

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE *Annona dolabripetala* RADDI (ANNONACEAE)**

ISABELA DE SOUZA PINTO PEREIRA

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY
RIBEIRO – UENF**

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO DE 2019

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE *Annona dolabripetala* RADDI (ANNONACEAE)**

ISABELA DE SOUZA PINTO PEREIRA

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Orientadora: Dra. Maria Raquel Garcia Vega

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ

JULHO DE 2019

FICHA CATALOGRÁFICA

UENF - Bibliotecas

Elaborada com os dados fornecidos pela autora.

P436 Pereira, Isabela de Souza Pinto.

Estudo fitoquímico e potencial de atividade biológica de *Annona dolabripetala* Raddi (Annonaceae) / Isabela de Souza Pinto Pereira. - Campos dos Goytacazes, RJ, 2019.

206 f. : il.

Bibliografia: 195 - 206.

Tese (Doutorado em Ciências Naturais) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Centro de Ciência e Tecnologia, 2019.

Orientadora: Maria Raquel Garcia Vega.

1. *Annona dolabripetala*. 2. flavonoides. 3. alcaloides. 4. atividade antineoplásica. 5. atividade antinociceptiva e anti-inflamatória. I. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. II. Título.

CDD - 500

**ESTUDO FITOQUÍMICO E POTENCIAL DE ATIVIDADE BIOLÓGICA
DE *Annona dolabripetala* RADDI (ANNONACEAE)**

ISABELA DE SOUZA PINTO PEREIRA

Tese apresentada ao Centro de Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, para obtenção do título de Doutor em Ciências Naturais.

Aprovada em 22 de julho de 2019

Comissão Examinadora:



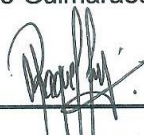
Dra. Leda Mathias – UENF



Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira – UENF



Dr. Bruno Guimarães Marinho – UFRRJ



Dra. Maria Raquel Garcia Vega - UENF (Orientadora)

Dedico este trabalho à minha mãe Janete, minha maior incentivadora e educadora, exemplo de mãe e filha. À minha irmã Pamela e aos meus sobrinhos Maria Luiza e Lucas Antonio, por todo amor e incentivo nessa jornada acadêmica.

Muito obrigada!

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, autor da vida, por sua graça, consolo, cuidado, amizade e amor.

Agradeço à minha família, pelo incentivo e apoio ao longo desses anos dedicados aos estudos. À minha mãe Janete, minha irmã Pamela, meus sobrinhos Maria Luiza e Lucas Antonio, meus avós Berenice e Sylvio *in memoriam*, e ao meu pai Sergio *in memoriam*.

Aos amigos de laboratório Adriana, Amaro, Carolina, Fernanda, Luana, Marcelo, Queitilane e Suzana, que de alguma forma contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal, muito obrigada.

Aos que tanto foram solícitos em tirar dúvidas, trocar informações, parcerias nos resultados em especial a Lilian Carneiro, Aline Nascimento e Marina Barreto.

Aos meus amigos fora da UENF, aqueles dos quais não preciso citar nomes, pois sabem que estão incluídos aqui.

Aos professores da UENF, aos técnicos e funcionários que com toda dedicação e empenho mantém nossa Universidade de pé, apesar de todas as dificuldades.

À Dra. Maria Raquel Garcia Vega por me orientar desde a monografia, por me incentivar, por seu cuidado, por sua amizade, pelo seu exemplo de profissional e mãe que é. Muito obrigada por tudo.

Ao professor Dr. Rodrigo Rodrigues de Oliveira pela amizade e conhecimento trocado no laboratório.

Aos professores Dr. Bruno Marinho e Dr. Milton Kanashiro pela colaboração.

Aos professores Leda Mathias e Carlos Matos pelas análises no CG-EM e tantas dúvidas sanadas.

À professora Adriana Lobão pela identificação da espécie botânica.

Aos pesquisadores e funcionários do National Center for Natural Products Research - University of Mississippi que me acolheram e me orientaram no período de doutorado sanduíche, principalmente ao Dr. Ikhtas Khan, Dra. Cristina Avonto e Dr. Zulfiqar Ali. As minhas amigas de laboratório Ebru Erol e Pei Cee Lim por tantos bons momentos. Grata por minha passagem curta e enriquecedora nesse grupo de pesquisa.

À CAPES, órgão de fomento que financiou meus estudos por longos 4 anos.

Gratidão a todos!

"Não se pode dominar a natureza, senão respeitando-a."

Francis Bacon

RESUMO

PEREIRA, Isabela de Souza Pinto. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, julho de 2019. Estudo fitoquímico e potencial de atividade biológica de *Annona dolabripetala* Raddi (Annonaceae). Professora orientadora: Dra. Maria Raquel Garcia Vega.

A espécie *Annona dolabripetala* Raddi é uma árvore nativa e endêmica do Brasil. Essa espécie foi escolhida por fazer parte do projeto que visa contribuir para o conhecimento químico de espécies oriundas da Mata Atlântica da Região Norte Fluminense, através do isolamento das substâncias majoritárias por processos cromatográficos e identificação estrutural com base nos dados espectroscópicos de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas, e por comparação com dados da literatura. O objetivo do estudo abrange também a avaliação do potencial biológico do extrato e frações das folhas frente às atividades antineoplásica, antinociceptiva e anti-inflamatória. Como contribuição para o conhecimento químico dessa espécie, foram identificados/isolados 23 substâncias. Na análise por CG-EM foram identificadas as substâncias de **1** a **16**, como ácidos graxos, ésteres, cetona e esteroides, onde todas as fragmentações de massas foram comparadas com as substâncias identificadas pela biblioteca NIST. Seis flavonoides glicosilados foram isolados (**17** a **22**) e um alcaloide a liriodenina (**23**), marcador quimiotaxônomico da família e do gênero. A fração flavonoídica das folhas apresentou atividade antineoplásica moderada com CI_{50} $44,65 \pm 1,12$ $\mu\text{g/mL}$ frente ao ensaio de MTT com células de linfoma histiocítico U937. Na avaliação antinociceptiva, o extrato bruto e a fração em acetato de etila foram eficazes em reduzir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 66,83% e 63,46%, respectivamente, em relação ao grupo controle negativo. Já no modelo de imersão de cauda em água quente a fração em clorofórmio apresentou maior efeito significativo. Na avaliação da atividade anti-inflamatória, o extrato bruto reduziu significativamente em 70,7% o edema de pata induzido por carragenina. O conjunto dos resultados obtidos neste trabalho contribuem para o conhecimento químico da família Annonaceae, além de apontar o potencial farmacológico da espécie *Annona dolabripetala* como antinociceptivo, anti-inflamatório e antineoplásico, sendo estes efeitos descritos pela primeira vez na espécie.

Palavras-chave: *Annona dolabripetala*, flavonoides, alcaloides, atividade antineoplásica, atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

ABSTRACT

PEREIRA, Isabela de Souza Pinto. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, July 2019. Phytochemical study and biological activity on *Annona dolabripetala* Raddi (Annonaceae). Advisor: Dra. Maria Raquel Garcia Vega.

Annona dolabripetala Raddi is an endemic native tree in Brazil. The featuring species relate to a research project from which our first objective derives: contributing to the chemical knowledge of the Atlantic Forest species in the Northern Region of Rio de Janeiro State through the isolation of the major compounds by chromatographic processes, and structural identification based on NMR spectroscopic data, mass spectrometry, and by comparison with literature data. The second research objective regards the evaluation of the biological potential of the extract and leaf fractions against antineoplastic, antinociceptive and anti-inflammatory activities. In this work, were identified/isolated 23 compounds. In GC-MS analysis were identified compounds **1** to **16** such as fatty acids, esters, ketones and steroids, all the mass fragments were compared with the compounds identified by the NIST mass spectral library. Six glycoside flavonoids (**17-22**), and an alkaloid: liriodenine (**23**), a chemotaxonomic marker of the family and the genus. The leaf flavonoid fraction showed moderate antineoplastic activity with EC_{50} $44.65 \pm 1.12 \mu\text{g/mL}$ compared to the MTT assay with U937 histiocytic lymphoma cells. In antinociceptive evaluation, the crude extract and fraction in ethyl acetate were effective in reducing the number of abdominal writhes induced by acetic acid in 66.61% and 63.46%, respectively, against the negative control group. In the immersion model of tail in hot water, the fraction in chloroform presented greater significant effect. In the evaluation of anti-inflammatory activity, crude extract significantly reduced carrageenan-induced paw edema by 70.7%. The results obtained in this work contribute to the chemical knowledge of the Annonaceae family, and show the antinociceptive, anti-inflammatory and antineoplastic effects of the extract and fractions tested, being these effects regarding the studied species described for the first time.

Keywords: *Annona dolabripetala*, flavonoids, alkaloids, antineoplastic activity, antinociceptive and anti-inflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Distribuição geográfica da família Annonaceae destacada em verde. - 4 -
- Figura 2:** Partes da planta de *Annona dolabripetala*. **A** obtida do site “Flora do Brasil 2020” (FLORA DO BRASIL, 2019); **B** e **C** obtidas no dia da coleta realizada para a atual pesquisa. - 8 -
- Figura 3:** Estruturas químicas das substâncias isoladas e identificadas em *Annona dolabripetala*. - 9 -
- Figura 4:** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários. - 11 -
- Figura 5:** Biossíntese simplificada dos flavonoides. - 12 -
- Figura 6:** Biossíntese das classes de flavonoides. - 13 -
- Figura 7:** Subclasses de flavonoides. - 14 -
- Figura 8:** Esqueletos das diversas subclasses de flavonoides. - 15 -
- Figura 9:** Gráfico representativo das partes da planta de trabalhos em que flavonoides foram isolados. - 16 -
- Figura 10:** Gráfico representativo das classes de flavonoides que foram isolados. - 17 -
-
- Figura 11:** Estruturas dos flavonoides isolados em *Annona* de 1984 a 2018. - 22 -
- Figura 12:** Posições que predominam a ligação das unidades de açúcar. - 26 -
- Figura 13:** Sequência de fragmentações em flavonoides O e C-glicosídeos, respectivamente. - 27 -
- Figura 14:** **A:** nomenclatura das fragmentações; **B:** numeração das ligações glicosídicas em hexose e pentose, respectivamente. - 28 -
- Figura 15:** Fragmentações intraglicosídicas. - 29 -
- Figura 16:** Nomenclatura dos tipos de fragmentações. - 30 -
- Figura 17:** Representativo das partes da planta identificados por LC-MS em espécies do gênero *Annona*. - 31 -
- Figura 18:** Representativo das classes de flavonoides identificados por LC-MS em espécies do gênero *Annona*. - 31 -
- Figura 19:** Esquema representativo do preparo das amostras a análise no UV. - 51 -
- Figura 20:** Fluxograma do procedimento de extração das folhas de *A. dolabripetala*. - 52 -
- Figura 21:** Fluxograma do procedimento de extração do caule de *A. dolabripetala*. - 52 -

Figura 22: Fluxograma do procedimento cromatográfico da fração em clorofórmio das folhas de <i>A. dolabripetala</i> .	- 54 -
Figura 23: Fluxograma do primeiro tratamento cromatográfico da fração flavonoídica das folhas de <i>A. dolabripetala</i> .	- 58 -
Figura 24: Fluxograma do segundo tratamento cromatográfico da fração flavonoídica das folhas de <i>A. dolabripetala</i> .	- 59 -
Figura 25: Fluxograma da obtenção da fração flavonoídica dos caules.	- 65 -
Figura 26: Protocolo experimental do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.	- 71 -
Figura 27: Modelo de retirada da cauda. Protocolo experimental e fórmula utilizada para a quantificação da antinocicepção.	- 72 -
Figura 28: Protocolo experimental do modelo de edema de pata induzido por carragenina.	- 73 -
Figura 29: Cromatograma das frações flavonoídicas das folhas e caules em 254 nm.	- 75 -
Figura 30: Reação do ácido gálico com molibdênio.	- 77 -
Figura 31: Curva padrão de ácido gálico na concentração de 20,0 a 300,0 µg/mL a 750 nm.	- 78 -
Figura 32: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CD ₃ OD) de IP-1-1-1FFA.	- 79 -
Figura 33: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CD ₃ OD) de IP-1-1-1FFA.	- 79 -
Figura 34: Cromatograma de HPLC obtido para IP-1-1-1FFA a 254 nm.	- 80 -
Figura 35: Cromatogramas de HPLC a 254 nm obtidos da análise da fração flavonoídica IP-1-1-1FFA e das substâncias de 17 a 21 .	- 81 -
Figura 36: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, CDCl ₃) de IADFEH.	- 82 -
Figura 37: Espectro de RMN ¹³ C (125 MHz, CDCl ₃) de IADFEH.	- 83 -
Figura 38: A. Cromatograma completo obtido da análise da fração em hexano por CG-EM; B. Ampliação do cromatograma até 34 min.	- 84 -
Figura 39: A. Espectro de massas do íon molecular 200 m/z (substância 1) em 10,189 min; B. Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; C. Proposta mecanística de fragmentação de massas.	- 86 -
Figura 40: A. Espectro de massas do íon molecular 268 m/z (substância 2) em 13,321 min; B. Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; C. Proposta mecanística de fragmentação de massas.	- 87 -

- Figura 41:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 256 m/z (substância **3**) em 14,477 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 88 -
- Figura 42:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 284 m/z (substância **4**) em 14,781 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 89 -
- Figura 43:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 296 m/z (substância **5**) em 15,925 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 90 -
- Figura 44:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 312 m/z (substância **6**) em 16,622 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 91 -
- Figura 45:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 324 m/z (substância **7**) em 18,057 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 92 -
- Figura 46:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 340 m/z (substância **8**) em 18,316 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 93 -
- Figura 47:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 370 m/z (substância **9**) em 18,376 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 94 -
- Figura 48:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 394 m/z (substância **10**) em 20,691 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 95 -
- Figura 49:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 366 m/z (substância **11**) em 22,623 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 96 -
- Figura 50:** **A.** Espectro de massas do íon molecular 430 m/z (substância **12**) em 26,188 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 97 -
- Figura 51:** Espectro de massas do íon molecular 400 m/z (substância **13**) em 28,111 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas. - 98 -

Figura 52: Espectro de massas do íon molecular 450 m/z (substância 14) em 29,150 min; B. Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; C. Proposta mecanística de fragmentação de massas.	- 99 -
Figura 53: A. Espectro de massas do íon molecular 414 m/z (substância 15) em 30,188 min; B. Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; C. Proposta mecanística de fragmentação de massas.	- 100 -
Figura 54: A. Espectro de massas do íon molecular 410 m/z (substância 16) em 32,718 min; B. Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; C. Proposta mecanística de fragmentação de massas.	- 101 -
Figura 55: Estrutura dos flavonoides isolados (17-22).	- 102 -
Figura 56: Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância 17	- 110 -
Figura 57: Ampliação do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância 17	- 110 -
Figura 58: Ampliação do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância 17	- 111 -
Figura 59: Ampliação do espectro de RMN ¹ H (400 MHz, CD ₃ OD) da substância 17	- 111 -
Figura 60: Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da substância 17	- 112 -
Figura 61: Ampliação do espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, CD ₃ OD) da substância 17	- 112 -
Figura 62: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (CD ₃ OD) da substância 17	- 113 -
Figura 63: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD ₃ OD) da substância 17	- 113 -
Figura 64: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD ₃ OD) da substância 17	- 114 -
Figura 65: Cromatograma do HPLC-DAD da substância 17 em 254 nm.	- 114 -
Figura 66: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância 17	- 115 -
Figura 67: Propostas de fragmentações no modo positivo da substância 17	- 116 -
Figura 68: Espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	- 120 -
Figura 69: Ampliação do espectro de RMN ¹ H (500 MHz, DMSO-d ₆) da substância 18	- 120 -

Figura 70: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 18	- 121 -
Figura 71: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 18	- 121 -
Figura 72: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 18	- 122 -
Figura 73: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 18	- 122 -
Figura 74: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 18	- 123 -
Figura 75: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 18	- 123 -
Figura 76: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 18	- 124 -
Figura 77: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 18 . -	124 -
Figura 78: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 18 . -	125 -
Figura 79: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 18	- 125 -
Figura 80: Cromatograma do HPLC-DAD da substância 18 em 254 nm.	- 126 -
Figura 81: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância 18 no tempo de retenção de 21,158 min.	- 126 -
Figura 82: Propostas de fragmentações no modo positivo da substância 18 . ..	- 127 -
Figura 83: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 19	- 131 -
Figura 84: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 19	- 131 -
Figura 85: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 19	- 132 -
Figura 86: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 19	- 132 -
Figura 87: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 19	- 133 -
Figura 88: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 19 . -	133 -

Figura 89: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 19 .	- 134 -
Figura 90: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 19 .	- 134 -
Figura 91: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 19 .	- 135 -
Figura 92: Cromatograma do HPLC-DAD da substância 19 em 254 nm.	- 135 -
Figura 93: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância 19 .	- 136 -
Figura 94: Proposta de fragmentação no modo positivo da substância 19 .	- 137 -
Figura 95: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 20 .	- 141 -
Figura 96: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 20 .	- 141 -
Figura 97: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 20 .	- 142 -
Figura 98: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 20 .	- 142 -
Figura 99: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 20 .	- 143 -
Figura 100: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 20 .	- 143 -
Figura 101: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 20 .	- 144 -
Figura 102: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 20 .	- 144 -
Figura 103: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 20 .	- 145 -
Figura 104: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 20 .	- 145 -
Figura 105: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 20 .	- 146 -
Figura 106: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 20 .	- 146 -
Figura 107: Cromatograma do HPLC-DAD da substância 20 em 254 nm.	- 147 -

Figura 108: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância 20 .	- 147 -
Figura 109: Proposta de fragmentação da substância 20 .	- 148 -
Figura 110: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 21 .	- 152 -
Figura 111: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 21 .	- 152 -
Figura 112: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 21 .	- 153 -
Figura 113: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 21 .	- 153 -
Figura 114: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 21 .	- 154 -
Figura 115: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância 21 .	- 154 -
Figura 116: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) da substância 21 .	- 155 -
Figura 117: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) da substância 21 .	- 155 -
Figura 118: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO- d_6) da substância 21 .	- 156 -
Figura 119: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO- d_6) da substância 21 .	- 156 -
Figura 120: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO- d_6) da substância 21 .	- 157 -
Figura 121: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO- d_6) da substância 21 .	- 157 -
Figura 122: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO- d_6) da substância 21 .	- 158 -
Figura 123: Cromatograma do HPLC-DAD da substância 21 em 254 nm.	- 158 -
Figura 124: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância 21 .	- 159 -
Figura 125: Propostas de fragmentações da substância 21 .	- 160 -
Figura 126: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 22 .	- 164 -
Figura 127: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 22 .	- 164 -

Figura 128: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 22	- 165 -
Figura 129: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 22	- 165 -
Figura 130: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) da substância 22	- 166 -
Figura 131: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância 22	- 166 -
Figura 132: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância 22	- 167 -
Figura 133: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância 22	- 167 -
Figura 134: Espectro de DEPT-135 (125 MHz, CD_3OD) da substância 22	- 168 -
Figura 135: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (CD_3OD) da substância 22 168 -	
Figura 136: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (CD_3OD) da substância 22	- 169 -
Figura 137: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (CD_3OD) da substância 22	- 169 -
Figura 138: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD_3OD) da substância 22 170 -	
Figura 139: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD_3OD) da substância 22	- 170 -
Figura 140: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD_3OD) da substância 22	- 171 -
Figura 141: Cromatograma do UPLC-DAD da substância 22 em 254 nm.	- 171 -
Figura 142: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e MS/MS do íon quasi-molecular em m/z 741.	- 172 -
Figura 143: Espectros de massas no modo negativo (ESI-) e MS/MS do íon quasi-molecular em m/z 739.	- 172 -
Figura 144: Proposta de fragmentação da substância 22	- 173 -
Figura 145: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) da substância 23	- 176 -
Figura 146: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) da substância 23	- 176 -

- Figura 147:** Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO- d_6) da substância **23**. - 177 -
- Figura 148:** Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **23**. - 177 -
- Figura 149:** Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **23**. - 178 -
- Figura 150:** Espectro de DEPT-135 (125 MHz, DMSO- d_6) da substância **23**. - 178 -
- Figura 151:** Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO- d_6) da substância **23**. - 179 -
- Figura 152:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO- d_6) da substância **23**. - 179 -
- Figura 153:** Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO- d_6) da substância **23**. - 180 -
- Figura 154:** Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO- d_6) da substância **23**. - 180 -
- Figura 155:** Cromatograma do UPLC-DAD da substância **23** em 340 nm. - 181 -
- Figura 156:** Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e MS/MS do íon quasi-molecular em m/z 276. - 181 -
- Figura 179:** Proposta de fragmentação da substância **23**. - 182 -
- Figura 158:** Efeitos da administração oral prévia do extrato bruto e das frações das folhas da *Annona dolabripetala* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. - 185 -
- Figura 159:** Efeitos da administração oral prévia do extrato e frações, controle, veículo e morfina no modelo de imersão da cauda em água quente. - 187 -
- Figura 160:** Efeito da administração oral prévia do extrato e frações no modelo de edema de pata induzido por carragenina. - 189 -
- Figura 161:** Avaliação do efeito citotóxico de IP-1-1-1FFA e IADFEA frente as células neoplásicas da linhagem U937 (linfoma histiocítico), após 48 horas de incubação. - 191 -

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação botânica da família Annonaceae.....	- 4 -
Tabela 2: Subfamílias da família Annonaceae e seus respectivos gêneros.	- 5 -
Tabela 3: Espécies de <i>Annona</i> já estudadas quimicamente até 2019.....	- 7 -
Tabela 4: Flavonoides isolados no gênero <i>Annona</i> de 1984 a 2018.	- 18 -
Tabela 5: Principais características entre HPLC e UPLC.	- 23 -
Tabela 6: Principais métodos de ionização, analisadores de massas e detectores de um espectrômetro de massas.	- 24 -
Tabela 7: Perda de massas características de C e O-glicosídeos.....	- 29 -
Tabela 8: Estudos por LC-MS de flavonoides no gênero <i>Annona</i>	- 33 -
Tabela 9: Principais revisões bibliográficas na última década referente à atividade antineoplásica em espécies de <i>Annona</i>	- 40 -
Tabela 10: Massas obtidas das partes vegetais coletadas e códigos em parênteses. -	48 -
Tabela 11: Presença e ausência de classes de metabólitos secundários nos extratos brutos das folhas e caules.....	- 74 -
Tabela 12: Teste qualitativo de presença de flavonoides nas frações dos extratos. ...	75 -
Tabela 13: Leitura das absorvâncias para a construção da curva padrão.	- 77 -
Tabela 14: Substâncias identificadas por CG-EM e pela biblioteca de espectro de massas NIST.....	- 85 -
Tabela 15: Dados de RMN ¹³ C dos flavonoides de 17 a 22	- 105 -
Tabela 16: Dados de RMN ¹ H (400 MHz), ¹³ C (100 MHz) da substância 17 em CD ₃ OD em comparação com os dados da literatura em DMSO-d ₆ . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.....	- 109 -
Tabela 17: Dados de RMN ¹ H (500 MHz), ¹³ C (125 MHz) da substância 18 em DMSO-d ₆ em comparação com os dados da literatura em CD ₃ OD. Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.....	- 119 -
Tabela 18: Dados de RMN ¹ H (500 MHz), ¹³ C (125 MHz) da substância 19 em DMSO-d ₆ em comparação com os dados da literatura em DMSO-d ₆ . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.....	- 130 -

- Tabela 19:** Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **20** em DMSO- d_6 em comparação com os dados da literatura em CD_3OD . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz. - 140 -
- Tabela 20:** Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **21** em DMSO- d_6 em comparação com os dados da literatura em CD_3OD . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz. - 151 -
- Tabela 21:** Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **22** em CD_3OD em comparação com os dados da literatura em acetona- d_6 . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz. - 163 -
- Tabela 22:** Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **23** em DMSO- d_6 em comparação com os dados da literatura em $\text{CDCl}_3/\text{CD}_3\text{OD}$ (3:1). Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz. - 175 -
- Tabela 23:** Avaliações biológicas *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto e frações das folhas de *Annona dolabripetala*. - 183 -
- Tabela 24:** Valores de média do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e a porcentagem de inibição em comparação ao grupo controle da indometacina, extrato e frações das folhas de *A. dolabripetala*. - 185 -
- Tabela 25:** Valores calculados em % do tempo de latência do extrato e frações das folhas de *A. dolabripetala*. - 187 -
- Tabela 26:** Efeito das frações e do extrato das folhas da *Annona dolabripetala* no modelo de edema de pata induzido por carragenina. - 190 -

LISTA DE ABREVIATURAS

HPLC – high performance liquid chromatography / CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

UPLC – ultra performance liquid chromatography / CLUE - cromatografia líquida de ultra eficiência

UHPLC – ultra-high performance liquid chromatography

CL/EM – cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas

RMN – ressonância magnética nuclear

HSQC – heteronuclear single quantum coherence - correlação heteronuclear de quantum único

HMBC – heteronuclear multiple bond correlation - correlação heteronuclear a múltiplas ligações

EI – electron ionization – ionização por elétrons

CG-EM – cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas

CC – cromatografia em coluna

FE – fase estacionária

FM – fase móvel

UV-VIS – ultravioleta visível

MS – mass spectrometry – espectrometria de massas

ESI – eletrospray ionization - ionização por eletrospray

EM – electron multiplier – multiplicação de elétrons

APCI – atmospheric pressure chemical ionization – ionização química à pressão atmosférica

APPI - atmospheric pressure proton ionization – ionização por fótons à pressão atmosférica

TOF – time of flight - tempo de vôo

RP – reverse phase – fase reversa

CCDA - cromatografia em camada delgada analítica

CCDP – cromatografia em camada delgada preparativa

EAG – equivalentes de ácido gálico

TR – tempo de retenção

FT – fenóis totais

MTT - 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazoílium

Cl₅₀ – concentração inibitória média

U937 - célula humana de linfoma histiocítico

ACN - acetonitrila

MeOH - metanol

H₂O - água

AA – ácido acético

AF – ácido fórmico

DE50 – dose efetiva média

TFA – ácido trifluoracético

DMSO – dimetilsulfóxido

COX - ciclooxigenase

LOX - lipoxigenase

IADCE – extrato hidroalcoólico do caule de *Annona dolabripetala*

IADFE - extrato hidroalcoólico das folhas de *Annona dolabripetala*

IADFEH – fração em hexano das folhas de *Annona dolabripetala*

IADFEC – fração em clorofórmio das folhas de *Annona dolabripetala*

IADFEA – fração em acetato de etila das folhas de *Annona dolabripetala*

IP-1-1-1FFA – fração flavonoídica das folhas de *Annona dolabripetala*

IP-1-51-2FFA – fração flavonoídica do caule de *Annona dolabripetala*

SUS – Sistema Único de Saúde

HIV – human immunodeficiency virus - vírus da imunodeficiência humana

NCNPR – National Center for Natural Products Research

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	- 1 -
2. OBJETIVOS.....	- 3 -
2.1 Objetivo geral	- 3 -
2.2 Objetivos específicos	- 3 -
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	- 4 -
3.1 Família Annonaceae Juss.	- 4 -
3.2 Gênero <i>Annona</i> L.....	- 6 -
3.3 Espécie <i>Annona dolabripetala</i> Raddi	- 7 -
3.4 Flavonoides.....	- 9 -
3.5 Biossíntese.....	- 10 -
3.5.1 Subclasses	- 14 -
3.6 Flavonoides no gênero <i>Annona</i>	- 16 -
3.7 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) .	- 23 -
3.8 Estudos de flavonoides em <i>Annona</i> por LC-MS.....	- 26 -
3.8.1 Fragmentação de flavonoides glicosilados	- 27 -
3.8.2 Estudos em <i>Annona</i>	- 30 -
3.9 Atividades biológicas.....	- 39 -
3.9.1 Atividade antineoplásica	- 40 -
3.9.2 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.....	- 41 -
4. PARTE EXPERIMENTAL	- 44 -
4.1 Materiais e métodos do estudo fitoquímico	- 44 -
4.1.1 Materiais	- 44 -
4.1.2 Equipamentos.....	- 45 -
4.1.3 Reveladores de CCDA	- 46 -
4.1.4 Material botânico	- 47 -
4.1.5 Metodologia	- 47 -
4.1.6 Prospecção fitoquímica	- 48 -
4.1.6.1 Teste para alcaloides (Dragendorff)	- 48 -
4.1.6.2 Teste para flavonoides (Shinoda).....	- 48 -
4.1.6.3 Teste para saponinas	- 49 -
4.1.6.4 Teste para triterpenos e esteroides (Liebermann-Burchard).....	- 49 -
4.1.6.5 Teste para polissacarídeos	- 49 -
4.1.6.6 Teste para taninos.....	- 50 -
4.1.6.7 Teste de fenóis totais	- 50 -

4.1.7	Procedimento cromatográfico de <i>Annona dolabripetala</i>	51 -
4.1.7.1	Fração em hexano das folhas (IADFEH)	53 -
4.1.7.2	Fração em clorofórmio das folhas (IADFEC)	53 -
4.1.7.2.1	Fração IP-3-1-CHCl ₃	55 -
4.1.7.2.2	Amostra IP-3-3Q a 3T	55 -
4.1.7.2.3	Amostra IP-3-6I a 6L	55 -
4.1.7.2.4	Amostra IP-3-8B	56 -
4.1.7.2.5	Fração IP-3-1-AcOEt	56 -
4.1.7.2.6	Amostra IP-3-21I	56 -
4.1.7.2.7	Amostra IP-3-27B	57 -
4.1.7.3	Fração em acetato de etila das folhas (IADFEA)	57 -
4.1.7.3.1	Fração flavonoídica das folhas (IP-1-1-1FFA) – 1º tratamento cromatográfico	60 -
4.1.7.3.2	Amostra IP-1-8N	60 -
4.1.7.3.3	Amostra IP-1-31A+31C+31F	60 -
4.1.7.3.4	Fração flavonoídica das folhas (IP-1-1-1FFA) – 2º tratamento cromatográfico	61 -
4.1.7.3.5	Amostra IP-1-84I	61 -
4.1.7.3.6	Amostra IP-2-4N a 4Q	61 -
4.1.7.3.7	Amostra IP-2-7B	62 -
4.1.7.3.8	Amostra IP-2-4S a 4V	62 -
4.1.7.3.9	Amostra IP-2-10D a 10K	62 -
4.1.7.3.10	Amostra IP-2-4W	63 -
4.1.7.3.11	Amostra IP-3-13D a 13F	63 -
4.1.7.3.12	Amostra IP-1-84O	63 -
4.1.7.3.13	Amostra IP-2-23H	64 -
4.1.7.3.14	Amostra IP-2-23I a 23L	64 -
4.1.7.4	Procedimento cromatográfico da fração em acetato de etila do caule (IADCEA)	64 -
4.1.7.5	Análises por LC-MS	65 -
4.2	Materiais e métodos do estudo biológico	66 -
4.2.1	Atividade antineoplásica	66 -
4.2.1.1	Materiais	66 -
4.2.1.2	Equipamentos	66 -
4.2.1.3	Cultura das linhagens de células de origem neoplásica	67 -
4.2.1.4	Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT	67 -

4.2.1.5	Análise estatística	- 68 -
4.2.2	Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.....	- 68 -
4.2.2.1	Materiais.....	- 68 -
4.2.2.2	Tratamento e preparo das substâncias e amostras	- 68 -
4.2.2.3	Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético....	- 70 -
4.2.2.4	Modelo de imersão de cauda em água quente	- 71 -
4.2.2.5	Modelo de edema de pata.....	- 72 -
4.2.2.6	Análise estatística	- 73 -
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	- 74 -
5.1	Prospecção fitoquímica.....	- 74 -
5.2	Análise da fração IP-1-1-1FFA.....	- 77 -
5.2.1	Determinação do teor de fenóis totais	- 77 -
5.2.2	Análise por RMN e HPLC-DAD da fração flavonoídica	- 78 -
5.3	Análise da fração em hexano por RMN e CG/EM.....	- 82 -
5.4	Determinação estrutural das substâncias isoladas	- 102 -
5.4.1	Substância 17 (IP-2-15E)	- 107 -
5.4.2	Substância 18 (IP-1-34B)	- 117 -
5.4.3	Substância 19 (IP-2-30A)	- 128 -
5.4.4	Substância 20 (IP-2-23G)	- 138 -
5.4.5	Substância 21 (IP-1-31E)	- 149 -
5.4.6	Substância 22 (IP-3-27B.2)	- 161 -
5.4.7	Substância 23 (IP-3-10CC).....	- 174 -
5.5	Estudos Biológicos.....	- 183 -
5.5.1	Avaliações das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória <i>in vivo</i> -	184
	-	
5.5.1.1	Modelo de avaliação da atividade antinociceptiva por contorções abdominais induzidas por ácido acético	- 184 -
5.5.1.2	Modelo de avaliação da atividade antinociceptiva por imersão de cauda em água quente.....	- 186 -
5.5.1.3	Modelo de avaliação da atividade anti-inflamatória do edema da pata	- 188 -
5.5.2	Avaliação da atividade antineoplásica <i>in vitro</i>	- 191 -
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	- 193 -
7.	REFERÊNCIAS	- 195 -

1. INTRODUÇÃO

De um total estimado de 350 mil espécies no planeta, o Brasil é considerado um país megadiverso com 34.916 espécies vegetais catalogadas. Desse número, 55% são espécies endêmicas, fato que proporciona ao país possuir a maior biodiversidade genética vegetal do mundo (STEHMANN e SOBRAL, 2017).

O Bioma Mata Atlântica possui mais de 20 mil espécies vegetais sendo 8 mil endêmicas (SOS MATA ATLÂNTICA, 2016) e é reconhecido como *Hotspots* de Biodiversidade, o que significa que é uma área de grande riqueza biológica e endemismos, mas que infelizmente possui a maioria das espécies ameaçadas de extinção (STEHMANN e SOBRAL, 2017).

Esses números aumentam a responsabilidade e a urgência dos pesquisadores em descobrir a riqueza química guardada no nosso território brasileiro, antes que seja extinta (PAVAN-FRUEHAUF, 2000). Quando os primeiros colonizadores chegaram ao Brasil, a Mata Atlântica cobria 15% do território brasileiro, área equivalente a 1.306.421 km². Nesse período o conhecimento popular de plantas medicinais era transmitido de geração a geração e chegou até os colonizadores, naturalistas e aventureiros (ALMEIDA et al., 2009; SOS MATA ATLÂNTICA, 2016). Até hoje, todo esse conhecimento sobre o uso de plantas medicinais ajuda a ciência a direcionar os estudos na área da fitoquímica, além de revelar o quanto a biodiversidade brasileira é abundante e importante. Embora detenha grande riqueza vegetal, atualmente na Farmacopeia Brasileira (5ª edição, volume 2) estão registradas apenas 65 espécies e destas, apenas 14 são nativas (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010). O SUS oferta à população, com recursos da União, Estados e Municípios, 12 medicamentos fitoterápicos que constam na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (Rename) e são indicados, por exemplo, para uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite. Números muito modestos e que evidenciam o grande potencial a ser conhecido e investigado e que podem ser úteis para o melhoramento da qualidade de vida do homem (RENAME, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

As plantas produzem grande quantidade de substâncias essenciais que são formadas a partir de rotas metabólicas do qual originam os chamados produtos naturais. Esses produtos naturais também são conhecidos por metabólitos

secundários ou micromoléculas e possuem propriedades que os qualificam como mensageiros de informação, sendo responsáveis pela conectividade entre o organismo e o ambiente. Essas substâncias de pequena massa molecular, possuem como características a polaridade diferenciada, meia-vida curta e variável, enorme variabilidade estrutural, ocorrência esporádica e potencial antioxidante (GOTTLIEB e BORIN, 2012).

Espécies da família Annonaceae contém em sua constituição química, principalmente, as classes de alcaloides, flavonoides, acetogeninas, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides, entre outros (KAPLAN et al., 2015). A presença desses metabólitos está diretamente ligada ao potencial biológico dessas espécies, no qual apresentam atividades comprovadas como antitumoral, antimicrobiana, anticonvulsiva, antiprotozoário, anti HIV, entre outras (COSTA, 2009).

Annona dolabripetala Raddi apresenta três estudos fitoquímicos na literatura que relatam o isolamento de flavonoides e identificação de alcaloides, taninos e xantonas. Nesses estudos foram usadas técnicas de caracterização como HPLC-ESMS, RMN ¹H e análise qualitativa (CAMPOS, 2013; MACHADO et al., 2013; SANTOS e SALATINO, 2000). Ainda há relatos de estudos biológico dos extratos das folhas avaliando o potencial bactericida, antioxidante e citotóxico (CAMPOS, 2013; PAES, 2016).

Devido às características químicas e terapêuticas descritas na literatura sobre espécies da família Annonaceae e também buscando contribuir com o mapeamento químico de espécies oriundas da Mata Atlântica, foi escolhida a espécie *Annona dolabripetala* Raddi para este trabalho.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento químico de espécies oriundas da Mata Atlântica da Região Norte Fluminense, bem como, avaliar o potencial biológico da espécie *Annona dolabripetala* Raddi.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar o estudo sobre a composição química das folhas e caules da espécie *Annona dolabripetala* da família Annonaceae através de extração, isolamento, purificação e elucidação estrutural das substâncias utilizando métodos cromatográficos e espectrais como: CL/EM, CG-EM, RMN ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais;
- ✓ Avaliar a atividade antineoplásica dos extratos e frações das folhas através de ensaios com MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolium) em células de linfoma U937;
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos e frações das folhas através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e modelo de imersão de cauda em água quente;
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos e frações das folhas através do modelo de edema de pata induzida por carragenina;

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Família Annonaceae Juss.

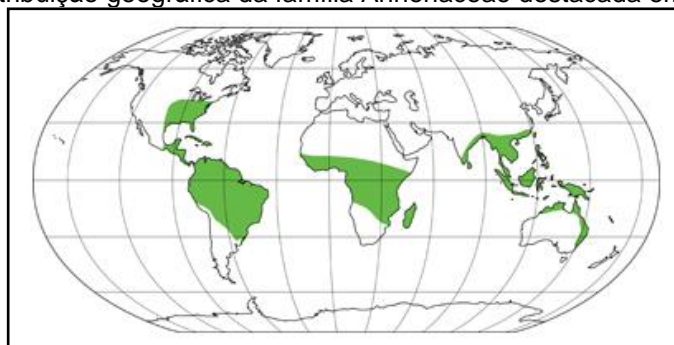
A classificação botânica da família Annonaceae Juss. está representada na Tabela 1 a seguir baseado na classificação APG IV, 2016 (BYNG et al., 2016).

Tabela 1: Classificação botânica da família Annonaceae.

Classificação Botânica	
Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Subclasse	Magnoliidae
Ordem	Magnoliales
Família	Annonaceae

As espécies da família Annonaceae ocorrem como árvores, raramente arbustos, subarbustos ou lianas. Estão distribuídas nas Américas, Sudeste Asiático, arquipélago Malaio, Nova Guiné, Ilhas do Pacífico, Austrália, Índia, Madagascar e África (Figura 1) (SOUZA e LORENZI, 2005). Com cerca de 2500 espécies e 109 gêneros reconhecidos, a família Annonaceae é classificada de acordo com a filogenética em quatro subfamílias: Ambavioideae, Anaxagoreoideae, Annonoideae e Malmeoideae (CHATROU et al., 2012).

Figura 1: Distribuição geográfica da família Annonaceae destacada em verde.



Fonte: (LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA PLANTAS VASCULARES, 2019).

No Brasil, a família Annonaceae está presente nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal. Compreende 29 gêneros nativos e 386

espécies (FLORA DO BRASIL, 2019; LOPES e MELLO-SILVA, 2014). A Tabela 2 descreve as subfamílias e seus respectivos gêneros.

Tabela 2: Subfamílias da família Annonaceae e seus respectivos gêneros.

Subfamílias	Gêneros		
Anaxagoreoideae	<i>Anaxagorea</i> *		
Ambavioideae	<i>Tetrameranthus</i> *	<i>Cleistopholis</i>	<i>Lettowianthus</i>
	<i>Ambavia</i>	<i>Cyathocalyx</i>	<i>Meiocarpidium</i>
	<i>Cananga</i>	<i>Drepananthus</i>	<i>Mezzettia</i>
Annonoideae	<i>Annona</i> *	<i>Pseudartabotrys</i>	<i>Uvariopsis</i>
	<i>Bocagea</i> *	<i>Anonidium</i>	<i>Afroguatteria</i>
	<i>Cardiopetalum</i> *	<i>Asimina</i>	<i>Cleistochlamys</i>
	<i>Cymbopetalum</i> *	<i>Boutiquea</i>	<i>Dasymaschalon</i>
	<i>Diclinanona</i> *	<i>Disepalum</i>	<i>Desmos</i>
	<i>Duckeanthus</i> *	<i>Goniothalamus</i>	<i>Dielsiothammus</i>
	<i>Duguetia</i> *	<i>Neostenanthera</i>	<i>Exellia</i>
	<i>Froesiodendron</i> *	<i>Asteranthe</i>	<i>Fissistigma</i>
	<i>Fusaea</i> *	<i>Hexalobus</i>	<i>Friesodielsia</i>
	<i>Guatteria</i> *	<i>Isolona</i>	<i>Gilbertiella</i>
	<i>Hornschuchia</i> *	<i>Mischogyne</i>	<i>Melodorum</i>
	<i>Porcelia</i> *	<i>Monocyclanthus</i>	<i>Monanthotaxis</i>
	<i>Trigynaea</i> *	<i>Monodora</i>	<i>Pyramidanthe</i>
	<i>Xylopia</i> *	<i>Ophrypetalum</i>	<i>Schefferomitra</i>
	<i>Mkilua</i>	<i>Sanrafaelia</i>	<i>Sphaerocoryne</i>
	<i>Artabotrys</i>	<i>Uvariastrum</i>	<i>Toussaintia</i>
	<i>Letestudoxa</i>	<i>Uvariadendron</i>	<i>Uvaria</i>
Malmeoideae	<i>Bocageopsis</i> *	<i>Piptostigma</i>	<i>Oncodostigma</i>
	<i>Cre mastosperma</i> *	<i>Polyceratocarpum</i>	<i>Orophea</i>
	<i>Ephedranthus</i> *	<i>Maasia</i>	<i>Phaeanthus</i>
	<i>Klarobelia</i> *	<i>Fenerivia</i>	<i>Phoenicanthus</i>
	<i>Malmea</i> *	<i>Dendrokingstonia</i>	<i>Platymitra</i>
	<i>Mosannonna</i> *	<i>Monocarpia</i>	<i>Polyalthia</i>
	<i>Onychopetalum</i> *	<i>Alphonsea</i>	<i>Popowia</i>
	<i>Oxandra</i> *	<i>Desmopsis</i>	<i>Pseuduvaria</i>
	<i>Pseudephedranthus</i> *	<i>Enicosanthum</i>	<i>Sageraea</i>
	<i>Pseudomalmea</i> *	<i>Fitzalania</i>	<i>Sapranthus</i>
	<i>Pseudoxandra</i> *	<i>Haplostichanthus</i>	<i>Stelechocarpus</i>
	<i>Ruizodendron</i> *	<i>Marsypopetalum</i>	<i>Stenanona</i>
	<i>Unonopsis</i> *	<i>Meiogyne</i>	<i>Tridimeris</i>
	<i>Annickia</i>	<i>Miliusa</i>	<i>Trivalvaria</i>
	<i>Greenwayodendron</i>	<i>Mitrephora</i>	<i>Woodiellantha</i>
	<i>Mwasumbia</i>	<i>Neo-uvaria</i>	<i>Sirdavidia</i>

* gêneros encontrados em território brasileiro.

Fonte: (CHATROU et al., 2012; COUVREUR et al., 2015; LOPES; MELLO-SILVA, 2014).

A importância econômica desta família se evidencia no uso de algumas espécies que possuem frutos comestíveis, como por exemplo a *Annona squamosa* (pinha) e *Annona muricata* (graviola). Outra espécie conhecida é a *Cananga odorata* (ylang-ylang), cujos óleos essenciais podem ser encontrados na indústria de perfumaria. Na aromaterapia o seu óleo é muito difundido com propósitos medicinais nos tratamentos de depressão, pressão arterial alta e ansiedade, no entanto são

necessárias robustas evidências sobre os efeitos clínicos (SAEDI E CRAWFORD, 2006). O comércio dessas espécies ajuda a movimentar a economia dos locais que as cultivam.

Costa (2009) apresenta uma revisão do uso popular e atividades farmacológicas comprovadas de algumas espécies da família Annonaceae, essas atividades relatadas são: antitumoral, antimicrobiana, anticonvulsiva, antiprotozoário, anti-agregação plaquetária, tripanomicida, anti HIV, antimalarial, antidiabética, antihelmíntica, antiviral, antifúngica e antileishmania. Além dessas, destacam-se outras propriedades como potencial inseticida, larvicida e pesticida.

As atividades farmacológicas relatadas na família, são atribuídas aos metabólitos secundários presentes nas espécies, que possuem como constituintes químicos majoritários os alcaloides, flavonoides, acetogeninas, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides e outras classes minoritárias como lignanas, oligossacarídeos, monoterpenos e xantonas (KAPLAN et al., 2015). Alguns gêneros são caracterizados por produzirem metabólitos específicos em maior quantidade, como por exemplo, as acetogeninas, alcaloides e flavonoides presentes em *Annona* e diterpenos no gênero *Xylopia* (BARBOSA e VEGA, 2017; VEGA, 2007).

3.2 Gênero *Annona* L.

Segundo Leboeuf et al. (1982), *Annona* é um dos gêneros mais representados em número de espécies da família Annonaceae. São aproximadamente 120 espécies distribuídas na América e África tropical.

No Brasil, o gênero *Annona* é encontrado nos biomas Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal (FLORA DO BRASIL, 2019).

Na literatura podemos encontrar diversos estudos biológicos com espécies do gênero *Annona*. De acordo com um levantamento bibliográfico realizado por Paes (2016), das 120 espécies no gênero, apenas 26 já foram estudadas biologicamente. As atividades biológicas mais relatadas em espécies desse gênero são: pesticida, citotóxica, antitumoral, antidepressiva, larvicida, anti-oxidante, antiparasitária, ansiolítica, antifúngica, antinociceptiva, moluscida, anticonvulsivante, anti-inflamatória, bactericida, entre outras.

As classes de metabólitos secundários mais encontradas em espécies do gênero *Annona* são os alcaloides, acetogeninas, esteroides, diterpenos, flavonoides e peptídeos (LEBOEUF et al., 1982).

De acordo com revisões bibliográficas encontradas na literatura do gênero *Annona* é possível estimar que há mais de 140 alcaloides e 289 acetogeninas já identificadas (BERMEJO et al., 2005; NASCIMENTO, 2008; RABÊLO, 2014).

A revisão realizada por Vega (2007), apresenta os metabólitos secundários encontrados em 33 espécies do gênero *Annona* estudadas quimicamente no período de 1971 à 2006 e observa-se que as classes das acetogeninas, alcaloides e flavonoides são as mais presentes. Com o objetivo de atualizar até o ano de 2019 essa lista de espécies estudadas quimicamente, foi elaborada a Tabela 3 a seguir, no qual constam um total de 46 espécies. Esses dados foram coletados através do site de busca *Scifinder* utilizando como palavras chaves cada espécie do gênero *Annona* reconhecido pelos bancos de dados do *The Plant List* e *Reflora* (FLORA DO BRASIL, 2019; THE PLANT LIST, 2019).

Tabela 3: Espécies de *Annona* já estudadas quimicamente até 2019.

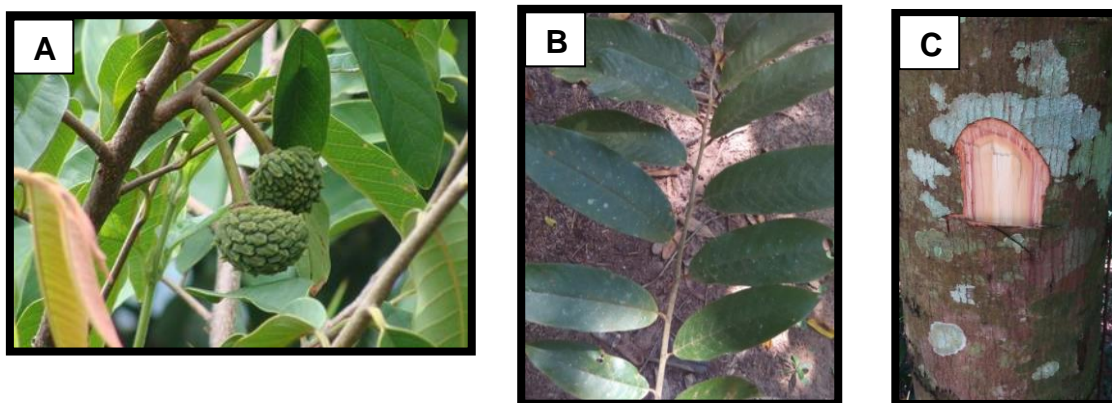
<i>A. acuminata</i>	<i>A. amazonica</i>	<i>A. ambotay</i>	<i>A. bullata</i>	<i>A. cacans</i>
<i>A. cherimola</i>	<i>A. coriacea</i>	<i>A. cornifolia</i>	<i>A. crassiflora</i>	<i>A. cristalensis</i>
<i>A. densicoma</i>	<i>A. dioica</i>	<i>A. diversifolia</i>	<i>A. dolabripetala</i>	<i>A. elliptica</i>
<i>A. emarginata</i>	<i>A. foetida</i>	<i>A. glabra</i>	<i>A. glauca</i>	<i>A. haematantha</i>
<i>A. hayesii</i>	<i>A. hypoglauca</i>	<i>A. jahnii</i>	<i>A. leptopetala</i>	<i>A. lutescens</i>
<i>A. macrophyllata</i>	<i>A. montana</i>	<i>A. monticola</i>	<i>A. mucosa</i>	<i>A. muricata</i>
<i>A. nutans</i>	<i>A. paludosa</i>	<i>A. pickelii</i>	<i>A. purpurea</i>	<i>A. reticulata</i>
<i>A. rugulosa</i>	<i>A. salzmanii</i>	<i>A. seleroderma</i>	<i>A. senegalensis</i>	<i>A. sericea</i>
<i>A. spinescens</i>	<i>A. squamosa</i>	<i>A. sylvatica</i>	<i>A. tomentosa</i>	<i>A. vepretorum</i>
<i>A. warmingiana</i>				

3.3 Espécie *Annona dolabripetala* Raddi

Annona dolabripetala Raddi é uma árvore de 2,5 a 6,0 m de altura, nativa e endêmica do Brasil. Suas folhas possuem tricomas ferrugíneos diferenciando-se de outras espécies do gênero (Figura 2). Seu domínio fitogeográfico é a Mata Atlântica, sendo encontrada nas vegetações de Floresta Estacional Semidecidual e Floresta

Ombrófila (= Floresta Pluvial). Ocorrência confirmada nos estados da Bahia, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (DUTRA et al., 2012; FLORA DO BRASIL, 2019).

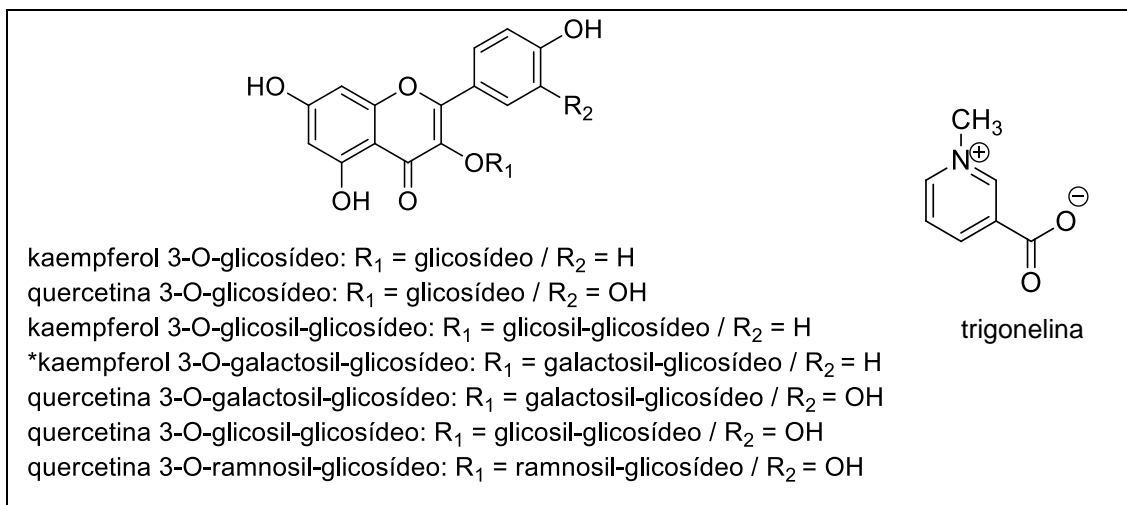
Figura 2: Partes da planta de *Annona dolabripetala*. **A** obtida do site “Flora do Brasil 2020” (FLORA DO BRASIL, 2019); **B** e **C** obtidas no dia da coleta realizada para a atual pesquisa.



Na literatura pode-se encontrar diversos nomes populares, tais como: araticum, ata, araticu, biribá-do-mato, pinha-do-mato. Além da nomenclatura comum, são citadas como sinônimas botânicas as espécies: *Annona minensis*, *Annona neolaurifolia*, *Rollinia longifolia*, *Rollinia minensis*, *Rollinia dolabripetala* (FLORA DO BRASIL, 2019; RAINER, 2007).

Entre os estudos fitoquímicos e biológicos de *Annona dolabripetala*, são encontrados na literatura os trabalhos de Paes (2016) no qual avaliou a atividade citotóxica frente as linhagens de células neoplásicas U937 e THP-1 com extratos das frações hexânica, clorofórmica e metanólica das folhas, todas as frações foram consideradas inativas; e Machado et al. (2013) que quantificou através de análise por RMN ¹H a concentração do alcaloide trigonelina presente no extrato das folhas. Os seguintes autores citam seus estudos com a sinonímia botânica *Rollinia dolabripetala*: Santos e Salatino (2000) identificaram e isolaram 7 flavonóis glicosilados do extrato das folhas; Campos (2013) avaliou e constatou a presença das classes de flavonóis, taninos e xantonas por testes qualitativos do extrato hidroalcoólico das folhas, além de confirmar a atividade bactericida contra *Staphylococcus aureus*, o potencial antioxidante pelo método de DPPH e a atividade citotóxica em melanoma murino. As estruturas das substâncias isoladas e identificadas desses estudos são mostradas na Figura 3 a seguir.

Figura 3: Estruturas químicas das substâncias isoladas e identificadas em *Annona dolabripetala*.



*estrutura não confirmada pelo autor.

3.4 Flavonoides

Os flavonoides pertencem a uma classe de compostos amplamente distribuída no reino vegetal e representam uma das classes de metabólitos secundários mais importantes e diversificadas entre os produtos naturais. Encontram-se em abundância nas angiospermas e têm grande diversidade estrutural (ZUANAZZI et al., 2017).

Nas plantas, os flavonoides estão envolvidos em uma variedade de processos biológicos, importantes para a sua sobrevivência, tais como: a atração de vetores animais para polinização e dispersão de sementes, estimulação de bactérias *Rhizobium* para fixação de nitrogênio, promoção do crescimento do tubo polínico, reabsorção de nutrientes minerais de folhas senescentes, controlam a ação de hormônios vegetais e inibem enzimas. Além disso, os flavonoides também são conhecidos por aumentar a tolerância a uma variedade de estressores abióticos, sendo agentes de defesa contra herbívoros e patógenos, e agentes alelopáticos com outras espécies de plantas (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

Portanto, não é difícil compreender a importância dos flavonoides nas plantas e porque elas investem grande quantidade de energia na produção desses metabólitos secundários. Duas dessas funções importantes dos flavonoides nas plantas merecem destaque, pois podem interessar diretamente aos seres humanos. Primeiro, por desempenharem papel importante na proteção das plantas contra os

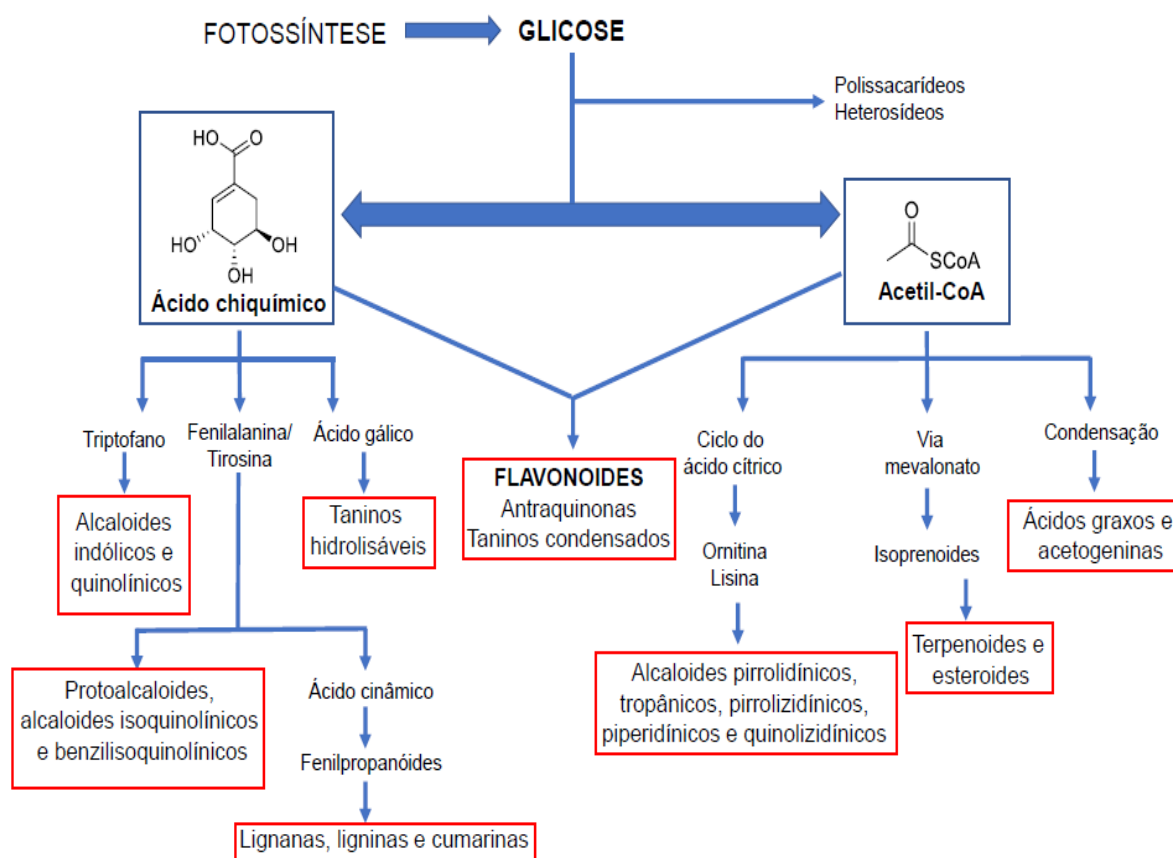
níveis prejudiciais de radiação UV e segundo, por suas propriedades antioxidantes (ANDERSEN e MARKHAM, 2006).

Os flavonoides são considerados marcadores quimiotaxonômicos, devido a especificidade em algumas espécies, gêneros e famílias e sua relativa estabilidade estrutural (ZUANAZZI et al., 2017). Na revisão realizada por Sousa et al. (2015) são relatados 180 flavonoides isolados e identificados em Annonaceae, desse total 31 são a partir de sete espécies de *Annona* até o ano de 2014. O desenvolvimento das relações quimiotaxonômicas, por exemplo, são impedidos pela falta de estudos com enfoque nos flavonoides da família Annonaceae.

3.5 Biossíntese

As rotas biossintéticas dos metabólitos secundários são ativadas a partir de alguns fatores relacionados ao crescimento e desenvolvimento das plantas ou por períodos de estresse que podem ser causados por limitações nutricionais ou ataque microbiológico, por exemplo (SANTOS, 1999).

Na Figura 4 está representado o ciclo biossintético dos metabólitos secundários, no qual a origem de todos eles podem ser resumidos a partir do metabolismo da glicose e em seguida duas rotas metabólicas principais a do ácido chiquímico e do acetato ou acetil-CoA. Além dessas duas rotas, existe uma terceira chamada de rota mista que são derivados da combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidade de acetato ou derivados deste, na qual se originam os flavonoides, antraquinonas e taninos condensados (SANTOS, 1999).

Figura 4: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

Fonte: SANTOS et al., 1999.

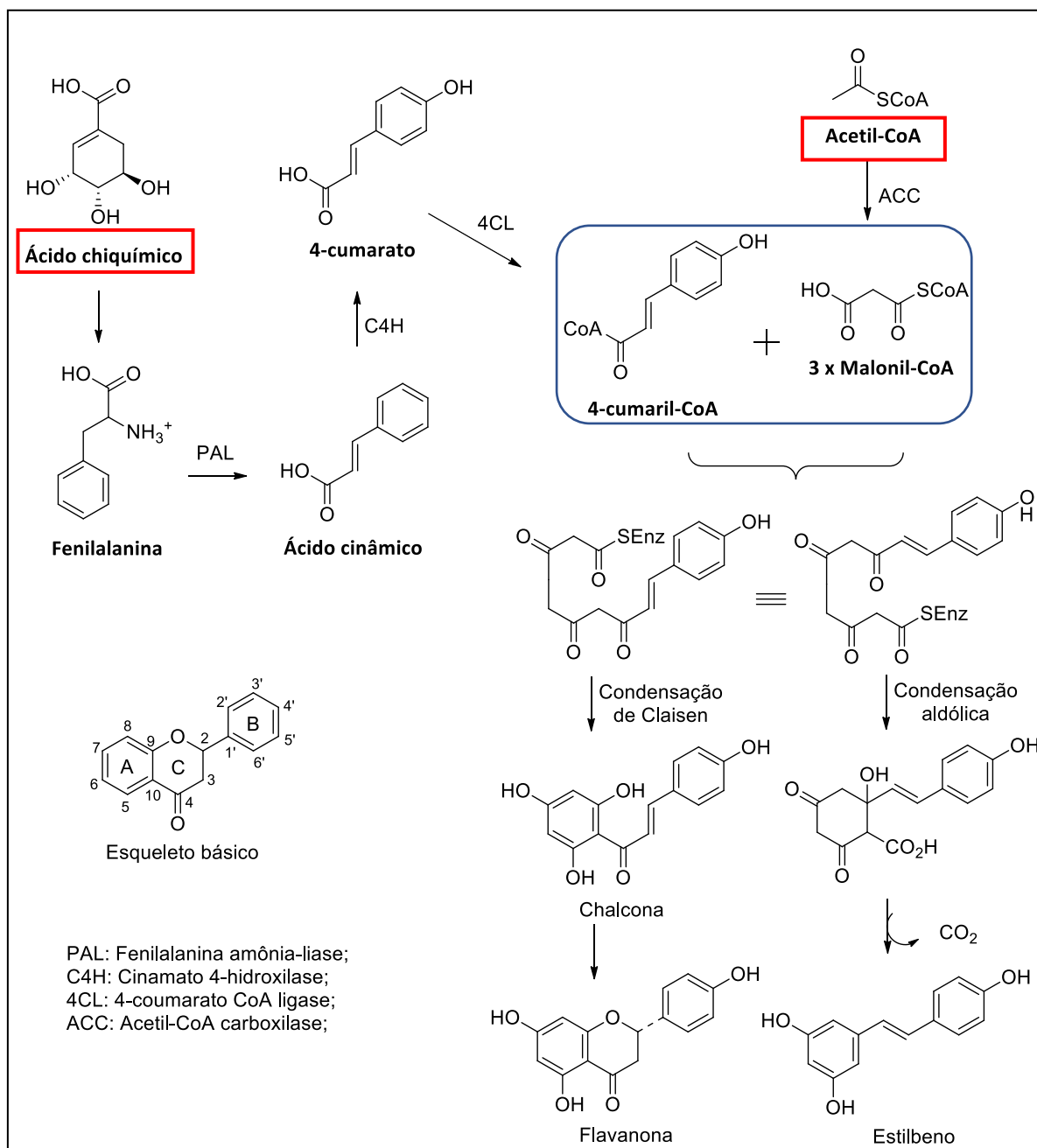
Os flavonoides são oriundos da rota biossintética mista, na qual uma parte do esqueleto flavonoídico é derivado do ácido chiquímico e a outra do acetil-CoA. O esqueleto básico dos flavonoides é composto por dois anéis aromáticos (A e B) e uma junção destes com três átomos de carbono, que formam o anel C. Podem ser encontrados na forma livre, no qual são denominados agliconas, ou ligados a uma mais unidade de açúcar, chamados de heterosídeos (ZUANAZZI et al., 2017).

A via do ácido chiquímico origina o aminoácido fenilalanina, precursora do ácido cinâmico, responsável pela formação do anel aromático B e a junção com os três átomos de carbono. Já a via do acetil-CoA origina três moléculas de malonil-CoA que, através de reações subsequentes de hidroxilação e redução, levam a formação dos anéis A e C (Figura 5) (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; DEWICK, 2009; ZUANAZZI et al., 2017).

Juntamente com processos oxidativos, originam-se diferentes classes de flavonoides: chalconas, flavanonas, flavonas, diidroflavonóis e flavonóis, de acordo com a presença do oxigênio no átomo de carbono 4, ligação dupla entre os átomos

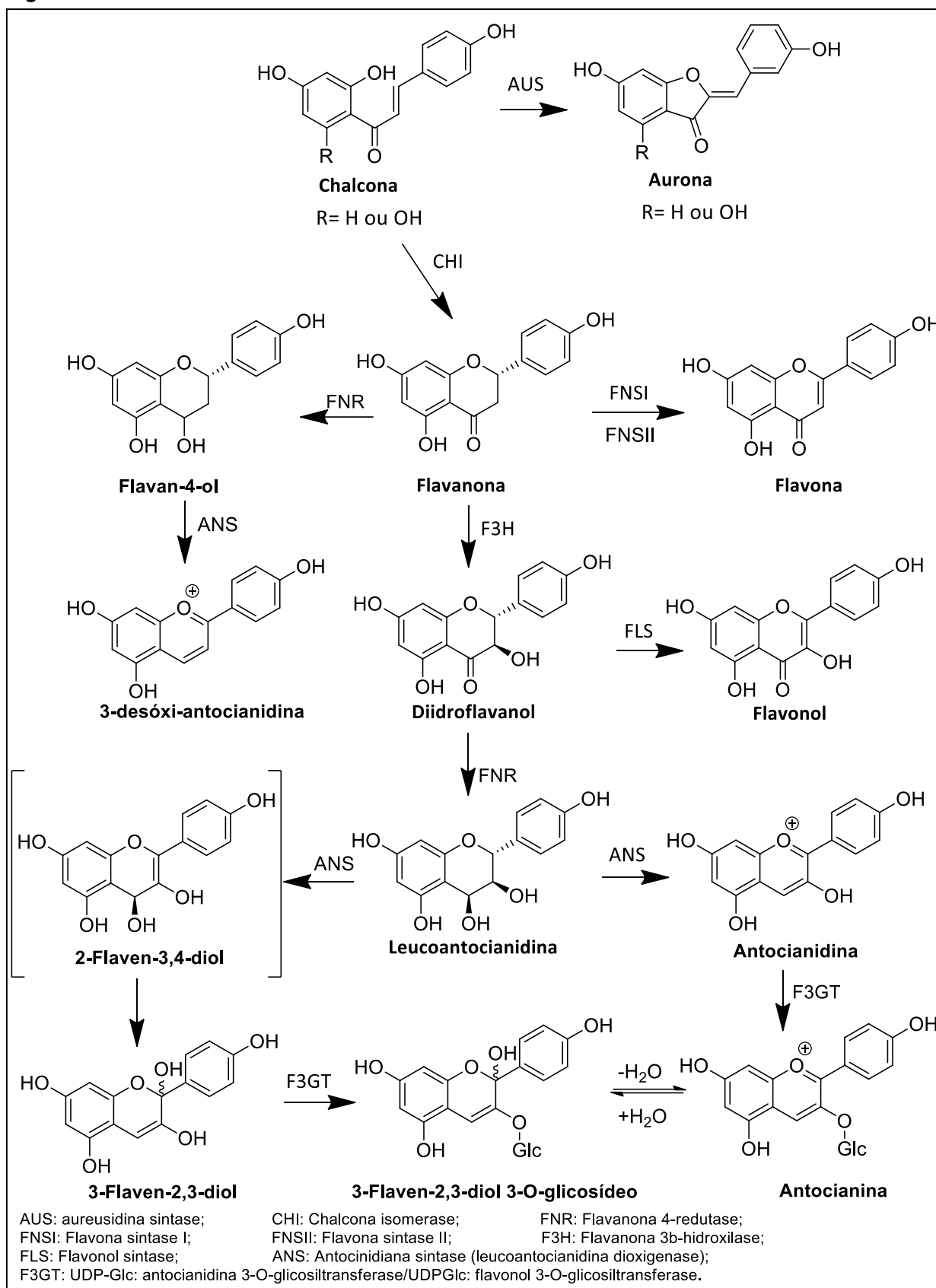
de carbono 2 e 3 ou a presença de um grupo hidroxila na posição 3 do anel C. (Figura 6, p. 13) (ANDERSEN e MARKHAM, 2006; DEWICK, 2009).

Figura 5: Biossíntese simplificada dos flavonoides.



Fonte: ANDERSEN e MARKHAM, 2006; DEWICK, 2009; ZUANAZZI et al., 2017.

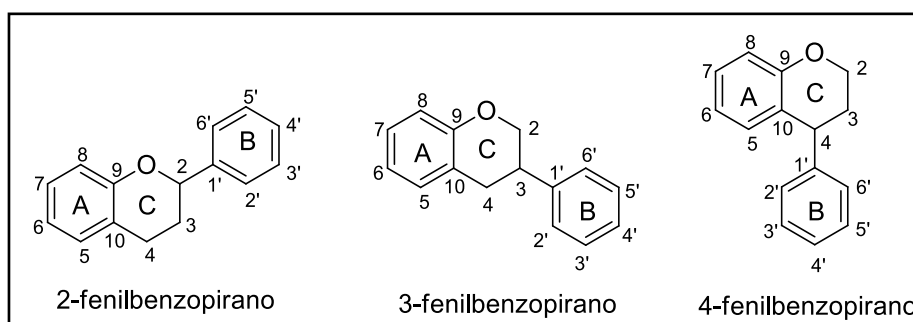
Figura 6: Biossíntese das classes de flavonoides.



3.5.1 Subclasses

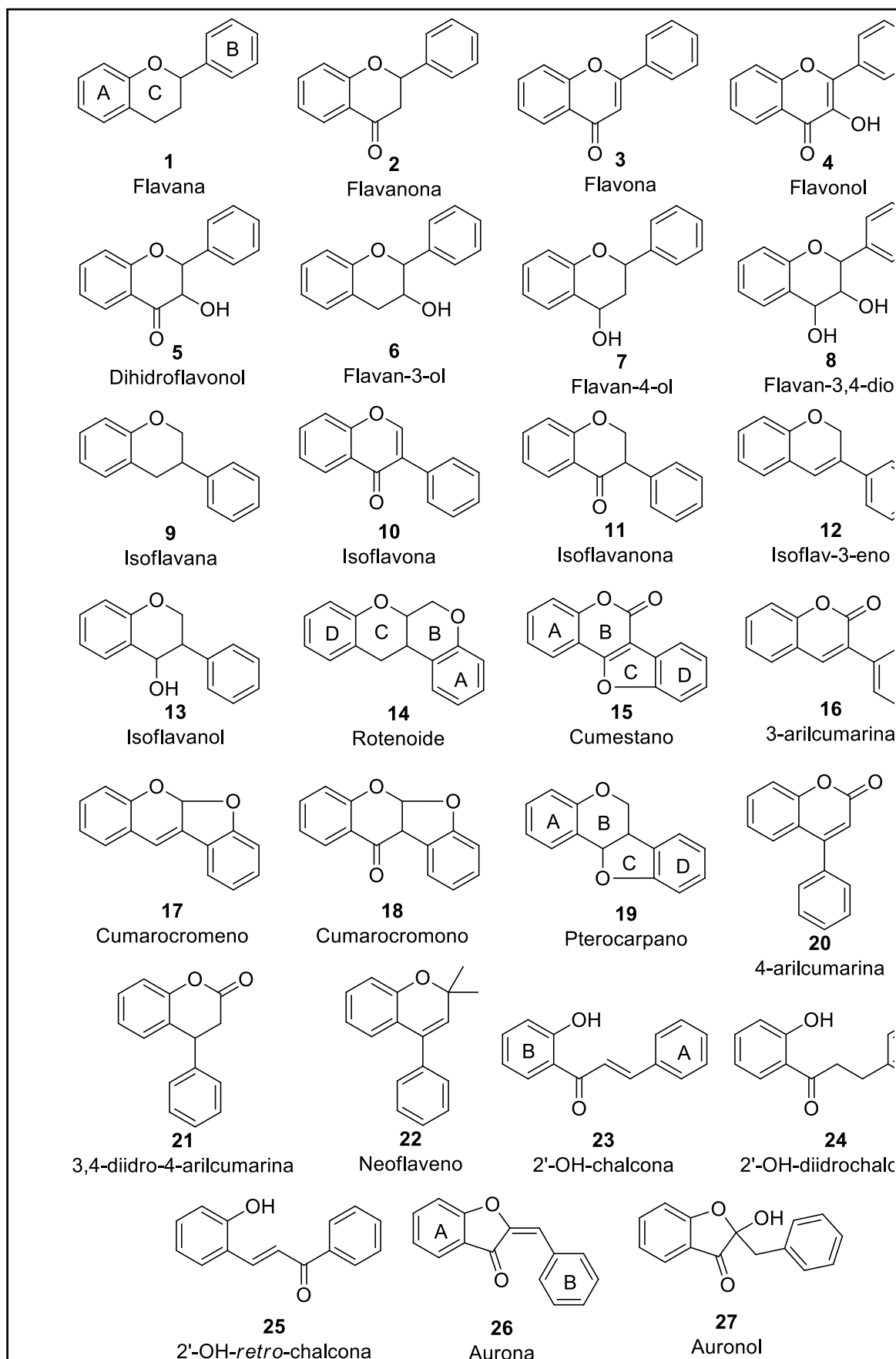
Os flavonoides são formados por uma sequência de átomos de carbono C6-C3-C6, também chamados de fenilbenzopirano. Três tipos de classes de flavonoides existem de acordo com a posição em que o grupo fenil (anel B) estiver ligado (Figura 7). A primeira são os flavonoides (2-fenilbenzopiranos), aqueles em que o anel B está ligado à posição 2 do anel C. A segunda classe são os isoflavonoides (3-fenilbenzopiranos), onde o anel B está ligado na posição 3 do anel C. A última classe são os neoflavonoides (4-fenilbenzopiranos) que possuem o anel B ligado na posição 4. Além dessas três classes, existem os flavonoides minoritários que não possuem os 3 anéis formados, são os derivados das chalconas e auronas (GROTEWOLD, 2006).

Figura 7: Subclasses de flavonoides.



De acordo com Grotewold (2006), cada classe de flavonoides possui subclasses com esqueletos básicos definidos a partir das 3 classes supracitadas. Na Figura 8 estão representados os derivados do 2-fenilbenzopirano que são os esqueletos 1-8, do 3-fenilbenzopirano que são os esqueletos 9-19, e do 4-fenilbenzopirano que são os 20-22 e os minoritários que são os esqueletos 23-27.

Figura 8: Esqueletos das diversas subclasses de flavonoides. **Fonte:** GROTEWOLD, 2006.



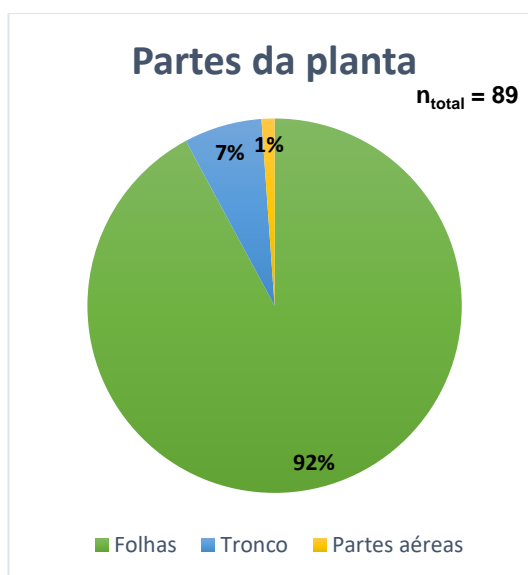
3.6 Flavonoides no gênero *Annona*

Os dados do levantamento bibliográfico realizado para este trabalho estão sumarizados na Tabela 4 (p. 18). Nessa revisão foi utilizado o site de busca *Scifinder*. Na busca foi utilizado as palavras chaves *Annona* e *flavonoids*. Dos 17 artigos encontrados, o primeiro data de 1984, sendo os dados coletados até 2018 e somam 46 estruturas diferentes de flavonoides no gênero *Annona* representados na Figura 11 (p. 22).

Os dados extraídos dessa revisão são sumarizados nas Figuras 9 e 10. Nessas figuras são identificadas as principais partes da planta que são fontes de flavonoides e as porcentagens da presença da diversidade de classes estruturais de flavonoides isolados nesse gênero.

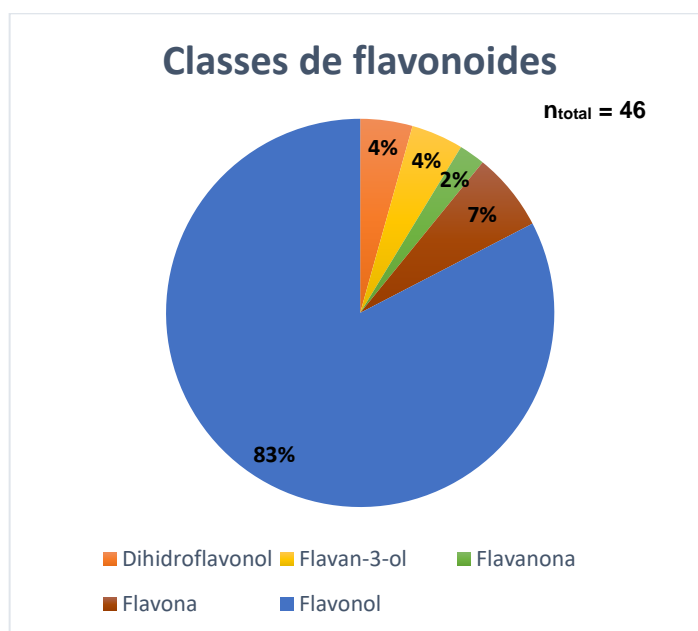
Foi adicionado a Tabela 4 (p. 18) o trabalho de identificação e isolamento de flavonoides dos autores Santos e Salatino (2000), com a sinonímia botânica de *Annona dolabripetala*, a *Rollinia dolabripetala*.

Figura 9: Gráfico representativo das partes da planta de trabalhos em que flavonoides foram isolados.



n: representa o total de citações das partes da planta que tiveram flavonoides isolados.

Figura 10: Gráfico representativo das classes de flavonoides que foram isolados.



n: representa o total de citações de estruturas de flavonoides diferentes.

Segundo os dados apresentados na Figura 9, é possível concluir que dos flavonoides isolados em espécies de *Annona*, 92% foram das folhas, 7% do tronco e 1% das partes aéreas. Das 46 espécies que apresentam estudos fitoquímicos na literatura, de acordo com essa revisão apenas em 16 espécies do gênero *Annona* foram isolados flavonoides.

Das cinco classes de flavonoides relatadas em espécies de *Annona*, como é possível observar na Figura 10, os flavonóis são 83% da classe, desses 76% são flavonóis glicosilados.

A seguir, são descritas algumas características estruturais e de ocorrência das subclasses de flavonoides encontradas em *Annona*.

- ✓ Diidroflavonóis: também chamado de flavanonóis; presença no tronco; possui uma hidroxila na posição 3 e uma carbonila na posição 4 do anel C; não possui ligação dupla entre as posições 2 e 3; taxifolina (**1**) foi relatada no gênero *Annona*.
- ✓ Flavan-3-ol: conhecido também como flavanol; presença nas folhas e tronco; diferentemente do diidroflavonol não possui a carbonila na posição 4 do anel C; como exemplo, a catequina (**3**) e a epicatequina (**4**).

- ✓ Flavanonas: observado a presença no tronco; eriodictiol (**5**) é o único flavonoide dessa subclasse relatado.
- ✓ Flavonas: presentes nas folhas; podem ser glicosiladas; luteolina (**6**), é o esqueleto mais comum; a maioria possui hidroxila na posição 5 do anel A e dependendo podem ter outras hidroxilas nas posições 7, 3', 4'; destaca-se a flavona **8** com ramnose ligada na posição 5.
- ✓ Flavonóis: presentes nas folhas e tronco; maioria são glicosilados na posição 3 do anel C; possui diversidade em padrões de metilação e hidroxilação; rutina (**23**), hiperina (**26**) e isoquercitrina (**27**) são os mais comuns observados em *Annona*;

Tabela 4: Flavonoides isolados no gênero *Annona* de 1984 a 2018.

Nº	Flavonoides	Espécie	Parte investigada	Bibliografia
DIIDROFLAVONOL				
1	Taxifolina / Diidroquercetina	<i>A. ambotay</i>	Tronco	(OLIVEIRA et al., 1987)
2	Diidrokaempferol	<i>A. ambotay</i>	Tronco	(OLIVEIRA et al., 1987)
FLAVAN-3-OL				
3	Catequina	<i>A. senegalensis</i>	Partes aéreas	(LALL et al., 2017)
		<i>A. ambotay</i>	Tronco	(OLIVEIRA et al., 1987)
4	Epicatequina	<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(LAGE et al., 2014)
FLAVANONA				
5	Eriodictiol	<i>A. ambotay</i>	Tronco	(OLIVEIRA et al., 1987)
FLAVONA				
6	Luteolina	<i>A. sylvatica</i>	Folhas	(ARAUJO et al., 2014)
		<i>A. reticulata</i>	-	(VERSIANI et al., 2011)
7	Luteolina-7-O-glicosídeo	<i>A. tomentosa</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
8	5,7,4'-trihidroxi-6,3'-dimetoxi-flavona 5-O- α -L-ramnopiranosídeo	<i>A. squamosa</i>	Folhas	(PANDA e KAR, 2015)
FLAVONOL				
9	Kaempferol	<i>A. ambotay</i>	Tronco	(OLIVEIRA et al., 1987)
		<i>A. dioica</i>	Folhas	(VEGA et al., 2007)
10	Kaempferol-3-O-ramnosídeo	<i>A. purpurea</i>	Folhas	(CHANG et al., 1998)

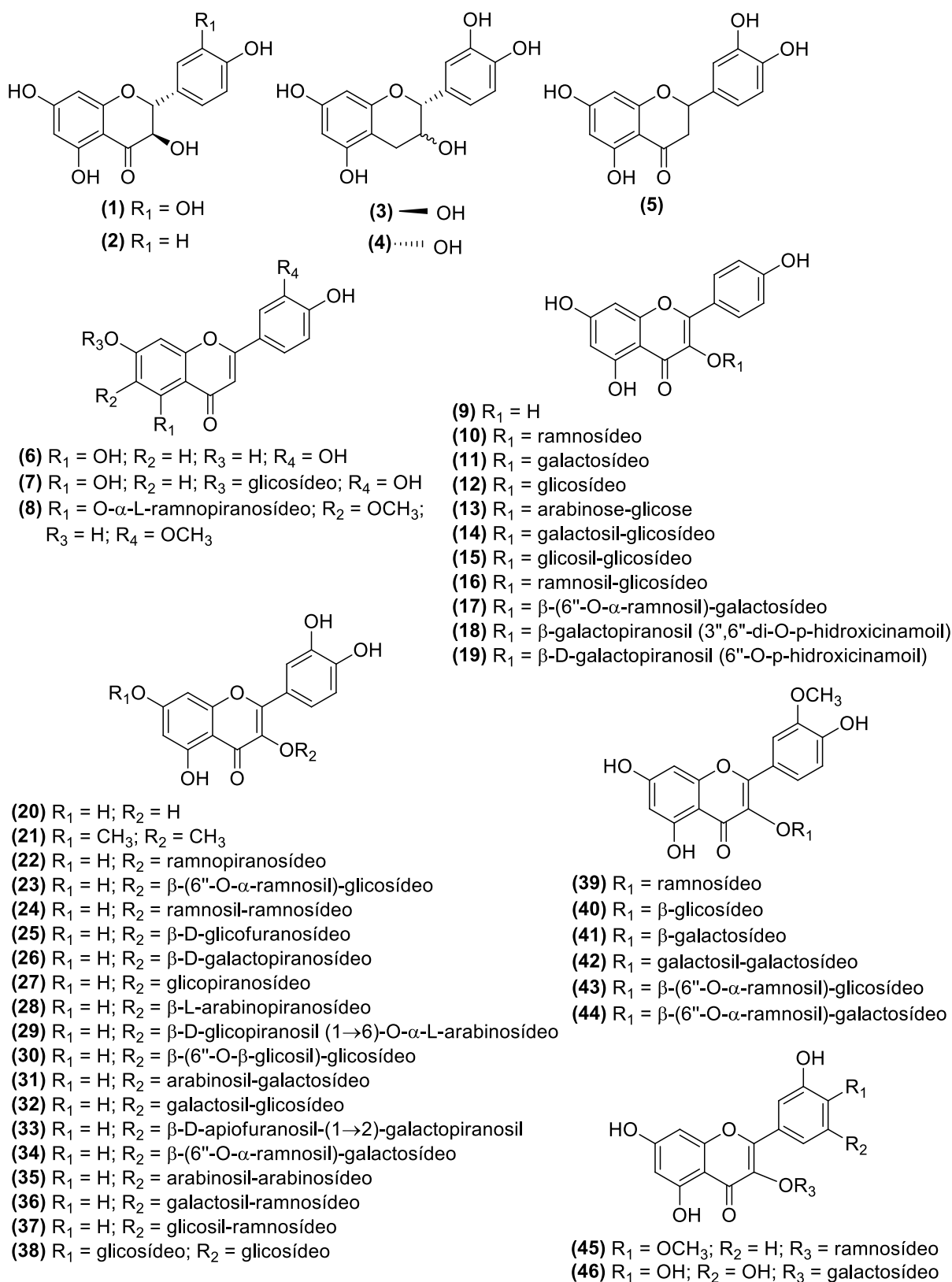
11	Kaempferol-3-O- β -galactosídeo	<i>A. dioica</i>	Folhas	(FORMAGIO et al., 2013)
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(LAGE et al., 2014)
		<i>A. dioica</i>	Folhas	(VEGA et al., 2007)
12	Kaempferol-3-O-glicosídeo	<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>R. dolabripetala</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
13	Kaempferol-3-O-arabinose-glicose	<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
14	Kaempferol-3-O-galactosil-glicosídeo	<i>R. dolabripetala</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)*
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
15	Kaempferol-3-O-glicosil-glicosídeo	<i>R. dolabripetala</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
16	Nicotiflorin / Kaempferol-3-O- β -(6''-O- α -ramnosil)-glicosídeo / Kaempferol-3-O-ramnosil-glicosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
		<i>A. tomentosa</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. warmingiana</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
17	Biorobin / Kaempferol-3-O- β -(6''-O- α -ramnosil)-galactosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
18	Kaempferol-3-O- β -galactopiranosil (3'',6''-di-O- <i>p</i> -hidroxicinamoil)	<i>A. dioica</i>	Folhas	(VEGA et al., 2007)
19	Kaempferol-3-O- β -D-galactopiranosil (6''-O- <i>p</i> -hidroxicinamoil)	<i>A. dioica</i>	Folhas	(VEGA et al., 2007)
20	Quercetina	<i>A. sylvatica</i>	Folhas	(ARAUJO et al., 2014)
		<i>A. cherimolia</i>	Folhas	(VILLAR et al., 1984)
		<i>A. ambotay</i>	Tronco	(OLIVEIRA et al., 1987)
21	Quercetina-3,7-dimetoxi	<i>A. squamosa</i>	Folhas	(KOTKAR et al., 2002)
22	Quercetina-3-O-ramnopiranosídeo	<i>A. purpurea</i>	Folhas	(CHANG et al., 1998)
		<i>A. warmingiana</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
23	Rutina / Quercetina-3-O-rutinosídeo / Quercetina-3-O- β -(6''-O- α -ramnosil)-glicosídeo	<i>A. cherimolia</i>	Folhas	(VILLAR et al., 1984)
		<i>A. squamosa</i>	Folhas	(KOTKAR et al., 2002)
		<i>A. squamosa</i>	Folhas	(SONI et al., 2018)

		<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
		<i>R. dolabripetala</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. tomentosa</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. warmingiana</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. monticola</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)*
24	Quercetina-3-O-ramnosil-ramnosídeo	<i>A. warmingiana</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
25	Isoquercitrosídeo / Quercetina-3-O- β -D-glicofuranosídeo	<i>A. cherimolia</i>	Folhas	(VILLAR et al., 1984)
		<i>A. dioica</i>	Folhas	(FORMAGIO et al., 2013)
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(LAGE et al., 2014)
26	Hiperina / Quercetina-3-O- β -D-galactopiranosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
		<i>A. cherimolia</i>	Folhas	(RAJU et al., 2015)
		<i>A. nutans</i>	Folhas	(SILVA et al., 2015b)
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. squamosa</i>	Folhas	(KOTKAR et al., 2002)
		<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
		<i>A. cherimolia</i>	Folhas	(RAJU et al., 2015)
		<i>R. dolabripetala</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
27	Isoquercitrina / Quercetina-3-O-glicopiranosídeo	<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. tomentosa</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. warmingiana</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. monticola</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(LAGE et al., 2014)
28	Quercetina-3-O- β -L-arabinopiranosídeo	<i>A. cherimolia</i>	Folhas	(RAJU et al., 2015)
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
29	Petalosídeo / Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosil (1 \rightarrow 6)-O- α -L-arabinosídeo	<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(LAGE et al., 2014)
		<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(OLIVEIRA et al., 2017b)
30	Quercetina-3-O- β -(6''-O- β -glicosil)-glicosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)

		<i>R. dolabripetala</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. warmingiana</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
31	Quercetina-3-O-arabinosil-galactosídeo	<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
32	Quercetina-3-O-galactosil-glicosídeo	<i>R. dolabripetala</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
33	Quercetina-3-O-β-D-apiofuranosil-(1→2)-galactopiranosil	<i>A. nutans</i>	Folhas	(SILVA et al., 2015b)
34	Quercetina-3-β-robinobiosídeo / Quercetina-3-O-β-(6"-O-α-ramnosil)-galactosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
		<i>A. monticola</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
35	Quercetina-3-O-arabinosil-arabinosídeo	<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
36	Quercetina-3-O-galactosil-ramnosídeo	<i>A. crassiflora</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
37	Quercetina-3-O-glicosil-ramnosídeo	<i>A. warmingiana</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
		<i>A. monticola</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)*
38	Quercetina-3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo	<i>A. warmingiana</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
39	Isoramnetina-3-O-ramnosídeo	<i>A. purpurea</i>	Folhas	(CHANG et al., 1998)
40	Isoramnetina-3-O-β-glicosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
		<i>A. monticola</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
41	Cacticina / Isoramnetina-3-O-β-galactosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
		<i>A. nutans</i>	Folhas	(SILVA et al., 2015b)
42	Isoramnetina-3-O-galactosil-galactosídeo	<i>A. monticola</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
43	Narcissina / Isoramnetina-3-O-β-(6"-O-α-ramnosil)-glicosídeo / Isoramnetina 3-O-rutinosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
		<i>A. monticola</i>	Folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)
44	Keioside / Isoramnetina-3-O-β-(6"-O-α-ramnosil)-galactosídeo	<i>A. coriacea</i>	Folhas	(NOVAES et al., 2018)
45	Tamarixetina-3-O-ramnosídeo	<i>A. purpurea</i>	Folhas	(CHANG et al., 1998)
46	Miricetina-3-O-galactosídeo	<i>A. squamosa</i>	Folhas	(KOTKAR et al., 2002)

*estruturas não confirmadas pelos autores.

