

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Exatas
Departamento de Química

Gisele Avelar Lage

**Isolamento, identificação química e bioprospecção de
metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora*
Mart.**

Belo Horizonte
2011

**Isolamento, identificação química e
bioprospecção de metabólitos
secundários nas folhas de *Annona
crassiflora* Mart.**

Gisele Avelar Lage

UFMG-ICEx/DQ.864

D. 496

GISELE AVELAR LAGE

**ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E
BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS
FOLHAS *ANNONA CRASSIFLORA* Mart.**

Dissertação apresentada ao Departamento de Química do Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Química – Química Orgânica.

Belo Horizonte

2011

L174i
2011
D
Lage, Gisele Avelar,
Isolamento, identificação química e bioprospecção
de metabólitos secundários nas folhas de annona
crassiflora Mart. / Gisele Avelar Lage. 2011.
xi, 108 f. : il.

Orientador: José Dias de Souza Filho.

Co-orientadora: Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de
Minas Gerais. Departamento de Química.

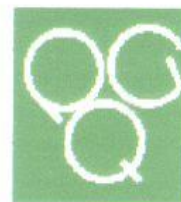
Inclui bibliografia.

1. Química orgânica - Teses 2. Produtos naturais -
Teses 3. Flavonóides - Teses 4. Alcalóides - Teses
5. Araticum - Teses I. Souza Filho, José Dias de,
Orientador II. Pimenta, Lúcia Pinheiro Santos, Co-
orientadora III. Título.

CDU 043



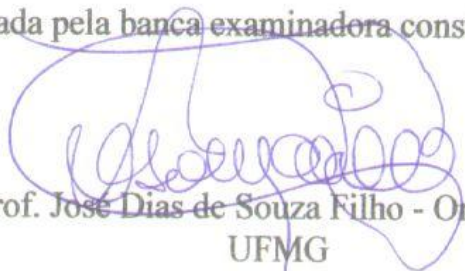
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA - ICEx
31270-901 - BELO HORIZONTE - MG
TEL.: 031 - 3499-5732
FAX: 031 - 3499-5700
E-MAIL: pgquimic@zeus.qui.ufmg.br



**"Isolamento, Identificação Química e Bioprospecção de Metabólitos
Secundários nas Folhas de *Annona crassiflora* Mart."**

Gisele Avelar Lage

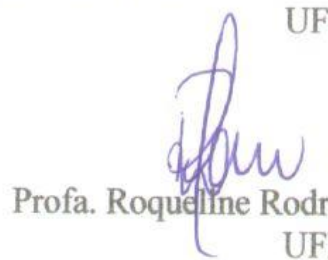
Dissertação aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:



Prof. José Dias de Souza Filho - Orientador
UFMG



Profa. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta - Co-Orientadora
UFMG



Profa. Roqueline Rodrigues Silva de Miranda
UFMG



Prof. Fernando Carazza
UFMG

Belo Horizonte, 29 de julho de 2011.

O trabalho descrito nesta dissertação foi realizado sob orientação do Professor Doutor José Dias de Souza Filho e co-orientação da Professora Doutora Lúcia Pinheiro Santos Pimenta.

O trabalho descrito nesta dissertação foi desenvolvido sob a colaboração das professoras Doutoras Jaqueline Aparecida Takahashi (UFMG) e Vanessa Carla Furtado Mosqueira (UFOP).

Dedico este trabalho ao meu pai Juscelino Rodrigues Lage, minha mãe Elzimar de Lourdes Avelar Lage, meus irmãos Patrik e Gabriel Avelar Lage e aos meus exemplares orientadores Lúcia Pinheiro Santos Pimenta e José Dias de Souza Filho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Nossa Senhora, por guiar cada passo meu, por acalmar meu coração e iluminar minha mente e pelas pessoas que conheci nesta caminhada, que me ajudaram muito.

Aos meus pais, que muito me ensinam, me apóiam, me dão força, mas sobretudo por serem pais e por sermos uma família. Obrigada por tudo! Amo vocês!

Aos meus irmãos, Patrik e Gabriel, pelas conversas, pela presença, pelo incentivo. Obrigada por serem meus amigos!!

Ao meu namorado, meu amor e amigo, Felipe Mansur, por me acalmar, pelo carinho, por todo este tempo juntos, pelo amor, por dar mais alegria e paixão a minha vida.

À família Mota Lage, Tia Alcione, pela acolhida, por sempre estar de braços abertos pra mim, a minha amiga e prima Carla, pela amizade, conselhos, paciência, a Cássia e Vitor, pelas gargalhadas juntos, pelo carinho. Por mais que escreva aqui, não conseguirei expressar o que esta família significa para mim. Agradeço muito a todos vocês, de coração!

Aos meus orientadores, Dr. José Dias de Souza Filho e Dr^a. Lúcia Pinheiro Santos Pimenta, pela valiosa orientação, pela paciência, pelos grandiosos ensinamentos.

As minhas colaboradoras Professoras, Doutoradas, Jaqueline Aparecida Takahashi e Vanessa Carla Furtado Mosqueira, pelo apoio e experimentos realizados.

Aos professores: Jarbas Magalhães Resende, Ângelo de Fátima, Adão Sabino, Lucienir Pains Duarte, Fernando Carazza, Cláudio Luís Donnici, Rosemeire Brondi Alves e Rossimíriam Pereira de Freitas pelos ensinamentos que muito contribuíram à minha formação e pelos conselhos.

À Dr^a. Ivana Silva Lula do Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução, pela eficiência na execução e processamento de alguns espectros de RMN.

Aos meus professores de Graduação, Ensino Médio, Ensino Fundamental pela contribuição em minha formação. A vocês o meu respeito e admiração!

Agradecimentos

Aos amigos do laboratório: Werônica, Felipe, Daniel, Sabrina, Juliana, Denise, Luna, Bruno, Diego, Nayara, Ludmila, Rodrigo e Alan pelo apoio e amizade. Ao Bruno, Felipe, Werônica e Sabrina principalmente, por me ajudarem na realização dos experimentos.

A todos do laboratório da Professora Dr^a Jaqueline Aparecida Takahashi, principalmente à Adriana, Yuri e Karine pelas ajudas.

A todos do laboratório das Professoras Dr^{as} Rosemeire Brondi Alves e Rossimíriam Pereira de Freitas.

A todos do laboratório das Professoras Doutoras Lucienir Pains Duarte e Grácia Divina de Fátima Silva, principalmente, Fernando, Vanessa e Grazi pela ótima convivência, por me tirarem dúvidas, pelos conselhos, pela amizade.

A minha amiga Vanessa (Vanesga), pelo apoio e incentivo, pela paciência, por me ouvir, pelas nossas conversas, pelos estudos juntas. Muito obrigada de coração por tudo e principalmente por ser amiga!!

A todos do Grupo de Oração Universitário – Ministério Universidades Renovadas: Neila, Arnie, Paulo, Jean, Jeferson, Mateus, Nayara, Fabrícia, Everton, Eder, Juçara e todos os outros pelos momentos de oração, pelo apoio, pelas reuniões do núcleo, pelas risadas, muito obrigada pela amizade de vocês, agradeço sempre a Deus por ter colocado vocês na minha vida, no meu caminho.

Aos amigos e amigas do grupo de oração Pontos CMV, pelo apoio espiritual e por me fazer refletir sobre a vida.

A Paulete, Kátia, Lílian e Rafaela, funcionárias da secretaria da pós-graduação, pela disponibilidade de me receber, ouvir e esclarecer minhas dúvidas.

Aos funcionários e funcionária, Sr. Romário, Sr. Onésimo, Sr. Jair, Sr. Geraldo, Anderson, Rogério, Edinho, Wladimir e Fany, pela boa vontade e atenção comigo.

As meninas do xerox do Departamento de Química Rose, Laura e Rebeca, pela paciência, por sempre me atenderem muito bem e pelo carinho. Muito obrigada!!

Ao Departamento de Química e a Universidade Federal de Minas Gerais, pela oportunidade de realização deste trabalho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de mestrado.

Agradecimentos

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais, pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

SUMÁRIO

ÍNDICE DE FIGURAS.....	i
ÍNDICE DE TABELAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT.....	xi

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

Introdução.....	01
-----------------	----

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Cerrado.....	04
1.2 Família Annonaceae.....	06
1.3 <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	07
1.3.1 Taxonomia.....	09
1.4 Metabólitos secundários da família Annonaceae.....	09
1.5 Metabólitos secundários do gênero <i>Annona</i>	11
1.5.1 Terpenos.....	11
1.5.2 Acetogeninas de anonáceas.....	12
1.5.3 Alcaloides.....	13
1.5.4 Flavonoides.....	14
1.6 Atividades biológicas associadas ao gênero <i>Annona</i>	17
1.6.1 Atividade citotóxica.....	17
1.6.2 Atividade antioxidante.....	18
1.6.3 Atividade antimicrobiana.....	19

OBJETIVOS

Objetivos do trabalho.....	20
----------------------------	----

CAPÍTULO 2: PARTE EXPERIMENTAL

2.1 Materiais, métodos e instrumentação.....	21
2.1.1 Métodos cromatográficos.....	21

2.1.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD).....	21
2.1.1.1.1 Reagentes para revelações cromatográficas.....	21
2.1.1.2 Cromatografia em coluna (CC).....	24
2.1.1.2.1 Cromatografia de adsorção em coluna de poliamida (CCP).....	24
2.1.1.2.2 Exclusão em gel.....	24
2.1.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).....	25
2.1.1.4 Cromatografia em camada delgada preparativa.....	25
2.2 Transformações químicas.....	25
2.2.1 Micro-hidrólise em cromatografia em camada delgada de sílica.....	25
2.2.2 Reação de acetilação.....	26
2.3 Métodos físico-químicos.....	26
2.3.1 Faixa de fusão.....	26
2.3.2 Solventes.....	27
2.3.3 Infravermelho (IV).....	27
2.3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN).....	27
2.3.5 Espectrometria de massas com ionização por eletrospray (EM-ESI)	27
2.3.6 Polarímetro.....	28
2.4 Coleta e identificação botânica do material vegetal.....	28
2.5 Processamento do material vegetal.....	28
2.5.1 Obtenção dos extratos.....	28
2.6 Prospeção química realizada com o extrato etanólico bruto por CCDS...	28
2.7 Partição com solventes realizada com o extrato etanólico bruto obtido das folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	29
2.8 Isolamento dos constituintes químicos de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	31
2.8.1 Fracionamento cromatográfico da fração hidroalcólica (ACF02F).....	31
2.8.1.1 P03 sol1 obtida da ACF02F.....	33
2.8.1.2 P03 sol2 obtida da ACF02F.....	35
2.8.1.3 P03 sob2 obtida da ACF02F.....	36
2.8.1.4 P04 sol1 obtida da ACF02F.....	36
2.8.1.5 P04 sob obtida da ACF02F.....	38
2.8.1.6 P07 sol2 obtida da ACF02F.....	40
2.8.1.7 P07 sol1 obtida da ACF02F.....	40
2.8.1.8 P07 sob2 obtida da ACF02F.....	40
2.8.1.9 P05 sol1 obtida da ACF02F.....	41
2.8.1.10 P05 sob obtida da ACF02F.....	41

2.8.1.11 P06 obtida da ACF02F.....	41
2.8.1.12 P08 sol1 obtida da ACF02F.....	41
2.8.1.13 P08 sob obtida da ACF02F.....	42
2.8.1.14 P09 sol1 obtida da ACF02F.....	42
2.8.1.15 P09 sob obtida da ACF02F.....	42
2.8.1.16 P01 obtida da ACF02F.....	42
2.8.1.17 P02 obtida da ACF02F.....	42
2.8.2 ACF02F-PREC.....	43
2.9 Fluxograma e tabela geral do fracionamento.....	45

CAPÍTULO 3: RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo da fração polar obtida das folhas de <i>A. crassiflora</i> (ACF02F).....	47
3.2 Análise estrutural dos constituintes químicos isolados das folhas de <i>A. crassiflora</i> Mart.....	48
3.2.1 ACF-1.....	48
3.2.2 ACF-2	57
3.2.3 ACF-3	64
3.2.4 ACF-4	71

CAPÍTULO 4: ESTUDO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.1 Introdução Geral.....	81
4.1.1 Atividade antioxidante.....	81
4.1.1.1 Introdução.....	81
4.1.1.2 Atividade antioxidante pelo método do β -caroteno em CCDS.....	83
A – Metodologia.....	83
A.1 – Análise dos resultados.....	84
4.1.1.3 Atividade antioxidante pelo método do DPPH em CCDS.....	85
A – Metodologia.....	85
A.1 – Análise dos resultados.....	86
4.1.2 Atividade larvicida sobre <i>Artemia salina</i>	87
4.1.2.1 Introdução.....	87
A – Metodologia, segundo PIMENTA <i>et al.</i> , 2003.....	88
A.1 – Análise dos Resultados.....	89

4.1.3 Atividade antimicrobiana.....	91
4.1.3.1 Introdução.....	91
4.1.3.2 Testes antimicrobianos realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios.....	92
A – Metodologia.....	93
A.1 – Análise dos Resultados.....	93
 CONCLUSÃO.....	 95
 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 97

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 – Alguns produtos naturais provenientes de plantas aprovados como fármacos.....	02
Figura 1.2 – Cerrado brasileiro (Fonte: http://www.espacodocerrado.com/foto02.asp), acessado em 26/03/2011.....	06
Figura 1.3 – Árvore (A), folhas e fruto (B), fruto e polpa (C) e flor (D) de <i>Annona crassiflora</i> (Fonte: http://www.espacodocerrado.com/foto04.asp), acessado em 26/03/2011.....	08
Figura 1.4 – Alguns metabólitos secundários da família Annonaceae: liriodenina (1), alcaloide β -carbolínico (2), apigenina (3), kaempferol (4), quercetina (5), luteolina (6), β -sitosterol (7), estigmasterol (8) e uvaricina (9).....	10
Figura 1.5 – Terpenos isolados do gênero <i>Annona</i> : cânfora (1), borneol (2), β -cariofileno (3), friedelina (4) e β -sitosterol (5).....	11
Figura 1.6 – Acetogeninas do gênero <i>Annona</i>	12
Figura 1.6 – Acetogeninas do gênero <i>Annona</i> – Continuação.....	13
Figura 1.7 – Estrutura química da anonaína.....	14
Figura 1.8 – Alcaloides proaporfínicos de <i>Annona</i>	14
Figura 1.9 – Estrutura química geral de um flavonoide.....	15
Figura 1.10 – Flavonoides detectados em <i>Annona crassiflora</i>	16
Figura 1.11 – Estrutura química do flavonoide kaempferol.....	16
Figura 1.12 – Acetogeninas: annoglaxina (1) e 27-hidroxibullatacina (2).....	17
Figura 1.13 – Estrutura química da anolobina e nornantenina.....	19
Figura 1.14 Estrutura química da lanuginosina.....	19
Figura 2.1 – Esquema geral da partição realizada com o extrato etanólico bruto das folhas de <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	30

Figura 2.2 – Esquema geral do estudo fitoquímico de ACF02F.....	45
Figura 3.1 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; Espectros no UV para os constituintes referentes aos picos b)1, c)2, d)3 e e)4. (Condições de análise: capítulo 2, pág.25).....	47
Figura 3.2 – Reação de derivatização de um flavonoide (1) com o difenilboriloxietilamina (2) (KARTING e GOBEL, 1996).....	48
Figura 3.3 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; b) Espectro no UV – de ACF-1. (Condições de análise: capítulo 2, pág. 25).....	49
Figura 3.4 – Espectro no Infravermelho de ACF-1.....	49
Figura 3.5 – Estrutura química da genina de ACF-1.....	50
Figura 3.6 – Espectro de RMN de ^1H de ACF-1 (400 MHz, DMSO- d_6).....	50
Figura 3.7 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de ACF-1 (100 MHz, DMSO- d_6).....	53
Figura 3.8 – Expansões do mapa de contornos COSY de ACF-1 (400 MHz, DMSO- d_6).....	54
Figura 3.9 – Expansões do mapa de contornos HSQC de ACF-1 (400 MHz, DMSO- d_6).....	54
Figura 3.10 - Expansões do mapa de contornos HMQC de ACF-1 (400 MHz, DMSO- d_6).....	55
Figura 3.11 – Estrutura química de ACF-1.....	56
Figura 3.12 – Espectro de massas [(-)-ESI/EM] de ACF-1.....	56
Figura 3.13 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; b) Espectro no UV – de ACF-2. (Condições de análise: capítulo 2, pág. 25).....	57
Figura 3.14 – Espectro no Infravermelho de ACF-2.....	58
Figura 3.15 – Estrutura química de ACF-2.....	59
Figura 3.16 - Espectro de RMN de ^1H de ACF-2 (400 MHz, DMSO- d_6).....	59

Figura 3.17 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de ACF-2 (100 MHz, DMSO- d_6).....	60
Figura 3.18 - Expansões do mapa de contornos COSY de ACF-2 (400 MHz, DMSO- d_6).....	62
Figura 3.19 – Expansões do mapa de contornos HSQC de ACF-2 (400 MHz, DMSO- d_6).....	62
Figura 3.20 – Expansões do mapa de contornos HMQC de ACF-2 (400 MHz, DMSO- d_6).....	63
Figura 3.21 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; b) Espectro no UV – de ACF-3. (Condições de análise: capítulo 2, pág. 25).....	64
Figura 3.22 – Estrutura química de ACF-3.....	65
Figura 3.23 - Espectro de RMN de ^1H de ACF-3 (400 MHz, DMSO- d_6).....	65
Figura 3.24 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de ACF-3 (100 MHz, DMSO- d_6).....	66
Figura 3.25 – Mapa de contornos COSY de ACF-3 (400 MHz, DMSO- d_6).....	68
Figura 3.26 – Expansões do mapa de contornos HSQC de ACF-3 (400 MHz, DMSO- d_6).....	69
Figura 3.27 – Expansões do mapa de contornos HMQC de ACF-3 (400 MHz, DMSO- d_6).....	69
Figura 3.28 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; b) Espectro no UV – de ACF-4. (Condições de análise: capítulo 2, pág. 25).....	71
Figura 3.29 – Espectro no Infravermelho de ACF-4.....	72
Figura 3.30 – Estrutura química da genina de ACF-4.....	73
Figura 3.31 - Espectro de RMN de ^1H de ACF-4 (400 MHz, MeOH- d_4).....	73
Figura 3.32 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de ACF-3 (100 MHz, MeOH- d_4).....	76
Figura 3.33 – Mapa de contornos COSY de ACF- 4(400 MHz, MeOH- d_4).....	77

Figura 3.34 — Expansões do mapa de contornos HSQC de ACF-4 (400 MHz, MeOH- d_4).....	77
Figura 3.35 — Expansões do mapa de contornos HMQC de ACF-4 (400 MHz, MeOH- d_4).....	78
Figura 3.36 – Estrutura química de ACF-4.....	79
Figura 3.37 – Espectro de massas (EM-ESI) de ACF-4.....	79
Figura 4.1 – Estrutura do β -caroteno.....	83
Figura 4.2 – Teste de descoramento do β -caroteno em placa de sílica. (Da esquerda para a direita: vitamina C, quercetina, α -tocoferol, ACF-1, ACF-3, ACF-3, ACF02F, ACF01F, ACF02F-PREC, ACF-2, ACF-3, ACF-4.....	84
Figura 4.3 – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).....	85
Figura 4.4 – Teste de descoramento do DPPH em placa de sílica. (Da esquerda para a direita: vitamina C, rutina, ACF-1, ACF-4, ACF02F, ACF02F-PREC, ACF-2, ACF-3, ACF01F.....	86
Figura 4.5 – Captura/seqüestro de radicais por compostos fenólicos.....	87
Figura 4.6 – <i>Artemia salina</i> no estágio nauplii (A) e no estágio metanauplii (B) (Fonte: http://wszystkogra.pl/artemia-salina&page=5).....	89

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 2.1 – Prospeção fitoquímica realizada com o extrato etanólico bruto das folhas de <i>A. crassiflora</i> por CCDS.....	29
Tabela 2.2 – Prospeção fitoquímica por CCDS realizada nas frações ACF02F, ACF02F-PREC e ACF03F advindas do extrato etanólico bruto de <i>A. crassiflora</i>	30
Tabela 2.3 – Fracionamento cromatográfico de ACF02F obtida do extrato etanólico das folhas de <i>A. crassiflora</i> Mart.....	31
Tabela 2.4 – Frações provenientes da fração hidroalcólica (ACF02F) em poliamida	32
Tabela 2.4 – Frações provenientes da fração hidroalcólica (ACF02F) em poliamida – Continuação.....	33
Tabela 2.5 – Reunião das frações advindas do fracionamento cromatográfico da fração P03 sol1 (100,0 mg) de ACF02F.....	34
Tabela 2.6 – Reunião das frações advindas do fracionamento cromatográfico da fração P04 sol (80,0 mg) de ACF02F.....	36
Tabela 2.7– Reunião das frações advindas do fracionamento cromatográfico da fração P04 sob (800,0 mg) de ACF02F.....	38
Tabela 2.8 – Fracionamento cromatográfico de ACF02F-PREC obtida do extrato hidroalcólico (ACF02F).....	43
Tabela 2.9 – Reunião das frações advindas do fracionamento cromatográfico da fração ACF02F-PREC (800,0 mg).....	44
Tabela 2.10 – Siglas e massas das substâncias isoladas.....	46
Tabela 3.1 – Sinais dos hidrogênios da genina de ACF-1 e suas correlações	51
Tabela 3.2 – Sinais dos hidrogênios dos açúcares de ACF-1 e suas correlações.....	52
Tabela 3.3 – Sinais dos hidrogênios de ACF-2 e suas correlações.....	61
Tabela 3.4 – Sinais dos hidrogênios de ACF-3 e suas correlações.....	67

Tabela 3.5 – Sinais dos hidrogênios da genina de ACF-4 e suas correlações	74
Tabela 3.6 – Sinais dos hidrogênios do açúcar de ACF-4 e suas correlações	75
Tabela 4.1 – Amostras e suas concentrações utilizadas no teste larvicida sobre <i>Artemia salina</i>	90
Tabela 4.2 – Resultados do teste larvicida frente à <i>Artemia salina</i> do extrato, frações e substâncias isoladas das folhas de <i>A. crassiflora</i>	90
Tabela 4.3 – Porcentagens médias de inibição para cada microorganismo após 24h.....	93
Tabela 4.3 – Porcentagens médias de inibição para cada microorganismo após 24h – Continuação.....	94

RESUMO

Esta dissertação apresenta o estudo fitoquímico e avaliação biológica do extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora* Mart. *Annona crassiflora* é uma árvore nativa do Cerrado, conhecida popularmente como araticum, pertencente à família Annonaceae.

O estudo fitoquímico da parte hidroalcóolica do extrato etanólico das folhas levou ao isolamento e identificação de dois O-glicosídeos: a quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-O- α -L-arabinosídeo, conhecida como peltatosídeo, e quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo; um alcalóide aporfínico: norestefalagina e um flavan-3-ol: (-)-epicatequina. As estruturas destes compostos foram estabelecidas por RMN de ^1H (400 MHz), RMN ^{13}C (100 MHz), DEPT, HSQC, HMBC, COSY, ESI-EM, espectroscopia de UV / VIS e comparação de dados da literatura.

Embora flavonoides tenham sido descritos no gênero *Annona* esta é a primeira vez que os flavonoides descritos acima foram isolados e identificados de forma inequívoca em *Annona crassiflora*, no gênero *Annona* e na família Annonaceae. Apesar de o alcalóide aporfínico norestefalagina ter sido isolado no gênero *Xylopi*a, nunca foi descrito em *A. crassiflora* e no gênero *Annona*. A (-)-epicatequina, também foi isolada e caracterizada pela primeira vez em *A. crassiflora*.

O extrato etanólico das folhas, algumas de suas frações e seus compostos isolados foram avaliados frente às atividades antioxidante, antimicrobiano e larvicida. O extrato etanólico das folhas, uma de suas frações e seu precipitado apresentaram atividade antimicrobiana contra *Stafilococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, bem como *Candida albicans*. Os flavonóides, o alcalóide e o flavan-3-ol isolados, apresentaram atividade antioxidante no sistema de branqueamento do β -caroteno e ensaio do DPPH, ambos realizados em CCDS. No teste de toxicidade frente à *Artemia salina* o alcaloide, norestefalagina, apresentou boa atividade ($\text{DL}_{50} = 2,91 \mu\text{g} / \text{mL}$).

RESUMO

Esta dissertação apresenta o estudo fitoquímico e avaliação biológica do extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora* Mart. *Annona crassiflora* é uma árvore nativa do Cerrado, conhecida popularmente como araticum, pertencente à família Annonaceae.

O estudo fitoquímico da parte hidroalcóolica do extrato etanólico das folhas levou ao isolamento e identificação de dois O-glicosídeos: a quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-O- α -L-arabinosídeo, conhecida como peltatosídeo, e quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo; um alcalóide aporfínico: norestefalagina e um flavan-3-ol: (-)-epicatequina. As estruturas destes compostos foram estabelecidas por RMN de ^1H (400 MHz), RMN ^{13}C (100 MHz), DEPT, HSQC, HMBC, COSY, ESI-EM, espectroscopia de UV / VIS e comparação de dados da literatura.

Embora flavonoides tenham sido descritos no gênero *Annona* esta é a primeira vez que os flavonoides descritos acima foram isolados e identificados de forma inequívoca em *Annona crassiflora*, no gênero *Annona* e na família Annonaceae. Apesar de o alcalóide aporfínico norestefalagina ter sido isolado no gênero *Xylopia*, nunca foi descrito em *A. crassiflora* e no gênero *Annona*. A (-)-epicatequina, também foi isolada e caracterizada pela primeira vez em *A. crassiflora*.

O extrato etanólico das folhas, algumas de suas frações e seus compostos isolados foram avaliados frente às atividades antioxidante, antimicrobiano e larvicida. O extrato etanólico das folhas, uma de suas frações e seu precipitado apresentaram atividade antimicrobiana contra *Stafilococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli*, bem como *Candida albicans*. Os flavonóides, o alcalóide e o flavan-3-ol isolados, apresentaram atividade antioxidante no sistema de branqueamento do β -caroteno e ensaio do DPPH, ambos realizados em CCDS. No teste de toxicidade frente à *Artemia salina* o alcaloide, norestefalagina, apresentou boa atividade ($\text{DL}_{50} = 2,91 \mu\text{g} / \text{mL}$).

ABSTRACT

This dissertation presents the phytochemical study and the biological evaluation of the leaf ethanolic extract of *Annona crassiflora* Mart. *Annona crassiflora* is a native tree of the Cerrado area, popularly known as araticum, belonging to the Annonaceae family.

The phytochemical study of the hydroalcoholic portion of the leaf ethanolic extract led to the isolation and identification of two *O*-glycosides: quercetin-3-*O*- β -D-glycopyranosil(1 $\rightarrow$ 6)-*O*- α -L-arabinoside, known as peltatoside, and quercetin-3-*O*- α -L-arabinopiranoside; an aporphine alkaloid: norstephalagine; and a flavan-3-ol: (-)-epicatechin. Structures of the known compounds were established by ^1H NMR (400 MHz), ^{13}C NMR (100 MHz), DEPT, HSQC, HMBC, COSY, ESI-MS, UV/VIS spectroscopy and literature data comparison.

Although flavonoids have been described in *Annona* genus this is the first time that they have been isolated and unambiguously identified in *Annona crassiflora*, in *Annona* genus and in Annonaceae family. In spite of the aporphine alkaloid norstephalagine being isolated in *Xylopia* genus, never have been described in *A. crassiflora* and in *Annona* genus. The (-)-epicatechin was also isolated and characterized for the first time in *A. crassiflora*.

The leaves ethanolic extract, some of its fractions and its isolated compounds were evaluated front of antioxidant activities, larvicidal and antimicrobial. The leaf ethanolic extract, one of its fractions and their precipitate showed antimicrobial activity against *Stafilococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*, as well as *Candida albicans*. The flavonoids, the alkaloid and the flavan-3-ol isolated showed antioxidant activity in the TLC β -carotene bleaching and DPPH TLC assay. In the Brine Shrimp test only the alkaloid norstephalagine presented good activity (EC_{50} = 2.91 $\mu\text{g/mL}$).

INTRODUÇÃO

O uso dos produtos naturais iniciou-se há milhares de anos por várias populações com o intuito de tratar diversas patologias. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna, os produtos naturais continuam sendo utilizados e, estima-se que, cerca de 30% de todas as drogas avaliadas como agentes terapêuticos são derivados de metabólitos secundários (CALIXTO, 2005; VEIGA-JUNIOR e MELLO, 2008). O interesse por produtos naturais ficou maior principalmente devido as populações acreditarem que estes são isentos ou possuem poucos efeitos colaterais, e que são aparentemente eficazes nos casos onde a medicina tradicional não alcançou resultados esperados, o que nem sempre é confirmado pelas pesquisas científicas que avaliam a eficácia e a segurança, assim também como a garantia de qualidade na produção (CALIXTO, 2000; CARVALHO *et al.*, 2008).

Produtos naturais têm uma longa e bem sucedida história nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos. Plantas, insetos, microrganismos e organismos marinhos exibem complexa interação com o meio ambiente e produzem metabólitos utilizados para sua sobrevivência. Como consequência do papel biológico para os organismos produtores, esses metabólitos podem exibir amplo espectro de aplicação biológica (PUPO *et al.*, 2006).

Entre todas as novas espécies químicas aprovadas como fármacos (1184) entre 1981-2006, 5% correspondem a produtos naturais, 47% correspondem a derivados semi-sintéticos de produtos naturais, derivados de produtos naturais e produtos sintetizados com grupos farmacofóricos baseados em produtos naturais, 18% são produtos biológicos e vacinas e 30% são produtos totalmente sintéticos, planejados a partir de conhecimentos adquiridos sobre produtos naturais (NEWMAN e CRAGG, 2007).

GANESAN (2008) reavaliou os dados de NEWMAN e CRAGG (2007), através de aplicação de filtros para analisar as contribuições realmente originais de produtos naturais na terapêutica. Foram excluídos: os fármacos inspirados em produtos naturais descobertos antes de 1970, os derivados semi-sintéticos quando o produto natural só é usado como matéria prima e não contribuiu para a descoberta da atividade biológica (como por exemplo, os hormônios esteroidais), os fármacos

resultantes de produtos naturais (baseados em ligantes endógenos), e, somente um fármaco foi considerado no caso de existirem dois ou mais produtos naturais de estruturas parecidas. Este estudo resultou num conjunto de 24 fármacos inovadores derivados de produtos naturais após 1970, com aprovação no período de 1981-2006. Destes, 19 foram isolados de microrganismos (13 de actinobactérias, 2 de bactérias e 4 de fungos) e 5 de plantas. Os fármacos derivados de metabólitos secundários de plantas foram taxol (antitumoral), arglabina (antitumoral), artemisinina (antimalárico), forskolina (bronco- e vasodilatador) e plaunotol (antiúlceras) (Figura 1.1) (GANESAN, 2008).

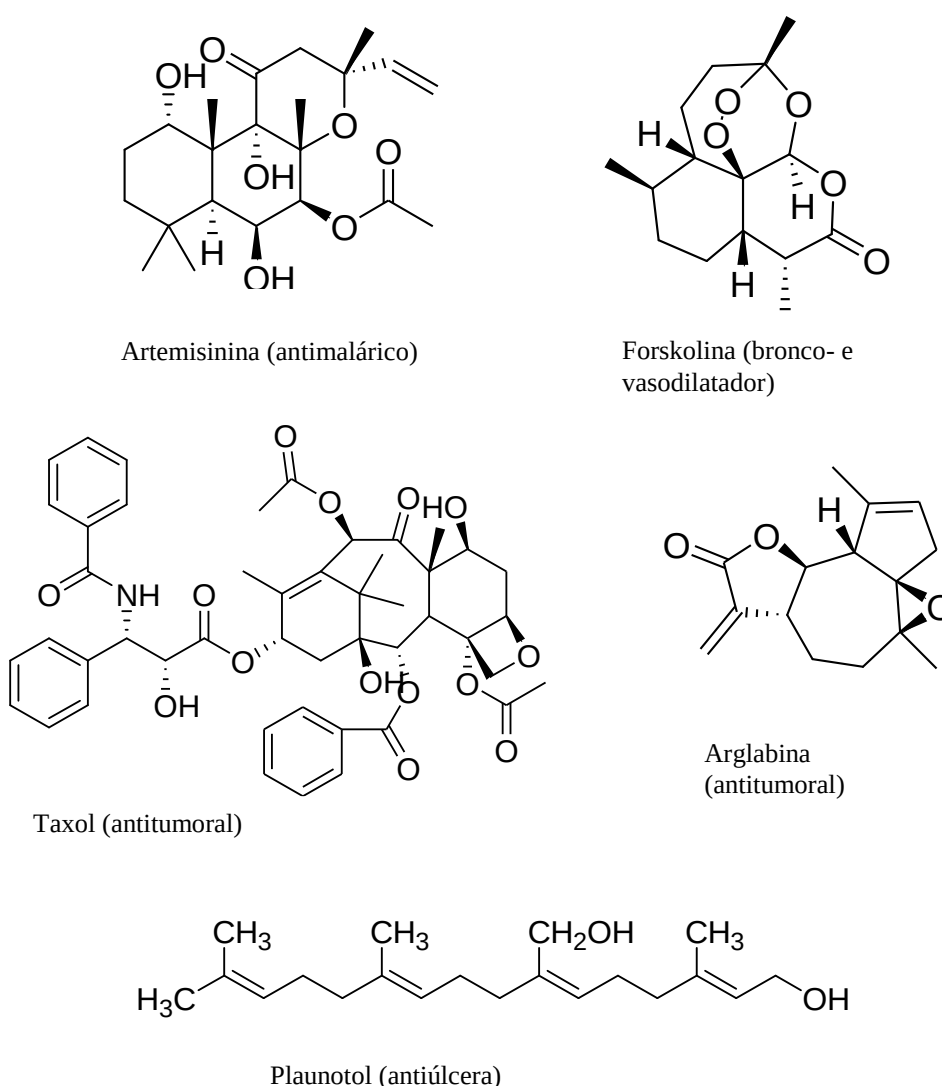


Figura 1.1 - Alguns produtos naturais provenientes de plantas aprovados como fármacos.

Diversos fatores têm impulsionado a busca de novas drogas de origem vegetal, tais como, a descoberta de drogas eficazes para o combate ao câncer, falta de acesso da maioria da população aos medicamentos modernos, estudos sobre a biodiversidade e a preservação das espécies (CARVALHO In: MERCADANTE *et al.*, 2001).

A pesquisa e produção de novos fármacos a partir de plantas envolvem diversos campos do conhecimento e vários métodos de análise. Eles geralmente têm início com um botânico, um etnobotânico ou um ecólogo que coleta e identifica a planta. Essa coleta geralmente é realizada para plantas que podem ter algum composto ativo, pois estão relacionadas taxonomicamente às espécies com compostos ativos já conhecidos ou que são utilizadas na medicina popular de uma região. Os fitoquímicos preparam os extratos dessa planta e submetem esse material à triagem biológica em ensaios farmacológicos. A presença de efeito farmacológico direciona o processo de isolamento do princípio ativo através do biomonitoramento pelos testes de atividade. Para a descoberta do mecanismo de ação desses compostos a biologia molecular disponibiliza ferramentas que permitem determinar os sítios celulares e ou fisiológicos envolvidos nesse processo. Isso demonstra que esse trabalho é necessariamente multidisciplinar e abrange alguns campos (BALUNAS e KINGHORN, 2005), como por exemplo, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL *et al.*, 2002).

Nosso grupo tem desenvolvido um estudo fitoquímico de plantas medicinais, especialmente da família Annonaceae. Esta compreende cerca de 130 gêneros e mais de 2300 espécies (ARAYA, 2004). O gênero *Annona* se destaca pelas diferentes classes de metabólitos secundários encontradas em espécies representantes do gênero, onde merecem destaque os alcaloides aporfínicos, flavonoides glicosilados ou não e acetogeninas de anonáceas.

Da espécie *Annona crassiflora*, nosso grupo já realizou o estudo fitoquímico das sementes e madeira e iniciou o estudo das folhas. Das sementes foram encontradas acetogeninas inéditas, que mostraram atividade citotóxica em várias linhagens de células tumorais humanas (SANTOS *et al.*, 1999; PIMENTA, 1995 e PIMENTA *et al.*, 1994).

Sobre pragas do milho e sorgo foi efetuado teste de atividade inseticida com extratos de *Annona crassiflora*, pela EMBRAPA de Sete Lagoas. Nas sementes

dessa planta e em frações do extrato etanólico de suas folhas foi detectada a atividade inseticida para o controle da lagarta do cartucho do milho, *Spodoptera frugiperda*, podendo vir a ser utilizada como potencial inseticida natural no controle dessa praga (PIMENTA *et al.*, 2000).

Assim, visando contribuir com o conhecimento de metabólitos secundários da espécie *Annona crassiflora*, em especial os compostos mais polares, decidiu-se investigar a composição química das folhas. Tendo deste modo como objetivo do trabalho, detectar, distinguir, isolar e identificar os metabólitos mais polares presentes nas folhas e avaliar algumas de suas atividades biológicas.

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Cerrado

O Brasil é considerado como um dos países de maior biodiversidade no mundo, pois se calcula que nada menos do que 10% de toda a biota terrestre encontra-se no país (MITTERMEIER *et al.*, 1997). Ele possui cinco dos principais biomas sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga (CALIXTO, 2000; RATES, 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008).

O Cerrado é o segundo maior bioma na América do Sul, depois da Floresta Amazônica. Ele ocupa cerca de 204 milhões de hectares - aproximadamente 25% do território nacional - (PROENÇA *et al.*, 2000) apresentando grande diversificação faunística e florística em suas diferentes fisionomias vegetais (AVIDOS e FERREIRA, 2000). Ainda pouco estudado, é estimado ser composto por cerca de 1000 espécies de árvores, 3000 espécies de ervas e arbustos, e por volta de 5000 trepadeiras (MENDONÇA *et al.*, citados por SANO e ALMEIDA, 1998).

O Cerrado é considerado um dos 25 sítios de maior biodiversidade do mundo (MYERS *et al.*, 2000). No entanto estima-se que nos últimos 40 anos cerca de 50 a 60% da cobertura original tenha sido removida (RATTER *et al.*, citados por PENNINGTON *et al.*, 2006). Com os avanços da agricultura moderna, o cerrado tem sido substituído por áreas de pastagem ou para cultivos de soja e outros grãos (FELFILI citados por ARAÚJO *et al.*, 2002). A rápida e intensiva expansão da

produção agrícola no cerrado tem fragmentado esse bioma, causando perda da biodiversidade e ameaçando a viabilidade das espécies em longo prazo.

