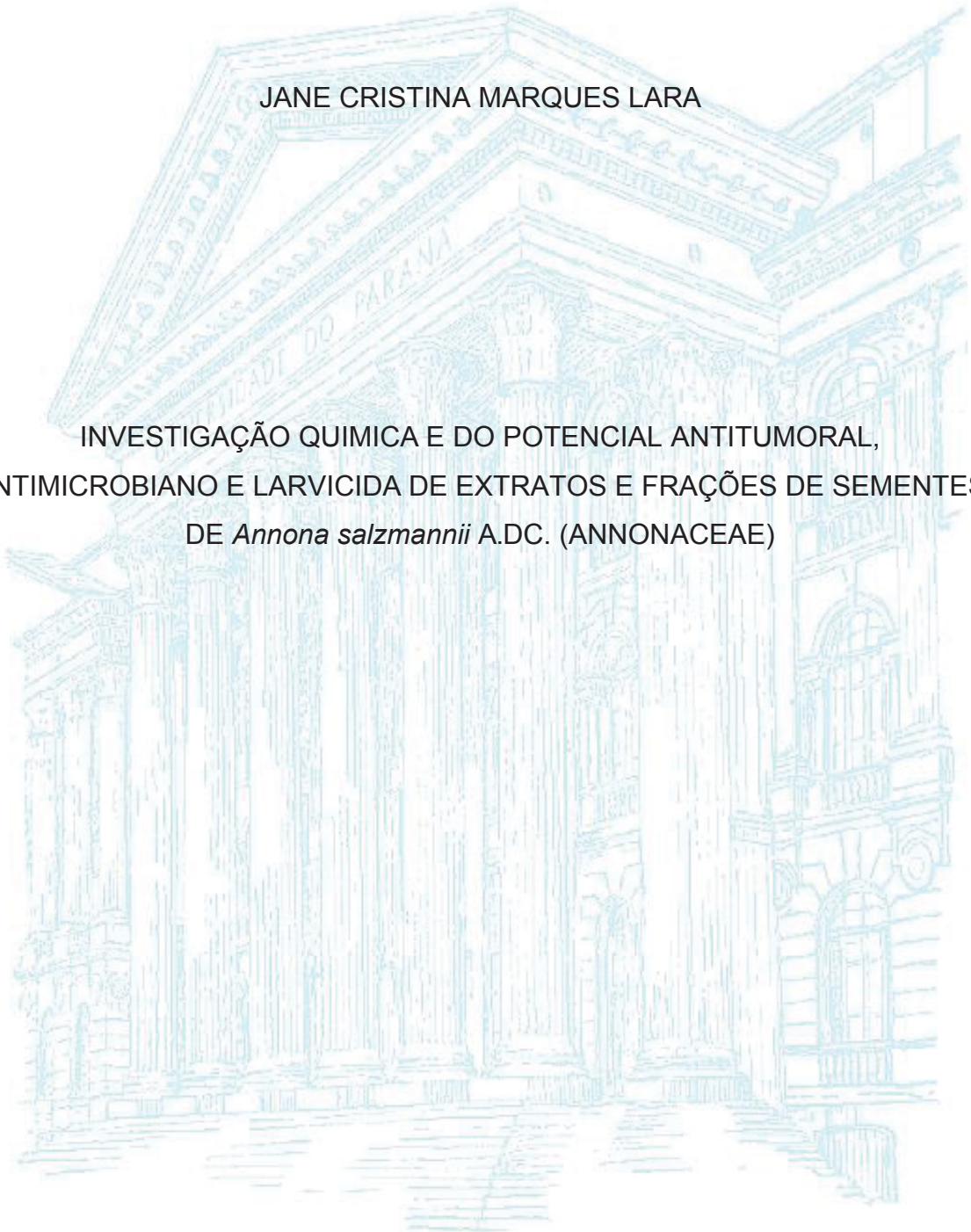


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JANE CRISTINA MARQUES LARA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E DO POTENCIAL ANTITUMORAL,  
ANTIMICROBIANO E LARVICIDA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE SEMENTES  
DE *Annona salzmannii* A.DC. (ANNONACEAE)



CURITIBA

2018

JANE CRISTINA MARQUES LARA

INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E DO POTENCIAL ANTITUMORAL,  
ANTIMICROBIANO E LARVICIDA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE SEMENTES  
DE *Annona salzmannii* A.DC (ANNONACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Insumos, Medicamentos e Correlatos, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Francinete Ramos Campos

CURITIBA

2018

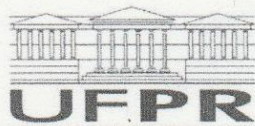
Lara, Jane Cristina Marques

Investigação química e do potencial antitumoral, antimicrobiano e larvicida de extratos e frações de sementes de *annona salzmannii* dc (annonaceae) [recurso eletrônico] / Jane Cristina Marques Lara – Curitiba, 2018.

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2018.  
Orientador: Dr<sup>o</sup>.Francinete Ramos Campos.

1. Annonaceae. 2. Investigação química. 3. Antimicrobianos. I. Campos, Francinete Ramos. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDD 615.32



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR CIÊNCIAS DA SAÚDE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS  
FARMACÊUTICAS

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **JANE CRISTINA MARQUES LARA** intitulada: **INVESTIGAÇÃO QUÍMICA E POTENCIAL ANTITUMORAL, ANTIMICROBIANO E LARVICIDA DE EXTRATOS E FRAÇÕES DE SEMENTES DE *Annona salzmannii* A.DC. (ANNONACEAE)**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 22 de Novembro de 2018.

FRANCINETE RAMOS CAMPOS  
Presidente da Banca Examinadora

THALITA GILDA SANTOS  
Avaliador Externo

JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS  
Avaliador Interno

JOCIANI ASCARI  
Avaliador Externo

MARILÍS DALLARMI MIGUEL  
Avaliador Interno

## AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente a **Deus** por que sem ele nada seria possível.

Ao meus pais, **Ivon** e **Jane**, e aos meus filhos **Robert**, **Jacqueline** e **Racquel** pelo incentivo, compreensão e muito carinho, e pelo apoio incondicional, amor e paciência do meu esposo **Walter**.

Aos meus familiares que mesmos distantes me incentivaram e entenderam a minha ausência em suas festas.

A Prof<sup>a</sup> Dra. **Francinete Ramos Campos** pela orientação, paciência, apoio e principalmente pela amizade em todo o período de execução deste estudo, sem ela nada seria possível.

Aos meus amigos e colegas **Tatiana**, **Estevam**, **Paola**, **Letícia**, **Allan** e **Vanessa** que tanto me ajudaram nesta jornada e que muito contribuíram com a sua amizade. Aos demais amigos pelo companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Andersson Barison, por todo o auxílio no Departamento de Química da UFPR.

À colega Livia do Departamento de Química por ajudar nas elucidações para melhoria deste trabalho.

Às colegas Ketlin e Leice por ajudarem nas estruturas das moléculas.

Ao Prof. Dr. Guilherme Sasaki pela colaboração da análise de CG-EM.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa recebida durante todo o período do Doutorado e para a participação de congressos.

Agradeço aos Profs. Membros da Banca de Qualificação, e a Banca de Defesa do Doutorado.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho.

## RESUMO

*Annona* L. (Annonaceae) abrange de 2500 espécies, distribuídas em 130 gêneros. Apenas 150 espécies (cerca de 7%) têm sido investigadas. No Brasil, as plantas deste gênero podem ser encontradas no Cerrado e na Floresta Amazônica. *Annona salzmannii* A.D.C., vem sendo estudada demonstrando diversas atividades biológicas, antileishmania, antitumoral, antimicrobiana, antiprotozoária, larvicida e antiparasitária, o que torna promissora a busca por metabólitos secundários em suas sementes ainda não investigadas. Os frutos de *A. salzmannii* foram coletados na Mata Atlântica, em colaboração com a Universidade Federal de Sergipe. Dos frutos foram retirada a polpa das sementes que foram então, lavadas, secas, trituradas e submetidas ao processo de extração por maceração a frio, resultando nos extratos em hexano, diclorometano e metanol. O extrato em hexano foi analisado por CG-EM, resultando em ácidos graxos saturados palmítico (14,3%) e esteárico (4,4%) e insaturados palmitoleico (1,7%), oleico (35,0%), e como majoritário o linoleico (45,3%). Na análise por RMN de <sup>1</sup>H foram identificados os ácidos graxos saturados palmítico e esteárico (13,2%) e insaturados oleico (36,1%) e o majoritário linoleico (49,3%), não sendo detectado o linolênico. O extrato em diclorometano foi fracionado por cromatografia por exclusão, sendo usado como fase estacionária Sephadex LH-20 e fase móvel em diclorometano e metanol em gradiente. Do fracionamento foram obtidas 15 frações. A fração 4 foi escolhida para análise por ter apresentado teste positivo para acetogeninas após revelação com reagente de Kedde via análise por CCDA. Na fração 4 foram identificadas as substâncias F4-1, F4-2, F4-3, como *muricin-G*, *squamocin A* e *rioclarin*, respectivamente, após análise por RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C e HR-MS. Todos os extratos foram submetidos a ensaio de atividade larvicida, sendo o extrato em diclorometano o que apresentou melhor atividade com CL<sub>50</sub> de 0,031 µg mL<sup>-1</sup>. Este extrato apresentou maior porcentagem de inibição (GI% > 97), contra linhagens tumorais, para BF6-F10 (melanoma murino) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano). Portanto, este extrato foi selecionado para avaliar a IC<sub>50</sub> apresentando valor ≤ 3,9 µg mL<sup>-1</sup> contra as linhagens celulares: B16-F10, HepG2, K562 (leucemia mielocítica crônica humana) e HL-60 (leucemia promielocítica humana). Todos os extratos foram submetidos a atividade antimicrobiana contra cepas de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, porém apresentaram atividade moderada, de acordo com a classificação de Holetz et al., (2001) e Naldin et al., (2004). A investigação química das sementes desta espécie demonstrou ser uma fonte promissora de acetogeninas com atividades antitumoral e larvicida.

Palavras-chave: Annonaceae, *Annona salzmannii*, acetogeninas, antitumoral, larvicida, sementes.

## ABSTRACT

*Annona L. (Annonaceae)* comprises of 2,500 species, distributed in 130 genera. Only 150 species (about 7%) have been investigated. In Brazil, plants of this genus can be found in the Cerrado and Amazon Rainforest. *Annona salzmannii* D.C., has been studied demonstrating several biological activities, antileishmania, antitumor, antimicrobial, antiprotozoal, larvicide and antiparasitic, which makes promising the search for secondary metabolites in its seeds not yet investigated. The fruits of *A. salzmannii* were collected in the Atlantic Forest, in collaboration with the Federal University of Sergipe. From the fruits the pulp was removed and the seeds were then washed, dried, crushed and subjected to the extraction process by cold maceration, resulting in extracts in hexane, dichloromethane and methanol. The hexane extract was analyzed by GC-MS, resulting in saturated palmitic (14.3%) and stearic (4.4%) and unsaturated palmitoleic (1.7%), oleic (35.0%) saturated fatty acids, and as the majority linoleic (45.3%). In the  $^1\text{H}$  NMR analysis palmitic and stearic saturated fatty acids (13.2%) and oleic unsaturated fatty acids (36.1%) and linoleic major ones (49.3%) were identified, and no linolenic was detected. The extract in dichloromethane was fractionated by exclusion chromatography, using as Sephadex LH-20 stationary phase and mobile phase dichloromethane and gradient methanol. From the fractionation, 15 fractions were obtained. Fraction 4 was chosen for analysis because it presented positive test for acetogenins after development with Kedde reagent via analysis by ADCC. In fraction 4 the substances F4-1, F4-2, F4-3, as *muricin-G*, *squamocin A* and *rioclarin* were identified. respectively, after  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR analysis. All extracts were submitted to larvicidal activity assay, the extract in dichloromethane being the best  $\text{LC}_{50}$  activity of  $0.031 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Furthermore, this extract had the highest percentage of inhibition ( $\text{GI}\% > 97$ ), against tumoral strains, for BF6-F10 (murine melanoma) and HepG2 (human hepatocellular carcinoma). Therefore, this extract was selected to evaluate the IC 50 presenting  $\leq 3.9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  against the cell lines: B16-F10, HepG2, K562 (human chronic myelocytic leukemia) and HL-60 (human promyelocytic leukemia). All extracts were submitted to antimicrobial activity against strains of *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa*, but presented moderate activity, according to Holetz et al. (2001) and Naldin et al., (2004). The chemical investigation of the seeds of this species has proved to be a promising source of acetogenins with antitumor and larvicidal activities.

Keywords: Annonaceae, *Annona salzmannii*, acetogenins, antitumor, larvicide, seeds.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DAS ROTAS BIOSSINTÉTICAS DOS METABÓLITOS VEGETAIS.....	22
FIGURA 2 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS.....	24
FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS .....	25
FIGURA 4 - ESQUELETOS DE ALGUMAS CLASSES DE ALCALOIDES COMUNS EM ANNONACEAE.....	26
FIGURA 5 - FLAVONOIDES DE ANNONACEAE .....	28
FIGURA 6 - PROPOSTAS DE BIOSÍNTESE DAS ACETOGENINAS .....	35
FIGURA 7 - SUBUNIDADES DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAS TETRAHIDROFURÂNICAS .....	36
FIGURA 8 - CONFIGURAÇÕES DE ACETOGENINAS ASIMICIN (R) E BULATACIN (S) .....	37
FIGURA 9 - CLASSIFICAÇÃO DAS ACETOGENINAS .....	37
FIGURA 10 - ATP SINTASE MITOCONDRIAL.....	38
FIGURA 11 - ESPÉCIES FRUTIFERAS DO GÊNERO <i>ANNONA</i> .....	39
FIGURA 12 - <i>ANNONA SALZMANNII</i> : A) ÁRVORE, B) FLOR, C) FRUTO VERDE, D) FRUTO MADURO E) SEMENTES .....	40
FIGURA 13 - ACETOGENINAS ISOLADAS DAS RAÍZES DE <i>A. SALZMANNII</i> .....	44
FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE <i>ANNONA SALZMANNII</i> .....	46
FIGURA 15 - A) COLUNA SEPHADEX DO EXTRATO DE DICLOROMETANO DAS SEMENTES DE <i>ANNONA SALZMANNII</i> , B) FRAÇÕES 1-15.....	49
FIGURA 16 - REAÇÃO DO TTC.....	54
FIGURA 17 - ANÁLISE DE CG-EM DO EXTRATO HEXANO DE SEMENTES DE <i>ANNONA SALZMANNII</i> . ESPECTROS DE MASSAS. (A) ÁCIDO PALMÍTICO $T_R = 6,454$ min; (B) ÁCIDO PALMITOLEICO $T_R = 6,565$ min; (C) ÁCIDO ESTEÁRICO $T_R = 7,777$ min; (D) ÁCIDO OLEICO $T_R = 7,922$ min; (E) ÁCIDO LINOLEICO $T_R = 8,252$ min .....	55
FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE $^1H$ DO EXTRATO DE HEXANO DAS SEMENTES DE <i>A. SALZMANNII</i> , MOSTRANDO ATRIBUIÇÕES DE SINAIS DA ESTRUTURA DOS TRIACILGLICEROIS .....	58



FIGURA 19 - ANÁLISE DE CCDA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS SEMENTES DE <i>ANNONA</i> <i>SALZMANNII</i> .....	60
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ (100 MHZ, $\text{CDCl}_3$ ) DA F4-1 .....	62
FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ (600 MHZ $\text{CDCl}_3$ ) DA F-1.....	63
FIGURA 22 - DADOS DE RMN DE $^{13}\text{C}$ DO ANEL MONO- TETRAHIDROFURANO DE F4-1 E COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA.....	64
FIGURA 23 - ESTRUTURA QUÍMICA DE F4-1 .....	64
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ (100 MHZ, $\text{CDCl}_3$ ) DE F4-2. ....	67
FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ (600 MHZ, $\text{CDCl}_3$ ) DE F4-2.....	68
FIGURA 26 - ESQUELETOS DO ANEL BIS-TETRAHIDROFURANOS DE F4-2 E SQUAMOCINS SELECIONADAS DA LITERATURA.....	69
FIGURA 27 - ESTRUTURA QUÍMICA DE F4-2 .....	69
FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE $^{13}\text{C}$ (100 MHZ, $\text{CDCl}_3$ ) DE F4-3 .....	72
FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE $^1\text{H}$ (600 MHZ, MEOD) DE F4-3.....	73
FIGURA 30 - ESQUELETOS DO ANEL BIS-TETRAHIDROFURANOS DE ACETOGENINAS COMPARADAS COM A F4-3.....	74
FIGURA 31 - ESTRUTURA QUÍMICA DE F4-3 .....	75

## LISTA DE QUADROS

- QUADRO 1 - ANÁLISE DE ESI(+)-HR-MS DO EXTRATO DE DICLOROMETANO DAS SEMENTES DE *ANNONA SALZMANNII* .....60
- QUADRO 2 - ACETOGENINAS COM FÓRMULA MOLECULAR  $C_{35}H_{62}O_7$  .....61
- QUADRO 3 - ACETOGENINAS COM FÓRMULA MOLECULAR  $C_{37}H_{66}O_7$  .....66
- QUADRO 4 - ACETOGENINAS COM FORMULA MOLECULAR  $C_{37}H_{66}O_8$  .....71

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - USOS POPULARES E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS COMPROVADAS DE ALGUMAS ESPÉCIES PERTENCENTES À FAMÍLIA ANNONACEAE.....	21
TABELA 2 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS COMPROVADAS DE ACETOGENINAS DE ESPÉCIE DE <i>Annona</i> . ....	30
TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE DE <i>Annona salzmannii</i> .....	41
TABELA 4 - ANÁLISE DO EXTRATO DE DICLOROMETANO (5,02 g) DAS SEMENTES DE <i>Annona salzmannii</i> .....	49
TABELA 5 - IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR CG-EM EM SEMENTES DE <i>Annona salzmannii</i> .....	55
TABELA 6 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H DO EXTRATO HEXANO DE <i>A. salzmannii</i> E DADOS DA LITERATURA .....	59
TABELA 7 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C E HMBC DE F4-1 IDENTIFICADO EM SEMENTES DE <i>Annona salzmannii</i> E DADOS DA LITERATURA. ....	65
TABELA 8 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C E HMBC DE F4-2 IDENTIFICADO EM SEMENTES DE <i>Annona salzmannii</i> E DADOS DA LITERATURA. ....	70
TABELA 9 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C DE F4-3 IDENTIFICADO EM SEMENTES DE <i>Annona salzmannii</i> E DADOS DA LITERATURA. ....	76
TABELA 10 - ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS BRUTOS DE SEMENTES DE <i>A. salzmannii</i> .....	77
TABELA 11 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA VIABILIDADE/PROLIFERAÇÃO CELULAR EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS .....	80
TABELA 12 - VALORES DE IC <sub>50</sub> PARA A ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO DICLOROMETANO FRENTE AS LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS .....	81
TABELA 13 - ENSAIO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DICLOROMETANO E FRAÇÕES (F4 E F5) DE SEMENTES DE <i>Annona salzmannii</i> .....	85

## LISTA DE SIGLAS

$\delta$	- Deslocamento químico
$\delta_H$	- Deslocamento químico do hidrogênio
$\delta_C$	- Deslocamento químico do carbono
$\varphi$	- Diâmetro da coluna
1D	- Unidimensional
2D	- Bidimensional
AcOEt	- Acetato de etila
CC	- Cromatografia em coluna
CCDA	- Cromatografia de camada delgada analítica
CCDP	- Cromatografia em camada delgada preparativa
CD <sub>3</sub> OD	- Metanol deuterado
CDCl <sub>3</sub>	- Clorofórmio deuterado
CG-EM	- Cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas
CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	- Diclorometano
CIM	- Concentração Inibitória Mínima
<i>d</i>	- Duplete
<i>dd</i>	- Duplo duplete
<i>ddd</i>	- Duplo duplo duplete
<i>DIMS</i>	- <i>Direct Infusion Mass Spectrometry</i>
<i>dl</i>	- Duplete largo
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DMSO- <i>d</i> <sub>6</sub>	- Dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	- 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
<i>dt</i>	- Duplo tripleto
EDTA	- Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	- Espectrometria de massas
ESI	- <i>Electrospray ionization</i>
ESI-EM/EM	- Espectrometria de massas sequencial
EtOH	- Etanol
eV	- Eletrón-volt
HMBC	- <i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
ATP	- Trifosfato de Adenosina
HSQC	- <i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	- Hertz
IE	- Impacto eletrônico
IPP	- Isopentil pirofosfato
IR	- Índice de retenção

IS	- <i>Ion Spray voltage</i>
J	- Constante de Acoplamento
m	- Multipleteo
m/z	- Razão massa-carga
MeOD- <i>d</i> <sub>6</sub>	- Metanol deuterado
MeOH	- Metanol
MHz	- Megahertz
MTT	- Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difeniltetrazólio
ORAC <sub>FL</sub>	- <i>Oxygen Radical Absorbance Capacity</i>
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
BNDS	- Banco Nacional do Desenvolvimento Social
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
q	- Quarteto
QqQ	- Triplo-quadrupolo
qTOF	- <i>Quadrupole-Time of Flight</i>
Rf	- Fator de retenção
RMN de <sup>13</sup> C	- Ressonância magnética nuclear de Carbono 13
RMN de <sup>1</sup> H	- Ressonância magnética nuclear de Hidrogênio
RPMI	- Roswell Park Memorial Institute medium
s	- Simpleto
SFB	- Soro fetal bovino
t	- Tripleto
TE	- Trolox equivalente
TMS	- Tetrametilsilano
Trp	- Triptofano
TSA	- Ágar triptona de soja
TSB	- Caldo triptona de soja
TTC	- Cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio
Tyr	- Tirosina
UFC	- Unidades formadoras de colônia
UV	- Ultravioleta
tR	- Tempo de retenção
EFAS	- Ácidos graxos essenciais
(IS)	- Índice de seletividade

## LISTAS DE ABREVIATURAS

LCPUFAS	- Ácidos graxo de polinsaturados cadeia longa
HepG2	- Carcinoma Hepatocelular
SMMC-771	- Carcinoma Hepatoma
BEL-7402	- Carcinoma hepatocelular
H-460	- Carcinoma de Pulmão
A-549	- Carcinoma de Pulmão
HELA	- Carcinoma Cervical
MCF-7	- Carcinoma de Mama
MKN-45	- Carcinoma Gástrico
HCT	- Adenocarcinoma do cólon do útero
PC-3	- Carcinoma de próstata
K562	- Leucemia crônica mielocítica
PACA2	- Carcinoma Pancreático
HT-29	- Carcinoma do Cólon
A-498	- Carcinoma de rim
SW-480	- Câncer colorretal
HEP-3B	- Hepatoma humano
HCT-8	- Carcinoma ileocecal
U-87-MG	- Glioblastoma
1A 9	- Câncer do ovário humano
LLC	- Carcinoma do pulmão de Lewis
A-459	- Carcinoma de pulmão
U-251	- Carcinoma do sistema nervoso central
MIAPaCa-2	- Tumor pancreático humano
Hep. 2,2,15	- Células de hepatoma humano transfectadas VHB
KB	- Carcinoma nasofaríngeo humano
MDAMB239	- Carcinoma mamário humano
L929	- Fibroblasto tumorigênico de camundongo
MeWo	- Meloma humano
BST	- Teste de camarão de salmoura
THT	- Tetrahidrofurano
L1210	- Células leucêmicas de murinos
RPMI 7951	- Tumor de melanoma
C6	- Glioma de rato
TGI	- Concentração da inibição do crescimento celular em 100%

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL.....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>19</b>
3.1	FAMÍLIA ANNONACEAE.....	19
3.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ANNONACEAE .....	22
3.2.1	Ácidos graxos .....	23
3.2.2	Alcaloides de Annonaceae .....	26
3.2.3	Acetogeninas de Annonaceae.....	28
3.2.4	Mecanismo de Ação .....	37
3.3	GÊNERO <i>ANNONA</i> L.....	38
3.4	<i>ANNONA SALZMANNII</i> A. DC. ....	39
3.5	CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA.....	41
3.6	ESTUDOS FITOQUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE <i>ANNONA SALZMANNII</i> .....	41
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>45</b>
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA .....	45
4.2	SECAGEM E MOAGEM.....	45
4.3	OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS SEMENTES .....	45
4.4	ANÁLISES DE RMN, CG-EM E HR-MS.....	46
4.5	ANÁLISE DO EXTRATO HEXANO POR CG-EM .....	47
4.6	ANÁLISE DO EXTRATO E FRAÇÕES POR RMN.....	47
4.7	ANÁLISE DO EXTRATO DICLOROMETANO.....	48
4.7.1	Cromatografia por exclusão em coluna.....	48
4.7.2	Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA).....	48
4.8	ENSAIO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA .....	50
4.8.1	Ensaio para a atividade larvicida .....	50
4.8.2	Ensaio para a atividade citotóxica .....	50
4.8.3	Ensaio para a atividade antimicrobiana .....	52

<b>5</b>	<b>RESULTADO E ANÁLISE DOS DADOS.....</b>	<b>55</b>
5.1	ANÁLISE DO EXTRATO HEXÂNICO DAS SEMENTES DE <i>ANNONA SALZMANNII</i> , POR CG-EM. ....	55
5.2	ANÁLISE DO EXTRATO HEXÂNICO DAS SEMENTES DE <i>ANNONA SALZMANNII</i> POR RMN DE <sup>1</sup> H. ....	57
5.3	ANÁLISE DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS SEMENTES.....	59
5.3.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	59
5.3.2	Análise de espectrometria de Massas de alta resolução HR-MS do extrato diclorometano e frações das sementes de <i>A.salzmannii</i> .....	60
5.3.3	Determinação Estrutural de F4-1.....	61
5.3.4	Determinação Estrutural de F4-2.....	65
5.3.5	Determinação Estrutural de F4-3.....	71
5.3.6	Ensaio para a atividade larvicida .....	77
5.3.7	Ensaio para atividade citotóxica .....	81
5.3.8	Ensaio para atividade antimicrobiana .....	86
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>89</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>90</b>
	<b>ANEXO 1- ESPECTRO DE HR-MS DO EXTRATO DICLOROMETANO.....</b>	<b>109</b>
	<b>ANEXO 2- ESPECTRO DE HR-MS DA FRAÇÃO 4.....</b>	<b>110</b>



## 1 INTRODUÇÃO

As espécies vegetais têm contribuído de forma significativa para o fornecimento de substâncias biologicamente ativas, as quais possuem grande valor agregado, devido às suas aplicações como medicamentos, cosméticos, alimentos e agroquímicos. Estes fitoquímicos extraídos de plantas medicinais, constituem uma alternativa na procura de novos agentes terapêuticos, podendo ser utilizados como fármacos ou como protótipos para o desenvolvimento de novos medicamentos. (MARQUES; LOPES, 2015).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população utiliza plantas medicinais (25 mil espécies) para tratar e prevenir diversos tipos de doenças. Nas classes terapêuticas de oncologia e anti-infecciosos, a participação dos produtos naturais na descoberta de novos medicamentos ultrapassa dois terços. A existência de uma medicina alternativa e natural, apoiada nas propriedades curativas das plantas medicinais, oferece aos usuários da fitoterapia, uma opção mais econômica para cuidar da saúde. (SOUZA et al., 2013).

Em 2006 foi publicada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, com as diretrizes detalhadas em 2008. No plano plurianual 2012-2015 do Governo Federal, foi destinado investimentos para três ações que compõem o “Programa 2015 - Aperfeiçoamento do SUS” que permitem o financiamento da assistência farmacêutica em plantas medicinais e fitoterápicos. (BNDS, 2014). Esta política garante a população brasileira o acesso seguro e uso racional de plantas, promovendo o uso sustentável da biodiversidade. (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

A fitoterapia no Brasil é vista como destaque por possuir um terço da flora mundial, sendo a Amazônia a maior reserva de produtos naturais, onde são encontradas riquezas medicinais, sendo pouco explorada, renovando o interesse pela química de produtos naturais como fonte de descoberta de novos fármacos. (CHAZDON; GUARIGUATA, 2016).

A descoberta de novos produtos naturais à base de plantas tem contribuído para o avanço da medicina na busca de moléculas com atividade farmacológica para o tratamento de várias doenças, dentre elas o câncer, e as infecções bacterianas. Os estudos envolvendo metabólitos secundários de plantas são de grande

importância, pois é um grande desafio para a área da saúde.(CHAZDON; GUARIGUATA, 2016).

Dessa forma, é evidente a validação do potencial terapêutico das mesmas, ocorrendo grande necessidade do desenvolvimento de pesquisas com vistas a se avaliar a eficácia e toxicidade dos fitoquímicos; para que seu uso seja mais seguro. Essas pesquisas e desenvolvimentos de novos fármacos estão levando a uma tendência crescente de buscar na natureza a resposta através do princípio ativo dos vegetais. (BRANDÃO, 2011).

Em 2012, o Ministério da Saúde, investiu mais de R\$ 30 milhões em 78 projetos de plantas medicinais e fitoterápicos. Atualmente, o Mercado Brasileiro comercializa diversos fitoterápicos, simples ou associados. Somente o segmento da indústria farmacêutica movimentou ao redor do globo, no ano de 2013, aproximadamente U\$ 989 bilhões e, a IMS Health (empresa responsável pela auditoria nas finanças da indústria farmacêutica no mundo) projeta que, no ano de 2018, esse valor seja de U\$ 1,3 trilhão. Segundo o BNDES, 40% dos medicamentos comercializados no Brasil, derivam de substâncias naturais provenientes da Amazônia. (BNDS, 2014).

O mercado farmacêutico Brasileiro tem crescido a cada ano. Após crescimento de 69,5 bilhões e, 2017, movimentando R\$ 38 bilhões em venda, este segmento deve atingir R\$ 87 bilhões em 2020. De acordo com a estimativa da IMS Health. (BNDS, 2014). Dados recentes mostram que a indústria farmacêutica norte-americana vem investindo mais em pesquisa e desenvolvimento (P&D) do que em marketing. Eles controlam atualmente cerca de 80% da produção de medicamentos no Brasil, com várias patentes estrangeiras de plantas nacionais. (KERDNA, 2016). As pesquisas no país envolvem bases acadêmicas, empresariais e diversas instâncias de governo.

Neste contexto, pesquisas em produtos naturais são essenciais para o fornecimento de informações científicas que conduzam ao desenvolvimento de produtos terapêuticos, tão importantes ao combate das doenças. Registros históricos mostram que a maioria das plantas medicinais foram introduzidas nas primeiras farmacopéias por sua reputação terapêutica. (CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2011).

A região Amazônica, devido a sua grande biodiversidade, além de abrigar a mais notável e diversificada fonte de produtos naturais, apresenta uma riqueza de variedades vegetais capazes de gerar produtos aplicáveis em diversos setores. Apesar da Amazônia ser considerada a maior floresta tropical do planeta,

apresentando não só uma grande diversidade de plantas, mas também de animais e micro-organismos, o seu potencial, principalmente de compostos com atividades biológicas é ainda pouco explorado. Por outro lado, a população que vive próxima à floresta detém um grande conhecimento sobre a utilidade de suas espécies, porém este é restrito e pouco divulgado, quando não apossados pelos estrangeiros. (BITAR, 2010).

A Mata Atlântica, é citada como fonte de mais de 100 espécies de plantas utilizadas como remédios populares, para aproximadamente 290 males e atividades antifúngicas comprovadas, confirmando seu grande potencial como fonte de substâncias passíveis de estudo e comercialização à indústria farmacêutica, e de desenvolvimento social. (BNDS, 2014). Este bioma sofre com a contínua devastação, sendo que mais de 93% da mata original já foi extinta. Desta forma, muitas espécies são, e talvez continuem para sempre desconhecidas, devido à diminuição das florestas e a descaracterização das populações tradicionais. Neste sentido, a exploração sustentada da região da Mata Atlântica pode vir a fornecer inúmeros produtos de alto valor agregado, além de promover a melhoria de qualidade de vida da população.

A importância dos ecossistemas que constituem a mata atlântica foi recentemente reconhecida com a sua inclusão na lista de *Hotspots* (regiões biologicamente mais ricas e ameaçadas do planeta), cuja a preservação é prioridade a nível mundial, em razão de sua imensa devastação, organizada pela ONG *Conservation International*. Apesar da devastação acentuada, a mata atlântica ainda contém uma parcela significativa da diversidade biológica do Brasil. (LEATEMIA; ISMAN, 2004).

O potencial destes biomas tem sido pouco estudado e, na maior parte dos casos, a exploração dos recursos naturais existentes tem sido exercida de forma predatória do ponto de vista social, econômico e ambiental. (ALMEIDA, 2016).

Plantas pertencentes à família Annonaceae vêm se destacando pela sua importância econômica e medicinal, constituindo uma gama de pesquisas para as áreas da Química, Taxonomia, Farmácia e área da saúde. No entanto, o número de espécies que têm sido investigadas é ainda extremamente reduzido. Dentre as 2000 espécies distribuídas em 120 gêneros, apenas 150 espécies (cerca de 7%) têm sido investigadas. Sua distribuição geográfica é pantropical, América, África e Ásia. (CHATROU et al., 2012).

Na literatura já foram descritos em *Annona salzmannii* A. DC. importantes metabólitos nas cascas, folhas e raízes como os alcaloides e acetogeninas, com importante atividades biológicas, como antitumoral e antimicrobiana. Na literatura não foi encontrado nenhum estudo sobre as sementes de *A. salzmannii*. Dessa forma a investigação da espécie pode ser fonte promissora de substâncias com possíveis ações biológicas com atividades antitumoral, larvicida e antimicrobiana, justificando, então o interesse de investigar as sementes, usando o reaproveitamento das sementes.

Desta forma, a partir das sementes de *A. Salzmannii* justamente por não ter sido encontrado nenhum estudo fitoquímico e biológico, foi investigada a espécie de ocorrência na Mata Atlântica por ser fonte promissora de substâncias com possíveis atividades biológicas, justificando assim o interesse da investigação química e farmacológica.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento da composição química e atividade antitumoral, antimicrobiano e larvicida de *A. salzmannii* A. DC. (Annonaceae), através do estudo das sementes.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos em hexano, diclorometano e metanol das sementes de *Annona salzmannii* e realizar estudo fitoquímico;
- Fracionar e identificar as substâncias presentes nos extratos bioativos, através de métodos cromatográficos;
- Identificar as substâncias através de análise de ESI(+) HR-MS e RMN;
- Submeter extratos e frações aos ensaios para avaliação preliminar de atividade antitumoral, antimicrobiana e larvicida.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 FAMÍLIA ANNONACEAE

A família Annonaceae é bastante diversa, cuja a distribuição abrange as regiões tropicais de todos os continentes, África, Ásia e nas Américas. Compreende cerca de 2500 espécies distribuídas em 130 gêneros. Nas Américas, a família é representada por 40 gêneros e cerca de 900 espécies com centro de distribuição na região amazônica e guianas. No Brasil ocorrem 29 gêneros, sendo sete endêmicos, e cerca de 372 espécies (FLORA BRASIL, 2020), presentes em maior parte, em florestas. (CHATROU, RAINER, MAAS, 2004). Os gêneros mais comuns encontrados na flora brasileira são *Annona*, *Guatteria* e *Xylopia*. (DI STASI, 2002). As características botânicas mais relevantes para a identificação das espécies dessa família incluem o odor forte do corte do tronco ou ramos, a presença de fibras longas e resistentes na casca do caule e a aparência de marcas de chamuscas no corte transversal do tronco. (BARON, 2010).

A família Annonaceae possui uma alternativa promissora econômica, sua madeira é usada em reflorestamento, paisagismo e sua produção de frutos aromáticos que são muito apreciados por possuírem valor nutracêutico e ricos em vitaminas (C, A e B1, B2, B5), fibras, além de apresentarem outras propriedades funcionais, trazendo benefícios para a saúde. (SÃO JOSÉ et al., 2014). Os frutos podem ser consumidos *in natura*, bem como serem utilizados na indústria para a produção de sucos, sorvetes, compotas e geléias; recebendo destaque frutos pertencentes ao gênero *Annona*, tais como: fruta-do-conde (*Annona squamosa* L.), graviola da montanha (*Annona montana* Macfad.), graviola (*Annona muricata* L.), biriba (*Rollinia mucosa* Jacq.) Baill, araticum (*Annona sylvatica* A. ST-Hil.). (BENITOREYES-TREJO et al., 2014; CORRÊA, 1984), e atemóia (*Annona atemoya*) que é um híbrido interespecífico entre a *A. squamosa* e *A. cherimola* caracterizado por possuir uma grande concentração de açúcar. (PEREIRA et al., 2011; RABÊLO, et al., 2015; SILVA, et al., 2015; DUTRA; SALIMENA; NETO, 2012; SCALOPPI JUNIOR; MARTINS, 2014).

