

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE QUÍMICA BACHARELADO

NAYARA DE FREITAS GOMES

**TRIAGEM FITOQUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR LC-MS
DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE VEGETAL**
Annona exsucca DC

São Luís – MA

2017

NAYARA DE FREITAS GOMES

**TRIAGEM FITOQUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR LC-MS
DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE VEGETAL**

Annona exsucca DC

Monografia apresentada ao Curso de Química da
Universidade Federal do Maranhão, como requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joselene Ribeiro de
Jesus Santos

São Luís – MA

2017

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

de Freitas Gomes, Nayara.

Triagem fitoquímica e identificação de metabólitos por LC-MS do extrato hidroalcólico das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC / Nayara de Freitas Gomes. - 2017.

51 p.

Orientador(a): Joselene Ribeiro de Jesus Santos.

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

1. Annonaceae. 2. *Annona exsucca* DC. 3. LC-ESI-IT-MS. 4. Prospeção fitoquímica. I. Ribeiro de Jesus Santos, Joselene. II. Título.

NAYARA DE FREITAS GOMES

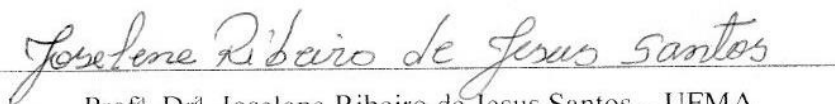
**TRIAGEM FITOQUÍMICA E IDENTIFICAÇÃO DE METABÓLITOS POR LC-MS
DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DAS FOLHAS DA ESPÉCIE VEGETAL**

Annona exsucca DC

Monografia apresentada ao Curso de Química da
Universidade Federal do Maranhão, como requisito
para a obtenção do grau de Bacharel em Química.

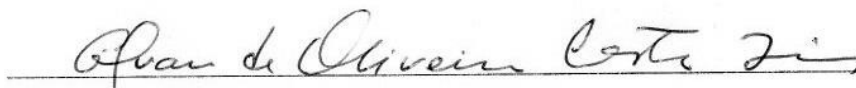
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joselene Ribeiro de
Jesus Santos

Aprovada em: 13 / julho / 2017



Prof^a. Dr^a. Joselene Ribeiro de Jesus Santos – UFMA

(Orientadora)



Prof. Dr. Gilvan de Oliveira Costa Dias – UFMA



Prof^a. Me. Francisca Socorro Nascimento Taveira – UFMA

Agradecimentos

Primeiramente agradeço à Deus por ter me dado oportunidade de ingressar no curso de Química Bacharelado e por todas as bênçãos concedidas e vitórias alcançadas, pois sem Ele nada disso seria possível.

Aos meus pais por todo apoio financeiro, dedicação, carinho, paciência e ajuda em todos os momentos da minha vida acadêmica.

Às minhas irmãs por serem companheiras e por estarem sempre do meu lado me dando apoio para continuar nessa luta.

Ao meu namorado Caio Vinícius pela paciência, compreensão, carinho e ajuda para o desenvolvimento deste trabalho.

À Prof^a. Dr^a. Cláudia Rocha pela disponibilidade e ajuda durante o desenvolvimento da pesquisa, a quem eu tenho muita admiração.

À Prof^a. Dr^a. Joselene Ribeiro pela oportunidade de desenvolver esta pesquisa, por ser minha orientadora e pelos ensinamentos adquiridos.

Ao meu amigo Matheus Henrique pelos conselhos, opiniões e apoio durante toda minha vida acadêmica, a quem eu tenho muito respeito.

Ao Marcos Bispo pela colaboração e incentivo durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Universidade Federal do Maranhão (UFMA) por fornecer o Herbário do Maranhão e o Laboratório de Produtos Naturais para a realização desta pesquisa.

Ao Instituto de Biociências da Unesp – Campus do litoral Paulista pela realização das análises do material.

De forma geral, agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para o desenvolvimento desta monografia. Obrigada a todos.

*“A nossa maior glória não reside no fato de nunca cairmos, mas sim em levantarmo-nos
sempre depois de cada queda”*

(Confúcio)

RESUMO

A família *Annonaceae* destaca-se pela produção diversificada dos metabólitos secundários, entretanto é uma das famílias de plantas pouco explorada do ponto de vista químico e biofarmacológico. Portanto, a fim de colaborar com o conhecimento sobre esta família, estudou-se a composição química das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC. Esta espécie é encontrada nas regiões norte, nordeste, sul e sudeste do território brasileiro e é popularmente conhecida como araticum salgado, pois o seu fruto quando maduro possui um sabor levemente salgado. Através de testes fitoquímicos e análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com fonte de ionização *electrospray* (LC-ESI-IT-MS/MS) e analisador do tipo *ion trap* além de experimentos de infusão direta (FIA-ESI-IT-MS) foi possível determinar as classes de metabólitos secundários presentes nas folhas desta espécie e caracterizar algumas dessas substâncias, respectivamente. Os resultados obtidos com os testes fitoquímicos confirmaram a presença de alcaloides, de flavonóides, de esteroides, dos taninos e das saponinas. Enquanto que os resultados obtidos pela espectrometria de massas permitiram caracterizar alguns alcaloides.

Palavras-chave: *Annonaceae*; *Annona exsucca* DC; prospecção fitoquímica, LC-ESI-IT-MS.

ABSTRACT

The *Annonaceae* family is noted by the diversified production of secondary metabolites, but there is little studies about its chemical and pharmacological potential. Therefore, to collaborate with the knowledge about this family, this work studied the chemical composition of the *Annona exsucca* DC leaves. This is a specie found in the north, northeast, south and southeast of the Brazilian territory and it is popularly known as “araticum salgado”, because its fruit when ripe has a slightly salty taste. Through phytochemical tests and analysis by high-efficiency liquid chromatography coupled to mass spectrometer with electrospray ionization and ion trap analyzer (LC-ESI-IT-MS/MS), in addition to direct infusion experiments (FIA-ESI-IT-MS) was possible to determine the classes of secondary metabolites present in the leaves of this species and characterize some of these substances, respectively. The phytochemical tests results confirmed the presence of alkaloids, flavonoids, steroids, tannins and saponins. While mass spectrometry results allowed to identify some alkaloids.

Keywords: *Annonaceae*; *Annona exsucca* DC; phytochemical prospecting, LC-ESI-IT-MS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 - Exemplos de frutos da família <i>Annonaceae</i>	13
Figura 4.1 - Ilustrações representando a altura da <i>Annona squamosa</i> (a), a flor da espécie <i>Annona mucosa</i> (b), o fruto da <i>Annona muricata</i> (c).....	17
Figura 4.2 – Estados brasileiros com ocorrência confirmada da espécie <i>Annona exsucca</i> DC...	19
Figura 4.3 - Ilustrações representando a árvore (a), a folha (b), a flor (c) e o fruto (d) da espécie vegetal <i>Annona exsucca</i> DC.....	20
Figura 4.4 - Rota metabólica vegetal.....	22
Figura 4.5 – Principais compostos presentes na família <i>Annonaceae</i>	23
Figura 4.6 – Principais estruturas encontradas nos alcaloides.....	24
Figura 4.7 – Alcaloides mais comuns no gênero <i>Annona</i>	25
Figura 4.8 – Estrutura da cafeína.....	25
Figura 4.9 - Acetogeninas encontradas em espécies do gênero <i>Annona</i>	26
Figura 4.10 - Unidade isoprênica dos terpenos.....	27
Figura 4.11 - Exemplos de terpenos, na parte (a) tem-se a Cânfora e na parte (b) tem-se o Borneol.....	27
Figura 4.12 - Estrutura do taxol.....	28
Figura 4.13 - Principais estruturas dos flavonóides.....	29
Figura 4.14 - Exemplos de flavonóides encontrados no gênero <i>Annona</i> , na parte (a) tem-se o flavonóide luteolina-7-O-glucosídeo presente na <i>Annona Tomentosa</i> e na parte (b) tem-se o flavonóide kaempferol-3-O-galactosídeo encontrado na <i>Annona crassiflora</i>	30
Figura 5.1 – Informações sobre a localização da planta, na parte (a) tem-se o local da coleta, e na parte (b) tem-se a foto da planta no dia da coleta.....	33
Figura 5.2 - Exsicata da espécie vegetal <i>Annona exsucca</i> DC.....	34
Figura 5.3 – Preparo da amostra em etapas, na parte (a) tem-se a secagem das folhas, na parte (b), as folhas trituradas, na parte (c), a balança ilustra a etapa de pesagem da amostra, na parte (d) tem-se o processo de extração, na parte (e), a ilustração do processo de filtração, na parte (f), a etapa de concentração do extrato e na parte (g) tem-se o extrato concentrado.....	35
Figura 5.4 – Fluxograma do procedimento experimental realizado.....	36
Figura 6.1 - Resultados dos testes fitoquímicos, onde na parte (a) tem-se a presença de taninos flobabênicos, na parte (b), a presença de flavonas, flavonóis e xantonas, na parte (c) há a presença das catequinas, na parte (d) tem-se indicativo das flavanonas, na parte (e) tem-se	

flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, na parte (f) há presença de esteroides, na parte (g) tem-se indicativo de saponinas e na parte (h) há a presença dos alcaloides.....	42
Figura 6.2 - Cromatograma de íons totais do extrato hidroalcólico das folhas da espécie <i>Annona exsucca</i> DC adquirido por LC-ESI-IT-MS.....	43
Figura 6.3 - Espectro de fragmentação da anonaína por ESI(+)-MS.....	44
Figura 6.4 - Espectro de fragmentação da asimilobina por ESI(+)-MS.....	44
Figura 6.5 - Espectro de fragmentação da norushinsunina por ESI(+)-MS.....	45
Figura 6.6 - Espectro de fragmentação da bismurrayafolina A por ESI(+)-MS.....	46
Figura 6.7 - Espectro de fragmentação da liriodenina por ESI(+)-MS.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Espécies usadas na medicina popular e suas aplicações.....	18
Tabela 5.1 - Confirmação para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	37
Tabela 5.2 - Confirmação dos testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.....	38
Tabela 6.1 - Resultados da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcólico das folhas da <i>Annona exsucca</i> DC.....	41

SUMÁRIO

1. Introdução.....	12
2. Objetivos.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos específicos.....	15
3. Metodologia.....	16
4. Referencial Teórico.....	17
4.1 A família <i>Annonaceae</i> e o gênero <i>Annona</i>	17
4.2 Espécie em estudo: <i>Annona exsucca</i> DC.....	18
4.2.1 Referências taxonômicas.....	20
4.3 Metabólitos secundários.....	21
4.3.1 Os metabólitos secundários na família <i>Annonaceae</i>	23
4.3.2 Metabólitos secundários do gênero <i>Annona</i>	24
4.3.2.1 Alcaloides.....	24
4.3.2.2 Acetogeninas.....	26
4.3.2.3 Terpenos.....	26
4.3.2.4 Flavonóides.....	28
4.4 Espectrometria de massas.....	30
5. Procedimento Experimental.....	32
5.1 Equipamentos utilizados.....	32
5.2 Reagentes e solventes.....	32
5.3 Coleta e identificação.....	33
5.4 Preparo da amostra.....	34
5.5 Triagem fitoquímica do extrato hidroalcolico das folhas da espécie <i>Annona exsucca</i> DC.....	37
5.5.1 Teste para fenóis e taninos.....	37
5.5.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.....	37
5.5.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.....	38
5.5.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas.....	38
5.5.5 Teste para esteroides e triterpenoides (Lieberman-Burchard).....	38
5.5.6 Teste para saponinas.....	39
5.5.7 Teste para a presença de alcaloides.....	39
5.6 Peso seco e rendimento do extrato bruto hidroalcolico.....	39

5.7 LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MS ⁿ do extrato hidroalcólico das folhas da <i>Annona exsucca</i> DC.....	39
6. Resultados e discussões.....	41
6.1 Prospecção fitoquímica do extrato hidroalcólico das folhas da espécie vegetal <i>Annona exsucca</i> DC.....	41
6.2 Rendimento de extrato bruto hidroalcólico.....	43
6.3 Análises espectrométricas do extrato hidroalcólico das folhas da <i>Annona exsucca</i> DC.....	43
7. Conclusão.....	47
Referências.....	48

1. INTRODUÇÃO

A Química de Produtos Naturais é uma vertente da Química Orgânica que realiza o isolamento e a identificação das substâncias naturais que são produzidas nas plantas, microorganismos e em alguns animais por meio do metabolismo secundário que possuem. Os estudos realizados por esta área permitem conhecer um elevado número de substâncias que já foram caracterizadas e também caracterizar novas substâncias [1]. Além disso, a Química de Produtos Naturais está diretamente relacionada com a farmacologia e a biologia, visto que a busca por novas moléculas com potenciais utilizações para o desenvolvimento de medicamentos, cosméticos, pesticidas, entre outras aplicações, necessitam dos conhecimentos em ambas as áreas [2].

Em geral, a Química de Produtos Naturais é comumente relacionada à Química das Plantas, também conhecida como fitoquímica, a qual é responsável pelo estudo dos componentes químicos encontrados nas plantas. Entretanto, a fitoquímica é frequentemente utilizada para revelar a presença de um determinado componente químico naquela espécie vegetal [1]. Os componentes químicos das plantas são classificados em metabólitos primários e metabólitos secundários. O primeiro refere-se à produção de substâncias que estão diretamente ligadas ao desenvolvimento da planta, sendo que tal processo ocorre por meio da fotossíntese. Os metabólitos secundários não apresentam relação direta com o crescimento da planta, contudo garantem a sobrevivência e a propagação das plantas que os produzem, são eles: compostos fenólicos, terpenóides, óleos essenciais, flavonóides, alcaloides, entre outros. Estes compostos são os responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos das plantas em relação aos animais e a outros organismos, e também possuem grande importância ecológica pois eles podem atuar tanto na atração de agentes polinizadores como na defesa química contra predadores [3; 4; 5].

Os metabólitos secundários produzidos nos vegetais podem variar de acordo com a família, o gênero e a espécie de uma determinada planta, logo ao saber a família e/ou o gênero de uma planta é possível conhecer previamente os metabólitos que poderão ser explorados nela [6]. Uma das famílias de plantas que se destaca pela produção desses metabólitos é a *Annonaceae*, sendo esta uma das famílias menos estudadas. Investigações fitoquímicas e farmacológicas, sobre as espécies desta família, vêm se intensificando nos últimos anos [7; 8].

A família *Annonaceae* é constituída por um grande número de espécies de plantas com alto interesse industrial, pois a maioria dessas espécies são frutíferas. Esta família possui aproximadamente 2500 espécies divididas em 130 gêneros distintos. No Brasil são encontradas

cerca de 386 espécies situadas principalmente, em sua maioria, nas florestas locais [9]. Dentre os gêneros existentes, o gênero *Annona* é considerado o mais importante desta família devido ao valor econômico que possui, pois apresenta algumas espécies frutíferas que são amplamente cultivadas e comercializadas no Brasil e no mundo, tanto na forma *in natura* quanto na forma de sucos e sobremesas [10; 11]. A figura 1.1 ilustra três espécies que apresentam essa finalidade, são elas: *Annona muricata* (graviola), *Annona squamosa* (fruta do conde), *Annona cherimola* (cherimoia), respectivamente.