Nesse bioma há uma grande quantidade de produtos florestais não madeireiros potencialmente úteis economicamente. Os frutos das espécies nativas do cerrado ocupam um lugar de destaque na alimentação da população local. Muitos desses frutos possuem elevado teor de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais (ALMEIDA *et al.*, 1998). Hoje, existem mais de 58 espécies de frutas nativas dos cerrados conhecidas e utilizadas pela população da região e de outros estados (AVIDOS e FERREIRA, 2000). Além do uso alimentício, há diversas espécies vegetais com potencial oleaginoso, bem como fornecedoras de fibras, forragem, tanino, corantes e medicamentos. Estes produtos são utilizados de diversas formas pelas populações locais que buscam na sua exploração, alternativas que contribuam para sua sobrevivência (GOMES e AMÂNCIO, 1995).

O cerrado apresenta um tipo de vegetação altamente diverso, com um número estimado de 10.000 espécies de plantas superiores, abrigando também uma grande diversidade de outros organismos de diferentes táxons. Entre as lenhosas destacam-se a família Fabaceae como a mais rica em espécies e a Poaceae entre as herbáceas. A flora do cerrado é superada em riqueza de espécies apenas pela Floresta Amazônica e Mata Atlântica (CAVASSAN *et. al.*, citado por ARAÚJO *et. al.*, 2006)

Dentre as várias espécies de uso popular, presentes no Cerrado, algumas pertencem à família Annonaceae.



Figura 1.2 - Cerrado brasileiro (Fonte: <http://www.espacodocerrado.com/foto02.asp>), acessado em 26/03/2011.

1.2 Família Annonaceae

A maioria das espécies em *Annonaceae* encontra-se vegetando e produzindo frutos em clima tropical e subtropical, poucas são as espécies nativas de clima temperado (NAKASONE e PAULL, 1998; JANICK e PAULL, 2006).

Segundo Araya (2004) a família *Annonaceae* possui 130 gêneros e 2300 espécies. Estas, geralmente estão distribuídas entre as áreas tropicais da América, África e Ásia. A África é o continente que contém o mais baixo número de espécies, aproximadamente 450. Cerca de 900 espécies se encontram entre os Neotrópicos (América do Sul, América Central, parte do México e Caribe) e quase 1200 nas áreas tropicais da Ásia e Austrália. Os gêneros *Uvaria* e *Polvalthia* se encontram na África e também Ásia, ambos com mais de 100 espécies. *Xylopia* é o único gênero da família que se encontra nas regiões tropicais de todos os continentes, enquanto

que *Anaxagorea* é o único gênero nos Neotrópicos e na Ásia tropical (CHATROU citado por PINTO *et al.*, 1999).

Dentre esses gêneros, *Annona* é considerado muito importante economicamente por apresentar algumas espécies que são amplamente cultivadas e comercializadas no Brasil, como *A. squamosa* (fruta-do-conde), *A. muricata* (graviola), *A. reticulata* (condessa) e *A. cherimola* (cherimóia), todas não nativas. Essas espécies são consideradas economicamente importantes, principalmente, devido às propriedades nutricionais dos frutos que são consumidos *in natura* ou na forma de sucos e sorvetes (LORENZI e MATOS, 2002). Há espécies silvestres dessa família que não apresentam importância relevante ao mercado, porém são muito apreciadas por comunidades locais.

No Brasil, a família Annonaceae compreende 26 gêneros e aproximadamente 260 espécies, desempenhando um importante papel na composição da vegetação (MAAS *et al.*, citado por SCALOPPI JUNIOR, 2007). A família Annonaceae conta com cerca de 45 espécies nativas do cerrado, dentre as quais a *Annona crassiflora* é uma das mais importantes (LORENZI e MATTOS, 2002).

1.3 *Annona crassiflora* Mart.

A *Annona crassiflora* Mart. é espécie nativa do cerrado e apresenta ampla distribuição nesse bioma, sendo encontrada na Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Tocantins. É conhecida popularmente como araticum, marolo, pinha-do-cerrado, cabeça de negro, entre outros. Os frutos dessa espécie são muito apreciados por populações locais, sendo encontrados em muitos pomares domésticos e consumidos *in natura* e/ou utilizados na fabricação de compotas, doces, geléias, sorvetes, sucos e licores (ALMEIDA *et al.*, 1998, LORENZI, 1998, LORENZI e MATOS, 2002).

O araticum ocorre naturalmente em solos ácidos, típicos do Cerrado, com pH em torno de 4,8, baixa concentração de fósforo, potássio, cálcio e magnésio e alta concentração de alumínio (NAVES *et al.*, 1995).

É uma espécie arbórea de 4 a 8 m de altura e o diâmetro da copa chega aos 4 m. O tronco é geralmente tortuoso, variando entre 20 a 30 cm de diâmetro revestido por casca áspera e corticosa resistente a ação do fogo. As folhas são alternas e simples (RIBEIRO *et al.*, 2000). As flores são solitárias, axilares e têm

pétalas engrossadas e carnosas. O fruto possui superfície tomentosa e tuberculada de cor verde no fruto em desenvolvimento, e marrom, quando maduro. A polpa é amarela ou avermelhada, adocicada e tem cheiro agradável. As sementes são elípticas e achatadas, de cor marrom. Floresce durante os meses de outubro e novembro, sendo que a frutificação tem início em novembro e a maturação ocorre entre janeiro e abril (LORENZI, 1998; CARVALHO, 2002; LORENZI *et al.*, 2006).

De acordo com FONSECA e RIBEIRO (1992), as sementes de araticum são dispersas no final da estação chuvosa e com a dormência podem superar os meses de estiagem, completar a maturação do embrião e germinar na estação chuvosa do próximo ano.

A espécie *Annona crassiflora* Mart. é caducifólia (perde as folhas durante parte do ano), heliófita (cresce a pleno sol) e seletiva xerófita, pois possui mecanismos anatomo-fisiológicos para restringir a perda de água (MELO, 2005). A planta possui sistema radicular pivotante, que atinge grandes profundidades (CARVALHO, 2002).



Figura 1.3 – Árvore (A), folhas e fruto (B), fruto e polpa (C) e flor (D) de *Annona crassiflora*. (Fonte: <http://www.espacodocerrado.com/foto04.asp>), acessado em 26/03/2011.

1.3.1 Taxonomia

A família Annonaceae é considerada em alguns sistemas de classificação tradicionais como Angiosperma basal por apresentar atributos considerados primitivos como hábito lenhoso; perianto bem desenvolvido, muitas vezes sem diferenciação em cálice e corola; polinização por coleópteros; numerosos estames, gineceu apocárpico, pólen monossulcados (APG - ANGIOSPERM PHILOGENY GROUP OU "GRUPO DE FILOGENIA DE ANGIOSPÉRMAS", 2003).

De acordo com o sistema APG (2003) e BARROSO (1991) a classificação taxonômica é feita da seguinte maneira:

Reino: Plantae	Ordem: Magnoliales
Divisão: Spermatophyta	Família: Annonaceae
Subdivisão: Angiospermae	Subfamília: Annonoideae
Reino: Magnoliophyta	Tribo: Unoneae
Classe: Magnolitaе	Gênero: <i>Annona</i>
Sub-classe: Magnoliidae	Espécie: <i>Annona crassiflora</i> Mart.

1.4 Metabólitos secundários da família Annonaceae

Em 1982, Leboeuf e colaboradores publicaram uma revisão sobre a fitoquímica da família Annonaceae, onde é relatada a predominância de alcaloides aporfínicos e oxoaporfínicos dentre os metabólitos secundários isolados de espécies pertencentes à família. Além de alcaloides, constituintes como polifenóis, óleos essenciais, terpenos e substâncias aromáticas também são encontradas em representantes da família.

Na família Annonaceae podem ser encontrados alcaloides dos tipos quinolínicos, pirrolizidínicos, piperidínicos, indolizidínicos, piridínicos e isoquinolínicos (SIMÕES e SCHENKEL, 2004).

O alcaloide oxoaporfínico liriodenina (**1**) (Figura 1.4, pág. 10) é o mais encontrado em espécies da família Annonaceae (SANTOS *et al.*, 2003). Os de ocorrência menos comum são os alcaloides β -carbolínicos (**2**) (Figura 1.4, pág. 10) (WANG *et al.*, 2002).

Quanto aos compostos fenólicos, na família Annonaceae os de maior ocorrência são os flavonoides (SIMÕES e SCHENKEL, 2004). Flavonoides como O-

glicosídeos de apigenina (**3**), kaempferol (**4**), quercetina (**5**), e luteolina (**6**) (Figura 1.4) foram detectados em espécies da família Annonaceae (SANTOS e SALATINO, 2000).

Entre os esteroides, os dois de ocorrência muito comum em Annonaceae são o β -sitosterol (**7**) e o estigmasterol (**8**) (Figura 1.4) (LEBOEUF *et al.*, 1982).

Segundo BERMEJO e colaboradores (2005), já foram isoladas 417 acetogeninas na família Annonaceae, destas, 176 foram relatadas no período de 1998 a 2004, sendo que a predominância dos compostos descritos era para espécies de *Annona*. A primeira acetogenina de anonácea, a uvaricina (**9**) (Figura 1.4), foi isolada das raízes de *Uvaria acuminata* (JOLAD *et al.*, 1982).

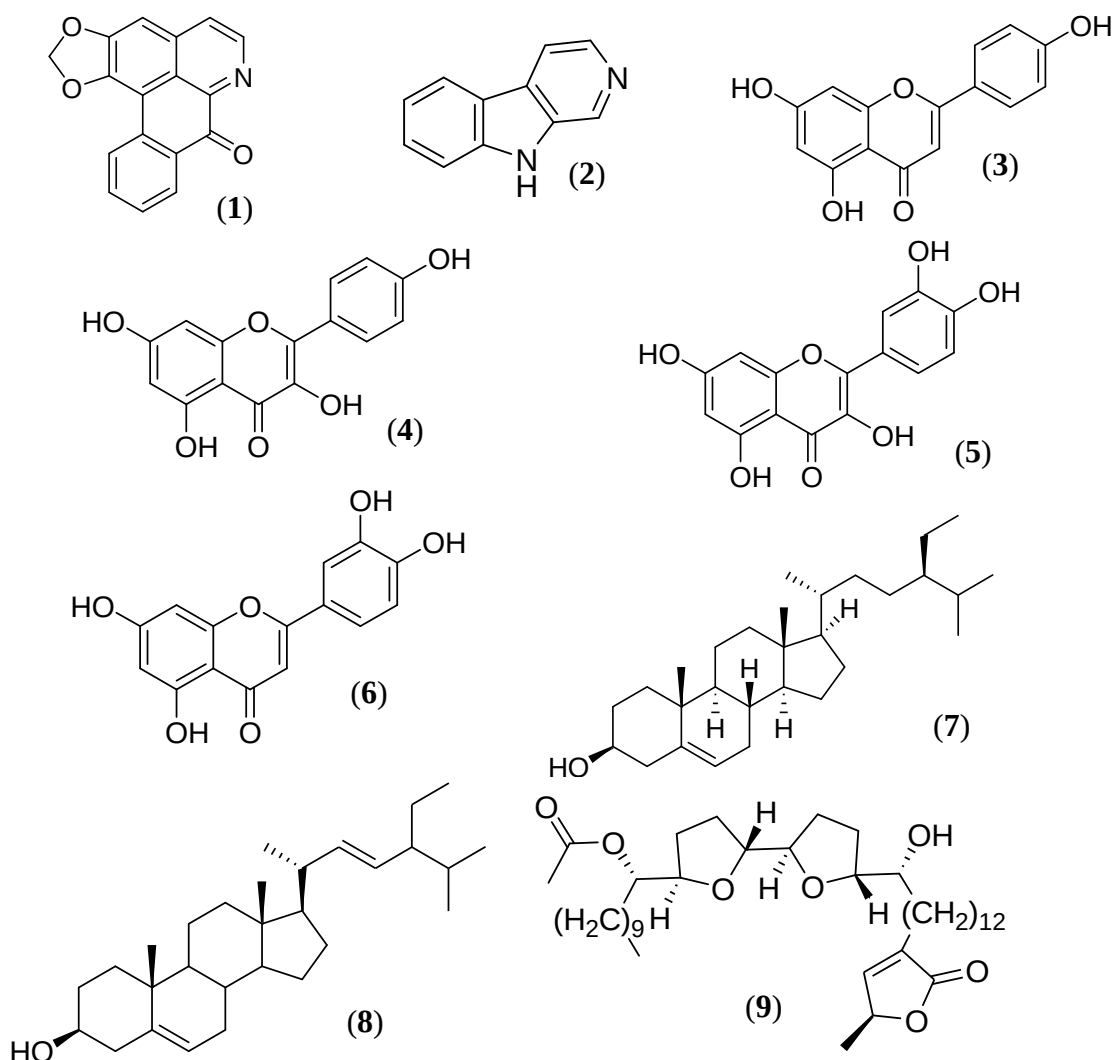


Figura 1.4 - Alguns metabólitos secundários da família Annonaceae: liriodenina (**1**), alcaloide β -carbólico (**2**), apigenina (**3**), kaempferol (**4**), quercetina (**5**), luteolina (**6**), β -sitosterol (**7**), estigmasterol (**8**) e uvaricina (**9**).

Entre os gêneros da família Annonaceae o gênero *Annona* possui muitos metabólitos secundários importantes.

1.5 Metabólitos secundários do gênero *Annona*

1.5.1 Terpenos

Os terpenos são uma ampla e diversa classe de metabólitos formados pela condensação de unidades de difosfato de dimetilalila. Eles são classificados como hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, sesterterpenos, triterpenos e tetraterpenos que possuem respectivamente 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 40 átomos de carbonos em sua estrutura (DEWICK, 2002).

Os monoterpenos cânfora (**1**) e borneol (**2**) (Figura 1.5) foram encontrados em raízes e casca de *Annona squamosa* (RAO *et al.*, citados por LEBOEUF, 1982). Bohlmann e Rao (1973) isolaram das raízes de *Annona squamosa* um sesquiterpeno, o β -cariofileno (**3**) (Figura 1.5).

Friedelina (**4**) (Figura 1.5), um triterpeno, foi encontrado nas folhas de *Annona squamosa* (BHAUMIK *et al.*, 1979). β -sitosterol (**5**) (Figura 1.5) tem sido frequentemente encontrado em folhas de *Annona muricata* e *Annona senegalensis*, nas sementes, casca e raízes de *Annona squamosa*, frutos e sementes de *Annona cherimolia* (RAO *et al.*, citados por LEBOEUF, 1982) e em *Annona crassiflora* (PIMENTA, 1995).

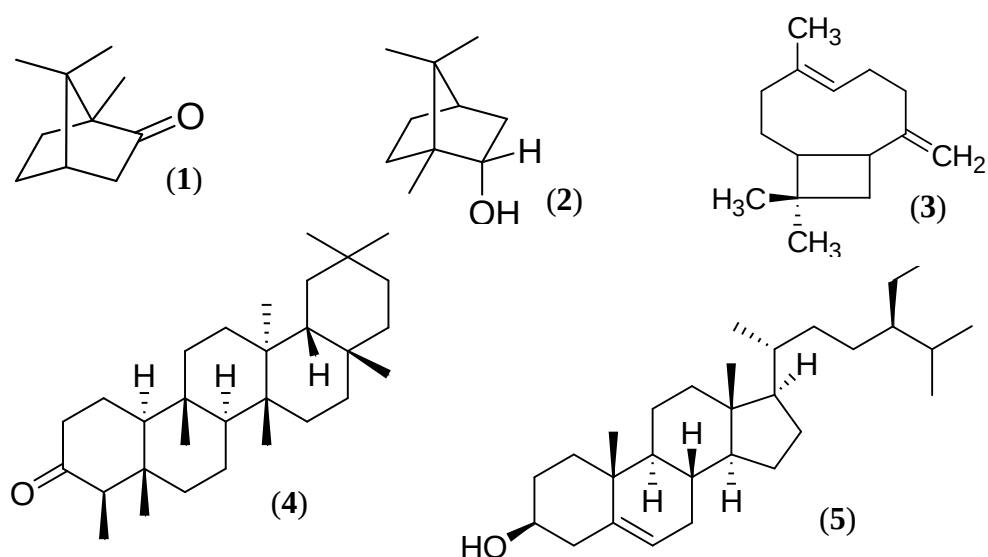


Figura 1.5 - Terpenos isolados do gênero *Annona*: cânfora (**1**), borneol (**2**), β -cariofileno (**3**), friedelina (**4**) e β -sitosterol (**5**).

1.5.2 Acetogeninas de anonáceas

Essa classe de produtos naturais se caracteriza por uma longa cadeia hidrocarbônica, geralmente, C-35 ou C-37, sustentando um anel γ -lactônico terminal, anéis tetra-hidrofurânicos ou tetra-hidropirânicos, epóxidos ou ligações duplas, e vários constituintes oxigenados.

As acetogeninas de anonáceas são classificadas com base nas características estruturais presentes (BERMEJO *et al.*, 2005).

Em um estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa sete acetogeninas, puras ou em misturas, foram isoladas a partir da fração hexânica das sementes de *Annona cornifolia* são elas: 9-hidroxifolianina (1), squamocina L (2), folianina A (3), folianina B (4), 4-desoxilongimicina B (5), annonfolina (6) e squamocina M (7). E cinco a partir da fração clorofórmica: isolongimicina B (8), bulatacina (9), asimicina (10), cornifolina (11) e annotacina (12) (Figura 1.6) (LIMA *et al.*, 2010).

Um estudo realizado em 1995 sobre as sementes de *Annona crassiflora* foram isoladas três acetogeninas inéditas, a crassiflorina (13), a desoxicrassiflorina (14) e a araticulina (15) (Figura 1.6) (PIMENTA, 1995).

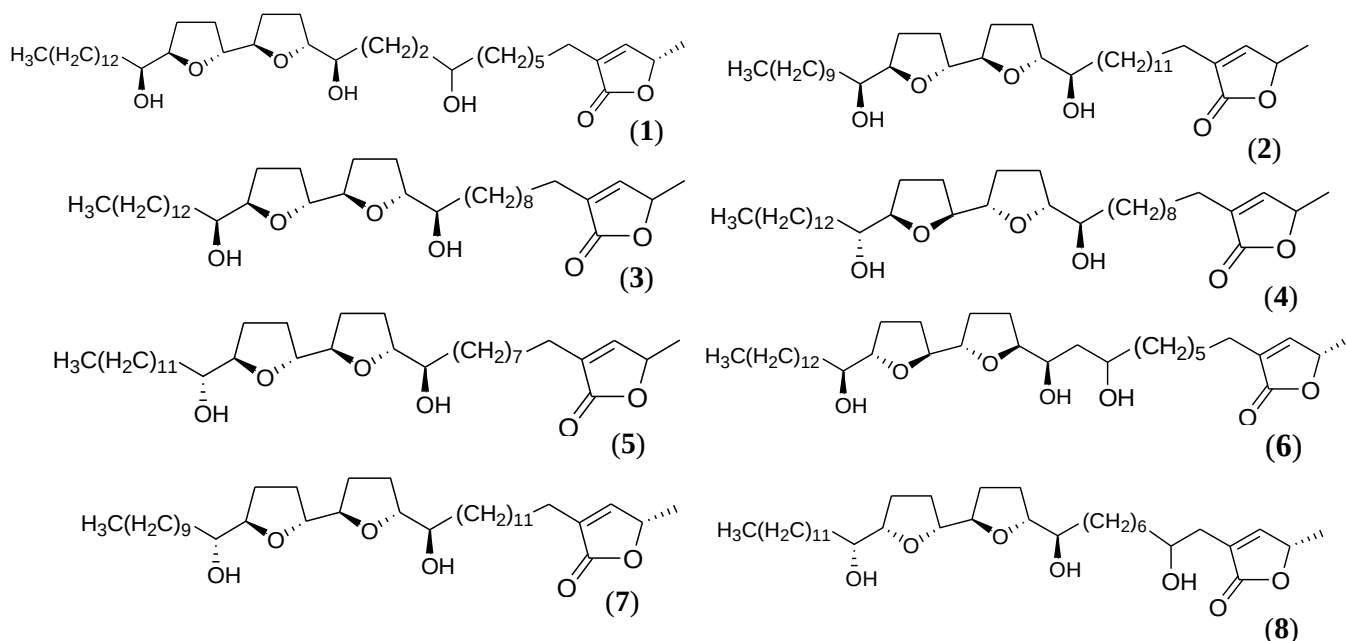


Figura 1.6 – Acetogeninas do gênero *Annona*.

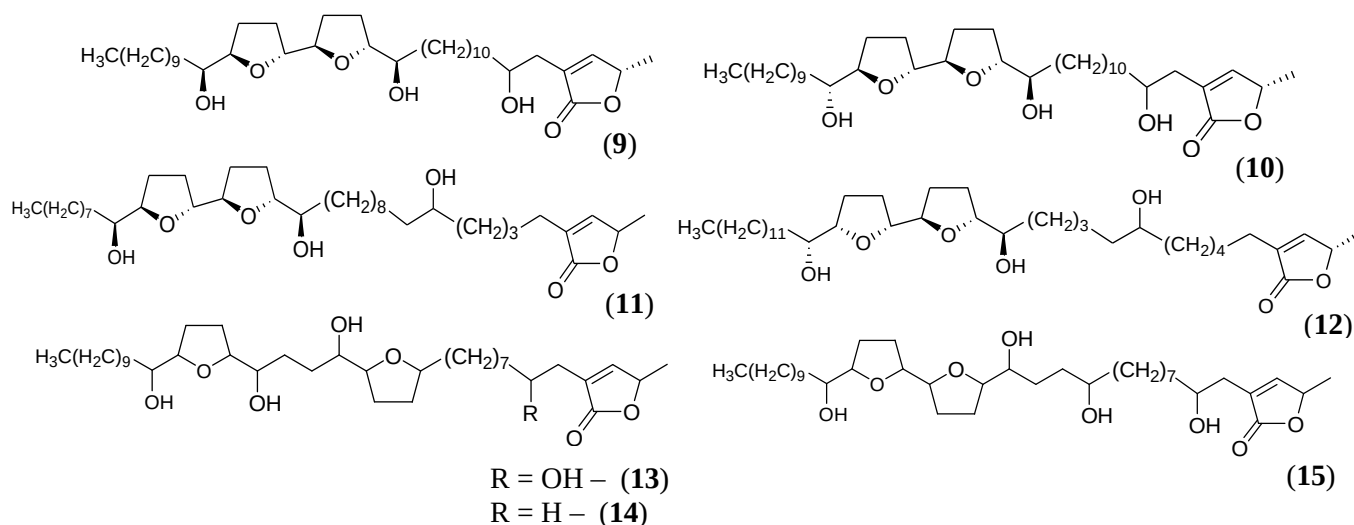


Figura 1.6 – Acetogeninas do gênero *Annona* – Continuação.

1.5.3 Alcaloides

Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, mas também, em menor quantidade em microorganismos e animais. Eles são classificados de acordo com o aminoácido precursor, que podem ser ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, histidina, ácido antranílico, triptofano e reações de aminação (DEWICK, 2002).

Os alcaloides aporfínicos têm uma ampla representação dentro do grupo dos alcaloides isoquinolínicos, encontrados somente em plantas das famílias Annonaceae, Berberidaceae, Lauraceae, Magnoliaceae, Menispermaceae, Monimiaceae, Ranunculaceae (ordem Ranales), Papaveraceae (ordem Rhodales) e Rhamnaceae (ordem Rhamnales) (GUINAUDEAU *et al.*, 1979). Na família Annonaceae a presença dos alcalóides aporfínicos é constante em espécies do gênero *Annona* (DEBOURGUES *et al.*, 1987).

A anonaína (Figura 1.7, pág. 14) é o alcaloide aporfínico de ocorrência mais comum no gênero *Annona*. É encontrada nas espécies *A. cherimola*, *A. glabra*, *A. Montana*, *A. paludosa*, *A. reticulata*, *A. salzmanni*, *A. senegalensis*, *A. squamosa* e *A. spinescens* (QUEIROZ *et al.*, 1996, BHAUMIK *et al.*, 1979).

A estefarina (**1**), glaziovina (**2**) e promucosina (**3**) (Figura 1.8) são alcalóides que possuem esqueleto proaporfínico, que são de menor ocorrência em *Annona*. Esses alcalóides já foram encontrados em *Annona purpurea* (CHANG *et al.*, 2000).

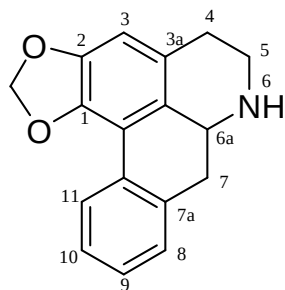
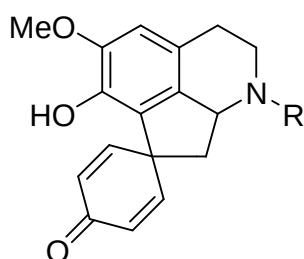


Figura 1.7 – Estrutura química da anonaína



R	Alcalóide
H	Estefarina
CH ₃	Glaziovina
C(O)OCH ₃	Promucosina

Figura 1.8 – Alcalóides proaporfínicos de *Annona*.

1.5.4 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias redutoras (SIMÕES *et al.*, 2004) derivados das chalconas. Ocorrem nas plantas em uma variedade de formas estruturais, todas contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo básico (HARBONE, 1984). Eles derivam compostos químicos com esqueletos do tipo flavonas, flavonóis, antocianidinas e catequinas, entre outros (DEWICK, 2002).

Os flavonoides são uma classe muito extensa de produtos naturais distribuída no reino vegetal. Estão presentes em todas as partes das plantas, desde raízes até as flores e frutos. Ocorrem de forma livre (aglicona) ou ligados a açúcares (glicosídeos). Muitos são coloridos (amarelos), atuando na atração de insetos para a polinização de plantas (YAO *et al.*, 2004).

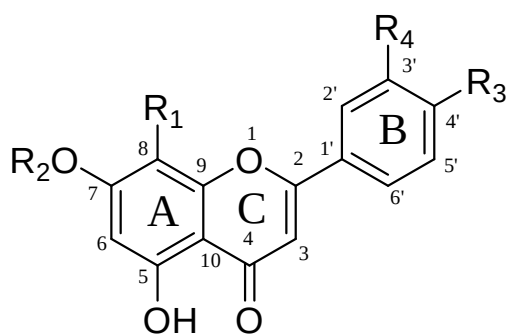


Figura 1.9 - Estrutura química geral de um flavonoide.

Na biossíntese das várias classes de flavonoides, eles podem sofrer várias modificações: adição ou redução, hidroxilação, metilação de grupos hidroxila ou do núcleo dos flavonoides, dimerização (produzindo biflavonoides), glicosilação de grupos hidroxila (produzindo O-glicosídeos) ou em algum núcleo carbônico (produzindo C-glicosídeos) (YAO *et al.*, 2004 e HARBONE, 1984).

Devido à capacidade de estabilizar radicais livres e espécies reativas de oxigênio, os flavonoides têm sido considerados potentes antioxidantes naturais, isso se deve aos grupos hidroxilas ligados à estrutura do anel aromático. Geralmente esta atividade antioxidante dos flavonoides aumenta com o aumento dos grupos hidroxilas e diminui nas glicosilações. Outro fator que aumenta o potencial antioxidante do flavonoide é a presença do grupo orto diidroxila no anel B, a presença de ligação dupla entre C₂ e C₃ em conjugação com a função oxo em C₄ do anel C e a presença de grupos hidroxila em C₃ e C₅. Estes fatores favorecem a deslocalização de elétrons nos núcleos aromáticos, permitindo assim a estabilidade do radical (BALASUNDRAM *et al.*, 2006). Os radicais oriundos das moléculas de antioxidantes são relativamente estáveis e não possuem energia suficiente para reagir (NAWAR, 1996; ARAÚJO, 2004).

As classes de flavonoides mais abundantes no gênero *Annona* são os flavonóis e seus derivados glicosilados, estando presentes tanto os O-glicosídeos como os C-glicosídeos (SANTOS e SALATINO, 2000).

Os flavonoides glicosilados: Kaempferol-3-O-galactosídeo (**1**), kaempferol-3-O-glicosídeo (**2**), quercetina-3-O-arabinosídeo (**3**), quercetina-3-O-arabinosilarabinosídeo (**4**) e quercetina-3-O-arabinosilgalactosídeo (**5**) (Figura 1.10, pág. 16) foram identificados por CG-MS nas folhas de *Annona crassiflora*. O-glicosídeos de quercetina, isoramnetina, kaempferol e luteolina foram detectados

nas folhas de *Annona monticola*, *Annona warmingiana* e *Annona tomentosa* (SANTOS & SALATINO, 2000).

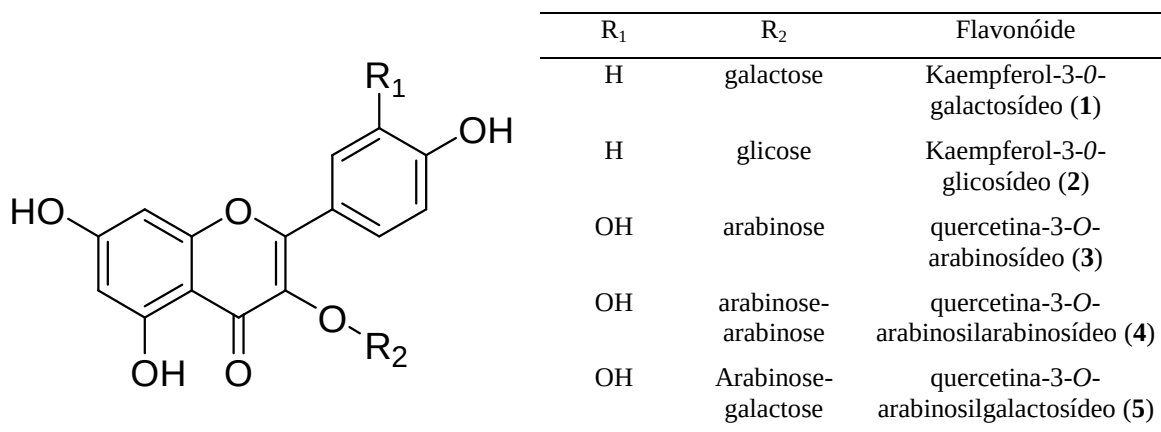


Figura 1.10 – Flavonoides detectados em *Annona crassiflora*.

O flavonoide kaempferol (Figura 1.11), e três derivados 3-O-glicosilados de kaempferol foram isolados das folhas de *Annona dioica* (VEJA *et al.*, 2007).

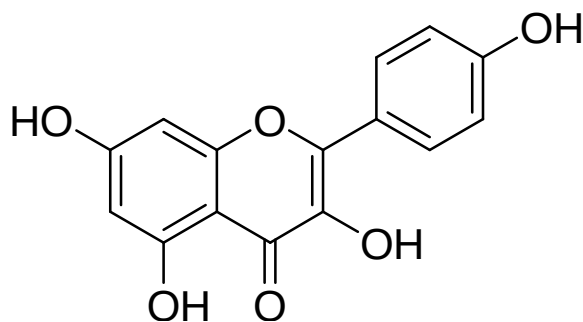


Figura 1.11 – Estrutura química do flavonoide kaempferol

1.6 Atividades biológicas associadas ao gênero *Annona*

1.6.1 Atividade citotóxica

A busca por substâncias com atividade citotóxica e potencialmente anticancerígena sempre foi uma das prioridades da química medicinal e um grande número de abordagens diferentes vem sendo utilizado nessa busca. No entanto, a descoberta de substâncias antitumorais seletivas permanece como um objetivo na pesquisa do câncer (PISCO *et al.*, 2006).

Uma abordagem utilizada para se ter relação com atividade anticancerígena é a atividade citotóxica frente à *Artemia salina*, onde o experimento consiste em medir qual a concentração do produto mata 50% da população de *Artemia*, fazendo assim uma alusão às células cancerosas (PERFEITO *et al.*, 2005).

Dezoito extratos pertencentes a cinco espécies de *Annona* foram submetidos ao ensaio de letalidade sobre *Artemia salina*. Foram testados extratos provenientes das folhas, sementes e madeira de *Annona crassiflora*, sementes de *Annona nutans*, madeira de *Annona hypoglauca* e folhas de *Annona cherimola*. Todos os extratos apresentaram atividade citotóxica (SANTOS PIMENTA *et al.*, 2003).

As acetogeninas annoglaxina (**1**) e 27-hidroxibullatacina (**2**) (Figura 1.12), isoladas de *Annona glabra*, mostraram atividade tóxica sobre células tumorais de mama, rim, próstata e pâncreas (LIU *et al.*, 1999) e sobre linhagem celular de hepatoma humano, sendo esta ação causada pela diminuição do potencial transmembrânico de mitocôndrias, induzindo a morte celular (apoptose) (CHEN *et al.*, 2004).

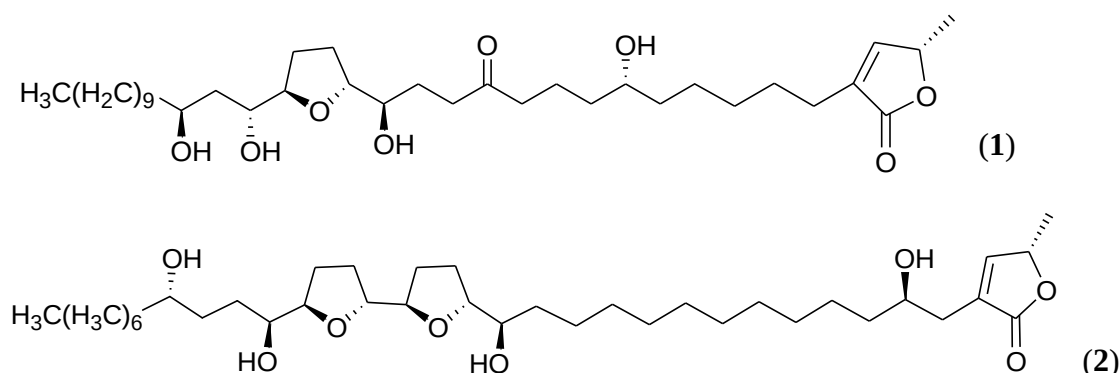


Figura 1.12 - Acetogeninas: annoglaxina (**1**) e 27-hidroxibullatacina (**2**).

Extratos das sementes de *A. squamosa* exibiram potente atividade citotóxica contra linhagens de células tumorais de mama (MCF-7) e leucemia (K-562), sendo as acetogeninas responsáveis pela indução da morte celular (apoptose) dessas células (PARDHASARADHI *et al.*, 2005).

Muitos alcaloides provenientes do gênero *Annona* exibem potencial medicinal. Alguns relatados em *A. cherimola* têm atividade citotóxica (CASSADY, 1990) e efeito relaxante (CHULIÁ *et al.*, 1995), em *A. squamosa* foi encontrado um alcalóide que é um princípio ativo cardiotônico (WAGNER *et al.*, 1980) e alguns alcalóides provenientes de *A. purpurea* que mostraram significativa inibição da agregação plaquetária (CHANG *et al.*, 1998). Além disso, algumas dessas substâncias têm propriedades tóxicas, podendo conferir às plantas proteção contra herbívoros, pragas e patógenos. Estudos com extratos de diversas espécies de *Annona* demonstraram atividades larvicida, inseticida, moluscicida, entre outros (SAXENA *et al.*, 1993).

1.6.2 Atividade antioxidante

Dentre os metabólitos secundários já encontrados ou detectados no gênero *Annona* que mostraram possuir atividade antioxidante se destacam os flavonoides e as acetogeninas.

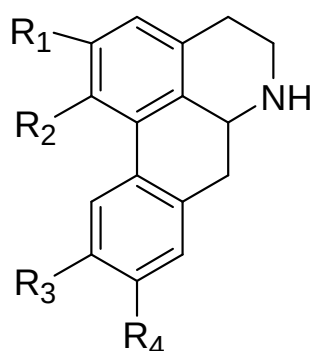
As acetogeninas 9-hidroxi folianina (1), squamocina L (2), folianina A (3), folianina B (4), 4-desoxilongimicina B (5), annonfolina (6) e squamocina M (7), isolongimicina B (8), bulatacina (9), asimicina (10), cornifolina (11) e annotacina (12) (Figura 1.6, págs. 12 e 13) todas isoladas de *Annona cornifolia*, foram submetidas à atividade antioxidante frente ao radical orgânico 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) e todas apresentaram resultado positivo (LIMA *et al.*, 2010).

Flavonóides como quercetina, isoramnetina, kaempferol e seus derivados C- ou O- glicosídeos, que já foram detectados em *Annona crassiflora*, demonstraram atividade antioxidante utilizando dois métodos, frente ao radical DPPH e ao β -caroteno (ALVES *et al.*, 2007).

1.6.3 Atividade antimicrobiana

Em uma revisão RIOS *et al.* (1988), fizeram um levantamento das atividades biológicas observadas em alcaloides aporfínicos e proaporfínicos, entre os alcaloides já isolados no gênero *Annona*, a anonaína (Figura 1.7, pág. 14) e a estefarina (Figura 1.8, pág. 14) apresentaram atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*, a glaziovina (Figura 1.8, pág. 14) apresentou atividades sobre *Escherichia coli*.

A anolobina, nornantenina e a lanuginosina (Figuras 1.13 e 1.14) também encontradas do gênero *Annona* apresentaram atividade antimicrobiana sobre a bactéria *Salmonella typhimurium* (RIOS *et al.*, 1988).



R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	Alcalóide
OCH ₂ O		H	OH	anolobina
OCH ₃	OCH ₃	OCH ₂ O		nornantenina

Figura 1.13 – Estrutura química da anolobina e nornantenina

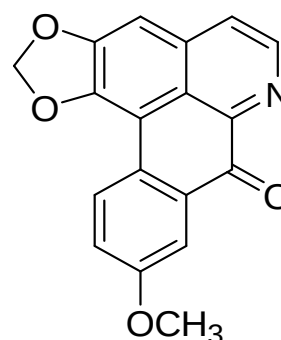


Figura 1.14 – Estrutura química da lanuginosina

Flavonoides como quercetina e O-glicosídeos de quercetina apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus mutans* (FEHLBERG *et al.*, 2009).

OBJETIVOS

Objetivos do trabalho

No CerQBio/DQ/UFG são realizadas pesquisas que visam o isolamento e identificação de novos metabólitos secundários com atividade biológica, centradas em espécies do Cerrado e da família Annonaceae.