Os principais países produtores de anonáceas que se destacam no mercado mundial são: Austrália, Chile, Espanha, Estados Unidos, Nova Zelândia e Israel.

Dentre os produtores de *A. cherimola* se destacam: México, Brasil, Venezuela e Costa Rica; já *A. muricata* é cultivada principalmente na Tailândia, Filipinas, Brasil e Cuba e por fim a Índia produz principalmente *A. squamosa*.

Devido, a sua grande importância em 2003 foi criada a Associação Brasileira dos Produtores de Anonáceas, que se destina a orientar os produtores de frutas de qualidade e conquista de mercado. (PEREIRA et al., 2011; SOBRINHO, 2010).

Diferentes partes das plantas (folhas, raízes, cascas, talos e sementes) da família Annonaceae são utilizadas na medicina popular e têm sido estudadas quanto as suas atividades farmacológicas (TABELA 1), tendo sido comparado seu uso como: antiparasitária, antitumoral, inseticida, antiviral, antimicrobiana e antiescorbútica (CARBAJAL et al., 1991; RABÊLO, et al., 2015), anticonvulsivante (GONZALEZ-TRUJANO et al., 2006), e hipocolesterolêmica. (MOGHADAMTOUSI et al., 2014). Uma espécie que se destaca é *Annona muricata* a qual apresenta diversas atividades farmacológicas comprovadas: sedativa, analgésica (NUNES et al., 2012), capacidade hipotensora, vasodilatadora, antiespasmódica, relaxante do músculo liso, cardiodepressora, (NUNES et al., 2012), leishmanicida (COSTA, et al., 2006; PEREIRA et al., 2011), anticonvulsivante (GONZALEZ-TRUJANO et al., 2006) e hipocolesterolêmica. (SOBRINHO, 2010).

TABELA 1 - USOS POPULARES E ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS COMPROVADAS DE ALGUMAS ESPÉCIES PERTENCENTES À FAMÍLIA ANNONACEAE

<b>Espécie</b>	<b>Uso popular</b>	<b>Atividade Comprovada</b>
<i>Annona</i> spp	Todas partes da planta apresentam propriedades antiparasitária, antitumoral, contra enterocolite, antiviral, antimicrobiana, antiescorbútica, antifúngica e inseticida. (LEATEMIA; ISMAN, 2004).	Antidiarreica, antiprotozoária e antitumoral. (TEMPONE et al., 2005); (SENTHILKUMAR; VARMA; GURUSUBRAMANIAN, 2009). Leishmanicida. (LUNA, 2006). Antileucêmica. (RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990).
<i>Annona muricata</i> L.	Folhas para diabetes, como Antiespasmódico para inflamação. (FLORENCE et al., 2014). Inchaço e males da digestão. (VÁSQUEZ; MENDONÇA; NODA, 2014).	Leishmanicida. (SILVA, et al., 2015). Antidiabética, antioxidante, antihipertensivo, vasodilatador, cardiodepressor, anticonvulsivante. (FLORENCE et al., 2014). Arteriosclerose, diabetes. (AHAMMADSAHIB et al., 1993). Antitumoral. (CORIA-TÉLLEZ et al., 2016).
<i>Annona crassiflora</i> Mart.	Óleo das sementes é usado no tratamento de infecções no couro cabeludo; infusão das folhas e sementes tratam diarreia. (ROESLER, 2011).	Inseticida contra <i>Aedes aegypti</i> . (VEGA et al., 2007). Antioxidante. (ROESLER, 2011).
<i>Annona dioica</i> St. Hil.	As folhas combatem a diarreia. (VEGA et al., 2007).	Citotóxica. (VEGA et al., 2007). Para artrite e reumatismo. (DAYU, 2012).
<i>Duguetia furfuracea</i> St.Hil.	As cascas como calmante e para dores nos rins. (DA SILVA, D. B. et al., 2009).	Antitumoral, tripanocida e antileishmaniana. (DA SILVA, et al., 2009).
<i>Duguetia lanceolata</i> St. Hil.	As folhas como anti-inflamatório, cicatrizante, antimicrobiano. (SOUSA et al., 2008).	Antinociceptiva, antiinflamatória, antibacteriana. (SOUSA et al., 2008).
<i>Guatteria australis</i> A.St.Hil.	Frutos são indicados para tratar ferimentos. (DE BRITO; DE SENNA-VALE, 2011).	Ferimentos. (DE BRITO; DE SENNA-VALE, 2011).
<i>Rollinia sericea</i> R. E. Fries	As folhas para picada de cobra. (PINTO; AMOROZO; FURLAN, 2006).	Antimicrobiana. (ITO, R K et al., 2010).
<i>Xylopia aromática</i> Lam. Mart.	Frutos como diurético e para tratar edema de pele. (MOREIRA et al., 2007).	Antiplasmódica. (DE MESQUITA et al., 2007). Antiprotozoária. (OSORIO et al., 2007).
<i>Xylopia sericea</i> St. Hil.	Frutos e folhas utilizadas como aninflamatório. (PONTES, et al., 2007).	Inseticida. (PONTES et al., 2007).
<i>Xylopia aethipica</i> (Dunal) A. Rich.	Oleos essenciais para dores no estomago, bronquites e desintéria. (FEKAM BOYOM et al., 2003).	Antimalárica. (FEKAM BOYOM et al., 2003)

Fonte: O autor (2014).

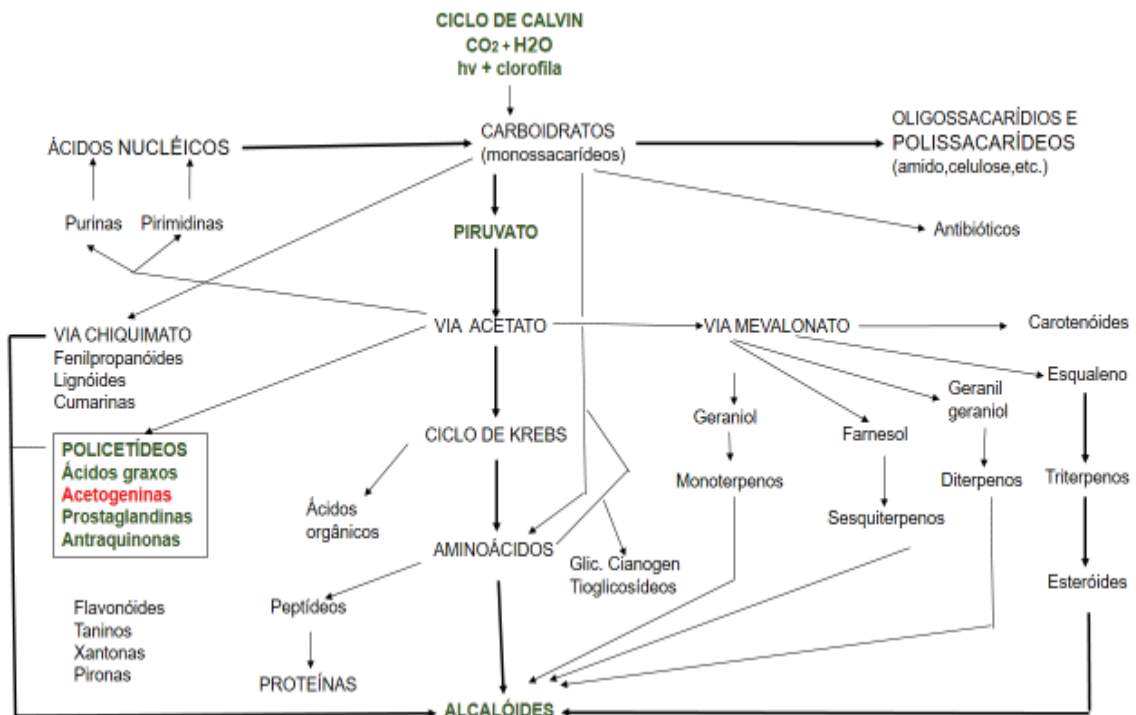


### 3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS DE ANNONACEAE

O metabolismo vegetal é dividido em primário e secundário (FIGURA 1). O metabolismo primário está associado com a formação, manutenção e reprodução das plantas, envolvendo o metabolismo de macromoléculas (proteínas, carboidratos e lipídios). (GARCEZ et al., 2013).

Os metabólitos secundários desempenham importante papel na adaptação das plantas ao ambiente, pois estão envolvidos na defesa contra micro-organismos, insetos e herbívoros. Esses compostos também agem na proteção contra raios ultravioleta, atração de polinizadores e animais dispersores de sementes, bem como na alelopatia. Compostos polifenólicos, terpenos, esteroides, alcaloides e as acetogeninas que são formados a partir dos ácidos graxos. (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

FIGURA 1 - ESQUEMA GERAL DAS ROTAS BIOSINTÉTICAS DOS METABÓLITOS VEGETAIS



FONTE: (SIMÕES, 2007)

### 3.2.1 Ácidos graxos

As Anonáceas possuem ácidos graxos (FIGURA 2 e 3), e triacilglicerídeos que estão entre os principais constituintes da gordura dietética, que representam uma forma de energia. (VAZ et al., 2006).

Os principais ácidos graxos saturados, são o palmítico, e esteárico, e os ácidos graxos insaturados, palmitoleico, oleico-ômega 9, são sintetizados pelo corpo, já os ácidos graxos insaturados linoleico- ômega 6 e o linolênico – ômega 3 são ácidos graxos essenciais que não são produzidos pelo corpo, e sim obtidos através da alimentação. Estes resultados são consistentes com outros dados publicados para outras espécies *Annona*. Em *A. cornifolia*, foram encontrados ácidos graxos insaturados (71,4%) e saturados (22,7%) (LIMA et al., 2012), em *A. squamosa* identificou-se ácidos graxos insaturados (73,3%) e saturados (25,7%) (Ansari et al., 1985), em *A. crassiflora* identificou-se ácidos graxos insaturados (74,3%) e saturados (33,3%) (LUZIA e JORGE, 2013), em *A. diversifolia* identificou-se ácidos graxos insaturados (78,4%) e saturados (21,6%) (BENITOREYES-TREJO et al., 2014), em *A. muricata* os resultados foram insaturados (75,7%) e saturada (24,3%). (CASTRO et al., 1984, LUZIA e JORGE 2012).

Quimicamente um ácido graxo consiste em uma série de carbonos unidos, ligados por ligações simples (saturados) e duplas (insaturados), e um grupo carboxila terminal, os quais diferem pelo comprimento da cadeia carbônica, número e posição das duplas ligações. (CANO, MÁRCIA, LIMA, 2008).

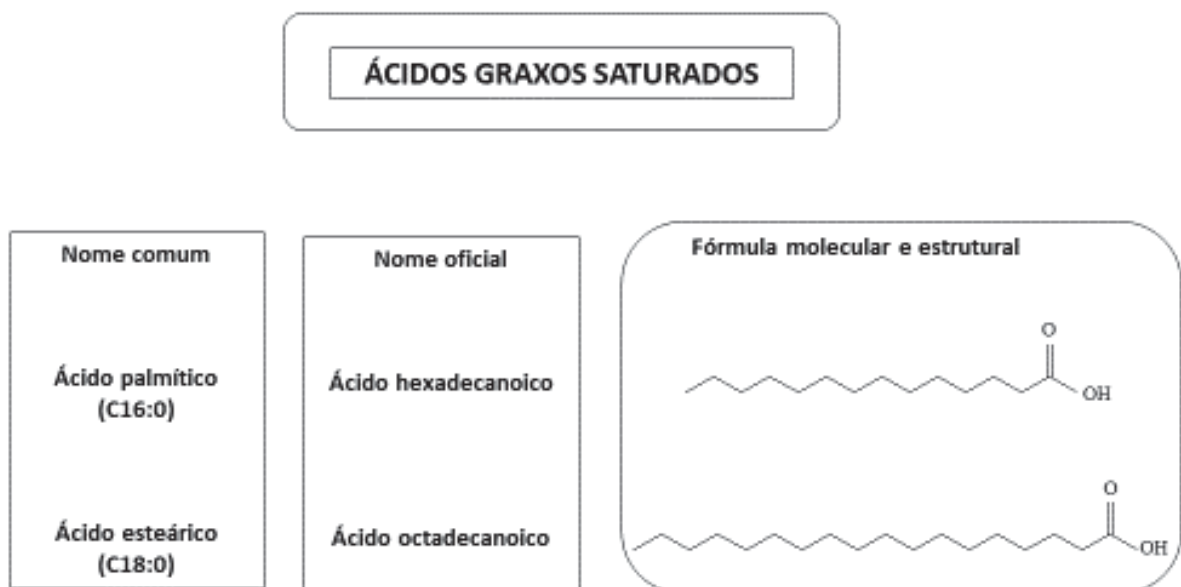
Ácidos graxos são as “gorduras boas” essenciais para todas as células do nosso corpo, e responsáveis pela produção de energia, aumento do metabolismo, crescimento muscular, transporte de oxigênio, e crescimento normal celular. Responsável pelas funções nervosas, fornecem nutrientes que auxiliam no funcionamento das funções cerebrais, porque ajudam no impulso nervoso, além da manutenção da saúde cardiovascular e regulação hormonal. Os ácidos graxos são ácidos carboxílicos com cadeias hidrocarbonadas, classificados segundo o comprimento da cadeia de carbonos (cadeia curta, média e longa). Possuem uma cadeia carbônica que varia de 2 a 36 ou mais átomos de carbono, além de um grupo metílico e um grupo carboxílico em lados opostos. (GÓMEZ, 2003). Os ácidos graxos comerciais compreendem entre 4 a 24 carbonos com diferentes graus de carbonos saturados e insaturados.

Ácido graxos saturados (FIGURA 2) são de cadeia linear, ou seja não contém ligações duplas, suas estruturas estão presentes nos óleos e gorduras, sendo normalmente encontrados na forma sólida. Estão presentes em carnes gordas, banha, nata, manteiga, margarina, palma, cacau, coco, pele de aves etc. Sua ingestão não deve ultrapassar seis por cento da dieta. (COSTA; BRESSAN; SABARENSE, 2006).

O ácido palmítico, ( $C_{16}H_{32}O_2$ ), é produzido naturalmente no corpo humano, sendo considerado o mais abundante dos ácidos graxos saturados encontrados na natureza. Representa de 20% a 30% dos lipídios totais na maioria dos animais e plantas, no óleo de palma, constitui 40% dos lipídios encontrados no mesmo. Quimicamente é considerado ácido graxo de cadeia média, sendo frequentemente utilizado para elevar os níveis de energia, não aumentando os níveis de colesterol. (CHRISTIE, 2013).

Ácido esteárico ( $C_{18}H_{36}O_2$ ), é um ácido graxo saturado de cadeia longa com 18 carbonos (ácido octadecanoico, 18:0), presente em óleos e gorduras vegetais. Sua principal fonte de alimentos são as carnes e laticínios, onde o consumo chega a ser 60%. Seguido pelos peixes, cereais, cacau (manteiga de cacau), hortaliças e ovos. É o segundo ácido graxo saturado mais consumido (25,8%) seguido do palmítico (53,3%). (MARSET et al., 2009).

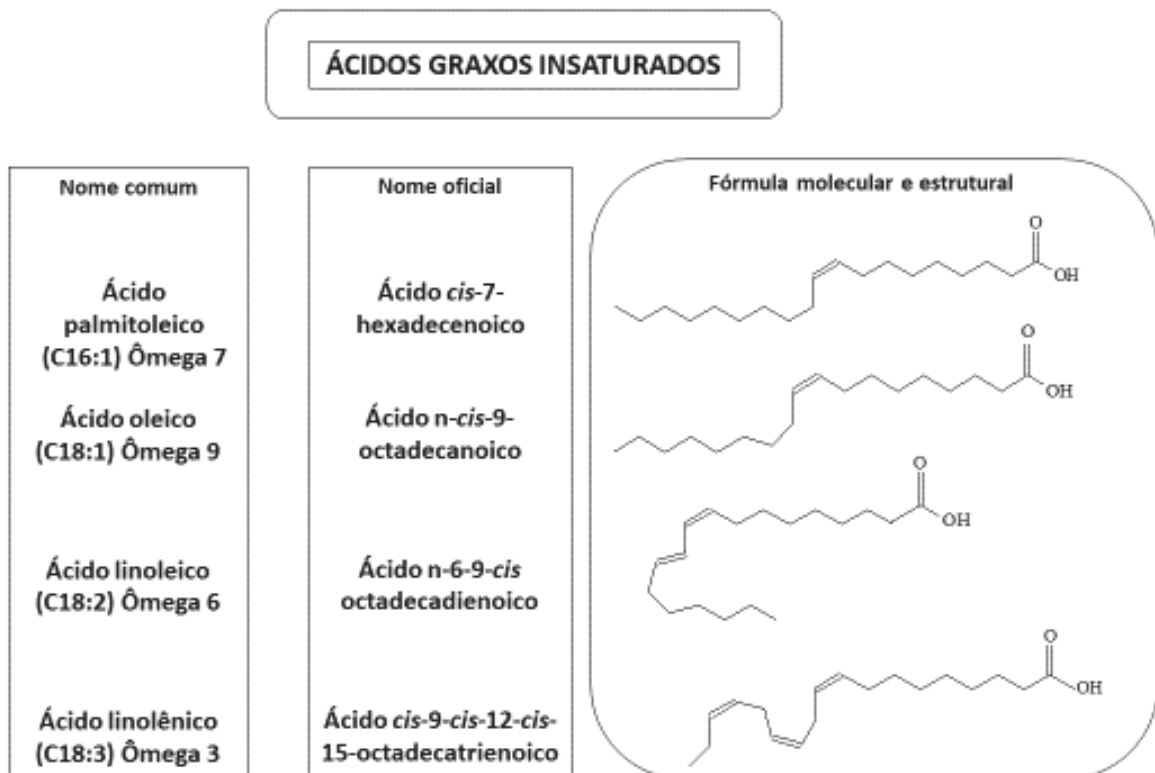
FIGURA 2 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS GRAXOS SATURADOS



Fonte: autor (2017)

Ácidos graxos insaturados (FIGURA 3) estão divididos em monoinsaturados que possuem somente uma ligação dupla e poli-insaturados que contêm uma ou mais duplas ligações em sua cadeia de carbonos. (RAPOSO, 2015). O ácido oleico é um ácido graxo insaturado, de cadeia longa (18:1), da série ômega 9, sendo o mais encontrado na natureza. As principais fontes de alimentos são os óleos de oliva e canola, entretando esse ácido graxo pode ser produzido pelo nosso organismo. (NASCIUTTI et al., 2015).

FIGURA 3 - ESTRUTURA DOS ÁCIDOS GRAXOS INSATURADOS



Fonte: autor (2017)

Ácidos graxos ômega 3, possuem sua primeira dupla ligação no carbono 3 a partir do radical metil do ácido graxo. São encontrados na sua grande maioria nos peixes, (sardinhas, salmão, atum, arenque, anchova) e algas marinhas, nos óleos de sementes de linhaça e alguns vegetais. (CANO, MÁRCIA, LIMA, 2008).

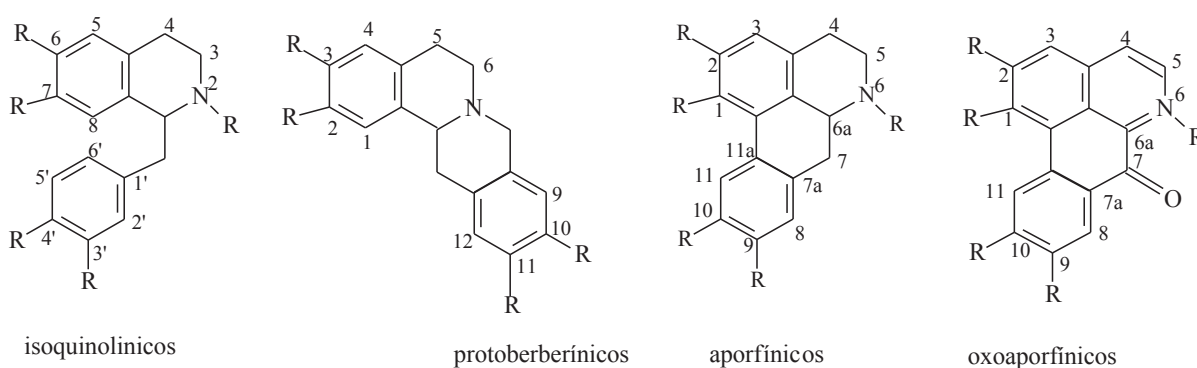
Os ácidos graxos poli-insaturados de cadeia longa  $\omega$ -3 (LCPUFAs) exibem ações citoprotetoras e citotóxica que contribuem para mecanismos anti-angiogênicos e neuroprotetores dentro da retina. (SANGIOVANNI; CHEW, 2005).

Além disso, vários estudos têm relatado a atividade citotóxica, (LANDS, 2016; JIANG; BRYCE; HORROBIN, 1998) de ácidos graxos essenciais, em diversas linhagens tumorais incluindo células de tumor colorretal humano (METERISSIAN et al., 1995), câncer de próstata (DU TOIT; VAN ASWEGEN; DU PLESSIS, 1996), adenocarcinoma mamário (COMBA et al., 2010), câncer de esôfago (MOON; BATRIEL; MANTZOROS, 2014), cancro da mama (SOTO-GUZMAN et al., 2013) cancro do pulmão. (ZAJDEL; WILCZOK; TARKOWSKI, 2015). Ainda tem sido relatado que ácidos graxos atuam na proliferação e diferenciação neural. (WANG et al., 2014). Diante de tantas atividades farmacológicas, há interesse em novas fontes de ácidos graxos, tais como sementes de frutos comestíveis.

### 3.2.2 Alcaloides de Annonaceae e Flavonoides

Outra classe de compostos importante da família Annonaceae são os alcaloides. Esta família caracteriza-se particularmente pela produção de alcaloides dos tipos isoquinolínicos e benziltetrahydroisoquinolínicos, embora ocorra a produção de outros tipos de alcaloides como protoberberínicos, tetrahydroprotoberberínicos, aporfínicos oxoaporfínicos (FIGURA 4), entre outros. (LIMA et al., 2012).

FIGURA 4 - ESQUELETOS DE ALGUMAS CLASSES DE ALCALOIDES COMUNS EM ANNONACEAE



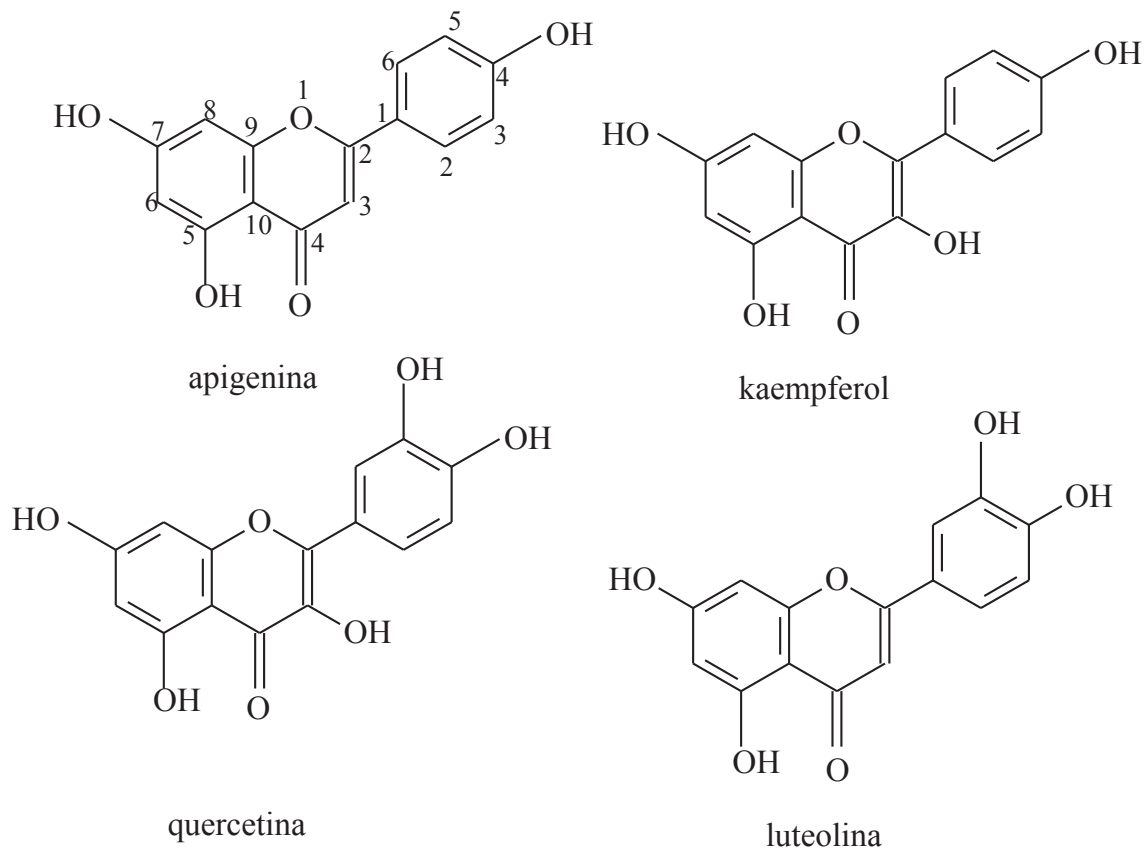
Fonte: autor (2017)

Estudos realizados com espécies da família Annonaceae evidenciaram algumas classes de metabólitos secundários importantes farmacologicamente. Entre eles, destacam-se flavonas benziladas com propriedades antimicrobiana e citotóxica; flavonoides com propriedades antimicrobiana, antimalárica e antitumoral, (EGYDIO-BRANDÃO et al., 2017) terpenoides com atividade antitumoral, citotóxica,

antibacteriana, antifúngica, antiparasitária, pesticida e efeitos imunossupressivos (MOGHADAMTOUSI et al., 2014) alcaloides benzilisoquinolínicos e bisbenziltetrahydroisoquinolínicos com atividade antiparasitária, antitumoral, inseticida, antidepressiva e antibacteriana (NUNES et al., 2012; TEMPONE et al., 2005); alcaloides aporfínicos tais como: liriodenine, anonaine e asimilobine que possuem atividade antitumoral e antileishmania. (DA SILVA et al., 2009).

As flavonas são uma classe de flavonoides, conhecidas por serem protetores químicos naturais, que absorvem luz em comprimentos de onda mais curtos do que aqueles visíveis ao olho humano, protegendo as células vegetais dos danos causados pela fotoxidação. Elas possuem propriedades antioxidantes, anticarcinogênica, anti-inflamatória, antiestrogênica, entre outras. Flavonoides (FIGURA 5) são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas e pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, podendo ser encontrados em espécies vegetais, entre as principais famílias botânicas se destaca a Annonaceae. Como exemplos identificados nessa espécie pode-se citar kaempferol, quercentina e a luteolina que é encontrada na salsa, alcachofra, aipo e nas uvas. (HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008).

FIGURA 5 - FLAVONOIDES DE ANNONACEAE



Fonte: autor (2017)

### 3.2.3 Acetogeninas de Annonaceae

Atualmente outra classe de compostos vêm tomando interesse, as acetogeninas, que estão sendo isoladas em todas as partes da planta. (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999a). Acetogeninas são substâncias naturais bioativas, derivadas dos policetídeos (FIGURA 1) que apresentam importantes atividades biológicas tais como: citotóxica, antitumoral, pesticida, vermícida, atividade leishmanicida, mal de Parkinson, antimicrobiana, diabetes, problemas gastrointestinais, infecções do fígado, coração, rins, hipotensor, doenças de pele, imunossupressora, antiemética, inibidora do apetite e antimalárica (TABELA 2).

Quimicamente caracterizam-se por possuir uma larga cadeia alifática com um a três anéis tetrahydrofurano (THF), geralmente com 35/37 carbonos, ligações duplas, cetonas, hidroxilas, epoxi e conjugação com um anel  $\gamma$ -lactônico no final da cadeia. (PAES et al., 2016). As acetogeninas têm despertado interesse, e são fortes candidatas para a próxima geração de fármacos antitumorais devido a seu mecanismo

de ação. Possuem ampla atividade farmacológica, devido a sua ação antitumoral, antimicrobiana, citotóxica, antiparasitária, imunossupressora e inseticida (TABELA 2).

A classe dos policetídeos possuem uma extensa quantidade de metabólicos secundários. É uma grande fonte de produtos naturais encontrado nas plantas que incluem vários medicamentos importantes. (BARRETO, 2014).



TABELA 2 - ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS COMPROVADAS DE ACETOGENINAS DE ESPÉCIES DE ANNONA.

(continua)

Espécie	Acetogenina	Atividade comprovada	Referências
<b><i>Annona squamosa</i> L.</b>	Squamocin IV, squamocin-V, squamoxinone-E, uvaringrandin, squamocin, bullatatin, uvariamicin-III, solamin, murisolin, annotemoyin-1.	Citotoxicidade contra a Hep-G2, SMMC-7721, BEL-7402, BGC-803 e linhas celulares de carcinoma humano H460.	(MIAO et al., 2016).
	Annosquacins A-D, annosquatin A, annosquatin B, annosquamin A, annosquamin B, annosquamin C 12, 15- <i>cis</i> -squamosstatin-a, bullatatin.	Citotoxicidade contra o carcinoma humano do pulmão (A-549), carcinoma de colo do útero (Hela), carcinoma da mama (MCF7), carcinoma de hepatoma (HepG2 e SMMC-7721) e linhas de células de adenocarcinoma gástrico (MKN-45).	(CHEN et al., 2012).
	Squamosstanin-c, squamosstanin-d, Squamocin-O1, squamocin-O2.	Citotoxicidade contra adenocarcinoma do cólon humano (HCT), carcinoma de pulmão humano (A-549), carcinoma da mama humano (MCF-7) e adenocarcinoma da próstata humana (PC-3). Atividades citotóxica contra as células K562 e HELA.	(YANG et al., 2009).
	2,4- <i>cis</i> -mosinone a, 2,4- <i>trans</i> -mosinone a, mosin c, mosin b, dieposabadelin, squamocenin, lepirenin, dotistenin.	Atividade citotóxica seletiva contra a linha celular de tumor pancreático humano (PACA-2) inseticida, atividade citotóxica.	(ARAYA et al., 2002). (IDENSI BAJIN et al., 2009). (RAGASA, TORRES; SORIANO, 2013).
	Muricin j, muricin k, muricin L, muricin m, muricin n, muricenin.	Antiproliferativa contra células humanas -PC-3 de cancro da próstata.	(SUN. et al., 2014, 2015).
<b><i>Annona muricata</i> L.</b>	Annoreticuin-9-ona, <i>cis</i> -annoreticuin, sabadelin.	Citotóxicas contra a linha celular de tumor pancreático humano (PACA-2), adenocarcinoma da próstata humana (PC-3) e carcinoma do pulmão humano (A-549), contra o carcinoma de hepatoma humano linha de células (Hep G2)	(VILA-NOVA et al., 2013).
	Corosolone, annonacinone.		
	Annonacin, squamocin.	Atividade leishmanicida.	(DE MORAES et al., 2016). (CORIA-TÉLLEZ et al., 2016).
	Cohibin a, b, cohibin c, d, donhexocin, montecristin, muricatenol, murihexol, coronin, epomuricenis a, b, epoxymurin, epomurinis a, b, epomusenin a, b, epoxyrollin a, dieporeticanin-1, murin a, rolin b, sabadelin,	Problemas gastrointestinais, infecções fígado, coração e rins, hipoglicemia, hipotensor, tratamentos de câncer. Doenças de pele, desconforto na asma, gripe e resfriados; contra parasitas internos, usada para banho de assento, tratar doenças	

corepoxylone, diepomuricanin a, b = como diarreia, coração e fígado. Para hipertensão, utilizado como epoxyrollin b, annocatalin, annoglaxin, repelentes e pesticidas. Controle de larvas de lepidópteros, pulgões annohexocin, annomontacin, annomontacin, e tripés; tratamento da malária, anti-helmíntico, parasitas, cis, annomuricin, annomuricin a, annomuricin antimicrobiana, anticonvulsivante, digestivo, distúrbios gástrico, b, annomuricin c, e, cis, trans, annomuricin- câncer da próstata, diabetes, neuralgia, reumatismo, artrite, dor done, annomutacin, annonacin, annonacin a, abdominal e nas costas, hemorragia menstrual, abortos, febre, annonacin, cis-, Annonacin-10-one, cis-, infecção vaginal, doenças renais e de pele, diarreia, usado como annonacinone, annonacin 10-one, (2,4-trans)- inseticida. dispepsia, alergia, helmintíase, úlcera 1or-annonacin aone, annopentocin a, b, c; estomacal. câncer, ascariíase, acidez do estômago, dificuldade em annoreticuín-9-one, annoreticuín, cis, urinar, tosse, dor de cabeça. tratamento da obesidade, urinário, arianacin, corossolin, corossolone, cis- micose, sedativo, para insônia; carcinoma de pulmão humano (A- corossolone, gigantetrocin a, gigantetrocin b, 549), carcinoma de mama (MCF-7), adenocarcinoma de colon 2,4 cis / trans, gigantetrocin b, humano (HT-29), carcinoma de rim (A-498), adenocarcinoma de gigantetronenin, goniothalamín, cis- próstata (PC-3) e carcinoma pancreático (PACA-2). Carcinoma de goniothalamín, isoannonacin, 2,4-trans; cis- células de epidermoide humano. isoannonacin, 2,4-trans-isoannonacin-10-one, javoricin, longifolicin, montanacin, montanacin h, muricapentocin, muricatalicin, muricatalin, muricatetrocin a, b, muricatin a, b, muricatin c, muricatin d, muricatocin a, muricatocin b, c, muricenin, muricin a, b, c, d, muricin f, g, muricin h, muricin i, muricin j, k, l, muricin m, muricin n, muricoreacin, muricoreacin a, b, murihexocin, murihexocin a, murihexocin b, murihexocin c, murisolín, cis-panatellín, cis-reticulatácín, cis-reticulatácín-10-one, solamín, cis-solamín, cis-solamín a, cis-uvariamicín i, iv, xylomaténin, xylomáticín, bullatácín, gigantecín, cis-squamostatín a, d, annocatacín a, annocatacín b, asimicinone-9-oxo.

Asiminecin, bullatácín, desacetylulvaricín, isodesacetylulvaricín, robustocín, rolliniastatin 1, 2.

Leishmaniose.

(ARANGO et al., 2000).

Squamocín, montanacín d, annonacín Desacetylulvaricín.

Citotóxico (SW480).

(XUE et al., 2014).

