



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA**  
**COORDENAÇÃO DE QUÍMICA BACHARELADO**

**MATHEUS HENRIQUE OLIVEIRA DE SOUSA**

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
DE *Annona mucosa* Jacq.**

**São Luís**

**2017**

**MATHEUS HENRIQUE OLIVEIRA DE SOUSA**

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
DE *Annona mucosa* Jacq.**

Monografia apresentada a Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências da Coordenação do Curso de Química Bacharelado para a obtenção do título de Bacharel em Química.

**Orientadora:** Profa. Dra. Joselene Ribeiro de Jesus Santos

**São Luís**

**2017**

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).  
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Sousa, Matheus Henrique Oliveira de.

Prospecção fitoquímica, identificação e avaliação da atividade microbiológica de metabólitos secundários de *Annona mucosa* Jacq / Matheus Henrique Oliveira de Sousa. - 2017.

84 f.

Orientador(a): Joselene Ribeiro de Jesus Santos.

Monografia (Graduação) - Curso de Química, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2017.

1. Alcaloides. 2. *Annona mucosa* Jacq. 3. Atividade microbiológica. 4. Flavonoides. 5. Prospecção fitoquímica. I. Santos, Joselene Ribeiro de Jesus. II. Título.

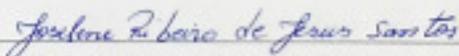
MATHEUS HENRIQUE OLIVEIRA DE SOUSA

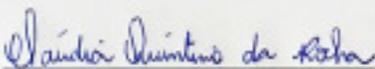
PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, IDENTIFICAÇÃO E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS  
DE *Annona mucosa* Jacq.

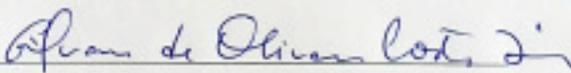
Monografia apresentada a Universidade Federal do Maranhão, como parte das exigências da Coordenação do Curso de Química Bacharelado para a obtenção do título de Bacharel em Química.

Orientadora: Profª. Dra. Josclene Ribeiro de Jesus Santos

APROVADA EM: 22/ dezembro / 2017

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Josclene Ribeiro de Jesus Santos – UFMA  
(Orientadora)

  
\_\_\_\_\_  
Profª. Dra. Cláudia Quintino da Rocha – UFMA

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Gilvan de Oliveira Costa Dias – UFMA

Dedico este trabalho aos meus super-heróis, que me  
salvaram sempre que eu estive em perigo:

Minha mãe Maria, meu irmão Thyago, e minhas amigas  
Dani, Jeiza e Marta...

Nada no mundo pode pagar o que eu devo a vocês,  
obrigado pelos conselhos, companheirismo e pelas  
boas horas jogadas fora

“Olhe dentro de você...

O que você vê?

Seria sua alma uma luz que se esgota?

Fortalecida pela fúria,

Endurecida pelo fogo?

Busque profundamente...

Quem será você?”

(Lux Elementalista, League of Legends)

## AGRADECIMENTOS

Ao Universo, pela vida, sustento, e todas as oportunidades randômicas geradas que me levaram por todo o caminho ao longo dessa jornada. A minha “lua e estrelas”, por me guiar nas noites mais escuras, quando o que restava era apenas admirar aquele ponto brilhante indicando o caminho a seguir.

Agradeço ao meu “primeiro par de pais”, Maria e Paulo, que sempre foram meu referencial de força, dedicação e amor verdadeiro. Agradeço pelos longos anos de cuidado e carinho, pela educação e conselhos dados, pelas longas horas de conversa. Obrigado por sempre me ouvirem e me mostrarem que nenhum problema é grande demais que não possa ser resolvido. Obrigado por sempre acreditarem em cada um dos meus sonhos, me motivando a ir cada vez mais a lugares nunca antes imaginados. Certamente sem essa crença cega eu não teria chegado até aqui, isso tudo é fruto de tudo que vocês me ensinaram.

Agradeço ao meu “segundo par de pais”, Naldiane e Uiramar, pelo suporte dado quando eu e meu irmão precisamos. Não há uma única janela para que consigamos ver o lado de fora, existem milhares delas, obrigado por me ensinarem a ver o meu mundo tridimensional por outros ângulos, outras janelas.

Ao meu irmão, Thyago, por ser a pessoa que me deixou infesta-lo de coisas relacionadas a química todos os dias e todas as horas ao longo dos anos na graduação, por sempre ouvir todas as vezes que eu precisei explicar para alguém o que eu desenvolvia de pesquisa e dedicava horas a fio. Agradeço por dividir todos os ensinamentos que essa vida nos permite dividir. Obrigado por seus conselhos, suas filosofias de vida, e por embarcar em todos os meus planos mirabolantes.

A minha grandiosíssima amiga, Danielle, que considero como irmã, por sempre conversar comigo sobre os mais diversos problemas, dos mais leves aos mais densos, complicados, perigosos e me acompanhar desde sempre me incentivando todos os dias a ser o melhor que eu posso, em todos os sentidos. Obrigado por ser minha psicóloga-designer preferida, e por me ajudar a desenrolar a bola de lã de dilemas que eu sempre crio, as vezes com uma tesoura, para cortar essas coisas fora, ou simplesmente me dando ajuda para desembaraçar o emaranhado de linhas. Obrigado por sempre estar disponível, e por nunca me cobrar nada pelos seus serviços!

Aos meus companheiros de curso de modo geral, e em mais que especial as minhas amigas Jeizilda (Jeiza Freitas) e Martonilda (Marta Diniz) por me acompanharem quando o trem saiu do trilho, me ajudarem a coletar as coisas que restaram e por terem sido as melhores pessoas que eu encontrei nessa vida. Obrigado pelos “cafés com biscoito” nos fins de tarde, e por todas as conversas que entremearam esse processo. O que nós construímos foi rápido, mas é forte para sobreviver a qualquer coisa que vier no nosso caminho. Obrigado principalmente por todos vocês terem me aturado todos os dias, sou bastante complicado, principalmente se privado de sono e/ou sobrecarregado de trabalho.

Agradeço a professora Joselene, minha orientadora, segunda mãe e exemplo de vida acadêmica, por toda a confiança, por ter me ensinado grande parte do que sei sobre orgânica, por acreditar no meu potencial, e por ter me inserido no grupo de pesquisa que permitiu que esse trabalho nascesse. Obrigado pelo investimento de tempo, pelas explicações, puxões de orelha, aconselhamento e orientação que me guiaram e direcionaram ao longo desses anos de graduação. Espero ser pelo menos metade de tudo que você conseguiu ser.

Agradeço aos meus professores de orgânica, Roberto Sigfrido e Francisca Taveira, por terem compartilhado comigo uma fração de todo o conhecimento de vocês sobre química orgânica e por terem sido meus exemplos motivadores. Sem essa ajuda eu muito provavelmente não teria escolhido a longa missão de ser um químico orgânico como vocês.

A professora Cláudia, por ter me ajudado com as análises de massas, por ter me mostrado como a cromatografia pode ser ainda mais divertida, por ter levado minhas amostras para conhecer o mundo e realizar todos os tipos de testes que é possível de se imaginar. Obrigado pelas conversas e aconselhamentos sobre o futuro acadêmico, pela ajuda em geral com o meu trabalho e por toda a assistência prestada aos problemas que foram aparecendo durante o período da graduação.

A professora Patrícia, do Laboratório de microbiologia clínica - LABMIC da UFMA, por ter cedido o espaço e os alunos para a realização das análises microbiológicas realizadas. Agradeço também às alunas de mestrado Nadine e em especial a Emmeline, que me ajudou a entender melhor como funcionam as análises microbiológicas e por ter doado parte desse conhecimento para mim durante os dias que eu passei no laboratório de microbiologia.

## RESUMO

O presente trabalho descreve os resultados obtidos para os estudos fitoquímico e microbiológico do extrato hidroetanólico a 70%, suas frações e metabólitos isolados a partir das folhas do Biribazeiro (*Annona mucosa* Jacq.). Inicialmente realizou-se a preparação do extrato hidroetanólico (70%) das folhas do vegetal e uma triagem fitoquímica em busca dos metabólitos secundários de estudo. Os testes confirmaram a presença de taninos, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, leucoantocianidinas, antocianidinas, esteroides livres, saponinas e alcaloides. Em seguida realizou-se o fracionamento orgânico do extrato bruto, e através de cromatografia em camada delgada da fração clorofórmica realizou-se a separação de misturas de alcaloides e flavonoides que foram identificados, através de técnicas hífenadas de LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, como o alcaloide romucosina e a antocianidina delfinidina-3-O-β-glucopiranosídeo. Além do isolamento e identificação de metabólitos secundários, esse trabalho apresenta resultados para a avaliação microbiológica através da técnica de difusão em meio sólido de perfuração em poços com amostras do extrato hidroetanólico 70% bruto bem como de frações e metabólitos isolados. Através desses ensaios foram obtidos resultados satisfatórios frente a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC e ao fungo *Candida albicans* e ao isolado clínico de *Salmonella spp* atribuindo-se essas atividades aos alcaloides e flavonoides identificados. Os resultados fitoquímicos obtidos corroboram a identificação botânica da espécie estudada *Annona mucosa* Jacq. como pertencente à família *Annonaceae*, devido a presença de substâncias que são comumente encontradas em vegetais pertencentes a essa família e através da avaliação microbiológica como importante fonte de substâncias químicas na produção de novos medicamentos.

**Palavras chave:** prospecção fitoquímica, alcaloides, flavonoides, atividade microbiológica, *Annona mucosa* Jacq.

## ABSTRACT

The present work describes the results obtained for the phytochemical and microbiological studies of the hydroethanolic extract (70%), its fractions and isolated metabolites from the leaves of the Biribazeiro (*Annona mucosa* Jacq.). Initially, a preparation of the hydroethanolic extract (70%) was done from the leaves of the plant and a phytochemical screening in search of the interest secondary metabolites. The test confirmed the presence of tannins, flavonols, flavanones, xanthenes, leucoantocianidines, anthocyanidins, free steroids, saponins and alkaloids. Then the crude extract was partitioned and from the chloroform fraction was made the separation of alkaloids and flavonoids mixtures by thin layer chromatography (TLC) techniques, and the compounds were identified by hyphenated techniques such as HPLC-ESI-IT-MS/MS and FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, as the alkaloid romucosin, and the anthocyanidin delphinidine-3-O- $\beta$ -glucopyranoside. In addition to the isolation and identification of secondary metabolites, this work also presents results for a microbiological evaluation through agar diffusion method with the crude hydroalcoholic extract, fractions and isolated metabolites samples. Though this was observed satisfactory results against the bacterium *Staphylococcus aureus* ATCC and the fungus *Candida albicans* and clinical isolates of *Salmonella* spp. attributing these activities to identified alkaloids and flavonoids. The phytochemical results corroborate the botanical identification of the studied species *Annona mucosa* Jacq. as belonging to the *Annonaceae* family, through the occurrence of metabolites common to this family, and through microbiological evaluation as an important source of chemicals in the production of new drugs.

**Keywords:** phytochemical prospection, alkaloids, flavonoids, microbiological activity, *Annona mucosa* Jacq.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Princípios ativos de fármacos obtidos de produtos naturais.....	18
<b>Figura 2:</b> Princípios ativos de medicamentos anticancerígenos e antineoplásicos obtidos de metabólitos secundários.....	19
<b>Figura 3:</b> Distribuição geográfica da família <i>Annonaceae</i> .....	21
<b>Figura 4:</b> Distribuição geográfica do gênero <i>Annona</i> .....	24
<b>Figura 5:</b> Metabólitos secundários isolados do gênero <i>Annona</i> .....	25
<b>Figura 6:</b> Rotas biossintéticas do metabolismo secundário de vegetais.....	26
<b>Figura 7:</b> Exemplos de alcaloides aporfínicos isolados de espécies da família <i>Annonaceae</i> ..	28
<b>Figura 8:</b> Reação de biossíntese do precursor de alcaloides isoquinolínicos.....	30
<b>Figura 9:</b> Esqueleto básico de vários tipos de alcaloides do gênero <i>Annona</i> .....	31
<b>Figura 10:</b> Alcaloides marcadores quimiotaxionômicos do gênero <i>Annona</i> .....	31
<b>Figura 11:</b> Rota biossintética dos terpenóides. Via do mevalonato .....	33
<b>Figura 12:</b> Rota biossintética dos terpenóides. Via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato.....	34
<b>Figura 13:</b> Terpenóides isolados de diversas espécies vegetais do gênero <i>Annona</i> .....	35
<b>Figura 14:</b> Estruturas básicas de diterpenos do tipo ent-Kaurano.....	36
<b>Figura 15:</b> Acetogeninas isoladas de vegetais do gênero <i>Annona</i> .....	37
<b>Figura 16:</b> Acetogeninas isoladas das folhas de <i>Annona muricata</i> .....	38
<b>Figura 17:</b> Rota biossintética de flavonoides .....	39
<b>Figura 18:</b> Flavonóides isolados do gênero <i>Annona</i> .....	40
<b>Figura 19:</b> Distribuição geográfica da espécie <i>Annona mucosa</i> Jacq. no Brasil.....	41
<b>Figura 20:</b> <i>Annona mucosa</i> Jacq .....	42
<b>Figura 21:</b> Acetogeninas rolidecina D e desacetilivaricina isoladas do extrato metanólico de <i>Annona mucosa</i> .....	43
<b>Figura 22:</b> Antibióticos de origem sintética .....	45
<b>Figura 23:</b> Primeiros terpenóides isolados com ação antimicrobiana.....	46
<b>Figura 24:</b> Etapas de preparo e concentração do extrato bruto .....	50
<b>Figura 25:</b> Fluxograma de trabalho para a obtenção dos extratos e suas frações .....	51
<b>Figura 26:</b> Etapas para preparo da amostra dos alcaloides totais (FAT).....	53
<b>Figura 27:</b> CCDA da fração clorofórmica com destaque para a substância FCN-A1 .....	54
<b>Figura 28:</b> CCDP da fração clorofórmica e CCDA da fração isolada FCN-A1 .....	55
<b>Figura 29:</b> CCDA de alcaloides de maior polaridade .....	55
<b>Figura 30:</b> Misturas de alcaloides FCN-A2 .....	56
<b>Figura 31:</b> Fluxograma de isolamento de alcaloides.....	57
<b>Figura 32:</b> Preparo de amostra para a posterior análise através do método cromatográfico hifenado LC-MS .....	58
<b>Figura 33:</b> Cromatograma de íons totais da fração FCN-A1 adquirido por LC-ESI-IT-MS..	64
<b>Figura 34:</b> Cromatograma de íons totais da fração FCN-A2 adquirido por LC-ESI-IT-MS..	65
<b>Figura 35:</b> Espectro de massas para o alcaloide romucosina .....	66
<b>Figura 36:</b> Proposta de fragmentação para o alcaloide romucosina.....	66
<b>Figura 37:</b> Espectro de massas para a antocianidina delfinidina-3- $\beta$ -O-glucopiranosídeo.....	67
<b>Figura 38:</b> Proposta de fragmentação para a delfinidina-3- $\beta$ -O-glucopiranosídeo.....	68
<b>Figura 39:</b> Placas microbiológicas para os ensaios frente a bactérias e fungo.....	71
<b>Figura 40:</b> Placas microbiológicas para os ensaios frente a <i>P. aeruginosa</i> e <i>E. coli</i> .....	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Aplicações de anonáceas na medicina tradicional.....	23
<b>Tabela 2:</b> Principais “Blocos de construção” de produtos naturais .....	27
<b>Tabela 3:</b> Alcaloides marcadores quimiotaxionômicos isolados de espécies de <i>Annona</i> .....	32
<b>Tabela 4:</b> Classificação taxionômica da espécie de estudo .....	47
<b>Tabela 5:</b> Parâmetros utilizados na análise por FIA-ESI-IT-MS <sup>n</sup> .....	59
<b>Tabela 6:</b> Concentrações das amostras avaliadas nos ensaios microbiológicos.....	61
<b>Tabela 7:</b> Resultado da triagem fitoquímica do extrato hidroetanólico 70% das folhas .....	63
<b>Tabela 8:</b> Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de bactérias e fungos avaliados pelo teste de difusão em poços .....	70

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	16
<b>2.1 Objetivo Geral</b> .....	16
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	16
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b> .....	17
<b>3.1 O uso de plantas medicinais no Brasil</b> .....	17
<b>3.2 Aplicações de produtos naturais no desenvolvimento de fármacos</b> .....	17
<b>3.3 Considerações sobre a família <i>Annonaceae</i></b> .....	20
<b>3.4 Considerações sobre o gênero <i>Annona</i></b> .....	24
<b>3.5 Metabólitos secundários do gênero <i>Annona</i></b> .....	26
3.5.1 Alcaloides .....	28
3.5.2 Terpenos .....	33
3.5.3 Acetogeninas .....	36
3.5.4 Flavonoides .....	38
<b>3.6 Espécie do estudo: <i>Annona mucosa</i> Jacq.</b> .....	40
<b>3.7 Considerações sobre a atividade antimicrobiana</b> .....	44
<b>3.8 Referencias Taxionômicas</b> .....	47
<b>4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL</b> .....	48
<b>4.1 Suportes utilizados na cromatografia</b> .....	48
<b>4.2 Reveladores</b> .....	48
<b>4.3 Equipamentos</b> .....	48
<b>4.4 Reagentes e solventes</b> .....	49
<b>4.5 Material botânico</b> .....	49
4.5.1 Coleta e identificação .....	49
4.5.2 Preparo do extrato bruto do material vegetal .....	49
<b>4.6 Fracionamento do extrato bruto</b> .....	50
<b>4.7 Prospecção fitoquímica do extrato</b> .....	52
<b>4.8 Peso seco e avaliação do rendimento da extração hidroalcoólica.</b> .....	52
<b>4.9 Preparo da fração alcaloídica para análise microbiológica</b> .....	52
<b>4.10 Isolamento de alcaloides por CCD</b> .....	53
4.10.1 Isolamento da fração FCN-A1 .....	54
4.10.2 Isolamento da mistura de alcaloides FCN-A2 .....	56
<b>4.11 Preparo de amostras para LC-MS</b> .....	57

4.11.1	Preparo amostra FCN-A1 .....	57
4.11.2	Preparo de amostra FCN-A2.....	57
<b>4.12</b>	<b>Análise das amostras por LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup> .....</b>	<b>59</b>
<b>4.13</b>	<b>Ensaio microbiológicos .....</b>	<b>60</b>
4.13.1	Microorganismos utilizados.....	60
4.13.2	Preparo das suspensões microbianas .....	60
4.13.3	Preparo das amostras utilizadas nos ensaios microbiológicos .....	60
4.13.4	Teste de perfuração em meio sólido .....	61
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Peso seco e avaliação do rendimento da extração.....</b>	<b>62</b>
<b>5.2</b>	<b>Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico 70% .....</b>	<b>62</b>
<b>5.3</b>	<b>Identificação estrutural de substâncias das frações FCN-A1 e FCN-A2.....</b>	<b>64</b>
5.3.1	Fração FCN-A1.....	65
5.3.2	Fração FCN-A2.....	66
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica das amostras.....</b>	<b>69</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>73</b>
	<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>74</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Metabólitos secundários são produzidos por diversos tipos de espécies vegetais, bem como de fungos, bactérias e alguns animais, e tem sido alvo de estudos devido a possibilidade de utilização de diversos desses constituintes químicos na produção de fitomedicamentos, ou até mesmo na obtenção de princípios ativos utilizados pela indústria farmacêutica na produção de fármacos, como é o caso dos medicamentos compostos por substâncias como o ácido salicílico, a atropina, o taxol, o quinino ou a morfina, todos obtidos a partir de vegetais.

As aplicações dos metabólitos secundários vão desde o tratamento de inflamações simples, até o tratamento de doenças como o câncer, sendo que de 1940 a 2014, das 175 moléculas descobertas, 85, o equivalente a 49%, são de origens vegetais, resultado de aplicação diretas dos metabólitos isolados de plantas, ou de derivações desses metabólitos (CRAGG; NEWMAN, 2016). Muitas dessas substâncias têm eficácia comprovada, como é o caso da vincristina, utilizada como princípio ativo de medicamentos utilizados no tratamento de casos agudos de leucemia.

O Brasil é um país com grande área territorial, vários biomas distintos e com uma vasta riqueza vegetal e animal, de forma que é possível encontrar cerca de 350.000 a 500.000 espécies vegetais diferentes, distribuídas ao longo de todo o território, o que corresponde a um total de 20% de todas as espécies vegetais do mundo (ALBUQUERQUE et. al, 2007a). Estudos na área de produtos naturais tornam-se importantes dada a quantidade de espécies vegetais contidas no território nacional, bem como a exclusividade de um bioma tipicamente brasileiro, como é o caso do bioma da caatinga.

Estudos relacionados a família *Annonaceae* tem sido realizado ao longo de vários anos, sendo isolados vários metabólitos secundários de diversas espécies vegetais que compõem essa família. Ensaio biológicos de extratos ou compostos isolados de partes desses vegetais comprovam a eficácia dos medicamentos utilizados na medicina popular em que se utilizavam as folhas, cascas ou sementes de frutas de espécies dessa família no tratamento de diabetes, a partir do chá de folhas de graviola (*Annona muricata*) ou como anti-inflamatório com o chá de folhas, caule ou frutos de pimenta de macaco (*Xylopia aromatica* Mart.) (GRANDI et al., 1989)

Apesar de serem estudadas ao longo de muitos anos, o principal foco de estudo desses vegetais foi na obtenção de metabólitos secundários como os alcaloides e as acetogeninas,

sendo este último um metabólito exclusivos de vegetais pertencentes ao gênero *Annona* (CORTES, et al., 2014), e a pouca preocupação dada a avaliação biológica dos metabólitos isolados, bem como a carência de estudos farmacológicos mais direcionados que avaliassem a possibilidade de tais metabólitos se tornarem medicamentos ou até mesmo a possibilidade de extratos desses vegetais se tornarem fitomedicamentos.

O estudo de vegetais do gênero *Annona* torna-se importante já que esse gênero compreende um grande número de espécies vegetais, distribuídos amplamente em regiões tropicais, e por serem amplamente utilizada na medicina popular, sobretudo no Brasil, já que os vegetais e frutos de algumas espécies podem ser facilmente encontrados em diversas regiões. A existência de pouco enfoque na comprovação das atividades biológicas observadas na medicina popular credita ao gênero grande potencial de estudo. Além disso o gênero *Annona* apresenta metabólitos como alcaloides, flavonoides e acetogeninas, que são compostos com diversas atividades biológicas comprovadas e em alguns casos elevadas toxicidades, e por isso precisam de estudos farmacológicos mais detalhados que avaliem a segurança do uso de determinados medicamentos que utilizem, ou contenham, tais metabólitos (FOGLIO et al., 2006). No caso dos alcaloides e acetogeninas atenção especial deve ser dada já que estudos com esses metabólitos começaram a ganhar importância nos últimos anos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Isolar e identificar metabólitos secundários de interesse que possam ter aplicações biológicas, no extrato hidroetanólico a 70% das folhas da espécie vegetal *Annona mucosa* Jacq.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Identificar fitoquímicamente classes de metabólitos secundários da espécie vegetal *Annona mucosa* Jacq;
- Isolar através de técnicas cromatográficas os metabólitos secundários de interesse biológico presentes no material vegetal;
- Identificar os metabólitos isolados através de técnicas acopladas LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>;
- Avaliar a atividade biológica do material vegetal através de ensaios biológicos do extrato bruto, frações obtidas e substâncias isoladas frente a fungos e bactérias de interesse;
- Contribuir de forma geral com os estudos químicos e biológicos da espécie vegetal estudada, bem como de sua família botânica.

### **3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA**

#### **3.1 O uso de plantas medicinais no Brasil**

O Brasil é um país rico em biodiversidade vegetal, tendo em toda a sua extensão um representativo de 20% do número de espécies do mundo, número que vai de 350.000 a 500.000 espécies vegetais. Dessa riqueza de espécies são conhecidas, através da medicina popular, diversos vegetais que apresentam propriedades biológicas, sendo utilizados como medicamentos nas formas de chás, emplastos, etc. de maneira até mesmo indiscriminada por não haver comprovação, em algumas situações, de tais propriedades biológicas (Albuquerque et. al. 2007a; Maciel et. al. 2002).

Os primeiros registros da utilização de remédios obtidos de materiais vegetais datam da época do Brasil colônia, já que por falta de medicamentos trazidos da Europa, os médicos portugueses utilizavam do conhecimento adquirido dos índios para a obtenção de conhecimentos sobre determinados vegetais que poderiam ser utilizados para curar determinadas enfermidades (VEIGA 2002).