Figura 1.1 - Exemplos de frutos da família *Annonaceae*.



Fonte: www.dicasetutoriais.net/2015/07/diferencas-entre-anonas.html; Acesso em: Abril de 2017.

Além disso, as plantas da família *Annonaceae* são amplamente empregadas na medicina popular no combate a diversas enfermidades, tais como: diarreia, espasmos, diabetes, tosse, problemas respiratórios, reumatismos e alguns tipos de câncer. Utilizam-se todas as partes das plantas, desde as raízes até o fruto para o preparo de chás, xaropes e sucos, a fim de inibir e/ou controlar os sintomas de uma determinada doença. Como exemplos desta aplicação, pode-se citar a *Annona muricata* e a *Annona glabra* que são amplamente estudadas pela medicina convencional, através dos conhecimentos obtidos pela medicina popular [12; 13].

Entretanto, na família *Annonaceae* existem inúmeras espécies de plantas pouco pesquisadas, as quais não se conhece todo o seu potencial medicinal, microbiológico e farmacológico. Um grande exemplo disto é a planta estudada neste presente trabalho: *Annona exsucca* DC, a qual pouco se conhece sobre as suas características gerais, composição química e funções medicinais, visto que ela é uma espécie encontrada com certa frequência na beira das matas ciliares de diversas formações da Amazônia e da Mata Atlântica [14]. Assim, neste estudo, por meio dos testes fitoquímicos e de técnicas cromatográficas acopladas, buscou-se conhecer as classes de substâncias químicas presentes nesta espécie, com o objetivo de identificar as possíveis aplicações desta espécie que podem contribuir, futuramente, na obtenção de novos medicamentos, a fim de proporcionar melhorias para o bem-estar da sociedade e ajudar no desenvolvimento da indústria farmacêutica.

Neste trabalho, a identificação das classes de compostos, presentes nas folhas da planta em estudo (*Annona exsucca* DC), foi realizado a partir do extrato hidroetanólico das folhas, o qual foi utilizado na execução de testes fitoquímicos previamente determinados na literatura. O livro mais utilizado sobre este assunto é o “Introdução à fitoquímica experimental”, do autor Francisco José de Abreu Matos, que por esta razão foi o livro referência para a realização dos testes fitoquímicos.

Posteriormente, realizou-se a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espectrômetro de massas com fonte de ionização *electrospray* (LC-ESI-IT-MS/MS) e analisador do tipo *ion trap* além de experimentos de infusão direta.

O presente trabalho tem como um dos principais objetivos estudar a composição química da espécie *Annona exsucca* DC a fim de obter-se possíveis substâncias candidatas para posteriores aplicações biofarmacológicas, garantindo assim, a melhoria e a manutenção da vida humana.

Logo, este trabalho é de grande importância para a comunidade científica brasileira pois realizou-se um estudo sobre uma planta nativa pouco conhecida e deste modo, além de contribuir para o enriquecimento dos conhecimentos científicos gerais sobre a composição química deste gênero, este trabalho também colabora para o desenvolvimento científico nacional e da indústria farmacêutica brasileira.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

❖ Identificar as classes de metabólitos presentes no extrato hidroalcólico das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC.

2.2. Objetivos Específicos

❖ Conhecer através de triagem fitoquímica, as classes de metabólitos secundários presentes no extrato hidroalcólico das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC.

❖ Caracterizar os compostos químicos do extrato hidroalcólico através da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MS).

❖ Colaborar para o conhecimento científico acerca da composição química das espécies da família *Annonaceae*.

3. METODOLOGIA

Como o trabalho realizado tratou-se de uma pesquisa qualitativa e experimental, assim o método utilizado para desenvolvê-lo baseou-se primeiramente na revisão da literatura acerca da família e do gênero da planta estudada, e posteriormente na coleta e preparação da amostra para realizar a identificação das classes de compostos por meio da triagem fitoquímica e da cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). O desenvolvimento do procedimento metodológico deste trabalho foi realizado em várias etapas, conforme as descrições abaixo:

- ❖ Pesquisa na literatura científica dos últimos anos sobre a composição química e as informações bibliográficas da família, do gênero e da espécie em estudo;
- ❖ Coleta, secagem, moagem e pesagem do material vegetal;
- ❖ Obtenção do extrato hidroetanólico das folhas da espécie em estudo neste trabalho;
- ❖ Realização da triagem fitoquímica.
- ❖ Elucidação estrutural dos compostos químicos presentes no extrato hidroalcolólico das folhas da planta em questão por LC-MS.

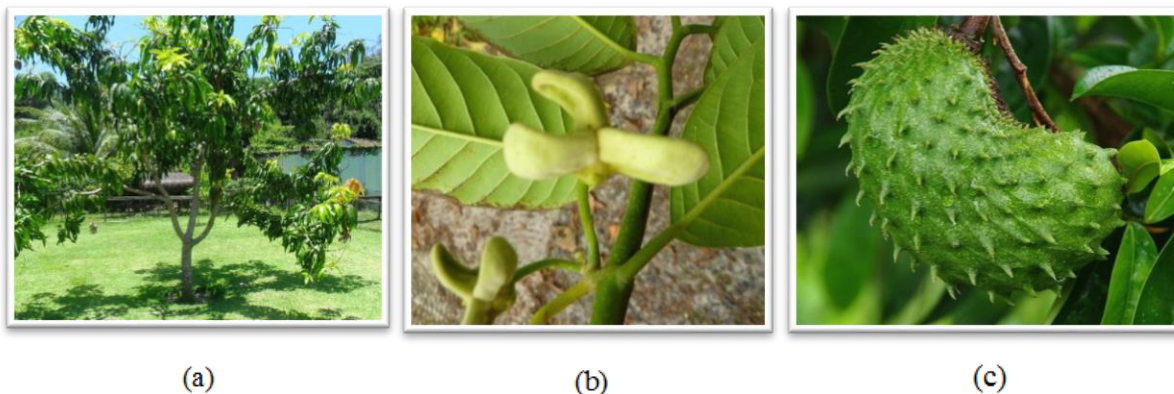
4. REFERENCIAL TEÓRICO

4.1 A família *Annonaceae* e o gênero *Annona*

A família *Annonaceae* possui aproximadamente 2500 espécies vegetais compreendidas em 130 gêneros. No Brasil existem cerca de 386 espécies distribuídas em 29 gêneros. Os gêneros com maior destaque na flora brasileira são: *Annona*, *Duguetia*, *Guatteria* e *Xylopia*. Entretanto, o gênero *Guatteria* é considerado o maior, visto que possui cerca de 300 espécies, e 88 das suas espécies são encontradas no Brasil [9].

Em geral, as plantas da família *Annonaceae* apresentam-se na forma de árvores com alturas variando de 3 a 5 metros, já as flores são compostas de duas a quatro pétalas, e os frutos possuem as cascas ásperas e cheias de gomos [15]. Na figura 4.1(a), é possível observar a imagem de uma das espécies desse gênero, a *Annona squamosa*, exemplificando a altura que vegetais desse gênero podem ter, a figura 4.1 (b) ilustra as pétalas das flores da espécie *Annona mucosa* e a figura 4.1 (c), o fruto correspondente a *Annona muricata*, respectivamente. Esta figura mostra características, citadas anteriormente, referentes à família *Annonaceae*.

Figura 4.1 - Ilustrações representando a altura da *Annona squamosa* (a), a flor da espécie *Annona mucosa* (b), o fruto da *Annona muricata* (c).



Fonte: (a) dopoucoumtodo.blogspot.com.br/2015/10/ata-pinha-ou-fruta-do-conde.html; Acesso: Abril de 2017. (b) cotram.org/taxa/index.php?taxon=Rollinia; Acesso em Abril de 2017 (c) melhorcomsaude.com/graviola-milagre-natural-cura-cancer; Acesso em: Abril de 2017.

O gênero *Annona* é um dos gêneros mais apreciados mundialmente, pois fornece frutos comestíveis, que podem ser consumidos na forma *in natura* ou na forma de bolos, sucos, sorvetes e outras formas de doces. Por esta razão, este gênero possui um alto valor industrial e econômico. Além de possuir essa finalidade, os frutos também possuem aplicações medicinais juntamente com outras partes da planta, como por exemplo: as folhas, as raízes, as flores, as sementes e o caule [16; 17].

Além das aplicações alimentícias explicitadas acima, o gênero *Annona* é também conhecido pelo alto valor medicinal das suas espécies, sendo que todas as partes da planta, desde as raízes até as sementes, são destinadas para o tratamento de doenças pela medicina popular. Na tabela 4.1 são exemplificadas algumas espécies dessa família que são aplicadas na medicina popular.

Tabela 4.1 - Espécies usadas na medicina popular e suas aplicações.

ESPÉCIE	NOME POPULAR	PARTE DA PLANTA	INDICAÇÃO
<i>Annona muricata</i>	Graviola	Folhas	Dores nas costas; diabetes
<i>Annona squamosa</i>	Fruta do conde	Folhas	Vômitos; dores musculares; cansaço; febre; doenças de pele
<i>Annona crassiflora</i>	Araticum	Sementes e folhas	Câncer; picada de cobra; doenças venéreas
<i>Annona cherimola</i>	Cherimóia	Sementes	Inseticida; antiparasitária
<i>Annona mucosa</i>	Biribá	Folhas	Anti-inflamatório

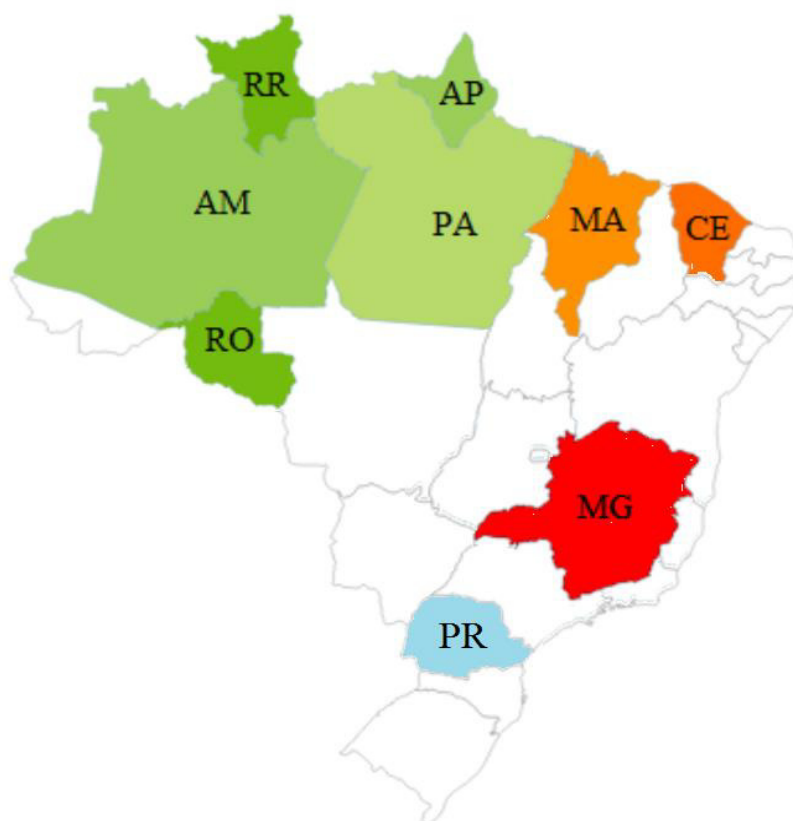
Fonte: Adaptada de BRUGINSKI (2016).

O gênero *Annona* possui cerca de 200 espécies [18] incluindo 44 espécies classificadas no antigo gênero *Rollinia*, as quais foram realocadas para o gênero *Annona* por H. Rainer em 2007 [19], baseado em estudos morfológicos, cardinológicos e palinológicos.

4.2 Espécie em estudo: *Annona exsucca* DC

A espécie vegetal *Annona exsucca* DC é popularmente conhecida pelos seguintes nomes: araticum salgado, “do tupi – fruta mole”, araticum macho, aticum ripa, aticum temperado, fruta do conde pequena, envira preta, envira bobó, biribá brava, entre outros nomes. É uma espécie incomum encontrada com certa frequência na beira de matas ciliares da floresta Amazônica e da Mata Atlântica. Os estados brasileiros, como pode ser visualizado na figura 4.2 (página 19), com ocorrências confirmadas desta espécie são: Amazonas (AM), Amapá (AP), Pará (PA), Rondônia (RO), Roraima (RR), Ceará (CE), Maranhão (MA), Minas Gerais (MG) e no estado do Paraná (PR) [14].

Figura 4.2 – Estados brasileiros com ocorrência confirmada da espécie *Annona exsucca* DC.



Fonte: Adaptada de www.floradobrasil.jbrj.gov.br; Acesso em: Abril de 2017.

As árvores desta espécie atingem uma altura variando entre 4 a 7 metros, possuindo uma copa cilíndrica, a qual pode atingir de 2 a 3 metros de diâmetro. O tronco possui diâmetro de 10 a 20 cm e sempre é encontrado reto, além disso possui casca estriada. As folhas medem de 6 a 13 cm de comprimento e 1,8 a 4,8 cm de largura. São caracterizadas por serem simples, sem pêlos e com a margem ondulada. As flores apresentam-se na forma de hélice e possuem três pétalas que são desiguais entre si com 6 a 13 mm de comprimento. Os frutos são pequenos, atingem de 4 a 6 cm de diâmetro com casca espessa de coloração verde antes de amadurecer, e amarelo pardo quando estão maduros. É possível observar, na página 20, na figura 4.3 (a), a árvore da espécie em questão, na figura 4.3 (b), a folha, na figura 4.3 (c), a flor e na figura 4.3 (d), o fruto [14].

Figura 4.3 - Ilustrações representando a árvore (a), a folha (b), a flor (c) e o fruto (d) da espécie vegetal *Annona exsucca* DC.



Fonte: A autora (2017).

Os frutos quando maduros tem a polpa amarelada e um sabor levemente salgado, e por este motivo, essa espécie recebeu o nome popular de araticum salgado. A polpa pode ser consumida tanto na forma *in natura* como no preparo de doces e/ou salgados. Os frutos, após colhidos, podem ser consumidos no máximo até 10 dias quando conservados a temperatura ambiente, entretanto quando são armazenados sob refrigeração podem durar por mais tempo, e isto garante um alto valor comercial e industrial a esta espécie [14].

