzidos há cerca de 50 anos (AKENDENGUE et al., 1999; SOARES-BEZERRA et al., 2004). Foram usados pela primeira vez por Gaspar Vianna, médico brasileiro, em 1912, na sua forma trivalente (Sb^{3+}), o chamado tártaro emético, obtendo algum sucesso, visto que naquela época 90% dos casos evoluíam para o óbito por não haver tratamento (LAINSON apud SOARES-BEZERRA et al., 2004). No entanto, esta formulação era de difícil administração e ocasionava tosse, dor no peito e depressão. Somente em 1937, que o estibogliconato de sódio, um medicamento derivado do ácido estibônico, onde o antimônio encontra-se na forma pentavalente, começou a ser empregado no tratamento das leishmanioses (SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Além do estibogliconato de sódio, outro antimonial pentavalente, o antimoniato de N-metilglucamina, também é utilizado no combate a essa doença (BERMAN apud SOARES-BEZERRA et al., 2004; CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001; CROFT; COOMBS, 2003). Entretanto, ambos, além de caros e apresentarem a necessidade de um tratamento prolongado, possuem severos efeitos colaterais, que incluem problemas gastrointestinais, cardiotoxicidade e, em alguns casos, insuficiência renal e hepática (BARATA et al., 2000).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza como tratamento para a leishmaniose visceral 20 mg de Sb/kg/dia, por via intramuscular ou intravenosa, por, no mínimo, 20 dias e até duas semanas após a cura parasitológica, com dose diária máxima de 850 mg de antimônio. Para a leishmaniose cutânea, a recomendação é de 10 a 20 mg Sb/kg/dia, até que a lesão se cure. Para a leishmaniose mucocutânea, é recomendada a administração de 20 mg de Sb/kg/dia durante 30 dias (TRACY; WEBESTER JÚNIOR apud SOARES-BEZERRA et al., 2004).

Outras drogas alternativas como a pentamidina e a anfotericina-B, desenvolvidas inicialmente para combater outras doenças, embora bastante tóxicas, também são empregadas contra as diferentes formas de leishmaniose (BASSELIN et al., 1996; CHAN-BACAB; PEÑA-RODRÍGUEZ, 2001).

A pentamidina foi descrita no final da década de 50 para o tratamento da pneumonia, vindo a ser usada nos casos de leishmaniose visceral resistente aos antimoniais e no tratamento de algumas leishmanioses difuso-cutânea e mucocutânea, causadas por *Leishmania aethiopica*, apresentando bons resultados em pacientes imunodeprimidos (BASSELIN et al., 1996). Para uma efetiva ação da pentaminida contra os parasitas causadores das leishmanioses, a OMS recomenda uma dose de 4 mg/kg, aplicados por via endovenosa três vezes por semana (SOARES-BEZERRA et al., 2004). Segundo Berman apud Soares-Bezerra et al. (2004), já se observou que após a administração de 15 injeções

(correspondente a 5 semanas de tratamento), 77% dos pacientes com leishmaniose visceral evoluíram para cura e após a administração de 27 injeções (correspondente a 9 semanas de tratamento) o percentual de cura foi de 94%.

A anfotericina B é um potente agente antiparasitário e antifúngico com grande faixa de atividade contra organismos que apresentam ergosterol como principal constituinte de suas membranas plasmáticas ao invés do colesterol das membranas de células animais, visto que o mecanismo de ação desta droga resulta de sua ligação ao ergosterol, com conseqüente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasita (SAHA et al., 1986; OLLIARO; BRYCESON, 1993; URBINA, 1997). É utilizada no tratamento da leishmaniose mucocutânea na América do Sul e em casos de leishmaniose visceral refratários ao tratamento com antimoniais (BERMAN, 1998). Atualmente é o agente terapêutico mais promissor na cura de leishmaniose visceral e também nos casos resistentes ao tratamento com pentamidina (CROFT et al., 1991).

Recentemente a Hexadecilfosfocolina, também conhecida pelo nome de miltefosina, uma alquilfosfocolina desenvolvida originalmente para o tratamento do câncer (UNGER et al. apud SOARES-BEZERRA et al., 2004), vem sendo apontada como a melhor alternativa no tratamento da leishmaniose visceral, uma vez que o fármaco pode ser administrado por via oral, ao contrário de outros (SUNDAR et al.; JHA et al. apud SOARES-BEZERRA et al., 2004). Entretanto, a maior limitação na utilização de miltefosina é a teratogenicidade e isso exclui seu uso em mulheres grávidas (CROFT; COOMBS, 2003).

3. 2. 1 – Procedimento

Antes do teste propriamente dito, deve-se realizar o ajuste da concentração parasitária para $4,0 \times 10^6$ parasitas/mL. Para realizar esse ajuste, 1 mL de meio de cultura rico das formas

promastigotas foi transferido a um frasco contendo 15 mL de meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) e 2% de urina humana esterilizada, que, em seguida, foi incubado em estufa por 72 horas a uma temperatura de 26°C.

Após o período de incubação, os parasitas foram transferidos para um tubo de centrífuga de 50 mL e centrifugados por 15 minutos a 4000 rpm a temperatura de 4 °C. Desta centrifugação se obteve uma fase sólida, contendo os promastigotas (denominada de *pellet*) e o sobrenadante. A fase líquida foi transferida para outro tubo de centrífuga (Tubo B) e o *pellet* deixado no tubo de origem (Tubo A).

Ao tubo contendo os parasitas (Tubo A) foi adicionado 1 mL do sobrenadante (ressuspensão). Dessa mistura, foram realizadas as diluições necessárias para a obtenção da melhor forma de contagem. Após a verificação da melhor diluição os parasitas foram contados em câmara de Neubauer. Concluída a contagem, se realizou os cálculos para obtenção da concentração parasitária desejada (Tubo C) levando em consideração a diluição realizada (Figura 23).

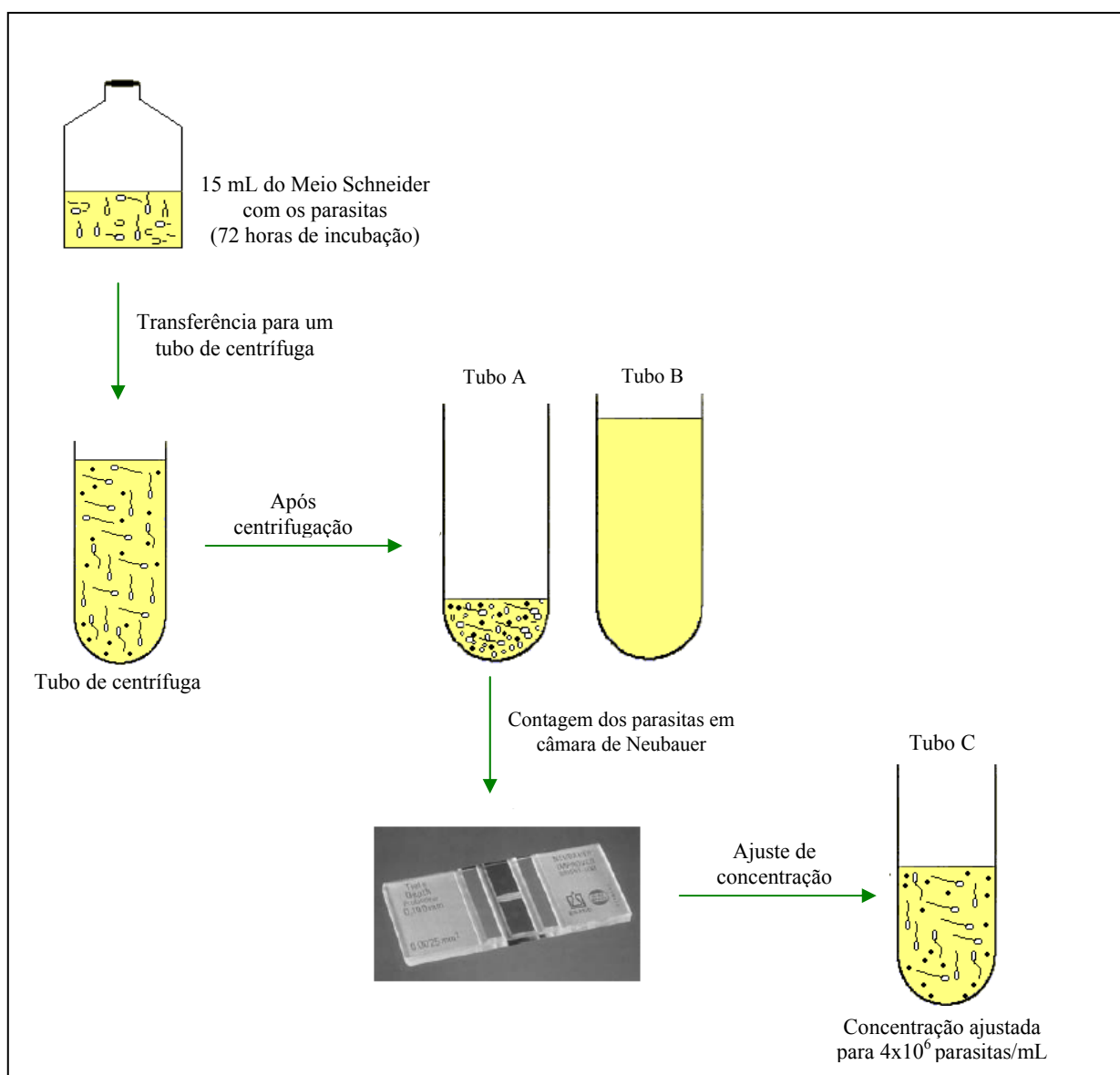


Figura 23: Ajuste da concentração parasitária a ser utilizada no teste *in vitro* da atividade leishmanicida.
 FONTE: COSTA, 2004.

Para a montagem da placa de microtitulação de 96 poços (Figura 24), foram colocados 200 μ L do sobrenadante (Tubo B) nos primeiros poços de cada fileira da placa e 100 μ L nos demais poços, incluindo os poços controles (poços da linha H da placa). Nos primeiros poços foi retirado um volume de 6,4 μ L do sobrenadante, sendo substituído o mesmo volume pelas amostras dissolvidas em DMSO (Sigma Chemical CO., St. Louis, MO, USA). O primeiro poço da primeira fileira foi homogeneizado e, em seguida, foram retirados 100 μ L da suspensão, transferindo-se às próximas fileiras, em sucessivas diluições, até a última, da qual

o volume de 100 μL foi descartado. Um inóculo de 100 μL do parasita foi misturado ao sobrenadante e adicionado a todos os poços da placa.

Após 24 horas de incubação a 26°C, os valores das $DL_{50/24 \text{ horas}}$ foram determinadas pela contagem dos parasitas em câmara de Neubauer e comparados numericamente com os controles: DMSO contendo os parasitas sem as drogas (A) e os parasitas sozinhos (B). Todos os experimentos foram realizados em triplicata, usando a Pentamidina como droga de referência.

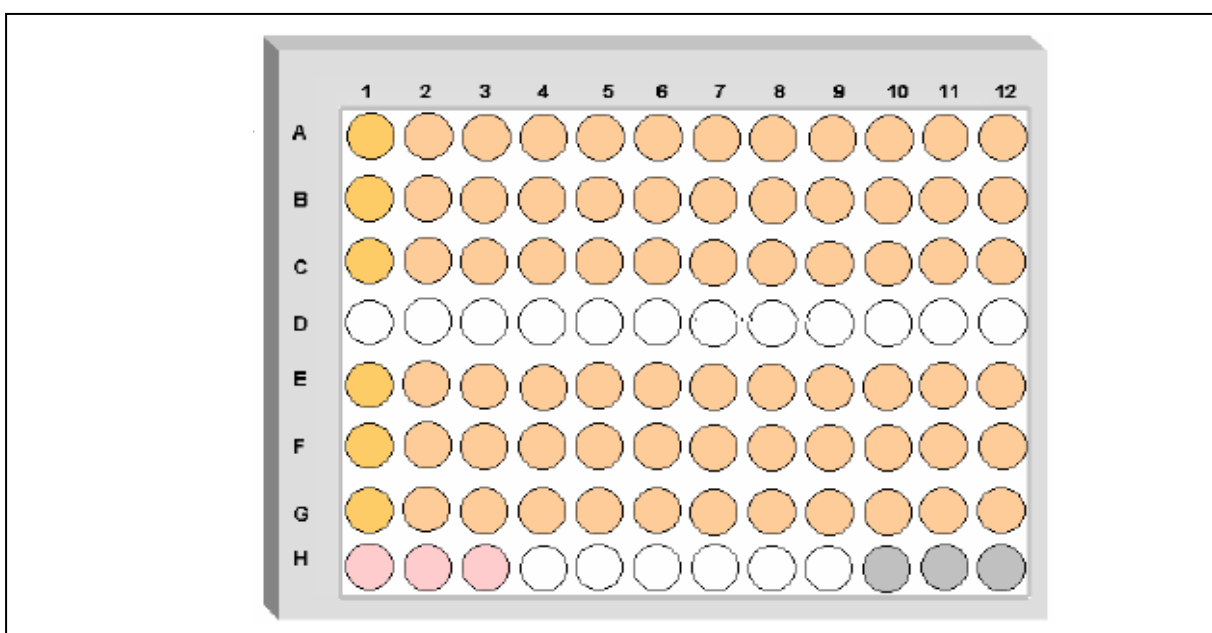


Figura 24: Placa de microtitulação de 96 poços utilizada no teste *in vitro* da atividade leishmanicida.

NOTA: Cada placa foi utilizada para analisar duas amostras em triplicata e em concentrações distintas. A amostra 1 foi colocada nos poços das linhas A, B e C, a amostra 2 foi distribuída nos poços das linhas E, F e G e os controles nos poços da linha H.

FONTE: COSTA, 2004.

3. 3 – ATIVIDADE LARVICIDA FRENTE AO MOSQUITO *Aedes aegypti*

O teste de atividade larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti* foi realizado no Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), sob a orientação do Dr. Wanderli Pedro Tadei.

A dengue é uma doença infecciosa, de origem viral, transmitida para o homem por meio da picada de fêmeas de mosquitos contaminados pertencentes ao gênero *Aedes*. O principal vetor é o inseto *Aedes aegypti*, também vetor da febre amarela urbana, embora outras espécies como *Aedes albopictus* e *Aedes polynesiensis* possam estar envolvidos na transmissão (GUZMÁN; KOURI, 2001).

A infecção pelo vírus pode ser assintomática ou levar a uma febre clássica ou hemorrágica. Os sinais e sintomas clínicos variam de acordo com a idade da pessoa infectada. Recém-nascidos e crianças jovens normalmente desenvolvem apenas uma enfermidade febril não específica, com manchas vermelhas difíceis de distinguir de outras viroses. Os casos mais graves geralmente ocorrem em crianças mais velhas e adultos. Esses casos são caracterizados por um rápido aumento na temperatura corporal que dura por volta de 5 a 6 dias. Durante o período febril, o paciente pode apresentar dores no corpo, sensação de cansaço, falta de apetite, náuseas, vômitos, manchas vermelhas na pele, cefaléia, mialgias e artralgia. Às vezes pode ocorrer petéquias, epistaxe e sangramento gengival, metrorragia, além de outras manifestações hemorrágicas (GUZMÁN; KOURI, 2001; LIGON, 2005).

Tanto o mosquito macho quanto o mosquito fêmea do *Aedes aegypti* alimentam-se de néctar ou seiva vegetal, porém a fêmea, após o acasalamento, necessita de sangue para a maturação dos ovos. Os ovos então são depositados em recipientes naturais ou artificiais, preferencialmente contendo água limpa. As larvas, em todos os 4 ínstars, possuem grande mobilidade e alimentam-se de detritos orgânicos, fungos, bactérias e protozoários existentes na água que se encontram (ROZENDAAL apud COELHO, 2006).

3. 3. 1 – Procedimento (MONTENEGRO et al., 2006)

Larvas de mosquitos *Aedes aegypti*, obtidas a partir de ovos cedidos pelo Laboratório de Malária e Dengue do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, foram criadas e

mantidas no Insetário do mesmo Instituto, a uma temperatura média de 27°C e umidade relativa do ar de 80%, com fotoperíodo de cerca de 12 horas. Os experimentos foram realizados em triplicata, na concentração de 300 ppm, com os extratos hexânico, metanólico e metanólico solúvel e com as frações alcaloídica e hidrometanólica.

Grupos contendo 20 larvas no 3º instar foram colocados em contato com os extratos e frações dissolvidos em DMSO. A mortalidade foi determinada após exposição das larvas durante 24, 48 e 72 horas. O nível de atividade dos extratos e frações testados foi estabelecido com base no percentual médio de mortalidade das larvas: mortalidade > 75% resultado promissor, mortalidade > 50 e < 75% resultado parcialmente promissor, mortalidade > 25 e < 50% resultado fracamente promissor e mortalidade < 25% inativo.

3. 4 – CAPACIDADE CAPTURADORA DE RADICAIS LIVRES

A atividade antioxidante e capacidade capturadora de radicais livres foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas, sob a orientação da professora Dra. Ana Lúcia Queiroz de Assis Galotta.

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do mesmo (GALOTTA, 2005; SOUSA et al., 2007). Em bioquímica e medicina, antioxidantes são enzimas ou outras moléculas orgânicas, como vitamina A ou β -caroteno, capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que os mesmos ataquem os alvos biológicos das células (SOUSA et al., 2007). Na indústria química, antioxidantes são substâncias que retardam a autooxidação de produtos químicos, como borrachas e plásticos. A autooxidação é causada, em princípio, por reações radicalares em cadeia entre oxigênio e os substratos. Os antioxidantes efetivos são substâncias que interrompem essas reações em

cadeia devido à capacidade que apresentam em capturar os radicais livres formados (HUANG apud GALOTTA, 2005).

Triagens clínicas e estudos epidemiológicos têm estabelecido uma correlação inversa entre a utilização de frutas e vegetais e a ocorrência de doenças cardiovasculares, inflamações, câncer e desordens relacionadas com a idade. Acredita-se que os antioxidantes absorvidos desses alimentos, incluindo substâncias polifenólicas, tocoferóis (vitaminas E), ácido ascórbico (vitamina C), selênio e carotenóides, são os responsáveis pela prevenção dessas doenças relacionadas com o estresse oxidativo (SOUSA et al., 2007). Por essa razão o conhecimento da capacidade antioxidante dos constituintes dos alimentos vem tornando-se um tópico de progressivo interesse nos últimos anos (HUANG apud GALOTTA, 2005).

Além dos alimentos, muitas plantas têm sido estudadas com a finalidade de se detectar e isolar antioxidantes naturais (GALOTTA, 2005). Vários métodos são utilizados para determinar a atividade antioxidante em extratos e substâncias isoladas; um dos mais usados consiste em avaliar a atividade seqüestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura que absorve a 515 nm (SOUSA et al., 2007).

Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar ($R^\bullet$), o DPPH (82) (Figura 25) é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou seqüestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional (SOUSA et al., 2007).

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE_{50}), também chamada de concentração inibitória (CI_{50}). Quanto maior o consumo de

DPPH por uma amostra, menor será a sua CE_{50} e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

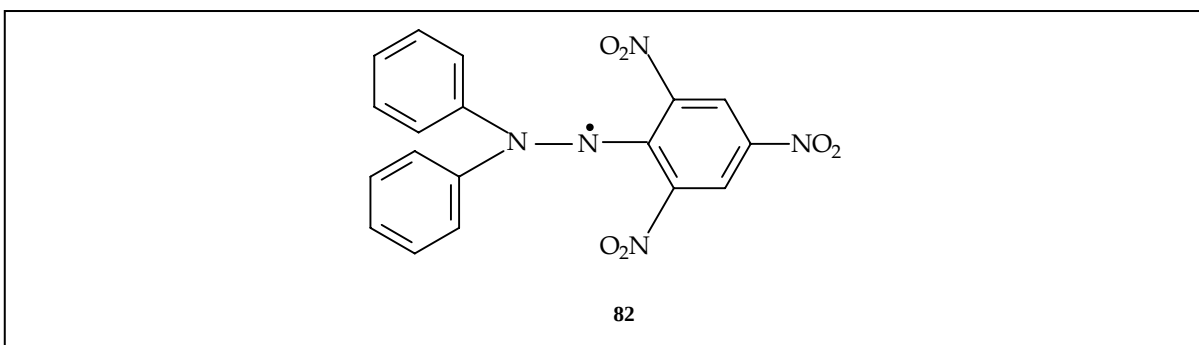


Figura 25: Estrutura química do 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH).

3. 4. 1 – Método Qualitativo (CHOI et al., 2002; MONTENEGRO et al., 2006)

Os extratos e as frações testadas foram submetidos à CCD (utilizando-se os eluentes apropriados para cada caso) e, depois de secas, foram submersas, durante 10 segundos, em solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) a 0,4 mM. Após secagem das mesmas a temperatura ambiente, o aparecimento de manchas esbranquiçadas sob fundo violeta sugeriu a presença de substâncias antioxidantes no material testado.

3. 4. 2 – Método Quantitativo (BURDA; OLESZEK apud GALOTTA, 2005)

As amostras (5,0 mg) foram solubilizadas em balão volumétrico de 50 mL com metanol, grau espectrofotométrico (Sigma) e a partir dessas soluções foram feitas diluições, obtendo-se, no final, concentrações de 1, 10 e 100 $\mu\text{g/mL}$.

Alíquotas de 750 μL de cada diluição foram colocadas em cubetas de plástico contendo 1,5 mL de solução de DPPH (0,002%p/v) em metanol. Os experimentos foram realizados em triplicata e após 30 minutos as absorbâncias foram medidas em $\lambda = 517 \text{ nm}$.

A absorbância desta solução de DPPH foi também medida no mesmo tempo (30 minutos), tendo sido preparada no tempo zero do experimento, ficando, durante os 30 minutos, protegida da incidência direta de luz.

O metanol puro foi utilizado para a correção da linha base no espectrofotômetro.

O percentual de inibição do DPPH (ou a % da atividade antioxidante) foi calculado pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ de inibição do DPPH} = 1 - A_a/A_b \times 100$$

Onde A_a = absorbância da amostra e A_b = absorbância da solução de DPPH.

O cálculo da CE_{50} (concentração efetiva para descolorir 50% da solução de DPPH) foi realizado utilizando-se o método probitos de análise (FINNEY, 1974).

3. 5 – DETERMINAÇÃO DE FENÓLICOS TOTAIS

Os testes de determinação de fenólicos totais foram realizados no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Química da Universidade Federal do Amazonas, sob a orientação da professora Dra. Ana Lúcia Queiroz de Assis Galotta.

Entende-se por compostos fenólicos de plantas o conjunto de substâncias de diversas categorias capazes de neutralizar ou seqüestrar radicais livres e quelar metais de transição, agindo tanto na inibição como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Entre as substâncias mais comumente classificadas como compostos fenólicos destacam-se os fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas.

Visto que muitos estudos têm demonstrado a possibilidade dos antioxidantes utilizados nas indústrias alimentícias, tais como butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), tri-hidroxi-butil-fenona (THBP) e galato de

propila (GP), apresentarem alguns efeitos tóxicos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer uma associação entre eles (SOUSA et al., 2007).

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas. O reagente consiste de uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, no qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6^+ porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (SOUSA et al., 2007).

3. 5. 1 – Procedimento

Os extratos e frações testados (0,01 g) foram dissolvidos em metanol, transferidos quantitativamente para balões volumétricos de 10 mL e tiveram seus volumes completados com o mesmo solvente.