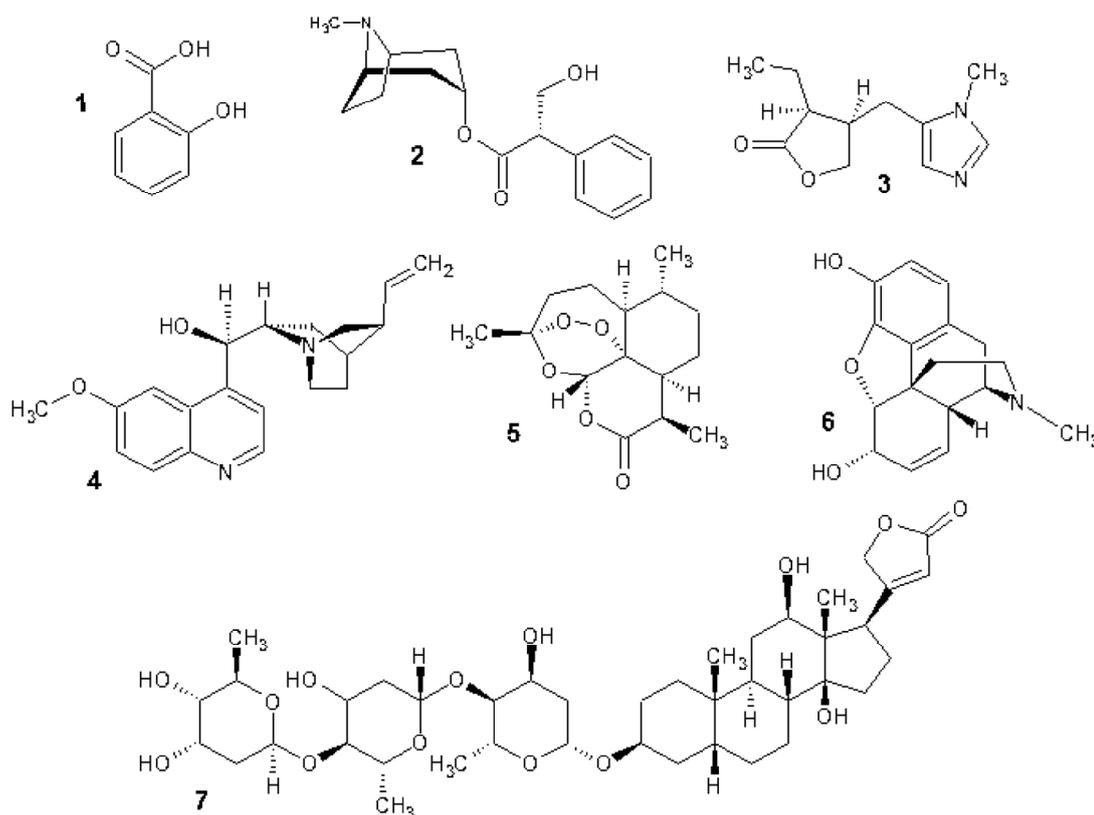
A utilização de medicamento oriundos de vegetais, os fitoterápicos, foi regulamentada pela OMS em 1978, e essa regulamentação trazia consigo o objetivo do estudo de diversas espécies vegetais, de forma que o conhecimento popular pudesse estar aliado com o conhecimento científico, e assim fossem realizados estudos que comprovassem a eficácia de determinados medicamentos em suas mais diversas aplicações. Muito foi proposto acerca da utilização de fitoterápicos nos hospitais no Brasil e em 2005 o SUS propôs a inclusão de diversos medicamentos fitoterápicos como tratamentos para diversas enfermidades. As espécies vegetais foram inseridas nos programas de atendimento hospitalar seguindo critérios como: Ter eficiência comprovada, ser de fácil cultivo, ter baixa toxicidade, estar inserida no Programa Farmácia Viva, ter baixa incidência de efeitos colaterais e estar presente em farmacopeias ou livros oficiais (Ministério da Saúde).

#### **3.2 Aplicações de produtos naturais no desenvolvimento de fármacos**

Medicamento oriundos de vegetais são utilizados pelo homem desde os primórdios dos tempos, na busca por alívio de dores e cura de doenças, e além disso no controle de pragas e infestações em plantações. Atenção especial deve ser dada as civilizações egípcias, que

utilizavam extratos de produtos naturais na conservação de múmias, greco-romana, onde diversos produtos vegetais eram utilizados como venenos para a defesa e caça, e chinesa, que contribuiu enormemente com a química de produtos naturais com uma rica diversidade de aplicações de vegetais na medicina tradicional. (BOLZANI; VIEGAS, 2006).

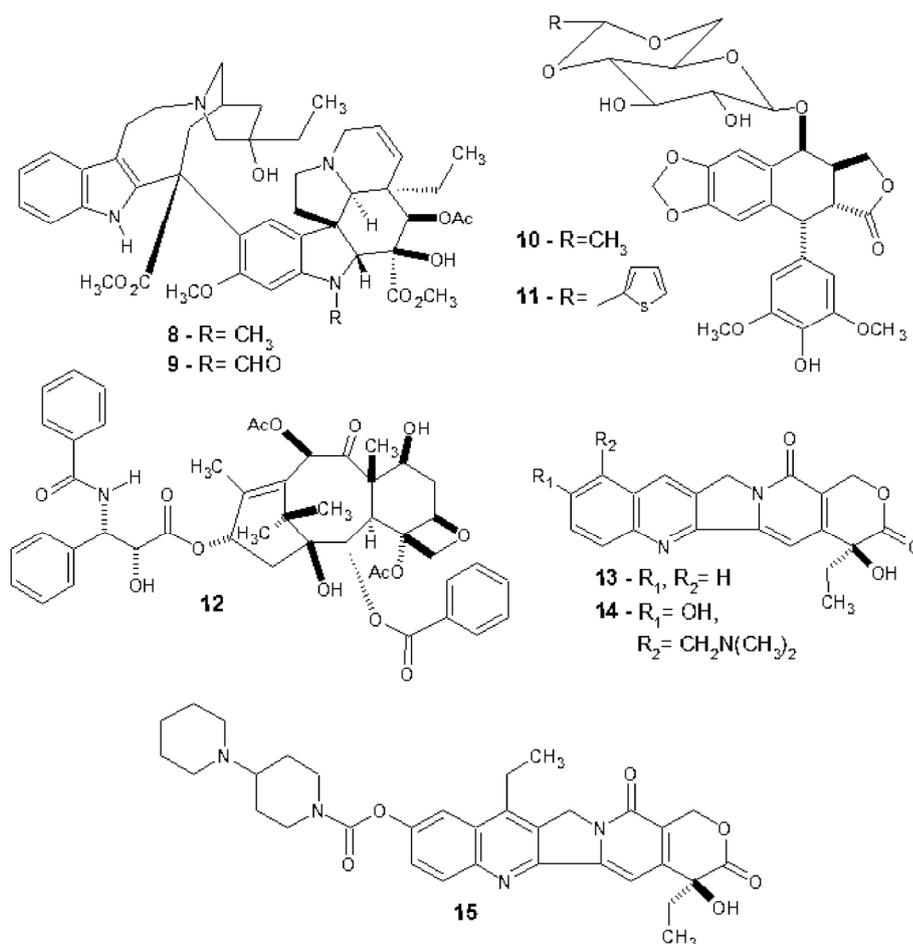
Muitos dos medicamentos obtidos atualmente são decorrentes do acúmulo de conhecimento sobre as propriedades curativas e tóxicas de diversos vegetais sendo estes acumulados ao longo dos anos, tais conhecimentos permitiram que substâncias como o ácido salicílico (1), a atropina (2), a pilocarpina (3), o quinino (4), a artemisinina (5), o taxol (6), a digoxina (6) e a morfina (7) (Figura 01) fossem isolados como princípios ativos de diversas espécies vegetais (ALVES, 2001). Para o tratamento de câncer, uma doença grave, de 1940 a 2014 das 175 moléculas descobertas, 85 (49%) são aplicação diretas de metabólitos isolados de plantas, ou de derivações desses metabólitos (CRAGG; NEWMAN, 2016).



**Figura 1:** Princípios ativos de fármacos obtidos de produtos naturais. Fonte: ALVES (2001)

O isolamento de produtos naturais é visto como uma importante fonte na descoberta de substâncias que sejam citotóxicas para células tumorais, e possam ser utilizadas contra o câncer, dentre as substâncias isoladas dá-se grandes destaque para a vimblastina e a vincristina (8 e 9,

Figura 02), isoladas de *Catharrantus roseus*, o etoposídeo e o teniposídeo (10 e 11, Figura 02) e para os antineoplásicos camptotecina (13, Figura 02) e seus derivados topotecan e irinotecan (14 e 15, Figura 02) e para o taxol (12, Figura 02). Como muitas dessas substâncias são obtidas em pequenas proporções e sob condições muito específicas que determinam a produção de tais metabólitos pelo vegetal, muito tem sido estudado com relação a rota biossintética desses fármacos, já que eles apresentam interesse comercial. (BOLZANI; VIEGAS, 2006).



**Figura 2:** Princípios ativos de medicamentos anticancerígenos e antineoplásicos obtidos de metabólitos secundários. Adaptado de BOLZANI; VIEGAS (2006)

Cerca de 50% de todos os medicamentos utilizados são de origem sintética, e 25% de origem vegetal. Em países industrializados, 25% dos medicamentos prescritos são de origem vegetal, sendo essas substâncias obtidas de apenas 90 espécies vegetais diferentes. Muito ainda deve ser investido em pesquisas farmacológicas por diversos países já que nos últimos 20 anos os medicamentos encontrados no mercado são oriundos de pesquisas científicas da China, Coreia e Japão, sendo bem menor a contribuição de outros países. (FOGLIO et. al, 2006).

Espera-se que o isolamento de princípios ativos de diversos fármacos, a partir de materiais vegetais, deva ser ainda mais explorado embora muito já tenha sido estudado visto que diversas espécies vegetais são utilizadas como medicamentos sem respaldo científico sobretudo quanto a sua eficácia e segurança. Além disso, apenas 17% de todas as espécies vegetais disponíveis já foram estudadas, sendo que na maioria das vezes não houve um aprofundamento quanto às propriedades fitoquímica e farmacológicas dos seus extratos (FOGLIO et. al, 2006).

### 3.3 Considerações sobre a família *Annonaceae*

As anonáceas pertencem a ordem da *Magnoliales*, sendo esta ordem subdivida nas famílias das *Annonaceae*, *Magnoliaceae* e *Myristicaceae*, compreendendo cerca de 120 espécies. No Brasil é possível encontrar, dessa família, 29 gêneros e cerca de 392 espécies (BARON, 2010; MAAS et. al. 2015a), distribuídas em todo o território nacional.

A família das anonáceas também é dividida nas subfamílias: *Ambavioideae*, que possui nove gêneros ao todo, mas apenas o *Tetrameranthus* ocorre no Brasil, *Anaxagoreoideae*, contendo o único gênero *Anaxagorea*, *Annonoideae*, que é a subfamília que apresenta a maior quantidade de gêneros no Brasil, sendo ao todo 12, dentre eles os gêneros *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia* e a subfamília *Malmeoideae* que aparecem em maior número na Ásia, sendo encontrado apenas o gênero *Malmeeae* no Brasil, (LOPES, SILVA, 2014).

Essa família apresenta distribuição nas regiões tropicais observando-se sua maior ocorrência na América Central e do Sul, no continente Asiático e na África (MAAS et al. 2011; CHATROU, 2012), na Figura 03 (página 21) é possível observar a distribuição geográfica dessa família.



**Figura 3:** Distribuição geográfica da família *Annonaceae*. Fonte: TROPICOS<sup>1</sup>

Na América do Sul, o Peru lidera a contagem do número de espécimes, com 6118 representantes dessa família, logo em seguida vem o Equador, com 2964 espécimes, e em terceiro lugar o Brasil, com 2299 espécimes (TROPICOS<sup>1</sup>). No Brasil pode-se observar vegetais dessa família principalmente nos biomas da Mata Amazônica, Mata Atlântica, e no Cerrado, sendo possível encontrá-las em menores proporções nas demais regiões (LOPES; SILVA, 2014).

Essa família é composta por vegetais arbóreos, arbustivos, semi arbustivos e lianas, caracterizados por apresentar casca fibrosa, folhas simples, alternas e dísticas (exceto para o gênero *Tetrameranthus*, que possui folhas espiraladas) com pecíolo pequeno e sem estípulas (GALASTRI, 2008), flores que variam de tamanho ou cor, podendo ser esbranquiçadas, creme-amareladas, alaranjadas, esverdeadas ou até vinho. As anonáceas são facilmente reconhecidas através do forte odor liberado quando são cortadas suas folhas, ramos ou tronco, pelas longas e resistentes fibras presentes na casca (RIBEIRO et. al. 1999) e pelo aroma que suas flores exalam que simulam, dependendo da espécie, o odor dos frutos maduros (RINALDI, 2007).

As anonáceas são cultivadas por apresentarem um bom potencial comercial, sendo sua madeira utilizada na construção civil ou de embarcações, algumas espécies possuem flores das

<sup>1</sup>Disponível em: <<http://www.tropicos.org/NamePage.aspx?nameid=42000007&tab=maps>>, consultado em abr/2017.

quais podem ser produzidos perfumes através da extração dos óleos essenciais, como plantas ornamentais, no paisagismo urbano, e principalmente por conta dos frutos, que podem ser utilizados na produção de sucos e sobremesas (GALASTRI, 2008; JUDD et. al., 1999; RABELO, 2014).

Na medicina popular, utilizam-se diversas partes do vegetal de diversas espécies de anonáceas na cura de alguns males, como apresentado na Tabela 1 (página 23), e muito tem sido estudado por conta de suas aplicações farmacológicas e potencial no desenvolvimento de medicamentos, já que diversas espécies apresentam metabólitos secundários bioativos, como alcaloides, acetogeninas, terpenos e flavonoides (SILVA et. al. 2009).

Em estudos realizados com extratos dessa família obtiveram-se diversas atividades biológica como atividade antileishmania (RAYNAUD-LE GRANDIC et al., 2004), antioxidante e citoprotetora (BARRECA et al., 2011), citotóxica, apresentando potencial antitumoral (BETANCUR-GALVIS et al., 1999; FORMAGIO et al., 2013b; SILVA et al., 2007), anti-inflamatória (FORMAGIO et al., 2013a; FORMAGIO et al., 2013b), antiviral (BETANCUR-GALVIS et al., 1999) e ainda um estudo expondo sobre a eliminação de radicais livres, atividade antiproliferativa, anti-inflamatória e hipoglicemiante, atribuindo estes efeitos à presença de flavonoides no extrato e frações avaliados (FORMAGIO et al., 2013a).

**Tabela 1:** Aplicações de anonáceas na medicina tradicional. Adaptado de RODRIGUES (2016) e RABELO (2014)

<b>Espécie</b>	<b>Parte utilizada</b>	<b>Forma de preparo</b>	<b>Aplicação na medicina popular</b>	<b>Referencia</b>
<i>Anaxagorea dolichocarpa</i>	Folhas e casca	Infusão	Dores de cabeça	MAAS et. al (1984)
<i>Annona squamosa</i>	Folhas	In natura	Furúnculos, aftas e úlceras	FENNER et. al. (2006); SOUZA et al. (2012)
<i>Duguetia furfuraceae</i>	Folhas	Infusão	Dismenorreia, Reumatismo	FARIAS et al (2013) RODRIGUES; CARVALHO (2011)
<i>Annona dioica</i>	1 Sementes 2 Frutos 3 Folhas	1 Infusão 2 Cataplasma 3 Infusão	1 Diarreia 2 Emoliente 3 Reumatismo	RODRIGUES; CARVALHO (2011)
<i>Annona sylvatica</i>	folhas	-	Baixar pressão	VENDRUSCOLO; MENTZ (2006)
<i>Annona cassiflora</i>	sementes	Decocto ou infusão	Diarreia	RODRIGUES; CARVALHO (2011)
<i>Xylopia aromatica</i>	1 frutos 2 folhas e casca 3 casca	Decocto ou infusão	1 digestivo 2 anti-inflamatório 3 antimalárico	(RODRIGUES; CARVALHO, 2001, BLAIR et al., 1991, SUFFREDINI et al., 2007)
<i>Annona muricata</i>	Folhas, casca	Vitaminas, sucos ou chá	Ameba, gripe, hemorroidas, perda de peso, doenças no coração	(FREITAS et al., 2012)

### 3.4 Considerações sobre o gênero *Annona*

O gênero *Annona*, da família *Annonaceae*, pertence a subfamília *Annonoideae* tem cerca de 200 espécies, distribuídas a longo das regiões tropicais, nos continentes da América do sul e Central, e na África, como pode ser observado na Figura 04, (MAAS et. al., 2011) sendo acrescida a esse gênero outras 44 espécies que antes pertenciam ao gênero *Rollinia* (RAINER, 2007). No Brasil encontram-se cerca de 83 espécies nos biomas de Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Mata Amazônica e Pantanal (LOPES; SILVA, 2014).



**Figura 4:** Distribuição geográfica do gênero *Annona*. Fonte: TROPICOS<sup>2</sup>

Economicamente o gênero *Annona* é bastante explorado, sendo comercializadas principalmente os frutos das espécies *Annona cassiflora* (araticum), *Annona squamosa* (fruta-do-conde), *Annona muricata* (graviola), *Annona reticulata* (fruta da condessa), e *Annona cherimolia* (cherimóia), utilizados amplamente no consumo *in natura* ou na preparação de sobremesas e sucos. (LORENZI; MATOS, 2002).

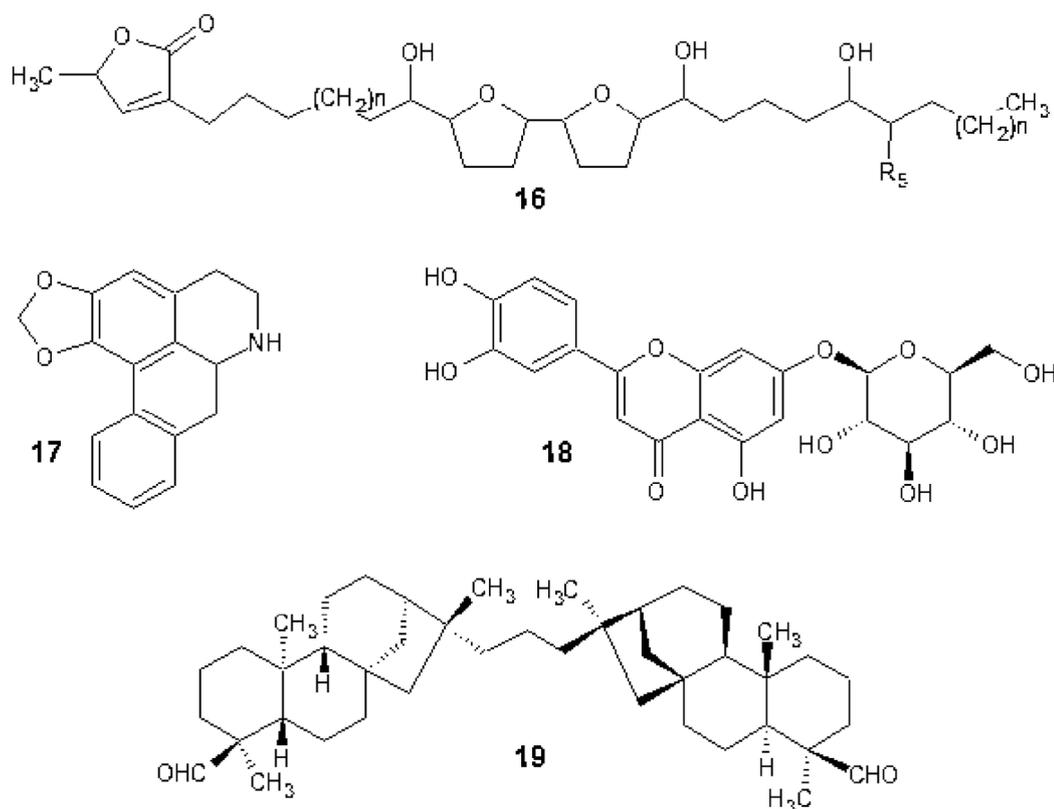
Além da exploração econômica, diversos vegetais desse gênero são utilizados na medicina popular, como a graviola (*A. muricata*), utilizada por diversas tribos da região amazônica no tratamento de aftas, como antitérmico, diurético, no combate a insônia, contra dores de cabeça e como emagrecedor (RINALDI, 2007), a ata, ou fruta-do-conde (*A.*

<sup>2</sup> Disponível em <<http://www.tropicos.org/Name/40015439?tab=maps>>, consultado em abr/2017

*squamosa*), utilizada no tratamento de furúnculos, úlceras e aftas e o marolinho (*Annona dioica*) utilizada contra reumatismo, ou no tratamento de diarreias. Os frutos dessa espécie também são utilizados no tratamento de infecções de pele ou como inseticida (VEGA et al, 2007). Muitas dessas atividades biológicas observadas são atribuídas a presença de alcaloides e acetogeninas nos extratos desses vegetais.

O gênero *Annona* é amplamente estudado devido a presença de diversos constituintes sintetizados através do metabolismo secundário desses vegetais. Os principais metabólitos estudados para essa classe de vegetais são as acetogeninas, os alcaloides isoquinolínicos, os diterpenos, esteroides, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, lactonas, flavonoides e cetonas (RODRIGUES, 2016).

Na Figura 05 são apresentadas as estruturas de algumas substâncias isoladas de vegetais do gênero *Annona*, sendo estes a acetogenina atremolina (16), isolada de *Annona x atemoya*, o alcaloide lirioidenina (17), isolado de *A. squamosa*, o flavonoide luteonina-7-O-glucosídeo (18), isolado de *Annona tomentosa* e o terpeno annomosina (19), isolado de *A. squamosa*.



**Figura 5:** Metabólitos secundários isolados do gênero *Annona*. Fonte: RABELO (2014)

### 3.5 Metabólitos secundários do gênero *Annona*

Os Metabólitos secundários, ou produtos naturais, são uma classe de compostos orgânicos produzidos por um organismo específico, ou por um pequeno número de organismos, que na maioria das vezes se apresentam como não essenciais para o organismo, seja ele um animal, inseto ou vegetal, diferentemente dos metabólitos produzidos por atividade primária, como os açúcares, aminoácidos, ácidos nucleicos, e seus polímeros (MANN, 1987). Na Figura 6, tem-se um esquema da biossíntese total de tais metabólitos.

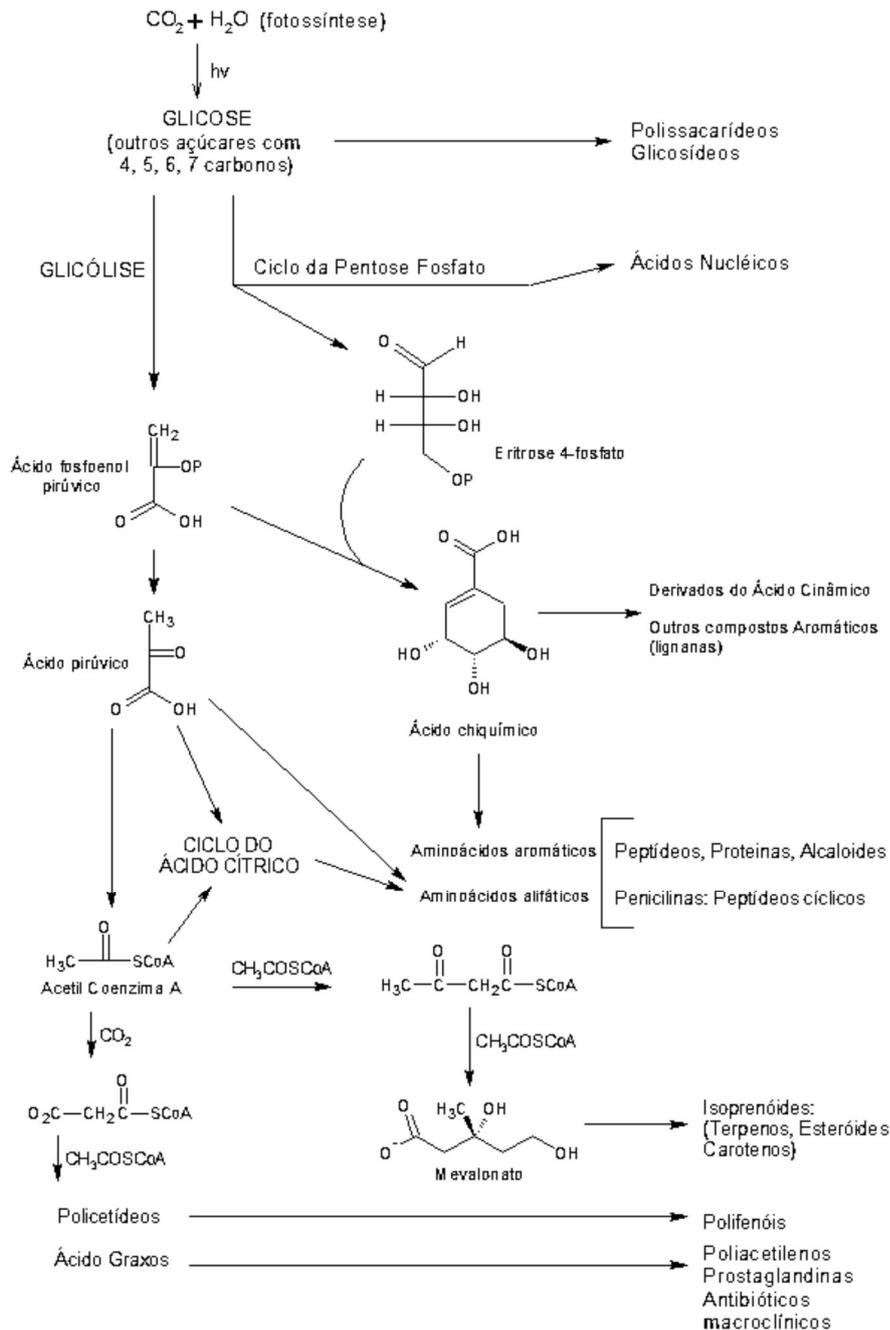


Figura 6: Rotas biossintéticas do metabolismo secundário de vegetais. Adaptado

A principal função apontada para tais substâncias é a de proteção do organismo. No caso das plantas, eles são os principais responsáveis em garantir a sobrevivências das espécies onde ocorrem, por apresentarem atividades antibióticas, antifúngicas e antivirais ou para proteger tais organismos de patógenos, e além disso, podendo também ter função antigerminativa ou tóxica para outras plantas, o que diminui a competição por nutrientes. Além disso, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (FUMAGALI, et al. 2008).