Figura 11: Estruturas dos flavonoides isolados em *Annona* de 1984 a 2018.



3.7 Cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS)

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) ou *High Performance Liquid Chromatography* (HPLC - sigla em inglês) é uma técnica que sem dúvida teve grande evolução no que tange a equipamentos e colunas cromatográficas. Melhorando assim, a eficiência nas análises, além de permitir o acoplamento a outros equipamentos (técnicas hífenadas) que possibilitam resultados mais completos do analito.

O uso de solventes especiais e ultrapuros, detectores seletivos e sensíveis, partículas da fase estacionária extremamente pequenas, desenvolvimento de bombas para líquidos de alta precisão e exatidão a pressões de até 3000 psi, são alguns desses avanços (CIOLA, 1998). Dentre os avanços mais recentes, temos a Cromatografia Líquida de Ultra Eficiência (CLUE) ou *Ultra Performance Liquid Chromatography* (UPLC – sigla em inglês), que também pode ser encontrada na literatura sob a nomenclatura de UHPLC – *Ultra-High Performance Liquid Chromatography* que mostra um avanço na área tecnológica e a promoção da química verde, proporcionando nas suas análises, menor uso de solventes e menor produção de resíduos (MALDANER et al., 2012). Uma análise das características de cada uma dessas técnicas é resumida na Tabela 5.

Tabela 5: Principais características entre HPLC e UPLC.

	HPLC	UPLC / UHPLC
Colunas Cromatográficas	15-20 cm de comprimento 2-5 mm de diâmetro interno	5-10 cm de comprimento 1-2,1 mm de diâmetro interno
Partículas de FE	3 - 5 μm	$\leq 2 \mu\text{m}$
Fase estacionária	Sílica, Alumina, C18, C8, fenil, ciano e grupos polares	C18, C8, fenil, ciano e grupos polares
Pressão	100-200 bar (~1400-3000 psi)	400-1000 bar (~6000-15000 psi)
Detectores	UV-VIS, arranjo de diodos (DAD), massas (LC-MS), fluorescência, índice de refração, eletroquímicos	UV-VIS, arranjo de diodos (DAD), massas (LC-MS)

Fonte: (CIOLA, 1998; MALDANER et al., 2012; PORTO, 2014).

São diversas as vantagens da UPLC em relação à HPLC. Duas vantagens estão diretamente relacionadas as altas velocidades que a fase móvel pode chegar devido as altas pressões: a detectabilidade e a diminuição do tempo de análise. Além dessas, há outras como: economia das fases estacionárias e móveis, pequeno volume de amostra, facilidade de transferência de um método desenvolvido por HPLC para

UPLC, grande variedade de colunas e equipamentos, e menor geração de resíduos (MALDANER et al., 2012). O espectrômetro de massas atua como um detector capaz de fornecer informações sobre as substâncias eluídas pela coluna cromatográfica. Na Tabela 6 são mostrados os tipos mais descritos na literatura.

Tabela 6: Principais métodos de ionização, analisadores de massas e detectores de um espectrômetro de massas.

Métodos de ionização	Analisador de massas	Detectores
Electrospray – ESI – <i>Electrospray Ionization</i>	Quadrupolo	Multiplicação de elétrons – EM – <i>Electron Multiplier</i>
Ionização Química à Pressão Atmosférica – APCI – <i>Atmospheric Pressure Chemical Ionization</i>	Tempo de Voo – TOF – <i>Time-of-Flight</i>	Chapas Fotográficas
Ionização por Fótons à Pressão Atmosférica – APPI – <i>Atmospheric Pressure Photon Ionization</i>	<i>Ion trap</i>	Detector de Faraday

Fonte: (LANÇAS, 2009).

As fontes que mostram melhor desempenho no acoplamento LC-MS são as que realizam a ionização à pressão atmosférica, dentre elas, a ESI é a mais empregada. Durante o processo de ionização da amostra, podem ser gerados moléculas protonadas ($[M+H]^+$) ou desprotonadas ($[M-H]^-$), nos chamados modos de ionização positivo ou negativo, respectivamente. De modo geral, no modo positivo são analisadas substâncias com grupamentos básicos, como aminas, amidas e ésteres. Já no modo negativo são frequentemente analisadas substâncias com funções ácidas, como ácidos carboxílicos e fenóis (CROTTI et al., 2006). A ESI é mais adequada para análises de substâncias polares e de média polaridade, com massa molecular elevada e funciona muito bem em fase reversa (RP), ou seja, fase estacionária apolar como C8 e C18 (LANÇAS, 2009).

O detector tem a função de registrar a carga induzida ou a corrente produzida quando um íon atravessa ou atinge uma superfície. Atualmente os detectores mais usados são os baseados na multiplicação de elétrons (EM). As características que devem possuir são: resposta a uma ampla faixa de massas, baixo ou nenhum ruído, alta estabilidade, resposta independente da massa, detecção simultânea e resposta rápida (LANÇAS, 2009).

É importante ressaltar que as experiências com espectrometria de massas podem ocorrer de forma sequencial a partir da fragmentação por dissociação induzida

por colisão (CID), que é capaz de fornecer informações relevantes para a elucidação estrutural. Durante a análise, alguns íons precursores são selecionados, e em seguida fragmentados na célula de colisão do MS por CID gerando espectros de MS/MS ou MS². Essa informação permite a interpretação dos padrões de fragmentações características como eliminação de água, CO, CO₂, NH₃, por exemplo, e/ou comparação com espectros existentes em bancos de dados (PRATA et al., 2016).

A Cromatografia Líquida acoplada a Espectrometria de Massas (LC-MS) junto a espectrometria de massas sequencial (MSⁿ), deram origem a análises denominadas de desreplicação, muito usada na química de produtos naturais para amostras complexas. A desreplicação baseia-se num processo de triagem (*screening*) de extratos com o objetivo de identificar e/ou negatizar substâncias presentes com auxílio de padrões e o uso associado a bancos de dados robustos como *Chapman & Hall's Dictionary of Natural Products*, *Chemical Abstracts Service's NAPRALERT*, *METLIN* e *MassBank*, por exemplo (FARIAS, 2014; SILVA et al., 2012). A aplicação da desreplicação, não só ajuda a identificar substâncias já conhecidas, como permite priorizar o isolamento de substâncias (PETTA, 2008).

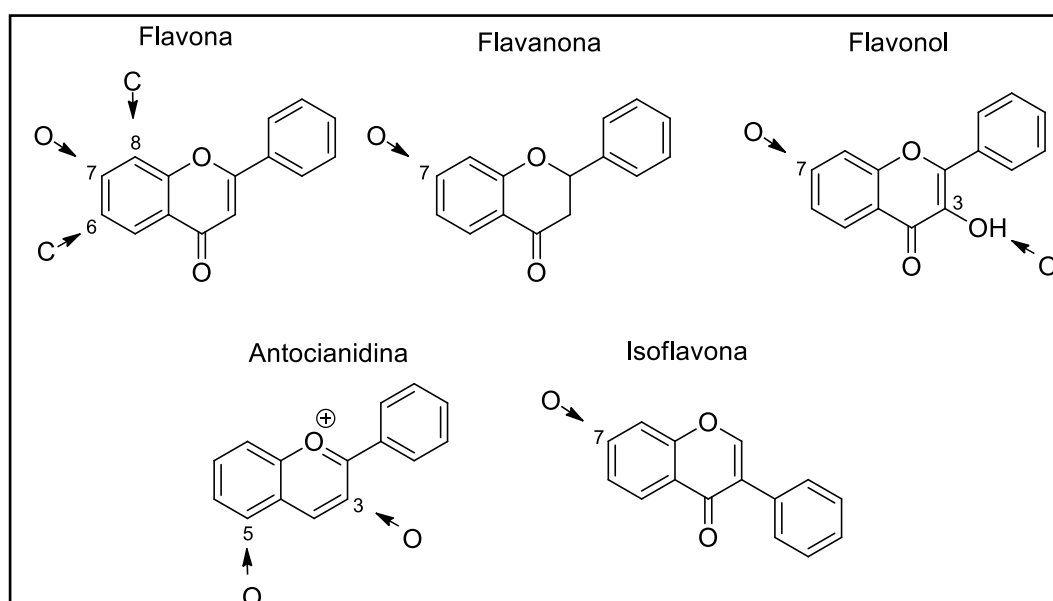
As vantagens relacionadas às técnicas hífenadas, como a LC-MS fizeram com que estudos em produtos naturais para a determinação do perfil químico de espécies, crescessem significativamente.

3.8 Estudos de flavonoides em *Annona* por LC-MS

A análise estrutural de flavonoides necessita de técnicas analíticas avançadas como espectrometria de RMN, MS e/ou cristalografia de raio-X, e todas requerem amostras adequadamente purificadas e em grande quantidade. Além disso, são difíceis de isolar devido à complexidade de substâncias presentes nos extratos. Portanto, as técnicas hífenadas como LC-MS ou LC-RMN ajudam a contornar essas desvantagens. LC-MS é uma técnica com metodologia rápida, com alta sensibilidade e demanda pouca quantidade de amostra (VUKICS e GUTTMAN, 2010).

De forma geral, nas plantas, o tipo de flavonoide mais encontrado são os glicosilados, podendo ser O-glicosídeo ou C-glicosídeo. A diferença é que a unidade de açúcar está ligada ao átomo de oxigênio do grupo hidroxil da aglicona em O-glicosídeos, enquanto que em C-glicosídeos a unidade de açúcar está diretamente ligada à cadeia carbônica por uma ligação C-C. Na Figura 12 a seguir são mostradas as posições que predominam a ligação das unidades de açúcar em algumas subclasses de flavonoides que são encontradas no gênero *Annona*. Observa-se que nas posições C-3 e C-7 predominam os flavonoides O-glicosilados e nas posições C-6 e C-8 os flavonoides C-glicosilados (VUKICS e GUTTMAN, 2010).

Figura 12: Posições que predominam a ligação das unidades de açúcar.



Fonte: (VUKICS e GUTTMAN, 2010).

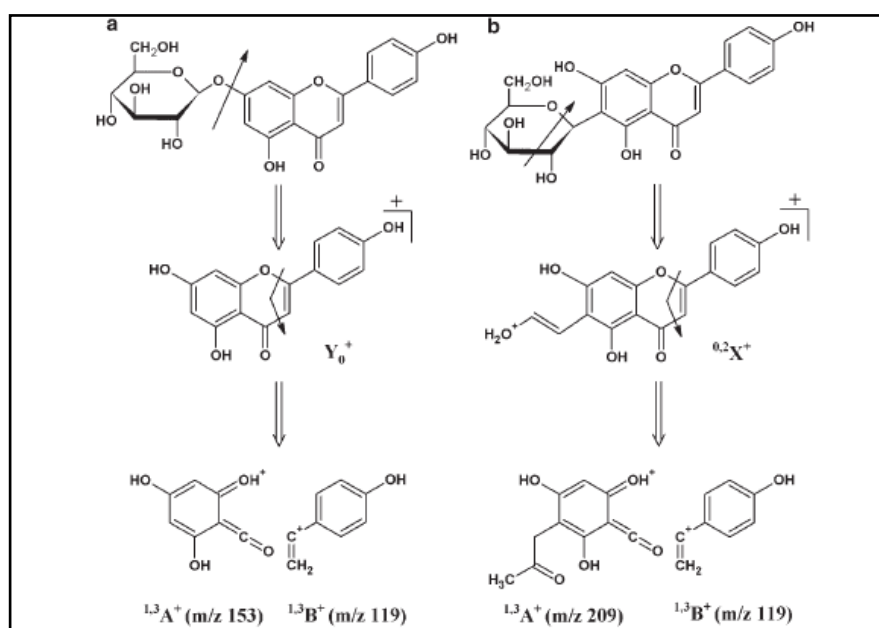
Em uma análise por espectrometria de massas a unidade de açúcar é a primeira parte a ser fragmentada. No caso dos flavonoides O-glicosilados é necessária baixa energia para quebrar a ligação hemiacetal C-O, isso faz com que normalmente haja a liberação da unidade de açúcar inteira, por exemplo, as perdas de hexose (162 u), desoxiexose (146 u) e pentose (132 u). Já nos flavonoides C-glicosilados uma alta energia é necessária para romper a ligação forte C-C, com predominância de fragmentação intraglicosídica. Nesse caso é característico observar fragmentos das unidades de açúcar junto a perdas de moléculas de água (18 u), CO (28 u) e/ou CO₂ (44 u) (CUYCKENS e CLAEYS, 2004).

A partir da revisão bibliográfica realizada neste trabalho (Tabela 4, p. 18) verificou-se que do total de flavonoides isolados até o momento no gênero *Annona*, aproximadamente 76% deles são flavonóis O-glicosídeos.

3.8.1 Fragmentação de flavonoides glicosilados

De forma resumida, a Figura 13 representa a sequência de fragmentações que acontecem normalmente com flavonoides do tipo C e O-glicosídeos. Inicialmente, ocorre a fragmentação glicosídica ou intraglicosídica e, em seguida, as fragmentações na molécula da aglicona.

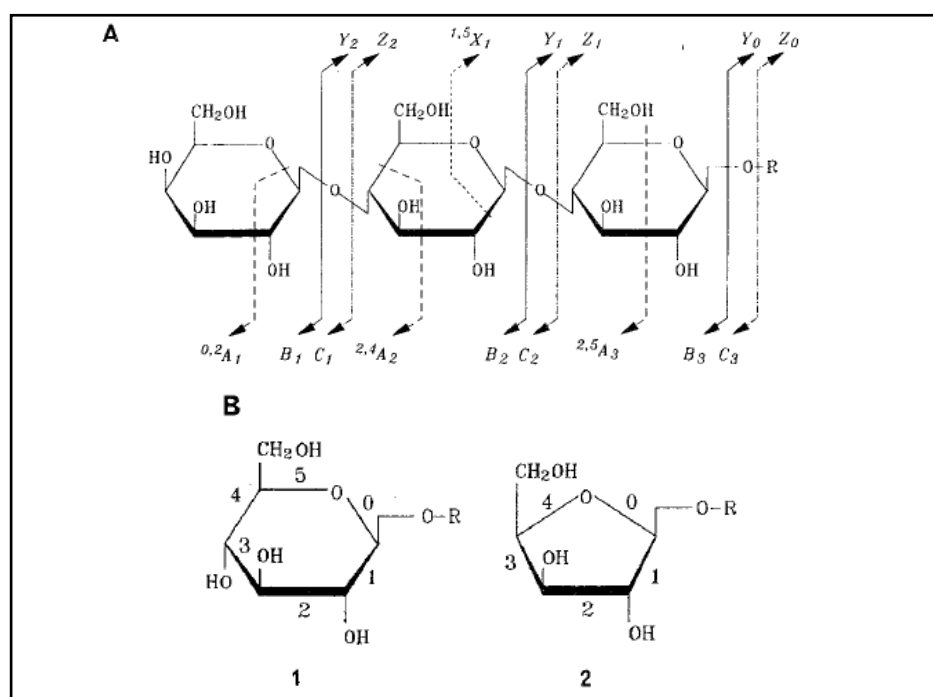
Figura 13: Sequência de fragmentações em flavonoides O e C-glicosídeos, respectivamente.



Fonte: (VUKICS e GUTTMAN, 2010).

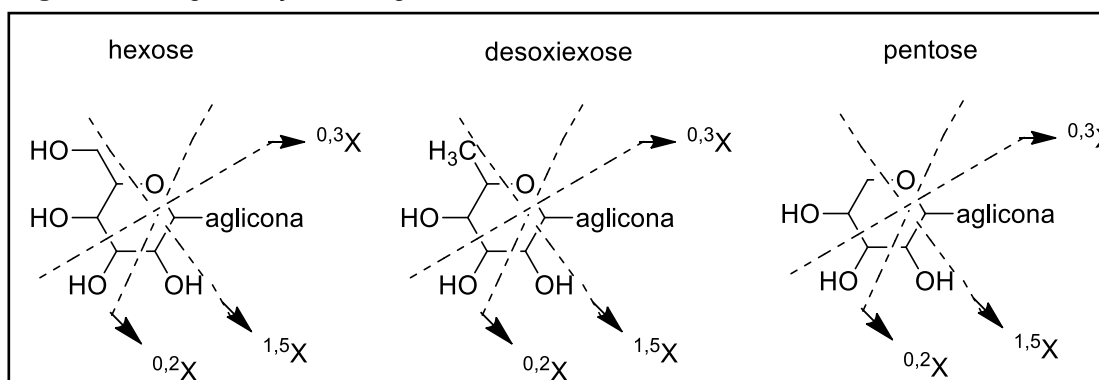
Domon e Costello (1988), elaboraram uma nomenclatura para fragmentação de açúcares que é aceita e utilizada até hoje. Na Figura 14 estão representadas as posições em que ocorrem fragmentações na unidade de açúcar. As letras A, B, C são fragmentos da unidade de açúcar (de acordo com a seta); as letras X, Y e Z são fragmentos da unidade da aglicona (de acordo com a seta); os números sobrescritos são referentes a quebra de ligações intraglicosídicas; já os números subscritos são de acordo com a quantidade de unidade de açúcar.

Figura 14: **A:** nomenclatura das fragmentações; **B:** numeração das ligações glicosídicas em hexose e pentose, respectivamente.



Fonte: (DOMON e COSTELLO, 1988).

Os fragmentos A, B e C possuem diferentes valores de m/z para cada tipo de unidade de açúcar, suas massas podem ser deduzidas através da diferença de massas dos fragmentos X, Y e Z. Isso ajuda na identificação da unidade de açúcar, já que não se obtém informações a respeito da estereoquímica deles por análises LC-MS (VUKICS e GUTTMAN, 2010). As fragmentações intraglicosídicas são diversas e na Figura 15 e Tabela 7 são representados os tipos que podem ocorrer em C e O-glicosídeos.

Figura 15: Fragmentações intraglicosídicas.

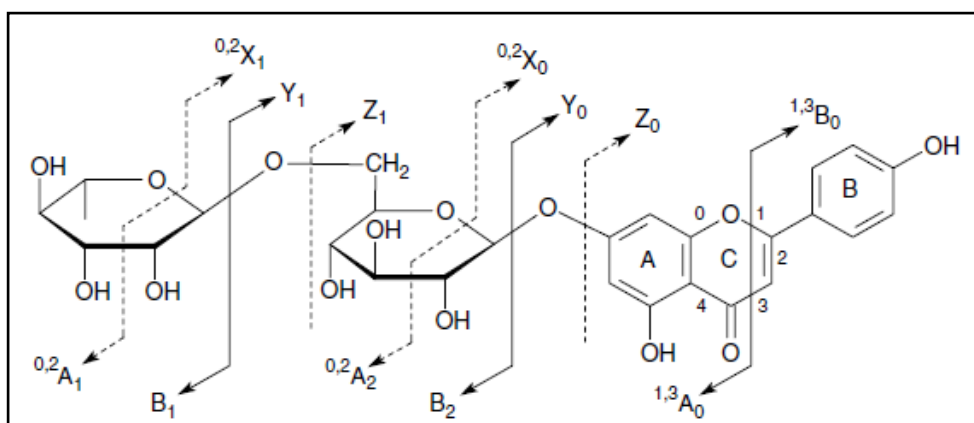
Fonte: (CUYCKENS e CLAEYS, 2004).

Tabela 7: Perda de massas características de C e O-glicosídeos.

Fragmentos	Hexoses	Desoxiexoses	Pentoses
$^{0,1}X$	$[M \pm H - 150]$	$[M \pm H - 134]$	$[M \pm H - 120]$
$^{0,2}X$	$[M \pm H - 120]$	$[M \pm H - 104]$	$[M \pm H - 90]$
$^{0,3}X$	$[M \pm H - 90]$	$[M \pm H - 74]$	$[M \pm H - 60]$
$^{1,5}X$	$[M \pm H - 134]$	$[M \pm H - 120]$	$[M \pm H - 104]$
$^{2,3}X - 2H_2O$	$[M \pm H - 66]$	$[M \pm H - 66]$	-
$^{0,4}X - 2H_2O$	$[M \pm H - 96]$	$[M \pm H - 80]$	$[M \pm H - 66]$
$^{0,2}X - H_2O$	$[M \pm H - 138]$	$[M \pm H - 122]$	$[M \pm H - 108]$
$^{0,2}X - 2H_2O$	$[M \pm H - 156]$	$[M \pm H - 140]$	$[M \pm H - 126]$
$^{2,3}X - 3H_2O$	$[M \pm H - 84]$	$[M \pm H - 84]$	-
Y	$[M \pm H - 162]$	$[M \pm H - 146]$	$[M \pm H - 132]$
Z	$[M \pm H - 180]$	$[M \pm H - 164]$	$[M \pm H - 150]$

Fonte: (VUKICS e GUTTMAN, 2010).

A nomenclatura dada para a fragmentação da aglicona, ou seja, o flavonoide livre é sugerido por Ma e colaboradores (1997). Na Figura 16 a seguir essa nomenclatura é apresentada onde os íons designados com as letras A e B são fragmentos de íons que contém os anéis A e B do esqueleto flavonoídico intactos. Os números sobrescritos indicam o número das ligações quebradas no anel C. As informações obtidas a partir dos íons fragmentados do anel C são muito importantes, pois ajudam a descobrir o número e a natureza dos substituintes dos anéis A e B. As fragmentações no anel C podem ser nas posições 1/2, 0/2, 0/3, 0/4 ou 2/4 via reações retro-Diels-Alder (VILLIERS et al., 2016).

Figura 16: Nomenclatura dos tipos de fragmentações.

Fonte: (CUYCKENS e CLAEYS, 2004).

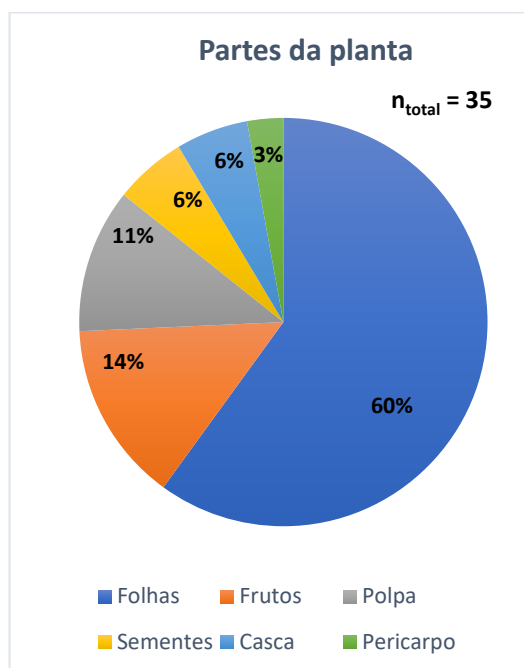
As fragmentações observadas a partir da quebra de ligações no anel C geram pequenas perdas moleculares como por exemplo das moléculas de H₂O (18 Da), CO (28 Da), C₂H₂O (42 Da), CO₂ (44 Da). Mas essas perdas não são determinantes para a diferenciação das classes de flavonoides (VUKICS e GUTTMAN, 2010).

3.8.2 Estudos em *Annona*

Diante da importância das técnicas hífenadas na identificação de flavonoides e considerando essa classe como um dos marcadores quimiotaxonômicos da família Annonaceae, foi realizado um levantamento bibliográfico no gênero *Annona*. Nessa revisão foi utilizado o site de busca *Scifinder*. Para isso, na busca usaram-se as palavras chaves *Annona*, *flavonoids*, *HPLC* e *UPLC*. O primeiro artigo encontrado é do ano de 2000 e a pesquisa foi realizada até final de 2018. Somam 29 referências de estudos por LC-MS de flavonoides no gênero *Annona* (Tabela 8, p. 33).

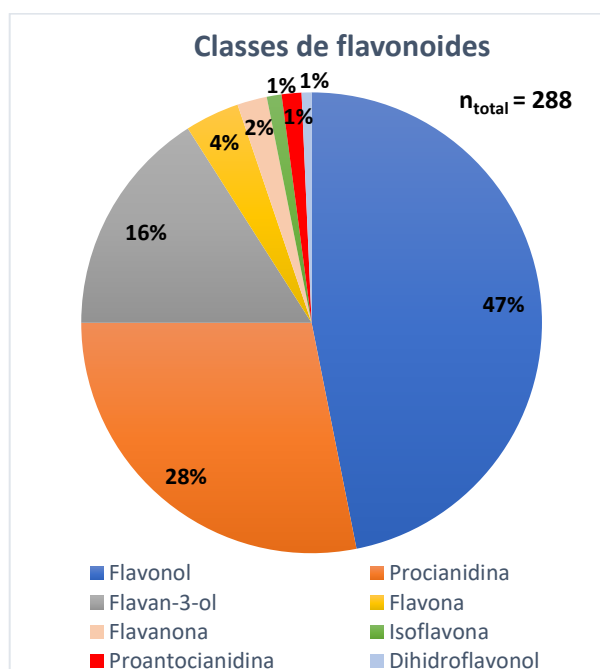
As Figuras 17 e 18 a seguir resumem os dados da Tabela 8, com relação as partes da planta e classes de flavonoides identificados por LC-MS em *Annona*.

Figura 17: Representativo das partes da planta identificados por LC-MS em espécies do gênero *Annona*.



n: número total de citações das partes da planta que tiveram flavonoides identificados.

Figura 18: Representativo das classes de flavonoides identificados por LC-MS em espécies do gênero *Annona*.



n: número de ocorrência.

Os dados apresentados na Tabela 8 (p. 33) e Figuras 17 e 18, dos artigos analisados 12 espécies do gênero *Annona* são citadas, sendo *A. muricata* e *A. cherimola* as mais estudadas. A maior parte dos flavonoides identificados nessas espécies foram das folhas (60%) e frutos (14%). As classes de flavonoides mais relatadas foram os flavonóis (47%, no qual 42% são glicosilados), procianidinas (28%) e flavan-3-óis (16%).

De acordo com a Tabela 8 pode-se verificar que a maioria dos trabalhos citam o uso exclusivo da fase reversa (RP-LC), no qual a maioria das análises de RP-LC são realizadas utilizando colunas de octadecil C18. Dos sistemas mais usados, a fase móvel contém uma fase aquosa e uma fase orgânica com metanol e acetonitrila, onde aproximadamente 70% são sistemas acidificados, geralmente com ácido acético ou ácido fórmico, que ajudam a suprimir a ionização dos flavonoides além de aumentar a retenção. Os detectores mais usados em LC são o arranjo de diodo (DAD) e o espectrômetro de massas (MS); e o tipo de ionização a pressão atmosférica mais usada é o ESI no modo negativo apresentando maior sensibilidade.

No estudo realizado por Sousa et al. (2015), que sumariza os flavonoides isolados/identificados na família Annonaceae, verifica-se que a maioria no gênero *Annona* encontra-se na forma de glicosídeos, sendo 29 flavonóis (28 flavonóis glicosilados), 1 flavona glicosilada e 1 flavan-3-ol. Os dados aqui levantados corroboram com este perfil, no qual, flavonóis glicosilados são a classe predominante no gênero *Annona*.

Tabela 8: Estudos por LC-MS de flavonoides no gênero *Annona*.

LC-MS			Flavonoides	Espécie / parte da planta	Referências
Equipamento	Fase estacionária (coluna e dimensões da partícula), fluxo, temperatura	Fase móvel (v/v)			
HPLC-PDA-ESI (-/+)-Quad-MS	Luna C18 (25 cm x 4.6 mm, 5 µm), 1.0 mL/min, 22 °C	0,1% AF:ACN 85:15 - 40 min até alcançar AF:ACN 30:70 e retorna para condições iniciais em 5 min	Luteolina / Quercetina	<i>A. sylvatica</i> / folhas	(ARAUJO et al., 2014)
HPLC-ESI(-)-triQ-TOF-MS/MS	Shim-pack XR-ODS III (150 x 2.0mm, 2.2 µm), 0.40 mL/min, 40 °C	A: 0,1% AF em H ₂ O; B: MeOH; 0–1 min, 5% B; 1–4 min, 5–60% B; 4–7 min, 60–70% B; 7–10 min, 70–100% B; 10–10.50 min, 100% B; 10.50–11 min, 100–5% B; 11–15 min, 5% B	Catequina / Epicatequina / Rutina / Quercetina / Naringenina / Apigenina	<i>A. crassiflora</i> / fruto	(ARRUDA et al., 2018)
HPLC-DAD-ESI (-/+)-ITMS	Discovery C18 (250 mm x 4.6 mm, 5 µm), 1.0 mL/min, 30 °C	MeOH/H ₂ O: 10–50% (0–50 min), 50–100% (50–60 min), 100–10% (60–70 min)	Epicatequina / Procianidinas dímeros (4) / Procianidinas trímeros (6)	<i>A. cherimola</i> / polpa do fruto	(BARRECA et al., 2011)
UPLC-PDA-ESI (-)-MS/MS	Waters Atlantis T3 (50 x 4.6 mm, 3 µm), 30 °C	A: 0,2% AA em H ₂ O; B: 0,2% AA em ACN; 0 min, 2% B; 4.5 min, 22% B; 6.5 min, 22% B; 7.5 min, 90% B; 8.5 min, 90% B; 9.5 min, 2% B; 11 min, 2% B	Catequina / Epicatequina / Epigalocatequina galato / Diidroxiquercetina / Procianidina B2 / Procianidina trímero	<i>A. squamosa</i> / polpa do fruto	(BASKARAN et al., 2016)
HPLC-UV	C18, 1.0 mL/min	30% ACN e 70% tampão de fosfato 0.025M, pH 2.5	Kaempferol	<i>A. muricata</i> / folhas	(BATUBARA et al., 2015)
HPLC-ESI-TOF-MS	Poroshell 120 EC-C18 (4.6 mm x 100 mm, 2.7 µm), 0.8 mL/min, 25 °C	A: 1% AA; B: ACN; 0 min, 0.8% B; 2.5 min, 0.8% B; 5.5 min, 6.8% B; 11 min, 14.4% B; 17 min, 24% B; 22 min, 40% B; 26 min, 100% B, 30 min, 100% B; 32 min, 0.8% B; 34 min, 0.8% B	Procianidina dímero tipo B (6) / Procianidina trímero tipo B (3) / Procianidina tetramero tipo B (2) / Procianidina dímero tipo A / Catequina / Epicatequina / Quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-glicosídeo (2) / Calabricosídeo A (2) / Rutina (2) / Quercetina hexosídeo (2) / Catequina diglicopiranosídeo / Catequina	<i>A. cherimola</i> / folhas	(DÍAZ-DE-CERIO et al., 2018)

			diglicopiranosídeo / Kaempferol hexosídeo (2) / Kaempferol 3-O-β-D-(6"-O-p-coumaroil) galactopiranosídeo (3)		
RP-HPLC-ESI(-)-QTOF-MS/MS	Hypersil ODS (250 x 4.6 mm, 5.0 mm)	-	Catequina / Epicatequina / Proantocianidinas (procianidina tipo B)	<i>A. cherimola</i> / pericarpo	(CHAI et al., 2017)
HPLC-DAD-ESI (-/+)-Duo ion trap-MS/MS	LiChroCARTs 250-4 LiChrosphers 100 RP-18 (250 x 4.0 mm, 5.0 μm), 1.0 mL/min	A: 0,05% TFA; B: MeOH; 0 min - 80% A, 20% B; 20 min - 20% A, 80% B; 25 min - 20% A, 80% B	Rutina xilosídeo / Rutina / Kaempferol-3-O-rutinosídeo	<i>A. cherimola</i> / folhas	(FALÉ et al., 2013)
LC-DAD-MS MALDI-MS	-	-	Quercetina-O-dihexosídeo / Quercetin-O-hexosil-pentosídeo / Rutina / Quercetina-3-O-β-glicopiranosídeo / Kaempferol-O-deoxihexosil-hexosídeo / Kaempferol-O-hexosídeo / Quercetina-O-pentosídeo / Kaempferol-O-pentosídeo / Catequina / Epicatequina / Procianidina dímero tipo A (4) / Procianidina dímero tipo B (3) / Procianidina trímero tipo B (5) / Procianidina trímero tipo A (2)	<i>A. crassiflora</i> / folhas	(FERRAZ et al., 2017)
LC-PDA	C18 (4.6 mm x 25 cm, 5 μm), 1.0 mL/min, 22 °C	A: acetato de sódio 2 mM; B: ACN; 10% B - 10 min; 15% B - 5 min; 100% B - 15 min	Rutina	<i>A. crassiflora</i> / sementes	(FORMAGIO et al., 2015)
HPLC	C18 (4.6 x 50 mm, 5 mm), 1.0 mL/min, 35 °C	A: 50 mM fosfato de sódio em 10% MeOH, pH 3.3; B: 70% MeOH; 0-15 min 100% A; 15-45 min 70% A; 45-65 min 65% A; 65-70 min 60% A; 70-95 min 50 % A; 95-100 min 0 % A	Luteolina / Homoorientina / Quercetina / Tangeretina / Genisteina / Gliciteina / (+)-Taxifolina / (+)-Catequina / (+)-Galocatequina / (+)-Epicatequina galato / Daidzeina	<i>A. muricata</i> / folhas	(GEORGE et al., 2015)
HPLC	C18 (4.6 x 50 mm, 5 mm), 1.0 mL/min, 35 °C	A: 50 mM fosfato de sódio em 10% MeOH, pH 3.3; B: 70% MeOH; 0-15 min 100% A; 15-45 min 70% A; 45-65 min 65% A; 65-	Quercetina / Robinetina / Apigenina-6-C-glicosídeo / Vitexina / Luteolina 3',7-di-O-glicosídeo	<i>A. muricata</i> / folhas	(GEORGE et al., 2012)

		70 min 60% A; 70–95 min 50 % A; 95–100 min 0 % A			
HPLC-DAD	C18 Spherisorb ODS2 (25.0 x 0.46 cm, 5 µm), 0.9 mL/min	A: H ₂ O/AF 19:1; B: MeOH; Início 5% B; 15% B - 3 min; 25% B - 13 min; 30% B - 25 min; 35% B - 35 min; 45% B - 39 min; 45% B - 42min; 55% B - 47 min; 75% B - 56 min; 100% B - 60 min	Quercetina-3-O-galactosídeo / Quercetina-3-O-glicosídeo / Quercetina-3-O-rutinosídeo / Kaempferol-3-O-rutinosídeo	<i>A. muricata</i> / folhas	(GROSSO et al., 2015)
HPLC-DAD-ESI (-)-IT/MS	Synergi Hydro-RP C18 (150 x 3.0 mm, 4 µm), 0.4 mL/min, 25 °C	A: 2% AA em H ₂ O; B: 0.5% AA em H ₂ O e MeOH 10:90	Diidrokaempferol-hexosídeo	<i>A. muricata</i> / polpa	(JIMÉNEZ et al., 2014)
HPLC-DAD	C18 (4.6 x 150 mm, 5 µm), 0.6 mL/min	A: 2% AF em H ₂ O; B: ACN; 17% B - 10 min; 20% B - 20 min; 30% B - 30 min; 50% B - 40 min; 60% B - 50 min; 70% B - 60 min; 20% B - 70 min; 10% B - 80 min	Catequina / Epicatequina / Rutina / Quercitrina / Quercetina / Luteolina	<i>A. coriacea</i> / folhas	(JUNIOR et al., 2016)
HPLC-ESI(-)-MS/MS	Shimadzu Shimpack XR-ODS III (150 x 2 mm, 5 µm), 0.35 mL/min	A: 0,1% AF em H ₂ O; B: 0,1% AF em ACN; 15–40% (0–7 min); 40–90% (7–8 min); 90–90% (8–9 min); 90–15% (9–10 min)	(Epi)catequina (2) / Procianidinas tipo B2 (2) / Procianidina tipo C1 / Quercetina-3-glicosídeo / Kaempferol-3-O-rutinosídeo / Kaempferol-7-O-glicosídeo	<i>A. crassiflora</i> / casca do fruto	(JUSTINO et al., 2016)
HPLC-ESI(-)-Q-TOF-MS/MS	Agilent Zorbax (50 x 2.1mm, 1.8 µm), 0.35 mL/min	A: 0,1% AF em H ₂ O; B: MeOH; 2% B (0 min); 98% B (0–15 min); 100% B (15–17 min); 2% B (17–18 min); 2% B (18–22 min)	Procianidina tipo B2 (2) / Procianidina tipo C1 (2) / (Epi)catequina (2) / Quercetina-diglicosídeo (2) / Quercetina-glicosil-pentosídeo (2) / Quercetina-glicosídeo / Rutina (2) / Quercetina-ramnosídeo / Kaempferol-ramnosídeo / Quercetina / Quercetina-xilosídeo-rutinosídeo	<i>A. muricata</i> / folhas	(JUSTINO et al., 2018)
UPLC-PDA-ESI(+)/MS	Zorbax Eclipse XDB-C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm), 1.0 mL/min	A: 1% AF em H ₂ O; B: ACN; 95–5% A (0–60 min)	Quercetina-3-O-rutinosídeo / Kaempferol-3-O-rutinosídeo	<i>A. muricata</i> / folhas	(KIM et al., 2016)
HPLC-PDA	Capcell Pak C18 UG120 (250 x 4,6	A: 0,1% TFA em H ₂ O; B: MeOH;	(+)-Catequina / (-)-Epicatequina / Procianidina tipo B1 / Procianidina tipo B2 / Procianidina tipo C1	<i>A. atemoya</i> / fruto	(KUMAZAWA et al., 2007)

	mm, 5 µm), 1.0 mL/min, 30 °C	18% B (0-20 min); 18-22% B (20-25 min); 22% B (25-50 min); 22-100% B (50-80 min)	(-)-Epicatequina / Procianidina tipo B1 / Procianidina tipo B2 / Procianidina tipo C1	<i>A. cherimola</i> / fruto	
HPLC-DAD-ESI (-/+)-MS ⁿ	C18 Spherisorb ODS2 (25.0 x 0.46 cm, 5 µm), 0.92 mL/min	A: 1% AF; B: MeOH; Início 5% B; 15% B - 3 min; 25% B - 13 min; 30% B - 25 min; 35% B - 35 min; 45% B - 39 min; 45% B - 42 min; 55% B - 47 min; 75% B - 56 min; 100% B - 60 min	Catequina / Epicatequina / Procianidina derivado / Catequina derivado / Quercetina-hexosídeo-ramnosil-pentosídeo / Quercetina-di-O-hexosídeo / Quercetina-di-O-hexosídeo / Rutina-O-pentosídeo / Quercetina-3-O-galactosídeo / Quercetina-3-O-glicosídeo / Quercetina-3-O-rutinosídeo / Quercetina-3-O-robinobiosídeo / Quercetina-3-O-pentosídeo / Kaempferol-3-O-hexosídeo / Quercetina-ramnosil-hexosídeo + Kaempferol-ramnosil-hexosídeo / Quercetina-hexosil-ramnosídeo / Quercetina-pentosil-ramnosídeo / Kaempferol-3-O-rutinosídeo	<i>A. muricata</i> / folhas	(MANCINI et al., 2018)
HPLC-DAD	C18 Spherisorb ODS2 (25.0 x 0.46 cm, 5 µm), 0.9 mL/min	A: 5% AF; B: MeOH; Início 5% B; 15% B - 3 min; 25% B - 13 min; 30% B - 25 min; 35% B - 35 min; 45% B - 39 min; 45% B - 42 min; 55% B - 47 min; 75% B - 56 min; 100% B - 60 min	Quercetina-3-O-galactosídeo / Quercetina-3-O-glicosídeo / Quercetina-3-O-rutinosídeo / Kaempferol-3-O-rutinosídeo / Quercetina / Kaempferol	<i>A. muricata</i> / folhas	(OLIVEIRA et al., 2017a)
HPLC-DAD	C18 ODS (250 x 4.6 mm, 5 µm), 1.0 mL/min	MeOH/H ₂ O 93:7	Quercetina	<i>A. squamosa</i> / sementes	(PANDA e KAR, 2007)
HPLC-DAD	C18 (4,6 mm x 25 cm, 5 µm), 30 °C	A: 0.6% tampão ortofosfato monossódico; B: ACN	Rutina (3) / Isoquercetrina (2) / Epicatequina (2) / Catequina derivado (2)	<i>A. senegalensis</i> / folhas	(POTCHOO et al., 2008)
HPLC-DAD	C18 (4.6 mm x 250 mm, 5 µm), 1.0 mL/min	A: ACN; B: AA; 9% A - 10 min; 25% A - 11 min; 70% A - 16 min; 9% A - 31 min	Catequina / Epicatequina	<i>A. squamosa</i> / fruto	(RAMALHO et al., 2014)
HPLC-DAD	LiChrospher 100 RP-18 (250 x 4 mm, 5 mm), 1.0 mL/min, 40 °C	A: 0.1% H ₃ PO ₄ em H ₂ O; B: 0.1% H ₃ PO ₄ em ACN; 5% B (0 min); 95% B (60 min); 10 min eluição isocrática	Flavonoides	<i>A. crassiflora</i> / folhas	(RIBEIRO et al., 2018)

HPLC-DAD-ESI (-)-QTOF-MS	Poroshell 120 EC-C18 (4.6 x 100 mm, 2.7 µm), 0.8 mL/min, 25 °C	A: 0,5% AA; B: ACN; 0 min, 5% B; 2 min, 7% B; 4 min, 9% B; 7 min, 12% B; 8 min, 15% B; 9 min, 16% B; 12 min, 18% B; 14 min, 20% B; 15 min, 22% B; 16 min, 25% B; 18 min, 28% B; 19 min, 30% B; 20 min 31% B; 21.50 min, 32% B; 25 min, 100% B; 30 min, 100% B; 32 min, 5% B.	<u>Polpa</u> : Luteolina-glicopiranosídeo / Procianidina dímero tipo A (1) / Procianidina dímero tipo B (5) / Procianidina trímero tipo B (2) / Procyinidina tetramero tipo B (3) / Catequina/ Epicatequina; <u>Casca</u> : Procianidina dímero tipo A (2) / Procianidina dímero tipo B (5) / Procianidina trímero tipo B (3) / Procianidina tetrameri tipo B (4) / Catequina / Epicatequina / Calabricosídeo A (2) / Rutina (2) / Quercetina hexosídeo / Catequina di-glicopiranosídeo (2) / Hesperidina; <u>Sementes</u> : Procianidina dímero tipo B (3) / Procianidina trímero tipo B (1) / Catequina / Epicatequina / Rutina (2) / Neoferocitrina / Hesperidina / Neoponcirina / Miconiosídeo A	<i>A. cherimola</i> / Polpa, casca e sementes	(GARCÍA-SALAS et al., 2015)
HPLC-DAD-ESI (-)-MS ⁿ	Phenomenex Gemini C18 (250 x 3.0 mm, 5 µm), 0.4 mL/min	A: ACN; B: 0,1% AA; 25% A (10 min); 25% A (20 min); 50% A (40 min); 100% A (42–47 min); 20% A (49–55 min)	Proantocianidina dímero tipo B (3) / Catequina / Rutina / Quercetina-3-O-hexosídeo / Quercetina-3-O-glicuronídeo	<i>A. cherimola</i> / fruto	(SPÍNOLA et al., 2015)
HPLC-DAD	C18 (250 x 4.6 mm, 5 µm), 0.7 mL/min	A: 1% AF em H ₂ O; B: ACN; 13% B - 10 min; 20% B – 20 min; 30% B – 30 min; 50% B-40 min; 60% B – 50 min; 70% B – 60 min; 20% B – 70 min; 10% B – 80 min	Catequina / Epicatequina / Rutina / Isoquercitrina / Quercitrina / Quercetina / Kaempferol	<i>A. muricata</i> / folhas	(SOUZA et al., 2018)
HPLC-ESMS	Spherosil ODS II (125 x 4.0 mm, 5 µm), 0.5 mL/min	A: ACN; B: 1% AA; 20:80 por 10 min; 40:60 por 8 min; 75:25 por 10 min e 100% de A por 2 min	Kaempferol-3-O-galactosídeo / Kaempferol-3-O-glicosídeo / Kaempferol-3-O-arabinose-glicosídeo* / Kaempferol -3-O-galactosil-glicosídeo / Kaempferol -3-O-glicosil-glicosídeo / Quercetina-3-O-galactosídeo / Quercetina-3-O-glicosídeo / Quercetina-3-O-arabinosídeo /	<i>A. crassiflora</i> / folhas	(SANTOS e SALATINO, 2000)

			<p>Quercetina-3-O-arabinosil-galactosídeo / Quercetina-3-O-arabinosil-arabinosídeo / Quercetina-3-O-galactosil-ramnosídeo / Quercetina-3-O-ramnosil-glicosídeo</p>		
			<p>Quercetina-3-O-ramnosil-glicosídeo* / Quercetina-3-O-glicosídeo / Quercetina-3-O-ramnosil-galactosídeo / Quercetina-3-O-glicosil-ramnosídeo* / Isoramnetina-3-O-β-glicosídeo / Isoramnetina-3-O-galactosil-galactosídeo / Isoramnetina-3-O-ramnosil-glicosídeo</p>	<i>A. monticola</i> / folhas	
			<p>Kaempferol -3-O-ramnosil-glicosídeo / Quercetina-3-O-glicosídeo / Quercetina-3-O-ramnosídeo / Quercetina-3-O-glicosil-glicosídeo / Quercetina-3-O-glicosil-ramnosídeo / Quercetina-3-O-glicosídeo-7-O-glicosídeo / Quercetina-3-O-ramnosil-glicosídeo / Quercetina-3-O-ramnosil-ramnosídeo</p>	<i>A. warmingiana</i> / folhas	
			<p>Luteolina-7-O-glicosídeo / kaempferol-3-O-ramnosil-glicosídeo / quercetina-3-O-glicosídeo / quercetina-3-O-ramnosil-glicosídeo</p>	<i>A. tomentosa</i> / folhas	
			<p>Kaempferol-3-O-glicosídeo / kaempferol-3-O-galactosil-glicosídeo* / Kaempferol -3-O-glicosil-glicosídeo / quercetina-3-O-glicosídeo / quercetina-3-O-galactosil-glicosídeo / quercetina-3-O-glicosil-glicosídeo / quercetina-3-O-ramnosil-glicosídeo / quercetina-3-O-ramnosil-glicosídeo</p>	<i>A. dolabripetala</i> / folhas	

ACN (Acetonitrila); MeOH (Metanol); H₂O (Água); AF (Ácido fórmico); AA (Ácido acético); TFA (Ácido trifluoracético).

O número entre parênteses representa as mesmas substâncias identificadas.

*estruturas não confirmadas pelos autores.

3.9 Atividades biológicas

Até o século XIX, os metabólitos secundários extraídos de plantas vegetais na forma de chás e infusões eram os mais utilizados pela população como uso medicinal. A partir do século XX, as universidades e indústrias farmacêuticas começaram a mostrar interesse no estudo desse conhecimento popular, a fim de obter, a partir dos produtos naturais, os princípios ativos e identificar seus potenciais biológicos (BERNARDES et al., 2017).

Ainda hoje os produtos naturais são fonte de pesquisa devido as suas atividades biológicas que favorecem a economia e aumentam a qualidade de vida dos seres humanos.

No trabalho de Costa (2009) são apresentados exemplos de espécies da família Annonaceae usadas na medicina popular e responsáveis por diversas propriedades farmacológicas significativas para a humanidade, tais como: antitumoral, antimicrobiana, anticonvulsiva, antiprotozoário, anti-agregação plaquetária, tripanomicida, anti HIV, antimalarial, antidiabética, antihelmíntica, antiviral, antifúngica e antileishmania. Além dessas, destacam-se outras propriedades como potencial inseticida, larvicida e pesticida.

Na literatura pode-se encontrar diversos estudos biológicos com espécies do gênero *Annona*. De acordo com um levantamento bibliográfico realizado por Paes (2016), das 120 espécies no gênero, apenas 26 já foram estudadas biologicamente até o ano de 2015. As atividades biológicas mais relatadas em espécies desse gênero são: pesticida, citotóxica, antitumoral, antidepressiva, larvicida, antioxidante, antiparasitária, ansiolítica, antifúngica, antinociceptiva, moluscida, anticonvulsivante, anti-inflamatória, bactericida, entre outras.

Paes (2016) também avaliou a atividade citotóxica frente as linhagens de células neoplásicas U937 e THP-1 com extratos das frações hexânica, clorofórmica e metanólica das folhas de *Annona dolabripetala*, todas as frações foram consideradas inativas.

3.9.1 Atividade antineoplásica

Estima-se que 47% dos medicamentos usados no tratamento de câncer são produtos naturais ou derivados dos mesmos (NEWMAN e CRAGG, 2007). Esse dado só ressalta a importância dos estudos dessas áreas.

Na Tabela 9 a seguir, estão resumidas as principais revisões bibliográficas envolvendo espécies do gênero *Annona* com potencial de atividade antineoplásica *in vitro* e classes de metabólitos secundários.

Tabela 9: Principais revisões bibliográficas na última década referente à atividade antineoplásica em espécies de *Annona*.

Espécie	Classes de metabólitos	Referências
<i>Annona muricata</i>	Acetogeninas	(RADY et al., 2018) (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018) (MOGHADAMTOUSI et al., 2015)
<i>Annona</i> spp.	Acetogeninas	(PAES et al., 2016)
<i>Annona reticulata</i>	Acetogeninas	(JAMKHANDE e WATTAMWAR, 2015)
<i>Annona</i> spp	Alcaloides	(LUCIO et al., 2015)
<i>Annona squamosa</i>	Acetogeninas	(GAJALAKSHMI et al., 2011)

Os autores Rady et al. (2018), Coria-Téllez et al. (2018) e Moghadamtousi et al. (2015), realizaram revisões direcionadas a espécie *A. muricata*. Dados como o uso tradicional e as propriedades citotóxicas das acetogeninas isoladas dessa espécie são os principais resultados dessas revisões.

Paes et al. (2016) revisou todas as acetogeninas isoladas de espécies do gênero *Annona* e seus respectivos efeitos citotóxicos.

Jamkhande et al. (2015) revisou vários aspectos da espécie *A. reticulata*, tais como taxonomia, morfologia, distribuição geográfica, constituintes químicos e atividades farmacológicas. Foi comprovada a atividade citotóxica das acetogeninas isoladas.

Lucio et al. (2015) realizou uma compilação de todos os alcaloides já isolados da família Annonaceae e suas respectivas atividades biológicas. Dos 35 alcaloides avaliados quanto a citotoxicidade, 16 foram inativos.

Gajalakshmi et al. (2011) apresenta uma revisão das atividades farmacológicas, uso tradicional e constituintes químicos de *A. squamosa*. É citado um estudo com 12 acetogeninas isoladas que foram avaliadas quanto a inibição de

crescimento de células cancerígenas usando o método de MTT, no qual as acetogeninas mostraram uma inibição significativa frente à várias linhagens celulares.

É possível identificar a importância que a classe das acetogeninas tem para a família Annonaceae, sendo um marcador quimiotaxonômico desse táxon e também com relação a atividade citotóxica que essa classe apresenta.

3.9.2 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

Foi realizada uma revisão dos estudos envolvendo as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* de espécies do gênero *Annona* com a metodologia similar ao usado neste estudo. Nessa pesquisa foi utilizado o site de busca *Scifinder* e palavras chaves *Annona*, *antinociceptive* e *anti-inflammatory*.

De acordo com estudos, o mecanismo de antinociceção e anti-inflamatório pode ser por inibição da ciclooxigenase (COX) e lipoxigenases (LOX) e no caso de flavonoides presentes no extrato da planta, foi constatado que inibiriam a peroxidação do ácido araquidônico (POMA et al., 2011). Alguns metabólitos derivados desse ácido (eicosanoides) estariam envolvidos no processo inflamatório que são produzidos via ciclooxigenase e lipoxigenase quando uma célula é ativada por trauma mecânico, citocinas, fatores de crescimento ou outros estímulos (HAMID et al., 2012; CORIA-TÉLLEZ et al., 2018).

Carballo et al. (2010) realizaram o teste de contorções abdominais por ácido acético e obtiveram um resultado significativo do extrato etanólico das folhas de *A. diversifolia* na dose de 100 mg/kg com $DE_{50} = 15,35$ mg/kg, sendo o valor de referência o tramadol $DE_{50} = 12,42$ mg/kg.

Foi avaliado o extrato metanólico e frações das folhas de *A. tomentosa* administrados na dose de 100 mg/kg quanto as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória. As frações em hexano e diclorometano reduziram em 42% e 34%, respectivamente, o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, enquanto o controle positivo, a morfina reduziu em 50% na dose de 5,01 mg/kg. No teste de retirada de cauda a fração em hexano apresentou efeito significativo nas doses de 10, 50 e 100 mg/kg. Na avaliação anti-inflamatória somente a fração em

diclorometano reduziu de forma significativa o edema de pata em 39% na dose de 100 mg/kg (CARNEIRO et al., 2017).

Hamid et al. (2012) avaliaram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico das folhas de *A. muricata* por diferentes testes. O extrato inibiu em 53% o número de contorções abdominais na dose de 100 mg/kg, mesma dose usada no controle positivo piroxicam que inibiu em 51%. O teste de retirada de cauda mostrou resultados significativos nas doses de 100 e 300 mg/kg.

Ishola et al. (2014) avaliaram o extrato aquoso dos frutos de *A. muricata* quanto ao teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O extrato foi capaz de reduzir em 55% o número de contorções na dose de 200 mg/kg enquanto o diclofenaco reduz em 60% na dose de 20 mg/kg. No teste de retirada de cauda e edema de pata também foi possível ver um efeito significativo apenas com a dose de 200 mg/kg.

Oliveira et al. (2019) utilizaram o teste de retirada de cauda para avaliar o extrato hidroalcoólico das folhas de *A. crassiflora* nas doses de 587 e 53 mg/kg, no qual não apresentaram resultado significativo frente a morfina como controle positivo.

O extrato etanólico das folhas de *A. vepretorum* foi capaz de inibir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 62, 81 e 92% nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg comparadas aos controles positivos indometacina na dose de 20 mg/kg que inibiu em 93% e a morfina na dose de 10 mg/kg com 100% de inibição. No teste de retirada de cauda as doses de 25 e 100 mg/kg apresentaram efeito significativo. Na avaliação do edema de pata as doses usadas do extrato foram de 25, 50 e 100 mg/kg que foram capazes de inibir significativamente o aumento do volume do edema induzido por carragenina (SILVA et al., 2015a).

O extrato etanólico das folhas de atemoia (*A. squamosa* e *A. cherimola*) nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 42, 48 e 63% em comparação a morfina que reduziu em 100% (10 mg/kg) e indometacina que reduziu em 91% (20 mg/kg). Nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg mostraram efeito significativo no teste de retirada de cauda (SILVA et al., 2017).

Sousa et al. (2010) avaliaram o extrato etanólico das folhas de *A. muricata*. O extrato foi capaz de inibir em 14 e 41% o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético nas doses de 200 e 400 mg/kg, respectivamente. No teste de retirada

de cauda as mesmas concentrações avaliadas mostrarm resultados significativos. As doses de 200 e 400 mg/kg reduziram o edema de pata em 29 e 37%, respectivamente.

Islam et al. (2012) avaliaram o potencial antinociceptivo do extrato metanólico das folhas de *A. reticulata* frente ao teste de contorções abdominais. Nas doses de 50, 100, 200 e 400 mg/kg apresentaram redução no número de contorções de 47, 55, 67 e 69% em comparação ao ácido acetilsalicílico que inibe em 73% na dose de 400 mg/kg.

Foi avaliado a atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *A. muricata* com o teste de edema de pata. O extrato na dose de 1,5 mg/kg mostrou efeito significativo na diminuição do edema em 57% comparado a indometacina que reduziu em 60% na dose de 5,0 mg/kg (POMA et al., 2011).

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Materiais e métodos do estudo fitoquímico

4.1.1 Materiais

- ✓ Folhas de alumínio para CCDA 20x20 cm - 150µm - C18-W sílica w/UV 254 – Sorbtech;
- ✓ Folhas de alumínio para CCDA 20x20 cm - 200µm – Silica G w/UV 254 – Sorbtech;
- ✓ Folhas de alumínio para CCDA 20x20 cm – HPTLC Sílica 60 F₂₅₄ – Merck;
- ✓ SilicaFlash P60 40-63 µm (230-400 mesh) – Silicycle;
- ✓ SilicaFlash G60 60-200 µm (70-230 mesh) – Silicycle;
- ✓ Placa de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa – Silica G w/uv 254 – placas de vidro – 500 µm 20x20 cm – Sorbent Technologies;
- ✓ Sephadex LH-20;
- ✓ Pipeta volumétrica (5 mL) para colunas de purificação;
- ✓ Celite 545 (C212-500) – 500 gm – Fisher Scientific;
- ✓ Cartuchos para Biotage: Flash 12+M / SNAP C18 12g / SNAP ULTRA 10g;
- ✓ Padrões: quercetina / nariginina / miricetina / kaempferol / hesperidina / rutina / genisteína - fornecidos pelo NCNPR para comparação na CCDA;
- ✓ Cartucho para filtragem amostra da CCDP - Thermo – etelectron Corporation – Hypersep SI 2000 mg / 15 mL / 20 Pkg;
- ✓ Ácido acético - Synth;
- ✓ Poliamida < 0,07 µm;
- ✓ Solventes P.A., deuterados e de grau HPLC;
- ✓ Água destilada e desionizada;
- ✓ Coluna de vidro para Cromatografia em Coluna a pressão normal (CC);
- ✓ Erlenmeyer;
- ✓ Bécher;
- ✓ Funil de separação;
- ✓ Pipetas volumétricas e graduadas;

- ✓ Ponteiras;
- ✓ Balão de fundo redondo;
- ✓ Pera de sucção;
- ✓ Papel de filtro;
- ✓ Tubos de RMN.

4.1.2 Equipamentos

- ✓ Cromatógrafo para cromatografia líquida acoplado ao espectrômetro de massas (LC-MS):
Modelo do NCNPR: HPLC-DAD Agilent, coluna S8-C18 RRHD (2,1 x 100 mm, 1,8 μ m) à 30 °C acoplado ao espectrômetro de massas Agilent 1260 com analisador tipo quadrupolo (Q) Agilent 6130 e fonte de ionização por eletrospray (ESI). Foi utilizado o detector DAD-UV ajustado nos comprimentos de onda 220, 254 e 350 nm. Os modos positivo e negativo do ESI foram configurados em 100-1000 m/z .
Modelo da UENF: UPLC-DAD Shimadzu, coluna Phenomenex Kinetex XB C-18 (75 mm x 2,1 mm x 1,7 μ m) junto a uma coluna de guarda C-18 (2,1 mm x 2,1 μ m) Phenomenex acoplado ao espectrômetro de massas de alta resolução com analisador tipo quadrupolo-tempo de voo (Q-TOF) e fonte de ionização por electro spray (ESI) Bruker Daltonics;
- ✓ Cromatógrafo para cromatografia em fase gasosa acoplado ao espectrômetro de massas (CG-EM): cromatógrafo gasoso Agilent 7890A acoplado ao espectrômetro de massas Agilent 5975C inert XL EI/CI MSD com detector triplo-axis;
- ✓ Cromatógrafo para cromatografia flash: Biotage - Isolera four;
- ✓ Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:
Modelo do NCNPR: Bruker Ascend 400 (400 e 100 MHz) e 500 (500 e 125 MHz);
Modelo da UENF: Bruker Ascend 500 (500 e 125 MHz);
- ✓ Manifold para extração de fase sólida (SPE-Visiprep) - Vacuum Manifold - Supelco Solutions within;
- ✓ Moinho de facas e martelo;

- ✓ Coletor de frações automático;
- ✓ Espectrofotômetro UV: 1800 Shimadzu;
- ✓ Estufa para secagem: MA 033/3 – Marconi;
- ✓ Evaporador Rotativo: 802 – Fisatom;
- ✓ Câmara com Lâmpada Ultravioleta: 254 nm e 365 nm;
- ✓ Balança Analítica: AY 220, Shimadzu / M 1702 – Bel engineering;
- ✓ Ultrassom: CD-4820 - Digital Ultrasonic Cleaner – Kondortech;
- ✓ Placa de aquecimento: 261.1 – Quimis;
- ✓ Colunas cromatográficas de diferentes tamanhos;

4.1.3 Reveladores de CCDA

- ✓ Cloreto férrico (FeCl_3)

Foram misturados 2 g de FeCl_3 em 102 mL de ácido clorídrico (HCl) 0,5N. Esta solução foi estocada em frasco âmbar.

- ✓ Iodo

Cristais de iodo em um frasco vedado.

- ✓ *p*-anisaldeído

Em um frasco de 1000 mL, 500 mL de etanol (95%) foram resfriados a 0 °C. Foram adicionados 34,5 mL de H_2SO_4 (98%) e deixado esfriar. Em seguida foram adicionados 10,5 mL ácido acético glacial e 25,5 mL de *p*-anisaldeído. Em por fim, o volume foi ajustado para 1000 mL com o acréscimo de 430 mL de etanol. Esta solução foi estocada em frasco âmbar.

- ✓ Dragendorff

Solução A: 1,7 g de Nitrato de bismuto, 80 mL de H_2O , 20 mL de ácido acético

Solução B: 40 g de Iodeto de potássio, 100 mL de H_2O

Em um frasco de 1000 mL foram misturados 5 mL de cada solução (A e B) em uma solução de 20 mL de ácido acético em 70 mL de H_2O . Esta solução foi estocada em frasco âmbar.

✓ Vanilina

Foram solubilizados 3 g de vanilina em uma solução contendo 135 mL de H₂O destilada, 135 mL de álcool etílico e 30 mL de H₂SO₄ (conc.). Esta solução foi estocada em vidro âmbar, protegida da luz.

✓ Orcinol

Em um frasco foi preparado uma solução contendo 80 mL de água destilada com 200 mg de orcinol. A essa solução foram adicionados 20 mL de ácido sulfúrico concentrado.

4.1.4 Material botânico

Caules e folhas de *Annona dolabripetala* Raddi foram coletadas na Reserva Biológica da União (22°27'30"S; 42°02'15"O) em Rio das Ostras, no bioma Mata Atlântica, em julho e setembro de 2015. A identificação botânica foi realizada pela professora Adriana Lobão no Jardim Botânico do Rio de Janeiro. A exsicata está depositada no Herbário do Centro de Biociência e Biotecnologia da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, sob o número H9770, também está publicada no site JABOT/JBRJ, disponível para consulta pública (<http://huenf.jbrj.gov.br/v2/consulta.php>).

4.1.5 Metodologia

O material vegetal (folhas e caules) foi seco em estufa com circulação de ar contínua à 40 °C, e posteriormente, as folhas foram trituradas em moinho de facas e os caules em moinho de martelo. Em seguida, o caule foi submetido à maceração estática, enquanto o material vegetal das folhas foi submetido a extração por percolação até exaustão em etanol/água (9:1) à temperatura ambiente com troca de solventes semanal. Os extratos obtidos foram submetidos a evaporação à pressão reduzida em rota evaporador e liofilizados.

Parte dos extratos hidroalcoólicos foram ressuspensos em metanol/água (1:1) e, em seguida, submetidos à partição com os solventes na ordem crescente de

polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. Cada partição foi concentrada a pressão reduzida no rota-evaporador.

A Tabela 10 a seguir resume as massas obtidas desde os materiais vegetais coletados até os processos de extração e partição líquido-líquido.

Tabela 10: Massas obtidas das partes vegetais coletadas e códigos em parênteses.

	Caules (g)	Folhas (g)
Massa total do material vegetal seco	2415,04	1089,69
Extrato hidroalcoólico	53,58 (IADCE)	189,88 (IADFE)
Fração em hexano	4,59 (IADFEH)	46,48 (IADCEH)
Fração em clorofórmio	4,77 (IADFEC)	16,79 (IADCEC)
Fração em acetato de etila	2,24 (IADFEA)	15,93 (IADCEA)

4.1.6 Prospecção fitoquímica

4.1.6.1 Teste para alcaloides (Dragendorff)

Foram solubilizados 10,0 mg dos extratos brutos (IADFE e IADCE) em 4,0 mL de HCl 1% (v/v) contidos em cada tubo de ensaio. Filtrou-se, e em cada solução aquosa ácida obtida foram adicionadas 5 gotas do reagente de precipitação de alcaloides Dragendorff. O controle positivo foi preparado através do mesmo procedimento, adicionando-se miligramas de alcaloide padrão.

Formação de precipitado vermelho nas soluções com o reagente de Dragendorff indica a presença de alcaloides (MATOS, 1997).

4.1.6.2 Teste para flavonoides (Shinoda)

Foram solubilizados 10,0 mg dos extratos brutos (IADFE e IADCE) e frações (IADCEH, IADCEC, IADCEA, IADFEH, IADFEC e IADFEA) em volumes de metanol iguais a 3,0 mL, contidos em cada tubo. Filtrou-se e em seguida foram adicionados 1,0 mL de ácido clorídrico concentrado. Deixou-se as soluções reagirem com 1,0 cm

de fita de magnésio. O término da reação é indicado pelo fim da efervescência. Preparou-se uma solução de controle positivo através do mesmo procedimento, porém utilizando como padrão o flavonoide rutina.

O surgimento de uma coloração vermelha é indicativo da presença de flavonoides (flavonóis, flavanonas, flavanonóis e/ou xantonas, livres ou seus heterosídeos) (MATOS, 1997).

4.1.6.3 Teste para saponinas

Foram solubilizados 10,0 mg dos extratos brutos (IADFE e IADCE) em 1-2 mL de clorofórmio e separou-se a parte solúvel da parte insolúvel neste solvente orgânico. A parte insolúvel de cada amostra foi dissolvida em 5-10 mL de água destilada e filtrada para um tubo de ensaio. Agitou-se cada tubo contendo o filtrado fortemente por 2-3 minutos e observou-se a formação de espuma.

Espuma persistente e abundante confirma a presença de saponinas (heterosídes saponínicos) (MATOS, 1997).

4.1.6.4 Teste para triterpenos e esteroides (Liebermann-Burchard)

Foram solubilizados 10,0 mg dos extratos brutos (IADFE e IADCE) em 1,0 mL de clorofórmio em tubos de ensaio. Em seguida filtrou-se cada solução clorofórmica e foram adicionados 2,0 mL de anidrido acético, agitou-se cada tubo suavemente e pelas paredes destes, adicionou-se cuidadosamente 1,0 mL de H₂SO₄ concentrado. Tornou-se a agitar suavemente e observou-se uma rápida mudança de cores.

Para a presença de esteroides deve-se observar coloração azul seguida de verde permanente. Para a presença de triterpenos observa-se uma coloração parda até vermelha (MATOS, 1997).

4.1.6.5 Teste para polissacarídeos

Em um tubo de ensaio foram adicionadas duas gotas de solução a 1% (m/v) de bórax, seguido de duas gotas de fenolftaleína, resultando em uma solução cor de rosa.

Foram adicionados 10,0 mg dos extratos brutos (IADFE e IADCE) sequencialmente sobre as soluções.

Esse procedimento pode ocasionar o desaparecimento da coloração rosa, que reaparece com o aquecimento e some novamente com o resfriamento. Se tal fenômeno for observado, a reação é positiva (MATOS, 1997).

4.1.6.6 Teste para taninos

Foram solubilizados 10,0 mg dos extratos brutos (IADFE e IADCE) em 2,0 mL de etanol em tubos de ensaio. Em seguida filtrou-se cada solução e foram adicionadas 3 gotas de FeCl_3 (2%).

Para a presença de taninos deve-se observar coloração azul ou verde. (MATOS, 1997).

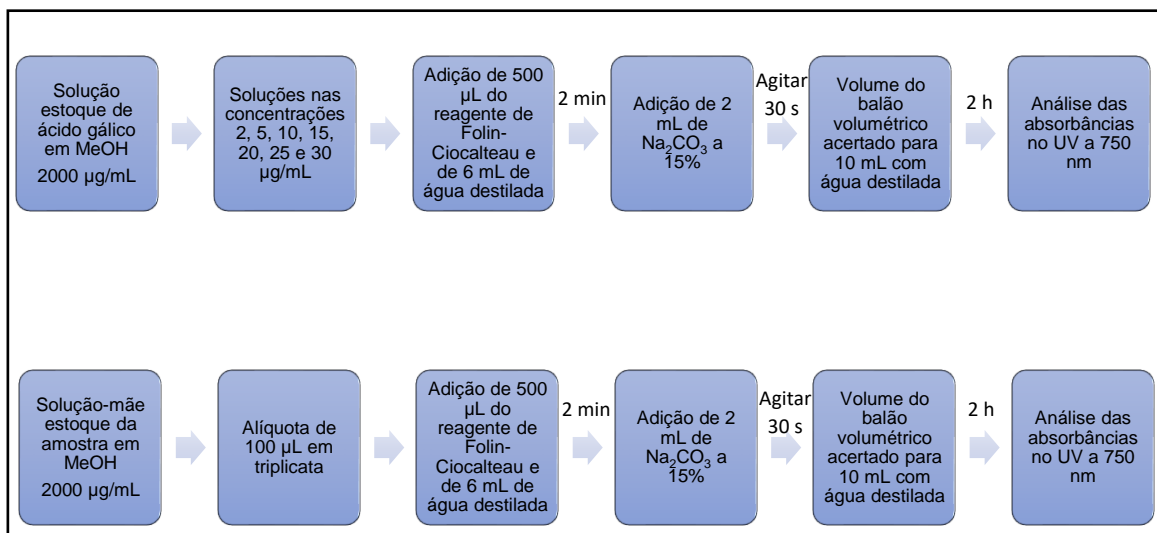
4.1.6.7 Teste de fenóis totais

A metodologia usada foi de acordo com a apresentada em Sousa et al., (2007). Foram solubilizados 20,0 mg da fração flavonoídica das folhas (IP-1-1-1FFA) em metanol e transferido para um balão volumétrico de 10 mL e o volume foi acertado, constituída assim, a “solução-mãe”. A partir desta, uma alíquota de 100 μL foi transferida para outro balão volumétrico e agitada com 500 μL do reagente de *Folin-Ciocalteu* e 6 mL de água destilada. Depois de 2 min, 2 mL de Na_2CO_3 a 15% foram adicionados a cada mistura e agitados por 30 segundos. Por seguinte, as soluções tiveram seus volumes acertados com água destiladas para 10 mL. Após 2h de reação, as absorvâncias das amostras foram medidas em triplicatas a 750 nm (Figura 19), tendo como “branco” de metanol e os demais reagentes utilizados nas amostras.

A determinação do teor de fenóis totais foi feita por interpolação da absorvância das amostras contra a curva de calibração, obtida por meio da curva padrão do ácido gálico em concentrações de 20, 100, 150, 200 e 300 $\mu\text{g/mL}$, sendo os resultados expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato. Na preparação dos padrões foram utilizados os mesmos reagentes. O reativo de *Folin-Ciocalteu*, quando na presença de compostos fenólicos, muda sua coloração de

amarela para azul e a intensidade da coloração azul é maior quanto maior a quantidade de compostos fenólicos na solução.

Figura 19: Esquema representativo do preparo das amostras a análise no UV.



4.1.7 Procedimento cromatográfico de *Annona dolabripetala*

O procedimento cromatográfico foi realizado conforme é representado nos fluxogramas das Figuras 20 e 21 (p. 52) a seguir e mais detalhado nos tópicos correspondentes aos fracionamentos.

As pastilhas das colunas cromatográficas foram preparadas da seguinte forma: as amostras foram solubilizadas em quantidade mínima de CHCl_3 e maceradas com celite 545 ou sílica de mesma granulometria usada na coluna cromatográfica, na proporção de 2:1 em relação a quantidade de amostra.

Figura 20: Fluxograma do procedimento de extração das folhas de *A. dolabripetala*.

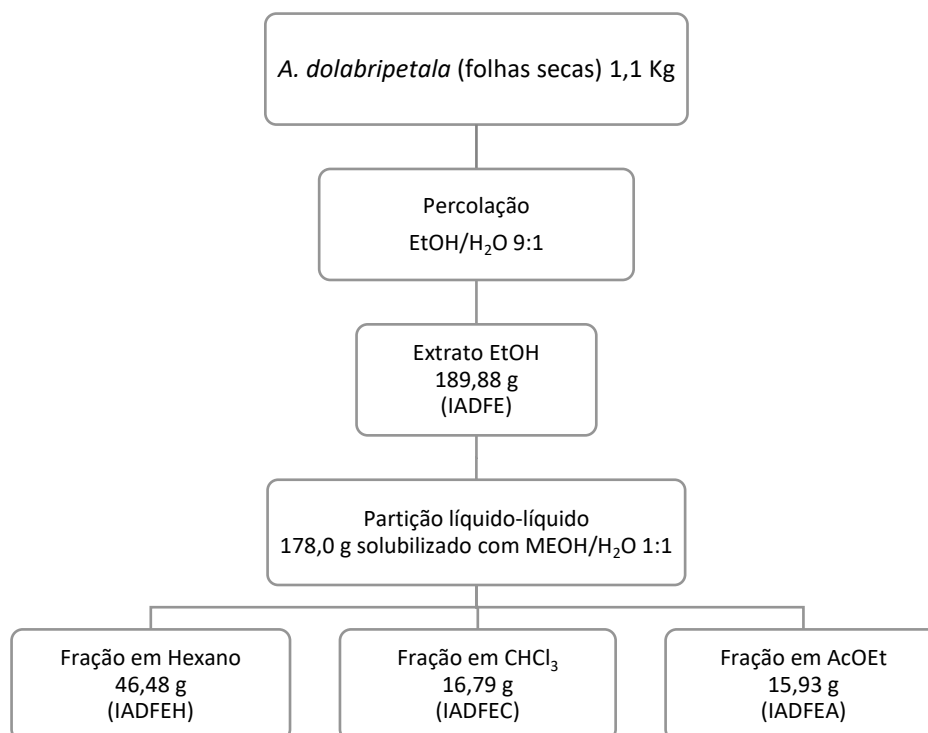
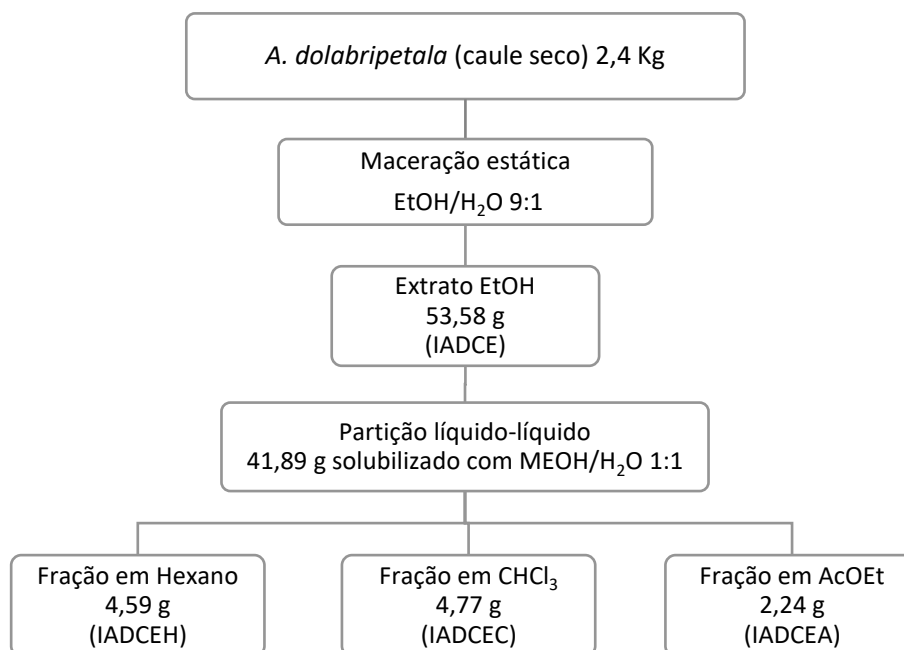


Figura 21: Fluxograma do procedimento de extração do caule de *A. dolabripetala*.



4.1.7.1 Fração em hexano das folhas (IADFEH)

A análise cromatográfica para identificação de componentes da fração em hexano das folhas de *A. dolabripetala* (IADFEH) foi realizada por RMN ^1H e ^{13}C , além de análise por CG/EM através de comparação dos dados com a biblioteca NIST versão 2.0.

O equipamento de CG-EM Agilent 5975C com um detector de massas triplo-axis Agilent 5975C HP-5MS, coluna (30 m \times 250 μm \times 0.25 μm). O espectrômetro de massas foi ajustado para 280 $^{\circ}\text{C}$ e a energia do impacto de elétrons (EI) para 70 eV. A temperatura inicial do forno foi ajustada para 80 $^{\circ}\text{C}$, e o fluxo de 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ foi usado até atingir 280 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura final (280 $^{\circ}\text{C}$) foi mantida durante 30 min (tempo total de corrida de 50 min). A temperatura da porta de injeção foi fixada em 280 $^{\circ}\text{C}$ e 1 μL de amostra foi injetada.

4.1.7.2 Fração em clorofórmio das folhas (IADFEC)

A fração em clorofórmio IADFEC ($m = 8,0389$ g) foi submetida a uma cromatografia em coluna (CC) empacotada com sílica seca. A amostra foi solubilizada em CHCl_3 e misturada com sílica para preparo da pastilha. A coluna foi eluída com 100% clorofórmio, 100% acetato de etila e 100% metanol em quantidade suficiente até que todas as substâncias solúveis nesses solventes fossem extraídas. O procedimento cromatográfico dessa fração está representado esquematicamente na Figura 22.

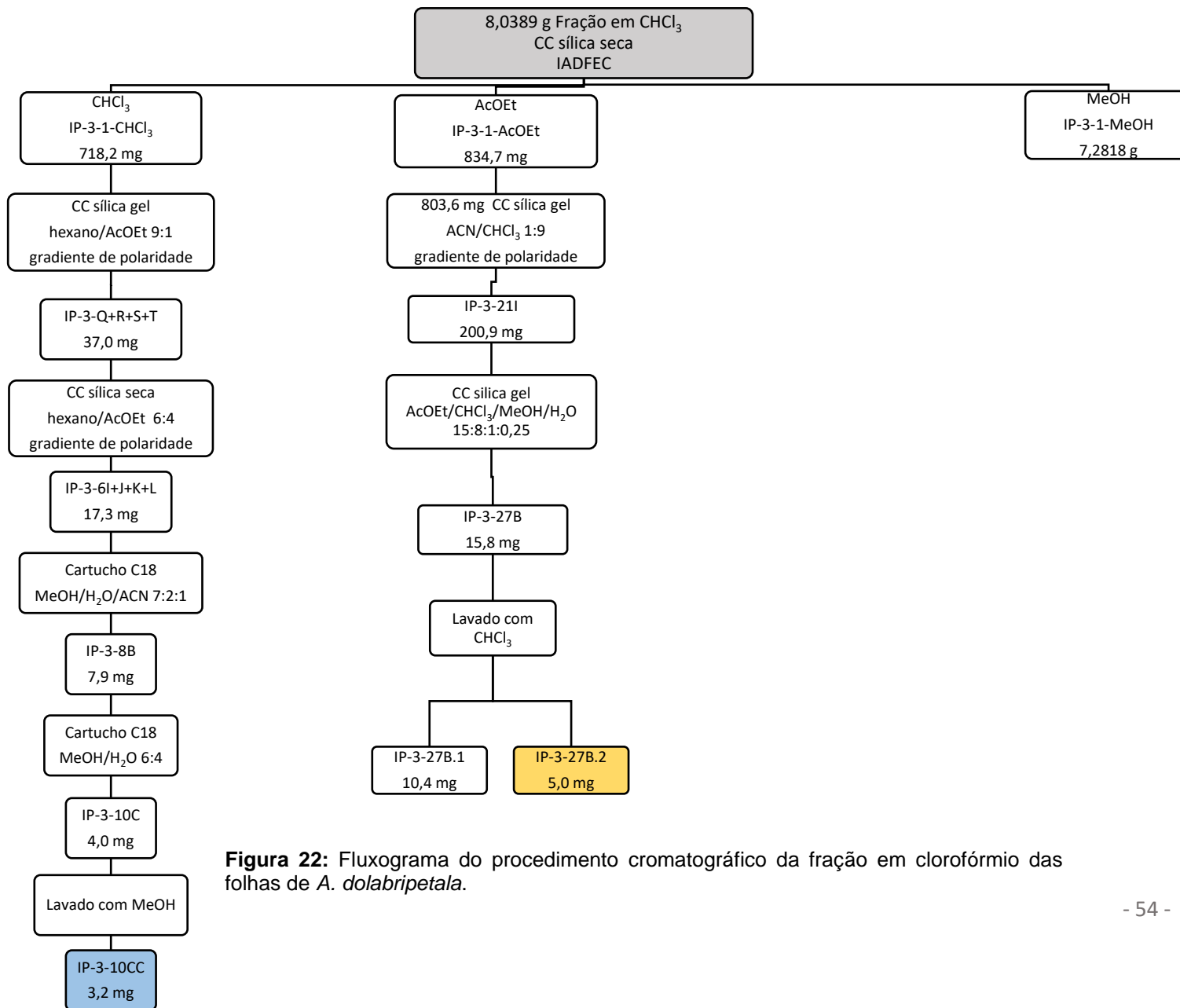


Figura 22: Fluxograma do procedimento cromatográfico da fração em clorofórmio das folhas de *A. dolabripetala*.

4.1.7.2.1 Fração IP-3-1-CHCl₃

Essa fração (m = 718,2 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna (CC) empacotada com sílica gel em hexano e usado pastilha. Eluída a uma concentração de hexano/AcOEt 9:1 (v/v), seguido de gradiente crescente de polaridade (hexano/AcOEt) e posteriormente para a recuperação da amostra foi utilizado metanol. Foram obtidas 65 frações que após análise por CCDA, foram reagrupadas em 21 subfrações com códigos IP-3-3A a IP-3-3U. A CCDA foi eluída com sistemas hexano/AcOEt 8:2, 7:3, 5:5, 4:6 e 2:8 (v/v) e revelado com vanilina sulfúrica.

4.1.7.2.2 Amostra IP-3-3Q a 3T

As subfrações IP-3-3Q, IP-3-3R, IP-3-3S e IP-3-3T foram agrupadas (m = 37,0 mg), a pastilha preparada foi submetida a uma coluna cromatográfica empacotada com sílica seca. O sistema de solvente usado foi hexano/AcOEt 6:4 + 200 µL de ácido acético (v/v), seguido de gradiente crescente de polaridade (hexano/AcOEt) e posteriormente para a recuperação da amostra foi utilizado metanol. Foram coletadas 47 frações que foram reagrupadas em 12 (IP-3-6A a IP-3-6L). A CCDA RP-18 foi eluída com 100% MeOH e uma gota de ácido acético e revelado com vanilina sulfúrica.

4.1.7.2.3 Amostra IP-3-6I a 6L

As subfrações IP-3-6I, IP-3-6J, IP-3-6K e IP-3-6L foram agrupadas (m = 17,3 mg) e solubilizadas em MeOH/H₂O 1:1 (v/v). No processo cromatográfico foi usado o cartucho com sílica C18 eluída em MeOH/H₂O/ACN 7:2:1 (v/v). Foram obtidas 22 frações que foram agrupadas em 4 frações (IP-3-8A a IP-3-8D). A CCDA RP18 foi eluída no sistema com MeOH e uma gota de ácido acético e revelado na luz UV.