A espécie *Annona crassiflora* tem sido objeto de estudo do grupo de pesquisa do CerQBio. Sementes, madeira e folhas já foram estudadas e avaliadas biologicamente (LIMA *et al.*, 2010; PIMENTA, 1995). Até o presente momento, somente há relatos de isolamento e identificação de alcaloides aporfínicos como metabólitos secundários nas folhas. No entanto, SANTOS e SALATINO (2000) descreveram a identificação de seis geninas de flavonoides nas folhas de *A. crassiflora* através do uso da CLAE-MS e padrões de flavonoides. No entanto, nenhum flavonoide foi isolado e identificado inequivocamente pelos métodos espectroscópicos usuais e, assim, suas estruturas e configuração absoluta não puderam ser completamente determinadas. Portanto, nosso objetivo principal foi isolar alguns dos constituintes polares do extrato etanólico das folhas, em especial os flavonoides e alcaloides, e identificá-los de forma inequívoca, utilizando as técnicas espectroscópicas usuais: UV, IV, RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC, COSY e espectrometria de massas.

Neste contexto, o grande interesse do presente trabalho envolveu os seguintes objetivos específicos:

- Isolar alguns dos constituintes polares do extrato etanólico das folhas, em especial os flavonoides e alcaloides.
- Promover um estudo detalhado de confirmação estrutural dos metabólitos secundários isolados, utilizando métodos espectroscópicos e espectrométricos.
- Desenvolver estudos de atividade biológica de extratos e das substâncias isoladas.

CAPÍTULO 2- PARTE EXPERIMENTAL

Os critérios de pureza adotados foram: visualização de uma única mancha em cromatoplaça com variação de eluentes, estreita faixa de fusão e número de sinais no espectro de RMN de ^{13}C .

2.1 Materiais, métodos e instrumentação

2.1.1 Métodos cromatográficos

2.1.1.1 Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para realização do método foram utilizadas placas de vidro recobertas com uma suspensão de sílica gel 60 G da Merck em água destilada (1:2): 0,25 mm de espessura para CCDS analítica, 0,5 mm para CCDS preparativa, ambas ativadas a 100 °C em estufa, e cromatoplaças pré-fabricadas de sílica gel 60, de 0,2 mm de espessura da Sigma.

Placas de celulose e poliamida da Fluka também foram utilizadas.

2.1.1.1.1 Reagentes para revelações cromatográficas [WAGNER *et al.*, 1984; MATOS, 1988; CANNELL, 1998 e ZWEIG e SHERMA, 1987]

- Irradiação de luz ultravioleta (lâmpada Mineralight, modelo UVG 11, $\lambda = 254 \text{ nm}$).
- Reagente: Sulfato Cérico

Sulfato cérico (4,2 g) foi dissolvido em 500 mL de água destilada e a solução foi cuidadosamente misturada com 2,8 mL de ácido sulfúrico concentrado. A mistura foi aquecida até a dissolução e, após resfriamento, foi diluída com água destilada para 1 L.

Após a pulverização, a cromatoplaça foi submetida ao aquecimento a 100 °C. Este é um reagente geral, mas também detecta alcaloides aporfinicos, brucina, colchicina, papaverina e fisostigmina. Também detecta compostos orgânicos de iodo e acetatos de tocoferol.

- Reagente: Anisaldeído-Ácido Sulfúrico

O revelador é constituído por duas soluções.

Solução A: Solução de anisaldeído em ácido acético a 2%.

Solução B: Solução etanólica de ácido sulfúrico a 20%.

Procedeu-se a pulverização da cromatoplaca com a solução A, seguida imediatamente da solução B e aquecimento a 100 °C. É um reagente de uso geral, mas também utilizado na detecção de óleos essenciais, saponinas e catequinas. No visível os componentes dos óleos essenciais apresentam coloração azul, verde, vermelho ou marrom. Saponinas produzem manchas azuis ou azuis-violeta e algumas vezes amarelas. Catequinas produzem manchas de cor vermelha ou marrom.

- Reagente: Vanilina-Ácido Sulfúrico (Reagente de Godin)

Duas soluções são utilizadas como Reagente de Godin.

Solução A: Solução etanólica de vanilina a 1%.

Solução B: Solução etanólica de ácido sulfúrico a 5%.

Pulverização da placa com a solução A, seguida da solução B e aquecimento a 100 °C. É um reagente geral, mas também utilizado para detecção de terpenoides, derivados de fenilpropanos e fenóis. Para saponinas produzem manchas róseas ou azul.

- Reagente: Dragendorff

Para pulverização, prepararam-se duas soluções:

Solução A: Nitrato de bismuto, $\text{Bi}(\text{NO}_3)_3$, (0,85 g) dissolvido em solução de ácido acético glacial (10 mL) e água destilada (40 mL).

Solução B: 20 mL de solução aquosa de iodeto de potássio (KI) a 40 %.

Combinam-se as duas soluções obtendo-se a solução mãe. A solução para pulverização é preparada adicionando-se a 20 mL da solução mãe, 20 mL de ácido acético glacial e 60 mL de água destilada.

Após a pulverização da cromatoplaca, observa-se o desenvolvimento de coloração alaranjada que indica a presença de alcaloides, compostos heterocíclicos nitrogenados, aminas quaternárias, lactamas, lactonas, esteroides α - β insaturados, ciclo-hexilaminas, polietilenoglicol e derivados, compostos óxidos de polietileno e lipídeos.

- Reagente: NP-PEG

Este revelador é composto por duas soluções:

Solução A: Solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 2%.

Solução B: Solução etanólica de polietileno glicol-4000 a 5%.

A cromatoplaça (já tendo sido observada fluorescência na luz UV) é pulverizada com a solução A, seguida imediatamente da solução B e observada em luz UV. Fluorescências intensas principalmente nas cores laranja e amarelo esverdeado são indicativas da presença de flavonoides e outras substâncias fenólicas. Para flavonóis como glicosídeos de quercetina e miricetina, e para as flavonas, como glicosídeos de luteolina observa-se uma cor alaranjada, para flavonóis como glicosídeos de kaempferol e isoraminetina, e flavonas, como glicosídeos de apigenina, observa-se cor amarelo esverdeado.

O revelador difenilboriloxietilamina (NP) é utilizado na revelação de substâncias fenólicas, pois reage com estes formando complexos derivados fluorescentes. Este revelador é muito utilizado devido a sua sensibilidade e especificidade. O PEG é geralmente utilizado como intensificador da fluorescência (KARTING e GOBEL, 1996).

- Revelador: Cloreto férrico

Solução aquosa de cloreto férrico (FeCl_3) a 10%.

A cromatoplaça é borrifada com o cloreto férrico a 10% e logo em seguida é colocada sob aquecimento a 100 °C por cinco minutos.

Os fenóis e taninos podem ser identificados pelo reagente cloreto férrico com a formação de manchas de cor azul da Prússia. Fenóis e taninos do tipo catecol e pirogalol formam manchas azul da Prússia intensas. É necessária uma maior concentração para detecção de fenóis e taninos do tipo floroglucinol e resorcinol para obter manchas de mesma intensidade como as oferecidas pelas soluções mais diluídas de catecol e pirogalol. O ácido elágico dá uma má resposta quando em contato com o cloreto férrico, isto é explicado pelo baixo potencial de oxidação/redução que este ácido possui (Zweig e Sherma, 1987).

Algumas exceções frente a este revelador têm sido notadas. O ácido *p*-hidroxibenzoico não forma manchas de cor azul da Prússia, e o ácido salicílico quelado, origina uma mancha de cor violeta.

O cloreto férrico também é utilizado como reagente para aminas aromáticas (manchas azuis), triptamina, esteroides e compostos fenólicos.

- Revelador: Kedde

Solução A: Solução etanólica de ácido 3,5-dinitrobenzoico a 3 %.

Solução B: Solução metanólica 2,0 mol/L de KOH.

Pulverização da placa com solução A, seguida imediatamente da solução B. Reagente utilizado na detecção de lactonas de 5 membros α,β -insaturadas, apresentando como resultado positivo o desenvolvimento de coloração rósea.

2.1.1.2 Cromatografia em coluna (CC)

No presente trabalho foram utilizadas a cromatografia de adsorção e a cromatografia por filtração em gel.

2.1.1.2.1 Cromatografia de adsorção em coluna de poliamida (CCP)

Foi utilizada como fase estacionária a poliamida CC6 Macherey-Nagel com tamanho de partícula menor que 0,07 mm e como eluentes, solventes puros ou misturas, que serão descritos posteriormente. As colunas foram empacotadas via úmida de acordo com procedimentos usuais (DEGANI *et al.*, 1998). As frações recolhidas foram concentradas em rotavapor sob pressão reduzida e analisadas através de CCDS. As frações semelhantes foram reunidas gerando os grupos.

2.1.1.2.2 Exclusão em gel

Foi utilizado Sephadex LH 20 da Sigma. Para o preparo do gel, este foi intumescido previamente por 24 horas com o solvente a ser usado, em seguida, transferido para a coluna de vidro até se obter a sedimentação total do suporte. A amostra foi dissolvida em quantidade suficiente de fase móvel e então aplicada suavemente no topo da coluna até a penetração completa no suporte. Em seguida procedeu-se a eluição no solvente escolhido. As frações recolhidas manualmente foram concentradas sob pressão reduzida e analisadas por CCDS.

2.1.1.3 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

A cromatografia líquida de alta eficiência analítica foi usada para averiguar a pureza das substâncias isoladas.

As análises foram realizadas em Cromatógrafo UFLC Shimadzu, bombas modelo LC-6AD, com detector diode array SPD-M20A, integrador modelo CBM-20A no CiPharma na Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Foram utilizadas colunas semi-preparativas em fase reversa Supelco SPLC-18 (partículas de 5 µm, dimensão 250 x 10 mm). O detector utilizado foi operado na faixa de 200 a 800 nm. As amostras foram solubilizadas em solvente apropriado, grau HPLC, e filtradas em microfiltro Milipore Millex-HV 0,45 µm.

Todas as análises ocorreram nas seguintes condições:

- Coluna: Supelco SPLC-18 (dimensão 250 x 10 mm, partículas de 5 µm);
- Detecção: 200 a 800 nm;
- Fluxo: 0,8 mL/min;
- Fase móvel: acetonitrila:água (7:3).

2.1.1.4 Cromatografia em camada delgada preparativa

Para realização do método foram utilizadas placas de vidro recobertas com uma suspensão de sílica gel 60 G Merck em água destilada: 0,5 mm de espessura ativada a 100 °C em estufa. Aproximadamente 7,0 mg da amostra foram aplicadas na placa, e após a eluição as manchas na placa foram raspadas separadamente e colocadas uma a uma em uma coluna de 1,0 cm de diâmetro e 10,0 cm de comprimento, contendo sílica da Merck com granulometria de 0, 6 mm.

2.2 Transformações químicas

2.2.1 Micro-hidrólise em cromatografia em camada delgada de sílica [Mattos, 1988].

As amostras foram aplicadas em uma placa de sílica gel da Fluka (1 mm; 5X10 cm). Após secagem do ponto de aplicação, a placa foi introduzida em uma cuba saturada de vapores de HCl e o sistema foi submetido à temperatura de 100°C

em estufa por 22 min. Em seguida, a placa foi retirada da cuba e deixada sob ar frio até não haver vestígios de HCl. Ao lado da amostra foram aplicados padrões de geninas ou açúcares para comparação.

Após a eluição da placa com as fases móveis específicas para a identificação das geninas e dos açúcares presentes, estas foram reveladas com reveladores específicos de acordo com o que se queria caracterizar.

2.2.2 Reação de acetilação [Mattos, 1988]

Em um balão de fundo redondo de 10 mL contendo 20,0 mg da amostra foram adicionados 5 mL de anidrido acético e 2 mL de piridina. A mistura foi mantida sob refluxo, aquecimento a 40 °C e agitação durante aproximadamente 3 horas. O desenvolvimento da reação foi acompanhado por CCDS. Após este período colocou-se a mistura em 10 mL de água com gelo. Logo após, a mistura foi transferida para um funil de separação e extraída 3 vezes com 10 mL de clorofórmio cada extração.

Para retirar o excesso de piridina, o extrato clorofórmico foi lavado rapidamente com ácido clorídrico 1% e, em seguida, com água destilada. O pH foi verificado e estava abaixo de 7. Para retirar o excesso de ácido, lavou-se o extrato clorofórmico com solução de bicarbonato de sódio 5% e, em seguida, com água destilada.

A solução clorofórmica foi tratada com sulfato de sódio anidro, filtrada e concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

2.3 Métodos físico-químicos

2.3.1 Faixa de fusão

Os pontos de fusão foram determinados em aparelho MQAPF- 302 (Microquímica Equipamentos) adaptado a um microscópio pertencente ao Laboratório NEPLAM (Departamento de Química-ICEx-UFMG). A faixa de temperatura foi determinada sem correção.

2.3.2 Solventes

Foram utilizados solventes das marcas Quimex, Synth, Nuclear, Cinética e Vetec de grau P. A.

2.3.3 Infravermelho (IV)

Os espectros no infravermelho foram obtidos utilizando inserção de pastilhas de KBr em espectrômetro Perkin Elmer BX – Região -Spectrum One- FT-IR Spectrometer Universal ATR Sampling Accessory, região de 4500 a 370 cm^{-1} , scan 64, resolução 4 e intervalo 2 do Departamento de Química-ICEx-UFMG.

2.3.4 Ressonância magnética nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ^1H , RMN de ^{13}C , subespectros DEPT 135 e os mapas de contornos COSY, HSQC e HMBC foram obtidos em espectrômetros Bruker AVANCE DPX200 e DRX400 no Laboratório de Ressonância Magnética de Alta Resolução (LAREMAR) do Departamento de Química-ICEx-UFMG. Os deslocamentos químicos (δ) foram registrados em ppm e as constantes de acoplamento em Hertz (Hz). O tetrametilsilano, TMS, foi usado como padrão de referência interno para deslocamento químico (δ 0) em soluções deuteroclorofórmicas. Em soluções com outros solventes deuterados, o deslocamento químico dos hidrogênios residuais dos solventes foram utilizados como referência interna (DMSO- d_6 : δ_{H} 2,50, δ_{C} 39,51; MeOH- d_4 : δ_{H} 4,78, δ_{C} 49,15).

2.3.5 Espectrometria de massas com ionização por electrospray (EM-ESI)

Os espectros de massas foram obtidos em espectrômetro de massas marca Micromass, modelo Micro TM Q-TOF, equipado com fonte de ionização electrospray operando no modo negativo, no Departamento de Química-ICEx-UFMG. Soluções metanólicas dos compostos foram preparadas e analisadas na faixa de m/z entre 50 e 1000 daltons.

2.3.6 Polarímetro

A rotação óptica específica $[\alpha]_D$ foi obtida em polarímetro Perkin Elmer-Polrimer 341 do Laboratório de Químico e Bioprospecção de Plantas do Cerrado (CerQBio) do Departamento de Química-ICEx-UFMG.

2.4 Coleta e identificação botânica do material vegetal

As folhas utilizadas no estudo fitoquímico foram coletadas pela Professora Doutora Lúcia Pinheiro Santos Pimenta, na cidade de Itatiaiuçu, Minas Gerais. A identificação foi feita pelo botânico João Renato Stehmann do Departamento de Botânica do ICB-UFMG. A coleta foi realizada em 17 de julho de 2007. Uma excicata Nº 22.988 encontra-se depositada no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG (BHCB).

2.5 Processamento do material vegetal

As folhas foram limpas, secas em estufa ventilada a 45 °C e moídas em moinho de facas obtendo-se 610,24 g do material vegetal.

2.5.1 Obtenção dos extratos

O pó das folhas foi submetido à extração exaustiva por percolação primeiramente com hexano P.A., para desengorduramento do material, obtendo-se 13,49 g de extrato hexânico após a remoção do solvente a pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório. Continuou-se a extração com álcool etílico aquoso 80% (v/v), o que resultou, após a remoção do solvente, em 268,63 g de extrato etanólico.

2.6 Prospecção química realizada com o extrato etanólico bruto por CCDS

Realizou-se a prospecção química no extrato etanólico bruto por CCDS (Tabela 2.1, pág. 29), a fim de caracterizar metabólitos secundários diferentes

daqueles relatados na literatura, utilizando reveladores específicos para detecção de algumas classes de metabólitos secundários (Wagner *et al.*, 1984; Matos, 1988).

Tabela 2.1 – Prospecção fitoquímica realizada com o extrato etanólico bruto das folhas de *A. crassiflora* por CCDS.

Classes de produtos naturais	Revelador	Resultado	Referência
Alcaloides	Dragendorff	+	Wagner, 1984
Flavonoides	NP/PEG	+	Wagner, 1984
Substâncias em geral (p. ex. terpenoides)	Vanilina/ H ₂ SO ₄	+	Cannell, 1998

2.7 Partição com solventes realizada com o extrato etanólico bruto obtido das folhas de *Annona crassiflora* Mart.

157,5 g do extrato etanólico bruto das folhas de *Annona crassiflora* foram solubilizadas em 1 L de uma mistura de metanol/água (8:2) e transferidos para um funil de separação. Extraíu-se, por duas vezes com CHCl₃ (da primeira vez com 1000 mL e da segunda com 500 mL), obtendo-se a fração hidroalcóolica (ACF02F) e a fração clorofórmica (ACF03F) conforme descrito na Figura 2.1 (pág. 30). Da fração hidroalcóolica precipitou um sólido marrom denominado ACF02F-PREC. Esta partição teve como objetivo obter uma fração mais polar do extrato.

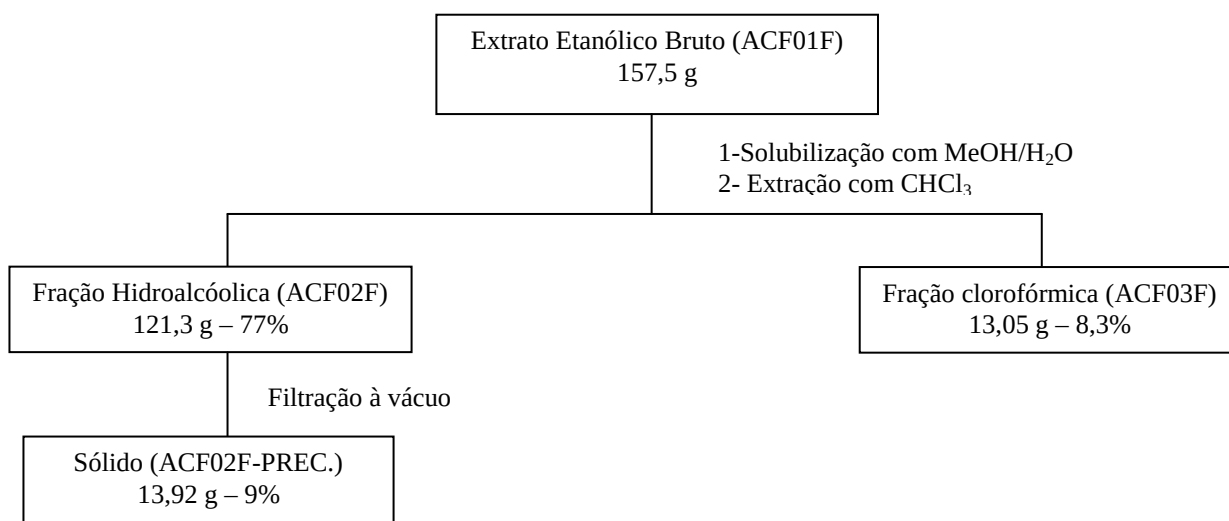


Figura 2.1- Esquema geral da partição realizada com o extrato etanólico bruto das folhas de *Annona crassiflora* Mart.

As frações ACF02F, ACF02F-PREC e ACF03F foram avaliadas por CCDS. A fração ACF02F-PREC também foi analisada em CCD de poliamida (CCDP) e celulose (CCDC), para obter uma melhor separação das manchas, utilizando diferentes reveladores. O resultado da prospecção fitoquímica em CCDS e CCD de poliamida e celulose é mostrado na Tabela 2.2. Selecionou-se a fração ACF02F para a continuação do estudo fitoquímico por ela ter maior massa, pelos resultados positivos frente aos reveladores testados e por apresentar uma natureza mais polar comparada à outra fração.

Tabela 2.2 – Prospecção fitoquímica por CCDS realizada nas frações ACF02F, ACF02F-PREC e ACF03F advindas do extrato etanólico bruto de *A. crassiflora*.

Frações testadas	Classe de Produto Natural		
	Alcaloides	Flavonoides	Substâncias em Geral (outros constituintes)
ACF02F	+	+	+
ACF02F-PREC*	-	+	+
ACF03F	+	+	+

*Resultados para o sólido ACF02F-PREC em CCDS, CCPD e CCDC.

2.8 Isolamento dos constituintes químicos de *Annona crassiflora* Mart.

2.8.1 Fracionamento cromatográfico da fração hidroalcoólica (ACF02F)

A fração hidroalcoólica ACF02F (41,10 g) foi cromatografada em coluna de poliamida em fase reversa (90,0 cm de comprimento e 4,0 cm de diâmetro), e eluída com diferentes solventes como mostrados na Tabela 2.3. Foram recolhidas 52 frações. Estas foram analisadas por CCDS, reveladas com diferentes reveladores e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplas. Os resultados estão esquematizados na Tabela 2.4 (pág. 32). As frações mais polares eram as de interesse.

Tabela 2.3 – Fracionamento cromatográfico de ACF02F obtida do extrato etanólico das folhas de *A. crassiflora* Mart.

Frações	Eluente	Frações	Eluente
P01-02	H ₂ O	P14-17	MeOH : H ₂ O (7:3)
P03-05	MeOH : H ₂ O (2:8)	P18-22	MeOH
P06-09	MeOH : H ₂ O (3:7)	P23-27	MeOH : AcOEt (1:1)
P10-13	MeOH : H ₂ O (1:1)	P28-52	AcOEt

Nas frações P03, P04, P07, P08 e P09 ocorreram precipitações espontâneas. Os sólidos foram filtrados, secos e submetidos à avaliação por CCD, IV e faixa de fusão. Dos sobrenadantes das frações P03 e P07, ocorreram novas precipitações e os sólidos obtidos foram comparados aqueles obtidos da primeira precipitação, por CCDS.

Os sólidos provindos da primeira precipitação das frações P03, P04, P08 e P09 e também os derivados da segunda precipitação das frações P03 e P07 foram remetidos para análises espectroscópicas.

As frações mais polares da fração ACF02F são discutidas separadamente ao longo deste capítulo, e ao final há um fluxograma e uma tabela resumindo o trabalho fitoquímico realizado.

Tabela 2.4 – Frações provenientes da fração hidroalcoólica (ACF02F) obtidas por cromatografia em coluna de poliamida em fase reversa.

Fração	Massa/mg	Resultado				
		Substâncias	Flavonoides	Alcaloides	Compostos	Substâncias
		em Geral (Vanilina/ H ₂ SO ₄)			Fenólicos	em Geral (Anisaldeído/ H ₂ SO ₄)
P01	1.534,0	+	-	+	+	+
P02	2.674,0	+	-	+	+	+
P03sol1*	268,6	+	+	-	+	+
P03sol2*	16,0	+	+	-	+	+
P03sob2*	581,6	+	-	+	+	+
P04sol1*	164,0	+	+	-	+	+
P04sob*	1.000,0	+	+	+	+	+
P05sol1*	27,7	+	+	-	+	+
P05sob*	221,9	+	+	-	+	+
P06	74,2	+	+	-	+	+
P0 sol1*	11,5	+	+	-	+	+
P07sol2*	14,4	+	+	-	+	+
P07sob2*	67,7	+	+	-	-	+
P08sol1*	40,9	+	+	-	+	+
P08sob*	163,7	+	+	-	+	+
P09sol1*	14,1	+	+	-	+	+
P09sob*	191,8	+	+	-	+	+
P10-12	800,0	+	+	-	+	+
P13-15	436,0	+	+	-	+	+
P16-18	241,0	+	+	-	+	+
P19-20	57,00	+	+	-	+	+
P21-24	208,0	+	+	-	+	+
P25-26	92,0	+	+	-	+	+
P27-29	166,0	+	+	-	+	+
P30-32	100,0	+	+	-	+	+
P33-35	106,8	+	+	-	+	+
P36-38	118,2	+	+	-	+	+

Tabela 2.4 – Frações provenientes da fração hidroalcoólica (ACF02F) obtidas por cromatografia em coluna de poliamida em fase reversa. Continuação.

P39-41	160,1	+	+	-	+	+
P42-44	334,5	+	+	-	+	+
P45-47	211,5	+	+	-	+	+
P48-50	435,0	+	+	-	+	+
P51-52	101,2	+	+	-	+	+

Sol1: primeiro sólido a precipitar na fração; sol2: segundo sólido a precipitar na fração; sob: sobrenadante do sólido 1; sob2: sobrenadante do sólido 2.

A fração ACF02F foi submetida à avaliação por CLAE em fase reversa acoplada com detector de arranjos de diodos nas condições descritas na página 25, no item 2.1.1.3.

Foram selecionadas as frações mais polares e seus respectivos sólidos, para o prosseguimento do trabalho fitoquímico. As frações são descritas na ordem que foram estudadas.

2.8.1.1 P03 sol1 obtida da ACF02F

A fração P03 sol1 foi obtida como um sólido amarelo (260 mg). Posterior análise por CCDS indicou tratar-se de uma amostra rica em compostos fenólicos. A avaliação da amostra por CLAE em fase reversa acoplada com detector de arranjos de diodos foi conduzida nas condições mostradas na página 25, no item 2.1.1.3.

Tentou-se solubilizar o P03 sol1 em metanol para que pudesse ser purificado por cromatografia em coluna de Sephadex. No entanto, este foi solúvel parcialmente. A parte não solúvel (160 mg) foi filtrada e apresentou-se como um sólido amarelo, com faixa de fusão entre 265 e 268 °C. Este foi enviado para análise espectroscópica por RMN e após interpretação dos espectros, identificou-se o flavonoide glicosilado quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)-O- α -L-arabinopiranosídeo ou quercetina-3-O-vicianosídeo ou peltatosídeo, denominado ACF-1.

A parte solúvel em metanol da fração P03 sol1 (100,0 mg) foi submetida a purificação em coluna de Sephadex LH20, obtendo-se 26 frações. A fase móvel utilizada foi MeOH:H₂O (9:1). As frações com R_f semelhantes em análise por CCDS foram agrupadas. O resultado das análises por CCDS estão mostradas na Tabela 2.5 (pág. 34).

Tabela 2.5 – Reunião das frações advindas do fracionamento cromatográfico da fração P03 sol1 (100,0 mg) de ACF02F.

Grupo (Frações reunidas)	Massa (mg)	Resultado da prospecção química		
		Substâncias	Flavonoides	Alcaloides
		em Geral (Fenóis)		
01 (01-02)	1,0	+	+	NT
02 (03-04)	6,7	-	-	-
03 (05-06)	5,4	-	-	-
04 (07-08)	6,6	+	-	-
05 (09-10)	9,4	+	-	-
06 (11-12)	11,4	+	+	-
07 (13-15)	10,8	+	+	NT
08 (16-17)	6,7	+	+	NT
09 (18-20)	8,1	+	+	-
10 (21-23)	9,7	+	+	-
11 (24-26)	2,1	+	-	-

NT: não testado.

Todos os grupos listados na Tabela 2.5 foram analisados por CCDS, porém optou-se por prosseguir o trabalho com os grupos 05, 06, 07, 08, 09 e 10, pois apresentaram maior massa.

Grupo 05

Comportou de forma similar a ACF-1 em CCDS.

Grupo 06

Apresentou-se como um sólido amarelo escuro com faixa de fusão entre 265 e 268 °C. Revelou-se positivamente frente ao NP/PEG apresentando três manchas, uma delas mostrou-se igual a do peltatosídeo, ACF-1, por comparação em CCDS. As outras manchas não foram trabalhadas, pois após purificação apresentaram massa muito menor que 1,0 mg.

Grupo 07

Este grupo apresentou uma coloração marrom clara que sob análise por CCDS e revelador NP/PEG apresentou quatro manchas, sendo uma delas com o mesmo Rf de ACF-1.

Grupo 08

A solubilização do grupo 08 em metanol não foi total, sendo separado um sólido (esbranquiçado) da parte solúvel. Foi determinada também a faixa de fusão do sólido (FF= 260 a 271 °C), que, após análise por RMN percebeu-se que a amostra estava impura, não sendo possível sua identificação.

Grupo 09

O grupo 09 resultou em um sólido amarelo que se mostrou puro por apresentar uma única mancha em análise por CCDS e faixa de fusão entre 265 e 268 °C. Este foi enviado para análise por RMN, espectrometria de massa e espectroscopia no IV. Após interpretação dos espectros foi identificado um heterosídeo flavônico, o peltatosídeo (ACF-1).

Grupo 10

O grupo 10 não foi totalmente solúvel em metanol, sendo assim separado o sólido amarelo esbranquiçado (6,0 mg) da parte solúvel. Foi determinada a faixa de fusão do sólido (FF= 265 a 268 °C) e levado a caracterização por RMN que após interpretação foi identificado como sendo o ACF-1.

2.8.1.2 P03 sol2 obtida da ACF02F

Este material apresentou-se como um sólido marrom claro com faixa de fusão entre 265 e 269 °C e mostrou uma única mancha em CCDS frente ao revelador NP/PEG. Este foi enviado para análise por RMN. Após interpretação dos espectros foi identificado o ACF-1.

2.8.1.3 P03 sob2 obtida da ACF02F

Apresentou-se como um sólido marrom escuro que revelou positivamente três manchas em CCDS frente ao reagente NP/PEG, no qual uma das manchas apresentou o mesmo R_f de ACF-1.

2.8.1.4 P04 sol1 obtida da ACF02F

O sólido, P04 sol1, foi parcialmente solúvel em metanol e removido por filtração.

A parte não solúvel (84,0 mg) foi submetida a uma reação de micro-hidrólise, como descrito na página 25, no item 2.2.1. Por comparação com padrões de geninas e açúcares, pode-se concluir que havia o flavonoide quercetina na molécula e também um açúcar não identificado através dos padrões disponíveis no laboratório. Este sólido foi enviado para análise por RMN e foi identificado como o ACF-1, o peltatosídeo.

A porção solúvel (80,0 mg) foi submetida a purificação em coluna de Sephadex LH 20, tendo o MeOH como fase móvel. Foram obtidas 23 frações que após análises por CCDS foram reunidas em 8 grupos (Tabela 2.6).

Tabela 2.6 - Reunião das frações advindas do fracionamento cromatográfico da fração P04 sol (80,0 mg) de ACF02F.

Grupos (Frações reunidas)	Massa (mg)	Resultado da prospecção química	
		Substâncias em Geral (Catequinas)	Flavonóides
01 (01-03)	5,8	-	-
02 (04-06)	8,7	+	+
03 (07-09)	16,2	+	+
04 (10-12)	24,2	+	+
05 (13-15)	10,0	+	+
06 (16-18)	1,0	+	+
07 (19-21)	0,5	-	-
08 (22-23)	1,1	+	+

Todos os grupos foram analisados por CCDS, porém optou-se por prosseguir o trabalho com os grupos 03, 04, 05, e 06, pois apresentaram maior massa.

Grupo 03

Mistura de dois sólidos, um de cor amarela e outro de cor alaranjada, apresentando duas manchas em CCDS, muito parecidas com as do grupo 04. Estas foram separadas por cromatografia preparativa, como descrito no item 2.1.1.4 na página 25, utilizando a fase móvel acetato de etila, metanol e água (81:15:4) e enviadas para análise por RMN. Um dos sólidos foi identificado como ACF-1 o outro não foi possível a identificação.

Grupo 04

Um sólido amarelo alaranjado com faixa de fusão entre 263 e 276 °C apresentou em CCDS duas manchas muito parecidas com as do grupo 03. Estas manchas foram purificadas por cromatografia preparativa, como descrito no item 2.1.1.4 na página 25, utilizando a fase móvel acetato de etila, metanol e água (81:15:4) e enviadas para análise por RMN. Uma das substâncias, após interpretação dos espectros, foi identificada como sendo o ACF-1. Não foi possível identificar a outra substância, porque se constatou que a amostra estava impura, após análise por RMN.

Grupo 05

O grupo apresentou-se como um sólido alaranjado escuro e muitas manchas em análise por CCDS, uma delas possuindo o mesmo R_f de ACF-1.

Grupo 06

O grupo 06 comportou-se de maneira semelhante ao grupo 09 da P03 sol1, com semelhança de R_f e coloração na placa, chegando-se a conclusão que também era o peltatosídeo (ACF-1).

2.8.1.5 P04 sob obtida da ACF02F

A fração P04 sob (800 mg) foi submetida à purificação em coluna de Sephadex LH 20 com fase móvel metanol (MeOH), originando 50 frações, as quais foram agrupadas de acordo com suas semelhanças em CCDS (Tabela 2.7).

Tabela 2.7 - Reunião das frações advindas do fracionamento cromatográfico da fração P04 sob (800,0 mg) de ACF02F.

Grupo (Frações)	Massa / mg	Resultado da prospecção química		
		Alcaloide	Flavonoide	Substâncias em Geral (Fenóis)
01 (01-02)	9,3	-	-	-
02 (03-04)	23,5	+	-	+
03 (05-08)	38,0	+	-	+
04 (09-10)	24,7	+	-	+
05 (11-13)	34,0	+	-	+
06 (14-17)	51,3	+	+	+
07 (18-19)	37,8	-	+	+
08 (20-22)	100,7	-	+	+
09 (23-25)	158,4	-	+	+
10 (26-28)	147,5	-	+	+
11 (29-31)	62,7	-	+	+
12 (32-34)	24,1	-	-	-
13 (35-37)	11,7	-	-	-
14 (38-40)	6,9	-	+	+
15 (41-42)	4,5	-	+	+
16 (43-45)	5,7	-	+	+
17 (46-48)	4,4	-	+	+
18 (49-50)	2,4	-	+	+

Todos os grupos foram analisados por CCDS, porém optou-se por prosseguir o trabalho com os grupos 05, 06, 08, 09 e 10, pois apresentaram maior massa.

Grupo 05

Este grupo não se mostrou totalmente puro por análise em CCDS. Após purificação por cromatografia preparativa (item 2.1.1.4, pág 25), obteve-se um sólido de faixa de fusão entre 278 e 282 °C, que foi denominado ACF-2 (14,1 mg). Este foi submetido à CLAE de fase reversa acoplada com detector de diodos, conduzida nas condições descritas na página 25, no item 2.1.1.3, e comparado por análise em CCDS, com um alcaloide aporfínico isolado anteriormente das folhas de *A. crassiflora* pelo nosso grupo de pesquisa. Foi enviado para análise por RMN e identificado como a norestefalagina.

Grupo 06

Este grupo apresentou-se como um sólido marrom que quando analisado por CCDS, mostrou tratar-se de uma mistura complexa. Comparação do grupo 06 com a ACF-2 permitiu identificar ACF-2 na mistura junto a outros compostos fenólicos.

Grupo 08

Apresentou-se como um sólido alaranjado claro que por análise em CCDS revelou várias manchas frente ao reagente NP/PEG e uma delas mostrou R_f igual ao de ACF-1.

Grupo 09

Do grupo 09 ocorreu uma precipitação, um sólido amarelo bem claro (31,6 mg), que foi removido por filtração. Este foi submetido à micro-hidrólise em CCDS, como descrito na página 25 no item 2.2.1. A comparação com diferentes geninas flavônicas e açúcares demonstrou a presença de quercetina e um açúcar não identificado através dos padrões disponíveis no laboratório. Quando comparado a ACF-1 apresentou o mesmo R_f .

Do sobrenadante, foi isolado um composto fenólico, denominado ACF-3, que após análise de seus espectros de RMN, pôde ser identificado como a epicatequina (28,0 mg). A análise em polarímetro resultou em uma rotação óptica específica $[\alpha]$ negativa, no valor de $-19,3^\circ$, concluindo então, que era a (-)-epicatequina. ACF-3 também foi submetido à análise por CLAE, nas condições descritas na página 25, no item 2.1.1.3.

Grupo 10

O grupo 10 comportou-se de maneira semelhante ao grupo 09 em CCDS com a diferença que o sobrenadante apresentou duas manchas em CCDS.

Os componentes do sobrenadante foram submetidos à cromatografia preparativa, como descrito no item 2.1.1.4 na página 25, utilizando como fase móvel acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (53:6:6:4,5). A mancha com Rf de 0,7 foi identificada como sendo a (-)-epicatequina (ACF-3), que apresentou faixa de fusão entre 240 e 243 °C e massa de 25,6 mg, e a mancha com Rf de 0,35 como sendo o peltatosídeo (ACF-1), com massa de 18 mg.

2.8.1.6 P07 sol2 obtida da ACF02F

O sólido obtido da segunda precipitação da fração P07 (13,0 mg) apresentou cor amarela e uma única mancha em análise por CCDS, com faixa de fusão entre 230 e 233 °C. A análise por RMN permitiu identificar o flavonoide quercetina-3-O-β-L-arabinopiranosídeo, denominado ACF-4.

Este sólido foi submetido à análise por CLAE em fase reversa acoplada com detector de diodos nas condições descritas na página 25, no item 2.1.1.3.

2.8.1.7 P07 sol1 obtida da ACF02F

Este sólido foi comparado por CCDS com a fração P07 sol2. Elas apresentaram o mesmo Rf, concluiu-se então que P07 sol1 era o flavonoide quercetina-3-O-β-L-arabinopiranosídeo (ACF-4).

2.8.1.8 P07 sob2 obtida da ACF02F

Este material apresentou-se como um sólido marrom escuro que quando analisado por CCDS mostrou muitas manchas e uma delas, coincidente com ACF-4.

2.8.1.9 P05 sol1 obtida da ACF02F

Esta fração apresentou um sólido marrom, muito solúvel em metanol, e teve um comportamento idêntico a fração P05 sob quando submetidos a análises por CCDS.

2.8.1.10 P05 sob obtida da ACF02F

A P05 sob apresentou duas manchas em análise por CCDS quando reveladas com vanilina/H₂SO₄. Estas foram separadas por cromatografia preparativa, como descrito no item 2.1.1.4 na página 25. A mancha com R_f de 0,7 foi identificada como sendo a (-)-epicatequina (ACF-3) (36,0 mg), que apresentou faixa de fusão entre 240 e 243 °C, e a mancha com R_f de 0,34 como sendo o peltatosídeo (ACF-1) (10,8 mg).

2.8.1.11 P06 obtida da ACF02F

Esta fração mostrou-se muito semelhante às frações P05 sol1 e P05 sob, mas uma mancha a diferenciava das demais. Foi submetida à purificação em cromatografia preparativa, como descrito no item 2.1.1.4 na página 25, utilizando como fase móvel acetato de etila, metanol, água (25:4:1). Foi isolada a (-)-epicatequina, ACF-3 (19,2 mg), ACF-1 (3,0 mg) e outro sólido com massa igual a 15,6 mg. Este foi enviado para análise por RMN, que após interpretação dos espectros pode-se concluir que se tratava do quercetina-3-O-β-L-arabinopiranosídeo (ACF-4).