A biossíntese de produtos naturais é regulada por diversos fatores sendo um deles a predisposição genética do vegetal a produzir tal metabólito, e em alguns casos através de estímulos externos, o que classifica as defesas produzidas em: Defesas constitutivas, por estarem sempre presentes nos vegetais, independentemente de qualquer estímulo que a planta possa sofrer. E em defesas induzidas, as quais ocorrem quando o vegetal sofre algum tipo de estresse ou ataque de algum animal, isso faz com que ocorra a produção do metabólito, e também o acúmulo dele durante certo período de tempo (LEVIN, 1973).

A grande diversidade de produtos naturais observadas decorre do número de reações que podem ser seguidas nas rotas biossintéticas que diferenciam tais metabólitos. Os principais “blocos de construção” desses metabólitos, segundo MANN (1987), são os compostos apresentados na Tabela 2.

**Tabela 2:** Principais “blocos de construção” de produtos naturais. Fonte: MANN (1987)

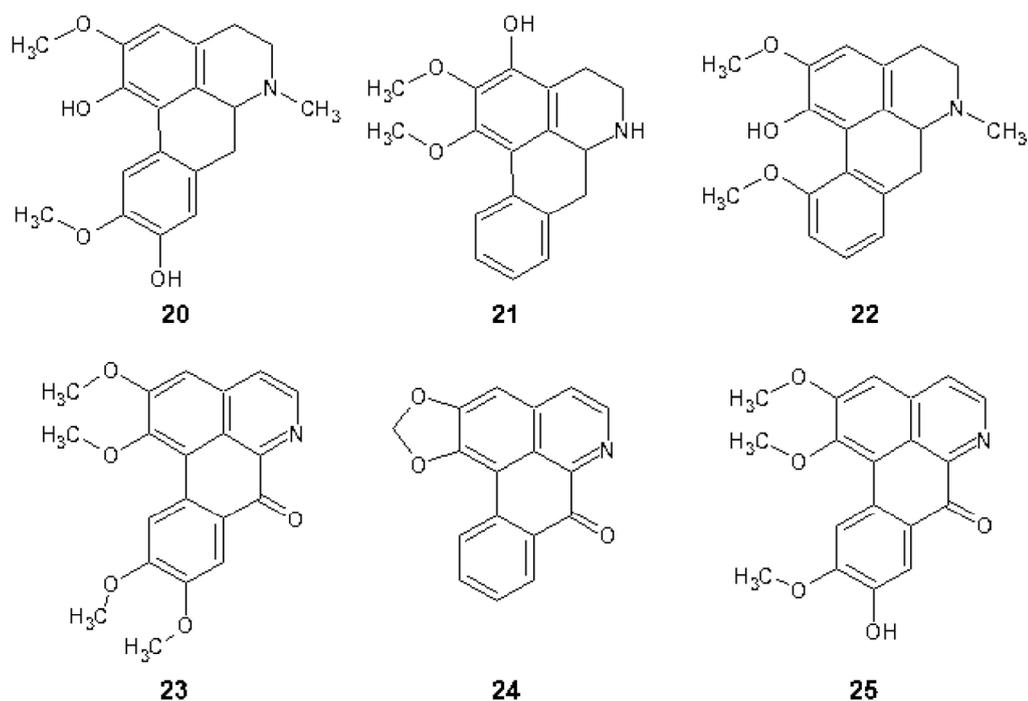
<b>Ácido chiquímico</b>	Precursor de muitos compostos aromáticos, incluindo os aminoácidos aromáticos, ácido cinâmico, e alguns polifenóis.
<b>Aminoácidos</b>	Precursor de alcaloides e antibióticos peptídeos, incluindo a penicilina e a cefalosporina.
<b>Acetato</b>	Precursor de poliacetilenos, prostaglandinas, antibióticos macrocíclicos, polifenóis, e isoprenóides (terpenos, esteroides, e carotenoides)

Alguns constituintes químicos de grande importância econômica e valor nutricional foram isolados em várias espécies do gênero *Annona*, dentre eles açúcares, proteínas, lipídeos, ácido ascórbico, taninos, aminoácidos, pectinas, polifenóis, carotenoides e vitaminas do complexo B (DI STASI; LIMA, 2003; LORENZI; MATOS, 2002).

### 3.5.1 Alcaloides

Os alcaloides são compostos nitrogenados, com ampla distribuição na natureza e representam uma das classes mais generalizadas de compostos, dotados de propriedades biológicas (ANISZEWSKI, 2015; LEBOEUF, 1982). Essas substâncias, apesar de serem comumente observadas em vegetais, também podem ser isoladas a partir de insetos, algas, animais marinhos e terrestres, microrganismos e fungos (MANN, 1994).

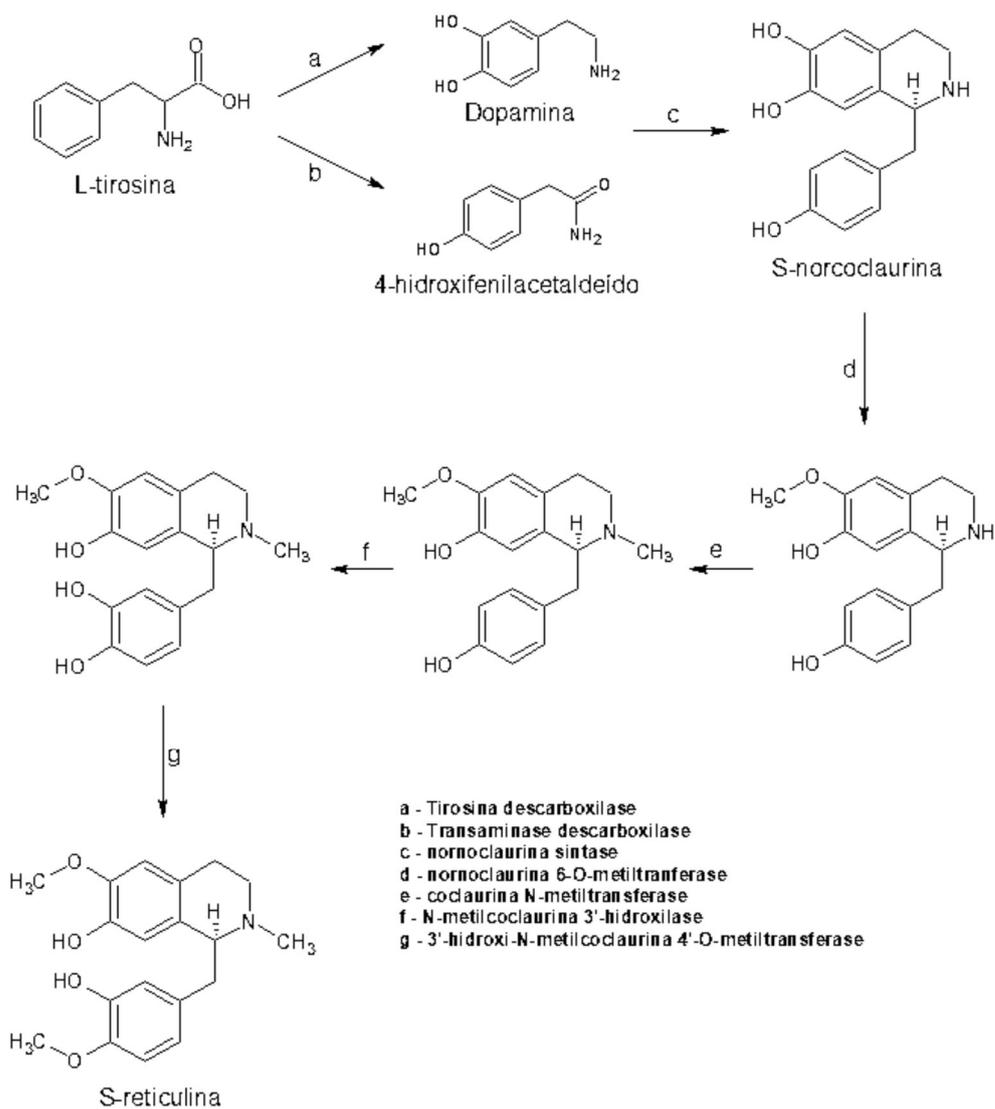
Cerca de 934 alcaloides já foram caracterizados em 254 espécies distribuídas em 59 gêneros da família das *Annonaceae* (CORDELL et al., 2001; LÚCIO et al., 2015; BARRETO et al., 2015). Fitoquimicamente essa família conta com os alcaloides isoquinolínicos, com predominância para os alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos (Figura 7) (LEBOEUF et al., 1982).



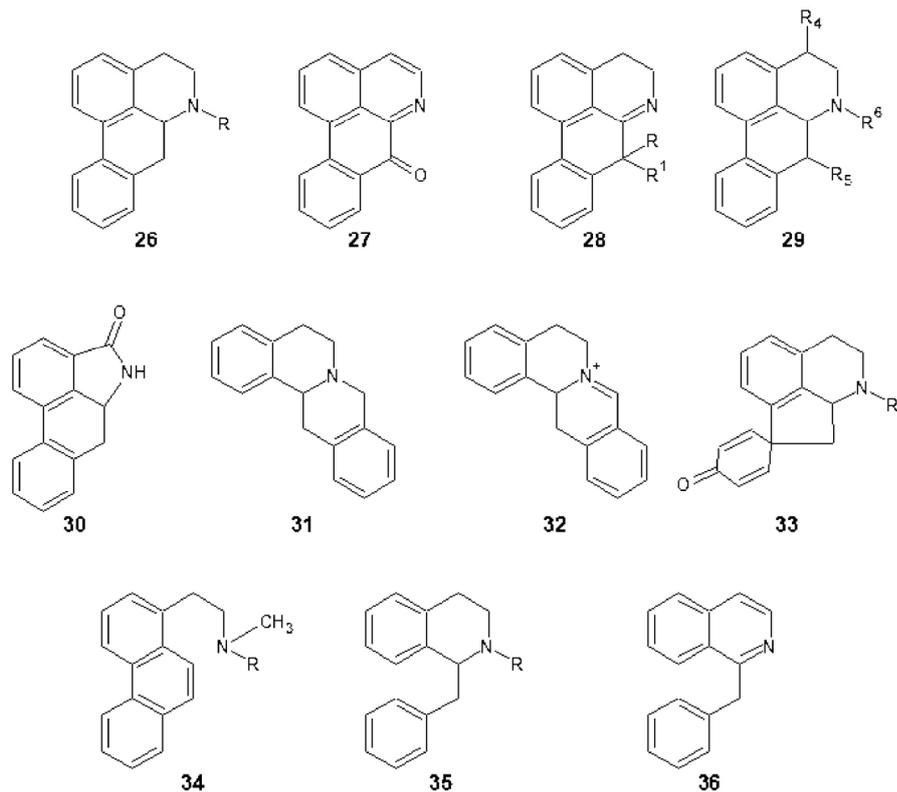
**Figura 7:** Exemplos de alcaloides aporfínicos, 20 – isoboldina, 21 – 3-hidronornuciferina, 22 - isotebaína e oxoaporfínicos, 23 – oxoglaucina, 24 – liriodenina, 25 – atherolina, isolados de espécies da família *Annonaceae*. Fonte: Autor

A origem biossintética dos alcaloides isoquinolínicos começa pela rota do ácido chiquímico, este é responsável pela formação dos aminoácidos aromáticos L-fenilalanina e L-tirosina, sendo essas duas substâncias as precursoras desse tipo de alcaloides. (RINALDI, 2007). Numa etapa inicial da reação ocorre uma condensação entre a dopamina e um aldeído, o p-hidroxifenilacetaldéido, essa condensação ocorre através da reação de Mannich, gerando o intermediário (S)-norcoclaurina, que após uma sequência de etapas (hidroxilação e metilação), resulta em (S)-reticulina, um intermediário biossintético dos alcaloides isoquinolínicos, a partir do qual resultam as séries dos alcaloides aporfínicos, tetrahidroprotoberberínicos e protoberberínicos (RODRIGUES, 2016). Na Figura 8 (página 30) tem-se uma proposta de rota biossintética para a formação da estrutura benziltetrahydroisoquinolínica e os seus derivados, segundo Diaz et al. (2015).

Apesar dos alcaloides aporfínicos serem os mais encontrados em diversas espécies do gênero *Annona*, também é possível isolar alcaloides benziltetraisoquinolínicos, benzilisoquinolínicos, proaporfínicos, fenantrênicos, alcaloides não isoquinolínicos, como a cafeína, as protoberberinas, tetrahidroprotoberberínicos, dehidroaporfínicos, aporfínicos 4 ou 7 substituídos e isoquinolínicos simples (RODRIGUES, 2016). Na Figura 9 (página 31), é possível observar o esqueleto básico de vários desses tipos de alcaloides.

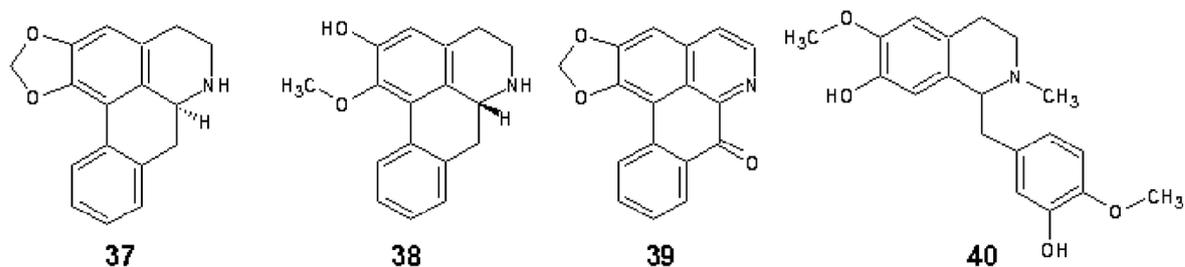


**Figura 8:** Reação de biossíntese do precursor de alcaloides isoquinolínicos, S-reticulina, a partir de L-tirosina. Fonte: DIAZ et al., (2015)



**Figura 9:** Esqueleto básico de vários tipos de alcaloides do gênero *Annona*. 26 – aporfínicos, 27 – oxoaporfínicos, 28 – dehidroaporfínicos, 29 – aporfínicos 4 ou 7 substituídos, 30 – aristolactamas, 31 – tetrahidroprotoberberínicos, 32 – protoberberínicos, 33 – proaporfínicos, 34 – fenantrênicos, 35 – benziltetrahidroisoquinolínicos, 36 - benzilisoquinolínicos  
Adaptado de: RODRIGUES, (2016).

Os alcaloides anonaína (37), asimilobina (38), liriodenina (39) e reticulina (40) (Figura 10), foram descritos para diversas espécies desse gênero, e por isso podem ser considerados marcadores quimiotaxonômicos (CRUZ et al, 2011). Na Tabela 3 (página 32) encontram-se dados de espécies onde esses alcaloides foram isolados.



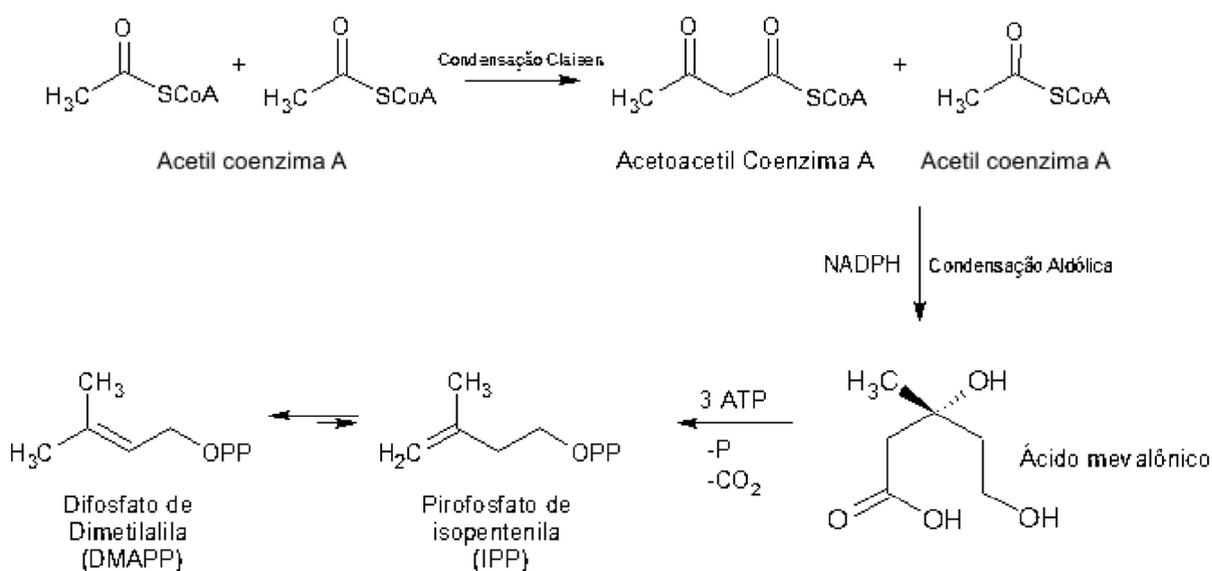
**Figura 10:** Alcaloides marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Annona*. Fonte: CRUZ et al., (2011)

**Tabela 3:** Alcaloides marcadores quimiotaxionômicos isolados de espécies de *Annona*. Adaptado de: RINALDI, (2007)

<b>Alcaloide</b>	<b>Espécie</b>	<b>Referencias</b>
<b>Anonáina</b>	<i>A. cherimolia</i>	SIMEON; RIOS; VILLAR, 1990
	<i>A. glabra</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. montana</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. paludosa</i>	GUINAUDEAU; LEBOUEF; CAVÉ, 1994
	<i>A. reticulata</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. salzmannii</i>	GUINAUDEAU; LEBOUEF; CAVÉ, 1994
	<i>A. senegalensis</i>	PHILIPPOV; KANDÉ; MACHEV, 1994
	<i>A. squamosa</i>	BHAUMIK et al., 1979
	<i>A. spinecens</i>	QUEIROZ; ROBLLOT; CAVÉ, 1996
	<i>A. mucosa</i>	CHEN et. al., 1996
<b>Asimilobina</b>	<i>A. exsucca</i> DC	GOMES, 2017
	<i>A. cherimolia</i>	SIMÉON; RIOS; VILLAR, 1990
	<i>A. glabra</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. hayesii</i>	RASAMIZAFY et al., 1987
	<i>A. montana</i>	LEBOUEF et al., 1982a
<b>Liriodenina</b>	<i>A. paludosa</i>	GUINAUDEAU; LEBOUEF; CAVÉ, 1994
	<i>A. acuminata</i>	BORUP-GROCHTMANN et al., 1982
	<i>A. ambotay</i>	OLIVEIRA et al., 1987
	<i>A. bullata</i>	GUINAUDEAU; LEBOUEF; CAVÉ, 1994
	<i>A. cristalensis</i>	FAUST et al., 1981
	<i>A. dioica</i>	SANTOS; MORAIS; BRAZ-FILHO, 2003
	<i>A. hayesii</i>	RASAMIZAFY et al., 1987
	<i>A. montana</i>	LEBOUEF et al., 1982b
<b>Reticulina</b>	<i>A. mucosa</i>	CHEN et. al., 1996
	<i>A. cherimolia</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. glabra</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. muricata</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. montana</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. paludosa</i>	LAPREVOTE et al., 1988
	<i>A. purpurea</i>	WU et al., 2000
	<i>A. reticulata</i>	LEBOUEF et al., 1982a
	<i>A. squamosa</i>	LEBOUEF et al., 1982a
<i>A. spinescens</i>	QUEIROZ; ROBLLOT; CAVÉ, 1996	

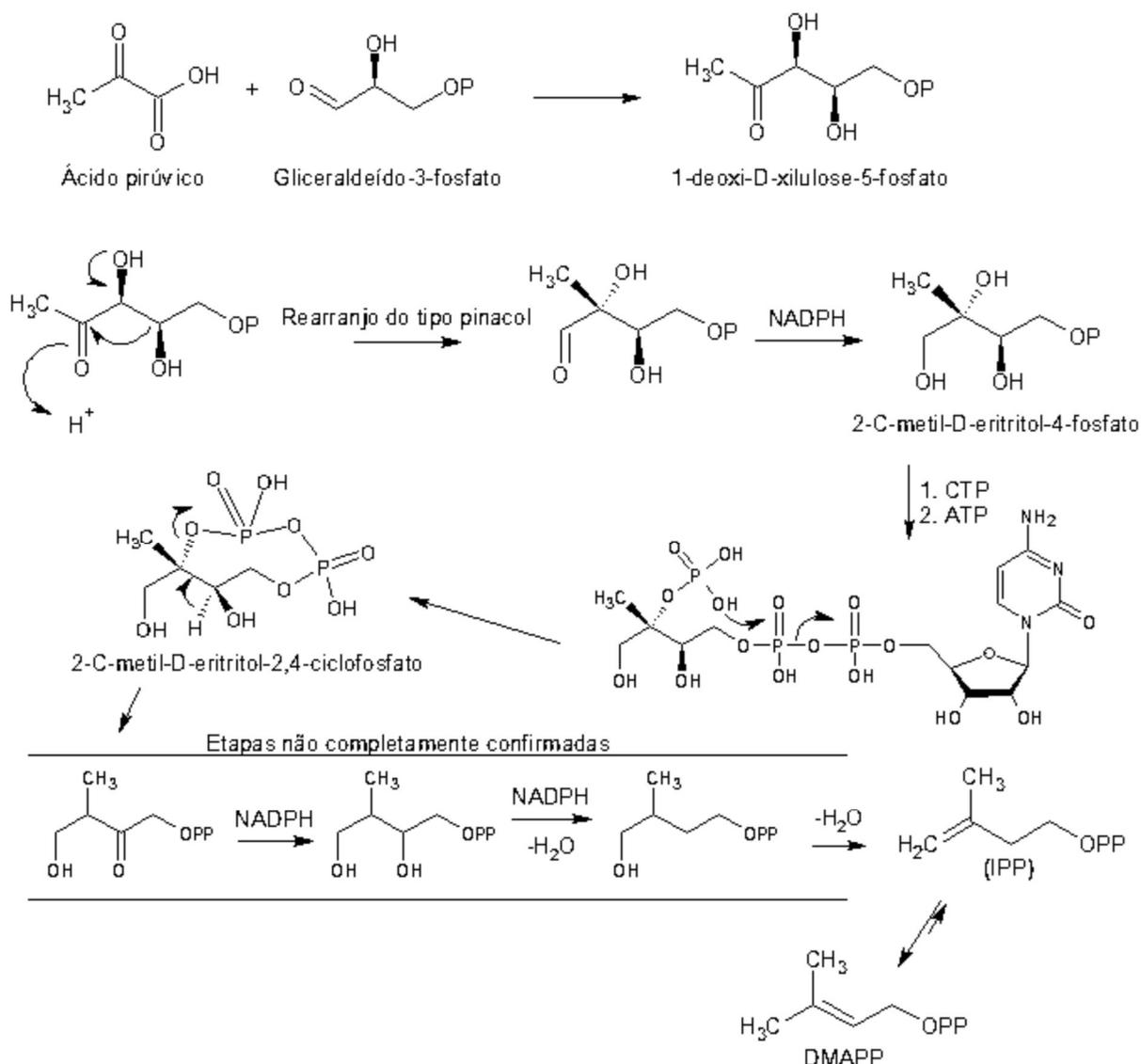
### 3.5.2 Terpenos

Terpenos são produtos naturais que contém unidades isoprênicas podendo ser obtidos a partir de duas rotas biossintéticas, a do mevalonato, que tem como precursores o piruvato e a acetil-coenzima A, apresentada na Figura 11, e a do 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulose que tem como precursores o piruvato e o gliceraldeído-3-fosfato (AHARONI et al., 2006), que pode ser vista na Figura 12 (página 34). Em ambas as vias haverá a formação do precursor difosfato de isopentenila (IPP), que será convertido em difosfato de dimetilalila (DMAPP), e a união de unidades de IPP e DMAPP resultará em difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenos, que são unidades constituídas por 10 carbonos.