4.1.7.2.4 Amostra IP-3-8B

A amostra IP-3-8B (m = 7,9 mg) foi solubilizada em MeOH/H₂O 1:1 (v/v). No processo cromatográfico foi usado o cartucho com sílica C18 eluída em MeOH/H₂O 1:1 (v/v) e em seguida com a polaridade aumentada para a proporção de 6:4 (v/v). Foram obtidas 24 frações que foram agrupadas em 10 frações (IP-3-10A a IP-3-10J). A CCDA RP18 foi eluída no sistema com MeOH e uma gota de ácido acético e revelado na luz UV. A subfração IP-3-10C (m = 4,0 mg) apresentou a presença de cristais e foi lavado com MeOH, obtendo-se a subfração IP-3-10CC (3,2 mg) insolúvel. Em seguinte essa amostra foi enviada para análise por RMN.

4.1.7.2.5 Fração IP-3-1-AcOEt

Essa fração (m = 803,6 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna (CC) empacotada com sílica gel em CHCl₃ e usado pastilha. Eluída a uma concentração de ACN/CHCl₃ 1:9 (v/v), seguido de gradiente crescente de polaridade (ACN/CHCl₃) e posteriormente para a recuperação da amostra foi utilizado metanol. Foram obtidas 29 frações que após análise por CCDA, foram reagrupadas em 11 subfrações com códigos IP-3-21A a IP-3-21K. A CCDA foi eluída com sistema de solventes ACN/CHCl₃ 1:9 e 1:1 (v/v) e revelada com vanilina sulfúrica e orcinol.

4.1.7.2.6 Amostra IP-3-21I

A amostra IP-3-21I (m = 200,9 mg) foi submetida a uma cromatografia em coluna empacotada com sílica gel em CHCl₃. A amostra foi solubilizada no sistema de solventes que a coluna foi inicialmente eluída em AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 15:8:1:0,25 (v/v), 12 frações foram coletadas. Em seguida a polaridade foi aumentada e mais 10 frações foram coletadas com a proporção de 15:8:2:0,5 (v/v). Mais 5 frações foram obtidas com o sistema de solventes na proporção 15:8:4:1 (v/v) e mais 2 frações foram coletadas a fim de retirar toda amostra da coluna com a proporção de 6:4:4:1 (v/v). A partir da

análise por CCDA eluída com o sistema de solventes inicial, revelada com orcinol, foi possível reagrupar em 12 subfrações (IP-3-27A a IP-3-27L).

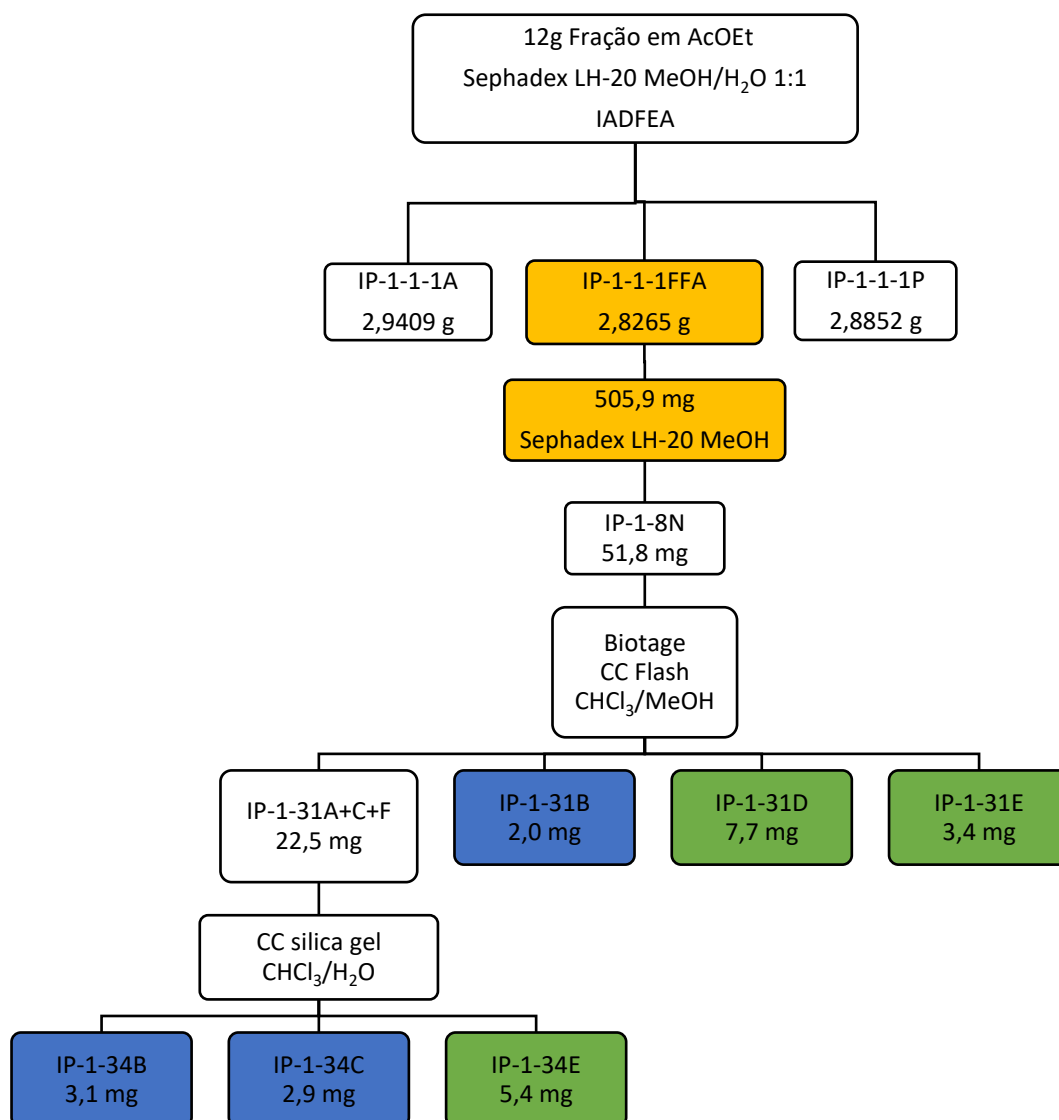
4.1.7.2.7 Amostra IP-3-27B

A amostra IP-3-27B (m = 15,8 mg) foi lavada com CHCl_3 , obtendo-se as subfrações IP-3-27B.1 (m = 10,4 mg) solúvel e IP-3-27B.2 (m = 5,0 mg) parte insolúvel. A amostra IP-3-27B.2 foi enviada para análise por RMN devido ao seu grau de pureza apresentado na CCDA eluída em $\text{AcOEt}/\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 15:8:2:0,5 (v/v), revelada com orcinol.

4.1.7.3 Fração em acetato de etila das folhas (IADFEA)

A fração em acetato de etila IADFEA (m = 12,0681 g) foi cromatografada em coluna empacotada com Sephadex LH-20 com sistema de solventes $\text{MeOH}/\text{H}_2\text{O}$ 1:1 (v/v). A amostra foi solubilizada no mesmo sistema de solventes. Foram obtidas 3 subfrações IP-1-1-1A (m = 2,9409 g), IP-1-1-1FFA (m = 2,8265 g) e IP-1-1-1P (m = 2,8852 g). Por apresentar um perfil flavonoídico na CCDA e na análise por UPLC, a subfração IP-1-1-1FFA foi exaustivamente estudada como é descrito a seguir e representado esquematicamente no fluxograma das Figuras 23 e 24 (p. 58 e 59).

Figura 23: Fluxograma do primeiro tratamento cromatográfico da fração flavonoídica das folhas de *A. dolabripetala*.



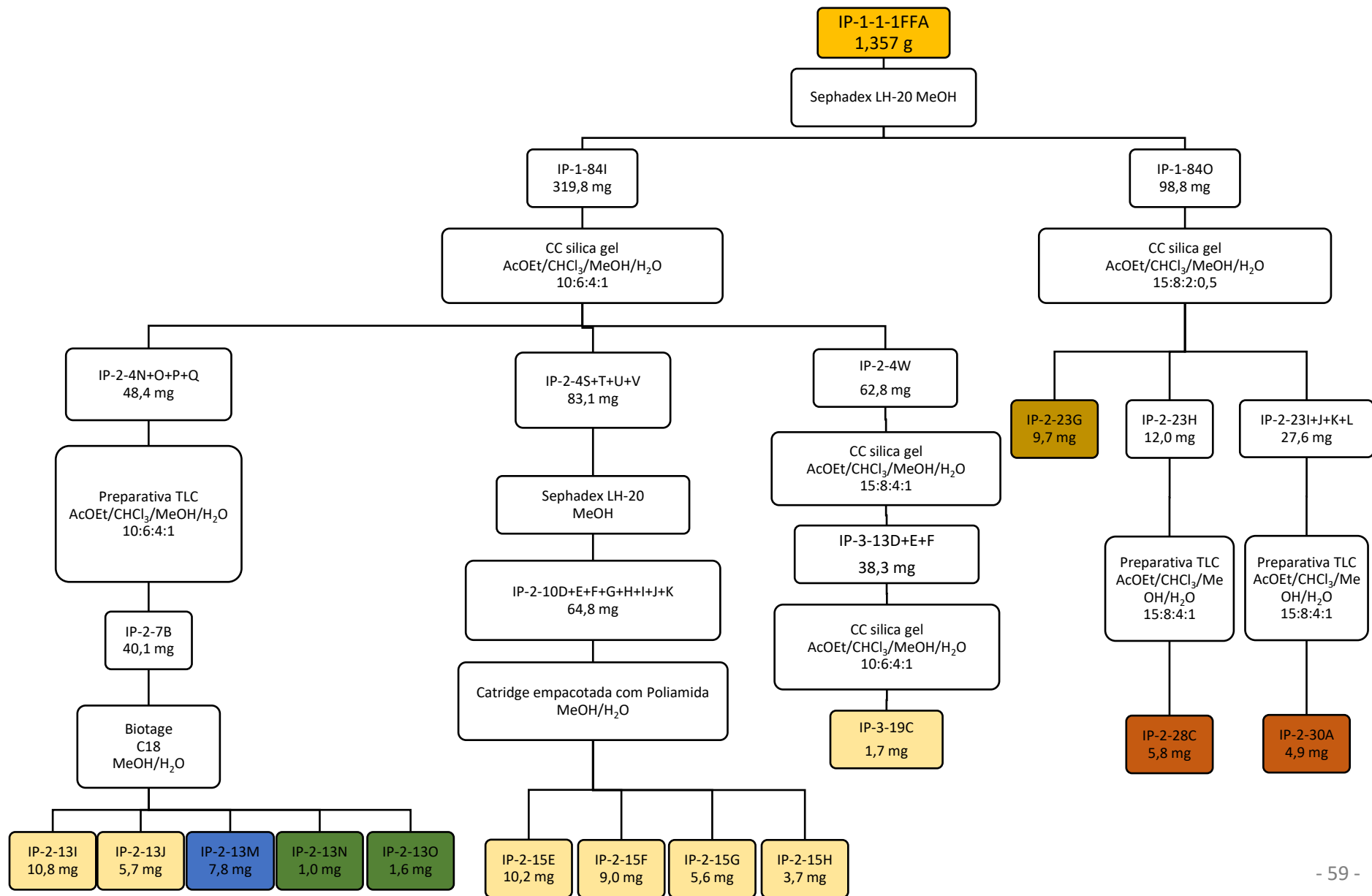


Figura 24: Fluxograma do segundo tratamento cromatográfico da fração flavonoídica das folhas de *A. dolabripetala*.

4.1.7.3.1 Fração flavonoídica das folhas (IP-1-1-1FFA) – 1° tratamento cromatográfico

Como mostrado no fluxograma da Figura 23 (p. 58), foram usados 505,9 mg de amostra solubilizada em MeOH em uma coluna empacotada com Sephadex LH-20 eluída com 100% MeOH. Foram obtidas 182 frações que após análise por CCDA, foram reagrupadas em 25 subfrações com códigos IP-1-8A a IP-1-8Y. A CCDA foi eluída com a fase orgânica do sistema de solventes CHCl_3 /butanol/MeOH/ H_2O 7:3:3:4 (v/v) e revelado com p-anisaldeído.

4.1.7.3.2 Amostra IP-1-8N

A amostra IP-1-8N (m = 51,8 mg) foi solubilizada em MeOH e submetida a um processo cromatográfico utilizando o biotage com cartucho de sílica flash 12+M. O primeiro sistema de solventes usado foi CHCl_3 /MeOH 95:5 (v/v) e depois aumentado a polaridade para a proporção 9:1. O comprimento de onda usado foi 254 e 365 nm. Foram obtidas 57 frações que foram reagrupadas em 7 subfrações (IP-1-31A a IP-1-31G) de acordo com o perfil apresentado na CCDA que foi eluída com a fase orgânica em CHCl_3 /butanol/MeOH/ H_2O 5:3:5:4 (v/v) e revelado com p-anisaldeído. As subfrações IP-1-31B (m = 2,0 mg), IP-1-31D (m = 7,7 mg) e IP-1-31E (m = 3,4 mg) apresentaram estar puras na CCDA e foram analisadas por RMN.

4.1.7.3.3 Amostra IP-1-31A+31C+31F

As subfrações IP-1-31A, IP-1-31C e IP-1-31F (m = 22,5 mg) foram reagrupadas e a pastilha foi preparada usando celite 545 e MeOH. A coluna foi empacotada com sílica gel em CHCl_3 . O sistema de solventes usado foi um gradiente crescente de polaridade iniciado com 100% CHCl_3 até CHCl_3 /MeOH 1:1 (v/v) e posteriormente para a recuperação da amostra foi utilizado metanol. Um total de 56 frações foram coletadas e reagrupadas em 6 subfrações (IP-1-34A a IP-1-34F). As amostras IP-1-34B (m = 3,1 mg), IP-1-34C (m = 2,9 mg) e IP-1-34E (5,4 mg) foram analisadas por RMN devido ao grau de pureza

apresentado na CCDA que foi eluída em CHCl_3 /butanol/MeOH/ H_2O 5:3:5:4 (v/v) fase orgânica e revelado com p-anisaldeído.

4.1.7.3.4 Fração flavonoídica das folhas (IP-1-1-1FFA) – 2° tratamento cromatográfico

Como apresentado no fluxograma da Figura 24 (p. 59), foram usados 1,357 g de amostra solubilizada em MeOH em uma coluna empacotada com Sephadex LH-20 eluída com 100% MeOH. Foram obtidas 164 frações que após análise por CCDA, foram reagrupadas em 16 subfrações com códigos IP-1-84A a IP-1-84P. A CCDA foi eluída com sistema de solventes AcOEt/ CHCl_3 /MeOH/ H_2O 10:6:4:1 (v/v), e revelado com p-anisaldeído.

4.1.7.3.5 Amostra IP-1-84I

A amostra IP-1-84I (m = 319,8 mg) foi solubilizada no mesmo sistema de solventes usado na coluna cromatográfica AcOEt/ CHCl_3 /MeOH/ H_2O 10:6:4:1 (v/v). Foram coletadas 195 frações que de acordo com o perfil cromatográfico apresentado na CCDA, foram reagrupadas em 24 subfrações IP-2-4A a IP-2-4X. Foi usado o mesmo sistema de solventes para eluição na CCDA com a adição de uma gota de ácido acético e revelado com p-anisaldeído.

4.1.7.3.6 Amostra IP-2-4N a 4Q

Com o objetivo de separar duas manchas majoritárias, as amostras IP-2-4N, IP-2-4O, IP-2-4P, IP-2-4Q (m = 48,4 mg) foram reagrupadas e em seguida solubilizada em MeOH. A amostra foi aplicada em uma placa de cromatografia em camada delgada preparativa, eluída no sistema de solventes AcOEt/ CHCl_3 /MeOH/ H_2O 10:6:4:1 (v/v). Foram obtidas 6 frações (IP-2-7A a IP-2-7F) após a filtração da sílica removida da placa cromatográfica. A subfração IP-2-7B (m = 40,1 mg) apresentou as duas manchas majoritárias na placa de CCDA após o procedimento.

4.1.7.3.7 Amostra IP-2-7B

A amostra IP-2-7B (m = 40,1 mg) foi solubilizada em MeOH e submetida a um processo cromatográfico utilizando o biotage com cartucho SNAP ULTRA C18. O sistema de solventes usado foi MeOH/H₂O com aumento de polaridade. O comprimento de onda foi 254 e 365 nm. Foram obtidas 90 frações que foram reagrupadas em 17 subfrações (IP-2-13A a IP-2-13Q) de acordo com o perfil apresentado na CCDA que foi eluída em AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 6:6:4:1 (v/v) e revelado com p-anisaldeído. As subfrações IP-2-13I (m = 10,8 mg), IP-2-13J (m = 5,7 mg), IP-2-13M (m = 7,8 mg), IP-2-13N (m = 1,0 mg), IP-2-13O (m = 1,6 mg) apresentaram estar puras na CCDA e foram analisadas por RMN.

4.1.7.3.8 Amostra IP-2-4S a 4V

Com o objetivo de separar duas manchas majoritárias, as amostras IP-2-4S, IP-2-4T, IP-2-4U, IP-2-4V (m = 83,1 mg) foram reagrupadas e em seguida solubilizada em MeOH. A amostra foi cromatografada em coluna empacotada com Sephadex LH-20 utilizando MeOH como fase móvel. Foram obtidas 95 frações, reagrupadas em 16 (IP-2-10A – IP-2-10P). A placa de CCDA foi eluída com AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 6:6:4:1 (v/v) e revelada com p-anisaldeído.

4.1.7.3.9 Amostra IP-2-10D a 10K

As amostras IP-2-10D, IP-2-10E, IP-2-10F, IP-2-10G, IP-2-10H, IP-2-10I, IP-2-10J, IP-2-10K (m = 64,8 mg) foram reagrupadas. A pastilha foi preparada com a amostra solubilizada em MeOH e poliamida, introduzida num cartucho de 10 cm de altura e 2,5 cm de diâmetro empacotado com mesma sílica. O sistema de solventes usado foi um gradiente de polaridade MeOH/H₂O 6:4, 7:3, 8:2, 9:1 (v/v) e por fim 100% MeOH. Foram obtidas 41 frações, reagrupadas em 16 (IP-2-15A a IP-2-15P). A placa de CCDA foi eluída com AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 6:6:4:1 (v/v) e revelada com p-anisaldeído. As subfrações IP-2-15E (m = 10,2 mg), IP-2-15F (m = 9,0 mg), IP-2-15G (m = 5,6 mg), IP-2-15H (m = 3,7 mg) apresentaram índice de pureza na CCDA e foram analisadas por RMN.

4.1.7.3.10 Amostra IP-2-4W

A amostra IP-2-4W (m = 62,8 mg) foi solubilizada no sistema de solventes AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 15:8:4:1 (v/v), mas a coluna foi empacotada com sílica em CHCl₃. A fase móvel foi iniciada com o sistema de solventes AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 15:8:4:1 (v/v), a polaridade foi aumentada com AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 6:4:4:1 (v/v) e finalizada com 100% MeOH. Foram coletadas 24 frações que de acordo com o perfil cromatográfico apresentado na CCDA, foram reagrupadas em 7 subfrações IP-3-13A a IP-3-13G. Para eluição na CCDA foi usado AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 10:6:4:1 (v/v) com a adição de uma gota de ácido acético e revelado com orcinol.

4.1.7.3.11 Amostra IP-3-13D a 13F

As amostras IP-3-13D, IP-3-13E, IP-3-13F (m = 38,3 mg) foram reagrupadas e solubilizadas no mesmo sistema de solventes usado para empacotar a coluna e na fase móvel AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 10:6:4:1 (v/v). Foram coletadas 15 frações que de acordo com o perfil cromatográfico apresentado na CCDA, foram reagrupadas em 14 subfrações IP-3-19A a IP-3-19N. Para eluição na CCDA foi usado AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 10:6:4:1 (v/v) com a adição de uma gota de ácido acético e revelado com orcinol. A amostra IP-3-19C (m = 1,7 mg) foi enviada para análise por RMN.

4.1.7.3.12 Amostra IP-1-84O

A amostra IP-1-84O (m = 93,2 mg) foi solubilizada no sistema de solventes usado na coluna cromatográfica AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 15:8:2:0,5 (v/v). A coluna foi empacotada com sílica em CHCl₃. Foram coletadas 50 frações com o sistema de solventes AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 15:8:2:0,5 (v/v) e mais 29 frações com o sistema AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 15:8:4:1 (v/v). As subfrações foram reagrupadas em 14 (IP-2-23A a IP-2-23N). Para eluição na CCDA foi usado AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 10:6:4:1 (v/v) com a adição de uma gota de ácido

acético e revelado com p-anisaldeído. A amostra IP-2-23G (m = 9,7 mg) foi enviada para análise por RMN.

4.1.7.3.13 Amostra IP-2-23H

Com o objetivo de separar uma mancha majoritária, a amostra IP-2-23H (m = 12,0 mg) foi solubilizada em MeOH. A amostra foi aplicada em uma placa de cromatografia em camada delgada preparativa, eluída no sistema de solventes AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 15:8:4:1 (v/v). Foram obtidas 6 frações (IP-2-28A a IP-2-28F) após a filtração da sílica removida da placa cromatográfica. A subfração IP-2-28C (m = 5,8 mg) foi enviada para análise por RMN.

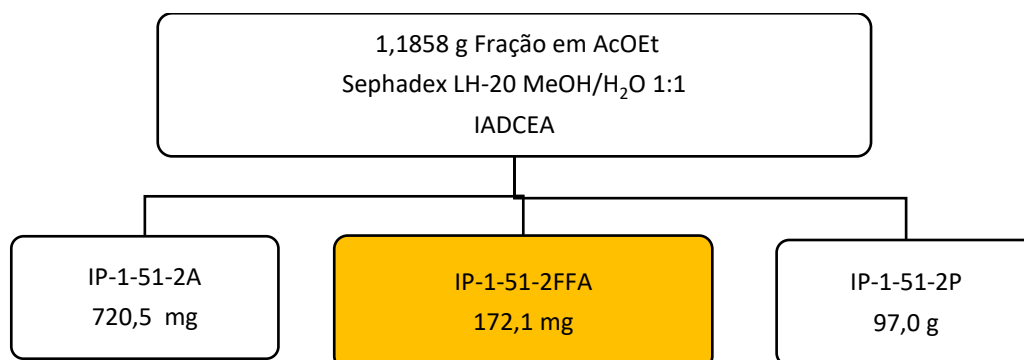
4.1.7.3.14 Amostra IP-2-23I a 23L

Com o objetivo de separar uma mancha majoritária, as amostras IP-2-23I, IP-2-23J, IP-2-23K, IP-2-23L (m = 27,6 mg) foram reagrupadas e solubilizada em MeOH. A amostra foi aplicada em uma placa de cromatografia em camada delgada preparativa, eluída no sistema de solventes AcOEt/CHCl₃/MeOH/H₂O 15:8:4:1 (v/v). Foram obtidas 6 frações (IP-2-30A a IP-2-30F) após a filtração da sílica removida da placa cromatográfica. A subfração IP-2-30A (m = 4,9 mg) foi enviada para análise por RMN.

4.1.7.4 Procedimento cromatográfico da fração em acetato de etila do caule (IADCEA)

A fração em acetato de etila IADCEA (m = 1,1858 g) foi cromatografada em coluna empacotada com Sephadex LH-20 com sistema de solventes MeOH/H₂O 1:1 (v/v). A amostra foi solubilizada no mesmo sistema de solventes. Foram obtidas 3 subfrações IP-1-51-2A (m = 720,5 mg), IP-1-51-2FFA (m = 172,1 mg) e IP-1-51-2P (m = 97,0 mg) (Figura 25). Por apresentar um perfil flavonoídico na CCDA, a subfração IP-1-51-2FFA foi comparada por UPLC com a fração flavonoídica das folhas (IP-1-1-1FFA) (Figura 25).

Figura 25: Fluxograma da obtenção da fração flavonoídica dos caules.



4.1.7.5 Análises por LC-MS

Com o auxílio da cromatografia líquida acoplada ao espectrômetro de massas (LC-MS) foram realizadas análises das frações flavonoídicas (folhas e caules) e das substâncias puras para determinação da massa molecular e fragmentações MS/MS.

Para a fração flavonoídica das folhas (IP-1-1-1FFA) e substâncias de **17** a **21**, utilizou na análise por HPLC-MS como fase móvel água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,2% de ácido acético. O gradiente foi desenvolvido da seguinte forma: 15% de B por 5 min e aumento para 19% em 20 min, depois de 19% para 70% de B em 1 min, para 75 em 79 durante 5 min, e por fim, o gradiente foi aumentado para 95% de B em 1 min e a coluna lavada com 90% de B por 4 min. O fluxo foi de 0,250 mL/min. Essa análise foi realizada em parceria com o Laboratório do National Center for Natural Products Research (NCNPR) da Universidade do Mississippi.

Na UENF a análise das frações flavonoídicas (IP-1-1-1FFA – folhas e IP-1-51-2FFA – caules) e das substâncias de **22** e **23** por UPLC-MS utilizou como fase móvel água (A) e acetonitrila (B), ambas contendo 0,1% de ácido fórmico. O seguinte gradiente foi utilizado: 15% de B por 5 min e aumento para 19% em 20 min, depois de 19% para 70% de B em 5 min, para 75% em 9 min, e por fim, o gradiente foi aumentado para 100% de B em 5 min e a coluna lavada com 100% de B por 3 min.

4.2 Materiais e métodos do estudo biológico

4.2.1 Atividade antineoplásica

4.2.1.1 Materiais

- ✓ Dimetilsulfóxido (DMSO) – Sigma
- ✓ Isopropanol P.A. – Labsynth e Scharlau
- ✓ Ácido clorídrico P.A. – Labsynth
- ✓ Trypan Blue – Sigma (T6146)
- ✓ Meio de cultura DMEM/F-12 – Gibco (BRL)
- ✓ Gentamicina – Gibco
- ✓ Soro fetal bovino – Gibco

4.2.1.2 Equipamentos

- ✓ Estufa para cultura celular – Forma Scientific Inc., modelo 3159
- ✓ Fluxo laminar – Veco
- ✓ Garrafa de cultivo celular de 25 cm², 75 cm² e 150 cm² – TPP
- ✓ Centrifuga – IEC CENTRA-7R
- ✓ Centrifuga – FANEM Baby I Modelo 206
- ✓ Tubo falcon de 15 mL e 50 mL – TPP
- ✓ Pipetas – Lapmater soft
- ✓ Ponteiras – Axygen
- ✓ Espectrofotômetro – Epoch™, BioTek® Instruments, Inc
- ✓ Placas de cultura 96 poços – TPP
- ✓ Criotubos – Corning
- ✓ Microscópio – Axionplan – Carl Zeiss
- ✓ Vortex – Gehaka
- ✓ pHmetro – Biomixer
- ✓ Balança analítica (Shimadzu)

4.2.1.3 Cultura das linhagens de células de origem neoplásica

A linhagem U937 (célula humana de linfoma histiocítico), adquiridas da American Type Culture Collection (ATCC) foram cultivadas em meio DMEM-F12 (Gibco, BRL), suplementado com 2,0 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada dois dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) à 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada.

4.2.1.4 Avaliação da viabilidade celular por metabolização do MTT

O microensaio colorimétrico utilizando o sal de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolio) verifica, a viabilidade celular através da atividade enzimática das desidrogenases mitocondriais das células vivas. Baseia-se então, na redução do MTT (coloração amarela e solúvel em água) a formazana (coloração púrpura e insolúvel em água) (VALADARES et al., 2007). Esse ensaio foi realizado em parceria com o Laboratório de Biologia do Reconhecer – UENF.

Desta forma, os ensaios realizados utilizam as células U937, que foram plaqueadas em volume de 100 µL/poço (1x10⁶cels/mL) em placas de 96 poços, tratadas com as amostras (extratos, frações) nas concentrações finais de 200, 100, 25, 12,5, 6,3 e 3,0 µg/mL. As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada.

Como controles negativos todas as células foram incubadas com meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 µg/mL de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). Para os extratos, frações substâncias isoladas as células foram incubadas com DMSO (SIGMA®) na concentração ideal.

As células foram incubadas por 48 horas com a amostra e após o tempo determinado foram adicionados 20 µL de MTT (Sigma, 5 mg/mL) para cada 100 µL de cultivo. As amostras foram mantidas na estufa por quatro horas para a metabolização do MTT. Após esse período foram retirados 150 µL do sobrenadante de cada poço e depois adicionados 100 µL de uma solução de HCl

com isopropanol, para a solubilização dos cristais de formazana formados. A leitura dos valores da absorbância da placa de 96 poços é realizada em espectrofotômetro (Epoch™, BioTex® Instruments, Inc.) com comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas. Metodologia segundo Mosmann (1983).

4.2.1.5 Análise estatística

Todos os dados foram analisados usando o software *GraphPad Prism v. 5.01*. Os valores foram expressos como a média \pm SEM, utilizado-se o teste two-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Os valores de CI_{50} foram determinados através da curva de regressão não linear. As diferenças significativas foram consideradas como $p < 0,05$.

4.2.2 Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória

4.2.2.1 Materiais

- ✓ Ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil);
- ✓ Dimetilsulfóxido (pureza – 99,9%);
- ✓ Morfina (pureza – 97%);
- ✓ Dexametasona (pureza - 97%);
- ✓ λ -carragenina (pureza – 99%);

4.2.2.2 Tratamento e preparo das substâncias e amostras

- ✓ Controle: grupo tratado com água destilada;
- ✓ Veículo: grupo tratado com solução de dimetilsulfóxido (DMSO) em água destilada na concentração de 5,0 % (v/v). O DMSO foi utilizado como solvente na diluição dos extratos. Este grupo foi incluído a fim de descartar a interferência deste solvente nos efeitos antinociceptivo e/ou anti-inflamatório;

- ✓ IADFE: extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona dolabripetala*. Administrado por via oral na dose de 500 mg/kg;
- ✓ IADFEH: fração em hexano do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona dolabripetala*. Administrado por via oral na dose de 100 mg/kg;
- ✓ IADFEC: fração em clorofórmio do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona dolabripetala*. Administrado por via oral na dose de 100 mg/kg;
- ✓ IADFEA: fração em acetato de etila do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona dolabripetala*. Administrado por via oral na dose de 100 mg/kg;
- ✓ IP-1-1-1FFA: fração flavonoídica da fração em acetato de etila do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona dolabripetala*. Administrado por via oral na dose de 100 mg/kg;
- ✓ Ácido acético: utilizado para induzir as contorções abdominais no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e preparado na concentração de 1,2% (v/v) em água destilada e administrado 0,01 mL/g de peso do animal da solução por via intraperitoneal 60 minutos após a administração oral do extrato bruto IADFE e frações IADFFH, IADFEC, IADFEA, IP-1-1-1FFA, água destilada, veículo e indometacina;
- ✓ Carragenina: agente flogógeno utilizado no modelo de edema de pata na concentração a 1,0 % (10 mg/mL). Administrada no volume de 0,02 mL por via intraplantar na pata traseira direita no modelo de edema de pata 60 minutos após a administração oral de água destilada, veículo e do extrato bruto IADFE e frações IADFFH, IADFEC, IADFEA, IP-1-1-1FFA e administração subcutânea de dexametasona;
- ✓ Dexametasona: anti-inflamatório esteroide reconhecido e utilizado como controle positivo no modelo do edema de pata. Foi administrado na dose de 2,25 mg/kg, por via subcutânea. Esta dose utilizada foi obtida a partir do cálculo de DE50 (dose que produz 50% do efeito máximo de uma droga), de acordo com Dos Santos et al. (2015);
- ✓ Morfina: agonista não seletivo de receptores opioides reconhecidamente utilizado como analgésico. Neste estudo, foi utilizada como controle positivo nos modelos algésimétricos de imersão de cauda em água quente. Este fármaco foi administrado por via oral na dose de 8,15 mg/kg.

A dose utilizada foi obtida a partir do cálculo de DE50 de acordo com Marinho et al. (2011);

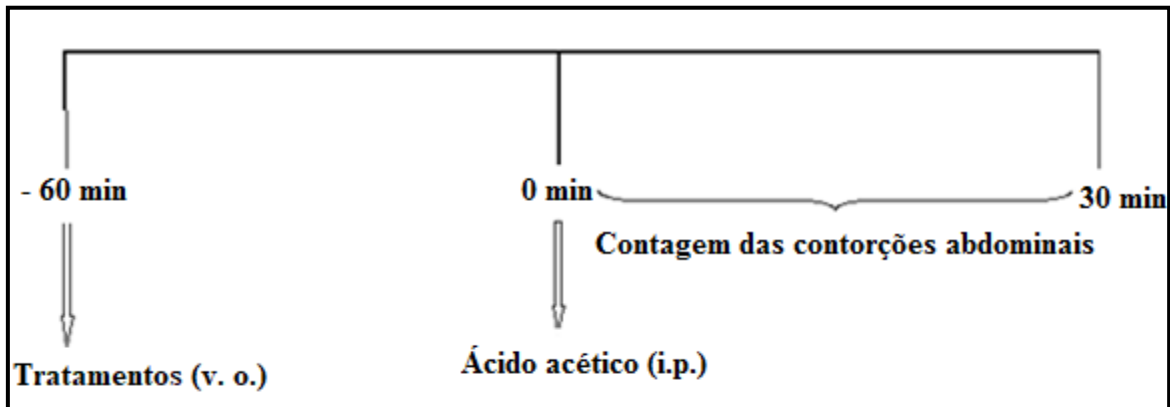
- ✓ Indometacina: Anti-inflamatório não-esteroidal reconhecido e utilizado como controle positivo em modelos de nocicepção periférica. Neste estudo, foi utilizada como controle positivo no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Este fármaco foi administrado por via oral na dose de 10 mg/kg, de acordo com Ferreira et al., 2010.

Os valores de DE50 dos fármacos de referência (indometacina, morfina e dexametasona), utilizados como controle positivo para as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, foram obtidos ajustando-se os pontos de dados que representam os efeitos antinociceptivo e/ou anti-inflamatório demonstrados nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, de imersão de cauda e edema de pata por regressão não-linear (dose resposta sigmoidal) utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.0 (San Diego, Califórnia, USA).

4.2.2.3 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Esse modelo foi usado para triagem da atividade antinociceptiva (KOSTER et al., 1959). As contorções abdominais foram induzidas pela administração intraperitoneal de 0,01 mL/g de peso do animal de ácido acético (1,2%), 60 minutos após a administração água destilada, veículo, indometacina, extratos e frações por via oral. A contagem do número de contorções foi iniciada imediatamente após a injeção e permaneceu por um período de 30 minutos. O padrão de contorção abdominal estabelecido para contagem foi o aparecimento de fortes contrações abdominais, alongamento de todo o corpo do animal, seguido pelo alongamento dos membros posteriores e contato do abdômen com o assoalho do recipiente em que o animal se encontrava. O protocolo experimental é representado na Figura 26.

Figura 26: Protocolo experimental do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

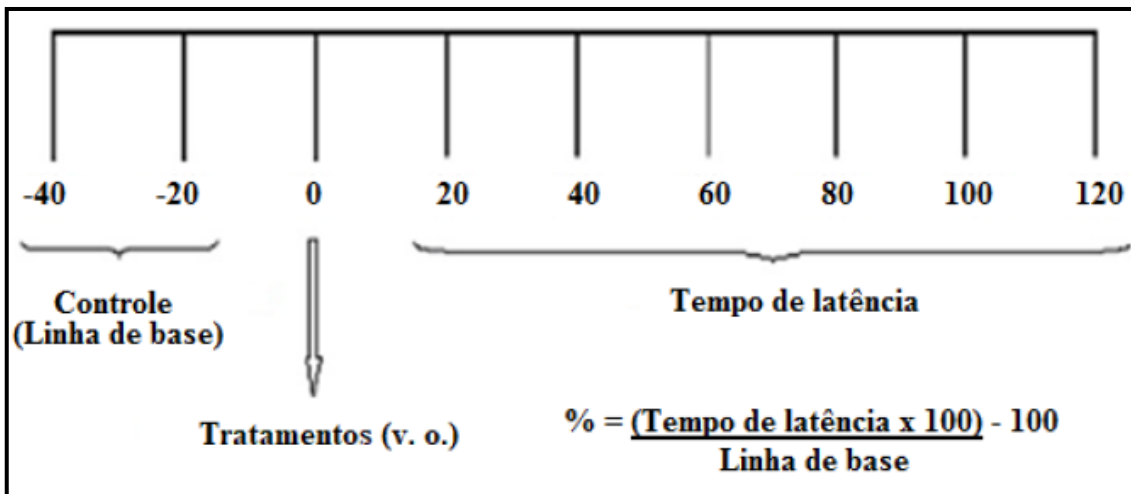


Fonte: (CARNEIRO, 2017).

4.2.2.4 Modelo de imersão de cauda em água quente

Esse modelo foi utilizado para avaliação da atividade antinociceptiva a nível espinhal (BEN-BASSAT et al., 1959). O modelo foi realizado como descrito por Moncada et al. (2003), com alterações. Foram feitas várias medidas dos tempos de latência com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas, totalizando oito medidas. As primeiras duas medidas foram realizadas antes dos tratamentos (e são chamadas de medidas controle). Após a segunda medida controle, foi feita a administração de água destilada, veículo, morfina (8,15 mg/kg), IADFE, IADFEH, IADFEC, IADFEA, IP-1-1-1FFA, (na dose de 100 mg/kg, exceto o IADFE que foi administrado na dose de 500 mg/kg), esperou-se 20 minutos e as outras seis medidas foram realizadas, também com intervalo de 20 minutos entre elas. A média das medidas controle é denominada "linha de base". Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, calculamos um "cut-off" de 3 vezes o valor da linha de base. Foi imerso 1/3 da cauda do animal de cada grupo em banho de água quente ($50\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a manifestação de retirada da cauda ("flicking response") ou apresentação de sinais de luta. A antinocicepção foi quantificada pelo cálculo do percentual de aumento em relação à linha de base, dado pela fórmula na Figura 27 e seu protocolo experimental.

Figura 27: Modelo de retirada da cauda. Protocolo experimental e fórmula utilizada para a quantificação da antinocicepção.

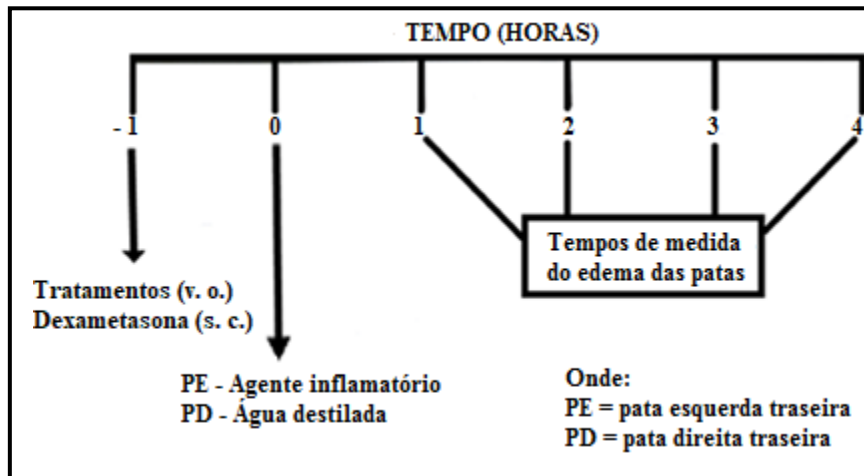


Fonte: (CARNEIRO, 2017).

4.2.2.5 Modelo de edema de pata

Para avaliar o efeito antiedematogênico do extrato hidroalcoólico das folhas da *Annona dolabripetala* e suas frações, utilizou-se a técnica da pletismografia. Através do pletismômetro, foi avaliado o edema na pata dos animais induzido por carragenina (VAN ARMAN, 1979). Este aparelho mede pequenas variações de volume de líquido, numa coluna de água acoplada ao equipamento, deslocado pela inserção da pata do animal até a articulação tíbio-társica. Diferentes grupos foram tratados oralmente com água destilada, veículo, extrato e frações IADFE, IADFEH, IADFEC, IADFEA, IP-1-1-1FFA por via oral (na dose de 100 mg/kg, exceto o IADFE que foi administrado na dose de 500 mg/kg), e dexametasona (2,25 mg/kg) por via subcutânea, 60 minutos antes da indução do edema. O edema na pata dos camundongos foi induzido através da administração intraplantar de 0,02 mL de carragenina (1%) na pata esquerda traseira do animal. Na pata direita traseira foi injetado o mesmo volume de solução fisiológica. O edema foi avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a administração da carragenina. Os resultados foram expressos pela diferença de volume entre as patas esquerda e direita traseiras, em μL . O protocolo experimental está representado na Figura 28.

Figura 28: Protocolo experimental do modelo de edema de pata induzido por carragenina.



Fonte: (CARNEIRO, 2017).

4.2.2.6 Análise estatística

Todos os grupos experimentais foram constituídos de 6-10 animais. Os resultados estão expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). A significância estatística entre os grupos foi realizada pela aplicação de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni para os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de ANOVA de duas vias acompanhada pelo teste de Bonferroni para os modelos de retirada da cauda e edema de pata. Os valores de p menores que 0,05; 0,01 e 0,001 foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Prospecção fitoquímica

Os principais grupos de metabólitos secundários podem ser identificados em amostras de extratos e/ou frações a partir de testes qualitativos por reações químicas que resultam em mudanças de coloração e/ou precipitação. A maior desvantagem dessa análise é a possibilidade de resultados falso-negativos ou falso-positivos, além de interpretações subjetivas por parte do analista. Mas não perde sua importância para uma análise inicial e rápida de um estudo químico mais aprofundado (REGINATTO, 2017).

Os extratos brutos das folhas e caule de *Annona dolabripetala* foram submetidos a testes fitoquímicos qualitativos para identificação da presença dos metabólitos secundários majoritários (Tabela 11).

Tabela 11: Presença e ausência de classes de metabólitos secundários nos extratos brutos das folhas e caules.

Classes de metabólitos secundários	Extrato bruto das folhas (IADFE)	Extrato bruto do caule (IADCE)
Alcaloides	-	+
Flavonoides	+	+
Saponinas	-	-
Polissacarídeos	-	-
Triterpenos	+	+
Esteroides	-	+
Taninos	+	-

Alguns reagentes clássicos para detecção de classes de metabólitos foram usados, como o Dragendorff para alcaloides, a reação de Shinoda para flavonoides e a reação de Liebermann-Burchard para detecção de triterpenos e esteroides.

O extrato bruto do caule (IADCE) sugere a presença de alcaloides, flavonoides, triterpenos e esteroides. Já o extrato bruto das folhas (IADFE) sugere a presença das classes de flavonoides, triterpenos e taninos.

Na literatura foi encontrado o estudo de Campos (2013) que realizou testes qualitativos no extrato hidroalcoólico das folhas de *Rollinia dolabripetala* (sinonímia de *Annona dolabripetala*), no qual avaliou e constatou a presença das

classes de flavonóis, taninos e xantonas, além da ação antioxidante frente ao método DPPH.

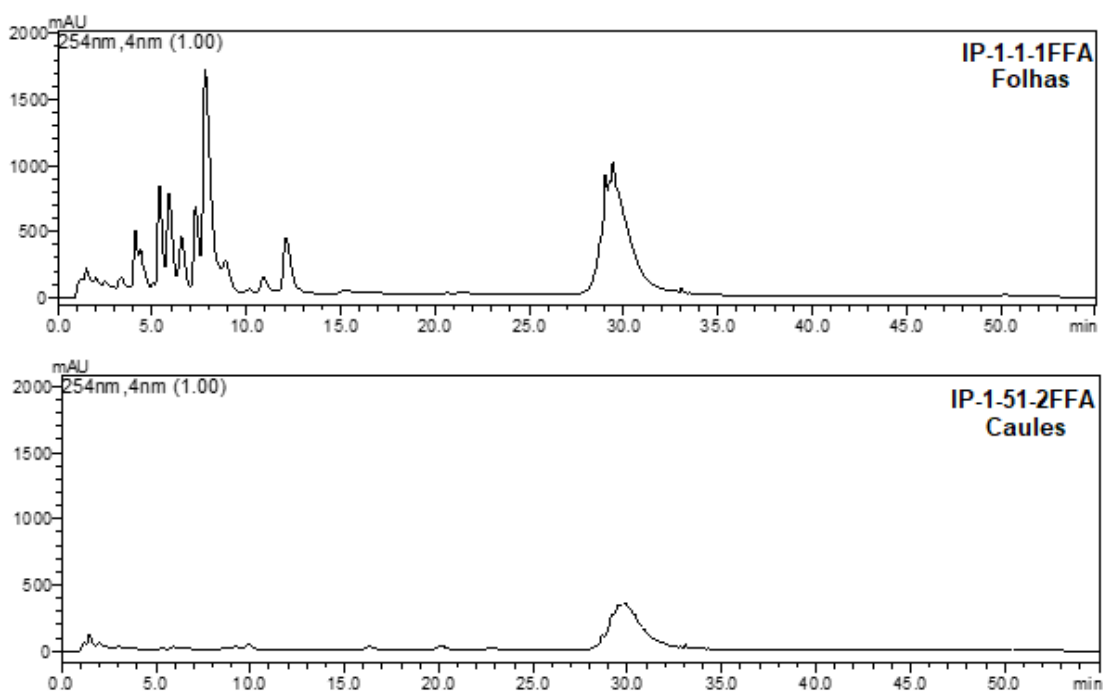
O objetivo inicial desse estudo com *Annona dolabripetala* foi direcionar a pesquisa para a classe de flavonoides. Como a presença dessa classe foi confirmada pelo teste qualitativo, tanto no extrato das folhas quanto do caule, foram testadas as frações obtidas do particionamento líquido-líquido como consta na Tabela 12.

Tabela 12: Teste qualitativo de presença de flavonoides nas frações dos extratos.

Folhas		Caules	
Hexano (IADFEH)	-	Hexano (IADCEH)	-
Clorofórmio (IADFEC)	-	Clorofórmio (IADCEC)	-
Acetato de etila (IADFEA)	+	Acetato de etila (IADCEA)	+

A avaliação qualitativa das frações das folhas e caules de *A. dolabripetala* sugerem a presença de flavonoides apenas nas frações em acetato de etila. A partir disso, foi realizado um procedimento cromatográfico por exclusão em gel de sephadex LH-20 com MeOH/H₂O 1:1, a fim de obter uma fração rica em flavonoides (IP-1-1-1FFA – folhas e IP-1-51-2FFA - caules). As frações flavonoídicas foram analisadas por UPLC (Figura 29).

Figura 29: Cromatograma das frações flavonoídicas das folhas e caules em 254 nm.



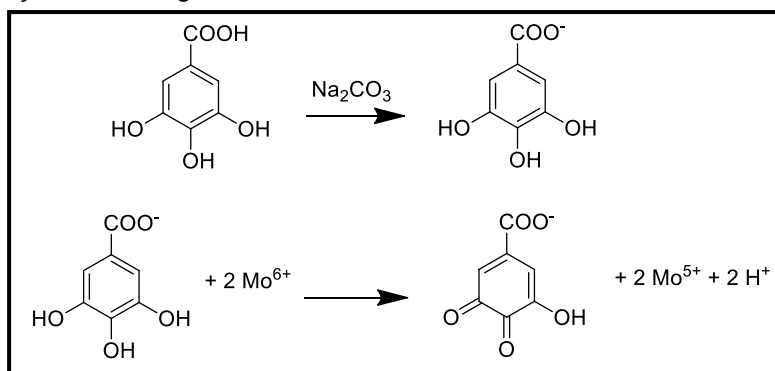
Analisando o cromatograma comparativo das duas frações flavonoídicas apresentadas na Figura 29, é possível observar a maior quantidade de flavonoides presentes na fração das folhas (IP-1-1-1FFA) do que em relação ao caule (IP-1-51-2FFA). Por esse resultado, foi direcionado o estudo químico visando o isolamento desses flavonoides para a fração flavonoídica das folhas.

5.2 Análise da fração IP-1-1-1FFA

5.2.1 Determinação do teor de fenóis totais

O reagente de Folin-Ciocalteu é uma mistura dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstíco. O molibdênio apresenta estado de oxidação 6+ (cor amarela), mas em presença de agentes redutores como as substâncias fenólicas formam-se complexos molibdênio-tungstênio (cor azul). A média do estado de oxidação desses metais está entre 5+ e 6+. A Figura 30 mostra a desprotonação do ácido gálico em meio básico resultando no fenolato, em seguida ocorre a reação de oxirredução do fenolato com o reagente de Folin, no qual o molibdênio sofre redução, mudando a coloração da solução de amarela para azul (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 30: Reação do ácido gálico com molibdênio.

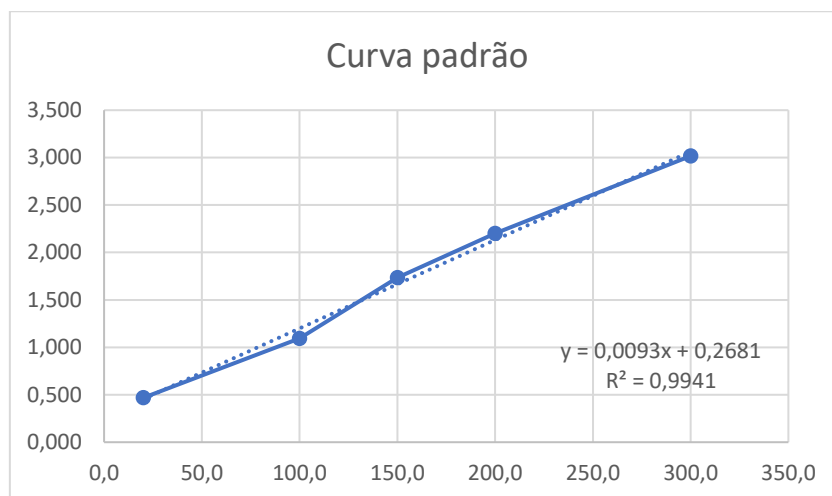


Fonte: (OLIVEIRA et al., 2009).

O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação das absorvâncias da fração flavonoídica IP-1-1-1FFA contra a curva padrão construída a partir de concentrações de ácido gálico (20,0 a 300,0 $\mu\text{g/mL}$) e expressos em mg de equivalentes de ácido gálico por g de extrato (Figura 31 e Tabela 13).

Tabela 13: Leitura das absorvâncias para a construção da curva padrão.

Concentração dos padrões	Absorbância
20,0 $\mu\text{g/mL}$	0,468
100,0 $\mu\text{g/mL}$	1,095
150,0 $\mu\text{g/mL}$	1,734
200,0 $\mu\text{g/mL}$	2,201
300,0 $\mu\text{g/mL}$	3,017

Figura 31: Curva padrão de ácido gálico na concentração de 20,0 a 300,0 µg/mL a 750 nm.

A equação da curva padrão do ácido gálico foi $y = 0,0093x + 0,2681$, onde y é a absorbância, x é a concentração de fenóis a 750 nm e o coeficiente de correlação $R^2 = 0,9941$.

As três análises da amostra (IP-1-1-1FFA) deram os seguintes valores de absorbância: 0,834, 0,902 e 0,918. O resultado obtido na determinação dos fenóis totais (FT) pelo método de Folin-Ciocalteu, foi de $33,2 \pm 1,9$ mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por g de extrato.

5.2.2 Análise por RMN e HPLC-DAD da fração flavonoídica

A fração flavonoídica IP1-1-1FFA foi analisada quanto ao perfil químico apresentado no espectro de RMN ^1H e ^{13}C , além de análises por HPLC.

O espectro de RMN ^1H da fração (Figura 32, p. 79) mostra sinais característicos de flavonoides glicosilados e o espectro de RMN ^{13}C (Figura 33, p. 79) confirma essa observação. Sinais característicos do esqueleto básico de flavonoides são observados, a partir dos sinais referentes aos anéis aromáticos A e B na região de 6,20 a 7,64 ppm no espectro de ^1H . No espectro de ^{13}C os sinais característicos do anel aromático A de flavonoides em 98,0 e 93,0 ppm, e do anel B na região de 115,0 a 130,0 ppm. Sinais característicos de açúcares estão localizados na região entre 1,08 a 4,54 ppm no espectro de ^1H , já no

espectro de ^{13}C entre 81,8 a 60,0 ppm. Sinais de átomos de hidrogênio e carbono anomérico estão na região de 5,0 e 100,0 ppm, respectivamente.

Figura 32: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3OD) de IP-1-1-1FFA.

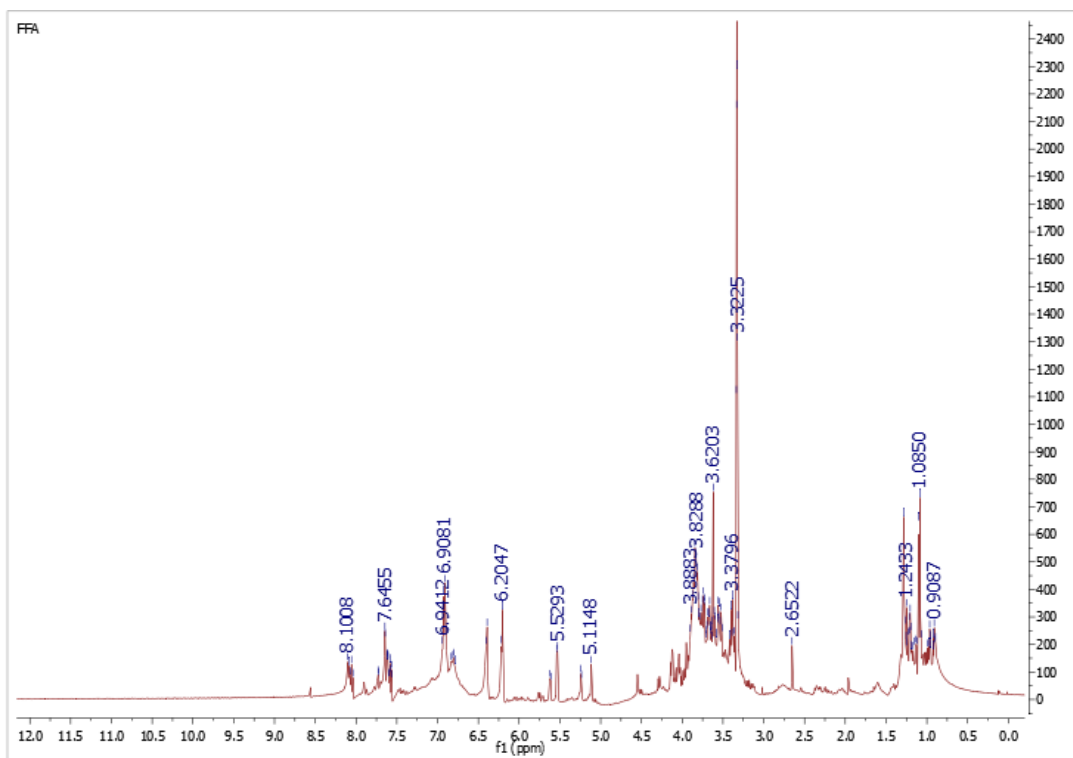
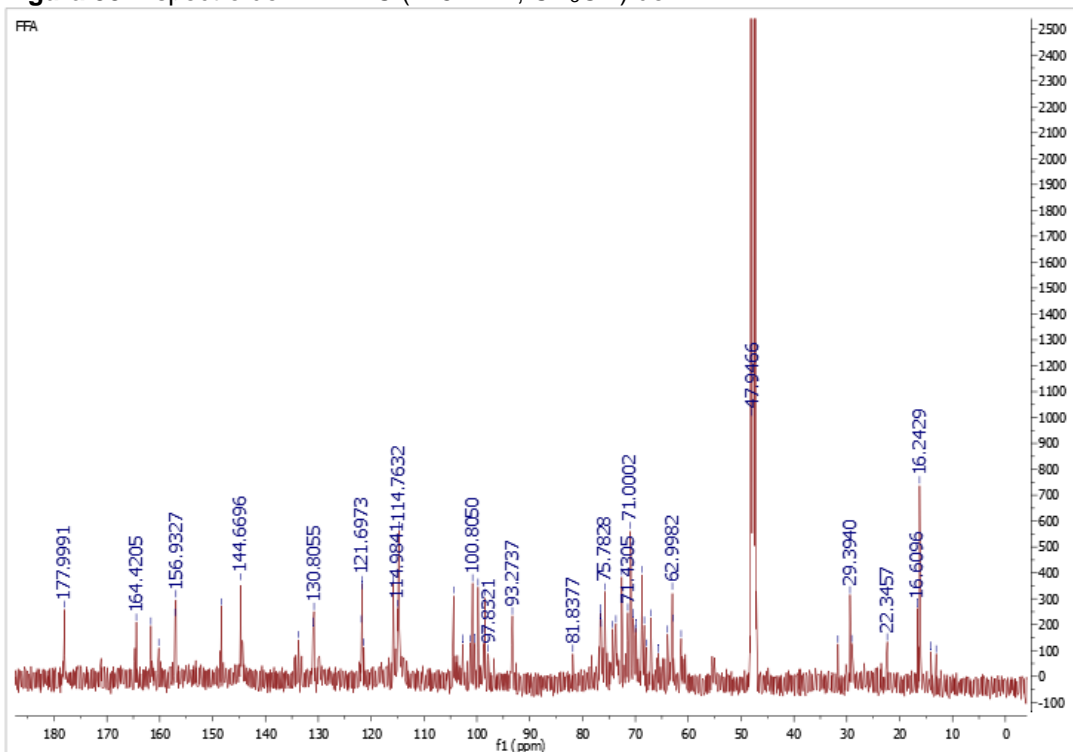


Figura 33: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) de IP-1-1-1FFA.



A Figura 34 mostra o cromatograma obtido da análise no HPLC-DAD a 254 nm com dois sinais majoritários nos tempos de retenção 14,229 e 29,382 min. De forma comparativa, na Figura 35 foram sobrepostos os cromatogramas obtidos posteriormente ao isolamento de flavonoides da fração flavonoídica IP-1-1-1FFA por processos cromatográficos (substâncias **17** a **21**). É possível observar que as substâncias presentes nos sinais majoritários foram isoladas, como a IP-1-31E (tr = 14,116 min) e IP-2-23G (tr = 29,379 min).

Após a identificação estrutural por espectros de RMN, as substâncias de **17** a **21** foram analisadas por HPLC-MS, como é descrito mais detalhadamente nos itens de determinação estrutural de cada substância.

Figura 34: Cromatograma de HPLC obtido para IP-1-1-1FFA a 254 nm.

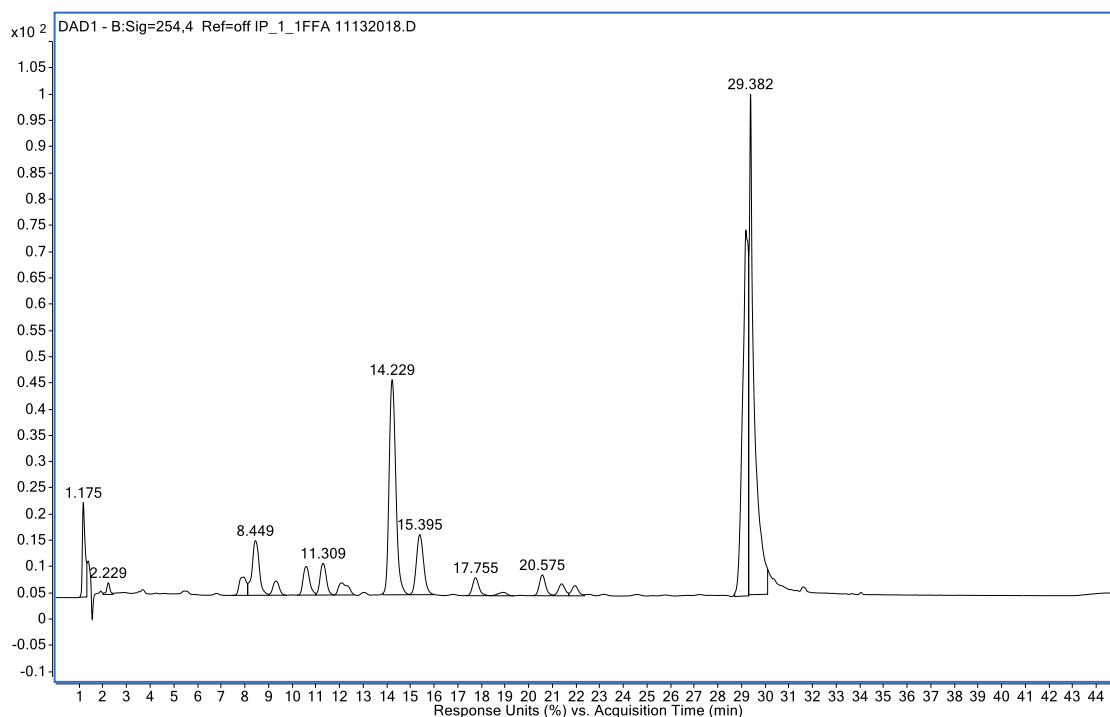
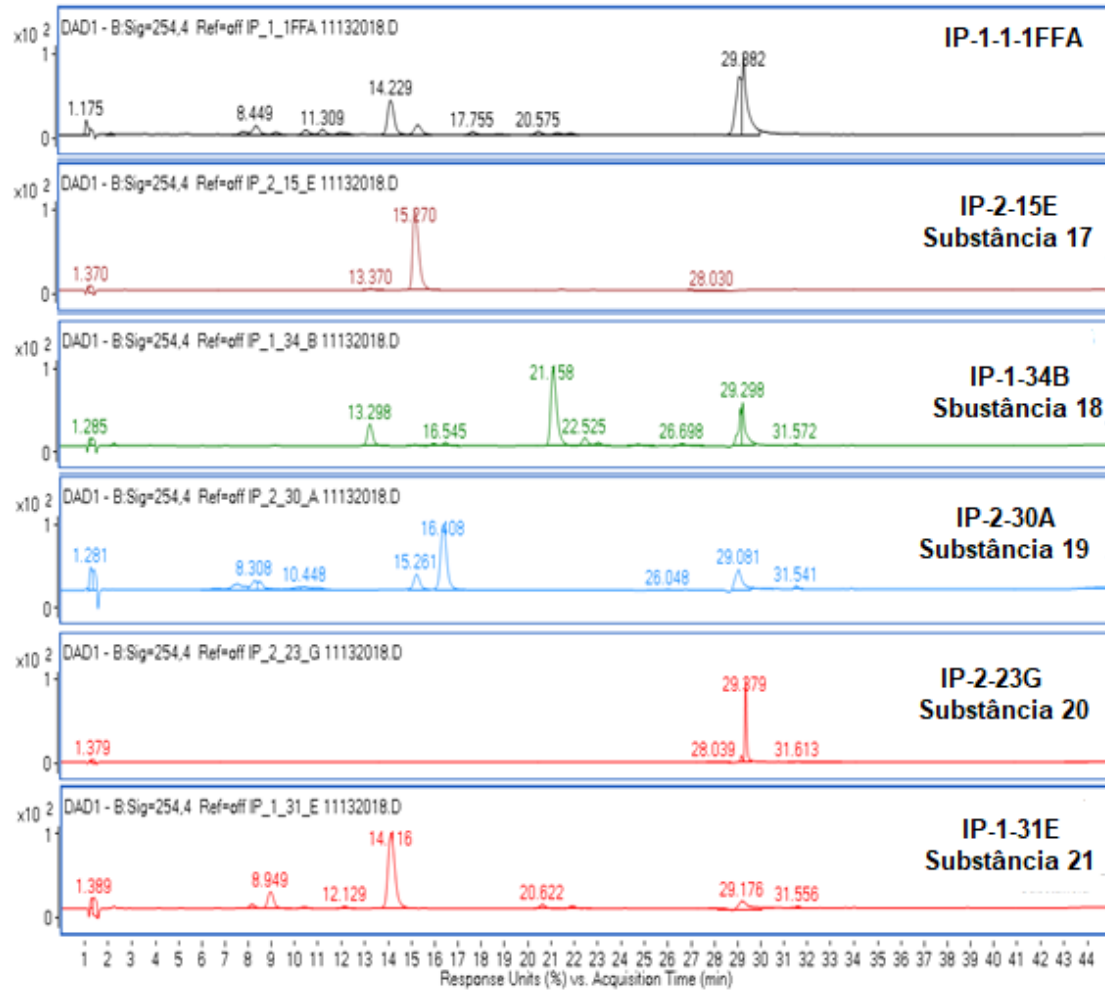


Figura 35: Cromatogramas de HPLC a 254 nm obtidos da análise da fração flavonoídica IP-1-1-1FFA e das substâncias de 17 a 21.



5.3 Análise da fração em hexano por RMN e CG/EM

A fração em hexano apresentou-se como óleo de coloração amarela e foi analisada quanto ao perfil químico apresentado pelos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , além de análise por CG-EM a fim de identificar as substâncias por comparação das fragmentações de massas com o banco de dados NIST.

Analisando o espectro de RMN ^1H (Figura 36) é possível observar sinais característico de metilas na região de 1,00 a 2,00 ppm. Região de sinais de átomos de hidrogênio vinílicos entre 4,11 e 5,14 ppm. As classes de terpenos e esteroides possuem esses sinais de deslocamento e o teste qualitativo para identificação dessas classes sugere apenas a presença de triterpenos, porém não foi realizado teste específico para outras classes de terpenos e/ou ácidos graxos. O espectro de RMN ^{13}C (Figura 37) mostra sinais característicos de ligações duplas de esteroides e/ou triterpenos na região de 124,0 a 136,0 ppm aproximadamente, bem como sinais característicos de átomos de carbono metílicos (CH_3) e metilênicos (CH_2) em torno de 15,0 a 60,0 ppm.

Figura 36: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) de IADFEH.

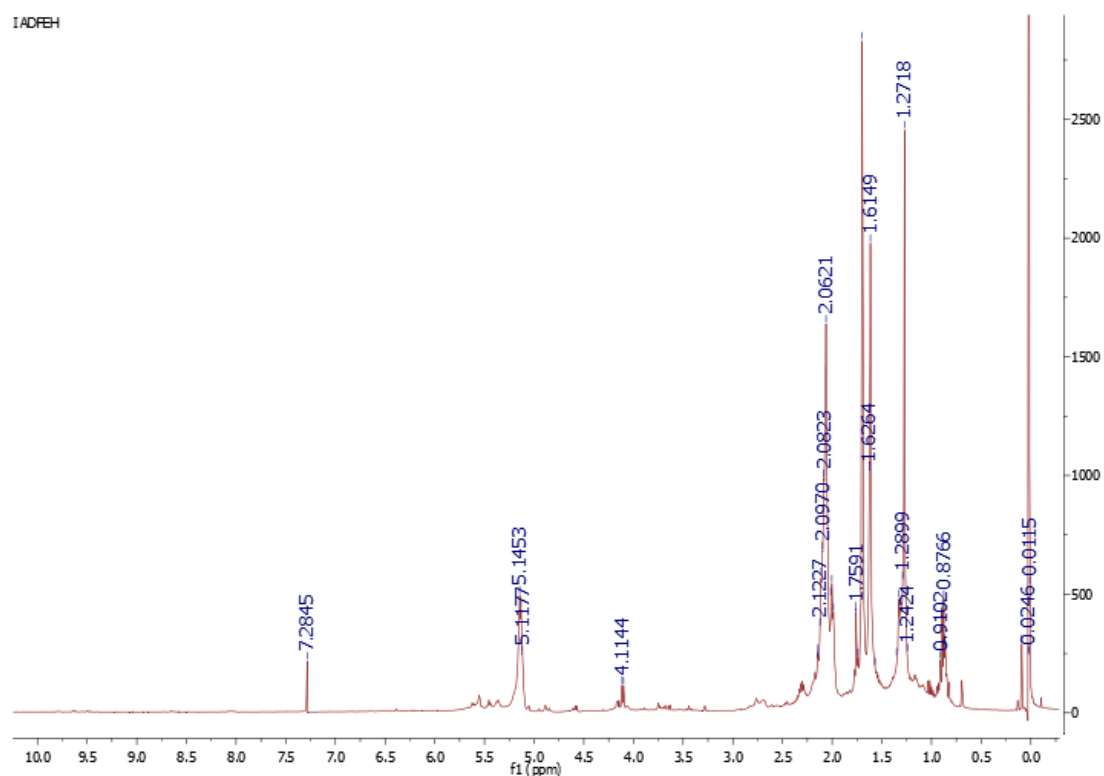
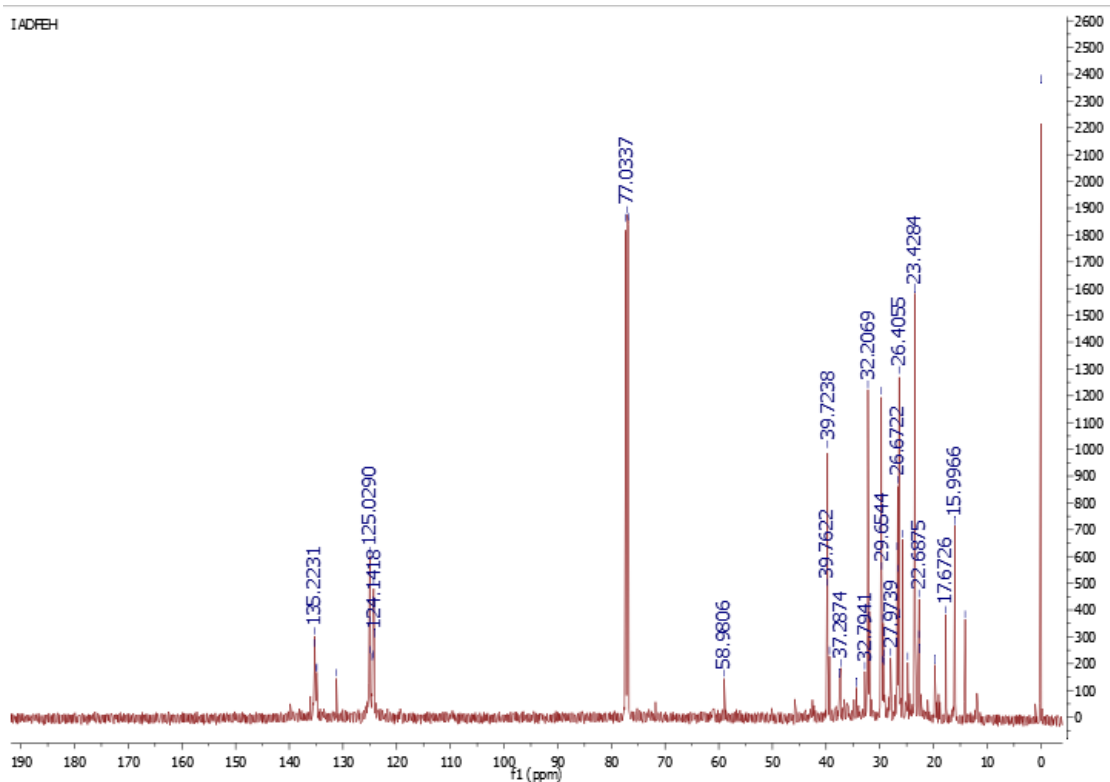


Figura 37: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) de IADFEH.



A análise por CG-EM teve como objetivo identificar as substâncias voláteis comparando-as com as substâncias identificadas pela biblioteca de espectros de massas NIST. Foram consideradas apenas as substâncias com índice de similaridade maior que 80% (Figura 38, p. 84 e Tabela 14, p. 85).

Foram identificadas dezesseis substâncias (**1-16**) pertencentes as classes de ácidos graxos, ésteres, cetona e esteroides. Na análise fitoquímica, o teste de esteroides deu negativo, isso pode estar relacionado a baixa concentração dessa classe no extrato bruto das folhas, no qual outras substâncias possam ter camuflado a presença.

Os compostos sugeridos pela biblioteca são substâncias de baixo peso molecular e grande cadeia de hidrocarbonetos o que justifica a presença de sinais com baixo deslocamento químico nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C . Os sinais entre 125 a 135 ppm no espectro de RMN ^{13}C são característicos das duplas ligações presentes nas estruturas de esteroides. O CG-EM é um método de melhor detecção de compostos voláteis, que são observados com picos intensos no cromatograma. Já os esteroides foram observados após os 25 min

de análise no cromatograma, com picos de baixa intensidade que podem ser devido ao alto ponto de ebulição dessas substâncias.

Figura 38: A. Cromatograma completo obtido da análise da fração em hexano por CG-EM; B. Ampliação do cromatograma até 34 min.

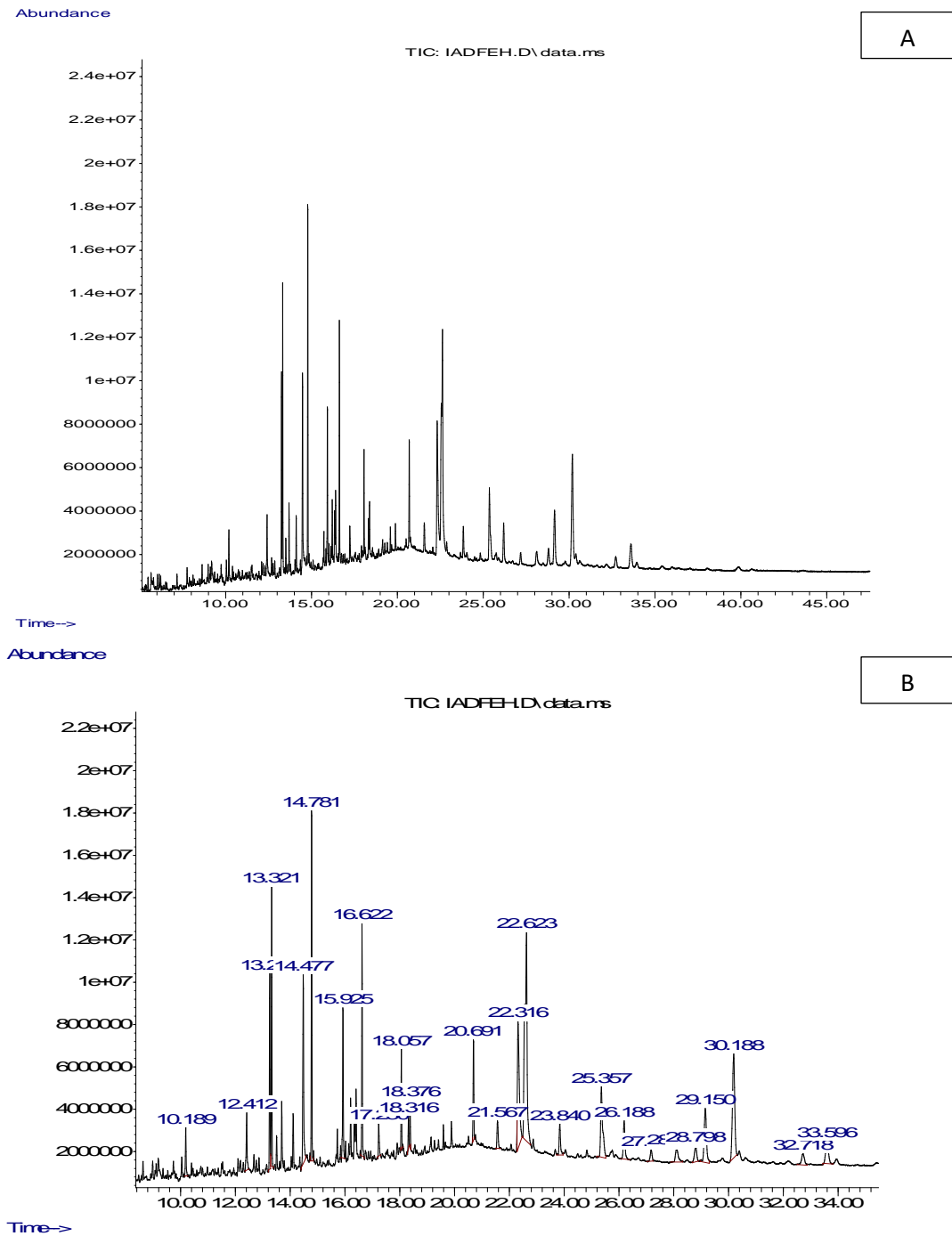


Tabela 14: Substâncias identificadas por CG-EM e pela biblioteca de espectro de massas NIST.

Subst.	TR (min)	Íon molecular <i>m/z</i>	Pico base <i>m/z</i>	Nomenclatura	IS
1	10,189	200	73	Ácido dodecanóico	85,5%
2	13,321	268	58	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona	94,1%
3	14,477	256	73	Ácido n-hexadecanóico	93,9%
4	14,781	284	88	Ácido hexadecanóico etil ester	91,7%
5	15,925	296	71	Fitol	92,2%
6	16,622	312	88	Ácido octadecanóico etil ester	91,6%
7	18,057	324	99	4,8,12,16-tetrametilheptadecan-4-olide	91,0%
8	18,316	340	88	Ácido eicosanóico etil ester	85,6%
9	18,376	370	129	Ácido hexanodióico di-(2- etilhexil) ester	88,7%
10	20,691	394	57	Octacosano	89,2%
11	22,623	366	57	Hexacosano	85,5%
12	26,188	430	165	Vitamina E	90,0%
13	28,111	400	55	Campesterol	84,9%
14	29,150	450	239	16-hentriacontanona	89,1%
15	30,188	414	55	γ -sitosterol	91,1%
16	32,718	410	174	Estigmasta-3,5-dien-7-ona	82,2%

Subst.: Substâncias; **TR:** Tempo de Retenção; **IS:** Índice de Similaridade

Os espectros de massas das substâncias que apresentaram índice de similaridade maior que 80% com os espectros de massas dos compostos de acordo com a biblioteca NIST estão separados, juntamente com as suas respectivas propostas de fragmentação (Figuras 39 a 54, p. 86-101).

Figura 39: **A.** Espectro de massas do íon molecular 200 m/z (substância **1**) em 10,189 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

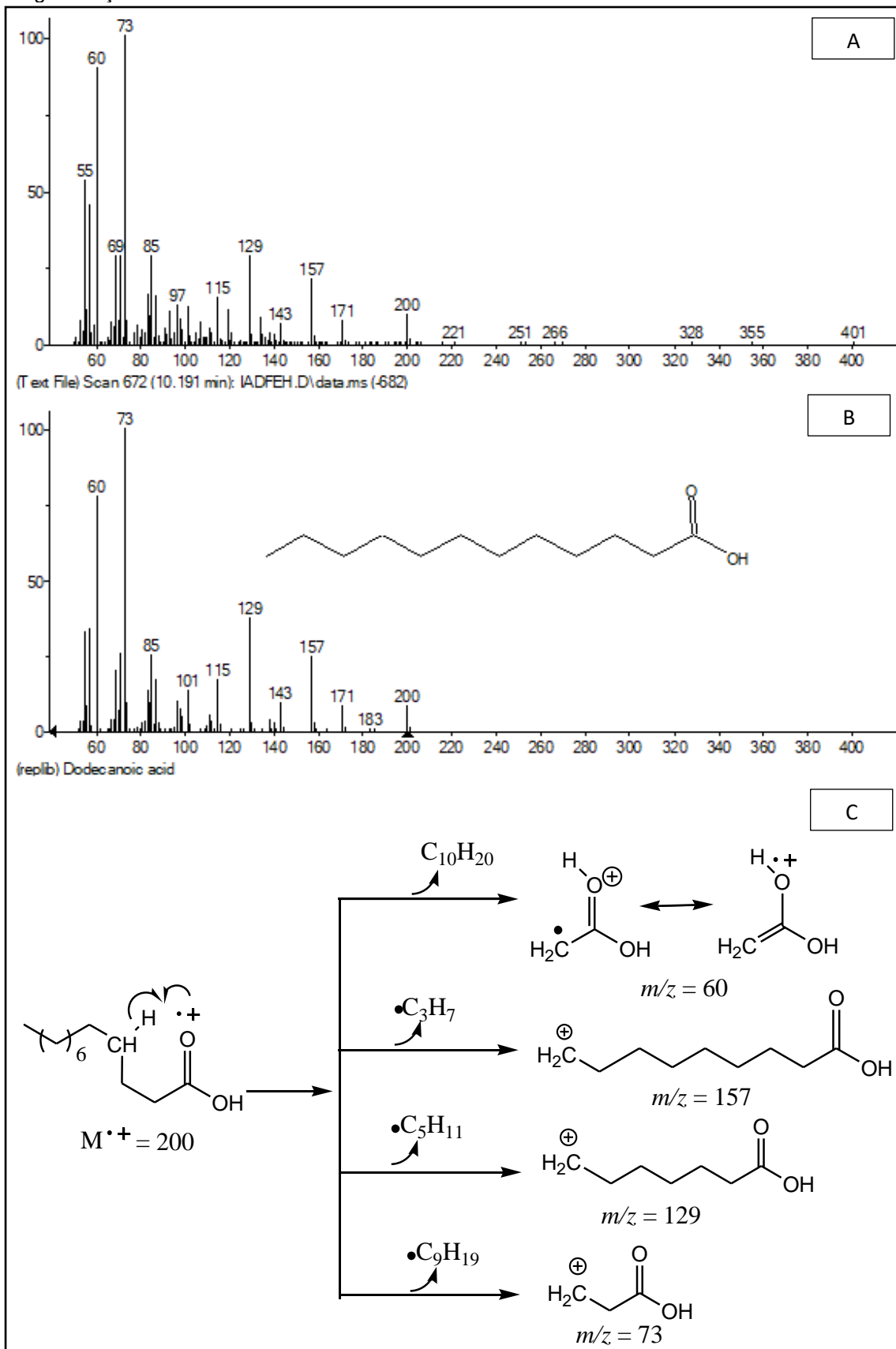


Figura 40: **A.** Espectro de massas do íon molecular 268 m/z (substância **2**) em 13,321 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

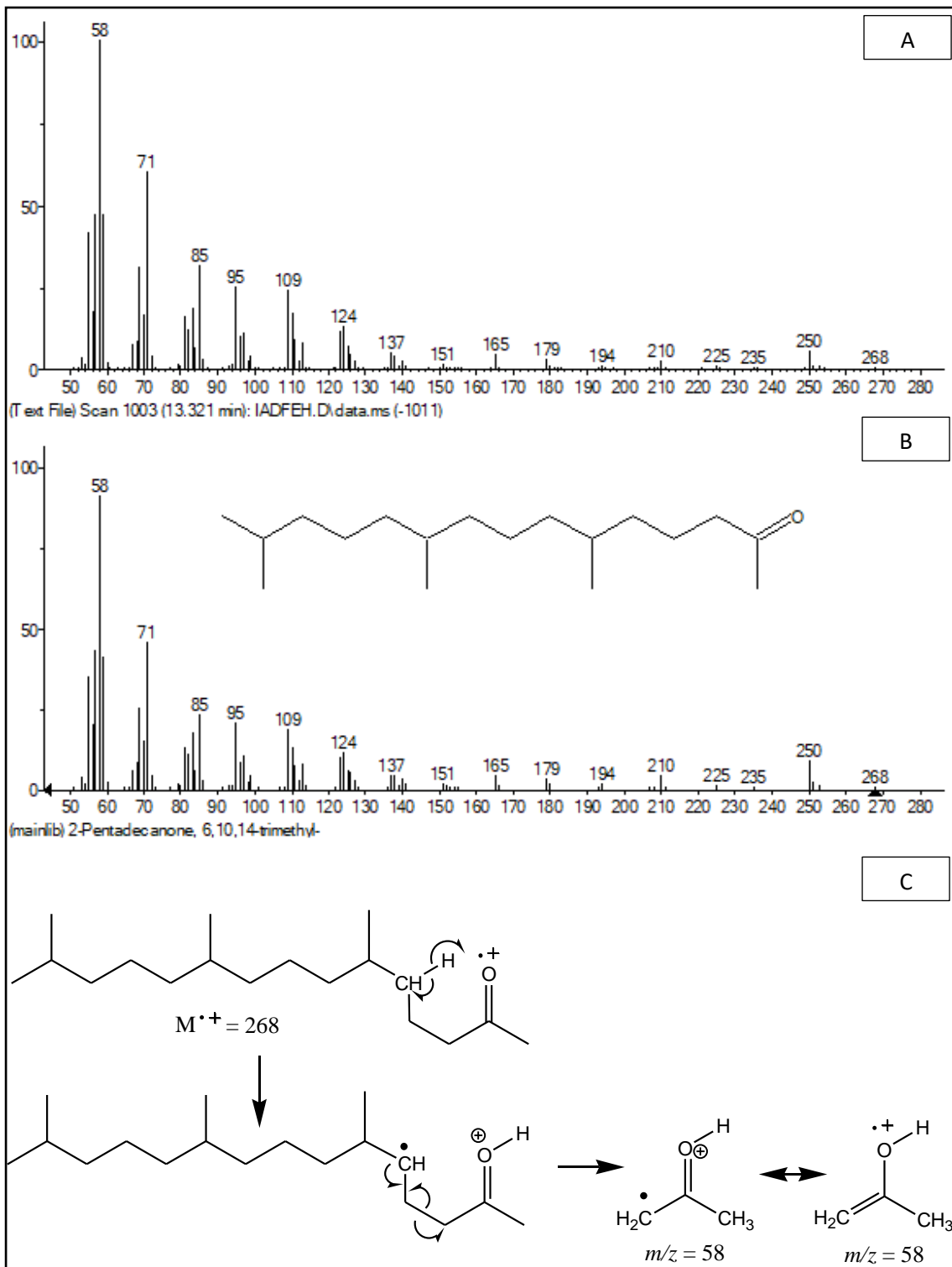


Figura 41: **A.** Espectro de massas do íon molecular 256 m/z (substância **3**) em 14,477 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecânica de fragmentação de massas.