4.2.1 Referências taxonômicas

Segundo a Sistemática de Angiospermas do Brasil [20], a classificação taxonômica desta espécie vegetal é realizada da seguinte maneira:

Reino: *Plantae* Divisão: *Spermatophyta* Classe: *Magnolita* Ordem: *Magnoliales*
 Família: *Annonaceae* Tribo: *Unoneae* Gênero: *Annona* Espécie: *Annona exsucca* DC

4.3 Metabólitos secundários

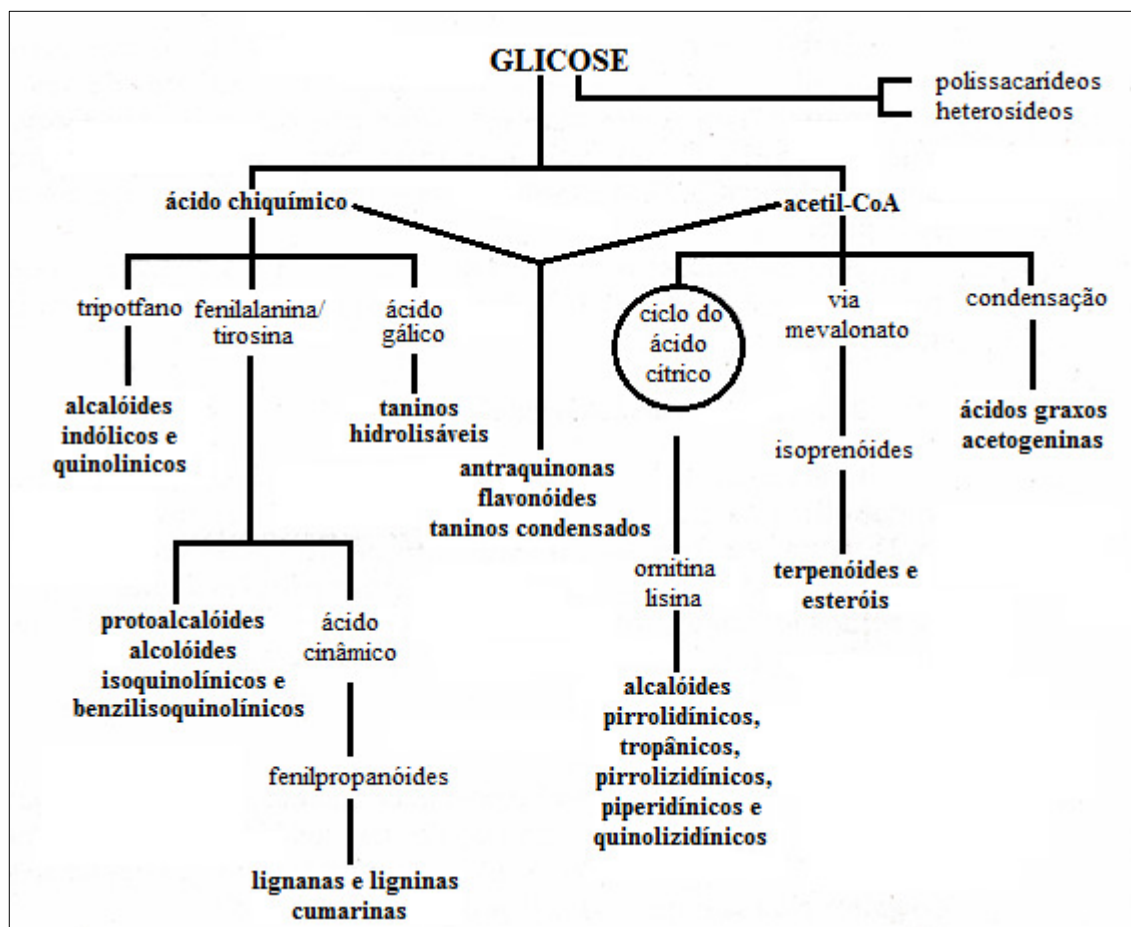
As substâncias químicas presentes nas plantas podem ser classificadas em duas categorias: metabólitos primários e metabólitos secundários. Os metabólitos primários são substâncias que estão diretamente ligadas com o desenvolvimento da planta e que são encontradas em todas as espécies vegetais, tais como: os açúcares, aminoácidos, proteínas e os ácidos nucleicos. Os metabólitos secundários, diferente dos primários, são substâncias encontradas de forma limitada em cada espécie vegetal, as quais garantem a sobrevivência da planta, como por exemplo: prevenção de ataque de predadores, reprodução da espécie, e entre outros fatores [21; 22].

O metabolismo vegetal necessita de processos fotossintéticos para produzir as substâncias do metabolismo primário que irão dar origem aos metabólitos secundários. As reações fotossintéticas podem ocorrer tanto na presença como na ausência da luz solar. Quando as reações ocorrem na presença da luz, a energia solar é absorvida pelas moléculas de clorofila e depois são transferidas para moléculas que armazenam a energia, como o ATP e NADPH. E as reações que acontecem na ausência da luz solar, utilizam as moléculas de ATP e NADPH como fonte de energia para a fixação do gás carbônico (CO_2), cujo principal destino é a sua conversão em glicose [23].

Todos os metabólitos primários e secundários são provenientes do metabolismo da glicose, onde ela é convertida em moléculas do ácido pirúvico as quais dão origem há duas vias distintas. Na primeira via, as moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico e formam os metabolitos secundários aromáticos, como por exemplo: alcaloides indólicos, cumarinas e taninos hidrossolúveis. Na segunda via, a oxidação do piruvato continua até formar as moléculas de acetil-coenzima A (acetil-coA), as quais podem seguir três vias: via do ciclo de ácido cítrico, via do mevalonato e a via da condensação do acetato que forma os derivados do acetato [23].

O ciclo do ácido cítrico forma os alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato é a responsável pela formação dos terpenoides e esteróis e a via da condensação de acetato origina as acetogeninas. A produção das antraquinonas, dos flavonóides e dos taninos condensados, ocorre por meio da combinação de uma unidade do ácido chiquímico com uma ou mais unidades do acetato ou dos seus derivados [23]. A figura 4.4 mostra (página 22), de forma resumida, as vias de biossíntese e os seus produtos obtidos.

Figura 4.4 - Rota metabólica vegetal.



Fonte: www.geocities.ws/plantastoxicas/metabolismo.html; Acesso em: Maio de 2017.

Os metabólitos secundários podem ser classificados de acordo com a sua estrutura e/ou rota de biossíntese. Além disso, a produção dos metabólitos secundários nas plantas é diretamente influenciada por fatores que modificam o ambiente em que vivem, como por exemplo: aumento da temperatura, ameaça dos predadores, queimadas, destruição do solo, falta de radiação solar, mudanças de estações, presença de microorganismos, entre outros. Muitos desses fatores apresentam ligações com as ações antrópicas no ambiente, mas também são influenciados por outros fatores como estímulos mecânicos, poluição atmosférica, simbiose com agentes patogênicos e fatores edafoclimáticos, os quais estão relacionados com o clima e o solo [24].

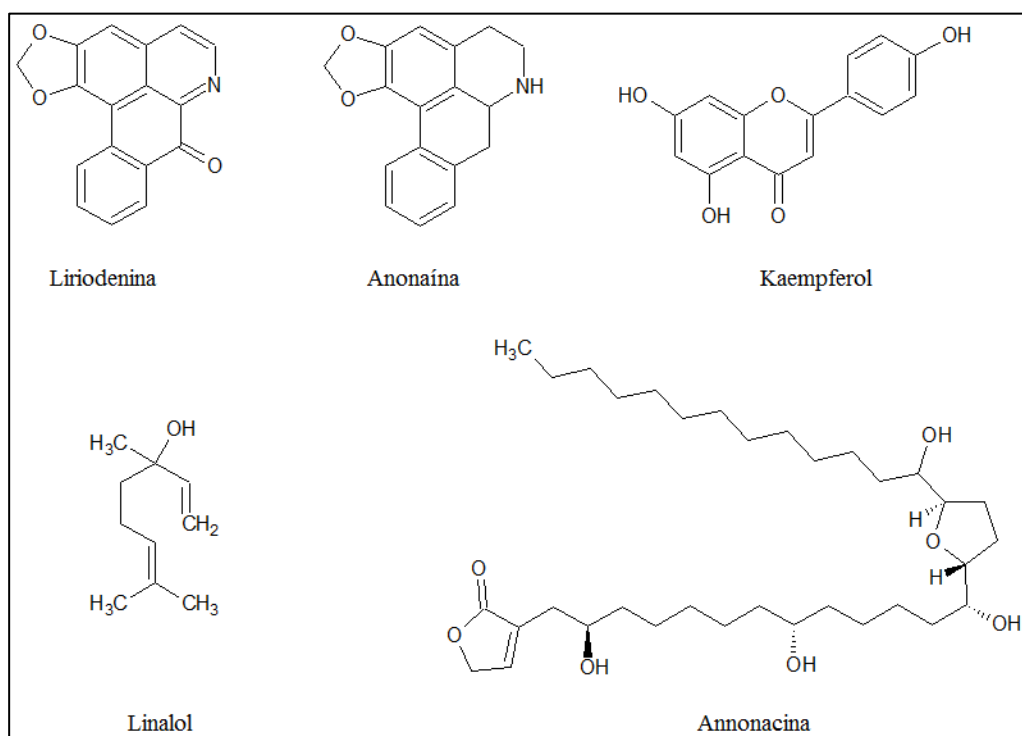
A quantidade e as classes de compostos que serão produzidas pelas plantas são influenciadas por estes fatores, o que pode causar mudanças no perfil químico e na quantidade de substâncias extraídas das plantas. É importante ressaltar que, os metabólitos secundários são os principais compostos que contribuem para a atividade farmacológica dos produtos naturais,

e portanto, faz-se necessário conhecer estes fatores para evitar a perda desta atividade, e também à não produção de um ou mais metabólitos que são importantes para a sobrevivência da espécie ou que garantem a atividade farmacológica do extrato. Além disso, estes fatores também são importantes para realizar a coleta da planta no tempo correto, pois, deste modo, é possível obter a classe de substâncias que se deseja extrair em maior quantidade [25; 26].

4.3.1. Os metabólitos secundários na família *Annonaceae*

A família *Annonaceae* possui uma grande variedade de substâncias químicas na sua composição, isso se deve à diversidade biogenética e estrutural dos metabólitos secundários que podem ser encontrados nas suas espécies. Essa família, geralmente, é caracterizada pela ocorrência de alcaloides e acetogeninas, entretanto também apresenta outras classes de compostos como por exemplo: polifenóis, terpenos, compostos aromáticos, lignanas, neolignanas, flavonóides, chalconas, esteroides, lactonas e amidas. Vale ressaltar que mesmo com essa diversidade de classes de compostos, a classe dos alcaloides é mais estudada dessa família [27; 28; 29]. A figura 4.5 ilustra algumas substâncias das principais classes de compostos dessa família.

Figura 4.5 – Principais compostos presentes na família *Annonaceae*.



Fonte: A autora (2017).

4.3.2 Metabólitos secundários do gênero *Annona*

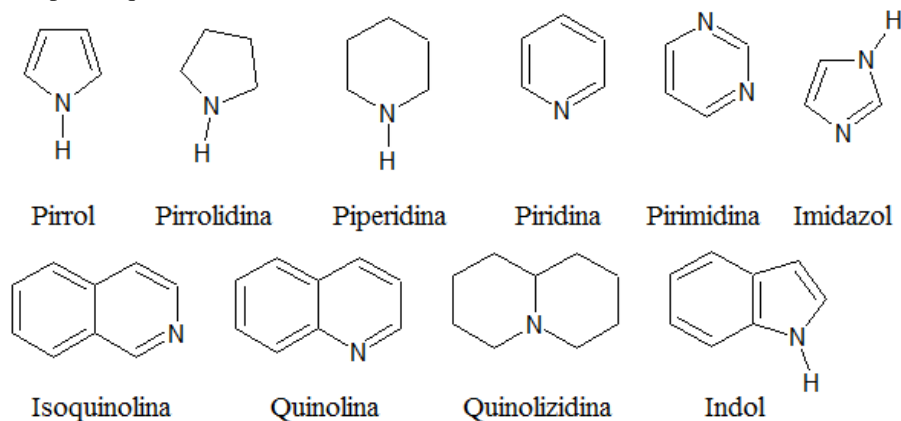
As espécies vegetais da família *Annonaceae*, especialmente as do gênero *Annona*, são caracterizadas principalmente pela presença de alcaloides benzilisoquinólicos, entretanto, também apresentam outras classes de alcaloides. Além disso, os atuais estudos químicos realizados com as espécies desse gênero revelam que, além dos alcaloides, existem outras classes de metabólitos secundários presentes nessas espécies, como por exemplo: as acetogeninas, os terpenos e os flavonóides.

4.3.2.1 Alcaloides

Os alcaloides são compostos orgânicos nitrogenados encontrados principalmente nas plantas, mas também estão presentes, em menor quantidade, em microorganismos e animais. Estas moléculas podem apresentar um ou mais átomos de nitrogênio na sua estrutura, o qual confere a alcalinidade desses compostos e, tal propriedade facilita a extração e a purificação deles, pois formam sais solúveis em água quando estão em contato com ácidos orgânicos e inorgânicos. Essa classe de compostos pode ser encontrada em todas as partes da planta, e a sua principal função é garantir a proteção contra predadores, como por exemplo: herbívoros e patógenos [30; 31; 32].

Com relação a classificação, os alcaloides são classificados de acordo com a sua rota de biossíntese, pois eles dependem do aminoácido precursor, o qual é o responsável por fornecer o esqueleto fundamental da estrutura juntamente com o nitrogênio. Entre as principais classes estão: indólicos e quinolínicos que são provenientes do triptofano; pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos que são derivados da ornitina; isoquinolínicos e benzilisoquinolínicos que são oriundos da tirosina [31]. A figura 4.6 abaixo, mostra os esqueletos estruturais básicos encontrados nos diversos tipos de alcaloides.

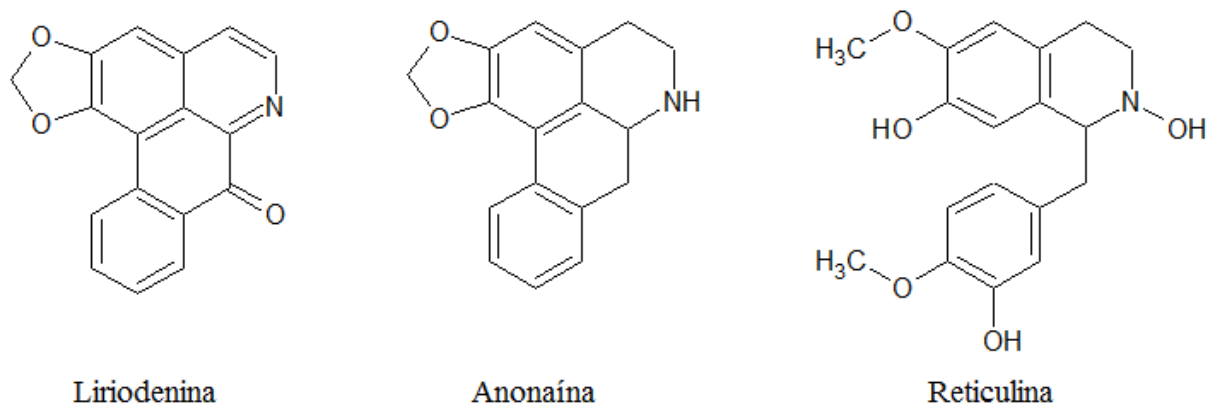
Figura 4.6 – Principais esqueletos encontrados nos alcaloides.



Fonte: A autora (2017).

Dentre as diversas classes de alcaloides existentes, os isoquinolínicos são os mais encontrados na família *Annonaceae*, incluindo os aporfínicos e os oxaporfínicos que são os dois maiores grupos dessa classe. A presença dos alcaloides nessa família é constante no gênero *Annona*. A liriodenina (oxaporfínico), anonaína (aporfínico) e reticulina (benzilisoquinolínico), como mostra a figura 4.7, são os alcaloides mais comuns encontrados nas espécies desse gênero, e por isso podem ser considerados os marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Annona* [33].