Uma alíquota de 0,2 mL de cada solução amostra foi transferida para um frasco âmbar e colocada em contato com 1,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu por 5 minutos. Passado este tempo, neutralizou-se as misturas com uma alíquota da solução de NaHCO_3 a 6%.

Após 1 hora e meia da adição da solução de NaHCO_3 a 6%, as absorbâncias das amostras foram medidas a 725 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como branco o metanol e todos os reagentes, menos os extratos e frações amostras.

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,5 a 0,03125 µg/mL) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de amostra. A equação da curva de calibração do ácido gálico foi $Y = 5,007x - 0,0025$, onde Y é a concentração do ácido gálico, x é a absorbância a 725 nm e o coeficiente de correlação R = 0,9994.



Folhas

Frutos

Galhos

Duguetia riparia
Fonte: Livia Cunha / Socorro Teodora

CAPÍTULO IV: ***Resultados e Discussão***

4. 1 – FITOQUÍMICA

4. 1. 1 – Prospecção fitoquímica dos extratos brutos

Os extratos brutos hexânico, metanólico e metanólico aquoso 80% obtidos dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*, foram submetidos aos ensaios de prospecção fitoquímica descrito por Mattos (1998) e os resultados das análises foram dispostos na tabela 26.

Os ensaios realizados com o extrato hexânico, evidenciaram teste positivo apenas para esteróides livres, enquanto os testes realizados com o extrato metanólico e metanólico aquoso 80%, apresentaram resultados positivo para compostos fenólicos, triterpenóides, esteróides livres e alcalóides.

Os testes realizados para detecção de acetogeninas de Annonaceae, classe de substâncias exclusiva, até o momento, desta família, apresentaram resultados negativos para os extratos trabalhados.

Classe de substâncias	EH	EM	EMA80%
Fenóis e taninos	-	-	-
Antocianinas e antocianidinas	-	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	-	+	+
Chalconas e auronas	-	-	-
Flavanonóis	-	+	-
Leucoantocianidinas	-	-	-
Catequinas	-	-	-
Flavanonas	-	+	-
Triterpenóides	-	+	+
Esteróides livres	+	+	+
Alcalóides	-	+	+

Tabela 26: Resultado da prospecção fitoquímica realizada nos extratos brutos da espécie *Duguetia riparia*.

Nota: EH: extrato hexânico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EM: extrato metanólico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EMA80%: extrato metanólico aquoso 80% dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

4. 1. 2 – Identificação dos constituintes químicos de *Duguetia riparia*

Das 15 frações separadas para a análise fitoquímica, apenas as frações RMG₈, RMG₉ e RMG₁₃ foram trabalhadas e tiveram seus espectros de RMN de ¹H e ¹³C e técnicas correlatas obtidos.

Após análise dos respectivos espectros, se verificou a presença dos alcalóides liriodenina, na fração RMG₈; liriodenina, oxoputerina e lisicamina, na fração RMG₉ e assimilobina, na fração RMG₁₃.

4. 1. 2. 1 – Fração RMG₈

A fração RMG₈, sólido amarelo amorfo solúvel em metanol, apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff.

O espectro de RMN de ¹H apresentou sinais múltiplos na região entre δ_H 8,75 e 6,45 típicos de hidrogênios aromáticos e metilênicos (Figura 26). Os grupos de sinais mais intensos, observados na região entre δ_H 8,75 e 7,39, foram atribuídos a sete hidrogênios de natureza aromática, característicos de anel piridínico (anel B) e anel benzênico (anel D) dissustituídos próprios de núcleo aporfinico (Figura 27).

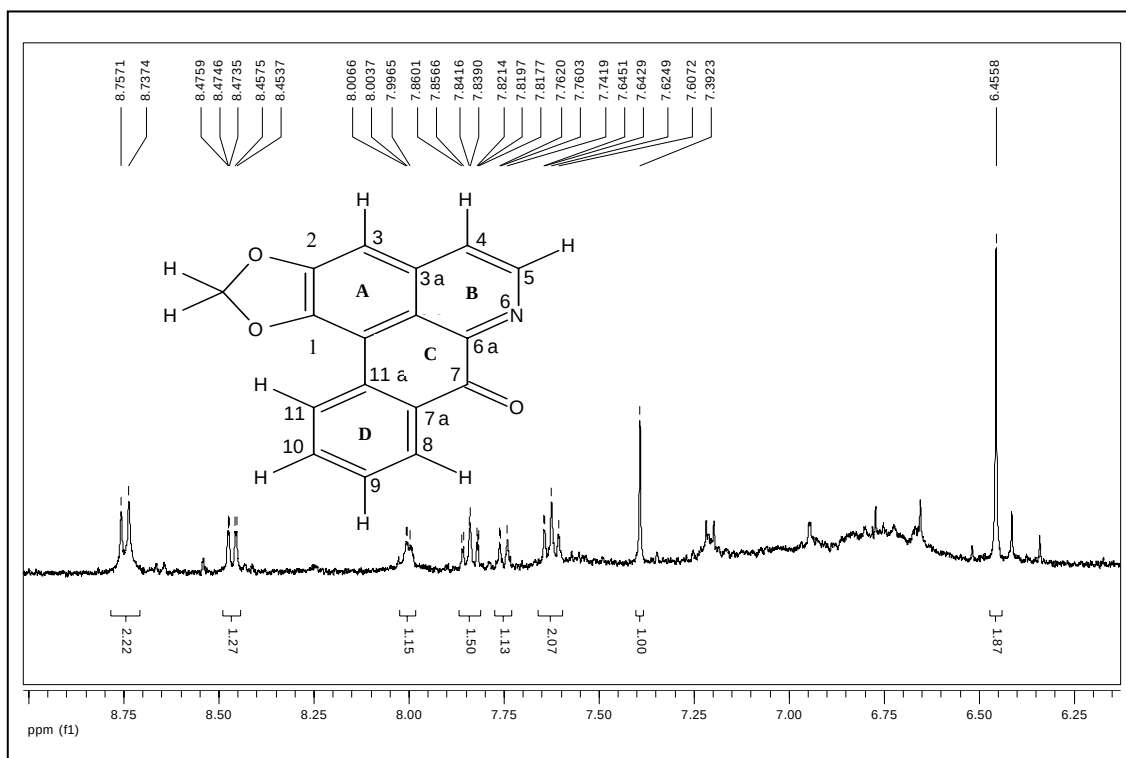


Figura 26: Expansão entre δ_{H} 8,75 e 6,25 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₈.

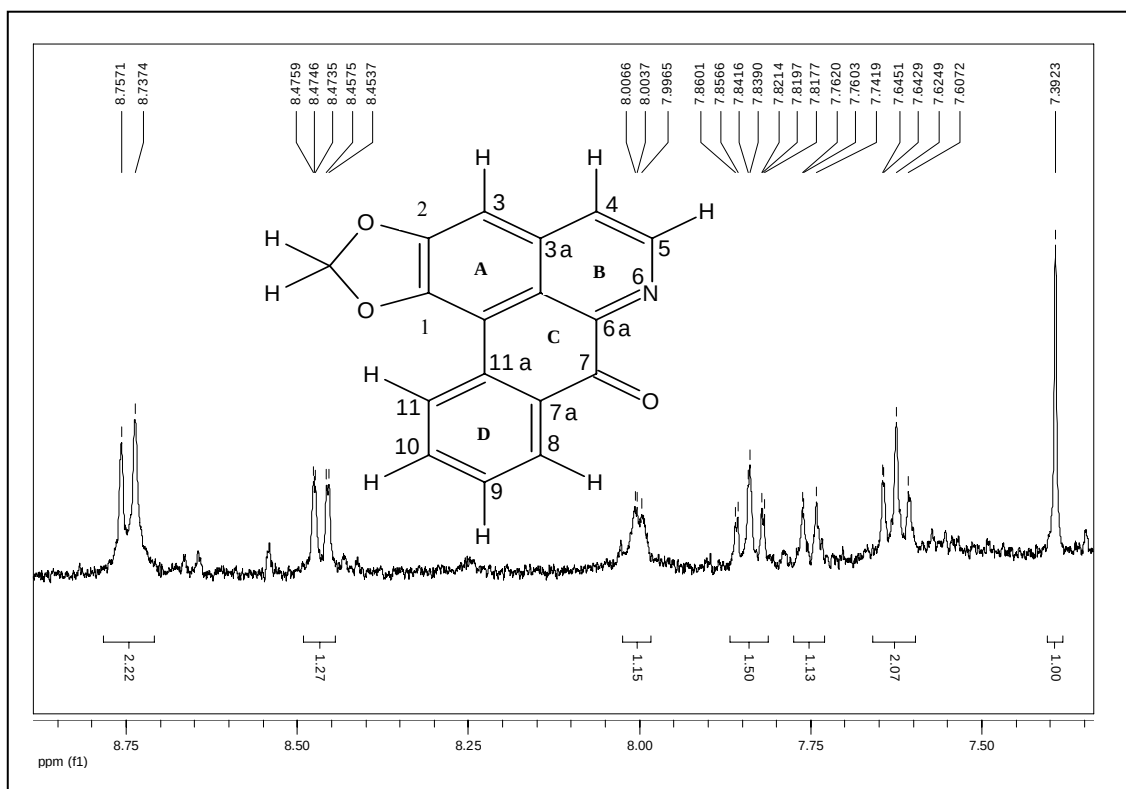


Figura 27: Expansão entre δ_{H} 8,75 e 7,50 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₈.

O sinal em δ_{H} 8,00 (1H, d, $J = 5,2$ Hz) e em δ_{H} 8,73 (1H, d, $J = 5,2$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H4 e H5, α e β respectivamente do anel B piridínico (Figura 28).

Os sinais em δ_{H} 8,46 (1H, dd, $J = 7,8; 1,4$ Hz); em δ_{H} 7,62 (1H, ddd, $J = 7,8; 7,4$ Hz); em δ_{H} 7,84 (1H, ddd, $J = 8,4; 7,4$ Hz) e 8,75 (1H, d, $J = 8,4$ Hz) corresponderam, respectivamente, aos hidrogênios H8, H9, H10 e H11 do anel benzênico (D) dissustituído (Figura 28).

Adicionalmente, o simpleto em δ_{H} 6,45 (2H) sugeriu a presença de um grupo metilenodioxi, além do sinal em δ_{H} 7,39 (1H, s) característico do anel A, pentassustituído do núcleo aporfínico (Figura 28).

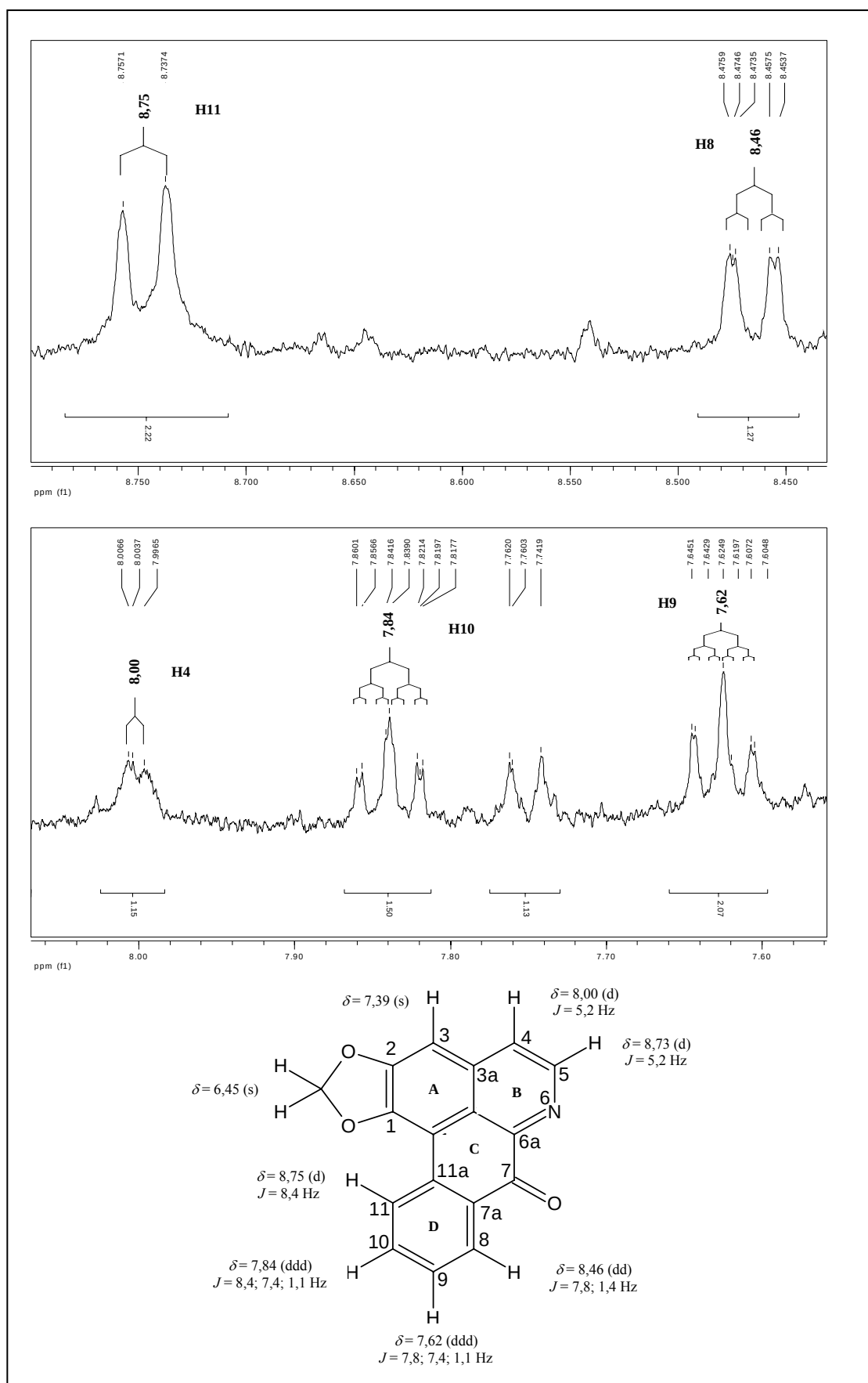


Figura 28: Expansão entre δ_{H} 8,75 e 7,60 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₈.

A análise comparativa dos dados de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG_8 com os sinais registrados por Torres et al. (2007) a 400 e 200 MHz e CDCl_3 , confirmaram a presença do alcalóide liriodenina na fração RMG_8 (Tabela 27).

Posição do hidrogênio	RMN de ^1H (δ_{H}) (multiplicidade) Torres et al. (2007)	RMN de ^1H (δ_{H}) (multiplicidade, J em Hz) RMG_8
Metilenodioxí	6,36 (2H, s)	6,45 (2H, s)
3	7,17 (1H, s)	7,39 (1H, s)
4	7,76 (1H, d)	8,00 (1H, d, 5,2)
5	8,88 (1H, d)	8,73 (1H, d, 5,2)
8	8,58 (1H, dd)	8,46(1H, dd, 7,8; 1,4)
9	7,57 (1H, ddd)	7,62 (1H, ddd, 7,8; 7,4; 1,1)
10	7,73 (1H, ddd)	7,84 (1H, ddd, 8,4; 7,4; 1,1)
11	8,63 (1H, d)	8,75 (1H, d, 8,4)

Tabela 27: Comparação dos deslocamentos químicos (δ_{H}), multiplicidades e constantes de acoplamento (J) dos sinais dos hidrogênios de RMG_8 com aqueles do alcalóide liriodenina.

A análise do mapa de contornos COSY, evidenciou a existência de um sinal do H10 em δ_{H} 7,84 (ddd, $J = 8,4; 7,4$ Hz) acoplando com H11 em δ_{H} 8,75 (d, $J = 8,4$ Hz) e o H9 em δ_{H} 7,62 (ddd, $J = 7,8; 7,4$ Hz) acoplando com o H8 em δ_{H} 8,46 (dd, $J = 7,8; 1,4$ Hz) e com o H10 em δ_{H} 7,84 (ddd, $J = 8,4; 7,4$ Hz) (Figura 29), confirmando a presença do alcalóide liriodenina na fração RMG_8 .

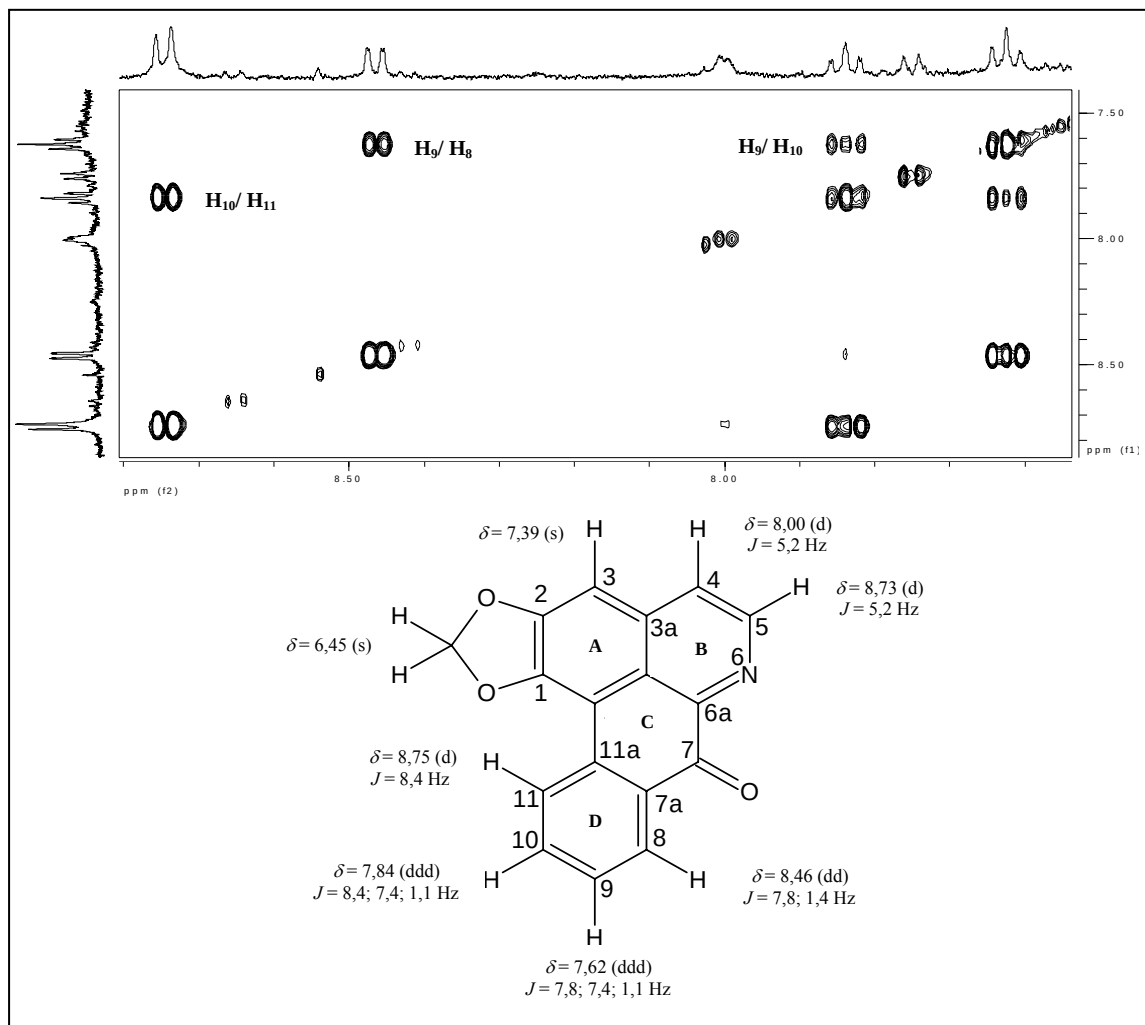


Figura 29: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD₃OD) de RMG₈. Expansão da região entre δ_{H} 8,80 e 7,60.

4. 1. 2. 2 – Fração RMG₉

A fração RMG₉, sólido amarelo em forma de agulha, apresentou várias manchas quando aplicada em cromatofolhas de sílica C18 e revelada com reagente de Dragendorff para alcalóides.

A análise do espectro de RMN ¹H da fração RMG₉, além de evidenciar vários sinais que não puderam ser atribuídos a uma substância específica, revelou a presença de sinais referentes aos alcalóides liriodenina, oxoputerina e lisicamina.

Visto que os sinais característicos do alcalóide liriidenina haviam sido discutidos no item anterior, esta secção se ocupou em discutir apenas os sinais atribuídos aos dois últimos alcalóides: oxoputerina e lisicamina.

4. 1. 2. 2. 1 – Identificação do alcalóide oxoputerina

A fração RMG₉ evidenciou oito sinais entre δ_H 8,68 a 4,06 com integração para onze hidrogênios. A presença de um grupo metilenodioxí, verificada através do sinal δ_H 6,34 com integração para dois hidrogênios, e de um hidrogênio aromático em δ_H 7,34 (1H, s), evidenciou a existência de um anel pentassubstituído, semelhante ao apresentado pela liriidenina. Os sinais em δ_H 7,96 e δ_H 8,68, com integração para dois hidrogênios, indicaram a presença de hidrogênios α e β do anel piridínico (anel B) em H4 e H5, respectivamente. Os sinais correspondentes aos três hidrogênios aromáticos em δ_H 7,50 (1H, dd, $J = 8,3$ e $1,2$ Hz), δ_H 7,62 (1H, dd, $J = 8,3$ e $7,5$ Hz) e δ_H 8,03 (1H, dd, $J = 7,9$ e $1,2$ Hz) e ao sinal em δ_H 4,06, atribuído ao grupo metoxila com integração para três hidrogênios, indicaram a presença do benzeno trissubstituído. Estes dados sugeriram a presença de um derivado da liriidenina substituído com um grupo metoxila em C11 (Figuras 30, 31, 32 e 33).

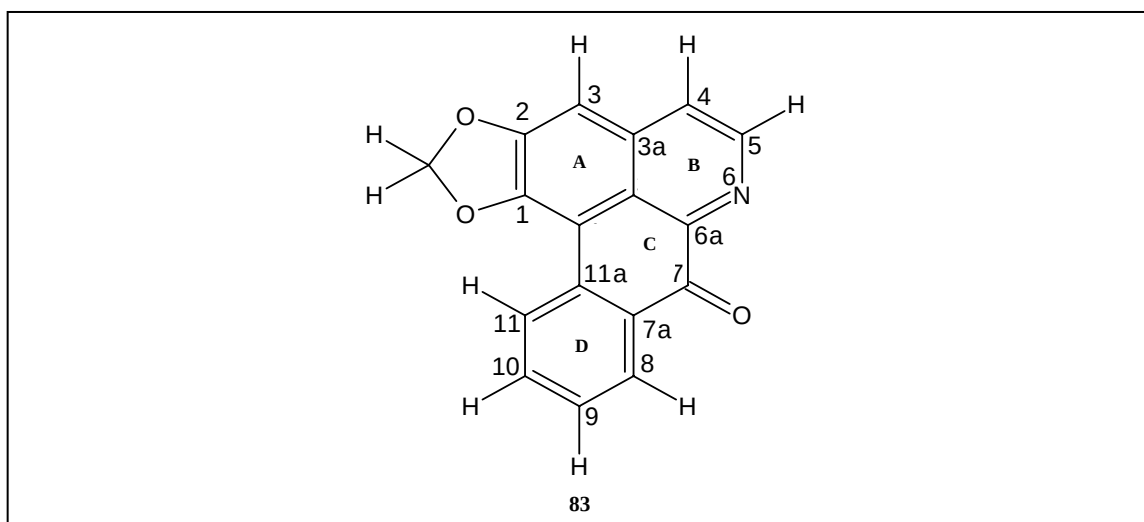


Figura 30: Estrutura do alcalóide liriidenina.