**Figura 11:** Rota biossintética dos terpenóides. Via do mevalonato. Adaptado de: DEWICK, (2002)

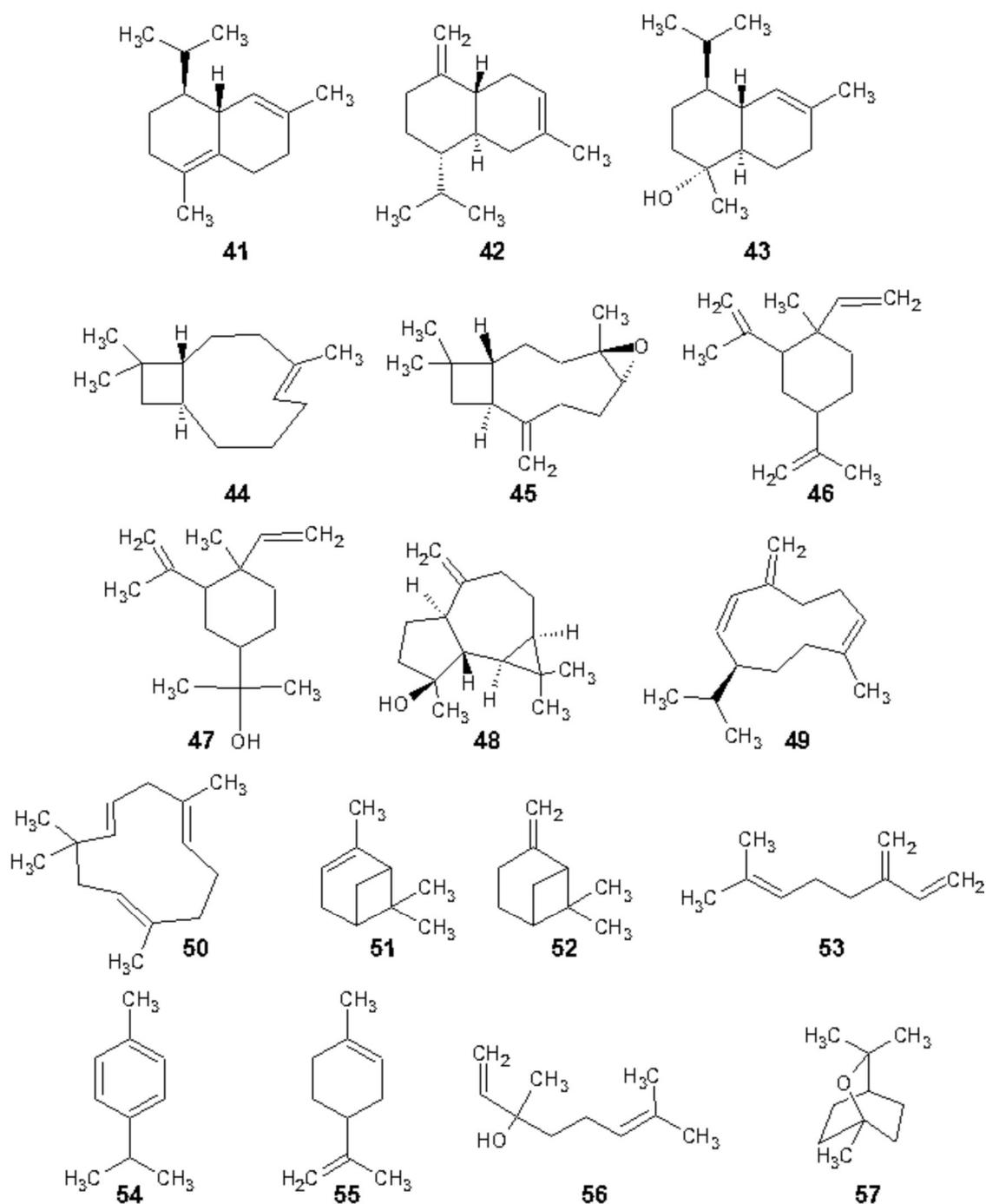
Os sesquiterpenos são obtidos da condensação de uma unidade IPP com outra de GPP, gerando o difosfato de farnesila (FPP) com 15 unidades de carbono. A condensação de uma unidade de IPP com outra de FPP resultará em difosfato de geranilgeranila (GGPP) com 20 unidades de carbono, originando os diterpenos (ALCANTARA, 2015). Os triterpenos, com 30 unidades de carbono, podem ser formados pela condensação de duas unidades de FPP e para os tetraterpenos, com 40 unidades de carbono ocorre a condensação de duas unidades de GGPP (MONTANARI, 2010).



**Figura 12:** Rota biossintética dos terpenóides. Via do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. Adaptado de: DEWICK, (2002)

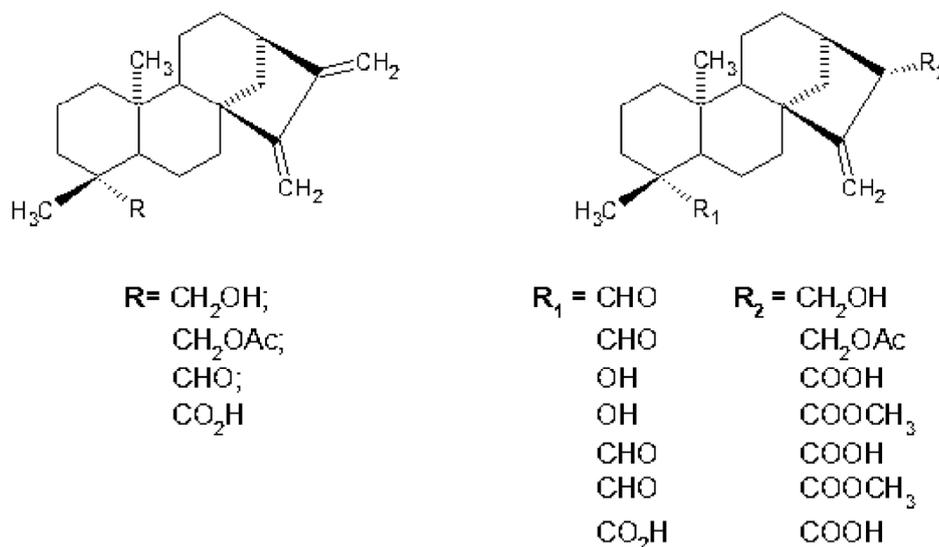
Os óleos essenciais são obtidos a partir de uma mistura de terpenos, sendo mais comuns os monoterpenos, e sesquiterpenos em espécies de *Annonaceae* (ALCANTARA, 2015). ANDRADE, et al. (2003), fez um levantamento de 1954 a 2001 e identificou 518 terpenos, distribuídos em 11 esqueletos diferentes, sendo mais comuns os diterpenos do tipo caurano (LUNA, 2006). Alguns óleos essenciais de espécies da família das *Annonaceae* têm importância econômica, como é o caso do óleo de cananga, isolado de *Cananga odorata macrophylla* e o óleo de ylang-ylang, isolado de *Cananga odorata geminua* (ALCANTARA, 2015) utilizados na perfumaria (CRAVEIRO e col., 1981).

Os constituintes terpênicos que mais se destacam em espécies do gênero *Annona* são o  $\alpha$ -cadineno (41),  $\gamma$ -cadineno (42),  $\alpha$ -cadinol (43), E-cariofileno (44), óxido de cariofileno (45),  $\beta$ -elemeno (46), elemol (47), espatulenol (48), germaceno D (49) e  $\alpha$ -humuleno (50), (RODRIGUES, 2016) sendo esses apresentados na Figura 13. Podem ainda ser observados, como constituintes majoritários, o  $\alpha$ -pineno (51),  $\beta$ -pineno (52), mirceno (53), p-cimeno (54), limoneno (55), linalol (56) e 1,8-cineol (57) (Figura 13) (RABELO, 2015).



**Figura 13:** Terpenóides isolados de diversas espécies vegetais pertencentes ao gênero *Annona*. Adaptado de: RODRIGUES (2016)

Os diterpenóides do tipo ent-kaurano podem ser considerados como marcadores quimiotaxionômicos do gênero *Annona* dada a sua comum ocorrência em diversas espécies. Algumas estruturas desse tipo de terpenos são mostradas na Figura 14, abaixo.



**Figura 14:** Estruturas básicas de diterpenos do tipo ent-Kaurano. Adaptado: LUNA (2006)

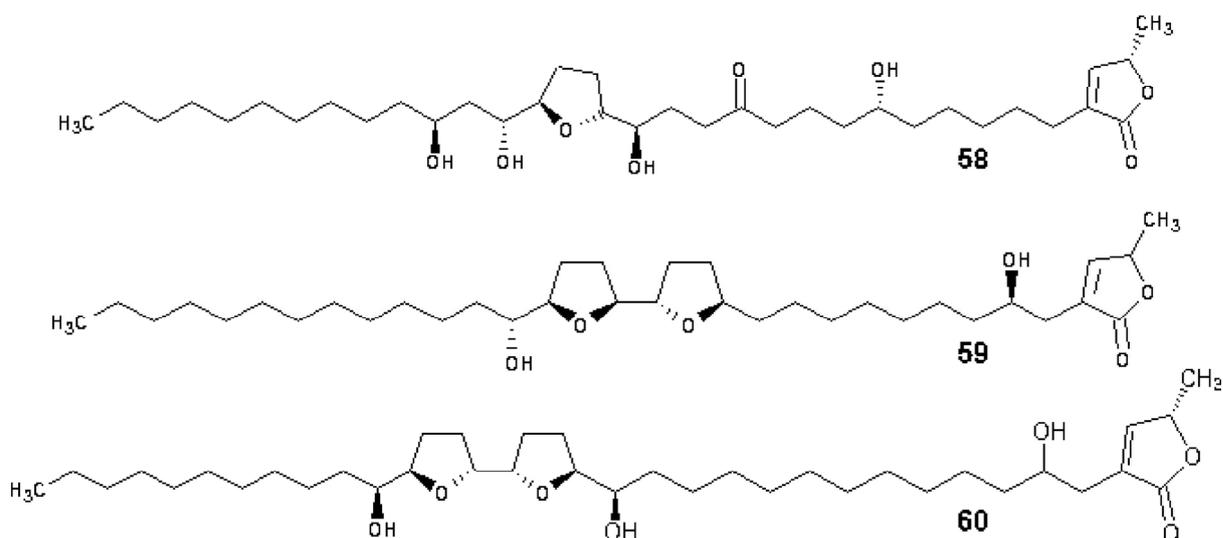
Muitos desses óleos essenciais de *Annonaceae* apresentam atividades leishmanicida, tripanocida, antimicrobiana, anti-inflamatória e antinociceptivos (SIQUEIRA e col., 2011; COSTA e col., 2009a; SOUSA e col., 2004)

### 3.5.3 Acetogeninas

As acetogeninas são compostos C<sub>35</sub>-C<sub>39</sub> derivados de ácidos graxos de cadeia longa, contendo duas cadeias longas de hidrocarbonetos, uma das quais conecta um grupo terminal  $\gamma$ -lactona-2,4-dissubstituído, podendo ser saturado ou  $\alpha$ ,  $\beta$ -insaturado a um número variável de anéis tetrahydrofurânicos (THF). As cadeias hidrocarbônicas apresentam-se geralmente oxigenadas, com hidroxilas, acetoxilas e/ou cetonas. Também foram reportadas acetogeninas sem a presença do anel THF, com anéis simples, contendo ligações duplas, e apresentando, ou não, grupos etóxidos. (FANG, et al. 1993; CHANG & WU, 2001).

O gênero *Annona* é o que mais contém esse metabólito isolado, sendo que das 417 acetogeninas isoladas até 2004, 289 foram obtidas de vegetais desse gênero, segundo

BREMEJO, et al. (2005). Na Figura 15, abaixo, são apresentados algumas acetogeninas isoladas no gênero *Annona*.

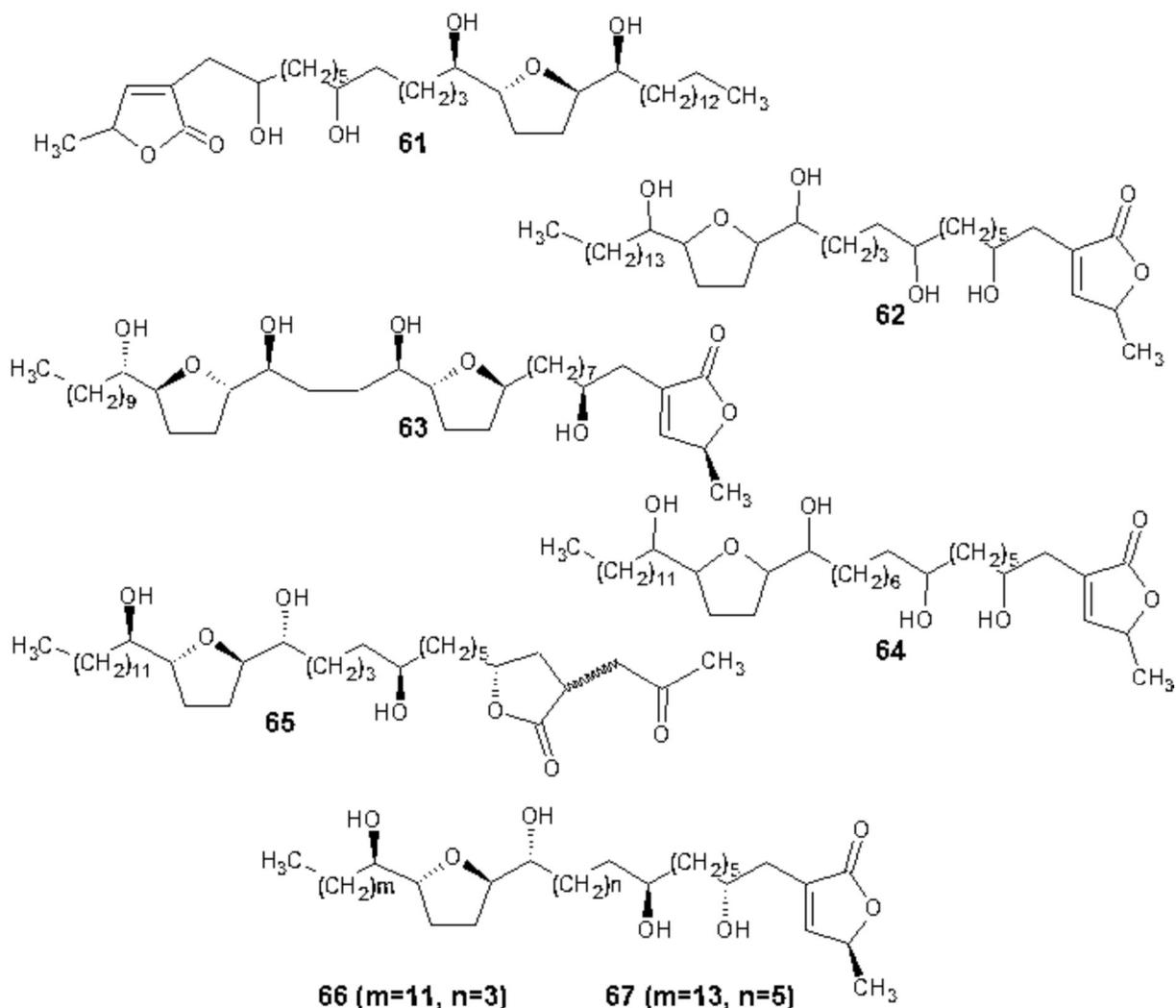


**Figura 15:** Acetogeninas isoladas de vegetais do gênero *Annona*. 58 – annoglacina, 59 – rolidecina C, 60 - bullatacina. Fonte: Autor

Esses metabólitos constituem uma classe de produtos naturais promissora como protótipos de agentes inseticidas, sendo encontradas em diversas parte do vegetal como nas cascas de galhos nas raízes e principalmente em sementes de plantas da família *Annonaceae* (BERMEJO et al., 2005; CASTILLO-SÁNCHEZ et al., 2010).

Acetogeninas têm apresentado uma grande variedade de propriedades biológicas, tais como citotóxica, antitumoral, antiparasitária, pesticida, antimicrobiana e atividade imunossupressora (ALALI, et al., 1999). Além disso, ANSANTE, (2014), observou o potencial inseticida da acetogenina roliniastatina-1, obtida a partir de extratos metanólicos das folhas de *Annona mucosa*.

LUNA, (2006) isolou as acetogeninas anossenegalina, xilomaticina, bulatanocina, anomontacina, anonacina, goniotalicimina, isoanonacina (Figura 16, pagina 38), a partir do extrato bruto das folhas de *Annona muricata* e realizou testes frente a caramujos (*Biomphalaria glabrata*) e ao mosquito da dengue (*Aedes aegypti*) observando-se toxicidade e morte para ambas as espécies estudadas em concentrações consideráveis.

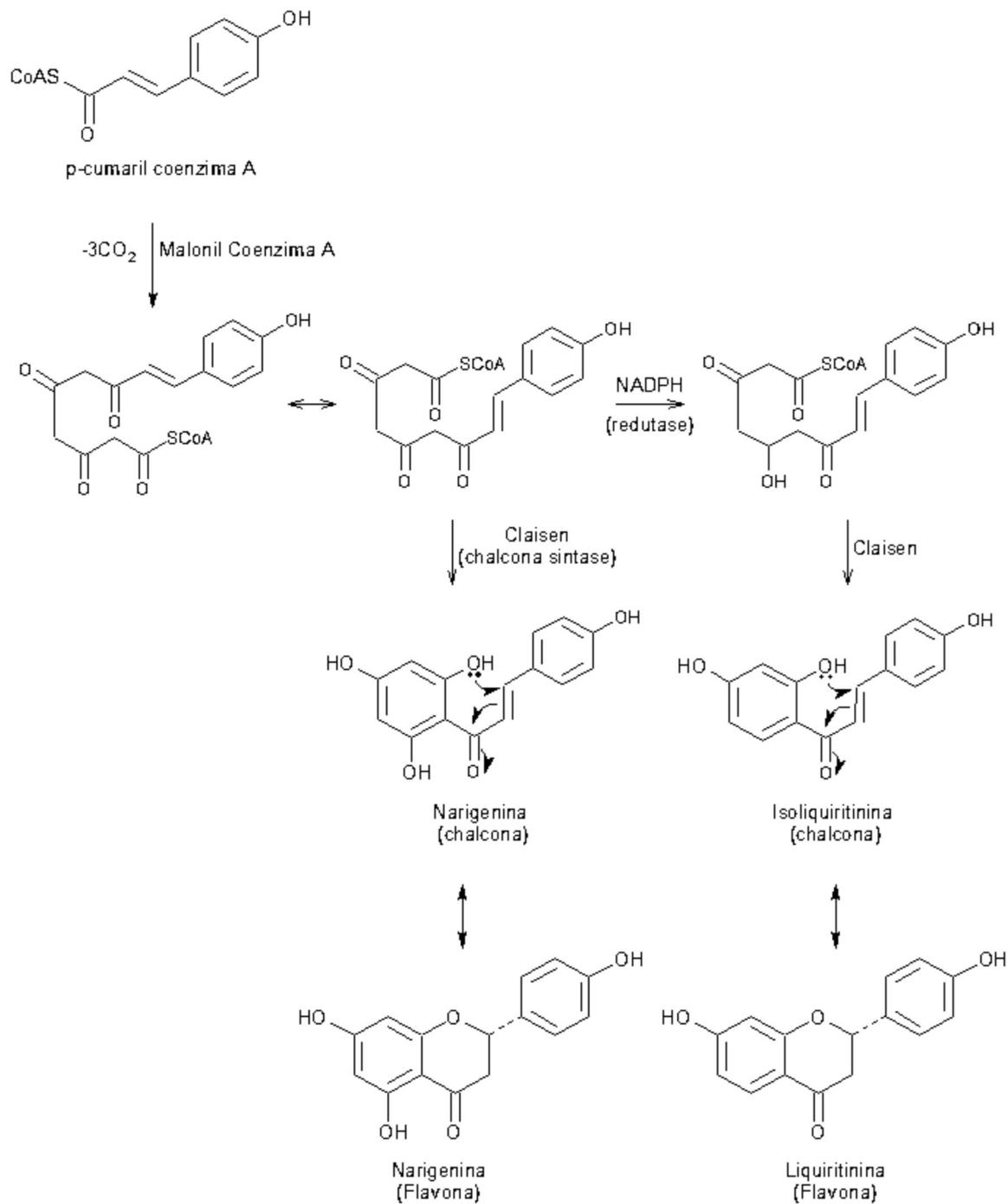


**Figura 16:** Acetogeninas isoladas das folhas de *Annona muricata*. 61 – anossenegalina, 62 – xilomaticina, 63 – bulatonicina, 64 – anomontacina, 65 – isoanonacina, 66 – anonacina, 67 – goniotalamicina. LUNA, (2006)

### 3.5.4 Flavonoides

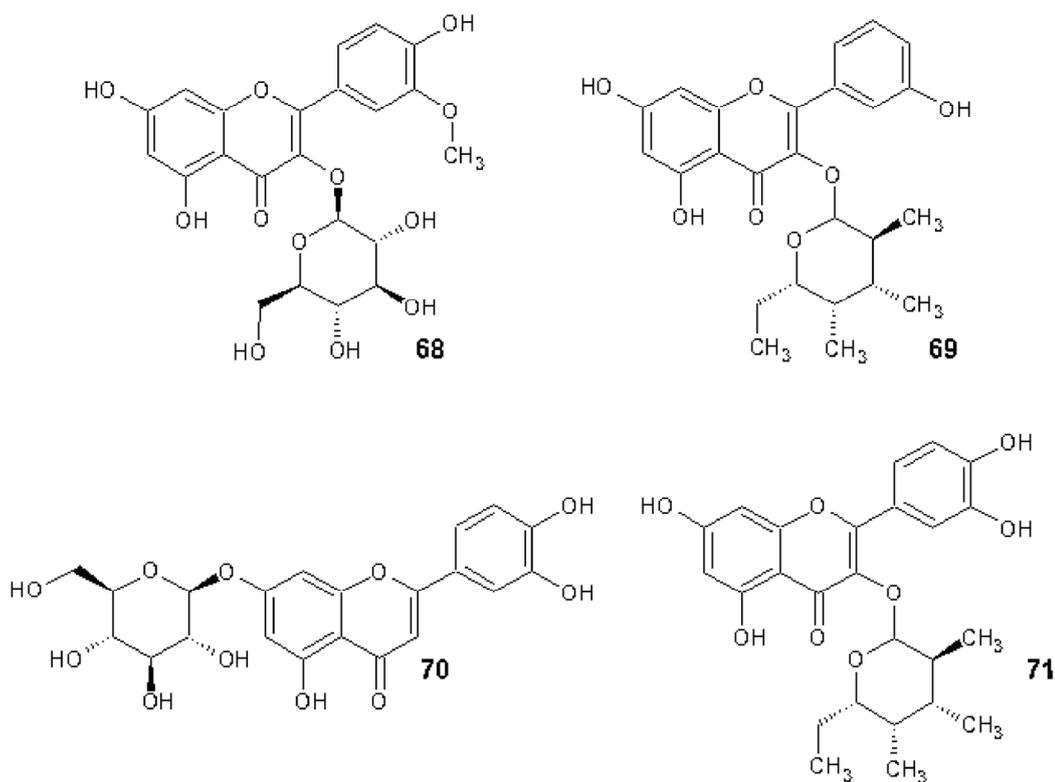
Os flavonoides podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavolignanas (BEHLING et al., 2004), porém, frequentemente ocorrem em plantas como derivados glicosilados, contribuindo para o brilho do azul, do vermelho e do laranja nas folhas, flores e frutos (AGUIAR et al., 2007).

Esses metabólitos são substâncias sintetizadas pelas plantas em respostas a infecções microbianas, o que justifica sua principal atividade biológica (DEWICK, 2002), sendo um produto de rota mista, biossintetizado a partir da rota do ácido chiquímico e do ácido acético (CAZAROLLI, 2008), como escrito na Figura 17, abaixo.



**Figura 17:** Rota biossintética de flavonoides. Destaque para as flavonas narigenina e liquiritina. Adaptado de: DEWICK, (2002)

As principais classes de flavonoides do gênero *Annona* são as a flavona (luteonina) e os flavonóis (ramnetina, quercetina, rutina, isoramnetina e canferol), mostrados na Figura 18, abaixo, sendo os mais abundantes os flavonóis e seus derivados glicosilados (SANTOS; SALATINO, 2000).