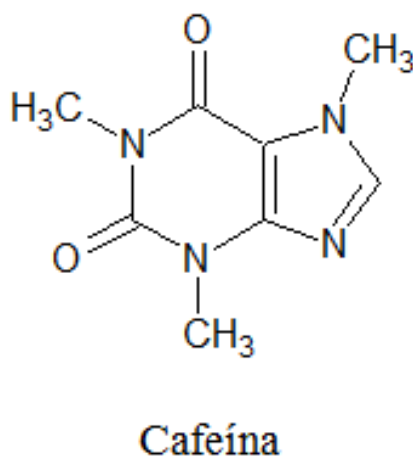
Figura 4.7 – Alcaloides mais comuns no gênero *Annona*.



Fonte: A autora (2017).

Os estudos recentes realizados com as espécies vegetais do gênero *Annona* mostram que existem uma grande diversidade de alcaloides aporfínicos na sua composição, além disso também são encontrados alcaloides do tipo não isoquinolínicos em algumas espécies desse gênero, como por exemplo: a presença da cafeína, como composto majoritário, nas sementes da *Annona cherimola* (figura 4.8) [33].

Figura 4.8 – Estrutura da cafeína.

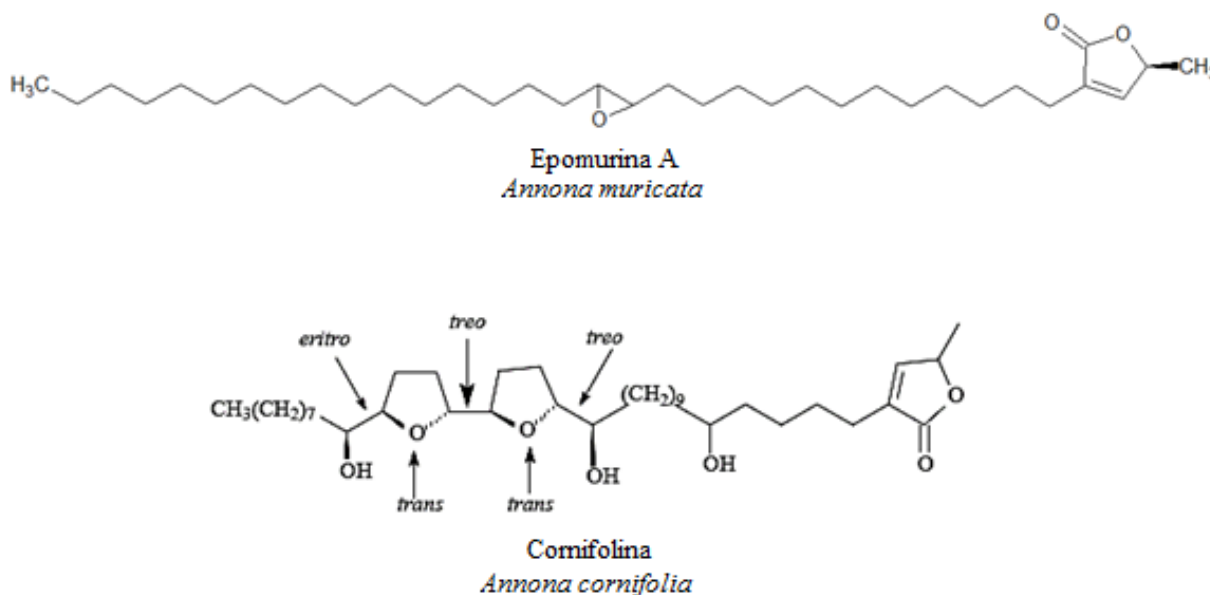


Fonte: A autora (2017).

4.3.2.2 Acetogeninas

As acetogeninas são produtos naturais que possuem uma longa cadeia carbônica, formada geralmente com 35 a 37 átomos de carbono ligada com um anel γ -lactona terminal. Além disso podem apresentar diferentes grupos funcionais na sua cadeia, como por exemplo: anéis tetrahydrofurânicos e tetrahidropirânicos, grupos oxigenados e ligações duplas. A presença dos grupos funcionais na cadeia carbônica das acetogeninas sugerem que elas são derivadas dos policetídeos, onde ocorre a combinação das moléculas por meio da via do acetil-coA com dois ou três carbonos lineares, como o ácido etanoico e o ácido propanoico. Vale ressaltar que as acetogeninas são substâncias exclusivas da família *Annonaceae*, sendo que o gênero *Annona* é a principal fonte de obtenção desta classe de metabólitos [34; 35; 36]. A figura 4.9 abaixo, mostra alguns exemplos de acetogeninas encontradas em espécies vegetais do gênero *Annona*.

Figura 4.9 – Acetogeninas encontradas em espécies do gênero *Annona*.



Fonte: A autora (2017).

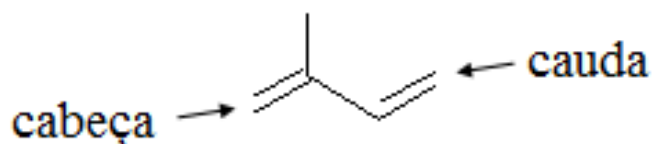
Esta classe de substâncias apresenta um grande potencial biológico, pois possuem várias propriedades biológicas, como por exemplo: antitumoral, antiparasitária, antimicrobiana, pesticida, entre outras propriedades [34].

4.3.2.3 Terpenos

Os terpenos são uma classe de produtos naturais de grande ocorrência nas plantas. Possuem uma ampla diversidade estrutural a qual deriva da junção cabeça-cauda de cinco átomos de carbono, também conhecida como unidade isoprênica (figura 4.10). Os terpenos são

classificados de acordo com a junção das unidades isoprênicas, deste modo, eles podem ser monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos e tetraterpenos, e possuem, respectivamente, a junção de duas, três, quatro, cinco, seis e oito unidades isoprênicas [37].

Figura 4.10 - Unidade isoprênica dos terpenos.



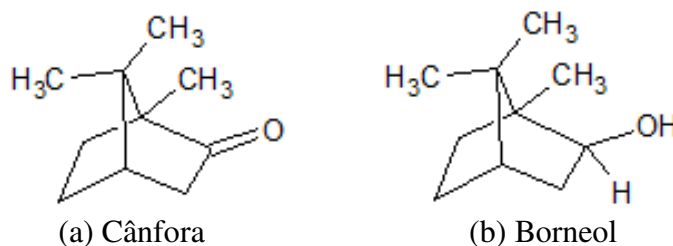
Fonte: A autora (2017).

Dentre as classes de terpenos citadas anteriormente, os monoterpenos e os sesquiterpenos são os principais componentes dos óleos essenciais, além disso ambos possuem importantes propriedades terapêuticas, tais como: expectorantes, anti-inflamatórios, anti-infecciosos, antimicrobianos, entre outras propriedades. Os triterpenos, são uma outra classe de terpenóides, que apresentam um grande potencial de atividade biológica, como por exemplo: anti-inflamatória, antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antiviral, analgésica, antioxidante, antidiabética, entre outras atividades [38].

Com relação à sua formação, os terpenos possuem duas vias distintas de biossíntese: a primeira ocorre na via do mevalonato que tem como precursores o piruvato e o acetil-coA; e a segunda via é a partir da via do 5-fosfato de 1-desoxi-D-xilulose que apresenta como precursores o piruvato e o gliceraldeído. As duas vias de biossíntese formam o difosfato de isopentenila, com cinco unidades de carbono, o qual será convertido em difosfato de dimetilalila para poder dar início à formação dos terpenos [39].

O gênero *Annona* também possui essa classe de produtos naturais na sua composição, isto foi observado nas folhas da espécie vegetal *Annona squamosa* que mostrou a presença dos monoterpenos canfôra na figura 4.11 (a) e o borneol na figura 4.11 (b) nas folhas dessa planta [33].

Figura 4.11 – Exemplos de terpenos, na parte (a) tem-se a Cânfora e na parta (b) tem-se o Borneol.

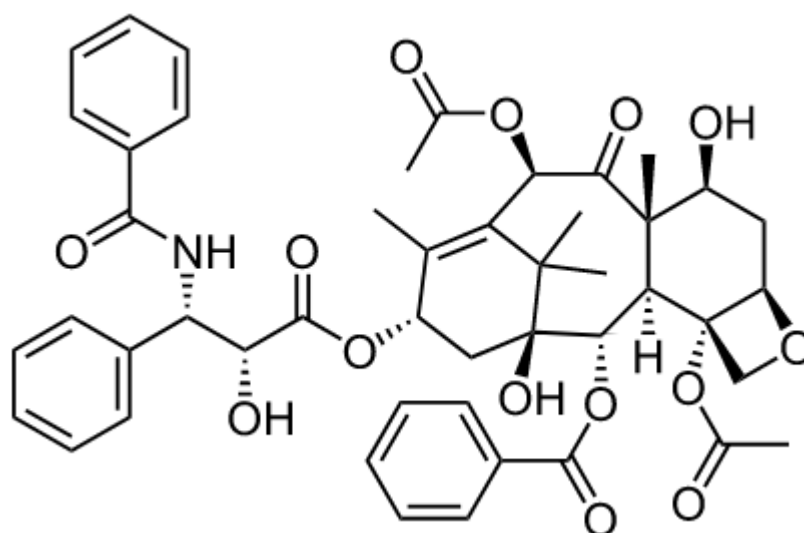


Fonte: A autora (2017).

Os terpenos podem ser encontrados em diversas partes de uma planta, como por exemplo: folhas, flores, raízes, caule e frutos, sendo que neste último eles são encontrados principalmente nas cascas e nas sementes. Os terpenos, também conhecidos como óleos essenciais, quando extraídos dessas partes da planta, possuem na maioria das vezes, um cheiro muito agradável, o que permite a sua aplicação nos produtos cosméticos e nos perfumes na forma de fragrâncias [40].

Além disso, os terpenos apresentam um grande interesse econômico a nível mundial nas indústrias de fármacos, um grande exemplo disso é o taxol (figura 4.12), isolado da espécie vegetal *Taxus brevifolia*, pois ele é o princípio ativo de um fármaco no combate ao câncer, e devido à sua complexidade de extração, ele possui um valor estimado em 1,8 bilhões de dólares [41].

Figura 4.12 – Estrutura do taxol.



Fonte: A autora (2017).

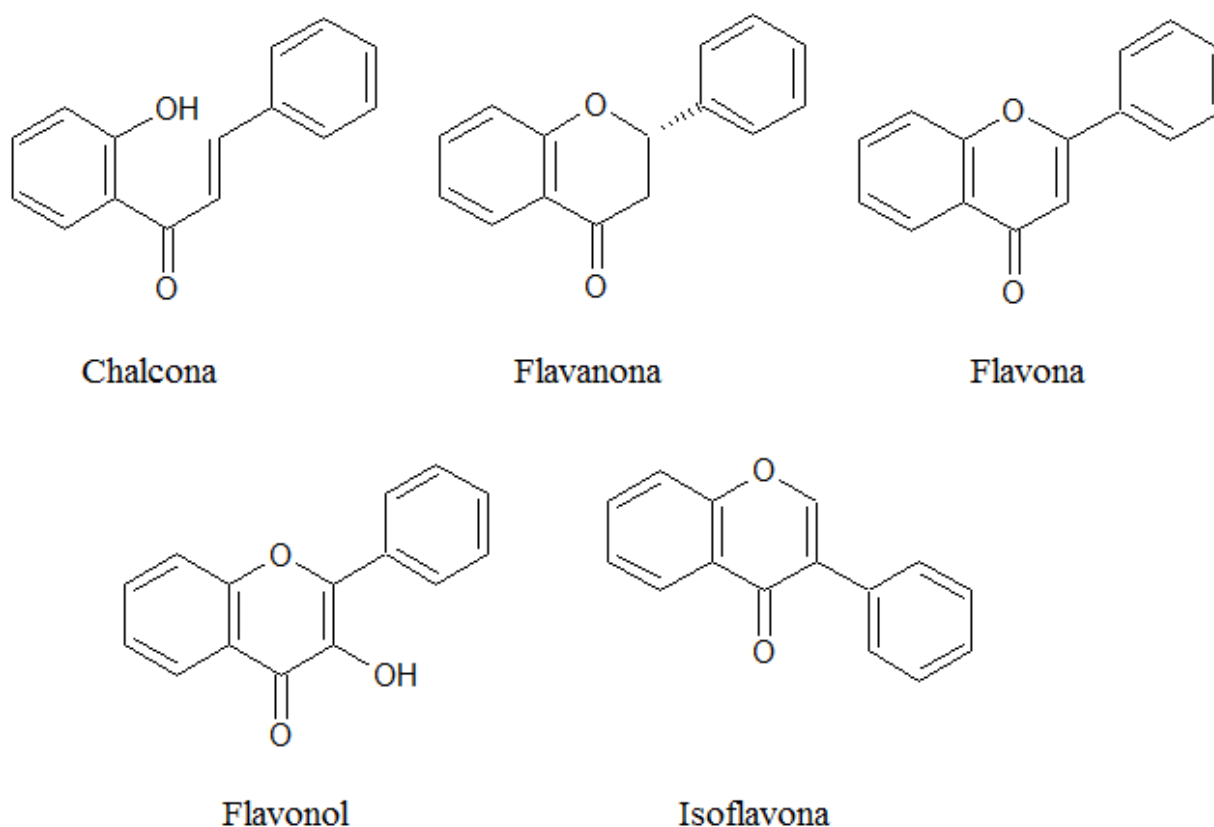
4.3.2.4 Flavonóides

Os flavonóides são uma classe de produtos naturais que estão presentes em todas as partes das plantas, ou seja, podem ser encontradas nas raízes, no caule, nas folhas, nas flores e nos frutos. Muitos flavonóides apresentam coloração amarelada e são responsáveis pela atração dos agentes polinizadores. Essa classe de substâncias possui propriedades farmacológicas que apresentam ação antioxidante, antiviral, antialérgica, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antimalárica, anestésica e antidepressiva [42; 43; 44; 45].

Os flavonóides são derivados a partir de duas rotas de biossíntese: a primeira é através da via do ácido chiquímico e a segunda é por meio da via do acetato. Eles podem ser

classificados de acordo com o seu processo de formação, logo possuem dez tipos de classificações, que são: flavonas, flavonóis, antocianinas, leucoantocianidinas, glicoflavonas, chalconas, biflavonilas, auronas, flavanonas e isoflavonas [42; 43; 44; 45; 46; 47]. Os flavonóides são compostos solúveis em água, metanol, etanol e butanol, pois possuem média polaridade, além disso são compostos levemente ácidos. Vale ressaltar que os flavonóides podem ser degradados quando estão na presença do oxigênio em meio alcalino e, apesar de apresentarem coloração amarelada, o que permite a visualização desses compostos na região do visível, eles também podem ser visualizados na região do ultravioleta, visto que possuem grupos cromóforos na sua estrutura [42; 43; 44; 45]. A figura 4.13 mostra algumas estruturas básicas dessas classes de flavonóides.