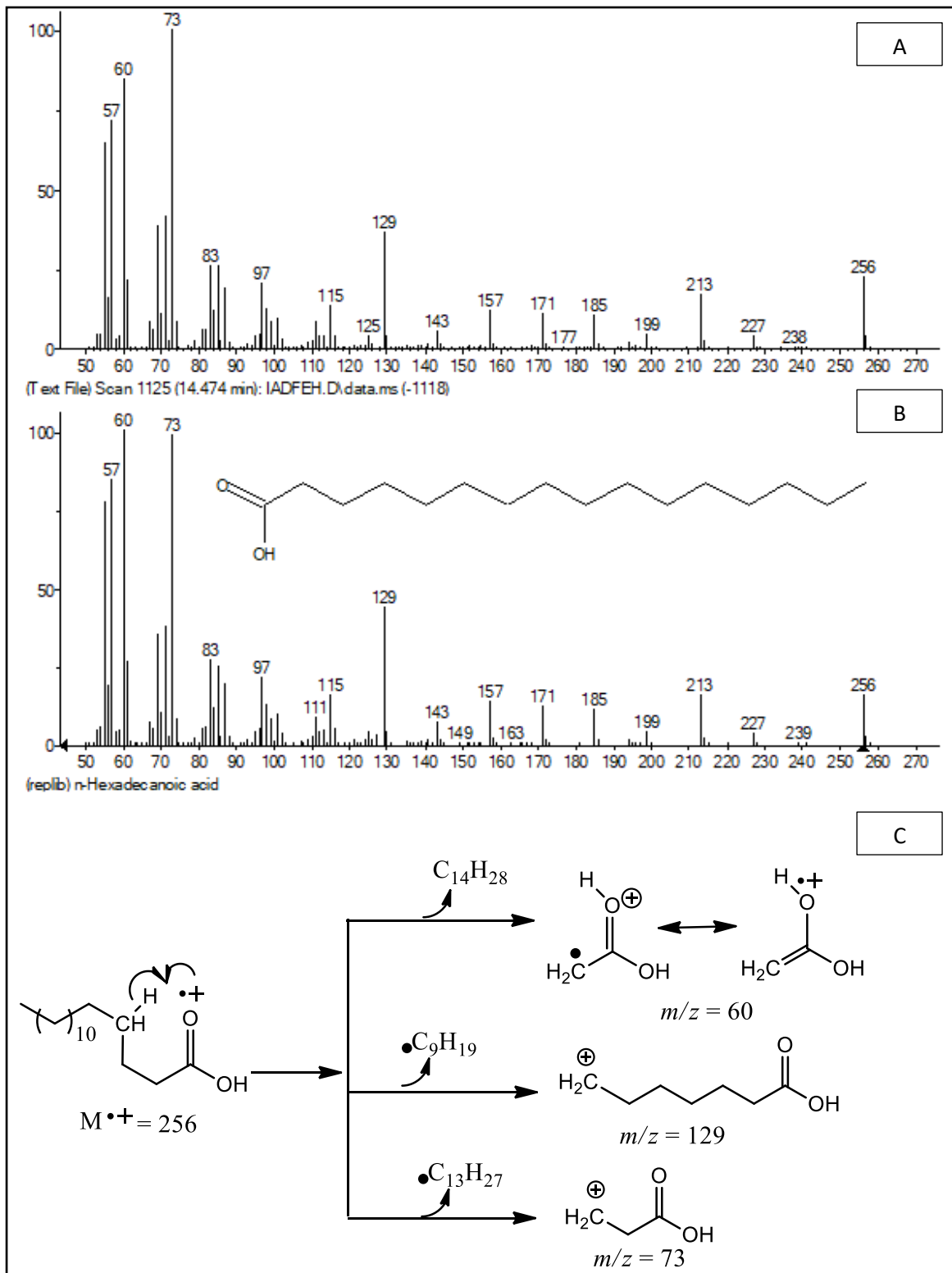


Figura 42: **A.** Espectro de massas do íon molecular 284 m/z (substância **4**) em 14,781 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

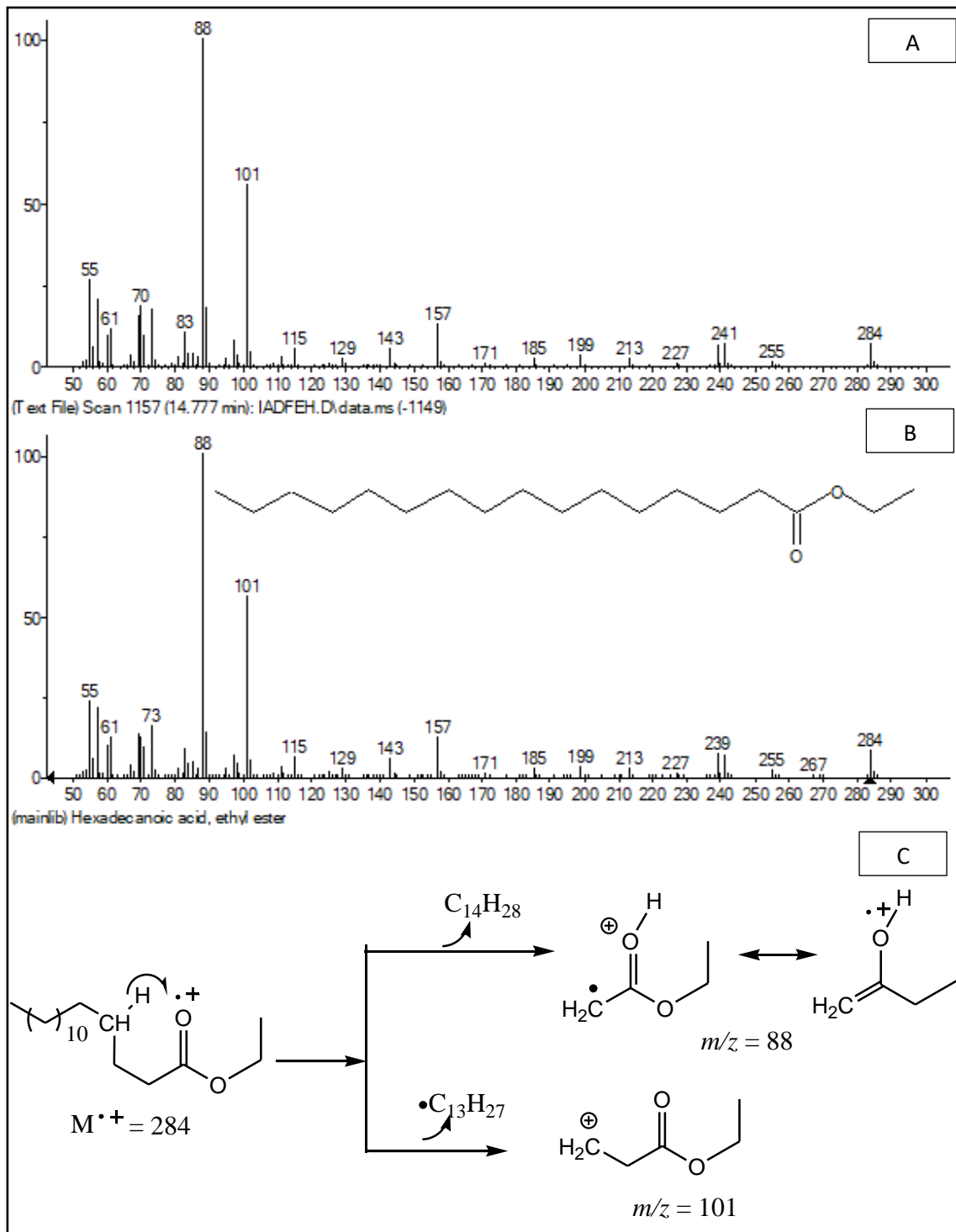


Figura 43: **A.** Espectro de massas do íon molecular 296 m/z (substância **5**) em 15,925 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

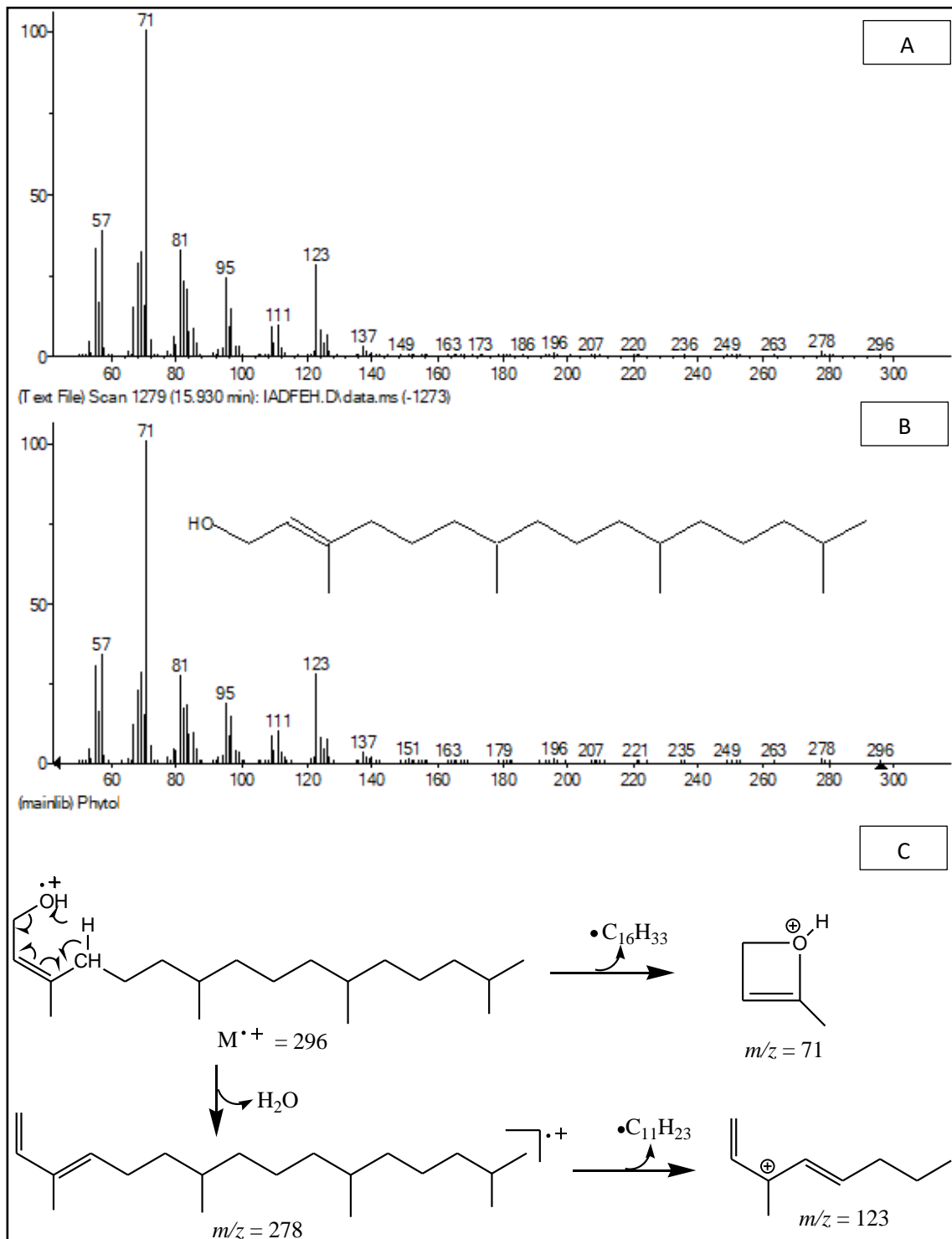


Figura 44: **A.** Espectro de massas do íon molecular 312 m/z (substância **6**) em 16,622 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

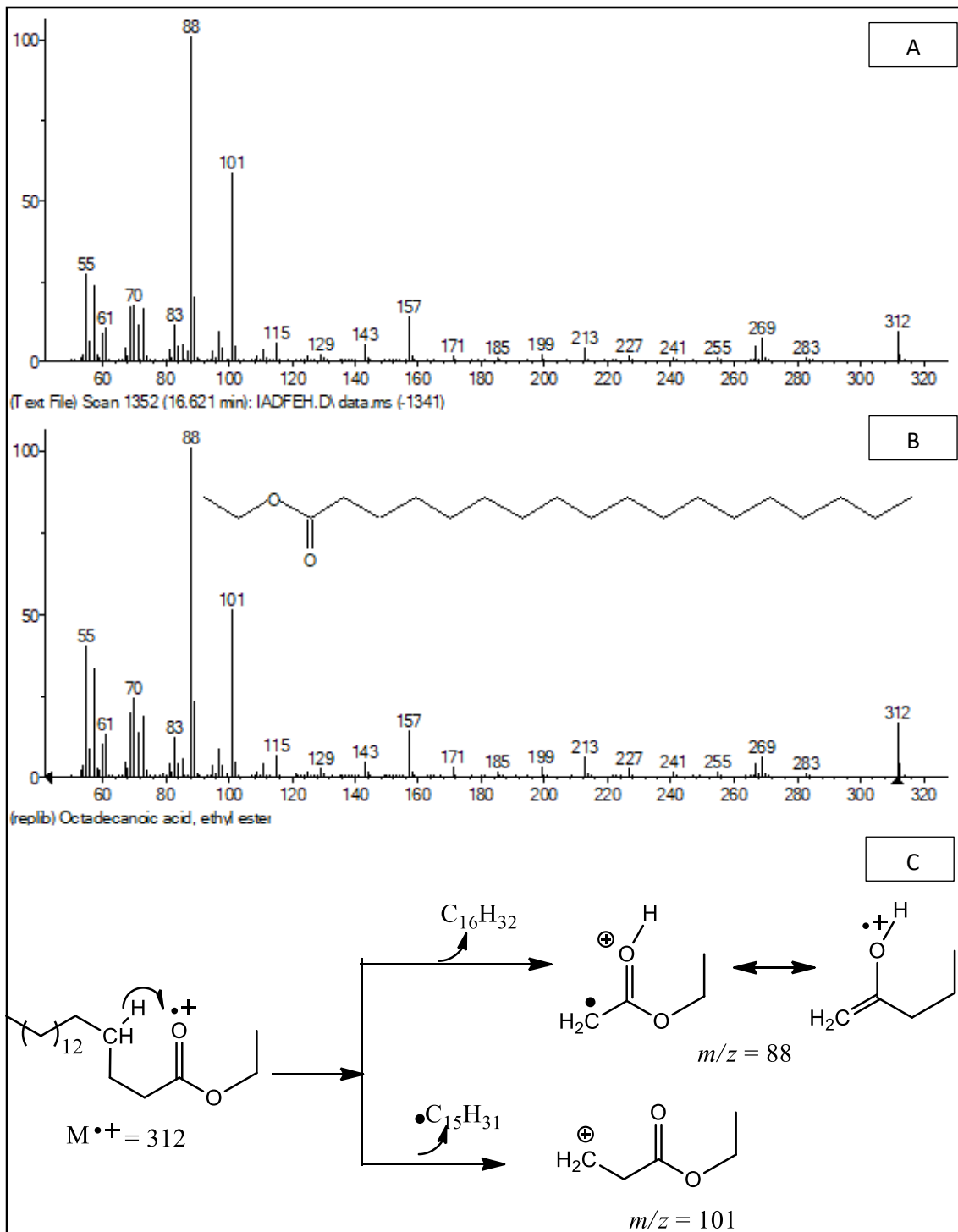


Figura 45: **A.** Espectro de massas do íon molecular 324 m/z (substância **7**) em 18,057 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

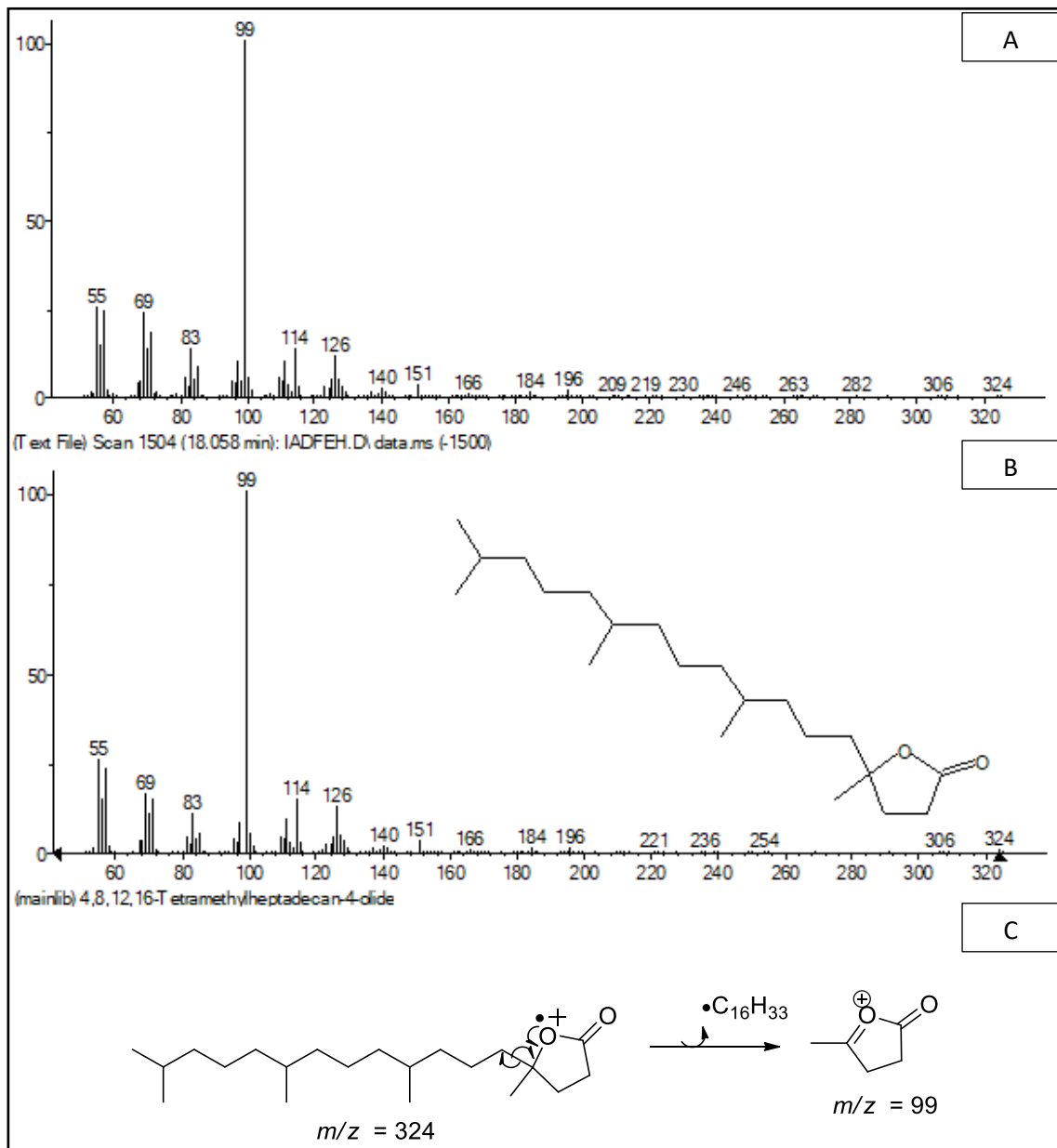


Figura 46: **A.** Espectro de massas do íon molecular 340 m/z (substância **8**) em 18,316 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

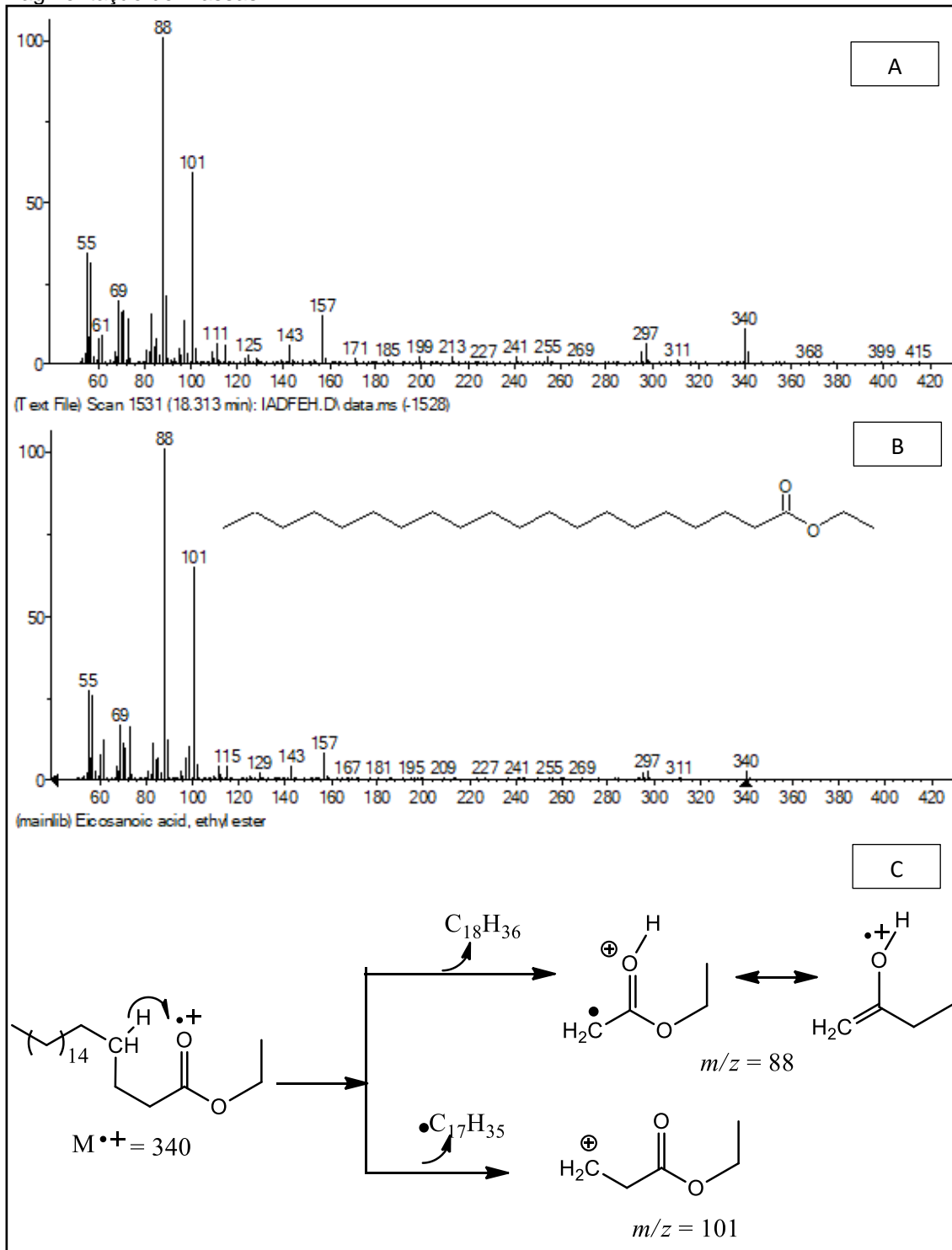


Figura 47: **A.** Espectro de massas do íon molecular 370 m/z (substância **9**) em 18,376 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

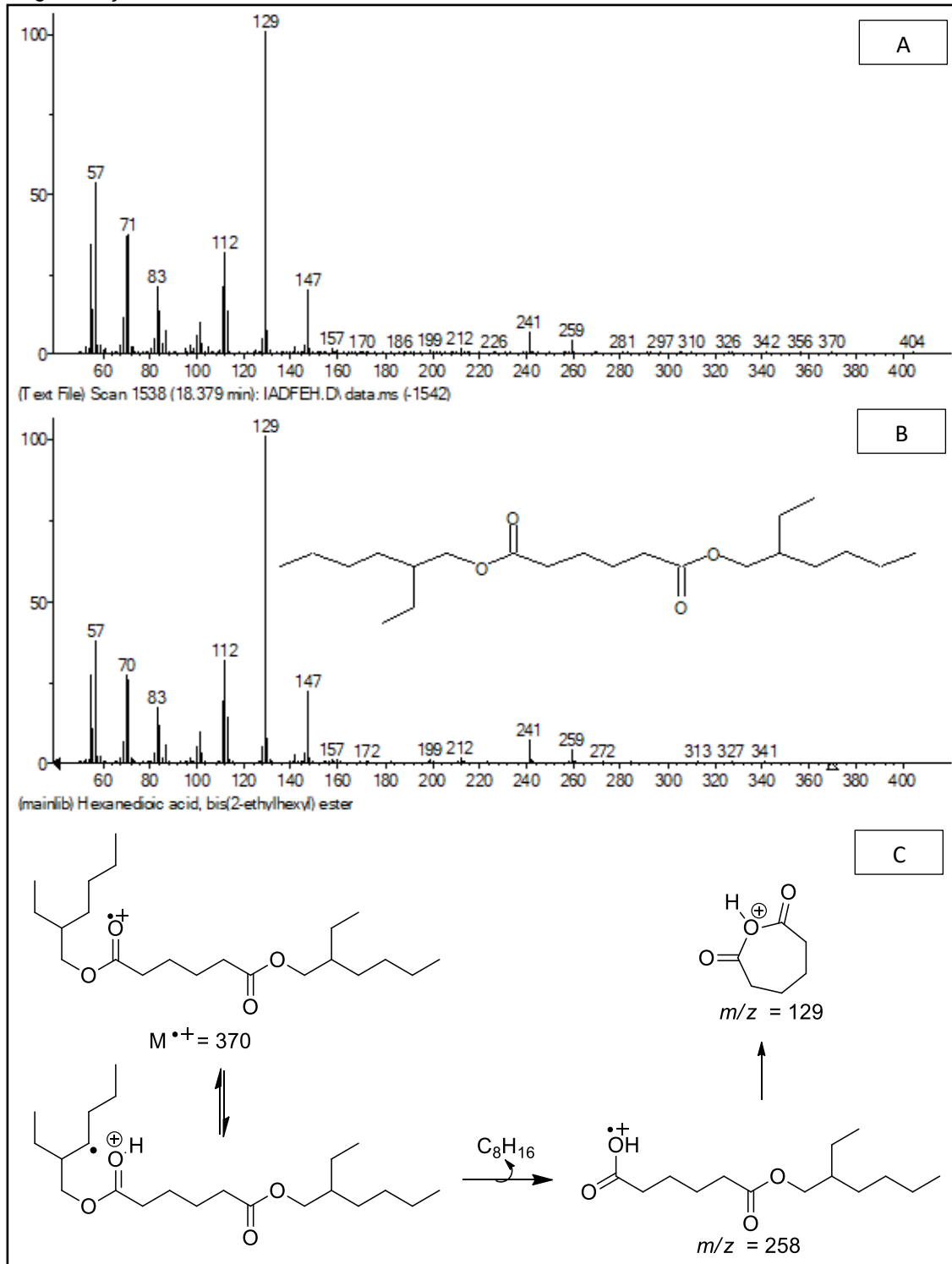


Figura 48: **A.** Espectro de massas do íon molecular 394 m/z (substância **10**) em 20,691 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

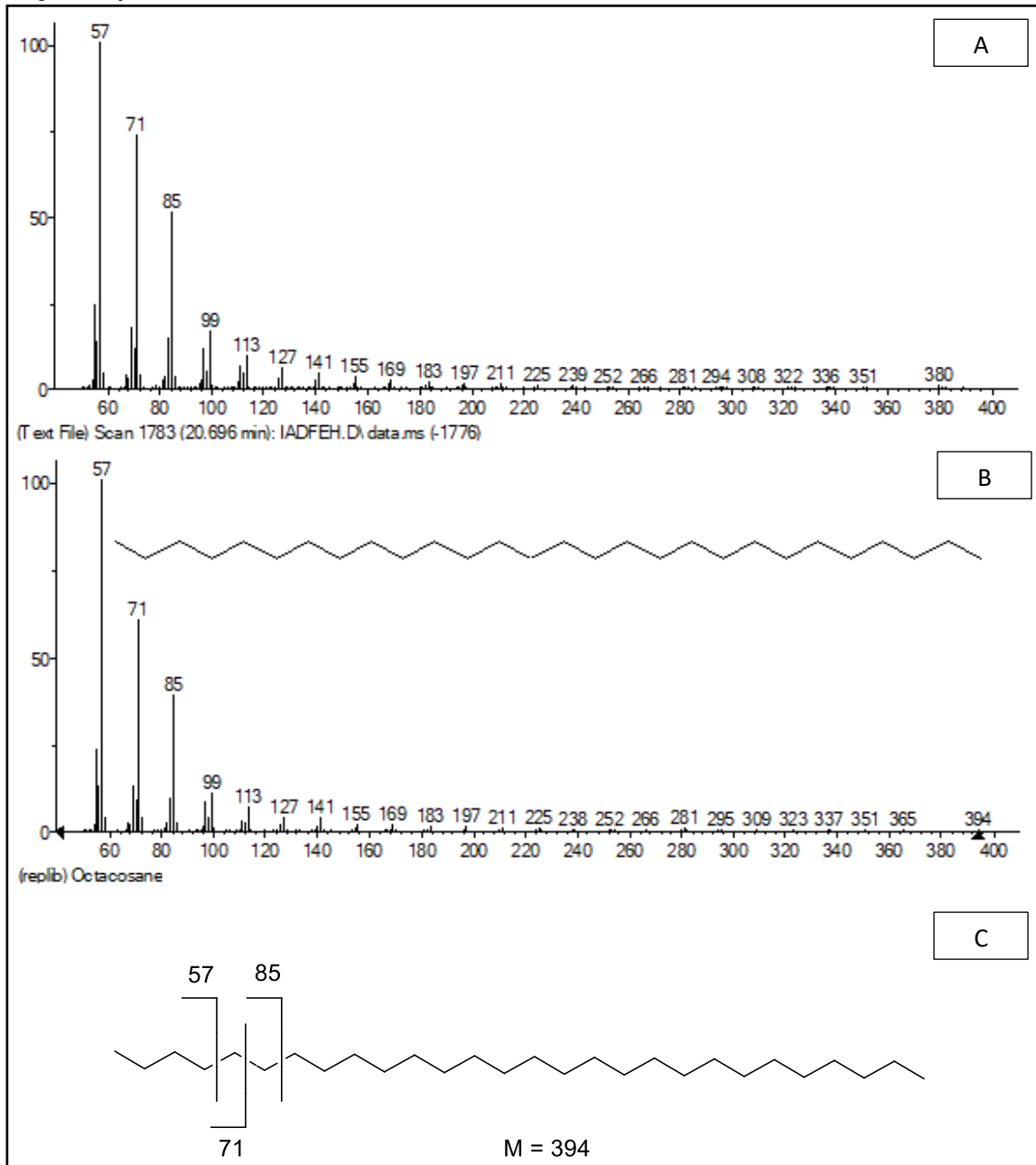


Figura 49: **A.** Espectro de massas do íon molecular 366 m/z (substância **11**) em 22,623 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecânica de fragmentação de massas.

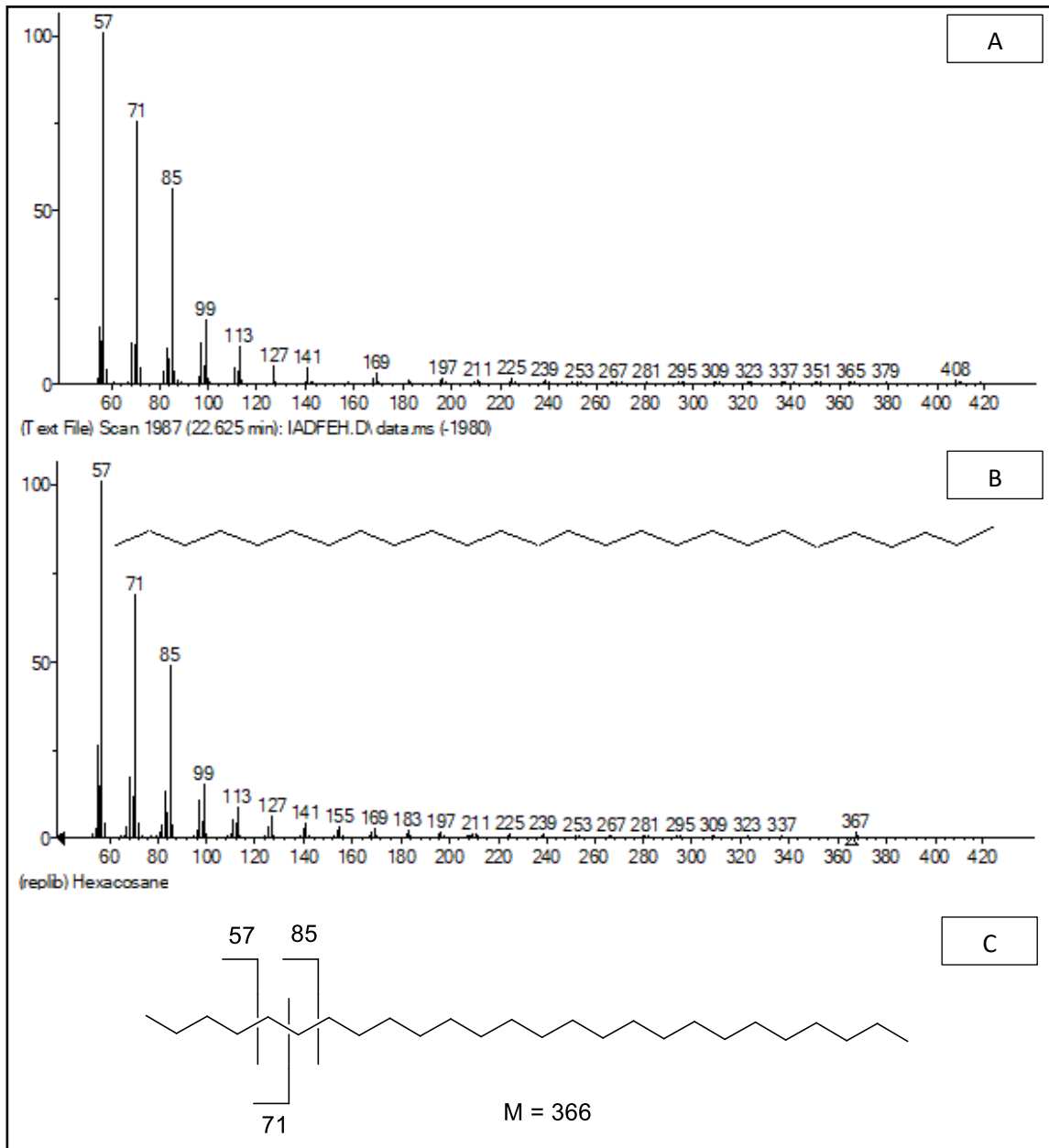


Figura 50: **A.** Espectro de massas do íon molecular 430 m/z (substância **12**) em 26,188 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

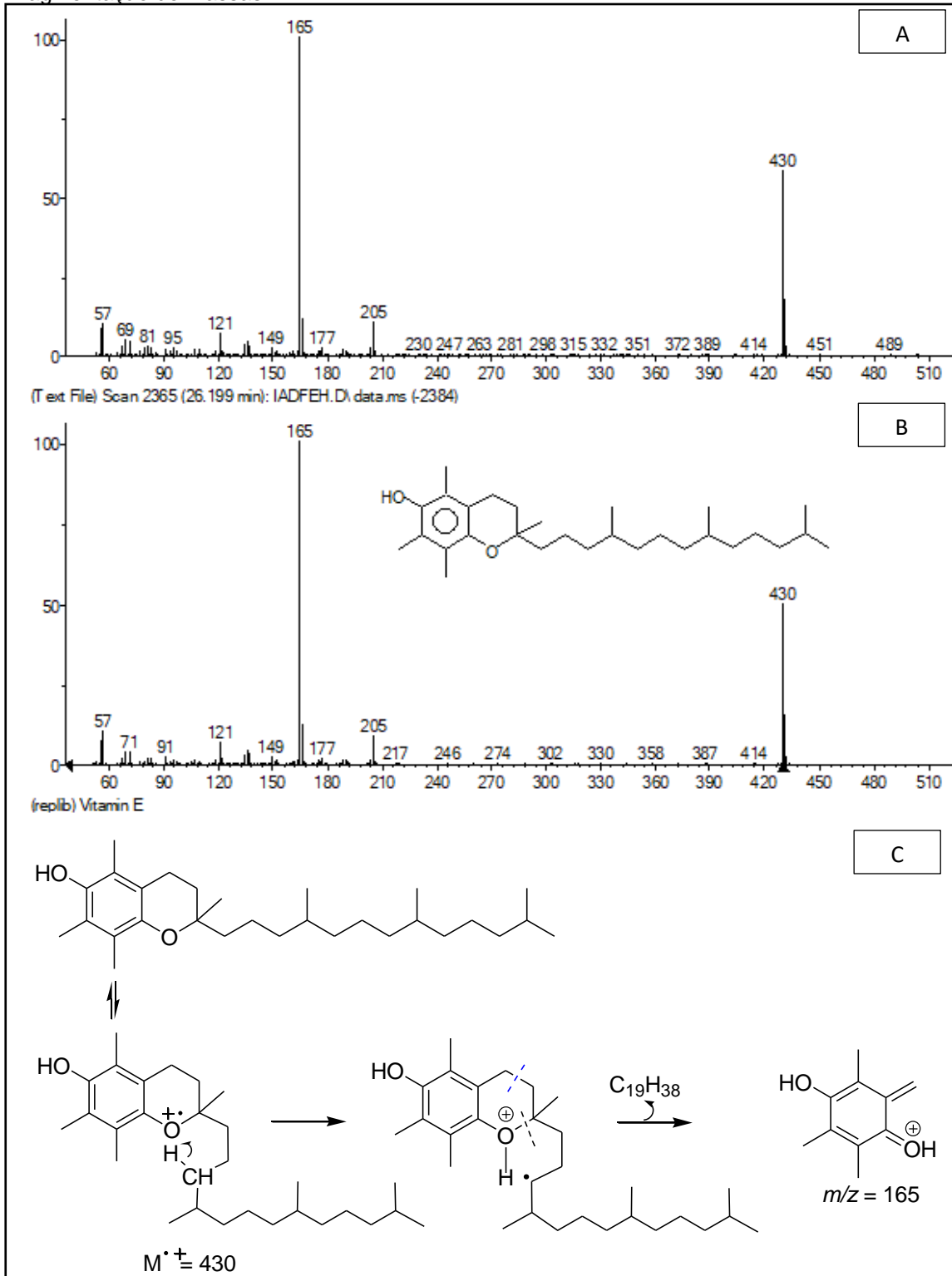


Figura 51: Espectro de massas do íon molecular 400 m/z (substância **13**) em 28,111 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

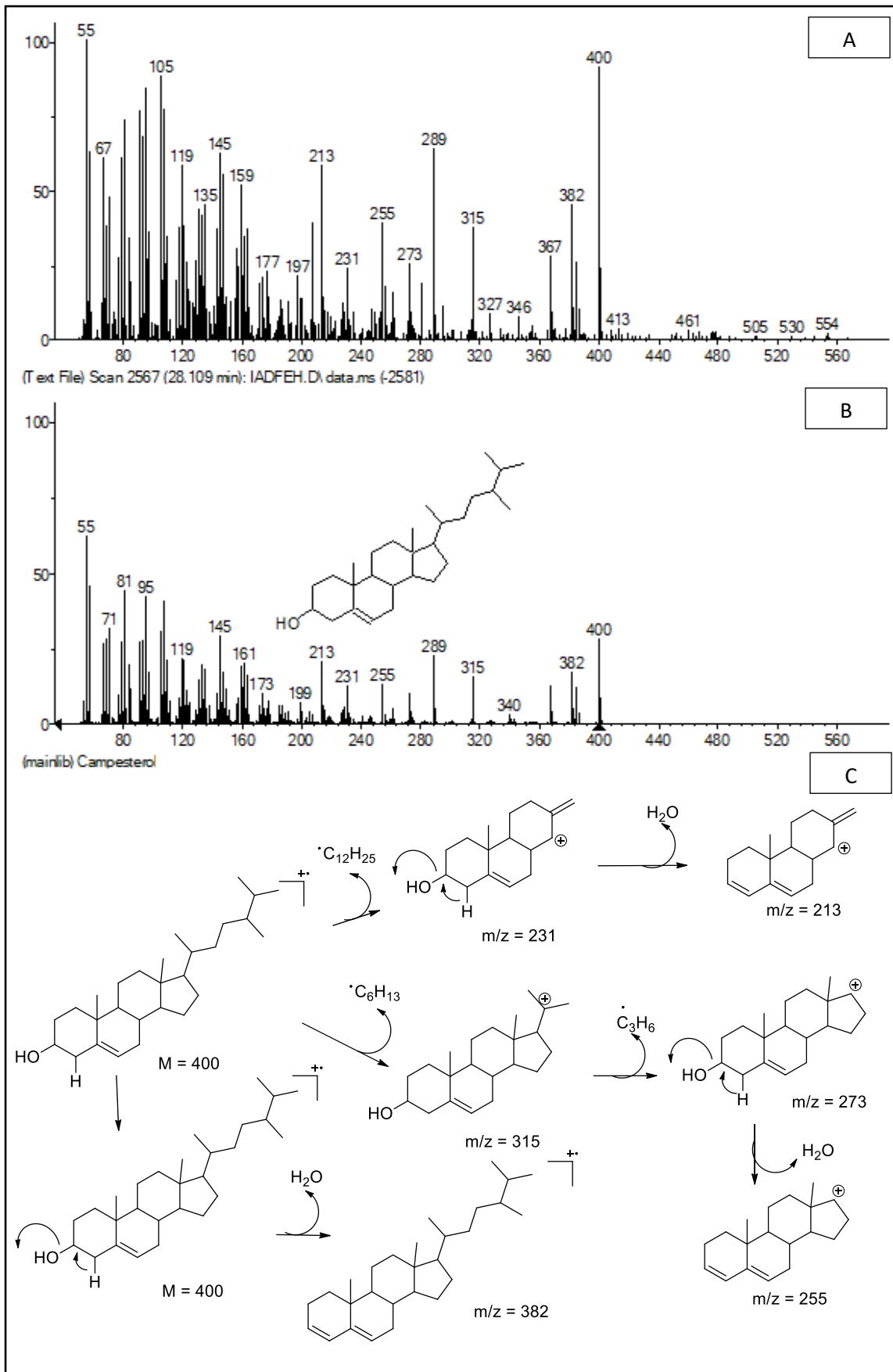


Figura 52: Espectro de massas do íon molecular 450 m/z (substância **14**) em 29,150 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

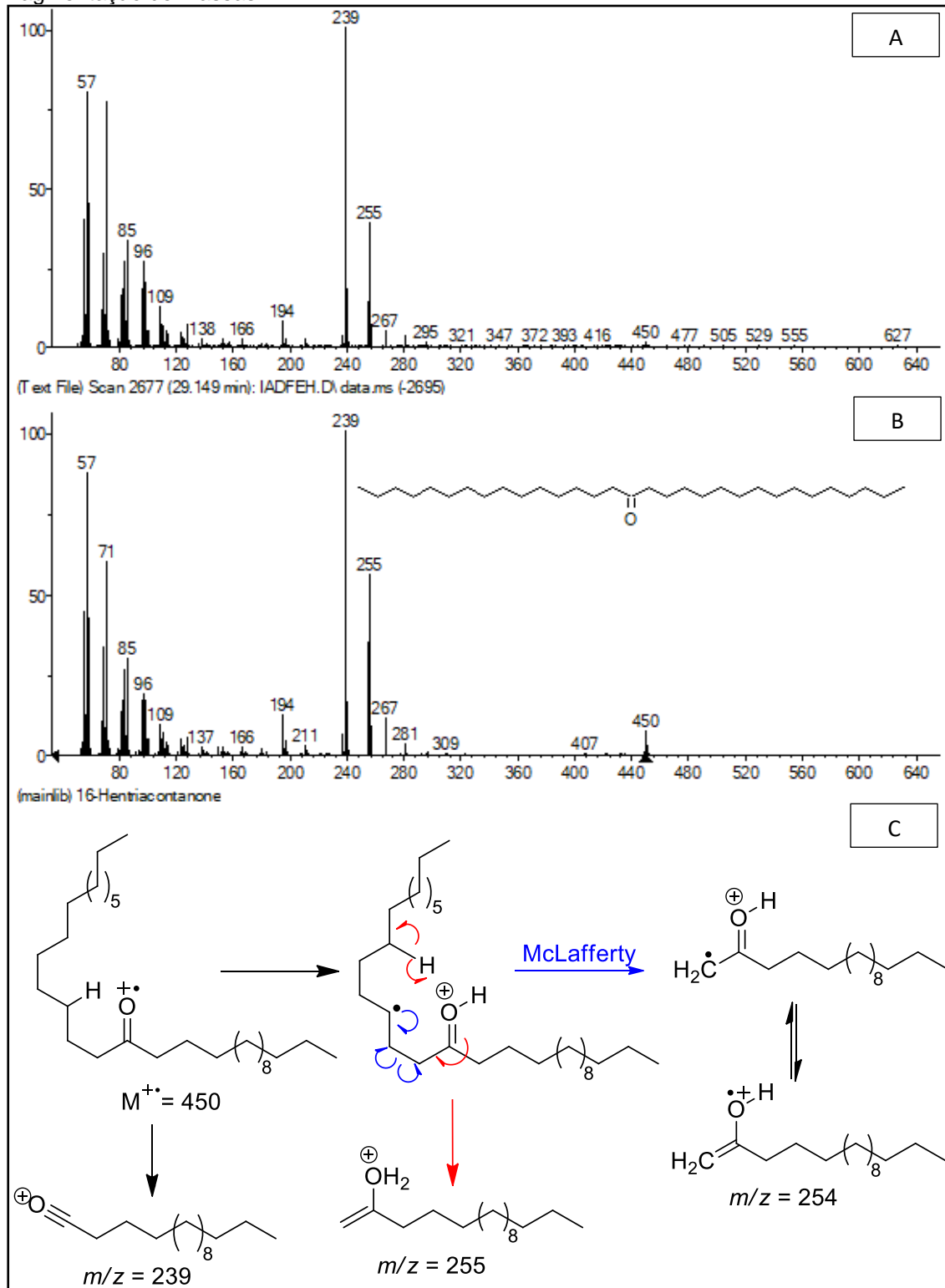


Figura 53: **A.** Espectro de massas do íon molecular 414 m/z (substância **15**) em 30,188 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.

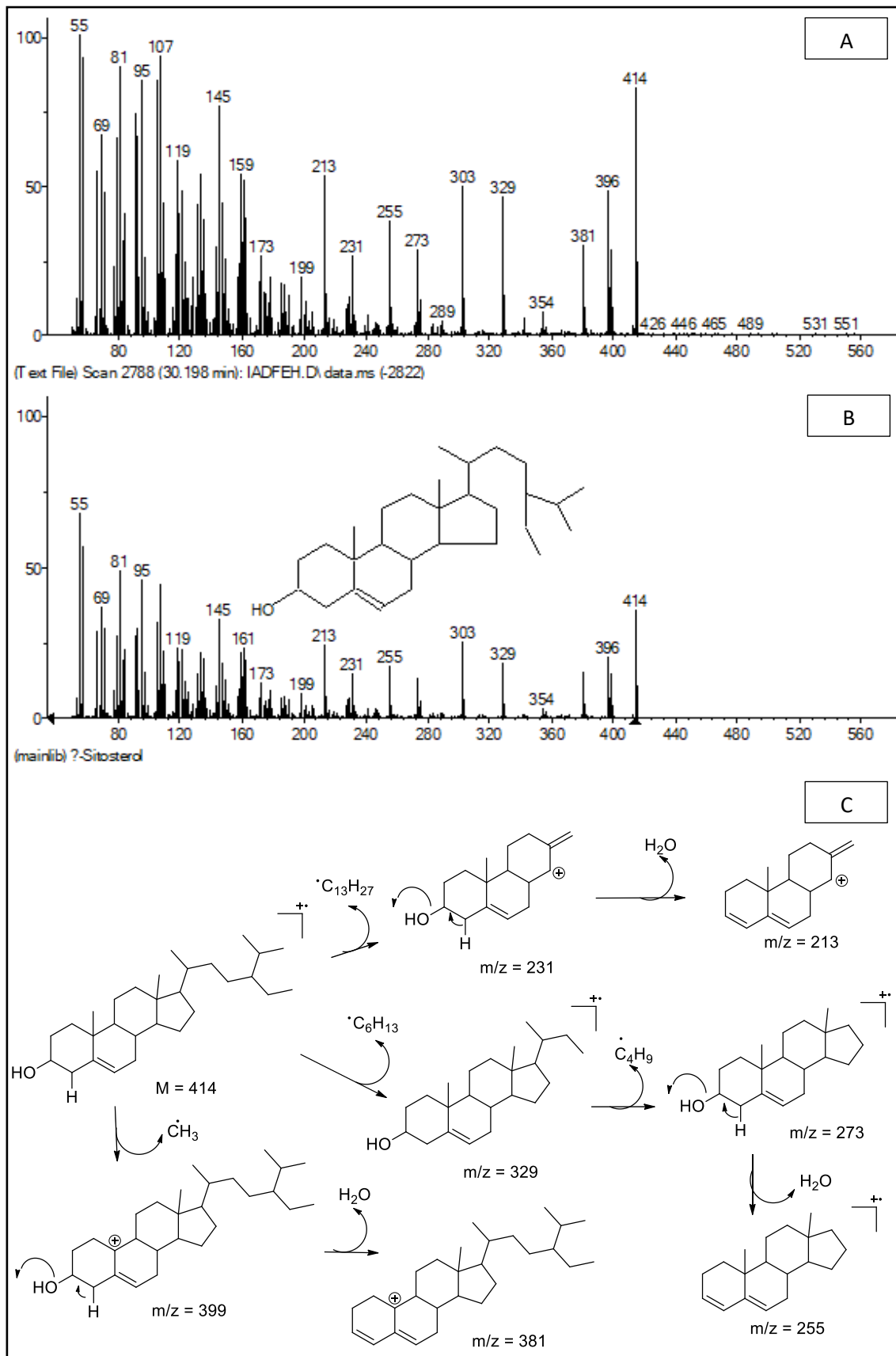
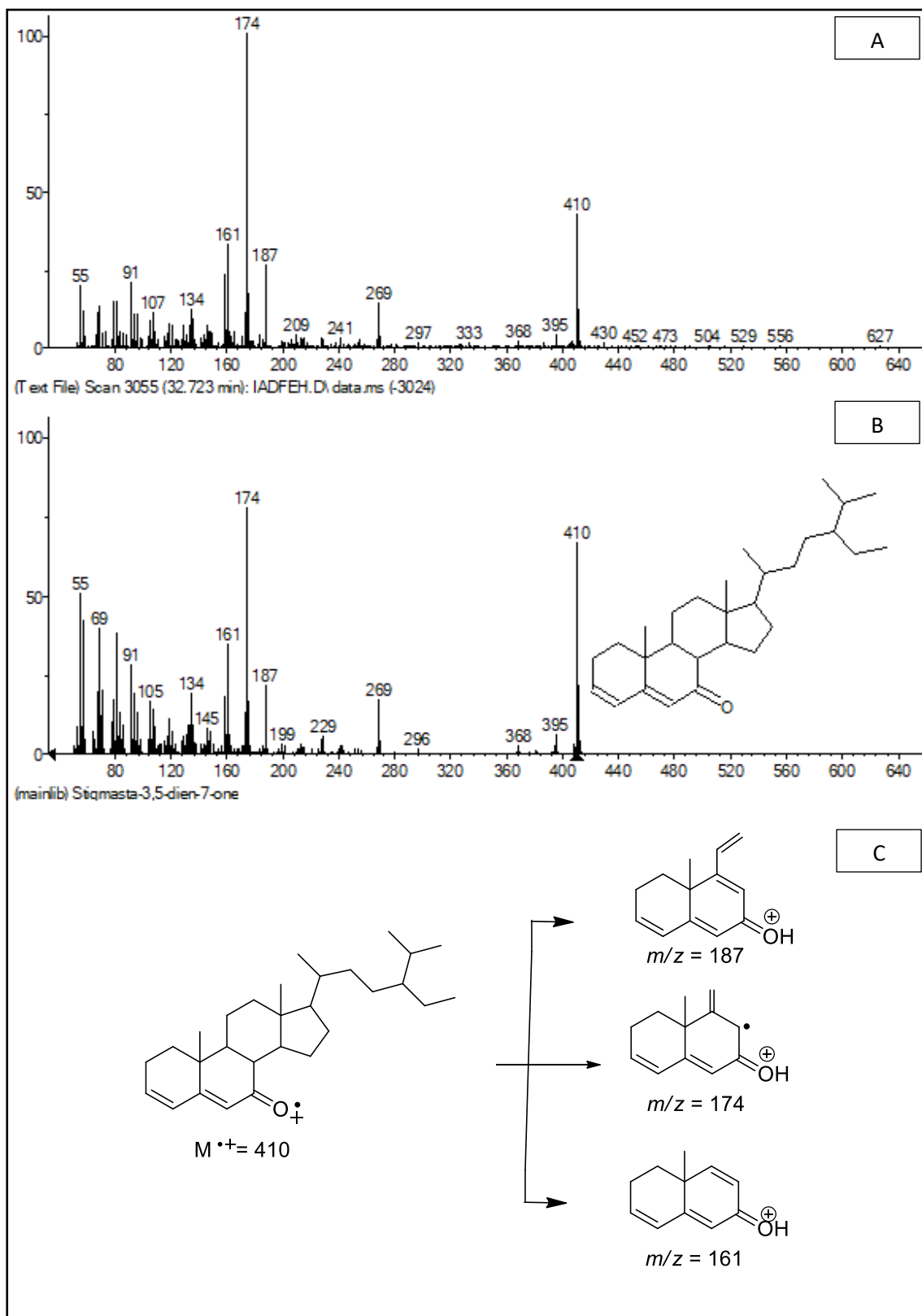
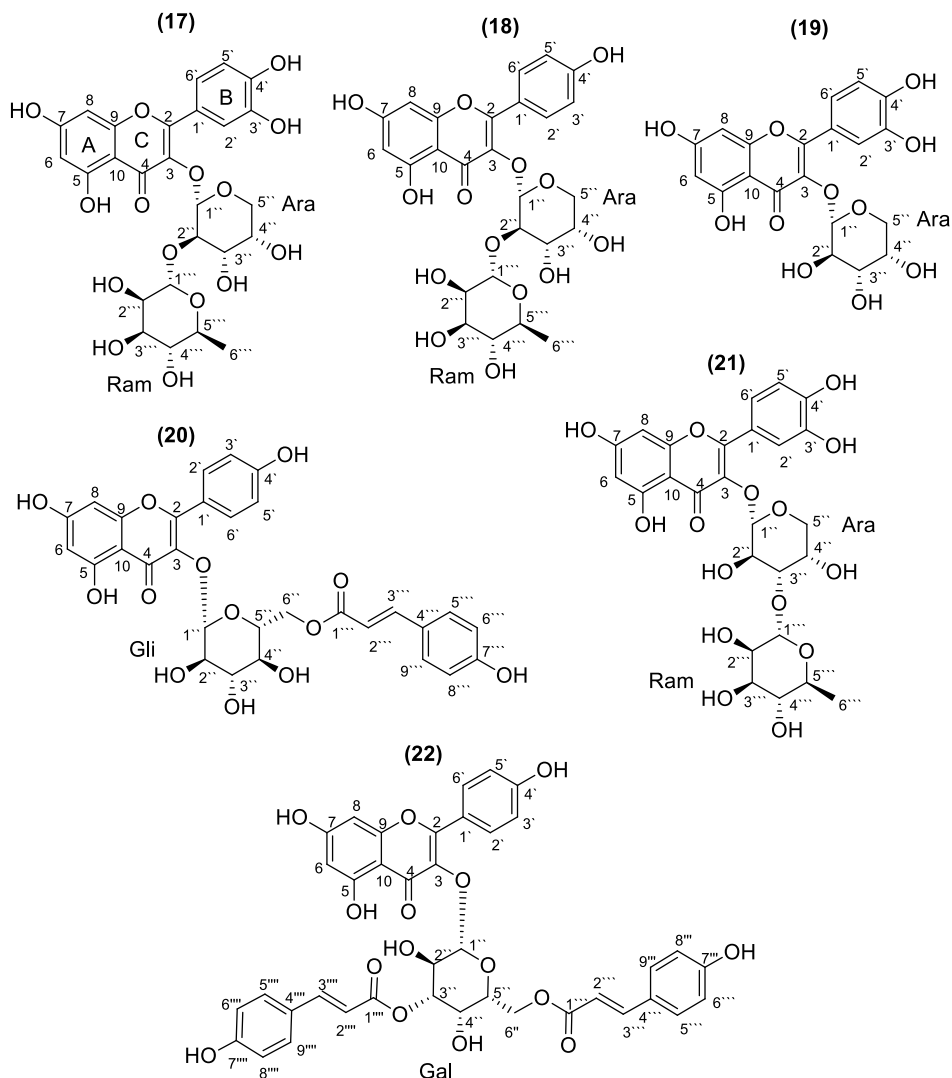


Figura 54: **A.** Espectro de massas do íon molecular 410 m/z (substância **16**) em 32,718 min; **B.** Espectro de massas da molécula sugerida pela biblioteca NIST; **C.** Proposta mecanística de fragmentação de massas.



5.4 Determinação estrutural das substâncias isoladas

Figura 55: Estrutura dos flavonoides isolados (17-22).



Na Figura 55 estão representadas as estruturas dos seis flavonoides isolados (17-22) das frações em clorofórmio e flavonoídica das folhas de *Annona dolabripetala*. As principais diferenças por RMN nos esqueletos desses flavonoides são discutidas de forma geral a seguir e uma comparação dos valores de deslocamento químico de carbono é resumida na Tabela 15 (p. 105), posteriormente serão discutidas individualmente cada uma.

Análise dos padrões de substituição dos flavonoides isolados conduziu a identificação das substâncias com esqueleto básico correspondentes ao

kaempferol (**18**, **20**, **22**) e quercetina (**17**, **19**, **21**) que se diferenciam apenas pela presença de mais uma hidroxila na posição C-3' no anel B da quercetina.

Kaempferol tem como característica básica o padrão de substituição AA'BB' para o anel B. Os sinais dos átomos de carbono 2' e 6' são em torno de ~130,0 ppm e se sobrepõem no espectro de RMN ¹³C, o mesmo acontece nas posições 3' e 5' (~115,0 ppm) por possuírem o mesmo ambiente químico. No espectro de RMN ¹H são observados dupletos em ~8,00 ppm (H-2' e H-6') e ~6,90 ppm (H-3' e H-5') com a mesma constante de acoplamento em *orto* (~8,5 Hz) (HARBONE et al., 1975).

Nos flavonoides de quercetina obtidos, foram observados o padrão de substituição para o anel B do tipo ABC, no qual, os ambientes químicos são diferentes pela presença das hidroxilas nas posições C-3' e C-4'. No espectro de RMN ¹³C os sinais dos átomos de carbono 2' e 5' são em torno de ~115,0 ppm e o C-6' em ~121,0 ppm. No espectro de RMN ¹H, dois sinais de dupletos e um de duplo duplete são observados. Um sinal de duplete com J = 2,5 Hz característico do H-2' que acopla em *meta* com H-6'. Um sinal de H-5' é visto como duplete com J = 8,5 Hz que acopla em *orto* com H-6'. E um sinal de H-6' se apresenta como duplo duplete que acopla em *orto* com H-5' (J = 8,5 Hz) e em *meta* com H-2' (J = 2,5 Hz) (HARBONE et al., 1975).

No anel A é possível observar os sinais de dupletos no espectro de RMN ¹H referente as posições H-6 e H-8, todos os flavonoides apresentam deslocamentos químicos em torno de ~6,20 e ~6,40, respectivamente, com constante de acoplamento *meta* J = 2,0 Hz (HARBONE et al., 1975).

As estereoquímicas (α e β) das unidades de açúcar ligadas entre si e na aglicona foram determinadas em relação a suas constantes de acoplamento (J em Hz) por Harbone e Mabry, 1982, além de comparações com os dados de RMN dos flavonoides já isolados na literatura.

Todos os flavonoides mostraram sinais de absorções no espectro de RMN ¹H correspondentes a uma ou mais unidades de açúcar representados pelos sinais de ¹H ligados a átomos de carbono carbinólicos. No flavonoide **17** a presença de duplete em 5,55 ppm (J = 5,2 Hz) e simpleto em 5,11 ppm. O flavonoide **18** também apresentou dois sinais de hidrogênio anomérico em 5,47 ppm (d, J = 4,8 Hz) e 4,94 ppm. Os flavonoides **19**, **20** e **22** apresentaram um

duplete cada em 5,23 ppm ($J = 5,3$ Hz), 5,39 ppm ($J = 7,7$ Hz), e 5,30 ppm ($J = 7,9$ Hz), respectivamente. O flavonoide **21** apresentou dois sinais de dupletos em 5,44 ppm ($J = 4,8$) e 4,93 ppm ($J = 1,7$). Para a identificação dos tipos de açúcar foram utilizados estudos da literatura com valores de sinais de RMN ^1H e ^{13}C (NEHME et al., 2005).

Foi observado que os flavonoides **20** e **22** apresentavam unidades de coumaroil ligadas as unidades de açúcar. O sistema AA'BB' foi observado duas vezes no flavonoide **20**, representando os sinais do anel B da aglicona e os sinais de átomos de hidrogênio aromático da unidade de coumaroil em 7,35 ppm (d, $J = 8,7$ Hz) para H-5''' e H-9''', e 6,79 ppm (d, $J = 8,2$ Hz) para H-6''' e H-8'''. Além dos sinais característicos de ligação dupla com geometria *trans* reconhecida pelos sinais em 6,10 ppm (C-2''', d) e 7,37 ppm (C-3''', d) e valores de J em torno de 16,0 Hz. Já o flavonoide **22** apresentou três sinais referentes ao padrão de substituição AA'BB' significando a presença de duas unidades de coumaroil em cada flavonoide. Para o flavonoide **22** os sinais de ^1H foram em δ_{H} : 7,32 (d, $J = 8,5$ Hz) H-5''' e H-9'''; 6,68 (d, $J = 8,7$ Hz) H-6''' e H-8'''; 7,52 (d, $J = 8,5$ Hz) H-5'''' e H-9''''; 6,81 (d, $J = 8,7$ Hz) H-6'''' e H-8''''.

Dados completos de RMN bidimensionais como HSQC e HMBC foram utilizados para auxiliar nas identificações, além de comparações com dados da literatura. Assim foi possível determinar as estruturas dos flavonoides como sendo: quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose (**17**), kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose (**18**), quercetina-3-O-arabinosídeo (**19**), kaempferol-3- β -D-(6-O-*trans-p*-coumaroil)-glicopiranosídeo (**20**), quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosose (**21**) e kaempferol-3-O-[3'',6''-di-O-*p*-coumaroil]- β -D-galactosídeo (**22**).

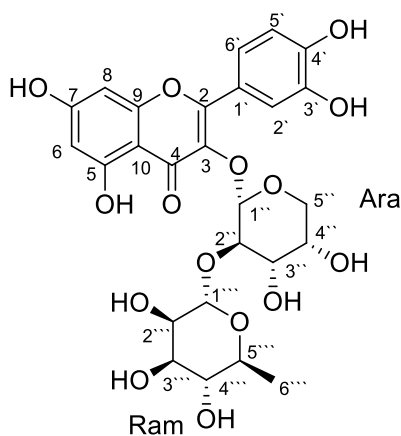
Tabela 15: Dados de RMN ¹³C dos flavonoides de 17 a 22.

C	17	18	19	20	21	22
2	157,12	156,03	154,77	156,16	156,20	159,93
3	133,75	133,42	133,28	133,21	133,69	134,05
4	177,99	177,40	176,73	177,31	177,37	178,15
5	161,68	161,17	160,96	161,08	156,14	161,57
6	98,35	98,69	99,72	99,03	98,63	98,70
7	164,32	164,19	165,15	165,24	164,12	164,74
8	93,22	93,64	94,07	93,78	93,45	93,45
9	156,93	156,26	156,55	156,43	161,20	159,80
10	104,40	103,90	102,41	103,44	103,90	104,14
1'	121,70	120,59	120,37	120,80	120,84	121,15
2'	114,86	130,85	115,04	130,86	116,02	130,94
3'	144,65	115,27	145,27	115,07	145,00	115,44
4'	148,32	160,03	149,40	160,00	148,52	160,26
5'	115,80	115,27	115,36	115,07	115,55	115,44
6'	121,76	130,85	121,79	130,86	121,93	130,94
Ara						
1''	99,76	99,22	101,62		99,98	
2''	71,45	74,64	70,72		75,00	
3''	70,99	70,66	71,77		70,52	
4''	67,10	66,23	66,14		66,13	
5''	63,92	63,76	64,32		63,60	
Ram						
1'''	100,81	100,05			100,57	
2'''	75,79	70,53			71,06	
3'''	70,85	69,00			70,99	
4'''	72,59	71,89			68,59	
5'''	68,74	68,61			71,89	
6'''	16,23	17,49			17,49	
Gli						
1''				101,79		
2''				71,04		
3''				72,94		
4''				68,26		
5''				72,87		
6''				63,19		
Gal						
1''						103,45
2''						69,10
3''						75,81
4''						66,56
5''						73,21
6''						62,65
Cou						
1'''				166,17		167,32
2'''				113,58		113,23
3'''				144,67		145,23
4'''				124,85		125,68
5'''				130,10		129,75

6'''	115,75	114,79
7'''	159,88	157,07
8'''	115,75	114,79
9'''	130,10	129,75
1''''		167,27
2''''		113,79
3''''		145,58
4''''		125,89
5''''		129,82
6''''		115,37
7''''		157,74
8''''		115,37
9''''		129,82

Solventes: Substância **17** e **22** - CD₃OD; **18** a **21** - DMSO-d₆.

5.4.1 Substância 17 (IP-2-15E)



Quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 56 a 59, p. 110), sinais na região de δ_{H} 6,39 (H-8; d) e 6,20 (H-6; d) com constante de acoplamento *meta* ($J = 2,0$ Hz) representam os átomos de hidrogênio aromático referentes ao anel A do flavonoide e correlacionam, respectivamente, com os átomos de carbono em δ_{C} 93,22 e 98,35 de acordo com os dados de HSQC (Figura 62, p. 113). O sinal em δ_{H} 12,59 é característico do hidrogênio da hidroxila na posição C-5 quelada à carbonila em C-4, formando uma ligação de hidrogênio.

Observou-se o padrão de substituição ABC representado pela presença de três sinais que correspondem aos três átomos de hidrogênio localizados em ambientes químicos diferentes característico do anel B com substituintes em duas posições. Esses sinais estão representados em δ_{H} 7,64 atribuído ao duplete em H-2' com constante de acoplamento em *meta* com H-6' ($J = 2,1$ Hz). O sinal de duplete em δ_{H} 6,90 é atribuído ao H-5' com $J = 8,4$ Hz devido ao acoplamento em *orto* com H-6'. Já o duplo duplete em δ_{H} 7,56 é atribuído ao H-6' que acopla em *orto* com H-5' ($J = 8,4$ Hz) e em *meta* com H-2' ($J = 2,1$ Hz). Através das correlações a duas, três e quatro ligações entre átomos de hidrogênio e carbono por HMBC (Figuras 63-64, p. 113), foi possível confirmar a presença das hidroxilas nas posições C-3' e C-4'.

A α -arabinose foi confirmada através da correlação por HSQC de um duplete em δ_{H} 5,55 (H-1'') característico do hidrogênio anomérico, com $J = 5,2$ Hz que caracteriza o açúcar com configuração α , acoplada com o átomo de

carbono em δ_c 99,76 (C-1''). No experimento HMBC é observado no mapa, uma correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o hidrogênio anomérico H-1'' ($\delta_H = 5,55$) e o carbono C-3 ($\delta_c = 133,75$), confirmando a ligação da α -arabinose ao carbono C-3.

A presença de uma segunda unidade de açúcar (α -ramnose) foi confirmada devido ao sinal de outro hidrogênio anomérico observado em δ_H 5,11 (sl) e atribuído a H-1''' acoplado com o átomo de carbono em δ_c 100,81 por HSQC. No experimento HMBC é observado, a correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o hidrogênio H-2'' (δ_H 4,12) e o carbono C-1''' (δ_c 100,81), confirmando que as duas unidades de açúcar estão ligadas pelas posições H-2'' \rightarrow C-1'''.

Análise do espectro de RMN ^{13}C (Figuras 60 a 61, p.112) e HSQC revelaram sinais referentes a átomos de carbono não hidrogenados, dentre os quais, δ_c : 157,12 (C-2); 133,75 (C-3); 177,99 (C-4); 161,68 (C-5); 164,32 (C-7); 156,93 (C-9); 104,40 (C-10), 121,70 (C-1'), 144,65 (C-3') e 148,32 (C-4'). Além desses, outros sinais foram atribuídos a átomos de carbono metínicos (CH) em δ_c : 98,35 (C-6); 93,22 (C-8); 114,86 (C-2'); 115,80 (C-5'); 121,76 (C-6'); 100,81 (C-1'''), 75,79 (C-2'''), 70,85 (C-3'''), 72,59 (C-4'''), 68,74 (C-5'''), 16,23 (C-6'''), 99,76 (C-1''), 71,45 (C-2''), 71,99 (C-3''), 67,10 (C-4''). Constatou-se também a presença de um carbono metilênico (CH₂) em δ_c : 63,92 (C-5''), pertencente ao açúcar do tipo pentose (arabinose).

Portanto, a partir das análises uni e bidimensionais do espectro de RMN e por comparações com dados da literatura (HALABALAKI et al., 2011) foi possível identificar o flavonoide quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose como a substância **17** (Tabela 16, p. 109).

Tabela 16: Dados de RMN ^1H (400 MHz), ^{13}C (100 MHz) da substância **17** em CD_3OD em comparação com os dados da literatura em DMSO-d_6 . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.

Substância 17						HALABALAKI et al., 2011	
C	HSQC		HMBC			HSQC	
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$^4J_{\text{HC}}$	δ_c	δ_H
2	157,12	-	-	H-6'	H-5'	156,4	-
3	133,75	-	-	H-1''	-	132,9	-
4	177,99	-	-	-	-	176,6	-
5	161,68	-	H-6	-	-	160,8	-
7	164,32	-	H-8, H-6	-	-	168,5	-
9	156,93	-	H-8	-	-	155,2	-
10	104,40	-	-	H-8, H-6	-	102,1	-
1'	121,70	-	H-2'	H-5'	-	120,2	-
3'	144,65	-	H-2'	H-5'	-	145,7	-
4'	148,32	-	H-5'	H-6'	-	149,8	-
CH							
6	98,35	6,20 (d, 2,0)	-	H-8	-	99,4	6,05 (d, 2,0)
8	93,22	6,39 (d, 2,0)	-	H-6	-	93,9	6,28 (d, 2,0)
2'	115,80	7,64 (d, 2,1)	-	H-6'	-	115,6	7,56 (d, 2,2)
5'	114,86	6,90 (d, 8,4)	-	-	-	116,0	6,78 (d, 8,2)
6'	121,76	7,56 (dd, 2,1; 8,4)	-	-	-	121,1	7,55 (dd, 8,2; 2,2)
Ara							
1''	99,76	5,55 (d, 5,2)	-	H-2'', H-5 β , H-5 α	-	99,6	5,43 (d, 5,0)
2''	71,45	4,12 (dd, 6,6; 5,4)	H-3''	-	-	71,0	4,10 (dd, 8,0; 5,3)
3''	70,99	3,83 (m)	-	-	-	70,6	3,67 (m)
4''	67,10	3,81 (m)	H-3''	H-2''	-	71,9	3,66 (m)
5''	63,92	3,85 (m, 5 α) 3,40 (m, 5 β)	-	H-1''	-	68,4	3,64 (m, 5 α) 3,42 (dd, 13,5; 4,0, 5 β)
Ram							
1'''	100,81	5,11 (sl)	-	H-2''	-	99,9	4,95 (s)
2'''	75,79	3,55	H-1'''	-	H-5'''	74,5	3,70 (m)
3'''	70,85	3,72 (dd, 3,1; 9,5)	-	H-1'''	-	69,9	3,42 (dd, 9,2; 3,1)
4'''	72,59	3,38 (d, 9,5)	-	H-6'''	-	66,6	3,21 (t, 9,2)
5'''	68,74	3,86 (m)	H-6'''	-	-	64,1	3,68 (m)
6'''	16,23	1,09 (d, 6,2)	H-4'''	-	-	17,4	0,95 (d, 6,0)

Figura 56: Espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância 17.

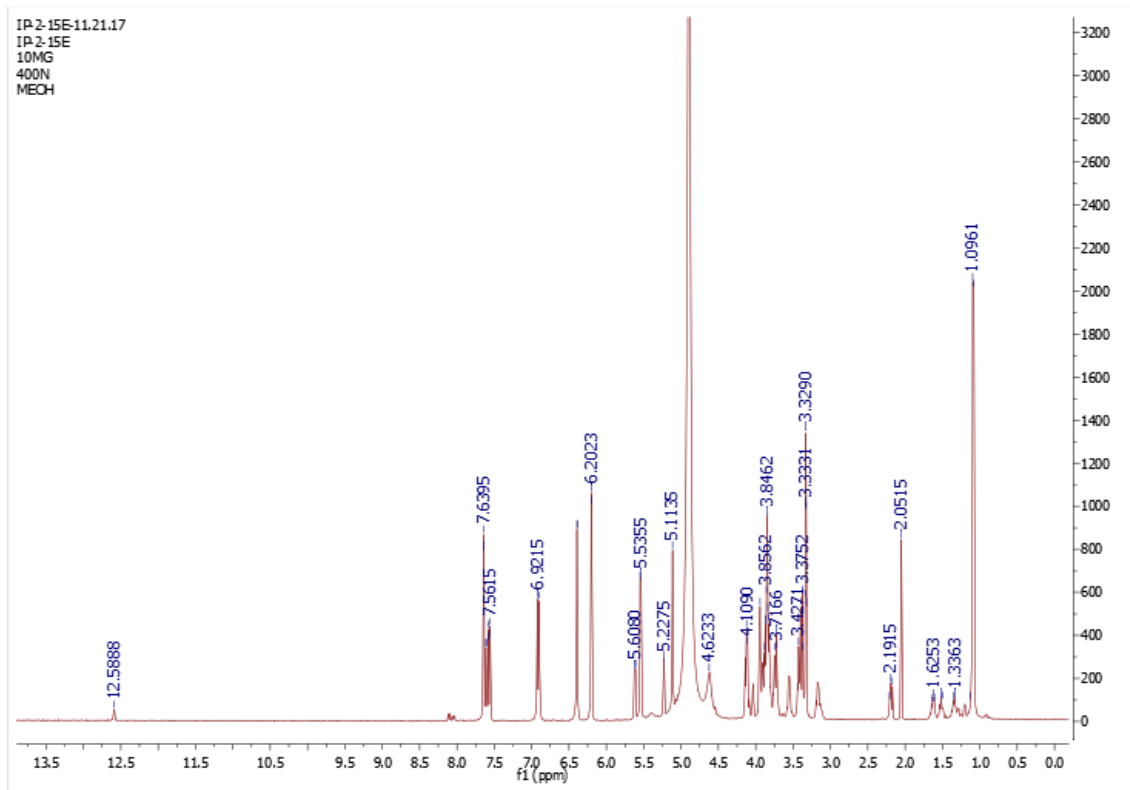


Figura 57: Ampliação do espectro de RMN ^1H (400 MHz, CD_3OD) da substância 17.

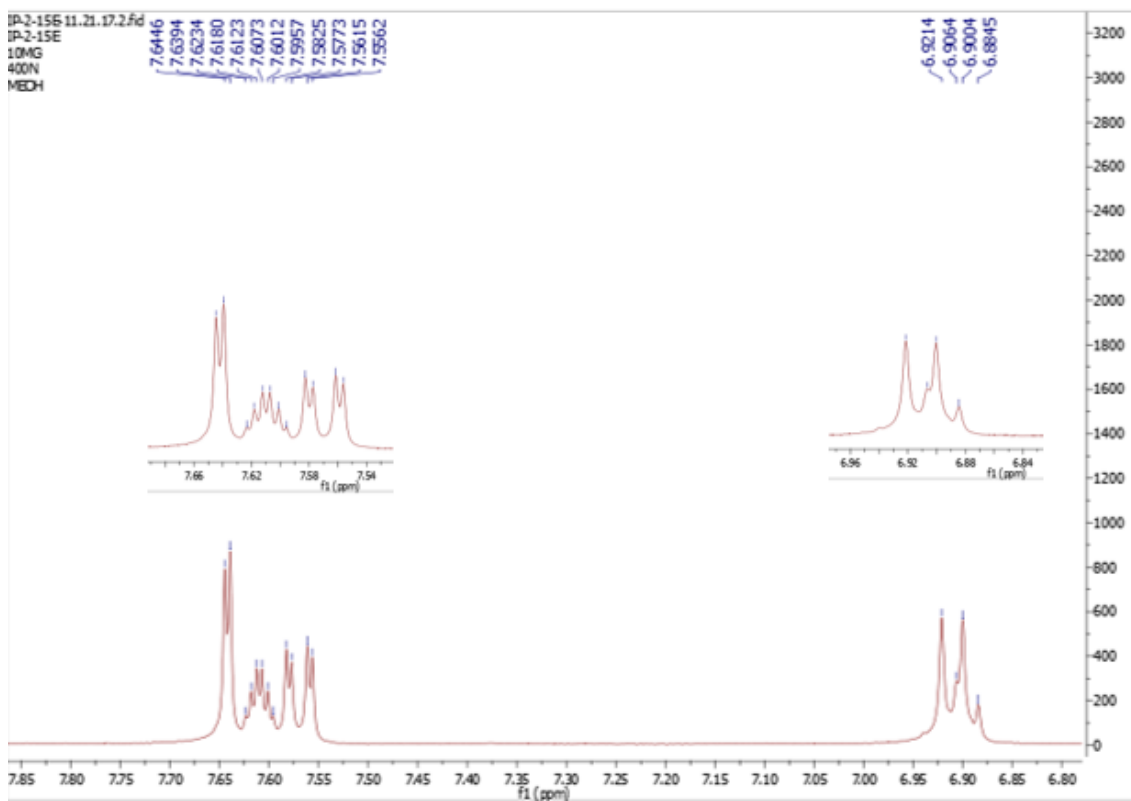


Figura 58: Ampliação do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) da substância 17.

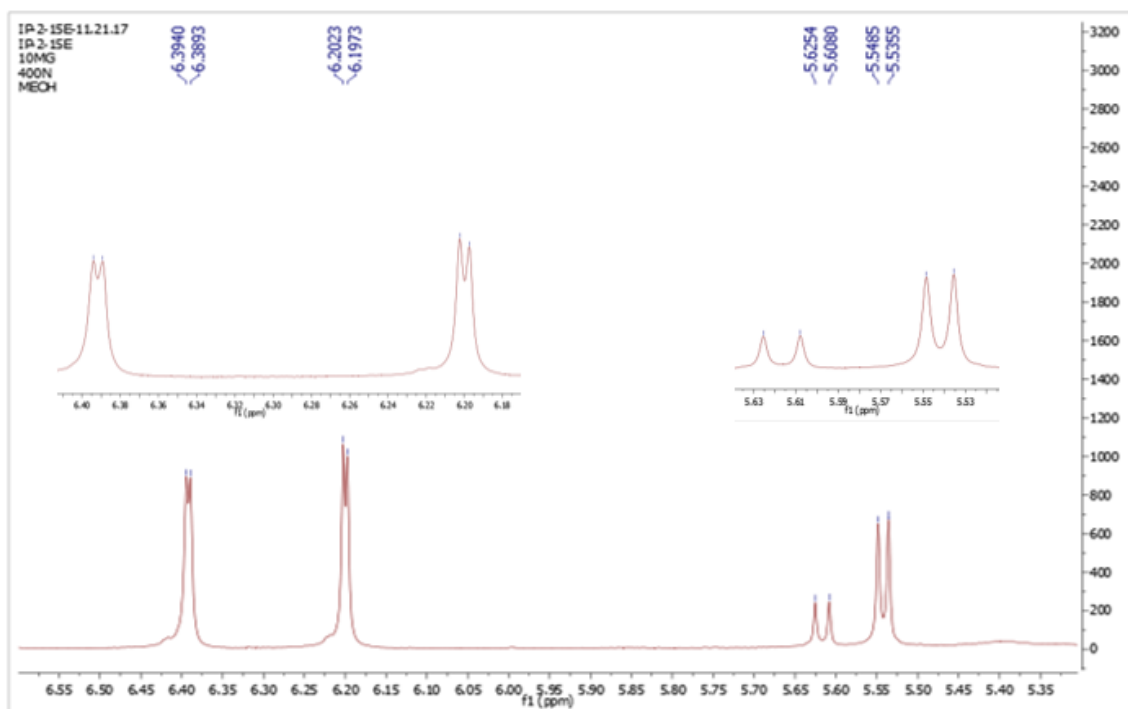


Figura 59: Ampliação do espectro de RMN ¹H (400 MHz, CD₃OD) da substância 17.

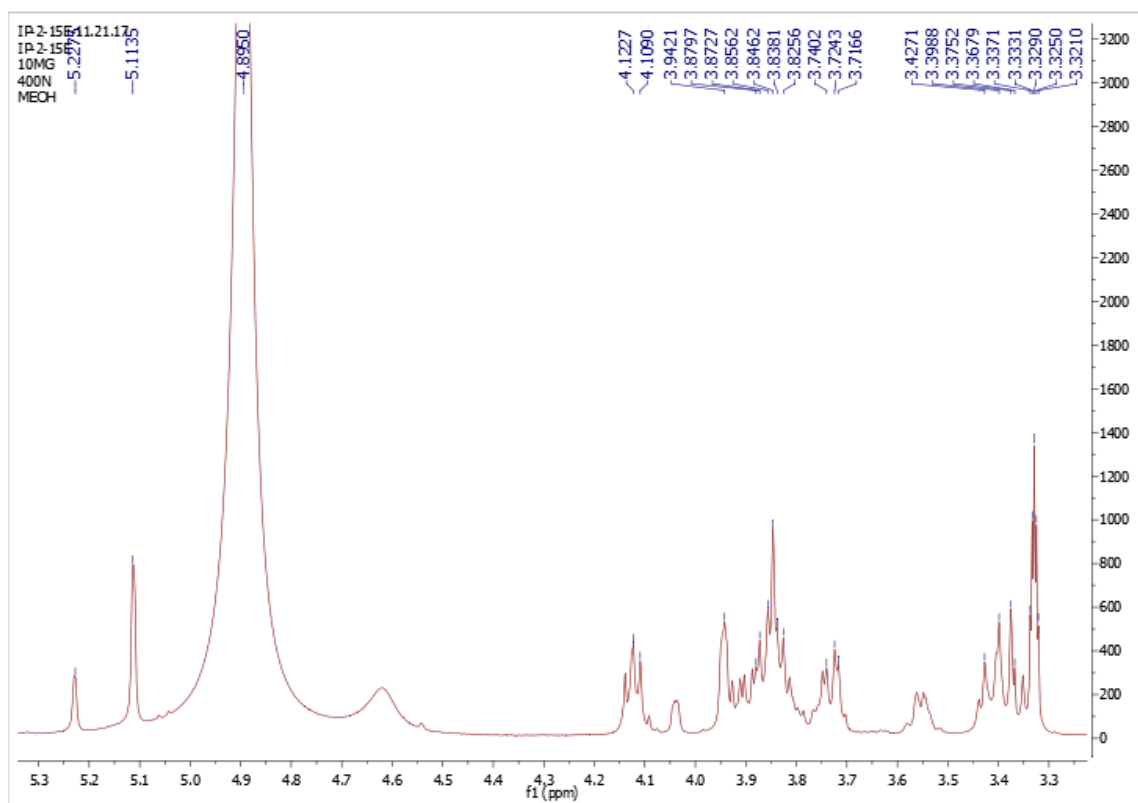


Figura 60: Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) da substância 17.

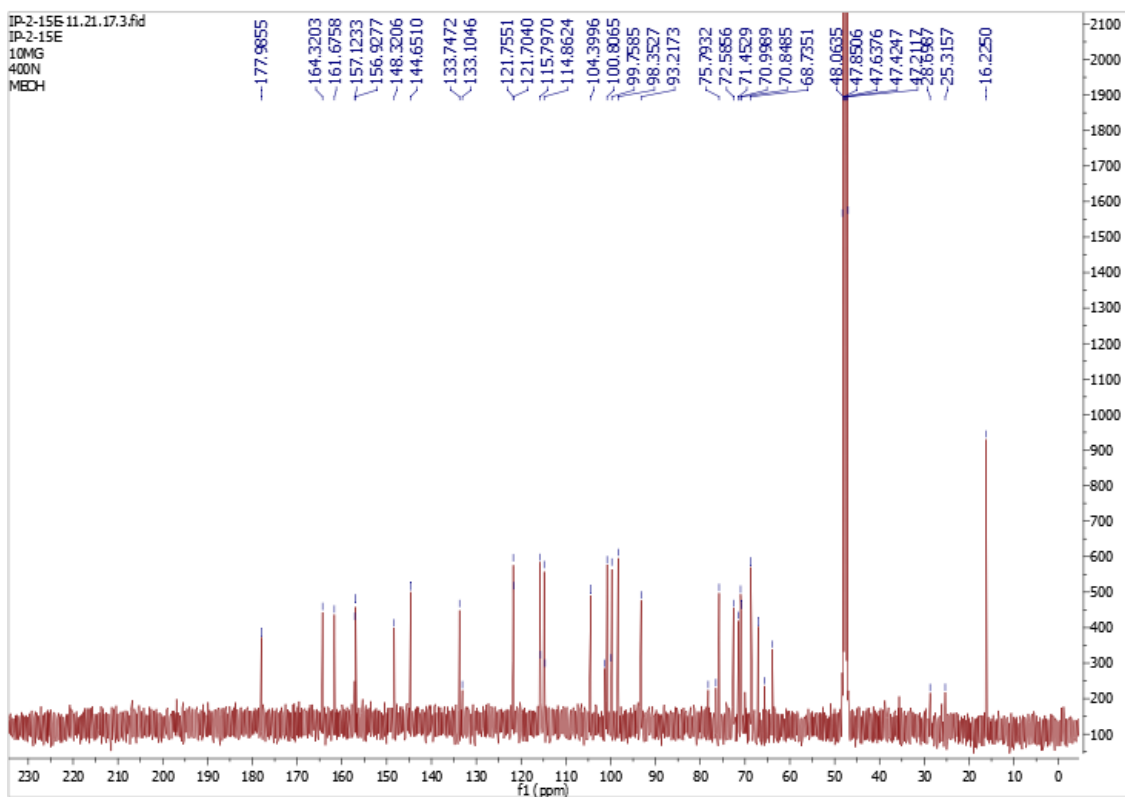


Figura 61: Ampliação do espectro de RMN ¹³C (100 MHz, CD₃OD) da substância 17.

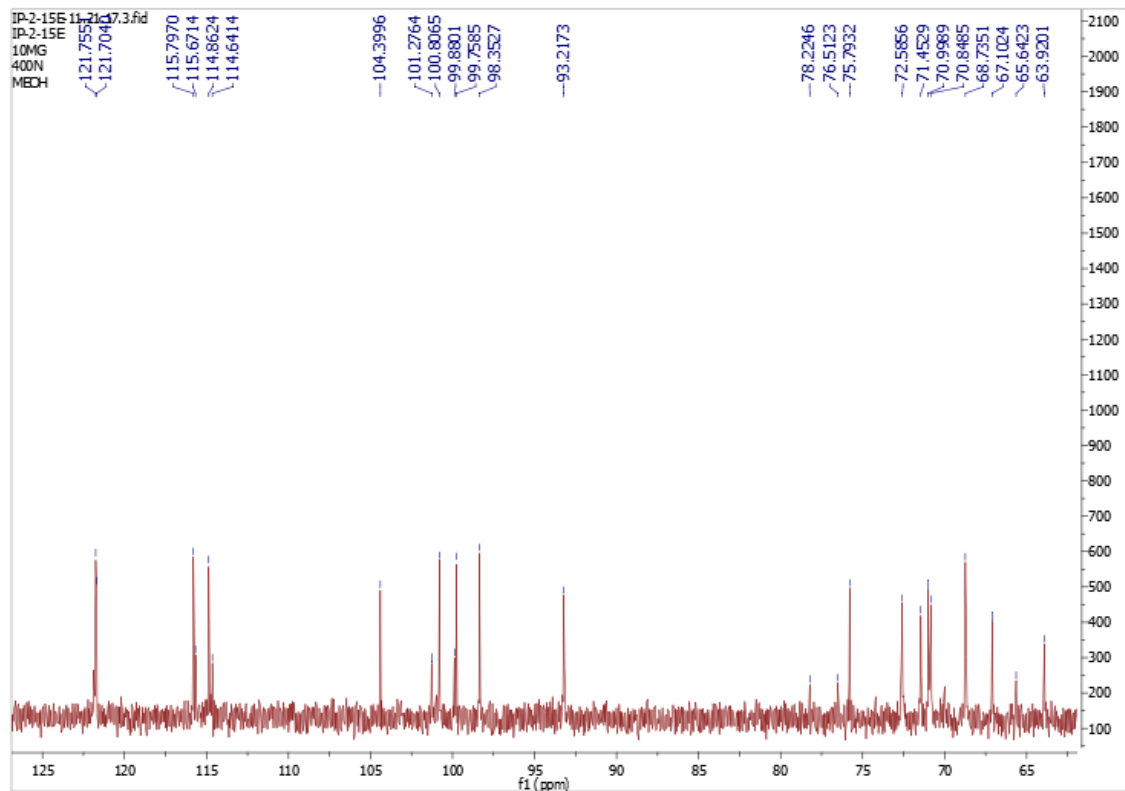


Figura 62: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (CD₃OD) da substância 17.