(continuação)

<b><i>Annona salzmannii</i> A. DC.</b>	Parisín, salzmanolin.  Salzmanin annonacin, almunequin, bullatalicin, squamocin.	Citotóxico, antiparasitário, imunossupressor e atividade inseticida, carcinoma nasofarínge.  Células do epitélio renal.	(QUEIROZ et al., 2003).  (QUEIROZ et al., 1999).
<b><i>Annona atemoia</i> Maab.</b>	Atemotetrolin, squamostatine a, squamostatín a, squamostatín d, squamostatín d, artemoín a-d, annonisin.	12,15- <i>cis</i> -Antioxidante e antimicrobiana	(DURET; HOCQUEMILLER, 1997; RABÉLO, 2014).
<b><i>Annona bullata</i> A. Rich.</b>	Parviflorín.	Citotóxica contra células de tumor.	(HOYE, YE, 1996).
<b><i>Annona montana</i> Macfad.</b>	Montalícín a-e, <i>cis</i> -annoreticuin, montalícín i, montalícín j, annonacin, <i>cis</i> -annonacin, gigantetronenín, annonacín, <i>cis</i> -annonacín, xylopiánin, annoreticuin, goniotalamicín, montalícín c, e, j.  Montalícín c.  Montalícín, <i>cis</i> -montalícín.  Montalícín g, h, monlicíns a, b, (+)-monhexocín, (-)-monhexocín, murisolín, 4-deoxyannomontacín e muricatacín montanacín f, annoquinone a.	Hepato carcinoma, Hep G2 e Hep 3B citotóxica: HCT-8, 1A9PTX10 U-87-MG, PC-3 (próstata).  Citotóxica: 1A9; Hep G2.  Carcinoma (LLC).  Antibacteriano: <i>Bacillus subtilis</i> e <i>Micrococcus luteus</i> .	(LIAW et al., 2004).  (LIAW et al., 2005). (WANG et al., 2002). (WU, T. S. et al., 1987).
<b><i>Annona crassiflora</i> Mart.</b>	Araticulín.	A 459 (carcinoma humano de pulmão), HT-29 (adenocarcinoma humano do colon), MCF-7 (carcinoma humano de mama), RPMI 7951 (melanoma) e U 251 (carcinoma do sistema nervoso central).	(SUN; CASSADYT; OLIVEIRA, 1996).
<b><i>Annona coriacea</i> Mart.</b>	Extrato das sementes de toda a planta.  Coriadienín.	Induz efeito genotóxico, atividade citotóxica da medula óssea, antitumoral, imunossupressor, pesticida, antiprotozoária, anti-helmíntico, antimicrobiano, contra câncer de próstata, efeito neurotóxico.  Contra carcinoma nasofarínge humano.	(FAGUNDES, DE OLIVEIRA, VALADRES, 2005).  (DA SILVA et al., 1996).

(conclusão)

<b><i>Annona cherimolia</i> Mill.</b>	Annomolon (1) e 34-epi-annomolon (1'), e uma mistura de epimeros de annomolon B (2) MIAP aCa-2) e 34-epi-annomolon B (2').	(SON; KIM; WOO, 2003).
<b><i>Annona spinescens</i> Mart.</b>	Almunequin, bullatanocin, isodesacetylulvaricin, squamocin-k, desacetylulvaricin, neoannonin Spinencin.	Antiparasitários, inseticidas, citotóxica, antitumoral, e atividades imunossupressoras. (QUEIROZ et al., 1997).
<b><i>Annona reticulata</i> L.</b>	cis-isomurisolenin e trans-isomurisolenin annoreticuín-9-ona, bullatatin, squamocin, cis-bullatatinone, bullatatinone, cis-murisolinon, trans-bullatatinone, trans-murisolinon.	Atividade citotóxica contra Hep. 2,2,15 (células de hepatoma humano transfectadas VHB), Hep. G2 (hepatoma humano célula), KB (carcinoma nasofaríngeo humano) e CCM2 (células de tumor do cólon humano).
<b><i>Annona cornifolia</i> A.ST.-Hill</b>	9-hidroxfolianin. Cornifolin.	(LIMA et al., 2011). Citotóxica contra carcinoma mamário humano (MDA MB-231), fibroblasto tumorigênico de camundongo (L-929), melanoma humano (MeWo), glioma de rato- C6.
	9-hidroxfolianin, folianin b, asimicin, bullatatin 9-hidroxfolianin, 4-desoxylongimicin, folianin a, squamocin m, squamocin L, folianin b annofolin annotacin, isolongimicin b.	Letalidade de Artemia salina (BST), antioxidante e citotóxica. (LIMA, ; PIMENTA; BOAVENTURA, 2010).
<b><i>Annona glabra</i> L.</b>	Anoglacin a, anoglacin b. Glabracin a, glablabracin b, javoricin bullatanocin. Glabranin, annonacin, corossolin, corossolone	Carcinoma da mama humano (MCF-7) e carcinoma pancreático (PACA-2). Carcinoma do pulmão humano (A-549), carcinoma de mama humana (MCF-7), adenocarcinoma do cólon humano (HT-29), humano), carcinoma renal humano(A498),adenocarcinoma da próstata humano ( PC-3) e carcinoma pancreático humano (PACA-2). Inibidores potentes do complexo I da cadeia respiratória mitocondrial. (LIU et al., 1999). (LIU et al., 1998).
<b><i>Annona glauca</i> Schumacher &amp; Thonn.</b>	Annoglaucín, rolliniastatin-2. Annomonícín, montanancín.	(TORMO et al., 2003). (WU, T. S. et al., 1987). Células leucêmicas de murinos L1210 e P388, adenocarcinoma mamário humano MDA-MB23. (JOSSANG et al., 1990).

A partir do ano de 1982 surgiu o primeiro estudo fitoquímico da família, o isolamento da primeira acetogenina (ACG), a uvaricin, isolada das raízes de *Uvaria acuminata*, que apresentou potencial antitumoral, despertando atenção dos pesquisadores. (JOLAD et al., 1982).

As acetogeninas de Annonaceae contém estrutura básica de 35 a 37 átomos de carbonos que combinados com uma unidade de 2-propanol em C-2 formam um anel metil-substituído  $\alpha,\beta$ -insaturada  $\gamma$ -lactona terminal. (FANG et al., 1993).

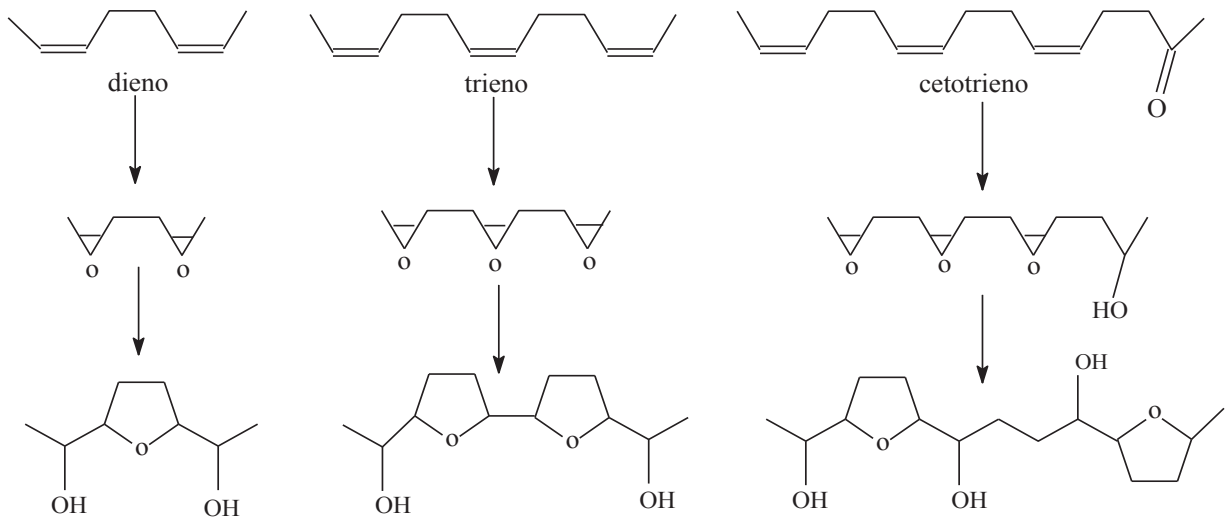
As acetogeninas com cadeia hidrocarbônica menor que (C35), comparada com acetogeninas de cadeia carbônica maior que (C37), possuem maior atividade, mesmo que os outros fatores estruturais sejam idênticos, isso é devido a acetogenina possuir uma cauda menos hidrofóbica. A existência de um anel THF podem ter a mesma atividade inibitória da enzima que 2 aneis THF. Do anel THF até o anel  $\gamma$ -lactônico tem um espaço, e esse influencia na atividade das acetogeninas, se ele é curto enfraquece a atividade. (MIYOSHI et al., 1998).

O grupo  $\gamma$ -lactona terminal é essencial para atividade. Redução da ligação dupla em  $\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas reduz a atividade; cetolactonas são menos potentes que  $\gamma$ -lactonas  $\alpha,\beta$ -insaturadas; redução da cetona restaura alguma atividade. (FANG et al., 1993).

As acetogeninas possuem rotas biossintetizadas através de mecanismos semelhantes aos ácidos graxos, com combinações lineares de duas ou três unidades de carbono via acetil-CoA, malonil-CoA e propanil-CoA. Os anéis tetrahidrofuranos (THF) adjacentes ou não-adjacentes, podem ser formados devido epoxidação de intermediários insaturados dieno, trieno e cetotrieno seguido por abertura e fechamento de anel, ao longo da cadeia de ácido graxo, onde podem ser encontrados grupos oxigenados, hidroxilas, cetona e anel epóxido, anéis tetrahidrofuranos, além de ligações duplas. (FIGURA 6).

A estereoquímica dos anéis tetrahidrofuranos e dos grupos hidroxilas adjacentes depende das posições das ligações duplas. (LANDOLT et al., 1995).

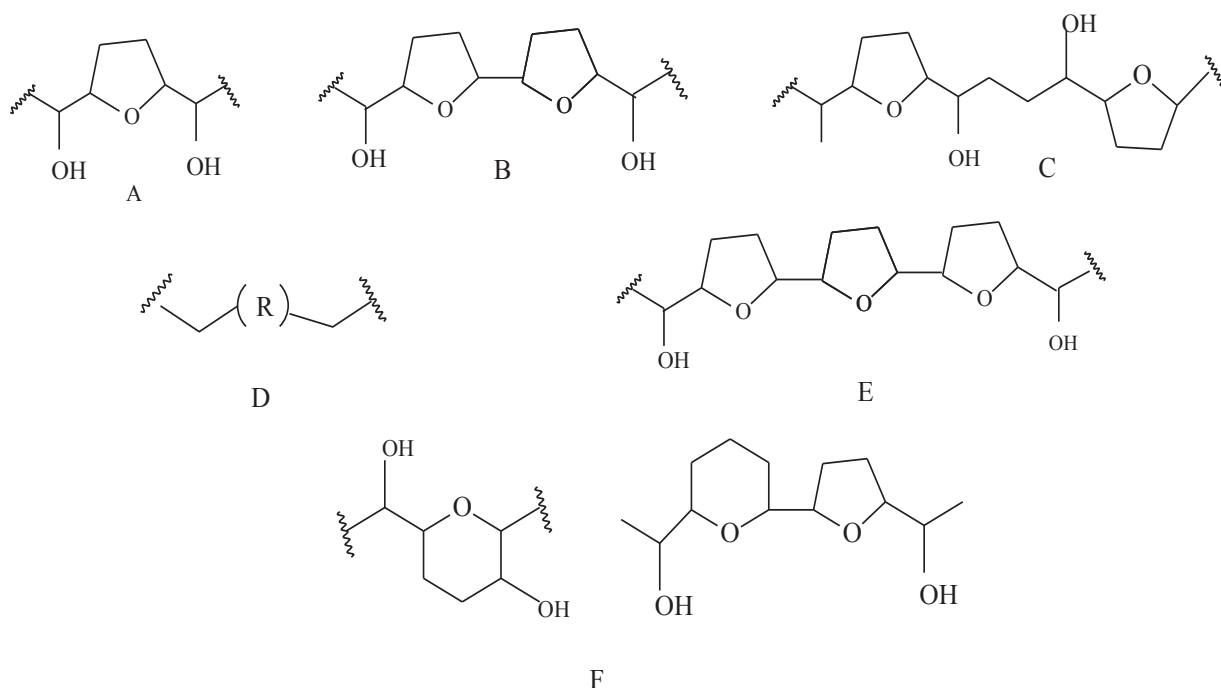
FIGURA 6 - PROPOSTAS DE BIOSÍNTESE DAS ACETOGENINAS



Fonte: Adaptado de LANDOLT (1995).

Acetogeninas, em relação ao anel tetrahydrofurano, são classificadas quanto ao número, presença ou ausência de anéis, de subunidades de  $\gamma$ -lactonas e de anel epóxido. São classificadas: anel mono-tetrahydrofurano (A), bis-tetrahydrofurano adjacente (B) e não adjacente (C), e sem anel mono-tetrahydrofurano (D), tri-tetrahydrofurano adjacente (E) e acetogeninas não clássicas (F). (FIGURA 7) (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999a).

FIGURA 7 - SUBUNIDADES DE ACETOGENINAS DE ANNONACEAS TETRAHIDROFURANICAS



FONTE: o autor (2017)

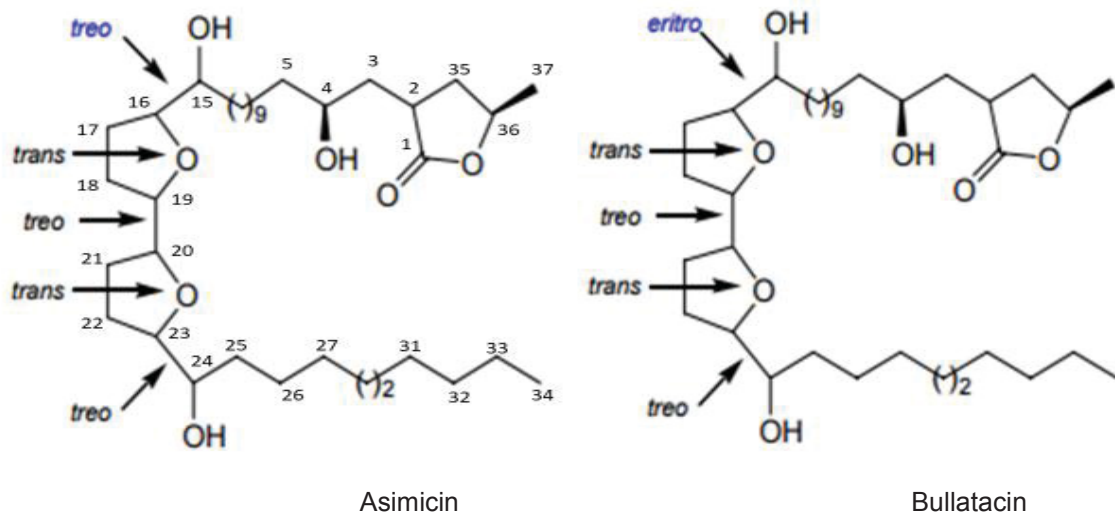
Em relação a estrutura-atividade as acetogeninas contendo 2 anéis THF adjacentes são mais potentes que os contendo 2 anéis THF não adjacentes, seguidas pelas acetogeninas que tem apenas 1 anel THF e essas são mais potentes daquelas que não possuem anel THF. (LUNA, 2006; PAES et al., 2016).

Modificações que aumentam a atividade incluem o grupo hidroxila (OH) na posição C-4, o aumento do número de hidroxilação para 3 OH livres também aumentam a atividade antitumoral, especialmente se uma OH estiver presente no final da cadeia alifática; um nível médio de polaridade deve ser importante porque a presença de 4 ou 5 OH diminui a atividade. (LUNA, 2006; PAES et al., 2016).

Compostos com grupo ceto ao longo da cadeia alifática são menos ativos que seus análogos hidroxilados; redução dos grupos carbonilas a álcoois aumenta a atividade. A presença de ligações duplas e/ou dióis vicinais ao longo da cadeia hidrocarbônica aumentam a atividade. Derivados acetonídeos de dióis vicinais, derivados acetilados e outras possíveis substituições sobre as hidroxilas produzem compostos menos ativos que aqueles de partida.

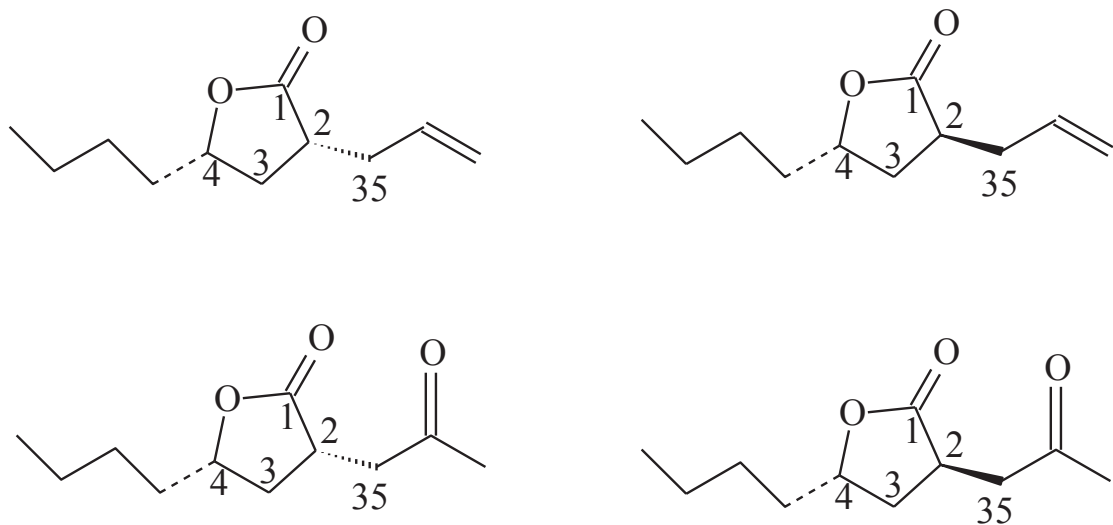
A estereoquímica da molécula é fundamental para a Relação Estrutura Atividade (REA). A mudança na estereoquímica de um centro assimétrico pode resultar em aumento na atividade citotóxica. A asimicin (R) é um bilhão de vezes menos ativa do que a bullatacin (S). (FIGURA 8).

FIGURA 8 - CONFIGURAÇÕES DE ACETOGENINAS ASIMICIN (R) E BULATACIN (S)



A subunidade  $\gamma$ -lactona  $\alpha,\beta$ -insaturadas é essencial para a atividade citotóxica.. (RUPPRECHT; HUI; MCLAUGHLIN, 1990). (FIGURA 9).

FIGURA 9 - CLASSIFICAÇÃO DAS ACETOGENINAS



FONTE: Fang (1993)

### 3.2.4 Mecanismo de ação das acetogeninas

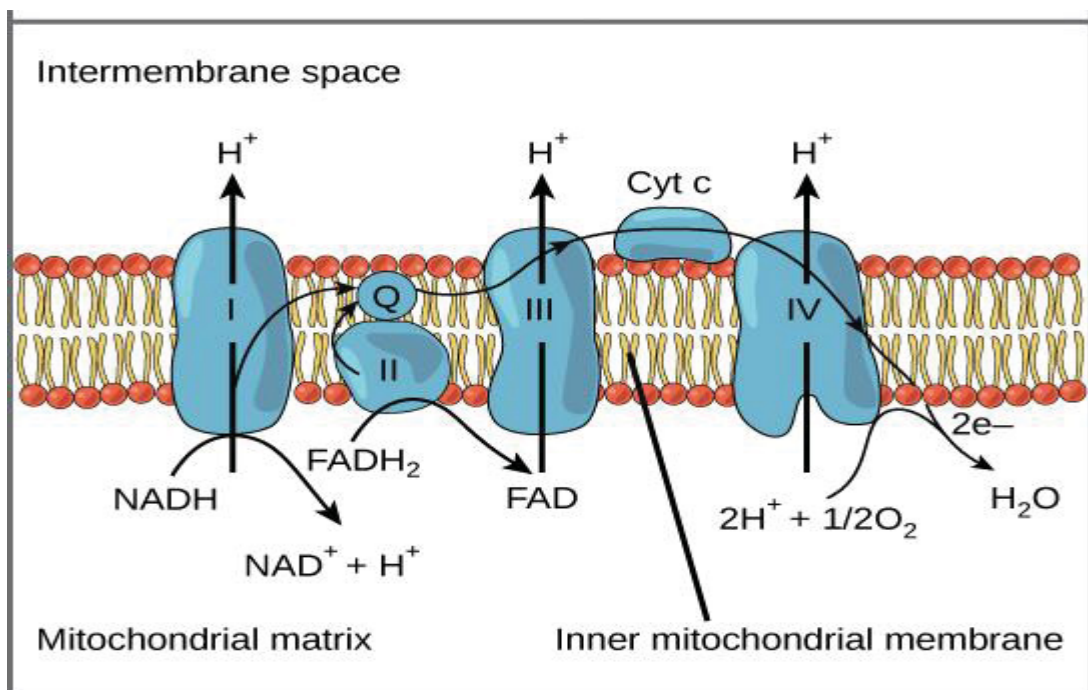
Sua ação primária, em vários modelos celulares, está relacionada com sua capacidade de depleção dos níveis de ATP, inibição específica da respiração mitocondrial do complexo I. Ao inibir a NADH: Ubiquinona oxirredutase ocorre o bloqueio da fosforilação oxidase das mitocôndrias, não permitindo a conversão de



ADP e Fosfato inorgânico em ATP principalmente de células tumorais, uma vez que essas células possuem uma alta demanda de ATP. (BARRETO, 2014 ; PAES et al., 2016).

Como o próprio nome sugere, a ATP sintase (FIGURA 10) vai catalisar a síntese de moléculas de ATP, através do processo de fosforilação oxidativa. Ou seja, para se dar a fosforilação do ADP em ATP é necessário que ocorra uma oxidação, que neste caso passa pela utilização de NADH ou FADH<sub>2</sub> na cadeia respiratória mitocondrial.

FIGURA 10 - ATP SINTASE MITOCONDRIAL



Fonte: <https://openstax.org/details/books/biology-2012>

### 3.3 GÊNERO *ANNONA* L.

O gênero *Annona* L. compreende, 175 espécies tropicais, com a recente inclusão do gênero *Rollinia* (LOPES; MELLO-SILVA, 2014). No Brasil, as plantas deste gênero podem ser encontradas no Cerrado e na Floresta Amazônica. (EGYDIO et al., 2013). Estas espécies são popularmente conhecidas como fruta-do-conde, pinha, graviola, entre outros nomes. (BOSCOLO; VALLE, 2008). As espécies mais

comuns encontradas em território nacional são *A. cherimola*, *A. coriacea*, *A. muricata*, *A. reticulata*, *A. mucosa* e *A. squamosa* (FIGURA 11). (DI STASI, 2002).

FIGURA 11 - ESPÉCIES FRUTIFERAS DO GÊNERO *ANNONA*



*Annona cherimola*  
(cherimóia)



*Annona coriacea*  
(marolo)



*Annona mucosa*  
(biribá)



*Annona muricata*  
(graviola)



*Annona squamosa*  
(fruta-do-conde)



*Annona reticulata*  
(condessa)

Fonte: <http://www.safarigarden.com.br>

Economicamente, algumas espécies de *Annona* são empregadas no paisagismo, como fornecedoras de madeira de ótima qualidade, além, é claro, do fornecimento de frutos comestíveis. Ainda, muitas espécies deste gênero são utilizadas na medicina popular, nos mais diversos tratamentos de enfermidades. (DA CRUZ, 2011).

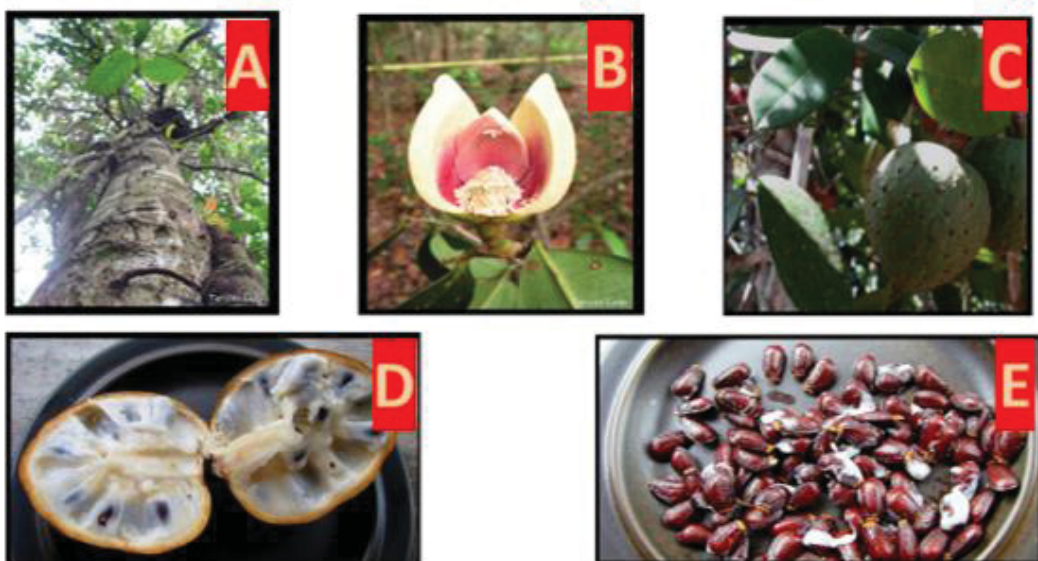
#### 3.4 *Annona salzmannii* A. DC.

*Annona salzmannii* é uma árvore frondosa de ocorrência no sudoeste do Brasil, Bahia e São Paulo (FIGURA 12 A). Possui ramos castanho-acinzentados quando herborizados, curtos, na inserção dos pecíolos, densamente lenticelados, folhas com

pecíolo 0,7-1,5 cm compr; lâmina oblonga ou obovada, 7-21,5×3,5-8 cm, coriácea, base aguda, ápice agudo a acuminado, margem revoluta, 7-12 pares de nervuras secundárias, glabra na face ventral, tricomas esparsos na face dorsal. Bráctea triangular (FIGURA 12 B), a oblongo-lanceolada, ca. 0,4×0,3cm, pilosa. Flores isoladas, terminais; pedicelo ca. 2 cm compr., piloso, glabrescente quando maduro. Sépala condescidas, obtusas, ca. 0,5×1 cm, pubescentes na face externa, glabras na face interna. Pétalas 6, bisseriadas, livres; pétalas externas oblongas, ca. 5×3 cm, amarelas, com mancha roxa na face interna (quando frescas), tricomas simples, adpressos, dourados, em ambas as faces; pétalas internas oblongas, ca. 3,5×2 cm, coloração roxo-clara na face interna e amarelada na face externa (quando frescas), tricomas simples, adpressos, na base e tricomas menores no restante. Estames ca. 0,4 cm compr., papilosos no ápice. Carpelos numerosos, ca. 0,5 cm compr.; ovário densamente piloso, 1 óvulo basal; estilete turbinado. Fruto (FIGURA 12 C) sincárpico, obovado, ca. 5×4 cm (ainda jovem), quando maduro sua casca é amarela (FIGURA 12 D), tricomas simples, ferrugíneos, suas sementes são várias (FIGURA 12 E). (PONTES; BARBOSA; MAAS, 2004).

É um gênero muito diverso, possuindo distribuição nos Estados da Bahia, Sergipe, Pernambuco, Paraíba e no litoral do Espírito Santo. (FIGURA 12).

FIGURA 12 - *Annona salzmannii*: A) ÁRVORE, B) FLÔR, C) FRUTO VERDE, D) FRUTO MADURO E) SEMENTES



### 3.5 CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DE *A. salzmannii*

A classificação taxonômica (TABELA 3) proporciona a importância da planta, sua ordem em categorias.

TABELA 3 - CLASSIFICAÇÃO TAXONÔMICA DA ESPÉCIE DE *A. salzmannii*

Classificação Taxonômica	
REINO	Vegetal
DIVISÃO	Magnoliophyta
CLASSE	Magnoliopsida
SUBCLASSE	Magnollidae
ORDEM	Magnoliales
FAMÍLIA	Annonaceae
SUBFAMÍLIA	Annonoideae
TRIBO	Unoneae
SUBTRIBO	Annoneae
GÊNERO	<i>Annona</i>

Fonte: (CRONQUIST, 1985).

### 3.6 ESTUDOS FITOQUÍMICOS E BIOLÓGICOS DE *A. salzmannii*

Paulo et al. (1992), isolou quatro alcaloides a anonaina (16 mg), reticulina, (28 mg), laureliptina (8 mg) e isoboldina (11 mg), das cascas de *A. salzmannii* e testou suas atividades antimicrobiana. O alcaloide anonaina mostrou atividade contra as bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermis* e não mostrou atividade na presença de *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os alcaloides reticulina, laureliptina e isoboldina mostraram atividade antifúngica. (PAULO et al., 1992).

Da Cruz (2011) estudou o extrato hexânico da casca de *A. salzmannii* e identificou três sesquiterpenos, óxido de cariofileno, espatulenol e selin-11-en-4 $\alpha$ -ol; dois esteroides, estigmast-4-en-3-one,  $\beta$ -sistosterol, além de, três alcaloides oxoaporphinos, azaanthraceno, cleistopholina e liriodenina; três alcaloides aporphinos, anonaina, xylopina e assimilobina; e um alcaloide benziltetrahydroisoquinolino, reticulina. Os alcaloides anonaina, reticulina, isoboldina e

asimilobina são considerados marcadores quimiotaxonômicos deste gênero. (DA CRUZ, 2011).

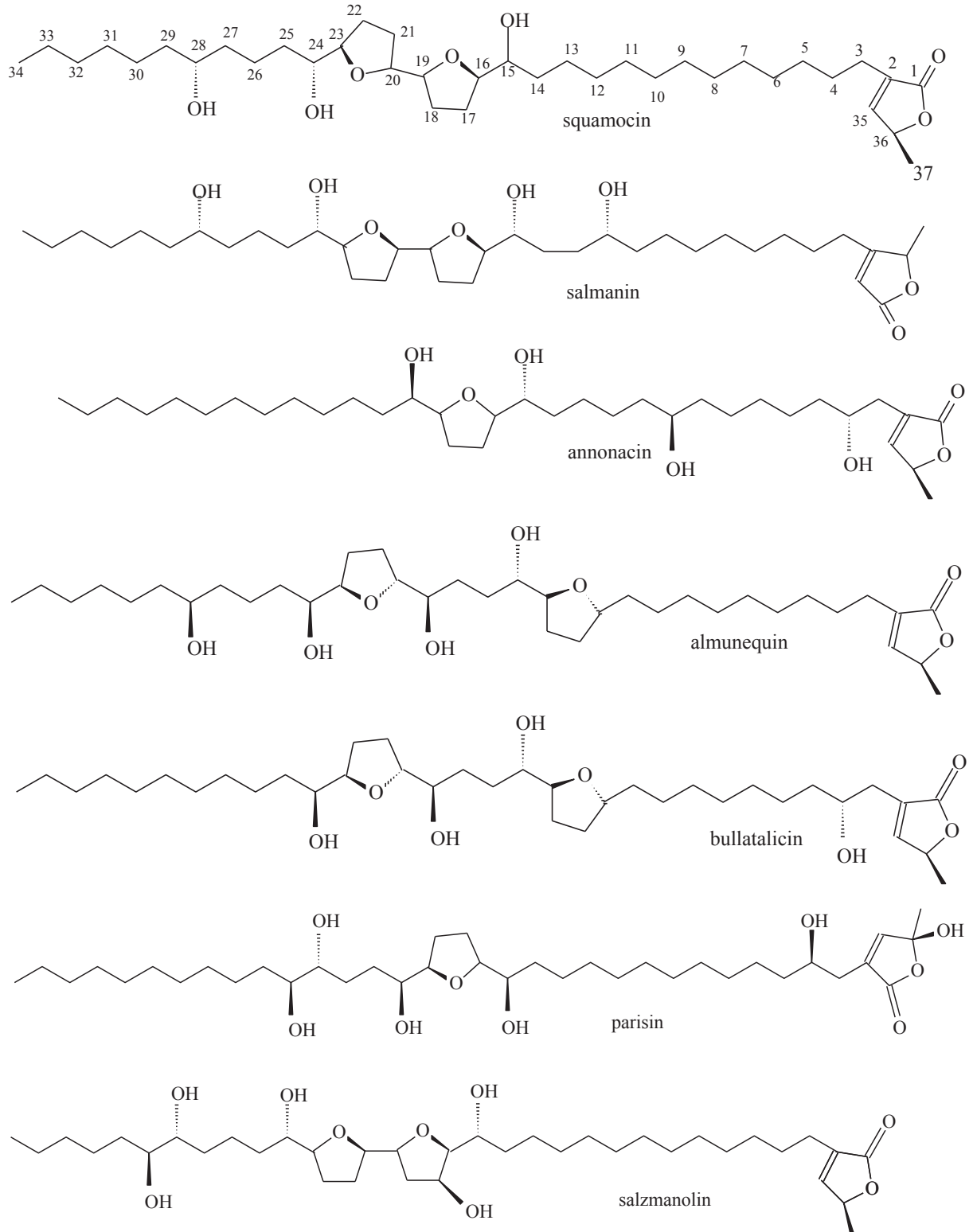
Da Costa et al. (2013) a partir das cascas de *A. salzmannii* isolou os alcaloides liriodenina, anonaina, asimilobina, reticulina e cleistofolina e observou a atividade antioxidante realizada pela capacidade de absorção do oxigênio radical (ORAC-FL) e a atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo. Na atividade antioxidante o alcaloide mais ativo foi a asimilobina com o valor de ORAC<sub>FL</sub> de 2,09, sendo duas vezes mais ativo do que o padrão de Trolox, seguido de anonaina 0,85 e liriodenina 0,30, equivalentes de Trolox relativos. Para atividade antimicrobiana os compostos mais ativos foram os aporfinoides liriodenina, anonaina e asimilobina. Em relação aos ensaios antimicrobianos, todos os alcaloides avaliados apresentaram alguma atividade antimicrobiana. (COSTA et al., 2013).

Em um estudo recente do extrato metanólico das folhas de *A. salzmannii* foi identificado os alcaloides anonaina, asimilobina e norcoridina, sendo a última citada encontrada pela primeira vez nas folhas desta espécie. (TELES et al., 2015).

Costa et al. (2011) realizou o estudo químico e biológico do óleo essencial das folhas de *Annona*, obtidos através de hidrodestilação e analisados por CG-DIC (Cromatografia à Gás por Detecção de Ionização de Chama). A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi avaliada contra bactérias e fungos, assim como a atividade larvicida contra as larvas de *Aedes aegypti*. No estudo químico foram identificados 34 compostos predominando os sesquiterpenos, sendo os principais biciclogermacreno (20,3%), (*E*)-cariofileno (19,9%),  $\delta$ -cadineno (15,3%),  $\alpha$ -copaeno (10,0%) e all-aromadendreno (5,7%). (COSTA et al., 2011).

Costa et al. (2013) continuou os estudos químicos e biológicos do óleo essencial de *Annona salzmannii* realizando a avaliação da atividade biológica contra *Trypanosoma cruzi* com uma concentração de  $89,7 \pm \text{mg mL}^{-1}$  considerada atividade muito promissora. Os óleos essenciais exibiram potente atividade antitumoral, para quase todas as linhagens celulares avaliadas, com inibição do crescimento total (TGI) menor que  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ . No estudo químico foram identificados 23 compostos, sendo que predominaram os 98,3 % sesquiterpenos, cujo os principais  $\delta$ -cadineno (22,6%), (*E*)-cariofileno (21,4%),  $\alpha$ -copaeno (13,3%), biciclogermacreno (11,3%) e germacreno D (6,9%). confirmando a importância química e biológica do óleo essencial. (COSTA et al., 2013).

Queiroz et al. (1999, 2003) estudou o extrato de MeOH das raízes de *A. salzmannii* e observou uma nova acetogenina bistetrahidrofurano, salzmanin, além das já conhecidas, squamocin, almunequin, bullatalicin, annonacin e parisin salzmanolin (FIGURA 13). A atividade citotóxica destas foi investigada apresentando um resultado significativo. A atividade citotóxica da salzmanin foi investigada e comparada com a squamocin, as duas acetogeninas tiveram significativa atividade nas linhagens celulares, KB, ED<sub>50</sub> (carcinoma nasofaríngeo humano) 10<sup>-4</sup> µg/mL, comparado com as células normais VERO, ED<sub>50</sub> (células epiteliais renais de macaco) 10<sup>-2</sup> µg/mL, a atividade maior é da acetogenina salzmanin (0,1 x 10<sup>-4</sup> µg/mL) e squamocin (4 x 10<sup>-4</sup> µg/mL), propabilidade dessa atividade da salzmanin ter uma hidroxila no C-12. (QUEIROZ et al., 1999, 2003).

FIGURA 13 - ACETOGENINAS ISOLADAS DAS RAIZES DE *A. SALZMANNII*

Fonte: Queiroz (1999, 2003).