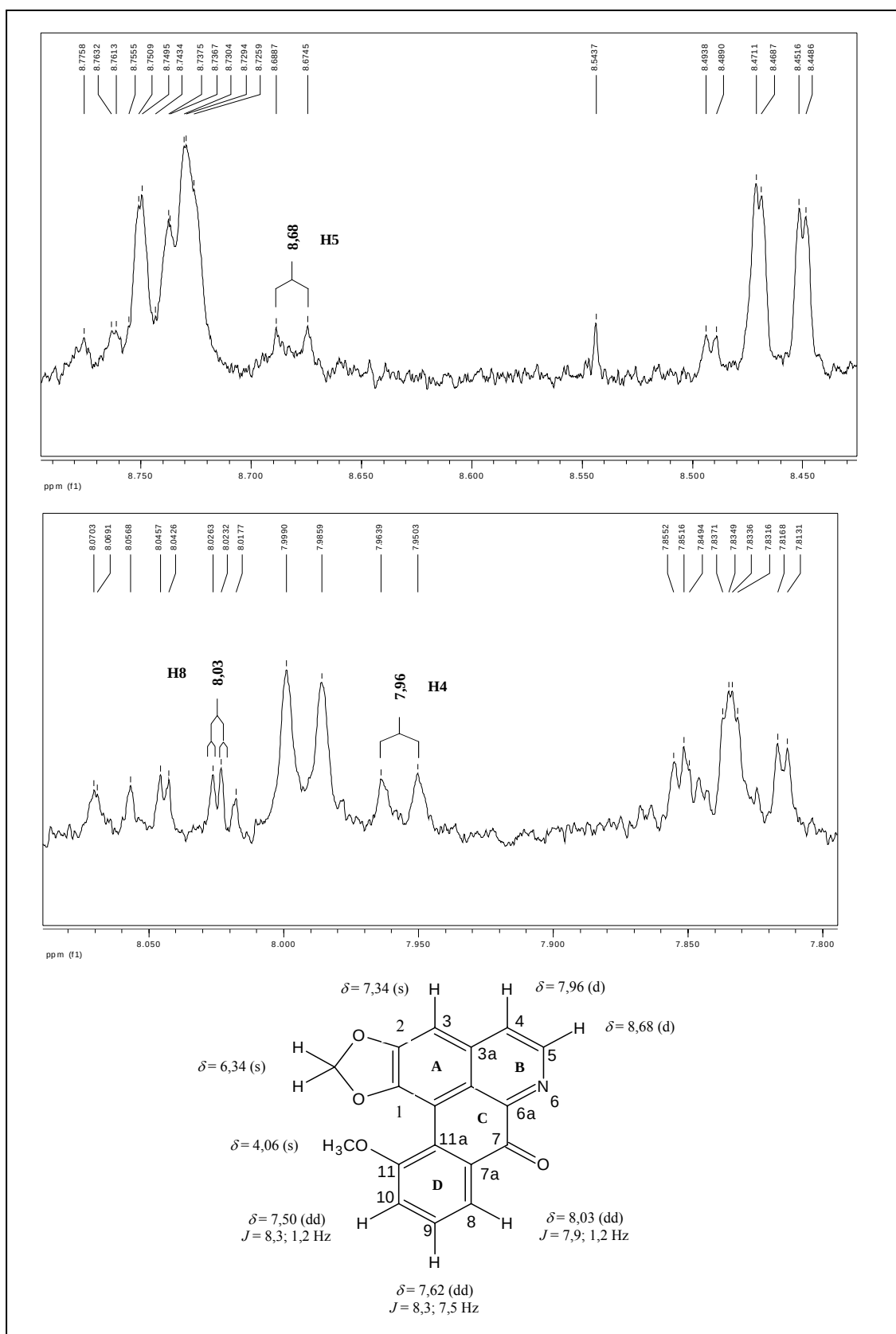


Figura 31: Expansão entre δ_{H} 8,75 e 7,80 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₉.

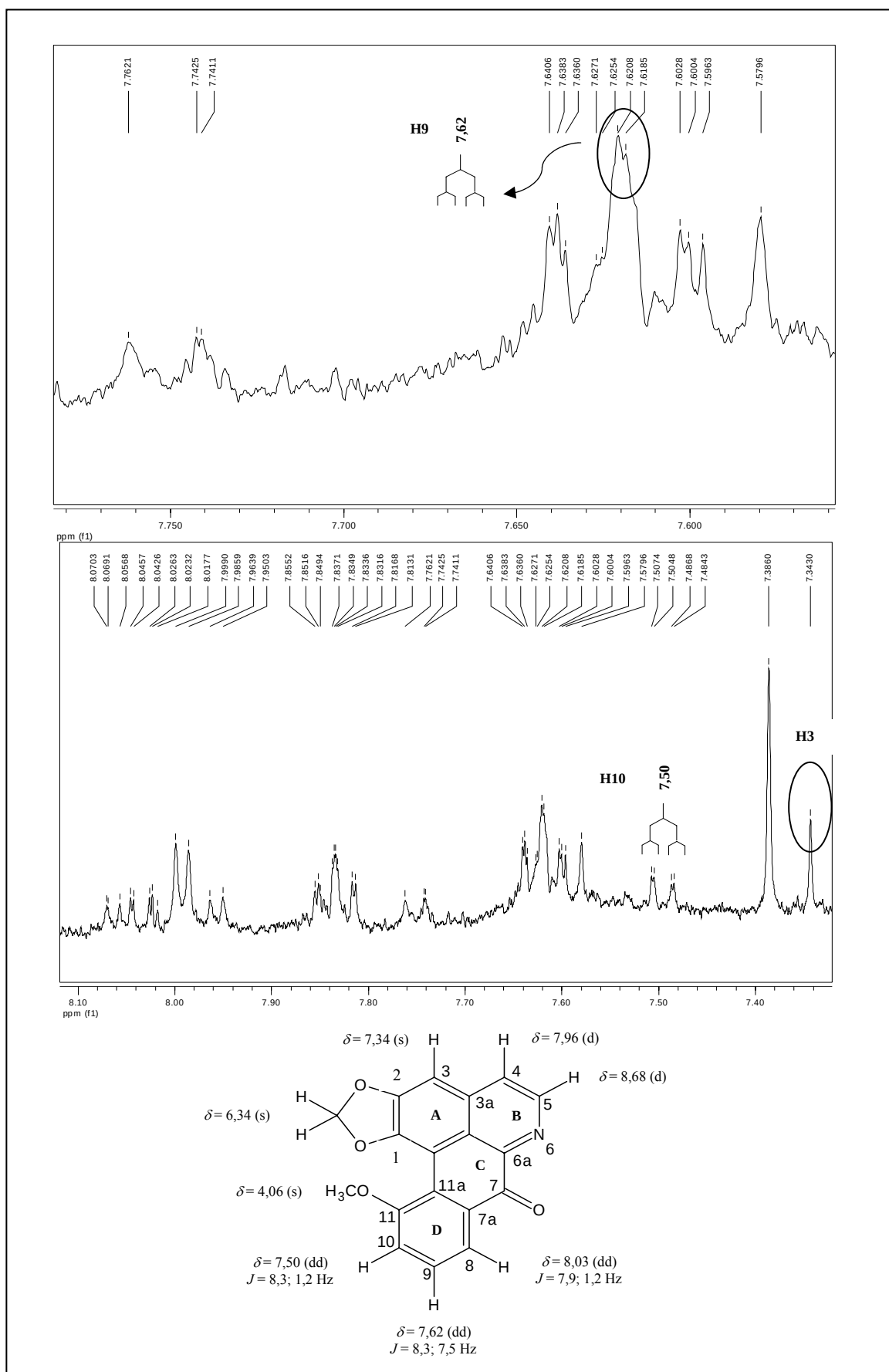


Figura 32: Expansão entre δ_{H} 7,75 e 7,40 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₉.

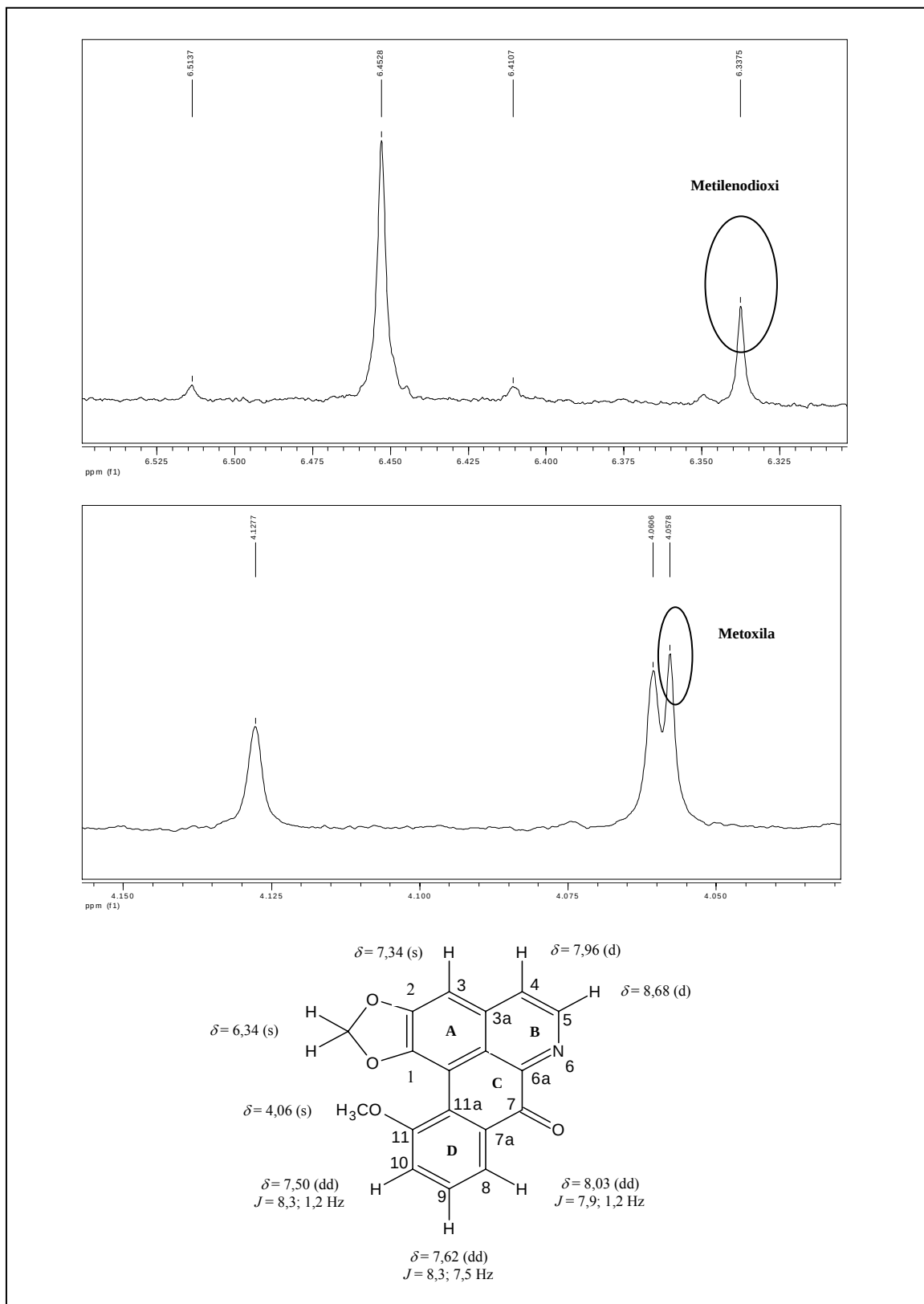


Figura 33: Expansão entre δ_H 6,52 e 4,05 do espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₉.

A análise comparativa dos dados de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG_9 com os sinais registrados por Rabelo (2008) a 400 MHz, confirmaram a presença do alcalóide oxoputerina na fração RMG_9 (Tabela 28).

Posição do hidrogênio	RMN de ^1H (δ_{H}) (multiplicidade, J em Hz) Rabelo (2008)	RMN de ^1H (δ_{H}) (multiplicidade, J em Hz) RMG_9
Metilenodioxí	6,26 (2H, s)	6,34 (2H, s)
3	7,15 (1H, s)	7,34 (1H, s)
4	7,73 (1H, d)	7,96 (1H, d)
5	8,83 (1H, d)	8,68 (1H, d)
8	8,17 (1H, dd, 7,8; 1,1)	8,03 (1H, dd, 7,9; 1,2)
9	7,55 (1H, ddd, 8,2; 7,8)	7,62 (1H, dd, 8,3; 7,5)
10	7,30 (1H, dd, 8,2; 1,1)	7,50 (1H, dd, 8,3; 1,2)
Metoxila	4,02 (1H, s)	4,06 (1H, s)

Tabela 28: Comparação dos deslocamentos químicos (δ_{H}), multiplicidades e constantes de acoplamento (J) dos sinais dos hidrogênios de RMG_9 com aqueles do alcalóide oxoputerina.

A análise do mapa de contornos COSY, confirmou a presença do alcalóide oxoputerina na fração através da correlação entre os sinais do H9 em δ_{H} 7,62 (dd, $J = 8,3$; 7,5 Hz) acoplando com H10 em δ_{H} 7,50 (dd, $J = 8,3$; 1,2 Hz) e com o H8 em δ_{H} 8,03 (dd, $J = 7,9$; 1,2 Hz) (Figura 34).

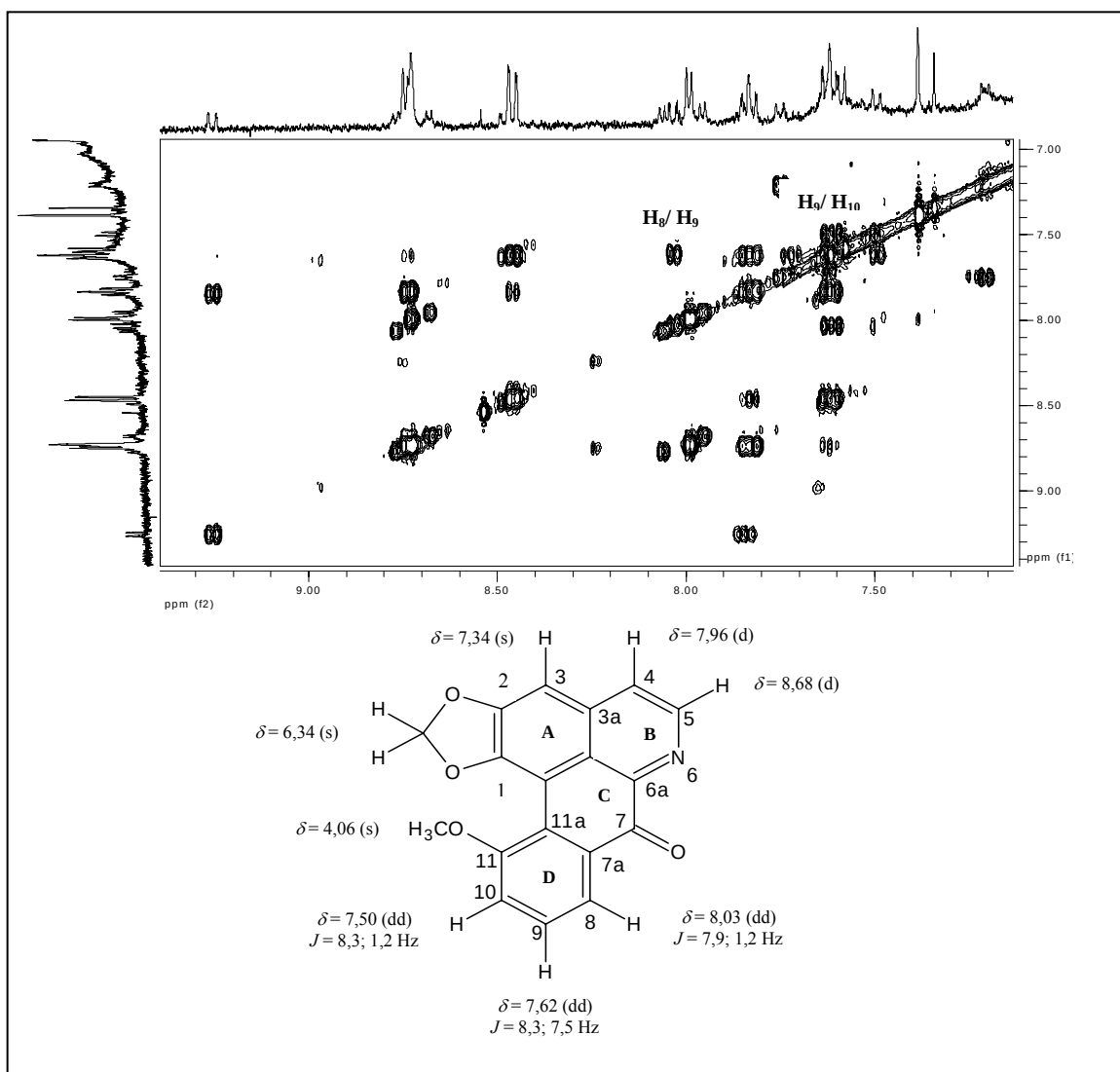


Figura 34: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD₃OD) de RMG₉. Expansão da região entre δ_H 9,00 e 7,50.

Visto que os alcalóides oxoputerina e lisicamina encontravam-se misturados e impuros na fração RMG₉, foi necessária a realização do experimento de TOCSY-Seletivo para confirmar a presença dos mesmos na referida fração.

Esse experimento consiste em irradiar o sinal de um hidrogênio pertencente a determinado sistema para que ocorra a identificação, através de sinais, dos hidrogênios pertencentes ao mesmo sistema e, portanto pertencentes a uma mesma substância.

No caso da oxoputerina, irradiando o sinal do H10 em δ_H 7,50 foi possível determinar os três hidrogênios pertencentes ao anel D do sistema oxoaporfínico, os hidrogênios 8 (δ_H

8,03), 9 (δ_H 7,62) e 10 (δ_H 7,50), já que existe uma substituição nesse anel em C11 (um grupo metoxila em δ_H 4,06) (Figura 35).

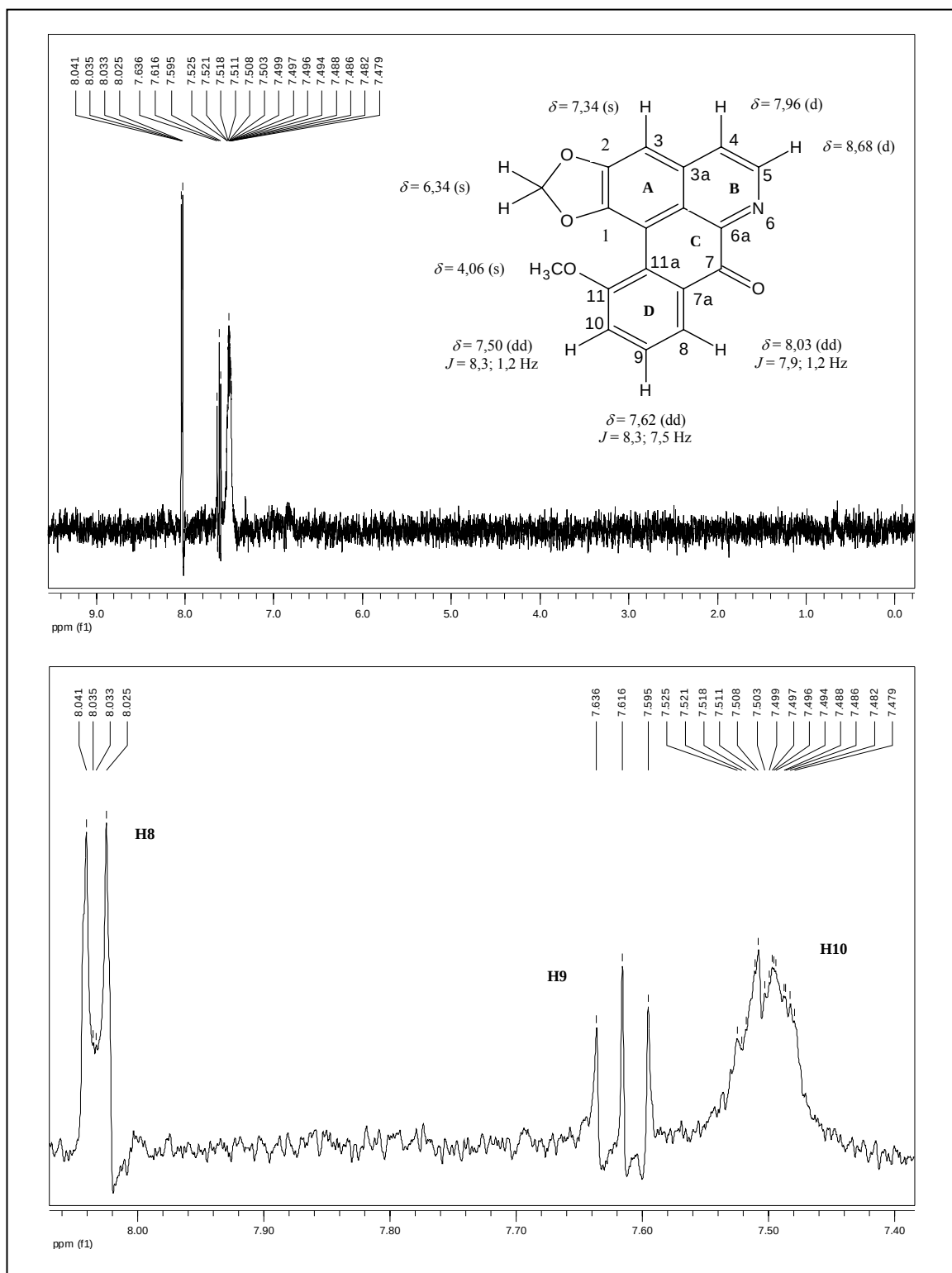


Figura 35: Espectro de TOCSY-Seletivo (400 MHz, CD₃OD) de RMG₉. Expansão da região entre δ_H 9,00 e 7,40.

4. 1. 2. 2. 2 – Identificação do alcalóide lisicamina

Além dos sinais característicos do alcalóide oxoputerina, a fração RMG₉ evidenciou mais nove sinais indicativos da presença do alcalóide lisicamina.

Esses sinais foram identificados entre δ_H 9,25 a 4,06 com integração para treze hidrogênios. A presença de dois grupos metoxilas, verificados através dos sinais δ_H 4,06 e δ_H 4,13, com integração para seis hidrogênios, e do sinal de um hidrogênio aromático em δ_H 7,58 (1H, s), evidenciou a existência de um anel pentassubstituído. Os sinais em δ_H 8,06 e δ_H 8,77, com integração para dois hidrogênios, indicaram a presença de hidrogênios α e β do anel piridínico (anel B) em H4 e H5, respectivamente. Os sinais correspondentes aos quatro hidrogênios aromáticos em δ_H 7,63 (1H, ddd, $J = 7,7$; $7,5$ e $1,2$ Hz), δ_H 7,83 (1H, ddd, $J = 8,5$; $7,5$ e $1,8$ Hz), δ_H 8,49 (1H, dd, $J = 7,7$ e $1,8$ Hz) e δ_H 9,25 (1H, dd, $J = 8,5$ e $1,2$ Hz), indicaram a presença do benzeno trissubstituído. Estes dados sugeriram a presença do alcalóide lisicamina na mistura RMG₉ (Figuras 36, 37, 38 e 39).