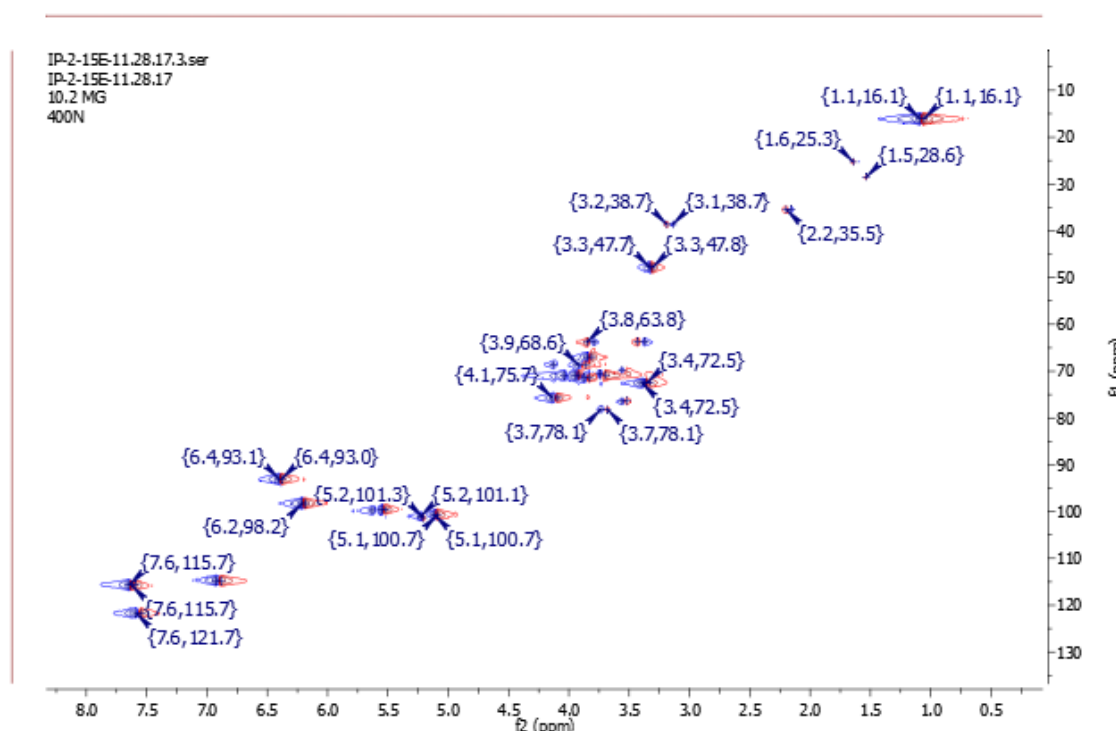


Figura 63: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD₃OD) da substância 17.

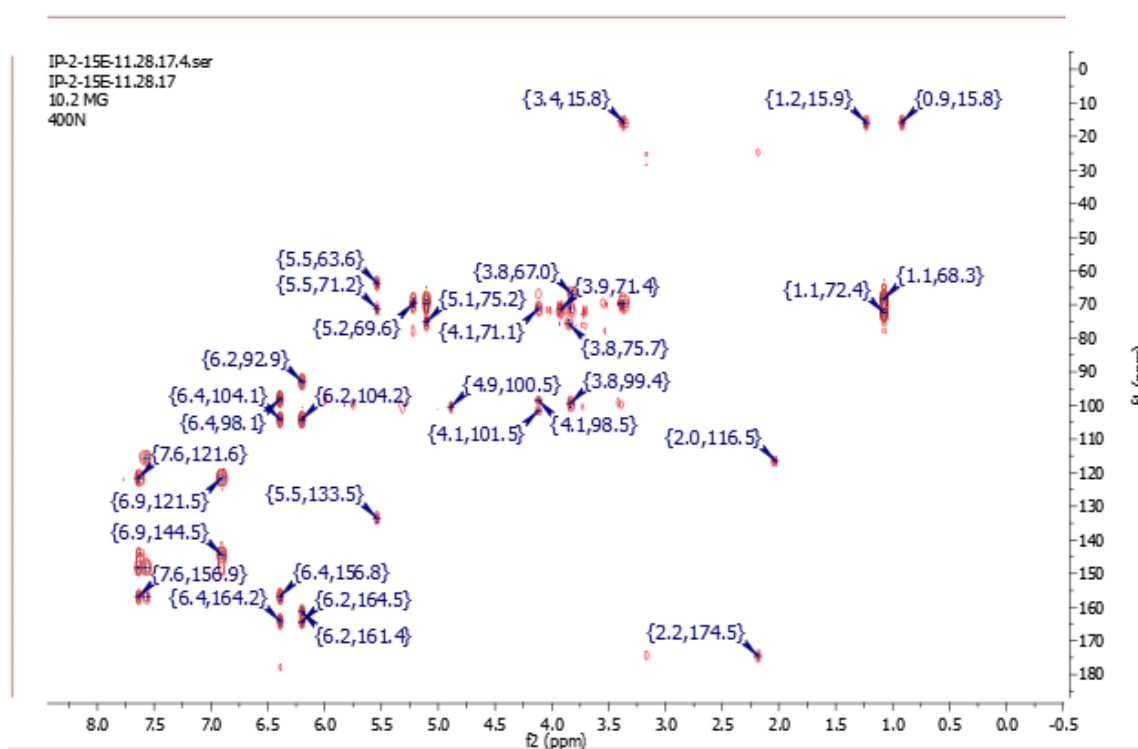
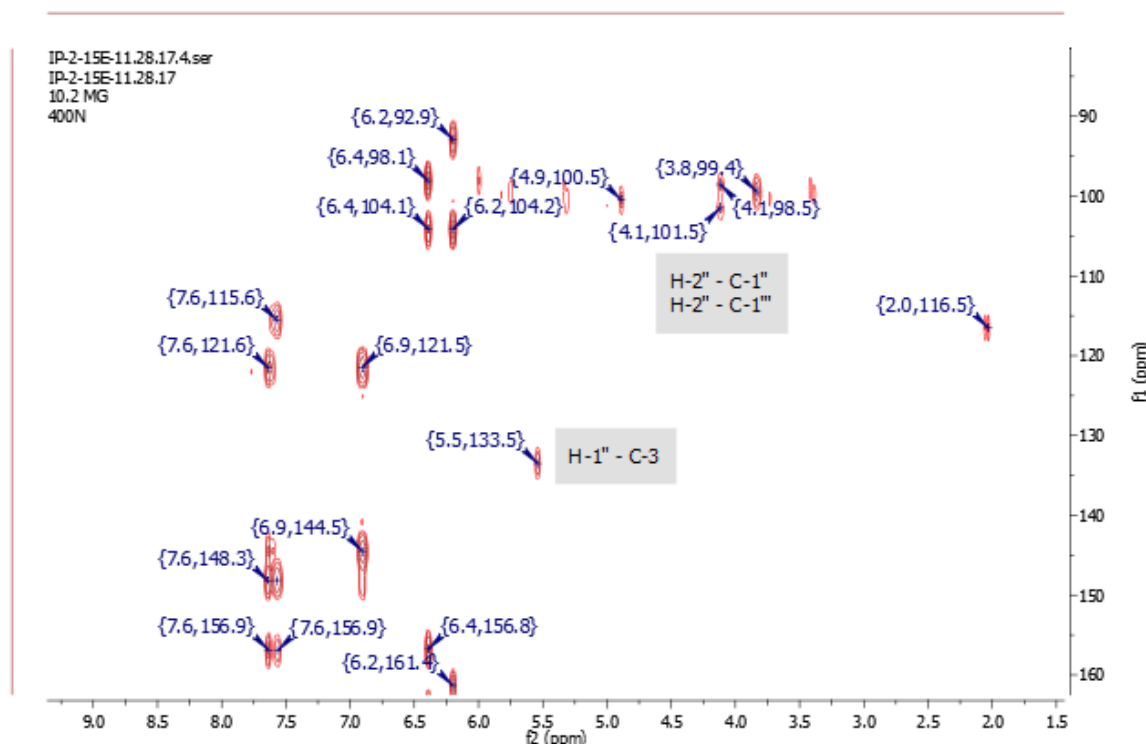


Figura 64: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD_3OD) da substância **17**.

A fim de confirmar a identificação estrutural por RMN, a substância **17** foi submetida à análise por HPLC-DAD-MS. O cromatograma obtido mostra um pico majoritário com tempo de retenção em 15,270 min (Figura 65). Os espectros de massas obtidos tanto no modo positivo (ESI+) quanto no modo negativo (ESI-) são vistos, além das propostas de fragmentações na Figura 66.

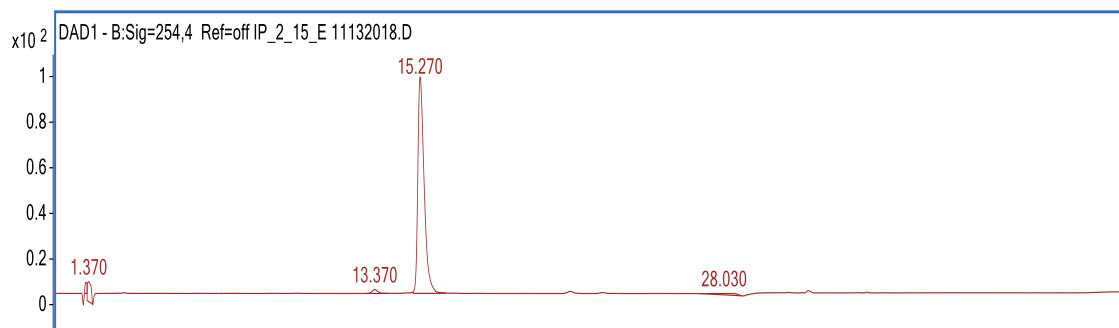
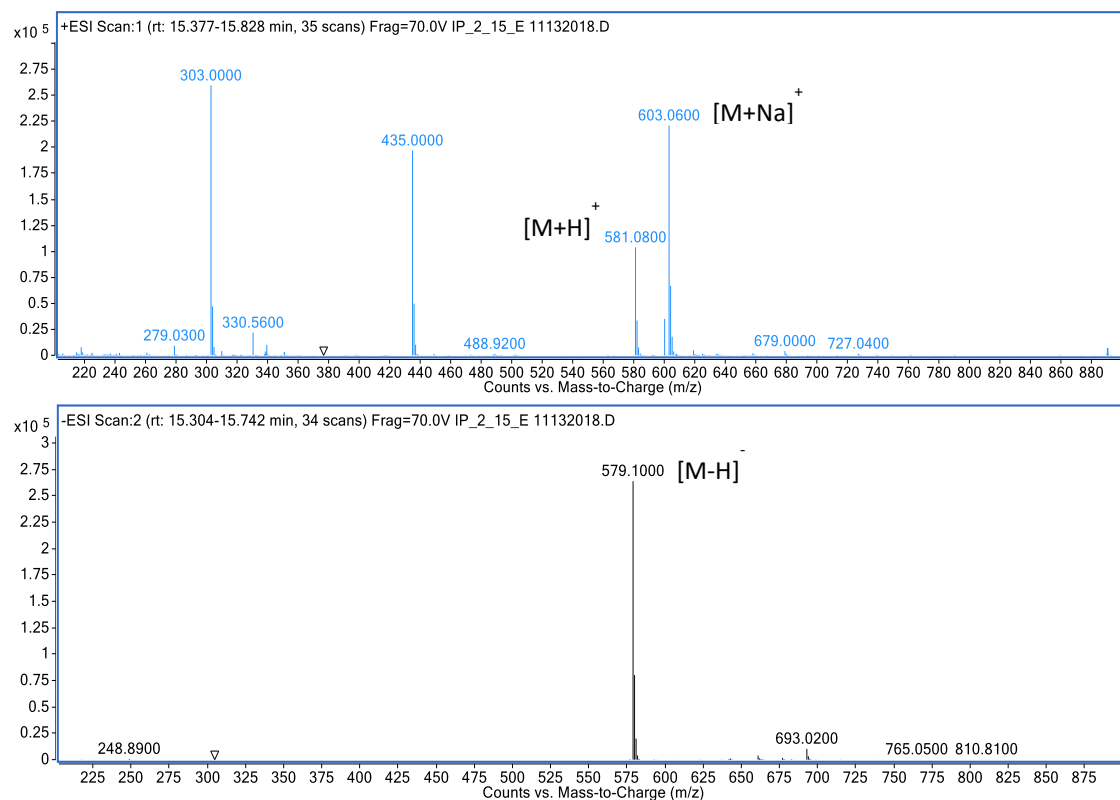
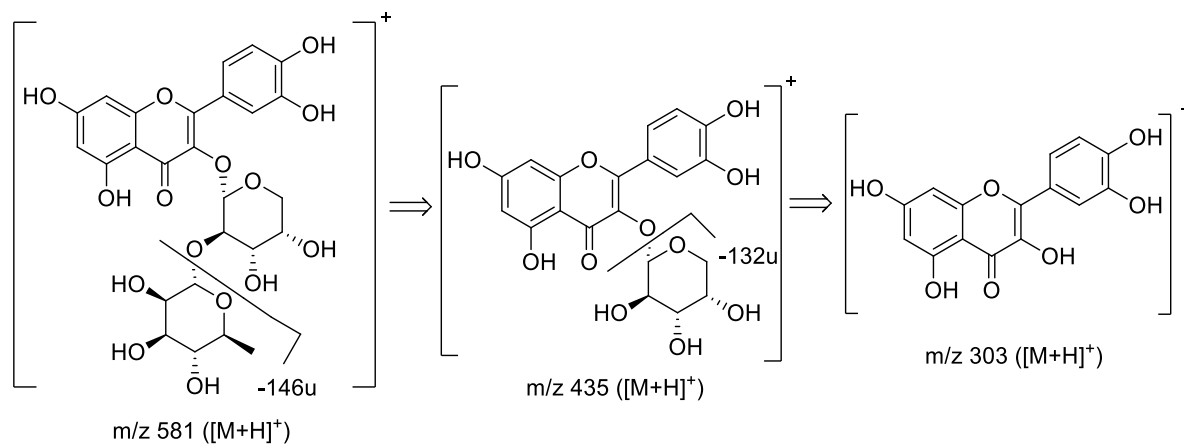
Figura 65: Cromatograma do HPLC-DAD da substância **17** em 254 nm.

Figura 66: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância **17**.



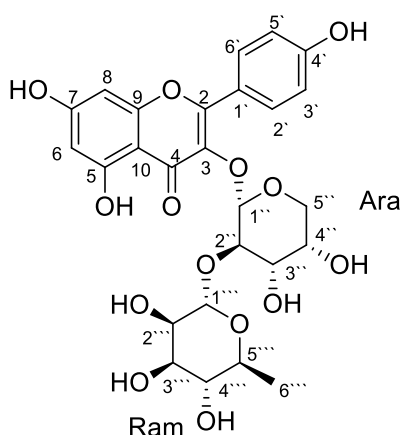
O espectro de massas no modo positivo apresentou o sinal do íon *quasi*-molecular em m/z 581 ($[M+H]^+$), consistente com a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{15}$, confirmando a proposta estrutural da quercetina 3-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose. O íon m/z 435 refere-se à aglicona ligada à arabinose, formado após a perda de 146u, característica de desoxiexose, no caso, a ramnose. Em seguida, ocorre uma segunda fragmentação com a formação do íon m/z 303, referente à aglicona, resultante da perda de 132u, característica de pentose, no caso, a arabinose (Figura 67).

Figura 67: Propostas de fragmentações no modo positivo da substância **17**.



De acordo com a literatura, a substância **17** foi isolada pela primeira vez em uma espécie do gênero *Annona*.

5.4.2 Substância 18 (IP-1-34B)



Kaempferol 3-O- α -L-ramnopyranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopyranose

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 68 a 72, p. 120) sinais de dupletos na região de δ_{H} 6,44 (H-8) e 6,21 (H-6) com constante de acoplamento *meta* ($J = 2,0$ Hz) representam os átomos de hidrogênio aromático referentes ao anel A do flavonoide e correlacionam, respectivamente, com os átomos de carbono em δ_{C} 93,64 e 98,69 de acordo com os dados do mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figura 77, p. 124). O sinal em δ_{H} 12,65 é característico do hidrogênio da hidroxila na posição C-5 quelada à carbonila em C-4, formando uma ligação de hidrogênio.

Foi observado o padrão de substituição AA'BB' no anel B representado pelos sinais em δ_{H} 8,06 atribuído a H-2' e H-6' e em δ 6,89 atribuído a H-3' e H-5' acoplados pela interação spin-spin em *orto* ($J = 8,5$ Hz). Através das correlações a duas e três ligações entre átomos de hidrogênio e carbono por HMBC (Figuras 78 e 79, p. 125), foi possível confirmar a presença da hidroxila na posição C-4'.

A α -arabinose foi confirmada através da correlação por HSQC de um duplete em δ_{H} 5,47 na posição H-1'' característico do hidrogênio anomérico com $J = 4,8$ Hz que caracteriza o açúcar com configuração α acoplado com o átomo de carbono em δ_{C} 99,22 (C-1''). No experimento HMBC é observado a correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 5,47) e o carbono C-3 (δ_{C} 133,42), confirmando a ligação da α -arabinose ao carbono C-3.

A presença de uma segunda unidade de açúcar (α -ramnose) foi confirmada devido ao sinal de outro hidrogênio anomérico observado em δ_H 4,94 e atribuído a H-1''' acoplado com o átomo de carbono em δ_C 100,05 por HSQC. No mapa de correlação heteronuclear HMBC é observado a correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o hidrogênio anomérico H-1''' (δ_H 4,94) e o carbono C-2'' (δ_C 74,64), confirmando que as duas unidades de açúcar estão ligadas pelas posições C-2'' com o C-1'''.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figuras 73 a 76, p. 122) e HSQC revelaram sinais referentes a átomos de carbono não hidrogenados, dentre os quais, δ_C : 156,03 (C-2); 133,42 (C-3); 177,40 (C-4); 161,17 (C-5); 164,19 (C-7); 156,26 (C-9); 103,90 (C-10), 120,59 (C-1') e 160,03 (C-4'). Além desses, outros sinais foram atribuídos a átomos de carbono metínicos (CH) em δ_C : 98,69 (C-6); 93,64 (C-8); 130,85 (C-2'/6'); 115,27 (C-3'/5'); 17,49 (C-6'''), 68,61 (C-5'''), 70,53 (C-2'''), 69,00 (C-3'''), 71,89 (C-4'''), 100,05 (C-1'''), 66,23 (C-4''), 70,66 (C-3''), 74,64 (C-2''), 99,22 (C-1''). Constatou-se também a presença de um carbono metilênico (CH₂) em δ_C : 63,76 (C-5''), pertencente ao açúcar do tipo pentose (arabinose).

A substância **18** através das análises uni e bidimensionais do espectro de RMN ^{13}C e 1H , e por comparações com dados da literatura (MOON et al., 2010) confirma ser o flavonoide kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose (Tabela 17, p. 119).

Tabela 17: Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **18** em DMSO- d_6 em comparação com os dados da literatura em CD_3OD . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.

Substância 18					MOON et al., 2010	
C	HSQC		HMBC		HSQC	
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	δ_c	δ_H
2	156,03	-	-	H-2', H-6'	158,3	-
3	133,42	-	-	H-1''	135,0	-
4	177,40	-	-	-	179,3	-
5	161,17	-	H-6	-	162,9	-
7	164,19	-	H-8, H-6	-	165,6	-
9	156,26	-	H-8	-	158,4	-
10	103,90	-	-	H-8, H-6	105,8	-
1'	120,59	-	-	H-3', H-5'	122,7	-
4'	160,03	-	H-3', H-5'	H-2', H-6'	161,3	-
CH						
6	98,69	6,21 (d, 2,0)	-	H-8	99,8	6,18 (d, 2,4)
8	93,64	6,44 (d, 2,0)	-	H-6	94,7	6,38 (d, 2,4)
2'/6'	130,85	8,06 (d, 8,5)	-	-	132,1	8,03 (d, 8,8)
3'/5'	115,27	6,89 (d, 8,5)	-	-	116,3	6,90 (d, 8,8)
Ara						
1''	99,22	5,47 (d, 4,8)	H-2''	H-5'' β	101,0	5,52 (d, 5,2)
2''	74,64	3,95 (t, 6,0)	-	H-1'''	77,2	4,10 (dd, 6,4; 5,2)
3''	70,66	3,67	H-2''	H-5'' β	72,8	3,82 (dd, 6,4; 2,8)
4''	66,23	3,63 (m)	H-5'' β	-	68,4	3,78 (m)
5''	63,76	3,20 α 3,56 β (dd, 11,1; 5,6)	-	H-1''	65,2	3,34 α (m) 3,76 β (dd, 11,2; 5,2)
Ram						
1'''	100,05	4,94	-	-	102,2	5,09 (d, 1,6)
2'''	70,53	3,42	H-1'''	-	72,5	3,91 (dd, 3,2; 1,6)
3'''	69,00	3,63	-	-	72,3	3,70 (dd, 9,6; 3,2)
4'''	71,89	3,17	-	H-6'''	74,0	3,35 (t, 9,6)
5'''	68,61	3,67	H-6'''	H-1'''	70,2	3,87 (dq, 9,6; 6,0)
6'''	17,49	0,98 (d, 6,1)	-	-	17,9	1,09 (d, 6,0)

Figura 68: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 18.

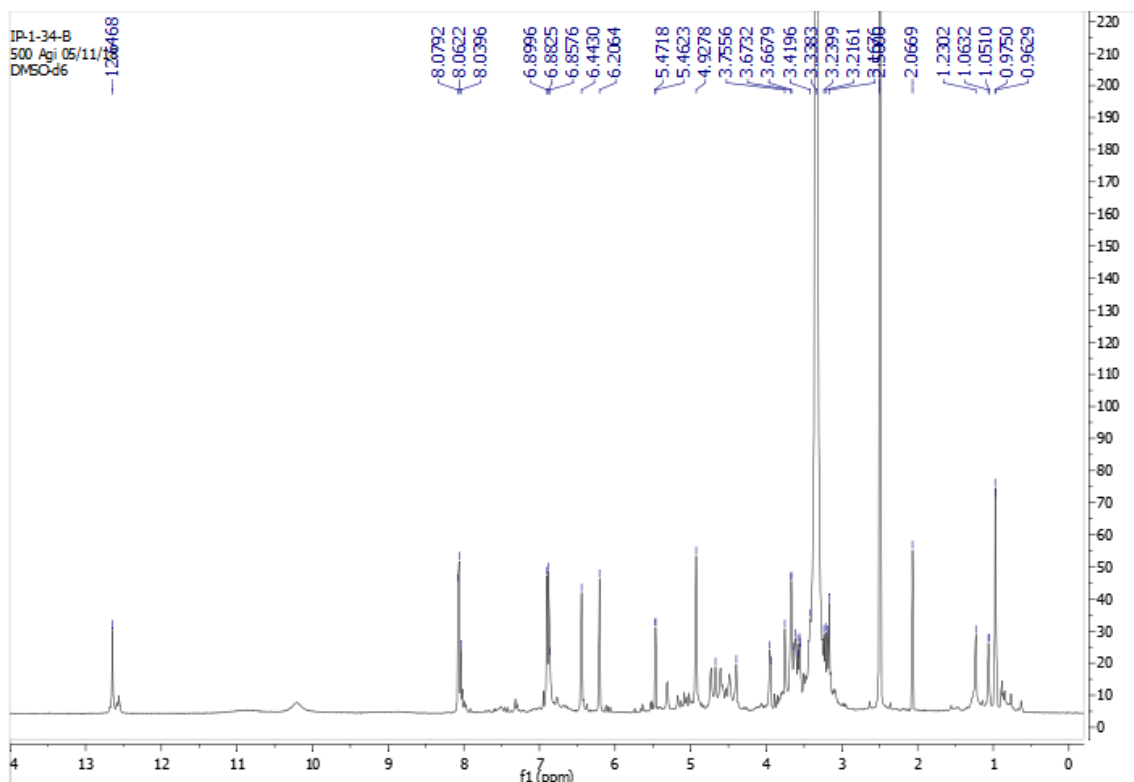


Figura 69: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 18.

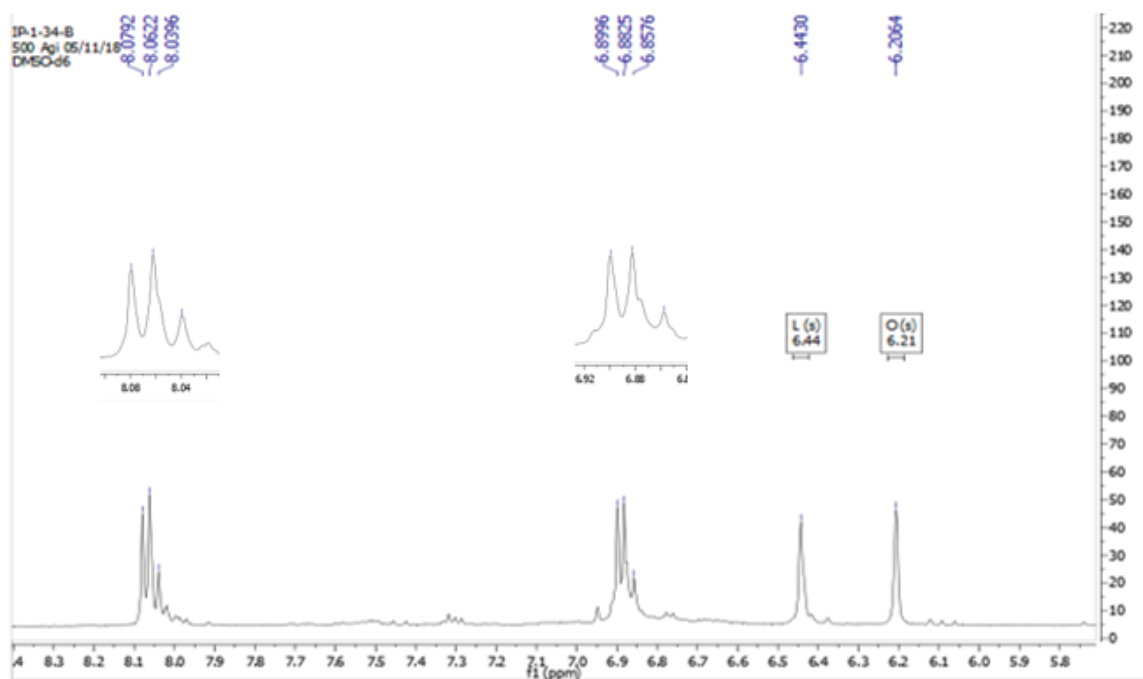


Figura 70: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **18**.

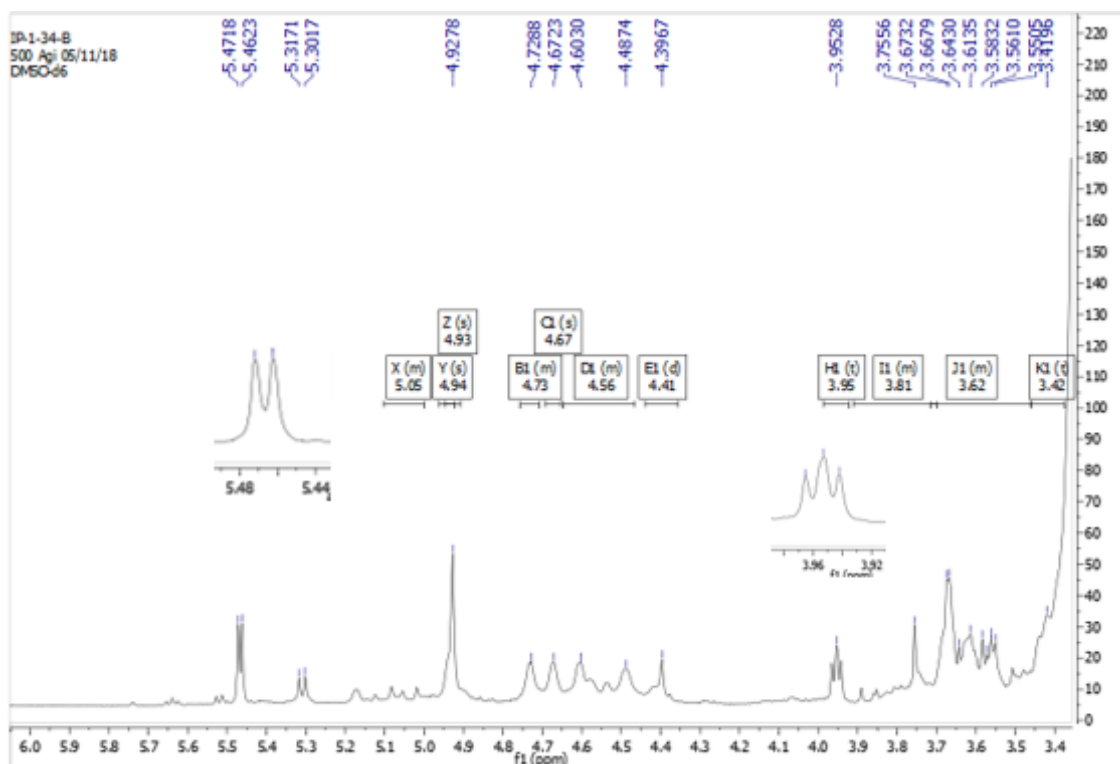


Figura 71: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **18**.

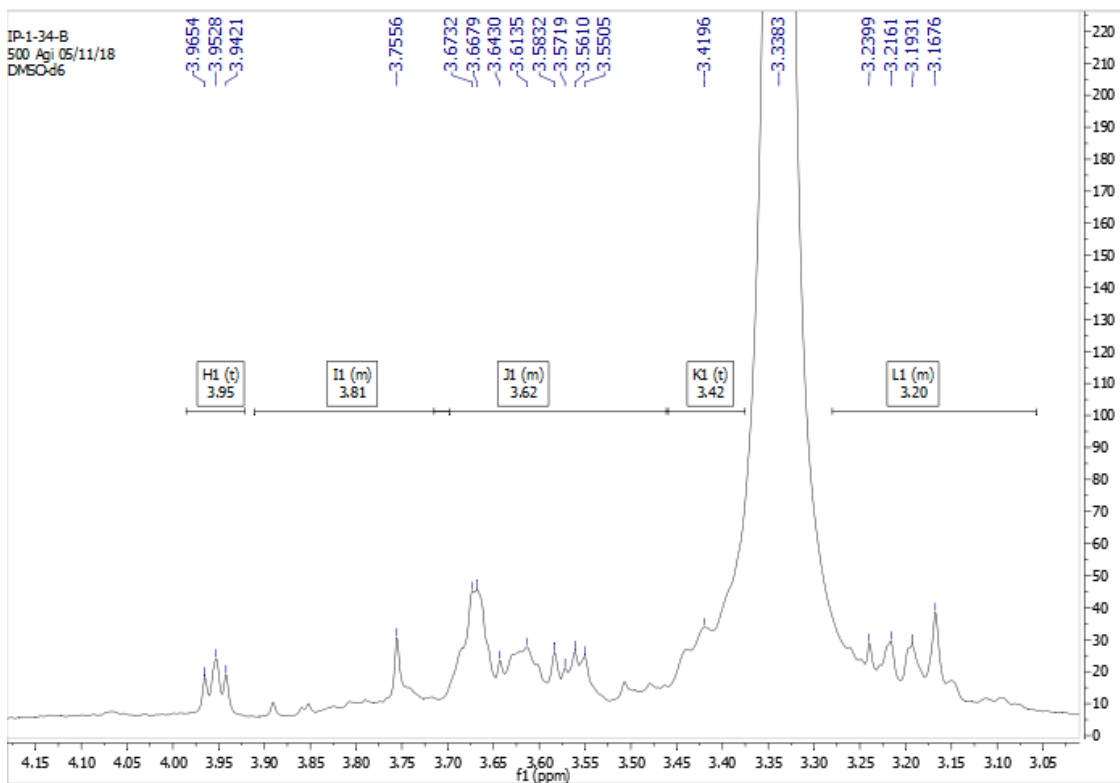


Figura 72: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 18.

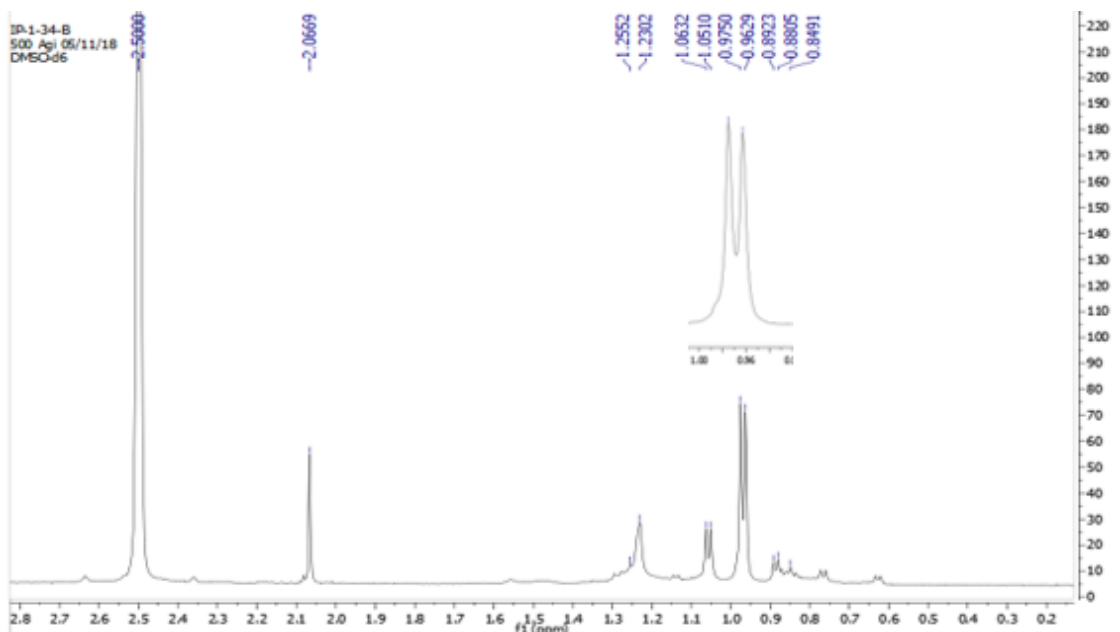


Figura 73: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) da substância 18.

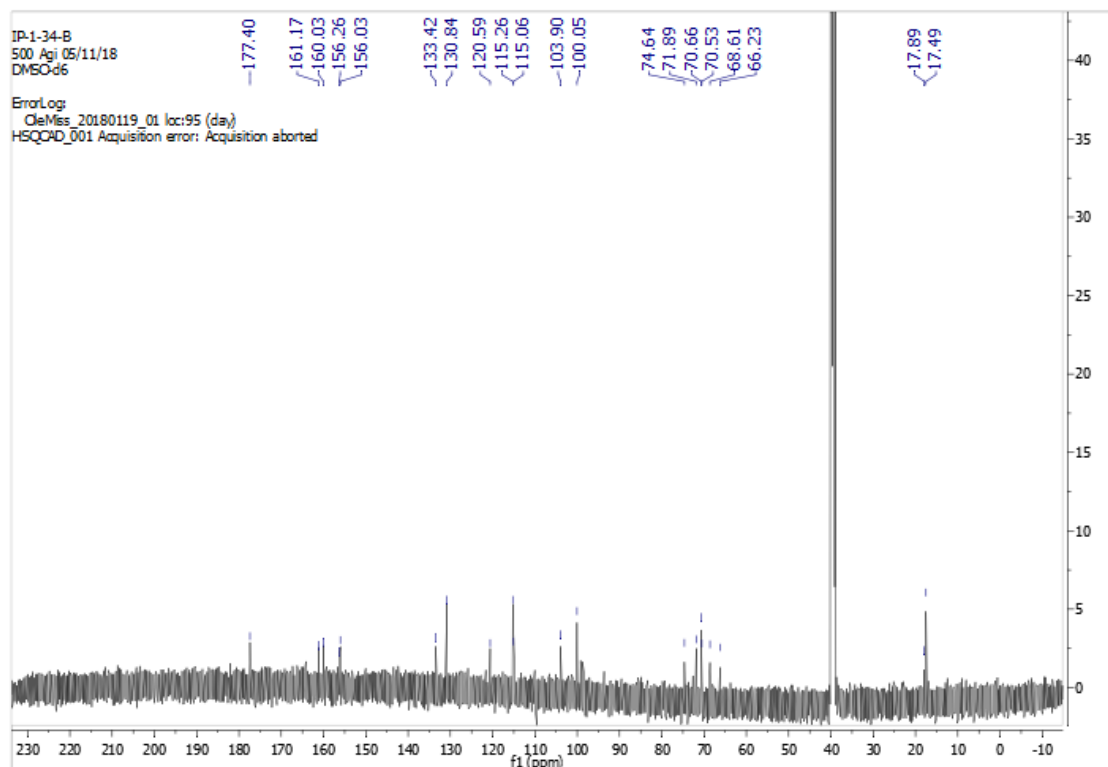


Figura 74: Ampliação do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d6) da substância **18**.

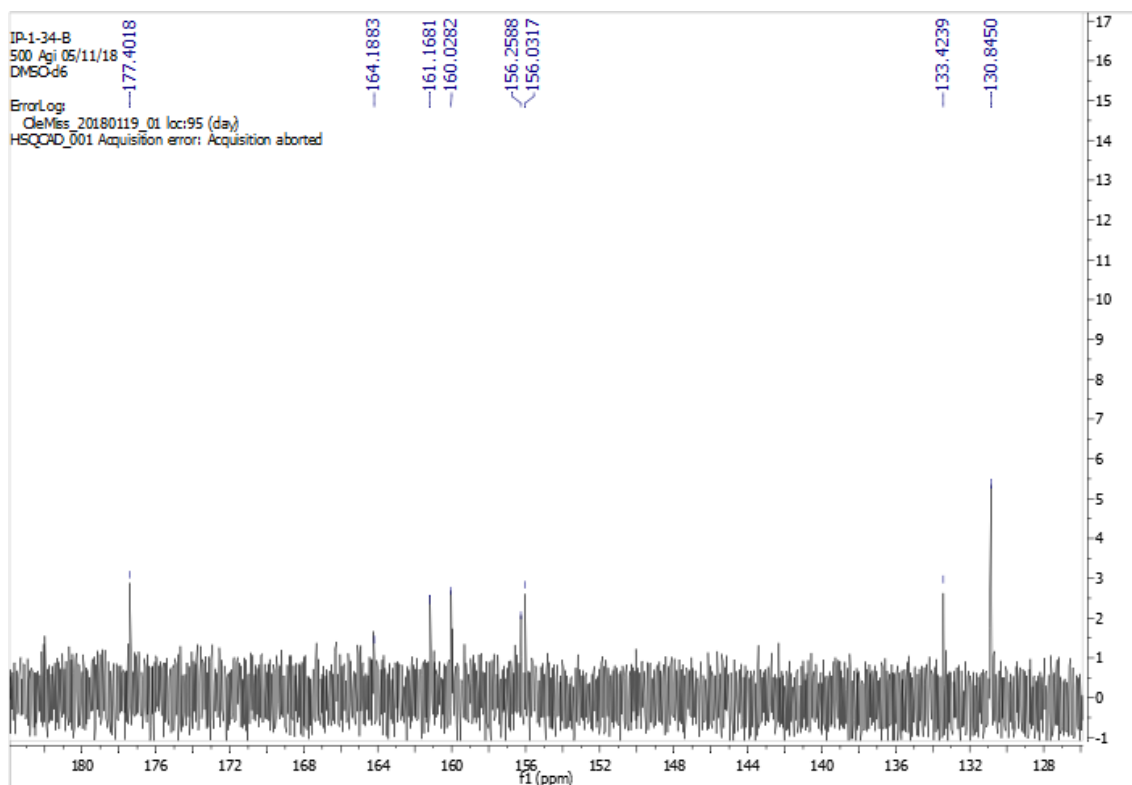


Figura 75: Ampliação do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d6) da substância **18**.

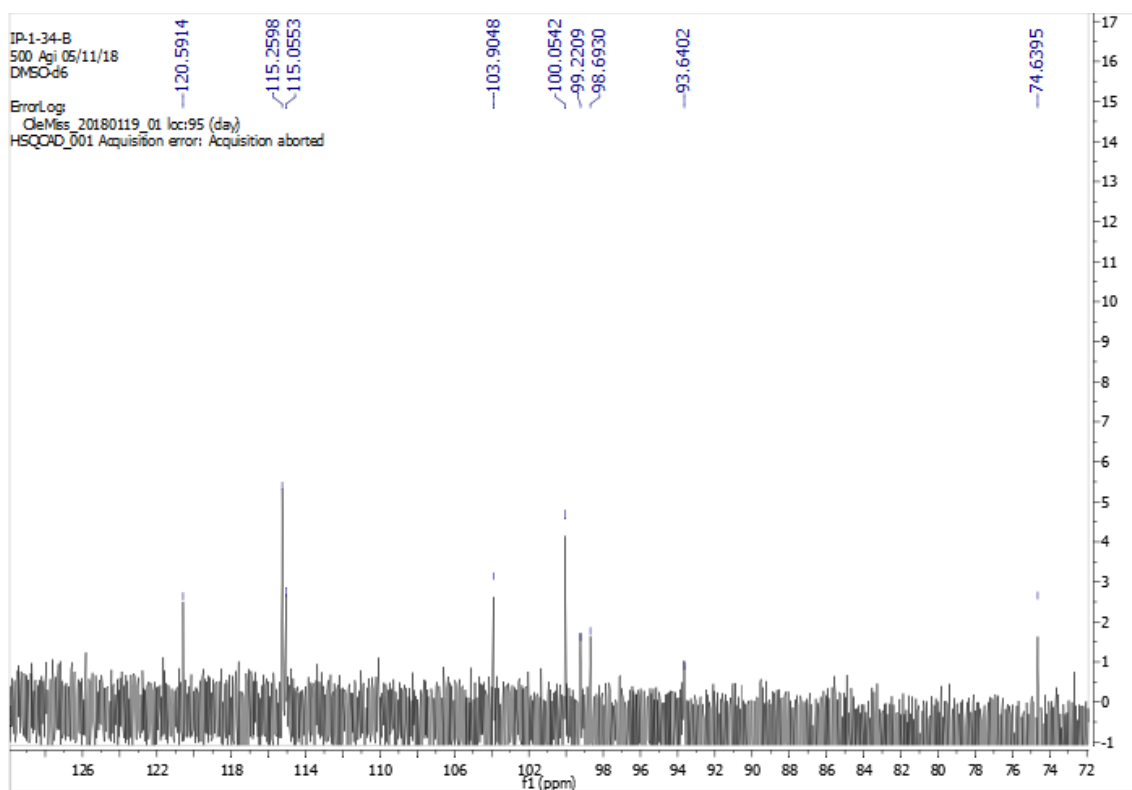


Figura 76: Ampliação do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) da substância **18**.

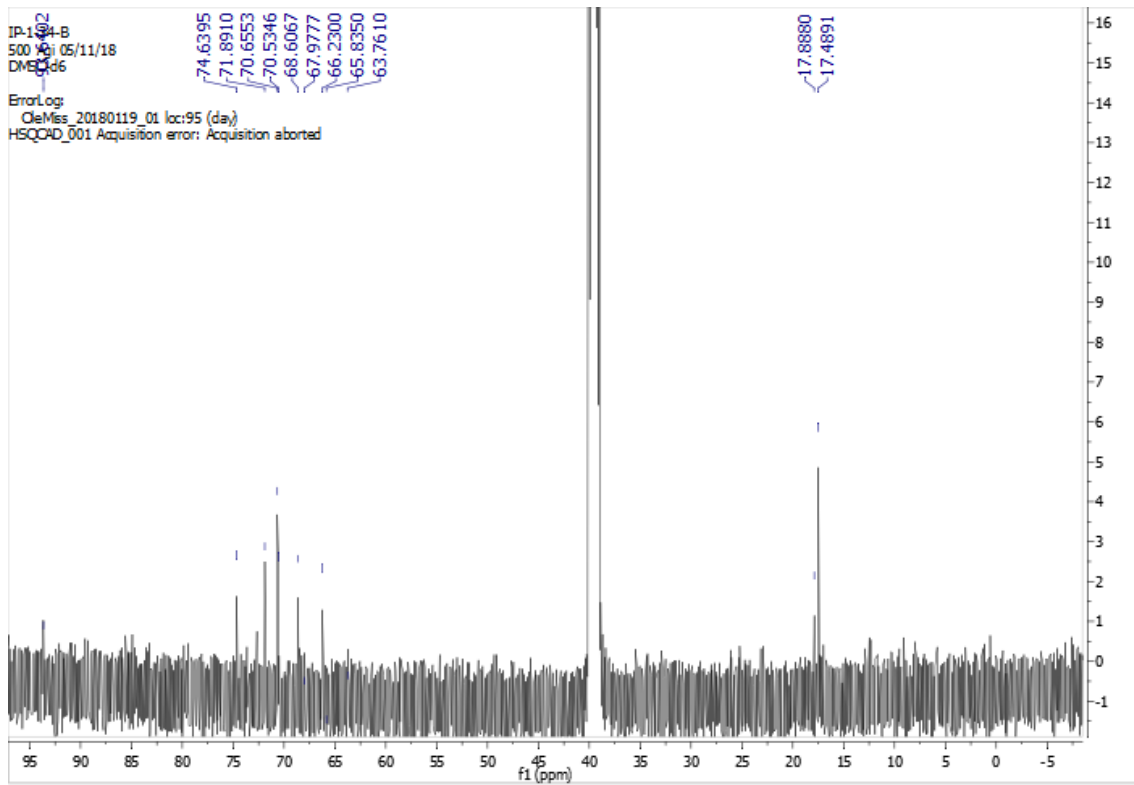


Figura 77: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d₆) da substância **18**.

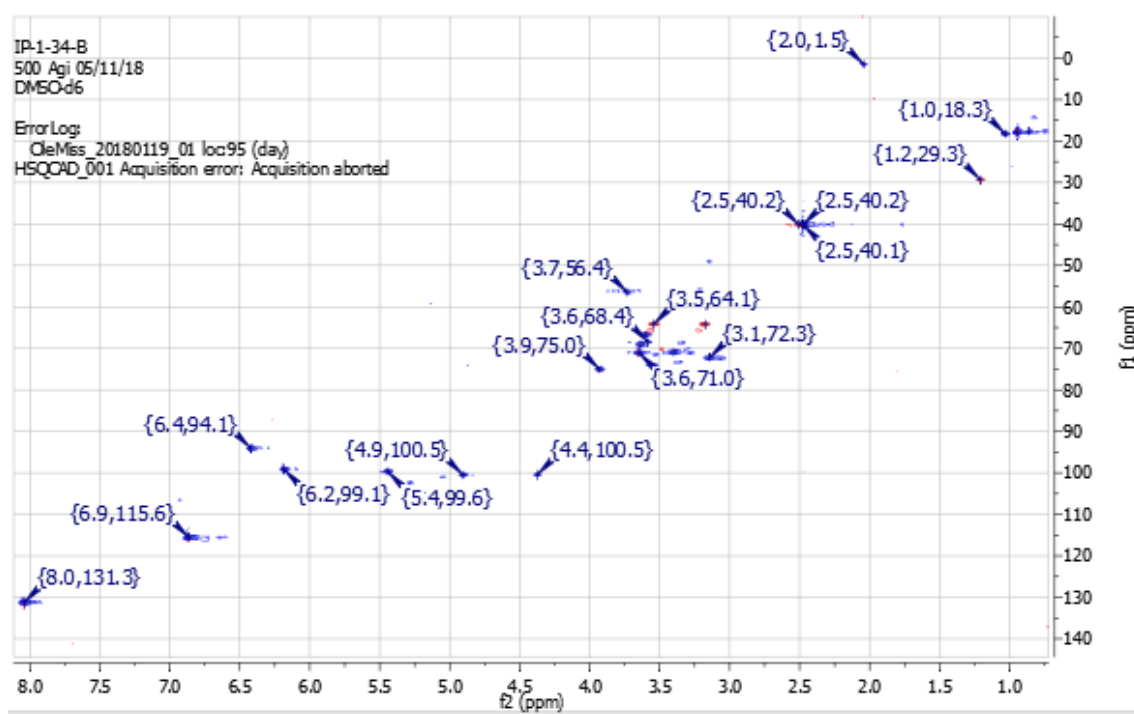


Figura 78: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 18.

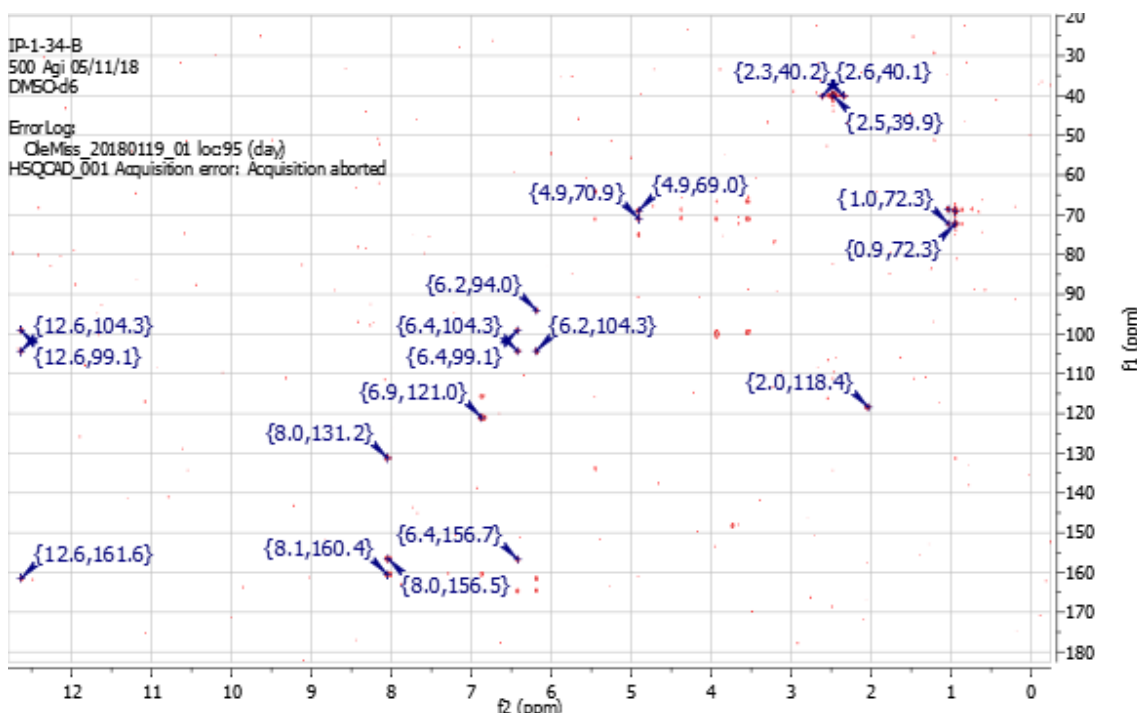
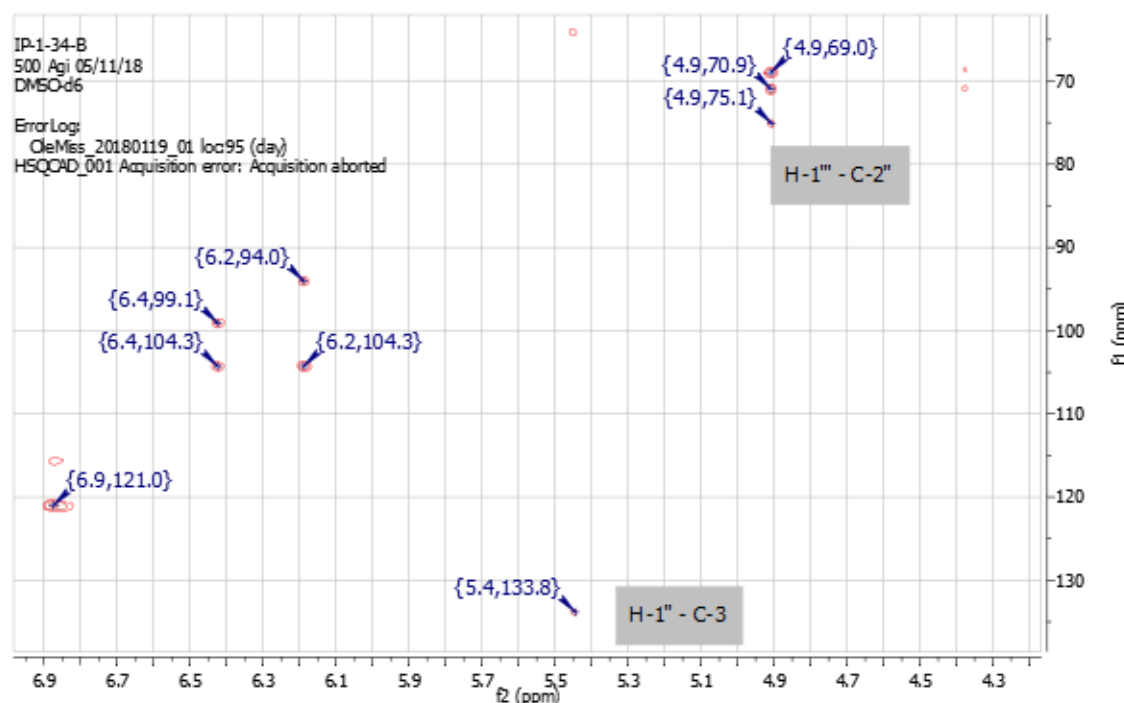


Figura 79: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 18.



A fim de confirmar a identificação por RMN, a substância **18** presente na fração IP-1-34B, foi analisada por HPLC-DAD-MS. O cromatograma obtido mostra um pico majoritário com tempo de retenção em 21,158 min (Figura 80) e os espectros de massas obtidos tanto no modo positivo (ESI+) quanto no modo negativo (ESI-) são mostrados com suas propostas de fragmentações na Figura 81.

Figura 80: Cromatograma do HPLC-DAD da substância **18** em 254 nm.

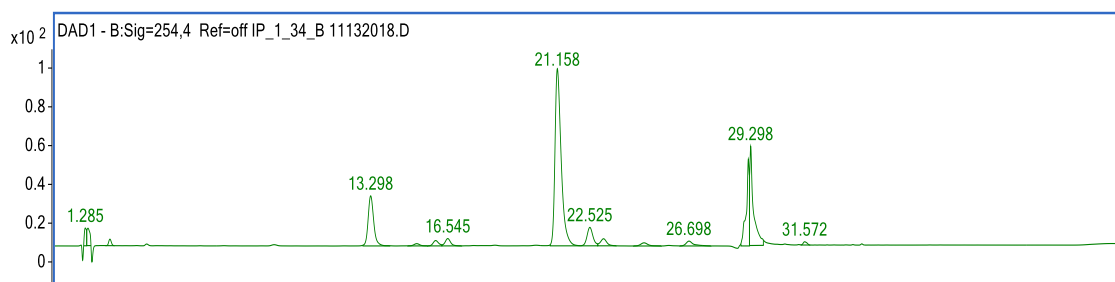
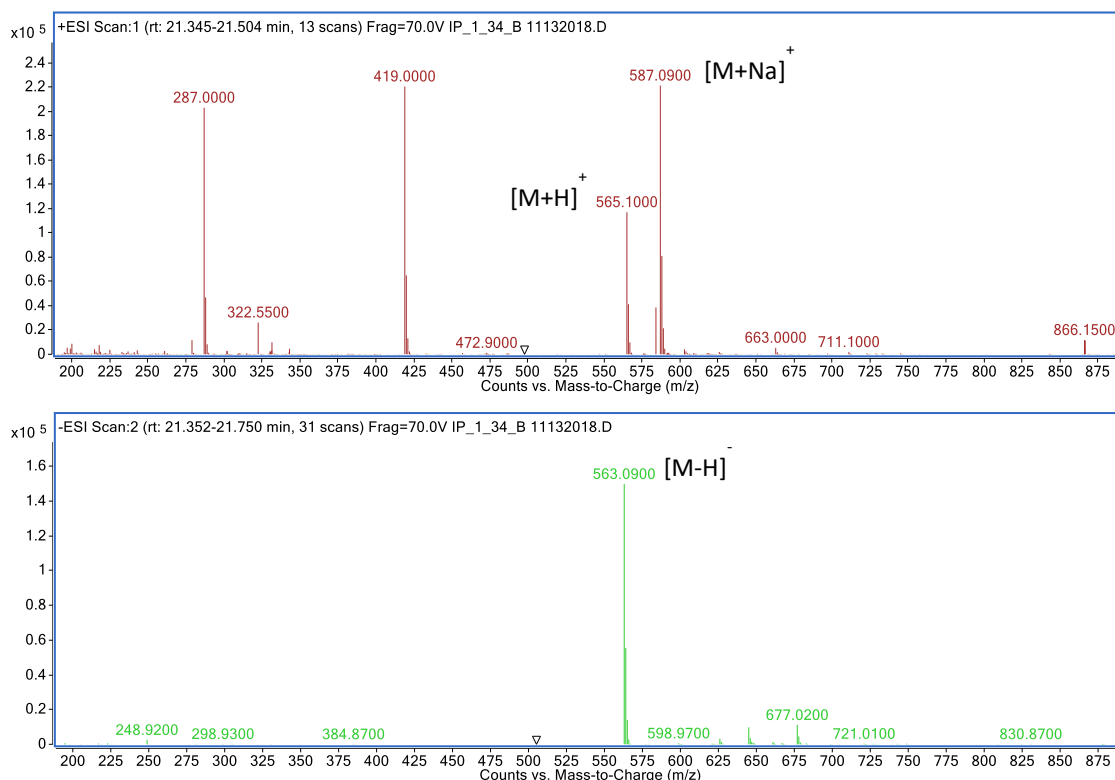
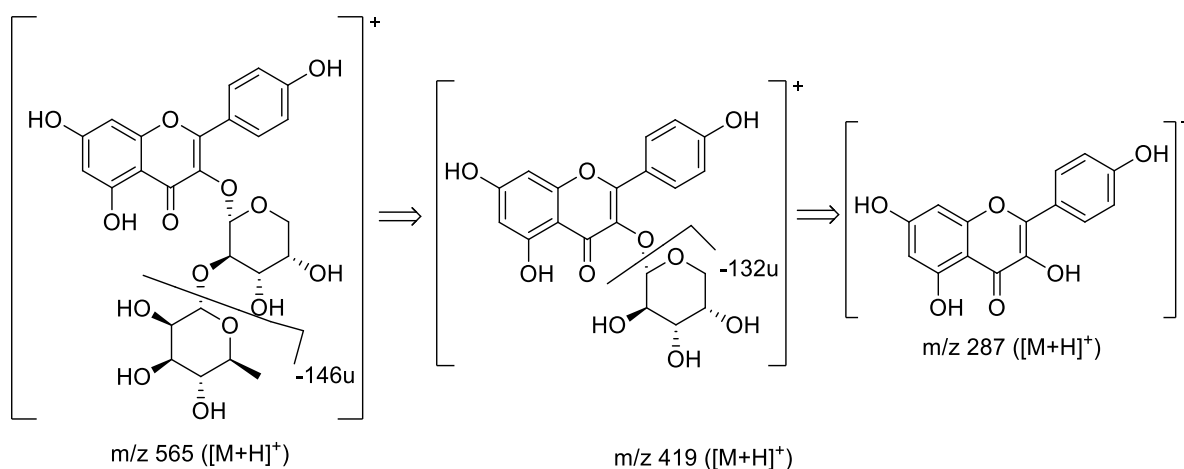


Figura 81: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância **18** no tempo de retenção de 21,158 min.



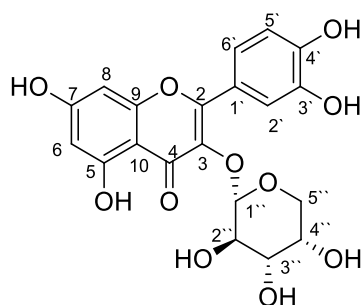
O íon *quasi*-molecular em m/z 565 $[M+H]^+$ é consistente com a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{14}$, confirmando a proposta estrutural do kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose. O íon m/z 419 que é referente a aglicona ligada à arabinose, formando a perda de 146u é característico de desoxiexose, no caso, a ramnose. Em seguida, ocorre uma segunda fragmentação com a formação do íon m/z 287, referente a aglicona e a perda de 132u característica de pentose, no caso, a arabinose (Figura 82).

Figura 82: Propostas de fragmentações no modo positivo da substância **18**.



De acordo com a literatura, a substância **18**, kaempferol 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose foi isolada pela primeira vez em uma espécie do gênero *Annona*.

5.4.3 Substância 19 (IP-2-30A)



Quercetina 3-O-arabinosídeo

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 83 a 86, p.131), sinais na região de δ_{H} 6,26 (H-8) e 6,05 (H-6) representam os átomos de hidrogênio aromático referentes ao anel A dos flavonoides e correlacionam, respectivamente, com os átomos de carbono em δ_{C} 94,07 e 99,72 de acordo com os dados de correlação heteronuclear por HSQC (Figuras 88 e 89, p. 133). O sinal em δ_{H} 12,57 é característico do hidrogênio da hidroxila na posição C-5 quelada a carbonila em C-4, formando uma ligação de hidrogênio.

Observou-se o padrão de substituição ABC representado pela presença de três sinais que correspondem aos três átomos de hidrogênio localizados em ambientes químicos diferentes como característica do anel B com substituintes em duas posições. Esses sinais estão representados em δ_{H} 7,51 atribuído ao H-2' que se apresenta como duplete com $J = 2,2$ Hz, devido ao acoplamento *meta* com H-6'. O sinal de duplete em δ_{H} 6,82 atribuído ao H-5' com $J = 8,5$ Hz devido ao acoplamento em *orto* com H-6'. Já o duplo duplete em δ_{H} 7,61 atribuído ao H-6' com $J = 8,3$ Hz acoplado em *orto* ao H-5' e com $J = 2,2$ Hz acoplado em *meta* ao H-2'. Através das correlações a duas, três e quatro ligações entre átomos de hidrogênio e carbono por HMBC (Figuras 90 e 91, p. 134) foi possível confirmar a presença das hidroxilas nas posições C-3' e C-4'.

A unidade de açúcar (arabinose) ligado ao carbono carbinólico em C-3 do anel C, mostrou sinal com absorção no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 5,23 (d, $J = 5,3$ Hz) na posição H-1'' característico do hidrogênio anomérico acoplado com o átomo de carbono em δ_{C} 101,62. Esses valores foram confirmados pela correlação heteronuclear a uma ligação HSQC. No mapa de HMBC é observado,

a correlação a três ligações ($^3J_{CH}$) entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_H 5,23) e o carbono C-3 (δ_C 133,28), confirmando a ligação da arabinose ao carbono C-3.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figura 87, p. 133) e HSQC revelaram sinais referentes aos átomos de carbono não hidrogenados, dentre os quais, δ_C : 154,77 (C-2); 133,28 (C-3); 176,73 (C-4); 160,96 (C-5); 165,15 (C-7); 156,55 (C-9); 102,41 (C-10), 120,37 (C-1'), 145,27 (C-3') e 149,40 (C-4'). Além desses, outros sinais foram atribuídos a átomos de carbono metínicos (CH) em δ_C : 99,72 (C-6); 94,07 (C-8); 115,04 (C-2'); 115,36 (C-5'); 121,79 (C-6'); 101,62 (C-1''); 70,72 (C-2''); 71,77 (C-3''); 66,14 (C-4''). Constatou-se também a presença de um carbono metilênico (CH₂) em δ_C : 64,32 (C-5'') pertencente ao açúcar do tipo pentose (arabinose).

Portanto, a substância **19** isolada mostrou através das análises uni e bidimensionais do espectro de RMN ^{13}C e 1H , e por comparações com dados da literatura (MARKHAM et al., 1978) a confirmação do flavonoide quercetina 3-O-arabinosídeo (Tabela 18, p. 130).

Tabela 18: Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **19** em DMSO- d_6 em comparação com os dados da literatura em DMSO- d_6 . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.

Substância 19						MARKHAM et al., 1978
C	HSQC		HMBC			HSQC
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$^4J_{\text{HC}}$	δ_c
2	154,77	-	-	H-2'	-	156,4
3	133,28	-	-	H-1''	-	133,5
4	176,73	-	-	-	-	177,8
5	160,96	-	H-6	-	-	161,2
7	165,15	-	-	-	-	164,1
9	156,55	-	H-8	-	-	156,8
10	102,41	-	-	H-8, H-6	-	104,1
1'	120,37	-	-	H-5'	-	121,1
3'	145,27	-	H-2'	H-5'	-	145,0
4'	149,40	-	-	H-2'	-	148,4
CH						
6	99,72	6,05 (s)	-	H-8	-	99,4
8	94,07	6,26 (s)	-	H-6	-	93,5
2'	115,04	7,51 (d, 2,2)	-	H-6'	-	115,6
5'	115,36	6,82 (d, 8,5)	H-6'	-	H-2'	115,8
6'	121,79	7,61 (dd, 8,3; 2,2)	-	H-2'	-	121,6
Ara						
1''	101,62	5,23 (d, 5,3)	H-2''	-	-	101,8
2''	70,72	3,75 (t, 6,2)	H-3''	-	-	71,7
3''	71,77	3,51 (s)	H-2''	H-1''	-	70,8
4''	66,14	3,65 (m)	H-5'' β	-	-	65,9
5''	64,32	3,23 α (m) 3,62 β (m)	-	H-1''	-	64,1

Figura 83: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 19.

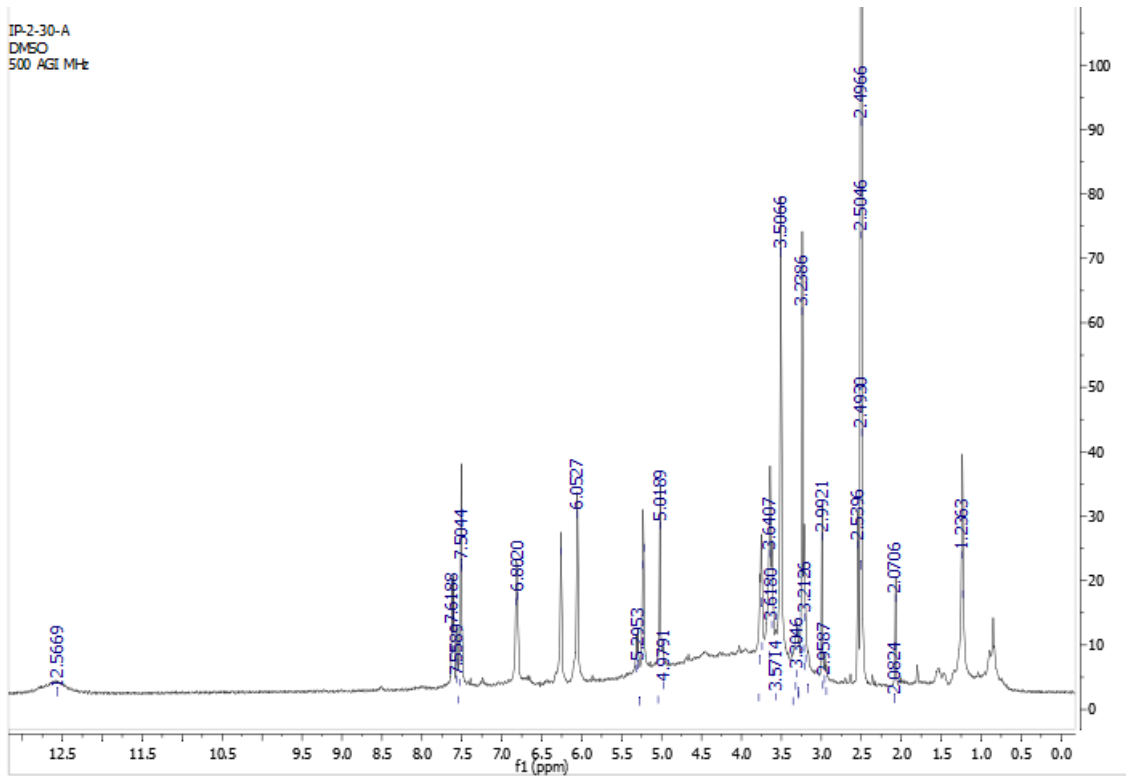


Figura 84: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 19.

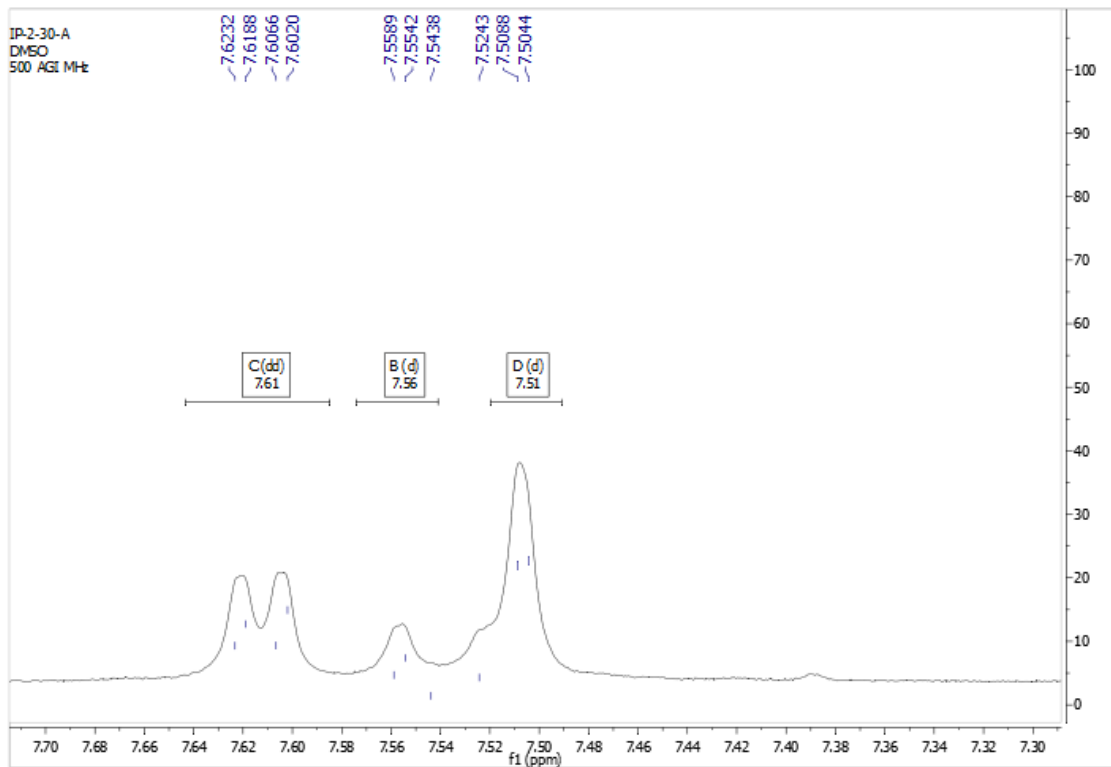


Figura 85: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **19**.

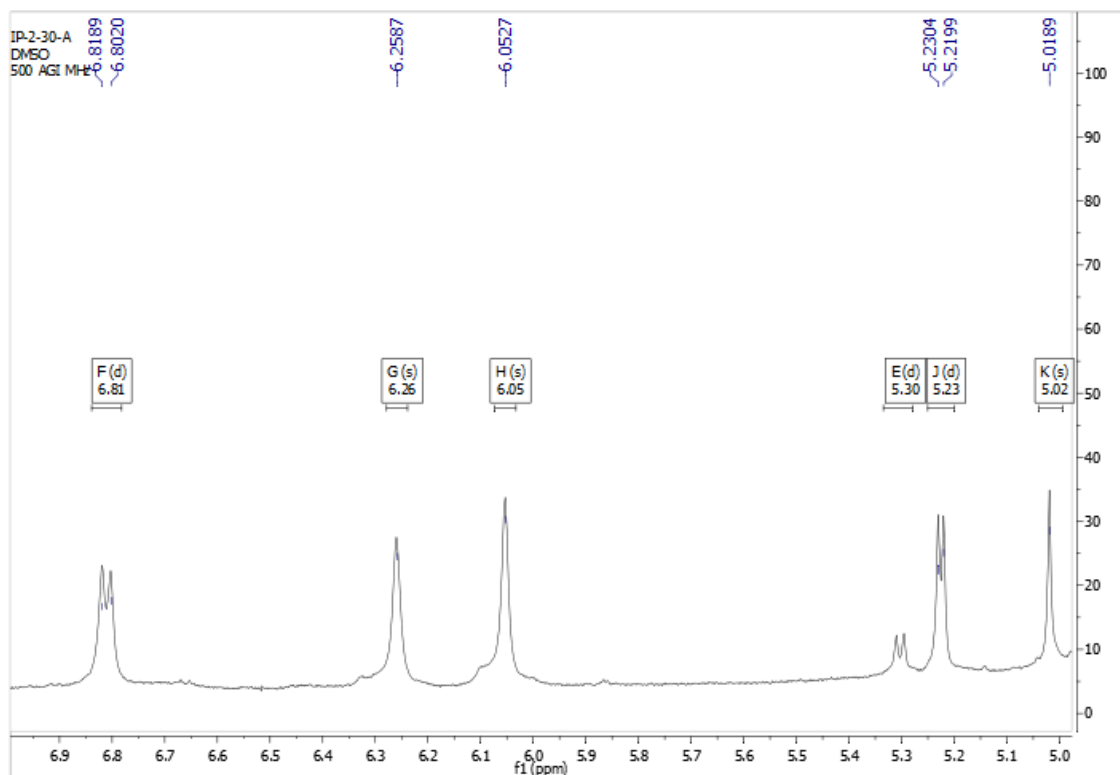


Figura 86: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância **19**.

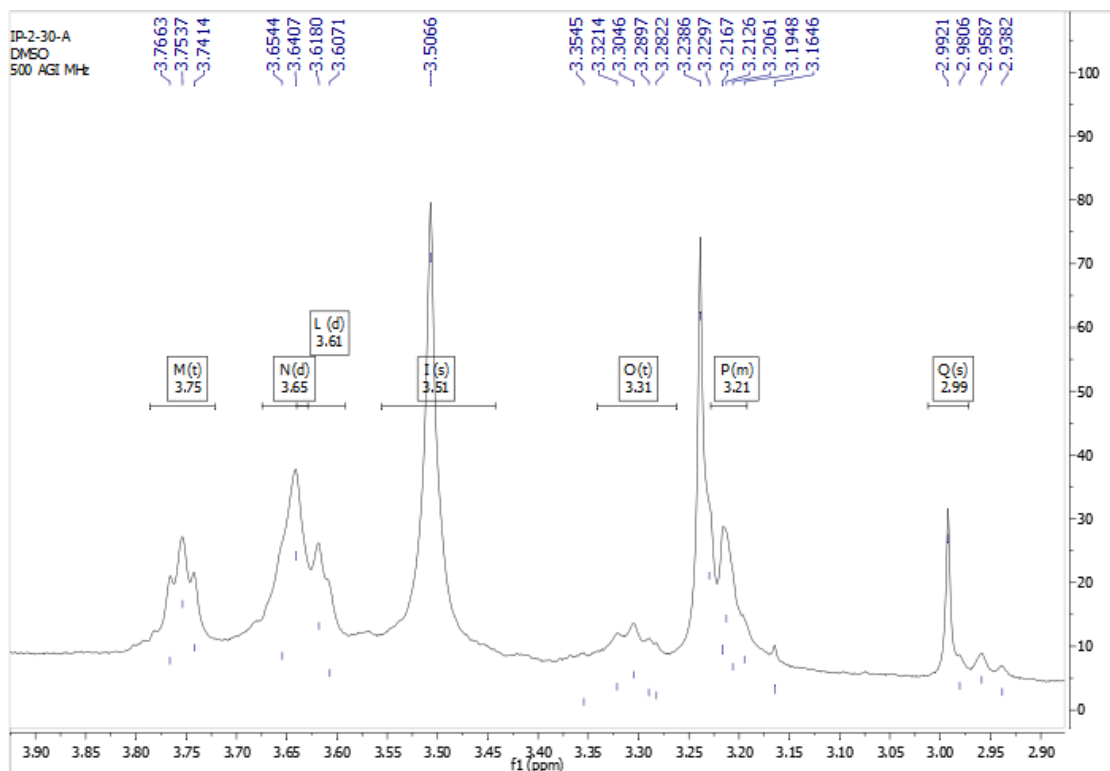


Figura 87: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 19.

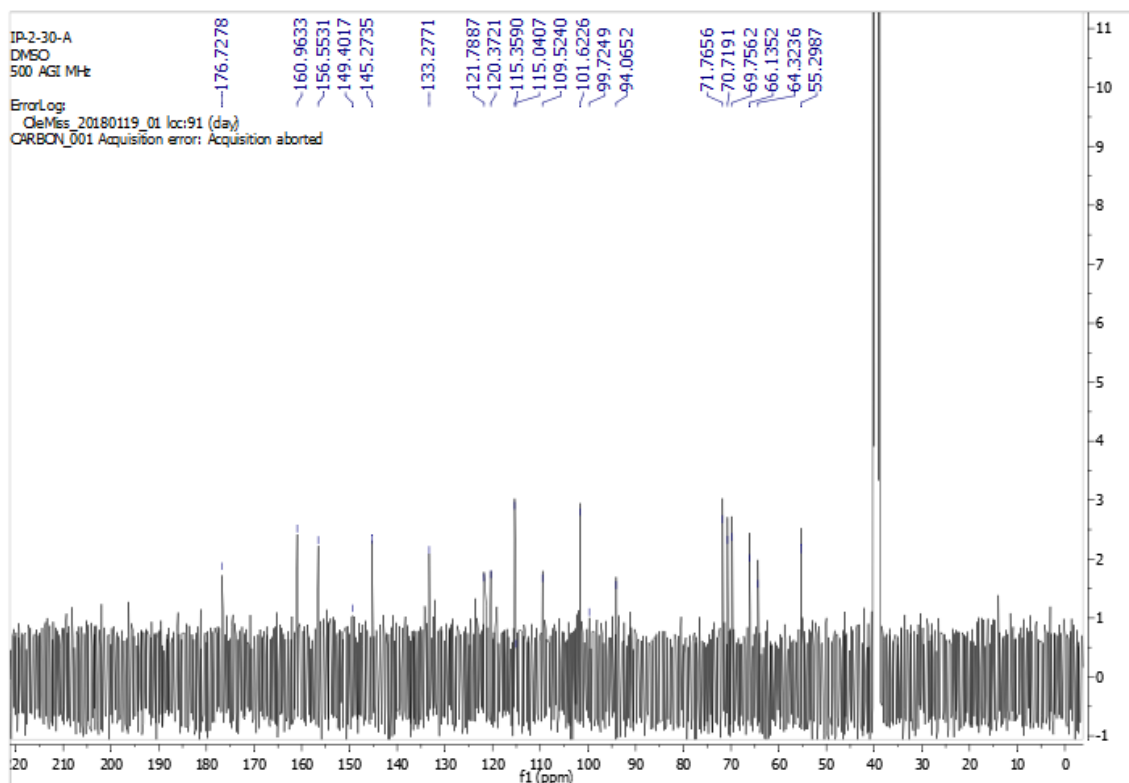


Figura 88: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 19.

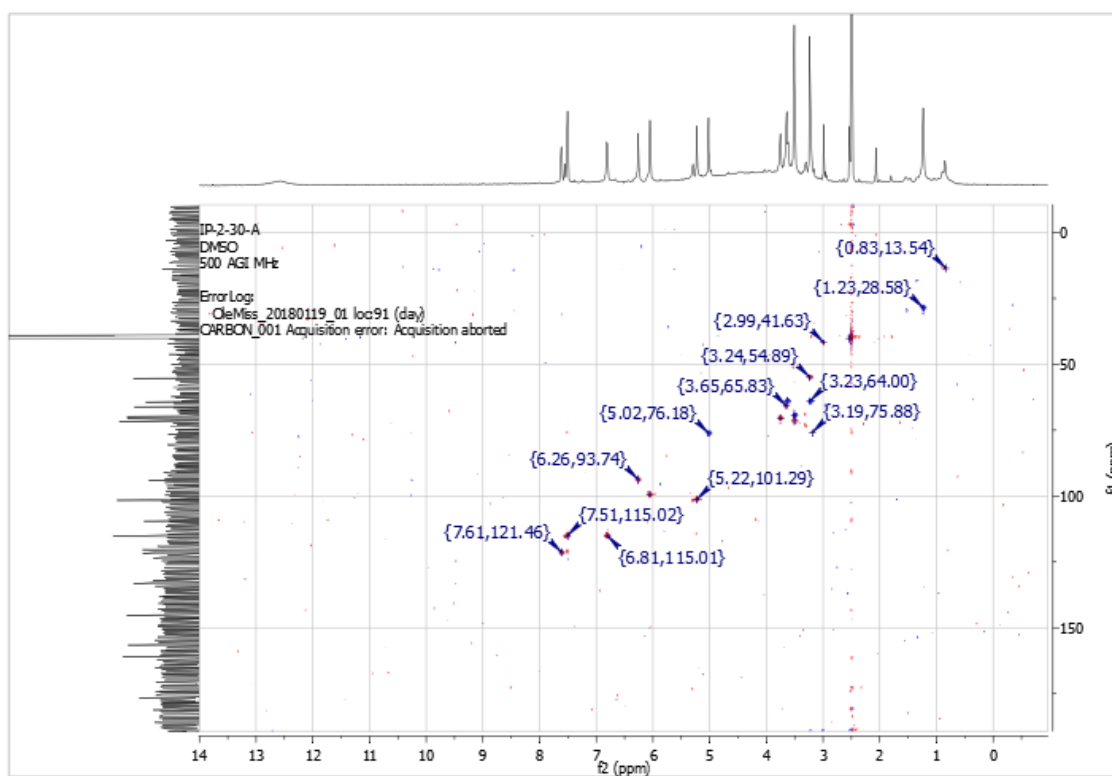


Figura 89: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 19.

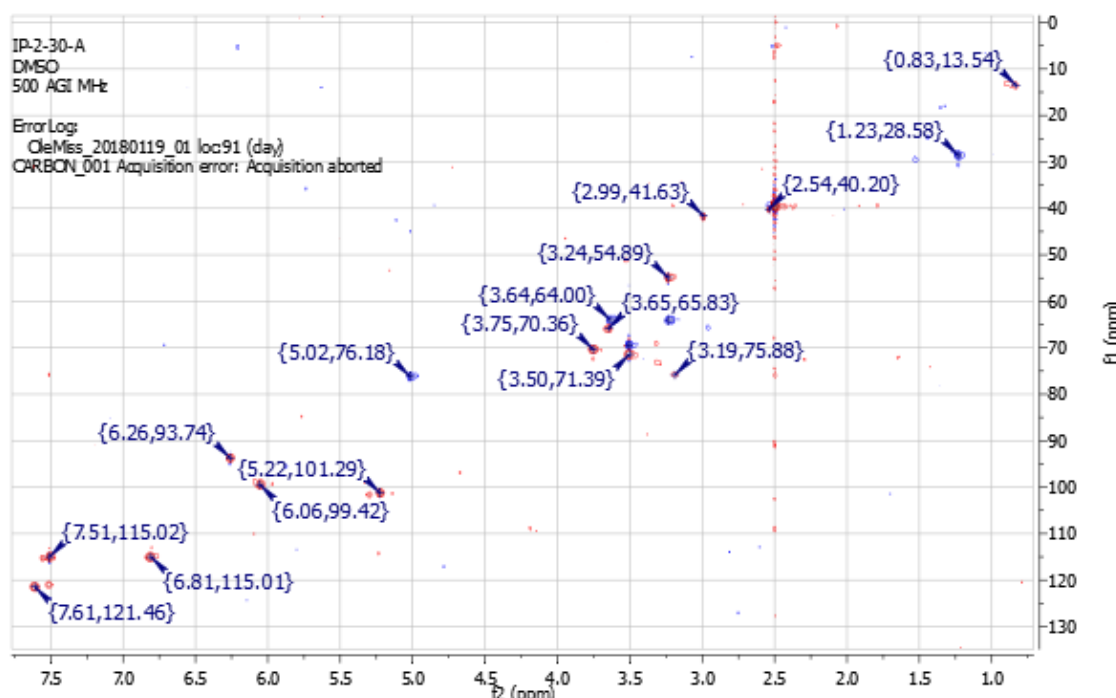


Figura 90: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 19.