2.8.1.12 P08 sol1 obtida da ACF02F

Com alta solubilidade em metanol, este sólido (40,9 mg) de cor amarelo escuro apresentou faixa de fusão entre 230 e 234 °C e uma única mancha frente à análise por CCDS. Após análise por RMN e interpretação dos espectros concluiu-se que era o ACF-4.

2.8.1.13 P08 sob obtida da ACF02F

Em experimento por CCDS apresentou várias manchas frente a muitos reveladores, mas uma delas era idêntica a ACF-4.

2.8.1.14 P09 sol1 obtida da ACF02F

Trata-se de um sólido alaranjado (14,1 mg) que apresentou ponto de fusão entre 230 e 235 °C. Este foi submetido à análise espectroscópica por RMN e após observação dos dados identificou-se este como sendo ACF-4.

2.8.1.15 P09 sob obtida da ACF02F

P09 é um sólido marrom escuro que em experimento por CCDS apresentou muitas manchas frente a muitos reveladores, sendo uma delas idêntica a ACF-4.

2.8.1.16 P01 obtida da ACF02F

Esta fração apresentou-se como um mel de cor marrom escura. Esta foi submetida à análise por CCDS comparando-se com as outras substâncias isoladas, ACF-1, ACF-2, ACF-3 e ACF-4. Foram obtidas várias manchas e uma delas apresentou o mesmo Rf de ACF-1.

Ela foi submetida à reação de acetilação como descrito em 2.2.2 na página 26. Logo após a acetilação, a fração foi submetida à análise por RMN de ^1H , onde foram visíveis registros de sinais na região de δ 1,9 a 2,9, região típica de acetoxilas, confirmando que a substância presente na fração foi acetilada. Este procedimento foi realizado para tornar a fração mais polar e para posterior análise em CG-MS.

2.8.1.17 P02 obtida da ACF02F

Esta fração se apresentou como sendo uma cera de cor marrom escura, muito semelhante a P01. Esta foi submetida à análise por CCDS comparando-se

com as outras substâncias isoladas, ACF-1, ACF-2, ACF-3 e ACF-4. Foram obtidas várias manchas e uma delas apresentou o mesmo R_f de ACF-1.

Ela foi submetida à reação de acetilação como descrito em 2.2.2 na página 26. Logo após a acetilação, a fração foi submetida à análise por RMN de ¹H, onde foram visíveis registros de sinais na região de δ 1,9 a 2,9, região típica de acetoxilas, confirmando que a substância presente na fração foi acetilada.

As demais frações advindas da fração ACF02F não foram analisadas, pois o foco deste trabalho eram as frações mais polares.

2.8.2 ACF02F- PREC

Este precipitado originado da fração ACF02F como um sólido de cor marrom escuro, foi caracterizado como uma mistura de compostos fenólicos sem nenhuma evidência de possuir alcaloides. Este sólido foi submetido à purificação por cromatografia por exclusão utilizando Sephadex LH-20. A coluna (50 cm de comprimento e 3 cm de diâmetro) foi eluída com metanol e metanol/água como mostrado na Tabela 2.8. Foram recolhidas 50 frações. Estas foram analisadas por CCDS, reveladas com diferentes reveladores e agrupadas de acordo com o perfil observado nas cromatoplas. Os resultados estão esquematizados na Tabela 2.9 (pág. 44). Boa parte da amostra ficou retida na coluna.

Tabela 2.8 – Fracionamento cromatográfico de ACF02F-PREC obtida do extrato hidroalcóolico (ACF02F).

Frações	Eluente
01-39	MeOH
40-50	MeOH : H ₂ O (1:1)

Tabela 2.9 – Reunião das frações advindas do fracionamento cromatográfico da fração ACF02F-PREC (800,0 mg).

Grupo (Frações reunidas)	Massa (mg)	Resultado		
		Substâncias em Geral (terpenoides, fenois)	Flavonoides	Acetogeninas
01 (01-03)	11,0	+	-	-
02 (04-05)	24,5	+	-	-
03 (06-07)	37,3	+	+	-
04 (08-10)	31,6	+	+	-
05 (11-12)	42,4	+	+	-
06 (13-14)	41,5	+	+	+
07 (15-16)	51,3	+	+	+
08 (17-18)	49,6	+	+	-
09 (19-22)	54,8	+	+	-
10 (23-26)	56,3	+	-	-
11 (27-30)	47,8	+	-	-
12 (31-34)	38,9	+	-	-
13 (35-40)	24,3	+	-	-
14 (41-44)	15,7	+	-	-
15 (45-50)	9,1	+	-	-

Os grupos 06 e 07 que revelaram positivamente frente ao revelador Keede, específico de acetogeninas, foram escolhidos para o prosseguimento do trabalho.

Grupo 06

Este grupo revelou apenas duas manchas em experimento por CCDS utilizando-se revelador geral. Foi submetido então a cromatografia preparativa, como descrito no item 2.1.1.4 na página 25. Após purificação, uma das manchas revelou-se positivamente, frente ao revelador Kedde, e a outra frente ao revelador NP/PEG. Ambas as amostras foram enviadas para análise por RMN. A mancha que revelou positivamente frente ao NP/PEG, após interpretação dos espectros, foi identificada

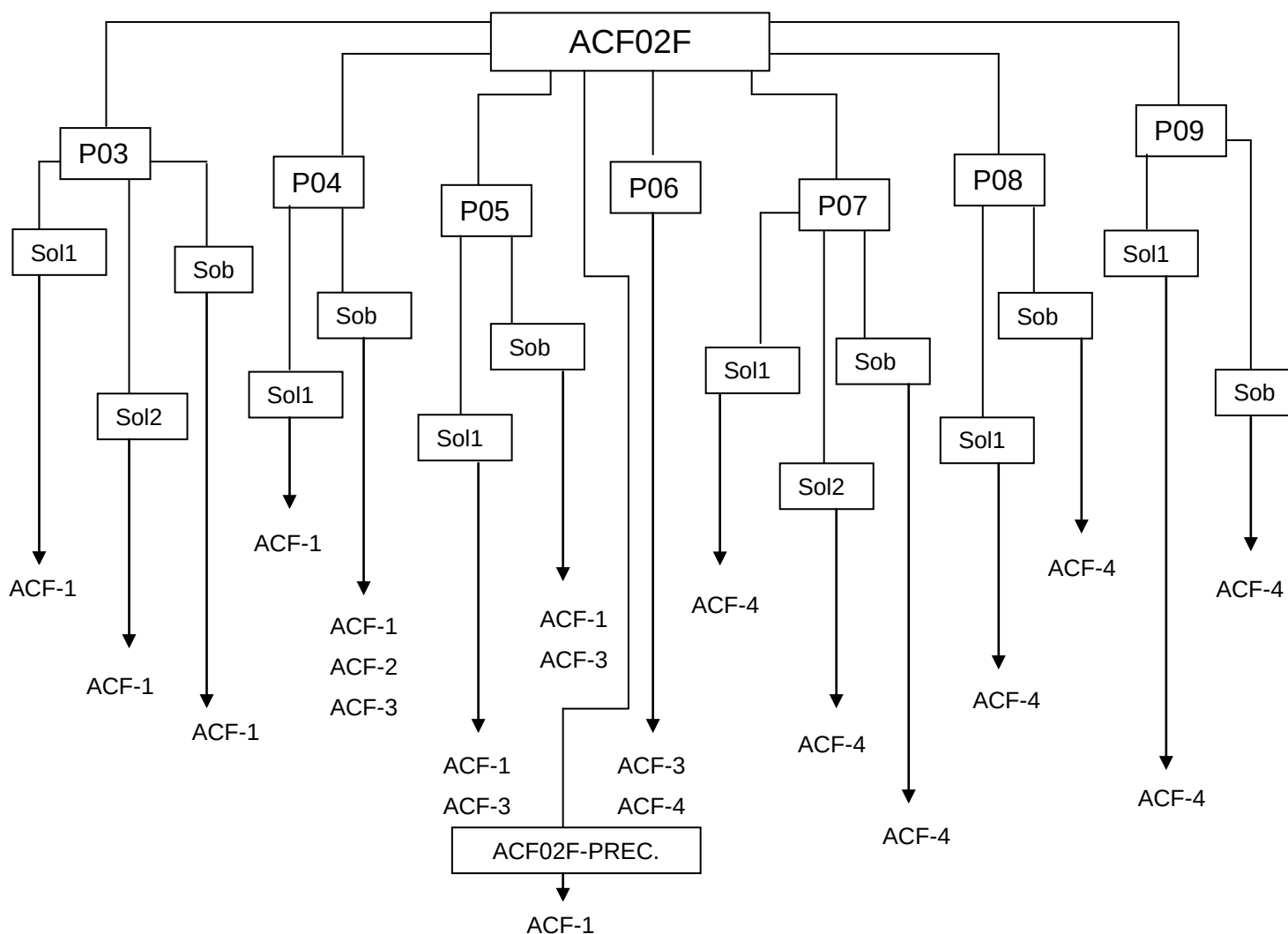
como sendo o ACF-1. A outra mancha, revelada com kedde, não se mostrou totalmente pura, não sendo possível sua identificação.

Grupo 07

Este grupo apresentou-se como sendo um sólido de cor alaranjado escuro muito semelhante ao do grupo 06. Frente ao experimento de CCDS também se portou de maneira parecida.

2.9 Fluxograma e tabela geral do fracionamento

Fluxograma abaixo apresenta um resumo do fracionamento cromatográfico feito com a fração hidroalcóolica ACF02F.



ACF-1: peltatosídeo

ACF-3: (-)-epicatequina

ACF-2: norestefalagina

ACF-4: quercetina-3-O-β-L-arabinopiranosídeo

Figura 2.2 – Esquema geral do estudo fitoquímico de ACF02F.

As siglas e as massas das substâncias identificadas nas frações provenientes de ACF02F são mostradas na Tabela 2.10.

Tabela 2.10 – Siglas e massas das substâncias isoladas.

<i>Siglas</i>	<i>Massas (mg)</i>
ACF-1	277,0
ACF-2	34,0
ACF-3	89,0
ACF-4	83,0

CAPÍTULO 3 – RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Estudo da fração polar obtida das folhas de *A. crassiflora* (ACF02F)

A fração ACF02F forneceu as substâncias puras, ACF-1, ACF-2, ACF-3 e ACF-4. Ela foi submetida à análise por CLAE em fase reversa acoplada com detector por arranjos de diodo (Capítulo 2, pág. 25).

O cromatograma obtido (Figura 3.1-a) apresentou constituintes com tempo de retenção entre 5 e 25 minutos com absorções máximas em comprimentos de onda entre 209 e 355 nm característicos de substâncias fenólicas.

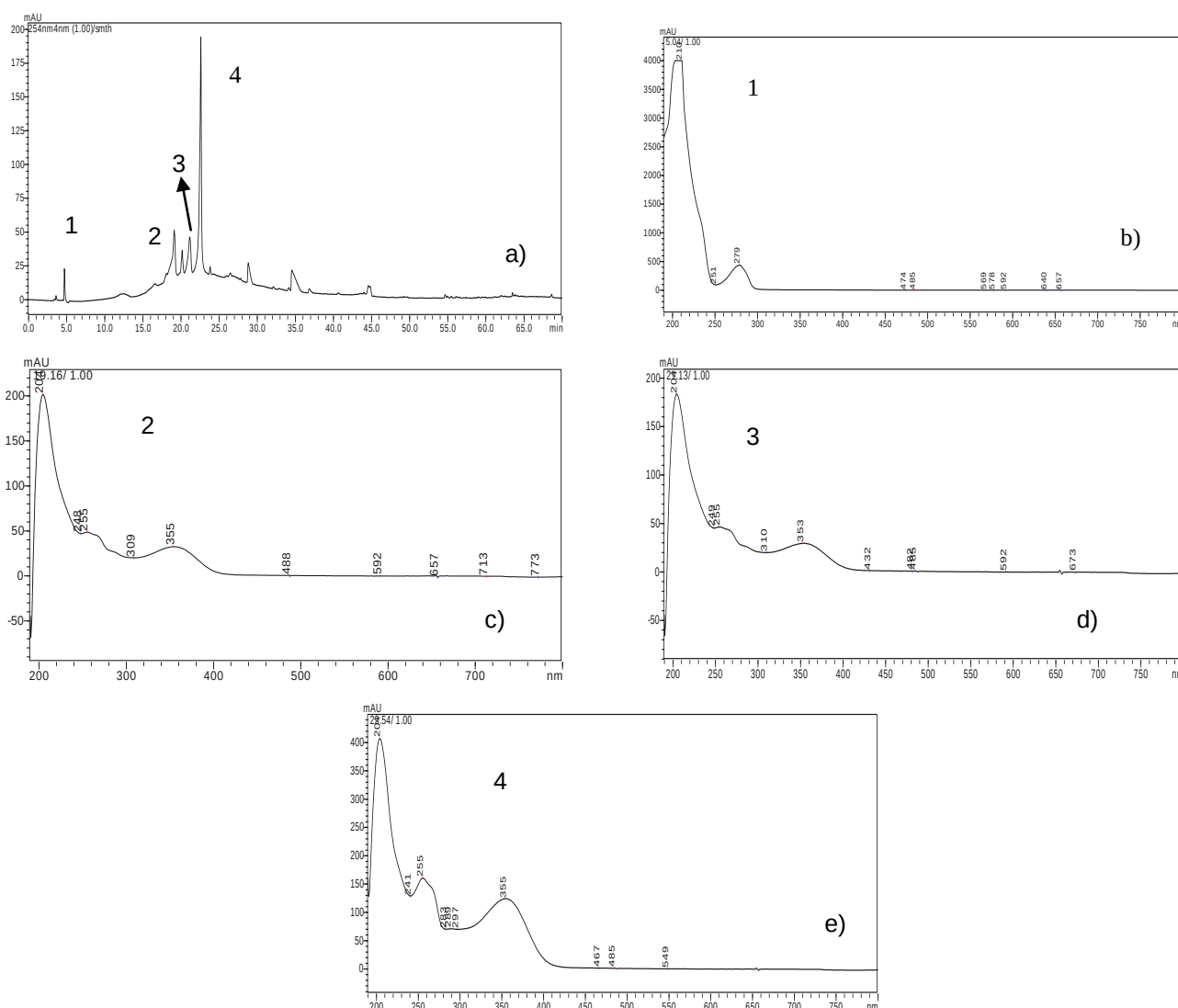


Figura 3.1 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; Espectros no UV dos constituintes referentes aos picos b)1, c)2, d)3 e e)4. (Condições de análise: capítulo 2, pág. 25).

3.2 Análise estrutural dos constituintes químicos isolados das folhas de *A. crassiflora* Mart.

3.2.1 ACF-1

ACF-1 (100 mg) apresentou-se como um sólido amarelo esbranquiçado. A análise por CCDS indicou tratar-se de um flavonoide, devido ao desenvolvimento de fluorescência alaranjada após borrifação da placa com NP/PEG, específico para a detecção de flavonoides e outros compostos fenólicos. Os flavonoides reagem com o NP (difetilboriloxietilamina) formando complexos fluorescentes, como mostrado na Figura 3.2. A avaliação da amostra por CLAE em fase reversa (Capítulo 2, pág. 25) acoplada ao arranjo de diodos, indicou a presença de flavonoides pelos espectros no UV obtidos.

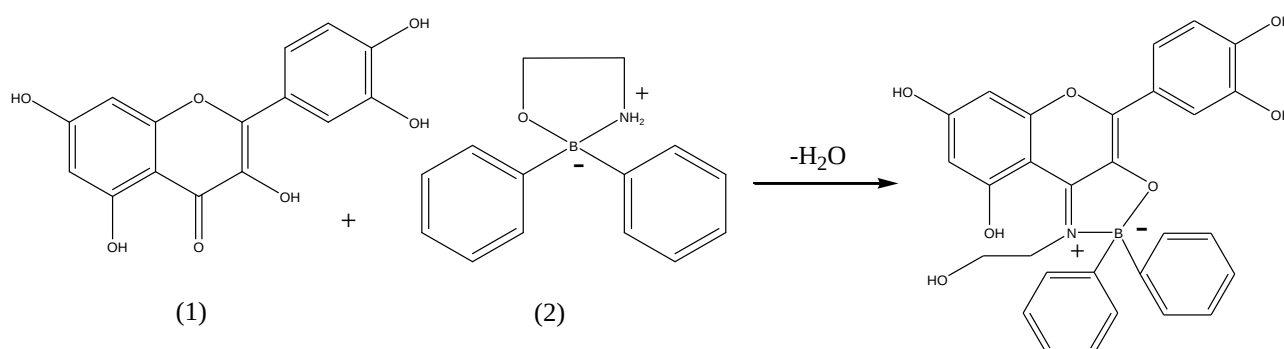


Figura 3.2 – Reação de derivatização de um flavonoide (1) com o difetilboriloxietilamina (2) (KARTING e GOBEL, 1996).

O cromatograma obtido (Figura 3.3, pág. 49) apresentou um pico relativo à constituinte com tempo de retenção de 19,1 minutos que no UV apresentou absorções em λ 210, 255 e 355 nm, característicos de substâncias fenólicas.

A absorção em λ 255 nm é característica do anel B e a absorção em λ 355 nm é referente ao anel A, do flavonoide. Estas absorções (λ 255 e 355 nm) também caracterizam ACF-1 como sendo pertencente à classe dos flavonóis (ANDERSEN e MARKHAM; 2005).

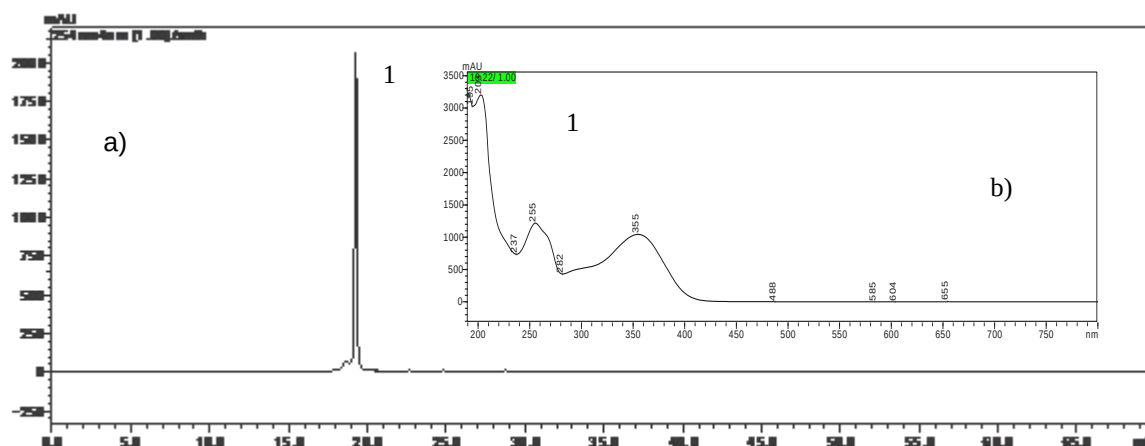


Figura 3.3 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; b) Espectro no UV – de ACF-1. (Condições de análise: capítulo 2, pág. 25).

O espectro no infravermelho de ACF-1 (Figura 3.4) mostra as atribuições das principais absorções. A presença de fenol é sugerida pelas bandas intensas em 3496, 1282 e 1068 cm^{-1} (BARBOSA, 2007). A presença de açúcares foi sugerida pelas absorções em 3378, 1198 e 1068 cm^{-1} (SILVA, 2006).

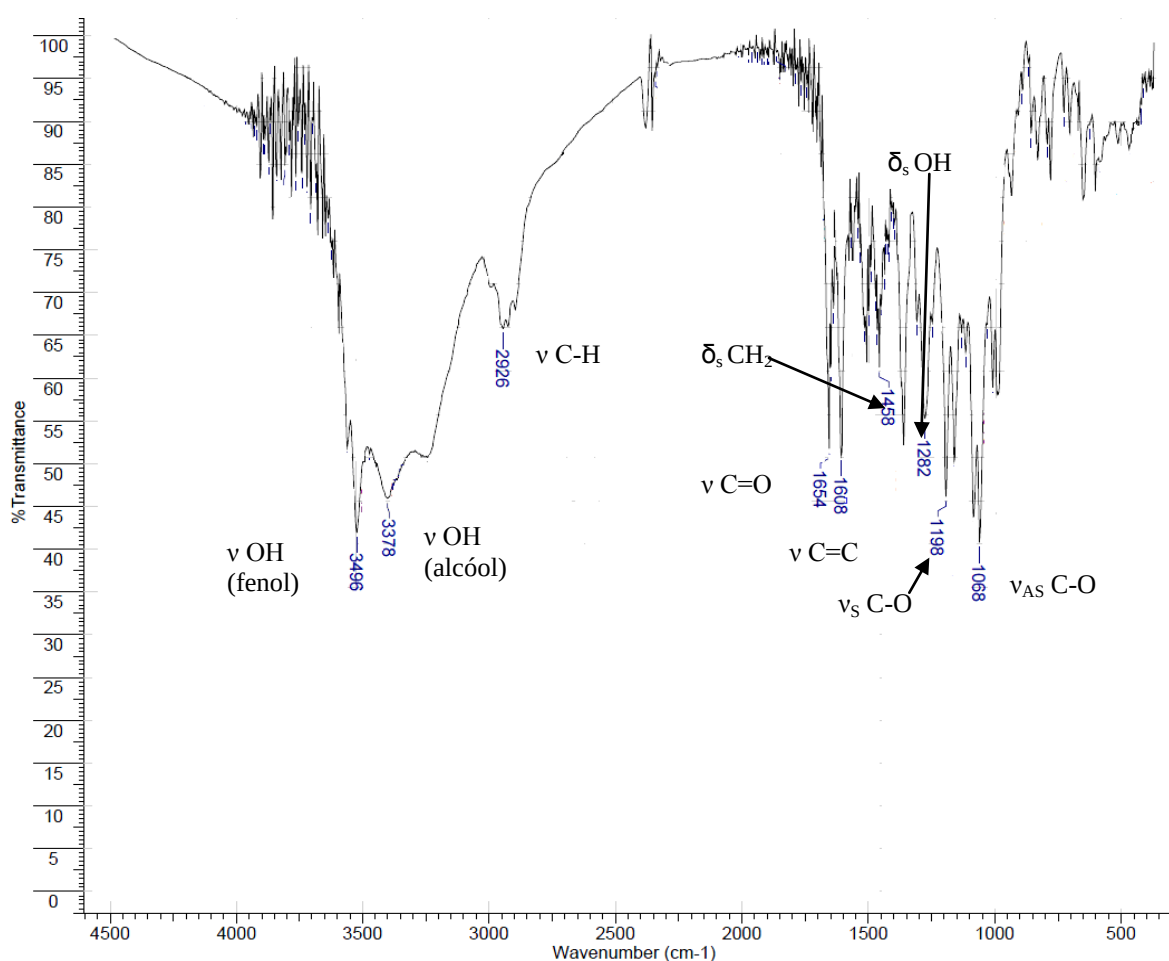


Figura 3.4 – Espectro no Infravermelho de ACF-1.

Para a determinação estrutural, inicialmente alguns sinais dos espectros de RMN de ^1H (Figura 3.6) e de ^{13}C (Figura 3.7, pág. 53) foram assinalados por comparação com dados da literatura (TENG *et al.*, 2002, AGRAWAL, 1989). Dentre estes, os sinais em δ 6,19 (H-6) e δ 6,39 (H-8) atestaram o padrão de substituição do anel A pelo valor da constante de acoplamento meta de 1,89 Hz. Os sinais em δ 6,81 (H-5') e δ 7,66 (H-6') provaram o padrão de substituição do anel B pelo valor da constante de acoplamento *orto* de 8,5 Hz. Estes dados sugeriram a presença de genina quercetina na molécula. A Figura 3.5 corresponde à estrutura da genina de ACF-1. A Tabela 3.1 (pág. 51) mostra os valores dos sinais de hidrogênio da genina e suas correlações.

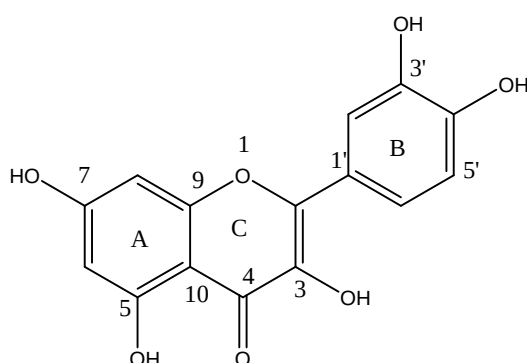


Figura 3.5 – Estrutura química da genina de ACF-1.

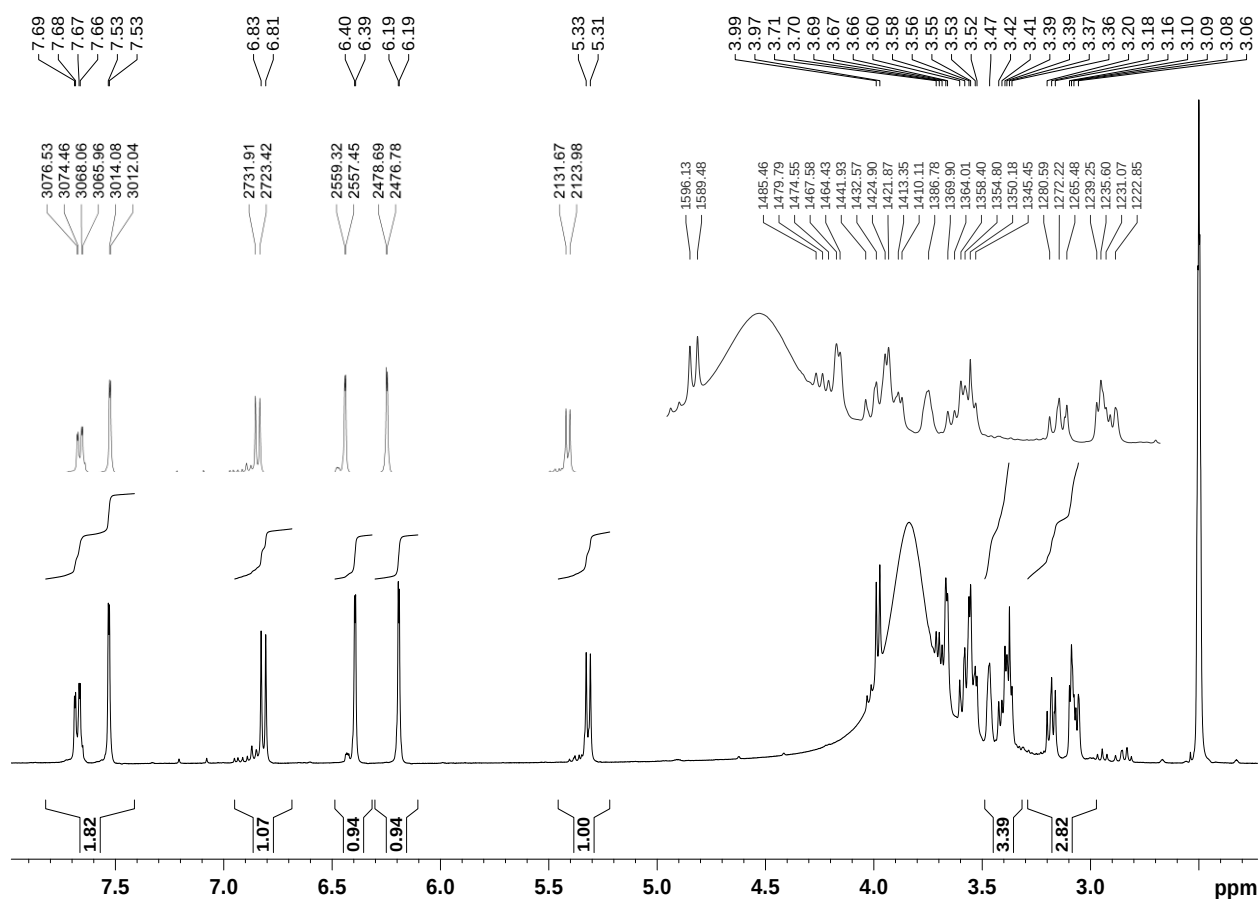


Figura 3.6 – Espectro de RMN de ^1H de ACF-1 (400 MHz, DMSO- d_6).

Tabela 3.1 – Sinais dos hidrogênios da genina de ACF-1 e suas correlações

δ (ppm)	H _i	<i>J</i> / Hz	COSY	C _i (HSQC)	C _i (HMBC)	C _i (Agrawal, 1989)
7,67	H-6'	8,49 e 2,10	6,81 (H-5')	C-6' (121,97)	C-4'(148,47) C-2' (115,18)	C-6' (122,1)
7,53	H-5'	8,49	7,67 (H-6')	C-5' (115,91)	C-3'(144,81) C-4'(148,47) C-6'(121,97) C-1' (121,05)	C-5' (115,5)
6,81	H-2'	2,04	7,67 (H-6')	C-2' (115,18)	C-4' (148,47) C-3'(144,81) C-6'(121,97)	C-2' (115,2)
6,39	H-8	1,89	6,19 (H-6)	C-8 (93,47)	C-7 (164,10) C-9 (156,32) C-10(103,95) C-6 (98,64)	C-8 (93,4)
6,19	H-6	1,89	6,39 (H-8)	C-6 (98,64)	C-5 (161,21) C-7 (164,10) C-10(103,95) C-8 (93,47)	C-6 (98,7)

O espectro de RMN de ^1H exibiu sinais na região de δ 3,0 a 5,4, que são compatíveis com deslocamentos químicos de hidrogênios característicos de açúcares, indicando a presença de açúcar na molécula. Os sinais de hidrogênios da porção sacarídica estão assinalados na Tabela 3.2 (pág. 52) que contém também os valores das constantes de acoplamento.

Tabela 3.2 – Sinais dos hidrogênios dos açúcares de ACF-1 e suas correlações.

δ (ppm)	H _i	J / Hz	COSY	C _i (HSQC)	C _i (HMBC)	C _i (Agrawal, 1989)
5,31	H-1''	7,69	3,58 (H-2'')	C-1''(101,76)	C-3(133,47)	C-1''(101,7)
3,97	H-1'''	6,65	3,18 (H-2''')	C-1'''(102,62)	C-6''(66,48) C-2'''(72,48)	C-1'''(102,7)
3,69	H-6'' _{equatorial}	5,40	3,55 (H-5'')	C-6'' (66,48)	C-3''(74,33)	C-6''(66,4)
3,66	H-4''	3,34	-	C-4'' (68,24)	C-5''(72,99)	C-4''(68,2)
3,58	H-2''	9,37	3,37 (H-4'')	C-2'' (71,02)	C-5''(72,99)	C-2''(71,0)
3,55	H-3''	3,03	3,37 (H-5'')	C-3'' (74,33)	C-4''(68,24) C-6''(66,48)	C-3''(74,2)
3,53	H-5''' _{equatorial}	3,24	3,47 (H-4''')	C-5''' (64,95)	C-2'''(72,48)	C-5'''(65,0)
3,47	H-4'''	Simpleto largo	-	C-4''' (67,36)		C-4'''(67,3)
3,39	H-6'' _{axial}	Multiplete	-	C-6'' (66,48)	C-3''(74,33)	C-6''(66,4)
3,37	H-5''	3,60	3,55 (H-3'')	C-5'' (72,99)		C-5''(73,1)
3,18	H-3'''	6,74	3,53 (H-5''' _{axial})	C-3''' (70,37)	C-2'''(72,48)	C-3'''(70,4)
3,09	H-2'''	3,65	3,97(H1''')	C-2''' (72,48)	C-3'''(70,37)	C-2'''(72,4)
3,07	H-5''' _{axial}	8,22	-	C-5''' (64,95)	C-3'''(70,37)	C-5'''(65,0)

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT135 (Figura 3.7 pág. 53) indicou a presença de 26 carbonos, sendo 15 carbonos característicos de flavonóides e os outros 11, que evidenciaram a natureza dissacarídica da molécula. No subespectro DEPT 135, estão registrados dois sinais em δ 66,48 e δ 64,95, devidos a dois carbonos metilênicos, além de quatorze sinais de carbonos ligados a apenas um hidrogênio.

O sinal em δ 5,29 foi atribuído a um dos hidrogênios anoméricos do açúcar diretamente ligado à genina (H-1'') pois, o mesmo, exibiu no mapa de contornos HMBC uma correlação com o carbono em δ 133,47 (C-3) (Figura 3.10, pág. 55). O sinal em δ 3,95 foi atribuído ao outro hidrogênio anomérico, pois este exibiu no mapa de contornos HMBC, uma correlação com o carbono metilênico do açúcar diretamente ligado à genina (C-6'') (Figura 3.10, pág. 55).

A configuração da ligação do açúcar ligado à genina foi feita através da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico (H-1''). A constante encontrada foi de 7,69 Hz, constante que caracteriza uma ligação beta (β). Para o segundo

açúcar, a constante de acoplamento do hidrogênio anomérico encontrada foi de 6,65 Hz, o que caracteriza a configuração da ligação entre os dois açúcares como sendo alfa (α) (TENG, 2002).

Os sinais dos carbonos não hidrogenados foram atribuídos de acordo com a literatura (AGRAWAL, 1989) e confirmados pelo HMBC, são eles: C-2 (156,32), C-3 (133,47), C-4 (177,40), C-5 (161,21), C-7 (164,10), C-9 (156,32), C-10 (103,95), C-1' (121,05), C-3' (144,81) e C-4' (148,47).

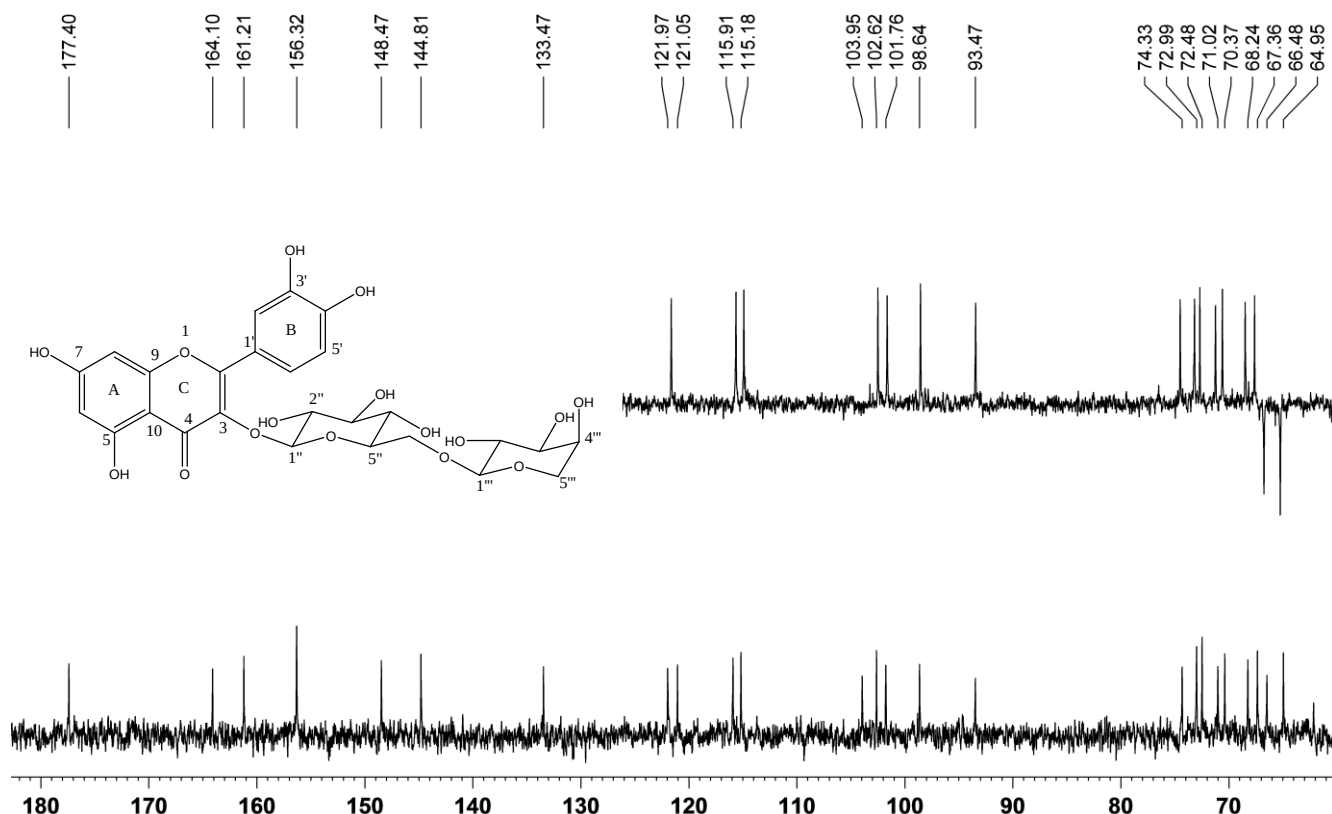


Figura 3.7 - Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 de ACF-1 (100 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

As Tabelas 3.1 (pág. 51) e 3.2 (pág. 52) coluna 5 contém os assinalamentos inequívocos dos sinais dos carbonos que foram baseados em experimento de RMN bidimensional.

No mapa de contornos COSY (Figura 3.8, pág. 54), o sinal em δ 6,81 (H-2'), mostrou correlação com o sinal em δ 7,67 que foi atribuído a H-6'. A análise das correlações encontra-se na Tabela 3.2 (pág. 52) e no mapa de contornos COSY (Figura 3.8, pág. 54).

Através do experimento HSQC (Figura 3.9, pág. 54) foi possível a atribuição do sinal de C-6' em δ 121,97 pela sua correlação com sinal de hidrogênio em δ 7,67 (H-6'). As demais correlações são relatadas nas Tabelas 3.1(pág. 51) e 3.2(pág. 52).