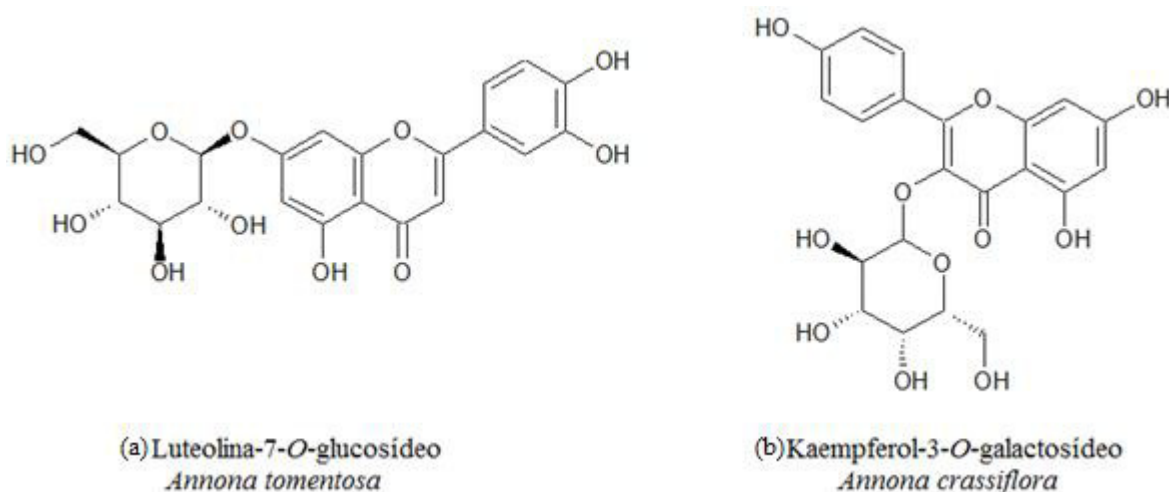
Figura 4.13 - Principais estruturas dos flavonóides.



Fonte: A autora (2017).

Com relação ao gênero *Annona*, as classes de flavonóides mais encontradas nas espécies vegetais deste gênero são as flavonas e os flavonóis, os quais estão presentes nas espécies *Annona Tomentosa* e *Annona crassiflora*, respectivamente. Na página 30, a figura 4.14 (a) mostra o flavonóide luteolina-7-O-glucosídeo, presente na *Annona Tomentosa* e a figura 4.14 (b) mostra o flavonóide kaempferol-3-O-galactosídeo, encontrado na *Annona crassiflora* [48].

Figura 4.14 - Exemplos de flavonóides encontrados no gênero *Annona*, na parte (a) tem-se o flavonóide luteolina-7-O-glucosídeo presente na *Annona Tomentosa* e na parte (b) tem-se o flavonóide kaempferol-3-O-galactosídeo encontrado na *Annona crassiflora*.



Fonte: A autora (2017).

4.4 Espectrometria de massas

Com o avanço da tecnologia, tornou-se possível o desenvolvimento de equipamentos capazes de identificar e determinar a estrutura das substâncias presentes em uma determinada amostra com maior precisão e rapidez que os métodos clássicos de análise. As técnicas hífenadas foram um dos métodos de análise que surgiram, a partir deste progresso tecnológico, com intuito de facilitar o processo de identificação dos diversos tipos de compostos existentes na natureza. A cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas (LC-MS) constitui um tipo de técnica hífenada amplamente valiosa para a análise de moléculas, visto que ela consegue determinar novos compostos com a vantagem da rapidez na obtenção dos resultados [49].

A espectrometria de massas (MS) é uma técnica em que as moléculas são convertidas em íons na fase gasosa, os quais são separados pelo espectrômetro de massas conforme a sua razão massa/carga (m/z). A partir da remoção ou da adição de um elétron ou próton em uma molécula neutra são produzidos íons que o equipamento será capaz de detectar. Assim, as análises realizadas nos espectrômetros de massas podem ser feitas no modo de íons positivo ou negativo [49].

O aperfeiçoamento das técnicas de ionização permitiu a determinação precisa das massas de compostos com alto e baixo peso molecular, o que ampliou a aplicação da espectrometria de massas. Uma das técnicas de ionização mais empregadas neste âmbito, é a

ionização por *electrospray* (ESI), que consiste em produzir íons por meio de um spray da solução contendo o analito em um campo elétrico. Gotículas carregadas são formadas através de um processo de nebulização, e conforme elas adentram no espectrômetro, o solvente é removido, isto implica na diminuição do tamanho da gotícula até o ponto em que sobre apenas íons. Com a aplicação de um forte campo elétrico sobre a superfície da gotícula, o processo de ionização é iniciado [49].

Após esta etapa, os íons são enviados para o analisador de massas. Dentre os vários tipos de analisadores, pode-se citar o analisador do tipo *ion trap* que consiste no armazenamento de íons no seu interior através da manipulação de corrente elétrica alternada e de radiofrequência, simultaneamente. Isto permite que os íons sejam liberados de forma controlada, o que proporciona analisar sua separação com uma maior resolução. A capacidade de captura de íons por curtos e longos períodos permite analisar tipos de fragmentações incomuns, que originam espectros de massas que nenhuma outra técnica é capaz de gerar [50].

Portanto, a cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um espectrômetro de massas que tenha fonte de ionização por *electrospray* e analisador de massas do tipo *ion trap* permite uma análise rápida, eficiente e precisa da amostra, visto que o espectrômetro de massas consegue identificar e caracterizar os analitos separados pelo cromatógrafo. Essa técnica hifenada vem se tornando uma poderosa ferramenta para identificação de compostos em misturas complexas sem necessidade de isolamento.

5.PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

5.1 Equipamentos Utilizados

Balança analítica analógica (HIDROMEL);

Balança analítica digital (SHIMADZU);

Bomba de vácuo TE-058 (TECNAL);

Evaporador rotativo (Staufen, IKA-WERK);

Moinho de facas (SKYMSSEN);

Cartuchos (PHENOMENEX STRATA C18);

HPLC (SHIMADZU);

Coluna (LUNA 5 µm C18 100 A, 150µm x 4,6µm);

Software LC Solution (SHIMADZU);

Analizador do tipo *ion trap* linear (THERMO SCIENTIFIC LTQ XL)

5.2 Reagentes e Solventes

Ácido clorídrico P.A. (MERCK)

Álcool etílico hidratado 700 INPM (ITAJÁ);

Álcool metílico P.A. (ISO FAR);

Hexano P.A (DINÂMICA);

Clorofórmio P.A. (ISO FAR);

Carbonato de bismutita (ISO FAR);

Iodeto de potássio P.A. (ISO FAR)

Cloreto férrico (SYNTH);

Sulfato anidro de sódio (ISO FAR);

Anidrido Acético (SYNTH);

Ácido Sulfúrico (SYNTH);

Hidróxido de sódio (DINÂMICA);

Iodo P.A. (VETEC);

Sílica gel 60 G (MERCK);

Papel de pH (MACHEREY-NAGEL);

Fita de magnésio;

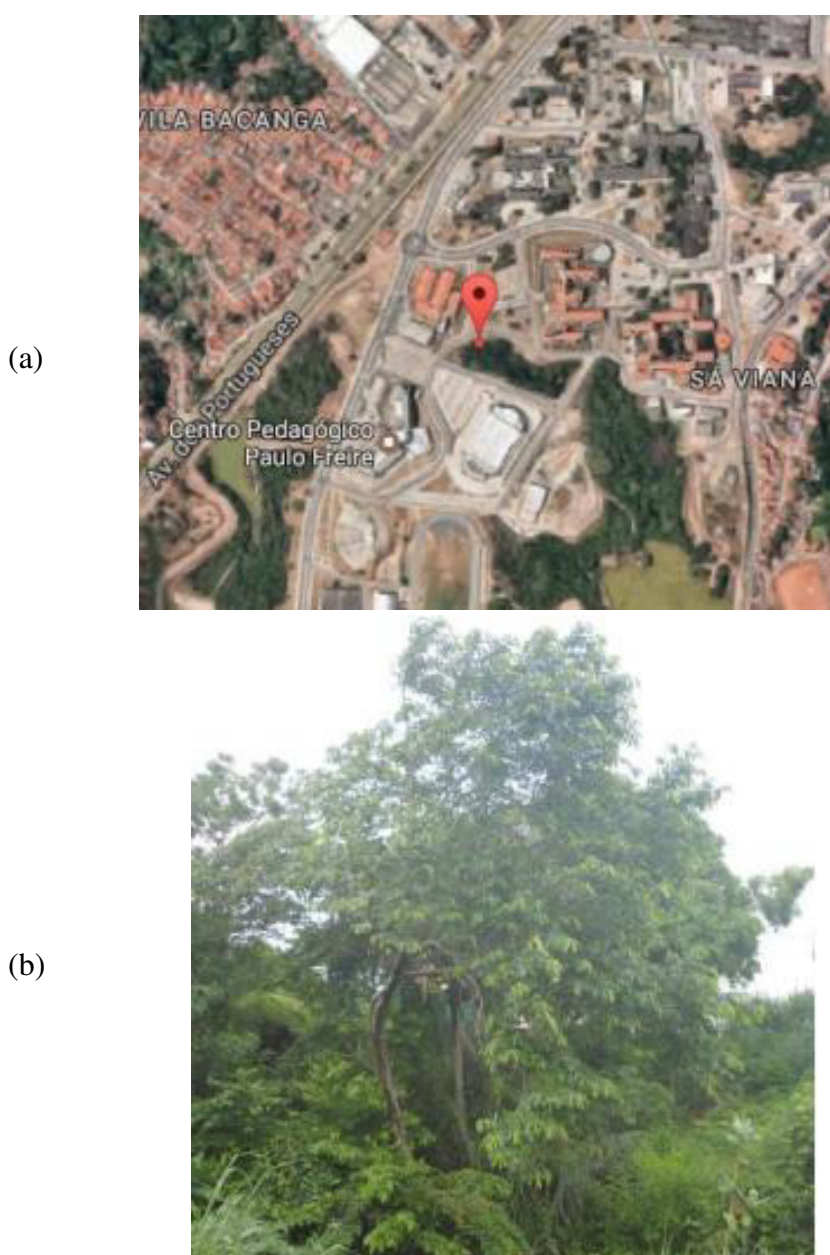
Água destilada;

Metanol Grau Massas (MERCK).

5.3 Coleta e identificação

As folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC foram coletadas próximas ao prédio Paulo Freire na Universidade Federal do Maranhão (UFMA) – Campus Bacanga (coordenadas 2°33'30.6"S 44°18'38.0"W), durante o período de estiagem, no dia 01 de outubro de 2015 às 9h45 min. O local da coleta pode ser visualizado na figura 5.1 (a), enquanto que a figura 5.1 (b) mostra a foto da planta no dia da coleta. O material coletado foi destinado para o preparo do extrato hidroalcólico, a fim de executar os testes fitoquímicos e a corrida cromatográfica.

Figura 5.1 – Informações sobre a localização da planta, na parte (a) tem-se o local da coleta, e na parte (b) tem-se a foto da planta no dia da coleta.



Fonte: (a) Google mapas (2017); (b) A autora (2017).

A identificação dessa espécie foi realizada através de outra coleta do material, a qual ocorreu no dia 04 de agosto de 2016 às 9h00. Preparou-se uma exsicata do material botânico coletado a qual foi levada para o Herbário do Maranhão vinculado ao Departamento de Biologia da Universidade Federal do Maranhão – Campus Bacanga, onde o professor Eduardo Bezerra Almeida Júnior ficou responsável por identificá-la. Por este motivo, a mesma está arquivada neste herbário sob o número de tombo 9.244. A figura 5.2 mostra a exsicata da espécie vegetal *Annona exsucca* DC.

Figura 5.2 - Exsicata da espécie vegetal *Annona exsucca* DC.



Fonte: A autora (2017).

5.4 Preparo da amostra

Após a coleta, as folhas foram submetidas à secagem em local ventilado e protegida da luz direta do sol durante sete dias. As folhas secas foram trituradas no moinho de facas, e resultaram em 450 gramas de material. Colocou-se esta massa em um recipiente de vidro, e adicionou-se 1500 mL de álcool etílico hidratado 700 INPM. Agitou-se essa mistura e deixou-se em repouso durante vinte e quatro horas para extrair os compostos químicos, após esta etapa,

filtrou-se o extrato que em seguida foi armazenado, e ao resíduo sólido, adicionou-se mais 1500 mL de álcool etílico hidratado 700 INPM. No total, foram realizadas cinco extrações, obtendo-se um volume de 7500 mL, que foi submetido a concentração sob pressão reduzida em evaporador rotativo, à temperatura constante de 40°C. O volume final do extrato bruto obtido foi de 500 mL, do qual retirou-se 100 mL para a realização dos testes fitoquímicos e para a análise do perfil cromatográfico.

A figura 5.3 mostra as etapas do processo através de fotos, ilustrando: a secagem das folhas (a), as folhas trituradas (b), a pesagem do material (c), o processo de extração (d), o processo de filtração (e), a concentração do extrato no rotaevaporador (f) e o extrato bruto concentrado (g).