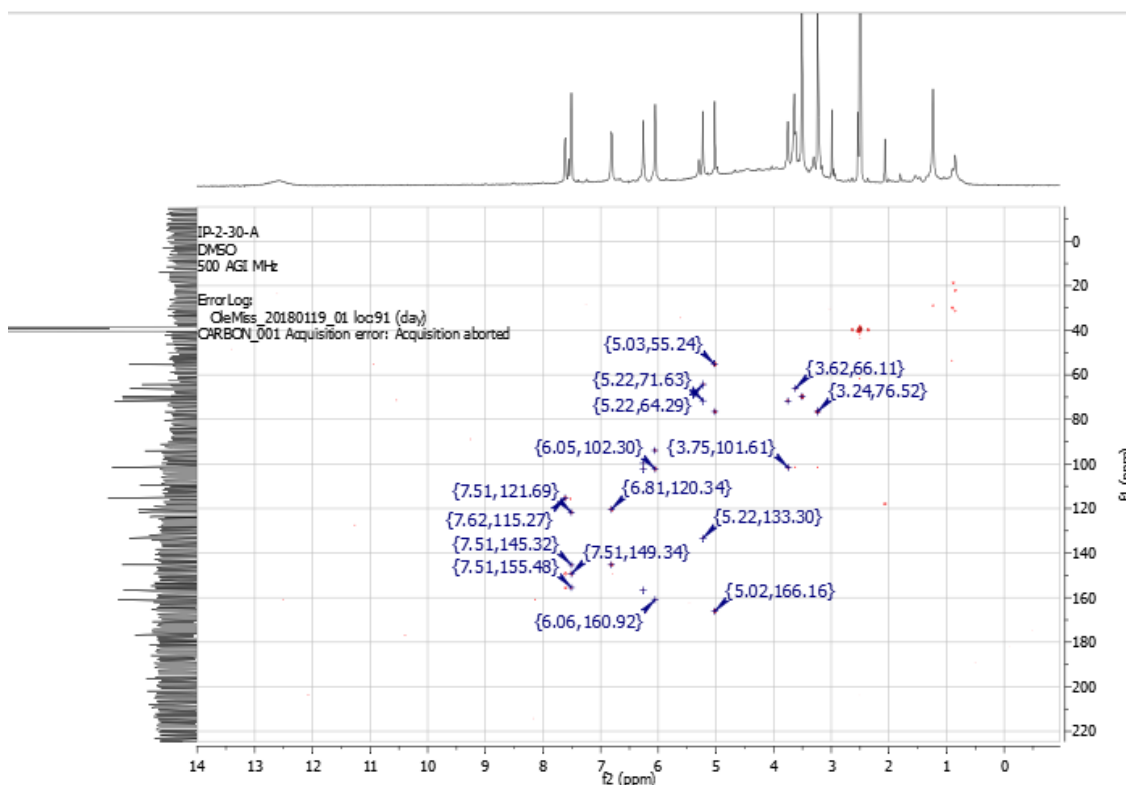
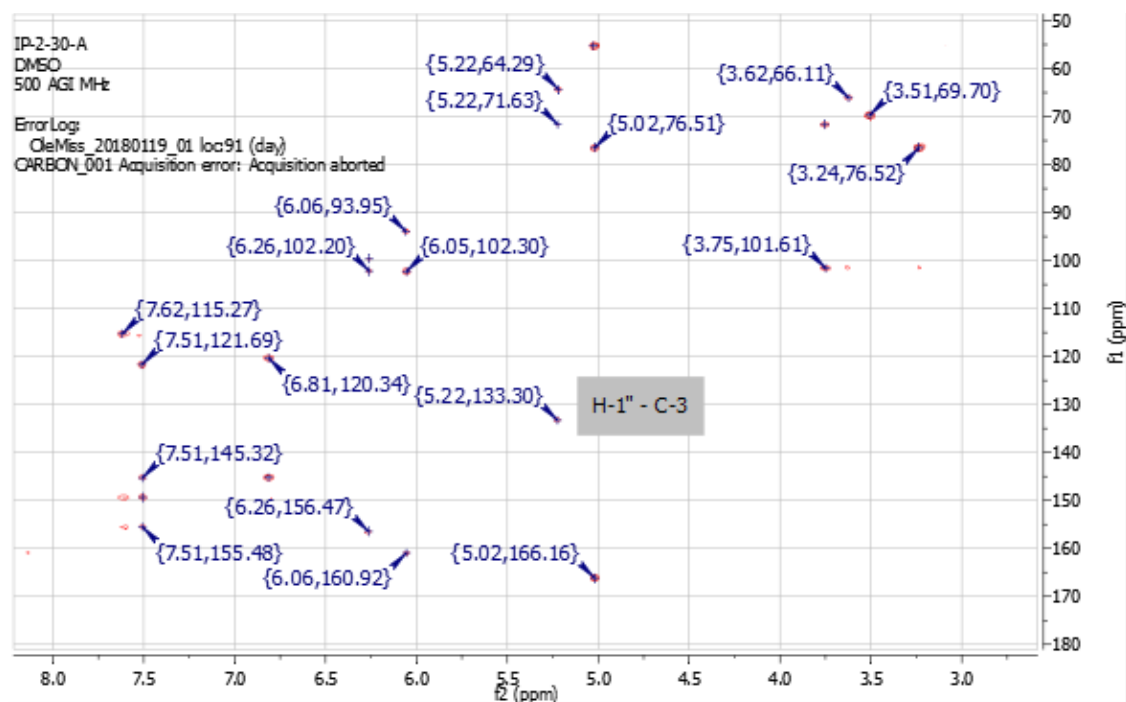


Figura 91: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância **19**.



A fim de confirmar a identificação estrutural por RMN, a substância **19** presente na fração IP-2-30A, foi submetida à análise por HPLC-DAD-MS. O cromatograma obtido mostra um pico majoritário com tempo de retenção em 16,408 min (Figura 92) e os espectros de massas obtidos tanto no modo positivo (ESI+) quanto no modo negativo (ESI-) são vistos Figura 93.

Figura 92: Cromatograma do HPLC-DAD da substância **19** em 254 nm.

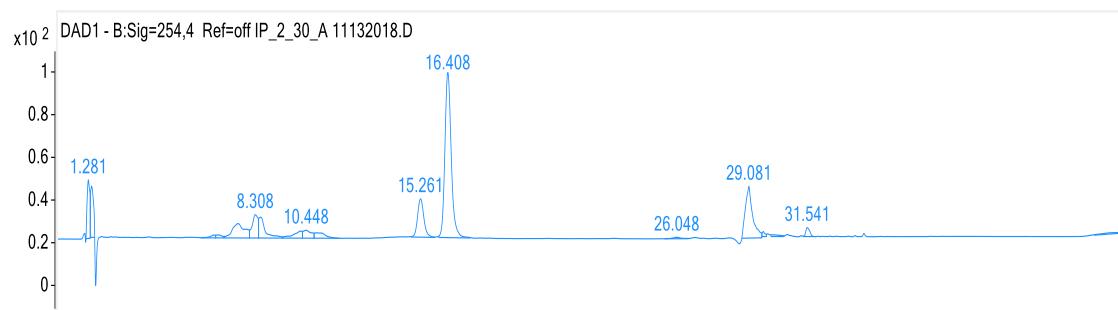
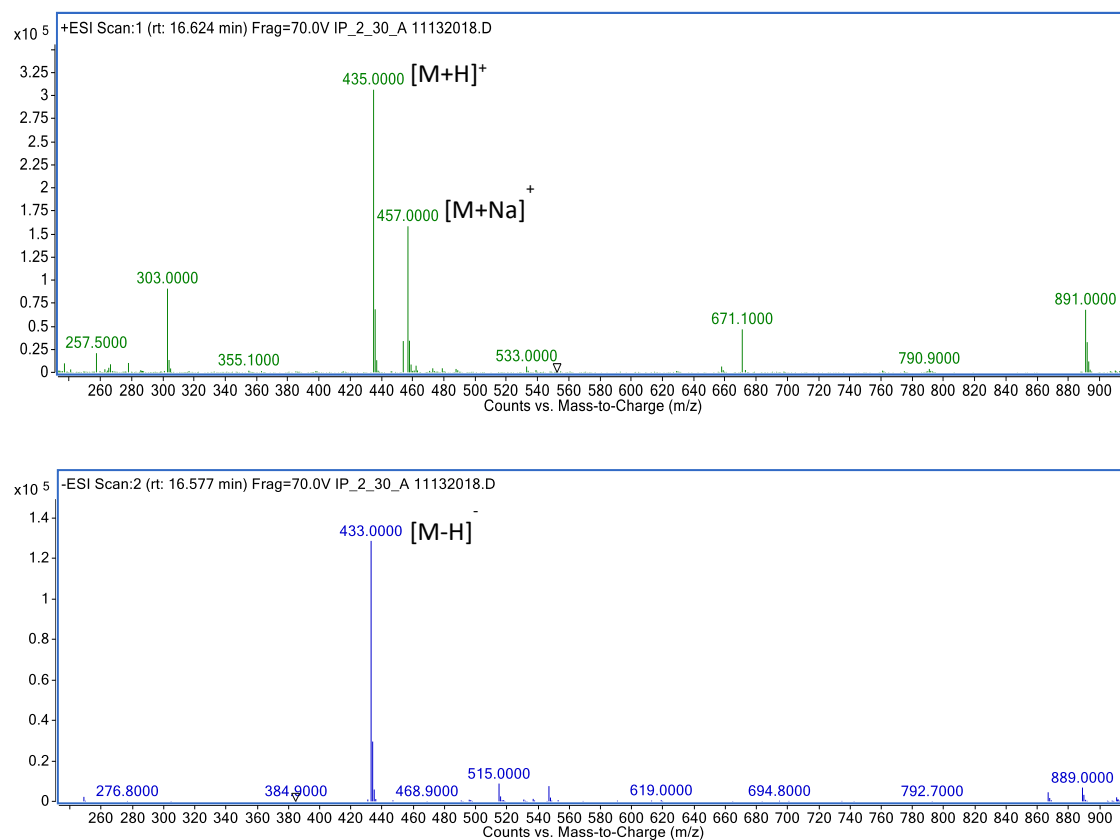
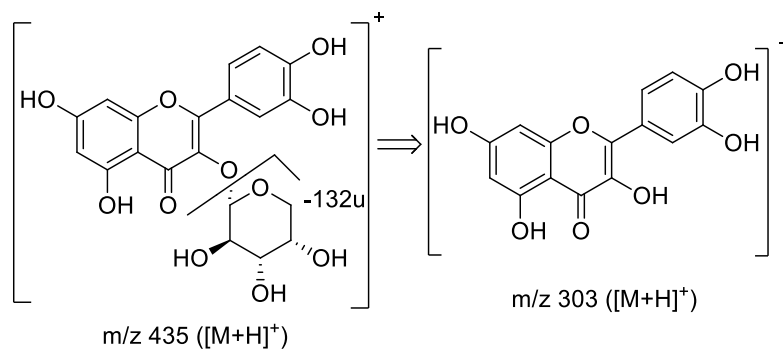


Figura 93: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância **19**.



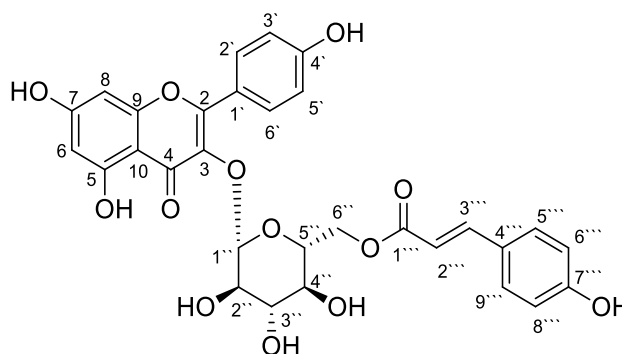
O espectro de massas no modo positivo apresentou o sinal do íon *quasi*-molecular em m/z 435 ($[M+H]^+$), consistente com a fórmula molecular $C_{20}H_{18}O_{11}$, confirmando a proposta da estrutura elucidada por RMN, a quercetina 3-O-arabinosídeo. A substância **19** foi caracterizada pela formação do íon m/z 303 que é referente a aglicona, ou seja, o flavonoide livre da unidade de açúcar. A perda de 132u é característico de pentose, no caso a arabinose (Figura 94).

Figura 94: Proposta de fragmentação no modo positivo da substância **19**.



A quercetina 3-O-arabinosídeo (**19**) isolada na fração IP-2-30A de *Annona dolabripetala*, já foi isolada anteriormente das folhas de *A. crassiflora* (LAGE et al., 2014; SANTOS e SALATINO, 2014) e das folhas de *A. cherimola* (RAJU et al., 2015).

5.4.4 Substância 20 (IP-2-23G)



Kaempferol 3-β-D-(6-O-*trans-p*-coumaroil)-glicopiranosídeo (*trans*-tilirosídeo)

Análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 95 a 98, p. 141) mostrou sinais típicos de substituição para o padrão kaempferol. Na região de átomos de hidrogênio aromático referentes ao anel A, observou-se os deslocamentos em δ_{H} 6,12 (s) e 6,36 (s) correspondendo aos átomos de hidrogênio H-6 e H-8 e no mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figuras 101 a 103, p. 144) apresentaram correlação a uma ligação com os sinais do espectro de RMN ^{13}C em δ_{C} 99,03 e 93,78, respectivamente.

Foi observado o padrão de substituição AA'BB' no anel B representado por dois dupletos em δ_{H} 8,05 atribuído a H-2' e H-6' e em δ_{H} 6,85 atribuído a H-3' e H-5' acoplados pela interação spin-spin em *orto* ($J = 8,6$ Hz).

A β-glicose foi confirmada através da correlação por HSQC de um sinal de duplete no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 5,39 (H-1'') característico do hidrogênio anomérico com $J = 7,7$ Hz que caracteriza o açúcar com configuração β, acoplado com o átomo de carbono em δ_{C} 101,79 (C-1''). No mapa de correlação HMBC é observado a correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 5,39) e o carbono C-3 (δ_{C} 133,21), confirmando a ligação da glicose ao carbono C-3.

A presença da unidade do ácido *p*-cumárico foi verificada através dos sinais característicos da dupla ligação em configuração *trans* em δ_{H} 6,10 (d, $J = 16,0$ Hz) e 7,37 (d, $J = 16,0$ Hz) para os H-2''' e H-3''' respectivamente. A presença dessa unidade também foi verificada pelos sinais dos átomos de hidrogênio aromático com as absorções em δ_{H} 7,35 (d, $J = 8,7$ Hz, H-5''' e H-9''')

e 6,79 (d, $J = 8,2$ Hz, H-6''' e H-8''') característicos do anel em posição *orto* (LENCINA et al., 2011).

No espectro de HMBC (Figuras 104 a 106, p.145) é possível confirmar a presença da unidade do ácido *p*-cumárico ligado à glicose, através da correlação a três ligações ($^3J_{HC}$) entre os átomos de hidrogênio H-6'' α (δ_H 4,11) e H-6'' β (δ_H 5,02) com o carbono na posição C-1''' (δ_C 166,17).

No espectro de RMN ^{13}C (Figuras 99 e 100, p. 143), observa-se a presença de 26 sinais, dos quais 12 sinais correspondem aos átomos de carbono não hidrogenados C-2, C-3, C-4, C-5, C-7, C-9, C-10, C-1', C-4', C-1''', C-4''', C-7'''. Treze sinais foram atribuídos aos átomos de carbono metínicos (CH) em C-6, C-8, C-2'/6', C-3'/5', C-1'', C-2'', C-3'', C-4'', C-5'', C-2''', C-3''', C-5'''/9'', C-6'''/8'''. Um único sinal de átomo de carbono metilênico (CH₂) é atribuído a posição C-6'' em δ_C 63,19.

Através das análises uni e bidimensionais do espectro de RMN ^{13}C e 1H e por comparações com dados da literatura (TSUKAMOTO et al., 2004), a substância **20** isolada, foi identificada como um flavonol glicosilado kaempferol 3-O- β -D-(6''-O-E-*p*-coumaroil)-glicopiranosídeo ou também conhecido como *trans*-tilirosídeo (Tabela 19, p. 140).

Tabela 19: Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **20** em DMSO- d_6 em comparação com os dados da literatura em CD_3OD . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.

Substância 20						TSUKAMOTO et al., 2004	
C	HSQC		HMBC			HSQC	
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$^4J_{\text{HC}}$	δ_c	δ_H
2	156,16	-	-	H-2'/6'	H-3'/5'	160,1	-
3	133,21	-	-	H-1''	-	136,0	-
4	177,31	-	-	-	H-8	180,1	-
5	161,08	-	H-6	-	-	163,7	-
7	165,24	-	H-6/8	-	-	167,6	-
9	156,43	-	H-8	-	-	159,3	-
10	103,44	-	-	H-6/8	-	106,2	-
1'	120,80	-	-	H-3'/5'	-	123,6	-
4'	160,00	-	H-3'/5'	H-2'/6'	-	162,3	-
7'''	159,88	-	H-6'''/8'''	H-5'''/9'''	-	162,0	-
1'''	166,17	-	-	6'' α , β /3'''	-	169,6	-
4'''	124,85	-	H-3'''	2'''/6'''/8'''	-	127,9	-
CH							
6	99,03	6,12 (s)	-	H-8	-	101,1	6,11 (s)
8	93,78	6,36 (s)	-	H-6	-	95,8	6,28 (s)
2'/6'	130,86	8,05 (d, 8,6)	-	-	-	133,0	7,98 (d, 8,8)
3'/5'	115,07	6,85 (d, 8,6)	-	-	-	116,8	6,80 (d, 8,8)
Gli							
1''	101,79	5,39 (d, 7,7)	H-2''	H-5''	-	104,9	5,22 (d, 7,1)
2''	71,04	3,58 (m)	H-3''	H-4''	-	78,8	3,45 (m)
3''	72,94	3,45 (dd, 3,3; 9,6)	-	-	-	76,5	3,44 (m)
4''	68,26	3,68 (m)	H-5''	H-6'' α	-	72,5	3,31 (m)
5''	72,87	3,70 (m)	H-6'' α /4''	H-1''	H-2''	76,6	3,45 (m)
2'''	113,58	6,10 (d, 16,0)	H-3'''	-	H-5'''/9'''	115,6	6,06 (d, 16,0)
3'''	144,67	7,37 (d, 16,0)	-	-	-	147,4	7,39 (d, 16,0)
5'''/9'''	130,10	7,35 (d, 8,7)	-	-	-	132,0	7,30 (d, 8,8)
6'''/8'''	115,75	6,79 (d, 8,2)	-	-	-	117,6	6,79 (d, 8,8)
CH₂							
6''	63,19	4,11 (dd, 4,6; 8,0) α 5,02 β	-	-	-	65,1	4,18 (dd, 11,6;6,6) 4,29 (dd, 11,6;2,2)

Figura 95: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 20.

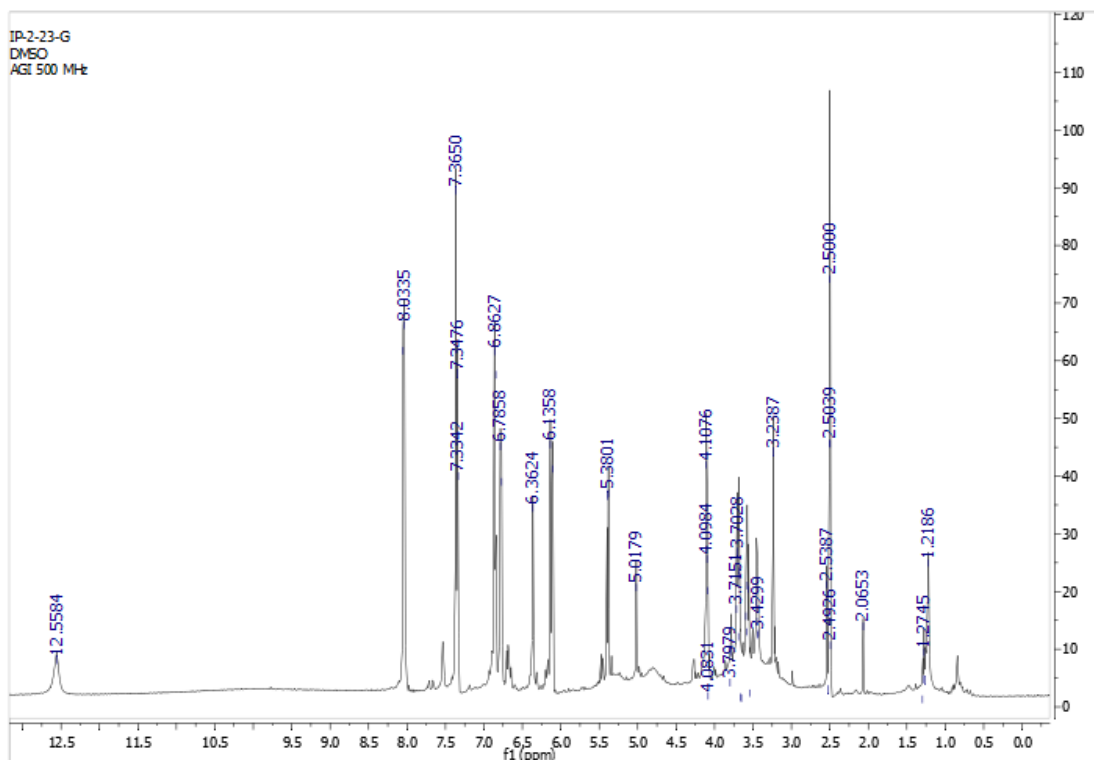


Figura 96: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 20.

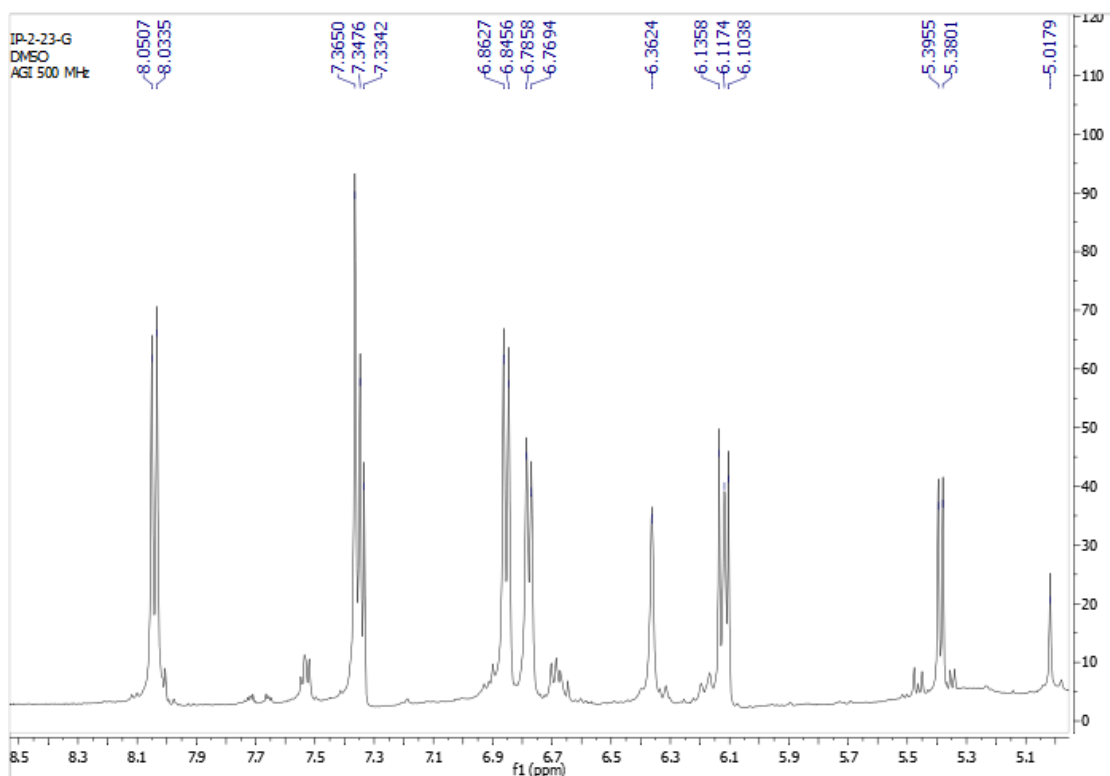


Figura 97: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 20.

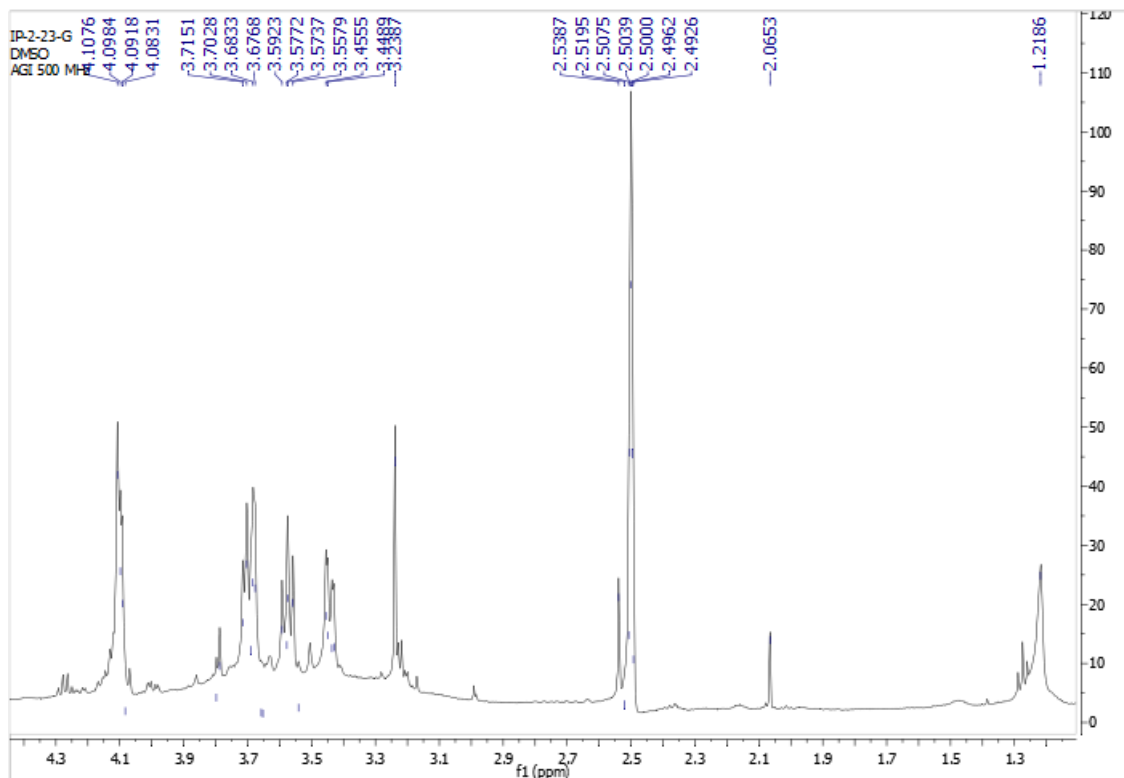


Figura 98: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 20.

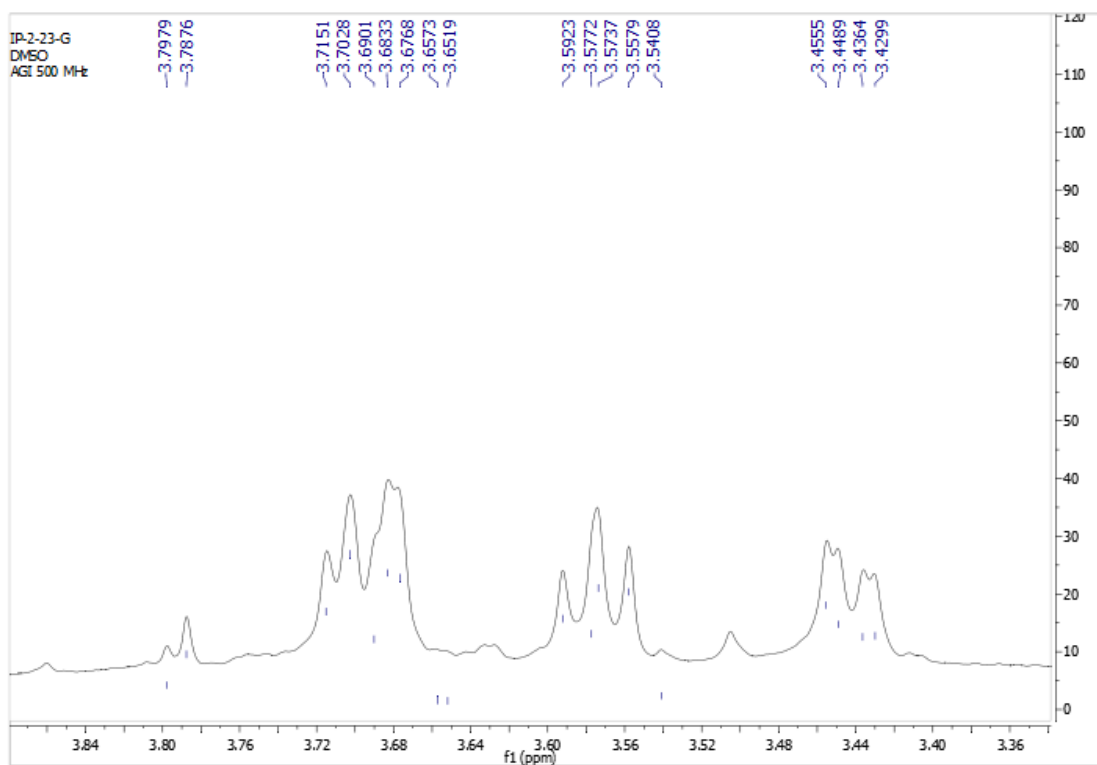


Figura 99: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 20.

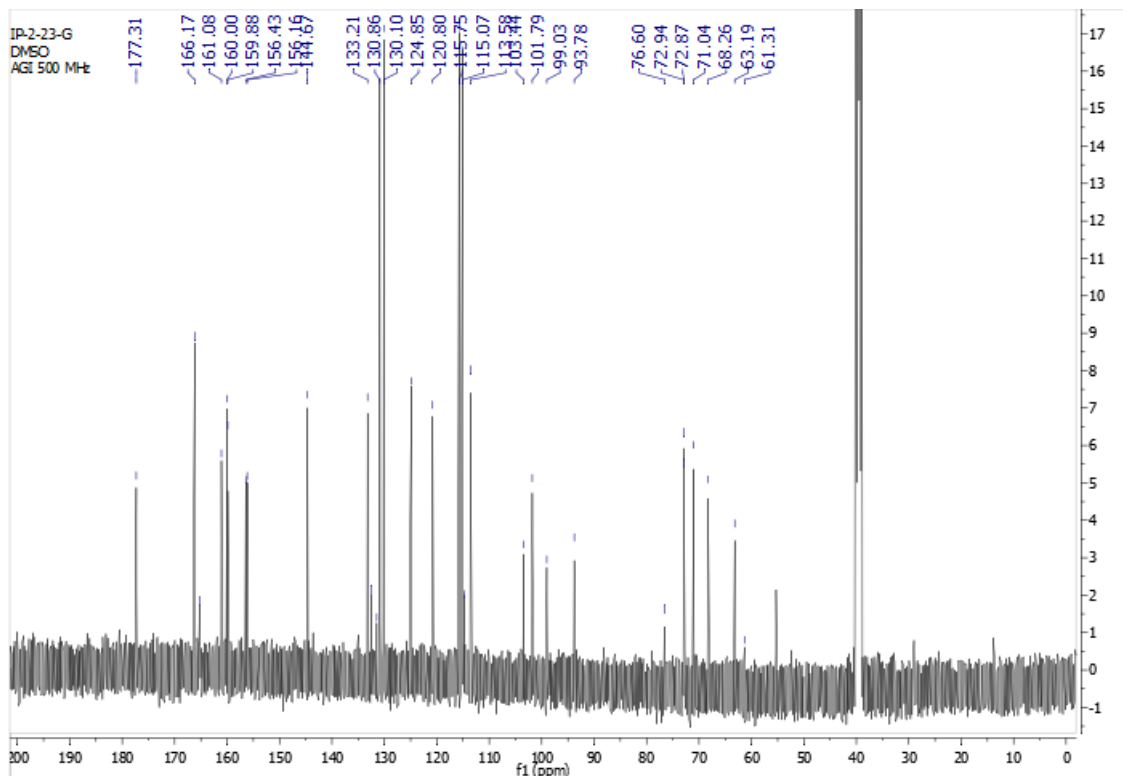


Figura 100: Ampliação do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d6) da substância 20.

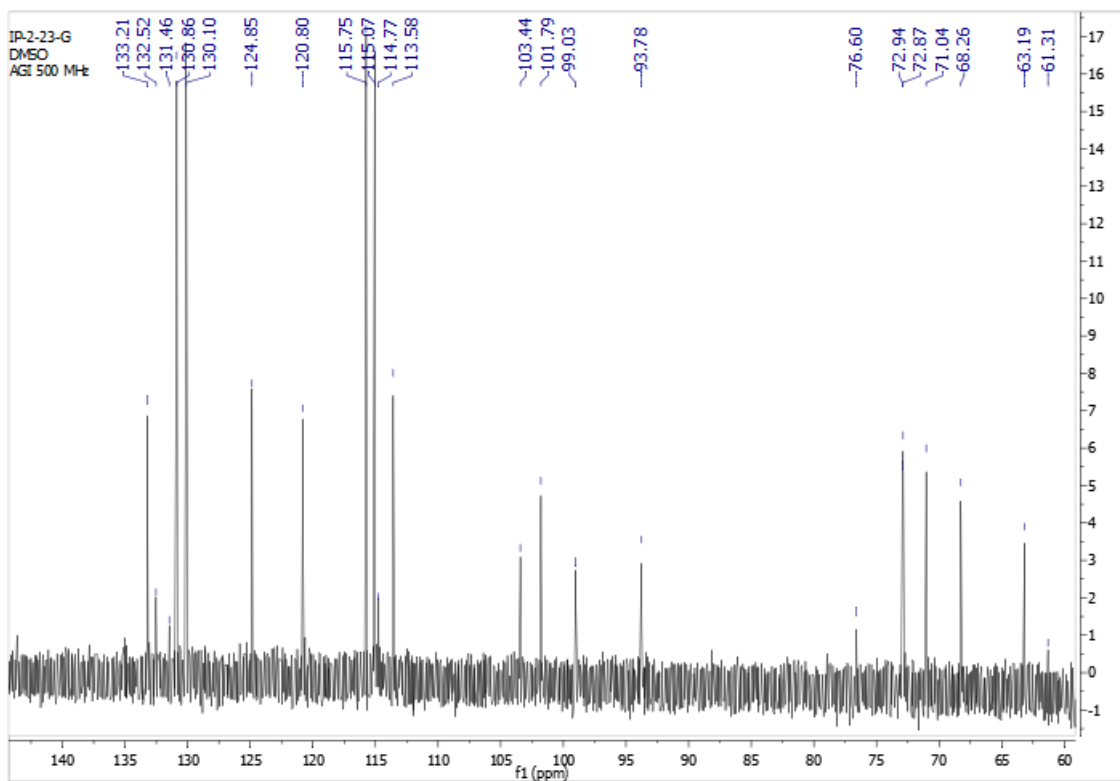


Figura 101: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 20.

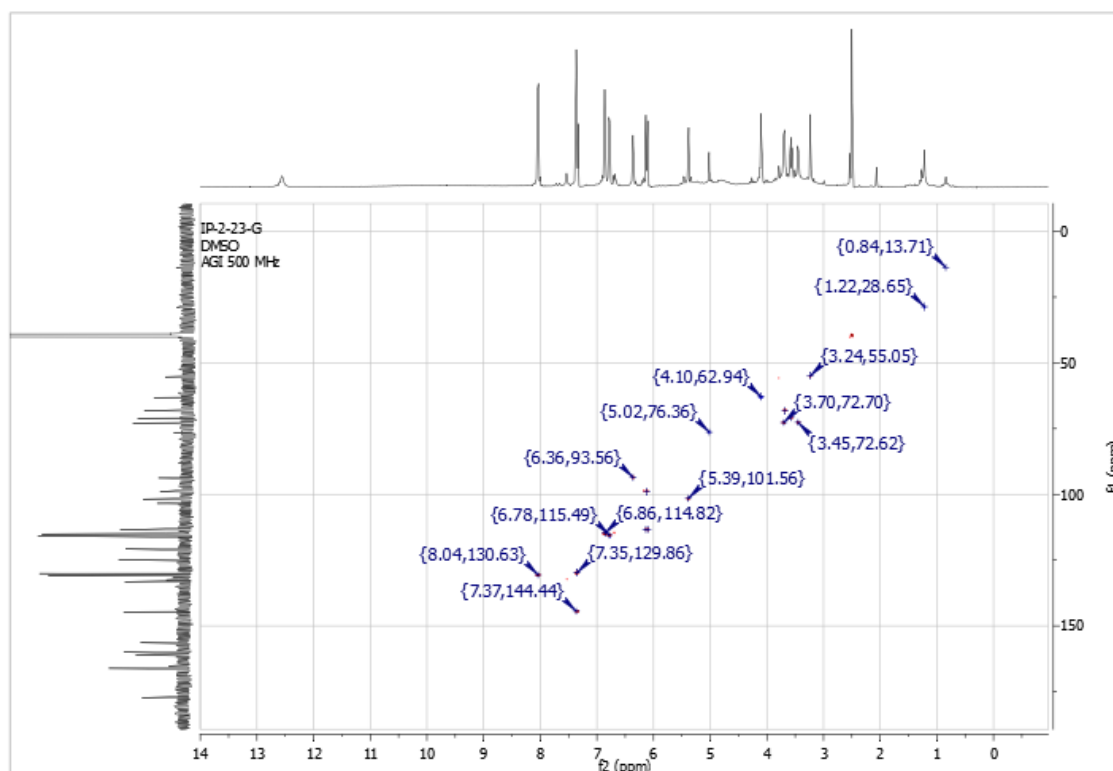


Figura 102: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 20.

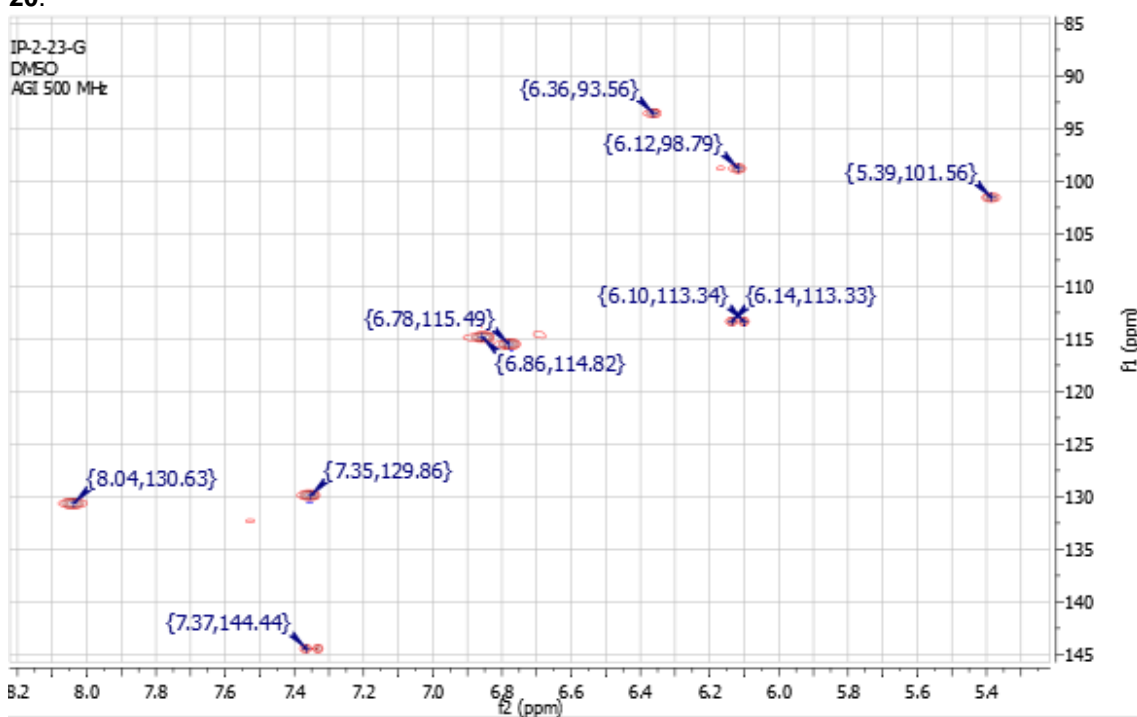


Figura 103: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 20.

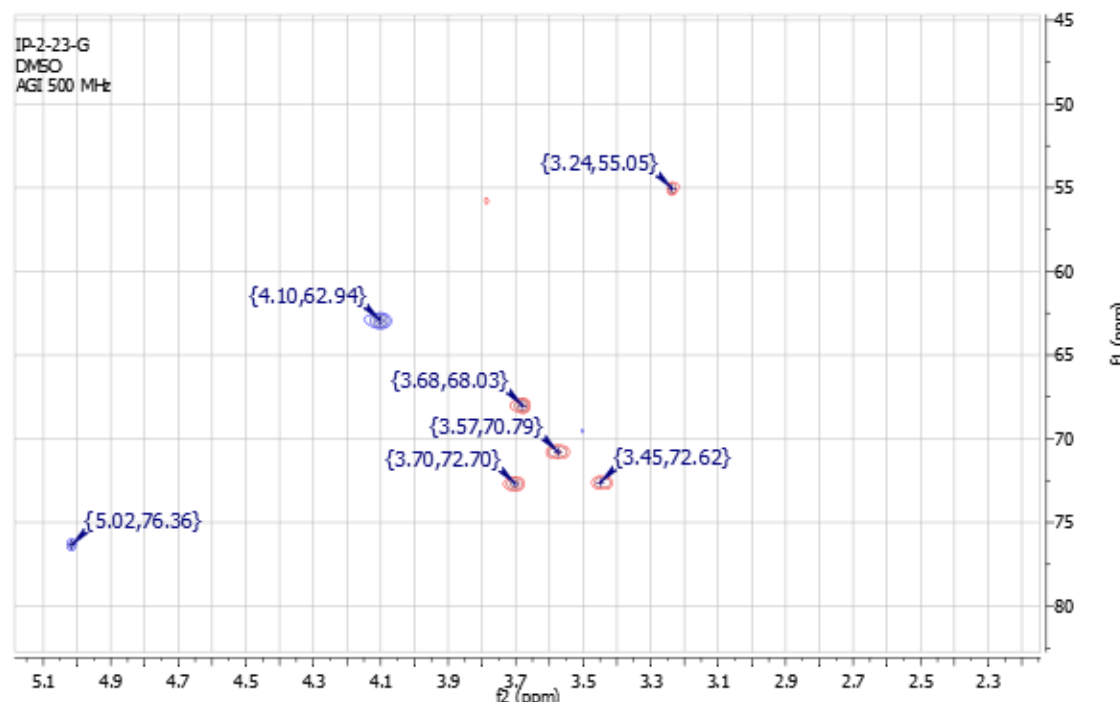


Figura 104: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 20.

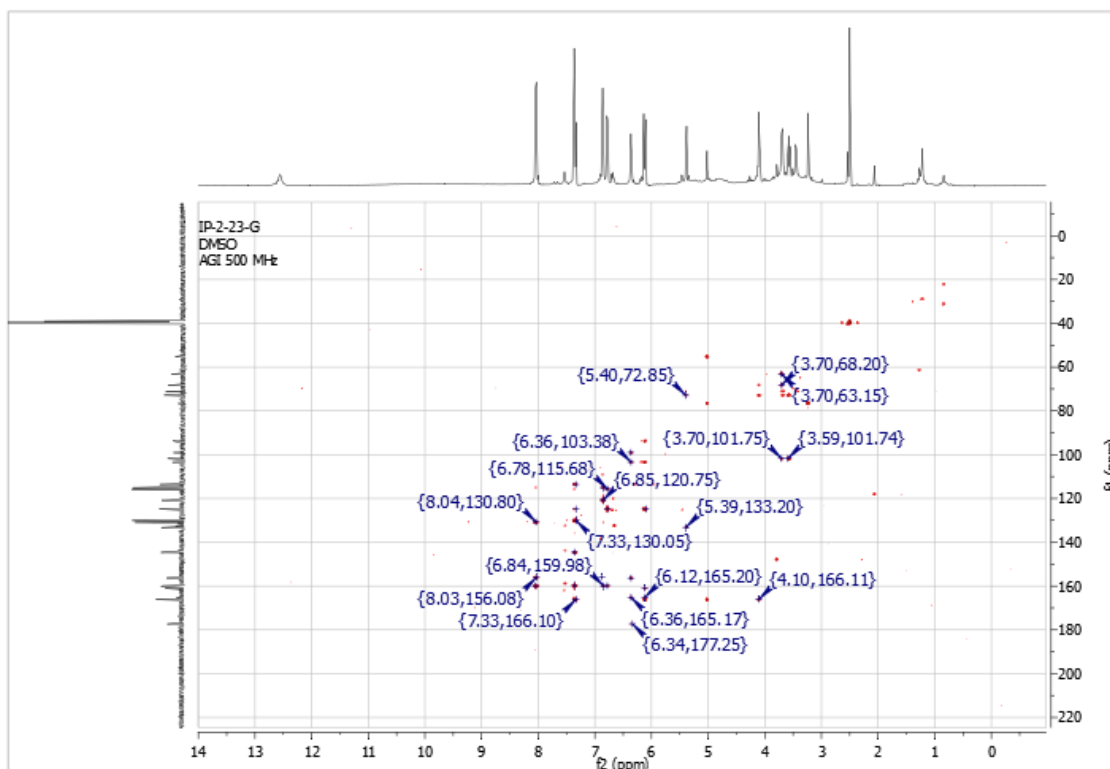


Figura 105: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 20.

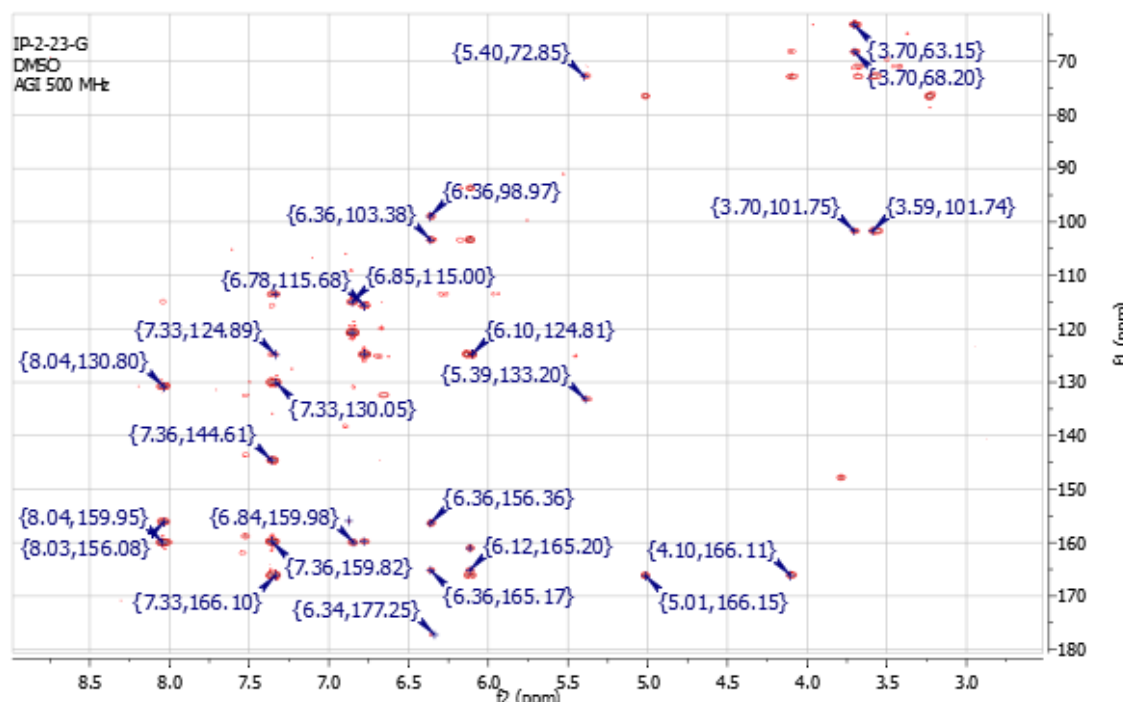
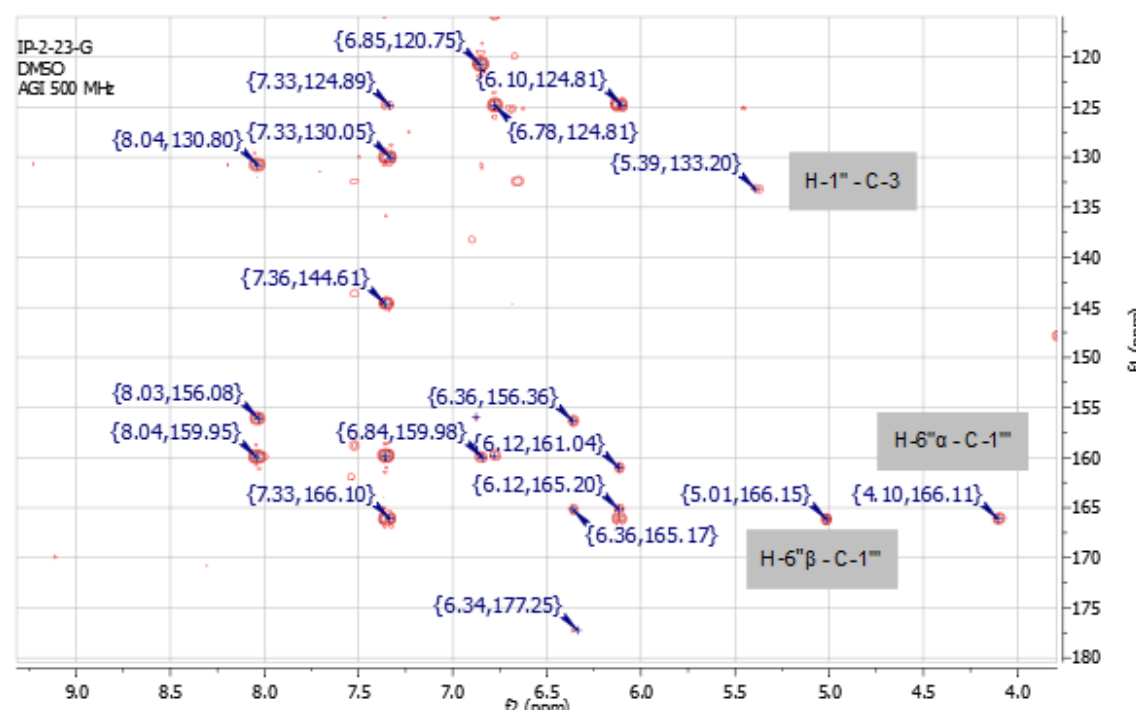


Figura 106: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 20.



A fim de confirmar a identificação estrutural por RMN, a substância **20** foi analisada por HPLC-DAD-MS. O cromatograma obtido mostra o tempo de retenção em 29,379 min (Figura 107) e os espectros de massas obtidos tanto no modo positivo (ESI+) quanto no modo negativo (ESI-) são mostrados na Figura 108.

Figura 107: Cromatograma do HPLC-DAD da substância **20** em 254 nm.

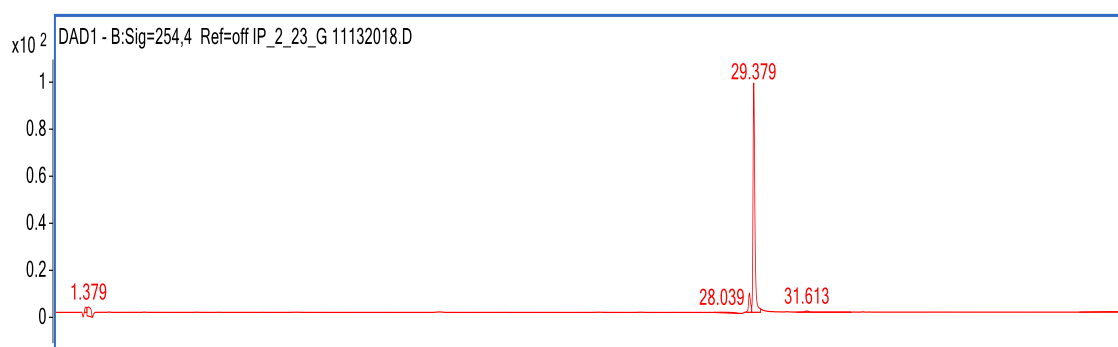
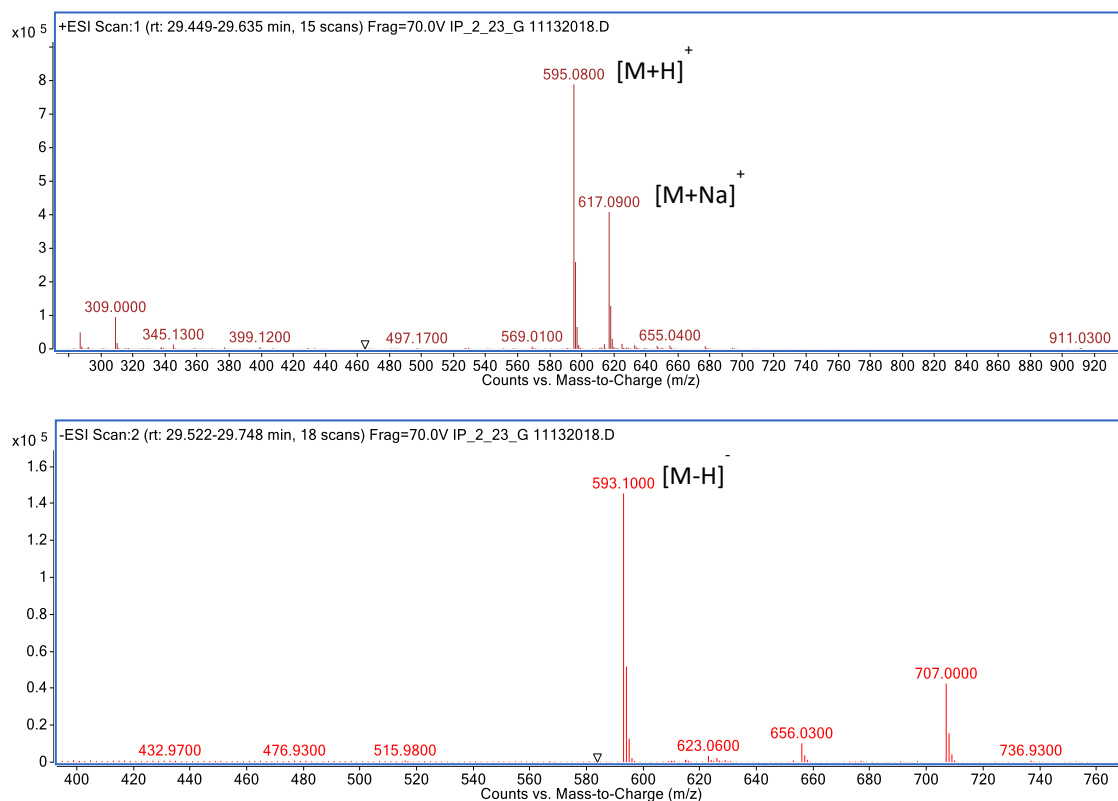
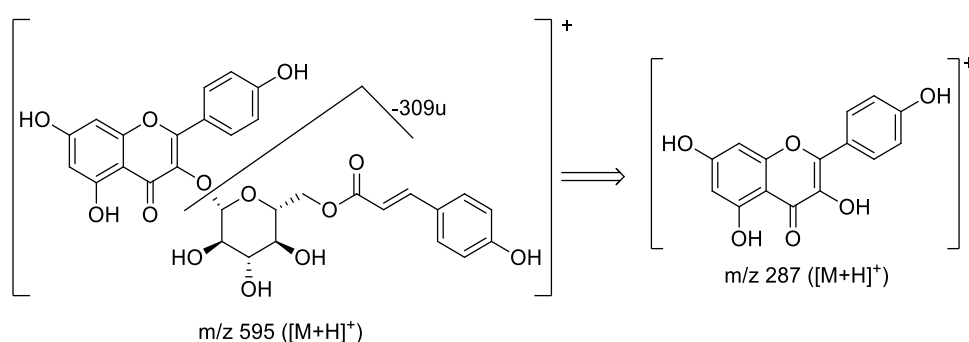


Figura 108: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância **20**.



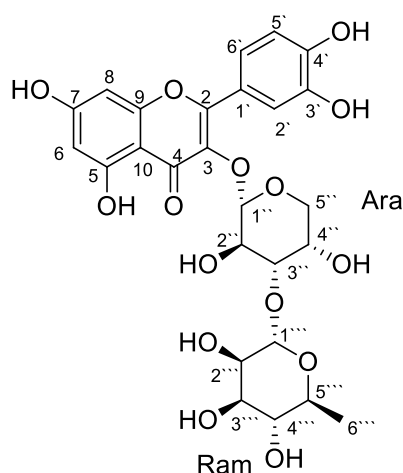
De acordo com as fragmentações obtidas pelo espectro de massas no modo positivo foi possível confirmar a estrutura elucidada por RMN, o *trans*-tilirosídeo. O sinal do íon *quasi*-molecular em m/z 595 ($[M+H]^+$), consistente com a fórmula molecular $C_{30}H_{26}O_{13}$, foi caracterizado pela formação do íon m/z 309 que é referente a fragmentação completa a partir da unidade de açúcar ligada ao ácido *p*-cumárico como é mostrado na proposta de fragmentação da Figura 109.

Figura 109: Proposta de fragmentação da substância **20**.



De acordo com a literatura, o kaempferol 3- β -D-(6-*O-trans-p*-coumaroil)-glicopiranosídeo (**20**), isolado na fração IP-2-23G é relatado pela primeira vez em uma espécie do gênero *Annona*.

5.4.5 Substância 21 (IP-1-31E)



Quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosose

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 110 a 115, p. 152), sinais de dupletos na região de δ_{H} 6,40 (H-8), e 6,20 (H-6) com constante de acoplamento *meta* ($J = 2,0$ Hz) representam os átomos de hidrogênio aromático referentes ao anel A dos flavonoides e correlacionam, respectivamente, com os átomos de carbono em δ_{C} 93,45 e 98,63 de acordo com os dados de HSQC (Figuras 118 e 119, p. 156). O sinal em δ_{H} 12,58 é característico do hidrogênio da hidroxila na posição C-5 quelada a carbonila em C-4, formando uma ligação de hidrogênio.

Observou-se o padrão de substituição ABC representado pela presença de três sinais que correspondem aos três átomos de hidrogênio localizados em ambientes químicos diferentes como característica do anel B com substituintes em duas posições. Esses sinais estão representados em δ_{H} 7,48 atribuído ao H-2' que se apresenta como duplete com constante de acoplamento em *meta* com H-6' ($J = 2,2$ Hz). O duplete em δ_{H} 6,85 é atribuído ao H-5' pois apresenta $J = 8,5$ Hz devido ao acoplamento em *orto* com H-6'. O sinal de duplo duplete em δ_{H} 7,69 é atribuído ao H-6' que acopla em *orto* com H-5' ($J = 8,5$ Hz) e em *meta* com H-2' ($J = 2,2$ Hz). Os valores dos deslocamentos químicos e das constantes de acoplamento permitiram definir o padrão de substituição do anel B. Pelas correlações a duas, três e quatro ligações entre átomos de hidrogênio e carbono por HMBC (Figuras 120-122, p. 157), foi possível confirmar a presença das hidroxilas nas posições C-3' e C-4'.

A α -arabinose foi confirmada através da correlação por HSQC de um sinal de absorção no espectro de RMN ^1H como um duplete em δ_{H} 5,44 (H-1'') característico do hidrogênio anomérico, com $J = 4,8$ Hz que caracteriza o açúcar com configuração α , acoplada com o átomo de carbono em δ_{C} 99,98 (C-1''). No mapa de correlação heteronuclear HMBC é observado no espectro, a correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 5,44) e o carbono C-3 (δ_{C} 133,69), confirmando a ligação da α -arabinose ao carbono C-3.

A presença de uma segunda unidade de açúcar (α -ramnose) foi confirmada devido ao sinal de outro átomo de hidrogênio anomérico observado em δ_{H} 4,93 (d, $J = 1,7$ Hz) e atribuído a H-1''' com $J = 1,7$ Hz que caracteriza o açúcar com configuração α , acoplado com o átomo de carbono em δ_{C} 100,57 (C-1''') por HSQC. No experimento HMBC é observado, a correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio H-1''' (δ_{H} 4,93) e o carbono C-3'' (δ_{C} 70,52), confirmando que as duas unidades de açúcar estão ligadas entre si pelas posições H-1''' \rightarrow C-3''.

A análise do espectro de RMN ^{13}C (Figuras 116 e 117, p. 155) e HSQC revelaram sinais referentes a átomos de carbono não hidrogenados, dentre os quais, δ_{C} : 156,20 (C-2); 133,69 (C-3); 177,37 (C-4); 156,14 (C-5); 164,12 (C-7); 161,20 (C-9); 103,90 (C-10), 120,84 (C-1'), 145,00 (C-3') e 148,52 (C-4'). Além desses, outros sinais foram atribuídos a átomos de carbono metínicos (CH) em δ_{C} : 98,63 (C-6); 93,45 (C-8); 116,02 (C-2'); 115,55 (C-5'); 121,93 (C-6'); 99,98 (C-1''); 75,00 (C-2''); 70,52 (C-3''); 66,13 (C-4''); 100,57 (C-1'''), 71,06 (C-2'''), 70,99 (C-3'''), 68,59 (C-4'''), 71,89 (C-5'''), 17,49 (C-6'''). Constatou-se também a presença de um carbono metilênico (CH_2) em δ_{C} : 63,60 (C-5''), pertencente ao açúcar do tipo pentose (arabinose).

A substância **21** isolada mostrou através das análises uni e bidimensionais do espectro de RMN ^{13}C e ^1H , e por comparações com dados da literatura (THANG et al., 2009) a confirmação da estrutura da quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosose (Tabela 20, p. 151).

Tabela 20: Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **21** em $\text{DMSO-}d_6$ em comparação com os dados da literatura em CD_3OD . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.

Substância 21						THANG et al., 2009	
C	HSQC		HMBC			HSQC	
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$^4J_{\text{HC}}$	δ_c	δ_H
2	156,20	-		H-2',H-6'		158,6	-
3	133,69	-	H-1''			135,8	-
4	177,37	-				179,4	-
5	156,14	-			H-8	158,4	-
7	164,12	-	H-6			165,9	-
9	161,20	-			H-6	163,0	-
10	103,90	-		H-6,H-8		105,7	-
1'	120,84	-		H-5'		122,9	-
3'	145,00	-	H-2'	H-5'	H-6'	146,0	-
4'	148,52	-	H-5'	H-6',H-2'		149,9	-
CH							
6	98,63	6,20 d, (2,0)		H-8		94,7	6,42 (d, 2,0)
8	93,45	6,40 (d, 2,0)		H-6		99,9	6,23 (d, 2,0)
2'	116,02	7,48 (d, 2,2)				117,4	7,74 (d, 2,0)
5'	115,55	6,85 (d, 8,5)				116,2	6,90 (d, 8,5)
6'	121,93	7,69 (dd, 2,2; 8,5)	H-5'	H-2'		123,2	7,60 (dd, 8,5; 2,0)
Ara							
1''	99,98	5,44 (d, 4,8)		H-2''		104,7	5,19 (d, 6,5)
2''	75,00	3,98 (dd, 4,7; 6,7)			H-1'''	71,8	4,08 (dd, 8,5; 6,5)
3''	70,52	3,42	H-2''	H-1'''	H-5'' β	80,0	3,74 (dd, 8,5; 3,0)
4''	66,13	3,61	H-5'' β			68,9	3,93 (m)
5''	63,60	3,22 α (dd, 2,6; 11,0) 3,59 β		H-1''		67,1	3,47 (dd, 12,5; 1,5) 3,82 (dd, 12,5; 4,0)
Ram							
1'''	100,57	4,93 (d, 1,7)		H-2'''		103,0	5,13 (d, 1,5)
2'''	71,06	3,66				72,2	4,05 (dd, 3,5; 1,5)
3'''	70,99	3,75 (m)		H-5'''		72,1	3,86 (m)
4'''	68,59	3,66		H-6'''	H-1'''	74,1	3,44 (t, 9,5)
5'''	71,89	3,16 (dd, 4,7; 9,5)	H-6'''			70,2	3,86 (m)
6'''	17,49	0,99 (d, 6,2)				18,1	1,28 (d, 6,5)

Figura 110: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 21.

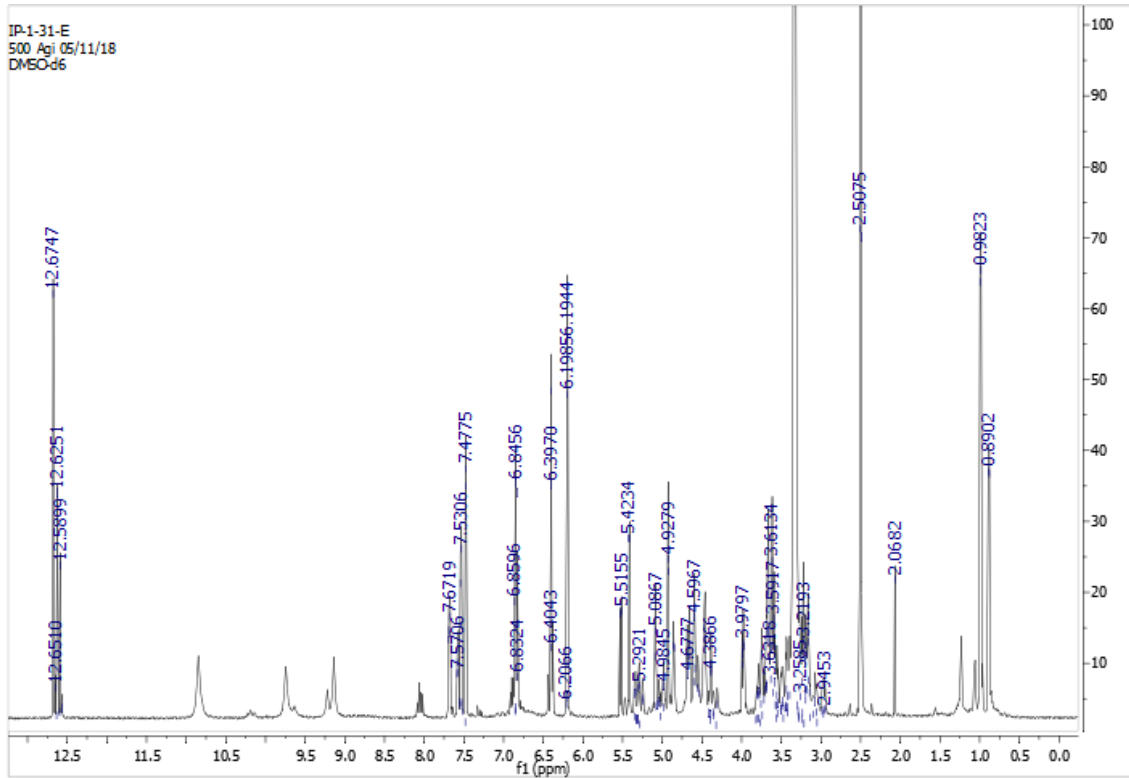


Figura 111: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 21.

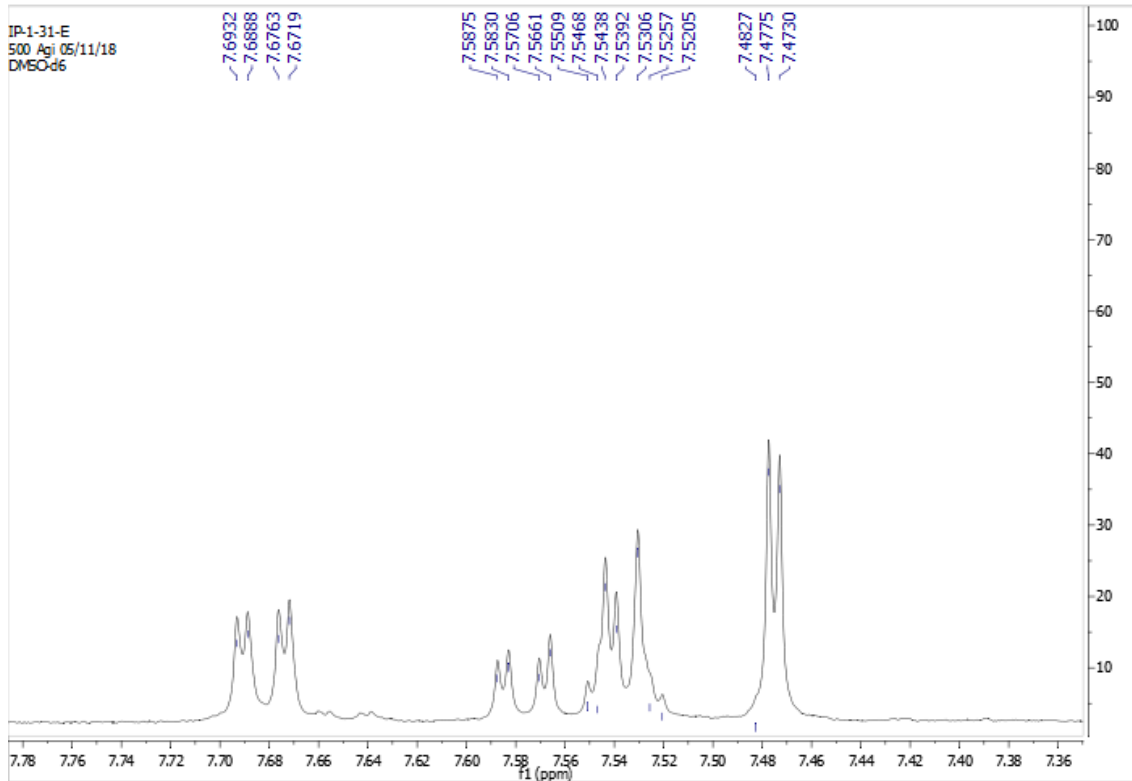


Figura 112: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 21.

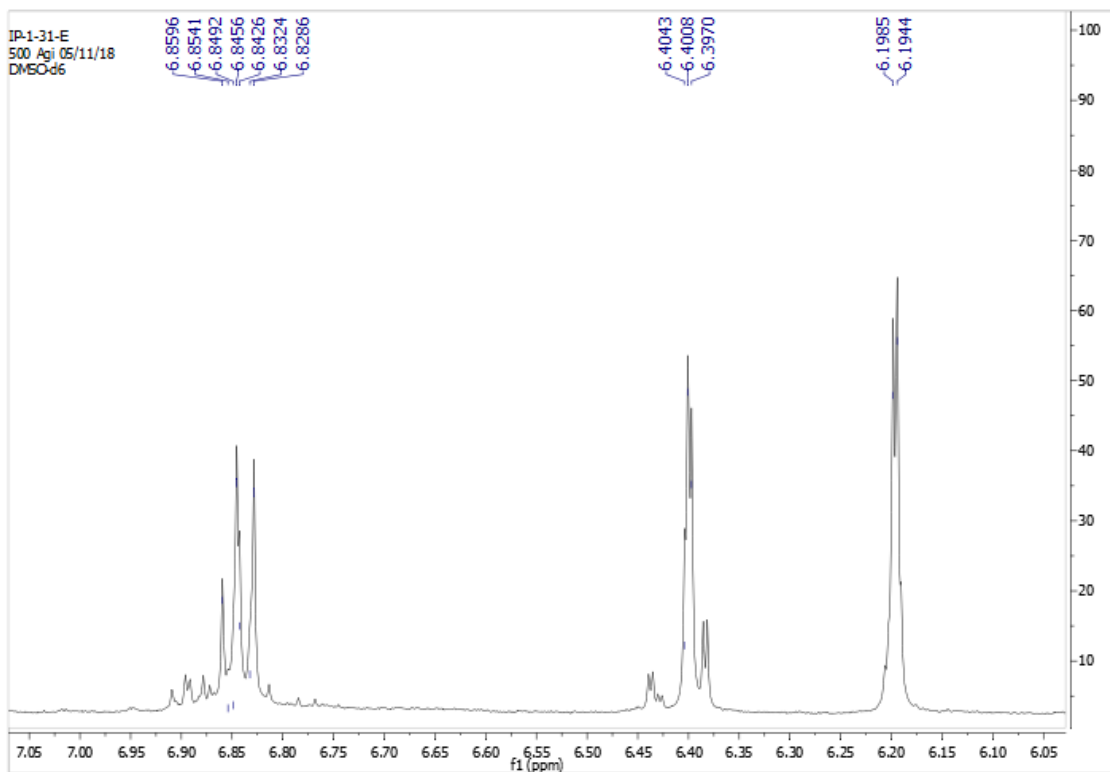


Figura 113: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d₆) da substância 21.

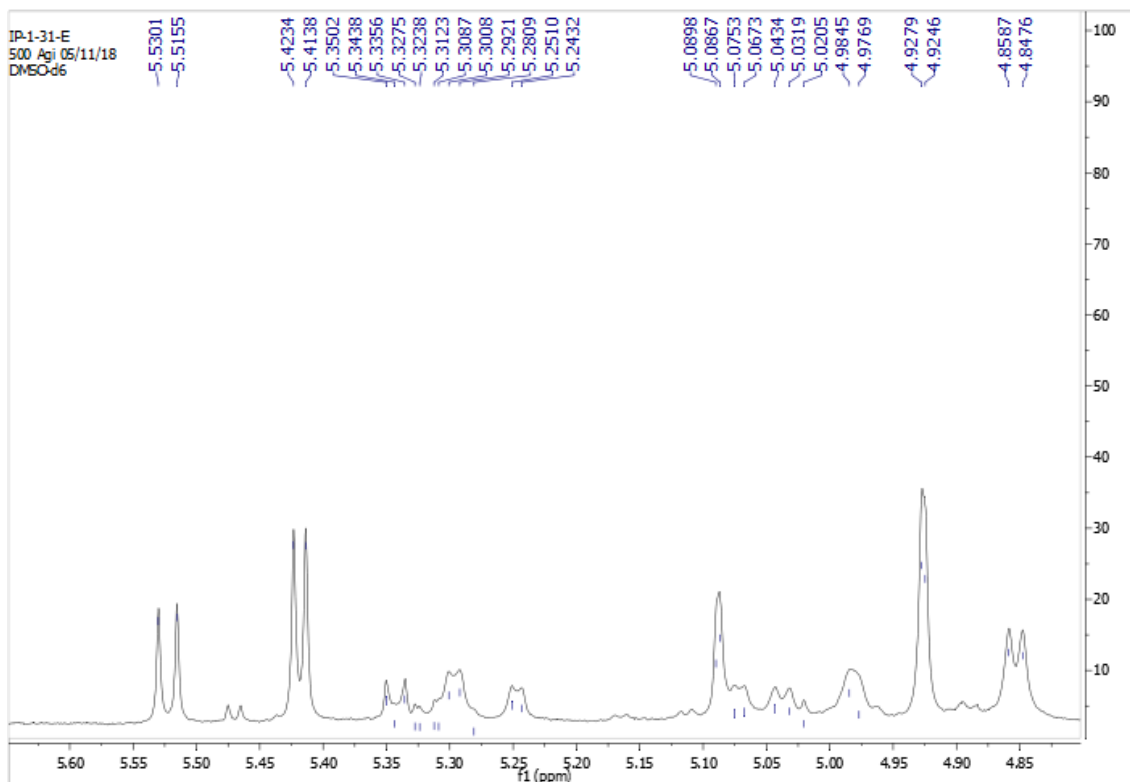


Figura 114: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 21.

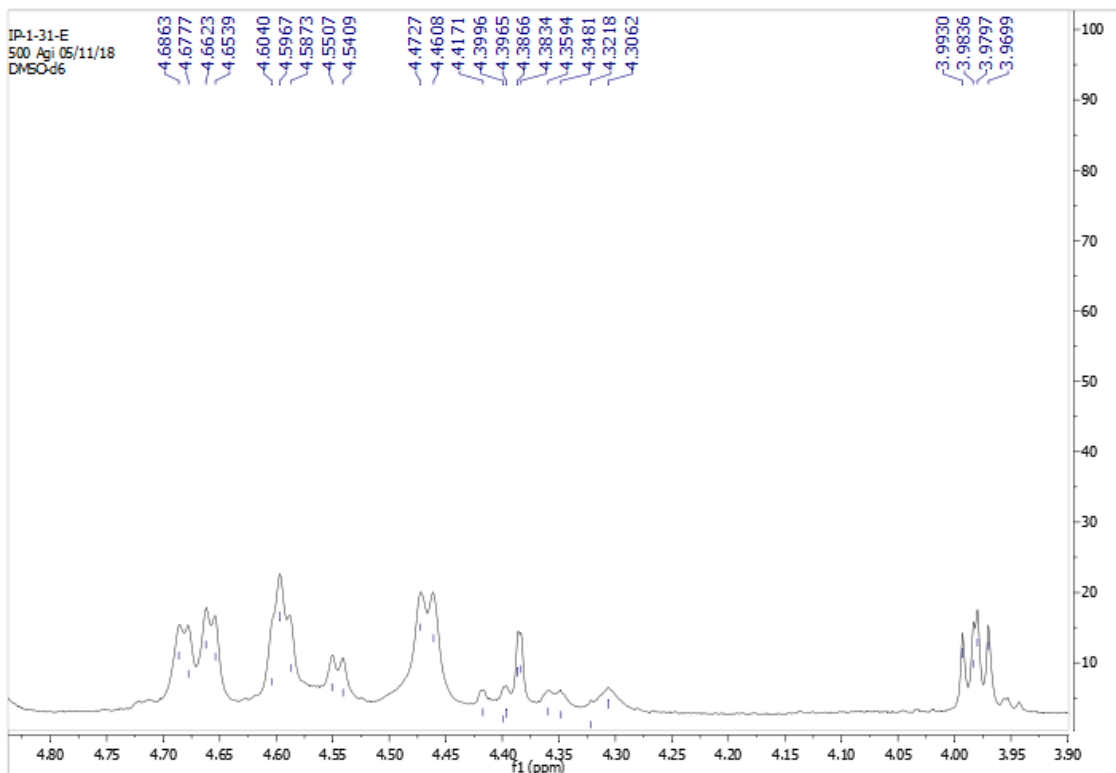


Figura 115: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, DMSO-d6) da substância 21.

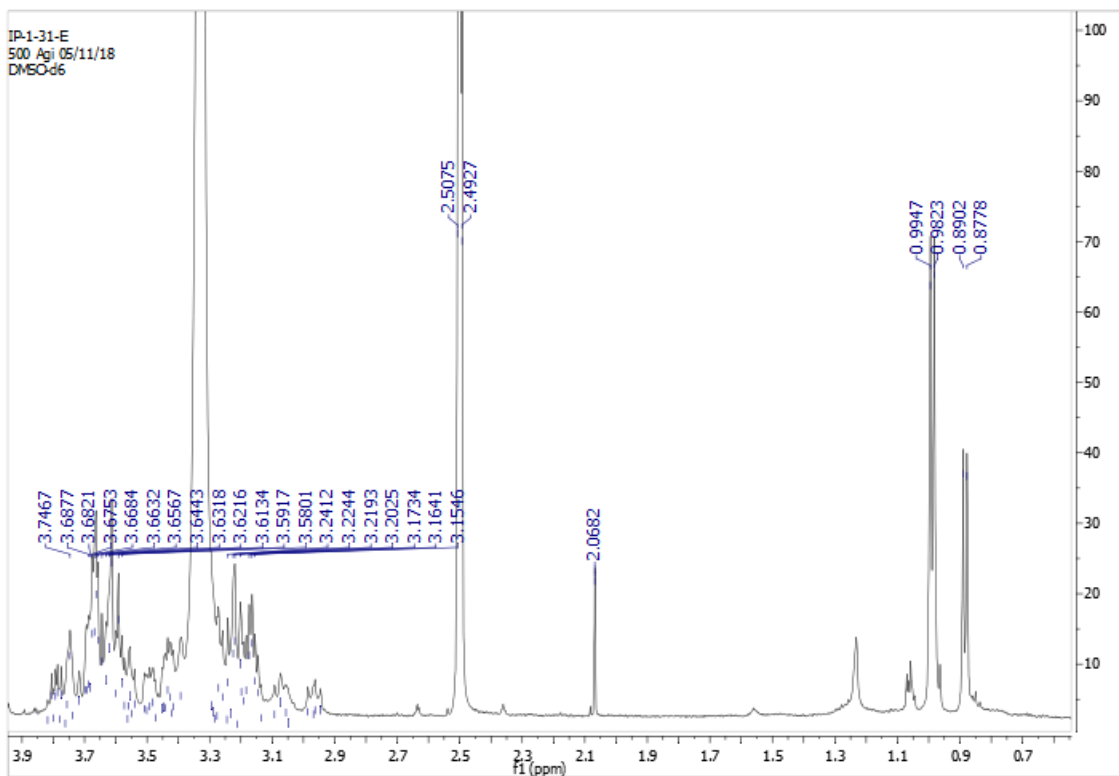


Figura 116: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d₆) da substância 21.

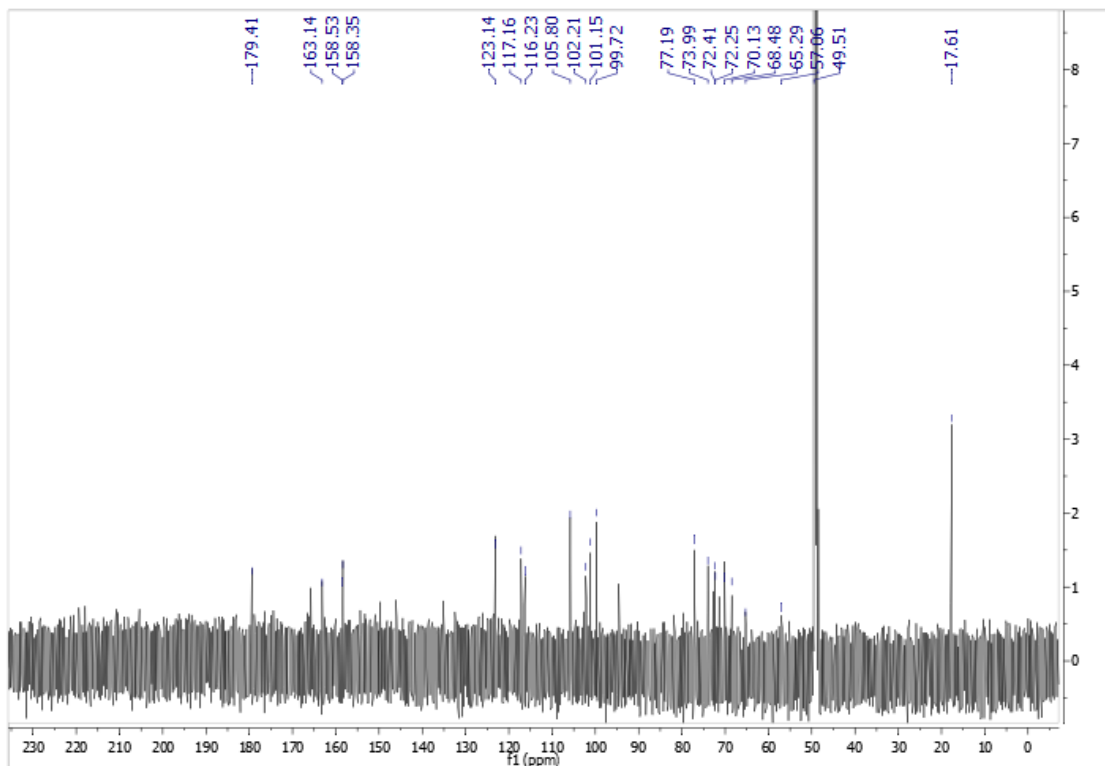


Figura 117: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d₆) da substância 21.

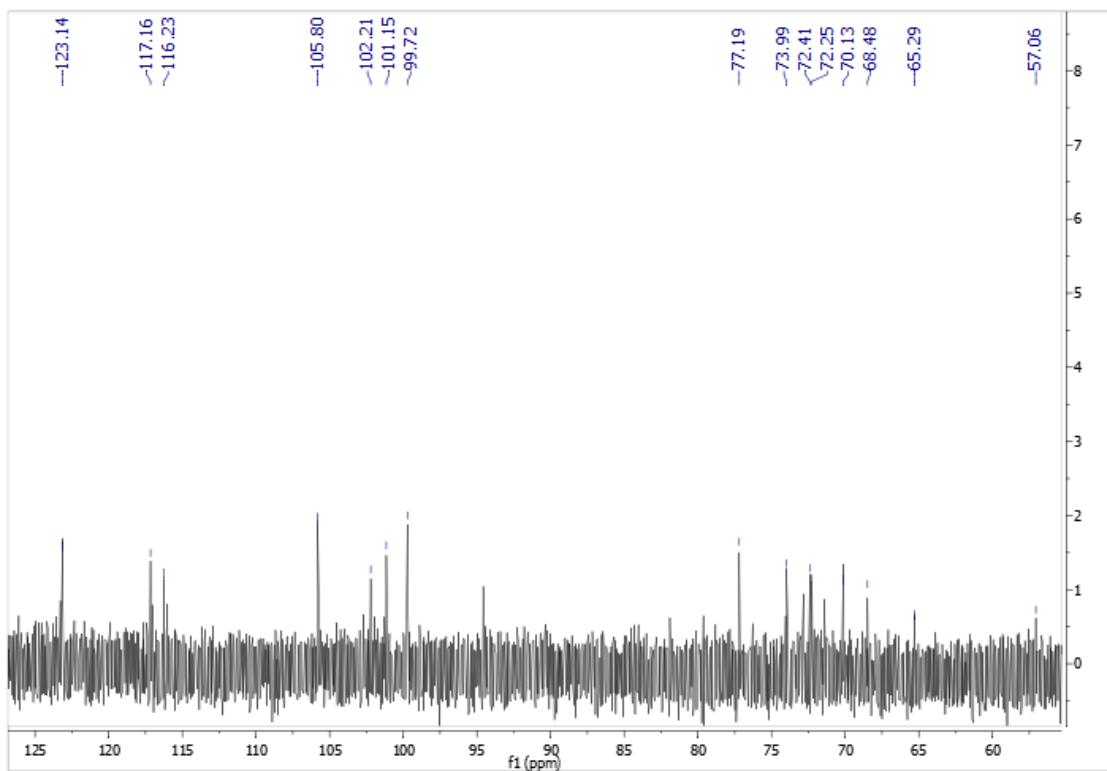


Figura 118: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 21.

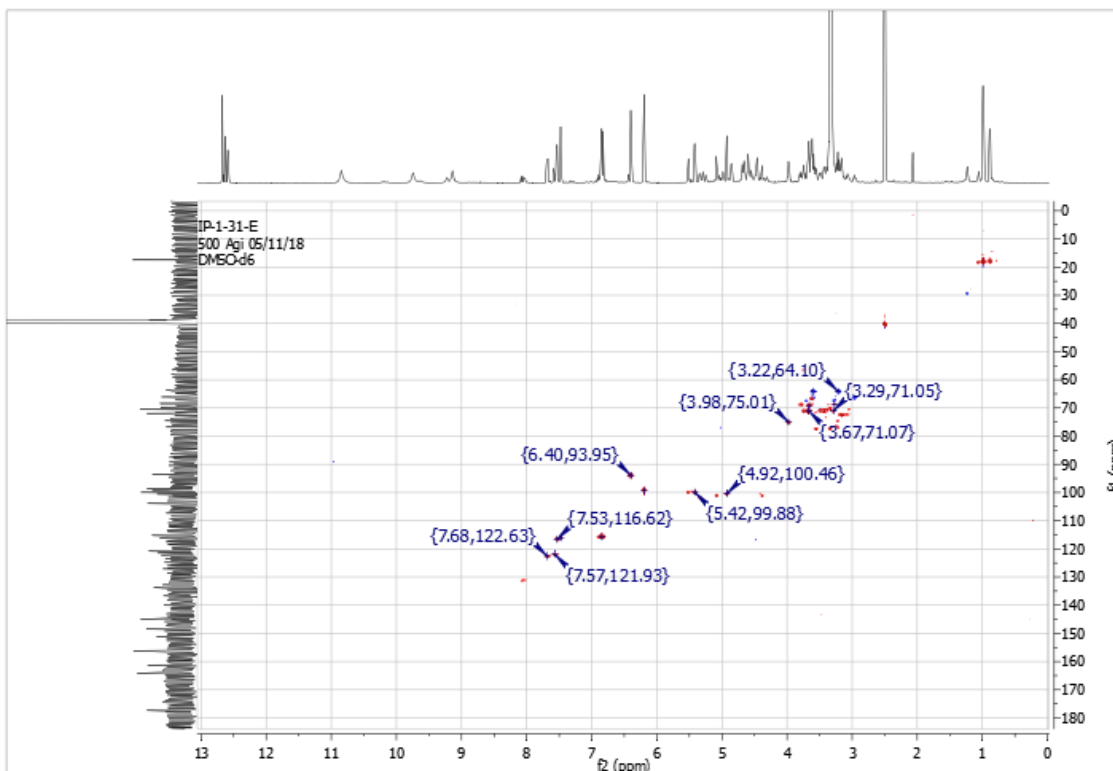


Figura 119: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d6) da substância 21.

