

PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CINCO
ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE

LAÍSSA RODRIGUES ESPOSTI PACHECO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO
CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO – 2014

PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CINCO
ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE

LAÍSSA RODRIGUES ESPOSTI PACHECO

“Monografia apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do título de
Licenciatura em Química.”

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Garcia Vega

CAMPOS DOS GOYTACAZES – RJ
JANEIRO – 2014

PERFIL QUÍMICO E POTENCIAL DE ATIVIDADE BIOLÓGICA DE CINCO
ESPÉCIES DA FAMÍLIA ANNONACEAE

LAÍSSA RODRIGUES ESPOSTI PACHECO

“Monografia apresentada ao Centro de
Ciência e Tecnologia da Universidade Estadual do
Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como parte dos
requisitos necessários para obtenção do título de
Licenciatura em Química.”

Prof^a. Dr^a. Maria Raquel Garcia Vega (Orientadora) – UENF

Prof^a. Dr^a. Lara Fonseca Barbosa - IFF

Prof^a. Dr^a. Virginia Freitas Rodrigues – Universidade Estácio de Sá

“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a nós mesmos.”

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por estar sempre ao meu lado e me ajudar a realizar meus sonhos.

A meus pais, padrasto e avós por me incentivarem a buscar as coisas que desejo e por me apoiarem sempre que necessário.

À professora Raquel, pela orientação e paciência durante a realização desse trabalho.

À Marina Meirelles, por toda a ajuda e os ensinamentos neste trabalho e no laboratório.

Aos meus colegas de laboratório e amigos na vida: Anaína Monteiro, Henrique Lopes, Jessica Xarifa, Laís Nascimento, Laysa Lanes, Renne Costa e Sthefanie de Carvalho, pela convivência dentro e fora do laboratório.

Às minhas amigas e amigos de todas as horas: Amanda Azevedo, Camila Faria, Clara Ayume, Cinthia Falcão, Drielle Bossenele, Eline Tourinho, Jéssica Cunha, Lucas Darella, Mario Lucas, Mirla Rodrigues, Natália Ramos, Rafaela Coutinho, Tais Pereira e Tamaris Santos, por fazerem minha vida melhor e me apoiarem nos momentos complicados, muito obrigada por existirem.

Aos professores Milton Masahiko do Laboratório de Biologia do Reconhecer (LBR) e Luciano Canellas do Núcleo de Desenvolvimento de Insumos de Base Biológica para a Agricultura (NUDIBA), pela permissão de uso de seus equipamentos nos testes biológicos e análises de infravermelho, respectivamente.

E aos professores desse período de graduação que contribuíram para que eu chegasse até aqui.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	III
LISTA DE TABELAS	V
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	VI
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	5
2. OBJETIVOS	7
2.1 Objetivo geral	7
2.2 Objetivos específicos	7
3. REVISÃO DE LITERATURA	8
3.1 Metabolismo especializado das plantas	8
3.2 Quimiosistemática – Marcadores Quimiotaxonômicos	8
3.3 Família Annonaceae	10
3.3.1 Gênero <i>Annona</i>	12
3.3.2 Gênero <i>Xylopia</i>	12
3.3.3 Gênero <i>Oxandra</i>	13
3.3.4 Atividades biológicas em Annonáceas	14
3.3.5 Teste de viabilidade celular por metabolização do MTT	14
3.4 Metaboloma	15
3.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho	16
3.4.2 Ressonância Magnética Nuclear	18
3.5 Espécies selecionadas para estudo	20
4. PARTE EXPERIMENTAL	26
4.1 Equipamentos e reagentes	26
4.2 Metodologia	26
4.2.1 Coleta e classificação botânica	26
4.2.2 Obtenção dos extratos brutos e particionamento	27
4.2.3 Preparo das amostras para análise por Espectroscopia de Infravermelho	28

4.2.4	Preparo das amostras para análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio	28
4.2.5	Preparo das amostras para teste de presença de alcaloides (Dragendorff e Mayer)	29
4.2.6	Preparo das amostras para teste de presença de esteróides e triterpenoides (Liebermann-Burchard)	29
4.2.7	Cultura da linhagem de células neoplásticas e avaliação do efeito citotóxico das amostras frente às mesmas	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1	Resultados dos testes fitoquímicos qualitativos	31
5.1.1	Teste para alcaloides (Dragendorff e Mayer)	31
5.1.2	Teste para esteroides e terpenoides (Liebermann-Burchard)	33
5.2	Espectroscopia na região do Infravermelho	35
5.2.1	<i>Annona acutiflora</i>	37
5.2.2	<i>Annona dioica</i>	38
5.2.3	<i>Annona dolabripetala</i>	39
5.2.4	<i>Oxandra nitida</i>	40
5.2.5	<i>Xylopia sericea</i>	41
5.3	Espectroscopia de RMN ¹ H	42
5.3.1	<i>Annona acutiflora</i>	44
5.3.2	<i>Annona dioica</i>	45
5.3.3	<i>Annona dolabripetala</i>	46
5.3.4	<i>Oxandra nitida</i>	47
5.3.5	<i>Xylopia sericea</i>	48
5.4	Atividades biológicas	49
6.	CONCLUSÃO	51
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do MTT e do seu produto reduzido (Formazana)	14
Figura 2: Espectro eletromagnético e vibrações/excitações moleculares correspondentes	16
Figura 3: Frequência de absorção típica de alguns grupos funcionais	17
Figura 4: Diferença de energia do núcleo de hidrogênio devido ao campo magnético	19
Figura 5: Representação de um próton sob o efeito de um campo magnético	19
Figura 6: Regiões do espectro de RMN ^1H e respectivos grupos funcionais	20
Figura 7: Flor de <i>Oxandra nitida</i>	21
Figura 8: Folha e frutos de <i>Xylopia sericea</i>	22
Figura 9: Folha e flor de <i>Annona dioica</i>	23
Figura 10: Folha e flor de <i>Annona acutiflora</i>	23
Figura 11: (A) Folhas e flores, (B) Fruto de <i>A. dolabripetala</i>	24
Figura 12: Alguns núcleos característicos para esqueletos básicos de alcaloides	32
Figura 13: (A) Esqueleto básico típico de triterpenos pentacíclicos; (B) Esqueleto básico típico de esteróides pregnanos	34
Figura 14: Espectros de infravermelho de <i>A. acutiflora</i> : (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	37
Figura 15: Espectros de infravermelho de <i>A. dioica</i> : (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	38
Figura 16: Espectros de infravermelho de <i>A. dolabripetala</i> : (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	39
Figura 17: Espectros de infravermelho de <i>O. nitida</i> : (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	40
Figura 18: Espectros de infravermelho de <i>X. sericea</i> : (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	41
Figura 19: Espectros de RMN ^1H (400 MHz; DMSO) de <i>A. acutiflora</i> com deslocamentos típicos de acetogeninas: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	44

Figura 20: Espectros de RMN ¹ H (400 MHz; DMSO) de <i>A. dioica</i> : (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	45
Figura 21: Espectros de RMN ¹ H (400 MHz; DMSO) de <i>A. dolabripetala</i> : (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	46
Figura 22: Espectros de RMN ¹ H (400 MHz; DMSO) de <i>O. nitida</i> com deslocamentos típicos de alcalóides oxaporfínicos: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	47
Figura 23: Espectros de RMN ¹ H (400 MHz; DMSO) de <i>X. sericea</i> : (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica	48
Figura 24: Avaliação da atividade citotóxica através do ensaio MTT. Células U937 foram tratadas com diferentes concentrações das frações metanólicas durante 48 horas. Como controle negativo foi utilizado DMSO na concentração de 400 µg	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Exemplos de substâncias de classes presentes em anonáceas	11
Tabela 2: Usos e atividades biológicas das espécies selecionadas para estudo	25
Tabela 3: Massa seca do material vegetal e partições obtidas	28
Tabela 4: Resultado dos testes de presença de alcaloides	33
Tabela 5: Resultado dos testes de avaliação da presença de esteroides e terpenoides	34
Tabela 6: Bandas de absorção e grupos funcionais característicos relacionados	35
Tabela 7: Tipos de hidrogênios nas amostras e faixas de deslocamento químico a eles associadas	43
Tabela 8: Valores de EC50 para cada fração metanólica avaliada frente linhagem de células U937	49

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

δ	Deslocamento químico em partes por milhão
MHz	Megahertz
RMN ^1H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Resumo

Título: Perfil químico e potencial de atividade biológica de cinco espécies da família Annonaceae

Autor: Laíssa Rodrigues Esposti Pacheco

Orientadora: Maria Raquel Garcia Vega

Palavras chave: metabolômica, Annonaceae, MTT.

Dentre as classes de metabólitos especiais produzidos pelas espécies vegetais pode-se citar os alcalóides, acetogeninas, flavonóides, terpenóides, esteróides, entre outros compostos. Tais compostos possuem propriedades como polaridade variada, pequena massa molecular, meia vida curta, reatividade química (variabilidade estrutural), ocorrência esporádica e potencial antioxidante, o que os caracteriza como mensageiros de informação. Devido ao fato de os metabólitos especiais serem característicos de determinadas famílias ou gêneros, estes podem ser usados com certa segurança para a dedução de perfis metabólicos de interesse e como marcadores quimiotaxonômicos para grupos vegetais específicos. Através de experimentos para o estudo do perfil metabólico ou perfil químico de uma determinada família vegetal é possível propor extrapolações no sentido de que espécies taxonomicamente próximas tenham tendência a produzirem metabólitos pertencentes a uma mesma classe de compostos ou com características químicas semelhantes.

No presente estudo foi obtido um perfil químico para cinco espécies da família Annonaceae pertencentes a três gêneros diferentes, sendo elas: *Oxandra nitida*, *Xylopia sericea*, *Annona dioica*, *Annona acutiflora* e *Annona dolabripetala*.

A análise das partições (hexânica, clorofórmica e metanólica) dos extratos foi primeiramente realizada através de testes fitoquímicos qualitativos para detecção de alcalóides, terpenóides e esteróides e, posteriormente, através do uso de métodos analíticos como a espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) e a Ressonância Magnética Nuclear – RMN ^1H . O perfil químico evidenciado para cada uma das frações estudadas revelou uma grande semelhança entre os gêneros *Annona* e *Xylopia*. Estes dados podem reforçar a classificação botânica na família Annonaceae considerando que estes gêneros estão mais próximos filogeneticamente entre si do que o gênero *Oxandra*.

As frações metanólicas obtidas das cinco espécies em estudo foram submetidas à avaliação do seu potencial de atividade biológica através de ensaio *in vitro* com células neoplásicas da linhagem U937 (linfoma). Os resultados mostraram que todos os extratos apresentam atividade em pelo menos uma das concentrações testadas, destacando-se a espécie *A. acutiflora* cuja concentração efetiva está em $13,43 \pm 1,55 \mu\text{g/mL}$.

Abstract

Título: Chemical profile and biological potential activity of five species of the Annonaceae family

Autor: Laíssa Rodrigues Esposti Pacheco

Orientadora: Maria Raquel Garcia Vega

Palavras chave: metabolomics, Annonaceae, MTT.

Among the classes of special metabolites produced by plant species can be mentioned alkaloids, acetogenins, flavonoids, terpenoids, steroids, and other compounds. Some of these compounds have properties as varied polarity, low molecular weight, short half-life, chemical reactivity (structural variability), sporadic occurrence and antioxidant potential, which characterizes them as messengers of information. Because of the special metabolites are characteristic of certain families or genera, these can be used with relative safety for the deduction of interest and metabolic profiles as chemotaxonomic markers for specific plant groups. Through experiments to study the metabolic profiles, or chemical profile of a given plant family is possible to propose extrapolation towards taxonomically related species which have a tendency to produce metabolites belonging to the same class or compounds with similar chemical characteristics.

In this study a chemical profile is obtained for five species of Annonaceae family belonging to three different genera, namely: *Oxandra nitida*, *Xylopia sericea*, *Annona dioica*, *Annona acutiflora* and *Annona dolabripetala*. The analysis of the partitions (hexane, chloroform and methanol) extracts was first carried out using qualitative testing of phytochemicals alkaloids, steroids and terpenoids and subsequently through the use of analytical methods such as spectroscopy, mid-infrared Fourier transform (FT -IR) and nuclear magnetic resonance ^1H -NMR. The chemical profile shown for each of the studied fractions revealed a great similarity between the *Annona* and *Xylopia* genres. These data can enhance botanical classification in the Annonaceae family whereas these genera are phylogenetically closer to each other than gender *Oxandra*.

The methanolic fractions obtained for five species in the study underwent assessment of their potential biological activity by in vitro assay with neoplastic cell line U937 (lymphoma). The results showed that all extracts have activity on at least some of the concentrations tested, highlighting the specie *A. acutiflora* whose effective concentration is $13.43 \pm 1.55 \mu\text{g} / \text{mL}$.

1. INTRODUÇÃO

O metaboloma ou perfil metabólico é a manifestação real do genoma e do proteoma de uma determinada amostra constituindo-se em uma análise que pode ser quantitativa e/ou qualitativa dos metabólitos presentes na mesma. Tal termo foi citado pela primeira vez na literatura por Oliver e colaboradores, em 1998 (OLIVER *et al.*, 1998).

A partir da análise do metaboloma é possível fazer um detalhamento das características e da composição química de determinada amostra, seja ela uma célula, tecido, fluido ou organismo, além da detecção de perfis metabólicos típicos e de interesse em um determinado estudo (KUHNNEN, 2007).

Um estudo metabolômico em espécies vegetais tem por objetivo obter informações biológicas rastreando e/ou identificando tantos metabólitos quanto forem possíveis produzidos e/ou modificados por determinado organismo (VILLAS-BÔAS, GOMBERT, 2006).

Dados da literatura comprovam que através de experimentos para o estudo do perfil metabólico ou perfil químico de uma determinada família vegetal é possível propor extrapolações no sentido de que espécies taxonomicamente próximas tenham tendência a produzirem metabólitos pertencentes a uma mesma classe ou com características químicas semelhantes (GOTTLIEB, BORIN, 2000; GOTTLIEB *et al.*, 1998).

Para esse tipo de experimento o extrato vegetal geralmente não é purificado, já que o desejado é uma visão geral dos metabólitos da espécie e não apenas metabólitos específicos. Sendo assim, a abordagem usualmente utilizada é denominada “impressão digital dos metabólitos” (SOARES, 2006).

A técnica de impressão digital dos metabólitos ou impressão digital cromatográfica vem sendo cada vez mais utilizada pela comunidade científica na área de produtos naturais pelo fato de enfatizar a caracterização dos componentes da amostra visando a identificação dos constituintes químicos e sua estabilidade (SCARMINIO, SOARES, 2006).

Neste sentido, busca-se a identificação dos metabólitos especiais das espécies em estudo. Os metabólitos especiais da planta são geralmente encontrados em grupos vegetais restritos e, ao contrário dos metabólitos primários, não são essenciais ao crescimento e desenvolvimento da espécie,

porém são extremamente necessários à sobrevivência e continuidade do indivíduo no ecossistema (TAIZ, ZEIGER, 2004).

Dados da literatura registram mais de 200.000 metabólitos primários e secundários produzidos por plantas e, a cada ano, são descobertos em média mais 4.000 compostos. Estima-se que cada organismo possui em média 30.000 metabólitos presentes em diferentes faixas de concentração (ZHANG *et al.*, 2002, PIMENTA *et al.*, 2013).

Dentre as várias técnicas empregadas no estudo do metaboloma de uma determinada espécie, as que foram discutidas nesse trabalho são a análise de extratos vegetais por FT-IR e RMN ¹H associadas a testes fitoquímicos qualitativos.

A realização de uma triagem de atividade biológica das frações metanólicas dos extratos por meio de testes de avaliação “*in vitro*” de atividade citotóxica frente à células humanas da linhagem U937 fornece um indicativo do potencial de bioatividade destes.

Tal teste se trata de um microensaio colorimétrico utilizando-se o 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)2,5-difenil brometo de tetrazolium, o chamado MTT, que dá nome a esse tipo de teste. Neste ensaio a atividade biológica das amostras é verificada através da avaliação da viabilidade das células em estudo antes e após tratamento com tais amostras (RODRIGUES, 2013).

O presente estudo busca estabelecer um perfil químico e de bioatividade para cinco espécies da família Annonaceae, sendo três do gênero *Annona*, uma do gênero *Xylopia* e uma do gênero *Oxandra*.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Contribuir para o conhecimento da química de espécies da família Annonaceae da região através da obtenção do perfil químico, bem como do potencial de atividade biológica das mesmas.

2.2 Objetivos específicos

- Fornecer ferramentas que ajudem na classificação quimiotaxonômica da família Annonaceae.
- Analisar o perfil químico de cinco espécies da família Annonaceae pertencentes à três gêneros diferentes: três *Annonas*, uma *Xylopi*a e uma *Oxandra* (*Annona acutiflora*, *A. dioica*, *A. dolabripetala*, *Xylopi*a *sericea* e *Oxandra nitida*);
- Verificar a presença de principais classes de metabólitos especiais nas frações de diferentes polaridades (hexânica, metanólica e clorofórmica) para cada espécie através de testes qualitativos;
- Aprendizado de manipulação operacional do espectrômetro de IV.
- Avaliação do potencial de bioatividade das frações metanólicas por meio de ensaios citotóxicos frente à linhagem de célula tumoral U973 (linfoma).