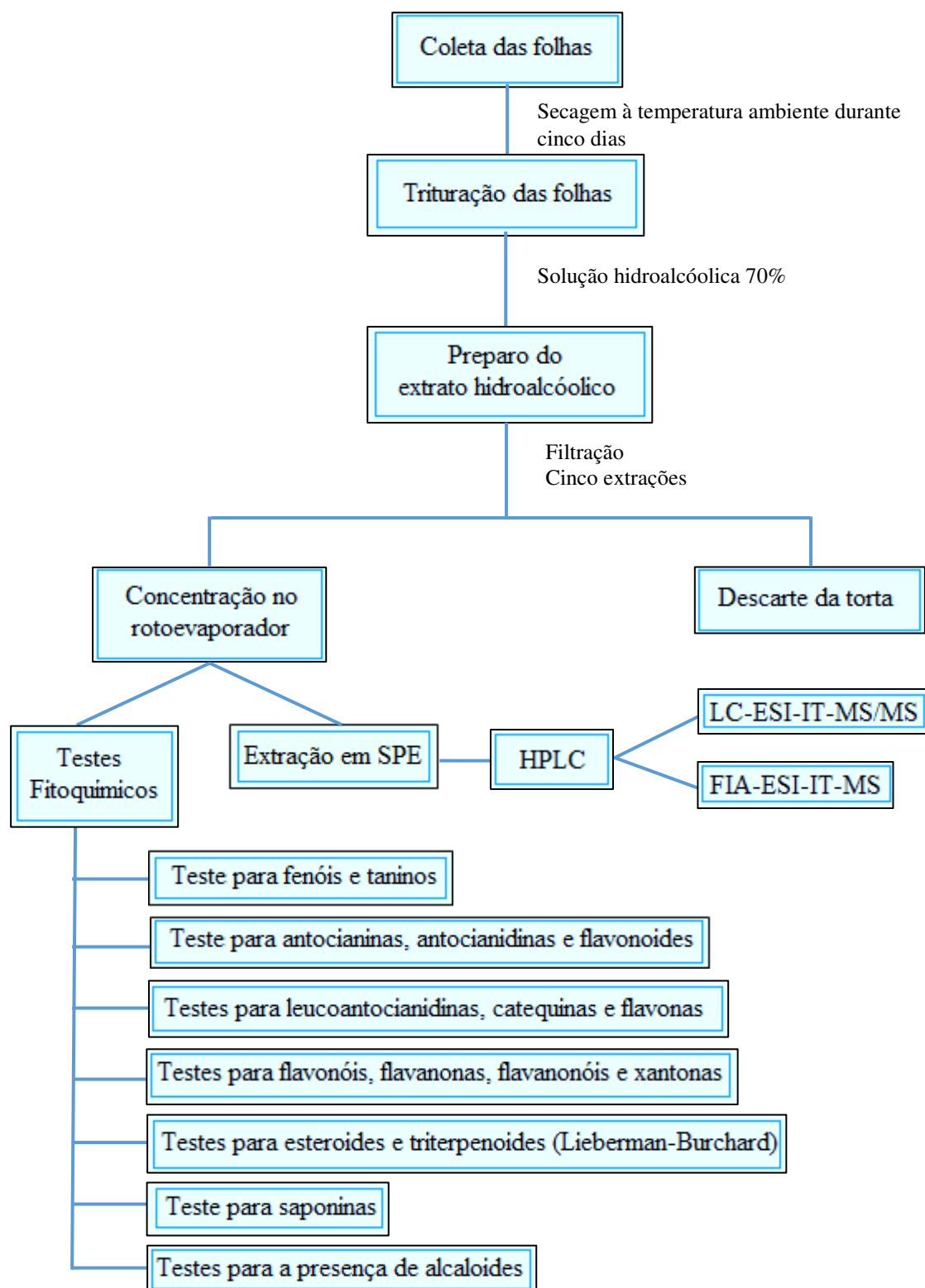
Figura 5.3 – Preparo da amostra em etapas, na parte (a) tem-se a secagem das folhas, na parte (b), as folhas trituradas, na parte (c), a balança ilustra a etapa de pesagem da amostra, na parte (d) tem-se o processo de extração, na parte (e), a ilustração do processo de filtração, na parte (f), a etapa de concentração do extrato e na parte (g) tem-se o extrato concentrado.



Fonte: A autora (2017).

A figura 5.4, página 36, apresenta, de forma resumida, todo o procedimento experimental realizado desde a coleta do material até a identificação dos constituintes pelas técnicas utilizadas.

Figura 5.4 – Fluxograma do procedimento experimental realizado.



Fonte: A autora (2017).

5.5 Triagem fitoquímica do extrato hidroalcólico das folhas da espécie *Annona exsucca* DC

De acordo com a metodologia proposta por Matos [51], os testes fitoquímicos foram realizados em sete tubos de ensaio enumerados, contendo 3,0 mL do extrato hidroalcólico cada, conforme os testes descritos abaixo.

5.5.1 Teste para fenóis e taninos

No tubo de ensaio 01, adicionou-se três gotas da solução alcóolica de cloreto férrico (FeCl_3), e em seguida, o tubo foi bem agitado e observou-se qualquer variação na sua coloração ou formação de precipitado. Após este procedimento, o tubo foi comparado a outro contendo apenas água e o cloreto férrico. Segundo MATOS [51], caso seja observada a coloração variando entre azul e vermelho, há um indicativo da presença de fenóis, caso seja observada a formação de precipitado de coloração azul escuro ou verde, há um indicativo de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis), para o primeiro caso, ou taninos flobabênicos (taninos condensados ou catéquicos) para o segundo.

5.5.2 Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Utilizou-se os tubos de ensaio 02, 03 e 04 para a realização desse teste. O tubo 02 foi acidificado a pH 3, enquanto que os tubos 03 e 04 foram alcalinizados ao pH 8,5 e 11, respectivamente. Observou-se qualquer mudança na coloração do extrato, visto que o aparecimento de diversas cores, de acordo com a tabela 5.1 abaixo, indica a presença de vários constituintes [51].

Tabela 5.1 - Confirmação para antocianinas, antocianidinas e flavonóides.

CONSTITUINTES	COR EM MEIO		
	Ácido ⁽³⁾	Alcalino ^(8,5)	Alcalino ⁽¹¹⁾
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-púrpura
Flavonas, flavonóis e xantonas	—	—	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	—	Vermelho púrpura
Flavonóis	—	—	Vermelho púrpura

Fonte: Introdução à fitoquímica experimental, p. 48 (MATOS, 2009).

5.5.3 Teste para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas

O tubo de ensaio 05 foi acidificado com ácido clorídrico até atingir o pH na faixa de 1-3 e o tubo 06 foi alcalinizado com hidróxido de sódio até pH 11. Ambos os tubos foram aquecidos com uma lâmpada de álcool durante 2-3 minutos. Se for observada mudança na coloração do extrato, por comparação aos tubos usados no teste anterior, deve-se consultar a tabela 5.2 abaixo para confirmar a presença desses constituintes [51].

Tabela 5.2 - Confirmação dos testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavonas.

CONSTITUINTES	COR EM MEIO	
	Ácido	Alcalino
Leucoantocianidinas	Vermelha	—
Catequinas (taninos catéquicos)	Pardo-amarelada	—
Flavanonas	—	Vermelho-laranja

Fonte: Introdução à fitoquímica experimental, p. 48 (MATOS, 2009).

5.5.4 Teste para flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas

Adicionou-se ao tubo de ensaio 07, um pequeno pedaço de magnésio em fita e 0,5 mL de ácido clorídrico (HCl) concentrado. Aguardou-se o fim da reação, o qual é indicado pelo término da efervescência, e em seguida, comparou-se a mudança na coloração da mistura com o tubo de ensaio 05. Caso haja o aparecimento ou intensificação da cor vermelha, isto indica a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, caso contrário não há presença desses constituintes [51].

5.5.5 Teste para esteroides e triterpenoides (Lieberman-Burchard)

Em um béquer, colocou-se 10 mL do extrato hidroalcólico e deixou-se em banho-maria até secar. Em seguida, extraiu-se o resíduo seco do béquer com 1-2 mL de clorofórmio (CHCl_3). Posteriormente, filtrou-se esta solução, gota a gota, em um pequeno funil simples fechado com um algodão e coberto com sulfato anidro de sódio (Na_2SO_4), para um tubo de ensaio seco.

Após essa etapa, adicionou-se 1 mL de anidrido acético ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_3$) e agitou-se de forma suave. Depois, colocou-se três gotas de ácido sulfúrico concentrado (H_2SO_4), e tornou-se a

agitar esta solução até observar mudança de cor. A coloração azul evanescente seguida da coloração verde permanente, vista no tubo de ensaio, indica a presença de esteroides livres nesse extrato. Caso a coloração visualizada no tubo de ensaio seja parda até vermelha tem-se indicativo da presença de triterpenoides pentacíclicos livres [51].

5.5.6 Teste para saponinas

No procedimento anterior, separou-se o resíduo insolúvel de clorofórmio e redissolveu-o em 5-10 mL de água destilada. Depois, essa solução foi filtrada para um tubo de ensaio seco e agitada fortemente durante 2-3 minutos. Se houver formação de uma espuma persistente e abundante, há presença de saponina [51].

5.5.7 Teste para a presença de alcaloides

Com o auxílio de um capilar, realizou-se a aplicação de uma pequena quantidade do extrato hidroalcólico sobre uma placa de vidro (10cm x 5cm) coberta com sílica gel 60G da Merck.

Desenvolveu-se um sistema de eluente composto com hexano, clorofórmio e metanol (na proporção de 3:6:1 para 10 mL) capaz de separar os compostos presentes nesse extrato. Em seguida, borrifou-se o reagente de Dragendorff sob a placa contendo o extrato, caso a placa apresente pigmentos de coloração vermelho-tijolo, o teste é positivo para a presença de alcaloides. O reagente de Dragendorff utilizado para a realização deste teste fitoquímico é específico para determinar a presença de alcaloides em um extrato hidroalcólico.

5.6 Peso seco e rendimento do extrato bruto hidroalcólico

Para a realização do cálculo de rendimento da extração retirou-se alíquotas de 1 mL do extrato hidroalcólico e transferiu-as para três frascos de vidro com a massa determinada, e utilizou-se corrente de ar para secar o extrato.

5.7 LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MSⁿ do extrato hidroalcólico das folhas da *Annona exsucca* DC

O extrato bruto das folhas da *Annona exsucca* DC foi analisado por HPLC-UV, para isso foi realizada uma etapa de limpeza para remover quaisquer contaminantes. A solução passou por uma extração em fase sólida (SPE) utilizando cartuchos Phenomenex Strata C18 (500 mg de fase estacionária) que foram previamente ativados com 5 mL de MeOH e equilibrados com 5 mL de MeOH: H₂O (1:1, v/v). Os compostos foram eluídos dos cartuchos

utilizando 1 mL de MeOH: H₂O (1:1, v/v) com um volume final de 5 mL. As amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm e secas posteriormente. O extrato seco foi diluído para 10 mg/mL em solvente grau HPLC. Alíquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no HPLC-PDA com detecção a 270 nm.

Utilizou-se um sistema HPLC modelo Shimadzu (Shimadzu Corp., Quioto, Japão), constituído por um módulo de injeção de solvente com uma bomba binária, e detector UV-VIS (SPA-10A). A coluna utilizada foi uma Luna 5 µm C18 100 A (150 µm x 4,6 µm). Os solventes de eluição utilizados foram A (ácido acético a 2% em água) e B (metanol). As amostras foram eluídas de acordo com o seguinte gradiente: 5% a 60% de B em 60 min. O fluxo foi de 1 mL/min, a temperatura da coluna foi de 20 °C. O volume de injeção da amostra foi de 20 µL. Os dados foram recolhidos e processados utilizando o software LC Solution (Shimadzu).

Para o ensaio com FIA-ESI-IT-MSⁿ, dissolveu-se 10 mg do extrato hidroalcolico bruto em 1 mL de MeOH:H₂O (1:1, v/v) depois de se utilizar um banho de ultrassom durante 5 minutos. As amostras foram então filtradas através de um filtro PTFE de 0,22 µm, e alíquotas de 20 µL foram injetadas diretamente no sistema FIA-ESI-IT-MSⁿ.

A infusão do fluxo direto das amostras foi realizada em um analisador do tipo *ion trap* linear Thermo Scientific LTQ XL equipado com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI), em modo positivo (Thermo, San Jose, CA, EUA). Utilizou-se um tubo capilar de aço inoxidável a 280 °C, uma voltagem do spray de 5,00 kV, tensão capilar de -90 V, lentes de tubo de -100 V e um fluxo de 5 µL/min. A análise completa da varredura foi registada na faixa de m/z de 100-1000. As fragmentações em estádios múltiplos (ESI-MSⁿ) foram realizadas utilizando o método de dissociação induzida por colisão (CID) contra hélio para ativação de 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 um experimento MS/MS realizado utilizando uma varredura de dados dependente nas moléculas [M-H] dos compostos de interesse com energia de colisão de 30% e tempo de ativação de 30 ms. Os íons produzidos foram então submetidos a uma maior fragmentação nas mesmas condições, até não serem observados mais fragmentos. A identificação dos diferentes compostos no perfil cromatográfico do extrato hidroalcolico foi feita comparando seus tempos de retenção e espectros UV com dados da literatura.

6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Prospecção fitoquímica do extrato hidroalcólico das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC

A triagem fitoquímica realizada no extrato hidroalcólico das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC, permitiu identificar a presença de diversas classes de compostos orgânicos. A tabela 6.1 abaixo, mostra as classes identificadas e as não identificadas no extrato hidroalcólico por meio da triagem fitoquímica. A intensidade destes constituintes foi visualizada através da mudança de coloração e formação de precipitado.

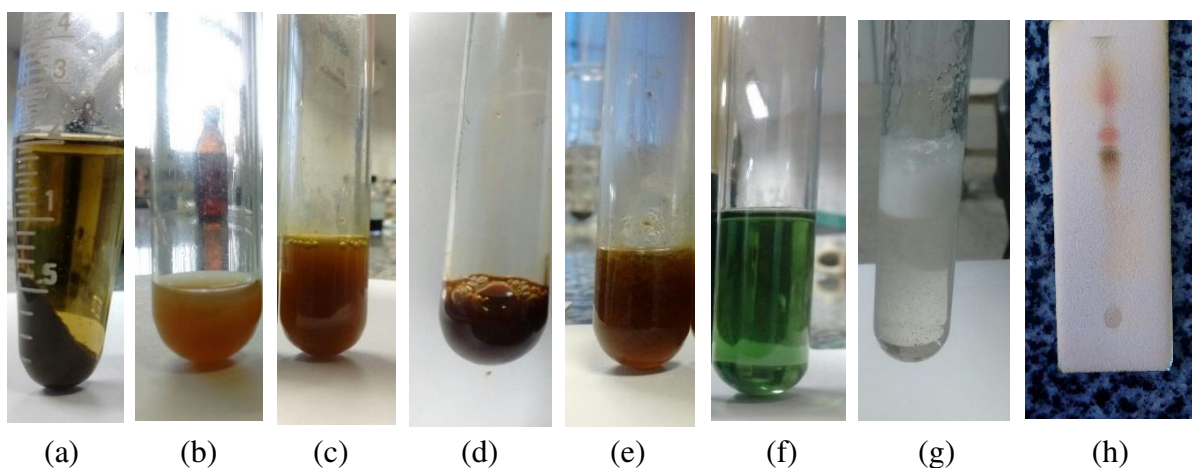
Tabela 6.1 - Resultados da prospecção fitoquímica do extrato hidroalcólico das folhas da *Annona exsucca* DC.

CONSTITUINTES	RESULTADOS	INTENSIDADE
Fenóis	Negativo	—
Taninos hidrolisáveis	Negativo	—
Taninos flobabênicos	Positivo	Alta
Antocianinas e antocianidinas	Negativo	—
Flavonas, flavonóis e xantonas	Positivo	Média
Chalconas e auronas	Negativo	—
Flavonóis	Negativo	—
Leucoantocianidinas	Negativo	—
Catequinas	Positivo	Alta
Flavanonas	Positivo	Alta
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas	Positivo	Alta
Esteroides	Positivo	Alta
Triterpenoides	Negativo	—
Saponinas	Positivo	Alta
Alcaloides	Positivo	Alta

Fonte: A autora (2017).

Os resultados obtidos com esses testes foram satisfatórios, pois permitiram identificar as classes dos constituintes presentes, no extrato hidroalcolólico das folhas da planta em estudo. Assim, como mostrado na tabela 6.1 da página 41, as classes de compostos identificadas também podem ser visualizadas na figura 6.1, visto que ela indica o resultado dos testes fitoquímicos realizados. Portanto, na figura 6.1 (a) tem-se a presença de taninos flobabênicos confirmada pela formação de precipitado e coloração verde na solução; na figura 6.1 (b) as flavonas, flavonóis e xantonas são confirmadas pela formação de coloração amarela em pH 11; na figura 6.1 (c) a confirmação de catequinas ocorre por meio da coloração pardo-amarelada na faixa de pH 1-3; na parte (d) a solução com pH 11 confirma a presença das flavanonas por meio da coloração vermelho-laranja; na figura 6.1 (e) a coloração vermelha indica a presença de flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas; na figura 6.1 (f) a presença de esteroides é indicada pelo aparecimento da cor verde; na figura 6.1 (g) a formação de espuma confirma a existência de saponinas e na figura 6.1 (h) o aparecimento da coloração vermelho-tijolo, após a placa cromatográfica ser borrifada com o reagente de Dragendorff, indica a presença de alcaloides.