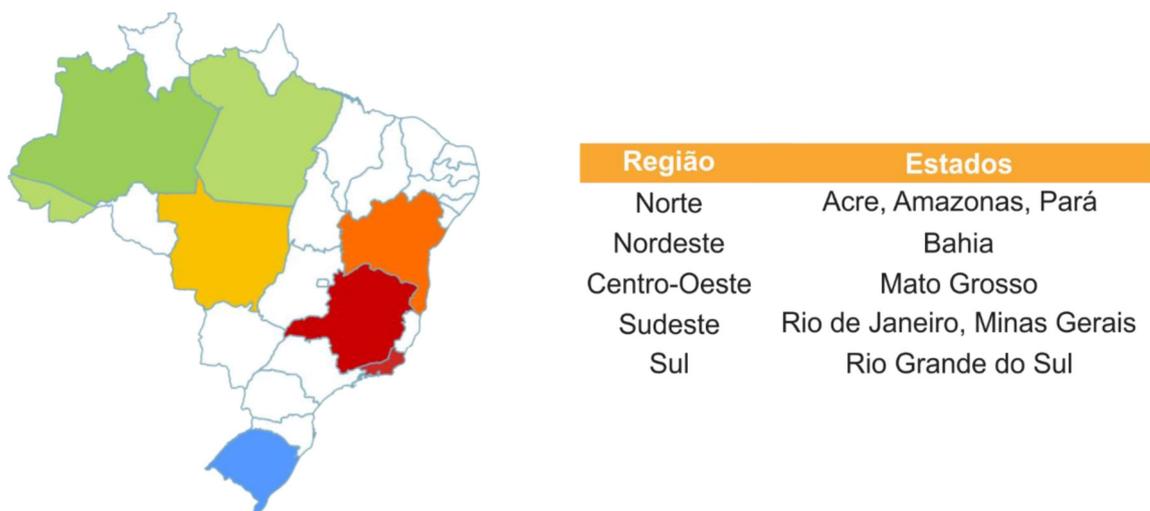
**Figura 18:** Flavonóides isolados do gênero *Annona*. 68 – isoramnetina-3-O-glicosídeo, 69 – canferol-3-O-galactosídeo, 70 – luteonina-7-O-glicosídeo, 71 – quercetina-3-O-galactosídeo.  
Fonte: (ARAUJO, 2013)

Estudos realizados quanto as atividades biológicas desses metabólitos comprovaram atividade antioxidantes (RICE-EVANS et al., 1995), vasodilatadora (DUARTE et al., 1993), anti-inflamatória (PATHAK et al., 1991), anticarcinogênica, antivirais (MIDDLETON et al., 2000), cardioprotetoras e antioxidantes (PATHAK et al., 1991; HOLLMAN et al., 1996; MARTINEZ-FLOREZ et al., 2000). Além disso os flavonoides são muito utilizados na indústria com corantes, aromatizantes e flavorizantes (BECHO, et al., 2009).

### 3.6 Espécie do estudo: *Annona mucosa* Jacq.

*Annona mucosa* Jacq. (Sin. *Rollinia mucosa* Jacq. Baill.), conhecida popularmente como biribá, biribá de Pernambuco, fruta da condessa, jaca de pobre, araticu ou araticum pitaya (IBF; LORENZI, 2006). Tem ampla distribuição geográfica, sendo cultivadas na América do Sul na Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana e Brasil, na América Central no

Panamá e Caribe e na América do Norte no México (USEFUL TROPICAL PLANTS<sup>3</sup>). No Brasil, sua mais corrente distribuição é mostrada na Figura 19, abaixo.



**Figura 19:** Distribuição geográfica da espécie *Annona mucosa* Jacq. no Brasil. Fonte: FLORA DO BRASIL<sup>3</sup>

O Biribazeiro (Figura 20, página 42) é uma árvore de médio porte, podendo alcançar de 4 a 15 metros de altura, seu tronco pode ter de 40 a 60 cm de diâmetro, tem galhos marrons, folhas alternas, decíduas, lisas, oblongas elípticas ou ovais oblongas com cerca de 4 a 15 cm de comprimento, com nervuras proeminentes e peninérveas (MORTON, 1987). Suas flores têm coloração verde-amarelado e estão dispostas em inflorescências, geralmente localizadas nas axilas das folhas, contendo de 1 a 3 flores, com pedúnculos e pedicelos densamente recoberto por tricomas verde-esbranquiçados. (IBF; MONTOSO GARDEN, LORENZI, 2006).

O fruto é esférico, ou cônico, na forma de coração, com cerca de 15 cm de diâmetro e casca amarelada, composta por segmentos cônicos mais ou menos hexagonais, cada um com uma protuberância tipo verruga. A polpa é branca, mucilaginosa, translúcida, succulenta, com sabor variando de levemente ácido ao doce (MORTON, 1987). Na fruta há numerosas sementes de cor marrom-escuro, brilhantes e elípticas, com cerca de 1,6 a 2 cm de comprimento. (MORTON, 1987; MONTOSO GARDEN).

<sup>3</sup> *Annona mucosa*, disponível em: <http://tropical.theferns.info/viewtropical.php?id=Annona+mucosa>, consultado em: jun/2017



**Figura 20:** *Annona mucosa* Jacq. Destaque para folhas, flores, e frutos, verde e maduro.  
Fonte: Reinaldo Aguilar<sup>4</sup>, (folhas e flores); Ahmad Morad<sup>5</sup> (frutos)

Várias partes do vegetal são utilizadas na medicina popular, e os efeitos biológicos observados variam de acordo com o material utilizado. Suas folhas são indicadas como medicação sudorífica, carminativa, estomáquica, antirreumática e anti-helmíntica por via oral

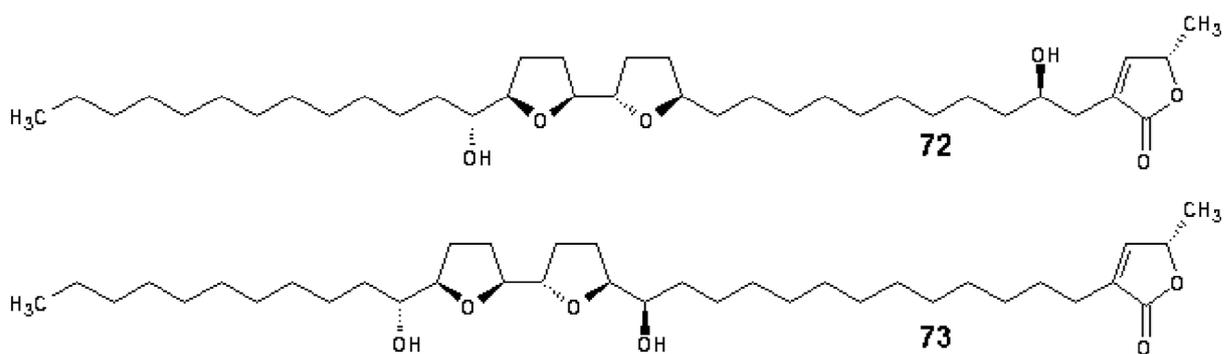
<sup>4</sup> Disponível em <<https://www.flickr.com/photos/adaduitokla/albums/72157626889686573/with/5900948242/>>, consultado em abr/2017

<sup>5</sup> Disponível em <<https://www.flickr.com/photos/plantaspininsulaosa/tags/rollinia/>> consultado em abr/2017

e, também podem ser utilizadas como compressas ou bochechos, no tratamento de estomatite, nevralgias e cefaleias, bem como, na forma de cataplasma em furúnculos e úlceras para induzir a supuração. Uma folha umedecida ou folhas machucadas, colocada na testa e nas fontes, são usadas para provocar o sono e aliviar a enxaqueca. Por suas folhas terem efeito inseticida, elas são aplicadas sobre ferimentos e úlceras, para evitar o ataque de insetos e suas larvas. As sementes trituradas são tóxicas e um eficiente meio para eliminação de piolhos e outros ectoparasitas, devendo evitar seu contato com os olhos pelo risco de causar cegueira (IBF).

Em estudos realizados por CHEN e colaboradores (1996) foi feito o isolamento dos alcaloides romucosina, anonaína, glaucina, purpureína, liriodenina, oxoglaucina, oxopurpureina, berberina e tetrahydroberberina, e as lignanas yangambina, magnolina, eudesmina e membrina a partir dos frutos dessa espécie.

GU e colaboradores (1997) isolaram, através de cromatografia em fase reversa de alta eficiência as acetogeninas rolidecina C (Figura 15, 59, página 37), e D (72, Figura 21) além da acetogenina desacetilivaricina (73, Figura 21). Através de testes biológicos do extrato metanólico das folhas comprovou-se a atividade citotóxica frente a linhagens tumorais de câncer de cólon para acetogenina rolidecina C, sendo tão potente quanto o medicamento utilizado no tratamento desse tipo de câncer, e a acetogenina rolidecina D que apresentou baixa atividade frente a outras seis linhagens tumorais humanas.



**Figura 21:** Acetogeninas Rolidecina D e Desacetilivaricina isoladas do extrato metanólico de *Annona mucosa*. Fonte: GU et al. (1997)

KUO et al. (2004) isolou o alcaloide romucosina I do extrato metanólico preparado a partir do caule do vegetal, e também os alcaloides romucosina C, tuduraina e promucosina, e em um estudo anterior (2001), avaliou o potencial antiplaquetário dos alcaloides romucosina

A, B, C e D, observando-se, para a romucosina A e D, uma significativa inibição de colágeno, ácido araquidônico e agregação plaquetária por conta da ativação plaquetária induzida.

DE LIMA (2011) isolou os alcaloides atherospermidina, e liriodenina, a partir de extratos diclorometânicos das folhas, e comprovou a atividade leishmanicida do extrato diclorometânico frente a *Leishmania spp*, bem como dos extratos hexânico das sementes e do alcaloide liriodenina.

BARBOZA (2013) avaliou a atividade leishmanicida de extratos obtidos a partir de sementes germinadas da espécie, observando-se atividade leishmanicida *in vivo* e *in vitro* mesmo com a toxicidade elevada para macrófagos. Além disso observou-se atividade antimicrobiana seletiva com inibição de crescimento de *Streptococcus pyogenes* e *Bacillus thurigiensis* em diferentes concentrações. As atividades biológicas observadas foram atribuídas as acetogeninas e alcaloides dos extratos metanólicos, hexânico e diclorometano utilizados.

RIBEIRO, et al. (2013) avaliou a atividade inseticida de extratos das folhas, galhos e sementes apontando o extrato das sementes como possível fonte de substâncias para a produção de inseticidas contra o gorgulho do milho (*Sitophilus zeamais* Mots).

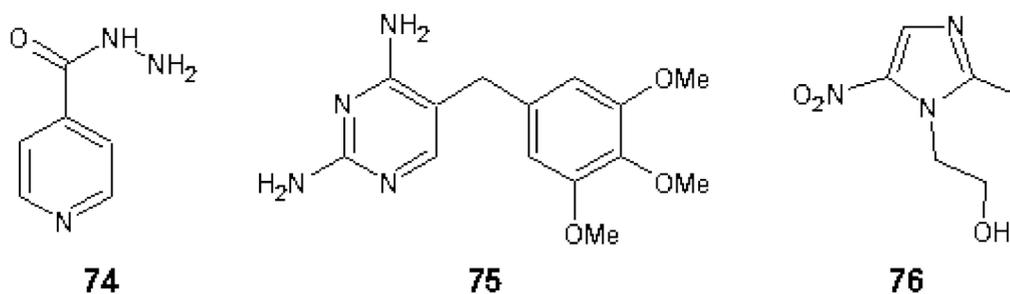
TURCHEN, e colaboradores (2016), avaliaram o efeito inseticida de extratos das folhas e sementes de *Rollinia mucosa*, frente ao percevejo marrom (*Euschistus heros* (F.)), onde observou-se que a atividade era melhor nos extratos obtidos a partir das sementes do vegetal, que a mortalidade das ninfas variava de acordo com a concentração do extrato, aumentando com concentrações superiores a 5,0mg/L, e que a sobrevivência de adultos do percevejo marrom diminuiu em concentrações superiores a 20 mg/L do extrato das sementes. Uma drástica redução na fecundidade e fertilidade dos insetos foi observada. Tais efeitos foram atribuídos a presença de acetogeninas no extrato das sementes.

### **3.7 Considerações sobre a atividade antimicrobiana**

Antibióticos são definidos como compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos e/ou bactérias sendo um grande marco na pesquisa de antibióticos naturais a descoberta da penicilina, por Alexandre Fleming em 1928, sendo isolada em 1940 por Chain, Florey e colaboradores de culturas do *Penicillium*, purificando o composto e realizando os primeiros ensaios biológicos (RABELO, 2013).

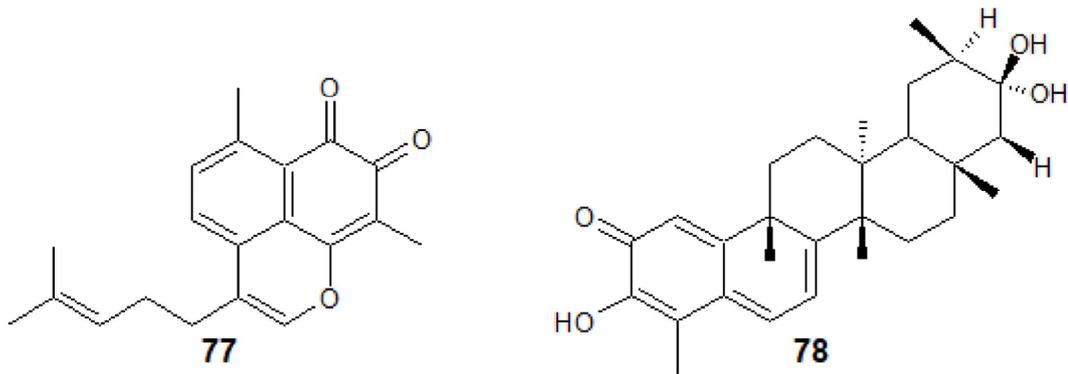
Devido ao grande consumo de antibióticos, observou-se o desenvolvimento de resistências as drogas utilizadas normalmente em tratamento de diversas infecções, o que torna tais medicamentos cada vez menos eficazes. Pesquisas na área de produtos naturais com extratos vegetais que apresentem ação antimicrobiana são vistas como uma saída para o combate aos microrganismos patogênicos e também às múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, levando assim à procura dessas novas alternativas terapêuticas (PALMEIRA et al., 2010).

Entre os anos 1940-1960 vários antibióticos foram descobertos através de triagens de produtos naturais microbianos, sendo a maioria deles eficazes para o tratamento de bactérias Gram positivas:  $\beta$ -lactâmicos (cefalosporina), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina) e outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina B). Neste período, apenas três derivados sintéticos foram introduzidos no mercado: isoniazida (74), trimetopim (75) e metronidazol (76) (Figura 22) (GUIMARÃES et al., 2010).



**Figura 22:** Antibióticos de origem sintética. Fonte: Autor

Em 1950 foram isolados os primeiros compostos de espécies vegetais com ação antimicrobiana: o diterpeno biflorina (77) e o triterpeno maitenina (78) (Figura 23, página 46). Outros compostos flavonoídicos com propriedades antimicrobianas efetivas contra *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA) foram isolados, como o lapachol e derivados, a plumbagina, a xantoxilina, filantimida, luteolina (REZENDE, 2007; XU; LEE, 2001; ZACCHINO, 2001).



**Figura 23:** Primeiros terpenóides isolados com ação antimicrobiana. 77 – biflorina, 78 - biflorina. Fonte: Autor

Vários estudos prévios revelaram que a atividade antimicrobiana de muitos extratos de plantas é devido à presença de alcaloides (SINGH et al., 2002), saponinas (BARILE et al., 2007; AUGUSTIN et al., 2011) e flavonoides (CUSHNIE, LAMB, 2005). Podem ser mencionados os diterpenos e sesquiterpenos (BRAZ-FILHO, 1999), os flavonoides quercetina, e O-glicosídeos de quercetina e os alcaloides anonaína, estefarina, glaziovina, anolobina, nornanternina e a lanuginoseina, todos obtidos de vegetais pertencentes ao gênero *Annona* (LAGE, 2011).

### 3.8 Referencias Taxionômicas

A espécie em estudo *Annona mucosa* Jacq. É classificada taxionômicamente, seguindo o sistema de taxionomia vegetal – APG (*Angiosperm Phylogeny Group*, 2003) como:

**Tabela 4:** Classificação taxionômica da espécie de estudo

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Divisão</b>	<i>Magnoliophyta</i>
<b>Classe</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Ordem</b>	<i>Magnoliales</i>
<b>Família</b>	<i>Annonaceae</i>
<b>Subfamília</b>	<i>Annonoideae</i>
<b>Gênero</b>	<i>Annona</i>
<b>Espécie</b>	<i>Annona mucosa</i> Jacq.

## **4. PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL**

### **4.1 Suportes utilizados na cromatografia**

Para a Cromatografia de camada delgada analítica (CCDA) foram utilizadas placas preparadas com sílica gel 60, da marca Merck. Foram preparadas suspensões da sílica em água destilada, e estas transferidas para placas de vidro com dimensões de 2 por 5 cm, até que houvesse uma fina camada da suspensão depositada sobre o vidro.

Para a Cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP) foram utilizadas placas com sílica gel 60G F264 para que fossem observadas substâncias na câmara UV, no comprimento de onda de 264nm. As placas foram preparadas com uma suspensão da sílica em água destilada (13 gramas de sílica para 70 mL de água destilada por placa), sendo esta transferida para placas de vidro com dimensões de 20 por 20 cm.

Após preparadas, todas as placas de cromatografia em camada delgada (analíticas ou preparativas) foram secas a temperatura ambiente, e logo em seguida levadas a estufa a 100°C por cerca de uma hora, para a ativação da sílica.

### **4.2 Reveladores**

Utilizou-se o revelador químico, Dragendorff para a revelação das placas de CCDA, para a confirmação de alcaloides e iodo ressublimado como revelador universal. Apesar de ser utilizado para indicar a presença de alcaloides, o reagente de Dragendorff tem como interferente os anéis lactônicos, e também pode indicar resultados positivos para a presença de acetogênicas.

### **4.3 Equipamentos**

Cromatógrafo líquido de alta eficiência (SHIMADZU), Evaporador rotativo (Fisatom 802), balança analítica (SHIMADZU AUY220), estufa de secagem esterilização (Odontobrás), câmara escura UV com lâmpada em 254nm (Optimiza tech), bomba a vácuo (Tecnal TE-058). Cartuchos para extração em fase sólida Chromabond C18, filtros PTFE 0,22µm, Coluna Luna (5 µm, C18, 100A, 150 µm X 4,6 µm), Espectrômetro de massas *Thermo Fisher Scientific* com fonte de *eletronspray* e analisador do tipo *ion-trap* linear.

As análises via Espectrometria de Massas foram realizadas no Instituto de Biociências da Unesp – Campus Litoral Paulista.

#### **4.4 Reagentes e solventes**

Os reagentes utilizados nesse trabalho foram: ácido clorídrico (MERCK), hidróxido de amônio (QUIMEX), cloreto de ferro (ISOFAR), hidróxido de sódio (QUIMEX), hidróxido de potássio (ISOFAR), carbonato de bismutila (QUIMEX), iodo (QUIMEX).

Os solventes utilizados foram: hexano (QUIMEX), diclorometano (QUIMEX), clorofórmio estabilizado (QUIMEX), acetato de etila (MERCK) e metanol (QUIMEX). Todos os solventes utilizados eram de grau P.A. Para as extrações que consumiram muito reagente fez-se a recuperação em rotoevaporador e reutilização do solvente nas extrações. Tais recuperações foram realizadas com clorofórmio, hexano e acetato de etila.

#### **4.5 Material botânico**

##### **4.5.1 Coleta e identificação**

O material botânico foi coletado entre os meses de julho e agosto de 2015, no bairro Espaço sideral, em São Luís. A coleta foi realizada durante o período de estiagem da região, sendo as partes aéreas do vegetal colocados para secar sob proteção da incidência direta da luz solar durante uma semana.

##### **4.5.2 Preparo do extrato bruto do material vegetal**

As partes aéreas, após secas, foram separadas e delas foram removidas as folhas, sendo estas limpas para evitar possíveis contaminantes. O material obtido foi triturado no moinho de facas, e em seguida pesadas (200,88g) e transferidas para um frasco onde seria realizada a extração.

Utilizou-se a extração exaustiva a frio por maceração, sendo a maceração da torta vegetal repetida por mais 3 vezes. No final das extrações o extrato hidroetanólico 70% das folhas (EhF) foi transferido para um frasco limpo e reservado e o material sólido (torta vegetal)

descartado. Como etapa posterior realizou-se a concentração do extrato hidroetanólico 70% em evaporador rotativo sob pressão reduzida, a 45°C (Figura 24).



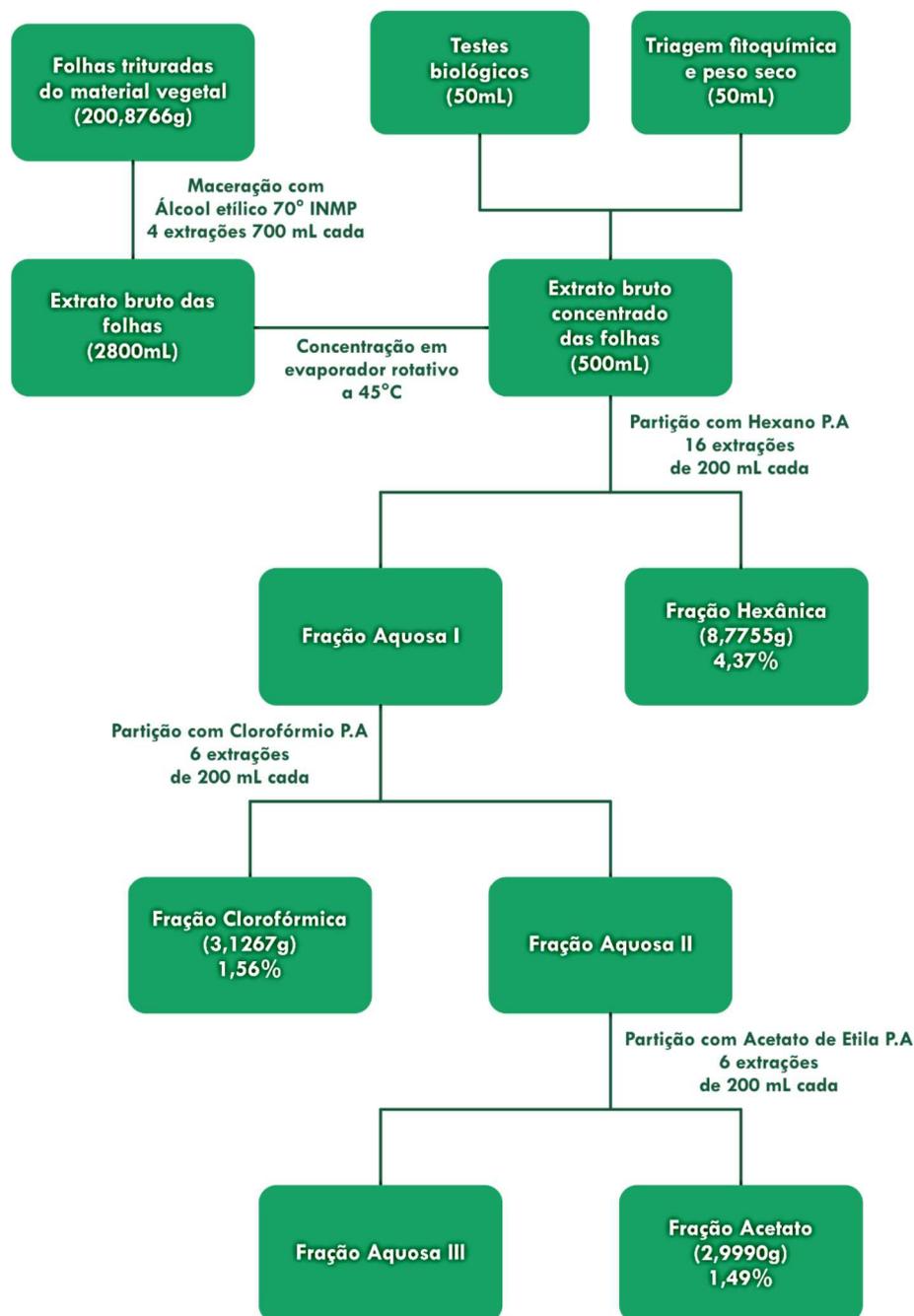
**Figura 24:** Etapas de preparo e concentração do extrato bruto: a) folhas do vegetal trituradas; b) etapa de maceração das folhas com álcool etílico 70%; (c) filtração e (d) concentração do extrato bruto hidroetanólico 70%. Fonte: Autor

#### 4.6 Fracionamento do extrato bruto

Foram retirados 50 mL do extrato hidroetanólico bruto, após a concentração, para a realização de ensaios microbiológicos e outros 50 mL para a realização da triagem fitoquímica, sendo destes separados 3 mL para a realização do peso seco do material para a avaliação do rendimento de extração. Com o volume restante do extrato hidroetanólico (500mL) deu-se sequência ao fracionamento com solventes orgânicos em ordem crescente de polaridade (hexano, clorofórmio e acetato de etila) por um processo de partição sendo os solventes utilizados na extração líquido-líquido renovados após um período de 24 horas. Ao final dessa

etapa todas as frações foram coletadas, codificadas como FH (fração hexânica), FC (fração clorofórmica), FA (fração acetato de etila), reservadas e rotoevaporadas até a redução do volume, sendo em seguida secas totalmente sob corrente de ar aquecido.