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material botânico de *Annona salzmannii* (frutos) foi coletado em novembro de 2013 na Mata do Castro com as coordenadas 11°24'24"S, 37°25'86"W, Município de Santa Luzia do Itanhi, Sergipe, sob a coordenação do Prof. Dr. Emmanuel Vilaça Costa. O material botânico foi identificado pela Professora Dra. Ana Paula do Nascimento Prata, taxonomista botânica do Departamento de Biologia da Universidade Federal do Sergipe (UFS). Uma exsicata da espécie foi depositada no Herbário ASE nº 28807/UFS. Cadastro no SISGEN nº ACAA36.

### 4.2 SECAGEM E MOAGEM

Dos frutos maduros foram retiradas as sementes, e essas foram lavadas em água corrente para a retirada da polpa que se encontrava ao redor das mesmas. Após, as sementes foram secas em estufa de ar circulante 45 °C por cinco dias, sendo em seguida trituradas em um moedor tipo industrial, modelo LQ003- Vithory..

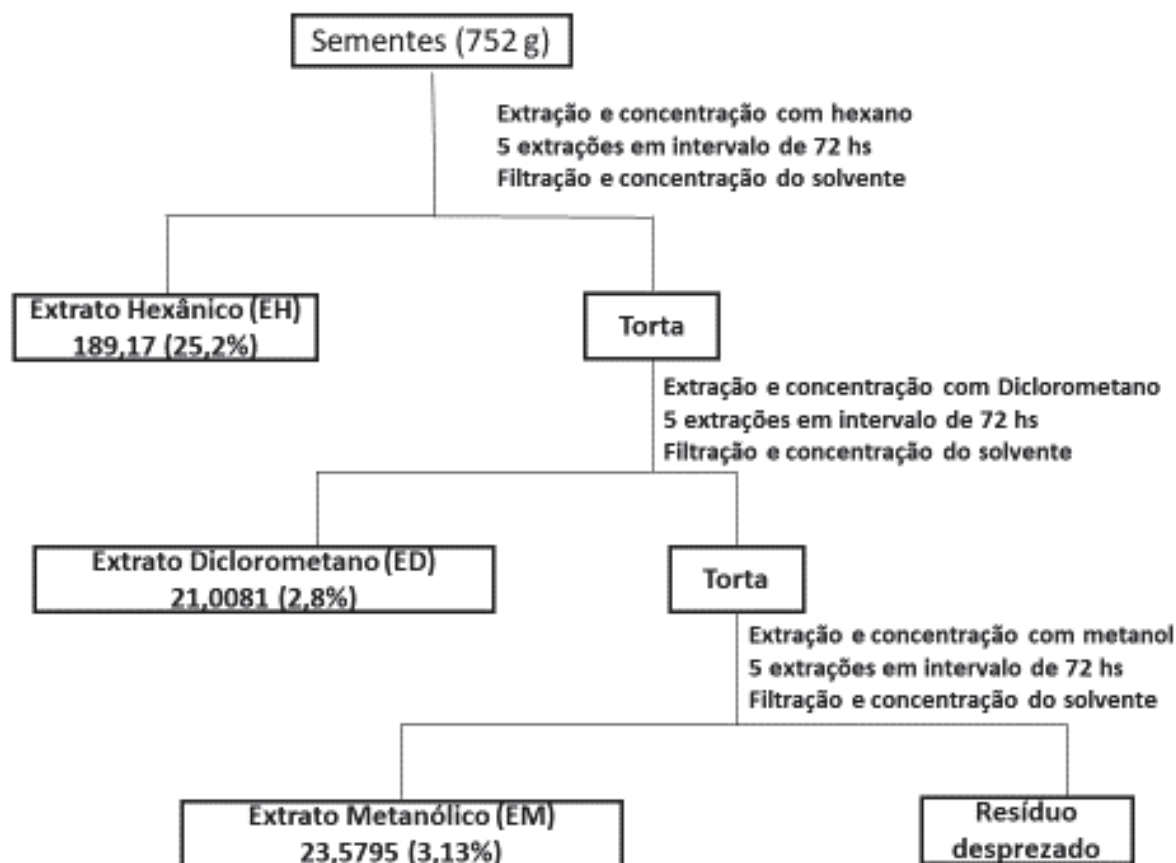
### 4.3 OBTENÇÃO DE EXTRATOS DAS SEMENTES

As sementes de *Annona salzmannii*, após secas, moídas e pesadas (752 g), foram submetidas à extração a frio pelo método de maceração com solventes em ordem crescente de polaridade (hexano, diclorometano e metanol) em recipiente fechado, temperatura ambiente pelo período de 72 horas, sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator. Este procedimento foi feito por mais 5 vezes até a exaustão. O extrato em hexano foi concentrado em um rotoevaporador à pressão reduzida, à temperatura de 40-50 °C e em seguida foi seco em dessecador. Após a completa secagem, o extrato hexano resultou um rendimento de 189,17 g sendo 25,2% do peso inicial. O extrato foi mantido em freezer para posterior estudo fitoquímico e biológico. A torta (resíduo) de cada extração respectiva foi utilizada para produção dos extratos diclorometano e metanólico, obtido pelo mesmo procedimento citado anteriormente. O extrato diclorometano apresentou rendimento de 21,0081 g



sendo 2,8%, do peso inicial. Já o extrato metanólico resultou em um rendimento de 23,5795 g sendo 3,1% do peso inicial. O resíduo do peso inicial remanescente foi desprezado (Figura 14).

FIGURA 14 - FLUXOGRAMA DA OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE *A. salzmannii*



Fonte: O autor (2014).

#### 4.4 ANÁLISES DE RMN, CG-EM e HR-MS

Os solventes P.A. (hexano, diclorometano e metanol) utilizados nas preparações dos extratos e nos fracionamentos passaram pelo processo de destilação, para a retirada das impurezas.

As análises de HR-MS foram realizadas em um Espectrômetro de Massas do tipo Orbitrap (LTQ Orbitrap Velos, Thermo Scientific), equipado com uma fonte de ionização *Electrospray* (ESI).

As análises de CG-EM foram realizadas em Varian 3800 Saturn 2000R ITD.

RMN Bruker Avance III 600, operando a 14,1 Tesla, observando  $^1\text{H}$  a 600,13 MHz equipado com uma sonda de detecção de 5 mm quadri nuclear inversa com gradiente z.

Todos os equipamentos estão instalados no Departamento de Bioquímica da UFPR.

#### 4.5 ANÁLISE DO EXTRATO HEXANO POR CG-EM

Essa análise foi feita em colaboração com o Departamento de Bioquímica da UFPR sob a coordenação do Prof. Guilherme Sasaki. O procedimento foi realizado através de derivatização lipídica, foram feitas alíquotas com 100 mL de óleo dissolvido em  $\text{CHCl}_3$  – MeOH solução (1:1, v/v), sendo que a primeira alíquota foi seca sob uma corrente de  $\text{N}_2$  suave. A metanólise foi realizada em seguida, com MeOH-HCl 1N a 100 °C durante 2 horas para obter os ésteres metílicos dos ácidos graxos (FAMES), que foram extraídos por partição (1 mL) n-hexano e (0,5) de água destilada. A fase orgânica (superior) foi recolhida e evaporada em fluxo de  $\text{N}_2$ . A análise foi realizada usando um cromatógrafo a gás Varian 3800 com um detector Saturn 2000 RMS (Agilent Technologies, EUA) equipado com 30 mx 0,25 mm d.i. coluna capilar de baixa bleed / MS (DB-225). A rampa de temperatura para a análise de ácidos graxos foi a seguinte: o injetor 250 ° C, inicial do forno a 50 ° C, mantém 2 min, aquece a 210 ° C (40 ° C por min, então mantém por 45 min). Os espectros de ionização elétrica (EI) foram obtidos a 70 eV a 200. O volume de injeção foi de 1 mg / 200  $\mu\text{L}$ , com uma razão de divisão de 1: 5. A análise pós-execução foi realizada com uma estação de trabalho Saturn 5.1. (SASSAKI et al., 2008).

#### 4.6 ANÁLISE DO EXTRATOS E FRAÇÕES POR RMN

Esta análise foi feita em colaboração com o Departamento de Química sob a coordenação do Prof. Andersson Barison. Espectros de RMN de  $^1\text{H}$  foram adquiridos quantitativamente em  $\text{CDCl}_3$  a 303 K num espectrômetro de RMN Bruker Avance III 600, operando a 14,1 Tesla, observando  $^1\text{H}$  a 600,13 MHz equipado com uma sonda de detecção de 5 mm quadri nuclear inversa com gradiente z. Todos os deslocamentos químicos de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC, são dados em ppm em relação

ao sinal TMS a 0,00 ppm como referência interna, e as constantes de acoplamento (J) em Hz. (BARISON et al., 2010).

## 4.7 ANÁLISE DO EXTRATO DICLOROMETANO

### 4.7.1 Cromatografia por exclusão em coluna

A amostra do extrato, diclorometano das sementes de *Annona salzmännii* (5,02 g) solubilizada com diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) e metanol (CH<sub>3</sub>OH) (1:1, v/v) foi submetida ao fracionamento através de cromatografia por exclusão, utilizando fase estacionária Sephadex LH-20 (CC, altura x φ = 75 x 2,7 cm) (FIGURA 15 A), e fase móvel CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> e MeOH (1:1 v/v). Após o fracionamento obteve-se 15 frações (FIGURA 15 B) (TABELA 4). Estas foram analisadas por CCDA.

### 4.7.2 Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

Todas as amostras foram, analisadas por CCDA. Foram usadas na análise e separação das substâncias, cromatofolhas Merck, sílica gel 60, com indicador de fluorescência F<sub>254</sub>, com suporte em alumínio e 0,2 mm de espessura. Para a separação, foi preparada a fase móvel utilizando hexano: clorofórmio: nitroetano: acetato de etila: acetona: metanol: acetonitrila: água (12:2:4:4:1:2:1,6:0,1). Após o desenvolvimento da cromatografia utilizou-se como agentes reveladores uma solução de anisaldeído sulfúrico a quente (1 g de anisaldeído, 5 mL de ácido sulfúrico e 90 mL de metanol). A análise de CCDA do extrato bruto de diclorometano e suas frações quando revelados utilizando solução do revelador de Kedde solução a frio (solução A – 3% de ácido 3,5-dinitrobenzóico e solução B- 5,7 % de hidróxido de potássio em etanol), apresentaram manchas de cor rosa avinhado características para as acetogeninas, conforme observou-se para o padrão de acetogeninas annonacin. Estas substâncias também foram visualizadas em comprimento de onda longo (365 nm). As placas também foram visualizadas em câmara de UV (UVP – Chromato-VUE® C-70G UV viewing system).

FIGURA 15 - A) COLUNA SEPHADEX DO EXTRATO DE DICLOROMETANO DAS SEMENTES DE *ANNONA SALZMANNII*, B) FRAÇÕES 1-15



Fonte: O autor (2014).

TABELA 4 - ANÁLISE DO EXTRATO DE DICLOROMETANO (5,02 g) DAS SEMENTES DE *A. salzmannii*

Fração	– Diclorometano/Metanol (1:1, v/v)	
	Rendimento (g)	
1	0,0092	
2	0,0558	
3	0,3558	
4	0,9218	
5	0,9058	
6	0,5565	
7	0,3894	
8	0,3445	
9	0,2438	
10	0,1136	
12	0,0560	
13	0,0350	
14	0,0303	
15	0,0202	

Fonte: O autor, 2015

## 4.8 ENSAIO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.8.1 Ensaio para a atividade larvicida

Larvas do 3º estágio de *Aedes aegypti* foram utilizadas no experimento (SANTOS; SILVA; BARBOSA, 2010). As faixas de concentração foram determinadas por uma curva de concentração-resposta prévia com 20 larvas. Uma solução estoque de 20.000 ppm foi preparada usando cada extrato e/ou fração (20 mg/mL), Tween-80 2,0 mg mL<sup>-1</sup> (10% v/v), DMSO 6,0 mg mL<sup>-1</sup> (30% v/v) e água mineral natural 12,0 mg mL<sup>-1</sup> (60% v/v). Da solução estoque foram preparadas soluções que variaram de 10 a 1000 ppm. Vinte larvas foram coletadas com uma pipeta Pasteur e colocadas em um frasco de 25 mL. O volume foi completado para 20 mL com água mineral natural e transferidos para copos descartáveis contendo volumes variáveis da solução estoque. Uma contagem de mortalidade foi realizada após 24 h. Os controles foram preparados com Tween-80 (0,1 mL), DMSO (0,3 mL) e água (19,6 mL). Para cada concentração e controle foram feitas três repetições. Como controle positivo foi utilizado o organofosforado temephos nas concentrações de 0,015 a 0,135 ppm. Esse ensaio foi realizado no Laboratório de Química Farmacêutica do Departamento de Fisiologia da UFS, em colaboração com o Prof. Dr. Emmanoel Vilaça Costa.

Neste trabalho, utilizou-se a classificação de Komalamisra e colaboradores como critério de avaliação do potencial dos extratos testados. Estes autores consideram que extratos brutos com valores CL<sub>50</sub> < 750 mg/L são considerados promissores; CL<sub>50</sub> < 50 mg/L são ativos, CL<sub>50</sub> entre 50 e 100 são moderadamente ativos, e CL<sub>50</sub> maior que 750 mg/L são inativos. (KOMALAMISRA et al., 2005).

### 4.8.2 Ensaio para a atividade citotóxica

O ensaio citotóxico *in vitro* foi realizado utilizando linhagem de células tumorais B16-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HL-60 (leucemia promielocítica humana) doadas pelo Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil. As amostras foram diluídas em DMSO (100%) estéril na concentração de 10 mg mL<sup>-1</sup> para os extratos. Os compostos foram testados em concentrações que variaram de 0,19-50 µg mL<sup>-1</sup>.

As células foram cultivadas em garrafas para cultura de células (75 cm<sup>3</sup>, volume de 250 mL). Os meios utilizados foram RPMI 1640 e suplementados com 10% de soro bovino fetal. As células foram mantidas em incubadoras com atmosfera de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. Diariamente acompanhou-se o crescimento celular com a utilização de microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingia confluência necessária para renovação de nutrientes. Para a manutenção de células aderidas utilizou-se tripsina (0,25%) caso as células estivessem aderidas as paredes das garrafas. As culturas de células apresentavam negativas para microplasma, conforme avaliado pela técnica de qPCR (Lookout® Mycoplasma qPCR detection kit, Cat. MP0040, Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA).

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos sobre a proliferação de células normais, PBMC (*peripheral blood mononuclear cells* – linfócitos e monócitos) foram obtidas a partir de sangue periférico de voluntários saudáveis. A coleta do sangue foi realizada em frasco heparinizados por profissionais capacitados, nas dependências do Laboratório de Engenharia Tecidual e Imunofarmacologia (LETI-Fiocruz-Bahia), utilizando seringas esterilizadas e descartáveis com volume de 4 mL. As PBMC foram isoladas a partir de uma amostra de cerca de 3 mL de sangue, acrescida de 5 mL de salina. As etapas até o isolamento incluíram a adição de 3 mL de Ficoll, seguida por 15 minutos de centrifugação a 1.500 rpm, e feita a aspiração dos PBMC, presentes na região intermediária entre as hemácias e o plasma. A suspensão de PBMC foi transferida para um outro tubo o qual foi acrescido com salina até o volume de 11 mL, sendo centrifugado por 55 minutos a 1.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado de PBMC foi ressuspenso em meio completo (RPMI 1640 acrescido de 20% de soro fetal bovino e 10 µg mL<sup>-1</sup> de ConA) e contado em câmara de Neubauer para posterior diluição e plaqueamento.

Para avaliar a citotoxicidade dos compostos, o ensaio do alamar blue foi realizado após 72 horas de exposição com os compostos teste. O alamar blue, recentemente identificado como resazurina, é um indicador fluorescente/colorimétrico com propriedades redox. Como os sais de tetrazólio, o alamar blue reduz-se em células em proliferação, sua forma oxidada é azul (não fluorescente/célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável). A redução do alamar blue reflete a proliferação celular. Este foi inicialmente utilizado para indicar crescimento e/ou viabilidade celular no monitoramento de proliferação de linfócitos e atualmente apresenta várias aplicações. (O'BRIEN et al., 2000).

Inicialmente, as células foram plaqueadas em placas de 96 cavidades (100 µL/poço de uma solução de  $0,3 \times 10^6$  células/mL para células em suspensão e  $0,7 \times 10^5$  células/mL para células aderidas). Após 24 horas de incubação, as amostras testes dissolvidas em DMSO foram adicionadas a cada poço e incubadas por 72 horas. A doxorrubicina foi utilizada como controle positivo. O controle negativo recebeu a mesma quantidade de DMSO. Quatro horas (24 horas para o PBMC) antes do final do período de incubação, 20 µL da solução estoque ( $0,312 \text{ mg/mL}^{-1}$ ) de alamar blue (resazurina) foram adicionados a cada poço. As absorbâncias foram mensuradas nos comprimentos de onda de 570 nm (reduzido) e 595 nm (oxidado) utilizando uma leitora de placa. (AHAMMADSAHIB et al., 1993).

A proliferação celular foi calculada utilizando a seguinte fórmula: % proliferação =  $ALW - (AHW \times R0) \times 100$ . Onde, ALW e AHW são as absorbâncias no menor e maior comprimento de onda, respectivamente. O R0 foi calculado utilizando a seguinte fórmula:  $R0 = AOLW/AOHW$ . Onde, AOLW e AOHW são as absorbâncias do meio adicionado ao alamar blue subtraído das absorbâncias do meio isolado nos comprimentos de onda menor e maior, respectivamente. A substância foi testada em diluição seriada, em duplicata ou triplicata. A porcentagem de inibição foi calculada e registrada a porcentagem de inibição x log da concentração e determinado suas  $IC_{50}$  realizado a partir de regressão não-linear utilizando o programa Prisma versão 5.0 (GraphPad Software). (AHAMMADSAHIB et al., 1993; O'BRIEN et al., 2000).

#### 4.8.3 Ensaio para a atividade antimicrobiana

Os ensaios antimicrobianos foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade II – Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná (UFPR) em colaboração com o Prof. Dr. Fabio Seigi Murakami.

Para realização dos ensaios foram utilizadas as cepas padrão da *American Type Culture Collection* (ATCC), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8738), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

Os micro-organismos liofilizados, submetidos aos ensaios antibacterianos, foram previamente colocados em tubos estéreis contendo caldo triptona de soja (TSB) e incubados por 24 h a  $(35 \pm 0,5) ^\circ\text{C}$ , para revitalização das células. Decorrido este

período de incubação, foi realizada cultura por esgotamento em ágar triptona de soja (TSA) para bactérias e em ágar sabouraud para levedura. As placas foram incubadas à 35 °C e 25 °C, respectivamente, pelo período entre 20 a 23 horas. A partir do crescimento em ágar foram realizadas as suspensões de cada micro-organismo, transferindo-se uma colônia ou metade de uma colônia isolada para solução salina 0,9%. Em seguida, as suspensões foram padronizadas através da comparação visual da turbidez com tubo equivalente à escala 0,5 de Mc Farland, para obtenção de uma cultura com, aproximadamente,  $1,0 \times 10^8$  UFC (unidades formadoras de colônias) por mililitro.

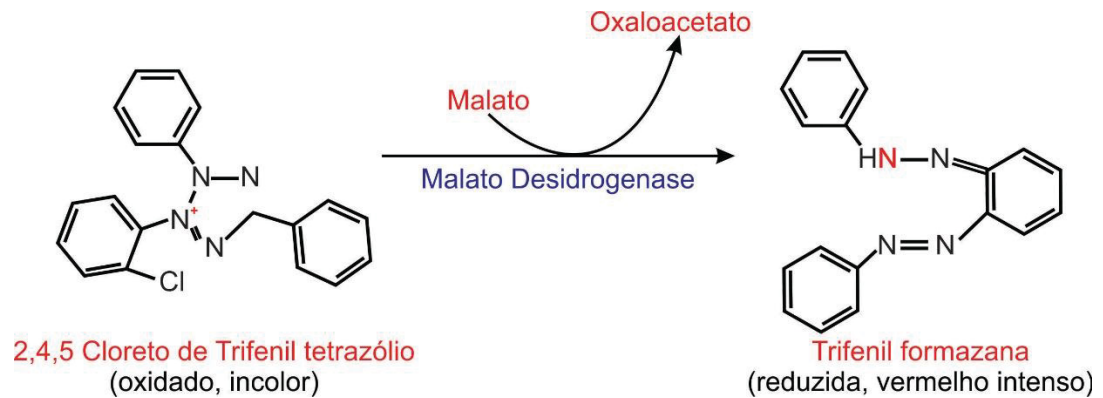
Os testes foram realizados pela técnica de diluição em microplacas, de 96 poços dispostos em doze colunas (1 – 12) e oito linhas (A – H), de acordo com a metodologia descrita por Veiga (2016). As análises foram realizadas em cabine de segurança biológica classe II, utilizando-se uma microplaca para cada micro-organismo. Para realização dos ensaios em todos os poços foram adicionados 100 µL do caldo específico para cada micro-organismo (caldo Mueller Hinton para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras). No primeiro poço de cada coluna (exceto nas colunas 11 e 12 reservadas para os controles positivo, negativo e branco) foram adicionados 100 µL das amostras (extrato diclorometano, F4 e F5) a serem testadas, nas concentrações iniciais para o extrato e frações (50 a  $1,56 \text{ mg. mL}^{-1}$ ). Em seguida, após homogeneização, com auxílio de uma micropipeta multicanal, uma alíquota de 100 µL do conteúdo de cada poço foi transferida para os pocinhos subsequentes das colunas obtendo-se, assim, diluições seriadas de 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256. Após a diluição foram adicionados 10 µL da suspensão de micro-organismos em cada poço. Os controles consistiram em 100 µL de caldo, 100 µL da solução diluente das amostras e 10 µL de solução salina 0,9% (controle negativo); 100 µL de caldo + 100 µL de solução antimicrobiano (cloranfenicol  $100 \text{ µg. mL}^{-1}$  para bactérias e cetoconazol  $250 \text{ µg. mL}^{-1}$  para levedura) e 10 µL da suspensão de micro-organismos (controle positivo); 100 µL de caldo, 100 µL da amostra testada e 10 µL de solução salina 0,9% (branco). (VEIGA, 2016).

As microplacas foram incubadas a 35 °C por 22 horas. Decorrido esse intervalo de tempo, adicionou-se em cada poço 20 µL da solução de TTC (cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio) a 0,125%, e as microplacas foram novamente incubadas por mais duas horas. Durante este período os poços em que há atividade dos extratos ou frações permanecem incolores, enquanto os poços nos quais há crescimento



microbiano coram de tom róseo a vermelho. (DUARTE et al., 2005). Após pesquisar na literatura foi utilizado o TTC cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (cor avermelhada), O TTC é um indicador de oxirredução utilizado para diferenciar tecidos metabolicamente ativos daqueles inativos, principalmente viabilidade celular. O mecanismo de reação baseia-se na dupla tetrazólio/formazano, no qual forma um sistema redox. Na presença de bactérias ativas, o TTC é reduzido a formazano vermelho (FIGURA 16), que se refere a quantidades de células viáveis. (GABRIELSON et al., 2002).

Figura 16 – Reação do TTC



De acordo com a leitura visual das microplacas após adição do TTC determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM), ou a última concentração na qual não houve desenvolvimento de coloração rósea para cada um dos microorganismos. (HOLETZ et al., 2002; NOLDIN et al., 2004).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 ANÁLISE DO EXTRATO HEXÂNICO DAS SEMENTES DE *ANNONA SALZMANNII*, POR CG-EM.

A análise de CG-EM da fração rica em ésteres metílicos provenientes do óleo das sementes de *A. salzmannii* (FIGURA 17, TABELA 5), mostrou a porcentagem de saturados (18,7%): palmítico 16:0 (FIGURA 17-A) (14,3%), palmitoleico (1,7%) (FIGURA 17-B), esteárico 18:0 (FIGURA 17-C) (4,4%), e demonstrou uma alta porcentagem de ácidos graxos insaturados (80,5%): oleico 18:1 (FIGURA 17-D) (33,5%) e linoleico 18:2 (FIGURA 17-E) (45,3%).

Entre os ácidos graxos saturados (18,7%), o ácido palmítico (14,3%) foi o mais abundante, seguindo do ácido esteárico (4,4%). ácido linolênico e ácido mirístico não foram detectados.

TABELA 5 - IDENTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS GRAXOS POR CG-EM EM SEMENTES DE *ANNONA SALZMANNII*

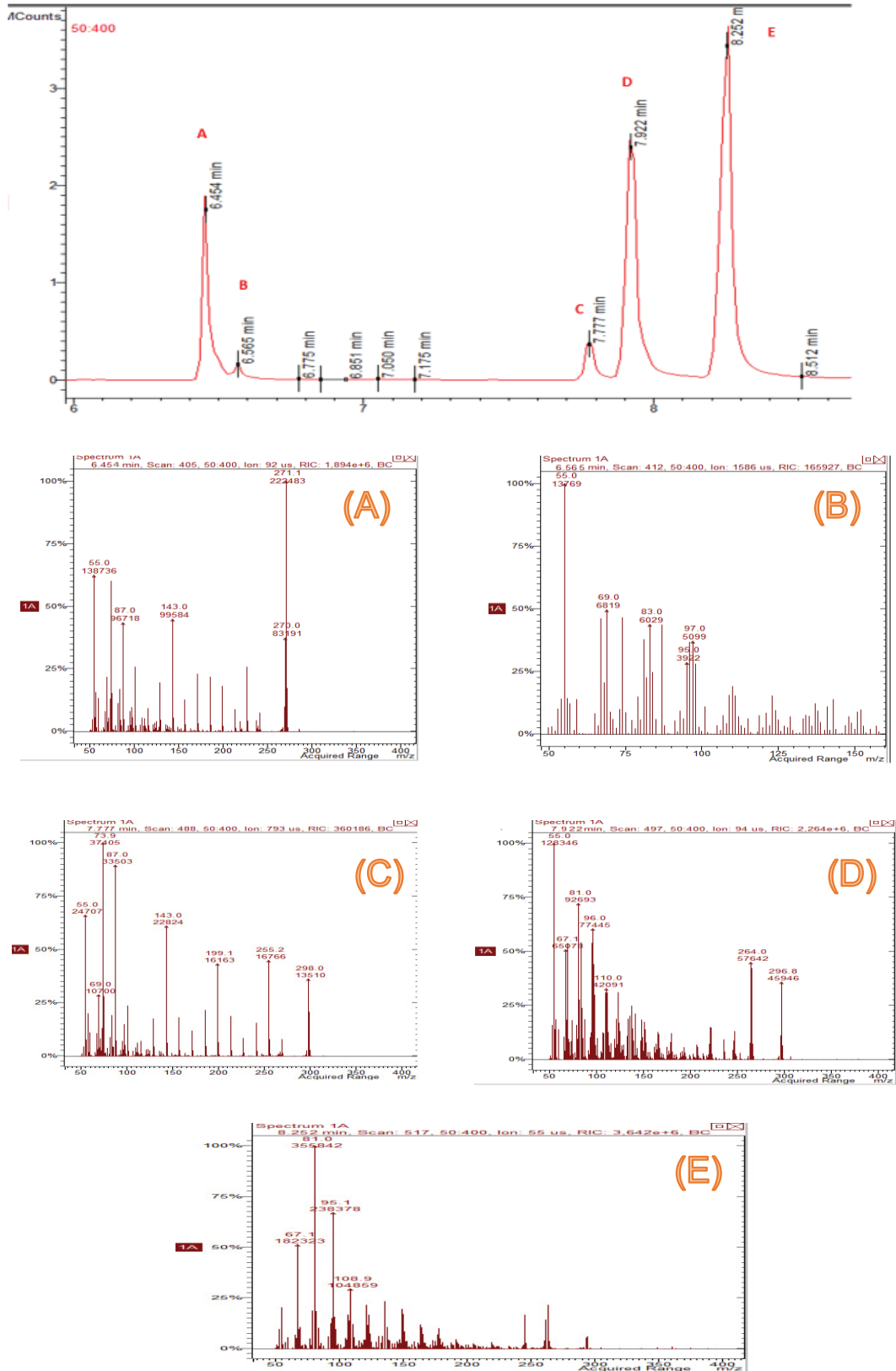
Pico	T <sub>R</sub> (min) <sup>a</sup>	Nome <sup>b</sup>	IE-EM m/z <sup>c</sup>	Área Pico <sup>d</sup>
A- 1	6.452	Ác. palmítico (16:0)	55.0, 87.0, 143.0, 270.1, 271.1	2901000
B- 2	6.565	Ác. palmitoleico (16:1)	55, 69, 83, 97	186875
C- 3	7.777	Ác. esteárico (18:0)	55, 69,0 73.9, 87,0, 101, 143.0, 199.1, 255.2, 298,0	1030000
D- 4	7.922	Áci. oleico (18:1)	55, 67.1, 81.0, 96.0, 110.0, 264.0, 296.8	6865000
E- 5	8.252	Ác. linoleico (18:2)	67.1, 81.0, 95.1, 108.9	205848

<sup>a</sup> Tempo de Retenção, <sup>b</sup> Nome dos ácidos graxos, <sup>c</sup> Ionização Eletrônica- Espectrômetria de Massas, <sup>d</sup> Área do pico, <sup>e</sup> Referencia Wiley 275, Lipid library.

Fonte: O Autor, 2014.

FIGURA 17- ANÁLISE DE CG-EM DO EXTRATO HEXANO DE SEMENTES DE *ANNONA SALZMANNII*. ESPECTROS DE MASSAS. (A) ÁCIDO PALMÍTICO t<sub>R</sub> = 6,454 min; (B) ÁCIDO

PALMITOLEICO  $t_R = 6,565$  min; (C) ÁCIDO ESTEÁRICO  $t_R = 7,777$  min; (D) ÁCIDO OLEICO  $t_R = 7,922$  min; (E) ÁCIDO LINOLEICO  $t_R = 8,252$  min



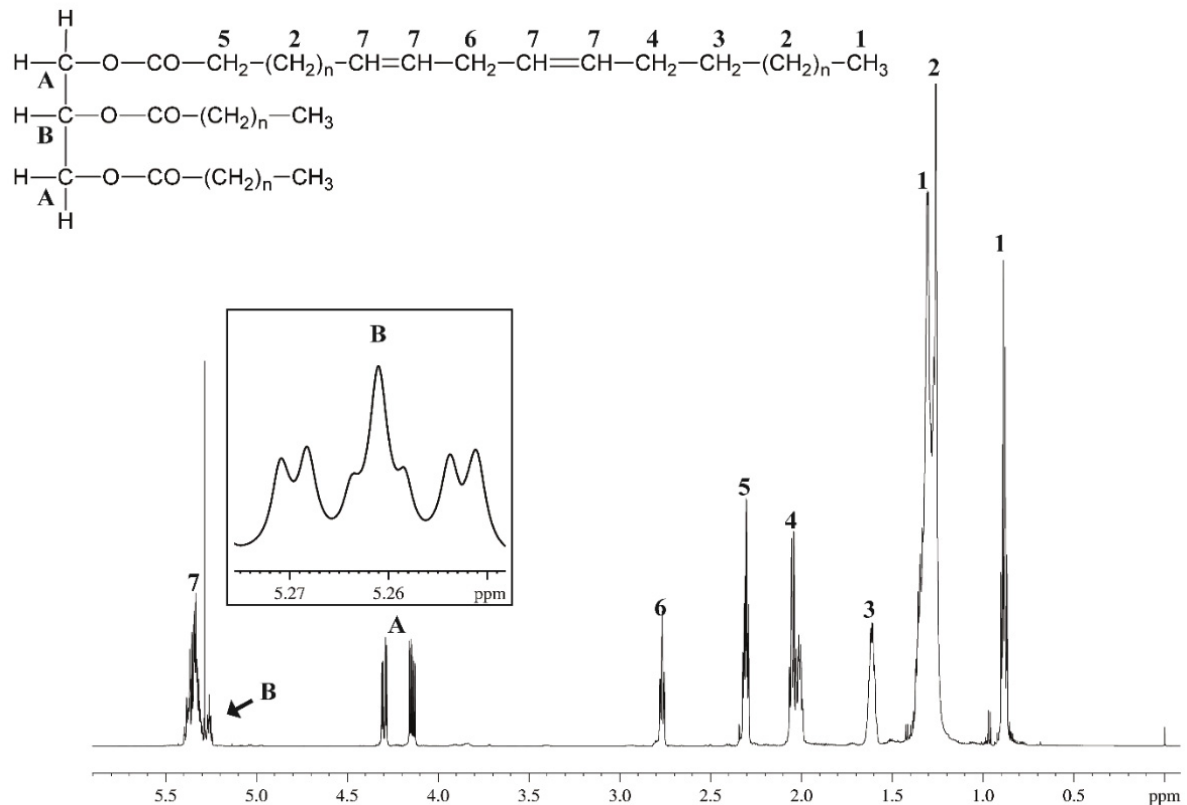
FONTE: O Autor (2016).

Estes resultados estão consistentes com outros dados publicados de ácidos graxos observados em outras espécies de *Annona*. A espécie *A. cornifolia* revelou 71,4% de ácidos graxos insaturados e 22,7% de saturados (LIMA et al., 2012); em *A. squamosa* 73,3% de ácidos graxos insaturados e 25,7% de saturados (ANSARI; AFAQUE; AHMAD, 1985); em *A. crassiflora* 74,3% de ácidos graxos insaturado e 33,3% de saturado (LUZIA; JORGE, 2013); em *A. diversifolia* mostrou 78,4% de ácidos graxos insaturados e 21,6% de saturados (BENITOREYES-TREJO et al., 2014); em *A. muricata* os 75,7% de ácidos graxos insaturados e 24,3% saturados. (CASTRO et al., 1984; MORENO; JORGE, 2012).

## 5.2 ANÁLISE DO EXTRATO HEXÂNICO DAS SEMENTES DE *A. salzmannii* POR RMN DE <sup>1</sup>H.

O extrato hexânico das sementes da *Annona salzmannii* foi analisado por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H. A análise identificou sinais de triacilglicerol (FIGURA 18) contendo ácidos oléico, linoléico e ácidos graxos saturados. Por conseguinte, o teor relativo de cada ácido graxo esterificado para o radical glicerol, revelando que as sementes oleaginosas são compostas por ácidos graxos saturados sendo palmítico e esteárico (13,2%), e insaturados oléico (36,1%) e linoléico (49,3%).

FIGURA 18 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO EXTRATO DE HEXANO DAS SEMENTES DE *A. salzmannii*, MOSTRANDO ATRIBUIÇÕES DE SINAIS DA ESTRUTURA DOS TRIACILGLICEROIS



Fonte: O autor, 2014.

A TABELA 6 apresenta os dados de RMN de  $^1\text{H}$ , indicando a atribuição dos sinais aos núcleos de hidrogênio na estrutura dos triglicerídeos. O sinal de número 1 entre  $\delta$  0,90 e 0,80 ppm é referente aos hidrogênios da metila, o número 2, entre  $\delta$  1,40 e 1,15 ppm é atribuído aos hidrogênios de grupos metilenos da cadeia alifáticas, o número 3, entre  $\delta$  1,70 e 1,50 ppm é atribuído aos hidrogênios do carbono do éster. O sinal 4, entre  $\delta$  2,10 e 1,90 ppm é atribuído aos hidrogênios ligados aos carbonos da dupla ligação entre os carbonos. O sinal 5, entre  $\delta$  2,35 e 2,20 ppm é atribuído aos hidrogênios de carbonos do éster, o sinal 6 entre  $\delta$  2,80 e 2,70 ppm é atribuído aos hidrogênios metilenos dialílicos, o sinal 7, entre  $\delta$  4,32 e 4,10 ppm são referentes aos hidrogênios ligados aos carbonos do glicerol. O sinal 8 entre  $\delta$  5,26 e 5,20 ppm corresponde ao hidrogênio ligado ao carbono de éster e finalmente o sinal 9, entre  $\delta$  5,40 e 5,26 aos hidrogênios ligados aos carbonos que formam ligações duplas.