Figura 6.1 - Resultados dos testes fitoquímicos, onde: (a) tem-se a presença de taninos flobabênicos, (b) a presença de flavonas, flavonóis e xantonas, (c) a presença das catequinas, (d) tem-se indicativo das flavanonas, (e) tem-se flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, (f) há presença de esteroides, (g) tem-se indicativo de saponinas e (h) há a presença dos alcaloides.



Fonte: A autora (2017).

Vale ressaltar que cada classe de metabólitos secundários possui diversas propriedades biológicas. Dentre estas classes, os taninos se destacam por acelerar o processo de cicatrização na pele. Outra classe que possui grande destaque biológico são os alcaloides, pois apresentam

algumas atividades de maior interesse, como: antitumoral, antimalárica, antidepressiva e anestésica. Na classe dos flavonóides são observadas, de maneira geral, atividades antitumoral, antimalárica, antidepressiva e anestésica além de possuírem atividades anti-inflamatória e antioxidante. As saponinas, da mesma forma que os flavonóides, têm atividade anti-inflamatória, além de possuírem ação antiviral e hemolítica. Além destas, outra classe de metabólitos presentes são os esteroides que possuem ação anti-inflamatória, bem como as saponinas e os flavonóides.

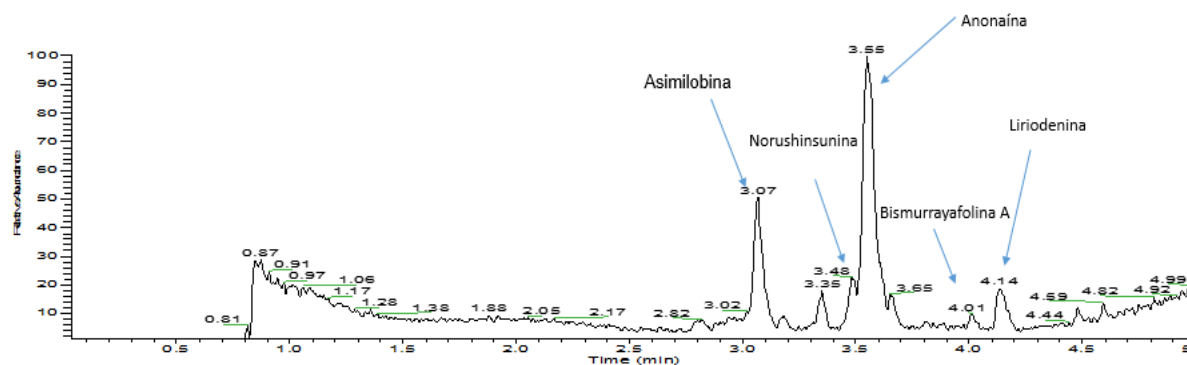
6.2 Rendimento de extrato bruto hidroalcólico

Por meio da média aritmética e da gravimetria, determinou-se o peso seco do extrato bruto, cujo valor foi de 0,1072 g/mL, com massa total de 53,5833 g e rendimento de 11%.

6.3 Análises espectrométricas do extrato hidroalcólico das folhas da *Annona exsucca* DC

No cromatograma de íons totais do extrato hidroalcólico das folhas da *Annona exsucca* DC (figura 6.2) foram identificados cinco picos cromatográficos, adquiridos através da técnica LC-ESI-IT-MS. Foi feita a identificação das possíveis estruturas correspondentess aos picos da análise dos fragmentos gerados pela espectrometria de massas.

Figura 6.2 - Cromatograma de íons totais do extrato hidroalcólico das folhas da espécie *Annona exsucca* DC adquirido por LC-ESI-IT-MS.



Fonte: A autora (2017).

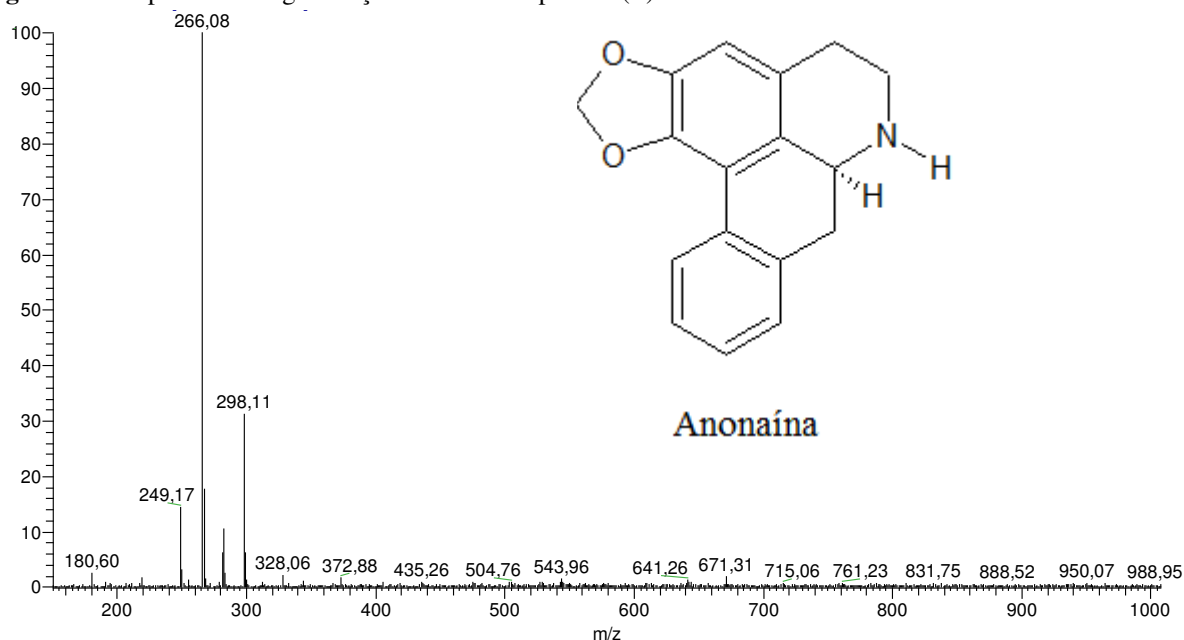
Os íons moleculares de cada espectro foram comparados com os principais íons moleculares presentes no gênero *Annona* encontrados na literatura. Abaixo estão descritos os principais fragmentos de cada espectro obtido e a estrutura equivalente a cada um deles.

I) Anonaína

Este composto orgânico pertence à classe dos alcaloides aporfínicos, apresenta como fórmula molecular $C_{17}H_{15}O_2N$ e m/z 266,08 $[M+H]^+$. E por meio da fragmentação do íon

molecular com m/z 266,08 observou-se íons fragmentados com m/z 249 $[M-NH_3]^+$, m/z 180 $[249-C_4H_5O]^+$, como pode ser visualizado na figura 6.3 [53].

Figura 6.3 - Espectro de fragmentação da anonaína por ESI(+)-MS.

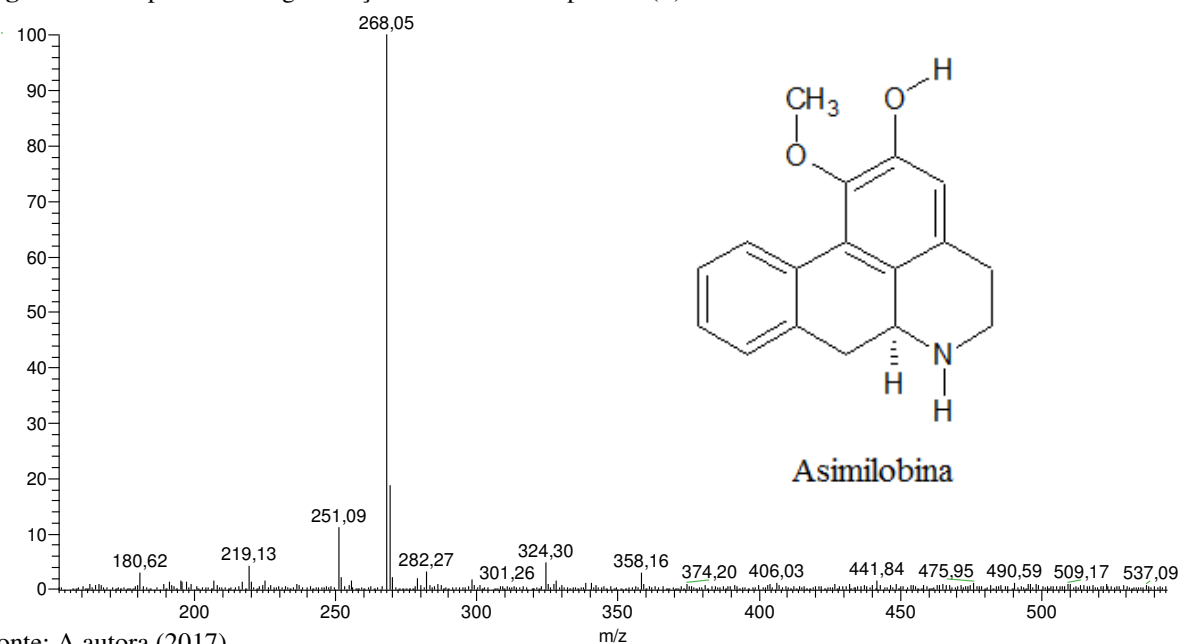


Fonte: A autora (2017).

II) Assimilobina

Assim como a anonaína, a assimilobina também é um alcaloide do tipo aporfínico, e tem como fórmula molecular $C_{17}H_{17}O_2N$ e m/z 268,05 $[M+H]^+$. A partir da fragmentação do íon da assimilobina, foi possível observar os íons fragmentos m/z 251 $[M-NH_3]^+$, m/z 219 $[251-CH_3OH]^+$ e m/z 180 $[219-C=C=O]^+$, como pode ser visualizado na figura 6.4 a seguir [53].

Figura 6.4 - Espectro de fragmentação da assimilobina por ESI(+)-MS.

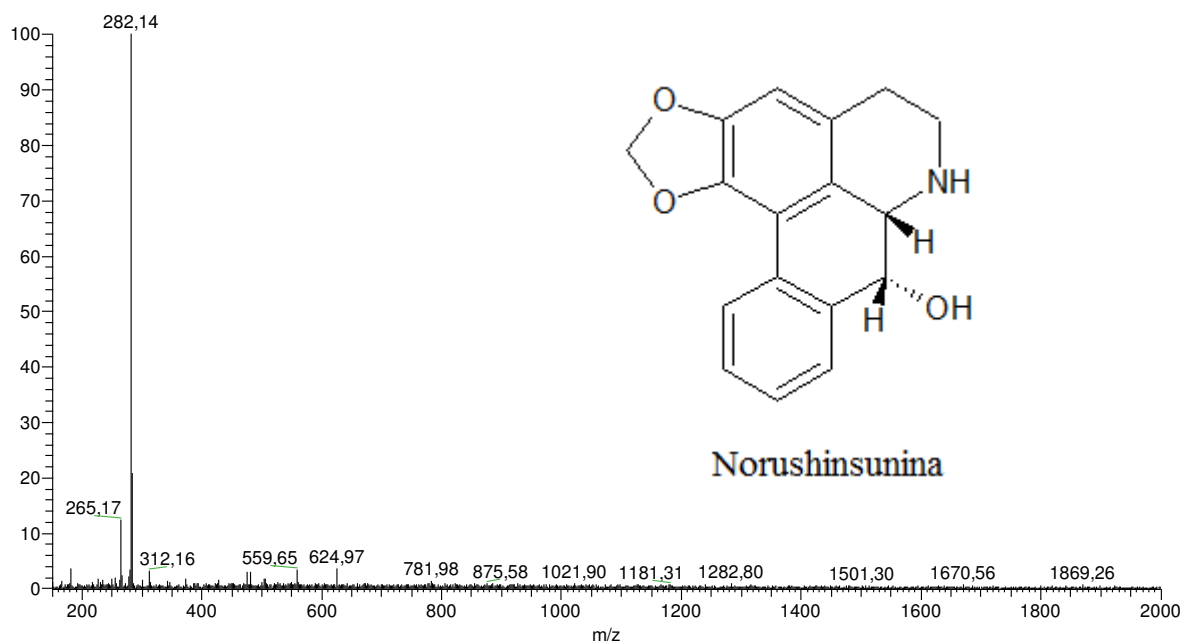


Fonte: A autora (2017).

III) Norushinsunina

Além da anonaína e da assimilobina, o composto norushinsunina também é um alcaloide aporfínico, e tem como fórmula molecular $C_{17}H_{15}O_3N$ e m/z 282,14 $[M+H]^+$. Na fragmentação do íon da norushinsunina observou-se o íon fragmentado m/z 265 $[M-NH_3]^+$, como pode ser visualizado na figura 6.5 a seguir.

Figura 6.5 - Espectro de fragmentação da norushinsunina por ESI(+)-MS.

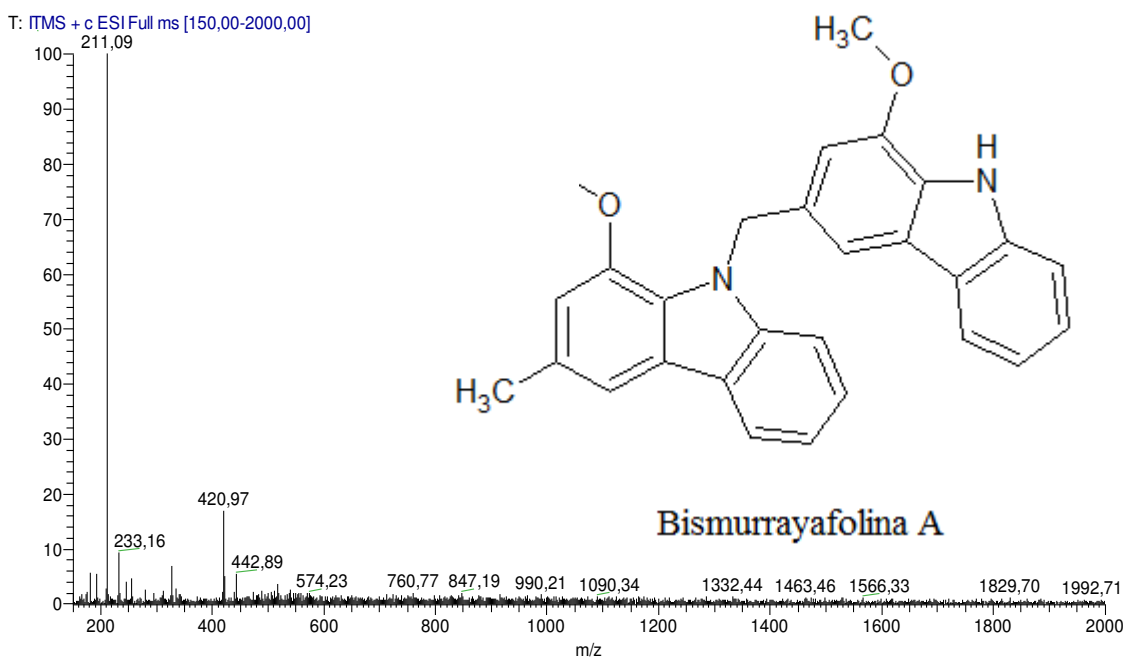


Fonte: A autora (2017).