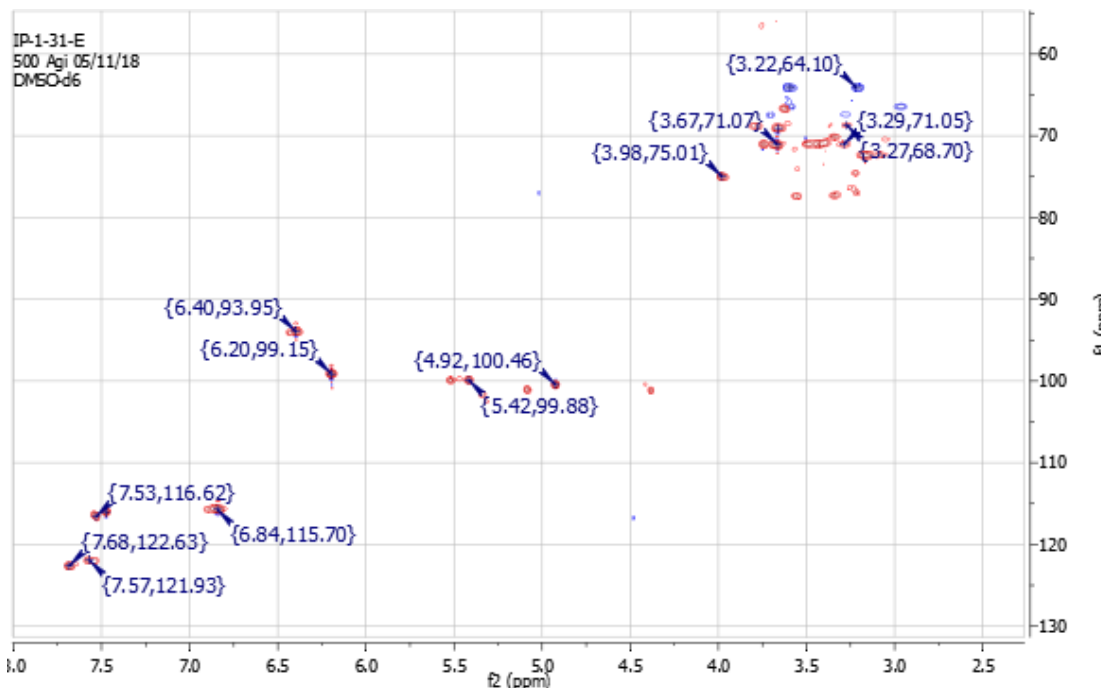


Figura 120: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 21.

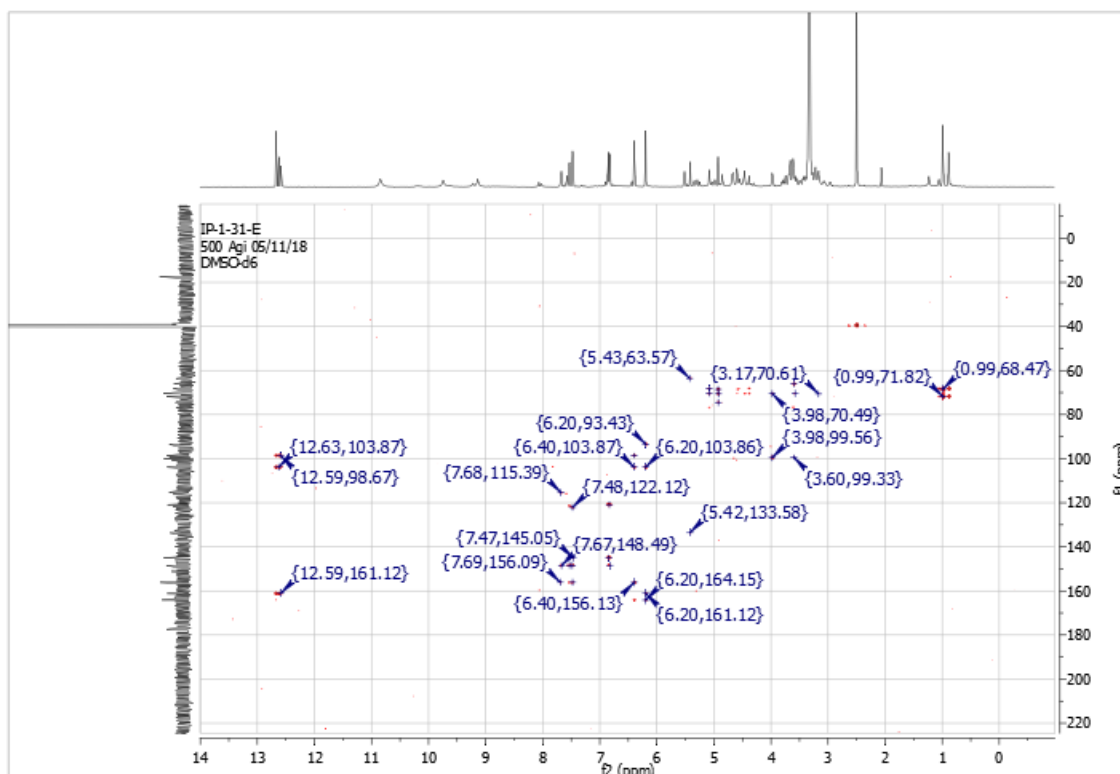


Figura 121: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância 21.

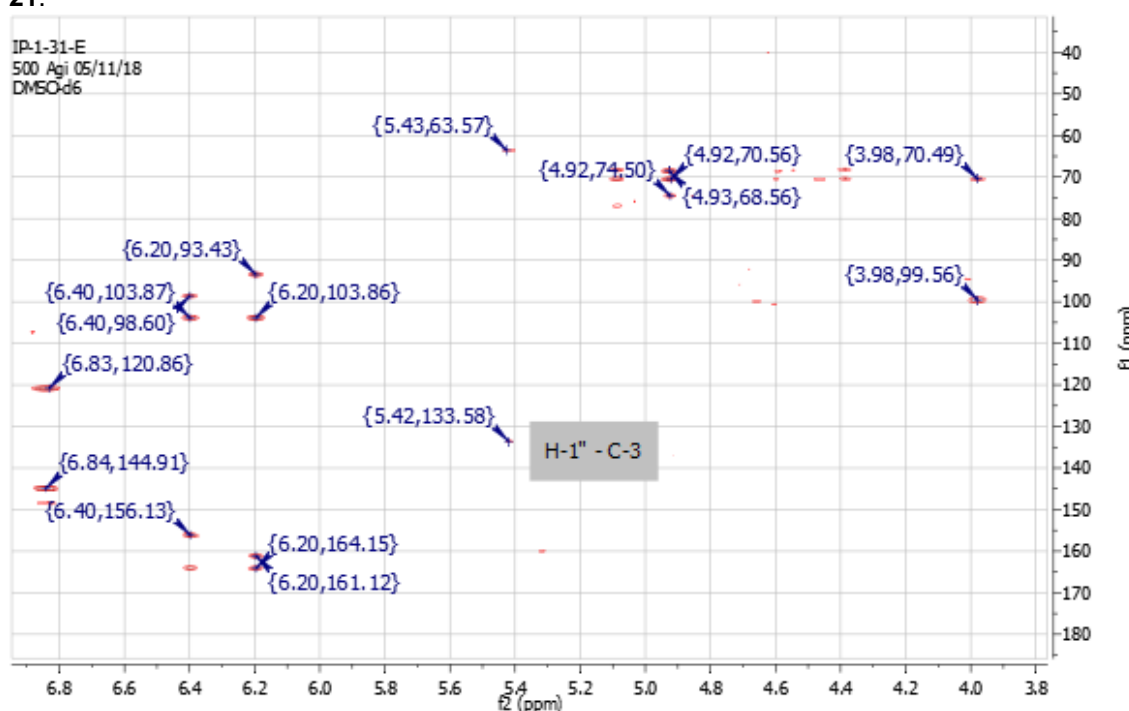
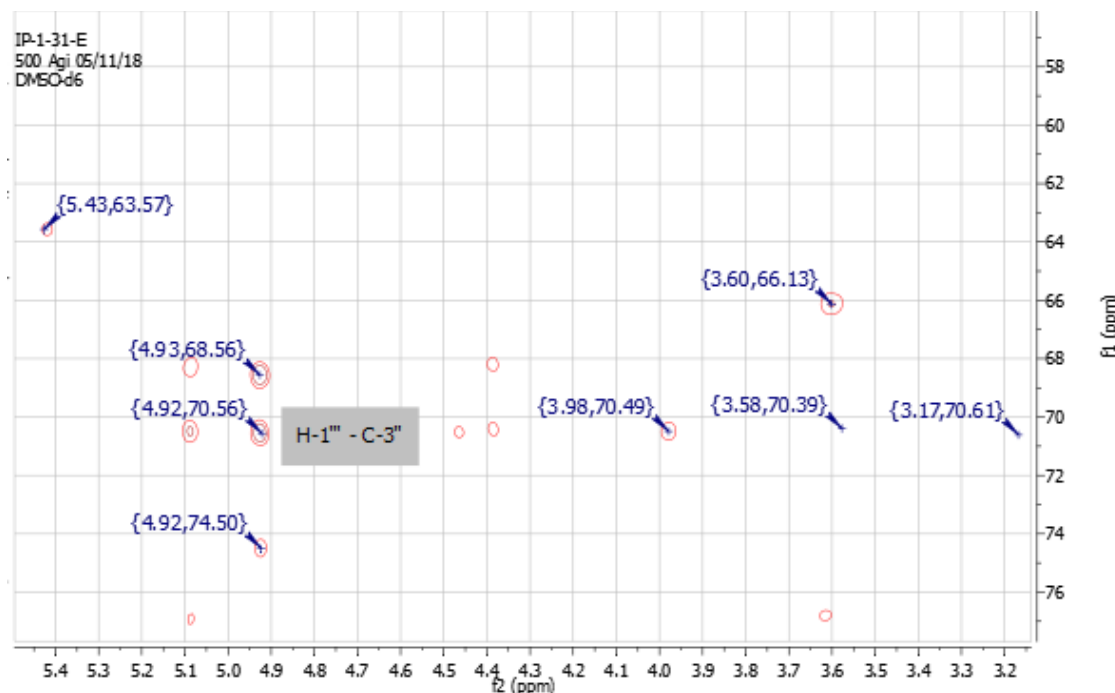


Figura 122: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d6) da substância **21**.



A fim de confirmar a identificação estrutural por RMN, a substância **21** foi submetida à análise por HPLC-DAD-MS. O cromatograma obtido mostra um pico majoritário com tempo de retenção em 14,116 min (Figura 123). Os espectros de massas obtidos tanto no modo positivo (ESI+) quanto no modo negativo (ESI-) são vistos, além das propostas de fragmentações na Figura 124.

Figura 123: Cromatograma do HPLC-DAD da substância **21** em 254 nm.

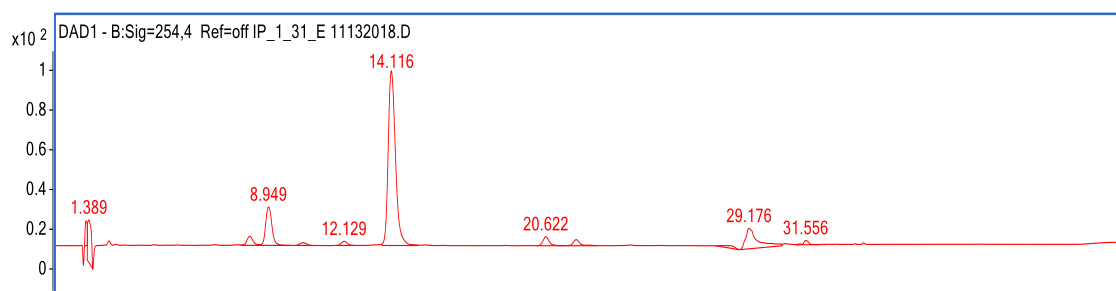
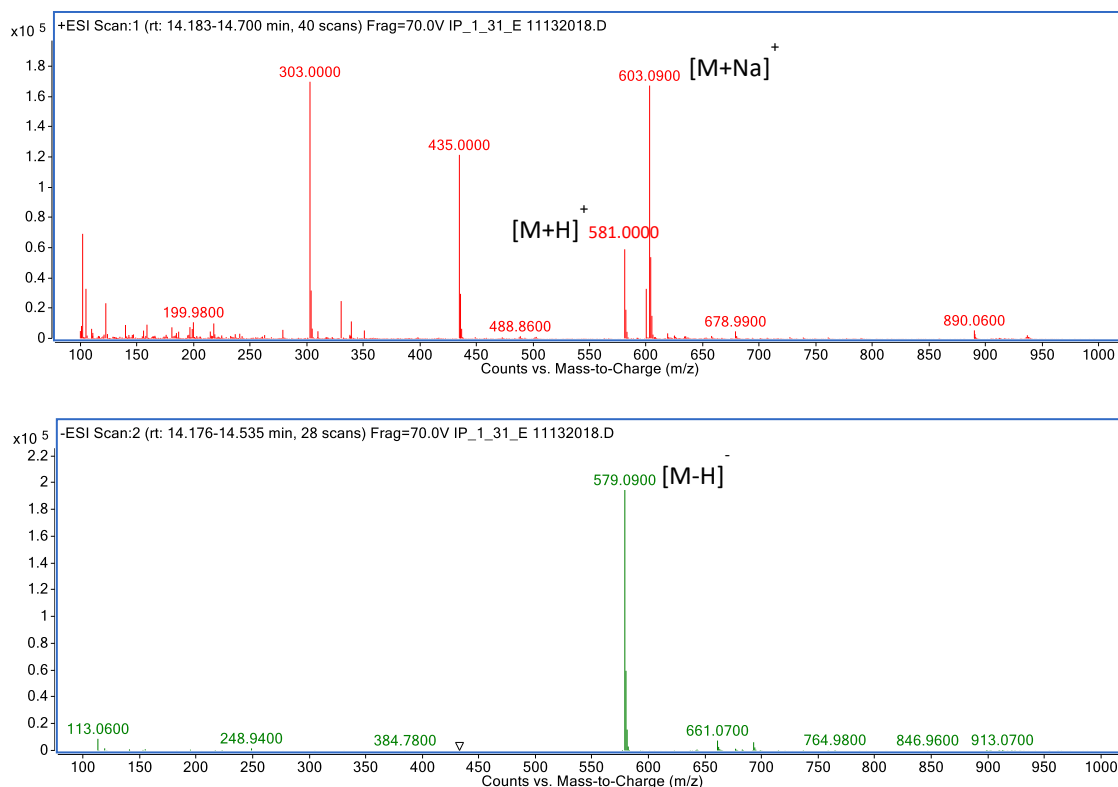
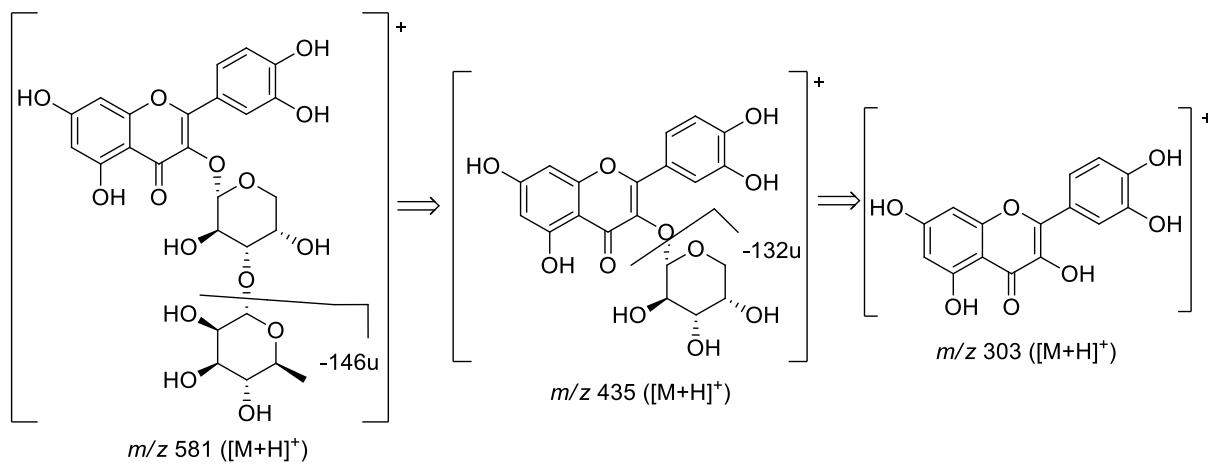


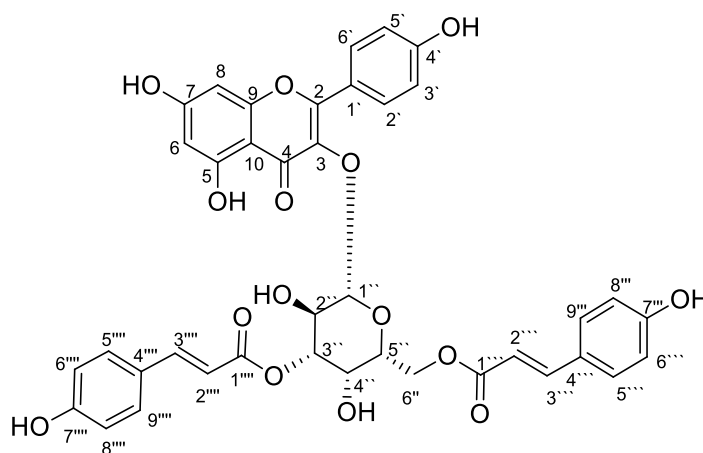
Figura 124: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e negativo (ESI-) da substância **21**.

O espectro de massas no modo positivo apresentou o sinal do íon *quasi*-molecular em m/z 581 ($[M+H]^+$), consistente com a fórmula molecular $C_{26}H_{28}O_{15}$, confirmando a proposta estrutural da quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosil. A formação do íon m/z 435 refere-se a aglicona ligada à arabinose, formado após a perda de 146u, característica de desoxiexose, a ramnose. Em seguida, ocorre uma segunda fragmentação com a formação do íon m/z 303, referente a aglicona, resultado da perda de 132u, característica de pentose, no caso, a arabinose (Figura 125).

Figura 125: Propostas de fragmentações da substância **21**.

De acordo com dados da literatura, a estrutura da quercetina 3-O- α -L-ramnopyranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosose na fração IP-2-31E, foi isolada pela primeira vez em uma espécie do gênero *Annona*.

5.4.6 Substância 22 (IP-3-27B.2)



Kaempferol 3-O-[3'',6''-di-O-*p*-coumaroil]-β-D-galactopiranosídeo

Na análise do espectro de RMN ^1H (Figuras 126 a 130, p. 164), sinais na região de δ_{H} 6,36 (H-8; d, $J = 2,1$ Hz) e 6,17 (H-6; d, $J = 2,1$ Hz) representam os átomos de hidrogênio aromático referentes ao anel A dos flavonoides e correlacionam, respectivamente, com os átomos de carbono em δ_{C} 93,45 e 98,70 de acordo com os dados do mapa de correlação heteronuclear HSQC (Figuras 135 a 137, p. 168).

Foi observado o padrão de substituição AA'BB' no anel B representado por sinais em δ_{H} 8,10 atribuído aos H-2' e H-6'; e em δ_{H} 6,90 atribuído aos H-3' e H-5', acoplados em *orto* com $J = 9,0$ Hz. Através das correlações a duas e três ligações entre átomos de hidrogênio e carbono por HMBC (Figuras 138 a 140, p. 170), foi possível confirmar a presença da hidroxila na posição C-4'.

A β-galactose foi confirmada através da correlação por HSQC de um sinal de duplete no espectro de RMN ^1H em δ_{H} 5,30 (H-1'') característico do hidrogênio anomérico com $J = 7,9$ Hz que caracteriza o açúcar com configuração β, acoplado com o átomo de carbono em δ_{C} 103,45 (C-1''). No mapa de correlação HMBC é observado a correlação a três ligações ($^3J_{\text{CH}}$) entre o hidrogênio anomérico H-1'' (δ_{H} 5,30) e o carbono C-3 (δ_{C} 134,05), confirmando a ligação da glicose ao carbono C-3.

A presença de duas unidades do ácido *p*-cumárico foram verificadas através dos sinais característicos da dupla ligação em configuração *trans* em δ_{H}

6,07 (H-2''', d, J = 16,0 Hz), 7,44 (H-3''', d, J = 16,0 Hz), 6,48 (H-2''''', d, J = 16,0 Hz) e 7,76 (H-3''''', d, J = 16,0 Hz). Além da presença dos sinais de átomos de hidrogênio aromático com absorções em δ_H : 7,32 (H-5''' e 9''', d, J = 8,5 Hz), 6,68 (H-6''' e 8''', d, J = 8,7 Hz), 7,52 (H-5'''' e 9''''', d, J = 8,5 Hz) e 6,81 (H-6'''' e 8''''', d, J = 8,7 Hz), característico do acoplamento em *orto*.

Análise do espectro de RMN ^{13}C (Figuras 131 a 133, p. 166) e HSQC revelaram sinais referentes a átomos de carbono não hidrogenados, dentre os quais, δ_C : 159,93 (C-2); 134,05 (C-3); 178,15 (C-4); 161,57 (C-5); 164,74 (C-7); 159,80 (C-9); 104,14 (C-10), 121,15 (C-1') e 160,26 (C-4'), 167,32 (C-1'''), 125,68 (C-4'''), 157,07 (C-7'''), 167,27 (C-1''''), 125,89 (C-4''''), 157,74 (C-7'''''). Além desses, outros sinais foram atribuídos a átomos de carbono metínicos (CH) em δ_C : 98,70 (C-6); 93,45 (C-8); 130,94 (C-2' e 6'); 115,44 (C-3' e 5'); 103,45 (C-1''), 69,10 (C-2''), 75,81 (C-3''), 66,56 (C-4''), 73,21 (C-5''), 113,23 (C-2'''), 145,23 (C-3'''), 129,75 (C-5''' e 9'''), 114,79 (C-6''' e 8'''), 113,79 (C-2''''), 145,58 (C-3''''), 129,82 (C-5'''' e 9'''''), 115,37 (C-6'''' e 8'''''). Constatou-se também a presença de um carbono metilênico (CH₂) pelo DEPT-135 (Figura 134, p. 168) em δ_C : 62,65 (C-6''), pertencente ao açúcar do tipo hexose (galactose).

Portanto, a substância **22** isolada mostrou através das análises uni e bidimensionais do espectro de RMN ^{13}C e ^1H , e por comparações com dados da literatura (VEGA et al., 2007) a confirmação da estrutura kaempferol 3-O-[3'',6''-di-O-*p*-coumaroil]- β -D-galactopiranosídeo (Tabela 21, p. 163).

Tabela 21: Dados de RMN ^1H (500 MHz), ^{13}C (125 MHz) da substância **22** em CD_3OD em comparação com os dados da literatura em acetona- d_6 . Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.

Substância 22						VEGA et al., 2007	
C	HSQC		HMBC			HSQC	
	δ_c	δ_H	$^2J_{\text{HC}}$	$^3J_{\text{HC}}$	$^4J_{\text{HC}}$	δ_c	δ_H
2	159,93	-				158,7	-
3	134,05	-		H-1''		135,5	-
4	178,15	-				179,1	-
5	161,57	-	H-6			162,9	-
7	164,74	-	H-8			165,4	-
9	159,80	-				158,0	-
10	104,14	-		H-6/8		105,4	-
1'	121,15	-		H-3'/5'		122,4	-
4'	160,26	-	H-3'/5'	H-2'/6'		161,1	-
1'''	167,32	-	H-2'''	H-6'' α / H-6'' β / H-3'''		167,1	-
4'''	125,68	-		H-2'''		126,9	-
7'''	157,07	-				160,6	-
1''''	167,27	-	2''''	H-3'''/ H-3''''		167,1	-
4''''	125,89	-		H- 6''''/8''''		127,1	-
7''''	157,74	-				160,7	-
CH							
6	98,70	6,17 (d, 2,1)		H-8		99,9	6,28 (d, 2,2)
8	93,45	6,36 (d, 2,1)		H-6		94,8	6,53 (d, 2,2)
2'/6'	130,94	8,10 (d, 9,0)				132,3	8,19 (d, 8,8)
3'/5'	115,44	6,90 (d, 9,0)				115,9	6,95 (d, 8,8)
1''	103,45	5,30 (d, 7,9)	H-2''			105,5	5,41 (d, 7,7)
2''	69,10	4,15 (dd, 7,8; 10,1)			H-5''	70,0	4,17 (dd, 7,7; 9,9)
3''	75,81	4,93 (dd, 3,4; 10,1)			H-6'' β	76,9	5,01 (dd, 9,9; 3,3)
4''	66,56	4,13 (d, 2,3)				67,5	4,15
5''	73,21	3,89			H-2''	74,1	4,01 (t, 6,6)
2'''	113,23	6,07 (d, 16,0)				115,1	6,17 (d, 16,1)
3'''	145,23	7,44 (d, 16,0)		H- 5'''/9'''		145,6	7,46 (d, 16,1)
5'''/9'''	129,75	7,32 (d, 8,5)		H-3'''		130,9	7,43 (d, 8,4)
6'''/8'''	114,79	6,68 (d, 8,7)				116,7	6,87 (d, 8,4)
2''''	113,79	6,48 (d, 16,0)				115,8	6,31 (d, 15,8)
3''''	145,58	7,76 (d, 16,0)		H- 5''''/9''''		145,6	7,67 (d, 15,8)
5''''/9''''	129,82	7,52 (d, 8,5)		H-3''''		131,0	7,58 (d, 8,4)
6''''/8''''	115,37	6,81 (d, 8,7)				116,7	6,91 (d, 8,4)
CH₂							
6''	62,65	4,17 α (d, 4,5) 4,36 β (d, 3,5)			H-3''	65,6	4,26 (d, 6,6)

Figura 126: Espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) da substância 22.

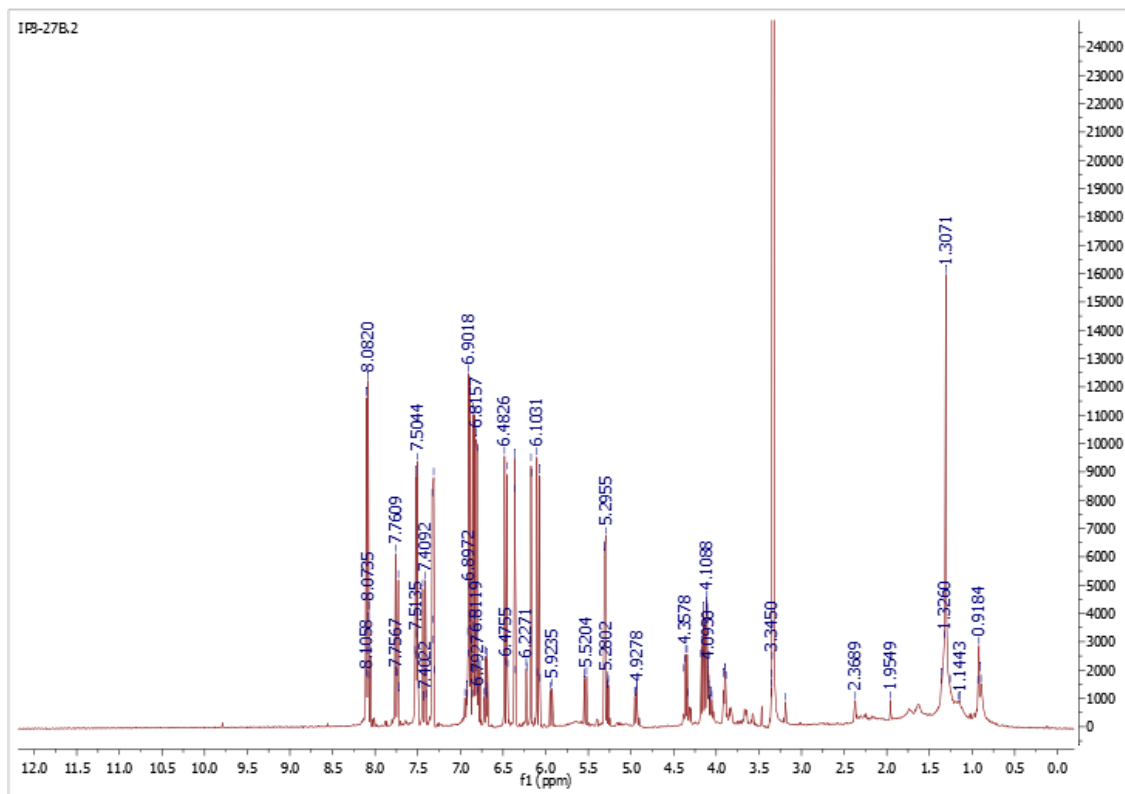


Figura 127: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) da substância 22.

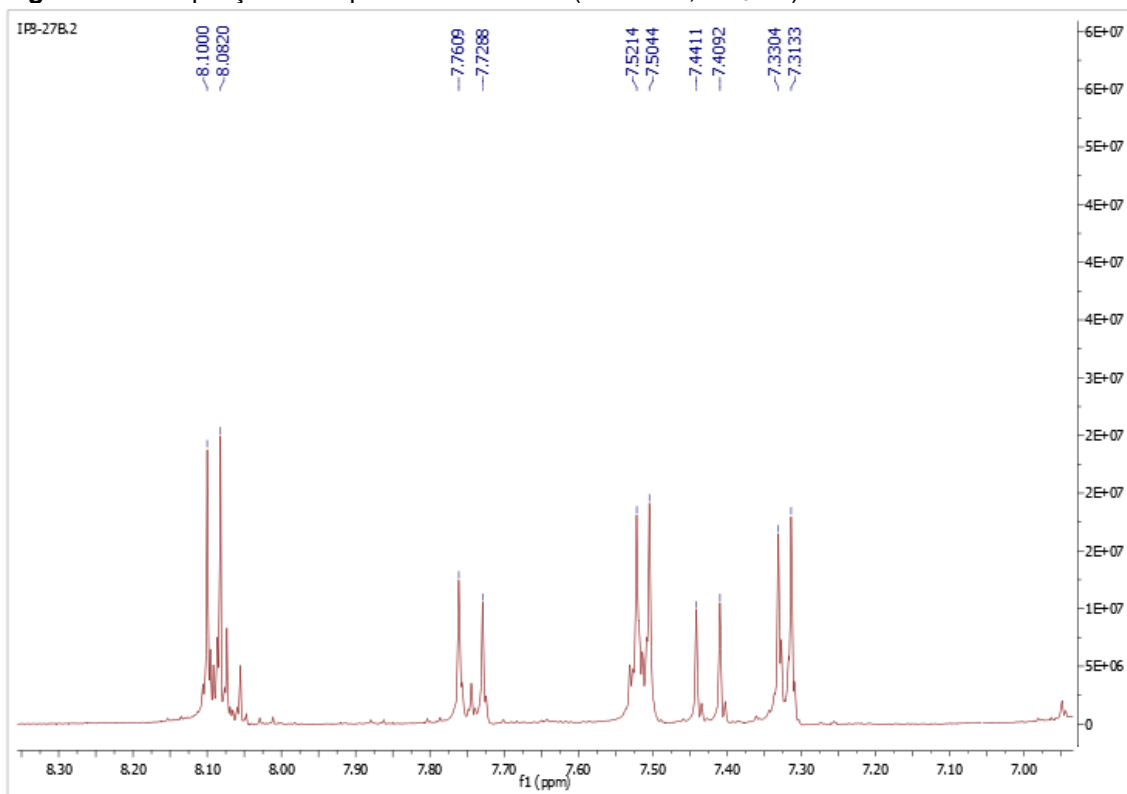


Figura 128: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) da substância **22**.

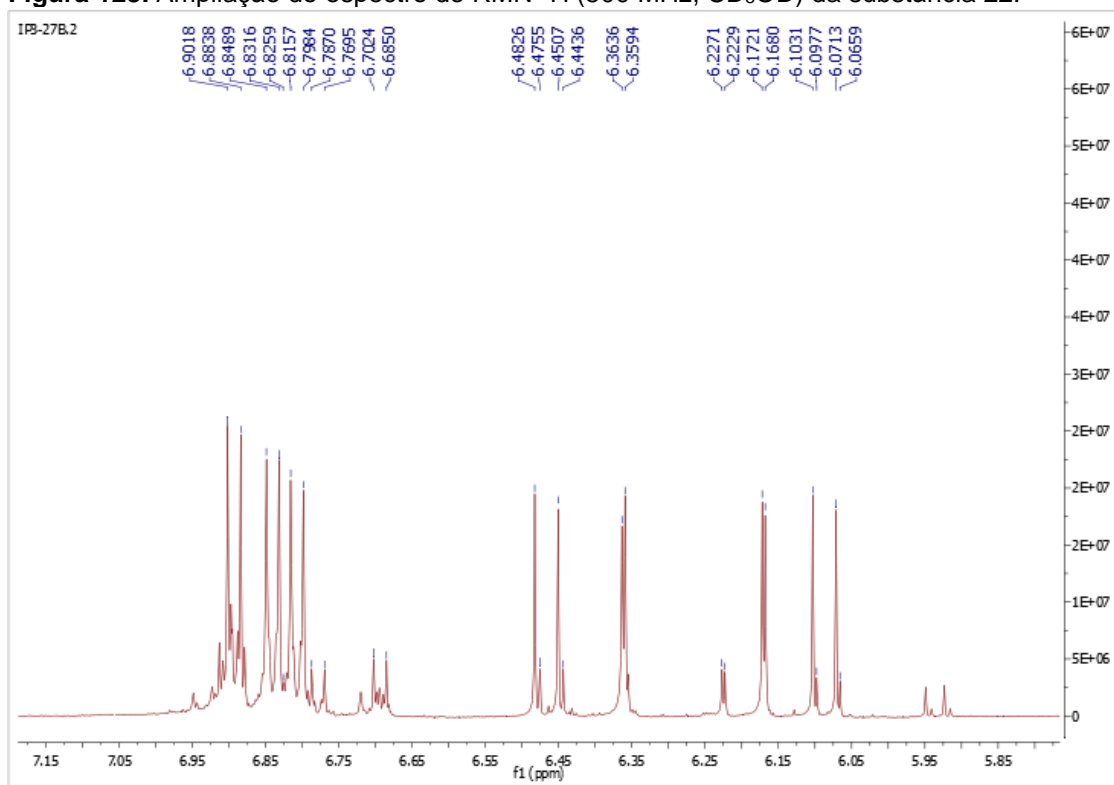


Figura 129: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) da substância **22**.

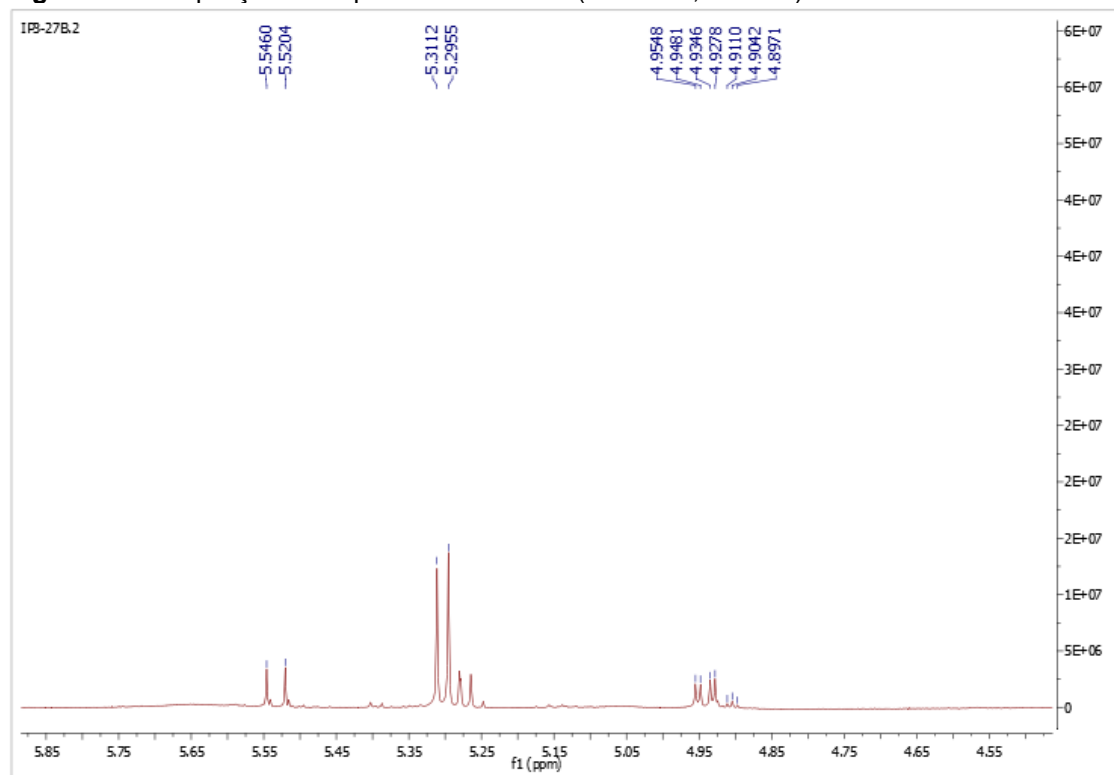


Figura 130: Ampliação do espectro de RMN ¹H (500 MHz, CD₃OD) da substância **22**.

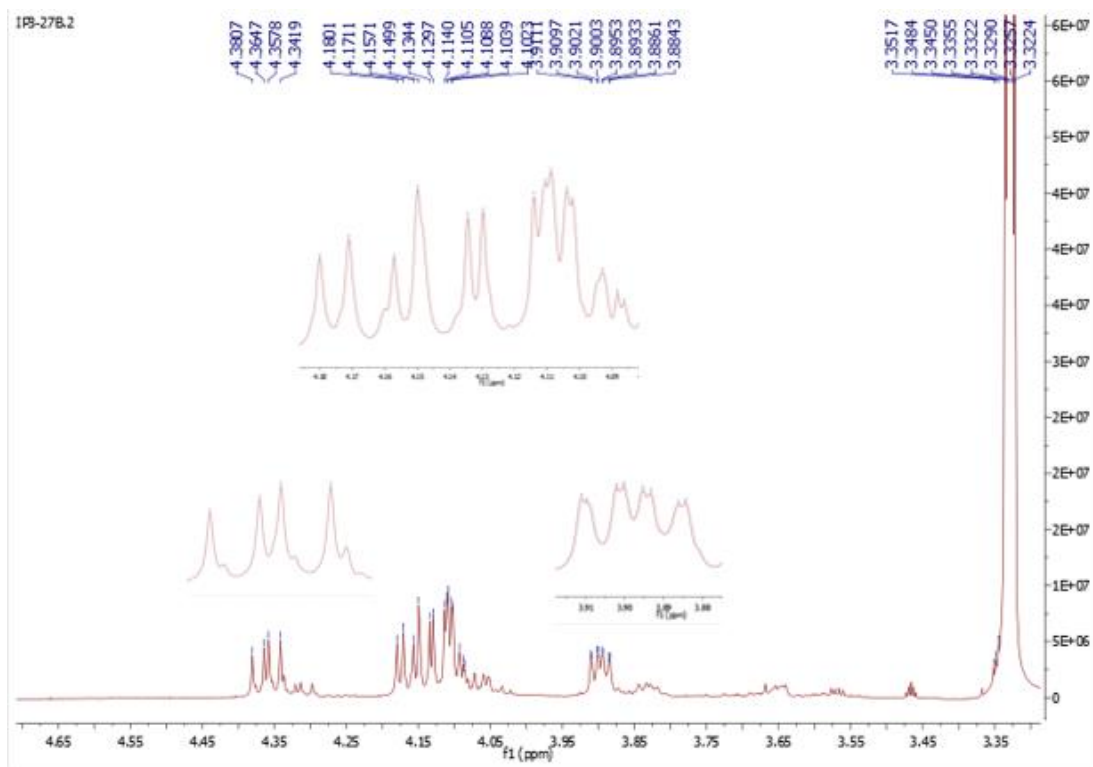


Figura 131: Espectro de RMN ¹³C (125 MHz, CD₃OD) da substância **22**.

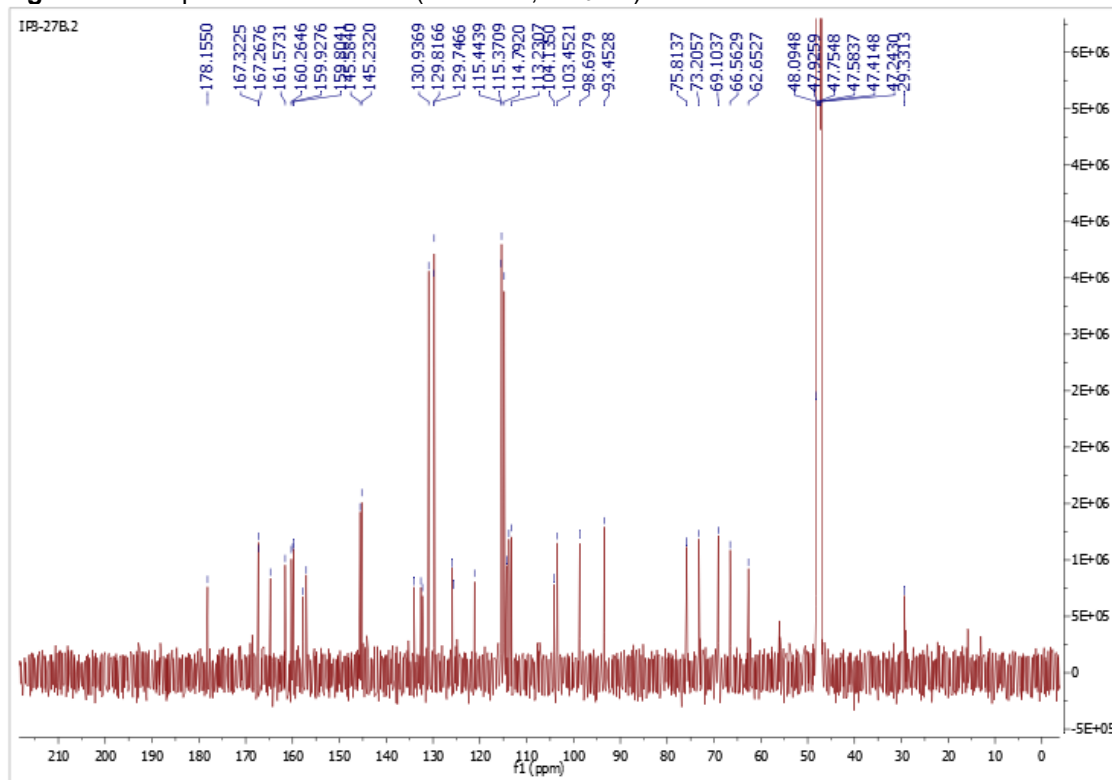


Figura 132: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância **22**.

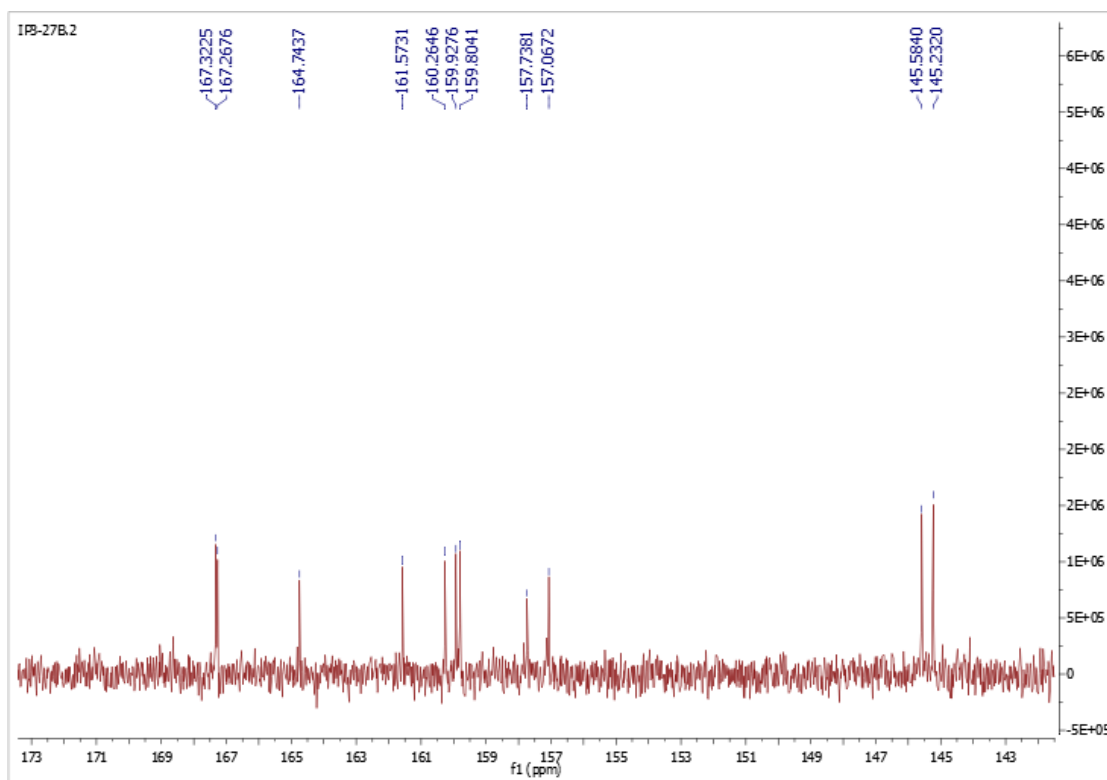


Figura 133: Ampliação do espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CD_3OD) da substância **22**.

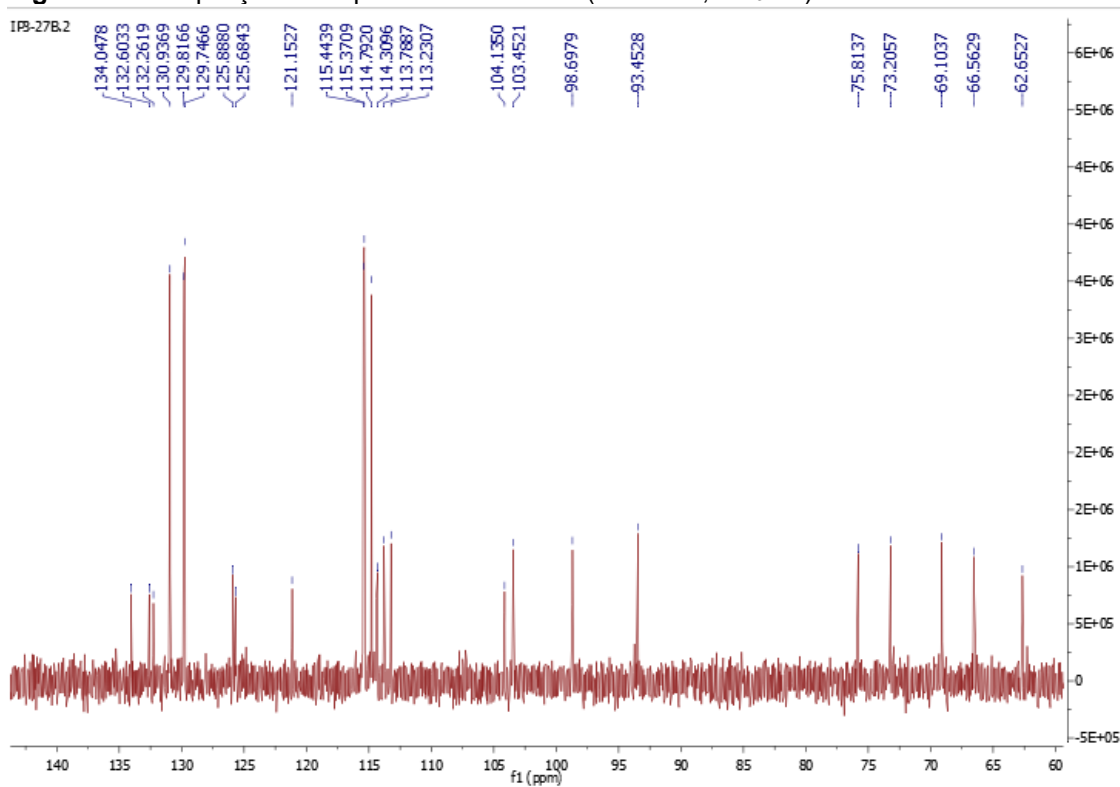


Figura 134. Espectro de DEPT-135 (125 MHz, CD₃OD) da substância 22.

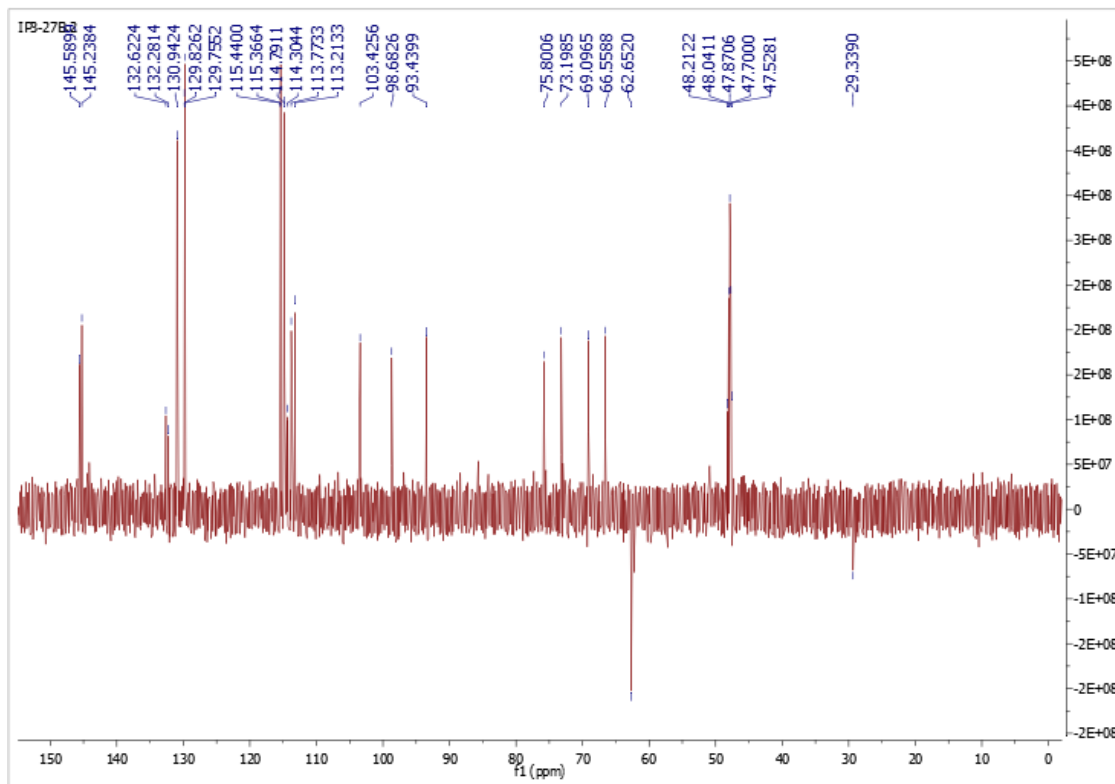


Figura 135. Mapa de correlação heteronuclear HSQC (CD₃OD) da substância 22.

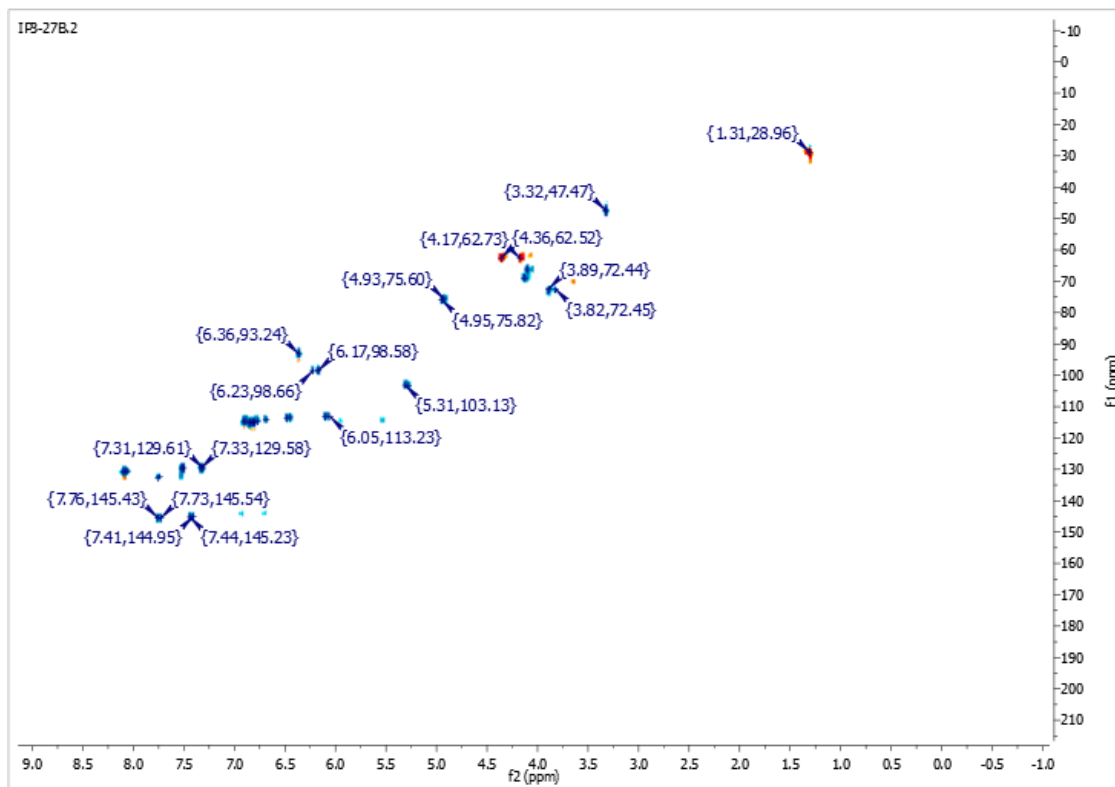


Figura 136: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (CD_3OD) da substância **22**.

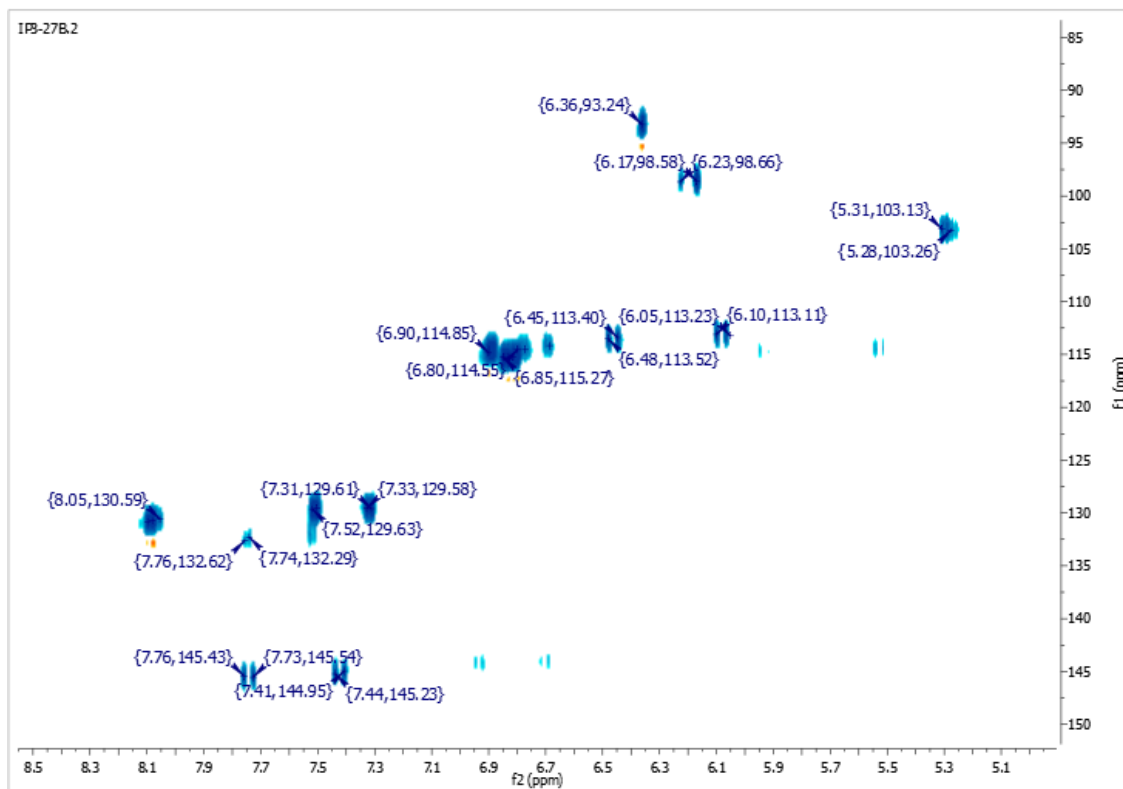


Figura 137: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (CD_3OD) da substância **22**.

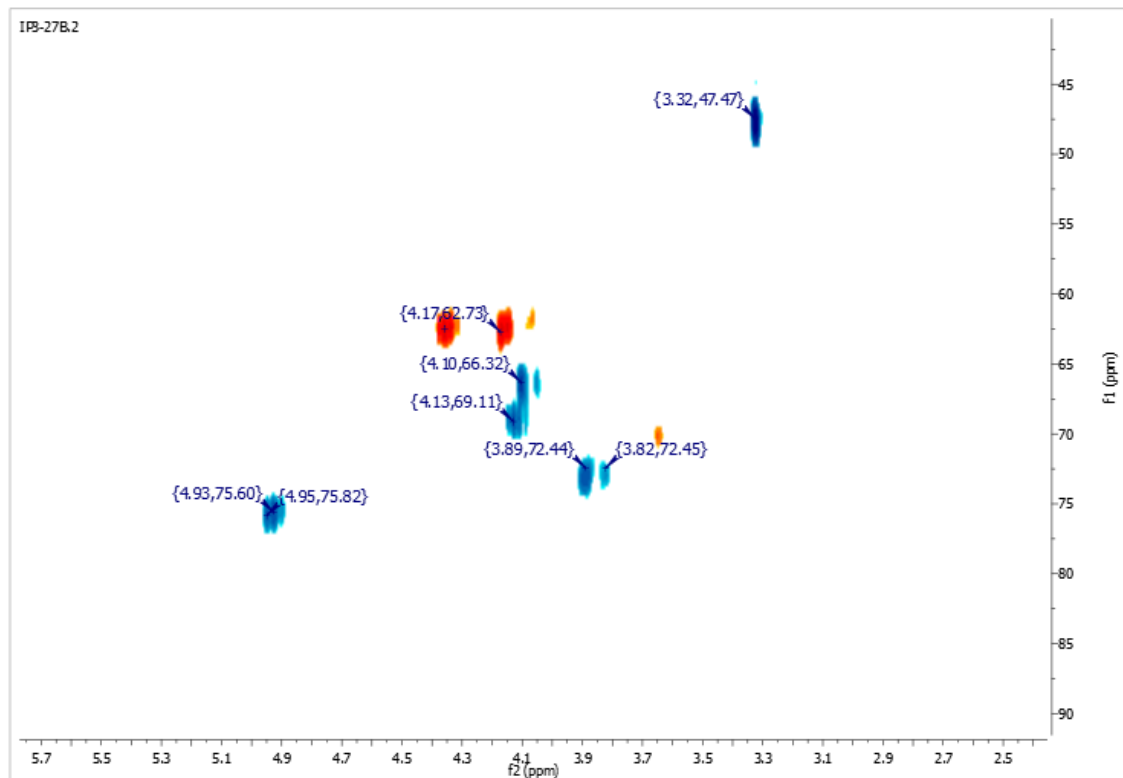


Figura 138: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD₃OD) da substância **22**.

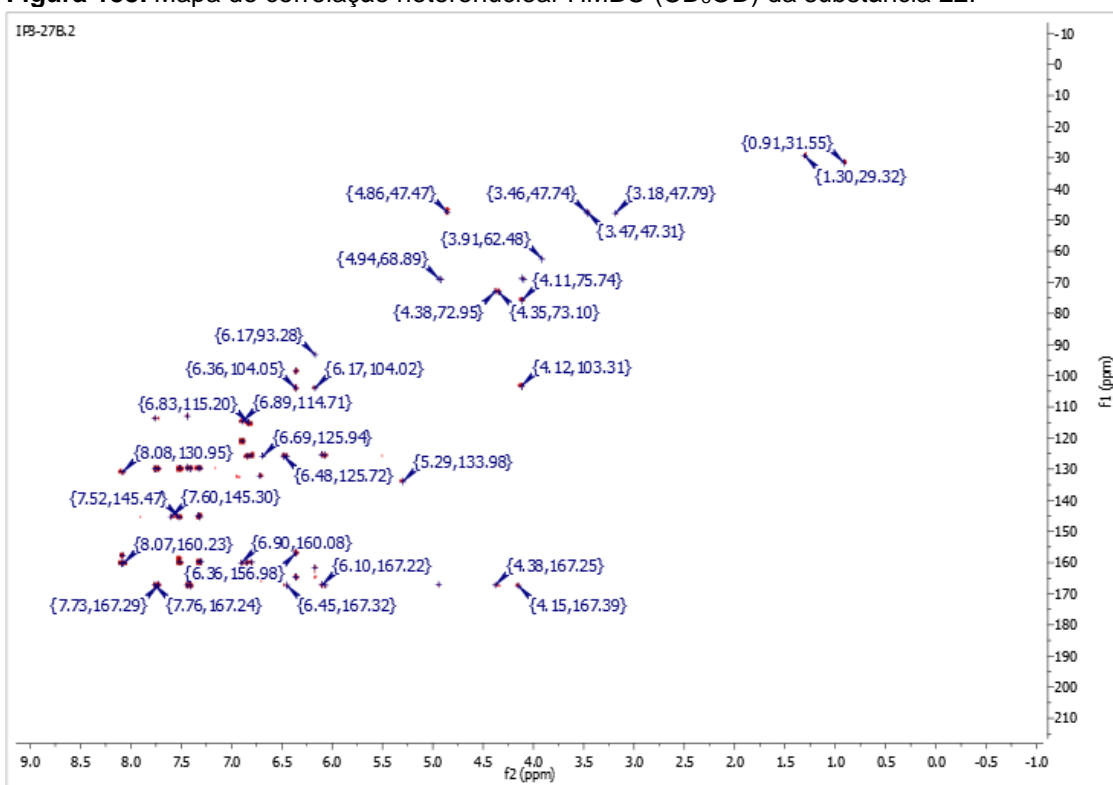


Figura 139: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD₃OD) da substância **22**.

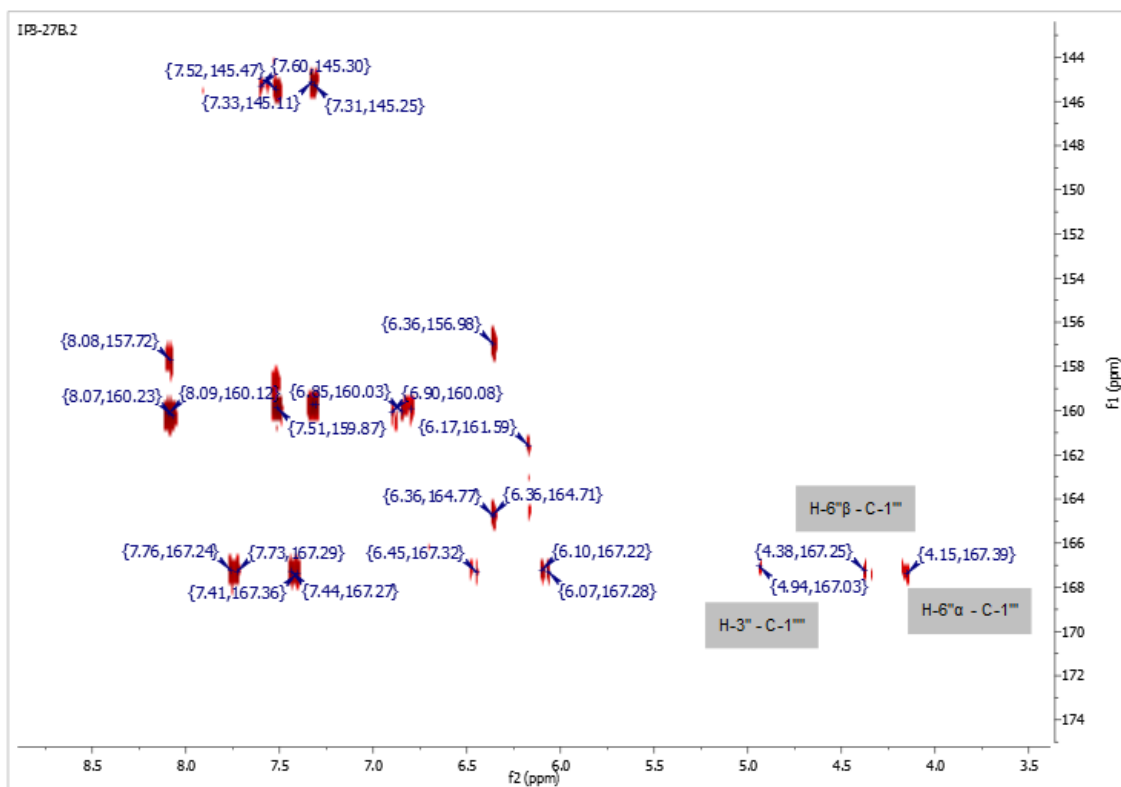
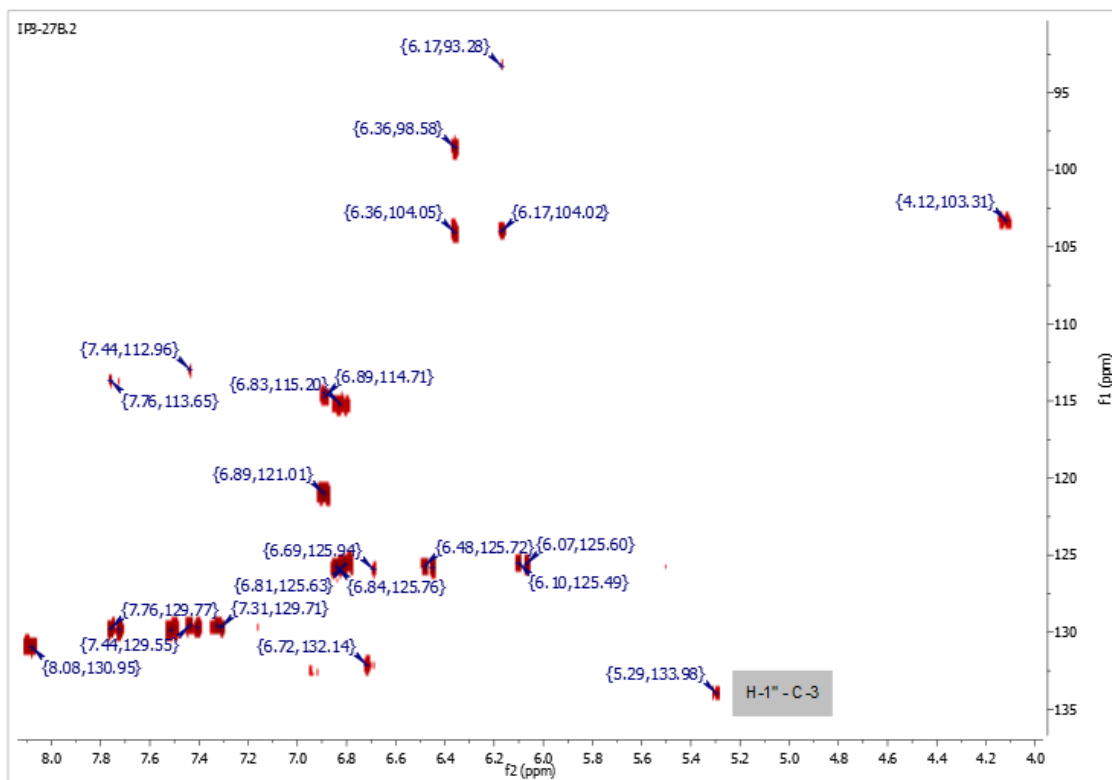


Figura 140: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (CD_3OD) da substância **22**.



A fim de confirmar a identificação estrutural por RMN, a substância **22** presente na fração IP-3-27B.2 foi analisada por UPLC-MS/MS. O cromatograma obtido mostra duas substâncias, sendo uma majoritária com tempo de retenção de 31,482 min (Figura 141) e os espectros de massas obtidos tanto no modo positivo (ESI+) quanto no modo negativo (ESI-) são vistos, além da proposta de fragmentação nas Figuras 142 a 144, respectivamente.

Figura 141: Cromatograma do UPLC-DAD da substância **22** em 254 nm.

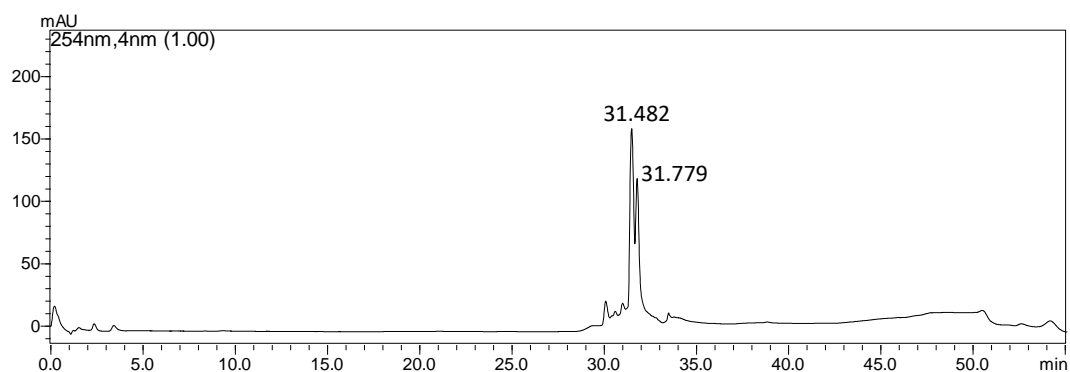


Figura 142: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e MS/MS do íon *quasi*-molecular em m/z 741.

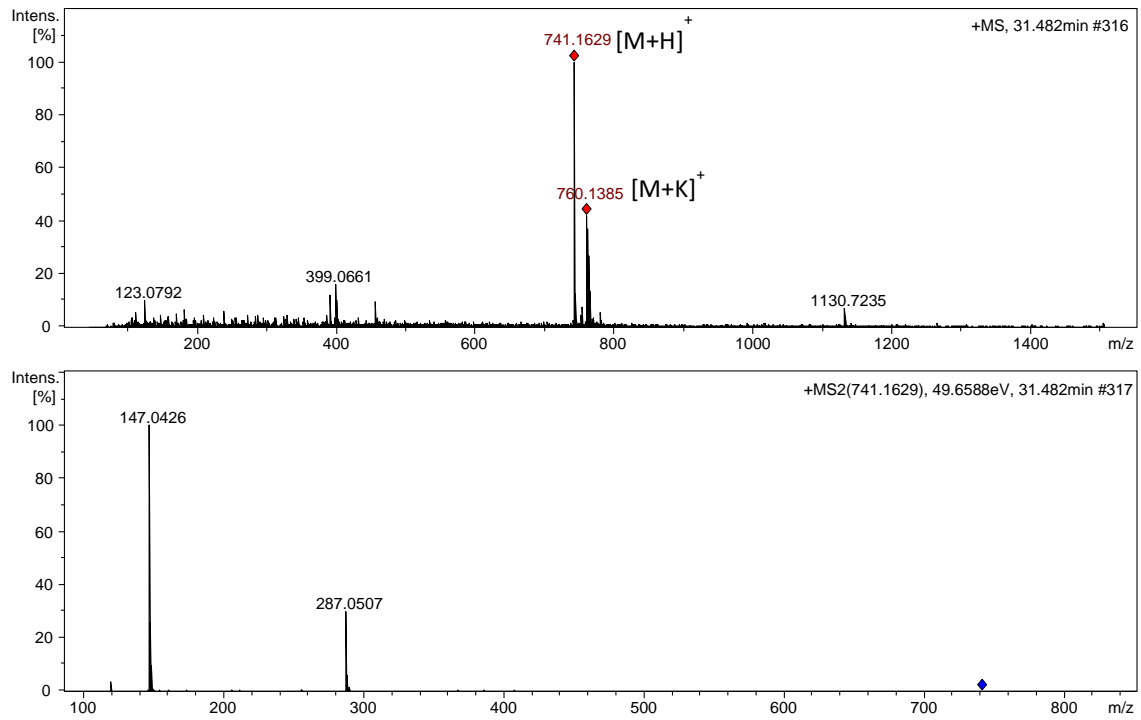
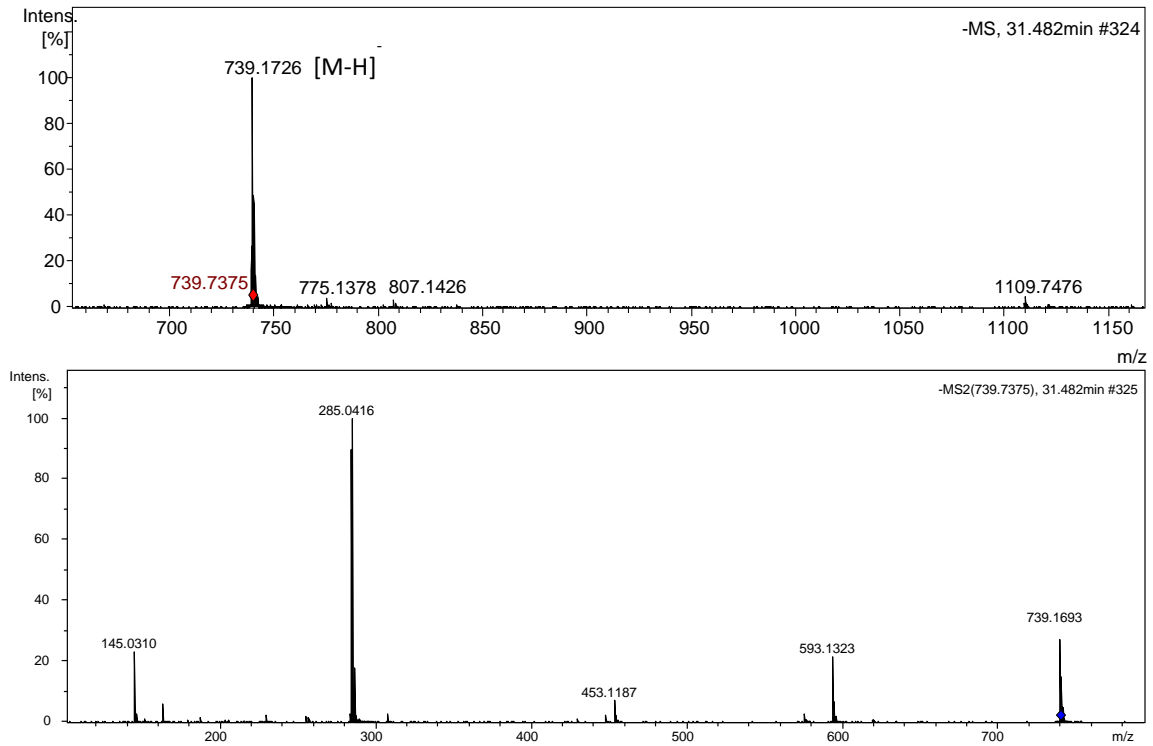
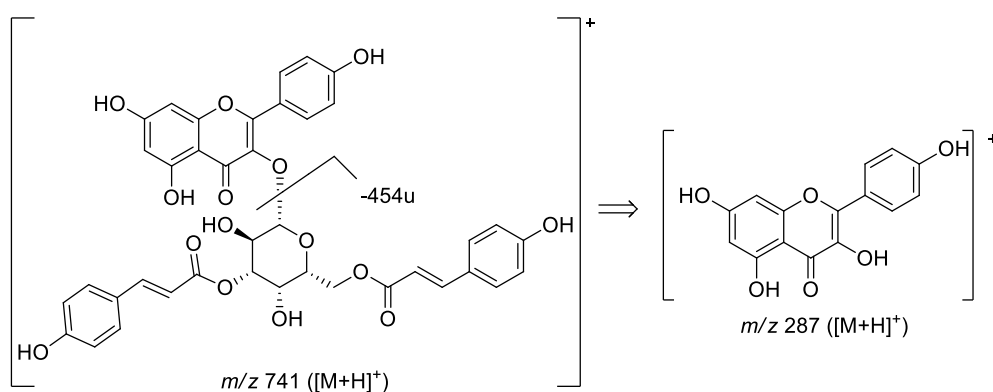


Figura 143: Espectros de massas no modo negativo (ESI-) e MS/MS do íon *quasi*-molecular em m/z 739.

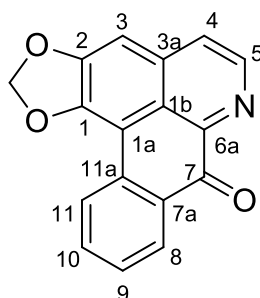


O espectro de massas no modo positivo apresentou o sinal do íon *quasi*-molecular em m/z 741 ($[M+H]^+$), consistente com a fórmula molecular $C_{39}H_{32}O_{15}$, confirmando a proposta estrutural do kaempferol 3-O-[3'',6''-di-O-*p*-coumaroil]- β -D-galactopiranosídeo. O íon m/z 287 refere-se a aglicona livre, a perda de 454u refere-se as duas unidades de ácido *p*-coumaroil e a unidade de açúcar do tipo hexose (Figura 144). Esse flavonoide já foi isolado anteriormente por Vega et al. (2007) das folhas de *Annona dioica*.

Figura 144: Proposta de fragmentação da substância **22**.



5.4.7 Substância 23 (IP-3-10CC)



Liriodenina

Na análise do espectro de RMN ^1H e ^{13}C , foi possível determinar que a amostra IP-3-10CC não apresentava espectros com sinais característicos de flavonoides.

No espectro de RMN ^1H (Figuras 145 a 147, p. 176) são observados sinais na região de átomos de hidrogênio aromático entre 7,58 a 8,82 ppm. Os átomos de hidrogênio das posições H-4 (8,05 ppm) e H-5 (8,82 ppm) apresentam correlação pelo valor das constantes de acoplamento (d, $J = 5,1$ Hz). Também são observadas correlações através das constantes de acoplamento entre os átomos de hidrogênio em H-8 (8,34, dd, $J = 1,5; 8,0$ Hz), H-9 (7,65, dt, $J = 1,0; 8,0$ Hz), H-10 (7,87, dt, $J = 1,5; 8,2$ Hz) e H-11 (8,64, d, $J = 8,2$ Hz).

O menor deslocamento observado no espectro de RMN ^1H em 6,51 ppm (s) é referente ao CH_2 correlacionado pelo mapa de correlação HSQC (Figuras 151 e 152, p. 179) com o carbono em 103,84 ppm que sugere a presença de um grupo OCH_2O entre os átomos de carbono nas posições 1 e 2, que foi confirmada por correlações heteronucleares observadas no mapa de HMBC a três ligações (Figuras 153 e 154, p. 180). Esse sinal é característico de alcaloides oxoaporfínicos.

Através dos dados das experiências HSQC, DEPT-135 (Figura 150, p. 178) e RMN ^{13}C (Figuras 148 e 149, p. 177) foi possível observar os sinais de carbono metínicos (CH) em 103,84 (C-3), 125,16 (C-4), 144,27 (C-5), 128,35 (C-8), 129,09 (C-9), 134,73 (C-10), 127,53 (C-11); os átomos de carbono não hidrogenados em δ_c : 149,09 (C-1), 106,58 (C-1a), 123,14 (C-1b), 152,23 (C-2), 144,97 (C-3a), 135,94 (C-6a), 181,70 (C-7), 131,27 (C-7a), 133,04 (C-11a); e um

átomo de carbono metilênico (CH₂) em δ_c 103,84 correlacionado com 6,51 (s), pertencente ao grupo OCH₂O.

As análises do mapa de correlação heteronuclear HMBC mostraram correlações a duas e principalmente três ligações como são vistas na Tabela 22. A partir disso e com dados da literatura (ZHANG et al., 2002) foi possível determinar a estrutura do alcaloide liriodenina.

Tabela 22: Dados de RMN ¹H (500 MHz), ¹³C (125 MHz) da substância **23** em DMSO-d₆ em comparação com os dados da literatura em CDCl₃/CD₃OD (3:1). Os deslocamentos químicos estão em ppm e as constantes de acoplamento entre parênteses estão em Hz.

Substância 23					ZHANG et al., 2002
HSQC		HMBC		HSQC	
C	δ_c	δ_H	² J _{HC}	³ J _{HC}	δ_c
1	149,09	-		H-3/CH ₂	148,6
1a	106,58	-		-	108,1
1b	123,14	-		H-3/H-4	123,5
2	152,23	-	H-3	CH ₂	152,3
3a	144,97	-		-	145,1
6a	135,94	-		-	136,3
7	181,70	-		-	182,8
7a	131,27	-		H-9/H-11	131,3
11a	133,04	-		H-10/H-8	133,2
CH					
3	103,84	7,58 (s)		H-4	103,5
4	125,16	8,05 (d, 5,1)		H-3	124,9
5	144,27	8,82 (d, 5,1)		-	144,6
8	128,35	8,34 (dd, 1,5; 8,0)		H-10	128,8
9	129,09	7,65 (dt, 1,0; 8,0)		H-11	128,9
10	134,73	7,87 (dt, 1,5; 8,2)		-	134,4
11	127,53	8,64 (d, 8,2)		-	127,7
CH₂	103,84	6,51 (s)		-	103,0

Figura 145: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) da substância **23**.

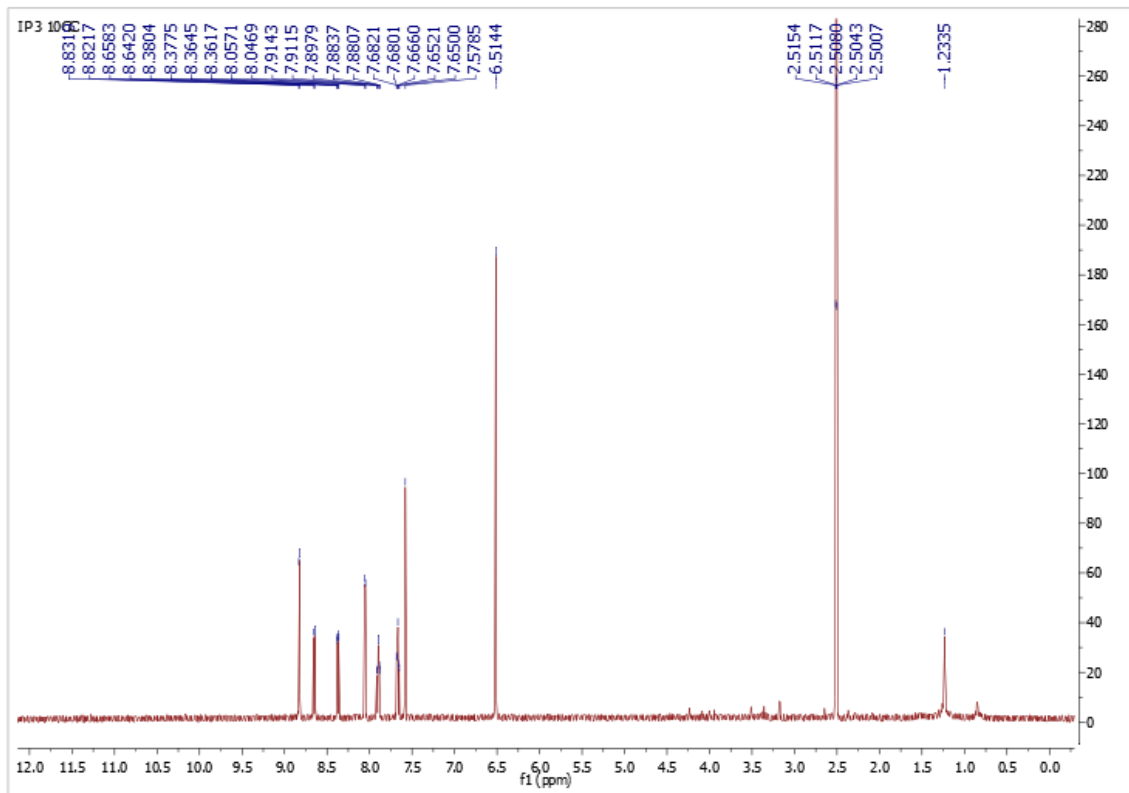


Figura 146: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) da substância **23**.

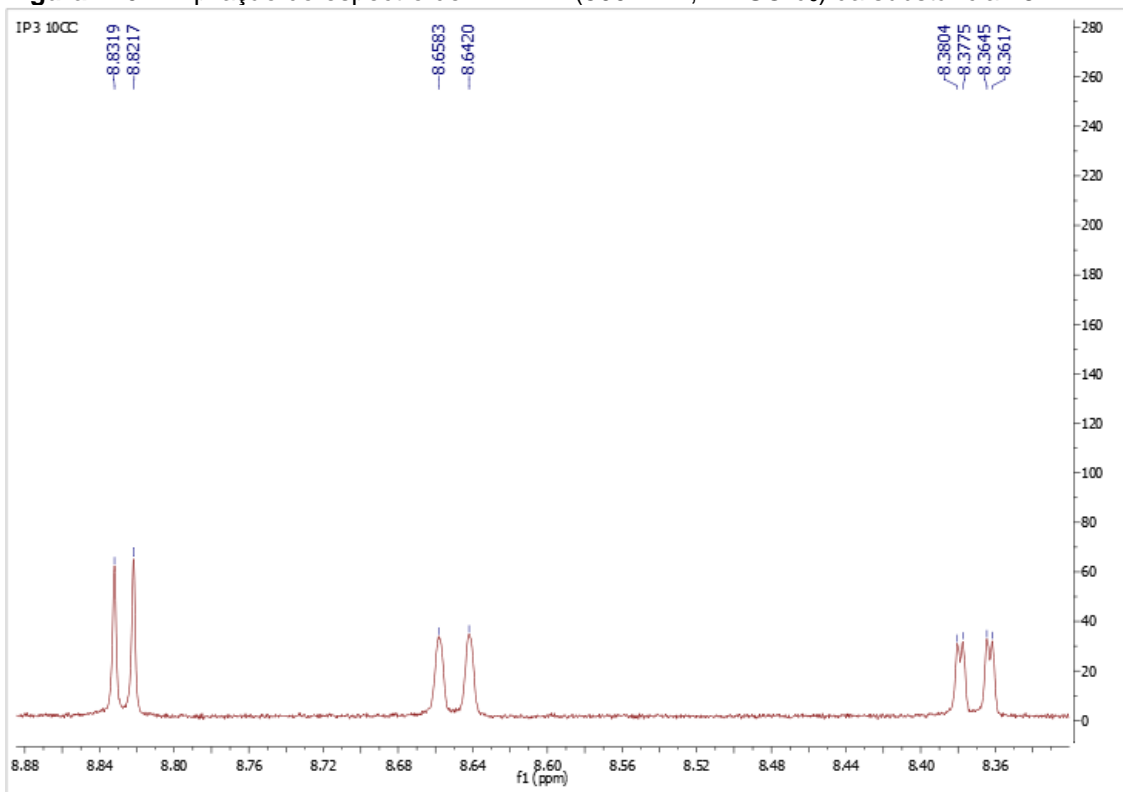


Figura 147: Ampliação do espectro de RMN ^1H (500 MHz, DMSO-d_6) da substância **23**.