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Metabolismo especializado das plantas

Nas plantas, os genes são a unidade informativa que comanda a produção de enzimas para a síntese, em primeira instância, dos metabólitos primários dessas. Tais metabólitos são fornecedores de matéria-prima e energia para a formação de outro grupo metabólico, denominado metabolismo secundário ou metabolismo especial. Tais compostos possuem propriedades como polaridade variada, pequena massa molecular, meia vida curta, reatividade química (variabilidade estrutural), ocorrência esporádica e alguns deles, como os flavonóides, por exemplo, potencial antioxidante, o que os caracteriza como mensageiros de informação. Devido ao fato de os metabólitos especiais serem característicos de determinadas famílias ou gêneros, esses podem ser usados, com certa segurança, para a dedução de perfis metabólicos de interesse e como marcadores quimiotaxonômicos para grupos vegetais específicos (GOTTLIEB, KAPLAN, BORIN, 1996; GOTTLIEB, BORIN, 2000).

As reações químicas ocorridas nos metabolismos primário e especial são essenciais ao crescimento, desenvolvimento e mecanismos de defesa dos organismos vivos. O metabolismo primário produz substâncias comuns a todos os seres vivos e de necessidade básica para o funcionamento das células, como proteínas, aminoácidos, lipídios e ácidos nucleicos, sendo geralmente estudado pela bioquímica. Já o metabolismo secundário ou especializado produz substâncias que são características de determinadas famílias ou gêneros sendo estudado pela química de produtos naturais. Dentre as classes de metabólitos especiais produzidos pelas espécies vegetais podem-se citar os alcalóides, acetogeninas, flavonóides, terpenóides, esteróides, entre outros tipos de substâncias (BRAZ-FILHO, 2006).

3.2 Quimiosistemática – Marcadores Quimiotaxonômicos

A taxonomia pode ser definida como a ciência que nomeia os organismos e os classifica hierarquicamente, o que é feito a partir de estudos morfológicos e genéticos visando compreender as relações de parentesco

existentes entre estes. Já a sistemática é parte da ciência que se dedica ao estudo dos tipos de organismos, sua diversidade e as relações existentes entre eles (RAVEN *et al.*, 1967; BRANT, 2003).

Nas últimas décadas, porém, a taxonomia passou a utilizar uma gama de ferramentas auxiliares na diferenciação entre as espécies não dependendo apenas de características morfológicas, mas utilizando, também, estudos das biomoléculas produzidas por cada espécie (CAVADA *et al.*, 1996).

Tal processo de estudo e classificação é denominado quimiosistemática ou quimiotaxonomia, onde o uso de metabólitos especiais como marcadores químicos em táxons de plantas tem sido cada vez mais aceito pelos taxonomistas (BRANT, 2003).

A quimiotaxonomia utiliza-se de três tipos de substâncias bioproduzidas pelas plantas: os metabólitos primários, que tem função vital nos organismos, os metabólitos semânticos, que são moléculas carregadoras de informação genética, como o DNA e o RNA; e os metabólitos secundários, também chamados de metabólitos especiais, como alcaloides, terpenóides, fenóis, entre outros. Tais metabólitos especiais têm sido amplamente utilizados como marcadores quimiotaxonômicos devido ao fato de possuírem origem botânica específica, o que permite relacionar filogenia, genética e morfologia (BRANT, 2003; EMERENCIANO, KAPLAN, GOTTLIEB, 1985).

Como exemplo pode-se citar a família Simaroubaceae a qual é caracterizada quimicamente pela produção de metabólitos especiais chamados quassinóides, um tipo de triterpenos biodegradáveis altamente oxigenados que são considerados os marcadores taxonômicos desta (RODRIGUES FILHO, 1989; ALMEIDA *et al.*, 2007). Os marcadores quimiotaxonômicos possuem relação botânica tão específica que determinados gêneros podem até mesmo serem excluídos de uma família devido à presença ou ausência de substâncias consideradas marcadores da mesma. Um exemplo deste tipo foi a exclusão do gênero *Picramnia* da família Simaroubaceae após estudos fitoquímicos em 1995 e sua inclusão numa nova família denominada Picramniaceae (ALMEIDA *et al.*, 2007).

3.3 Família Annonaceae

A família Annonaceae é composta predominantemente por árvores aromáticas e arbustos distribuídos pelas regiões tropicais e subtropicais, sendo considerada bastante homogênea quando analisada do ponto de vista morfológico e de habitat. Essa família é constituída por aproximadamente 130 gêneros e 2500 espécies, sendo que, no Brasil, contabiliza-se 29 gêneros e cerca de 260 espécies (OLIVEIRA, 1997; BARROSO, 1978; THOMAS, 1969).

As espécies de Annonaceae são de interesse econômico devido ao fato de algumas possuírem frutos comestíveis e também pelo fato de serem usadas na construção em geral, produção de fragrâncias e cosméticos e na medicina popular, porém talvez seja uma das famílias menos conhecidas quimicamente, devido a seu grande tamanho (CAVALCANTE, 1991; SILVA *et al.*, 1977; LOUREIRO *et al.*, 1997; EKUNDAYO, 1989; CORRÊA, 1984; VAN DEN BERG, 1993; ESTRELLA, 1995).

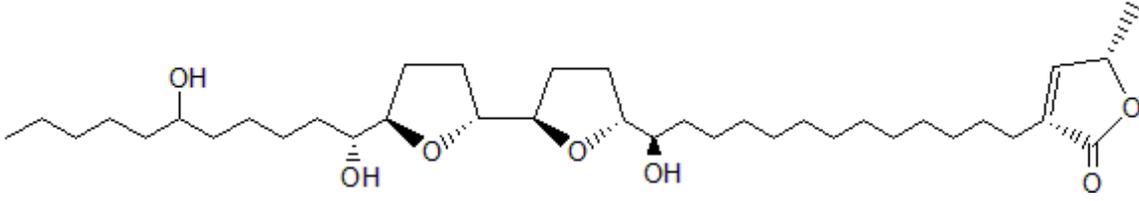
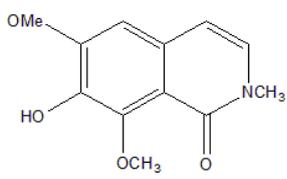
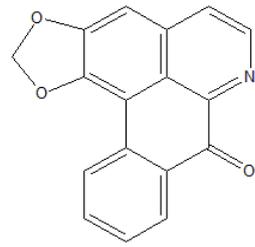
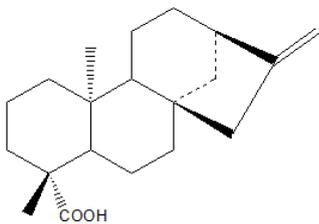
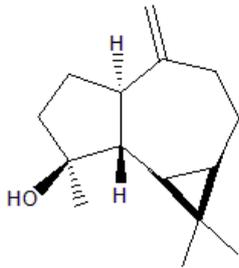
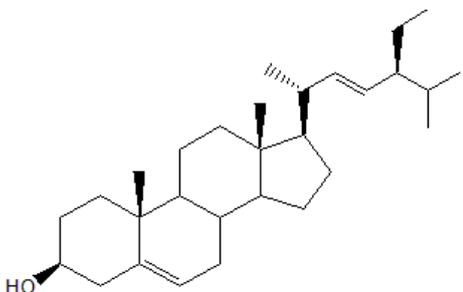
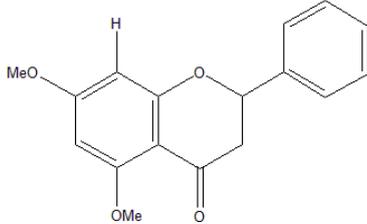
Resumidamente, as anonáceas são consideradas dicotiledôneas basais por possuírem um grande número de características primitivas, sendo, por isso, incluídas na ordem Magnoliales (TAKHTAJAN, 1969).

Vários estudos tem demonstrado grande quantidade de substâncias de natureza química diversificada nas mais variadas partes das plantas desta família. Os principais grupos de substâncias químicas são os alcaloides, as acetogeninas e os diterpenos. Porém, outras classes como: esteróides, polifenóis e flavonóides (este último principalmente nas folhas) também são registrados no perfil químico da família (CHATOU, RAINER, MAAS, 2004).

Por suas características químicas, as anonáceas são reconhecidas como fontes de grande número de alcaloides (em sua maioria isoquinolínicos e aporfínicos). De fato, alcalóides como anonaina, asimilobina e liriodenina, entre outros, são onipresentes em anonáceas e encontrados em todos os gêneros desta, sendo o último, o alcalóide oxaporfínico mais abundante em tal família. Tais substâncias são consideradas marcadores quimiotaxonômicos de anonáceas (VENDRAMIN, *et al.*, 2013; CASTRO-MORENO, *et al.*, 2013).

Na tabela 1 estão representados alguns exemplos de estruturas das classes de substâncias mais comuns em anonáceas e as espécies da qual foram isolados.

Tabela 1: Exemplos de substâncias de classes presentes em anonáceas.

<p>Acetogenina (VEGA, 2007)</p>  <p><i>Annona dioica</i> – Raízes</p>	
<p>Alcalóide isoquinolínico (CHEN <i>et al.</i>, 2001)</p>  <p>Cherianoine (<i>Annona cherimola</i> – Caule)</p>	<p>Alcalóide aporfínico (TINTO <i>et al.</i>, 1992)</p>  <p>Liriodenina (<i>Oxandra asbeckii</i> – Folhas)</p>
<p>Diterpeno (VIEIRA <i>et al.</i>, 2009)</p>  <p>Ácido caurenóico (<i>Xylopiia nitida</i> – Raízes)</p>	<p>Sesquiterpeno (SOUSA <i>et al.</i>, 2012)</p>  <p>Espatuleno (<i>Oxandra sessiflora</i> – Folhas)</p>
<p>Esteróide (VEGA, 2007)</p>  <p>Estigmasterol – encontrado em mistura com sitosterol (<i>Annona dioica</i> – Folhas)</p>	<p>Flavonóide (FLEISCHER <i>et al.</i>, 1997)</p>  <p>5,7-dimetoxiflavanona (<i>Uvaria mocoli</i> – Casca do tronco)</p>

Diversos metabólitos especiais isolados de espécies desta família têm atividades biológicas comprovadas cientificamente tais como: flavonóides com atividade antimicrobiana e antitumoral, diterpenos com propriedades antibacteriana e antifúngica, acetogeninas com atividade antiparasitária, inseticida e antitumoral e alcaloides com atividade antitumoral e antiparasitária. Nesta classe pode-se destacar o alcaloide liriodenina (Tabela 1, pág. 11), possivelmente o alcaloide oxaporfínico mais abundante em Annonáceas e que até 2012 foi identificado em 14 gêneros e 111 espécies desta família e que também apresenta uma ampla gama de atividades comprovadas e uma patente para atividade antitumoral (COSTA *et al.*, 2010, 2011; CHACÓN, GONZÁLEZ-ESQUINCA, 2012).

3.3.1 Gênero *Annona*

O gênero *Annona* possui cerca de 120 espécies que se encontram distribuídas pela América do Sul, América Central, África, Ásia e Austrália. Dentre suas espécies, várias produzem frutos comestíveis como a pinha (*Annona squamosa* L.) e a graviola (*Annona muricata* L.), sendo considerado o gênero de maior importância na fruticultura na família das Annonáceas (LEBOEUF *et al.*, 1982; NASCIMENTO, 2008).

Muitas espécies desse gênero são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de doenças. As espécies do gênero *Annona* possuem um alto teor de alcaloides e acetogeninas, estas últimas, substâncias altamente bioativas, com atividade citotóxica, antitumoral, antiparasitária e pesticida (LEBOEUF *et al.*, 1982; FANG *et al.*, 1993).

Além dos alcaloides e das acetogeninas, também há registros de esteróides, flavonóides, peptídeos e diterpenos em espécies deste gênero (VEGA, 2006).

3.3.2 Gênero *Xylopia*

O gênero *Xylopia* compreende aproximadamente 150 espécies, sendo um dos maiores da família Annonaceae (BRUMMITT, POWEL, 1988; PONTES *et al.* 2007).

A importância econômica desse gênero pode ser relacionada a alguns de seus frutos que são utilizados como condimentos, enquanto outros fornecem fibras para a produção de cordas, além de sua madeira também possuir diversos usos por ser leve e durável (SCOTTI *et al.*, 2012).

Esse gênero também apresenta espécies com propriedades medicinais, sendo usado como vermífugo, agente antimicrobiano (YIADOM, FIAGBE, AYIM, 1977, apud SCOTTI, *et al.*, 2012, p. 2146), acaricida, inseticida, nematocida (HERNÁNDEZ, 2001) para o controle de pragas agrícolas, além de possuir atividade citotóxica (ASEKUN, KUNLE, 2004).

Numerosas espécies deste gênero têm apresentado substâncias como acetogeninas (ALFONSO *et al.*, 1996), terpenóides, alcaloides, flavonóides e esteróis (PONTES *et al.*, 2007).

Dados da literatura citam por diversas vezes a presença de diterpenos kaurênicos, podendo-se considerar este como o principal metabólito especial encontrado neste gênero. Tal classe de metabólito é encontrada, principalmente, na casca do tronco, raízes e sementes nas espécies deste gênero (SCOTTI *et al.*, 2012; HASAN, HEALEY, WATERMAN, 1982, 1985; TAKAHASHI, VIEIRA, BOAVENTURA, 2001; CAVALCANTI *et al.*, 2010).

3.3.3 Gênero *Oxandra*

O gênero *Oxandra* possui 22 espécies entre as quais, 14 tem ocorrência confirmada no Brasil, distribuídas nas regiões de Mata Atlântica dos estados da Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, neste último ocorrendo também em áreas de restinga. As espécies deste gênero apresentam-se como árvores (LIMA, 2009, FORZZA *et al.*, 2010).

Dentre os dados bibliográficos levantados, não foram encontrados registros do isolamento de acetogeninas em espécies deste gênero. Das espécies registradas, apenas cinco apresentam estudos químicos até o momento. Estes estudos revelaram a presença de alcaloides azafluorenos e dehidroaporfínicos, terpenóides, esteróides e óleos essenciais. (ORTIZ, *et al.*, 2007; ROJANO, *et al.*, 2007, SOUSA *et al.*, *in press*)

3.3.4 Atividades biológicas em Annonáceas

As Annonáceas demonstram diversas propriedades farmacológicas, o que pode ser relacionado aos seus constituintes principais, os alcaloides e as acetogeninas, que são altamente bioativos (FAGUNDES *et al.*, 2005).

Dentre estes constituintes, as acetogeninas tem sido mais amplamente estudadas, devido ao fato de serem substâncias extremamente bioativas e que, em testes *in vitro*, tem demonstrado atividade citotóxica frente a várias linhagens de células humanas (RUPPRECHT *et al.*, 1990; FANG *et al.*, 1993, CHEN *et al.*, 2012).

3.3.5 Teste de viabilidade celular por metabolização do MTT

O método 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) trata-se de um microensaio colorimétrico no qual a viabilidade celular é avaliada através da ocorrência da metabolização do MTT pelas desidrogenases mitocondriais, o que só é possível em células vivas (RODRIGUES, 2013).

O MTT é um composto que possui coloração amarela, é solúvel em água e, em células vivas, é metabolizado pelas mitocôndrias. Após a redução do MTT, este forma um composto denominado formazana, que possui coloração púrpura a azulada e é insolúvel em água (Figura 1).

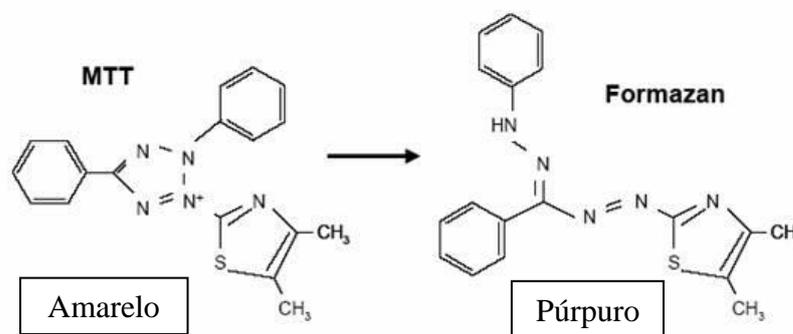


Figura 1: Estrutura química do MTT e do seu produto reduzido (formazana)

As células a serem testadas passam por um período de incubação com as amostras em estudo e após este período, adiciona-se o MTT e aguarda-se

um período de quatro horas para que seja verificado se houve ou não a metabolização do mesmo.

Como os cristais de formazana são insolúveis em água, é preciso que as amostras sejam tratadas com HCl e isopropanol, pois caso tais cristais não sejam devidamente solubilizados, estes podem interferir no resultado da análise colorimétrica.

O resultado dos testes se baseia na quantificação da formazana através da medida da absorbância da solução contendo as células em espectrofotômetro em 570 nm comparados a um padrão negativo não tratado.