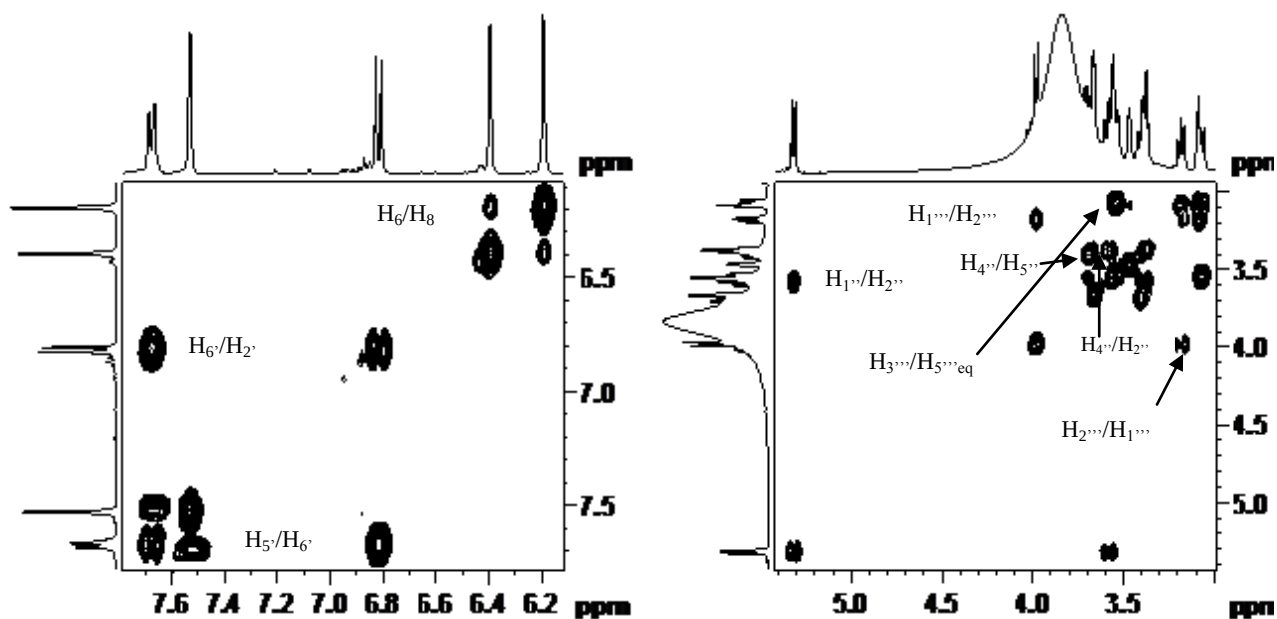


Figura 3.8 – Expansões do mapa de contornos COSY de ACF-1 (400 MHz, DMSO- d_6).

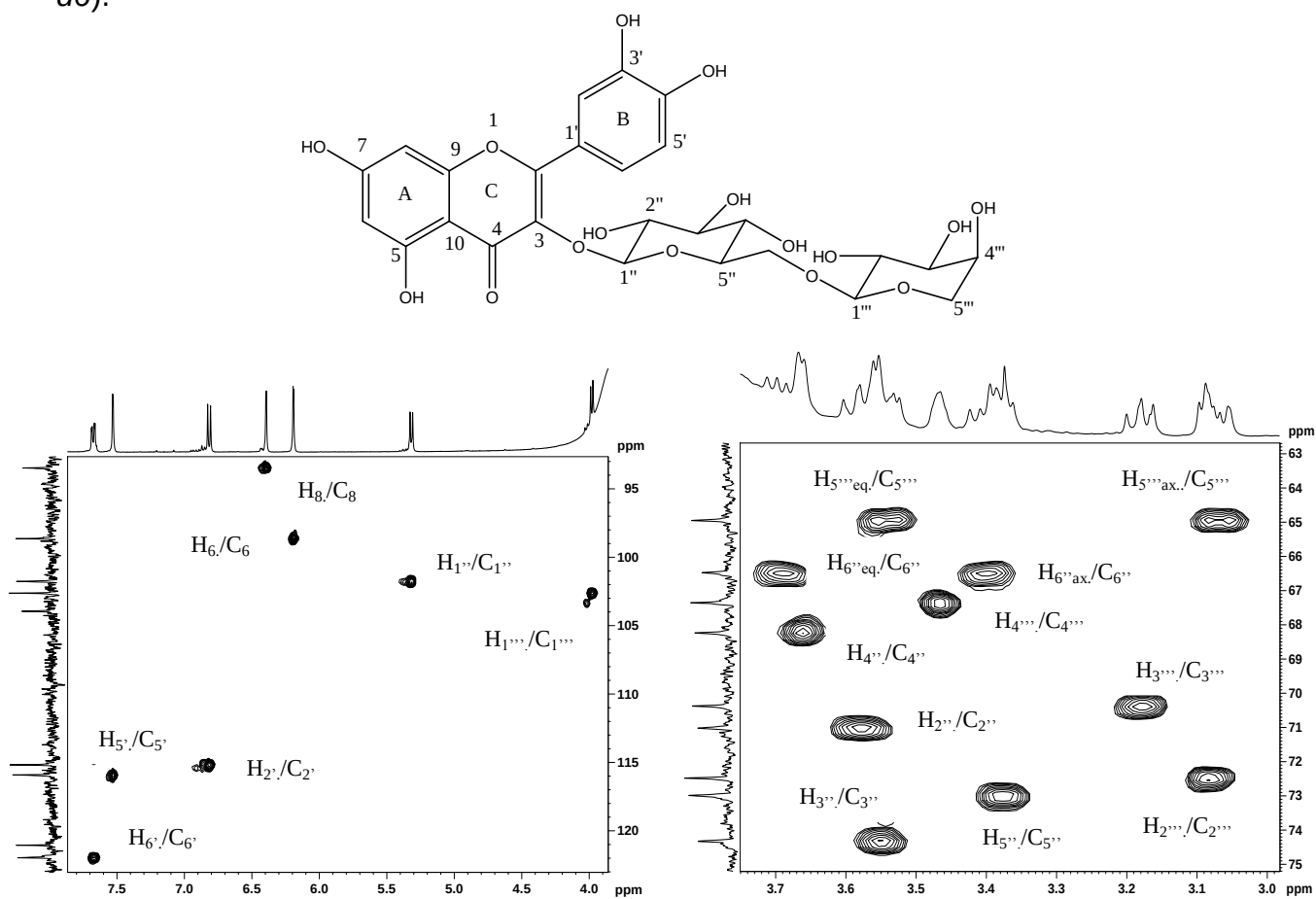


Figura 3.9 – Expansões do mapa de contornos HSQC de ACF-1 (400 MHz, DMSO- d_6).

O HMBC (Figura 3.10) foi indispensável para as atribuições inequívocas de H-1'', H-1''', H-6'', C-3', C-2, C-9 e C-5 como são descritos na Tabela 3.2 (pág. 52).

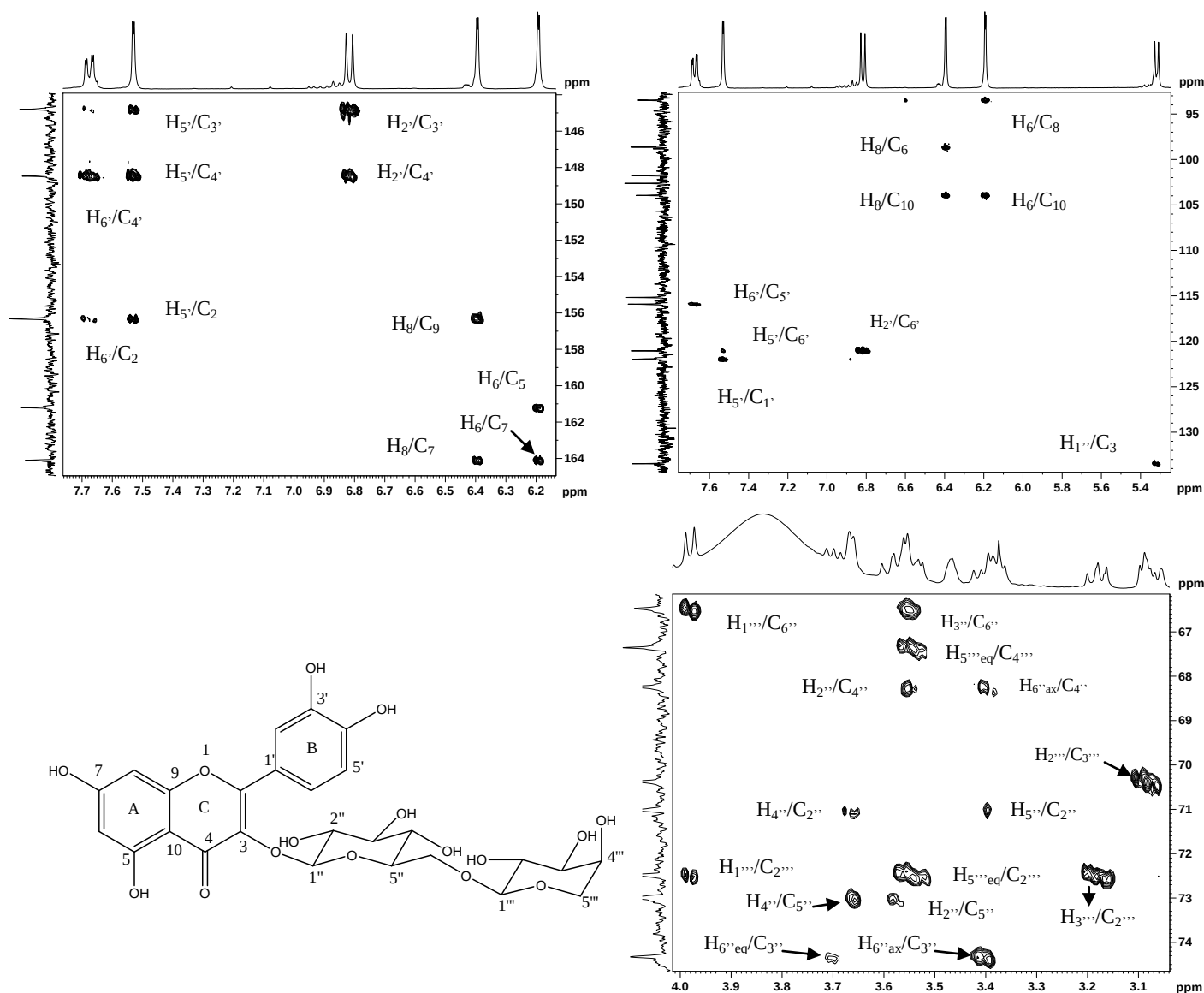


Figura 3.10 – Expansões do mapa de contornos HMBC de ACF-1 (400 MHz, DMSO- d_6).

Após todas as análises e confirmações concluiu-se que a molécula era um glicosídeo, onde a genina estava ligada a dois açúcares de nome quercetina 3-O- β -D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-O- α -L-arabinopiranosídeo, como mostrado na Figura 3.11 (pág. 56).

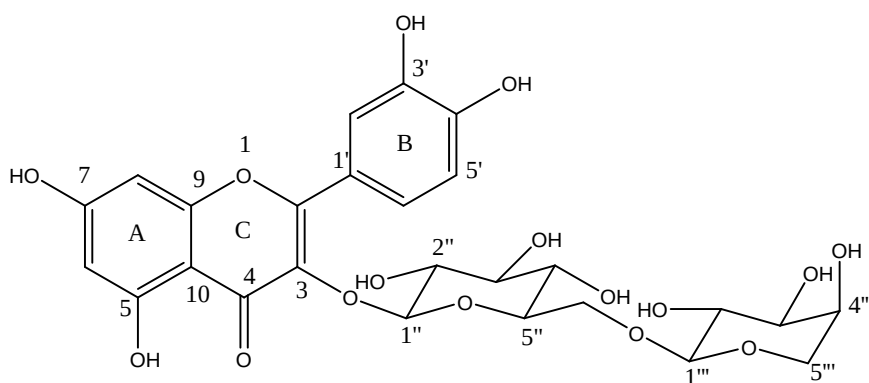


Figura 3.11 - Estrutura química de ACF-1

Pelo espectro de massas (Figura 3.12) confirmou-se a massa molar da molécula, que é igual a 596 g/mol. Como os flavonoides perdem próton com facilidade, o íon registrado $[M-H]$ é o 595 g/mol, que é o pico com maior intensidade mostrado no espectro. O pico com massa/carga 1190,94 foi atribuído à junção de duas moléculas do glicosídeo.

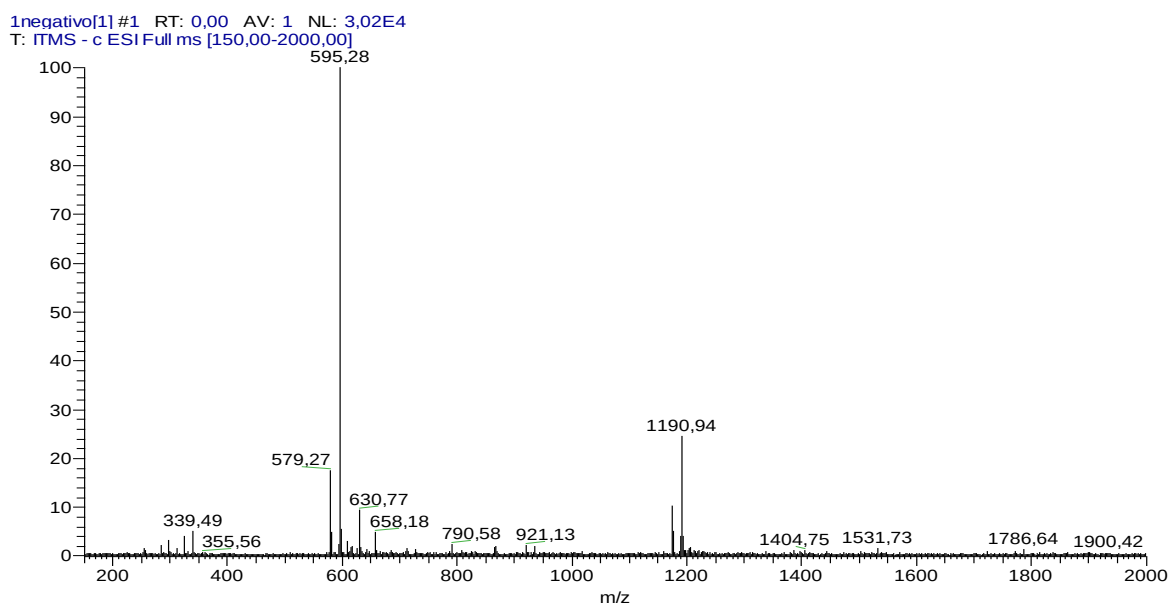


Figura 3.12 – Espectro de massas $[(-)\text{-ESI/EM}]$ de ACF-1.

Esta é a primeira vez que se relata o isolamento e caracterização deste flavonoide a partir das folhas de *A. crassiflora*, no gênero *Annona* e na família *Annonaceae*.

A presença de quercetina 3-O-β-D-glicopiranosil(1→6)-O-α-L-arabinopiranosídeo, podendo ser chamado de peltatosídeo (TENG *et al.*, 2002), foi detectada também nas frações P03 sol1, P03 sol2, P03 sob2, P04 sol1, P04 sob, P05 sol1, P05 sob e ACF02F-PREC.

3.2.2 ACF-2

ACF-2 (34 mg) foi obtido da fração P04 sob, e apresentou-se como um sólido amarelo claro. A análise por CCDS indicou tratar-se de um alcaloide, devido ao desenvolvimento de coloração alaranjada após borrifação da placa com o reagente de Dragendorff. A análise por CLAE (Capítulo 2, pág. 25) em fase reversa forneceu o cromatograma mostrado na Figura 3.13. Neste foi detectado um pico relativo ao constituinte com tempo de retenção de 23,0 minutos com absorções máximas em λ 202, 241 e 276 nm, compatível com aqueles apresentados por alcaloides aporfínicos, típicos de família Annonaceae.

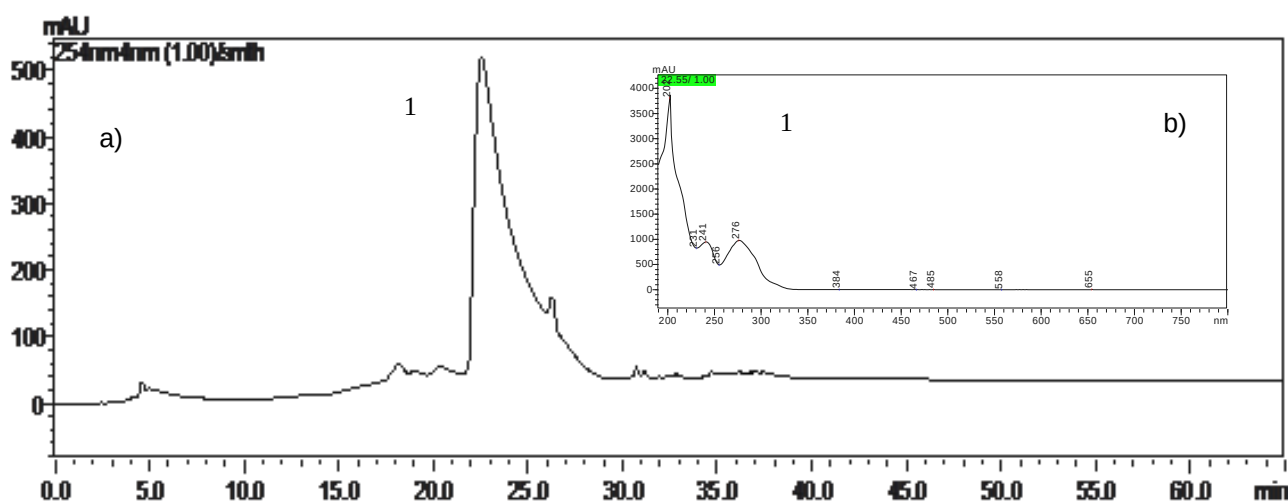


Figura 3.13 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; b) Espectro no UV de ACF-2. (Condições de análise: capítulo 2, pág. 25).

O espectro no infravermelho de ACF-2 (Figura 3.14, pág. 58) mostra as atribuições das principais absorções. A presença do grupo amino é sugerida pelas bandas em 3500, 3376, 1282 e 1654 cm^{-1} (BARBOSA, 2007).

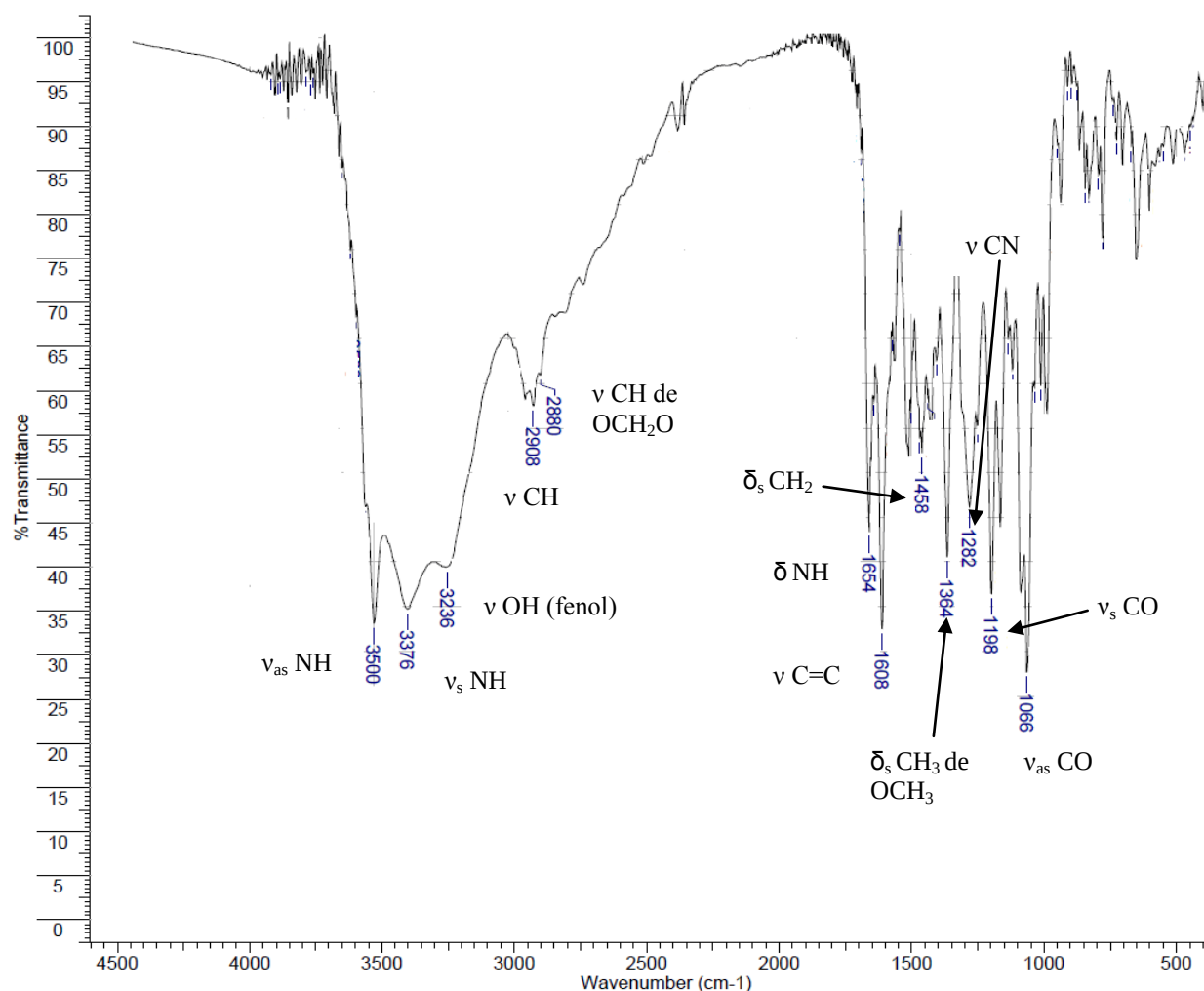


Figura 3.14 – Espectro no Infravermelho de ACF-2

A Figura 3.15 (pág. 59) corresponde à estrutura do alcaloide ACF-2. Para sua determinação estrutural, inicialmente alguns sinais dos espectros de RMN de ¹H (Figura 3.16, pág. 59) e de ¹³C (Figura 3.17, pág. 60) foram assinalados por comparação com dados da literatura (ZANIN e LORDELLO, 2007).

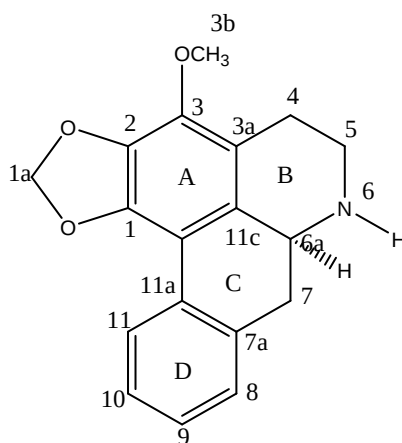


Figura 3.15 – Estrutura química de ACF-2.

O espectro de RMN de ^1H exibiu um sinal em 4,01 ppm relativo a três hidrogênios, o que indicou a presença de grupo metoxila na molécula, confirmando posteriormente que ele está ligado ao carbono 3, no anel A. Os sinais de hidrogênios e suas correlações estão assinalados na Tabela 3.3 (pág. 61).

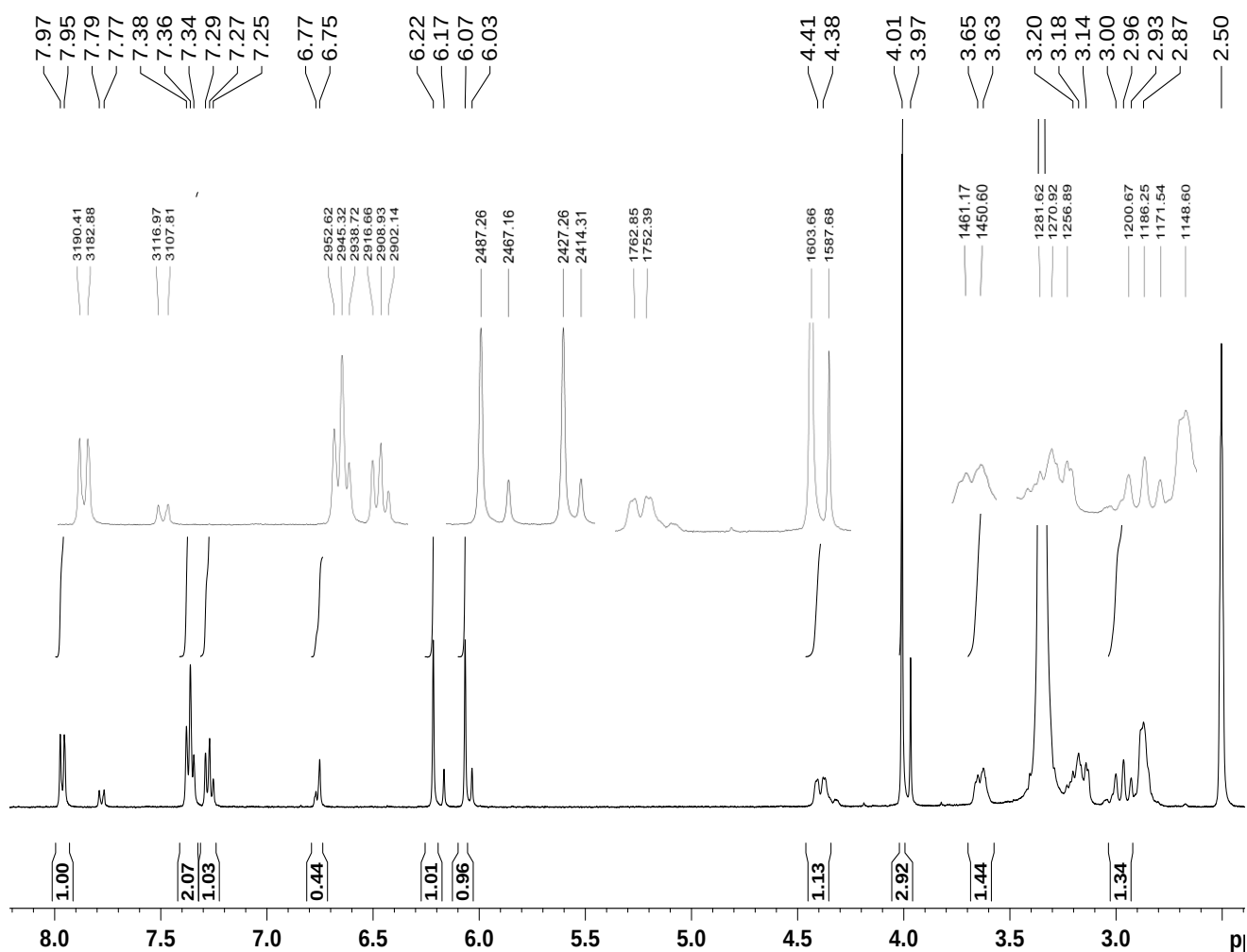


Figura 3.16 – Espectro de RMN de ^1H de ACF-2 (400 MHz, $\text{DMSO}-d_6$).

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT 135 (Figura 3.17) indicou a presença de 18 carbonos, sendo 10 carbonos hidrogenados, dos quais, aqueles com sinais em δ 39,72, δ 32,56 e δ 20,39 são devidos aos carbonos metilênicos C-5, C-7 e C-4, respectivamente, do anel aporfínico. O sinal em δ 101,42 é característico de carbono metilênico presente em um grupo metilenodioxi. O sinal em δ 59,41 corresponde ao carbono do grupo metoxila, e os outros 5 são sinais de carbonos ligados a um hidrogênio.

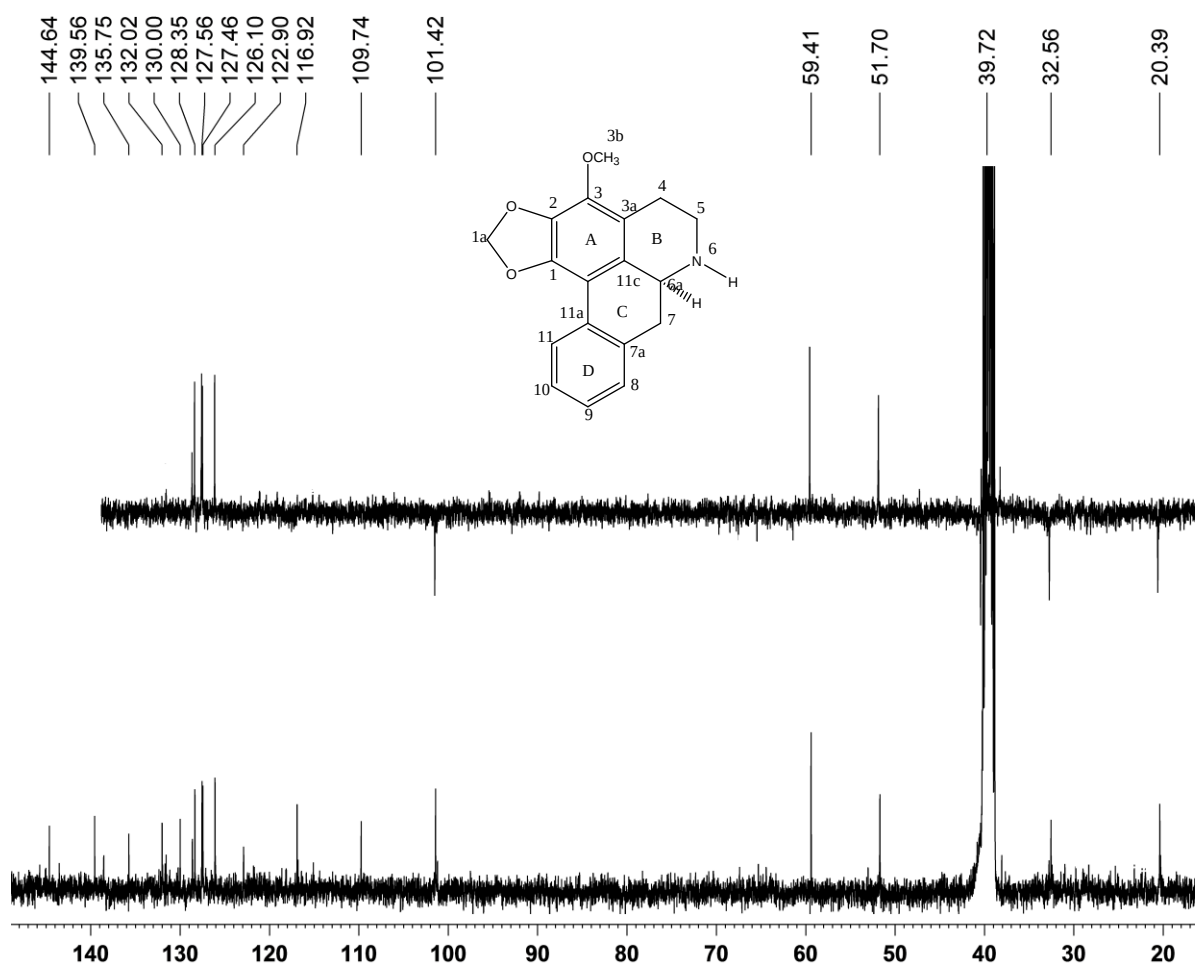


Figura 3.17 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT 135 de ACF-2 (100 MHz, DMSO- d_6).

Os sinais de RMN de ^1H e ^{13}C são condizentes com aqueles do esqueleto aporfínico do alcaloide norestefalagina, conforme dados da literatura (ZANIN e LORDELLO, 2007).

Tabela 3.3 – Sinais dos hidrogênios de ACF-2 e suas correlações.

δ (ppm)	H _i	J / Hz	COSY	C _i (HSQC)	C _i (HMBC)	C _i (Zanin, 2007)
7,97	H-11	7,53	7,36 (H-10)	C-11 (126,10)	C-10(127,46) C11b(109,74)	C-11(126,0)
7,38	H-8	6,85	7,27 (H-9)	C-8 (128,35)	-	C-8(128,1)
7,36	H-10	6,85	7,27 (H-9)	C-10 (127,46)	C-11 (126,10) C-9 (127,56)	C-10(127,3)
7,27	H-9	7,20	7,79 (H-10)	C-9 (127,56)	C-11 (126,10) C-7 (32,56)	C-9(127,5)
6,22	H ₁ -1a	-	-	C-1a (101,42)	C-1 (144,64) C-2 (135,75)	C-1a(101,2)
6,07	H ₂ -1a	-	-	C-1a (101,42)	C-2 (135,75)	C-1a(101,2)
4,41	H-6a	10,40	3,14 e 2,96 (H-7)	C-6a (51,70)	-	C-6a(52,0)
4,01	H-3b	simpleto	-	C-3b (59,41)	C-3 (139,56)	C-3b(59,3)
3,65	H ₁ -5	10,50	2,87 (H-4)	C-5 (39,72)	-	C-5(40,0)
3,20	H ₂ -5	10,70	-	C-5 (39,72)	-	C-5(40,0)
3,14	H ₁ -7	múltiplo	3,41 (H-6a)	C-7 (32,56)	-	C-7(32,8)
2,96	H ₂ -7	14,40	3,41 (H-6a)	C-7 (32,56)	C-6a (51,70)	C-7(32,8)
2,87	H-4	simpleto largo	3,65 (H-5)	C-4 (20,39)	-	C-4(20,7)

Os sinais dos carbonos não hidrogenados foram atribuídos de acordo com a literatura (SILVA *et al.*, 2009 e ZANIN E LORDELLO, 2007) e confirmados pelo mapa de contornos HMBC, sendo eles: C-1 (144,64), C-2 (135,75), C-3 (139,56), C-3a (122,90), C-7a (130,00), C-11a (116,92), C-11b (109,74) e C-11c (132,02).

A Tabela 3.3, coluna 5 contém os assinalamentos inequívocos dos sinais dos carbonos que foram baseados em experimento de RMN bidimensional.

No mapa de contornos COSY (Figura 3.18, pág. 62), o sinal em δ 2,87 (H-4) mostrou correlação com o sinal em δ 3,65 que foi atribuído a H-5. A análise das correlações encontra-se na Tabela 3.3 e no mapa de contornos COSY (Figura 3.18, pág. 62).

Pelo experimento HSQC (Figura 3.19, pág. 62) foi confirmada a correlação entre o sinal de hidrogênio com δ 4,01 com o sinal de carbono em δ 59,41. As demais correlações são relatadas na Tabela 3.3.

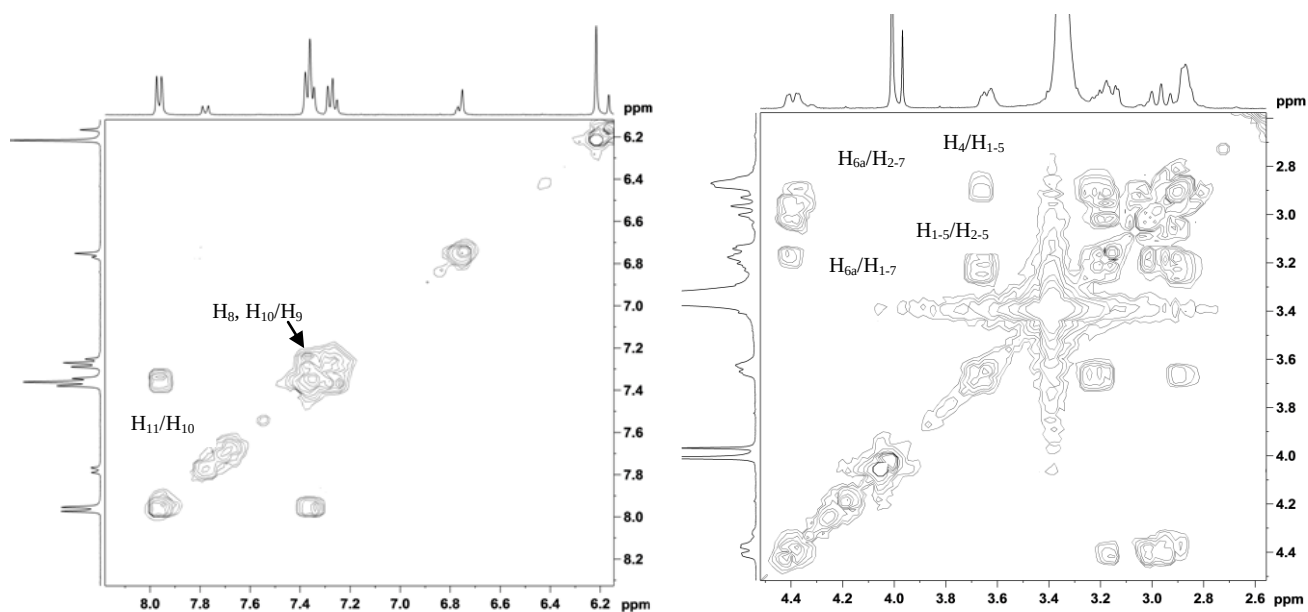


Figura 3.18 – Expansões do mapa de contornos COSY de ACF-2 (400 MHz, DMSO- d_6).

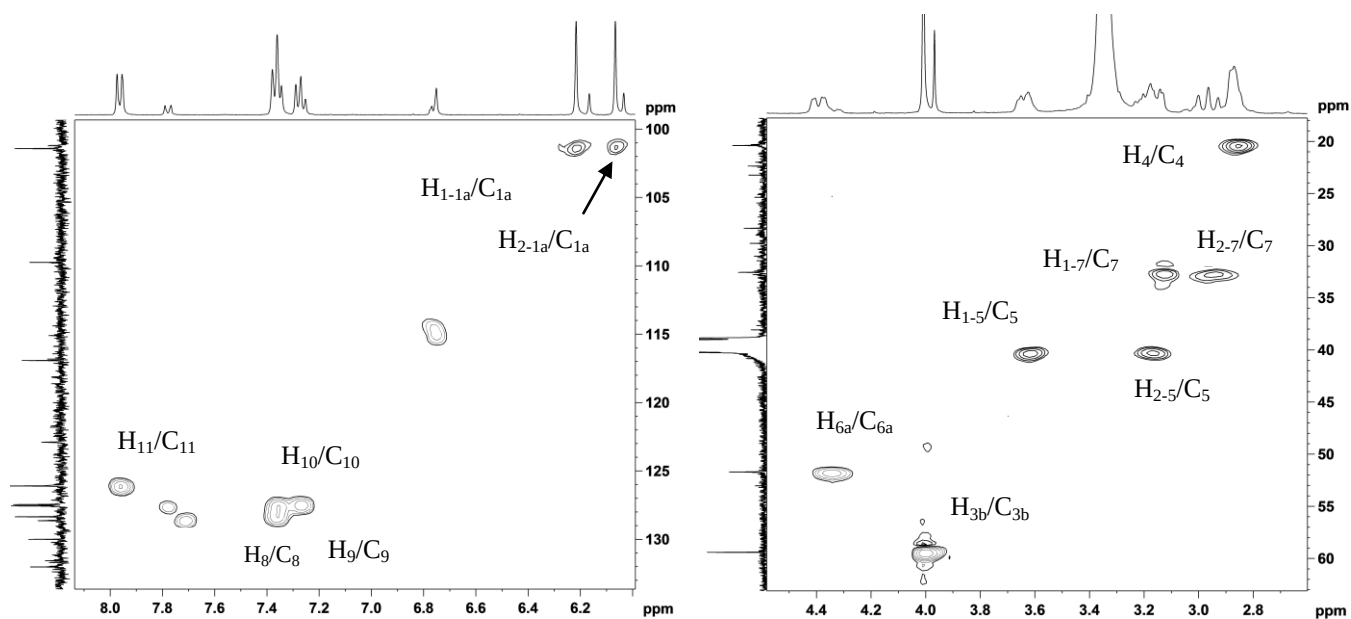
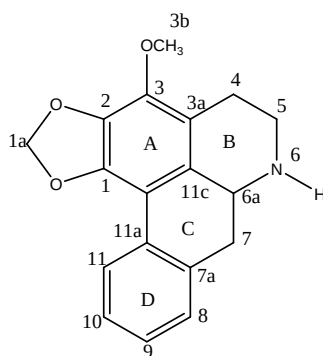


Figura 3.19 – Expansões do mapa de contornos HSQC de ACF-2 (400 MHz, DMSO- d_6).