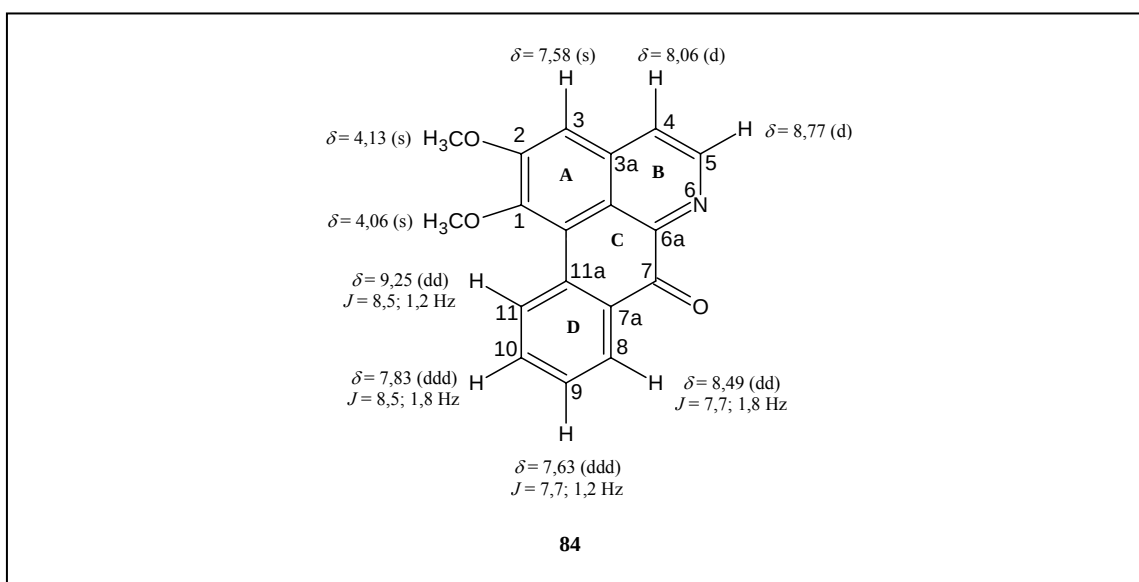


Figura 36: Estrutura do alcalóide lisicamina.

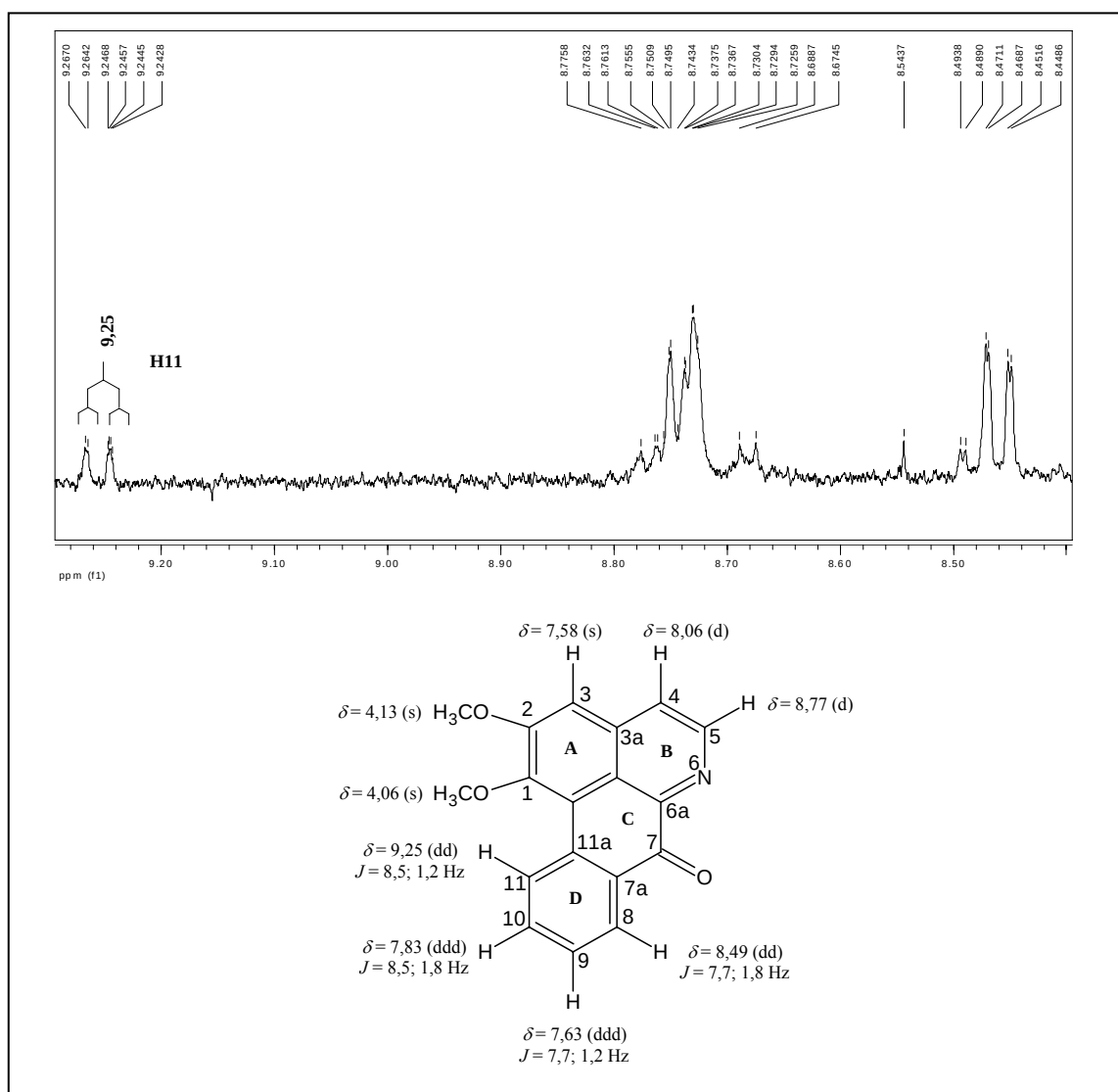


Figura 37: Expansão entre δ_{H} 9,20 e 8,50 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₉.

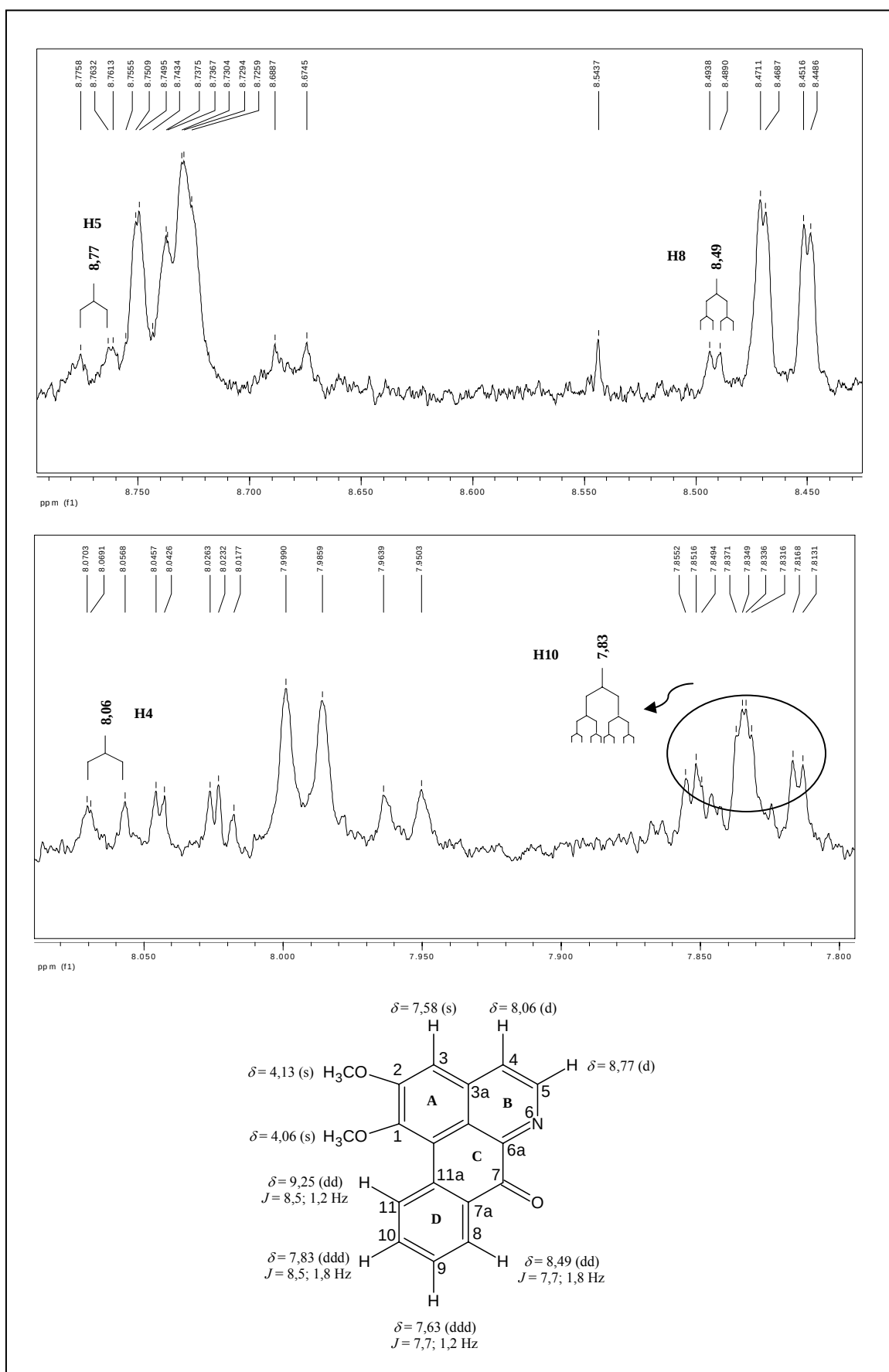


Figura 38: Expansão entre δ_{H} 8,75 e 7,80 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₉.

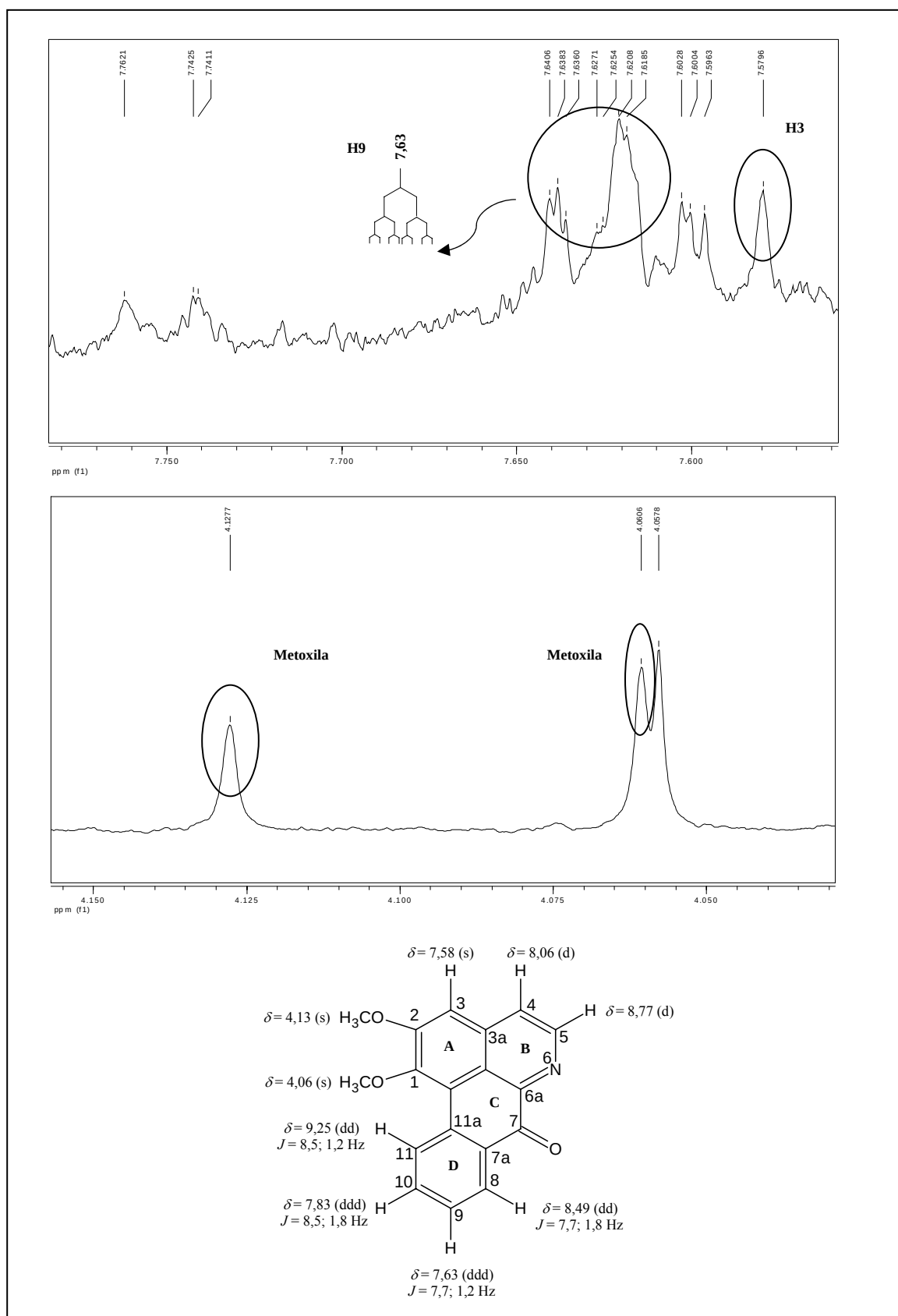


Figura 39: Expansão entre δ_H 7,75 e 4,05 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₉.

A análise comparativa dos dados de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG_9 com os sinais registrados por Chang et al. (2000) em CDCl_3 , confirmaram a presença do alcalóide lisicamina na fração RMG_9 (Tabela 29).

Posição do hidrogênio	RMN de ^1H (δ_{H}) (multiplicidade, J em Hz) Chang et al. (2000)	RMN de ^1H (δ_{H}) (multiplicidade, J em Hz) RMG_9
Metoxila	4,03 (3H, s)	4,06 (3H, s)
Metoxila	4,11 (3H, s)	4,13 (3H, s)
3	7,24 (1H, s)	7,58 (1H, s)
4	7,82 (1H, d)	8,06 (1H, d)
5	8,93 (1H, d)	8,77 (1H, d)
8	8,59 (1H, dd, 8,0; 1,4)	8,49 (1H, dd, 7,7; 1,8)
9	7,58 (1H, ddd, 8,0; 1,1)	7,63 (1H, ddd, 7,7; 1,2)
10	7,78 (1H, ddd, 8,0; 1,4)	7,83 (1H, ddd, 8,5; 1,8)
11	9,19 (1H, dd, 8,0; 1,1)	9,25 (1H, dd, 8,5; 1,2)

Tabela 29: Comparação dos deslocamentos químicos (δ_{H}), multiplicidades e constantes de acoplamento (J) dos sinais dos hidrogênios de RMG_9 com aqueles do alcalóide lisicamina.

A análise do mapa de contornos COSY, evidenciou a existência do sinal do H11 em δ_{H} 9,25 (dd, $J = 8,5; 1,2$ Hz) acoplando com H10 em δ_{H} 7,83 (ddd, $J = 8,5; 1,8$ Hz) e de um sinal do H9 em δ_{H} 7,63 (ddd, $J = 7,7; 1,2$ Hz) acoplando com o H10 em δ_{H} 7,83 (ddd, $J = 8,5; 1,8$ Hz) e com o H8 em δ_{H} 8,49 (dd, $J = 7,7; 1,8$ Hz) (Figura 40), confirmando a presença do alcalóide lisicamina.

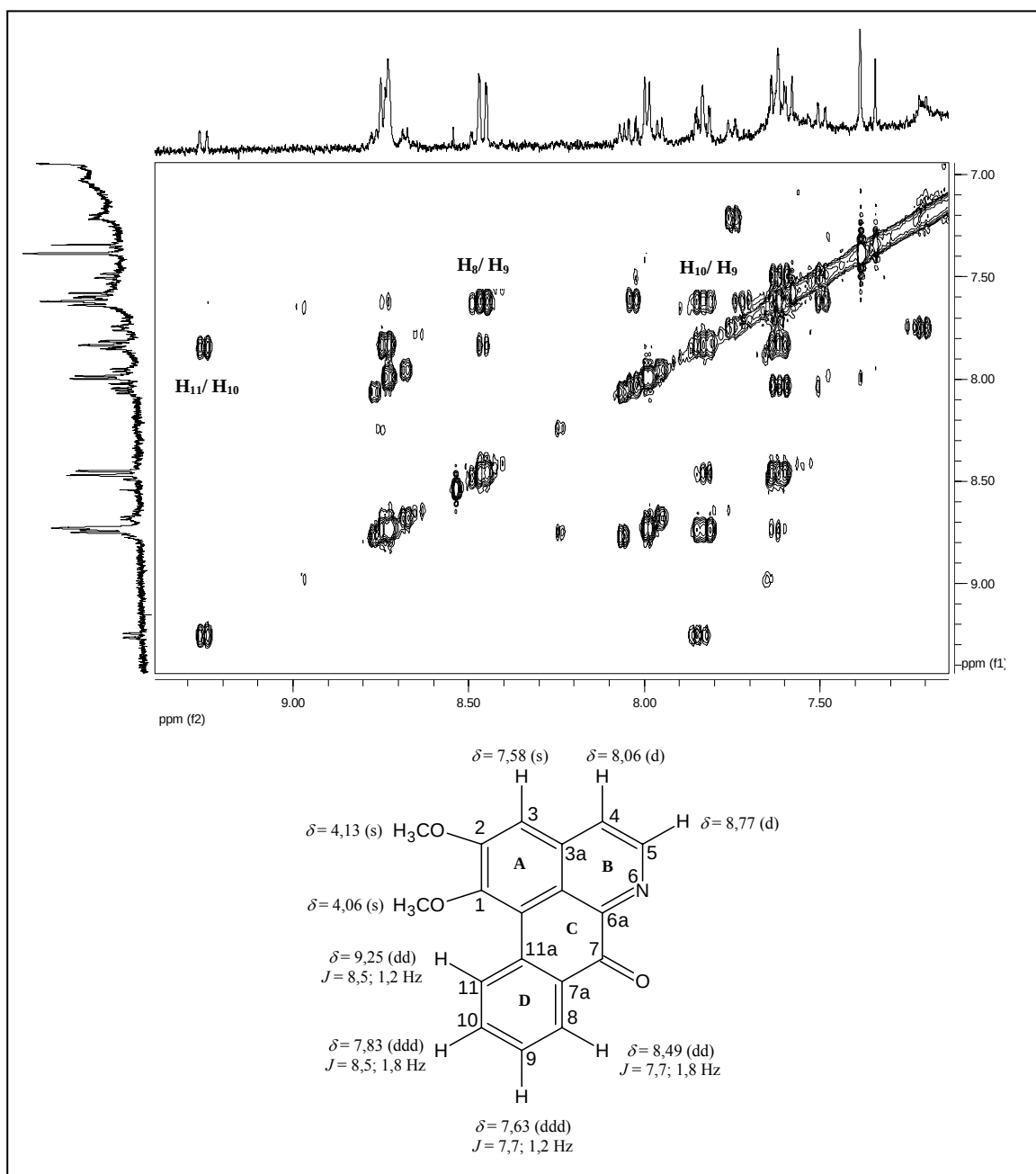


Figura 40: Mapa de contornos COSY (400 MHz, CD₃OD) de RMG₉. Expansão da região entre δ_H 9,30 e 7,50.

Com a análise do espectro de TOCSY-Seletivo (400 MHz, CD₃OD), através da marcação do sinal do H11 em δ_H 9,25, foi possível determinar os quatro hidrogênios pertencentes ao anel D do sistema oxoaporfínico: H8 (δ_H 8,49), H9 (δ_H 7,63), H10 (δ_H 7,83) e H11 (δ_H 9,25) (Figura 41).

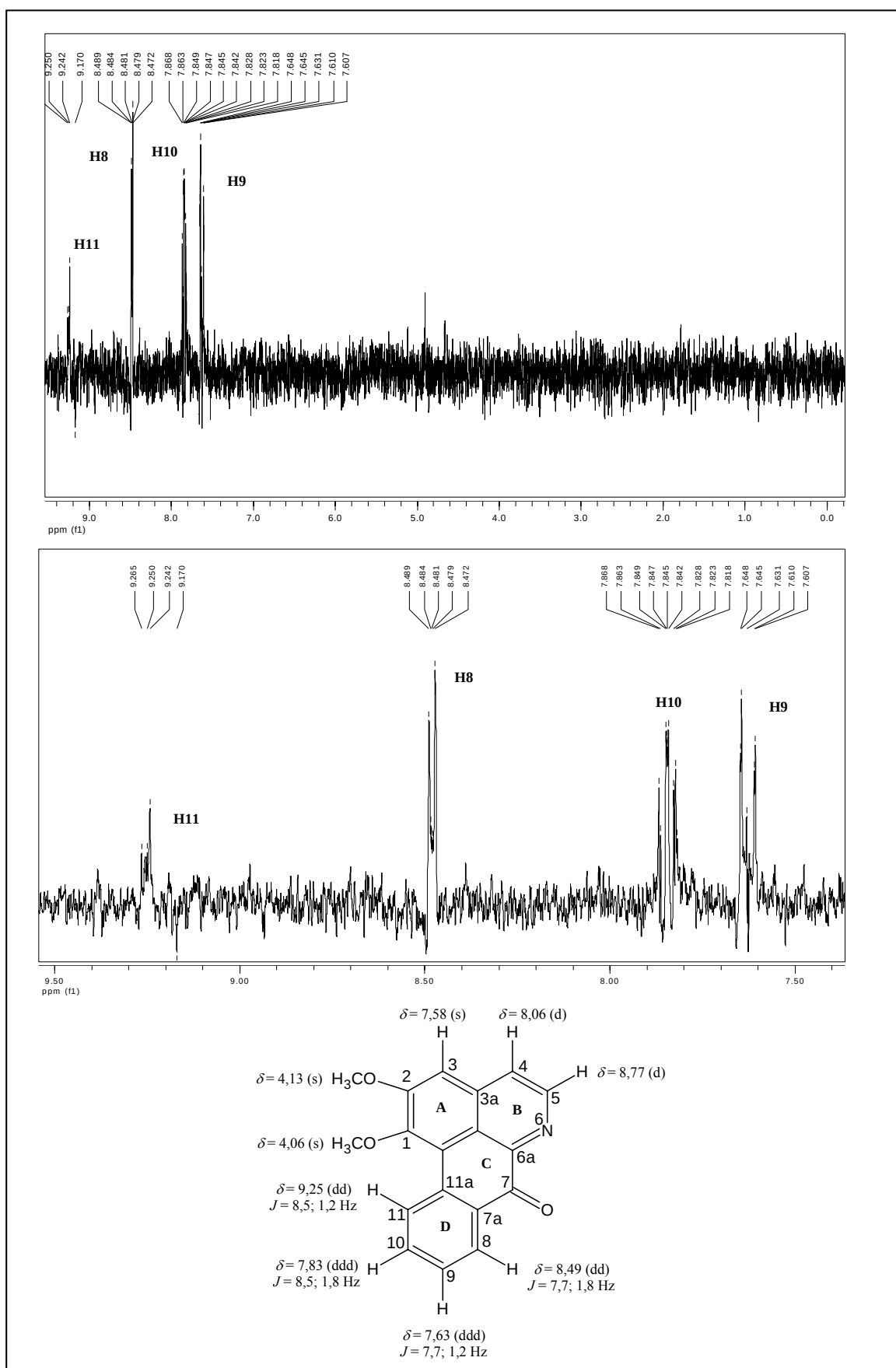


Figura 41: Espectro de TOCSY-Seletivo (400 MHz, CD₃OD) de RMG₉. Expansão da região entre δ_H 9,00 e 7,50.