3.4 Metaboloma

O metaboloma fornece informações sobre as micromoléculas produzidas e/ou modificadas por um determinado organismo, sendo dependente do estado fisiológico, de desenvolvimento e/ou patológico de tal indivíduo. A análise do perfil metabólico ou “*fingerprint*” metabólico constitui-se numa visão geral dos metabólitos (identificáveis ou não) presentes em determinado organismo (VILLAS-BOAS, GOMBERT, 2006).

O uso de tal técnica vem sendo intensificado principalmente na área de ciências naturais como forma de obtenção de dados significativos sobre o perfil químico e metabólico de famílias, gêneros ou espécies vegetais e como marcadores quimiotaxonômicos, possibilitando a definição de perfis típicos e de interesse em determinado estudo (FRÉDÉRICH *et al.*, 2010; KUHNEN, 2007).

A análise metabolômica engloba o uso de vários métodos analíticos como a espectroscopia de infravermelho médio com transformada de Fourier (FT-IR) e a ressonância magnética nuclear (RMN), porém para a obtenção de informações realmente significativas é necessário o uso da quimiometria e sua associação com tratamentos estatísticos dos dados recolhidos, o que geralmente é feito através da análise de componentes principais (ACP) (KUHNEN, 2007).

3.4.1 Espectroscopia na Região do Infravermelho

A região do espectro eletromagnético que corresponde à radiação infravermelha está localizada entre as regiões do visível e das micro-ondas, conforme apresentado na figura 2 a seguir.



Figura 2: Espectro eletromagnético e vibrações/excitações moleculares correspondentes (Baseado em BRUICE, 2006).

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho mede o comprimento de onda e a intensidade de absorção desse tipo de energia por uma dada amostra em faixas de comprimento de onda de interesse, geralmente entre 4000 e 400 cm^{-1} . Tal absorção ocorre devido ao fato de as ligações químicas presentes nas substâncias possuírem frequências de vibração típicas, assim, quando determinada ligação recebe energia através de radiação eletromagnética com exatamente o mesmo valor de sua energia vibracional, esta energia é absorvida pela molécula (WILSON JR., DECIUS, CROSS, 1955).

A figura 3 a seguir mostra as frequências de absorção típicas de alguns grupos funcionais.

Ligação	Função	Faixa de absorção (cm ⁻¹)
-O-H	Álcool, fenol, enol, ácido carboxílico	3650 – 3200, aguda aberta
-R ₂ NH	Aminas secundárias, 1 banda	3400 – 3140, média
-NH ₂	Aminas primárias, 2 bandas	3400 – 3350, média
-C-H	Em alcanos	2962 – 2853, forte
-C-H	Em alcenos	3095 – 3010
-CO-C-H	Em aldeídos	2900 – 2800, 2700 – 2775
-C≡C-, -C≡N	Alcinos e nitrilas	2500 – 2000
R ₂ C=O	Em carbonilas	1630 – 1850
H ₂ C=CH ₂	Em alcenos	1680 – 1650
-C=C-	Em aromáticos	1600 – 1650, 1450 – 1500

Figura 3: Frequência de absorção típica de alguns grupos funcionais (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

Este método consiste na passagem de um feixe de luz infravermelha por um meio contendo a amostra a ser estudada, enquanto outra porção do mesmo feixe passa por uma amostra de referência. Ambos os feixes são refletidos para o detector, onde a diferença entre estes é comparada e os dados experimentais são coletados e processados.

A técnica de espectroscopia na região do infravermelho por transformada de Fourier é mais rápida e barata que a convencional, devido ao fato de não se variar a frequência da luz infravermelha, mas sim guiá-la através de um interferômetro, que é de construção mais simples e barata que um monocromador. Além disso, como as informações de todas as frequências são coletadas simultaneamente, a análise torna-se mais rápida.

A espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FT-IR) vem ganhando destaque como método analítico devido ao fato de ser bastante sensível, rápida, barata e reprodutível. Apenas determinados tipos de ligação química possuem frequência de ligação na região do infravermelho, sendo assim, esta técnica é bastante útil principalmente na caracterização de grupos funcionais específicos auxiliando, dessa forma, na identificação de regiões de impressão digital metabólica de moléculas (KUHNNEN, 2007).

3.4.2 Ressonância Magnética Nuclear

A espectroscopia de RMN foi desenvolvida no fim da década de 1940 por físico-químicos para o estudo das propriedades dos núcleos atômicos, porém em 1951, os químicos perceberam o potencial de tal técnica para o estudo das estruturas de substâncias orgânicas.

Tal técnica se baseia no fato de que alguns núcleos de átomos se comportam como se estivessem girando em torno de um eixo, em alguns casos especiais a carga existente no núcleo gira em torno de seu próprio eixo, gerando assim, um dipolo magnético. Tal carga em movimento gera um momento angular que pode ser descrito em função do número de spin da molécula (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

A espectrometria de ressonância magnética nuclear estuda principalmente núcleos com número de spin igual a $\frac{1}{2}$, como o de hidrogênio (^1H) e carbono-13 (^{13}C).

Quando tais núcleos são submetidos ao efeito de radiação eletromagnética com frequência adequada, estes absorvem energia e ocorre uma troca de spin de um estado de baixa energia para um de alta energia, conforme mostrado nas figuras 4 e 5 (p. 19). Tal troca acontece devido ao fato de os núcleos entrarem em ressonância com a frequência aplicada, dando origem ao nome Ressonância Magnética Nuclear.

Quando um núcleo alinha-se a favor do campo magnético aplicado, ele passa para um estado de maior energia, e, quando um núcleo alinha-se contra o campo aplicado, este passa a um estado de menor energia. A diferença entre a energia absorvida pelos spins nucleares nesta transição é medida pelo aparelho responsável por este tipo de análise, gerando um sinal proporcional à quantidade de spins entre os estados considerados (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

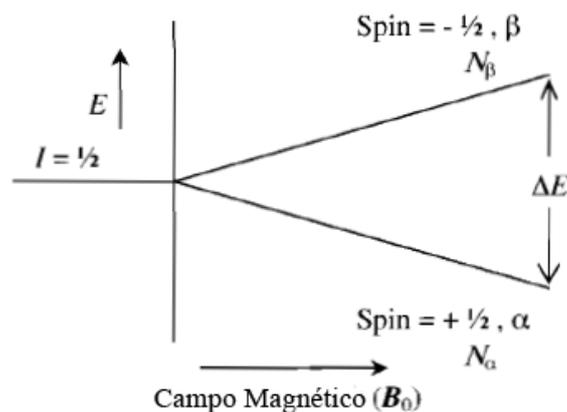


Figura 4: Diferença de energia do núcleo de hidrogênio devido ao campo magnético (Adaptado de SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005).

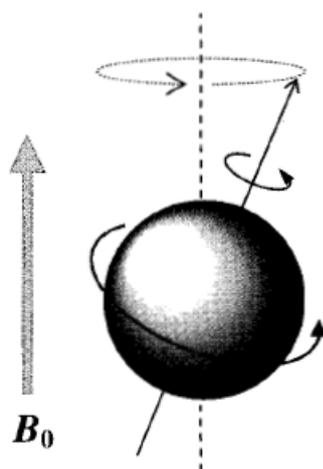


Figura 5: Representação de um próton sob o efeito de um campo magnético (Adaptado de SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) é uma das técnicas instrumentais utilizadas para elucidação estrutural de uma substância, auxiliando na caracterização do esqueleto de carbono e hidrogênio.

Cada região do espectro de RMN ^1H pode ser correlacionada a um tipo de grupo funcional e através disso torna-se possível prever os deslocamentos químicos prováveis de determinada substância ou supor estruturas que condizem com os deslocamentos apresentados num espectro. Na figura 6 (p. 20) estão demonstradas oito regiões do espectro de RMN ^1H e os grupos funcionais correspondentes.

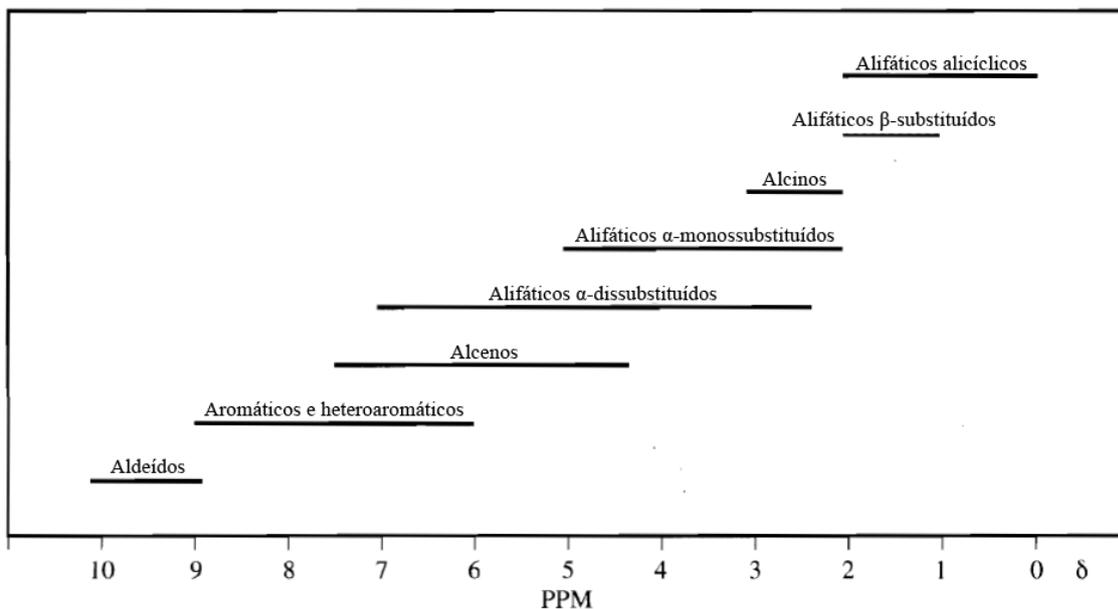


Figura 6: Regiões do espectro de RMN ^1H e respectivos grupos funcionais (Adaptado de SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2005).

Da mesma forma que ocorre no caso da técnica de FT-IR, a espectroscopia de RMN também auxilia na identificação da região de impressão digital de metabólitos de moléculas quando associada a técnicas quimiométricas.

3.5 Espécies selecionadas para estudo

Para este trabalho foram selecionadas cinco espécies de três gêneros da família Annonaceae, sendo elas: *Oxandra nitida*, *Xylopia sericea*, *Annona dioica*, *Annona acutiflora* e *Annona dolabripetala*.

- *Oxandra nitida*:

A espécie *Oxandra nitida* (Figura 7, p. 21), também é conhecida como Imbiú amarelo. Tal espécie pode ser encontrada na Bahia, Espírito Santo e Rio de Janeiro, floresta pluvial dos tabuleiros e atlântica de baixada, baixomontanha e restinga, sendo que nas restingas do Rio de Janeiro, ocorre nas florestas sobre cordão (LOBÃO, ARAUJO, KURTZ, 2005; MAAS *et al.*, 1994).

Na literatura encontra-se apenas um estudo químico e nenhum farmacológico desta espécie; tal estudo foi realizado durante o trabalho de

iniciação científica da autora no qual foram isoladas 5 substâncias (3 alcalóides aporfínicos e dois esteróides) de extratos desta espécie (PACHECO, VEGA, 2013).



Figura 7: Flor de *Oxandra nitida*.

- *Xylopi* *sericea*:

A espécie *Xylopi sericea* (Figura 8, p. 22), também é conhecida por vários nomes populares como: pindaíba vermelha, pimentão do mato, pau de anzol, pau de embira e pimenta de macaco.

Tal espécie ocorre como árvore possuindo aproximadamente 8 m de altura, sendo por vezes utilizada na ornamentação. Seu tronco fornece madeira bastante utilizada para mastros de embarcações simples, as fibras de sua casca são usadas na indústria de cordoaria caseira e suas sementes são usadas como substitutas para a pimenta do reino ou a da Índia (CORREA, 1984).

Distribui-se pela América do Sul, Venezuela, Guiana até a Bolívia e pelo Brasil, onde ocorre nos estados de Roraima, Bahia, Goiás, Minas Gerais e Rio de Janeiro (FRIES, 1930). Apresenta-se numa grande variedade de habitats, como: cerrado, floresta pluvial ripária e dos tabuleiros, campo rupestre, floresta pluvial atlântica de baixada e montanha, restinga, floresta estacional e em vegetação alterada (LOBÃO, ARAUJO, KURTZ, 2005).

Dados da literatura mostram que os óleos essenciais das folhas e frutos desta espécie possuem atividade acaricida, já os óleos das raízes demonstram eficiência moderada como bactericida e fungicida e ainda atividade antimicrobiana. A presença de monoterpenos, diterpenos, em sua maioria kaurênicos, alcaloides e sesquiterpenos é apontada como a razão para tais

atividades biológicas (PONTES *et al.*, 2007; TAKAHASHI, VIEIRA, BOAVENTURA, 2001; CAMARA, ALENCAR, SILVEIRA, 1996, FOURNIER *et al.*, 1994).



Figura 8: Folha e frutos de *Xylopiia sericea*.

- *Annona dioica*:

A espécie *Annona dioica* (Figura 9, p. 23) também é conhecida por seus nomes populares aratikú-ñu, ata rasteira e marolo. Distribui-se no Brasil pelos estados do Tocantins, Maranhão, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e Rio Grande do Sul, ocorrendo no cerrado e no pantanal.

Além de possuir frutos comestíveis, as demais partes dessa planta, como folhas e sementes também são utilizadas na medicina popular contra reumatismo, diarreia, como sedativo, inseticida, anticatarral e para a limpeza de parasitas.

Estudos químicos citam a presença de flavonóides e alcalóides aporfínicos nessa espécie e estudos farmacológicos têm demonstrado atividade antioxidante, citotóxica, hipoglicêmica e anti-inflamatória para os extratos das folhas e caule desta planta (FORMAGIO *et al.*, 2013; MAHMOUD *et al.*, 2011; VEGA *et al.*, 2004, 2007; DOS SANTOS, MORAIS, BRAZ-FILHO, 2003).



Figura 9: Folha e flor de *Annona dioica*.

- *Annona acutiflora*:

A espécie *Annona acutiflora* (Figura 10) também chamada guiné ou guiné caboclo distribui-se pelos estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo e Bahia. No Rio de Janeiro pode ser encontrada na floresta pluvial atlântica de baixada e na restinga (KURTZ, 2001; MAAS *et al.*, 2002; FRIES, 1931).

Esta espécie possui uso religioso em forma de banho contra feitiçaria e/ou mau-olhado e seu fruto é comestível (LOBÃO, ARAUJO, KURTZ, 2005).

Até o presente momento, não foram encontrados dados na literatura relacionados a estudos químicos e/ou farmacológicos para esta espécie.



Figura 10: Folha e flor de *Annona acutiflora*.

- *Annona dolabripetala*:

A espécie *Annona dolabripetala* (Figura 11, p. 24) também é conhecida como araticum de Guaratinguetá, araticum amarelo, ata, biribá do mato ou pinha do mato, apresentando-se nas florestas montanas e da mata atlântica,

ocorrendo na Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo e Paraná (DUTRA, SALIMENA, NETO, 2012).

Até o presente momento não foram encontrados dados sobre estudos químicos e/ou farmacológicos na literatura relacionados a esta espécie.



Figura 11: (A) Folhas e flores, (B) Fruto de *A. dolabripetala*.

Na tabela 2 se encontram resumidas algumas informações sobre usos e /ou atividades biológicas das espécies utilizadas neste trabalho, bem como a parte da planta estudada neste trabalho.

Tabela 2: Usos e atividades biológicas das espécies selecionadas para estudo.

Espécie (Nome científico/Nome popular)	Parte analisada*	Atividade biológica e/ou uso popular	Referência
<i>Annona Acutiflora</i> / Guiné, Guiné caboclo	Folhas	n.e.	MAAS, RAINER, LOBÃO, 2012
<i>Annona dioica</i> / Aratikú-ñu, ata rasteira, marolo	Raízes	Reumatismo, diarreia, sedativo, anticatarral, inseticida	PAVETTI <i>et al.</i> , 1983; MAAS, RAINER, LOBÃO, 2012; POTT & POTT, 1994; BASUALDO & SORIA, 1996; SANTOS <i>et al.</i> , 2003; VEGA, 2006
<i>Annona dolabripetala</i> / Araticum de Guaratinguetá, araticum amarelo, ata, biribá do mato, pinha do mato	Folhas	n.e.	MAAS, LOBÃO, RAINER, 2010
<i>Xylopia sericea</i> / Chapéu de sol, embira, embiriba, pimenta de macaco, pindaíba, pindaíba branca	Folhas	Acaricida, antimicrobiana	PONTES <i>et al.</i> , 2007
<i>Oxandra nitida</i> R. E. Fr./ Imbiú amarelo	Folhas	n.e.	PACHECO, VEGA, 2013

Legenda:

* Parte da planta utilizada para a preparação de extrato e análise no presente trabalho.
n.e.: Não encontrada.

4. PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Equipamentos e reagentes

- Os espectros de infravermelho foram obtidos no equipamento Perkin-Elmer 1605 FT-IR; os espectros foram registrados a partir da incorporação das amostras sólidas em brometo de potássio (KBr) por maceração.
- Os espectros de RMN ^1H foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX-400 MHz. Como referência interna foi utilizado o Tetrametilsilano (TMS), todos os espectros tiveram acumulação padronizada (230 scans) e todas as amostras foram solubilizadas em DMSO.
- Reagente de Dragendorff: 8 g de subnitrato de bismuto ($\text{BiONO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$) solubilizados em 20 mL de ácido acético (Solução A); 27,2 g de iodeto de potássio (KI) solubilizados em 50 mL de água destilada (Solução B). O reagente é preparado através da mistura das soluções A e B.
- Reagente de Mayer: 1,36 g de cloreto de mercúrio (HgCl_2) solubilizados em 60 mL de água destilada (Solução A); 5 g de iodeto de potássio solubilizados em 20 mL de água destilada (Solução B). O reagente é preparado pela mistura das soluções A e B e posterior diluição para 100 mL de solução.

4.2 Metodologia

4.2.1 Coleta e classificação botânica

A espécie vegetal *Annona dioica* foi coletada em Assunção (Paraguai) em abril de 2003 e uma exsicata encontra-se depositada na Universidade Nacional de Asunción sob o número 8567.

A coleta das espécies *Annona dolabripetala* e *Xylopia sericea* foi realizada na Reserva Biológica da União localizada no município de Casemiro

de Abreu, sendo a primeira coletada em março de 2013 e a segunda em agosto de 2008, essa última possuindo uma exsicata depositada no herbário da UENF sob o número 897. A exsicata da espécie *A. dolabripetala* foi enviada ao Jardim Botânico do Rio de Janeiro para confirmação de sua classificação.

A espécie *Oxandra nitida* foi coletada na Estação Ecológica Mata do Carvão no município de São Francisco de Itabapoana em junho de 2008 e sua identificação foi baseada na exsicata de número 879 depositada no herbário UENF.

A coleta da espécie *Annona acutiflora* foi realizada na Reserva de Pacotuba, localizada no município de Cachoeiro de Itapemirim em janeiro de 2012 e uma exsicata foi enviada para o Jardim Botânico do Rio de Janeiro para confirmação de sua identificação.

4.2.2 Obtenção dos extratos brutos e particionamento

O material vegetal coletado foi separado em partes da planta, secas em estufa de circulação de ar e moídas em moinho de martelo. O material seco pesado em balança semi-analítica foi submetido à maceração em temperatura ambiente utilizando-se um sistema de MeOH/H₂O (9:1), concentrado à pressão reduzida com o uso de evaporador rotativo e, após a destilação dos solventes, obteve-se os extratos brutos hidroalcoolicos. Tais extratos foram fracionados com o uso de solventes de diferentes polaridades (metanol, clorofórmio e hexano). Na tabela 3 a seguir estão detalhadas as partições obtidas.

Tabela 3: Massa seca do material vegetal e partições obtidas.

Espécie	Parte da planta (Peso do material vegetal seco)	Partições obtidas
<i>O. nitida</i>	Folhas (947,8 g)	MeOH – 64,68 g CHCl ₃ – 32,75 g Hex – 18,09 g
<i>X. sericea</i>	Folhas (740,6 g)	MeOH – 242,03 g CHCl ₃ – 128,57 g Hex – 131,05 g
<i>A. acutiflora</i>	Folhas (9,62 g)	MeOH – 4,80 g CHCl ₃ – 260 mg Hex – 3,36 g
<i>A. dolabripetala</i>	Folhas (19,36 g)	MeOH – 1,98 g CHCl ₃ – 320 mg Hex – 1,05 g
<i>A. dioica</i>	Raízes (8,62 g)	MeOH – 1,44 g CHCl ₃ – 6,02 g Hex – 1,16 g

4.2.3 Preparo das amostras para análise por Espectroscopia de Infravermelho

Separou-se 2 mg de cada extrato utilizado neste estudo para análise por FT-IR. As amostras foram misturadas a 9 mg de brometo de potássio (KBr) em pó e maceradas. As análises foram feitas utilizando-se 40 varreduras com registro dos sinais compreendidos entre as frequências de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.2.4 Preparo das amostras para análise por Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio

Pesou-se 5 mg de cada extrato analisado neste trabalho, os quais foram solubilizados com 500 µL do solvente deuterado dimetilsulfóxido (DMSO), e filtrados para a realização da análise por RMN ¹H. Todos os espectros obtidos tiveram sua acumulação padronizada em 230 scans.

4.2.5 Preparo das amostras para teste de presença de alcaloides (Dragendorff e Mayer)

Solubilizou-se 10 miligramas de cada um dos 15 extratos em 4 mL de HCl 1% (v/v) contidos em tubos de ensaio. Filtrou-se, e cada solução aquosa ácida obtida foi separada em duas porções de 2 mL para tubos de ensaio diferentes (evitou-se a presença de solvente orgânico). Em seguida, adicionou-se aos 15 tubos 5 gotas do reagente de precipitação de alcaloides Dragendorff e nos outros 15 tubos o reagente de Mayer, separadamente (MATOS, 1997).

A formação de precipitado vermelho nas soluções com o reagente de Dragendorff e coloração esbranquiçada nas soluções com o reagente de Mayer indicam a presença de alcaloides.

4.2.6 Preparo das amostras para teste de presença de esteróides e terpenoides (Liebermann-Burchard)

Foram dissolvidos 10 miligramas dos 15 extratos estudados em 1 mL de clorofórmio, contidos em 15 tubos de ensaio. Filtrou-se cada solução clorofórmica e adicionou-se 2 mL de anidrido acético agitando suavemente cada tubo e, pelas paredes destes, adicionou-se cuidadosamente 1 mL de H₂SO₄ concentrado e tornou-se a agitar suavemente a mistura. Observou-se uma rápida mudança de cores.

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

4.2.7 Cultura da linhagem de células neoplásticas e avaliação do efeito citotóxico das amostras frente às mesmas.

A linhagem U937 (célula humana de linfoma histiocítico) foi cultivada em meio D-MEM F12 (Gibco, BRL). As culturas foram replicadas a cada dois dias e mantidas em estufa (Forma Scientific Inc., modelo 3159) a 37 °C, com 5% de CO₂ e umidade controlada.

As células U937 foram plaqueadas em volume de 100 μL /poço (1×10^6 cels/mL) em placas de 96 poços, tratadas com os extratos nas concentrações finais de 400 μg , 200 μg , 100 μg , 50 μg , 25 μg , 12,5 μg . As células foram mantidas em estufa a 37 °C, com 5% de CO_2 e umidade controlada.

Como controles negativos as células foram incubadas com meio D-MEM F12 (Gibco, BRL) suplementado com 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de gentamicina (Gibco, BRL) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, BRL). Para os extratos as células foram incubadas com DMSO (SIGMA[®]) na concentração ideal.

O microensaio colorimétrico utilizando MTT (3-(4,5- dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) foi realizado após tratamento para avaliar a viabilidade celular. As células foram incubadas por 48 horas com os extratos 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, homogeneizando bem para permitir a solubilização dos cristais de formazana. A leitura dos valores da absorbância da placa de 96 poços foi realizada em espectrofotômetro (EPOCH[™], BioTax[®] Instruments, Inc.) em comprimento de onda de 570 nm. Os experimentos foram realizados em triplicatas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Resultados dos testes fitoquímicos qualitativos

O mais complexo e fascinante no estudo prospectivo de plantas é que cada táxon possui um sistema próprio, caracterizado por metabólitos específicos: alcalóides, terpenóides, fenólicos etc.. A presença ou ausência de concentrações consideráveis de metabólitos secundários numa determinada espécie é influenciado por vários fatores, tais como: época da coleta, idade da planta e fatores ambientais como herbivoria, por exemplo. Os testes qualitativos aqui empregados detectam apenas metabólitos especiais que estejam presentes em altas concentrações nos extratos analisados.

5.1.1 Teste para alcaloides (Dragendorff e Mayer)

Alcaloides possuem uma grande variabilidade estrutural e caracterizam-se pela presença de um ou mais átomos de nitrogênio na sua estrutura (Figura 12, p. 32). Esses compostos são encontrados nos vegetais predominantemente na forma combinada, com ácidos orgânicos, e em concentração menor, na forma livre. Nessa forma são insolúveis em meio aquoso e solúveis em solventes orgânicos, como clorofórmio, éter e benzeno; na forma de sal, a solubilidade é inversa. O grau de alcalinidade que apresentam é variável, dependendo da disponibilidade do par de elétrons do nitrogênio, podendo revelar caráter ácido quando este é quaternário, estes últimos não são detectados pelo reagente de Dragendorff.

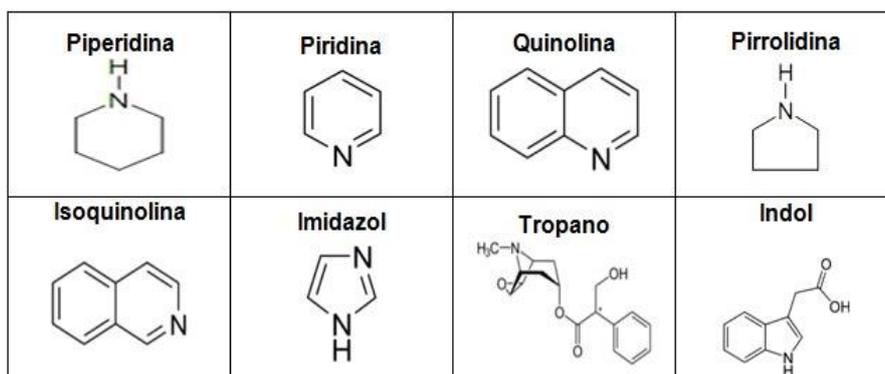


Figura 12: Alguns núcleos característicos para esqueletos básicos de alcaloides.

A avaliação da presença de alcaloides foi realizada segundo metodologia descrita anteriormente nos quinze extratos (metanólico, clorofórmico e hexânico) das cinco espécies deste estudo.

Os resultados obtidos indicam a presença de alcaloides na espécie *Oxandra nitida* verificada através dos dois testes: Dragendorff e Mayer, o que condiz com os resultados obtidos em estudo anterior sobre esta espécie, da qual foram isolados três alcalóides aporfínicos.

Apesar de a literatura citar a presença de alcaloides em caules de *A. dioica* estes não foram detectados no presente trabalho, mas cabe ressaltar que a parte utilizada da planta para a presente análise são as raízes e que tais testes possuem sensibilidade limitada, detectando apenas quantidades significativas da classe de substâncias em questão. Os demais resultados encontram-se resumidos na tabela 4 a seguir:

Tabela 4: Resultado dos testes de presença de alcaloides.

Extrato	Dragendorff	Mayer
<i>A. dioica</i> MeOH	-	-
<i>A. dioica</i> CHCl ₃	-	-
<i>A. dioica</i> Hex	-	-
<i>A. acutiflora</i> MeOH	-	-
<i>A. acutiflora</i> CHCl ₃	-	-
<i>A. acutiflora</i> Hex	-	-
<i>A. dolabripetala</i> MeOH	-	-
<i>A. dolabripetala</i> CHCl ₃	-	-
<i>A. dolabripetala</i> Hex	-	-
<i>O. nitida</i> MeOH	++	+
<i>O. nitida</i> CHCl ₃	++	+
<i>O. nitida</i> Hex	-	-
<i>X. sericea</i> MeOH	-	-
<i>X. sericea</i> CHCl ₃	-	-
<i>X. sericea</i> Hex	-	-

Legenda: + → Mudança de coloração

++ → Precipitado

- → Nenhuma alteração

5.1.2 Teste para esteróides e terpenóides (Liebermann-Burchard)

Terpenos e esteroides (Figura 13) são de ampla distribuição no reino vegetal em concentrações variáveis e de acordo com o padrão de substituição (oxigenação e/ou insaturações) podem variar de polaridade e inclusive formar outras classes de substâncias como, por exemplo, os alcaloides esteroidais que possuem nitrogênio em sua estrutura ou saponinas quando unidades de carboidratos estão ligadas a estrutura básica.

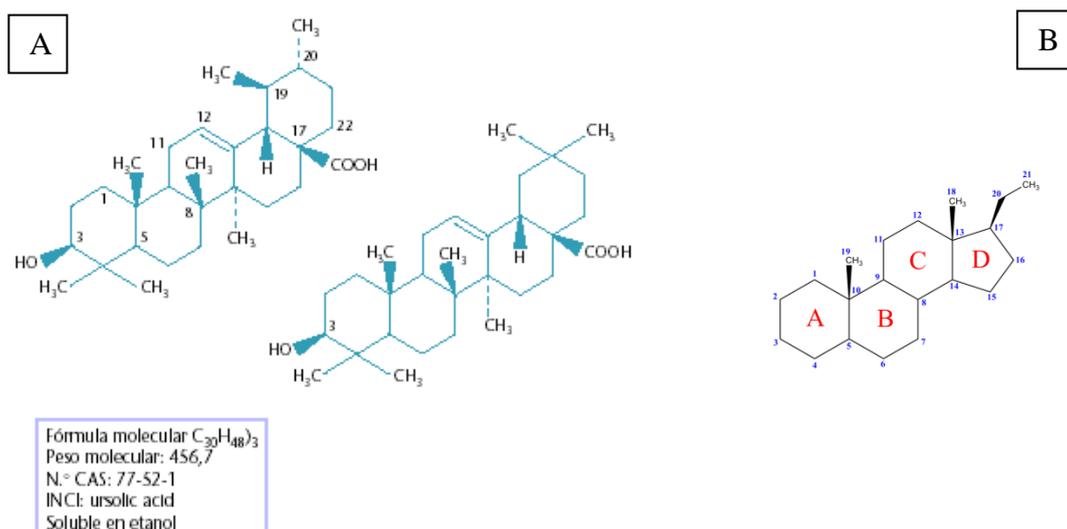


Figura 13: (A) Esqueleto básico típico de triterpenos pentacíclicos; (B) Esqueleto básico típico de esteróides pregnanos.

O teste para avaliação da presença de esteróides e terpenos foi realizado em cada um dos quinze extratos das cinco espécies analisadas neste trabalho. Foram detectadas a presença de esteroides nas três frações (hexano, clorofórmio e metanol) das espécies *A. acutiflora* e *A. dolabripetala* e terpenos na fração hexânica de *A. dioica* e nas frações hexânica de clorofórmica de *O. nitida*. Os resultados para o teste de Liebermann-Burchard encontram-se resumidos na tabela 5 a seguir.

Tabela 5: Resultado dos testes de avaliação da presença de esteroides e terpenoides.

Extrato	Esteróides	Terpenoides
<i>A. dioica</i> MeOH	-	-
<i>A. dioica</i> $CHCl_3$	-	-
<i>A. dioica</i> Hex	-	+
<i>A. acutiflora</i> MeOH	+	-
<i>A. acutiflora</i> $CHCl_3$	+	-
<i>A. acutiflora</i> Hex	+	-
<i>A. dolabripetala</i> MeOH	+	-
<i>A. dolabripetala</i> $CHCl_3$	+	-
<i>A. dolabripetala</i> Hex	+	-
<i>O. nitida</i> MeOH	-	+
<i>O. nitida</i> $CHCl_3$	-	+
<i>O. nitida</i> Hex	-	-
<i>X. sericea</i> MeOH	-	-
<i>X. sericea</i> $CHCl_3$	-	-
<i>X. sericea</i> Hex	-	-

Legenda: + → Mudança de coloração
 - → Nenhuma alteração

5.2 Espectroscopia na região do Infravermelho

A espectroscopia no infravermelho fornece evidências da presença de vários grupos funcionais na estrutura orgânica devido à interação das moléculas ou átomos com a radiação eletromagnética em um processo de vibração molecular.

As regiões mais importantes do espectro de infravermelho envolvem o início e o final do espectro, e compreendem as faixas de 4000-1300 cm^{-1} e 900-690 cm^{-1} . A região inicial, de alta energia é chamada região dos grupamentos funcionais, aqui se encontram as absorções de hidroxila de álcool, ácido carboxílico, fenol, enol, vibrações de -NH de aminas primárias e secundárias, grupo carbonila e outros.

As amostras no presente trabalho constituem misturas complexas separadas por partição em solventes orgânicos em polaridades diferentes e para análise das mesmas foram consideradas as seguintes faixas mostradas na tabela 6:

Tabela 6: Bandas de absorção e grupos funcionais característicos relacionados (Baseado em SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

GRUPO FUNCIONAL	BANDAS (cm^{-1})
R-OH / R-NH	3000-3600
CH, CH ₂ , CH ₃	2700-2900
R-C=O	1600-1800
-Ar	≈1500

A análise dos espectros obtidos mostram para a banda de absorção em torno 3000 cm^{-1} , de forma geral, um aumento na intensidade das mesmas nas frações com polaridades maiores (metanol e clorofórmio) em contrapartida as bandas de absorção entre 2700-2900 cm^{-1} associadas a CH₂ e CH₃ de compostos alifáticos aumentam com a diminuição da polaridade das frações, como pode ser evidenciado, por exemplo, na figura 16 A, B e C (p. 39) para a espécie *A. dolabripetala*. As três espécies do gênero *Annona* (Figuras 14, 15 e 16, p. 37, 38 e 39) e a espécie do gênero *Xylopi*a (Figura 18, p. 41) apresentaram perfis semelhantes.