Um esquema do trabalho realizado pode ser observado na Figura 25, abaixo.



**Figura 25:** Fluxograma de trabalho para a obtenção dos extratos e suas frações. Fonte: Autor

#### **4.7 Prospecção fitoquímica do extrato**

Os testes realizados seguiram a metodologia proposta por MATOS (2009) para a prospecção de constituintes do extrato hidroetanólico 70% e os resultados foram utilizados como parâmetro inicial para avaliar a presença de determinadas classes de metabólitos secundários no extrato.

Os testes foram realizados para avaliar a presença de fenóis, taninos, antocianinas, antocianidinas, flavonoides, leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas, esteroides, triterpenoides, saponinas, alcaloides e bases quaternárias.

#### **4.8 Determinação do peso seco e avaliação do rendimento da extração hidroalcoólica.**

Do volume total reservado para a prospecção fitoquímica, retirou-se uma alíquota de 3 mL para a realização do peso seco. Essa alíquota foi dividida em três partes, de 1mL cada, e transferida para frascos separados, previamente pesados, que foram levados para a secagem total através de corrente de ar aquecido. Após a secagem total da parte líquida, os frascos foram novamente pesados, e tirou-se uma média dos valores obtidos para determinar a concentração do extrato hidroetanólico em g/mL. Com esses dados realizou-se o cálculo de rendimento da extração através de métodos matemáticos.

#### **4.9 Preparo da fração alcaloídica para análise microbiológica**

Solubilizou-se com 20mL de clorofórmio uma parte da fração clorofórmica (0,44g), procedendo-se a lavagem dessa fração, em um funil de separação, com 25mL de solução de HCl 3%, reservando-se a fração aquosa. A lavagem foi efetuada por três vezes consecutivas, totalizando 100 mL de solução ácida.

A fração aquosa ácida foi então basificada com hidróxido de amônio até pH 11. Essa fração foi extraída sucessivamente por 4 vezes com 30mL de clorofórmio. Após a extração a fração alcaloídica foi seca, pesada e reservada para tratamentos posteriores. Essas etapas estão apresentadas resumidamente no fluxograma apresentado na Figura 26, página 53.



**Figura 26:** Etapas para preparo da amostra dos alcaloides totais (FAT). Fonte: Autor

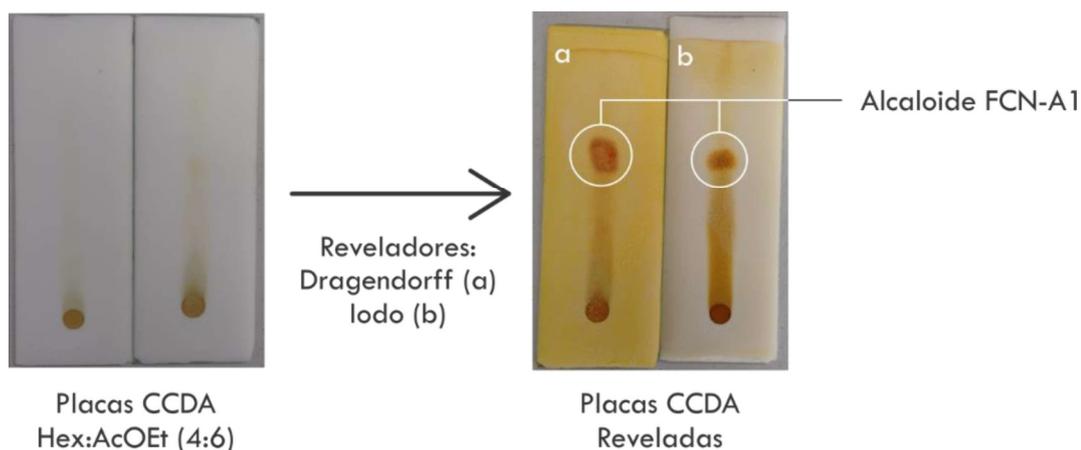
#### 4.10 Isolamento de alcaloides por CCD

Confirmada a presença de alcaloides no extrato vegetal, selecionou-se a fração clorofórmica para trabalho, já que análises cromatográficas prévias mostraram a presença de alcaloides apenas nessa etapa do fracionamento orgânico.

Inicialmente realizou-se uma CCDA exploratória da fração clorofórmica, para que através da otimização das corridas cromatográficas fosse encontrado um sistema de eluentes adequado para a separação dos alcaloides contidos nessa fração.

O sistema de eluentes utilizado foi Hex:AcOEt (4:6), e observou-se um alcaloide destacado dos demais *spots* na corrida cromatográfica, sendo este nomeado FCN-A1.

A corrida cromatográfica mostrou na placa vários *spots* com cores diferentes, mas nenhuma coloração foi observada na região em que estava contida a fração FCN-A1. Após a utilização dos reveladores químicos Dragendorff e vapor de iodo observaram-se manchas na placa de coloração avermelhadas, para o revelador Dragendorff, que são características da presença de alcaloides. Realizou-se a corrida em duas placas cromatográficas distintas, para avaliar além da presença de alcaloides, a presença de alguma outra substância co-eluindo com a que se encontrava separada na corrida cromatográfica (Figura 27).

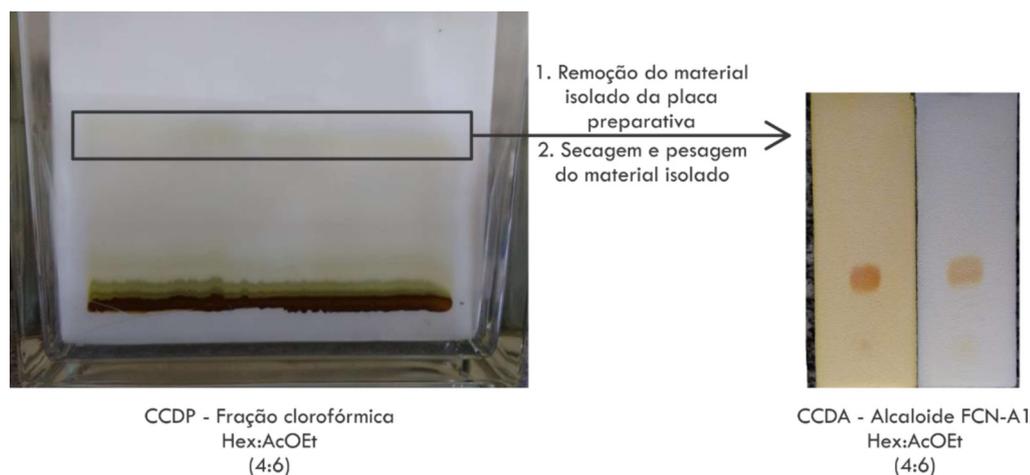


**Figura 27:** CCDA da fração clorofórmica com destaque para a substância FCN-A1. Fonte: Autor

As corridas cromatográficas analíticas evidenciaram que o sistema de eluentes utilizado tinha sido adequado para permitir o isolamento de um dos alcaloides presentes na fração clorofórmica e com essa informação utilizou-se o mesmo sistema de eluentes para isolar essa substância através de CCDP.

#### 4.10.1 Isolamento da fração FCN-A1

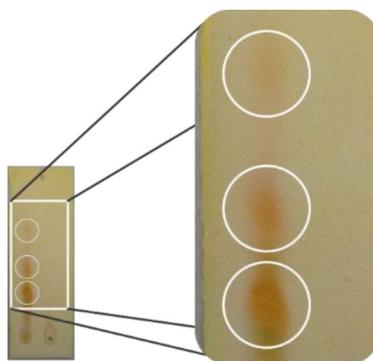
Após a realização da CCDP, e posterior separação da fração FCN-A1, o material seco foi então ressolubilizado e uma nova corrida cromatográfica foi realizada para confirmar a presença de alcaloides (Figura 28, página 55). Novamente a corrida foi realizada em duas placas, com dois reveladores químicos, um universal, e outro específico, para garantir que a fração isolada continha um alcaloide e que ele não estava co-eluindo com nenhuma outra substância.



**Figura 28:** CCDP da fração clorofórmica e CCDA do alcaloide isolado FCN-A1. Fonte: Autor

Na placa cromatográfica de confirmação observou-se a presença de apenas um alcaloide, tanto na placa revelada com Dragendorff, quanto na placa revelada na placa com vapor de iodo. O reagente químico Dragendorff confirma a presença de alcaloide na fração FCN-A1, e o revelador de iodo indica a ausência de substâncias co-eluído com esta fração isolada.

Após o isolamento dessa fração, como se sabia pelo perfil cromatográfico analítico da fração clorofórmica, ainda haviam outros alcaloides retidos na base da placa preparativa, que por serem compostos de maior polaridade, não foram eluídos já que a fase móvel não tinha força de arraste suficiente para promover a separação. Todo o material contido na base foi então removido da placa, e lavado com a mesma solução extratora que se utilizou na remoção do alcaloide FCN-A1. A seguir realizou-se uma corrida cromatográfica, em que se observou a presença de outros três alcaloides. (Figura 29)

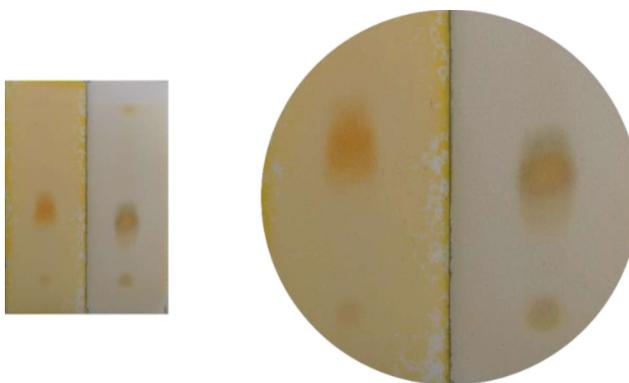


**Figura 29:** CCDA de alcaloides de maior polaridade com destaque para outros três alcaloides. Fonte: Autor

Após a CCDA do material retido na sílica, utilizou-se um novo sistema de eluentes para a separação da mistura de alcaloides retidos na base.

#### 4.10.2 Isolamento da mistura de alcaloides FCN-A2

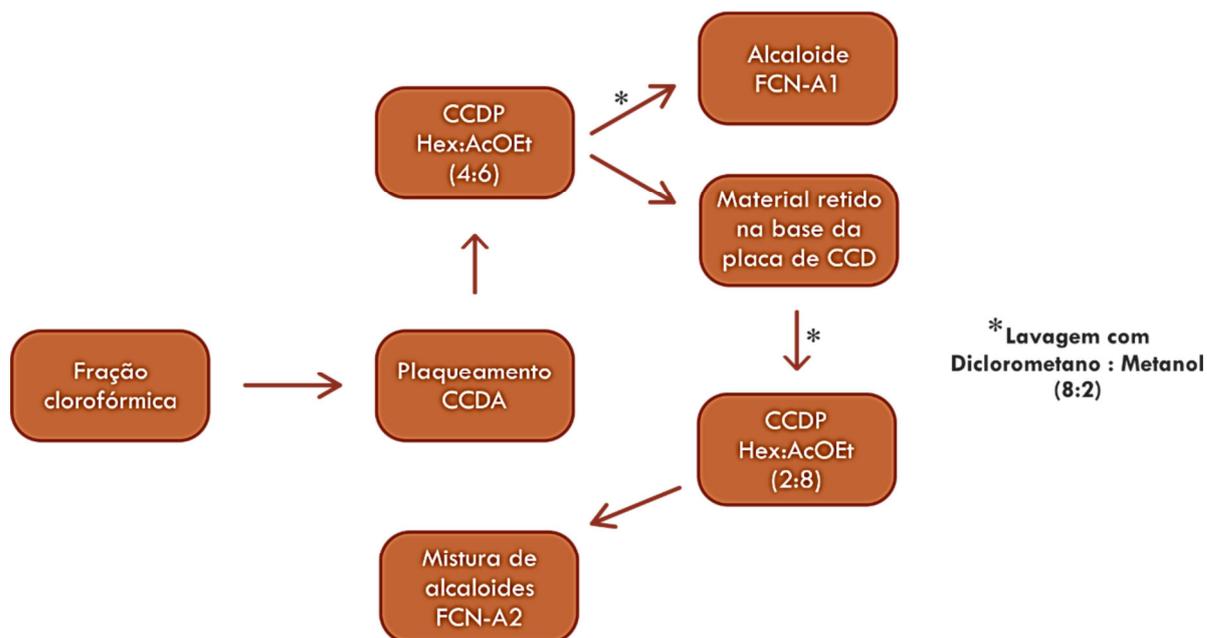
A mistura de alcaloides FCN-A2 foi isolada em CCDP, com o sistema de eluentes Hex: AcOEt (2:8). A massa do material isolado foi de 5,5 mg. O material tem aspecto oleoso, e coloração marrom esverdeado. Após a eluição cromatográfica, realizou-se uma corrida em CCDA para confirmação da separação do material isolado (Figura 30).



**Figura 30:** Misturas de alcaloides FCN-A2. Destaque para alcaloides isolados. Fonte: Autor

A cromatografia em camada delgada analítica revelou a existência de uma outra substância co-eluindo com os alcaloides separados na CCDP. Assim, devido a impossibilidade de separação por técnica cromatográfica de bancada fez-se a limpeza do material para posterior separação e identificação por LC-MS.

No fluxograma abaixo (Figura 31) é possível observar todo o esquema de trabalho realizado



**Figura 31:** Fluxograma de isolamento de alcaloides. Fonte: Autor

#### 4.11 Preparo de amostras para LC-MS

Como etapa prévia a realização das análises dos alcaloides por espectrometria de massas, realizou-se o preparo das amostras para evitar que impurezas ou partículas sólidas fossem levadas para a análise em LC/MS. Todos os solventes utilizados nessa etapa eram de grau HPLC.

##### 4.11.1 Preparo amostra FCN-A1

Após a secagem total, a amostra FCN-A1 foi diluída com 5 mL de Metanol, e uma alíquota de 0,5 mL foi transferida para um outro frasco onde realizou-se a diluição para 1,0mL, com MeOH. A seguir a amostra foi passada através de um filtro PTFE de 0,22 µm para um *vial* de HPLC, e a amostra foi reservada e rotulada.

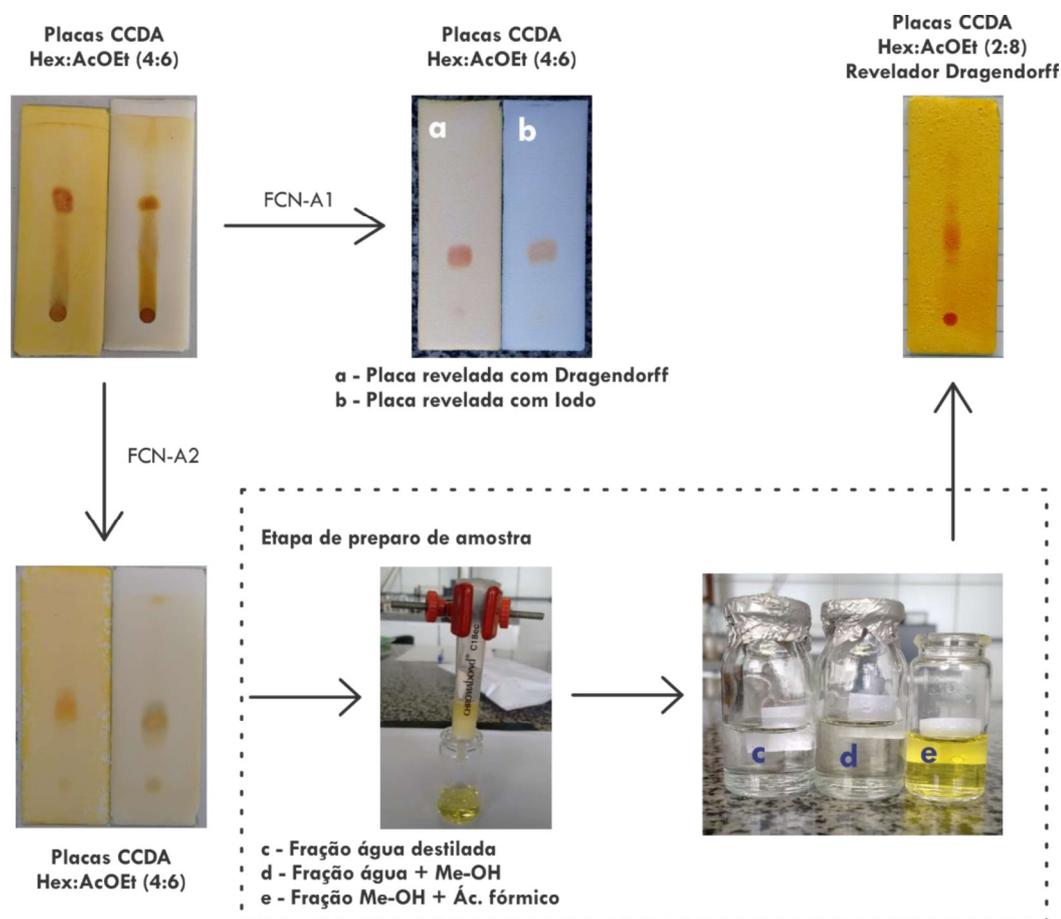
##### 4.11.2 Preparo de amostra FCN-A2

A amostra FCN-A2 foi ressolubilizada com água ultrapura, e passada em um cartucho de C18 (Chromabond C18ec), inicialmente com água ultrapura, logo em seguida com uma

mistura de água:metanol (1:1) e por fim com metanol puro. As frações foram coletadas separadas, rotuladas e levadas para a secagem dos solventes.

Após secas as frações foram plaqueadas, para obtenção dos perfis cromatográficos, e em seguida a fração contendo apenas água foi descartada, por não haver a presença de alcaloides, e as outras duas frações foram unidas novamente por apresentarem perfil cromatográfico semelhante. A essa mistura acrescentou-se 1 mL de MeOH e removeu-se o material particulado sólido com o auxílio de um filtro PTFE de 0,22 µm para um *vial* de HPLC, sendo a amostra reservada e rotulada.

Na Figura 32, abaixo tem-se um fluxograma com todas as etapas de trabalho



**Figura 32:** Preparo de amostra para a posterior análise através do método cromatográfico hifenado LC-MS. Fonte: Autor

#### 4.12 Análise das amostras por LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>

A análise das frações foi realizada num sistema de HPLC modelo SHIMADZU (Shimadzu Corp. Quioto, Japão), com coluna Luna C18, 100 Å, com poros de 5µm, e dimensões 150 x 4,6 mm. A fase móvel utilizada consistiu em água + ácido fórmico (0.01%) (A) e metanol + ácido fórmico (0,01%) (B). Utilizou-se um gradiente de eluição de 10 a 100% de B em 10 minutos, com um fluxo de fase móvel de 1mL/min, e um volume de injeção de 20µL.

Para o ensaio com FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, dissolveu-se 10mg das amostras secas em 1mL de metanol, grau HLPC, e utilizou-se o banho de ultrassom durante 5 minutos para a solubilização das amostras. Ao fim as amostras foram filtradas através de um filtro PTFE de 0,22µm e alíquotas de 20µL foram injetadas diretamente no LC-MS para as análises por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>.

A análise das amostras foi realizada em um analisador do tipo íon *trap* linear *Thermo Scientific* LTQ XL, equipado com fonte de ionização por eletronspray (ESI), utilizando-se o modo positivo (*Thermo Scientific*, San Jose, CA, EUA). Nas análises utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável. Na Tabela 5, abaixo, encontram-se os parâmetros utilizados na análise.

**Tabela 5:** Parâmetros utilizados na análise por FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>. Fonte: Autor

<b>Temperatura tubo capilar</b>	280°C
<b>Voltagem do spray</b>	5,00 kV
<b>Tensão capilar</b>	-90V
<b>Lentes de tubo</b>	-100V
<b>Fluxo de corrida</b>	5µL/min

A análise completa de varredura foi registrada na faixa de m/z de 100-1000. As demais fragmentações realizadas em estágios múltiplos (ESI-MS<sup>n</sup>) foram realizadas utilizando-se o método de dissociação por colisão (CID) contra hélio, para a ativação dos íons.

O primeiro evento de varredura foi um espectro de massa completo para adquirir dados sobre íons nessa faixa de m/z. O segundo evento de varredura foi uma experiência MS/MS realizada com uma varredura de dados dependente nas moléculas [M+H]<sup>+</sup> dos compostos de interesse com energia de colisão de 30%, e tempo de ativação 30ms. Os íons produzidos foram então submetidos a novas fragmentações obedecendo-se as mesmas condições da primeira

fragmentação, até não serem observados a produção de novos fragmentos. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico das frações analisadas foi feita comparando seus tempos de retenção com dados obtidos da literatura, além dos dados dos fragmentos obtidos através da espectrometria de massas.

#### **4.13 Ensaios microbiológicos**

Para os ensaios microbiológicos, utilizou-se a metodologia de difusão microbiológica em meio sólido, a técnica utilizada foi a de perfuração de poços. Foram testados o extrato bruto concentrado as frações hexânica, clorofórmica, acetato, a fração alcaloídica total e a fração FCN-A1.

##### **4.13.1 Microrganismos utilizados**

Foram utilizadas cepas da bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, e Gram-negativas *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Salmonella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 35218 e do fungo *Candida albicans* ATCC 9002.

##### **4.13.2 Preparo das suspensões microbianas**

Os microrganismos foram inicialmente reativados a partir das suas culturas originais e mantidas em meio líquido BHI (Brain Heart Infusion) à 37 °C por 24 horas. Posteriormente, as amostras foram cultivadas em placas de Ágar Nutriente a 37°C por 24 horas. As colônias isoladas foram então retiradas do meio de cultura, com o auxílio de uma alça de platina, e ressuspendidas em 3mL de solução fisiológica NaCl 0.89% estéril, até atingir uma turbidez equivalente na escala 0,5 de Mc. Farland, equivalente a  $1,5 \times 10^8$  bact/mL. Os testes foram realizados em duplicatas (CLSI, 2008).

##### **4.13.3 Preparo das amostras utilizadas nos ensaios microbiológicos**

As amostras vegetais testadas foram o extrato hidroetanólico 70% das folhas (EhF), as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato (FA), a fração de alcaloides totais (FAT) e a fração FCN-A1 separada. Todas as frações foram secas, de seus respectivos solventes

orgânicos, pesadas, e ressuspensas com 2mL de álcool etílico a 70%, para que se mantivesse um controle das concentrações das amostras testadas (Tabela 6).

**Tabela 6:** Concentrações das amostras avaliadas nos ensaios microbiológicos. Fonte: Autor

<b>Amostra</b>	<b>Concentração</b>
<b>EhF</b>	67000 µg/mL
<b>FH</b>	49800 µg/mL
<b>FC</b>	53500 µg/mL
<b>FA</b>	56900 µg/mL
<b>FAT</b>	11000 µg/mL
<b>FCN-A1</b>	76300 µg/mL

#### 4.13.4 Teste de perfuração em meio sólido

O potencial antimicrobiano das amostras foi avaliado pela técnica de perfuração de poços em meio ágar Müller Hinton, para os ensaios com bactérias, e ágar Sabourad 4% dextrose, para a amostra fúngica.

Inicialmente realizou-se o semeio dos microrganismos nas placas, com o auxílio de um swab estéril sendo em seguida o meio perfurado com cilindros de (6mm). Colocou-se em cada um dos poços alíquotas de 50 µL de cada um dos extratos e frações testados e seus respectivos controles. Utilizou-se como controle negativo álcool etílico 70%, utilizado para ressuspender as amostras, para que fosse possível observar a interferências da utilização desse solvente nos resultados, e como controle positivo cloranfenicol (0,02mg/ml) para as bactérias e nistatina 100.000 UI/mL suspensão para a amostra fúngica. As placas foram incubadas a 37 °C por um período de 24 horas. Após incubação, foi medido o diâmetro do halo de inibição (mm) do crescimento quando presente. (CLEELAND; SQUIRES, 1991).

## **5. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 Peso seco e avaliação do rendimento da extração**

Com a média das massas obtidas (n=3), foi possível calcular a concentração do extrato bruto, sendo esta igual a 0,0670g/mL.

A massa total do material solubilizado no extrato hidroetanólico 70% foi obtida através de regra de três simples, com os valores obtidos para o peso seco (0,0670g), e o volume total do extrato bruto (500mL), obtendo-se o valor de 33,4833g. Em seguida com uma nova regra de três, entre a massa total de material solubilizado no extrato bruto (33,4833g) e a massa do material vegetal utilizada para extração (200,8766g), obteve-se o rendimento expresso em porcentagem sendo este valor 16,67%.