4. 1. 2. 3 – Fração RMG₁₃

A fração RMG₁₃, sólido amarelo amorfo solúvel em metanol, apresentou resultado positivo frente ao reagente de Dragendorff.

O espectro de RMN de ¹H apresentou sinais múltiplos na região entre δ_H 8,32 e 2,66 típicos de hidrogênios aromáticos, não aromáticos e de um grupo metoxila (Figura 42). Os sinais correspondentes aos quatro hidrogênios aromáticos em δ_H 7,21 (1H, m), δ_H 7,26 (2H, m) e δ_H 8,32 (1H, d), indicaram a presença de um anel benzênico trissubstituído (Figura 43).

A presença do sinal de um hidrogênio aromático em δ_H 6,63 (1H, s) (Figura 43) e de um grupo metoxila, verificado através do sinal δ_H 3,55, com integração para três hidrogênios, evidenciou a existência de um anel pentassubstituído (Figura 44). O sinal δ_H 3,71 (1H, dd), δ_H 3,30 (1H, m) e os sinais em δ_H 2,66 e δ_H 2,97, com integração para cinco hidrogênios, sugeriram a presença dos anéis B e C na estrutura do alcalóide isolado (Figura 44).

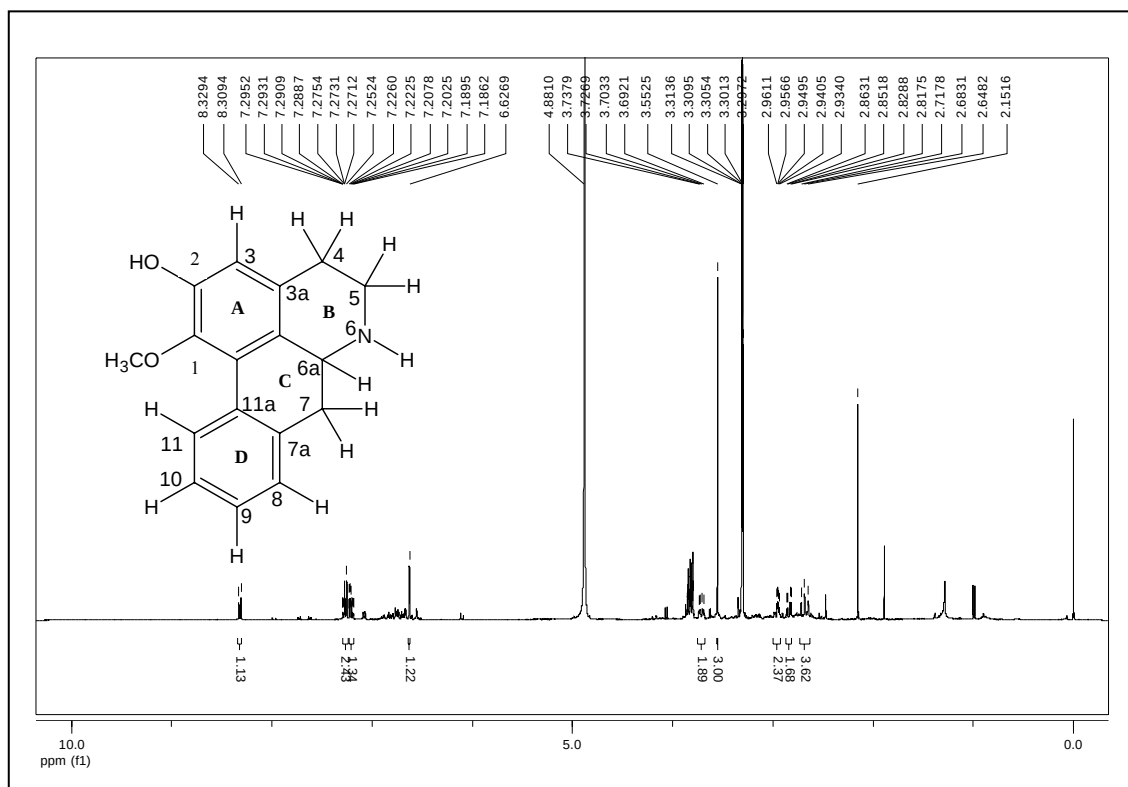


Figura 42: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CD₃OD) de RMG₁₃.

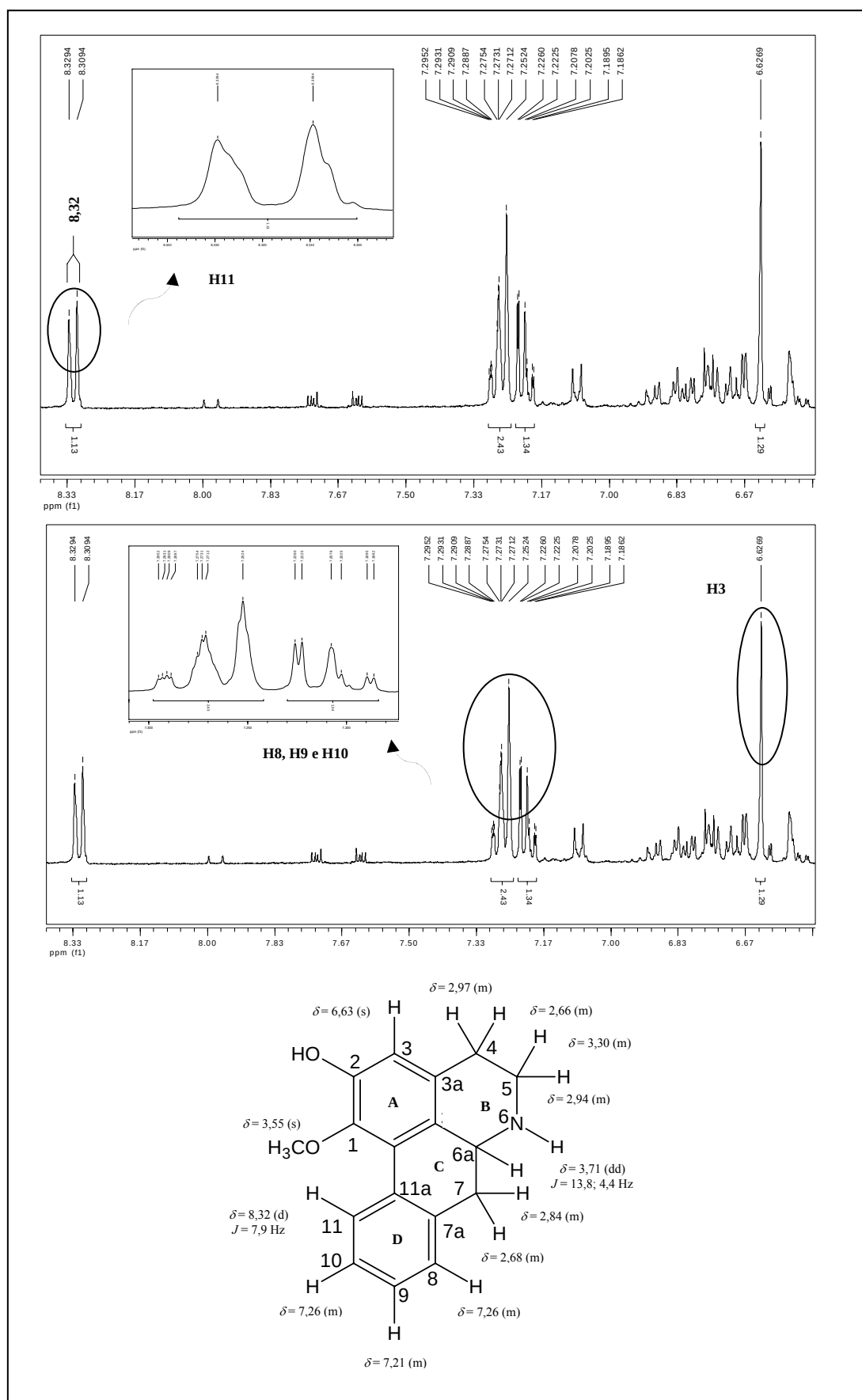


Figura 43: Expansão entre δ_{H} 8,33 e 6,67 do espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₁₃.

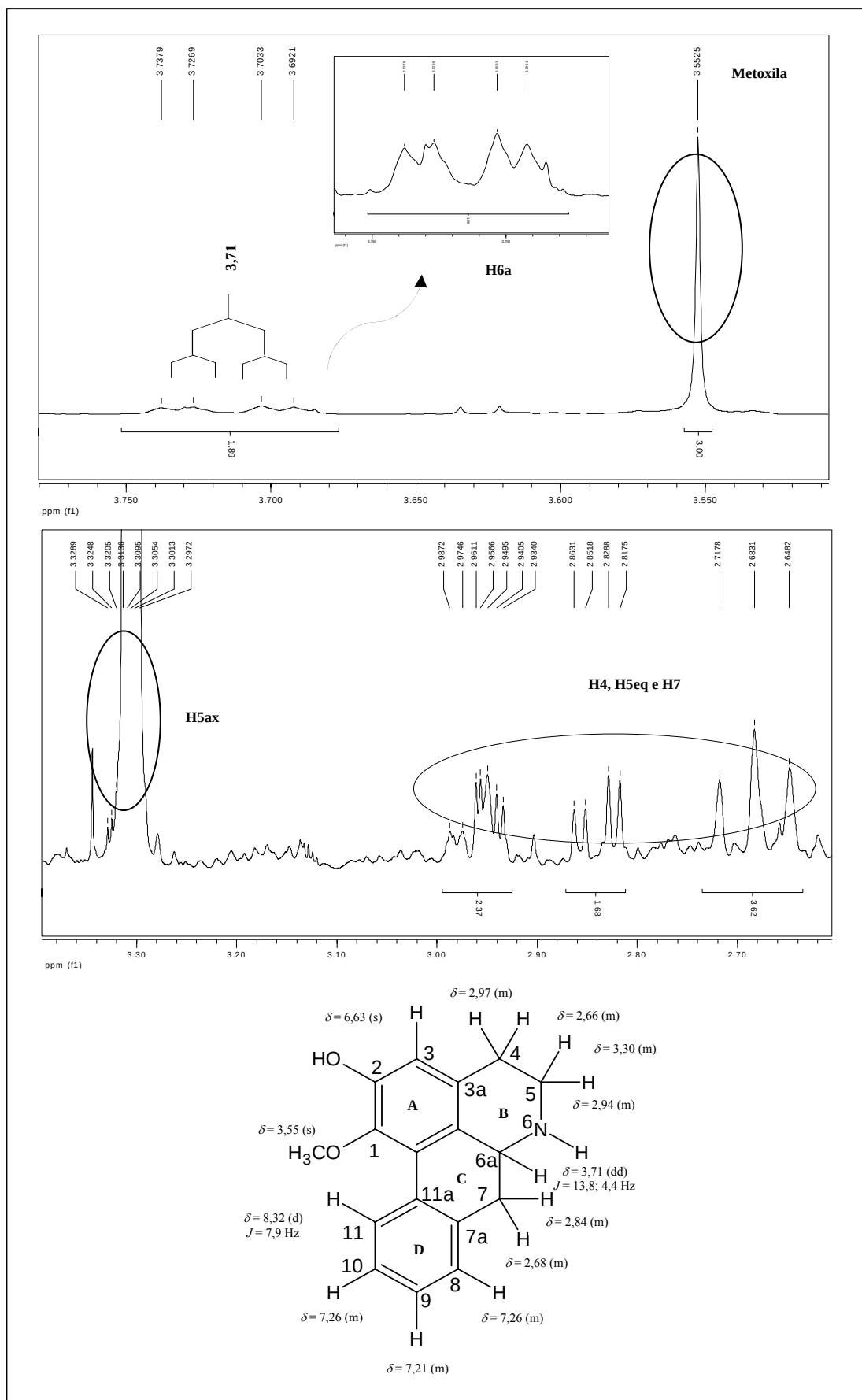


Figura 44: Expansão entre δ_H 3,75 e 2,70 do espectro de RMN de 1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG₁₃.

A análise comparativa dos dados de RMN de ^1H (400 MHz, CD_3OD) de RMG_{13} com os sinais registrados por Fischer et al. (1999) a 300 MHz e CDCl_3 , confirmaram a presença do alcalóide assimilobina na fração RMG_{13} (Tabela 30).

RMN de ^1H (δ_{H}) (multiplicidade, J em Hz) Fischer et al. (1999)	RMN de ^1H (δ_{H}) (multiplicidade, J em Hz) RMG_{13}
δ_{H} 2,46 – 2,78 (5H, m)	δ_{H} 2,66 – 2,97 (5H, m)
δ_{H} 3,19 – 3,21 (1H, m)	δ_{H} 3,30 (1H, m)
δ_{H} 3,38 (3H, s, OMe)	δ_{H} 3,55 (3H, s, OMe)
δ_{H} 3,62 – 3,68 (1H, dd, 13,2; 4,8)	δ_{H} 3,71 (1H, dd, 13,8; 4,4)
δ_{H} 6,50 (1H, s)	δ_{H} 6,63 (1H, s)
δ_{H} 7,01 – 7,12 (3H, m)	δ_{H} 7,21 – 7,26 (3H, m)
δ_{H} 8,06 – 8,08 (1H, d, 6,0)	δ_{H} 8,32 (1H, d, 7,9)

Tabela 30: Comparação dos deslocamentos químicos (δ_{H}), multiplicidades e constantes de acoplamento (J) dos sinais dos hidrogênios de RMG_{13} com aqueles do alcalóide assimilobina.

A análise conjunta do espectro de RMN de ^{13}C (Figura 45) e respectivas seções expandidas (Figura 46) da fração RMG_{13} evidenciaram a presença de um grupo de carbono de maior intensidade. Neste grupo, foi possível identificar a presença de seis carbonos não hidrogenados, com sinais em δ_{C} 145,3 (C1); δ_{C} 150,9 (C2); δ_{C} 137,2 (C7a); δ_{C} 133,5 (C11a); δ_{C} 127,3 (C11b) e δ_{C} 128,1 (C11c); de seis carbonos metínicos, com sinais em δ_{C} 116,7 (C3); δ_{C} 54,8 (C6a); δ_{C} 128,9 (C8); δ_{C} 128,6 (C9); δ_{C} 128,1 (C10) e δ_{C} 129,0 (C11); de três carbonos metilênicos, com sinais em δ_{C} 29,1 (C4); δ_{C} 43,9 (C5) e δ_{C} 37,8 (C7) e um sinal em δ_{C} 60,5 indicativo da presença de um grupo metoxila.

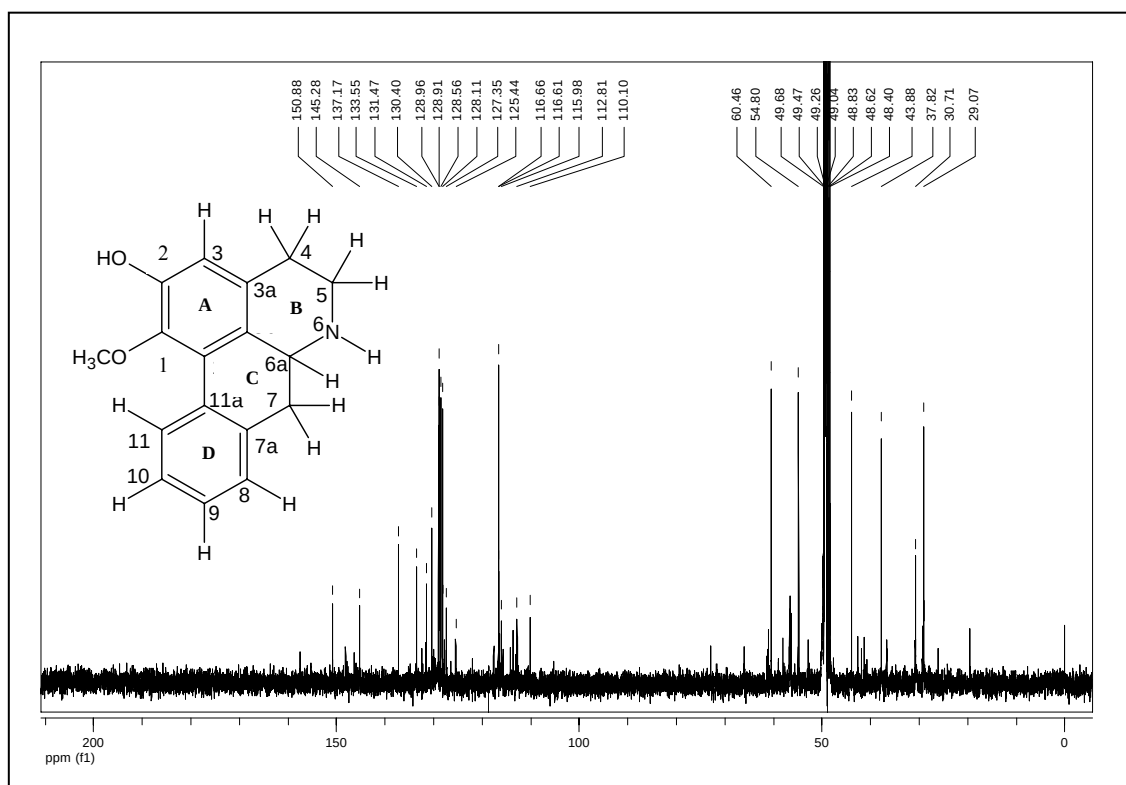


Figura 45: Espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de RMG_{13} .

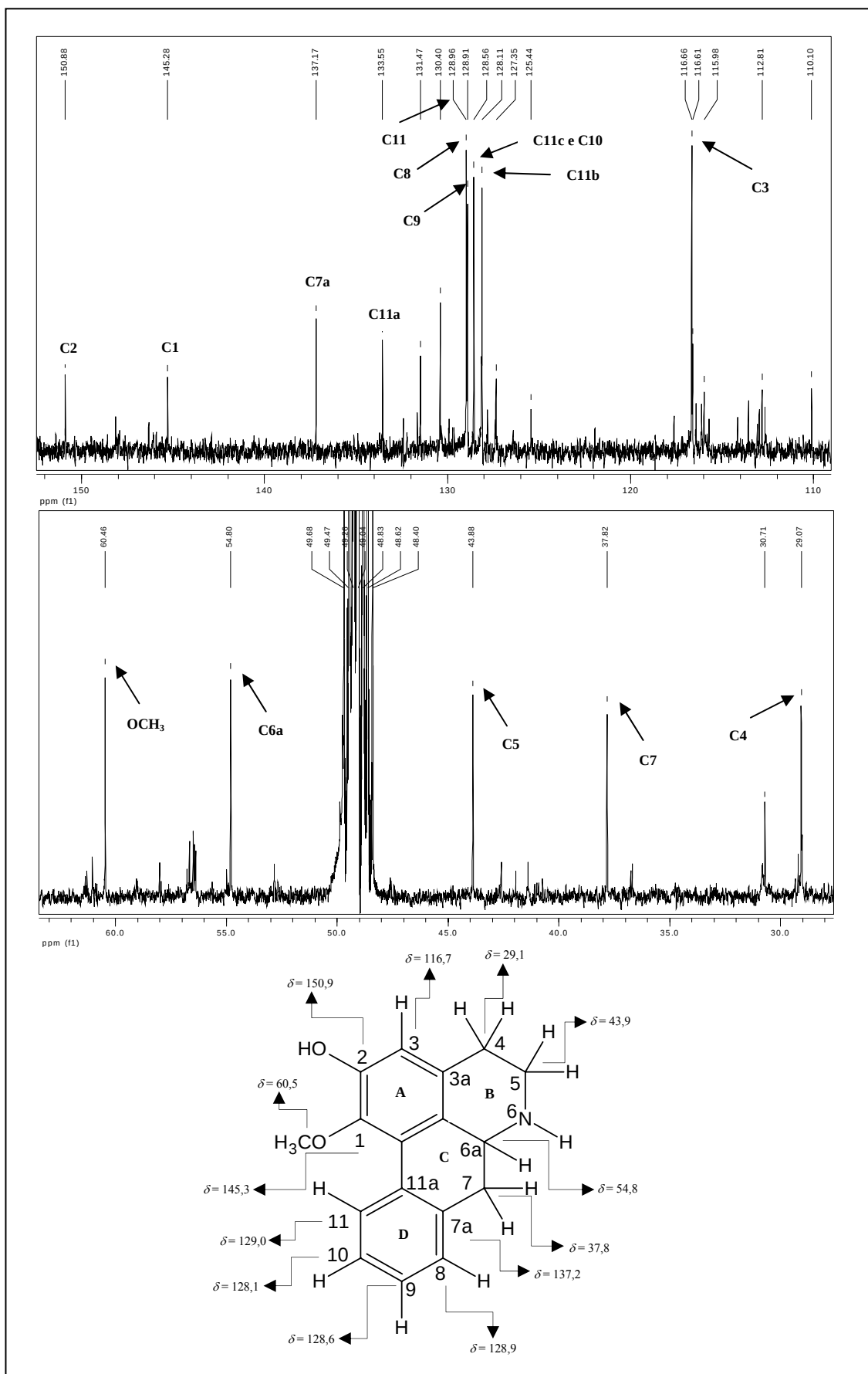


Figura 46: Expansão entre δ_{C} 150 e 30 do espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD₃OD) de RMG₁₃.

A análise comparativa dos dados de RMN de ^{13}C (100 MHz, CD_3OD) de RMG_{13} com os sinais registrados por Fischer et al. (1999) a 75,5 MHz e CDCl_3 , confirmaram a presença do alcalóide assimilobina na fração RMG_{13} (Tabela 31).

Posição e tipo de carbono	Fischer et al. (1999) (δ_{C})	RMG_{13} (δ_{C})
1 (C)	142,5	145,3
2 (C)	148,0	150,9
3 (CH)	114,2	116,7
4 (CH_2)	28,3	29,1
5 (CH_2)	42,7	43,9
6a (CH)	53,1	54,8
7 (CH_2)	36,8	37,8
7a (C)	135,6	137,2
8 (CH)	127,6	128,9
9 (CH)	127,2	128,6
10 (CH)	126,9	128,1
11 (CH)	126,8	129,0
11a (C)	131,5	133,5
11b (C)	125,0	127,3
11c (C)	127,8	128,1
OCH_3	60,0	60,5

Tabela 31: Dados comparativos dos deslocamentos químicos (δ_{C}) dos espectros de RMN ^{13}C da fração RMG_{13} com os do alcalóide assimilobina.