Nas frações mais polares da espécie *O. nitida* se verifica uma ausência de sinais na região de 2700-2900 cm^{-1} , entretanto observam-se bandas largas

e intensas para a região de carbonilas e compostos aromáticos (Figura 17, p. 40), estes dados podem ser relacionados com a presença de compostos com anéis heterocíclicos ou fundidos como por exemplo de alcaloides cuja presença também foi corroborada pelos testes fitoquímicos e dados da literatura para este gênero.

Embora este método não seja muito eficiente para determinar classes de substâncias, visto que, é possível observar apenas grupos funcionais, os dados aqui obtidos podem reforçar a classificação botânica na família Annonaceae considerando que os gêneros *Annona* e *Xylopia* estão mais próximos filogeneticamente entre si do que o gênero *Oxandra*.

A seguir são apresentados os espectros obtidos para as 15 frações analisadas.

5.2.1 *Annona acutiflora*

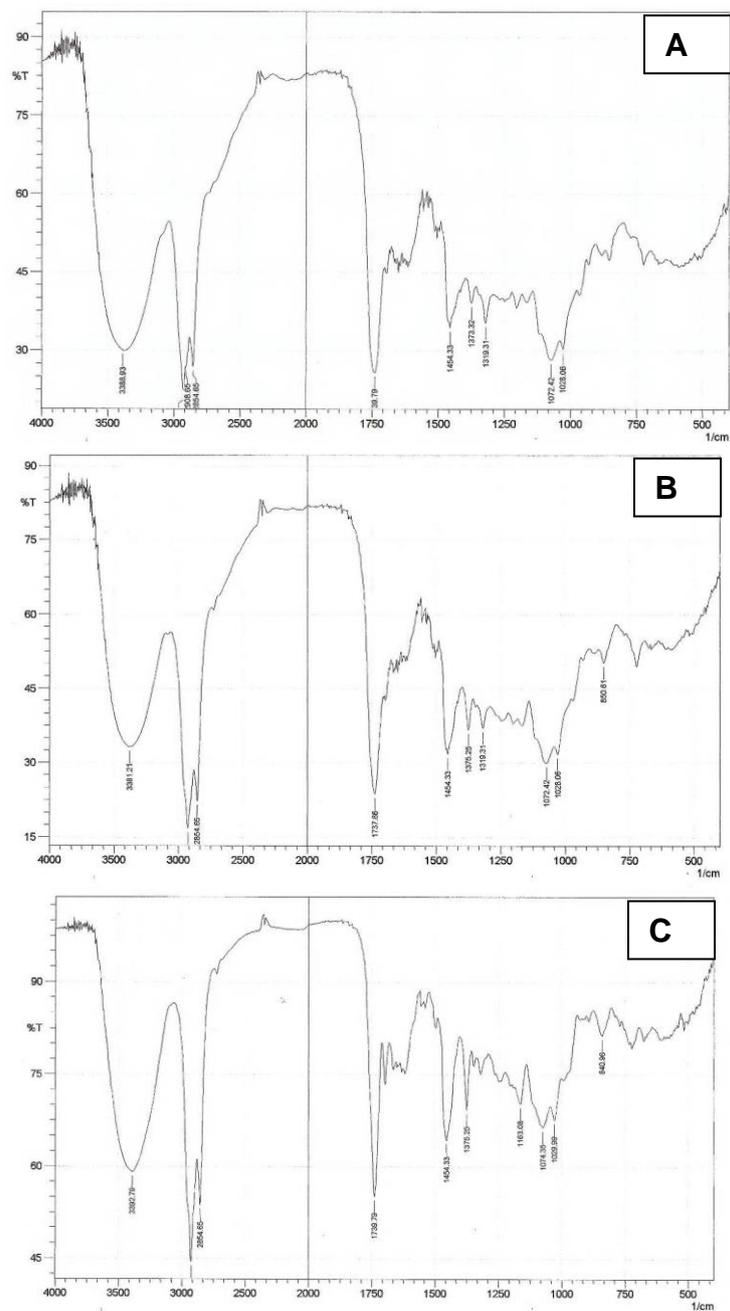


Figura 14: Espectros de infravermelho de *A. acutiflora*: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

5.2.2 *Annona dioica*

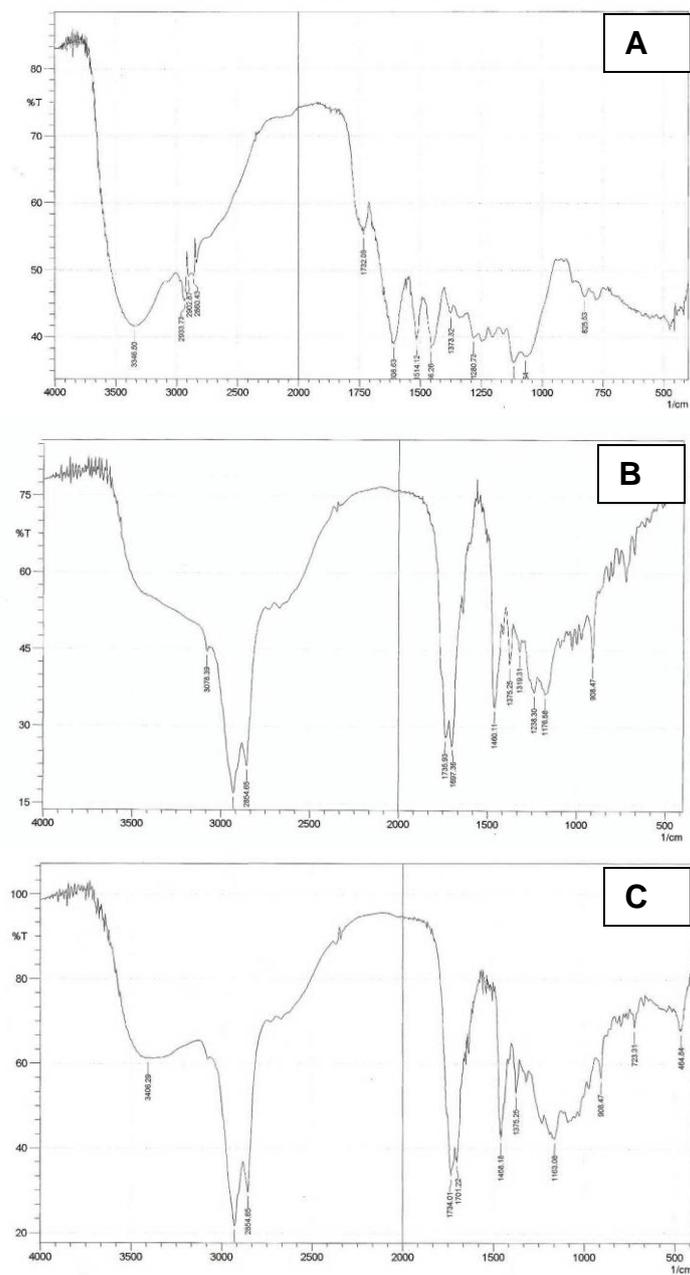


Figura 15: Espectros de infravermelho de *A. dioica*: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

5.2.3 *Annona dolabripetala*

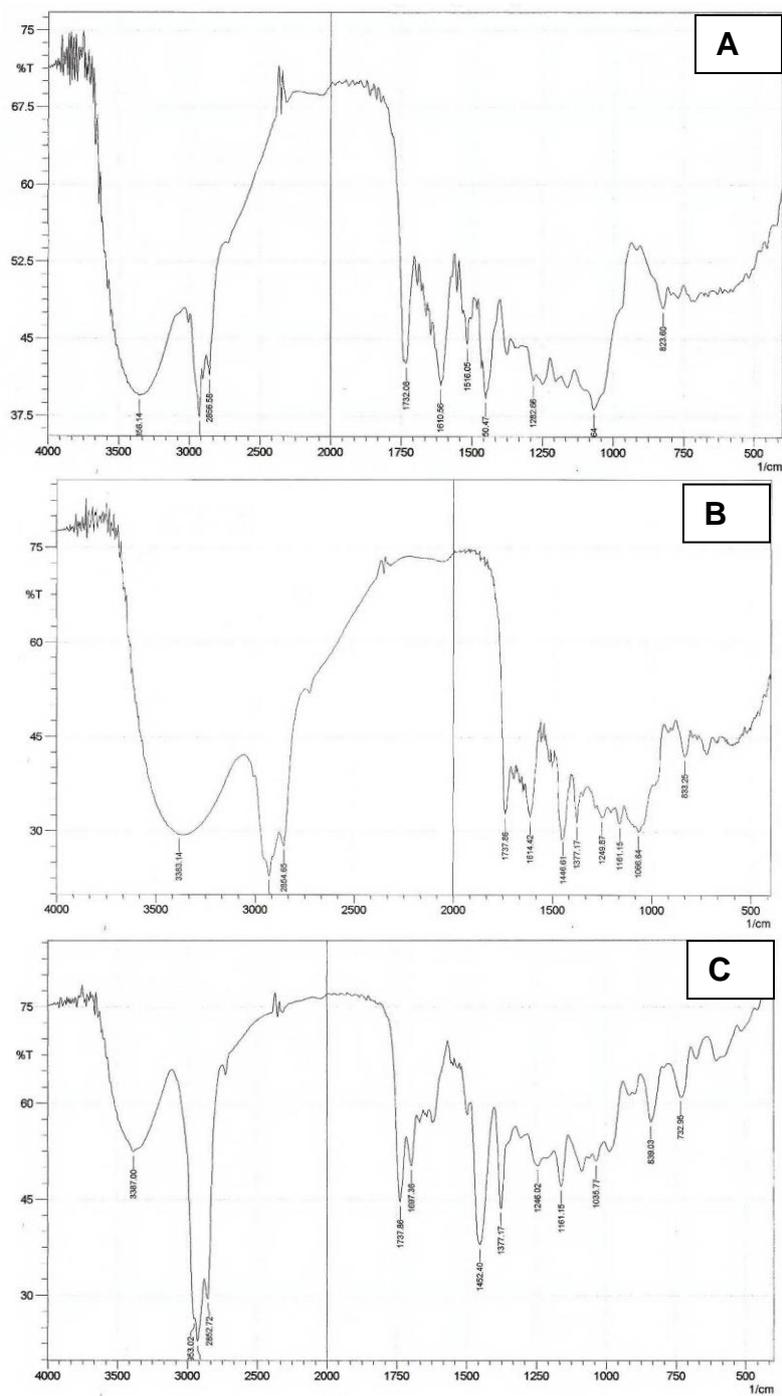


Figura 16: Espectros de infravermelho de *A. dolabripetala*: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

5.2.4 *Oxandra nitida*

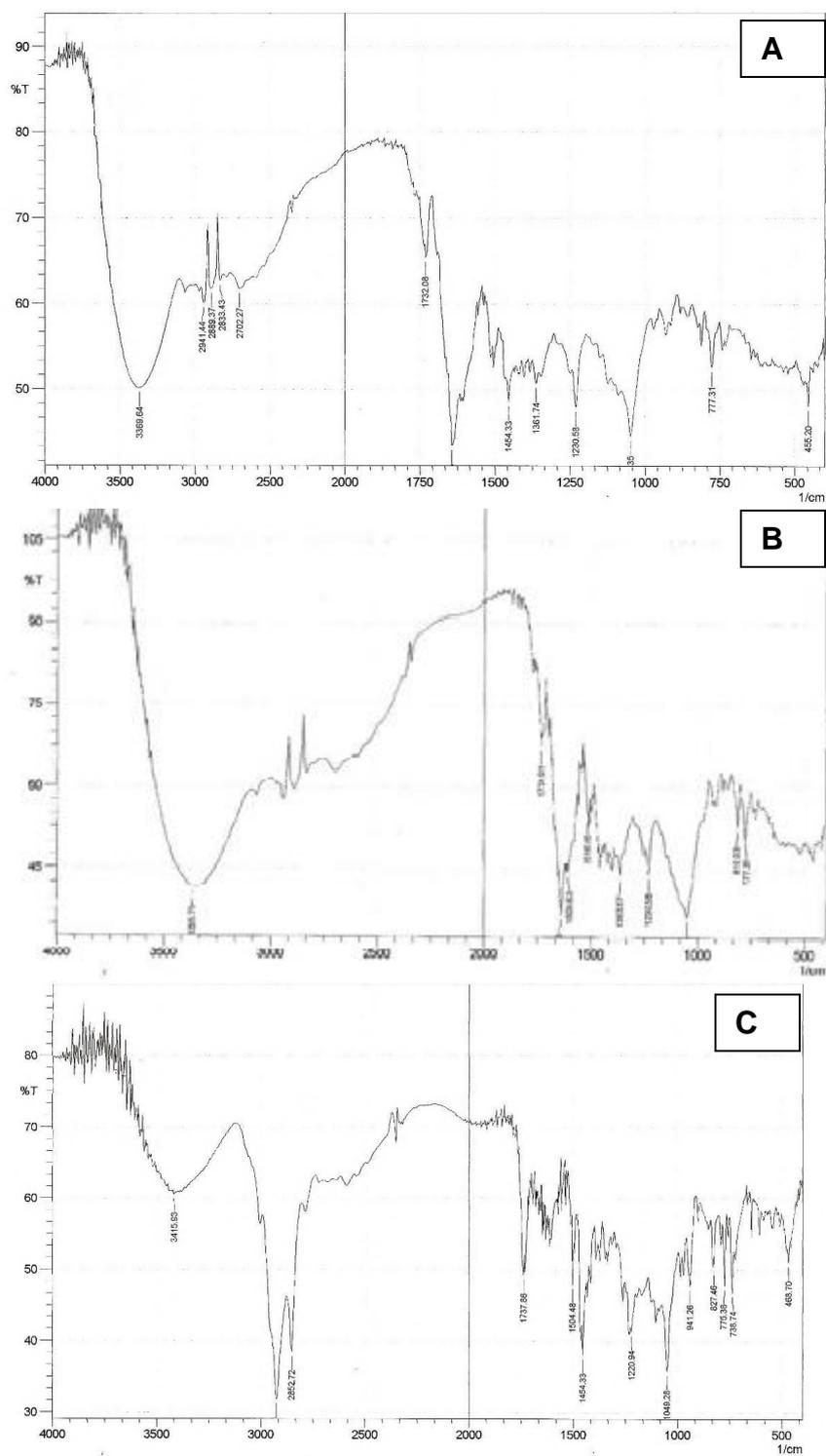


Figura 17: Espectros de infravermelho de *O. nitida*: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

5.2.5 *Xylopiya sericea*

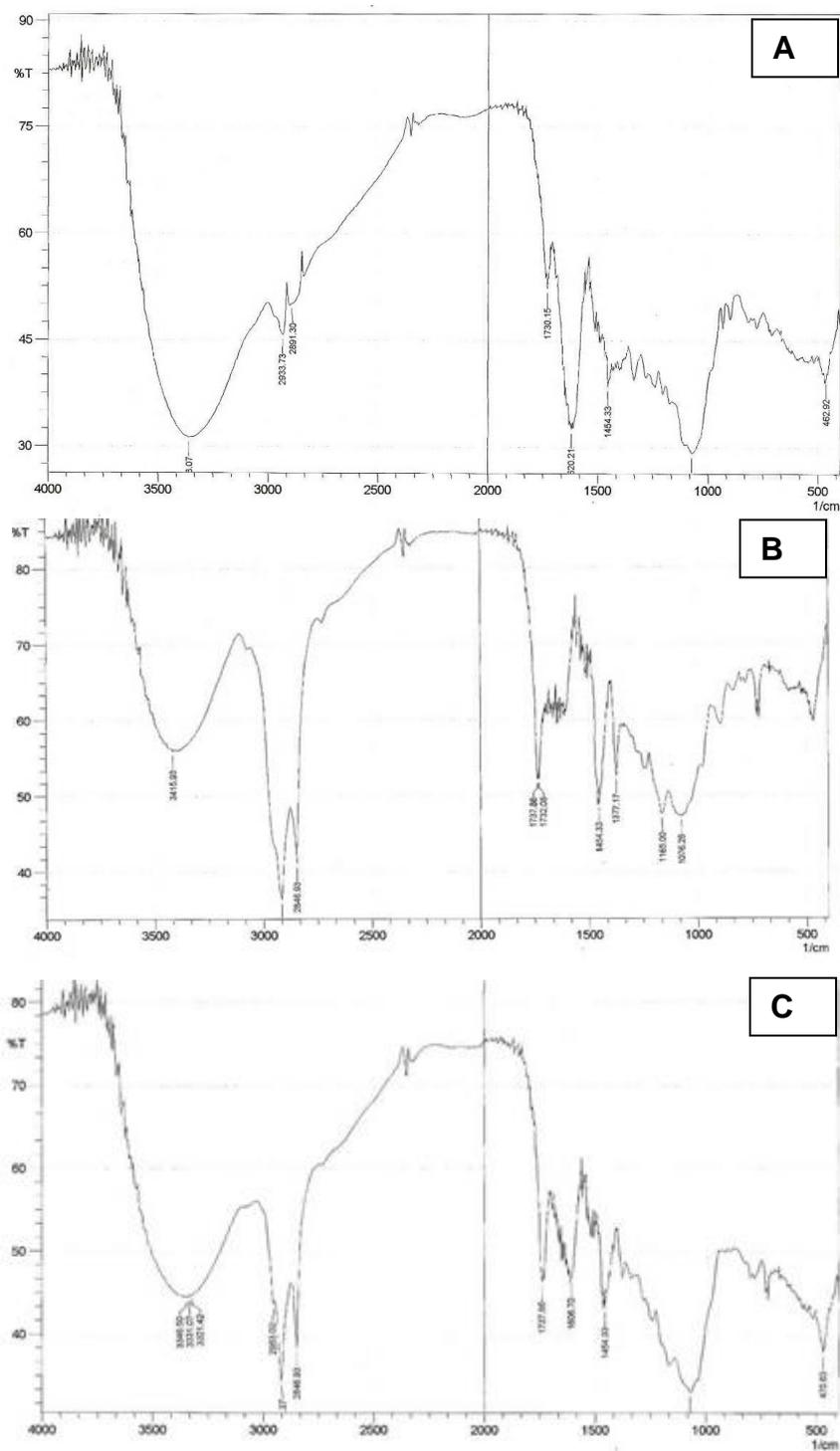


Figura 18: Espectros de infravermelho de *X. sericea*: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

5.3 Espectrometria de RMN ^1H

A Ressonância Magnética Nuclear (RMN) é uma técnica fundamental para a elucidação estrutural de metabólitos especiais, mas, recentemente – na era ômica (genômica, proteômica, metabolômica) – vem sendo utilizada também na determinação do perfil químico de amostras complexas, principalmente pela rapidez, sensibilidade e a reprodutibilidade das análises.