O HMBC (Figura 3.20) foi indispensável para as atribuições inequívocas de H-3b, H-1a, C-1, C-2, C-3, C-3b e C-1a como são descritos na Tabela 3.3 (pág. 61).

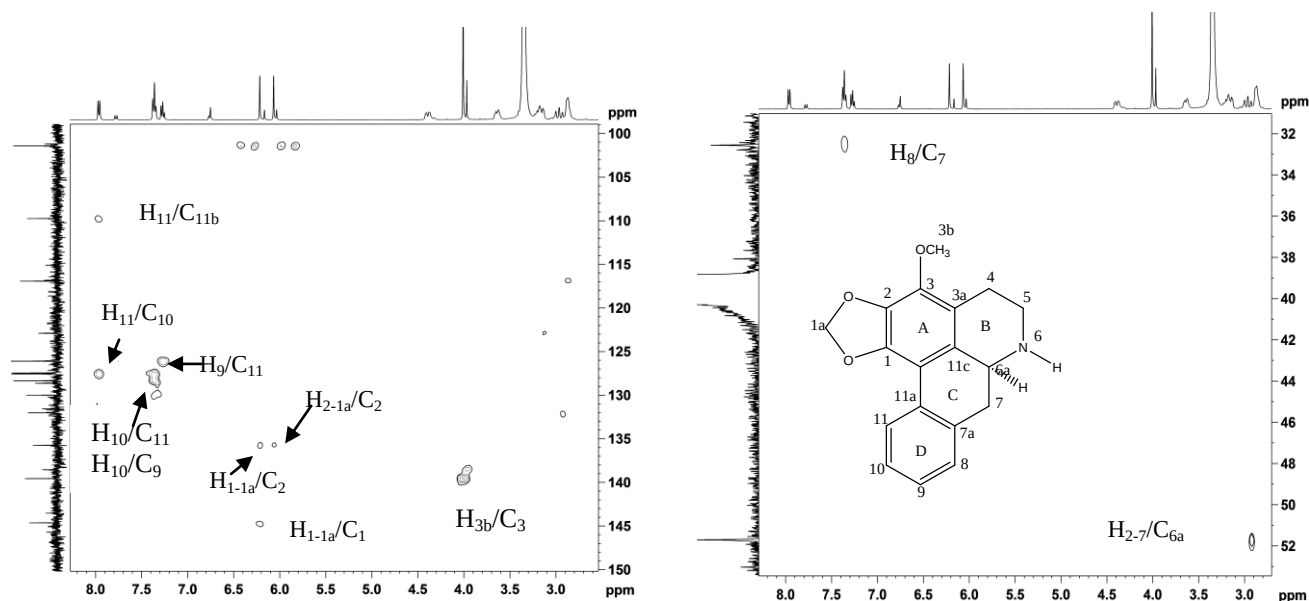


Figura 3.20 – Expansões do mapa de contornos HMBC de ACF-2 (400 MHz, DMSO- d_6).

O valor da rotação óptica específica, $[\alpha]_D$, encontrada para a norestefalagina foi de -1,5, o que caracteriza a configuração do hidrogênio 6a como estando para trás.

Esta é a primeira vez que se relata o isolamento e a caracterização do alcaloide norestefalagina a partir das folhas de *A. crassiflora* e no gênero *Annona*.

3.2.3 ACF-3

ACF-3 (28 mg) apresentou-se como um sólido alaranjado escuro. A análise por CCDS indicou tratar-se de um flavan-3-ol, devido ao desenvolvimento de cor vermelho intenso após borrifação com vanilina/H₂SO₄ e aquecimento (WAGNER *et al.*, 1984). A avaliação da amostra por CLAE em fase reversa acoplada ao arranjo de diodos (Capítulo 2, pág. 25) indicou a presença de compostos fenólicos pelos espectros no UV obtidos.

O cromatograma obtido (Figura 3.21-a) apresentou um pico relativo à constituinte com tempo de retenção de 5,1 minutos com absorções máximas em λ 210 e 279 nm, este último característico de flavan-3-ol (ANDERSEN e MARKHAM; 2005).

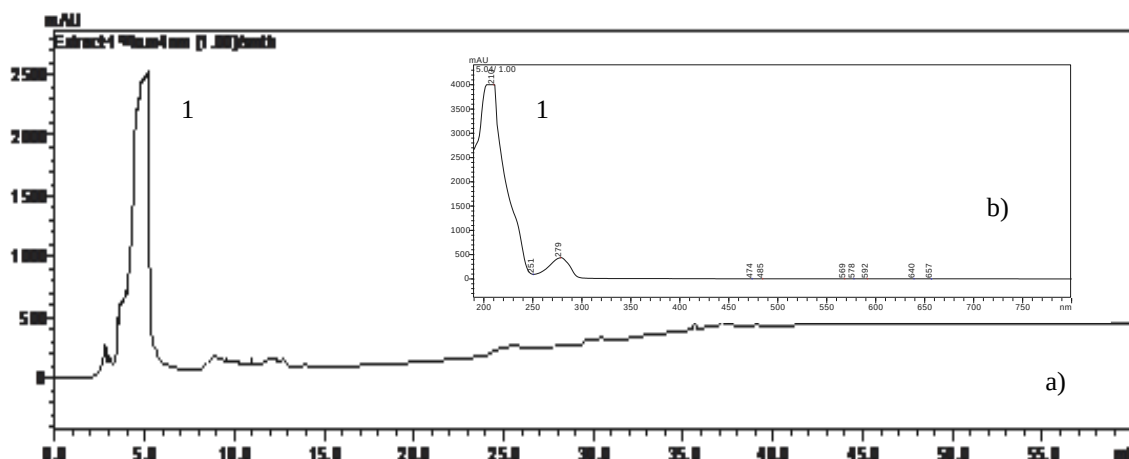


Figura 3.21 –a) Cromatograma obtido por CLAE em fase reversa; b) Espectro no UV - de ACF-3. (Condições de análise: capítulo 2, pág. 25).

Para a determinação estrutural, inicialmente alguns sinais dos espectros de RMN de ¹H (Figura 3.23, pág. 65) e de ¹³C (Figura 3.24, pág. 66) foram assinalados por comparação com dados da literatura (AGRAWAL, 1989). Dentre estes, os sinais em δ 5,90 (H-6) e δ 5,73 (H-8) atestaram o padrão de substituição do anel A pelo valor da constante de acoplamento meta de 2,0 Hz. Os sinais em δ 6,64 (H-5') e δ 6,69 (H-6') provaram o padrão de substituição do anel B pelo valor da constante de acoplamento *orto* de 8,9 Hz. A Figura 3.22 (pág. 65) corresponde à estrutura de ACF-3. A Tabela 3.4 (pág. 67) mostra os valores dos sinais de hidrogênio e suas correlações.

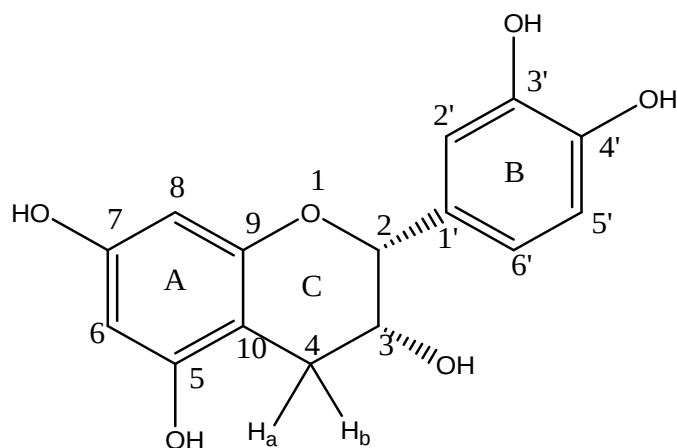
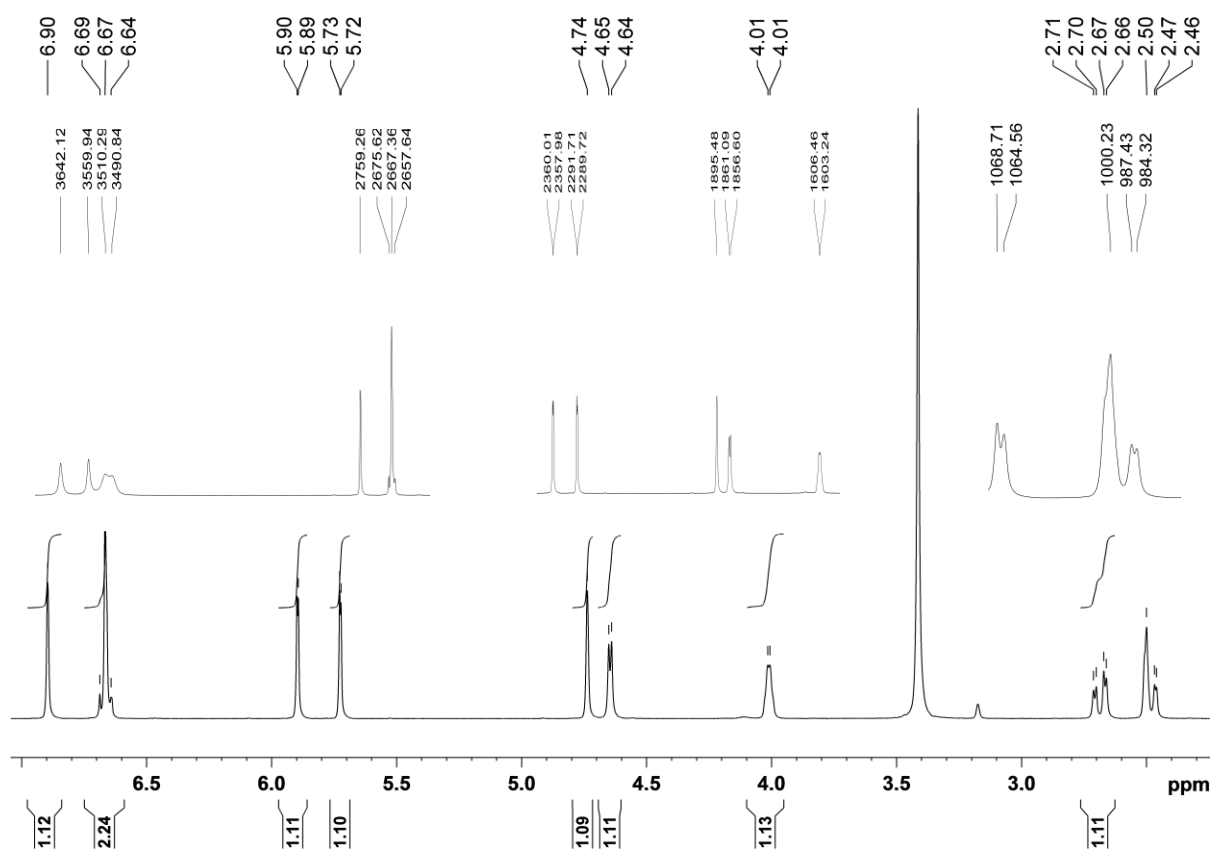


Figura 3.22 – Estrutura química de ACF-3.

Figura 3.23 - Espectro de RMN de ¹H de ACF-3 (400 MHz, DMSO-*d*₆).

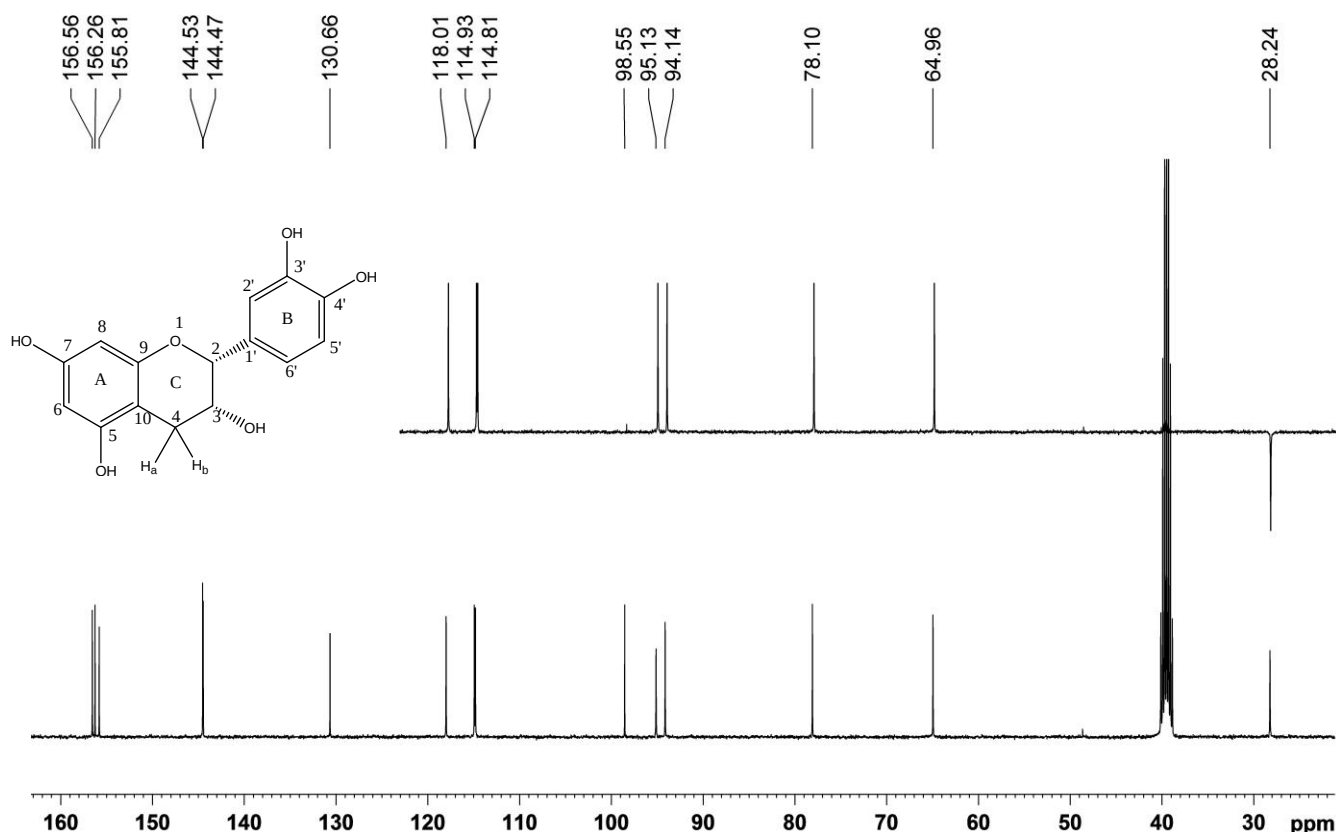


Figura 3.24 – Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 (100 MHz, $\text{DMSO-}d_6$) de ACF-3.

Como pode ser observado no espectro de RMN de ^1H , os sinais de H-4a,b são dupletos duplos com constantes de acoplamento 16,35 Hz (geminada) e 4,40 Hz e 3,11 Hz (vicinais, $H_{4ab,3}$) (Tabela 3.4, pág. 67). Como os valores das constantes vicinais são baixos, esses hidrogênios estão em relações *sin-clinais* e *anti-clinais*. Por outro lado H-2 é um simpleto largo, o que o coloca em relação *sin-clinal* com H-3. Estes fatos definem as configurações relativas de C-2 e C-3 como sendo S para ambos. (PESSUTO *et al.*, 2009).

A medida do poder rotatório específico, $[\alpha]_D$, de valor $-19,3^\circ$, comprovou que ACF-3 se trata da (-)-epicatequina, dando suporte as configurações propostas pela análise de RMN.

A análise do espectro de RMN de ^{13}C e do subespectro DEPT135 (Figura 3.24) indicou a presença de 15 carbonos, todos característicos de compostos fenólicos. No subespectro DEPT 135, é registrado um sinal em δ 28,24 devido à presença de um carbono metilênico, 7 sinais referentes a carbonos ligados a apenas um hidrogênio e os outros são relativos a carbonos não hidrogenados.

Tabela 3.4 – Sinais dos hidrogênios de ACF-3 e suas correlações.

δ (ppm)	H _i	J / Hz	COSY	C _i (HSQC)	C _i (HMBC)	C _i (Agrawal,1989)
6,90	H-2'	Simpleto	4,74 (H-2)	C-2' (114,81)	C-6' (118,01) C-3' (144,47) C-4' (144,53) C-2 (78,10) C-1' (130,66)	C-2' (115,0)
6,69	H-6'	8,90	4,74 (H-2)	C-6' (118,01)	C-2' (114,81) C-1' (130,66) C-3' (144,47) C-4' (144,53) C-2 (78,10)	C-6' (118,1)
6,64	H-5'	8,90	-	C-5' (114,93)	C-2' (114,81) C-1' (130,66) C-3' (144,47) C-4' (144,53) C-2 (78,10)	C-5' (115,0)
5,90	H-6	2,00	2,70 e 2,47 (H-4)	C-6 (95,13)	C-5 (156,26) C-7 (156,56)	C-6 (95,3)
5,73	H-8	2,00	4,74 (H-2)	C-8 (94,14)	C-7 (156,56) C-9 (155,81)	C-8 (94,4)
4,74	H-2	Simpleto largo	4,01 (H-3) 2,70 (H-4 _a) e 2,47 (H-4 _b)	C-2 (78,10)	C-2' (114,81) C-6' (118,01) C-1' (130,66) C-9 (155,81) C-4 (28,24)	C-2 (78,1)
4,01	H-3	3,22	4,74 (H-2) 2,70 e 2,47 (H-4)	C-3 (64,96)	-	C-3 (65,1)
2,70	H _a -4	4,40 e 16,35	4,74 (H-2) 4,01 (H-3) 5,90 (H-6)	C-4 (28,24)	C-10 (98,55)	C-4 (28,0)
2,47	H _b -4	3,11 e 16,35	4,74 (H-2) 4,01 (H-3) 5,90 (H-6)	C-4(28,24)	C-2 (78,10) C-3 (64,96) C-5 (156,26)	C-4 (28,0)

Os sinais dos carbonos não hydrogenados foram atribuídos de acordo com a literatura (AGRAWAL, 1989) e confirmados pelo mapa de contornos HMBC, são eles: C-5 (156,26), C-7 (156,56), C-9 (155,81), C-10 (98,55), C-3' (144,47) e C-4' (144,53).

A Tabela 3.4 (pág. 67), coluna 5 contém os assinalamentos inequívocos dos sinais dos carbonos que foram baseados em experimento de RMN bidimensional.

No mapa de contornos COSY (Figura 3.25), o sinal em δ 4,74 (H-2), mostrou correlação com o sinal em δ 4,01 que foi atribuído a H-3. A análise das correlações encontra-se na Tabela 3.4 (pág. 67) e no mapa de contornos COSY (Figura 3.25).

Pelo experimento HSQC (Figura 3.26, pág.69) foi possível a atribuição do sinal de C-2 em δ 78,10 pela sua correlação com o sinal de hidrogênio em δ 4,74 (H-2). As demais correlações são relatadas na Tabela 3.4 (pág. 67).

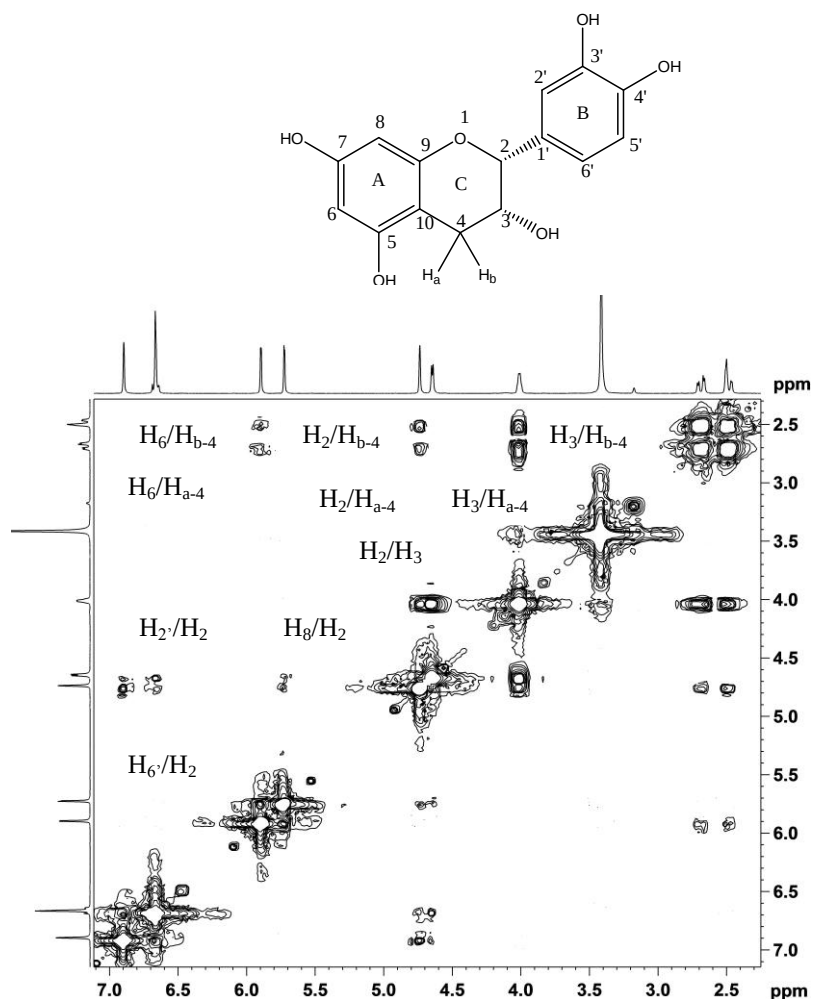


Figura 3.25 - Mapa de contornos COSY de ACF-3 (400 MHz, DMSO-*d*₆)

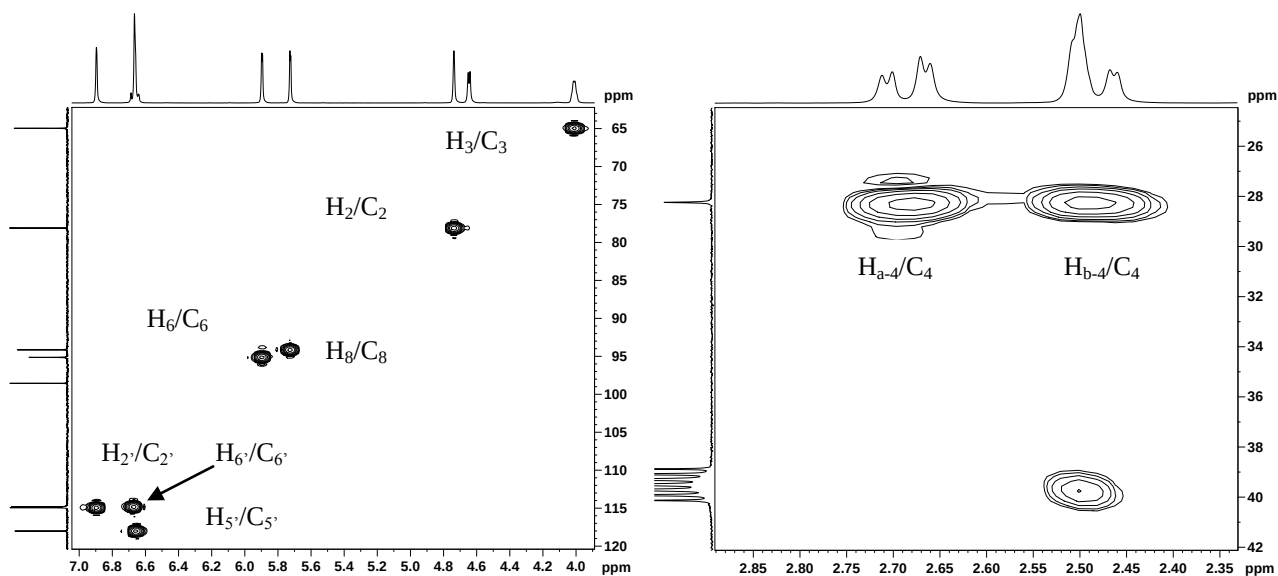


Figura 3.26 – Expansões do mapa de contornos HSQC de ACF-3 (400 MHz, DMSO- d_6).

O HMBC (Figura 3.27) foi indispensável para as atribuições inequívocas de H-2, H-6, H-8, C-1', C-2, C-3, C-6 e C-8 como são descritos na Tabela 3.4 (pág. 67).

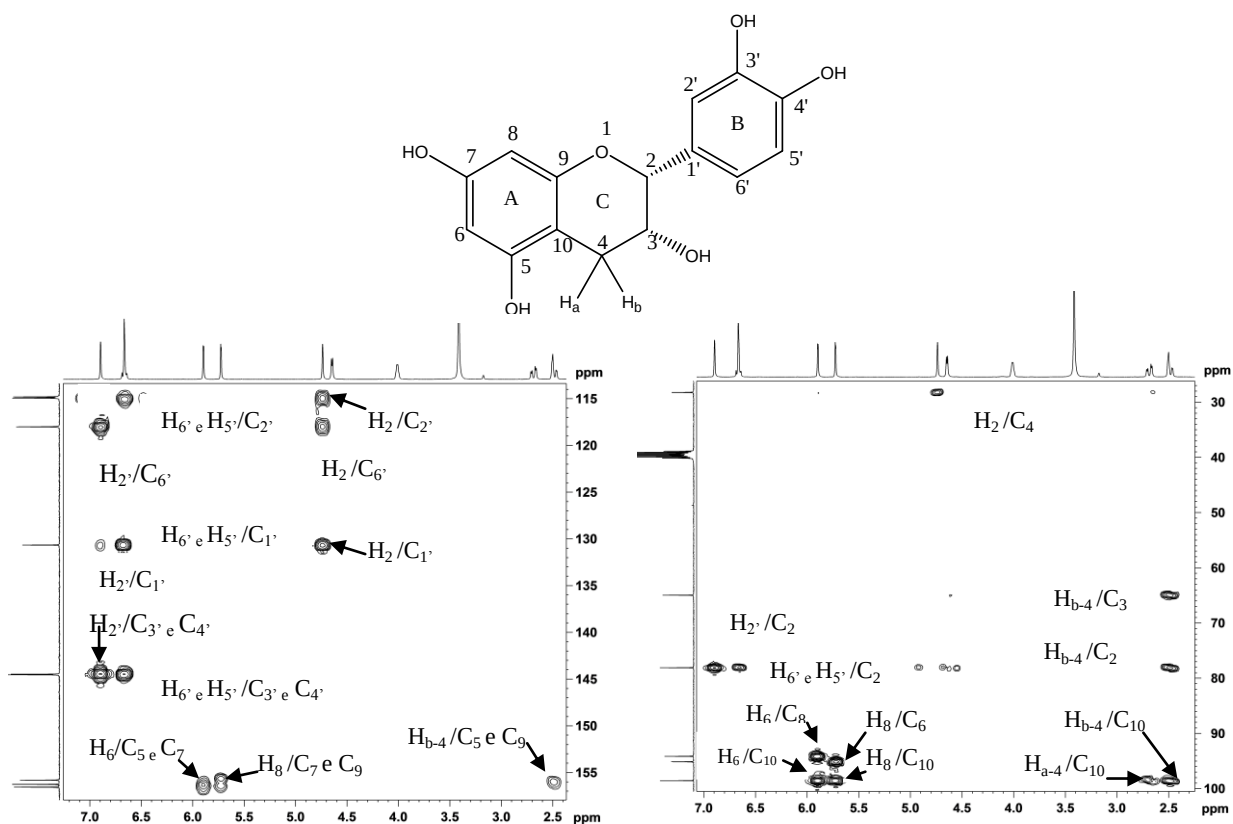


Figura 3.27 – Expansões do mapa de contornos HMBC de ACF-3 (400 MHz, DMSO- d_6).

A medida do poder rotatório específico, $[\alpha]_D$, de valor -19,3 comprovou que ACF-3 se trata da (-)-epicatequina, dando suporte as configurações propostas pela análise de RMN.

Esta é a primeira vez que se relata o isolamento e a caracterização da (-)-epicatequina a partir das folhas de *A. crassiflora*.

A presença da (-)-epicatequina foi detectada também nas frações P05 sol1, P05 sob e P06.

3.2.4 ACF-4

ACF-4 (13,0 mg) apresentou-se como um sólido, com cristais bem definidos de cor amarela. A análise por CCDS indicou tratar-se de um flavonoide, devido ao desenvolvimento de fluorescência alaranjada após borrifação da placa com NP/PEG, específico para a detecção de flavonoides e outros compostos fenólicos, pois compostos fenólicos quando em contato com o NP (difetilboriloxietilamina) formam complexos derivados fluorescentes, como mostrado na Figura 3.2 (pág. 48). A avaliação da amostra por CLAE em fase reversa (Capítulo 2, pág. 25) acoplada ao arranjo de diodos indicou a presença de flavonoides pelos espectros no UV obtidos.

O cromatograma obtido (Figura 3.28) apresentou um pico relativo à constituinte com tempo de retenção de 21,2 minutos, que no UV apresentou absorções máximas em λ 209, 255 e 354 nm, característicos de substâncias fenólicas.

A absorção em λ 255 nm é característica do anel B e a absorção em λ 354 nm é referente ao anel A do flavonoide. Estas absorções (λ 255 e 354 nm) também caracterizam ACF-4 como sendo pertencente à classe dos flavonóis (ANDERSEN e MARKHAM; 2005).

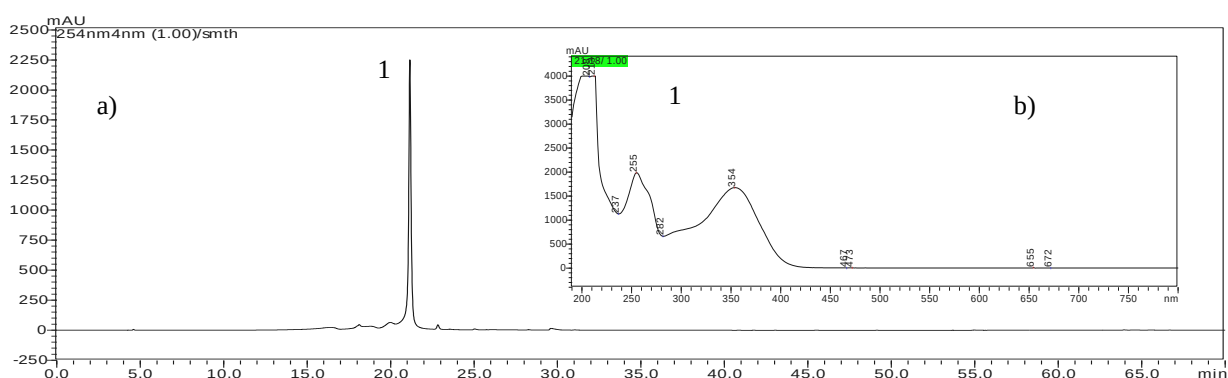


Figura 3.28 – a) Cromatograma obtido de CLAE em fase reversa; b) Espectro no UV- de ACF-4. (Condições de análise: capítulo 2, página 25).

A Figura 3.29 mostra o espectro no infravermelho de ACF-4 com as atribuições das principais absorções. A presença de hidroxilas fenólicas e alcoólicas é sugerida pelas bandas intensas em 3422, 1288 e 1064 cm^{-1} (BARBOSA, 2007). Os sinais em 3422, 1364, 1288, 1202 e 1064 cm^{-1} sugeriram a presença de açúcar na molécula (SILVA, 2006).

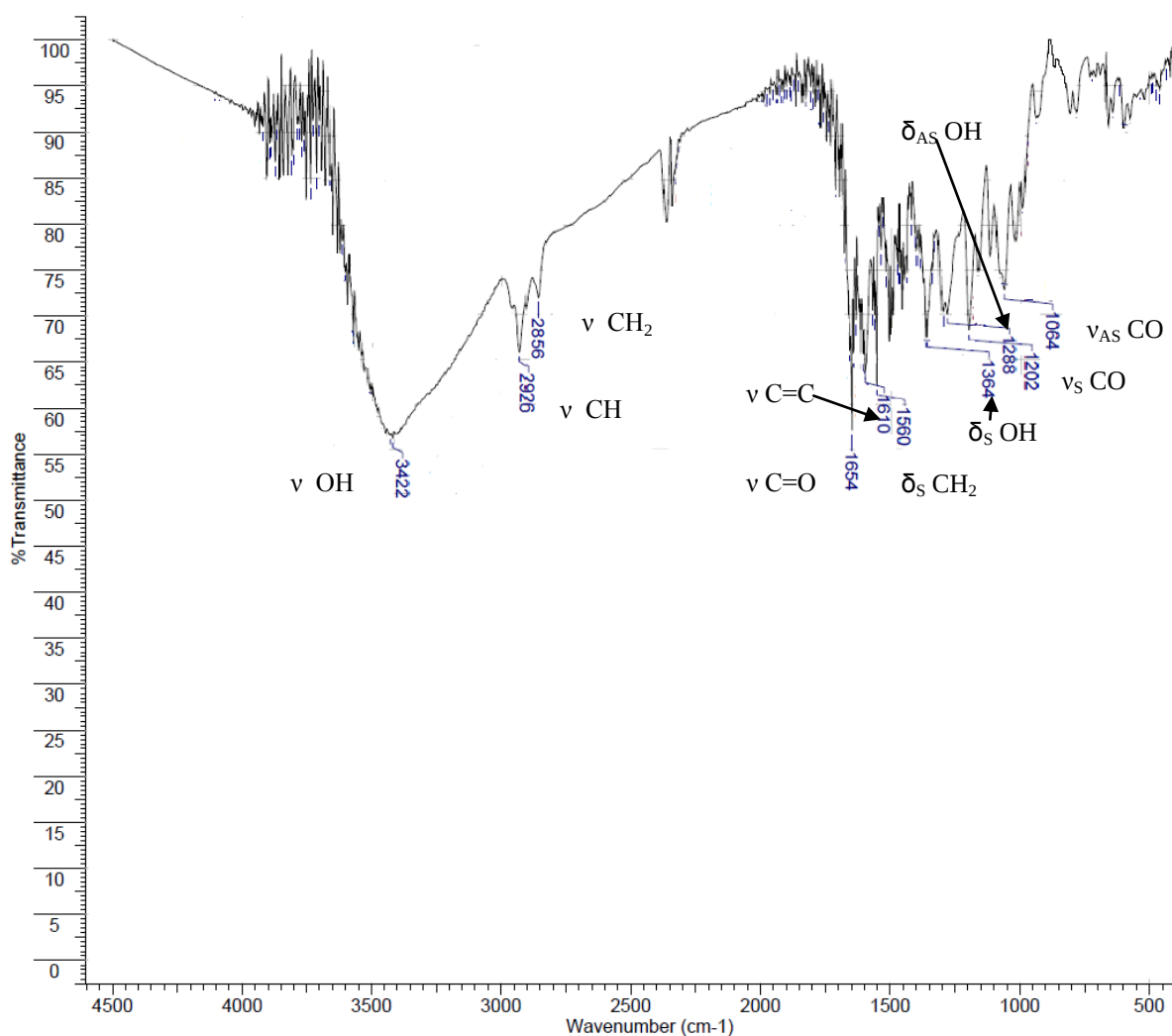


Figura 3.29 – Espectro no Infravermelho de ACF-4.

Para a determinação estrutural, inicialmente alguns sinais dos espectros de RMN de ^1H (Figura 3.31, pág. 73) e de ^{13}C (Figura 3.32, pág. 76) foram assinalados por comparação com dados da literatura (TENG *et al.*, 2002, AGRAWAL, 1989). Dentre estes, os sinais em δ 6,19 (H-6) e δ 6,38 (H-8) atestaram o padrão de substituição do anel A pelo valor da constante de acoplamento meta de 1,98 Hz. Os sinais em δ 6,88 (H-5') e δ 7,57 (H-6') provaram o padrão de substituição do anel B

pelo valor da constante de acoplamento *orto* de 8,49 Hz. Estes dados sugeriram a presença da genina quercetina na molécula. A Figura 3.30 corresponde à estrutura da genina do flavonoide ACF-4. A Tabela 3.5 (pág. 74) mostra os valores dos sinais de hidrogênio da genina e suas correlações.

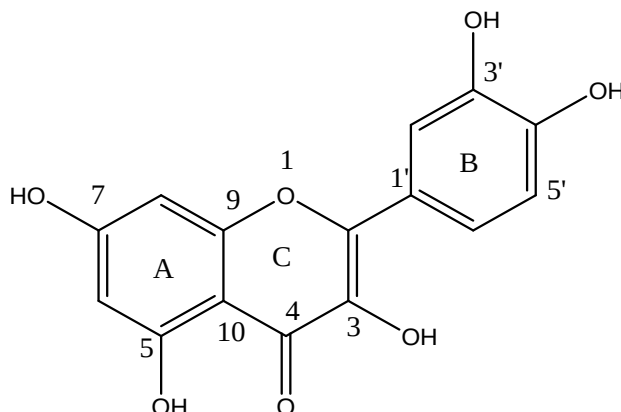


Figura 3.30 – Estrutura química da genina de ACF-4.