A análise do mapa de contornos HSQC (Figura 47) e seções expandidas (Figuras 48 e 49), possibilitou associar os sinais dos carbonos metínicos com aqueles dos hidrogênios correspondentes em δ_{C} 129,0 (C11)/ δ_{H} 8,32 (H11, d); δ_{C} 128,9 (C8)/ δ_{H} 7,26 (H8, m); δ_{C} 128,6 (C9)/ δ_{H} 7,21 (H9, m); δ_{C} 128,1 (C10)/ δ_{H} 7,26 (H10, m); δ_{C} 116,7 (C3)/ δ_{H} 6,63 (H3, s) e δ_{C} 54,8 (C6a)/ δ_{H} 3,71 (H6a, dd); os sinais dos carbonos metilênicos com os hidrogênios

diastereotópicos em δ_C 43,9 (C5)/ δ_{Hax} 3,30 (H5, m) e δ_{Heq} 2,94 (H5, m); δ_C 37,8 (C7)/ δ_{Hax} 2,84 (H7, m) e δ_{Heq} 2,68 (H7, m) e δ_C 29,1 (C4)/ δ_{Hax} 2,97 (H4, m) e δ_{Heq} 2,66 (H4, m) e o sinal do grupo OCH_3 em δ_C 60,5/ δ_H 3,55 (s).

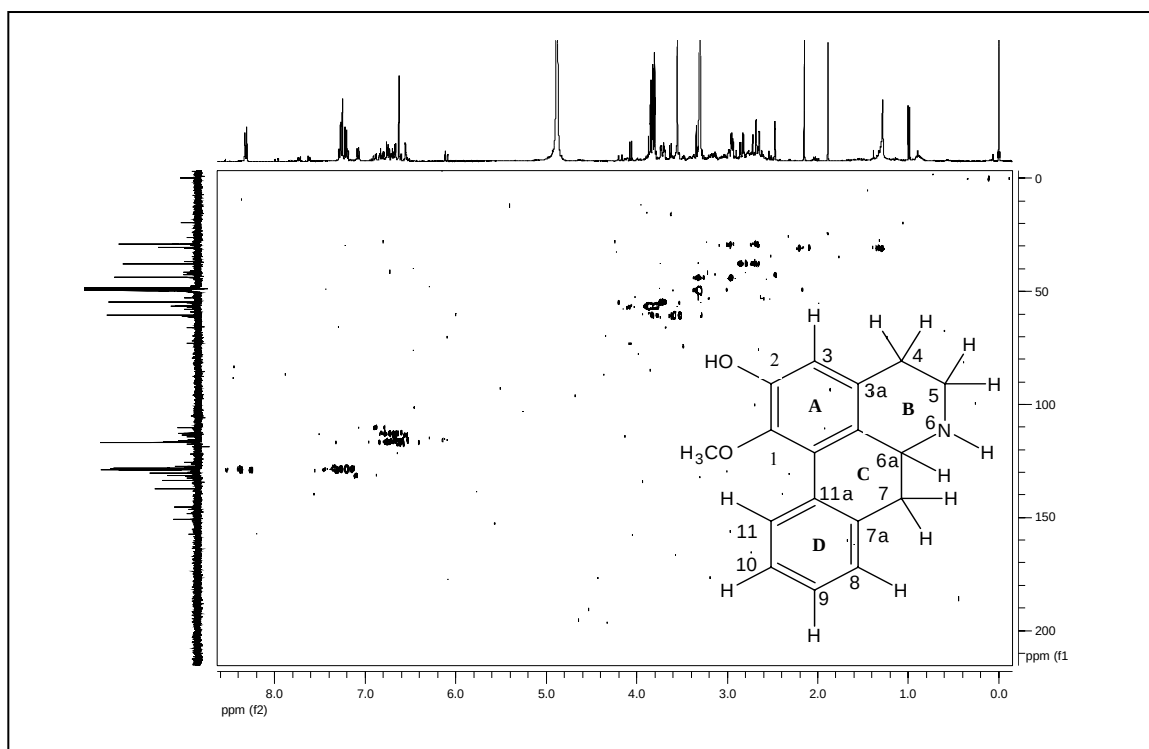


Figura 47: Mapa de contornos HSQC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG_{13} .

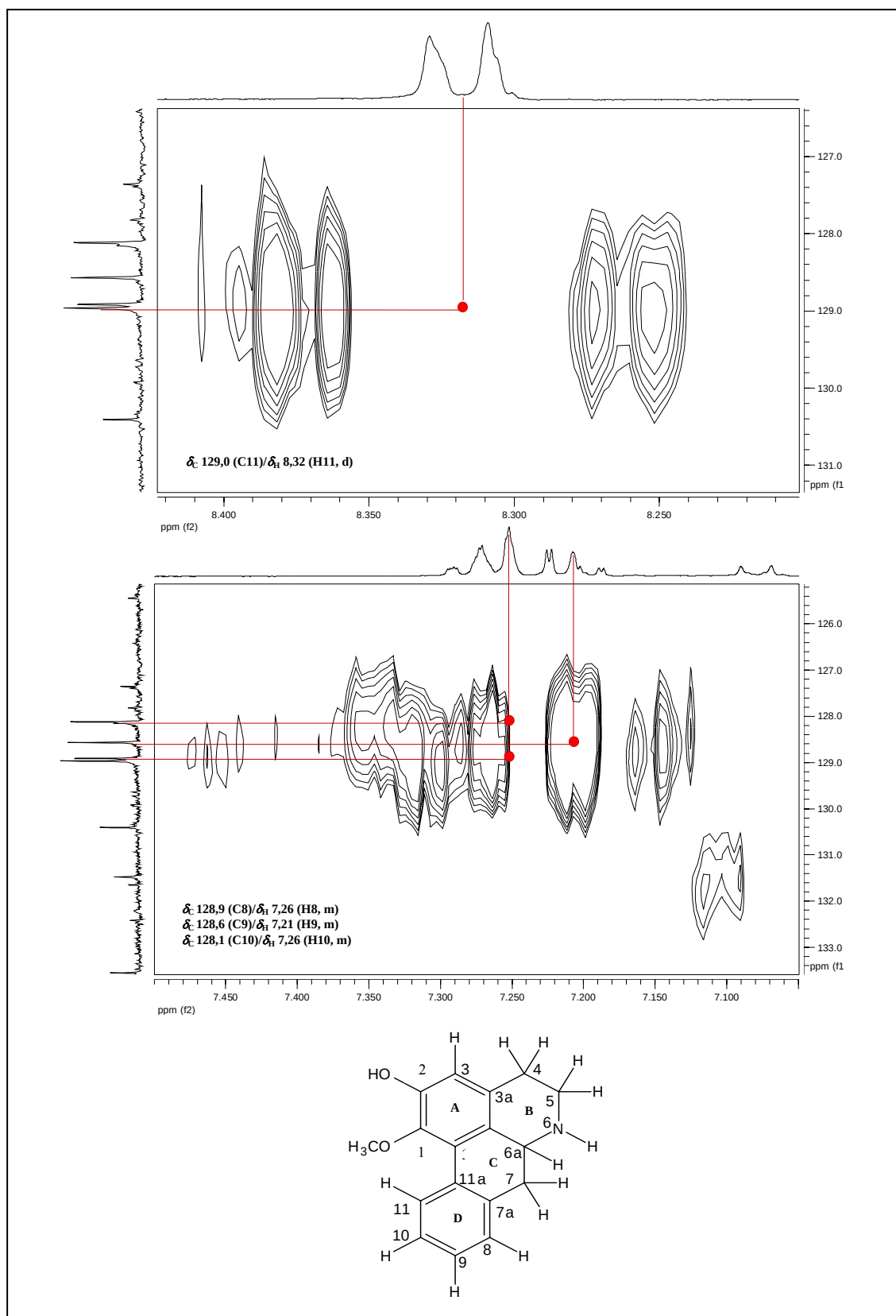


Figura 48: Expansão entre δ_H 8,40 e 7,10 do mapa de contornos HSQC (^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG_{13} .

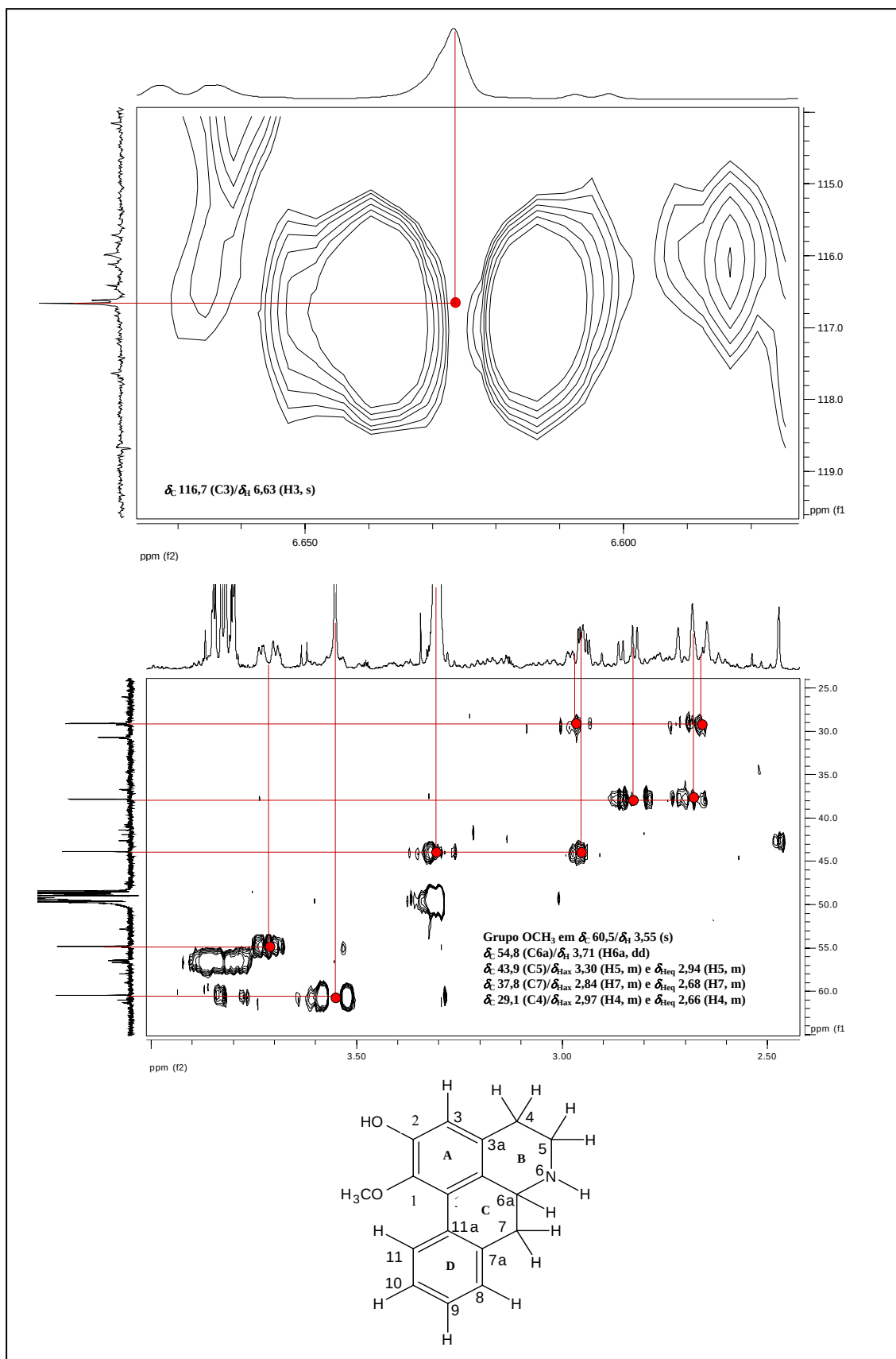


Figura 49: Expansão entre δ_H 6,65 e 2,50 do mapa de contornos HSQC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG₁₃.

Através da análise do mapa de contornos HMBC (Figura 50) e seções expandidas (Figuras 51, 52, 53 e 54), foi possível verificar a existência das seguintes correlações:

O sinal de hidrogênio em δ_H 8,32 (H11, d) com os sinais de carbono em δ_C 137,2 (C7a); δ_C 128,9 (C8); δ_C 128,6 (C9); δ_C 128,1 (C10) e δ_C 127,3 (C11b) (Figura 51);

O sinal de hidrogênio em δ_H 7,26 (H8 e H10, m) com os sinais de carbono em δ_C 137,2 (C7a); δ_C 133,5 (C11a); δ_C 129,0 (C11); δ_C 128,6 (C9) e δ_C 128,1 (C10) (Figura 51);

O sinal de hidrogênio em δ_H 7,21 (H9, m) com os sinais de carbono em δ_C 137,2 (C7a); δ_C 133,5 (C11a); δ_C 129,0 (C11) e δ_C 128,1 (C10) (Figura 51);

O sinal de hidrogênio em δ_H 6,63 (H3, s) com os sinais de carbono em δ_C 150,9 (C2) e δ_C 145,3 (C1) (Figura 52);

O sinal de hidrogênio em δ_H 6,63 (H3, s) com o sinal de carbono em δ_C 128,1 (C11c) (Figura 52);

O sinal de hidrogênio em δ_H 6,63 (H3, s) com o sinal de carbono em δ_C 29,1 (C4) (Figura 53);

O sinal de hidrogênio do grupo OCH_3 em δ_H 3,55 (s) com o sinal de carbono em δ_C 145,3 (C1) (Figura 53);

O sinal de hidrogênio em δ_H 2,84 (H7ax, m) com os sinais de carbono em δ_C 137,2 (C7a); δ_C 133,5 (C11a); δ_C 128,9 (C8); δ_C 128,6 (C9) e δ_C 128,1 (C11c) (Figura 54);

O sinal de hidrogênio em δ_H 2,68 (H7eq, m) com os sinais de carbono em δ_C 137,2 (C7a); δ_C 133,5 (C11a); δ_C 128,9 (C8); δ_C 128,6 (C9) e δ_C 128,1 (C11c) (Figura 54);

O sinal de hidrogênio em δ_H 2,66 (H4eq, m) com o sinal de carbono em δ_C 130,4 (C3a) (Figura 54).

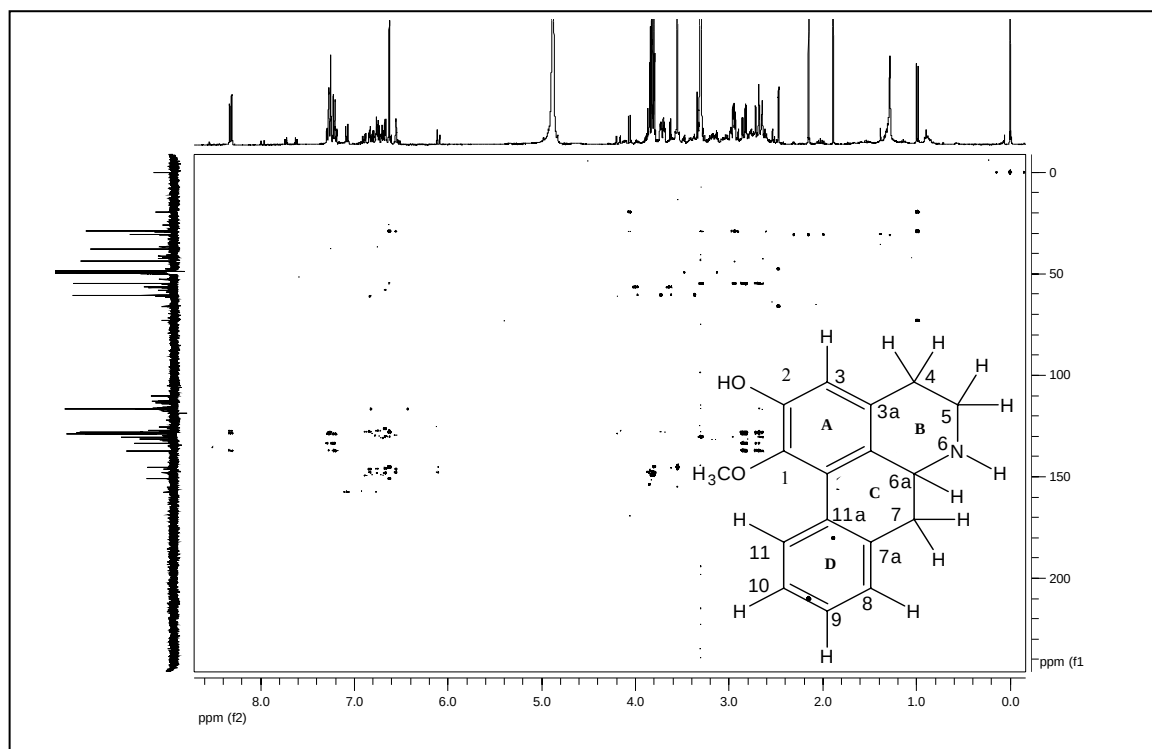


Figura 50: Mapa de contornos HMBC (^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG_{13} .

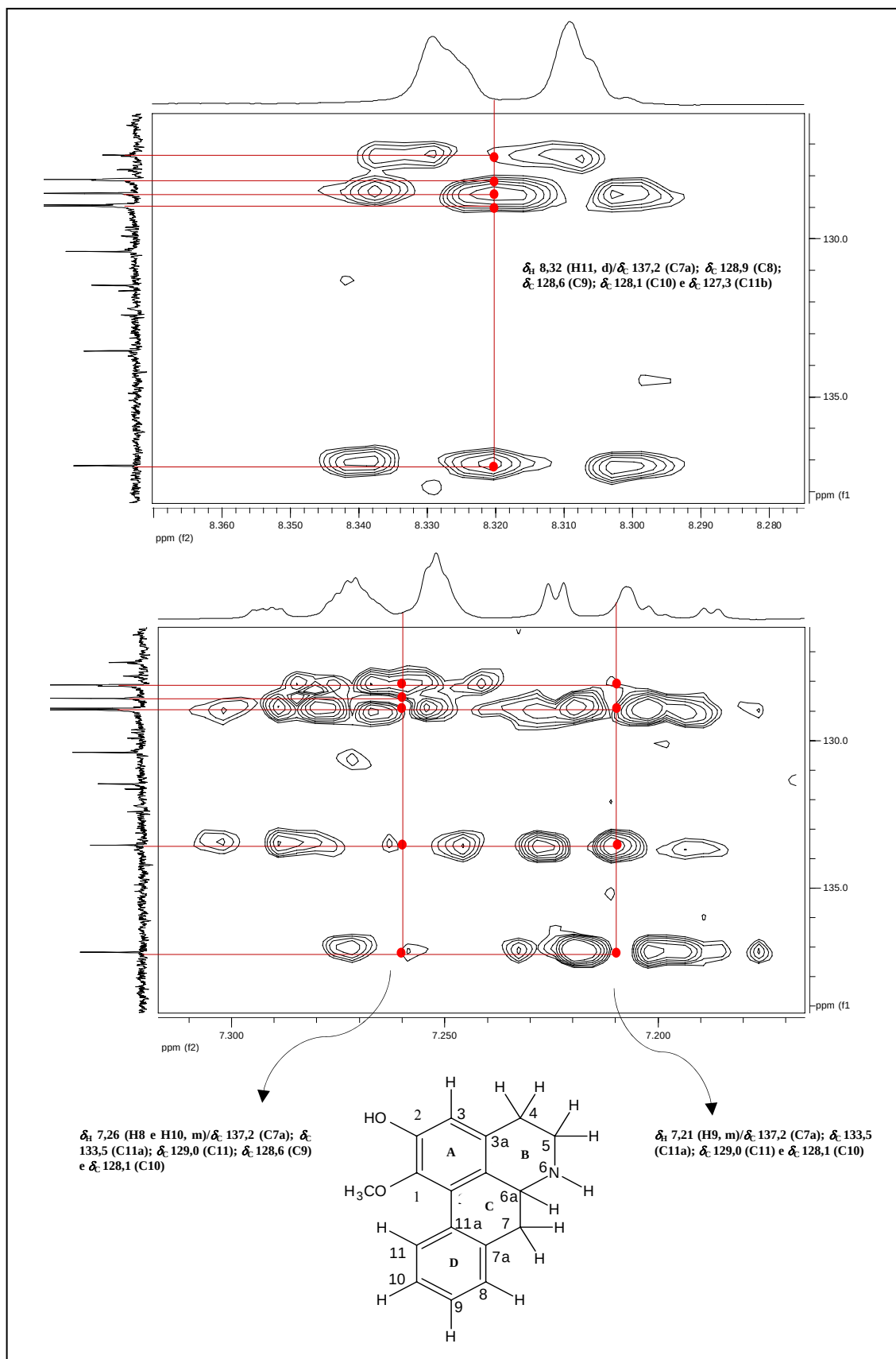


Figura 51: Expansão entre δ_H 8,36 e 7,20 do mapa de contornos HMBC (^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG₁₃.

Figura 52: Expansão entre δ_H 6,65 e 6,60 do mapa de contornos HMBC (1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG₁₃.

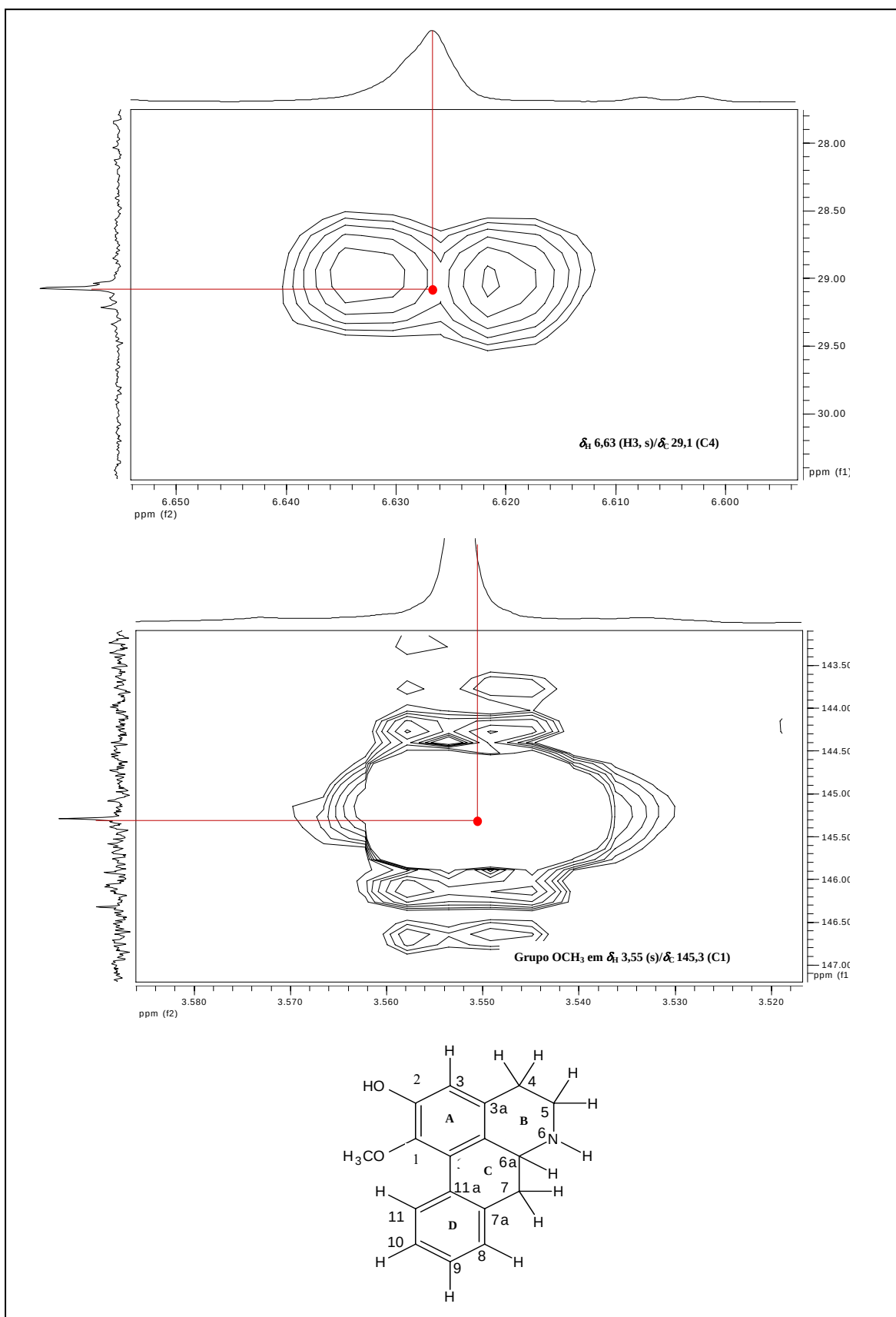


Figura 53: Expansão entre δ_H 6,65 e 3,52 do mapa de contornos HMBC (^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG₁₃.