Para RMN ^1H , um padrão interno mais comumente utilizado é o tetrametilsilano (TMS), $\text{Si}(\text{CH}_3)_4$. Esta substância tem uma constante de blindagem muito elevada; a maioria das demais substâncias tem constante de blindagem menor que o TMS. A diferença entre a constante de blindagem do TMS e a dos outros compostos é chamada de deslocamento químico, e é denominada δ . Uma vez que as constantes de blindagem têm valores na faixa de 10^{-5} a 10^{-6} gauss, é comum multiplicar a diferença nos seus valores por 10^6 para produzir números gerenciáveis. Em tais casos, diz-se que o deslocamento químico tem unidades de partes por milhão (ppm).

Assim, quando diminui a blindagem σ , aumenta o deslocamento químico δ . Por isso, os núcleos que têm grande deslocamento químico são classificados como fortemente desblindados.

A feição do espectro de RMN ^1H pode sugerir a presença de metabólitos especiais diferenciados principalmente pelas características dos hidrogênios alifáticos (saturados ou insaturados) e aromáticos, estas características aliadas a dados da literatura para os gêneros de plantas estudados podem indicar a presença de classes de substâncias como terpenóides (mono, sesqui, di ou triterpenos), compostos fenólicos como os flavonóides e/ou alcaloides, entre outros.

Para análise das amostras no presente trabalho foram consideradas as seguintes faixas de deslocamentos químicos (Tabela 7), além dos dados da literatura.

Tabela 7: Tipos de hidrogênios nas amostras e faixas de deslocamento químico a eles associadas (Baseado em SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007).

Tipo de hidrogênio	δ (ppm)
Hidrogênios alifáticos	0 - 2,5
Hidrogênios ligados a instaurações Hidrogênios carbinólicos Hidrogênios carboidratos	2,5 - 5,5
Hidrogênios de grupos metilendioxi / aromáticos	5,5 - 7,5
Hidrogênios ligados a anéis aromáticos heterocíclicos / “ponte” de hidrogênio	7,5 - 12

De forma geral as frações analisadas de espécies do gênero *Annona* e *Xylopi*a apresentam perfil semelhante com escassos ou nenhum sinal na região de hidrogênios aromáticos, intensos sinais na região de alifáticos e presença de sinais também na região entre 2,5 - 5,5 ppm. Estes perfis estão de acordo ao teste qualitativo realizado onde foi detectada a presença de esteróides e triterpenos nestas espécies. Para *A. dioica* (Figura 20, p. 45) e *A. acutiflora* (Figura 19, p. 44) pode-se sugerir a presença de acetogeninas, marcadores quimiotaxonomicos de Annonaceas, pela observação de um acúmulo de sinais entre 3-4 ppm, devido aos hidrogênios carbinólicos e do anel γ -lactônico característicos desta classe de moléculas.

Um perfil químico completamente diferente pode ser observado para a espécie *Oxandra nitida* (Figura 22, p. 47), com um acúmulo de sinais na região de hidrogênios aromáticos e de hidrogênios ligados a anéis heterocíclicos bem como sinais intensos em torno de 6 ppm (metilendioxi) e uma escassez de sinais entre 0-2,5 ppm nas frações mais polares (MeOH e CHCl₃). Estes dados associados a testes fitoquímicos e revisão da literatura sugerem a presença de alcaloides e compostos fenólicos nesta espécie. Além disso, nestas frações também se observou sinais entre 3-5 ppm, sugerindo a presença de terpenóides, o que também foi observado nos testes fitoquímicos.

A técnica de RMN ¹H permitiu uma análise mais exata em relação a classes de compostos provavelmente presentes nas frações analisadas e forneceu um perfil diferenciado para as espécies com semelhança entre os gêneros mais próximos como também observado na espectrometria de IV.

A seguir são apresentados os espectros obtidos para cada espécie analisada e suas frações.

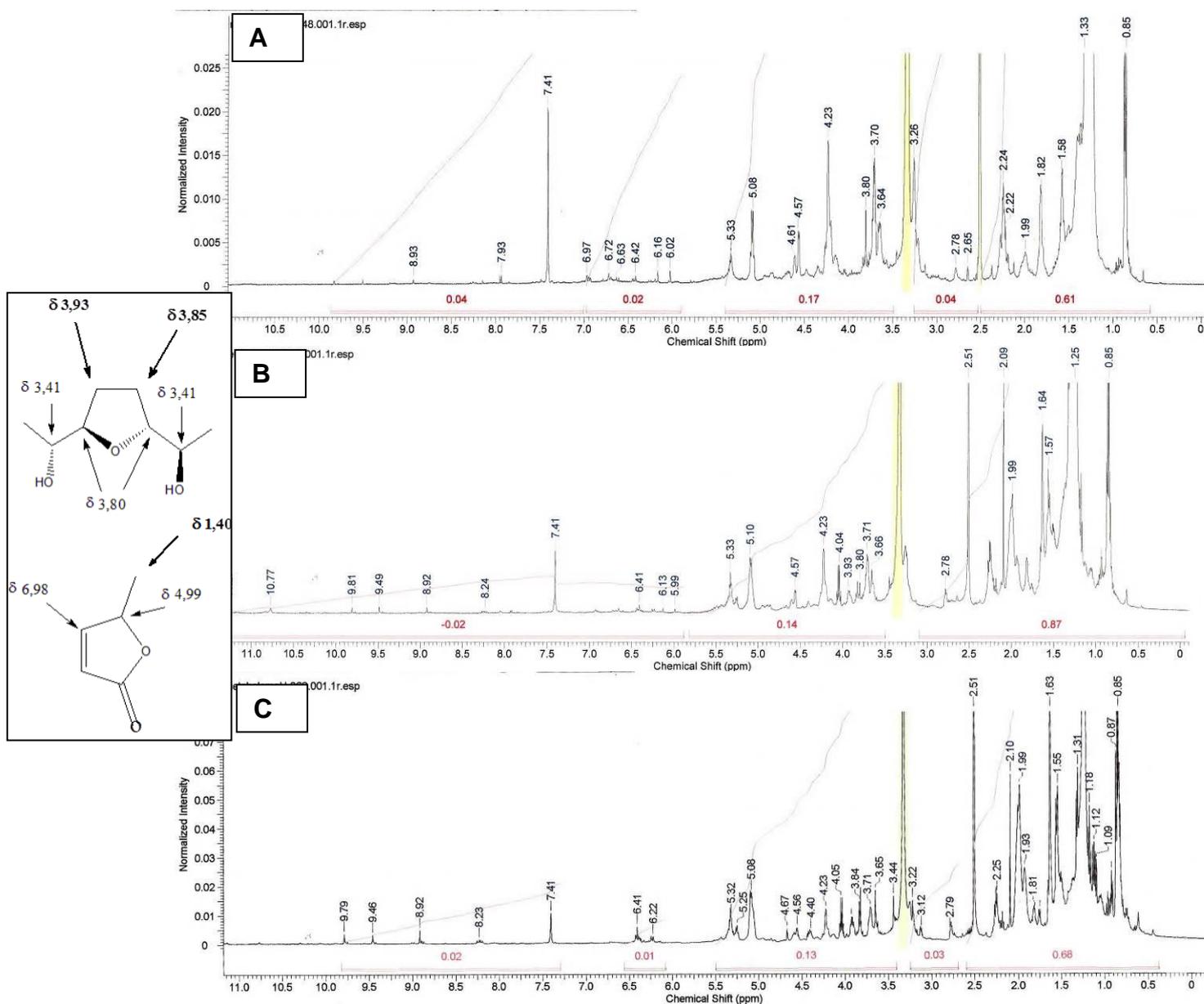
5.3.1 *Annona acutiflora*

Figura 19: Espectros de RMN ^1H (400 MHz; DMSO) de *A. acutiflora* com deslocamentos típicos de acetogeninas: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

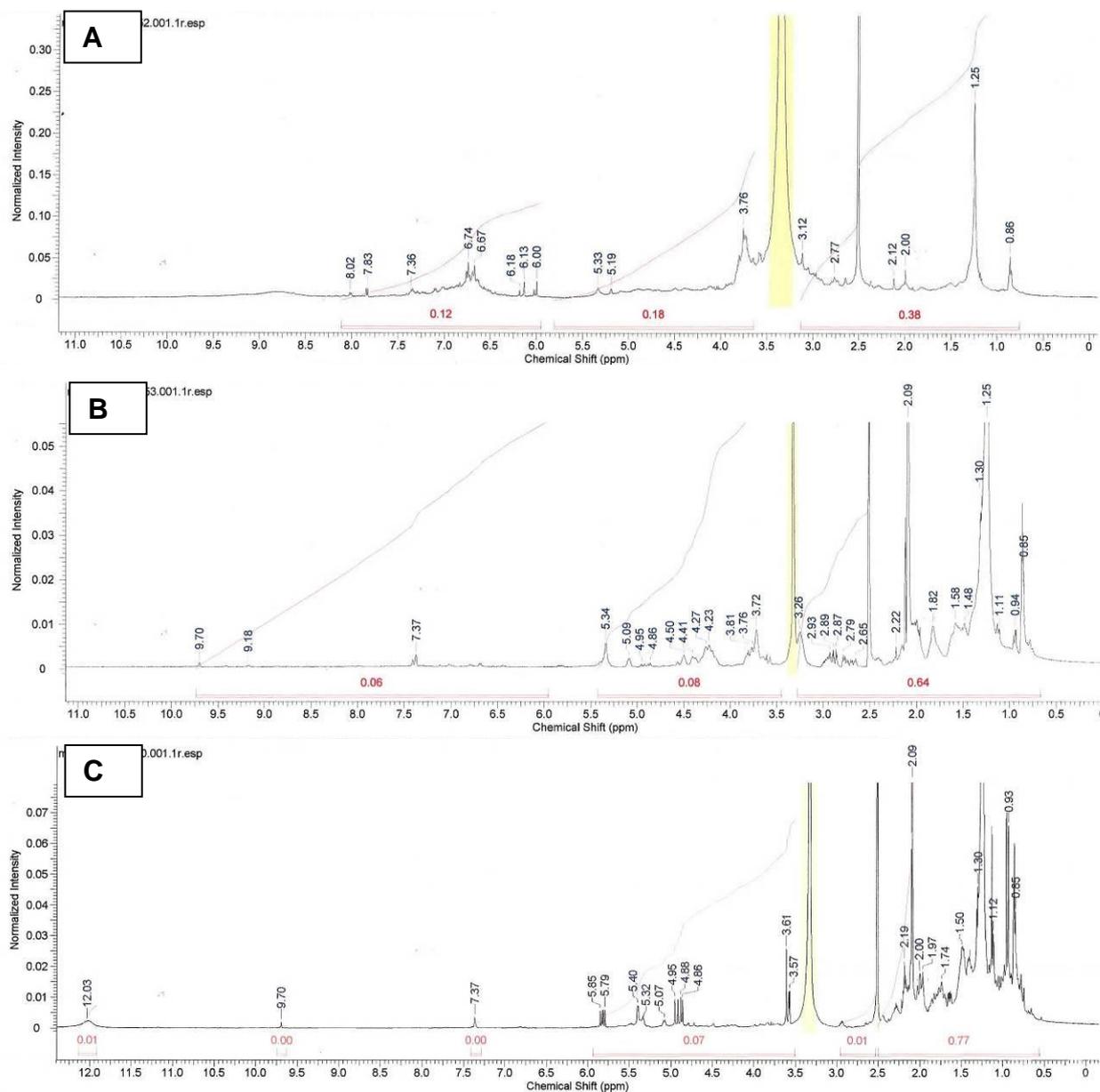
5.3.2 *Annona dioica*

Figura 20: Espectros de RMN ^1H (400 MHz; DMSO) de *A. dioica*: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

5.3.3 *Annona dolabripetala*

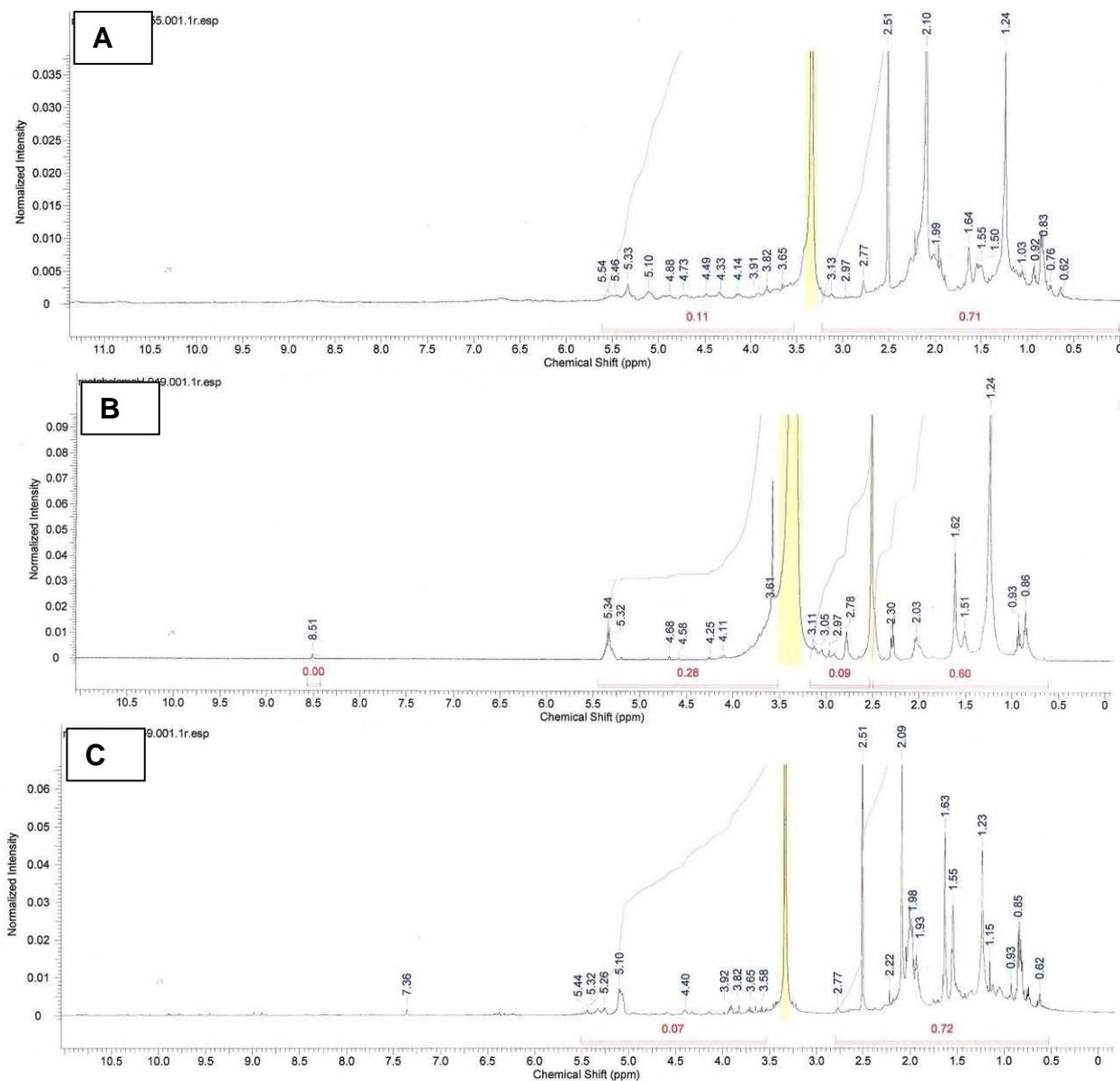


Figura 21: Espectros de RMN ^1H (400 MHz; DMSO) de *A. dolabripetala*: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