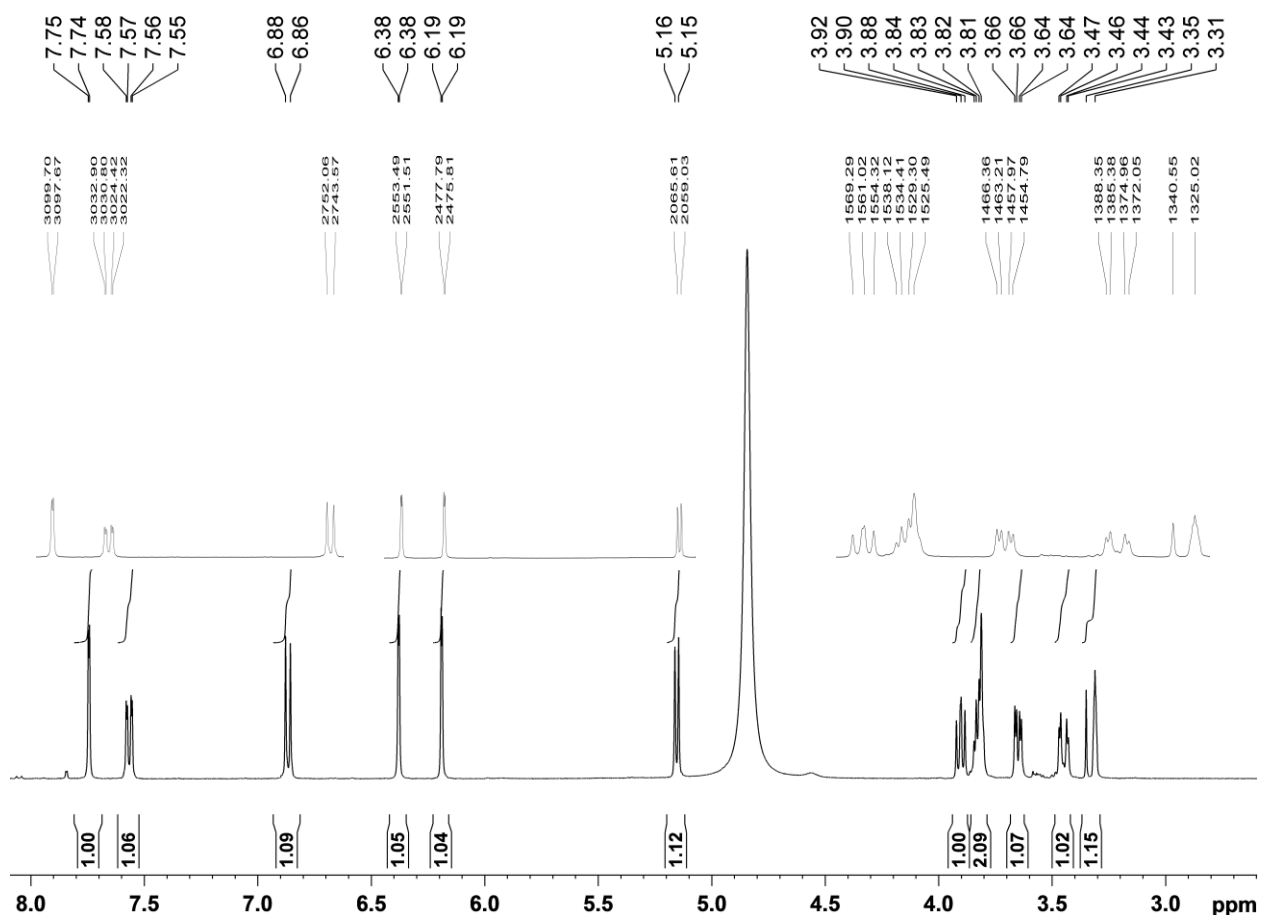


Figura 3.31 – Espectro de RMN de ^1H de ACF-4 (400 MHz, $\text{MeOH-}d_4$).

Tabela 3.5 – Sinais dos hidrogênios da genina de ACF-4 e suas correlações.

δ (ppm)	H _i	<i>J</i> / Hz	COSY	C _i (HSQC)	C _i (HMBC)	C _i (Agrawal, 1989)
7,75	H-2'	2,03	6,88 (H-6')	C-2' (117,63)	C-2(158,83) C-4'(150,08) C-3'(146,09) C-1'(123,04)	C-2'(117,5)
7,57	H-6'	8,49 e 2,10	6,88 (H-5')	C-6' (123,19)	C-2(158,83) C-4'(150,08) C-3'(146,09) C-2'(117,63)	C-6'(123,1)
6,88	H-5'	8,49	7,57 (H-6')	C-5' (116,31)	C-4'(150,08) C-3'(146,09) C-6'(123,19)	C-5'(116,3)
6,38	H-8	1,98	6,19 (H-6)	C-8 (94,86)	C-10(105,78) C-9(158,53) C-7(166,12) C-6(100,02)	C-8(95,0)
6,19	H-6	1,98	6,38 (H-8)	C-6 (100,02)	C-5(163,15) C-7(166,12) C-8 (94,86) C-10(105,78)	C-6(100,0)

O espectro de RMN de ^1H exibiu sinais na região de 3,2 a 5,2 ppm onde foram visíveis o registro de sinais proporcionais a 6 hidrogênios, característicos de açúcares. Esse fato é indicativo da presença de uma unidade de açúcar o que foi confirmado pelo registro de 5 sinais típicos de açúcar no espectro de RMN de ^{13}C (TENG, 2002). Esses 6 sinais estão assinalados na Tabela 3.6 (pág. 75) que contém também os valores das constantes de acoplamento.

Tabela 3.6 – Sinais dos hidrogênios do açúcar de ACF-4 e suas correlações.

δ (ppm)	H _i	<i>J</i> / Hz	COSY	C _i (HSQC)	C _i (HMBC)	C _i (Agrawal, 1989)
5,16	H-1''	6,58	3,90 (H-2'')	C-1''(104,83)	C-3(135,81) C-5''(67,10) C-3''(74,29)	C-1''(104,6)
3,90	H-2''	7,48	3,66 (H-3'')	C-2'' (73,04)	C-1''(104,83) C-3''(74,29)	C-2''(73,2)
3,84	H-5'' _{equatorial}	5,71	3,46 (H-5'' _{ax})	C-5'' (67,10)	C-1''(104,83) C-3''(74,29) C-4''(69,26)	C-5''(67,0)
3,82	H-4''	3,81	3,46 (H-5'' _{ax})	C-4'' (69,26)	C-2''(73,04) C-3''(74,29) C-5''(67,10)	C-4''(69,1)
3,66	H-3''	8,40 e 3,16	3,90 (H-2'')	C-3'' (74,29)	C-1'' (104,83) C-2'' (73,04) C-4''(69,26)	C-3''(74,1)
3,46	H-5'' _{axial}	13,35 e 2,91	3,82 (H-4'')	C-5'' (67,10)	C-1'' (104,83) C-3'' (74,29) C-4'' (69,26)	C-5''(67,0)

A análise do espectro de RMN de ¹³C e do subespectro DEPT135 (Figura 3.32, pág. 76) indicou a presença de 20 carbonos, sendo 15 carbonos característicos de flavonoides e os outros 5 restantes, evidenciou a natureza sacarídica da molécula. O subespectro DEPT 135 apresentou 10 sinais, o sinal em δ 67,10 é devido à presença de um carbono metilênico os outros 9 sinais são de carbonos ligados a apenas um hidrogênio.

O sinal em δ 5,16 foi atribuído ao hidrogênio anomérico do açúcar ligado à genina (H-1''), pois o mesmo exibiu no mapa de contornos HMBC (Figura 3.35, pág 78) uma correlação com o carbono em δ 135,81 (C-3).

A configuração da ligação do açúcar ligado à genina foi feita através da constante de acoplamento do hidrogênio anomérico. A constante encontrada foi de 6,58 Hz, constante que caracteriza uma ligação alfa (α).

Os sinais dos carbonos não hidrogenados foram atribuídos de acordo com a

literatura (AGRAWAL, 1989) e confirmados pelo mapa de contornos HMBC, sendo eles: C-2 (158,83), C-3 (135,81), C-4 (179,60), C-5 (163,15), C-7 (166,12), C-9 (158,53), C-10 (105,78), C-1' (123,04), C-3' (146,09) e C-4' (150,08).

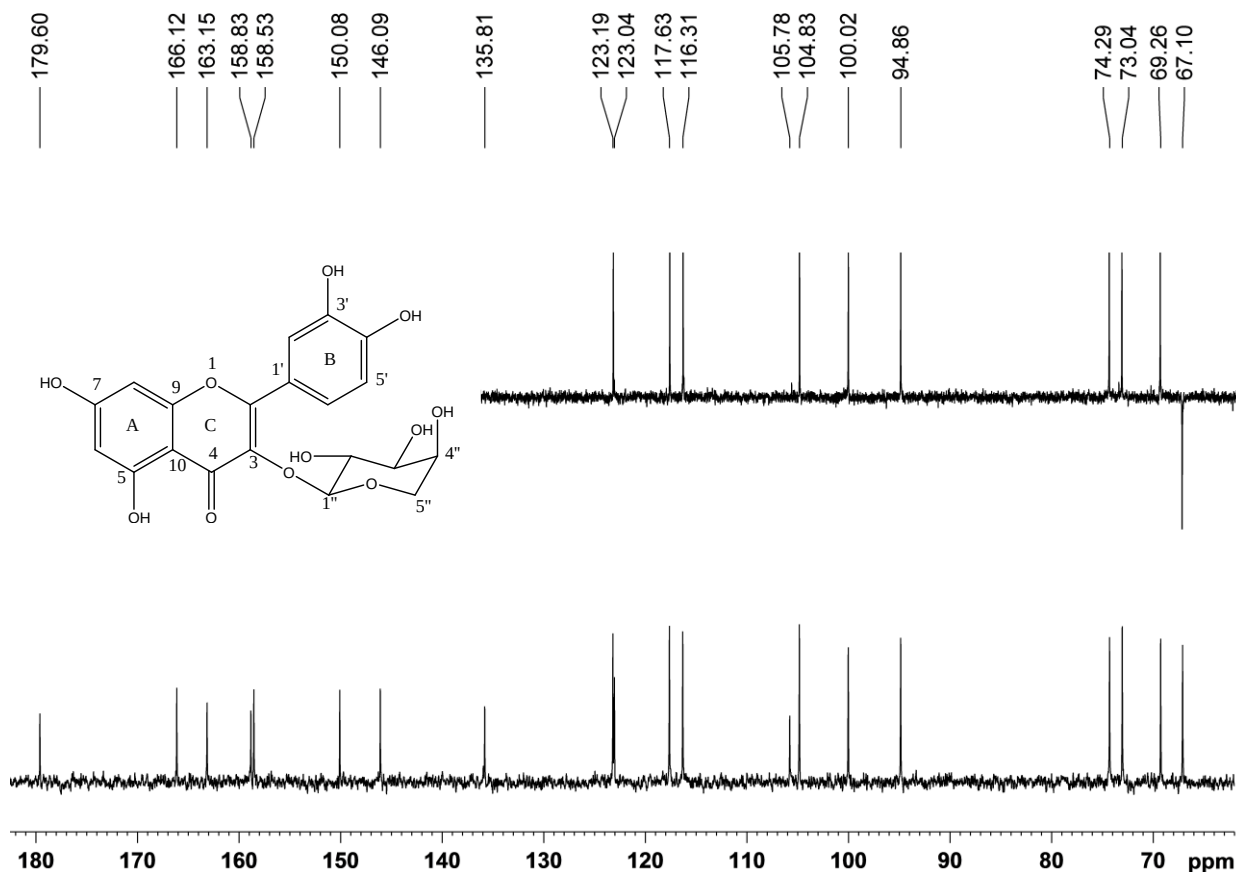


Figura 3.32 - Espectro de RMN de ^{13}C e subespectro DEPT135 (100 MHz, $\text{MeOH-}d_4$) de ACF-4.

As Tabelas 3.5 (pág. 74) e 3.6 (pág. 75), coluna 5 contém os assinalamentos inequívocos dos sinais dos carbonos que foram baseados em experimento de RMN bidimensional.

No mapa de contornos COSY (Figura 3.33, pág. 77), o sinal em δ 6,88 (H-5'), mostrou correlação com o sinal em δ 7,57 que foi atribuído a H-6'. A análise das correlações encontra-se nas Tabelas 3.5 e 3.6 (páginas 74 e 75) e no mapa de contornos COSY (Figura 3.33, pág.77).

Pelo experimento HSQC (Figura 3.34, pág.77) foi possível a atribuição do sinal de C-5' em δ 116,31 pela sua correlação com o sinal de hidrogênio em δ 6,88 (H-5'). As demais correlações são relatadas nas Tabelas 3.5 e 3.6 (páginas 74 e 75).

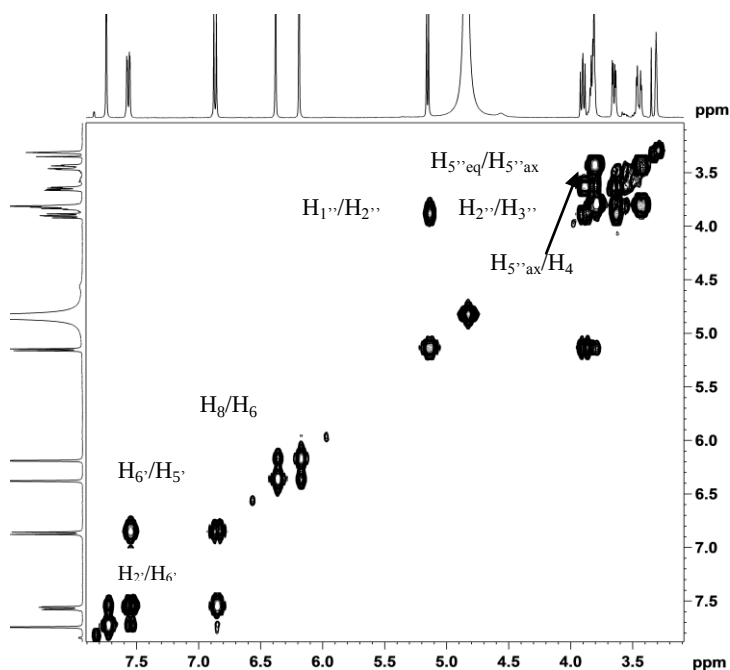


Figura 3.33 – Mapa de contornos COSY de ACF-4 (400 MHz, MeOH- d_4)

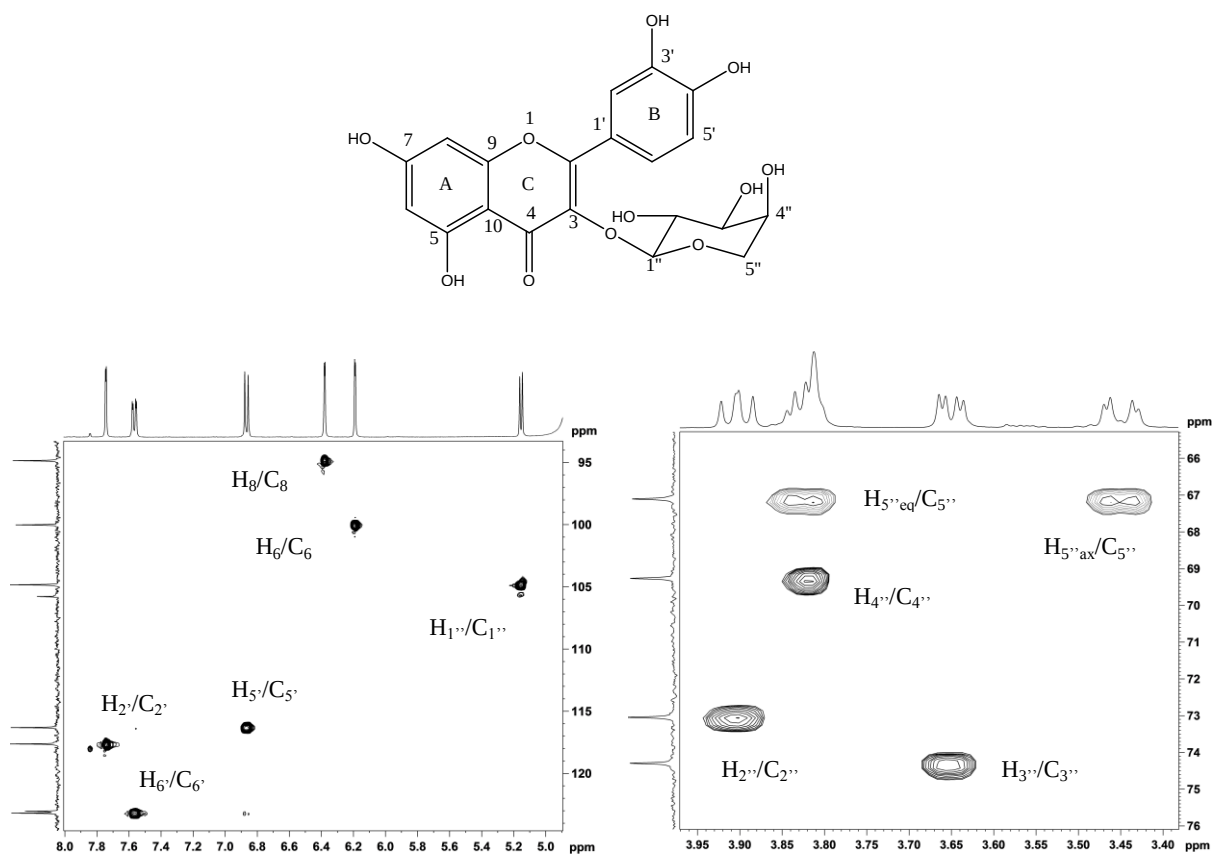


Figura 3.34 – Expansões do mapa de contornos HSQC de ACF-4 (400 MHz, MeOH- d_4).

O HMBC (Figura 3.35) foi indispensável para as atribuições inequívocas de H-1'', H-5', H-6', C-3, C-2, C-9 e C-5 como são descritos nas Tabelas 3.5 e 3.6 (páginas 74 e 75).

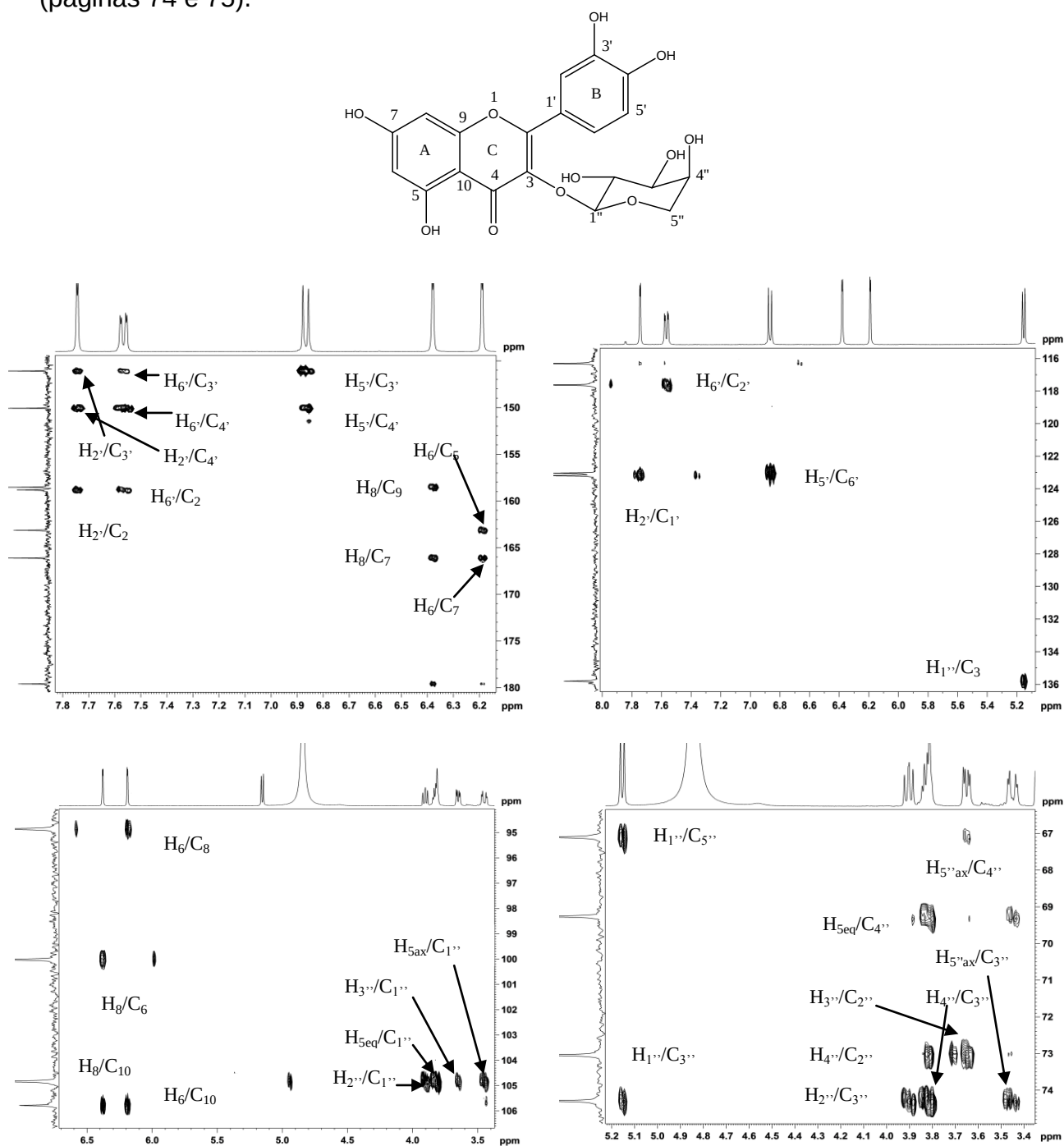


Figura 3.35 – Expansões do mapa de contornos HMBC de ACF-4 (400 MHz, MeOH-*d*₄).

Após todas as análises e confirmações pode-se concluir que a molécula era um glicosídeo ligado a um açúcar de nome quercetina 3-O- α -L-arabinopiranosídeo, como mostrado na Figura 3.36.

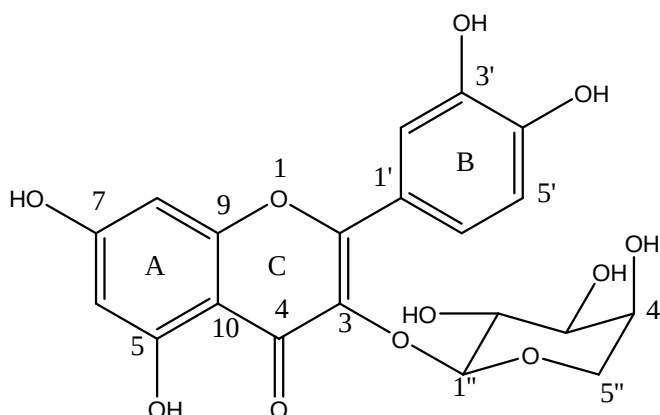


Figura 3.36 – Estrutura química de ACF-4.

Pelo espectro de massas (Figura 3.37) pode-se confirmar a massa molar da molécula, que é igual a 434 g/mol. Como os flavonoides possuem hidrogênios ácidos que saem facilmente, o íon registrado $[M-H]$ é o 433 g/mol, que é o pico com maior intensidade mostrado no espectro. O pico com massa/carga 866,89 provavelmente deve-se a junção de duas moléculas de quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo.

2negativo[1] #1 RT: 0,00 AV: 1 NL: 2,20E4
T: ITMS - c ESI Full ms [150,00-1000,00]

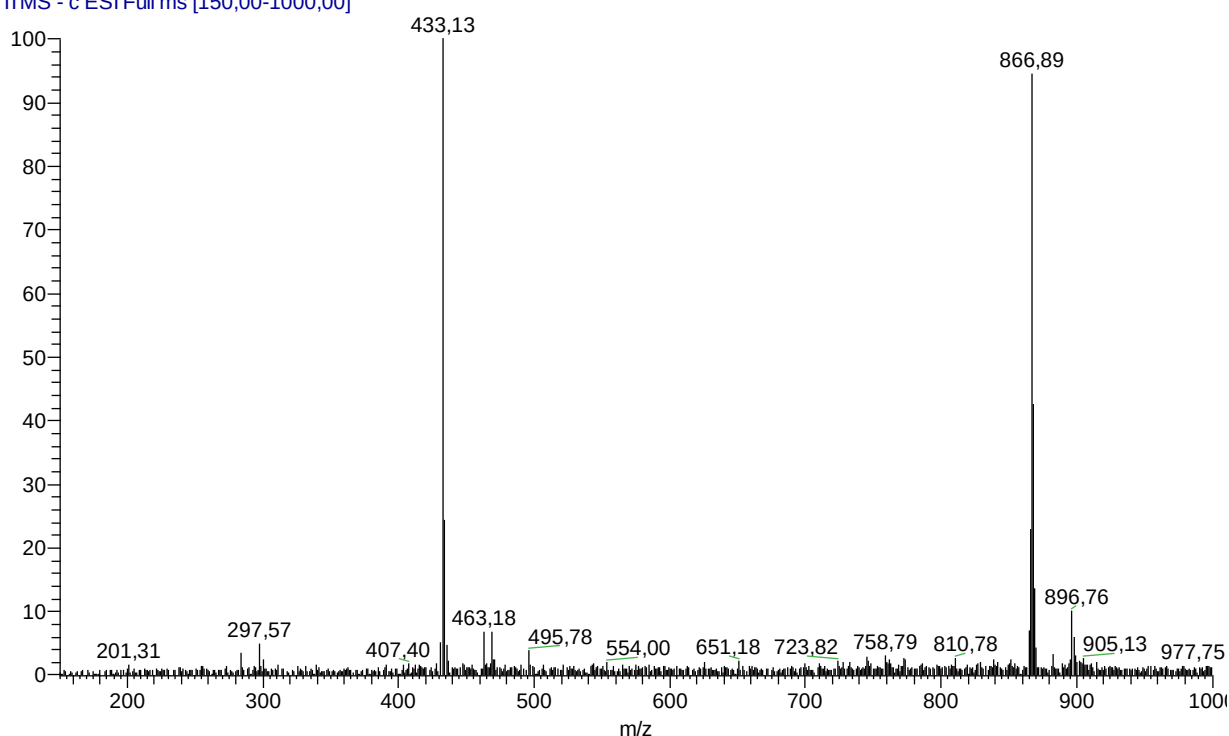


Figura 3.37 – Espectro de massas $[(-)\text{-ESI/EM}]$ de ACF-4.

Esta é a primeira vez que se relata o isolamento e a caracterização deste flavonoide a partir das folhas de *A. crassiflora*, no gênero *Annona* e na família *Annonaceae*.

A presença de quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo foi detectada também nas frações P07, P07, P08 e P09.

Os derivados de quercetina descritos neste trabalho, quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil(1 $\rightarrow$ 6)-O- α -L-arabinopiranosídeo e quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo são os primeiros descritos inequivocamente no gênero *Annona* e na família *Annonaceae*.

CAPÍTULO 4 – ESTUDO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

4.1 – Introdução Geral

O estudo da atividade biológica do extrato etanólico bruto, da fração hidroalcoólica das folhas de *Annona crassiflora* e de substâncias isoladas foi direcionado para testes em que extratos de espécies da família Anonaceae e substâncias isoladas apresentaram atividade. O estudo da atividade biológica realizado neste trabalho compreende:

- Estudo da atividade antioxidante,
- Estudo da atividade larvicide sobre *Artemia salina* e,
- Estudo da atividade antimicrobiana (bactérias e fungo).

4.1.1 – Atividade Antioxidante

4.1.1.1 – Introdução

Espécies reativas de oxigênio (EROs), são formadas nas células, como consequência de reações bioquímicas oxidativas. Esses radicais desempenham papéis importantes no organismo, atuando na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular e sinalização intercelular, e na síntese de compostos biologicamente importantes. No entanto, EROs podem ser danosas se sua produção for excessiva sob condições anormais (inflamações, fatores externos), causando danos em membranas lipídicas, inativação de enzimas e proteínas e danos no DNA (PIETTA, 2000). Esses danos podem estar relacionados na etiologia de diversas doenças humanas, como envelhecimento precoce, doenças cardíacas, inflamação, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer) e câncer (PIETTA, 2000; RUSSO *et al.*, 2002). O organismo humano possui substâncias antioxidantes endógenas (ex. Se-glutationa peroxidase, catalase e superóxido dismutase), porém quando estas não são capazes de conter a produção excessiva de EROs, o uso de

antioxidantes exógenos através da dieta se faz necessário (SELLÉS e GARRIDO, 2010).

Antioxidantes são substâncias que, em concentrações menores que a do substrato oxidável, inibem significativamente a oxidação, adiando seu início ou reduzindo sua taxa (NAWAR, 1996; SIES, 1997; SILVA et al., 1999). Essas substâncias fazem parte do sistema de defesa dos organismos vivos, com ação intracelular e extracelular, em meio hidrofílico e hidrofóbico, sendo produzidos pelo organismo ou obtidos da dieta. Podem estar presentes no alimento, ou serem adicionados para aumentar a vida de prateleira (KOLAKOWSKA, 2003).

Segundo ARAÚJO (2004), o efeito do antioxidante consiste na inativação de radicais livres, na complexação de íons metálicos ou na redução de hidroperóxidos para produtos incapazes de formar radicais livres.

Os antioxidantes podem atuar inibindo a auto-oxidação, a fotooxidação ou a oxidação enzimática. Na auto-oxidação podem funcionar como bloqueadores de reações em cadeia ou prevenindo as reações. Os bloqueadores de reação em cadeia são divididos em doadores e receptores de elétrons, sendo que os doadores de elétrons competem com o lipídeo pelo radical peroxil, resultando na diminuição da velocidade de reação. Os receptores competem com o oxigênio tripleto pelo radical livre, reduzindo a formação do radical peroxil (YANISHLIEVA-MASLAROVA, 2001; ARAÚJO, 2004).

Os antioxidantes podem ser primários e sinérgicos. Os antioxidantes primários incluem os compostos fenólicos poliidroxilados (galatos) e os fenóis com impedimento estrutural (BHA, BHT, TBHQ e tocoferóis). Atuam bloqueando a ação dos radicais livres convertendo-os em produtos estáveis, além de atuarem nas reações com radicais lipídicos (NAWAR, 1996).

Os antioxidantes sinérgicos podem atuar como removedores de oxigênio, ou como agentes complexantes. Ácido ascórbico, palmitato de ascorbila, sulfito e eritorbatos reagem com o oxigênio livre removendo-o de sistemas fechados. Ácido cítrico, EDTA e derivados do ácido fosfórico imobilizam íons metálicos, aumentando significativamente a energia de ativação de reações de oxidação (ARAÚJO, 2004).

4.1.1.2. Atividade antioxidante pelo método de descoramento do β -caroteno em CCDS

O β -caroteno (Figura 4.1) é um carotenóide que atua como antioxidante devido à presença de ligações duplas conjugadas, que são suscetíveis à oxidação sob ação de luz ou oxigênio (HARBONE, 1984).

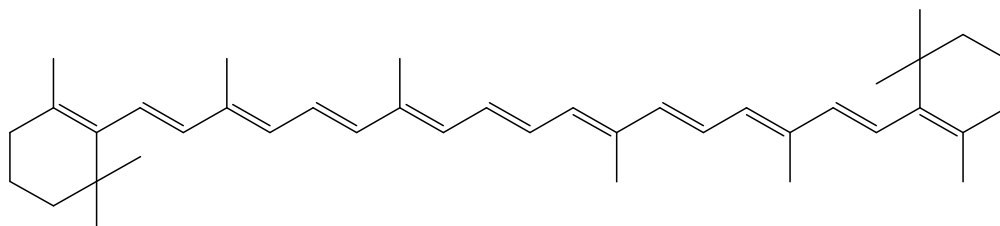


Figura 4.1 - Estrutura do β -caroteno.

A – Metodologia

O teste foi feito em placa com sílica gel 60 F254 da Fluka e desenvolvidas com sistema de solventes adequados.

As amostras testadas foram preparadas pesando-se 1,0 mg da amostra diluindo-se para 50 μ L de metanol.

Além das amostras foram aplicadas à placa: quercetina (flavonóide), α -tocoferol (vitamina E) e ácido ascórbico (vitamina C), que foram usados como padrões, por apresentarem atividade antioxidante (COUTO e CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

A solução de quercetina foi preparada adicionando 4,0 mg em 10,0 mL de metanol. Para a solução de α -tocoferol utilizou-se 20,0 mg em 5,0 mL de clorofórmio e para o ácido ascórbico, pesou-se 40,0 mg e diluiu-se em 7,0 mL de água deionizada (HUANG, 2005).

Utilizando pipetas automáticas, aplicou-se 5,0 μ L de cada amostra, inclusive dos padrões, sobre a placa.

Após a aplicação, a placa foi colocada em uma cuba cromatográfica contendo a fase móvel: acetato de etila, metanol e água/ 70:10:2, anteriormente preparada.

Depois da eluição, a placa foi visualizada sobre luz UV 254 nm e suas fluorescências marcadas. Logo após, a placa foi pulverizada com solução de β -

caroteno 0,05% em clorofórmio, e deixada sob irradiação UV (254nm), até o branqueamento total da mesma. O teste foi considerado positivo para amostras que apresentaram mancha amarela ou laranja após o branqueamento da placa.

As amostras testadas foram: ACF01F, ACF02F, ACF02F-PREC, ACF-1 (Peltatosídeo), ACF-2 (Norestefalagina), ACF-3 (Epicatequina) e ACF-4 (quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo).

A.1 – Análise dos Resultados

Usando-se uma solução de β -caroteno 0,05% em clorofórmio, borrifada sobre as placas de CCD de sílica, onde se encontravam os padrões quercetina, vitamina C, vitamina E e os extratos ACF01F, ACF02F e ACF02F-PREC e as substâncias ACF-1, ACF-2, ACF-3 e ACF-4 pode-se observar que as substâncias testadas protegem o β -caroteno contra a oxidação causada pela ação de luz ou oxigênio, através da presença de manchas que permanecem laranja (cor da solução de β -caroteno) após a exposição da placa à luz ultravioleta (UV – 254 nm) por aproximadamente 10h.

A Figura 4.2 mostra a placa após a borrifação do β -caroteno e exposição à luz ultravioleta.

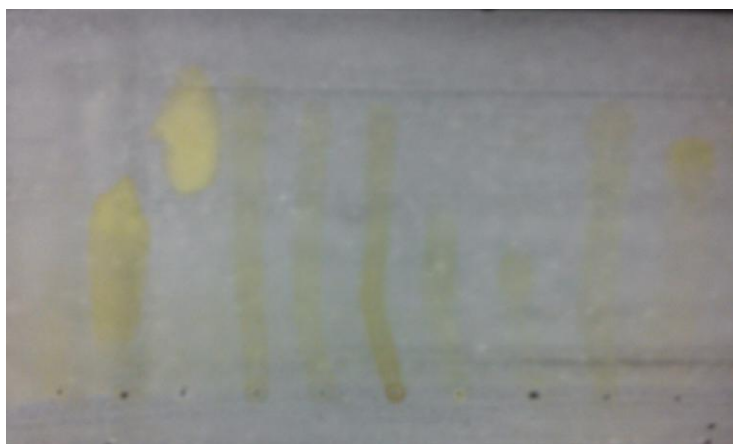


Figura 4.2 – Teste de descoramento do β -caroteno em placa de sílica. (Da esquerda para a direita: quercetina, vitamina C, α -tocoferol, ACF01F, ACF02F, ACF02F-PREC, ACF-1, ACF-2, ACF-3, ACF-4.

Todas as substâncias, frações e extratos testados apresentaram atividade antioxidante frente a método do descoramento do β -caroteno.

4.1.1.3 Atividade Antioxidante pelo método do DPPH em CCDS

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) (Figura 4.3) é um radical estável, sua cor é púrpura, mas após ser reduzido por um composto antioxidante, adquire coloração amarela, é disponível comercialmente, e muito utilizado em testes para determinar a potência antioxidante de polifenóis (HUANG *et al.*, 2005).

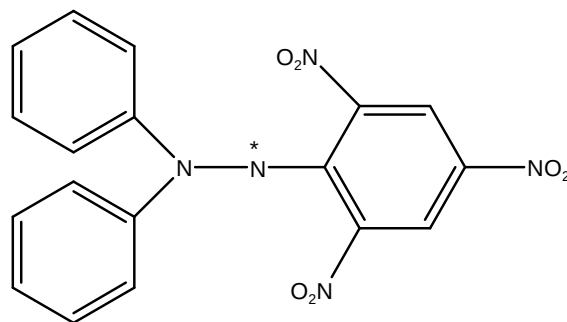


Figura 4.3 – Radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

A – Metodologia

As placas foram feitas com sílica-gel 60 F254 da Fluka e desenvolvidas com sistema de solventes adequados. Para as amostras testadas com este método utilizou-se a fase móvel: acetato de etila, metanol, água/ 60:20:5.

As amostras testadas foram preparadas pesando-se 1,0 mg e diluindo-as em 50 µL de metanol.

Além das amostras foram aplicadas à placa: ácido ascórbico (vitamina C) e rutina (flavonoide), que foram usados como padrões, pois apresentam atividade antioxidante (COUTO e CANNIATTI-BRAZACA, 2010).

A solução de rutina foi preparada adicionando 4,0 mg em 10,0 mL de metanol e para o ácido ascórbico, pesou-se 40,0 mg e diluiu-se em 7,0 mL de água deionizada.

Após a eluição da placa, esta foi visualizada sobre luz UV 254 nm e as fluorescências marcadas. Logo depois a placa foi borrifada com solução metanólica do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) na concentração de 2 mg/mL. A placa foi avaliada e foi considerada resposta positiva ao teste o aparecimento de manchas amarelas sobre o fundo roxo ou púrpura.

A.1 – Análise dos Resultados

Os extratos ACF01F, ACF02F e ACF02F-PREC e as substâncias ACF-1, ACF-2, ACF-3 e ACF-4 apresentaram atividade antioxidante frente ao descoramento do DPPH em camada delgada de sílica.

A placa de sílica com o resultado do teste (Figura 4.4) após a borrifação do DPPH é mostrada abaixo. A reação entre o radical e as amostras testadas está representada na Figura 4.5 (pág. 87). A substância reage com o radical DPPH, se oxidando e evitando que o radical cause algum dano ao organismo em que ele está presente.

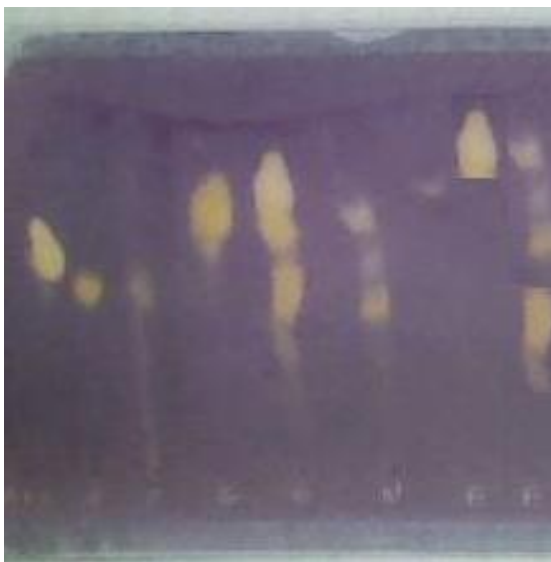


Figura 4.4 – Teste de descoramento do DPPH em placa de sílica. (Da esquerda para a direita: vitamina C, rutina, ACF-1, ACF-4, ACF02F, ACF02F-PREC, ACF-2, ACF-3, ACF01F).

A placa mostra as manchas com coloração alaranjada em um fundo púrpura, evidenciando a atividade antioxidante das substâncias, frações e extratos testados.