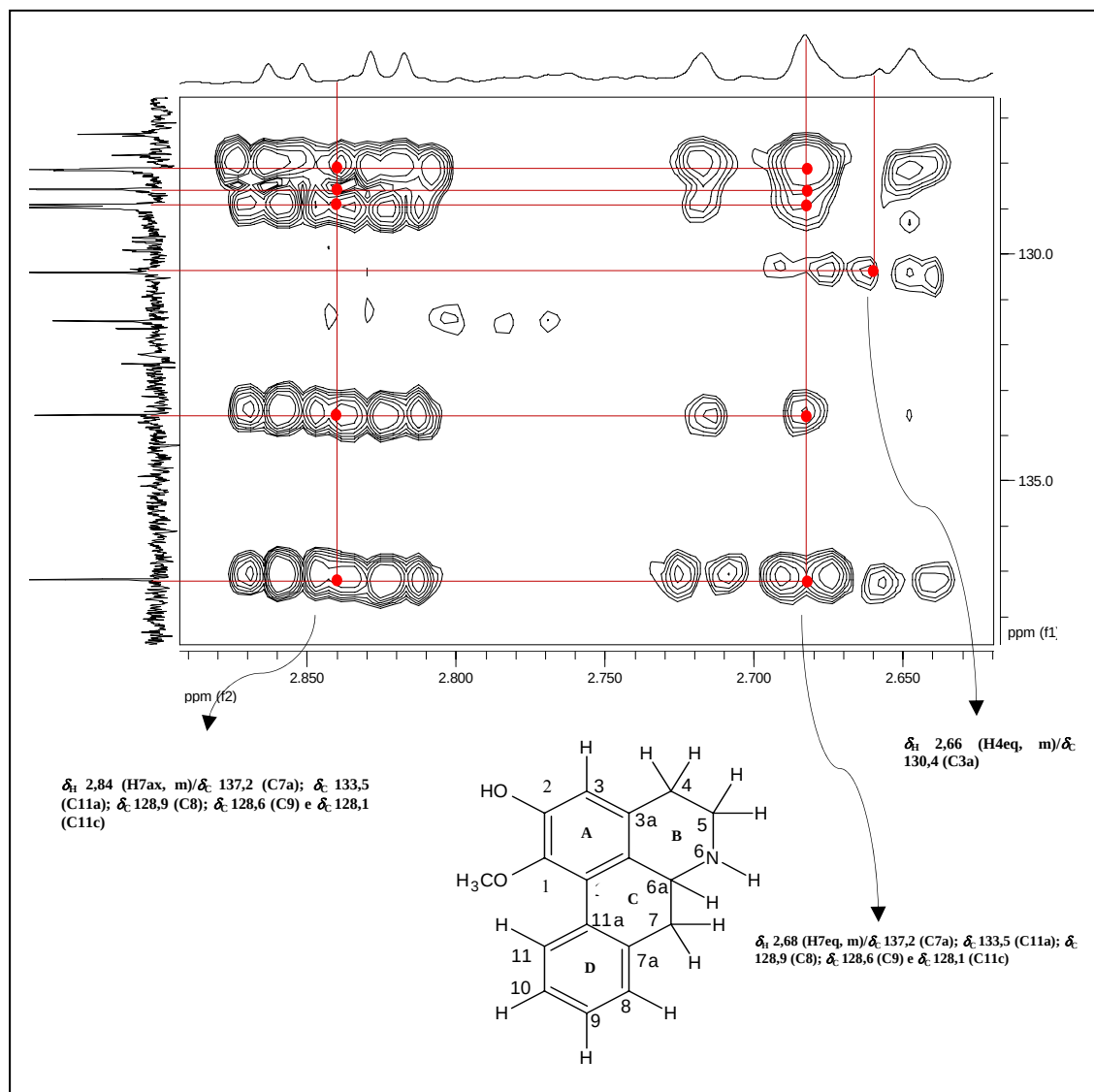


Figura 54: Expansão entre δ_H 2,85 e 2,65 do mapa de contornos HMBC (^1H a 400 MHz, ^{13}C a 100 MHz, CD_3OD) de RMG_{13} .

4. 2 – TESTES

4. 2. 1 – Toxicidade frente à *Artemia salina* Leach (TAS)

Os extratos brutos e frações obtidas dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia* foram testados, primeiramente, na concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$, e se verificou que todas as

amostras apresentaram inibição maior que 50%. Por essa razão, novos ensaios foram realizados utilizando-se cinco concentrações diferentes e inferiores a 500 µg/mL.

Os resultados obtidos foram analisados através do programa estatístico probitos de análises para a determinação da DL₅₀ (Tabela 32).

Extratos e frações	DL ₅₀ (µg/mL)	Intervalo de confiança 95% (µg/mL)
EH	4,90	3,03 < DL ₅₀ < 7,95
EM	277,36	214,27 < DL ₅₀ < 359,04
EMS	358,32	199,10 < DL ₅₀ < 644,86
FA	253,29	196,08 < DL ₅₀ < 327,20
FHM	336,14	285,30 < DL ₅₀ < 396,04

Tabela 32: Resultado da toxicidade frente à *Artemia salina* dos extratos e frações de *Duguetia riparia*.

Nota: EH: extrato hexânico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EM: extrato metanólico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EMS: extrato metanólico solúvel dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FA: fração alcaloídica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FHM: fração hidrometanólica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

O resultado mais promissor, entre os extratos testados foi o obtido com o extrato hexânico (EH), que apresentou DL₅₀ = 4,9 µg/mL. Segundo Dolabela (1997), este resultado é indicativo da existência de uma correlação positiva com atividade antitumoral.

Os demais extratos (EM e EMS) e as duas frações testadas (FA e FHM), apesar de apresentarem DL₅₀ maiores que 200 µg/mL, são considerados, por Ferrigni et al. (1984) e Meyer et al. (1982), substratos capazes de conterem compostos com atividade biológica, pois os valores obtidos da DL₅₀ foram menores que 1000 µg/mL.

4. 2. 2 – Atividade leishmanicida

Tanto os extratos (hexânico, metanólico e metanólico solúvel) quanto às frações (hidrometanólica e alcaloídica) obtidas dos galhos finos de *Duguetia riparia* foram testadas

frente às cepas de *Leishmania amazonensis* nas concentrações de 40, 80, 160 e 320 µg/mL, utilizando-se a pentamidina como substância padrão ($DL_{50} = 12 \mu\text{g/mL}$).

Analisando-se os gráficos das porcentagens de inibição de cada amostra testada frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, notou-se a existência de correlação positiva entre essa grandeza e as concentrações analisadas (Figuras 55 e 56).

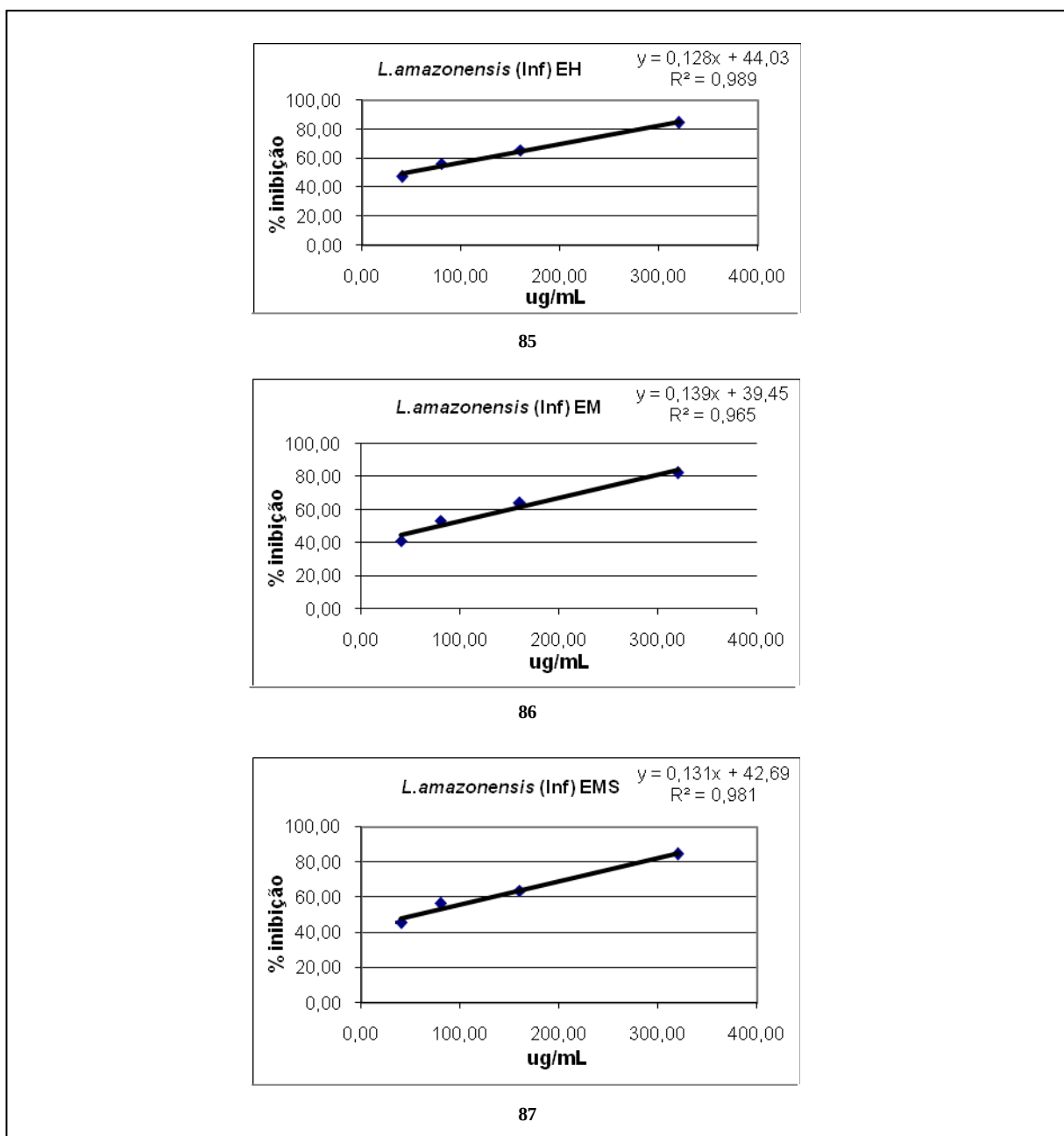


Figura 55: Curvas de inibição dos extratos brutos dos galhos finos de *Duguetia riparia* testados frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*: extrato hexânico (85), extrato metanólico (86) e extrato metanólico solúvel (87).

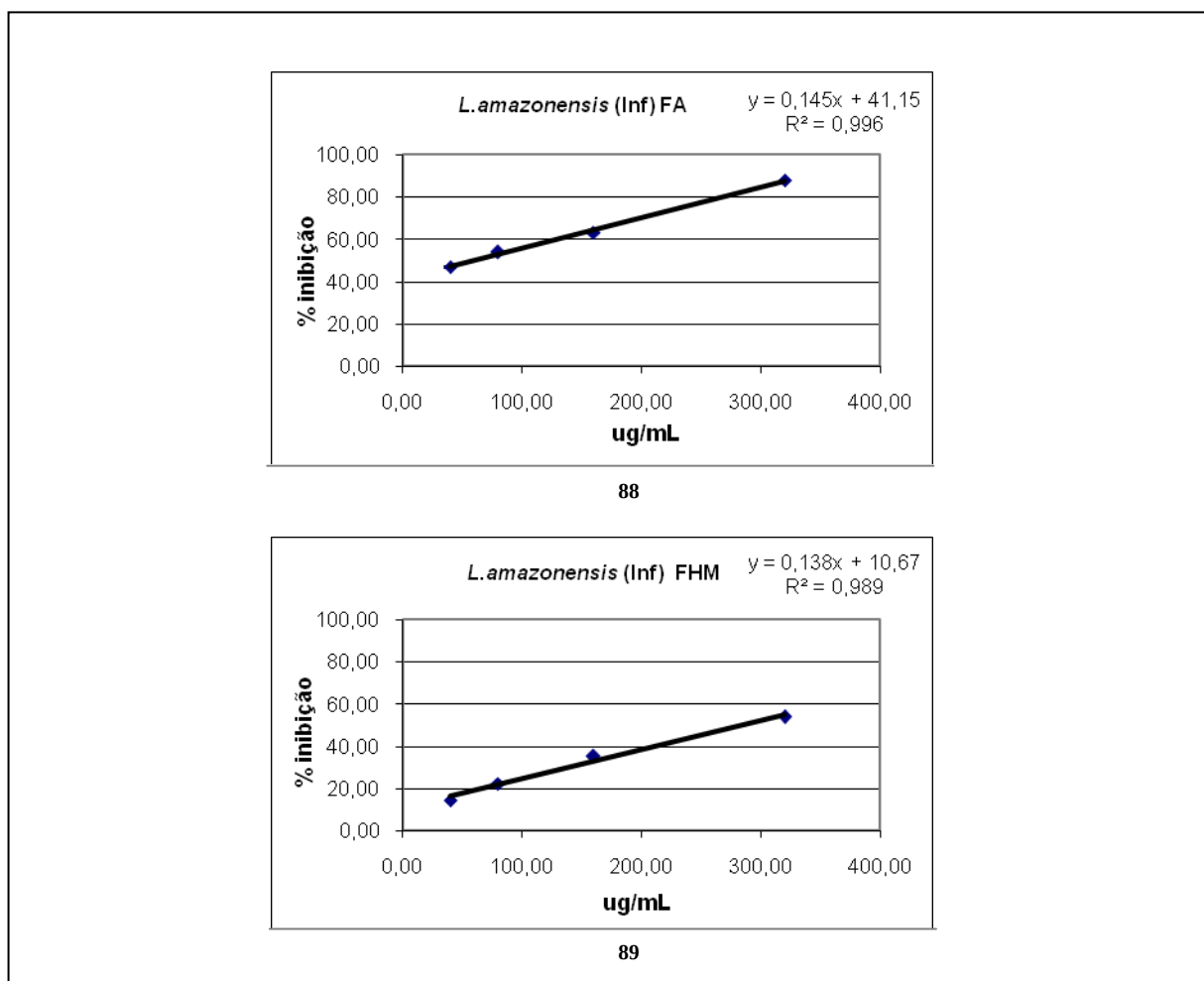


Figura 56: Curvas de inibição das frações dos galhos finos de *Duguetia riparia* testadas frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*: fração alcaloídica (88) e fração hidrometanólica (89).

Atribuindo-se o valor 50 aos y das equações da reta obtidas nos gráficos de percentagem de inibição, obtiveram-se as DL_{50} de cada amostra testada (Tabela 33).

Amostra	DL_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
EH	46,4
EM	75,9
EMS	55,5
FA	61,0
FHM	285,0

Tabela 33: Resultado da DL_{50} das amostras testadas frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Nota: EH: extrato hexânico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EM: extrato metanólico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EMS: extrato metanólico solúvel dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FA: fração alcaloídica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FHM: fração hidrometanólica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

Através dos valores das DL_{50} , notou-se, com exceção da fração hidrometanólica, que apresentou DL_{50} de 285 $\mu\text{g/mL}$, que as amostras testadas apresentaram resultado inibitório significativo frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, sendo o extrato hexânico o resultado mais promissor.

Comparando-se os valores das DL_{50} do extrato metanólico solúvel (55,5 $\mu\text{g/mL}$) e da fração alcaloídica (61,0 $\mu\text{g/mL}$), com a DL_{50} do extrato metanólico (75,9 $\mu\text{g/mL}$), se verificou aumento do potencial inibitório das duas primeiras amostras com relação à última, sugerindo que os fitoconstituintes, presentes no extrato bruto, responsáveis pela atividade leishmanicida, permaneceram com suas estruturas intactas após os processos de partição que foram submetidos, visto que as duas primeiras amostras foram originadas deste último.

Com relação à fração hidrometanólica, obtida da partição do extrato hexânico, se verificou um aumento da DL_{50} , indicando a possível ausência ou diminuição da concentração dos constituintes bioativos presentes no extrato original ou sugerindo possível efeito sinérgico entre os mesmos.

4. 2. 3 – Atividade larvicida frente ao mosquito *Aedes aegypti*

Geralmente, os métodos descritos na literatura para avaliar a atividade larvicida de determinada amostra consiste em testá-la frente às larvas escolhidas em, pelo menos, cinco concentrações diferentes para obtenção da DL_{50} . Muitos autores realizam testes preliminares fixando uma concentração máxima tolerada para a escolha das concentrações a serem trabalhadas.

Neste trabalho, como descrito anteriormente, os extratos e frações da espécie em estudo foram preparadas, inicialmente, na concentração de 300 ppm e deixadas em contato com larvas de 3º instar do mosquito *Aedes aegypti* durante 24, 48 e 72 horas. Através desta metodologia observou-se que as amostras analisadas apresentaram inatividade frente a larvas do mosquito escolhido para o ensaio (Tabela 34).

% Média de Mortalidade das Larvas de <i>Aedes aegypti</i> (300 ppm)					
Tempo de Exposição	EH	EM	EMS	FA	FHM
24 horas	0,0	6,67	0,0	0,0	13,3
48 horas	0,0	20,0	13,3	6,67	20,0
72 horas	13,3	13,3	0,0	6,67	13,3

Tabela 34: Percentagem média de mortalidade das larvas de *Aedes aegypti* frente aos extratos e frações testados.

Nota: EH: extrato hexânico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EM: extrato metanólico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EMS: extrato metanólico solúvel dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FA: fração alcaloídica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FHM: fração hidrometanólica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

4. 2. 4 – Capacidade capturadora de radicais livres

4. 2. 4. 1 – Método qualitativo

A avaliação preliminar qualitativa dos extratos hexânico, metanólico e metanólico solúvel, e das frações alcaloídica e hidrometanólica por CCD em gel de sílica, revelada com solução metanólica a 0,4 mM do radical DPPH, sugeriu a presença de substâncias com atividade antioxidante, evidenciadas nas cromatoplacas pela presença de manchas esbranquiçadas sob fundo púrpuro, resultantes da redução do radical DPPH (Figura 57).

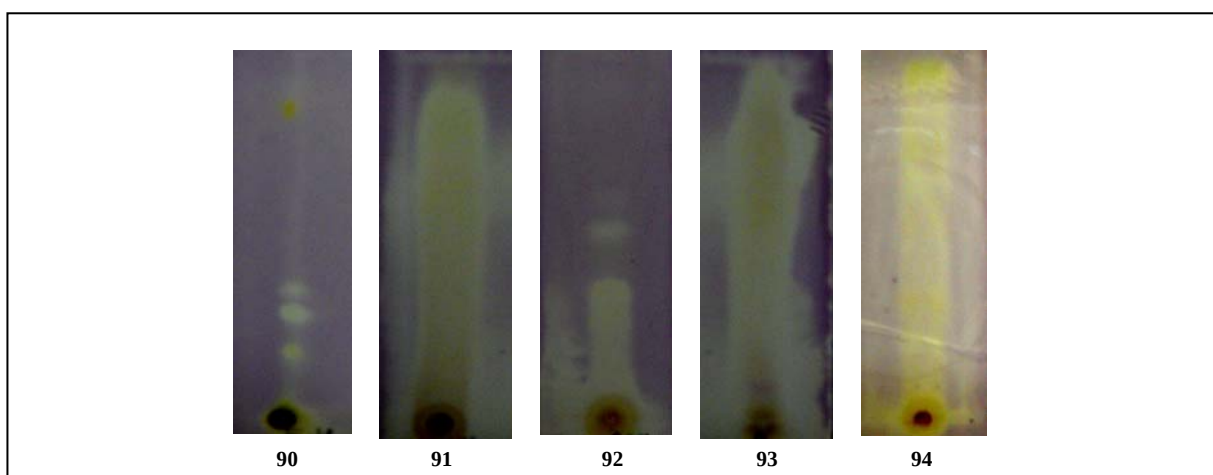


Figura 57: Cromatoplacas das amostras testadas logo após contato com DPPH, indicando a presença de compostos antioxidantes: Extrato hexânico (90), extrato metanólico (91), extrato metanólico solúvel (92), fração alcaloídica (93) e fração hidrometanólica (94).

4. 2. 4. 2 – Método quantitativo (espectrofotométrico)

Visto que os testes preliminares (método qualitativo) apresentaram resultados satisfatórios, os extratos e frações em estudo foram avaliados quanto à atividade capturadora de radicais livres e as médias dos valores percentuais de redução de DPPH para cada amostra, nas três concentrações testadas, foram descritas na tabela 35.

Amostra	1 µg/mL	10 µg/mL	100 µg/mL
EH	38,2	41,8	79,2
EM	42,6	90,5	94,5
EMS	34,1	50,5	94,9
FA	47,6	77,3	91,2
FHM	37,4	38,4	42,6

Tabela 35: Valores relativos às médias do percentual de redução de DPPH dos extratos e frações estudados, em três distintas concentrações.

Nota: EH: extrato hexânico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EM: extrato metanólico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EMS: extrato metanólico solúvel dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FA: fração alcaloídica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FHM: fração hidrometanólica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

Analisando a percentagem de inibição, por ordem crescente de concentração, se observou a existência de correlação positiva entre ambos, ou seja, à medida que se aumenta a concentração das amostras testadas, também ocorre aumento da percentagem de inibição do DPPH.

Observou-se também que na concentração de 1 µg/mL, nenhuma das amostras apresentaram percentual de inibição maior que 50%. Na concentração de 10 µg/mL, apenas o extrato metanólico e a fração alcaloídica apresentaram uma inibição significativa e superior a 50%. Já na concentração de 100 µg/mL, apenas a fração hidrometanólica apresentou inibição inferior a 50%.