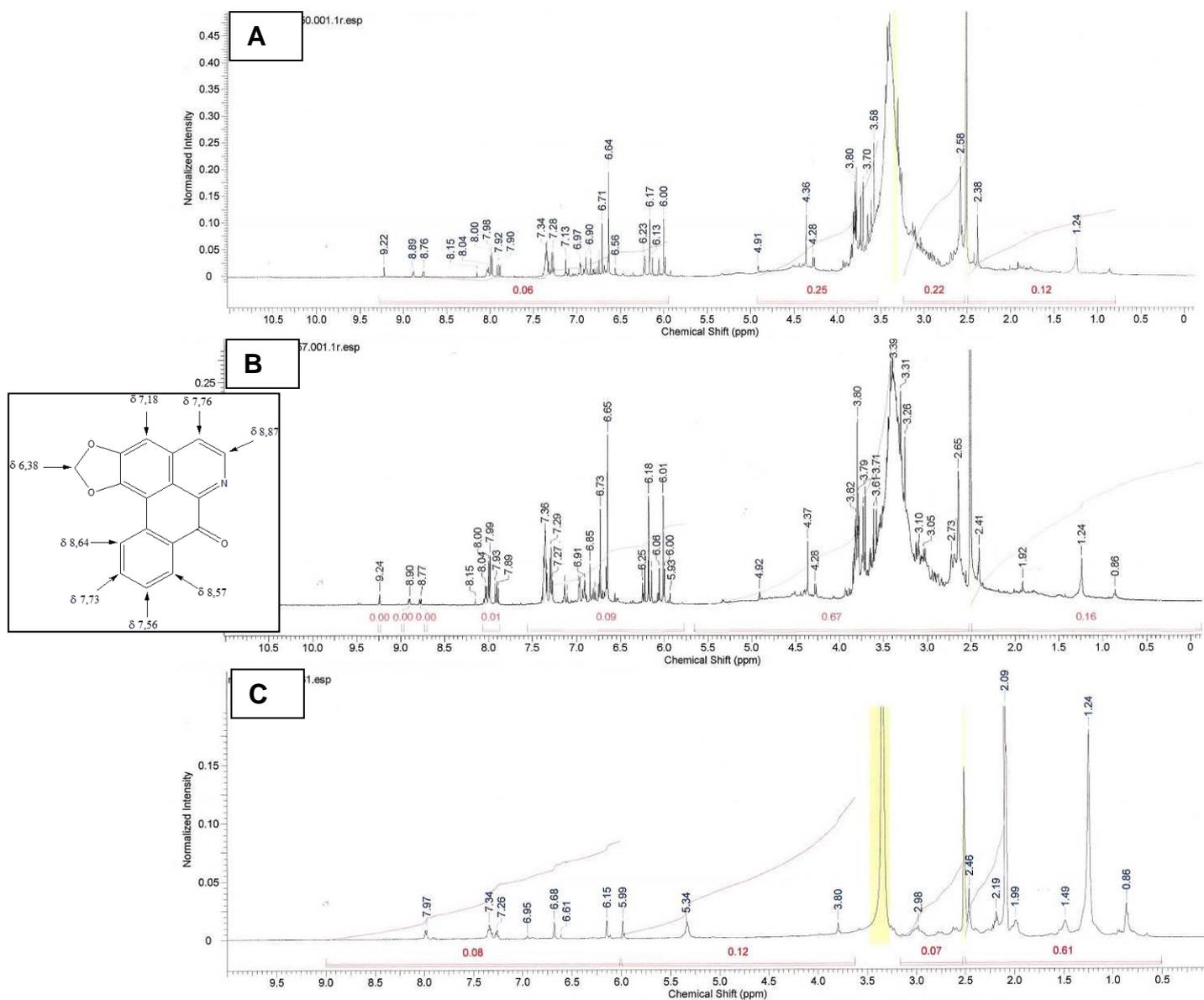
5.3.4 *Oxandra nitida*

Figura 22: Espectros de RMN ^1H (400 MHz; DMSO) de *O. nitida* com deslocamentos típicos de alcalóides oxaporfínicos: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

5.3.5 *Xylopiya sericea*

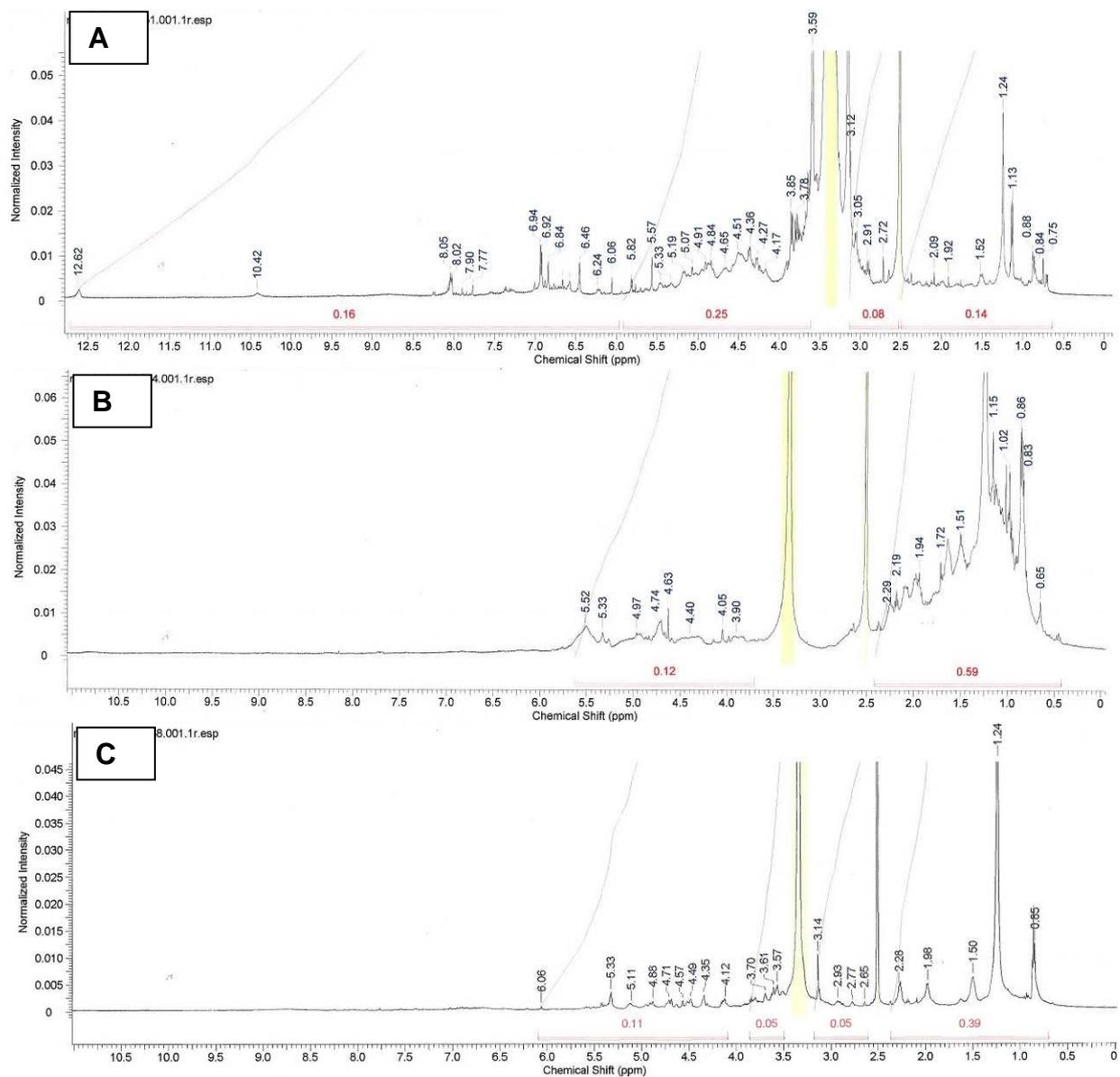


Figura 23: Espectros de RMN ^1H (400 MHz; DMSO) de *X. sericea*: (A) fração metanólica, (B) fração clorofórmica e (C) fração hexânica.

5.4 Atividades biológicas

As frações metanólicas obtidas das cinco espécies em estudo foram submetidas à avaliação do seu potencial de atividade biológica através de ensaio *in vitro* com células neoplásicas da linhagem U937 (linfoma). Os resultados obtidos mostram que todas as espécies analisadas apresentam atividade em pelo menos alguma uma das concentrações testadas (Figura 24, p. 50), destacando-se a espécie *A. acutiflora* cuja concentração efetiva está em $13,43 \pm 1,55 \mu\text{g/mL}$ o que representa um excelente resultado se compararmos, por exemplo, à substâncias puras usadas clinicamente como o Paclitaxol®, cujo EC_{50} para esta mesma linhagem celular é de $10 \mu\text{g/mL}$.

Na tabela abaixo são apresentados os resultados obtidos para os cinco extratos avaliados.

Tabela 8: Valores de EC_{50} para cada fração metanólica avaliada frente linhagem de células U937.

EXTRATO	EC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)
ONFM	$48,07 \pm 1,07$
XSFM	$46,63 \pm 1,17$
AAFM	$13,43 \pm 1,55$
ADRM	$116,4 \pm 1,25$
ADLFM	$197,3 \pm 1,55$

ONFM: *Oxandra nitida* folhas metanólico

XSFM: *Xylopia sericeae* folhas metanólico

AAFM: *Annona acutiflora* folhas metanólico

ADRM: *Annona dioica* raízes metanólico

ADLFM: *Annona dolabripetala* folhas metanólico.

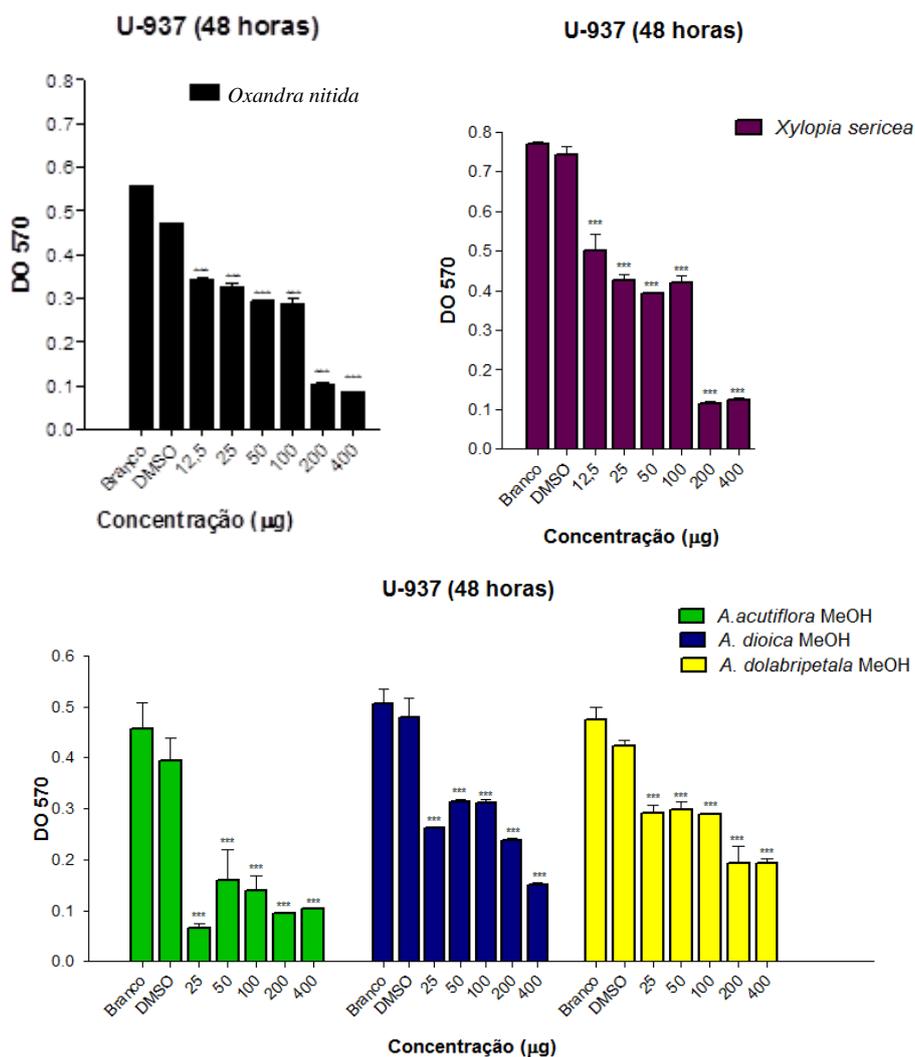


Figura 24: Avaliação da atividade citotóxica através do ensaio MTT. Células U937 foram tratadas com diferentes concentrações das frações metanólicas durante 48 horas. Como controle negativo foi utilizado DMSO na concentração de 400 µg.

6. CONCLUSÃO

Não pode existir vida na terra sem a presença das plantas e, estudá-las, sob qualquer que seja a ótica científica, é parte do domínio da Química de Produtos Naturais, neste sentido, o estudo fitoquímico e de atividade biológica realizado no presente trabalho mostra-se relevante para esta área do conhecimento.

Através da análise dos resultados obtidos para os espectros de infravermelho e RMN ^1H das frações estudadas foi possível confirmar a proximidade filogenética existente entre os gêneros *Annona* e *Xylopia* que apresentam perfil químico semelhante.

Os testes qualitativos realizados para identificação de alguns grupos funcionais nas frações de diferentes polaridades das cinco espécies trabalhadas ajudam a corroborar os resultados obtidos através da análise de algumas faixas de importância dos espectros de infravermelho e RMN ^1H .

As atividades biológicas apresentadas pelas anonáceas podem ser relacionadas aos seus constituintes principais. As acetogeninas são um exemplo de classe de substância altamente bioativa e com comprovada atividade citotóxica frente a variadas linhagens de células tumorais humanas, e por isso tem sido apontadas como responsáveis por este tipo de atividade nas espécies dessa família. Tal classe de substância foi observada para as espécies do gênero *Annona* estudadas através da análise do perfil químico observado para as mesmas.

Todas as espécies analisadas apresentaram bioatividade frente as células da linhagem U937, com destaque para a espécie *A. acutiflora* que apresentou atividade semelhante a uma substância já utilizada clinicamente, mesmo se tratando de uma partição ainda não purificada, o que pode significar um grande potencial nessa área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALFONSO, D.; COLMAN, S. T.; ZHAO, G. X.; SHI, G.; YE, Q.; SCHWEDLER, J. T.; MCLAUGHLIN, J. L. Aromin and aromicin, two new bioactive annonaceous acetogenins, possessing an unusual bis-THF ring structure, from *Xylopia aromatica* (Annonaceae). **Tetrahedron**, v. 52, n. 12, p. 4215-4224, 1996.

ALMEIDA, M. M. B.; ARRIGA, A. M. C.; SANTOS, A. K. L.; LEMOS, T. L. G.; BRAZ-FILHO, R.; VIEIRA, I. J. C. Ocorrência e atividade biológica de quassinóides da última década. **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 935-951, 2007.

ASEKUN, O. T.; KUNLE, O. The chemical constituents of the fruit essential oil of *Xylopia aethiopica* (Dunal) A. Rich from Nigeria. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 7, n. 2, p. 186-189, 2004.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiosperma do Brasil**. LTC-Livros Técnicos e Científicos Ed S. A./Ed. da Universidade de São Paulo, São Paulo, 1978, v. 1, p. 28-33.

BASUALDO, I.; SORIA, N. Farmacopea herbolaria paraguaya: espécies de la medicina folclórica utilizadas para combatir enfermedades del aparato respiratório (Parte I). **Rojasiana**, v. 3, n. 2, p. 197-238, 1996.

BRANT, A. J. C. **Flavonóides, cumarinas e benzofuranos como marcadores quimiotaxonômicos em Asteraceae**. 2003. 185 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2003.

BRAZ-FILHO, R. Identificação De Princípios Ativos Isolados De Plantas Medicinais – Biopirataria, Química De Produtos Naturais E Biodiversidade Fitoquímica De Plantas Brasileiras. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA PARA O PROGRESSO DA CIÊNCIA, 57., 2006. Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: SBPC, 2006.

BRUCE, P. Y. **Química Orgânica**. 4. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2006.

BRUMMITT, R. K.; POWEL, C. E.; **Authors of Plant Names**, Royal Botanic Gardens: Kew, 1988.

CÂMARA, C. A. G.; ALENCAR, J. W.; SILVEIRA, E. R. Volatile constituents of *Xylopia sericea* St. Hill. **Journal of Essential Oil Research**, v. 8, n. 1, p. 75-78, 1996.