TABELA 6 - DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$  DO EXTRATO HEXANO DE *A. salzmannii* E DADOS DA LITERATURA

Número	Literatura (ppm) <sup>1</sup>	Extrato Hexano (ppm) <sup>2</sup>	Designação
1	0,90-0,80	0,91-0,86	-CH <sub>3</sub> Grupo acil
2	1,40-1,15	1,40-1,20	-(CH <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> Grupo acil
3	1,70-1,50	1,66-1,57	-OCO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> Grupo acil
4	2,10-1,90	2,07-1,98	-CH <sub>2</sub> -CH=CH Grupo acil
5	2,35-2,20	2,32-2,28	-OCO-CH <sub>2</sub> Grupo acil
6	2,80-2,70	2,78-2,75	=HC-CH <sub>2</sub> -CH=
7	4,32-4,10	4,31-4,12	-CH <sub>2</sub> OCOR Glicerol
8	5,26-5,20	5,28-5,23	>CHO CR
9	5,40-5,26	5,40-5,29	-CH=CH- Grupo acil

Fonte: (GUILLÉN; RUIZ, 2001)<sup>1</sup>, O autor (2014)<sup>2</sup>.

O extrato em hexano dos óleos das sementes da *Annona salzmannii* foi analisado por técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$ . A análise identificou sinais de triacilglicerol contendo ácidos oléico, linoléico e ácidos graxos saturados.

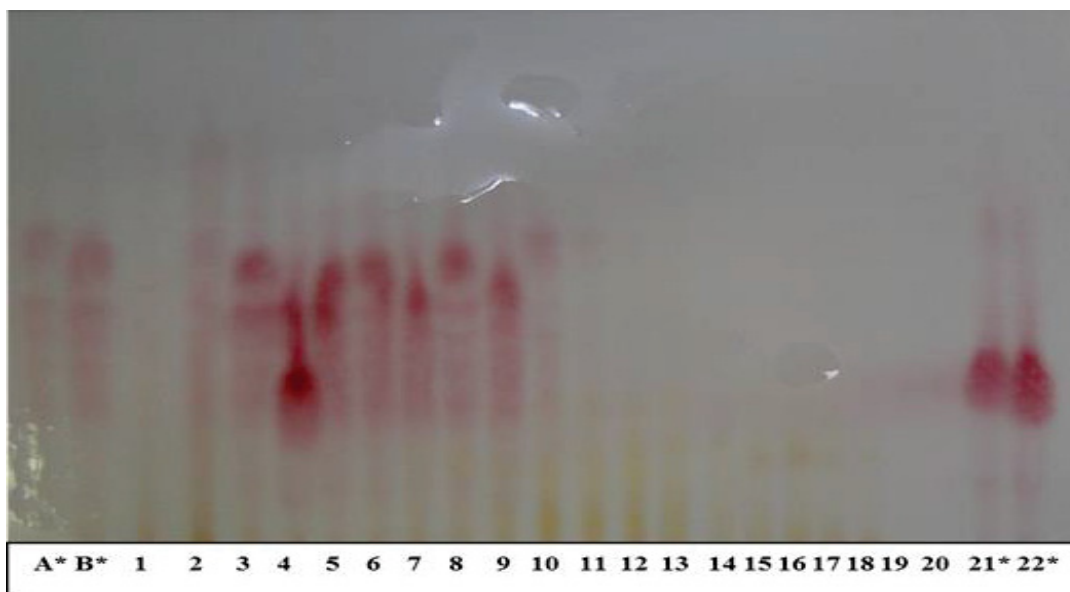
### 5.3 ANÁLISE DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS SEMENTES

#### 5.3.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCDA)

A Figura 19 mostra o perfil cromatográfico do extrato bruto do diclorometano das sementes de *A. Salzmannii* (A\* e B\*), frações de 1 a 20, que posteriormente foram juntadas a fração 15 a 20, reduzindo a 15 frações. A fração 21\* e 22\* é referente ao padrão de acetogenina annonacin.

Visualmente as acetoginas são detectadas por CCDA, utilizando o reativo de Kedde para identificar as acetoginas  $\alpha$  e  $\beta$  insaturadas e  $\gamma$ -lactonas, que também exibem absorção no UV em 210 nm. As substâncias revelaram do rosa claro ao rosa-avinhado.

FIGURA 19 - ANÁLISE DE CCDA DAS FRAÇÕES E DO EXTRATO DICLOROMETANO DAS SEMENTES DE *A. salzmannii*



Extrato de diclorometano de *A. salzmannii* - A\* e B\*; Frações - 1 a 20; Padrão de acetogenina - 21\* e 22\*. Revelador – Solução de Kedde.

Fonte: O autor (2014).

### 5.3.2 Análise de espectrometria massas de alta resolução (HR-MS) do extrato diclorometano e frações das sementes de *A. salzmannii*

No Quadro 1 estão os dados de HR-MS resumidos para o extrato diclorometano apresentando os íons possivelmente identificados com valores de  $m/z$  com quatro casas decimais, com fórmula molecular protonadas  $[M+H]^+$  sodiadas  $[M+Na]^+$  e erro em ppm. O espectro de HR-MS do extrato de diclorometano se encontra no Anexo 1.

QUADRO 1 - ANÁLISE DE ESI(+)-HR-MS DO EXTRATO DE DICLOROMETANO DAS SEMENTES DE *A. salzmannii*

Fórmula molecular	Massa Experimental	Erro ppm
$C_{20}H_{29}ONa$	308.2118 $[M+Na]^+$	2.3785
$C_{35}H_{62}O_7 H$	595.4562 $[M+H]^+$	- 1.1062
$C_{35}H_{62}O_7 Na$	617.4380 $[M+Na]^+ *$	- 1.2708 F4-1
$C_{37}H_{66}O_7 H$	623.4877 $[M+H]^+$	- 0.6829
$C_{37}H_{66}O_7 Na$	645.4694 $[M+Na]^+ *$	-1.0072 F4-2
$C_{37}H_{66}O_8 Na$	661.4441 $[M+Na]^+ *$	0.3282 F4-3
$C_{40}H_{62}O_7 Na$	677.4380 $[M+Na]^+$	-1.115

Fonte: O autor (2016)

Na análise de HR-MS da fração 4 foram observada três substâncias majoritárias, sendo estas as mesmas observadas no espectro de HR-MS do extrato de diclorometano. Estas substâncias foram nomeadas como F4-1, F4-2 e F4-3, observadas somente como íons sodiados  $[M + Na]^+$ , sendo estes 617.4380, 645.4694 e 661.4441. (ANEXO 2).

### 5.3.3 Determinação Estrutural de F4-1

A primeira substância nomeada de F4-1 apresentou íon protonado  $[M+H]^+$  de  $m/z$  595.4562 e observado íon sodiado de  $m/z$  617.4388  $[M+Na]^+$  no espectro de HR-MS do extrato de diclorometano no qual foi deduzida a fórmula molecular  $C_{35}H_{62}O_7$ , compatível para as substâncias apresentadas, de acordo com a base de dados Reaxys e Science Direct. (QUADRO 2).

Quadro 2 - ACETOGENINAS COM FÓRMULA MOLECULAR  $C_{35}H_{62}O_7$

Composto	Posição da hidroxila	Estereoisômeros	BTHF /MTHF	Referências
Parviflorin	13, 22, 26	<i>Eritro/trans/treo/trans/treo</i>	BTHF	(RATNAYAKE, SUNIL <i>et al.</i> , 1993)
Carolin C	13,22,26	<i>Treo/trans/treo/cis/eritro</i>	BTHF	(QUEIROZ <i>et al.</i> , 1998)
Annonacinone	4,15,20 (CO,10)	<i>Treo/trans/treo</i>	MTHF	(WU, 2006)
Isoannonacin-10-one	15,20 (CO,10)	<i>Treo/trans/treo</i>	MTHF	(VILA-NOVA <i>et al.</i> , 2013)
Reticulacinone	4,15,20(CO,11)	<i>Treo/trans/treo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO, <i>et al.</i> , 1998)
Muricin G	4,10,15,20	<i>Treo/trans/treo</i>	MTHF	(CHANG <i>et al.</i> , 2001)
Mosin C	4,15,20 (CO,9)	<i>Treo/cis/treo</i>	MTHF	(HOPP <i>et al.</i> , 1997)
Uvarigrandin A	5,15,24	<i>Treo/trans/treo/trans/treo</i>	BTHF	(ALALI <i>et al.</i> , 1999)
Longimicina B	4,11,20	<i>Treo/trans/treo/trans/treo</i>	BTHF	(LIMA <i>et al.</i> , 2010)
Rollimembrin	4,13,22	<i>Treo/cis/treo/cis/eritro</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO, <i>et al.</i> , 1998)
Squamocin B	15,24,28	<i>Treo/trans/treo/trans/eritro</i>	BTHF	(SAHAI <i>et al.</i> , 1994)
Bullacin	6,13,22	<i>Treo/trans/treo/trans/treo</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO, <i>et al.</i> , 1998)
Isolongimicin B	4,11,20	<i>Eritro/treo/treo</i>	BTHF	(LIMA <i>et al.</i> , 2010)
Rollinacin	4,10,20	<i>Trans/treo/trans/treo</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO, <i>et al.</i> , 1998)
Squamone	15,20 (CO,9)	<i>Treo/trans/treo</i>	MTHF	(RAMIREZ; HOYE, 1995)
Annocherin	4,15,20 (CO,7)	<i>Treo/trans/treo</i>	MTHF	(WOO <i>et al.</i> , 1999)
Annomolam A	15,20 (CO,11)	<i>Treo/trans/treo</i>	MTHF	
Plagionicin B	5,15,20 (CO,10)	<i>Treo/cis/treo</i>	MTHF	(NGUYEN; <i>et al.</i> , 2006)

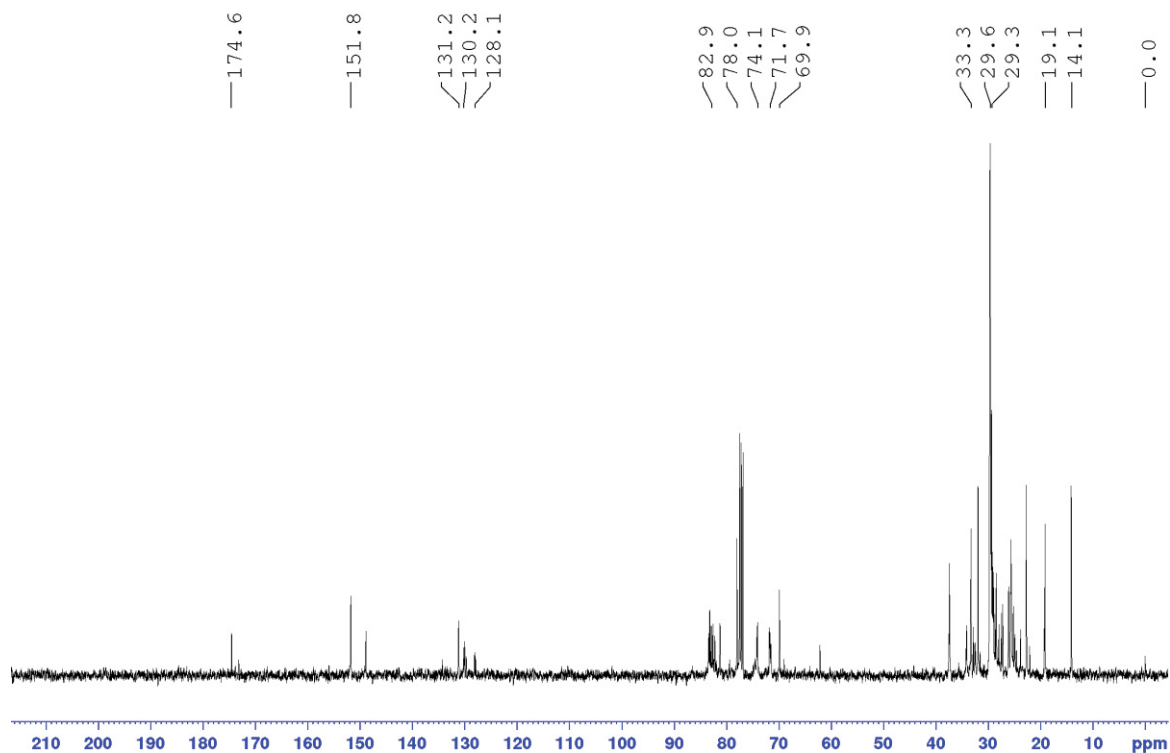


Molvizarin	4,13,22	<i>Treo/trans/treo/trans/eritro</i>	<i>BTHF</i>	(FANG <i>et al.</i> , 1993)
Longimicina C	4,9,18	<i>Treo/trans/treo/trans/treo</i>	<i>BTHF</i>	
Muricin F	4,21,24,25	<i>Trans/threo-threo</i>	<i>MTHF</i>	(CHANG <i>et al.</i> , 2001)
Isomolvizarin-2	13,22	<i>Treo/trans/treo/trans/treo</i>	<i>BTHF</i>	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
Annoreticuione	4,5,20 (C,9)	<i>Treo/trans/treo</i>	<i>MTHF</i>	(ZAFRA-POLO, <i>et al.</i> , 1998)

Fonte: O autor (2016)

Primeiramente, o espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da F4-1 foi analisado e observou-se os sinais de carbono referente ao anel  $\gamma$ -lactona em  $\delta$  151,8 (C-33), 131,2 (C-2), 174,6 (C-1), 78,0 (C-34), no carbono aderido a lactona em  $\delta$  19,1 (C-35). Foram observados quatro sinais de hidroxila (OH) em  $\delta$  69,9 (C-4), 74,1 (C-15), 71,7 (C-10) e 74,1 (C-20). Outro sinal foi observado referente a uma metila terminal em  $\delta$  14,1 (C-32). A estrutura do anel mono-tetrahidrofurano foi observada através dos sinais de carbono em  $\delta$  82,9 (C-16), 29,3 (C-17), 29,6 (C-18) e 82,9 (C-19), com hidroxilas adjacentes 74,1 (C-15 e C-20). Ao longo da cadeia do anel foi observado uma dupla ligação em  $\delta$  128,1 (C-23), 130,2 (C-24) (FIGURA 20).

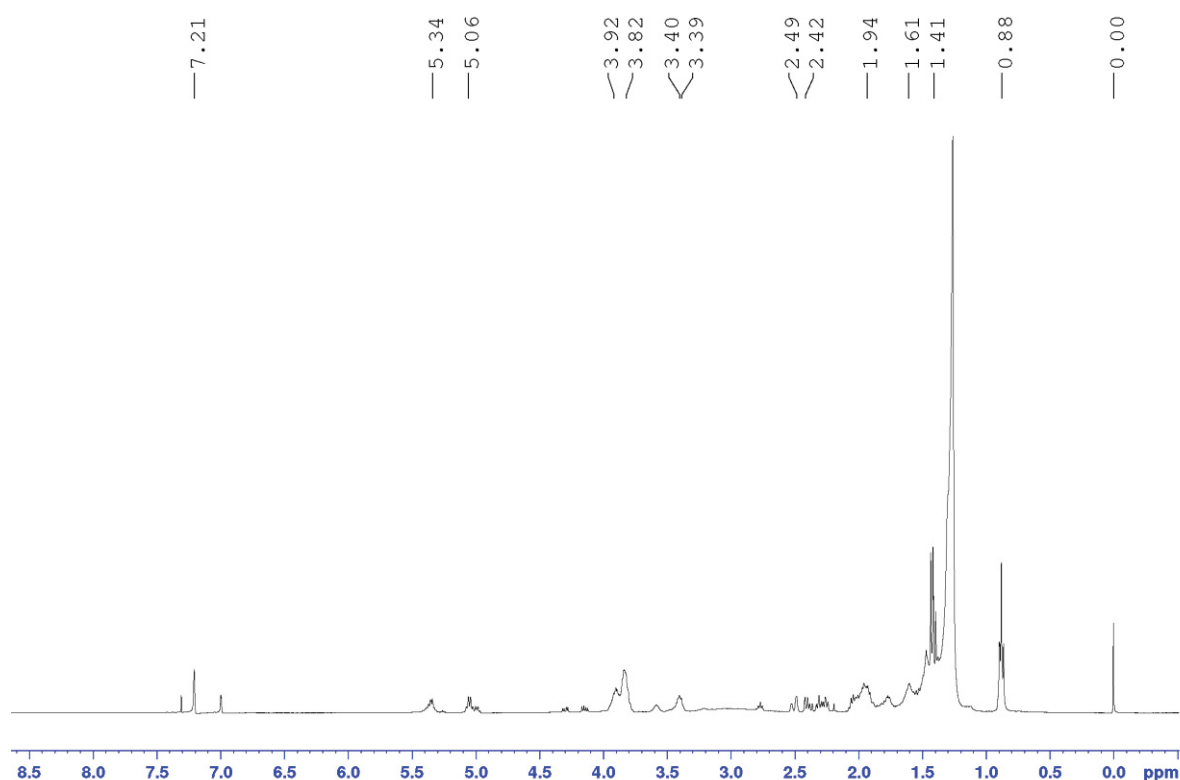
FIGURA 20 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DA F4-1



Fonte: O autor, 2015.

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi analisado e foram observados os sinais de deslocamentos de hidrogênio referente a estrutura do anel  $\gamma$ -lactona em  $\delta$  7,21 *d* ( $J = 1,2$  Hz, H-33), 5,06 *qd* ( $J = 6,8; 1,2$  Hz, H-34), 1,41 *d* ( $J = 6,8$  Hz, H-35). Aderido ao anel lactônico foi observado os sinais em  $\delta$  2,42 e 2,49 *dd* ( $J = 15,2; 8,2$  Hz, H-3a e 3b), 3,82 *m* (Hz, H-4). Foram observados dois hidrogênios em  $\delta$  3,39 *m* (H-15), 3,40 *m* (H-20), sugerindo duas hidroxilas adjacentes ligadas ao anel mono-tetrahidrofurano; foi observado hidrogênios ligados no anel  $\delta$  3,92 *m* (H-16-19), 1,94 *m* e 1,61 *m* H-17a,17b), 1,94 *m* e 1,61 *m* (H-18a,18b). Ao longo da cadeia foi observado uma dupla ligação em  $\delta$  5,34 *m* (H-23 – 24). (FIGURA 21).

FIGURA 21 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  (600 MHz  $\text{CDCl}_3$ ) DA F4-1

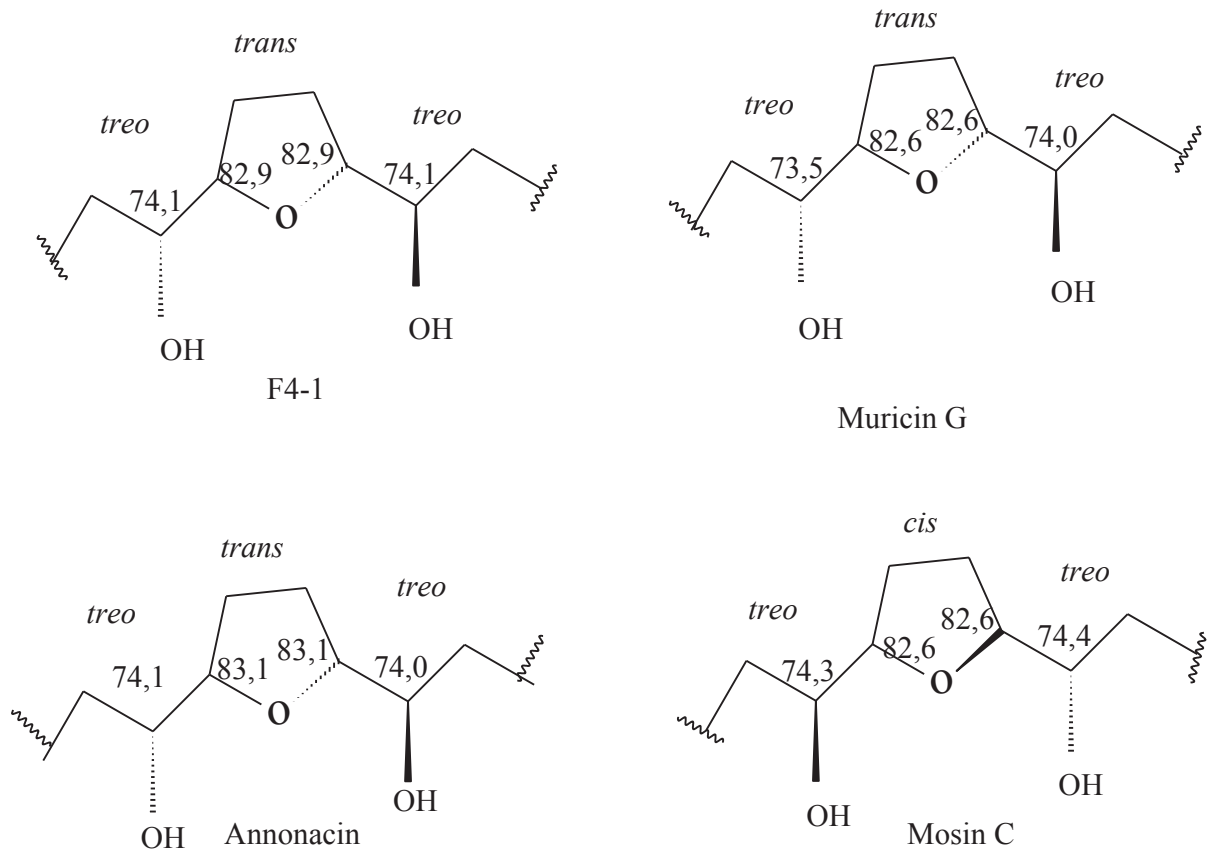


Fonte: O autor, 2015.

Para a identificação da configuração relativa ao anel mono-tetrahidrofurano foi realizada a comparação dos valores de deslocamento químico de RMN de  $^{13}\text{C}$  da F4-1 com as acetogeninas, annonacina, muricin g e mosin c (FIGURA 22). Portanto, F4-1 foi identificada como a acetogenina muricin g (FIGURA 23, TABELA 7) pela primeira

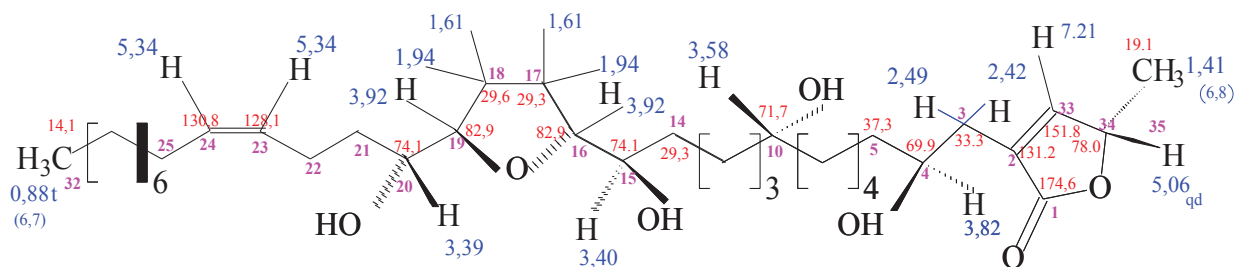
vez nas sementes de *Annona salzmannii*. Os dados obtidos estão de acordo com os da literatura. (CHANG & WU, 2001).

FIGURA 22 - DADOS DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  DO ANEL MONO-TETRAHIDROFURANO DE F4-1 E COMPARAÇÃO COM DADOS DA LITERATURA



Fonte: O autor (2015), (HOPP et al., 1997)

FIGURA 23 - ESTRUTURA QUÍMICA DE F4-1



Fonte: O autor, 2015.

TABELA 7 - DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  E HMBC DE F4-1 IDENTIFICADO EM SEMENTES DE *ANNONA SALZMANNII* E DADOS DA LITERATURA.

Posição	F4-1 <sup>1</sup>			MURICIN G <sup>2</sup>	
	$\delta$ $^1\text{H}$ (J = Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC	$\delta$ $^1\text{H}$ (J = Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$
1		174,6			174,6
2		131,2			131,1
3a	2,42 <i>dd</i> (15,2; 8,2)	33,3	1,2,4,5,33	2,41 <i>m</i>	33,3
3b	2,49 <i>dd</i> (15,2; 8,2)	33,3	1,2,4,5,33	2,50 <i>m</i>	33,3
4	3,82 <i>m</i>	69,9	3	3,82 <i>m</i>	69,9
5 ao 9	1,25-1,50	22,4-37,3		1,2-1,5	37,3
10	3,58 <i>m</i>	71,7	10	3,58 <i>m</i>	71,6
11 ao 14	1,25-1,50			1,2-1,5	
15	3,39 <i>m</i>	74,1	1,2,4,5,7	3,43 <i>m</i>	74
16	3,92 <i>m</i>	82,9		3,89 <i>m</i>	82,6
17a	1,94 <i>m</i>	29,3		1,99 <i>m</i>	25,5-29,9
17b	1,61 <i>m</i>	29,3		1,65 <i>m</i>	25,5-29,9
18a	1,94 <i>m</i>	29,6		1,99 <i>m</i>	25,5-29,9
18b	1,61 <i>m</i>	29,6		1,65 <i>m</i>	25,5-29,9
19	3,92 <i>m</i>	82,9		3,89 <i>m</i>	82,6
20	3,40 <i>m</i>	74,1	1,2,9	3,43 <i>m</i>	73,5
21	1,25-1,50	22-37,5		1,2-1,5	33,3
22	2,19 <i>m</i>	22-37,5		2,17 <i>m</i>	25,5-29,9
23	5,34 <i>m</i>	130,2		5,36 <i>m</i>	130,8
24	5,34 <i>m</i>	128,1		5,36 <i>m</i>	128,9
25	2,19 <i>m</i>	22-37,5		2,17 <i>m</i>	25,5-29,9
26 ao 31	1,25-1,50	22-37,5		1,2-1,5	25,5-29,9
32	0,88 <i>t</i> (6,8 Hz)	14,1	32	0,87 <i>t</i> (6,7 Hz)	14,1
33	7,21 <i>d</i> (1,3 Hz)	151,8	1,2,3,33,34	7,18 <i>d</i> (1,2 Hz)	151,9
34	5,06 <i>qd</i> (6,8;1,3 Hz)	78	2,33,35	5,05 <i>qd</i> (6,8;1,2 Hz)	78
35	1,41 <i>d</i> (6,8 Hz)	19,2	2,33,34	1,41 <i>d</i> (6,8 Hz)	19,1

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: <sup>1</sup> Experimento de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ , utilizando TMS como referência interna. <sup>2</sup> Dados da literatura (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de acordo com Chang & Wu (2001).

#### 5.3.4 Determinação Estrutural de F4-2

A segunda substância da fração 4, nomeada de F4-2 apresentou íon protonado de  $m/z$  623.4877  $[\text{M}+\text{H}]^+$  e íon adutado de  $m/z$  645.46942  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , no qual foi deduzida a fórmula molecular  $\text{C}_{37}\text{H}_{66}\text{O}_7$  (QUADRO 1). Conforme levantamento da literatura, existem várias possibilidades de acetogeninas para essa fórmula molecular (QUADRO 3).

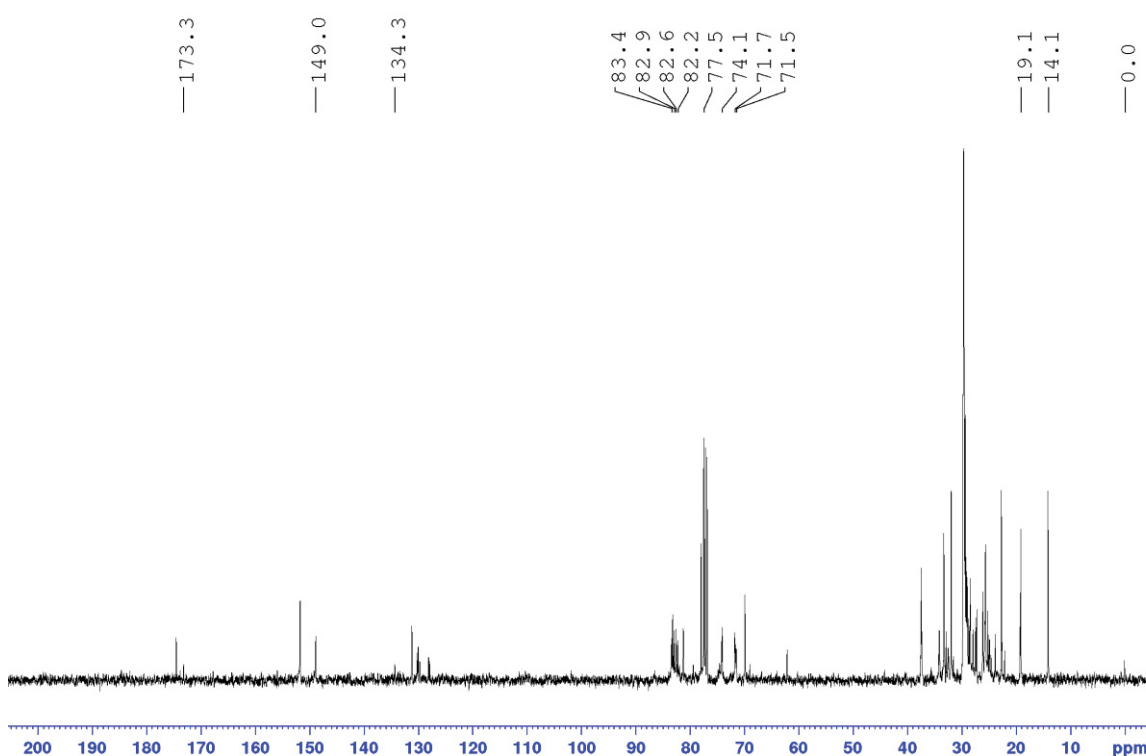
QUADRO 3 - ACETOGENINAS COM FÓRMULA MOLECULAR C<sub>37</sub>H<sub>66</sub>O<sub>7</sub>

Composto	Posição da hidroxila	Estereoisômeros	BTHF/ MTHF	Referências
Bullatacin	4,15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(SHI <i>et al.</i> , 2014)
Asimicin	4,15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(ZHAO <i>et al.</i> , 1994)
Rolliniastatin-1	4,15,24	<i>Threo/cis/threo/cis/erythro</i>	BTHF	(KEUM <i>et al.</i> , 2005)
Trilobacin	4,15,24	<i>Threo/trans/erythro/cis/threo</i>	BTHF	(WOOT <i>et al.</i> , 1995)
Glaucanetin	4,13,22	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(ALALI., 1999)
Longimicin- A	4,11,20	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(YE <i>et al.</i> , 1996)
squamocin	15,24,28	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(SAHAI <i>et al.</i> , 1994)
Isorollinicin	15,24,28	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1996)
Motrilin	15,24,29	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(FANG <i>et al.</i> , 1993)
Squamocin-D	15,24,28	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(SAHAI <i>et al.</i> , 1994)
Squamocin- F	12,15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(DANG <i>et al.</i> , 2011)
Asimin	10,15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(ZHAO <i>et al.</i> , 1994)
Asiminecin	15,24,29	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(ZHAO <i>et al.</i> , 1994)
Bullatacinone	15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(RIESER <i>et al.</i> , 1992)
Rollinone	15,24	<i>Threo/cis/threo/cis/erythro</i>	BTHF	(ABREO; SNEDEN, 1990)
Trilobacinone	15,24	<i>Threo/trans/erythro/cis/threo</i>	BTHF	(HE <i>et al.</i> , 1997)
Bullatin	10,15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(SAHAI <i>et al.</i> , 1994)
Bullanin	15,24,30	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(MARSHALL <i>et al.</i> , 1998)
Trilobin	10,15,24	<i>Threo/trans/erythro/cis/threo</i>	BTHF	(WOOT <i>et al.</i> , 1995)
Asitribin	15,24,28	<i>Threo/trans/erythro/cis/threo</i>	BTHF	(WOOT <i>et al.</i> , 1995)
Asiminocin	15,24,30	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(MARSHALL <i>et al.</i> , 1997)
Longimicin-D	10,13,22	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(YE <i>et al.</i> , 1996)
Mucoxin	8,14,17	<i>Threo/trans/threo/cis-trans/threo</i>	BTHF	(LI <i>et al.</i> , 2008)
Narumicin-I	5,15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(RAYNAUD <i>et al.</i> , 1997)
Annosilin-A	20,23,24	<i>Trans/threo/trans/threo-threo</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1996)
4deoxygigantecin	14,17,22	<i>Trans/threo-threo/trans/threo</i>	BTHF	(MAKABE <i>et al.</i> , 1997)
Squamostatin-D	16,19,24	<i>Trans/threo-threo/trans/erythro</i>	BTHF	(CHANG <i>et al.</i> , 1999)
Squamostatin-E	16,19,24	<i>Trans/threo-threo/trans/threo</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
Senegalene (C29=C30)	4,12,13,21	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(SAHPAZ <i>et al.</i> , 1994)
Squamosten-A (C23=C24)	4,12,15,20	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(ARAYA, H <i>et al.</i> , 1994)
Gonionenin (C21=C22)	4,10,13,18	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1996)
Xylopien (C23=C24)	4,8,15,20	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
Xylomatenin (C23=C24)	4,10,15,20	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
Tonkinin- B	15,17,22	<i>Threo/trans/erythro</i>	MTHF	(ALAI <i>et al.</i> , 1999)
Gigantransenin C (C22=C23)	10,13,18,21	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
Gigantransenin A (C21=C22)	10,13,18,23	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
Coriacin (C17=C18)	4,14,21,22	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
Glabranin (C23=C24)	4,16,19,20	<i>Trans/threo-threo</i>	MTHF	(ALALI <i>et al.</i> , 1999)

Fonte: (MARSHALL, J A; CHEN, 1997)

O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  apresentou sinais característicos para acetogenina bis-tetrahidrofurano com hidroxilas adjacentes ao anel, conforme observado no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ . Primeiramente, neste espectro foram observados os sinais de carbono referente ao anel  $\gamma$ -lactona em  $\delta$  173,3 (C-1), 134,3 (C-2), 149,0 (C-35), 77,5 (C-36), e ligado ao C-37 uma metila em  $\delta$  19,1 (C-37). Foram observados três sinais de carbono da hidroxila (OH) em  $\delta$  74,1 (C-15), 71,7 (C-24) e 71,5 (C-28). Outro sinal foi observado no final da cadeia em  $\delta$  14,1 (C-34). A estrutura do anel bis-tetrahidrofurano foi observado através dos sinais de carbono em  $\delta$  83,4 (C-16), 82,6 (C-19), 82,2 (C-20) e 82,9 (C-23), com hidroxilas adjacentes 74,1 e 71,5 (C-15 e 24) (FIGURA 24).

FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DE F4-2.