IV) Bismurrayafolina A

Outro alcaloide que foi identificado nesse extrato hidroalcolólico foi o bismurrayafolina A, o qual é classificado como um alcaloide carbazólico. Apresenta como fórmula molecular $C_{28}H_{24}N_2O_2$ e m/z 420,97 $[M+H]^+$. Por meio da fragmentação do íon bismurrayafolina A foi possível observar o íon fragmentado m/z 211,09 $[M - C_{14}H_{12}NO]$. De acordo com a literatura, a base para a identificação desse composto é a presença de um pico estável, próximo a 100% de abundância relativa, com m/z 210-211 que equivale à metade do íon molecular, logo conclui-se que este composto é um dímero [49]. A figura 6.6 (página 46) ilustra o espectro de fragmentação deste composto, onde é possível visualizar os fragmentos citados anteriormente.

Figura 6.6 - Espectro de fragmentação da bismurrayafolina A por ESI(+)-MS.

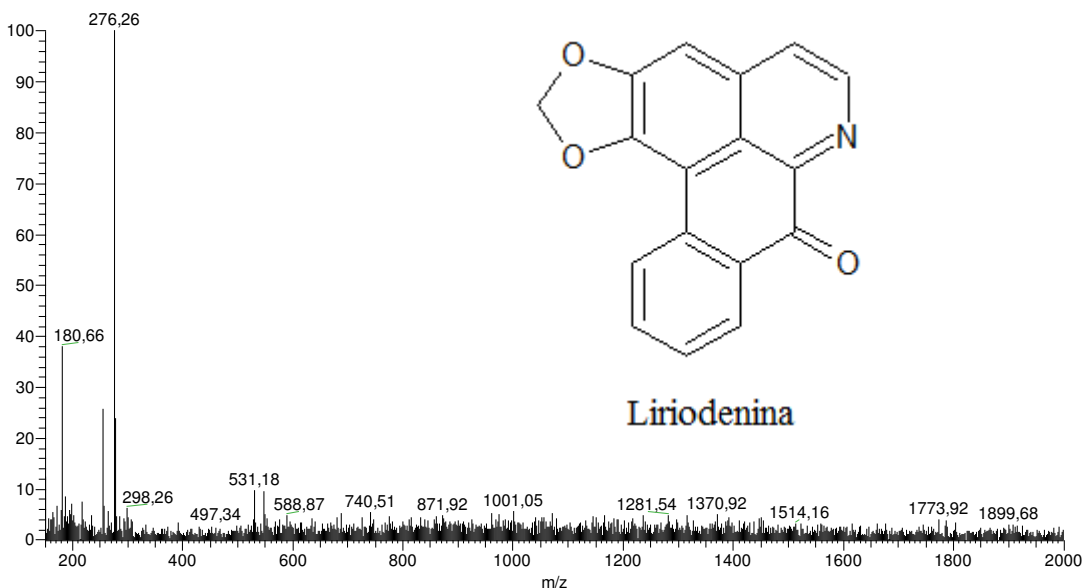


Fonte: A autora (2017).

V) Liriodenina

Além dos alcaloides aporfínico e carbazólico identificados anteriormente, houve a identificação de um alcaloide do tipo oxaporfínico, que foi a liriodenina. Este alcaloide apresenta como fórmula molecular $C_{17}H_9O_3N$ e m/z 276,26 $[M+H]^+$. Através da fragmentação do íon da liriodenina foi possível observar o íon fragmentado m/z 180 $[M-C_5H_6NO]^+$, como pode ser observado na figura 6.7 abaixo [53].

Figura 6.7 - Espectro de fragmentação da liriodenina por ESI(+)-MS.



Fonte: A autora (2017).

7. CONCLUSÃO

A triagem fitoquímica do extrato hidroalcólico das folhas da espécie vegetal *Annona exsucca* DC mostrou que esta planta possui classes de metabólitos secundários comuns ao gênero *Annona* e a família *Annonaceae*, tais como: taninos, flavonóides, esteroides, saponinas e alcaloides. A presença desses metabólitos foi confirmada por meio da mudança de coloração e formação de precipitado através da realização dos testes fitoquímicos.

Os resultados da cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massa (LC-ESI-IT-MS/MS e FIA-ESI-IT-MS) permitiram caracterizar algumas substâncias presentes no extrato hidroalcólico. Foi possível caracterizar cinco alcaloides nesse extrato, os quais foram: anonaína, liriodenina, asimilobina, norushinsunina e bismurrayafolina A. Vale ressaltar que a anonaína e a liriodenina são marcadores quimiotaxonômicos do gênero *Annona*, e como a *Annona exsucca* DC pertence a este gênero, é comum a presença desses alcaloides, portanto, é um atributo que corrobora com a classificação botânica da planta.

REFERÊNCIAS

1. OLIVEIRA, B. H. **Química de Produtos Naturais**. Disponível em: <www.gpnb.ufpr.br/qpn.html>. Acessado em: Abril de 2017.
2. Programa de Pós-Graduação em Química da UFC. **Química de Produtores Naturais**. Disponível em: <www.pgquim.ufc.br/quimica-de-produtos-naturais/>. Acessado em: Abril de 2017.
3. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. **Tipos de metabólitos**. Disponível em: <<http://www.feis.unesp.br/Home/departamentos/fisicaquimica/relacaodocentes973/jeanricharddasnoymarinho/04-tipos-de-metabolitos.doc>>. Acessado em: Abril de 2017.
4. LÓPEZ, C. A. A. **Considerações gerais sobre plantas medicinais**. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento, 1(1):19-27. 2006
5. RAVEN, P. H., EVERT, R. F., CURTIS, H. **Biologia Vegetal**. 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 906 p. 2007.
6. BELL, E. A.; CHARLWOOD, B.V. **Secondary plant products**. In Encyclopedia Plant Physiology. New York: Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, v. 8, 1980.
7. RIBEIRO, L. A. A.; TAVARES, J.F.; ANDRADE, N.C.; SILVA, M.S.; SILVA, B.A. 2007. **O Ácido (8)17,12E,14-labdatrieno-18-óico (labdano302), diterpeno tipo labdano isolado de *Xylopia langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae) relaxa a traquéia isolada de cobaia**. Rev Bras Farmacogn 17: 197-203.
8. VALTER J. L.; ALENCAR, K. M. C.; SARTORI, A. L. B.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; LAURA, V. A.; NÍDIA YOSHIDA, N.C.; CAROLLO, C. A.; SILVA, D. B.; GRASSI, R. F.; FABRI, J. R.; SIQUEIRA, J. M. 2008. **Variação química no óleo essencial das folhas de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae)**. Rev Bras Farmacogn 18: 373-378.
9. MAAS, P. J. M. ; RAINER, H. ; LOBÃO, A. Q. **Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB110572>>. Acessado em 10 de abril de 2017.
10. LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários das folhas de *Annona crasiflora* Mart. (Annonaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.
11. DINIZ, T. C.; ARAÚJO, C. S.; SILVA, J. C.; OLIVEIRA JUNIOR, R. G.; LIMASARAIVA, S. R. G.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; NUNES, X. P.; ALMEIDA, J. R. G. S. **Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice**. Journal of Medicinal Plant Research, v. 7, p. 2729-2735, 2013.

12. BARATA, L. E. S.; ALENCAR, A. A. J.; TASCONE, M.; TAMASHIRO, J. **Plantas Medicinais Brasileiras. IV. *Annona muricata* L. (Graviola).** Revista Fitos Vol.4 N°01 março 2009.
13. CHANG FR, YANG PY, LIN JY, LEE KH, WU YC 1998. **Bioactive kaurane diterpenoids from *Annona glabra*.** J Nat Prod 61: 437-439.
14. *Annona exsucca*, família das *Annonaceae*. **Colecionando Frutas.** Disponível em: <www.colecionandofrutas.org/annonaexsucca.htm>. Acessado em: Maio de 2017.
15. MAAS, P. J. M. ; WESTRA, L. Y. T. e col. **Rollinia.** Flora Neotropica Monograph, New York, v. 57, p. 1-188, 1992.
16. LAGE, G. A. **Isolamento, identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários das folhas de *Annona crasiflora* Mart. (Annonaceae).** Dissertação em Química (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 2011.
17. DINIZ, T. C.; ARAÚJO, C. S.; SILVA, J. C.; OLIVEIRA JUNIOR, R. G.; LIMASARAIVA, S. R. G.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; NUNES, X. P.; ALMEIDA, J. R. G. S. **Phytochemical screening and central nervous system effects of ethanolic extract of *Annona vepretorum* (Annonaceae) in mice.** Journal of Medicinal Plant Research, v. 7, p. 2729-2735, 2013.
18. MAAS, P. J. M. **Neotropical Annonaceae.** In: MILLIKEN, W.; KLITGARD, B.; BACARAT, A. Neotropikey: interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics. 2009. Disponível em: <www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Annonaceae.htm>. Acessado em: maio de 2017.
19. 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.
20. BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; COSTA, C.G.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F. & LIMA, H.C. de 1991. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**, v. 3, Universi//Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 326p. il.
21. LÓPEZ, C. A. A. **Considerações gerais sobre plantas medicinais. Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, 1(1):19-27. 2006.
22. RAVEN, P. H., EVERT, R. F., CURTIS, H. **Biologia Vegetal.** 7ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 906 p. 2007.
23. OLIVEIRA, R. B. **Metabolismo Vegetal.** Disponível em: <<http://www.geocities.ws/plantastoxicas/metabolismo.html>>. Acessado em: 13 de Junho de 2017.
24. GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Química Nova, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.

25. CANNAS, S. et al. **Chemical composition, cytotoxicity, antimicrobial and antifungal activity of several essential oils.** *Natural Product Research*, v. 30, n. 3, p. 332–339, 27 fev. 2016.
26. TAVARES, L. et al. **Elucidating Phytochemical Production in *Juniperus* sp.: Seasonality and Response to Stress Situations.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61, n. 17, p. 4044–4052, maio 2013.
27. COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; XAVIER, C. M.; SILVA, J. R. A.; AMARAL, A. C. F.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; FERREIRA, A. G.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L. P. J. **Pyrimidine- β -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity.** *Journal of Natural Products*, v. 69, p. 292-294, 2006.
28. LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. **Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity.** *Food Chemistry*, v. 122, n. 4, p. 1129-1138, 2010.
29. SILVA, M. S.; TAVARES, J. F.; QUEIROGA, K. F.; AGRA, M. F.; BARBOSA FILHO, J. M.; ALMEIDA, J. R. G. DA S.; DA SILVA, S.A.S. **Alcaloides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae).** *Quimica Nova*, v. 32, n. 6, p. 1566-1570, 2009.
30. GOODEIN, T. W., MERCER, E. I. The alkaloids, In: Goodwin, T. W., Mercer, E. I. (Eds), **Introduction to Plant Biochemistry**. 2. ed. Pergamon Press, Oxford, New York, p. 480-527, 1983.
31. KUTCHAN, T. **Alkaloids biosynthesis – the basis for metabolic engineering of medicinal plants.** *Plant Cell*, vol. 7, n. 7, p. 1059-1070, 1995.
32. EVANS, W. C. **Trease and Evan's Pharmacognosy**. 14. ed. London: WB Saunders, 612p, 1996.
33. LEBOEUF, M. et al. **The phytochemistry of the annonaceae.** *Phytochemistry*, v. 21, n. 12, p. 2783–2813, jan. 1980.
34. ALALI, F. Q.; LIU, X.-X.; MCLAUGHLIN, J. L. **Annonaceous Acetogenins: Recent Progress.** *Journal of Natural Products*, v. 62, n. 3, p. 504–540, mar. 1999.
35. GALLIMORE, A. R. **The biosynthesis of polyketide-derived polycyclic ethers.** *Nat. Prod. Rep.*, v. 26, n. 2, p. 266–280, 2009.
36. HENNING, U. **Book Review: The Biosynthesis of Steroids, Terpenes, and Acetogenins. By J. H. Richards and J. B. Hendrickson.** *Angewandte Chemie International Edition in English*, v. 5, n. 1, p. 148–149, jan. 1966.
37. DZUBAK, P.; HAJDUCH, M.; VYDRA, D.; HUSTOVA, A.; KVASNICA, M. D.; BIEDERMANN, D.; MARKOVA, L.; URBANC, M.; SAREK, J. **Triterpenoids.** Previous review: *Nat. Prod. Rep.*, 22, 487, 2005.
38. COLOMA, A. G.; BALBOA, C. L.; REINA, O. S. M.; FRAGA, B. M. **Triterpene-based plant defenses.** *Phytochem Ver*, v. 10, p. 245-260, 2011.

39. 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.
40. FOGAÇA, J. R. V. **Terpenos**. Disponível em: <<http://brasilecola.uol.com.br/quimica/terpenos.htm>>. Acessado em: Junho de 2017.
41. ZHANG, L.; DEMAINE, A. L. **Natural products drug discovery and therapeutic medicine**. Humana Press, v. 3, 382 p. 2005.
42. Yao, L. H.; Jiang, Y. M.; Shi, J.; Tomás- Barberán, F. A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S. S. **Flavonoids in Food and their Health Benefits**. *Plant Foods for Human Nutrition*, 59, 113-122, 2004.
43. HARBORNE, J. B. **The Flavonoids**. New York: Chapman & Hall, 1994. 676 p.
44. MANTHEY, J. A.; BUSLIG, B. S. **Flavonoids in the living system**. New York: Plenum Press, 1998. 278 p.
45. MARKHAM, K. R. **Techniques of flavonoid identification**. New York: Academic Press, 1982. 113p.
46. PEREIRA, C. A. M. **Estudo cromatográfico (HPLC, HPTLC, LCMS) e análise microscópica das folhas de espécies de Passiflora L.** 2002. 273f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2002.
47. HARBONE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2.ed. London: Chapman and Hall, 1984. 288p.
48. SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. **Foliar flavanoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance**. *Phytochemistry*, vol. 55, n. 6, p. 567-573, 2000.
49. Instituto de Química da USP. **Espectrometria de massas**. Disponível em: <www2.iq.usp.br/docente/miyamoto/DEG_7_Espectrometria_de_massas.pdf>. Acessado em: Junho de 2017.
50. Química orgânica de sistema biológicos. **Técnicas de análise em espectrometria de massas**. Disponível em: <qopn.iqsc.usp.br/files/2008/05/cursoem-2.pdf>. Acessado em: Junho de 2017.
51. MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: UFC, 2009.
52. HERZ, W. KIRBY, GW. STEGLICH, W. TAMM, C. **Progress in the Chemistry of Organic Natural Products**, vol. 52. Springer, Wien New York, p. 196.
53. BRUGINSKI, E. R. D. **Identificação de alcalóides e acetogeninas diretamente em tecidos de folhas e sementes de *Annona rugulosa* (ANNONACEAE) por DESI-MSI**. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, 2016.