Em linhas gerais, pode-se afirmar que a fração alcaloídica e o extrato metanólico foram as amostras que apresentaram melhor resultado de inibição ao DPPH, fato este que refletiu no valor da CE₅₀ encontrado após tratamento estatístico utilizando-se o programa

probitos de análise, 1,15 µg/mL para a fração alcaloídica e 1,22 µg/mL para o extrato metanólico (Tabela 36).

Com relação às demais amostras analisadas, observou-se que o extrato metanólico solúvel apresentou melhor resultado de CE_{50} (4,31 µg/mL) quando comparado ao extrato hexânico (6,99 µg/mL) e à fração hidrometanólica, que por apresentar valores baixos de inibição ao DPPH não gerou dados homogêneos para o cálculo de sua CE_{50} pelo programa estatístico empregado.

Extratos e frações testadas	CE_{50} (µg/mL)
EH	6,99
EM	1,22
EMS	4,31
FA	1,15
FHM	*

Tabela 36: Concentração efetiva necessárias para descolorir 50% da solução de DPPH (CE_{50}).

(*) Amostra que não gerou dados homogêneos para o cálculo da CE_{50} .

Nota: EH: extrato hexânico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EM: extrato metanólico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EMS: extrato metanólico solúvel dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FA: fração alcaloídica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FHM: fração hidrometanólica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

4. 2. 5 – Determinação de fenólicos totais

Os resultados encontrados no ensaio de determinação de fenólicos totais pelo método Folin-Ciocalteu, expresso como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama dos extratos brutos testados e por grama das frações analisadas, foram apresentados na tabela 37. Os cálculos para a obtenção da concentração de fenólicos totais nas amostras testadas foram realizados através da equação da reta $y = 5,007x - 0,0025$ originada da curva de calibração construída com soluções padrões de ácido gálico (0,5; 0,25; 0,125; 0,0625 e 0,03125 µg/mL) (Figura 58).

Extratos e frações testadas	Fenólicos totais (mg EAG/g)
EH	46,63
EM	249,75
EMS	52,03
FA	79,72
FHM	11,98

Tabela 37: Concentração de fenólicos totais presentes nas amostras testadas.

Nota: EH: extrato hexânico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EM: extrato metanólico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EMS: extrato metanólico solúvel dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FA: fração alcaloídica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FHM: fração hidrometanólica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

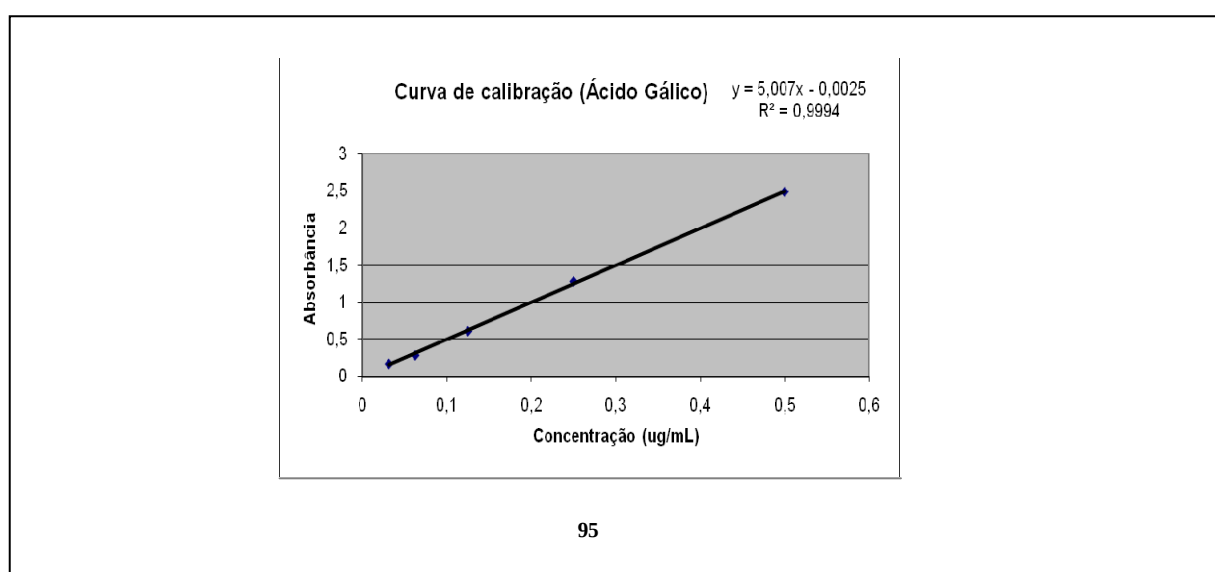


Figura 58: Curva de calibração utilizada no teste de determinação de fenólicos totais.

Pelos valores apresentados na tabela 37, podemos notar que, com exceção da fração hidrometanólica (FHM), todas as amostras apresentaram uma concentração de fenólicos totais significativa. Dentre essas, verificamos que o menor teor foi registrado no extrato hexânico (46,63 mg EAG/g) e o maior teor, no extrato metanólico (249,75 mg EAG/g).

Observou-se correlação negativa entre a concentração de fenólicos totais e a CE_{50} do extrato hexânico, extrato metanólico solúvel e fração alcaloídica, sugerindo que, provavelmente, a atividade antioxidante das referidas amostras está diretamente ligada à presença de compostos fenólicos totais. Já o extrato metanólico não segue o mesmo comportamento descrito nas amostras anteriores, o que leva a acreditar que a ação

seqüestradora de radicais livres desta amostra está, de certa maneira, ligada à existência de determinado constituinte químico (Tabela 38).

Extratos e frações testadas	CE ₅₀ (µg/mL)	Fenólicos totais (mg EAG/g)
EH	6,99	46,63
EM	1,22	249,75
EMS	4,31	52,03
FA	1,15	79,72
FHM	*	11,98

Tabela 38: Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante (CE₅₀) das amostras testadas.

(*) Amostra que não gerou dados homogêneos para o cálculo da CE₅₀.

Nota: EH: extrato hexânico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EM: extrato metanólico dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

EMS: extrato metanólico solúvel dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FA: fração alcaloídica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.

FHM: fração hidrometanólica dos galhos finos da espécie *Duguetia riparia*.



Duguetia riparia
Fonte: Livia Cunha / Socorro Teodora

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Após o término do trabalho realizado com os galhos finos da espécie *Duguetia riparia*, espécie essa estudada pela primeira vez, foi possível concluir que a metodologia empregada no estudo fitoquímico se mostrou adequada, já que resultou no isolamento e identificação dos alcalóides liriodenina (marcador quimiotaxonômico da família Annonaceae), oxoputerina, lisicamina e asimilobina e que os demais ensaios realizados evidenciaram ser a espécie estudada uma matéria-prima promissora na obtenção de novos fitoterápicos, haja vista que o extrato hexânico apresentou, pelo teste de toxicidade frente a *Artemia salina*, DL₅₀ compatível com uma possível atividade antitumoral (DL₅₀ = 4,9 µg/mL); resultado inibitório significativo frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (DL₅₀ = 46,4 µg/mL) e boa atividade antioxidante (CE₅₀ = 6,99 µg/mL).

Também foi possível observar que os extratos metanólico e metanólico solúvel, bem como a fração alcaloídica apresentaram, além da atividade inibitória frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, resultados significativos quanto à capacidade capturadora de radicais livres (atividade antioxidante), destacando-se entre eles a fração alcaloídica, com CE₅₀ igual a 1,15 µg/mL e o extrato metanólico, com CE₅₀ igual a 1,22 µg/mL.



Duguetia riparia
Fonte: Livia Cunha/Socorro Teodora

REFERÊNCIAS

ACHENBACH, H.; HEMRICH, H. Alkaloids, flavonoids and phenylpropanoids of the west African plant *Oxymitra velutina*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 4, p. 1265-1267, 1991.

AKENDENGUE, B.; NGOU-MILAMA, E.; LAURENS, A.; HOCQUEMILLER, R. Recent advances in the fight against leishmaniasis with natural products. **Parasite**, v. 6, p. 3-8, 1999.

ALALI, F. Q.; LIU, X. X.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: recent progress. **Journal of Natural Products**, v. 62, p. 504-540, 1999.

ALMEIDA, J. R. G. S.; LÚCIO, A. S. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. de F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L. da. Alcalóides isolados de *Duguetia gardneriana* Mart. (Annonaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 28., 2005, Poços de Caldas.

ALTAMIRANO-ENCISO, A. J.; MARZOCHI, M. C. A.; MOREIRA, J. S.; SCHUBACH, A. O.; MARZOCHI, K. B. F. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v.10, n.3, set./dez., 2003.

BARATA, L. E. S.; SANTOS, L. S.; FERRI, P. H.; PHILLIPSON, J. D.; PAINE, A.; SIMON, L. C. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589-595, 2000.

BASSELIN, M.; LAWRENCE, F.; ROBERT-GERO, M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigotes. **Biochemical Journal**, v. 315, p. 631-634, 1996.

BATES, P. A. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic cultura. **Parasitology**, v. 108, p. 4-9, 1994.

BERMAN, J.D. Chemotherapy of Leishmaniasis: recent advances in the treatment of visceral disease. **Curr.Opin.Infec. Dis.**, v. 11, p. 707-710, 1998.

BORIES, C.; LOISEAU P.; CORTES, D.; MYINT, S. H.; HOCQUEMILLER, R.; GAYRAL, P.; CAVÉ, A.; LAURENS, A. Antiparasitic activity of *Annona muricata* and *Annona cherimolia* seeds. **Planta Medica**, v. 57, p. 434-436, 1991.

CAMARGO, L. M. A.; BARCINSK, M. A. Leishmanioses, feridas bravas e kalazar. **Ciência e Cultura**, v. 55, n. 1, jan./mar., 2003.

CAROLLO, C. A.; SIQUEIRA, J. M. de; GARCEZ, W. S.; DINIZ, R.; FERNANDES, N. G. N-nitrosoanonaine and N-nitrosoxylophine, aporphine alkaloids from *Duguetia furfuracea*. **Journal of Natural products**, v. 69, n. 8, p. 1222-1224, 2006.

CASTEDO, L.; GRANJA, J. A.; RODRIGUEZ DE LERA, A.; CARMEN VILLAYERDE, M. Alkaloids from *Guatteria goudotiana*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 8, p. 2781-2783, 1991.

CAVÉ, A.; LEBOEUF, M.; WATERMAN, P. G. The aporphinoid alkaloids of the Annonaceae. In: ALKALOIDS: CHEMICAL AND BIOLOGICAL PERSPECTIVES. New York: John Wiley, 1987. p. 134-270.

CHAN-BACAB, M. J.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Natural Products Reports**, v. 18, p. 674-688, 2001.

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

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

CHOI, C. W.; KIM, S. C.; HWANG, S. S.; CHOI, B. K.; AHN, H. J.; LEE, M. Y.; PARK, S. H.; KIM, S. K. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

COÊLHO, A. A. M. Análise inseticida de extratos de plantas do bioma cerrado sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegypti*. 2006. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília.

COSTA, E. V. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). 2004. 170 f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Curso de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003.

CROFT, S. L.; DAVIDSON, R. N.; THORNTON, E. A. Liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 28, SUPB, p. 111-118, 1991.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classifications of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981, 1262p.

DEBOURGES, D.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloïdes des annonacées, 77. Alcaloïdes de *Duguetia spixiana*. **Journal of Natural products**, v. 50, n. 4, jul./agost., p. 664-673, 1987.

DOLABELA, M. F. Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti-trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas. 1997. 100 f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Curso de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

FECHINE, I. M.; LIMA, M. A.; NAVARRO, V. R.; CUNHA, E. V. L. da; SILVA, M. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, J. G. S. Alcalóides de *Duguetia trunciflora* Maas (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, Supl., p. 17-19, 2002.

FECHINE, I. M.; NAVARRO, V. R.; CUNHA, E. V. L. da; SILVA, M. S.; MAIA, J. G. S.; BARBOSA-FILHO, J. M. Alkaloids and volatile constituents from *Duguetia flagellaris*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 30, p. 267-269, 2002.

FECHINE, I. M.; SILVA, M. S. da; CUNHA, E. V. L. da; BARBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F. Alcalóides isolados *Hornschuchia obliqua* (Annonaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, Supl., p. 121-122, 2002.

FERRIGNI, N. R.; McLAUGHLIN, J. L.; POWELL, R. G.; SMITH, C. R. Jr. Use of potato discs brine shrimp bioassay to detect activity and isolate piceatannol as the antileukemic principle from the seeds of *Euphorbia lagascae*. **Journal of Natural Products**, v. 47, n. 2, p. 347-352, 1984.

FINNEY, D. J. **Probits analysis**. 3 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1974, 77p.

FISCHER, D. C. H.; GONÇALVES, M. I.; OLIVEIRA, F.; ALVARENGA, M. A. Constituents from *Siparuna apiosyce*. **Fitoterapia**, v. 70, p. 322-323, 1999.

FRIES, R. E. Annonaceae In: DIE NATÜRLICHEN PFANZENFAMILIEN. Berlin, 1959. p. 1-171.

GALOTTA, A. L. Q. A. Estudo químico e farmacológico da espécie *Euterpe precatoria* (Martius) Arecaceae. 2005. 341f. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

GEMTCHÚJNICOV, I. D. **Manual de taxonomia vegetal: plantas de interesse econômico**. São Paulo: Editora Agronômica Ceres, 1976.

GOTTIELIEB, O. R.; MORS, N. B. Potencial utilization of brazilian wood extractives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 28, p. 196-215, 1980.

GRIMALDI, G.; TESH, R.B. Leishmaniasis oh the New World: current concepts and implications for future research. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 6, p.230-250, 1993.

GUZMÁN, M. G.; KOURI, G. Dengue: an update. **Lancet Infectious Diseases**, v. 2, p. 33-42, 2001.

HENRIQUES, A. T.; KERBER, V. A.; MORENO, P. R. H. Alcalóides: generalidades e aspectos básicos In: FARMACOGNOSIA: DA PLANTA AO MEDICAMENTO. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, 1999. p. 641-656.

HEYWOOD, V. H. **Flowering Plants of the World**. Oxford: University Press, 1978, p 30-31.

HOEHNE, F. C.; KUHLMANN, M.; HANDRO, O. **O Jardim Botânico de São Paulo**. São Paulo: Secretaria da agricultura, indústria e comércio de São Paulo, 1941.

HUTCHINSON, J. **The genera of flowering plants**. Oxford: University Press, 1964, 516p.

JOLAD, S. D.; HOFFMANN, J. J.; SCHRAM, K. H.; COLE, J. R. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **J. Org. Chem.**, v. 47, n. 16, p. 3151-3153, 1982.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Nacional, 1993, p. 286-289.

KAMPERDICK, C.; HONG VAN, N.; VAN SUNG, T. Constituents from *Miliusa balansae* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, dez., p. 991-994, 2002.

LAINSON, R.; SHAW, J. J.; READY, P. D.; MILES, M. A.; PÓVOA, M. Leishmaniasis in Brazil XVI. Isolation and identification of *Leishmania* species from sand flies, wild mammal and man in north. Pará state with particular reference to *Leishmania braziliensis guyanensis*, causative agent of “pian-bois”. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 4, p.530-536, 1981.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution, classification and geographical distribution. In: THE LEISHMANIASIS. London: Acad. Press Inc., 1987. p.100-128.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIX, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LIGON, B. L. Dengue fever and dengue hemorrhagic fever: a review of the history, transmission, treatment and prevention. **Seminars in Pediatric Infectious Diseases**, v. 16, p. 60-65, 2005.

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

MAHIOU, V.; ROBLOT, F.; FOURNET, A.; HOCQUEMILLER, R. Bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Guatteria boliviana* (Annonaceae). **Phytochemistry**, v. 54, n. 7, p. 709-716, 2000.

MARCONDES, C. B. **Entomologia médica e veterinária**. São Paulo: Atheneu, 2001, 432p.

MASS, P. J. M. et al. **Flora neotropica: *Duguetia* (Annonaceae)**. New York: Organization for Flora Neotropica (Botanical Garden), 2003, p. 186-189.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2 ed. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 1998, 141 p.

McLAUGHLIN, J. L. Grown-gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fraction In: **METHODS IN PLANT BIOCHEMISTRY**. London, 1991. p. 1-32.

McLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. Simple bench-top Biossays (brine shrimp and potato disk) for the Discovery of Plant Antitumorcoumpounds In: **HUMAN MEDICINAL AGENTS FROM PLANTS**. Balandrini, 1993. p. 113-117.

MERCK. **Dyeing reagents for thin layer and paper chromatography**. Germany: E. Merck, 1971, 118 p.

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 activity plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MIRANDA, J. C.; REIS, E.; SCHRIEFER, A.; GONÇALVES, M.; REIS, M. G.; CARVALHO, L.; FERNANDES, O.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Frequency of infection of *Lutzomyia phlebotomines* with *Leishmania braziliensis* in a Brazilian endemic area as assessed by pinpoint capture and polymerase chain reaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 2, p.185-188, 2002.

MONTENEGRO, L. H. M.; OLIVEIRA, P. E. S.; CONSERVAL, L. M.; ROCHA, E. M. M.; BRITO, A. C.; ARAÚJO, R. M.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, R. P. L. Terpenóides e avaliação do potencial antimalárico, larvicida, anti-radicalar e anticolinesterásico de *Pouteria venosa* (Sapotaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, Supl., dez., p. 611-617, 2006.

MUHAMMAD, I.; DUNBAR, D. C.; TAKAMATSU, S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Antimalarial, cytotoxic and antifungal alkaloids from *Duguetia hadrantha*. **Journal of Natural products**, v. 64, n. 5, p. 559-562, 2001.

MURILO, J.; RESTREPO, D. **Las anonáceas de la región de Araracuara. Estudios en la Amazonia Colombiana XX**. Bogotá: Soporte Editorial, 2000, 218p.

NASCIMENTO, F. C.; BOAVENTURA, M. A. D.; ASSUNÇÃO, A. C. S.; PIMENTA, L. P. Acetogeninas de anonáceas isoladas de folhas de *Rollinia laurifolia*. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 319-322, 2003.

OLLIARO, P.L.; BRYCESON, A.D.M. Pratical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 323-328, 1993.

OMAR, S.; LENG, C.; AHMAD, F.; JIU, X. N.; JABER, H.; HUANG, J.; NAKATSU, T. Phenanthrene lactams from *Goniothalamus velutinus*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 12, p. 4395-4397, 1992.

PAULINO NETO, H. F.; OLIVEIRA, P. E. A. M. As anonáceas e os besouros. **Revista Ciência Hoje**, v. 38, mar., p. 59-61, 2006.

PAULO, M. Q.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LIMA, E. O.; MAIA, R. F.; BARBOSA, R. C. B. B. C.; KAPLAN, M. A. C. Antimicrobial activity, of benzyloquinoline alkaloids from *Annona salzmanii* D. C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, p. 39-41, 1992.

PEREIRA, G. F. M.; FONSECA, H. H. R. Leishmaniose tegumentar americana: epidemiologia e controle. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, n. supl., p. 45-50, 1994.

PÉREZ, E.; SÁEZ, J.; BLAIR, S.; FRANCK, X.; FIGADERE, B. Isoquinoline alkaloids from *Duguetia vallicola* stem bark with antiplasmodial activity. **Letters in Organic Chemistry**, v. 1, n. 1, p. 102-104, 2004.

PINTO, C. A.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 25, n. supl. 1, p. 45-61, 2002.

PRANCE, G. T. **Árvores de Manaus**. Manaus: INPA, 1975.

RABELO, D. de M. Estudo fitoquímico e biológico de *Guatteria citriodora* Ducke. 2008. 98f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Curso de Pós-Graduação em Química de Produtos Naturais, Universidade Federal do Amazonas, Manaus.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESUS, M. N. de; MARZAL, P. C.; JUNIOR, H. F. A.; TEMPONE, G. A. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C. **Flora da reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999, 816p.

ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A. Alcaloïdes des Annonacées XLIV. Alcaloïdes de *Duguetia obovata*. **Journal of Natural Products**, v. 46, n. 6, nov./dez., p. 862-873, 1983.

RODRÍGUEZ, M.; HASEGAWA, M.; MÉNDEZ, J.; PEREIRA, G.; ARVELO, F. Bioactive oxoaporphine alkaloids from *Guatteria calva*. **Fitoterapia**, n. 70, p. 74-76, 1999.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; McLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: a review. **Journal of Natural Products**, v. 53, n. 2, p. 237-278, 1990.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE, T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 19, n. 3, p. 195-200, 1986.

SÁNCHEZ, M. **Catálogo preliminar comentado de la flora del medio Coquetá. Estudios en la Amazonía Colombiana XII**. Bogotá: Impreandes Presencia, 1997, 557p.

SANTOS, L. P. Estudo químico e biomonitorado das sementes de *Annona crassiflora* (Annonaceae) objetivando o isolamento. 1995. Tese (Doutorado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

SANTOS, P. R. D. dos; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal Braz. Chem. Soc.**, v. 14, n. 3, p. 396-400, 2003.

SHI, G.; MacDOUGAL, J. M.; McLAUGHLIN, J. L. Bioactive annonaceous acetogenins from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 4, p. 719-723, 1997.

SILVA, D. B. da; MATOS, M. de F. C.; NAKASHITA, S. T.; MISU, C. K.; YOSHIDA, N. C.; CAROLLO, C. A.; FABRI, J. R.; MIGLIO, H. da S.; SIQUEIRA, J. M. Isolamento e avaliação da atividade citotóxica de alguns alcalóides oxaporfínicos obtidos de Annonaceae. **Química Nova**, v. 30, n. 8, p. 1809-1812, 2007.

SILVEIRA, A. J. de A. Alcalóides isoquinolínicos de *Duguetia pycnastera*. 1994. 90 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Pará, Belém.

SIMÕES, C. M. **Farmacologia da planta ao medicamento**. 3 ed. Santa Catarina: Editora da UFRGS, 2001, 833p.

SIQUEIRA, J. M. de; BOMM, M. D.; PEREIRA, N. F. G. Estudo fitoquímico de *Unonopsis lindmanii* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade sobre a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 557-559, 1998.

SIQUEIRA, J. M. de; ZIMINIANI, M. G.; RESENDE, U. M.; BOAVENTURA, M. A. D. Estudo fitoquímico das cascas de *Duguetia glabriuscula* – Annonaceae, biomonitorado pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24, n. 2, p. 185-187, 2001.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 2, abr./jun., 2004.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; VIEIRA-Jr, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TORRES, O.; SANTAFE, G.; ANGULO, A.; VILLA, H.; ZULUAGA, J.; DORIA, M. Obtención de alcalóides a partir de corteza y madera de La especie *Rollinia pittieri* (Annonaceae). **Scientia et Technica Año XIII**, n. 33, may., p. 333-336, 2007.

URBINA, J. Lipid biosynthesis pathway as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. S91-S99, 1997.

VINATEA, J. E. Artemia um ser excepcional. **Panorama de Aqüicultura**, v. 25, p. 8-9, 1994.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKI, E. M. **Plant Drug Analysis Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München**. 1996, 320p.

WANG, Z. W.; MA, W. W.; McLAUGHLIN, J. L.; GUPTA, M. P. 2,4,5-trimethoxystyrene, a bioactive component of the bark of *Duguetia panamensis*. **Journal of Natural Products**, v. 51, n. 2, mar./apr., p. 382-384, 1988.

WU, Y. C.; CHANG, G. Y.; DUTH, C. Y.; WANG, S. K. Cytotoxic alkaloids of *Annona montana*. **Phytochemistry**, v. 33, n. 2, p. 497-500, 1993.