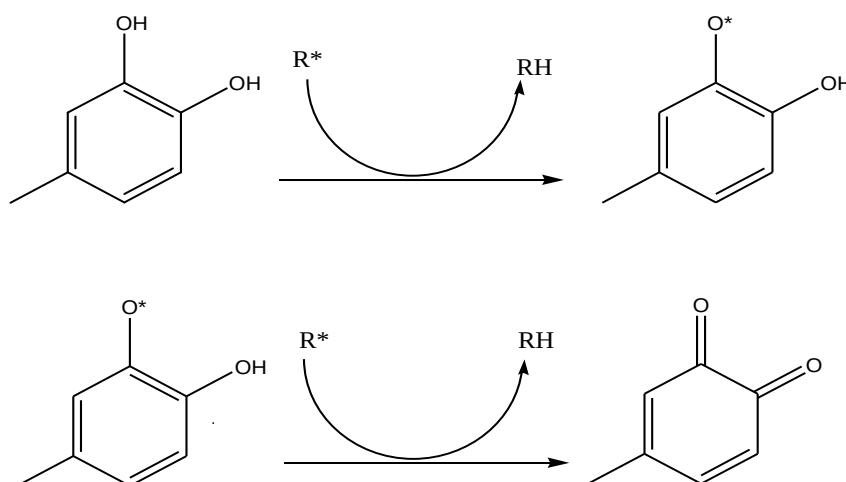


Figura 4.5 – Captura/sequestro de radicais por compostos fenólicos.

4.1.2 – Atividade larvícida sobre *Artemia salina*

4.1.2.1 – Introdução

Na seleção de agentes com potencial atividade citotóxica, anticancerígena e pesticida destaca-se o teste larvícida sobre *Artemia salina* (TAS). Desde 1982 esse teste tem sido utilizado para monitorar o isolamento de substâncias com potencial ação antitumoral e pesticida, a partir de plantas. Contudo, o ensaio é usado para avaliar diferentes atividades farmacológicas, uma vez que tem demonstrado uma boa correlação com várias atividades biológicas (MEYER *et al.*, 1982), como por exemplo, a atividade tripanosomicida, antitumoral *in vitro* (DOLABELA, 1997), atividade antibacteriana (BRASILEIRO *et al.*, 2006) e antifúngica (NINÕ *et al.*, 2006). O teste parte da premissa que uma substância ativa pode ser tóxica dependendo da dose (BOHLIN *et al.*, 1999). Esse teste é simples, de baixo custo e realizado no próprio laboratório de fitoquímica. Os extratos e substâncias puras são considerados ativos quando a dose que mata 50% dos indivíduos (DL_{50}) é menor que 1000 $\mu\text{g/mL}$ por MEYER *et al.*, (1982). Para substâncias puras onde: DL_{50} menores que 80 $\mu\text{g/mL}$ consideram-se altamente tóxico, ou ativos, entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ moderadamente tóxico e acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ com baixa toxicidade ou não tóxico (DOLABELA, 1997).

A – Metodologia, segundo PIMENTA *et al.*, 2003

Preparou-se 1L de solução salina, usando-se sal marinho sintético da marca DEEP OCEAN e água deionizada (37,5g/L).

Em 100 mL de solução salina, adicionaram-se cerca de 10 mg de ovos de *Artemia salina*, sendo deixado sob iluminação artificial a 28 °C. A eclosão ocorreu após aproximadamente 24 horas.

Os náuplios, que é o estágio da *Artemia salina* após 24 h, foram coletados e transferidos para outro aquário para atingirem o estágio de metanauplii (Figura 4.6. pág. 89).

Foram preparadas as soluções-mãe de lapachol e das amostras-teste (extratos e frações) dissolvidos em DMSO. O teste foi realizado em triplicata utilizando-se cinco concentrações diferentes, expressas em µg/mL. As soluções foram distribuídas em tubos de ensaio contendo concentração adequada de solução.

Preparou-se um grupo controle negativo, pela utilização de solução marinha contendo 1% de DMSO (v/v).

As larvas no estágio metanáuplio (estágio da *Artemia salina* após 48 h) foram adicionadas às soluções a serem testadas, utilizando-se uma pipeta automática, sendo colocadas aproximadamente dez larvas em cada tubo de ensaio.

Toda bateria de ensaio foi mantida em local fresco durante 24 horas.

Após este período, fez-se a leitura, pela contagem de larvas sobreviventes e mortas; esta foi realizada a olho nu, sendo usado um fundo branco para melhor contraste.

A determinação da DL₅₀ (com intervalo de confiança de 95%) foi feita utilizando-se o método Probitos de análise.

Em todos os ensaios realizados, o lapachol, foi utilizado como controle positivo e apresentou DL₅₀ entre 60 e 85 µg/mL.



Figura 4.6 – *Artemia salina* no estágio náuplio(A) e no estágio metanáuplio (B)
(Fonte: <http://wszystkogra.pl/artemia-salina&page=5>) (Acessado em: 29/04/2011)

A.1 – Análise dos Resultados

Segundo critérios empregados para a classificação de atividade larvicida frente à *Artemia salina* de extratos, frações e substâncias obtidas de plantas são considerados ativos quando apresenta DL_{50} menor ou igual a 1000 $\mu\text{g/mL}$ (MEYER *et al.*, 1982). Levando isto em consideração, os ensaios de toxicidade empregando o microcrustáceo *Artemia salina* como indicador, foram realizados até a concentração máxima de 1000 $\mu\text{g/mL}$.

O critério utilizado para classificação de toxicidade, empregando *Artemia salina*, foi baseado nas concentrações das DL_{50} onde: DL_{50} menor que 80 $\mu\text{g/mL}$ foram consideradas altamente tóxicas, entre 80 $\mu\text{g/mL}$ e 250 $\mu\text{g/mL}$ moderadamente tóxico e acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ com baixa toxicidade ou não tóxico (DOLABELA, 1997).

O extrato, amostras e substâncias submetidas ao teste larvicida frente à *Artemia salina*, e suas concentrações estão descritas na Tabela 4.1 (pág. 90).

Tabela 4.1 – Amostras e suas concentrações utilizadas no teste larvídica sobre *Artemia salina*.

Amostras	Concentrações (µg/mL)				
	1	2	3	4	5
ACF01F	1000	500	250	125	50
ACF02F	1000	500	250	125	50
ACF02FPREC	1000	500	250	125	50
ACF03F	1000	500	250	125	50
ACF-1	250	125	90	50	25
ACF-2	500	250	125	50	15
ACF-3	250	125	90	50	25
ACF-4	250	125	90	50	25
Lapachol ^a	100	75	50	25	10

ACF01F: extrato etanólico bruto; ACF02F: fração hidroalcoólica; ACF02F-PREC.: precipitado da ACF02F; ACF03F: fração clorofórmica; ACF-1: peltatosídeo; ACF-2: norestefalagina; ACF-3: (-)-epicatequina; ACF-4: quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo; ^a controle positivo.

Utilizando-se o método Probitos de análise foram obtidos os resultados, para o extrato, as frações e as substâncias, que são apresentados na Tabela 4.2.

Tabela 4.2 – Resultados do teste larvídica frente à *Artemia salina* do extrato, frações e substâncias isoladas das folhas de *A. crassiflora*.

Amostra	DL ₅₀ (ppm)	Intervalo de confiança (ppm)
ACF01F	1029,97	769,61 a 1396,56
ACF02F	869,27	646,83 a 1.168,21
ACF02F-PREC	497,12	380,48 a 649,50
ACF03F	51,69	35,67 a 74,90
ACF-1	80,29	71,01 a 90,79
ACF-2	2,91	7,67 a 14,21
ACF-3	57,48	49,29 a 67,03
ACF-4	109,52	96,81 a 123,89
Lapachol ^a	65,78	57,23 a 75,33

ACF01F: extrato etanólico bruto; ACF02F: fração hidroalcoólica; ACF02F-PREC.: precipitado da ACF02F; ACF03F: fração clorofórmica; ACF-1: peltatosídeo; ACF-2: norestefalagina; ACF-3: (-)-epicatequina; ACF-4: quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo; ^a controle positivo.

Como pode ser visto na Tabela 4.2 (pág. 90) o extrato etanólico bruto (ACF01F) foi considerado não ativo, por apresentarem DL_{50} em concentração acima de 1000 $\mu\text{g/mL}$. SANTOS PIMENTA *et al.*, (2003) também não encontraram atividade larvicida frente a *Artemia salina* para o extrato etanólico bruto das folhas de *Annona crassiflora*.

As frações ACF02F e ACF02F PREC apresentaram concentração inibitória mínima de 50% entre 250 $\mu\text{g/mL}$ e 1000 $\mu\text{g/mL}$. Sendo considerados de baixa toxicidade ou não tóxicos, segundo DOLABELA *et al.*, (1997).

As substâncias ACF-1 e ACF-4 apresentaram uma moderada atividade larvicida, com concentrações de DL_{50} entre 80 e 250 $\mu\text{g/mL}$.

A fração ACF03F e as substâncias ACF-2 e ACF-3 apresentaram concentrações que matam 50% da população menores que 80 $\mu\text{g/mL}$, sendo considerados altamente tóxicos.

Em relação ao extrato etanólico bruto, a fração hidroalcoólica (ACF02F) e as substâncias isoladas a partir desta fração, pode-se perceber que a atividade larvicida frente à *Artemia salina* aumenta nesta ordem e em uma proporção satisfatória.

4.1.3 – Atividade antimicrobiana

4.1.3.1 – Introdução

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas tiveram início na década de 1940. Em 1993, OSBORN, pesquisando a atividade de 2.300 plantas superiores contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento de um ou de ambos os microorganismos.

No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com CARDOSO e SANTOS (1948) que avaliaram extratos de 100 diferentes plantas, indicadas em terapêutica como anti-inflamatórias ou cicatrizantes. Destas, apenas cinco extratos apresentaram atividade inibitória contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus* X-19.

A Sociedade de Doenças Infecciosas da América (do inglês, IDSA) divulgou que em 2004 nos hospitais dos Estados Unidos, aproximadamente 2 milhões de

peessoas adquiriram infecções bacterianas. A bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* é a responsável por metade das infecções hospitalares e mata cerca de 100 mil pacientes a cada ano nos Estados Unidos (DEMAIN e SANCHEZ, 2009). Outra doença infecciosa que ainda mata muitas pessoas é a diarreia. Essa doença pode ser causada pela bactéria *Escherichia coli* que causa infecção diarreica aguda (BALDI *et al.*, 2009).

A bactéria Gram-positiva *Bacillus cereus* é responsável por causar intoxicações alimentares, podendo também participar de infecções cutâneas acompanhadas de necrose ou gangrena, bacteremia e septicemia e mais raramente pneumonias, meningites e infecções oculares (TRABULSI *et al.*, 1999).

Salmonella typhimurium está entre os sorotipos de Salmonella mais comuns causadoras de Salmonelose. Nos seres humanos, a salmonelose causa diarreia, febre e cólicas abdominais 12 a 72 horas após a infecção e pode durar até sete dias. Alguns casos resultam em internação. A salmonela é facilmente transmitida através das fezes de pessoas ou animais. A incidência de salmonelose está aumentando no mundo, causando milhões de infecções e muitas mortes na população humana de cada ano (SCHAECHTER *et al.*, 2002).

Com relação aos antifúngicos, pesquisam-se fármacos com alvos específicos, para diminuir a toxicidade, já que células fúngicas e humanas são semelhantes e compartilham de muitas vias metabólicas intermediárias, onde há enzimas similares. As pesquisas, no que tange aos antifúngicos, buscam inibidores da biossíntese do ergosterol, da inibição das topoisomerasas ou ainda da parede celular fúngica (ZACCHINO *et al.*, citado por YUNES e CALIXTO, 2001).

Os testes antimicrobianos foram realizados nos seguintes laboratórios: Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios coordenado pela Professora Dr^a. Jacqueline Aparecida Takahashi do Departamento de Química da UFMG.

4.1.3.2 – Testes antimicrobianos realizados no Laboratório de Biotecnologia e Bioensaios

As culturas de microrganismos utilizadas neste experimento foram: duas bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC (American Type Culture Collection) 25923 e *Bacillus cereus* ATCC 11778), duas bactérias Gram-negativas

(*Escherichia coli* ATCC 25723 e *Salmonella typhimurium* ATCC 15243), e a levedura (*Candida albicans* ATCC 18804).

A – Metodologia

Bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*) e Gram-negativas (*Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*) e a levedura (*Candida albicans*) foram mantidas em infuso de cérebro e coração (BHI), sob refrigeração a 7 °C.

Os microorganismos foram reativados em BHI e um inóculo de cada um foi padronizado em espectrofotômetro para uma concentração final de $1,87 \times 10^5$ UFC/mL ($3,75 \times 10^4$ UFC/poço).

O bioensaio foi realizado em placas de microtitulação, para todos os compostos e extratos, em quintuplicata.

Os compostos foram adicionados aos poços na concentração de 2000 µg/mL (200µg/poço e concentração final 1000µg/mL), para extratos, ou 500µg/mL (50µg/poço e concentração final de 250µg/mL), para substâncias puras, em BHI, e em seguida, 100 µL do inóculo bacteriano foram adicionados. As placas foram incubadas a 35 °C por 24h.

Foi utilizado como controle positivo o meio BHI e negativo o DMSO que foram testados simultaneamente. A porcentagem de inibição de crescimento bacteriano foi determinada usando leitor de placas tipo ELISA. Valores de CIM50 e CIM90 foram determinados (ZACCHINO E GUPTA, 2007).

A.1 – Análise dos Resultados

Tabela 4.3 – Porcentagens médias de inibição para cada microorganismo após 24h.

Amostras	% de inibição				
	<i>S. aureus</i>	<i>B. cereus</i>	<i>S. typhimurium</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. albicans</i>
ACF01F	61	70	67	83	80
ACF02F	67	88	74	85	85
ACF02FPREC.	76	100	74	82	86
ACF-1	ND	ND	ND	1,7	ND

Tabela 4.3 – Porcentagens médias de inibição para cada microorganismo após 24h – Continuação.

ACF-2	80	ND	ND	3,0	ND
ACF-3	86	ND	ND	5,5	ND
ACF-4	ND	ND	ND	ND	ND
DMSO ^a	ND	ND	ND	ND	ND
Cloranfenicol ^b	100	99	NT	NT	NT
Ampicilina ^c	NT	NT	92	93	NT
Nistatina ^d	NT	NT	NT	NT	100

^a Controle negativo; ^b controle positivo de bactérias gram-positivas; ^c controle positivo para bactérias gram-negativas; ^d controle positivo para a levedura ND: não detectado; ACF02F: fração hidroalcoólica; ACF02F-PREC.: precipitado da ACF02F; ACF-1: peltatosídeo; ACF-2: norestefalagina; ACF-3: (-)-epicatequina; ACF-4: quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo.

As frações ACF01F, ACF02F e ACF02F-PREC mostraram-se bem ativas frente a todos os microorganismos testados. Dentre as substâncias, apenas a ACF-2 e ACF-3 mostraram atividade inibitória, mas somente frente à bactéria *Staphylococcus aureus*.

Para *Escherichia coli*, as substâncias ACF-1, ACF-2 e ACF-3 apresentaram uma porcentagem muito pequena de inibição, quase insignificante.

CONCLUSÃO

O principal objetivo deste projeto foi isolar alguns dos constituintes mais polares do extrato etanólico das folhas de *Annona crassiflora*, em especial os flavonoides e alcaloides, e identificá-los de forma inequívoca, utilizando as técnicas espectroscópicas usuais: UV, IV, RMN de ^1H e ^{13}C , DEPT, HSQC, HMBC, COSY e espectrometria de massas.

O estudo do extrato hidroalcólico, proveniente do extrato etanólico bruto, resultou no isolamento de dois flavonoides glicosilados: quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-O- α -L-arabinopiranosídeo, o peltatosídeo, e quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo; um alcaloide: norestefalagina e a (-)-epicatequina.

Esta é a primeira vez que se relata o isolamento e caracterização dos dois flavonóides glicosilados, o peltatosídeo e a quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo na espécie *Annona crassiflora*, no gênero *Annona* e na família Annonaceae. O alcalóide aporfínico norestefalagina tem sido isolado no gênero *Xylopi*a, mas nunca foi descrito em *A. crassiflora* e no gênero *Annona*. O flavan-3-ol, (-)-epicatequina, também foi isolado e caracterizado pela primeira vez em *A. crassiflora*.

Os compostos fenólicos são predominantes nas folhas de *Annona crassiflora*, apresentando menor concentração desta classe de compostos em outras partes da planta.

As atividades biológicas, dos extratos etanólico e hidroalcólico e substâncias isoladas, determinadas foram: atividade antimicrobiana, atividade larvicida frente a *Artemia salina* e atividade antioxidante.

O extrato etanólico (ACF01F), hidroalcólico (ACF02F) e o precipitado da fração hidroalcólica (ACF02F-PREC) apresentaram atividade contra as bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*), Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium*), e a levedura (*Candida albicans*). Dentre as substâncias isoladas a ACF-2 (norestefalagina) e a ACF-3 ((-)-epicatequina) foram as únicas que apresentaram atividade antimicrobiana e contra apenas a bactéria *Staphylococcus aureus*.

No teste larvicida contra *Artemia salina*, a ACF-2 (norestefalagina) foi a que apresentou melhor resultado, com dose letal de 50% igual a 2,91 ppm, concentração altamente tóxica. As outras substâncias ACF-1 (peltatosídeo), ACF-3 ((-

)epicatequina) e ACF-4 (quercetina-3-O- β -L-arabinopiranosídeo), apresentaram DL_{50} entre 55,0 e 110,0 ppm. O extrato, ACF01F, e as frações ACF02F e ACF02F-PREC, apresentaram baixa atividade com resultados entre 495,0 a 1030,0 ppm.

Tanto o extrato (ACF01F) e as frações (ACF02F, ACF02F-PREC) quanto às substâncias isoladas (ACF-1, ACF-2, ACF-3 e ACF-4) apresentaram atividade antioxidante frente aos dois métodos testados, método de descoramento do DPPH e do β -caroteno, ambos desenvolvidos em CCD de sílica.

Este trabalho foi um trabalho muito importante, pois muito acrescentou no estudo da família Annonaceae, no gênero *Annona* e na espécie *Annona crassiflora*. Também descobriu-se com esta pesquisa que a espécie *Annona crassiflora* é uma rica fonte da substância quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil (1 $\rightarrow$ 6)-O- α -L-arabinopiranosídeo, ou peltatosídeo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agrawal, P. K.; Carbon-13 NMR of flavonoids. Elsevier: Amsterdam – Oxford – New York – Tokyo, 1989, 564 p.

Almeida, S. P.; Proença, C. E. B.; Sano, S. M.; Ribeiro, J. F. Cerrado: espécies vegetais úteis. *Embrapa- CPAC*, Planaltina, Distrito Federal, 1998.

Alves, C. Q.; Brandão, H. N.; David, J. M.; David, J. P.; Lima, L. S. Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. *Diálogos & Ciência*, ano V, n. 12, 2007.

Andersen, A.; e Markham, C. Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications *Revise Proof*, 11-23, 2005.

APG: <http://www.mobot.org/mobot/research/apweb/>, acessado dia 26/03/11.

Araújo, J. M. A. Química de Alimentos: teoria e prática. 3. Ed. Viçosa: UFV, 2004. 478 p.

Araya, H.; Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds. *Bull. Natl. Inst. Agro-Environ. Sci.*, **23**, 77-149, 2004.

Avidos, M. F. D.; Ferreira, L. T. Frutos dos cerrados: preservação gera muitos frutos. *Revista Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento*, **3** (15), 36-41, 2000.

Baldi, F.; Bianco, M. A.; Nardone, G.; Pilotto, A.; Zamparo, E. Focus on acute diarrhoeal disease. *World Journal of Gastroenterology*, **15**, 3341-3348, 2009.

Balasundram, N.; Sundram, K.; Samman, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, **99**, 191-203, 2006.

Balunas, M. J.; Kinghorn, A. D. Drug Discovery from Medicinal Plants. *Life Sciences*, **78**, 431-441, 2005.

Barbosa, L. C. A. Espectroscopia no Infravermelho na caracterização de compostos orgânicos. 1 ed. Editora UFV, Viçosa MG, 2007, 189p.

Barroso, G. M. Sistemática de angiospermas no Brasil. Universidade Federal de Viçosa, Imprensa Universitária, 1991.

Bermejo, A.; Figadere, B.; Zafra-Polo, M. C.; Barrachina, E. E.; Cortes, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. *Natural Product Reports*, **22**, 269-303, 2005.

Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B.; Juneau, J. P.; Bhacca, N. S.; Mukherjee, R. Alkaloids from leaves of *Annona squamosa*. *Phytochemistry*, **18** (9), 1584-1586, 1979.

Bohlin, L.; Bruhn, J.; Biossay Methods in natural product research and drug development. Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1999. (TAS)

Bohlmann, F.; Rao, N. In: Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R. The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry*, **21** (12), 2783-2813, 1982.

Brasileiro, B. G.; Pizziolo V. R.; Raslan, D. S.; Jamal, C. M.; Silveira D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, **42** 195-202, 2006.

Calixto, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *Journal Ethnofarmacol*, **100**, 131-134, 2005.

Calixto, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, **33**, 179-189, 2000.

Cannell, R. J. P.; Natural Products Isolation. New Jersey, Totowa: Human Press, 1998, 473p.

Cardoso, H. T.; Santos, M. L. Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais. *Bras. Med.*, São Paulo, **62**, 67-70, 1948.

Carvalho, A. C. B.; Balbino, E.E.; Maciel, A.; Perfeito, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognisia*, **18**, 314-319, 2008.

Carvalho, J. A. Araticum: o doce aroma do cerrado. Minas Gerais: Gráfica Editora Folha Machadense, 20p., 2002.

Carvalho, J. E. Fitoterápicos: Alimento ou Medicamento? In: Mercadante, A. Z.; Bobbio, F. O.; Bobbio, P. A.; Pereira, J. L.; Pastore, G. M., ed. *Ciência de Alimentos: avanços e perspectivas vol II*. Faculdade de Engenharia de Alimentos da Unicamp, Campinas, 196-202, 2001.

Cassady, J. M. Natural products as a source of potential cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Journal of Natural Products*, **53** (1), 23-41, 1990.

Cavassan, O.; Pinheiro, S.; Gomes, P.; Seniciato, T. O Ensino de Ciências, a Biodiversidade e o Cerrado. In: Araújo, E. S. N. N.; Caluzi, J. J.; Caldeira, A. M. A. (Orgs.). *Divulgação Científica e Ensino de Ciências: Estudos e Experiências*. São Paulo - SP Referências adicionais: Brasil/Português; Meio de divulgação: Impresso; ISBN: 8575312383, 2006.

Chang, F.R; Chen, C. Y.; Wu, P. H.; Kuo, R. Y.; Chang, Y. C.; Wu, Y. C. New alkaloids from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, **63**, 746-748, 2000.

Chang, F. R.; Wei, J. L.; Teng, C. M.; Wu, Y. C. Two new 7- dehydroaporphine alkaloids and antiplatelet action aporphines from the leaves of *Annona purpurea*. *Phytochemistry*, **49**, 2015-2018, 1998.

Chatrou, L.W. Las Annonaceae y el proyecto Annonaceae: una breve revisión de su estado actual, p.51-57. In: Pinto, A. C. Q. Acta Horticulturae. Proceedings of the First International Symposium on Cherimoya. Loja, Ecuador, 497p., 1999.

Chen, C.H.; Hsieh, T. J.; Liu, T.Z.; Chern, C. L.; Hsieh, P.Y.; Chen, C.Y. Annoglabin, a novel dimeric kaurane diterpenoid, and apoptosis in Hep G2 cells of annomontacin from the fruits of *Annona glabra*. *Journal Natural Product*, **67**, 1942-1946, 2004.

Chuliá, S.; Ivorra, M. D.; Cave, A.; Cortes, D.; Noguera, M. A. Relaxant activity of three aporphine alkaloids from *Annona cherimolia* on isolated aorta of rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, **47** (8), 647-650, 1995.

Costa, P.; Ferreira, V.; Esteves, P.; Vasconcellos, M. Ácidos e Bases em Química Orgânica. Porto Alegre: Bookman, 2005, 151p.

Couto, M. A. L.; Canniatti-Brazaca, S. G. Quantificação de vitamina C e capacidade antioxidante de variedades cítricas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, 30(Supl.1): 15-19, 2010.

Debourges, D.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cave, A. Alkaloids of the Annonaceae. Part 77. Alkaloids of *Duguetia spixiana*. *Journal of Natural Products*, **50** (4), 664-673, 1987.

Degani, A. L.; Cass, Q. B.; Vieira, P. C.; Cromatografia um breve ensaio. *Química Nova na Escola Cromatografia*, (7), 21-25, 1998.

Dolabela, M. F. *Triagem in vitro para atividade antitumoral e anti Trypanossoma cruzi de extratos vegetais, produtos naturais e substâncias sintéticas*. Minas Gerais, 130p. Dissertação de Mestrado, Departamento de Fisiologia e Farmacologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, 1997.

Demain, A. L.; Sanchez, S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics*, **62**, 5-16, 2009.

Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach*. 2^a Ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, 507 p., 2002.

Fehlberg, I.; Oliveira, R. A.; Guedes, M. L. S.; Cruz, F. G. Atividade antibacteriana de flavonóides e triterpenos de *Myrcia guianensis*. 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química – Fortaleza- CE, 2009.

Felfili, J. M. Padrões de Diversidade do Cerrado do Centro-Oeste Brasileiro. In: Araújo, E. L.; Moura, N. A.; Sampaio, E. V. S. B.; Gestinari, L. M. S.; Carneiro, J. M. T. Biodiversidade, conservação e uso sustentável da Flora do Brasil. Universidade Federal Rural de Pernambuco/Imprensa Universitária, Recife, 2002.

Fonseca, C. E. L da; Ribeiro, J. F. Fruteiras nativas do cerrado: Estágio atual e perspectivas futuras. Simpósio Nacional de recursos genéticos de fruteiras nativas. Cruz das almas: Anais: EMBRAPA – CNPMF, 1992.

Ganesan, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Current Opinion in Chemical Biology*, **2**, 306-317, 2008.

Gomes, M. A. O.; Amâncio, R. Relatório do diagnóstico participativo de agroecossistemas. UFLA- DAE, Lavras, 1995.

Guinaudeau, H.; Leboeuf, M.; Cavé, A. Aporphine Alkaloids II. *Journal of Natural Products*, **42** (4), 325-360, 1979.

Harbone, J. B.; *Phytochemical methods: A guide to modern techniques of plant analysis*, 2nd ed., Chapman and Hall: London, 55-136, 1984.

Huang, D.; Ou, B.; Prior, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 1841-1856, 2005.

Janick, J.; Paull, R. E. The encyclopediamof fruits and nuts. *Cabi international*, 160p., 2006.

Jolad, S. D.; Hoffmann, K. H. S.; Cole, J. R.; Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). *Journal of Organic Chemistry*, **47**, 3151-3153, 1982.

Karting, T.; Gorbel, I. Effect of fluorescence intensifiers on the fluorodensitometric determination of flavones and flavonols after detection with diphenylboric acid 2-aminoethyl ester. *Journal of Chromatography A*, **740**, 99-107, 1996.

Kolakowska, A. Lipid Oxidation in Food Systems. In: SIKORSKI, Z.E.; Kolakowska, A. Chemical and Functional Properties of Food Lipids. *Boca Raton*: CRC PRESS, 2003. (Versão digital em: www.crcpress.com).

Lima, L. A. R. S.; Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. *Food Chemistry*, **122**, 1129–1138, 2010.

Liu, X.X., Pilarinou, E.; McLaughlin, J. L. Two novel acetogenins, annoglaxin and 27-hydroxybullatacin, from *Annona glabra*. *Journal of Natural Product*, **62**, 848-852, 1999.

Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R. The phytochemistry of the Annonaceae. *Phytochemistry*, **21** (12), 2783-2813, 1982.

Lorenzi, H.; Sartori, S.; Bacher, L. B.; Lacerda, M. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas. São Paulo: Instituto Plantarum de estudos da flora, 686p., 2006.

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. Árvores brasileiras. Manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, São Paulo, **2**, 1998.

Maas, P. J. M.; Kamer, H. M.; Junikka, L.; Silva, R. M.; Rainer, H. Annonaceae from

Central-eastern Brazil. In: Scaloppi Junior, E. J. Propagação de espécies de Annonaceae com estacas caulinares. Jaboticabal: Tese de doutorado. UNESP-FCAV, 92p., 2007.

Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr., V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, **25** (3), 429-438, 2002.

Matos, F. J. A.; Introdução à fitoquímica experimental. Ceará, Fortaleza: Coleção Ciência - EUFC, 1988, 128p.

Melo, D. L. B. Dormência em sementes de *Annona crassiflora* Mart. Dissertação de mestrado- Lavras: Universidade Federal de Lavras: UFLA, 51p., 2005.

Mendonça, R. C.; Felfili, J. M.; Walter, B. M. T.; Silva, M. C.; Rezende, A. R.; Filgueiras, T. S.; Nogueira, P. E. Flora vascular do Cerrado. In: Sano, S. M.; Almeida, S. P. Cerrado: ambiente e flora. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária do Brasil (EMBRAPA), Brasil, 286-556, 1998.

Meyer, B. N.; Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, **45**, 456-460, 1982.

Mittermeier, R.A., Gil,P.R.; Mittermeier, C.G. Megadiversidad - los países biológicamente más ricos del mundo. *CEMEX*. Mexico, MX, 1997.

Myers, N.; Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Fonseca, G. A. B.; Kent, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, **403**, 853-858, 2000.

Nakasone, H. Y.; Paull, R. E. Tropical fruits. *CABI publishing*, 45-65,1998.

Naves, R. V.; Almeida Neto, J. X.; Rocha, M. R. Determinação de características físicas em frutos e o teor de nutrientes em folha e no solo, de três espécies frutíferas ocorrência natural nos cerrados de Goiás. *Anais da escola de Agronomia e Veterinária*, **25**, 99–106, 1995.

Nawar, W.W. Lipids. In: Fennema, O.R. *Food Chemistry*. 3 Ed. New York: Marcel Dekker, 1069p, 1996.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *Journal of Natural Products*, **70**, 461-477, 2007.

Niño, J.; Narváez, D. M.; Mosquera, O. M.; Correa, Y. M.; Antibacterial, antifungal and cytotoxic activities of eight Asteraceae and two Rubiaceae plants from colombian biodiversity. *Braz J Microbiol*, **37**: 566-570, 2006.

Osborn, E. M. On the occurrence of antibacterial substances in green plants. *British. Journal of Experimental Pathology*, London, **24** (6), 227-231, 1993.

Perfeito, J. P.; Santos, M. L.; López, K. S. E.; Paula, J. E.; Silveira, D. Characterization and biological properties of *Pouteria torta* extracts: a preliminary study. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, **15**, 183-186, 2005.

Pessuto, M. B.; Costa, I. C.; Souza, A. B.; Nicoli, F. M.; Mello, J. C. P.; Petereit, F.; Luftmann, H. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Química Nova*, **32** (2), 412-416, 2009.

Pietta, P. G. Flavonoids as Antioxidants. *J. Nat. Prod*, **63**, 1035-1042, 2000.

Pimenta, L. P. S. Estudo químico bio-monitorado das sementes de *Annona crassiflora* objetivando o isolamento de acetogeninas tetra-hidrofurânicas. Belo Horizonte, Departamento de Química, ICEx – UFM. Tese de doutorado, 1995.

Pimenta, L. P. S.; Boaventura, M. A. D.; Oliveira, A. B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofurânica citotóxica de *Annona crassiflora* (araticum). *Química Nova*, São Paulo, **17** (5), 387-391, 1994.

Pimenta, L. P. S.; Prates, H. T.; Viana, P. A.; Boaventura, M. A. D.; Inseticide action of ethanolic extract from *Annona crassiflora* seeds against *Spodoptera frugiperda*. In:

XXI International Congress of entomology, Foz do Iguaçu – Paraná. Abstract Book I. v. I, p. 1035, 2000.

Pimenta, L. P. S.; Pinto, G. B.; Takahashi, J. A.; Silva, L. G. F.; Boaventura, M. A. D. Biological screening of *Annonaceous* Brazilian medicinal plants using *Artemia salina*. *Phytomedicine*, 10, 209-212, 2003.

Pisco, L.; Kordian, M.; Peseke, K.; Feist, H. Michalik, D.; Estrada, E.; Carvalho, J.; Hamilton, G.; Rando, D.; Quincoces, J. Synthesis of compounds with antiproliferative activity as analogues of prenylated natural products existing in Brazilian propolis. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **41**, 401-407, 2006.

Proença, C.; Oliveira, R. S.; Silva, A. P. Flores e Frutos do Cerrado. Editora Universidade Brasília, São Paulo – Imprensa Oficial, Brasil, 28–31, 2000.

Pupo, M. T.; Guimarães, D. O.; Furtado, N. A. J. C.; Borges, W. S. Microbial natural products: a promising source of bioactive compounds. In: Taft, C. A. Modern biotechnology in medicinal chemistry and industry. *Kerala: Research Signpost*, 51-78, 2006.

Queiroz, E. F.; Roblot, F.; Cavé, A.; Paulo, M. Q.; Fournet, A. Pessioine and spinosine, two catecholic berbines from *Annona purpurea*. *Journal of Natural Products*, **59**, 438-440, 1996.

Rao, R. V. K.; Murty, N.; Rao, J. V. L. N. In: Leboeuf, M.; Cavé, A.; Bhaumik, P. K.; Mukherjee, B.; Mukherjee, R. The phytochemistry of the annonaceae. *Phytochemistry*, **21** (12), 2783-2813, 1982a.

Rates, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, **39**, 603-613, 2001.

Ratter, J. A.; Bridgewater, S.; Ribeiro, J. F. Biodiversity Patterns of Woody cerrado vegetation: an overall view. In: Pennington, R. T.; Lewis, G. P.; Ratter, J. A. Neotropical savannas and seasonally dry forests. *Plant diversity, biogeography and conservation*. CRC Press, Flórida, 2006.

Ribeiro, J. P.; Brito, M. P.; Junior, E. S.; Fonseca, C. E. L. Araticum, Funep, Jaboticabal, 2000.

Rios, J. L.; Recio, M. C.; Vilar, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacol.*, **23**, 127-149, 1988.

Russo, A.; Longo, R.; Vanella, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. *Fitoterapia*, **73** (1): S21-S29, 2002.

Santos, D. Y. A. C.; Salatino, M. L. F. Foliar Flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. *Phytochemistry*, **55**, 567-573, 2000.

Santos, L. P.; Boaventura, M. A. D.; Sun, N. J.; Cassady, J. M.; Oliveira, A. B. Araticulin, a new *bis*-tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds. *Phytochemistry*, **42**, 705, 1999.

Santos, P. R. D.; Morais, A. A.; Braz-Filho, R. Alkaloids from *Annona dióica*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **14** (3), 369-400, 2003.

Santos Pimenta, L. P.; Pinto, G. B.; Takahashi, J. A.; Silva, L. G. F. E., Boaventura, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plantas using *Artemia salina* (Brine Shrimp Test). *Phytomedicine*, **10**, 209-212, 2003.

Saxena, R. C.; Harshan, V.; Saxena, A.; Sukumaran, P.; Sharma, M. C.; Kumar, M. L. Larvicidal and chemosterilant activity of *Annona squamosa* alkaloids against *Anopheles stephensi*. *Journal American Mosquito Control Association*, **9**, 84-87, 1993.

Schaechter, M.; Engleberg, N. C.; Eisenstein, B. I.; Medoff, G. Microbiologia: mecanismo das doenças infecciosas. 3 ed. Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2002, 642p.

Sellés, A. J. N.; Garrido, G. G. The Challenges of Antioxidant Therapy with Natural Products. *Comp. Bio. Nat. Prod.*, **4**, 1-35, 2010.

Sies, H. Oxidative stress: oxidants and antioxidants. *Experimental Physiology*, **82**, 291-295, 1997.

Silva, M. S.; Tavares, J. F.; Queiroga, K. F.; Agra, M. F.; Filho, J. M. B.; Almeida, J. R. G. S.; Silva, S. A. S. Alcalóides e outros constituintes de *Xylopia langsdorffiana* (Annonaceae). *Química Nova*, **32** (6), 1566-1570, 2009.

Silva, V. de F. Caracterização e avaliação de acilaçúcar sintético no comportamento da mosca-branca *Bemisia tabaci* (gennadius, 1886) biótipo B (Hemiptera: aleyrodidae) em tomateiro. Lavras, Departamento de Química – UFLA. Dissertação de mestrado, 2006.

Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, v. 22, p. 94-103, 1999.

Simões, C. M. O.; Schenkel, E. P. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis, Ed. da UFSC, 2004.

Teng, R.; Xie, H.; Li, H. Z.; Liu, X.; Wang, D.; Yang, C. Two new acylated flavonoid glycosides from *Morina nepalensis* var. *alba* Hand.-Mazz. *Magnetic Resonance in Chemistry*, **40**, 415–420, 2002.

Trabulsi, L. R.; Alterthum, F.; Gompertz, O. F.; Candeias, J. A. N. Microbiologia 3ed. São Paulo: Atheneu, 1999.

Veiga-Junior, V.F.; Mello, J. C. P. As monografias sobre plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, **18**, 464-471, 2008.

Vega, M. R. G.; Souza, A. E.; Vieira, I. J. C.; 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 Brazilian Chemical Society*, **18** (8), 1554-1559, 2007.

Wagner, H.; Heiter, M.; Fersti, W. New drugs with cardiotoxic activity. Chemistry and pharmacology of cardiotoxic active principle of *Annona squamosa*. *Planta Medica*, **40** (1), 77-85, 1980.

Wagner, H.; Bladt, S.; Zgainski, E. M.; Plant Drug Analysis. Institut für Pharmazeutische Biologie der Universität München; 1984, 307p.

Wang, L. Q.; Min, B. S.; Li, Y.; Nakamura, N.; Qin, G. W.; Li, C. J.; Hattori, M. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, **10**, 561-565, 2002.

Yanishlieva-Maslarova, N.V. Inhibiting oxidation. In: Pokorny, J.; Yanishlieva Maslarova, N.V.; Gordon, M.H. Antioxidants in food – Practical applications. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2001. 380p. (Versão digital em: www.woodhead-publishing.com).

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.

Zacchino, S.A.; Gupta, M.P. Manual de técnicas *in vitro* para la detección de compuestos antifúngicos. Rosario. Corpus Editorial y Distribuidora, 2007.

Zacchino, S. Estratégias para a descoberta de novos agentes antifúngicos. In: Yunes, R. A.; Calixto, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal. Chapecó: Agros, p. 47-75, 2001.

Zanin, S. M. W.; Lordello, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). *Química Nova*, **30** (1), 92-98, 2007.

Zweig, G.; Sherma, J. CRC Handbook of Chromatography: General data and principles, V II. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1987, 172p.