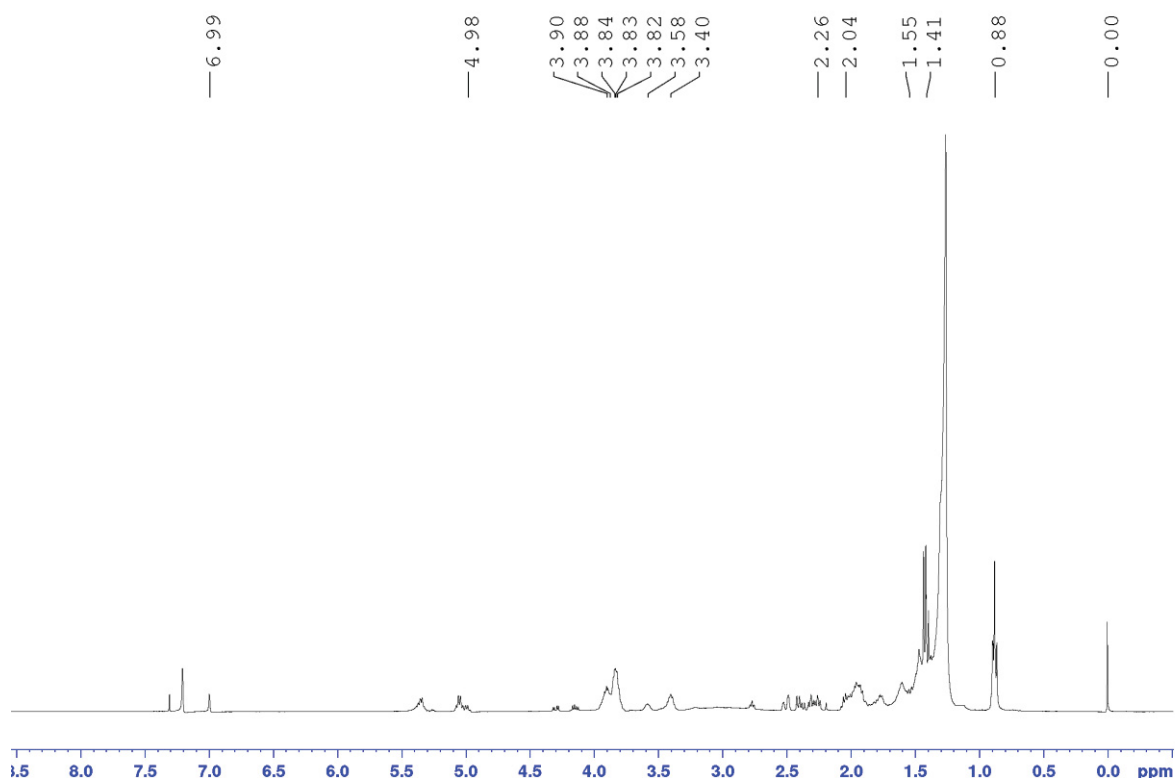


Fonte: O autor, 2016

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi analisado e foram observados os sinais de deslocamentos de hidrogênio em  $\delta$  6,99 *d* ( $J = 1,4$  Hz, H-35), 4,98 *qd* (H-36), 1,41 *t* ( $J=7,0$  Hz, H-37) referente a estrutura do anel  $\gamma$ -lactona aderido ao anel lactônico foi observado os sinais em  $\delta$  2,26 e 2,26 *d* ( $J=7,7$  Hz, H-3a e 3b), em  $\delta$  1,55 e 2,04 *m* (Hz, H-4a e 4b). Foi observado os hidrogênios no anel bis-tetrahidrofurano, em  $\delta$  3,82

$m$  (Hz, H-16), 3,88  $m$  (Hz, H-19), 3,83  $m$  (Hz, H-20) e 3,90  $m$  (Hz, H-23). Foram observados hidrogênios geminais ligados a hidroxila do anel bis-tetrahydrofurano  $\delta$  3,40  $m$  (Hz, H-15), 3,84  $m$  (Hz, H-24), e ao longo da cadeia foram observado  $\delta$  3,58  $m$  (Hz, H-28). Ligado a uma metila terminal  $\delta$  0,88  $t$  ( $J=6,9$  Hz, H-34) (FIGURA 25).

FIGURA 25 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  (600 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DE F4-2



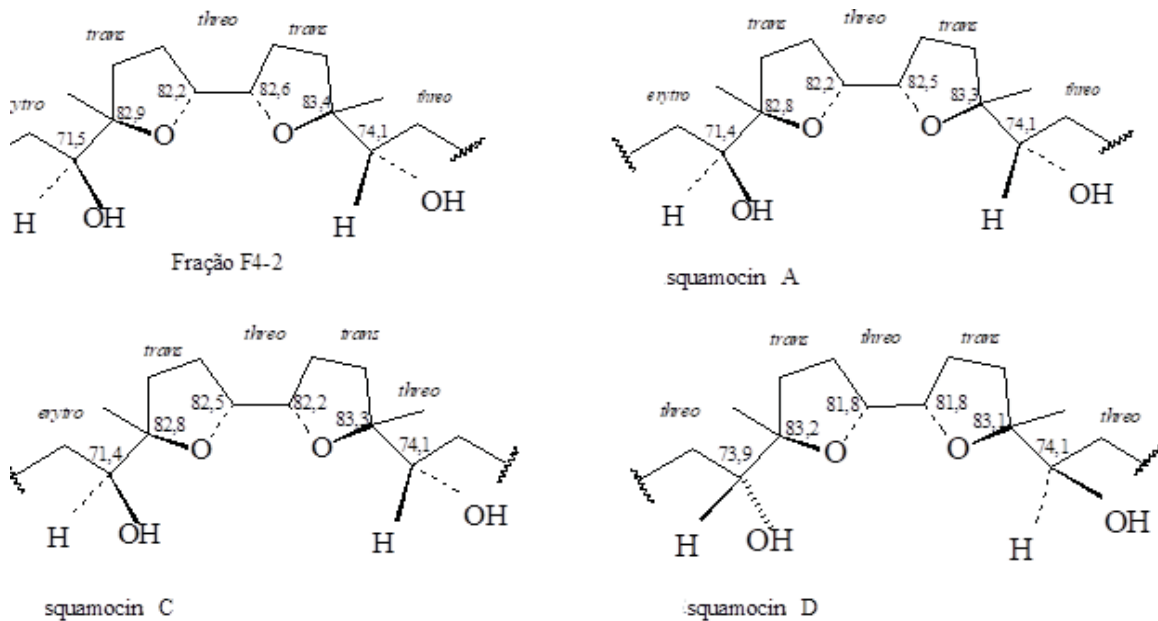
Fonte: O autor, 2016

Devido as várias possibilidades de acetogeninas de mesma fórmula molecular para F4-2 conforme observado no Quadro 3, fez-se um levantamento bibliográfico de acetogeninas que mais se assemelhavam aos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para facilitar a comparação com os dados de F4-2. Com isso, as várias possibilidades foram reduzidas somente as acetogeninas do tipo esquamocinas (FIGURA 26). Portanto, os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos anéis bis-THF de F4-2 foram comparados com os dados das esquamocinas do tipo A, C e D (FIGURA 26, TABELA 8).

A configuração relativa da substância foi definida como *eritroltrans/treoltrans/treo* com base nos deslocamentos químicos observados e comparação com dados da literatura. (BORN et al., 2016). Portanto, F4-2 foi

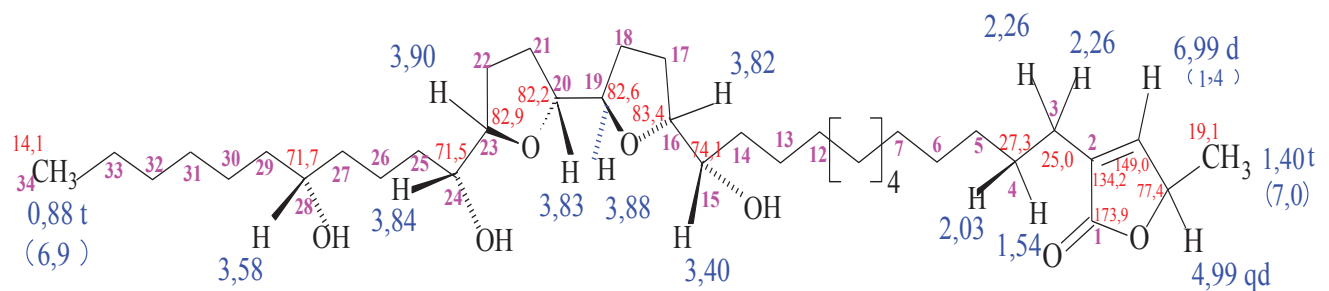
identificada como a acetogenina squamocin A (FIGURA 27, TABELA 8) pela primeira vez nas sementes de *Annona salzmannii*. Os dados obtidos estão de acordo com os da literatura. (ARAYA, HIROSHI et al., 2002; SAHAI et al., 1994).

FIGURA 26 - ESQUELETOS DO ANEL BIS-TETRAHIDROFURANOS DE F4-2 E SQUAMOCINS SELECIONADAS DA LITERATURA



Fonte: O autor, 2016

FIGURA 27 - ESTRUTURA QUÍMICA DE F4-2



Fonte: O autor, 2016



TABELA 8 - DADOS DE RMN DE  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  E HMBC DE F4-2 IDENTIFICADO EM SEMENTES DE *A. salzmannii* E DADOS DA LITERATURA.

POSICÃO	FRAÇÃO F4-2 <sup>1</sup>		SQUAMOCIN A <sup>2</sup>		SQUAMICIN C <sup>3</sup>		SQUAMOCIN D <sup>4</sup>	
	$\delta$ $^1\text{H}$ (J = Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	HMBC	$\delta$ $^1\text{H}$ (J = Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ (J = Hz)	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$ (J = Hz)
1		173,3			173,9		173,9	$\delta$ $^{13}\text{C}$
2		134,3			134,3		134,4	173,9 134,3
3a	2,26 d(J=7,7)	25	1,2,4,35	2,21	25,2	2,26 d(J=7,7)	25,2	2,26 d(J=7,7)
3b	2,26 d(J=7,7)		1,2,4,35					
4.	1,55 e 2,04 m	27,3	2,5,37	1,20-1,90	27,4		27,4	1,54
5.					29,2		29,2	
6 a 9								
10								
11								
12.								
13.								
14.					25,7		25,7	
15	3,4 m	74,1	14,16	3,33 d(J=11, 7,5)	33,3		33,4	3,4
16	3,82 m	83,4	15,16	3,76 m	74,1	3,39 m	74,1	3,81 m
17a		29,3		1,20-1,90	83,3		83,3	1,65-1,98
17b					28,4		28,4	1,65-1,98
18a								1,65-1,98
18b					28,9		28,9	1,65-1,98
19	3,88 m	82,6	18	1,20-1,90	82,2	3,82 m	82,2	3,81 m
20	3,83 m	82,2	19	3,86 m	82,5	3,82 m	82,5	393 m
21				1,20-1,90	28,9		28,9	
22				1,20-1,90	24,8		24,6	
23	3,90 m	82,9	23	3,76 m	82,8	3,96 m	82,8	
24	3,84 m	71,5	23,24	3,76 m	71,4	3,96 m	71,4	
25				1,20-1,90	32,5		32,4	
26		22		1,20-1,90	22		26,1	
27		37,4		1,20-1,90	37,3		25,7	
28	3,58 m	71,7	28	3,52 m	71,8		37,5	
29		37,5		1,20-1,90	37,5	3,58 m	71,9	
30				1,20-1,90	25,7		37,3	
31				1,20-1,90	29,7		25,3	
32				1,20-1,90	31,8		31,9	
33				1,20-1,90	22,6		22,6	
34	0,88 t(J=6,9)	14,1	32,33	0,83 t(J=7,0)	14,1	0,88 t(J=6,7)	14	0,88 t(J=7,1)
35	6,99 q	149		6,96 q(J=1,4)	148,8	6,98 q(J=1,4)	148,8	6,99 q(J=1,4)
36	4,98 qd	77,5		4,95 qd(J=6,8;1,4)	77,4	4,99 qd(6,9)	77,4	4,99 qd(J=7,1)
37	1,40 t	19,1		1,36 t	19,2	1,41 t(J=7,1)	19,2	1,41 t(J=6,7)

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: <sup>1</sup> Experimento de RMN de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  e HMBC (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>, utilizando TMS como referência interna. <sup>2,3,4</sup> Dados da literatura (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de acordo com Sahai et al. (1994); Araya et al. (2002) e Born et al. (2016).

### 5.3.5 Determinação Estrutural de F4-3

A terceira substância nomeada de F4-3 apresentou íon sodiado de  $m/z$  661.4441  $[M+Na]^+$ , no qual foi deduzida a fórmula molecular  $C_{37}H_{66}O_8Na$ . Conforme levantamento da literatura, existem várias possibilidades de acetogeninas para essa fórmula molecular  $C_{37}H_{66}O_8$  (QUADRO 4).

QUADRO 4 - ACETOGENINAS COM FORMULA MOLECULAR  $C_{37}H_{66}O_8$

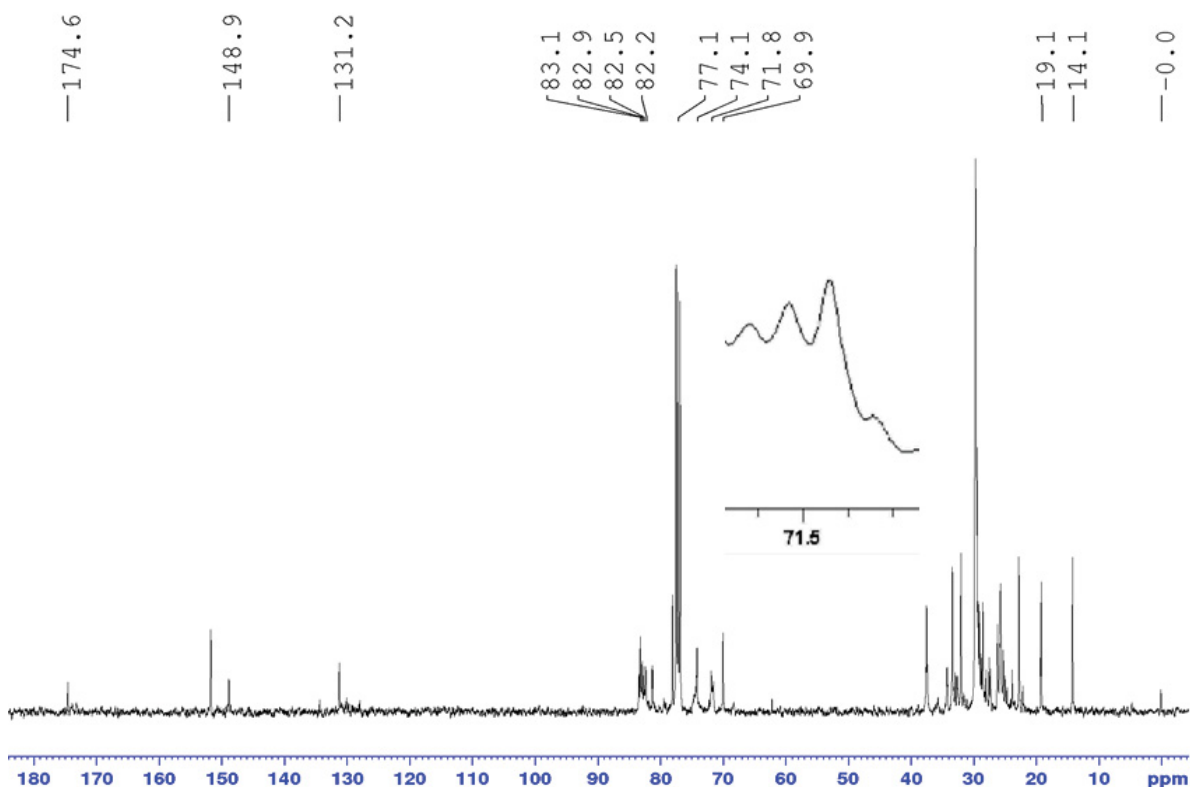
Composto	Posição da hidroxila	Estereoisômeros	BTHF/MTHF	Referências
Rioclarin	4,15,24,28	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
30-OH-bullatacin	4,15,24,30	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
31-OH-bullatacin	4,15,24,31	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
32-OH-bullatacin	4,15,24,32	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
Bullatretrocin	15,24,31,32	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro-erythro</i>	BTHF	(HE <i>et al.</i> , 1997)
Rollitacin	15,24,28,29	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro-erythro</i>	BTHF	(GU <i>et al.</i> , 1997)
Panalicin	5,15,24,28	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(ESMANS <i>et al.</i> , 1991)
Espelicin	5,15,24,29	<i>Threo/trans/threo/trans/erythro</i>	BTHF	(RAYNAUD <i>et al.</i> , 1997)
Uvariasolin-I	5,6,15,24	<i>Threo-threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(RAYNAUD <i>et al.</i> , 1997)
Sylvaticin	4,16,19,24	<i>Trans/threo-threo/cis/erythro</i>	BTHF	(DONOHOE <i>et al.</i> , 2009)
Gigantecin	4,14,17,22	<i>Trans/threo-threo/trans/erythro</i>	BTHF	(CORTES <i>et al.</i> , 1993)
Cherimolin-1	4,16,19,24	<i>Trans/threo-threo/trans/erythro</i>	BTHF	(CORTES <i>et al.</i> , 1993)
Parvifloracin	4,14,17,22	<i>Trans/threo-threo/trans/threo</i>	BTHF	(RATNAYAKE, S <i>et al.</i> , 1993)
12,15- <i>cis</i> -bullatacin	4,16,19,24	<i>Cis/threo-threo/trans/erythro</i>	BTHF	(GU <i>et al.</i> , 1995)
12,15- <i>cis</i> -bullatanocin	4,16,19,24	<i>Cis/threo-threo/trans/threo</i>	BTHF	(GU <i>et al.</i> , 1995)
12,15- <i>cis</i> -sylvaticin	4,16,19,24	<i>Cis/threo-threo/cis/erythro</i>	BTHF	(DONOHOE <i>et al.</i> , 2009)
Araticulin	4,12,15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(SUN <i>et al.</i> , 1996)
10-hidroxyasimicin	4,10,15,24	<i>Threo/trans/threo/trans/threo</i>	BTHF	(HUH; ROUSH, 2008)
Gonionenin-21/22-epóxido	4,10,13,18	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(GU <i>et al.</i> , 1994)
Gigantetronenin	4,14,17,18	<i>Threo/threo/trans</i>	MTHF	(LIAW <i>et al.</i> , 2004)
4-acetylannonacin	4,10,15,20	<i>Threo/trans/threo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)
4-acetylgigantetrocin A	14,17,18	<i>Trans/threo-threo</i>	MTHF	(ZAFRA-POLO <i>et al.</i> , 1998)

Fonte: O autor (2016)

O espectro de RMN de  $^{13}C$  da primeira substância da F4-3 mostrou sinais característicos para acetogenina com anel bis-tetrahidrofurano com hidroxilas adjacentes ao anel, conforme observado no espectro de RMN de  $^{13}C$ . Primeiramente, neste espectro foram observados os sinais de carbono referente ao anel  $\gamma$ -lactona em  $\delta$  174,6 (C-1), 131,2 (C-2), 148,9 (C-35), 77,1 (C-36) e ligado ao anel lactônico uma metila  $\delta$  19,1 (HZ, C-37). Foram observados quatro sinais de carbono da hidroxila

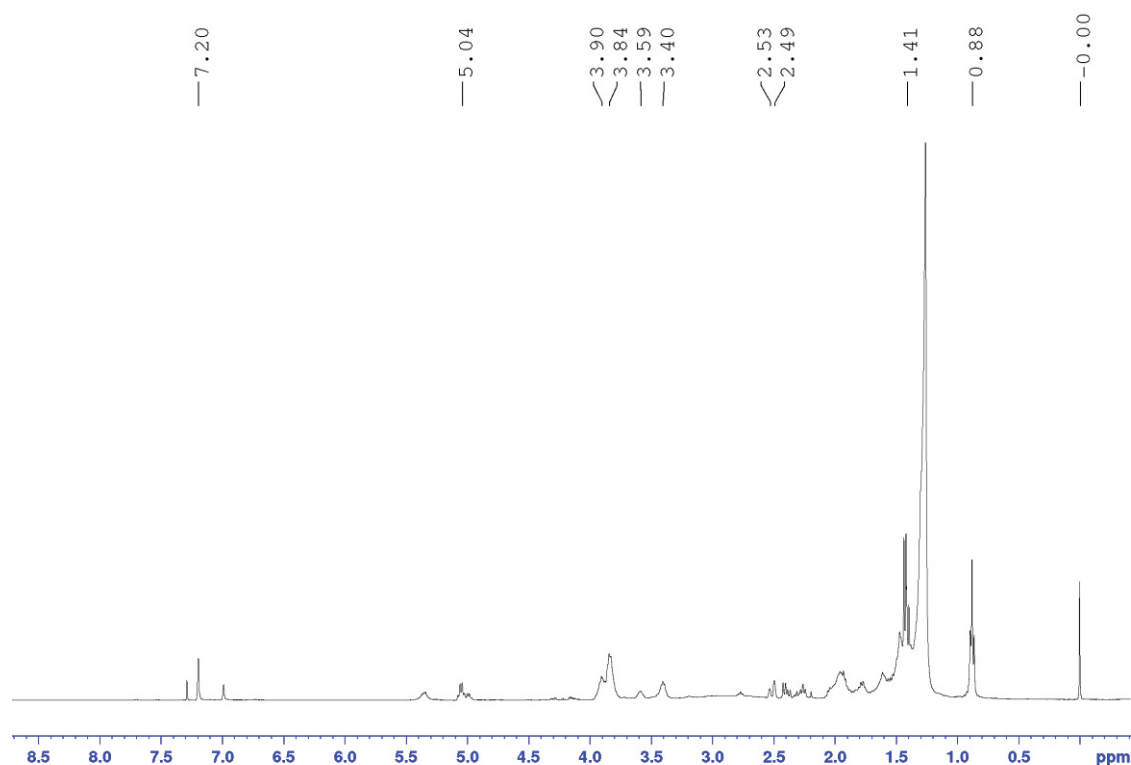
(OH) em  $\delta$  69,9 (C-3), 74,1 (C-15), 71,5 (C-24) e 71,8 (C-28). Outro sinal foi observado no final da cadeia em  $\delta$  14,1 (C-34). A estrutura do anel bis-tetrahydrofurano foi observado através dos sinais de carbono em  $\delta$  83,1 (C-16), 81,3 (C-19), 81,2 (C-20) e 82,9 (C-23), com hidroxilas adjacentes 74,1 e 71,5 (C-15 e C-24) (FIGURA 28).

FIGURA 28 - ESPECTRO DE RMN DE  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) DE F4-3



Fonte: o autor, 2016

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  foi analisado e foram observados os sinais de deslocamentos de hidrogênio em  $\delta$  7,20 *d* ( $J = 1,4$  Hz, H-35), 5,04 *qd* (H-36), 1,41 *t* ( $J = 7,0$  Hz, H-37) referente a estrutura do anel  $\gamma$ -lactona. Aderido ao anel lactônico foi observado os sinais em  $\delta$  2,49 *d* ( $J = 5,1$  Hz, H-3a), 2,53 *d* ( $J = 5,1$  Hz, H-3b), e  $\delta$  3,84 *m* (H-4). Os sinais de hidrogênio em  $\delta$  3,90 *m* (H-16), 3,84 *m* (H-19), 3,84 *m* (H-20) e 3,90 *m* (H-23) foram observados para o anel bis-THF (FIGURA 29).

FIGURA 29 - ESPECTRO DE RMN DE  $^1\text{H}$  (600 MHz, MEOD) DE F4-3

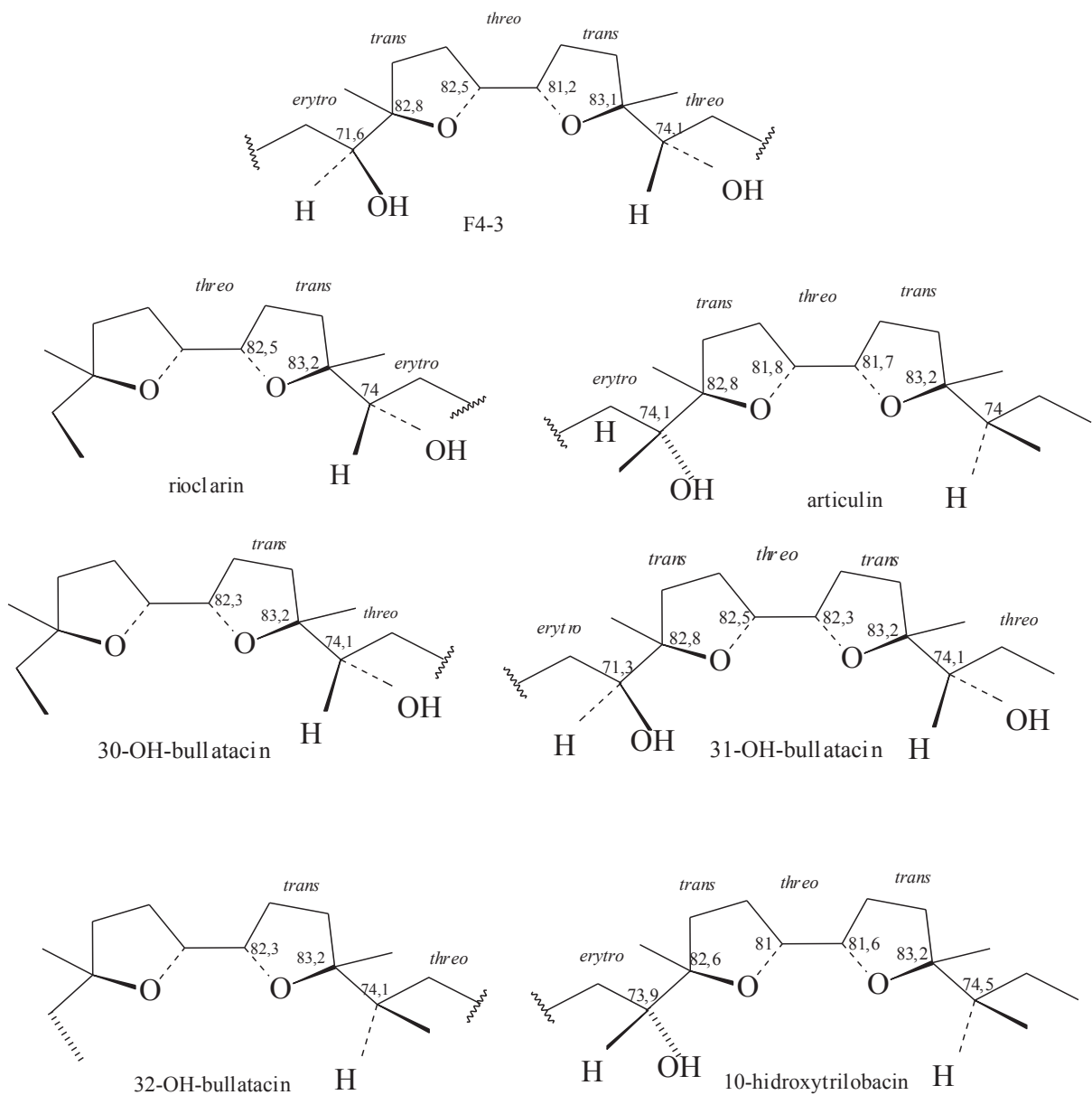
Fonte: O autor, 2017

Devido as várias possibilidades de acetogeninas de mesma fórmula molecular para F4-3 conforme observado no Quadro 5, fez-se um levantamento bibliográfico de acetogeninas que mais se assemelhavam aos sinais de RMN de  $^{13}\text{C}$  para facilitar a comparação com os dados de F4-3. Com isso, as várias possibilidades foram reduzidas somente as acetogeninas com hidroxila no carbono 4 e hidroxilas no carbono 28, 30, 31 e 32, tais como: rioclarin, 30-OH-bullatacin, 31-OH-bullatacin e 32-OH-bullatacin (QUADRO 4). Portanto, os deslocamentos químicos de RMN de  $^{13}\text{C}$  dos anéis bis-THF de F4-3 foram comparados com os dados das acetogeninas da literatura. (FIGURA 30).

A configuração relativa da substância foi definida como *Threo/trans/threo/trans/erythro* com base nos deslocamentos químicos observados e comparados com os dados da literatura. Portanto, F4-3 foi identificada como acetogenina Rioclarin (FIGURA 31, TABELA 9), pela primeira vez nas sementes de *Annona salzmannii*. Os dados obtidos estão de acordo com os da literatura. (ALALI;

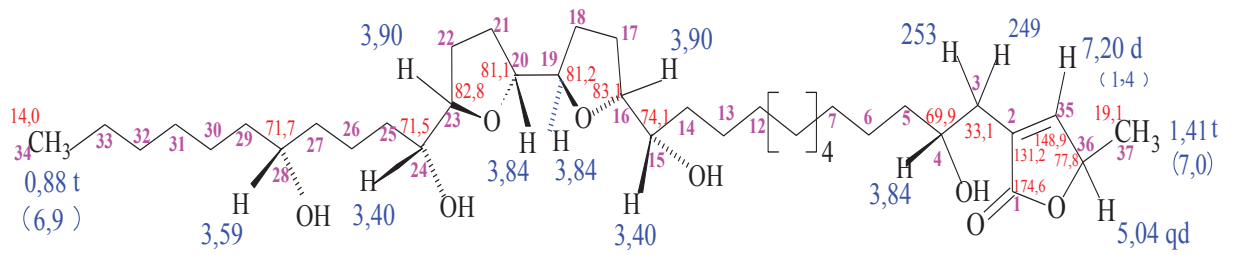
LIU; MCLAUGHLIN, 1999; BORN et al., 2016; SAEZ et al., 1993; ZAFRA-POLO, M C et al., 1996)

FIGURA 30 - ESQUELETOS DO ANEL BIS-TETRAHIDROFURANOS DE ACETOGENINAS COMPARADAS COM A F4-3



Fonte: O autor (2017); Saez et al. (1993); Alali et al. (1999) e Zafra-Polo et al. (1996).

FIGURA 31 - ESTRUTURA QUÍMICA DE F4-3



Fonte: O autor, 2017

TABELA 9 - DADOS DE RMN DE <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C DE F4-3 IDENTIFICADO EM SEMENTES DE *A. salzmannii* E DADOS DA LITERATURA.

Posição	F4-3 <sup>1</sup>		Rioclarin <sup>2</sup>		30-OH-bullatacin <sup>3</sup>		31-OH-bullatacin <sup>4</sup>		32-OH-bullatacin <sup>5</sup>	
	$\delta$ <sup>1</sup> H (J = Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>1</sup> H (J = Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>1</sup> H (J = Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>1</sup> H (J = Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C	$\delta$ <sup>1</sup> H (J = Hz)	$\delta$ <sup>13</sup> C
1		174,6		174,6		174,6		174,6		174,6
2		131,2		131		131,2		131,2		131,2
3a	2,49 dd (15,2; 8,2)	33,1	2,38 m	33,1	2,54 dddd	33,3	2,53 dddd	33,3	2,54 dddd	33,3
3b	2,53 dd (15,2; 8,2)	33,1	2,52	33,1	2,40 dddd	33,1	2,40 dddd	33,3	2,40 dddd	33,3
4	3,84 m	69,9	3,81 m	69,7	3,84 m	70	3,84 m	70	3,84 m	70
5 ao 9						37,3		37,4		37,4
10 ao 14										
15	3,40 m	74,1	3,4 m	74	3,40 m	74,1	3,40 m	74,1	3,40 m	74,1
16	3,90 m	83,1	3,84 m	83,3	3,85 m	83,2	3,85 m	83,2	3,85 m	83,2
17 ao 18										
18b										
19	3,84 m	82,5	3,84 m	82,5	3,83 m	82,3	3,83 m	82,3	3,83 m	82,3
20	3,84 m	82,2	3,84 m	82,1	3,85 m	82,5	3,85 m	82,5	3,85 m	82,5
21 ao 22										
23	3,90 m	82,9	3,84 m	82,7	3,93 m	82,8	3,93 m	82,8	3,93 m	82,8
24	3,84 m	71,5	3,82 m	71,4	3,87 m	71,3	3,87 m	71,3	3,87 m	71,3
25				32,3		32,2		32,9		32,4
26				21,9		26		26		26
27				37,2		29,7-29,4		29,7-29,5		29,7-29,4
28	3,59 m	71,7	3,58 m	71,6		25,4		29,7-29,5		29,7-29,4
29										
30					3,58 m	71,7	1,60-1,20 m	37,4	1,60-1,20 m	25,6
31					1,60-1,20 m	37,3	3,60 m	71,7	1,60-1,20 m	37
32					1,60-1,20 m	27,8	1,60-1,20 m	37	3,52 m	77,3
26 ao 31	1,25-1,50	22-37,5								
34	0,88 t (6,9 Hz)	14	0,87	14	0,90 t	14	0,93 t	14,1	0,93 t	9,87
35	7,20 d (1,4 Hz)	148,9	7,17	151,8	7,19 q	151,8	7,19 q	151,8	7,19 q	151,8
36	5,04 qd (6,8;1,3 Hz)	77,5	5,03	77,9	5,06 qq	78	5,06 qq	78	5,06 qq	78
37	1,41 d (7,0 Hz)	19,1	1,4	19,1	1,44 d	19,1	1,44 d	19,1	1,44 d	19,1

FONTE: O autor (2016).

LEGENDA: <sup>1</sup> Experimento de RMN de <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>), utilizando TMS como referência interna. <sup>2,3,4,5</sup> Dados da literatura (100 MHz, CDCl<sub>3</sub>) de acordo com Saez et al. (1993) ; Born et al. (2016); Alali et al. (1999) e Zafra-Polo et al. (1996).

### 5.3.6 Ensaio para a atividade larvicida

Para o ensaio foram utilizadas larvas do terceiro estágio nos bioensaios porque estudos anteriores mostraram que esse era o estágio mais resistente (SILVA et al., 2003), do mosquito *Aedes aegypti*. A mortalidade das larvas foi verificada a cada 24 horas e a Concentração Letal para 50% da população de *A. aegypti* (CL<sub>50</sub>) foi calculada utilizando a análise de "Probit". (FINNEY; STEVENS, 1948).

Na tabela 10 é apresentado o resultado do estudo da atividade larvicida dos extratos brutos Hexânico (EH), Diclorometano (DCM) e Metanólico (EM). Todos os extratos analisados no ensaio de atividade larvicida foram considerados promissores com valores menores de 700 mg.L<sup>-1</sup>. O extrato DCM foi o que apresentou melhor resultado com CL<sub>50</sub> de 0,031 mg.L<sup>-1</sup> que comparado com o padrão temephos, mostrou-se ter um alto potencial larvicida, seguido do extrato metanólico que também foi ativo com CL<sub>50</sub> 3,76 mg.L<sup>-1</sup>

TABELA 10 - ATIVIDADE LARVICIDA DOS EXTRATOS BRUTOS DE SEMENTES DE *A. salzmannii*

Extratos	CL <sub>50</sub> ppm	95% de IC de CL <sub>50</sub> ppm
Extrato Hexânico - EH	569,77	408,11-825,88
Extrato Diclorometano -DCM	0,031	0,016-0,043
Extrato Metanólico - EM	3,76	2,79-5,1
Themephós <sup>a</sup>	0,042	0,035-0,05

<sup>a</sup> Controle positivo.

Fonte: O autor, 2014.

O ensaio larvicida realizado por Costa et al. (2011), utilizando óleo essencial de folhas de *A. salzmannii* não mostrou nenhuma atividade larvicida nas concentrações superiores a 1000 µg.mL<sup>-1</sup>. (COSTA et al., 2011).

Um estudo de atividade larvicida das cascas de *Annona salzmannii* foi realizado por Cruz et al. (2011), utilizando os extratos brutos hexânico e metanólico, as frações alcaloídica e neutra, além do composto óxido de cariofileno. Todas as amostras analisadas apresentaram atividade larvicida, com valor menor que 700 µg.mL<sup>-1</sup>. A fração neutra proveniente do extrato metanólico foi a mais ativa com CL<sub>50</sub> de 15,92



$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo atribuído a esse efeito a presença de acetogeninas, detectadas via CCD. (DA CRUZ, et al., 2011).

A atividade inseticida contra larvas de *Aedes aegypti* foi realizada por Costa et al. (2013) sendo testadas várias espécies de *Annona*. O extrato bruto metanólico e suas frações hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol provenientes das sementes de *A. dioica*, apresentaram uma mortalidade larval inferior a 50% independente do solvente utilizado. Os extratos das sementes de *A. crassiflora* e *A. coriaceae*, como hexânico e metanólico (desengordurado com hexano), além de diclorometano e metanólico (desengordurado com diclorometano) foram testados/avaliados. Os extratos de *A. crassiflora* que apresentaram atividade larvicida (utilizando diferentes concentrações) foram os extratos hexânico, metanólico (desengordurado com hexano) e diclorometano, além da fração hexânica proveniente do extrato metanólico (desengordurado com diclorometano). Enquanto que para *A. coriaceae* o extrato bruto hexano e metanólico (desengordurado com hexano) apresentaram alto potencial larvicida, com  $\text{CL}_{50}$  0,007  $\text{mg mL}^{-1}$ . Das sementes de *A. mucosa* o extrato metanólico mostrou 100% de mortalidade com  $\text{CL}_{50}$  0,010  $\text{mg mL}^{-1}$ , isso se deve as moléculas bioativas como inseticidas rollidecin C e rollidecin D isoladas em extratos metanólicos. (COSTA, M., et al. , 2013).