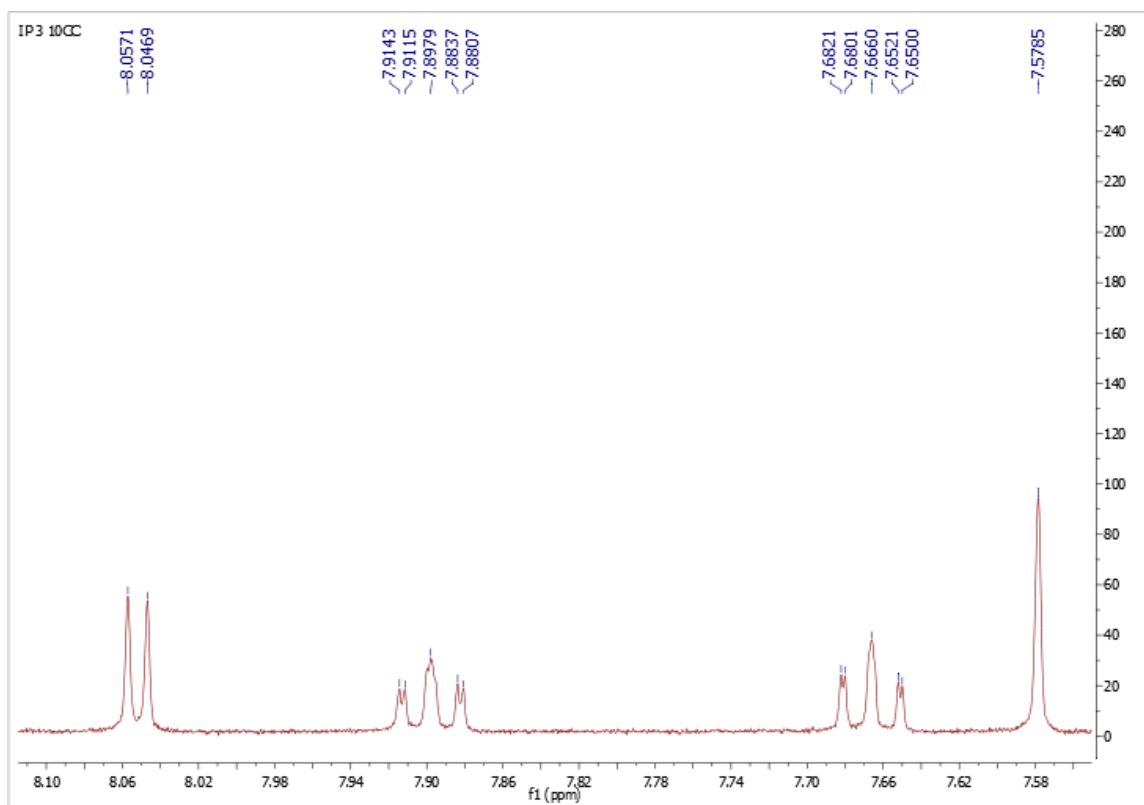


Figura 148: Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, DMSO-d_6) da substância **23**.

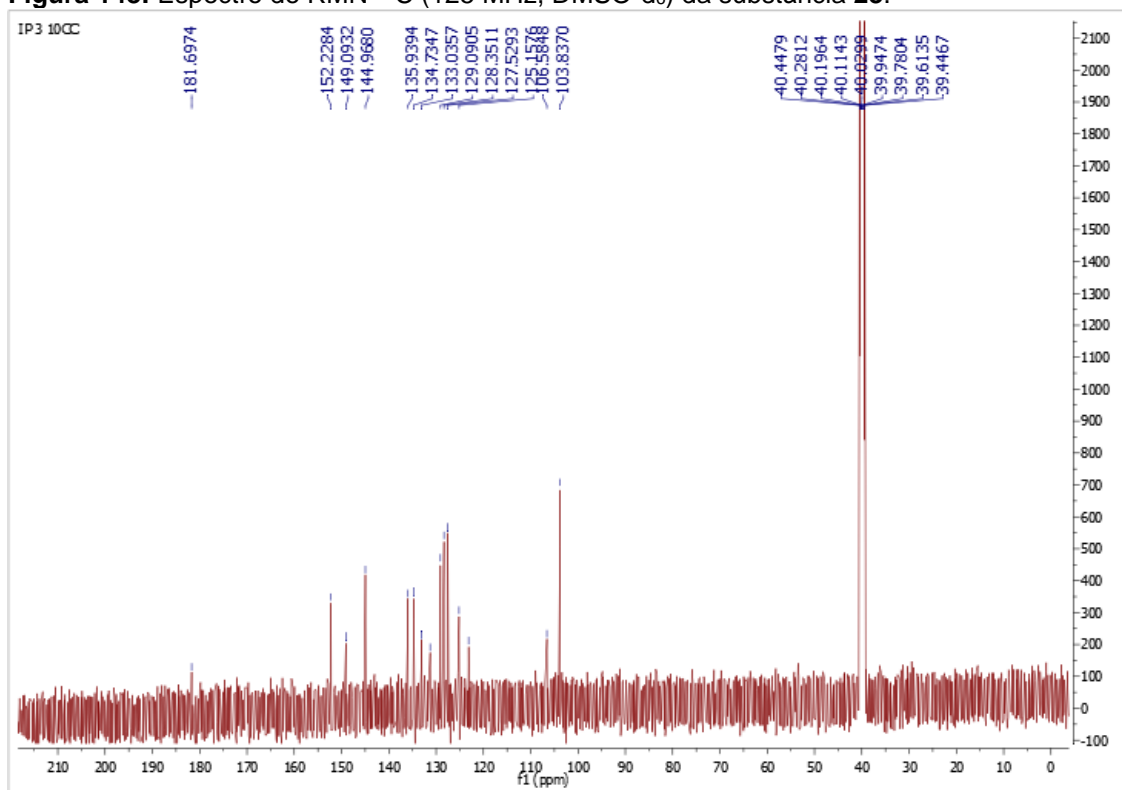


Figura 149: Ampliação do espectro de RMN ¹³C (125 MHz, DMSO-d₆) da substância 23.

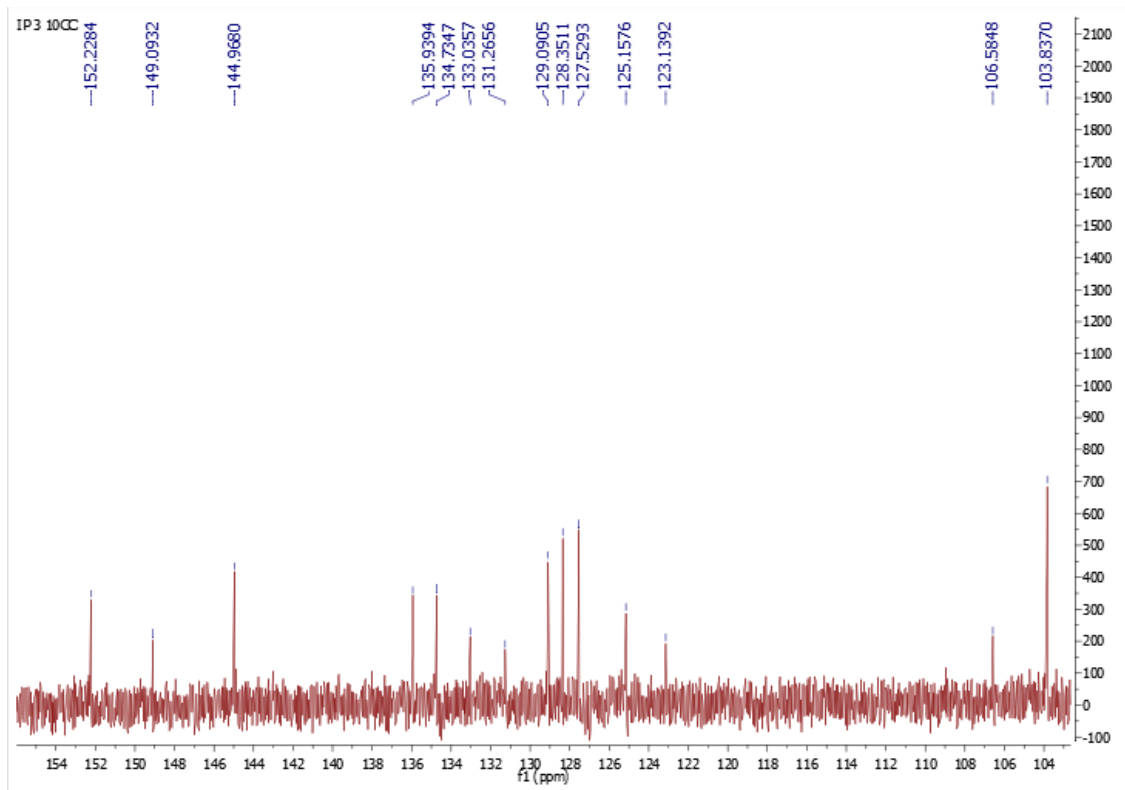


Figura 150: Espectro de DEPT-135 (125 MHz, DMSO-d₆) da substância 23.

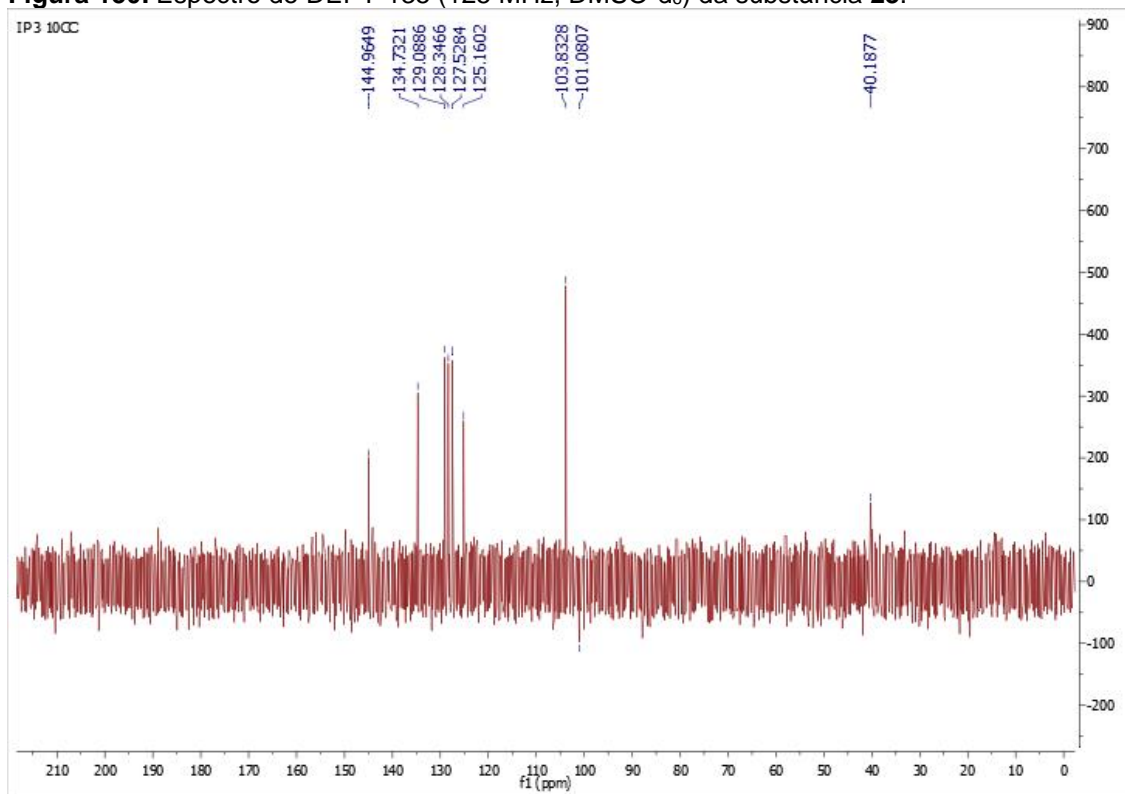


Figura 151: Mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d₆) da substância **23**.

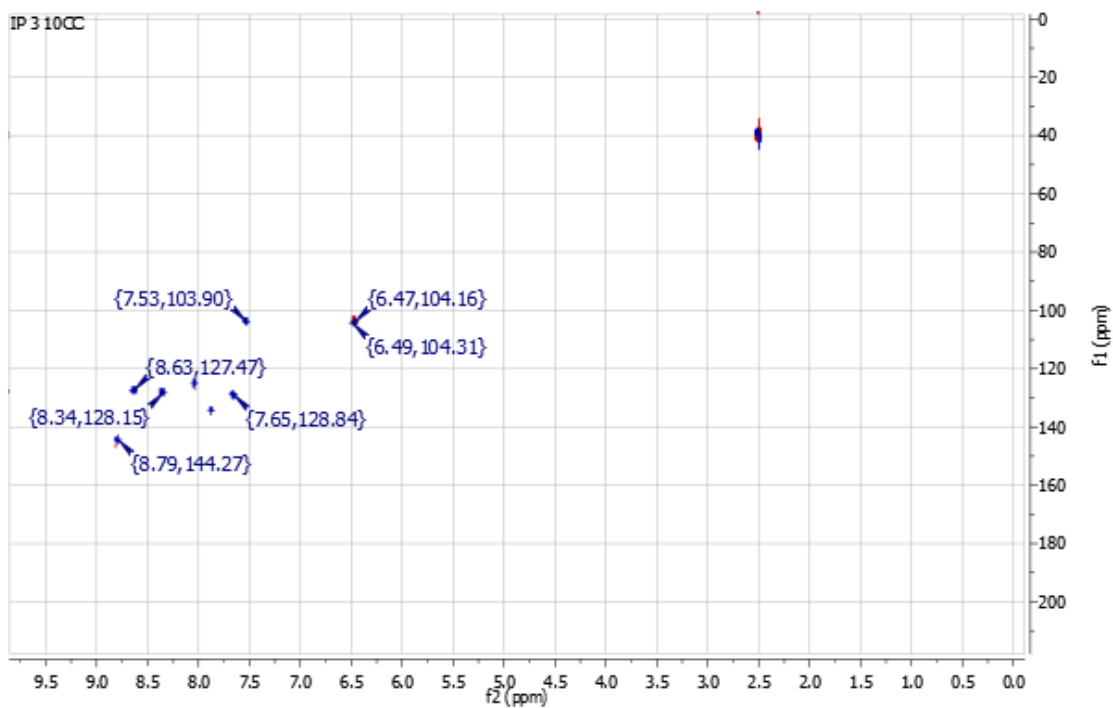


Figura 152: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HSQC (DMSO-d₆) da substância **23**.

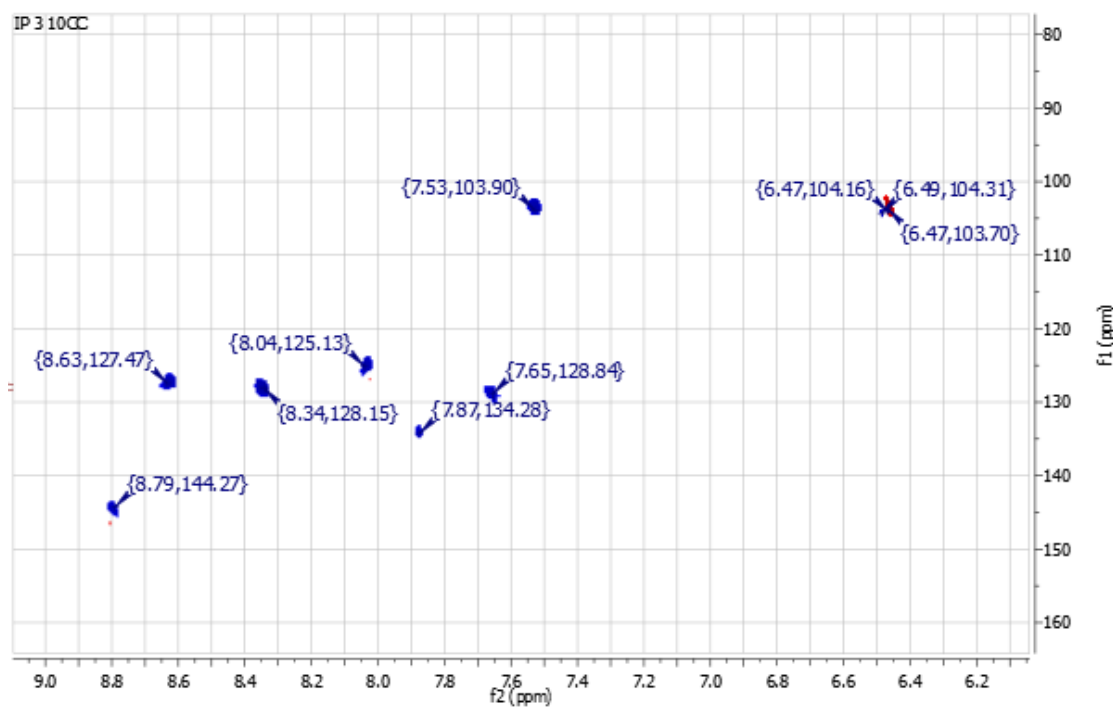


Figura 153: Mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d₆) da substância **23**.

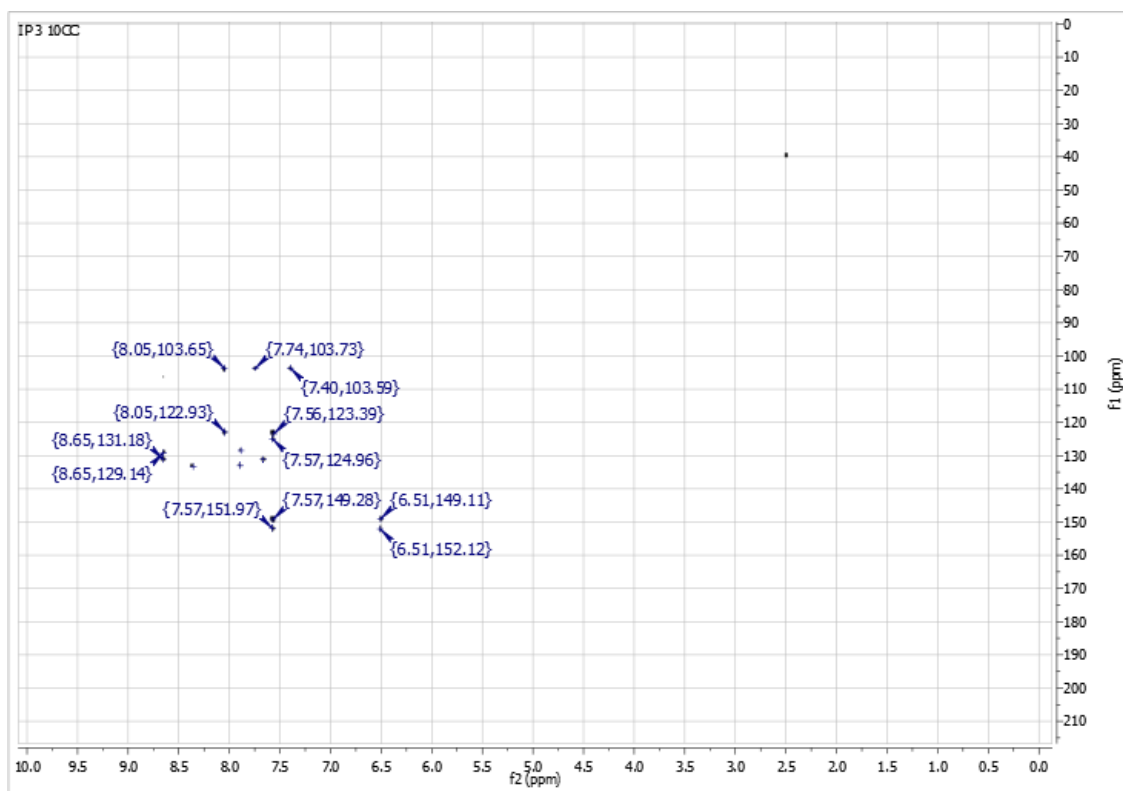
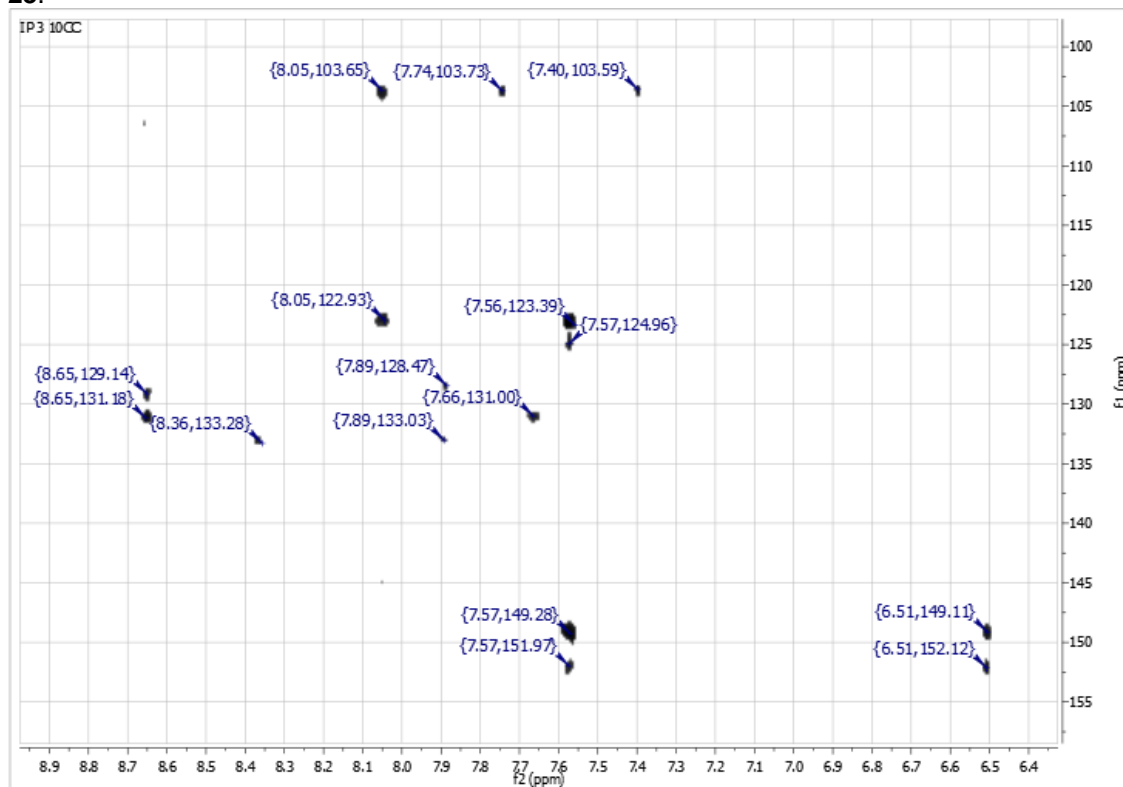


Figura 154: Ampliação do mapa de correlação heteronuclear HMBC (DMSO-d₆) da substância **23**.



A fim de confirmar a identificação estrutural por RMN, a substância **23** foi analisada por UPLC-MS/MS. O cromatograma obtido em 254 nm mostra um pico majoritário com tempo de retenção em 30,566 min (Figura 155). Os espectros de massas obtidos no modo positivo (ESI+) e as fragmentações MS/MS são mostradas na Figura 156.

Figura 155: Cromatograma do UPLC-DAD da substância **23** em 340 nm.

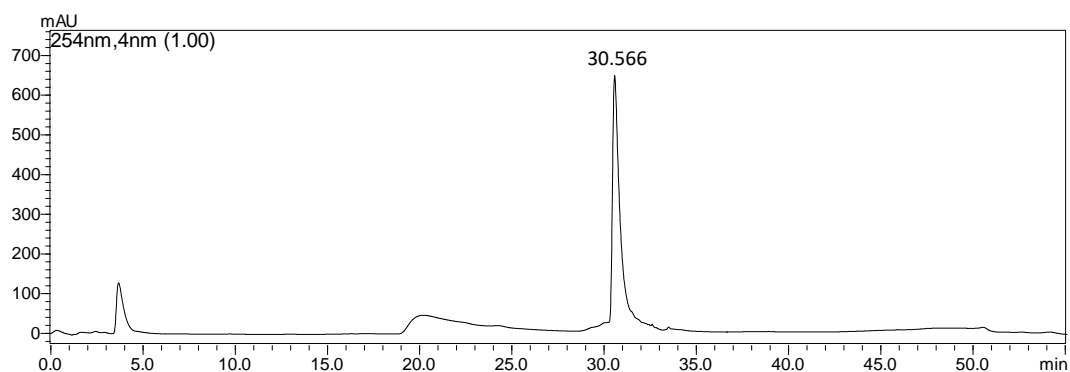
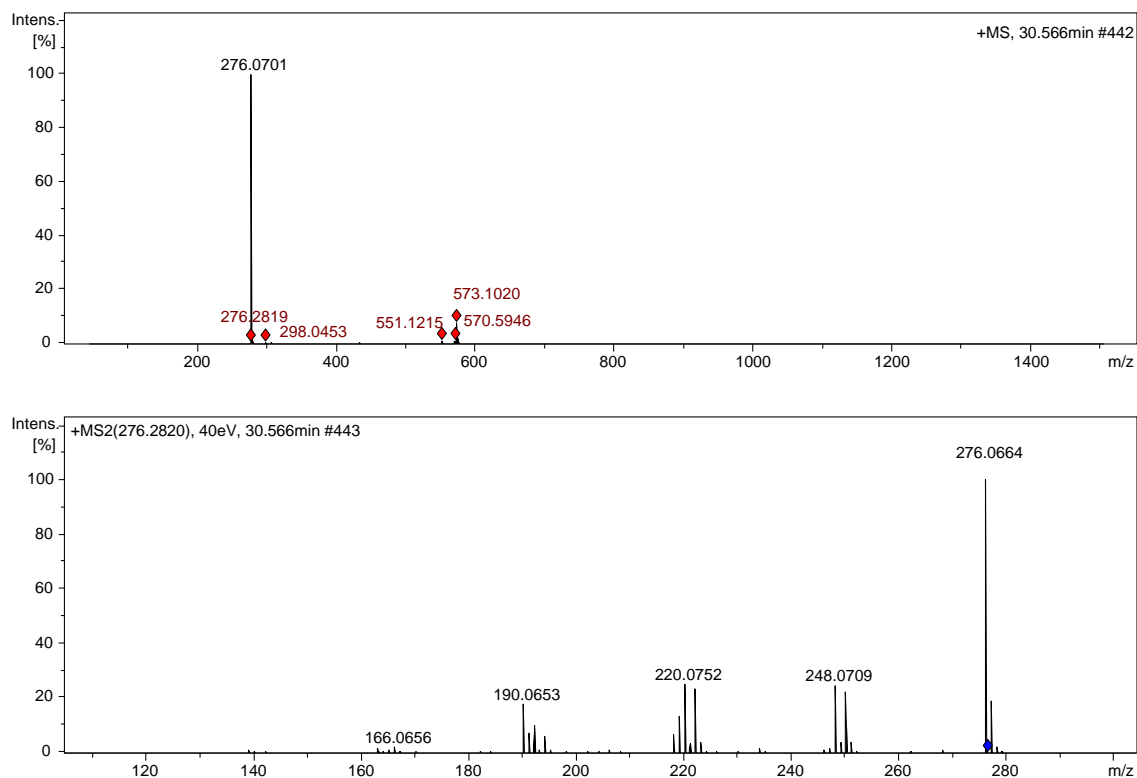
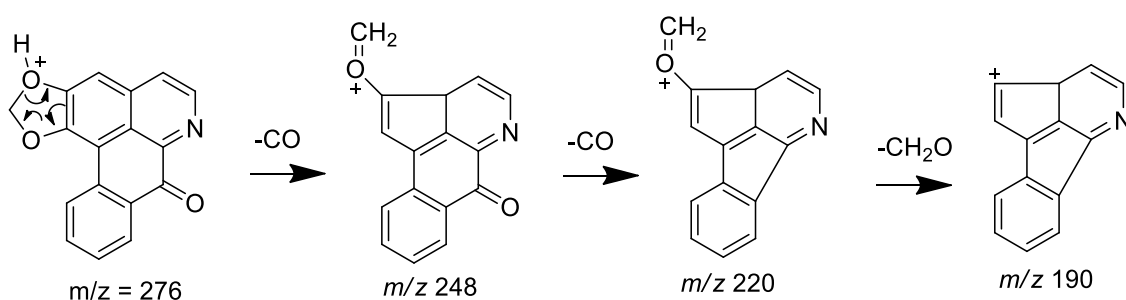


Figura 156: Espectros de massas no modo positivo (ESI+) e MS/MS do íon *quasi*-molecular em m/z 276.



O espectro de massas no modo positivo apresentou o pico do íon *quasi*-molecular em m/z 276 ($[M+H]^+$), consistente com a fórmula molecular $C_{17}H_9NO_3$, confirmando a proposta estrutural da liriodenina. Primeiro ocorre a formação do íon em m/z 248 que se refere a perda de 28u característico de CO. Em seguida, outra perda de 28u com a formação do m/z 220 também característico de CO, e por fim uma perda de 30u característico do grupo CH_2O com a formação do m/z 190 (Figura 187).

Figura 157: Proposta de fragmentação da substância **23**.



A liriodenina já foi isolada de diversos gêneros da família Annonaceae (LUCIO et al., 2015), e é considerada um marcador quimiotaxonômico da família Annonaceae e do gênero *Annona*, segundo Leboeuf et al. (1982).

5.5 Estudos Biológicos

Os resultados obtidos a partir das avaliações das atividades antineoplásica *in vitro*, antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* dos extratos e frações das folhas de *Annona dolabripetala* estão resumidas na Tabela 23.

De acordo com o estudo apresentado por Paes (2016) das folhas de *Annona dolabripetala*, não foi considerado relevante realizar nova avaliação antineoplásica com a célula U937 das frações em hexano e clorofórmio e extrato bruto. Portanto, foi avaliada apenas da fração em acetato de etila e flavonoídica pela aluna de doutorado Marina Barreto Silva do Centro de Biociências e Biotecnologia da UENF sob orientação do professor Milton Kanashiro.

As avaliações *in vivo* (antinociceptiva e anti-inflamatória) foram realizadas em parceria com o Laboratório de Farmacologia da UFRRJ. A aluna de doutorado Lilian Uchoa Carneiro sob orientação do professor Bruno Guimarães Marinho realizou os testes dos extratos e frações em parceria com o nosso grupo de pesquisa.

Tabela 23: Avaliações biológicas *in vitro* e *in vivo* do extrato bruto e frações das folhas de *Annona dolabripetala*.

Extratos/frações (códigos)	Antineoplásica (EC ₅₀ µg/mL)	Antinociceptiva		Anti-inflamatória edema de pata (% inibição)
		contorções abdominais (% inibição)	imersão da cauda*	
IADFE	-	66,83%	342,7%	70,7%
IADFEH	-	44,45%	134,27%	46,8%
IADFEC	-	40,29%	399,4%	55,5%
IADFEA	> 200	63,46%	62,7%	26,2%
IP-1-1-FFA	44,65 ± 1,12	51,88%	282,0%	34,2%

IADFE – extrato hidroalcoólico das folhas; IAFEH – fração em hexano das folhas; IADFC – fração em clorofórmio das folhas; IADFA – fração em acetato de etila das folhas; IP-1-1-1FFA – fração flavonoídica das folhas.

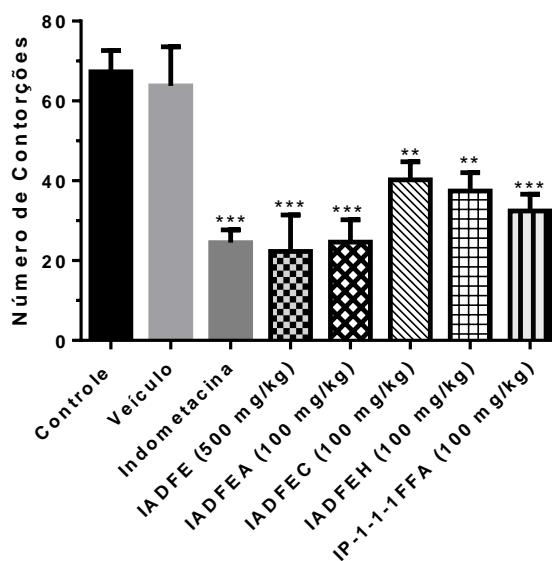
* porcentagem de aumento das curvas em relação ao grupo controle.

5.5.1 Avaliações das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*

5.5.1.1 Modelo de avaliação da atividade antinociceptiva por contorções abdominais induzidas por ácido acético

Por ser considerado o teste mais sensível, o modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi o primeiro realizado. O extrato hidroalcoólico das folhas (IADFE) e frações em hexano (IADFEH), clorofórmio (IADFEC), acetato de etila (IADFEA) e flavonoídica (IP-1-1-1FFA) de *Annona dolabripetala* foram testadas em comparação ao grupo controle. Observa-se na Figura 158 e Tabela 24 (p. 185) que todas as frações e extrato testadas apresentaram resultados significativos. O IADFE reduziu significativamente o número de contorções abdominais, em 66,83% ($22,33 \pm 9,1$), valor menor inclusive do que a indometacina que reduziu em 63,61% ($24,5 \pm 3,2$) em comparação ao grupo controle. A fração em acetato de etila (IADFEA) reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, em 63,46% ($24,6 \pm 5,6$), na mesma proporção que o controle positivo. As frações IP-1-1-1FFA, IADFEH e IADFEC reduziram em 51,88% ($32,4 \pm 4,2$), 44,45% ($37,4 \pm 4,4$) e 40,29% ($40,2 \pm 4,6$), o número de contorções abdominais, respectivamente.

Figura 158: Efeitos da administração oral prévia do extrato bruto e das frações das folhas da *Annona dolabripetala* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Os resultados estão expressos como média \pm EPM ($n = 6$) do número de contorções. A significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, indometacina, frações e extrato, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Tabela 24: Valores de média do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e a porcentagem de inibição em comparação ao grupo controle da indometacina, extrato e frações das folhas de *A. dolabripetala*.

Fração/Extrato	Número de contorções	Porcentagem de inibição
Controle	67,33 \pm 5,3	-
Veículo	63,8 \pm 9,8	-
Indometacina	24,5 \pm 3,2	63,61%
IADFE	22,33 \pm 9,1	66,83%
IADFEC	40,2 \pm 4,6	40,29%
IADFEA	24,6 \pm 5,6	63,46%
IADFEH	37,4 \pm 4,4	44,45%
IP-1-1-1FFA	32,4 \pm 4,2	51,88%

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ foram calculados entre o grupo controle e os grupos veículo, indometacina, extrato e frações por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

Esses resultados apresentados são inéditos na espécie *Annona dolabripetala*, embora outras espécies de *Annona* já tiveram seus extratos avaliados quanto a atividade antinociceptiva por contorções abdominais induzidas por ácido acético. A fração em hexano do extrato das folhas de *A. tomentosa* teve uma redução de 42% no número de contorções (CARNEIRO et al., 2017). O extrato etanólico das folhas de *A. muricata* reduziu em 53% o

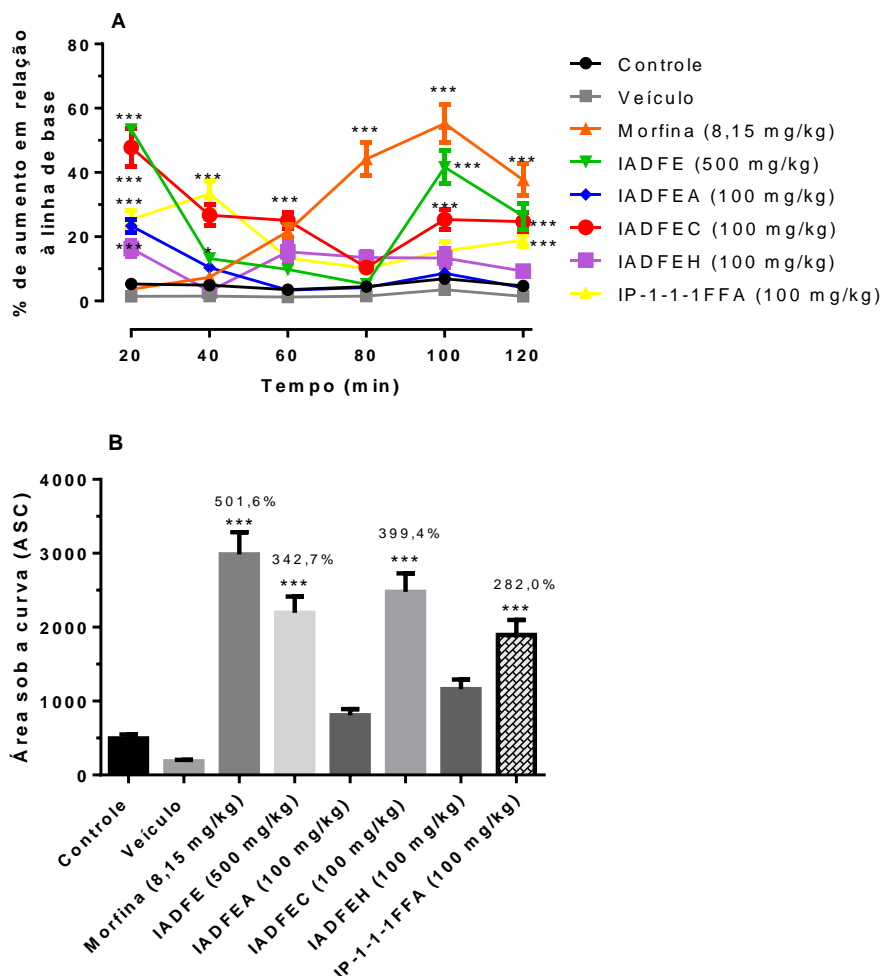
número de contorções (HAMID et al., 2012). Ishola et al. (2014) avaliaram o extrato aquoso dos frutos de *A. muricata* que foi capaz de reduzir em 30%. O extrato etanólico das folhas de atemoia reduziram em 63% (SILVA et al., 2017). O extrato metanólico das folhas de *A. reticulata* inibiram em 55% (ISLAM et al., 2012). O extrato etanólico das folhas de *A. muricata* no estudo de Sousa et al. (2010) não apresentou inibição. O extrato etanólico das folhas de *A. vepretorum* reduziu em 92% o número de contorções abdominais, melhor resultado da literatura, todos comparados na mesma dose de 100 mg/kg (SILVA et al., 2015a).

5.5.1.2 Modelo de avaliação da atividade antinociceptiva por imersão de cauda em água quente

O modelo de retirada de cauda por imersão em água quente tem como objetivo detectar se a amostra usada apresenta atividade antinociceptiva central, portanto, é um teste mais específico do que o de contorções abdominais. O extrato bruto e frações foram testadas, a fim de aprofundar o entendimento de suas ações antinociceptivas. Na Figura 159 e Tabela 25 (p. 187) é possível observar que as frações em acetato de etila (IADFEA) em hexano (IADFEH) não apresentaram um efeito significativo em relação ao grupo controle.

O extrato bruto (IADFE) na dose de 500 mg/kg, aumentou o tempo de latência de retirada de cauda imersa em água quente nos tempos de 20, 100 e 120 minutos. A fração em clorofórmio (IADFEC) na dose 100 mg/kg, aumentou significativamente o tempo de latência da retirada de cauda nos tempos de 20, 60, 100 e 120 minutos após a administração. A fração em hexano (IADFEH) na dose de 100 mg/kg, apresentou efeito significativo nos tempos de 20 e 60 minutos. Já a fração flavonoídica (IP-1-1-1FFA) na dose de 100 mg/kg, aumentou significativamente o tempo de latência da retirada de cauda nos tempos de 20, 40 e 120 minutos após a administração da fração. Todos os extratos e frações foram comparados em relação ao grupo controle.

Figura 159: Efeitos da administração oral prévia do extrato e frações, controle, veículo e morfina no modelo de imersão da cauda em água quente.



Os resultados estão expressos como média \pm EPM ($n = 6$) da % de aumento em relação à linha de base. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva. A significância estatística (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$) foi calculada entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina, extrato e frações, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni (A) e One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni (B).

Tabela 25: Valores calculados em % do tempo de latência do extrato e frações das folhas de *A. dolabripetala*.

Tratamento	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	5,3 \pm 0,5	4,9 \pm 0,8	3,5 \pm 0,9	4,5 \pm 1,0	6,9 \pm 0,8	4,7 \pm 0,4
Veículo	1,45 \pm 1,1	1,54 \pm 1,0	1,22 \pm 1,1	1,52 \pm 0,5	3,54 \pm 1,1	1,41 \pm 0,8
Morfina	3,65 \pm 0,5	7,38 \pm 1,0	21,68 \pm 2,0***	44,21 \pm 5,1***	55,24 \pm 6,2***	37,68 \pm 5,0***
IADFE	53,4 \pm 1,1***	13,2 \pm 1,0*	9,8 \pm 0,9	5,2 \pm 0,5	41,7 \pm 5,1***	26,4 \pm 4,0***
IADFEC	47,8 \pm 6,0***	26,7 \pm 3,2***	25,1 \pm 2,5***	10,4 \pm 1,0	25,4 \pm 3,1***	24,7 \pm 3,0***
IADFEA	23,4 \pm 2,1***	10,4 \pm 0,8	3,4 \pm 0,3	4,2 \pm 0,5	8,6 \pm 0,9	4,1 \pm 0,5
IADFEH	16,3 \pm 2,3*	3,1 \pm 0,4	15,3 \pm 3,3*	13,5 \pm 2,2	13,4 \pm 3,1	9,3 \pm 1,6
IP-1-1-1FFA	25,4 \pm 2,6***	33,4 \pm 4,1***	13,4 \pm 2,0	10,2 \pm 1,5	15,6 \pm 3,0	18,9 \pm 1,9***

Esses resultados de avaliação de atividade antinociceptiva das folhas de *Annona dolabripetala* são inéditos para a espécie, embora seja encontrado na literatura avaliações da atividade antinociceptiva pelo modelo de retirada de cauda com espécies do gênero *Annona*. Carneiro et al. (2017) relata que a fração em hexano das folhas de *A. tomentosa* apresentou um efeito mais significativo que a morfina como controle positivo. Hamid et al. (2012) observaram efeito significativo do extrato etanólico das folhas de *A. muricata* nas doses de 100 e 300 mg/kg. Ishola et al. (2014) avaliaram o extrato aquoso dos frutos de *A. muricata* e observaram efeito significativo na dose de 200 mg/kg. Do extrato hidroalcoólico das folhas de *A. crassiflora*, Oliveira et al. (2019) não obtiveram resultado significativo. O extrato etanólico das folhas de *A. vepretorum* apresentou resultado significativo nas doses de 25 e 100 mg/kg (SILVA et al., 2015a). O extrato etanólico das folhas de atemoia nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg mostraram efeito significativo no teste de retirada de cauda (SILVA et al., 2017).

Logo, esses resultados ressaltam o efeito antinociceptivo central observado nos extratos de espécies de *Annona* e aumenta o interesse em avaliar o potencial biológico desse táxon.

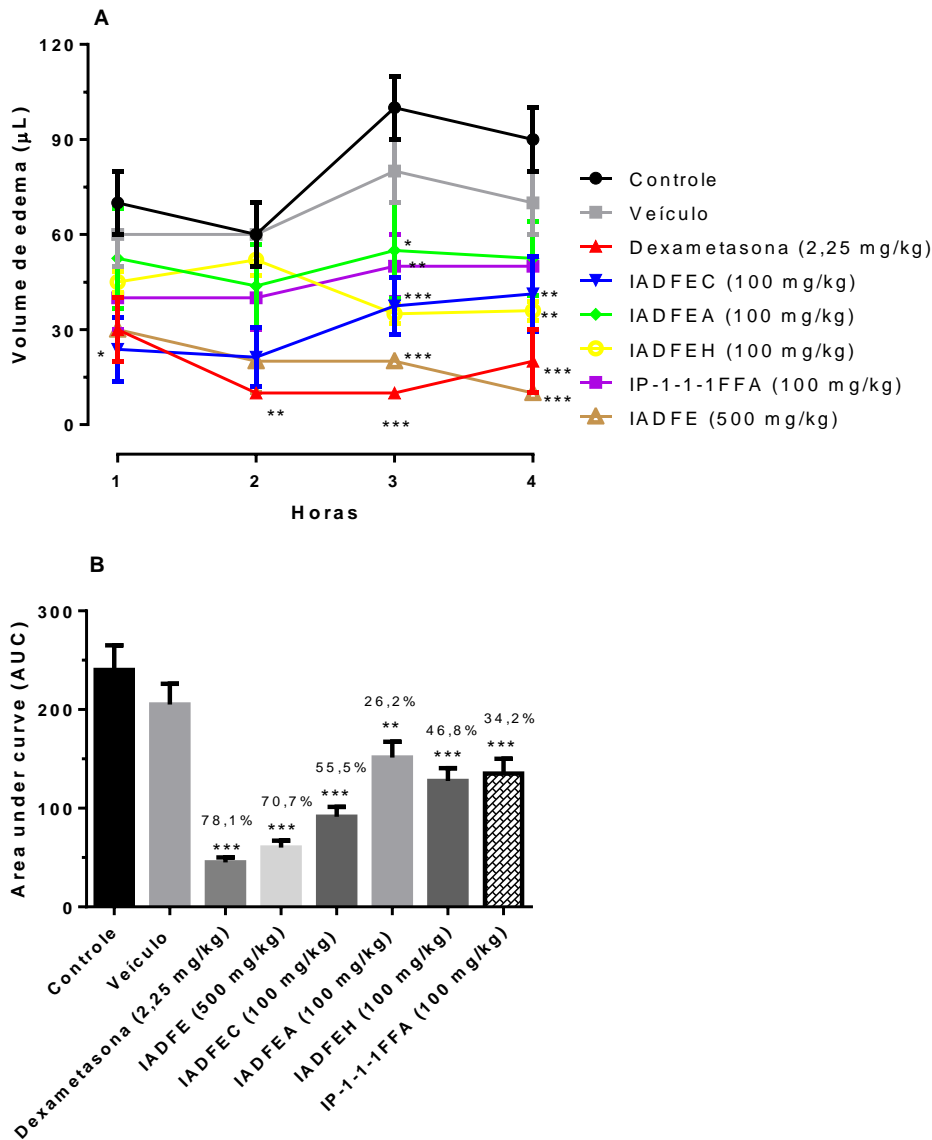
5.5.1.3 Modelo de avaliação da atividade anti-inflamatória do edema da pata

Esse modelo tem como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória sobre o edema de pata induzido por carragenina (Figura 160, p. 189), tendo como controle positivo a dexametasona. Nesse modelo, o extrato bruto (IADFE) na dose de 500 mg/kg e as frações em acetato de etila (IADFEA), clorofórmio (IADFEC), flavonoídica (IP-1-1-1FFA) e hexano (IADFEH) na dose de 100 mg/kg das folhas de *A. dolabripetala* foram testadas.

Na Figura 160 é possível observar que o efeito mais significativo de *A. dolabripetala* comparado ao grupo controle foi do extrato bruto (IADFE), que mostrou eficácia em inibir em 70,7% o edema de pata induzido por carragenina. A fração IADFEC foi eficaz em inibir o edema de pata na medida de 1, 3 e 4h e

o extrato IADFE na medida de 3 e 4h. Na medida de 3h, as frações IADFEC, IADFEA, IADFEH e IP-1-1-1FFA foram capazes de inibir o edema. Já no tempo de 4h, apenas IADFEC e IADFEH foram eficazes (Tabela 26, p. 190).

Figura 160: Efeito da administração oral prévia do extrato e frações no modelo de edema de pata induzido por carragenina.



Em A, os animais foram pré-tratados oralmente com água destilada, veículo, dexametasona, extrato e frações. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva. A carragenina foi aplicada na pata esquerda traseira dos animais em todos os grupos e a diferença de volume foi feita em comparação com a pata direita traseira que recebeu água destilada. Os resultados estão expressos como média + E.P.M. (n = 6) do volume de edema de pata. A significância estatística (*p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona, extrato e frações, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni (A) e One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni (B).

Tabela 26: Efeito das frações e do extrato das folhas da *Annona dolabripetala* no modelo de edema de pata induzido por carragenina.

Tratamentos	1h	2h	3h	4h
Controle	70,0 ± 10,0	61,4 ± 10,0	101,0 ± 10,0	92,4 ± 10,0
Veículo	60,0 ± 10,0	62,3 ± 10	81,4 ± 10	71,5 ± 10,0
Dexametasona	31,2 ± 10,0	11,0 ± 0,01**	10 ± 0,01***	20,0 ± 10,0***
IADFE	30,4 ± 10,1	20,4 ± 10,0	20,3 ± 0,1***	10,2 ± 0,01***
IADFEC	23,75 ± 9,99*	21,25 ± 9,34	37,5 ± 9,01***	41,25 ± 11,87**
IADFEA	52,5 ± 15,78	43,75 ± 13,22	55,0 ± 15,12*	52,5 ± 11,61
IADFEH	45,0 ± 3,2	52,0 ± 5,0	35,0 ± 3,0***	36,0 ± 3,0**
IP-1-1-1FFA	40,5 ± 11,2	41,7 ± 12,1	52,4 ± 11,3**	50,0 ± 0,01

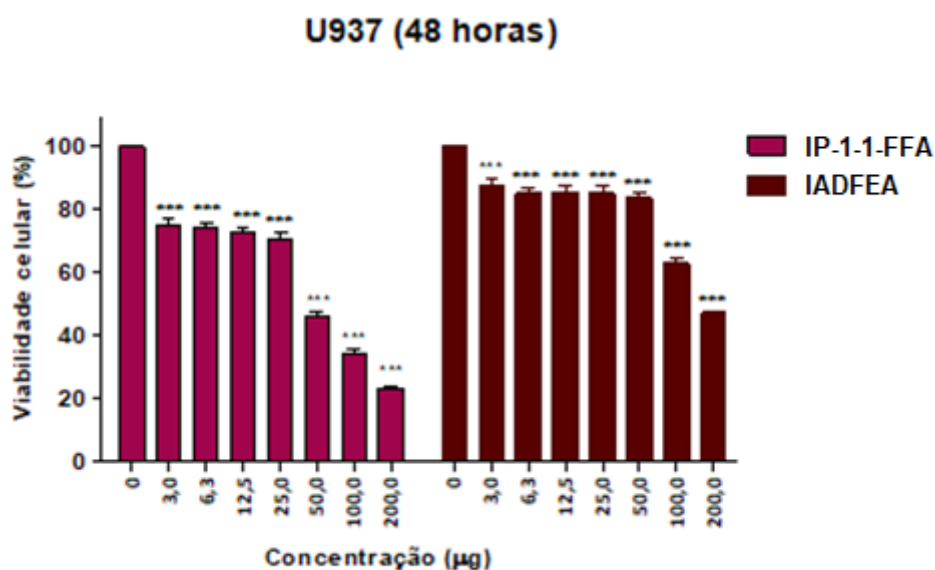
Os resultados apresentados para *Annona dolabripetala* são significativos em vista do número reduzido de trabalhos na literatura da avaliação anti-inflamatória, através do modelo de edema de pata em espécies do gênero *Annona*. Na literatura foram encontrados quatro estudos que relatam a capacidade de inibição de edema de pata dos extratos das folhas de *A. tomentosa*, *A. vepretorum* e *A. muricata* (POMA et al., 2011; SOUSA et al.; 2010); SILVA et al., 2015a; CARNEIRO et al., 2017).

5.5.2 Avaliação da atividade antineoplásica *in vitro*

As frações em acetato de etila (IADFEA) e flavonoídica (IP-1-1-1FFA) das folhas de *A. dolabripetala* tiveram sua viabilidade celular avaliadas pelo ensaio com MTT frente a linhagem celular de linfoma histiocítico U937. Verificou-se que IP-1-1-1FFA apresentou melhor resultado, sendo capaz de reduzir a viabilidade celular após 48 horas de incubação com uma concentração efetiva que inibe em 50% o crescimento celular (CI_{50}) em $44,65 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$, enquanto IADFEA apresentou $CI_{50} > 200 \mu\text{g/mL}$ (Figura 161).

De acordo com Suffness e Pezzutto, (1990) para extratos de plantas serem consideradas significativas quanto ao seu potencial citotóxico, o valor de CI_{50} deverá ser $\leq 20,0 \mu\text{g/mL}$. O que torna o resultado da fração flavonoídica uma atividade moderada.

Figura 161: Avaliação do efeito citotóxico de IP-1-1-1FFA e IADFEA frente as células neoplásicas da linhagem U937 (linfoma histiocítico), após 48 horas de incubação.



* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, valores estatisticamente significativos.

Não foram avaliadas as frações em hexano e clorofórmio, já que Paes (2016) cita em seu trabalho de doutorado a avaliação dessas frações com $CI_{50} > 200,0$ para a fração em hexano e $CI_{50} 77,29 \pm 1,16 \mu\text{g/mL}$ para a fração em clorofórmio na mesma linhagem celular.

O único trabalho encontrado na literatura do gênero *Annona* e mesma linhagem celular U937 foi de Osorio et al. (2007) que avaliaram a atividade citotóxica do extrato em acetato de etila das folhas de *A. muricata* e mostrou alta citotoxicidade com $CI_{50} 7,8 \pm 0,3 \mu\text{g/mL}$. Ressaltamos que há interesse em avaliar a atividade antineoplásica *in vitro* dos flavonoides desse trabalho, visto que de acordo com nossa revisão bibliográfica, não há estudos direcionados aos flavonoides de *Annona* quanto a avaliação citotóxica.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise da fração em hexano das folhas de *Annona dolabripetala* Raddi por cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, identificou dezesseis substâncias voláteis (**1-16**) como ácidos graxos, ésteres, cetona e esteroides, comparadas com as substâncias identificadas pela biblioteca de espectros de massas NIST com índice de similaridade maior que 80%. A partir de processos cromatográficos de isolamento usando colunas cromatográficas a pressão normal, foram isolados os flavonoides quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose (**17**), kaempferol-3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- α -L-arabinopiranosose (**18**), quercetina-3-O-arabinosídeo (**19**), kaempferol-3- β -D-(6-O-*trans-p*-coumaroil)-glicopiranosídeo (**20**), quercetina 3-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- α -L-arabinopiranosose (**21**) e kaempferol-3-O-[3",6"-di-O-*p*-coumaroil]- β -D-galactopiranosídeo (**22**). Além dos flavonoides, foi isolado também o alcaloide lirioidenina (**23**), marcador quimiotaxonômico do gênero *Annona* e da família Annonaceae. Todos os flavonoides e alcaloide foram isolados pela primeira vez na espécie *Annona dolabripetala*.

Foram avaliados o potencial biológico do extrato bruto, das frações em hexano, clorofórmio, acetato de etila e flavonoídica das folhas de *A. dolabripetala*. Na avaliação da atividade antinociceptiva, o extrato bruto foi capaz de inibir em 66,83% o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e aumentou significativamente o tempo de latência no modelo de retirada de cauda em água quente. A fração em acetato de etila e flavonoídica inibiram em 63,46% e 51,88%, respectivamente, o número de contorções abdominais em relação ao controle negativo. No modelo de imersão de cauda em água quente a fração em clorofórmio apresentou resultados mais significativos. Quanto a avaliação anti-inflamatória no modelo de edema de pata induzida por carragenina, o extrato bruto foi capaz de inibir em 70,7% em relação ao controle negativo. A fração em hexano não apresentou atividade significativa em nenhum dos modelos testados. Na avaliação antineoplásica com a linhagem celular de linfoma histiocítico U937 a fração flavonoídica apresentou resultado moderado

com CI_{50} $44,65 \pm 1,12 \mu\text{g/mL}$. As avaliações biológicas são descritas pela primeira vez na espécie *Annona dolabripetala*.

7. REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, M. R.; LIMA, J. A.; SANTOS, N. P.; PINTO, A. C. Pereirina: o primeiro alcaloide isolado no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 942–952, 2009.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. **Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications**. CRC Press, 1 ed., v. 45, 2006.
- ARAUJO, R. C. P.; NEVES, F. A. R.; FORMAGIO, A. S. N.; KASSUYA, C. A. L.; STEFANELLO, M. E. A.; SOUZA, V. V.; PAVAN, F. R.; CRODA, J. Evaluation of the anti-mycobacterium tuberculosis activity and in vivo acute toxicity of *Annona sylvatic*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14, n. 209, p. 1–10, 2014.
- ARRUDA, H. S.; PEREIRA, G. A.; MORAIS, D. R.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. M. Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Chemistry**, v. 245, p. 738–749, 2018.
- BARBOSA, L. T. C.; VEGA, M. R. G. Diterpenos do gênero *Xylopia*. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, p. 1712–1733, 2017.
- BARRECA, D.; LAGANÀ, G.; FICARRA, S.; TELLONE, E.; LEUZZI, U.; GALTIERI, A.; BELLOCCO, E. Evaluation of the antioxidant and cytoprotective properties of the exotic fruit *Annona cherimola* Mill. (Annonaceae). **Food Research International**, v. 44, p. 2302–2310, 2011.
- BASKARAN, R.; PULLENCHERI, D.; SOMASUNDARAM, R. Characterization of free, esterified and bound phenolics in custard apple (*Annona squamosa* L) fruit pulp by UPLC-ESI-MS / MS. **Food Research International**, v. 82, p. 121–127, 2016.
- BATUBARA, I.; ACHMADI, S. S.; NURWENDARI, W. Extraction technique to separate kaempferol from Soursop (*Annona muricata*) leaves. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 9S, p. 106–110, 2015.
- BEN-BASSAT, J.; PERETZ, E.; SULMAN, F. G. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method. **Archs. Int. Pharmacodyn. Ther.**, v. 122, p. 434–447, 1959.
- BERMEJO, A.; FIGADÈRE, B.; ZAFRA-POLO, M. C.; BARRACHINA, I.; ESTORNELL, E.; CORTES, D. Acetogenins from Annonaceae: recent progress in isolation, synthesis and mechanisms of action. **Natural product reports**, v. 22, p. 269–303, 2005.
- BERNARDES, L. S. C.; LANG, K. L.; PETROVICK, P. R.; SCHENKEL, E. P. **Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre. p. 486, 2017.

BYNG, JAMES W.; CHASE, M. W.; CHRISTENHUSZ, M. J. M.; FAY, M. F.; JUDD, W. S.; SOLTIS, D. E.; MABBERLEY, D. J.; SENNIKOV, A. N.; SOLTIS, P. S.; STEVENS, P. F. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 181, n. 1, p. 1–20, 2016.

CAMPOS, M. G. **Atividade Antimelanótica de compostos fenólicos e extratos hidroalcoólicos de Inga Subnuda e *Rollinia dolabripetala* e ação antibacteriana e antioxidante.** Dissertação. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2013.

CARBALLO, A. I.; MARTÍNEZ, A. L.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; PELLICER, F.; VENTURA-MARTÍNEZ, R.; DÍAZ-REVAL, M. I.; LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 95, n. 1, p. 6–12, 2010.

CARNEIRO, L. U.; SILVA, I. G.; SOUZA, M. E. A.; CÔRTEZ, W. S.; CARVALHO, M. G.; MARINHO, B. G. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of leaf extracts from *Annona tomentosa* R. E. Fr. **Journal of Integrative Medicine**, v. 15, n. 5, p. 379–387, 2017.

CARNEIRO, L. U. **Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos metanólicos da *Annona Tomentosa* R.E.Fr.** Dissertação. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2017.

CHAI, W.; LIN, M.; WANG, Y.; XU, K.; HUANG, W.; PAN, D.; ZOU, Z.; PENG, Y. Inhibition of tyrosinase by cherimoya pericarp proanthocyanidins: Structural characterization, inhibitory activity and mechanism. **Food Research International**, v. 100, p. 731–739, 2017.

CHANG, F.; WEI, J.; TENG, C.; WU, Y. Antiplatelet Aggregation Constituents from *Annona purpurea*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 12, p. 10–14, 1998.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, R.; MOLS, J. B.; MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. 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, p. 5–40, 2012.

CIOLA, R. **Fundamentos da cromatografia a líquido de alto desempenho: HPLC.** São Paulo: Blucher, 1998.

CORIA-TÉLLEZ, A. V.; MONTALVO-GÓNZALEZ, E.; YAHIA, E. M.; OBLENDO-VÁZQUEZ, E. N. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 11, p. 662–691, 2018.

COSTA, E. V. **Estudo Fitoquímico e atividades biológicas de *Guatterioopsis Blepharophylla*, *Guatterioopsis Fresiana* e *Guatterioopsis Hispida* (Annonaceae).** Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2009.

COUVREUR, T. L. P.; NIANGADOUMA, R.; SONKÉ, B.; SAUQUET, H. *Sirdavidia*, an extraordinary new genus of Annonaceae from Gabon. **PhytoKeys**, v. 19, n. 46, p. 1–19, 2015.

CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Espectrometria de massas com ionização por “electrospray”: processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 287–292, 2006.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 39, n. 1, p. 1–15, 2004.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3. ed. [s.l.] John Wiley & Sons, 2009.

DÍAZ-DE-CERIO, E. AGUILERA-SAEZ, L. M.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; VERARDO, V.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; FERNÁNDEZ, I.; ARRÁEZ-ROMÁN, D. Characterization of bioactive compounds of *Annona cherimola* L. leaves using a combined approach based on HPLC-ESI-TOF-MS and NMR. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, 2018.

DOMON, B.; COSTELLO, C. E. A Systematic Nomenclature for Carbohydrate Fragmentations in FAB-MS/MS Spectra of Glycoconjugates. **Glycoconjugate J.**, v. 5, p. 397–409, 1988.

DOS SANTOS, G. C. M.; FERNANDES, R. D.; BARROS, T. R.; ABREU, H. S.; SUZART, L. R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R.; MARINHO, B. G. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the methanolic extract from the stem bark of *Lophantera lactescens*. **Planta Médica**, v. 81, n. 18, p. 1688-1696, 2015.

DUTRA, S. M.; SALIMENA, R. G.; NETO, L. M. Annonaceae na Serra Negra, Minas Gerais, Brazil. **Rodriguésia**, v. 63, n. 4, p. 785–793, 2012.

FALÉ, P. L.; FERREIRA, C.; MARUZZELLA, F.; FLORÊNCIO, M. H.; FRAZÃO, F. N.; SERRALHEIRO, M. L. M. Evaluation of cholesterol absorption and biosynthesis by decoctions of *Annona cherimola* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 718–723, 2013.

FARIAS, E. X. **Estudo do potencial citotóxico dos metabólitos secundários isolados do fungo marinho *Paecilomyces lilacinus* recuperados de sedimentos da costa cearense**. Dissertação. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, 2014.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, ed 5, p. 904, v. 2, 2010.

FERRAZ, C. R.; SILVA, D. B.; PRADO, L. C. S.; CANABRAVA, H. A. N.; BISPO-DA-SILVA, L. B. Antidiarrhoeic effect and dereplication of the aqueous extract of *Annona crassiflora* (Annonaceae). **Natural Product Research**, p. 1–5, 2017.

FERREIRA, F. S., BRITO, S. V., SARAIVA, R. A., ARARUNA, M. K. A., MENEZES, I. R. A., COSTA, J. G. M., COUTINHO, H. D. M., ALMEIDA, W. O., ALVES, R. R. N. Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard

Tupinambis merianae. **J. Ethnopharmacol.** v. 130, p. 514–520. 2010.

FLORA DO BRASIL. **Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.**, 2019. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br>>

FORMAGIO, A. S. N.; KASSUYA, C. A. L.; NETO, F. F.; VOLOBUFF, C. R. F.; IRIGUCHI, E. K. K.; VIEIRA, M. C.; FOGLIO, M. A. The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St . Hill. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 14, p. 1–8, 2013.

FORMAGIO, A. S. N.; VIEIRA, M. C.; VOLOBUFF, C. R. F.; SILVA, M. S.; MATOS, A. L.; CARDOSO, C. A. L.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E. In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 48, n. 8, p. 308–315, 2015.

GAJALAKSHMI, S.; DIVYA, R.; DEEPIKA, V. D.; MYTHILI, S.; SATHIAVELU, A. Pharmacological activities of *Annona squamosa*: a review. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 10, n. 2, p. 24–29, 2011.

GARCÍA-SALAS, P.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M.; MORALES-SOTO, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Identification and quantification of phenolic and other polar compounds in the edible part of *Annona cherimola* and its by-products by HPLC-DAD-ESI-QTOF-MS. **Food Research International**, v. 78, p. 246–257, 2015.

GEORGE, V. C.; KUMAR, D. R. N.; RAJKUMAR, V.; SURESH, P. K.; KUMAR, R. A. Quantitative Assessment of the relative antineoplastic potential of the n-butanolic leaf extract of *Annona muricata* Linn. in normal and immortalized human cell lines. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, p. 699–704, 2012.

GEORGE, V. C.; KUMAR, D. R. N.; SURESH, P. K.; KUMAR, R. A. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **J Food Sci Technol**, v. 52, n. 4, p. 2328–2335, 2015.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. M. B. Químico-biologia quantitativa: um novo paradigma?. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2105–2114, 2012.

GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, C.; ANDRADE, P. B. HPLC-DAD analysis and in vitro enzyme inhibition: An integrated approach to predict herbal binary mixture behaviour employing median effect equation. **Microchemical Journal**, v. 119, p. 176–182, 2015.

GROTEWOLD, E. **The Science of Flavonoids**. Ohio, USA, Springer, 273p. 2006.

HALABALAKI, M.; URBAIN, A.; PASCHALI, A.; MITAKOU, S.; TILLEQUIN, F.; SKALTSOUNIS, A. Quercetin and Kaempferol 3-O-[α -L-Ramnopyranosyl-(1-2)- α -L-arabinopyranoside]-7-O- α -L-ramnopyranosides from *Anthyllis hermanniae*: Structure Determination and Conformational Studies. **Journal of Natural Medicines**, v. 74, p. 1939–1945, 2011.

HAMID, R. A.; FOONG, C. P.; AHMAD, Z.; HUSSAIN, M. K. Antinociceptive and

anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 630–641, 2012.

HARBONE, J. B.; MABRY, T. J.; MABRY, H. **The flavonoids**. New York: Academic Press, 1975.

HARBONE, J. B.; MABRY, T. J. **The flavonoids: Advances in Research**, University Press, Cambridge, 1982.

ISHOLA, I. O.; AWODELE, O.; OLUSAYERO, A. M.; OCHIENG, C. O. Mechanisms of Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) Fruit Extract in Rodents. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, n. 12, p. 1375–1382, 2014.

ISLAM, M. R.; RAHMAN, S. M.; AHMED, M.; DAS, P. R.; ISLAM, M. T.; KABIR, M. H.; AHMED, I.; RAHMATULLAH, M. Antinociceptive activity studies with methanol extract of *Annona reticulata* L. (Annonaceae) and *Carissa carandas* L. (Apocynaceae) leaves in Swiss albino mice. **Advances in Natural and Applied Sciences**, v. 6, n. 8, p. 1313–1318, 2012.

JAMKHANDE, P. G.; WATTAMWAR, A. S. *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 5, n. 3, p. 144–152, 2015.

JIMÉNEZ, V. M.; GRUSCHWITZ, M.; SCHWEIGGERT, R. M.; CARLE, R.; ESQUIVEL, P. Identification of phenolic compounds in soursop (*Annona muricata*) pulp by high-performance liquid chromatography with diode array and electrospray ionization mass spectrometric detection. **Food Research International**, v. 65, p. 42–46, 2014.

JUNIOR, J. G. A. S.; COUTINHO, H. D. M.; BORIS, T. C. C.; CRISTO, J. S.; PEREIRA, N. L. F.; FIGUEIREDO, F. G.; CUNHA, F. A. B.; AQUINO, P. E. A.; NASCIMENTO, P. A. C.; MESQUITA, F. J. C.; MOREIRA, P. H. F.; COUTINHO, S. T. B.; SOUZA, I. T.; TEIXEIRA, G. C.; FERREIRA, N. M. N.; FARINA, E. O.; TORRES, C. M. G.; HOLANDA, V. N.; PEREIRA, V. S.; GUEDES, M. I. F. Chemical characterization and cytoprotective effect of the hydroethanol extract from *Annona coriacea* Mart. (Araticum). **Pharmacognosy Research**, v. 8, n. 4, p. 253–257, 2016.

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; SILVA, N. M.; SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, A.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, v. 69, p. 167–182, 2016.

JUSTINO, A. B.; MIRANDA, N. C.; FRANCO, R. R.; MARTINS, M. M.; SILVA, N. M.; ESPINDOLA, F. S. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against α -amylase, α -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83–92, 2018.

KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; ROCHA, M. E. N.; MARQUES, A. M.; SANTOS, P. R. D. Panorama quimiosistemático em Annonaceae. In: ALMEIDA,

J. R. G. S.; JÚNIOR, R. G. O.; OLIVEIRA, A. P. (Eds.). **Annonaceae: tópicos selecionados**. 1. ed. Curitiba: CRV, 2015. p. 550.

KIM, G.; TRAN, N. K. S.; CHOI, E.; SONG, Y.; SONG, J.; SHIM, S.; PARL, T. Immunomodulatory Efficacy of Standardized *Annona muricata* (Graviola) Leaf Extract via Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways in RAW 264 . 7 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE-BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412–417, 1959.

KOTKAR, H. M.; MENDKI, P. S.; SADAN, A. V. G. S.; JHA, S. R.; UPASANI, S. M.; MAHESHWARI, V. L. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 1, p. 33–37, 2002.

KUMAZAWA, S.; IKENAGA, M.; USUI, Y.; KAJIYA, K.; MIWA, S.; ENDO, J.; CHIKASAWA, C.; SUZUKI, Y.; SUZUKI, Y.; SHIMOI, K.; NAKAYAMA, T. Comprehensive analysis of polyphenols in fruits consumed in Japan. **Food Sci. Technol. Res.**, v. 13, n. 4, p. 404–413, 2007.

LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA PLANTAS VASCULARES. **Annonaceae Juss.**, 2019. Disponível em: <http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/annonaceae.html>

LAGE, G. A.; MEDEIROS, F. S.; FURTDON, W. L.; TAKAHASHI, J. A.; FILHO, J. D. S.; PIMENTA, L. P. S. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, n. 11, p. 808–811, 2014.

LALL, N.; KISHORE, N.; BODIBA, D.; MORE, G.; TSHIKALANGE, E.; KIKUCHI, H.; OSHIMA, Y. Alkaloids from aerial parts of *Annona senegalensis* against *Streptococcus mutans*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 16, p. 1944–1947, 2017.

LANÇAS, F. M. A Cromatografia Líquida Moderna e a Espectrometria de Massas: finalmente "compatíveis"? **Scientia Chromatographica**, v. 1, n. 2, p. 35–61, 2009.

LEBOEUF, M.; CAVÉ, A.; BHAUMIK, P. K.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The Phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, p. 2783–2813, 1982.

LENCINA, C.; PIRES, V. S.; GOSMANN, G.; TAKETA, A. T. C.; SCHENKEL, E. P. Tilirosídeo em *Croton gnaphalii* Ball. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 11, n. 2, p. 89–93, 2011.

LOPES, J. D. E. C.; MELLO-SILVA, R. **Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil 1**. Palestra Anonáceas - V Congresso Internacional & Encontro Brasileiro sobre Annonaceae: do gene à exportação. **Anais...Botucatu**: 2014

LUCIO, A. S. S. C.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LEITÃO-DA-CUNHA, E. V.;

TAVARES, J. F.; FILHO, J. M. B. **Alkaloids of the Annonaceae**: Occurrence and a compilation of their biological activities. In: KNOLKER, H.-J. (Ed.). *The Alkaloids*. Elsevier, 2015. p. 233–409.

MA, Y. L.; LI, Q. M.; VAN DEN HEUVEL, H.; CLAEYS, M. Characterization of Flavone and Flavonol Aglycones by Collision-induced Dissociation Tandem Mass Spectrometry. **Rapid Communications in mass spectrometry**, v. 11, p. 1357–1364, 1997.

MACHADO, A. R. T.; LAGE, G. A.; MEDEIROS, F. S.; SOUZA FILHO, J. D.; PIMENTA, L. P. S. Quantitative analysis of trigonelline in some *Annona* species by proton NMR spectroscopy. **Natural Products and Bioprospecting**, v. 3, n. 4, p. 158–160, 2013.

MALDANER, L.; CRISTINA, I.; FONTES, S. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v. 4, n. 3, p. 197–207, 2012.

MANCINI, S.; NARDO, L.; GREGORI, M.; RIBEIRO, I.; MANTEGAZZA, F.; DELERUE-MATOS, C.; MASSERINI, M.; GROSSO, C. Functionalized liposomes and phytosomes loading *Annona muricata* L. aqueous extract: Potential nanoshuttles for brain-delivery of phenolic compounds. **Phytomedicine**, v. 42, p. 233–244, 2018.

MARINHO, B. G.; MIRANDA, L. S. M.; MEIRELES, B. A.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; MATHEUS, M. E.; PEREIRA, V. L. P.; FERNANDES, P. D. Antinociceptive activity of (–)-(2S,6S)-(6-ethyltetrahydropyran-2-yl)-formic acid on acute pain in mice. **Behavioural Pharmacology**, p. 22:564–572, 2011.

MARKHAM, K. R.; TERNAJ, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids-III naturally occurring flavonoids glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, n. 9, p. 1389–1397, 1978.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016. **Uso de fitoterápicos e plantas medicinais cresce no SUS**. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/noticias/agencia-saude/24205-uso-de-fitoterapicos-e-plantas-medicinais-cresce-no-sus>>.

MOGHADAMTOUSI, S. Z.; FADAEINASAB, M.; NIKZAD, S.; MOHAN, G.; ALI, H. M.; KADIR, H. A. *Annona muricata* (Annonaceae): A review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 15625–15658, 2015.

MONCADA, A.; CENDÁN, C. M.; BAEYENS, J. M.; POZO, E. D. Effects of serine/threonine protein phosphatase inhibitors on morphine-induced antinociception in the tail flick test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 465, n. 1–2, p. 53–60, 2003.

MOON, S. S.; RAHMAN, M. A. A.; MANIR, M. M.; AHAMED, V. S. J. Kaempferol glycosides and cardenolide glycosides, cytotoxic constituents from the seeds of *Draba nemorosa* (Brassicaceae). **Archives of Pharmacal Research**, v. 33, n. 8, p. 1169–1173, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NASCIMENTO, M. C. B. S. **Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades**. Tese. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008.

NEHME, C. J.; BASTOS, W. L.; ARAÚJO, A. J.; CAVALHEIRO, A. J. An HPLC-PAD Method to Analyse Flavonoid Glycosides and Styrylpyrones from *Cryptocarya* Species (Lauraceae). **Phytochemical Analysis**, v. 16, p. 93–97, 2005.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461–477, 2007.

NOVAES, P.; FERREIRA, M. J. P.; SANTOS, D. Y. A. C. Flavonols from *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 78, n. November 2017, p. 77–80, 2018.

OLIVEIRA, A. B.; OLIVEIRA, G. G.; ARAZZA, F.; MAIA, J. G. S. Geovanine, A New Azaanthracene alkaloid from *Annona ambotay* Aubl. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2650–2651, 1987.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009.

OLIVEIRA, A. P.; SÁ, I.; PEREIRA, D. M.; GONÇALVES, R. F.; ANDRADE, P. B.; VALENTÃO, P. Exploratory studies on the *in vitro* anti-inflammatory potential of two herbal teas (*Annona muricata* L. and *Jasminum grandiflorum* L.), and relation with their phenolic composition. **Chemistry and Biodiversity**, v. 14, 2017a.

OLIVEIRA, C. C.; VELOSO, C. C.; FERREIRA, R. C. M.; LAGE, G. A.; PIMENTA, L. P. S.; DUARTE, I. D. G.; ROMERO, T. R. L.; PEREZ, A. C. Peltatoside isolated from *Annona crassiflora* induces peripheral antinociception by activation of the cannabinoid system. **Planta Medica**, v. 83, p. 261–267, 2017b.

OLIVEIRA, C. C.; MATOS, N. A.; VELOSO, C. C.; LAGE, G. A.; PIMENTA, L. P. S.; DUARTE, I. D. G.; ROMERO, T. R. L.; KLEIN, A.; PEREZ, A. C. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart. in mice. **Inflammopharmacology**, v. 27, p. 397–408, 2019.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 630–635, 2007.

PAES, M. M.; VEGA, M. R. G.; CORTES, D.; KANASHIRO, M. M. Potencial citotóxico das acetogeninas do gênero *Annona*. **Revista Virtual de Química**, v. 8, n. 3, p. 945–980, 2016.

PAES, M. M. **Potencial da bioatividade de espécies da família Annonaceae e investigação do efeito antineoplásico das acetogeninas isoladas de *Annona dioica***. Tese. Campos dos Goytacazes: Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2016.

PANDA, S.; KAR, A. Protective effects of 5,7,4'-trihydroxy-6,3'-dimethoxy-flavone 5-O-a-L-ramnopyranoside, isolated from *Annona squamosa* leaves in thyrotoxicosis and in hepatic lipid peroxidation in rats. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, p. 5726–5728, 2015.

PANDA, S.; KAR, A. **Ã**. *Annona squamosa* seed extract in the regulation of hyperthyroidism and lipid-peroxidation in mice: Possible involvement of quercetin. **Phytomedicine**, v. 14, p. 799–805, 2007.

PAVAN-FRUEHAUF, S. **Plantas medicinais de Mata Atlântica: manejo sustentado e amostragem**. 1. ed. São Paulo: Annablume/Fapesp, 2000.

PETTA, T. **Técnicas modernas em espectrometria de massas aplicadas no isolamento de bioherbicidas produzidos por microrganismos**. Dissertação. Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 2008.

POMA, E. M.; REQUIS, E. R.; GORDILLO, G. C.; FUERTES, C. M. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (Guanábana) de Cuzco. **Ciencia e Investigation**, v. 14, n. 2, p. 29-33, 2011.

PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspetos críticos à transferência e validação de métodos analíticos**. Coimbra: Universidade de Coimbra, 2014.

POTCHOO, Y.; RICHARD, D.; SAKIÈ, E.; GUISSOU, I. P.; KINI, F.; YARO, B. Comparative phytochemical content of leaves extracts of two *Annona senegalensis* Pers: the one from Togo and the other originates from Burkina Faso. **Journal of biological sciences**, v. 8, n. 3, p. 577–583, 2008.

PRATA, P. S.; MOGOLLÓN, N. G. S.; AUGUSTO, F. Técnicas Cromatográficas Multidimensionais na Investigação de Metabólitos Secundários. **Scientia Chromatographica**, v. 8, n. 4, p. 209–229, 2016.

RABÊLO, S. V. **Revisão de alcaloides do gênero *annona*, estudo fitoquímico e avaliação da atividade biológica de *atemoia* (*Annona cherimola* x *Annona squamosa*)**. Dissertação. Petrolina: Universidade Federal do Vale do São Francisco, 2014.

RADY, I.; BLOCH, M. B.; CHAMCHEU, R. C. N.; MBEUMI, S. B.; ANWAR, M. R.; MOHAMED, H.; BABATUNDE, A. S.; KUIATE, J. R.; NOUBISSI, F. K.; SAYED, K. A. E.; WHITFIELD, G. K.; CHAMCHEU, J. C. Anticancer Properties of Graviola (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 39, 2018.

RAINER, H. Monographic studies in the genus *Annona* L. (Annonaceae): Inclusion of the genus *Rollinia* A.St.-Hil. **Annalen des Naturhistorischen Museums in Wien**, v. 108, p. 191–205, 2007.

RAJU, D. U.; BABU, K. S.; RAVADA, S. C. R.; GOLAKOTI, T. Isoquinoline

alkaloid, flavonoids and a triol from leaves of *Annona cherimola*. **Journal of Applicable Chemistry**, v. 4, n. 1, p. 120–126, 2015.

RAMALHO, S. A.; GUALBERTO, N. C.; NETA, M. T. S. L.; BATISTA, R. A.; ARAÚJO, S. M.; MOREIRA, J. J. S.; NARAIN, N. Catechin and epicatechin contents in wines obtained from brazilian exotic tropical fruits. **Food and Nutrition Sciences**, v. 5, p. 449–457, 2014.

REGINATTO, F. H. **Introdução à análise fitoquímica**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre, p. 486, 2017.

RENAME, Relação Nacional de Medicamentos Essenciais. Ministério da Saúde. Brasília, p. 218, 2018.

RIBEIRO, I. C. D. O.; MARIANO, E. G. A.; CARELI, R. T.; MORAIS-COSTA, F.; SANT'ANNA, F. M.; PINTO, M. S.; SOUZA, M. R.; DUARTE, E. R. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle. **BMC veterinary research**, v. 14, n. 32, p. 1–10, 2018.

SAEDI, N.; CRAWFORD, G. H. Botanical Briefs: ylang-ylang oil - extracts from the tree *Cananga odorata*. **Close Encounters with the Environment**. v. 77, 2006.

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

SANTOS, R. I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Eds.). *Farmacognosia da planta ao medicamento*. Porto Alegre: Ed. universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, 1999. p. 821.

SILVA, F. M. A.; KOOLEN, H. H. F.; ALMEIDA, R. A.; SOUZA, A. D. L.; PINHEIRO, M. L. B.; COSTA, E. V. Desreplicação de Alcalóides Aporfínicos e Oxoaporfínicos de *Unonopsis guatteroides* por ESI-IT-MS. **Química Nova**, v. 35, n. 5, p. 944–947, 2012.

SILVA, H. N.; RABELO, S. V.; DINIZ, T. C.; OLIVEIRA, F. G. S.; TELES, R. B. A.; SILVA, J. C.; SILVA, M. G.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, ALMEIDA, J. R. G. S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extract from atemoya (*Annona cherimola* Mill x *Annona squamosa* L.). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 11, n. 18, p. 224–232, 2017.

SILVA, J. C.; ARAÚJO, C. S.; LIMA-SARAIVA, S. R. G.; OLIVEIRA-JUNIOR, R. G.; DINIZ, T. C.; WANDERLEY, C. W. S.; PALHETA-JUNIOR, R. C.; MENDES, R. L.; GUIMARÃES, A. G.; QUINTANS-JUNIOR, L. J.; ALMEIDA, J. R. G. S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) in rodents. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 197, p. 1–10, 2015a.

SILVA, N. L.; ZOBIOLE, N. N.; SILVA, D. B.; SARTORI, A. L. B.; OLIVEIRA, R. J.; PINTO, M. E. A.; SANTOS, F. J. L.; SIQUEIRA, J. M. Constituintes Químicos e atividade fitotóxica das folhas de *Annona nutans*. **Química Nova**, v. 38, n. 5, p. 640–644, 2015b.

SONI, H.; MALIK, J.; YADAV, A. P.; YADAV, B. Characterization Of Rutin Isolated By Leaves *Annona squamosa* By Modern Analytical Techniques. **European Journal of Biomedical and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, n. 6, p. 484–489, 2018.

SOS MATA ATLÂNTICA. **SOS Mata Atlântica**, 2016. Disponível em: <<https://www.sosma.org.br/nossa-causa/a-mata-atlantica/>>

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

SOUSA, O. V.; VIEIRA, G. D. V.; PINHO, J. J. R. G.; YAMAMOTO, C. H.; ALVES, M. S. Antinociceptive and Anti-Inflammatory Activities of the Ethanol Extract of *Annona muricata* L. Leaves in Animal Models. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 11, p. 2067–2078, 2010.

SOUSA, E. A.; SILVA, A. A. C. A.; CHAVES, M. H. **Revisão dos flavonoides de Annonaceae**. In: ALMEIDA, J. R. G. S. ; JÚNIOR, R. G. O; OLIVEIRA, A. P. (Eds.). *Annonaceae: tópicos selecionados*. 1. ed. Curitiba. p. 550, 2015.

SOUZA, D. O.; SALES, V. S.; RODRIGUES, C. K. S.; OLIVEIRA, L. R.; LEMOS, I. C. S.; DELMONDES, G. A.; MONTEIRO, A. B.; NASCIMENTO, E. P.; FIGUEIREDO, F. R. S. D. N.; COSTA, J. G. M.; CRUZ, G. M. P.; VIANA, G. S. B.; BARBOSA, R.; MENEZES, I. R. A.; FELIPE, C. F. B.; KERNTOPF, M. R. Phytochemical Analysis and Central Effects of *Annona muricata* Linnaeus: Possible Involvement of the Gabaergic and Monoaminergic Systems. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 17, n. 4, p. 1306–1317, 2018.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática: Guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da Flora Brasileira, baseado em APG II**. 1. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2005.

SPÍNOLA, V.; PINTO, J.; CASTILHO, P. C. Identification and quantification of phenolic compounds of selected fruits from Madeira Island by HPLC-DAD – ESI-MS n and screening for their antioxidant activity. **Food Chemistry**, v. 173, p. 14–30, 2015.

STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. **Biodiversidade no Brasil**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 486.

SUFFNESS, M.; PEZZUTTO, J. M. **Assays related to cancer drug discovery**. In: HOSTETTMANN, K. (Ed.), *Methods in Plant Biochemistry: assays for bioactivity*. v. 6. Academic Press, London, 1990, p. 220.

THANG, T. D.; KUO, P. C.; LUONG, N. X.; DUNG, N. X.; HAC, L. H.; KUO, Y. H.; YANG, M. L.; WU, T. S. Chemical Constituents From The Leaves Of *Xylopia poilanei* And Their Bioactivity. **Heterocycles**, v. 78, n. 3, p. 763–770, 2009.

THE PLANT LIST. **A Working list of all plant species**, 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em: 10 jun. 2019.

TSUKAMOTO, S.; TOMISE, K.; ABURATANI, M.; ONUKI, H.; HIRORTA, H.; ISHIHARAJIMA, E.; OHTA, T. Isolation of cytochrome p450 inhibitors from strawberry fruit, *Fragaria ananassa*. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 11, p. 1839–1841, 2004.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C. DE; CUNHA, L. C. Synadenium umbellatum: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 43, n. 4, p. 631–638, 2007.

VAN ARMAN, C. G. **Oedema and increased vascular permeability**. In: VANE, J. R.; FERREIRA, S. H. (Eds.). *Anti-Inflammatory Drugs*. 2. ed. [s.l.] Springer, Berlin, Heidelberg, 1979. p. 75–91.

VEGA, M. R. G. **Constituintes químicos de Eupatorium macrocephalum Less e Annona dioica: Uma contribuição ao estudo de plantas medicinais no Paraguai**. Tese. Seropédica: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2007.

VEGA, M. R. G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; ECHEVARRIA, A. Flavonoids from *Annona dioica* Leaves and their Effects in Ehrlich Carcinoma Cells, DNA-topoisomerase I and II. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 8, p. 1554–1559, 2007.

VERSIANI, M. A.; DIYABALANAGE, T.; RATNAYAKE, R.; HENRICH, C. J.; BATES, S. E.; MCMAHON, J. B.; GUSTAFSON, K. R. Flavonoids from Eight Tropical Plant Species That Inhibit the Multidrug Resistance Transporter ABCG2. **Journal of Natural Products**, v. 74, p. 262–266, 2011.

VILLAR, A.; MARES, M.; RIOS, J. L. Flavonoids from *Annona cherimolia* Mill. leaves. **Plantes Medicinales et Phytotherapie**, v. 18, n. 4, p. 233–236, 1984.

VILLIERS, A. DE; VENTER, P.; PASCH, H. Recent advances and trends in the liquid-chromatography – mass spectrometry analysis of flavonoids. **Journal of Chromatography A**, v. 1430, p. 16–78, 2016.

VUKICS, V.; GUTTMAN, A. Structural characterization of flavonoid glycosides by multi-stage mass spectrometry. **Mass Spectrometry Review**, v. 29, p. 1–16, 2010.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H. N.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. New sesquiterpenoids from the root of *Guatteria multivenia*. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 6, p. 856–859, 2002.

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. **Flavonoides**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Eds.). *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Porto Alegre: Artmed, 2017. p. 486.