CASTRO-MORENO, M.; TINOCO-OJANGURÉN, C. L.; CRUZ-ORTEGA, M. del R.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Influence of seasonal variation on the phenology and liriodenine content of *Annona lutescens* (Annonaceae). **Journal of Plant Research**, v. 126, p. 529-537, 2013.

CAVADA, B. S.; SANTI, T.; GADELHA, C. A. de A.; GRANGEIRO, T. B.; NETO, M. A.; NUNES, E. P.; GALVANI, F. R. Bases quimiotaxonômicas para diferenciação dos táxones *Acacia caven* (Mol.) Mol. e *Acacia farnesiana* (L.) Willdenow (Leguminosae, Mimosoideae). **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 2/3, n. 1, p. 1-10. 1995/1996.

CAVALCANTE, P.B. **Frutas comestíveis da Amazônia**. 5. ed. Belém: CEJUP, 1991. 279p.

CAVALCANTI, B. C.; FERREIRA, J. R. O.; MOURA, D. J.; ROSA, R. M.; FURTADO, G. V.; BURBANO, R. R.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; CAMARA, C. A. G.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A.; RAO, V. S.; COSTA-LOTUFO, L. V.; MORAES, M. O.; PESSOA, C. Structure-mutagenicity relationship of kaurenoic acid from *Xylopiia sericeae* (Annonaceae). **Mutation Research**, v. 701, n. 2, p. 153-163, 2010.

CHACÓN, I. de la C.; GONZÁLEZ-ESQUINCA, A. R. Liriodenine alkaloid in *Annona diversiflora* during early development. **Natural Product Research**, v. 26, n. 1, p. 42-49, 2012.

CHATOU, L. W.; RAINER, H.; MAAS, P. J. M. **Flowering Plants of Neotropics**; SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V.; (Eds.). Botanical Garden: New York, 2004, p. 18-20.

CHEN, C. Y.; CHANG, F. R.; PAN, W. B.; WU, Y. C. Four alkaloids from *Annona cherimola*. **Phytochemistry**, v. 56, n. 7, p. 753-757, 2001.

CHEN, Y.; XU, S. S.; CHEN, J. W.; WANG, Y.; LI, X.; CAI, B. O.; FAN, N. B. Antitumor activity of annonaceous acetogenins in HepS and S180 xenografts bearing mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 22, n. 8, p. 2717-2719, 2012.

CORRÊA, M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; SALVADOR, M. J.; MAIA, B. H. L. N. S.; CABRAL, E. C.; EBERLIN, M. N. Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidante and antimicrobial agents. **Journal of Natural Products**, v. 73, n. 6, p. 1180-1183, 2010.

COSTA, E. V.; PINHEIRO, M. L. B.; SOUZA, A. D. L.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R.; VALDEZ, R. H.; NAKAMURA, T. U.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of oxoaporphine and pyrimidine- β -carboline alkaloids from the branches of *Annona foetida* Mart. (Annonaceae). **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9714-9720, 2011.

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

EKUNDAYO, O. A. Review of the volatiles of the Annonaceae. **Journal Essential Oil Research**, v. 1, n. 5, p. 223-245, 1989.

EMERENCIANO, V. P.; KAPLAN, M. A.; GOTTLIEB, O. R. Evolution of sesquiterpene lactones in angiosperms. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 13, n. 2, p. 145-166, 1985.

ESTRELLA, E. **Plantas Medicinales Amazonicas**: realidad y perspectivas. Lima: GEF/PNUD, 1995. 302p.

FAGUNDES, F. A.; OLIVEIRA, L. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C. *Annona coriacea* induz o efeito genotóxico em camundongos. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 2, n. 1, p. 24-29, 2005.

FANG, X. P.; RIESER, M. J.; GU, Z. M.; ZHAO, G. X.; MCLAUGHLIN, J. L. Annonaceous acetogenins: an updated review. **Phytochemical Analysis**, v. 4, n. 1, p. 27-48, 1993.

FLEISCHER, T. C.; WAIGH, R. D.; WATERMAN, P. G. A novel retrodihydrochalcone from the stem bark of *Uvaria mocoli*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1387-1391, 1997.

FORMAGIO, A. S. N.; KASSUYA, C. A. L.; FORMAGIO NETO, F.; VOLOBUFF, C. R. F.; IRIGUCHI, E. K. K.; VIEIRA, M. C.; FOGLIO, M. A. The flavonoid

content antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, n. 1, p. 14, 2013.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A. F.; CARVALHO JR., A. A.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; de LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C. **Catálogo de plantas e fungos do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010. v. 1. 873 p.

FOURNIER, G.; HADJIAKHOONDI, A.; LEBOEUF, M.; CAVE, A.; CHARLES, B.; FOURNIAT, J. Volatile constituents of *Xylopiya frutescens*, *X. pynaertii* and *X. sericea*: chemical and biological study. **Phytotherapy Research**, v. 8, n. 3, 166-169, 1994.

FRÉDÉRICH, M.; JANSEN, C.; TULLIO, P.; TITS, M.; DEMOULIN, V.; ANGENOT, L. Metabolomic analysis of *Echinacea* spp. by ¹H nuclear magnetic resonance spectrometry and multivariate da analysis technique. **Phytochemical Analysis**, v. 21, n. 1, p. 61-65, 2010.

FRIES, R. E. Revision der Arten einiger Annonaceen-Gattungen I. **Acta Horti Bergiani**, v. 10, n. 1, p. 1-128, 1930.

FRIES, R. E. Revision der Arten einiger Annonaceen-Gattungen. **Acta Horti Bergiani**, v. 10, n. 2, p. 129-341, 1931.

GOSMANN, G.; de MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre / Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC, 2000. p. 75-86.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. de M. B. Quimiosistemática como ferramenta na busca de substâncias ativas. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. de M. B. **Biodiversidade: um enfoque químico-biológico**. Rio de Janeiro: Ed. UFRJ, 1996. 268 p.

GOTTLIEB, O. R.; BORIN, M. R. de M. B.; PAGOTTO, C. L. A. da C.; ZOCHER, D. H. T. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 3, n. 2, p. 97-102, 1998.

HASAN, C. M.; HEALEY, T. M.; WATERMAN, P. G. Kaurane and kaurene diterpenes from the stem bark of *Xylopija acutiflora*. **Phytochemistry**, v. 21, n. 8, p. 2134-2135, 1982.

HASAN, C. M.; HEALEY, T. M.; WATERMAN, P. G. Acutifloric acid: a diterpene dimer from the stem bark of *Xylopi* *acutiflora*. **Phytochemistry**, v. 24, n. 1, p. 192-194, 1985.

HERNÁNDEZ, C. R. **Plantas contra plagas: potencial práctico de ajo, anona, nim, chile y tabaco**. 2. ed. México: RAPAM, 2006, 132 p.

KUHNEN, S. **Metabolômica e bioprospecção de variedades crioulas e locais de milho (*Zea mays* L.)**. 2007. 243 f. Tese (Doutorado em Recursos Genéticos Vegetais) – Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

KURTZ, B. C. Annonaceae. In: COSTA, A. F.; DIAS, I. C. A.; (Orgs.). **Flora do Parque Nacional da Restinga de Jurubatiba e arredores, Rio de Janeiro, Brasil: listagem, florística e fitogeografia: Angiospermas, pteridófitas, algas continentais**. Rio de Janeiro: Museu Nacional, 2001, p. 26-27.

LEBOEUF, M.; CAVE, A.; BHAUMIK, P.; MUKHERJEE, B.; MUKHERJEE, R. The phytochemistry of the Annonaceae. **Phytochemistry**, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.

LIMA, J. C. **Estudo de prospecção fitoquímica e toxicológico de espécies da família Annonaceae frente ao *Aedes aegypti***. 2009. 35 f. Monografia (Graduação em Licenciatura em Química) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2009.

LOBÃO, A. Q.; ARAUJO, D. S. D.; KURTZ, B. C. Annonaceae das restingas do estado do Rio de Janeiro, Brazil. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 85-96, 2005.

LOUREIRO, A. A.; FREITAS, J. A.; FREITAS, C. A. A. **Essências madeireiras da Amazônia**. Manaus: MCT/INPA-CPPF, 1997. v. 3, 103p.

MAAS, P. J. M. Project Systematics of Annonaceae. **Taxon**, v. 32, n. 3, p. 528-529, 1983.

MAAS, P. J. M.; MENNEGA, E. A.; WESTRA, L. Y. T.; Studies in Annonaceae XXI: index to species and infraspecific taxa of Neotropical Annonaceae. **Candollea**, v. 49, n. 2, p. 389-481, 1994.

MAAS, P. J. M.; KAMER, H. M.; JUNIKKA, L.; MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae of eastern and south-eastern Brazil (Bahia, Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo & Rio de Janeiro). **Rodriguésia**, v. 52, n. 80, p. 61-94, 2002.

MAAS, P. J. M.; RAINER, H.; LOBÃO, A. Annonaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/PrincipalUC/PrincipalUC.do>> Acesso em: 18 ago. 2013.

MAHMOUD, T. S.; MARQUES, M. R.; PESSOA, C. O.; LOTUFO, L. V. C.; MAGALHÃES, H. I. F.; de MORAES, M. O.; de LIMA, D. P.; TININIS, A. G.; de OLIVEIRA, J. E. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 3, p. 456-464, 2011.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997, p. 45-62.

NASCIMENTO, M. C. S. **Constituintes bioorgânicos isolados de *Annona cacans* Warming (Annonaceae) e avaliações de bioatividades**. 2008. 173 f. Tese (Doutorado em Ciências) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. 2008.

OLIVEIRA, J. A família Annonaceae Juss. In: LISBOA, P.L.B. (Org.). **Caxiuana**. Belém: MPEG, 1997. p.253-262.

OLIVER, S. G; WINSON, M. K; KELL, D. B; BAGANZ, F. Systematic functional analysis of the yeast genome. **Trends in Biotechnology**. v. 16, n. 9, p. 373-378, 1998.

ORTIZ, A. A.; PATIÑO, G. S.; SUÁREZ, L. E. C.; AYAZO, O. T. Azafluorenonas em corteza de *Oxandra longipétala* R. E. Fr. (Annonaceae). **Scientia et Technica**. v. 1, n. 33, p. 177-178, 2007.

PACHECO, L. R. E.; VEGA, M. R. G. Estudo do metaboloma de *Oxandra nitida* R. E. Fr. (Annonaceae) oriunda da Mata Atlântica e de Restinga da Região Norte Fluminense. In: CONGRESSO FLUMINENSE DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA, 5., 2013, Campos dos Goytacazes. **Anais...** Campos dos Goytacazes: Essentia, 2013. CD.

PAVETTI, C.; BASUALDO, I.; ORTIZ, M.; SORIA, N. **Plantas nativas de uso em medicina popular em el Paraguay**: parte I, n. 6, Publicaciones FCQ, Assunción: Universidad Nacional de Assunción, 1983.

PIMENTA, L. P. S.; KIM, H. K.; VERPOORTE, R.; CHOI, Y. H. NMR-Based metabolomics: a probe to utilize biodiversity; ROESSNER, U.; DIAS, D. A. (Eds.). Metabolomics tools for natural product discovery: methods and protocols. **Methods in molecular biology**, v. 1055, p. 117-127, 2013.

PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; JÚNIOR, M. G. C. G.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopia sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838-841, 2007.

POTT & POTT, **Plantas do Pantanal**, Brasília, EMBRAPA, 1994.

RAVEN, P. H.; HOLM, R. W. Systematics and the levels of organization approach. **Systematic Zoology**. v. 16, n. 1, p. 1-5, 1967.

RODRIGUES FILHO, E. Estudo fitoquímico de *Picramnia riedeli* e *Picramnia bahiense*: uma contribuição quimiosistemática da família Simaroubaceae. Tese (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos. 2008. 131 p.

RODRIGUES, V. F. Estudo químico da espécie *Trichilia quadrijuga* e abordagem químico-biológica da planta medicinal *Cajanus cajan*. Dissertação (Doutorado em Ciências) – Laboratório de Ciências Químicas, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes. 2013. 225 p.

ROJANO, B.; PÉREZ, E.; FIGADÈRE, B.; MARTIN, M. T.; RECIO, M. C.; GINER, R.; RÍOS, J. L.; SCHINELLA, G.; SÁEZ, J. Constituents of *Oxandra* cf. *xylopioides* with anti-inflammatory activity. **Journal of Natural Products**. v. 70, n. 5, p. 835-838, 2007.

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

SANTOS, P. R. D.; MORAIS, A. A.; BRAZ-FILHO, R. Alkaloids from *Annona dioica*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 14, n. 3, p. 396-400, 2003.

SCARMINIO, I. S.; SOARES, P. K. Taxonomia por abordagem metabolômica para análise e rastreio de quatro variedades de *Bauhinia fortificata* Link. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29, 2006. Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: USP, 2006.

SCOTTI, L.; TAVARES, J. F.; da SILVA, M. S.; FALCÃO, E. V.; SILVA, L. de M.; SOARES, G. C. da S.; SCOTTI, M. T. Chemotaxonomy of three genera of the Annonaceae family using self-organizing maps and ^{13}C NMR data of diterpenes. **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2146-2152, 2012.

SILVA, M. F.; LISBÔA, P. L. B.; LISBÔA, R. C. L. **Nomes vulgares de plantas amazônicas**. Belém: INPA, 1977. 222p.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Spectrometric identification of organic compounds**. New York: John Willey & Sons, 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. Rio de Janeiro: LTC – Livros Técnicos e Científicos, 2007.

SOARES, P. K. **Taxonomia por abordagem metabolômica e métodos quimiométricos para análise e rastreamento de plantas do gênero *Bauhinia***. 2006. 103 f. Dissertação (Mestrado em Química dos Recursos Naturais) – Universidade Estadual de Londrina. Londrina, 2006.

SOUSA, E. A.; SILVA, A. A. de C. A.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; ROQUE, N. F.; CHAVES, M. H. Um novo sesquiterpeno de *Oxandra sessiflora* (Annonaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 35., 2012. Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: USP, 2012.

SOUSA, E. A.; SILVA, A. A. de C. A.; ROQUE, N. F.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; LAGO, J. H. G.; CHAVES, M. H. Terpenes and steroids from leaves of *Oxandra sessiflora* R. E. Fries. **Phytochemistry Letters**. No prelo.

TAKAHASHI, J. A.; VIEIRA, H. S.; BOAVENTURA, M. A. D. Mono and diterpenes from seeds of *Xylopia sericea*. **Química Nova**, v. 24, n. 5, p. 616-618, 2001.

TAKHTAJAN, A. **Flowering plants**: origin and dispersal. 1. ed. Edinburgh: Oliver & Boyd, 1969. 320 p.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Surface protection and secondary defense compounds. **Plant Physiology**. New York, p. 320-345, 2004.

THOMAS, A. le. Annonacées. In: AUBREVILLE, A. (Ed.). **Flore du Gabon**. Paris, v. 16, 1969.

TINTO, W. F.; BLAIR, L. C.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Terpenoid constituents of *Oxandra asbeckii*. **Journal of Natural Products**, v. 55, n. 6, p. 701-706, 1992.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2. ed. Belém: MPEG, 1993. 207p.

VEGA, M. R. G.; BARRETO, I. J. B.; MACHADO, M. M.; REGHINI, R. G.; ESTEVES-SOUZA, A.; VIEIRA, I. J. C.; MATHIAS, L.; ECHEVARRIA, A.; BRAZ-FILHO, R. Constituintes químicos e atividade biológica de *Annona dioica* St. Hill. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA / CONGRESSO LATINOAMERICANO DE QUÍMICA, 27. / 26., 2004. Salvador. **Resumos...** Salvador: USP, 2004.

VEGA, M. R. G. **Constituintes químicos de *Eupatorium macrocephalum* Less e *Annona dioica*: uma contribuição ao estudo de plantas medicinais do Paraguai**. 2006. 157 f. Tese (Doutorado em química orgânica) – Instituto de Ciências Exatas, Universidade Estadual Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2006.

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.

VENDRAMIN, M. E.; COSTA, E. V.; SANTOS, E. P.; PINHEIRO, M. L. B.; BARISON, A.; CAMPOS, F. R. Chemical constituents from leaves of *Annona*

rugulosa (Annonaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 49, p. 152-155, 2013.

VIEIRA, M. G. S.; LIMA NETO, M. N.; FREITAS, J. V. B.; COSTA NETO, A.; GOMES, C. L.; GRAMOSA, N. V.; SILVEIRA, E. R. Diterpenos das raízes de *Xylopia nitida* Dunal. (Annonaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009. Fortaleza. **Resumos...** Fortaleza: USP, 2009.

VILLAS-BÔAS, S. G; GOMBERT, A. K. Análise do metaboloma: uma ferramenta biotecnológica emergente na era pós-genômica. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**. n. 36, p. 58-69, 2006.

WILSON JR., E. B.; DECIUS, J. C.; CROSS, P. C. **Molecular vibrations: the theory of infrared and raman vibrational spectra**. New York: McGraw-Hill, 1955. 388 p.

ZHANG, W.; CURTIN, C.; FRANCO, C. Towards manipulation of post-biosynthetic events in secondary metabolism of plant cell cultures. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 30, n. 6, p. 688-696, 2002.