Um estudo realizado por Guarido (2009) dos extratos hexano, diclorometano e metanólico de sementes de *Annona foetida* mostrou a eficácia destes contra as larvas de *Aedes aegypti*. Sendo que o extrato diclorometano demonstrou ser mais eficaz, com uma atividade de  $\text{CL}_{50}$  0,73 ppm. Esta atividade foi atribuída a alta concentração de acetogeninas presente no extrato. (GUARIDO, 2009).

Morales et al. (2004) realizaram um estudo comprovando a atividade larvicida das sementes de *Annona muricata* contra larvas de *Aedes aegypti*. Os resultados obtidos com o extrato éter de petróleo na concentração de 180 ppm obteve-se uma  $\text{CL}_{50}$  232,23, a qual proporcionou 100% de mortalidade das larvas, enquanto que o extrato etanólico na concentração de 1800 ppm obteve uma  $\text{CL}_{50}$  74,68 proporcionando 100% de mortalidade. A mistura de acetogeninas proveniente do extrato éter de petróleo, na concentração de 75 ppm mostrou 100% de mortalidade larval, sendo estes considerados os mais promissores no ensaio. (MORALES; GONZÁLEZ; ARAGÓN, 2004).

Bobadilla et al. (2005) avaliaram atividade inseticida contra larvas do *Aedes aegypti* de suspensões aquosas a partir do extrato etanólico 95% de sementes, flores,

folhas, casca do talo e casca da raiz. A suspensão das sementes foi a que apresentou maior toxicidade na concentração  $0,5 \text{ mg mL}^{-1}$  com  $CL_{50} 0,06 \text{ mg mL}^{-1}$  proporcionando em 24 h 100% de mortalidade, seguido das suspensões das flores e folhas na concentração de  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  e  $100 \text{ mg mL}^{-1}$ , respectivamente, proporcionando em 36 horas 100% de mortalidade, enquanto que a casca do talo e casca da raiz não alcançaram 100% de mortalidade em altas concentrações. (BOBADILLA; SISNIEGAS; ZAVALETA, 2005).

Bobadilla et al. (2002) avaliaram a atividade inseticida do extrato etanólico de sementes de *Annona cherimolia* e *Annona muricata* contra larvas do *Anopheles sp.*, é um mosquito, hospedeiro e transmissor da malária. O extrato de *A. muricata* mostrou-se mais tóxico na concentração  $0,8 \text{ mL}/100 \text{ mL}$  com  $CL_{50} 0,004 \text{ mL}/100\text{mL}$ ; e no extrato de *A. cherimolia* na concentração  $1,20 \text{ mL}/100 \text{ mL}$  com  $CL_{50} 0,012 \text{ mL}/100\text{mL}$ , proporcionando em 24 h 100% de mortalidade para ambos extratos. Neste sentido, a atividade inseticida pode ser devida a uma interação ou efeito sinérgico dos princípios ativos, dada por um complexo de alcaloides benziltetrahydroisoquinolinos, de ação citotóxica e por acetogeninas conhecidas devido a propriedades inseticidas, antifúngicas e anticancerígenas. (BOBADILLA et al., 2002).

Mendonça et al. (2005) avaliaram a atividade inseticida contra larvas do *Aedes aegypti* de 17 plantas medicinais do Brasil. As que mostraram maior atividade foram os óleos de *Anacardium occidentale*, *Copaifera langsdorfii*, *Carapa guianensis*, *Cymbopogon winterianus*, *Ageratum conyzoides* com  $CL_{50} 14,5; 41; 57; 98$  e  $148 \mu\text{g.L}^{-1}$ , respectivamente, ainda o extrato etanólico mais ativo foi o do caule de *Annona glabra* que apresentou um valor de  $CL_{50}$  de  $27 \mu\text{g.L}^{-1}$ , todos com uma concentração inicial de 500 ppm, proporcionando 100% de mortalidade das larvas. (MENDONÇA et al., 2005).

As plantas da família Annonaceae apresentam uma classe de produtos naturais, as acetogeninas que são promissoras como agentes inseticidas, sendo encontrada seu potencial nas cascas de galhos e raízes, principalmente em sementes. A uvaricina foi a primeira acetogenina isolada a partir das raízes da *Uvaria accuminata* em 1982, isso evidência como os estudos são atuais com estas substâncias. (KRINSKI; MASSAROLI; MACHADO, 2014).

A população do mosquito *Aedes aegypti*, transmissor da dengue está cada vez mais resistente aos inseticidas comerciais. O Temephós, o inseticida mais usado em todo país já se tornou obsoleto devido a resistência das larvas do mosquito. Os

produtos naturais que tem atividade larvicida são uma alternativa para o controle químico e é uma alternativa mais segura, mas há necessidade de mais pesquisas para comprovar suas reais eficácias. (ZARA, et al., 2016).

### 5.3.7 Ensaio para atividade citotóxica

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos no ensaio de citotoxicidade em concentração única de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os extratos metanólico, diclorometano, hexânico e controle positivo doxorrubicina. Somente as amostras que foram capazes de inibir pelo menos 75% da proliferação foram consideradas ativas e selecionadas para o ensaio de cálculo do valor de  $\text{IC}_{50}$ . Todos os extratos testados foram promissores frente a linhagem celular de B16-F10 (melanoma murino), com destaque para o extrato diclorometano que apresentou maior porcentagem de inibição da viabilidade celular ( $\text{GI}\% > 97$ ), seguido do extrato em hexano ( $\text{GI}\% > 84$ ) e extrato metanólico ( $\text{GI}\% > 77,38$ ). Ainda o extrato diclorometano apresentou maior viabilidade frente a linhagem celular HepG2 (carcinoma hepatocelular humano) ( $\text{GI}\% > 97$ ) seguido do extrato em hexano ( $\text{GI}\% > 72,96$ ), portanto, o extrato em diclorometano foi selecionado para ensaio de  $\text{IC}_{50}$ .

Segundo o programa de triagem de drogas citotóxicas, extratos que apresentam valores de  $\text{IC}_{50} < 30 \mu\text{g mL}^{-1}$  e compostos isolados com valores de  $\text{IC}_{50} < 4 \mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados promissores. (SUFFNESS; PEZZUTO, 1990). Portanto, o extrato diclorometano mostrou-se promissor para esses tipos de linhagens tumorais.

TABELA 11 - PORCENTAGEM DE INIBIÇÃO DA VIABILIDADE/PROLIFERAÇÃO CELULAR EM LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Amostras	Porcentagem de inibição ( $\text{GI}\% \pm \text{DP}$ ) <sup>a</sup>	
	B16F10 <sup>b</sup>	HepG2 <sup>b</sup>
Extrato Metanólico	77,38 $\pm$ 9,536	48,47 $\pm$ 12,52
Extrato Diclorometano	98,01 $\pm$ 0,6946	97,53 $\pm$ 0,5919
Extrato Hexânico	84,19 $\pm$ 8,175	72,96 $\pm$ 12,65
DOX <sup>c</sup>	94,63 $\pm$ 1,801	98,00 $\pm$ 0,8857

<sup>a</sup> $\text{GI}\%$  valores apresentados como a média  $\pm$  DP de três repetições medidos por ensaio Alamar blue, após 72 h de incubação. Todos foram avaliados e testados a uma concentração de  $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$ .

<sup>b</sup>Linhagem celular: B16-F10 (melanoma murino) e HepG2 (Carcinoma hepatocelular humano). <sup>c</sup>A doxorubicina foi utilizado como controle positivo.

Fonte: O autor, 2014.

A Tabela 12 apresenta os valores de  $IC_{50} \pm$  intervalo de confiança de três experimentos independentes realizados em triplicata pelo método do Alamar blue após 72 horas de exposição com as células BF6-F10 (melanoma murino), HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HL-60 (leucemia promielocítica humana e PBMC (célula mononuclear do sangue periférico).

TABELA 12 - VALORES DE  $IC_{50}$  PARA A ATIVIDADE CITOTÓXICA DO EXTRATO DICLOROMETANO FRENTE AS LINHAGENS DE CÉLULAS TUMORAIS

Amostra	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )				
	<sup>a</sup> B16-F10	<sup>a</sup> HepG2	<sup>a</sup> K562	<sup>a</sup> HL-60	<sup>a</sup> PBMC
Extrato Diclorometano	3.9	2.9	2.9	2,7	6,1
Doxorrubicina <sup>b</sup>	<0.04	0.04	0.13	< 0.04	0,12

<sup>a</sup>Linhas celulares: B16-F10 (melanoma murinho) HepG2 (carcinoma hepato celular humano), K562 (leucemia mielocítica crônica humana), HL60 (leucemia promielocítica humana) e PBMC (célula mononuclear do sangue periférico) , <sup>b</sup>Doxorrubicina: controle positivo. Fonte: O autor, 2016.

Diante dos resultados obtidos, o extrato diclorometano foi considerado citotóxico e seletivo com  $IS \geq 2$  com exceção para a linhagem tumoral B16-F10 ( $IS$  1,5) (TABELA 12). Considerando assim o extrato diclorometano das sementes de *Annona salzmannii*, um extrato promissor contra essas linhagens tumorais, a probabilidade se deve as acetogeninas encontradas no extrato diclorometano, muricin G, squamocin A e Rioclarin.

Há vários relatos na literatura quando se verifica a citotoxicidade das acetogeninas.

As acetogeninas Uvaricina A e B obtidas do extrato etanol (EtOH) das partes aéreas da *Uvaria* sp., foram avaliadas quanto a atividade citotóxica. As linhagens utilizadas foram: A2780 ( $IC_{50}$  6,4 e 8,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), melanoma A2058 ( $IC_{50}$  6,6 e 7,2  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), a linha celular de câncer de pulmão H522 ( $IC_{50}$  10 e ,10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Ambas acetogeninas mostraram fraca inibição frente a todas as linhagens celulares. (DAI et al., 2012).

Da espécie *A. dioica* A. St.-Hil., obtiveram-se extratos em hexano, clorofórmio, metanol e aquoso, do cerne, da casca da haste, cerne da raiz, casca do caule subterrâneo e de folhas. A citotoxicidade dos extratos foi testada contra cepas de células tumorais de HCT-8 (carcinoma de cólon humano), SF-295 (glioblastoma) e MDA-MB-435 (melanoma) (National Cancer Institute, Bethesda, MD, EUA). Todos os

extratos apresentaram alta atividade citotóxica, mais de 75%. (MAHMOUD et al., 2011).

Wang e colaboradores realizaram teste *in vivo* utilizando camundongos inoculados com linhagem celular de carcinoma de pulmão murino (LLC), usando o extrato de diclorometano e metanol (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> – MeOH) das folhas da *Annona montana*, destes extratos purificados foram identificadas as acetogeninas annonacin e montanacin F. Neste estudo a annonacin mostrou citotoxicidade mais potente ED<sub>50</sub>: 0,012 mg/mL apresentando citotoxicidade 20 vezes menor que o controle positivo adriamicina. Avaliou-se a citotoxicidade *in vitro* contra a linhagem de células tumorais (LLC) de montanacina F, que mostrou atividade potente com o valor de ED<sub>50</sub>: 0,083 mg/mL, potencial que o controle positivo o fármaco adriamicina, ED<sub>50</sub>: 0,15 mg/mL. (WANG et al., 2002).

Uma pesquisa sobre os extratos (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> / AcOEt 50:50) das sementes de *A. spraguei* Safford, resultou em frações nas quais foram identificadas 4 acetogeninas: as guanaconetins 1,2,3 e 4. O teste realizado para avaliação da citotoxicidade foi o MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio] }, utilizando seis linhagens de células tumorais: A-549 (carcinoma do pulmão humano, CCL-185), HepG2 (carcinoma hepático humano, CCL-8085), HTB-22 e células HT-29 (carcinoma de mama humana), HTB-38 (carcinoma de cólon humano), MES-SA (carcinoma de ovário humano CRL- 1976) e CRL-1977 (carcinoma resistente a doxorrubicina). O carcinoma hepático humano (HepG2) foi a linhagem celular mais sensível ao conjunto de ACG, seguido de mama (MCF-7), ovário (MES-SA) e o carcinoma de ovário resistente a doxorrubicina (MES-SA / Dx5), enquanto o pulmão (A-549) e o cólon (HT-29) eram os carcinomas menos sensíveis a deste conjunto de acetogeninas. A citotoxicidade contra a linha celular MES-SA foi ligeiramente superior à observada contra a do carcinoma resistente a doxorrubicina do ovário (MES-SA / Dx5). A seletividade dessas acetogeninas contra a linha celular do adenocarcinoma do fígado foi mais aparente. A guanaconetina-3 mostrou uma maior inibição do crescimento celular para todas as linhas celulares. A atividade antitumoral das acetogeninas bis-THF com configuração relativa de *treo/trans/treo/trans/eritro* foi caracterizada por C 15,24,30-trioxigendas, que inibiram a ação mitocondrial, enzima do complexo I, bem como o crescimento de várias linhagens tumorais. (CHAHBOUNE et al., 2006).

Um estudo feito por Chen e colaboradores, teve como objetivo investigar os constituintes químicos e a atividade antitumoral do extrato padronizado de sementes

de *A. squamosa in vitro* e *in vivo*. O estudo citotóxico foi feito pelo método de MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio] } *in vitro* e modelo de tumor de transplante de células H22 (hepatoma *in vivo*), da Medicina Chinesa. O extrato de acetato de etila obteve frações e foram identificadas as acetogeninas 12,15-cis-squamostatin-A e bullatacin. Foram usadas as linhagens de células *in vitro* A549 (carcinoma de pulmão), MCF-7 (carcinoma de mama humano), HepG2 (carcinoma hepato celular humano) e HELA (carcinoma do colo do útero humano), e modelo de tumor de transplante de células H22 de hepatoma. O extrato exibiu uma atividade antitumoral significativamente maior contra as células MCF-7 (IC<sub>50</sub> 0,25 µg / ml) e Hep G2 (IC<sub>50</sub> 0,36 µg/ ml). A atividade antineoplásica *in vivo* mostrou que o extrato exibiu um efeito antitumoral contra H22 quando administrado por via oral. A taxa de inibição do extrato atingiu 69,55% a uma dose de 18 mg / kg / dia, superior à da ciclofosfamida (63,75%) administrada por injeção intraperitoneal com uma dose maior de 30 mg / kg / dia. O extrato de sementes de *Annona squamosa* mostrou o potencial das acetogeninas, que são bem conhecidas pela inibição de células tumorais. A bullatacin, uma acetogenina bistetrahidrofurano conhecida como o inibidor mais potente do complexo de cadeia respiratória mitocondrial I, exibiu 300 vezes mais eficaz do que o taxol quando testado *in vivo* e foi usado para controlar a qualidade do extrato padronizado. (CHEN et al., 2012).

O estudo feito por Sun e colaboradores, teve como objetivo avaliar o potencial citotóxico do extrato de EtOH (etanol) da polpa de frutas de *Annona muricata* (graviola), obtendo-se com a continuação três acetogeninas, sendo duas com cadeia hidrocarbônica (C-35) Muricin M e N e uma com (C-37) muricenin, todas com anel mono-tetrahidrofurano e quatro grupos de hidroxilas. Todas elas mostraram inibição, com a seguinte potência: muricin N > muricin M > muricenin. As acetogeninas muricin M e N demonstraram atividades antiproliferativa mais potentes contra a células PC-3 (carcinoma de próstata humana). Foi concluído que as acetogeninas C-35 mais curtas eram mais potentes do que os compostos com C-37, de fato, a muricenin C-37 tinha uma diminuição acentuada da atividade inibitória neste experimento, no entanto, a probabilidade é que poderia estar relacionado a uma dupla que existia nessa acetogenina. (SUN et al., 2015).

Um estudo reportado pelo grupo de Zorofchien (2014), sobre a atividade citotóxica dos extratos de acetato de etila, hexano e metanol das folhas de *Annona muricata*, contra MCF-7 (células de câncer de mama humano), MDA-MB-231 (células

de câncer de mama humano), A549 (células de câncer de pulmão humano), HepG2 (células de hepatoma humano) e WRL-68 (células hepáticas humanas) usando o teste MTT {brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazólio] }. Os resultados mostraram a atividade citotóxica significativa do extrato de acetato de etila em relação a todas as células cancerosas. O extrato de acetato de etila ( $IC_{50}$  variou de  $5,09 \pm 0,41$  a  $11,36 \pm 0,67 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) mostrou a maior citotoxicidade contra todas as células cancerosas em comparação com outras. Além disso, o extrato de acetato de etila exibiu a maior atividade citotóxica em relação às células A549 com  $IC_{50}$  de  $5,09 \pm 0,41$  em comparação com  $11,32 \pm 1,54$  para o controle positivo de curcumina. Após 24 e 48 h de tratamento, as células A549 apresentaram os valores de  $IC_{50}$  de  $17,542 \pm 0,92$  e  $10,612 \pm 1,34 \mu\text{g} / \text{mL}$ . Vale ressaltar que WRL-68 células hepáticas humanas normais não foram visivelmente afetadas pelo tratamento. (MOGHADAMTOUSI et al., 2014).

A atividade das acetogeninas estão relacionadas a inibição do NADH: ubiquinona redutase, levando a morte programada das células tumorais. Esse mecanismo de ação é interessante para o desenvolvimento de medicamentos oncológicos, incluindo os casos de resistência aos medicamentos, ou podem até serem usados como sensibilizadores durante a administração de quimioterápicos. (PAES et al., 2016)

### 5.3.8 Ensaio para atividade antimicrobiana

A avaliação antimicrobiana do extrato diclorometano e frações F4 e F5 das sementes de *Annona salzmannii*, foi realizada pelo método de microdiluição. (VEIGA, 2016). Este baseia-se na sucessiva diluição das amostras em placa de 96 poços e submete o micro-organismo a ação do extrato ou fração em estudo. A concentração inibitória mínima (CIM) é dada em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os experimentos foram realizados em triplicata para cada cepa indicadora utilizada. A atividade antimicrobiana não tem efeito em nível mitocondrial ou complexo I.

O critério utilizado para classificação da atividade antimicrobiana das amostras de *A. salzmannii* foi: CIM menor que  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  - ativo; CIM de  $1000$  a  $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$  - moderadamente ativo; CIM entre  $5000$  e  $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$  - pouco ativo e CIM maior que  $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , inativo. (HOLETZ et al., 2002; NOLDIN et al., 2004).

De acordo com os resultados descritos na TABELA 13, pode-se observar que o extrato bruto e as frações F4 e F5 contra as cepas de *C. albicans*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* mostraram-se moderadamente ativos nas concentrações testadas (CIM > 1000 µg mL<sup>-1</sup>).

TABELA 13 - ENSAIO ANTIMICROBIANO DO EXTRATO DICLOROMETANO E FRAÇÕES (F4 E F5) DE SEMENTES DE *A. salzmannii*

Amostras	CIM (µg mL <sup>-1</sup> )			
	<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	<i>E. coli</i> (ATCC 8738)	<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 9027)	<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)
Extrato Diclorometano	>1000	>1000	>1000	>1000
F4	>1000	>1000	>1000	>1000
F5	>1000	>1000	>1000	>1000

Fonte: O autor (2016).

Na literatura tem sido relatada a investigação de atividade antimicrobiana de espécies de *Annona* tanto de extratos brutos, assim como de substâncias isoladas, principalmente de alcaloides e em menor quantidade as acetogeninas.

Paulo e colaboradores testaram os alcaloides anonaina, reticulina, isoboldina e laurelliptina isolados das cascas de *A. salzmannii*. Destes somente o alcaloide anonaina apresentou atividade (1 mg.mL) contra cepas de bactérias *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*. Entretanto, os quatro alcaloides não apresentaram atividade para *Candida albicans*, *C. tropicalis*, *Cryptococcus neoformans* e *Pseudomonas aeruginosa*. Ainda, estes alcaloides foram testados contra *Trichophyton rubrum*, sendo os alcaloides anonaina e isoboldina os que apresentaram forte inibição antifúngica (500 µg mL<sup>-1</sup>), seguido dos demais alcaloides, já para o fungo *Microsporium gypseum*, novamente o alcaloide anonaina apresentou forte inibição (500 µg mL<sup>-1</sup>), seguido da isoboldina e reticulina com fraca inibição e a laurelliptina não apresentou inibição. (PAULO et al., 1992).

Costa e colaboradores também testaram alcaloides isolados das cascas de *A. salzmannii* que apresentaram resultados significativos com valores de CIM entre 25 a 100 µg mL<sup>-1</sup>, alguns mais ativos ou similares aos controles positivos (cloranfenicol para cepas de bactérias e cetoconazol para cepas de levedura), com destaque para os alcaloides aporfínicos anonaina, asimilobina e para o alcaloide oxoaporfínico liriodenina frente a *K. rhizophila*, *Staphylococcus aureus* penicilinase-(8-), *S. epidermidis* e *C. dubliniensis*. (COSTA et al., 2013).



Roberto e seus colaboradores observaram que as folhas de *Annona vepretorum* apresentaram uma forte ação dos extratos etanólico e hexânico, frente à bactéria *Escherichia coli* com valor de CIM de 0,39 mg.mL, sendo que o extrato hexânico inibiu fortemente o crescimento da *Salmonella choleraesuis* com o mesmo valor de CIM, como também apresentou moderada atividade contra *Serratia marcescens* e *Staphylococcus aureus*. O extrato clorofórmico apresentou moderada atividade contra *Escherichia coli*. Todos os extratos apresentaram fraca atividade frente aos demais micro-organismos, *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *Shigella flexneri*. A atividade antimicrobiana tem sido relacionada aos flavanóides, esteroides e terpenóides presente nestes extratos. (ROBERTO et al., 2014).

Um estudo foi realizado com folhas e caules de atemoia que é um híbrido entre *Annona cherimola* Mill. x *Annona squamosa* L. a partir dos extratos hexânico e metanólico das folhas e do extrato etanólico dos talos. Das dez cepas bacterianas que foram submetidas ao teste de sensibilidade aos extratos de atemoia, as cepas de *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella choleraesuis*, *Serratia marcescens* e *Shigella flexneri* mostraram-se resistentes aos três extratos testados, sendo a primeira uma bactéria Gram-positiva, e as demais, Gram-negativas. As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) e *Klebsiella pneumoniae* (Gram-negativa) foram sensíveis à ação dos extratos etanólico e metanólico, gerando valores de CIM variando entre 781,2 e 6.250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e de 3.125 a 12.500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Todas as cepas mostraram-se resistentes ao extrato hexânico. *S. aureus* é um dos principais agentes isolados de pacientes com infecções de pele, e essas cepas foram escolhidas porque são resistentes a todos os antimicrobianos betalactâmicos. A atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos e etanólico tem sido atribuída a presença de flavonoides, enquanto que a baixa ou ausência de atividade do extrato em hexano a ter baixa quantidade de flavonoides e ter mais terpenóides. (RABÊLO et al., 2013).

Silva e colaboradores, avaliaram o potencial antibacteriano de extratos hidroalcolólicos e aquoso das cascas, folhas e frutos da *Annona muricata*, frente as cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Foi utilizado a técnica de difusão em discos e foi observado que os extratos

hidroalcóolicos e aquosos das cascas, folhas e frutos da graviola mostraram-se inativos frente aos micro-organismos testados. (SILVA et al., 2011).

Pathak et al (2010) avaliou o efeito antibacteriano de extratos das folhas da *Annona muricata*, contra as cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Streptococcus pyogenes*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella pneumonia* e *Enterobacter aerogenes*. O extrato metanólico mostrou atividade antibacteriana para quase todas as cepas testadas (6000 ppm), entretanto para *Escherichia coli* e *Enterobacter aerogenes* apresentou somente a altas concentrações (8000 ppm). Enquanto que o extrato aquoso apresentou atividade antibacteriana somente a partir de concentrações acima de 8000 ppm, não apresentando atividade para *Streptococcus pyogenes*. Análise fitoquímica preliminar foi realizada sendo relatada a presença de carboidratos, esteroides, glicosídeos cardíacos, taninos, mas a ausência de alcaloides, saponinas, fenólicos e flavonoides. (PATHAK et al., 2010).

Os extratos metanólico e clorofórmico e as frações das folhas de *Annona reticulata* foram testados seletivamente contra diferentes cepas de micro-organismos. As cepas de bactérias Gram positivas utilizadas incluem *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, Gram negativas *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Estirpes fúngicas como *Candida albicans* e *Candida blanki* foram empregados para a determinação da atividade antifúngica. Os extratos revelaram-se eficazes contra todas as cepas bacterianas e fúngicas. As amostras demonstraram uma potente atividade contra estirpes bacterianas com valores de CIM do extrato metanólico de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $60 \mu\text{g mL}^{-1}$  e o extrato clorofórmico de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  a  $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ , podendo ser atribuído o potente efeito inibitório apresentado pelo extrato metanólico a presença de compostos fenólicos e polifenólicos. (JAMKHANDE et al., 2016).

Acetogenina 9-hidroxi-folianina isolada de extrato etanólico de sementes de *Annona cornifolia* foi capaz de inibir 20 cepas de fungo patogênico de fungo filamentoso *Paracoccidioides brasiliensis*. O intervalo de CIM apresentado foi de 3,4 e  $27,7 \mu\text{g mL}^{-1}$  sendo a acetogenina considerada mais potente que o antifúngico comercial trimethoprim-sulfamethoxazol. (LIMA et al., 2011).

No levantamento bibliográfico sobre a atividade antimicrobiana pode-se observar que não há um consenso sobre o nível de inibição aceitável dos produtos testados frente as cepas microbianas. Os resultados obtidos são divergentes uma vez

que cada autor se baseia em uma classificação que podem ser de valores próximos aos antibióticos padrões utilizados ou valores de inibição muito superiores a estes. Sendo muito difícil a comparação dos resultados, pois o potencial de inibição pode estar associado ao modo de preparo dos extratos, partes da planta, o tipo de metabólitos presentes, assim como as cepas analisadas.

## 6 CONCLUSÃO

- Identificação dos ácidos graxos insaturados: oleico 33,5%, linoleico 45,3% e o ácido palmitoleico 1,7%; ácidos graxos saturados: palmítico 14,3% e esteárico 4,4%. O óleo de sementes de *Annona salzmannii* é uma fonte promissora de EFAS.
- Identificação de três acetogeninas no extrato diclorometano de sementes de *A. salzmannii*, a Muricin G, Esquamocin A e Rioclarin, primeiro relato dessas acetogeninas em nessa espécie.
- A potente atividade larvicida do extrato diclorometano  $CL_{50}$  de  $0,031 \text{ mg.L}^{-1}$  foi maior que o controle Temephos. Podendo ser utilizado contra as larvas de *Aedes aegypti*.
- A atividade citotóxica promissora do extrato de diclorometano frente as linhagens de células tumorais, B16-F10 ( $IC_{50} 3,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ), HepG2 ( $IC_{50} 2,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ), K562 ( $IC_{50} 2,9 \text{ mg.L}^{-1}$ ) HL-60 ( $IC_{50} 2,7 \text{ mg.L}^{-1}$ ).
  - A atividade antimicrobiana moderada do extrato diclorometano e frações F4 e F5, frente as cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *C. albicans*, ( $CIM > 1000 \text{ mg.mL}^{-1}$ ).

## REFERÊNCIAS

- ABREO, J.; SNEDEN, T. Rollinone, a revision and extension of structure. **Journal of Natural Products** v. 53, n. 4, p. 983–985, 1990.
- AHAMMADSAHIB, K. I. HOLLINGWORTH, J. P.; MCGOUREN, Y.; H. H and MCLAUGHLIN, J. L. Mode of action of bullatacin: a potent antitumor and pesticidal annonaceous acetogenin. **Life sciences**, v. 53, n. 14, p. 1113–1120, 1993.
- ALALI, F. Q.; LIU, X.; MCLAUGHLIN, J. L. Invited Review. *Review Literature And Arts Of The Americas*. **Journal of Natural Products**, v.62 p. 504–540, 1999.
- ALMEIDA, D. S. DE. **Recuperação ambiental Mata Atlântica**. 3rd ed. re ed. [S.l.: s.n.], 2016.
- ANDREZA CANO, M.; MARIA MÁRCIA, B.; ÂNGELA LIMA, P. Utilização de ácidos graxos essenciais no tratamento de feridas. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 61, p. 620–628, 2008. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0034-71672008000500015&lang=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-71672008000500015&lang=pt)>.
- Annonaceae in Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB110219>>. Acesso em: 21 Dez. 2018
- ANSARI, M. H.; AFAQUE, S.; AHMAD, M. Isoricinoleic acid in *Annona squamosa* seed oil. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 62, n. 10, p. 1514–1514, 1985. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF02541905>>.
- ARANGO, G. J. *et al.* Actividad Leishmanicida de Annonacina, Aislada de *Annona muricata* contra *Leishmania panamensis*. **Revista Vitae**, p. 38–42, set. 2000.
- ARAYA, H. *et al.* Squamocin-O1 and squamocin-O2, new adjacent bis-tetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry**, v. 61, n. 8, p. 999–1004, 2002.
- ARAYA, H. *et al.* Squamosten-A, a Novel Mono-tetrahydrofuranic Acetogenin with a Double Bond in the Hydrocarbon Chain, from *Annona squamosa* L. **Chem. Pharm. Bull**, v. 42, n. 2, p. 388–391, 1994. BARISON, A. *et al.* A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Magnetic resonance in chemistry : MRC**, v. 48, n. 8, p. 642–650, 2010.
- BARISON, A. *et al.* A simple methodology for the determination of fatty acid composition in edible oils through <sup>1</sup>H NMR spectroscopy. **Magnetic resonance in chemistry : MRC**, v. 48, n. 8, p. 642–650, 2010.

BARON, D. **Desenvolvimento de plantas jovens de *Annona emarginata* (schltdl.) h. rainer (araticum-de-terra- fria) cultivadas em solução nutritiva.** 2010. 103 f. Dissertação, (Mestre em Ciências Biológicas)- Setor de Botânica, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2010.

BARRETO, F. S. **Estudo da atividade citotóxica de compostos obtidos do extrato acetônico das folhas de *Annona muricata* L. por fracionamento bioguiado.** 89 f. Dissertação, (Mestre em Farmacologia)- Setor de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, 2014.

BENITOREYES-TREJO *et al.* *Annona diversifolia* seed oil as a promising non-edible feedstock for biodiesel production. **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 400–404, 2014.

BITAR, E. F. Cientista Social formada pela Universidade Federal do Amazonas, tem especialização em Psicologia Social e mestrado em Psicologia Social e das Organizações pela Universidade Fernando Pessoa (Portugal), é professora de Sociologia e Antropologia da graduação. **Enciclopédia Biosfera**. v. 6, p. 1–10, 2010.

BNDS. **Perspectivas do investimento 2015-2018 e panoramas setoriais.** p. 198, 2014.

BOBADILLA, A. *et al.* *cherimolia* Miller “chirimoya” Y *A. muricata* Linneaus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de Anopheles sp. **Rev. peru. biol.** v. 9, n. 2, p. 64–73, 2002.

BOBADILLA, M.; SISNIEGAS, M.; ZAVALETA, G. Linnaeus « guanábana » sobre *Aedes aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae). **Rev. peru. biol.** v. 12, n. 1, p. 145–152, 2005.

BORN, L. *et al.* Die relative Konfiguration der aus *Annona squamosa* isolierten Acetogenine Annonin I (Squamocin) und Annonin. **Planta Med.** v.56, p. 312–316, 2016. Disponível em: <<https://www.thieme-connect.com/products/ejournals/abstract/10.1055/s-2006-960967>>. BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. D. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. p. 263–277, 2008.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. D. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, **Rio de Janeiro**, Brasil. p. 263–277, 2008.

BRANDÃO, A. Fitoterapia, com Certeza. **Pharmacia Brasileira**, n. 81, 2011. Disponível em: <[http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/131/022a028\\_fitoterapia.pdf](http://www.cff.org.br/sistemas/geral/revista/pdf/131/022a028_fitoterapia.pdf)>.

CARBAJAL, D. *et al.* Pharmacological screening of plant decoctions commonly used

in Cuban folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 33, n. 1–2, p. 21–24, 1991.

CASTRO, F. A. DE et al. Características Físicas E Químicas Da Graviola. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 19, n. 3, p. 361–365, 1984. Disponível em: <<https://seer.sct.embrapa.br/index.php/pab/article/viewFile/15472/9410>>.

CHAHBOUNE, N. et al. Guanaconetins, new antitumoral acetogenins, mitochondrial complex I and tumor cell growth inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 4, p. 1089–1094, 15 fev. 2006. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089605008953>>. Acesso em: 23 jun. 2015.

CHANG, F. R. et al. Acetogenins from seeds of *Annona reticulata*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 6, p. 1057–1061, 1998.

CHANG, F. R. et al. Bioactive acetogenins from the seeds of *Annona atemoya*. **Phytochemistry**, v. 51, n. 7, p. 883–889, 1999.

CHANG, F.; WU, Y.; YANG-CHANG, W. Novel cytotoxic Annonaceous acetogenins from *Annona muricata*. **Journal of natural products**, n. 64, p. 925–931, 2001.

CHATROU, L W; RAINER, H; MAAS, P. J. M. In: Annonaeae (Soursop Family): Smith N. et al. (eds). Flowering Plants of the Geotropism. **New York Botanical garden. New York**. [S.l: s.n.], 2004.

CHATROU, L. W. et al. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, n. 1, p. 5–40, 2012.

CHAZDON, R. L.; GUARIGUATA, M. R. Natural regeneration as a tool for large-scale forest restoration in the tropics: prospects and challenges. **Biotropica**, v. 48, n. 6, p. 716–730, 2016.

CHEN, Y.; XU, S. S.; et al. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 462–466, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2012.05.019>>..

CHEN, Y.; et al. Six cytotoxic annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* seeds. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 960–966, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.041>>.

CHRISTIE, W. W. **What is a Lipid\_ - AOCs Lipid Library**. . [S.l: s.n.]. Disponível em:

<<http://lipidlibrary.aocs.org/Primer/content.cfm?ItemNumber=39371&navItemNumber=19200#fatty>>. , 2013.

COMBA, A. et al. Effect of  $\omega$ -3 and  $\omega$ -9 fatty acid rich oils on lipoxygenases and cyclooxygenases enzymes and on the growth of a mammary adenocarcinoma model. **Lipids in health and disease**, v. 9, p. 1–11, 2010.

**CONSELHO REGIONAL DE FARMÁCIA DO ESTADO DE SÃO PAULO**. Plantas medicinais e fitoterápicos. [S.l: s.n.], 2011.

CORRÊA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas.(IBDF, Ed). **Rio de Janeiro: Imprensa Nacional**. [S.l: s.n.], 1984.

CORTES, D.; FIGADERE, B.; CAVÉ, A. Bis-tetrahydrofuran acetogenins from annonaceae. **Phytochemistry**, v. 32, n. 6, p. 1467–1473, 1993.

COSTA, E. V.; DA CRUZ, P. E. O.; et al. Antioxidant and antimicrobial activities of aporphinoids and other alkaloids from the bark of *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). **Natural product research**, v. 27, n. 11, p. 1002–6, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22582985>>.

COSTA, E. V. et al. Chemical Composition and Antioxidant, Antimicrobial, and Larvicidal Activities of the essential Oils of *Annona salzmannii* and *A. pickelii* (Annonaceae). **Natural product communications**, v. 6, n. 6, p. 907–912, 2011. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0703993104>&5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25246403&5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4249520&5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21815437&5Cnhttp://arxiv.org/abs/1011.1669&5Cn>.

COSTA, E. V.; et al. Chemical composition of the essential oils of *Annona pickelii* and *Annona salzmannii* (Annonaceae), and their antitumour and trypanocidal activities. **Natural product research**, v. 27, n. 2013a, p. 997–1001, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583044>>.

COSTA, M. et al. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus , 1762 ) ( Diptera : Culicidae ) 1.**Revista Brasileira de Biociências**. v.11, n.2 p. 184–190, 2013.

COSTA, E. V. et al. A pyrimidine- $\beta$ -carboline and other alkaloids from *Annona foetida* with antileishmanial activity. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 2, p. 292–294, 2006..

CRONQUIST, A. An Integrated System of classifications of flowering plants. [S.l: s.n.], **Columbia University Press New York**, 1985. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2121803?Search=yes&resultItemClick=true&searchText>>



=international&searchText=monetary&searchText=system&searchUri=/action/doBasicSearch?Query=international+monetary+system&prq=monetary+system+evolution%25>.