### **5.2 Prospecção fitoquímica do extrato hidroetanólico 70%**

A prospecção fitoquímica do extrato foi realizada com etapa preliminar do estudo, com o objetivo de detectar as principais classes de metabólitos secundários presentes nessa espécie vegetal. Além disso, por falta de dados na literatura sobre a espécie em questão, traçar esses metabólitos através desses testes é importante na contribuição de dados químicos sobre a espécie, bem como do gênero e família.

A triagem fitoquímica detectou a presença de fenóis, flavonóis, flavanonas, esteroides livres. Testes preliminares com o reagente Dragendorff revelaram a presença de alcaloides (Tabela 7, página 63)

**Tabela 7:** Resultado da triagem fitoquímica do extrato hidroetanólico 70% das folhas. (-) resultado negativo; (+) baixa concentração; (++) média concentração; (+++) alta concentração; N – Não especificado. Fonte: Autor

<b>Grupos de metabólitos</b>	<b>EhF</b>
<b>Fenóis</b>	N
<b>Taninos</b>	++
<b>Antocianinas e Antocianidinas</b>	-
<b>Chalconas e Auronas</b>	-
<b>Flavonóis</b>	++
<b>Leucoantocianidinas</b>	+
<b>Catequinas</b>	-
<b>Flavanonas</b>	++
<b>Flavanonóis, Flavanonas, flavanonóis, xantonas</b>	+++
<b>Esteroides</b>	+++
<b>Triterpenoides</b>	-
<b>Saponinas</b>	++
<b>Alcaloides</b>	+++

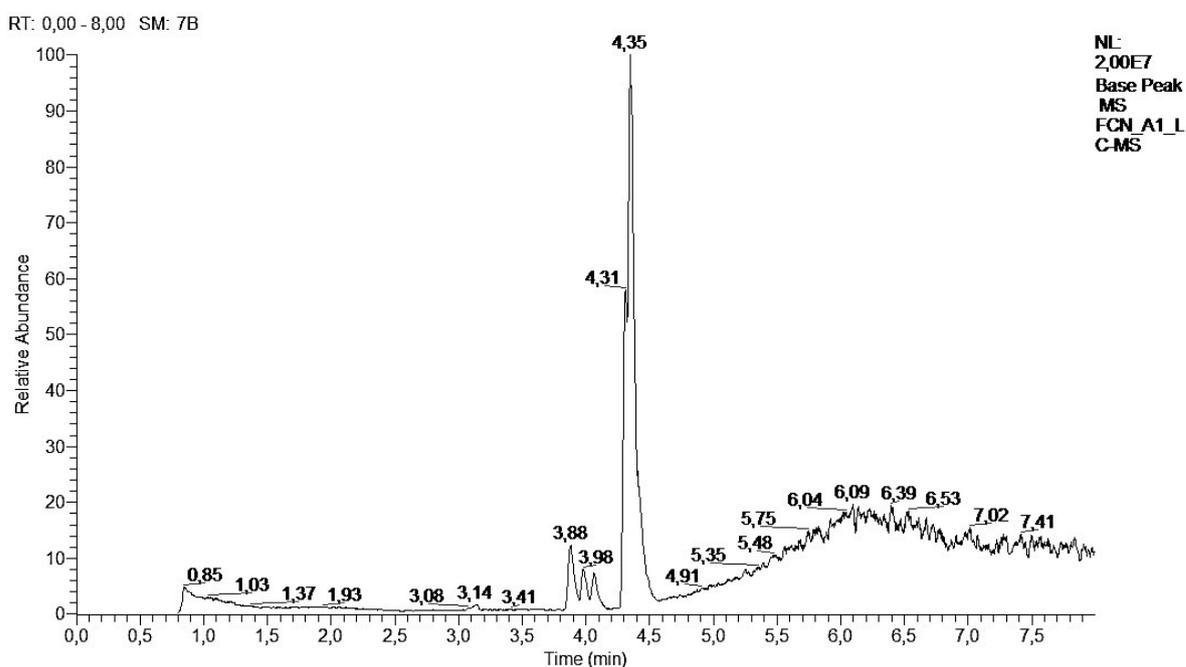
Devido a alteração de cor do extrato bruto, em algumas situações a presença de coloração decorrente da presença de uma substância pode ser interferente na observação de cor de alguma outra substância também contida no extrato. Isso comumente ocorre em extrato brutos de matrizes vegetais, sobretudo em extratos obtidos de folhas, por conter uma mistura grande de metabólitos. Para minimizar essas interferências cada ensaio é realizado várias vezes para uma mesma classe de metabólitos secundários, com diferentes reações químicas.

A presença de alcaloides e flavonoides já era esperada durante a realização da triagem fitoquímica, por serem metabólitos secundários amplamente encontrados em diversas espécies de vegetais do gênero *Annona*. A confirmação de alcaloides presentes no extrato vegetal direcionou o trabalho para o isolamento de substâncias presentes nessa classe.

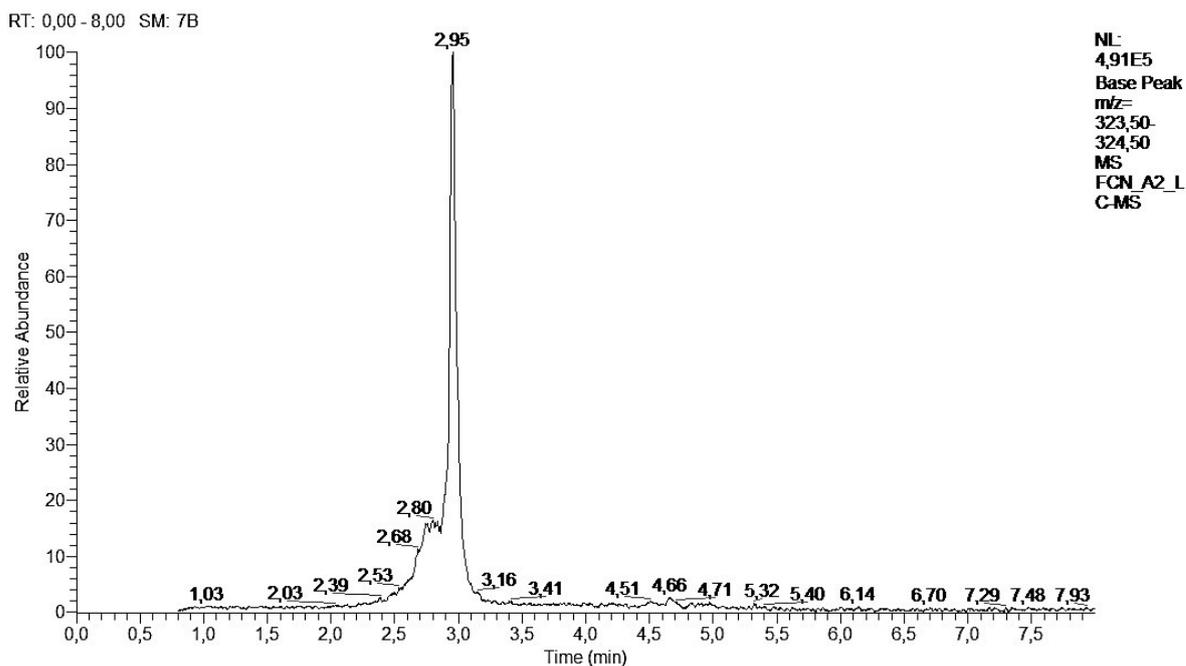
### 5.3 Identificação estrutural de substâncias das frações FCN-A1 e FCN-A2

A corrida realizada na primeira etapa com o objetivo de adquirir dados relativos aos íons gerados na fragmentação, utilizando a técnica LC-ESI-IT-MS e FIA-ESI-IT-MS<sup>n</sup>, no modo positivo, encontra-se na Figura 33 (FCN-A1), abaixo, e na Figura 34 (FCN-A2), página 65.

A FCN-A1 apresentou 4 picos principais, que não eram observados os *spots* em CCD já que por apresentarem baixas concentrações e ter os *spots* espalhados, não eram observados quando revelados com vapor de iodo, que comprovariam a presença das outras substâncias co-eluindo com o alcaloide alvo.



**Figura 33:** Cromatograma de íons totais da fração FCN-A1 adquirido por LC-ESI-IT-MS.  
Fonte: Autor



**Figura 34:** Cromatograma de íons totais da fração FCN-A2 adquirido por LC-ESI-IT-MS.  
Fonte: Autor

Na segunda etapa da análise, uma varredura MS/MS foi realizada, para que dados estruturais fossem obtidos. Os dados obtidos através dos íons moleculares foram comparados com dados da literatura para metabólitos isolados do gênero *Annona*.

### 5.3.1 Fração FCN-A1

A fração FCN-A1 isolada através de CCDP, foi pesada, obtendo-se 33,1 mg da substância, que tem aspecto oleoso e coloração alaranjada.

Através dos dados obtidos apenas por espectrometria de massas, não foi possível realizar a identificação das substâncias contidas nessa fração já que a análise de massas não foi realizada com energia de ionização suficiente para que houvesse a aquisição dos dados de fragmentação das estruturas. Estudos posteriores com a fração FCN-A1 serão realizados para que haja a otimização da metodologia analítica utilizada.

### 5.3.2 Fração FCN-A2

Da Fração FCN-A2 os picos selecionados encontram-se nos tempos de retenção, em minutos, 2,97 e 4,21, apresentando picos de substâncias que poderiam ser identificadas através dos dados obtidos por espectrometria de massas. As estruturas foram identificadas por comparação por dados contidos na literatura, e encontram-se nas Figuras 35 e 37, abaixo.

Na Figura 35, observa-se o espectro de massas para uma substância com pico base de  $m/z$ : 324  $[M+H]^+$ , e demais fragmentos com  $m/z$ : 309  $[M^+-CH_3]$ ,  $m/z$ : 278  $[M^+-CH_2O_2]$  e  $m/z$ : 217  $[M^+-C_3H_7O_4]$ . Tais dados foram atribuídos ao alcaloide N-metoxycarbonílico romucosina, a partir de dados obtidos da literatura. O alcaloide identificado já havia sido anteriormente isolado de folhas da *Annona cherimolia* (CHEN, WU; 2001), e caule de *Annona cassiflora* (EGYDIO, et al., 2013). Na Figura 36, abaixo, é possível observar uma proposta de fragmentação para o alcaloide isolado.

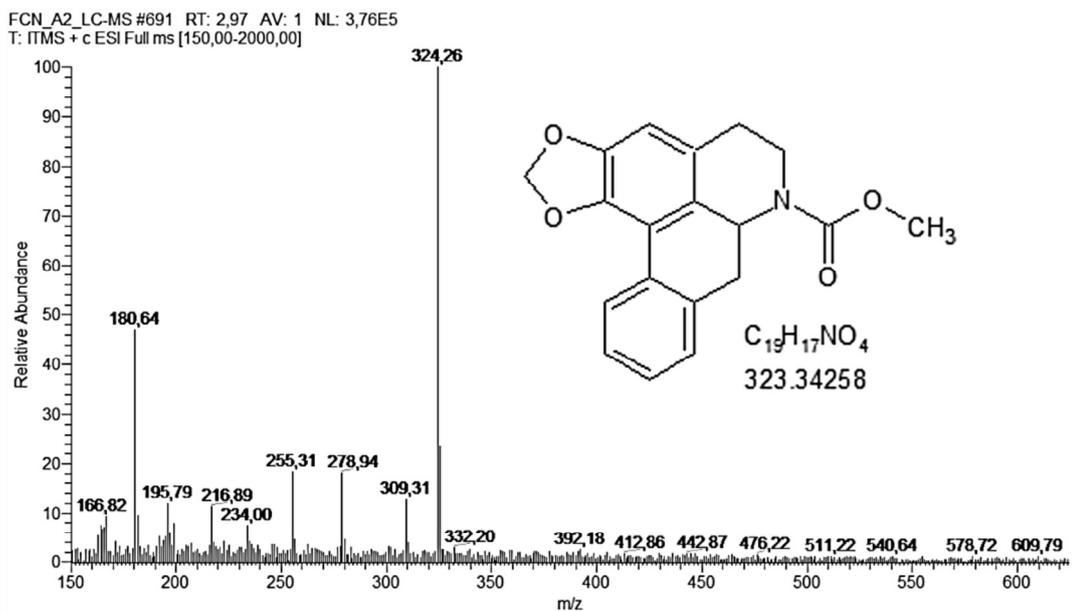


Figura 35: Espectro de massas para o alcaloide romucosina. Fonte: Autor

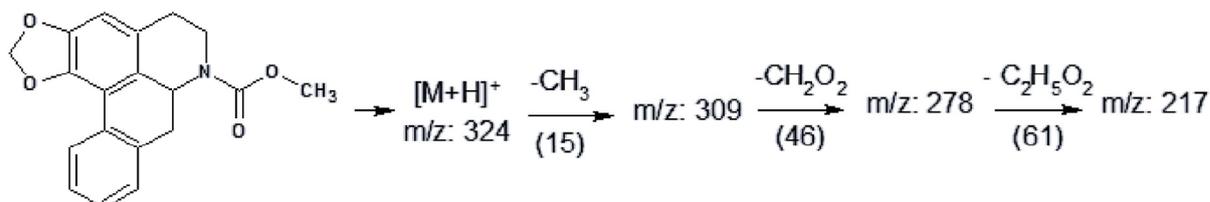
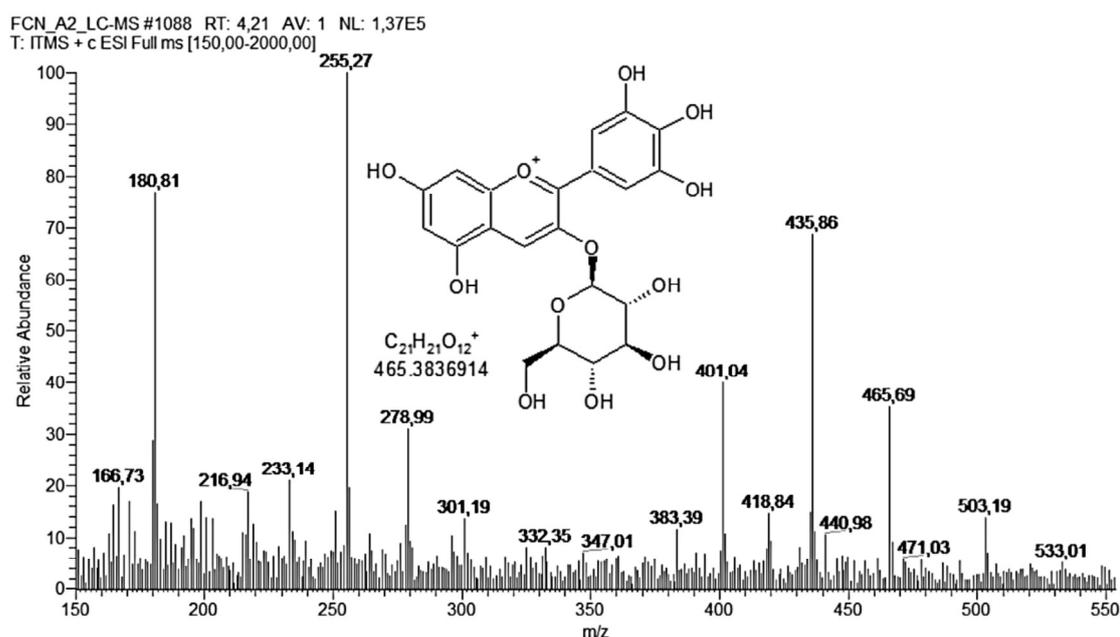
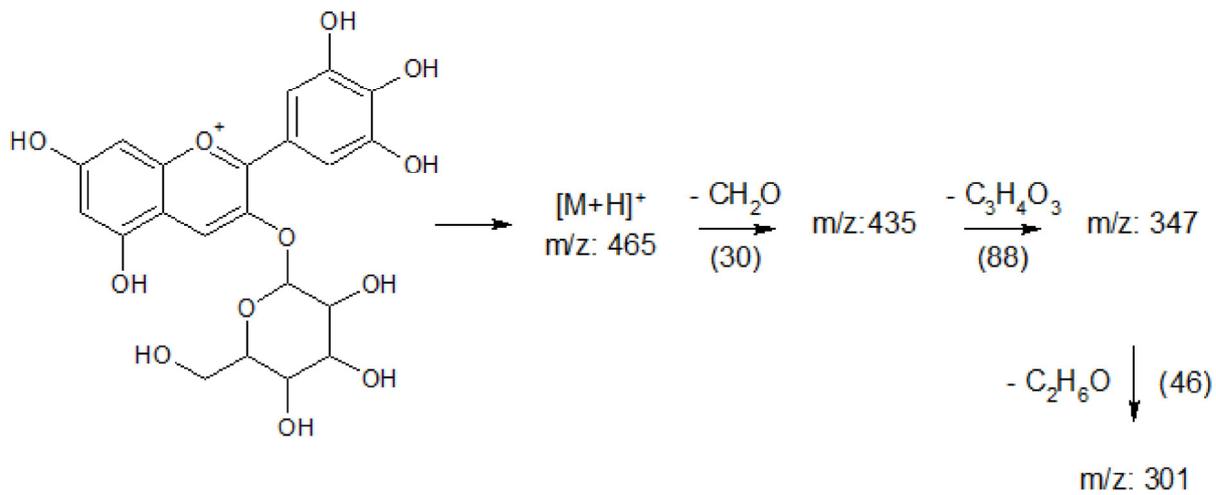


Figura 36: Proposta de fragmentação para o alcaloide romucosina. Fonte: Autor

Na Figura 37, abaixo, tem-se o espectrograma para uma substância com pico íon molecular  $m/z$ : 465  $[M+H]^+$  e pico base de  $m/z$ : 255. Além disso há também fragmentos com  $m/z$ : 435  $[M^+-CH_2O]$ ;  $m/z$ : 347  $[M^+-C_4H_6O_4]$ ;  $m/z$ : 301  $[M^+-C_6H_{12}O_5]$ . Com os fragmentos obtidos, e a partir de dados consultados na literatura, identificou-se a substância isolada como sendo o flavonoide, da classe das antocianidinas, delfinidina-3- $\beta$ -O-glucopiranosídeo (KOH, YOUN, KIM; 2014). Na Figura 38, página 68, tem-se uma proposta de fragmentação para o flavonoide isolado.



**Figura 37:** Espectrograma de massas para a antocianidina Delfinidina-3- $\beta$ -O-glucopiranosídeo. Fonte: Autor



**Figura 38:** Proposta de fragmentação para a antocianina Delphinidina-3-β-O-glucopiranosídeo.  
 Fonte: Autor

#### **5.4 Avaliação da atividade antimicrobiana e antifúngica das amostras**

A avaliação microbiológica de extratos vegetais é comumente utilizada como etapa preliminar na procura de frações bioativas ou de substâncias que apresentem potencial antimicrobiano (SILVEIRA, et al. 2009), essa etapa é primordial na procura de vegetais que apresentem potencial farmacológico.

A avaliação realizada teve como objetivo o rastreamento de frações bioativas no extrato vegetal hidroetanólico 70% das folhas da *Annona mucosa*, através dos ensaios com o extrato bruto, e com suas respectivas frações orgânicas, e também com os metabólitos isolados, para que através dessa fosse possível observar qual seriam as frações com maior atividade microbiológica.

Os microrganismos utilizados para essa avaliação foram escolhidos por serem comumente utilizados em ensaios que visam explorar a atividade microbiológica de vegetais do gênero *Annona*, ou que apresentaram algum tipo de atividade microbiológica, em estudos anteriores, quando testados frente a extratos vegetais da família *Annonaceae*. Além disso, tais microrganismos foram escolhidos para os ensaios microbiológicos por apresentarem resistência elevada contra medicamentos utilizados em tratamentos comuns em hospitais, e por serem responsáveis pelos principais tipos mais graves de infecções hospitalares. Observando-se tais fatores é importante buscar novas formas de tratar tais infecções utilizando-se de novas fontes, como os produtos naturais de vegetais.

**Tabela 8:** Diâmetro dos halos de inibição do crescimento de bactérias e fungos avaliados pelo teste de difusão em poços. Fonte: Autor

Microrganismo utilizado	Amostra / Diâmetro halos de inibição (mm)							
	EhF (1)	FH (2)	FC (3)	FA (4)	FAT (5)	FCN-A1 (6)	C+	C-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	13	7	10	10	16	16	30	0
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603	NM	NM	NM	NM	8	NM	25	0
<i>Salmonella spp.</i>	NM	NM	NM	NM	7	8	30	0
<i>Candida albicans</i> ATCC 9002	NM	NM	NM	NM	12	9	15	0

**Legendas:** EhF – Extrato hidroetanólico 70% das folhas; FH – Fração hexânica; FC – Fração clorofórmica; FA – Fração Acetato; FAT – Fração alcaloídica total; FCN-A1 – Fração clorofórmica neutra, alcaloide 1; NM – Não mensurável. Concentrações (em µg/mL): EhF= 67000; FH= 49800; FC= 53500; FA= 56900; FAT= 11000, FCN-A1= 76300.

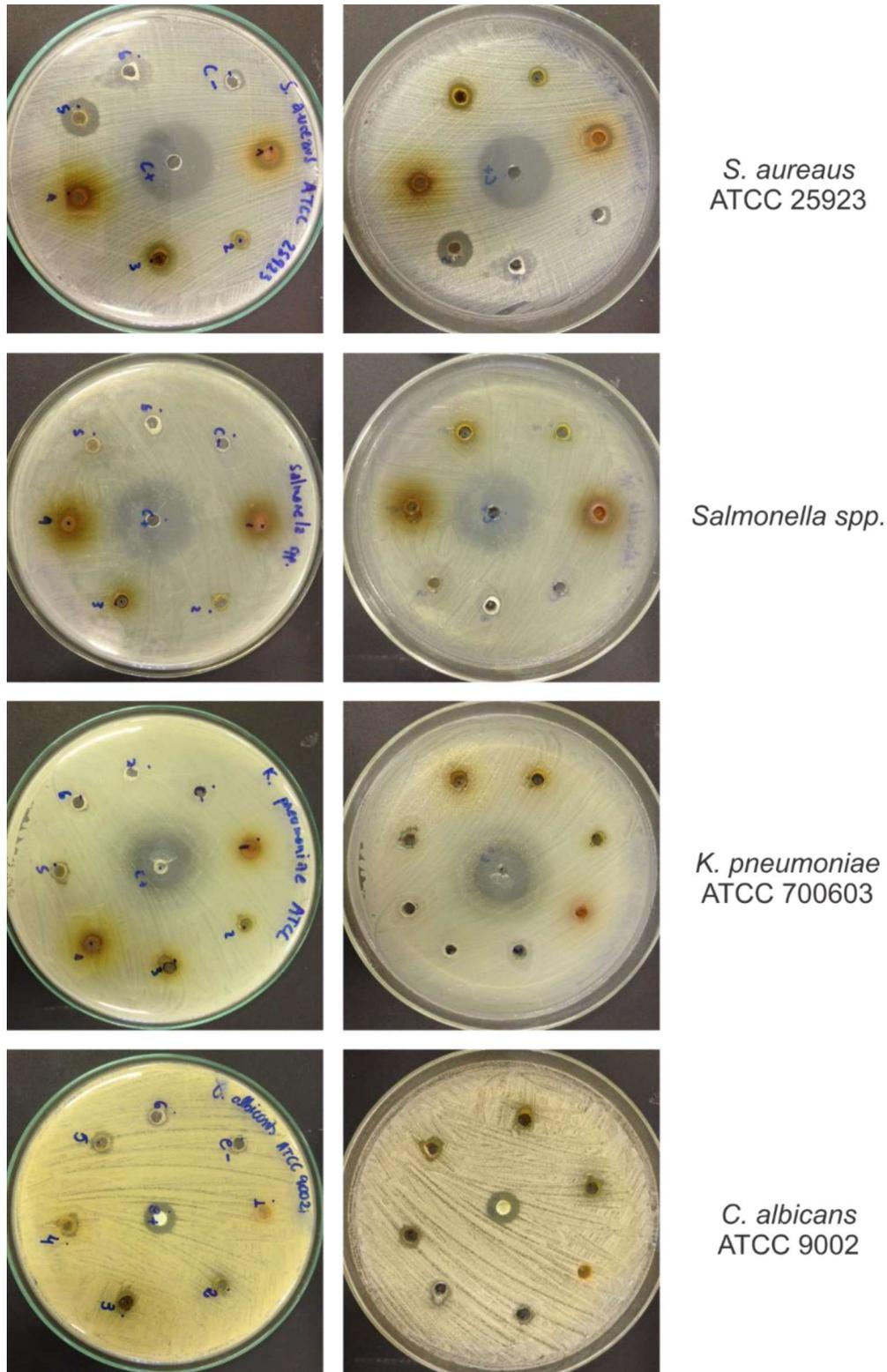
Dos dados obtidos observa-se que os extratos apresentaram atividades microbiológicas para algumas das amostras testadas, principalmente nos ensaios realizados frente a bactéria gram-positivas *Staphylococcus aureus* ATCC, onde se observou halos de inibição significativos, para todas as frações, e os maiores halos nos poços da fração alcaloídica total e para do alcaloide FCN-A1.