DA CRUZ, P. E. O. Estudo Fitoquímica e Investigação das Atividades Antioxidante, Antimicrobiana e Larvicida das Cascas de *Annona salzmannii* A. DC. (Annonaceae). 180 f. Dissertação, (Mestre em Química)- Setor de Química, Universidade Federal de Sergipe, Sergipe, 2011.

DA CRUZ, E. P. et al. Chemical constituents from the bark of *Annona salzmannii* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 39, n. 4–6, p. 872–875, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bse.2011.06.008>>.

DA SILVA, D. B. et al. The antitumoral, trypanocidal and antileishmanial activities of extract and alkaloids isolated from *Duguetia furfuracea*. **Phytomedicine**. [S.l.: s.n.], 2009.

DA SILVA, E. L. M. et al. Coriadienin, the first annonaceous acetogenin with two double bonds isolated from *Annona coriaceae*. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 5, p. 528–530, 1996.

DAI, Y. et al. Antiproliferative acetogenins from a *Uvaria* sp. from the madagascar dry forest(1). **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p. 479–483, 2012.

DANG, Q. LE et al. Nematicidal and Antifungal Activities of Annonaceous Acetogenins from *Annona squamosa* against Various Plant Pathogens. **Journal of Agricultural and food chemistry**, p. 11160–11167, 2011.

DAYU, R. U. R. H. Stinging nettles leaf ( *Urtica dioica* L .): Extraordinary vegetable medicine. **Perspectives in Medicine**, v. 3, n. 1, p. 9–38, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.hermed.2012.11.001>>.

DE BRITO, M. R.; DE SENNA-VALE, L. Plantas medicinais utilizadas na comunidade caiçara da Praia do Sono, Paraty, Rio de Janeiro, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 25, n. 2, p. 363–372, 2011.

DE MESQUITA, M. L. et al. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**. [S.l.: s.n.], 2007

DE MORAES, I. V. M. et al. UPLC–QTOF–MS and NMR analyses of graviola (*Annona muricata*) leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 2, p. 174–179, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X15002331>>.

DI STASI, H.-L. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. p. 592,

2002.

DONOHUE, T. J. et al. Concise Syntheses of the Natural Products (+)-Sylvaticin and (+)-cis-Sylvaticin. **JACS Articles**, n. 5, p. 12854–12861, 2009.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305–311, fev. 2005.

DU TOIT, P. J.; VAN ASWEGEN, C. H.; DU PLESSIS, D. J. The effect of essential fatty acids on growth and urokinase-type plasminogen activator production in human prostate DU-145 cells. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 55, n. 3, p. 173–177, 1996.

DURET, P.; HOCQUEMILLER, R. Acetogenin Annona a Tea40 Ya Seeds \*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 7, p. 1423–1426, 1997.

DUTRA, S. M.; SALIMENA, F. R. G.; NETO, L. M. Annonaceae in Serra Negra, Minas Gerais, Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 4, p. 785–793, 2012. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rod/v63n4/a04v63n4.pdf>>.

EGYDIO-BRANDÃO et al. Central Bringing Excellence in Open Access Alkaloids from Annona : Review from 2005 to 2016. **JSM Biochemistry & Molecular Biology**, n. December, 2017.

EGYDIO, A. P. M. et al. Free amino acid composition of Annona (Annonaceae) fruit species of economic interest. **Industrial Crops and Products**, v. 45, p. 373–376, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.12.033>>.

ÉPARVIER, V. Cytotoxic Monotetrahydrofuran Acetogenins from *Disepalum plagioneurum*. **J. Nat. Prod.** v.69, p. 1289–1294, 2006.

ESMANS, E. et al. Squamocin-2-one and panalycin, two acetogenins. **Phytochemistry**, v. 30, n. 2, p. 30–33, 1991.

FAGUNDES, F.A., DE OLIVEIRA, L.B., VALADRES, M. *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24–29, 2005.

FANG, X. et al. Annonaceous Acetogenins : An Updated Review. **Phytochemical Analysis**, v. 4, n. November 1992, p. 27–48, 1993.

FEKAM BOYOM, F. et al. Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants. **Phytochemistry**, v. 64, n. 7, p. 1269–1275, 2003.

FINNEY, D. J.; STEVENS, W. L. A Table for the Calculation of Working Probits and Weights in Probit Analysis. **Biometrika**, v. 35, n. 1/2, p. 191–201, 1948. Disponível em: <<http://www.jstor.org/stable/2332639>>.

FLORENCE, N. T. et al. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 2, p. 784–790, 2014.

GABRIELSON, J. et al. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of Microbiological Methods**, v. 50, n. 1, p. 63–73, jun. 2002.

GÓMEZ, M. E. DE LOS D. B. **Modulação da Composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta.I. Estabilidade oxidativa**. Tese (Doutorado em Bromatologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2003.

GONZALEZ-TRUJANO, M. E. et al. Anticonvulsant Effect of *Annona diversifolia* Saff. **Epilepsia**, v. 47, n. 11, p. 1810–1817, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2006.00827.x/pdf>>.

GARCEZ, W. S. et al. Naturally Occurring Plant Compounds with Larvicidal Activity Against *Aedes aegypti*. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 363–393, 2013. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1984-6835.20130034>>.

GÓMEZ, M. E. DE LOS D. B. **Modulação da Composição de ácidos graxos poliinsaturados ômega 3 de ovos e tecidos de galinhas poedeiras, através da dieta.I. Estabilidade oxidativa**. Tese (Doutorado em Bromatologia) Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo. 2003.

GONZALEZ-TRUJANO, M. E. et al. Anticonvulsant Effect of *Annona diversifolia* Saff. **Epilepsia**, v. 47, n. 11, p. 1810–1817, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1528-1167.2006.00827.x/pdf>>.

GU, Z. et al. Gonionenin: A new cytotoxic annonaceous acetogenin from *Goniothalamus giganteus* and the conversion of mono-THF acetogenins to bis-THF acetogenins. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 59, p. 3472–3479, 1994. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo00091a043>>.

GU, Z. et al. New bioactive adjacent bis-thf annonaceous acetogenins from *Annona bullata*. **Phytochemistry**, v. 40, n. 2, p. 467–477, 1995.

GU, Z. et al. Screening for Annonaceous Acetogenins in Bioactive Plant Extracts by Liquid Chromatography / Mass Spectrometry. **J. Nat. Prod.**, v. 656, n. 96, p. 242–248, 1997.

GUARIDO, M. M. **Atividade inseticida de extratos de *Annona foetida* Mart. (Annonaceae) sobre imaturos de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae)**. 72 f. Dissertação (Mestre em Ciências Biológicas)- Setor área de concentração em entomologia. Universidade Federal do Paraná, 2009.

GUILLÉN, M. D.; RUIZ, A. High resolution  $^1\text{H}$  nuclear magnetic resonance in the study of edible oils and fats. **Trends in Food Science & Technology**, v. 12, n. 9, p. 328–338, 2001.

HARRI LORENZI, LUIS BACHE, MARCO LACERDA, S. S. **Brazilian Fruits & Cultivated Exotics\_ Harri Lorenzi, Luis Bacher, Marco Lacerda, Sergio Sartori\_ 9788586714245\_ Amazon**. Instituto ed. [S.l: s.n.], 2006.

HE, K. et al. Additional Bioactive Annonaceous Acetogenins from *Asimina triloba* (Annonaceae). **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 5, n. 3, p. 501–506, 1997.

HOLETZ, F. B. et al. Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro**. 98 v. 97, n. October, p. 1027–1031, 2002.

HOPP, D. C. et al. Novel mono-tetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line, PACA-2. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 6, p. 581–586, 1997. HOYE, T. R. et al. Stereostructural studies on the 4-hydroxylated annonaceous acetogenins: A novel use of Mosher ester data for determining relative configuration [between C(4) and C(36)]. **Tetrahedron Letters**, v. 35, n. 46, p. 8529–8532, 1994.

HOYE, T. R.; YE, Z. X. Highly efficient synthesis of the potent antitumor annonaceous acetogenin (+)-parviflorin. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 118, n. 7, p. 1801–1802, 1996.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas : fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição EM. **Alim. Nutr. Araquara**. p. 97–108, 2008.

HUH, C. W.; ROUSH, W. R. Highly Stereoselective and Modular Syntheses of 10-Hydroxytrilobacin and Three Diastereomers via Stereodivergent [ 3 + 2 ] -Annulation Reactions. **Organic Letters**, v. 10, n. 15, p. 3371–3374, 2008.

IDENSI B. et al. Annonaceous acetogenins: Precursors from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 2, p. 72–76, 2009.

ITO, R K et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from rollinia sericea (r.e.fr.) r.e.fr. (annonaceae) leaves. **Journal of Essential Oil Reserarch**, v. 22, n. October 2014, p. 37–41, 2010.

JAMKHANDE, P. G. et al. Assessment of *Annona reticulata* Linn. leaves fractions for invitro antioxidative effect and antimicrobial potential against standard human pathogenic strains. **Alexandria Journal of Medicine**, v. 52, n. 1, p. 19–25, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajme.2014.12.007>>.

JIANG, W. G.; BRYCE, R. P.; HORROBIN, D. F. Essential fatty acids: molecular and cellular basis of their anti-cancer action and clinical implications. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 27, n. 3, p. 179–209, 1998.

JOLAD, S. D. et al. Uvaricin, a new antitumor agent from *Uvaria accuminata* (Annonaceae). **The Journal of Organic Chemistry**, v. 47, n. 16, p. 3151–3153, jul. 1982. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jo00137a024>>.

JOSSANG, A. et al. Deux nouvelles acetogenines monotetrahydrofuranniques cytotoxiques: L'annonomicine et la montanacine. **Tetrahedron Letters**, v. 31, n. 13, p. 1861–1864, 1990.

KERDANA. **Plantas Mediciniais - Floresta Amazônica**. . [S.l.]: Kerdana Produção Editorial Ltda. Disponível em: <<http://floresta-amazonica.info/plantas-mediciniais.html> %3E acesso em 08 março de 2016>. , 2016

KEUM, G. et al. Stereoselective Syntheses of Rolliniastatin 1 , Rollimembrin , and Membranacin are Annonaceous acetogenins isolated from the seeds of Rollinia. **J.AM.CHEM.SOC.**, v. 2, n. 7, p. 10396–10399, 2005.

KOMALAMISRA, N. et al. Triagem para atividade larvicida em algumas plantas tailandesas contra quatro espécies de vetores de mosquitos. **Saúde Pública J Trop Med do Sudeste Asiático**., p. 1412–1422, 2005.

KRINSKI, D.; ET AL. Insecticidal potential of the Annonaceae family plants. **Revista Brasileira de Fruticultura**2. [S.l: s.n.]. , 2014

LANDOLT, J. L. et al. Determination of Structure-Activity Relationships of Annonaceous Acetogenins by Inhibition of Oxygen Uptake in Rat Liver. **Chemico-Biological Interactions**, v. 98, n. 1, p. 1–13, 1995.

LANDS, B. Fatty acids: essential fatty acids. in: LANDS, B. **Encyclopedia of Food and Health**. [S.l: s.n.], 2016. p. 615–622.

LEATEMIA, J. A.; ISMAN, M. B. Insecticidal Activity of Crude Seed Extracts of *Annona spp* ., *Lansium domesticum* and *Sandoricum koetjape* Against Lepidopteran Larvae. **Phitoparasitica**, v. 32, n. 1, p. 30–37, 2004.

LI, N. et al. Recent progress on the total synthesis of acetogenins from Annonaceae. **Beilstein Journal of Organic Chemistry**, v. 4, 2008.

LIAW, C.-C. et al. Novel cytotoxic monotetrahydrofuranic Annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 13, n. 15, p. 4767–76, 2005. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0968089605003937>>.

LIAW, C. C. et al. Montacin and cis-montacin, two new cytotoxic monotetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1804–1808, 2004.

LIAW, C. C. et al. Nine new cytotoxic monotetrahydrofuranic annonaceous acetogenins from *Annona montana*. **Planta Medica**, v. 70, n. 10, p. 948–959, 2004.

LIMA, L. A. R. S. et al. Avaliação da atividade citotóxica das sementes de *Annona cornifolia* A. St.-Hil. (Annonaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 629–634, 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722012000400009&lng=pt&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722012000400009&lng=pt&nrm=iso&tlng=en)>.

LIMA, L. A. R. S.; PIMENTA, L. P. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Acetogenins from *Annona cornifolia* and their antioxidant capacity. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1129–1138, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.100>>.

LIMA, L. A. R. S. *et al.* Antifungal activity of 9-hydroxy-folianin and sucrose octaacetate from the seeds of *Annona cornifolia* A. St. -Hil. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 44, n. 7, p. 2283–2288, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.030>>.

LIU, X. X. et al. Glabracins A and B, two new acetogenins from *Annona glabra*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 6, n. 7, p. 959–965, 1998.

LIU, X. X. et al. Two bioactive mono-tetrahydrofuran acetogenins, annoglacins A and B, from *Annona glabra*. **Phytochemistry**, v. 50, n. 5, p. 815–821, 1999.

LOPES, J. D. E. C.; MELLO-SILVA, R. Diversidade e caracterização das annonaceae do brasil 1. **Rev. Bras. Frutic.** v.36, p. 125–131, 2014.

LUNA, J. DE S. **Estudo de Plantas Bioativas**. 262 f. Tese (Doutorado em Química)- Departamento de Química. Universidade Federal do Pernambuco *Brasil*, 2006.

LUZIA, D. M. M.; JORGE, N. Bioactive substance contents and antioxidant capacity of the lipid fraction of *Annona crassiflora* Mart. seeds. **Industrial Crops and Products**, v. 42, n. 1, p. 231–235, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.05.027>>.

MAHMOUD, T. S. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 456–464, 2011. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2011000300017&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2011000300017&lng=en&nrm=iso&tlng=en)>.

MAKABE, H.; TANAKA, A.; ORITANI, T. Total Synthesis of (+)-4Deoxygigantecin. **Tetrahedron Letters**, v. 38, n. 24, p. 4247–4250, 1997.

MARQUES, J. P.; LOPES, G. C. Alcaloides Como Agentes Antitumorais : Considerações Químicas E Biológicas. **Revista Uningá Review**. v. 24, p. 56–61, 2015.

MARSET, J. B. et al. Ácido Esteárico Y Salud Cardiovascular. **Actividad Dietetica**, v. 13, n. 4, p. 161–172, 2009. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1138-0322\(09\)73428-5](http://dx.doi.org/10.1016/S1138-0322(09)73428-5)>.

MARSHALL, J. A.; CHEN, M. Z. Total synthesis of the annonaceous acetogenins asimincin and asiminecin by a bidirectional approach. **Journal of Organic Chemistry**, v. 62, n. 6, p. 5996–6000, 1997.

MARSHALL, J. A.; HINKLE, K. W. Total synthesis of the cytotoxic annonaceous acetogenin (30S)-bullantin. **Tetrahedron Letters**, v. 39, n. 11, p. 1303–1306, 1998.

MENDONÇA, F. A. C. DE; SILVA, K. F. S.; ANA, A. E. G. S. **Activities of some Brazilian plants against larvae of the mosquito *Aedes aegypti***. v. 76, p. 629–636, 2005.

METERISSIAN, S. H. et al. Effect of membrane free fatty acid alterations on the adhesion of human colorectal carcinoma cells to liver macrophages and extracellular matrix proteins. **Cancer Letters**, v. 89, n. 2, p. 145–152, 1995.

MIAO, Y. J. et al. Three cytotoxic Annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Phytochemistry Letters**, v. 16, p. 92–96, 2016. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390016300325>>.

MIYOSHI, H. et al. Essential structural factors of annonaceous acetogenins as potent inhibitors of mitochondrial complex I. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1365, n. 3, p. 443–452, 1998.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* leaves induced apoptosis in A549 cells through mitochondrial-mediated pathway and involvement of NF- $\kappa$ B. **BMC Complementry & Alternative Medicine**, p. 1–13, 2014.

MOON, H. S.; BATRIEL, S.; MANTZOROS, C. S. Alpha linolenic acid and oleic acid additively down-regulate malignant potential and positively cross-regulate AMPK/S6

axis in OE19 and OE33 esophageal cancer cells. **Metabolism: Clinical and Experimental**, v. 63, n. 11, p. 1–8, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.metabol.2014.07.009>>.

MORALES, Carlos Andrés; GONZÁLEZ, Ranulfo;; ARAGÓN, Raúl. Avaliação da atividade larvicida de extratos polares e não polares de acetogeninas de *Annona muricata* em larvas de *Aedes aegypti* e *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae). **Revista Colombiana de Entomologia**, p. 187–192.2004.

MOREIRA, I. C. et al. Sesquiterpenos e hidrocarbonetos dos frutos de *Xylopia emarginata* (Annonaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, p. 55–58, 2007.

MORENO LUZIA, D. M.; JORGE, N. Soursop ( *Annona muricata* L.) and sugar apple ( *Annona squamosa* L.). **Nutrition & Food Science**, v. 42, n. 6, p. 434–441, 2012. Disponível em: <<http://www.emeraldinsight.com/doi/abs/10.1108/00346651211277690>>.

NASCIUTTI, PRISCILA REGINA et al. Ácidos graxos e o sistema cardiovascular. **Enciclopédia Biosfera**, v. 11, n. February 2017, p. 10–29, 2015.

NOLDIN, F. et al. Antimicrobial Activity of Fractions and Compounds from *Calophyllum brasiliense* ( Clusiaceae / Guttiferae ). 2004.

NUNES, C. DOS R.; BERNARDES, N. R.; GLÓRIA, LORENA DE LIMA, OLIVEIRA, D. B. DE. Flavonóides em Annonaceae: ocorrência e propriedades biológicas. **VÉRTICES, Campos dos Goytacazes/ RJ**, v. 14, n. 1, p. 39-57, jan./abr. 2012, v. 14, n. 1, p. 39–57, 2012.

O'BRIEN, J. et al. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**. [S.l: s.n.]. , 2000

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. [S.l: s.n.]. , 2007

PAES, M. M. et al. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 945–980, 2016.

PATHAK, P. In Vitro Antimicrobial Activity and Phytochemical Analysis of the Leaves of *Annona Muricata*. **International Journal of Pharma Research and Development**, v. 2, n. 5, p. 1–6, 2010.

PAULO, M. DE Q. et al. Antimicrobial activity of benzyloquinoline alkaloids from



*Annona salzmanii* D.C. **Journal of ethnopharmacology**, v. 36, n. 1, p. 39–41, 1992.

PEREIRA, M. C. T. et al. Anonáceas: pinha, atemoia e graviola. **Informe Agropecuário**, v. 32, n. 264, p. 9, 2011.

PINTO, E. D. P. P.; AMOROZO, M. C. D. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 20, n. 4, p. 751–762, 2006.

PONTES, A. F.; BARBOSA, M. R. D. V.; MAAS, P. J. M. Flora Paraibana: Annonaceae Juss. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 2, p. 281–293, 2004.

PONTES, W. J. T. et al. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* Koch). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838–841, 2007.

QUEIROZ, E. F. et al. A new bistetrahydrofuran acetogenin from the roots of *Annona salzmanii*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 5, p. 710–713, 1999.

QUEIROZ, E. F. et al. Spinencin, a new bis-tetrahydrofuran acetogenin from the seeds of *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 8, p. 760–765, 1997.

QUEIROZ, E. F. et al. Three new bistetrahydrofuran acetogenins from the seeds of *Annona spinescens*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 1, p. 34–39, 1998.

QUEIROZ, E. F. et al. Two unusual acetogenins from the roots of *Annona salzmanii*. **Journal of natural products**, v. 66, p. 755–758, 2003. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/np020543h>>.

RABÊLO, S. V. et al. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de atemoia (*Annona cherimola* Mill x *A. squamosa* L.). v. 36, p. 265–271, 2013.

RABÊLO, S. V. Revisão de alcaloides do gênero *Annona*, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de atemoia (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*) 234 f. Dissertação, (Mestre em Recursos Naturais)- Setor de Recursos Naturais do Semiárido, Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2014.

RABÊLO, S. V. et al. Alkaloids isolated from the leaves of atemoya (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 25, n. 4, p. 419–421, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0102695X15001271>>.

RAGASA, C. Y. .; TORRES, O. B. .; SORIANO, G. Sterols and triterpenes from the fruit of *Annona*. **Silliman Journal**, v. 54, n. 1, p. 107–111, 2013.

RAMIREZ, E. A; HOVE, T. R. Determination of Relative and Absolute Configuration in the Annonaceous Acetogenins. **Studies in Natural Products Chemistry**, v. 2, n. 1, p. 251–282, 1995.

RAPOSO, H. F. Efeito dos ácidos graxos n-3 e n-6 na expressão de genes do metabolismo de lipídeos e risco de aterosclerose Effects of n-3 and n-6 fatty acids on the expression and risk of atherosclerosis. **Rev.Nutr. Campinas**, v. 23, n. 5, p. 871–879, 2015.

RATNAYAKE, S. et al. Parvifloracin and parviflorin : cytotoxic bistetrahydrofuran acetogenins with 35 carbons from *Asimina parviflora* ( Annonaceae ). **Cam. J. Chem.**, v. 72, p. 287–293, 1994.

RAYNAUD, S. et al. Acetogenins from the bark of *Uvaria Pauci-Ovulata*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 2, p. 321–326, 1997.

RIESER, M. J. et al. Determination of Absolute Configuration of Stereogenic Carbinol Centers in Annonaceous Acetogenins by <sup>1</sup>H- and <sup>19</sup>F-NMR Analysis of Mosher Ester Derivatives. **Journal of American Chemical Society**, v. 114, n. June 2016, p. 10203–10213, 1992.

ROBERTO, J. et al. Atividade antioxidante, citotóxica e antimicrobiana de *Annona vepretorum* MART. (ANNONACEAE). **Rev. Bras. Frutic.** v.36, n.1 , p. 258–264, 2014.

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl<sub>4</sub>-induced liver damage in rats. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 31, n. 1, p. 93–100, 2011.

RUPPRECHT, J. K.; HUI, Y. H.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: A review. **Journal of Natural Products (Lloydia)**, v. 53, n. 2, p. 237–278, 1990.

SAEZ, J. et al. Rioclarine et membranacine, deux nouvelles acetogenines bis-tetrahydrofuraniques des graines de *rollinia membranacea* **Journal of Natural Products**, v. 5, n. 3, p. 351–356, 1993.

SAHAI, M. et al. Annonaceous Acetogenins from the Seeds of *Annona squamosa*. Adjacent Bis-tetrahydrofuranic Acetogenins. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 42, n. 6, p. 1163–1174, 1994. Disponível em:  
<[https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/42/6/42\\_6\\_1163/\\_article%5Cnhttp://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/42.1163?from=CrossRef%5Cnhttp://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/42.1163?from=CrossRef](https://www.jstage.jst.go.jp/article/cpb1958/42/6/42_6_1163/_article%5Cnhttp://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/42.1163?from=CrossRef%5Cnhttp://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/42.1163?from=CrossRef)>.

SAHPAZ, S. et al. Senegalene, une nouvelle acetogénine oléfínique monotetrahydrofuranique des graines d'*Annona senegalensis*. **Can. J. Chem.**, v. 72, p. 3–6, 1994.

SANGIOVANNI, J. P.; CHEW, E. Y. The role of omega-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in health and disease of the retina. **Progress in Retinal and Eye Research**. v.27, p.87-138, 2005.

SANTOS, S. R. L.; SILVA, V. B.; BARBOSA, J. D. F. Toxic Effects on and Structure-Toxicity Relationships of Phenylpropanoids , Terpenes , and Related Compounds. v. 10, n. 10, 2010.

SÃO JOSÉ, A. R. *et al.* Atualidades e perspectivas das Anonáceas no mundo. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. 36, n. spe1, p. 86–93, 2014.

SASSAKI, G. L. *et al.* Application of acetate derivatives for gas chromatography-mass spectrometry: Novel approaches on carbohydrates, lipids and amino acids analysis. **Journal of Chromatography A**, v. 1208, n. 1–2, p. 215–222, 2008.

SCALOPPI JUNIOR, E. J.; MARTINS, A. B. G. Estaquia em Anonas . **Revista Brasileira de Fruticultura** , v. 36, p. 147–156, 2014.

SENTHILKUMAR, N.; VARMA, P.; GURUSUBRAMANIAN, G. Larvicidal and adulticidal activities of some medicinal plants against the Malarial Vector, *Anopheles stephensi* (Liston). **Parasitology Research**, v. 104, n. 2, p. 237–244, 2009.

SHI, J. *et al.* European Journal of Medicinal Chemistry Synthesis and tumor cell growth inhibitory activity of biotinylated annonaceous acetogenins. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 71, p. 219–228, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2013.11.012>>.

SILVA, A. A. DE S. *et al.* Estudo fitoquímico e atividades leishmanicida , anticolinestárásica e antioxidante de extratos de *Annona glabra L.* ( araticum panã ). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v. 36, n. 2, p. 189–194, 2015.

SILVA, F. R. **Avaliação da Atividade Antibacteriana de Extratos de *Annona Muricata L.* (Annonaceae)**. 17 f. Trabalho de Conclusão de Curso-TCC, (Bacharel em Farmácia)- Departamento de Farmácia, Universidade Estadual do Paraíba, 2011.

SILVA, H. DO N. *et al.* Prospecção científica de espécies do gênero *annona* (annonaceae) com atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. **PhD Proposal**, v. 1, p. 2326–2334, 2015.

SILVA, I. G. *et al.* Efeito Larvicida e Toxicológico do extrato bruto etanólico da casca do caule de *Magonia pubescens* sobre *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae), em criadouros artificiais. **Revista de Patologia Tropical**, v. 32, n. 1, p. 73–86, 2003.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: Da Planta Ao Medicamento (Portuguese Edition): Cláudia Maria Oliveira Simões: Amazon.com.br: Livros**. [S.l: s.n.],

207AD. Disponível em: <[http://www.amazon.com.br/Farmacognosia-Da-Planta-Medicamento-Portuguese/dp/8570256825/ref=sr\\_1\\_8?s=books&ie=UTF8&qid=1453849144&sr=1-8&keywords=farmacognosia](http://www.amazon.com.br/Farmacognosia-Da-Planta-Medicamento-Portuguese/dp/8570256825/ref=sr_1_8?s=books&ie=UTF8&qid=1453849144&sr=1-8&keywords=farmacognosia)>.

SOBRINHO, R. B. **Potencial de exploração de anonáceas no nordeste do Brasil raimundo. Fortaleza: embrapa agroindústria tropical**, 2010.

SON, J. K.; KIM, D. H.; WOO, M. H. Two New Epimeric Pairs of Acetogenins Bearing a Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. **J. Nat. Prod.** v.66, p. 1369–1372, 2003.

SOTO-GUZMAN, A. et al. Role of arachidonic acid metabolism in Stat5 activation induced by oleic acid in MDA-MB-231 breast cancer cells. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 88, n. 3, p. 243–249, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.plefa.2012.12.003>>.

SOUSA, O. V. et al. Efeitos antinociceptivo e antiinflamatório do extrato etanólico das Folhas de *Duguetia lanceolata* St.-Hil. (Annonaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, n. 3, p. 398–402, 2008.

SOUZA, C. M. et al. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais - Use of medicinal plants with antimicrobial activity by users of the Public Health System in Campina.** [S.l.]: Rev. bras. plantas med.vol.15 no.2 Botucatu 2013. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722013000200004](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722013000200004)>., 2013.

SUFFNESS; PEZZUTO. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTETTMANN K (Ed), *Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity.* **Academic Press, London**, p. 71–133, 1990. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_nlinks&ref=000178&pid=S0001-3765201100030002300053&lng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_nlinks&ref=000178&pid=S0001-3765201100030002300053&lng=pt)>.

SUN, N.; CASSADYT, J. M.; OLIVEIRA, A. B. D. E. Araticulin , a bis - tetrahydrofuran polyketide from *Annona crassiflora* seeds threo threo H0. **Pergamon Press Ltd**, v. 42, n. 3, p. 705–707, 1996.

SUN, S. et al. Isolation of Three New Annonaceous Acetogenins from Graviola Fruit (*Annona muricata*) and their Anti-Proliferation on Human Prostate Cancer Cell PC-3. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960894X15006319>>.

SUN, S. et al. Three new anti-proliferative Annonaceous acetogenins with mono-tetrahydrofuran ring from graviola fruit (*Annona muricata*). **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 12, p. 2773–2776, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2014.03.099>>.

TAYLOR, P.; LEAVES, R. E. F. A.; ITO, R. K. **Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Rollinia sericea* (R.E.FR.) R.E.FR. (Annonaceae) Leaves.** October 2014, p. 37–41, 2010.

TELES, D. O. et al. Alkaloids from leaves of *Annona salzmannii* and *Annona vepretorum* (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 61, p. 465–469, 2015.

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382–390, 2005.

TORMO, J. R. et al. Inhibitory effects on mitochondrial complex I of semisynthetic mono-tetrahydrofuran acetogenin derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 13, n. 22, p. 4101–4105, 2003.

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S. DE; NODA, S. D. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 44, n. 4, p. 457–472, 2014.

VEGA, M. R. G. et al. Flavonoids from *Annona dioica* leaves and their effects in Ehrlich carcinoma cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554–1559, 2007.

VEIGA, A. **Padronização e validação do método de microdiluição para determinação de concentração inibitória mínima de compostos antimicrobianos**, Dissertação, (Mestre em Ciências Farmacêuticas)- Setor da Ciência da Saúde, UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, 2016.

VILA-NOVA, N. S. et al. Different susceptibilities of *Leishmania* spp. promastigotes to the *Annona muricata* acetogenins annonacinone and corosolone, and the *Platymiscium floribundum* coumarin scoparone. **Experimental Parasitology**, v. 133, p. 334–338, 2013.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância. **Pelotas: Embrapa Clima Temperado**, p. 16, 2010.

WANG, L. Q. et al. Annonaceous acetogenins from the leaves of *Annona montana*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 10, n. 3, p. 561–565, 2002.

WANG, Z. et al. Palmitic acid affects proliferation and differentiation of neural stem cells in vitro. **Journal of neuroscience research**, v. 92, n. 5, p. 574–86, 2014.  
Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24446229>>.

WOO, M. et al. Annonaceous Acetogenins with a C-7 Carbonyl Group from *Annona cherimolia* Seeds. **J. Nat. Prod.** v.62, p. 1250–1255, 1999.

WOOT, M. H. et al. Asitribin and asiminenins a and b , novel bioactive annonaceous acetogenins from the seeds of *Asimina triloba*. **Heterocycles**, v. 41, n. 8, p. 2–5, 1995.

WU, T. S. et al. Annoquinone-A, an antimicrobial and cytotoxic principle from *Annona montana*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 6, p. 1623–1625, 1987.

WU, Y.C. *New Research and Development on the Formosan Annonaceous Plants*. [S.l.]: **Elsevier Masson SAS**, 2006. v. 33. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S157259950680044X>>.

XUE, J.Y. et al. Desacetylurvaricin Induces S Phase Arrest in SW480 Colorectal Cancer Cells Through Superoxide Overproduction. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 115, n. 3, p. 464–475, 2014.

YANG, H. et al. New nonadjacent bis-THF ring acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Fitoterapia**, v. 80, n. 3, p. 177–181, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2009.01.005>>.

YE, Q. et al. Longimicins A-D: Novel bioactive acetogenins from *Asimina longifolia* (annonaceae) and structure-activity relationships of asimicin type of annonaceous acetogenins. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 9, p. 1790–1796, 1996.

ZAFRA-POLO, M. C. et al. Acetogenins from Annonaceae, inhibitors of mitochondrial complex I. **Phytochemistry**, v. 42, n. 2, p. 253–271, 1996.

ZAFRA-POLO, M. C. et al. Natural acetogenins from annonaceae, synthesis and mechanisms of action. *Phytochemistry*, v. 48, n. 7, p. 1087–1117, 1998.

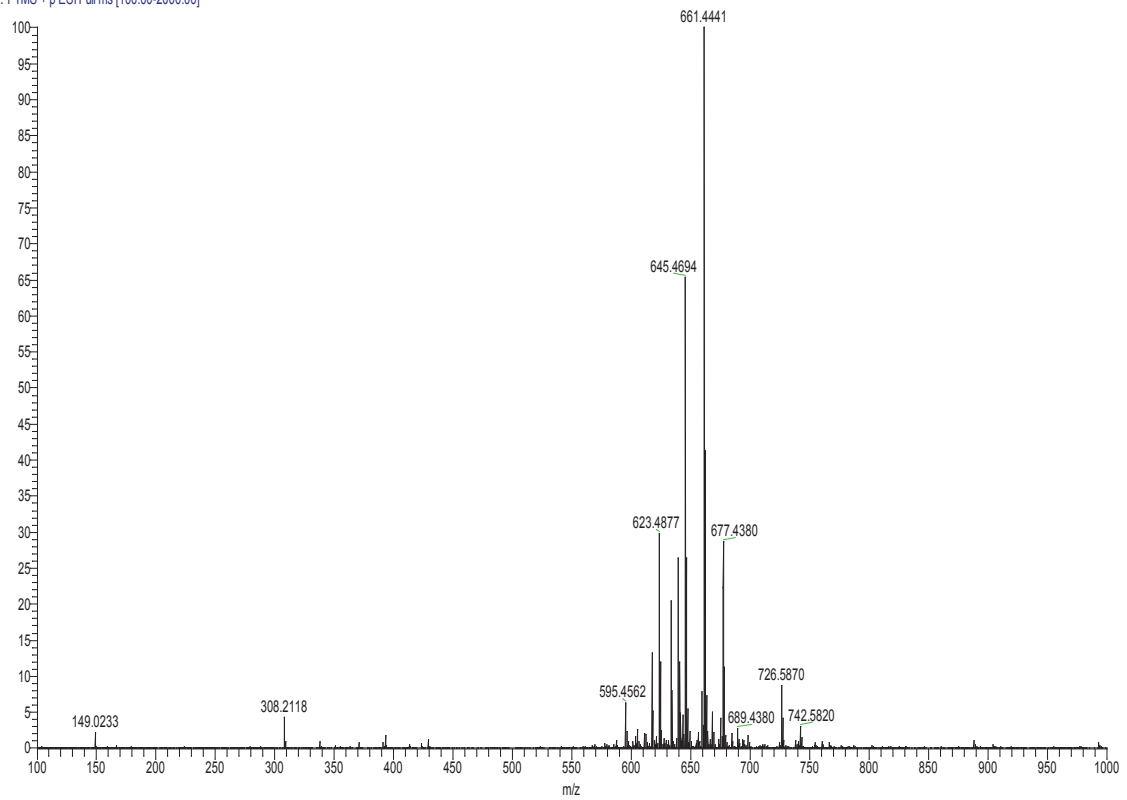
ZAJDEL, A.; WILCZOK, A.; TARKOWSKI, M. Toxic effects of n-3 polyunsaturated fatty acids in human lung A549 cells. **Toxicology in Vitro**, v. 30, n. 1, p. 486–491, 2015. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S088723331500226X>>.

ZARA, L. S. A. et al. Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v. 25, n. 2, p. 1–11, 2016. Disponível em: <[http://www.iec.pa.gov.br/template\\_doi\\_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200391&scielo=S2237-96222016000200391](http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000200391&scielo=S2237-96222016000200391)>.

ZHAO, G. X. et al. Asimin, asimiacin, and asiminecin: novel highly cytotoxic asimicin isomers from *Asimina triloba*. **Journal of medicinal chemistry**, v. 37, n. 13, p.1976, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8027979>>.

**ANEXO 1- ESPECTRO DE HR-MS DO EXTRATO DICLOROMETANO**

FRAN\_SALZ\_DCM#36-67 RT: 0.40-0.65 AV: 32 SB: 31 0.01-0.37 NL: 1.07E8  
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]



## ANEXO 2- ESPECTRO DE HR-MS DA FRAÇÃO F4

FRAN\_SALZ\_F4#56-93 RT: 0.57-0.86 AV: 38 SB: 49 0.02-0.41 NL: 9.79E7  
T: FTMS +p ESI Full ms [100.00-2000.00]