A ensaio realizado frente a bactéria *Klebsiella pneumoniae* ATCC apresentou halos para a fração FAT, com um halo de tamanho não muito significativo (Figura 39, página 71).

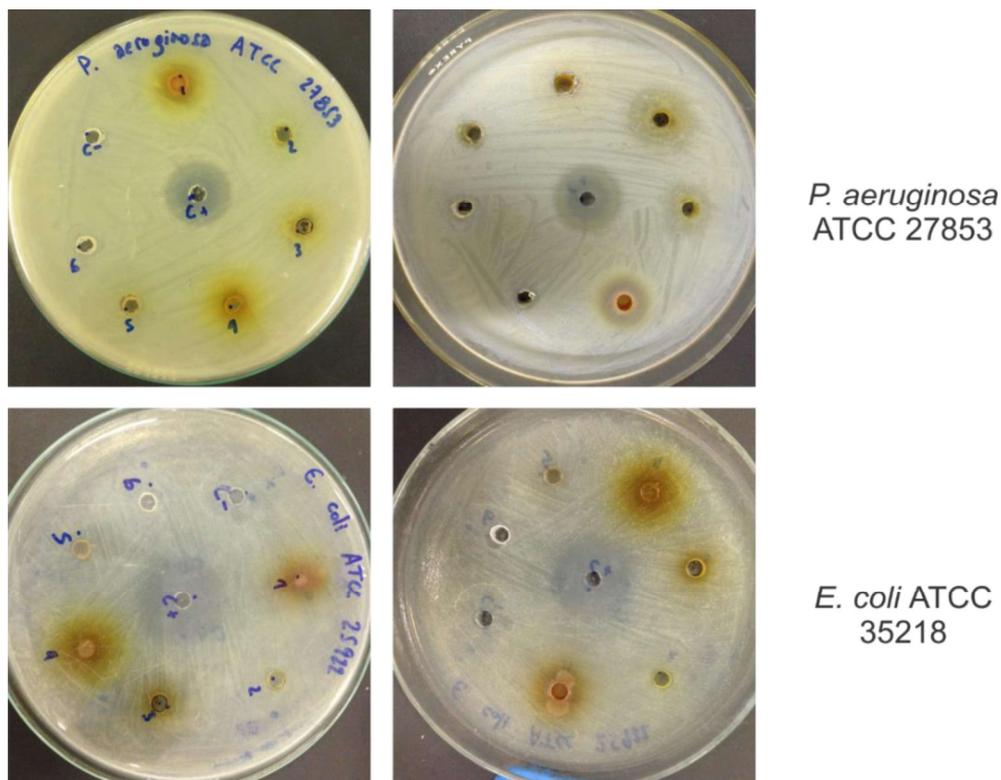
Para o fungo *Candida albicans* ATCC 9002, observou-se um halo de inibição pequeno para a Fração alcaloídica total, e para o alcaloide FCN-A1 (Figura 39, página 71).

Não se observaram atividades inibitórias, através da metodologia de difusão em poços, em nenhuma das amostras testadas para as bactérias Gram-negativas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 35218 (Figura 40, página 72). Além disso, observou-

se que algumas das amostras realizadas apresentaram halos de inibição de tamanhos irregulares, de forma que eles não foram medidos, apresentados como NM na Tabela 8, acima.



**Figura 39:** Placas microbiológicas para os ensaios frente a *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *K pneumoniae* e *C. albicans*. Fonte: Autor



**Figura 40:** Placas microbiológicas para os ensaios frente a *P. aeruginosa* e *E. coli*. Fonte: Autor

As atividades microbiológicas observadas já eram esperadas, dada a presença de flavonoides e alcaloides, confirmadas através da prospecção fitoquímica, que também apresentou resultados para outras classes de metabólitos secundários, na etapa inicial de desenvolvimento do trabalho, visto que alguns tipos de flavonoides são capazes de formar complexos com proteínas solúveis e a parede celular de bactérias e fungos (COWAN, 1999; ARIF et al., 2011) inibindo assim seu crescimento, e que metabólitos como acetogeninas, comuns em anonáceas, e os alcaloides, presentes no extrato vegetal estudado, também possuem atividades antimicrobianas frente a diversos tipos de microrganismos.

SIMINSK, et al. (2015) já havia observado o potencial microbiológico da espécie *Annona mucosa* frente a *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli*, e os resultados obtidos nesse estudo corroboram parte dos dados contidos na literatura e demonstram o potencial dessa espécie para o estudo e desenvolvimento fármacos para o controle e tratamento de *S. aureus*, já que essa bactéria é considerada um importante agente patógeno visto sua virulência, resistência a antimicrobianos e associação a doenças e enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, e infecções de diversos tipos (ARAUJO, 2011).

## 6. CONCLUSÃO

Através da triagem fitoquímica do extrato hidroetanólico 70% das folhas da *Annona mucosa* foi possível traçar o perfil químico do biribá, observando-se diversos metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, terpenos e as saponinas, comumente presentes em diversas espécies vegetais pertencentes ao gênero *Annona*.

As técnicas de cromatografia em camada delgada permitiram o isolamento de frações contendo alcaloides como constituintes majoritários, e a técnica foi aplicada como uma etapa de separação de frações contendo tais metabólitos.

A aplicação de técnicas acopladas de LC-MS, e das fragmentações múltiplas utilizadas permitiram a identificação estrutural do alcaloide romucosina, comum ao gênero *Annona*, e da antocianidina delfinidina-3-O- $\beta$ -glucopiranosídeo, sendo este o primeiro estudo em que houve o isolamento e identificação dessa antocianidina na espécie *Annona mucosa*.

Os ensaios microbiológicos indicam a presença de compostos ativos na fração alcaloídica total, bem como nas demais frações orgânicas, frente ao isolado clínico da bactéria *Staphylococcus aureus*, e para as frações alcaloídica total e FCN-A1 frente ao fungo *Candida albicans*, possibilitando a continuidade do estudo através da caracterização e avaliação da toxicidade desses metabólitos, afim de avaliar a possibilidade do desenvolvimento de fármacos tendo este metabólito como princípio ativo.

## REFERENCIAS

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; KIM, T. Y.; RI, M. B.; GIRI, A.P.; VERSTAPPEN, F. W. A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, H.J. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 5, p. 49-58, 2006.

AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; TSAI, S. M.; PARK, Y. K. Transformações Enzimáticas de Flavonoides. **B. CEPPA**, v.25, n.1, p 61-76, 2007.

ANDRADE, N. C. et al. Terpenoids of the Annonaceae: Distribution and compilation of <sup>13</sup>C NMR data. **Recent Research Developments in Phytochemistry**, v. 7, p. 1-85, 2003.

ANSANTE, Thiago Felipe. **Metabólitos secundário de *Annonaceae*: triagem, fracionamento biomonitorado e bioatividade frente a *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (*Lepidoptera: Noctuidae*)**. Dissertação (mestrado). Escola Superior de Agricultura, Piracicaba, São Paulo, 2014.

ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous Acetogenins: Recent Progress. **Journal of Natural Products**, vol. 62, n. 3, p.504-540, 1999.

ALCANTARA, Joelma Moreira. **Composição química e potencial biológico dos óleos essenciais de *Annonaceae* dos CAMPI INPA e UFAM**. Tese (doutorado). Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal do Amazonas. Manaus. 2015

ALVES, Hélio de Mattos. A diversidade das plantas como fontes de fitofármacos. **Cadernos temáticos de Química Nova na Escola** – Plantas como fontes de fitofármacos. n 3. Maio 2001.

ANISZEWSKI, Tadeusz. Alkaloids: Chemistry, Biology, Ecology and Applications. **Elsevier**, 2015.

ARAUJO, Camila de Souza. **Estudo Fitoquímico e Atividade biológica *in vitro* de *Annona vepretorum* MART. (*Annonaceae*)**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2013.

ARAUJO, Isabella Santos. **Atividade antimicrobiana de plantas aromáticas que ocorrem no estado do Pará**. Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana – BA, 2011

Arif, T., Mandal, T.K., Dabur, R. (2011). Natural products: Anti – fungal agents derived from plants. Opportunity, Challenge and Scope of Natural Products in Medicinal Chemistry, **Journal of Asian Natural Products Research** v. 81, p, 283 – 311.

AUGUSTIN, Jörg M. et al. Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. **Phytochemistry**, v. 72, n. 6, p. 435-457, 2011.

BARBOZA, T. J de S. **Avaliação do potencial leishmanicida e antibacteriano de *Annona mucosa* Jacq. – Annonaceae cultivada *in vivo* e *in vitro***. Rio de Janeiro, 2013. Dissertação mestrado – Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal, ênfase em Conservação e Utilização da Biodiversidade, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

BARILE, Elisa et al. Saponins from *Allium minutiflorum* with antifungal activity. **Phytochemistry**, v. 68, n. 5, p. 596-603, 2007.

BARON, D. **Desenvolvimento de plantas jovens de *Annona emarginata* (SCHLTDL.) H. Rainer (Araticum-de-terra-fria) cultivadas em solução nutritiva**. 2010. 111p. Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual Paulista, São Paulo, 2010.

BARRECA, D.; LAGANA, G.; FICARRA, S.; TELLONE, E.; LEUZZI, U.; GALTIERI, A.; BELLOCCO, E. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). **Food Research International**, v.44, n.7, p.2302-2310, 2011.

BARRETO, Francisco Stefãnio et al. **Potencial antitumoral de compostos obtidos de plantas da família *Annonaceae***. In: ALMEIDA, Jackson Roberto Guedes da Silva; OLIVEIRA JUNIOR, Raimundo de; OLIVEIRA, Ana Paula. ANNONACEAE: TÓPICOS SELECIONADOS. Curitiba: Crv, 2015. cap. 14. p. 427-457.

BECHO, J. R. M.; MACHADO, H.; GUERRA, M. O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 1, n. 1, p. 21-25, 2009.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

- BERMEJO, A.; FIGADERE, B.; ZAFRA-POLO, M.C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural Product Reports**, London, v. 22, n.2, p.269-303, 2005.
- BETANCUR-GALVIS, L. A.; SAEZ, J.; GRANADOS, H.; SALAZAR, A.; OSSA, J. E. Antitumor and antiviral activity of Colombian medicinal plant extracts. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.94, n.4, p.531-535, 1999.
- BOLZANI, V. S; VIEGAS, Cláudio Jr. Os produtos Naturais e a Química Moderna. **Química Nova**, v. 29, no. 2, 326 – 337, 2006.
- BRAZ-FILHO, R. Brazilian phytochemical diversity: bioorganic compounds produced by secondary metabolism as a source of new scientific development, varied industrial applications and to enhance human health and the quality of life. **Pure and Applied Chemistry**, v. 71, p. 1663-1672, 1999.
- CASTILLO-SÁNCHEZ, L. H. C.; JIMÉNEZ-OSORNIO, J. J.; DELGADO-HERRERA, M. A. Secondary metabolites of the Annonaceae, Solanaceae and Meliaceae families used as biological control of insects. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, Yucatán, v. 12, n.3, p.445-462, 2010.
- CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.R.B. Flavonoids: prospective drug candidates. **Journal of Medical Chemistry**. v. 8, n. 13, p.1429-1440, 2008
- CHANG, F. R.; WU, Y. C. Novel cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of Natural Products**. v.64, p. 925-931, 2001.
- CHATROU, Lars W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5-40, 2012.
- CHEN, Y; CHANG, F; WU, Y. Isoquinoline alkaloids and lignans from *Rollinia mucosa*. **Journal of Natural Products**, 1996, v. 59, 904-906.
- CORDELL, G.A.; QUINN-BEATTIE, M.L.; FARNSWORTH, N.R. The potential of alkaloids in drugs Discovery. **Phytotherapy Research**, v.15, p-182-205,2001.

- CORTES, et al., **Nuevos Fármacos inspirados en annonáceas**. Palestras V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene a exportação. v. 36, edição especial, e., p. 022-031, Fevereiro 2014.
- COSTA, Emmanoel Vilaça. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas de *Guatterioopsis blepharophylla*, *Guatterioopsis friesiana* e *Guatterioopsis hispida* (Annonaceae)**. 2009. 350f. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Ciências Exatas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009a
- COWAN, M.M. - Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, p. 564-82, 1999.
- CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. Natural Products as Source of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**. v.79, p. 629-661, 2016
- CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do Nordeste**. 1 ed., Fortaleza: Edições UFC, 1981.
- CRUZ, P. E. O. **Estudo fitoquímico e investigação das atividades, antioxidante, antimicrobiana e larvicida das cascas de *Annona salzmannii* a. dc. (Annonaceae)**. 2011. 136 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.
- CUSHNIE, TP Tim; LAMB, Andrew J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 26, n. 5, p. 343-356, 2005.
- DE LIMA, J.P.S; et al. *In vitro* Antileishmanial and cytotoxic activities of *Annona mucosa*. **Rev. Virtual de Quim.**, 2012, v. 4 (6), p. 692-702.
- DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2<sup>a</sup> Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 507 p., 2002.
- DIAZ, G.; MIRANDA, I.L.; DIAZ, M.A.N. **Quinolines, Isoquinolines, Angustureine, and Congeneric Alkaloids — Occurrence, Chemistry, and Biological Activity**. In: RAO, VENKET, RA, L.G. *Phytochemicals - Isolation, Characterization and Role in Human Health*. In: Intech, 2015, p. 141-162.

DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; TANARGO, J. Vasodilator effects of quercetin in isolated rat vascular smooth muscle. **European Journal of Pharmacology**, v. 239, p. 1-7, 1993.

FANG et al., Annonaceaus acetogenins: An update review. **Phytochemical Analysis**. v.4, p.27-48, 1993.

FOGLIO, M. A; QUEIROGA, C. L; SOUSA, I. M. O; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Multiciência**, 2006.

FORMAGIO, A. S.; KASSUYA, C. A.; NETO, F. F.; VOLOBUFF, C. R.; IRIGUCHI, E. K.; DO C VIEIRA, M.; FOGLIO, M. A. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v.13, n.1, p.13-14, 2013 a.

FORMAGIO, A. S.; VIEIRA, M. D. C.; DOS SANTOS, L. A.; CARDOSO, C. A.; FOGLIO, M. A.; DE CARVALHO, J. E.; ANDRADE-SILVA, M.; KASSUYA, C. A. Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer activities of the essential oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, v.16, n.1, p.20-25, 2013 b.

FUMAGALI, Elisângela et al. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Rev. bras. Farmacognosia**. João Pessoa, v. 18, n. 4, p. 627-641. Dez. 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2008000400022&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2008000400022&lng=en&nrm=iso)>. Consultado em 31 May 2017.

GALASTRI, N. A. **Morfoanatomia e Ontogênese de Frutos e Sementes de *Annona dioica* A. St.-Hil, *Duguetia furfuracea* (A. St.-Hil.) Saff. e *Xylopia emarginata* Mart. (Annonaceae)**. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, SP, 2008.

GOMES, Nayara de Freitas. **Triagem fitoquímica e identificação de metabólitos por LC-MS do extrato hidroetanólico 70% das folhas da espécie vegetal *Annona exscucca* DC.** (Monografia). Centro de Ciências Exatas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís – MA, 2017

GRANDI, Telma Sueli Mesquita; TRINDADE, Jorge Antônio da; PINTO, Marcio José Filardi; FERREIRA, Liliana Lobo; CATELLA, Agostinho Carlos. Plantas medicinais de Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v3 (5), p. 185-224. 1989.

GU, Z; et al. Isolation of New Bioactive *Annonaceous* Acetogenins from *Rollinia mucosa* Guided by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. **Bioorganical & Medicinal Chemistry**, v. 5, no. 10, p 1911 – 1916, 1997.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

GUINAUDEAU, H.; LÉBOUEF, M.; CAVÉ, A. Aporphine alkaloids, V. **Journal of Natural Products**, v.57, p. 1033-1135, 1994.

HOLLMAN, P. C.; VAN TRIPP, J.; BUYSMAN, M. N.; VAN DER GAAG, M. S.; MENGELERS, M. B. Relative Bioavailability of the flavonoid quercetin from various foods in man. **Federation of European Biochemical Societies Letters**. n. 418, n.1- 2, p. 152-156, 1997.

IBF - INSTITUTO BRASILEIRO DE FLORESTAS. **Fruta da condessa**. Disponível em <<http://ibflorestas.org.br/loja/arvores-medicinais/muda-10a30-fruta-da-condessa.html>>, Acesso: 03 de jun. de 2017.

JUDD, W.S.; CAMPBELL, C.S.; KELLOGG, E.A.; STEVENS, P.F. Plant Systematics: a phylogenetic approach. **Massachusetts: Sinauer Associates**, 1999. 598p.

KOSENKOVA, Yu, S; et al. Fatty-acid composition and secondary metabolites from slightly polar extracts of the aerial part of *Primula macrocalyx*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, issue 5, p. 564-568. sep. 2008

KUO, R. et al. Antiplatelet activity of N-methoxycarbonyl aporphines from *Rollinia mucosa*. **Phytochemistry**, v. 57, 2001, p. 421-425.

KUO, R. et al. A new phenanthrene alkaloid, Romucosine I, from *Rollinia mucosa*. **Z. Naturforsch.** v. 59b, p 334 – 336 (2004).

LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários das folhas de *Annona crassiflora* Mart. (*Annonaceae*)**. Dissertação em Química (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.

- LEBOUEF, M; et al. The phytochemistry of the *Annonaceae*. **Phytochemistry**, v.21, n. 12, p. 2783 – 2813, 1982a.
- LEBOEUF, M., et al. Alcaloides des annonacees XL: étude chimique et pharmacologique des alcaloides de l'Annona montana Macf. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v.16. p 169-184,1982b.
- LEBOEUF, M. et al. Alcaloïdes des annonacées: 43. Alcaloïdes du Xylopiia frutescens Aubl. **Plantes Médicinales et Phytothérapie**, v. 16, n. 4, p. 253-259, 1982c.
- LEVIN, D. The role of trichomes in plant defense. **The Quarterly Review of Biology**, New York, v. 48, p. 3-15, 1973.
- LOPES; SILVA, 2014 artigoscielo <<http://www.scielo.br/pdf/rbf/v36nspe1/v36nspe1a15.pdf>>
- LORENZI, H.; MATOS, F. de A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.
- LORENZI, H. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: (de consumo in natura)**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2006. 640 p
- LÚCIO, Ana Silvia Suassuna Carneiro et al. Chapter Five - Alkaloids of the Annonaceae: Occurrence and a Compilation of Their Biological Activities. **The Alkaloids: Chemistry and Biology**, v. 74, p. 233-409, 2015.
- LUNA, Josiane de Souza. **Estudo de Plantas Bioativas**. 2006. 233 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2006.
- MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110249>>. Acesso em: 11 dez. 2015
- MAAS, Paul JM et al. An updated index to genera, species, and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. **Nordic Journal of Botany**, v. 29, n. 3, p. 257-356, 2011
- MANN, J; **Secondary metabolism**, Vol. 2. Oxford: Clarendon press, 1987.
- MANN, John et al. **Natural Products: their chemistry and biological significance**. Longman Scientific & Technical, 1994.

MARTÍNEZ-FLOREZ, S.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J.; CULEBRAS, J. M.; TUÑÓN, M. J. Revisión: Los Flavonoids: propiedades y acciones antioxidantes. **Nutrición hospitalaria: organo oficial de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y enteral**, v. 17, n. 6, p. 271-278, 2002.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 673-751, 2000.

MONTANARI, Ricardo Marques. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. Tese (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Agorquímica. Universidade Federal de Viçosa – Minas Gerais, 2010.

MONTOSO GARDENS. **Rollinia mucosa (Annonaceae)**. Disponível em <[http://www.montosogardens.com/rollinia\\_mucosa.htm](http://www.montosogardens.com/rollinia_mucosa.htm)>. Acesso: 03 de jun de 2017.

MORTON, J. 1987. **Biriba**. P. 88-90. Em: Frutos de climas quentes. Julia F. Morton, Miami, FL.

PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, S. B.; DE SOUZA, J. H.; DE ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcolico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 42, n. 1, p. 33-37, 2010.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., Flavonoids as medicinal agents: recent advances. **Fitoterapia**, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.

PHILIPPOV, S.; KANDÉ, K. M.; MACHEV, K. Alkaloids of *Annona senegalensis*. **Fitoterapia**, v.66, p. 275-276, 1994.

QIU, Fan; LUO, Jianguang; YAO, Shun; MA, Li; KONG, Lingyi. Preparative isolation and purification of anthocyanins from purple sweet potato by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Separation Science**, v 32, issue 12, p. 2146-2151. jun 2009.

RABÊLO, Suzana Vieira. **Revisão de alcaloides do gênero Annona, Estudo Fitoquímico e avaliação da atividade biológica de Atemoia (*Annona cherimola x Annona squamosa*)**.

Dissertação (mestrado). Programa de Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido. Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, 2014.

RABÊLO, Suzana Vieira et al. *Annona* Species (Annonaceae) Oils. In: PREEDY, Victor (Ed.). *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*. Londres: **Academic Press**, 2015a. Cap. 24. p. 221-230

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. *Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien: Serie B: für Botanik und Zoologie*, **Ann Arbor**, v. 108, p. 191-205, 2007.

RAYNAUD-LE GRANDIC, S.; FOURNEAU, C.; LAURENS, A.; BORIES, C.; HOCQUEMILLER, R.; LOISEAU, P. M. In vitro antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.58, n.6, p.388-392, 2004.

REZENDE, C. M. Vladimir Prelog and the stereochemistry of organic molecules: a centenary of birth. **Química Nova**. São Paulo, v. 30, n. 4, 2007.

RIBEIRO, J.E.L.S. et al. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: Inpa, 800p, 1999.

RIBEIRO, L. P; et al. *Annona mucosa* Jacq. (Annonaceae): A promising source of bioactive compounds against *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, 55 (2013) 6-14.

RIBEIRO, L. P; et al. **Efeito do extrato etanólico de sementes de *Annona mucosa* no desenvolvimento e comportamento alimentar de *Spodoptera frugiperda***. *Bragantia*, Campinas, v. 75, n. 3, p.322-330, 2016.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, G. B.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, n. 4, p. 375-383, 1995.

RINALDI, Maria Valéria Nani. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca* Mart.** 2007. 125f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007

RODRIGUES, Cristiane Maria Sousa de Castro. **Estudo fitoquímico e avaliação biológica de *Annona leptopetala* (Annonaceae)**. 235f. DISSERTAÇÃO (Mestrado em Recursos Naturais – Universidade Federal do Vale do São Francisco, Petrolina, Pernambuco, 2016

SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.

SIMINSKI, Tamila; SOUZA, Jaqueline Sampietro; ARAUJO, Cristiane Ferreira Lopes; AÑEZ, Rogério Benedito da Silva; NUNES, Rogério Alexandre. Avaliação da atividade antimicrobiana das espécies *Aspidosperma nitidum*, *Annona cassiflora* e *Annona mucosa* frente a cepas ATCC. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer; Goiania, v.11, n.22. p. 2882

SILVA, M. S. et. al. Alkaloids and other constituents from *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.

SILVA, S. M. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de Brasília, Brasília, 2013.

SILVEIRA, Luiz Mário da Silva; OLEA, Roberto Sigfrido Gallegos; MESQUITA, Josinete Santos; CRUZ, América de Lourdes Nogueira; MENDES, Janica Correa. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Rev. Bras. Farm.**, 90(2), p. 124 – 128, 2009.

SIMEON, S; RIOS, J. L.; VILLAR, A. Antimicrobial activity of *Annona cherimolia* steam bark alkaloids. **Pharmazie**, v.45, p. 442-443, 1990.

SINGH, B.; SAHU, P. M.; SINGH, S. Antimicrobial activity of pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium subulatum*. **Fitoterapia**, v. 73, n. 2, p. 153-155, 2002.

SIQUEIRA, Carlos AT et al. Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and *in vitro* antiprotozoal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 1, p. 0-0, 2011.

TROPICOS, página da internet. Obtido em: <  
<http://www.tropicos.org/Name/42000007?tab=maps#>>

TURCHEN, L. M. et al. Potential phytoinsecticide of *Annona mucosa* (Jacq) (Annonaceae) in the control of brown stink bug. **Journal of Bioscience**, Uberlândia, v. 32, n. 3, p. 581 – 587, maio/jun, 2016.

VEGA, M. R.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich

carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, n.8, p.1554-1559, 2007.

XU, H. X.; LEE, S. F. Activity of plant flavonoids against antibiotic-resistant bacteria. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, n. 1. p. 39-43, 2001.

YANG, Jinfeng; KWON, Yong Soo; KIM, Myong, Jo. Isolation and characterization of bioactive compounds from *Lepisorus thunbergianus* (KAULF). **Arabian Journal of Chemistry**, v 8, issue 3. p. 407-413. May 2015

ZACCHINO, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: YUNES, R. A. CALIXTO, J. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Chapecó: Agros, p. 47-75, 2001.